

(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2008-507530

(P2008-507530A)

(43) 公表日 平成20年3月13日 (2008.3.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く		

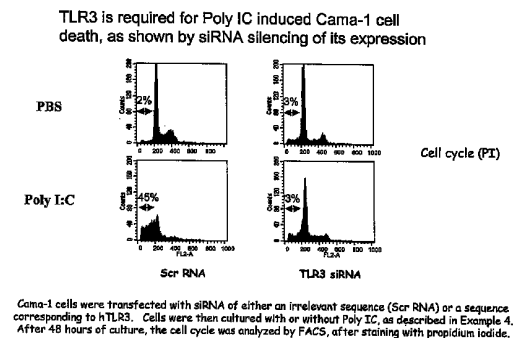
(21) 出願番号	特願2007-522657 (P2007-522657)	(71) 出願人	596129215
(86) (22) 出願日	平成17年7月19日 (2005.7.19)		シェーリング コーポレイション
(85) 翻訳文提出日	平成19年3月16日 (2007.3.16)		Schering Corporation
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/025602		アメリカ合衆国 ニュージャージー 07
(87) 国際公開番号	W02006/014653		033-0530, ケニルワース, ギャロ
(87) 国際公開日	平成18年2月9日 (2006.2.9)		ッピング ヒル ロード 2000
(31) 優先権主張番号	60/589,616	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成16年7月20日 (2004.7.20)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T o l l 様受容体を発現する腫瘍細胞におけるアポトーシスの誘導

(57) 【要約】

いくつかの型の癌細胞は、1つまたはそれより多くの T o l l 様受容体 (T L R) を発現する。これらの T L R が処置の標的である。本発明は、T L R を発現する腫瘍細胞を選択し、そしてその細胞を治療的に有効な量の T L R リガンドと接触させることによって、T o l l 様受容体を発現する癌および腫瘍細胞を処置するための方法に関連する。本発明は特に、T L R 3 アゴニストを用いて、T L R 3 を発現する癌および腫瘍細胞を処置する方法に関連する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

癌を処置するための方法であって、

a) T L Rを発現する癌を有する患者を選択する工程、および

b) 該患者に治療的に有効な量の T L R リガンドを投与する工程

を包含する、方法。

【請求項 2】

前記リガンドがアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

腫瘍細胞のアポトーシスを誘導するための方法であって、

a) T L Rを発現する腫瘍細胞を選択する工程、および

b) 該細胞を、該細胞においてアポトーシスを誘導するのに有効な量の T L R リガンドと接触させる工程

を包含する、方法。

【請求項 4】

前記リガンドがアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

癌を処置するための方法であって、

a) T L R 3を発現する癌を有する患者を選択する工程；および

b) 該患者に治療的に有効な量の T L R 3 リガンドを投与する工程

を包含する、方法。

【請求項 6】

前記リガンドがアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記アゴニストがポリ I C である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記アゴニストがポリ A U である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記アンタゴニストが抗体またはその断片である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 T L R 3 を発現する癌が乳癌である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 T L R 3 を発現する癌が大腸癌である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 12】

前記方法が、前記患者に化学療法剤または癌処置を投与する工程をさらに包含する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 13】

前記方法が、T L R 3 リガンドの投与前に、前記患者に低用量の I 型 I F N を投与する工程をさらに包含する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 14】

腫瘍細胞のアポトーシスを誘導するための方法であって、

a) T L R 3 を発現する腫瘍細胞を選択する工程；および

b) 該細胞を、該細胞においてアポトーシスを誘導するのに有効な量で T L R 3 リガンドと接触させる工程

を包含する、方法。

【請求項 15】

前記リガンドがアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記アゴニストがポリ I C である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

前記アゴニストがポリ A U である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

前記アンタゴニストが抗体またはその断片である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 TLR3 を発現する腫瘍細胞が乳癌細胞である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 TLR3 を発現する腫瘍細胞が大腸癌細胞である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 21】

前記方法が、前記細胞を化学療法剤または癌処置に接触させる工程をさらに包含する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 22】

前記方法が、TLR3 リガンドの投与前に、前記細胞を低用量の I 型 IFN と接触させる工程をさらに包含する、請求項 14 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の引用)

本願は、米国出願第 60 / 589 , 616 号に対する優先権を主張する。

【0002】

(発明の背景)

(発明の分野)

本発明は、TLR を発現する腫瘍細胞を選択し、そしてその細胞を治療的に有効な量の TLR リガンドと接触させることによって、Toll 様受容体 (TLR) を発現する癌および腫瘍細胞を処置するための方法に関連する。本発明は特に、TLR3 アゴニストを用いて、TLR3 を発現する癌および腫瘍細胞を処置するための方法に関連する。

【背景技術】

【0003】

(背景)

癌は、世界中で主な死因の 1 つである。従って、我々がこの致命的な疾患を処置する新規な方法を開発することが必須である。多くの現在の癌治療は、急速に分裂する細胞に影響を与える。これらの治療は、癌細胞のみでなく、胃腸管および毛包の細胞のような、全ての急速に分裂する細胞に影響を与えるので、破壊的な副作用を有する。従って、そのような破壊的な副作用を有さない、新規の処置方法が必要である。本出願は、Toll 様受容体 3 を、癌処置における処置標的として同定する。

【0004】

Drosophila toll タンパク質は、Drosophila 胚において、背側 - 腹側パターン形成を制御し、そして太古からの宿主防御メカニズムを表すとも考えられる。

【0005】

Toll 様受容体 (TLR) と呼ばれる、Drosophila toll のヒト相同体も同定された。ヒトの Toll タンパク質と Drosophila の Toll タンパク質との配列の整列は、このタンパク質鎖の全長にわたって相同性が存在することを示す。よって、TLR はヒトの先天免疫の重要な構成要素であると考えられる。

【0006】

ヒト Toll 様受容体のファミリーは、10 個の高度に保存された受容体タンパク質である TLR1 ~ TLR10 から構成される。Drosophila toll と同様に、ヒト TLR は、病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns; PAMP) を認識するロイシンリッチリピート (LLRR) ドメインからなる細胞外ドメイン、およびヒトインターロイキン - 1 (IL - 1) 受容体の細胞質ドメインと相同的な細胞質ドメインを有する I 型膜貫通タンパク質であ

10

20

30

40

50

る。Drosophila tollおよびIL-1受容体の両方のシグナル伝達経路と同様に、ヒトToll様受容体はNF- κ B経路を介してシグナル伝達する。

【0007】

哺乳類TLRは多くの特徴およびシグナル伝達メカニズムを共有するが、その生物学的機能は非常に異なる。これは、部分的には、4つの異なるアダプター分子(MyD88、TIRAP、TRIF、およびTRAF)が、TLRと様々な組み合わせで会合し、そして異なるシグナル伝達経路を媒介するという事実による。それに加えて、1つのTLRに対する異なるリガンドが、異なるシグナル伝達経路を優先的に活性化し得る。さらに、TLRは、様々な造血系細胞および非造血系細胞において、識別的に発現される。よって、TLRリガンドに対する応答は、TLRによって活性化されるシグナル伝達経路だけでなく、個々のTLRを発現する細胞の性質にも依存する。

10

【0008】

いくつかのTLRのリガンドはまだ同定されていないが、多くのTLR特異的リガンドが既に報告されている。例えば、ポリICおよびポリAUは、どちらもTLR3アゴニストである。

【0009】

ポリイノシン酸 - ポリシチジル酸(ポリIC)は、大きさが不均一な、高分子量合成2本鎖RNAである。ポリICはTLR3アゴニストであるが、抗ウイルス応答および遺伝子の転写後調節に関与する普遍的な酵素であるPKRの強力な活性化因子でもある。

【0010】

ポリアデニル酸 - ポリウリジル酸(ポリAU)は、合成ポリリボヌクレオチドの2本鎖複合体である。ポリAUは、TLR3アゴニストである。ポリAUは、体液性免疫応答および細胞性免疫応答の両方の修飾因子であり、そしてインターフェロンの誘導因子でもある。

20

【0011】

ポリICおよびポリAUはどちらも、乳房、膀胱、腎臓、および胃の癌のような、異なる型の癌でのアジュバント治療としていくつかの臨床試験において使用されたが、これらの薬剤は、本明細書中で開示される新規方法において以前に使用されたことはない。

【0012】

先に述べたように、本出願は、Toll様受容体3を、癌の処置における処置標的として同定する。以下の発表された研究は、TLRとアポトーシスとの間の関係に関連する。

30

【0013】

非特許文献1(Aliprantisら)は、ヒトToll様受容体2(hTLR2)を発現する単球細胞株におけるアポトーシスの誘導に対する細菌リボタンパク質(BLP)の影響を調査する実験について報告する。非特許文献1を参照のこと。

【0014】

Aliprantisらによる別の参考文献(非特許文献2)は、FADDの補充によるカスパーゼ8の活性化の誘発におけるTLR2の役割に関連する。非特許文献2を参照のこと。

【0015】

非特許文献3(Sabroeら)は、好中球の生存におけるTLR2の役割に関連する。非特許文献3を参照のこと。

40

【0016】

非特許文献4(BannermanおよびGoldblum)は、細菌リボ多糖(LPS)受容体としてTLR4およびTLR2を示す研究に関連する。非特許文献4を参照のこと。

【0017】

非特許文献5(Meyerら)は、ヒト上皮細胞株(HeLaS3)、ケラチノサイト(HaCaTおよびA431細胞)、およびマウス線維芽細胞(McCoys細胞)におけるTLR7アゴニストによるアポトーシスの誘導についての研究に関連する。非特許文献

50

5を参照のこと。

【0018】

非特許文献6(Wenら)は、糖尿病が、先天免疫受容体であるTLR3の発現を介した、膵島によるウイルス様刺激の直接認識の組み合わせによって部分的に誘導されることを示唆する。Wenらはまた、ポリICによるアポトーシスの誘導がおそらくTLR3によって媒介されることを推測する。非特許文献6を参照のこと。

【0019】

最後に、非特許文献7(Hanら)は、TRIFを過剰発現する293細胞におけるアポトーシスの誘導に関連する。非特許文献7はまた、TLR3によって活性化される、TRIF誘導細胞内シグナル伝達経路(ISRE/IFN、NF Bおよびアポトーシス)の提案されたモデルに言及する。非特許文献7を参照のこと。

【非特許文献1】Aliprantisら、「Cell Activation and Apoptosis by Bacterial Lipoproteins Through Toll-like Receptor-2」、Science、第285巻、736-739頁(1999年7月30日)

【非特許文献2】Aliprantisら、「The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2」、Embo J.、第19(13)巻、3325-3336頁(2000)

【非特許文献3】Sabroeら、「Selective Roles for Toll-Like Receptor(TLR)2 and TLR4 in the Regulation of Neutrophil Activation and Life Span」、J. Immunology、第170巻、5268-5275頁(2003)

【非特許文献4】BannermanおよびGoldblum、「Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis」、Am. J. Physiology Lung Cell Molecular Physiology、第284巻、L899-L914頁(2003)

【非特許文献5】Meyerら、「Induction of apoptosis by Toll-like Receptor-7 agonist in tissue cultures」、British J. Dermatology、第149巻(supp. 66)、9-13頁(2003)

【非特許文献6】Wenら、「The Effect of Innate Immunity on Autoimmune Diabetes and the Expression of Toll-Like Receptors on Pancreatic Islets」、J. Immunology、第172巻、3173-3180頁(2004)

【非特許文献7】Hanら、「Mechanisms of the TRIF-induced Interferon-stimulated Response Element and NF-B Activation and Apoptosis Pathways」、J. Biological Chemistry、第279巻、第15号、15652-15661頁(2004)

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0020】

(発明の要旨)

本発明の実施態様は、a)TLRを発現する癌を有する患者を選択する工程、およびb)その患者に、治療的に有効な量のTLRリガンドを投与する工程を包含する、癌を処置するための方法を提供する。好ましくは、そのリガンドはアゴニストまたはアンタゴニス

10

20

30

40

50

トである。

【 0 0 2 1 】

本発明の別の実施態様は、a) T L Rを発現する腫瘍細胞を選択する工程、およびb) その細胞を、その細胞においてアポトーシスを誘導するために有効な量のT L Rリガンドと接触させる工程を包含する、腫瘍細胞のアポトーシスを誘導するための方法を提供する。好ましくは、そのリガンドはアゴニストまたはアンタゴニストである。

【 0 0 2 2 】

本発明の別の実施態様は、a) T L R 3を発現する癌を有する患者を選択する工程、およびb) その患者に、治療的に有効な量のT L R 3リガンドを投与する工程を包含する、癌を処置するための方法を提供する。好ましくは、そのリガンドはアゴニストまたはアンタゴニストである。より好ましくは、そのアゴニストはポリA Uである。最も好ましくは、そのアゴニストはポリI Cである。あるいは、そのアンタゴニストは抗体またはその断片である。好ましくは、T L R 3を発現する癌は大腸癌である。最も好ましくは、T L R 3を発現する癌は乳癌である。その方法はさらに、患者に化学療法剤または癌処置を投与することを含み得る。その方法はまたさらに、T L R 3リガンドの投与前に、患者に低用量のI型I F Nを投与することを含み得る。

10

【 0 0 2 3 】

本発明の別の実施態様は、a) T L R 3を発現する腫瘍細胞を選択する工程、およびb) その細胞を、その細胞においてアポトーシスを誘導するために有効な量のT L R 3リガンドと接触させる工程を包含する、腫瘍細胞のアポトーシスを誘導するための方法を提供する。好ましくは、そのリガンドはアゴニストまたはアンタゴニストである。より好ましくは、そのアゴニストはポリA Uである。最も好ましくは、そのアゴニストはポリI Cである。あるいは、そのアンタゴニストは抗体またはその断片である。好ましくは、T L R 3を発現する腫瘍細胞は大腸癌細胞である。最も好ましくは、T L R 3を発現する腫瘍細胞は乳癌細胞である。その方法はさらに、その細胞を化学療法剤または癌処置と接触させることを含み得る。その方法はまたさらに、T L R 3リガンドの投与前に、細胞を低用量のI型I F Nと接触させることを含み得る。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 2 4 】

本発明の前述および他の特徴は、以下の発明の詳細な説明および図面の簡単な説明からより容易に明らかである。

30

【 0 0 2 5 】

(発明の詳細な説明)

本明細書中で引用された全ての刊行物は、その全体が参考として援用される。

【 0 0 2 6 】

(定義)

「アポトーシス」という用語は、プログラム細胞死を意味する。

【 0 0 2 7 】

「アゴニスト」という用語は、受容体に結合し、そして活性化し得るリガンドを意味する。

40

【 0 0 2 8 】

「アンタゴニスト」という用語は、受容体に結合し、そして受容体をブロックまたは不活性化し得るリガンドを意味する。あるいは、「アンタゴニスト」は、アゴニストが受容体に結合するのを防止するように、アゴニストに結合し、そしてアゴニストをブロックまたは不活性化し得る。

【 0 0 2 9 】

「抗体」という用語は、免疫グロブリン全体、すなわちF_c断片に結合した2つのF_a断片を含むものを意味する。「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、霊長類化(primatized)抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体を包含する。「抗体」という用語は、免疫グロブリンの5つの主要なクラス(Ig

50

A、IgD、IgE、IgGおよびIgM)および免疫グロブリンのサブクラス(アイソタイプ、すなわちIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgAおよびIgA2)のいずれか1つを含む。

【0030】

「抗体断片」という用語は、F_ab断片、F_c断片、F_(a b)₂断片およびF_v断片のような、免疫グロブリン全体の任意の断片または断片の組み合わせを意味する。

【0031】

「癌」という用語は、代表的に未制御の細胞増殖によって特徴付けられる生理学的状態を記述する。癌の例は、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫および白血病を含むがこれらに限定されない。より具体的な例は、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、大腸癌、直腸結腸癌、子宮内膜癌、唾液腺癌腫、腎臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、および様々な型の頭部および頸部癌を含む。

【0032】

「化学療法剤」という用語は、癌の処置に有用な化学的化合物を意味する。

【0033】

「処置」という用語は、任意の臨床的に望ましいまたは有用な効果を引き起こす、疾患または異常の処置的、予防的または抑制的な手段を意味し、1つまたはそれより多くの症状の緩和、疾患または障害の進行の後退、遅延、または休止を含むがこれらに限定されない。

【0034】

「siRNA」という用語は、短い干渉RNAを意味する。

【0035】

「TLR」という用語は、Toll様受容体を意味する。TLRは、Toll様受容体の任意の種であり得る。好ましくは、その用語は、TLR1~TLR10の1つのような、ヒトToll様受容体(hTLR)を指す。

【0036】

「TLRを発現する癌」という用語は、Toll様受容体を発現する細胞を含む腫瘍を意味する。

【0037】

「TLRを発現する腫瘍細胞」という用語は、Toll様受容体を発現する腫瘍細胞を意味する。

【0038】

「発現する(express)」、「発現する(expresses)」、「発現」、および「発現している」という用語は全て、ポリペプチドを産生するための核酸の転写および翻訳を意味する。細胞において、これはそのポリペプチドが分泌されるか、細胞質にとどまるか、または少なくとも部分的に細胞膜に存在するかのいずれかであることを意味する。

【0039】

「リガンド」という用語は、受容体のような、別の分子に特異的に結合し得る任意の分子を意味する。「リガンド」という用語は、アゴニストおよびアンタゴニストの両方を含む。「リガンド」は例えば、低分子(有機分子)、抗体または抗体断片、siRNA、アンチセンス核酸、ポリペプチド、DNAおよびRNAであり得る。

【0040】

「TLRリガンド」という用語は、Toll様受容体、特にヒトTLR1~TLR10に特異的に結合し得る任意の分子を意味する。「TLRリガンド」という用語は、TLRのアゴニストおよびアンタゴニストの両方を含む。「TLRリガンド」は例えば、低分子(有機分子)、抗体または抗体断片、siRNA、アンチセンス核酸、ポリペプチド、DNAおよびRNAであり得る。

【0041】

10

20

30

40

50

「対応する TLR リガンド」という用語は、特定の TLR に結合するリガンドを意味する。例えば、TLR 1 リガンドは、TLR 1 の対応する TLR リガンドである。同様に、TLR 2 リガンドは、TLR 2 の対応する TLR リガンドである。この同じ原理が TLR 3 ~ TLR 10 にもあてはまる。

【0042】

「患者」という用語は、ヒトおよび非ヒト動物の両方を意味する。

【0043】

「ポリ IC」という用語は、ポリイノシン酸 - ポリシチジル酸を意味する。

【0044】

「ポリ AU」という用語は、ポリアデニル酸 - ポリウリジル酸を意味する。

10

【0045】

「治療的に有効な量」という用語は、癌のような、TLR によって引き起こされる、または媒介される医学的状态を特徴付ける 1 つまたはそれより多くのパラメーターを緩和する、TLR リガンドのような組成物の量を意味する。

【0046】

「有効量 (effective amount)」および「有効な量 (amount effective)」という用語は、細胞におけるアポトーシスの誘導のような、ある効果を引き起こす、TLR リガンドのような医薬品組成物の量を意味する。

【0047】

「低用量」という用語は、処置的效果のようなある効果を達成するために普通であると考えられるより低い物質の量を意味する。

20

【0048】

(Toll 様受容体 (TLR) の特徴付け)

ヒト Toll 様受容体 (hTLR) のファミリーは、10 個のメンバー hTLR 1 ~ hTLR 10 から構成される。hTLR 1 ~ hTLR 10 のそれぞれの完全なオープンリーディングフレームのヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列は、当該分野で公知である。例えば、hTLR 1 ~ hTLR 10 の配列は PCT 公開第 WO 01 / 90151 において開示されるが、その配列は公の命名法と異なって番号が付けられている。hTLR 1 ~ hTLR 10 のそれぞれのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列はまた、下記の表 1 において示すように、GenBank (登録商標) データベースにおいても見出され得る。

30

【0049】

【表 1】

表 1

TLR	ヌクレオチド配列の GenBank 番号	アミノ酸配列の GenBank 番号
HTLR1	NM 003263	NP 003254
HTLR2	NM 003264	NP 003255
HTLR3	NM 003265	NP 003256
HTLR4	NM 138557 (アイソフォーム 4) NM 138556 (アイソフォーム 2) NM 138554 (アイソフォーム 1) NM 003266 (アイソフォーム 3)	NP 612567 (アイソフォーム D) NP 612566 (アイソフォーム B) NP 612564 (アイソフォーム A) NP 003257 (アイソフォーム C)
HTLR5	NM 003268	NP 003259
HTLR6	NM 006068	NP 006059
HTLR7	NM 016562	NP 057646
HTLR8	NM 138636 (アイソフォーム 2) NM 016610 (アイソフォーム 1)	NP 619542 (アイソフォーム 2) NP 057694 (アイソフォーム 1)
HTLR9	NM 138688 (アイソフォーム B) NM 017442 (アイソフォーム A)	NP 619633 (アイソフォーム B) AAF72189 (アイソフォーム A)
hTLR10	NM 030956	AAK26744

10

20

30

当業者は、任意の TLR の核酸配列およびアミノ酸配列を考慮して、標準的な分子生物学の技術を用いて、任意の TLR タンパク質またはその断片、そのタンパク質または断片に対する抗体、核酸またはその断片、核酸プローブ、アンチセンス、siRNA 等を産生し得る。これらの分子を次いで TLR を発現する癌または腫瘍細胞を選択するために使用し得る。

【0050】

下記の表 2 で示すように、いくつかの TLR リガンドが同定された。当業者は、下記のリガンドのいずれも単離または産生し得る。あるいは、そのリガンドを市販の供給源から購入し得る。

【0051】

【表 2】

表 2

TLR	リガンド
TLR1	マイコプラズマリポペプチド (ジアシル化リポタンパク質) (Sigma-Aldrich)
TLR2	マイコプラズマリポペプチド (ジアシル化リポタンパク質) (Sigma-Aldrich), 細菌性リポペプチド (Sigma-Aldrich)
TLR3	dsRNA (Invivogen), ポリアデニル酸-ポリウリジル酸 (ポリ AU) (Invivogen), ポリイノシン酸-ポリシチジル酸 (ポリ IC) (Invivogen)
TLR4	LPS (Sigma-Aldrich)
TLR5	フラジェリン (Calbiochem)
TLR6	細菌性リポペプチド (Sigma-Aldrich)
TLR7	イミキモッド (Aldara®) (3M Pharmaceuticals), R848 (3M Pharmaceuticals)
TLR8	R848 (3M Pharmaceuticals)
TLR9	CpG DNA (MWG Biotech)
TLR10	未知

10

20

TLRは、免疫応答のメディエーターとして機能する。従って、TLRの処置的適用は、腫瘍学、感染性疾患、自己免疫、アレルギー、喘息、COPDおよび心臓病学の分野に存在する。

【0052】

本発明は、部分的には、ある型の腫瘍細胞はToll様受容体を発現すること、およびこれらのTLRへのリガンド結合は、腫瘍に対する免疫応答の確立を助け、そしてその有効性を改善するという知見に基づく。

30

【0053】

(TLRを発現する癌または腫瘍細胞の選択)

本発明の方法の工程は、TLRを発現する癌を有する患者を選択すること、またはTLRを発現する腫瘍細胞を選択することを含む。

【0054】

「選択すること」という用語は、目的の何かを同定することを意味する。本適用の文脈において、「患者を選択すること」という語句は、TLRを発現する癌のような、特定の特徴を有する患者を同定することを意味する。「TLRを発現する腫瘍細胞を選択すること」という語句は、Toll様受容体を発現する腫瘍細胞を同定することを意味する。

40

【0055】

当該分野において公知であるように、TLRを発現する癌を有する患者を選択する、またはTLRを発現する腫瘍細胞を選択する多くの方法が存在する。例えば、TLRを発現する腫瘍細胞に結合し、そしてそれを同定するために、抗体または抗体断片を使用し得る。好ましくは、TLR3を発現する腫瘍細胞に結合し、そしてそれを同定するためにTLR3抗体を使用する。抗体またはその断片を、医薬品組成物においてインビボで、またはインビトロで投与し得る。好ましくは、患者に対して生検を実施し、そして腫瘍細胞をインビトロで選択する。そうでなければTLRリガンド処置のプロトコールに含まれない患者を補充する潜在的な手段として、生検の前にTLRの発現を増加させることも可能である。TLR3の場合、低用量のI型IFNまたはTLR3リガンド自身を、生検前、または他のあらゆる診断的手順(穿刺吸引または医学的映像)の前に、数日間投与し得る。あ

50

るいは、この出願の表 2 において同定された T L R リガンドのいずれか 1 つ、または他の低分子を、T L R を発現する腫瘍細胞に結合し、そしてそれを同定するために使用し得る。好ましくは、T L R 3 を発現する細胞に結合し、そしてそれを同定するために T L R 3 リガンドを使用する。再び、選択工程を好ましくはインビトロで行う。さらに、腫瘍細胞を溶解して、その細胞が増加したレベルの特定の T L R タンパク質（ウェスタンブロットによって）、または特定の T L R R N A（ノーザンブロットによって）を示すかどうかを決定し得る。

【 0 0 5 6 】

選択過程は、検出可能な標識の使用を含み得る。例えば、上記の抗体、抗体断片、低分子、D N A、R N A、および他のリガンドを、検出するために標識する必要がある。10 検出は視覚的に、またはデバイスの使用によって達成され得る。当該分野で通常使用される検出可能な標識は、例えば放射性標識、蛍光標識、および酵素的標識を含むが、任意の検出可能な標識を使用し得る。

【 0 0 5 7 】

T L R を発現する腫瘍細胞を同定することに加えて、選択工程はおそらく特定の腫瘍細胞がどの T o l l 様受容体（T L R 1 ~ T L R 1 0）を発現しているかを同定する。これは、T L R を発現する腫瘍細胞を選択するために使用される多くの抗体、抗体断片、D N A、R N A、低分子、または他のリガンドが、T L R 1 ~ T L R 1 0 のうちの個々の T L R に特異的に結合するという事実による。

【 0 0 5 8 】

T L R を発現する癌を有する患者を選択する、または T L R を発現する腫瘍細胞を選択する工程を、間接的な様式でも実施し得る。例えば、癌による特定の T L R の発現を、特定の病因を有する癌の特定のサブタイプと関連させ得る。ウイルスのような、この特定の病因の任意のマーカーは、所定の T L R の発現を示し得、そして対応する T L R リガンドの使用を導く有用なマーカーであり得る。20

【 0 0 5 9 】

（患者への T L R リガンドの投与）

本発明の方法の別の工程は、患者に、治療的に有効な量の T L R リガンドを投与することを含む。この工程は、T L R リガンドを医薬品組成物中で投与することを含む。例えば、30 医薬品組成物は、錠剤の形式であり得、その結果、リガンドが血流中に吸収される。次いで循環系によって T L R リガンドが T L R を発現する癌へと送達され得、その結果、リガンドと癌とがお互いに接触し得る。この接触工程が、リガンドが癌の T o l l 様受容体に結合し、そして癌における増殖阻害およびアポトーシスを誘導することを可能にする。あるいは、黒色腫の処置のためのように、医薬品組成物を局所的（l o c a l l y）または表面（t o p i c a l l y）に投与し得る。

【 0 0 6 0 】

上記で述べたように、選択工程はおそらく、その癌が発現している特定の T L R を同定する。好ましくは、投与工程は、T o l l 様受容体を発現する癌を有する患者に、対応するリガンドを投与することを含む。例えば、癌が T L R 1 を発現しているなら、好ましくは患者に有効な量の T L R 1 リガンドを投与する。同様に、癌が T L R 2 を発現している40 なら、好ましくは患者に有効な量の T L R 2 リガンドを投与する。同じ原理が T L R 3 ~ T L R 1 0 にもあてはまる。

【 0 0 6 1 】

好ましくは、本発明の方法は、T L R 3 を発現する癌を有する患者に、有効な量の T L R 3 リガンドを投与することを含む。好ましくは、T L R 3 リガンドはアゴニストである。より好ましくは、T L R 3 リガンドはポリ A U である。最も好ましくは、T L R 3 リガンドはポリ I C である。好ましくは、癌は大腸癌細胞または乳癌である。

【 0 0 6 2 】

好ましくは、本発明の方法はさらに、患者に化学療法剤または癌処置を投与することを含む。50

【 0 0 6 3 】

好ましくは、本発明の方法はさらに、患者に低用量のⅠ型ⅠＦＮまたはＴＬＲ３リガンドを投与することを含む。例えば、低用量のⅠ型ⅠＦＮは１～３ＭＵの範囲であり、そして好ましくは２ＭＵである。より好ましくは、低用量のⅠ型ⅠＦＮは１ＭＵより少ない。

【 0 0 6 4 】

（ＴＬＲを発現する腫瘍細胞とＴＬＲリガンドとの接触）

あるいは、本発明の方法の工程は、ＴＬＲを発現する腫瘍細胞を、有効な量のＴＬＲリガンドと接触させることを含む。インビボにおいて、接触工程は、ＴＬＲリガンドを医薬品組成物中で患者に投与することを含む。インビトロにおいて、接触工程は、ＴＬＲを発現する腫瘍細胞およびＴＬＲリガンドを、リガンドと細胞とがお互いに接触し得るように、物理的に近づけることを含む。この接触工程は、リガンドが細胞のＴｏｌｌ様受容体に結合し、そして腫瘍細胞において増殖阻害およびアポトーシスを誘導することを可能にする。

10

【 0 0 6 5 】

上記で述べたように、選択工程はおそらく、その腫瘍細胞が発現している特定のＴＬＲを同定する。好ましくは、接触工程は、Ｔｏｌｌ様受容体を発現する細胞を、対応するリガンドと接触させることを含む。例えば、腫瘍細胞がＴＬＲ１を発現しているなら、好ましくは細胞を有効な量のＴＬＲ１リガンドと接触させる。同様に、腫瘍細胞がＴＬＲ２を発現しているなら、好ましくは細胞を有効な量のＴＬＲ２リガンドと接触させる。同じ原理がＴＬＲ３～ＴＬＲ１０にもあてはまる。

20

【 0 0 6 6 】

好ましくは、本発明の方法は、ＴＬＲ３を発現する腫瘍細胞を、有効な量のＴＬＲ３リガンドと接触させることを含む。好ましくは、ＴＬＲ３リガンドはアゴニストである。より好ましくは、ＴＬＲ３リガンドはポリＡＵである。最も好ましくは、ＴＬＲ３リガンドはポリＩＣである。好ましくは、細胞は大腸癌細胞または乳癌細胞である。

【 0 0 6 7 】

好ましくは、本発明の方法はさらに、細胞を化学療法剤または癌処置と接触させることを含む。

【 0 0 6 8 】

好ましくは、本発明の方法はさらに、細胞を低用量のⅠ型ⅠＦＮまたはＴＬＲ３リガンドと接触させることを含む。例えば、低用量のⅠ型ⅠＦＮは１～３ＭＵの範囲であり、そして好ましくは２ＭＵである。より好ましくは、低用量のⅠ型ⅠＦＮは１ＭＵより少ない。

30

【 0 0 6 9 】

（ポリペプチド）

抗体、抗体断片またはリボペプチドのようなポリペプチドを、本発明の方法において、ＴＬＲを発現する癌または細胞を選択するために選択工程において、ＴＬＲリガンドを患者に送達するために投与工程において、またはＴＬＲ発現細胞において増殖阻害およびアポトーシスを誘導するために接触工程において使用し得る。それに加えて、ＴＬＲに結合する（抗体のような）リガンドを同定または産生するために、ＴＬＲポリペプチドまたはその断片を産生し得る。

40

【 0 0 7 0 】

本明細書中で使用される場合、「ポリペプチド」または「ペプチド」という用語は、例えば完全なタンパク質の残基の全数までおよびそれを含んで、少なくとも８個、好ましくは少なくとも１２個、より好ましくは少なくとも２０個、そして最も好ましくは少なくとも３０個またはそれより多くの連続的なアミノ酸残基を含むポリペプチドの断片または部分を意味する。「ポリペプチド」という用語はまた、欠失体、付加体、修飾体、置換体、アナログ、変異体、および糖鎖付加ポリペプチドまたは非糖鎖付加ポリペプチドを含む。

【 0 0 7 1 】

置換は、保存的置換および非保存的置換の両方を含む。

50

【 0 0 7 2 】

アミノ酸残基の修飾は、カルボキシル末端またはカルボキシル側鎖を含む残基の脂肪族エステルまたはアミド、ヒドロキシル基を含む残基の O - アシル誘導体、およびアミノ末端アミノ酸またはアミノ基を含む残基、例えばリジンまたはアルギニンの N - アシル誘導体を含み得るがこれに限らない。

【 0 0 7 3 】

アナログは、非天然 (unnatural) アミノ酸残基、またはホスホチロシン残基、ホスホセリン残基、もしくはホスホスレオニン残基のようなリン酸化アミノ酸残基の組み込みのような修飾を含むポリペプチドである。他の可能性のある修飾は、スルホン化、ビオチン化、または他の部分、特にリン酸基と類似の分子形状を有するものの付加を含む

10

【 0 0 7 4 】

ポリペプチドの合成の技術は、例えば Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149 (1963); Merrifield, Science 232: 341 (1986); および Athertonら、Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach、1989、IRL Press、Oxfordにおいて記載されている。

【 0 0 7 5 】

ポリペプチドのアナログを、化学的合成によって、または部位特異的変異誘導 [Gillmanら、Gene 8: 81 (1979); Robertsら、Nature 328: 731 (1987) または Innis (編)、1990、PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications、Academic Press、New York、NY]、または完全な受容体をコードする核酸を修飾するために、Daughertyら [Nucleic Acids Res. 19: 2471 (1991)] によって例示されたように、ポリメラーゼ連鎖反応法 [PCR; Saikiら、Science 239: 487 (1988)] を用いることによって調製し得る。組み換え産物の精製または検出のために、エピトープタグを加えることを想定する。

20

【 0 0 7 6 】

(核酸)

30

TLR を発現する癌を有する患者を選択するために、または TLR を発現する腫瘍細胞を選択するために、核酸を使用し得る。患者を選択するために、好ましくは患者の腫瘍の生検を行う。次いで、その腫瘍細胞を、インビトロで TLR 核酸の発現に関して分析し得る。

【 0 0 7 7 】

この出願の表 1 において示すように、hTLR1 ~ hTLR10 のそれぞれの核酸配列およびアミノ酸配列は、当該分野で公知である。当業者は、特定の腫瘍細胞が TLR 核酸を発現しているかどうかを決定するためのハイブリダイゼーションアッセイを行うために、公知の配列またはその断片を使用し得る。例えば、特定の TLR の公知の配列を使用して、当業者は、腫瘍細胞がその特定の TLR を発現しているかどうかを決定するためにノーザンブロット分析を行い得る。

40

【 0 0 7 8 】

それに加えて、特定の TLR またはその断片をコードする核酸を使用して、TLR ポリペプチドを産生し得る。次いでその TLR ポリペプチドを使用して、特定の TLR に対する抗体を産生し得る。

【 0 0 7 9 】

核酸「断片」は、本明細書中で、少なくとも 17、一般的に少なくとも 25、好ましくは少なくとも 35、より好ましくは少なくとも 45、そして最も好ましくは少なくとも 55 またはそれより多くの連続的なヌクレオチドを含むヌクレオチド配列として定義される。

50

【0080】

核酸の操作および発現の一般的な技術が、例えばSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版)、1989、第1-3巻、Cold Spring Harbor Laboratoryにおいて一般的に記載されている。

【0081】

(抗体産生)

TLRに特異的な抗体およびその断片を、本発明の方法の、TLR発現細胞を選択するために選択工程において、TLRリガンドを患者に送達するために投与工程において、またはTLR発現細胞において増殖阻害およびアポトーシスを誘導するために接触工程において使用し得る。

10

【0082】

個々のTLRの抗原性(すなわち免疫原性)断片を産生し得る。それらがTLRリガンドに結合するかどうかに関わらず、そのような断片は、完全な受容体と同様、完全な受容体に結合し得る抗体を調製するための抗原として有用である。より短い断片をキャリアに連結または結合し得る。エピトープは一般的に少なくとも5つ、好ましくは少なくとも8個のアミノ酸残基を含むことが当該分野で周知であるので[Ohnoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:2945(1985)]、抗体の産生に使用される断片は、一般的に少なくともそのサイズである。好ましくは、それらは、上記で記載したように、さらにより多くの残基を含む。所定の断片が免疫原性かどうかを、慣用的な実験によって容易に決定し得る。

20

【0083】

免疫学的にコンピテントな宿主において抗体産生を誘導するために完全なTLRを抗原として使用する場合には一般的に必要なが、より小さい抗原性断片は、好ましくは免疫原性キャリア分子(すなわち、宿主動物において独立に免疫学的応答を惹起する性質を有する高分子)への架橋または連結によって、または結合によって、最初により免疫原性にする。小さいポリペプチド断片は、ハプテン(抗体に特異的に結合し得るが、抗体産生を誘導できない分子、すなわち、それらは免疫原性ではない)として作用することがあるので、キャリア分子への架橋または結合が必要であり得る。そのような断片の免疫原性キャリア分子への結合は、「キャリア効果」として通常公知であるものによって、それらをより免疫原性にする。

30

【0084】

適切なキャリア分子としては、例えばタンパク質およびポリペプチド、多糖類、リポ多糖類等のような、天然または合成のポリマー化合物が挙げられる。キーホールリンペットヘモシアニン、ならびにヒトまたはウシのガンマグロブリン、ヒト、ウシ、またはウサギの血清アルブミン、またはそのようなタンパク質のメチル化または他の誘導体のような、哺乳類血清タンパク質を含むがこれらに限定されない、タンパク質キャリア分子が特に好ましい。他のタンパク質キャリアは、当業者に明らかである。好ましくは、そのタンパク質キャリアは、断片に対する抗体が惹起される宿主動物に対して外来性であるが、その必要はない。

40

【0085】

キャリア分子に対する共有結合を、当該分野で周知の方法を用いて達成し得、その正確な選択は、使用されるキャリア分子の性質によって指示される。免疫原性キャリア分子がタンパク質である場合、本発明の断片を、例えばジシクロヘキシルカルボジイミドのような、水溶性カルボジイミドまたはグルタルアルデヒドを用いて結合し得る。

【0086】

これらのような結合薬剤を、別のキャリア分子を用いることなく、断片をそれ自身に架橋するためにも使用し得る。そのような凝集物への架橋も、免疫原性を増加させ得る。単独で、または結合もしくは凝集と組み合わせて、公知のアジュバントを使用することによっても、免疫原性を増加させ得る。

50

【 0 0 8 7 】

動物をワクチン接種するために適切なアジュバントとしては、アジュバント 6 5 (ピーナッツオイル、マンナイドモノオレエート、およびモノステアリン酸アルミニウムを含む) ; フロイント完全または不完全アジュバント ; 水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムおよびミョウバンのようなミネラルゲル ; ヘキサデシルアミン、オクタデシルアミン、リゾレシチン、臭化ジメチルジオクタデシルアンモニウム、N , N - ジオクタデシル - N ' , N ' - ビス (2 - ヒドロキシメチル) プロパンジアミン、メトキシヘキサデシルグリセロールおよびプルロニックポリオールのような界面活性剤 ; ピラン、硫酸デキストラン、ポリ IC、ポリアクリル酸およびカルボポールのようなポリアニオン ; ムラミルジペプチド、ジメチルグリシンおよびタフトシンのようなペプチド ; およびオイルエマルジョンが挙げられるがこれらに限定されない。ポリペプチドも、リボソームまたは他のマイクロキャリアへ組み込んだ後、投与し得る。

10

【 0 0 8 8 】

アジュバントおよびイムノアッセイの様々な局面に関する情報が、例えば、P . T i j s s e n , P r a c t i c e a n d T h e o r y o f E n z y m e I m m u n o a s s a y s , 第 3 版、1 9 8 7、Elsevier、New York によるシリーズにおいて開示されている。ポリクローナル抗血清を調製する方法を含む他の有用な参考文献は、Microbiology、1 9 6 9、Hoeber Medical Division、Harper and Row ; Landsteiner、Specificity of Serological Reactions、1 9 6 2、Dover Publications、New York、およびWilliamsら、Methods in Immunology and Immunochemistry、第 1 巻、1 9 6 7、Academic Press、New York を含む。

20

【 0 0 8 9 】

標準的な方法を用いて免疫された動物からの血清を直接使用し得る、または I g G 画分を、血漿分離交換法または固定化プロテイン A のような I g G 特異的吸着剤を用いた吸着クロマトグラフィーのような、標準的な方法を用いて血清から分離し得る。あるいは、モノクローナル抗体を調製し得る。

【 0 0 9 0 】

T L R またはその抗原性断片に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、周知の技術によって産生する。通常、その過程は、不死化細胞株と、望ましい抗体を産生する B リンパ球との融合を含む。あるいは、不死の抗体産生細胞株を産生する、非融合技術、例えばウイルスにより誘導されたトランスフォーメーション [C a s a l l i ら、Science 2 3 4 : 4 7 6 (1 9 8 6)] を使用し得る。不死化細胞株は、通常トランスフォーメーションされた哺乳類細胞、特にげっ歯類、ウシ、およびヒト起源の骨髓腫細胞である。最も多くの場合、利便性および入手可能性の問題として、ラットまたはマウスの骨髓腫細胞株を採用する。

30

【 0 0 9 1 】

抗原を注射した哺乳類から抗体産生リンパ球を得る技術は周知である。一般的に、ヒト起源の細胞を採用するなら、末梢血リンパ球 (P B L) を使用する、または非ヒト哺乳類の供給源からは脾臓またはリンパ節細胞を使用する。宿主動物に、精製抗原の反復投与量を注射し (ヒト細胞をインビトロで感作する)、そして動物に望ましい抗体産生細胞を産生させてから、それらを不死化細胞株と融合するために回収する。融合の技術も当該分野で周知であり、そして一般的に細胞をポリエチレングリコールのような融合剤と混合することを含む。

40

【 0 0 9 2 】

H A T (ヒポキサンチン - アミノプテリン - チミジン) 選択のような、標準的な手順によってハイブリドーマを選択する。望ましい抗体を分泌するものを、ウェスタンブロッティング、E L I S A (酵素結合免疫吸着アッセイ)、R I A (ラジオイムノアッセイ) 等のような、標準的なイムノアッセイを用いて選択する。抗体を、標準的なタンパク質精製

50

技術を用いて培地から回収する [Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, Amsterdam, 1985)]。

【0093】

上記の技術を適用する指針を提供するために、多くの参考文献が入手可能である [Kohlerら、Hybridoma Techniques (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1980); Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, Amsterdam, 1985); Campbell, Monoclonal Antibody Technology (Elsevier, Amsterdam, 1984); Hurrell, Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications (CRC Press, Boca Raton, FL, 1982)]。モノクローナル抗体はまた、周知のファージライブラリーシステムを用いても産生され得る。例えば、Huseら、Science 246:1275 (1989); Wardら、Nature 341:544 (1989)を参照のこと。

10

【0094】

ポリクローナルまたはモノクローナルに関わらず、そのように産生された抗体を、例えば免疫親和性クロマトグラフィーによって受容体を精製するために、周知の方法によって固体支持体に結合した固定化形式で使用され得る。

20

【0095】

未標識または標準的な方法によって標識された、抗原性断片に対する抗体も、TLRのイムノアッセイの基礎として使用し得る。使用される特定の標識は、イムノアッセイの型に依存する。使用し得る標識の例としては、³²P、¹²⁵I、³H、および¹⁴Cのような放射性標識；フルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシルおよびウンベリフェロンのような蛍光標識；ルシフェリンおよび2,3-ジヒドロフタラジンジオンのような化学発光剤；および西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、リゾチーム、およびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼのような酵素が挙げられるがこれらに限定されない。

【0096】

抗体を、公知の方法によって、そのような標識でタグ化し得る。例えば、アルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド、イミデート、スクシンイミド、ビスジアゾ化ベンジジン等のような結合剤を使用して、抗体を蛍光標識、化学発光標識または酵素標識でタグ化し得る。関与する一般的な方法は、当該分野で周知であり、そして例えばImmunoassay: A Practical Guide, 1987, Chan (編)、Academic Press, Inc., Orlando, FLにおいて記載される。そのようなイムノアッセイを、例えば受容体の精製の間に得られた画分に対して実施し得る。

30

【0097】

本発明の抗体をまた、発現クローニングシステムにおいて、TLRを発現する特定のcDNAクローンを同定するために使用し得る。

40

【0098】

受容体のリガンド結合部位に特異的な中和抗体も、リガンド結合をブロックするためのアンタゴニスト（阻害剤）として使用され得る。そのような中和抗体を、慣用実験によって、例えば下記で記載する放射性リガンド結合アッセイを用いることによって、容易に同定し得る。TLR活性の拮抗作用を、完全な抗体分子、またはFab断片、Fc断片、F(ab)₂断片およびFv断片のような周知の抗原結合断片を用いて達成し得る。

【0099】

そのような断片の定義を、例えば、Klein, Immunology (John Wiley, New York, 1982); Weir編、Immunochemistry, 第4版 (Blackwell Scientific Publishers, Ox

50

ford、1986)のParham、第14章において見出し得る。抗体断片、例えばFab断片[Tijssen、Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier、Amsterdam、1985)]、Fv断片[Hochmanら、Biochemistry 12:1130(1973); Sharonら、Biochemistry 15:1591(1976); Ehrlichら、米国特許第4,355,023号]および抗体半分子(half molecules)(Auditore-Hargreaves、米国特許第4,470,925号)の使用および産生もまた、記載された。公知の抗体重鎖および軽鎖可変領域配列に基づいて組み換えFv断片を作成する方法が、例えばMooreら(米国特許第4,642,334号)によって、およびPlueckthun[Bio/Technology 9:545(1991)]によって、さらに記載された。あるいは、それらを標準的な方法によって化学的に合成し得る。

10

【0100】

ポリクローナルおよびモノクローナルの両方の抗イディオタイプ抗体も、抗原としての受容体に対して惹起された抗体を用いて産生され得る。そのような抗体は、受容体を模倣し得るので有用であり得る。

【0101】

(医薬品組成物)

TLRアゴニストおよびアンタゴニストを、治療的に使用して、TLRの活性を刺激またはブロックし、そしてそれによってTLRによって引き起こされる、または媒介される任意の医学的状態を処置し得る。処置的適用に関わる投与レジメは、処置物質の作用を改変し得る様々な因子、例えば患者の状態、体重、性別および食事、投与時間、および他の臨床的因子を考慮して、担当医師によって決定される。

20

【0102】

そのような物質の治療的投与のための代表的なプロトコールは、当該分野で周知である。医薬品組成物の投与は、代表的には非経口、腹腔内、静脈内、皮下もしくは筋肉内での注射による、または注入による、または任意の他の受容可能な全身性の方法による。多くの場合、処置投与量は、安全性および有効性を最適化するために、低いレベルから上へ向かってタイトレーションされる。一般的に、1日投与量は体重1キログラムあたり約0.01から20mgのタンパク質の範囲に入る。代表的には、投与量範囲は、体重1キログラムあたり約0.1から5mgまでである。

30

【0103】

より小さな分子サイズおよびおそらく減少した投与後の半減期(クリアランス時間)を考慮して、投与量を調整する。しかし、TLRアンタゴニストは、本発明の方法を用いて同定し得る、有機低分子および阻害性リガンドアナログを含む他の型の阻害剤に加えて、中和抗体またはその結合断片を含むことが、当業者によって認識される。

【0104】

医薬品組成物を単純な溶液中で投与し得るが、より代表的には、キャリア、好ましくは医薬品キャリアのような他の材料と組み合わせて使用される。有用な医薬品キャリアは、医薬品組成物を患者に送達するために適切な、任意の適合性の無毒性物質であり得る。滅菌水、アルコール、脂肪、ワックス、および不活性固体が、キャリアに含まれ得る。薬学的に受容可能な佐剤(緩衝剤、分散剤)も、医薬品組成物に含まれ得る。一般的に、そのような薬物の非経口投与に有用な組成物は周知である(例えば、Remington's Pharmaceutical Science、第17版(Mack Publishing Company、Easton、PA、1990))。あるいは、医薬品組成物を、移植可能な薬物送達システムによって、患者の体内に導入し得る[Urquhartら、Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24:199(1984)]。

40

【0105】

多くの従来 of 投与処方物において、治療用処方物を投与し得る。処方物は、代表的には

50

、1つまたはそれより多くの薬学的に受容可能なキャリアと共に、少なくとも1つの活性成分を含む。処方物としては、経口、直腸内、経鼻、または非経口（皮下、筋肉内、静脈内および皮内を含む）投与に適切なものが挙げられ得る。

【0106】

処方物は、簡便に単位投与形式で提示され得、そして薬学の分野で周知の任意の方法によって調製され得る。例えば、Gilmanら（編）（1990）、The Pharmacological Bases of Therapeutics、第8版、Pergamon Press；およびRemington's Pharmaceutical Sciences、前出、Easton、Penn；Avisら（編）（1993）Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications、Dekker、New York；Liebermanら（編）（1990）Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets、Dekker、New York；およびLiebermanら（編）（1990）Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems、Dekker、New Yorkを参照のこと。

10

【0107】

（組み合わせ治療）

癌の予防または処置におけるTLRリガンドの有効性を、リガンドを、この同じ目的のために有効な、別の薬剤または処置と組み合わせることで投与することによって改善し得る。例えば、TLRリガンドを、化学療法剤または癌処置と組み合わせることで投与され得る。好ましくは、TLRリガンドはTLR3アゴニストである。

20

【0108】

「化学療法剤」は、癌の処置に有用な化学的化合物である。化学療法剤の例としては、チオテパおよびシクロホスファミド（CYTOXANTM）のようなアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン、ピボスルファンのようなアルキルスルホネート；ベンゾドーパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドーパ（meturedopa）、およびウレドーパ（uredopa）のようなアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、およびトリメチロールメラミン（trimethylolmelamine）を含むエチレンイミンおよびメチルアメラミン（methylamelamine）；アセトゲニン（特にブラタシンおよびブラタシノン（bullatacinone））；カンプトテシン（合成アナログトポテカンを含む）；プリオスタチン；カリスタチン（callystatin）；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシン、およびビゼレシン合成アナログを含む）；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成アナログ、KW-2189およびCBI-TMIを含む）；エレウテロビン（eleutherobin）；パンクラチスタチン；サルコジクチン（sarcodictyin）；スポンジスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド（cholophosphamide）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミン酸化物、メルファラン、ノベムビシン（novembichin）、フェネステリン（phenesterine）、プレドニムスチン（prednimustine）、トロホスファミド、およびウラシルマスタードのようなナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン（chlorozotocin）、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンのようなニトロソウレア；エネジイン（enediayne）抗生物質（例えばカリチエアミシン、特にカリチエアミシガンマ11およびカリチエアミシンphil1、例えばAgnew、Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186（1994）を参照のこと）のような抗生物質；ダイネマイシンAを含むダイネミシン（dynemicin）；クロドロネートのようなビスホスホネート；エスパラマイシン（esperamicin）；ならびにネオカルチノスタチン発色団および関連する色素タンパク質エネジイン抗生物質発色団、アクラシノマイシン（aclacinomycin）、アクチノマイシ

30

40

50

ン、オースラマイシン (authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カク
チノマイシン、カラビシン (carabycin)、カルミノマイシン (carminomycin)、
カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン
、デトルビシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキシソルビシン (アドリ
アマイシン^{T M}) (モルフォリノ - ドキシソルビシン、シアノモルフォリノ - ドキシソルビシ
ン、2 - ピロリノ - ドキシソルビシンおよびデオキシドキシソルビシンを含む)、エピルビシ
ン、エソルビシン (esorubicin)、イダルビシン、マルセロマイシン (marcellomycin)、
マイトマイシンCのようなマイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン (nogalamycin)、
オリボマイシン、ペプロマイシン、ポト
フィロマイシン (potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン (qu
elamycin)、ロドルビシン (rodorubicin)、ストレプトニグリン、
ストレプトゾシン、チューバーシジン (tubercidin)、ウベニメクス、ジノス
タチン、およびゾルビシン; メトトレキサートおよび5 - フルオロウラシル (5 - FU)
のような代謝拮抗剤; ドネプテリン (denopterin)、メトトレキサート、プテ
ロプテリン (pteropterin) およびトリメトレキサートのような葉酸アナログ
; フルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン (thiamiprine) およ
びチオグアニンのようなプリンアナログ; アンシタビン、アザシチジン、6 - アザウリジ
ン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン
、およびフロクスウリジンのようなピリミジンアナログ; カルステロン、プロピオン酸ド
ロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、およびテストラクトンのような
アンドロゲン; アミノグルテチミド、ミトーテン、およびトリロスタンのような抗副腎 (anti - adrenal);
フロリン酸 (frolinic acid) のような葉酸
補充剤; アセグラトン、アルドホスファミド (aldophosphamide) グリコ
シド; アミノレブリン酸; エニルウラシル; アムサクリン; ベストラブシル (bestrabucil);
ピサントレン; エダトレキサート (edatraxate); デホホラ
ミン (defofamine); デメコルチン; ジアジコン; エルホルニチン (elfornithine);
酢酸エリプチニウム (elliptinium acetate)
; エポチロン (epothilone); エトグルシド; 硝酸ガリウム; ヒドロキシウレ
ア; レンチナン; ロニダミン; マイタンシンおよびアンサマイトシンのようなマイタンシ
ノイド (maytansinoid); ミトグアゾン; ミトザントロン; モビダモール;
ニトラクリン; ペントスタチン; フェナメト (phenamet); ビラルビシン; ロソ
キザントロン; ポドフィリン酸 (podophyllinic acid); 2 - エチル
ヒドラジド; プロカルバジン; PSK (登録商標); ラゾキサン; リゾキシン; シゾフィ
ラン; スピロゲルマニウム; テヌアゾン酸; トリアジコン (triaziquone);
2, 2', 2'' - トリクロロトリエチルアミン; トリコテセン (trichothecene) (特にT - 2 毒素、パラクリン (verracurin) A、ロリジン (roridin) A
およびアンゲイジン (anguidine)); ウレタン; ビンデシン; ダカ
ルバジン; マンノムスチン; ミトブロニトール; ミトラクトール; ビボプロマン; ガシト
シン (gacytosine); アラビノシド (「Ara - C」); シクロホスファミド
; チオテパ; タキソイド、例えばバクリタキセル (TAXOL (登録商標)、Bristol - Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.)
およびドキシセタキセル (doxetaxel) (TAXOTERE (登録商標)、Rhône - Poulenc Rorer, Antony, France); クロラムブシル;
ゲムシタビン (Gemzar^{T M}); 6 - チオグアニン; メルカプトプリン; メトトレキサ
ート; シスプラチンおよびカルボプラチンのような白金アナログ; ビンブラスチン; 白金;
エトポシド (VP - 16); イホスファミド; ミトザントロン; ピンクリスチン; ビ
ノレルビン (Navelbine^{T M}); ノバントロン; テニボシド; エダトレキサ
ート; ダウノマイシン; アミノプテリン; ゼローダ; イバンドロネート; CPT - 11; ト
ポイソメラーゼ阻害剤 RFS 2000; ジフルオロメチルオルニチン (DMFO); レチ
ノイン酸のようなレチノイド; カベシタビン; および上記のいずれかの薬学的に受容可能

10

20

30

40

50

な塩、酸、または誘導体を含む。例えば、タモキシフェン (NolvadexTMを含む)、ラロキシフェン、ドロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン (trioxifene)、ケオキシフェン (keoxifene)、LY117018、オナプリストン、およびトレミフェン (FarestonTM)を含め、抗エストロゲンおよび選択的エストロゲン受容体調節物質 (SERM)のような、腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するよう作用する抗ホルモン剤；例えば、4(5)-イミダゾール、アミノグルテチミド、酢酸メゲストロール (MegaceTM)、エキセメスタン、フォルメスタン、ファドロゾール、ボロゾール (RivisorTM)、レトロゾール (FemaraTM)、およびアナストロゾール (ArimidexTM)のような、副腎におけるエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤；ならびにフルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリドおよびゴセレリンのような抗アンドロゲン；および上記のいずれかの薬学的に受容可能な塩、酸、または誘導体も、この定義に含まれる。

10

20

30

40

50

【0109】

癌の「処置」は、癌を除去するための手術、および癌または腫瘍を減少させるかまたは破壊するための放射線処置を含む。癌の予防または処置におけるTLRリガンドの有効性を、低用量のI型IFNと組み合わせてリガンドを投与することによっても改善し得る。例えば、低用量のI型IFNは、1~3MUの範囲、そして好ましくは2MUである。より好ましくは、低用量のI型IFNは1MUより少ない。好ましくは、TLRリガンドはTLR3アゴニストである。

【0110】

上記で述べたように、組み合わせ処置に関与する投与レジメンは、担当医師によって決定される。

【実施例】

【0111】

本発明の例示として提供される、以下の制限しない実施例を参照することによって、本発明をより良く理解し得る。以下の実施例は、本発明をより完全に説明するために提供され、そして決して本発明の広い範囲を制限すると解釈されるべきでない。他に示さなければ、固体混合物中の固体、液体中の液体、および液体中の固体に関して下記で与えられるパーセンテージは、それぞれwt/wt、vol/vol、およびwt/volベースである。細胞培養中は一般的に滅菌条件が維持された。

【0112】

(材料および一般的な方法)

例えば、Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、1982、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor Press；Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版)、第1-3巻、1989、Cold Spring Harbor Press、NY；Ausubelら、Biology、Greene Publishing Associates、Brooklyn、NY；またはAusubelら(1987および増刊)、Current Protocols in Molecular Biology、Greene/Wiley、New York；Innisら(編)、PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications、1990、Academic Press、N.Y.において記載されるような、標準的な方法を使用した。

【0113】

(細胞株および試薬)

ヒト乳房腫瘍細胞株である、Cama-1、SW527、BT-483およびMCF-7を、ATCC (Rockville、MD) から得て、そして2mMのL-グルタミン (Life Technologies、Paisley Park、GB)、10%の

ウシ胎仔血清 (Life Technologies)、160 µg/mL のゲンタリン (gentalline) (Schering Plough, Kenilworth, NJ)、2.5 mg/mL の炭酸水素ナトリウム (Life Technologies)、アミノ酸 (Invitrogen) および 1 mM のピルビン酸ナトリウム (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) を補充した 4.5 g/mL のグルコース (Invitrogen, San Diego, CA) を含む DMEM F12 中で培養した (完全培地と呼ばれる)。ポリイノシン酸 - ポリシチジン酸 (ポリIC) を、Invitrogen (San Diego, CA) から得た。ペプチドグリカン (PGN) および リポ多糖 (LPS) を、Sigma-Aldrich から購入した。I 型 IFN 受容体をブロックする mAb を、PBL Biochemical Laboratories (Piscataway, NJ) から購入し、そして TNF - 中和 mAb を、Genzyme (Cambridge, MA) から購入した。Stat1 に対する抗体、リン酸化 Stat1 (チロシン 701) に対する抗体および PKR に対する抗体を、Cell Signaling (Beverly, MA) から購入した。ヒト IFN - に対する抗体を、R&D Systems (Minneapolis, MIN) から購入した。NF - B p65 サブユニット、TRAF6 および - チュープリンに対する抗体を、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) から購入した。一般的なカスパーゼ阻害剤 z - VAD - fmk を、R&D Systems から購入した。シクロヘキシミド (CHX) を、Sigma-Aldrich から購入した。

10

20

【0114】

ヒト原発性乳房腫瘍サンプルを、病院の生命倫理プロトコールに従って Centre Leon Be'rrard (Lyon, France) から得た。単一の細胞懸濁液を、コラゲナーゼ A (Sigma-Aldrich) による消化、ならびに洗浄および製造会社の指示に従って HEA マイクロビーズ (Mylteni Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) を用いてヒト上皮抗原 (HEA) 陽性細胞を濃縮した後に得た。最終的な単一細胞懸濁液は、80% より多くの HEA 陽性細胞、および 2% より少ない CD4⁺ 造血系の混入物を含んでいた。

【0115】

(アポトーシス分析)

TLR リガンドによる処置後の細胞回復を、クリスタルバイオレット染色 (Sigma-Aldrich) によって測定した。細胞を 96 穴プレートに、10⁴ 細胞/ウェルでプレATINGした。TLR リガンド有りまたは無しのいずれかで 72 時間培養した後、細胞を PBS で洗浄し、6% のホルムアルデヒド (Sigma-Aldrich) で 20 分間固定し、2 回洗浄し、そして次いで 0.1% のクリスタルバイオレットで 10 分間染色した。洗浄および 1% の SDS 中で 1 時間インキュベートした後、Vmax プレートリーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) において、605 nm で吸光度を読み取った。アネキシン V 染色を、アネキシン - FITC アポトーシス検出キット (BD Pharmingen, San Diego, CA) で、製造会社の指示に従って行った。70% のエタノール中で一晩透過処理した後、3 µg/mL のヨウ化プロピジウム (PI) (Molecular probes, Eugene, OR) で染色することによって、二倍体未満 (sub-diploid) の細胞を検出した。二重線識別モジュールを備えた FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA) で、そして Cellquest Pro ソフトウェア (Becton Dickinson) を用いて、フローサイトメトリーによって蛍光を分析した。

30

40

【0116】

(生化学)

Cama-1 細胞を、1% の Nonidet - P40 を含む緩衝液中で溶解した。SDS - ポリアクリルアミドゲル (Invitrogen) に、1 レーンあたり 20 µg の全

50

タンパク質をローディングした。上記で記載した抗体を用いて、標準的な技術によってウェスタンブロット (WB) を行った。抗 IRAK - 4 モノクローナル抗体を、Fossiez ら、「T cell interleukin - 17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines」、J. Exp. Med.、第 183 (6) 巻、2593 - 2603 (1996) において記載されたプロトコールに従って、研究室で作製した。

【0117】

(サイトカイン分泌)

IL - 6 の分泌を、DuoSet ELISA キット (R&D Systems) を製造会社の指示に従って用いた標準的な酵素結合アッセイ (ELISA) によって、培養上清中で測定した。

10

【0118】

(siRNA 実験)

Cama - 1 細胞を、6 穴プレートに 1 ウェルあたり 3×10^5 細胞でプレーティングした。一晚接着させた後、siRNA のトランスフェクションを、 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ のリポフェクトアミン 2000 (Invitrogen) および 100 nM の siRNA を含む OptiMEM 培地 (Life technologies) 中で 5 時間行った。次いでポリ IC による処理およびアポトーシス分析の前に、細胞を洗浄し、そして完全培地中で 72 時間培養した。TLR3 に特異的な siRNA 二重鎖、PKR に特異的な siRNA 二重鎖、IRAK - 4 に特異的な siRNA 二重鎖、TRAF6 に特異的な siRNA 二重鎖および p65 に特異的な siRNA 二重鎖を、Dharmacon (Lafayette、CO) から SMART - Pools として購入した。TRIF siRNA を、同じ供給会社から単一のオリゴ二重鎖 ($5' - \text{GCUCUUGUAUCUGAAGCAC} - 3'$) (配列番号 23) として購入した。TLR3 および TRIF の発現を、以下のプライマーを用いて、TaqPCR Ready Mix (Sigma - Aldrich) による PCR (35 サイクル: 1 分 94、1 分 55、2 分 72) によって評価した: TLR3 に関して $5' - \text{AACGATTCTCTTTGCTTGGCTTTC} - 3'$ (前方向) (配列番号 24) / $5' - \text{GCTTAGATCCAGAAATGGTCAAG} - 3'$ (逆方向) (配列番号 25)、および TRIF に関して $5' - \text{ACTTCCTAGCGCCTTCGACA} - 3'$ (前方向) (配列番号 26) / $5' - \text{ATCTTCTACAGAAAGTTGGA} - 3'$ (逆方向) (配列番号 27)。PKR、IRAK - 4、TRAF6 および p65 の発現を、上記で記載したように WB によって評価した。

20

30

【0119】

(実施例 1)

これらの実験のセットにおいて、TLR1 ~ TLR10 のそれぞれに関する TLR の発現を、6 つのヒト結腸直腸腺癌細胞株において、RT - PCR によって検出した。分析した 6 つの細胞株は、Caco2、LoVo、Colo320DM、SNU - C1、T84 および Colo205 であった。同量の mRNA を、各細胞株から抽出した。続いて mRNA を、hTLR 特異的プライマーを用いて、PCR によって 35 サイクル (94 で 30 秒、60 で 45 秒、72 で 90 秒) 増幅した。以下のプライマーを使用した:

40

【0120】

【化 1】

TLR1F: caggatcaaggacttgatcttc (配列番号 1);
 TLR1R: ttctctcatgaaggcaaactcg (配列番号 2);
 TLR2F: ctccaggagcagcaagcactg (配列番号 3);
 TLR2R: atcttccgcagcttgacagaag (配列番号 4);
 TLR3F: aacgattccttgcttggttc (配列番号 5);
 TLR3R: gcttagatccagaatggtaag (配列番号 6);
 TLR4F: ctccagaatgactttgctgtac (配列番号 7);
 TLR4R: gcaggacaatgaagatgatacc (配列番号 8);
 TLR5F: cgaacctcatccacttatcag (配列番号 9);
 TLR5R: gtgaacttagggactttaagac (配列番号 10);
 TLR6F: ccaatgtacctgtgagctaag (配列番号 11);
 TLR6R: ccactcactctggacaaagtgtg (配列番号 12);
 TLR7F: ggatctgtcttcaatttgaac (配列番号 13);
 TLR7R: ccaaggtctgcccatacttg (配列番号 14);
 TLR8F: gctatccttgatgagaaaaag (配列番号 15);
 TLR8R: gcattgaagcacctcggacag (配列番号 16);
 TLR9F: actgttccgcctctcgctg (配列番号 17);
 TLR9R: gccagcacaacagcgtcttg (配列番号 18);
 TLR10F: ttgttcagagctgccaggaag (配列番号 19); および
 TLR10R: gcaaagtagaattcataatggcac (配列番号 20).

10

20

次いでPCR産物を、エチジウムブロミドで染色したアガロースゲル上で分析した。

30

【0121】

これらの実験の結果は、Caco2細胞株はTLR2、TLR5、TLR7およびTLR9を発現していたことを示す。LoVo細胞株は、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5およびTLR6を発現していた。Colo320 DM細胞株はTLR5およびTLR6を発現していた。SNU-C1細胞株は、TLR4を発現していた。T84細胞株はTLR4、TLR5、およびTLR6を発現していた。Colo205細胞株は、TLR4、TLR5、およびTLR6を発現していた。

【0122】

同様の分析を、8つのヒト肺細胞株(NCI-H526、SHP-77、NCI-N417、A549、NCI-H358、A427、NCI-H292、NCI-H187)および4つのヒト乳癌細胞株(SW527、Cama-1、BT483、MCF-7)に対して行った。これらの実験の結果は、NCI-H526細胞株(小細胞肺癌)は、TLR2、TLR3、TLR5およびTLR9を発現していたことを示す。SHP-77細胞株(SCLCの大細胞変体)は、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR9およびTLR10を発現していた。NCI-N417細胞株(小細胞肺癌)は、TLR5を発現していた。A549細胞株(肺癌)は、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、およびTLR10を発現していた。NCI-H358細胞株(細気管支肺胞上皮癌)は、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7およびTLR10を発現していた。A427細胞株(肺癌)は、TLR2、TLR3、TLR5およびTLR6を発現していた。NCI-H292細胞株(類表皮肺癌)は、TL

40

50

R 1、T L R 2、T L R 3、T L R 4、T L R 5、T L R 6 および T L R 1 0 を発現していた。N C I - H 1 8 7 細胞株（小細胞肺癌）は、T L R 5、T L R 6、および T L R 1 0 を発現していた。S W 5 2 7 細胞株（乳房腺癌）は、T L R 2、T L R 4、T L R 6 および T L R 1 0 を発現していた。C a m a - 1 細胞株（乳房腺癌）は、T L R 2、T L R 5、T L R 6 および T L R 1 0 を発現していた。B T 4 8 3 細胞株（乳房腺癌）は、T L R 2、T L R 4、T L R 5、T L R 6、T L R 7、T L R 9 および T L R 1 0 を発現していた。M C F - 7 細胞株（乳房腺癌）は、T L R 2、T L R 5、T L R 6 および T L R 9 を発現していた。

【 0 1 2 3 】

大腸、乳房および肺由来の、試験したヒト腫瘍系統の全ては、多くの T L R 転写物を発現することが明らかである。しかし、各細胞株においてどの T L R が発現するかおよびその発現レベルに関して、実質的な不均一性が存在する。

【 0 1 2 4 】

（実施例 2）

4 つのヒト乳房腫瘍細胞株である、C a m a - 1、S W 5 2 7、B T 4 8 3、および M C F - 7 を、ポリ I C に応答した細胞死に関して分析した。細胞を $5 \mu\text{g} / \text{m l}$ の P G N、 $50 \mu\text{g} / \text{m l}$ のポリ I C または $10 \mu\text{g} / \text{m l}$ の L P S と 7 2 時間インキュベートした。コントロール細胞を、P B S とともに培養した。クリスタルバイオレット染色によって細胞傷害性を評価し、そしてコントロールのパーセントとして表した。

【 0 1 2 5 】

平均して、コントロール細胞は 1 0 0 % の細胞回復率を示した。P G N 細胞は、平均 9 5 % の細胞回復率を示した。L P S 処理細胞は、平均して 9 5 % の回復率を示した。平均して、ポリ I C で処理した細胞は 6 7 . 5 % の細胞回復率を示した。具体的には、C a m a - 1、S W 5 2 7、B T 4 8 3 および M C F - 7 細胞株は、それぞれ 3 3 %、7 5 %、6 7 %、および 1 0 0 % の細胞回復率を示した。

【 0 1 2 6 】

そのデータは、ポリ I C が、試験した細胞株のうち 3 つ、C a m a - 1、B T 4 8 3 および S W 5 2 7 において、細胞回復率の減少を引き起こしたことを示す。データからわかるように、C a m a - 1 細胞株は、一貫して最も劇的な減少を示した。しかし、ポリ I C は M C F - 7 細胞においては細胞回復率の減少を引き起こさなかった。

【 0 1 2 7 】

さらに、さらなる T L R リガンドを試験して、細胞傷害性に対するあらゆる可能性のある影響を決定した。試験したリガンドは、P G N、L P S、フラジェリン、R 8 4 8 および C p G であった。細胞を、 $5 \mu\text{g} / \text{m l}$ の P G N、 $10 \mu\text{g} / \text{m l}$ の L P S、 $50 \text{ ng} / \text{m l}$ のフラジェリン、 $6 \mu\text{g} / \text{m l}$ の R 8 4 8、 $10 \mu\text{g} / \text{m l}$ の C p G O D N と、またはコントロールとして P B S と、7 2 時間培養した。クリスタルバイオレット染色によって細胞回復率を評価し、そしてコントロールのパーセントとして表した。それらのリガンドのうちどれも、4 つの乳癌細胞株（C a m a - 1、B T 4 8 3、S W 5 2 7 および M C F - 7）のいずれの細胞回復率も有意に減少させなかった。P G N は細胞回復率には影響を与えなかったが、それはある細胞株において I L - 8 の分泌を誘導し、従って細胞傷害性の欠如は、T L R 誘発が存在しないためではないことが確立された。

【 0 1 2 8 】

（実施例 3）

C a m a - 1 細胞を、ポリ I C に反応した T L R 3 m R N A の発現に関して分析した。C a m a - 1 細胞を、完全培地（ $4.5 \text{ g} / \text{m l}$ のグルコースを含み、そして 2 mM の L - グルタミン、1 0 % のウシ胎仔血清、 $160 \mu\text{g} / \text{m l}$ のゲンタリン、 $2.5 \text{ mg} / \text{m l}$ の炭酸水素ナトリウムを補足した D M E M F 1 2）中で、単独で、または L P S（ $5 \mu\text{g} / \text{m l}$ ）および / もしくはポリ I C（ $5 \mu\text{g} / \text{m l}$ ）と共に、4 8 時間培養した。各グループの細胞から m R N A を抽出した。次いで m R N A を逆転写し、そして h T L R 3 特異的プライマー（T L R 3 F : a a c g a t t c c t t t g c t t g g c t t c（配

10

20

30

40

50

列番号 5) および T L R 3 R : g c t t a g a t c c a g a a t g g t c a a g (配列番号 6)) を用いて 3 5 サイクル (上記の実施例 1 におけるように) P C R 増幅した。T L R 3 m R N A は、休止 C a m a - 1 細胞からは増幅できなかった。

【 0 1 2 9 】

h T L R 3 特異的プライマーを用いた R T - P C R 由来の増幅 D N A を、ゲルに流した。このゲルは、ポジティブコントロール (プラスミド T L R 3)、ポリ I C で処理した細胞、およびポリ I C および L P S の両方で処理した細胞において、T L R 3 の発現を示した。ゲルは、L P S で処理した、または何も処理していない (ネガティブコントロール) 細胞において、T L R 3 の発現を示さなかった。

【 0 1 3 0 】

そのデータは、ヒト乳癌 C a m a - 1 細胞において、T L R 3 m R N A の発現が、ポリ I C によって誘導されることを示す。従って、ポリ I C 処理は、特定の腫瘍細胞株において、その認識された受容体である T L R 3 の発現をアップレギュレートする。他方、L P S による処理は、C a m a - 1 細胞における T L R 3 m R N A の発現に影響を与えなかった。

【 0 1 3 1 】

(実施例 4)

2 つの細胞株である、大腸癌細胞株 L S 1 7 4 T および乳癌細胞株 C a m a - 1 を、死および細胞周期の変化に関して分析した。細胞を、ポリ I C (5 μ g / m l) の存在下または非存在下のいずれかで 4 8 時間培養した。1 μ g / m l のプロモデオキシウリジン (B r d U) の 3 0 分のパルスの後、細胞を 7 0 % エタノール中で 4 にて一晩固定した後、F I T C 結合抗 B r d U モノクローナル抗体および 3 μ g / m l のヨウ化プロビジウムで染色した。細胞死および細胞周期を、フローサイトメトリー (F A C S) によって分析した。B r d U の組み込みは増殖の尺度であり、一方、ヨウ化プロビジウム染色は D N A 含有量、特にアポトーシスを起こしている二倍体未満の細胞集団の定量を可能にする。

【 0 1 3 2 】

そのデータは、B r d U を組み込んだ L S 1 7 4 T 細胞のパーセンテージが、処理前の 2 7 % から、ポリ I C の存在下での 4 8 時間培養後に 9 % になったことを示す。逆に、二倍体未満の D N A 含有量を有する L S 1 7 4 T 細胞のパーセンテージは、処理前の 3 % から、ポリ I C の存在下で 4 8 時間培養後には 2 3 % になり、ポリ I C の強力な細胞傷害性を示す。

【 0 1 3 3 】

そのデータはまた、B r d U を組み込んだ C a m a - 1 細胞のパーセンテージは、処理前の 1 5 % から、ポリ I C の存在下での 4 8 時間培養後に 2 % になったことを示す。逆に、二倍体未満の D N A 含有量を有する C a m a - 1 細胞のパーセンテージは、処理前の 4 % から、ポリ I C の存在下での 4 8 時間培養後に 1 7 % になり、これは、ポリ I C によって引き起こされたアポトーシスを示す。

【 0 1 3 4 】

これらのデータは、ポリ I C による 4 8 時間の処理で、L S 1 7 4 T および C a m a - 1 細胞株の両方が、分裂を停止し、そしてアポトーシスを起こすことを示す。

【 0 1 3 5 】

(実施例 5)

乳房腫瘍細胞株に対するポリ I C 処置の効果をさらに調査するために、アネキシン V 染色によって、C a m a - 1 細胞において細胞死を分析した。細胞を、5 μ g / m l のポリ I C 有りまたは無しのいずれかで、2 4 時間培養した。アポトーシスを、アネキシン V 染色およびフローサイトメトリーによって測定した。そのデータは、7 0 % を超える C a m a - 1 細胞がアネキシン V によって染色されたことを示し、ポリ I C によって誘導されたアポトーシスをさらに示す。

【 0 1 3 6 】

本発明者らはまた、ポリ I C 誘導アポトーシスの動態を決定することを試みた。C a m

10

20

30

40

50

a - 1 細胞を、 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ または $50 \text{ ng} / \text{ml}$ のポリ I C 有りまたは無しのいずれかで培養した。培養中のアポトーシス（アネキシン陽性）細胞のパーセンテージを、続く 30 時間の間測定した。そのデータは、未処理の細胞が 30 時間後に 15 % の自然発生的なアポトーシスを示したことを示す。しかし、ポリ I C で処理した細胞の 80 % は細胞死を示した。具体的には、ポリ I C は、ポリ I C の添加から 9 時間後に始まる C a m a - 1 細胞におけるアポトーシスを引き起こし、そして処理の 30 時間後には 80 % までのアポトーシス細胞に達した。

【0137】

本発明者らは次いで、ヒト初代乳房腫瘍細胞に対してポリ I C が有する効果を決定することを試みた。新規に回復した腫瘍単一細胞懸濁液を、P B S またはポリ I C ($50 \mu\text{g} / \text{ml}$) のいずれかと共に 48 時間インキュベートした。アポトーシスを P I 染色によって測定した。そのパーセンテージは、低い D N A 含有量の細胞（サブ G 0 / G 1 細胞）、すなわちアポトーシス細胞の割合を表す。そのデータは、P B S で処理した細胞の 19.5 % が低い D N A 含有量を有し、一方ポリ I C で処理した細胞の 38.6 % が低い D N A 含有量を有していたことを示す。従って、ポリ I C の同様の細胞傷害性効果が、ヒト乳房初代腫瘍細胞において観察された。

【0138】

（実施例 6）

T L R 3 を、ポリ I C 誘導アポトーシスにおけるその役割に関して分析した。C a m a - 1 細胞を、無関係な配列（S c r R N A ; 配列：A C U A G U U C A C G A G U C A C C U t t）（配列番号 21）、または h T L R 3（配列：C A G U G U U G A A C C U U A C C C A t t）（配列番号 22）のいずれかに対応する s i R N A でトランスフェクトした。s i R N A トランスフェクションを、 $3 \mu\text{g} / \text{mL}$ のリポフェクトアミン 2000 および 100 nM の s i R N A を含む、1 mL の O p t i M E M^{T M} 培地中で、5 時間行なった。次いで細胞をリン酸緩衝化生理食塩水溶液（P B S）で洗浄し、完全培地中で 72 時間培養し、その後、 $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ のポリ I C によって 48 時間処理した。次いで細胞周期を、実施例 3 で記載されたように、エチジウムブロミドによって染色した後 F A C S によって分析した。

【0139】

これらの実験の結果を図 1 に示す。そのデータは、ポリ I C の存在下で、無関係なスクランブル R N A でトランスフェクトした C a m a - 1 細胞の 48 時間のインキュベーションは、二倍体未満の細胞のパーセンテージを 2 % から 45 % へと増加させたことを示す。しかし、ポリ I C の存在下で h T L R 3 s i R N A によりトランスフェクトした C a m a - 1 細胞の 48 時間のインキュベーションは、二倍体未満の細胞のパーセンテージを増加させず、これは、3 % で変化しないままであった。

【0140】

これらのデータは、ポリ I C によって C a m a - 1 細胞に伝達されるアポトーシスシグナルは、T L R 3 の発現を必要とすることを示す。

【0141】

（実施例 7）

ポリ A U を、そのアポトーシスに対する効果に関して分析した。C a m a - 1 細胞を、P B S または $5 \text{ ng} / \text{ml}$ から $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ までの範囲の漸増濃度のポリ A U のいずれかと共に 48 時間培養した。アポトーシスを、アネキシン V 陽性細胞のパーセンテージを測定することによって分析した。そのデータは、ポリ I C と同様、ポリ A U はアポトーシスを引き起こすことを示す。

【0142】

（実施例 8）

本発明者らは、インビボでポリ I C 誘導アポトーシスに対する I F N の効果を分析した。T R P - T a g マウスは、網膜色素上皮に S V 40 の T 抗原を発現し、そして代表的には生後数週間以内に完全な貫通を有する眼の腫瘍を発生させる。

10

20

30

40

50

【0143】

これらの実験において、1実験あたり14～16匹のTRP-Tag/IFN α 1-R/-マウス（これらは、I型インターフェロンの受容体（IFN α 1-R）およびII型インターフェロンの受容体（IFN α 2-R）を同時に欠損したマウスと交雑させたTRP-Tagマウスである）を、ポリIC（100 μ g/用量）またはPBSのいずれかの静脈内注射によって、21、23、25、27および29日目に処置した。目に見える眼の腫瘍の発生の動態を、1週間に2～3回モニターした。

【0144】

眼腫瘍の出現は、PBSで処置したマウスと比較して、ポリICで処置したマウスにおいて、21日間まで遅延した。これらの実験に使用したマウスは、機能的なインターフェロン応答システムを有していないので、そのデータは、ポリIC誘導腫瘍増殖阻害は、インビボにおいてI型およびII型インターフェロンと独立であることを示す。

10

【0145】

（実施例9）

ポリIC誘導Cama-1細胞傷害性の経路を決定するために、RNA干渉を使用してTRIFおよびPKRの発現を効率的にダウンレギュレートした。Cama-1細胞を、6穴プレートに1ウェルあたり3 \times 10⁵細胞でプレーティングした。一晚接着させた後、siRNAトランスフェクションを、3 μ g/mLのリポフェクトアミン2000（InvivoGen）および100nMのsiRNAを含むOptiMEM培地（Life Technologies）中で5時間行った。細胞を、MOCK（水）、コントロールスクランブル二重鎖（scr）siRNA、TRIF siRNAまたはPKR siRNAのいずれかでトランスフェクトした。

20

【0146】

PKRに特異的なsiRNA二重鎖を、Dharmacon（Lafayette, CO）からSMART-Poolsとして購入した。TRIF siRNAを、同じ供給会社から単一のオリゴ二重鎖5'-GCUCUUGUAUCUGAAGCAC-3'（配列番号23）として購入した。TLR3およびTRIF発現を、以下のプライマーを用いて、TaqPCR Ready Mix（Sigma-Aldrich）を用いたPCR（35サイクル：94℃で1分、55℃で1分、72℃で2分）によって評価した：TLR3に関して5'-AACGATTCTCTTTGCTTGCTTC-3'（配列番号24）（前方向）/5'-GCTTAGATCCAGAAATGGTCAAG-3'（配列番号25）（逆方向）、およびTRIFに関して5'-ACTTCTCTAGCGCCTTCGACAC-3'（配列番号26）（前方向）/5'-ATCTTCTACAGAAAGTTTGGGA-3'（配列番号27）（逆方向）。PKRの発現を、ウェスタンブロットによって評価した。TRIF mRNAに関して、5 μ g/mLのポリIC有りまたは無しのいずれかでさらに24時間培養した後にPCRを行った。

30

【0147】

そのデータは、RNA干渉を使用してTRIFおよびPKRの発現を効率的にダウンレギュレートしたことを示す。

【0148】

siRNAトランスフェクションの72時間後、Cama-1細胞を、5 μ g/mLのポリIC有りまたは無しのいずれかでさらに24時間培養した。アポトーシスを、アネキシンV染色によって測定し、そして培養中のアポトーシス細胞のパーセンテージとして表した。平均して、未処理のコントロール細胞（MOCKおよびscr）の10%が、アポトーシスを起こした。対照的に、ポリICで処理したコントロール細胞（MOCKおよびscr）の約75%が、アポトーシスを起こした。TRIF siRNAグループにおいて、未処理の細胞は10%のアポトーシス細胞を示し、一方、TRIF siRNAで処理した細胞は20%のアポトーシス細胞を示した。最後に、PKR siRNAグループにおいて、未処理細胞は10%のアポトーシス細胞を示し、一方、PKR siRNAで処理した細胞は80%のアポトーシス細胞を示した。

40

50

【0149】

従って、T R I F に対する s i R N A による処理は、ポリ I C 誘導アポトーシスを実質的に抑止し、一方 P K R 発現の非存在下において細胞死は正常に起こった。

【0150】

これらのデータは、C a m a - 1 細胞におけるポリ I C 誘導アポトーシスは、T L R 3 および T R I F の両方によって媒介され、そして P K R 非依存性であることを明らかに示す。

【0151】

(実施例 10)

T L R 3 によって媒介される細胞傷害性をさらに調査するために、どちらも T L R シグナル伝達の下流メディエーターであるシグナル伝達分子 I R A K - 4 および T R A F 6 の関与を評価した。C a m a - 1 細胞を 6 穴プレートに 1 ウェルあたり 3×10^5 細胞でプレーティングした。一晚接着させた後、s i R N A トランスフェクションを、 $3 \mu\text{g} / \text{mL}$ のリポフェクトアミン 2000 (InvivoGen) および 100 nM の s i R N A を含む OptiMEM 培地 (Life Technologies) 中で 5 時間行った。細胞を、コントロールスクランブル二重鎖 (scr) s i R N A、I R A K - 4 s i R N A または T R A F - 6 s i R N A のいずれかでトランスフェクトした。次いで細胞を洗浄し、そしてポリ I C による処理およびアポトーシス分析の前に、完全培地中で 72 時間培養した。I R A K - 4 および T R A F 6 に特異的な s i R N A 二重鎖を、Dharmacon (Lafayette, CO) から SMART-Pools として購入した。

【0152】

I R A K - 4 および T R A F 6 の発現を、ウェスタンブロットによって分析した。ウェスタンブロットは、I R A K - 4 および T R A F 6 s i R N A が、対応するタンパク質の発現を消滅させることを示す。

【0153】

s i R N A トランスフェクションの 72 時間後、C a m a - 1 細胞を、 $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ のポリ I C 有りまたは無しのいずれかでさらに 24 時間培養した。アポトーシスを、アネキシン V 染色によって測定し、そして培養中のアポトーシス細胞のパーセンテージとして表した。平均して、未処理のコントロール細胞 (scr) の 10 % が、アポトーシスを起こした。対照的に、ポリ I C で処理したコントロール細胞 (scr) の約 75 % が、アポトーシスを起こした。I R A K - 4 s i R N A グループにおいて、培養物は 20 % のアポトーシス細胞しか示さなかったが、一方、T R A F 6 s i R N A グループにおいては、75 % の細胞が培養の最後にはアポトーシス性であった。T R A F 6 s i R N A グループにおいて、未処理細胞は 15 % のアポトーシス細胞を示し、一方、T R A F 6 s i R N A によって処理した細胞は、75 % のアポトーシス細胞を示した。

【0154】

そのデータは、I R A K - 4 発現の阻害が、T L R 3 によって媒介される細胞傷害性の阻害を引き起こしたことを示す。しかし、T R A F 6 発現の阻害は、T L R 3 によって媒介される細胞傷害性の阻害を引き起こさなかった。T R A F 6 は、T L R シグナル伝達経路において I R A K - 4 の下流に位置すると考えられたので、この知見は予期されていなかった。従って、これは、T L R 3 が I R A K - 4 を介してシグナル伝達をして、T R A F 6 非依存性のアポトーシス経路を活性化し得たことを示唆する。

【0155】

並行して、 $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ のポリ I C 有りまたは無しのいずれかで 24 時間培養した、s i R N A トランスフェクト C a m a - 1 細胞の上清における I L - 6 濃度を、E L I S A によって決定した。そのデータは、scr グループに関して、未処理細胞および処理細胞が、それぞれ 10 および 110 の I L - 6 濃度 ($\text{pg} / \text{mL} / 10^6$ 細胞) を有していたことを示す。s i R N A I R A K - 4 グループにおいて、未処理細胞および処理細胞は、それぞれ 10 および 40 の I L - 6 濃度 ($\text{pg} / \text{mL} / 10^6$ 細胞) を有していた。s i R N A T R A F 6 グループにおいて、未処理細胞および処理細胞は、それぞれ 10 お

10

20

30

40

50

よび 20 の IL - 6 濃度 (pg / ml / 10^6 細胞) を有していた。これらのデータは、IRAK - 4 および TRAF 6 がどちらも、サイトカイン産生に必要であったことを示す。

【 0 1 5 6 】

(実施例 1 1)

TLR 3 によって媒介されるアポトーシスにおける 1 型インターフェロンの関与を評価した。Cama - 1 細胞を、5 μ g / ml のポリ IC とともに、0 時間、1 時間、6 時間、18 時間または 24 時間のいずれかでインキュベートした。細胞溶解産物における IFN - 、リン酸化 Stat 1 (チロシン 701) (P - Stat - 1) および総 Stat - 1 の存在を、ウェスタンブロットによって分析した。

10

【 0 1 5 7 】

そのデータは、ポリ IC 処理時に IFN - 産生が強力に誘導されたことを示す。また、Stat 1 のリン酸化が観察された。これらの観察は、Cama - 1 細胞において、I 型 IFN のシグナル伝達が、ポリ IC によって引き起こされたことを示す。興味深いことに、Stat 1 のリン酸化は、ポリ IC 処理の 6 時間後に最大であり、その時 IFN - の産生はまだほとんど検出できなかった。

【 0 1 5 8 】

別の実験において、Cama - 1 細胞を、20 μ g / ml の中和 IFN I 型受容体 mAb (抗 IFN R 1) またはアイソタイプコントロール (マウス Ig G 1) のいずれかとともに 1 時間プレインキュベートした。次いで細胞を 5 μ g / ml のポリ IC 有りまたは無しで、またはそれぞれ 1000 U / ml の IFN - または IFN - の混合物と、24 時間培養した。アポトーシスを、アネキシン V 染色によって測定し、そして培養中のアポトーシス細胞のパーセンテージとして表した。

20

【 0 1 5 9 】

抗体の非存在下で、未処理細胞、ポリ IC 処理細胞および IFN / 処理細胞は、それぞれ 10 %、70 % および 20 % のアポトーシス細胞を示した。mIgG 1 グループにおいて、未処理細胞、ポリ IC 処理細胞および IFN / 処理細胞は、それぞれ 10 %、70 % および 20 % のアポトーシス細胞を示した。抗 IFN R 1 グループにおいて、未処理細胞、ポリ IC 細胞および IFN / 処理細胞は、それぞれ 10 %、30 % および 15 % のアポトーシス細胞を示した。

30

【 0 1 6 0 】

そのデータは、特異的モノクローナル抗体による I 型 IFN 受容体の中和が、ポリ IC 誘導アポトーシスを有意に減少させたことを示す。これは、I 型 IFN が TLR 3 によって媒介されるアポトーシスに必要であることを示す。

【 0 1 6 1 】

IFN と IFN との混合物による Cama - 1 細胞の処理は、有意なアポトーシスを誘導することができなかった。これは、I 型 IFN シグナル伝達は TLR 3 によって引き起こされる細胞傷害性に必要であったが、単独で細胞死を誘導するのに十分でないことを示す。

【 0 1 6 2 】

40

(実施例 1 2)

本発明者らは、TNF - が TLR 3 によって媒介されるアポトーシスにおいて役割を果たしているかどうか決定することを試みた。Cama - 1 細胞を、20 μ g / ml の中和抗 TNF - mAb または 10 μ g / ml の CHX 有りまたは無しのいずれかでプレインキュベートした。次いで細胞を、5 μ g / ml のポリ IC または 25 ng / ml の TNF - 有りまたは無しのいずれかで培養した。アポトーシスを、アネキシン V 染色によって測定し、そして培養中のアポトーシス細胞のパーセンテージとして表した。

【 0 1 6 3 】

抗体の非存在下で、未処理細胞、ポリ IC 処理細胞および TNF - 処理細胞は、それぞれ 10 %、70 %、および 40 % のアポトーシス細胞を示した。抗 TNF - mAb グ

50

ループにおいて、未処理細胞、ポリIC処理細胞およびTNF- α 処理細胞は、それぞれ10%、65%および10%のアポトーシス細胞を示した。CHXグループにおいて、未処理細胞、ポリIC処理細胞およびTNF- α 処理細胞は、それぞれ15%、40%および70%のアポトーシス細胞を示した。

【0164】

そのデータは、Cama-1細胞をTNF- α 誘導アポトーシスから保護した中和抗TNF- α 抗体は、ポリICによって引き起こされる細胞死に影響を与えなかったことを示す。従って、TNF- α はTLR3によって媒介されるアポトーシスにおいて役割を果たしていない。

【0165】

上記で述べたように、NF- κ Bが制御する生存プログラムをブロックすることによって細胞をTNF- α 誘導性アポトーシスに感受性にすることが公知である一般的な転写阻害剤CHXによってCama-1細胞を前処理した。

【0166】

そのデータは、CHXは有意にCama-1細胞をTNF- α 誘導性アポトーシスに感受性にしたことを示す。対照的に、CHXはポリIC誘導性アポトーシスから細胞を部分的に保護した。これは、これら2つのアポトーシス促進性刺激によって、異なるメカニズムが引き起こされることを確認する。

【0167】

次いでRNA干渉を使用して、TLR3によって媒介されるアポトーシスにおけるNF- κ Bの関与を評価した。72時間前にp65に対するsiRNAまたはスクランブルコントロール二重鎖(scr)でトランスフェクトしたCama-1細胞を、50ng/mlまたは5 μ g/mlのポリIC有りまたは無しのいずれかで24時間培養した。ポリIC処理の前のp65タンパク質発現の消滅を、ウェスタンブロットによって評価した。アポトーシスをアネキシンV染色によって測定した。結果を、培養中のアポトーシス細胞のパーセントとして表した。

【0168】

scrグループにおいて、未処理細胞、ポリIC(50ng/ml)処理細胞およびポリIC(5 μ g/ml)処理細胞は、それぞれ10%、20%および70%のアポトーシス細胞を示した。siRNA p65グループにおいて、未処理細胞、ポリIC(50ng/ml)処理細胞およびポリIC(5 μ g/ml)処理細胞は、それぞれ10%、10%および20%のアポトーシス細胞を示した。

【0169】

そのデータは、siRNAによるNF- κ B p65発現の阻害は、ポリIC誘導細胞傷害性に対する有意な保護を引き起こしたことを示す。これは、ポリICによって引き起こされるアポトーシスにおける、NF- κ Bのアポトーシス促進の役割を確認する。

【0170】

まとめると、これらの結果は、TNF- α の分泌がポリIC誘導性アポトーシスの原因ではないことを示す。それに加えて、これらの結果は、TLR3によって媒介されるアポトーシスにおけるNF- κ Bのアポトーシス促進の役割を示し、それはTNF処理時の抗アポトーシス効果と対照的である。

【0171】

(実施例13)

本発明者らは、次にアポトーシスにおけるカスパーゼの役割に取り組んだ。Cama-1細胞を25 μ Mの一般的なカスパーゼ阻害剤z-VAD-fmkまたはDMSOと共に1時間プレインキュベートし、その後、5 μ g/mlのポリICまたは25ng/mlのTNF- α (ポジティブコントロールとして使用した)有りまたは無しで24時間培養した。アポトーシスをアネキシンV染色によって測定し、そして培養中のアポトーシス細胞のパーセンテージとして表した。

【0172】

10

20

30

40

50

DMSOグループにおいて、未処理細胞、ポリIC処理細胞およびTNF- α 処理細胞は、それぞれ10%、70%および40%のアポトーシス細胞を示した。z-VAD-fmkグループにおいて、未処理細胞、ポリIC処理およびTNF- α 処理細胞は、それぞれ10%、30%および10%のアポトーシス細胞を示した。

【0173】

そのデータは、広いカスパーゼ阻害剤であるz-VAD-fmkによるカスパーゼ活性の阻害は、ポリIC誘導性アポトーシスを大きく抑制したことを示す。これは、TLR3によって引き起こされる細胞傷害性におけるカスパーゼの主な役割を示唆する。

【0174】

別の実験において、上記で得られた細胞由来の溶解産物を、PARPの切断、カスパーゼ3およびカスパーゼ8に関してウェスタンブロットによって分析した。

10

【0175】

そのデータは、カスパーゼ依存性アポトーシスの特徴であるPARPの切断が、ポリIC処理時にCama-1細胞において起こったことを示す。これは、TLR3によって媒介されるアポトーシスにおけるカスパーゼの関与を確認する。実際、ウェスタンブロット分析によって証明されるように、カスパーゼ3はポリIC処理時に活性化された。

【0176】

(実施例14)

本発明者らは、TLR3リガンドとI型インターフェロンとの間に何らかの相乗作用が存在するかどうかをさらに調査しようと試みた。初代乳癌細胞SKBr3を、6穴プレートに1ウェルあたり 3×10^5 細胞でプレATINGした。一晚接着させた後、siRNAトランスフェクションを、 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ のリポフェクトアミン2000 (InvivoGen) および100nMのsiRNAを含むOptiMEM培地 (Life Technologies) 中で5時間行った。細胞を、MOCK (水)、TLR3 siRNAまたはPKR siRNAのいずれかでトランスフェクトした。次いで細胞を洗浄し、完全培地中で72時間培養し、その後、 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ のポリICにより24時間処理し、そしてアポトーシス分析を行った。

20

【0177】

MOCKグループにおいて、未処理細胞およびポリIC ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) 処理細胞は、それぞれ10%および22%のアポトーシス細胞を示した。TLR3 siRNAグループにおいて、未処理細胞およびポリIC ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) 処理細胞は、それぞれ8%および13%のアポトーシス細胞を示した。PKR siRNAグループにおいて、未処理細胞およびポリIC ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) 処理細胞は、それぞれ12%および22%のアポトーシス細胞を示した。

30

【0178】

そのデータは、乳房腺癌細胞株SKBr3は、ポリICで処理した場合に部分的なアポトーシスを起こしたことを示す。それに加えて、そのデータは、TLR3 siRNAによる細胞の前処理がアポトーシスを無効にし、一方、PKR siRNAが保護効果を有さなかったことを示す。

【0179】

別の実験において、本発明者らは、IFN α およびポリICが、アポトーシスを誘導するために相乗的に作用するかどうかを決定することを試みた。SKBr3細胞を、未処理としたか、または10U/mLもしくは100U/mLのIFN α - もしくはIFN α - の低用量混合物のいずれかで処理した。ポリICを以下の投与量で投与した：0、0.5、5および50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で48時間。

40

【0180】

そのデータは、未処理ポリICグループにおいて、未処理細胞、IFN α - / (10U/mL) 処理細胞およびIFN α - / (100U/mL) 処理細胞は、それぞれ10%、14%および22%のアポトーシス細胞を示したことを示す。0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ポリICグループにおいて、未処理細胞、IFN α - / (10U/mL) 細胞およびIFN

50

- / (1 0 0 U / m l) 処理細胞は、それぞれ 1 5 %、4 5 % および 5 5 % のアポトーシス細胞を示した。5 μ g / m l ポリ I C グループにおいて、未処理細胞、I F N - / (1 0 U / m l) 細胞および I F N - / (1 0 0 U / m l) 処理細胞は、それぞれ 2 0 %、5 5 % および 6 0 % のアポトーシス細胞を示した。5 0 μ g / m l ポリ I C グループにおいて、未処理細胞、I F N - / (1 0 U / m l) 細胞および I F N - / (1 0 0 U / m l) 処理細胞は、それぞれ 2 0 %、5 5 % および 6 0 % のアポトーシス細胞を示した。

【 0 1 8 1 】

従って、I F N は、アポトーシスを誘導するためにポリ I C と相乗的に作用し得た。この相乗作用は、2 つの徴候を有していた：1) 前処理した場合、S K B r 3 細胞は、非前処理細胞より 1 0 0 倍低い濃度で、ポリ I C 誘導性アポトーシスに対して感受性になった；および 2) ポリ I C によってアポトーシスに誘導された S K B r 3 細胞のパーセンテージは、I 型 I F N 前処理の後、2 2 % から 6 6 % へと増加した。

10

【 0 1 8 2 】

結論として、I 型 I F N 前処理は、T L R 3 によって媒介されるポリ I C 誘導性アポトーシスに対して S K B r 3 乳房腺癌細胞を感受性にした。従って、乳癌患者の低用量 I 型 I F N による前処置は、ポリ I C 処置の効力を高めるだけでなく、そうでなければポリ I C から利益を得られない患者の補充を可能にする。患者を手術の前に低用量の I 型 I F N で処置して、生検に対する免疫組織学によって陽性と評価される、および T L R 3 リガンドに反応性となる腫瘍のパーセンテージを増加させることもできる。それに加えて、低用量の I 型 I F N と低用量のポリ I C との組み合わせは、より高い投与量のポリ I C 単独よりも有効であり得る。この組み合わせはまた、副作用のリスクを減少させ得る。

20

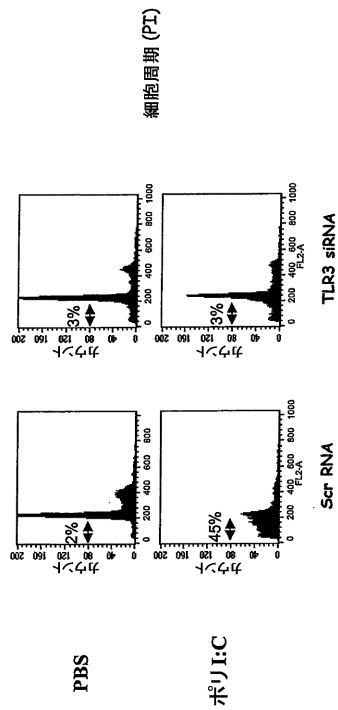
【図面の簡単な説明】

【 0 1 8 3 】

【 図 1 】 図 1 は、ポリ I C とともに 4 8 時間インキュベーションした後の、C a m a - 1 細胞のアポトーシスに対する、T L R 3 の s i R N A サイレンシングの効果を示すグラフのセットである。

【図 1】

TLR3は、その発現のsiRNAサイレンシングによって
示されるように、ポリIC誘導性Cama-1細胞死に必要である



Cama-1細胞を、無関係な配列(Scr RNA)またはTLR3に対応する配列のいずれかのsiRNAで
トランスフェクトした。次いで、実施例4で記載したように、細胞をポリIC有または無しで培養した。
48時間の培養後、ヨウ化プロピジウムで染色した後、細胞周期を、FACSによって分析した。

Fig. 1

【配列表】

[2008507530000001.xml](#)

【手続補正書】

【提出日】平成19年6月22日(2007.6.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

[2008507530000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US2005/025602

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K45/00 A61K31/713 A61K39/395 A61P35/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE, COMPENDEX, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PODOLSKY M D ET AL: "TARGETING TOLL LIKE RECEPTOR 3 BY DOUBLE STRANDED RNA IN BREAST CANCER: RESULTS FROM IN VITRO STUDIES AND RANDOMIZED TRIAL" JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, GRUNE AND STRATTON, NEW YORK, NY, US, vol. 22, no. 4, 15 July 2004 (2004-07-15), page 9619, XP009051335 ISSN: 0732-183X the whole document	1-22
X	WO 2004/047612 A (NUVELO, INC; DEDERA, DOUGLAS; EMTAGE, PETER, C., R) 10 June 2004 (2004-06-10) page 5, line 19 - page 6, line 4 ----- -/--	1-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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 14 November 2005		Date of mailing of the international search report 17/01/2006
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Pilling, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US2005/025602

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	WO 2004/050868 A (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY; SEYA, TSUKASA; MATSUMOTO, MISAKO;) 17 June 2004 (2004-06-17) abstract	1-22
E	-& EP 1 577 383 A (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) 21 September 2005 (2005-09-21) page 9, line 12 - line 23 page 21, line 13 - line 20; claim 14	1-22
X	WO 03/099195 A (EISAI CO., LTD) 4 December 2003 (2003-12-04) page 8, line 8 - line 9 page 9, line 16 - line 23	1-22
X	WO 03/045431 A (SCHERING CORPORATION) 5 June 2003 (2003-06-05) page 3, line 31 - page 4, line 4 page 5, line 10 - line 13 page 21, line 25 - line 34	1-22
X	WO 03/035695 A (TANOX, INC; AN, LING-LING; WU, HERREN; FUNG, MICHAEL, S., C) 1 May 2003 (2003-05-01) page 5, line 16 - line 22; claim 18	1-22
X	KRIEG ARTHUR M: "Antitumor applications of stimulating toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides." CURRENT ONCOLOGY REPORTS. MAR 2004, vol. 6, no. 2, March 2004 (2004-03), pages 88-95, XP009056484 ISSN: 1523-3790 "Conclusions"	1-22
X	SALAZAR A M ET AL: "LONG-TERM TREATMENT OF MALIGNANT GLIOMAS WITH INTRAMUSCULARLY ADMINISTERED POLYINOSINIC-POLYCYTIDYLIC ACID STABILIZED WITH POLYLYSINE AND CARBOXYMETHYLCELLULOSE: AN OPEN PILOT STUDY" NEUROSURGERY, WILLIAMS & WILKINS, BALTIMORE, MD, US, vol. 38, no. 6, June 1996 (1996-06), pages 1096-1104, XP001000929 ISSN: 0148-396X abstract	1-22

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2005/025602

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	<p>YOUN J K ET AL: "ADJUVANT TREATMENT OF OPERABLE STOMACH CANCER WITH POLYADENYLIC POLYURIDYLIC ACID IN ADDITION TO CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS A PRELIMINARY REPORT"</p> <p>INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOPHARMACOLOGY, vol. 12, no. 3, 1990, pages 289-296, XP009056488 ISSN: 0192-0561 abstract</p>	1-22
X	<p>KHAN A LATIF ET AL: "Polyadenylic-polyuridylic acid enhances the natural cell-mediated cytotoxicity in patients with breast cancer undergoing mastectomy"</p> <p>SURGERY (ST LOUIS), vol. 118, no. 3, 1995, pages 531-538, XP009056483 ISSN: 0039-6060 abstract</p>	1-22
X	<p>CHO C-H ET AL: "ANTITUMOR EFFECT OF MONOPHOSPHORYL LIPID A, POLYADENYLIC-POLYURIDYLIC ACID AND CISPLATIN ON B16 MELANOMA-INDUCED PULMONARY METASTASIS IN MICE"</p> <p>DAEHAN MISAENGMUL HAGHOEJI - JOURNAL OF THE KOREAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, DACHAN MISAENGMUL HAGHOC, SEOUL, KO, vol. 29, no. 2, 1994, pages 231-244, XP009011649 ISSN: 0253-3162 abstract</p>	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2005/025602

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 2004047612	A	10-06-2004	AU	2003295649 A1	18-06-2004
			CA	2506356 A1	10-06-2004
			EP	1567863 A2	31-08-2005
WO 2004050868	A	17-06-2004	CA	2507716 A1	17-06-2004
			EP	1577383 A1	21-09-2005
			JP	2004180540 A	02-07-2004
EP 1577383	A	21-09-2005	CA	2507716 A1	17-06-2004
			WO	2004050868 A1	17-06-2004
			JP	2004180540 A	02-07-2004
WO 03099195	A	04-12-2003	AU	2003273171 A1	12-12-2003
			EP	1511499 A2	09-03-2005
			JP	2005530805 T	13-10-2005
WO 03045431	A	05-06-2003	AU	2002359516 A1	10-06-2003
			CA	2468320 A1	05-06-2003
			CN	1617742 A	18-05-2005
			EP	1450858 A2	01-09-2004
WO 03035695	A	01-05-2003	CN	1642982 A	20-07-2005
			EP	1412390 A2	28-04-2004

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
	C 1 2 N 15/00 Z N A A	

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

(72)発明者 ルペーク, セルジュ
フランス国 エフ - 6 9 3 8 0 シブリユー ダーゼス, シュマン ドゥ マラン, 5 1 4

(72)発明者 レノ, トゥフィク
フランス国 エフ - 6 9 3 8 0 シブリユー ダーゼス, ルー ドゥ リグリーズ, 3 4 8

(72)発明者 サルーン, ブルーノ
スイス国 ツェーハー - 1 0 0 8 プリリー, アベニユー ドゥ シャトー 8 1

(72)発明者 コステ - インヴァーニジ, イザベル
フランス国 エフ - 6 9 3 8 0 シャジー ダーゼス, ルー コンペ, 7

(72)発明者 リゾアン, マリー - クロチルド
フランス国 エフ - 6 9 0 0 5 リヨン, プレイス サン ジャン, 8

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA63 CA04 CA05 CA11 HA11
4C084 AA02 AA13 AA17 BA44 CA27 CA59 MA01 NA14 ZB262
4C085 AA03 AA13 AA14 BB01 CC32 DD88 EE01 GG01
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26