

(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2008-500005

(P2008-500005A)

(43) 公表日 平成20年1月10日(2008.1.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/455 (2006.01)	C O 7 K 14/455	4 B O 6 4
C O 7 K 7/08 (2006.01)	C O 7 K 7/08	4 B O 6 5
C O 7 K 7/06 (2006.01)	C O 7 K 7/06	4 C O 8 4
C O 7 K 5/113 (2006.01)	C O 7 K 5/113	4 C O 8 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 168 頁) 最終頁に続く		

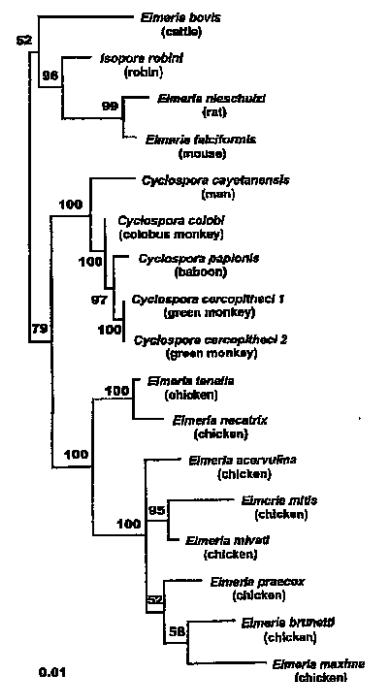
(21) 出願番号 特願2006-520402 (P2006-520402)
 (86) (22) 出願日 平成16年7月15日 (2004. 7. 15)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年3月16日 (2006. 3. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/023113
 (87) 国際公開番号 W02005/010040
 (87) 国際公開日 平成17年2月3日 (2005. 2. 3)
 (31) 優先権主張番号 60/487, 336
 (32) 優先日 平成15年7月15日 (2003. 7. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506016370
 バロス リサーチ インスティテュート
 アメリカ国 エムアイ 4 8 8 4 2 ホルト
 カレッジロード 2 4 3 0
 (71) 出願人 506016473
 ミシガン ステート ユニヴァーシティー
 アメリカ国 エムアイ 4 8 8 2 4 イース
 トランシング アドミニストレーションビル
 ディング 2 4 6 オフィス オヴ イ
 ンテレクチュアル プロパティー
 (74) 代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀
 (72) 発明者 アイルスウォース チャールズ
 アメリカ国 エムアイ 4 8 8 4 2 ホルト
 ト ヘザートン 1 9 1 5
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌及び感染症の免疫療法のための組成物及び方法

(57) 【要約】

本発明は、対象における免疫応答を刺激するための、及びインターロイキン12 (IL-12) 治療の代替として使用するための、原発性腫瘍疾患、転移性腫瘍疾患及び感染症の予防及び治療のための組成物及び方法を提供する。詳細には本発明は、免疫刺激活性を有することから、癌及び感染症の治療及び予防並びに免疫変調に用途を有するアピコンプレックス関連タンパク質 (ARP) を提供する。ARPを含む組成物が提供される。インターロイキン12 (IL-12) 治療の代替として使用するための、及び対象における免疫応答を誘発するための、癌及び／又は感染症を予防及び／又は治療するためのARPの使用方法も提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

動物における疾患を治療又は予防する方法であって、前記動物にタンパク質を供給する薬学的有効量の医薬組成物を前記動物に投与することを含み、前記タンパク質が、デフォルトパラメータに調整したBLAST 2.0アルゴリズムによって決定される配列番号 1、配列番号 2、配列番号 28 又は配列番号 30 からなる群から選択されるタンパク質のいずれか 1 つと少なくとも 25 % の同一性を有し、前記タンパク質が免疫刺激活性を有する方法。

【請求項 2】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、タンパク質、前記タンパク質をコードする核酸、又は前記タンパク質をコードする核酸をトランスフェクトされている細胞として供給する、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

疾患を治療する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

疾患を予防する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、

- (a) 配列番号 1 を含む単離されたタンパク質、
- (b) 配列番号 2 を含む単離されたタンパク質、
- (c) 配列番号 28 を含む単離されたタンパク質、 20
- (d) 配列番号 30 を含む単離されたタンパク質、
- (e) 配列番号 3、4、5、6 及び 7 を含む単離されたタンパク質、
- (f) 前記 (a) ~ (e) のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、又は

(g) 前記 (a) ~ (e) のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞（前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している）

として供給する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

医薬組成物が、配列番号 1 を含む単離されたタンパク質を含む、請求項 5 に記載の方法。 30

【請求項 7】

医薬組成物が、配列番号 2 を含む単離されたタンパク質を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

医薬組成物が、配列番号 28 を含む単離されたタンパク質を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

医薬組成物が、配列番号 30 を含む単離されたタンパク質を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 10】 40

医薬組成物が、配列番号 3、4、5、6 及び 7 を含む単離されたタンパク質を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 11】

医薬組成物が、動物に前記タンパク質を、

- (a) (1) アイメリアに感染している組織又は細胞の細胞抽出物を作製する段階、
- (2) 上清を作製するために前記細胞抽出物を遠心分離する段階、
- (3) タンパク質を沈殿させてペレットにするために硫酸アンモニウムによって前記上清を分画し、且つ前記ペレットを溶液に再懸濁する段階、
- (4) H I C カラムに前記溶液を適用する段階、
- (5) 溶出した物質を作製するために前記 H I C カラムに結合した物質を溶出させる段階 50

、
(6) D E A E カラムに負荷するための試料を作製するために、前記溶出した物質を透析する段階、

(7) D E A E カラムに前記試料を適用する段階、

(8) 溶出した画分を作製するために緩衝液で前記 D E A E カラムに結合した物質を溶出させ、且つ前記溶出した画分を濃縮する段階、

(9) サイズ排除カラムに前記濃縮され溶出した画分を適用する段階、

(10) 前記サイズ排除カラムから溶出した画分を収集及びプールする段階、

(11) カルシウム結合タンパクを除去するために H I C カラムに前記プールされた画分を適用する段階、

(12) H P L C H I C カラムに前記 H I C カラムから溶出した画分を適用し、且つ活性画分を収集する段階（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン 1 2 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする 10 時間以内に哺乳動物から単離されたものである）、

(13) 前記活性画分を透析する段階、並びに

(14) H P L C D E A E カラムに前記透析された活性画分を適用し、且つ 1 つ若しくは複数の活性画分を収集する段階（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン 1 2 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする 10 時間以内に哺乳動物から単離されたものである）

を含む工程の生成物である単離されたタンパク質、

(b) 組換え発現されたタンパク質、

(c) 前記 (a) をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、又は

(d) 前記 (a) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞（前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している）

として供給する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 1 2】

単離されたタンパク質が、

(15) 逆相 H P L C カラムに段階 (14) において収集された活性画分を適用する段階、及び

(16) 溶出したタンパク質を作製するために前記逆相 H P L C カラムから結合したタンパク質を溶出させる段階（前記タンパク質は樹状細胞からのインターロイキン 1 2 の放出を刺激する活性を有し、前記樹状細胞は前記活性をアッセイする 10 時間以内に哺乳動物から単離されたものである）

をさらに含む工程の生成物である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

単離されたタンパク質が、段階 (16) の溶出したタンパク質を再生する段階をさらに含む工程の生成物である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

細胞抽出物が、アイメリアに感染している組織から作製され、前記組織がウシ小腸組織である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

医薬組成物が、

(a) 精製されたアピコンプレックス門生物の、又はアピコンプレックス門生物に感染している細胞のホモジネートを作製する段階、

(b) ペレットを得るために前記ホモジネートを遠心分離する段階、

(c) ホスホリパーゼを含む溶液で前記ペレットを処理する段階、

(d) 上清を得るために前記溶液を遠心分離する段階、

(e) 逆相 H P L C カラムに前記上清を適用する段階、及び

(f) 溶出したタンパク質を作製するために前記逆相 H P L C カラムから結合したタンパク質を溶出させる段階（前記タンパク質は樹状細胞からのインターロイキン 1 2 の放出を

10

20

30

40

50

刺激する活性を有し、前記樹状細胞は前記活性をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)

を含む工程の生成物である単離されたタンパク質である、請求項3に記載の方法。

【請求項16】

医薬組成物が、段階(f)の溶出したタンパク質を再生する段階をさらに含む工程の生成物である単離されたタンパク質である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

医薬組成物が、組換え発現された単離されたタンパク質である、請求項11に記載の方法。

【請求項18】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、(a)～(e)のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸として供給する、請求項5又は11に記載の方法。

【請求項19】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、(a)～(e)のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸として供給し、前記ヌクレオチド配列が前記動物において作動可能なプロモーターに連結している、請求項5又は11に記載の方法。

【請求項20】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、(a)～(e)のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸として供給し、前記ヌクレオチド配列がプロモーターに作動可能に連結している請求項5又は11に記載の方法。

【請求項21】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、
 (a) 配列番号3、4、6又は7を含む単離されたタンパク質、
 (b) 配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30のいずれか1つの変異体を含む単離されたタンパク質（前記変異体は、それぞれ配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30に対して保存的アミノ酸置換のみを有する）、
 (c) 配列番号3、4、6又は7の変異体を含む単離されたタンパク質（前記変異体は、それぞれ配列番号3、4、6又は7に対して保存的アミノ酸置換のみを有する）、
 (d) P R O F（プロフィリン）ドメインを含む単離されたタンパク質、
 (e) 低ストリンジェンシー条件下で配列番号15、16、17、18、19、20若しくは27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされるアミノ酸配列を含む、免疫刺激活性を有する単離されたタンパク質、
 (f) 高ストリンジェンシー条件下で配列番号15、16、17、18、19、20若しくは27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされるアミノ酸配列を含む、免疫刺激活性を有する単離されたタンパク質、
 (g) 前記(a)～(f)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、

(h) 前記(a)～(f)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞（前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している）として供給し、前記医薬組成物が樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである、請求項3に記載の方法。

【請求項22】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、配列番号3、4、6又は7を含む単離されたタンパク質として供給する、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってアッセイされる分子量18～25 k D及び4.0と4.7との間の等

10

20

30

40

50

電点 (pI) を含む単離されたタンパク質として供給する請求項 10 から 15 又は 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 28 又は配列番号 30 のいずれか 1 つの変異体を含む単離されたタンパク質として供給し、前記変異体がそれぞれ配列番号 1、配列番号 2、配列番号 28 又は配列番号 30 に対して保存的アミノ酸置換のみを有する、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、配列番号 3、4、6 又は 7 の変異体を含む単離されたタンパク質として供給し、前記変異体がそれぞれ配列番号 3、4、6 又は 7 に対して保存的アミノ酸置換のみを有する、請求項 21 に記載の方法。 10

【請求項 26】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、PROF (プロフィリン) ドメインを含む単離されたタンパク質として供給する、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 27】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、低ストリンジェンシー条件下で配列番号 15、16、17、18、19、20 若しくは 27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされる単離されたタンパク質として供給し、前記タンパク質が免疫刺激活性を有する、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 28】 20

医薬組成物が、動物にタンパク質を、高ストリンジェンシー条件下で配列番号 15、16、17、18、19、20 若しくは 27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされる単離されたタンパク質として供給し、前記タンパク質が免疫刺激活性を有する、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 29】

アイメリアの核酸が、(a)～(f) のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 30】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、前記 (a)～(f) のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列として供給し、前記ヌクレオチド配列が前記動物において作動可能なプロモーターに連結している、請求項 21 に記載の方法。 30

【請求項 31】

形質転換細胞が、前記 (a)～(f) のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞を含み、前記ヌクレオチド配列がプロモーターに作動可能に連結している、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 32】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、
 (a) 配列番号 1 を含む単離されたタンパク質、
 (b) 配列番号 2 を含む単離されたタンパク質、
 (c) 配列番号 28 を含む単離されたタンパク質、 40
 (d) 配列番号 30 を含む単離されたタンパク質、
 (e) 配列番号 3、4、5、6 及び 7 を含む単離されたタンパク質、
 (f) 前記 (a)～(e) のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、又は

(g) 前記 (a)～(e) のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞 (前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している) として供給する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 33】

医薬組成物が、配列番号 1 を含む単離されたタンパク質を含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 3 4】

医薬組成物が、配列番号 2 を含む単離されたタンパク質を含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

医薬組成物が、配列番号 2 8 を含む単離されたタンパク質を含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 6】

医薬組成物が、配列番号 3 0 を含む単離されたタンパク質を含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 7】

医薬組成物が、配列番号 3、4、5、6 及び 7 を含む単離されたタンパク質を含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 8】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、
 (a) (1) アイメリアに感染している組織又は細胞の細胞抽出物を作製する段階、
 (2) 上清を作製するために前記細胞抽出物を遠心分離する段階、
 (3) タンパク質を沈殿させてペレットにするために硫酸アンモニウムによって前記上清を分画し、且つ前記ペレットを溶液に再懸濁する段階、
 (4) 前記溶液を H I C カラムに適用する段階、
 (5) 溶出した物質を作製するために前記 H I C カラムに結合した物質を溶出させる段階、
 (6) D E A E カラムに負荷するための試料を作製するために前記溶出した物質を透析する段階、
 (7) D E A E カラムに前記試料を適用する段階、
 (8) 溶出した画分を作製するために緩衝液で前記 D E A E カラムに結合した物質を溶出させ、且つ前記溶出した画分を濃縮する段階、
 (9) サイズ排除カラムに前記濃縮され溶出した画分を適用する段階、
 (10) 前記サイズ排除カラムから溶出した画分を収集及びプールする段階、
 (11) カルシウム結合タンパクを除去するために H I C カラムに前記プールされた画分を適用する段階、
 (12) H P L C H I C カラムに前記 H I C カラムから溶出した画分を適用し、且つ活性画分を収集する段階（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン 1 2 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする 1 0 時間以内に哺乳動物から単離されたものである）、
 (13) 前記活性画分を透析する段階、並びに
 (14) H P L C D E A E カラムに前記透析された活性画分を適用し、且つ 1 つ若しくは複数の活性画分を収集する段階（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン 1 2 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする 1 0 時間以内に哺乳動物から単離されたものである）
 を含む工程の生成物である単離されたタンパク質、
 (b) 組換え発現されたタンパク質、
 (c) 前記 (a) をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、又は
 (d) 前記 (a) をコードし、プロモーターに作動可能に連結しているヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞
 として供給する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 3 9】

単離されたタンパク質が、
 (15) 前記段階 (14) において収集された活性画分を逆相 H P L C カラムに適用する段階、及び
 (16) 溶出したタンパク質を作製するために前記逆相 H P L C カラムから結合したタン

パク質を溶出させる段階

をさらに含む工程の生成物であり、前記タンパク質が樹状細胞からのインターロイキン 12 の放出を刺激する活性を有し、前記樹状細胞が前記活性をアッセイする 10 時間以内に哺乳動物から単離されたものである、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

単離されたタンパク質が、前記段階（16）の溶出したタンパク質を再生する段階をさらに含む工程の生成物である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

細胞抽出物が、アイメリアに感染している組織から作製され、前記組織がウシ小腸組織である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 42】

医薬組成物が、

（a）精製されたアピコンプレックス門生物の、又はアピコンプレックス門生物に感染している細胞のホモジネートを作製する段階、

（b）ペレットを得るために前記ホモジネートを遠心分離する段階、

（c）ホスホリパーゼを含む溶液で前記ペレットを処理する段階、

（d）上清を得るために前記溶液を遠心分離する段階、

（e）逆相 HPLC カラムに前記上清を適用する段階、及び

（f）溶出したタンパク質を作製するために前記逆相 HPLC カラムから結合したタンパク質を溶出させる段階（前記タンパク質は樹状細胞からのインターロイキン 12 の放出を刺激する活性を有し、前記樹状細胞は前記活性をアッセイする 10 時間以内に哺乳動物から単離されたものである）

を含む工程の生成物である単離されたタンパク質である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 43】

医薬組成物が、段階（f）の溶出したタンパク質を再生する段階をさらに含む工程の生成物である単離されたタンパク質である、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

医薬組成物が、（a）～（e）のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸として動物に前記タンパク質を供給する、請求項 32 又は 38 に記載の方法。

【請求項 45】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、（a）～（e）のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸として供給し、前記ヌクレオチド配列が前記動物において作動可能なプロモーターに連結している、請求項 32 又は 38 に記載の方法。

【請求項 46】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、（a）～（e）のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸として供給し、前記ヌクレオチド配列がプロモーターに作動可能に連結している、請求項 32 又は 38 に記載の方法。

【請求項 47】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、

（a）配列番号 3、4、6 又は 7 を含む単離されたタンパク質、

（b）配列番号 1、配列番号 2、配列番号 28 又は配列番号 30 のいずれか 1 つの変異体を含む単離されたタンパク質（前記変異体は、それぞれ配列番号 1、配列番号 2、配列番号 28 又は配列番号 30 に対して保存的アミノ酸置換のみを有する）、

（c）配列番号 3、4、6 又は 7 の変異体を含む単離されたタンパク質（前記変異体は、それぞれ配列番号 3、4、6 又は 7 に対して保存的アミノ酸置換のみを有する）、

（d）PROF（プロフィリン）ドメインを含む単離されたタンパク質、

（e）低ストリンジェンシー条件下で配列番号 15、16、17、18、19、20 若しくは 27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされるアミノ酸配列を含む、免疫刺激活性を有する単離されたタンパク質、

10

20

30

40

50

(f) 高ストリンジェンシー条件下で配列番号 15、16、17、18、19、20 若しくは 27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされるアミノ酸配列を含む、免疫刺激活性を有する単離されたタンパク質、

(g) 前記 (a) ～ (f) のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、

(h) 前記 (a) ～ (f) のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞（前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している）として提供し、前記医薬組成物が樹状細胞からのインターロイキン 12 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞が前記能力をアッセイする 10 時間以内に哺乳動物から単離されたものである、請求項 4 に記載の方法。

10

【請求項 48】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、配列番号 3、4、6 又は 7 を含む単離されたタンパク質として供給する、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってアッセイされる分子量 18～25 kD 及び 4.0 と 4.7 との間の等電点 (pI) を含む単離されたタンパク質として供給する、請求項 37 から 42 又は 46 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 50】

20

医薬組成物が、動物にタンパク質を、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 28 又は配列番号 30 のいずれか 1 つの変異体を含む単離されたタンパク質として供給し、前記変異体がそれぞれ配列番号 1、配列番号 2、配列番号 28 又は配列番号 30 に対して保存的アミノ酸置換のみを有する、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、配列番号 3、4、6 又は 7 の変異体を含む単離されたタンパク質として供給し、前記変異体がそれぞれ配列番号 3、4、6 又は 7 に対して保存的アミノ酸置換のみを有する、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 52】

医薬組成物が、PROF（プロフィリン）ドメインを含む単離されたタンパク質として動物に前記タンパク質を供給する、請求項 47 に記載の方法。

30

【請求項 53】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、低ストリンジェンシー条件下で配列番号 15、16、17、18、19、20 若しくは 27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされる、免疫刺激活性を有する単離されたタンパク質として供給する、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 54】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、高ストリンジェンシー条件下で配列番号 15、16、17、18、19、20 若しくは 27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされる、免疫刺激活性を有する単離されたタンパク質として供給する、請求項 47 に記載の方法。

40

【請求項 55】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、(a) ～ (f) のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列として供給する、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 56】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、(a) ～ (f) のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列として供給し、前記ヌクレオチド配列が前記動物において作動可能なプロモーターに連結している、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 57】

形質転換細胞が、(a) ～ (f) のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配

50

列を含む核酸で形質転換された細胞を含み、前記ヌクレオチド配列がプロモーターに作動可能に連結している、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 58】

動物における疾患を治療又は予防する方法であって、そのような治療又は予防が望ましい前記動物に治療又は予防有効量の精製されたアピコンプレックス門生物又は精製されたアピコンプレックス門生物のタンパク質含有膜画分を投与することを含む方法。

【請求項 59】

精製及び不活性化されたアピコンプレックス門生物を投与することを含む、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

アピコンプレックス門生物の孢子形成オーシストを投与することを含み、対象が、前記アピコンプレックス門生物の自然宿主ではない、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 61】

アピコンプレックス門生物がアイメリア種である、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 62】

アピコンプレックス門生物又はタンパク質含有膜画分が経口投与される、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 63】

医薬組成物が、金属キレート剤と共に投与される、請求項 5、11、15、21、32、38、42 又は 47 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 64】

疾患が癌である、請求項 5、11、15、21、32、38、42、47 又は 58 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 65】

対象に癌に対する二次療法を施すことをさらに含む、請求項 64 に記載の方法。

【請求項 66】

二次療法が、手術、放射線療法、化学療法、又はその組合せである、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 67】

二次療法が、対象に CD40 リガンド、インターフェロン γ 、インターロイキン 4、インターロイキン 18、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、別のサイトカイン、抗 CD40 抗体、又はその組合せを投与することを含む、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 68】

癌が卵巣癌である、請求項 64 に記載の方法。

【請求項 69】

疾患が感染症であり、前記感染症がヒト免疫不全ウイルス (HIV) 又はアイメリア属生物への感染によって引き起こされるものではない、請求項 5、11、15、21、32、38、42、47 又は 58 に記載の方法。

【請求項 70】

感染症が細菌によって引き起こされる、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 71】

感染症がウイルスによって引き起こされる、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 72】

ウイルスがインフルエンザウイルスである、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 73】

感染症がヒトにおけるものであり、医薬組成物が単離されたタンパク質を含み、前記単離されたタンパク質の用量が約 2.8 mg から約 280 mg である、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 74】

10

20

30

40

50

用量が約 5 m g から約 1 0 0 m g である、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

用量が約 1 0 m g から約 5 0 m g である、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

感染症が原生動物によって引き起こされる、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 7】

感染症が寄生虫によって引き起こされる、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 8】

動物が鳥類種ではなく、且つヒト免疫不全ウイルス（H I V）に感染しておらず、医薬組成物の投与が免疫応答を刺激する、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2、4 7 又は 5 8 に記載の方法。 10

【請求項 7 9】

動物がヒト免疫不全ウイルス（H I V）に感染しておらず、医薬組成物の投与が前記動物におけるインターロイキン 1 2（I L－1 2）の全身レベルの上昇を刺激する、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2、4 7 又は 5 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

動物がヒト免疫不全ウイルス（H I V）に感染していない、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2、4 7 又は 5 8 に記載の方法。

【請求項 8 1】

医薬組成物が生物のゲノムによってコードされるタンパク質を含む、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2 又は 4 7 に記載の方法。 20

【請求項 8 2】

生物がアピコンプレックス門生物である、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

アピコンプレックス門生物がアイメリア種である、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

医薬組成物が精製された分子を含む、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2 又は 4 7 に記載の方法。

【請求項 8 5】

医薬組成物が単離されたタンパク質を含み、前記単離されたタンパク質がジスルフィド結合を含む、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2 又は 4 7 に記載の方法。 30

【請求項 8 6】

ジスルフィド結合が還元型である、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

ジスルフィド結合が酸化型である、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 8】

医薬組成物がグリコシル化タンパク質を含む、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2 又は 4 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

医薬組成物が非グリコシル化タンパク質を含む、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2 又は 4 7 に記載の方法。 40

【請求項 9 0】

医薬組成物がグリコシルホスファチジルイノシトール（G P I）連結タンパク質を含む、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2 又は 4 7 に記載の方法。

【請求項 9 1】

医薬組成物がグリコシルホスファチジルイノシトール（G P I）連結ではないタンパク質を含む、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2 又は 4 7 に記載の方法。

【請求項 9 2】

医薬組成物が天然タンパク質を含む、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2 又は 4 7 に記載の方法。 50

【請求項 9 3】

医薬組成物が組換え発現されたタンパク質を含む、請求項 5、11、15、21、32、38、42 又は 47 に記載の方法。

【請求項 9 4】

治療又は予防することがアイメリア属タンパク質を含む前記医薬組成物を用いるものである、請求項 5、11、15、21、32、38、42 又は 47 に記載の方法。

【請求項 9 5】

動物がヒトである、請求項 5、11、15、21、32、38、42、47 又は 58 に記載の方法。

【請求項 9 6】

動物がヒトではない、請求項 5、11、15、21、32、38、42、47 又は 58 に記載の方法。

【請求項 9 7】

(a) 配列番号 3、4、6 又は 7 を含む精製されたポリペプチド、
(b) 配列番号 3、4、5、6 及び 7 を含む精製されたポリペプチド、
(c) デフォルトパラメータに調整した BLAST 2.0 アルゴリズムによって決定される配列番号 29 と少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む精製されたポリペプチド、並びに

(d) 配列番号 3、4、5、6 及び 7 を含むアミノ酸配列の変異体を含む精製されたポリペプチド（前記変異体は、それぞれ配列番号 3、4、5、6 及び 7 に対して保存的アミノ酸置換のみを有する）

からなる群から選択される精製されたポリペプチド。

【請求項 9 8】

ポリペプチドが配列番号 3、4、6 又は 7 を含み、前記ポリペプチドがドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってアッセイされる分子量 18～25 kD 及び 4.0 と 4.7 との間の等電点 (pI) を有する、請求項 9 7 に記載の精製されたポリペプチド。

【請求項 9 9】

ポリペプチドが配列番号 3、4、5、6 及び 7 を含み、前記ポリペプチドがドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってアッセイされる分子量 18～25 kD 及び 4.0 と 4.7 との間の等電点 (pI) を有する、請求項 9 7 に記載の精製されたポリペプチド。

【請求項 100】

(a) アイメリアに感染している組織又は細胞の細胞抽出物を作製すること、
(b) 上清を作製するために前記細胞抽出物を遠心分離すること、
(c) タンパク質を沈殿させてペレットにするために硫酸アンモニウムによって前記上清を分画すること、及び前記ペレットを溶液に再懸濁すること、

(d) 前記溶液を HIC カラムに適用すること、

(e) 溶出した物質を作製するために前記 HIC カラムに結合した物質を溶出させること

(f) DEAE カラムに負荷するための試料を作製するために、前記溶出した物質を透析すること、

(g) DEAE カラムに前記試料を適用すること、

(h) 溶出した画分を作製するために緩衝液で前記 DEAE カラムに結合した物質を溶出させること、及び前記溶出した画分を濃縮すること、

(i) サイズ排除カラムに前記濃縮され溶出した画分を適用すること、

(j) 前記サイズ排除カラムから溶出した画分を収集及びプールすること、

(k) カルシウム結合タンパクを除去するために HIC カラムに前記プールされた画分を適用すること、

(l) HPLC HIC カラムに前記 HIC カラムから溶出した画分を適用すること、及

10

20

30

40

50

び活性画分を収集すること（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである）、

（m）前記活性画分を透析すること、

（n）HPLC DEACラムに前記透析された活性画分を適用すること、及び1つ又は複数の活性画分を収集すること（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである）

を含む、ポリペプチドの製造方法。

【請求項101】

10

（o）逆相HPLCラムに段階（n）で収集された活性画分を適用する段階、及び

（p）溶出したタンパク質を作製するために前記逆相HPLCラムから結合したタンパク質を溶出させる段階（前記タンパク質は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する活性を有し、前記樹状細胞は前記活性をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである）

をさらに含む、請求項100に記載の方法。

【請求項102】

段階（p）の溶出したタンパク質を再生する段階をさらに含む、請求項101に記載の方法。

【請求項103】

20

細胞抽出物が、アイメリアに感染しているウシ小腸組織から作製される、請求項100に記載の方法。

【請求項104】

請求項100に記載の工程の生成物である、精製されたポリペプチド。

【請求項105】

（a）精製されたアピコンプレックス門生物の、又はアピコンプレックス門生物に感染している細胞のホモジネートを作製すること、

（b）ペレットを得るために前記ホモジネートを遠心分離すること、

（c）ホスホリパーゼを含む溶液で前記ペレットを処理すること、

（d）上清を得るために前記溶液を遠心分離すること、

30

（e）逆相HPLCラムに前記上清を適用すること、及び

（f）溶出したタンパク質を作製するために前記逆相HPLCラムから結合したタンパク質を溶出させること（前記タンパク質は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する活性を有し、前記樹状細胞は前記活性をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである）

を含む、ポリペプチドの製造方法。

【請求項106】

作製された抽出物がウシに自然に感染する精製されたアピコンプレックス門生物のものである、請求項105に記載の方法。

【請求項107】

40

請求項105に記載の工程の生成物である、精製されたポリペプチド。

【請求項108】

請求項97、104又は107に記載の治療有効量のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項109】

第1タンパク質に結合する抗体であって、前記第1タンパク質のアミノ酸配列が配列番号26からなり、前記抗体が第2タンパク質に結合せず、前記第2タンパク質のアミノ酸配列が配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30からなる抗体。

【請求項110】

モノクローナル抗体である請求項109に記載の抗体。

50

【請求項 1 1 1】

請求項 1 1 0 に記載の抗体のフラグメントを含む分子であって、前記フラグメントが前記第 1 タンパク質と結合できる分子。

【請求項 1 1 2】

(a) 配列番号 3、4、6 又は 7 を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、

(b) 配列番号 3、4、5、6 及び 7 を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、並びに

(c) デフォルトパラメータに調整した BLAST 2.0 アルゴリズムによって決定される配列番号 29 と少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子
からなる群から選択される単離された核酸。 10

【請求項 1 1 3】

精製されている、請求項 1 1 2 に記載の核酸。

【請求項 1 1 4】

ベクターである、請求項 1 1 2 に記載の核酸。

【請求項 1 1 5】

ポリペプチドをコードする核酸配列に作動可能に連結しているプロモーターをさらに含む、請求項 1 1 4 に記載のベクター。

【請求項 1 1 6】

発現ベクターを含む宿主細胞であって、前記発現ベクターがヌクレオチド配列に作動可能に連結しているプロモーターを含み、前記プロモーターが前記ヌクレオチド配列に関して非天然であり、前記ヌクレオチド配列が、 20

(a) 配列番号 3、4、6 若しくは 7 を含むポリペプチド、

(b) 配列番号 3、4、5、6 及び 7 を含むポリペプチド、又は

(c) デフォルトパラメータに調整した BLAST 2.0 アルゴリズムによって決定される配列番号 29 と少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする宿主細胞。

【請求項 1 1 7】

哺乳動物宿主細胞である、請求項 1 1 6 に記載の宿主細胞。 30

【請求項 1 1 8】

酵母細胞である、請求項 1 1 6 に記載の宿主細胞。

【請求項 1 1 9】

昆虫細胞である、請求項 1 1 6 に記載の宿主細胞。

【請求項 1 2 0】

細菌細胞である、請求項 1 1 6 に記載の宿主細胞。

【請求項 1 2 1】

大腸菌である、請求項 1 2 0 に記載の宿主細胞。

【請求項 1 2 2】

コードされているポリペプチドが請求項 1 1 6 に記載の細胞によって発現されるように前記細胞を増殖させること、及び発現した前記ポリペプチドを回収することを含むポリペプチドの製造方法。 40

【請求項 1 2 3】

発現したポリペプチドを回収することが、

(a) 宿主細胞の抽出物を作製すること、

(b) 上清を作製するために前記宿主細胞の抽出物を遠心分離すること、

(c) タンパク質を沈殿させるために硫酸アンモニウムによって前記上清を分画すること、

(d) ペレットを得るために前記沈殿を遠心分離すること、

(e) 前記ペレットを溶液に再懸濁すること、 50

- (f) 低圧疎水性相互作用カラムに前記溶液を適用すること、
(g) 前記低圧疎水性相互作用カラムから溶出した活性画分を収集すること（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである）、
(h) 前記低圧疎水性相互作用カラムから前記溶出した活性画分を透析すること、
(i) 低圧DEAEカラムに前記透析された活性画分を適用すること、
(j) 前記低圧DEAEカラムから溶出した1つ又は複数の活性画分を収集すること（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである）、
(k) サイズ排除カラムに前記低圧DEAEカラムから溶出した前記活性画分を適用すること、及び
(l) 前記サイズ排除カラムから前記活性画分を溶出させること（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである）を含む、請求項122に記載の方法。

【請求項124】

医薬組成物が血清アルブミンをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項125】

血清アルブミンがヒト血清アルブミンである、請求項124に記載の方法。

【請求項126】

ヒト血清アルブミンが前記組成物の重量に対して約1重量%から約10重量%の濃度で存在する、請求項125に記載の方法。

【請求項127】

ヒト血清アルブミンが前記組成物の重量に対して約2重量%から約4重量%の濃度で存在する、請求項126に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2003年7月15日に出願された米国特許出願第60/487336号の優先権を主張するものである。

【0002】

本発明は、免疫応答を刺激するための組成物及び方法、並びに原発性腫瘍疾患、転移性腫瘍疾患及び感染症の予防及び治療に関する。さらに詳細には本発明は、アピコンプレックス関連タンパク質（APS）、フラグメント、その誘導体、ホモログ又は類似体を含む組成物、並びに免疫刺激、癌及び感染症の予防及び治療へのそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0003】

2000年における国立癌研究所のサーベイランス、疫学、及び最終結果（SEER）のデータベース並びに統計局からの集団データに基づくと、米国では1.22百万の新症例（男性619700人、女性600400人）が浸潤癌と診断を受け、552200人が癌で死亡した。Braunwald et al., HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE, 15th ed., McGraw-Hill (2001), at pp 491を参照のこと。癌は、米国において依然として心疾患に次ぐ第2位の死因である。同文献。多くの資源及び尽力が、癌を予防及び治療する有効な方法を探求するのに投資されている。

【0004】

小腸腫瘍

癌と同様に普及していることに、小腸の腫瘍は希少事象である（例えばJuckett & Rosenberg, (1988) Mech, Ageing Dev. 43:239-257参照）。数年にわたり、予備実験が腫瘍のないこの自然の環境の原因を判定する試みを報告した。しかし、結果は結論に達せず、研究は精力的には遂行されなかった。

10

20

30

40

50

【0005】

他の消化管癌に比べて小腸癌による死亡が低い数字であることから、癌に対する小腸の顕著な抵抗性を実証できる。他の全ての癌と比べた小腸癌の比率はわずか0.0071である。Parkin et al. eds (1997) *Cancer Incidence in Five Continents*, Vol. V (IARC Scientific Publications No. 143) Lyon, IARC。これは、調査した全ての年及び種々のコホート全てについてほぼ同じである（同文献）。小腸腫瘍の発生率は、死亡率と同じ傾向にも従う（Parkin et al., eds., (1997), *Cancer Incidence in Five Continents*, Vol. VII (IARC Scientific Publications No. 143) Lyon, IARC)。低い発生率は、人類について、全ての遺伝子プールについて、及び長期間にわたりほぼ普遍的にあてはまる。これは、ほぼ全ての他の哺乳動物種についてもあてはまると思われる（ヒツジの2品種は例外である可能性）。Lingeman et al., (1972), *J. of the National Cancer Institute* 48:325-346参照。 10

【0006】

小腸の異常な性質に関する追加観察は、（主に長崎及び広島）放射線が誘発する病気及び腸の遺伝病に関する研究に由来する。大線量の高エネルギー放射線は、骨髄細胞及び小腸の内側を覆っている上皮細胞の破壊によって死亡を引き起こす。これらの細胞は両方とも放射線によって容易に損傷又は破壊される。非致死線量の放射線を受けた被爆者では、その後になって骨髄の癌の発生率が正常な発生率よりもずっと高いが、小腸癌の発生率の増加はない。Shimizu et al. (1991), *J. Radiat. Res. Supplement*, 212-230を参照のこと。 20

【0007】

遺伝病である家族性大腸ポリポージスにおいて、患者は大腸癌の疾病素因を有することが公知である。しかし、小腸癌の潜在性は、胃腸管全体にポリポシスが出現している個体でさえも非常に低い。Lightdale et al., (1982), *Small Intestine*, in: *Cancer epidemiology and Prevention* (eds, Schottenfield et al.) W.B Saunders Co.を参照のこと。

【0008】

最終的にかつ注目に値すべきことに、他の部位に生じた癌から小腸への転移の拡散は非常にまれである。これは、局所の癌から小腸を防御する何らかのメカニズムが、同様に他の大部分の癌の発生も遮断するよう作動していることを示唆している。 30

【0009】

小腸中の、又は小腸の癌の発生率が非常に低いのは、自然の強固な事実であり、説明を是非とも必要とする。以上に記載した事実は、長い間公知であった。これらの事実は、多くの科学者を驚かせ、その原因を推測するよう彼らを刺激した。小腸腫瘍の低い発生率は、消化管器官の相対的サイズを原因とはできない。それは、ヒトにおいて小腸は、消化管の長さの90%及び吸収表面積の98%を構成しているからである（Gabos et al., (1993) *International J. of Epidemiology* 22:198-206)。これは、他の動物についても同様にあてはまる。低い発生率は、神経細胞及び筋細胞でそうであるような低い細胞ターンオーバー速度を原因とはできない。それは、小腸陰窩の上皮が身体の全ての器官の中で最も高いターンオーバー速度を有するからである。Potten及びLoeffler (1990, *Development* 110: 1001-1020)は、「マウスの回腸には約 7.5×10^5 個の陰窩が存在することから、回腸には 3×10^6 個と 1.2×10^7 個との間の幹細胞が存在するに違いない。よって、3年の寿命の間にマウス小腸では 10^9 回と 10^{10} 回との間の幹細胞分裂が起こる。 10^6 回中約1回の自然突然変異率では、約 10^3 又は約 10^4 回、すなわち1日当たり約1～10回の自然突然変異が予想されよう。したがって、小腸に癌がまれにしか発生しないことは驚異的である。小腸が適切に理解されていないメカニズムによって防御されているにちがいないことは確実である。」と述べている。 40

【0010】

Ashley及びWells (1988, *Seminars in Oncology* 15:116-128)は、小腸の防御状況に関する種々の推測を挙げた。それらには、a) 内容物の流動性及び迅速な通過によって有害 50

物質の曝露から防御されていること、b) 小腸内腔のアルカリ度、c) 高濃度の分泌性免疫グロブリン、d) 低い細菌濃度、並びにe) 潜在的発癌物質を失活させるヒドロキシラーゼの存在がある。Cairns (1975, Nature 255: 197-200)によって別のメカニズムが提案された。これは、陰窩下部の幹細胞として始まり、陰窩、次に絨毛の表面に沿って移動し、最終的に剥がれて管腔に入る上皮細胞の物理的移動を伴う。これは、いずれはさらに突然変異して形質転換細胞（癌）になりうる変異（異常）型幹細胞の蓄積を予防しうるであろう。これらの推測のいずれも証明されていない。

【0011】

Bennettら(1951, Proceedings of Society for Experimental Biology 78: 790-791、以後「Bennett」と呼ぶ)による報告において、小腸は、腫瘍増殖を抑制する化学物質を含むことが示唆された。マウスの小腸細胞を抽出し、3画分、すなわち原料の低速遠心分離から生じるペレット（画分4）、高速遠心分離から生じるペレット（画分90）、及びその上清（supernatant）に分離した。各画分と共にリンパ肉腫細胞を規定時間インキュベートし、両者をマウスに接種した。画分90を用いたとき少数の動物しか腫瘍を発生しなかったが、上清及び画分4と共にインキュベートした細胞を用いたとき多数の動物が腫瘍を発生して死亡する結果となった。肝臓、脾臓及び筋肉からの類似の抽出物は、全く腫瘍の阻止を示さなかった。Bennettは、この試験により彼らの仮説は確認されたと結論した。Bennettは、さらなる試験において上清の活性が（ミクロソームを含有する）画分90の成分の混入が原因であり、より注意深い調製により除去できることも示した。このように、上清自体は活性ではなかった。Bennettは、彼らが推定される活性の原因としてのタンパク質分解酵素を除去したことも述べた。

【0012】

1970年代半ばに別のグループも小腸抽出物を試験し（Chan et al., 1975, J. of the British Society of Gastroenterology 16:50-52、以後「Chan」と呼ぶ）、Bennettの結果と異なる説明に至った。Chanは、小腸抽出物と共に腫瘍細胞を *in vitro* でインキュベートした結果、動物に接種する前に細胞の死滅がもたらされたこと、その抽出物が腫瘍細胞と同様に正常細胞を死滅させること、及び活性が上清中ではなく主にミクロソーム画分に存在したと結論した。彼らは、上皮の酵素活性がこれらの観察結果の原因であったと示唆した。

【0013】

Calman (1974, Gut 15: 552-554)による報告では、小腸における抗腫瘍効果は、無傷の免疫系の存在を必要とすることが示された。胸腺切除及び放射線は、腫瘍を小腸に移植できるようにすることが示された。同じ処置を受けたが、胸腺移植片で免疫系が再構成された動物では、腫瘍は小腸でもはや再び増殖しないであろう。両群において、腫瘍をうまく胃に移植することができた。このように、小腸の防御効果は、局所免疫系の強化に関係していると思われた。しかし、局所免疫系を制御する因子の探索は実施されなかった。

【0014】

原生動物とそれらの宿主の免疫応答

寄生虫は、多種のくぐりぬけ戦略を進化させ、その戦略によって一次宿主中で生存し、環境中の、しばしば二次宿主中の通過を通常は必要とする一連の発育期を経て生活環を完了することが可能となっている。これらの戦略には、抗原の脱落、抗原の移動、細胞内での長期間生存、宿主細胞の生化学的性質の操作、多器官への感染、及び被嚢形成がある（例えばBeverley, (1996), Cell 87: 787-789; Zambrano-Villa et al., (2002), Trends in Parasitol. 18: 272-278を参照のこと）。そのようなメカニズムは、進化圧により微調整され、原生動物が宿主免疫応答を回避するのを助ける。原生動物は、これらの回避メカニズムに非常に専門化しているため、1つの宿主の種又は属の中でのみ生活環を完了できる場合が多い。

【0015】

アピコンプレックスは、動物の胞子形成性単細胞寄生虫であり、マラリア、コクシジウム症、赤尿症、コリドー病、東海岸熱、及び胆汁熱のような種々の疾患を引き起こす種が

ある。アピコンプレックス門の4つの主なクラスは、コクシジウム綱 (Coccidia) (属には例えばベスノイチア (Besnoitia)、カリオスポラ (Caryospora)、クリプトスポリジウム (Cryptosporidium)、アイメリア (Eimeria)、フレンケリア (Frenkelia)、ハモンディア (Hammondia)、ヘパトゾーン (Hepatozoon)、イソスポラ (Isospora)、ランケステレラ (Lankesterella)、ネオスポラ (Neospora)、サルコシスティス (Sarcocystis)、及びトキソプラズマ (Toxoplasma) がある)、グレガリナ亜綱 (Gregarinia) (属には、例えばグレガリナ、モノシスティス (Monocystis)、オフリオシスティス (Ophriocystis)、及びシュードモノシスティス (Pseudomonocystis) がある)、ヘモスポリダ目 (Haemosporida) 又は住血胞子虫類 (haemosporidian) (属には例えばヘモプロテウス (Haemoproteus)、ヘパトシスチス (Hepatocystis)、及びプラスモディウム (Plasmodium) がある)、及びピロプラスマ目 (Piroplasmida) 又はピロプラスミド (Piroplasmids) (属には例えばバベシア (Babesia)、シトックスゾーン (Cytauxzoon)、及びタイレリア (Theileria) がある) である。ヒトに感染する7種が同定された (プラスモジウム、バベシア、クリプトスポリジウム、イソスポラ、シクロスポラ (Cyclospora)、サルコシスティス、及びトキソプラズマ)。

【0016】

アピコンプレックスをよく表している特徴は、生物の頂端と呼ばれる一端にみられる一群のオルガネラである。この「頂端複合構造」には、ミクロネーム及びロプトリーとして知られている分泌オルガネラ、微小管からなる極輪、並びに一部の種では極輪内に存在するコノイドがある。生活環のいくつかの時点で、アピコンプレックスのメンバーは、宿主細胞に侵入又は付着する。頂端オルガネラは、これらの宿主寄生体相互作用に役割を果たす。

【0017】

2、3のアイメリア種は、ある動物において重度の罹患と時に死亡を引き起こすことが公知である。特に、E. テネラ (E. tenella)、E. アセルブリナ (E. acervulina) 及び E. マキシマ (E. maxima) は、養鶏産業における問題である。ストレス及び密集状態は、アイメリア感染症を増悪し、重い下痢及び死亡を引き起こす。同様の問題が、ウシ畜産業で起こり場合があり、子ウシ同士の密集が重症の疾患をもたらさう。成動物は、通常はアイメリアに対する免疫をもっているが、大部分の脊椎動物では無症状低感染が地域流行する。最初の曝露の際に動物における短期の体液性免疫応答が報告された (Faber et al., (2002), Vet. Parasitol. 104: 1-17; Allen & Fetterer, (2002), Clin. Microbiol. Rev. 15: 58-65; Rose, (1987), Eimeria, Isospora, and Cryptosporidium, in: Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology, and Immunoprophylaxis (ed. E.J.L. Soulsby) pp275-230) が、これは、宿主の生涯にわたり持続する防御を供すると思われる局所細胞性免疫応答に置き換わる。この防御の正確なメカニズムは完全には知られておらず、生活環の爆発的増殖を受けずに低レベルの生物がなぜ生存するかは、謎のままである。

【0018】

Aliberti et al. (2003, Nature Immunology 4(5): 485-490) は、トキソプラズマゴンディー (Toxoplasma gondii) のシクロフィリンの (プロフィリンドメインを含まない) アイソフォームである精製タンパク質 C-18 は、樹状細胞 (DC) からのインターロイキン 12 (IL-12) の生成を刺激できることを示した。しかし、組換え T. ゴンディー C-18 は、T. ゴンディーのタキゾイト粗抽出物 (STAg) に比べて低下した IL-12 刺激活性を示した。

【0019】

スポロゾイト 19 kD 抗原

アイメリアに対するワクチン接種は、家禽及びより少ない程度にウシの畜産における実質的な研究主題である。化学的予防は、養鶏業における標準的な治療であるが、アイメリアの耐性株は問題となり始めている。ワクチンの開発は、代替法とみなされ、小腸上皮層に侵入する時期であるスポロゾイト期からの表面抗原の使用に焦点を当てている (例えば

Allen & Fetterer, (2002), Clin. Microbiol. Rev. 15: 58-65; Blackman & Bannister, (2001), Mol. Biochem. Parasitol. 117: 11-25; Min et al., (2001), Vaccine 20:267-274参照)。メロゾイト表面抗原も関心対象であり、それはこの時期の原生動物が、第1ラウンドの倍加後に放出され、隣接細胞に感染するからである。このプロセスの間に有効な免疫応答が感染拡大を制限しうるであろう。

【0020】

ワクチンとしての使用について最終的に調査された表面分子の1つが、E. アセルブリナのcDNA発現ライブラリーから数回単離された。それは、もともとJenkinsら(1988, Exp. Parasitol. 66: 96-107)によってアセルブリナの膜に対して作製されたウサギ抗体によって検出される少量の表面タンパク質(クローンcSZ-1)として同定された。しかし、感染しているニワトリからの血清はそれと反応しなかった。彼らはウエスタンブロットで240及び160kDに2本のバンドを確認し、大腸菌で作られたβ-ガラクトシダーゼ融合タンパク質がT細胞の分割を活性化できたことを示した。続いて、別のグループ(Laurent et al., (1994), Mol. Bioch. Parasitol. 63: 79-86)は、1Pと呼ばれる19kD表面タンパク質が3つの家禽アイメリア種の間で保存されており、JenkinsらのcSZ-1クローンと同じcDNA配列を共有することを報告し、ヨウ素化は以前の研究で変則的に高分子量を与えた可能性があることを示唆した。彼らのクローンのヌクレオチド配列は、「19kDスポロゾイト抗原」(アクセッション番号Z26584)の名前でGenbankに寄託された。ごく最近、Lillehojら(2000, Avian Diseases 44: 379-389)は、cDNAクローン(3-1E)からE. アセルブリナのメロゾイト(アクセッション番号Z26584)に対するウサギ抗血清と反応するわずかに長いタンパク質リーディングフレームを単離した。翻訳物は、N末端での追加のアミノ酸17個を含むが、分子の残りは、事実上同一であった。彼らは、E. アセルブリナを2回攻撃感染させたニワトリから単離され、その後そのタンパク質に曝露された脾臓細胞からの*in vitro*でのIFNγ生成を示すことによって、3-1Eタンパク質が細胞性免疫を活性化したことを実証した。彼らは、アイメリアからのコクシジウム症を予防するための適度に有効なワクチンとしてそのタンパク質を使用することも示した。このグループは、DNAワクチンとしてそのヌクレオチド配列を使用するこの潜在性を探求し続けている(Song, et al., (2001), Vaccine 19: 234-252; Min, et al., (2001), Vaccine 20: 267-274)。唯一の薬剤としてDNAワクチンは、攻撃感染からの部分防衛のみを発生した。種々のニワトリサイトカイン遺伝子を有するプラスミドの添加は、いくらか改善を供したが、依然として2分の1未満にはオーシスト産生を低下させなかった。

【0021】

本明細書における参照の引用又は論考を、それらが本発明の従来技術であるとの容認として解釈してはならない。

【非特許文献1】Braunwald et al., HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE, 15th ed., McGraw-Hill (2001), pp 491

【非特許文献2】Juckett & Rosenberg, (1988) Mech, Ageing Dev. 43:239-257

【非特許文献3】Parkin et al. eds (1997) Cancer Incidence in Five Continents, Vol. V (IARC Scientific Publications No. 143) Lyon, IARC

【非特許文献4】Parkin et al., eds., (1997), Cancer Incidence in Five Continents, Vol. VII (IARC Scientific Publications No. 143) Lyon, IARC

【非特許文献5】Lingeman et al., (1972), J. of the National Cancer Institute 48: 325-346

【非特許文献6】Shimizu et al. (1991), J. Radiat. Res. Supplement, 212-230

【非特許文献7】Lightdale et al., (1982), Small Intestine, in: Cancer epidemiology and Prevention (eds, Schottenfield et al.) W.B Saunders Co.

【非特許文献8】Gabos et al., (1993) International J. of Epidemiology 22:198-206

【非特許文献9】Potten and Loeffler (1990, Development 110: 1001-1020)

【非特許文献10】Ashley and Wells (1988, Seminars in Oncology 15: 116-128)

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 1 1】 Cairns (1975, Nature 255: 197-200)
- 【非特許文献 1 2】 Bennett et al.(1951, Proceedings of Society for Experimental Biology 78: 790-791)
- 【非特許文献 1 3】 Chan et al., 1975, J. of the British Society of Gastroenterology 16: 50-52
- 【非特許文献 1 4】 Calman (1974, Gut 15: 552-554)
- 【非特許文献 1 5】 Beverley, (1996), Cell 87: 787-789
- 【非特許文献 1 6】 Zambrano-Villa et al., (2002), Trends in Parasitol. 18: 272-278
- 【非特許文献 1 7】 Faber et al., (2002), Vet. Parasitol. 104: 1-17 10
- 【非特許文献 1 8】 Allen & Fetterer, (2002), Clin. Microbiol. Rev. 15: 58-65
- 【非特許文献 1 9】 Rose, (1987), Eimeria, Isopora, and Cryptosporidium, in: Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology, and Immune Opophylaxis (ed. E.J.L. Soulsby) pp275-230
- 【非特許文献 2 0】 Aliberti et al. (2003, Nature Immunology 4(5): 485-490)
- 【非特許文献 2 1】 Blackman & Bannister, (2001), Mol. Biochem. Parasitol. 117: 11-25
- 【非特許文献 2 2】 Min et al., (2001), Vaccine 20: 267-274
- 【非特許文献 2 3】 Jenkins et al. (1988, Exp. Parasitol. 66: 96-107)
- 【非特許文献 2 4】 Laurent et al., (1994), Mol. Bioch. Parasitol. 63: 79-86 20
- 【非特許文献 2 5】 Lillehojら(2000, Avian Diseases 44: 379-389)
- 【非特許文献 2 6】 Song, et al., (2001), Vaccine 19: 234-252
- 【発明の開示】
- 【課題を解決するための手段】
- 【0022】

本明細書に使用する「単離された」という用語は、参照された物質がその天然環境、例えば細胞から取り出されたことを意味する。このように単離された生物学的物質は、細胞成分、すなわちその天然物質が自然に存在する細胞の成分（例えば細胞質成分又は膜成分）の一部又は全てを含まない場合がある。核酸分子の場合、単離された核酸には PCR 産物、単離された mRNA、cDNA、又は制限フラグメントがある。別の実施形態において、単離された核酸は好ましくはその核酸が見出されうる染色体から切り出され、さらに好ましくは非コード領域ともはや結合しておらず隣接もしない（が、その天然調節領域又はその部分とは結合しうる）。さらに、染色体で見られたとき単離された核酸分子に含まれる遺伝子の上流又は下流に位置する他の遺伝子と結合しておらず隣接もしない。なお別の実施形態において、単離された核酸は 1 つ又は複数のイントロンを欠如している。単離された核酸分子には、プラスミド、コスミド、人工染色体などに挿入された配列、すなわちその核酸分子がキメラ組換え核酸コンストラクトの一部を形成するときの配列がある。このように具体的な実施形態において、組換え核酸は単離された核酸である。単離されたタンパク質は、他のタンパク質若しくは核酸、又はその両方と会合できる。単離されたタンパク質は、それらと細胞中で会合するか、又は単離されたタンパク質が膜関連タンパク質ならば、細胞膜と会合する。単離されたオルガネラ、細胞、又は組織は、生物においてそれが見出される解剖学的部位から取り出される。単離された物質を精製してもよいが、精製する必要はない。

【0023】

タンパク質又は核酸に関して「精製された」という用語は、熟練者が所望の目的のために精製された物質を使用するのに足る程度に混入物から所望の物質を分離することを指す。好ましくはこれは、少なくとも 1 オーダ高い精製が達成されたこと、さらに好ましくは 2 又は 3 オーダ高い、最も好ましくは 4 又は 5 オーダ高い出発物質又は天然物質の精製が達成されたことを意味する。具体的な実施形態において精製された ARP は、総タンパク質又は核酸に対して、場合によってはその重量に対して少なくとも 60%、少なくとも 8 50

0 %、又は少なくとも90 %である。具体的な実施形態において、精製されたARPは、例えばドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動又はアガロースゲル電気泳動によってアッセイするとき均質となるまで精製されている。

【0024】

本発明は、動物における疾患を治療又は予防する方法を提供し、その方法は、その動物に薬学的有効量の医薬組成物を投与することを含み、その医薬組成物は、その動物にタンパク質を供給し、そのタンパク質は、デフォルトパラメータに調整したBLAST 2.0アルゴリズムによって決定される配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30の配列と少なくとも25 %、少なくとも30 %、少なくとも35 %、少なくとも40 %、少なくとも45 %、少なくとも50 %、少なくとも55 %、少なくとも60 %、少なくとも65 %、少なくとも70 %、少なくとも75 %、少なくとも80 %、少なくとも85 %、少なくとも90 %、少なくとも95 %、少なくとも98 %又は少なくとも99 %の同一性を有し、且つそのタンパク質は免疫刺激活性を有する。本発明は、タンパク質、そのタンパク質をコードする核酸、又はそのタンパク質をコードする核酸をトランスフェクトされた細胞として動物にそのタンパク質を供給する医薬組成物もさらに提供する。

10

【0025】

本発明は、(a) 配列番号1を含む単離されたタンパク質、(b) 配列番号2を含む単離されたタンパク質、(c) 配列番号28を含む単離されたタンパク質、(d) 配列番号30を含む単離されたタンパク質、(e) 配列番号3、4、5、6及び7を含む単離されたタンパク質、(f) 前記(a)～(e)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、又は(f) 前記(a)～(e)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞(前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結する)として動物にタンパク質を供給する医薬組成物をその動物に投与することを含む、動物における癌を治療又は予防する方法を提供する。

20

【0026】

本発明は、医薬組成物が、(a) (1) アイメリアに感染している組織若しくは細胞の細胞抽出物を作製する段階、(2) 上清を作製するためにその細胞抽出物を遠心分離する段階、(3) タンパク質を沈殿させてペレットにするために硫酸アンモニウムによってその上清を分画し、且つそのペレットを溶液に再懸濁する段階、(4) HICカラムにその溶液を適用する段階、(5) 溶出した物質を作製するために、HICカラムに結合した物質を溶出させる段階、(6) DEAEカラムに負荷するための試料を作製するためにその溶出した物質を透析する段階、(7) DEAEカラムにその試料を適用する段階、(8) 溶出した画分を作製するためにDEAEカラムに結合した物質を緩衝液で溶出させ、且つその溶出した画分を濃縮する段階、(9) サイズ排除カラムにその濃縮され溶出した画分を適用する段階、(10) そのサイズ排除カラムから溶出した画分を収集及びプールする段階、(11) カルシウム結合タンパク質を除去するためにHICカラムにそのプールされた画分を適用する段階、(12) HPLC HICカラムにHICカラムから溶出した画分を適用し、且つ活性画分を収集する段階(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)、(13) その活性画分を透析する段階、並びに(14) HPLC DEAEカラムにその透析された活性画分を適用し、且つ1つ若しくは複数の活性画分を収集する段階(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)を含む工程の生成物である単離されたタンパク質、(b) 組換え発現されたタンパク質、(c) 上記(a)をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、又は(d) 上記(a)をコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞(前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している)として動物にタンパク質を供給する、癌を治療又は予防する方法を提供する。

30

40

【0027】

本発明は、(a) 精製されたアピコンプレックス門生物若しくはアピコンプレックス門

50

生物に感染している細胞のホモジネートを作製する段階、(b)ペレットを得るためにそのホモジネートを遠心分離する段階、(c)ホスホリパーゼを含む溶液でそのペレットを処理する段階、(d)上清を得るためにその溶液を遠心分離する段階、(e)逆相HPLCカラムにその上清を適用する段階、及び(f)溶出したタンパク質を作製するために、その逆相HPLCカラムから結合したタンパク質を溶出させる段階を含む工程の生成物である単離されたタンパク質である医薬組成物を含む、癌を治療又は予防する方法を提供し、前記タンパク質は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する活性を有し、前記樹状細胞は前記活性をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである。

【0028】

本発明は、(a)配列番号3、4、6又は7を含む単離されたタンパク質、(b)それぞれ配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30に対する保存的アミノ酸置換のみを有する、配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30のいずれか1つの変異体を含む単離されたタンパク質、(c)それぞれ配列番号3、4、6又は7に対する保存的アミノ酸置換のみを有する、配列番号3、4、6又は7の変異体を含む単離されたタンパク質、(d)PROF(プロフィリン)ドメインを含む単離されたタンパク質、(e)低ストリンジェンシー条件下で配列番号15、16、17、18、19、20若しくは27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされるアミノ酸配列を含む単離されたアピコンプレックス門タンパク質、(f)高ストリンジェンシー条件下で配列番号15、16、17、18、19、20若しくは27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされるアミノ酸配列を含む単離されたアピコンプレックス門タンパク質、(g)前記(a)～(f)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、(h)前記(a)～(f)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞(前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している)として動物にタンパク質を供給する医薬組成物をその動物に投与することを含む、動物における癌を治療又は予防する方法を提供し、前記医薬組成物は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである。

【0029】

本発明は、(a)配列番号1を含む単離されたタンパク質、(b)配列番号2を含む単離されたタンパク質、(c)配列番号28を含む単離されたタンパク質、(d)配列番号30を含む単離されたタンパク質、(e)配列番号3、4、5、6及び7を含む単離されたタンパク質、(f)前記(a)～(e)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、又は(f)前記(a)～(e)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞(前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している)として動物にタンパク質を供給する医薬組成物をその動物に投与することを含む、動物における感染症を治療又は予防する方法を提供する。

【0030】

本発明は、(a)(1)アイメリアに感染している組織若しくは細胞の細胞抽出物を作製する段階、(2)上清を作製するためにその細胞抽出物を遠心分離する段階、(3)タンパク質を沈殿させてペレットにするために硫酸アンモニウムによってその上清を分画し、且つそのペレットを溶液に再懸濁する段階、(4)HICカラムにその溶液を適用する段階、(5)溶出した物質を作製するために、そのHICカラムに結合した物質を溶出させる段階、(6)DEAEカラムに負荷するための試料を作製するためにその溶出した物質を透析する段階、(7)DEAEカラムにその試料を適用する段階、(8)溶出した画分を作製するためにそのDEAEカラムに結合した物質を緩衝液で溶出させ、且つその溶出した画分を濃縮する段階、(9)サイズ排除カラムにその濃縮され溶出した画分を適用する段階、(10)そのサイズ排除カラムから溶出した画分を収集及びプールする段階、(11)カルシウム結合タンパク質を除去するためにHICカラムにそのプールされた画

10

20

30

40

50

分を適用する段階、(12) HPLC HICカラムにそのHICカラムから溶出した画分を適用して活性画分を収集する段階(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)、(13) その活性画分を透析する段階、並びに(14) HPLC DEAEカラムにその透析された活性画分を適用し、且つ1つ若しくは複数の活性画分を収集する段階(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)を含む工程の生成物である単離されたタンパク質、(b) 組換え発現されたタンパク質、(c) 上記(a)をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、又は(d) 上記(a)をコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞(前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している)として医薬組成物が動物にタンパク質を供給する、感染症を治療又は予防する方法を提供する。

【0031】

本発明は、(a) 精製されたアピコンプレックス門生物若しくはアピコンプレックス門生物に感染している細胞のホモジネートを作製する段階、(b) ペレットを得るためにそのホモジネートを遠心分離する段階、(c) ホスホリパーゼを含む溶液でそのペレットを処理する段階、(d) 上清を得るためにその溶液を遠心分離する段階、(e) 逆相HPLCカラムにその上清を適用する段階、及び(f) 溶出したタンパク質を作製するためにその逆相HPLCカラムから結合したタンパク質を溶出させる段階を含む工程の生成物である単離されたタンパク質である医薬組成物を含む、感染症を治療又は予防する方法を提供し、前記タンパク質は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する活性を有し、前記樹状細胞は前記活性をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである。

【0032】

本発明は、(a) 配列番号3、4、6又は7を含む単離されたタンパク質、(b) それぞれ配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30に対する保存的アミノ酸置換のみを有する、配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30のいずれか1つの変異体を含む単離されたタンパク質、(c) それぞれ配列番号3、4、6又は7に対する保存的アミノ酸置換のみを有する、配列番号3、4、6又は7の変異体を含む単離されたタンパク質、(d) PROF(プロフィリン)ドメインを含む単離されたタンパク質、(e) 低ストリンジェンシー条件下で配列番号15、16、17、18、19、20若しくは27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされるアミノ酸配列を含む単離されたアピコンプレックス門タンパク質、(f) 高ストリンジェンシー条件下で配列番号15、16、17、18、19、20若しくは27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされるアミノ酸配列を含む単離されたアピコンプレックス門タンパク質、(g) 前記(a)~(f)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、(h) 前記(a)~(f)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞(前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している)として動物にタンパク質を供給する医薬組成物をその動物に投与することを含む、動物における感染症を治療又は予防する方法を提供し、前記医薬組成物は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである。

【0033】

本発明は、癌を治療又は予防する方法を提供し、その方法は、そのような治療又は予防が望ましい対象に、(a) 配列番号1を含む単離されたタンパク質(E. テネラのARP)、(b) 配列番号2を含む単離されたタンパク質(E. アセルブリナのARP)、(c) 配列番号3、4、5、6及び7を含む単離されたタンパク質(ウシアイメリア種ARPの部分アミノ酸配列)、(d) 配列番号28を含む単離されたタンパク質(クローンE1

のA R P)、(e) 配列番号30を含む単離されたタンパク質(クローンE1薬物生成物のA R P)からなる群から選択される治療又は予防的に有効量の物質を投与することを含む。配列番号3~7は、必ずしも隣接せず、各フラグメントに介入配列又は隣接配列が存在しうる。好ましくはタンパク質は、配列番号3から配列番号7の順にN末端からC末端に配列番号3、4、5、6及び7を含む、(f) (1) アイメリアに感染している組織又は細胞の細胞抽出物を作製する段階、(2) 上清を作製するためにその細胞抽出物を遠心分離する段階、(3) タンパク質を沈殿させてペレットにするために硫酸アンモニウムによってその上清を分画し、且つそのペレットを溶液に再懸濁する段階、(4) 疎水性相互作用(以下「H I C」と記載)カラムにその溶液を適用する段階、(5) 溶出した物質を作製するためにそのH I Cカラムに結合した物質を溶出させる段階、(6) ジエチルアミノエチル(以下「D E A E」と記載)カラムに負荷するための試料を作製するために、その溶出した物質を透析する段階、(7) D E A Eカラムにその試料を適用する段階、(8) 溶出した画分を作製するために緩衝液でそのD E A Eカラムに結合した物質を溶出させ、且つその溶出した画分を濃縮する段階、(9) サイズ排除カラムにその濃縮され溶出した画分を適用する段階、(10) そのサイズ排除カラムから溶出した画分を収集及びプールする段階、(11) カルシウム結合タンパクを除去するためにH I Cカラムにそのプールされた画分を適用する段階、(12) 高速液体クロマトグラフィー(以下「H P L C」と記載)H I CカラムにそのH I Cカラムから溶出した画分を適用し、且つ活性(免疫刺激性)画分を収集する段階(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞はその能力をアッセイする(又は下記の第5、6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする)10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)、(13) その活性画分を透析する段階、並びに(14) H P L C D E A Eカラムにその透析された活性画分を適用し、且つ1つ若しくは複数の活性(免疫刺激性)画分を収集する段階(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする(又は下記の第5、6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする)10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)を含む工程の生成物である単離されたタンパク質、(g) (1) 精製されたアピコンプレックス門生物又はアピコンプレックス門生物に感染している細胞のホモジネートを作製する段階、(2) ペレットを得るためにそのホモジネートを遠心分離する段階、(3) ホスホリパーゼを含む溶液でそのペレットを処理する段階、(4) 上清を得るためにその溶液を遠心分離する段階、(5) 逆相H P L Cカラムにその上清を適用する段階、及び(6) 溶出したタンパク質を作製するためにその逆相H P L Cカラムから結合したタンパク質を溶出させる段階(前記タンパク質は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力(免疫刺激能)を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする(又は下記の第5、6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする)10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)を含む工程の生成物である単離されたタンパク質、(f) 上記(a)~(g)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、並びに(h) 上記(a)~(g)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞(前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している)からなる群から選択される、治療又は予防有効量の物質を投与することを含む。

【0034】

本発明は、癌を治療又は予防する方法も提供し、その方法は、そのような治療又は予防が望ましい対象に、(a) 配列番号3、4、6又は7を含む単離されたタンパク質、(b) 配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30の変異体を含む単離されたタンパク質(前記変異体は、それぞれ配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30に対して保存的アミノ酸置換のみを有する)、(c) 配列番号3、4、6又は7の変異体を含む単離されたタンパク質(前記変異体は、それぞれ配列番号3、4、6又は7に対して保存的アミノ酸置換のみを有する)、(d) デフォルトパラメータに調整したBLAS

T 2.0アルゴリズムによって決定される配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30の配列と少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、又は少なくとも80%の同一性を含む単離されたタンパク質、(e) PRO F (プロフィリング) ドメインを含む単離されたタンパク質、(f) 低ストリンジェンシー条件下で配列番号15、16、17、18、19、20若しくは27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされるアミノ酸配列を含む、単離されたアピコンプレックス門タンパク質、(g) 前記(a)～(f)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、(h) 前記(a)～(f)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞(前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している)からなる群から選択される、治療又は予防有効量の物質を投与することを含み、前記物質は、免疫刺激能、例えば樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は、前記能力をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである。

10

20

30

40

50

【0035】

本発明は、感染症を治療又は予防する方法も提供し、前記感染症はヒト免疫不全ウイルス(HIV)又はアイメリア属生物の感染によって引き起こされず、その方法は、そのような治療又は予防が望ましい対象に、(a) 配列番号1を含む単離されたタンパク質(E. テネラのARP)、(b) 配列番号2を含む単離されたタンパク質(E. アセルブリナ
のARP)、(c) 配列番号28を含む単離されたタンパク質(クローンE1のARP)、
(d) 配列番号30を含む単離されたタンパク質(クローンE1薬物生成物のARP)、
(e) 配列番号3、4、5、6及び7を含む単離されたタンパク質(ウシアメリア種
ARPの部分アミノ酸配列)、(f) (1) アイメリアに感染している組織又は細胞の細胞抽出物を作製する段階、(2) 上清を作製するためにその細胞抽出物を遠心分離する段階、(3) タンパク質を沈殿させてペレットにするために硫酸アンモニウムによってその上清を分画し、且つそのペレットを溶液に再懸濁する段階、(4) その溶液をHICカラムに適用する段階、(5) 溶出した物質を作製するためにそのHICカラムに結合した物質を溶出させる段階、(6) DEACカラムに負荷するための試料を作製するためにその溶出した物質を透析する段階、(7) DEACカラムにその試料を適用する段階、(8)
(9) 溶出した画分を作製するために緩衝液でそのDEACカラムに結合した物質を溶出させ、且つその溶出した画分を濃縮する段階、(9) サイズ排除カラムにその濃縮され溶出した画分を適用する段階、(10) そのサイズ排除カラムから溶出した画分を収集及びプールする段階、(11) カルシウム結合タンパクを除去するためにHICカラムにそのプールされた画分を適用する段階、(12) HPLC HICカラムにそのHICカラムから溶出した画分を適用し、且つ活性(免疫刺激性)画分を収集する段階(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞はその能力をアッセイする(又は下記の第5. 6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする) 10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)、(13) その活性画分を透析する段階、及び(14) HPLC DEAC
カラムにその透析された活性画分を適用し、且つ1つ又は複数の活性(免疫刺激性)画分を収集する段階(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする(又は下記の第5. 6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする) 10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)を含む工程の生成物である単離されたタンパク質、(g) (1) 精製されたアピコンプレックス門生物の、又はアピコンプレックス門生物に感染している細胞のホモジネートを作製する段階、(2) ペレットを得るためにそのホモジネートを遠心分離する段階、(3) ホスホリパーゼを含む溶液でそのペレットを処理する段階、(4) 上清を得るためにその溶液を遠心分離する段階、(5) 逆相HPLCカラムにその上清を適用する段階、及び(6) 溶出したタンパク質を作製するためにそ

の逆相HPLCカラムから結合したタンパク質を溶出させる段階（前記タンパク質は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力（免疫刺激能）を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする（又は下記の第5、6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする）10時間以内に哺乳動物から単離されたものである）を含む工程の生成物である単離されたタンパク質、（i）上記（a）～（g）のいずれかをコードする単離された核酸、並びに（i）上記（a）～（g）のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞（前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している）からなる群から選択される、治療又は予防有効量の物質を投与することを含む。

【0036】

本発明は、感染症を治療又は予防する方法を提供し、前記感染症はヒト免疫不全ウイルス（HIV）又はアピコンプレックス門生物の感染によって引き起こされず、その方法は、そのような治療又は予防が望ましい対象に、（a）配列番号3、4、6又は7を含む単離されたタンパク質、（b）配列番号1又は配列番号2の変異体を含む単離されたタンパク質（前記変異体は、それぞれ配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30に対して保存的アミノ酸置換のみを有する）、（c）配列番号3、4、6又は7の変異体を含む単離されたタンパク質（前記変異体は、それぞれ配列番号3、4、6又は7に対して保存的アミノ酸置換のみを有する）、（d）デフォルトパラメータに調整したBLAST 2.0アルゴリズムによって決定される配列番号1、又は配列番号2、配列番号28又は配列番号30の配列と少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、又は少なくとも80%の同一性を含む単離されたタンパク質、（e）PROF（プロフィリン）ドメインを含む単離されたタンパク質、（f）低ストリンジェンシー条件下で配列番号15、16、17、18、19、20若しくは27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされるアミノ酸配列を含む単離されたアピコンプレックス門タンパク質、（g）前記（a）～（f）のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、（h）前記（a）～（f）のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞（前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している）からなる群から選択される、治療又は予防有効量の物質を投与することを含み、前記物質は免疫刺激能、例えば樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである。

【0037】

本発明は、免疫応答を刺激する方法も提供し、その方法は、対象が鳥類種ではなく、且つヒト免疫不全ウイルス（HIV）にも感染していないことを条件として、その対象に、（a）配列番号1を含む単離されたタンパク質（E. テネラのARP）、（b）配列番号2を含む単離されたタンパク質（E. アセルブリナのARP）、（c）配列番号28を含む単離されたタンパク質（クローンE1のARP）、（d）配列番号30を含む単離されたタンパク質（クローンE1薬物生成物のARP）、（e）配列番号3、4、5、6及び7を含む単離されたタンパク質（ウシアイメリア種ARPの部分アミノ酸配列）、（f）（1）アイメリアに感染している組織又は細胞の細胞抽出物を作製する段階、（2）上清を作製するためにその細胞抽出物を遠心分離する段階、（3）タンパク質を沈殿させてペレットにするために硫酸アンモニウムによってその上清を分画し、且つそのペレットを溶液に再懸濁する段階、（4）その溶液をHICカラムに適用する段階、（5）溶出した物質を作製するためにそのHICカラムに結合した物質を溶出させる段階、（6）DEAEカラムに負荷するための試料を作製するためにその溶出した物質を透析する段階、（7）DEAEカラムにその試料を適用する段階、（8）溶出した画分を作製するために緩衝液でそのDEAEカラムに結合した物質を溶出させ、且つその溶出した画分を濃縮する段階、（9）サイズ排除カラムにその濃縮され溶出した画分を適用する段階、（10）そのサ

10

20

30

40

50

イズ排除カラムから溶出した画分を収集及びプールする段階、(11)カルシウム結合タンパクを除去するためにH I Cカラムにそのプールされた画分を適用する段階、(12)H P L C H I CカラムにそのH I Cカラムから溶出した画分を適用し、且つ活性(免疫刺激性)画分を収集する段階(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞はその能力をアッセイする(又は下記の第5.6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする)10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)、(13)その活性画分を透析する段階、及び(14)H P L C D E A Eカラムにその透析された活性(免疫刺激性)画分を適用し、且つ1つ又は複数の活性画分を収集する段階(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする(又は下記の第5.6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする)10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)を含む工程の生成物である単離されたタンパク質、(g)(1)精製されたアピコンプレックス門生物の、又はアピコンプレックス門生物に感染している細胞のホモジネートを作製する段階、(2)ペレットを得るためにそのホモジネートを遠心分離する段階、(3)ホスホリパーゼを含む溶液でそのペレットを処理する段階、(4)上清を得るためにその溶液を遠心分離する段階、(5)逆相H P L Cカラムにその上清を適用する段階、及び(6)溶出したタンパク質を作製するためにその逆相H P L Cカラムから結合したタンパク質を溶出させる段階(前記タンパク質は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力(免疫刺激能)を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする(又は下記の第5.6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする)10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)を含む工程の生成物である単離されたタンパク質、(h)上記(a)~(f)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、並びに(i)上記(a)~(f)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞(前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している)からなる群から選択される有効量の物質を投与することを含む。

【0038】

本発明は、免疫応答を刺激する方法も提供し、その方法は、対象がヒト免疫不全ウイルス(H I V)に感染していないことを条件として、その対象に、(a)配列番号3、4、5、6及び7を含む単離されたタンパク質、(b)(1)鳥類種に自然感染しないアイメリアに感染している組織又は細胞の細胞抽出物を作製する段階、(2)上清を作製するためにその細胞抽出物を遠心分離する段階、(3)タンパク質を沈殿させてペレットにするために硫酸アンモニウムによってその上清を分画し、且つそのペレットを溶液に再懸濁する段階、(4)その溶液をH I Cカラムに適用する段階、(5)溶出した物質を作製するためにそのH I Cカラムに結合した物質を溶出させる段階、(6)D E A Eカラムに負荷するための試料を作製するためにその溶出した物質を透析する段階、(7)D E A Eカラムにその試料を適用する段階、(8)溶出した画分を作製するために緩衝液でそのD E A Eカラムに結合した物質を溶出させ、且つその溶出した画分を濃縮する段階、(9)サイズ排除カラムにその濃縮され溶出した画分を適用する段階、(10)そのサイズ排除カラムから溶出した画分を収集及びプールする段階、(11)カルシウム結合タンパクを除去するためにH I Cカラムにそのプールされた画分を適用する段階、(12)H P L C H I CカラムにそのH I Cカラムから溶出した画分を適用し、且つ活性(免疫刺激性)画分を収集する段階(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞はその能力をアッセイする(又は下記の第5.6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする)10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)、(13)その活性画分を透析する段階、及び(14)H P L C D E A Eカラムにその透析された活性画分を適用し、且つ1つ又は複数の活性(免疫刺激性)画分を収集する段階(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする

(又は下記の第5. 6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする) 10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)を含む工程の生成物である単離されたタンパク質、(c) (1) 精製されたアピコンプレックス門生物の、又はアピコンプレックス門生物に感染している細胞のホモジネートを作製する段階、(2) ペレットを得るためにそのホモジネートを遠心分離する段階、(3) ホスホリパーゼを含む溶液でそのペレットを処理する段階、(4) 上清を得るためにその溶液を遠心分離する段階、(5) 逆相HPLCカラムにその上清を適用する段階、及び(6) 溶出したタンパク質を作製するためにその逆相HPLCカラムから結合したタンパク質を溶出させる段階(前記タンパク質は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力(免疫刺激能)を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする(又は下記の第5. 6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする) 10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)を含む工程の生成物である単離されたタンパク質、(d) 上記(a)～(c)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、並びに(e) 上記(a)～(c)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞(前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している)からなる群から選択される有効量の物質を投与することを含む。

【0039】

本発明は、免疫応答を刺激する方法も提供し、その方法は、対象が鳥類種ではなく、且つヒト免疫不全ウイルス(HIV)に感染していないことを条件として、その対象に、(a) 配列番号3、4、6又は7を含む単離されたタンパク質、(b) 配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30の変異体を含む単離されたタンパク質(前記変異体は、それぞれ配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30に対して保存的アミノ酸置換のみを有する)、(c) 配列番号3、4、6又は7の変異体を含む単離されたタンパク質(前記変異体は、それぞれ配列番号3、4、6又は7に対して保存的アミノ酸置換のみを有する)、(d) デフォルトパラメータに調整したBLAST 2.0アルゴリズムによって決定される配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30の配列と少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、又は少なくとも80%の同一性を含む単離されたタンパク質、(e) PROF(プロフィリン)ドメインを含む単離されたタンパク質、(f) 低ストリンジェンシー条件下で配列番号15、16、17、18、19、20若しくは27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされるアミノ酸配列を含む、単離されたアピコンプレックス門タンパク質、(g) 前記(a)～(f)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、(h) 前記(a)～(f)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞(前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している)からなる群から選択される有効量の物質を投与することを含み、前記物質は免疫刺激能、例えば樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである。

【0040】

本発明は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に感染していない対象におけるインターロイキン12(IL-12)の全身レベルを上昇させる方法を提供し、その方法は、IL-12レベルのそのような上昇が望ましい前記対象に、(a) 配列番号1を含む単離されたタンパク質、(b) 配列番号2を含む単離されたタンパク質、(c) 配列番号28を含む単離されたタンパク質、(d) 配列番号30を含む単離されたタンパク質、(e) 配列番号3、4、5、6及び7を含む単離されたタンパク質、(f) (1) アイメリアに感染している組織又は細胞の細胞抽出物を作製する段階、(2) 上清を作製するためにその細胞抽出物を遠心分離する段階、(3) タンパク質を沈殿させてペレットにするために硫

酸アンモニウムによってその上清を分画し、且つそのペレットを溶液に再懸濁する段階、
 (4) その溶液をH I Cカラムに適用する段階、(5) 溶出した物質を作製するためにそのH I Cカラムに結合した物質を溶出させる段階、(6) D E A Eカラムに負荷するための試料を作製するためにその溶出した物質を透析する段階、(7) D E A Eカラムにその試料を適用する段階、(8) 溶出した画分を作製するために緩衝液でそのD E A Eカラムに結合した物質を溶出させ、且つその溶出した画分を濃縮する段階、(9) サイズ排除カラムにその濃縮され溶出した画分を適用する段階、(10) そのサイズ排除カラムから溶出した画分を収集及びプールする段階、(11) カルシウム結合タンパクを除去するためにH I Cカラムにそのプールされた画分を適用する段階、(12) H P L C H I CカラムにそのH I Cカラムから溶出した画分を適用し、且つ活性(免疫刺激性)画分を収集する段階(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする(又は下記の第5.6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする)10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)、(13) その活性画分を透析する段階、及び(14) H P L C D E A Eカラムにその透析された活性画分を適用し、且つ1つ又は複数の活性(免疫刺激性)画分を収集する段階(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする(又は下記の第5.6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする)10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)を含む工程の生成物である単離されたタンパク質、(g)(1)精製されたアピコンプレックス門生物の、又はアピコンプレックス門生物に感染している細胞のホモジネートを作製する段階、(2) ペレットを得るためにそのホモジネートを遠心分離する段階、(3) ホスホリパーゼを含む溶液でそのペレットを処理する段階、(4) 上清を得るためにその溶液を遠心分離する段階、(5) 逆相H P L Cカラムにその上清を適用する段階、及び(6) 溶出したタンパク質を作製するためにその逆相H P L Cカラムから結合したタンパク質を溶出させる段階(前記タンパク質は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力(免疫刺激能)を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする(又は下記の第5.6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする)10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)を含む工程の生成物である単離されたタンパク質、(h) 上記(a)~(g)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、並びに(i) 上記(a)~(g)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞(前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している)からなる群から選択される有効量の物質を投与することを含む。

【0041】

本発明は、ヒト免疫不全ウイルス(H I V)に感染していない対象におけるインターロイキン12(I L-12)の全身レベルを上昇させる方法も提供し、その方法は、そのようなI L-12レベルの上昇が望ましい対象に、(a) 配列番号3、4、6又は7を含む単離されたタンパク質、(b) 配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30の変異体を含む単離されたタンパク質(前記変異体は、それぞれ配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30に対して保存的アミノ酸置換のみを有する)、(c) 配列番号3、4、6又は7の変異体を含む単離されたタンパク質(前記変異体は、それぞれ配列番号3、4、6又は7に対して保存的アミノ酸置換のみを有する)、(d) デフォルトパラメータに調整したBLAST 2.0アルゴリズムによって決定される配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30の配列と少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、又は少なくとも80%の同一性を含む単離されたタンパク質、(e) P R O F(プロフィリン)ドメインを含む単離されたタンパク質、(f) 低ストリンジェンシー条件下で配列番号15、16、17、18、19、20若しくは27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされるアミ

ノ酸配列を含む単離されたアピコンプレックス門タンパク質、(g) 前記(a)～(f)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、(h) 前記(a)～(f)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞(前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している)からなる群から選択される有効量の物質を投与することを含み、前記物質は免疫刺激能、例えば樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである。

【0042】

本発明は、組換え細胞に発現されたARPタンパク質を抽出する方法も提供し、その方法は、(a) 前記宿主細胞の抽出物を作製すること、(b) 上清を作製するためにその宿主細胞の抽出物を遠心分離すること、(c) タンパク質を沈殿させるために硫酸アンモニウムによってその上清を分画すること、(d) ペレットを得るためにその沈殿を遠心分離すること、(e) そのペレットを溶液に再懸濁すること、(f) 低圧疎水性相互作用カラムにその溶液を適用すること、(g) その低圧疎水性相互作用カラムから溶出した活性画分を収集すること(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)、(h) その低圧疎水性相互作用カラムから溶出した活性画分を透析すること、(i) 低圧DEAEカラムにその透析された活性画分を適用すること、(j) その低圧DEAEカラムから溶出した1つ又は複数の活性画分を収集すること(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)、(k) サイズ排除カラムにその低圧DEAEカラムから溶出した活性画分を適用すること、及び(1) そのサイズ排除カラムから活性画分を溶出させること(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)を含む。

【0043】

本発明は、癌を治療又は予防する方法も提供し、その方法は、そのような治療又は予防が望ましい対象に、治療又は予防有効量の精製されたアピコンプレックス門生物又は精製されたアピコンプレックス門生物のタンパク質含有膜画分を投与することを含む。

【0044】

本発明は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)又はアイメリア属生物の感染によって引き起こされない感染症を治療又は予防する方法も提供し、その方法は、そのような治療又は予防が望ましい対象に、治療又は予防有効量の精製されたアピコンプレックス門生物又は精製されたアピコンプレックス門生物のタンパク質含有膜画分を投与することを含む。

【0045】

本発明は、免疫応答を刺激する方法をさらに提供し、その方法は、対象がヒト免疫不全ウイルス(HIV)に感染しておらず、且つ鳥類種ではないことを条件として、その対象に治療又は予防有効量の精製されたアピコンプレックス門生物又は精製されたアピコンプレックス門生物のタンパク質含有膜画分を投与することを含む。

【0046】

本発明は、(a) 配列番号3、4、6又は7を含む精製されたポリペプチド、(b) 配列番号3、4、5、6及び7を含む精製されたポリペプチド、(c) デフォルトパラメータに調整したBLAST 2.0アルゴリズムによって決定される配列番号29と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、又は少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む精製されたポリペプチド、並びに(d) 配列番号3、4、5、6及び7を含むアミノ酸配列の変異体を含む精製されたポリペプチドからなる群から選択される精製されたポリペプチドを提供し、前記変異体はそれぞれ配列番号3、4、5、6及び7に対して保存的アミノ酸置換のみを有する。本発明は、治療有効量のそのポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物も提供する。

10

20

30

40

50

【0047】

本発明は、(a) アイメリアに感染している組織又は細胞の細胞抽出物を作製する段階、(b) 上清を作製するためにその細胞抽出物を遠心分離する段階、(c) タンパク質を沈殿させてペレットにするために硫酸アンモニウムによってその上清を分画し、且つそのペレットを溶液に再懸濁する段階、(d) その溶液をH I Cカラムに適用する段階、(e) 溶出した物質を作製するためにそのH I Cカラムに結合した物質を溶出させる段階、(f) D E A Eカラムに負荷するための試料を作製するために、前記溶出した物質を透析する段階、(g) D E A Eカラムにその試料を適用する段階、(h) 溶出した画分を作製するために緩衝液でそのD E A Eカラムに結合した物質を溶出させ、且つ前記溶出した画分を濃縮する段階、(i) サイズ排除カラムにその濃縮され溶出した画分を適用する段階、(j) そのサイズ排除カラムから溶出した画分を収集及びプールする段階、(k) カルシウム結合タンパクを除去するためにH I Cカラムにそのプールされた画分を適用する段階、(l) H P L C H I CカラムにそのH I Cカラムから溶出した画分を適用し、且つ活性(免疫刺激性)画分を収集する段階(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする(又は下記の第5. 6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする)10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)、(m) その活性画分を透析する段階、(n) H P L C D E A Eカラムにその透析された活性画分を適用し、且つ1つ又は複数の活性(免疫刺激性)画分を収集する段階(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする(又は下記の第5. 6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする)10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)を含む、ポリペプチドを単離する方法も提供する。ある実施形態において、ポリペプチドを製造する方法は、(o) 逆相H P L Cカラムに段階(n)の活性画分を適用すること、及び(p) 溶出したタンパク質を作製するためにその逆相H P L Cカラムから結合したタンパク質を溶出させること(前記タンパク質は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力(免疫刺激能)を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする(又は下記の第5. 6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする)10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)をさらに含む。本発明は、この工程の生成物である精製されたポリペプチドも提供する。本発明は、治療有効量のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物をさらに提供する。

【0048】

本発明は、(1) 精製されたアピコンプレックス門生物の、又はアピコンプレックス門生物に感染している細胞のホモジネートを作製する段階、(2) ペレットを得るためにそのホモジネートを遠心分離する段階、(3) ホスホリパーゼを含む溶液でそのペレットを処理する段階、(4) 上清を得るためにその溶液を遠心分離する段階、(5) 逆相H P L Cカラムにその上清を適用する段階、及び(6) 溶出したタンパク質を作製するためにその逆相H P L Cカラムから結合したタンパク質を溶出させる段階(前記タンパク質は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力(免疫刺激能)を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする(又は下記の第5. 6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする)10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)を含む、ポリペプチドを単離する方法をさらに提供する。本発明は、この工程の生成物である精製されたポリペプチドも提供する。本発明は、治療有効量のそのポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物をさらに提供する。

【0049】

本発明は、第1タンパク質に結合する抗体を提供し、その第1タンパク質のアミノ酸配列は配列番号26からなり、その抗体は第2タンパク質に結合せず、その第2タンパク質のアミノ酸配列は配列番号1又は配列番号2からなる。具体的な実施形態において、その抗体は、モノクローナル抗体である。別の具体的な実施形態において、本発明は、前記抗

体のフラグメントを有する分子を提供し、そのフラグメントは前記第1タンパク質と結合できる。

【0050】

本発明は、(a) 配列番号3、4、6又は7を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、(b) 配列番号3、4、5、6及び7を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、並びに(c) デフォルトパラメータに調整したBLAST 2.0アルゴリズムによって決定される配列番号29と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、又は少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子からなる群から選択される単離された核酸を提供する。一実施形態において、その核酸は、精製されている。別の実施形態において、その核酸は、ベクターである。なお別の実施形態において、そのベクターは、前記ポリペプチドをコードする前記核酸配列に作動可能に連結しているプロモーターをさらに有する。

10

【0051】

本発明は、発現ベクターを含む宿主細胞も提供し、前記発現ベクターは、ヌクレオチド配列に作動可能に連結しているプロモーターを有し、前記プロモーターは前記ヌクレオチド配列に関して非天然であり、前記ヌクレオチド配列は、(a) 配列番号3、4、6若しくは7を有するポリペプチド、(b) 配列番号3、4、5、6及び7を含むポリペプチド、又は(c) デフォルトパラメータに調整したBLAST 2.0アルゴリズムによって決定される配列番号29と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、若しくは少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。

20

【0052】

一実施形態において、宿主細胞は、哺乳動物宿主細胞である。別の実施形態において、宿主細胞は、酵母細胞である。別の実施形態において、宿主細胞は、昆虫細胞である。なお別の実施形態において、宿主細胞は、細菌細胞である。具体的な実施形態において、細菌細胞は大腸菌である。本発明は、ポリペプチドの製造方法をさらに提供し、その方法は、コードされるそのポリペプチドが細胞によって発現されるように前記細胞を増殖させること及びその発現されたポリペプチドを回収することを含む。具体的な実施形態において、発現されたポリペプチドは、(1) 前記細胞の抽出物を作製する段階、(2) 上清を作製するためにその細胞抽出物を遠心分離する段階、(3) タンパク質を沈殿させるために硫酸アンモニウムによってその上清を分画する段階、(4) ペレットを得るためにその沈殿を遠心分離する段階、(5) そのペレットを溶液に再懸濁する段階、(6) 低圧カラムに前記溶液を適用する段階、(7) その低圧カラムから溶出した活性(免疫刺激性)画分を収集する段階(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする(又は下記の第5.6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする)10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)、(8) その活性画分を透析する段階、(9) HPLC DEAEカラムにその透析された活性画分を適用する段階、(10) そのHPLC DEAEカラムから溶出した1つ又は複数の活性(免疫刺激性)画分を収集する段階(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする(又は下記の第5.6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする)10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)、(11) サイズ排除カラムにその活性画分を適用する段階、及び(12) そのサイズ排除カラムからその活性(免疫刺激性)画分を溶出させる段階(前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする(又は下記の第5.6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする)10時間以内に哺乳動物から単離されたものである)を含む方法によって回収される。

30

40

A R P	アピコンプレックス関連タンパク質（本発明の活性分子）
S I E	小腸抽出物
B E X	ウシ小腸抽出物
G M - C S F	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
I L 2	インターロイキン 2
I L 1 2	インターロイキン 1 2
I F N γ	インターフェロンガンマ
D C	樹状細胞
L G L	大型顆粒リンパ球
N K 又は N K 細胞	ナチュラルキラー細胞
n __ N K	標的細胞に対する N K の比、n は接種比を表す
C M C	細胞性細胞傷害性
s p p .	所定の属の多様な種
c D N A	相補 D N A

【発明を実施するための最良の形態】

【0053】

本発明は、原発性腫瘍疾患、転移性腫瘍疾患及び感染症の予防及び治療、対象における免疫応答の刺激、並びにインターロイキン 1 2（I L - 1 2）治療の代替としての使用のための組成物及び方法を提供する。詳細には本発明は、免疫刺激活性を有し、よって癌及び感染症の治療及び予防への、並びに免疫変調における用途を有するアピコンプレックス関連タンパク質（A R P）を提供する。A R P を含む組成物を提供する。癌及び感染症の予防及び／又は治療のための、インターロイキン 1 2（I L - 1 2）治療の代替として使用するための、並びに対象における免疫応答を誘発させるための A R P の使用方法も提供する。任意の理論に縛られずに、本発明は、アイメリアに感染したウシの小腸抽出物から精製された分子がアピコンプレックス門原生動物であるアイメリアアセルブリナの表面抗原（3-1E、Lellehoj et al., 2000, Avian Diseases 44: 379-389）と高度に相同であり、ピコモル濃度及びフェムトモル濃度レベルで樹状細胞の強健な活性化物質であり、*i n v i t r o* 及び *i n v i v o* の両方で種相互免疫刺激効果を有するという出願者らの発見に一部基づいている。

【0054】

開示を明確にするためであるが、限定する目的ではなく、本発明の詳細な説明を以下の小節に分ける。

- (i) A R P
- (i i) 精製されたアピコンプレックスの A R P
- (i i i) A R P の誘導体及び類似体
- (i v) A R P 、誘導体及び類似体に対する抗体
- (v) A R P の構造予測及び機能性分析
- (v i) A R P 活性のキャラクタリゼーション及び実証
- (v i i) 本発明の組成物の使用
- (v i i i) 他の抗癌療法
- (i x) 他の抗感染剤
- (x) 投与計画
- (x i) 投与、製剤及びキット
- (x i i) 製品
- (x i i i) 治療中の効果の監視

【0055】

いくつかの実施形態において、本発明の A R P は、免疫刺激活性を有する、アピコンプレックス門生物のタンパク質だけでなく、そのフラグメント、誘導体、変異体、ホモログ又は類似体である。アピコンプレックス門生物は、アピコンプレックス門の生物の 1 つである。アピコンプレックス門生物の非限定的な例には、下記の表 1 に挙げられているもの

10

20

30

40

50

がある。具体的な実施形態において、本発明のARPには、配列番号1（E. テネラのARP）、配列番号2（E. アセルブリナのARP）、及び配列番号3～7を有するタンパク質（ウシアイメリア種ARPの部分アミノ酸配列。配列番号3～7は、必ずしも隣接せず、各フラグメントに介入配列又は隣接配列が存在しうる。好ましくはタンパク質は、配列番号3から配列番号7の順にN末端からC末端への配列番号3、4、5、6及び7を含む）があるが、それに限定されない。

【0056】

具体的な実施形態において、本発明のARPは、BLAST 2.0スイートプログラム（Altschul et al., Nucleic Acids Res, 2: 3389-3402, 1997）を使用してデフォルトパラメータを用いたBLASTアルゴリズムによって測定されるように、配列番号1又は配列番号2の配列と少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%の同一性を有する（アピコンプレックス門生物のゲノムにコードされる）アピコンプレックス門タンパク質であり、そのアピコンプレックス門タンパク質は、免疫刺激活性及び／又は抗癌活性を有する。例えば下記の第5. 6節及び第12. 3節に記載されているようなアッセイによって、そのような（免疫刺激）活性を測定できる。具体的な実施形態において、本発明のARPは、天然アピコンプレックス門タンパク質である。いくつかの実施形態において、本発明のARPは、可溶型で存在する。いくつかの実施形態において、本発明のARPは、膜連結型として存在する。データベースの類似性検索のために使用できるBLASTファミリーのプログラムには、ヌクレオチドデータベース配列に対するヌクレオチドクエリ配列のためのBLASTN、タンパク質データベース配列に対するヌクレオチドクエリ配列のためのBLASTX、タンパク質データベース配列に対するタンパク質クエリ配列のためのBLASTP、ヌクレオチドデータベース配列に対するタンパク質クエリ配列のためのTBLASTN、及びヌクレオチドデータベース配列に対するヌクレオチドクエリ配列のためのTBLASTXがある。Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 19, Ausubel, et al., Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1995を参照のこと。上記プログラムの新バージョン又は新しいプログラムが概して将来確実に入手できるようになるであろうが、それらを本発明に使用できる。デフォルトへのパラメータの調整を将来的に必要なに応じ容易に変更できるものである。

【0057】

具体的な実施形態において、本発明のARPは、保存されたPROF（プロフィリン）ドメインを含むタンパク質であり、そのタンパク質は免疫刺激活性及び／又は抗癌活性を有する。例えば下記の第5. 6節及び第12. 3節に記載されているアッセイによって、そのような活性を測定できる。反復する配列パターン又はモチーフに基づいて、保存されたドメインは規定される。公知の保存されたドメインの検索を、例えばウェブサイトncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgiで行うことができる。一実施形態において、保存されたPROF（プロフィリン）ドメインは、Conserved Domain Database(CDD v.1.60)及びデフォルトパラメータに調整したRPS-BLAST (Reverse Position-Specific BLAST) アルゴリズムによって決定される。現行のCDDデータベースは、2つの人気の高いコレクションであるSmart及びPfam、並びにNCBIからの寄与から得られるドメインを含んでいる。Conserved Domain Databaseにおいて、PROF（プロフィリン）ドメインは、smart00392若しくはcd00148ドメイン、又はpfam00235ドメインとしても同定されている（PSSMのId14983、14824及び801に相当）。タンパク質配列における保存されたドメインを同定するために、RPS-TBLASTアルゴリズムを使用できる。クエリ配列を、基本となる保存されたドメインのアラインメントから準備された位置特異的スコアマトリックスと比べる。クエリ配列と代表的なドメイン配列とのペア状のアラインメント、又は多重アラインメントとしてヒットを表示できる。Marchler-Bauer et al., (2003) Nucleic Acids Research 31:383-387 (2003); Marchler-Bauer et al., (2002) Nucleic Acid Research 30:281-283を参照のこと。これら全ては、その全体が参照により本明細書に

組み込まれている。「PROF」ドメインは、アメーバから哺乳動物までの生物に存在する、自然界に遍在するプロフィリンに代表される。プロフィリンは、アクチンの重合の調節に関与し、ホスファチジルイノシトールサイクル及びRas経路の構成要素と相互作用することによって、細胞骨格を主なシグナル伝達経路と連結させる。例えば、Korenbaum et al., *Biochemistry* (1998) 37(26): 9274-83; Schluter et al., *Biochim Biophys Acta*, (1997) 1359(2): 97-109を参照のこと。これら全ては、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。具体的な実施形態において、本発明のARPは植物プロフィリン、例えば配列番号11、12、13又は14である。

【0058】

具体的な実施形態において、本発明のARPは、アピコンプレックス門タンパク質であり、そのタンパク質がコードする核酸（アピコンプレックス門cDNA又はゲノム核酸）は、ストリンジェントな条件（高、中又は低ストリンジェント条件）で（例えば配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、又は配列番号20に示される配列若しくはその逆相補体、又はARP誘導体をコードする核酸若しくはその逆相補体を有する）ARPの核酸とハイブリダイズし、そのアピコンプレックス門タンパク質は、免疫刺激活性及び／又は抗癌活性を有する。例えば下記の第5.6節及び第12.3節に記載されているようなアッセイによって、そのような活性を測定できる。ストリンジェントな条件は、例えば配列依存性及び環境依存性であり、例えば長い配列の方が高温で特異的にハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションの完璧なガイドは、Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993)にみられる。Martin et al (*EMBO J* 4: 1625-1630 (1985))及びDavies et al (*Methods in Molecular Biology Vol 28: Protocols for nucleic acid analysis by non-radioactive probes*, Isaac, P.G. (ed) pp 9-15, Humana Press Inc., Totowa NJ, USA)も参照のこと。これら全ては、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【0059】

具体的な実施形態において、低ストリンジェンシー条件下でARPの核酸又はその逆相補体にハイブリダイズ可能な核酸が提供される。非限定的な例として、そのような低ストリンジェンシー条件を用いる方法は以下のとおりである（Shilo and Weinberg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 6789-6792も参照）。35%フォルムアミド、5×SSC、50mMトリス塩酸（pH7.5）、5mMのEDTA、0.1%PVP、0.1%フィコール、1%BSA、及び500µg/ml変性サケ精子DNAを含む溶液中でDNAを含むフィルターを40℃で6時間前処理する。以下のように修正した同溶液中でハイブリダイゼーションを行う：0.02%PVP、0.02%フィコール、0.2%BSA、100µg/mlサケ精子DNA、10%（wt/vol）硫酸デキストラン。5～20×10⁶cpmの32P標識プローブを使用する。40℃で18～20時間ハイブリダイゼーション混液中でフィルターをインキュベートし、次に2×SSC、25mMトリス塩酸（pH7.4）、5mMのEDTA、及び0.1%SDSを含む55℃の溶液中で1.5時間洗う。洗液を新鮮溶液と交換し、60℃でさらに1.5時間インキュベートする。フィルターを乾燥状態で転写させ、オートラジオグラフィーのために露出させる。必要ならば、3回目として65～68℃でフィルターを洗い、フィルムに再露出させる。別の実施例では、ホルムアミドなしで62℃で低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションを行う。使用される低ストリンジェンシーの他の条件は、（例えば種相互ハイブリダイゼーションに採用されるように）当技術分野で周知である。

【0060】

別の具体的な実施形態において、高ストリンジェンシー条件下でARPの核酸又はその逆相補体にハイブリダイズ可能な核酸が提供される。例としてであるが、限定としてではなく、そのような高ストリンジェンシー条件を使用する方法は以下のとおりである。6×SSC、50mMトリス塩酸（pH7.5）、1mMのEDTA、0.02%PVP、0.02%フィコール、0.02%BSA、及び500µg/ml変性サケ精子DNAから

構成される緩衝液中でDNAを含むフィルターの予備ハイブリダイゼーションを65℃で8時間から一晩行う。100 μg/ml 変性サケ精子DNA及び5～20×10⁶ cpmの³²P標識プローブを含む予備ハイブリダイゼーション混液中でフィルターを65℃で48hハイブリダイズさせる。2×SSC、0.01%PVP、0.01%フィコール、及び0.01%BSAを含む溶液中で37℃で1時間フィルターの洗浄を実施する。この後に、0.1×SSC中で50℃で45分間洗ってからオートラジオグラフィーを行う。別の例において、50%ホルムアミドで62℃で高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションを行う。使用されうる高ストリンジェンシーの他の条件は、当技術分野で周知である。

【0061】

10

別の具体的な実施形態において、中ストリンジェンシー条件下でARPの核酸又はその逆相補体にハイブリダイズ可能な核酸が提供される。そのようなストリンジェンシーに適切な条件の選択は、当技術分野において周知である（例えばSambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkを参照のこと。Ausubel et al., eds., in the Current Protocols in Molecular Biology series of laboratory technique manuals, (著作権) 1987-1997, Current Protocols, (著作権) 1994-1997 John Wiley and Sons, Inc.も参照のこと）。非限定的な一例において、中ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションを20%ホルムアミドで62℃で実施できる。

【0062】

20

（配列番号3～7を有する）ウシARP又はその誘導体が治療的又は予防的に使用される実施形態において、ARPはジスルフィド結合を有する。一実施形態において、ウシARPはジスルフィド結合を破壊するであろう還元条件に供されていない。還元されたARPタンパク質は、酸化型よりも2～5倍大きな活性を有する。

【0063】

いくつかの実施形態において、本発明のARPは、翻訳後修飾されている。いくつかの実施形態において、本発明のARPは、翻訳後修飾されていない。具体的な実施形態において、本発明のARPは、グリコシル化されている。具体的な実施形態において、本発明のARPは、グリコシル化されていない。

【0064】

30

いくつかの実施形態において、本発明のARPは、膜連結型である。いくつかの実施形態において、本発明のARPは、膜連結型ではない。具体的な実施形態において、本発明のARPは、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）連結型である。具体的な実施形態において、本発明のARPは、GPI連結型ではない。一実施形態において、本発明のARPは、リポタンパク質である。別の実施形態において、本発明のARPは、リポタンパク質ではない。

【0065】

具体的な実施形態において、本発明のARPは天然タンパク質である。具体的な実施形態において、本発明のARPは、組換えにより製造されたタンパク質である。具体的な実施形態において、本発明のARPは、18 kD～25 kDの範囲の分子量及び4.0と4.7との間の等電点（pI）を有する。

40

【0066】

当技術分野で公知の任意の1つ若しくは複数のアッセイ又は第5.6節に記載されるようなアッセイによって、所望の活性について本発明の治療用ARPをin vitroで試験できる。

【0067】

本発明のARPは、非常に低濃度（例えばピコモル又はフェムトモル濃度レベル）でも強力な免疫刺激活性を概して有する。具体的な実施形態において、免疫応答を誘発するための、並びに癌及び感染症の予防及び治療のための本発明の治療又は予防用組成物は、濃厚にされたARPを含む。本明細書に使用する、タンパク質（例えばペプチド、ポリペプ

50

チド又は融合タンパク質) に関して「濃厚にされた」という用語は、そのタンパク質が得られる自然状態又は本来の状態に比べて、そのタンパク質が、目的の組成物に存在するタンパク質の総量に対してより高い割合を構成していることを意味している。存在する他のタンパク質の量が選択的に低減することによって、又は目的の特異的タンパク質の量が選択的に増加することによって、又はこれら2つの組合せによって濃厚にすることを達成できる。「濃厚にされた」は、他のタンパク質が存在しないことを意味するわけではないことに注意すべきである。この用語は、他の供給源からのタンパク質が存在しないことも意味しない。他の供給源からのタンパク質は、例えば別の種のゲノム又はクローニングベクターによってコードされるタンパク質を含みうる。この用語は、所望のタンパク質の比率を増加させるために人的に介入した状況のみに及ぶことを意味している。具体的な実施形態において、A R Pは、総タンパク質の重量に対して0.001wt%、0.003wt%、0.01wt%、0.05wt%、0.1wt%、0.5wt%、1wt%、10wt%、20wt%、30wt%を超える。

【0068】

核酸に関して「濃厚にされた」という用語は、その核酸が得られた自然状態又は本来の状態に比べて、その核酸が目的の組成物に存在する核酸の総量に対してより高い割合を構成することを意味する。存在する他の核酸の量が選択的に低減することによって、又は目的の特異的核酸の量が選択的に増加することによって、又はこれら2つの組合せによって濃厚にすることを達成できる。「濃厚にされた」は、他の核酸が存在しないことを意味するわけではないことに注意すべきである。この用語は、他の供給源からの核酸が存在しないことも意味しない。他の供給源からの核酸は、例えば別の種のゲノム又はクローニングベクターによってコードされる核酸を含みうる。この用語は、所望の核酸の比率を増加させるために人的に介入した状況のみに及ぶことを意味している。

【0069】

好ましい実施形態において、本発明のA R Pは、精製されている。タンパク質又は核酸に関して「精製されている」という用語は、出発物質又は天然物質の少なくとも1オーダー高い精製、好ましくは2又は3オーダー高い、最も好ましくは4又は5オーダー高い精製が達成されることを意味する。このように、本明細書に使用する「精製された」という用語は、その物質が100%精製されたことを意味せず、よって精製されたタンパク質又は核酸が他の任意の物質を排除していることを意味しない。具体的な実施形態において、精製されたA R Pは、総タンパク質又は核酸の、場合によっては重量に対して少なくとも60%、少なくとも80%、又は少なくとも90%である。具体的な実施形態において、精製されたA R Pは、例えばドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動又はアガロースゲル電気泳動によってアッセイするとき均質になるまで精製されている。

【0070】

具体的な実施形態において、本発明のA R Pは、任意の発達期の精製された生存可能な、若しくは不活性化されたアピコンプレックス門生物、又はそのタンパク質画分(例えばそのタンパク質含有膜調製物又はその貯蔵顆粒調製物)の形で存在する。具体的な実施形態において、アピコンプレックス門生物は、アイメリアであり、そのアイメリアは種特異的であり、自然宿主と異なる種の宿主には通常は症候性感染を引き起こせない。別の具体的な実施形態において、不活性化されたアピコンプレックス門生物は、生活環を欠損したアピコンプレックス門生物である。

【0071】

A R Pの調製及び精製

いくつかの実施形態において、癌及び／又は感染症の治療又は予防に使用される本発明の組成物は、濃厚にされたA R P、単離されたA R P、又は精製されたA R Pを含む。本明細書に記載される方法によると、本発明の組成物に採用されるA R Pは、総タンパク質のmgに対して0.001~100パーセントの範囲、又は総タンパク質のmgに対して少なくとも0.001%、少なくとも0.003%、少なくとも0.01%、少なくとも0.1%、少なくとも1%、少なくとも10%、少なくとも30%、少なくとも60%、

若しくは少なくとも90%でありうる。一実施形態において、本発明の組成物に採用されるARPは、総タンパク質に対して少なくとも4%である。別の実施形態において、ARPは、例えばドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動によってアッセイするとき、みかけの均質になるまで精製されている。本発明のARPは、例えば可溶性画分（上清）若しくは不溶性画分（ペレット）のいずれかの使用によって、感染している組織の、又は精製されたアピコンプレックス門生物のホモジネートから、或いは細胞表面に作用する酵素の使用によって無傷細胞（例えば組換えタンパク質又はアピコンプレックス門細胞を発現している哺乳動物細胞）から精製されうる。沈殿による分離、吸着による分離（例えばカラムクロマトグラフィー、膜吸着剤、半径流カラム、バッチ吸着、高速液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、無機吸着剤、疎水性吸着剤、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー）、又は溶液状態の分離（例えばゲルろ過、電気泳動、液相分配、界面活性剤分配、有機溶媒抽出、及び限外ろ過）を含むがそれに限定されない、当技術分野において公知の任意の技術をARPの精製に使用できる。Scopes, PROTEIN PURIFICATION, PRINCIPLES, AND PRACTICE, 3rd ed., Springer (1994)を参照のこと。その本文全体は参照により本明細書に組み込まれている。精製の間は、第5.6節及び第12節に記載されているように1つ又は複数の*in vitro*又は*in vivo*アッセイによってARPの免疫刺激活性及び／又は抗腫瘍活性を監視すべきである。本発明は、二価陽イオンの結合の調節によってARPの活性及び／又は凝集状態に影響するARPの単離方法に対する任意の修正も包含する。ゲル電気泳動を例とするがそれに限定されない、当技術分野において公知の任意の方法によってARPの純度をアッセイできる。上記Scopesを参照のこと。

10

20

【0072】

組織及び細胞抽出物からの可溶性ARPの精製

一実施形態において、ARPは、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、げっ歯類、鳥類、霊長類（例えばサル）、哺乳類、及びヒトを含むがそれに限定されない脊椎動物（その動物は症候性感染又は非症候性感染を有しうる）のアピコンプレックスに感染している組織から精製される。別の実施形態において、ARPは、アピコンプレックス門生物に感染している細胞培養から精製される。なお別の実施形態において、ARPは、アピコンプレックス門生物の調製物から精製される。感染している組織、細胞培養、又はアピコンプレックス門生物の調製物からARPを精製するために使用できる方法が、非限定的な例として下記の第6節に示される。

30

【0073】

簡潔には、非限定的な例として感染している組織又は細胞の調製物（例えばホモジナイズされた小腸組織又は腸粘膜細胞の調製物）を遠心分離する。結果として生じた液状上清を固体硫酸アンモニウムで45%飽和にし、遠心分離し、ペレットを捨てる。固体硫酸アンモニウムで上清を80%飽和にし、再度遠心分離し、上清を捨てる。瓶又は試験管内で完全に再懸濁してから1.5M硫酸アンモニウム／50mMリン酸ナトリウム（pH6.8）にペレットを溶かす。溶解していない物質を遠心分離で除去する。

【0074】

好ましい実施形態において、サイズ排除クロマトグラフィー前の高分子の負荷を減らすために2つの原体加工段階を使用する。第1段階は、疎水性相互作用カラム（以下「HIC」カラムと記載。下記6.2.2節参照）を使用する。大量の不活性化物質、特にポリ核酸が通過液及び洗液中に除去される。硫酸アンモニウムを含まない緩衝液への交換の後に活性な（免疫刺激性）物質が溶出する（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする（又は下記の第5.6節及び第12節に記載されている1つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする）10時間以内に哺乳動物から単離されたものである）。緩衝液を交換しながら4℃で0.2MのNaCl／10mMリン酸ナトリウム（pH7.4）4Lに対して透析することによってDEAEクロマトグラフィー用の溶出した物質を調製する。DEAEイオン交換クロマトグラフィーを用いて同様にその溶出液を処理し（下記第6.2.

40

50

2 節参照)、通過液及び洗液を捨てる。高 NaCl 濃度での溶出液を保存し、膜圧力セルで濃縮し、サイズ排除カラム (例えば Superdex (商標) カラム) に入れる。(第 5. 6 節及び第 1 2 節に記載されている 1 つ又は複数のアッセイによってアッセイされるタンパク質含量に関する) 比活性は、精製の各段階からの保存された画分について決定される。サイズ排除クロマトグラフィー段階の終わりに約 7000 倍の精製に達する。具体的な実施形態において (例えば小腸抽出物を使用する場合、細菌エンドトキシンは常に混入物である)、精製の各段階で LAL アッセイ (下記第 5. 3 節参照) でエンドトキシンレベルを監視する。エンドトキシンレベルは約 1000 分の 1 に減少し、その結果として DC アッセイを妨害しうるレベルを十分下回る最終レベルとなる (最小 DC 活性について 1000 U/mL の閾値。DC アッセイの詳細な記載については第 5. 6 節及び第 1 2 節を参照のこと)。

10

【0075】

いくつかの実施形態において、最終的な精製に十分な物質を得るために、多数の試料 (例えば動物の腸) からの抽出物を含むプールを作る。好ましくは、これらは粗上清中に高活性が存在するかについて予備選択される (そのような活性の予備検査の例については第 6. 2. 1 節を参照のこと)。腸又は細胞の調製物のいくつかのバッチを合わせ、濃縮し、(HIC カラムによって、下記第 6. 2. 2 節参照) カルシウム結合タンパク質を除去し、プールと名付ける。

【0076】

精製産物を得るために、高速液体クロマトグラフィー (以後「HPLC」と記載) HIC カラムでプールを最初に分離する。硫酸アンモニウムを除去するためにその活性画分 (前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン 12 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする (又は下記の第 5. 6 節及び第 1 2 節に記載されている 1 つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする) 10 時間以内に哺乳動物から単離されたものである) を透析し、0. 15 M の NaCl を用いた HPLC DEAE カラムに適用する (下記第 6. 2. 2 節参照)。NaCl 勾配を適用し、活性 (下記の第 5. 6 節及び第 1 2 節に記載されている 1 つ又は複数のアッセイによりアッセイされる免疫刺激活性) は、イオン強度 0. 3 M 近くの主ピークと共に溶出する。好ましくは HIC からの活性物質を処理するために DEAE の運転を使用する。具体的な実施形態において、プールされた活性領域を逆相 HPLC カラム (例えば C8 逆相 HPLC カラム、下記第 6. 2. 2 節参照) に適用し、水-アセトニトリル勾配を加えて溶出させる。活性 (下記の第 5. 6 節及び第 1 2 節に記載されている 1 つ又は複数のアッセイによりアッセイされる免疫刺激活性) は、流速の小さい、勾配のゆるい溶出プロトコルで 40 % アセトニトリル近くに溶出する。これらの活性画分の純度の問題は、細かくサンプリングした分離物に沿って吸光度に対して活性をプロットすることによって取り組まれる。適度に頑健な一次回帰直線及びゼロ近くの切片は、混入分子の欠如を示す。

20

30

【0077】

逆相 HPLC カラムによる精製段階は、大部分のタンパク質を変性させる。好ましい実施形態において、逆相 HPLC カラムから溶出するタンパク質は、当技術分野で公知の方法によって、好ましくは 1 3 節に記載される方法によって再生 (renaturing) される。別の実施形態において、逆相 HPLC カラムは本発明の ARP を精製するために使用されない。

40

【0078】

いくつかの実施形態において、可溶性 ARP は、(1) 濃厚にされた ARP、例えば組換え ARP タンパク質を発現する細胞の抽出物を有する溶液を作製する段階、(2) 上清を得るためにその溶液を遠心分離する段階、(3) タンパク質を沈殿させるために硫酸アンモニウムによってその上清を分画し、ペレットを得るためにその沈殿を遠心分離し、且つそのペレットを溶液に再懸濁する段階、(4) 低圧 HIC カラムにその溶液を適用し、且つ活性 (免疫刺激性) 画分を収集する段階 (前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン 12 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする (又は

50

下記の第 5. 6 節及び第 1 2 節に記載されている 1 つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする) 1 0 時間以内に哺乳動物から単離されたものである)、(5) その活性画分を透析する段階、(6) H P L C D E A E カラムにその透析された活性画分を適用し、且つ 1 つ又は複数の活性 (免疫刺激性) 画分を収集する段階 (前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン 1 2 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする (又は下記の第 5. 6 節及び第 1 2 節に記載されている 1 つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする) 1 0 時間以内に哺乳動物から単離されたものである)、並びに (7) サイズ排除カラムにその活性画分を適用し、且つ溶出した活性 (免疫刺激性) 画分を収集する段階 (前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン 1 2 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする (又は下記の第 5. 6 節及び第 1 2 節に記載されている 1 つ若しくは複数のアッセイによりその能力をアッセイする) 1 0 時間以内に哺乳動物から単離されたものである) を含む工程によって単離されうる (下記第 1 0. 2 節参照)。

【0079】

具体的な実施形態において、可溶性 A R P は、(1) 組換え A R P を発現する細菌によって消費される無機培地を作製する段階、(2) D E A E カラムにその培地を適用する段階、(3) 溶出した画分を作製するために緩衝液で D E A E カラムに結合した物質を溶出させる段階、(4) サイズ排除カラムに溶出した画分を適用する段階、及び (5) そのサイズ排除カラムから溶出した画分を収集する段階を含む工程によって単離される。

【0080】

別の実施形態において、A R P は、表 1 に挙げるものを含むがそれに限定されないアピコンプレックス門原生動物から精製される。図 1 も一部のアピコンプレックス門原生動物に関する系統発生を提供する。精製方法の非限定的な例を第 8 節に示す。

【0081】

【表 1】

アピコンプレックス門

コキシジウム綱

アイメリア目

クリプトスポリジウム科

クリプトスポリジウムアンデルソニ
 クリプトスポリジウムバイレイ
 クリプトスポリジウムカニス
 クリプトスポリジウムフェリス
 クリプトスポリジウムガリ
 クリプトスポリジウムメレアグリジス
 クリプトスポリジウムムリス
 クリプトスポリジウムパルブム
 クリプトスポリジウムサウロフィルム
 クリプトスポリジウムセルペンティス
 クリプトスポリジウムライリ
 クリプトスポリジウム種

30

40

未分類のクリプトスポリジウム

アイメリア科

カリオスポラ属

カリオスポラビゲネティカ

カリオスポラ種

コレオアイメリア属

コレオアイメリア種

シクロスボラ属

シクロスボラカエタネンシス

シクロスボラセルコピテチ

シクロスボラコロビ

シクロスボラパピオニス

シクロスボラ種

シクロスボラ種Gombe 22株

シクロスボラ種Gombe 34株

シクロスボラ種Gombe 40株

10

アイメリア属

アイメリアアセルブリナ

アイメリアアデネオデイ

アイメリアアーサタ

アイメリアアラバメンシス

アイメリアアルビグラ

アイメリアアントロゾイ

アイメリアアリゾネンシス

アイメリアアウベルネンシス

アイメリアボビス

アイメリアブルネティ

アイメリアカトロネンシス

アイメリアケトジビ

アイメリアチョボタリ

アイメリア克蘭ダリス

アイメリアジボドミシス

アイメリアファルシフォルミス

アイメリアファウレイ

アイメリアランゲバルテリ

アイメリアロイコピ

アイメリアマキシマ

アイメリアメレアグリミティス

20

30

40

アイメリアミティス
 アイメリアミバティ
 アイメリアネカトリクス
 アイメリアニーシュルチ
 アイメリアオニコミシス
 アイメリアオビノイダリス
 アイメリアパピラタ
 アイメリアペロミスチ
 アイメリアピラレンシス
 アイメリアポリタ
 アイメリアポリチ
 アイメリアプレコクス
 アイメリアレーディ
 アイメリアリオアリベンシス
 アイメリアスカブラ
 アイメリアショルチセッキ
 アイメリアセバラタ
 アイメリアセビレテンシス
 アイメリアスチーデ
 アイメリアテレキイ
 アイメリアテネラ
 アイメリアトロピヅラ
 アイメリアウェイブリゲンシス

10

20

ゴウシアヤネ

ゴウシア属

イソスボラ属

30

イソスボラベリ
 イソスボラフェリス
 イソスボラグリフォニ
 イソスボラインスラリウス
 イソスボラオハイオエンシス
 イソスボラペロミシス)
 イソスボラロビニ
 イソスボラスイス

ウマニクハウシムシ科

トキソプラズマ属

40

真コクシジウム目

アデレオリナ亜目

ランケステレラ科	
ランケステレラ	
コルボデラ科	
コルボデラ属	
コルボデラポンティカ	
コルボデラ種ATCC 50594	
グレガリナ亜綱	
真グレガリナ目	10
グレガリナ科	
レクディナ科	
ライディアナ科	
モノシステイス科	
オフリオシステイス科	
シュードモノシステイス属	
シュードモノシステイスレピジオタ	
ヘモスポリダ目（住血胞子虫類）	
ヘモプロテウス属	20
ヘモプロテウスケロディナエ	
ヘモプロテウスコルンバエ	
ヘモプロテウスコプキ	
ヘモプロテウスマジョリス	
ヘモプロテウスプチオダクチリ	
ヘモプロテウスシルバエ	
ヘモプロテウス種	
未分類のヘモプロテウス	
ヘパトシスチス属	
ヘパトシスチス種	30
ロイコシトゾーン属	
ロイコシトゾーンデュブロイリ	
ロイコシトゾーンシモンディ	
プラスモディウム属	
プラスモディウムアガメ	
プラスモディウムアセルリ	
プラスモディウムアズロフィルム	
プラスモディウムベルゲイ	
プラスモディウムブラジリアヌム	40
プラスモディウムチャバウディ	
プラスモディウムキリカフエ	

プラスモディウムククルス
 プラスモディウムシノモルギ
 プラスモディウムエロンガツム
 プラスモディウムファイルチルディ
 プラスモディウムファルシパルム (熱帯熱マラリア原虫)
 プラスモディウムフィールディ
 プラスモディウムフロリデンス
 プラスモディウムフラギル
 プラスモディウムガリナセウム
 プラスモディウムギガンテウム
 プラスモディウムゴンデリ
 プラスモディウムグアング
 プラスモディウムヘテロヌクレアレ
 プラスモディウムヒロバティ
 プラスモディウムイヌイ
 プラスモディウムジュクスタヌクレアレ
 プラスモディウムノウレシ
 プラスモディウムロフラエ
 プラスモディウムマラリアエ
 プラスモディウムc f. マラリアエ
 プラスモディウムメキシカヌム
 プラスモディウムヌクレオフィルム
 プラスモディウムオバーレ (卵形熱マラリア原虫)
 プラスモディウムライケノウィ
 プラスモディウムレリクツム
 プラスモディウムロウキシ
 プラスモディウムシミオバーレ
 プラスモディウムシミウム
 プラスモディウムピンケイ
 プラスモディウムビバックス (三日熱マラリア原虫)
 プラスモディウムヨエリイ
 プラスモディウム種
 未分類のプラスモディウム

10

20

30

未分類のヘモスポリダ目
 ピロプラスマ目 (ピロプラスミド)
 バベシア科
 バベシア属
 タイレリア科

40

シトックスゾーン属

タイレリア属

未分類のピロプラスマ目

ピロプラスマ属種BH 1

ピロプラスマ属種BH 3

ピロプラスマ属種CA 1

ピロプラスマ属種CA 3

ピロプラスマ属種CA 4

ピロプラスマ属種FD 1

ピロプラスマ属種MD 1

ピロプラスマ属種WA 1

ピロプラスマ属種WA 2

未分類のアピコンプレックス門

トリダクナヘモリンパアピコンプレックス

アピコンプレックス種7 2 1 4 1

未同定の共生生物N型

10

追加の情報については、例えばncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/index.cgiのアピコンプレックス門プラスモディウムファルシパルムのウェブサイト；plasmodb.orgのウェブサイト；又はbiology.unm.edu/biology/coccidiaのウェブサイトを参照のこと。

20

【0082】

精製されたアピコンプレックス門生物を当技術分野で公知の任意の方法によって得ることができる。例えばTomley, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 13: 171-176 (1997); Ryley et al., Parasitology, 73: 311-362(1976); 米国特許第6, 001, 363号、第6, 100, 241号、第5, 792, 644号、第6, 451, 984号及び6, 008, 342号を参照のこと。詳細な例については第8節も参照のこと。

30

【0083】

一実施形態において、ARPは、コクシジウム綱から精製される。別の実施形態において、ARPは、アイメリア科から精製される。なお別の実施形態において、ARPは、アイメリア属から精製される。

【0084】

簡潔には、非限定的な例として以下のようにE. テネラからARPを精製できる（第8節参照）。孢子形成オーシストをPBSに懸濁し遠心分離する。上清を取り出し、残しておく。ペレットを30mMヘベスに懸濁し氷冷しながらホモジナイズする。この処理の結果として、大部分のオーシストが破壊され、ほぼ無傷のままのスポロシストが放出される。微量遠沈管にそのホモジネートを移し、遠心分離する。

40

【0085】

第2の調製では、超音波処理中にホモジネートを冷却しておくように注意しながらホモジネートを超音波処理する。放出されたスポロシストの約80%が破壊される。懸濁液をプールし微量遠心分離する。ペレットを残しておき、以後の処理のために4℃で保存する。

【0086】

孢子形成オーシストを3回目に抽出するための出発物質は、第2の抽出調製物の残渣ペレットである。このペレット物質をヘベスに懸濁し、ガラスビーズの入ったベッドビーターチューブに移す。次に、このチューブにヘベスを完全に満たし、加熱を防ぐように注意しながらミニベッドビーター（Mini-Beadbeater）で加工する。この懸濁液を短時間微量

50

遠心分離し、上清をガラスビーズと分離する。この上清を微量遠心分離し、フィルター滅菌し、逆相HPLCクロマトグラフィーによるARPの精製に使用する（例えばC8逆相HPLCクロマトグラフィー）。ペレットは膜連結型のARPの精製に使用できる。

【0087】

膜連結ARPの精製

具体的な実施形態において、本発明の治療又は予防用組成物は、アピコンプレックス門原生動物のタンパク質含有膜調製物を含む（第9節参照）。任意の理論に縛られることなく、ARPは、可溶型と膜連結型の2つの形で存在すると考えられている。具体的な実施形態において、本発明のARPは、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカーを介して細胞膜と連結している（原生動物由来GPI及びその受容体（Toll様受容体2）の説明については、例えばAlmeida et al., J. of Leukocyte Biology, 2001, 70:467-477; Campos et al., the J. of Immunology, 2001, 167:416-423; Ropert et al., Current Opinion in Microbiology, 2000, 3:395-403を参照のこと）。アピコンプレックス門生物がウシのような宿主に感染すると、宿主の血液中に存在する内因性ホスホリパーゼC又はDによる切断が原因で、可溶性ARPもアピコンプレックス門生物の膜から生じうる。非酵素法又は酵素法によってARPを膜から抽出できる。具体的な実施形態において、ARPは、界面活性剤によって膜から抽出される。別の具体的な実施形態において、ARPは、例えば内部若しくは外部ホスホリパーゼ又はプロテアーゼを用いた酵素法によって膜から放出される。インキュベーション緩衝液に二価陽イオンが存在しないならば、共沈する大きなARPの凝集体は（たとえあったとしても）同時に溶解する。

10

20

【0088】

ある実施形態において、膜結合ARPは、（1）精製されたアピコンプレックス門生物の、アピコンプレックス門生物に感染している細胞の、又は組換えARPを発現している細胞のホモジネートを作製する段階、（2）ペレットを得るためにそのホモジネートを遠心分離する段階、（3）溶液にそのペレットを懸濁し、且つ（例えばホスホリパーゼを用いた）酵素法によってARPを放出させるためにその溶液を処理する段階、（4）ARPが非常に濃厚である上清を得るためにその溶液を遠心分離する段階、（5）逆相HPLCカラムにその上清を適用する段階、及び（6）その逆相HPLCカラムから結合したタンパク質を溶出させる段階を含む工程によって単離される。具体的な実施形態において、段階（6）で溶出した結合タンパク質を当技術分野で公知の任意の手法によって再生させる。単離工程の間に、第5.6節及び第12節に記載されている1つ又は複数のアッセイによってARPの免疫刺激活性を監視する。具体的な実施形態において、膜結合ARPは、以下の方法によって調製される。

30

【0089】

簡潔には、非限定的な例としてE. テネラのスポロゾイトから膜の粗調製物を以下のように調製できる。ホモジナイゼーション緩衝液（以後「HB」と呼ぶ）（50 mM トリス（pH 7.4）、1 mM のPMSF、50 μ l/ml プロテアーゼ阻害剤カクテル）中のオーシストの懸濁液を氷冷しながら超音波処理した後、凍結融解サイクル（液体窒素／室温）を行う。この方法の結果、オーシスト、スポロシスト及びスポロゾイトがほとんど完全に破壊される。内部ホスホリパーゼによる膜からのARPの放出を阻害し、且つ／又はARPの凝集を促進して収量を増やすために10 mM のZnCl₂を添加できる。

40

【0090】

次に膜をペレットにするために細胞ホモジネートを遠心分離する。この遠心分離方式は、核、他のオルガネラ、ペレット可能なARP凝集体、及び存在するなら貯蔵顆粒もペレットにする。ZnCl₂を有さないHBに入れるさらなる精製サイクルでオルガネラを破壊できる。

【0091】

HB 1 ml にペレットを懸濁し、再度遠心分離する。遠心分離／再懸濁を、懸濁緩衝液中でZnCl₂存在下でもう1度、非存在下でさらに2～3回繰り返す。ZnCl₂非存在下で行った遠心分離サイクルからの上清は、かなりの量のARPを含有する。

50

【0092】

プロテアーゼ阻害剤存在下又は非存在下でHB100 μ lに最終ペレットを懸濁し、追加の量のARPを放出させるために37℃で1～4時間インキュベートする。ホスホリパーゼCは16 U/mlでARPの放出を促進する。溶液中に放出されたARPを、遠心分離後に2回の洗浄サイクルを行うことによって不溶性物質と分離できる。3つの上清全てを合わせる。それらの上清は少量の混入物を有するARPを含み、逆相クロマトグラフィー（例えばC8逆相クロマトグラフィー）による1回分離によってその混入物を除去できる。

【0093】

ARPの抗体－アフィニティ精製

別の実施形態において、ARP又はそのフラグメントを精製するために抗体を使用する。任意のARP調製物、例えばアピコンプレックスに感染している組織抽出物、細胞培養物、又はタンパク質含有膜調製物をARPの抗体アフィニティ精製に使用できる。組換えARP産物又は合成ARPを精製する場合にも抗体を使用できる。抗体はモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であってよく、抗体は、ARP又は（例えば親水性部分を有する）ARPのフラグメントに対して作製されうる。具体的な実施形態において、配列番号26（ウシARPフラグメント5（配列番号7）に融合したウシARPフラグメント4（配列番号6）に融合したウシARPフラグメント3（配列番号5）に融合したウシARPフラグメント2（配列番号4）に融合したウシARPフラグメント1（配列番号3））に結合する抗体を、ARP又はそのフラグメントを精製するために使用する。ARPが融合タンパク質として発現するように操作された場合は、ARPを精製するために、ARPではない融合タンパク質の部分に対して作製された抗体を使用できる。当技術分野で公知であるか、又は下記の第5.4節に記載されたような任意の方法によって抗体を作製できる。

【0094】

タンパク質を精製するために抗体を使用する方法は、標準的であり、当技術分野で周知であり、本明細書では詳細には記載されない。例えばScopes, PROTEIN PURIFICATION, PRINCIPLES AND PRACTICE, 3rd ed., Springer (1994), at pp 187-236を参照のこと。その本文全体は参照により本明細書に組み込まれている。

【0095】

ARPの組換え発現

ARPを組換えにより製造するために当技術分野で公知の方法を利用できる。宿主細胞において繁殖及び発現させるためにARPをコードする核酸配列を発現ベクターに挿入できる。

【0096】

本明細書に使用する発現コンストラクトは、適当な宿主細胞におけるARPの発現を可能にする1つ又は複数の調節領域に作動可能に関連している、ARP又はそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を指す。「作動可能に関連している」は、調節領域及び発現されるARP配列が繋がれ、転写及び最終的に翻訳が可能になるように配置されている関連を指す。

【0097】

ARPの転写に必要な調節領域は、発現ベクターによって提供されうる。コグネート開始コドンなくARP遺伝子配列を発現させるのならば、翻訳開始コドン（ATG）も提供されうる。適合性の宿主－コンストラクト系において、RNAポリメラーゼのような細胞転写因子は、発現コンストラクトの調節領域に結合し、宿主生物における修飾ARP配列の転写に影響するであろう。遺伝子発現に必要な調節領域の厳密な性質は、宿主細胞によって多様でありうる。一般に、RNAポリメラーゼと結合でき、作動可能に関連している核酸配列の転写を助長できるプロモーターが必要とされる。そのような調節領域には、TATAボックス、キャップ形成配列、CAAT配列などのような転写及び翻訳の開始に関与している5'非コード配列がありうる。コード配列の3'に位置する非コード領域は

10

20

30

40

50

、ターミネーター及びポリアデニル化部位のような転写終止調節配列を含みうる。

【0098】

プロモーターのような調節機能を有するDNA配列をARP遺伝子配列に結合させるために、又はベクターのクローニング部位にARP遺伝子配列を挿入するために、当技術分野で周知の手法によってcDNAの末端に適当な適合性の制限部位を提供するリンカー又はアダプターをライゲートできる (Wu et al., 1987, Methods in Enzymol, 152:343-349)。制限酵素を用いた切断の後に、一本鎖DNA末端を消化して短くするか、補足することによって平滑末端を作成する修飾を行ってからライゲーションを行うことができる。あるいは、PCRを使用することによって所望の制限酵素部位を含むDNAの増幅によってDNAのフラグメントにその所望の制限酵素部位を導入できる。

10

【0099】

さらなるクローニングを行わずに、ARPを発現及び産生させるための適当な宿主細胞に、調節領域に作動可能に関連しているARP配列を有する発現コンストラクトを直接導入できる。例えば米国特許第5, 580, 859号を参照のこと。発現コンストラクトは、例えば相同組換えを介して宿主細胞のゲノムにARP配列の組み込みを促進するDNA配列も含みうる。この場合、宿主細胞で繁殖させARPを発現させるためにその適当な宿主細胞に適した複製起点を有する発現ベクターを採用する必要はない。

【0100】

プラスミド、コスミド、ファージ、ファージミド又は修飾されたウイルスを含むがそれに限定されない多様な発現ベクターを使用できる。そのような宿主発現系は、目的コード配列を産生できその後精製できる媒介体を表すが、適当なヌクレオチドコード配列で形質転換されるか、又はそれをトランスフェクトされた場合に*in situ*でARPを発現しうる細胞も表す。これらには、ARPコード配列を含む組換えバクテリオファージDNA発現ベクター、プラスミドDNA発現ベクター又はコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌 (例えば大腸菌及び枯草菌) のような微生物; ARPコード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母 (例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*))、ピチア (*Pichia*)) ; ARPコード配列を含む組換えウイルス発現ベクター (例えばバキュロウイルス) に感染している昆虫細胞系; 組換えウイルス発現ベクター (例えばカリフラワーモザイクウイルス (CaMV)、タバコモザイクウイルス (TMV)) に感染しているか、若しくはARPコード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター (例えばTiプラスミド) で形質転換された植物細胞系; 又は哺乳動物細胞のゲノムから得られるプロモーター (例えばメタロチオネインプロモーター) 若しくは哺乳動物ウイルスから得られるプロモーター (例えばアデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター) を含む組換え発現コンストラクトを有する哺乳動物細胞系 (例えばCOS、CHO、BHK、293、NS0、3T3細胞) があるが、それらに限定されない。好ましくは、特に組換えARP分子全体の発現のために大腸菌のような細菌細胞及び真核細胞が、組換えARP分子の発現のために使用される。例えば、ARPの効果的な発現のためにサイトメガロウイルスの主要中間初期遺伝子 (major intermediate early gene) からのプロモーターエレメントを有するベクターと共にチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) のような哺乳動物細胞を使用できる (Foecking et al., 1986, Gene 45: 101及びCockett et al., 1990, Bio/Technology 8: 2)。

20

30

40

【0101】

細菌系において、発現させるARP分子のために意図される使用に応じて多数の発現ベクターを好都合に選択できる。例えば、ARP分子の医薬組成物を発現させるためにそのようなARPを大量に製造しようとする場合、容易に精製される高レベルの融合タンパク質産物の発現を指示するベクターが理想的でありうる。そのようなベクターには、ARPコード配列がPCR反応から直接ライゲートされうるものであり、融合タンパク質が産生されるようにlacZコード領域のフレーム内に配置されうる大腸菌発現ベクターpCR2.1 TOP0 (Invitrogen社製); pINベクター (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13: 3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24: 5503-5509) などがあ

50

るが、それに限定されない。F L A G ペプチド、m a l E タンパク質、又はC B D タンパク質との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させるために、pFLAG (Sigma社製)、pMAL (NEB社製) 及びpET (Novagen社製) のような一連のベクターも使用できる。正しくフォールディング且つ成熟させるために、これらの組換えタンパク質をペリプラスム間隙に方向付けることもできる。発現されたタンパク質のアフィニティ精製のために、融合された部分を使用できる。エンテロキナーゼのような特異的プロテアーゼに対する切断部位が存在することによってA P R を切断することが可能になる。グルタチオンS-トランスフェラーゼ (G S T) を有する融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させるためにpGEXベクターも使用できる。一般にそのような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオンアガロースビーズマトリックスへの吸着及び結合後に遊離グルタチオンの存在下で溶出させることによって、溶解した細胞からその融合タンパク質を容易に精製できる。pGEXベクターは、トロンビン又は第X a 因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計されていることから、クローニングされた標的遺伝子産物をG S T 部分から放出できる。 10

【0102】

昆虫系において、外来遺伝子を発現させるために多数のベクターを使用でき、例えば外来遺伝子を発現させるベクターとしてオートグラフィ核多角体ウイルス (A c N P V) を使用できる。スポドプテラフルギペルダ (Spodoptera frugiperda) の細胞のような細胞でウイルスは増殖する。ウイルスの可欠領域 (例えばポリヘドリン遺伝子) にA R P のコード配列を個別にクローニングし、A c N P V のプロモーター (例えばポリヘドリンプロモーター) の制御下に置くことができる。 20

【0103】

哺乳動物宿主細胞において、多数のウイルス系発現系を利用できる。発現ベクターとしてアデノウイルスを使用する場合、アデノウイルス転写／翻訳制御複合体、例えば後期プロモーター及び三連のリーダー配列に、目的のA R P のコード配列をライゲートできる。次に、このキメラ遺伝子を *in vitro* 又は *in vivo* 組換えによってアデノウイルスゲノムに挿入できる。ウイルスゲノムの可欠領域 (領域E 1 又はE 3) への挿入の結果として、生存可能であり、感染した宿主中にA R P を発現できる組換えウイルスがもたらされるであろう (例えばLogan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 355-359を参照のこと)。挿入されたA R P コード配列が効率的に翻訳されるには特異的開始シグナルも必要でありうる。これらのシグナルにはA T P 開始コドン及び隣接配列がある。さらに、開始コドンは挿入部全体の翻訳を確実にするために所望のコード配列のリーディングフレームと同調しなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナル及び開始コドンは、天然及び合成の両方の多様な起源でありうる。発現の効率は、適当な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどの包含によって増大しうる (例えばBittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153: 51-544を参照のこと)。 30

【0104】

さらに、所望の特異的な方式で挿入された配列の発現を変調するか、又は遺伝子産物を修飾及びプロセッシングする宿主細胞株を選択できる。そのようなタンパク質産物の修飾 (例えばグリコシル化) 及びプロセッシング (例えば切断) は、タンパク質の機能に重要でありうる。種々の宿主細胞が、タンパク質及び遺伝子産物の翻訳後プロセッシング及び修飾に特徴的且つ特異的なメカニズムを有する。発現される外来タンパク質の正しい修飾及びプロセッシングを確実にするために適当な細胞系又は宿主系を選択できる。この目的のために、一次転写体の適切なプロセッシングのための、及び遺伝子産物の翻訳後修飾、例えば遺伝子産物のリン酸化及びホスホリル化のための細胞機械を有する真核生物宿主細胞を使用できる。そのような哺乳動物宿主細胞には、P C 1 2、C H O、V E R Y、B H K、H e l a、C O S、M D C K、2 9 3、3 T 3、W 1 3 8、B T 4 8 3、H s 5 7 8 T、H T B 2、B T 2 O 及びT 4 7 D、N S 0 (免疫グロブリン鎖を全く内因性産生しないマウス骨髄腫細胞系)、C R L 7 O 3 O 及びH s S 7 8 B s t 細胞があるが、それに限定されない。細菌又は酵母系における発現は、翻訳後修飾がA R P 活性に必須でないことが判明すれば使用できる。 40

【0105】

適切にプロセッシングされたARPを長期間高収量で製造するために、細胞での安定発現が望ましい。選択マーカを含むベクターを使用することによってARPを安定発現する細胞系を操作できる。非限定的な例として、発現コンストラクトを導入した後に操作された細胞を強化培地中で1～2日間増殖させてから選択培地に切り換えてもよい。発現コンストラクト中の選択マーカは、選択に対する耐性を付与し、細胞がその染色体に発現コンストラクトを安定組み込みすること、及び培養で増殖すること、及び細胞系に拡大することを最適に可能にする。ARPが連続的に発現する長い期間、そのような細胞を培養できる。

【0106】

使用されうる多数の選択系には、抗生物質耐性（ゲネチシン又はG-418に対する耐性を付与するNeo（Wu and Wu, 1991, *Biotherapy* 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260: 926-932; 及びMorgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217; May, 1993, *TIB TECH* 11(5): 155-215); ゼオシン耐性のためのZeo; ブラスチジシン耐性のためのBsdなどのようなマーカ）、抗代謝耐性（メトトレキサート耐性を付与するDhfr（Wigler et al., 1980, *Natl. Acad. Sci. USA* 77: 357; O'Hare et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1527)）、ミコフェノール酸耐性を付与するgpt（Mulligan & Berg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2072); 及びヒグロマイシン耐性を付与するhygro（Santerre et al., 1984, *Gene* 30: 147)があるが、それに限定されない。さらに、tk-、hgp^rt-、又はap^rt-細胞を含めるがそれに限定されない突然変異細胞系を、チミジンキナーゼ、ヒポキサンチン、グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ又はアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼの対応する遺伝子を有するベクターと組み合わせて使用できる。組換えDNA法の分野で一般に公知である方法を所望の組換えクローンを選択するために日常的に適用でき、そのような方法は、例えばAusubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); 及びDracopoli et al. (eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994)の第12及び13章; Colberre-Garapin et al., 1981, *J. Mol. Biol.* 150: 1に記載されている。

【0107】

標準条件の温度、インキュベーション時間、吸光度及び培地組成で組換え細胞を培養できる。しかし、組換え細胞の増殖のための条件は、ARPの発現のための条件と異なりうる。ARPの産生を増大させるために修正された培養条件及び培地も使用できる。ARPを産生させるための最適な条件を確立するために、当技術分野で公知の任意の手法を適用できる。

【0108】

ARP遺伝子の単離

当技術分野で公知の任意の手法によってARPをコードする遺伝子を単離できる。ARP遺伝子の単離のための具体的な実施形態を以下に述べる。例えば、アピコンプレックス属の原生動物を使用してその総RNAを単離できる。アピコンプレックス門原生動物の総RNAを一旦入手できたならば、cDNAライブラリーのスクリーニング、ARPのmRNAのアフィニティ精製、及びポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を含むがそれに限定されない当技術分野で公知の方法によってARP遺伝子を単離できる。

【0109】

具体的な実施形態において、単離されたARP遺伝子は、配列番号1（E. テネラのARP）、配列番号2（E. アセルブリナのARP）又は配列番号3～7（ウシアイメリア種ARPの部分配列。配列番号3～7は、必ずしも隣接せず、各フラグメントに介入配列又は隣接配列が存在しうる。好ましくはその核酸分子は、配列番号3から配列番号7の順にN末端からC末端への配列番号3、4、5、6及び7を含むタンパク質をコードする）をコードする核酸分子を含む。具体的な実施形態において、単離されたARP遺伝子は、

配列番号 1、配列番号 2、又は配列番号 26（配列番号 7 に融合した配列番号 6 に融合した配列番号 5 に融合した配列番号 4 に融合した配列番号 3）をコードする核酸分子からなる。

【0110】

一実施形態において、当技術分野で公知の任意の方法（例えば OrientExpress cDNA Library Construction System（Novagen 社製））を使用することによって cDNA ライブラリーを発生させる。第 1 鎖、第 2 鎖を合成するために総 mRNA を使用し、ラムダ（ λ ）バクテリオファージのアームにライゲートする。例えば PhageMaker Kit（Novagen 社製）によって、構築したファージ DNA をバクテリオファージにパッケージできる。細菌宿主に感染させてラムダバクテリオファージ cDNA ライブラリーを発生させるために種々の DNA 挿入部を含むバクテリオファージを使用する。通常はそのライブラリーは $10^5 \sim 10^6$ 個の一次クローンを含む。このファージライブラリーを増幅させて、例えば平板 1 枚当たり約 10^4 個のクローンとなるように平板に蒔く。次に、ARP 遺伝子プロンプ（例えば E. テネラの ARP）を用いた膜リフティング法によって、ライブラリーをスクリーニングできる。あるいは、イソプロピル-1-チオ- β -D-ガラクトシド（IPTG）によってタンパク質の発現を誘導することによって cDNA ライブラリーをスクリーニングできる。発現したタンパク質を含む、平板から持ち上げられた膜を、ARP（例えば配列番号 1 又は 2）に対して発生させた抗体を使用することによってスクリーニングする。DNA 配列決定により、確認されたクローンを分析する。正しい DNA 挿入部をタンパク質発現用のタンパク質発現ベクターにサブクローニングする。DC 活性化性について組換えタンパク質を試験できる。

【0111】

別の実施形態において、ARP 遺伝子（例えば配列番号 15、16、17、18、19、20 又は 27）をベクター（例えば pET-Blue2 ベクター（Novagen 社製））に逆方向にクローニングする。このプラスミドを形質転換により細菌宿主に導入する。pET-Blue2 プラスミドを有する細菌株は、ヘルパーファージ R408 の感染後に一本鎖（ss）ファージ DNA を発生させる能力を有する。挿入体の正の鎖はファージが形成する間に作られる。逆方向を有する正の鎖は、ベクターにクローニングされた本来の ARP 遺伝子の負の鎖に対応する。この ss DNA は、ARP の標的 mRNA に相補的である。この ss DNA をビオチン化してアピコンプレックス門原生動物の総 mRNA 調製物に加えて 2 本の相補鎖をハイブリダイズさせることができる。ストレプトアビジン磁気ビーズに結合させることによって複合体を単離できる。未結合の mRNA を洗浄後に、結合したアピコンプレックス ARP の標的 mRNA は低塩条件下で溶出するが、ビオチン化 ss DNA は強力なビオチン-ストレプトアビジンの結合によって磁気ビーズに結合したままである。結果としてもたらされた mRNA は、標的アピコンプレックス ARP 遺伝子に特異的であり、第 1 鎖 DNA、第 2 鎖 DNA を合成するために使用され、DNA 配列決定及びタンパク質発現のためにタンパク質発現ベクターにクローニングされる。DNA 配列は、ARP 遺伝子との相同性によって確認される。DC 活性化機能を試験するために組換えタンパク質を発現させる。具体的な実施形態において、抗腫瘍活性はマウス試験によって確認される。

【0112】

別の実施形態において、アピコンプレックス原生動物から単離された総 mRNA を用いて、プライマーとしてオリゴ dT を使用した MMLV 逆転写酵素によって第 1 鎖を合成できる。Taq ポリメラーゼと、ARP 遺伝子配列（例えば配列番号 15、16、17、18、19、20 又は 27）又は GenBank からの EST のコンセンサスによって決定される特異的プライマーとを使用することによるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を実施するために、結果としてもたらされた試料を使用する。分子量標準及び ARP 遺伝子からの予想される値と比較して分子量を決定するために DNA アガロースゲルによって PCR 産物を分析できる。クローニングベクター（例えば Invitrogen 社製 PCR2.1 TOP0）に PCR 産物を導入でき、それらのサイズの分析及び ARP 遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR 増幅パターンに基づき正しい挿入部を有するプラスミドを選択できる。最後にその遺伝子

を発現ベクターに再クローニングできる。A R P 配列を最終確認し、A R P 遺伝子を厳密に決定するために、クローニングされた遺伝子を D N A 配列分析に供することができる。

【0113】

別の実施形態において、選択前にゲノムライブラリー又は c D N A ライブラリー中の所望の配列を増幅させるためにポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を使用する。A R P の配列に相当するオリゴヌクレオチドプライマーを、P C R におけるプライマーとして使用できる。好ましい態様において、オリゴヌクレオチドプライマーは、異なる種の A R P 遺伝子間で相溶性の高い保存されたセグメントの少なくとも一部に相当する。潜在的に関心もたれる供給源 (R N A 又は D N A)、好ましくは c D N A ライブラリーからの配列を増幅するためのプライマーとして合成オリゴヌクレオチドを利用できる。例えば Perkin-Elmer 社製 Cetus サーマルサイクラー及び Taq ポリメラーゼ (例えば Gene Amp (商標)) の使用によって P C R を実施できる。増幅される核酸には、任意の種からの m R N A 又は c D N A 又はゲノム D N A がありうる。P C R 反応において他の種からのホモログを増幅させるための縮重プライマーを合成できる。

【0114】

P C R 反応のプライミングに使用するハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーを変更し、A R P ヌクレオチド配列と単離される核酸ホモログとの間のヌクレオチド配列の類似性の度合を高めたり、又は低くできるようにすることも可能である。種相互ハイブリダイゼーションには低ストリンジェンシー条件が好ましい。同種ハイブリダイゼーションには、中度にストリンジェントな条件が好ましい。A R P ホモログのセグメントをうまく増幅させた後で、そのセグメントをクローニングして標準法によって配列決定し、完全 c D N A 又はゲノムクローンを単離するためのプローブとして利用できる。これは逆に、以下に記載するように遺伝子の完全ヌクレオチド配列の決定、その発現の分析、及び機能性分析のためのタンパク質産物の生成を可能にする。このように、A R P 及び A R P 類似体をコードする追加の遺伝子を同定できる。

【0115】

ペプチド合成

組換え法によって A R P 又はそのフラグメントを製造する代替法は、ペプチド合成である。例えば、ペプチド合成装置の使用によって A R P 全体、又は A R P の部分に対応するペプチドを合成できる。通常のペプチド合成又は当技術分野で周知の他の合成プロトコルを使用できる。

【0116】

Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 によって記載された方法と類似の方法を用いた固相ペプチド合成によって、A R P 又はその部分のアミノ酸配列を含むペプチドを合成できる。合成中に、C 末端が連結した延長中のポリペプチド鎖及び不溶性ポリマー支持体、すなわちポリスチレンビーズに保護された側鎖を有する N- α -保護アミノ酸を段階的に付加する。ジシクロヘキシルカルボジイミドのような試薬と反応させることによって活性化した N- α -保護アミノ酸の α -カルボキシル基に N- α -脱保護アミノ酸のアミノ基を連結することによってペプチドを合成する。活性化カルボキシル基への遊離アミノ基の結合は、ペプチド結合の形成を誘導する。最も一般に使用される N- α -保護基には、酸に不安定な B o c 及び塩基に不安定な F m o c がある。適当な化学物質、樹脂、保護基、保護アミノ酸及び試薬の詳細は当技術分野で周知であるため、本明細書において詳細に説明しない (Atherton et al., 1989, Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press 及び Bodanszky, 1993, Peptide Chemistry, A Practical Textbook, 2nd Ed., Springer-Verlag を参照のこと)。

【0117】

ゲル浸透クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー及びイオン交換クロマトグラフィーを用いた分取用 H P L C のような通常の方法を用いて、結果としてもたらされた A R P 又はそのフラグメントの精製を果たす。適当なマトリックス及び緩衝液の選択は、当技術分野で周知であるため、本明細書において詳細に説明しない。

【0118】

精製されたアピコンプレックスのARP

具体的な実施形態において、本発明は、癌及び感染症の治療のための、及び免疫応答を誘発するためのARPを含む精製されたアピコンプレックス門生物を提供する。好ましい実施形態において、精製されたアピコンプレックス門生物は、不活性化されたアピコンプレックス門生物又は目的とされる宿主において疾患を引き起こせないアピコンプレックス門生物でもある。癌の治療又は予防のために、ARPを含む精製又は不活性化されたアピコンプレックス門生物を、対象に直接、好ましくは経口的に投与できる。

【0119】

アイメリア属のようなアピコンプレックスの一部の属は、高度に種特異的である。例えば鳥類種に感染するアイメリアは、通常は非鳥類種には症候性感染を引き起こさない。本発明の一実施形態において、ARPを含むアピコンプレックス門生物を、その生物の自然宿主ではない対象に癌の治療及び予防のために投与する。 10

【0120】

好ましい実施形態において、ARPを含むアイメリアの孢子形成オーシストを、その生物の自然宿主ではない対象に癌の治療及び予防のために投与する。

【0121】

本発明の別の実施形態において、欠損した生活環を有するようにARPを含むアピコンプレックス門生物を操作してその生物が宿主において症候性感染を引き起こせないようにして、癌の治療又は予防のためにその操作されたアピコンプレックス門生物を対象に投与 20
する。アピコンプレックス門生物が欠損した生活環を有するようにできる、当技術分野で公知の任意の手法を使用できる。そのような手法には、遺伝子操作、化学毒素の使用、又は放射線照射があるが、それに限定されない。アピコンプレックス門生物が欠損した生活環を有するかどうかは、動物に感染させた後にその生物が細胞に進入したことを実証するための生検を行うことによって試験できる。適当な待機期間をおくことで、その生物が生活環を完了して便中にオーシストを作成できないかが示されるであろう。

【0122】

アピコンプレックスは、複雑な生活環を有し、種々のアピコンプレックスの群の間で大きな多様性が存在する。無性生殖及び有性生殖が関与するが、一部のアピコンプレックスは1つ又はもう1つの成長期をスキップする。基本生活環は感染期又はスポロゾイトが宿主細胞に進入し、次に繰り返し分裂して多数のメロゾイトを形成するときに開始すると言われている場合もある。一部のメロゾイトは有性生殖細胞又はガモントに変換する。ガモントは対になって繋がり、ガモントシスト (gamontocyst) を形成する。ガモントシスト内ではガモントは分裂して無数のガメートを形成する。次にガメートの対は、融合して融合体を形成し、それは新しいスポロゾイトへの減数分裂によって起こり、生活環が再び開始する。アピコンプレックスは様々な方法で新しい宿主に伝播し、マラリア原虫のように感染している蚊によって伝播するものもあれば、感染した宿主の便に入るか又は捕食者が感染している獲物を食べたときに伝播しうる。 30

【0123】

コクシジウム綱は、腸管のような粘膜表面を介して脊椎動物に感染する傾向がある。コクシジウム綱アイメリア目アイメリア科は、1つの宿主のみを必要とする生活環及びオーシスト期での環境中の迅速な通過を特徴とする。アイメリア属は、各アイメリア種に特異的な腸の領域に限定しているスポロゾイトの侵入、メロゾイト形成、ガメトサイト形成、及びオーシストの形成が特徴的である。オーシストは環境中で孢子形成して摂取され、オーシストの壁は十二指腸内で胆汁酸塩及びトリプシンによって壊れる。スポロゾイトは上皮細胞壁を透過し、そこでスポロゾイトは専用の膜で自分を防御する。この安全な楽園の中でスポロゾイトはシズントとして120000個のメロゾイトを生成する。成熟した場合、これらは破裂し他の細胞に侵入する。この過程が2、3回繰り返され、その後有性生殖が起こりオーシストが形成されるガモント期が続く。これらは便と共に排泄され、生活環を完了する。 40

【0124】

本発明によると任意の発達期、例えばメロゾイト、ガモント、ガモントシスト、ガメート、スポロゾイト、又はオーシストのアピコンプレックス門生物を、癌若しくは感染症の治療若しくは予防に、又は免疫応答を誘発させるために使用できる。好ましい実施形態において、アピコンプレックス生物のスポロゾイト、メロゾイト又はオーシストは、癌若しくは感染症の治療若しくは予防に、又は免疫応答を誘発させるために使用される。さらに好ましくは、アイメリア種のスポロゾイト、メロゾイト又はオーシストは、癌若しくは感染症の治療若しくは予防に、又は免疫応答を誘発させるために使用される。

【0125】

本発明の別の実施形態において、癌を治療又は予防するために、A R Pを含む死滅したアピコンプレックス門生物を対象に投与する。化学毒素及び放射線照射を含むがそれ限定されない当技術分野で公知の任意の方法によってアピコンプレックス門生物を殺滅できる。 10

【0126】

なお別の実施形態において、癌を治療又は予防するために、A R Pを含むアピコンプレックス門生物のタンパク質画分、好ましくは膜調製物又は貯蔵顆粒調製物を対象に投与する。

【0127】

A R Pの誘導体及び類似体

本発明は、さらにA R Pの誘導体（限定するものではないが、断片が挙げられる）、及び類似体を提供するものである。A R Pに関連する誘導体及び類似体の製造及び使用は、本発明の範囲内である。 20

【0128】

具体的な実施形態では、誘導体又は類似体は機能的に活性、すなわち、完全長の野生型A R Pに関連する1以上の機能活性を示すことができる。好ましくは、誘導体又は類似体は、D Cアッセイにより分析されるように樹状細胞の活性化因子である（5．6節及び12．3節参照）。A R Pの誘導体又は類似体は、当業界に既知の手順により所望の活性を試験することができ、限定するものではないが下記5．5節及び12節に記載のアッセイが挙げられる。

【0129】

特に、A R P誘導体は、機能的に等価な分子を与える置換、挿入又は欠失によってA R P配列を変更することにより作成し得る。好ましくは、A R P配列のこのような変更は、可変部でなされ（すなわち、異なるA R P分子間で高度に保存されていない領域、例えば、図19参照）、例えば、変更はA R Pの最初の15個のアミノ酸でなされる。本発明の実施に際して、ヌクレオチドコード配列の縮退のため、A R P遺伝子と同じアミノ酸配列を実質的にコードする他のD N A配列を用いてもよい。これらとしては、限定するものではないが、機能的に等価なアミノ酸残基をコードする様々なコドンの配列内での置換によって変更され、それによりサイレント変化を生じるA R P遺伝子の全部又は一部を含むヌクレオチド配列が挙げられる。同様に、本発明のA R P誘導体は、限定するものではないが、配列内の残基と機能的に等価なアミノ酸残基が置換されて、サイレント変化（すなわち、保存型置換）を生じる変更配列を含むA R Pのアミノ酸配列の全部又は一部を、アミノ酸一次配列として含むものが挙げられる。例えば、配列内の1個以上のアミノ酸残基を、機能的等価物として作用する同じ極性の別のアミノ酸により置換して、サイレント変化をもたらすことができる。配列内のアミノ酸の代替物は、そのアミノ酸が属する分類のその他のメンバーから選択されてもよい。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン及びメチオニンが挙げられる。極性中性アミノ酸としては、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、及びグルタミンが挙げられる。正に帯電した（塩基性）アミノ酸としては、アルギニン、リジン及びヒスチジンが挙げられる。負に帯電した（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸及びグルタミン酸が挙げられる。本 40 50

発明のARP誘導体は、限定するものではないが、アミノ酸一次配列として、アミノ酸残基が同じ化学特性(すなわち、保存型置換)を有する残基で置換されている変更配列を含むARPのアミノ酸配列の全部又は一部を含むものも挙げられる。具体的な実施形態では、1、2、3、4、又は5個のアミノ酸が置換される。具体的な実施形態では、配列番号：1のアミノ酸残基181のHisをTyrに変えることができ、新たなタンパク質は、やはり配列番号：1と同じ活性を有する。具体的な実施形態では、配列番号：1のアミノ酸残基183のSerをAlaに変えることができ、新たなタンパク質は、やはり配列番号：1と同じ活性を有する。他の具体的な実施形態では、配列番号：1のアミノ酸残基181のHisをTyrに変えることができ、アミノ酸残基183のSerをAlaに変えることができ、新しいタンパク質は、やはり配列番号：1と同じ活性を有する。

10

【0130】

ARPの誘導体又は類似体は、限定するものではないが、ARP若しくはそれらの断片と実質的に相同であるか、又はそれらをコードする核酸がARP核酸配列とハイブリッド形成し得るこれらのペプチドが挙げられる。

【0131】

本発明のARP誘導体及び類似体は、当業界で知られた様々な方法で製造し得る。製造をもたらす操作は、遺伝子又はタンパク質レベルで行うことができる。例えば、クローニングARP遺伝子配列は、当業者に知られた任意の多くの方法により修飾し得る(Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.)。配列は、制限酵素で適当な部位を切断し、次いで、さらに酵素修飾し、所望により単離及び*in vitro*で結合させることができる。ARPの誘導体又は類似体をコードする遺伝子の製造において、修飾された遺伝子が確実に所望のARP活性をコードする遺伝子領域で翻訳停止信号により中断されないでARPと同じ翻訳の読み枠内に残るようにすることに注意すべきである。

20

【0132】

さらに、ARPをコードする核酸配列は、*in vitro*又は*in vivo*で突然変異させて、翻訳、開始、及び／又は終止配列を形成し且つ／又は破壊するか、或いは、コード領域で変異体を形成し且つ／又は新しい制限酵素部位を形成し若しくは既存の制限酵素部位を破壊し、更なる*in vitro*修飾を容易とすることが可能である。当該技術分野で知られた任意の突然変異技術を用いることが可能であり、限定するものではないが、*in vitro*部位特異的突然変異誘発(Hutchinson, C. et al., 1978, J. Biol. Chem 253:6551)、TAB. RTM. リンカー(Pharmacia社製)などが挙げられる。

30

【0133】

ARP配列の操作は、タンパク質レベルでされてもよい。例えば、グリコシル化、アセチル化、ホスホリル化、アミド化、既知の保護／封鎖基による誘導体化、タンパク質分解的切断、抗体分子若しくは他の細胞性リガンドへの結合などにより、翻訳の間又は後に様々な修飾されるARP断片又は他の誘導体若しくは類似体は、本発明の範囲内に含まれる。任意の多くの化学修飾が、既知の技術により行われてもよく、限定するものではないが、遊離NH₂-基、遊離COOH-基、OH-基、Trp-、Tyr-、Phe-、His-、Arg-、又はLys-などの側鎖の保護又は修飾に有用な試薬；臭化シアン、水酸化アミン、BNPS-スカトール、酸又はアルカリ加水分解による特異的化学切断；トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8プロテアーゼ、NaBH₄による酵素的切断；アセチル化、ホルミル化、酸化、還元；ツニカマイシンの存在下での代謝合成；などが挙げられる。

40

【0134】

さらに、ARP類似体及び誘導体を化学合成することが可能である。例えば、所望の領域を含み、*in vitro*での所望の凝集活性を媒介し、受容体に結合するARP部分に相当するペプチドを、ペプチド合成機の使用により合成することができる。さらに、所望により、非古典的アミノ酸又は化学的アミノ酸類似体を、ARP配列への置換又は付加として導入することができる。非古典的アミノ酸としては、限定するものではないが、共

50

通のアミノ酸のD異性体、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、システイン酸、 ϵ -ブチルグリシン、 ϵ -ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β -アラニン、 β -メチルアミノ酸、 Ca -メチルアミノ酸、及び $\text{N}\alpha$ -メチルアミノ酸などのデザイナーアミノ酸が挙げられる。

【0135】

具体的な実施形態では、ARP誘導体は、そのアミノ末端及び／又はカルボキシ末端で非ARPアミノ酸配列とペプチド結合を介して融合したARP又はそれらの断片を含む、キメラタンパク質又は融合タンパク質である。好ましい実施形態では、非ARPアミノ酸配列をARP又はそれらの断片のアミノ末端で融合させる。他の好ましい実施形態では、非ARPアミノ酸配列を、ARP又はそれらの断片の可変部、例えばARP遺伝子の最初の15個のアミノ酸で融合させる。一実施形態では、このようなキメラタンパク質を、タンパク質をコードする核酸の組換え発現により製造する（インフレームを非ARPコード配列に結合させたARPコード配列を含む）。このようなキメラ生成物は、様々な会社（例、Retrogen社、Operon社など）にオーダーメイドするか、又は適当なコードフレームで所望のアミノ酸配列をコードする適当な核酸配列と当該技術分野で知られた方法で互いにライゲートさせ、当該技術分野で共通に知られた方法によりキメラ生成物を発現させることにより製造することができる。或いは、このようなキメラ生成物をタンパク質合成技術、例えば、ペプチド合成機により製造することができる。具体的な実施形態では、異種信号配列により成熟ARPをコードするキメラ核酸を発現させて、キメラタンパク質を発現し、細胞でプロセッシングして成熟ARPタンパク質にする。コンピュータシミュレーションを利用して、APR及び非APR遺伝子の一次配列を三次元構造を予想するのに用いてもよいであろう（Hopp and Woods, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78:3824-3828）。キメラ組換え遺伝子は、三次構造及び生物学的機能の間の相関関係の点に照らして設計されるであろう。同様に、異種（非ARP）タンパク質をコードする配列と融合したARP分子の重要な部分を含むキメラ遺伝子を作成してもよい。具体的な実施形態では、このようなキメラ構造体を用いて、限定するものではないが、ARPの安定性、溶解性、又はプロテアーゼ耐性などといった、APRの所望の特性を高めるのに用いることができる。他の実施形態では、キメラ構造体をARPを特異的部位に向かわせるのに用いることができ、例えば、癌の特異型に対する抗体と融合したARPを含むキメラ構造体は、ARPを癌部位に送達することを可能にする。更なる実施形態では、His標識、FLAG標識、緑色蛍光タンパク質（GFP）、 β -ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク質（MalE）、セルロース結合タンパク質（CenA）又はマンノースタンパク質などのキメラ構造体を、本発明のARPを同定又は精製するために用いることができる。

【0136】

他の具体的な実施形態では、ARP誘導体は、アピコンプレクサの他の種のARPと相同な領域を含む1つの種のアピコンプレクサのARP断片である。本明細書で用いられるように、当該領域に含まれる数と同数のアミノ酸を有する第2のタンパク質中の任意の配列と比較した場合に、この領域のアミノ酸配列が、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも45%、少なくとも55%、少なくとも65%、少なくとも75%の同一性であるか、又は保存型変化を伴う場合には、最初のタンパク質の領域は、第2のタンパク質と「相同である」とみなせる。

【0137】

具体的な実施形態では、本発明は、ARP誘導体及び類似体、特にARP断片及びARPの1つ以上の領域を含むこのような断片の誘導体を提供するものである。

【0138】

具体的な実施形態では、アイメリア属以外の種、好ましくはアピコンプレクサ門の他の種のARPに関連する際には、ARPの特異的部位を含む断片は、アイメリアのARPの特異的部位とほぼ相同なそれぞれのARP内の部位を含むものである。

【0139】

ARP、誘導体及び類似体に対する抗体

様々な実施形態では、A R P又はA R Pの領域に特異的なモノクローナル又はポリクローナル抗体は、免疫測定法においてA R Pの量を測定するのに用いることができるか、又はA R Pの免疫親和的精製に用いることができる。Hopp&Woodsの親水性分析（Hopp & Woods, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78 :3824-3828 (1981)参照）を、タンパク質の親水性領域を同定し、且つ、A R Pの潜在型エピトープを同定するのに用いることができる。具体的な実施形態では、配列番号：26（断片2（配列番号：4）と融合し、断片3（配列番号：5）と融合し、断片4（配列番号：6）と融合し、また断片5（配列番号：7）と融合したウシのA R P断片1（配列番号：3））に結合する抗体が、A R Pの量を測定する免疫測定法又はA R Pの免疫親和的精製法に用いられる。

【0140】

A R Pに免疫特異的に結合する抗体又はそれらの抗原断片は、抗体の合成に関する技術分野、特に、化学合成で知られた任意の方法によるか、又は、好ましくは組換え発現技術により製造することができる。

【0141】

A R P又はそれらの抗原断片に免疫特異的なポリクローナル抗体は、当該分野で広く知られた様々な手順により製造することができる。例えば、A R Pは、限定するものではないが、ウサギ、マウス、及びラットなどの様々な宿主動物に投与することができ、A R Pに特異的なポリクローナル抗体を含む血清の産生を誘導する。宿主の種によっては、様々なアジュバントを用いて免疫応答を増大させてもよく、限定するものではないが、フロイント（完全及び不完全）、水酸化アルミニウムなどの無機化合物のゲル、リゾレシチンなどの界面活性物質、プルロニックポリオール（pluronic polyol）、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、スカシガイヘモシアニン、ジニトロフェノール、及びBCG（カルメットゲラン桿菌）及びコリネバクテリウムパルバムなどの潜在的に有用なヒトアジュバントが挙げられる。このようなアジュバントは、当業界に周知であってもよい。

【0142】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換え、及びファージディスプレイ技術、又はそれらの組合せの使用を含む、当該分野で知られた広く様々な技術を用いて調製することができる。例えば、モノクローナル抗体としては、当該分野で知られ、また、例えば、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981)に示されたものが挙げられる。本明細書に用いられる用語「モノクローナル抗体」は、限定するものではないが、ハイブリドーマ技術を介して産生される抗体である。用語「モノクローナル抗体」とは、任意の真核生物の、原核生物の、又はファージのクローンを含む、単一クローンから派生する抗体をいい、それが産生される方法ではない。

【0143】

ハイブリドーマ技術を用いて特異的抗体を産生し、スクリーニングする方法は、日常的（routine）であり、当該分野で広く知られている。簡潔には、非マウス抗体を用いてマウスを免疫化し、免疫応答が検出される時点、例えばその抗原に特異的な抗体がマウス血清に検出される時点で、マウスの脾臓を回収し、碑細胞を単離する。次いで、碑細胞を周知技術により、任意の最適なミエローマ細胞、例えば、A T C Cから入手可能なS P 2 O細胞系由来の細胞と融合させる。ハイブリドーマを選定し、限界希釈法によりクローン化する。次いで、ハイブリドーマクローンを、本発明のポリペプチドを結合させることが可能な抗体を分泌する細胞で、当業界に既知の方法で評価する。一般的に、高レベルの抗体を含む腹水は、陽性ハイブリドーマクローンを有するマウスを免疫化することにより生じさせることができる。

【0144】

本発明は、本発明の抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養する工程であって、好ましくは、ハイブリドーマが、非マウス抗原で免疫化したマウスから単離した碑細胞をミエローマ細胞と融合させることにより生じさせ、次いで、抗原に結合可能な抗体を分泌する

10

20

30

40

50

ハイブリドーマクローンを得るために、融合から得られるハイブリドーマをスクリーニングする工程を含む方法により産生される、抗体並びにモノクローナル抗体を生成する方法を提供するものである。

【0145】

特異的に特定のエピトープを認識する抗体断片は、当業者に知られた任意の技術により作成してもよい。例えば、本発明の F a b 及び F (a b ') 2 断片は、パパイン (F a b 断片を作製するため) 又はペプシン (F (a b ') 2 断片を作製するため) などの酵素を用いて、免疫グロブリン分子をタンパク質分解的に切断することによって作成してもよい。F (a b ') 2 断片は可変部、軽鎖定常部及び重鎖の C H 1 領域を含む。さらに、本発明の抗体は、当業界に知られた様々なファージディスプレイ方法を用いて作成することも 10

【0146】

ファージディスプレイ方法では、機能的抗体領域が、それらをコードするポリヌクレオチド配列を担持するファージ粒子の表面に提示される。特に、V_H 及び V_L 領域をコードする DNA 配列は、動物の c DNA ライブラリー (例えば、罹患組織のヒト又はマウス c DNA ライブラリー) から増幅される。V_H 及び V_L 領域をコードする DNA を、PCR によって s c F v リンカーと一緒に再結合させ、ファージミドベクターに入れてクローン化する。ベクターは大腸菌にエレクトロポレーションにより導入され、この大腸菌はヘルパーファージに感染する。これらの方法に用いられるファージは、典型的には f d 及び M 1 3 などの繊維状ファージであり、V_H 及び V_L 領域は、通常、ファージ遺伝子 III 又は 20 遺伝子 VIII のいずれかと組換え技術により融合される。特定抗原に結合する抗原結合領域を発現するファージを選定し、抗原、例えば、標識抗原又は固相表面若しくはビーズに結合若しくは捕獲した抗原を用いて、同定することができる。本発明の抗体を作成するのに用いることができるファージディスプレイ方法の例としては、例えば、以下に開示されたものが挙げられる。Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods 182 : 41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods 184: 177-186; Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24: 952-958; Persic et al., 1997, Gene 187: 9-18; Burton et al., 1994, Advances in Immunology 57: 191-280; 国際出願 P C T / G B 9 1 / O 1 1 3 4 号; 国際公開 W O 9 0 / 0 2 8 0 9、W O 9 1 / 1 0 7 3 7、W O 9 2 / 0 1 0 4 7、W O 9 2 / 1 8 6 1 9、W O 9 3 / 1 1 2 3 6、W O 9 5 / 1 5 9 8 2、W O 9 5 / 2 0 4 0 1 30、及び W O 9 7 / 1 3 8 4 4; 及び米国特許第 5, 6 9 8, 4 2 6 号、第 5, 2 2 3, 4 0 9 号、第 5, 4 0 3, 4 8 4 号、第 5, 5 8 0, 7 1 7 号、第 5, 4 2 7, 9 0 8 号、第 5, 7 5 0, 7 5 3 号、第 5, 8 2 1, 0 4 7 号、第 5, 5 7 1, 6 9 8 号、第 5, 4 2 7, 9 0 8 号、第 5, 5 1 6, 6 3 7 号、第 5, 7 8 0, 2 2 5 号、第 5, 6 5 8, 7 2 7 号、第 5, 7 3 3, 7 4 3 号及び第 5, 9 6 9, 1 0 8 号。

【0147】

上記参考文献に記載されているように、ファージ選択後、ファージ由来の抗体をコードする領域を単離し、使用して全抗体又は任意の他の所望の結合断片を生成し、例えば、以下に記載のように、任意の所望の宿主、例えば哺乳類の細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母菌、及び細菌で発現する。P C T 公報 W O 9 2 / 2 2 3 2 4; Mullinax et al., 1992, B 40 ioTechniques 12 (6): 864-869; Sawai et al., 1995, AJRI 34: 26-34; 及び Better et al., 1988, Science 240: 1041-1043に開示された分野で知られた方法を用いて、組換え技術により F a b、F a b ' 及び F (a b ') 2 断片を産生する技術を用いることもできる。

【0148】

全抗体を作成するために、V_H 又は V_L ヌクレオチド配列、制限部位、及び制限部位を保護するフランキング配列を含む PCR プライマーを、s c F v クローン中の V_H 又は V_L 配列を増幅させるのに用いることができる。当業者に知られたクローニング技術を利用して、PCR で増幅した V_H 領域を、例えばヒト γ 4 定常部などの V_H 定常部を発現するベクターに入れてクローン化することができ、また、PCR で増幅した V_L 領域を、例え 50

ばヒト κ 又は λ 定常部などの V_L 定常部を発現するベクターに入れてクローン化することができる。好ましくは、 V_H 又は V_L 領域を発現するベクターは、EF-1 α プロモーター、分泌シグナル、可変部、定常部、及びネオマイシンなどの選択マーカー用のクローニング部位を含む。 V_H 及び V_L 領域は、必要な定常部を発現する1つのベクターに入れてクローン化してもよい。その後、重鎖転換ベクター及び軽鎖転換ベクターを細胞系に同時にトランスフェクトして、当業者に知られた技術を用いて、全長の抗体、例えば、IgGを発現する安定又は一過性の細胞系を作る。

【0149】

ヒトの抗体の*in vivo*での使用及び*in vitro*検出アッセイなどの用途によっては、ヒト化抗体又はキメラ抗体を使用することが好ましいであろう。ヒト免疫グロブリン配列由来の抗体ライブラリーを用いて、上述したファージディスプレイ法を含む当該技術分野で知られた様々な方法により、ヒト抗体を作成し得る。米国特許第4,444,887号及び第4,716,111号；及び国際公報WO98/46645、WO98/50433、WO98/24893、WO98/16654、WO96/34096、WO96/33735、及びWO91/10741も参照のこと。

【0150】

キメラ抗体は、抗体の異なる部位が異なる免疫グロブリン分子由来のものである分子である。キメラ抗体を作製する方法は、当該技術分野で知られている。例えば、Morrison, 1985, Science 229: 1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4: 214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125: 191-202; 及び米国特許第5,807,715号、第4,816,567号、第4,816,397号、及び第6,311,415号を参照のこと。

【0151】

ヒト化抗体は、所定の抗原に結合することが可能であり、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク領域及び非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するCDRを含む、抗体又はその変異体又はそれらの断片である。ヒト化抗体は、全て又は実質的に全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリン（すなわち、ドナー抗体）のものに相当し、全て又は実質的に全てのフレームワーク領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、実質的に全ての、少なくとも1つ、典型的には2つの可変部（Fab、Fab'、F(ab')₂、Fabc、Fv）を含む。好ましくは、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常部（Fc）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのものも含む。通常、抗体は軽鎖、並びに、少なくとも重鎖の可変部の両方を含むであろう。抗体は、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3、及びCH4領域を含んでもよい。ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA及びIgEなどの任意のクラスの免疫グロブリン、並びにIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4などの任意のアイソタイプから選択することができる。通常、定常部は、ヒト化抗体が細胞毒性を示すことが望まれる相補的固定定常部であり、クラスは典型的にはIgG1である。このような細胞毒性が望まれない場合には、定常部はIgG2クラスのものであろう。ヒト化抗体は、1以上のクラス又はアイソタイプ由来の配列を含んでもよく、所望のエフェクター機能を最適化するために特定の定常部を選択することは、当業者の範囲内である。ヒト化抗体のフレームワーク及びCDR領域は、親配列に正確に対応している必要はなく、例えば、ドナーCDR又はコンセンサスフレームワークは、少なくとも1つの残基の置換、挿入、又は欠失によって突然変異していてもよいので、その部位のCDR又はフレームワーク残基はコンセンサス又は移入抗体のいずれにも対応しない。しかし、このような突然変異は、広範にはわたらないであろう。通常、少なくとも75%、より頻繁には90%、最も好ましくは95%以上のヒト化抗体残基が、親のフレームワーク領域（FR）及びCDR配列のものに対応するであろう。ヒト化抗体は、当該分野で知られた様々な技術を用いて産生することができ、限定するものではないが、CDR移植（欧州特許EP239,400号；国際公開WO91/09967；及び米国特許第5,225,539号、第5,530,101号、及び第5,585,089号）、化粧張り（veneering）又は表面再処理（欧州特許EP

592, 106号及びEP519, 596号; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28 (4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering* 7 (6): 805-814; 及び Roguska et al., 1994, *PNAS* 91: 969-973)、チェーンシャッフリング (chain shuffling) (米国特許第5, 565, 332号)、及び、例えば、米国特許第6, 407, 213号、米国特許第5, 766, 886号、WO9317105、Tan et al., *J. Immunol.* 169: 1119-25 (2002)、Caldas et al., *Protein Eng.* 13 (5):353-60 (2000)、Morea et al., *Methods* 20 (3): 267-79 (2000)、Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272 (16):10678-84 (1997)、Roguska et al., *Protein Eng.* 9(10): 895-904 (1996)、Couto et al., *Cancer Res.* 55 (23 Supp): 5973s-5977s (1995)、Couto et al., *Cancer Res.* 55(8): 1717-22 (1995)、Sandhu JS, *Gene* 150(2): 409-10(1994)、及び Pedersen et al., *J. Mol. Biol.* 235 (3): 959-73 (1994)に開示の技術が挙げられる。しばしば、抗原結合を変更、好ましくは改良するために、フレームワーク領域内のフレームワーク残基がCDRドナー抗体由来の対応する残基と置換されるであろう。これらのフレームワーク置換は、当該技術分野で広く知られた方法、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのCDR及びフレームワーク残基の相互作用、並びに特定位置の異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較をモデリングすることにより確認する (例えば、Queen他、米国特許第5, 585, 089号; 及び Riechmann et al., 1988, *Nature* 332: 323参照のこと)。

【0152】

さらに、ARPに免疫特異的に結合する抗体又はそれらの抗原断片は、同様に、ARP又はそれらの抗原ペプチドを、当業者に広く知られた技術を用いて「模倣 (mimic)」する抗イディオタイプ抗体を生じさせるのに利用することができる。(例えば、Greenspan & Bona, 1989, *FASEB J.* 7 (5):437-444; 及び Nissinoff, 1991, *J. Immunol.* 147 (8):2429-2438参照)。

【0153】

抗体をコードするポリヌクレオチド配列

本発明は、ARP又はそれらの抗原断片に免疫特異的に結合する抗体又はそれらの断片をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供するものである。本発明は、高緊縮、中間、又は低緊縮ハイブリダイゼーション条件下で本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドも含む。

【0154】

ポリヌクレオチドを入手して、そのポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を当業界で知られた方法で決定してもよい。所望の抗原に対して免疫特異的な抗体のヌクレオチド配列は、例えば、GenBankなどの文献又はデータベースから入手することができる。APRのアミノ酸配列又はそれらの抗原断片が分かれば、この抗体又はそれらの断片 (例えば、CDR) をコードするヌクレオチド配列は、当該技術分野で広く知られた方法を用いて決定することができる、すなわち、特定のアミノ酸をコードすることが知られたヌクレオチドコドン、抗体をコードする核酸を生じさせるように構築する。このような抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成したオリゴヌクレオチドから構築されてもよく (例えば、Kutmeier et al., 1994, *BioTechniques* 17: 242に記載のように)、簡潔には、抗体をコードする配列の一部を含む重複するオリゴヌクレオチドの合成、これらのオリゴヌクレオチドのアニーリング及び連結、次いで、連結されたオリゴヌクレオチドのPCRによる増幅を含む。

【0155】

或いは、抗体をコードするポリヌクレオチドを、好適な源から得た核酸から生じさせてもよい。もし、特定の抗体をコードする核酸を含むクローンは利用可能ではないが、抗体分子の配列が知られている場合には、免疫グロブリンをコードする核酸を化学的に合成してもよく、或いは、配列の3'及び5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを用いたPCR増幅により、又は、例えば、抗体をコードするcDNAライブラリーからcDNAクローンを同定するために、特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプロ

ブを用いてクローニングすることにより、好適な源（例えば、抗体 c D N A ライブラリー、又は本発明の抗体を発現するために選択されたハイブリドーマ細胞などの、抗体を発現する任意の組織又は細胞から作成した c D N A ライブラリー、又はそれらから単離した核酸、好ましくはポリ A + R N A）から得てもよい。さらに、P C R により作成した増幅した核酸を、当該分野で広く知られた任意の方法を用いて複製可能なクローニングベクターに入れてクローン化してもよい。

【0156】

抗体のヌクレオチド配列が一旦決定されれば、抗体のヌクレオチド配列を、ヌクレオチド配列操作、例えば、組換え D N A 技術、部位特異的突然変異誘発法、P C R などとして当該技術分野で広く知られた方法を用いて操作して（例えば、Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY、及び、Ausubel et al., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY に記載の技術を参照のこと。なお、これらの文献は両方共、その全体が本明細書に参照により援用される。）、様々なアミノ酸配列を含む抗体を作成し、例えば、アミノ酸の置換、欠失、及び／又は挿入を生じさせてもよい。

【0157】

具体的な実施形態では、1つ以上の C D R を、ルーチンの組換え D N A 技術を用いてフレームワーク領域内に挿入する。フレームワーク領域は、自然発生的又はコンセンサスフレームワーク領域であってもよく、好ましくはヒトフレームワーク領域であってもよい（例えば、ヒトフレームワーク領域のリストとして Chothia et al., 1998, J. Mol. Biol. 278 : 457-479 参照）。好ましくは、フレームワーク領域の組合せにより形成したポリヌクレオチド及び C D R は、特定の抗原に特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、上述したように、1個以上のアミノ酸の置換がフレームワーク領域内でなされてもよく、好ましくは、アミノ酸置換により抗体とその抗原との結合を改良する。さらに、このような方法を用いて、鎖内ジスルフィド結合に關与する1つ以上の鎖内ジスルフィド結合が欠如した抗体分子を生じさせる、1つ以上の可変領域のシステイン残基のアミノ酸置換又は欠失を行ってもよい。他のポリヌクレオチドの変化も本発明に包含され、当該技術分野の技術の範囲内である。

【0158】

抗体の組換え発現

本発明の抗体、誘導體、類似体又はそれらの断片（例えば、本発明の抗体の重鎖若しくは軽鎖、又はそれらの部分、又は本発明の一本鎖抗体）の組換え発現は、抗体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの構築を必要とする。本発明の抗体分子又は抗体の重鎖若しくは軽鎖、又はそれらの部分（好ましくは、必ずしも必要ではないが、重鎖又は軽鎖可変領域を含む）をコードするポリヌクレオチドが得られたら、抗体分子産生用のベクターを、当該分野で広く知られた技術を用いて組換え D N A 技術により作成してもよい。例えば、米国特許第 6, 3 3 1, 4 1 5 号参照のこと。このように、ヌクレオチド配列をコードする抗体を含むポリヌクレオチドを発現させることによりタンパク質を調製する方法について、本明細書に記載する。当業者に広く知られている方法を、抗体コード配列及び適当な転写及び翻訳調節シグナルを含む発現ベクターを構築するのに用いることができる。これらの方法としては、例えば、in vitro 組換え D N A 技術、合成技術、及び in vivo 遺伝子組み換えが挙げられる。したがって、本発明は、プロモーターに実施可能に結合した、本発明の抗体分子、抗体の重鎖又は軽鎖、抗体の重鎖若しくは軽鎖の可変領域又はそれらの部分、或いは重鎖又は軽鎖 C D R をコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターを提供するものである。このようなベクターとしては、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列が含まれてもよく（例えば、国際公報 W O 8 6 / 0 5 8 0 7 及び W O 8 9 / 0 1 0 3 6 ; 及び米国特許第 5, 1 2 2, 4 6 4 号）、抗体の可変領域を重鎖全体、軽鎖全体、又は重鎖及び軽鎖全体の両方の発現ベクターのようなものでクローン化してもよい。

【0159】

発現ベクターを、通常の方法で宿主細胞にトランスフェクトし、その後、トランスフェクション細胞を通常の方法で培養して本発明の抗体を産生する。このように、本発明は、異種プロモーターに実行可能に結合された、本発明の抗体若しくはそれらの断片、又はそれらの重鎖若しくは軽鎖、又はそれらの一部、又は本発明の一本鎖抗体をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を包含する。二本鎖抗体の発現における好ましい実施形態では、以下に詳述するように、全免疫グロブリン分子の発現において、重鎖及び軽鎖の両方をコードするベクターを宿主細胞に同時発現させてもよい。

【0160】

様々な宿主発現ベクター系を利用して、本発明の抗体分子を発現させてもよい（例えば、米国特許第5,807,715号、及び上記5.1.2節に記載のもの）。抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅により増大させることができる（概説として、Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987)参照）。抗体を発現するベクター系のマーカーが増幅可能な場合には、宿主細胞の培養で存在するインヒビターレベルの増加により、マーカー遺伝子のコピー数を増大させるであろう。増幅された領域は抗体遺伝子に関連しているので、抗体の産生もまた増大するであろう（Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3: 257）。

【0161】

宿主細胞は、本発明の2つの発現ベクター、すなわち、重鎖由来のポリペプチドをコードする第1のベクター及び軽鎖由来のポリペプチドをコードする第2のベクターを同時にトランスフェクトされてもよい。この2つのベクターは、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの等しい発現を可能にする同一の選択可能なマーカーを含有していてもよい。或いは、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの両方をコードし、発現することが可能な一つのベクターを用いてもよい。このような状況では、過剰の毒性の遊離の重鎖を避けるために、軽鎖を重鎖の前に配置すべきである（Proudfoot, 1986, Nature 322: 52; 及びKohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2197）。重鎖及び軽鎖のコード配列は、cDNA又はゲノムDNAを含んでもよい。

【0162】

本発明の抗体分子は組換え発現により一旦産生されたら、免疫グロブリン分子の精製における分野で知られた任意の方法により精製してもよく、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティ、特に、Protein Aに因んだ特異抗原に対する親和性による、及び、サイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度差、又は、タンパク質の精製に関する任意の他の標準技術が挙げられる。さらに、本発明の抗体又はそれらの断片は、本明細書に記載された又は当該技術分野で知られた異種ポリペプチド配列と融合させて、精製を容易にしてもよい。

【0163】

ARPの構造予測及び機能解析

本発明は、アピコンプレクサの様々な種から得られるARPを提供するものである。したがって、ARP又はそれらの断片の構造がアミノ酸配列に基づいて予想され得るか否かは重要であろう。構造予測、結晶学的データの解析、配列アラインメント、並びに、ホモロジーモデリング法は、BLAST、ConvexのCHARMM release 21.2、及びQUANTA v.3.3、(Molecular Simulations, Inc., York, United Kingdom)などの当該技術分野で利用可能なコンピュータソフトウェアプログラムを用いて達成し得る。例えば、ARPには、パラメータをデフォルトするRPS-BLAST (Reverse Position-Specific BLAST) アルゴリズム設定により決定されるConserved Domain Database (CDD v. 1.60) 内の保存されたPROF (smart 00392又はcd 00148) 領域を含むものがある。

【0164】

一旦ARPが同定されれば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティ

10

20

30

40

50

、及びサイジングカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、溶解度差を含む標準的方法、又はタンパク質精製などの任意の標準技術により単離、精製してもよい。前述の *in vitro* の活性及び *in vivo* の生物学的機能を、任意の好適なアッセイを用いて評価してもよい(後述された免疫測定を含む)。

【0165】

或いは、一旦組換え宿主細胞により産生されるARPが同定されれば、ARPのアミノ酸配列は、例えば、自動アミノ酸シーケンサを用いたタンパク質の配列決定のための標準技術により決定することができる。

【0166】

ARP配列は、親水性分析により特徴付けることができる(Hopp, T. and Woods, K., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78: 3824)。親水性プロファイルを用いて、ARPの疎水性及び親水性領域、並びにこのような領域をコードする遺伝子配列の対応領域を同定することができる。

【0167】

特定の二次構造を担うARPの領域を同定するために、二次構造解析(Chou, P. and Fasman, G., 1974, Biochemistry 13: 222)を行うこともできる。

【0168】

構造解析の他の方法も採用することができる。これらとしては、限定するものではないが、例えば、X線結晶学(Engstrom, A., 1974, Biochem. Exp. Biol. 11: 7-13)及びコンピュータモデリング(Fletterick, R. and Zoller, M. (eds.), 1986, Computer Graphics and Molecular Modeling, in Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York)が挙げられる。

【0169】

ARP又はそれらの断片の機能的活性を、当該分野で知られた様々な方法により分析することができる。

【0170】

例えば、抗体への結合に関して、他の属由来のARPとある属由来のARPが結合又は競合する能力を評価する場合に、当該技術分野で既知の様々な免疫測定法を用いることができ、限定するものではないが、放射免疫測定などの技術を用いた競合及び非競合アッセイ系、ELISA(酵素免疫測定法)、「サンドイッチ」免疫測定法、免疫放射定量測定法、ゲル内沈降反応、免疫拡散測定法、*in situ*免疫測定法(金コロイド、酵素又は放射性同位体標識を例えば用いる)、ウェスタンブロット、沈降反応、凝集法(例えば、ゲル凝集法、赤血球凝集試験)、補体結合法、蛍光抗体法、タンパク質Aアッセイ、及び免疫電気泳動法などが挙げられる。抗体結合は、一次抗体上の標識を検出することにより検出することができる。或いは、一次抗体は、特に二次抗体が標識されている場合には、二次抗体又は試薬の一次抗体への結合を検出することにより検出される。多くの方法が、免疫測定法の結合検出に関する技術分野で知られており、本発明の範囲内に含まれる。

【0171】

タンパク質の半減期は、タンパク質の安定性の測定法であり、タンパク質の活性が1/2低下するのに必要な時間を示す。ARPの半減期は、限定するものではないが、DCアッセイ及びNKアッセイ(5.6節及び12節参照)などの、ある期間に亘って被検体から得られるサンプル中のARP活性を測定する任意の方法により決定することができる。サンプル中のARP濃度に対する標準化は、ARP投与後のある期間に亘って得られたサンプル中のARP分子のレベルを測定するための抗ARP抗体(又はARPを他の部分に融合する遺伝子の融合部分に対する抗体)を用いた免疫測定法、又は放射標識されたARP分子の投与後被検体から得たサンプル中の放射標識されたARP分子の検出により行うことができる。具体的な実施形態では、当該技術分野で知られた技術を、*in vivo*でのARPの半減期を延長するのに用いることができる。例えば、アルブミン又は高分子量のポリエチレングリコール(PEG)のような不活性ポリマー分子を用いることができる。例えば、国際公報WO93/15199、WO93/15200、及びWO01/7

7 1 3 7 ; 及び米国特許第 6 , 5 2 8 , 4 8 5 号参照。

【0 1 7 2】

その他の方法が当業者に知られているであろうが、それは本発明の範囲内である。

【0 1 7 3】

A R P 活性の特徴付け及び実証

本発明に従って用いられる A R P の免疫刺激活性及び／又は抗癌活性は、当該技術分野で知られた方法により決定することができる。ある実施形態では、A R P の免疫刺激活性及び／又は抗癌活性を、限定するものではないが、当該技術分野で知られ、また、本明細書に参照により援用される Yamanaka, 2001, Microbiol Immunol 2001; 45 (7): 507-14 に記載されたヒト腫瘍移植片を有する重症複合免疫不全マウスモデル又はヌードマウスなどの癌動物モデルなどの様々な実験動物モデルを用いることにより決定される。 10

【0 1 7 4】

A R P の免疫刺激活性及び／又は抗癌活性を試験する様々な *in vitro* 及び *in vivo* アッセイが、A R P の精製工程に用いられる。本発明の手順及び組成は、ヒトに使用する前に、所望の治療又は予防活性に関して *in vitro*、さらに *in vivo* で試験されることも好ましい。

【0 1 7 5】

一実施形態では、N K 細胞アッセイを用いて、N K 様細胞 (12. 2 節参照) の A R P で誘導される細胞毒性を評価する。簡潔には、一例として、限定するものではないが、N K 細胞アッセイを次のように実施することができる。大型顆粒リンパ球 (L G L) を、腫瘍細胞と様々な割合で (標的割合に対するエフェクター) 4 日間、37℃、5% C O₂ で同時培養する。培地は、低濃度の I L 2 に加えて、試験される A R P も含む。培養を 4 日目の終わりに終了し、M T T 細胞生死判別定量試験を用いて生体染色する (Mossman, T. J. Immunol. Methods 65: 55(1983); 及び Sigma Chemical MTT (M5655) product application note 参照)。培地を吸引し、残った細胞を洗浄し、M T T を含み、F C S を加えた D M E M / F 1 2 で置換する。細胞をさらに 4 ~ 5 時間、37℃でインキュベートする。光吸収を、プレートリーダーを活用して測定する。光吸収の減少は、1 ウェル当りの生存細胞数の減少 (すなわち、細胞毒性) を示していた。H C l を含む 2 - プロパノールで培地の置換をすることにより、M T T を可溶化した後、光吸収を再び測定すると、ウェル全体に亘って均一な色を与える。N K 誘導活性を、負 (P B S / B S A) 及び正 (内部標準) 対照群と比較して計算する。 20 30

【0 1 7 6】

他の実施形態では、A R P 活性を I F N γ アッセイ (12. 4 節参照) により測定する。一例として、限定するものではないが、培地への L G L による I F N γ の産生及び放出は、次のように決定される。N K 細胞で増強された L G L を単離し、10% ウシ胎児血清、ゲンタマイシン (50 μ g / mL)、及び I L 2 (125 U / mL) を追加した 200 μ L の D M E M / F 1 2 に、2. 5 又は 5. 0 $\times 10^5$ 細胞 / ウェルの密度で、96 ウェルプレートに蒔く。試験されるべき A R P を加え、細胞を一晩培養し、その後、馴化培地 (C M) を除去し、次いで、遠心して吸引された細胞を除く。次いで、商業的に入手可能な E L I S A キットを用いて、所定量の C M の I F N γ を測定する。 40

【0 1 7 7】

好ましい実施形態では、樹状細胞 (D C) アッセイを用いて、D C 活性化の指標として、単離したばかりの樹状細胞からのインターロイキン-12 (I L - 12) の放出を追跡調査する (12. 3 節参照)。この活性は、A R P の *in vitro* の N K - C M C 及び *in vivo* の抗腫瘍活性の両方と高い相関関係がある。簡潔には、一例として、限定するものではないが、D C アッセイは以下のように行うことができる。単離したばかりの樹状細胞 (C D 11c⁺ 碑細胞、例えば、活性評価の 10 時間以内に B A L B / c マウスの脾臓から単離) を、サイトカインを追加した培地に 0. 5 $\times 10^6$ 細胞 / mL の密度で懸濁させる (G M - C S F、1.0 ng / mL ; I L - 4、1.0 ng / mL ; I F N γ 、3. 0 ng / mL ; 抗マウス C D 40、0. 5 mg / mL)。次いで、樹状細胞 (10 50

0 μ L / ウェル) を、100 μ L 培地 / ウェルに希釈した A R P を含む 96 ウェル組織培養プレートに加え、37℃、5% CO₂、95% 空気で一晚培養する。次いで、樹状細胞 (C D 11 c⁺ 碑細胞) からのマウス I L - 12 の放出を E L I S A を用いて測定する。

【0178】

ヒトで試験する前に、治療に使用する化合物を、限定するものではないが、ラット、マウス、ニワトリ、雌ウシ、サル、ウサギなどの好適な動物モデル系で試験することができる。当該技術分野で知られ、広く用いられている主な動物モデルとしては、限定するものではないが、Hann et al., 2001, Curr Opin Cell Biol 2001 Dec; 13 (6):778-84に記載されたマウスが挙げられる。

【0179】

好ましい実施形態では、S - 180 細胞系 (A T C C C C L 8、バッチ F 4805) が、この系が動物及び培養液 (血清含有及び無血清条件の両方で) の両方で増殖可能であるので、腫瘍モデルとして選ばれる。腫瘍は、組織培養から得られる細胞懸濁液の注射によりマウス (B A L B / c) に定着させる。マウス1匹当たり約 1×10^6 から 3×10^6 個の細胞を、腹腔内に注射する。腫瘍は、腹腔内の複数の部位で複数の充実性結節として現れたが、これは大半の動物で10日～15日以内に死を引き起こす。動物の生存の観察に加えて、それらの状態を腫瘍の成長の進行として定性的に評価し、以下の段落に記載したような腫瘍指数を作成するのに用いる。

【0180】

腫瘍モデル実験の薬物活性の評価を確立するために、腫瘍モデル実験では、動物の観測調査と共にそれらの生存状況を組み合わせた指標を開発し得る。例えば、週に1回又は2回、マウスの腹腔内の S 180 腫瘍の存在、定着、末期的進行を触診する。以下の基準に従って、腫瘍の発生及び進行をこれらのマウスで評価する：「0」－触診された腫瘍なし；「1」－初発腫瘍が存在するように見える；小さいサイズ (～1 mm)；腹部膨張なし；「2」－腫瘍が定着したように見える；多少の腹部膨満；明らかな悪液質なし；「3」－腫瘍がよく定着し、顕著な腹部膨満、動物が悪液質を示す；及び、「4」－動物が死んだ。処置群の指数の値は、群中の個々のマウスの指数の平均である。

【0181】

さらに、当業者に知られた任意のアッセイを、癌及び／又は感染症の治療又は予防に関する本明細書に開示された組み合わせた治療法の予防及び／又は治療上の有用性を評価するために用いることができる。

【0182】

本発明の組成物の使用

本発明の組成物は、それらの必要のある被検体に投与して、免疫応答を刺激し、癌又は感染症 (それらの一以上の症状を含む) を予防又は治療し、又はインターロイキン 12 (I L - 12) 処置に代わるものとして使用する。本発明の組成物は、免疫応答を誘導させるために、それらの必要な被検体に、単独又は免疫刺激に有用な1つ以上の他の治療法と組み合わせて投与してもよい。本発明の組成物は、被検体の I L - 12 の全身レベルを上昇させるために、それらの必要な被検体に、単独又は1つ以上の他の治療法と組み合わせて投与してもよい。本発明の組成物は、癌又は感染症を予防又は治療するために、それらの必要な被検体に、単独で、或いは、癌 (限定するものではないが、下記5. 8節に記載した予防又は治療薬が挙げられる) 又は感染症 (限定するものではないが、下記5. 9節に記載した予防又は治療薬が挙げられる) の予防又は治療に有用な1つ以上の他の治療法と組み合わせて投与してもよい。

【0183】

一実施形態では、本発明は、癌又は感染症 (1つ以上のそれらの症状を含む) を予防又は治療する方法であって、前記感染症はヒト免疫不全ウイルス (H I V) に感染することによって引き起こされず、このような治療又は予防が望まれる被検体に治療上又は予防上有効な量の A R P を投与する過程を含む方法を提供するものである。他の実施形態では、本発明は、癌又は感染症 (1つ以上のそれらの症状を含む) を治療又は予防する方法で

10

20

30

40

50

あって、前記感染症はヒト免疫不全ウイルス（H I V）に感染することによって引き起こされず、このような治療又は予防が望まれる被検体に1つ以上のA R Pをコードするヌクレオチド配列を含む治療上又は予防上有効な量の核酸を投与する過程を含む方法を提供するものである。他の実施形態では、本発明は癌又は感染症（1つ以上のそれらの症状を含む）を治療又は予防する方法であって、前記感染症はヒト免疫不全ウイルス（H I V）に感染することによって引き起こされず、このような治療又は予防が望まれる被検体にA R Pをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された治療上又は予防上有効な量の細胞を投与する過程を含み、前記ヌクレオチド配列が実行可能にプロモーターに結合されている方法を提供するものである。さらに別の実施形態では、本発明は、癌又は感染症（1つ以上のそれらの症状を含む）を治療又は予防する方法であって、前記感染症はヒト免疫不全ウイルス（H I V）に感染することによって引き起こされず、このような治療又は予防が望まれる被検体に治療上又は予防上有効な量のA R P及びA R P以外の治療上又は予防上有効な量の1つ以上の試薬を投与する過程を含む方法を提供するものである。具体的な実施形態では、治療される癌は卵巣癌である。具体的な実施形態では、感染症はアピコンプレクサ門の生物に感染することにより引き起こされる。他の具体的な実施形態では、感染症はアピコンプレクサ門の生物に感染することによって引き起こされない。

10

【0184】

他の実施形態では、本発明は、前記被検体がヒト免疫不全ウイルス（H I V）に感染しない条件下で、有効量のA R Pを被検体に投与する過程を含む、免疫応答を刺激する方法を提供するものである。他の実施形態では、本発明は、被検体がヒト免疫不全ウイルス（H I V）に感染しない条件下で、1つ以上のA R Pをコードするヌクレオチド配列を含む有効量の核酸を被検体に投与する過程を含む、免疫応答を刺激する方法を提供するものである。他の実施形態では、本発明は、被検体がヒト免疫不全ウイルス（H I V）に感染しない条件下で、A R Pをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質変換した有効量の細胞を被検体に投与する過程を含み、前記ヌクレオチド配列が実行可能にプロモーターに結合されている免疫応答を刺激する方法を提供するものである。さらに別の実施形態では、本発明は、被検体がヒト免疫不全ウイルス（H I V）に感染しない条件下で、有効量のA R P及びA R P以外の有効量の1つ以上の免疫刺激剤を被検体に投与する過程を含む、免疫応答を刺激する方法を提供するものである。具体的な実施形態では、被検体は鳥類である。他の具体的な実施形態では、被検体は鳥類ではない。

20

30

【0185】

さらに別の実施形態では、本発明は、被検体のインターロイキン-12（I L-12）の全身レベルを上昇させる方法であって、前記被検体はヒト免疫不全ウイルス（H I V）に感染せず、このようなインターロイキン-12レベルの上昇が望まれる被検体に有効量のA R Pを投与する過程を含む方法を提供するものである。他の実施形態では、本発明は、被検体のインターロイキン-12の全身レベルを上昇させる方法であって、前記被検体はヒト免疫不全ウイルス（H I V）に感染せず、1つ以上のA R Pをコードするヌクレオチド配列を含む有効量の核酸をインターロイキン-12レベルのこのような上昇が望まれる被検体に投与する過程を含む方法を提供するものである。他の実施形態では、本発明は、被検体のインターロイキン-12（I L-12）の全身レベルを上昇させる方法であって、前記被検体はヒト免疫不全ウイルス（H I V）に感染せず、インターロイキン-12レベルのこのような上昇が望まれる被検体にA R Pをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質変換した有効量の細胞を投与する過程を含み、前記ヌクレオチド配列が実行可能にプロモーターに結合されている方法を提供するものである。さらに別の実施形態では、本発明は、被検体のインターロイキン-12（I L-12）の全身レベルを上昇させる方法であって、前記被検体はヒト免疫不全ウイルス（H I V）に感染せず、インターロイキン-12レベルのこのような上昇が望まれる被検体に有効量のA R P及びA R P以外の有効量の1つ以上の免疫刺激剤を投与する過程を含む方法を提供するものである。

40

【0186】

50

いくつかのアジュバントが、投与した抗原に対する免疫応答を高めるために実験的に用いられる。しかし、水酸化アルミニウム (alum) しか、ヒトに使用するアジュバントとして FDA に認可されていない。この不活性な無機分子は安全であることが示されているが、中程度に良好なアジュバントでしかない。他のアジュバント (例えば、カルメットゲラン桿菌 (BCG)、フロインドアジュバント、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、ジニトロフェノール、QS-21、CAP が動物研究に用いられ、又は現在ヒトで研究中である。残念ながら、これらは非特異的であるか (CAP、QS-21、ジニトロフェノール) 又は毒性 (BCG、KLH、フロインドアジュバント) がある。

【0187】

本発明のさらなる実施形態では、ARP の非常に強力な樹状細胞活性化特性により、ARP がワクチンの産生に関する優れたアジュバントを提供するための理想的候補となる。無機アジュバントは、免疫系の非特異的活性化因子とみなされる。これに対して、ARP は自然免疫の特異的活性化因子となるように思われる。したがって、ARP は樹状細胞の抗原提示活性を上方制御する遺伝的に事前にプログラムされた事象のカスケードを活性化させると同時に、即時型細胞応答 (例えば、NK 細胞) の活性化、さらに重要なことに、適応免疫の活性化 (細胞性及び体液性の両方) に関連するサイトカインの放出を同時に生じる。この後者の機能は、記憶 T 細胞 (細胞応答) 及び循環抗体 (体液性応答) の生成を可能にするであろう。

【0188】

本明細書に用いられる被検体は、動物、好ましくは哺乳動物をいう。ある実施形態では、被検体は家畜であり、限定するものではないが、ニワトリ、ブタ、ウシ、ウマ、及びヤギが挙げられる。ある実施形態では、被検体はペットであり、限定するものではないが、ネコ、イヌ、及びトリが挙げられる。好ましい実施形態では、被検体はヒトである。

【0189】

標的感染症

本発明の方法により治療又は予防することができる感染症は、これらに限定するものではないが、ウイルス、細菌、菌類、原生動物及び寄生虫などの感染体により引き起こされる。

【0190】

本発明の方法により治療又は予防することができるウイルス性疾患は、限定するものではないが、A 型肝炎、B 型肝炎、C 型肝炎、インフルエンザ、水痘、アデノウイルス、単純疱疹 I 型 (HSV-I)、単純疱疹 II 型 (HSV-II)、牛痘、ライノウイルス、エコーウイルス、ロタウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、パピローマウイルス、パポバウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス (echinovirus)、アルボウイルス、ハンタウイルス (hantavirus)、コクサッキーウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、及びポリオウイルスにより引き起こされるものが挙げられる。本発明によれば、本発明の方法により治療又は予防される疾患は、ヒト免疫不全ウイルスによって引き起こされない (ヒト免疫不全ウイルス I 型 (HIV-I)、又はヒト免疫不全ウイルス II 型 (HIV-II)。例えば、疾患は AIDS ではない。)

【0191】

本発明の方法により治療又は予防することができる細菌性疾患は、限定するものではないが、放線菌、リケッチア、マイコプラズマ、ナイセリア、及びレジオネラなどの細菌により引き起こされる。

【0192】

本発明の方法により治療又は予防することができる真菌性疾患は、限定するものではないが、アスペルギルス症 (aspergillosis)、クリプトコッカス症 (cryptococcosis)、スポロトリウム症、コクシジオイデス症、パラコクシジオイデス症、ヒストプラズマ症、ブラストミセス症、接合菌症、及びカンジダ症が挙げられる。

【0193】

本発明の方法により治療又は予防することができる原虫症は、限定するものではないが

、レーシュマニア、コクジジオア (kokzidioa)、及びトリパノソーマ属などの原虫により引き起こされる。具体的な実施形態では、本発明の方法により治療又は予防することができる原虫疾患は、アピコンプレクサ原虫によっては引き起こされない。

【0194】

本発明の方法により治療又は予防することができる寄生虫病は、限定するものではないが、クラミジア及びアメーバ症などの寄生虫によって引き起こされる。

【0195】

標的とする癌
治療上の使用

ある実施形態では、本発明は、このような治療が望まれる被検体に、A R Pを含む治療上有効な量の組成物を投与する過程を含む癌を治療する方法（それらの症状の改善を含む）を提供するものである。本発明の組成物は、例えば、一次、二次、三次又は四次の癌治療に用いられてもよい。ある実施形態では、本発明は、このような癌の1つ以上の通常の治療法に対して抵抗性のある患者の癌を治療する方法（それらの症状の改善を含む）であって、A R Pを含む治療上有効な量の組成物を前記被検体に投与する過程を含む方法を提供するものである。治療に対応して、がん細胞の少なくともかなりの部分が死滅せず、或いは、それらの細胞分裂が停止しない場合には、癌は治療に抵抗性であると判断されるであろう。このような判断は、このような状況で当該技術分野に受け入れられている「抵抗性」の意味を用い、癌細胞に対する治療の効果を評価するための当該技術分野で知られた任意の方法によって、*in vivo*又は*in vitro*のいずれかでなすことができる。具体的な実施形態では、癌細胞の数が有意に減少しないか、或いは増加した場合には、癌は抵抗性である。 10 20

【0196】

本発明は、既存のこのような癌の単独療法に抵抗性のある被検体の癌を治療する方法（1つ以上のそれらの症状の改善を含む）であって、前記被検体に治療上有効な量のA R Pを含む組成物及びA R P以外の治療上有効な量の1つ以上の治療薬を投与する過程を含む方法を提供するものである。本発明は、また、任意の他の抗癌治療（例えば、放射線療法、化学療法又は外科手術）と組み合わせて、他の治療に対する抵抗性が証明された患者に、A R Pを含む組成物を投与することで癌を治療する方法を提供するものである。本発明は、また、癌患者又は1つ以上の他の癌治療を以前に行ったために免疫抑制された患者の治療方法を提供するものである。本発明は、また、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、及び／又は生物療法／免疫療法が毒性が強すぎる事が判明したか、又は判明するかもしれない、すなわち、治療した被検体に容認できない又は耐え難い副作用を生じる場合に、代わりとなる癌の治療方法を提供するものである。 30

【0197】

具体的な実施形態では、癌治療のために、本発明のA R Pを含む組成物を、アピコンプレクサ門の生物に感染していない被検体に投与する。

【0198】

本発明により包含される方法によって治療することができる癌は、限定するものではないが、腫瘍、悪性腫瘍、転移、又は、癌とみなされるであろう制御されていない細胞増殖により特徴付けられる任意の疾患若しくは障害が挙げられる。癌は、原発性癌又は転移性癌であってもよい。本発明により治療することができる特異的癌は、限定するものではないが、表2に記載のものが挙げられる（このような障害の概説としては、Fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphiaを参照のこと）。 40

【0199】

【表 2】

悪性及び関連のある障害

白血病	
急性白血病	
急性リンパ性白血病	
急性骨髄性白血病	
骨髄芽球性	
前骨髄球性	
骨髄単球性	10
単核球性	
赤白血病	
慢性白血病	
慢性骨髄性（顆粒球）白血病	
慢性リンパ球性白血病	
真性多血症	
リンパ腫	
ホジキン病	
非ホジキン病	20
多発性骨髄腫	
ワルデンストレーム・マクログロブリン血症	
重鎖病	
固形腫瘍	
肉腫及び癌腫	
繊維肉腫	
粘液肉腫	
脂肪肉腫	
軟骨肉腫	
骨原性肉腫	30
脊索腫	
血管肉腫	
内皮腫	
リンパ管肉腫	
リンパ管内皮腫	
滑液腫瘍	
内皮腫	
ユーイング腫瘍	
平滑筋肉腫	40
横紋筋肉腫	

結腸癌

直腸癌

腭癌

乳癌

卵巢癌

前立腺癌

扁平上皮癌

基底細胞癌

腺癌

10

汗腺癌

脂腺癌

乳頭癌

乳頭腺癌

嚢胞腺癌

髓様癌

気管支原性肺癌

腎細胞癌

肝臓癌

20

胆管癌

絨毛癌

精上皮腫

胚性癌腫

ウイルス腫瘍

子宮頸癌

精巣腫瘍

肺癌

小細胞肺癌

膀胱癌

30

上皮性癌

グリア細胞腫

星細胞腫

髓芽腫

頭蓋咽頭腫

上衣細胞腫,

松果体腫

血管芽細胞腫

聴神経腫

40

乏突起細胞腫

髄膜腫

黒色腫

神経芽細胞腫

網膜芽細胞腫

10

【0200】

予防的使用

本発明の組成物は、限定するものではないが、表2に記載のそれらの障害などの腫瘍性又は悪性の状態への進行を阻止するために投与することができる。このような予防的使用は、異常増殖又は癌への進行を促進することが知られているか又は疑われている状態、特に、過形成、化生、又はさらにとりわけ、異形成からなる非腫瘍性の細胞増殖が生じた場合（このような異常増殖条件のレビューとしては、Robbins and Angell, 1976, Basic Pathology, 2d Ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp.68-79参照のこと）に、必要とされる。過形成は、構造又は機能の有意な変化が無い、組織又は器官における細胞数の増加を伴う制御された細胞増殖形態である。ほんの一例として、子宮内膜の過形成は、しばしば子宮体癌の前に起こる。化生は、ある種類の成熟細胞又は完全に分化した細胞が別の種類の成熟細胞と置き換わる制御された細胞増殖形態である。化生は、上皮又は結合組織細胞で生じることができる。典型的な化生は、いくらか無秩序な上皮化生を伴う。異形成は、しばしば癌の前兆であり、上皮で主に見出される。それは、個別細胞の均一性及び細胞の構築の方向性の喪失を伴う、非腫瘍性の細胞増殖の最も無秩序な形態である。異形成細胞は、しばしば異常に大きい、濃く染まった核を有し、多形成を示す。異形成は、慢性的な刺激又は炎症が存在するところで特徴的に発生し、しばしば頸部、気道、口腔、及び胆嚢で見出される。

30

【0201】

過形成、化生又は異形成として特徴付けられる異常な細胞増殖の存在の代わりに又はそれに加えて、患者から入手した細胞のサンプルにより *in vivo* 又は *in vitro* で示される、1つ以上の転換形質又は悪性の表現型の存在によって、本発明の組成物の予防上／治療上の投与の望ましさを示すことも可能である。このような転換形質の特徴としては、形態変化、より緩い基質接着、接触阻止の消失、足場依存性の消失、プロテアーゼ放出、糖輸送の増加、血清要求性の減少、胎児性抗原の発現、250,000ダルトンの細胞表面タンパク質の消失などが挙げられる（転換形質又は悪性の表現型に関連する特徴としては、同上の84～90頁も参照のこと）。

【0202】

具体的な実施形態では、白斑症、上皮の良性様過形成若しくは異形成病変、又はボーエン病、*in situ*の癌腫が、予防処置の望ましさを示す前癌病変部である。

40

【0203】

他の実施形態では、繊維嚢胞性疾患（嚢胞性過形成、乳腺異形成、特に腺症（良性上皮過形成））が、予防処置の望ましさを示している。

【0204】

本発明の組成物の予防的使用は、癌を引き起こすであろう一部のウイルス性感染でも必要とされる。例えば、ヒトパピローマウイルスは子宮頸癌を引き起こす可能性があり（例えば、Hernandez-Avila et al., Archives of Medical Research (1997) 28 : 265-271参照）、エプスタインバーウイルス（EBV）はリンパ腫を引き起こす可能性があり（例

50

えば、Herrmann et al., J Pathol (2003) 199 (2): 140-5参照)、B型又はC型肝炎ウイルスは肝臓癌を引き起こす可能性があり(例えば、El-Serag, J Clin Gastroenterol (2002) 35 (5 Suppl 2): S72-8参照)、ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV)－IはT細胞白血病を引き起こす可能性があり(例えば、Mortreux et al., Leukemia(2003) 17 (1): 26-38参照)、及びヒトヘルペスウイルス－8感染はカポジ肉腫を引き起こす可能性がある(例えば、Kadow et al., Curr Opin Investig Drugs (2002) 3 (11): 1574-9参照)。

【0205】

他の実施形態では、1つ以上の以下の悪性の素因を示す患者が、有効量の本発明の組成物を投与することにより治療される。悪性(例えば、慢性骨髄性白血病に関するフィラデルフィア染色体、濾胞性リンパ腫に関するt(14;18)、家族性ポリープ症又はガードナー症候群(大腸癌の危険性の前兆)、良性モノクローナル免疫グロブリン血症(多発性骨髄腫の危険性の前兆)、メンデル(遺伝的)遺伝形質を示す癌又は前癌性疾患の患者の一親等の親族(例えば、大腸の家族性ポリープ症、ガードナー症候群、遺伝性外骨症、多内分泌腺腫症、アミロイド産生の甲状腺髄様癌及びクロム親和細胞腫、ポイツーイエーガー症候群、フォンレックリングハウゼンの神経線維腫症、網膜芽細胞腫、頸動脈小体腫瘍、皮膚黒色癌(cutaneous melanocarcinoma)、眼内黒色腫、色素性乾皮症、血管拡張性失調症、Chediak-Higashi症候群、白皮症、ファンconi再生不良性貧血、及びブルーム症候群(Robbins and Angell, 1976, Basic Pathology, 2d Ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 112-113参照)など)に関連する染色体転座、並びに発癌物質への暴露(例えば、喫煙、及び特定の化学物質の吸入又は接触)。

【0206】

他の具体的な実施形態では、本発明の組成物は、乳癌、大腸癌、卵巣癌、又は子宮頸癌への進行を阻止するためにヒトに投与される。

【0207】

遺伝子治療

一実施形態では、1つ以上のARPをコードする配列を含む1つ以上の核酸分子を、遺伝子治療の手段として、免疫応答を刺激するため及び／又は癌又は感染症を予防若しくは治療するために、被検体に投与する。遺伝子治療とは、発現された又は発現し得る核酸の被検体への投与によって行われる治療をいう。

【0208】

本発明に従って、当該分野で利用可能な遺伝子治療の任意の方法を用いることができる。典型的方法を以下に示す。

【0209】

遺伝子治療方法の一般的な概説としては、Goldspiel et al., 1993, Clinical Pharmacol. 12: 488-505; Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596; Mulligan, 1993, Science 260: 926-932; 及び Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217; May, 1993, TIBTECH 11 (5): 155-215を参照のこと。利用できる組換えDNA技術の分野で一般に知られた方法が、Ausubel et al. (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; 及び Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NYに記載されている。

【0210】

好ましい実施形態では、本発明の組成物は、1つ以上のARPをコードするヌクレオチド配列を含み、当該核酸配列は、好適な宿主中でARPを発現する発現ベクターの一部である。特に、このような核酸は、ARPコード領域に実行可能に結合されたプロモーター、好ましくは異種(外来の)プロモーターを有し、当該プロモーターは誘導性又は恒常的であり、任意に組織特異的である。他の特定の実施形態では、ARPコード配列及び任意の他の所望の配列がゲノム中の所望の部位で相同的組換えを促進する領域に隣接されており、それ故ARP核酸の染色体内発現をもたらす核酸分子が用いられる(Koller and Smi

thies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 :8932-8935 ; Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438)。

【0211】

核酸の患者への送達は、患者が直接核酸又は核酸担持ベクターに曝される場合には直接、或いは、細胞を *in vitro* で最初に形質転換し、次いで患者に移植する場合には間接的のいずれかであってもよい。これらの2つのアプローチは、*in vivo* 又は *ex vivo* 遺伝子療法としてそれぞれ知られている。

【0212】

具体的な実施形態では、核酸配列は、直接 *in vivo* で投与され、そこで発現してコードされた生成物を生成する。これは、当該技術分野で知られた以下のような任意の多くの方法により達成し得る。例を挙げると、例えば欠陥若しくは弱毒レトロウイルス又はその他のウイルス性ベクターを用いて感染させることによる（米国特許第4,980,286号参照）といった、適当な核酸発現ベクターの一部として構築し、それを投与して細胞内に含まれるようにすることによるもの、又は裸のDNAの間接注射によるもの、又は微粒子照射（例えば、遺伝子銃、Biolistic、Dupont社製）若しくは脂質若しくは細胞表面受容体若しくはトランスフェクション試薬（transfecting agent）によるコーティング、リボソーム、微粒子若しくはマイクロカプセルへの封入の利用によるもの、又は核に入ることが知られているペプチドに結合させてそれらを投与することによるもの、受容体により媒介されるエンドサイトーシスにさらされるリガンドに結合させてそれを投与することによるもの（例えば、Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432参照）（これは受容体の特異的に発現する標的細胞型に用いることができる）などがある。他の実施形態では、リガンドはエンドソームを破壊する融合性のウイルスペプチドを含み、核酸がリソソーム分解されるのを妨げることを可能にする、核酸-リガンド複合体を形成することができる。さらに他の実施形態では、特異的受容体を標的にすることにより、核酸を *in vivo* で細胞特異的な取り込み及び発現の標的にすることができる（例えば、PCT公報WO92/06180号、1992年4月16日付（Wu他）；WO92/22635、1992年12月23日付け（Wilson他）；WO92/20316、1992年11月26日（Findeis他）；WO93/14188、1993年7月22日付（Clarke他）、WO93/20221、1993年10月14日付（Young）参照）。或いは、核酸を細胞内に導入し、さらに、発現させるために、相同的組換えにより宿主細胞DNA内に組み入れることができる（Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935; Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438)。

【0213】

一実施形態では、1つ以上のARPをコードする核酸を含むウイルスベクターが、本発明に従って用いられる（Miller et al., 1993, Meth. Enzymol. 217: 581-599参照）。レトロウイルスベクターは、例えば、遺伝子治療に用いることができ、ARPを被検体に送達することができる。これらのレトロウイルスは、ウイルスゲノムのパッケージング及び宿主細胞DNAへの組込みに必要とされないレトロウイルスの配列を除去するように修飾されている。レトロウイルスベクターについての更なる詳細は、Boesen et al., 1994, Biotherapy 6: 291-302; Clowes et al., 1994, J. Clin. Invest. 93:644-651; Kiem et al., 1994, Blood 83 : 1467-1473; Salmons and Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4: 129-141; 及びGrossman and Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3: 110-114に見出すことができる。

【0214】

遺伝子治療に用いることができる他のウイルスとしては、アデノウイルスベクターがある。アデノウイルスは、呼吸上皮に遺伝子を送達させるために特に魅力的な媒体である。アデノウイルスは、軽い疾患を引き起こす呼吸上皮に自然感染する。アデノウイルス型送達システムの他の標的は肝臓、中枢神経系、内皮細胞、及び筋肉である。アデノウイルスは、非分裂細胞に感染することができるという利点を有する。Kozarsky及びWilson (1993, Current Opinion in Genetics and Development 3: 499-503) は、アデノウイルス型遺

伝子療法の概説を公開している。Bout他（1994, Human Gene Therapy 5 : 3-10）は、アカゲザルの呼吸上皮に遺伝子を導入するためのアデノウイルスベクターの使用について示している。遺伝子療法におけるアデノウイルスの他の使用例は、Rosenfeld et al., 1991, Science 252: 431-434; Rosenfeld et al., 1992, Cell 68 : 143-155; Mastrangeli et al., 1993, J. Clin. Invest. 91: 225-234; P C T公報W O 9 4 / 1 2 6 4 9 号; 及びWang et al., 1995, Gene Therapy 2: 775-783に見出すことができる。好ましい実施形態では、癌を予防又は治療するためにA R Pを被検体に送達するために、アデノウイルスベクターは遺伝子治療に用いられる。

【0215】

アデノ随伴ウイルス（A A V）も、遺伝子療法に使用することが提案されてきた（Wals 10
h et al., 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204: 289-300; 米国特許第5, 436, 146号）。

【0216】

遺伝子療法への別のアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウムに媒介されるトランスフェクション、又はウイルス感染などの方法により組織培養中の細胞に遺伝子を導入する過程を伴う。通常、導入方法としては、選択可能なマーカーの細胞への導入が挙げられる。次いで、細胞は選別下に置かれ、取り込んだこれらの細胞を単離して、導入された遺伝子を発現する。その後、これらの細胞は患者に送達される。

【0217】

この実施形態では、核酸は、得られる組換え細胞の *in vivo*での投与前に、細胞に導入する。このような導入は、当該分野で知られた任意の方法により実行することができ、限定するものではないが、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、核酸配列を含むウイルス又はバクテリオファージベクターによる感染、細胞融合、染色体により媒介される遺伝子導入、微小核体により媒介される遺伝子導入、スフェロプラスト融合などが挙げられる。外来遺伝子を細胞に導入する技術分野において、多くの技術が知られており（例えば、Loeffler and Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217: 599-618; Cohen et al., 1993, Meth. Enzymol. 217: 618-644; Cline, 1985, Pharmac. Ther. 29: 69-92参照）、受容細胞の必要な発生的及び生理的機能が破壊されないならば、本発明に従って用いてもよい。当該技術は、核酸は、細胞により発現可能であり、 30
好ましくは遺伝的であり、且つその細胞の子孫により発現可能となるように、核酸の安定な細胞導入をもたらすべきである。

【0218】

得られる組換え細胞は、当該分野で知られている様々な方法により患者に送達することができる。組換え血液細胞（例えば、造血幹又は前駆細胞）は、好ましくは静脈内投与される。使用に想定される細胞の量は、所望の効果、患者の状態などに依存し、当業者によって決定し得る。

【0219】

遺伝子療法を目的として核酸を導入可能な細胞には、任意の所望の利用可能な細胞型が含まれ、限定するものではないが、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、繊維芽細胞、 40
筋細胞、肝細胞; Tリンパ球、Bリンパ球、NK細胞、樹状細胞、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球、自己癌細胞などの血液細胞; 様々な幹細胞又は前駆細胞、特に、造血性の幹細胞又は前駆細胞、例えば、骨髄、臍帯血、末梢血、胎児肝臓などから得られるようなものが挙げられる。

【0220】

好ましい実施形態では、遺伝子療法に用いられる細胞は、患者自身のものである。

【0221】

組換え細胞が遺伝子療法に用いられる一実施形態では、ヌクレオチド配列が細胞又はこれらの子孫により発現可能であるように、1つ以上のA R Pをコードする1つ以上のヌクレオチド配列を細胞に導入し、次いで、組換え細胞を治療効果を得るために *in vivo* 50

oで投与する。具体的な実施形態では、幹細胞又は前駆細胞が用いられる。in vitroで単離し、維持することができる任意の幹細胞及び／又は前駆細胞は、本発明のこの実施形態に従って、潜在的に用いることができる（例えば、PCT公報WO94/08598、1994年4月28日付；Stemple and Anderson, 1992, Cell 71: 973-985；Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229；及びPittelkow and Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61: 771参照）。他の具体的な実施形態では、癌細胞が用いられる。

【0222】

具体的な実施形態では、遺伝子療法の目的で導入される核酸は、コード領域に実行可能に結合された恒常的、組織特異的、又は誘導性のプロモーターを含む。好ましい実施形態では、遺伝子療法を目的として導入される核酸は、転写の適当なインデューサーの存在又は不存在を制御することによって核酸の発現が制御可能となるように、コード領域に実行可能に結合された誘導性プロモーターを含む。

10

【0223】

その他の抗癌療法

本発明は、ARPを単独又はARP以外の1つ以上の予防又は治療薬と組み合わせて含む組成物をそれらを必要とする被検体に投与する過程を含む癌を予防又は治療する方法を提供するものである。その他の治療又は予防薬としては、限定するものではないが、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質、核酸分子、小分子、模倣薬、合成薬、無機分子、及び有機分子が挙げられる。有用であると知られているか、又は癌の予防若しくは治療に用いられていたか若しくは現在用いられている任意の薬剤又は治療法（例えば、化学療法、放射線療法、外科手術、ホルモン療法、及び／又は生物療法／免疫療法）を、本明細書に記載の発明に従って、本発明の組成物と組み合わせて使用することができる。

20

【0224】

このような薬剤の例（すなわち、抗癌剤）としては、限定するものではないが、DNAに相互作用する薬剤として、これらに限定するものではないがアルキル化剤（例えば、クロランブシル、シクロホスファミド、イソファミド（Isofamide）、メクロレタミン、メルファラン、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；チオテパなどのアジリジン；ブスルファンなどのメタンスルホン酸エステル；カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシンなどのニトロソ尿素；シスプラチン、カルボプラチンなどの白金錯体；マイトマイシンなどの生体内還元性アルキル化剤、及びプロカルバジン、ダカルバジン、及びアルトレタミン）；ブレオマイシンなどのDNA切断試薬；インターカレートするトポイソメラーゼII阻害剤、例えば、アムサクリン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、イダルビシン、ミトキサントロンなどのインターカレーター、及びエトポシド及びテニポシドなどの非インターカレーター；インターカレートしないトポイソメラーゼII阻害剤、例えばエトポシド及びテニポシド（Teniposide）；及びDNAマイナーグリーブバインダー、例えば、プリカマイシン（Plicamycin）が挙げられ；代謝アンタゴニストとしては、限定するものではないが、メトトレキセート及びトリメトトレキセートなどの葉酸拮抗薬；フルオロウラシル、フルオロデオキシウリジン、CB3717、アザシチジン、及びフロクスウリジンなどのピリミジンアンタゴニスト；メルカプトプリン、6-チオグアニン、ペントスタチンなどのプリンアンタゴニスト；シタラビン及びフルダラビンなどの糖が修飾された類似体；及びヒドロキシ尿素などのリボヌクレオチド還元酵素阻害剤が挙げられ；チューブリンに相互作用する薬剤としては、限定するものではないが、コルヒチン、ビンクリスチン及びビンブラスチン、両方のアルカロイド及びパクリタキセル及びサイトキサンが挙げられ；ホルモン剤としては、限定するものではないが、エストロゲン、結合型エストロゲン及びエチニルエストラジオール及びジエチルスチルベステロール、クロロトリアニセン（Chlortrianisen）及びイデNSTロール（Idenestrol）；カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、メドロキシプロゲステロン、及びメゲストロールなどのプロゲステン；及びテストステロン、プロピオン酸テストステロンなどのアンドロゲン；フルオキシメステロン、メチルテストステロン；副腎皮質ホルモン剤、例えば、プレ

30

40

50

ドニゾン、デキサメサゾン、メチルプレドニゾン、及びプレドニゾン；黄体形成ホルモンを放出するホルモン剤又はゴナドトロピン放出ホルモン拮抗薬、例えば酢酸ロイプロリド及び酢酸ゴセレリン；抗ホルモン抗体としては、限定するものではないが、タモキシフェンなどの抗エストロゲン薬、フルタミドなどの抗アンドロゲン薬；及びミトタン及びアミノグルテチミドなどの抗アドレナリン薬；サイトカインとしては、限定するものではないが、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-18、TGF- β 、GM-CSF、M-CSF、G-CSF、TNF- α 、TNF- β 、LAF、TCGF、BCGF、TRF、BAF、BDG、MP、LIF、OSM、TMF、PDGF、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、及びウテログロビン（米国特許第5,696,092号）が挙げられ；抗血管新生剤としては、限定するものではないが、VEGF（例えば、その他の中和抗体（Kim他、1992年；Presta他、1997年；Sioussat他、1993年；Kondo他、1993年；Asano他、1995年、米国特許第5,520,914号）、可溶性受容体構築物（Kendall及びThomas、1993年；Aiello他、1995年；Lin他、1998年；Millauer他、1996年）、チロシンキナーゼ阻害剤（Siemeister他、1998年、米国特許第5,639,757号、及び第5,792,771号）、アンチセンス戦略、VEGF又はVEGF受容体に対するRNAアプタマー及びリボザイム（Saleh他、1996年；Cheng他、1996年；Ke他、1998年；Parry他、1999年）；WO98/16551に記載されたような拮抗作用を有するVEGFの変異体；その他の化学的分類の化合物、例えば、米国特許第5,972,922号に記載されているようなアンジオスタチン様4,9(11)ステロイド及びC21酸化ステロイドなどのステロイド；米国特許第5,712,291号及び第5,593,990号に記載のようなサリドマイド及び関連化合物、前駆物質、類似体、代謝物及び加水分解生成物；トロンボスポンジン（TSP-1）及び血小板因子4（PF4）；インターフェロン及びメタロプロテイナーゼ（metalloproteinase）阻害剤；メタロプロテイナーゼの組織阻害剤（TIMP）；抗侵入因子、レチノイン酸及びパクリタキセル（米国特許第5,716,981号）；AGM-1470（Ingber他、1990年）；サメ軟骨抽出物（米国特許第5,618,925号）；アニオン性ポリアミド又はポリウレアオリゴマー（米国特許第5,593,664号）；オキシインドール誘導体（米国特許第5,576,330号）；エストラジオール誘導体（米国特許第5,504,074号）；チアゾロピリミジン誘導体（米国特許第5,599,813号）；及びLM609（米国特許第5,753,230号）；アポトーシス誘導薬としては、限定するものではないが、bcl-1、bcl-2（bcl-1、サイクリンD1と異なる；GenBankアクセッション番号M14745、X06487；米国特許第5,650,491号；及び第5,539,094号）及びBcl-x1、Mcl-1、Bak、A1、A20などのファミリーメンバー、及びアンチセンスヌクレオチド配列（米国特許第5,650,491号；第5,539,094号；及び第5,583,034号）が挙げられ；免疫毒素及びcoagulant、腫瘍ワクチン、及び抗体が挙げられる。

【0225】

本発明の方法に従って用いることが可能な抗癌剤の具体例としては、限定するものではないが、アシピシン；アクラルピシン；アコダゾール塩酸塩；アクロニン；アドゼレシン；アルデスロイキン；アルトレタミン；アンボマイシン（ambomycin）；酢酸アメタントロン；アミノグルテチミド、アムサクリン；アナストロゾール；アンスラマイシン；アスパラギナーゼ；アスパーリン（asperlin）；アザシチジン；アザテパ（azetepa）；アゾトマイシン（azotomycin）；バチマスタット；ベンゾデパ；ビカルタミド；塩酸ビスアントレン；ビスナフィドジメシレート；ビゼレシン；硫酸ブレオマイシン；ブレキナールナトリウム；プロピリミン；プスルファン；Cアクチノマイシン；カルステロン；カラセミド；カルベチマー（carbetimer）；カルボプラチン；カルムスチン；塩酸カルビシン（carbacin hydrochloride）；カルゼレシン；セデフィンゴール；クロランブシル；シロルマイシン（cirolemycin）；シスプラチン；クラドリピン；クリスナトールメシレート；シ

クロホスファミド；シタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイシン；塩酸ダウノルビシン
 ；デシタビン；デキソルマブプラチン；デザグアニン；デザグアニンメシレート；ジアジク
 オン；ドセタキセル；ドキソルビシン；塩酸ドキソルビシン；ドロロキシフェン；クエン
 酸ドロロキシフェン；プロピオン酸ドロモスタノロン；デュアゾマイシン（duazomycin）
 ；エダトレキサート；塩酸エフロルニチン；エルサミトルシン（elsamitrucin）；エンロ
 プラチン；エンプロマート；エピプロピジン；塩酸エピルビシン；エルブロゾール（erbu
 lozole）；塩酸エソルビシン（esorubicin hydrochloride）；エストラムスチン；エスト
 ラムスチンリン酸ナトリウム；エタニダゾール；エトポシド；リン酸エトポシド；エトプ
 ライン（etoprine）；塩酸ファドロゾール；ファザラビン；フェンレチニド；フロクスウ
 リジン；リン酸フルダラビン；フルオロウラシル；フルオロシタビン；ホスキドン；ホス
 トリエシンナトリウム；ゲムシタビン；塩酸ゲムシタビン；ヒドロキシウレア；塩酸イダ
 ルビシン；イホスファミド；イルモホシン；インターロイキン I I（組み換えインターロ
 イキン I I 又は r I L 2 を含む）、インターフェロン アルファ-2 a；インターフェロ
 ン アルファ-2 b；インターフェロン アルファ-n 1；インターフェロン アルファ
 -n 3；インターフェロン ベーター I a；インターフェロン ガンマー I b；イプロブ
 ラチン；塩酸イリノテカン；酢酸ランレオチド；レトロゾール；酢酸ロイプロリド；塩酸
 リアロゾール；ロメトレキソールナトリウム；ロムスチン；塩酸ロソキサントロン；マソ
 プロコール；マイタンシン；塩酸メクロレタミン；酢酸メゲストロール；酢酸メレンゲス
 トロール；メルファラン；メノガリル；メルカプトプリン；メトトレキサート；メトトレ
 キサートナトリウム；メトプライン；メツレデパ；ミチンドミド；ミトカルシン（mitoca
 rcin）；ミトクロミン；ミトジリン（mitogillin）；マイトマルシン（mitomalcin）；マ
 イトマイシン；ミトスパー（mitosper）；ミトタン；塩酸ミトキサントロン；ミコフェノ
 ール酸；ノコダゾール；ノガラマイシン；オルマブプラチン；オキシスラン；パクリタキセ
 ル；ペガスパルガーゼ；ペリオマイシン（peliomycin）；ペンタムスチン；硫酸ペプロマ
 イシン；ペルホスファミド；ピポブroman；ピポスルファン；塩酸ピロキサントロン；プ
 リカマイシン；プロメスタン；ポルフィマーナトリウム；ポルフィロマイシン；プレドニ
 ムスチン；塩酸プロカルバジン；ピューロマイシン；塩酸ピューロマイシン；ピラゾフリ
 ン；リボプリン；ログレチミド；サフィンゴール；塩酸サフィンゴール；セムスチン；シ
 ムトラゼン；スパーフォセート（sparfosate）ナトリウム；スパルソマイシン；塩酸スピ
 ロゲルマニウム；スピロムスチン；スピロプラチン；ストレプトニグリン；ストレプトゾ
 シン；スロフェヌル；タリソマイシン；テコガラナトリウム；テガフル；塩酸テトキサ
 ントロン；テモポルフィン；テニポシド；テロキシロン；テストラクトン；チアミプリン
 ；チオグアニン；チオテバ；チアゾプリン；チラパザミン；クエン酸トレミフェン；酢酸
 トレストロン（trestolone acetate）；リン酸トリシリピン；トリメトレキサート；グル
 クロン酸トリメトレキサート；トリプトレリン；塩酸ツブプロゾール；ウラシルマスタード
 ；ウレデパ；バプレオチド；ベルテポルフィン；硫酸ビンブラスチン；硫酸ビンクリスチ
 ン；ビンデシン；硫酸ビンデシン；硫酸ビネピジン（vinepidine sulfate）；硫酸ビング
 リシネート；硫酸ビンロイロシン（vinleurosine sulfate）；酒石酸ビノレルビン；硫酸
 ビンロシジン（vinrosidine sulfate）；硫酸ビンゾリジン（vinzolidine sulfate）；ボ
 ロゾール；ゼニプラチン；ジノスタチン；塩酸ゾルビシンが挙げられる。その他の抗癌剤
 としては、限定するものではないが、20-エピー-1,25ジヒドロキシビタミンD3；
 5-エチニルウラシル；アビラテロン；アクラルビシン；アシルフルベン；アデシペノー
 ル（adecypenol）；アドゼレシン；アルデスロイキン；全TKアンタゴニスト；アルトレ
 タミン；アンバムスチン；アミドックス（amidox）；アミホスチン；アミノレブリン酸；
 アムルビシン；アムサクリン；アナグレリド；アナストロゾール；アンドログラホリド；
 血管形成阻害剤；アンタゴニストD；アンタゴニストG；アンタレリクス；抗背側化形態
 形成タンパク質-1；抗アンドロゲン、前立腺癌；抗エストロゲン剤；抗新生物薬；アン
 チセンスオリゴヌクレオチド；グリシン酸アフィジコリン；アポトーシス遺伝子修飾因子
 ；アポトーシス制御因子；アプリン酸；a r a-C D P-D L-P T B A；アルギニンデ
 アミナーゼ；アシュラクリン（asulacrine）；アタメスタン；アトリムスチン；アキシナ

10

20

30

40

50

スタチン (axinastatin) 1 ; アキシナスタチン 2 ; アキシナスタチン 3 ; アザセトロン
 ; アザトキシン ; アザチロシン ; バッカチン I I I 誘導体 ; バラノール (balanol) ; バ
 チマスタット ; B C R / A B L アンタゴニスト ; ベンゾクロリン ; ベンゾイルスタウロス
 ポリン ; ベータラクタム誘導体 ; ベータアラチン ; ベータクラマイシン B ; ベツリン酸
 ; b F G F 阻害剤 ; ビカルタミド ; ビサントレン ; ビサジリジニルスパーミン (bisaziri
 dinylspermine) ; ビスナフィド ; ビストラテン (bistratene) A ; ビゼレシン ; ブレフ
 レート (breflate) ; プロピリミン ; ブトチタン ; ブチオニンスルホキシミン ; カルシポ
 トリオール ; カルホスチン C ; カンプトセシン誘導体 ; カナリア痘 I L - 2 ; カペシタビ
 ン ; カルボキサミドアミノトリアゾール ; カルボキサミドトリアゾール ; C a R e s
 t M 3 ; C A R N 7 0 0 ; 軟骨由来の阻害剤 ; カルゼレシン ; カゼインキナーゼ阻害 10
 剤 (I C O S) ; カスタノスパーミン ; セクロピン B ; セトロレリクス ; クロリン類 (ch
 lorlins) ; クロロキノキサリンスルホンアミド ; シカプロスト ; シスープロフィリン ; ク
 ラドリピン ; クロミフェン類似体 ; クロトリマゾール ; コリスマイシン (collismycin)
 A ; コリスマイシン B ; コンプレタスタチン A 4 ; コンプレタスタチン類似体 ; コナゲニ
 ン ; クランベシジン 8 1 6 ; クリスマトール ; クリプトフィシン (cryptophycin) 8 ; ク
 リプトフィシン A 誘導体 ; キュラシン A ; シクロペンタントラキノン ; シクロプラタム (c
 ychoplatam) ; サイペマイシン (cypemycin) ; シタラビンオクホスファート ; 細胞溶解
 因子 ; サイトスタチン ; ダクリキシマブ (decliximab) ; デシタピン ; デヒドロダイデム
 ニン B ; デスロレリン ; デキサメタゾン ; デキシホスファミド ; デクスラゾキサラン ; デク
 スベラパミル ; ジアジキノン ; ダイデムニン B ; d i d o x ; ジエチルノルスパーミン ; 20
 ジヒドロ5-アザシチジン ; ジヒドロタキソール, 9- ; ジオキサマイシン ; ジフェニ
 ルスピロムスチン ; ドセタキセル ; ドコサノール ; ドラセトロン ; ドキシフルリジン ; ド
 ロロキシフェン ; ドロナビノール ; デュオカルマイシン S A ; エブセレン ; エコムスチン
 ; エデルホシン ; エドレコロマブ ; エフロルニチン ; エレメン ; エミテフル ; エピルビシ
 ン ; エプリステロイド ; エストラムスチン類似体 ; エストロゲンアゴニスト ; エストロゲ
 ンアンタゴニスト ; エタニダゾール ; リン酸エトポシド ; エキセメスタン ; ファドロゾー
 ル ; ファザラビン ; フェンレチニド ; フィルグラスチム ; フィナステリド ; フラボピリド
 ール ; フレゼラスチン ; フルアステロン ; フルダラビン ; 塩酸フルオロダウノルニシン (f
 luorodaunorunicin hydrochloride) ; ホルフェニメクス ; ホルメスタン ; ホストリエシ
 ン ; ホテムスチン ; ガドリニウムテキサフィリン ; 硝酸ガリウム ; ガロシタピン ; ガニレ 30
 リクス ; ゼラチナーゼ阻害剤 ; ゲムシタピン ; グルタチオン阻害剤 ; ヘプスルファム ; ヘ
 レグリン ; ヘキサメチレンビスアセタミド ; ヒペリシン ; イバンドロン酸 ; イダルビシン
 ; イドキシフェン ; イドラマントン ; イルモホシン ; イロマスタット ; イミダゾアクリド
 ン類 ; イミキモド ; 免疫賦活ペプチド ; インスリン様成長因子 1 受容体阻害剤 ; インター
 フェロンアゴニスト ; インターフェロン類 ; インターロイキン類 ; イオベングアニン ; ヨ
 ードドキソルビシン ; イポメアノール (ipomeanol) , 4- ; アイロプラクト (iropact
) ; イルソグラジン ; イソベンガゾール ; イソホモハリコンドリニン B ; イタセトロン ; ジ
 ャスプラキノリド ; カハラライド F ; ラメラリン-N トリアセテート ; ランレオチド ;
 レイナマイシン ; レノグラスチム ; レンチナン硫酸 ; レプトルスタチン (leptolstatin)
 ; レトロゾール ; 白血病阻害因子 ; 白血病アルファインターフェロン ; ロイプロリド+エ 40
 ストロゲン+プロゲステロン ; ロイプロレリン ; レバミゾール ; リアロゾール ; 線形ポリ
 アミン類似体 ; 脂肪親和性二糖ペプチド ; 脂溶性白金化合物 ; リソクリンアミド (lissoc
 linamide) 7 ; ロバプラチン ; ロンブリシン ; ロメトレキソール ; ロニダミン ; ロソサン
 トロン (losoxantrone) ; ロバスタチン ; ロキソリピン ; ラートテカン (lurtotecan) ;
 ルテチウムテキサフィリン ; リソフィリン ; 細胞溶解性ペプチド ; マイタンシン ; マンノ
 スタチン A ; マリマスタット ; マソプロコール ; マスピン ; マトリリシン阻害剤 ; マトリ
 クスメタロプロテイナーゼ阻害剤 ; メノガリル ; メルバロン (merbarone) ; メテレリン
 ; メチオニナーゼ ; メトクロプラミド ; M I F 阻害剤 ; ミフェプリストン ; ミルテホシン
 ; ミリモスチム ; 不適正二本鎖 R N A ; ミトグアゾン ; ミトラクトール ; マイトマイシン
 類似体 ; ミトナフィド (mitonafide) ; マイトトキシニン繊維芽細胞成長因子-サポリン ; 50

ミトキサントロン；モファロテン；モルグラモスチム；モノクローナル抗体、ヒト絨毛性
 ゴナドトロピン；モノホスホリル脂質A＋ミコバクテリウム（myobacterium）細胞壁s k
 ；モピダモール；多剤耐性遺伝子阻害剤；多発性腫瘍サプレッサー1型療法；マスタード
 抗癌剤；ミカペルオキシド（mycaperoxide）B；マイコバクテリア細胞壁抽出物；ミリア
 ポロン（myriaporone）；N－アセチルジナリン；N－置換ベンズアミド類；ナファレリ
 ン；ナグレスチブ（nagrestip）；ナロキソン＋ペンタゾシン；napavin；ナフテ
 ルピン；ナルトグラスチム；ネダプラチン；ネモルピシン；ネリドロン酸；中性エンドペ
 プチダーゼ；ニルタミド；ニサマイシン；一酸化窒素モジュレータ；窒素酸化物酸化防止
 剤；ニトルリン（nitruillyn）；O6－ベンジルグアニン；オクトレオチド；オキセノン
 ；オリゴヌクレオチド類；オナプリストン；オندانセトロン；オندانセトロン；オラ
 シン（oracin）；口腔のサイトカイン誘導因子；オルマプラチン；オサテロン；オキサリ
 プラチン；オキサウノマイシン；パクリタキセル；パクリタキセル類似体；パクリタキセ
 ル誘導体；パラウアミン；パルミトイルリゾキシシン；パミドロン酸；パナキシトリオール
 ；パノミフェン；パラバクチン；パゼリプチン；ペガスパルガーゼ；ペルデシン；多硫酸
 ペントサンナトリウム；ペントスタチン；ペントロゾール（pentroazole）；ペルフルブロ
 ン；ペルホスファミド；ペリリルアルコール；フェナジノマイシン；酢酸フェニル；ホス
 ファターゼ阻害剤；ピシバニール；塩酸ピロカルピン；ピラルピシン；ピリトレキシム；
 プラセチンA；プラ
 セチンB；プラスミノゲン活性化因子阻害剤；白金錯体；白金化合物；白金－トリアミ
 ン錯体；ポルフィマーナトリウム；ポルフィロマイシン；プレドニゾン；プロピルビスー
 アクリドン；プロスタグランジンJ2；プロテアソーム阻害剤；プロテインAベースの免
 疫変調成分；プロテインキナーゼC阻害剤；プロテインキナーゼC阻害剤、微細藻類；タ
 ンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤；プリンヌクレオシドホスホリラーゼ阻害剤；プ
 ルプリン類；ピラゾロアクリジン；ピリドキシル化ヘモグロビンポリオキシエチレン結合
 体；rafアンタゴニスト；ラルチトレキセド；ラモセトロン；rasファルネシルタン
 パク質トランスフェラーゼ阻害剤；ras阻害剤；ras－GAP阻害剤；脱メチル化レ
 テリプチン；レニウムRe186エチドロネート；リゾキシシン；リボザイム；RIIレチ
 ンアミド；ログレチミド；ロヒツキン（rohitukine）；ロムルチド；ロキニメクス；ルビ
 ギノン（rubiginone）B1；ルボキシル；サフィンゴール；セイントピン；SarCNU
 ；サルコフィトールA；サルグラモスチム；Sdi1模倣剤；セムスチン；老化誘導阻害
 剤1；センスオリゴヌクレオチド；情報伝達阻害剤；情報伝達調整因子；一本鎖抗原結合
 タンパク質；シゾフィラン；ソブゾキサシン；ボロカプタートナトリウム；フェニル酢酸ナ
 トリウム；ソルベロール（solverol）；ソマトメジン結合タンパク質；ソネルミン；スパ
 ルホス酸；スピカマイシンD；スピロムスチン；スプレノペンチン；スポンジスタチン1
 ；スクワラミン；幹細胞阻害剤；幹細胞分裂阻害剤；スティピアミド；ストロメリシン阻
 害剤；スルフィノシン（sulfinosine）；超活性血管活性腸管ペプチドアンタゴニスト；
 スラジスタ（suradista）；スラミン；スワインソニン；合成グリコサミノグリカン；タ
 リムスチン；5－フルオロウラシル；ロイコボリン；タモキシフェンメチオダイド；タウ
 ロムスチン；タザロテン；テコガランナトリウム；テガフル；テルラピリリウム；テロメ
 ラーゼ阻害剤；テモボルフィン；テモゾロマイド；テニポシド；テトラクロロデカオキシ
 ド；テトラゾミン（tetrazomine）；タリブラスチン（thaliblastine）；チオコラリン；
 トロンボポイエチン；トロンボポイエチン模倣剤；チマルファシン；チモポイエチン受容
 体アゴニスト；チモトリナン；甲状腺刺激ホルモン；錫エチルエチオプルプリン；チラパ
 ザミン；チタノセン2塩化物；トプセンチン；トレミフェン；全能性幹細胞因子；翻訳阻
 害剤；トレチノイン；トリアセチルウリジン；トリシリピン；トリメトレキサート；トリ
 プトレリン；トロピセトロン；ツロステリド；チロシンキナーゼ阻害剤；チロホスチン；
 UBC阻害剤；ウベニメクス；尿生殖洞誘導成長阻害因子；ウロキナーゼ受容体アンタゴ
 ニスト；バプレオチド；バリオリンB；ベクター系、赤血球遺伝子治療；サリドマイド；
 ベラレソール；ベラミン；バーディン（verdins）；ベルテボルフィン；ビノレルビン；
 ビンクサルチン（vinxaltine）；バイタクシン；ボロゾール；ザノテロン（zanoterone）

10

20

30

40

50

；ゼニプラチン；ジラスコルブ；及びジノスタチンスチマラマーが挙げられる。

【0226】

本発明は、癌細胞を破壊するためのx線、ガンマ線及びその他の放射線源の使用を含む放射線療法と組み合わせたARPを含む組成物の投与も包含する。好ましい実施形態では、放射線治療は、放射がリモートソースから向けられる外照射療法又は遠隔療法として施される。その他の好ましい実施形態では、放射線治療は放射線源が癌細胞又は腫瘍に近い身体内部に配置される内科治療又は近接照射療法として施される。

【0227】

好ましい実施形態では、本発明の組成物は、免疫応答を刺激する際、及び／又は癌の予防又は治療の際に、インターロイキン-18 (IL-18)、CD40リガンド、インターフェロン γ (IFN γ)、インターロイキン-4 (IL-4)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、その他のサイトカイン、抗CD40抗体及び共刺激アゴニストと組み合わせて用いられる。具体的な実施形態では、本発明のARPは、これらの薬剤と共に相乗的な免疫刺激効果を示すであろう。

【0228】

具体的な実施形態では、限定するものではないが、 P^{32} 療法などの腹腔内放射線療法、全腹部及び骨盤放射線療法、シスプラチン、パクリタキセル (タキソール) 又はドセタキセル (タキソテール) 及びシスプラチン又はカルボプラチンの組合せ、シクロホスファミド及びシスプラチンの組合せ、シクロホスファミド及びカルボプラチンの組合せ、5-FU及びロイコボリンの組合せ、エトポシド、リポソームのドキソルビシン、ゲムシタビン或いはトポテカンなどの卵巣癌の治療に有用な1つ以上の予防上又は治療上有効な量のその他の薬剤と組み合わせて、ARPを含む予防上又は治療上有効な量の組成物を卵巣癌患者に投与する。特に好ましい実施形態では、本発明の予防上又は治療上有効な量の組成物は、白金に抵抗性の疾患が認められる患者に対し、一般にタキソールの投与と組み合わせて投与される。更なる実施形態は、白金に抵抗性の疾患が認められる患者にイホスファミド、シスプラチン製剤をベースにした併用投薬計画の失敗後の救急療法としてヘキサメチルメラミン (HMM)、及びそれらの腫瘍における細胞質内のエストロゲン受容体の検出レベルにある患者にタモキシフェンの投与を含む、難治性の卵巣癌患者の治療である。

【0229】

癌治療法並びにそれらの投薬量、投薬経路及び推奨される使用法は、当該技術分野で知られており、Physician's Desk Reference (第56版、2002年) のような文献に記載されている。

【0230】

その他の抗感染剤

本発明は、感染症を予防又は治療する方法であって、それらの必要な被検体に、ARPを単独で又はARP以外の1つ以上の予防又は治療薬と組み合わせて含む組成物を投与する過程を含む方法を提供するものである。有用であると知られている、又は感染症の予防若しくは治療に使用されてきたか若しくは現在使用されている任意の薬剤又は治療法を、本明細書に記載の本発明に従って、本発明の組成物と組み合わせて用いることができる。

【0231】

このような細菌感染を治療するための薬剤の例としては、限定するものではないが、葉酸拮抗薬 (例えば、マフェニド、スルファジアジン銀、琥珀酸スルファチアゾール、スルファセタミド、スルファジアジン、スルファメトキサゾール、スルファサラジン、スルフィソキサゾール、ピリメタミン (pyrimethoamine)、トリメトプリム、コトリモクサゾール)、細胞壁合成の阻害剤 (例えば、ペニシリン、セファロスポリン、カルバペネム、モノバクタム、バンコマイシン (vancomycin)、バシトラシン、クラブラン酸、スルバクタム、タゾバクタム)、タンパク質合成阻害剤 (例えば、テトラサイクリン、アミノグリコシド、マクロライド、クロラムフェニコール、クリンダマイシン)、フルオロキノロン (例えば、シプロフロキサシン (ciprofloxacin)、エノキサシン、ロメフロキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン)、ナリジクス酸、メセナミン、ニトロフランチン、ア

10

20

30

40

50

ミノサリチル酸、サイクロセリン、エタンブトール、エチオナミド、イソニアジド、ピラチナミド、リファンピン、クロファジミン、及びダプソンが挙げられる。

【0232】

ARPと組み合わせて用いることができる真菌感染を治療するための薬剤の例としては、限定するものではないが、アンホテリシンB、フルコナゾール、フルシトシン、イトラコナゾール、ケトコナゾール、クロトリマゾール、エコナゾール、グリセオフルビン、ミコナゾール、及びニスタチンが挙げられる。

【0233】

ARPと組み合わせて用いることができる原虫感染を治療するための薬剤の例としては、限定するものではないが、クロロキン、デヒドロエメチン、ジロキサニドフロエート、エメチン、メトロニダゾール、パラモマイシン、クロロキン、メフロキン、プリマキン、ピリメタミン、キニーネ、キニジン、メラルソプロール、ニフルティモックス、ペンタミジン、スラミン、スチボグルコン酸ナトリウム、ピリメタミン、及びキナクリンが挙げられる。 10

【0234】

ARPと組み合わせて用いることができる蠕虫（寄生虫）感染を治療するための抗蠕虫薬剤の例としては、限定するものではないが、イベルメクチン、メベンダゾール、ピランテルパモエート、チアベンダゾール、プラジカンテル、及びニクロサミドが挙げられる。

【0235】

ARPと組み合わせて用いることができるウイルス感染を治療するための抗ウイルス薬の例としては、限定するものではないが、アマンタジン、リバビリン、リマンタジン、アシクロビル、ファムシクロビル、フォスカーネット、ガンシクロビル、トリフルリジン、ビダラビン、ジダノシン（ddI）、スタブジン（d4T）、ザルシタビン（ddC）、ジドブジン（AZT）、ラミブジン、アバカビル、デラビルジン、ネビラピン、エファビレンツ、サキナビル、リトナビル、インジナビル、ネルフィナビル、アンプレナビル、ロピナビル及びインターフェロンが挙げられる。 20

【0236】

投与計画

本発明の予防及び／又は治療プロトコルの毒性及び有効性は、例えば、LD₅₀（集団の50%が死に至る量）及びED₅₀（集団の50%に治療効果のある量）を決定するための細胞培養又は動物実験の標準的な製剤手順により決定できる。毒性と治療効果間の用量比が治療指数であり、LD₅₀／ED₅₀の比として表すことができる。高い治療指数を示す予防及び／又は治療薬が好ましい。毒性の副作用を示す予防及び／又は治療薬を用いても良いが、非感染細胞に対する潜在的損害を最小化し、それにより副作用を低減するために、このような薬剤を感染組織部位に向ける送達システムは注意して設計すべきである。 30

【0237】

細胞培養試験及び動物試験から得られるデータは、ヒト使用のための予防及び／又は治療薬の用量範囲を決定するのに用いることができる。このような薬剤の用量は、毒性がわずか又は毒性の無いED₅₀を包含する血中濃度範囲内にあることが好ましい。用量は、採用した用量及び利用した投与経路によって、このような範囲内で変更してもよい。本発明に用いられる任意の薬剤では、治療に有効な量は、最初に細胞培養試験から見積もることができる（5.6節及び12節参照）。用量は、細胞培養で決定されるIC₅₀（すなわち、症状の最大阻害の半分を達成する試験化合物の濃度）を包含する循環血漿濃度範囲を達成するために動物モデルで決定されてもよい。このような情報は、ヒトで有用な用量をより正確に決定するのに用いることができる。例えば、血漿レベルは、高速液体クロマトグラフィーにより測定してもよい。 40

【0238】

特定の障害又は病状の治療に効果的な本発明の組成物量は、障害又は病状の性質に依存し、標準的臨床技術によって決定することができる。製剤に用いられる正確な用量は、投 50

与経路及び疾患又は障害の重症度にも依存し、施術者の判断及び各患者の状況によって決定する必要がある。

【0239】

本発明により提供されるヒト患者に静脈内投与するARPの用量は、好ましくは100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重未満、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重未満、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重未満、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重未満、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重未満、0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重未満、0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重未満、0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重未満、0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重未満、又は0.001 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重未満である。好ましい実施形態では、ARPは一人当たり一日に付き0.1 μg の用量で与えられる（又は約0.14 ng/kg 体重）。

【0240】

インフルエンザウイルスの感染を治療する場合には、ヒトを治療するための用量は、マウス1匹当たり約10,000 ngであると見出されているマウスの好適な用量から導くことができる。体重が異なることを考えると、ヒトで匹敵する用量は28 mgであろう。本発明を用いたヒト患者におけるインフルエンザウイルス感染の治療では、用量は好ましくは約2.8 mgから約280 mg、より好ましくは約5 mgから約100 mg、最も好ましくは約10 mgから約50 mgである。

【0241】

最初の総量を投与する前に、各患者は少量（例えば、処方された量の1/100から1/10）の本発明の組成物の皮下注射を受けて、任意の急性の過敏症を検出することが好ましい。注射部位を、試験後1～2時間検査する。もし何の反応も検出されなければ、その後総量を投与する。

【0242】

本発明の組成物は、経口投与することも可能である。一実施形態では、アピコンプレクサ属（例えば、アイメリアテネラ）の無処置の孢子形成オーシストを飲料水と共に経口で与える。投与量は、原虫の異種間の感染力によるが、一例としては、単回投与で100から10,000 オーシストであってもよい。

【0243】

本発明の組成物は、様々な形態で投与することができる。一実施形態では、本発明の組成物は膜結合型のARPを含む。他の実施形態では、本発明の組成物は、組換えARPを発現している生きている又は死んでいる細菌を含む。他の実施形態では、本発明の組成物は、組換えARPを発現している特定の臓器に特異的な生細菌を含む（例えば、乳酸桿菌属は、腸組織で生存するであろうが、ある種の空気感染性非病原性細菌は、肺又は鼻腔などに特異的であろう）。

【0244】

投与法、処方及びキット

本発明は、有効量のARPを含む組成物を被検体に投与することによる治療及び／又は予防方法を提供するものである。好ましい態様では、ARPを精製する。被検体は、好ましくは動物であり、限定するものではないが、ウシ、ブタ、ニワトリなどの動物が挙げられ、また、好ましくは哺乳動物である。好ましい実施形態では、被検体は家畜であり、限定するものではないが、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ及びウマが挙げられる。他の実施形態では、被検体はペットであり、限定するものではないが、ネコ、イヌ、及びトリが挙げられる。他の好ましい実施形態では、被検体はヒトである。

【0245】

例えば、リボソーム、微粒子、マイクロカプセルへの封入、組換え細胞による発現、受容体により媒介されるエンドサイトーシス（例えば、Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432参照）、レトロウイルス又は他のベクターの一部としてのARP核酸の構築などの様々な送達システムが知られており、本発明の組成物を投与するのに用いることができる。導入方法としては、限定するものではないが、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内及び経口ルートが挙げられる。本化合物は、例えば、注入又は大量瞬時投与によるもの、上皮又は粘膜皮膚の上皮（例えば、口腔粘膜、直腸及び腸管粘膜など）を

10

20

30

40

50

介した吸収によるものなどの任意の好都合な経路により投与してもよく、また、他の生理活性物質と共に投与してもよい。投与は、全身又は局所的であってもよい。

【0246】

具体的な実施形態では、治療に必要な領域に本発明の医薬組成物を局所的に投与することが望まれるであろう。これは、例えば、外科手術の間の局所注入により、例えば外科手術後の創傷包帯と併せた局所適用により、注射により、カテーテル手段により、座薬手段により、又はインプラント手段により達成するであろう。前記インプラントは、多孔性、非多孔性、又はゲル状物質のものであってもよく、シアラスティック膜 (sialastic membrane) などの膜、又は繊維が挙げられる。一実施形態では、投与は悪性腫瘍又は腫瘍性若しくは前癌性組織の部位 (又は前部位) に直接注射することによってもよい。

10

【0247】

他の実施形態では、特定の領域を標的にするためにARPのキメラ構造物が用いられる、すなわち、組成物の全身投与でさえ、選ばれた臓器が組成物の標的にされるであろう (例えば、ARPと融合した特定の種類の癌に対する抗体が、このキメラ構造物を腫瘍表面に送達させるであろう。) 。

【0248】

具体的な実施形態では、例えばレトロウイルスベクターの使用による (米国特許第4,980,286号参照) といった、適当な核酸発現ベクターの一部として構築し、細胞内に含まれるように投与することにより、或いは直接注射により、或いは微粒子照射 (例えば、遺伝子銃; Biolistic、Dupont社製)、又は脂質若しくは細胞表面受容体若しくはトランスフェクション試薬によるコーティングの利用により、或いは核に入ることが知られているホメオボックス様ペプチドに結合させて投与することによる (例えば、Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 1864-1868参照) などにより、ARP核酸を *in vivo* で投与して、そのコードされたタンパク質の発現を促進することができる。或いは、ARP核酸を細胞内に導入し、相同組換えによって発現させるために宿主細胞DNA内に組み入れることができる。

20

【0249】

本発明は、また、医薬組成物を提供するものである。このような組成物は、本発明の治療上有効な量の組成物、及び医薬上許容される担体又は賦形剤を含む。このような担体としては、限定するものではないが、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、及びこれらの組合せが挙げられる。担体及び組成物は、無菌であってもよい。処方は、投与型に適應させる必要がある。

30

【0250】

本組成物は、所望により、少量の湿潤剤若しくは乳化剤、又はpH緩衝剤を含むこともできる。本組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、ピル、カプセル、徐放性製剤、又は粉末であってもよい。本組成物は、従来の結合剤及びトリグリセリドなどの担体を有する座薬として処方されることができる。経口製剤としては、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的な担体を含むことができる。

【0251】

好ましい実施形態では、本組成物は、ヒトへの静脈内投与に用いられる医薬組成物として通常の手順に従って処方される。典型的には、静脈内投与用の組成物は、無菌等張水性緩衝液に入れた溶液である。必要な場合には、組成物は注射部位の痛みを和らげるために可溶化剤及びリグノカインなどの局所的麻酔薬も含んでもよい。一般的には、成分は別々又は単回投与形態で一緒に混合して、例えば、凍結乾燥粉末又は水を含まない濃縮物として、活性物質の量が示してあるアンプル又はサシェなどの密閉した密封容器中で供給される。注入により組成物が投与される場合には、医薬品グレードの滅菌水又は生理食塩水を含む注入容器に分注し得る。組成物を注射により投与する場合には、注射用の滅菌水又は生理食塩水のアンプルを、投与前に成分を混合することができるよう提供することができる。

40

50

【0252】

本発明の組成物は、中性又は塩型として処方し得る。医薬上許容可能な塩としては、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などから誘導されるものなどの遊離アミノ基を用いて形成されるもの、及び、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、水酸化第2鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどから誘導されるものなどの遊離のカルボキシ基を用いて形成されるものが挙げられる。

【0253】

一実施形態では、精製したアピコンプレクサ門の生物を経口で与える。具体的な実施形態では、無処置のアピコンプレクサ属（例えば、アイメリアテネラなどのアイメリア種）の孢子形成オーシストを飲料水と共に経口で与える。

10

【0254】

従前に記載の処方に加えて、本発明の組成物はデポー製剤として処方されてもよい。このような長時間作用性の製剤は、埋め込み（例えば、皮下又は筋肉内に）又は筋肉内注射により投与されてもよい。したがって、例えば、本組成物は、好適なポリマー又は疎水性物質（例えば、許容可能な油のエマルジョン）又はイオン交換樹脂を用いて、或いは難溶性誘導体、例えば、難溶性塩として処方してもよい。リポソーム及びエマルジョンは、親水性薬剤のためのよく知られた送達媒体又は担体の例である。

【0255】

本発明の組成物は、所望により、活性成分を含む1回以上の投与形態を含むことができる包装又はディスペンサ装置に入れて提供してもよい。包装としては、例えば金属又はブリスターパックなどのプラスチックフォイルを含む。包装又はディスペンサ装置には、投与の指示書が添えられていてもよい。

20

【0256】

本発明は、本発明の治療内容を実行するためのキットも提供する。このようなキットは、1つ以上の容器に、治療上又は予防上有効な量の本発明の組成物を医薬上許容可能な形態で含む。本発明のキットのバイアルに含まれる組成物は、例えば、滅菌生理食塩水、デキストロース溶液、又は緩衝溶液、又はその他の医薬上許容可能な滅菌流体と組み合わせた、医薬上許容可能な溶液の形態であってもよい。或いは、本組成物は、凍結乾燥又は乾燥させていてもよい。この例では、キットは、注射用に溶液を形成するために組成物を戻すために、任意にさらに容器中に医薬上許容可能な溶液（例えば、生理食塩水、デキストロース溶液など）、好ましくは滅菌されたものを含む。

30

【0257】

他の実施形態では、本発明のキットは、さらに製剤を注射するための針又はシリンジ、好ましくは滅菌形態で包装されたもの、及び／又は包装したアルコールパッドを含む。臨床家による又は患者による本発明の製剤の投与のために任意に指示書が含まれる。

【0258】

ある実施形態では、本発明は、1回の投与に十分な量の本発明の組成物を含む医薬製剤又は医薬組成物をそれぞれ含む複数の容器を含むキットを提供するものである。

【0259】

具体的な実施形態では、キットはA R Pを含む組成物を含む第1の容器；及び第1の容器のA R Pの投与前、同時、又は後に投与する場合に、各成分の単独投与の効果以上に全体の治療効果を改善するために有効な量、又は、各成分を単独で使用する場合に治療の副作用を減少させるために有効な量の異なる治療法を含む第2の容器を含む。好ましい具体的な実施形態では、本発明は、第1の容器に本発明の組成物を含み、第2の容器に精製したサイトカインを含む組成物を含むキットを提供するものである。

40

【0260】

化学療法薬、放射線療法、及びサイトカインなどの生物製剤／免疫治療薬などの治療法のための適当かつ推奨される投与量、処方、及び投与経路が当該分野で知られており、Physician's Desk Reference（第56版、2002年）のような文献に記載されている。

50

【0261】

製品

本発明は、最終梱包し、ラベルした医薬品も包含する。この製品は、ガラス製バイアル又はその他の密閉容器などの適当な器又は容器内に適当な回数分の投与形態を含む。非経口投与に好適な投薬形態の場合には、活性成分は滅菌してあり、粒子状物質を含まない溶液として投与するのに好適である。すなわち、本発明は非経口溶液及び凍結乾燥粉末の両方を含み、各々滅菌されており、後者は注射前に再組成するのに適している。或いは、単回投与形態は、経口、経皮、局所又は粘膜送達に適した固体であってもよい。

【0262】

好ましい実施形態では、単回投与形態は静脈内、筋肉内、又は皮下送達に好適である。したがって、本発明は、溶液、好ましくは滅菌され、各送達経路に適したものを含む。 10

【0263】

他の好ましい実施形態では、本発明の組成物は、限定するものではないが、レシチン、タウロコール酸、及びコレステロールなどの生体適合性界面活性剤；又は、限定するものではないが、 γ グロブリン及び血清アルブミンなどのその他のタンパク質と共に容器に貯蔵されている。さらに好ましくは、本発明の組成物は、ヒト用途ではヒト血清アルブミンと共に貯蔵されており、また、獣医学用途ではウシ血清アルブミンと共に貯蔵されている。任意の理論に捉われないが、低濃度のARPは、プラスチック製又はガラス製容器の表面で変性される傾向にある。本明細書に記載の取扱い法及び貯蔵法によれば、容器表面のARPの損失を最小限に抑え、ARPを活性状態で保つであろう。当該技術分野で知られたその他の方法も使用することができる。Wang, International J. of Pharmaceutics, 185 : 129-188 (1999)参照。 20

【0264】

任意の医薬品と同様に、包装材料及び容器は、貯蔵及び輸送の間生成物の安定性を保護するために設計される。さらに、本発明の製品は、使用説明書又は医者、技術者、又は患者に、問題の疾患又は障害の適切な予防又は治療の仕方を助言するその他の情報提供材料を含む。すなわち、製品には、限定するものではないが、実際の投与量、観察方法（平均絶対リンパ球数、腫瘍細胞数、及び腫瘍サイズを観察するための方法など）及びその他の観察情報などの投与方法を示し、又は提案する説明手段が含まれる。

【0265】

さらに具体的には、本発明は、箱、ビン、チューブ、バイアル、コンテナ、噴霧器、吸入器、静注用（i. v.）バッグ、膜（envelope）などの包装材料；及び少なくとも前記包装材料内に含まれる単回投与形態の医薬品を1つ含む製品を提供するものである。本発明は、箱、ビン、チューブ、バイアル、コンテナ、噴霧器、吸入器、静注用（i. v.）バッグ、膜（envelope）などの包装材料；及び少なくとも前記包装材料内に含まれる単回投与形態の医薬品を各々含む製品を提供するものでもある。本発明はさらに、箱、ビン、チューブ、バイアル、コンテナ、噴霧器、吸入器、静注用（i. v.）バッグ、膜（envelope）などの包装材料；及び少なくとも前記包装材料内に含まれる単回投与形態の医薬品を各々含む製品を提供するものでもある。本発明は、さらに製剤を注射するための針又はシリンジ、好ましくは滅菌形態で包装されたもの、及び／又は包装したアルコールパッドを含む。 40

【0266】

具体的実施形態では、製品は包装材料並びに前記包装材料内に含まれる医薬品及び指示書を含み、前記医薬品はARP、又はそれらの誘導體、断片、ホモログ、類似体及び医薬上許容される担体であり、前記指示書は癌を有する被検体を予防、治療又は管理する投与方法を示す。他の実施形態では、製品は、包装材料並びに前記包装材料内に含まれる医薬品及び指示書を含み、前記医薬品はARP又はそれらの誘導體、断片、ホモログ、類似体、ARP又はそれらの誘導體、断片、ホモログ、類似体以外の予防又は治療薬、及び医薬上許容される担体であり、前記指示書は癌を有する被検体を予防、治療又は管理する投与方法を示す。他の実施形態では、製品は、包装材料並びに前記包装材料内に含まれる2つ 50

の医薬品及び指示書を含み、第1の医薬品がA R P、又はそれらの誘導体、断片、ホモログ、類似体及び医薬上許容される担体であり、第2の医薬品がA R P又はそれらの誘導体、断片、ホモログ、類似体以外の予防又は治療薬であり、前記指示書は癌を有する被検体を予防、治療又は管理する投与方法を示す。

【0267】

治療の間の効果の観察

本発明のA R P組成物を用いた免疫療法が腫瘍性疾患の発生及び進行に与える影響は、当業者に既知の任意の方法により観察することができ、限定するものではないが、以下のものを測定する方法が挙げられる。a) 細胞性免疫の評価として遅延型過敏症；b) *i n v i t r o*での細胞溶解性のTリンパ球の活性；c) 腫瘍特異性抗原、例えば、癌胎児 (C E A) 抗原値；d) コンピュータ断層撮影 (C T) スキャンなどの技術を用いた腫瘍の形態変化；e) 危険性の高い被検体の特定の癌に対する危険性の推定バイオマーカーのレベルの変化、及びf) 超音波診断器を用いた腫瘍の形態の変化。

10

【0268】

遅延型過敏性皮膚試験

遅延型過敏性皮膚試験は、抗原に対する全体的な免疫適格性及び細胞性免疫が重要である。一連の共通の皮膚抗原に対し反応できないことをアネルギーという (Sato, T., et al, 1995, Clin.Immunol. Pathol., 74: 35-43)。

【0269】

皮膚試験の適切な技術としては、使用前に抗原を4℃で滅菌して貯蔵し、光から保護し、且つ使用前に短時間で再構成させることが必要である。25ゲージ針又は27ゲージ針により、抗原の皮下よりむしろ皮内投与を確実にする。抗原の皮内投与後24時間から48時間に、最大規模の紅斑及び硬結の両方を物差しで測る。任意の投与された抗原又は抗原群に対する機能低下が、より高い濃度の抗原を用いて試験するか、又は、不明瞭な状況下では、介在する試験を用いた試験の繰り返しにより確認される。

20

【0270】

細胞傷害性T細胞の*I n V i t r o*での活性化

Ficoll-Hypaqueの勾配遠心技術により単離されたTリンパ球由来の末梢血 8×10^6 個を、10%ウシ胎児血清を含む3ml R P M I 培地中で、 4×10^6 個のマイトマイシンCで処置した腫瘍細胞を用いて再刺激する。ある実施形態では、33%の二次的に混合したリンパ球細胞上清又はI L - 2が、T細胞増殖因子源として培地に含まれる。

30

【0271】

免疫化後の細胞傷害性T細胞の一次応答を測定するために、T細胞を、刺激物質である腫瘍細胞無しに培養する。他の実施形態では、T細胞を抗原性の異なる細胞で再刺激する。6日後、培地の細胞障害性について4時間の51Cr放出アッセイで試験する。自然発生的な51Cr放出は、20%未満の値に到達するはずである。抗M H CクラスI遮断作用では、W6/32ハイブリドーマの10倍に濃縮された上清を最終濃度12.5%となるように試験物に加える (Heike M., et al., J. Immunotherapy, 15: 165-174)。

【0272】

腫瘍特異的抗原のレベル

全ての腫瘍上の独自の腫瘍抗原を検出するのは不可能であるかもしれないが、多くの腫瘍は、腫瘍と正常細胞を区別する抗原を提示する。モノクローナル抗体試薬は、抗原の単離及び生化学的特徴付けを可能とし、非形質転換細胞と形質転換細胞とを区別し、形質転換細胞の細胞系譜を定義するための診断上有益であった。最も良く特徴付けられているヒト腫瘍関連抗原は、腫瘍胎児抗原である。これらの抗原は胚形成の間に発現されるが、正常な成人組織では検出されないか、又は検出するのが非常に困難である。典型的抗原は、正常な成人大腸細胞では見出されないが、胎児の腸及びヒト大腸癌細胞で見出される糖タンパク質である、癌胎児抗原 (C E A) である。C E Aは、大腸癌細胞から脱落して、血清で見出されるので、血清中の抗原の存在を利用して大腸癌の患者を選別できると最初は考えられていた。しかし、膵臓癌及び乳癌などの他の腫瘍を有する患者もC E Aの血清値

40

50

を上昇させた。したがって、治療を受けている癌患者の C E A レベルの下降及び上昇を観測することが腫瘍の進行及び治療に対する応答を予想するのに有用であることが証明された。

【0273】

いくつかの他の腫瘍胎児抗原は、ヒトの腫瘍を診断し、観察するのに有用であり、例えば、ウシの肝臓及び卵黄嚢の細胞で正常に分泌された、 α -フェトプロテイン、 α -グロブリンは、肝臓及び胚芽細胞腫瘍の患者の血清で見出され、疾病状態のマーカーとして利用できる。

【0274】

コンピュータ断層撮影 (C T) スキャン

10

C T は、依然として癌の精密な診断技術の選択肢である。C T は、転移の検出では、任意の他の画像技術よりも感度が高く、特異的であることが証明されている。

【0275】

推定バイオマーカーの測定

特定の癌の危険性に対する推定バイオマーカー値を、本発明の複合分子の効果を観測するために測定する。例えば、前立腺癌の危険性の高い被検体では、血清前立腺特異抗原 (P S A) を、Brawer, M. K., et. al., 1992, J.Urol., 147: 841-845、及び Catalona, W. J., et al., 1993, JAMA, 270: 948-958 に記載の手順により測定する。又は、結腸直腸癌の危険性のある被検体では、C E A を 5 . 1 0 . 3 節に上記したように測定する。また、乳癌の危険性の高い被検体では、エストラジオールの 1 6 位の水酸化を、Schneider, J. e t al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:3047-3051 に記載の手順により測定する。

20

【0276】

超音波診断器

超音波診断器は、依然として癌の精密な診断技術の代替的選択肢である。

【0277】

治療の間の副作用の観察

A R P の単独又は他の治療法 (他の治療薬又は予防薬を含む) と組み合わせた使用の間の任意の副作用を観察することも好ましい。癌治療又は感染症の治療の間の化学療法の副作用の例としては、限定するものではないが、胃腸毒性、例えば限定するものではないが早期発生型及び遅発型の下痢及び膨満；嘔気；嘔吐；摂食障害；白血球減少症；貧血；好中球減少；無力症；腹部痙攣；熱；痛み；体重の減少；脱水症；脱毛症；呼吸困難；不眠症；眩暈、粘膜炎、口腔乾燥症及び腎不全、また同様に、便秘、神経及び筋肉作用、腎臓及び膀胱への一時的又は持続的損傷、インフルエンザ型の症状、体液鬱滞、及び一時的又は持続的不妊症が挙げられる。放射線療法の副作用としては、限定するものではないが、疲労、口内乾燥、及び食欲減退が挙げられる。その他の副作用としては、胃腸毒性、例えば限定するものではないが早期発生型及び遅発型の下痢及び膨満；嘔気；嘔吐；摂食障害；白血球減少症；貧血；好中球減少；無力症；腹部痙攣；熱；痛み；体重の減少；脱水症；脱毛症；呼吸困難；不眠症；眩暈、粘膜炎、口腔乾燥症及び腎不全が挙げられる。生物療法／免疫療法からくる副作用としては、限定するものではないが、投与部位での発疹又は隆起、例えば熱、寒気及び疲労などのインフルエンザ型の症状、消化管異常及びアレルギー反応が挙げられる。ホルモン療法からくる副作用としては、限定するものではないが、嘔気、不妊問題、鬱病、食欲減退、眼疾患、頭痛、及び体重変動が挙げられる。さらに、患者が典型的に経験する望まれない作用は多くあり、当該技術分野で知られている。Physician's Desk Reference (第 5 6 版、2 0 0 2 年) に多くのものが記載されている。

30

40

【実施例 1】

【0278】

ウシの小腸抽出物からの A R P の精製材料

実施例で用いられる腸の供給源：大型動物の腸を、新鮮な食肉処理をされたウシから得

50

た。これらは、通常、Michigan州AshleyのBellingar Packing社から入手した。ラット及びマウスの腸は、Indiana州IndianapolisのHarlan Industries社から購入した、Sprague Dawleyラット又はBALB-cマウスから入手した。ブタの腸は、Bellingar Packing社から入手した。ブタ及びウシの腸には、Michigan州HowellのBain's Packing & Refrigeration社から入手したものもあった。

【0279】

方法

ARPの濃縮又は単離

抽出及び遠心分離

盲腸に近いウシの小腸回腸切片（25フィート又は40フィート）を屠殺直後の動物から切除した。各切片を、その長さ方向に細長く切り、内容物を十分に洗浄した。洗浄は、食肉処理場で、シプロフロキサシン（10mg/L）を加えたリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中で開始し、研究室で終了した。組織は氷上で研究室に輸送し、そこで1フィートの細長い片に切断し、外側の脂肪性沈着物を除去した。各切片をシプロフロキサシンを含むPBS溶液中で洗浄した。次いで、これをシプロフロキサシンを含まないPBSを含む6つのビーカー（氷上）を介して連続洗浄した。各切片を十分に拭いて過剰の流体を除き、次いで、軟部組織を漿膜の外皮から擦り取り、漿膜を廃棄した。軟部組織を家庭用電動式小型フードプロセッサで、プロセッサの開始と停止を10回繰り返して50mLの分量に細かく刻んだ。等量の冷30mM Hepesを加え、テフロン製の乳棒で55mLのガラス製ホモジナイザー用チューブ中で混合物をホモジナイズした。ホモジナイザーで5回上下動後、材料を冷蔵したSS-34 Sorvol rotor中で18,000rpm（25,000G）で遠心分離にかけた。得られた上清液を、滅菌ステンレス製90mmフィルターホルダーに装着した2層のMillipore社製のプレフィルター（#API507500）を通して、前ろ過し、懸濁液中の脂質微粒子を除いた。ろ液は、液体窒素中で瞬間凍結させ、-80℃で凍らせて貯蔵した。

【0280】

前ろ過したBBXの予備試験

調製：

- （a）10×PBSから2.0Lの1×PBS緩衝液を調製し、4℃に順応させる。
- （b）柔らかくなるまで逆浸透脱イオン水中で、適当な数（予備試験する腸の数よりも1つ多い）の長さ100mm、幅10mmの再生セルロース透析膜、MWCO 6-8000を浸漬する。
- （c）前ろ過したBBX及び腸の混合物の一定量の腸に付き1.2mlを解凍する。

【0281】

活性試験：

- （a）1.0mの各腸抽出物及び腸の混合物を、1LのPBSで4℃で3時間透析する。
- （b）緩衝液を変えて、一晚透析する。
- （c）透析液を滅菌1.2mlのクリオチューブに移す。
- （d）透析したストック液のBBX1：10に希釈することにより（1部のBBXに9部の滅菌0.1%BSAを含むPBSを加える）、樹状細胞活性試験用に各試料を準備する。各ストック液からのものを連続的に1：2の希釈を4回する（50μlストック液に50μlの0.1%BSA/PBSを加える）4×。
- （e）図により予備試験試料を所定の活性を有する適当な予備試験対照と比較する。
- （f）瞬間凍結し、-80℃のフリーザーで予備試験の残余分を貯蔵する。

【0282】

プロセス管理：

予備試験対照の20%未満しか樹状細胞活性を生じない腸からの抽出物は廃棄する。

【0283】

Procipitate（商標）及びCleanascite（商標）

Ligochem, Inc.社製の2つの市販の大量処理生成物（Cleanascite（商標）及びProcipi 50

tate (商標)) を用いて、非活性高分子の最初の減少を可能にした。抽出物 3 部を、脂質、浮遊細胞、細胞残屑及び粘液性不純物を選択的に除く非イオン性吸着剤である、Cleanascite (商標) 1 部で処理した。遠心分離後、得られた上清を、合成の非水溶性アニオン性高分子電解質であるProcipitate (商標) を用いて、上清 4 部対Procipitate (商標) 1 部の割合で処理して、選択的にタンパク質を除いた。これを製造元の提言に従って低速で回転させ、上清を更に精製に付した。

【0284】

限外ろ過

各週毎のバッチの少量の試料を、試験用にAmicon攪拌セル (800 シリーズ) を用い、最初に300 kDの円盤膜を適用して300 kDより大きいサイズの不純物を除き、次いで、10 kDの円盤膜を適用して10 kD未満の不純物を除くと同時に試料を濃縮して、精製した。この手順の間、リン酸緩衝生理食塩水を用いて>300 kDの保持物質 (retentate) を洗浄した。得られた10から300 kDの試料を、NKアッセイ及び/又はマウスで試験した。 10

【0285】

試料が活性であった場合は、バッチ全体を大規模手順で処理した。溶液をMillipore社製のPelicon (商標) 限外ろ過システムの300 kDのろ板を通してろ過し、その30 mM HEPES 洗浄液と共に<300 kDの流入 (flow-through) 物質を、10 kD円盤膜を備えたAmicon (商標) 攪拌セルで濃縮した。ステージ1 BEX (ウシの抽出物) と示される得られた物質を、Serum Acrodisc (商標) 0.22 µm (Gelman社製カタログ# 4525) フィルターを用いて滅菌ろ過し、瞬間凍結し、-80 °Cで保存して、ステージ2 BEX精製を待った。 20

【0286】

Superdex (商標) サイズ排除

ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて、ステージ1からステージ2にさらに精製した。1200 mlのカラム (Amicon カatalog# 9644100) に、Superdex-75調製グレード (Pharmacia社製 カatalog# 17-1044-01) を充填し、15 mMリン酸ナトリウム、120 mM塩化ナトリウム、pH 7.0 (PBS) で平衡化する。PBS緩衝液を、フラクションの定組成溶離に用いた。搭載に先立ち、ステージ1のBEXをCentri Prep-10 (商標) (Amicon カatalog# 4304) で35~40 mg/mlに濃縮し、Serum Acrodisc (商標) 0.22 µm (Gelman社製 カatalog# 4525) を用いてろ過した。グリセロールを最終濃度が5%になるように加えて、カラム体積の0.1~1% (1.2~12 ml) で試料をカラムに搭載した。次のクロマトグラフィーのパラメータを用いた。280 nm、吸収最大測定限界1.0、流速4.0 ml/分 (18~26 psi)、チャートスピード5 cm/hr 及びフラクションサイズ2.0分/8.0 mL。 30

【0287】

活性フラクションを貯め、YM10円盤膜 (Amicon カatalog# 13632) を備えたAmicon Stir Cell (商標) 型番号8200 (Amicon カatalog# 5123) を用いて~40 mg/mlに濃縮した。ステージ2を滅菌ろ過し、-80 °Cで次の精製工程に備えて貯蔵した。 40

【0288】

DEAE

DEAE-Sepharoseカラム (1.5 × 6 cm、DEAE-Sepharose Fast Flow、Pharmacia Biotech Inc.社製、Piscataway, NJ) を、30 mM Hepes 及び0.1 M NaCl、pH 7.4で平衡化した。PBSのSuperdex75 (商標) (ステージ2) から得た試料を、カラムに適用した。次いで、カラムを100 mlの0.1 M NaClを含む30 mM Hepes、その後200 mlの0.2 M NaClを含む同緩衝液で洗浄した。カラムを約120 mlの0.3 M NaClを含むHepes緩衝液を用いて定組成溶離した。フラクションを2.5 ml/フラクションで4分ごとに回収した。カラムをさらに0.5 M NaClを含む30 mM Hepesで溶離した。フラクションをNK媒 50

介細胞毒性試験及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した。

【0289】

ARPの精製：改良法

抽出及び遠心分離

6. 2. 1節の同工程を参照。

【0290】

前ろ過したBEXの予備試験

6. 2. 1節の同工程を参照。

【0291】

硫酸アンモニウム分画

抽出上清を、固体化学を利用して4℃で45%硫酸アンモニウムに注ぎ、1時間攪拌した。これを250mLの遠心瓶で13,000RPM(17,300G)で30分間、また、40mLの遠心チューブで15,000RPM(17,500G)で20分間遠心分離にかけた。上清をデカントして4Lのガラスビーカーに移し、ペレットを廃棄した。上清を固体硫酸アンモニウムを用いて飽和率80%にし、上記のように遠心分離し、上清を廃棄した。ペレットを、瓶又はチューブ内で完全に懸濁した後、1.5M硫酸アンモニウム/50mMリン酸Na(pH6.8)に溶解した。溶解しない物質を、250mL遠心瓶で10,000RPM(10,200G)で30分間遠心分離して除いた。上清を滅菌ステンレス製90mmフィルターホルダーに装着した2層のMillipore社製のプレフィルター(API507500)を通して、前ろ過した。各工程後、試料を品質管理検査した。

10

20

【0292】

疎水性相互作用カラム(以下「HIC」)段階溶離クロマトグラフィー

300mLのphenyl sepharose 6 fast flow (high substitution) - Amersham Pharmacia Biotech社製17-0973-05を充填した5cm×20cmのクロマトグラフィーカラムをpH6.8の1.5M硫酸アンモニウム/50mMリン酸ナトリウム緩衝液で平衡化した。室温で、前ろ過した硫酸アンモニウムで処理したBBXを流速~18mL/分でカラムでポンピングした。濁らなくなるまでカラムから流出液を回収した(~1200mL)。カラムを900mLの1.5M硫酸アンモニウム/50mMリン酸ナトリウムで洗浄した。活性物質を700mLの0.5Mリン酸ナトリウム緩衝液で溶離した。

30

【0293】

溶離した物質を、4℃で4Lの0.2M NaCl/10mMリン酸Na(pH7.4)で透析し、3~6時間後に緩衝液を取り替え、次いで一晩最終的な透析をして、DEAEクロマトグラフィー用に準備した。

【0294】

DEAE工程-溶離クロマトグラフィー

試料を0.2M NaCl、10mMリン酸ナトリウム、pH7.4で透析後、試料を0.45µmのメンブランを通してろ過して微粒子を除き、次いで、DEAE-Sepharoseカラム(0.5×8cm)にかけた。カラムを約800mLの同じ緩衝液(0.2M NaCl、10mMリン酸ナトリウム、pH7.4)で洗浄した。280nmの吸収がベースラインに至った場合に、結合した物質を約400mLの溶離緩衝液(0.5M NaCl、10mMリン酸Na、pH7.4)で溶離した。溶離したフラクションを、YM10メンブランを備えたAmicon stir cellにより濃縮して約20mLにした。試料を二等分に分割し、液体窒素中で瞬間凍結して、次いで-80℃で貯蔵した。

40

【0295】

Superdex(商標)サイズ排除

ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて、DEAE段階溶離で物質をさらに精製した。1200mLのカラム(Amicon カタログ#9644100)に、Superdex-75調製グレード(Pharmacia社製 カタログ#17-1044-01)を充填し、15mMリン酸ナトリウム、120mM塩化ナトリウム、pH7.0(PBS)で平衡化する。PBS緩衝液

50

を、フラクシヨンの定組成溶離に用いた。搭載に先立ち、試料をSerum Acrodisc (商標) 0.22 μm (Gelman社製 カタログ#4525) を用いてろ過し、カラム体積の0.1~1% (1.2~12 ml) でカラムに搭載した。次のクロマトグラフィーのパラメータを用いた。280 nm、吸収最大測定限界1.0、流速4.0 ml/分 (18~26 psi)、チャートスピード5 cm/hr 及びフラクシオンサイズ2.0分/8.0 mL。試料を、液体窒素中で瞬間凍結して-80℃で貯蔵した。

【0296】

Superdex (商標) 試料の濃縮及びカルモジュリン除去

7つのバッチからの活性領域を解凍し、貯蔵したところ、典型的には約1,200 mLを生じた。試料をGSA rotorで10,000 rpm (10,200 G) で30分間遠心分離して全ての沈殿を除いた。次いで、試料を0.45 μm シリンジフィルターでろ過し、DEAE-Sepharoseカラム (0.3×5.5 cm) にかけた。カラムを0.2 M NaCl、10 mM リン酸Na、pH 7.4 (約200 mL) で洗浄した。結合した物質を、1 M NaCl、0.1 mM CaCl₂、10 mM Tris、pH 7.0で溶離した。タンパク質ピークを約50~60 mLで回収し、1リットルの1 M NaCl、0.1 mM CaCl₂、10 mM Tris、pH 7.0で一晩透析した。

10

【0297】

カルモジュリン及びその他のカルシウム結合タンパク質を除くために、HICカラム (1.5×6 cm) を1 M NaCl、0.1 mM CaCl₂、10 mM Tris、pH 7.0で平衡化し、その後試料をカラムに搭載した。試料をかけた後、カラムを同じ緩衝液を用いて洗浄した。流入フラクシオンを回収したところ、約75から80 mLを構成した。カラムを同じ緩衝液 (約100 mL) で洗浄し、次いで結合した物質を1 mM EGTA (エチレンジトリカルボン酸) (β-アミノエチルエーテル)-N, N, N', N'-テトラ酢酸) を含む10 mM Tris、pH 7.0で溶離した。流入フラクシオンは、全てDC活性を有しており、次の工程に用いた。

20

【0298】

HIC勾配クロマトグラフィー

全高速液体クロマトグラフィー (以下「HPLC」) をWaters Associates (Milford, MA) 社製626 LC system及びLinear Instruments (Reno, Nevada) 社製 200 Uvis absorbance detectorを用いて280 nm (HIC) 又は215 nm (DEAE及びC-8 separations) のいずれかで行った。全化学物質は、特に断りのない限り、J. T. Baker (Phillipsburg, NJ) 社から入手した超高純度バイオ試薬グレードである。

30

【0299】

試料の体積を測定し、同体積の3.0 M硫酸アンモニウム (ACSグレード、Mallinckrodt社製、Paris KY) 溶液とpH 7.2の50 mMリン酸緩衝液中で混合した。試料をHPLCの溶媒注入管を介してロードした。溶媒は、緩衝液AがpH 7.2の1.5 M硫酸アンモニウムを含む50 mMリン酸緩衝液であり、緩衝液BがpH 7.2の50 mMリン酸緩衝液である。試料を、緩衝液Aで平衡化した、粒子サイズ13 μm 、21.5×150 mmのPhenyl-5PWカラム (TosoHaas社製、Montgomeryville, PA) に、室温で、流速4 mL/分でかけた。このとき、線形勾配は、0~100%緩衝液Bで90分間かけて、4 mL/分で行った。フラクシオンは、フラクシオンコレクター (LKB-Frac-100、Pharmacia社製、Piscataway NJ) を用いて2.5分ごとに回収した。フラクシオンをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈し、DCアッセイで評価した。活性フラクシオンを貯蔵し、Spectra/Por 1メンブラン透析用チューブ、6~8000 MWCO (Fisher社製、Pittsburgh PA) でPBSを2回取り替えて透析した。

40

【0300】

DEAE勾配クロマトグラフィー

試料は、HPLCの溶媒注入管を介してロードした。溶媒は、緩衝液CがpH 7.2のPBSであり、緩衝液DがpH 7.2の0.5 M NaClを含む15 mMリン酸緩衝液である。試料を、緩衝液Cで平衡化した、10 μm のビーズ、8×75 mm (TosoHaas社

50

製)のDEAE-5PWカラムに、室温で、1 mL/分でかけた。安定なベースラインが確立されるまで、カラムに緩衝液Cを流した。このとき、線形勾配は、0~100%の緩衝液Dで90分かけて、1 mL/分で行った。フラクションは、手動で個々のピークを集めるか、又は5分間隔でフラクションコレクターを用いて回収した。フラクションは、PBSで希釈して、DCアッセイで評価した。

【0301】

C8逆相クロマトグラフィー

試料は、大容量(>5 mL)では溶媒注入管を介するか、又はより少ない試料ではインジェクターループを介してロードした。溶媒は、緩衝液Eが5%アセトニトリル(HP LCグレード、Burdick and Jackson社製、Muskegon MI)/95%水(HP LCグレード、Burdick and Jackson社製)/0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)であり、緩衝液Fが90%HP LC用アセトニトリル/10%HP LC用の水/0.08%TFAである。試料を、緩衝液Eで平衡化した、C8、5 µmのビーズ、300 Å、4.6×150 mmカラム(Vydac 208TP5415、The Separations Group社、Hesperia CA)に、55℃、1 mL/分でかけた。安定なベースラインが確立されるまで、カラムに緩衝液Eを流した。このとき、線形勾配は、30~55%の緩衝液Fで150分かけて、1 mL/分、55℃で行った。フラクションは、5分間隔又は個々のピークを回収した。フラクションは、PBSで希釈し、DCアッセイで活性を評価した。大量のフラクションを液体窒素で瞬間凍結し、-80℃で貯蔵した。

10

【0302】

結果

濃縮した又は単離したARP

小腸組織は、典型的には屠殺したばかりの6頭のウシから週に約1回入手した。抽出&遠心分離、Procipitate(商標)&Cleanascite(商標)、及び限外ろ過工程によって、サイズ範囲が約10~300 kDの高分子可溶性混合物を得た。この物質は、無毒であり、マウスのS-180腫瘍を治療し、NK細胞傷害を*in vitro*で誘導し、NK細胞中のIFN γ を*in vitro*で誘導し、さらに、*in vitro*で樹状細胞からのIL-12放出を誘導し得るであろう。溶液をマイコプラズマ及び細菌試験(MSU Animal Health Diagnostic Laboratory)用に採取し、LALの反応性を測定した。それを、限外ろ過膜で濃縮することにより、サイズ排除(ステージ2)精製用に準備した。Superdex(商標)分子篩カラムによる分離により、約20~30 kDに集中した1つの領域に限定された活性が生じた。

20

30

【0303】

ステージ2(サイズ排除精製)物質の純度を高めて、任意のエンドトキシンの負荷を低減するために、濃縮した1回目のSuperdex(商標)分離の活性フラクションを再びカラムにかけた。再実施のピークの中央部分を保持して、BBX-01と表示し、FDAにより認可された第1相臨床試験の最初の工程で用いた。この物質を滅菌ろ過し、限外ろ過膜で濃縮し、Iowa大学のGMP製剤施設で、投与形態に無菌充填した。

【0304】

DEAEイオン交換クロマトグラフィーを用いて、ステージ2の物質をステージ3の物質に精製した。Superdex(商標)分離から得た再実施物質の活性部分を洗浄したばかりのDEAE Sepharose(商標)カラムにかけた。ステージ2の物質の高いイオン強度(0.15 M)のために、大半のタンパク質はカラムに結合しないで通過した。これをフラクションAと表示する。結合した物質をイオン強度を2段階上昇(0.2 M及び0.5 M)させて溶離した。最初の溶離をフラクションBと表示し、2番目の溶離をフラクションCと表示する。2つのタイプの活性をフラクションA及びCでそれぞれ検出したが、フラクションBは大抵弱い活性を示した。フラクションAの活性は、高IFN γ 値の誘導に関連しており、これはIL18であることが証明された。フラクションCは、大部分のNK誘導活性及び抗腫瘍活性を有しており、樹状細胞を活性化する唯一のフラクションである。フラクションCは、5%のタンパク質しか含まず、BBX-01cと表示する。この物質は

40

50

、ヒトの第1相臨床試験の第2工程で用いた。

【0305】

A R Pの精製：改良法

改良した精製手順を開発して、回収及び比活性を高めた。改良した手順により、最終工程でのA R Pの収率が、場合により $10^2 \sim 10^3$ 倍と同じ程度だけ増加した。採用した手順の最初の部分では、硫酸アンモニウムによる分別を利用して粗物質を処理する長時間に亘る方法の実施を用いた。それは2段階で行った。最初の工程により約50%のタンパク質の夾雑物をいくらかのその他の物質と一緒に除き、内在するプロテアーゼによるA R Pのタンパク質分解を阻害したが、第2工程ではA R Pを沈殿させて体積を減少させ、更なる精製工程を促進させ、更にタンパク質分解を最小限に留めた。タンパク質分解の阻止は、非常に高い確率で、収率の増加及び配列されたA R Pペプチドの平均長の増加に關与しており、これによりデータベース検索によるアイメリア表面抗原の同定が可能となった。最適条件を見出す実験により、最初の沈殿で飽和度45%の硫酸アンモニウムを生じ、次いで2回目の沈殿で80%の飽和度を生じた。最終的な沈殿ペレット中の活性物質は回収可能であり、更に精製するためにこれを再懸濁させた。

10

【0306】

Superdex（商標）サイズ排除クロマトグラフィーの前に、高分子搭載物（load）を減らすために、2つの大量処理工程を取り入れた。最初の工程では、硫酸アンモニウム分別処理の再溶解ペレットと適合するH I Cカラムを用いた。大量の不活性物質、特に核酸を流入法及び洗浄で除いた。硫酸アンモニウムを含まない緩衝液に変更後、活性物質を溶離した。溶離は、流入法及び洗浄は省いたが、D E A Eイオン交換クロマトグラフィーにより同様の方法で処理した。高N a C l濃度での溶離が保持され、メンブラン圧力セル（membrane pressure cell）で濃縮し、Superdex（商標）カラムに加え、低吸収領域で活性物質を溶離した（図2（A））。典型的バッチ（1週間）の活性物質の全回収量を図2（B）に示す。比活性（タンパク質容量に対する）を、各精製工程から得た保持したフラクションで決定した（表3）。Superdex工程が終了したときには、約7000倍の精製が達成された。

20

【0307】

【表3】

各バッチで行われた精製工程

30

精製工程	活性物質の位置	活性物質の回収量	全タンパク質	比活性
抽出物	上清	100	25504	1.0
45%硫酸アンモニウムによる除去	上清	102	11684	2.2
80%硫酸アンモニウムによる除去	ペレット	80	11035	1.8
疎水性相互作用段階溶離	P B S 溶離液	59	6683	2.2
D E A E 段階溶離	塩溶離液	65	460	36.2
サイズ排除（商標） クロマトグラフィー	選ばれた フラクション	62	2.3	6820.0

40

【0308】

細菌のエンドトキシンは大抵小腸抽出物から得られる夾雑物であったので、エンドトキシン量を、各精製工程でL A Lアッセイ（13節参照）により測定した。図2（A）に示した工程については、これを図2（B）に示す。エンドトキシン量を約1000分の1に減少させると、D Cアッセイを妨げる可能性のあるものよりも非常に低い最終量となる（

50

1 2 . 3 節参照、最小 D C 活性に対する閾値 1 0 0 0 U / m L) 。

【0 3 0 9】

最終精製に十分な物質を得るために、2 1 頭のウシの腸から得られた抽出物を含むプールを作製した。これらを粗ホモジネート上清中で高活性のものを事前に選別し、3 つ同時に処理した。3 つの腸調製物の 7 つのバッチを併せて、濃縮し、カルシウム結合タンパク質を除去し、プールと命名した。このようなプールを 4 つ作製した。第 1 のプールは、方法の開発に用いて、第 2 のプールは第 1 の配列決定可能な生成物を得るために用いた。

【0 3 1 0】

精製した生成物を得るために、一度にプールの半分を H P L C H I C カラムで最初に分離した。活性物質は、クロマトグラムの端付近に位置しており (図 3 (A) 参照)、これは適度に疎水性の分子を示す。より早期に活性成分が検出されたこともあるが、弱く、散発的であった。活性フラクションを透析して、硫酸アンモニウムを除き、0 . 1 5 M NaCl の H P L C D E A E カラムにかけた。NaCl 勾配をかけ、0 . 3 M のイオン強度付近の主要なピークを有する活性成分を溶離した。クロマトグラム及び活性を図 3 (B) に示す。H I C から得た活性物質を処理するために、D E A E を 3 回実施する必要があった。プールした活性領域を C 8 逆相 H P L C カラムにかけて、アセトニトリル水溶液勾配を用いて溶離した (図 3 (C))。緩やかな浅い勾配溶離プロトコルで、活性物質は約 4 0 % アセトニトリル付近で溶離した。1 4 回の分離を行って、D E A E 分離から得た物質を処理した。活性物質は、2 つの主要な近隣ピーク及び 2 若しくは 3 つの軽微なピーク又は肩部に付随していた。このことは分子の微小な変化を示しているように思われるが、これらの差異は定量されなかった。これらの活性フラクションの純度の問題について、精密に採取した分離に従って活性対吸収をプロットすることにより対処した。これを図 3 (D) に示す。線形回帰線は合理的に確固としており、ゼロ付近の交点は汚染分子が欠如していることを示している。

【0 3 1 1】

最初の主要なピークは、 α と表示するが、約半分の C 8 分離から得られ、ロータリーエバポレータにより濃縮し、トリプシンで消化し、M S U の Macromolecular Structure Facility でのペプチド分離及び Edman 配列決定法に供した。相当な量のタンパク質が濃縮工程で明らかに失われた。4 つのピークは配列情報をもたらしたが、そのうちの 1 つは、ウシ A R P の異なる領域から得た 2 つの配列を含んでいた。この情報は、P a t t i n P r o t プログラム (P a t t i n P r o t 検索は、例えば、ウェブサイト [phil. ibcp. fr](http://phil.ibcp.fr) (N P S @、次いで P a t t i n P r o t を選択する) で行うことができる) を用いてデータベース検索を開始するのにすでに十分であり、混合物中のタンパク質の 1 つとして A R P が同定された。濃縮工程には、回収したフラクションを多数回、1 つのチューブに移す工程が含まれていたため、我々は物質の損失はプラスチック製の円錐管にタンパク質が付着したことが原因に相違ないと考えた。実験により、チューブ間で分子を移動するにはアセトニトリルの添加が必要であることを実証した。 α ピークの後半分及び第 2 の主要なピーク (β) の前半分で処理の変更を別々に取り込むことにより、はるかに高いトリプシンペプチド量を生じた。これらのペプチドは、配列一致のための利用可能な公共データベースの検索 (例えば、B L A S T、P a t t i n P r o t) の範囲を拡大するのに十分な配列を与える。

【実施例 2】

【0 3 1 2】

スポロゾイト抗原タンパク質の同定

タンパク質配列決定サービスは、M S U の Macromolecular Structure Facility (Edman 法) 及び M-Scan Inc 社、ペンシルベニア州 West Chester (MS-MS 法) により提供された。

【0 3 1 3】

Edman 配列決定法用のトリプシンペプチドは、以下の手順を用いて調製した。いくつかの C 8 分離から得た活性フラクション、典型的には、1 m L を微小遠心管に入れ、3 5 °C、真空下ではほぼ乾燥するまで蒸発させた (Centrivap Concentrator、Labconco 社製、Kans

as City M0)。全サンプルチューブを200 μ Lの60% HPLC用アセトニトリル／40% HPLC用の水／0.1% TFAで3回洗浄し、各回体積をほぼ乾燥状態になるまで減少させた。3回の洗浄後、全てのフラクションを合わせて一つの微小遠心管に入れ、500 μ LのHPLC用の水で再び2回洗浄し、各洗浄後に減少させてほぼ乾燥状態とした。約15 μ Lに減少させた合わせた試料を、消化用緩衝液（100 mM Tris（試薬グレード、Sigma-Aldrich社、St. Louis M0）、pH 8.4、2 mM CaCl_2 ）で125 μ Lに希釈した。トリプシン（シーケンズグレード、Sigma-Aldrich社）を2%（w/w）となるように加え、試料を37℃で4時間インキュベートした。試料のpHを確認して、さらに50 μ Lの消化用緩衝液を加えた。消化は、18～20時間の消化後に、試料を液体窒素で瞬間凍結することにより停止した。

10

【0314】

トリプシンペプチドの精製は、MSUのMacromolecular Structure Facilityで、Vydac C18カラム、5 μ m、300 Å、ID 800 μ mを用いた微小口径の逆相HPLCにより、160分で5% Hから70% Hの線形勾配を用いて行った。緩衝液Gは、0.1% TFAの水溶液から構成されている。緩衝液Hは、90% HPLCグレードのアセトニトリル、10% HPLCグレードの水、及び0.985% TFAから構成されている。吸収をKratos Analytical社製Spectroflow 783検出器で、214 nmで観察した。選択したペプチド断片のN末端配列解析を、Edman分解化学反応に利用されるPerkin Elmer/Applied Biosystems社製494 cLC Procise Protein Sequencerにより行った。

【0315】

20

MS-MS分析のサンプルは、上述のように単離して、消化した。2つの試料をM-Scan Inc.社（West Chester, PA）に送った。トリプシンの自己消化及び試料の消化。各試料をC18 ZipTipにかけて、0.1%ギ酸水溶液で洗浄して脱塩した。ペプチドを、0.1%ギ酸を含む、60%アセトニトリル及び40%水からなる溶液を用いて溶離した。各試料から得られたペプチド混合物を、Sciex Q-Star/Pulsar mass spectrometerを用いた陽イオンESI-MSにより最初に分析した。試料をナノスプレー用ニードルを用いて導入し、データをMCAモードで回収した。同じ機器及び試料導入方法を、MS/MS配列決定に用いた。

【0316】

Edman及びMS/MS法により得られたトリプシンペプチド由来のアミノ酸配列を表4に示す。2つ以上の別の配列が重畳していた解読結果があったり、また、大半は汚染されておりどのペプチドのほとんどの位置にも複数の解読結果がもたらされたが、いくつかの確固たる解読結果がEdman法を用いて様々なピークから得られた。BLASTなどの最も普通に使用されるプログラムでは、このような複雑なデータを用いて検索を行うことはできなかった。したがって、配列は、PATTINPROTプログラム（Network Protein Sequence Analysis（NPS@）；TIBS 2000, 25: 147-150）の利用により割り当てられた。各位置での複数のアミノ酸配列解読結果を、所望の類似性レベル（通常70%より高い）でプログラムを検索し、タンパク質がこれらのパラメータと一致したリストを作成した。リストには通常数十の異なるエントリーが含まれていたため、第2のペプチド配列を用いて再び検索した。通常、このような手順によって、スポロゾイト抗原に関連するエントリーしか含まないリストを作成した。任意の同定可能な夾雑物が最初のリスト上にある場合には（トリプシン、セラチン、アルブミン）、それらの配列をアミノ酸の解読結果から除き、残った解読結果を用いて検索を繰り返した。アイメリアスポロゾイト抗原が適当な候補とみなされると、複数の解読結果をある有力な配列との一致を見つけることによりデコンヴォリューションし、その後残った配列がタンパク質の異なる部分とも一致するかを決定した。この戦略は、多くのケースで成功し、ウシARPの最も可能性の高いいくつかのペプチド配列をもたらした。

30

40

【0317】

【表 4】

Edmanトリプシンペプチド又はMS/MS解析から得られた有望な配列

断片の出所	得られた配列
$\alpha_1 18, \alpha_2 18/\beta_1 18^1$	EWLVDTGKVF
MS/MS	LVDTGK
$\alpha_2 25$	VFAGGVASIADG
$\alpha_2 25$	AGYQIESVQEDNGTVQ
$\alpha_2 35, \alpha_2 32/\beta_1 30, \alpha_1 28, \beta_1 32$	³ MFGASTDSGGDPNAELVQYN
MS/MS ²	³ MFGASTDS
$\alpha_2 13/\beta_1 14, \text{MS/MS}$	APDGVYIGGVK
$\alpha_1 18, \alpha_2 18/\beta_1 18$	GGGFLIK
$\alpha_2 50/\beta_1 46, \alpha_2 49/\beta_1 45$	TPNENIAIALYDEEKEQNKA
MS/MS	TPNXXXIALYDEEKEQNK
$\alpha_2 53/\beta_1 49, \alpha_1 40, \alpha_1 37$	ADALTTALNFADFLYQ

10

¹複合したペプチドの解読は、「/」を用いて、例えば $\alpha_2 18/\beta_1 18$ のように付した。

²MS/MS法は、IとLとを、また、しばしばQとKとを区別できないので、これらのアミノ酸のうち1つを有する全位置において、MS/MSの解読結果からは確実ではない。

20

³トリプシンペプチドを用いたので、最初の解読可能なアミノ酸に先行する位置は、R又はKのいずれかであるが、これらの2つのうち1つが正しいアミノ酸であることは最終的に決定できない。

【0318】

しかし、いくつかのデータの質のために、アミノ酸の割り当てで起こり得る誤りを除くことはできない。表5に、起こり得る誤り（ここで、標準文字は、高い信頼性のあるデータ、すなわち、複数の解読結果及び複数の試料を示し、下線は、信頼性のより低いもの

30

【0319】

【表 5】

配列番号：3、4、5、6及び7で起こり得る誤り

配列番号：3	Glu Trp Leu Val Asp Thr Gly Lys Val Phe <u>Ala Gly</u> <u>Gly Val Ala Ser Ile Ala Asp Gly</u> ¹
配列番号：4	Arg Met Phe Gly Ala Ser Thr Asp Ser Gly Gly/Asn Asp Pro Asn Ala Glu Leu Val Lys Ala/Val Gly/Phe Tyr/Ala Gln/Gly Ile/Gly Glu/Val Ser/Ala Val/Ser Gln/Ile Glu/Ala Asp Asn/Gly ²
配列番号：5	Gln Ala Ile Val ³
配列番号：6	Ala Pro <u>Asp</u> Gly Val Tyr Ile Gly <u>Gly</u> Val Lys ⁴
配列番号：7	Gly/Glu Gly/Trp Gly/Leu Phe/Val Leu/Asp Ile/Thr Lys/Gly Thr Pro Asn Glu Asn Ile Ala Ile Ala Leu Tyr Asp Glu Glu Lys Glu Gln Asn Lys <u>Ala Asp</u> <u>Ala Leu Thr Thr Ala Leu Asn Phe Ala Asp Phe Leu</u> <u>Tyr Gln</u> ⁵

¹信頼性のより低いもの：1つの試料中に複雑な2つの解読結果。アイメリアアセルブリナの保存領域と同一性を有する解読結果が、ここに割り当てられた（他の解読結果としての配列番号：4参照）。

²信頼性の最も低いもの：1つの試料中に2つの解読結果。アイメリアで一致するために、各ケースの第2の選択は、配列番号：3に割り当てられた。アイメリアに一部一致するため、第1の選択は、ここに割り当てられる。

³信頼性の最も低いもの：低いS/N（信号対ノイズの比）及び唯一の試料から誘導されるもの。

⁴信頼性のより低いもの：僅かに低いS/N、しかし、これらの位置に対して存在する他のアミノ酸の読み取り結果はない。

⁵信頼性のより低いもの：唯一の試料から得られるものだが、S/Nは良好。信頼性の最も低いもの：2つの配列を含む2つの試料から得たデコンヴォリューションしたデータ。アイメリアと一致するために、各ケースでの第2の選択は、断片1に割り当てられた。断片1の対応する領域もまた、MS/MSデータにより裏付けて、信頼性を高めた。アイメリアと一致するため、各重複解読結果からの第1の選択は、ここに割り当てられた。これにより、配列はほぼ信頼し得るものになるが、3つのGlyはS/Nが低い。

【0320】

βピークの後半分をM-Scan Inc.社にMS/MS配列決定解析のために送った。いくつかのペプチドが同定され、アイメリア抗原との一致は様々であった。かなり長い可変領域も検出され、既知のARP配列とやはり低い類似性で一致したので、分子の一部に割り当てられた。

【0321】

全ペプチド配列を評価したときには、スポロゾイト抗原との相同性の証拠は圧倒的であった。アイメリア19kD抗原3-1Eに対する配列比較を図4に示す。大半の他の配列は、分かりやすい夾雑物、ケラチン、トリプシン、及びウシアルブミンに割り当てることができるであろう。少数の生じた配列は、割り当てられないままであった。

【実施例3】

【0322】

e. テネラオーシストからの活性物質の抽出

オーシストは、意図的に感染させた動物から、庭の土壌から、又は感染した動物の排出物から得ることができる。オーシストを単離する方法は、当該技術分野で知られている。例えば、Tomley, Methods: A companion to Methods in Enzymology 13: 171-176 (1997) 参照、当該文献は本明細書にその全体が参照により援用される。例えば、孢子形成オーシストを得るのに使用することが可能な手順の一つに以下のものがある。6から8週齢のLi

10

20

30

40

50

ght Sussex chickenに、 10^3 から 6×10^3 個の孢子形成オーシストを経口投与することにより感染させ、7日後に酵素処理又は化学処理を用いて盲腸からオーシストを回収し（例えば、盲腸を取り出して、切断し、pH 8.0のリン酸緩衝蒸留水を加え、市販のブレンダーを用いて微細な半流動状物（pulp）にホモジナイズする。次に、トリプシン（Difco 1:250粉末）を最終濃度が1.5% w/vになるように加える。次に、41℃で30分間インキュベートし、2種の厚みのモスリンを通してろ過し、1000gで10分間遠心分離する。次に、上清を捨てて、同体積の飽和塩化ナトリウム溶液と取替え、よく混合し、再び遠心分離する。次に、カニューレ又は長針を装着したシリンジを用いて塩の上からオーシストを回収する。そして、遠心分離と緩衝水中での再懸濁とを繰り返して洗浄する。次いで、オーシストを孢子にする（例えば、オーシストを2%（w/v）重クロム酸カリウムに懸濁させ、強制通気しながら28~30℃で48時間インキュベートする。次いで、遠心分離と水による希釈を繰り返して重クロム酸カリウムを除く。次いで、次亜塩素酸ナトリウムを最終濃度が10%（v/v）になるように加え、氷浴で5~10分間インキュベートする。次いで、遠心分離し、ペレットを飽和塩化ナトリウム溶液と混合する。次いで、チューブの内容物を蒸留水で覆い、5分間遠心分離する。次いで、混じりけの無い無菌のオーシストを塩と水との界面から滅菌蒸留水中に回収し、水中で遠心分離を繰り返すことにより洗浄する）。

【0323】

約 3×10^8 個の孢子形成オーシスト（Dr. Ray Fettererより贈与、USDA）を9.0 mLのPBSに懸濁させ、200×Gで10分間遠心分離した。上清（「洗浄液」）を除き、保持した。ペレット（~0.5 mL凝集体積）を、0.5 mLの30 mM HEPESに懸濁させ、合計で約15分間、ガラスホモジナイザーで氷上でホモジナイズした（準備1）。ほとんどのオーシストを粉碎し、大部分が無傷のままのスποロシストを放出した。微量のあまり硬くない、小さめの構造体（恐らくスποロゾイト）が観察可能であった。連続的ホモジナイゼーションによって、これらの構造体はかなり増えるとは思えなかった。ホモジネートを微小遠心管に移して、6000×Gで20分間遠心分離した。上清（~200 µg/mLタンパク質）を滅菌ろ過し（0.22 µm）、E. テネラ孢子形成オーシストの可溶性タンパク質抽出物（EtH-1）を消化した。

【0324】

第2の調製法では、それぞれ全量約500 µLで、ホモジネートを3つの微小遠心管に分配した。超音波処理の間ホモジネートを冷却した状態に保つように注意しながら、各懸濁液を、Fisher Scientific Ultrasonic Dismembrator（商標）（モデル100）を用いて、1秒のバーストを30回加えて超音波処理した。約80%の放出されたスποロシストを破碎させて非耐光性の「破碎（disrupted）」スποロゾイトにした。上清を貯蔵し、6000×Gで20分間微小遠心機にかけた。得られた上清を保持し、滅菌ろ過し、EtH-2を消化した。ペレットを保持し、さらなる処理（第3の抽出参照）に備えて4℃で保管した。

【0325】

アイメリアテネラ孢子形成オーシストの第3の抽出のための出発物質は、第2の抽出調製物の残余のペレットであった。このペレットを+4℃で18日間保存した。ペレット状物質を500 µLの30 mM HEPESに懸濁し、0.5 mmのガラスビーズ（BioSpec Products社製 #11079105）約1.3 mLを含む2 mLのビードビーター（Bead Beater）管に移した。次いで、この管を30 mM HEPESで完全に満たし、Mini-Beadbeater（BioSpec Products社製 型番3110BX）で、各々4800 cpmで3分間の2サイクルで処理した。3分間のサイクル間に、過剰な加温を阻止するため、この管を15分間氷上に置いた。懸濁液を短時間微小遠心機にかけ、上清をガラスビーズから分離した。この上清を8000×Gで20分間、微小遠心分離にかけ、滅菌ろ過し、活性をDC/mL12放出アッセイで試験した。

【0326】

破碎したオーシスト、スποロシスト、破碎したスποロシスト、及びスποロゾイトを部分

的にホモジナイズし、洗浄した混合物から得た上清には、少量のタンパク質中に大量の DC 活性が含まれていた。図 5 (A) に示すように、最初の抽出上清は、低ピコグラムレベルの合計タンパク質量に対して活性がある希釈曲線を与えた。20 kD のタンパク質では、これは約 50 fM である。これは抽出物中の全タンパク質が活性であることが前提だが、それは非現実的である。したがって、活性分子はおそらくこのレベルより低い活性である。異常な第 2 の活性領域が 2 日の異なる試験日で全 5 回の繰り返し実験で現れたが、それは、活性な分子がそれ自身又は他の分子と不活性な複合体 (二量体、三量体、多量体) を形成するので、その活性部位が隔離されるためであろう。十分に希釈すれば、この複合体は解離し、活性が再び現れる。

【0327】

10

第 2 の抽出では超音波処理を利用して、オーシスト及びスポロシストの破碎を促進させた。これにより活性物質の収率を実質的に変化させ、高希釈で活性の再発生を繰り返した。第 3 の抽出では、Bead Beater (商標) を利用してマイクロビーズで嚢胞を破碎したので、最初の DC アッセイで変則的に高レベルの活性を生じたが、後のアッセイでは、図 6 に非常に類似していた。活性ゼロに達するのに必要とされる希釈量は、真に注目に値する。この広範な量/応答は、上述した低希釈の「隆起 (hump)」に相関するであろう。もし異なる解離定数を有する異なるサイズの複合体が活性を出すのであれば、このような長い横ばいの応答を生ずるであろう。

【0328】

抽出物の試料を、ウシ抽出物のものと同様の手順を用いて、C8 HPLC で分離した。クロマトグラム及び活性を図 5 (B) に示す。活性の位置が高純度のウシの分子と比較して、高い保持時間にシフトしている。このことは、原虫から直接抽出した場合には、アイメリア分子に対して高い疎水性を示しているように思われる。

20

【実施例 4】

【0329】

粗膜調製及び E. テネラのスポロゾイトから得られる ARP の膜結合形態の精製手順

(1) オーシストの破碎

ホモジナイゼーション緩衝液 (HB) : 50 mM Tris pH 7.4、1 mM PMSF、50 μ l/ml プロテアーゼ阻害剤混合物及び 10 mM $ZnCl_2$ (一部の試験では) 中に 3×10^7 /ml のオーシストを含む 1 ml の懸濁液を、ガラスホモジナイザーで 20 分間ホモジナイズし、次いで、15 回の凍結-解凍サイクル (液体窒素/37 $^{\circ}C$)、又は、3 回の凍結-解凍サイクルによる氷上での 10 秒 $\times$ 36~45 バーストの超音波処理 (Fisher Scientific Ultrasonic Dismembrator、モデル 100) を行った。ホモジナイゼーションによりほぼ完全にオーシストを破碎してスポロシストを得た。超音波処理によりスポロシスト壁を除く存在する全構造体をほぼ完全に破碎した。

30

【0330】

(2) 膜沈降及び洗浄

細胞のホモジネートを 4 $^{\circ}C$ 、15000 g で 15 分、スピンのかけ、膜をペレット化した。この遠心分離法により、核、その他の細胞小器官、ペレット化が可能な ARP 凝集体及びもしあれば貯蔵顆粒も十分ペレット化できる。細胞小器官は、 $ZnCl_2$ を含まない HB 中のさらなる精製サイクルで破碎すべきである。ペレットを 1 ml の HB に懸濁させ、再び遠心分離した。遠心分離/再懸濁を、懸濁緩衝液中で、10 mM $ZnCl_2$ 有りでもう 1 回、また、10 mM $ZnCl_2$ 無しでさらに 2~3 回繰り返した。10 mM $ZnCl_2$ の存在下での 2 回の洗浄サイクルを含むこの手順により得られたペレットを、12.5.1 節に記載した免疫刺激活性試験で、粗膜調製物として用いた。

40

【0331】

(3) 膜からの ARP の放出

膜結合 ARP の精製のために、最終的ペレットを $ZnCl_2$ を含まない 100 μ l の HB に懸濁させ、プロテアーゼ阻害剤及びセレウス菌由来のホスホリパーゼ C、16 U/ml

50

1 の存在下又は非存在下で 37℃で 1～4 時間インキュベートした。

【0332】

(4) 膜遠心及び洗浄

溶液に放出された ARP を、工程 2 に記載の遠心分離により不溶性物質を分離し、次いで、洗浄サイクルを 2 回行った。合計 3 つの上清を併せた。

【0333】

(5) C8 逆相クロマトグラフィー

C8 クロマトグラフィーを、90 分で 100% 緩衝液 E から 100% 緩衝液 F の線形勾配を用いて、6 節に記載のように行った。各フラクションからの一定分量について、再生後の DC 活性を検査した (図 18)。

10

【0334】

結論

対照試料 (PLC なし) では、有意な量の DC 因子が自然発生的に溶液中に放出されることが確認された。外部の PLC を添加すると、放出される活性物質量は、4 回の実験全てで増加し、増加範囲は 10 倍から 25% にわたり、このデータは DC 因子が実際に外側の細胞膜に結合した GPI であることを示唆していた。

【0335】

自然発生的並びに PLC 消化後に溶液中に放出された物質は、逆相 HPLC クロマトグラフィーで分析するのに十分な純度であった。DC 活性物質が溶出した領域 (41～55% 緩衝液 F) は、完全にクリーンで、215 nm で 0.01 未満の UV 吸収を有する 2～3 つのピークを含んでいた。勾配での DC 活性物質の位置は、全分析試料、すなわち、PLC の存在又は非存在下、37℃で 4 時間インキュベートした後の、工程 2 の膜洗浄により得られた上清及び工程 4 の膜洗浄により得られた上清で同じであった。

20

【0336】

工程 2 の超音波処理及び膜洗浄の間のオーシスト懸濁液中の 10 mM $ZnCl_2$ の存在により、最初の 2 つの洗浄工程で有意に ARP の損失が阻止されることが示されたが、この効果は、おそらく内在するホスホリパーゼを阻止し、ARP がより小さい範囲に凝集するためであろう。 $ZnCl_2$ の非存在下で約 50% の損失であったのに対し、 $ZnCl_2$ の存在下では 1% 未満に ARP の損失が抑えられた。これにより、細胞破碎により生じた細胞内の物質を洗い流すことが可能になり、DC 因子 (ARP) のいかなる損失もなくきれいな膜調製物が得られる (この調製物中の ARP 凝集物の存在が可能となる)。 $ZnCl_2$ を含まない緩衝液中で膜ペレットを再懸濁させることにより $ZnCl_2$ を除去することで、自然発生的な活性物質の放出を回復する。 $ZnCl_2$ を含まない緩衝液中でペレットを洗浄し、37℃で 1 時間インキュベーションすることにより、約 35～50% の DC 活性のペレットを溶液中に取り出すことができ、不純物のない DC 因子 (ARP) の調製物を得ることができる。全処理に 1 日かかる。

30

【実施例 5】

【0337】

アイメリアテネラ cDNA の遺伝子クローニング及び発現

E. テネラ ARP のクローニング及び発現

全 RNA は、E. テネラから、50 mM Tris-HCl pH 7.5、10 mM EDTA、1 M チオシアン酸グアニジン (Sigma 社製)、及び 0.5% の N-ラウロイルザルコシン (Sigma 社製) を含む緩衝液 200 μ L 中で、最終濃度 1 mg/mL のプロテイナーゼ K (商標) (Sigma 社製) で $\sim 10^7$ 個のオーシストを消化処理することにより得た。混合物を、37℃で 16 時間、密封した Eppendorf (商標) チューブ中に入れて振とうさせ、次いで、チオシアン酸グアニジン 120 mg、及び TRI (商標) 試薬 (MRC, Inc. 社製) 1 mL を加えた。全 RNA の単離を、Chomczynsky 及び Sachi (1987 年) に基づく製造元の提案に従って行った。全 RNA の最終ペレットを 75% エタノールで 2 回洗浄し、空気乾燥し、0.4% ジエチルピロカルボネート (DEP) で前処理して RNase を阻害した 20 μ L の滅菌蒸留脱イオン水 (DDW) に溶解し

40

50

た。

【0338】

第1鎖cDNAを、製造元の提案に従ってSuperScript RT(商標)(Life Technologies社製)を用いて得た。全RNA約1 μ g(6 μ L)、及びオリゴ(dT₂₀)(Genemed社製)1 μ gを、全量11 μ Lとなるように共に混合し(DEP処理した滅菌DDWにより調整)、90℃で2分間加熱し、氷上に置いた。混合物に、4 μ Lの5 $\times$ 第1鎖緩衝液、2 μ Lの0.1M DTT、1 μ Lの全4個のdNTPの混合物(各25mM、Life Technologies社製)及び30Uの抗RNase(Ambion社製)を加えた。これを37℃で2分間インキュベートし、次いで200UのSuperScript RT(商標)を加え、短時間低速遠心分離にかけた。反応を37℃で100分間、次いで、70℃で15分間進行させ、酵素を不活性化した。RNaseH(4U、Life Technologies社製)を37℃で30分間加え、前工程で形成されたRNA:DNA二本鎖からRNAを消化した。 10

【0339】

二本鎖cDNAの調製を、上記で得られた第1鎖cDNA、及び、次のプライマー(Retrogen Inc社製)を用い、PCRを利用して行った。E. テネラEST由来のARP遺伝子配列に特異的な順方向プライマー、CCAGTTTTTGCTTCTTTCC、及び、アイメリアに関連するいくつかの属由来の遺伝子に相補的となるよう設計された逆方向プライマー、TARAASCCRSMTGGTRMAGGTACTC、ここで、R=A又はG、S=C又はG、及びM=A又はCである。その時点ではE. テネラ由来のC末端領域のARPの配列情報が欠けていたので、縮重している第2のプライマーを選択した。Taq-ポリメラーゼ(Life Technologies社製)を、2mMのMgCl₂及び0.2%BSAと共に用いた。PCR Express(商標)(Hybaid社製)で実行されたプログラムは、以下のとおりであった。a) 94℃で2分、50℃で45秒、72℃で1分からなる1サイクル。b) 92℃で30秒、53℃で30秒(1℃/秒の勾配で)、72℃で60秒(5秒/サイクルの時間増加率で)からなる20サイクル; c) 92℃で30秒、55℃で45秒、72℃で100秒(5秒/サイクルの時間増加率で)からなる15サイクル; 及び、d) 72℃で10分、次いで4℃の保持工程からなる1サイクル。第1鎖cDNA(0.2 μ L)を含む19.8 μ Lのポリメラーゼ混合物を、0.2mlのMulti Ultra(商標)チューブ(Sorenson BioScience, Inc.社製)で反応させた。プログラムの終了後、全体積を、RunOne(商標)cell and power supply unit(EmbiTec社製)を用いて、0.5 $\times$ TAE(Tris-acetate:酢酸、pH8.5)緩衝液上で作成した0.8%アガロースゲルで、50Vで分離した。ゲルを調製したばかりの0.05%臭化エチジウム中で10分間染色することにより視覚化し、短時間蒸留水で洗浄し、Transilluminator Model M-20E(VWR社製)で観察した。1つの主要なバンドを見極め、ゲルから切断し、Wizard PCR(商標)キット(Promega社製)で製造元の手順を用いて洗浄した。断片をレジンから50 μ Lの滅菌DDWに溶出させた。 20 30

【0340】

cDNAを、製造元の提案に従って、pCR2.1 TOP0クローニングベクター(Invitrogen社製)に挿入した。個々の断片(水中4 μ L)を1 μ Lのベクターと混合し、室温で5分間インキュベートし、氷上に置いた。形質転換手順として、のNovaBlue(商標)コンピテント細胞(Novagen社製)、又はTransforMax EC100 Electrocompetent(商標)細胞(Epi 40 centre社製)のいずれかの大腸菌40 μ Lを、1~2 μ Lの上記混合物と混合し、ECM399型エレクトロポレーター(BTX社製)(EC100細胞用)の0.1cmキューベット(BTX社製)中での1500V、5m秒のエレクトロポレーション又はヒートショック法(30秒、43℃、NovaBlue細胞用)による形質転換のいずれかを行った。形質転換された混合物を500 μ LのSOC培地で希釈し、37℃で1時間インキュベートした。次いで、細菌懸濁液を、100 μ L/プレートで、LB培地アンピシリン(100 μ g/mL)を含む予熱した(37℃)プレートに蒔いた。蒔く直前にIPTG及びX-galをプレートに拡散させた。白色コロニー(インサート含有)を選択し、40 μ g/mLカナマイシンを含むLBプレートに再び蒔き、1つのコロニーを得た。各クローンから得た単独のコロニーを、ベクターに特異的なプライマー(M13順方向(-40)、及びM 50

1 3 逆方向)を用いたPCRによるインサートサイズの分析に用いた。マグネシウム濃度が3 mMで、最終体積が10 μ L/チューブであった以外は、PCRの条件は上記と同様であった。断片を臭化エチジウムで上記のように視覚化した。インサートサイズが0.5~0.6 k Bのクローンを、利用可能なEST:順方向プライマーAAATGGGAGAAGCAGACACC、及び逆方向プライマーTCCGCGAAGTTAAGAGCTGTTGの比較分析に基づいてE.テネラARPに特異的であるように設計されたプライマー(Retrogen Inc.社により合成されたもの)を用いたPCRにより分析した。PCRプログラムは、アニーリング温度が第2段階で56 $^{\circ}$ Cであり、第3段階で58 $^{\circ}$ Cであった以外は上記と同じであった。アガロースゲルでシングルバンドを示したクローンを、更なる調査のために選択した。

【0341】

DC/IL-12アッセイ用の試料を、選択したクローンを、滅菌15 mLポリプロピレン製遠心管(Fisher社製)内で40 μ g/mLのカナマイシンを添加された3 mLの液体LB培地中で、好気条件下で育成することにより調製した(37 $^{\circ}$ Cで20時間振盪)。細菌細胞を、微小遠心HSC10K(商標)(Savant社製)で+4 $^{\circ}$ Cで5分間、10,000 $\times$ gで遠心分離することにより、1.7 mLのSafeSeal Multi(商標)微小遠心管(Sorenson BioScience, Inc.社製)に回収した。上清を除去し、0.22 μ mの酢酸セルロースフィルター(Costar社製)(3,000 $\times$ gで5分)を備えたSpin-X遠心管で滅菌ろ過した。細菌細胞を0.5 mLの滅菌ろ過したPBSで洗浄し、上記と同じ条件下で再ペレット化し、0.2 mLの滅菌PBSに再懸濁させた。細菌細胞を、Sonic Dismembrator(商標)100型(Fisher社製)で、30秒間隔で10秒のパルスをもつ3回、超音波により破碎させたが、全ての処理は氷上で行った。試料を、HSC10Kで遠心分離(10,000 $\times$ g、10分、+4 $^{\circ}$ C)することにより透澄化し、上清を上記のようにSpin-Xチューブで滅菌ろ過した。DCアッセイでは、アッセイの各ウェルに付き、各使用済みの培地及び破碎した細菌の上清から10 μ Lを用いた。

【0342】

E.テネラcDNA由来の大腸菌から得られたARPの組換え型は、精製したウシの分子及びE.テネラの卵母細胞から抽出されたARPとほぼ同じ特異的活性を有している。図5参照。約50フェムトモルの活性タンパク質濃度で50%の活性が生じている。組換え物質をクローニングベクター、pCR2.1 TOP0から得た。ベクターにより、LacZ遺伝子に対するフレームに配置されたcDNAからの発現が可能となる。 β -ガラクトシダーゼに融合したARPタンパク質として全構造体を、1 Lの最少増殖培地の上清から得た。上清を、6節に記載の方法によりDEAEクロマトグラフィーを用いて精製し、6節に記載の方法を用いてC8 HPLCにより分離した。約200 ngのタンパク質を含む、2つの活性なピークのうちの1つをDCアッセイで評価したところ、図6の応答が得られた。

【0343】

E.テネラARPのcDNAを、pCR2.1 TOP0クローニングベクター(Invitrogen社製)に挿入した。適当なクローンをインサートサイズ、配列、及び配向により選択した。最適化した発現ベクターではなかったが、融合タンパク質形態のインサートから作製されたタンパク質もあり、DC活性を示した。EtU3で示されるインサートのDNA配列を、図7(A)に示す。これらのインサートは、大腸菌及び真核細胞の発現ベクターにトランスフェクトされるであろう。発現したタンパク質は、同定及び精製を可能にするための除去可能な標識配列を含むであろう。LacZプロモーターに対し直接又は逆配向のいずれかで導入されたインサートを有するクローニングベクターを含む2つの大腸菌の培養液から得られる生成物の活性物質を、図7(B)に示す。正しく配向されたARP遺伝子しかDC活性を示さなかった。このことは、2つの培養液間でその他の全てが同じであるので、活性はこの分子に関係しているという証拠が明らかに示されている。

【0344】

最小無機培地で育成した大腸菌中のクローニングベクターにより得られたタンパク質のC8クロマトグラフィー精製結果を、図7(C)に示し、DC活性を挿入図に示す。活性は弱い、スποロゾイトから抽出された活性物質と同様の保持時間に位置づけられる。大

10

20

30

40

50

腸菌の培地を最初にD E A Eクロマトグラフィー、次いでSuperdex（商標）クロマトグラフィー（手順の詳細記述については6節参照）により精製したところ、高純度の生成物を得た。純度は、分析用C 8クロマトグラフィーカラムの2つの活性ピークとして示される（図7（C））。このデータは、N末端領域が、D C活性のいかなる損失もなく有意に伸長できることを示唆している。N末端で β -ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク質（M a l E）、F L A Gペプチド、又はセルロース結合タンパク質（C e n A）の一部のいずれかと融合されたA R P分子は、有意な活性を保持していた。その上、C末端（YからH、及びGからA又はSのいずれか）付近の2つの位置での点変異は、明らかに突然変異のD C活性を変化させなかった。A R P分子の活性におけるC末端の重要性を明らかにするために、短縮されたA R P分子をP C R（プライマー：CTATGTGAGAGCATCAGCTTTG）によりC末端の前に終止コドンの14個のアミノ酸を導入することにより作成した。完全長の対照と比較して、D C活性は有意（桁違い）に低いことを示した。P C R（プライマー：GAAGGAGTTTGCAAAATGGGAA）によりA T G開始コドンの前にShine-Dalgarnoリボソーム結合部位（R B S）が導入されたT 7プロモーターから、両方とも発現した。したがって、欠落した配列（TALNFAEYLHQSGF）は、A R Pの構造又は活性のいずれかに重要である。

【0345】

c D N Aを発現ベクター（pMAL-pZE、New England Biolabs社製）のトランスフェクションにより、D C活性を有するクローンを成功裏に作成した。このベクターは、エンテロキナーゼ切断部位に隣接したm a l E遺伝子（N末端でのマルトース結合タンパク質との融合用）を含んでおり、発現タンパク質の迅速な分離及び精製を可能にしている。融合A R Pタンパク質をI P T G誘導により発現させ、D Cアッセイによりチェックした場合に活性であると思われた。エンテロキナーゼを用いた切断によるA R Pタンパク質の融合構造体からの放出によりD C活性は向上しなかったもので、組換え分子の外来部位は活性に影響しないであろうことが示された。

【0346】

哺乳類細胞でのA R Pの安定な発現では、E .テネラA R P遺伝子を2つのベクター、p Tracer-CMV2（Invitrogen社製）又はp3xFLAG-CMV9（Sigma社製）に入れて再クローン化した。ベクターpTracer-CMV2への一方向性クローニングを、KpnI及びXbaI部位に入れて行った。クローニングの断片は、新たに作成した部位Kpn I（開始コドンの前）及びXba I（終止コドンの後ろ）を有するプライマーを用いた遺伝子のP C R増幅により作成した。開始コドンを欠損した、Hind III部位に隣接するpMal-p2eベクター中の構築物から切り出されたA R P遺伝子を、ベクターp3xFLAG-CMV9のHind III部位に入れてクローニングに用いた。分泌シグナルペプチド並びに3xFLAGペプチドに関連する遺伝子の配向及びインフレーム位置を、インサートの完全配列決定により確認した。両方のプラスミドを用いて、製造元の提案に従ってLipofectamine 2000（Invitrogen社製）を用いてC H O - K 1及びS - 180細胞系を形質転換した。抗生物質（pTracer-CMV2ではZeocine、p3xFLAG-CMV9ではG-418）を含む増殖培地中で選別後に、形質転換した細胞の個別のクローンを得た後、96ウェルプレートに低細胞密度で再び蒔いた。両方のケースで、使用済みの培地は、D Cアッセイ（103希釈まで）で高活性を示し、このことはA R Pが細胞から分泌していることを意味した。C 8 R Pクロマトグラフィーによる培地の分析により、細菌で発現されたA R Pのものに近い位置で溶出するD C活性物質の1つのピークの存在が示された。試算により、哺乳類細胞で発現されたA R Pの特異的活性は、細菌で発現されたタンパク質のものに相当するか、又はそれより高いことが示された。

【0347】

癌の生存及び成長に影響する多くのサイトカイン、ケモカイン及び増殖因子の遺伝子が、近年癌の遺伝子治療に導入されている。特に、インターロイキン12（I L 12）の遺伝子を、様々な実験用癌細胞に導入したところ、細胞の腫瘍形成及び／又は腫瘍成長の顕著な減少が得られた。恐らく、癌細胞により放出されたI L 12が、局所的な生得の免疫応答を刺激し、腫瘍の成長を遅らせるか、或いは腫瘍を一斉に排除するのであろう。

【0348】

A R P 遺伝子の単離及び発現の成功により、現在癌免疫療法における類似の使用を提案することが可能となっている。A R P は、恐らく I L 1 2 の放出に加えて D C の成熟及び活性化を包含する多くの経路を誘導するので、A R P 遺伝子の使用は、恐らく特異的因子（例えば I L - 1 2）の遺伝子の使用よりも一層効果的であろう。したがって、より「完全な」免疫応答が引き起こされる。

【0349】

癌の免疫治療における A R P 遺伝子の使用例を、以下に概説する。腫瘍をがん患者から切除し、短期培養する。培養した癌細胞に、搬出可能な発現ベクター中の A R P 遺伝子をトランスフェクトし、サイトカイン及びケモカインなどのその他の潜在的に有用な遺伝子も同様にトランスフェクトしてもよい。致死的な放射線を照射したトランスフェクション癌細胞を、患者に再導入する。トランスフェクション癌細胞は、*i n s i t u*で A R P を局所的に放出し、それにより隣接する D C を活性化し、I L 1 2 及び可能性のあるその他の免疫変調成分を放出させるであろう。この応答により、トランスフェクション癌細胞に対する局所的免疫応答を刺激することができるであろう。癌細胞が殺傷され、腫瘍に関連する抗原を放出し、それを回収し、処理し、D C を提示させ、身体に存在する他の腫瘍細胞（原発腫瘍、転移、再発）に対する特異的な適応的（記憶）免疫応答を生じる。

【0350】

E 1 クローンからの E . テネラ A R P の単離

A R P をコードする E . テネラ遺伝子を、順方向プライマー（ATGGGTGAAGAGGCTGATACTC AGG）及び逆方向プライマー（TTAGAAGCCGCCCTGGTACAGGTACTCAGCGA）を用いて P C R によりクローン化した。P C R 断片を、clonableRT（Novagen社製）を用いて一晩 1 6 °C で pET -Blue-1 acceptor vector（Novagen社製）に連結させた。得られたプラスミドを、カルベニシリン／テトラサイクリン及び白／青クローン選択を用いて、大腸菌宿主 Nova Blue に入れて形質転換した。陽性クローンを、同じ順方向プライマー及び pET Blue Down primer # 7 0 6 0 3 - 3（Novagen社製）を用いて、コロニー P C R により同定し、正しい配向の D N A インサートであること確認した。インサートの D N A 配列を、配列決定法により確認した。陽性クローンのプラスミドを単離し、タンパク質を発現させるために宿主株 TurnerTM (DE3) pLacI（Novagen社製）に入れて形質転換した。1つの安定なクローンを E 1 と称した。（図 2 0 参照）。クローン E 1 を、2 0 0 4 年 7 月 1 5 日に、American Type Culture Collection に寄託し、特許寄託番号__が割り当てられた。

【0351】

寒天培地からの E 1 の単一クローンを、5 0 μ g / m l カルベニシリン及び 3 4 μ g / m l クロラムフェニコールの存在下で、1 % グルコースを添加した 1 0 m l の L B 培地に播種した。培養液を、2 5 0 r p m で振盪しながら一晩 3 7 °C に維持した。次いで、培養液を 1 リットルの同じ培地に加え、2 . 5 時間成長させたところ、6 0 0 n m での吸収は 0 . 6 ~ 0 . 8 であった。タンパク質発現を、イソプロピルー 1 - チオー β - D - ガラクトピラノシド（I P T G）を 0 . 5 m M の最終濃度となるように加えることにより誘導した。4 時間後、細菌を 8 , 0 0 0 r p m (6 , 5 0 0 × g) で 2 0 分間遠心分離することにより、回収した。上清を除いて保存し、ペレットを使用するまで凍結させた。

【0352】

細菌ペレットを、3 0 m l の P B S に再懸濁させ、1 , 6 0 0 p s i で 3 回フレンチプレスに通し、細胞を破碎した。押圧した細胞（press cell）を P B S ですすぎ、残りの細胞試料を回収した。試料を、SS34 rotor を用いて、3 0 分間、1 5 , 0 0 0 r p m (1 7 , 5 0 0 × g) で遠心分離にかけて細胞片を除いた。上清及びペレットを別々に保存した。上清の全量は、合計で約 3 8 m l となった。次いで、硫酸アンモニウムを 3 0 % の飽和度になるように上清に加えた。4 °C で 1 時間の攪拌後、沈殿を遠心分離により除いた。硫酸アンモニウムをさらに加えて、4 5 % の飽和度とした。1 時間後、沈殿を除いた。硫酸アンモニウムを 8 0 % の飽和度になるように加えた。試料を 4 °C で一晩攪拌した。沈殿を遠心分離により回収した。ペレットを、1 . 5 M 硫酸アンモニウム、5 0 m M リン酸ナトリウム、p H 7 . 0 中で再懸濁させた。次いで、試料を遠心分離して、溶解しなかった物

10

20

30

40

50

質を除いた。

【0353】

Phenyl-Sepharose（商標）カラムの疎水性クロマトグラフィー：

溶解性フラクションを、phenyl-Sepharoseカラム（Fast Flow、(low sub)、Pharmacia社製、 3×3.3 cm）の疎水性クロマトグラフィーにかけた。試料をカラムにかけた後、それをベースラインが得られるまで同じ緩衝液で洗浄した。1.5 Mから0 Mの逆の線形勾配（reverse linear gradient）の硫酸アンモニウム、50 mMリン酸Na、pH 7.0（各緩衝液槽ごとに200 ml）を、室温で流速2 ml/分で適用した。5 mlのフラクションを回収した。選択したフラクションをDCアッセイ及びSDS-PAGEで分析した。活性フラクションを貯蔵し、4℃で一晩、0.2 M NaCl、10 mMリン酸Na、pH 7.0で透析し、DEAE-Sepharose（商標）クロマトグラフィーに備えた。

10

【0354】

DEAE-Sepharose（商標）クロマトグラフィー：

DEAE-Sepharose（商標）カラム（Fast Flow、Pharmacia社製、 1.5×5.5 cm）を最初の緩衝液（0.2 M NaCl、10 mMリン酸Na、pH 7.0）で平衡化した。試料をかけた後、カラムを同じ緩衝液で洗浄し、Abs 280で観察しながら結合していない物質を除いた。吸収がベースラインにきた時に、線形勾配（0.2 M～0.6 M NaClの10 mMリン酸Na溶液、pH 7.0、各緩衝液ごとに200 ml）をかけた。5 mlのフラクションを回収した。溶出したフラクションをDCアッセイ及びSDS-PAGEで解析した。

20

【0355】

Superdex（商標）サイズ排除クロマトグラフィー

最終的な精製及びエンドトキシンの除去は、6節に記載の方法を用いて、Superdex（商標）75クロマトグラフィーにより達成した。活性試料を凍結する代わりに4℃で貯蔵した。

【0356】

品質管理のためのC8クロマトグラフィー

Superdexクロマトグラフィーから得た貯蔵した活性物質試料で、逆相HPLC（9節に記載したように）を行った。

【実施例6】

30

【0357】

ARPの物理特性

長年のARPの不純物を含む調製物を取り扱っていた間、分子の物理的特性の情報を得ることが困難であった。当初は、例えば、それがタンパク質か又は他の種類の高分子であるのかがはっきりしていなかった。後から考えると、タンパク質の非常に強い特性というのは、それが大抵任意のほぼ純粋な調製物中で非常に微量な成分であったということを指していたことは明らかである。ARP分子の性質に関連するいくつかの発見が以下の小節に含まれている。

【0358】

分子量

40

いくつかの実験により、ARPの分子量範囲は20 kD近くに中心があることが示されている。この分子量に関する多くの間接証拠が、既知の活性フラクションでのSDS-PAGEのゲルバンドから得られている。同様に、通常、分子篩（sieving）クロマトグラフィーカラムによりこの範囲で活性物質が溶出されている。直接的証拠は、大規模なSDS-PAGEスラブゲルから得られている。活性物質は、SDSでの煮沸を避けるために試料調製物に僅かな変更を加えてこの系に適用し、電気泳動後にゲルをスライスし、タンパク質を溶出させ、再生し、試験した。唯一回収可能な活性物質は、20 kD（ 18 ± 3 kD）の範囲に位置していた。

【0359】

このことは、最終的な精製及び配列決定で確認された。トリのアイメリア由来の相同タ

50

ンパク質が 18.5 kD の予想量を有することが報告されており、ペプチド断片に対する抗体は、E. テネラ及び E. アセルブリナ (Lillihøj 他、2000 年) 由来の 20 kD のバンドと反応する。

【0360】

pI の決定

等電点電気泳動法後のアクリルアミドゲルから得られるタンパク質の抽出及び再折り畳みについてのいくつかの実験により、NK アッセイのタンパク質活性では、4.0～4.7 の範囲にあることを明らかにしたが、E. アセルブリナ及び E. テネラの ARP タンパク質に対する予想される pI は 4.3～4.5 である。これらの結果は、有意な数のカルボキシ基を含む酸性タンパク質に一致している。

10

【0361】

等電点電気泳動法を、会社の指示に従って、プレキャスト pH 3～7 IEF gel (Novex 社製) を用いて行った。Broad pI calibration kit (Pharmacia 社製) を pI 計算の標準として用いた。

【0362】

ARP 活性の pH 依存性

いくつかの実験により、ARP 活性の pH 依存性が明らかにされた。粗原料では、NK 活性は、高い pH > 10、及び低い pH < 4 の両方で有意に減少することが見出された。実験によっては、pH 4.0 未満で最小活性が観察されたが、ある実験は、3.4 < pH < 3.7 の範囲に最小活性があることを示した。高い pH での活性の損失は、少なくとも一部は再生処理により回復することができるが、低い pH の影響は、多くの場合 (特に、pH < 2.0 では)、不可逆的であった。

20

【0363】

温度安定性

製剤 BBX-01 の安定性を、いくつかの温度で評価して、保存寿命及び保存条件の決定に役立てた。結果を表 6 に示す。

【0364】

【表 6】

BBX-01 熱安定性の評価

30

条件	50%の損失に至るまでの時間 (推定される指数関数的損失から評価した)	所見 (NK アッセイにより測定した活性)
-80°C	>> 1 年	24 ヶ月以内に検出可能な損失なし
4°C	>18 ヶ月	18 ヶ月以内に検出可能な損失なし
外界温度 (~24°C)	~6 週	2 週間で ~20 % の損失
37°C	~6 日	
56°C	~11 分	
16 回の凍結-解凍サイクル (液体 N ₂ から外界温度)		活性の検出可能な損失なし

40

【0365】

長期間の冷凍及び冷蔵条件下で活性は減少しなかったが、温度の増加に連れて減少した。しかし、37°C でさえ半減期はほぼ 1 週間だったので、このことは薬物としての有用性が体温での自己分解により制限されないであろうことを示唆している。

【0366】

ヒト血清アルブミン中での E1 の安定性

1、5、又は 10 % w/v の HSA (ヒト血清アルブミン) の存在下における組換え A

50

R PであるE 1 (1 μ g/mL)の安定性についての予備調査は、4℃で保存したときに、4、11、25、39及び54日では活性の損失がないことを示す。より高い温度の試験でも顕著な安定性が示される。H S Aの存在下で、37℃で41日、55℃で6時間又は70℃で2時間のいずれかの後でも活性の損失は検出されなかった。B B X-01を超える安定性の増加は、恐らくE 1調製物の純度がより高く、予想されるプロテアーゼ夾雑物を回避しているためであろう。ヒト臨床試験での使用として、A R P E 1を、3% H S Aと共に1 μ g/mLで処方し、4℃で少なくとも55週間、D Cアッセイで測定したときに活性の損失もなく保存した。

【0367】

A R Pの酵素感受性

部分的に精製した物質は、タンパク質を含んでいたが、核酸、糖脂質、リポ多糖、又はペプチド成分とこれらのいくつかの複合体は含んでいなかったという有力な証拠があった。部分的に精製したフラクションを、トリプシン、キモトリプシン、V8、サブチリシン、及びパインなどのプロテアーゼを用いて処理することにより、活性物質の除去に全て成功した。慎重な滴定実験により、概して、全活性を除去するのにプロテアーゼのサブチリシン由来の1つのカットで十分であったことが示されたが、キモトリプシンは活性を10分の1減少させるのに3つのカットを必要とした。これらの結果は、活性分子の主要成分がタンパク質であったという有力な証拠をもたらした。改良したタンパク質又は複合体が活性に重要であった可能性を検証するために、さらに分解酵素を試験した。

【0368】

ヌクレアーゼ、例えばR N a s e A及びD N a s e Iを用いたいくつかの実験では、A R Pの活性はN K及びI N F γ アッセイで追跡した。両酵素において、酵素なしで同じ条件下でインキュベートしたA R Pと比較して、37℃でのインキュベーションの9時間及び24時間後に活性の損失はなかった。どちらのケースでも、4%アガロースゲルでのN K-活性成分の移動が酵素を用いた処理により影響を受けず、さらに可視の核酸バンドは消失しない。このことは、核タンパク質複合体が活性に重要で無かったことを示していた。

【0369】

粗ウシタンパク質調製物のN結合炭水化物部分に特異的なフラボバクテリウムメニンゴセプチカム由来のペプチド-N-グリコシダーゼFを用いた脱グリコシル化に関し、脱グリコシル化酵素 (deglycosylase) を用いて、いくつかの実験も行われた。これらは、消化後に、活性分子の位置がポリアクリルアミドゲル上で移動しなかったことを示した。しかし、活性は酵素を用いたインキュベーション後に、約40%だけ減少した。このことは短い炭水化物鎖が分子に安定性を与えるであろうことの証拠を与える、又は、余分な負電荷 (A s n > A s p) の導入のためにその除去により活性を減少させる。ウシA R P配列には、2つの有望なN-グリコシル化部位 (Asn-Gly-Thr) が存在している (表4参照)。

【0370】

A R PのD C活性及び凝集状態に対する二価陽イオンの影響

アルカリ土類金属の塩 (C a C l ₂、M g C l ₂) 及び遷移金属の塩 (Z n C l ₂ 及び C u C l ₂) について、準精製したウシ腸由来のA R P調製物及び組換えA R Pにより誘導されるD C活性の阻害に関し、試験をした。粗A R P調製物を用いて、Z n C l ₂ 及び C u C l ₂ は、mM~ μ Mの濃度範囲 (生理学的範囲内である) で一貫して活性阻害を示したが、C a C l ₂ 及びM g C l ₂ では示さなかった。銅及び亜鉛とA R Pとの相互作用にいくらかの相違があり、さらに探求する必要がある。両方の遷移金属が、精製した組換えA R PのD C活性も阻害した。しかし、10mMアルカリ土類金属の塩との組換えA R Pのプレインキュベーションを伴う予備実験では、無機培地 (2mM M g S O ₄、0.1mM C a C l ₂ を含み、金属の痕跡のないM9) 又はリッチな (L B) 培地のいずれかで増殖させた細菌由来のA R P調製物中で異なる効果を示した。前者はカルシウムイオン及びマグネシウムイオンの両方により阻害されたが、後者はマグネシウムイオンによっ

10

20

30

40

50

てのみ阻害された。この違いは、合成の間の二価金属又はその他の補助因子の局所濃度及びA R Pの配座異性体の折り畳まれ、生じた異なる組のせいである可能性がある。

【0371】

Zn^{2+} による活性阻害のメカニズムに関する実験により、10 mM $ZnCl_2$ の存在下でA R Pの凝集が生じ、15000 gで30分間の遠心分離によりペレット化可能な高分子量の構造体を生じることが明らかにされた。このデータは、二価カチオンの結合が、A R Pの三次構造で電荷を誘導し、内側の疎水性領域を晒し、凝集及び／又はその他のタンパク質との相互作用をもたらし、このことが活性の損失に導くことを示唆している。

【0372】

両金属グループの代表による阻害は、A R P処理及び精製手順の設計に影響を及ぼす可能性がある。アルカリ土類金属は、全組織及び臓器に豊富にある。 Zn^{2+} の生理的濃度は、血清中の10 μM から精液中の3 mMまで様々である。 Zn^{2+} 及び Cu^{2+} の濃度は、悪性の物を含むいくつかの疾患の間で変化することが示された。組織及び／又は病態によっては、これらの金属濃度は、A R Pの抗腫瘍活性を妨げるのに十分高いと思われる。これらのケースでは、金属キレート剤の局所投与がA R P処理手順に含まれるべきであろう。

【実施例7】

【0373】

A R P活性の測定

動物腫瘍モデルを用いた腫瘍保護測定

BALB/c雄マウスを通常用い、Harlan Industries社から約7週齢のものを入手した。それらは、2日間環境に順応させた後、任意の処置を施した。マウスは、ワイヤー製のふたを有し、水の容器及びフードペレット（マウスの餌）が備えられた、16 cm×26 cmのプラスチック製ケージ内に、1つのケージ当り5匹以下で飼育した。動物は、自由に水及び餌に接触可能にした。残物は週に一度取り替え、水及び餌は毎日点検した。室内照明は一日24時間点灯した。

【0374】

S-180細胞系（ATCC CCL 8, batch F4805）を、この同じ系を動物及び培地（血清含有及び血清なしの条件の両方で）の両方で増殖させることができたので、腫瘍モデルとして選択した。腫瘍を組織培養液から得られる細胞懸濁液の注射によりマウスに定着させた。約 1×10^6 から 3×10^6 個の細胞を、マウス一匹に付き腹腔内に注射した。腫瘍が、腹腔の多数の部位で多数の充実性結節として発生し、10から15日以内に大半の動物で死を引き起こした。動物の生存の観察に加えて、それらの状態を腫瘍成長の進行として質的に評価し、腫瘍指数を作成するのに用いた。

【0375】

治療手順

各実験の治療群は、5匹の動物から構成され、各実験に用いられる合計数から無作為に選んだ。治療は、5日間の毎日の腹腔内注射（ほぼ正午に）から構成されていて、S-180腫瘍細胞の注射後1日目を開始した。注射量は、全治療で0.5 mlで一定に保たれた。負対照群は、治療溶液に用いた緩衝液のみの偽注射を受けた。動物は、腫瘍成長による死まで、又はもし退行が生じたなら100日目まで追跡した。治療に対する任意の遅延型反応を観察するために、自然の寿命まで生き延びさせた動物もあった。

【0376】

腫瘍指数

不完全な腫瘍モデル実験での薬物活性の推定値を確立するために、動物の観察による調査並びに生存状況を組み合わせた指標を開発した。マウスの腹腔内のS180腫瘍の存在、定着及び末期的進行を、週に1度又は2度触診した。腫瘍の発生及び進行は、以下の基準に従ってこれらのマウスで評価した。「0」－触診された腫瘍なし；「1」－初発腫瘍が存在するように思われる；小さいサイズ（～1 mm）；腹部膨張なし；「2」－腫瘍が定着したように見える；多少の腹部膨満；明らかな悪液質なし；「3」－腫瘍がよく定着

し、顕著な腹部膨満、動物が悪液質を示す；及び、「4」—動物が死んだ。処置群の指標値は、群中の個々のマウスの指標の平均である。

【0377】

NKアッセイ

材料

DMEM/F12培地、ウシ胎児血清（FCS）、及びヒト組換えインターロイキン2（hr-IL2）（R & D Systems, Inc社製）は、Gibco/BRLから入手した。Percoll（商標）（Pharmacia, Inc社製）、ゲンタマイシン及びMTTは、Sigma Chemical Co.社から入手した。マウス上皮細胞成長因子（EGF）、ウシインシュリン及びヒトトランスフェリンは、Collaborative Research Corpから購入した。腫瘍研究、小腸抽出物（MEX-SI）の単離及び脾臓由来のNK細胞の単離に用いた雄Balb/Cマウスは、Harlan Bioproducts for Science (Indianapolis, IN)から購入した。

【0378】

NK（LGL）細胞の単離

脾臓（1回の実験当たり10～15個）を、6～10週齢の雄Balb/Cマウスから無菌的に取り出した。脾細胞を、2枚の滅菌ガラス製顕微鏡用スライドを用いて脾臓から「圧搾（squeezed）」した。細胞を10%ウシ胎児血清（FCS）及びゲンタマイシン（50 µg/mL）を含む約10 mLのDMEM/F12中で回収した。回収した細胞を70 µmのナイロンメッシュスクリーンに通すことにより、単一細胞懸濁液を得た。細胞ペレットをPBSで一回洗浄後（675 × gで5分間遠心分離した）、赤血球細胞を短時間の低浸透圧ショック（すなわち、滅菌蒸留脱イオン化水に曝し、直ぐに適当な容量の10 × PBSで処理して等張性に戻した）により溶解した。残った細胞を遠心分離にかけ、DMEM/F12 + 10% FCSに再懸濁させ、DMEM/F12 + 10% FCS（フラスコ1個当たり5個の脾臓から得た細胞）を各々25 mL含む75 cm²のフラスコに移した。細胞を37℃で60分間インキュベートし、選択的に付着細胞を容易に取り除いた（主に繊維芽細胞及びマクロファージ）。インキュベーション後、フラスコをゆっくり振盪させ、非付着細胞を除き、遠心分離でペレット化し、DMEM/F12（添加物なし）（1.0 mL/10⁸細胞）に再懸濁させた。15 mLの遠心管中の70%/60%/40%（2 mL/4 mL/4 mL）Percoll（商標）勾配上に1.0 mLの容量のこれらの細胞懸濁液を注意深く積層させ、30分間675 × Gで遠心分離にかけた。40/60界面の沈殿物が主に大型顆粒リンパ球（LGL）に相当する細胞をNK細胞で強化した。これらの細胞を注意深くパスツールピペットで除き、遠心分離にかけ、PBSで1回洗浄し、ゲンタマイシン（50 µg/mL）及び10%ウシ胎児血清を追加した約5 mLのDMEM/F12に再懸濁させた。細胞の計数及びLGL細胞の適当な希釈をこれらの細胞を用いて以下のように行った。便宜上、このLGL細胞調製物を、同義的にNK細胞という。

【0379】

NK細胞媒介性細胞毒性（NK-CMC）アッセイ

マウス sarcoma 180細胞を、10% FCS及びゲンタマイシン（50 µg/mL）を追加した100 µLのDMEM/F12中、5 × 10³細胞/ウェルの密度で96ウェルプレートに蒔いた。数時間適切な付着を確実にさせた後、試験試料（例えば、ARPタンパク質、正又は負の対照群などの試料）を10～25 µLの体積で各ウェルに加えた。NK細胞を100 µLの添加したDMEM/F12に次の指定した密度で加えた。0 NK細胞/ウェル、5 × 10⁴ NK細胞/ウェル（1:10 標的/エフェクター比）、1.25 × 10⁵ NK細胞/ウェル（1:25 標的/エフェクター比）、2.5 × 10⁵ NK細胞/ウェル（1:50 標的/エフェクター比）、及び5 × 10⁵ NK細胞/ウェル（1:100 標的/エフェクター比）。（注意：通常、1:50及び1:100の比のみスクリーニング目的に用いた。IL2を最終濃度125 U/mLで培地添加物として加えた）。共培養液を4日間、37℃、5% CO₂でインキュベートし、終結し、MTT細胞生存率定量試験（Mossmann, T. J. Immunol. Methods 65:55 (1983)；及びSigma Chemical MTT (M5655) product application note参照）を用いて生体染色した。各ウェルから培地

を注意深く吸引し、残った細胞を2回洗浄し、MTT (50 μ g/mL) を含む100 μ LのDMEM/F12+10%FCSと取り替えた。プレートにさらに、37°Cで4~5時間インキュベートした。プレートリーダー (600nmフィルター) を活用して吸収を測定した。吸収の減少は、ウェル当りの精細胞の数の減少 (すなわち、細胞毒性) を示していた。0.04M HClを含む2-プロパノール200 μ Lを含む培地で置き換えることにより、MTTを可溶化した後、吸収を再度測定した。これによりウェル全体に統一色を与え、不均等な細胞分布による吸収測定値の矛盾を最小化した。負 (PBS/BSA) 及び正 (内部標準) の対照群と比較して、NK誘導活性を計算した。

【0380】

樹状細胞 (DC) アッセイ

10

BEXの準精製調製物の活性を調査するために、単離したばかりの樹状細胞 (DC) からのIL12の放出をDC活性の指標として追跡するアッセイを開発した。この活性は、in vitroでのNK-CMC及びin vivoでの抗腫瘍活性の両方と高い相関関係にある。

【0381】

特殊試薬

マウス組換えGM-CSF、IL4及びIFN γ 及び抗マウスCD40は、R&D Systems社 (Minneapolis, MN) から入手した。コラゲナーゼDは、Boehringer Mannheim社 (Indianapolis, IN) から入手した。MiniMACS磁気細胞分離システムは、Miltenyi Biotech社 (Auburn, CA) から入手した。

20

【0382】

DCの単離及び培養

DCは、Miltenyi Biotech社から購入した磁気支援型細胞分離 (magnetic assisted cell separation) (MACS) システムを用いて、8~12週齢の雄BALB/cマウス (Haran Bioproducts for Science社製、Indianapolis, IN) の脾臓から単離した。概説すると、脾臓を無菌的にマウスから取り出し、5mLの維持培地 (10%FCS及び抗生物質が添加されたDMEM/F12) を含むペトリ皿に入れた。次いで、各脾臓に~0.5mLずつコラゲナーゼD溶液 (1mg/mLを含む10mM Hepes-NaOH、pH7.4、150mM NaCl、5mM MgCl₂、1.8mM CaCl₂) を注射し、5~10mLのコラゲナーゼDに入れ、5~6片に切断し、37°Cで45~60分間インキュベートした。次いで、コラゲナーゼ消化した脾臓をスライドガラスを用いて処理し、70 μ mのナイロンメッシュセルストレイナー (cell strainer) に通した。ストレイナーに40mLの培地を流した後、細胞を遠心分離にかけ (8分@200 $\times$ G)、1mLのPBSに懸濁させ、細胞懸濁液を室温で5分間、10mLのlysis緩衝液 (155mM NH₄Cl、10mM KHCO₃、0.1mM EDTA) 中でインキュベートすることにより赤血球細胞を溶解させ、次いでPBS中で50mLに希釈し、遠心分離した (8分@200 $\times$ G)。次いで、碑細胞をMACS緩衝液 (2mM EDTA及び0.5% BSAを添加したPBS pH7.2) 10mLに懸濁させ、40 μ mのナイロンメッシュセルストレイナーに通し、MACS緩衝液40mLを流した。この時点で細胞の予備的計数を行い、遠心分離にかけた (8分@200 $\times$ G)。碑細胞を、MACS緩衝液400 μ L当り、10⁸個の細胞密度で懸濁させた。抗CD11c抗体で被覆したParamagnetic MicroBeadsを碑細胞懸濁液 (100 μ L/10⁸細胞) と混合し、+4°Cで15分間インキュベートし、洗浄し、MACS緩衝液1.0mLに懸濁させ、強磁場内に置かれたMS+分離カラムに通した。CD11c⁺細胞をカラムに保持したが、CD11c⁻細胞は、流入細胞フラクションとしてカラムから洗い流した。次いで、CD11c⁺細胞を、磁場からカラムを除くことにより回収し、1mLのMACS緩衝液で2回カラムを洗い流した。CD11c⁺細胞を培地で1回洗浄し、0.5 $\times$ 10⁶細胞/mLの密度でサイトカインを添加した培地 {マウスGM-CSF (1ng/mL)、マウスIL-4 (1ng/mL)、マウスINF γ (3ng/mL) 及び抗マウスCD40 (0.5mg/mL) を含む、10%FCS及びゲンタマイシンを添加したDMEM/F12} に懸濁させた。

30

40

50

次いで、CD11c⁺細胞を、1ウェル当り培地100μLに希釈した試験試料（例えば、ARPタンパク質、正又は負の対照群を含む試料）を含む96ウェル組織培養プレートに加え（100μL／ウェル）、5%CO₂、95%空气中、37℃で一晩培養した。

【0383】

DCからのマウスIL12（p70）放出の測定

CD11c⁺ 碑細胞からのマウスIL12放出を、ELISAを用いて測定した。簡潔には、CD11c⁺細胞培養上清を、一晩インキュベーション（通常15～18時間）後サンプリングした。培地のサンプル（100μL）を、抗マウスIL12（p70）捕捉用抗体（R&D社製、#MAB419、1ウェル当り100μL中に250ng）で被覆したELISAプレートに加え、37℃又は室温で2時間インキュベートした。ELISAプレートを洗浄用緩衝液で十分に洗浄した後、1ウェル当り100μLの検出用抗体／検出用試薬（ビオチン標識抗マウスIL12、R&D社製、#BAF419、50ng／mLで、ストレプトアビジン-HRP）を加えた。ELISAプレートを再び2時間インキュベートし、洗浄し、TMP基質溶液（Pierce社製、#34021）に20分間曝した。基質反応を100μL／ウェルの2M H₂SO₄を加えることにより止めた。ELISAプレートを、450nm（540nmで修正した）で読み取り、ELISAでの（intra-ELISA）標準曲線（範囲：2000～31.25pg／mL）を用いてmIL12（p70）レベルを計測した。

【0384】

INF-γ アッセイ

LGLによる培地へのINFγの産生及び放出を以下のように評価した。NK細胞で強化したLGLを12.2節で上述したように単離し、10%ウシ胎児血清、ゲンタマイシン（50μg／mL）、及びIL2（125U／mL）を添加した200μlのDMEM／F12中に、2.5又は5.0×10⁵細胞／ウェルの密度で、96ウェルプレートに蒔いた。試験サンプル（例えば、ARPタンパク質を含む試料、正又は負の対照群）を加え、細胞を一晩培養し、その後、馴化培地（CM）を除き、遠心分離にかけて吸引された細胞を除いた。次いで、定量のCMを、様々な供給源（BD PharMingen Inc.社、Genzyme Corp.社、及びR&D Systems Inc.社）から購入したELISAキットを用いてINFγについて測定した。簡潔には、ELISAアッセイでは、CM又は血清サンプル（及びINFγ標準物質）を、予め捕捉用抗体（ハムスターモノクローナル抗マウスINFγ）で被覆したELISAプレートウェルで、37℃で1時間、インキュベートする。十分に洗浄後、ウェルをビオチン標識二次抗体（ポリクローナル抗マウスINFγ）に、37℃で1時間曝す。次いで、洗浄後、ウェルを検出用試薬（西洋わさびペルオキシダーゼに結合したストレプトアビジン）に、37℃で15～20分間曝す。再び、十分に洗浄後、100μL TMB基質をウェルに加え、室温で5～7分間インキュベートした。反応を100μLの2M H₂SO₄を加えて停止する。450nmでの吸収をプレートリーダーを用いて読み取り、INFγ濃度を標準曲線から計算した。

【0385】

ARPの抗腫瘍活性

マウスS-180モデルにおける活性濃縮又は単離したARP

BBX-01cの質を決定するために用いられた、一連の通常のスクリーニング実験の一つの生存プロットに編集した。これを図8に示す。治療群の約半数の動物が治療されたとみなされた-100日より多く生存した。死んだものの中でも、対照群より平均して寿命が増加しており、約2.5倍であった。

【0386】

ある実験では、5日の投与計画を、S180腫瘍の注射に関して異なる時間に開始した。-5日目から-1日目、-2日目から+2日目、1日目から5日目、及び4日目から8日目。抗腫瘍活性は、腫瘍の注射の2日前に開始した注射が最適であった（治療群5匹のうち4匹）。結果は、1日目に開始した注射でも非常に良好であった（治療群5匹のうち

3匹)。－5日目から－1日目、又は4日目から8日目に注射がされた場合には、抗腫瘍活性は乏しかった。これらのケースでは、寿命の増加は、非治療群のわずか～150%であった。

【0387】

E. テネラ由来の粗膜調製物の抗腫瘍活性

粗膜調製物を、50 μ lのオーシスト懸濁液から9節に記載したように調製した。予備段階の結果を図17に示す。腫瘍指数は、この調製物が抗腫瘍活性を示し、精製した可溶性ARPと同様に用いることができることを示す。

【0388】

純度が増大した場合の抗腫瘍活性

精製手順の検証によって、大抵マウスモデルでの腫瘍の治療の成功がもたらされた。異なる精製工程から得られる試料を回収し、NKアッセイで活性を検証し、その後、標準的な5日間の手順に従って、腫瘍耐性マウスに注射した。50%を超える純度であった、プール1由来のC8クロマトグラフィーの試料を含め、各工程で高い活性を観察した。

【0389】

E. テネラ抽出物の抗腫瘍活性

E. テネラのオーシストからの抽出物は、8節に記載の第2の手順を用いて調製した。S-180腫瘍耐性のマウスの5つの群に、異なる投与量のARP含有抽出物を5日間注射した。これらの投与量を図9に示す(右側)。実験に入ってから40日目の予備段階での結果は、最適な投与量がこの抽出物で存在するであろうことを示している(0.36 ng/マウス/日)。3桁の投与範囲にわたって、0.048 ng/マウス/日に至るまで、良好な応答が観察される。

【0390】

組換えE. テネラARP、EtU3及びE1の抗腫瘍活性

EtU3又はE1クローン(図20参照)由来又はE. テネラ孢子形成オーシストの抽出物由来の精製した組換えARP分子を、3つ又は5つの異なる投与量でS-180腫瘍耐性マウスに注射した。これらの投与量を、図9に示す(右側)。観察される腫瘍がないマウスが「治療された」とみなされた時点でマウスを100日間追跡調査した。全種類のARP分子に対する最適な治療投与範囲は、0.1から10 ng/マウス/日の間であった。応答体とは、対応する対照群の平均以上の2つの標準偏差より多く生存したマウスである。マウス抗腫瘍モデルにおいて50%の応答を得るのに有効な量の推定値が、Hillの式を応答体数対投与量に当てはめることにより得られ、0.011 ng/マウス/日の値が得られた(回帰計数=0.86、CV=7.5%)。

【0391】

抗腫瘍活性とin vitroアッセイとの相関

部分的に精製したARP物質に関する初期の抗腫瘍試験では、NKアッセイも同時に試験された。2つの試験の相関を図10(A)に示す。マウス腫瘍モデルで試験した試料を、NKアッセイ及びDCアッセイでも試験して、開始用量の確立に役立てた。DCアッセイの動物の生存に対する相関を図10(B)に示す。この相関により、腫瘍試験に関して動物の使用に頼ることなく、また、抗腫瘍実験に固有の長期の遅滞なく、精製の間、定期的に活性を追跡することが可能となった。

【0392】

ヒト患者での応答

ARPの抗癌活性を第1相臨床試験でも試験した。試験は毒性を評価するために設計されていたが、陽性腫瘍状態の可能性のある患者に対しては常に注意を払う。試験の第2過程では、濃縮したARP組成物(BBX-01c)を用いた際に、胚細胞性卵巣癌の一人の患者が、血清IL-12レベルが上昇し(図11)、部分的に精製したARP(BBX-01c)の1回の5日間治療過程後に8cmの骨盤の腫瘍が劇的に減少し(表7)、さらに2回目の5日間治療過程後に腫瘍及び腹膜の腹水を全て完全に除去されたことを示した。患者の肝臓及び脾臓のその他の瘤は難治性であったが、ほぼ2年間静的なままであっ

10

20

30

40

50

た。患者は深刻な痛み及び寝たきりの状態から解放され、仕事に復帰可能な痛みのない状態となった。この患者の成功に続いて、他の末期の上皮性卵巣癌患者を補充した。主な癌専門医の評価は、これらの疾患が予想よりも長い間安定状態のままであったことを示している。

【0393】

【表7】

患者#5-RWに対するCTスキャンの概要

日	骨盤の瘤	肝臓&脾臓の瘤	腹水	所見
12-4-00	8 x 8 cm	8 x 9 cm 肝臓の瘤 6 x 6 cm 脾臓の瘤	有り	B B X - 0 1 c 治療の前
2-1-01	2 x 3 cm	変化なし	なし	B B X - 0 1 c の最初 の治療過程後 2 週目
3-6-01	2 x 3 cm	変化なし	有り	B B X - 0 1 c の最初 の治療過程後 7 週目
5-9-01	検出不能	変化なし	なし	B B X - 0 1 c の 2 回目 の治療過程後 6 週目
11-9-01	検出不能	変化なし	なし	B B X - 0 1 c の 2 回目 の治療過程後 3 2 週目
6-30-02	検出不能	変化なし	なし	B B X - 0 1 c の 2 回目 の治療過程後 6 6 週目

10

20

【0394】

AR P の免疫刺激活性

N K 活性

早期にこの計画で、マウス脾臓から単離された細胞傷害性リンパ球が、*in vitro*でのS180細胞に対するマウス及びウシ小腸抽出物の細胞傷害効果の重要なメディエータであり、*in vivo*でのこれらの抽出物の抗腫瘍作用にも恐らく中心的に関与することが発見された。したがって、NK様細胞の細胞毒性活性の誘導を評価するための新しい*in vitro*アッセイを考案し、不連続なPercoll（商標）勾配を用い、マウス脾臓から単離された大型顆粒リンパ球（LGL）を用いて実行した。ナチュラルキラー（NK）細胞は、*in vitro*及び*in vivo*でのSIEの細胞溶解効果の重要なメディエータとして通常言及される。しかし、キラー細胞により活性化されるリンパ球（LAK）などの、碑細胞のLGL集団に含まれる他のリンパ球もまた含まれるであろうことに留意すべきである。

30

【0395】

LGLを、様々なエフェクター対標的（E：T）細胞比で4日間、S180腫瘍細胞と共培養した。この手順は、NK活性に関する他の報告された実験では典型的には用いられない。これは、NKの活性化が生じている間に腫瘍細胞が分裂しているので独特である。これは、*in vivo*条件をもっと近く模倣するであろうより複雑な環境を作る。培地は、低濃度のIL2（125U/ml）に加えて、試験される腸の抽出物の任意の実験的（精製）調製物を含んでいた。最も高いNK：S180の比（100—NK）で、IL2単独で誘導される「定常」活性は、通常低く（10～15%）、このことはS180細胞が、IL2により誘導されるLGL細胞の細胞溶解作用に対して相対的に耐性を有していることを示唆している。しかし、部分的に精製したウシ小腸抽出物の存在下では、これらのLGLの細胞溶解活性は劇的且つ相乗的に増加し、しばしば、50：1という低いエフェクター：標的比でほぼ100%の細胞毒性をもたらした（エフェクター：標的比は細胞を蒔いた時点—0日目に決定することに留意すべきである。S180細胞は、続く培養期間の間に3～4回の集団倍加を受け、LGLはこれらの条件下では増殖しないので、NK細胞の活性化の時点での実際のE：T比は、恐らくここで言われているものよりもかなり低いものであろう。）

40

50

【0396】

ナチュラルキラー細胞媒介細胞傷害（NK-CMC）の誘導は、S180細胞の抽出物の任意の直接的細胞毒性又は増殖阻害作用に関連しない。SIE誘導NK-CMCは、NK細胞の非存在下で（0__NK効果）、S180細胞の増殖又は生存度に与える観察可能な効果がないことを、膨大な投与範囲にわたって証明することができる。SIEで処理したNK/S180共培養液の顕微鏡観察により、「活性化された」培養液中のNK細胞のクラスター形成及び凝集が言及された。NK細胞のクラスター形成は、特にS180細胞の周囲に集中しているように思われる。経時変化実験は、2～3日のNK細胞のSIEへの暴露が、細胞溶解活性を誘導するのに必要とされることを示す。SIE誘導NK-CMCの誘導は、抗アシアローGM1抗体でLGL/S180の共培養液を処理することにより阻止され、NK細胞の細胞溶解効果の特異的に阻止する。これらの結果は、NK細胞が、S180腫瘍細胞に対するSIEの*in vitro*での細胞障害反応の媒介に主に関与することを示している。

10

【0397】

*in vitro*でのSIEによるNK-CMCの誘導は、これらの培養の培地のIFN γ レベルの増加に非常に関連している。IFN γ （[IFN γ]）の濃度を、SIEに曝したLGL培養液の馴化培地で測定するときに、[IFN γ]は、処理の18時間以内に劇的に増加する。容量反応の関係は、[IFN γ]の増加とNK-CMCの誘導との間に緊密に結びついた関係があることを示す（図11）。マウスIFN γ （抗マウスIFN γ 抗体）に対する中和抗体を用いたNK/S180細胞共培養液の処理は、SIEにより誘導されたNK-CMCを著しく減少させ、且つ／又は阻止する。しかし、マウス組換えIFN γ を直接的にNK/S180共培養液に加えることでは、SIEにより誘導される最大NK-CMCを遥かに下回る、NK-CMCの僅かな増加しかもたらさない。これらの結果は、SIEにより誘導される[IFN γ]の増加が、SIE誘導NK-CMCを媒介する際に早期に必要なとされる事象であるが、それ自身ではNK-CMCを誘導するのに十分ではないことを示唆している。

20

【0398】

SIEによるLGL培養液中でのIFN γ の急速な誘導は、様々な精製工程の活性を試験するためのより迅速な方法をもたらす。INFアッセイ考案して（12.4節参照）、数年間、活性の1日のみの試験を提供するのに使用した。

30

【0399】

NK-CMCに影響を及ぼすための多数の生物反応修飾物質が報告されている。我々は、*in vitro*でのSIE誘導活性を再現しようとして、多くのこれらの因子をNK-CMCアッセイでスクリーニングしてきた。

【0400】

【表8】

様々なサイトカイン¹がNK-CMC及びDCアッセイに与える影響の要約

サイトカイン	NK-CMC活性	DC/mIL12放出 ²
インターロイキン		
IL-1 β	- ³	-
IL-2	+ ⁴	-
IL-3	-	-
IL-4	-	+
IL-5	-	-
IL-6	-	-
IL-7	-	nt

40

IL-10	-	阻害
IL-11	-	nt
IL-12	++ ⁵	na
IL-15	-	nt
IL-18	++	-
インターフェロン		
IFN α	-	nt
IFN γ	+ ⁶	-
デフェンシン、抗菌ペプチド		
コルチコステチン	-	nt
マガイニンI	-	nt
マガイニンII	-	nt
セクロピンA	-	nt
セクロピンB	-	nt
セクロピンP1	-	nt
デフェンシン1	-	nt
ケモカイン		
MIP-1 α	-	nt
JE/MCP-1	-	nt
KC	-	nt
種々のサイトカイン、増殖因子		
TNF α	+ ⁵	-
TGF α	-	nt
TGF β	-	-
FGFbasic	-	-

1. 各薬剤は、in vitroのNKアッセイ（LGLアッセイ）で、広範な濃度に亘って、IL-2（125 U/ml）の存在下及び非存在下の両方で試験した。
2. 相乗作用及び阻害について薬剤を試験した。
3. 相加又は相乗効果が僅か又は無いことを示す。nt＝未検、na＝該当なし
4. IL-2は、高濃度の時のみNK-CMCを顕著に増加させる。
5. IL-12は、IL-2が低濃度の時に相乗的にNK-CMCを増加させる。しかし、これらの効果は、MEX又はBEXと異なり、NK：S180細胞比に制限される。（本文参照）。IL-2の存在下でNK細胞を弱く活性化する（最大応答＜50%細胞毒性）。
6. IL-2の存在下でNK細胞を弱く活性化する（最大応答＜50%細胞毒性）。

【0401】

IL-12、IL-18、TNF α 、及びIFN γ だけが、BEX（濃縮したARP）と同様の条件下で試験した場合にNK-CMCを増加させる任意の能力を示した。しかし、TNF α 及びIFN γ は、BEXに比べて比較的弱いエンハンサーであった。さらに、以下に記載するように、IL-12のNK-CMCを増加する能力は、LGL混合物中の樹状細胞によるその産生に関連している。最終的に、Aフラクション（DEAE流入フラクション）の主要成分であるIL18は、フラクションC（DEAE溶出フラクション）には存在していない。したがって、我々のLGL/S180アッセイ系のin vitro条件下で試験したNK-CMCの既知のエンハンサーは、小腸由来の抽出物に類似の様式では、NK細胞媒介細胞傷害を刺激しない。

【0402】

樹状細胞の活性化

我々は、近年、樹状細胞（DC）がin vitroでのARPにより誘導される活性において重要な役割を果たすことを証明した。これは、標準的NKアッセイからDCを除くことにより、全体的なNK-CMC活性を除くことをベースにしている。さらに、BBX-01cは、磁気支援型細胞分離（MACS）により得られる濃縮したDC懸濁液からのmIL-12（マウスIL-12）放出を誘導する。抗mIL-12（中和抗体）もま

10

20

30

40

50

た、顕著にBBXで誘導されるNK細胞媒介細胞傷害(NK-CMC)を減少させる。

【0403】

他の活性化因子の非存在下ではBBX-01cは脾臓DC由来の中程度の量のmIL-12しか誘導しなかったもので、これらの観察をBBX-01c物質の有用なアッセイに活用する試みが大幅に制限された。他の樹状細胞アゴニスト及び補助刺激分子の活用は、BBXのC成分との強力な相乗効果を示した(図13(A) - 下のパネル)。4つの添加物は、BBX-01cの存在下で最大の応答を与えるが、その非存在下では活性を有しない。4つの添加物のうちの1つを取り除くことにより、IL-12放出に様々な減少をもたらす。CD40リガンドと置き換わる抗CD40抗体は、最も重要な相乗作用を示す薬剤であり、次いでGM-CSF、さらにIL-4が続く。後者の2つのサイトカインは、樹状細胞を成熟に導くが、CD40リガンドはCD4T細胞の存在を模倣して、結果的に樹状細胞にそれらの活性化サイトカインを放出させる。E.テネラ抽出物は、BBX試料に対してほぼ理想的な様式で振る舞い(図13(A) - 上のパネル)、2つの活性分子の類似性を強化するが、さらに重要なことに、小腸組織のその他の分子は活性に不可欠ではないことを示している。

10

【0404】

4つの添加物の最適化により、BBX-01c及びアイメリアの活性の非常に確固としたアッセイが開発された。DC/mIL-12放出活性は、Superdex、HIC、様々なHPLCクロマトグラフィー分離、並びにその他の分別から得られる試料のNK-CMC活性と非常によく相関している。さらに、用量/応答関係は、低レベルのBBX-01cの活性C成分を検出する場合に、DC/mIL-12放出アッセイがNK-CMCアッセイよりも有意に感受性が高いことを示している。それは完全にA成分に対しては非感受性で、抗腫瘍活性と最も高い相関性を有するBBXの以下の成分の理想的なアッセイとなる。樹状細胞で活性であることが報告されたその他のサイトカインもまたCとの相乗作用が試験され、これらは上記表8に報告されている。

20

【0405】

BBXの活性に関する他の重要な観察は、樹状細胞を精製するために単離したばかりの碑細胞を使用することの必要性である。もしDC様細胞を、末梢血単球から培養液中でIL4及びGM-CSFとインキュベーションすることにより調製したら、それらはBBXに対し応答しない。さらに、単離したばかりの碑細胞を培養条件に順応させることができれば、それらは反応性を失う。これを図13(B)に示す。樹状細胞の成熟の特定の段階が活性に必要とされると思われる。in vitroで樹状細胞を腫瘍抗原に曝す現在の免疫治療手順は、アイメリア抗原刺激によって利益を得ないであろう。これに対し、in vivoで行われるこれらの手順は非常に高められるであろう。

30

【0406】

マウス腫瘍モデルでのGM-CSFとの相乗作用

樹状細胞からのIL-12放出アッセイの開発の間に、いくつかのサイトカインがBBX-01cとの相乗作用を示した。これと臨床条件との関連性を探求する必要がある、将来人体試験で重要となるであろう。GM-CSF(顆粒球マクロファージコロニー刺激因子)との相乗作用のin vivoでの試験を、マウス腫瘍モデルで2つの実験を行った。その実質的な歴史及びヒト治療の相対的な安全性のために、GM-CSFが選択された。さらに、その作用形態は主に細胞集団の数を拡大し、BBX-01cに対する最も相補的な機能をもたらすであろう。

40

【0407】

2つの投薬の組合せの結果を図14に示す。偽注射又はGM-CSF単独を受けた動物は、類似の生存曲線を辿った。次善のBBX-01c投与を行ったものは、いくらかの治癒及び残存の動物の生存率中央値の延長を示した。併用治療は、腫瘍成長の痕跡がなく、100%の治癒効果があった。

【0408】

GM-CSFの投与量は、20 ng/マウス/日であったが、これは0.1 µg/kg

50

／日のヒト投与量とほぼ等価である。このようなヒト投与量は、化学療法の前後に白血球数を上昇させるために癌の治療に用いられる $r h G M - C S F$ （組換えヒト $G M - C S F$ ）に関する投薬範囲 $2 \sim 32 \mu g / k g / 日$ よりもかなり低い。この投与量は、 $G M - C S F$ に対するヒトの許容度が $B B X - 01c$ との可能な組合せでは問題とならないであろうことを示唆している。

【0409】

インターロイキン-12の誘導

$i n v i t r o$ 及び $i n v i v o$ の両方での $A R P$ の主な効果の1つに、樹状細胞からのインターロイキン-12 ($I L 12$) の放出の誘導がある。 $I L 12$ は、例えば免疫調節などの、様々な用途が提案されてきた。しかし、このような用途は、 $I L 12$ の投与に関連する深刻な毒性により制限されてきた。本発明の $A R P$ は $I L - 12$ の全身投与の代替法を提供し、関連の毒性なしに $I L 12$ の投与の恩恵を与える。

10

【0410】

$i n v i v o$ での $A R P$ 分子の薬動力学の予備評価を、 $D C / m I L 12$ 生物検定の非常に高い感受性を利用して、マウスで試験して、非常に低濃度で $A R P$ を検出した。マウスに腹腔内又は皮下注射により、 0.1% $B S A$ の $P B S$ 溶液 $0.5 m l$ に希釈した $A R P E t U 3$ （活性タンパク質 $352.5 n g$ ）を1回投与、又は $E . テネラ$ 抽出物（ $36 n g$ の活性 $A R P$ 含有）を1回投与した。マウスは、以下の間隔で軽いエーテル麻酔を用い、眼窩洞穿刺技術を介して出血させた： 1 時間、 3.5 時間、 7.5 時間、 12 時間、 24 時間、及び 42 時間。血液をヘパリン化マイクロヘマトクリットの毛管に回収し、 $\sim 7000 r p m$ で 10 分間遠心分離した。血漿を単離して、血液回収が終了するまで $+4^{\circ}C$ で保管した。

20

【0411】

動物で $A R P$ が $I L 12$ を誘導し得る度合を評価するために、一定量の血漿試料を培地に入れて希釈し、 $I L 12 E L I S A$ に直接適用した。腹腔内注射した3匹のマウス及び皮下注射した1匹のマウスからの結果を、治療ごとに図25に示す。血漿 $I L 12$ は、注射後約5時間でピークに達し、速度定数 $0.92 / 時間$ の濃度の指数関数的増加及び速度定数 $\sim 0.15 / 時間$ の濃度の指数関数的減衰を示した。

【0412】

これらの実験により、 $E . テネラ$ 由来の $A R P$ 薬物療法による $I L 12$ の誘導に関する原理の裏付けを示した。この実験で注射された $A R P$ レベルは、マウスでの有効投与量より著しく高く（ ~ 0.05 から $5 n g / マウス / 日$ ）、したがって、 $i n v i v o$ での $I L 12$ の誘導に関する上昇速度及び下降速度は、仮定的とみなす必要がある。

30

【0413】

さらに、 $B B X - 01$ は、第1相臨床試験の選択的患者での血清 $I L 12$ の濃化を誘導した（図11参照）。

【実施例8】

【0414】

$A R P$ の精製に用いられるその他のアッセイ

エンドトキシンに関する $L A L$

40

エンドトキシンは通常 $L A L$ ゲルクロット法（the Associates of Cape Cod Incorporated 社から入手、704 Main St., Falmouth MA）により検査する。試料は、精製工程の様々な時点で採取し（1及び2段階の処理）及び製造元により記載された標準的方法を用いてエンドトキシンレベルを試験した。小腸処理の初期段階では、ヒト使用に対し上記許容可能なレベルのエンドトキシンが含まれていたが、これらは更なる精製により安全なレベルに減少させる。 $Superdex$ （商標）75カラムによる処理により、施行ごとにエンドトキシンレベルは10分の1未満の減少をもたらした。したがって、カラムを通して物質を再処理することにより、エンドトキシンを任意の所望レベル、 $U S P$ 水の本来の背景濃度にまで減少させることが可能となった。標的エンドトキシンレベルは、非経口薬剤のための $F D A$ ガイドライン（ $< 5 E U / k g$ ）に合致する最終濃度の物質が得られるように設定した

50

。BBX-01 (100 mg/ヒト) の最も高い提案投与量では、これは約 70 kg/ヒト $\times$ 5 EU/kg $\div$ 100 mg/ヒト、又は 70 kg の患者に対し 3.5 EU/mg の最大標的エンドトキシンレベルを与える。BBX-01 のパイロジェンの安全性の検証は、STS, Rush, NY で独立に試験することによってもたらされた。エンドトキシンレベルが 0.4 ($\pm$ 0.2) EU/mg である Superdex (商標) 再処理物質についてのウサギパイロジェン試験は、発熱効果をもたらさなかった。

【0415】

再生

ARP を含む回収したフラクションの再生には、逆相クロマトグラフィー、SDS-ゲル電気泳動 (例えば、分子量の決定)、等電点電気泳動 (pI の決定)、及びいくつかの化学修飾の後に、いくつかの改良と共に、Cabilly et al. Proc Natl Acad Sci USA. 81 (11): 3273-7 (1984) により、異なる用途 (不溶性組換えタンパク質の再折り畳み) に関して記載された方法を利用した。C-4、C-8、又は C18 HPLC カラムクロマトグラフィーより回収したか、又はアクリルアミドゲルのスライスから抽出したフラクションを、6~8, 000 kD (Spectra/Por, Houston, TX) の MW 分画の多孔性分子透析チューブ (molecular porous dialysis tubing) に入れた。BSA を、最終濃度が 0.5 mg/mL になるように各バッグに加えた。次いで、バッグを、50 倍の量の 8 M ウレア/50 mM アミノ酢酸ナトリウム、pH 10.8、1 mM シス테인、及び 0.1 mM シスチンで、4℃で 16 時間透析し、その後、これを 100 倍の量の 1 M ウレアを含む同じ緩衝液で 24 時間透析し、最終的に 2 mM EDTA、1 mM シス테인、及び 0.1 mM シスチンを含む 100 倍の量の PBS を 2 回交換した (8 時間、及び 16 時間)。フラクションを、Spin-X (商標) チューブ (Costar 社製、Cambridge, MA) を用いることにより滅菌ろ過し、in vitro アッセイ用に希釈した。

【0416】

SDS-PAGE 電気泳動:

Modular-Mini PROTEAN II (商標) 電気泳動システム (BioRad 社製 カタログ番号 165-2940) を、15% T、0.8% C Tris/グリシン SDS ポリアクリルアミドゲルと共に用いた。SDS ゲル電気泳動は、Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685 に従って行った。ゲルは、銀染色し、写真を撮影し、貯蔵のために乾燥させるか (Promega 社製の Gel Drying Kit、Fisher カタログ番号 PR-V7120)、又は密封バッグに湿ったまま保管した。ARP の分子量の概算のために、ゲルをスライスに切断し、チューブに入れ、0.1~0.5% SDS を含む緩衝液で抽出し、その後、再生させた。抽出物を NK 活性及び DC 活性について試験した。SDS-PAGE 標準 (Bio-Rad 社製) を、分子量の計算に用いた。

【0417】

化学修飾手順

純粋でない活性なウシ試料の化学修飾を利用して ARP 中の様々なアミノ酸の重要性を決定した。反応は、純粋なタンパク質用に設計された「The Protein Protocols CD-ROM」(Walker, 1998、Protein Protocols on CD、Humana Press 社、Totowa, NJ) に従って行った。修飾を付加することにより粗タンパク質混合物の利用が可能となった。遊離の COOH 残基の修飾 (Asp、Glu、及び C 末端中) では、試薬 EDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド) を用いた。His 修飾 (エトキシホルミル化) では、試薬 DEP (ピロ炭酸ジエチル) を用いた。Trp 修飾では、Koshland 試薬 (2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジルブロマイド) を用いた。グアニジン基 (Arg 中) の修飾では、CHD (1, 2-シクロヘキサジオール) 試薬を用いた。遊離 SH 基 (Cys 中) の修飾では、2つの方法が利用された。a) Ellman 試薬、DTNB (5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸)) 及び b) NEM (N-エチルマレイミド)。遊離 NH₂ 基 (アミジン化) (Lys、及び可能な N 末端中) の修飾では、アミジン化試薬 MAH (メチルアセチミデート (methyl acetimidate) 塩酸塩) を用いた。一般的な酸化/ニトロ化反応では、TNM (テトラニトロメタン) を用いた。還元反応を行うために、

NaBH_4 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、又は Na_2SO_3 のいずれかによる処理を用いた（これらの試薬の酸化還元電位は、1.24、2.96、及び0.92Vである）。Asn-Gly部位の分子の切断には、塩基性pHでヒドロキシシルアミンを用いた。

【実施例9】

【0418】

動物及びヒトでの毒物学

初期の毒物試験

小腸抽出物又は任意のその精製フラクションを用いた標準的(腹腔内)治療の間、毒性は観察されなかった。動物の健康状態、それらの活性レベル、体重増加に、明白な変化は認められなかった。

10

【0419】

1.0mlまで単回投与で与えられた3匹のマウスで、ブタ小腸抽出物の急性毒性を試験した。過敏性又はアナフィラキシーの誘導について試験するために、0.5及び0.9mlのブタ抽出物の反復投与を、それぞれ7日後及び8日後に行った。これらは、いかなる観察可能な変化も誘導しなかった。

【0420】

高い皮下投与量のBBX-01cでは、マウスで非常に穏やかな表現型の変化が認められたが、5日間の注射の間だけしか認められなかった。様々な臓器由来の組織試料で何の病理学的効果も観察されなかった。

20

【0421】

治療動物は、通常碑腫大を示した。これは、通常IL-12などの他の免疫促進剤で観察された。脾臓には病理学的変化はなかったので、腫大は、腸抽出物で処置した利点及び所望の結果とみなされる。

【0422】

イヌでのBBX-01の安全移行

FDAの勧告の下、最初のBBX-01製剤について2匹の雄及び2匹の雌のビーグルで初期安全移行試験を行った。これは、MPI Research社、ミシガン州Mattawanに外注した。試験の目的は、ヒトで使用されるであろう初期投与量を動物に注射したところ、イヌの体重は減少変化しなかった。これは、ヒトで初期投与量が安全に投与することができ、用量の漸増を進め得る基準レベルを与え得るとFDAによりみなされていた。報告の概要は、薬物に対する副作用はなかったことを示していた。

30

【0423】

患者での毒性、BBX-01（試験の第1工程）

第1相臨床試験のこの工程で観察される唯一の毒性は、注射部位での穏やかな、可逆的紅斑であった。これは隆起せず、かゆみはなかった。全ての患者で大小の程度はあれ生じたが、危険とはみなされなかった。他の副作用は、血液化学、細胞数、又は注意深い身体診療では観察されなかった。

【0424】

患者での毒性、BBX-01c（試験の第2工程）

より高い純度の製剤であるBBX-01cは、患者の半数により高い同等の投与量を与えた時でさえ、前の製剤の紅斑を示さなかった。非常に高い投与量は、薬物がなかったため、追求しなかったが、胚細胞性卵巢癌患者でのある強い反応がこの物質の治療指数が恐らく高かったことを示していた。

40

【0425】

E.テネラ抽出物のマウスでの予備的毒性

8節に記載の方法を用いて、E.テネラのオーシスト由来の調製物を2匹のマウスに1回高用量で注射した。投与は、12.1節に記載の抗腫瘍試験で与えられた40回高用量であった。マウスは、何の観察可能な行動変化もなく注射を許容して、何らかの急性反応の兆候も生じなかった。

【0426】

50

E. テネラ組換えARP、EtU3の予備的毒性

組換えARP (EtU3) について、予備的毒性試験を行った。3匹の雄BALB/cマウスに、4.3 μ gのEtU3を含む1mlの0.1%BSA含有緩衝液を、4日間連続で毎日各々（腹腔内）注射した。1匹の注射しないマウスを対照として確保した。体重を注射の間及び注射後に測定した。4回目の注射の24日後、マウスに5回目の注射がなされた。5回目の注射の約1時間後に、血清IL12レベルの測定及び予備的な薬物動態解析の測定のために血液を各マウスからサンプリングした。さらに、以下の臓器を除き、更なる組織病理学的な解析のために10%緩衝ホルマリンで固定した。脾臓、肝臓、肺、腎臓、副腎、心臓及び脳。EtU3での治療の間又は後で、毒性の明白な示唆は、観察されなかった。これらには、体重の有意な変化、「だらしなさ」、嗜眠及び下痢がなかったことも含まれる。

10

【0427】

マウスでのrBBX-01の毒性

rBBX-01 (3% HSAで製剤したE1)の急性毒性を、腹腔内 (i.p.) 投与経路を用いてマウスで評価した。3匹の雄マウスに、4日間連続で毎日4.27 μ g/kgのrBBX-01をi.p.注射した。27日目に各マウスは、5回目の投与を受けた。5回目の投与の1時間後、全動物を屠殺し、剖検した。選択した臓器及び組織を組織病理用に処理した。

【0428】

治療したマウスのいずれにも毒性のひどい兆候はなかった。治療した3匹のマウスの体重は、治療期間の間予期した僅かな増加を示した。臓器（肝臓、脾臓、腎臓、副腎、腺、心臓、肺及び脳）をサンプリングし、固定し、組織病理学的に検査した。サンプリングした組織のいずれにも、何の毒性作用も観察されなかった。

20

【0429】

より広範な試験では、腹腔内 (i.p.) 投与経路下で、rBBX-01の急性及び慢性毒性をマウスで評価した。25匹の雄マウスに以下のようにrBBX-01の1回量をi.p.注射した。5匹のマウスに对照溶媒 (3% HSAのPBS溶液) を注射し、10匹のマウスに400 ngのARP E1を注射し、5匹のマウスに20 ngのrBBX-01を注射し、5匹のマウスに1 mgのrBBX-01を注射した。注射後4日目に、400 ngの治療群の中から3匹のマウスを屠殺し、剖検した。残りのマウスは、17日目又は19日目のいずれかに剖検した。選択した臓器及び組織は、組織病理用に処理した。体重は、試験の4、8、10及び13日目に記録した。脾臓の湿重量を、17日目又は19日目に剖検で測定した。

30

【0430】

治療したマウスのいずれにも毒性のひどい兆候はなかった。体重は、任意の治療群で有意な差異はなかった。400 ngのrBBX-01で治療したマウスで、对照溶媒で処置した動物と比較した場合に、脾臓の湿重量に僅かな増加があった。臓器及び組織をサンプリングし、固定し、組織病理学的に検査した。有意な毒性作用は、いずれのサンプリングした組織においても観察されなかった。

【0431】

ラットでのrBBX-01の毒性

ラットでの一日に一度の皮下投与の5日後に、rBBX-01の潜在的毒性を評価するために試験を行った。試験は、雄及び雌のCD (登録商標) [対照: CD (登録商標) (SD) IGS BR] ラット (10/性別/群) からなる3つの群から構成されていた。2つの群は、被験物質としてrBBX-01を7.5及び300 ng/動物の投与量で受け、1つの群は対照として用いられ、溶媒として3%ヒト血清アルブミン (HSA) のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を受けた。全群の投与容量は、0.3 mL/動物であった。最初の5匹の動物/性別/群を6日目に剖検したが、最後の5匹の動物/性別/群は、15日目に剖検した。

40

【0432】

50

死亡及び臨床的兆候の観察及び体重の測定を試験を通して記録した。血液試料を、臨床病理学のパラメータの評価として2、6、及び15日目に回収した。それぞれの暫定の及び末期の剖検（6日目及び15日目）で、完全な剖検検査を行い、臓器重量を測定し、選択した組織を回収し、予定される将来の処理及び評価に備えて保存した。

【0433】

生存、臨床的兆候、体重、血液化学的評価／臨床化学的評価、及び巨視的評価に与える非治療に関連する影響を、試験の間記録した。非治療関連臓器の重量変化は、暫定の剖検でいずれかの性別で又は末期の剖検で雌で生じた。しかし、末期の剖検の雄は、投与に関連する前立腺の重量の増加を、7.5及び300 ng／動物で示した（それぞれ34%及び90%対照群より重い）。後の研究で、同じ治療を受けているラットは、前立腺の重量、及びこの臓器には治療に関連した効果がなかったと決定した15日目に剖検された全動物（1、3、及び4群。各投与量0、7.5、及び300 ng／動物）の前立腺の顕微鏡の評価で有意な増加を示さなかった。

10

【0434】

この試験の条件及び発見に基づいて、ラットへの5日間連続のrBBX-01の毎日1回の皮下投与は、300 ng／動物の投与レベルまでよく許容された。

【実施例10】

【0435】

ARPの天然存在度及び分布

動物の分布

20

様々な種

長年の経過の間、抽出物をマウス、ラット、ブタ及びウシから採取した。この早期の研究から得られた活性を表9に示す。これらの種の様々な組織を検査したが、小腸からの抽出物は、マウス抗腫瘍モデルで一貫して活性であり、このことは活性因子が積極的に種特異的ではないことを示していた。我々は、A成分（IL18含有）及びC成分（ARP含有）の存在を明らかにしたとき、AフラクションのIL-18がある程度種の壁を横断することができるのでこれらの抽出物中で主要な寄与因子であると推測した。DCアッセイは、実験マウス及びラットがARP（Cフラクション）活性を有していなかったことを示した。MSUからのブタ試料もまた活性を欠いていたが、屠殺場のブタ由来の10年齢の凍結試料は、高い活性を保持していた。このことは、環境要素を含む薬剤がARP活性に関連していたことを示唆しており、全ての動物がこの薬剤に暴露されていたとは限らないことを示唆していた。我々は、MSUの畜産農家から野生のマウスを、また、農場で飼育されたウシに類似しているであろう非実験動物を試験することが許可された、BRI所有地からトガリネズミを捕らえた。

30

【0436】

【表 9】

4つの種からの早期抽出物のまとめ

治療	ILS ¹	経過 ²
ブタ回腸抽出物		
of 6/4/91	--	6/6
of 6/19/91	130% (4/6) ³	2/6
of 8/7/91	150% (5/6)	1/6
of 8/7/91	162% (5/6)	1/6
of 8/7/91	145% (5/6)	1/6
粘膜	185% (5/6)	1/6
粘膜下	209% (2/6)	4/6
平滑筋	133% (6/6)	--
マウス (Balb/c)		
脳	115% (5/5)	--
小腸 ⁴	195% (2/24)	22/24
大腸	120% (6/6)	--
大腸	85% (5/5)	--
脾臓 (上清)	78% (5/5)	--
脾臓 (ペレット)	69% (4/5)	1/6
ラット (Sprague Dawley)		
脳	98%	--
小腸	200% (5/6)	1/6
小腸	--	6/6
大腸	166% (1/6)	5/6
大腸	--	6/6
ウシ		
回腸粘膜	254% (2/6)	4/6
回腸粘膜下	--	6/6
回腸平滑筋	--	6/6
遠位回腸 (全ての層)	200% (1/5)	4/5
近位回腸 (全ての層)	214% (2/5)	3/5
十二指腸	83% (5/5)	--
空腸	74% (5/5)	--

¹ ILS = 100%は、対照群と同一の生存を示す。² 50日を超えて腫瘍なしに生存³ この範疇の動物の数、対、群中の総数⁴ 多くの実験の代表的試料

【0437】

ウシでのアイメリアのタンパク質の同定により、環境要因が活性に不可欠であったとい

10

20

30

40

50

う観念を確認した。しかし、野生のマウスでの活性の欠如は、D C アッセイは、マウス脾臓の樹状細胞を基にしているために、マウス由来のアイメリアが我々のアッセイで働かない可能性があることを示唆していた。さらに、腸ではない脾臓の樹状細胞を用いた場合には、異種間のアイメリアタンパク質の提示でしか有効ではないことを示唆している。これを解明するための更なる研究を計画している。

【0438】

ウシの飼育

我々は、ウシから数百の腸断片を得て、通常、動物と動物抽出物のプールとの間の広範囲の活性を観察した。図15に示すように、この変動のいくつかは、異なる品種に起因していたが、品種内の変動もまた非常に高かった。より高レベルの活性を通常含む肉牛の場合には、これらは食肉処理場からより頻繁に選定された。より高い収率によって、均一に精製するのに十分な量に一層速く到達することが可能となった（6節参照）。 10

【0439】

組織分布

様々な臓器

観察された活性が腸管に限定されるという仮説を検証するために、限られた組の臓器及び組織を、長年かけて検査してきた。検査した齧歯類由来の脳及び脾臓は、抗腫瘍活性を示さなかった。ウシの脾臓、肝臓、及び肺由来の近年の組織試料は、D C アッセイ及びN K アッセイで何らの活性を示さなかった。しかし、試料の大きさの限定及び試験の感度のために、他の臓器におけるA R Pの不存在は決定的なものではない。 20

【0440】

腸に沿った活性の分布

ウシの腸管に沿った活性の初期の試験により、マウスにおいて、小腸の回腸が最も高い抗腫瘍性を含んでいたことが明らかにされた（上記表9）。A R Pに特異的な活性をD C アッセイにより同定し得るであろう場合には、これが再び検査された。3つの実験の平均を図16（A）に示す。腸管に沿ったプールした試料の予備的なマウス抗腫瘍結果を図16（B）に示す。これらの結果は、従前の発見を確認し、腸管に沿った活性の分布に対するより細かな詳細をもたらした。この分布は、ウシでのアイメリアの生活期の位置と一致している。さらに重要なことに、この分布はウシにおける癌の罹患率に合致している（Lingeman and Garner, J. Natl. Cancer Inst. 48 (2): 325-46 (1972)）。ヒトと異なり、多くの動物では大腸癌の発生率が低く、さらに回腸でも発生率が低い。ウシでは、腸管癌は空腸及び直腸でのみ観察される。これは、図16（A）に示されたD C 活性化能の分布に非常に近似的に一致する。 30

【0441】

腸壁を横断する活性分布

70～90%のN K 活性、80～100%のI F N γ 誘導活性及び80～100%のD C 活性が、30mM E D T Aの使用により腸組織から抽出し得るであろう。

【0442】

小腸回腸切片を調製し、6節に記載のように洗浄した。全長約3フィートの洗浄した切片を2～3cmの切片に切断し、P B Sに0.5～1mM D T Tと共に5～10分間インキュベートして粘液を除いた。溶液をデカントし、組織片を、60mlのP B S、30mM E D T A、1mM P M S F中で3～4回交換しながら、40℃で30～60分間攪拌した。この手順により細胞を、残った組織中での活性量の解析により検証されるように、N K -、D C -及びI F N γ -誘導活性物質の大半が含まれる粘膜層から取り除いた。粘膜細胞フラクションへの全活性型の定量的抽出は、腸管粘膜へのアイメリア感染の既知の制限と一致している。 40

【実施例11】

【0443】

ドメイン研究

ジスルフィド架橋の重要性が、ウシ及びE. テネラA R Pの両方の半純粋な試料で検証 50

されてきた。A s n - G l y 部位でのウシ A R P の切断は、N K -、及び D C - 活性の両方を大幅に減少させた。ウシ A R P は、分子の真中に少なくとも1つのこのような部位を有しているので（図4）、得られた A R P 分子の断片は、N K -、又は D C - 活性のいずれかに対して応答可能なドメインを含まないことが示されている。

【0444】

合成ペプチド（50-mer）をウシ分子の可変領域と3-1 E タンパク質のフランキンゲ領域との組合せから構築した（図4）。このペプチドは、Alpha Diagnostic International, Inc. 社により合成され、乾燥粉末として受けた。新たに再構成した状態と再生した形態の両方で試験した。約 0.1 mg/mL から始まって7桁に亘る範囲の濃度で試験した場合に、どちらの形態も何らの活性も示さなかった。この合成ペプチドは、ジスルフィド結合間のドメインを包含しており、その活性の欠損により様々なドメインが樹状細胞の結合に重要であるか、又はより多くの分子がこのドメインの正しい折り畳みに必要とされるということが示されている。

10

【0445】

E. テネラ由来の組換え A R P に関する実験により、この分子の N 末端が D C 活性に大きな変化を与えることなく大きな非関連タンパク質とペプチドとの融合を許容可能であることを示した（10節）。6位に A T G 開始コドンをもつ短縮分子（GEADTを欠如している）は少なくとも完全なタンパク質と同じ活性であったが、開始コドンが21位に移動した場合（GEADTQAWDTSVREWLVDTを欠く短縮分子を形成）には活性は失われた。このことは、N末端の遠位部分は恐らく少なくとも D C 活性の発現に重要な任意のドメインの形成に関連していないことを示唆している。E. テネラ A R P の2つの C 末端変異体（一方は T y r から H i s 及び G l y から S e r への二重の変換を有し、他方は G l y から A l a への変換を有する。10節）が得られ、D C アッセイで等しく活性であると思われる。C末端から3つのアミノ酸（SGF）を欠如している別の変異体は、有意な活性を保持していたが、7、10又は14個のアミノ酸をC末端から欠如している変異体は、有意により低い（もしあれば）D C 活性を示し（10節）、それは分子のC末端部分が D C 活性を決定する何らかのドメインの一部であることを示唆している。分子のこの部分は、既知のアピコンプレクサ A R P に高度に保存された領域を含まない。この領域の共通のモチーフは T/S-A/I-L-A/N-F-A-E-(Y)-L であり、これは E S T の比較により判断されるようにアイメリア、アカパンカビ内に保存されており、トキソプラズマ由来の A R P 配列に最も頻繁に見られる。

20

30

【実施例12】

【0446】

可変及び定常領域に対する抗体

2つの20-merのエピトープに対するポリクローナル抗体は、Alpha Diagnostics International, Inc. 社から入手されるウサギで産生させている。一方のエピトープはウシ配列の非保存領域由来のものであり、CRMFGASTDSGGDPYAELVQにわたる。他方は、E. アセルブリナ配列由来のものであり、CALYDEEKEQNKADALTALにわたる。最初のケースでは、システインは分子の一部であるが、第2のケースでは、システインを先頭に加えて抗原性の改良に用いられるキーホールリンベットヘモシアニンへの結合を可能にした。

40

【実施例13】

【0447】

疎水性膜アンカーの証拠

実施形態によっては、A R P はアイメリア寄生虫の外側の表面抗原である。我々は、G P I 結合タンパク質に特異的な酵素であるホスホリパーゼ C（P L C）による A R P 放出の可能性を研究することにより、細胞膜へのその結合（G P I 結合 対 膜内在性タンパク質）のメカニズムを調査した。実施例4で提示された結果は、A R P が、E. テネラスポロゾイトの外膜に結合された G P I であることを示唆している。

【0448】

A R P の膜からの自然発生的な放出がこれらの実験で観察されたが、それは表面タンパ

50

ク質の「脱落」として他の寄生生物に関する文献に記載されている (Zambrano-Villa et al., Trends Parasitol. 18 (6): 272-8 (2002))。このプロセスは、温度上昇、10 mM EGTAにより刺激され、トリパノソーマ由来の内在性原生動物 PLC の阻害剤である、10 mM ZnCl₂ の存在下で阻害された。これらの観察は、恐らく内在性 PLC が原因である、ARP 放出の酵素的特性の可能性と一致している。しかし、非酵素的メカニズムは排除しない。

【0449】

多くの原虫の表面タンパク質が GPI 部分 (Ropert and Gazzinelli, Curr Opin Microbiol. 3 (4): 395-403 (2000); Almeida and Gazzinelli, J Leukoc Biol. 70 (4): 467-77 (2001)) により固定され、この部分単独で従前にマクロファージ活性化能を示しており (Magez et al., J Immunol. 15; 160 (4): 1949-56 (1998))、恐らくその脂質部分を介してトール様受容体-2 に結合することが知られている (Campos, 2001, J. of Immunology 167: 416-423)。我々の実験は、ARP の放出が GPI 結合の制御を介して原虫の代謝により制御されていること、また、PLC により破壊される膜結合は、DC 細胞の活性化には必要とされないことを示唆している。更なる証拠が、ホスホリパーゼ治療の存在下及び非存在下での高活性 E. テネラ抽出物の C8RP-HP LC 分離における活性物質の位置を比較することにより得られた。両方のケースで、活性は変化しないままであり、同じフラクションに現れた。このことは、ARP と GPI 自身、LPS、及び細菌のリポタンパク質などの脂質成分に依存する DC 活性化因子とを区別する (Brightbill et al., Science 285 (5428): 732-6 (1999); Aliprantis et al., Science 285(5428): 736-9 (1999))。in vivo での抗腫瘍活性に対する E. テネラのスポロゾイト由来の膜調製物を試験した際の予備データは、可能な解釈の1つとして、ARP の膜結合形態は、安定性及び／又は徐放性特性を向上させる効果的治療薬となり得ることを暗示している。

【実施例14】

【0450】

E. テネラのオーシストの経口投与

マウス腫瘍モデルを用いて、異種のアイメリアの経口投与が、E. テネラ抽出物の投与により見られる抗腫瘍反応を生じ得るか否かを決定する。オーシストを与えた腫瘍耐性マウスの寿命の増加について調べる。オーシストを与えられた腫瘍のないマウスについて、オーシスト摂取後約2～3週間で脾臓及び小腸での DC 活性を検査する。これにより、SI 組織で ARP を上昇させることができるか否か、及びこれが他の組織に広がり得るか否かが示されるであろう。一晩の水の制限の後、オーシストは飲料水中に入れてマウスに与えられる。各マウスは、約100,000個のオーシストを含む約0.5 mL を飲む。

【実施例15】

【0451】

ヒトでの ARP の抗ウイルス活性の証拠

BBX-01 の第1相臨床試験の間、末期の肺癌患者が、2箇所の体内の領域から、パピローマウイルス由来と思われる長期間のいぼが完全に消失したことを報告した。第1のものは背中の中及び中央領域に沿っており（脊柱の線に沿って）、また、第2のものは左腕の上側領域に沿っている。報告は、いぼが突然乾燥し、消失したと記載していた。患者は、約2週間の間隔を空けた、3回の徐々に量を増やした単回投与で BBX-01 を受けた後、しかし、繰り返し投与治療過程を受ける前に、これは生じた。患者は、この期間他の治療を受けなかった。

【実施例16】

【0452】

アイメリア19kD スポロゾイト抗原に対し相同なタンパク質の同定

本発明の単離したペプチドで見出されたものと類似の配列及び／又は構造を有する他のタンパク質を同定するために、配列相同性検索を、本発明の E. アセルブリナ ARP (配列番号: 2) 及びウシアメリアタンパク質配列の可変領域を用いて行った。National Library of Medicineにより運営されているウェブサイト (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) により

10

20

30

40

50

T)を介して利用可能な、The Basic Local Alignment Research Tool (B L A S T) (登録商標)を使用して、ウシアイメリアタンパク質の相同性を同定した(表10)。或いは、Plasmodium falciparumゲノム配列を含むデータベースを、次のウェブサイトで利用可能なB L A S Tアルゴリズムを利用した、アイメリア19kDスポロゾイト抗原と熱帯熱マラリア原虫ゲノムの配列との間の比較に用いた: plasmodb. org/plasmodb/servlet/sv?page=blast(表10)。

【0453】

簡潔には、アイメリア19kDスポロゾイト抗原ペプチドを、次のB L A S T検索に用いた。1) 合計39, 196配列を有するヒト(Homo sapiens)タンパク質配列のデータベース、2) 合計1, 687, 930を有するG e n B a n k + E M B L + D D B J + P D B (但し、E S T、S T S、G S S、又はフェーズ0、1又は2 H T G Sを除く)配列のデータベース、及び3) 合計15, 724, 693配列を有する、G e n B a n k + E M B L + E S T区分からのD D B J配列のデータベース。これらのデータベースの全てがNational Library of Medicine (N L M) のNational Center for Biotechnology I F N o r m a t i o n (N C B I) のウェブサイトを介して公共の検索に利用可能であり、上述のウェブサイトで見出し得たであろう。

10

【0454】

ヒトタンパク質配列のデータベース内でPairwise B L A S T比較を、タンパク質ータンパク質の比較に好適である、「blastp」プログラムオプションを用いて行った。アイメリア19kDスポロゾイト抗原とヒトタンパク質データベースに保管してある配列との間に有意な相同性がないことを見出した。

20

【0455】

G e n B a n k + E M B L + D D B J + P D B (但し、E S T、S T S、G S S、又はフェーズ0、1又は2のH T G Sを除く)配列のデータベース内でのPairwise B L A S T比較を、全6つの読み枠内で翻訳されたヌクレオチド「配列2」に対してタンパク質「配列1」を比較する「tblastn」プログラムオプションを用いて行った。有意な配列及び構造上の相同性が、アイメリア19kDスポロゾイト抗原とこのデータベースに保管されている既知のタンパク質配列との間で見出された。

【0456】

G e n B a n k + E M B L + E S T区分からのD D B J配列のデータベースの範囲内でのPairwise B L A S T比較を、全6つの読み枠内で翻訳されたヌクレオチド「配列2」に対してタンパク質「配列1」を比較する「tblastn」プログラムオプションを用いて行った。有意な相同性が、アイメリア19kDスポロゾイト抗原とデータベースに保管されている既知のE S T配列の間に見出された。興味深いことに、アピコンプレクサのメンバーのみがこの検索から得られた。

30

【0457】

本発明のウシアイメリアタンパク質の可変領域の配列を、G e n B a n k + E M B L + D D B J + P D B (但し、E S T、S T S、G S S、又はフェーズ0、1又は2のH T G S配列を除く)配列のデータベースのB L A S T検索に用いた。

【0458】

G e n B a n k + E M B L + D D B J + P D B (但し、E S T、S T S、G S S、又はフェーズ0、1又は2のH T G S配列を除く)配列のデータベースの範囲内でのPairwise B L A S T比較を、全6つの読み枠内で翻訳されたヌクレオチド「配列2」に対してタンパク質「配列1」を比較する「tblastn」プログラムオプションを用いて行った。本発明のウシアイメリアタンパク質の可変領域とウシのデータベースに保管されている任意の既知のタンパク質との間に、妥当な相同性は見出せなかった。

40

【0459】

同定したA R Pを、ウェブサイトncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi.で利用可能である、Conserved Domain Database (C D D v. 1. 60)及びデフォルトパラメータ(default parameter)に対するReverse Position-Specific BLAST(登録商標)アル

50

ゴリズム設定を用いて、保存された領域についても分析した。この分析は、同定したA R Pは、プロフィリンにより表される、保存されたP R O F（プロフィリン）ドメインを有していることを示した。データは、カバノキ花粉（例えば、配列番号：13）を含む調製物がD Cアッセイで活性であったことを示した。タンパク質レベルでのアラインメントに基づいて、カバノキの花粉がE. テネラA R Pに対する28%の同一性及び54%の類似性、E. アセルブリナA R Pに対する31%同一性及び57%類似性を有している。

【0460】

【表10】

代表的な BLAST（登録商標）結果

代表的な BLAST（登録商標）結果						
入力配列	アクセシ ョン番号	配列番 号	説明	ビット スコア	同一性の割 合	ポジティブ の割合 ¹
EA19kD スポロゾイト 抗原	11561738	8	プラスモディウム(chr9.phat_327)	116	39	56
EA19kD スポロゾイト 抗原	11562004	9	プラスモディウム (chr9.gen_161)	116	38	58
EA19kD スポロゾイト 抗原	11562590	10	プラスモディウム (chr9.glm_372)	100	40	58
EA19kD スポロゾイト 抗原	11513601	11	ヘベアブラジリエンシス由来のラテッ クスプロフィリン HeVb8 鎖A	35	26	42
EA19kD スポロゾイト 抗原	2781152	12	シロイヌナズナ由来のプロフィリンI	31		
EA19kD スポロゾイト 抗原	1942360	13	ヨーロッパシラカバ由来のカバノキ花 粉	31	31	57
EA19kD スポロゾイト 抗原	15224838	14	シロイヌナズナ由来のプロフィリンI	31		
EA19kD スポロゾイト 抗原	BG235691	21	TR:Q24777 Q24777 19 KDA スポロゾイ ト抗原。[2]TR:Q03777;MRNA 配列に類 似の EtESTed11f08.yl アイメリアテネラ S5-2 cDNA Neg 選択アイメリアテネラ cDNA 5'	285	83	91
EA19kD スポロゾイト 抗原	CB070888	22	TR:Q24777 Q24777 19 KDA スポロゾイ ト抗原。[2]TR:Q03777;MRNA 配列に類 似の TgESTzye83c06.yl TgME49 in vivo ブラディゾイト cDNA サイズ選択トキ ソプラズマ原虫 cDNA クローン TgESTzye83c06.yl 5'	169	51	72
EA19kD スポロゾイト 抗原	BM189297	23	TR:Q24777 Q24777 19 KDA スポロゾイ ト抗原。[2]TR:Q03777;MRNA 配列に類 似の TgESTzyb37c04.yl TgRH タキゾイ トを引いた cDNA ライブラリートキノ プラズマ原虫 cDNA クローン TgESTzyb37c04.yl 5'	169	51	72
EA19kD スポロゾイト 抗原	AA167907	24	アイメリアアセルブリナ19kDaス ポロゾイト抗原、MRNA 配列に類似 の CpEST.071 uniZAPCpIOWAsporoLib1 クリプトスポリジウムバルバム cDNA 5'	129	46	64
EA19kD スポロゾイト 抗原	CA856473	25	TR:Q24777 Q24777 19 KDA スポロゾイ ト抗原[2]TR:Q03777;MRNA 配列に類似 の PfESToac08g05.yl プラスモディウム 熱帯熱3D7生殖母細胞cDNAライ ブラリープラスモディウム熱帯熱3D 7 cDNA 5'	122	38	57

¹ ポジティブの割合：配列同一性及び／又は保存の割合に基づくことが可能な、2つの配列間の類似性の範囲

【実施例17】

【0461】

マウスでのA R Pの抗ウイルス活性の証拠

特定病原体未感染の雌BALB/cマウスを、用量LD90のインフルエンザウイルスA/N

10

20

30

40

50

WS / 33 (H1N1)により鼻腔内に感染させた。次いで、マウスを2つの治療手順のうちの1つによりARP E1を用いて治療した。最初の手順では、マウスは、100 ngのARP E1を、ウイルスに暴露する48時間前、ウイルスに暴露(0日目)した4時間後、及びウイルス暴露後3日目及び6日目に、腹腔内に与えることにより受けた。第2の手順では、マウスは、100、1,000、又は10,000 ngのARP E1を腹腔内に、ウイルス暴露(0日目)の4時間後、及びウイルス暴露の3日後及び6日後に受けた。プラセボ処置されるマウスは、ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水を受けた。マウスは、死ぬまで毎日観察した。マウスの生存状況を表11に示す。

【0462】

【表11】

10

インフルエンザに暴露したマウスの生存状況

化合物	用量 (ng / 日)	投与計画	生存 / 合計	死亡数 ^a の平均日数 ± SD
ARPE1	100	-2, 0, 3, 6	0/10	12.3 ± 1.2*
ARPE1	100	0, 3, 6	2/10	12.1 ± 1.6
ARPE1	1,000	0, 3, 6	3/10	12.7 ± 2.7
ARPE1	10,000	0, 3, 6	5/10*	12.0 ± 1.4*
プラセボ		0, 3, 6	2/20	11.3 ± 1.2

20

a) 21日目より前に死んだマウスの死亡の平均日数

* $P < 0.05$

【0463】

生存数及び死亡するまでの時間の有意な増加が、10,000 ngのARP E1で治療したマウスであった。3～11日目のこれらのマウスで、動脈血酸素飽和度も測定した。1,000 ng及び10,000 ngのARP E1で治療したマウスの酸素飽和度の減少の統計的に有意な減少があった。

30

【実施例18】

【0464】

樹状細胞麻痺の惹起による免疫抑制薬としてのARPの使用

ARPの一次活性は樹状細胞中でのIL-12の産生を誘導するが、高用量(～1000回の刺激用量)でARPがIL-12産生を抑制することに気づいた。この観察に基づいて、過敏性又は不適当な免疫応答により引き起こされる疾患の治療にARPを免疫抑制剤として使用することが可能であろう。この仮定を、SJLマウスにおいて実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)モデルで試験した。EAEを、ヒトの多発性硬化症(MS)に非常に類似しているマウスの疾患を誘導する脊髄由来のミエリン塩基性タンパク質で免疫化することによりマウスに誘導する。

40

【0465】

SJLマウスは、0日目及び10日目にミエリン塩基性タンパク質により免疫化され、0.1 µg、1.0 µg又は10 µgのARP E1の治療をi.p.で毎日与えられたか、或いは5 mgのLinomideがs.c.で与えられたか、或いは溶媒単独が与えられた。治療は5日間毎日行われた。LinomideはEAEを阻止することが知られている薬剤であり、正対照として用いている。EAEは、マウスで、尾ではじまり、死ぬまで進行する進行性の麻痺として現れる。EAEの重症度は、EAEスコアによって測定され、正常な0で始まり、死ぬ場合の5まで増加する。倫理的理由のため、マウスはスコア4に達すると屠

50

殺される。実験は15日目に終了した。平均EAEスコアを表12に示す。

【0466】

【表12】

SJLマウスでARPがEAEに与える影響

処置	15日目のEAEスコア±SD
溶媒	1.8 ± 1.9
Linomide	0.6 ± 1.3
ARP E1 0.1 μg	2.7 ± 1.3
ARP E1 1.0 μg	1.5 ± 1.6
ARP E1 10.0 μg	1.1 ± 1.5

10

【0467】

ARP処置群のEAEスコアは溶媒対照と有意には区別がないが、スコアの傾向は、提案されているARPの作用メカニズムと一致している。ARPが免疫賦活薬として作用することが期待される最も低い用量では、疾患を僅かに悪化させるように思われた。しかし、ARPの免疫抑制活性薬としての活性が予期され得る高用量では、疾患は抑制されるように思われ、溶媒で処置した対照とLinomide正対照との間の中間のスコアを与える。

20

【実施例19】

【0468】

マウスでのカンジダアルビカンス感染を治療するためのARPの使用

この試験の目的は、カンジダアルビカンスによる感染の誘発後に、ARP投与がマウスの生存率を上昇させるか否かを決定することであった。雌CD1マウスの群を、0日目に静脈内(i.v.)に接種し、カンジダアルビカンスの感染量を測定したところ、対照群で60～100%の死亡率をもたらした。マウスの群に、0日目の感染誘発の約1.5時間後に、供試物質(0.1、1.0又は10.0 ng/マウス/日)を3つの濃度のうちの1つで、又は溶媒をi.p.注射により投与し、1日目から4日目に再び投与し、合計で5回投与した。更なるアッセイの対照群のマウスは、感染誘発の約1、24、48及び72時間後に、体重1 kgに付き、約80 mgのフルコナゾールを強制経口投与した。マウスを、感染性の接種後の死亡率について、14日目まで観察した。

30

【0469】

【表 1 3】

ARPで治療したカンジダアルピカンス誘発マウスの生存状況

処置	投与量	死ぬまでの平均時間 ^a	平均生存時間 ^b	死亡率
溶媒	-	6.0	10.4	40
ARP	0.1 ng	13.0	13.6	20
ARP	1.0 ng	4.0	7.8	60
ARP	10.0 ng	6.0	12.2	20
フルコナゾール	~80 mg/kg	-	14.0	0

b) 誘発、全動物に関する時間 (日数)

a) 誘発、自然死に関する時間 (日数) のみ

【0 4 7 0】

試験群及び溶媒処置群との間で、死亡率、平均生存時間又は死ぬまでの平均時間には統計的有意差は観察されなかった。0.1 ng の用量の ARP で効果があったかもしれないが、高用量では明らかではなかった。

【実施例 2 0】

【0 4 7 1】

マウスでのマラリア治療のための ARP の使用

この試験の目的は、ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium yoelii*) による感染誘発後の ARP 投与がマウスの生存率を増加させるか否かを判定することであった。雄 C57BL/6 マウスの群に、0 日目に感染量のネズミマラリア原虫を i. v. 接種した。マウスの群に、試験物質 (0.1、1.0 又は 10.0 ng / マウス / 日) を 3 つの濃度のうちの 1 つで、又は溶媒を、1 日目、再び 2 日目から 5 日目に、合計 5 回、i. p. 注射により投与した。更なるアッセイの対照群のマウスに、体重 1 kg に付き約 40 mg のクロロキンを用いて i. p. 注射により 1 日目から 5 日目に同様に投与した。

【0 4 7 2】

【表 1 4】

ARPにより治療したネズミマラリア原虫誘発マウスの生存状態

処置	投与量	生存 (日数) $\pm$ SD	寄生された赤血球%
溶媒	-	24.0 $\pm$ 0.7	42
ARP	0.1 ng	26.3 $\pm$ 1.2	34
ARP	1.0 ng	25.9 $\pm$ 1.2	33
ARP	10.0 ng	26.4 $\pm$ 1.1	36
クロロキン	40 mg/kg	37.0 $\pm$ 0.7	12

【0 4 7 3】

活性の別のマーカーとして、マウスの体温及び心拍数も観測された。ARP の 3 つの投与量の全てで、体温上昇及び心拍数の遅れ及び減少がマラリアに感染したマウスで典型的に見られた。さらに、生存率の僅かな上昇及び寄生された赤血球数の減少により明らかのように、このモデルで ARP 活性の徴候があったが、これらの差異は統計的には有意ではなかった。

【実施例 2 1】

【0 4 7 4】

マーマットでの慢性肝炎の治療のための A R P の使用

肝炎に慢性的に感染したマーマットの肝炎 D N A のレベル及び抗肝炎抗体力価の両方を観察した。3匹のマーマットを、2週間、25 ng / kg の A R P で毎日治療した、別の3匹のマーマットを未処置の対照群として用いた。血液試料を、肝炎 D N A レベル及び抗体力価の分析のために、処置開始の3、7、15、21、28及び42日後に回収した。使用した A R P の用量では、A R P 治療の効果は肝炎 D N A レベル又は抗肝炎抗体力価のいずれにも見られなかった。

【実施例 2 2】

【0 4 7 5】

マウスでの結核の治療のための A R P の使用

0日目に、マウスの群を結核菌 Erdman 株 (M. t b) に吸入により暴露した。1、2、3、4及び5日目に、マウスに0.1 ng、1.0 ng 又は10.0 ng の A R P E 1を含む3% B S A 及びリン酸緩衝生理食塩水を腹腔内注射により与えた。マウスの対照群は、溶媒のみを与えた。0、21及び42日目に、肺の M. t b のコロニー形成単位 (c f u) を決定した。対照群及びどの治療群との間にも c f u に有意な統計的差異はなかった。この特定の治療計画は M. t b 感染に有意な効果を示さなかったが、異なる投与量、投与経路又は治療時間によっては有利な効果を与えるであろう。

【実施例 2 3】

【0 4 7 6】

E 1 での c y s 残基の数の決定

E 1 (A R P E 1) のアミノ酸配列は、プラスミド生成物に挿入された核酸配列により予想されるように、2つのシステインを含むはずである。硫黄の反応性及びタンパク質の安定性におけるジスルフィド結合形成の潜在的役割のため、組換えタンパク質のスルフヒドリル含量、並びに還元状態を評価する必要がある。各バッチで得られる質量分析データから、18, 414 Da の一貫した質量が得られた。これは、両方のスルフヒドリル基が還元されていると仮定したときに、E 1 配列 (図 2 0) として与えられているアミノ酸配列で予想される的確な質量である。ジスルフィド結合が存在していたかどうかを、18, 412 Da の質量から予想されるであろう。質量分析は非常に正確であるが、18, 414 Da の質量が還元状態を示すと結論付けることは、裏付けとなるデータがない状態では難しい。このようなデータを得るために、タンパク質のスルフヒドリル基を Ellman 試薬により修飾し、質量を再決定した。

【0 4 7 7】

Ellman 試薬は、ジスルフィド架橋を介して結合した2つのチオーニトロ安息香酸残基の二量体である。これは、タンパク質中のシステインのチオールと反応してジスルフィド混合物を形成し、明確な質量の付加体を与えるであろう。タンパク質及びチオール付近の局所的な還元環境によって、これらのジスルフィド混合物を変換することができ、タンパク質上にジスルフィドを生成し、Ellman 試薬の再生をもたらす。この反応はまた、各タンパク質のシステインを酸化させるために、還元された Ellman 単量体を与える。

【0 4 7 8】

E 1 タンパク質が2つのスルフヒドリル基を含む場合には、Ellman 反応から得られる2つの生成物のうち第1のものは、以下の質量を有する二重の付加体となるはずである。

【0 4 7 9】

$18, 414.24 + 396.3 \text{ (Ellman)} - 2 \text{ (水素の損失)} = 18, 808.54 \text{ Da}$

【0 4 8 0】

第2の生成物は、質量18, 412.24 Da のタンパク質のジスルフィド型になるはずである。

【0 4 8 1】

10

20

30

40

50

この反応の手順、続いてE1原薬の質量分析データを以下に示す。質量分析により検出された主成分のみが予想された2つの生成物である。

【0482】

結果

deconvoluted Electrospray MS スペクトル (図26) は、Ellman試薬とE1タンパク質との反応で予想される2つの質量を有している。いかなる有意な他の質量も存在しない。

【0483】

この分析の第2の結果は、各バッチ (18, 414 Da の分子量) より製造される原薬は、還元型で存在する可能性が高い。

10

【0484】

手順

試薬:

1. DTNB (5, 5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸) = Ellman試薬)、Pierce社製、カタログ番号 # 22582

2. Cys (システイン)、Sigma社製、カタログ番号 C6852

3. DMSO (ジメチルスルホキシド)、Sigma社製、カタログ番号 D8418

4. Gu-HCl (塩化グアニジン)、Fisher社製、カタログ番号 BP178-500

5. Tris (Trizma base)、Sigma社製、カタログ番号 T1503

6. HCl (塩酸)、EMScience社製、カタログ番号 HX0603-75

20

7. CH₃COONH₄ (酢酸アンモニウム)、Baker社製、カタログ番号 0596-01

8. H₂O、Baker社製、HPLC試薬、カタログ番号 4218-03

【0485】

ストック溶液:

1. Tris-HCl: 1M、pH 7.88

2. 酢酸アンモニウム: 1M、pH 6.96

3. DTNB: DMSO中 100mM

4. 10×PBS (ステージIIで使用)

5. Cys: PBS中 100mM

30

【0486】

作用液:

1. 反応用緩衝液: 0.1M Tris-HCl、pH 7.92~8.0

2. 透析用緩衝液: 10mM 酢酸アンモニウム pH 6.7

3. DTNB: 0.1M Tris中 440μM

4. Gu-HCl: 0.1M Tris中 8M

5. Cys: PBS中 195.5μM

6. PBS

7. タンパク質: E1-9、Cys中 1.8mg/ml = 195.5μM

【0487】

40

作用液の調製:

Gu-HCl 及びタンパク質を除く全作用液は、ストック溶液 (#1、2、3、6) から調製するか、或いは実験の直前に固体試薬を (#5) を希釈することにより調製した。Gu-HCl は、実験の1週間前に調製し、室温に保持した。タンパク質は、-80℃に保持し、実験の直前に解凍した。

【0488】

実験の直前に、全ての溶液を氷上のデシケーター内で30分間脱気し、窒素下で開放し、22℃の水浴で15分間時々振盪させながら15分のインキュベーションにより22℃ (その日の室温) に昇温させた。

【0489】

50

試料の処理：

1. DTNB修飾 45 μ l の試験溶液 (PBS、Cys、タンパク質) を 225 μ l の Gu-HCl と混合し、室温で 15 分間インキュベートしてタンパク質を変性させた。20 μ l の DTNB 溶液をプレートリーダー上で加え、OD₄₁₄ を 1 時間、30 秒ごとに読み取りながら観測した。1 時間内に得られた最も高い OD₄₁₄ を、 $\epsilon_{414} = 14,047$ を使用して放出された TNB²⁻ イオンの濃度を計算するのに用いた (Methods in Enzymology, 1983, 91, 49-60)。PBS OD₄₁₄ 読み取り値を、Cys 及びタンパク質の読み取り値から引いた。対照タンパク質試料 DTNB を、0.1 M tris で置換した。

【0490】

結果：Cys 試料：73% DTNB 修飾

タンパク質試料：34% DTNB 修飾

【0491】

2. 透析 反応後、DTNB 修飾試料及び対照タンパク質試料を透析して、Gu-HCl を別々のビーカーに移し、それぞれ 3~10 時間 3 × 300 ml の 10 mM 酢酸アンモニウム内に置いた。

【0492】

3. 試料分析 修飾されたタンパク質の存在を決定するために、標準的手順に従って、両方の試料を C8 RP-クロマトグラフィーで分析した。修飾した Cys 残基の数を、DTNB 修飾 (M-Scan、標準的手順) 後に分子量の増加を測定することにより見積もった。副成分 (恐らく、C8 クロマトグラムにおける副成分と同じ (ピーク高さで全量の ~16%)) は、2 つの修飾された残基を示した (分子量増加 = 397 Da)。主成分は、18412 Da に酸化されていた。

【実施例 24】

【0493】

ジスルフィド結合及び ARP 活性

特異的プライマー及び PCR を用いて、Cys 残基から Ser 残基へ変える指定点変異を行った。突然変異 (1 の突然変異では Cys 35 → Ser 及び他の突然変異では Cys 73 → Ser + Arg 80 → Trp) を配列決定で確認した。馴化培地及び細菌抽出物を DC アッセイにより分析した。両方の修飾体は、非修飾 ARP と比較して、約 1/10 の活性の減少をもたらした。Arg 80 は通常疎水性アミノ酸により占められる非保存領域内にあるので、疎水性の Trp への変更は、重要性が低いと思われる。このことは、恐らくジスルフィド結合の形成のために、ARP 分子中の両方の Cys 残基が DC 活性に重要であることを暗示している。

【0494】

アッセイ系に加えた場合に、ARP の酸化型及び還元型の両方が活性である。図 27 に示すように、in vivo 試験では、還元型が酸化型よりも 2~5 × 活性であった。in vitro 試験では、過剰な酸化型又は還元型のいずれかのグルタチオンをアッセイ系に加えた場合、還元型グルタチオンは、DC アッセイで応答を低下させた。しかし、これらの両方の実験では、セルの当面の環境では酸化還元電位を決定することはできなかったもので、どちらの型が DC セルに直接関連しているかは言うことはできない。

【0495】

引用参考文献及び同等物

本明細書に引用される全ての参考文献は、各別々の公報又は特許又は特許出願が具体的且つ独立に、その全体が本明細書において参照により援用されることを意図するかのようなものと同一範囲で、その全体が本明細書において参照により援用される。

【0496】

本発明の多くの改変及び変更は、その趣旨及び範囲を逸脱することなく行うことができ、当業者に明らかであろう。本明細書に記載された具体的な実施形態は、単なる具体例として提供されており、本発明は、添付の特許請求の範囲の用語、並びに、このような特許

10

20

30

40

50

請求の範囲に与えられる等価物の全容のみによって限定されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0497】

【図1】シクロスポラ及びアイメリア種の小サブユニットのリボソームRNA配列の系統樹を示す。トキソプラズマ・ゴンディイ (*Toxoplasma gondii*) をアウトグループとして用いたカルテットパズリング最尤法の結果を示す。解析後、アウトグループブランチを、明確にするために移動させた。節点の左の数は、各内部ブランチごとのカルテットパズリングサポート値を示す。スケールバーは、進化距離0.01ヌクレオチド/配列内の位置を示す。垂直距離は、明確にするだけのためである（この図は、Eberhard et al., 1999, *Emerging Infectious Diseases*, 5 (5): 651-658.から採用した）。 10

【図2 (A)】Superdex (商標) 75を用いた分子篩クロマトグラフィー工程の例及びNKアッセイ及びDCアッセイにおける活性を示す。図2 (B) は、Superdex (商標) サイズ排除工程の最後における、6節に概説した精製スキームからの典型的な全回収量を示す。粗原料内の活性（全容量に対して補正）を左端に示す。Superdex (商標) クロマトグラフィー後に回収した全量を右端に示す。

【図3 (A)】カルシウム結合タンパク質除去工程後のBBXのHIC勾配クロマトグラフィーを示す。図3 (B) は、HIC勾配からの活性フラクションのDEAE勾配クロマトグラフィーを示す。図3 (C) は、DEAE勾配からの活性フラクションのC8逆相勾配を示す。図3 (D) は、C8活性フラクションの吸収及び活性の相関を示す。

【図4】3つのアイメリア種由来のタンパク質配列の比較を示す。E. テネラ (EtU3) 及びE. アセルブリナ (3-1E: アクセション番号AF113613) の配列をcDNAの翻訳から得た。EtU3のcDNAは、10節に記載のE. テネラmRNAから得た。未知の種の推定ウシアメリア由来の断片をトリプシンペプチドのEdman及びMS/MSアミノ酸配列決定により得た。 20

【図5 (A)】DCアッセイでの未精製E. テネラ抽出物の希釈プロファイルを示す。8節の最初の抽出物に準じて試料を調製した。2つの別々のDCアッセイに及ぶ5つの反復希釈曲線を平均化した。エラーバーは、5つの反復の標準偏差を示す。図5 (B) は、第2のE. テネラ抽出物のC8HPLC分離及び対応するフラクションのDCアッセイ活性を示す。

【図6】ARPの様々な源の用量/応答曲線を示す。純粋ではないE. テネラ抽出物及びDEAE精製組換え試料は、全タンパク質重量の約4%のARPを含む。純粋なウシ抽出物及び組換えE. テネラタンパク質は純粋であるが、約95%が逆相クロマトグラフィー条件により変性された。これらの推定値を用いてアッセイのタンパク質濃度を計算した。高度に純粋なrARP試料をDEAE活性フラクションからサイズ排除クロマトグラフィーにより得た。その純度及びタンパク質含量をC8逆相クロマトグラフィーにより少量の試料で評価し、その活性を補正することなく濃度に対してプロットした。応答曲線は、類似の最大レベルに標準化した。 30

【図7 (A)】10節に記載のプライマーを用いてE. テネラmRNAから得られたcDNAクローンのDNA配列を示す。図7 (B) は、図 (A) に示された順方向又は逆方向のいずれかのcDNAを組み込んだプラスミドを含むE. coliの2つの培地由来の活性を示す。図7 (C) は、E. テネラのクローン化ARPを有するクローニングプラスミドを含むE. coliにより調整された精製した最小培地のC8HPLC分離及び対応するフラクションのDCアッセイ活性を示す。 40

【図8】対照及び部分的に精製したARP (ステージ1 BEX) 処置群由来の腫瘍耐性Balb/cマウスの生存データの編集を示す。これらの生存時間は、増強されたARP (ステージ1抽出物) 生成物の有効性をチェックするために設計されたスクリーニング実験から得られた。対照の数は、いくつかのバッチをしばしば同じ対照に対して同時にスクリーニングしたので、処置群の数に等しくない。

【図9】マウス腫瘍モデルにおけるE. テネラ抽出物及び組換えE. テネラARPの抗腫瘍活性を示す。各処置ごとに3つ又は5つの投与群を示す。投与手順は、腫瘍注射後1日目 50

に開始して5日間毎日連続で ng ／マウス／日の指示用量から構成されていた。抽出物中のARPの量をC8HPLCクロマトグラフィーにより決定した。対照群は、緩衝液の偽注射を受けた。A) EtU3クローン由来の組換えE. テネラARP、B) E1クローン由来の組換えE. テネラARP、C) 胞子形成オーシスト由来のE. テネラARP抽出物【図10】マウスでの抗腫瘍応答との*in vitro*でのNK及びDCアッセイの相関を示す。(A) BEXの各バッチをマウス及びNKアッセイで定期的に試験した。この図では、約1年の抽出物にわたる一連のバッチを用いた。*in vivo*の抗腫瘍活性を、寿命の増加及び生存から計算される腫瘍指数により示され、0は100%の治療を表し、4は負の対照群を超える生存の優位性を表す。*in vitro*のNKアッセイ活性を、50%の細胞殺傷に到達するのに必要な希釈の対数により示した。実線は、点を通る最良の直線回帰を示す。(B) 実験的用量はDCアッセイで予め試験し、触診可能な腫瘍、悪液質の存在、及び生存状態の程度に基づいて、この用量に対する活性の対数を腫瘍指数に対してプロットした。この指数は、上記と同じエンドポイントを有する。回帰に適したパラメータを各プロットに表示した。

10

【図11】2回の5日間の低用量のBBX-01cの治療過程の間の患者#5-RWの血清IL-12レベルを示す。血清レベルを測定し、1日目から5日目を通してBBX-01cの注射をした。最終的試料は9日目又は10日目のいずれかに取り出された。

【図12】処置したLGL培地中のIFN γ のレベルの上昇と誘導されたNK-CMCの相関を示す。LGL/S180同時培養液を、様々な濃度のBEXで処理し、*in vitro*のNKアッセイで標準的な4日間でNK-CMCを分析した。LGL培養液を同じ濃度のBEXで処理し、調整済みの培地のIFN γ 濃度を一晚培養後に分析した。

20

【図13 (A)】相乗的添加剤の関数としてE. テネラ及びウシBBX-01cに対するDCアッセイの応答を示す。各パネルにおいて、活性を、抗原単独、添加剤単独、全ての添加剤(ALL)と抗原、1つの添加剤を追加した抗原(+と表示)、及び1つの添加剤のみが欠損した抗原(-と表示)として測定する。2つのパネルは、2つの別々のアッセイを示し、2つの間の絶対値は比較できない。図13 (B)は、組織培養条件における時間の関数としてのBBX-01cに対する、単離したばかりのCD11c⁺樹状細胞の感受性の欠損を示す。

【図14】マウス腫瘍モデルにおけるBBX-01c(増強したARP)及びGM-CSFの相乗作用を示す。2つの治療量以下のBBX-01cを、GM-CSFと共に又はなしで腫瘍後1日目に注射した。GM-CSF単独では、溶媒の偽注射と有意には違わなかった。

30

【図15】基準と比較した様々なウシの品種のDCアッセイの活性を示す。ボックスは、第25パーセンタイル(底)から第75パーセンタイル(上端)までを示す。ボックスの上及び下の線は、それぞれ第95及び第5パーセンタイル指標を示す。中央値はボックスの内側の線として表示する。

【図16 (A)】自然の腫瘍発生率に比較した、ウシの腸系の切片由来の抽出物のDC活性を示す。図16 (B)は、マウス腫瘍モデルにおけるウシの腸の抽出物の抗腫瘍活性を示す。12. 1. 2節に記載したように、腫瘍指数は、進行中の実験を評価するために用いた。小腸及び大腸に沿った3つの隣接フラクションのストックが、盲腸サンプルと共に含まれていた。各群は、12. 1. 1節の手順後の5匹のマウスの群から構成されていた。

40

【図17】アイメリアテネラ粗膜調製物のDC活性及びマウス腫瘍指数データを示す。樹状細胞IL12生成物を、E. テネラ粗膜フラグメント懸濁液のさまざまな希釈物として示す。ここで1. 0は、懸濁液の希釈がされていないことを示し、*in vivo*抗腫瘍アッセイでマウスに投与される濃度である。膜懸濁液活性の進行中の試験の腫瘍指数もまた示す。試験治療のより低い値は、陽性の抗腫瘍活性を示す。

【図18】pH7. 4の50mM *tris*-HCl、1mM PMSF中で、37℃、4時間でインキュベーション後にE. テネラオーシストからの粗膜調製物から放出されたARPのC8逆相クロマトグラフィーを示す(9節)。

50

【図 19】様々なアピコンプレクサ発現遺伝子配列断片 (E S T) 翻訳物のアラインメントを示す。アラインメントは、目視による観察により行った。ある位置での「類似性」の閾値は、その位置に存在した他のアミノ酸と比較した非保存的变化とみなすであろうたった 2 つのそのアミノ酸であった。もしこの条件が満たされれば、記録したアミノ酸はカラム中で最も一般的に生じるものである。開始のメチオニンからの平均長は 191 である。アミノ酸の特性に基づいて、比較される E S T のうち、41 位 ($41 / 191 = 21\%$) は 100% の同一性を有し、106 位 ($106 / 191 = 55\%$) は少なくとも 80% の類似性を有する。

【図 20】E. テネラ A R P E 1 クローン及び E t U 3 (図中 U 3 ともいう) クローンの DNA 配列のアラインメントを示す。

10

【図 21】E 1 クローン抽出物から得られた 80% 硫酸アンモニウムフラクションの H I C 勾配クロマトグラフィー分離のクロマトグラム及び対応する D C アッセイ活性プロファイルを示す。

【図 22】E 1 クローン抽出物の H I C クロマトグラフィーから得られる活性フラクションの D E A E 勾配クロマトグラフィー分離のクロマトグラム及び対応する D C アッセイ活性プロファイルを示す。

【図 23】E 1 クローン抽出物の D E A E クロマトグラフィーから得られる活性フラクションの Superdex アイソクラチッククロマトグラフィー分離のクロマトグラム及び対応する D C アッセイ活性プロファイルを示す。

【図 24】E 1 クローン抽出物の Superdex クロマトグラフィーから得られる少量のストックした活性フラクションの C 8 H P L C 分離のクロマトグラムを示す。これは、Superdex 生成物が高い純度であることを示す。

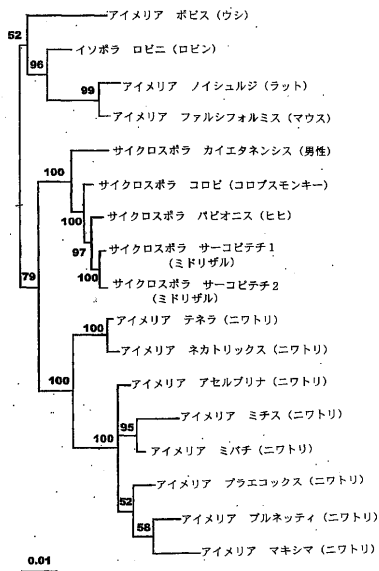
20

【図 25】マウス内の I L - 1 2 の E L I S A 試験は、E. テネラ A R P (E t U 3) で処理した。

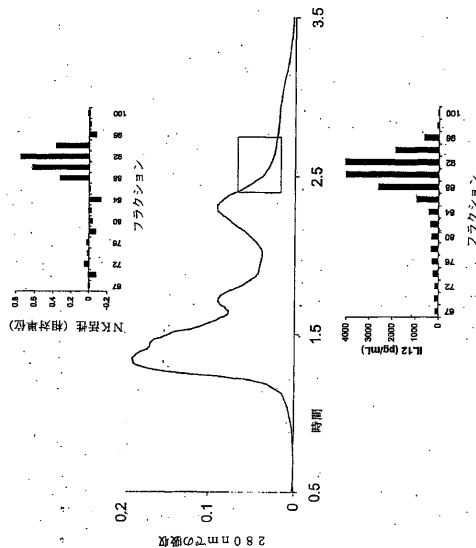
【図 26】A R P E 1 との Ellman 試薬の反応に対して、予測される質量が 18, 414 及び 18, 809 を示す、Deconvoluted electrospray M S スペクトルを示す。

【図 27】A R P の酸化型及び還元型の両方の用量 / 応答曲線を示す。曲線は、一定のタンパク質濃度に調整されている。

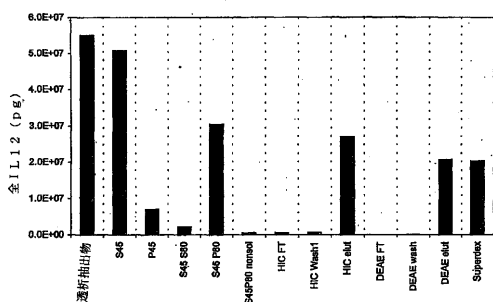
【図 1】



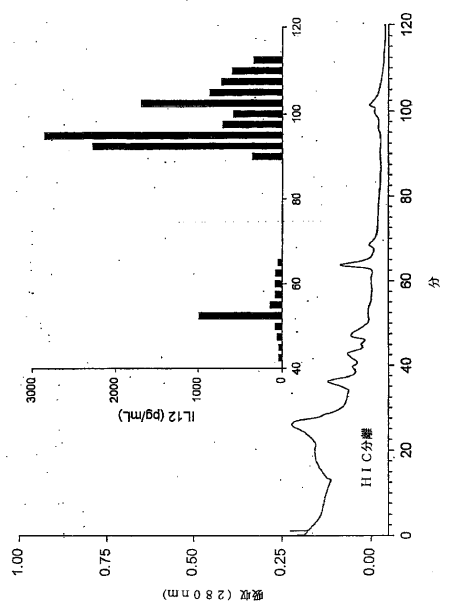
【図 2 (A)】



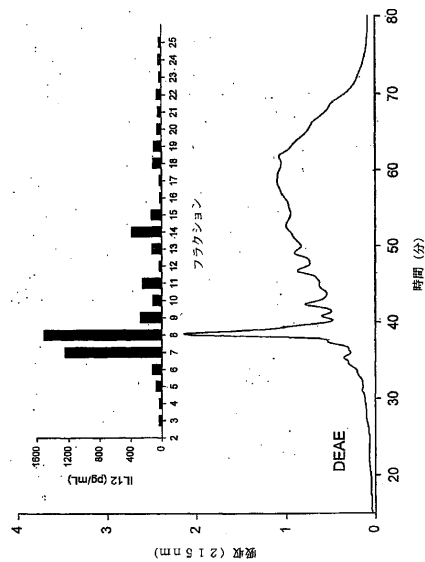
【図 2 (B)】



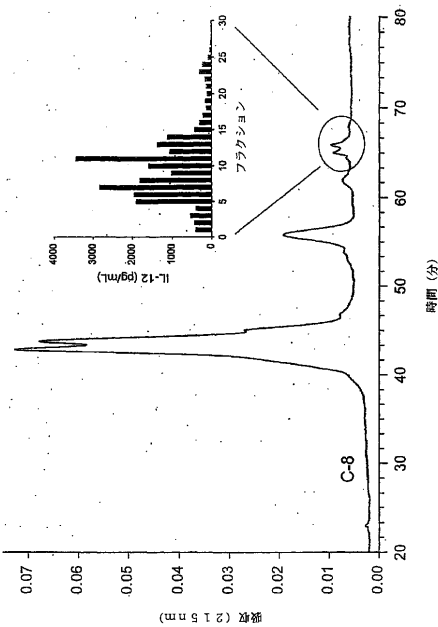
【図 3 (A)】



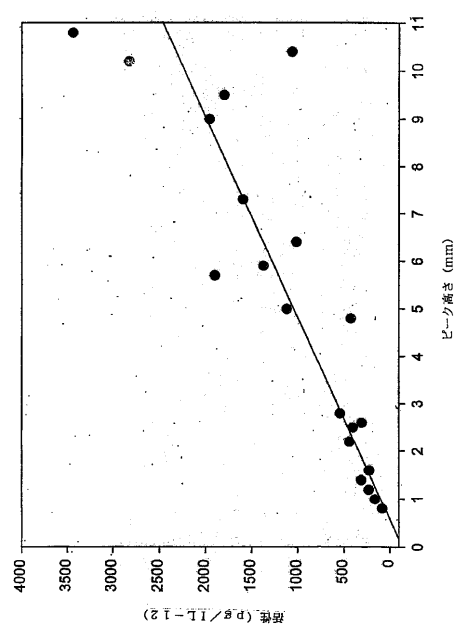
【図 3 (B)】



【図 3 (C)】



【図 3 (D)】



【図 4】

有望なN末端

Et03: SSPCFILPOI IFYLVCKMG EADTQANDTS VREMLVDTGR VFRAGGVASIA
3-1E: ARVFIVCSFF VFPYSVRMGE EADTQANDTS VREMLVDTGR VYAGGIASIA
bov: EMLVDTGR VFRAGGVASIA
50-mar: IASIA

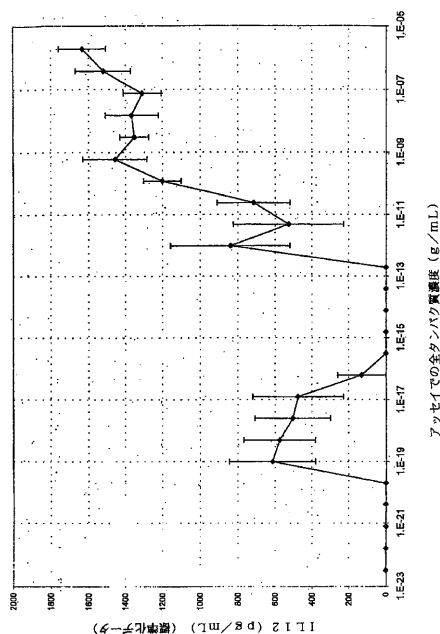
Et03: DGCRLFGA [REDACTED] YQIEVP QEDGTSISVD CDEASTLRQA
3-1E: DGCRLFGA [REDACTED] YQIEVL QEDGSSSTQED CDEASTLRQA
bov: DG RMFGA [REDACTED] YQIESV QEDNGTVQ QA
50-mar: DGCRLFGAST DSGGDPYARL VQ--TGQIEVL QEDGSSSTQED CDEAE

Et03: VVDGRAPNGV YIGGTYKLA EVKRDFTND QNYDVAILGK NKGGEELIKT
3-1E: IVDGRAPNGV YIGGIKYKLA EVKRDFTYND QNYDVAILGK NKGGEELIKT
bov: IV APDGV YIGGVK .GGGEELIKT

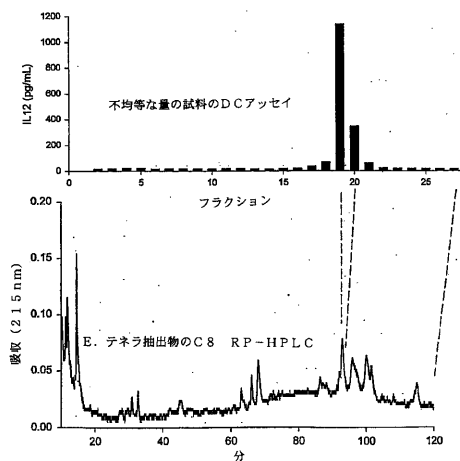
Et03: PNEVVIALY DEEKEQNKAD ALTTALNFAE YLSQSGF
3-1E: PNDVVIALY DEEKEQNKAD ALTTALNFAE YLYQGGF
bov: PNEVIALY DEEKEQNKAD, ALTTALNFAE ELYQ

注意：低保存領域を強調表示で示す。ウシ配列のギャップは、データがないことを示す。
ハイフンは配列比較を目的としたシフトを示す。

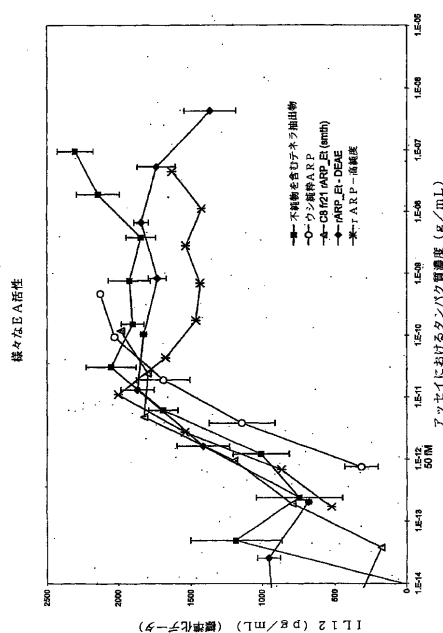
【図 5 (A)】



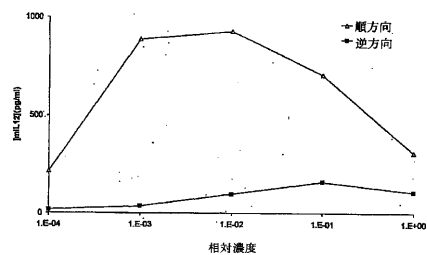
【図 5 (B)】



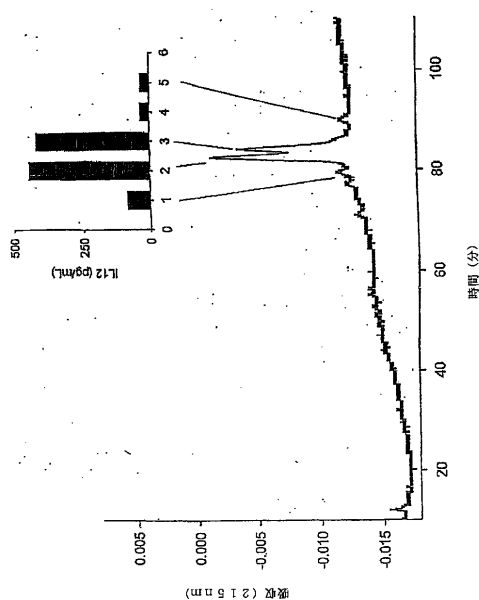
【図 6】



【図 7 (B)】



【図 7 (C)】

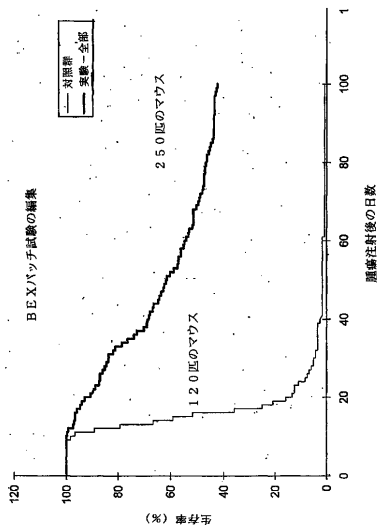


【図 7 (A)】

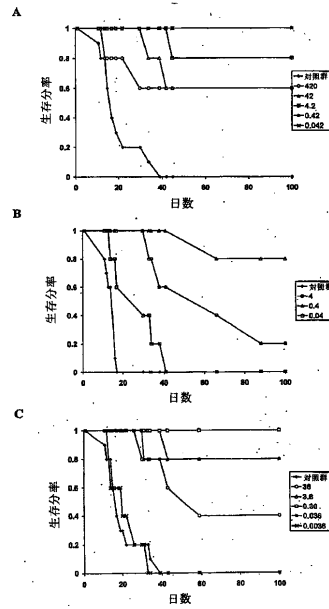
クローンE1U3のDNA配列

TCCAGTTTTGCTTTCTTTCCAAATATTTCTATTAGTTTGCAAAATG
GGAGAAGCAGACACCCAGGCTGGGACATCTCGTCCGCGAGTGGCTGGT
GACACCGGCGAGGCTTTCCGCGCGCTGCTAGCATAGCCGAGCGGCTC
CGGCTCTCGGAGCAGCAGTGGAGGCGAGGCGAAGCCTGGGAGAACTC
GTCAAGACCAACTACCAATTTAGAGTCCCCAGGAAGACGGAACCTCTATT
TCAGTGGATTGCGACGAGGCGGAGACTCTCGCGCAGGCGGTGGACGGC
CGCGCGCCCAACGGGCTCATCTCGGCGGACCAAGTCAAGCTCGCGGAA
GTCAAAAGGGACTTCACCTTCAACGACCAAACTATGATGTGGCGATTCTG
GGAAAACCAAGGCGGAGGTTTGTATTAAGTCAAAACGAAATGTT
GTTATAGCTTTGATGATGAAGAAAAGTACAAACAAAGCTGATGCTCTC
ACAACAGCTCTTAATCTCGCGGAGTACCTTACCAGTCCGGCTTCTAA

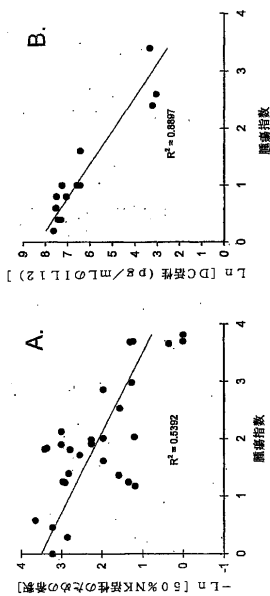
【図 8】



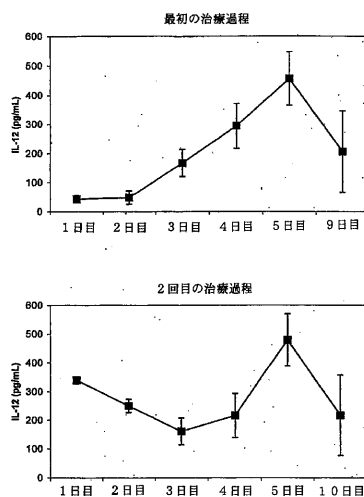
【図 9】



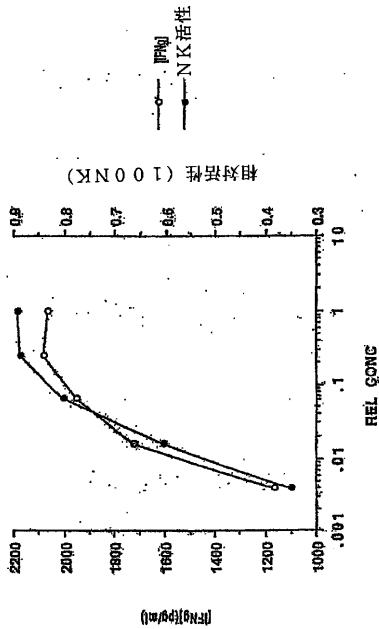
【図 10】



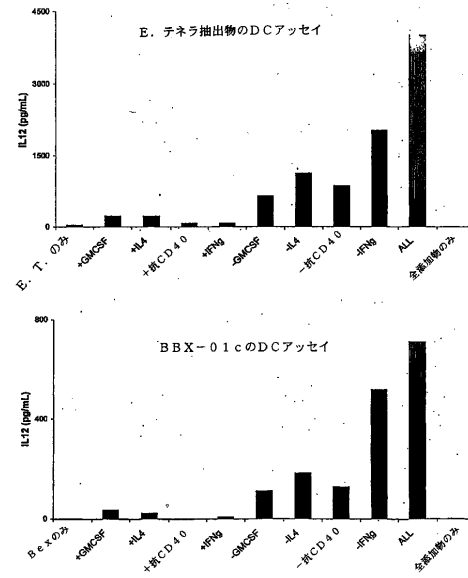
【図 11】



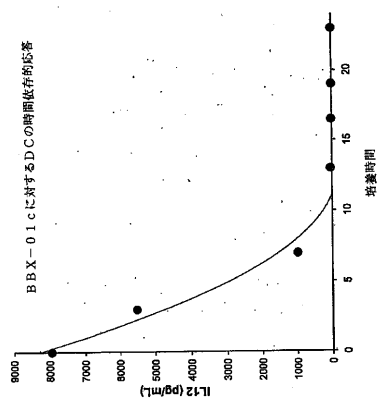
【図 12】



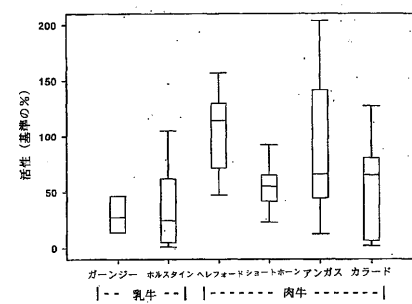
【図 13 (A)】



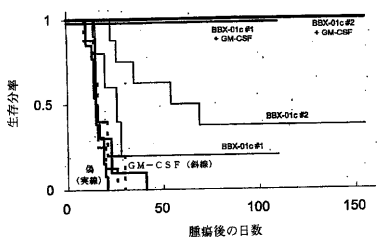
【図 13 (B)】



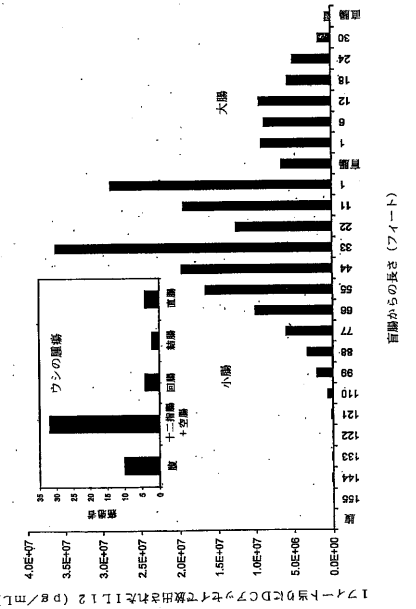
【図 15】



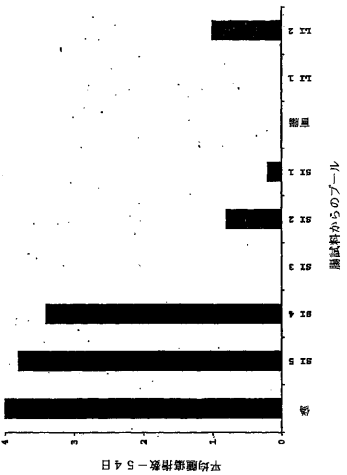
【図 14】



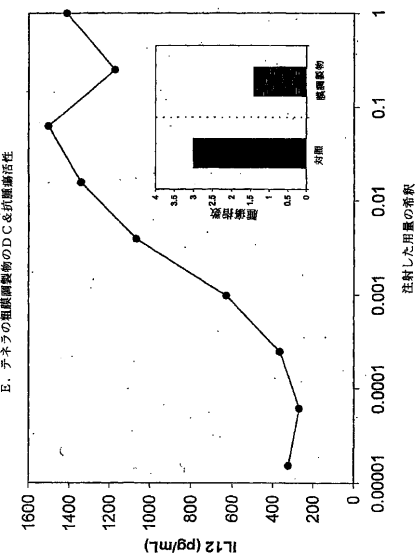
【図 16 (A)】



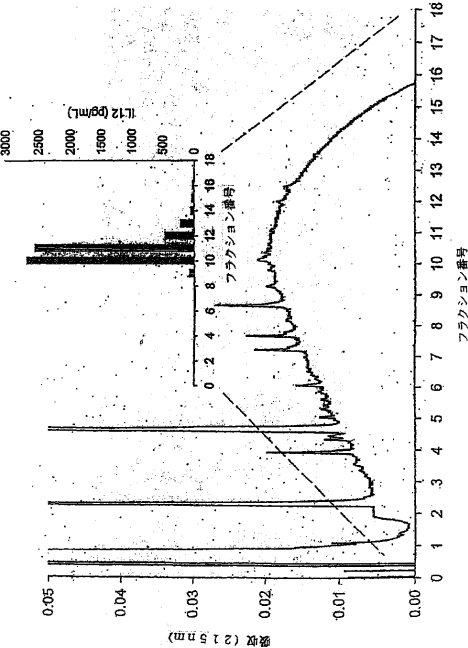
【図 16 (B)】



【図 17】



【図 18】



【図 19】

```

1
C parvum ..... 50
E acervulin ..... 50
E tenella ..... 50
N caninum ..... 50
N caninum2 ..... 50
P falciparu ..... 50
P yoelii ..... 50
S neuropa ..... 50
T gondii1 ..... 50
T gondii2 ..... 50
T gondii3 ..... 50
IDENTITY ..... 50
SIMILARITY ..... 50

101
C parvum ..... 101
E acervulin ..... 101
E tenella ..... 101
N caninum ..... 101
N caninum2 ..... 101
P falciparu ..... 101
P yoelii ..... 101
S neuropa ..... 101
T gondii1 ..... 101
T gondii2 ..... 101
T gondii3 ..... 101
IDENTITY ..... 101
SIMILARITY ..... 101

151
C parvum ..... 151
E acervulin ..... 151
E tenella ..... 151
N caninum ..... 151
N caninum2 ..... 151
P falciparu ..... 151
P yoelii ..... 151
S neuropa ..... 151
T gondii1 ..... 151
T gondii2 ..... 151
T gondii3 ..... 151
IDENTITY ..... 151
SIMILARITY ..... 151

201
C parvum ..... 201
E acervulin ..... 201
E tenella ..... 201
N caninum ..... 201
N caninum2 ..... 201
P falciparu ..... 201
P yoelii ..... 201
S neuropa ..... 201
T gondii1 ..... 201
T gondii2 ..... 201
T gondii3 ..... 201
IDENTITY ..... 201
SIMILARITY ..... 201

```

【図 19 - 1】

```

201 ..... 223
C parvum ..... 223
E acervulin ..... 223
E tenella ..... 223
N caninum ..... 223
N caninum2 ..... 223
P falciparu ..... 223
P yoelii ..... 223
S neuropa ..... 223
T gondii1 ..... 223
T gondii2 ..... 223
T gondii3 ..... 223
IDENTITY ..... 223
SIMILARITY ..... 223

```

【図 20】

```

E1及びU3クローンのDNA配列
1 ..... 50
E1 ATGGGTGAAG AGGCTGATAC TCAGGCTTGG GACACTTGG TCAGGCTGAGTG
U3 ATGGGTGAAG AGGCTGATAC TCAGGCTTGG GACACTTGG TCAGGCTGAGTG

51 ..... 100
E1 GCTGGTGTAC ACCGCGAGGG TTTTCGCGGG CGGCGTGTCT AGCATAGCGG
U3 GCTGGTGTAC ACCGCGAGGG TTTTCGCGGG CGGCGTGTCT AGCATAGCGG

101 ..... 150
E1 ACAGCTGCGG GCTCTTGGGA GACACAGTGG AGGCGAGGG CACGCGCTGG
U3 ACAGCTGCGG GCTCTTGGGA GACACAGTGG AGGCGAGGG CACGCGCTGG

151 ..... 200
E1 GAAGAACTCG TCAGACCAAA CTACCAAAAT GAAGTCCCC AGGAGACCG
U3 GAAGAACTCG TCAGACCAAA CTACCAAAAT GAAGTCCCC AGGAGACCG

201 ..... 250
E1 AACCTCTATT TCAGTGGATT GCGACAGGG GAGACTCTG CGGCGAGCG
U3 AACCTCTATT TCAGTGGATT GCGACAGGG GAGACTCTG CGGCGAGCG

251 ..... 300
E1 TGTGTGACGG CGGCGGCGCC AACGGGCTCT ACATCGCGG CACCAATAC
U3 TGTGTGACGG CGGCGGCGCC AACGGGCTCT ACATCGCGG CACCAATAC

301 ..... 350
E1 AAGCTGCGCG AAGTCAAAAG GCACTTCAAC TTCAAGACC AAAACTATGA
U3 AAGCTGCGCG AAGTCAAAAG GCACTTCAAC TTCAAGACC AAAACTATGA

351 ..... 400
E1 TGTGTGACGG CTGGGAAAAA ACAAGGCGG AGGCTTTTGG ATTAAACTTC
U3 TGTGTGACGG CTGGGAAAAA ACAAGGCGG AGGCTTTTGG ATTAAACTTC

401 ..... 450
E1 CAAAGAAAAA TGTGTGATA GCTTTGTATG ATGAGAAAA AGAACAAAA
U3 CAAAGAAAAA TGTGTGATA GCTTTGTATG ATGAGAAAA AGAACAAAA

451 ..... 500
E1 AAGCTGATG CTCTACAAAC AGCTCTAAC TTGCTGAGT ACCTGACCA
U3 AAGCTGATG CTCTACAAAC AGCTCTAAC TTGCTGAGT ACCTGACCA

501 ..... 513
E1 GGGCGGCTTC TAA
U3 GGGCGGCTTC TAA

```

【図 20 - 1】

```

E1及びU3クローンのタンパク質配列
1 ..... 40
E1 MGEADTQAW DTSVREWLVD TGRVFAGGVA SIADGCRLEG
U3 MGEADTQAW DTSVREWLVD TGRVFAGGVA SIADGCRLEG

41 ..... 80
E1 AAVEGEGNAW RELVKINYQI EVPEQDGTSI SVDCEASTL
U3 AAVEGEGNAW RELVKINYQI EVPEQDGTSI SVDCEASTL

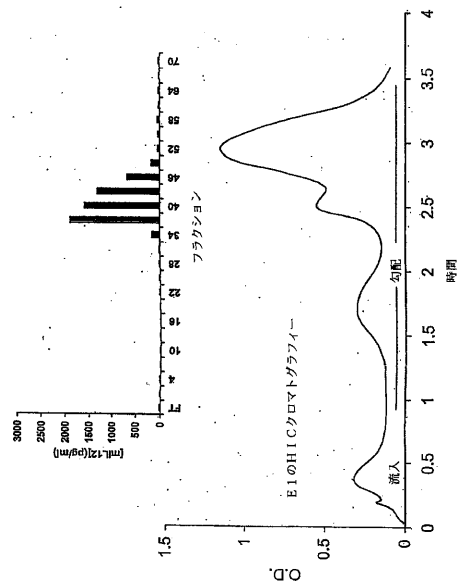
80 ..... 120
E1 ROAVVDGRAP NGVYIGGTGY KLAHVKRDFP FNDQNYDVAI
U3 ROAVVDGRAP NGVYIGGTGY KLAHVKRDFP FNDQNYDVAI

121 ..... 160
E1 LGKNKGGGFL IKTPNENVVI ALYDEEKEQN KADALTTALN
U3 LGKNKGGGFL IKTPNENVVI ALYDEEKEQN KADALTTALN

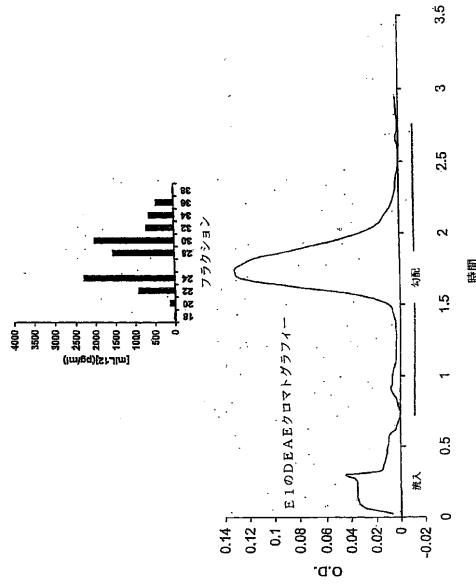
161 ..... 170
E1 FASYLYQGSGF
U3 FASYLYQGSGF

```

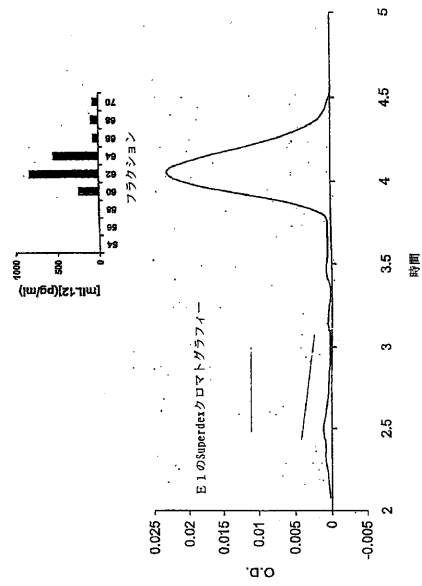
【図 2 1】



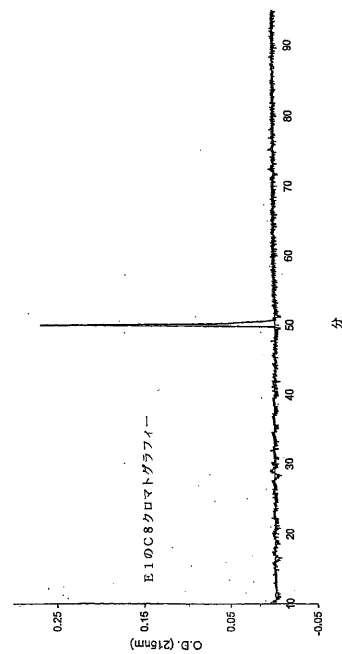
【図 2 2】



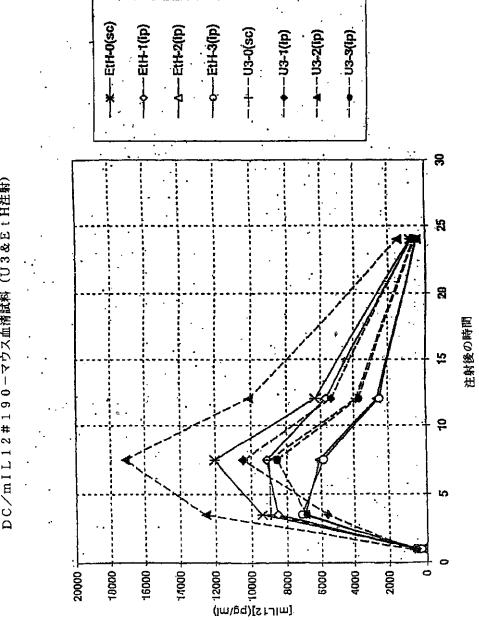
【図 2 3】



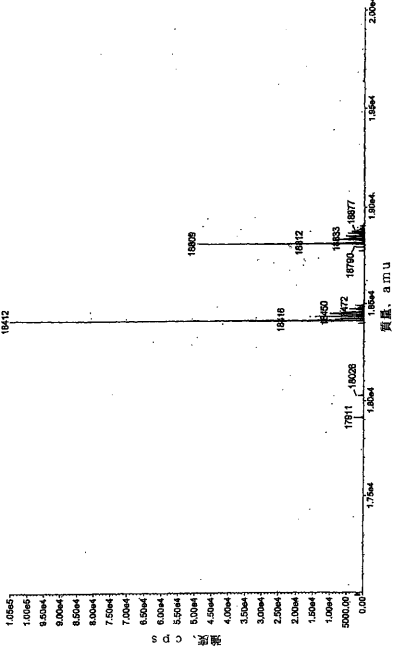
【図 2 4】



【図 25】



【図 26】



【配列表】

2008500005000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成18年6月14日(2006.6.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

動物における疾患を治療又は予防する方法であって、前記動物にタンパク質を供給する薬学的有効量の医薬組成物を前記動物に投与することを含み、前記タンパク質が、デフォルトパラメータに調整したBLAST 2.0アルゴリズムによって決定される配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30からなる群から選択されるタンパク質のいずれか1つと少なくとも25%の同一性を有し、前記タンパク質が免疫刺激活性を有する方法。

【請求項2】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、タンパク質、前記タンパク質をコードする核酸、又は前記タンパク質をコードする核酸をトランスフェクトされている細胞として供給する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

疾患を治療する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

疾患を予防する、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、

- (a) 配列番号1を含む単離されたタンパク質、
- (b) 配列番号2を含む単離されたタンパク質、
- (c) 配列番号28を含む単離されたタンパク質、
- (d) 配列番号30を含む単離されたタンパク質、
- (e) 配列番号3、4、5、6及び7を含む単離されたタンパク質、
- (f) 前記(a)～(e)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、又は

(g) 前記(a)～(e)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞(前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している)

として供給する、請求項3に記載の方法。

【請求項6】

医薬組成物が、配列番号1を含む単離されたタンパク質を含む、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

医薬組成物が、配列番号2を含む単離されたタンパク質を含む、請求項5に記載の方法。

【請求項8】

医薬組成物が、配列番号28を含む単離されたタンパク質を含む、請求項5に記載の方法。

【請求項9】

医薬組成物が、配列番号30を含む単離されたタンパク質を含む、請求項5に記載の方法。

【請求項10】

医薬組成物が、配列番号3、4、5、6及び7を含む単離されたタンパク質を含む、請

求項 5 に記載の方法。

【請求項 1 1】

医薬組成物が、動物に前記タンパク質を、

- (a) (1) アイメリアに感染している組織又は細胞の細胞抽出物を作製する段階、
 - (2) 上清を作製するために前記細胞抽出物を遠心分離する段階、
 - (3) タンパク質を沈殿させてペレットにするために硫酸アンモニウムによって前記上清を分画し、且つ前記ペレットを溶液に再懸濁する段階、
 - (4) H I C カラムに前記溶液を適用する段階、
 - (5) 溶出した物質を作製するために前記 H I C カラムに結合した物質を溶出させる段階、
 - (6) D E A E カラムに負荷するための試料を作製するために、前記溶出した物質を透析する段階、
 - (7) D E A E カラムに前記試料を適用する段階、
 - (8) 溶出した画分を作製するために緩衝液で前記 D E A E カラムに結合した物質を溶出させ、且つ前記溶出した画分を濃縮する段階、
 - (9) サイズ排除カラムに前記濃縮され溶出した画分を適用する段階、
 - (10) 前記サイズ排除カラムから溶出した画分を収集及びプールする段階、
 - (11) カルシウム結合タンパクを除去するために H I C カラムに前記プールされた画分を適用する段階、
 - (12) H P L C H I C カラムに前記 H I C カラムから溶出した画分を適用し、且つ活性画分を収集する段階（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン 1 2 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする 1 0 時間以内に哺乳動物から単離されたものである）、
 - (13) 前記活性画分を透析する段階、並びに
 - (14) H P L C D E A E カラムに前記透析された活性画分を適用し、且つ 1 つ若しくは複数の活性画分を収集する段階（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン 1 2 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする 1 0 時間以内に哺乳動物から単離されたものである）
- を含む工程の生成物である単離されたタンパク質、
- (b) 組換え発現されたタンパク質、
 - (c) 前記 (a) をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、又は
 - (d) 前記 (a) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞（前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している）
- として供給する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 1 2】

単離されたタンパク質が、

- (15) 逆相 H P L C カラムに段階 (14) において収集された活性画分を適用する段階、及び
 - (16) 溶出したタンパク質を作製するために前記逆相 H P L C カラムから結合したタンパク質を溶出させる段階（前記タンパク質は樹状細胞からのインターロイキン 1 2 の放出を刺激する活性を有し、前記樹状細胞は前記活性をアッセイする 1 0 時間以内に哺乳動物から単離されたものである）
- をさらに含む工程の生成物である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

単離されたタンパク質が、段階 (16) の溶出したタンパク質を再生する段階をさらに含む工程の生成物である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

細胞抽出物が、アイメリアに感染している組織から作製され、前記組織がウシ小腸組織である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

医薬組成物が、

- (a) 精製されたアピコンプレックス門生物の、又はアピコンプレックス門生物に感染している細胞のホモジネートを作製する段階、
 - (b) ペレットを得るために前記ホモジネートを遠心分離する段階、
 - (c) ホスホリパーゼを含む溶液で前記ペレットを処理する段階、
 - (d) 上清を得るために前記溶液を遠心分離する段階、
 - (e) 逆相HPLCカラムに前記上清を適用する段階、及び
 - (f) 溶出したタンパク質を作製するために前記逆相HPLCカラムから結合したタンパク質を溶出させる段階（前記タンパク質は樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する活性を有し、前記樹状細胞は前記活性をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである）
- を含む工程の生成物である単離されたタンパク質である、請求項3に記載の方法。

【請求項16】

医薬組成物が、段階（f）の溶出したタンパク質を再生する段階をさらに含む工程の生成物である単離されたタンパク質である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

医薬組成物が、組換え発現された単離されたタンパク質である、請求項11に記載の方法。

【請求項18】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、（a）～（e）のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸として供給する、請求項5又は11に記載の方法。

【請求項19】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、（a）～（e）のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸として供給し、前記ヌクレオチド配列が前記動物において作動可能なプロモーターに連結している、請求項5又は11に記載の方法。

【請求項20】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、（a）～（e）のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸として供給し、前記ヌクレオチド配列がプロモーターに作動可能に連結している請求項5又は11に記載の方法。

【請求項21】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、

- (a) 配列番号3、4、6又は7を含む単離されたタンパク質、
- (b) 配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30のいずれか1つの変異体を含む単離されたタンパク質（前記変異体は、それぞれ配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30に対して保存的アミノ酸置換のみを有する）、
- (c) 配列番号3、4、6又は7の変異体を含む単離されたタンパク質（前記変異体は、それぞれ配列番号3、4、6又は7に対して保存的アミノ酸置換のみを有する）、
- (d) PROF（プロフィリン）ドメインを含む単離されたタンパク質、
- (e) 低ストリンジェンシー条件下で配列番号15、16、17、18、19、20若しくは27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされるアミノ酸配列を含む、免疫刺激活性を有する単離されたタンパク質、
- (f) 高ストリンジェンシー条件下で配列番号15、16、17、18、19、20若しくは27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされるアミノ酸配列を含む、免疫刺激活性を有する単離されたタンパク質、
- (g) 前記（a）～（f）のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、
- (h) 前記（a）～（f）のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞（前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している）

として供給し、前記医薬組成物が樹状細胞からのインターロイキン12の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする10時間以内に哺乳動物から単離されたものである、請求項3に記載の方法。

【請求項22】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、配列番号3、4、6又は7を含む単離されたタンパク質として供給する、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってアッセイされる分子量18~25kD及び4.0と4.7との間の等電点(pI)を含む単離されたタンパク質として供給する請求項10から15又は20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30のいずれか1つの変異体を含む単離されたタンパク質として供給し、前記変異体がそれぞれ配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30に対して保存的アミノ酸置換のみを有する、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、配列番号3、4、6又は7の変異体を含む単離されたタンパク質として供給し、前記変異体がそれぞれ配列番号3、4、6又は7に対して保存的アミノ酸置換のみを有する、請求項21に記載の方法。

【請求項26】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、PROF（プロフィリン）ドメインを含む単離されたタンパク質として供給する、請求項21に記載の方法。

【請求項27】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、低ストリンジェンシー条件下で配列番号15、16、17、18、19、20若しくは27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされる単離されたタンパク質として供給し、前記タンパク質が免疫刺激活性を有する、請求項21に記載の方法。

【請求項28】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、高ストリンジェンシー条件下で配列番号15、16、17、18、19、20若しくは27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされる単離されたタンパク質として供給し、前記タンパク質が免疫刺激活性を有する、請求項21に記載の方法。

【請求項29】

アイメリアの核酸が、(a)~(f)のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項21に記載の方法。

【請求項30】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、前記(a)~(f)のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列として供給し、前記ヌクレオチド配列が前記動物において作動可能なプロモーターに連結している、請求項21に記載の方法。

【請求項31】

形質転換細胞が、前記(a)~(f)のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞を含み、前記ヌクレオチド配列がプロモーターに作動可能に連結している、請求項21に記載の方法。

【請求項32】

- 医薬組成物が、動物にタンパク質を、
- (a) 配列番号1を含む単離されたタンパク質、
 - (b) 配列番号2を含む単離されたタンパク質、
 - (c) 配列番号28を含む単離されたタンパク質、
 - (d) 配列番号30を含む単離されたタンパク質、

(e) 配列番号 3、4、5、6 及び 7 を含む単離されたタンパク質、
(f) 前記 (a) ～ (e) のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、又は
(g) 前記 (a) ～ (e) のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞（前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している）として供給する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 3 3】

医薬組成物が、配列番号 1 を含む単離されたタンパク質を含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

医薬組成物が、配列番号 2 を含む単離されたタンパク質を含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

医薬組成物が、配列番号 2 8 を含む単離されたタンパク質を含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 6】

医薬組成物が、配列番号 3 0 を含む単離されたタンパク質を含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 7】

医薬組成物が、配列番号 3、4、5、6 及び 7 を含む単離されたタンパク質を含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 8】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、
(a) (1) アイメリアに感染している組織又は細胞の細胞抽出物を作製する段階、
(2) 上清を作製するために前記細胞抽出物を遠心分離する段階、
(3) タンパク質を沈殿させてペレットにするために硫酸アンモニウムによって前記上清を分画し、且つ前記ペレットを溶液に再懸濁する段階、
(4) 前記溶液を H I C カラムに適用する段階、
(5) 溶出した物質を作製するために前記 H I C カラムに結合した物質を溶出させる段階、
(6) D E A E カラムに負荷するための試料を作製するために前記溶出した物質を透析する段階、
(7) D E A E カラムに前記試料を適用する段階、
(8) 溶出した画分を作製するために緩衝液で前記 D E A E カラムに結合した物質を溶出させ、且つ前記溶出した画分を濃縮する段階、
(9) サイズ排除カラムに前記濃縮され溶出した画分を適用する段階、
(10) 前記サイズ排除カラムから溶出した画分を収集及びプールする段階、
(11) カルシウム結合タンパクを除去するために H I C カラムに前記プールされた画分を適用する段階、
(12) H P L C H I C カラムに前記 H I C カラムから溶出した画分を適用し、且つ活性画分を収集する段階（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン 1 2 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする 1 0 時間以内に哺乳動物から単離されたものである）、
(13) 前記活性画分を透析する段階、並びに
(14) H P L C D E A E カラムに前記透析された活性画分を適用し、且つ 1 つ若しくは複数の活性画分を収集する段階（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン 1 2 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする 1 0 時間以内に哺乳動物から単離されたものである）を含む工程の生成物である単離されたタンパク質、
(b) 組換え発現されたタンパク質、

(c) 前記 (a) をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、又は
(d) 前記 (a) をコードし、プロモーターに作動可能に連結しているヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞
として供給する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 39】

単離されたタンパク質が、
(15) 前記段階 (14) において収集された活性画分を逆相 HPLC カラムに適用する段階、及び
(16) 溶出したタンパク質を作製するために前記逆相 HPLC カラムから結合したタンパク質を溶出させる段階
をさらに含む工程の生成物であり、前記タンパク質が樹状細胞からのインターロイキン 12 の放出を刺激する活性を有し、前記樹状細胞が前記活性をアッセイする 10 時間以内に哺乳動物から単離されたものである、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

単離されたタンパク質が、前記段階 (16) の溶出したタンパク質を再生する段階をさらに含む工程の生成物である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

細胞抽出物が、アイメリアに感染している組織から作製され、前記組織がウシ小腸組織である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 42】

医薬組成物が、
(a) 精製されたアピコンプレックス門生物の、又はアピコンプレックス門生物に感染している細胞のホモジネートを作製する段階、
(b) ペレットを得るために前記ホモジネートを遠心分離する段階、
(c) ホスホリパーゼを含む溶液で前記ペレットを処理する段階、
(d) 上清を得るために前記溶液を遠心分離する段階、
(e) 逆相 HPLC カラムに前記上清を適用する段階、及び
(f) 溶出したタンパク質を作製するために前記逆相 HPLC カラムから結合したタンパク質を溶出させる段階 (前記タンパク質は樹状細胞からのインターロイキン 12 の放出を刺激する活性を有し、前記樹状細胞は前記活性をアッセイする 10 時間以内に哺乳動物から単離されたものである)
を含む工程の生成物である単離されたタンパク質である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 43】

医薬組成物が、段階 (f) の溶出したタンパク質を再生する段階をさらに含む工程の生成物である単離されたタンパク質である、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

医薬組成物が、(a) ～ (e) のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸として動物に前記タンパク質を供給する、請求項 32 又は 38 に記載の方法。

【請求項 45】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、(a) ～ (e) のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸として供給し、前記ヌクレオチド配列が前記動物において作動可能なプロモーターに連結している、請求項 32 又は 38 に記載の方法。

【請求項 46】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、(a) ～ (e) のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸として供給し、前記ヌクレオチド配列がプロモーターに作動可能に連結している、請求項 32 又は 38 に記載の方法。

【請求項 47】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、
(a) 配列番号 3、4、6 又は 7 を含む単離されたタンパク質、
(b) 配列番号 1、配列番号 2、配列番号 28 又は配列番号 30 のいずれか 1 つの変異体

を含む単離されたタンパク質（前記変異体は、それぞれ配列番号 1、配列番号 2、配列番号 28 又は配列番号 30 に対して保存的アミノ酸置換のみを有する）、

（c）配列番号 3、4、6 又は 7 の変異体を含む単離されたタンパク質（前記変異体は、それぞれ配列番号 3、4、6 又は 7 に対して保存的アミノ酸置換のみを有する）、

（d）PROF（プロフィリン）ドメインを含む単離されたタンパク質、

（e）低ストリンジェンシー条件下で配列番号 15、16、17、18、19、20 若しくは 27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされるアミノ酸配列を含む、免疫刺激活性を有する単離されたタンパク質、

（f）高ストリンジェンシー条件下で配列番号 15、16、17、18、19、20 若しくは 27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされるアミノ酸配列を含む、免疫刺激活性を有する単離されたタンパク質、

（g）前記（a）～（f）のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、

（h）前記（a）～（f）のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞（前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している）

として提供し、前記医薬組成物が樹状細胞からのインターロイキン 12 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞が前記能力をアッセイする 10 時間以内に哺乳動物から単離されたものである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 48】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、配列番号 3、4、6 又は 7 を含む単離されたタンパク質として供給する、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってアッセイされる分子量 18～25 kD 及び 4.0 と 4.7 との間の等電点（pI）を含む単離されたタンパク質として供給する、請求項 37 から 42 又は 46 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 50】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 28 又は配列番号 30 のいずれか 1 つの変異体を含む単離されたタンパク質として供給し、前記変異体がそれぞれ配列番号 1、配列番号 2、配列番号 28 又は配列番号 30 に対して保存的アミノ酸置換のみを有する、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、配列番号 3、4、6 又は 7 の変異体を含む単離されたタンパク質として供給し、前記変異体がそれぞれ配列番号 3、4、6 又は 7 に対して保存的アミノ酸置換のみを有する、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 52】

医薬組成物が、PROF（プロフィリン）ドメインを含む単離されたタンパク質として動物に前記タンパク質を供給する、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 53】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、低ストリンジェンシー条件下で配列番号 15、16、17、18、19、20 若しくは 27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされる、免疫刺激活性を有する単離されたタンパク質として供給する、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 54】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、高ストリンジェンシー条件下で配列番号 15、16、17、18、19、20 若しくは 27、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされる、免疫刺激活性を有する単離されたタンパク質として供給する、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 5 5】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、(a)～(f)のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列として供給する、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 6】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、(a)～(f)のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列として供給し、前記ヌクレオチド配列が前記動物において作動可能なプロモーターに連結している、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 7】

形質転換細胞が、(a)～(f)のいずれかのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞を含み、前記ヌクレオチド配列がプロモーターに作動可能に連結している、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 8】

動物における疾患を治療又は予防する方法であって、そのような治療又は予防が望ましい前記動物に治療又は予防有効量の精製されたアピコンプレックス門生物又は精製されたアピコンプレックス門生物のタンパク質含有膜画分を投与することを含む方法。

【請求項 5 9】

精製及び不活性化されたアピコンプレックス門生物を投与することを含む、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

アピコンプレックス門生物の孢子形成オーシストを投与することを含み、対象が、前記アピコンプレックス門生物の自然宿主ではない、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 1】

アピコンプレックス門生物がアイメリア種である、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

アピコンプレックス門生物又はタンパク質含有膜画分が経口投与される、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 3】

医薬組成物が、金属キレート剤と共に投与される、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2 又は 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 4】

疾患が癌である、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2、4 7 又は 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 5】

対象に癌に対する二次療法を施すことをさらに含む、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

二次療法が、手術、放射線療法、化学療法、又はその組合せである、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

二次療法が、対象に C D 4 0 リガンド、インターフェロン γ 、インターロイキン 4、インターロイキン 1 8、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F)、別のサイトカイン、抗 C D 4 0 抗体、又はその組合せを投与することを含む、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 8】

癌が卵巣癌である、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 9】

疾患が感染症であり、前記感染症がヒト免疫不全ウイルス (H I V) 又はアイメリア属生物への感染によって引き起こされるものではない、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2、4 7 又は 5 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

感染症が細菌によって引き起こされる、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

感染症がウイルスによって引き起こされる、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 2】

ウイルスがインフルエンザウイルスである、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

感染症がヒトにおけるものであり、医薬組成物が単離されたタンパク質を含み、前記単離されたタンパク質の用量が約 2 . 8 m g から約 2 8 0 m g である、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

用量が約 5 m g から約 1 0 0 m g である、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

用量が約 1 0 m g から約 5 0 m g である、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

感染症が原生動物によって引き起こされる、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 7】

感染症が寄生虫によって引き起こされる、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 8】

動物が鳥類種ではなく、且つヒト免疫不全ウイルス（H I V）に感染しておらず、医薬組成物の投与が免疫応答を刺激する、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2、4 7 又は 5 8 に記載の方法。

【請求項 7 9】

動物がヒト免疫不全ウイルス（H I V）に感染しておらず、医薬組成物の投与が前記動物におけるインターロイキン 1 2（I L - 1 2）の全身レベルの上昇を刺激する、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2、4 7 又は 5 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

動物がヒト免疫不全ウイルス（H I V）に感染していない、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2、4 7 又は 5 8 に記載の方法。

【請求項 8 1】

医薬組成物が生物のゲノムによってコードされるタンパク質を含む、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2 又は 4 7 に記載の方法。

【請求項 8 2】

生物がアピコンプレックス門生物である、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

アピコンプレックス門生物がアイメリア種である、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

医薬組成物が精製された分子を含む、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2 又は 4 7 に記載の方法。

【請求項 8 5】

医薬組成物が単離されたタンパク質を含み、前記単離されたタンパク質がジスルフィド結合を含む、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2 又は 4 7 に記載の方法。

【請求項 8 6】

ジスルフィド結合が還元型である、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

ジスルフィド結合が酸化型である、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 8】

医薬組成物がグリコシル化タンパク質を含む、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2 又は 4 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

医薬組成物が非グリコシル化タンパク質を含む、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2 又は 4 7 に記載の方法。

【請求項 9 0】

医薬組成物がグリコシルホスファチジルイノシトール（G P I）連結タンパク質を含む、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2 又は 4 7 に記載の方法。

【請求項 9 1】

医薬組成物がグリコシルホスファチジルイノシトール（G P I）連結ではないタンパク質を含む、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2 又は 4 7 に記載の方法。

【請求項 9 2】

医薬組成物が天然タンパク質を含む、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2 又は 4 7 に記載の方法。

【請求項 9 3】

医薬組成物が組換え発現されたタンパク質を含む、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2 又は 4 7 に記載の方法。

【請求項 9 4】

治療又は予防することがアイメリア属タンパク質を含む前記医薬組成物を用いるものである、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2 又は 4 7 に記載の方法。

【請求項 9 5】

動物がヒトである、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2、4 7 又は 5 8 に記載の方法。

【請求項 9 6】

動物がヒトではない、請求項 5、1 1、1 5、2 1、3 2、3 8、4 2、4 7 又は 5 8 に記載の方法。

【請求項 9 7】

（a）配列番号 3、4、6 又は 7 を含む精製されたポリペプチド、
（b）配列番号 3、4、5、6 及び 7 を含む精製されたポリペプチド、
（c）デフォルトパラメータに調整した BLAST 2.0 アルゴリズムによって決定される配列番号 2 9 と少なくとも 9 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む精製されたポリペプチド、並びに
（d）配列番号 3、4、5、6 及び 7 を含むアミノ酸配列の変異体を含む精製されたポリペプチド（前記変異体は、それぞれ配列番号 3、4、5、6 及び 7 に対して保存的アミノ酸置換のみを有する）
からなる群から選択される精製されたポリペプチド。

【請求項 9 8】

ポリペプチドが配列番号 3、4、6 又は 7 を含み、前記ポリペプチドがドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってアッセイされる分子量 1 8 ～ 2 5 k D 及び 4 . 0 と 4 . 7 との間の等電点（p I）を有する、請求項 9 7 に記載の精製されたポリペプチド。

【請求項 9 9】

ポリペプチドが配列番号 3、4、5、6 及び 7 を含み、前記ポリペプチドがドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってアッセイされる分子量 1 8 ～ 2 5 k D 及び 4 . 0 と 4 . 7 との間の等電点（p I）を有する、請求項 9 7 に記載の精製されたポリペプチド。

【請求項 1 0 0】

（a）アイメリアに感染している組織又は細胞の細胞抽出物を作製すること、
（b）上清を作製するために前記細胞抽出物を遠心分離すること、
（c）タンパク質を沈殿させてペレットにするために硫酸アンモニウムによって前記上清を分画すること、及び前記ペレットを溶液に再懸濁すること、
（d）前記溶液を H I C カラムに適用すること、
（e）溶出した物質を作製するために前記 H I C カラムに結合した物質を溶出させること、
（f）D E A E カラムに負荷するための試料を作製するために、前記溶出した物質を透析

すること、

- (g) D E A E カラムに前記試料を適用すること、
- (h) 溶出した画分を作製するために緩衝液で前記 D E A E カラムに結合した物質を溶出させること、及び前記溶出した画分を濃縮すること、
- (i) サイズ排除カラムに前記濃縮され溶出した画分を適用すること、
- (j) 前記サイズ排除カラムから溶出した画分を収集及びプールすること、
- (k) カルシウム結合タンパクを除去するために H I C カラムに前記プールされた画分を適用すること、
- (l) H P L C H I C カラムに前記 H I C カラムから溶出した画分を適用すること、及び活性画分を収集すること（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン 1 2 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする 1 0 時間以内に哺乳動物から単離されたものである）、
- (m) 前記活性画分を透析すること、
- (n) H P L C D E A E カラムに前記透析された活性画分を適用すること、及び 1 つ又は複数の活性画分を収集すること（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン 1 2 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする 1 0 時間以内に哺乳動物から単離されたものである）を含む、ポリペプチドの製造方法。

【請求項 1 0 1】

- (o) 逆相 H P L C カラムに段階 (n) で収集された活性画分を適用する段階、及び
- (p) 溶出したタンパク質を作製するために前記逆相 H P L C カラムから結合したタンパク質を溶出させる段階（前記タンパク質は樹状細胞からのインターロイキン 1 2 の放出を刺激する活性を有し、前記樹状細胞は前記活性をアッセイする 1 0 時間以内に哺乳動物から単離されたものである）をさらに含む、請求項 1 0 0 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

段階 (p) の溶出したタンパク質を再生する段階をさらに含む、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

細胞抽出物が、アイメリアに感染しているウシ小腸組織から作製される、請求項 1 0 0 に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

請求項 1 0 0 に記載の工程の生成物である、精製されたポリペプチド。

【請求項 1 0 5】

- (a) 精製されたアピコンプレックス門生物の、又はアピコンプレックス門生物に感染している細胞のホモジネートを作製すること、
- (b) ペレットを得るために前記ホモジネートを遠心分離すること、
- (c) ホスホリパーゼを含む溶液で前記ペレットを処理すること、
- (d) 上清を得るために前記溶液を遠心分離すること、
- (e) 逆相 H P L C カラムに前記上清を適用すること、及び
- (f) 溶出したタンパク質を作製するために前記逆相 H P L C カラムから結合したタンパク質を溶出させること（前記タンパク質は樹状細胞からのインターロイキン 1 2 の放出を刺激する活性を有し、前記樹状細胞は前記活性をアッセイする 1 0 時間以内に哺乳動物から単離されたものである）を含む、ポリペプチドの製造方法。

【請求項 1 0 6】

作製された抽出物がウシに自然に感染する精製されたアピコンプレックス門生物のものである、請求項 1 0 5 に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

請求項 1 0 5 に記載の工程の生成物である、精製されたポリペプチド。

【請求項 108】

治療有効量の請求項 97、104 又は 107 に記載のポリペプチド又はデフォルトパラメータに調整した BLAST 2.0 アルゴリズムによって決定される配列番号 1、配列番号 2、配列番号 28 又は配列番号 30 からなる群から選択されるタンパク質のいずれか 1 つと少なくとも 25% の同一性を有するタンパク質、及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物であって、前記タンパク質が免疫刺激活性を保有する医薬組成物。

【請求項 109】

第 1 タンパク質に結合する抗体であって、前記第 1 タンパク質のアミノ酸配列が配列番号 26 からなり、前記抗体が第 2 タンパク質に結合せず、前記第 2 タンパク質のアミノ酸配列が配列番号 1、配列番号 2、配列番号 28 又は配列番号 30 からなる抗体。

【請求項 110】

モノクローナル抗体である請求項 109 に記載の抗体。

【請求項 111】

請求項 110 に記載の抗体のフラグメントを含む分子であって、前記フラグメントが前記第 1 タンパク質と結合できる分子。

【請求項 112】

(a) 配列番号 3、4、6 又は 7 を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、
(b) 配列番号 3、4、5、6 及び 7 を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、並びに
(c) デフォルトパラメータに調整した BLAST 2.0 アルゴリズムによって決定される配列番号 29 と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子
からなる群から選択される単離された核酸。

【請求項 113】

精製されている、請求項 112 に記載の核酸。

【請求項 114】

ベクターである、請求項 112 に記載の核酸。

【請求項 115】

ポリペプチドをコードする核酸配列に作動可能に連結しているプロモーターをさらに含む、請求項 114 に記載のベクター。

【請求項 116】

発現ベクターを含む宿主細胞であって、前記発現ベクターがヌクレオチド配列に作動可能に連結しているプロモーターを含み、前記プロモーターが前記ヌクレオチド配列に関して非天然であり、前記ヌクレオチド配列が、

(a) 配列番号 3、4、6 若しくは 7 を含むポリペプチド、
(b) 配列番号 3、4、5、6 及び 7 を含むポリペプチド、又は
(c) デフォルトパラメータに調整した BLAST 2.0 アルゴリズムによって決定される配列番号 29 と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド
をコードする宿主細胞。

【請求項 117】

哺乳動物宿主細胞である、請求項 116 に記載の宿主細胞。

【請求項 118】

酵母細胞である、請求項 116 に記載の宿主細胞。

【請求項 119】

昆虫細胞である、請求項 116 に記載の宿主細胞。

【請求項 120】

細菌細胞である、請求項 116 に記載の宿主細胞。

【請求項 121】

大腸菌である、請求項 120 に記載の宿主細胞。

【請求項 1 2 2】

コードされているポリペプチドが請求項 1 1 6 に記載の細胞によって発現されるように前記細胞を増殖させること、及び発現した前記ポリペプチドを回収することを含むポリペプチドの製造方法。

【請求項 1 2 3】

発現したポリペプチドを回収することが、

- (a) 宿主細胞の抽出物を作製すること、
- (b) 上清を作製するために前記宿主細胞の抽出物を遠心分離すること、
- (c) タンパク質を沈殿させるために硫酸アンモニウムによって前記上清を分画すること、
- (d) ペレットを得るために前記沈殿を遠心分離すること、
- (e) 前記ペレットを溶液に再懸濁すること、
- (f) 低圧疎水性相互作用カラムに前記溶液を適用すること、
- (g) 前記低圧疎水性相互作用カラムから溶出した活性画分を収集すること（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン 1 2 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする 1 0 時間以内に哺乳動物から単離されたものである）、
- (h) 前記低圧疎水性相互作用カラムから前記溶出した活性画分を透析すること、
- (i) 低圧 D E A E カラムに前記透析された活性画分を適用すること、
- (j) 前記低圧 D E A E カラムから溶出した 1 つ又は複数の活性画分を収集すること（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン 1 2 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする 1 0 時間以内に哺乳動物から単離されたものである）、
- (k) サイズ排除カラムに前記低圧 D E A E カラムから溶出した前記活性画分を適用すること、及び
- (l) 前記サイズ排除カラムから前記活性画分を溶出させること（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン 1 2 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする 1 0 時間以内に哺乳動物から単離されたものである）を含む、請求項 1 2 2 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

医薬組成物が血清アルブミンをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

血清アルブミンがヒト血清アルブミンである、請求項 1 2 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

ヒト血清アルブミンが前記組成物の重量に対して約 1 重量%から約 1 0 重量%の濃度で存在する、請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

ヒト血清アルブミンが前記組成物の重量に対して約 2 重量%から約 4 重量%の濃度で存在する、請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

治療有効量の請求項 9 7、1 0 4 又は 1 0 7 に記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2008500005000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成 19 年 7 月 13 日 (2007.7.13)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

動物における疾患を治療又は予防する医薬組成物であって、デフォルトパラメータに調整したBLAST 2.0アルゴリズムによって決定される配列番号 1、2、28、及び30からなる群から選択されるいずれか1つのタンパクと少なくとも25%の同一性を有するタンパクを含む免疫刺激活性を有する医薬組成物。

【請求項 2】

医薬組成物が、タンパク質、前記タンパク質をコードする核酸、又は前記タンパク質をコードする核酸をトランスフェクトされている細胞として供給される、請求項1記載の医薬組成物。

【請求項 3】

医薬組成物が、

- (a) 配列番号1を含む単離されたタンパク質、
 - (b) 配列番号2を含む単離されたタンパク質、
 - (c) 配列番号28を含む単離されたタンパク質、
 - (d) 配列番号30を含む単離されたタンパク質、
 - (e) 配列番号3、4、5、6及び7を含む単離されたタンパク質、
 - (f) 前記(a)～(e)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、又は
 - (g) 前記(a)～(e)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で形質転換された細胞（前記ヌクレオチド配列はプロモーターに作動可能に連結している）
- として供給される、請求項2記載の医薬組成物。

【請求項 4】

医薬組成物が、配列番号1を含む単離されたタンパク質を含む、請求項3記載の医薬組成物。

【請求項 5】

医薬組成物が、配列番号2を含む単離されたタンパク質を含む、請求項3記載の医薬組成物。

【請求項 6】

医薬組成物が、配列番号28を含む単離されたタンパク質を含む、請求項3記載の医薬組成物。

【請求項 7】

医薬組成物が、配列番号30を含む単離されたタンパク質を含む、請求項3記載の医薬組成物。

【請求項 8】

医薬組成物が、配列番号3、4、5、6及び7を含む単離されたタンパク質を含む、請求項3記載の医薬組成物。

【請求項 9】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってアッセイされる分子量18～25 kD及び4.0と4.7との間の等電点（pI）を含む単離されたタンパク質として供給する請求項1～8のいずれか記載の医薬組成物。

【請求項 10】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30のいずれか1つの変異体を含む単離されたタンパク質として供給し、前記変異体がそれぞれ配列番号1、配列番号2、配列番号28又は配列番号30に対して保存的アミ

ノ酸置換のみを有する、請求項 9 記載の 医薬組成物。

【請求項 1 1】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、配列番号 3、4、6 又は 7 の変異体を含む単離されたタンパク質として供給し、前記変異体がそれぞれ配列番号 3、4、6 又は 7 に対して保存的アミノ酸置換のみを有する、請求項 9 記載の 医薬組成物。

【請求項 1 2】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、PROF（プロフィリン）ドメインを含む単離されたタンパク質として供給する、請求項 9～1 1 のいずれか記載の 医薬組成物。

【請求項 1 3】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、低ストリンジェンシー条件下で配列番号 1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0 若しくは 2 7、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされる単離されたタンパク質として供給し、前記タンパク質が免疫刺激活性を有する、請求項 9～1 2 のいずれか記載の 医薬組成物。

【請求項 1 4】

医薬組成物が、動物にタンパク質を、高ストリンジェンシー条件下で配列番号 1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0 若しくは 2 7、又は前記配列番号のいずれかの相補体にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列からなる核酸によってコードされる単離されたタンパク質として供給し、前記タンパク質が免疫刺激活性を有する、請求項 9～1 2 のいずれか記載の 医薬組成物。

【請求項 1 5】

動物における疾患を治療又は予防する 医薬組成物 であって、そのような治療又は予防が望ましい前記動物に治療又は予防有効量の精製されたアピコンプレックス門生物又は精製されたアピコンプレックス門生物のタンパク質含有膜画分を含む 医薬組成物。

【請求項 1 6】

精製及び不活性化されたアピコンプレックス門生物を含む、請求項 1 5 記載の 医薬組成物。

【請求項 1 7】

アピコンプレックス門生物の孢子形成オーシストを含み、対象が、前記アピコンプレックス門生物の自然宿主ではない、請求項 1 5 又は 1 6 記載の 医薬組成物。

【請求項 1 8】

アピコンプレックス門生物がアイメリア種である、請求項 1 5～1 7 のいずれか記載の 医薬組成物。

【請求項 1 9】

アピコンプレックス門生物又はタンパク質含有膜画分が経口投与される、請求項 1 5～1 8 のいずれか記載の 医薬組成物。

【請求項 2 0】

医薬組成物が、金属キレート剤と共に投与される、請求項 1～1 9 のいずれか記載の 医薬組成物。

【請求項 2 1】

疾患が癌である、請求項 1～2 0 のいずれか記載の 医薬組成物。

【請求項 2 2】

対象に癌に対する二次療法を施すことをさらに含む、請求項 2 1 記載の 医薬組成物。

【請求項 2 3】

二次療法が、手術、放射線療法、化学療法、又はその組合せである、請求項 2 2 記載の 医薬組成物。

【請求項 2 4】

二次療法が、対象に CD 4 0 リガンド、インターフェロン γ 、インターロイキン 4、インターロイキン 1 8、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、別のサイトカイン、抗 CD 4 0 抗体、又はその組合せを投与することを含む、請求項 2 2 又は 2

4 記載の医薬組成物。

【請求項 25】

癌が卵巣癌である、請求項 21～24 のいずれか記載の 医薬組成物。

【請求項 26】

疾患が感染症であり、前記感染症がヒト免疫不全ウイルス（HIV）又はアイメリア属生物への感染によって引き起こされるものではない、請求項 1～20 のいずれか記載の 医薬組成物。

【請求項 27】

感染症が細菌によって引き起こされる、請求項 26 記載の 医薬組成物。

【請求項 28】

感染症がウイルスによって引き起こされる、請求項 26 記載の 医薬組成物。

【請求項 29】

ウイルスがインフルエンザウイルスである、請求項 28 記載の 医薬組成物。

【請求項 30】

感染症がヒトにおけるものであり、医薬組成物が単離されたタンパク質を含み、前記単離されたタンパク質の用量が約 2.8 mg から約 280 mg である、請求項 29 記載の 医薬組成物。

【請求項 31】

用量が約 5 mg から約 100 mg である、請求項 30 記載の 医薬組成物。

【請求項 32】

用量が約 10 mg から約 50 mg である、請求項 31 記載の 医薬組成物。

【請求項 33】

感染症が原生動物によって引き起こされる、請求項 26 記載の 医薬組成物。

【請求項 34】

感染症が寄生虫によって引き起こされる、請求項 26 記載の 医薬組成物。

【請求項 35】

動物が鳥類種ではなく、且つヒト免疫不全ウイルス（HIV）に感染しておらず、医薬組成物の投与が免疫応答を刺激する、請求項 1～34 のいずれか記載の 医薬組成物。

【請求項 36】

医薬組成物が、アピコンプレックス門生物のゲノムによってコードされるタンパク質を含む、請求項 1～35 のいずれか記載の 医薬組成物。

【請求項 37】

アピコンプレックス門生物がアイメリア種である、請求項 36 記載の 医薬組成物。

【請求項 38】

医薬組成物が精製された分子を含む、請求項 1～37 のいずれか記載の 医薬組成物。

【請求項 39】

医薬組成物が単離されたタンパク質を含み、前記単離されたタンパク質がジスルフィド結合を含む、請求項 1～38 のいずれか記載の 医薬組成物。

【請求項 40】

ジスルフィド結合が還元型である、請求項 39 記載の 医薬組成物。

【請求項 41】

ジスルフィド結合が酸化型である、請求項 39 記載の 医薬組成物。

【請求項 42】

医薬組成物がグリコシル化タンパク質を含む、請求項 1～41 のいずれか記載の 医薬組成物。

【請求項 43】

医薬組成物が非グリコシル化タンパク質を含む、請求項 1～41 のいずれか記載の 医薬組成物。

【請求項 44】

医薬組成物がグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）連結タンパク質を含む

、請求項 1～43 のいずれか記載の医薬組成物。

【請求項 45】

医薬組成物がグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）連結ではないタンパク質を含む、請求項 1～43 のいずれか記載の医薬組成物。

【請求項 46】

医薬組成物が天然タンパク質を含む、請求項 1～45 のいずれか記載の医薬組成物。

【請求項 47】

医薬組成物が組換え発現されたタンパク質を含む、請求項 1～46 のいずれか記載の医薬組成物。

【請求項 48】

動物がヒトである、請求項 1～47 のいずれか記載の医薬組成物。

【請求項 49】

動物がヒトではない、請求項 1～47 のいずれか記載の医薬組成物。

【請求項 50】

(a) 配列番号 3、4、6 又は 7 を含む精製されたポリペプチド、
(b) 配列番号 3、4、5、6 及び 7 を含む精製されたポリペプチド、
(c) デフォルトパラメータに調整した BLAST 2.0 アルゴリズムによって決定される配列番号 29 と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含む精製されたポリペプチド、並びに
(d) 配列番号 3、4、5、6 及び 7 を含むアミノ酸配列の変異体を含む精製されたポリペプチド（前記変異体は、それぞれ配列番号 3、4、5、6 及び 7 に対して保存的アミノ酸置換のみを有する）
からなる群から選択される精製されたポリペプチド。

【請求項 51】

ポリペプチドが配列番号 3、4、6 又は 7 を含み、前記ポリペプチドがドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってアッセイされる分子量 18～25 kD 及び 4.0 と 4.7 との間の等電点（pI）を有する、請求項 50 記載の精製されたポリペプチド。

【請求項 52】

ポリペプチドが配列番号 3、4、5、6 及び 7 を含み、前記ポリペプチドがドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってアッセイされる分子量 18～25 kD 及び 4.0 と 4.7 との間の等電点（pI）を有する、請求項 50 記載の精製されたポリペプチド。

【請求項 53】

治療有効量の請求項 50～52 のいずれか記載のポリペプチド、又はデフォルトパラメータに調整した BLAST 2.0 アルゴリズムによって決定される配列番号 1、配列番号 2、配列番号 28 又は配列番号 30 からなる群から選択されるタンパク質のいずれか 1 つと少なくとも 25% の同一性を有するタンパク質、及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物であって、前記タンパク質が免疫刺激活性を保有する医薬組成物。

【請求項 54】

第 1 タンパク質に結合する抗体であって、前記第 1 タンパク質のアミノ酸配列が配列番号 26 からなり、前記抗体が第 2 タンパク質に結合せず、前記第 2 タンパク質のアミノ酸配列が配列番号 1、配列番号 2、配列番号 28 又は配列番号 30 からなる抗体。

【請求項 55】

モノクローナル抗体である請求項 54 記載の抗体。

【請求項 56】

請求項 55 記載の抗体のフラグメントを含む分子であって、前記フラグメントが前記第 1 タンパク質と結合できる分子。

【請求項 57】

(a) 配列番号 3、4、6 又は 7 を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含

む単離された核酸、

(b) 配列番号 3、4、5、6 及び 7 を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸、並びに

(c) デフォルトパラメータに調整した BLAST 2.0 アルゴリズムによって決定される配列番号 29 と少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子

からなる群から選択される単離された核酸。

【請求項 58】

発現ベクターを含む宿主細胞であって、前記発現ベクターがヌクレオチド配列に作動可能に連結しているプロモーターを含み、前記プロモーターが前記ヌクレオチド配列に関して非天然であり、前記ヌクレオチド配列が、

(a) 配列番号 3、4、6 若しくは 7 を含むポリペプチド、

(b) 配列番号 3、4、5、6 及び 7 を含むポリペプチド、又は

(c) デフォルトパラメータに調整した BLAST 2.0 アルゴリズムによって決定される配列番号 29 と少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする宿主細胞。

【請求項 59】

コードされているポリペプチドが請求項 58 記載の細胞によって発現されるように前記細胞を増殖させること、及び発現した前記ポリペプチドを回収することを含むポリペプチドの製造方法。

【請求項 60】

発現したポリペプチドを回収することが、

(a) 宿主細胞の抽出物を作製すること、

(b) 上清を作製するために前記宿主細胞の抽出物を遠心分離すること、

(c) タンパク質を沈殿させるために硫酸アンモニウムによって前記上清を分画すること

、

(d) ペレットを得るために前記沈殿を遠心分離すること、

(e) 前記ペレットを溶液に再懸濁すること、

(f) 低圧疎水性相互作用カラムに前記溶液を適用すること、

(g) 前記低圧疎水性相互作用カラムから溶出した活性画分を収集すること（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン 12 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする 10 時間以内に哺乳動物から単離されたものである）、

(h) 前記低圧疎水性相互作用カラムから前記溶出した活性画分を透析すること、

(i) 低圧 D E A E カラムに前記透析された活性画分を適用すること、

(j) 前記低圧 D E A E カラムから溶出した 1 つ又は複数の活性画分を収集すること（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン 12 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする 10 時間以内に哺乳動物から単離されたものである）、

(k) サイズ排除カラムに前記低圧 D E A E カラムから溶出した前記活性画分を適用すること、及び

(l) 前記サイズ排除カラムから前記活性画分を溶出させること（前記活性画分は樹状細胞からのインターロイキン 12 の放出を刺激する能力を有し、前記樹状細胞は前記能力をアッセイする 10 時間以内に哺乳動物から単離されたものである）

を含む、請求項 59 記載の方法。

【請求項 61】

医薬組成物が血清アルブミンをさらに含む、請求項 1 ～ 49 のいずれか、又は請求項 53 記載の医薬組成物。

【請求項 62】

血清アルブミンがヒト血清アルブミンである、請求項 61 記載の医薬組成物。

【請求項 63】

ヒト血清アルブミンが前記組成物の重量に対して約 1 重量 % から約 10 重量 % の濃度で

存在する、請求項 6 1 又は 6 2 記載の 医薬組成物。

【請求項 6 4】

ヒト血清アルブミンが前記組成物の重量に対して約 2 重量 % から約 4 重量 % の濃度で存在する、請求項 6 1 又は 6 2 記載の 医薬組成物。

【請求項 6 5】

治療有効量の請求項 5 0 ～ 5 2 のいずれか記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含む 医薬組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/023113

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/455 A61K39/012		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K 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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, 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	LILLEHOJ HYUN S ET AL: "A recombinant Eimeria protein inducing interferon-gamma production: Comparison of different gene expression systems and immunization strategies for vaccination against coccidiosis" AVIAN DISEASES, vol. 44, no. 2, April 2000 (2000-04), pages 379-389, XP009041774 ISSN: 0005-2086 the whole document ----- -/--	1-127
☒ Further documents are listed in the continuation of box C ☒ 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 23 December 2004		Date of mailing of the international search report 07/01/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Didelon, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/023113

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	LAURENT FABRICE ET AL: "The immunodominant Eimeria acervulina sporozoite antigen previously described as p160/p240 is a 19-kilodalton antigen present in several Eimeria species" MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 63, no. 1, 1994, pages 79-86, XP002311783 ISSN: 0166-6851 the whole document	1-127
X	WO 92/04461 A (HOECHST AG ; GENEX CORP (US)) 19 March 1992 (1992-03-19) claim 6; figure 6	1-5, 11-21, 23-31, 38-47, 49,50, 52-63, 76-96, 100-108
P,X	WO 2004/020643 A (CURTISS ROY III ; KONG WEI (US); UNIV WASHINGTON (US)) 11 March 2004 (2004-03-11) figure 50; example 18	1-127
A	BRAKE DAVID A: "Vaccinology for control of apicomplexan parasites: A simplified language of immune programming and its use in vaccine design" INTERNATIONAL JOURNAL FOR PARASITOLOGY, vol. 32, no. 5, May 2002 (2002-05), pages 509-515, XP002311784 ISSN: 0020-7519 the whole document	1-127
A	JENKINS MARK C: "Progress on developing a recombinant coccidiosis vaccine" INTERNATIONAL JOURNAL FOR PARASITOLOGY, vol. 28, no. 7, July 1998 (1998-07), pages 1111-1119, XP002311785 ISSN: 0020-7519 the whole document	1-127

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US2004/023113

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9204461	A	19-03-1992	EP 0548252 A1	30-06-1993
			JP 6504187 T	19-05-1994
			WO 9204461 A1	19-03-1992
WO 2004020643	A	11-03-2004	WO 2004020643 A2	11-03-2004

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/20 (2006.01)	C 0 7 K 16/20	4 C 0 8 7
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 35/12 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 39/012 (2006.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/012	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 33/02 (2006.01)	A 6 1 P 31/16	
A 6 1 P 33/00 (2006.01)	A 6 1 P 33/02	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 P 33/00	
	C 1 2 P 21/08	

(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, IT, LU, 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, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. テフロン

- (72)発明者 ホ シュチョン
アメリカ国 エムアイ 4 8 8 2 3 イーストラランシング タールトン 8 1 2
- (72)発明者 ジャケット デイビッド
アメリカ国 エムアイ 4 8 8 2 3 イーストラランシング タールトン 7 0 8
- (72)発明者 ジャッジ ジョン ダブリュ
アメリカ国 エムアイ 4 8 8 4 2 ホルト #ディー 1 1 エヌオウレリウス 2 4 5 5
- (72)発明者 ローゼンバーク バーネット
アメリカ国 エムアイ 4 8 8 4 2-9 7 7 8 ホルト カレッジロード 2 4 3 0
- (72)発明者 ブラトキン イゴール ブイ
アメリカ国 エムアイ 4 8 9 1 0 ランシング #3 2 7 ドゥバネイ ドライブ 4 7 3 1
- (72)発明者 ブラトキン タティアナ
アメリカ国 エムアイ 4 8 9 1 0 ランシング #3 2 7 ドゥバネイ ドライブ 4 7 3 1

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA31 BA43 CA04 CA05 CA06 CA09 CA10 CA11 DA02
DA06 DA12 EA04 FA02 FA10 GA05 GA11 GA18 GA19 GA27
HA03 HA08 HA14 HA17
4B064 AG01 AG27 BA13 BA14 BF03 CA02 CA06 CA09 CA10 CA19
CA20 CC24 CE02 CE04 CE06 CE07 CE09 CE10 CE11 CE14

