

(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2019-528437  
(P2019-528437A)

(43) 公表日 令和1年10月10日(2019.10.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	D 4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	Y 4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 P 35/02 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-504135 (P2019-504135)  
 (86) (22) 出願日 平成29年7月28日 (2017.7.28)  
 (85) 翻訳文提出日 平成31年2月21日 (2019.2.21)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/069154  
 (87) 国際公開番号 WO2018/019990  
 (87) 国際公開日 平成30年2月1日 (2018.2.1)  
 (31) 優先権主張番号 16305979.3  
 (32) 優先日 平成28年7月28日 (2016.7.28)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 591100596  
 アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ  
 サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ  
 ディカル  
 フランス国、エフー75013 パリ、リ  
 ユ・ドゥ・トルビアク 101  
 (71) 出願人 510139564  
 ユニヴェルシテ ポール サバティエ ト  
 ウールーズ トロワ  
 フランス共和国 エフー31062 トウ  
 ールーズ セデックス 9, ルート ド  
 ウ ナルボンヌ 118

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍関連マクロファージをターゲティングすることによるガン疾患の処置方法

(57) 【要約】

本発明は、腫瘍関連マクロファージをターゲティングすることによるガンの処置方法に関する。TAMを検出及びターゲティングするために、本発明者らは、腫瘍関連マクロファージの表面上に露出した特異的マーカーを調査した。本発明者らは、正常なマクロファージには存在しないsideroflexin3が腫瘍関連マクロファージによって発現されることを示した。これは、サンプル中の腫瘍関連マクロファージ(TAM)を同定するための方法であって、i) 該サンプルに含まれる細胞集団上のCD163、CD68及びSF3XN3マーカーの細胞表面発現を検出する工程、並びにii) CD163、CD68及びSF3XN3マーカーを発現する細胞がTAMであると結論付ける工程を含む方法に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

サンプル中の腫瘍関連マクロファージ (TAM) を同定するための方法であって、i) 該サンプルに含まれる細胞集団上の CD163、CD68 及び SFXN3 マーカーの細胞表面発現を検出する工程、並びに ii) CD163、CD68 及び SFXN3 マーカーを発現する細胞が TAM であると結論付ける工程を含む、方法。

## 【請求項 2】

サンプルが、血液サンプル、懸濁液中の PBMCS サンプルからなる群より選択される液体サンプルである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

液体サンプルに含まれる細胞集団上の CD163、CD68 及び SFXN3 マーカーの細胞表面発現の検出を、該マーカーに特異的な抗体のセットを用いて実施する、請求項 1 ~ 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

液体サンプルに含まれる細胞集団上の CD163、CD68 及び SFXN3 マーカーの細胞表面発現の検出をフローサイトメトリーによって実施する、請求項 1 ~ 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

サンプルが、脳、頭頸部、副腎、結腸、小腸、胃、心臓、肝臓、皮膚、腎臓、肺、膵臓、精巣、卵巣、前立腺、子宮、甲状腺、脾臓、膀胱、乳房、骨髄及びリンパ節の組織切片からなる群より選択される組織サンプルである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

CD163、CD68 及び SFXN3 に特異的な抗体のセットを用いて組織サンプルを染色することからなる工程を含む、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

組織サンプル中の CD163、CD68 及び SFXN3 マーカーの細胞発現の検出を免疫化学又は免疫蛍光によって実施する、請求項 5 ~ 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

ガンに罹患している患者の予防又は治療において使用するための、SFXN3 アンタゴニスト。

## 【請求項 9】

前記ガンが、全ての急性白血病及び慢性白血病からなる群より選択される白血病である、請求項 8 に記載の使用のための SFXN3 アンタゴニスト。

## 【請求項 10】

前記白血病が慢性リンパ球性白血病である、請求項 9 に記載の使用のための SFXN3 アンタゴニスト。

## 【請求項 11】

前記ガンが、全ての非ホジキンリンパ腫及びホジキンリンパ腫からなる群より選択される白血病である、請求項 8 に記載の使用のための SFXN3 アンタゴニスト。

## 【請求項 12】

前記ガンが、脳、頭頸部、副腎、結腸、小腸、胃、心臓、肝臓、皮膚、腎臓、肺、膵臓、精巣、卵巣、前立腺、子宮、甲状腺、膀胱、乳房、子宮内膜の腫瘍、多発性骨髄腫、肉腫からなる群より選択される固形腫瘍である、請求項 8 に記載の使用のための SFXN3 アンタゴニスト。

## 【請求項 13】

前記アンタゴニストが SFXN3 中和抗体又はアプタマーである、請求項 8 ~ 10 に記載の使用のための SFXN3 アンタゴニスト。

## 【請求項 14】

前記アンタゴニストが SFXN3 遺伝子発現阻害剤であり、前記 SFXN3 遺伝子発現阻害剤が、低分子干渉 RNA (siRNA)、ヌクレアーゼ、リボザイム又はアンチセン

10

20

30

40

50

スオリゴヌクレオチドである、請求項 8 ~ 10 のいずれか一項に記載の使用のための S F X N 3 アンタゴニスト。

【請求項 15】

請求項 8 ~ 14 のいずれか一項に記載の S F X N 3 アンタゴニストと、薬学的に許容し得る担体とを含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野：

本発明は、C D 1 6 3、C D 6 8 及び S F X N 3 マーカーの細胞表面発現を検出することによって、サンプル中の腫瘍関連マクロファージ ( T A M ) を同定するための方法に関する。本発明はまた、ガンの処置において使用するための s i d o r e f l e x i n 3 のアンタゴニストに関する。

10

【背景技術】

【0002】

発明の背景：

ガン発生及び腫瘍成長の促進における腫瘍微小環境の重要性は、過去十年間でますます認められている (H. Korkaya JCI, 121, (10), 3804-3809, 2011; E. Lonardo, J. Frias-Aldeguer, Cell Cycle, 11(7), 1282-1290, 2012; J. W. Pollard, Nature Reviews Immunology, 9 (4), 259-270, 2009)。

20

【0003】

腫瘍微小環境は、腫瘍成長を阻害することに代えて、細胞増殖を刺激し、ガン幹細胞 ( C S C ) を活性化し、転移を促進することによって腫瘍形成を促す慢性炎症を特徴とする [V. Plaks, Cell Stem Cell, 16(3), 225-238, 2015; S. M. Cabarcas, L. A. International Journal of Cancer, 129(10), 2315-2327, 2011)。腫瘍炎症反応を主導するのは、腫瘍関連マクロファージ ( T A M ) である [R. Noy Immunity, 41(1), 49-61, 2014]。多数の T A M と、急速な疾患進行及び不良な患者転帰との間の相関関係が数十年間で観察されている [L. Bingle, Journal of Pathology, 196 (3), 254-265, 2002; B.-Z. Qian Cell, 141(1), 39-51, 2010] ; しかしながら、ごく最近、この矛盾した表現型が説明された。この相関関係は、マクロファージ由来因子が C S C コンパートメントを活性化して C S C の幹様特徴を促進し、腫瘍進行、転移及びさらに C S C 化学耐性を悪化させる T A M 媒介性パラクリンシグナリングに起因すると現在理解されている。

30

【0004】

腫瘍への単球浸潤は、ケモカイン (例えば、C C L 2、C C L 5 及び C X C L 1 2 )、C S F - 1 及び補体カスケードの構成要素によって媒介される [E. Bonavita, Advances in Cancer Research, 128, 141-171, 2015; E. Bonavita, Cell, 160(4), 700-714, 2015]。それらが腫瘍内にあると、腫瘍環境は、腫瘍馴化マクロファージへのそれらの分化を急速に促進する。当初、T A M は、M 2 腫瘍促進マーカーを発現する M 1 表現型からかけ離れていると考えられていた [Biswas SK. Nature Immunology, 11(10), 889-896, 2010]。

【0005】

M 2 様 T A M 及びサブセットをより特異的に同定するために、ヘモグロビン・スカベンジャーレセプター C D 1 6 3 [Heusinkveld M. The Journal of Immunology, 187(3), 1157-1165, 2011; Martinez FO., Annual Review of Immunology, 27, 451-483, 2009]、マクロファージ・スカベンジャーレセプター 1 C D 2 0 4 [Biswas SK. Nature Immunology, 11(10), 889-896, 2010, Laoui, D. International Journal of Developmental Biology, 55(7-9), 861-867, 2011]、マンノースレセプター C D 2 0 6 [Mantovani, A. Trends in Immunology, 23(11), 549-555, 2002]、マクロファージレセプター C D 6 8 (Tang X, Cancer Letter 2013, Takeuchi H, Oncol Lett 2016 ; Hu H, tumour biol 2016 ; Kim KJ, PlosOne 2015) 並びにより最近では T 細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン含有タンパク質 3 ( T i m - 3 ) [Yan W., Gut, 64(10), 1593-1604, 2015] が使用され大きな成

40

50

功を収めている。しかしながら、結局のところ、TAMを適切に分類及び同定する方法に関する論争が依然としてある。TAMをより良好に分類するために、TAMの機能、例えば血管新生又は免疫抑制の促進に基づく分類が現在使用されているが、マクロファージは、多くの機能を同時に実行することができる動的な可塑性細胞であることに注目することが重要である。

【0006】

したがって、このアプローチは自己限定的であり得、TAMの多機能性能を強調し得る。どのマーカーを使用してどのようにマクロファージに言及するかに関しては、科学界の意見はまだ一致していないので、二元的なM1/M2分類が依然として一般に使用されている[Murray, P.J. Immunity, 41(1), 14-20, 2014]。

10

【0007】

したがって、TAMの新たな生物学的マーカーが必要とされている。特に、信頼性のある検出を可能にし、腫瘍中に存在するTAMのターゲティングも可能にするバイオマーカーが非常に望ましい。

【0008】

本発明の目的は、i)疾患発症の早期において腫瘍関連マクロファージを同定するための新たな信頼性のある方法、及びii)TAMを枯渇させることによってガンを処置するための新たな治療ターゲットを提供することによって、この必要性に対処することである。

【発明の概要】

20

【0009】

本発明は、サンプル中の腫瘍関連マクロファージ(TAM)を同定するための方法であって、i)該サンプルに含まれる細胞集団上のCD163、CD68及びSF3XN3マーカーの細胞表面発現を検出する工程、並びにii)CD163、CD68及びSF3XN3マーカーを発現する細胞がTAMであると結論付ける工程を含む方法に関する。

【0010】

本発明の第2の目的は、ガンに罹患している患者の予防又は治療において使用するためのSF3XN3アンタゴニストに関する。

【0011】

発明の詳細な説明：

30

本発明は、腫瘍関連マクロファージ(TAMとも称される。白血病におけるナース様細胞(NLC))におけるsideroflexin3の存在の同定に基づくものであり、これは、先行技術では全く言及されていなかった。

【0012】

より具体的には、本発明者らは、正常なマクロファージには存在しないsideroflexin3が腫瘍関連マクロファージによって発現されるという証拠を提示する。これは、腫瘍関連マクロファージの表面上に露出しており、その結果として、TAMを検出及びターゲティングするためのユニークな機会(例えば、ガンの治療)を提供する最初の特異的マーカーである。本発明者らは、sideroflexin3に対する抗体を使用して、LCC患者から得られたPBMCサンプルにおいてTAMを枯渇させ、白血病B細胞数を大きく減少させたという証拠をさらに提示する。

40

【0013】

本明細書では、TAMを検出及びターゲティングするために、本発明者らは、腫瘍関連マクロファージの表面上に露出した特異的マーカーを調査した。LCC患者から得られたTAMでマウスを免疫することによって、本発明者らは、200個の画分の中から、TAMを特異的に認識することができる4個の抗体画分を回収する。驚くべきことに、本発明者らは、1)画分中の抗体が、腫瘍関連マクロファージの表面において特異的に発現されたsideroflexin3タンパク質を認識することができたこと、2)抗体がTAMに特異的であり、患者若しくは健常ドナー由来の他のPBMC(例えば、リンパ球B及びT)又は腫瘍細胞を認識しなかったこと、3)LCC患者から得られたPBMCサンプ

50

ル中の *sideroflexin 3* 抗体の使用が TAM を枯渇させ、腫瘍細胞数を減少させたこと、4) *sideroflexin 3* 抗体が、乳房腫瘍サンプル中に存在する TAM を検出することもできたことを見出した。したがって、これらの結果は、TAM 上に発現された *sideroflexin 3* のターゲティングが、ガンにおいて有益な抗腫瘍免疫を回復させることを可能にすることを示している。

#### 【0014】

腫瘍関連マクロファージ (TAM) を同定するための方法

本発明の目的は、サンプル中の腫瘍関連マクロファージ (TAM) を同定するための方法であって、i) 該サンプルに含まれる細胞集団上の CD163、CD68 及び SF3XN3 マーカーの細胞表面発現を検出する工程、並びに ii) CD163、CD68 及び SF3XN3 を発現する細胞が腫瘍関連マクロファージであると結論付ける工程を含む方法に関する。

10

#### 【0015】

「腫瘍関連マクロファージ」(「TAM」とも称される) という用語は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、マクロファージ系統に属する細胞のタイプを説明することを意図する。それらは、非常に近接して、又は腫瘍塊内に見られる [Shih, J-Y., *Journal of Cancer Molecules* 2(3): 101-106 2006]。TAM は、多くの腫瘍型の間質内に見られる主要な白血球浸潤物を形成する循環単球又は常在組織マクロファージに由来する。腫瘍促進 (例えば、腫瘍血管新生を介した成長及び転移の促進) プロセスにおけるそれらの関与に関する証拠が増加している [Birbrair, A. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 307 (1): C25-C38. 2014; Thoreau, M; *Oncotarget* 6(29) 27832- 27832 2015]。TAM は、腫瘍微小環境中の広範な成長因子、サイトカイン及びケモカイン (微小環境は、様々なタイプの腫瘍間で異なるので、これらは、TAM を教育し、それらの特異的表現型及びそれ故に機能的役割を決定すると考えられる) と相互作用する。したがって、TAM は、それらが関連する腫瘍のタイプに応じて、それらの役割が異なることが示されている [Lewis, CE.; *Cancer Research* 66 (2): 605-612. (2006)]。多くの腫瘍型では、TAM 浸潤レベルは、有意な予後値であることが示されている。TAM は、乳ガン、卵巣ガン、神経膠腫及びリンパ腫のタイプにおける予後不良; 結腸ガン及び胃ガンにおける予後良好、並びに肺ガン及び前立腺ガンにおける予後不良及び予後良好の両方に関連している [Allavena, P.. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 66: 1. (2008)]。白血病では、TAM は、ナース様細胞 (NLC) とも称される。

20

30

#### 【0016】

TAM 細胞の調節 / 抑制機能の実証は、当技術分野で公知の任意の適切な方法によって決定され得る (Qian BZ and Pollard JW, *Cell*, 2010, vol 141, 1:39-41 を参照のこと)。特に、このような試験の例は、実施例のセクションに示されている。具体的には、実施例において具現化されている試験は、TAM 機能の評価のための標準的な *in vitro* 試験とされている。

#### 【0017】

いくつかの実施態様では、本発明の腫瘍関連マクロファージは、哺乳動物腫瘍関連マクロファージ、最も具体的にはヒト腫瘍関連マクロファージである。

40

#### 【0018】

「サンプル」という用語は、液体サンプル及び「組織サンプル」を指す。

#### 【0019】

「液体サンプル」という用語は、懸濁液中に腫瘍関連マクロファージの集団を含有しやすい任意のサンプルを指す。非限定的な例としては、生物学的液体、例えば血液 (例えば、末梢血又は臍帯血)、尿、リンパ、脳脊髄液若しくは腺管液、又は生理学的溶液 (例えば、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 又は組織培養培地) で希釈されたこのような液体、又は (例えば、遠心分離によって) 生物学的液体から得られた細胞であって、生理学的溶液に懸濁された細胞が挙げられる。「細胞を含有する液体サンプル」の他の例としては、骨髓穿刺液、針生検吸引液、又は例えばリンパ節若しくは脾臓由来の生検標

50

本から得られた（生理学的溶液中の）細胞懸濁液が挙げられる。

【0020】

いくつかの実施態様では、液体サンプルは、血液サンプルである。「血液サンプル」という用語は、被験体（例えば、腫瘍関連マクロファージの集団が同定され得るかの決定が関心対象である個体）から得られた全血サンプルを意味する。

【0021】

いくつかの実施態様では、液体サンプルは、P B M Cサンプルである。本明細書で使用される場合、「P B M C」又は「末梢血単核細胞」又は「未分画P B M C」という用語は、全P B M C、すなわち、円形の核を有する白血球の集団であって、所定のサブ集団について濃縮されていない集団を指す。典型的には、P B M Cサンプルは、非接着P B M C（これは、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、NK T細胞及びDC前駆体を含む）を含有するように選択工程に供されたものであり得る。したがって、本発明のP B M Cサンプルは、リンパ球（B細胞、T細胞、NK細胞、NK T細胞）を含有する。典型的には、これらの細胞は、フィコール（血液の層を分離する親水性多糖）を使用して全血から抽出され得、P B M Cは、血漿の層の下でセルリングを形成する。加えて、P B M Cは、赤血球を優先的に溶解する低張溶解バッファーを使用して、全血から抽出され得る。このような手順は、当業者に公知である。

10

【0022】

いくつかの実施態様では、流体サンプルは、懸濁液中の腫瘍関連マクロファージのサンプルである。典型的には、腫瘍関連マクロファージのサンプルは、P B M Cサンプルに対して実施されるF A C S選別方法によって調製される。例えば、腫瘍関連マクロファージは、T A M関連細胞表面マーカーであるC D 1 6 3及びC D 6 8に対する抗体を使用することによって単離される。腫瘍関連マクロファージのサンプルからこの方法を実施する場合、S F X N 3の細胞表面発現の検出のみを実施し得る。したがって、一態様では、本発明は、腫瘍関連マクロファージを同定するための方法であって、i) P B M CサンプルからC D 1 6 3 + / C D 6 8細胞（「腫瘍関連マクロファージ」）の集団を選択する工程、及びii) S F X N 3の細胞表面発現を検出することによって、腫瘍関連マクロファージの集団を同定する工程を含む方法に関する。

20

【0023】

本明細書で使用される場合、「M 1 3 0」；「M M 1 3 0」；「S C A R I 1」としても公知の「C D 1 6 3」(Cluster of Differentiation 163)という用語は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、ヒトではC D 1 6 3遺伝子[Gene ID: 9332]によってコードされるタンパク質を指す。C D 1 6 3は、単球及びマクロファージにおいて専ら発現される。それは、マクロファージによるヘモグロビン/ハプトグロビン複合体のクリアランス及びエンドサイトーシスに關与する急性期調節レセプターとして機能し、それにより、遊離ヘモグロビン媒介性酸化的損傷から組織を保護し得る。このタンパク質はまた、細菌に対する先天性免疫センサー及び局所炎症の誘導因子として機能し得る。分子サイズは、130kDaである。このレセプターは、スカベンジャーレセプターシステムインリッチファミリータイプBに属し、1048個のアミノ酸残基の細胞外ドメイン、1回膜貫通セグメント及び細胞質尾部からなり、複数のスプライス変異体がある。

30

40

【0024】

本明細書で使用される場合、「G P 1 1 0」；「L A M P 4」及び「S C A R D 1」としても公知の「C D 6 8」(Cluster of Differentiation 68)という用語は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、ヒトではC D 6 8遺伝子[Gene ID: 968]によってコードされるタンパク質を指す。この遺伝子は、ヒト単球及び組織マクロファージによって高度に発現される110kDの膜貫通糖タンパク質をコードする。それは、リソソーム/エンドソーム関連膜糖タンパク質(LAMP)ファミリーのメンバーである。このタンパク質は、リソソーム及びエンドソームに主に局在し、より小さな画分は細胞表面に循環する。それは、高度にグリコシル化された細胞外ドメインを有するタイプI内在性膜タンパク質であり、組織特異的及び器官特異的なレクチン又はセレクチンに結合する

50

。このタンパク質はまた、スカベンジャーレセプターファミリーのメンバーである。スカベンジャーレセプターは、典型的には、細胞残屑を除去し、食作用を促進し、マクロファージのリクルート及び活性化を媒介するように機能する。

【0025】

本明細書で使用される場合、「SFX3;」又は「BA108L7.2」としても公知の「sideroflexin3」又は「SFXN3」という用語は、Sideroflexinタンパク質の一メンバーであり、ヒトではSFXN3遺伝子[Gene ID: 81855]によってコードされるタンパク質を指す。Sideroflexinは、一般に、ミトコンドリアにおける鉄輸送に關与するタンパク質と言われている。加えて、ヒトSideroflexinはまた、脾臓細胞の分化において重要な役割を果たすと報告されている(Yoshikumi Y, J Cell Biochem.,95, 1157-1168 (2005))。野生型sideroflexin3ヒトアミノ酸配列の一例は、配列番号: 1 (NCBI参照配列: NP\_112233) に提供されている。配列番号: 1の野生型sideroflexin3アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の一例は、配列番号: 2 (NCBI参照配列: NM\_030971) に提供されている。

10

【0026】

細胞表面(例えば、TAM表面)における特定の表面マーカー、例えばSideroflexin3の発現を検出するための標準的な方法は、当技術分野で周知である。典型的には、表面マーカー(例えば、Sideroflexin3)の表面発現を検出することからなる工程は、表面マーカーに対する少なくとも1つのディファレンシャルな結合パートナーを使用することからなり得、前記細胞は、前記表面マーカーに対する前記結合パートナーによって結合される。

20

【0027】

本明細書で使用される場合、「表面マーカーに対する結合パートナー」という用語は、高い親和性で表面マーカーに結合することができる任意の分子(天然又は非天然)を指す。結合パートナーは、ポリクローナルまたはモノクローナルであり得る抗体、好ましくはモノクローナル抗体であり得る。別の実施態様では、結合パートナーは、アプタマーのセットであり得る。

【0028】

本発明のポリクローナル抗体又はそのフラグメントは、公知の方法にしたがって、適切な抗原又はエピトープを、例えばとりわけブタ、ウシ、ウマ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ及びマウスから選択される宿主動物に投与することによって生成され得る。抗体産生を増強するために、当技術分野で公知の様々なアジュバントが使用され得る。本発明の実施において有用な抗体はポリクローナルであり得るが、モノクローナル抗体が好ましい。

30

【0029】

本発明のモノクローナル抗体又はそのフラグメントは、抗体分子の生産を提供する任意の技術を使用して、細胞株の連続培養によって調製及び単離され得る。生産及び単離のための技術としては、限定されないが、元々のハイブリドーマ技術; ヒトB細胞ハイブリドーマ技術; 及びEBV-ハイブリドーマ技術が挙げられる。

【0030】

例えば、本発明のSideroflexin3の結合パートナーは、Abnovaから入手可能な抗ヒトSideroflexin3抗体(精製マウス抗ヒトSideroflexin3クローン4A3)であるか、又はAbcamから入手可能な抗体(クローンab77431又はクローンab181163)からなる群より選択される。

40

【0031】

本発明の結合パートナー、例えば抗体又はアプタマーは、検出可能な分子若しくは物質、例えば優先的には蛍光分子、又は放射性分子、又は当技術分野で公知の任意の他の標識を使用して標識され得る。一般に、シグナルを(直接的に又は間接的に)提供する標識は、当技術分野で公知である。

【0032】

50

本明細書で使用される場合、抗体又はアプタマーに関する「標識された」という用語は、検出可能な物質、例えばフルオロフォア〔例えば、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 又はフィコエリトリン (PE) 又はインドシアニン (Cy5)〕又は放射性物質を抗体又はアプタマーにカップリング (すなわち、物理的に連結) することによる抗体又はアプタマーの直接的な標識、並びに検出可能な物質との反応性によるプローブ又は抗体の間接的な標識を包含することを意図する。本発明の抗体又はアプタマーは、当技術分野で公知の任意の方法によって、放射性分子で標識され得る。より具体的には、抗体は、フルオロフォアに既にコンジュゲート (例えば、FITCにコンジュゲート及び/又はPEにコンジュゲート) されている。

#### 【0033】

上記アッセイは、固相支持体への結合パートナー (すなわち、抗体又はアプタマー) の結合を伴い得る。固体表面は、表面マーカーに対する結合パートナーでコーティングされたマイクロタイタープレートであり得る。あるいは、固体表面は、ビーズ、例えば活性化ビーズ、磁気反応性ビーズであり得る。ビーズは、限定されないが、ガラス、プラスチック、ポリスチレン及びアクリルを含む様々な材料から構成され得る。加えて、ビーズは、好ましくは蛍光標識される。好ましい実施態様では、蛍光ビーズは、Becton Dickinson Biosciences, (San Jose, California) から入手可能なTruCount (商標) チューブに含まれるものである。本発明によれば、フローサイトメトリーの方法は、表面マーカー (すなわち、CD163、CD68及びSideroflexin3) の表面発現を検出するための好ましい方法である。前記方法は、当技術分野で周知である。したがって、例えば、蛍光活性化細胞選別 (FACS) が使用され得る。区別可能な蛍光色素とカップリングされたCD163、CD68及びSideroflexin3に対する抗体 (又は、抗CD163抗体、抗CD68抗体及びSideroflexin3抗体でコーティングされたイムノビーズ) と組み合わせ、表面マーカーに対する蛍光標識抗体 (又は、抗体でコーティングされたイムノビーズ) を使用した細胞選別プロトコールは、適切な光学的配置で有する細胞選別機を使用した直接的な選別を可能にし得る。

#### 【0034】

本発明のさらなる目的は、組織サンプル中の腫瘍関連マクロファージ (TAM) を同定するための方法であって、i) CD163、CD68及びSideroflexin3マーカーの細胞発現を検出する工程、並びにii) CD163、CD68及びSideroflexin3を発現する細胞が腫瘍関連マクロファージであると結論付ける工程を含む方法に関する。

#### 【0035】

本明細書で使用される場合、「組織サンプル」という用語は、生物学的細胞のコレクションから典型的に構成されるサンプルを指し、例えば限定されないが、生検サンプル、剖検サンプル、外科的サンプル、細胞塗抹標本、細胞濃縮物、及び支持体上に固定された培養細胞が挙げられる。典型的には、組織サンプルは、一般に、顕微鏡スライド上で調製された材料のサンプルの顕微鏡検査が望まれる任意の材料を含む。組織サンプルは、診断、研究、教育又は他の目的のために収集され得る。前記サンプルは、任意の生物学的組織のものであり得る。組織サンプルの例としては、限定されないが、脳、副腎、結腸、小腸、胃、心臓、肝臓、皮膚、腎臓、肺、膵臓、精巣、卵巣、前立腺、子宮、甲状腺及び脾臓の組織切片が挙げられる。本明細書で使用される場合、「組織サンプル」は、新鮮な組織切片、又は凍結された組織切片、又は固定及び包埋された組織切片であり得る。例えば、組織学的検査のための組織サンプルは支持媒体中に包埋され、標準的なブロックに成形される。パラフィンワックスは、支持媒体として公知の一般に使用されているものであるが、限定されないが、Sakura Finetek製のTissueTek O.C.T、エステル、微結晶セルロース、蜜蝋、樹脂又はポリマー、例えばメタクリル酸塩を含む他の支持媒体もまた、支持媒体として使用され得ると認識されよう。Araldite 502キット、Eponate 12 (商標) キット及びメタクリル酸グリコール (GMA) キットを含む適切な樹脂及びポリマーは、Ted Pella, Inc., Redding, Califから入手可能である。

10

20

30

40

50

## 【0036】

いくつかの実施態様では、組織サンプルは、腫瘍サンプルである。「腫瘍サンプル」は、吸引若しくは穿刺、切除によって、又は生検若しくは切除細胞材料（保存材料、例えば新鮮凍結材料、ホルマリン固定材料、パラフィン包埋材料などを含む）をもたらす任意の他の外科的方法によって採取された腫瘍材料、例えば新生物病変由来の組織材料を含有するサンプルである。このような生物学的サンプルは、患者から得られた細胞を含み得る。細胞は、例えば乳頭吸引、乳管洗浄細胞診、微細針生検によって収集された、又は誘発性若しくは自発性乳頭分泌液に由来する細胞「塗抹標本」に見られ得る。

## 【0037】

いくつかの実施態様では、組織サンプルは、脳、頭頸部、副腎、結腸、小腸、胃、心臓、肝臓、皮膚、腎臓、肺、膵臓、精巣、卵巣、前立腺、子宮、甲状腺、脾臓、膀胱、乳房、骨髄及びリンパ節の組織切片からなる群より選択される組織サンプルである。

10

## 【0038】

組織サンプル中のCD163、CD68及びSF3N3マーカーの細胞発現の検出は、免疫化学又は免疫蛍光によって実施される。

## 【0039】

典型的には、組織サンプル中のマーカーの検出は、IHC法を使用して実施される。実際、免疫組織化学（IHC）法は、組織サンプル中の腫瘍関連マクロファージの存在を検出するために適切である。具体的には、IHCは、*in situ*で組織標本中のターゲットを検出する方法を提供する。IHCでは、サンプルの全体的な細胞完全性が維持されるので、目的のターゲット（すなわち、腫瘍関連マクロファージ）の存在及び位置の両方の検出が可能になる。典型的には、ホルマリンでサンプルを固定し、パラフィンに包埋し、染色及びその後の光学顕微鏡による検査のために切片に切断する。現在のIHC法は、直接的な標識又は二次抗体ベースの若しくはハプテンベースの標識のいずれかを使用する。公知のIHCシステムの例としては、例えば、EnVision（商標）(DakoCytomation)、PowerVision（登録商標）(Immunovision, Springdale, AZ)、NBA（商標）キット(Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA)、HistoFine（登録商標）(Nichirei Corp, Tokyo, Japan)が挙げられる。特定の実施態様では、CD163、CD68及びSidexin3マーカーに対する抗体と共にインキュベーションした後、組織切片（例えば、腫瘍関連マクロファージを含むサンプル）をスライド又は他の支持体上にマウントし得る。次いで、適切な固相支持体上にマウントされたサンプルの顕微鏡検査を実施し得る。顕微鏡写真の作成では、目的のタンパク質の存在を選択的に染色することによって強調するために、サンプルを含む切片をスライドガラス又は他の平面支持体上にマウントし得る。したがって、IHCサンプルは、例えば、(a)組織サンプルの調製、(b)前記細胞の固定及び包埋、並びに(c)前記細胞サンプル中の目的のタンパク質の検出を含み得る。いくつかの実施態様では、IHC染色手順は、組織の切断及びトリミング、固定、脱水、パラフィン浸潤、薄片への切断、スライドガラス上へのマウント、ベーキング、脱パラフィン処理、再水和、抗原回復、ブロックング工程、一次抗体の適用、洗浄、（場合により適切な検出可能な標識にカップリングされた）二次抗体の適用、洗浄、対比染色並びに顕微鏡検査などの工程を含み得る。

20

30

40

## 【0040】

いくつかの実施態様では、本発明の方法は、サンプル中に存在する腫瘍関連マクロファージのレベルを決定することからなる工程をさらに含む。

## 【0041】

治療方法及び使用：

本発明は、ガンを予防又は治療するための方法及び組成物（例えば、医薬組成物）を提供する。本発明はまた、ガンを阻害又は予防するための方法及び組成物を提供する。

## 【0042】

本発明との関連では、「治療又は予防」という用語は、このような用語が適用される障害若しくは症状又はこのような障害若しくは症状の1つ以上の症候の回復、緩和、その進

50

行の阻害又は予防を意味する。特に、この障害の治療は、悪性細胞の数を減少させることからなり得る。最も好ましくは、このような治療は、悪性細胞の完全な枯渇をもたらす。

【0043】

好ましくは、処置すべき個体は、ガンに罹患しているか又はガンに罹患している可能性があるヒト又は非ヒト哺乳動物（例えば、齧歯類（マウス、ラット）、ネコ、イヌ又は霊長類）である。好ましくは、個体は、ヒトである。

【0044】

第1の態様によれば、本発明は、ガンに罹患している患者の予防又は治療において使用するための *sideroflexin3* アンタゴニストに関する。

【0045】

「ガン」、「悪性腫瘍」及び「腫瘍」という用語は、典型的には無秩序な細胞成長を特徴とする哺乳動物における病理学的症状を指すか又は表す。より正確には、本発明の使用では、疾患、すなわちガンは、腫瘍細胞に共生的に関連することが示されている腫瘍関連マクロファージ TAM に関連する。さらに、本発明者らは、*sideroflexin3* に対する抗体と同様に、本発明のアンタゴニストが腫瘍関連マクロファージ (TAM) を殺傷し、腫瘍細胞成長を減少させることを示す：腫瘍細胞は、腫瘍微小環境において生存因子及び血管新生因子をこれらに提供する TAM をリクルートする（総説 Dirks A.E.M. Journal of Leukocyte Biology vol. 80 no. 6 1183-1196 December 2006を参照のこと）。

10

【0046】

特に、ガンは、固形腫瘍又は未分化骨髄細胞の無秩序な成長（すなわち、白血病、リンパ腫）に関連し得る。

20

【0047】

限定されないが、以下のものを含む様々なガン及び他の増殖性疾患は、本発明の方法及び組成物を使用して処置され得る：

- 膀胱、乳房、子宮/子宮頸部、結腸、腎臓、肝臓、肺、卵巣、食道、膵臓、前立腺、胃、頸部、甲状腺、結腸直腸、頭頸部及び皮膚のものを含むガン腫（扁平上皮ガンを含む）、

- 線維肉腫及び横紋筋肉腫 (rhabdomyosarcoma) を含む間葉起源の腫瘍；

- メラノーマ、セミノーマ、テラトカルシノーマ、神経芽細胞腫及び神経膠腫を含む他の腫瘍；

30

- 星状細胞腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、神経鞘腫を含む中枢神経系及び末梢神経系の腫瘍；

- 線維肉腫、横紋筋肉腫 (rhabdomyosarcoma) 及び骨肉腫を含む間葉起源の腫瘍；並びに

- メラノーマ、色素性乾皮症、角化棘細胞腫 (keratoacarcinoma)、セミノーマ、甲状腺濾胞ガン及びテラトカルシノーマを含む他の腫瘍。

- リンパ腫、例えば限定されないが、ホジキン病、非ホジキン病；多発性骨髄腫、例えば限定されないが、くすぶり型多発性骨髄腫、非分泌型骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、形質細胞白血病、孤立性形質細胞腫及び髄外性形質細胞腫、成人T細胞白血病/リンパ腫。

- 白血病、例えば限定されないが、急性白血病、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、例えば骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、赤白血病性の白血病及び骨髄異形成症候群、慢性白血病、例えば限定されないが、慢性骨髄性（顆粒球性）白血病、慢性リンパ球性白血病、有毛細胞白血病。

40

【0048】

一実施態様では、前記ガンは、全ての急性白血病及び慢性白血病：慢性リンパ球性白血病 (CLL)、急性骨髄性白血病 (AML)、急性リンパ球性白血病 (ALL)、成人T細胞白血病/リンパ腫 (ATLL)、慢性骨髄単球性白血病 (LMMC)、急性前骨髄球性白血病 (APL) からなる群より選択される白血病である。

【0049】

好ましい実施態様では、前記白血病は、慢性リンパ球性白血病 (CLL) である。

50

## 【0050】

一実施態様では、前記ガンは、全ての非ホジキンリンパ腫又はホジキンリンパ腫、成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)からなる群より選択されるリンパ腫である。

## 【0051】

一実施態様では、前記ガンは、脳、頭頸部、副腎、結腸、小腸、胃、心臓、肝臓、皮膚、腎臓、肺、膵臓、精巣、卵巣、前立腺、子宮、甲状腺、膀胱、乳房、子宮内膜の腫瘍、多発性骨髄腫及び肉腫からなる群より選択される固形腫瘍である。

## 【0052】

上記及び以下において、腫瘍、腫瘍疾患、ガン腫又はガンについて言及する場合、元の器官若しくは組織における、及び/又は他の任意の位置における転移は、あるいは又は加えて、腫瘍及び/又は転移の位置が何でもよいことを暗に意味する。

10

## 【0053】

「患者」又は「それを必要とする被験体」という用語は、アデノシンレセプターが関与する病状に罹患しているか又はそれに罹患しやすい任意の哺乳動物(好ましくは、ヒト)を指す。

## 【0054】

「sideroflexin3アンタゴニスト」は、sideroflexin3の活性を中和、遮断、阻害、抑止、低減又は妨害することができる分子(天然又は合成)又は細胞を指す。sideroflexin3アンタゴニストとしては、抗体及びその抗原結合フラグメント、キメラ抗原レセプターT細胞(CAR-T)、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、多糖、オリゴ糖、核酸、生体有機分子、ペプチド模倣物、薬理的な作用物質及びそれらの代謝産物、転写及び翻訳コントロール配列などが挙げられる。アンタゴニストとしては、タンパク質のアンタゴニスト変異体、タンパク質に対するsiRNA分子、タンパク質に対するアンチセンス分子、アプタマー、及びタンパク質に対するリボザイムも挙げられる。例えば、sideroflexin3アンタゴニストは、TAM表面上に発現される場合、sideroflexin3に結合してsideroflexin3の生物学的活性(例えば、腫瘍細胞成長の誘導及び転移の促進)を中和、遮断、阻害、抑止、低減又は妨害する分子であり得る。より具体的には、本発明のsideroflexin3アンタゴニストは、抗sideroflexin3抗体である。

20

30

## 【0055】

sideroflexin3の「生物学的活性」は、TAM表面上に発現される場合、腫瘍細胞成長及び/又は生存の誘導、免疫抑制並びに腫瘍転移の促進を意味する。

## 【0056】

sideroflexin3アンタゴニストである化合物の能力を決定するための試験は、当業者に周知である。好ましい実施態様では、アンタゴニストは、TAM表面上に発現される場合、sideroflexin3の生物学的活性を阻害するために十分な様式で、sideroflexin3に特異的に結合する。sideroflexin3に対する結合及びsideroflexin3の生物学的活性の阻害は、当技術分野で周知の任意の競合アッセイによって決定され得る。例えば、アッセイは、sideroflexin3アンタゴニストとして試験すべき薬剤がsideroflexin3に結合する能力を決定することからなり得る。結合能力は、Kd測定によって反映される。「KD」という用語は、本明細書で使用される場合、Kaに対するKdの比(すなわち、Kd/Ka)から得られ、モル濃度(M)として表される解離定数を指すことを意図する。結合生体分子のKD値は、当技術分野で十分に確立されている方法を使用して決定され得る。特定の実施態様では、「sideroflexin3に特異的に結合する」アンタゴニストは、1µM以下、100nM以下、10nM以下又は3nM以下のKDで、ヒトsideroflexin3ポリペプチドに結合する阻害剤を指すことを意図する。次いで、競合アッセイを行って、薬剤がsideroflexin3の生物学的活性を阻害する能力を決定し得る。機能的アッセイでは、a)腫瘍細胞成長及び/若しくは生存(遮断siderofl

40

50

e x i n 3 抗体を用いた実施例並びに図 2 及び 3 を参照のこと) 並びに / 又は b ) 腫瘍転移 ( 血管新生の阻害に対するアンタゴニストの効果に基づく試験 ) 及び / 若しくは腫瘍細胞遊走 ( マトリゲルアッセイ ) を阻害する能力の評価を使用し得ることが想定され得る。

【 0 0 5 7 】

当業者であれば、 s i d e r o f l e x i n 3 アンタゴニストが s i d e r o f l e x i n 3 の生物学的活性を中和、遮断、阻害、抑止、低減又は妨害するかを容易に決定し得る。最初に特性評価された遮断 s i d e r o f l e x i n 3 抗体と同じ方法で、 s i d e r o f l e x i n 3 アンタゴニストが s i d e r o f l e x i n 3 に結合し、及び / 又は腫瘍細胞成長を阻害するかをチェックするために、各アンタゴニストを用いて、結合アッセイ並びに / 又は細胞増殖及び / 若しくは生存アッセイを実施し得る。例えば、細胞増殖アッセイは、 C F S E 増殖アッセイによって測定され得る。例えば、細胞生存アッセイは、フローサイトメトリーによるヨウ化プロビジウム測定によって測定され得る。例えば、血管新生及び / 又は腫瘍細胞遊走アッセイは、マトリゲルアッセイによって測定され得る。

10

【 0 0 5 8 】

したがって、 s i d e r o f l e x i n 3 アンタゴニストは、 s i d e r o f l e x i n 3 に結合する分子であって、抗体、アプタマー及びポリペプチドからなる群より選択される分子であり得る。

【 0 0 5 9 】

当業者であれば、 s i d e r o f l e x i n 3 アンタゴニストが s i d e r o f l e x i n 3 の生物学的活性を中和、遮断、阻害、抑止、低減又は妨害するか ( ( i ) s i d e r o f l e x i n 3 に対する結合、並びに / 又は ( i i ) 腫瘍細胞成長及び / 若しくは生存の阻害、並びに / 又は ( i i i ) 腫瘍転移の遮断 ) を容易に決定し得る。

20

【 0 0 6 0 】

・抗体

別の実施態様では、 s i d e r o f l e x i n 3 アンタゴニストは、 T A M 表面において s i d e r o f l e x i n 3 に結合して T A M 活性 ( 腫瘍細胞成長及び / 又は生存の誘導、免疫抑制並びに腫瘍転移の促進 ) を遮断し得る抗体 ( この用語は、抗体フラグメント又は部分を含む ) であり得る。

【 0 0 6 1 】

好ましい実施態様では、 s i d e r o f l e x i n 3 に対する抗体が T A M 活性を損なうような方法 ( 「中和抗体」 ) で、 s i d e r o f l e x i n 3 アンタゴニストは、 s i d e r o f l e x i n 3 に対する抗体からなり得る。

30

【 0 0 6 2 】

よって、本発明では、 s i d e r o f l e x i n 3 の中和抗体は、 ( i ) s i d e r o f l e x i n 3 に結合し、並びに / 又は ( i i ) 腫瘍細胞成長及び / 若しくは生存を阻害し、並びに / 又は ( i i i ) 腫瘍転移を遮断する能力について、上記のように選択される。

【 0 0 6 3 】

本明細書に記載される抗体又はその部分の一実施態様では、抗体はモノクローナル抗体である。本明細書に記載される抗体又はその部分の一実施態様では、抗体はポリクローナル抗体である。本明細書に記載される抗体又はその部分の一実施態様では、抗体はヒト化抗体である。本明細書に記載される抗体又はその部分の一実施態様では、抗体はキメラ抗体である。本明細書に記載される抗体又はその部分の一実施態様では、抗体の部分は、抗体の軽鎖を含む。本明細書に記載される抗体又はその部分の一実施態様では、抗体の部分は、抗体の重鎖を含む。本明細書に記載される抗体又はその部分の一実施態様では、抗体の部分は、抗体の F a b 部分を含む。本明細書に記載される抗体又はその部分の一実施態様では、抗体の部分は、抗体の F ( a b ' ) 2 部分を含む。本明細書に記載される抗体又はその部分の一実施態様では、抗体の部分は、抗体の F c 部分を含む。本明細書に記載される抗体又はその部分の一実施態様では、抗体の部分は、抗体の F v 部分を含む。本明細

40

50

書に記載される抗体又はその部分の一実施態様では、抗体の部分は、抗体の可変ドメインを含む。本明細書に記載される抗体又はその部分の一実施態様では、抗体の部分は、抗体の1つ以上のCDRドメインを含む。

#### 【0064】

本明細書で使用される場合、「抗体」は、天然に存在する抗体及び天然に存在しない抗体の両方を含む。具体的には、「抗体」は、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体、並びにその一価フラグメント及び二価フラグメントを含む。さらに、「抗体」は、キメラ抗体、完全合成抗体、一本鎖抗体及びそれらのフラグメントを含む。抗体は、ヒト抗体又は非ヒト抗体であり得る。非ヒト抗体は、ヒトにおけるその免疫原性を減少させるためのリコンビナント方法によってヒト化され得る。

10

#### 【0065】

抗体は、従来の方法にしたがって調製される。モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein (Nature, 256:495, 1975)の方法を使用して作製され得る。本発明において有用なモノクローナル抗体を調製するために、抗原型 *s i d e r o f l e x i n 3* でマウス又は他の適切な宿主動物を適切な間隔で（例えば、週2回、週1回、月2回又は月1回）免疫する。屠殺の1週間以内に、最終「追加免疫」の抗原を動物に投与し得る。免疫中に免疫学的アジュバントを使用することが望ましいことが多い。適切な免疫学的アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、ミョウバン、*R i b i* アジュバント、Hunter's Titermax、サボニンアジュバント、例えば *Q S 2 1* 若しくは *Q u i l A*、又は *C p G* 含有免疫刺激オリゴヌクレオチドが挙げられる。他の適切なアジュバントは当技術分野で周知である。皮下、腹腔内、筋肉内、静脈内、鼻腔内又は他の経路によって、動物を免疫し得る。複数の経路によって、複数の形態の抗原で所定の動物を免疫し得る。

20

#### 【0066】

簡潔に言えば、リコンビナント *s i d e r o f l e x i n 3* は、リコンビナント細胞株による発現によって提供され得る。リコンビナント型 *s i d e r o f l e x i n 3* は、任意の前記方法を使用して提供され得る。免疫レジメンの後、動物の脾臓、リンパ節又は他の臓器からリンパ球を単離し、次いでポリエチレングリコールなどの薬剤を使用して適切な骨髓腫細胞株と融合させてハイブリドーマを形成する。融合後、記載されているように (Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology, 3rd edition, Academic Press, New York, 1996)、標準的な方法を使用して、融合パートナーではなくハイブリドーマが成長可能な培地中に細胞を置く。ハイブリドーマの培養後、所望の特異性の（すなわち、抗原に選択的に結合する）抗体の存在について、細胞上清を分析する。適切な分析技術としては、ELISA、フローサイトメトリー、免疫沈降及びウエスタンブロッティングが挙げられる。他のスクリーニング技術は当技術分野で周知である。好ましい技術は、コンフォメーションがインタクトな抗原であって、ネイティブにフォールディングされた抗原に対する抗体の結合を確認するもの、例えば非変性ELISA、フローサイトメトリー及び免疫沈降である。

30

#### 【0067】

重要なことに、当技術分野で周知であるように、抗体分子のごく一部（パラトープ）のみが、そのエピトープに対する抗体の結合に関与する（一般的に、Clark, W. R. (1986) The Experimental Foundations of Modern Immunology Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991) Essential Immunology, 7th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxfordを参照のこと）。Fc'領域及びFc領域は、例えば、補体カスケードのエフェクターであるが、抗原結合に関与しない。pFc'領域が酵素的に切断された抗体、又はpFc'領域なしで生産された抗体（F(ab')<sub>2</sub>フラグメントと称される）は、インタクトな抗体の抗原結合部位の両方を保持する。同様に、Fc領域が酵素的に切断された抗体、又はFc領域なしで生産された抗体（Fabフラグメントと称される）は、インタクトな抗体分子の抗原結合部位の一方を保持する。さらに進めて、Fabフラグメント

40

50

は、共有結合した抗体軽鎖と、抗体重鎖の一部（F d と称される）とからなる。F d フラグメントは、抗体特異性の主な決定基であり（単一のF d フラグメントは、抗体特異性を変化させずに、最大10個の異なる軽鎖に結合され得る）、F d フラグメントは、単独でエピトープ結合能を保持する。

**【0068】**

当技術分野で周知であるように、抗体の抗原結合部分内には、抗原のエピトープと直接的に相互作用する相補性決定領域（CDR）と、パラトープの三次構造を維持するフレームワーク領域（FR）とが存在する（一般的に、Clark, 1986; Roitt, 1991を参照のこと）。IgG免疫グロブリンの重鎖F d フラグメント及び軽鎖の両方において、3つの相補性決定領域（CDR1からCDR5）によってそれぞれ分離された4つのフレームワーク領域（FR1からFR4）が存在する。CDR、特にCDR5領域、より具体的には重鎖CDR5は、抗体特異性に大きく関与する。

10

**【0069】**

元の抗体のエピトープ特異性を保持しながら、哺乳動物抗体の非CDR領域を同種抗体又は異種特異的抗体の類似領域で置換し得ることは、現在では当技術分野で十分に確立されている。これは、非ヒトCDRをヒトFR及び/又はFc/pFc'領域に共有結合して機能的抗体を生産する「ヒト化」抗体の開発及び使用において最も明確に具現されている。

**【0070】**

特定の実施態様では、本発明は、ヒト化型抗体を含む組成物及び方法を提供する。本明細書で使用される場合、「ヒト化」は、CDR領域外のアミノ酸の一部、大部分又は全部がヒト免疫グロブリン分子由来の対応するアミノ酸で置換された抗体を表す。ヒト化の方法としては、限定されないが、米国特許第4,816,567号、米国特許第5,225,539号、米国特許第5,585,089号、米国特許第5,693,761号、米国特許第5,693,762号及び米国特許第5,859,205号（これらは、参照により本明細書に組み入れられる）に記載されているものが挙げられる。また、上記米国特許第5,585,089及び米国特許第5,693,761並びに国際公開公報第90/07861号では、ヒト化抗体の設計に使用され得る4つの可能な基準が提案されている。第1案は、アクセプターの場合、ヒト化すべきドナー免疫グロブリンと特に相同的な特定のヒト免疫グロブリン由来のフレームワークを使用すること、又は多くのヒト抗体由来のコンセンサスフレームワークを使用することであった。第2案は、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク中のアミノ酸が通常のものではなく、その位置のドナーアミノ酸がヒト配列に典型的なものである場合、アクセプターではなくドナーアミノ酸を選択し得ることであった。第3案は、ヒト化免疫グロブリン鎖中の3つのCDRに直接隣接する位置において、アクセプターアミノ酸ではなくドナーアミノ酸を選択し得ることであった。第4案は、抗体の三次元モデルにおいて、アミノ酸がCDRの3A以内に側鎖原子を有すると予測され、CDRと相互作用することができると予測されるフレームワーク位置にドナーアミノ酸残基を使用することであった。上記方法は、当業者がヒト化抗体の作製に用い得るいくつかの方法の単なる例示である。当業者であれば、他の抗体ヒト化方法を熟知しているであろう。

20

30

40

**【0071】**

ヒト化型抗体の一実施態様では、CDR領域外のアミノ酸の一部、大部分又は全部がヒト免疫グロブリン分子由来のアミノ酸で置換されているが、1つ以上のCDR領域内のアミノ酸の一部、大部分又は全部は不変である。アミノ酸のわずかな付加、欠失、挿入、置換又は改変は、それらが、所定の抗原に対する抗体の結合能を抑制しない限り許容可能である。適切なヒト免疫グロブリン分子としては、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及びIgM分子が挙げられる。「ヒト化」抗体は、元の抗体と類似の抗原特異性を保持する。しかしながら、特定ヒト化の方法を使用して、抗体の結合の親和性及び/又は特異性を、Wu et al., / . Mol. Biol. 294:151, 1999（その内容は、参照により本明細書に組み入れられる）によって記載されている「指向性進化」方法を使用して増加させ

50

得る。

【0072】

また、ヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子座の大部分についてトランスジェニックなマウスを免疫することによって、完全ヒトモノクローナル抗体を調製し得る。例えば、米国特許第5,591,669号、米国特許第5,598,369号、米国特許第5,545,806号、米国特許第5,545,807号、米国特許第6,150,584号及びそこで引用されている参考文献（その内容は、参照により本明細書に組み入れられる）を参照のこと。これらの動物は、内因性（例えば、マウス）抗体の産生が機能的に欠失するように遺伝子的に改変されている。これらの動物を免疫すると目的の抗原に対する完全ヒト抗体が産生されるように、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子座の全部又は一部を含有するように前記動物をさらに改変する。これらのマウス（例えば、Xenomouse (Abgenix)、HuMAbマウス(Medarex/GenPharm)）の免疫後、標準的なハイブリドーマ技術にしたがって、モノクローナル抗体を調製し得る。これらのモノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリンアミノ酸配列を有するので、ヒトに投与した場合にヒト抗マウス抗体(KAMA)応答を誘発しない。

10

【0073】

ヒト抗体を生産するためのin vitro方法も存在する。これらとしては、ファージディスプレイ技術（米国特許第5,565,332号及び米国特許第5,573,905号）及びヒトB細胞のin vitro刺激（米国特許第5,229,275号及び米国特許第5,567,610号）が挙げられる。これらの特許の内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

20

【0074】

したがって、当業者には明らかであるように、本発明はまた、F(ab')<sub>2</sub> Fab、Fv及びFdフラグメント；Fc及び/又はFR及び/又はCDR1及び/又はCDR2及び/又は軽鎖CDR3領域が、相同的なヒト配列又は非ヒト配列によって置換されているキメラ抗体；FR及び/又はCDR1及び/又はCDR2及び/又は軽鎖CDR3領域が、相同的なヒト配列又は非ヒト配列によって置換されているキメラF(ab')<sub>2</sub>フラグメント抗体；FR及び/又はCDR1及び/又はCDR2及び/又は軽鎖CDR3領域が、相同的なヒト配列又は非ヒト配列によって置換されているキメラFabフラグメント抗体；並びに、FR及び/又はCDR1及び/又はCDR2領域が、相同的なヒト配列又は非ヒト配列によって置換されているキメラFdフラグメント抗体を提供する。本発明はまた、いわゆる一本鎖抗体を含む。

30

【0075】

様々な抗体分子及びフラグメントは、限定されないが、IgA、分泌IgA、IgE、IgG及びIgMを含む一般的に公知の免疫グロブリンクラスのいずれかに由来し得る。IgGサブクラスも当業者に周知であり、限定されないが、ヒトIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4が挙げられる。

【0076】

別の実施態様では、本発明の抗体は、単ドメイン抗体である。用語「単ドメイン抗体」(sdAb)又は「VHH」は、軽鎖を本来的に欠くラクダ科哺乳動物に見られ得る種類の抗体の単一重鎖可変ドメインを指す。このようなVHHは、「nanobody(登録商標)」とも称される。本発明によれば、sdAbは、特にラマsdAbであり得る。

40

【0077】

中和抗sideroflexin3抗体の例は、実施例のセクションに開示されている。これらの抗体の抗原-結合配列（例えば、CDR）を使用して、本明細書に開示されるガンの処置のためのヒト化抗体を作製するために、当業者であれば、ルーチンな技術を使用し得る。

【0078】

キメラ抗原レセプターT細胞(CAR-T)

いくつかの実施態様では、抗sideroflexin3抗体の抗原結合フラグメント

50

は、キメラ抗原レセプターT細胞(CAR-T)の一部である。

【0079】

特定の実施態様では、CAR-T細胞は、本発明の単鎖可変フラグメント(scFv)を含むか、それからなるか、又はそれから本質的になる抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施態様では、抗原結合ドメインは、リンカーペプチドを含む。リンカーペプチドは、軽鎖可変領域と重鎖可変領域との間に位置し得る。

【0080】

本明細書で使用される場合、CAR-T細胞とも称される「キメラ抗原レセプターT細胞」という用語は、キメラ抗原レセプター(CAR)を発現するリンパ球を指す。「キメラ抗原レセプター」又は「CAR」という用語は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、T細胞シグナリングドメインに連結された抗体(例えば、scFv)の抗原結合ドメインを含有する人工的に構築されたハイブリッドタンパク質又はポリペプチドを指す。CARの特徴としては、モノクローナル抗体の抗原結合特性を利用して、T細胞特異性及び反応性を選択ターゲットに対して非MHC拘束的に再指向させるそれらの能力が挙げられる。非MHC拘束性抗原認識は、抗原プロセッシングとは無関係に抗原を認識して主要な腫瘍回避機構を回避する能力を、CARを発現するT細胞に与える。また、T細胞において発現される場合、CARは、有利には、内因性T細胞レセプター(TCR)鎖及び鎖と二量体化しない。このようなCARを設計及び生産するための戦略は当技術分野で周知であり、参考文献は、例えば、Bonini and Mondino, Eur. J. Immunol. 2015 (19)、Srivastava and Riddell, Trends Immunol. 2015 (20)、Jensen and Riddell, Curr. Opin. Immunol. 2015 (21)、Gill and June, Immunol. Rev. 2015 (22)に見られ得る。

10

20

【0081】

・アプタマー

別の実施態様では、sideroflexin3アンタゴニストは、sideroflexin3に対するアプタマーである。アプタマーは、分子認識の点で抗体の代替物となる分子のクラスである。アプタマーは、高い親和性及び特異性で、実質的に任意のクラスのターゲット分子を認識する能力を有するオリゴヌクレオチド又はオリゴペプチド配列である。このようなりガンドは、Tuerk C. and Gold L., 1990に記載されているようにランダム配列ライブラリーの試験管内進化法(SELEX法)を介して単離され得る。ランダム配列ライブラリーは、DNAのコンビナトリアル化学合成によって得られ得る。このライブラリーでは、各メンバーは、ユニークな配列の最終的には化学的に改変される線状オリゴマーである。このクラスの分子の可能な改変、使用及び利点は、Jayasena S.D., 1999に概説されている。ペプチドアプタマーは、ツーハイブリッド法(Colas et al., 1996)によってコンビナトリアルライブラリーから選択されるプラットフォームタンパク質(例えば、E. coliチオレドキシニンA)によって提示されるコンフォメーション的に制限された抗体可変領域からなる。

30

【0082】

よって、本発明では、sideroflexin3の中和アプタマーは、(i) sideroflexin3に結合し、並びに/又は(ii)腫瘍細胞成長及び/若しくは生存を阻害し、並びに/又は(iii)腫瘍転移を遮断する能力について、上記のように選択される。

40

【0083】

・sideroflexin3遺伝子発現阻害剤

さらに別の実施態様では、sideroflexin3アンタゴニストは、sideroflexin3遺伝子発現阻害剤である。「発現の阻害剤」は、遺伝子の発現を阻害する生物学的効果を有する天然化合物又は合成化合物を指す。したがって、「sideroflexin3遺伝子発現阻害剤」は、sideroflexin3遺伝子の発現を阻害する生物学的効果を有する天然化合物又は合成化合物を示す。

【0084】

本発明の好ましい実施態様では、前記sideroflexin3遺伝子発現阻害剤は

50

、*siRNA*、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ヌクレアーゼ又はリボザイムである。

【0085】

本発明において使用するための *sideroflexin 3* 遺伝子発現阻害剤は、アンチセンスオリゴヌクレオチド構築物をベースとするものであり得る。アンチセンスRNA分子及びアンチセンスDNA分子を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドは、*sideroflexin 3* mRNAに結合してタンパク質翻訳を防止するか、又はmRNA分解を増加させることによって、*sideroflexin 3* mRNAの翻訳を直接遮断し、それにより、細胞内の *sideroflexin 3* のレベル及び活性を低下させるように作用する。例えば、少なくとも約15塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、*sideroflexin 3* をコードするmRNA転写配列のユニーク領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを、例えば通常のプロセス技術によって合成し、例えば静脈内注射又は静脈内注入によって投与し得る。その配列が公知の遺伝子の遺伝子発現を特異的に阻害するためにアンチセンス技術を使用する方法は、当技術分野で周知である（例えば、米国特許第6,566,135号；米国特許第6,566,131号；米国特許第6,365,354号；米国特許第6,410,323号；米国特許第6,107,091号；米国特許第6,046,321号；及び米国特許第5,981,732号を参照のこと）。

10

【0086】

低分子干渉RNA (*siRNA*) もまた、本発明において使用するための *sideroflexin 3* 遺伝子発現阻害剤として機能し得る。*sideroflexin 3* 遺伝子発現が特異的に阻害されるように、低分子二本鎖RNA (*dsRNA*) 又は低分子二本鎖RNAの生成を引き起こすベクター若しくは構築物を使用することによって、*sideroflexin 3* 遺伝子発現を減少させ得る（すなわち、RNA干渉又はRNAi）。その配列が公知の遺伝子について、適切な *dsRNA* 又は *dsRNA* をコードするベクターを選択するための方法は、当技術分野で周知である（例えば、Tuschi, T. et al. (1999); Elbashir, S. M. et al. (2001); Hannon, GJ. (2002); McManus, MT. et al. (2002); Brummelkamp, TR. et al. (2002); 米国特許第6,573,099号及び米国特許第6,506,559号；並びに国際公開公報第01/36646号、国際公開公報第99/32619号及び国際公開公報第01/68836号を参照のこと）。

20

【0087】

*sideroflexin 3* に対する前記 *siRNA* の例としては、限定されないが、Yoshikumi Y (2005) J Cell Biochem. Aug 15;95(6):1157-68に記載されているものが挙げられる。

30

【0088】

リボザイムもまた、本発明において使用するための *sideroflexin 3* 遺伝子発現阻害剤として機能し得る。リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒することができる酵素的RNA分子である。リボザイムの作用機構は、相補的ターゲットRNAへのリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーションと、それに続くエンドヌクレアーゼ切断を含む。それにより、*sideroflexin 3* mRNA配列のエンドヌクレアーゼ切断を特異的及び効率的に触媒する人工ヘアピン又はハンマーヘッドモチーフリボザイム分子は、本発明の範囲内で有用である。リボザイム切断部位（これらとしては、典型的には、以下の配列GUA、GUU及びGUCが挙げられる）についてターゲット分子をスキャンすることによって、任意のRNAターゲット候補内の特異的リボザイム切断部位を最初に同定する。同定したら、切断部位を含有するターゲット遺伝子の領域に対応する約15~20リボヌクレオチドの間の短いRNA配列を、オリゴヌクレオチド配列を不適切にし得る予測構造的特徴（例えば、二次構造）について評価し得る。また、例えば、リボヌクレアーゼ保護アッセイを使用して、相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションへのアクセシビリティを試験することによって、候補ターゲットの適切性を評価し得る。

40

【0089】

50

s i d e r o f l e x i n 3 遺伝子発現阻害剤として有用なアンチセンスオリゴヌクレオチド、s i R N A 及びリボザイムは、公知の方法によって調製され得る。これらとしては、例えば、固相ホスホラミダイト(phosphoramidite)化学合成などによる化学合成技術が挙げられる。あるいは、アンチセンスRNA分子は、RNA分子をコードするDNA配列のin vitro又はin vivo転写によって作製され得る。このようなDNA配列は、T7又はSP6ポリメラーゼプロモーターなどの適切なRNAポリメラーゼプロモーターが組み込まれた様々なベクターに組み込まれ得る。細胞内安定性及び半減期を増加させる手段として、本発明のオリゴヌクレオチドに対する様々な改変を導入し得る。可能な改変としては、限定されないが、リボヌクレオチド若しくはデオキシリボヌクレオチドフランキング配列を分子の5'及び/若しくは3'末端に付加すること、又はホスホジエステラーゼ結合ではなくホスホロチオエート若しくは2'-O-メチルをオリゴヌクレオチド骨格内で使用することが挙げられる。

10

#### 【0090】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド、s i R N A 及びリボザイムは、単独で又はベクターに結合してin vivo送達され得る。その最も広い意味において、「ベクター」は、細胞(好ましくは、s i d e r o f l e x i n 3 を発現する細胞)へのアンチセンスオリゴヌクレオチドs i R N A 又はリボザイム核酸の運搬を促進することができる任意のビヒクルである。好ましくは、ベクターは、ベクターの非存在で起こり得る分解程度と比べて低減した分解で、核酸を細胞に輸送する。一般的に、本発明に有用なベクターとしては、限定されないが、アンチセンスオリゴヌクレオチドs i R N A 又はリボザイム核酸配列の挿入又は組み込みによって操作されたプラスミド、ファージミド、ウイルス、ウイルス源又は細菌源に由来する他のビヒクルが挙げられる。ウイルスベクターが好ましい種類のベクターであり、限定されないが、以下のウイルス:レトロウイルス、例えばモロニーマウス白血病ウイルス、ハーベイマウス肉腫ウイルス、マウス乳ガンウイルス、及びラウス肉腫ウイルス;アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス;SV40型ウイルス;ポリオーマウイルス;エプスタイン・バーウイルス;パピローマウイルス;ヘルペスウイルス;ワクシニアウイルス;ポリオウイルス;及びRNAウイルス、例えばレトロウイルスに由来する核酸配列が挙げられる。命名されていないが当技術分野で公知の他のベクターも容易に用い得る。

20

#### 【0091】

好ましいウイルスベクターは、非必須遺伝子が目的の遺伝子で置換されている非細胞変性真核生物ウイルスをベースとするものである。非細胞変性ウイルスとしてはレトロウイルス(例えば、レンチウイルス)が挙げられ、その生活環は、ゲノムウイルスRNAのDNAへの逆転写と、それに続くプロウイルスの宿主細胞DNAへの組み込みを含む。レトロウイルスは、ヒト遺伝子療法試験に承認されている。最も有用なのは、複製欠損性(すなわち、所望のタンパク質の合成を指令することはできるが、感染性粒子を製造することができない)レトロウイルスである。このような遺伝子的に改変されたレトロウイルス発現ベクターは、in vivoにおける高効率な遺伝子トランスダクションについて全般的な有用性を有する。複製欠損性レトロウイルスを生産するための標準的なプロトコール(外因性遺伝物質をプラスミドに組み込む工程、プラスミドでパッケージング細胞株をトランスフェクションする工程、パッケージング細胞株によってリコンビナントレトロウイルスを生産する工程、組織培養培地からウイルス粒子を回収する工程、及びウイルス粒子をターゲット細胞に感染させる工程を含む)は、KRIEGLER (A Laboratory Manual, " W.H. Freeman C.O., New York, 1990) and in MURRY (" Methods in Molecular Biology, " vol.7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J., 1991)に示されている。

30

40

#### 【0092】

特定の用途に好ましいウイルスは、遺伝子治療におけるヒトへの使用が既に承認されている二本鎖DNAウイルスであるアデノウイルス及びアデノ随伴(AAV)ウイルスである。アデノ随伴ウイルスは、複製欠損性となるように操作することができ、広範囲の細胞型及び種に感染することができる。それはさらに、熱安定性及び脂質溶媒安定性;造血細

50

胞を含む多様な系統の細胞における高いトランスダクション頻度；並びに、重複感染阻害がないので複数回のトランスダクションが可能であるなどの利点を有する。報告によれば、アデノ随伴ウイルスを部位特異的にヒト細胞DNAに組み込むことにより、挿入突然変異誘発の可能性及びレトロウイルス感染に特徴的な挿入遺伝子の発現の変動性を最小限にし得る。加えて、野生型アデノ随伴ウイルス感染は、選択圧の非存在下で100継代回以上にわたって組織培養液中で観察されており、これは、アデノ随伴ウイルスのゲノム組み込みは、比較的安定した事象であることを意味する。アデノ随伴ウイルスはまた、染色体外でも機能し得る。

#### 【0093】

他のベクターとしては、プラスミドベクターが挙げられる。プラスミドベクターは当技術分野で広く記載されており、当業者に周知である。例えば、SANBROOK et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989を参照のこと。ここ数年間では、プラスミドベクターは、*in vivo*において抗原をコードする遺伝子を細胞に送達するためのDNAワクチンとして使用されている。それらは、ウイルスベクターの多くと同じ安全上の懸念がないので、特に有利である。しかしながら、宿主細胞と適合性のプロモーターを有するこれらのプラスミドは、プラスミド内で作動可能にコードされた遺伝子からペプチドを発現し得る。いくつかの一般的に使用されるプラスミドとしては、pBR322、pUC18、pUC19、pRC/CMV、SV40及びpBlueScriptが挙げられる。他のプラスミドは当業者に周知である。加えて、DNAの特定のフラグメントを除去及び付加する制限酵素及びライゲーション反応を使用して、プラスミドをカスタム設計し得る。プラスミドは、様々な非経口経路、粘膜経路及び局所経路によって送達され得る。例えば、DNAプラスミドは、筋肉内、皮内、皮下、又は他の経路によって注射され得る。それはまた、鼻腔内スプレー又は点鼻液、直腸坐剤によって及び経口的に投与され得る。それはまた、遺伝子銃を使用して表皮又は粘膜表面に投与され得る。プラスミドを水溶液に加えてもよいし、金粒子上に乾燥してもよいし、又は別のDNA送達システム（限定されないが、リボソーム、デンドリマー、コクリエート及びマイクロカプセル化を含む）と併用してもよい。

#### 【0094】

ガンを予防又は治療する方法

本発明はさらに、被験体におけるガンを予防又は治療する方法であって、治療有効量のsideroflexin3アンタゴニストを該被験体に投与することを含む方法を企図する。

#### 【0095】

一態様では、本発明は、被験体における腫瘍成長及び/又は生存を阻害する方法であって、治療有効量のsideroflexin3アンタゴニストを投与することを含む方法を提供する。

#### 【0096】

「治療有効量」のsideroflexin3アンタゴニストは、膵管腺ガンを予防又は治療するために十分な量のアンタゴニストを意味する。しかしながら、本発明の化合物及び組成物の1日総使用量は、健全な医学的判断の範囲内で主治医によって決定されると理解されよう。任意の特定の被験体の具体的な治療有効用量レベルは、治療される障害及び障害の重症度；用いられる特定の化合物の活性；用いられる特定の組成物、被験体の年齢、体重、一般健康、性別、及び食事；投与時間、投与経路、及び用いられる特定の化合物の排泄速度；治療期間；用いられる特定のポリペプチドと組み合わせる又は同時に使用される薬物；及び医療分野で周知の同様の要因を含む様々な要因に依存するであろう。例えば、所望の治療効果を達成するのに必要なレベルよりも低レベルで化合物の投与を開始して、所望の効果が達成されるまで投与量を徐々に増加させることは、当業者の範囲内である。しかしながら、生成物の1日投与量は、0.01~1,000mg/成人/日の広範囲で変動し得る。好ましくは、治療される被験体への投与量を対症的に調整するために、組成物は、有効成分0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、1

0.0、15.0、25.0、50.0、100、250、及び500mgを含有する。医薬は、典型的には、有効成分約0.01mg~約500mg、好ましくは有効成分1mg~約100mgを含有する。有効量の薬物は、通常、0.0002mg/kg~約20mg/kg体重/日、特に約0.001mg/kg~7mg/kg体重/日の投与量レベルで供給される。

【0097】

本発明はまた、sideroflexin3アンタゴニストを用いて、血中でsideroflexin3を発現する高レベルのTAMを有する被験体におけるガンを処置するための方法に関する。

【0098】

本発明はまた、血中でsideroflexin3を発現する高レベルのTAMを有する被験体におけるガンの処置において使用するためのsideroflexin3アンタゴニストに関する。

10

【0099】

上記方法及び使用は、前記被験体から得られた血液サンプル中のsideroflexin3タンパク質を発現するTAMのレベルを測定し、参照コントロール値と比較する工程を含む。

【0100】

sideroflexin3を発現する高レベルのTAMは、ガンを有するか又は発症する高リスクを予測するものであり、sideroflexin3アンタゴニストを使用しなければならないことを意味する。

20

【0101】

典型的には、被験体から体液サンプルを得、このサンプル中のsideroflexin3のレベルを測定する。実際、統計的分析により、sideroflexin3を発現するTAMのレベルの減少は、sideroflexin3を発現する高レベルのTAMを示す患者において特に有益であることが明らかになった。

【0102】

本発明の医薬組成物：

上記sideroflexin3アンタゴニストを、薬学的に許容し得る賦形剤及び場合により徐放性マトリックス、例えば生分解性ポリマーと組み合わせて、治療用組成物を形成し得る。

30

【0103】

したがって、本発明は、本発明のsideroflexin3アンタゴニストと、薬学的に許容し得る担体とを含む医薬組成物に関する。

【0104】

本発明はまた、ガンの予防又は治療において使用するための医薬組成物であって、本発明のsideroflexin3アンタゴニストと、薬学的に許容し得る担体とを含む医薬組成物に関する。

【0105】

「薬学的に」又は「薬学的に許容し得る」は、必要に応じて哺乳動物、特にヒトに投与した場合に有害反応、アレルギー反応又は他の望ましくない反応を引き起こさない分子実

40

【0106】

治療用途では、組成物は、記載されているように、疾患の症候及びその合併症を治癒又は少なくとも部分的に停止するために十分な量で、疾患を既に患っている患者に投与される。医薬組成物の適切な投与量は、いくつかの十分に確立されたプロトコルのいずれかが1つにしたがって容易に決定される。例えば、体重1キログラム当たりの生物活性剤の最大許容用量を決定するために、(例えば、マウス又はラットの)動物研究が一般に使用される。一般に、試験される動物種の少なくとも1つは、哺乳動物である。例えば、動物研究の結果から、ヒトなどの他の種において使用するための用量を推定し得る。有効量を構

50

成するものはまた、疾患又は症状の性質及び重症度、並びに患者の健康の一般的状態に依存する。

【0107】

治療的処置では、医薬組成物に含まれるアンタゴニストは、所望の応答が達成されるまで、複数回投与量で又は単回用量として投与され得る。典型的には、処置はモニタリングされ、必要に応じて反復投与量が投与され得る。sideroflexin3の不活性化が必要である場合には常に、本発明の化合物は、確立された投与レジメンにしたがって投与され得る。

【0108】

製品の1日投与量は、0.01~1,000mg/成人/日の広範囲で変動し得る。好ましくは、処置すべき患者への投与量の症候性調整のために、組成物は、有効成分0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0、100、250及び500mgを含有する。医薬は、典型的には、有効成分約0.01mg~約500mg、好ましくは有効成分約1mg~約100mgを含有する。有効量の薬物は、通常、0.0002mg/kg~約20mg/kg体重/日、特に約0.001mg/kg~10mg/kg体重/日の投与量レベルで供給される。しかしながら、任意の特定の患者のための特定の用量レベル及び投与頻度は変動し得、用いられる特定の化合物の活性、その化合物の代謝安定性及びその作用の長さ、年齢、体重、一般的健康、性別、食事、投与の様式及び時間、排泄速度、薬物の組み合わせ、特定の症状の重症度、並びに治療を受けている宿主を含む様々な要因に依存すると理解されよう。

10

20

【0109】

経口、舌下、皮下、筋肉内、静脈内、経皮、局所又は直腸投与のための本発明の医薬組成物では、活性成分は単独で、又は別の活性成分と組み合わせて、単位投与形態で、従来の薬学的支持体との混合物として、動物及びヒトに投与され得る。適切な単位投与形態は、錠剤、ゲルカプセル剤、散剤、顆粒剤及び経口用懸濁剤又は液剤などの経口経路剤形、舌下及び口内投与形態、エアロゾル、インプラント、皮下、経皮、局所、腹腔内、筋肉内、静脈内、真皮下、経皮、髄腔内及び鼻腔内投与形態並びに直腸投与形態を含む。

【0110】

適切な単位投与形態としては、経口投与のための形態、例えば錠剤、ゼラチンカプセル、粉末、経口摂取すべき顆粒及び溶液又は懸濁液、舌下及び口腔投与のための形態、エアロゾル、インプラント、皮下、筋肉内、静脈内、鼻腔内又は眼内投与のための形態並びに直腸投与のための形態が挙げられる。

30

【0111】

本発明の医薬組成物では、活性成分は、一般に、毎日投与の投与量単位当たり前記活性成分0.5~1000mg、好ましくは1~500mg、より好ましくは2~200mgを含有する投与量単位として製剤化される。

【0112】

錠剤の形態の固体組成物を調製する場合、ラウリル硫酸ナトリウムなどの湿潤剤を、場合により微粉化された活性成分に追加し、次いで、これをシリカ、ゼラチン、デンプン、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、アラビアゴムなどの薬学的ビヒクルと混合する。錠剤は、スクロースで、様々なポリマー若しくは他の適切な物質でコーティングされ得るか、又はそれらは、長期的若しくは遅発的な活性を有するように、及び所定量の活性成分を連続的に放出するように処理され得る。

40

【0113】

ゼラチンカプセルの形態の調製物は、活性成分を希釈剤、例えばグリコール又はグリセロールエステルと混合し、得られた混合物を軟質ゼラチンカプセル又は硬質ゼラチンカプセルに注ぐことによって得られる。

【0114】

シロップ又はエリキシル剤の形態の調製物は、甘味料（これは、好ましくはカロリーフリーである）、防腐剤としてメチル-パラベン及びプロピルパラベン、香味料及び適切な

50

着色料と一緒に、活性成分を含有し得る。

【0115】

水分散性粉末又は顆粒は、分散剤又は湿潤剤又は懸濁剤、例えばポリビニルピロリドン及びさらには甘味料又は味修正剤と混合された活性成分を含有し得る。

【0116】

直腸投与は、直腸温度で融解する結合剤、例えばカカオバター又はポリエチレングリコールを用いて調製された坐剤を使用して行われる。

【0117】

非経口、鼻腔内又は眼内投与は、薬理的に適合性の分散剤及び/又は湿潤剤、例えばプロピレングリコール、ブチレングリコール又はポリエチレングリコールを含有する水性懸濁液、等張性生理食塩水溶液又は滅菌注射溶液を使用して行われる。

10

【0118】

したがって、共溶媒、例えばアルコール、例えばエタノール又はグリコール、例えばポリエチレングリコール若しくはプロピレングリコール及び親水性界面活性剤、例えばTween. RTM. 80は、静脈内経路によって注射可能な水溶液を調製するために使用され得る。筋肉内経路によって注射可能な油性溶液を調製するために、活性成分は、トリグリセリド又はグリセロールエステルによって可溶化され得る。

【0119】

経皮投与は、活性成分がアルコール溶液の形態である多層パッチ又はリザーバを使用して行われる。

20

【0120】

吸入による投与は、例えば、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又は任意の他の生物学的に適合性の推進剤ガスと一緒にトリオレイン酸ソルビタン又はオレイン酸を含有するエアロゾルを使用して行われる。

【0121】

活性成分はまた、場合により1つ以上の担体又は添加剤と共に、マイクロカプセル又はミクロスフェアとして製剤化され得る。

【0122】

慢性処置の場合に有用な持続放出形態では、インプラントが使用され得る。これらは、油性懸濁液の形態で、又は等張性媒体中のミクロスフェアの懸濁液の形態で調製され得る。

30

【0123】

活性成分はまた、シクロデキストリン、例えば、若しくは -シクロデキストリン、2-ヒドロキシプロピル -シクロデキストリン又はメチル -シクロデキストリンとの複合体の形態で提示され得る。

【図面の簡単な説明】

【0124】

【図1】4つの抗NLC抗体によるNLCの高染色。A. 4つの抗NLC抗体による、CLL患者からゲーティングしたB-CLL及びNLC並びに健常ドナーの血液サンプル由来の単球、T細胞及びB細胞の染色（実線：アイソタイプコントロール；破線：抗体）。B. 6-25抗体による、ゲーティングしたCD163<sup>+</sup>NLCに対する陽性染色及び他の細胞に対する陰性染色。C. アイソタイプコントロールのものと比較した、ゲーティングしたNLCに対する4つの抗体染色の蛍光強度の平均。

40

【図2】4つの抗体と共に培養した場合のNLC枯渇及び白血病細胞死。アイソタイプ条件と比較した、各抗NLC抗体の存在下における6日後の、CLL患者由来のPBMC培養物中のNLC（囲み枠）の枯渇の顕微鏡による可視化。各抗体を含む条件では、これらの培養物中のNLCの絶対数は、ほぼ0であった。

【図3】2つの市販の抗SF3XN3抗体及び6-25抗体又はアイソタイプによって明らかにしたリコンビナントsideroflexin3のウエスタンブロット。

【図4】6-25抗体若しくはアイソタイプコントロールと共に又は6-25抗体若しく

50

はアイソタイプコントロールなしで10日間培養したCLL患者由来PBMCからの顕微鏡検査及びB-CLL生存分析。FACS：死B-CLLの割合は囲み枠で示されている。

【図5】6-25若しくはアイソタイプコントロールと共に又は6-25若しくはアイソタイプコントロールなしでCLL患者のPBMCを10日間培養した後のNLCの数。

【実施例】

【0125】

実施例1：腫瘍関連マクロファージをターゲティングするためのsideroflexin

材料及び方法

フィコールを使用して患者由来のPBMCを単離し、RPMI10%FBS中、細胞 $10 \times 10^6$ 個/mlで10日間培養した。次いで、上清を除去し、接着細胞(NLC)をPBSで2回洗浄した。セルスクレーパーを使用してNLCを分離し、カウントし、乾燥ペレットを凍結した。非接着細胞の乾燥ペレットも凍結した。複数の患者由来のNLCをプールし、“Proteo-extract native membrane protein extraction kit”(Calbiochem)を使用して、膜タンパク質を抽出した。

【0126】

Pierce(商標)High Capacity Streptavidin Agarose beads(thermo Fisher Scientific)をヤギ抗マウスIgGビオチン(Sigma Aldrich, B7401)と共に室温で20分間インキュベーションし、3回洗浄し、次いで、ハイブリドーマ上清培養培地又はコントロール培地と共に4で2時間インキュベーションした。PBSで3回洗浄した後、コーティングビーズをNLC又は非接着細胞由来の膜タンパク質500 $\mu$ gと共に4で一晩インキュベーションした。ビーズを洗浄し、Laemmli溶液で溶出した。これらの溶液をアクリルアミドゲルにロードし、移動後にinstant blue(euromedex)で着色した。ゲルストリップを切断し、ペプチドを抽出した。簡潔に言えば、アセトニトリル及び重炭酸アンモニウムでストリップを洗浄し、還元し、DTT及びヨードアセトアミド(iodoacetamin)でアルキル化し、トリプシンで消化し、次いで、アセトニトリル及びギ酸でペプチドを抽出した。次いで、質量分析(mass spectrometry)によって、ペプチドを同定した。各条件(ハイブリドーマの上清なし、タンパク質なし、非接着細胞由来及びNLC由来のタンパク質あり)で同定したペプチドを比較した。

【0127】

結果

NLCを特異的に認識する4つの抗体のターゲットを決定するために、本発明者らは、免疫沈降によって、4つのハイブリドーマ培養上清を試験した。このようにして、本発明者らは、質量分析によって、各ハイブリドーマに関連するペプチドを同定した。

【0128】

本発明者らは、これらのペプチド：

6-16：sideroflexin3及びGRP78

6-25：sideroflexin3

6-66-49：GRP78

6-66-74：エンドプラスミン及びGRP78

を見出した。

【0129】

実施例2：腫瘍関連マクロファージのターゲティング

材料及び方法

NLCに対する抗体の生産

RPMI10%FBS中、細胞 $10 \times 10^6$ 個/mlで、慢性リンパ球性白血病(CLL)患者の血液サンプルから単離したPBMCの培養物から、NLCを生成した。37及び5%CO<sub>2</sub>雰囲気中で14日間培養した後、B白血病細胞を除去し、接着細胞(NLC)を収集した。異なるドナー由来のNLC3~1500万個をマウスに15日ごとに4

10

20

30

40

50

回腹腔内注射した。次いで、脾臓から脾細胞を単離し、63s2マウス骨髄腫細胞株と融合して、ハイブリドーマ200個を生産した。これらのハイブリドーマ培養物の馴化培地200をNLC又は白血病細胞と共に4で30分間インキュベーションし、次いで、蛍光二次抗マウス抗体と共にインキュベーションした。次いで、フローサイトメトリーによって、これらの細胞を分析した。

#### 【0130】

##### フローサイトメトリー分析

各ハイブリドーマ培養上清50 $\mu$ lを細胞(NLC、B白血病細胞又はCLL患者若しくは健常ドナー由来のPBMC)220万個と共に4で30分間インキュベーションした。PBSで洗浄した後、細胞を、蛍光色素にカップリングしたヤギ抗マウス抗体と共に4で30分間インキュベーションした。洗浄した後、細胞を、異なる蛍光色素にカップリングした抗ヒトCD163、抗ヒトCD3、抗ヒトCD19及び抗ヒトCD14と共に4で15分間インキュベーションした。洗浄した後、フローサイトメトリーによって、細胞を分析した。

10

#### 【0131】

##### 抗体との培養

CLL患者から単離したPBMCを、5 $\mu$ l/mlハイブリドーマ培養上清由来精製抗体と共に若しくは前記精製抗体なしで、又は5 $\mu$ l/mlアイソタイプコントロールと共に6日間培養した。次いで、顕微鏡下でカウントすることによってNLCの数を推定し、生存について、ヨウ化プロピジウムを使用して細胞カウンタによって、生白血病細胞を評価した。

20

#### 【0132】

##### 免疫組織化学

隣接正常組織を有する腫瘍標本のルーチンに処理された厚さ4 $\mu$ mのホルマリン固定パラフィン包埋切片に対して、IHCを実施した。クエン酸バッファー(pH6)中で、熱誘導性エピトープ回復技術を実施した。各抗体を30分間インキュベーションし、製造者のプロトコールにしたがってEnVision G|2 System/AP (Dako)酵素コンジュゲートポリマー骨格を使用して明らかにし、キットに含まれるPermanent Red Chromogen (Fas Red)によって可視化した。ヘマトキシリン及びエオシン(H&E)で厚さ $\mu$ mの切片を染色した。Autostainer plus (Dako)スライドプロセッサーを使用して、IHCを処理した。

30

#### 【0133】

##### 結果

NLCに対する4つの特異的抗体のフローサイトメトリー分析。

NLCは、CLLの腫瘍関連マクロファージ(TAM)として説明されている。

#### 【0134】

NLCをターゲティングするために、本発明者らは、NLCに対する特異的抗体を生産することを決定した。したがって、本発明者らは、LLC患者(patients with LLC)由来の精製NLCでマウスを免疫した。患者由来の末梢血単核球(PBMC)のin vitro培養によって、NLCを生成した。14日後、NLCを単離し、次いで、マウスに注射した。ハイブリドーマ約200個を得、患者由来のNLCを認識する能力について、フローサイトメトリーでそれらの上清を試験した。これらの上清200個のうち、4つ(6-16、6-25、6-66-49、6-66-74)はNLCを認識及び固定したが、白血病細胞を認識及び固定せず、LLC患者(patient with LLC)由来の単球をほとんど認識及び固定しなかった。図1Aは、アイソタイプ(黄色)と比較した各上清(青色)による染色を示す。これらの上清は、健常ドナー由来のT(CD3<sup>+</sup>)又はB(CD19<sup>+</sup>)リンパ球を固定しなかった(図1A)。図1Bは、CD163、TAM/NLCに対する特異的抗体及び6-25抗体によるNLCの二重染色を示すが、他のPBMCは、これら2つの抗体によって認識されなかった。これらの上清は、NLCに対する特異的抗体(このアイソタイプはIgG1であると決定された)を含有する。4つの抗体の平均蛍光強度は、アイソタイプのものと比較して図1Cに表されている。

40

#### 【0135】

50

## 抗体の機能性

抗体の機能性を試験するために、本発明者らは、CLL患者由来のPBMCを4つの各抗体と共に培養したところ、6日間の培養において、抗体なしの培養又はアイソタイプコントロールとの培養と比較して、NLCの数が大きく減少し（囲み枠内の大きな細胞）、生B白血球細胞の数が減少することを示した（図2）。

### 【0136】

#### 乳房腫瘍におけるTAMの検出

4つの抗体が、CLLにおいてNLC以外のTAMを認識することができたかを試験するために、本発明者らは、4つの抗体を用いて乳房腫瘍のIHC染色を実施した。本発明者らは、pH6条件では、これらの抗体の2つ（6-25及び6-66-49）が、炎症領域に特徴的な腫瘍端部及び腫瘍内部において優先的に、マクロファージに特異的な褐色染色をもたらしたことを示した。しかしながら、腫瘍から離れると（すなわち、「健常」組織では）、ごくわずかな染色が検出された。また、ガン細胞又は他の免疫細胞は、褐色に染色されなかった。

### 【0137】

#### 実施例3

#### 材料及び方法

##### 6-25抗体と共に培養した後のB CLL細胞及びNLCの生存

CLL患者の血液サンプルから単離したPBMCを、5µg/ml精製6-25抗体と共に若しくは5µg/ml精製6-25抗体なしで、又は5µg/mlアイソタイプコントロール（マウスIgG1）と共に6日間培養した。B CLLの枯渇前後に、位相差顕微鏡（20倍）で写真を取得した。マラッセラメラでNLCをカウントした。7AAD及びアネキシンVによる染色、次いでFACS分析によって、生白血球細胞を評価した。

### 【0138】

#### ウエスタンブロット

リコンビナントsideroflexin3の5、10、50又は100ngをウエスタンブロットティングに供し、ウサギポリクローナル抗SFXN3又はマウスモノクローナル抗SFXN3又は6-25抗体又はマウスIgG1アイソタイプを含む10µg/ml抗体溶液によって4で一晚プローブした。洗浄した後、膜を二次抗体溶液（1/10000、HRP）と共に室温で1時間インキュベーションした。次いで、ECLを用いて、視覚化を行った。

### 【0139】

#### 結果

6-25抗体によるウエスタンブロットでは、ヒトリコンビナントsideroflexin3が認識され、バンドは、22kDaのサイズに対応していた。2つの市販の抗体（ウサギポリクローナル抗体及びマウスモノクローナル抗体）によるウエスタンブロットによって、このヒトリコンビナントsideroflexin3の認識をチェックした。これら2つの抗体を用いて2つのバンドが得られたが、その一方は、sideroflexin3のサイズ（22kDa）に対応していた（図3）。

### 【0140】

6-25抗体の機能性を分析するために、本発明者らは、CLL患者のPBMCを、6-25若しくはアイソタイプコントロールと共に、又は6-25若しくはアイソタイプコントロールなしで6日間培養した。6日後、6-25との培養では、NLCの枯渇が示された。B CLLの排除後、枯渇はより明白であった。アイソタイプコントロールとの培養又は抗体なしの培養では、NLC発生は影響を受けなかった。実際、これらの培養では、6-25抗体との培養と比較して、円形の接着細胞が可視化された。次いで、これら3つの培養において、アネキシンV及び7-AADによる染色並びにFACS分析によって、B CLL細胞の生存を分析した。アイソタイプコントロールと共に又はアイソタイプコントロールなしで6日間培養した後では、B CLLの生存率は高く、死細胞はわずか6.4%であった。しかしながら、6-25抗体の存在下では、6日間の培養後、B C

10

20

30

40

50

LLの81.5%が死滅した(図4)。

【0141】

6-25若しくはアイソタイプコントロールと共に、又は6-25若しくはアイソタイプコントロールなしで培養したCLL患者2人由来のPBMCにおいても、NLCをカウントした。6-25との培養では、アイソタイプコントロールとの培養又はアイソタイプコントロールなしの培養と比較して、NLCの数はほぼ0であった(図5)。

## 【表 1】

表 1: 本発明を実施するための有用なヌクレオチド及びアミノ酸配列

配列番号	ヌクレオチドまたはアミノ酸配列
1 (sideroflexin 3 AA 配列)	MESKMGELPL DINIQEPRWD QSTFLGRARH FFTVTDPRNL LLSGAQLEAS RNIVQNYRAG VVTPGITEDQ LWRAKYVYDS AFHPDTGEKV VLIGRMSAQV PMNMTITGCM LTFYRKPTPTV VFWQWVNQSF NAIVNYSNRS GDTPITVRQL GTAYVSATTG AVATALGLKS LTKHLPPLVG RFVPFAAVAA ANCINIPLMR QRELQVGIPV ADEAGQRLGY SVTAAKQGIF QVVISRICMA IPAMAIPPLI MDTLEKKDFL KRRPWLGAPL QVGLVGFCLV FATPLCCALF PQKSSIHISN EPELRAQIH EQNPSVEVVY YNKGL
2 (sideroflexin 3 核酸配列)	ggcacctccc ttaggcgcca gggacagccg agcgttacct ggtccccggc agcggagttc ttaccacc ccagttctgg ttctgacgcc ctagctcatt ccgcaaattt agggcttggg tctggcttgt tccctccgg ctgaaccac ctctctctg agccgagcca gctaccgggg ctctggaat tgccaccct ccctgggcac ccttgagcc tccgtggagg gacgtcacgg ggcagagcgg gacgtgagcc tgagtttct gtaggcgtgc tctgtgtgtt ggctgggttc tgccaatccc cgtgcccacc gggtagggcg ggccgggaag ctctgcccc tcctgctgg tcggcgtcac gcgtgacgtc ccgctgatg gctgggaggg cccggcggcg acagcggagg cagagaggaa ggcggttctg agagctcag agagcgtgg aaagcaaat gggatgaattg ccttagaca tcaacatcca ggaacctcgc tgggacaaa gtactttct gggcagagcc cggcactttt tctactgtac tgatcctcga aatctgctgc tgcggggc acagctggaa gcttctcgga acatcgtgca gaactacagg gccggcgtgg tgacccagg gatcaccgag gaccagctgt ggagggccaa gtatgtgtat gactccgct tcatccgga cacaggggag aaggtggcc tgattggccg catgtcagcc caggtgcca tgaacatgac catcactggc tgcattgctca cattctacag gaagaccca accgtggtgt tctggcagtg ggtgaatcag tcttcaatg ccattgtaa ctactccaac cgcagtggg acactccat cactgtgagg cagctgggga cagcctatgt gagtgccacc actggagctg tggccacggc cctgggactc aaatccctca ccaagcact gccccctg gtcggcagat tttgccctt tgcagcagtg gcagctgcca actgcatcaa catccccctg atgaggcaga gagagctgca ggtagggcacc cgggtggctg atgaggcagg tcagaggctt ggctactcgg tgactgcagc caagcaggga atctccagg tgggtattc aagaatctgc atggcgattc ctgcatggc catcccacca ctgatcatgg aactctgga gaagaaagac ttctgaagc gccgcccctg gctgggggca ccctgcagg tgggactggt gggcttctgc ctggtattg caacccccct gtgctgtgce ctattcccc agaagagctc catacacata agcaacctgg aaccagagct gagagctcag atccatgagc aaaaccccag cgtgaagtg gtctactaca acaaggggct ttgaggaggg tcagcctctg tccccctc cacttcttg ggctgctgct ttagtggagt catgtaccc ctaccactg gctatctgcc tagcactggg caggggcctt ggtgggcaga tggcaattga ggtagcaac ctattaggtt gggggaggga ctccataag gctttctc cttctctgg ttcaaagat cagagcacat aacccctct gtgcttgagt gtccatgcat atacatacat gatacatg tgtatgtgta cattgggtcc tgaagctag aagcaggcat gctagcctag tatgttctga catctggct ccctctcag cctcatgccc acctgctgc cagccaggct acaggtgta ctctctc taaactgta caccagccaa gttattttg atggcacctc atccctcta gaaataggag gagccccagg atctcaggac

10

20

30

40

50

agagacttat agacactagt aggacaaagc gggctgaatc cttcaggttt ctgataccta gctceccaag  
 ctgactgggc tggcagagga gaacatgttg agacaagggg ggcaggggac ttatgcatcc ctcagtgcca  
 tccctgtat cctggaatag ctccatttcc cctcctctc tctaccagac aaaggagtgc ctgtgtcctg  
 tactgcccctc gctgtctccc ccaccacct acttgacagc gtgggcatct teaggcacag ccttgggagt  
 tcttggtgtg ctctgacatc atgacctcaa atctaaatcc tcaatceca actcccttc ccaaacaaaa  
 agccacagag gcagagcaag cattcccctt taagagcttc cactgcacc cctcecaagg gacacagcgg  
 taggaatggt gcttaaactc cacaggtatc agagaggggtg taactaggac atctcaagg gcagctaggc  
 cccgaatgta caatgttaag acagggaatt ttgtgtcca ttgactttt tttttttt taatggagt tcaactttt  
 gccaggtc gagtgcgatg gtgcatctt ggctactgc aacctctgc tctgggttc aagtattct  
 cttgcctcag tctcccgagt agtggaaatt acaggtgtgt gctaccacat ctgtctagt ttgtatttt  
 agcagagatg ggggtttcac catgttggcc aggctagtct cgaactctg acctcaggtg atccacctgc  
 cttggcctcc caaagcactg ggattacaag catgagccac tgtgccagc ctgttccact gacatttct  
 agacattcag caaaacccc accttaacct cttttcttc ttgagggtg gtctgtccc cacctccacc  
 ctcccacccc ctggaagagg aagggcccg gcacagtggt ctagtccaaa taaaatatgg gcttggggat  
 ggaatgggtg gtgtaagt cacagagtgt agttagatcc caactccat gacctctggc ttcagtgtg  
 ggtggggcag ggcagatgaa agggctcag tgggaacctc tgagagcatt ttctgttcc ccctatcaac  
 cgccccagt gataacatct gtgaagccag ccattactca ataaactgca aactgttcta aaaaaaaaaa  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

10

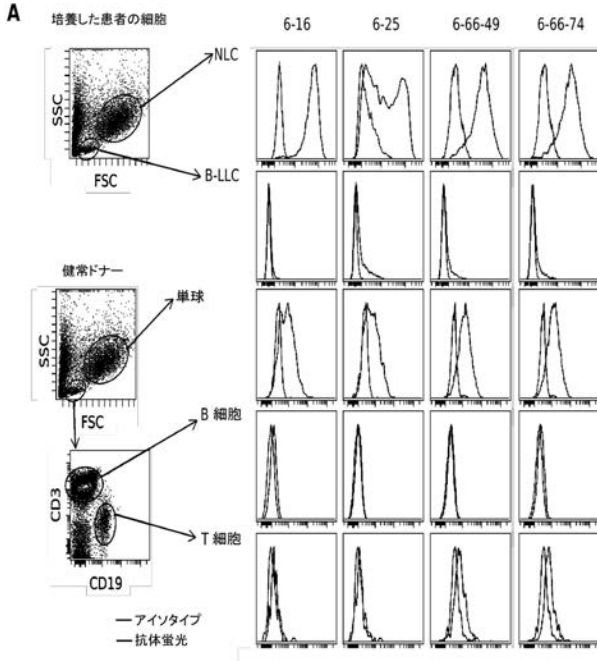
20

## 【 0 1 4 2 】

## 参考文献：

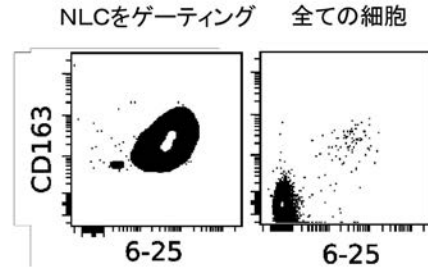
本出願を通して、様々な参考文献が、本発明が関係する技術水準を説明している。これらの参考文献の開示は、参照により本開示に組み入れられる。

【 図 1 A 】



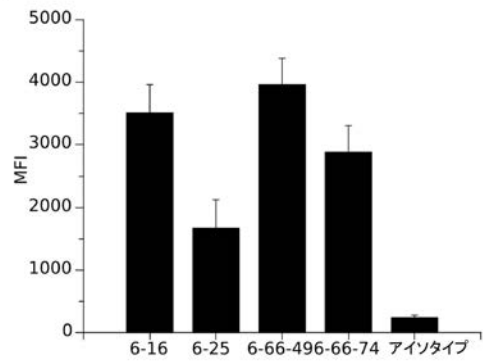
【 図 1 B 】

**B**

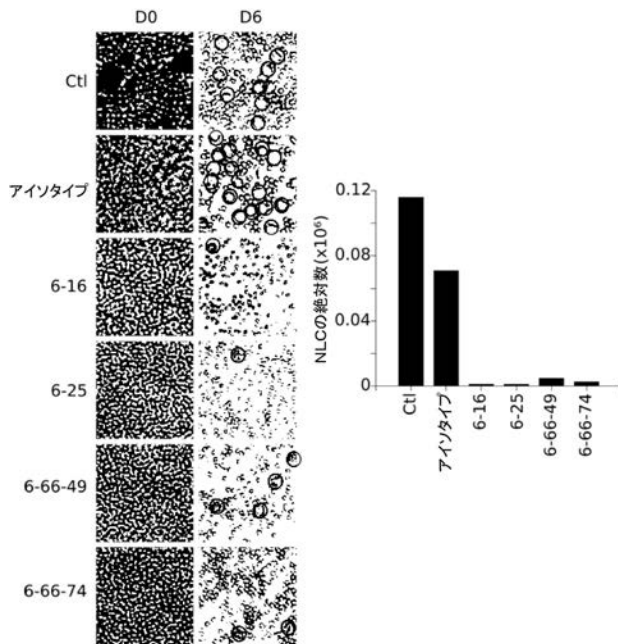


【 図 1 C 】

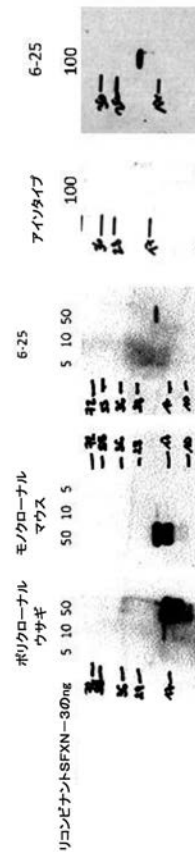
**C**



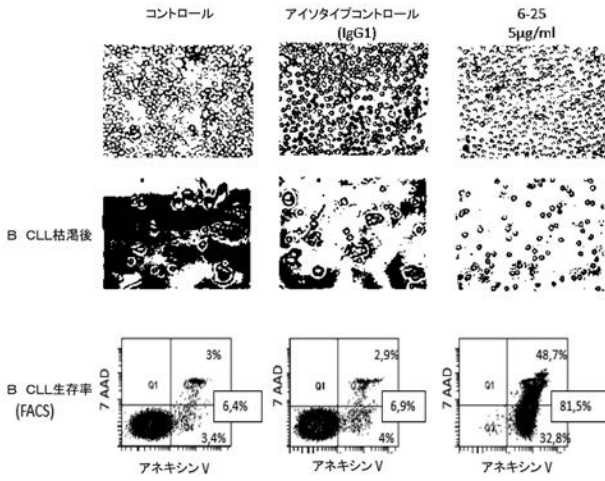
【 図 2 】



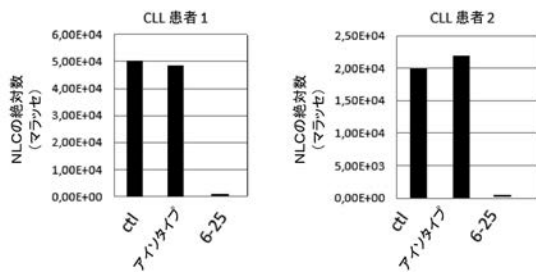
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

[2019528437000001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/069154
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/569 G01N33/574 A61K45/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/043614 A1 (BIONTECH AG [DE]; STRATIFYER MOLECULAR PATHOLOGY GMBH [DE]) 2 April 2015 (2015-04-02) claims 1,4,6	1-7
A	----- Y. W. KOH ET AL: "CSF-1R Expression in Tumor-Associated Macrophages Is Associated With Worse Prognosis in Classical Hodgkin Lymphoma", AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY, vol. 141, no. 4, 11 March 2014 (2014-03-11), pages 573-583, XP055335369, US ISSN: 0002-9173, DOI: 10.1309/AJCPR92TDDFARISU abstract page 573, column 2, last paragraph ----- -/--	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 September 2017		04/10/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Gundlach, Björn

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/069154

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007/140352 A2 (INVITROGEN CORP [US]; LIANG XIQUAN [US]; POPE ROBERT [US]; HAJIVANDI M) 6 December 2007 (2007-12-06) page 51, line 22 - line 23; claims 1,3; table 1; sequence 63 -----	1-7
X	WO 2011/031308 A1 (CYTOKINETICS INC [US]; WEBER BARBARA [US]; WOOSTER RICHARD F [US]) 17 March 2011 (2011-03-17) paragraphs [0008], [0012]; claims 1,2,11,12 -----	8-15
A	WO 2007/116597 A1 (UNIV EHIME [JP]; ABE YASUHITO; MURASE RYUICHI; HAMAKAWA HIROYUKI) 18 October 2007 (2007-10-18) claims 1-3 -----	1-7

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/069154

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015043614 A1	02-04-2015	NONE	
WO 2007140352 A2	06-12-2007	NONE	
WO 2011031308 A1	17-03-2011	NONE	
WO 2007116597 A1	18-10-2007	JP 5358808 B2	04-12-2013
		JP W02007116597 A1	20-08-2009
		WO 2007116597 A1	18-10-2007

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 38/47 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
	A 6 1 K 38/47	
	A 6 1 K 31/7088	
	A 6 1 K 31/713	
	A 6 1 K 31/7105	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

- (71) 出願人 595040744  
 サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシェルシュ・シャンティフィク  
 CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
 フランス国、75016 パリ、リュ・ミシェル・アンジュ 3
- (74) 代理人 110001508  
 特許業務法人 津国
- (72) 発明者 ブーボ, マリー  
 フランス国、31037 トゥールーズ・セデックス・1、セエス・53717、アヴニュ・ユベール・キュリアン 2、アンセルム・ユ1037 - セエールセテ
- (72) 発明者 イセバエル, ロワ  
 フランス国、31037 トゥールーズ・セデックス・1、セエス・53717、アヴニュ・ユベール・キュリアン 2、アンセルム・ユ1037 - セエールセテ
- (72) 発明者 トソリーニ, マリー  
 フランス国、31037 トゥールーズ・セデックス・1、セエス・53717、アヴニュ・ユベール・キュリアン 2、アンセルム・ユ1037 - セエールセテ
- (72) 発明者 フルニエ, ジャン - ジャック  
 フランス国、31037 トゥールーズ・セデックス・1、セエス・53717、アヴニュ・ユベール・キュリアン 2、アンセルム・ユ1037 - セエールセテ
- F ターム(参考) 4C084 AA02 AA13 AA17 BA44 DC22 NA14 ZB261 ZB271 ZC412  
 4C085 AA13 AA14 BB01 CC23 EE01 GG02 GG03 GG04 GG08 GG10  
 4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZB27

专利名称(译)	通过靶向肿瘤相关巨噬细胞治疗癌症的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019528437A</a>	公开(公告)日	2019-10-10
申请号	JP2019504135	申请日	2017-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家健康医学研究院 法国国家科学研究中心		
申请(专利权)人(译)	Ansutichu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 Université电保罗萨巴蒂埃图卢兹特鲁瓦 中心法国国家，香提网络点击		
[标]发明人	プーボマリー フルニエジャンジャック		
发明人	プーボ,マリー イセバエル,ロワ トソリーニ,マリー フルニエ,ジャン-ジャック		
IPC分类号	G01N33/53 A61P35/00 A61K45/00 A61P35/02 A61K39/395 A61K48/00 A61K38/47 A61K31/7088 A61K31/713 A61K31/7105		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.Y A61P35/00 A61K45/00 A61P35/02 A61K39/395.D A61K39/395.E A61K39 /395.N A61K39/395.T A61K48/00 A61K38/47 A61K31/7088 A61K31/713 A61K31/7105		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/DC22 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084 /ZB271 4C084/ZC412 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG08 4C085/GG10 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086 /MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086/ZB27		
优先权	2016305979 2016-07-28 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及通过靶向肿瘤相关巨噬细胞来治疗癌症的方法。为了检测和靶向TAM，我们研究了肿瘤相关巨噬细胞表面暴露的特异性标记。我们已经表明，在正常的巨噬细胞中不存在的sideroflexin3由与肿瘤相关的巨噬细胞表达。这是用于鉴定样品中的肿瘤相关巨噬细胞（TAM）的方法，其包括：i）检测样品中包含的细胞群上CD163，CD68和SFXN3标志物的细胞表面表达；和ii。）得出结论，表达CD163，CD68和SFXN3标记的细胞是TAM。

(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2019-528437 (P2019-528437A)
	(43) 公表日	令和1年10月10日 (2019. 10. 10)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53	D 4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53	Y 4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A G 1 P 35/00	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 P 35/02 (2006.01)</b>	A G 1 K 45/00	
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A G 1 P 35/02	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号	特願2019-504135 (P2019-504135)	(71) 出願人
(22) 出願日	平成29年7月28日 (2017. 7. 28)	591100596
(85) 翻訳文提出日	平成31年2月21日 (2019. 2. 21)	アンステイチュ ナショナル ドク ラ サンテ エ ドク ラ ルシエルシュ メ ディカル
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/069154	フランス国、エフ-75013 パリ、リ ユ・ドゥ・トルビアク 101
(87) 国際公開番号	W02018/019990	(71) 出願人
(87) 国際公開日	平成30年2月1日 (2018. 2. 1)	510139564
(31) 優先権主張番号	16305979.3	ユニヴェルシテ ボール サハティエ ト ゥールーズ トロワ
(32) 優先日	平成28年7月28日 (2016. 7. 28)	フランス共和国 エフ-31062 トゥ ールーズ セアックス 9、 ルート ド ゥ ナルボンヌ 118
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)	
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】	腫瘍関連マクロファージをターゲティングすることによるガン疾患の処置方法	