

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-530487

(P2005-530487A)

(43) 公表日 平成17年10月13日(2005.10.13)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/44	C 1 2 Q 1/44	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00	4 B 0 6 3
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/385	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/385	A 6 1 P 31/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 31/04	4 H 0 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 99 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-571301 (P2003-571301)  
 (86) (22) 出願日 平成15年2月28日 (2003. 2. 28)  
 (85) 翻訳文提出日 平成16年10月20日 (2004. 10. 20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/006298  
 (87) 国際公開番号 W02003/072595  
 (87) 国際公開日 平成15年9月4日 (2003. 9. 4)  
 (31) 優先権主張番号 60/361, 257  
 (32) 優先日 平成14年2月28日 (2002. 2. 28)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

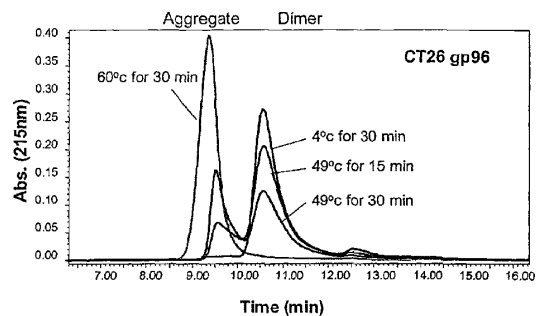
(71) 出願人 503125237  
 アンティジェニクス インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国 10011 ニューヨーク州、  
 ニューヨーク、スイート 2100、  
 ファイフス アベニュー 630  
 (71) 出願人 502433438  
 ユニバーシティー オブ コネティカット  
 ヘルス センター  
 アメリカ合衆国 06030 コネティカット州  
 ファーミントン、ファーミントン  
 アベニュー 263  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ストレスタンパク質のオリゴマー化に基づく方法および生成物

(57) 【要約】

一態様では、本発明は、ATPアーゼ活性、または熱ショックタンパク質もしくは熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の多量体構造、に基づく熱ショックタンパク質もしくは熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性を測定する方法、および熱ショックタンパク質もしくは熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性を調節する薬剤をスクリーニングする方法を提供する。別の態様では、本発明は、熱ショックタンパク質、または熱ショックタンパク質および抗原分子を含む複合体、の免疫原性を増強するための複合体、組成物および方法を提供する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性を検出する方法であって、前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性を前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性の指標として用いることを含む方法。

## 【請求項2】

gp96-ペプチド複合体の生物学的活性を検出する方法であって、前記gp96-ペプチド複合体のATPアーゼ活性を前記gp96-ペプチド複合体の生物学的活性の指標として用いることを含む方法。

## 【請求項3】

熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性を検出する方法であって、二量体型の前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の存在を前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性の指標として用いることを含む方法。

10

## 【請求項4】

gp96-ペプチド複合体の生物学的活性を検出する方法であって、二量体型の前記gp96-ペプチド複合体の存在を前記gp96-ペプチド複合体の生物学的活性の指標として用いることを含む方法。

## 【請求項5】

熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性を調節する化合物をスクリーニングする方法であって、

20

(A)化合物の不在下で前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性を測定すること；

(B)前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体を化合物と接触させること；

(C)前記化合物に接触させていない前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性と前記化合物に接触させた前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性とを比較すること；ならびに

(D)前記化合物に接触させた前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体と前記化合物に接触させていない前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性の任意の差を前記化合物が生物学的活性を調節することの指標として使用すること

を含む方法。

30

## 【請求項6】

前記ATPアーゼ活性を、イオン交換クロマトグラフィー、生物発光アッセイ、HPLC、放射性同位元素アッセイまたは免疫親和性アッセイによって測定する、請求項5に記載の方法。

## 【請求項7】

ヌクレオチド-hsp結合の阻害剤の存在下で前記ATPアーゼ活性を測定することをさらに含み、前記阻害剤の存在によって阻害される前記ATPアーゼ活性を生物学的活性の指標として使用する、請求項5に記載の方法。

## 【請求項8】

ヌクレオチド-hsp結合の前記阻害剤が、ゲルダナマイシンまたはNECAである、請求項7に記載の方法。

40

## 【請求項9】

前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の質量ベースでの比活性が得られるように、前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の質量を測定することをさらに含む、請求項5に記載の方法。

## 【請求項10】

熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性を調節する化合物をスクリーニングする方法であって、

(A)化合物の不在下で二量体型の前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の量を測定すること；

50

(B)前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体を化合物と接触させること；

(C)前記化合物に接触させていない二量体型の前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の量と前記化合物に接触させた二量体型の前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の量とを比較すること；ならびに

(D)前記化合物に接触させた二量体型の前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体と前記化合物に接触させていない二量体型の前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の量の任意の差を、前記化合物が生物学的活性を調節することの指標として使用することを含む方法。

【請求項 1 1】

前記二量体型の熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の量を、サイズ排除クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、免疫アッセイ、フィルター、光散乱アッセイ、勾配遠心分離または分析用超遠心分離によって測定する、請求項10に記載の方法。

10

【請求項 1 2】

免疫系の適切な機能に部分的に起因する被験者の症状を診断する方法であって、前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性または前記被験者から得られた前記二量体型の熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の存在を前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性の指標として使用することを含み、前記生物学的活性が前記被験者中の1種または複数の免疫機能に関連し、それによってATPアーゼ活性または二量体型の量の変化から前記症状の変化が示される方法。

【請求項 1 3】

被験者の癌または感染症の予後を判定する方法であって、前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性または前記被験者から得られた前記二量体型の熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の存在を前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性の指標として使用することを含み、前記生物学的活性が前記癌の細胞または前記感染症を引き起こす原因物質に反応する1種または複数の免疫機能に関連し、それによってATPアーゼ活性または二量体型の量の変化から前記予後の変化が示される方法。

20

【請求項 1 4】

前記hsp-ペプチド複合体中のhspがgp96である、請求項5、10、12または13に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性を測定することをさらに含む、請求項1、2、12または13に記載の方法。

30

【請求項 1 6】

前記ATPアーゼ活性を、生物発光アッセイ、イオン交換クロマトグラフィー、または免疫親和性アッセイによって測定する、請求項15に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記二量体型の熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の量を測定することをさらに含む、請求項3、4、12または13に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記二量体型の熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の量を、サイズ排除クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、免疫アッセイ、フィルター、勾配遠心分離または分析用超遠心分離によって測定する、請求項17に記載の方法。

40

【請求項 1 9】

ヌクレオチド-hsp結合の阻害剤の存在下で前記ATPアーゼ活性を測定することをさらに含む、前記阻害剤の存在によって阻害される前記ATPアーゼ活性を生物学的活性の指標として使用する、請求項15に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記ヌクレオチド-hsp結合の阻害剤が、ゲルダナマイシンまたはNECAである、請求項19に記載の方法。

【請求項 2 1】

50

前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の質量ベースでの比活性が得られるように、前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の質量を測定することをさらに含む、請求項15に記載の方法。

【請求項22】

前記被験者から得られた前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体を単離および/または精製することをさらに含む、請求項12または13に記載の方法。

【請求項23】

熱ショックタンパク質-ペプチド複合体を含む組成物と、前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性または二量体型の量を測定するための説明書とを含むキットであって、前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性または二量体型の量を前記熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性の指標として使用するキット。

10

【請求項24】

前記生物学的活性が免疫学的活性である、請求項1、2、3、4、5、10、12または13に記載の方法。

【請求項25】

前記免疫学的活性が、抗原再提示またはT細胞活性化である、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記生物学的活性が免疫学的活性である、請求項23に記載のキット。

【請求項27】

前記免疫学的活性が、抗原再提示またはT細胞活性化である、請求項23に記載のキット

20

【請求項28】

前記生物学的活性が、抗原分子の結合および放出；MCP-1産生の誘導；一酸化窒素産生の誘導；ならびにCD91またはCD36の結合からなる群から選択される、請求項1、2、3、4、5、10、12または13に記載の方法。

【請求項29】

前記生物学的活性が、抗原分子の結合および放出；MCP-1産生の誘導；一酸化窒素産生の誘導；ならびにCD91またはCD36の結合からなる群から選択される、請求項23に記載のキット。

30

【請求項30】

前記hsp-ペプチド複合体のhspが、hsp70ファミリー、hsp90ファミリーおよびhsp60ファミリーからなる群から選択されるhspファミリーのメンバーである、請求項1、3、5、10、12または13に記載の方法。

【請求項31】

前記hsp-ペプチド複合体のhspが、hsp70ファミリー、hsp90ファミリーおよびhsp60ファミリーからなる群から選択されるhspファミリーのメンバーである、請求項23に記載のキット。

【請求項32】

前記hsp-ペプチド複合体のhspが、hsp90、gp96(grp94)、hsp104、hsp70およびhsp60からなる群から選択される、請求項1、3、5、10、12または13に記載の方法。

40

【請求項33】

前記hsp-ペプチド複合体のhspが、hsp90、gp96(grp94)、hsp104、hsp70およびhsp60からなる群から選択される、請求項23に記載のキット。

【請求項34】

オリゴマー化している免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含む精製した複合体であって、前記熱ショックタンパク質が、オリゴマー化剤と接触することによってオリゴマー化されており、ただし、前記オリゴマー化剤が、レクチン、4,4'-ジアニリノ-1,1'-ピナフチル-5,5'-ジスルホン酸(「ビス-ANS」)、グルタルアルデヒドまたはスルホスクシンイミジル(4-アジドサリチルアミド)ヘキサノエート(「SASD」)ではない、前記

50

複合体。

【請求項35】

オリゴマー化している免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含む精製した複合体であって、前記熱ショックタンパク質が、オリゴマー化剤と共有結合することによってオリゴマー化されており、ただし、前記オリゴマー化剤が、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではない、前記複合体。

【請求項36】

前記熱ショックタンパク質が、前記オリゴマー化剤と非共有結合している、請求項34に記載の複合体。

【請求項37】

前記熱ショックタンパク質が、gp96またはhsp90である、請求項34または35に記載の複合体。

【請求項38】

前記熱ショックタンパク質および抗原分子が、細胞溶解物から複合体として単離される、請求項34または35に記載の複合体。

【請求項39】

前記細胞溶解物が、癌細胞または感染症原因物質の抗原性を示す物質に感染した細胞に由来する、請求項26に記載の複合体。

【請求項40】

精製したオリゴマー化複合体の集団であって、前記集団中の各複合体は、免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含み、前記複合体が、オリゴマー化剤と接触することによってオリゴマー化されており、ただし、前記オリゴマー化剤が、レクチン、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではなく、また前記集団中の少なくとも1種の複合体が、前記集団中の別の複合体の抗原分子と異なる抗原分子を含む集団。

【請求項41】

精製したオリゴマー化複合体の集団であって、前記集団中の各複合体は、免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含み、前記複合体が、オリゴマー化剤と共有結合することによってオリゴマー化されており、ただし、前記オリゴマー化剤が、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではなく、また前記集団中の少なくとも1種の複合体が、前記集団中の別の複合体の抗原分子と異なる抗原分子を含む、前記集団。

【請求項42】

前記熱ショックタンパク質が、gp96またはhsp90である、請求項40または41に記載の複合体の集団。

【請求項43】

前記熱ショックタンパク質および抗原分子が、細胞溶解物から複合体として単離される、請求項40または41に記載の複合体の集団。

【請求項44】

前記細胞溶解物が、癌細胞または感染症原因物質の抗原性を示す物質に感染した細胞に由来する、請求項43に記載の複合体の集団。

【請求項45】

医薬上許容される担体および精製した複合体を含む医薬組成物であって、前記複合体は、オリゴマー化している免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含み、前記熱ショックタンパク質が、オリゴマー化剤と接触することによってオリゴマー化されており、ただし、前記オリゴマー化剤が、レクチン、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではない、前記医薬組成物。

【請求項46】

医薬上許容される担体および精製した複合体を含む医薬組成物であって、前記複合体は、オリゴマー化している免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含み、前記熱ショックタンパク質が、オリゴマー化剤と共有結合することによってオリゴマー化されており、ただし、前記オリゴマー化剤が、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDでは

10

20

30

40

50

ない、前記医薬組成物。

【請求項47】

医薬上許容される担体および治療有効投与量の精製した複合体を含む医薬組成物であって、前記複合体は、オリゴマー化している免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含み、前記熱ショックタンパク質が、オリゴマー化剤と共有結合することによってオリゴマー化されている医薬組成物。

【請求項48】

前記熱ショックタンパク質が、gp96またはhsp90である、請求項45、46または47に記載の医薬組成物。

【請求項49】

前記複合体が、癌または感染症の治療または予防に有効な量で存在する、請求項45、46または47に記載の医薬組成物。

【請求項50】

前記熱ショックタンパク質および抗原分子が、細胞溶解物から複合体として単離される、請求項45、46または47に記載の医薬組成物。

【請求項51】

前記細胞溶解物が、癌細胞または感染症原因物質の抗原性を示す物質に感染した細胞に由来する、請求項51に記載の医薬組成物。

【請求項52】

精製したオリゴマー化免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含むキットであって、前記熱ショックタンパク質が、オリゴマー化剤と接触することによってオリゴマー化されており、ただし、前記オリゴマー化剤が、レクチン、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではないキット。

【請求項53】

精製したオリゴマー化免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含むキットであって、前記熱ショックタンパク質が、オリゴマー化剤と共有結合することによってオリゴマー化されており、ただし、前記オリゴマー化剤が、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではないキット。

【請求項54】

前記熱ショックタンパク質が、gp96またはhsp90である、請求項52または53に記載のキット。

【請求項55】

前記抗原分子が、癌または感染症原因物質の抗原性を示す、請求項52または53に記載のキット。

【請求項56】

前記熱ショックタンパク質および抗原分子が、細胞溶解物から複合体として単離される、請求項55に記載のキット。

【請求項57】

前記細胞溶解物が、癌細胞または感染症原因物質の抗原性を示す物質に感染した細胞に由来する、請求項56に記載のキット。

【請求項58】

免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含む複合体と、前記複合体のオリゴマー化を引き起こすのに十分な量のオリゴマー化剤とを接触させることによって、前記複合体の抗原性または免疫原性を増強する方法であって、ただし、前記オリゴマー化剤が、レクチン、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではない、前記方法。

【請求項59】

免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含む複合体と、前記複合体のオリゴマー化を引き起こすのに十分な量のオリゴマー化剤とを接触させることによって、前記複合体の抗原性または免疫原性を増強する方法であって、ここで前記熱ショックタンパク質が、前記オリゴマー化剤と共有結合している、前記方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項60】

前記免疫学的活性熱ショックタンパク質が、非共有結合によって前記抗原分子と複合体を形成している、請求項58または59に記載の方法。

## 【請求項61】

前記抗原分子がペプチドである、請求項58または59に記載の方法。

## 【請求項62】

前記免疫学的活性熱ショックタンパク質および前記抗原分子を含む前記複合体が、細胞溶解物から単離される、請求項58または59に記載の方法。

## 【請求項63】

前記細胞溶解物が、癌細胞または感染症原因物質の抗原性を示す物質に感染した細胞に由来する、請求項58または59に記載の方法。

10

## 【請求項64】

前記熱ショックタンパク質が、gp96またはhsp90である、請求項58または59に記載の方法。

## 【請求項65】

癌または感染症を治療または予防する方法であって、そのような治療および予防が必要な被験者に、治療有効量の精製した複合体を投与することを含み、前記複合体が、オリゴマー化している免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含み、前記熱ショックタンパク質が、オリゴマー化剤と接触することによってオリゴマー化されており、ただし、前記オリゴマー化剤が、レクチン、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではなく、また前記抗原分子が、それぞれ前記癌の腫瘍特異的抗原もしくは腫瘍関連抗原の抗原性または前記感染症の原因物質の抗原性を示す、前記方法。

20

## 【請求項66】

癌または感染症を治療または予防する方法であって、そのような治療および予防が必要な被験者に、治療有効量の精製した複合体を投与することを含み、前記複合体が、オリゴマー化している免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含み、前記熱ショックタンパク質が、オリゴマー化剤と共有結合することによってオリゴマー化されており、また前記抗原分子が、それぞれ前記癌の腫瘍特異的抗原もしくは腫瘍関連抗原の抗原性または前記感染症の原因物質の抗原性を示す、前記方法。

## 【請求項67】

前記熱ショックタンパク質が、gp96またはhsp90である、請求項65または66に記載の方法。

30

## 【請求項68】

前記免疫学的活性熱ショックタンパク質および前記抗原分子を含む前記複合体が、細胞溶解物から単離される、請求項65または66に記載の方法。

## 【請求項69】

前記細胞溶解物が、癌細胞、または感染症原因物質の抗原性を示す物質に感染した細胞、に由来する、請求項68に記載の方法。

## 【請求項70】

前記細胞が、前記被験者から得られる、請求項68に記載の方法。

40

## 【請求項71】

癌または感染症を治療または予防する方法であって、そのような治療および予防が必要な被験者に、医薬上許容される担体および精製した複合体を含む医薬組成物を治療有効量投与することを含み、前記複合体は、オリゴマー化している免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含み、前記熱ショックタンパク質が、オリゴマー化剤と接触することによってオリゴマー化されており、ただし、前記オリゴマー化剤が、レクチン、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではなく、また前記抗原分子が、それぞれ前記癌の腫瘍特異的抗原もしくは腫瘍関連抗原の抗原性または前記感染症の原因物質の抗原性を示す、前記方法。

## 【請求項72】

50

癌または感染症を治療または予防する方法であって、そのような治療および予防が必要な被験者に、医薬上許容される担体および精製した複合体を含む医薬組成物を治療有効量投与することを含み、前記複合体は、オリゴマー化している免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含み、前記熱ショックタンパク質が、オリゴマー化剤と共有結合することによってオリゴマー化されており、また前記抗原分子が、それぞれ前記癌の腫瘍特異的抗原もしくは腫瘍関連抗原の抗原性または前記感染症の原因物質の抗原性を示す、前記方法。

【請求項 7 3】

前記熱ショックタンパク質が、gp96またはhsp90である、請求項71または72に記載の方法。

10

【請求項 7 4】

前記免疫学的活性熱ショックタンパク質および前記抗原分子を含む前記複合体が、細胞溶解物から単離される、請求項71または72に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記細胞溶解物が、癌細胞または感染症原因物質の抗原性を示す物質に感染した細胞に由来する、請求項74に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記細胞が、前記被験者から得られる、請求項74に記載の方法。

【請求項 7 7】

医薬組成物を製造する方法であって、

20

(a) 免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含む複合体と、前記複合体のオリゴマー化を引き起こすのに十分な量のオリゴマー化剤とを接触させること、ただし、前記オリゴマー化剤は、レクチン、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではない；ならびに

(b) 前記オリゴマー化している複合体と医薬上許容される担体とを合わせること；を含む方法。

【請求項 7 8】

医薬組成物を製造する方法であって、

(a) 免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含む複合体と、前記複合体のオリゴマー化を引き起こすのに十分な量のオリゴマー化剤とを接触させること、ここで前記オリゴマー化剤は、前記オリゴマー化剤と共有結合しており、ただし、前記オリゴマー化剤は、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではない；ならびに

30

(b) 前記オリゴマー化している複合体と医薬上許容される担体とを合わせること；を含む方法。

【請求項 7 9】

前記熱ショックタンパク質および抗原分子が、細胞溶解物から複合体として単離される、請求項77または78に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記細胞が、癌細胞または感染症原因物質の抗原性を示す物質に感染した細胞である、請求項79に記載の方法。

40

【請求項 8 1】

前記熱ショックタンパク質がgp96またはhsp90である、請求項77または78に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

1. 序

本発明は、免疫学、疾患の免疫療法、ストレスタンパク質媒介免疫調節およびワクチン開発の分野に関する。より詳細には、本発明は、熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性を測定する方法および熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的

50

活性を調節する薬剤をスクリーニングする方法に関する。本発明はまた、免疫治療部分、例えば熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の免疫原性を、それらのオリゴマー化を促進することによって増強する方法に関する。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

#### 2. 発明の背景

現代の医学では、免疫療法またはワクチン接種により、ポリオ、破傷風、結核、水痘、麻疹、肝炎などの疾患が実質的に根絶されている。ワクチン接種を用いた手法は、感染症を防止する免疫系の能力を利用している。タンパク質など生きていない物質を用いたワクチン接種により、一般に、抗体反応またはCD4+ヘルパーT細胞応答が引き起こされる。Ray 10  
ChaudhuriおよびMorrow(1993)Immunology Today 14: 344~348。一方、生細胞もしくは感染性ウイルスなどの生きている物質によるワクチン接種または感染は、一般にCD8+キラーTリンパ球(CTL)応答を引き起こす。CTL応答は、癌、感染性ウイルスおよびある種の細菌に対する保護にとって極めて重要である。CTL応答を得るための唯一の方法は、それ自体が病原性である生きた剤を使用することなので、これは実施上の問題を引き起こす。この問題は、一般に弱毒化したウイルス株および細菌株を使用することによって、またはワクチン接種に使用できる細胞全体を死滅させることによって回避されている。これらの戦略は功を奏しているが、弱毒化した菌株の使用は、弱毒化した物質が宿主DNAと遺伝子組換えを起こし、毒性のある有害株に変化し得るというリスクを常に抱えている。したがって、20  
特異的な仕方ではタンパク質など生きていない物質を用いたワクチン接種によってCD8+ CTL応答をもたらす得る方法が必要とされている。熱ショックタンパク質-ペプチド複合体が、癌および感染症に対するワクチンとして特に有用であることが見い出されている。(Srivastavaら、(1994)Curr. Op. Immu. 6: 728; Srivastava (1993) Adv. Cancer Res. 62 : 153)。

#### 【0003】

ストレスタンパク質とも呼ばれる熱ショックタンパク質(hsp)は、当初、熱ショックに20  
応答して細胞によって合成されるタンパク質として同定された。hspは、それらの分子量に基づいて、いくつかのファミリー、例えば、hsp90、hsp70、hsp60、sm hspなどに分類されており、各ファミリーは約1~5個の密接に関係するタンパク質からなる。Srivastava、2002、Annu. Rev. Immunol. 20: 395~425。ファミリー内のメンバーが密接に関係して30  
いても、個々のhspファミリーの間では、明白な相同性はほとんどないか、またはまったくない。熱ショックタンパク質は、あらゆる生活形態にあるあらゆる細胞中で、また種々の細胞内部位で発現される。それらは、通常の条件下で膨大な量で発現され、熱ショックや、毒素への暴露、酸化ストレス、グルコース欠乏などをはじめとする他の形態のストレスの結果、それらの発現は、はるかに高いレベルまで強力に誘導され得る。(Srivastava、2002、Annu. Rev. Immunol. 20: 395~425を参照のこと)。

#### 【0004】

熱ショックおよび他の生理学的ストレスに対する細胞応答に関する研究によって、hspが、これらの悪条件に対する細胞保護だけでなく、ストレスのない細胞の必須の生化学的および免疫学的プロセスにも関与していることが明らかになった。hspは、異なる種類の40  
シャペロン機能を果たす。例えば、細胞の細胞質、核、ミトコンドリア、または小胞体に局在するhsp70ファミリーのメンバー(Lindquistら、1988、Ann. Rev. Genetics 22: 631~677)は、免疫系細胞への抗原提示に関与し、また正常細胞中のタンパク質の移動、折り畳みおよびアセンブリに関与している。hspはまた、タンパク質またはペプチドと結合し、アデノシン三リン酸(ATP)の存在下または低pH下で、結合したタンパク質またはペプチドを放出することができる。

#### 【0005】

Srivastavaらは、近交系マウスのメチルコラントレン誘発肉腫に対する免疫応答を実証した(Srivastavaら、1988、Immunol. Today 9: 78~83)。これらの研究では、これらの腫瘍の個々に異なる免疫原性に反応性の分子は、96kDaの糖タンパク質(gp96)および84~86k 50

Daの細胞内タンパク質であることが判明した(Srivastavaら、1986、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3407~3411; Ullrichら、1986、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3121~3125)。特定の腫瘍から単離したgp96またはhsp84/86を用いてマウスを免疫感作すると、そのマウスは、その特定の腫瘍に対して免疫性を示したが、抗原が異なる腫瘍には免疫性を示さなかった。gp96およびhsp84/86をコードする遺伝子の単離および特性決定により、それらの間の有意な相同性が明らかになり、gp96およびhsp84/86が、それぞれ小胞体およびシトソルにおける同じ熱ショックタンパク質のカウンターパートであることがわかった(Srivastavaら、1988、Immunogenetics 28: 205~207; Srivastavaら、1991、Curr. Top. Microbiol. Immunol. 167: 109~123)。さらに、hsp70は、それが単離された腫瘍に対して免疫を誘発するが、抗原が異なる腫瘍に対しては誘発しないことがわかった。しかし、ペプチドを除去したhsp70では、その免疫原活性が失われることがわかった(UdonoおよびSrivastava、1993、J. Exp. Med. 178: 1391~1396)。これらの知見から、熱ショックタンパク質は、それ自体が免疫原性ではないが、抗原ペプチドと非共有結合性複合体を形成し、この複合体が抗原ペプチドに特異的な免疫を誘発できることが示唆された(Srivastava、1993、Adv. Cancer Res. 62: 153~177; Udonoら、1994、J. Immunol.、152: 5398~5403; Sutoら、1995、Science 269: 1585~1588)。

10

## 【0006】

この現象は、既知のまたは未知の抗原について腫瘍モデルおよびウィルスモデルの両方で観察されている。(Srivastavaら(1998)Immunity 8: 657; Ciupituら(1998)J. Exp. Med. 5: 685; Arnoldら(1995)J. Exp. Med. 182: 885)。gp96、hsc70、およびhsp84/hsp86に結合した抗原ペプチドの存在は、その抗原性ペプチドが既知である細胞中で構造的に実証されている(Nielandら(1996)Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 93: 6135; Breloerら(1998)Eur. J. Immunol. 28: 1016; Ishiiら(1999)J. Immunol. 162: 1303)。熱ショックタンパク質-ペプチド複合体を用いたワクチン接種は、癌の予防的処置(Srivastavaら(1986)Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 83: 3407; Ullrichら(1986)Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 83: 3121; Pengら(1997)J. I. Meth. 204: 13; BasuおよびSrivastava(1999)J. Exp. Med. 189: 797)および治療的処置(Tamuraら(1997)Science 278: 117; Yedavelliら(1999)Int. J. Mol. Med. 3: 243)の両方、ならびに感染症の予防(Ciupituら(1998)J. Exp. Med. 5: 685)に適用できる。この手法のヒト癌の免疫療法への移行は、gp96複合体(Janetzkiら(1998)J. Immunother. 4: 269; Amatoら(1999)ASCO学会、要旨集1278; Lewisら(1999)ASCO学会要旨集1687)またはhsp70複合体を自己ワクチンとして、また個々の患者の癌を熱ショックタンパク質の供給源(MenoretおよびChandawarkar(1998)Semin. in Oncology 25: 654)として用いて現在研究中である。

20

30

## 【0007】

hsp104、hsp90、hsp70およびhsp60を含む数種のhspは、ATPアーゼ活性を有することがわかっている(Scheibelら(1997)J. Biol. Chem. 272: 18608~18613; Richterら(2001)J. Biol. Chem. 276: 33689; Lopez-Buesaら(1998)Proc. Nat'l. Acad. Sci. 95: 15253; Schirmerら(1998)J. Biol. Chem. 273: 15546)。hsp90の場合には、ATP結合および加水分解がその分子シャペロン機能に関連していることも観察されている(Obermannら(1998)J. Cell Biol. 143: 901; Panaretouら(1998)EMBO J. 17: 4829)。しかし、ATPアーゼ活性の役割およびhsp90のin vivoにおける生物学的活性を促進する際の立体構造変化が、さらなる研究の主題として残っている。

40

## 【0008】

熱ショックタンパク質のhsp90ファミリーのメンバーであるgp96も、ATPアーゼ活性を有することが報告されている(Liら(1993)EMBO J. 12: 3143)。しかし、この知見はWearschおよびNicchittaによって異議が唱えられ、gp96のペプチド結合活性がアデニンヌクレオチド非依存性であり、ATP結合および加水分解がgp96の固有特性ではないことが提唱された((1997)J. Biol. Chem. 272: 5152)。これらの研究者はまた、gp96調製物の極めて弱いATPアーゼ活性が、カゼインキナーゼIIの微量の混入によるものであることも示した。Wearsch、VoglinoおよびNicchittaはさらに、gp96に結合したペプチドは、ATPまたはADPの存

50

在下または不在下で同一であり、化学的変性/再生または一過性熱ショックの後に、結合がそれぞれ2倍または4倍刺激されることを報告した((1998)Biochem. 37: 5709)。

【0009】

gp96は、非共有結合サブユニットの二量体として存在することがわかっている(WearschおよびNicchitta(1996)Prot. Exp. Pur. 7: 114)。ペプチドは、高次gp96複合体とアセンブリすることが提唱されている(SastryおよびLinderoth, J. Biol. Chem. 274: 12023)。さらに、熱ショックにより、疎水性ドメインへの溶媒およびペプチドの接近性を増大させる三次立体構造変化が起こることがわかっている(Wassenbergら(2000)J. Biol. Chem. 275: 22806)。しかし、Wassenbergら(上掲)は、固有のATP結合およびATPアーゼ活性を支持する証拠には議論の余地があり、アデノシンヌクレオチドを介したgp96-基質相互作用の調節の分子機構に関するコンセンサスがまだ明らかになっていないことを述べている。ggp96の生物物理学的および生化学的研究にもかかわらず、gp96とペプチド基質の間の相互作用の調節は、依然として完全に理解されていない。主要組織適合抗原複合体クラスI抗原のプロセッシングおよび提示経路におけるgp96-ペプチド複合体の機能に対するヌクレオチド結合および立体構造変化の影響についてはそれ程知られていない。

10

【0010】

免疫療法剤が開発されるにつれて、これらの相互作用のメカニズムおよびそれらがこれらの複合体の生物学的活性にどのように作用するかを理解することが重要になってきている。一態様では、本発明は、hsp-抗原複合体に基づく免疫療法剤の効力を判定するのに使用できるhspおよびhsp-抗原複合体の生物学的活性の検出および測定する方法を提供する。

20

【0011】

gp96、hsp90、hsp70、カルレティキュリン、hsp110およびgrp170などのhspは、多数のペプチドをシャペロン化することが知られている(その総説については、Srivastavaら、1998、Immunity 8: 657~665; Srivastava、2002、Annu. Rev. Immunol. 20: 395~425を参照のこと)。例えば、腫瘍誘発gp96は腫瘍抗原ペプチドを保有し、ウイルス感染細胞由来のgp96調製物はウイルスエピトープを保有し(SutoおよびSrivastava、1995、Science 269: 1585~1588)、またオポアルブミンまたは $\alpha$ -ガラクトシダーゼなどのモデル抗原でトランスフェクトした細胞由来のgp96調製物は、対応するエピトープと関係がある(Arnoldら、1995、J. Exp. Med. 182: 885~889; Breloerら、1998、Eur. J. Immunol. 28: 1016~1021)。細胞から単離した(Tamuraら、1997、Science 278: 117~120)、またはin vitroで再構成された(Blachereら、1997、J. Exp. Med. 186: 1183~1406)hsp-ペプチド複合体は、優れた免疫原であり、hspをシャペロンとした抗原ペプチドに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞応答を誘発するのに広く使用されている(その総説については、Srivastava、2002、Annu. Rev. Immunol. 20: 395~425を参照のこと)。

30

【0012】

hspの非共有結合性複合体および癌細胞から精製したペプチドは、癌の治療および予防に使用でき、1996年4月11日付けのPCT公開W0 96/10411、および1997年3月20日付けのW0 97/10001に記載されている(それぞれ、1998年4月12日発行の米国特許第5,750,119号、および1998年11月17日発行の米国特許第5,837,251号であり、いずれもその全体が参照により本明細書に組み込まれる)。ストレスタンパク質-抗原複合体の単離および精製、例えば病原体感染細胞からのものが記載され、ウイルスなどの病原体、ならびに細菌、原生動物、真菌および寄生虫を含む他の細胞内病原体が原因の感染症の治療および予防に使用される(例えば、1995年9月21日付けのPCT公開W0 95/24923を参照のこと)。免疫原性ストレスタンパク質-抗原複合体はまた、in vitroでストレスタンパク質と抗原ペプチドとの複合体を形成することによって調製でき、癌および感染症の治療および予防のためのこうした複合体の使用は、1997年3月20日付けのPCT公開W0 97/10000に記載されている(2000年2月29日発行の米国特許第6,030,618号)。養子免疫療法で使用される抗原提示細胞をin vitroで感作するためのストレスタンパク質-抗原複合体の使用は、1997年3月20日付けのPCT公開W0 97/10002に記載されている(1999年11月16日発行の米国特許第5,985,270号も参照のこと)

40

50

。

## 【0013】

より大きな免疫応答を誘発するhspおよびペプチドの複合体は、感染症ならびに癌の免疫療法を向上させるのに有用であろう。別の態様では、本発明は、熱ショックタンパク質、または熱ショックタンパク質および抗原分子を含む複合体、の免疫原性を高めるための複合体、組成物および方法を提供する。

## 【0014】

本明細書における参考文献の引用または考察は、それが本発明に対する従来技術であると認めるものと見なすべきではない。

## 【発明の開示】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0015】

## 3. 発明の概要

一態様では、本発明は、熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性を検出する方法を提供する。本発明はまた、この方法の、熱ショックタンパク質-ペプチド複合体を含む免疫療法剤の活性の測定；ワクチンまたは免疫療法への被験者の応答の評価；および熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の活性を調節する薬剤のスクリーニングへの使用を含む。

## 【0016】

本発明で使用するhspは、hsp70ファミリー、hsp90ファミリーおよびhsp60ファミリーを限定するものとしてではなく例として含む任意のhspファミリーから選択することができる。さらに、本発明で使用するhspは、それだけには限らないが、hsp90、gp96(grp94)、hsp104、hsp70およびhsp60を含めて任意のhspから選択することができる。好ましい実施形態では、本発明で使用するhspは、gp96である。

## 【0017】

本発明によって評価できる生物学的活性には、免疫学的活性、例えば、抗原提示細胞に対するペプチド抗原の提示(抗原再提示)およびT細胞活性化が含まれるが、それだけには限定されない。一実施形態では、生物学的活性という用語は、免疫学的活性に限定されている。hsp-ペプチド複合体の免疫学的活性は、予防的および治療的用途におけるその有用性に直接関係する。他の多くの生物学的活性は、当技術分野で公知であり、それだけには限らないが、サイトカイン、例えば、ヒトマクロファージ走化性タンパク質1(MCP-1)などの生物学的応答調節物質および一酸化窒素(NO)の産生の誘導；CD91(-2-マクログロブリン受容体、2MR)および/またはCD36などの受容体の結合；抗原分子の結合および放出；ならびに動物中の腫瘍の退縮、腫瘍がある動物の生存期間の延長および感染症の除去を引き起こす能力などを含むが、それだけには限定されない。生物学的活性は、in vivoおよび/またはin vitroで生じ、あるいは観察され得る。

## 【0018】

一実施形態では、本発明は、熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性を検出する方法であって、熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性を測定すること、および熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性を生物学的活性の指標として用いることを含む方法を提供する。それだけには限らないが、発光酵素に基づくアッセイなどATPが関係する酵素反応、ならびにそれだけには限らないが、イオン交換クロマトグラフィー、生物発光アッセイ、HPLC、放射性同位元素アッセイまたは免疫親和性アッセイなどATP、ADP、AMPおよび/または無機リン酸塩の濃度および/または量を検出する方法など、ATPアーゼ活性を測定するための当技術分野で公知の任意の方法を使用することができる。

## 【0019】

別の実施形態では、本発明は、熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性を検出する方法であって、オリゴマー型の熱ショックタンパ

10

20

30

40

50

ク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の量を測定すること、およびオリゴマー型の熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の存在を熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性の指標として用いることを含む方法を提供する。それだけには限らないが、サイズ排除クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、免疫アッセイ、勾配遠心分離、フィルター、光散乱アッセイまたは分析用超遠心分離など、熱ショックタンパク質もしくは熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のサイズおよび/または立体構造 (conformation) を決定するための当技術分野で公知の任意の方法を使用することができる。様々な実施形態では、二量体型の熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体が好ましい。

**【0020】**

10

本発明の方法は、熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体を含む組成物の生物学的活性を測定するために組み合わせて使用してもよい。

**【0021】**

別の実施形態では、本発明は、熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性を調節する潜在的な治療化合物をスクリーニングする方法を提供する。本発明は、化合物の不在下で熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性を測定するステップ；熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体を化合物と接触させるステップ；化合物に接触させていない熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性と、該化合物に接触させた熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性とを比較するステップ；ならびに化合物に接触させた熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体と、該化合物に接触させていない熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体とのATPアーゼ活性の任意の差を、該化合物が生物学的活性を調節することの指標として使用するステップを含む。本発明はさらに、ゲルダナマイシン、またはNECAなど、hspに結合するヌクレオチドの任意の他の特異的な阻害剤、の存在下でATPアーゼ活性を測定することを含み、ここでゲルダナマイシン、またはヌクレオチド結合の任意の他の特異的な阻害剤、の存在によって阻害されるATPアーゼ活性は、生物学的活性の指標として使用される。このステップは、他のタイプのATPアーゼが存在する場合に特に有用である。

20

**【0022】**

30

さらに別の実施形態では、化合物の不在下でオリゴマー型の熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の量を測定すること；該熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体を該化合物と接触させること；該化合物に接触させていないオリゴマー型の熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の量と該化合物に接触させたオリゴマー型の熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の量とを比較すること；ならびに該化合物に接触させたオリゴマー型の熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体と、該化合物に接触させていないオリゴマー型の熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体との量の任意の差を化合物が生物学的活性を調節することの指標として使用することを含む、潜在的な治療化合物をスクリーニングする方法を提供する。様々な実施形態では、二量体型の熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体が好ましい。

40

**【0023】**

さらに別の実施形態では、本発明は、熱ショックタンパク質および複合体の変異体をそれらの生物学的活性についてスクリーニングする方法であって、変異体のATPアーゼ活性または変異体によって形成されたオリゴマー構造の存在、あるいは変異体およびそれらの正常なカウンターパートを決定することを含む方法を提供する。

**【0024】**

さらに別の実施形態では、本発明は、熱ショックタンパク質およびその複合体の生物学的活性を調節する方法であって、熱ショックタンパク質および複合体と、該熱ショックタ

50

ンパク質および複合体のATPアーゼ活性またはオリゴマー化を調節する化合物とを接触させることを含む方法を提供する。こうした化合物は、被験者の免疫機能を調節するのに使用することができる。

【0025】

さらに別の実施形態では、本発明は、被験者の免疫系の異常なまたは亜正常な機能に部分的に起因する被験者の症状を診断する方法であって、前記方法は、熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性あるいは被験者から得られたオリゴマー型の熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の存在を、熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性の指標として使用することを含み、その生物学的活性は被験者中の1種または複数の免疫機能に関連し、それによってATPアーゼ活性またはオリゴマー型の量の変化から症状の変化が示される方法を提供する。様々な実施形態では、二量体型の熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体が好ましい。

10

【0026】

他の実施形態では、本発明は、被験者の癌または感染症の予後を判定する方法であって、熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性あるいは被験者から得られたオリゴマー型の熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の存在を熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性の指標として使用することを含み、その生物学的活性は癌細胞または感染症を引き起こす原因物質に応答するあるいはそれらを標的にする1種または複数の免疫機能に関連し、それによってATPアーゼ活性またはオリゴマー型の量の変化から予後の変化が示される方法を提供する。様々な実施形態では、二量体型の熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体が好ましい。

20

【0027】

一実施形態では、hspまたはhsp-ペプチド複合体は、組織試料または血液試料など被験者由来の試料から得ることができ、次いで、hspまたはhsp-ペプチド複合体をさらに単離および/または精製することができる。

【0028】

本発明の方法を使用して、熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の質量ベースに基づく比活性を提供することができる。その情報を使用して、診断もしくは治療用途で使用すべき熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の質または効力を制御することができる。該情報を使用して、より経済的で有効な製剤および投与量を考え出すことができる。

30

【0029】

本発明はさらに、熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性あるいはオリゴマー型の量を、熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性の指標として使用する、該熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体を含む組成物と、熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性あるいはオリゴマー型の量を測定するための説明書とを含むキットを提供する。様々な実施形態では、二量体型の熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体が好ましい。

40

【0030】

別の態様では、本発明は、熱ショックタンパク質および抗原分子を含む、熱ショックタンパク質または複合体の免疫原性を増強する複合体、組成物および方法を提供する。本発明はまた、細胞中への抗原送達を改善する手段に関するものであり、したがって、より効率的でしたがってより強力なワクチン調製物を提供する。

【0031】

一実施形態では、本発明は、オリゴマー化している免疫学的活性な熱ショックタンパク質および抗原分子を含む、精製した複合体を提供する。その熱ショックタンパク質は、オリゴマー化剤と接触させることによってオリゴマー化されており、ただし、このオリゴマ

50

ー化剤は、4,4'-ジアニリノ-1,1'-ビナフチル-5,5'-ジスルホン酸(「ビス-ANS」)、グルタルアルデヒドまたはスルホスクシンイミジル(4-アジドサリチルアミド)ヘキサノエート(「SASD」)ではない。別の実施形態では、本発明は、オリゴマー化している免疫学的活性な熱ショックタンパク質および抗原分子を含む、精製した複合体を提供する。その熱ショックタンパク質は、オリゴマー化剤と共有結合することによってオリゴマー化されており、ただし、このオリゴマー化剤は、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではない。ある実施形態では、熱ショックタンパク質は、オリゴマー化剤と非共有結合している。いくつかの実施形態では、オリゴマー化剤は、熱ショックタンパク質、ビオチン/アビジン、ビオチン/ストレプトアビジンおよびポリエチレングリコール(「PEG」)誘導体と結合できる二重特異性または多価抗体からなる群から選択される。ある実施形態では、熱ショックタンパク質は、gp96またはhsp90である。好ましい実施形態では、熱ショックタンパク質および抗原分子は、複合体として細胞溶解物、好ましくは癌細胞、または感染症原因物質の抗原性を示す物質に感染した細胞、から単離する。

10

**【0032】**

別の実施形態では、本発明は、精製したオリゴマー化している複合体の集団を提供する。前記集団中の各複合体は、免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含み、その複合体は、オリゴマー化剤と接触することによってオリゴマー化されており、ただし、このオリゴマー化剤は、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではなく、また前記集団中の少なくとも1種の複合体は、前記集団中の別の複合体の抗原分子と異なる抗原分子を含む。別の実施形態では、本発明は、精製したオリゴマー化している複合体の集団を提供する。前記集団中の各複合体は、免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含み、その複合体は、オリゴマー化剤と共有結合することによってオリゴマー化されており、ただし、このオリゴマー化剤は、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではなく、また前記集団中の少なくとも1種の複合体は、前記集団中の別の複合体の抗原分子と異なる抗原分子を含む。いくつかの実施形態では、熱ショックタンパク質は、オリゴマー化剤と非共有結合している。ある実施形態では、熱ショックタンパク質は、gp96またはhsp90である。好ましい実施形態では、熱ショックタンパク質および抗原分子は、複合体として細胞溶解物、好ましくは癌細胞、または感染症原因物質の抗原性を示す物質に感染した細胞、から単離する。

20

**【0033】**

別の実施形態では、本発明は、オリゴマー化している免疫学的活性熱ショックタンパク質を含む精製した複合体を提供する。その熱ショックタンパク質は、オリゴマー化剤と接触することによってオリゴマー化されており、ただし、このオリゴマー化剤は、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではない。特定の実施形態では、精製した複合体は、オリゴマー化している免疫学的活性熱ショックタンパク質を含み、その熱ショックタンパク質は、オリゴマー化剤と共有結合することによってオリゴマー化されており、ただし、このオリゴマー化剤は、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではない。複合体が抗原分子をさらに含むことが好ましく、熱ショックタンパク質が、オリゴマー化剤と接触する前に抗原分子と複合体を形成していることがさらに好ましい。あるいは、熱ショックタンパク質は、最初に抗原分子を含まず、そのオリゴマー化の後に抗原分子と接触する。

30

40

**【0034】**

別の実施形態では、本発明は、医薬上許容される担体および精製した複合体を含む医薬組成物を提供する。前記複合体は、オリゴマー化している免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含み、その熱ショックタンパク質は、オリゴマー化剤と接触することによってオリゴマー化されており、ただし、このオリゴマー化剤は、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではない。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、医薬上許容される担体および精製した複合体を含み、前記複合体は、オリゴマー化している免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含み、その熱ショックタンパク質は、オリゴマー化剤と共有結合することによってオリゴマー化されており、ただし、このオリゴマー化剤は、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではない。いくつかの実施形態では、

50

医薬組成物は、医薬上許容される担体および治療有効投与量の精製した複合体を含み、前記複合体は、オリゴマー化している免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含み、その熱ショックタンパク質は、オリゴマー化剤と共有結合することによってオリゴマー化されている。他の実施形態では、医薬組成物は、医薬上許容される担体および精製した複合体を含み、前記複合体は、オリゴマー化している免疫学的活性熱ショックタンパク質、抗原分子、および医薬上許容される担体を含み、その熱ショックタンパク質は、オリゴマー化剤と共有結合することによってオリゴマー化されており、またその医薬組成物は注射器中に存在する。特定の実施形態では、熱ショックタンパク質は、オリゴマー化剤と非共有結合している。ある実施形態では、熱ショックタンパク質は、gp96またはhsp90である。好ましい実施形態では、熱ショックタンパク質および抗原分子は、複合体として細胞溶解物、好ましくは癌細胞または感染症原因物質の抗原性を示す物質に感染した細胞から単離する。別の好ましい実施形態では、医薬組成物中の複合体は、癌または感染症の治療または予防に有効な量で存在する。

10

**【0035】**

さらに別の実施形態では、本発明は、オリゴマー化している免疫学的活性熱ショックタンパク質を含む精製した複合体を含むキットを提供する。その熱ショックタンパク質は、オリゴマー化剤と接触することによってオリゴマー化されており、ただし、このオリゴマー化剤は、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではない。ある実施形態では、このキットは、オリゴマー化している免疫学的活性熱ショックタンパク質を含む精製した複合体を含み、その熱ショックタンパク質は、オリゴマー化剤と共有結合することによってオリゴマー化されており、ただし、このオリゴマー化剤は、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではない。いくつかの実施形態では、熱ショックタンパク質は、オリゴマー化剤と非共有結合している。いくつかの実施形態では、熱ショックタンパク質は、gp96またはhsp90である。このキットは、抗原分子をさらに含む複合体を含むことが好ましい。好ましい実施形態では、熱ショックタンパク質および抗原分子は、複合体として細胞溶解物、好ましくは癌細胞、または感染症原因物質の抗原性を示す物質に感染した細胞、から単離する。

20

**【0036】**

別の実施形態では、本発明は、免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含む複合体と該複体のオリゴマー化を引き起こすのに十分な量のオリゴマー化剤とを接触させることによって、該複体の抗原性または免疫原性を増強する方法を提供し、ただし、このオリゴマー化剤は、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではない。別の実施形態では、免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含む複体の抗原性または免疫原性を増強する方法は、該複合体と該複体のオリゴマー化を引き起こすのに十分な量のオリゴマー化剤とを接触させることを含み、その熱ショックタンパク質は、オリゴマー化剤と共有結合している。特定の実施形態では、この方法で使用する複合体は、非共有結合によって抗原分子と複合体を形成した免疫学的活性熱ショックタンパク質を含む。好ましい実施形態では、抗原分子はペプチドである。別の好ましい実施形態では、免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含む複合体は、細胞溶解物、好ましくは癌細胞または感染症原因物質の抗原性を示す物質に感染した細胞から単離する。特定の実施形態では、熱ショックタンパク質は、gp96またはhsp90である。

30

40

**【0037】**

別の実施形態では、本発明は、最初にhspと、該hspのオリゴマー化を引き起こすのに十分な量のオリゴマー化剤とを接触させ、次いでオリゴマー化しているhspを抗原分子と接触させることによって、免疫学的活性hsp-ペプチド複体の抗原性または免疫原性を増強する方法を提供し、ただし、このオリゴマー化剤は、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではない。ある実施形態では、この方法は、hspと、該hspのオリゴマー化を引き起こすのに十分な量のオリゴマー化剤とを接触させ、次いでオリゴマー化しているhspを抗原分子と接触させることを含み、その熱ショックタンパク質は、オリゴマー化剤と共有結合しており、ただし、このオリゴマー化剤は、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASD

50

ではない。

【0038】

別の実施形態では、本発明は、癌または感染症を治療または予防する方法であって、こうした治療および予防が必要な被験者に、治療有効量の精製した複合体を投与することを含み、その複合体は、オリゴマー化している免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含み、その熱ショックタンパク質は、オリゴマー化剤と接触することによってオリゴマー化されており、ただし、このオリゴマー化剤は、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではなく、またその抗原分子が、それぞれ前記癌の腫瘍特異的もしくは腫瘍関連抗原または前記感染症の原因物質の抗原性を示す方法を提供する。ある実施形態では、この方法で使用する複合体は、オリゴマー化剤と共有結合することによってオリゴマー化された熱ショックタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、この方法で使用する複合体は、オリゴマー化剤と共有結合することによってオリゴマー化された熱ショックタンパク質を含み、ただし、このオリゴマー化剤は、グルタルアルデヒドではない。他の実施形態では、このオリゴマー化剤は、ビス-ANSまたはSASDではない。ある実施形態では、熱ショックタンパク質は、gp96またはhsp90である。好ましい実施形態では、熱ショックタンパク質および抗原分子は、複合体として細胞溶解物、好ましくは癌細胞または感染症原因物質の抗原性を示す物質に感染した細胞から単離する。別の好ましい実施形態では、この細胞は被験者から得る。

10

【0039】

別の実施形態では、本発明は、癌または感染症を治療または予防する方法であって、こうした治療および予防が必要な被験者に、医薬上許容される担体および精製した複合体を含む医薬組成物を治療有効量投与することを含み、前記複合体は、オリゴマー化している免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含み、その熱ショックタンパク質は、オリゴマー化剤と接触することによってオリゴマー化されており、ただし、このオリゴマー化剤は、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではなく、またその抗原分子が、それぞれ前記癌の腫瘍特異的もしくは腫瘍関連抗原または前記感染症の原因物質の抗原性を示す方法を提供する。いくつかの実施形態では、この方法は、医薬上許容される担体および精製した複合体を含む医薬組成物を治療有効量投与することを含み、前記複合体は、オリゴマー化している免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含み、その熱ショックタンパク質は、オリゴマー化剤と共有結合することによってオリゴマー化されている。いくつかの実施形態では、この方法で使用する複合体は、オリゴマー化剤と共有結合することによってオリゴマー化される熱ショックタンパク質を含み、ただし、このオリゴマー化剤は、グルタルアルデヒドではない。他の実施形態では、このオリゴマー化剤は、ビス-ANSまたはSASDではない。特定の実施形態では、この方法は、医薬上許容される担体および精製した複合体を含む医薬組成物を治療有効量投与することを含み、前記複合体は、オリゴマー化している免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含み、(a)その熱ショックタンパク質は、オリゴマー化剤と共有結合することによってオリゴマー化されており、(b)その医薬組成物は注射器中に存在し、また(c)その抗原分子は、癌の腫瘍特異的もしくは腫瘍関連抗原または感染症の原因物質の抗原性を示す。ある実施形態では、熱ショックタンパク質は、gp96またはhsp90である。好ましい実施形態では、免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含む複合体は、細胞溶解物、好ましくは癌細胞または感染症原因物質の抗原性を示す物質に感染した細胞から単離する。別の好ましい実施形態では、この細胞は被験者から得る。

20

30

40

【0040】

別の実施形態では、本発明は、医薬組成物を製造する方法であって、(a)免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含む複合体とその複合体のオリゴマー化を引き起こすのに十分な量のオリゴマー化剤とを接触させること(ただし、このオリゴマー化剤は、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではない); ならびに(b)オリゴマー化している複合体と医薬上許容される担体とを合わせることを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、この方法は、(a)免疫学的活性熱ショックタンパク質および抗原分子を含む

50

複合体とその複合体のオリゴマー化を引き起こすのに十分な量のオリゴマー化剤とを接触させること(このオリゴマー化剤は、オリゴマー化剤と共有結合しており、ただし、このオリゴマー化剤は、ビス-ANS、グルタルアルデヒドまたはSASDではない); ならびに(b)オリゴマー化している複合体と医薬上許容される担体とを合わせることを含む。ある実施形態では、熱ショックタンパク質は、gp96またはhsp90である。好ましい実施形態では、熱ショックタンパク質および抗原分子は、複合体として細胞溶解物、好ましくは癌細胞または感染症原因物質の抗原性を示す物質に感染した細胞から単離する。

【0041】

4. 図面の簡単な説明

(後記参照のこと)

【発明を実施するための最良の形態】

【0042】

5. 発明の詳細な説明

一態様では、本明細書に記載の本発明は、熱ショックタンパク質および熱ショックタンパク質-抗原分子複合体または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体(「hsp-ペプチド複合体」または「hsp複合体」)の生物学的活性を検出および測定する方法を提供する。本発明の方法を使用して、疾患のある被験者の予後、および被験者の治療への応答を判定することができる。この方法を使用して、hsp-ペプチド複合体の生物学的活性を調節する治療薬をスクリーニングし、また生物学的活性が増加または減少した異なるhspを用いて形成した複合体をスクリーニングすることもできる。

【0043】

本発明は、gp96-ペプチド複合体の構造とその機能特性の間関係を理解するために実施した研究の一部に基づいている。本発明者らは、二量体gp96がATPアーゼ活性を有し、特異的なTリンパ球に対して抗原を再提示でき、またMCP-1および一酸化窒素(NO)の産生を誘導できることを実証している。より高分子量の凝集体は、本明細書に例示したように、熱処理によって生成でき、この形態の凝集したgp96は、4つの生物学的アッセイすべてにおいて不活性である。第6節で示したデータは、二量体gp96の減少(損失)に伴う抗原再提示、MCP-1産生およびNO産生の減少(損失)も示している。

【0044】

本発明者らの研究の結果から、ATPアーゼ活性はgp96に固有の機能であり; ATPアーゼ活性は二量体型のgp96に関係があり; 二量体gp96はATPアーゼ活性に必要であり; ATPアーゼ活性は、gp96の形態、例えば、変性または他の立体構造変化によって不活性であると考えられているgp96のより高分子量の凝集体に関係がないことが証明されている。これらの結果に基づき、本発明者らは、ATPアーゼ活性が、二量体gp96とATPアーゼ活性の相関ならびに二量体gp96と抗原再提示およびT細胞活性化の相関に基づく生物学的活性および安定性の適切で信頼できる尺度であると判定した。

【0045】

種々の疾患の治療および診断におけるhspおよびhsp-ペプチド複合体の有効性について実施されている研究が増加すると、hsp-ペプチド複合体の生物学的活性を迅速にかつ安価に測定する必要がある。本発明は、定量的で感受性のある、ATPアーゼ活性および/またはhsp-ペプチド複合体オリゴマーの存在に基づく生物学的活性を検出する方法を提供する。

【0046】

一実施形態では、本発明は、hspまたはhsp-ペプチド複合体のATPアーゼ活性を測定することに基づく、hspまたはhsp-ペプチド複合体の生物学的活性を評価する方法を提供する。ATPアーゼ活性の存在は、hspまたはhsp-ペプチド複合体が生物学的に活性であることを示し、ATPアーゼ活性の欠如は、hspまたはhsp-ペプチド複合体が生物学的に不活性であることを示すことになる。

【0047】

本明細書では、「生物学的活性」という用語は、免疫学的活性、例えば、抗原提示細胞

10

20

30

40

50

に対するペプチド抗原の提示(抗原再提示)およびT細胞活性化を含むが、それだけには限定されない。一実施形態では、生物学的活性という用語は、免疫学的活性に限られている。hsp-ペプチド複合体の免疫学的活性は、予防的および治療的用途におけるそれらの有用性に直接関係する。他の多くの生物学的活性は、当技術分野で公知であり、それだけには限らないが、サイトカイン、例えば、ヒトマクロファージ走化性タンパク質1(MCP-1)などの生物学的応答調節物質および一酸化窒素(NO)の産生の誘導; CD91(  $\alpha$ 2-マクログロブリン受容体、  $\alpha$ 2MR)および/またはCD36などの受容体の結合; 抗原分子の結合および放出; ならびに動物中の腫瘍の退縮、腫瘍がある動物の生存期間の延長および感染症の除去を引き起こす能力などを含むが、それだけには限定されない。生物学的活性は、in vivoおよび/またはin vitroで生じ、あるいは観察され得る。

10

**【0048】**

「hsp」という用語は、抗原分子と非共有結合していない熱ショックタンパク質を示す。「hsp-ペプチド複合体」という用語は、熱ショックタンパク質と非共有結合している抗原分子を含む複合体を示す。抗原分子は、抗原タンパク質またはペプチドであることが好ましい。本発明の実施に有用な、ストレスタンパク質と交換可能に呼ばれてもいる熱ショックタンパク質は、以下の基準を満たす任意の細胞タンパク質の中から選択することができる: (1)細胞がストレス刺激に曝されたときに、その細胞内濃度が増加するタンパク質である; (2)他のタンパク質またはペプチドと結合できる; さらに(3)アデノシン三リン酸(ATP)の存在下または低pH、例えば、1、2、3、4、5もしくは6で、結合したタンパク質またはペプチドを放出できる; あるいは上記の全特性を有する任意の細胞タンパク質と少なくとも35%の相同性を示すタンパク質である。hspおよびhsp-ペプチド複合体は、ヒトhspおよびhsp-ペプチド複合体であることが好ましい。

20

**【0049】**

hspは、それだけには限らないが、hsp90、hsp70およびhsp60を含むhspファミリーに分類されている。一実施形態では、hspおよびhsp-ペプチド複合体は、hsp70、hsp90、およびhsp60などの単一hspファミリーのメンバーを含む。ATPアーゼ活性を有することが実証されている種は、hsp90、gp96(grp94)、hsp104、hsp70およびhsp60を含むが、それだけには限定されない。ある実施形態では、grp94としても知られているgp96が好ましいhspであり、gp96-抗原分子複合体が本発明の好ましいhsp-ペプチド複合体である。

**【0050】**

多くの方法が、hspまたはhsp-ペプチド複合体のATPアーゼ活性の検出および/または測定に使用可能である。通常、こうした方法では、ATPの減少(損失)、ADPの増加、AMPの増加および/または無機リン酸の増加によって決定できる加水分解したATPの量を測定することによってATPアーゼ活性が測定される。非限定的な例には、生物発光、HPLCおよび[ $^{32}$ P]-標識ATPを伴う免疫親和性ストリッピング技術および薄層クロマトグラフィーがある。こうした方法の詳細は第5.2節に記載している。

30

**【0051】**

別の実施形態では、本発明は、オリゴマーhspまたはhsp-ペプチド複合体の存在および/または濃度の決定に基づくhspまたはhsp-ペプチド複合体の生物学的活性を評価する方法を提供する。好ましい実施形態では、オリゴマー構造は、gp96の場合に観察されるような二量体構造である。したがって、それだけには限らず、例示的な目的だけで、二量体または二量体化という用語を以下で使用する。試料中の二量体hspまたはhsp-ペプチド複合体の存在は、試料中のhspまたはhsp-ペプチド複合体が生物学的に活性であることを示し、二量体hspまたは二量体hsp-ペプチド複合体の欠如は、hspまたはhsp-ペプチド複合体の生物学的活性が低下したことを示すことになる。高次凝集体、モノマーおよび分解産物から二量体型を区別するには、hspまたはhsp-ペプチド複合体のサイズおよび/または形状を決定することによって実施することができる。本発明は、それだけには限らないが、サイズ排除クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーを含む一般的なクロマトグラフ技術; それだけには限らないが、一次元および二次元電気泳動ならびにキャピラリー電気泳動を含む一般的な電気泳動技術; 質量分析; 光散乱アッセイ; 分析用超遠心分離(A

40

50

UC); ならびにそれだけには限らないが、分子量カットオフフィルターを含むフィルターの使用を含むが、それだけには限定されない、サイズによって二量体型のhspを検出する方法を提供する。こうした方法の詳細は第5.3節に記載している。

【0052】

本発明はまた、タンパク質の特定の立体構造(すなわち、コンフォーメーション)に対する特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体の使用を含むが、それだけには限定されない、立体構造によって二量体型のhspを検出する方法を提供する。一実施形態には、hspのモノマーおよびオリゴマー立体構造に対する抗体の使用が含まれる。好ましい実施形態では、こうした抗体は、二量体型のhspおよび/またはhsp-ペプチド複合体以外のhspまたはhsp-ペプチド複合体の形態に結合しない。こうした方法の詳細は第5.10節に記載している。

10

【0053】

特定の実施形態では、hspまたはhsp-ペプチド複合体の生物学的活性を評価する方法は、ATPアーゼ活性の検出および/または測定、ならびに二量体hspもしくは二量体hsp-ペプチド複合体の存在および/または濃度の決定の両方を含む。

【0054】

本発明の方法には、応用分野がたくさんある。ある場合において、この方法は、hsp-ペプチド複合体の商業生産に使用することができる。本発明は、高価で時間のかかる細胞系生物学的アッセイの実施に代わる方法として、その生物学的活性に関するhsp-ペプチド複合体の品質を制御およびモニターする迅速で安価な手段を提供する。この方法の詳細は第5.5節に記載している。

20

【0055】

さらに別の実施形態では、本発明は、免疫成分を用いた疾患の診断、または被験者の癌もしくは感染症の予後を提供する方法を提供する。こうした方法の詳細は第5.6節に記載している。

【0056】

本発明はまた、hspまたはhsp-ペプチド複合体の生物学的活性を調節する治療薬についてのスクリーニングに使用することができる。こうした方法の詳細は第5.8節に記載している。

【0057】

さらに別の実施形態では、本発明の方法は、無修飾hspまたはhsp-ペプチド複合体と同様の生物学的活性を有する、hspおよびその複合体の変異体、断片、ならびに誘導体をスクリーニングするのに使用することができる。hspおよびその複合体の変異体、断片、ならびに誘導体の生物学的活性は、無修飾hspまたはhsp-ペプチド複合体とより高度な相関関係があることが好ましい。

30

【0058】

さらに別の実施形態では、第5.7節に記載のように、本発明は、hspもしくはhsp-ペプチド複合体と、hspもしくはhsp-ペプチド複合体のATPアーゼ活性を阻害または促進させ、かつ/または二量体構造のhspもしくはhsp-ペプチド複合体を破壊/不安定化または安定化させる化合物とを接触させることによって、hspもしくはhsp-ペプチド複合体の生物学的活性を調節する方法を提供する。

40

【0059】

別の態様では、本発明は、熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質を含む免疫学的活性複合体のオリゴマー化を促進するためにオリゴマー化剤を使用することに関する。好ましい実施形態では、このオリゴマー化剤は、gp96の二量体種またはその多量体の形成を促進することになる。特に、本発明は、免疫学的活性部分、例えば、オリゴマー化剤でオリゴマー化している熱ショックタンパク質を含む複合体の製剤を提供する。癌および感染症を予防および治療するための、また被験者中の免疫応答を誘発するための製剤の使用方法も提供される。本発明は、免疫治療部分の生物学的効力を増大させること; 特異的および/または代替受容体あるいは非受容体媒介事象によって抗原提示細胞へのワクチ

50

ン送達を向上させること；免疫治療部分の送達を向上させること；免疫治療部分のアジュバント能力を向上させること；あるいは第2の免疫治療/免疫学的活性部分を捕えて、それらの特異的受容体媒介取込みによって抗原提示細胞に送達することが望ましい状況など、様々な状況で有用である。

【0060】

本発明は、免疫学的活性部分、例えば、オリゴマー化剤でオリゴマー化している熱ショックタンパク質を含む複合体の組成物を提供する。この複合体はさらに、癌の抗原または感染症の原因物質の抗原性を示す1種または複数の抗原分子、好ましくはペプチドを含むことができる。好ましい実施形態では、本発明のオリゴマー化している熱ショックタンパク質およびhsp-抗原分子複合体は、ATPアーゼ活性を有する。特定の実施形態では、本発明のオリゴマー化している熱ショックタンパク質は、変性していない、例えば熱変性していないhspである。本明細書では、「オリゴマー」には、「二量体」、「三量体」および多量体を含むより高次の単位数が含まれる。特定の実施形態では、gp96の「オリゴマー」は、二量体または多数の二量体 (a multiplicity of dimers) である。

10

【0061】

本明細書では、複合体に関して、「精製した」という用語は、全タンパク質の少なくとも60重量%が複合体である複合体の調製物を意味する。一実施形態では、全タンパク質の少なくとも70重量%を意味する。別の実施形態では、全タンパク質の少なくとも80重量%を意味する。別の実施形態では、全タンパク質の少なくとも90重量%を意味する。別の実施形態では、全タンパク質の少なくとも95重量%を意味し、別の実施形態では、全タンパク質の少なくとも99重量%を意味する。本明細書では、熱ショックタンパク質に関して、「精製した」という用語は、全タンパク質の少なくとも60重量%がhspであるhspの調製物を意味する。一実施形態では、全タンパク質の少なくとも70重量%を意味する。別の実施形態では、全タンパク質の少なくとも80重量%を意味する。別の実施形態では、全タンパク質の少なくとも90重量%を意味する。別の実施形態では、全タンパク質の少なくとも95重量%を意味し、別の実施形態では、全タンパク質の少なくとも99重量%を意味する。いくつかの実施形態では、純度は、SDS-PAGEゲル上への出現によって分析された均一性を意味する。好ましい実施形態では、hspは、抗原分子、例えば、ペプチドと非共有結合している。

20

【0062】

本発明はまた、感染症または癌の治療または予防に有効な量の複合体、ならびに医薬上許容される担体を含む医薬組成物であって、前記複合体が、オリゴマー化剤でオリゴマー化している熱ショックタンパク質を含む、医薬組成物を提供する。この複合体はさらに、あるタイプの癌の抗原または感染症原因物質の抗原の抗原性を示す1種または複数の抗原分子、好ましくはペプチドを含むことができる。

30

【0063】

本明細書では、特に指示がなければ、「免疫学的活性hsp」という用語は、免疫応答、好ましくはhspと複合体を形成した抗原分子に対する免疫応答を調節、好ましくは刺激または増強するhspの能力を意味する。

【0064】

多くのオリゴマー化剤は、当技術分野で公知である。「オリゴマー化剤」という用語は、他の分子のオリゴマー化、例えば、熱ショックタンパク質のオリゴマー化を促進する化合物を意味する。オリゴマー化剤は、分子、例えば、熱ショックタンパク質と共有結合または非共有結合することができる。一実施形態では、このオリゴマー化剤は、2種以上の熱ショックタンパク質と共有結合し、それによって熱ショックタンパク質のオリゴマー化を引き起こすことができる。別の実施形態では、このオリゴマー化剤は、2種以上の熱ショックタンパク質と非共有結合し、それによって熱ショックタンパク質のオリゴマー化を引き起こすことができる。別の実施形態では、このオリゴマー化剤は、1種の熱ショックタンパク質分子と共有結合し、別の熱ショックタンパク質分子上の類似したまたは異なるオリゴマー化剤と非共有結合することによってオリゴマー化を促進することができる。あ

40

50

る実施形態では、結合した2つの熱ショックタンパク質は、同一のものである。好ましい実施形態では、オリゴマー化している熱ショックタンパク質は、抗原分子、例えば、ペプチドと非共有結合している。

【0065】

本明細書では、特に指示がなければ、「分子」、「複合体」、「熱ショックタンパク質」、「ストレスタンパク質」、「抗原分子」および「オリゴマー化剤」という用語は、単独で使用する場合、複数の分子も含み、言及した分子の集団を意味することもある。

【0066】

本発明のいくつかの実施形態では、熱ショックタンパク質は、癌の抗原または感染症の原因物質の抗原性を示す。本明細書では、「抗原性」および「免疫原性」という用語は、それぞれ抗体または主要組織適合抗原複合体(「MHC」)分子と結合し、免疫応答を生じさせる分子の能力を意味する。本明細書では、「あるタイプの癌」は、由来する組織、例えば、乳房、肺、卵巣の細胞型を意味する。一実施形態では、抗原分子は、感染症原因物質の抗原の抗原性を示す。別の実施形態では、抗原分子は、前記細胞型の非癌性細胞内でのその発現に対して癌細胞内で過剰発現された抗原の抗原性を示す。例えば、この抗原分子は、腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原であってよい。一実施形態では、腫瘍関連抗原は、正常細胞に対して腫瘍細胞中でより高いレベルで発現される抗原であり、腫瘍特異的抗原は、腫瘍細胞内だけで発現され、正常細胞では発現されない抗原である。

10

【0067】

本発明はさらに、各複合体がオリゴマー化剤でオリゴマー化している熱ショックタンパク質を含む、精製した複合体の集団を提供する。この複合体はさらに、あるタイプの癌の抗原または感染症原因物質の抗原の抗原性を示す1種または複数の抗原分子、例えば、ペプチドを含むことができる。一実施形態では、熱ショックタンパク質は、hsp70、hsp90、gp96、カルレティキュリン、hsp110、grp170、またはその組合せを含むが、それだけには限定されない。

20

【0068】

本発明は、癌または感染症原因物質に対して免疫原性である複合体を製造する方法であって、熱ショックタンパク質またはhsp-抗原分子複合体と、熱ショックタンパク質のオリゴマー化を促進するのに十分な量のオリゴマー化剤とを接触させることを含む方法を提供する。一実施形態では、オリゴマー化している複合体は、オリゴマー化剤と共有結合した熱ショックタンパク質を含む。別の実施形態では、抗原分子は、癌の抗原または感染症の原因物質の抗原性を示す。別の実施形態では、オリゴマー化された複合体は、免疫学的活性熱ショックタンパク質を含む。本発明はさらに、本明細書に記載の方法によって製造された組成物を提供する。特定の実施形態では、オリゴマー化剤はレクチンではない。

30

【0069】

一実施形態では、抗原分子は、in vivoでhspと複合体を形成しているペプチドであり、この複合体は細胞から単離することができる。あるいは、この複合体は、精製したhspおよび抗原分子の調製物からin vitroで生成することができる。別の実施形態では、癌または感染症原因物質の抗原は、天然源から精製することによって、化学合成または組換えによって、また本明細書に記載のものなどin vitroの手順によって得ることができる。

40

【0070】

一実施形態では、本発明は、免疫学的活性hspおよび抗原分子を含む複合体と該複合体のオリゴマー化を促進するのに十分な量のオリゴマー化剤とを接触させることによって、オリゴマー化している複合体を製造する方法を提供する。別の実施形態では、オリゴマー化している複合体は、まずhspとhspのオリゴマー化を促進するのに十分な量のオリゴマー化剤とを接触させることによって免疫学的活性hspをオリゴマー化し、オリゴマー化しているhspと所定の抗原分子とを接触させることによって調製する。

【0071】

別の実施形態では、本発明は、オリゴマー化している複合体を製造する方法であって、細胞から免疫学的活性hsp-抗原分子複合体を単離すること；そのhsp-抗原分子複合体から

50

内在性抗原分子、例えば、ペプチドを除去すること； hspと所定の外来性抗原分子、例えば、異なるペプチドとを接触させ、それによってそのhspが外来性抗原分子と複合体を形成すること； ならびに新しく形成した複合体と新しく形成した複合体のオリゴマー化を促進するのに十分な量のオリゴマー化剤とを接触させることを含む方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、オリゴマー化している複合体を製造する方法であって、細胞から免疫学的活性hsp-抗原分子複合体を単離すること； そのhsp-抗原分子複合体から内在性抗原分子、例えば、ペプチドを除去すること； hspとhspのオリゴマー化を促進するのに十分な量のオリゴマー化剤とを接触させること； ならびにオリゴマー化しているhspと所定の外来性抗原分子、例えば、異なるペプチドとを接触させ、それによってそのオリゴマー化しているhspが外来性抗原分子と複合体を形成することを含む方法を提供する。

10

**【0072】**

本発明はさらに、熱ショックタンパク質を含む複合体の免疫原性を増強する方法であって、オリゴマー化剤を複合体と共有結合または非共有結合させることを含む方法を提供する。一実施形態では、この複合体は、抗原分子と結合した熱ショックタンパク質を含む。

**【0073】**

本発明の組成物および方法は、様々な状況で使用することができる。例えば、本発明の組成物を用いて、癌または感染症の治療または予防が望まれる個体あるいは被験者中の免疫応答を誘発することができる。癌または感染症の治療または予防が望まれる個体あるいは被験者は、動物、好ましくは哺乳動物、ヒトではない霊長類、最も好ましくはヒトである。本明細書では、「動物」という用語には、伴侶動物(例えば、ネコおよびイヌ)、動物園動物、シカ、キツネおよびアライグマを含む野生動物、飼育動物、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、シチメンチョウ、カモ、ニワトリを含む家畜および家禽、ならびにげっ歯類が含まれるが、それだけには限定されない。

20

**【0074】**

本発明によれば、オリゴマー化している免疫学的活性複合体を被験者に投与した結果、被験者中で、所定の抗原源に特異的な抗原ペプチドに対して免疫応答が調節、例えば、誘発、刺激、増強され、かつ/または免疫応答が維持される。オリゴマー化している複合体は、単回投与、または頻回投与として投与してよい。免疫原性投与量は、異なる被験者および異なる治療的または予防的用途によって異なっていてよい。

**【0075】**

一実施形態では、本発明は、免疫原性量以下のワクチン組成物によって免疫応答を誘導する方法であって、オリゴマー化しないで使用する場合に免疫応答を誘導するのに不十分であるワクチン組成物の量による免疫応答の誘導が、オリゴマー化によって容易になる方法を提供する。

30

**【0076】**

免疫治療部分とオリゴマー化剤を接触させて免疫治療部分のオリゴマー化を促進させることによって、本発明を使用して免疫治療部分の生物学的活性を増大させることもできる。本明細書では、「免疫治療部分」という用語は、免疫治療複合体の一部である分子を意味する。本明細書では、「オリゴマー化」という用語は、ポリマーまたはポリマー中間体が形成されるプロセスを意味する。一実施形態では、免疫治療部分は、二量体または多数の二量体を形成する。別の実施形態では、免疫治療部分は、高次の種、例えば、サブユニットを3個以上含むオリゴマーを形成する。

40

**【0077】**

本発明を使用して、受容体媒介事象によって抗原提示細胞(APC)へのワクチンの取り込みを増大させることもできる。本発明を使用して、非受容体媒介事象によって抗原提示細胞へのワクチンの取り込みを増大させることもできる。例えば、熱ショックタンパク質結合抗原ペプチドは、それだけには限らないが、飲作用、食作用ならびに細胞表面成分との非特異的相互作用とその後の細胞膜を横断してのhsp-ペプチド複合体の挿入および/または移行を含む非受容体媒介事象により、抗原提示細胞によって取り込まれ得る。熱ショックタンパク質をオリゴマー化すると、このような取り込みを増大させることができる。

50

## 【0078】

さらに、本発明を使用して、免疫治療部分のアジュバント能力を向上させることができる。本明細書では、「アジュバント能力」という用語は、抗原と組み合わせると、例えば、炎症反応の誘導によって免疫応答が高まり、抗体形成細胞またはTリンパ球などの免疫学的活性細胞の局所流入をもたらす非抗原物質の能力を意味する。アジュバント能力を有する免疫治療部分は、少量の抗原に対して抗体またはTリンパ球の産生を増大させ、抗体産生またはT細胞活性化期間を延長するので、ワクチン調製時に治療的に使用することができる。免疫治療部分をオリゴマー化すると、それらのアジュバント能力を増大させることができる。本明細書では、この免疫治療部分は、ストレスタンパク質、例えば、熱ショックタンパク質を意味する。一実施形態では、この熱ショックタンパク質は、hsp70、hsp90、gp96、カルレティキュリン、hsp110、grp170またはその組合せである。 10

## 【0079】

さらに、本発明を使用して、熱ショックタンパク質などの免疫治療部分の抗原性または免疫原性を、例えば、そのオリゴマー化を促進するような十分量のオリゴマー化剤と接触させることによって、高めることができる。抗原性または免疫原性の向上は、第5.15節で述べたようないくつかの方法で実証することができる。好ましい実施形態では、抗原性または免疫原性の増強を示すアッセイには、例えば、第8節に記載のような抗原再提示アッセイが含まれるが、それだけには限定されない。

## 【0080】

本明細書では、「調節(modulate)」は、免疫治療部分の特性、例えば、抗原性または免疫原性の変化を意味する。一実施形態では、抗原性または免疫原性の増大、増強または刺激を意味する。別の実施形態では、抗原性または免疫原性の低減または抑制を意味する。したがって、本明細書では、「モジュレーター」は、別の化合物の特性を「調節」する化合物を意味する。 20

## 【0081】

本発明を使用して、免疫治療部分の送達を改善することもできる。

## 【0082】

本発明はさらに、第2の免疫治療部分を捕えて、前記部分を被験者中の受容体媒介取り込みによって抗原提示細胞に送達する方法であって、オリゴマー化剤の存在下で第1のタンパク質および第2のタンパク質を含む複合体の組成物を被験者に投与することを含む方法を提供する。この複合体はさらに、癌の抗原または感染症の原因物質の抗原性を示す1種または複数の分子、好ましくはペプチドを含むことができる。一実施形態では、第2のタンパク質は、第1のタンパク質と異なる。別の実施形態では、第1のタンパク質と結合している抗原分子は、抗原提示細胞によって取り込まれ得るが、第2のタンパク質と結合している抗原分子は、通常抗原提示細胞によって取り込まれない。第1のタンパク質が第2のタンパク質とオリゴマー化すると、第2のタンパク質と結合している抗原分子の抗原提示細胞による取り込みが可能になる。 30

## 【0083】

一実施形態では、第1および第2のタンパク質は、両方とも熱ショックタンパク質である。別の実施形態では、第1のタンパク質は、それだけには限らないが、hsp70、hsp90、gp96、カルレティキュリン、hsp110、grp170またはその組合せを含む熱ショックタンパク質であるが、第2のタンパク質は、熱ショックタンパク質ではない。別の実施形態では、第1のタンパク質は、熱ショックタンパク質ではないが、第2のタンパク質は熱ショックタンパク質である。一実施形態では、第1のタンパク質はさらに、癌の抗原または感染症原因物質の抗原の抗原性を示す抗原分子と結合している。別の実施形態では、第2のタンパク質はさらに、癌の抗原または感染症原因物質の抗原の抗原性を示す抗原分子と結合している。 40

## 【0084】

本発明はさらに、癌または感染症を治療または予防する方法であって、本発明の組成物を被験者に投与することを含む方法を提供する。一実施形態では、この組成物は、熱シ 50

ックタンパク質と、前記癌の抗原または前記感染症の原因物質の抗原性を示す抗原分子と、オリゴマー化剤とを含む複合体を含む。

【0085】

別の実施形態では、この組成物は、上記の複合体および医薬上許容される担体を含む医薬組成物である。別の実施形態では、上記の複合体および医薬上許容される担体を含む医薬組成物は、容器、例えば、バイアルまたは注射器中に存在する。

【0086】

さらに別の実施形態では、あるタイプの癌または感染症を治療または予防する方法は、(a)熱ショックタンパク質と、オリゴマー化剤と、癌の抗原または感染症原因物質の抗原の抗原性を示す第1の抗原分子とからなる1種または複数の複合体を被験者に投与すること、ならびに(b)複合体の投与前、投与時、または投与後に、オリゴマー化剤と、前記癌の第2の抗原または前記感染症の原因物質の抗原性を示す第2の抗原分子を結合している熱ショックタンパク質の感作量の第2の複合体を用いて、*in vitro*で感作した抗原提示細胞を含む組成物を被験者に投与することを含む。APCは、それだけには限らないが、マクロファージ、樹状細胞、Bリンパ球、およびその組合せを含む当技術分野で公知の抗原提示細胞のうちから選択することができ、好ましくはマクロファージである。一実施形態では、第1の複合体は、APCを感作するのに用いた第2の複合体と同一である。別の実施形態では、第1の複合体は、APCを感作するのに用いた第2の複合体と異なる。APCおよび本発明の組成物を同時に投与する特定の実施形態では、APCおよび本発明の組成物は、同じ組成物(APCおよび複合体を含む)または異なる組成物中に存在してよい。本発明による養子免疫療法(感作されたAPCを用いる)では、オリゴマー化している分子複合体とインキュベーションすることによって免疫抗原提示細胞の活性化が可能になる。腫瘍または感染因子に対する*in vitro*の反応性は、細胞を*in vivo*で使用する前に測定することができる。この*in vitro*におけるブーストとそれに続くクローン選択および/または増殖、ならびに患者への投与は、有用な治療および/または予防的戦略である。

【0087】

一実施形態では、複合体、例えば、癌の抗原または感染症の原因物質の抗原性を示すペプチドと複合体を形成した熱ショックタンパク質の免疫学的活性部分は、被験者の自己由来、すなわち、被験者自身の細胞から単離したものである(例えば、癌の治療が望まれる場合に患者の腫瘍生検から調製する)。あるいは、複合体は、本発明の分子複合体の組成物を投与する被験者に対して同種異系であってもよい。一実施形態では、複合体は*in vitro*で、例えば、組換えによって熱ショックタンパク質を発現する培養細胞から調製する。

【0088】

熱ショックタンパク質と複合体を形成して特異的な複合体を生成するのに使用する外来性抗原および断片ならびにその誘導体は、当技術分野で公知のものならびに当技術分野で公知の標準的な免疫アッセイを用いて抗体またはMHC分子と結合する能力または免疫応答を生成する能力によって容易に同定されるもののうちから選択することができる。熱ショックタンパク質および抗原分子の特異的な複合体は、患者の癌もしくは前癌性組織または癌細胞系から単離することができ、あるいは*in vitro*で生成することができる(外来性抗原を抗原分子として使用する実施形態でも同様に必要である)。

【0089】

本発明はさらに、本発明の複合体を含む製剤または組成物を含むキットを提供する。本発明はまた、免疫学的活性熱ショックタンパク質またはその複合体、およびオリゴマー化剤を含む容器を含むキットを提供する。場合により、本発明の方法によってオリゴマー化している複合体を調製するための説明書をキットに含めることができる。

【0090】

特定の実施形態では、本発明は、原発性および転移性新生物疾患を予防および治療するための方法ならびに組成物に関する。

【0091】

本発明の治療養生法および医薬組成物は、追加の免疫応答熱ショックタンパク質、治療

薬、またはそれだけには限らないが、サイトカイン、化学療法薬、免疫療法薬、抗血管形成剤、ホルモン、抗体、ポリヌクレオチド、放射線および光力学的治療薬、抗生物質、抗ウイルス薬、抗原虫化合物および抗真菌化合物を含む生物学的応答改質剤と一緒に使用することができる。別の実施形態では、本発明の組成物を、放射線治療あるいは癌を治療するための1種または複数の化学療法薬と一緒に投与する。別の実施形態では、本発明の組成物を、感染症を治療するための抗菌薬、抗ウイルス薬または抗真菌薬と一緒に投与する。

#### 【0092】

癌治療に加えて、本発明の組成物は、例えば、家族歴のために癌に罹患しやすい被験者または環境要因によって癌への高いリスクがある被験者において種々の癌の予防に利用することができる。

10

#### 【0093】

本発明によれば、特定の治療養生法、医薬組成物、およびキットも提供される。

#### 【0094】

##### 5.1 熱ショックタンパク質調製物

ストレスタンパク質と交換可能に呼ばれてもいる本発明の実施に有用な熱ショックタンパク質は、以下の基準を満たす任意の細胞タンパク質の中から選択することができる：(1)細胞がストレス刺激に曝されたときに、その細胞内濃度が増加するタンパク質である；(2)他のタンパク質またはペプチドを結合できる；さらに(3)アデノシン三リン酸(ATP)の存在下または低pH、例えば、1、2、3、4、5もしくは6で、結合したタンパク質またはペプチドを放出できる；あるいは上記の全特性を有する任意の細胞タンパク質と少なくとも35%の相同性を示すタンパク質である。

20

#### 【0095】

非ワクチン治療様式の投与と併用してhsp-ペプチド複合体を使用する場合、ペプチドが症状に対して抗原性または適切であることが好ましい。特に好ましい実施形態では、特定タイプの癌にかかっている被験者に投与した治療様式の治療結果が、ペプチドがそのタイプの癌の抗原の抗原性を示すhsp-ペプチド複合体の投与によって改善されることが意図されている。

#### 【0096】

本発明では、hsp調製物は、それだけには限らないが、結合していないhsp70、hsp90、gp96、カルレティキュリン、hsp110もしくはgrp170またはペプチドと複合体を形成しているその非共有結合性もしくは共有結合性複合体を含むことができる。

30

#### 【0097】

一実施形態では、ペプチドとhsp70、hsp90、gp96、カルレティキュリン、hsp110またはgrp170との共有結合性または非共有結合性複合体は、癌患者から得た腫瘍細胞から手術後に調製および精製して、本発明の組成物中の特異的な複合体として使用することができる。

#### 【0098】

本明細書に記載の方法によれば、hspまたはMHC抗原と内因的に複合体を形成している免疫原性または抗原性ペプチドは、特異的な抗原分子として使用することができる。例えば、異なる腫瘍抗原(例えば、チロシナーゼ、gp100、メラニン-A、gp75、ムチンなど)ならびにそれだけには限らないが、免疫不全ウイルスI型(HIV-I)、ヒト免疫不全ウイルスII型(HIV-II)、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、インフルエンザ、水痘、アデノウイルス、単純疱疹I型(HSV-I)、単純疱疹II型(HSV-II)、牛痘、ライノウイルス、エコーウイルス、ロタウイルス、呼吸系発疹ウイルス、乳頭腫ウイルス、パポバウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス、アルボウイルス、ハンタウイルス、コクサッキーウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルスおよびポリオウイルスのタンパク質を含むウイルスタンパク質に対する細胞障害性T細胞応答を刺激するこうしたペプチドを調製することができる。抗原分子がin vivoでhspと複合体を形成しているペプチドである実施形態では、複合体は、細胞から単離でき、あるいはhspおよび抗原分子それぞれの精製した

40

50

調製物から *in vitro* で生成することができる。いくつかの実施形態では、抗原分子は、外来性抗原および断片ならびにその誘導体である。

【0099】

別の実施形態では、癌の抗原(例えば、腫瘍)または感染因子(例えば、ウィルス抗原、細菌抗原など)は、天然源から精製することによって、化学合成または組換えによって、また hsp と複合体を形成する下記のものなど *in vitro* の手順によって得ることができる。

【0100】

使用すべき特異的な hsp-抗原分子複合体が細胞内で *in vivo* で生成される複合体である実施形態では、下記のような例示的な精製手順を使用することができる。あるいは、*in vitro* で hsp と複合体を形成することによって抗原分子を使用しようと望む実施形態では、hsp は、ATP の存在下または低 pH、例えば、1、2、3、4、5 もしくは 6 で内在性 hsp-ペプチド複合体から精製して、そのように使用することができる。hsp は、化学合成または組換えによって生成することもできる。本明細書に記載のプロトコルを使用して、任意の真核細胞、例えば、あらかじめ選択された細胞内病原体、腫瘍細胞もしくは腫瘍細胞系で感染させた、組織、単離細胞または不死化した真核生物細胞系から特異的な hsp-ペプチド複合体または hsp 単独を単離することができる。

【0101】

5.1.1 hsp-ペプチド複合体の供給源

hsp-ペプチド複合体を収集する供給源は、得られた hsp-ペプチド複合体の所定の使用に基づいて選択することができる。hsp-ペプチド複合体はあらゆる細胞に見られるので、任意の組織または細胞試料を供給源として使用することができる。hsp-ペプチド複合体はまた、壊死性細胞死によって細胞から細胞の周囲に放出され得る；したがって、体液、分泌液、培養上清、発酵培地などが hsp-ペプチド複合体を収集する供給源になり得る。

【0102】

hsp-ペプチド複合体は、癌細胞または感染細胞から収集することができる。感染細胞および癌細胞は、当技術分野で公知の方法によって、適宜 *in vitro* で非癌細胞または未感染細胞(例えば、正常細胞)から調製することができる。(例えば、その全体が参照によって本明細書に取り込まれている米国特許第 6,017,540 号を参照のこと。)

感染症の治療および予防に関する用途の場合、抗原 hsp-ペプチド複合体は、細胞内病原体で感染または形質転換させた、組織全体、単離細胞、および不死化した細胞系を含む任意の感染細胞から収集することができる。抗原 hsp-ペプチド複合体は、感染因子、特に細胞内病原体に感染した細胞から収集することができる。細胞内病原体に感染した細胞から単離し、次いで哺乳動物に投与した抗原 hsp-ペプチド複合体を含むワクチンは、同じ病原体に感染した細胞に対する細胞性免疫応答を有効に刺激できることが実証されている。特に、免疫応答は、細胞内病原体を含有する細胞を標的化し破壊する細胞障害性 T 細胞カスケードによって媒介される。細胞内病原体に限られていないが、本明細書では、細胞内病原体は、それだけには限らないが、ウィルス、細菌、真菌、原生動物および細胞内寄生虫を含む、哺乳動物細胞内で存在でき、哺乳動物の疾患を引き起こすことができる任意の生きている生物を含む。

【0103】

hsp-ペプチド複合体は、それだけには限らないが、A 型肝炎、B 型肝炎、C 型肝炎、インフルエンザ、水痘、アデノウィルス、HSV-I、HSV-II、牛痘、ライノウィルス、エコーウィルス、ロタウィルス、呼吸系発疹ウィルス、乳頭腫ウィルス、パポバウィルス、サイトメガロウィルス、エキノウィルス、アルポウィルス、ハンタウィルス、コクサッキーウィルス、流行性耳下腺炎ウィルス、麻疹ウィルス、風疹ウィルス、ポリオウィルス、HIV-I、および HIV-II を含むウィルスに感染した細胞から収集することができる。さらに、抗原 hsp-ペプチド複合体は、ウィルス遺伝子を用いてトランスフェクトした細胞から収集することもできる。

【0104】

hsp-ペプチド複合体は、それだけには限らないが、結核、淋病、腸チフス、髄膜炎、骨

髄炎、髄膜炎菌敗血症、子宮内膜炎、結膜炎、腹膜炎、腎盂腎炎、咽頭炎、敗血症性関節炎、蜂巣炎、喉頭蓋炎、卵管炎、中耳炎、志賀赤痢、胃腸炎などを引き起こす細菌に感染した細胞を含む細菌感染細胞から収集することができる。好ましい実施形態では、hspまたはhsp-ペプチド複合体は、それだけには限らないが、マイコバクテリア、リケッチア、マイコプラズマ、ナイセリアおよびレジオネラを含む細胞内細菌に感染した細胞から収集することもできる。

#### 【0105】

hsp-ペプチド複合体は、それだけには限らないが、リーシュマニア、コクジジア(Kokzidiosa)、およびトリパノソーマを含む細胞内原生動物に感染した細胞から収集することもできる。さらに、hspまたはhsp-ペプチド複合体は、それだけには限らないが、クラミジアおよびリケッチアを含む細胞内寄生虫に感染した細胞から収集することができる。hsp-ペプチド複合体は、細菌に感染した細胞系から収集することもできる。

10

#### 【0106】

複数の部位に転移した癌を含む癌から単離した組織、または細胞は、この方法でhspまたはhsp-ペプチド複合体の供給源として使用することができる。例えば、血液、リンパ液または他の体液中を循環している白血病細胞も使用でき、充実性腫瘍組織(例えば、生検からの原発性組織)を使用することができる。

#### 【0107】

hsp-ペプチド複合体は、それだけには限らないが、例えば、間葉起源の腫瘍(肉腫)、すなわち、線維肉腫；粘液肉腫；脂肪肉腫；軟骨肉腫；骨肉腫；血管肉腫；内皮肉腫；リンパ管肉腫；滑膜肉腫；中皮肉腫；ユーイング腫瘍；骨髄性白血病；単球性白血病；悪性リンパ腫；リンパ性白血病；プラズマ細胞腫；平滑筋肉腫および横紋筋肉腫を含む腫瘍細胞から収集することができる。さらに、この方法は、hspまたはhsp-ペプチド複合体を上皮起源の腫瘍(癌)、すなわち、扁平上皮細胞または表皮癌；基底細胞癌；汗腺癌；脂腺癌；腺癌；乳頭癌；乳頭腺癌；嚢胞腺癌；髄様癌；未分化癌(単純癌)；気管支原性癌；気管支癌；黒色腫；腎細胞癌；肝細胞癌；胆道癌；乳頭癌；移行上皮癌；扁平上皮癌；絨毛癌；精上皮腫；胎児性癌 悪性奇形腫および奇形癌由来の腫瘍細胞から収集するのに使用できることが意図されている。hspまたはhsp-ペプチド複合体は、白血病、例えば、急性リンパ性白血病および急性骨髄性白血病(骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性および赤白血病)；慢性白血病(慢性骨髄性(顆粒球性)白血病および慢性リンパ性白血病)；ならびに真性多血症、リンパ腫(ホジキン病および非ホジキン病)、多発性骨髄腫、ワルデンストレーンマクログロブリン血症、および重鎖病の細胞から収集することもできる。hsp-ペプチド複合体は、発癌剤または放射線によって誘発される腫瘍由来の腫瘍細胞から収集することができる。発癌剤には、炭化水素および発癌性空気など喫煙に関連する発癌物質、食物、化粧品または他の汚染物質がある。hsp-ペプチド複合体は、腫瘍細胞系から収集することができる。

20

30

#### 【0108】

疾患の診断、予後あるいは治療、特に免疫療法またはワクチンへの応答の評価に関する用途の場合、hsp-ペプチド複合体は、体液、血液、リンパ液などから収集することができる。

40

#### 【0109】

##### 5.1.2 hsp70-ペプチド複合体の調製および精製

hsp70-ペプチド複合体の精製は、これまでに記載されている。例えば、Udonoら、1993、J. Exp. Med. 178: 1391~1396を参照のこと。限定するものではなく例として提供する使用可能な手順は、以下の通りである：

最初に、腫瘍細胞を、その3倍の体積量の30mM炭酸水素ナトリウムpH7.5、および1mMフッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)からなる1×溶解緩衝液に懸濁する。次いで、このペレットを、顕微鏡試験で確認して99%超の細胞が溶解するまで氷上で音波破碎する。音波破碎の代わりに、機械的剪断によって細胞を溶解してもよく、この手法では、通常細胞を30mM炭酸水素ナトリウムpH7.5、1mM PMSF中に再懸濁させ、氷上で20分間インキュベ-

50

トし、次いでダウンスホモジナイザー中で95%超の細胞が溶解するまでホモジナイズする。

#### 【0110】

次いで、溶解産物を1,000gで10分間遠心分離して破壊されていない細胞、核および他の細胞破壊片を除去する。得られた上清を100,000gで90分間再度遠心分離し、上清を収集し、次いで2mM  $\text{Ca}^{2+}$  および2mM  $\text{Mg}^{2+}$  を含有するリン酸緩衝食塩水(PBS)で平衡化したCon Aセファロースと混合する。細胞を機械的剪断によって溶解した場合、その上清は、同体積の2×溶解緩衝液で希釈してからCon Aセファロースと混合する。次いで上清をCon Aセファロースと4 で2~3時間結合させる。結合しなかった物質を収集し、10mMトリス-酢酸pH7.5、0.1mM EDTA、10mM NaCl、1mM PMSFに対して36時間透析する(3回、各回100倍体積量ずつ)。次いで透析物を17,000rpmで20分間遠心分離する(ソールバルSS34ローター)。次いで得られた上清を収集し、20mMトリス-酢酸pH7.5、20mM NaCl、0.1mM EDTAおよび15mM 2-メルカプトエタノール中で平衡化したMono Q FPLCカラムに加える。次いで、このカラムに20mM~500mM NaCl勾配を生じさせ、次いで、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によって溶出した画分を分画し、適切な抗hsp70抗体(StressGen製クローンN27F3-4など)を用いて免疫プロット法によって特徴付ける。

10

#### 【0111】

抗hsp70抗体に強く免疫反応する分画をプールし、hsp70-ペプチド複合体を硫酸アンモニウム、特に50%~70%硫酸アンモニウム画分で沈殿させる。次いで、得られた沈殿物を17,000rpmでの遠心分離(SS34ソールバルローター)によって収集し、70%硫酸アンモニウムで洗浄する。次いで、洗浄した沈殿物を可溶化させ、任意の残余硫酸アンモニウムをセファデックス(登録商標)G25カラム(Pharmacia)上でのゲルろ過によって除去する。必要に応じて、このように得られたhsp70調製物を、上記のようにMono Q FPLCカラムに通して再精製してもよい。

20

#### 【0112】

この方法を用いて、hsp70-ペプチド複合体を見かけ上均一になるまで精製することができる。通常、1gの細胞/組織からhsp70-ペプチド複合体を1mg精製することができる。

#### 【0113】

hsp70-ペプチド複合体を精製する改善した方法は、溶解産物中のhsp70がADPまたは非加水分解性ATP類似体と結合できるように、細胞タンパク質と、固体支持体に付着させたADPまたはATPの非加水分解性類似体とを接触させること、ならびに結合したhsp70を溶出することを含む。好ましい方法では、固体基層に付着させたADP(例えば、ADP-アガロース)を用いたカラムクロマトグラフィーを使用する。例えば、Peng、1997、J. Immuno. Meth. 204: 13~21を参照のこと。得られたhsp70調製物は、純度がより高い。hsp70の収率も約10倍以上著しく増加する。あるいは、ADPの代わりにATPの非加水分解性類似体を用いたクロマトグラフィーは、hsp70-ペプチド複合体の精製に使用することができる。限定するものではなく例としてのADP-アガロースクロマトグラフィーによるhsp70-ペプチド複合体の精製は、以下のように実施することができる：

30

Meth A肉腫細胞(細胞5億個)を低張緩衝液中でホモジナイズし、その溶解産物を4 で100,000gで90分間遠心分離する。この上清をADP-アガロースカラムに載置する。カラムを緩衝液で洗浄し、3mM ADP 5カラム体積で溶出する。hsp70-ペプチド複合体は、溶出する合計15画分のうち画分2~10中に溶出する。溶出した画分をSDS-PAGEによって分析する。この方法を用いて、hsp70-ペプチド複合体を見かけ上均一になるまで精製することができる。

40

#### 【0114】

##### 5.1.3 hsp90-ペプチド複合体の調製および精製

限定するものではなく例として提供する使用可能な手順は、以下の通りである：

最初に、腫瘍細胞を、その3倍の体積量の30mM炭酸水素ナトリウムpH7.5、および1mMフッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)からなる1×溶解緩衝液に懸濁する。次いで、このペレットを、顕微鏡試験で確認して99%超の細胞が溶解するまで氷上で音波破碎する。音

50

波破碎の代わりに、機械的剪断によって細胞を溶解でき、この手法では、通常、細胞を30 mM炭酸水素ナトリウムpH7.5、1mM PMSF中に再懸濁させ、氷上で20分間インキュベートし、次いでダウンスホモジナイザー中で95%超の細胞が溶解するまでホモジナイズする。

#### 【0115】

次いで、溶解産物を1,000gで10分間遠心分離して破壊されていない細胞、核および他の細胞破壊片を除去する。得られた上清を100,000gで90分間再度遠心分離し、上清を収集し、次いで2mM  $\text{Ca}^{2+}$  および2mM  $\text{Mg}^{2+}$  を含有するPBSで平衡化したCon Aセファロースと混合する。細胞を機械的剪断によって溶解した場合、その上清は、同体積の2×溶解緩衝液で希釈してからCon Aセファロースと混合する。次いで上清をCon Aセファロースと4 で2~3時間結合させる。結合しなかった物質を収集し、pH 7.4、1.0mM EDTA、250mM NaCl、1mM PMSFに対して36時間透析する(3回、各回100倍体積量ずつ)。次いで透析物を17,000rpmで20分間遠心分離する(ソーバルSS34ローター)。次いで得られた上清を収集し、透析緩衝液で平衡化したMono Q FPLCカラムに載置する。次いで、タンパク質を200mM~600mM NaClの塩勾配で溶出する。

10

#### 【0116】

溶出した画分をSDS-PAGEによって分画し、3G3(Affinity Bioreagents)などの抗hsp90抗体を用いて免疫プロット法によってhsp90-ペプチド複合体を含む画分を同定する。この方法を用いて、hsp90-ペプチド複合体を見かけ上均一になるまで精製することができる。通常、1gの細胞/組織からhsp90-ペプチド複合体を150~200 $\mu$ g精製することができる。

#### 【0117】

##### 5.1.4 gp96-ペプチド複合体の調製および精製

限定するものではなく例として提供する使用可能な手順は、以下の通りである：

腫瘍のペレットを、その3倍の体積量の30mM炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH7.5)および1mM PMSFからなる緩衝液に再懸濁し、細胞を氷上で20分間膨潤させる。次いで、この細胞ペレットを氷上でダウンスホモジナイザー(各細胞型によってホモジナイザーの適切なクリアランスは異なるはずである)中で95%超の細胞が溶解するまでホモジナイズする。

20

#### 【0118】

溶解産物1,000gで10分間遠心分離して破壊されていない細胞、核および他の細胞破壊片を除去する。次いで、この遠心分離ステップで得られた上清を100,000gで90分間再度遠心分離する。gp96-ペプチド複合体は100,000ペレットまたは上清のいずれかから精製することができる。

30

#### 【0119】

上清から精製する場合、上清を同体積の2×溶解緩衝液で希釈し、上清を2mM  $\text{Ca}^{2+}$  および2mM  $\text{Mg}^{2+}$  を含有するPBSで平衡化したCon Aセファロースと4 で2~3時間混合する。次いで、このスラリーをカラムに充填し、 $\text{OD}_{280}$  がベースラインまで低下するまで1×溶解緩衝液で洗浄する。次いで、カラムを1/3カラム床体積の10%  $\alpha$ -メチルマンノシド( $\alpha$ -MM)を溶解させた2mM  $\text{Ca}^{2+}$  および2mM  $\text{Mg}^{2+}$  を含有するPBS溶液で洗浄し、カラムをパラフィルム片で密閉し、37 で15分間インキュベートする。次いで、カラムを室温まで冷却し、カラムの底からパラフィルムを除去する。5カラム体積の  $\alpha$ -MM緩衝液をカラムに載置し、溶出液をSDS-PAGEで分析する。通常、得られた物質は約60~95%の純度であるが、これは使用した細胞型および組織対溶解緩衝液の比によって決まる。次いで、この試料を、5mMリン酸ナトリウムpH7を含有する緩衝液で平衡化したMono Q FPLCカラム(Pharmacia)に載置する。次いで、タンパク質は、0~1M NaCl勾配を有するカラムから溶出し、gp96画分は、400mM~550mM NaClで溶出する。

40

#### 【0120】

しかし、この手順は、単独でまたは組み合わせて使用する2つの追加ステップによって修正を加えて、見かけ上均一なgp96-ペプチド複合体を一貫して生成することができる。一方の任意選択のステップは、Con A精製ステップの前に硫酸アンモニウム沈殿を伴うが、もう一方の任意選択のステップは、Mono Q FPLCステップの代わりにCon A精製ステップの後にDEAE-セファロース精製を伴う。

50

## 【0121】

例として以下のように記載する第1の任意選択のステップでは、100,000g遠心分離ステップで得られた上清は、硫酸アンモニウムを加えることによって最終濃度を50%硫酸アンモニウムにする。氷水の入ったトレイ中に置かれたビーカー中の溶液を穏やかに攪拌しながら、硫酸アンモニウムをゆっくり加える。この溶液を4 で約1/2~12時間攪拌し、得られた溶液を6,000rpmで遠心分離する(ソバルSS34ローター)。このステップで得られた上清を取り出し、硫酸アンモニウム溶液を加えることによって70%硫酸アンモニウム飽和にし、6,000rpmで遠心分離する(ソバルSS34ローター)。このステップで得られたペレットを収集し、70%硫酸アンモニウムを含有するPBS中に懸濁させてペレットをすすぐ。この混合物を6,000rpmで遠心分離し(ソバルSS34ローター)、ペレットを2mM  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  を含むPBS中に溶解する。溶解しなかった物質を短時間の15,000rpmでの遠心分離(ソバルSS34ローター)で除去する。次いで、溶液をCon Aセファロースと混合し、既に述べた通りの手順に従う。

## 【0122】

例として以下のように記載する第2の任意選択のステップでは、Con Aカラムから溶出したgp96含有画分をプールし、透析によって、好ましくはセファデックスG25カラム上での緩衝液交換によって、緩衝液を5mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7、300mM NaClに交換する。緩衝液交換の後、溶液を、あらかじめ5mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7、300mM NaClで平衡化したDEAE-セファロースと混合する。タンパク質溶液とビーズを1時間穏やかに混合し、カラム中に注ぐ。次いで、280nmにおける吸光度がベースラインまで低下するまでカラムを5mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7、300mM NaClで洗浄する。次いで、結合したタンパク質を、その5倍の体積量の5mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7、700mM NaClを用いてカラムから溶出する。タンパク質含有画分をプールし、5mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7で希釈して、175mMまで塩濃度を低下させる。次いで、得られた物質を、5mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7で平衡化したMono Q FPLCカラム(Pharmacia)に加え、前述したようにMono Q FPLCカラム(Pharmacia)に結合するタンパク質を溶出させる。

## 【0123】

しかし、当業者は、ルーチンな実験から、第2の任意選択のステップを精製プロトコルに取り入れることの利点を評価できることが理解されている。さらに、それぞれの任意選択ステップを加えることの利点が、出発物質の供給源によって決まることも理解されている。

## 【0124】

gp96画分を100,000gペレットから単離する場合、ペレットを、その5倍の体積量の1%デオキシコール酸ナトリウムまたは1%オキシルグルコピラノシドのいずれかを含有する(しかし  $\text{Mg}^{2+}$  および  $\text{Ca}^{2+}$  を含まない)PBS中に懸濁し、氷上で1時間インキュベートする。この懸濁液を20,000gで30分間遠心分離し、得られた上清を、数回の外液交換を含むPBS(やはり  $\text{Mg}^{2+}$  および  $\text{Ca}^{2+}$  を含まない)に対する透析を行って、洗浄剤を除去する。透析物を100,000gで90分間遠心分離し、上清を収集し、上清にカルシウムおよびマグネシウムを加えて、それぞれ2mMの最終濃度にする。次いで、この試料を未改変のまたは改変した方法によって精製して、gp96-ペプチド複合体を100,000g上清から単離する。上記を参照のこと。

## 【0125】

この手順を用いて、gp96-ペプチド複合体を見かけ上均一になるまで精製することができる。1gの細胞/組織からgp96を約10~20  $\mu\text{g}$  単離することができる。

## 【0126】

gp96-ペプチド複合体からのhspの分離は、ATPの存在下または低pHで行うことができる。これらの2つの方法を用いて、gp96-ペプチド複合体からペプチドを溶出することができる。最初の手法は、ATPの存在下でgp96-ペプチド複合体調製物をインキュベートすることを含む。もう一方の手法は、低pH緩衝液中でgp96-ペプチド複合体調製物をインキュベートすることを含む。これらの方法および当技術分野で公知の任意の他の方法を適用して、

hsp-ペプチド複合体からhspおよびペプチドを分離することができる。

【0127】

5.1.5 hsp110-ペプチド複合体の調製および精製

限定するものではなく例として提供する、Wangら、2001、J. Immunol. 166(1): 490~7によって記載されている使用可能な手順は、以下の通りである：

細胞または組織、例えば、腫瘍細胞組織のペレット(40~60ml)を、その5倍の体積量の低張緩衝液(30mM炭酸水素ナトリウム、pH7.2、およびプロテアーゼ阻害剤)中でダウンスホモジネーションによってホモジナイズする。この溶解産物を4,500×g、次いで100,000×gで2時間遠心分離する。細胞または組織が肝臓由来の場合、得られた上清をまずブルーセファロースカラム(Pharmacia)に加えてアルブミンを除く。あるいは、得られた上清を、あらかじめ結合緩衝液(20mMトリス-HCl、pH7.5; 100mM NaCl; 1mM MgCl<sub>2</sub>; 1mM CaCl<sub>2</sub>; 1mM MnCl<sub>2</sub>; および15mM 2-ME)で平衡化したCon Aセファロースカラム(Pharmacia Biotech、米国ニュージャージー州Piscataway)に載置する。結合したタンパク質は、15% -D-ο-メチルマンノシド(Sigma、米国ミズーリ州St. Louis)含有結合緩衝液で溶出する。

10

【0128】

Con Aセファロースに結合していない物質はまず、20mMトリス-HCl、pH7.5; 100mM NaCl; および15mM 2-MEの溶液に対して透析し、次いでDEAE-セファロースカラムに載置し、100~500mM NaClの塩勾配によって溶出する。hsp110を含有している画分を集め、透析し、20mMトリス-HCl、pH7.5; 200mM NaCl; および15mM 2-MEで平衡化したMono Q(Pharmacia)10/10カラムに導入する。結合したタンパク質は、200~500mM NaCl勾配で溶出する。Wangら、1999、J. Immunol. 162: 3378によって記載されているように、画分をSDS-PAGEによって分析し、続いてhsp110に対するAbを用いた免疫プロット法を行う。プールしたhsp110を含有する画分をセントリプラス(Amicon、米国マサチューセッツ集Beverly)によって濃縮し、スーパーロース12カラム(Pharmacia)に載置する。タンパク質を流速0.2ml/分で40mMトリス-HCl、pH8.0; 150mM NaCl; および15mM 2-MEによって溶出する。

20

【0129】

5.1.6 grp170-ペプチド複合体の調製および精製

限定するものではなく例として提供する、Wangら、2001、J. Immunol. 166(1): 490~7によって記載されている使用可能な手順は、以下の通りである：

細胞または組織、例えば、腫瘍細胞組織のペレット(40~60ml)を、その5倍の体積量の低張緩衝液(30mM炭酸水素ナトリウム、pH7.2、およびプロテアーゼ阻害剤)中でダウンスホモジネーションによってホモジナイズする。この溶解産物を4,500×g、次いで100,000×gで2時間遠心分離する。細胞または組織が肝臓由来の場合、得られた上清をまずブルーセファロースカラム(Pharmacia)に載置してアルブミンを除く。あるいは、得られた上清を、あらかじめ結合緩衝液(20mMトリス-HCl、pH7.5; 100mM NaCl; 1mM MgCl<sub>2</sub>; 1mM CaCl<sub>2</sub>; 1mM MnCl<sub>2</sub>; および15mM 2-ME)で平衡化したCon Aセファロースカラム(Pharmacia Biotech、米国ニュージャージー州Piscataway)に加える。結合したタンパク質は、15% -D-ο-メチルマンノシド(Sigma、米国ミズーリ州St. Louis)含有結合緩衝液で溶出する。

30

【0130】

Con Aセファロースに結合した物質はまず、20mMトリス-HCl、pH7.5、および150mM NaClに対して透析し、次いでMono Qカラムに加え、150~400mM NaCl勾配によって溶出する。プールした画分を濃縮し、スーパーロース12カラム(Pharmacia)に載置する。均質なgrp170を含有する画分を集める。

40

【0131】

5.1.7 hspの組換え体発現

当技術分野で公知の方法を利用して、hspを組換えによって生成することができる。熱ショックタンパク質をコードする核酸配列は、発現ベクターに挿入して、宿主細胞内で増殖および発現させることができる。

【0132】

本明細書では、発現構築体は、適切な宿主細胞内でhspの発現を可能にする1種または複

50

数の調節領域と動作可能に結合したhspをコードするヌクレオチド配列を意味する。「動作可能に結合する (operably associated)」とは、発現されるべき調節領域およびhsp配列が転写、最終的には翻訳を可能にするように結合し配置される結合を意味する。

#### 【0133】

hspの転写に必要な調節領域は、発現ベクターによって与えることができる。その同族の開始コドンと欠くhsp遺伝子配列を発現すべき場合には、翻訳開始コドン(ATG)を与えてもよい。適合性がある宿主-構築体系では、RNAポリメラーゼなどの細胞転写因子は、発現構築体上の調節領域に結合して、宿主生物中の改変したhsp配列の転写に作用する。遺伝子発現に必要な調節領域の正確な性質は、宿主細胞ごとに異なる。一般に、RNAポリメラーゼと結合し、動作可能に結合した核酸配列の転写を促進させることができるプロモーターが必要である。こうした調節領域は、TATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列など転写および翻訳の開始に関連する5'非翻訳配列を含んでいてよい。コード配列に対して3'側の非翻訳領域は、ターミネーターおよびポリアデニル化部位などの転写終結調節配列を含んでいてよい。

10

#### 【0134】

プロモーターなどの制御機能を有するDNA配列をhsp遺伝子配列と結合させる、あるいはhsp遺伝子配列をベクターのクローニング部位に挿入するためには、適切な適合性を有する制限部位をもたらすリンカーまたはアダプターを、当技術分野でよく知られている技術(Wuら、1987、Methods in Enzymol、152: 343~349)によってcDNAの両端に連結することができる。制限酵素を用いた切断の後に改変して、一本鎖DNA末端を消化または充填することによって連結の前に平滑末端を作製することができる。あるいは、所望の制限酵素部位を含むプライマーを用いたPCRの使用によるDNA増幅によって、所望の制限酵素部位をDNA断片に導入することができる。

20

#### 【0135】

調節領域と動作可能に結合したhsp配列を含む発現構築体は、適切な宿主細胞中に直接導入して、さらにクローニングすることなくhsp-ペプチド複合体を発現および生成することができる。例えば、米国特許第5,580,859号を参照のこと。発現構築体は、例えば、相同組換えによって、宿主細胞のゲノムへのhsp配列の組込みを容易にするDNA配列を含んでいてもよい。この場合、宿主細胞内でhspを増殖および発現させるために、適切な宿主細胞に適した複製開始点を含む発現ベクターを使用する必要はない。

30

#### 【0136】

それだけには限らないが、プラスミド、コスミド、ファージ、ファージミドまたは改変ウイルスを含む種々の発現ベクターを使用することができる。通常、こうした発現ベクターは、適切な宿主細胞内でベクターが増殖するための機能的な複製開始点、hsp遺伝子配列を挿入するための1種または複数の制限エンドヌクレアーゼ部位、および1種または複数の選択マーカーを含む。発現ベクターは、それだけには限らないが、細菌、酵母、昆虫、哺乳動物およびヒトを含む原核生物または真核生物由来の適合性のある宿主細胞と一緒に使用しなければならない。

#### 【0137】

正確に切断されたhspまたはhsp-ペプチド複合体を長期間、高収量で生成させるには、哺乳動物細胞内で安定に発現させることが好ましい。hspまたはhsp-ペプチド複合体を安定に発現する細胞系は、選択マーカーを含むベクターを使用することによって操作することができる。限定するものではなく例として、発現構築体の導入に続いて、操作した細胞を強化培地中で1~2日間増殖させ、次いで選択培地に切り換えることができる。発現構築体中の選択マーカーは、選択に対して耐性を与え、細胞が最適に発現構築体をそれらの染色体に安定に組み込み、培地中で増殖し、細胞系に増殖することを可能にする。こうした細胞は、長期間培養することができる、その間hspは継続的に発現される。

40

#### 【0138】

組換え細胞は、標準条件の温度、培養期間、吸光度および培地組成で培養することができる。しかし、組換え細胞の増殖条件は、hspおよび抗原タンパク質の発現のものとは異な

50

るかもしれない。改変した培養条件および培地を使用してhspの生成を高めることもできる。例えば、hspをそれらの同族のプロモーターと一緒に含む組換え細胞は、熱または他の環境ストレス、または化学的ストレスに曝露することができる。当技術分野で公知の任意の技術を適用して、hspまたはhsp-ペプチド複合体を生成するための最適条件を確立することができる。

#### 【0139】

##### 5.1.8 ペプチド合成

組換え技術によってhspを生成することに代わる方法は、ペプチド合成である。例えば、hsp全体、またはhspの一部に相当するペプチドは、ペプチド合成機の使用によって合成することができる。従来のペプチド合成または当技術分野でよく知られている他の合成プロトコルを使用することができる。

10

#### 【0140】

hspのアミノ酸配列を有するペプチドまたはその一部分は、Merrifield、1963、J. Am. Chem. Soc.、85: 2149によって記載されているものと類似の手順を用いて固相ペプチド合成によって合成することができる。合成中に、保護された側鎖を有するN- $\alpha$ -保護アミノ酸を、そのC末端に結合して成長しているポリペプチド鎖および不溶性のポリマー支持体、すなわちポリスチレンビーズ、に段階的に加える。ペプチドは、N- $\alpha$ -脱保護アミノ酸のアミノ基を、ジシクロヘキシルカルボジイミドなどの試薬と反応させることによって活性化させたN- $\alpha$ -保護アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基と結合させることによって合成する。遊離アミノ基を活性化されたカルボキシル基に結合させると、ペプチド結合形成が生じる。最も一般的に使用するN- $\alpha$ -保護基には、酸不安定性のBocおよび塩基不安定性のFmocがある。適切な化学作用、樹脂、保護基、保護アミノ酸および試薬の詳細は、当技術分野でよく知られており、したがって本明細書では詳細に論じていない(Athertonら、1989、Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach、IRL Press、およびBodanszky、1993、Peptide Chemistry、A Practical Textbook、第2版、Springer-Verlagを参照のこと)。

20

#### 【0141】

得られたhspの精製は、ゲル浸透、分配および/またはイオン交換クロマトグラフィーを用いた分取HPLCなどの従来の手順を用いて実施する。適切なマトリックスおよび緩衝液の選択は、当技術分野でよく知られており、したがって本明細書では詳細に説明していない。

30

#### 【0142】

##### 5.2 ATPアーゼ活性を測定する方法

本発明によれば、hspまたはhsp-ペプチド複合体のATPアーゼ活性を使用して、hspまたはhsp-ペプチド複合体の生物学的活性と関連付け、それによって生物学的活性を測定することができる。本発明の方法を使用して、試料中に生物学的に活性なhspまたはhsp-ペプチド複合体が存在するかどうかを検出することができる。この方法は、試料中のhspまたはhsp-ペプチド複合体の質量が既知である場合に、特異的な生物学的活性が誘導されるように定量的であってよい。hspまたはhsp-ペプチド複合体試料の特異的な生物学的活性を使用して、試料の治療的または予防的量を推定することができる。比活性を使用して、hspまたはhsp-ペプチド複合体を含む試料の生物学的活性を比較することができる。この方法はさらに、ゲルダナマイシンまたは他の任意の特異的なhsp-ヌクレオチド結合の阻害剤(例えば、アデノシン類似体5'-N-エチルカルボキサミドアデノシン(NECA))の存在下でATPアーゼ活性を測定することを含み、ゲルダナマイシン、または他の任意の特異的なヌクレオチド結合の阻害剤の存在によって阻害されるATPアーゼ活性は、生物学的活性と関連している。このステップは、試料中に他のタイプのATPアーゼが存在し得る場合、特に有用である。

40

#### 【0143】

ATPアーゼ活性を測定できるどんな方法も使用することができる。非限定的な例には、それだけには限らないが、発光酵素に基づくアッセイなどATP、ADP、および/またはAMPの

50

生成または消費に関する酵素反応、ならびにそれだけには限らないが、イオン交換クロマトグラフィーなどATP、ADP、AMPおよび/または無機リン酸の濃度および/または量を検出する方法がある。

#### 【0144】

特定の一実施形態では、生物発光ATPアッセイを使用することができる。限定するものではなく例として、以下のようにアッセイを行うことができる：

タンパク質試料を、ミリポアBIOMAXスピンカラム(10Kda MWC0)を用いて濃縮して、500  $\mu$ g/mlのタンパク質濃度にする。gp96(1  $\mu$ g)を20%DMSOまたは400  $\mu$ Mの特異的な阻害剤ゲルダナマイシンを含む20%DMSOを含むATP(10~30倍モル濃度過剰)の溶液と混合する。次いで、この混合物を37 で4時間インキュベートする。続いて、個々の試料をPBSで100  $\mu$ Lに希釈する。各試料50  $\mu$ L中に含まれるATPは、Molecular Devices LmaxルミノメーターおよびROCHE CLII生物発光キットを用いてATP標準曲線と比較して定量化する。DMSOおよびDMSO/ゲルダナマイシン測定値の間のATP濃度の差は、gp96に特異的なATP加水分解量を表す。別の方法として、ゲルダナマイシンは、このアッセイではNECAと置換することができる。

10

#### 【0145】

別の実施形態では、イオン交換クロマトグラフィー法を使用することができる。限定するものではなく例として、以下のようにアッセイを行うことができる：

約0.5mg/mLのgp96試料を、5mM  $MgCl_2$ および25mM KCLのPBS溶液の存在下で10 $\times$ モル定量のATPと一緒に37 でインキュベートする。種々の時点でアリコートを取り、イオン交換HPLCシステムを用いて残りのATPを決定する。ゲルダナマイシン阻害実験では、ゲルダナマイシン対ATP1:1、2:1、5:1および10:1の比でゲルダナマイシンを混合物に加える。ATP分析のために種々の時点でアリコートを取る。カゼインキナーゼIIによるATP加水分解を、以下の条件下で試験する：0.5U/mlカゼインキナーゼIIを20  $\mu$ g/mL ATP、ゲルダナマイシン(ゲルダナマイシン対ATPの比1:1、1:2、1:5および1:10)を含むまたは含まない2mg/mLカゼインと一緒に混合し、10mM  $MgCl_2$ 、130mM KCLおよび5mM DTTを含む40mM HEPES中で37 でインキュベートする。種々の時点でアリコートを取り、ATP濃度について分析する。

20

#### 【0146】

ATP濃度は、Partisil SAXカラム(2.1 $\times$ 250mm、10  $\mu$ m、Alltech)を用いてイオン交換HPLCによって測定し、溶出は、0.3~1Mリン酸アンモニウムの直線勾配を用いて0.25mL/分で25分間実施する。すべてのクロマトグラフィーは、Waters Alliance HPLCシステムで215nmの吸光度を検出して行う。ATPは、ADPおよびAMPから完全に分離し、定量化は、ATP標準曲線を用いたピーク面積に基づく。gp96に特異的なATPアーゼ活性は、1時間当りのgp96タンパク質1mg当りの加水分解されたATPの量(nmol/mg/hr)として表す。カゼインキナーゼIIの特異的なATPアーゼ活性は、1時間当りのタンパク質1単位当りの加水分解されたATPの量(nmol/U/hr)として表す。gp96またはカゼインキナーゼIIを加えていないATPを単独で含む試料について決定するように、すべての比率値をバックグラウンド加水分解について補正する。

30

#### 【0147】

ATPアーゼ活性は、[ $-^{32}P$ ]-標識ATPおよび薄層クロマトグラフィーを使用する免疫親和性ストリッピング技術を用いて測定することもできる。これは、限定するものではなく例として提供しており、以下の通りである。(LiおよびSrivastava(1993)EMBO J. 12: 3143; WearschおよびNicchitta(1997)J. Biol. Chem. 272: 5152):

40

通常、1  $\mu$ gの精製したgp96またはhsp70を、20mM HEPES、pH7.2、20mM NaClおよび2mM  $MgCl_2$ を含む反応体積20  $\mu$ L中の20  $\mu$ M [ $-^{32}P$ ]ATPと一緒に37 で1時間インキュベートする。次いで、反応混合物1  $\mu$ Lをポリエチレンイミン(PEI)セルロースプレート上にスポットする。薄層クロマトグラフィーを1:1の1M LiClと1M HCOOHの比に対して行う。次いで、このプレートを乾燥し、フィルムに露光し、対応する放射性スポットを切り出しカウントする。ATPアーゼ活性は、[ $-^{32}P$ ]ATPから生成した[ $-^{32}P$ ]ADPおよび[ $-^{32}P$ ]AMPの量から決定し、すなわち、加水分解されたATPの割合は、[ADP+AMP]/[ATP+AMP+ADP] $\times$ 100%として計算する。精製したgp96またはhsp70を欠くバックグラウンドATP加水分解を減算する。

50

## 【0148】

ATPアーゼ活性は、HPLCを用いて測定することもできる。下記は、限定するものではなく例として提供する：

gp96(2 µg; 200 µg/mlのPBS溶液)をATP(160 µM)、10mM MgCl<sub>2</sub>および20%DMSOを含む同体積のPBSに加える。対照実験では、DMSO単独の代わりにDMSOに溶解したゲルダナマイシン(160 µM)を使用する。試料を混合し、37 °Cで4時間インキュベートする。これに続いて、10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH4.0)を80 µL加えて反応を急冷し、試料をHPLC自動サンプラーに導入して注入する。1%アセトニトリルを含む60mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH6.0)で平衡化したAquasil C18カラム(250mm x 4.6mm)を用いて、ADPをATPから分離する。流速は、0.5ml/分である。自動ピーク積分およびADP標準曲線との比較の後、ADPの量を定量化する。

10

## 【0149】

当技術分野で公知の放射性同位元素アッセイを使用して、hspまたはhsp-ペプチド複合体のATPアーゼ活性を測定することもできる。

## 【0150】

## 5.3 サイズによってオリゴマー構造を決定する方法

本発明によれば、hspまたはhsp-ペプチド複合体のオリゴマー構造を使用して、hspまたはhsp-ペプチド複合体の生物学的活性を測定することができる。本発明の方法を使用して、試料中に生物学的に活性なhspまたはhsp-ペプチド複合体が存在するかどうかを検出することができる。この方法は、試料中のhspまたはhsp-ペプチド複合体の質量が既知である場合に、特異的な生物学的活性が誘導され得るように定量的であってよい。hspまたはhsp-ペプチド複合体試料の特異的な生物学的活性を使用して、試料の治療的または予防的量を推定することができる。比活性を使用して、hspまたはhsp-ペプチド複合体を含む試料の生物学的活性を比較することができる。

20

## 【0151】

オリゴマー構造の存在を検出または測定するための当技術分野で公知の任意の方法を使用することができる。この方法は、hspと一緒に使用するよう設計することが好ましい。オリゴマー化の進行をモニターする方法も使用することができる。

## 【0152】

特定の一実施形態では、サイズ排除クロマトグラフィーを使用することができる。限定するものではなく例として提供するChadliら、(1999)J. Biol. Chem. 274: 4133~4139によって説明されている手順は、以下の通りである。

30

## 【0153】

FPLCシステム(Amersham Pharmacia Biotech)を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを、50mM トリス-HCl、pH8.65で平衡化したスーパーコース6またはスーパーコース12 10/30カラムで4 °Cで実施する。同じ緩衝液を用いて流速0.2ml/分で溶出を行う。280nmにおけるUV吸光度によって溶出したタンパク質を検出する。Amersham Pharmacia Biotech製の高および低分子量校正キットを用いてカラムを校正する。使用する標準試料は、チログロブリン(669kDa)、フェリチン(440kDa)、カタラーゼ(232kDa)、アルドラーゼ(158kDa)、ウシ血清アルブミン(67kDa)およびキモトリプシノーゲン(25kDa)である。ブルーデキストランおよび重クロム酸カリウムを使用して、それぞれ空隙体積および全体積を測定する。

40

## 【0154】

別の実施形態では、SDSおよび非変性PAGEを使用することができる。限定するものではなく例として提供するChadliら、(1999)J. Biol. Chem. 274: 4133~4139によって説明されている手順は、以下の通りである：

SDSおよび非変性PAGEならびに銀染色をPhastシステム(Amersham Pharmacia Biotech)で行う。分子量校正キット(Amersham Pharmacia Biotech)には、ホスホリラーゼb(94kDa)、ウシ血清アルブミン(67kDa)、オボアルブミン(43kDa)、炭酸脱水酵素(30kDa)、大豆トリプシン阻害剤(20kDa)およびβ-ラクトアルブミン(14.4kDa)が含まれる。

## 【0155】

非変性PAGEは、10%ポリアクリルアミドクレーンゲル、375mM トリス緩衝液、pH8.9を用

50

いてMultipore II(Amersham Pharmacia Biotech)で4で行った。チログロブリン(669kDa)、フェリチン(440kDa)、カタラーゼ(232kDa)、乳酸脱水素酵素(140kDa)およびウシ血清アルブミン(67kDa)を含む校正キット(Amersham Pharmacia Biotech)を使用して、製造業者の推奨に基づいてタンパク質の見掛け分子量を推定する。Bio-imageソフトウェア(Millipore)を用いてOmni media scanner装置で銀染色されたバンドの走査を行う。

#### 【0156】

非変性PAGE上で分離したhsp試料をニトロセルロスへ電氣的に転写させる。空気乾燥したフィルターは、10%脱脂粉乳のPBS溶液、0.05%ツイーン20(PBST)中で2時間インキュベートし、PBSTで洗浄し、抗hsp90抗体Ab119(37)(1:4000)またはd7(28)(1:4000)と一緒に2時間インキュベートし、PBSTで洗浄し、抗ウサギまたは抗マウス抗体と一緒に1時間イン

10

#### 【0157】

別の実施形態では、ゲルろ過クロマトグラフィーを使用することができる。限定するものではなく例として提供するWearschおよびNicchitta(1996)Biochem. 35: 16760~9によって説明されている手順は、以下の通りである。

#### 【0158】

TSK-GEL g3000 SW分析用ゲルろ過カラム(Tosohaus、米国ペンシルベニア州Montgomeryville)は、PBS(リン酸緩衝食塩水)または緩衝液A(110mM KOAc、25 nM K-HEPES、pH7.2、20 mM NaCl、1mM Mg(OAc)<sub>2</sub>、0.1mM CaCl<sub>2</sub>)中で平衡化する。体積125μLの試料をカラムに流

20

#### 【0159】

さらに別の実施形態では、二次元電気泳動を使用することができる。限定するものではなく例として提供するWearschおよびNicchitta(1996)Prot. Exp. Pur. 7: 114~121によって説明されている手順は、以下の通りである：

第1次元(非還元)段階では、試料を0.5Mトリス、5%SDS、0.01%プロモフェノールブルー

30

#### 【0160】

沈降速度を使用して、hspまたはhsp-ペプチド複合体の多量体構造を決定することもできる。WearschおよびNicchitta(1996)Biochem. 35: 16760~9によって行われた以下のアッセイは、限定するものではなく例として提供する：

40

沈降係数(s)を決定する場合、試料は、既知の標準試料と同時にスクロース勾配で分析する。天然grp94、エラスターゼで消化されたgrp94、およびin vitroで合成されたgrp94 C(構築体の調製を参照のこと)は、緩衝液Aを補充した15~30%スクロース勾配で分析する。In vitroで合成されたgrp94-Cexp翻訳産物およびgrp94-MBP融合タンパク質は、PBSを補充した10~25%スクロース勾配で分析する。11.5mLの勾配を調製し、自動Densi-Flow II c(Buchler Instruments、米国カンザス州Lenexa)を用いて収集する。体積200μLの試料を勾配にロードし、ベックマンSW41ローター中で40,000rpmで室温で20時間遠心分離する。カタラーゼ(11.3S)、酵母アルコール脱水素酵素(7.4S)、BSA(4.3S)、オボアルブミン(3.5S)、およびキモトリプシノーゲンA(2.6S)を標準試料として使用する。0.5mLの画分を勾配から集め、SDS-PAGE(grp94試料)によって、または280nmにおける吸光度(タンパク質標準

50

試料)から分析する。

【0161】

当業者は、質量分析を使用して、gp96および/またはgp96複合体のオリゴマー構造を決定することもできる。

【0162】

別の実施形態では、限定するものではなく例として提供するフィルターを使用して、gp96二量体および/またはgp96複合体二量体の存在および/または量を測定することができる。好ましい実施形態では、このようなフィルターは、あるサイズの分子を通過させるが、より大きい分子を捕捉する分子量カットオフフィルターである。

【0163】

本発明の別の実施形態は、光散乱アッセイを使用して、オリゴマー型のgp96および/またはgp96複合体の存在または濃度を決定する。

【0164】

さらに別の実施形態では、分析用超遠心分離を使用して、gp96二量体および/またはgp96複合体二量体の存在および/または量を測定することができる。この技術は、当業者によく知られている。

【0165】

別の実施形態では、勾配遠心分離を使用して、gp96二量体および/またはgp96複合体二量体の存在および/または量を測定することができる。この技術は、当業者によく知られている。

【0166】

#### 5.4 生物学的活性を測定する方法

本発明によれば、hspまたはhsp-ペプチド複合体の生物学的活性を検出または測定する代わりに、hspおよび/またはhsp-ペプチド複合体のオリゴマー構造またはATPアーゼ活性を用いることができる。hspおよび/またはhsp-ペプチド複合体の特に関心のある生物学的活性は、免疫学的活性、例えば、抗原提示細胞に対するペプチド抗原の提示(抗原再提示)およびT細胞活性化; それだけには限らないが、サイトカイン例えば、ヒトマクロファージ走化性タンパク質1(MCP-1)などの生物学的応答調節物質および一酸化窒素(NO)の産生の誘導; CD91(α2-マクログロブリン受容体、α2MR)および/またはCD36などの受容体の結合; 抗原分子の結合および放出; ならびに動物中の腫瘍の退縮、腫瘍がある動物の生存期間の延長および感染症の除去を引き起こす能力を含むが、それだけには限定されない。生物学的活性は、*in vivo*および/または*in vitro*で生じ、あるいは観察され得る。

【0167】

ペプチドと結合するhspの能力は明らかであるが、このペプチド担持メカニズムはあまり理解されていない。gp96は、小胞体に見られるタンパク質であり、*in vitro*および*in vivo*で明らかなアミノ酸特異性を示さずに多数のペプチドと結合する。実際に、免疫応答でgp96がその役割を果たすためには、まずペプチドがhspと結合していなければならない(SastryおよびLinderoth(1999)*J. Biol. Chem.* 274: 12023~12035)。

【0168】

SastryおよびLinderoth(上掲)は、ペプチドとgp96の結合を検出するアッセイについて記載している。簡単に言えば、ペプチド-ピレンをモル過剰なgp96と一緒に室温で10分間低塩緩衝液(20mM HEPES、pH7.9、20mM NaCl、2mM MgCl<sub>2</sub>)中でインキュベートする。この混合物を、70,000分子量カットオフ膜を用いて2時間透析して、任意の未結合のペプチド-pyrを除去する。濃縮水の蛍光を340nmにおける励起によってモニターする。この波長では、タンパク質発色団(TrpおよびTyr)は紫外線を吸収せず、ピレンだけが励起される。

【0169】

hspによる抗原ペプチドの再提示は、重要な別の生物学的活性である。本発明者らは、gp96の二量体構造の減少が、その抗原再提示活性の低下と相関関係があることを実証している。RAW264.7 APCおよびCTLによって媒介されるgp96複合体のペプチドに特異的な免疫応答を、CTLによって分泌されるIFN- $\gamma$  レベルによって測定した。IFN- $\gamma$  は、一般的な免

10

20

30

40

50

疫状態の指標であることが当技術分野で公知であるサイトカインである。これはまた、腫瘍認識および拒絶において主要な役割を果たす。二量体gp96は、用量依存的な方法でIFN- $\gamma$ の分泌を刺激することができたが、凝集したgp96は、IFN- $\gamma$ の分泌を刺激しなかった。再提示アッセイは、限定するものではなく例として第8節に記載する。

#### 【0170】

hspまたはhsp-ペプチド複合体の提示に応答して、抗原提示細胞は、MCP-1を分泌しNOを生成する。MCP-1は、血液単球および組織マクロファージの炎症反応で重要な役割を果たす。NOが、免疫応答の重要なモジュレーターであることも分かっている(Weiら、(1995) Nature 375: 408~411)。

#### 【0171】

CD91/2M受容体は、熱ショックタンパク質の細胞表面受容体である。このCD91/2M受容体は、多様なリガンドのエンドサイトーシスで役割を果たす。2Mの他に、2MRの他のリガンドには、リポタンパク質-ペプチド複合体、ラクトフェリン、組織型プラスミノーゲン活性化因子(tPA)、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子(uPA)、および外毒素がある。したがって、2M受容体は、エンドサイトーシス、抗原提示、コレステロール調節、ApoE含有リポタンパク質クリアランス、およびカイロミクロン残遺物除去を含む種々の細胞プロセスで役割を果たす。したがって、本発明の方法により、他の分子とCD91/2M受容体とを結合させる、またはその結合をブロックするhspもしくはhsp-ペプチド複合体の能力の検出または測定が可能になる。

#### 【0172】

CD36も、熱ショックタンパク質の受容体として作用することが示されている。CD36は、クラスBスカベンジャー受容体ファミリーのメンバーであり、毛細血管内皮細胞、乳腺分泌上皮細胞、分化した脂肪細胞、B細胞、マクロファージ、およびいくつかのタイプの腫瘍細胞で主に発現される。CD36は、血小板接着および凝集、アポトーシス細胞の食作用、ならびに長鎖脂肪酸の代謝において役割を果たすと考えられている。特に、熱ショックタンパク質gp96は、これらの細胞中でCD36と結合し、一酸化窒素およびケモカインの産生を刺激することがわかっている。(Panjwaniら、2000、Cell Stress & Chaperones 5(4): 373~397; 2000年10月6日出願の米国仮特許出願60/238865)。したがって、本発明の方法により、他の分子とCD36を結合させる、またはその結合をブロックするhspもしくはhsp-ペプチド複合体の能力の検出または測定が可能になる。

#### 【0173】

##### 5.5 品質管理および標準化における使用

本発明によれば、hspまたはhsp-ペプチド複合体のオリゴマー構造またはATPアーゼ活性を使用して、hspまたはhsp-ペプチド複合体の生物学的活性を測定することができる。本発明の方法を使用して、試料中に生物学的に活性なhspまたはhsp-ペプチド複合体が存在するかしないかを検出することができる。この方法は、試料中のhspまたはhsp-ペプチド複合体の質量が既知である場合に、特異的な生物学的活性が誘導され得るように定量的であり得る。hspまたはhsp-ペプチド複合体の試料の特異的な生物学的活性を使用して、試料の治療的または予防的量を推定することができる。また比活性を使用して、hspまたはhsp-ペプチド複合体を含む試料の生物学的活性を比較することもできる。

#### 【0174】

本発明の方法は、hsp-ペプチド複合体調製物の商業生産および貯蔵の間の品質管理に使用することができる。hsp-ペプチド複合体調製物の品質特徴には、その比活性に関係し得る調製物の効力; 貯蔵要件、貯蔵履歴およびその効力に対する影響に関連する調製物の安定性が含まれる。本発明の方法を使用して、特に患者特異的なhsp-ペプチド複合体調製物において、所与のhspまたはhsp-ペプチド複合体の調製物から導出できる投与回数を決定または予測することもできる。

#### 【0175】

hspおよびその複合体には多くの商業用途がある。癌および感染症の治療および予防のためのhsp-ペプチド複合体の使用は、米国特許第6,030,618号; 第5,935,576号; 第5,750,

10

20

30

40

50

119号；第5961,979号；第6,048,530号；第5,837,251号；および第6,017,540号に記載されている。養子免疫療法で使用する抗原提示細胞を *in vitro* で感作するためのストレスタンパク質-抗原複合体の使用は、1997年3月20日付けのPCT公開W0 97/10002に記載されている(1999年11月16日発行の米国特許第5,985,270号も参照のこと)。本発明の方法は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国仮特許出願60/232,779；および米国特許出願09/693,643に記載のものなど、hspまたはhsp-ペプチド複合体を含む製剤および治療の有効性を改善する方法でも有用である。

#### 【0176】

本発明の方法は、第5.5節で記載している比較的高価で面倒な生物学的アッセイの代わりに使用することができる。本発明の方法は、製造プロセスで規定要件の遵守をモニターするのに使用することができる。 10

#### 【0177】

##### 5.6 診断および予後における使用

一実施形態では、本発明は、被験者の免疫系の機能に一部起因する被験者の症状を診断する方法であって、前記方法が、熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性あるいは被験者から得られた二量体型の熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の存在と、熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性との相関関係を示すことを含む方法を提供する。生物学的活性は被験者中の1種または複数の免疫機能に関連するので、ATPアーゼ活性または二量体型の量の変化により、症状の変化が示される。本発明の方法は、免疫系の一般的な容態、免疫系の非抗原特異的特徴、および/または被験者の免疫応答性をモニターする好都合な方法を提供する。 20

#### 【0178】

別の実施形態では、本発明は、被験者の癌または感染症の予後を判定する方法であって、熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性あるいは被験者から得られた二量体型の熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の存在と熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体の生物学的活性との相関関係を示すことを含み、その生物学的活性は癌細胞または感染症を引き起こす原因物質に応答するあるいはそれらを標的にする1種または複数の免疫機能に関連する方法を提供する。こうした免疫機能は、抗原提示、抗原に対する応答の増幅、ならびに特異的および非特異的の両方の特徴におけるエフェクター細胞機能と関係がある。したがって、ATPアーゼ活性または二量体型の量の変化により、予後の変化が示唆される。 30

#### 【0179】

本発明のさらに別の実施形態では、癌または感染症の予後は、ATPアーゼ活性および/または被験者由来の癌細胞または感染細胞から単離した多量体構造のhspおよび/またはhsp-ペプチド複合体を測定することによって確立することができる。こうした細胞によって生成されたhspまたはhsp-ペプチド複合体の生物学的活性は、癌細胞または感染細胞の *in vivo* での免疫原性を反映し、癌または感染症の予後を提供するのに使用することができる。 40

#### 【0180】

様々な実施形態では、本発明の方法を使用して、ワクチン、化学療法、放射線、または免疫療法などの治療を受けた後の被験者の免疫状態をモニターすることもできる。

#### 【0181】

##### 5.7 hspおよびhsp-ペプチド複合体の生物活性の調節

さらに別の実施形態では、本発明は、熱ショックタンパク質およびその複合体の生物学的活性を調節する方法であって、熱ショックタンパク質および複合体と熱ショックタンパク質および複合体のATPアーゼ活性またはオリゴマー化を調節する化合物とを接触させることを含む方法を提供する。こうした化合物は、被験者の免疫機能を調節するのに使用でき、以下に記載した本発明の方法によって同定することができる。

#### 【0182】

hspまたはhsp-ペプチド複合体の生物活性の調節を使用して、免疫不全症状(それだけには限らないが、免疫抑制剤、化学療法および放射線照射の使用など)、あるいは過敏性免疫系に関連する症状(それだけには限らないが、アレルギー、移植拒絶、および自己免疫疾患)のいずれかを治療することができる。

【0183】

#### 5.8 薬物スクリーニング

本発明を使用して、hspまたはhsp-ペプチド複合体の生物学的活性を調節する治療薬をスクリーニングすることもできる。一実施形態では、薬剤をhspまたはhsp-ペプチド複合体を含む組成物と接触させ、次いで、組成物中のhspまたはhsp-ペプチド複合体のATPアーゼ活性または二量体化を測定することによってその薬剤をスクリーニングすることができる。

10

【0184】

未接触の組成物に比べてATPアーゼ活性または二量体が増加すると、試験化合物は、生物学的活性を増大させる治療薬として同定されることになる。

【0185】

未接触の組成物と比較してATPアーゼ活性または二量体が低下すると、試験化合物は、生物学的活性を低下させる治療薬として同定されることになる。

【0186】

治療薬の例には、ゲルダナマイシン類似体(例えば、17-アリル-アミノ-ゲルダナマイシン); およびヌクレオチド類似体(Rosserら、J. Bio. Chem. 2000, 275: 22789を参照のこと)を含め、ペプチド、小分子、ペプチド類似物質、抗体、脂質、炭水化物、抗生物質を含むが、それだけには限定されない。

20

【0187】

治療薬を試験して、それらが、hspの生理活性を増加または低下させる薬剤または環境因子に対するhspの耐性を、増加または低下させるかどうかを確かめることもできる。この実施形態は、第1に、ATPアーゼ活性または二量体の検出によって組成物中のhspの生物活性を測定すること、第2に、スクリーニングすべき薬剤とhspを含む組成物とを接触させ、次いで再度生物学的活性を測定すること、最後に、組成物を薬剤と接触させ、あるいは生物学的活性を阻害または高めることが当技術分野で公知である環境因子、例えば、pHまたは温度を変え、次いで、三度目に生物学的活性を測定することを含む。このような方法で、スクリーニングした薬剤が、hspの生物学的活性を調節するかどうかを、hspの生物学的活性の既知の阻害剤または促進剤の作用を増加または低下させることによって、決定することができる。

30

【0188】

本発明の方法を使用して、hspの生物学的活性を調節する方法をスクリーニングすることもできる。化合物は、hsp-ペプチド複合体を含有する組成物に加えても、その組成物から取り除いてもよく、化合物を加える前後にhsp-ペプチド複合体の生物活性を測定する。組成物に加えるまたは組成物から取り去ることができる化合物には、イオン、酸、塩基、塩、金属、気体、液体、固体、酵素、タンパク質、脂質、炭水化物、ペプチドおよびヌクレオチドがあるが、それだけには限定されない。化合物を試験して、それらが、hsp-ペプチド複合体の生物活性を増加または低下させることが当技術分野で公知の薬剤または環境因子に対するhsp-ペプチド複合体の耐性を、増加または低下させるかどうかを決定することもできる。

40

【0189】

#### 5.9 生物学的活性を測定するキット

本発明はまた、本発明の方法および/または治療養生法を実施するためのキットも提供する。限定するものではなく例として提供する一実施形態は、陽性対照として比活性が既知のhspまたはhsp-ペプチド複合体の容器、ATPの容器およびゲルダナマイシンの容器を含むキットである。限定するものではなく例として提供する別の実施形態は、陽性対照として比活性が既知のhspまたはhsp-ペプチド複合体およびgp96に対する立体構造特異的抗体

50

の容器を含むキットである。限定するものではなく例として提供する別の実施形態は、陽性対照として比活性が既知のhspまたはhsp-ペプチド複合体および分子量カットオフフィルターの容器を含むキットである。本発明のキットにさらに含まれるものは、熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質-ペプチド複合体のATPアーゼ活性または二量体型の量を測定するための説明書である。

#### 【0190】

##### 5.10 組換えhspの合理的な設計

本発明の方法を使用して、生物活性の増加または低下について変異体hspをスクリーニングすることもできる。変異体は、突然変異誘発、エラープロードPCR、遺伝子シャフリングを含む組換えDNA技術を用いて当業者によって作製することができる。組換えhspが得られた後、本発明の方法を用いて組換えhspおよび複合体を生物活性について測定することができる。

10

#### 【0191】

##### 5.11 hspに対する立体構造特異的抗体

さらに別の実施形態では、本発明は、それだけには限らないが、組換え抗体、その断片および誘導体を含む立体構造特異的ポリクローナルまたはモノクローナル抗体の使用によって、オリゴマー型のhspあるいは特異的な立体構造のhspまたはhsp-ペプチド複合体を検出する方法を提供する。一実施形態では、こうした抗体は、特定の立体構造、例えば、二量体型のhspおよび/またはhsp-ペプチド複合体とだけ結合し、他の形態のhspおよび/またはhsp-ペプチド複合体と結合しない。結合した抗体は、当技術分野で公知の技術、例えば、ELISAによって定量することができる。特定の実施形態では、この抗体は、モノマーおよびオリゴマー(非二量体)のhspおよび/またはhsp-ペプチド複合体と結合するが、二量体型と結合しない。さらに別の実施形態では、この抗体は、モノマー型のhspまたはhsp-ペプチド複合体に存在するエピトープと結合し、前記エピトープは、hspまたはhsp-ペプチド複合体がオリゴマー化または二量化するときマスクされる。

20

#### 【0192】

立体構造特異的なポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体は、当技術分野でよく知られている技術によって作製することができる。この例では、抗体は、測定すべき二量体型のhspまたはhsp-ペプチド複合体に特異的である。

#### 【0193】

立体構造特異的抗体を使用して、生物学的活性を示すhspまたはhsp-ペプチド複合体を単離または濃縮することもできる。親和精製など当技術分野で公知の任意の方法を使用することができる。これにより、極めて強力なhspまたはhsp-ペプチド複合体を含む組成物の調製が可能になる。

30

#### 【0194】

限定するものではなく例として固有蛍光、円偏光二色性、熱量測定、またはタンパク質立体構造と異なるリガンド結合を決定するアッセイを含む、hspまたはhsp-ペプチド複合体の立体構造変化を検出するための、当技術分野で公知の任意の方法を使用することができる。

#### 【0195】

##### 5.12 抗原分子

以下の小節は、本発明のhsp-ペプチド複合体の抗原/免疫原成分として有用なペプチドの概要およびどのようにしてこうしたペプチドを、例えば、*in vitro*でhspと抗原分子を複合体形成するためのペプチドの組換え発現に使用するために確定するかを提供する。しかし、本発明を実施する際に、hsp/ペプチド複合体の抗原分子の同一性は、例えば、hsp/ペプチド複合体を癌細胞または病原体に感染した組織から直接複合体の集団として精製できる場合、既知である必要がない。

40

#### 【0196】

一実施形態では、抗原ペプチドは、癌細胞、あるいは病原体または感染症を引き起こす感染因子に感染した細胞、に由来してよい。病原体または感染因子の例には、ウイルス

50

ス、細菌、真菌、原生動物、寄生虫などがあるが、それだけには限定されない。病原体は、ヒトに感染するものであることが好ましい。抗原ペプチドは、癌細胞、感染細胞あるいは癌細胞、感染細胞、もしくはウイルス粒子を含む病原体と抗原決定基を共有するまたは類似の抗原性を示す抗原細胞から得られたタンパク質(例えば、細胞質ゾルおよび/または膜由来タンパク質)のタンパク質分解消化によって生成することができる。抗原ペプチドは、タンパク質をATP、塩酸グアニジウム、および/または酸に曝すことによって生成することもできる。抗原ペプチドは、感染症を引き起こす原因物質(病原体)の抗原性を示す抗原細胞、またはこうした原因物質の変異体から生成することもできる。

#### 【0197】

癌細胞全体、感染細胞または他の抗原細胞をこの方法に使用するので、この方法を使用する前にこれらの抗原ペプチドを単離するまたは特徴付ける必要がなく、さらにはその同一性を知る必要がない。抗原細胞の供給源は、その抗原が関連する疾患の性質によって選択することができる。本発明の一実施形態では、多部位に転移した癌を含む癌から単離した任意の組織、または細胞は、この方法で抗原細胞として使用することができる。例えば、血液、リンパ液または他の体液中を循環している白血病細胞も使用でき、充実性腫瘍組織(例えば、生検からの原発性組織)を使用することができる。その細胞が本明細書で使用できる癌の非限定的なリストを、以下の第5.18節で提供する。

10

#### 【0198】

本発明の別の実施形態では、病原体又は感染因子、すなわち、感染細胞に感染した任意の細胞は、抗原ペプチドを調製するための抗原細胞として使用することができる。特に、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、または原生動物などの細胞内病原体に感染した細胞が好ましい。本明細書で使用できる細胞を感染させ得る感染因子の例示的なリストを、第5.18節で提供する。

20

#### 【0199】

さらに別の実施形態では、感染症を引き起こし得る任意の病原体または感染因子は、抗原ペプチドを調製するための抗原細胞として使用することができる。それだけには限らないが、複製欠損変異体、非病原性または弱毒化変異体、非感染性変異体などの病原体または感染因子の変異体も、この目的で抗原細胞として使用することができる。例えば、*in vitro*で培養できるまたは感染物質から単離できる多くのウイルス、細菌、真菌、寄生虫および原生動物は、抗原細胞の供給源として使用し得る。ウイルス粒子を含むこうした病原体を増殖させる当技術分野で公知の方法を使用することができる。抗原細胞として使用できる病原体または感染因子の例示的なリストを、第5.18節で提供する。

30

#### 【0200】

癌組織、癌細胞、または感染細胞由来の細胞系も、抗原細胞として使用することができる。ヒト起源の癌または感染組織、細胞、または細胞系が好ましい。癌細胞、感染細胞、または抗原細胞は、当技術分野で公知の任意の方法によって同定および単離することができる。例えば、癌細胞または感染細胞は、形態、酵素アッセイ、増殖アッセイ、あるいは病原体または発癌性ウイルスの存在によって同定することができる。所定の抗原の特徴が既知の場合、抗原細胞は、当技術分野で公知の任意の生化学的または免疫学的方法によって同定または単離することもできる。例えば、癌細胞または感染細胞は、外科手術、内視鏡検査、他の生検技術、体液(血液など)からの単離、親和性クロマトグラフィー、および蛍光活性化細胞選別法(例えば、細胞による抗原発現に対する蛍光標識抗体を用いて)によって単離することができる。類似した抗原性を示す抗原細胞は、共通して1種または複数の抗原決定基を有し、それに対する被験者の免疫応答が望まれる(例えば、治療的または予防的目的で)。

40

#### 【0201】

癌を治療または予防するのに使用する場合、公知の腫瘍特異的(すなわち、腫瘍細胞中で発現される)または腫瘍関連抗原(すなわち、腫瘍細胞中で比較的過剰発現される)あるいはその断片または誘導体を使用するのが好ましい。例えば、こうした腫瘍特異的または腫瘍関連抗原には、KS 1/4全癌抗原(PerezおよびWalker、1990、J. Immunol. 142: 3662

50

~ 3667; Bumal、1988、Hybridoma 7(4): 407~415); 卵巣癌抗原(CA125)(Yuら、1991、Cancer Res. 51(2): 468~475); 前立腺酸性リン酸(Tailerら、1990、Nucl. Acids Res. 18(16): 4928); 前立腺特異抗原(HenttuおよびVihko、1989、Biochem. Biophys. Res. Comm. 160(2): 903~910; Israeliら、1993、Cancer Res. 53: 227~230); 黒色腫関連抗原p97(Estinら、1989、J. Natl. Cancer Inst. 81(6): 445~446); 黒色腫抗原gp75(Vijayaradhilら、1990、J. Exp. Med. 171(4): 1375~1380); 高分子量黒色腫抗原(Nataliら、1987、Cancer 59: 55~63)および前立腺特異的膜抗原があるが、それだけには限定されない。hspと複合体を形成できる他の外来性抗原には、癌遺伝子(例えば、ras、特に4種類のアミノ酸残基(12、13、59または61)でしか生じない活性化変異を有するrasの変異体(Gedde-Dahlら、1994、Eur. J. Immunol. 24(2): 410~414)および癌抑制遺伝子(例えば、細胞障害性T細胞応答を刺激できる種々の変異体または多形性p53ペプチド抗原が同定されているp53(Gnjaticら、1995、Eur. J. Immunol. 25(6): 1638~1642))など癌細胞内で高頻度で変異する部分またはタンパク質が含まれる。

10

## 【0202】

好ましくは、ウイルス疾患を治療または予防するのに使用する場合、公知のウイルスのエピトープを含む適当なタンパク質およびペプチドは、適切な細胞中で発現され得る。例えば、こうしたウイルス由来の抗原エピトープには、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、インフルエンザ、水痘、アデノウイルス、単純疱疹I型(HSV-I)、単純疱疹II型(HSV-II)、牛痘、ライノウイルス、エコーウイルス、ロタウイルス、呼吸系発疹ウイルス、乳頭腫ウイルス、パポバウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス、アルボウイルス、ハンタウイルス、コクサッキーウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、天然痘ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、ヒト免疫不全ウイルスI型(HIV-I)、およびヒト免疫不全ウイルスII型(HIV-II)があるが、それだけには限定されない。

20

## 【0203】

好ましくは、細菌感染症を治療または予防するのに使用する場合、公知の細菌のエピトープを含む適当なタンパク質およびペプチドは、適切な細胞中で発現され得る。例えば、こうした細菌エピトープは、それだけには限らないが、グラム陽性桿菌(例えば、リステリア(Listeria)、炭疽菌(Bacillus anthracis)などの桿菌(Bacillus)、エリジペロスリックス(Erysipelothrix)種)、グラム陰性桿菌(例えば、バルトネラ(Bartonella)、ブルセラ(Brucella)、カンピロバクター(Campylobacter)、エンテロバクター(Enterobacter)、エシェリキア(Escherichia)、フランシセラ(Francisella)、ヘモフィルス(Hemophilus)、クレブシエラ(Klebsiella)、モルガネラ(Morganella)、プロテウス(Proteus)、プロビデンシア(Providencia)、シュードモナス(Pseudomonas)、サルモネラ(Salmonella)、セラチア(Serratia)、シゲラ(Shigella)、ビブリオ(Vibrio)、およびエルシニア(Yersinia)種)、スピロヘータ菌(例えば、ライム病を引き起こすボレリアブルグドルフェリ(Borrelia burgdorferi)を含むボレリア(Borrelia)種、およびレプトスピラ(Leptospira))、嫌気性菌(例えば、アクチノミセス(Actinomyces)および破傷風菌(C. tetani)、ボツリヌス菌(C. botulinum)、ウェルシュ菌(C. perfringens)を含むクロストリジウム(Clostridium)種)、グラム陽性および陰性球菌、連鎖球菌(Streptococcus)種、肺炎球菌(Pneumococcus)種、ブドウ球菌(Staphylococcus)種(例えば、黄色ブドウ球菌(S. aureus)および肺炎ブドウ球菌(S. pneumoniae))、ナイセリア(Neisseria)種(例えば、髄膜炎菌(N. meningitidis))を含む様々な細菌に由来してよい。

30

40

## 【0204】

好ましくは、真菌感染症を治療または予防するのに使用する場合、公知の真菌のエピトープを含む適当なタンパク質およびペプチドは、適切な細胞中で発現され得る。例えば、こうした抗原エピトープは、アスペルギルス(Aspergillus)(例えば、アスペルギルスフミガツス(Aspergillus fumigatus))、クリプトコッカス(Cryptococcus)(例えば、クリプトコッカスネオフォルマンズ(Cryptococcus neoformans))、スポロトリクス(Sporotrix)、コクシジオイデス(Coccidioides)、パラコクシジオイデス(Paracoccidioides)、ヒストプラズマ(Histoplasma)、ブラストミセス(Blastomyces)、カンジダ(Candida)(例えば、カン

50

ジダアルピカンス(*Candida albicans*)、リゾプス(*Rhizopus*)、リゾムコール(*Rhizomucor*)、アブシディア(*Absidia*)、およびバシディオボールス(*Basidiobolus*)種を含む様々な真菌に由来してよい。

【0205】

好ましくは、寄生虫感染症を治療または予防するのに使用する場合、公知の原生動物、線虫、または蠕虫のエピトープを含む適当なタンパク質およびペプチドは、適切な細胞中で発現され得る。例えば、こうした抗原エピトープは、それだけには限らないが、アメーバ(*Entamoeba*)、マラリア原虫(*Plasmodium*)、リーシュマニア(*Leishmania*)、アイメリア(*Eimeria*)、クリプトスポリジウム(*Cryptosporidium*)、ジアルジア鞭毛虫(*Giardiasis*)、トキソプラズマ(*Toxoplasma*)、およびトリパノソーマ(*Trypanosoma*)種を含む様々な原生動物に由来してよい。

10

【0206】

5.12.1 抗原タンパク質の調製

本発明の一実施形態では、癌細胞、感染細胞、または病原体に由来するタンパク質調製物を提供する。例えば、癌の治療には、手術後に癌患者から得られた腫瘍細胞からタンパク質調製物を調製する。本発明の別の実施形態では、1種または複数の所定の抗原タンパク質は、こうした抗原をコードする組換え発現系の導入によって改変された細胞系で合成し、こうした細胞を用いてタンパク質を調製する。タンパク質は、1種または複数の細胞画分、例えば、抗原細胞の細胞質ゾルから得られ、あるいは抗原細胞の膜または細胞壁から抽出または可溶化させることができる。細胞溶解、細胞内容物の分画、およびタンパク質富化または単離のための当技術分野で公知の任意の技術を使用することができる。例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる *Current Protocols in Immunology*、第2巻、第8章、Coliganら(編)、John Wiley & Sons, Inc.; *Pathogenic and Clinical Microbiology: A Laboratory Manual*、Rowlandら、Little Brown & Co.、1994年6月を参照のこと。細胞内容物を分画するのに使用する技術に応じて、細胞画分には、少なくとも20、50、100、500、1,000、5,000、10,000、または20,000種の異なるタンパク質が含まれる。

20

【0207】

本明細書では、「タンパク質調製物」という用語は、抗原細胞から得られたタンパク質の混合物、抗原細胞の細胞画分、またはウィルス粒子を意味する。タンパク質は、細胞質ゾルなどの細胞画分から得ることができる。タンパク質はまた、非細胞質ゾルタンパク質(例えば、細胞壁、細胞膜または細胞小器官由来のもの)であっても、両方であってもよい。細胞画分には、細胞質ゾル画分、膜画分、ならびに核、ミトコンドリア、リソソーム、および小胞体由来画分などの細胞小器官画分が含まれていてよいが、それだけには限定されない。タンパク質調製物は、非組換えまたは組換え細胞から得ることができる。

30

【0208】

特定の実施形態では、タンパク質調製物は、抗原細胞内の他のタンパク質から特定の1種または複数のタンパク質を選択的に取り出すまたは保持するいずれの調製方法にもかかれていないものである。

【0209】

特定の実施形態では、タンパク質調製物は、分画および/または精製していない全細胞溶解物であり、細胞の他の非タンパク質物質を含んでいてよい。

40

【0210】

別の特定の実施形態では、タンパク質調製物は、さらなる分画または精製にかけていない細胞画分中の全タンパク質であり、細胞の他の非タンパク質物質を含んでいてよい。

【0211】

さらに別の実施形態では、タンパク質調製物は、ウィルス粒子調製物中の全タンパク質である。

【0212】

特定の実施形態では、タンパク質調製物は、抗原細胞の全細胞タンパク質、全細胞質ゾ

50

ルタンパク質、または全膜結合タンパク質を含む。

【0213】

様々な実施形態では、タンパク質調製物は、少なくとも20、50、100、500、1,000、5,000、10,000、または20,000種の異なるタンパク質を含む。抗原細胞のタンパク質調製物中には、複数の異なる抗原タンパク質が存在する。さらに、タンパク質調製物中のタンパク質は、*in vitro*でhspと複合体を形成させる前にプロテアーゼ消化ステップにかけることができる。あるいは、タンパク質調製物中のタンパク質は、*in vitro*でhspと複合体を形成させる前にプロテアーゼ消化ステップにかけない。

【0214】

抗原細胞またはウイルス粒子のタンパク質調製物を作製するために、当技術分野で公知の標準プロトコルを用いて抗原細胞の溶解あるいは細胞壁、細胞膜、またはウイルス粒子構造の破壊を行うことができる。様々な実施形態では、例えば、機械的剪断、音波破碎、凍結および解凍、細胞周囲の培地の浸透圧の調整、またはこれらの技術の組合せによって抗原細胞を溶解することができる。他の実施形態では、抗原細胞は、洗浄剤などの化学薬品によって溶解することができる。

【0215】

細胞を溶解した後、細胞破壊片、非タンパク質物質または細胞質ゾルを含まない物質、および/または膜由来タンパク質(細胞小器官の膜中のタンパク質を含む)を取り出すことができる。これらの成分の取り出しは、低速遠心分離またはろ過などの技術によって実施することができる。細胞破壊片および無傷の細胞を除去した後、高速遠心分離ステップを使用して、上清中に存在する細胞質ゾルタンパク質とペレット中に捕集される膜由来タンパク質とを分離することができる。当技術分野で一般に公知の標準的な手順により、ペレットから膜由来タンパク質をさらに単離することができる。当技術分野で一般に公知の標準的な技術を使用して、ウイルス粒子からウイルスタンパク質を抽出することができる。これらの分離法は、抗原細胞、細胞質ゾルまたは膜中に存在する分子の一般的かつ全体的なサイズ、密度、および/または電荷に基づいて作用する。これらの分離法は、他のタンパク質から任意の1種または複数の特定のタンパク質を選択的に取り出すまたは保持することはない、あるいはそうするように設計されていない。

【0216】

様々な実施形態では、抗原細胞由来のタンパク質は、サイズ、密度、電荷、細胞部位またはその組合せなど、それらの一般的な生化学的および/または生物物理学的特性によって必要に応じて分離することができる。当技術分野で公知の多くの技術を使用して、分離を行うことができる。

【0217】

例示的だが限定するものではない、細胞質ゾルタンパク質を含むタンパク質調製物を作製するのに使用できる方法は以下の通りである：

患者の生検由来の腫瘍細胞または*in vitro*で培養した腫瘍細胞である細胞、あるいは病原性物質に感染した細胞を、その3倍の体積量の30mM炭酸水素ナトリウムpH7.5、1mM PMSFを含む1×溶解緩衝液中に懸濁し、氷上で20分間インキュベートし、次いで低張膨潤細胞をダウンスホモジナイザー中で95%超の細胞が溶解するまでホモジナイズする。剪断する代わりに、細胞を、顕微鏡試験で確認して99%超の細胞が溶解するまで氷上で音波破碎してもよい。音波破碎を使用する場合、細胞を、1mM PMSFを含んでいてよいリン酸緩衝食塩水(PBS)などの緩衝液中に懸濁してから音波破碎する。

【0218】

溶解産物を1,000×gで10分間遠心分離して無傷の細胞、核および他の細胞破壊片を除去する。得られた上清を約100,000×gで約1時間再度遠心分離し、上清を回収する。100,000×g上清を、PBSまたは他の適当な緩衝液に対して4で36時間透析して(3回、各回100倍体積量ずつ)、本発明の可溶性細胞質ゾルタンパク質を得る。必要に応じて、ろ過または低速遠心分離によって調製物中の不溶性物質を除去してもよい。

【0219】

10

20

30

40

50

例示的だが、限定するものではない、膜由来タンパク質を含むタンパク質調製物を作製するのに使用できる方法は以下の通りである：

患者の生検由来の腫瘍細胞または *in vitro* で培養した腫瘍細胞である細胞、あるいは病原性物質に感染した細胞を、その3倍の体積量の30mM炭酸水素ナトリウムpH7.5、1mM PMSFを含む1×溶解緩衝液中に懸濁し、氷上で20分間インキュベートし、次いで低張膨潤細胞をダウンスホモジナイザー中で95%超の細胞が溶解するまでホモジナイズする。剪断する代わりに、細胞を、顕微鏡試験で確認して99%超の細胞が溶解するまで氷上で音波破碎してもよい。音波破碎を使用する場合、細胞を、1mM PMSFを含んでいてよいリン酸緩衝食塩水(PBS)などの緩衝液中に懸濁してから音波破碎する。

#### 【0220】

次いで、溶解産物を100,000×gで10分間遠心分離して細胞膜を集める。膜由来タンパク質は、脂質二重層から取り出し、1%デオキシコール酸ナトリウムを含有する5体積のPBS( $Ca^{2+}$ および $Mg^{2+}$ を含まない)中にペレットを再懸濁させ、氷上で1時間インキュベートすることによって100,000gペレット(そこに膜由来タンパク質が位置している)から単離することができる。得られた懸濁液を20,000gで30分間遠心分離し、得られた上清を収集し、PBS( $Ca^{2+}$ および $Mg^{2+}$ を含まない)を数回変えて透析して、界面活性剤を除去する。得られた透析物を100,000gで90分間遠心分離し、この上清をさらに精製する。次いで、この上清にカルシウムとマグネシウムの両方を加えて、2mMの最終濃度を得る。必要に応じて、ろ過または低速遠心分離によって調製物中の不溶性物質を除去してもよい。

#### 【0221】

特定の実施形態では、抗原細胞から得られた細胞質ゾルおよび/または膜由来タンパク質の集団は、プロテアーゼ処理または任意のさらなる抽出もしくは選択プロセスなしでhs pと直接複合体を形成することができる。あるいは、このタンパク質をプロテアーゼ処理にかけてから複合体を形成することもできる。

#### 【0222】

##### 5.12.2 抗原ペプチドの調製

本発明によれば、抗原細胞から得られた細胞質ゾルおよび膜由来タンパク質を必要に応じて消化して抗原ペプチドを生成することができる。一実施形態では、細胞質ゾルまたは膜由来タンパク質のいずれかを消化に用いる。別の実施形態では、細胞質ゾルおよび膜由来タンパク質は、消化反応で一緒になって抗原ペプチドを生成する。好ましい実施形態では、プロテアーゼ消化で使用するタンパク質調製物は、抗原細胞、あるいは抗原細胞の細胞質ゾルまたは膜内の他のタンパク質から特定の1種または複数のタンパク質を選択的に取り出すまたは保持する任意の調製方法にかけられていない。

#### 【0223】

様々なプロテアーゼまたはタンパク質分解酵素を本発明で使用して、抗原細胞のタンパク質調製物から抗原ペプチドを含むペプチドの集団を生成することができる。酵素消化は、単独で、またはそれだけには限らないが、トリプシン、ブドウ球菌ペプチダーゼI(プロテアーゼV8としても知られている)、キモトリプシン、ペプシン、カテプシンG、サーモリシン、エラスターゼ、およびパインを含む当技術分野でよく知られているタンパク質分解酵素のいずれかとの適当な組合せで行うことができる。トリプシンは、リジンおよびアルギニンのカルボキシル末端側を切断する極めて特異的なセリンプロテイナーゼである。切断部位の数が限られているため、多くのMHC結合エピトープが無傷のままであると予想される。ブドウ球菌ペプチダーゼI、セリンプロテイナーゼは、グルタミン酸およびアスパラギン酸残基の後を切断する特異性をもつ。消化は、単一のプロテアーゼまたはプロテアーゼの混合物を用いて実施することができる。使用するプロテアーゼまたはタンパク質分解酵素は、特定の酵素に適した条件下でインキュベートする。酵素は、精製されていると好ましい。臭化シアン切断などの非酵素的方法を使用してペプチドを生成することもできる。消化すべきタンパク質調製物を等分して、それぞれ異なる酵素を用いた複数の反応にかけることができ、得られたペプチドは、必要に応じて一緒にプールして使用することができる。タンパク質を酵素反応で完全に消化する必要はないかもしれない。これらの反

10

20

30

40

50

応の結果、タンパク質調製物中に存在する各タンパク質につき、多様で異なるセットのペプチドが生成される。異なるペプチドのセットを生成すると、hspと複合体を形成したときにタンパク質調製物中の抗原に対して免疫応答を誘発させ得る抗原ペプチドの生成がより高い確率で可能になる。好ましい実施形態では、消化すべきタンパク質調製物を等分して2つの別々の反応にかけ、2種の異なるタンパク質分解酵素を使用してタンパク質調製物中に存在するタンパク質の2つの異なるペプチドのセットを生成する。タンパク質、酵素および反応条件によって、反応では未消化のタンパク質が残るかもしれない。好ましい実施形態では、トリプシンおよびブドウ球菌ペプチダーゼIを別々に使用してタンパク質調製物を消化する。

#### 【0224】

別の好ましい実施形態では、酵素消化を停止させてからペプチドとhspの複合体を形成する。本発明の一実施形態では、阻害剤を使用して酵素消化を停止させることができる。本発明で使用できる酵素阻害剤には、タンパク質消化でどの酵素を使用するかによってPM SF、ベスタチン、アマスタチン、ロイペプチン、およびシスタチンがあるが、それだけには限定されない。たいていのプロテアーゼの阻害剤は、当技術分野でよく知られている。あるいは、酵素消化を停止させる別の方法は、反応から酵素を物理的に除去することによるものである。これは、選択した酵素を、遠心分離またはろ過などのよく知られている方法によって反応から容易に除去できる樹脂または物質などの固相に付着させることによって行うことができる。タンパク質調製物は、ある期間固相に接触させるかまたは固相を通して流す。こうした固定化酵素は、商業的に購入でき、または当技術分野でよく知られて

10

20

#### 【0225】

消化反応の終了時に、ペプチドを、必要に応じて調製物中のジペプチドなどの低分子量物質、または単一アミノ酸残基から分離することができる。場合によっては、ペプチドを、サイズ、電荷、またはその組合せなどそれらの一般的な生化学的および/または生物物理学的特性によって分離することができる。当技術分野で公知の任意の技術を使用して分離を行うことができる。

#### 【0226】

本発明の別の実施形態では、抗原細胞内に内因的に存在するペプチドを単独で、または細胞質ゾルおよび膜由来タンパク質のタンパク質分解消化によって生成したペプチドと組み合わせる本発明で使用することができる。抗原細胞内に内因的に存在するペプチドには、*in vivo*でhspおよび/またはMHCクラスIおよびII分子と複合体を形成するペプチドがある。本発明によれば、抗原細胞のタンパク質調製物から直接単離したこうしたペプチドは、hspと複合体を形成することができる。

30

#### 【0227】

一実施形態では、抗原ペプチドは、ATPの存在下または低pHでhsp-ペプチド複合体から溶出することができる。これらの実験条件を使用して、潜在的に有用な抗原決定基を含み得る細胞からペプチドを単離することができる。単離した後、従来のアミノ酸配列決定法を用いて各抗原ペプチドのアミノ酸配列を決定することができる。次いで、こうした抗原分子は、化学合成または組換え法によって生成し、精製し、*in vitro*でhspと複合体を形

40

#### 【0228】

例示的なものであるが限定するものではない、hsp-ペプチド複合体からペプチドを溶出するのに使用できる方法は、以下の通りである：

所定のhsp-ペプチド複合体をセントリコン10アセンブリ(Millipore)によって遠心分離して、複合体と緩く結合していたすべての低分子量物質を取り出す。高分子量画分を取り出しSDS-PAGEによって分析し、一方、低分子量は、以下に記載のようにHPLCによって分析することができる。例示的な一方法では、高分子量画分中のhsp-ペプチド複合体を10mM ATPと一緒に室温で30分間インキュベートする。別の例示的な方法では、ストレスタンパク質-ペプチド複合体に酢酸またはトリフルオロ酢酸(TFA)を加えて、10%(体積/体積)の最終

50

濃度にし、この混合物を室温でまたは沸騰水浴中でまたはその中間の任意の温度で10分間インキュベートする (Van Bleekら、1990、Nature 348: 213~216; およびLiら、1993、EMBO Journal 12: 3143~3151を参照のこと)。

#### 【0229】

前述のように、得られた試料をセントリコン10アセンブリによって遠心分離する。高および低分子量画分を回収する。残りの高分子量ストレスタンパク質-ペプチド複合体をATPと一緒にまたは低pHで再度インキュベートして、任意の残りのペプチドを取り出すことができる。

#### 【0230】

得られたより低分子量の画分をプールし、蒸発によって濃縮し、0.1%TFA中に溶解する。次いで、溶解した物質を、例えば、0.1%TFAで平衡化したVYDAC C18逆相カラムを用いて逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって分画する。次いで、0.1%TFA中アセトニトリル0~80%の直線勾配を有するカラムを展開することによって結合した物質を流速約0.8ml/分で溶出する。ペプチドの溶出は、OD210によってモニターし、ペプチドを含有する画分を集めることができる。

10

#### 【0231】

別の実施形態では、抗原ペプチドをMHC-ペプチド複合体から単離することができる。MHC分子からの潜在的免疫原性ペプチドの単離は、当技術分野でよく知られている。例えば、その開示が参照により本明細書に組み込まれるFalkら、1990、Nature 348: 248~251; Rotzscheら、1990、Nature 348: 252~254; Elliottら、1990、Nature 348: 191~197; Falkら、1991、Nature 351: 290~296; Demotzら、1989、Nature 343: 682~684; Rotzscheら、1990、Science 249: 283~287を参照のこと。

20

#### 【0232】

いくつかの実施形態では、MHC-ペプチド複合体は、従来の免疫親和手順によって単離することができる。次いで、約0.1%TFAのアセトニトリル溶液の存在下で複合体をインキュベートすることによって、MHC-ペプチド複合体からペプチドを溶出することができる。逆相HPLCによって、溶出したペプチドを分画および精製することができる。当技術分野でよく知られている手動または自動アミノ酸配列決定技術によって、溶出したペプチドのアミノ酸配列を決定することができる。潜在的保護ペプチドのアミノ酸配列が決定した後、従来のペプチド合成または当技術分野で公知の他のプロトコルを用いてこのペプチドを任意の量で合成することができる。

30

#### 【0233】

上記で単離したものと同一アミノ酸配列を有するペプチドは、Merrifield、1963、J. Am. Chem. Soc., 85: 2149によって記載されているものと類似の手順を用いて固相ペプチド合成によって合成することができる。合成中に、保護された側鎖を有するN-保護アミノ酸を、そのC末端によって結合して成長しているポリペプチド鎖および不溶性のポリマー支持体、すなわちポリスチレンビーズ、に段階的に加える。ペプチドは、N-脱保護アミノ酸のアミノ基を、ジシクロヘキシルカルボジイミドなどの試薬と反応させることによって活性化させたN-保護アミノ酸のカルボキシル基と結合させることによって合成することができる。遊離アミノ基を活性化されたカルボキシル基に結合させると、ペプチド結合形成が生じる。一般的に使用するN-保護基には、酸不安定性のBocおよび塩基不安定性のFmocがある。

40

#### 【0234】

一実施形態では、まずC-末端N-保護アミノ酸をポリスチレンビーズに付着させる。次いで、N-保護基を除く。脱保護されたアミノ基を、次のN-保護アミノ酸の活性化カルボン酸基と結合させる。所望のペプチドが合成されるまでこのプロセスを繰り返す。次いで、得られたペプチドを不溶性ポリマー支持体から切断し、アミノ酸側鎖を脱保護する。保護ペプチド断片を縮合することによってより長いペプチドを誘導することができる。適切な化学作用、樹脂、保護基、保護アミノ酸および試薬の詳細は、当技術分野でよく知られている (Athertonら、1989、Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical

50

Approach、IRL Press、およびBodanszky、1993、Peptide Chemistry、A Practical Textbook、第2版、Springer-Verlagを参照のこと)。

#### 【0235】

得られたペプチドの精製は、ゲル浸透、分配および/またはイオン交換クロマトグラフィーを用いた分取HPLCなどの従来の手順を用いて実施する。適切なマトリックスおよび緩衝液の選択は、当技術分野でよく知られており、したがって本明細書では詳細に説明していない。

#### 【0236】

##### 5.12.3 外来性抗原分子

病原体の既知の抗原あるいは癌の腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原の抗原性を示す分子、例えば、抗原またはその抗原部分を選択して、熱ショックタンパク質と複合体を形成する抗原分子として使用することができる。それだけには限らないが、放射性免疫測定法、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫放射定量測定法、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、*in vivo*免疫アッセイ(例えば、金コロイド、酵素または放射性同位元素標識を用いる)、ウェスタンブロット、免疫沈降反応、凝集アッセイ(例えば、ゲル凝集アッセイ、血球凝集反応アッセイ)、補体結合アッセイ、免疫蛍光測定法、タンパク質Aアッセイ、および免疫電気泳動アッセイなどの技術を用いた競合および非競合アッセイシステムを含む、当技術分野で公知のいくつかのアッセイを使用して免疫原性または抗原性を測定することができる。一実施形態では、1次抗体上の標識を検出することによって抗体結合を検出する。別の実施形態では、1次抗体との2次抗体または試薬の結合を検出することによって1次抗体を検出する。他の実施形態では、2次抗体を標識する。免疫アッセイで結合を検出するための多くの手段が当技術分野で公知であり、その使用が想定されている。一実施形態では、免疫原性を検出するために、標準的な方法、例えば、*in vitro*細胞障害性アッセイまたは*in vivo*遅延型過敏性アッセイによってT細胞媒介応答を検定することができる。

10

20

#### 【0237】

抗原分子として使用するのに潜在的に有用な抗原またはその誘導体は、病原体の感染力の中和への抗原の関与(このような病原体によって感染症を治療または予防することが望ましい)(Norrby、1985、Summary、in Vaccines 85、Lernerら(編)、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、New York、388~389頁)、タイプもしくは基特異性、患者の抗血清もしくは免疫細胞による認識、および/または抗原に特異的な抗血清もしくは免疫細胞の保護作用の実証など、様々な基準によって確認することができる。さらに、病原体が原因の疾患を治療または予防することが望まれる場合、抗原のコードされたエピトープは、時が経つにつれて、または同じ病原体の異なる分離体のうちで抗原変異を少し示す、またはまったく示さないことが好ましい。

30

#### 【0238】

##### 5.13 hsp/抗原分子複合体の*in vitro*生成

*In vivo*で内因的に結合したhspおよびペプチドの特異的な複合体を使用していない実施形態では、hspおよび抗原分子複合体を*in vitro*で生成する。当業者に理解されるように、前記の手順によって単離した、または化学合成した、または組換えによって生成したペプチドは、*in vitro*で種々の精製した天然または組換えストレスタンパク質を用いて再構成して、免疫原性非共有結合ストレスタンパク質-抗原分子複合体を生成することができる。あるいは、外来性抗原またはその抗原性もしくは免疫原性断片もしくは誘導体とストレスタンパク質との複合体を形成して、本発明の免疫治療または予防ワクチンに使用することができる。*in vitro*でストレスタンパク質と抗原分子との複合体を形成するための好ましい例示的なプロトコルを、以下に述べる。

40

#### 【0239】

複合体を形成する前に、hspをATPまたは低pHで前処理して、所定のhspと結合し得る任意のペプチドを除去する。ATP手順を用いる場合、Levyら、1991、Cell 67: 265~274によって記載されているように、アピラナーゼを加えることによって過剰なATPを調製物から

50

除去する。低pH手順を用いる場合、pH改変試薬を加えることによって緩衝液を中性pHに再調整する。

#### 【0240】

抗原分子(1 $\mu$ g)と前処理したhsp(9 $\mu$ g)を混合して、約5抗原分子：1ストレスタンパク質のモル比とする。次いで、この混合物を、20mMリン酸ナトリウム、pH7.2、350mM NaCl、3mM MgCl<sub>2</sub>および1mMフッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)を含むものなどの適当な結合緩衝液中で4 $^{\circ}$ ~45 $^{\circ}$ で15分~3時間インキュベートする。この調製物をセントリコン10アセンブリ(Millipore)によって遠心分離して、任意の結合していないペプチドを除去する。ペプチドとストレスタンパク質の結合をSDS-PAGEによって検定することができる。これは、内在性hsp-ペプチド複合体から解離されたペプチドのMHC-ペプチド複合体から単離したペプチドの*in vitro*での複合体形成についての好ましい方法である。

10

#### 【0241】

限定するものではなく例として、またhsp70と、タンパク質などの外来性抗原分子との複合体を生成するのに好ましい本発明の別の実施形態では、精製したhsp 5~10マイクログラムを、100マイクロリットルの体積の20mMリン酸ナトリウム緩衝液pH7.5、0.5M NaCl、3mM MgCl<sub>2</sub>および1mM ADP中における等モル量の抗原分子と一緒に37 $^{\circ}$ で1時間インキュベートする。このインキュベーション混合物をリン酸緩衝食塩水でさらに1mlに希釈する。

#### 【0242】

限定するものではなく例として、またgp96もしくはhsp90とペプチドとの複合体を生成するのに好ましい本発明の別の実施形態では、精製したgp96またはhsp90 5~10マイクログラムを、20mMリン酸ナトリウム緩衝液pH7.5、0.5M NaCl、3mM MgCl<sub>2</sub>を含むものなどの適当な緩衝液中における等モル量または過剰量の抗原ペプチドと一緒に50~65 $^{\circ}$ で5~20分間インキュベートする。このインキュベーション混合物を室温まで冷却させ、必要に応じてセントリコン10アセンブリ(Millipore)によって1回または複数回遠心分離して、任意の結合していないペプチドを除去する。

20

#### 【0243】

複合体形成に続いて、免疫原性ストレスタンパク質-抗原分子複合体を、例えば、以下に記載した混合リンパ球標的細胞アッセイ(MLTC)を用いて、必要に応じて*in vitro*で検定することができる。免疫原性複合体を単離した後、それらを、以下で述べる好ましい投与プロトコルおよび賦形剤を用いて、必要に応じて動物モデルにおいてさらに特徴付けることができる。

30

#### 【0244】

##### 5.14 hspおよび抗原分子のオリゴマー化

本発明のオリゴマー化剤は、2個以上のhsp、またはhspと抗原分子の複合体のオリゴマー化を促進する当技術分野で公知の任意の化合物であってよい。使用できるオリゴマー化剤としては、共有結合によってオリゴマー化を促進する分子および熱ショックタンパク質またはhsp-抗原分子複合体との非共有結合によってオリゴマー化を促進する分子が挙げられる。一般に、それらと共有結合することによって2個以上の部分の間でオリゴマー化を促進するオリゴマー化剤は、「架橋剤」または「架橋結合剤」と呼ばれている。架橋剤は、通常定義された化学基と反応して、2種以上の部分の結合を可能にしてオリゴマーを生じ得る化合物である。

40

#### 【0245】

架橋剤は二官能性；すなわち、2種の異なる部分または同じ部分における2つの領域と反応し共有結合する2つの反応性基を含み、あるいは多官能性、例えば、三官能性であってよい。さらに、架橋剤は、ホモ官能性(例えば、ホモ二官能性)であってもヘテロ官能性(例えば、ヘテロ二官能性)であってもよい。ホモ二官能性架橋結合剤では、反応性基は同一であり、これらの試薬は官能基のように結合する。ヘテロ二官能性架橋結合剤では、反応性基は異なる化学的性質を有し、異なった官能基の間で架橋を形成させる。いくつかの例示的なホモ二官能性およびヘテロ二官能性架橋結合剤を以下で述べる。

50

## 【0246】

本明細書では、「オリゴマー化剤」という用語には、非共有結合によって免疫治療部分、例えば、熱ショックタンパク質のオリゴマー化を促進する試薬も含まれる。こうしたオリゴマー化剤の例には、2価(または二重特異性)抗体があるが、それだけには限定されない。ビオチン化およびハプテン化試薬ならびにそれらの同族の結合パートナーは、架橋結合剤または非共有結合オリゴマー化剤のいずれかであると考えられる。これらの試薬は、ビオチンまたはハプテン部分をオリゴマー化すべき標的と架橋または共有結合させる。次いで、共有結合的に改変した標的のビオチンまたはハプテン部分は、他の標的分子に付着できるアビジン、ストレプトアビジン(ビオチン)または免疫グロブリンG(IgG)と非共有結合的に相互作用する。アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン(NeutrAvidin) 10  
 )ビオチン-結合タンパク質およびカプトアビジン(CaptAvidin)ビオチン-結合タンパク質は、ビオチン化した標的の4個の分子と密接に結合でき、IgGは2個のハプテンと結合できる。

## 【0247】

本発明は、第1の熱ショックタンパク質分子と第2の熱ショックタンパク質分子を結合させる化学架橋結合剤を提供する。この第1および第2の熱ショックタンパク質分子は、同一であり得るが、同一でなくてもよい。一実施形態では、架橋結合剤は、ホモ二官能性架橋結合剤であり、通常、第1の熱ショックタンパク質分子上のアミンまたはチオール基と第2の熱ショックタンパク質分子上のアミンまたはチオール基とをそれぞれ結合させる。ホモ二官能性架橋結合剤としては、例えば、グルタルアルデヒド、ビス(イミドエステル)、 20  
 ビス(スクシンイミジルエステル)、ジイソシアン酸エステルおよび二酸塩化物などのホモ二官能性アミン架橋剤が挙げられる。ホモ二官能性架橋剤の例としては、p-アジドフェニルグリオキサール水和物(APG); 1,8-ビス-マレイミドトリエチレングリコール(BM[PEO]<sub>3</sub>); 3,3'-ジチオビス[スルホスクシンイミジルプロピオネート]; (DTSSP); ビス[2-(スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(スルホ-BSOCOES); ジスクシンイミジルスベレート(DSS); エチレングリコールビス[スルホスクシンイミジルスクシネート](スルホ-EGS); N,N'-ビス(3-マレイミドプロピオニル)-2-ヒドロキシ-1,3-プロパンジアミン; PEGビス(p-ニトロ-フェニルカルボネート)およびジメチルスベルイミデートジヒドロクロリド(Dimethyl suberimidate dihydrochloride)(DMS)が挙げられるが、それだけには限定されない。上記、ならびに他のホモ二官能性架橋剤は、例えば、Sigma(米国ミズー 30  
 リ州St. Louis)、Pierce Biotechnology, Inc.(米国イリノイ州Rockford)またはMolecular Probes(米国オレゴン州Eugene)から市販されている。本明細書における開示に基づいて、当業者は、本発明で使用する他の架橋剤を選択または設計することができるだろう。

## 【0248】

別の実施形態では、架橋結合剤は、好ましくはカップリングまたは活性化部分(例えば、チオール、トリフレート、トレシレート(tresylate)、アジリズン(aziridone)、オキシラン、または好ましくはマレイミドと一緒に)と誘導体化させたポリエチレングリコール(「PEG」)である。マレイミドモノメトキシPEGなどの化合物は、例示的な活性化PEG化合物である。他の例としては、モノメトキシポリ(エチレングリコール)-マレイミド(mPEG-MAL) 40  
 )またはNHS-ポリ(エチレングリコール)-マレイミド(PEG-MAL)が挙げられる。本発明は、PEGリンカーを用いて第1および第2の熱ショックタンパク質分子を架橋することを含む。

## 【0249】

別の実施形態では、架橋結合剤は、ヘテロ二官能性架橋結合剤であり、通常、第1の熱ショックタンパク質分子上のアミン基と第2の熱ショックタンパク質分子上のチオール基とを結合させ、逆もまた同様である。ヘテロ二官能性架橋剤の例としては、N-スクシンイミジル-S-アセチル-チオアセテート(SATA)、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(sSMCC)、2-イミノチオラン(トラウト薬(Traut's agent)); N-[ 50  
 -マレイミドアセトキシ]スクシンイミドエステル(AMAS); N- -マレイミドプロピオン酸(B

MPA); N-[ $\alpha$ -マレイミドプロピオン酸]ヒドラジド・TFA(BMPH); 1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミドヒドロクロリド(EDC); [N- $\epsilon$ -マレイミドカプロイルオキシ]スクシンイミドエステル(EMCS); N-[ $\gamma$ -マレイミドブチリルオキシ]スクシンイミドエステル(GMBS); m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)およびN-スクシンイミジルヨードアセテート(SIA)が挙げられるが、それだけには限定されない。上記、ならびに他のホモ二官能性架橋剤は、例えば、Sigma(米国ミズーリ州St. Louis)、Pierce Biotechnology, Inc.(米国イリノイ州Rockford)またはMolecular Probes(米国オレゴン州Eugene)から市販されている。本明細書における開示に基づいて、当業者は、本発明で使用する他の架橋剤を選択または設計することができるだろう。

#### 【0250】

別の実施形態では、架橋結合剤は三官能性である。三官能性架橋剤は、1分子当り3個の異なる反応性または複合体形成基をもち、3個の異なる生物学的分子；例えば、熱ショックタンパク質をオリゴマー化させることができる。三官能性架橋剤の例としては、 $\alpha$ -[トリリス(ヒドロキシメチル)ホスフィノ]プロピオン酸(THPP)およびトリリス-スクシンイミジルアミノトリアセテート(TSAT)が挙げられるが、それだけには限定されない。上記、ならびに他のホモ二官能性架橋剤は、例えば、Sigma(米国ミズーリ州St. Louis)、Pierce Biotechnology, Inc.(米国イリノイ州Rockford)またはMolecular Probes(米国オレゴン州Eugene)から市販されている。本明細書における開示に基づいて、当業者は、本発明で使用する他の架橋剤を選択または設計することができるだろう。

#### 【0251】

本発明の架橋結合剤は、2種以上の熱ショックタンパク質分子の間でオリゴマー化を促進できる任意の化合物を意味する。一実施形態では、本発明の架橋結合剤は、直鎖状または分枝状置換脂肪族化合物である。別の実施形態では、本発明の架橋結合剤は、シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロアルキルまたは置換シクロヘテロアルキルである。一実施形態では、架橋結合剤は光反応性である。

#### 【0252】

一実施形態では、本発明のオリゴマー化剤は、ストレプトアビジン-ビオチンリンカーである。この実施形態では、ビオチンは、第1の熱ショックタンパク質と結合でき、一方アビジンまたはストレプトアビジンは、第2の熱ショックタンパク質と結合することができる。アビジンおよびストレプトアビジンに対するビオチンの強親和性は、今度はビオチンおよびアビジン/ストレプトアビジンに結合している熱ショックタンパク質分子のオリゴマー化を促進できる安定なビオチン-アビジンまたはビオチン-ストレプトアビジン結合をもたらす。いくつかの実施形態では、第1および第2の熱ショックタンパク質分子は同一である。

#### 【0253】

別の実施形態では、オリゴマー化剤は多価、例えば、2価(二重特異性とも呼ばれる)抗体である。二重特異性抗体は、それに対して抗体が特異的な第1および第2のタンパク質、例えば、熱ショックタンパク質と非共有結合的に結合し、それによって第1および第2のタンパク質のオリゴマー化が促進される。いくつかの実施形態では、第1および第2のタンパク質は同一である。

#### 【0254】

本発明によれば、熱ショックタンパク質部分、例えば、hsp-ペプチド複合体の免疫調節活性を破壊しないオリゴマー化剤を使用する。一実施形態では、オリゴマー化剤は、抗原分子、例えば、ペプチドと熱ショックタンパク質の結合を阻害しない。別の実施形態では、オリゴマー化剤は、hspとその受容体の結合を阻害しない。別の実施形態では、オリゴマー化剤は、中性pHで活性および機能的である。

#### 【0255】

上記の開示に基づいて、熱ショックタンパク質のオリゴマー化を促進する他のオリゴマー化剤は、当業者に明らかであろう。上記の開示したもの、ならびに他の架橋剤は、いずれもその全体が参照により本明細書に組み込まれるSigma(米国ミズーリ州St. Louis; Sig

10

20

30

40

50

カタログ、2002~2003、573~580頁参照のこと)、Pierce Biotechnology, Inc.(米国イリノイ州Rockford; Pierce Biotechnology, Inc. カタログ、2001~2002、294~334頁を参照のこと)またはMolecular Probes(米国オレゴン州Eugene; Molecular Probes ハンドブック、第9版、2002、第5章を参照のこと)などいくつかの会社から市販されている。

#### 【0256】

本発明の特定の実施形態では、いくつかの化合物は、オリゴマー化剤として使用していない。一実施形態では、本発明のオリゴマー化剤は、レクチンではない。別の実施形態では、本発明のオリゴマー化剤は、レクチンである。別の実施形態では、本発明のオリゴマー化剤は、グルタルアルデヒドではない。別の実施形態では、本発明のオリゴマー化剤は、スルホスクシンイミジル(4-アジドサリチルアミド)ヘキサノエート(「SASD」)ではない。さらに別の実施形態では、本発明のオリゴマー化剤は、BAGファミリートンパク質のメンバーではない(TakayamaおよびReed、2001、Nature Cell Biology 3: E237~E241を参照のこと)。

10

#### 【0257】

別の実施形態では、本発明のオリゴマー化剤は、4,4'-ジアニリノ-1,1'-ビナフチル-5,5'-ジスルホン酸(「ビス-ANS」)、1,8-アニリノナフタレンスルホネート(「8-ANS」)またはN-エチルカルボキサミドアデノシン(「NECA」)ではない。別の実施形態では、本発明のオリゴマー化剤は、アデノシン部分またはその構造擬態物質を含む化合物ではない。アデノシン部分の構造擬態物質には、アデノシンの2'、3'および5'位で種々の任意の置換が起こる分子が含まれる(Gewirthら、米国特許出願公開2002/0160496を参照のこと)。

20

#### 【0258】

##### 5.15 hsp-ペプチド複合体の免疫原性の決定

任意選択で、当技術分野で公知の任意の方法を用いて、本発明の特異的な複合体および希釈した複合体を免疫原性について検定することができる。限定するものではなく例として、以下の手順の1つを使用することができる。

#### 【0259】

##### 5.15.1 MLTCアッセイ

簡単に言えば、任意の好都合な投与経路を用いてある量の特異的または希釈したhsp-ペプチド複合体をマウスに注射する。陰性対照として、例えば、非特異的または希釈した複合体として使用すべきhsp-ペプチド複合体を他のマウスに注射する。特異的な抗原を含むことが知られている細胞、例えば、腫瘍細胞または感染症の原因物質に感染した細胞は、このアッセイでは陽性対照となりうる。マウスに2回、7~10日間空けて注射する。最後の免疫感作から10日後、脾臓を取り出し、リンパ球を放出する。放出したリンパ球は、続いて、所定の抗原を発現していた死細胞を加えることによって、in vitroで再刺激することができる。

30

#### 【0260】

例えば、 $8 \times 10^6$ 個の免疫脾臓細胞を、10%ウシ胎児血清を含有するRPMI培地3ml中における所定の抗原を含む $4 \times 10^4$ 個のマイトマイシンC処理または $\gamma$ -照射(5~10,000ラド)細胞(または場合によっては適切な遺伝子でトランスフェクトされた細胞)で刺激することができる。ある特定の場合では、T細胞増殖因子の供給源として2次混合したリンパ球培養上清33%が培地中に含まれていてよい(Glasebrookら、1980、J. Exp. Med. 151: 876を参照のこと)。免疫感作後の一次細胞傷害性T細胞応答を試験するために、脾臓細胞を刺激しないで培養することができる。いくつかの実験では、免疫したマウスの脾臓細胞を抗原性が異なる細胞で再刺激して、細胞傷害性T細胞応答の特異性を決定することができる。

40

#### 【0261】

6日後に培養物を、4時間の $^{51}\text{Cr}$ -放出アッセイで細胞毒性について試験する(Palladinoら、1987、Cancer Res. 47: 5074~5079およびBlachereら、1993、J. Immunotherapy 14: 352~356を参照のこと)。このアッセイでは、混合したリンパ球培養物を標的細胞懸濁液に加えて、異なるエフェクター:標的(E:T)の比(通常1:1~40:1)を得る。 $1 \times 10^6$ 個の標的細胞を20mCi $^{51}\text{Cr}/\text{ml}$ 含有培地中で37°Cで1時間インキュベートすることによって、標的

50

細胞を前標識する。標識化に続いて、細胞を3回洗浄する。各アッセイ点(E:T比)を三重で行い、適切な対照を取り込んで自然な<sup>51</sup>Cr放出(アッセイにリンパ球を加えない)および100%放出(細胞を洗浄剤で溶解する)を測定する。細胞混合物を4時間インキュベートした後、200gにおける5分間の遠心分離によって細胞をペレットにする。上清中に放出された<sup>51</sup>Crの量をカウンターによって測定する。試験試料中のcpmから自然放出されたcpmを引き算した値を、洗浄剤放出cpm全体から自然放出されたcpmを引き算した値で割り算した値として細胞毒性%を測定する。

#### 【0262】

MHCクラスIカスケードをブロックするために、K-44ハイブリドーマ細胞(抗MHCクラスIハイブリドーマ)由来の濃縮したハイブリドーマ上清を試験試料に加えて、最終濃度を12.5%にする。 10

#### 【0263】

##### 5.15.2 CD<sup>4+</sup>T細胞増殖アッセイ

本質的に、KruseおよびSebald、1992、EMBO J. 11: 3237~3244によって記載されているように、一次T細胞を脾臓、新鮮な血液、またはCSFから得て、FICOLL-PAQUE PLUS(Pharmacia、スウェーデンUpsalla)を用いた遠心分離によって精製する。末梢血単核球細胞を、抗原分子を発現している細胞の溶解産物と一緒に7~10日間インキュベートする。任意選択で、アッセイの24~48時間前に抗原提示細胞を培養物に加えて、溶解産物中の抗原を処理し提示することができる。次いで、細胞を遠心分離によって収集し、RPMI 1640培地(GibcoBRL、米国メリーランド州Gaithersburg)中で洗浄する。5×10<sup>4</sup>個の活性化T細胞/ウェル(PHA芽細胞)を、96ウェルプレート中の10%ウシ胎児血清、10 mM HEPES、pH7.5、2mM L-グルタミン、100単位/mlペニシリンG、および100 μg/ml硫酸ストレプトマイシンを含有するRPMI 1640培地中に37 °Cで72時間入れておき、1 μCi<sup>3</sup>H-チミジン(DuPont NEN、米国マサチューセッツ州Boston)/ウェルで6時間パルスし、収集し、トップカウント(TOPCOUNT)シンチレーションカウンター(Packard Instrument Co.、米国コネチカット州Meriden)で放射能を測定する。 20

#### 【0264】

##### 5.15.3 抗体反応アッセイ

本発明の特定の実施形態では、hsp-ペプチド複合体の免疫原性を、複合体を用いたワクチン接種に対して産生された抗体を測定することによって決定する。実施形態の一形態では、ワクチン(例えば、A 42)に使用する、精製した、非hsp複合体形態のペプチドの0.75 μg/ml PBS溶液50 μl/ウェルで、マイクロタイタープレート(96ウェル免疫プレートII、Nunc)を4 °Cで16時間、および20 °Cで1時間コーティングする。ウェルを空にし、1ウェル当たりPBS-T-BSA(0.05%(v/v)ツイーン20および1%(w/v)ウシ血清アルブミンを含有するPBS)200 μlで20 °Cで1時間ブロックし、次いでPBS-Tで3回洗浄する。ワクチン接種した動物(モデルマウスまたはヒト患者など)由来の血漿またはCSF 50 μl/ウェルを20 °Cで1時間塗布し、プレートをPBS-Tで3回洗浄する。次いで、抗ペプチド抗体活性を、適宜ヒツジ抗マウスまたは抗ヒト免疫グロブリン50 μl/ウェルと一緒に20 °Cで1時間インキュベートした後、熱量測定し、PBS-T-BSA中で1:1,500に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ(Amersham)と結合させ、そして(上記のようにPBS-Tでさらに3回洗浄した後)o-フェニレンジアミン(OPD)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>基質溶液50 μlと結合させる。5分後に2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 150 μlで反応を停止し、コントロールSLT-210光度計(SLT Lab-instr.、スイスZurich)で492nm(基準620nm)における吸光度を決定する。 40

#### 【0265】

##### 5.15.4 サイトカイン検出アッセイ

特異的なサイトカインのレベルを検出および定量することによって、本発明のhsp-ペプチド複合体に対するCD<sup>4+</sup>T細胞増殖応答を測定することができる。一実施形態では、例えば、IFN-γ検出アッセイを用いて細胞内サイトカインを測定して、本発明の複合体の免疫原性を試験することができる。この方法の例では、hsp-ペプチド複合体で治療した被験者由来の末梢血単核球細胞を、所与の腫瘍のペプチド抗原または感染症の原因物質のペプチ 50

ド抗原で刺激する。次いで、フローサイトメトリーによって検出可能なT細胞特異的標識抗体、例えば、FITC結合抗CD8およびPerCP標識抗CD4抗体で細胞を染色する。洗浄後、細胞を固定し、透過させ、ヒトIFN- (PE抗IFN-)とよく反応する色素標識抗体と反応させる。標準的な技術を用いてフローサイトメトリーによって試料を分析する。

#### 【0266】

あるいは、フィルター免疫アッセイ、酵素結合免疫スポットアッセイ(ELISPOT)を使用して、T細胞の周囲の特異的なサイトカインを検出することができる。一実施形態では、例えば、ニトロセルロースで裏打ちされたマイクロタイタープレートを精製したサイトカイン特異的1次抗体、すなわち、抗IFN- でコーティングし、このプレートをブロックして他のタンパク質の非特異的結合によるバックグラウンドを防ぐ。hsp-ペプチド複合体で治療した被験者から得られたサイトカイン分泌細胞を含む単核血球の試料をマイクロタイタープレートのウェル上に希釈する。標識、例えば、ビオチン標識された、2次抗サイトカイン抗体を加える。次いで、抗体サイトカイン複合体を検出することができる。酵素結合ストレプトアビジン-サイトカイン分泌細胞は、視覚的、顕微鏡的、または電子的検出法によって「スポット」として現れることになるだろう。

#### 【0267】

##### 5.15.5 四量体アッセイ

別の実施形態では、「四量体染色」アッセイ(Altmanら、1996、Science 274: 94~96)を使用して、抗原特異的T細胞を決定することができる。例えば、一実施形態では、腫瘍特異的抗原などの特異的なペプチド抗原を含むMHC分子は、可溶性ペプチド四量体を作製するために多量体化し、また例えば、ストレプトアビジンと複合体を形成することによって標識することができる。次いで、MHC-ペプチド抗原複合体を、hsp-ペプチド複合体で治療した被験者から得られたT細胞の集団と混合する。ビオチンを使用して、所定の抗原、すなわち、腫瘍特異的抗原を発現するT細胞を染色することができる。

#### 【0268】

##### 5.16 養子免疫療法との併用

養子免疫療法とは、場合によって、その細胞が直接または間接的に、腫瘍細胞および/または抗原成分への特異免疫あるいは腫瘍の退縮あるいは感染症の治療を媒介することを目的として免疫細胞を宿主に投与する、癌または感染症を治療するための治療手法を意味する。(その全体が参照により本明細書に組み込まれる1999年11月16日発行の米国特許第5,985,270号を参照のこと)。本明細書に記載の方法によれば、任意選択のステップとして、APCを抗原(または免疫原性)分子と複合体を形成したhspで感作し、養子免疫療法で使用する。

#### 【0269】

特定の実施形態では、任意の投与経路を用いる希釈した複合体の投与による療法は、任意選択でhsp-抗原分子複合体で感作したAPCを用いる養子免疫療法と併用することができる。hsp-ペプチド複合体で感作したAPCは、単独で、希釈したhsp-ペプチド複合体と合わせて、あるいは希釈したhsp-ペプチド複合体を投与する前または後に投与することができる。さらに、それだけには限らないが、例えば、皮下、静脈内または筋肉内を含めて、投与方法は異なっていてよいが、皮内または粘膜が好ましい。

#### 【0270】

##### 5.16.1 マクロファージおよび抗原提示細胞の調製

Inaba、K.ら、1992、J. Exp. Med.、176: 1693~1702によって記載されているように、それだけには限らないが、マクロファージ、樹状細胞およびB細胞を含む抗原提示細胞は、ヒト末梢血または骨髄由来の幹細胞および前駆細胞からin vitroで生成することによって得ることが好ましい。

#### 【0271】

APCは、当技術分野で公知の様々な方法のいずれかによって得ることができる。好ましい態様では、ヒト血液細胞から得られたヒトマクロファージを使用する。限定するものではなく例としては、マクロファージを以下のように得ることができる：

10

20

30

40

50

フィコールハイパック比重遠心法によって単核細胞を患者(好ましくは治療すべき患者)の末梢血から単離し、患者自身の血清または他のAB+ヒト血清であらかじめコーティングした組織培養皿上に播く。細胞を37℃で1時間インキュベートし、次いでピペッティングによって付着していない細胞を取り除く。皿に残った付着細胞に冷(4℃)1mM EDTAのリン酸緩衝生理食塩水溶液を加え、皿を室温で15分間放置する。細胞を収集し、RPMI緩衝液で洗浄し、RPMI緩衝液中に懸濁する。Inaba、K.ら、1992、J. Exp. Med.、176: 1693~1702によって詳細に記載されているように、マクロファージ-コロニー刺激因子(M-CSF)と一緒に37℃でインキュベートすることによってマクロファージの数が増加し、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)と一緒にインキュベートすることによって樹状細胞の数が増加し得る。

10

## 【0272】

## 5.16.2 hsp-ペプチド複合体によるマクロファージおよびAPCの感作

APCは、好ましくは複合体と一緒にin vitroで細胞をインキュベートすることによって、抗原分子に結合したhspで感作することができる。APCは、hsp-複合体と一緒にin vitroで37℃で15分~24時間インキュベートすることによって、hspと抗原分子の複合体で感作する。限定するものではなく例としては、 $4 \times 10^7$ 個のマクロファージを、1ml当り10マイクログラムのgp96-ペプチド複合体または1ml当り100マイクログラムのhsp90-ペプチド複合体と一緒に単純RPMI培地1ml中で37℃で15分~24時間インキュベートすることができる。細胞を3回洗浄し、患者に注射するのに好都合な濃度(例えば、 $1 \times 10^7$ /ml)で好ましくは無菌の生理学的培地中に再懸濁する。感作したAPCを注射する患者は、もともとそのAPCを単離した患者(自己実施形態)であることが好ましい。

20

## 【0273】

場合によっては、感作したAPCの、例えば、抗原特異的、クラスI拘束性細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を刺激する能力は、CTLを刺激して腫瘍壊死因子を放出するそれらの能力およびこのようなCTLの標的として働くそれらの能力によってモニターすることができる。

## 【0274】

## 5.16.3 感作したAPCの再注入

hsp-抗原分子で感作したAPCを、従来の臨床手順によって患者の全身に、好ましくは静脈内に再注入する。これらの活性化細胞を全身投与によって優先的に自己患者に再注入する。患者には一般に、患者の症状に応じて約 $10^6$ ~約 $10^{12}$ 個の感作されたマクロファージを与える。養生法によっては、患者には任意選択でさらに、それだけには限らないが、サイトカインIFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-6、TNFまたは他のサイトカイン増殖因子を含む生物学的応答調節物質を適当な投与量で与えることができる。

30

## 【0275】

## 5.17 受動免疫療法

本発明の組成物は、癌および感染症に対する受動免疫療法にも使用することができる。受動免疫は、異種生物に対して指向されたあらかじめ形成された抗体の投与によって得られる宿主の短期保護である。例えば、感染性生物に感染した細胞から得られた希釈したhsp-ペプチド複合体を含む本発明の組成物は、被験者中の免疫応答を誘発するのに使用することができる。被験者から取り出し疾患の治療および予防に使用した血清は、別の被験者中で感染性生物を生じた。

40

## 【0276】

## 5.18 疾患の予防および治療

本発明によれば、抗原ペプチド、例えば、抗原細胞またはウィルス粒子の消化された細胞基質および/または膜由来タンパク質由来のペプチドとhspの複合体を含む本発明の組成物を、癌または感染症にかかっている被験者に投与する。一実施形態では、「治療」または「治療する」は、癌または感染症、あるいは少なくとも1種のその識別可能な症状の回復を意味する。別の実施形態では、「治療」または「治療する」は、被験者によって必ずしも識別可能ではない、癌または感染症に関連した少なくとも1種の測定可能な物理的パラメーターの改善を意味する。さらに別の実施形態では、「治療」または「治療する」は

50

、癌または感染症の進行を、物理的に、例えば、識別可能な症状の安定化、あるいは生理学的に、例えば、物理的パラメーターの安定化、あるいはその両方によって抑制することを意味する。

【0277】

ある実施形態では、本発明の組成物は、かかる癌または感染症に対する予防的手段として被験者に投与する。本明細書では、「予防」または「予防する」は、所与の癌または感染症にかかるリスクの低減を意味する。実施形態の一形態では、本発明の組成物は、癌に対する遺伝的素因を有する被験者に予防的手段として投与する。実施形態の別の形態では、本発明の組成物は、それだけには限らないが、化学物質、放射線、タバコの煙、またはその組合せを含む発癌物質への曝露に直面している被験者、あるいは感染症の原因物質への曝露に直面している被験者に予防的手段として投与する。特定の実施形態では、本発明の組成物は、環境的に発癌物質、例えば、タバコの煙に曝されている被験者に予防的手段として投与する。

10

【0278】

例えば、ある実施形態では、本発明の組成物を投与すると、癌細胞または感染因子の増殖の抑制または低減が、前記組成物の不在下での増殖に対して少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%生じる。

20

【0279】

本発明の方法によって調製される組成物は、熱ショックタンパク質と抗原ペプチドの集団との複合体を含む。この組成物は、腫瘍部位で炎症反応を誘発するようであり、治療した癌患者の腫瘍負荷量の退行を最終的に引き起こし得る。本発明の方法によって調製される組成物は、被験者の免疫能力を高め、感染因子に対する特異免疫または前新生物および新生物細胞に対する特異免疫を誘発することができる。これらの組成物は、感染症の発症および進行を防止し、腫瘍細胞の増殖および進行を抑制する能力を有する。

【0280】

併用療法は、本発明のhsp-ペプチド複合体または組成物を別のモダリティと一緒に使用して、癌および感染症を予防または治療することを意味する。本発明の複合体の投与は、抗癌剤または抗感染症薬の効果を増強でき、逆もまた同様である。好ましくは、この別の形態のモダリティは、非hsp系モダリティであり、すなわち、このモダリティは、成分として熱ショックタンパク質を含まない。この手法は一般に、併用療法、補助療法または結合療法と呼ばれる(これらの用語は本明細書で互換的に用いられる)。併用療法を用いる場合、相加効力または相加治療効果を観察することができる。治療有効性が相加よりも高い相乗的な結果も期待することができる。併用療法の使用により、治療モダリティまたはhsp-ペプチド複合体単独での投与よりも優れた治療プロフィールも得ることができる。相加または相乗効果により、いずれか一方または両方のモダリティの投与量および/または投与頻度の調節が可能になって、不要または有害な作用を低減または回避することができる。

30

40

【0281】

様々な特定の実施形態では、併用療法は、治療モダリティで治療した被験者へのhsp-ペプチド複合体の投与を含み、単独で投与した治療モダリティは、被験者を治療するのに臨床的に適切ではなく、被験者は追加の有効療法が必要であり、例えば、被験者はhsp-ペプチド複合体を投与しないと治療モダリティに应答しないほどである。こうした実施形態に含まれているのは、治療モダリティを受けた被験者にhsp-ペプチド複合体を投与することを含む方法であり、療法に应答した前記被験者は、さらに副作用、再発、発生した耐性などに苦しむ。このような被験者は、治療モダリティ単独では治療に非应答性または不応性であり、すなわち、少なくともほぼ大部分の癌細胞もしくは病原体が死滅していない、またはそれらの細胞分裂が停止していない可能性がある。治療モダリティ単独には不応性で

50

ある被験者へのhsp-ペプチド複合体の投与を含む本発明の方法は、本発明の方法によって企図されるように投与すると治療モダリティの治療有効性を向上させ得ることをこれらの実施形態は示している。治療モダリティの有効性の決定は、当技術分野で公知の方法を用いて *in vivo* または *in vitro* で検定することができる。当技術分野で受け入れられている不応性の意味は、癌との関連でよく知られている。一実施形態では、癌もしくは感染症は、不応性または非応答性であり、それぞれ癌細胞もしくは病原体の数が著しく減少していない、または増加している。これらのうち、治療被験者は、化学療法または放射線治療を受けているものである。

#### 【0282】

本発明によれば、本発明の複合体は、多くの異なるタイプの治療モダリティと併せて使用することができる。こうしたモダリティの一部は、特定タイプの癌または感染症に特に有用である。他の多くのモダリティは、免疫系の機能化に効果があり、一般に新生物疾患および感染症の両方に適用することができる。

#### 【0283】

一実施形態では、本発明の複合体を1種または複数の生物学的応答調節物質と併せて使用して、癌または感染症を治療する。生物学的応答調節物質の一群は、サイトカインである。このような一実施形態では、hsp-ペプチド複合体を与えた被験者にサイトカインを投与する。別のこのような実施形態では、サイトカインと併せて化学療法薬を与えた被験者にhsp複合体を投与する。様々な実施形態では、1種または複数のサイトカインを使用することができる。IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IFN、IFN、IFN、TNF、TNF、G-CSF、GM-CSF、TGF-、IL-15、IL-18、GM-CSF、INF-、INF-、SLC、内皮単球活性化タンパク質-2(EMAP2)、MIP-3、MIP-3、またはHLA-B7などのMHC遺伝子からなる群から選択される。さらに、他の例示的なサイトカインとしては、それだけには限らないが、TNF 関連アポトーシス誘発リガンド(TRAIL)、TNF 関連活性化誘発サイトカイン(TRANCE)、TNF に関連するアポトーシスの弱誘導物質(TWEAK)、CD40リガンド(CD40L)、リンホトキシン(LT-)、リンホトキシン(LT-)、OX40リガンド(OX40L)、Fasリガンド(FasL)、CD27リガンド(CD27L)、CD30リガンド(CD30L)、41BBリガンド(41BBL)、APRIL、LIGHT、TL1、TNFSF16、TNFSF17、およびAITR-L、またはその機能性部分を含むTNFファミリーの他のメンバーが挙げられる。TNFファミリーの一般的な総説については、例えば、Kwonら、1999、Curr. Opin. Immunol. 11: 340~345を参照のこと。hsp-ペプチド複合体は、治療モダリティの前に投与することが好ましい。特定の実施形態では、癌の治療のために、本発明の1種または複数の複合体を、IL-12と併せてシクロホスファミドを与えた被験者に投与する。

#### 【0284】

別の実施形態では、本発明の複合体は、免疫系の様々なリガンド、受容体およびシグナル伝達分子のアゴニストまたはアンタゴニストである1種または複数の生物学的応答調節物質と併せて使用する。例えば、生物学的応答調節物質としては、Toll様受容体(TLR-2、TLR-7、TLR-8およびTLR-9)のアゴニスト；LPS；41BBリガンド、OX40リガンド、ICOS、およびCD40のアゴニスト；ならびにFasリガンド、PD1、およびCTLA-4のアンタゴニストが挙げられるが、それだけには限定されない。これらのアゴニストおよびアンタゴニストは、抗体、抗体フラグメント、ペプチド、ペプチド擬態化合物、および多糖類であってよい。

#### 【0285】

さらに別の実施形態では、本発明の複合体は、免疫刺激性核酸である1種または複数の生物学的応答調節物質と併せて使用する。その多くがメチル化されていないCpGモチーフを含むオリゴヌクレオチドであるこのような核酸は、脊椎動物のリンパ球の分裂を促進し、免疫応答を高めることが知られている。Woolridgeら、1997、Blood 89: 2994~2998を参照のこと。このようなオリゴヌクレオチドは、いずれもその全体が本明細書に組み込まれる国際特許公開WO 01/22972、WO 01/51083、WO 98/40100およびWO 99/61056、ならびにいずれもその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第6,207,646号、第6,194,388号、第6,218,371号、第6,239,116号、第6,429,199号、および第6,406,705号に記載されている。

YpGおよびCpRモチーフを含むホスホロチオエート型オリゴデオキシヌクレオチドなど他の種類の免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、Kandimallaらによって「Effect of Chemical Modifications of Cytosine and Guanine in a CpG-Motif of Oligonucleotides: Structure-Immunostimulatory Activity Relationships.」Bioorganic & Medicinal Chemistry 9 : 807~813 (2001)に記載されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。さらに含まれるのはCpGジヌクレオチドを欠く免疫刺激性オリゴヌクレオチドであり、これは、粘膜経路(低用量投与を含む)によって、または高用量で非経口経路によって投与すると、しばしばCpG核酸と同じ程度に抗体反応が増大するが、この反応はTh2依存性であった(IgG1>>IgG2a)。その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開第20010044416 A1号を参照のこと。免疫刺激性オリゴヌクレオチドの活性を測定する方法は、

10

#### 【0286】

さらに別の実施形態では、本発明の複合体は、1種または複数のアジュバントと併せて使用する。アジュバントは、別々にまたは本発明の複合体と混合して組成物中に含めて投与することができる。全身アジュバントは、非経口的に送達できるアジュバントである。全身アジュバントには、貯蔵効果を形成するアジュバント、免疫系を刺激するアジュバントおよびその両方を行うアジュバントが含まれる。本明細書では、貯蔵効果を形成するアジュバントは、体内で抗原をゆっくり放出させ、それによって免疫細胞の抗原への曝露が長くなるアジュバントである。このクラスのアジュバントには、ミョウバン(例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム);あるいはSeppic ISAシリーズのモンタニドアジュバント(例えば、モンタニドISA 720、AirLiquide、フランスParis)など、鉱油、非鉱油、油中水または油中水中油エマルジョン、水中油エマルジョンを含むエマルジョン系製剤; MF-59(スパン85およびツイーン80で安定化した水中スクアレンエマルジョン; Chiron Corporation、米国カリフォルニア州Emeryville); およびPROVAX(安定化界面活性剤およびミセル形成剤を含む水中油エマルジョン; IDEC、Pharmaceuticals Corporation、米国カリフォルニア州San Diego)が含まれるが、それだけには限定されない。

20

#### 【0287】

他のアジュバントは、免疫系を刺激し、例えば、免疫細胞にサイトカインまたはIgGを産生および分泌させる。このクラスのアジュバントには、CpGオリゴヌクレオチドなどの免疫刺激性核酸; QS21などシャボンノキ(Q. saponaria tree)の樹皮から精製したサポニン; ポリ[ジ(カルボキシルアトフェン-オキシ)ホスファゼン(PCPPポリマー; Virus Research Institute、USA); モノホスホリルリピドA(MPL; Ribic ImmunoChem Research, Inc.、米国モンタナ州Hamilton)、ムラミルジペプチド(MDP; Ribic)およびトレオニル-ムラミルジペプチド(t-MDP; Ribic)などのリポ多糖類(LPS)の誘導體; OM-174(リピドAに関連するグルコサミン二糖類; OM Pharma SA、スイスMeyrin); ならびにリーシュマニア伸長因子(精製したリーシュマニアタンパク質; Corixa Corporation、米国ワシントン州Seattle)、アミノアルキルグルコサミニドホスフェート(AGP; Corixa Corporation、米国ワシントン州Seattle)が含まれるが、それだけには限定されない。

30

40

#### 【0288】

他の全身アジュバントは、貯蔵効果を形成し免疫系を刺激するアジュバントである。これらの化合物は、上記で特定した全身アジュバントの両方の機能を有する化合物である。このクラスのアジュバントには、ISCOM(混合サポニン、脂質を含み、抗原を保持できる孔があるウィルスサイズの粒子を形成する免疫賦活複合体; CSL、オーストラリアMelbourne); SB-AS2(MPLおよびQS21を含む水中油エマルジョンであるスミスクラインビーチャムアジュバントシステム#2; SmithKline Beecham Biologicals[SBB]、ベルギーRixensart); SB-AS4(ミョウバンおよびMPLを含むスミスクラインビーチャムアジュバントシステム#4; SBB、ベルギー); CRL 1005などのミセルを形成する非イオン性ブロックコポリマー(これらは、ポリオキシエチレン側鎖がついた疎水性ポリオキシプロピレン直鎖を含む; Vaxcel、

50

Inc.、米国ジョージア州Norcross); およびシンテックスアジュバントフォーミュレーション(SAF、ツイーン80および非イオン性ブロックコポリマーを含む水中油エマルジョン; Syntex Chemicals, Inc.、米国コロラド州Boulder)が含まれるが、それだけには限定されない。

#### 【0289】

本発明によって有用な粘膜アジュバントは、本発明の複合体と併せて粘膜表面に投与したときに被験者の粘膜免疫応答を誘発できるアジュバントである。粘膜アジュバントとしては、CpG核酸(例えば、PCT公開特許出願WO 99/61056)、細菌毒素: 例えば、コレラ毒素(CT)、それだけには限らないが、CT Bサブユニット(CTB)(Wuら、1998、Tochikuboら、1998); CTD53(ValをAspに)(Fontanaら、1995); CTK97(ValをLysに)(Fontanaら、1995); CTK104(TyrをLysに)(Fontanaら、1995); CTD53/K63(ValをAspに、SerをLysに)(Fontanaら、1995); CTH54(ArgをHisに)(Fontanaら、1995); CTN107(HisをAsnに)(Fontanaら、1995); CTE114(SerをGluに)(Fontanaら、1995); CTE112K(GluをLysに)(Yamamotoら、1997a); CTS61F(SerをPheに)(Yamamotoら、1997a、1997b); CTS106(ProをLysに)(Douceら、1997、Fontanaら、1995); およびCTK63(SerをLysに)(Douceら、1997、Fontanaら、1995)を含むCT誘導体、密着帯毒素、zot、大腸菌(*Escherichia coli*)熱不安定腸毒素、不安定毒素(LT)、それだけには限らないが、LT Bサブユニット(LTB)(Verweijら、1998); LT7K(ArgをLysに)(Komaseら、1998、Douceら、1995); LT61F(SerをPheに)(Komaseら、1998); LT112K(GluをLysに)(Komaseら、1998); LT118E(GlyをGluに)(Komaseら、1998); LT146E(ArgをGluに)(Komaseら、1998); LT192G(ArgをGlyに)(Komaseら、1998); LTK63(SerをLysに)(Marchettiら、1998、Douceら、1997、1998、Di Tommasoら、1996); およびLTR72(AlaをArgに)(Giulianiら、1998)を含むLT誘導体、百日咳毒素、PT-9K/129G(Robertsら、1995、Cropleyら、1995)を含むPT. (Lyckeら、1992、Spangler BD、1992、FreytagおよびClements、1999、Robertsら、1995、Wilsonら、1995); 毒素誘導体(下記参照)(Holmgrenら、1993、Verweijら、1998、Rappuoliら、1995、FreytagおよびClements、1999); リピドA誘導体(例えば、モノホスホリルリピドA、MPL)(Sasakiら、1998、Vancottら、1998); ムラミルジペプチド(MDP)誘導体(Fukushimaら、1996、Ogawaら、1989、Michalekら、1983、Morisakiら、1983); 細菌外膜タンパク質(例えば、ボレリアブルグドルフェリの外表面タンパク質A(OspA)リポタンパク質、髄膜炎菌の外膜タンパク質)(Marinaroら、1999、Van de Vergら、1996); 水中油エマルジョン(例えば、MF59)(Barchfieldら、1999、Verschoorら、1999、O'Hagan、1998); アルミニウム塩(Isakaら、1998、1999); ならびにサポニン(例えば、QS21)(Aquila Biopharmaceuticals, Inc.、米国メイン州Worster)(Sasakiら、1998、MacNealら、1998)、ISCOM、MF-59(スパン85およびツイーン80で安定化した水中スクアレンエマルジョン; Chiron Corporation、米国カリフォルニア州Emeryville); Seppic ISAシリーズのモンタニドアジュバント(例えば、モンタニドISA 720、AirLiquide、フランスParis); PROVAX(安定化界面活性剤およびミセル形成剤を含む水中油エマルジョン; IDEC Pharmaceuticals Corporation、米国カリフォルニア州San Diego); シンテックスアジュバントフォーミュレーション(SAF; Syntex Chemicals, Inc.、米国コロラド州Boulder); ポリ[ジ(カルボキシルアトフェノキシ)ホスファゼン(PCPP)ポリマー; Virus Research Institute、USA)ならびにリーシュマニア伸長因子(Corixa Corporation、米国ワシントン州Seattle)が挙げられるが、それだけには限定されない。

#### 【0290】

##### 5.18.1 癌の治療

一実施形態では、併用療法は、本発明の複合体の投与に加えて、癌の予防または治療に役立つ1種または複数のモダリティの補助的な使用を含む。モダリティの例には、化学療法薬、免疫療法薬、抗血管形成剤、サイトカイン、ホルモン、抗体、ポリヌクレオチド、放射線および光力学療法薬が含まれるが、それだけには限定されない。特定の実施形態では、併用療法を使用して、癌の再発防止、転移の抑制、あるいは癌または転移の増殖および/または拡散の抑制を行うことができる。

#### 【0291】

本発明の方法によって治療または予防できるタイプの癌には、ヒト肉腫および癌腫、例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮細胞肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様腺癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝癌、胆道癌、絨毛癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、睾丸腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽腫、網膜芽腫；白血病、例えば、急性リンパ性白血病および急性骨髄性白血病(骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性および赤白血病)；慢性白血病(慢性骨髄性(顆粒球性)白血病および慢性リンパ性白血病)；ならびに真性多血症、リンパ腫(ホジキン病および非ホジキン病)、多発性骨髄腫、ワルデンストレーム大グロブリン血症、および重鎖病が含まれるが、それだけには限定されない。

10

## 【0292】

別の実施形態では、癌を有する患者は、抗癌治療(例えば、化学療法放射線)を受けていたために、免疫抑制してからhsp-ペプチド複合体またはhsp-感作APCの投与を行う。

## 【0293】

本発明によって提供する免疫療法が癌患者で使用するのに望ましい理由はたくさんある。第1に、麻酔を用いた外科手術は、免疫抑制をもたらす可能性がある。手術前の期間に適切な免疫療法を行うことによって、この免疫抑制は防止でき、または逆転させることができる。これにより、感染性合併症がより少なくなり、傷の治癒が促進され得る。第2に、腫瘍の大きさは手術の後に最小であり、この状態では免疫療法が有効である可能性が極めて高い。第3の理由は、外科手術時に腫瘍細胞が循環して流れており、この時点で有効な免疫療法を適用するとこれらの細胞が排除され得るという可能性である。

20

## 【0294】

本発明の予防的および治療的方法は、外科手術前、最中、または手術後のいずれかに癌患者の免疫能力を高めること、ならびに癌細胞に対する腫瘍特異免疫を誘発することを対象としており、その目的は癌の抑制であり、その最終的な臨床目標は、全癌の退行および根絶である。本発明の方法はまた、例えば、家族歴または環境リスク要因によって特定のタイプの癌に高いリスクがある個体に使用することができる。

30

## 【0295】

様々な実施形態では、癌患者を治療するために、本発明の複合体の他に、1種または複数の抗癌剤を投与する。抗癌剤は、腫瘍または癌の治療を助ける任意の分子または化合物を意味する。本発明の方法で使用できる抗癌剤の例としては：アシピシン(acivicin)；アクラルピシン；塩酸アコダゾール(acodazole hydrochloride)；アクロニン；アドゼレシン；アルデスロイキン；アルトレタミン；アンボマイシン(ambomycin)；酢酸アメタントロン(ametantone acetate)；アミノグルテチミド；アムサクリン；アナストロゾール；アントラマイシン(anthracycline)；アスパラギナーゼ；アスペルリン(asperlin)；アザチジン；アゼテパ(azetepa)；アゾトマイシン(azotomycin)；バチマスタット(batimastat)；ベンゾデパ(benzodepa)；ピカルタミド；塩酸ピサントレン；ビスナフィドジメシレート(bisnafide dimesylate)；ビゼレシン；硫酸プレオマイシン；プレキナルナトリウム(brequinar sodium)；プロピリミン；プスルファン；カクチノマイシン(cactinomycin)；カルステロン(calusterone)；カラセミド(caracemide)；カルベチマー(carbetimer)；カルボプラチン；カルムスチン；塩酸カルピシン(carubicin hydrochloride)；カルゼレシン(carzelesin)；セデフィンゴール(cedefingol)；クロラムブシル；シロレマイシン(cirrolemycin)；シスプラチン；クラドリピン；クリスナトールメシレート(crisnatol mesylate)；シクロホスファミド；シタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイシン；塩酸ダウノルピシン；デシタビン(decitabine)；デキソルマプラチン(dexormaplatin)；デザグアニン(detzaguanine)；デザグアニンメシレート；ジアジクオン(diaziquone)；ドセタキセル；ドキシソルピシン；塩酸ドキシソルピシン；ドロロキシフェン；クエン酸ドロロキシフェン；プロ

40

50

ピオン酸ドロモスタノロン; デュアゾマイシン(duazomycin); エダトレキセート; 塩酸エ  
 フロルニチン; エルサミトルシン(elsamitrucin); エンロプラチン; エンプロメート(enp  
 romate); エピプロピジン(epipropidine); 塩酸エピルピシン; エルプロゾール(erbulozo  
 le); 塩酸エソルピシン(esorubicin hydrochloride); エストラムスチン; リン酸エスト  
 ラムスチンナトリウム; エタニダゾール; エトポシド; リン酸エトポシド; エトプリン(e  
 toprine); 塩酸ファドロゾール; ファザラビン; フェンレチニド(fenretinide); フロク  
 スリジン; リン酸フルダラビン; フルオロウラシル; フルロシタビン(flurocitabine);  
 フォスキドン(fosquidone); フォストリエシンナトリウム; ゲンシタビン(gemcitabine);  
 塩酸ゲンシタビン; ヒドロキシ尿素; 塩酸イダルピシン; イフォスファミド; イルモフ  
 オシン(ilmofofosine); インターロイキンII(組換えインターロイキンIIまたはrIL2を含む) 10  
 、インターフェロン -2a; インターフェロン -2b; インターフェロン -n1; インター  
 フェロン -n3; インターフェロン -1a; インターフェロン -1b; イプロプラチン; 塩  
 酸イリノテカン; 酢酸ランレオチド; レトロゾール; 酢酸ロイプロリド; 塩酸リアロゾー  
 ル; ロメトレキソールナトリウム(lometrexol sodium); ロムスチン; 塩酸ロソキサント  
 ロン(losoxantrone hydrochloride); マソプロコール(masoprocol); マイタンシン; 塩酸  
 メクロレタミン; 酢酸メゲストロール; 酢酸メレンゲストロール; メルファラン; メノガ  
 リル; メルカプトプリン; メトトレキセート; メトトレキセートナトリウム; メトプリン  
 (metoprine); メツレデパ; ミチンドミド(mitindomide); ミトカルシン(mitocarcin); ミ  
 トクロミン(mitocromin); ミトギリン(mitogillin); ミトマルシン(mitomalcin); ミトマ  
 イシン; ミトスペル(mitosper); ミトタン; 塩酸ミトキサントロン; マイコフェノール酸 20  
 ; ノコダゾール; ノガラマイシン; オルマプラチン(ormaplatin); オキシスラン(oxisura  
 n); パクリタキセル; ペガスパルガーゼ(pegaspargase); ペリオマイシン(peliomycin);  
 ペンタムスチン(pentamustine); 硫酸ペプロマイシン; ペルホスファミド(perfosfamide)  
 ; ピボプロマン; ピボスルファン(piposulfan); 塩酸ピロキサントロン(piroxantrone hy  
 drochloride); プリカマイシン; プロメスタン(plomestane); ポルフィマーナトリウム;  
 ポルフィロマイシン; プレドニムスチン(prednimustine); 塩酸プロカルバジン; プロマ  
 イシン(puromycin); 塩酸プロマイシン; ピラゾフリン(pyrazofurin); リボプリン(ribo  
 prine); ログレチミド(rogletimide); サフィンゴル(safingol); 塩酸サフィンゴル; セム  
 スチン; シムトラゼン(simtrazene); スパルフォセートナトリウム; スパルソマイシン;  
 塩酸スピロゲルマニウム; スピロムスチン(spiromustine); スピロプラチン(spiroplatin 30  
 ); ストレプトニグリン(streptonigrin); ストレプトゾシン; スロフェナル; タリソマイ  
 シン; テコガランナトリウム; テガフル; 塩酸テロキサントロン(teloxantrone hydrochl  
 oride); テモポルフィン(temoporfin); テニポシド; テロクシロン(teroxirone); テスト  
 ラクトン; チアミプリン(thiamiprine); チオグアニン; チオテパ; チアゾフリン; チラ  
 バザミン; クエン酸トレミフェン; 酢酸トレストロン(trestolone acetate); リン酸トリ  
 シリピン(triciribine phosphate); トリメトレキセート; グルクロン酸トリメトレキセ  
 ート; トリプトレリン; 塩酸ツプロゾール; ウラシルマスタード; ウレデパ(uredepa);  
 バブレオチド(vapreotide); バルテポルフィン(verteporfin); 硫酸ピンブラスチン; 硫  
 酸ピンクリスチン; ピンデシン; 硫酸ピンデシン; 硫酸ピネピジン(vinepidine sulfate)  
 ; 硫酸ピングリシネート(vinglycinate sulfate); 硫酸ビンロイロシン(vinleurosine su 40  
 lfate); 酒石酸ピノレルピン; 硫酸ビンロシジン(vinrosidine sulfate); 硫酸ビンゾリ  
 ジン(vinzolidine sulfate); ポロゾール; ゼニプラチン(zeniplatin); ジノスタチン;  
 塩酸ゾルピシン(zorubicin hydrochloride)が挙げられるが、それだけには限定されない  
 。

#### 【0296】

使用できる他の抗癌薬としては: 20-epi-1,25ジヒドロキシビタミンD3; 5-エチニルウ  
 ラシル; アビラテロン(abiraterone); アクラルピシン; アシルフルベン; アデシペノー  
 ル(adecyphenol); アドゼレシン; アルデスロイキン; ALL-TKアンタゴニスト; アルトレタ  
 ミン; アンバムスチン(ambamustine); アミドックス(amidox); アミフォスチン; アミノ  
 レプリン酸; アムルピシン; アムサクリン; アナグレリド; アナストロゾール; アンドロ 50

グラフォリド; 血管新生阻害剤; アンタゴニストD; アンタゴニストG; アンタレリックス  
 (antarelix); 抗背方化形態形成タンパク質1; 抗アンドロゲン、前立腺癌; 抗エストロゲン;  
 アンチネオプラストン; アンチセンスオリゴヌクレオチド; グリシン酸アフィジコリン;  
 アポトーシス遺伝子モジュレーター; アポトーシス調節物質; アプリン酸; ara-CDP-  
 DL-PTBA; アルギニンデアミナーゼ; アスラクリン (asulacriner); アタメスタン; アトリ  
 ムスチン; アクシナスタチン1 (axinastatin 1); アクシナスタチン2; アクシナスタチン3  
 ; アザセトロン; アザトキシン (azatoxin); アザチロシン; バカチンIII誘導体 (baccatin  
 III derivatives); パラノール; パチマスタット (batimastat); BCR/ABLアンタゴニスト  
 ; ベンゾクロリン (benzochlorins); ベンゾイルスタウロスポリン (benzoylstaurosporine  
 ); ラクタム誘導体; -アレチン (beta-alethine); クラマイシンB; ベツリン酸; bF 10  
 GF阻害剤; ビカルタミド; ビサントレン; ビスアジリジニルスペルミン (bisaziridinylsp  
 ermine); ビスナフィド (bisnafide); ビストラテンA (bistratene A); ビゼレシン; プレ  
 フレート (breflate); プロピリミン; ブドチタン (budotitan); プチオニンスルホキシミ  
 ン; カルシボトリオール; カルフォスチンC; カンプトテシン誘導体; カナリボックスIL-  
 2; カペシタピン; カルボキサミド-アミノ-トリアゾール; カルボキシアミドトリアゾー  
 ル; CaRest M3; CARN 700; 軟骨由来阻害剤; カルゼレシン (carzelesin); カゼインキナ  
 ーゼ阻害剤 (ICOS); カスタノスペルミン; セクロピンB; セトロレリックス; クロルリン (c  
 hlorins); クロロキノキサリンスルホンアミド; シカプロスト (cicaprost); cis-ポルフ  
 ィリン; クラドリピン; クロミフェン類似体; クロトリマゾール; コリスマイシンA (coll  
 ismycin A); コリスマイシンB; コンプレタスタチンA4; コンプレタスタチン類似体; コ 20  
 ナゲニン; クラムベスシジン816 (crambescidin 816); クリスナトール (crisnatol); クリ  
 プトフィシン8 (cryptophycin 8); クリプトフィシンA誘導体; クラシンA; シクロペンタ  
 アントラキノン; シクロプラタム (cycloplatan); シペマイシン (cypemycin); シタラピン  
 オクフォスフェート (cytarabine ocfosfate); 細胞溶解因子; シトスタチン (cytostatin)  
 ; ダクリキシマブ (dacliximab); デシタピン (decitabine); デヒドロジデムニンB (dehydr  
 odidemnin B); デスロレリン (deslorelin); デキサメタゾン; デキシフォスファミド (dex  
 ifosfamide); デクスラゾキサソール; デクスベラパミル; ジアジクオン (diaziquone); ジデ  
 ムニンB (didemnin B); ジドックス (didox); ジエチルノルスペルミン; ジヒドロ-5-アザ  
 シチジン; ジヒドロタキソール、9-; ジオキサマイシン (dioxamycin); ジフェニルスピロ  
 ムスチン (diphenyl spiromustine); ドセタキセル; ドコサノール; ドラセトロン; ドキ 30  
 シフルリジン; ドロロキシフェン; ドロナビノール; デュオカルマイシンSA; エブセレン  
 ; エコムスチン (ecomustine); エデルフォシン (edelfosine); エドレコロマブ; エフロル  
 ニチン (eflornithine); エレメン; エミテフル (emitefur); エピルピシン; エプリステリ  
 ド; エストラムスチン類似体; エストロゲンアゴニスト; エストロゲンアンタゴニスト;  
 エタニダゾール; リン酸エトポシド; エキセメスタン; ファドロゾール; ファザラピン (f  
 azarabine); フェンレチニド (fenretinide); フィルグラスチム; フィナステリド; フラ  
 ポピリドール; フレゼラスチン (flezelastine); フルアステロン; フルダラピン; 塩酸フル  
 オロダウノルニシン (fluorodaunorunicin hydrochloride); フォルフェニメックス (for  
 fenimex); フォルメスタン; フォストリエシン; フォテムスチン; ガドリニウムテキサフ  
 ィリン (gadolinium texaphyrin); 硝酸ガリウム; ガロシタピン; ガニレリックス; ゼラ 40  
 チナーゼ阻害剤; ゲムシタピン; グルタチオン阻害剤; ヘプスルファミン (hepsulfam); ヘ  
 レグリン; ヘキサメチレンビスアセトアミド; ヒペリシン; イバンドロン酸; イダルピシ  
 ン; イドキシフェン; イドラマントン (idramantone); イルモフォシン (ilmofosine); イ  
 ロマスタット (ilomastat); イミダゾアクリドン (imidazoacridones); イミキモド; 免疫  
 賦活ペプチド; インスリン様成長因子-1受容体阻害剤; インターフェロンアゴニスト; イン  
 ターフェロン; インターロイキン; イオベングアン (iobenguane); ヨードドキシソルピシ  
 ン; イポメアノール (ipomeanol)、4-; イロプラクト (iropact); イルソグラジン; イソ  
 ベンガゾール (isobengazole); イソホモハリコンドリンB (isohomohalicondrin B); イタ  
 セトロン; ジャスプラキノリド; カハラリドF (kahalalide F); 三酢酸ラメラリン-N; ラ  
 ンレオチド; レイナマイシン; レノグラスチム; 硫酸レンチナン; レプトルスタチン (lep 50

tolstatin); レトロゾール; 白血病阻害因子; 白血球 インターフェロン; ロイプロリド+エストロゲン+プロゲステロン; ロイプロレリン; レバミゾール; リアロゾール; 直鎖状ポリアミン類似体; 親油性二糖類ペプチド; 親油性白金化合物; リソクリンアミド7(lissoclinamide 7); ロバプラチン(lobaplatin); ロンブリシン; ロメトレキソール(lometrexol); ロニダミン; ロソキサントロン(losoxantrone); ロバスタチン; ロキソリビン(loxoribine); ルロトテカン(lurtotecan); ルテチウムテキサフィリン; リソフィリン; 溶解性ペプチド; マイタンシン; マンノスタチンA; マリマスタット; マソプロコール(masoprococ); マスピン; マトリリシン阻害剤; マトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤; メノガリル; メルバロン; メテレリン(meterelin); メチオニナーゼ; メトクロプラミド; MIF阻害剤; ミフェプリストン; ミルテフォシン; ミリモスチム; 不適正二本鎖RNA; ミトグアゾン(mitoguzone); ミトラクトール(mitolactol); ミトマイシン類似体; ミトナフィド(mitonafide); ミトトキシン(mitotoxin)線維芽細胞成長因子-サボリン; ミトキサントロン; モファロテン; モルグラモスチム; モノクローナル抗体、ヒト絨毛膜ゴナドトロフィン; モノホスホリル脂質A+マイコバクテリウム細胞壁sk; モピダモール(mopidamol); 複数薬物抵抗遺伝子阻害剤; 複数腫瘍サプレッサー-1に基づく治療; マスタード抗癌剤; マイカペルオキシドB(mycaperoxide B); マイコバクテリア細胞壁抽出物; ミリアポロン(myriaporone); N-アセチルジナリン; N置換ベンズアミド; ナファレリン; ナグレスチップ(nagrestip); ナロキソン+ペンタゾシン; ナパビン(napavin); ナフテルピン(naphterpin); ナルトグラスチム; ネダプラチン; ネモルピシン(nemorubicin); ネリドロン酸(neridronic acid); 中性エンドペプチダーゼ; ニルタミド; ニサマイシン(nisamycin); 一酸化窒素モジュレーター; ニトロキシド酸化防止剤; ニトルリン(nitruillyn); 06-ベンジルグアニン; オクトレオチド; オキセノン; オリゴヌクレオチド; オナプリストン; オンダセットロン; オラシン(oracin); 経口サイトカイン誘導物質; オルマプラチン(ormaplatin); オサテロン; オキサリプラチン; オキサウノマイシン(oxaunomycin); パクリタキセル; パクリタキセル類似体; パクリタキセル誘導體; パラウアミン(palauamine); パルミトイルリゾキシシン; パミドロン酸; パナキシトリオール; パノミフェン; パラバクチン(parabactin); パゼリプチン(pazelliptine); ペガスパルガーゼ(pegaspargase); ペルデシン; ポリ硫酸ペントサンナトリウム; ペントスタチン; ペントロゾール(pentrozole); ペルフルブロン(perflubron); ペルホスファミド(perfosfamide); ペリリルアルコール; フェナジノマイシン; 酢酸フェニル; ホスファターゼ阻害剤; ピシバニル; 塩酸ピロカルピン; ピラルピシン; ピリトレキシム(piritrexim); プラセチンA; プラセチンB; プラスミノゲンアクチベーター阻害剤; 白金複合体; 白金化合物; 白金-トリアミン複合体; ポルフィマーナトリウム; ポルフィロマイシン; プレドニゾン; プロピルビス-アクリドン; プロスタグランジンJ2; プロテアソーム阻害剤; プロテインA基剤免疫モジュレーター; プロテインキナーゼC阻害剤; プロテインキナーゼC阻害剤、ミクロアルガル(microalgal); タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤; プリンヌクレオシドホスホリラーゼ阻害剤; パルプリン; ピラゾロアクリジン; ピリドキシル化ヘモグロビンポリオキシエチレン複合体; rafアンタゴニスト; ラルチトレキセド; ラモセトロン; rasファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害剤; ras阻害剤; ras-GAP阻害剤; 脱メチル化レテリプチン(retelliptine demethylated); レニウムRe186エチドロネート; リゾキシシン; リボザイム; RIレチンアミド; ログレチミド(rogletimide); ロヒツカイン(rohitukine); ロムルチド; ロキニメックス(roquinimex); ルビギノンB1(rubiginone B1); ルボキシル; サフィンゴル; サイントピン(saintopin); SarCNU; サルコフィトールA; サルグラモスチム; Sdi 1模倣体; セムスチン; セネセンス由来阻害剤1; センスオリゴヌクレオチド; シグナル伝達阻害剤; シグナル伝達モジュレーター; 一本鎖抗原結合タンパク質; シゾフィラン; ソブゾキシサン; ナトリウムボロカプテート(sodium borocaptate); フェニル酢酸ナトリウム; ソルベロール(solverol); ソマトメジン結合タンパク質; ソネルミン; スパルフォシン酸(sparfosic acid); スピカマイシンD; スピロムスチン(spiromustine); スプレノペンチン; スポンジスタチン1(spongistatin 1); スクアラミン; 幹細胞阻害剤; 幹細胞分裂阻害剤; スチピアミド(stipiamide); ストロメリシン阻害剤; スルフィノシン(sulfinosi

10

20

30

40

50

ne); 過度活動性血管作動性腸ペプチドアンタゴニスト(superactive vasoactive intestinal peptide antagonist); スラジスタ(suradista); スラミン; スワインソニン; 合成グリコサミノグリカン; タリムスチン; タモキシフェンメチオジド; タウロムスチン; タザロテン; テコガランナトリウム; テガフル; テルラピリリウム; テロメラゼ阻害剤; テモボルフィン; テモゾロミド; テニポシド; テトラクロロデカオキシド; テトラゾミン(tetrazomine); タリプラスチン(thaliblastine); チオコラリン(thiocoraline); トロンボポイエチン; トロンボポイエチン模倣体; チマルファシン(thymalfasin); チモポイエチン受容体アゴニスト; チモトリナン(thymotrinan); 甲状腺刺激ホルモン; エチルスズエチオブルプリン; チラパザミン; 二塩化チタノセン; トプセンチン(topsentin); トレミフェン; 全能性幹細胞因子; 翻訳阻害剤; トレチノイン; トリアセチルウリジン; トリシリピン(triciribine); トリメトレキセート; トリプトレリン; トロピセトロン; ツロステリド(turosteride); チロシンキナーゼ阻害剤; チルホスチン(tyrphostins); UBC阻害剤; ウベニメックス; 尿生殖洞由来成長阻害因子; ウロキナーゼ受容体アンタゴニスト; バプレオチド(vapreotide); パリオリンB; ベクター系、赤血球遺伝子療法; ベラレソール(velaresol); ベラミン; ベルジン(verdins); ベルテボルフィン; ビノレルピン; ビンキサルチン; ビタキシン; ポロゾール; ザノテロン(zanoterone); ゼニプラチン(zeniplatin); ジラスコルブ(zilascorb); およびジノスタチンステマラマーが挙げられるが、それだけには限定されない。

10

【0297】

抗癌剤は、それだけには限らないが、以下の群の化合物：細胞毒抗生物質、代謝拮抗剤、有糸分裂阻害剤、アルキル化剤、白金化合物、ヒ素化合物、DNAトポイソメラーゼ阻害剤、タキサン、ヌクレオシド類似体、植物アルカロイド、および毒；ならびにその合成誘導体を含む化学療法薬であってよい。表1は、この群の例示的な化合物を示す：

20

## 【表 1】

表1

<u>アルキル化剤</u>	
窒素マスタード:	シクロホスファミド イホスファミド トロホスファミド(Trofosfamide) クロラムブシル
ニトロソ尿素:	カルムスチン(BCNU) ロムスチン(CCNU) 10
アルキルスルホン酸エステル:	ブスルファン トレオスルファン
トリアゼン:	ダカルバジン
白金含有化合物:	シスプラチン カルボプラチン アロプラチン オキサリプラチン
<u>植物アルカロイド</u>	20
ビンカアルカロイド:	ビンクリスチン ビンブラスチン ビンデシン ビノレルビン
タキソイド:	パクリタキセル ドセタキソール
<u>DNAトポイソメラーゼ阻害剤</u>	
エピポドフィリン(Epipodophyllins):	エトポシド 30 テニポシド トポテカン 9-アミノカンプトテシン カンプトテシン クリスナトール
マイトマイシン:	ミトマイシンC
<u>葉酸代謝拮抗薬:</u>	
DHFR阻害剤:	メトトレキセート 40 トリメトレキセート
IMPデヒドロゲナーゼ阻害剤:	マイコフェノール酸 チアゾプリン リバビリン EICAR
リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤:	ヒドロキシ尿素

	デフェロキサミン	
<u>ピリミジン類似体:</u>		
ウラシル類似体:	5-フルオロウラシル	
	フロクスウリジン	
	ドキシフルリジン	
	ラチトレクセド(Ratitrexed)	
シトシン類似体:	シタラビン(ara C)	
	シトシンアラビノシド	10
	フルダラビン	
<u>プリン類似体:</u>	メルカプトプリン	
	チオグアニン	
<u>DNA代謝拮抗剤:</u>	3-HP	
	2'-デオキシ-5-フルオロウリジン	
	5-HP	
	$\alpha$ -TGDR	
	アフィジコリングリシネート	
	ara-C	20
	5-アザ-2'-デオキシシチジン	
	$\beta$ -TGDR	
	シクロシチジン	
	グアナゾール	
	イノシングリコジアルデヒド	
	マセベシンII(macebecin II)	
	ピラゾロイミダゾール	
<u>有糸分裂阻害剤:</u>	アロコルヒチン	30
	ハリコンドリンB	
	コルヒチン	
	コルヒチン誘導体	
	ドルスタチン10(dolstatin 10)	
	マイタンシン	
	リゾキシシ	
	チオコルヒチン	
	トリチルシステイン	
<u>その他:</u>		40
イソプレニル化阻害剤:		
ドーパミン作動性神経毒:	1-メチル-4-フェニルピリジニウムイオン	
細胞周期阻害剤:	スタウロスポリン	
アクチノマイシン:	アクチノマイシンD	
	ダクチノマイシン	
ブレオマイシン:	ブレオマイシンA2	
	ブレオマイシンB2	

アントラサイクリン:	ペプロマイシン	
	ダウノルビシン	
	ドキシソルビシン(アドリアマイシン)	
	イダルビシン	
	エピルビシン	
	ピラルビシン	
	ゾルビシン(Zorubicin)	10
	ミトキサントロン	
MDR阻害剤:	ベラパミル	
Ca <sup>2+</sup> ATPアーゼ阻害剤:	タプシガルジン	

## 【0298】

1種または複数の化学療法薬(例えば、FLAG、CHOP)を含む組成物も本発明によって企図されている。FLAGは、フルダラビン、シトシンアラビノシド(Ara-C)およびG-CSFを含む。CHOPは、シクロホスファミド、ビンクリスチン、ドキシソルビシン、およびプレドニゾンを含む。前述のリストはそれぞれ例示的なものであって、限定するものではない。

20

## 【0299】

一実施形態では、乳癌は、5-フルオロウラシル、シスプラチン、ドセタキセル、ドキシソルビシン、ハーセプチン(登録商標)、ゲムシタピン、IL-2、パクリタキセル、および/またはVP-16(エトポシド)と併せて本発明の複合体を含む医薬組成物で治療することができる。

## 【0300】

別の実施形態では、前立腺癌は、パクリタキセル、ドセタキセル、ミトキサントロン、および/またはアンドロゲン受容体アンタゴニスト(例えば、フルタミド)と併せて本発明の複合体を含む医薬組成物で治療することができる。

## 【0301】

別の実施形態では、白血病は、フルダラビン、シトシンアラビノシド、ゲムツズマブ(マイロターゲット)、ダウノルビシン、メトトレキセート、ビンクリスチン、6-メルカプトプリン、イダルビシン、ミトキサントロン、エトポシド、アスパラギナーゼ、プレドニゾンおよび/またはシクロホスファミドと併せて本発明の複合体を含む医薬組成物で治療することができる。別の例として、骨髄腫は、デキサメタゾンと併せて本発明の複合体を含む医薬組成物で治療することができる。白血病は、慢性骨髄性白血病(CML)であり、hsp-ペプチド複合体は、hsp70-ペプチド複合体を含み、また治療モダリティは、メシル酸イマチニブまたはグリベック(商標)であることが好ましい。

30

## 【0302】

別の実施形態では、黒色腫は、ダカルバジンと併せて本発明の複合体を含む医薬組成物で治療することができる。

40

## 【0303】

別の実施形態では、大腸癌は、イリノテカンと併せて本発明の複合体を含む医薬組成物で治療することができる。

## 【0304】

別の実施形態では、肺癌は、パクリタキセル、ドセタキセル、エトポシドおよび/またはシスプラチンと併せて本発明の複合体を含む医薬組成物で治療することができる。

## 【0305】

別の実施形態では、非ホジキンリンパ腫は、シクロホスファミド、CHOP、エトポシド、ブレオマイシン、ミトキサントロンおよび/またはシスプラチンと併せて本発明の複合体

50

を含む医薬組成物で治療することができる。

【0306】

別の実施形態では、胃癌は、シスプラチンと併せて本発明の複合体を含む医薬組成物で治療することができる。

【0307】

別の実施形態では、膵臓癌は、ゲムシタピンと併せて本発明の複合体を含む医薬組成物で治療することができる。

【0308】

本発明によれば、癌の予防または治療のために、本発明の複合体を抗癌剤より前、抗癌剤に続いて、または抗癌剤と同時に投与することができる。癌のタイプ、被験者の病歴および症状、ならびに選択した抗癌剤に応じて、本発明の複合体の使用を、化学療法の投与量およびタイミングに合わせることができる。

10

【0309】

本発明の複合体の使用は、化学療法の養生法に加えることができる。一実施形態では、化学療法薬は、 $100 \sim 1000 \text{mg/m}^2$ /サイクルの用量のゲムシタピンである。一実施形態では、化学療法薬は、 $200 \sim 4000 \text{mg/m}^2$ /サイクルの用量のダカルバジンである。好ましい実施形態では、ダカルバジンの用量は、 $700 \sim 1000 \text{mg/m}^2$ /サイクルである。別の実施形態では、化学療法薬は、 $25 \sim 50 \text{mg/m}^2$ /サイクルの用量のフルダラビンである。別の実施形態では、化学療法薬は、 $200 \sim 2000 \text{mg/m}^2$ /サイクルの用量のシトシンアラビノシド(Ara-C)である。別の実施形態では、化学療法薬は、 $1.5 \sim 7.5 \text{mg/kg}$ /サイクルの用量のドセタキセルである。別の実施形態では、化学療法薬は、 $5 \sim 15 \text{mg/kg}$ /サイクルの用量のパクリタキセルである。さらに別の実施形態では、化学療法薬は、 $5 \sim 20 \text{mg/kg}$ /サイクルの用量のシスプラチンである。さらに別の実施形態では、化学療法薬は、 $5 \sim 20 \text{mg/kg}$ /サイクルの用量の5-フルオロウラシルである。さらに別の実施形態では、化学療法薬は、 $2 \sim 8 \text{mg/kg}$ /サイクルの用量のドキソルピシンである。さらに別の実施形態では、化学療法薬は、 $40 \sim 160 \text{mg/kg}$ /サイクルの用量のエピポドフィロトキシンである。さらに別の実施形態では、化学療法薬は、 $50 \sim 200 \text{mg/kg}$ /サイクルの用量のシクロホスファミドである。さらに別の実施形態では、化学療法薬は、 $50 \sim 75$ 、 $75 \sim 100$ 、 $100 \sim 125$ 、または $125 \sim 150 \text{mg/m}^2$ /サイクルの用量のイリノテカンである。さらに別の実施形態では、化学療法薬は、 $3.7 \sim 5.4$ 、 $5.5 \sim 7.4$ 、 $7.5 \sim 11$ 、または $11 \sim 18.5 \text{mg/m}^2$ /サイクルの用量のピンプラスチンである。さらに別の実施形態では、化学療法薬は、 $0.7 \sim 1.4$ 、または $1.5 \sim 2 \text{mg/m}^2$ /サイクルの用量のピンクリスチンである。さらに別の実施形態では、化学療法薬は、 $3.3 \sim 5$ 、 $5 \sim 10$ 、 $10 \sim 100$ 、または $100 \sim 1000 \text{mg/m}^2$ /サイクルの用量のメトトレキセートである。

20

30

【0310】

好ましい実施形態では、本発明はさらに、併用療法の養生法の一部として投与する場合、低用量の化学療法薬の使用を含む。例えば、本発明の複合体を用いた初期治療により、その後の化学療法薬の投与によるチャレンジに対する腫瘍の感受性が増大する。この投与は、本発明の複合体なしで化学療法薬を投与する場合、より低い範囲付近または以下の投与量で行う。

【0311】

一実施形態では、本発明の複合体および低用量(例えば、 $6 \sim 60 \text{mg/m}^2$ /日以下)のドセタキセルを癌患者に投与する。別の実施形態では、本発明の複合体および低用量(例えば、 $10 \sim 135 \text{mg/m}^2$ /日以下)のパクリタキセルを癌患者に投与する。さらに別の実施形態では、本発明の複合体および低用量(例えば、 $2.5 \sim 25 \text{mg/m}^2$ /日以下)のフルダラビンを癌患者に投与する。さらに別の実施形態では、本発明の複合体および低用量(例えば、 $0.5 \sim 1.5 \text{g/m}^2$ /日以下)のシトシンアラビノシド(Ara-C)を癌患者に投与する。別の実施形態では、化学療法薬は、 $10 \sim 100 \text{mg/m}^2$ /サイクルの用量のゲムシタピンである。別の実施形態では、化学療法薬は、 $5 \sim 10$ 、 $10 \sim 20$ 、 $20 \sim 40$ 、または $40 \sim 75 \text{mg/m}^2$ /サイクルの用量のシスプラチン、例えば、プラチノールまたはプラチノール-AQ(Bristol Myers)である。さらに別の実施形態では、 $7.5 \sim 75 \text{mg/m}^2$ /サイクルの用量のシスプラチンを卵巣癌にかかっている患者

40

50

に投与する。さらに別の実施形態では、5~50mg/m<sup>2</sup>/サイクルの用量のシスプラチンを膀胱癌にかかっている患者に投与する。さらに別の実施形態では、化学療法薬は、2~4、4~8、8~16、16~35、または35~75mg/m<sup>2</sup>/サイクルの用量のカルボプラチン、例えば、パラプラチン(Bristol Myers)である。さらに別の実施形態では、7.5~75mg/m<sup>2</sup>/サイクルの用量のカルボプラチンを卵巣癌にかかっている患者に投与する。別の実施形態では、5~50mg/m<sup>2</sup>/サイクルの用量のカルボプラチンを膀胱癌にかかっている患者に投与する。さらに別の実施形態では、2~20mg/m<sup>2</sup>/サイクルの用量のカルボプラチンを睾丸癌にかかっている患者に投与する。さらに別の実施形態では、化学療法薬は、6~10、10~30、または30~60mg/m<sup>2</sup>/サイクルの用量のドセタキセル、例えば、タキソテール(Rhone Poulenc Rore r)である。さらに別の実施形態では、化学療法薬は、10~20、20~40、40~70、または70~135mg/kg/サイクルの用量のパクリタキセル、例えば、タキソール(Bristol Myers Squi bb)である。さらに別の実施形態では、化学療法薬は、0.5~5mg/kg/サイクルの用量の5-フルオロウラシルである。さらに別の実施形態では、化学療法薬は、2~4、4~8、8~15、15~30、または30~60mg/kg/サイクルの用量のドキシソルピシン、例えば、アドリアマイシン(Pharmacia & Upjohn)、ドキシル(Alza)、ルベックス(RUBEX)(Bristol Myers Squibb)である。

### 【0312】

別の実施形態では、抗体およびワクチンなどの1種または複数の免疫療法剤と併せて本発明の複合体を投与する。好ましい実施形態では、抗体には、癌に対するin vivoの治療および/または予防的用途がある。いくつかの実施形態では、抗体は、感染症の治療および/または予防のために使用することができる。治療的および予防的抗体の例としては、前立腺癌の治療のための現在臨床試験中のヒト化抗CTLA-4抗体であるMDX-010(Medarex、米国ニュージャージー州); RSV感染症にかかっている患者の治療のためのヒト化抗呼吸器合胞体ウイルス(RSV)モノクローナル抗体であるシナジス(登録商標)(MedImmune、米国メリーランド州); 転移性乳癌にかかっている患者の治療のためのヒト化抗HER2モノクローナル抗体であるハーセプチン(登録商標)(トラスツズマブ)(Genentech、米国カリフォルニア州)が挙げられるが、それだけには限定されない。他の例は、ヒト化抗CD18 F(ab')<sub>2</sub>(Genentech); ヒト化抗CD18 F(ab')<sub>2</sub>であるCDP860(Celltech、英国); CD4と融合した抗HIV gp120抗体であるPRO542(Progenics/Genzyme Transgenics); ヒト抗B型肝炎ウイルス抗体であるオスタビル(Ostavir)(Protein Design Lab/Novartis); ヒト化抗CMV IgG1抗体であるプロトビル(PROTOVIR)(商標)(Protein Design Lab/Novartis); マウス抗TNF- F(ab')<sub>2</sub>であるMAK-195(セガード(SEGARD))(Knoll Pharma/BASF); 抗CD14抗体であるIC14(ICOS Pharm); ヒト化抗VEGF IgG1抗体(Genentech); マウス抗CA 125抗体であるオバレックス(商標)(Altarex); マウス抗17-IA細胞表面抗原IgG2a抗体であるパノレックス(PANOREX)(商標)(Glaxo Wellcome/Centocor); マウス抗イディオタイプ(GD3エピトープ)IgG抗体であるBEC2(ImClone System); キメラ抗EGFR IgG抗体であるIMC-C225(ImClone System); ヒト化抗 V 3インテグリン抗体であるパイタクシン(商標)(Applied Molecular Evolution/Med Immune); ヒト化抗CD52 IgG1抗体であるカンパス(Campath)1H/LDP-03(Leukosite); ヒト化抗CD33 IgG抗体であるSmart M195(Protein Design Lab/Kanebo); キメラ抗CD20 IgG1抗体であるリツキサン(商標)(IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettyaku); ヒト化抗CD22 IgG抗体であるリンホサイド(LYMPHOCIDE)(商標)(Immunomedics); ヒト化抗HLA抗体であるSmart ID10(Protein Design Lab); 放射標識マウス抗HLA診断試薬抗体であるオンコリム(ONCOLYM)(商標)(Lym-1)(Techniclone); ヒト抗IL8抗体であるABX-IL8(Abgenix); ヒト化IgG1抗体である抗CD11a(Genentech/Xoma); ヒト化抗ICAM3抗体であるICM3(ICOS Pharm); 霊長類化抗CD80抗体であるIDEC-114(IDEC Pharm/Mitsubishi); 放射標識マウス抗CD20抗体であるゼパリン(商標)(IDEC/Schering AG); ヒト化抗CD40L抗体であるIDEC-131(IDEC/Eisai); 霊長類化抗CD4抗体であるIDEC-151(IDEC); 霊長類化抗CD23抗体であるIDEC-152(IDEC/Seikagaku); ヒト化抗CD3 IgGであるSMART抗CD3(Protein Design Lab); ヒト化抗補体因子5(C5)抗体である5G1.1(Alexion Pharm); ヒト化抗TNF- 抗体であるD2E7(CAT/BASF); ヒト化抗TNF- FabフラグメントであるCDP870(Celltech); 霊長類化抗CD4 IgG1抗体であ

る IDEC-151 (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); ヒト抗 CD4 IgG 抗体である MDX-CD4 (Medarex/Eisai/Genmab); ヒト化抗 TNF- $\alpha$  IgG4 抗体である CDP571 (Celltech); ヒト化抗 CD4 抗体である LDP-02 (LeukoSite/Genentech); ヒト化抗 CD4 IgG 抗体である オルソクロン OKT4A (Ortho Biotech); ヒト化抗 CD40L IgG 抗体である アントバ (ANTOVA) (商標) (Biogen); ヒト化抗 VLA-4 IgG 抗体である アンテグレン (商標) (Elan); ヒト抗 CD64 (Fc $\gamma$ R) 抗体である MDX-33 (Medarex/Centeon); ヒト化抗 IL-5 IgG4 抗体である SCH55700 (Celltech/Schering); それぞれ ヒト化抗 IL-5 および IL-4 抗体である SB-240563 および SB-240683 (SmithKline Beecham); ヒト化抗 IgE IgG1 抗体である rhuMab-E25 (Genentech/Norvartis/Tanox Biosystems); マウス抗 CD-147 IgM 抗体である ABX-CBL (Abgenix); ラット抗 CD2 IgG 抗体である BTI-322 (Medimmune/Bio Transplant); マウス抗 CD3 IgG2a 抗体である オルソクロン /OKT3 (Ortho Biotech); キメラ抗 CD25 IgG1 抗体である シムレクト (商標) (Novartis Pharm); ヒト化抗  $\alpha_2$  インテグリン IgG 抗体である LDP-01 (LeukoSite); マウス抗 CD18 F(ab') $_2$  である 抗 LFA-1 (Pasteur-Merieux/Immunotech); ヒト抗 TGF- $\beta_2$  抗体である CAT-152 (Cambridge Ab Tech); ならびに キメラ抗 因子 VII 抗体である コルセビン (Corsevin)M (Centocor) である。上記の免疫反応性試薬、ならびに任意の他の免疫反応性試薬は、免疫反応性試薬の供給者が推奨している養生法を含めて当業者に公知のどんな養生法に基づいて投与してもよい。

10

## 【0313】

別の実施形態では、その医薬上許容される塩を含めて、それだけには限らないが、アンジオスタチン、サリドマイド、クリングル5、エンドスタチン、セルピン (セリンプロテアーゼ阻害剤) 抗 トロンピン、フィブロネクチンの 29kDa の N 末端および 40kDa の C 末端タンパク質分解断片、プロラクチンの 16kDa のタンパク質分解断片、血小板因子-4 の 7.8kDa のタンパク質分解断片、血小板因子-4 の断片に相当する 13 アミノ酸ペプチド (Maione ら、1990、Cancer Res. 51: 2077~2083)、コラーゲン I の断片に相当する 14 アミノ酸ペプチド (Tolma ら、1993、J. Cell Biol. 122: 497~511)、トロンボスポンジン I の断片に相当する 19 アミノ酸ペプチド (Tolsma ら、1993、J. Cell Biol. 122: 497~511)、SPARC の断片に相当する 20 アミノ酸ペプチド (Sage ら、1995、J. Cell. Biochem. 57: 1329~1334)、またはその任意の断片、ファミリーメンバー、もしくは変異体を含む、1種または複数の抗血管形成剤と併せて本発明の複合体を投与する。

20

## 【0314】

血管形成を抑制し、ラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲン、および EGF の断片に相当する他のペプチドも記載されている (例えば、Cao、1998、Prog Mol Subcell Biol. 20: 161~176 を参照のこと)。RGD タンパク質と結合する (すなわち、ペプチドモチーフ Arg-Gly-Asp をもつ) ある種のインテグリンをブロックするモノクローナル抗体および環状ペプチドは、抗血管新生活性を有することが実証されている (Brooks ら、1994、Science 264: 569~571; Hammes ら、1996、Nature Medicine 2: 529~533)。さらに、受容体アンタゴニストによるウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーター受容体の阻害は、血管形成、腫瘍増殖および転移を抑制する (Min ら、1996、Cancer Res. 56: 2428~33; Crowley ら、1993、Proc Natl Acad Sci. 90: 5021~25)。複合体と併せたこうした抗血管形成剤の使用も本発明によって企図されている。

30

## 【0315】

さらに別の実施形態では、本発明の複合体は、ホルモン治療と関連して使用する。ホルモン療法治療には、ホルモンアゴニスト、ホルモンアンタゴニスト (例えば、フルタミド、ピカルタミド、タモキシフェン、ラロキシフェン、酢酸ロイプロリド (LUPRON)、LH-RH アンタゴニスト)、ホルモン生合成およびプロセッシングの阻害剤、ならびにステロイド (例えば、デキサメタゾン、レチノイド、デルトイド、ベタメタゾン、コルチゾール、コルチゾン、プレドニゾン、デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、エストロゲン、テストステロン、プロゲステロン)、ビタミン A 誘導体 (例えば、オールトランスレチノイン酸 (ATRA)); ビタミン D3 類似体; 抗ゲスタゲン (例えば、ミフェプリストン、オナプリストン)、ならびに抗アンドロゲン (例えば、酢酸シプロテロン) が含まれる。

40

50

## 【0316】

さらに別の実施形態では、本発明の複合体は、癌の治療における遺伝子治療プログラムと関連して使用する。一実施形態では、インターロイキン-2を分泌する組換え細胞を用いる遺伝子治療は、本発明の複合体と併せて投与して、癌、特に乳癌を予防または治療する(例えば、Deshmukhら、2001、J Neurosurg. 94: 287~92を参照のこと)。他の実施形態では、遺伝子治療は、それだけには限らないが、アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、RNA干渉分子、三重らせんポリヌクレオチドなどを含むポリヌクレオチド化合物の使用と共に実施し、こうした化合物のヌクレオチド配列は、腫瘍または癌の開始、進行、および/または病理学と関連がある遺伝子のDNAおよび/またはRNAのヌクレオチド配列に関連している。例えば、多くは癌遺伝子、増殖因子遺伝子、増殖因子受容体遺伝子、細胞周期遺伝子、DNA修復遺伝子であり、当技術分野でよく知られている。

10

## 【0317】

別の実施形態では、本発明の複合体は、放射線治療の養生法と併せて投与する。放射線治療では、放射線は、線またはX線であってよい。この方法は、外部ビーム放射線治療、放射性同位元素(I-125、パラジウム、イリジウム)、ストロンチウム89などの放射性同位元素の間隙移植(interstitial implantation)、胸部放射線治療、腹膜内P-32放射線治療、および/または全腹部および骨盤放射線治療などの放射線治療を含む癌の治療を含む。放射線治療の一般的な概要については、Hellman、第16章: Principles of Cancer Management: Radiation Therapy、第6版、2001、DeVitaら、編、J.B. Lippencott Company、Philadelphiaを参照のこと。好ましい実施形態では、放射線治療は、放射線を遠隔ソースから誘導する外部ビーム放射線または遠隔照射治療として投与する。様々な好ましい実施形態では、放射線治療は、放射線源を体内の癌細胞または腫瘍の塊の近くに配置する内科療法または近接照射療法として投与する。さらに含まれるのは、本発明の複合体と、ヘマトポルフィンおよびその誘導体、ベルトポルフィン(Vertoporphin)(BPD-MA)、フタロシアン、光増感剤Pc4、デメトキシ-ハイポクレリン(demethoxy-hypocrellin)A; および2BA-2-DMHAなどの光増感剤の投与を含む光線力学的療法との併用である。

20

## 【0318】

様々な実施形態では、癌を治療するために癌患者に短期治療サイクルで少なくとも1種の化学療法薬と併せて本発明の複合体を投与する。化学療法薬を用いた治療期間は、使用する特定の癌治療薬によって異なっていてよい。本発明はまた、不連続投与または1日量をいくつかに分画した部分投与も企図している。特定の癌治療薬に対する適切な治療期間は、当業者によって理解されよう。また、本発明は、各癌治療薬の最適な治療スケジュールの継続した評価を企図している。本発明は、その間に単一の治療薬または一連の治療薬を投与する少なくとも1サイクル、好ましくは2サイクル以上を企図している。1サイクルに対する適切な期間は、サイクルの合計数およびサイクル間の間隔のように当業者によって理解されよう。

30

## 【0319】

別の実施形態では、癌の症状(それだけには限らないが痛みなど)および本発明の複合体によって生じる副作用(それだけには限らないがインフルエンザ様症状、発熱など)を改善する化合物と併せて本発明の複合体を使用する。したがって、痛み、インフルエンザ様症状、および発熱を軽減することで知られている多くの化合物を、本発明の複合体と併せてまたは混合して使用することができる。こうした化合物には、鎮痛薬(例えば、アセトアミノフェン)、うっ血除去薬(例えば、プソイドエフェドリン)、抗ヒスタミン剤(例えば、マレイン酸クロルフェニラミン)、および咳抑制剤(例えば、デキストロメトルファン)が含まれる。

40

## 【0320】

## 5.18.2 感染症の治療

本発明の方法によって治療または予防できる感染症は、それだけには限らないが、ウイルス、細菌、真菌、原生動物、蠕虫、および寄生虫を含む感染因子によって引き起こされる。本発明は、細胞内病原体によって引き起こされる感染症を治療または予防することに

50

限定されない。多くの医学的に関連した微生物が、文献に広範に記載されている。例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれるC.G.A Thomas、Medical Microbiology、Bailliere Tindall、Great Britain 1983を参照のこと。

#### 【0321】

併用療法は、本発明の複合体の投与に加えて、感染症の予防または治療に役立つ1種または複数のモダリティの使用を含み、そのモダリティには、抗生物質、抗ウイルス薬、抗原虫化合物、抗真菌化合物、および抗蠕虫薬が含まれるが、それだけには限定されない。感染症を治療または予防するのに使用できる他の治療モダリティには、上記のような免疫治療薬、ポリヌクレオチド、抗体、サイトカイン、およびホルモンが含まれる。

#### 【0322】

ヒトとヒト以外の脊椎動物のどちらの感染性ウイルスにも、レトロウイルス、RNAウイルスおよびDNAウイルスが含まれる。ヒトに見られるウイルスの例としては：レトロウイルス科(例えば、HIV-1(HTLV-III、LAVまたはHTLV-III/LAVとも呼ばれる)、またはHIV-IIIなどのヒト免疫不全ウイルス；およびHIV-LPなどの他の分離株)；ピコルナウイルス科(例えば、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス；エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス)；カリシウイルス科(例えば、胃腸炎を引き起こす株)；トガウイルス科(例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス)；フラビウイルス科(例えば、デングウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス)；コロナウイルス科(例えば、コロナウイルス)；ラブドウイルス科(例えば、水疱性口炎ウイルス、狂犬病ウイルス)；フィロウイルス科(例えば、エボラウイルス)；パラミクソウイルス科(例えば、パラインフルエンザウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス)；オルトミクソウイルス科(例えば、インフルエンザウイルス)；ブンガウイルス科(例えば、ハンタンウイルス、ブンガウイルス、フレボウイルスおよびナイロウイルス)；アレナウイルス科(出血熱ウイルス)；レオウイルス科(例えば、レオウイルス、オルピウイルスおよびロタウイルス)；ビルナウイルス科；ヘパドナウイルス科(B型肝炎ウイルス)；パルボウイルス科(パルボウイルス)；パポバウイルス科(パピローマウイルス、ポリオーマウイルス)；アデノウイルス科(大部分アデノウイルス)；ヘルペスウイルス科(単純ヘルペスウイルス(HSV)1および2、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)、ヘルペスウイルス)；ポックスウイルス科(痘瘡ウイルス、牛痘ウイルス、ポックスウイルス)；およびイリドウイルス科(例えば、アフリカ豚コレラウイルス)；および分類不能ウイルス(例えば、海綿状脳症の原因微生物、デルタ肝炎の原因物質(B型肝炎ウイルスの欠陥付随体と考えられている)、非A、非B型肝炎の原因物質(クラス1：内服によって感染する；クラス2：非経口的に感染する(すなわちC型肝炎)；ノーウォークおよび関連ウイルス、ならびにアストロウイルス)が挙げられるが、それだけには限定されない。

#### 【0323】

企図されているレトロウイルスには、単純レトロウイルスと複合レトロウイルスの両方が含まれる。単純レトロウイルスには、B型レトロウイルス、C型レトロウイルスおよびD型レトロウイルスのサブグループが含まれる。B型レトロウイルスの例は、マウス乳腺癌ウイルス(MMTV)である。C型レトロウイルスには、サブグループC型グループA(ラウス肉腫ウイルス(RSV)、トリ白血病ウイルス(ALV)、および鳥骨髄芽球症ウイルス(AMV)を含む)およびC型グループB(マウス白血病ウイルス(MLV)、ネコ白血病ウイルス(FeLV)、マウス肉腫ウイルス(MSV)、テナガザル白血病ウイルス(GALV)、脾臓壊死ウイルス(SNV)、細網内皮症ウイルス(RV)およびサル肉腫ウイルス(SSV)を含む)が含まれる。D型レトロウイルスには、メイソン-ファイザーサルウイルス(MPMV)および1型サルレトロウイルス(SRV-1)が含まれる。複合レトロウイルスには、レンチウイルス、T細胞白血病ウイルスおよび泡沫状ウイルスのサブグループが含まれる。レンチウイルスには、HIV-1が含まれるが、HIV-2、SIV、ピスナウイルス、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)、およびウマ伝染性貧血ウイルス(EIAV)も含まれる。T細胞白血病ウイルスには、HTLV-1、HTLV-II、サルT細胞白血病ウイルス(STLV)、およびウシ白血病ウイルス(BLV)が含まれる。泡沫状ウイルスには、ヒト泡沫状ウイルス(HFV)、サル泡沫状ウイルス(SFV)およびウシ泡沫状ウイルス(BFV)が含まれる。

10

20

30

40

50

## 【 0 3 2 4 】

脊椎動物の抗原であるRNAウィルスの例としては、以下：オルトレオウィルス属(哺乳動物およびトリレトロウィルス両方の複数血清型)、オルビウィルス属(ブルータングウィルス、Eugeneangeeウィルス、ケメロボウィルス、アフリカウマ病ウィルス、およびコロラドダニ熱ウィルス)、ロタウィルス属(ヒトロタウィルス、ネプラスカ子ウシ下痢ウィルス、マウスロタウィルス、サルロタウィルス、ウシまたはヒツジロタウィルス、トリロタウィルス)を含むレオウィルス科；エンテロウィルス属(ポリオウィルス、コクサッキーウィルスAおよびB、ヒト細胞変性腸内孤児(ECHO)ウィルス、A型肝炎ウィルス、サルエンテロウィルス、マウス脳脊髄炎(ME)ウィルス、ポリオウィルスムリス、ウシエンテロウィルス、ブタエンテロウィルス)、カルジオウィルス属(脳心筋炎ウィルス(EMC)、メンゴウィルス) 10

、ライノウィルス属(少なくとも113種のサブタイプを含むヒトライノウィルス；他のライノウィルス)、アフトウィルス属(口蹄疫(FMDV))を含むピコルナウィルス科；ブタ小水疱性発疹ウィルス、サンミゲールアシカウィルス、ネコピコルナウィルスおよびノーウォークウィルスを含むカリシウィルス科；アルファウィルス属(東部ウマ脳炎ウィルス、セムリキ森林ウィルス、シンドビスウィルス、チクングニヤウィルス、オニオンニオンウィルス、ロス川ウィルス、ベネズエラウマ脳炎ウィルス、西部ウマ脳炎ウィルス)、フラピリウス属(蚊媒介黄熱病ウィルス、デングウィルス、日本脳炎ウィルス、セントルイス脳炎ウィルス、マリーバレー脳炎ウィルス、西ナイルウィルス、クンジンウィルス、中欧ダニ媒介ウィルス、極東ダニ媒介ウィルス、キャサヌール森林ウィルス、跳躍病ウィルス、ポワサンウィルス、オムスク出血熱ウィルス)、ルビウィルス属(風疹ウィルス)、ペスチウ 20

ィルス属(粘膜病ウィルス、豚コレラウィルス、ボーダー病ウィルス)を含むトガウィルス科；ブンヤウィルス属(ブンヤムウェラおよび関連ウィルス、カリフォルニア脳炎群ウィルス)、フレボウィルス属(シシリアサシチョウバエウィルス、リフトバレー熱ウィルス)、ナイロウィルス属(クリミア-コンゴ出血熱ウィルス、ナイロビヒツジ病ウィルス)、ならびにUukuvirus属(Uukuniemiおよび関連ウィルス)を含むブンヤウィルス科；インフルエンザウィルス属(A型インフルエンザウィルス、多数のヒトサブタイプ)；ブタインフルエンザウィルス、ならびにトリおよびウマインフルエンザウィルス；B型インフルエンザ(多数のヒトサブタイプ)、ならびにC型インフルエンザ(考えられる独立した属)を含むオルトミクソウィルス科；パラミクソウィルス属(1型パラインフルエンザウィルス、センダイウ 30

ィルス、赤血球吸着ウィルス、2~5型パラインフルエンザウィルス、ニューカッスル病ウィルス、流行性耳下腺炎ウィルス)、麻疹ウィルス属(麻疹ウィルス、亜急性硬化性全脳炎ウィルス、ジステンパーウィルス、牛疫ウィルス)、肺炎ウィルス属(呼吸器合胞体ウィルス(RSV)、ウシ呼吸器合胞体ウィルスおよびマウス肺炎ウィルス)を含むパラミクソウィルス科；森林ウィルス、シンドビスウィルス、チクングニヤウィルス、オニオンニオンウィルス、ロス川ウィルス、ベネズエラウマ脳炎ウィルス、西部ウマ脳炎ウィルス、フラピリウス属(蚊媒介黄熱病ウィルス、デングウィルス、日本脳炎ウィルス、セントルイス脳炎ウィルス、マリーバレー脳炎ウィルス、西ナイルウィルス、クンジンウィルス、中欧ダニ媒介ウィルス、極東ダニ媒介ウィルス、キャサヌール森林ウィルス、跳躍病ウィルス、ポワサンウィルス、オムスク出血熱ウィルス)、ルビウィルス属(風疹ウィルス)、ペスチウ 40

ィルス属(粘膜病ウィルス、豚コレラウィルス、ボーダー病ウィルス)；ブンヤウィルス属(ブンヤムウェラおよび関連ウィルス、カリフォルニア脳炎群ウィルス)、フレボウィルス属(シシリアサシチョウバエウィルス、リフトバレー熱ウィルス)、ナイロウィルス属(クリミア-コンゴ出血熱ウィルス、ナイロビヒツジ病ウィルス)、ならびにUukuvirus属(Uukuniemiおよび関連ウィルス)を含むブンヤウィルス科；インフルエンザウィルス属(A型インフルエンザウィルス、多数のヒトサブタイプ)；ブタインフルエンザウィルス、ならびにトリおよびウマインフルエンザウィルス；B型インフルエンザ(多数のヒトサブタイプ)、ならびにC型インフルエンザ(考えられる独立した属)を含むオルトミクソウィルス科；パラミクソウィルス属(1型パラインフルエンザウィルス、センダイウ 50

ィルス、赤血球吸着ウィルス、2~5型パラインフルエンザウィルス、ニューカッスル病ウィルス、流行性耳下腺炎ウィルス)、麻疹ウィルス属(麻疹ウィルス、亜急性硬化性全脳炎ウィルス、ジステンパ

ーウイルス、牛痘ウイルス)、肺炎ウイルス属(呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、ウシ呼吸器合胞体ウイルスおよびマウス肺炎ウイルス)を含むパラミクソウイルス科; ベシクロウイルス属(VSV)、チャンディプラウイルス、フランダーズ-ハートパークウイルス)、リッサウイルス属(狂犬病ウイルス)、魚ラプトウイルス、ならびに考えられる2種のラプトウイルス(マルブルグウイルスおよびエボラウイルス)を含むラプトウイルス科; リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCM)、タカリベウイルス複合体、ならびにラッサウイルスを含むアレナウイルス科; 伝染性気管支炎ウイルス(IBV)、マウス肝炎ウイルス、ヒト腸コロナウイルス、ならびにネコ伝染性腹膜炎(ネココロナウイルス)を含むコロナウイルス科のメンバーが挙げられるが、それだけには限定されない。

#### 【0325】

脊椎動物の抗原である例示的なDNAウイルスとしては: オルソポックスウイルス属(大痘瘡、小痘瘡、サル痘ワクチニア、牛痘、バッファロー痘、家兔痘、エクトロメリア)、レポリポックスウイルス属(粘液腫、線維腫)、アピポックスウイルス属(鶏痘、他のトリポックスウイルス)、カプリポックスウイルス属(羊痘、ヤギ痘)、スイポックスウイルス属(豚痘)、ラポックスウイルス属(伝染性膿疱性皮膚炎ウイルス、偽牛痘、ウシ丘疹性口炎ウイルス)を含むポックスウイルス科; イリドウイルス科(アフリカ豚コレラウイルス、2型および3型カエルウイルス、魚リンホシスチウイルス); アルファヘルペスウイルス(単純ヘルペス1型および2型、水痘-帯状疱疹、ウマ流産ウイルス、2および3型ウマヘルペスウイルス、仮性狂犬病狂犬病ウイルス、ウシ伝染性角結膜炎ウイルス、ウシ伝染性鼻気管炎ウイルス、ネコ鼻気管炎ウイルス、伝染性喉頭気管炎ウイルス)、ベータヘルペスウイルス(ヒトサイトメガロウイルスおよびブタ、サルおよびげっ歯類サイトメガロウイルス); ガンマヘルペスウイルス(エプスタイン-バーウイルス(EBV)、マレック病ウイルス、ヘルペスサイミリ、ヘルペスウイルスアテレス、ヘルペスウイルスシルピラグス(*sylvilagus*)、モルモットヘルペスウイルス、リュッケ腫瘍ウイルス)を含むヘルペスウイルス科; マストアデノウイルス属(ヒトサブグループA、B、C、D、Eおよび未分類; サルアデノウイルス(少なくとも23種の血清型)、イヌ伝染性肝炎、ならびにウシ、ブタ、ヒツジ、カエルおよび任意の他の種のアデノウイルス、アピアデノウイルス属(トリアデノウイルス); ならびに培養できないアデノウイルスを含むアデノウイルス科; 乳頭腫ウイルス属(ヒト乳頭腫ウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス、ショーブウサギ乳頭腫ウイルス、および他の種のような病原性パピローマウイルス)、ポリオーマウイルス属(ポリオーマウイルス、サル空胞ウイルス(SV-40)、ウサギ空胞形成ウイルス(RKV)、Kウイルス、BKウイルス、JCウイルス、およびリンパ親和性乳頭腫ウイルスなど他の霊長類ポリオーマウイルス)を含むパポウイルス科; アデノ関連ウイルス属、パルボウイルス属(ネコ汎白血球減少症ウイルス、ウシパルボウイルス、イヌパルボウイルス、ミンクアリューション病ウイルスなど)を含むパルボウイルス科が挙げられるが、それだけには限定されない。最後に、DNAウイルスには、クーラーおよびクロイツフェルト-ヤコブ病ウイルスならびに慢性感染性神経障害ウイルスなど上記の科に適合しないウイルスが含まれてよい。

#### 【0326】

本発明の複合体と併せて使用できる抗ウイルス化合物の多くの例は、当技術分野で公知であり:

リファンピシン、ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤(例えば、AZT、ddI、ddC、3TC、d4T)、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤(例えば、エファビレンズ、ネビラピン)、プロテアーゼ阻害剤(例えば、ロピナビル、アンブレナビル、インジナビル、リトナビル、およびサキナビル)、イドクスリジン(idoxuridine)、シドフォビル、アシクロビル、ガンシクロビル、ザナミビル、アマンタジン、およびパリビズマブを含むが、それだけには限定されない。抗ウイルス薬の他の例としては、アセマナン; アシクロビル; アシクロビルナトリウム; アデフォビル; アロブジン; アルビルセプトストックス(Alvircept Sudotox); 塩酸アマンタジン; アラノチン(Aranotin); アリルドン(Arildone); アテビルジンメシレート(Ateviridine Mesylate); アプリジン(Aviridine); シドフォビル; シパンフィリン(Cipamfylline); 塩酸シタラピン; デラビルジンメシレート; デスシクロビル(Desciclovir)

10

20

30

40

50

r); ジダノシン (Didanosine); ジスオキサリル (Disoxaril); エドクスジン (Edoxudine); エンビラデン (Enviradene); エンビロキシム (Enviroxime); ファムシクロビル; 塩酸ファミチン (Famotine Hydrochloride); フィアシタピン (Fiacitabine); フィアルリジン (Fialuridine); フォサリレート (Fosarilate); フォスカメットナトリウム (Foscamet Sodium); フォスフォネットナトリウム (Fosfonet Sodium); ガンシクロビル; ガンシクロビルナトリウム; イドクスリジン (Idoxuridine); ケトキサリル (Kethoxal); ラミブジン; ロブカビル (Lobucavir); 塩酸メモチン (Memotine Hydrochloride); メシサゾン (Methisazone); ネビラピン; ペンシクロビル; ピロダビル (Pirodavidir); リバビリル (Ribavirin); 塩酸リマシタジン; サキナビルメシレート; 塩酸ソマシタジン; ソリブジン; スタトロン; スタブジン; 塩酸チロロン; トリフルリジン; 塩酸バラシクロビル; ビダラピン; リン酸ビダラピン; リン酸ビダラピルナトリウム; ビロキシム (Viroxime); ザルシタピン; ジドブジン; ジンビロキシム (Ziniviroxime)が挙げられるが、それだけには限定されない。

10

### 【0327】

本発明の方法によって治療または予防できる細菌感染症または疾患は、それだけには限らないが、マイコバクテリア (例えば、ヒト型結核菌 (*Mycobacteria tuberculosis*), ウシ型結核菌 (*M. bovis*), 鳥型結核菌 (*M. avium*), 癩菌 (*M. leprae*), または *M. アフリカヌム* (*M. africanum*)), リケッチア、マイコプラズマ、クラミジア、およびレジオネラなど、その生活環に細胞内期を有する細菌を含む細菌によって引き起こされ得る。企図される細菌感染症の他の例としては、グラム陽性桿菌 (例えば、リステリア、炭疽菌などの桿菌、エリジペロスリックス種)、グラム陰性桿菌 (例えば、バルトネラ、ブルセラ、カンピロバクター、エンテロバクター、エシェリキア、フランシセラ、ヘモフィルス、クレブシエラ、モルガネラ、プロテウス、プロビデンシア、シュードモナス、サルモネラ、セラチア、シゲラ、ビブリオ、およびエルシニア種)、スピロヘータ菌 (例えば、ライム病を引き起こすボレリアブルグドルフェリを含むボレリア種)、嫌気性菌 (例えば、アクチノミセスおよびクロストリジウム種)、グラム陽性および陰性球菌、腸球菌 (*Enterococcus*) 種、連鎖球菌種、肺炎球菌種、ブドウ球菌種、ナイセリア種によって引き起こされる感染症が挙げられるが、それだけには限定されない。感染性細菌の具体例としては: ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*), ボレリアブルグドルフェリ、レジオネラニューモフィラ (*Legionella pneumophila*), ヒト型結核菌、鳥型結核菌、*M. イントラセルラーレ* (*M. intracellulare*), *M. カンサイイ* (*M. kansasii*), *M. ゴルドネ* (*M. gordonae*), 黄色ブドウ球菌、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*), 髄膜炎菌、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*), 化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (A群連鎖球菌)、ストレプトコッカスアガラクティエ (*Streptococcus agalactiae*) (B群連鎖球菌)、緑色連鎖球菌 (*Streptococcus viridans*), 大便連鎖球菌 (*Streptococcus faecalis*), ストレプトコッカスポビス (*Streptococcus bovis*), 肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*), インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*), 炭疽菌、ジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae*), 豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*), ウェルシュ菌、破傷風菌、アイロゲネス腸内菌 (*Enterobacter aerogenes*), 肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*), 動物パストツレラ病原菌 (*Pasturella multocida*), 有核紡錘菌 (*Fusobacterium nucleatum*), モニリフォルミス連鎖桿菌 (*Streptobacillus moniliformis*), 梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum*), トレポネーマペルテニュー (*Treponema pertenue*), レプトスピラ、リケッチア (*Rickettsia*), およびイスラエル放線菌 (*Actinomyces israelii*) が挙げられるが、それだけには限定されない。

20

30

40

### 【0328】

本発明の複合体と併せて使用できる抗菌物質または抗生物質としては: アミノグリコシド系抗生物質 (例えば、アブラマイシン、アルベカシン、バムベルマイシン (*bambermycins*)), プチロシン、ジベカシン、ネオマイシン、ウンデシレネート、ネチルマイシン、パロモマイシン、リボスタマイシン、シソマイシン、およびスペクチノマイシン)、アムフェニコール系抗生物質 (例えば、アジダムフェニコール (*azidamfenicol*), クロラムフェニコール、フロルフエニコール、およびチアムフェニコール (*thiamphenicol*)), アンサマイシン系抗生物質 (例えば、リファミド (*rifamide*) およびリファンピン)、カルバセフェム (例

50

えば、ロラカルベフ)、カルバペネム(例えば、ピアペネムおよびイミペネム)、セファロ  
 スポリン(例えば、セファクロル、セファドロキシル、セファマンドール、セファトリジ  
 ン、セファゼドン(cefazedone)、セフォゾプラン、セフピミゾール、セフピラミド、およ  
 びセフピロム)、セファマイシン(例えば、セフブペラゾン、セフメタゾール、およびセフ  
 ミノックス)、モノバクタム(例えば、アズトレオナム、カルモナム、およびチゲモナム(t  
 igemonam)、オキサセフェム(例えば、フロモキセフおよびモキサラクタム)、ペニシリン(  
 例えば、アムジノシリン(amdinocillin)、アムジノシリンピボキシル、アモキシシリン、  
 バカンピシリン、ベンジルペニシリン酸、ベンジルペニシリンナトリウム、エピシリン(e  
 picillin)、フェンペニシリン(fenbenicillin)、フロキサシリン(floxacin)、ペナム  
 シリン(penamccillin)、ペネタメートヒドリオジド(penethamate hydriodide)、ペニシリン  
 o-ペネタミン、ペニシリン0、ペニシリンV、ペニシリンVベンザチン、ペニシリンVヒド  
 ラバミン(penicillin V hydrabamine)、ペニメピサイクリン(penimepicycline)、および  
 フェンシヒシリンカリウム(phencihicillin potassium)、リンコサミド(例えば、クリン  
 ダマイシンおよびリンコマイシン)、マクロリド(例えば、アジスロマイシン、カルボマイ  
 シン、クラリトマイシン(clarithomycin)、ジリスロマイシン(dirithromycin)、エリスロ  
 マイシン、およびエリスロマイシンアシストレート(erythromycin acistrate))、アンフ  
 オマイシン、バシトラシン、カプレオマイシン、コリスチン、エンジュラシジン、エンピ  
 オマイシン、テトラサイクリン(例えば、アピサイクリン(apicycline)、クロルテトラサ  
 イクリン、クロモサイクリン(clomocycline)、およびデメクロサイクリン)、2,4-ジアミ  
 ノピリミジン(例えば、プロジモプリム)、ニトロフラン(例えば、フラルタドンおよび塩  
 化フラゾリウム(furazolium chloride)、キノロンおよびその類似体(例えば、シノキサシ  
 ン、シプロフロキサシン、クリナフロキサシン、フルメキン、およびグレパグロキサシ  
 ン(grepagloxacin)、スルホンアミド(例えば、アセチルスルファメトキシピラジン(acetyl  
 sulfamethoxypprazine)、ベンジルスルファミド(benzylsulfamide)、ノプリルスルファミ  
 ド(noprylsulfamide)、フタリルスルファセタミド、スルファクリソイジン(sulfachrysoi  
 dine)、およびスルファシチン(sulfacytine))、スルホン(例えば、ジアシモスルホン(dia  
 thymosulfone)、グルコスルホンナトリウム、およびソラスルホン)、シクロセリン、ムピ  
 ロシン、およびツペリンが挙げられるが、それだけには限定されない。

### 【0329】

抗菌物質の別の例としては、アセダプソン；アセトスルホンナトリウム(Acetosulfone  
 Sodium)；アラメシン(Alamecin)；アレクシジン(Alexidine)；アムジノシリン(Amdinocil  
 lin)；アムジノシリンピボキシル；アミサイクリン(Amicycline)；アミフロキサシン(Ami  
 floxacin)；アミフロキサシンメシレート；アミカシン；硫酸アミカシン；アミノサリチ  
 ル酸；アミノサリチル酸ナトリウム；アモキシシリン；アンフォマイシン；アンピシリン  
 ；アンピシリンナトリウム；アパルシリンナトリウム(Apalcillin Sodium)；アプラマイ  
 シン；アスパルトシン；硫酸アストロマイシン；アピラマイシン；アボパルシン；アジス  
 ロマイシン；アズロシリン；アズロシリンナトリウム；塩酸バカンピシリン；バシトラシ  
 ン；バシトラシンメチレンジサリチレート(Bacitracin Methylene Disalicylate)；バシ  
 トラシン亜鉛；バンベルマイシン(Bambermycins)；ベンゾイルパスカルシウム(Benzoylpa  
 s Calcium)；ベリスロマイシン(Berythromycin)；硫酸ベタマイシン(Betamicin Sulfate)  
 ；ピアペネム；ピニラマイシン(Biniramycin)；塩酸ビフェナミン(Biphenamine Hydrochl  
 oride)；ビスピリチオンマグスルフェックス(Bispyrithione Magsulfex)；ブチカシン(Bu  
 tikacin)；硫酸ブチロシン；硫酸カプレオマイシン；カルバドックス；カルベニシリンニ  
 ナトリウム；カルベニシリンインドアニルナトリウム；カルベニシリンフェニルナトリウム  
 ；カルベニシリンカリウム；カルモナムナトリウム；セファクロル；セファドロキシル；  
 セファマンドール；セファマンドールナフェート(Cefamandole Nafate)；セファマンドー  
 ルナトリウム；セファパロール(Cefaparole)；セファトリジン；セファザフルルナトリウ  
 ム(Cefazafur Sodium)；セファゾリン；セファゾリンナトリウム；セフブペラゾン；セ  
 フジニル；セフェピム；塩酸セフェピム；セフェテコール(Cefetecol)；セフィキシム；  
 塩酸セフムネノキシム(Cefmnenoxime Hydrochloride)；セフメタゾール；セフメタゾール

ナトリウム; セフォニシドナトリウム; セフォニシドナトリウム; セフォペラゾンナ  
 トリウム; セフォラニド; セフォタキシムナトリウム; セフォテタン; セフォテタンニナト  
 リウム; 塩酸セフォチアム; セフォキシチン; セフォキシチンナトリウム; セフピミゾー  
 ル; セフピミゾールナトリウム; セフピラミド; セフピラミドナトリウム; 硫酸セフピロ  
 ム; セフポドキシムプロキセチル; セフプロジル; セフロキサジン; セフスロジンナト  
 リウム; セフタジジム; セフチブテン; セフチゾキシムナトリウム; セフトリアキソンナト  
 リウム; セフロキシム; セフロキシムアクセチル; セフロキシムピボキセチル(Cefuroxim  
 e Pivoxetil); セフロキシムナトリウム; セファセトリルナトリウム; セファレキシン;  
 塩酸セファレキシン; セファログリシン; セファロリジン; セファロシンナトリウム; セ  
 ファピリンナトリウム; セフラジン; 塩酸セトサイクリン(Cetocycline Hydrochloride); 10  
 セトフェニコール(Cetophenicol); クロラムフェニコール; パルミチン酸クロラムフェ  
 ニコール; パントテン酸クロラムフェニコール複合体(Chloramphenicol Pantothenate Co  
 mplex); コハク酸クロラムフェニコールナトリウム; ホスファニル酸クロルヘキシジン;  
 クロロキシレノール; 重硫酸クロルテトラサイクリン; 塩酸クロルテトラサイクリン; シ  
 ノキサシン; シプロフロキサシン; 塩酸シプロフロキサシン; シロレマイシン(Cirolemyc  
 in); クラリスロマイシン; 塩酸クリナフロキサシン; クリンダマイシン; 塩酸クリンダ  
 マイシン; 塩酸パルミチン酸クリンダマイシン; リン酸クリンダマイシン; クロファジミ  
 ン; クロキサシリンベンザチン; クロキサシリンナトリウム; クロキシキン(Cloxyquin);  
 コリスチメテートナトリウム(Colistimethate Sodium); 硫酸コリスチン; クメルマイシ  
 ン; クメルマイシンナトリウム; シクラシリン; シクロセリン; ダルフォプリスチン; ダ  
 ブソン; ダプトマイシン; デメクロサイクリン; 塩酸デメクロサイクリン; デメサイクリ  
 ン(Demecycline); デノファンジン(Denofungin); ジアベリジン; ジクロキサシリン; ジ  
 クロキサシリンナトリウム; 硫酸ジヒドロストレプトマイシン; ジピリチオン; ジリスロ  
 マイシン(Dirithromycin); ドキシサイクリン; ドキシサイクリンカルシウム; ドキシサ  
 イクリンフォスファテックス(Doxycycline Fosfatex); ドキシサイクリンハイクレート;  
 ドロキサシンナトリウム(Droxacin Sodium); エノキサシン; エピシリン(Epicillin); 塩  
 酸エピテトラサイクリン(Epitetracycline Hydrochloride); エリスロマイシン; エリス  
 ロマイシンアシストレート(Erythromycin Acistrate); エリスロマイシンエストレート;  
 エチルコハク酸エリスロマイシン; エリスロマイシングルセプテート(Erythromycin Gluc  
 eptate); ラクトピオン酸エリスロマイシン; プロピオン酸エリスロマイシン; ステアリ  
 ン酸エリスロマイシン; 塩酸エタンブトール; エチオナミド; フレロキサシン; フロキサ  
 シリン; フルダラニン(Fludalanine); フルメキン; ホスホマイシン; ホスホマイシント  
 ロメタミン; フモキシシリン(Fumoxicillin); 塩化フラゾリウム(Furazolium Chloride);  
 酒石酸フラゾリウム(Furazolium Tartrate); フシジン酸ナトリウム; フシジン酸; 硫酸  
 ゲンタマイシン; グロクシモナム(Gloximonam); グラミシジン; ハロプロジン; ヘタシリ  
 ン; ヘタシリンカリウム; ヘキセジン(Hexedine); イバフロキサシン(Ibafloxacin); イ  
 ミペネム; イソコナゾール; イセパマイシン; イソニアジド; ジョサマイシン; 硫酸カナ  
 マイシン; キタサマイシン; レボフラルタドン(Levofuraltadone); レボプロピルシリン  
 カリウム(Levopropylcillin Potassium); レキシスロマイシン(Lexithromycin); リンコ  
 マイシン; 塩酸リンコマイシン; ロメフロキサシン; 塩酸ロメフロキサシン; ロメフロキ  
 サシンメシレート; ロラカルベフ; マフェニド; メクロサイクリン(Meclocycline); スル  
 ホサリチル酸メクロサイクリン; リン酸メガロマイシンカリウム(Megalomicin Potassium  
 Phosphate); メキドックス(Mequidox); メロベネム; メタサイクリン; 塩酸メタサイク  
 リン; メテナミン; ヒプル酸メテナミン; マンデル酸メテナミン; メチシリンナトリウム  
 ; メチオプリム(Metioprim); 塩酸メトロニダゾール; リン酸メトロニダゾール; メズロ  
 シリン; メズロシリンナトリウム; ミノサイクリン; 塩酸ミノサイクリン; 塩酸ミリンカ  
 マイシン(Mirincamycin Hydrochloride); モネンシン; モネンシンナトリウム; ナフシリ  
 ンナトリウム; ナリジキシム酸ナトリウム; ナリジキン酸; ナタマイシン; ネブラマイシ  
 ン; パルミチン酸ネオマイシン; 硫酸ネオマイシン; ウンデシレン酸ネオマイシン; 硫酸  
 ネチルマイシン; ニュートラマイシン(Neutramycin); ニフラデン(Nifuradene); ニフラ 50

ルデゾン(Nifuraldezone); ニフラテル(Nifuratel); ニフラトロン(Nifuratrone); ニフルダジル(Nifurdazil); ニフリミド(Nifurimide); ニフルピリノール; ニフルキナゾール(Nifurquinazol); ニフルチアゾール; ニトロサイクリン(Nitrocycline); ニトロフラントイン; ニトロミド(Nitromide); ノルフロキサシン; ノボピオシンナトリウム; オフロキサシン; オルメトプリム; オキサシリンナトリウム; オキシモナム(Oximonam); オキシモナムナトリウム; オキシリン酸; オキシテトラサイクリン; オキシテトラサイクリンカルシウム; 塩酸オキシテトラサイクリン; パルジマイシン(Palidimycin); パラクロロフェノール; パウロマイシン(Paulomycin); ペフロキサシン(Pefloxacin); ペフロキサシメシレート; ペナメシリン(Penamecillin); ペニシリンGベンザシン(Penicillin G Benzathine); ペニシリンGカリウム; ペニシリンGプロカイン; ペニシリンGナトリウム; ペニシリンV; ペニシリンVベンザシン; ペニシリンVヒドラバミン(Penicillin V Hydrabamine); ペニシリンVカリウム; ペンチジドンナトリウム(Pentizidone Sodium); アミノサリチル酸フェニル; ピペラシリンナトリウム; ピルベニシリンナトリウム(Pirbenicillin Sodium); ピリジシリンナトリウム(Piridicillin Sodium); 塩酸ピルリマイシン; 塩酸ピバンピシリン; パモ酸ピバンピシリン; ピバンピシリンプロベネート(Pivampicillin Probenate); 硫酸ポリミキシンB; ポルフィロマイシン; プロピカシン(Propikacin); ピラジナミド; ピリチオン亜鉛; 酢酸キンデカミン(Quindecamine Acetate); キヌプリスチン; ラセフェニコール(Racephenicol); ラモプラニン; ラニマイシン(Ranimycin); レロマイシン(Relomycin); レプロマイシン; リファブチン; リファメタン(Rifametan); リファメキシル(Rifamexil); リファミド(Rifamide); リファンピン; リファペンチン; リファキシミン; ロリテトラサイクリン; 硝酸ロリテトラサイクリン; ロサラマイシン(Rosaramicin); 酪酸ロサラマイシン; プロピオン酸ロサラマイシン; リン酸ナトリウムロサラマイシン; ステアリン酸ロサラマイシン; ロソキサシン(Rosoxacin); ロキササルゾン; ロキシスロマイシン; サンサイクリン(Sancycline); サンフェトリネムナトリウム(Sanfetrinem Sodium); サルモキシシリン(Sarmoxicillin); サルピシリン; スコパフィンジン(Scopafingine); シソマイシン; 硫酸シソマイシン; スパルフロキサシン; 塩酸スペクチノマイシン; スピラマイシン; 塩酸スタリマイシン(Stallimycin Hydrochloride); ステフィマイシン(Steffimycin); 硫酸ストレプトマイシン; ストレプトニコジド(Streptonicozid); スルファベンズ(Sulfabenz); スルファベンズアミド; スルファセタミド; スルファセタミドナトリウム; スルファシチン(Sulfacytine); スルファジアジン; スルファジアジンナトリウム; スルファドキシシン; スルファレン; スルファメラジン; スルファメーター; スルファメタジン; スルファメチゾール; スルファメトキサゾール; スルファモノメトキシシン; スルファモキソール; スルファニル酸亜鉛; スルファニトラン; スルファサラジン; スルファソミゾール(Sulfasomizole); スルファチアゾール; スルファザメト; スルフィソキサゾール; スルフィソキサゾールアセチル; スルフィソキサゾールジオールアミン; スルホミキシン(Sulfomyxin); スロベネム; スルタミシリン; サンシリンナトリウム(Suncillin Sodium); 塩酸タランピシリン; テイコプラニン; 塩酸テマフロキサシン; テモシリン(Temocillin); テトラサイクリン; 塩酸テトラサイクリン; リン酸テトラサイクリン複合体; テトロキソプリム; チアンフェニコール; チフェンシリンカリウム(Thiphencillin Potassium); チカルシリクレスシルナトリウム; チカルシリンナトリウム; チカルシリンナトリウム; チクラトン(Ticlatone); 塩化チオドニウム(Tiodonium Chloride); トブラマイシン; 硫酸トブラマイシン; トスフロキサシン; トリメトプリム; 硫酸トリメトプリム; トリスルファピリミジン(Trisulfapyrimidines); トロレアンドマイシン; 硫酸トロスペクトマイシン(Trospectomycin Sulfate); チロスリシン(Tyrothricin); バンコマイシン; 塩酸バンコマイシン; パージニアマイシン; ゴルバマイシン(Zorbamycin)が挙げられるが、それだけには限定されない。

### 【0330】

本発明の方法によって治療または予防できる真菌症には、アスペルギルス症、クリプトコッカス症、スポロトリクス症、コクシジオイデス症、パラコクシジオイデス症、ヒストプラズマ症、分芽菌症、接合菌症、ならびにカンジダ症が含まれるが、それだけには限定

されない。

【0331】

本発明の複合体と併せて使用できる抗真菌化合物としては：ポリエン(例えば、アンホテリシンb、カンジシジン、メパルトリシン、ナタマイシン、およびニスタチン)、アリアルアミン(例えば、ブテナフィンおよびナフチフィン)、イミダゾール(例えば、ビホナゾール、フトコナゾール、クロルダントイン(chlordantoin)、フルトリマゾール(flutrimazole)、イソコナゾール、ケトコナゾール、およびラノコナゾール)、チオカルバメート(例えば、トルシクレート、トリンデート(tolindate)、およびトルナフテート)、トリアゾール(例えば、フルコナゾール、イトラコナゾール、サベルコナゾール(saperconazole)、およびテルコナゾール)、プロモサリチルクロラニリド(bromosalicylchloranilide)、ブクロサミド(buclosamide)、プロピオン酸カルシウム、クロルフェニシン、シクロピロックス、アザセリン、グリセオフルビン、オリゴマイシン、ウンデシレン酸ネオマイシン、ピロルニトリン、シッカニン、ツベルシジンおよびピリジンが挙げられるが、それだけには限定されない。

10

【0332】

抗真菌化合物の別の例としては、アクリゾルシン；アンブルチシン(Ambruticin)；アンホテリシンB；アザコナゾール；アザセリン；バシファンジン(Basifungin)；ビホナゾール；塩酸ピフェナミン；ビスピリチオンマグサルフェックス(Bispyrithione Magsulfex)；硝酸フトコナゾール；ウンデシル酸カルシウム；カンジシジン；カルボール-フクシン；クロルダントイン；シクロピロックス；シクロピロックスオラミン；シロファンジン(Cilofungin)；シスコナゾール(Cisconazole)；クロトリマゾール；カプリミキシン(Cuprimycin)；デノファンジン(Denofungin)；ジピリチオン；ドコナゾール(Doconazole)；エコナゾール；硝酸エコナゾール；エニルコナゾール；硝酸エトナム；硝酸フェンチコナゾール；フィリピン；フルコナゾール；フルシトシン；フンジマイシン(Fungimycin)；グリセオフルビン；ハマイシン；イソコナゾール；イトラコナゾール；カラファンジン(Kalafungin)；ケトコナゾール；ロモフィンジン(Lomofingin)；リジマイシン(Lydimycin)；メパルトリシン；ミコナゾール；硝酸ミコナゾール；モネンシン；モネンシンナトリウム；塩酸ナフチフィン；ウンデシレン酸ネオマイシン；ニフラテル；ニフルメロン(Nifurmerone)；塩酸ニトララミン；ニスタチン；オクタン酸；硝酸オルコナゾール(Orconazole Nitrate)；硝酸オキシコナゾール；塩酸オキシファンジン(Oxifungin Hydrochloride)；塩酸パルコナゾール(Parconazole Hydrochloride)；パルトリシン；ヨウ化カリウム；プロクロノール；ピリチオン亜鉛；ピロルニトリン；ルタマイシン；塩化サンギナリウム；サベルコナゾール；スコパファンジン(Scopafungin)；硫化セレン；シネファンジン(Sinefungin)；硝酸スルコナゾール；テルピナフィン；テルコナゾール；チラム；チクラトン(Ticlatone)；チオコナゾール；トルシクレート；トリンデート；トルナフテート；トリアセチン；トリアフィジン(Triafluigin)；ウンデシレン酸；ビリドフリルビン(Viridoflilvin)；ウンデシレン酸亜鉛；および塩酸ジノコナゾール(Zinoconazole Hydrochloride)が挙げられるが、それだけには限定されない。

20

30

【0333】

本発明の方法によって治療または予防できる寄生虫症としては、アメーバ症、マラリア、リーシュマニア、コクシジウム、ジアルジア鞭毛虫症、クリプトスポリジウム症、トキソプラズマ症、およびトリパノソーマ症が挙げられるが、それだけには限定されない。さらに含まれるのは、それだけには限らないが、回虫症、鉤虫症、鞭虫症、糞線虫、トキソカラ症、旋毛虫症、回旋糸状虫症、フィラリア、およびジロフィラリア症を含む様々な蠕虫による感染症である。さらに含まれるのは、それだけには限らないが、住血吸虫症、肺吸虫症、および肝吸虫症などの様々な吸虫による感染症である。これらの疾患を引き起こす寄生虫は、それらが細胞にあるのか、それとも細胞外にあるのかに基づいて分類することができる。本明細書では、「細胞内寄生虫」は、その生活環全体が細胞内にある寄生虫である。ヒト細胞内寄生虫の例としては、リーシュマニア属(*Leishmania* spp.)、プラスモディウム属(*Plasmodium* spp.)、トリパノソーマクルージ(*Trypanosoma cruzi*)、トキソ

40

50

プラズマ原虫(*Toxoplasma gondii*)、バベシア属(*Babesia* spp.)、および旋毛虫(*Trichinella spiralis*)が挙げられる。本明細書では、「細胞外寄生虫」は、その生活環全体が細胞外にある寄生虫である。ヒトに感染できる細胞外寄生虫としては、赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)、ランブル鞭毛虫(*Giardia lamblia*)、*Enterocytozoon bieneusi*、ネグレリア(*Naegleria*)およびアカントアメーバ(*Acanthamoeba*)ならびにほとんどの蠕虫が挙げられる。さらに、別のクラスの寄生虫は主に細胞外にあると定義されているが、それらの生活環の臨界期(critical stage)には絶対細胞内に存在する。こうした寄生虫は、本明細書において「偏性細胞内寄生虫」と称される。これらの寄生虫は、それらの生涯の大部分またはそれらの生涯のほんの一部だけ細胞外環境に存在し得るが、これらにはすべて、それらの生活環において偏性細胞内期が少なくとも1回ある。この後者の分類の寄生虫には、ローデシアトリパノソーマ(*Trypanosoma rhodesiense*)およびガンビアトリパノソーマ(*Trypanosoma gambiense*)；イソスポーラ(*Isospora*) spp.、クリプトスポリジウム(*Cryptosporidium*) spp.、アイメリア属(*Eimeria*) spp.、ネオスポラ(*Neospora*) spp.、肉胞子虫属(*Sarcocystis*) spp.ならびに住血吸虫属(*Schistosoma*) sppが含まれる。

10

#### 【0334】

寄生虫症を治療するために本発明の複合体と併せて使用できる抗原虫化合物の多くの例は、当技術分野で公知であり：キニン、クロロキン、メフロキン、プログアニル、ピリメタミン、メトロニダゾール、フロ酸ジロキサニド、チニダゾール、アンホテリシン、ステボグルコン酸ナトリウム、トリモキサゾール、およびイセチオン酸ペンタミジンを含むが、それだけには限定されない。寄生虫症を治療するために本発明の複合体と併せて使用できる抗寄生虫薬の多くの例は、当技術分野で公知であり：メベンダゾール、レバミソール、ニクロサミド、ブラジクアンテル、アルベンダゾール、イベルメクチン、ジエチルカルバマジン、およびチアベンダゾールを含むが、それだけには限定されない。抗寄生虫化合物の他の例としては、アセダブソン；塩酸アモジアキン；アムキネート(Amquinat)；アルテフレン(*Arteflene*)；クロロキン；塩酸クロロキン；リン酸クロロキン；パモ酸シクログアニル；リン酸エンピロリン(*Enpiroline Phosphate*)；塩酸ハロファントリン；硫酸ヒドロキシクロロキン；塩酸メフロキン；メノクトン；塩酸ミリンカマイシン(*Mirincamycin Hydrochloride*)；リン酸プリマキン；ピリメタミン；硫酸キニン；およびテブキン(*Tebuquine*)が挙げられるが、それだけには限定されない。

20

#### 【0335】

一実施形態では、本発明の複合体は、非hspワクチン組成物と併せて使用することができる。ヒト用のこうしたワクチンの例は、その全体が参照により本明細書に組み込まれるThe Jordan Report 2000、Accelerated Development of Vaccines、National Institute of Healthに記載されている。ヒト以外の脊椎動物を治療するための多くのワクチンが、その全体が参照により本明細書に組み込まれるBennett、K. Compendium of Veterinary Products、第3版 North American Compendiums、Inc.、1995に開示されている。

30

#### 【0336】

##### 5.18.3 自己実施形態

hspの特異免疫原性は、それ自体がhsp由来ではなく、hspに結合した抗原タンパク質および/またはペプチドに由来する。本発明の好ましい実施形態では、癌ワクチンとして使用する本発明の組成物中の複合体は自己複合体であり、したがって、癌免疫療法における最もやっかいなハードルのうちの2つが回避される。第1は、実験動物の癌と同様にヒト癌が抗原的に異なる可能性である。このハードルを回避するために、本発明の好ましい実施形態では、hspと抗原タンパク質およびペプチドとの複合体を形成し、この複合体を使用して、そのタンパク質またはペプチドが由来する同一被験者の癌を治療する。第2に、癌免疫療法における現在の大部分の手法では、癌細胞系のCTL認識エピトープの決定に重点を置いている。この手法では、細胞系および癌に対するCTLが入手可能なことが必要とされる。これらの試薬は、圧倒的な割合のヒト癌に対して入手できない。自己抗原タンパク質および/またはペプチドの使用を対象とする本発明の一実施形態では、癌免疫療法は、細胞系またはCTLの入手可能性に依存せず、癌細胞の抗原エピトープの決定も必要としな

40

50

い。これらの利点により、自己抗原タンパク質および/またはペプチドに結合したhspの複合体は、癌に対する魅力的な免疫原になる。

【0337】

他の実施形態では、治療的または予防的複合体中の抗原ペプチドは、その複合体を投与する被験者と同種異系の被験者由来の同一タイプの癌の癌性組織から調製することができる。

【0338】

5.19 キット、投与養生法、投与および製剤

本発明の方法によって調製した熱ショックタンパク質に結合した抗原タンパク質/ペプチドの複合体を患者に治療有効投与量で投与して、細胞増殖性障害または感染症を治療または改善することができる。治療有効投与量は、このような障害の症状の改善をもたらすのに十分な複合体の量を意味する。複合体の有効投与量は、別の治療モダリティを併用している場合に異なっていてよい。化学療法薬、放射線治療およびサイトカインなどの生物学的/免疫療法剤などの治療モダリティに対する適切な推奨される投与量、製剤および投与経路は、当技術分野で公知であり、Physician's Desk Reference(第56版、2002)などの文献に記載されている。

10

【0339】

5.19.1 有効投与量

免疫原性の、有効量の抗原ペプチド集団の複合体を熱ショックタンパク質と一緒に含む本発明の組成物は、癌または感染症に対する治療を必要とする被験者に、その癌または感染症に対する免疫応答を誘発する方法として投与することができる。こうした複合体の毒性および治療有効性は、細胞培養物または実験動物の標準的な薬剤手順、例えば、LD<sub>50</sub>(集団の50%致死量)およびED<sub>50</sub>(集団の50%治療有効量)を決定することによって決定することができる。毒作用と治療効果との間の用量比は、治療指数であり、これをLD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>比として表すことができる。高い治療指数を示す複合体が好ましい。毒副作用を示す複合体を使用できるが、未感染細胞への潜在的な損傷を最小限にし、それによって副作用を低減するためには、患部組織の部位にこうした複合体をターゲティングする送達系を設計するように注意すべきである。

20

【0340】

一実施形態では、細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトで使用する投与量範囲を調製するのに使用することができる。複合体の投与量は、毒性がほとんどまたはまったくないED<sub>50</sub>を含む循環濃度の範囲内にあることが好ましい。投与量は、使用する剤形および利用する投与経路に応じてこの範囲内で異なっていてよい。本発明の方法で使用する任意の複合体において、治療有効投与量は、最初に細胞培養アッセイから推定することができる。細胞培養で明らかになったIC<sub>50</sub>(すなわち、症状の半最大抑制が得られる試験化合物の濃度)を含む循環血漿濃度範囲を得るために、投与量を動物モデルで調製することができる。こうした情報は、ヒトにおける有用な投与量をより正確に決定するために使用することができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

30

【0341】

別の実施形態では、ヒト患者に対して約0.1 μg~約600 μg、好ましくは約1 μg~約60 μgの範囲のhsp70-および/またはgp96-抗原分子複合体、あるいはその組合せを投与することができる。投与するhsp70-および/またはgp96複合体の量は、0.1、0.2、0.3、0.5、0.7、0.8、1、2、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、550または600 μgであってよい。この量は100 μg未満であることが好ましい。投与するhsp70-および/またはgp96複合体の量は、5 μg、25 μg、または50 μgであることが最も好ましい。本発明によって与えるヒト患者へのhsp-90ペプチド複合体の投与量は、約5~5,000 μgの範囲である。好ましくは、投与するhsp90複合体の量は、5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、400、500、750、1000、1500、2000、2500、3000、4000または5000 μgであり、

40

50

最も好ましい投与量は100 $\mu$ gである。これらの用量は、皮内または皮下に投与することが好ましい。これらの用量は、1回、または毎日、隔日、毎週、隔週、または毎月など繰り返し投与することができる。複合体を約4~6週間の期間、毎週1回投与することが好ましく、投与の形態または部位は、それぞれの投与によって異なることが好ましい。したがって、限定するものではなく例として、第1の注射は左腕の皮下に、第2は右腕、第3は左腹部、第4は右腹部、第5は左大腿部、第6は右大腿部などに投与することができる。同一部位は、1回または複数回注射の合間の後に繰り返してもよい。また、分画注射で投与してもよい。すなわち、例えば、同じ日に、用量の半分を一部位に、そのもう一方の半分を別の部位に投与することができる。あるいは、投与の形態は順次異なり、例えば、毎週の注射は、皮内、筋肉内、皮下、静脈内または腹腔内に順々に投与する。毎週1回の投与は、4週間行うことが好ましい。4~6週間後、さらなる注射は、1または複数カ月の期間にわたって、あるいは複合体の供給量が無くなるまで2週間毎に投与することが好ましい。後の注射は、月毎に投与してもよい。後の注射のペースは、患者の臨床経過および免疫療法への応答性に依りて変更することができる。好ましい例では、それぞれの部位の投与を順次変えながら皮内投与を行っている。

#### 【0342】

したがって、本発明は、被験者の癌または感染症を予防および治療する方法であって、宿主個々の免疫能力を刺激し、前新生物および/または新生細胞あるいは感染細胞に対する特異免疫を誘発する組成物を投与することを含む方法を提供する。

#### 【0343】

特定の実施形態では、当技術分野で公知の方法によって確認されているように、併用療法中にhsp-ペプチド複合体は最適下限量、例えば、治療モダリティなしに投与したときに検出可能な治療利益が示されない量で投与する。こうした方法では、治療モダリティを受けている被験者にこのような最適下限量のhsp-ペプチド複合体を投与すると、治療有効性の全体的な改善をもたらされる。

#### 【0344】

好ましい実施形態では、hsp-ペプチド複合体は、腫瘍退行または癌寛解を生じない量、あるいは治療モダリティなしで前記hsp-ペプチド複合体を投与したときに癌細胞が著しくは減少しないまたは増加する量で投与する。好ましい実施形態では、最適下限量のhsp-ペプチド複合体を、それによって全体的な治療有効性が改善する治療モダリティを受けている被験者に投与する。hsp-ペプチド複合体で治療している被験者のうちに含まれるのは、化学療法または放射線治療を受けているものである。最適下限量は、適切な動物研究によって決定することができる。ヒトにおけるこのような最適下限量は、動物実験から外挿により決定することができる。

#### 【0345】

ある特定の実施形態では、グリベック(商標)などの化学療法薬がすでに与えられている被験者にhsp-ペプチド複合体を投与する(例えば、カプセル形態で毎日400~800mg、400~600mg用量を毎日1回投与する、または各400mgずつの2回投与で800mg用量を毎日投与する)。併せて使用できる化学療法薬の非限定的な例としてグリベック(商標)を以下で使用する。他の多くの化学療法薬に対して、同様の投与養生法を使用することができる。こうした実施形態では、グリベック(商標)に加えてhsp-ペプチド複合体を投与する前に、hsp-ペプチド複合体なしにグリベック(商標)がすでに2日、2日~1週間、1週間~1カ月、1カ月~6カ月または6カ月~1年間与えられている被験者に、適切なhsp-ペプチド複合体を最初に投与する。特定の実施形態では、グリベック(商標)単独の治療に対して耐性を示した被験者にhsp-ペプチド複合体を投与する。

#### 【0346】

他の実施形態では、グリベック(商標)の最初の投与と同時に被験者にhsp-ペプチド複合体を最初に投与する。

#### 【0347】

さらに他の特定の実施形態では、hsp-ペプチド複合体の投与を含む治療をすでに受けて

いる被験者にグリベック(商標)(例えば、カプセル形態で毎日400~800mg)を投与する。こうした実施形態では、hsp-ペプチド複合体の投与に加えてグリベック(商標)を投与する前に、グリベック(商標)なしにhsp-ペプチド複合体がすでに2日、2日~1週間、1週間~1カ月、1カ月~6カ月または6カ月~1年間与えられている被験者に、グリベック(商標)を最初に投与する。

【0348】

特定の実施形態では、グリベック(商標)などの化学療法薬を経口的に投与する。別の特定の実施形態では、hsp-ペプチド複合体を皮内に投与する。

【0349】

上記で企図されたそれぞれの方法では、被験者に、例として、グリベック(商標)などの化学療法薬が毎日50mg~100mg、100mg~200mg、200mg~300mg、300mg~400mg、400mg~500mg、500mg~600mg、600mg~700mg、700mg~800mg、800mg~900mg、または900mg~1000mg与えられる。ある実施形態では、合計1日量を25mg~50mg、50mg~100mg、100mg~200mg、200mg~300mg、300mg~400mg、または400mg~500mgの毎日2回投与として被験者に投与する。

10

【0350】

5.19.2 治療養生法

癌および感染症の治療または予防のための上記の併用療法のいずれかでは、非hsp系モダリティの投与前、投与と同時に、または投与後に本発明の複合体を投与することができる。非hsp系モダリティは、癌または感染症の治療または予防のための上記のモダリティのいずれか1つであってよい。

20

【0351】

一実施形態では、その他のモダリティと比較的同時に本発明の複合体を被験者に投与する。この方法では、2種類の投与を、互いから1分未満~約5分、または約60分以下の時間フレーム内、例えば、同じ医師の来診で行うことが含まれる。

【0352】

別の実施形態では、本発明の複合体およびモダリティをまったく同じ時間に投与する。さらに別の実施形態では、本発明の複合体およびモダリティは、順番に、かつ本発明の複合体およびモダリティと一緒に作用して単独で投与した場合よりも利益が増大し得るような時間間隔内に投与する。別の実施形態では、本発明の複合体およびモダリティは、所望の治療的または予防的結果が得られるように、十分に近い時間で投与する。それぞれを任意の適切な形態で、任意の適当な経路によって同時にまたは別々に投与することができる。一実施形態では、本発明の複合体およびモダリティを異なる投与経路によって投与する。別の実施形態では、それぞれを同じ投与経路によって投与する。本発明の複合体は、同一のまたは異なる部位、例えば、腕および足で投与することができる。同時に投与する場合、本発明の複合体およびモダリティは、混合して、または同じ投与経路によって同じ投与部位で投与できるが、その必要はない。

30

【0353】

好ましい実施形態では、本発明の複合体は、第5.19.1節で記載した養生法によって投与する。様々な実施形態では、本発明の複合体およびモダリティは、1時間未満ずらして、約1時間ずらして、1時間~2時間ずらして、2時間~3時間ずらして、3時間~4時間ずらして、4時間~5時間ずらして、5時間~6時間ずらして、6時間~7時間ずらして、7時間~8時間ずらして、8時間~9時間ずらして、9時間~10時間ずらして、10時間~11時間ずらして、11時間~12時間ずらして、24時間以内ずらしてまたは48時間以内ずらして投与する。他の実施形態では、本発明の複合体およびワクチン組成物は、2~4日ずらして、4~6日ずらして、1週間ずらして、1~2週間ずらして、2~4週間ずらして、1カ月ずらして、1~2カ月ずらして、または2カ月以上ずらして投与する。好ましい実施形態では、本発明の複合体およびモダリティは、両方が依然として活性な時間フレーム中に投与する。当業者は、投与したそれぞれの成分の半減期を決定することによってこのような時間フレームを決定することができるはずである。

40

50

## 【0354】

一実施形態では、本発明の複合体およびモダリティは、同じ患者の来診中に投与する。特定の好ましい実施形態では、モダリティを投与する前に本発明の複合体を投与する。別の特定の実施形態では、モダリティを投与した後に本発明の複合体を投与する。

## 【0355】

ある実施形態では、本発明の複合体およびモダリティを被験者に周期的に投与する。周期的療法は、本発明の複合体をある期間投与し、続いてモダリティをある期間投与し、この逐次投与を繰り返すことを含む。周期的療法は、1種または複数の療法に対する耐性の発生を抑え、これらの療法のうちの一療法の副作用を防止または低減し、かつ/または治療の有効性を改善することができる。こうした実施形態では、本発明は、発明の複合体の交互投与、それに続く4~6日後、好ましくは2~4日後、より好ましくは1~2日後のモダリティの投与を企図しており、このようなサイクルは、要望通りの回数繰り返すことができる。ある実施形態では、本発明の複合体およびモダリティは、3週間未満、2週間に1回、10日に1回または毎週1回のサイクルで交互に投与する。特定の実施形態では、モダリティの投与から1時間~24時間後の時間フレーム内に、被験者に本発明の複合体を投与する。徐放または連続放出タイプのモダリティ送達系を使用する場合、時間フレームを数日以上にさらに延ばすことができる。

## 【0356】

## 5.19.3 製剤および使用

本発明に従って使用する医薬組成物は、1種または複数の生理学的に許容される担体または賦形剤を用いて従来の方法で製剤化することができる。

## 【0357】

したがって、複合体ならびにそれらの生理学的に許容される塩および溶媒和物は、吸入もしくは吹入(口または鼻のいずれかを通して)による投与、経口、頬側、非経口、直腸、または経皮投与のために製剤化することができる。投与の非侵襲法も企図されている。

## 【0358】

経口投与の場合、医薬組成物は、例えば、結合剤(例えば、化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース); 充填剤(例えば、ラクトース、微結晶セルロースまたはリン酸水素カルシウム); 滑沢剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルクまたはシリカ); 崩壊剤(例えば、ジャガイモデンプンまたはデンプングリコール酸ナトリウム); または湿潤剤(例えば、ラウリル硫酸ナトリウム)などの医薬上許容される賦形剤を用いて従来の方法によって調製した錠剤またはカプセル剤の形をとってよい。錠剤は、当技術分野でよく知られている方法によってコーティングすることができる。経口投与のための液体製剤は、例えば、液剤、シロップ剤または懸濁剤の形をとってよく、あるいは使用前に水または他の適当なビヒクルに溶解させる乾燥産物として提供することができる。こうした液体製剤は、懸濁化剤(例えば、ソルビトールシロップ剤、セルロース誘導體または水素化食用脂); 乳化剤(例えば、レシチンまたはアカシアゴム); 非水性ビヒクル(例えば、アーモンド油、油状エステル、エチルアルコールまたは精留した植物油); および防腐剤(例えば、メチルまたはプロピル-p-ヒドロキシベンゾエートまたはソルビン酸)などの医薬上許容される添加剤を用いて従来の方法によって調製することができる。これらの製剤は、必要に応じて緩衝塩、香料、着色料および甘味剤も含んでいてよい。

## 【0359】

経口投与のための製剤は、活性な複合体の制御放出が得られるように適当に製剤化することができる。

## 【0360】

頬側投与の場合、組成物は、従来の方法で製剤化した錠剤またはロゼンジの形をとることができる。

## 【0361】

吸入による投与の場合、本発明によって使用する複合体は、適当な噴射剤、例えば、ジ

クロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適当なガスの使用による加圧パックまたはネビュライザーからのエアロゾールスプレー供給の形で好都合に送達することができる。加圧エアロゾールの場合には、投与単位は、一定量を送達するためにバルブを供給することによって決定することができる。吸入器または注入器で使用する、例えば、ゼラチンのカプセル剤およびカートリッジは、複合体とラクトースまたはデンプンなどの適当な粉末基剤との粉末混合物を含むように製剤化することができる。

#### 【0362】

注射、例えば、大量注射または連続注入による非経口投与のために複合体を製剤化することができる。注射用の製剤は、防腐剤を加えた単位剤形、例えば、アンプル剤または多容量型容器で提供することができる。組成物は、油性または水性ビヒクル中で懸濁剤、液剤または乳濁剤などの形をとることができ、懸濁化剤、安定化剤および/または分散剤などの製剤化剤を含んでよい。あるいは、有効成分は、使用前に適当なビヒクル、例えば、無菌の発熱性物質を含まない水に溶解させるための粉末形態であってよい。

10

#### 【0363】

複合体は、例えば、カカオ脂または他のグリセリドなどの従来の坐剤基剤を含む坐剤または浣腸剤などの直腸組成物に製剤化することもできる。

#### 【0364】

既に記載した製剤の他に、複合体は、デポ製剤として製剤化することもできる。こうした長時間作用性の製剤は、移植(例えば、皮下または筋肉内)または筋肉内注射によって投与することができる。したがって、例えば、複合体は、適当なポリマーもしくは疎水性物質(例えば、許容される油中の乳濁液として)またはイオン交換樹脂を用いて、あるいはやや溶けにくい誘導體、例えば、やや溶けにくい塩として製剤化することができる。

20

#### 【0365】

組成物は、必要に応じて、有効成分を含む1種または複数の単位剤形を含み得るパックまたはディスペンサー装置で提供することができる。パックは、例えば、プリスターパックなどの金属またはプラスチック箔を含むことができる。パックまたはディスペンサー装置には、投与するための説明書を添付することができる。

#### 【0366】

さらに含まれるのは、本発明の複合体と併せたまたは混合したアジュバントの使用である。企図しているアジュバントとしては、第5.18節に記載のものなどの鉱物塩アジュバントまたは鉱物塩ゲルアジュバント、粒子状アジュバント、微粒子状アジュバント、粘膜アジュバント、および免疫刺激性アジュバントが挙げられるが、それだけには限定されない。アジュバントは、本発明の複合体との混合物として、または第5.19.2節に記載のように複合体と併せて使用して被験者に投与することができる。

30

#### 【0367】

さらに企図されているのは、本発明の複合体、好ましくはgp96複合体と併せたまたは混合したアデノシン二リン酸(ADP)の使用である。

#### 【0368】

##### 5.19.4 キット

本発明はまた、本発明の方法および/または治療養生法を実施するためのキットも提供する。

40

#### 【0369】

一実施形態では、こうしたキットは、第2の容器に含まれているhspと合わせるための抗原タンパク質およびペプチドを含むタンパク質調製物を1個または複数個の容器に含む。別の実施形態では、こうしたキットは、第2の容器に含まれているhspと合わせるための抗原ペプチドを含む消化ペプチドを1個または複数個の容器に含む。あるいは、タンパク質および/またはペプチドは、自己投与のために特定の患者から単離したhspと複合体を形成させるために、1個または複数個の容器に供給しておいてよい。場合によっては、タンパク質およびペプチドと複合体を形成させるための精製HSPをさらに第2の容器に供給する。

50

## 【0370】

別の実施形態では、こうしたキットは、治療または予防有効量の、好ましくは精製したhspと複合体を形成したタンパク質/ペプチドを医薬上許容される形態で1個または複数個の容器に含んでいてよい。このキットはさらに任意選択で、好ましくは精製した感作APCを第2の容器に含む。

## 【0371】

別の実施形態では、このキットは、1つの容器にhsp-ペプチド複合体を、第2の容器に前記複合体をオリゴマー化するためのオリゴマー化剤を、かつオリゴマー化している複合体を調製するための説明書を含んでいてよい。別の実施形態では、このキットは、抗原ペプチドを含む容器、hspを含む別の容器、このキットのhspをオリゴマー化するためのオリゴマー化剤を含む第3の容器、およびオリゴマー化しているhsp-ペプチド複合体を調製するための説明書を含んでいてよい。

## 【0372】

本発明のキットの容器内のhsp-ペプチド複合体は、例えば、無菌の生理食塩水、ブドウ糖溶液、または緩衝溶液、あるいは他の医薬上許容される無菌の液体と併せた医薬上許容される溶液の形であってよい。あるいは、hsp-ペプチド複合体は、凍結乾燥または乾燥させてもよく；この場合、このキットはさらに任意選択で、hspまたはhsp含有複合体を溶解させて注射目的の液剤を形成するために、好ましくは無菌の医薬上許容される溶液(例えば、生理食塩水、ブドウ糖溶液など)を容器内に含む。

## 【0373】

別の実施形態では、本発明のキットはさらに、好ましくは無菌形態で包装されたhsp-ペプチド複合体を注射するための針もしくは注射器、および/または包装されたアルコールパッドを含む。説明書は任意選択で、臨床医または患者によるhsp-ペプチド複合体の投与のために含まれている。

## 【0374】

キットはまた、本発明の併用療法を実施するために提供している。一実施形態では、キットは、1種または複数の精製したhsp-ペプチド複合体を含有する第1の容器および癌の治療のための非HSP系治療モダリティを含有する第2の容器を含む。癌がCMLであり、hsp-ペプチド複合体がhsp70-ペプチド複合体を含み、また治療モダリティがグリベック(商標)であることが好ましい。特定の実施形態では、第2の容器は、メシル酸イマチニブを含有している。別の特定の実施形態では、メシル酸イマチニブは精製されている。

## 【0375】

特定の実施形態では、キットは、単独で投与した場合に疾患または障害を治療するのに効果のない量で1種または複数の精製したhsp-ペプチド複合体を含有する第1の容器；ならびに第1の容器内のhsp-ペプチド複合体の投与前、投与と同時に、または投与後に投与した場合に各成分の単独投与の有効性に対して全治療有効性を改善するのに有効な量で非hsp系治療モダリティを含有する第2の容器を含む。別の特定の実施形態では、キットは、単独で投与した場合に疾患または障害を治療するのに効果のない量で1種または複数の精製したhsp-ペプチド複合体を含有する第1の容器；ならびに第1の容器内のhsp-ペプチド複合体の投与前、投与と同時に、または投与後に投与した場合に、単独投与したhsp-ペプチド複合体または単独投与した治療モダリティの投与の有効性に対して全治療有効性を改善するのに有効な量で1種または複数の非hsp系治療モダリティを含有する第2の容器を含む。さらに別の特定の実施形態では、キットは、単独で投与した場合に疾患または障害を治療するのに効果のない量で1種または複数の精製したhsp-ペプチド複合体を含有する第1の容器；ならびに第1の容器内のhsp-ペプチド複合体の投与前、投与と同時に、または投与後に投与した場合に、単独投与したhsp-ペプチド複合体または単独投与した治療モダリティの投与の有効性に対して全治療有効性を改善するのに有効な量で非hsp系治療モダリティをそれぞれ含有する第2の容器および第3の容器を含む。好ましい特定の実施形態では、本発明は、本発明の非共有結合hsp-ペプチド複合体の集団を含む1種または複数の精製したhsp-ペプチド複合体を第1の容器に；抗癌剤を含む組成物を第2の容器に；サイトカインまたは

アジュバントを含む組成物を第3の容器に含むキットを提供する。

【0376】

このキットは、例えば、プリスターパックなどの金属またはプラスチック箔を含むことができる。このキットには、投与のための1種または複数の再利用可能なもしくは使い捨ての装置(例えば、注射器、針、分注ペン)および/または投与のための説明書が添付されていてよい。

【0377】

5.20 免疫療法中の効果のモニタリング

新生物疾患の発生および進行に対するhsp-抗原分子複合体を用いた免疫療法の効果は、それだけには限らないが、a)細胞性免疫の評価としての遅延過敏症；b)細胞傷害性Tリンパ球の*in vitro*活性；c)腫瘍特異的抗原、例えば、癌胎児性(CEA)抗原のレベル；d)コンピュータ断層撮影(CT)スキャンなどの技術を用いた腫瘍形態の変化；e)リスクが高い個体における特定の癌に対するリスクの推定上の生物マーカーのレベルの変化、およびf)ソノグラムを用いた腫瘍形態の変化を測定することを含む、当業者に公知の任意の方法によってモニターすることができる。

10

【0378】

5.20.1 遅延過敏症皮膚試験

遅延過敏症皮膚試験は、全免疫能力および抗原に対する細胞性免疫において大変価値がある。一連の一般的な皮膚抗原に反応する能力がないことは、アネルギーと呼ばれている(Sato、T.ら、1995、Clin. Immunol. Pathol.、74: 35~43)。

20

【0379】

皮膚試験の適切な技術では、抗原を4℃で無菌貯蔵し、光から保護し、使用直前に再構成することが必要である。25-または27-ゲージ針によって、抗原の、皮下ではなく皮内投与が確実になる。抗原の皮内投与から24および48時間後に、最も大きな寸法の紅斑と硬結の両方を定規で測定する。任意の所与の抗原または抗原のグループに対する機能低下は、より高濃度の抗原で試験することによって、またはあいまいな場合は、中間試験を用いた繰返し試験によって確認する。

【0380】

5.20.2 細胞傷害性T細胞の*in vitro*活性化

フィコール-ハイパック比重遠心技術によって単離した $8 \times 10^6$ 個の末梢血由来Tリンパ球を、10%ウシ胎児血清を含有するRPMI培地3ml中で $4 \times 10^4$ 個のマイトマイシンC処理腫瘍細胞を用いて再刺激する。いくつかの実験では、33%の二次混合したリンパ球培養上清またはIL-2をT細胞増殖因子の供給源として培地に含めている。

30

【0381】

免疫感作後の細胞傷害性Tリンパ球の1次応答を測定するために、T細胞を刺激腫瘍細胞なしで培養する。他の実験では、T細胞を抗原が異なる細胞で再刺激する。6日後に、培養物を細胞毒性について4時間の<sup>51</sup>Cr放出アッセイで試験する。標的の自発的な<sup>51</sup>Cr放出は、20%未満のレベルに達するはずである。抗MHCクラスI遮断活性については、試験にW6/32ハイブリドーマの10倍濃縮した上清を最終濃度12.5%で加える(Heike M.、ら、J. Immunotherapy、15: 165~174)。

40

【0382】

5.20.3 腫瘍特異的抗原のレベル

すべての腫瘍に対して固有の腫瘍抗原を検出するのは可能ではないかもしれないが、多くの腫瘍は、それらを正常な細胞から区別する抗原を示す。モノクローナル抗体試薬は、抗原の単離および生化学的な特徴付けを可能にし、非形質転換細胞から形質転換細胞を区別するのに、また形質転換細胞の細胞系統を定義するのに診断上貴重である。最もよく特徴付けられたヒト腫瘍関連抗原は、腫瘍胎児抗原である。これらの抗原は胚形成時に発現されるが、正常な成人組織では存在しない、または検出するのが非常に困難である。原型抗原は、胎児腸およびヒト大腸癌細胞で見られるが、正常な成人結腸細胞で見られない糖タンパク質である癌胎児性抗原(CEA)である。CEAは結腸癌細胞から流れて血清中で発見さ

50

れたので、血清中のこの抗原の存在を使用して大腸癌について患者をスクリーニングすることができる。しかし、膵臓癌および乳癌などの他の腫瘍がある患者でも、CEA血清レベルは高い。したがって、治療を受けている癌患者のCEAレベルの低下と上昇のモニタリングが、腫瘍の進行および治療に対する応答を予測するのに有用であることが証明されている。

【0383】

いくつかの他の腫瘍胎児抗原は、ヒト腫瘍を診断およびモニタリングするのに有用であり、例えば、胎児肝細胞および卵黄嚢細胞によって通常分泌される $\alpha$ -フetoプロテインである $\alpha$ -胎児性タンパク質は、肝細胞および生殖細胞腫瘍がある患者の血清中に見られ、疾患状態のマーカーとして使用することができる。

10

【0384】

5.20.4 コンピュータ断層撮影(CT)スキャン

CTは、癌の正確な病期に対する技術の選択肢を残している。CTは、転移の検出に関する他のどんな撮像技術よりも感度が高く特異的であることが証明されている。

【0385】

5.20.5 推定上の生物マーカーの測定

ペプチド複合体に非共有結合したhspの作用をモニターするために、特定の癌のリスクに対する推定上の生物マーカーのレベルを測定する。例えば、前立腺癌に対するリスクが高い個体では、Brawer、M.K.、ら、1992、J. Urol.、147: 841~845、およびCatalona、W.J.、ら、1993、JAMA、270: 948~958によって記載されている手順によって血清前立腺特異抗原(PSA)を測定し;あるいは大腸癌に対するリスクがある個体では、上記のようにCEAを測定し;また乳癌に対するリスクが高い個体では、Schneider、J.、ら、1982、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、79: 3047~3051によって記載されている手順によってエストラジオールの16- $\beta$ -ヒドロキシル化を測定する。

20

【0386】

5.20.6 ソノグラム

ソノグラムは、癌の正確な病期に対する技術の別の選択肢を残している。

【実施例】

【0387】

6. 実施例: 二量体の存在とin vitro生物活性との相関関係

30

以下の実施例は、本発明の基準を提供する:

gp96-ペプチド複合体をマウスCT-26腫瘍から単離した。各調製物の個々のアリコートを含む4に維持し(未処理)、あるいは温和な熱処理にかけて複合体を変性させた。図1は、SECクロマトグラムを示している。これは、指示された条件下でタンパク質がより高分子量の凝集体に急速に転換することを示している。

【0388】

次いで、同じ試料を、抗原再提示およびIFN- $\gamma$ 発現によって測定するT細胞活性化について分析した。それぞれの3つの反復試験の結果を以下の表2に示す。これは、熱によって誘発されて二量体から凝集体に転移すると、抗原再提示およびT細胞活性化が同時に損なわれることを示している。

40

【表 2】

表2

条件	SECによる 二量体%	特異的なNECA活性 ( $\mu\text{g}$ NECAに結合したgp96/ $\mu\text{g}$ gp96)	腫瘍特異的T細胞活性化 (IFN- $\gamma$ 放出) (pg/ml)
実験1			
4°C	75.8	3.27	102600
60°Cで60分	0	0.08	9350
60°Cで120分	0	0.10	8100
実験2			
4°C	84.44	1.68	19600
49.5°Cで30分	0	0.12	3150
60°Cで30分	0	0.04	50
実験3			
4°C	87	1.96	8000
49°Cで15分	74	1.97	0
49°Cで25分	54	1.80	0
60°Cで30分	0	0.07	0

10

20

## 【0389】

二量体含有量はまた、NECAと結合するgp96の能力と関連がある。CT-26腫瘍から単離したgp96-ペプチド複合体を用いて、各調製物のアリコートNECAリガンド結合についても分析した。3つの反復試験のそれぞれの結果を表2に示す。二量体から凝集体への熱誘導転移に伴い、NECA結合活性が同時に失われた。

30

## 【0390】

さらなる実験により、二量体含有量は、抗原提示細胞によるケモカイン/一酸化窒素放出を刺激するgp96の能力と関連があることが示されている。Meth-Aマウス線維肉腫腫瘍から精製したgp96を熱摂動とpH摂動の両方にかけて。この物質を、マウス抗原提示細胞を誘発してMCP-1および一酸化窒素を分泌させるその能力についてSECおよびNECA結合によって分析した。この結果を図2にまとめて示す。熱処理により、変性または他の立体構造変化によって不活性であると考えられる高次凝集体へのgp96二量体の転換がもたらされた。二量体が失われるのに伴い、NECAリガンド結合ならびにMCP-1とNO産生の両方が減少した。gp96をpH7または9ではなくpH3に曝露した後、同様の傾向が観察された。これらの結果は、分子の構造的および生化学的特性と生物学的応答との間の認められた明確な関係と整合性がある。

40

## 【0391】

## 7. 実施例：二量体の存在とATPアーゼ活性との相関関係

以下の実験の結果から、精製したgp96複合体のATPアーゼ活性(タンパク質1mg当りのATP加水分解速度として測定する)は、二量体の存在と直接相関関係があることが確認されている。

## 【0392】

どのgp96アイソフォームがATPアーゼ活性をもつかを決定するために、ヒトgp96-ペプチド複合体を用いて2セットの実験を行った。実験の第1のセット(図3~6)では、ヒト卵巣腫瘍由来のgp96-ペプチド複合体を利用した。図3は、この調製物の分離用および分析用SEC

50

プロファイルを示す。示したように画分を収集し、さらに分析にかけた。図4は、分析用SECクロマトグラムを示す(点線は二量体型の溶出位置を示している)。図5は、個々の画分の銀染色SDS-PAGEゲルを示す。大部分の画分は、変性条件下で主に96kDaのポリペプチドを含むが、それらは非変性条件下ではSECで異なる分子量種に明らかに分離した。画分2~5は、主により高分子量の凝集体を含むが、画分8~10は二量体を表す。画分11および12は、SDS-PAGE分析に基づき、単量体種を含むことが考えられる。画分13以上は、分解産物およびより低分子量種を含む。

#### 【0393】

最後に、ルシフェリン-ルシフェラーゼ発光アッセイを用いて、各画分のATPアーゼ活性をATPの損失に基づいて決定した。値は、タンパク質1mgあたりのATP加水分解速度として報告している。図6に示すように、ATPアーゼ活性は二量体の存在と直接相関関係がある。ATPアーゼ活性は、二量体含有画分中に含まれており、高分子量凝集体および単量体画分中で活性が最低であった。これらの結果から、ATPの酵素加水分解には二量体gp96が必要であることが示されている。

10

#### 【0394】

腎臓腫瘍由来のgp96-ペプチド複合体の試料を用いてこれらの実験を繰り返した。結果は上記のものと完全に整合しており、変性または他の立体構造変化によって不活性であると考えられる精製時(架橋結合剤の不在下で)に生成した単量体gp96または高分子量凝集体ではなく、二量体gp96-ペプチド複合体がATPアーゼ活性をもつという結論をより強力にする。

20

#### 【0395】

##### 8. 実施例：ATPアーゼ活性と抗原再提示との相関関係

ATPアーゼ活性の関連性を効力の生物学的尺度として示そうとする試みの中で、ATPアーゼ活性を抗原再提示と相関させるためにヒトgp96を用いて一セットの実験を開始した。これらの実験は、二量体gp96とマウスモデルにおける抗原再提示とを関連付けたデータならびに二量体gp96とヒト由来複合体におけるATPアーゼ活性とを関連付けたデータに基づくものであった。

#### 【0396】

このために、マウスCD8 T細胞系が使用可能なマウス抗原、AH1ペプチドがin vitroでヒト腫瘍由来hspと置き換えたハイブリッド抗原再提示バイオアッセイ系を開発した。次いで、gp96-ペプチド複合体を、その抗原再提示および抗原特異的T細胞刺激を促進する能力について試験した。以下に示したのは、2種類のヒト腫瘍タイプを用いた3つの実験の結果であり、ATPアーゼ活性、抗原再提示およびSECによる二量体%についての分析結果の間の相関関係を示す。これらの結果は、本発明者らの既存の知識ベースに加わり、ATPアーゼ活性は意味のある形で、それらの生物学的活性に重要なhspおよびhsp-ペプチド複合体の他の重要な生物学的および構造的性質に関連するというさらなる確証を与える。

30

#### 【0397】

gp96調製物をヒト子宮内膜または腎細胞癌腫瘍試料から作製した。簡単に言えば、ヒト腫瘍組織をホモジナイズし、遠心分離によって清澄化し、50%硫酸アンモニウム沈殿にかけた。Con AおよびDEAEクロマトグラフィーを用いて得られた上清をさらに精製した。精製したタンパク質を使用するまで-80 で貯蔵した。

40

#### 【0398】

抗原提示細胞系、RAW264.7(ATCC#TIB-71)は、BALB/c株(H-2<sup>d</sup>)が起源であるアベルソンマウス白血病ウイルス形質転換マクロファージ細胞系である。マウスCT26腫瘍由来AH1エピトープに特異的なCTL系は、P. Srivastava(コネチカット大学病院)から得た。AH1ペプチドの他に照射済BALB/c脾細胞を用いてそれらを週1回の頻度で再刺激した。Sigma Genosys 1442 lake front circle, The Woodlands, Texas 77380-3600から9アミノ酸AH1ペプチドエピトープ(SPSYVYHQF)およびこのエピトープを含有する19量体ペプチド(RVTYHSPSYVYHQFERRAK)を得た。

#### 【0399】

50

AH1 19量体ペプチドを精製したgp96調製物に50:1のペプチド対タンパク質の比で加え、この混合物を37℃で30分間インキュベートした。MWC0セトリコンスピンフィルターユニット(Millipore)を用いて10倍体積量のPBSでスピン透析を4サイクル行って、結合していないペプチドを除去した。ブラッドフォードアッセイによって全タンパク質を決定した。

#### 【0400】

In vitro抗原再提示アッセイについて説明する。簡単に言えば、 $10^4$ 個のAH1ペプチド特異的CTL(刺激後8日目)を $10^4$ 個のRAW264.7細胞と一緒に96ウェル平底プレート中で共培養した。 $10\mu\text{g/mL}$ のin vitro担持gp96試料を手際よく分析し、あるいは一定のタンパク質濃度を維持するために指示された量の未担持gp96を用いて希釈した。タンパク質試料および対照をウェルに加え、37℃で18時間インキュベートした。遠心分離に続いて、その上清を、ELISA(R&D Systems)によるIFN- $\gamma$ レベルの分析のために収集した。報告した値は、6回の反復試験の平均を示す。AH1 9量体ペプチドは正の対照であり、未担持gp96、AH1 19量体ペプチドおよび培地単独は負の対照であった。別の負の対照は、CTLまたはAPCだけを含有するプレートに同じセットの試料を加えることによって得た。

10

#### 【0401】

ATPアーゼ活性は、37℃で4時間インキュベートした後にルシフェリン-ルシフェラーゼ発光アッセイを用いてATPの損失として測定した。値は、タンパク質1mg当りのATP加水分解速度として報告し、熱ショックタンパク質のhsp90ファミリーに対する特異性を確実にするためにゲルダナマイシン阻害可能である活性だけを表す。

#### 【0402】

このアッセイは以下のように行う。gp96試料( $2\mu\text{L}$ 、 $500\mu\text{g/mL}$  PBS溶液)を、10倍モル濃度過剰なATPの、 $12.5\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ および20%(v/v)DMSOまたは400Mゲルダナマイシン含有DMSOを含有するPBS溶液を含む溶液 $2\mu\text{L}$ と混合した。この混合物を37℃で4時間インキュベートした。次いで試料をPBSで $100\mu\text{L}$ に希釈し、ROCHE CLSII生物発光ATPアッセイキットを用いて各試料 $50\mu\text{L}$ 中に含まれるATPを定量した。生物発光は、Molecular Devices Lmaxルミノメーターを用いて測定した。阻害されていない測定値とゲルダナマイシンで阻害された測定値の間のATP濃度の差は、gp96に特異的なATP加水分解の量を反映する。この差から速度を計算し、1時間当りのタンパク質1mg当りのnmolの加水分解されたATPとして表した。

20

#### 【0403】

HPLCサイズ排除クロマトグラフィーは、現在最適化されており、いくつかの異なるフォーマットで実施されている。カラムは、 $10\text{mM}$ リン酸緩衝液、pH7.1中で $300\text{mM}$  NaClを用いて平衡化したTSK 3000SWXL(Toso Haus)またはスーパーロース6(Amersham Pharmacia)であった。すべての実験は、Waters AllianceまたはHP 1100 HPLCシステムを用いて流速 $0.5\text{mL}/\text{分}$ で室温で実施した。ヒト腫瘍由来gp96に関する以下の結果(下記表3に報告した)は、すべてスーパーロース6カラムを用いて分析した。二量体%値は、全ピーク面積に対する二量体ピークの面積パーセントを表す。

30

【表 3】

表3

実験	日付	腫瘍タイプ (調製日)	抗原再提示		ATPアーゼ (Nmol/mg/時)		二量体%	
			未処理	加熱	未処理	加熱	未処理	加熱
1	10-12-01	ヒト子宮内膜 (10-10-01)	陽性	陰性	8.5±0.3	0	86	0
2	10-19-01	ヒト子宮内膜 (10-10-01)	陽性	陰性	9.4±0.5	0	83	0
3	10-19-01	ヒト腎臓 (10-17-01)	陽性	陰性	10.3±0.1	0	84	0

ヒト腫瘍由来のgp96調製物についての抗原再提示の結果、ATPアーゼおよびサイズ排除クロマトグラフィーによる二量体%のまとめである。gp96試料をAH1 19量体ペプチドと一緒に導入し、洗浄して結合していないペプチドを除去し、次いで2つのアリコートに分け、そのうちの1つを60℃で10分間加熱した。未処理および熱処理試料をそれぞれのアッセイで評価した。「陽性」は、IFN- $\gamma$ 放出が検出されたことを意味し、「陰性」は、IFN- $\gamma$ 放出が検出されなかったことを意味する。

10

20

## 【0404】

分析前に、熱処理した試料をサーモサイクラーまたは循環水浴中で60℃で10分間インキュベートした。

## 【0405】

ハイブリッド再提示アッセイは、AH1 19量体ペプチドを担持したヒトgp96の、抗原をマウスAPCに送達して再提示を促進し抗原特異的T細胞の刺激をもたらす能力を測定する。ヒト子宮内膜由来gp96を用いた実験の結果を図7に示す。上のパネルは、APCとCTLの両方に加えた試料のINF- $\gamma$ レベルを示す。2および3番目のパネルは、CTLおよびAPC単独についての対照である。各データのセットには、培地単独、未担持gp96およびAH1 19量体が負の対照として含まれ、表面MHC I分子に直接置換できるAH1 19量体ペプチドは正の対照として含まれている。gp96/AH1 19量体複合体を10  $\mu$ g/mLで加え、あるいは未担持gp96を用いて1:3、1:10または1:30で希釈した。この結果は、用量依存的IFN- $\gamma$ 応答を示し、また未担持gp96による刺激がないことを示す。対照により、活性がAH1 19量体担持gp96に特異的であることが示されている。タンパク質-ペプチド複合体試料を60℃で10分間、すなわちタンパク質の完全な凝集を引き起こすことが知られている条件で加熱した場合、T細胞を刺激する能力が破壊されていた。同じ物質を用いてこの実験を繰り返し、同一の結果を得た。

30

## 【0406】

さらに、ヒト腎細胞癌試料片から調製したgp96タンパク質を用いて同じ実験プロトコルを繰り返した。この場合も同一の結果が得られ、熱処理によって無効になったT細胞の特異的で用量依存的な刺激があった。

40

## 【0407】

再提示アッセイで得たgp96-ペプチド複合体試料を、ATPアーゼ活性およびSECによる二量体%についてさらに分析した。この結果を表3にまとめて示す。抗原再提示アッセイで陽性だった試料は、ATPアーゼ活性をもち、SECにより主に二量体を含有していた。熱処理の後、すべてのATPアーゼ活性は失われており、すべての二量体タンパク質は高分子量凝集体に転換していた。これらの結果は、ATPアーゼ活性によって測定した酵素活性、SECによって測定した構造的性質とin vitro生物学的活性との間の明確な相関関係を示している。

## 【0408】

9. 実施例：ATPアーゼ活性は安定性を表す

50

本明細書で示したデータから、ATPアーゼ活性が安定性指示アッセイであることが示されている。二量体型のgp96を用いた加速安定性試験の結果、ATPアーゼ活性の一貫した付随的な損失がもたらされた。これらの実験には、強制的にgp96を凝集させるための温和な熱処理ならびに分解生成物を生成するためのタンパク質分解が含まれる。図8は、組換えgp96の試料を指示された温度で10分間インキュベートし、次いでATPアーゼ活性およびSECによる二量体%について分析した実験の結果を示す。温度に誘発された変性の結果として、ATPアーゼ活性の損失と二量体gp96の間に直接的な相関関係があった。類似の結果がヒトgp96-ペプチド複合体を用いて得られ、その場合温和な熱処理によりATPアーゼ活性が破壊され、また二量体タンパク質が高分子量凝集体に転換されていた。

【0409】

本明細書で引用したすべての参考文献は、それぞれ個々の刊行物または特許または特許出願がすべての目的でその全体が参照により組み込まれるように具体的にかつ個々に記載されているのと同程度にその全体がすべての目的で参照により本明細書に組み込まれている。

【0410】

当業者に明らかなように、本発明の多くの変更形態および変形形態は、その精神および範囲から逸脱することなく行うことができる。本明細書に記載の具体的な実施形態は、例としてのみ提供しており、本発明は、添付の特許請求の範囲の条項ならびにかかる特許請求の範囲によって権利が与えられる等価物の全範囲によってのみ限定されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0411】

【図1】hsp-ペプチド複合体を加熱すると、タンパク質がより高分子量の凝集体を急速に形成することを示すSEC図である。

【図2】グラフAは、gp96を50 および60 で30分間加熱した後に二量体レベルが低下したことを示しており、60 で加熱した場合に低下速度がより速い。いずれの試料も30分後に二量体を含有していなかった。グラフBは、50 および60 で30分間加熱した場合にgp96のNECA結合能力が低下したことを示しており、60 で加熱した場合に低下速度がより速い。gp96のいずれの試料も30分後にNECAと結合できなかった。グラフCおよびDは、gp96複合体を50 および60 で30分間加熱した場合に、MCP-1およびNOのマウスAPCによる分泌を刺激するgp96複合体の能力が急速に低下することを示している。グラフEおよびFは、それぞれgp96の二量体のレベルおよびNECA結合能力に対する酸性pHの影響を示している。二量体レベルもNECA結合能力もpH3.0で著しく低下している。グラフGおよびHは、それぞれマウスAPCによるMCP-1およびNOの分泌を刺激するgp96複合体の能力に対する酸性pHの影響を示している。MCP-1およびNO分泌の両方ともpH3.0で著しく低下している。

【図3】ヒト卵巣腫瘍細胞から調製したgp96複合体のSEC図であり、画分8~10が二量体型のhsp-ペプチド複合体に相当する。

【図4】ヒト卵巣腫瘍細胞から調製したgp96複合体の個々の画分のSEC図であり、画分8~10が二量体型のhsp-ペプチド複合体に相当する。

【図5】図3および4で表した個々の画分の銀染色SDS-PAGEゲルを示した図である。画分2~5にはgp96の大部分より高分子量の凝集体が含まれ、画分8~10は二量体を表す。

【図6】図3~5で表した画分のATPアーゼ活性を示した図である。二量体を表している画分8~10は、ATPアーゼ活性が最も高く、凝集体(画分2~5)および他の種(画分11~15)を表している画分は、ATPアーゼ活性が著しく低かった。

【図7】ハイブリッド抗原再提示アッセイは、マウス抗原AH1 19量体と複合体を形成したヒト由来gp96が、gp96またはAH1 19量体単独と比べて、IFN- $\gamma$ 分泌によって表される抗原再提示活性の用量依存的増加を引き起こすことを示している。上のパネルは、APCとCTLの両方に加えた試料のINF- $\gamma$ レベルを示す。2および3番目のパネルは、CTLおよびAPC単独についての対照である。各データのセットには、培地単独、未担持gp96およびAH1 19量体が陰性対照として含まれ、表面MHC I分子上で直接交換可能なAH1 19量体ペプチドは陽性対照として含まれている。gp96/AH1 19量体複合体を10  $\mu$ g/mLで加え、あるいは未担持gp96を

10

20

30

40

50

用いて1:3、1:10または1:30で希釈した。この結果は、用量依存的IFN- 応答を示し、また未担持gp96による刺激がないことを示す。対照は、活性がAH1 19量体担持gp96に特異的であることが示している。タンパク質-ペプチド複合体試料を60 で10分間、すなわちタンパク質の完全な凝集を引き起こすことが知られている条件で加熱した場合、T細胞を刺激する能力が破壊されていた。

【図8】組換えgp96の試料を、図に示した温度で10分間インキュベートし、次いで%二量体およびATPアーゼ活性について分析した実験の結果を示した図である。この図は、温度に誘発された凝集とATPアーゼ活性の損失との間の直接的な相関関係を示している。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

10

<110> Zabrecky, James  
Liu, Chuanliang  
Monks, Stephen  
Wasserman, Andrew  
Srivastava, Pramod

<120> METHODS AND PRODUCTS BASED ON OLIGOMERIZATION OF STRESS  
PROTEINS

<130> 8449-272-228

<150> US 60/361,257

<151> 2002-02-28

<160> 2

20

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Murine leukemia virus

<400> 1

Ser Pro Ser Tyr Val Tyr His Gln Phe  
1 5

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Murine leukemia virus

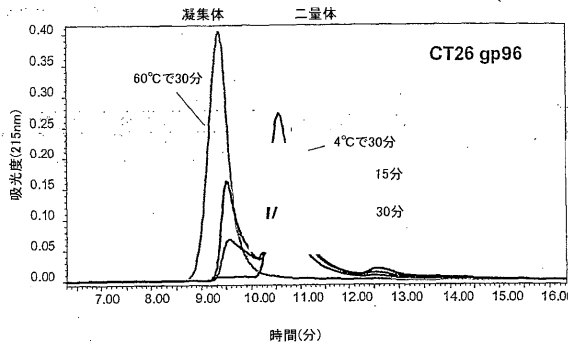
30

<400> 2

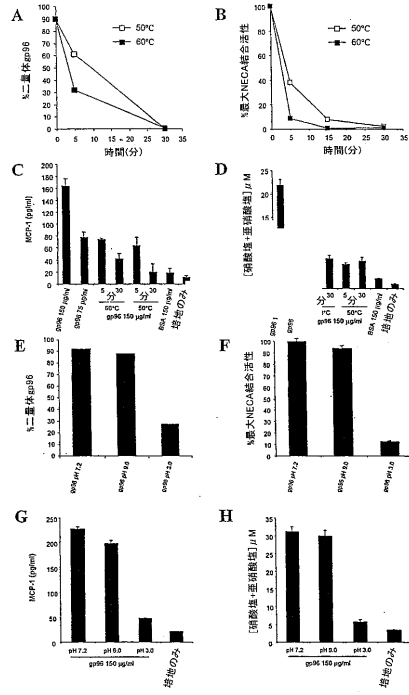
Arg Val Thr Tyr His Ser Pro Ser Tyr Val Tyr His Gln Phe Glu Arg  
1 5 10 15

Arg Ala Lys

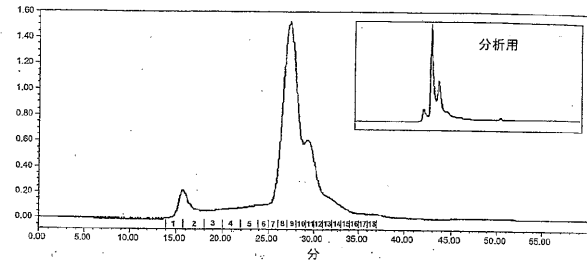
【 図 1 】



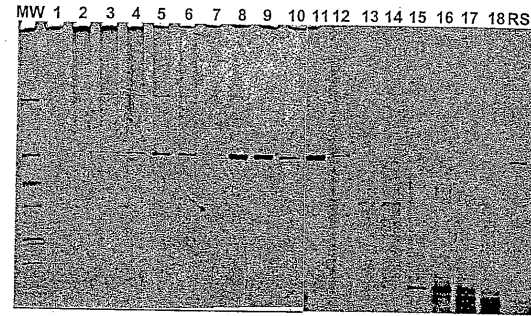
【 図 2 】



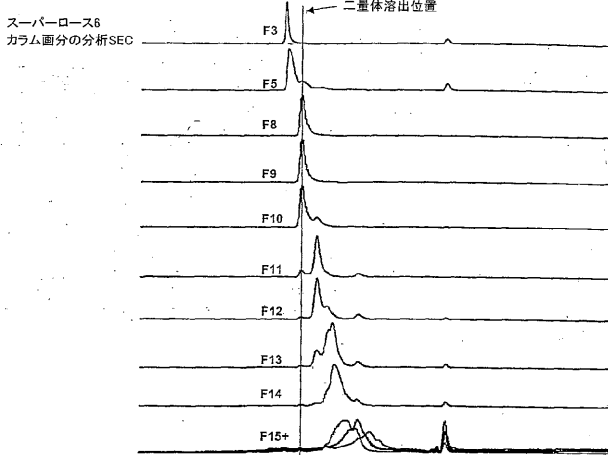
【 図 3 】



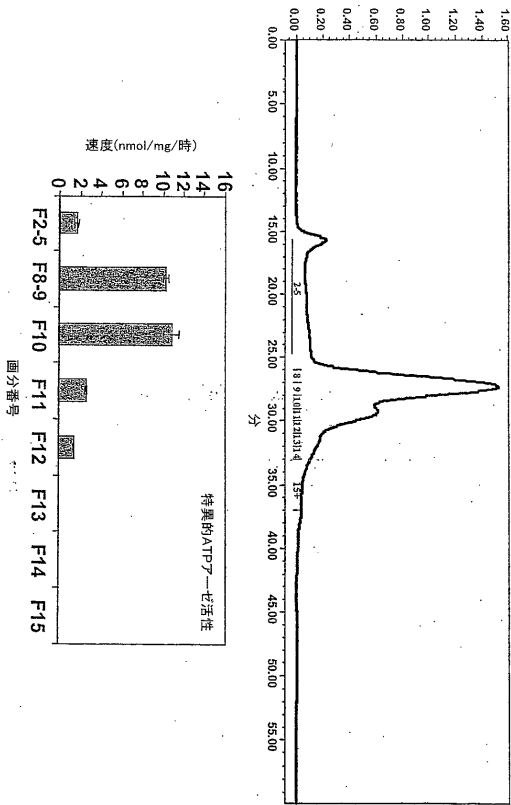
【 図 5 】



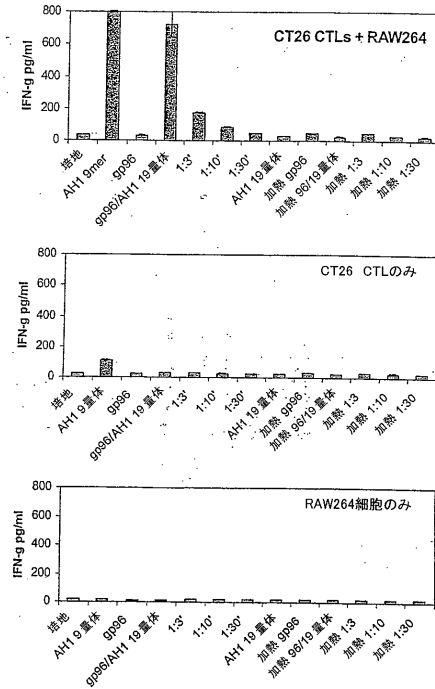
【 図 4 】



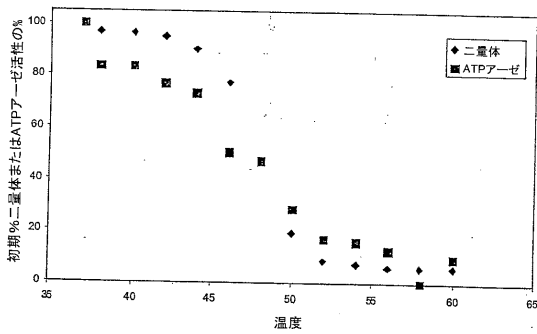
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 31/10	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 31/14	A 6 1 P 31/16	
A 6 1 P 31/16	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 P 31/20	A 6 1 P 31/22	
A 6 1 P 31/22	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 35/02	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	A 6 1 K 37/02	

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

(74) 代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(74) 代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(72) 発明者 ザブレッキー, ジェームズ, アール.

アメリカ合衆国 0 2 4 5 3 マサチューセッツ州, ウォルサム, アーリントン ロード 1 8

(72) 発明者 リュー, チュアンリアン

アメリカ合衆国 0 1 8 3 2 マサチューセッツ州, ハヴァーヒル, ヴィクター ストリート 2 3 ナンバー 2 3

(72) 発明者 モンクス, スティーブン エイ.

アメリカ合衆国 0 2 1 4 4 マサチューセッツ州, ソマーヴィル, ウィロウ アベニュー 5 8

(72) 発明者 ワッサーマン, アンドリュー

アメリカ合衆国 0 1 8 4 5 マサチューセッツ州, ノース アンドーヴァー, ジョンソン ストリート 7 0 7

(72) 発明者 スリヴァスタヴァ, プラモッド, ケイ.

アメリカ合衆国 0 6 0 0 1 コネティカット州, エイヴォン, フィーザント ラン 7 0

F ターム(参考) 2G045 CB01 DA36 FB01 GC15

4B063 QA01 QA18 QQ33 QS16 QS17 QS36 QX02 QX07

4C084 AA01 AA02 BA02 CA17 ZB261 ZB271 ZB311 ZB321 ZB331 ZB351

4C085 AA03 BB11 BB24 CC03 DD51 EE01

4H045 AA10 BA40 CA40 EA50

专利名称(译)	基于应激蛋白寡聚化的方法和产品		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005530487A</a>	公开(公告)日	2005-10-13
申请号	JP2003571301	申请日	2003-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	安特杰弗里·尼克斯公司 康涅狄格大学健康中心		
申请(专利权)人(译)	安特杰弗里·尼克斯公司 康涅狄格健康中心大学		
[标]发明人	ザブレッキージェームズアール リュージュアンリアン モンクススティーブンエイ ワッサーマンアンドリュウ スリヴァスタヴァプラモッドケイ		
发明人	ザブレッキー,ジェームズ,アール. リュウ,チュアンリアン モンクス,スティーブン エイ. ワッサーマン,アンドリュウ スリヴァスタヴァ,プラモッド,ケイ.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/19 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/00 A61K39/385 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/18 A61P31/20 A61P31/22 A61P35/00 A61P35/02 C07K14/47 C12Q1/02 C12Q1/34 C12Q1/42 C12Q1/44 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/542 G01N33/68		
CPC分类号	A61K31/19 A61K38/1709 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/18 A61P31/20 A61P31/22 A61P35/00 A61P35/02 C07K14/47 C12Q1/34 C12Q1/42 G01N33/68 G01N33/6893 G01N2500/00 G01N2500/02 G01N2500/04		
FI分类号	C12Q1/44 A61K39/00.H A61K39/385 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/18 A61P31/20 A61P31/22 A61P35/00 A61P35/02 C07K14/47 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/GC15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ33 4B063/QS16 4B063/QS17 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX07 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/BA02 4C084/CA17 4C084/ZB261 4C084/ZB271 4C084/ZB311 4C084/ZB321 4C084/ZB331 4C084/ZB351 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/BB24 4C085/CC03 4C085/DD51 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/BA40 4H045/CA40 4H045/EA50		
优先权	60/361257 2002-02-28 US		
其他公开文献	JP2005530487A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

一方面, 本发明提供了基于ATP酶活性或热休克蛋白或治愈休克蛋白-肽复合物的多聚体结构确定热休克蛋白或热休克蛋白-肽复合物的生物学活性的方法, 以及筛选方法 调节热休克蛋白或热休克蛋白-肽复合物生物学活性的药物。 在另一方面, 本发明提供了用于增强热休克蛋白或包含愈合休克蛋白和抗原性分子的复合物的免疫原性的复合物, 组合物和方法。

