

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4764585号
(P4764585)

(45) 発行日 平成23年9月7日 (2011.9.7)

(24) 登録日 平成23年6月17日 (2011.6.17)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 39/39 (2006.01)

A 6 1 K 39/39

A 6 1 K 39/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/00

Z

A 6 1 K 39/12 (2006.01)

A 6 1 K 39/12

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 P 37/04

請求項の数 12 (全 43 頁)

(21) 出願番号 特願2001-511964 (P2001-511964)
 (86) (22) 出願日 平成12年7月21日 (2000.7.21)
 (65) 公表番号 特表2003-505431 (P2003-505431A)
 (43) 公表日 平成15年2月12日 (2003.2.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/019816
 (87) 国際公開番号 W02001/007081
 (87) 国際公開日 平成13年2月1日 (2001.2.1)
 審査請求日 平成19年7月20日 (2007.7.20)
 (31) 優先権主張番号 60/144,965
 (32) 優先日 平成11年7月21日 (1999.7.21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 591032596
 メルク パテント ゲゼルシャフト ミッ
 ト ベシュレンクテル ハフツング
 Merck Patent Gesell
 schaft mit beschrae
 nkter Haftung
 ドイツ連邦共和国 デー-64293 ダ
 ルムシュタット フランクフルター シュ
 トラーセ 250
 Frankfurter Str. 25
 O, D-64293 Darmstadt
 , Federal Republic o
 f Germany
 (74) 代理人 100092093
 弁理士 辻居 幸一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質抗原およびペプチド抗原の免疫原性を増強するための F C 融合タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物において、ペプチド抗原またはタンパク質抗原に対する増強した免疫応答を誘発するための組成物であって、該組成物は、以下：

(i) 該抗原に対してポリペプチド結合によって連結された、免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含まず、かつ、免疫グロブリン重鎖定常領域を含む融合タンパク質；および

(ii) アジュバントタンパク質に対してポリペプチド結合によって連結された、免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含まず、かつ、免疫グロブリン重鎖定常領域を含む融合タンパク質を含み、

前記(i)および(ii)の免疫グロブリン定常領域は同じ種に由来し、かつ、F c 受容体を結合できる、組成物。

【請求項 2】

前記(i)および(ii)の免疫グロブリン定常領域がヒトに由来する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記アジュバントタンパク質がサイトカインである、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記サイトカインが、IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-12、IL-18、TNF および GM-CSF からなる群から選択される、請求項 3 に記載の組成物。

10

20

【請求項 5】

前記サイトカインが G M C S F である、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記抗原が、前立腺特異膜抗原 (PSMA)、サイトカインレセプターのエクストドメイン、ウイルスタンパク質、および癌特異タンパク質からなる群から選択される、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記 (i) および (ii) の融合タンパク質の免疫グロブリン重鎖定常領域が、ヒンジ領域を含む、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記 (i) および (ii) の融合タンパク質の免疫グロブリン重鎖定常領域が、C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメインを含む、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記 (i) および (ii) の融合タンパク質の免疫グロブリン部分が F c である、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 10】

哺乳動物において、予め選択された抗原に対する増強した免疫応答を誘発するためのワクチンを製造するための、請求項に記載の 1 から 9 のいずれか 1 項によって定められる組成物の使用。

【請求項 11】

前記免疫応答は、抗原融合タンパク質がアジュバント融合タンパク質なしに投与する場合よりも強力である、請求項 10 に記載の使用。

【請求項 12】

前記ワクチンは、抗原融合タンパク質およびアジュバント融合タンパクが同時に投与されるように使用されるものである、請求項 10 または 11 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本願は、1999年7月21日付けで出願された U . S . S . N . 60 / 144 , 965 (この開示は、本明細書中で参考として援用される) に対する優先権およびその恩恵を主張する。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、一般的に、哺乳動物において、予め選択されたタンパク質抗原およびペプチド抗原の免疫原性を増強するための方法および組成物に関する。より詳細には、本発明は、免疫グロブリン重鎖定常領域および予め選択された抗原を含む融合タンパク質をコードする核酸、およびその融合タンパク質を規定するアミノ酸配列を含む方法および組成物に関し、ここでこの融合タンパク質における予め選択された抗原は、この予め選択された抗原単独と比較して、この哺乳動物においてより強力な免疫応答を誘発し得る。

【0003】

(発明の背景)

ワクチン開発は伝統的に、感染因子を中和し得る防御的抗体の産生に焦点を当ててきた。現在のところ、ワクチンとして使用される因子としては、代表的に、不活性化または弱毒化微生物 (例えば、細菌またはウイルス)、それらの産物 (例えば、毒素)、または精製された抗原が挙げられる。現代分子生物学および遺伝子クローニング方法論の到来に伴ない、より純粋であり、かつ明らかにより特異的なワクチンを作製することが可能となった。さらに、分子レベルでの免疫系の見識により、感染性因子によって刺激される免疫応答の単離および特徴付けが可能となった。免疫応答の首尾良い産生に対する中枢であると考えられる免疫系の 2 つの要素としては、以下が挙げられる：調節性 T 細胞および細胞傷害性 T 細胞の中心的役割；ならびに、抗原提示細胞 (APC) によって、抗原がこれらの T 細胞に提示される様式。例えば、W . E . P a u l 編 (1993) F U N D A M E N T A

10

20

30

40

50

LS OF IMMUNOLOGY, Raven Press, Ltd., New York.

【0004】

代表的に、APCの外側から受容されるタンパク質抗原またはペプチド抗原（外因性抗原）は、APCのエンドサイトーシス性小胞またはエンドソーム内で分解され、ここで、生じたペプチドフラグメントは、主要組織適合遺伝子複合体（major histocompatibility class）（MHC）クラスIIタンパク質と複合体を形成する。生じた複合体は、細胞表面に移動し、この表面でこの複合体は、APC付近の免疫細胞に提示される。ペプチドフラグメントは、MHC分子によって規定される溝に適合し、そしてこの複合体は、この複合体に対する結合特異性を有するT細胞レセプターを発現するT細胞によって認識され得る。ペプチド負荷MHCクラスII分子とヘルパーT細胞との間の相互作用は、当該分野ではCD4⁺T細胞と呼ばれており、それ自身のMHCクラスII分子とT細胞表面上のCD4⁺レセプターとの間の別の相互作用によってさらに安定化される。従って、APC細胞内でプロセスされる外因性抗原は、MHCクラスII分子を介して細胞表面上に提示される。CD4⁺T細胞に提示される場合、このMHCクラスII複合体は、サイトカインを分泌するCD4⁺ヘルパー細胞を生じ、これが、ペプチドに対する抗体を産生するようにB細胞を刺激する。Paul（前出）を参照のこと。

【0005】

外因性抗原でのワクチン接種は、代表的に、CD4細胞媒介性T細胞応答を生じさせ、これが一般的に、抗体産生を生じさせる。細胞傷害性T細胞（CTL）は、代表的に、このような経路によって刺激されない。明らかに、例えば、ウイルスに感染した細胞におけるウイルスタンパク質の産生または癌細胞における癌特異タンパク質の産生を介して、抗原がAPC自体の内側から生じる（内因性抗原）状況下では、CTLは刺激される。実際、多くのウイルス性疾患では、CTLの産生が、ウイルスに感染した細胞を排除し、それによって感染から回復するにおいて重要であると考えられている。

【0006】

研究によって、内因性抗原と外因性抗原とは、示差的にプロセスされることが示されている。発生期のポリペプチドの合成の間、ポリペプチドの一部は、プロテオソームと呼ばれる細胞内構造によって分解される。このプロセスに由来するフラグメントは、MHCクラスII分子ではなく、新たに合成されたMHCクラスIと複合体化し、ここで、生じたMHCクラスI複合体含有抗原は、細胞表面に輸送される。再度、特異的ペプチドフラグメントに対する特異性を有するT細胞は、T細胞に結合するが、この場合、必要とされるコレセプター（co-receptor）相互作用は、MHCクラスI分子とCD8分子との間で生じる。従って、APCの表面上の内因性抗原は、CD8⁺T細胞に対して提示される。細胞傷害性ではないCD8⁺T細胞のいくつかの型が存在するが、CD8⁺T細胞は、CTLの大半を構成する。

【0007】

従って、強力なCTL応答を誘導し得るワクチンの設計は、抗原性分子（一般的に、タンパク質）が、細胞の内側で作製されるか、または適切な細胞区画内に送達されるかのいずれかであり、その結果、それがMHCクラスIプロセッシング経路に入り得ることを必要とする。1つの戦略は、目的のタンパク質またはペプチドをコードする遺伝子をウイルスに組み込み、次いで、この操作されたウイルスをワクチンとして使用することである（Lorenzら（1999）HUM. GENE THER. 10: 623 - 631）。別の戦略は、タンパク質をコードするDNAベクターを細胞に注入し、次いで、この細胞を動物または患者に投与することであり、ここで、これは細胞内から発現され、次いで、MHCクラスI分子を介して細胞表面上に提示される（Donnellyら（1997）ANNU. REV. IMMUNOL. 15: 617）。DNAベクターを筋肉または皮膚中に直接注入する類似の技術によって、いくつかの抗原に対するCTLおよび/または抗体応答を誘導することが示された（Lair（1988）CRIT. REV. IMMUNOL. 18: 449 - 84、および米国特許第5,589,466号）。研究

10

20

30

40

50

によって、抗原がAPCによって取りこまれ、そしてプロセスされ、ここで免疫系に提示されることが示された(Laiら、前出)。

【0008】

MHCクラスI経路への外因性ペプチドまたはタンパク質の送達は、化学的アジュバント(例えば、フロイントアジュバント、およびスクアレンと界面活性剤との混合物(Hilgersら(1999)VACCINE 17:219-228))の使用を通して、そしてより近年では、マクロファージによって食作用を受け、そして代替的なMHCクラスI経路を介してCTL応答を誘導する、抗原をコーティングした小ビーズの使用を通して、部分的に成功してきた(De Bruijnら(1995)EUR. J. IMMUNOL. 25:1274-1285)。さらに、抗原に対する免疫応答を増強する他の方法として、組換え免疫刺激性サイトカイン(例えば、IL-2、IL-12、GM-CSFなど)と組合せた化学的アジュバントの使用が挙げられ得る。例えば、1つの方法は、ハプテンと化学的に反応したタンパク質抗原に、このサイトカインを連結させる方法として、IL-2に融合された抗ハプテン抗体を使用する(Harvillら(1996)J. IMMUNOL. 157:3165)。

10

【0009】

別の技術は、免疫グロブリン可変領域の一部をペプチド抗原で置換する、抗体の「抗原化(antigenization)」を使用する。一旦、組換え抗体が、APC表面上のFcレセプターとの相互作用を介してAPCに結合すると、ハイブリッド分子のペプチド抗原はAPC上に提示される(Lanzaら(1993)PROC. NATL. ACAD. Sci. USA 90:11683-11687)。このアプローチの延長は、「抗原化された」免疫グロブリン重鎖をコードするプラスミドDNAの脾臓注射を利用し、この後、脾臓由来B細胞は、一旦免疫グロブリン軽鎖パートナーが与えられると、組換え抗体を分泌する。

20

【0010】

しかし、抗原送達系の免疫原性は、現代のワクチン開発における主要な技術的ハードルの1つである。ワクチン接種の目標は、強力な免疫応答を誘発することである。しかし、宿主免疫系は、細菌およびウイルスと闘うように誘起されるので、細菌またはウイルスがベクターとして使用される場合、このメッセンジャーは代表的に、このメッセージに沿って破壊される。さらに、特定のウイルスベクター(例えば、ワクシニアウイルスおよびアデノウイルス)に対する強力な免疫応答は、その用途を制限し、そしてタンパク質ベクターとして細菌毒素を使用する間に、同様の問題が生じ得ることが予期される。同様に、本来、免疫系により「自己」とはみなされない可変領域を利用する、抗体に基づく「タンパク質ベクター」は、潜在的に免疫原性である。これらのキャリア分子を複数使用することは、抗イディオタイプ応答を誘導し得、それによって、この有効な用途を妨げることが予期される。従って、予め選択されたタンパク質抗原またはペプチド抗原に対する強力かつ長期持続的な免疫を生じるワクチンを提供することが、本発明の目的である。

30

【0011】

(発明の要旨)

本発明は、一部、予め選択された抗原を免疫グロブリン重鎖定常領域に融合することによって、哺乳動物における予め選択されたペプチド抗原またはタンパク質抗原の免疫原性を増強することが可能であるという発見に基づく。次いで、生じる融合タンパク質(本明細書中では、「Fc-抗原融合タンパク質」または「抗原融合タンパク質」ともいわれる)またはこの融合タンパク質をコードする核酸配列は、ワクチンの形態で哺乳動物に投与されて、この予め選択された抗原に対する免疫応答を誘発し得る。さらに、予め選択された抗原に対して誘発された免疫応答の強さおよび型は、Fc-抗原融合タンパク質またはFc-抗原融合タンパク質をコードする核酸配列と共に特定のアジュバントを投与することによって調節され得ることが発見された。

40

【0012】

従って、本発明は、哺乳動物において、予め選択された抗原の免疫原性を増強するための

50

方法を提供する。1つの局面では、本方法は、免疫応答を誘発するに十分な量の予め選択された抗原に対してポリペプチド結合によって連結された免疫グロブリン重鎖定常領域を含むFc-抗原融合タンパク質を、哺乳動物に投与する工程を包含する。別の局面では、本方法は、予め選択された抗原に融合された免疫グロブリン重鎖定常領域を含むFc-抗原融合タンパク質をコードする、核酸配列（例えば、デオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA））を、哺乳動物に投与する工程を包含する。Fc-抗原融合タンパク質の部分の場合（融合タンパク質として投与されるか、核酸（これは、次いで、宿主において、融合タンパク質を産生するように発現される）として投与されるかのいずれか）、予め選択された抗原は、匹敵量（例えば、重量または分子数による）の予め選択された抗原単独（すなわち、免疫グロブリン重鎖定常領域に融合されていない、予め選択された抗原）よりも強力な免疫応答を、哺乳動物において刺激し得るという点で特徴付けられる。

10

【0013】

さらに、Fc-抗原融合タンパク質の予め選択された抗原に対して誘発された免疫応答は、アジュバントと共にFc-抗原融合タンパク質を投与することによって、増強または調節され得る。種々のアジュバント（例えば、フロイント完全アジュバントまたは非メチル化CpG配列を含むオリゴヌクレオチドのような、化学的アジュバント）が、本発明の実施において有用であり得るが、Fc-抗原融合タンパク質と共に使用される現在好ましいアジュバントは、第2のFc融合タンパク質（本明細書中では、「Fc-アジュバント融合タンパク質」または「アジュバント融合タンパク質」といわれる）、またはこのようなFc融合タンパク質をコードする核酸を含む。好ましいFc-アジュバント融合タンパク質は、アジュバントタンパク質（例えば、サイトカイン）に対してポリペプチド結合によって連結された免疫グロブリン重鎖定常領域を含む。Fc-アジュバント融合タンパク質の構築において有用な好ましいサイトカインとしては、例えば、インターフェロン-γ（IFN-γ）、インターロイキン-2（IL-2）、インターロイキン-4（IL-4）、インターロイキン-12（IL-12）、IL-18、腫瘍壊死因子（TNF）、顆粒球マクローファージコロニー刺激因子（GM-CSF）が挙げられる。別のクラスのFc-アジュバント融合タンパク質は、通常は、部分的（partially）または排他的に膜に結合したタンパク質の細胞外ドメインに対応するアジュバント部分に融合された免疫グロブリン重鎖領域を含む。例えば、CD40リガンドは、Fc部分に融合されて、増強されたアジュバントタンパク質として使用される。

20

30

【0014】

Fc-抗原融合タンパク質およびFc-アジュバント融合タンパク質の同時投与（同時または順次（例えば、Fc-抗原に次いでFc-アジュバント、またはFc-アジュバントに次いでFc-抗原）のいずれか）を使用して、予め選択された抗原に対して刺激される免疫応答の型を調節し得る。2つのクラスの免疫応答（Th1およびTh2と称される）が、異なる刺激および関与する異なるサイトカインに応答して開始される。Th1媒介性免疫応答は代表的に、事実上細胞性であり、一方、Th2媒介性免疫応答は代表的に、事実上体液性である。従って、Th1応答は、改変された細胞（癌細胞またはウイルス感染細胞）を攻撃するにおいて有用であり得、一方、Th2応答は、寄生生物のような細胞外因子を攻撃するにおいて有用であり得る。一般的免疫応答を刺激するためか、または特異的Th1応答もしくはTh2応答を開始もしくは調節するために、免疫グロブリン重鎖定常領域に融合されたサイトカインを投与することが、しばしば有用である。

40

【0015】

例えば、GM-CSFに対してペプチド結合によって連結された免疫グロブリン重鎖定常領域を含むFc-アジュバント融合タンパク質は、免疫応答（Th1応答およびTh2応答の両方を含む）の強力な一般的刺激物質である。IL-12またはIFN-γを含むFc-アジュバント融合タンパク質は、同時に投与されて、主に細胞性またはTh1媒介性の免疫応答を刺激し得る。あるいは、IL-4を含むFc-アジュバント融合タンパク質を投与して、主に体液性またはTh2媒介性の免疫応答を刺激し得る。

【0016】

50

さらに、Fc - アジュバント融合タンパク質中に存在する特定のサイトカインの選択は、Fc - 抗原融合タンパク質の予め選択した抗原に対して産生された抗体のクラスに影響を与え得る。例えば、IL - 12 含有 Fc - アジュバント融合タンパク質は、ヘルパーT細胞、およびIgG2aクラスの抗体の産生を刺激し得る。あるいは、IL - 4 含有アジュバント融合タンパク質は、IgEクラスの抗体の産生を刺激し得る。

【0017】

先に議論されたように、好ましい実施形態において、本発明は、Fc - 抗原融合タンパク質またはFc - 抗原融合タンパク質をコードする核酸をFc - アジュバント融合タンパク質と組み合わせて投与する工程を包含する。2つの融合タンパク質（各々は、免疫グロブリン重鎖定常領域を含む）を用いることによって、哺乳動物における同一または類似の細胞型において、予め選択された抗原およびアジュバントタンパク質（例えば、サイトカイン）の両方を同時に局在化することが可能である。例えば、マクロファージ、B細胞、顆粒球および樹状細胞は、それらの細胞表面上でFcレセプターを発現する。従って、Fcレセプターを結合し得る、Fc - 抗原融合タンパク質およびFc - アジュバント融合タンパク質を同時投与することによって、同一の細胞型において抗原融合タンパク質の抗原およびアジュバント融合タンパク質のアジュバントを同時に局在化することが可能である。次いで、このアジュバントは、予め選択された抗原の付近での免疫応答を刺激、増強、または他の方法で調節し得る。

【0018】

この好ましい実施形態において、本発明は、局在化または濃縮の2つの異なる形態を使用する。第1に、本発明は、抗原およびアジュバントの両方に融合され、身体の特定の領域に濃縮される共通部分を用いる。この方法では、このアジュバントの近傍における抗原の効果的な局所濃縮が増加される。第2に、本発明は、抗原を、免疫系の抗原プロセッシングおよび提示機構へ標的化する。第1の濃縮工程は、抗原タンパク質およびアジュバントタンパク質を免疫系にアクセス可能である身体の一部において濃縮を生じさせる部分に融合することによって実行され得る。第2の標的化工程は、この抗原タンパク質を抗原提示系への送達、または抗原提示系によるプロセッシングを増強する任意の部分に融合することによって実行され得る。

【0019】

従って、本発明は、2つの代替の方法によるこれらの濃縮効果を達成する。1つの方法は、2つの異なる融合タンパク質（抗原局在化タンパク質融合物およびアジュバント局在化タンパク質融合物）を構築および投与することである。第2の方法は、抗原、アジュバント、および局在化タンパク質を含む融合物を構築および投与することである。Fc部分は、局在化タンパク質の1例である。

【0020】

免疫グロブリン重鎖定常領域の重要な特徴は、Fc - 抗原融合タンパク質における予め選択された抗原とは異なり、これが、好ましくは、非免疫原性または意図されたレシピエントにおけるわずかに弱い免疫原性であることである。換言すると、Fc - 抗原融合タンパク質において、予め選択された抗原は、レシピエントにおける免疫原性を免疫グロブリン重鎖定常領域よりも高めるように設計される。同様に、Fc - アジュバント融合タンパク質はまた、意図されるレシピエントにおいて非免疫原性か、または弱い免疫原性であるべきであることが考慮される。免疫グロブリン重鎖定常領域の免疫原性は、減少され得、そして特定の場合、意図されるレシピエントと同一種に存在する免疫グロブリン定常領域配列に由来する免疫グロブリン定常領域配列またはこの配列に類似の配列を用いることによって排除され得る。例えば、免疫グロブリン重鎖定常領域（好ましくは、ヒト起源の）を使用して、ヒトに投与されるべき融合タンパク質を生成する。同様に、意図されるレシピエントがヒトである場合、Fc - アジュバント融合タンパク質におけるアジュバントタンパク質もまた、好ましくはヒト起源である。免疫グロブリン重鎖定常領域およびアジュバントタンパク質を規定する適切なアミノ酸配列の選択によって、主に予め選択された抗原に対する直接的な免疫応答を最適化することが可能である。

【0021】

好ましい実施形態において、このFc-抗原融合タンパク質の免疫グロブリン重鎖定常領域は、免疫グロブリンヒンジ領域、ならびに必要に応じて、CH2ドメイン、CH3ドメインおよびCH4ドメインまたはそれらの組み合わせからなる群より選択される免疫グロブリン定常領域ドメインを含む。しかし、この免疫グロブリン重鎖定常領域は、好ましくは、少なくともCH1ドメインを欠失する。さらに、本発明のFc融合タンパク質は、好ましくは、免疫グロブリン重鎖可変領域ドメイン(V_H)を欠失する。この融合タンパク質がヒトに投与される場合、免疫グロブリン重鎖定常領域は、好ましくは、ヒンジ領域、およびCH2ドメインもしくはCH3ドメインを含み、そして最も好ましくは、ヒンジ領域ならびにCH2ドメインおよびCH3ドメインの両方を含む。本発明の実施において有用である免疫グロブリン重鎖定常領域がIgA(Igα)、IgD(Igδ)、IgE(Igε)、IgG(Igγ)、およびIgM(Igμ)として当該分野において言及される5つの免疫グロブリンクラスのいずれかに属する免疫グロブリンに由来し得ることが意図される。しかし、IgGクラス由来の免疫グロブリン重鎖定常領域が好ましい。

10

【0022】

目的の任意の予め選択された抗原が、本発明のFc-抗原融合タンパク質において含まれ得ることが意図される。好ましい実施形態において、予め選択された抗原が、前立腺特異膜抗原、サイトカインレセプターのエクストドメイン(ectodomain)、ウイルスタンパク質、および癌特異抗原または腫瘍特異抗原からなる群より選択される。

20

【0023】

種々の構造を有するFc-抗原融合タンパク質は、本発明の実施において有用であり得る。例えば、予め選択された抗原のN末端は、免疫グロブリン重鎖定常領域のC末端に対してポリペプチド結合によって連結され得る。あるいは、予め選択された抗原のC末端は、免疫グロブリン重鎖定常領域のN末端に対してポリペプチド結合によって連結され得る。さらに、このFc-抗原融合タンパク質が複数の1つ以上の予め選択された抗原を含み得、この1つ以上の予め選択された抗原は、互いにか、または免疫グロブリン重鎖定常領域に直接かまたはポリペプチドリinkerを介して連結され得ることが意図される。さらに、2つ以上のFc-抗原融合タンパク質は、非共有または共有的のいずれかで(例えば、1つ以上のジスルフィド結合を通じて)共に結合され、ダイマーまたはマルチマーの組成物を産生し得る。ダイマー構築物におけるFc-抗原融合タンパク質は、同一か、または互いに異なり得ることが意図される。例えば、両方のFc-抗原融合タンパク質が、同一の免疫グロブリン重鎖定常領域を含み得るが、予め選択された抗原は異なり得る。類似の構造が、またこのFc-アジュバント融合タンパク質とともに使用され得ることが意図される。

30

【0024】

さらに、Fc融合タンパク質をコードする種々の核酸配列は、本発明の実施において有用であり得る。例えば、この核酸配列は、5'から3'方向に、免疫グロブリン重鎖定常領域および予め選択された抗原、または予め選択された抗原および免疫グロブリン重鎖定常領域のいずれかをコードし得る。さらに、この核酸配列はまた、必要に応じて、例えば、免疫グロブリン重鎖定常領域のヒンジ領域に直接融合された免疫グロブリン軽鎖配列に基づいて「リーダー」または「シグナル」配列を含み得る。好ましい実施形態において、このFc領域がIgG配列に基づく場合、このFc領域は、5'から3'方向に、少なくとも免疫グロブリンヒンジ領域(すなわち、第2の免疫グロブリンヒンジ領域配列とジスルフィド結合を形成し得る少なくとも1つのシステインアミノ酸を含むヒンジ領域)、免疫グロブリンCH2ドメインおよびCH3ドメインをコードする。さらに、Fc-抗原融合タンパク質をコードする核酸配列はまた、例えば、細菌宿主、意図されるレシピエント、またはその両方のいずれかにおいてFc融合タンパク質を発現し得る複製可能な発現ベクター内に組み込まれ得る。

40

【0025】

Fc-抗原融合タンパク質をコードする核酸配列の、単独かまたはFc-アジュバント融

50

合タンパク質をコードする核酸配列とともにのいずれかでの注射は、細胞性免疫応答、体液性免疫応答またはその両方の生成を生じ得ることが意図される。核酸ベースの免疫およびタンパク質ベースの免疫の組み合わせ（例えば、Fc - 抗原融合タンパク質をコードする核酸の、投与前、投与中または投与後のFc - 抗原融合タンパク質の投与）は、互いに相乗作用し、核酸またはタンパク質単独のいずれかでの免疫と比較して、予め選択された抗原に対するより強力な免疫応答を誘発し得る。

【0026】

本発明の前記および他の目的、特徴ならびに利点は、以下の詳細な説明、図面および特許請求の範囲からより明らかにされる。

【0027】

（発明の詳細な説明）

本発明は、哺乳動物において体液性（すなわち、抗体ベースの）免疫応答すなわちTh2細胞性媒介免疫応答、細胞性免疫応答すなわちTh1細胞性媒介応答、およびいくつかの場合、両方の型の免疫応答を誘導するためのインビボでのタンパク質抗原またはペプチド抗原の効率的な送達に関する。予め選択された抗原を免疫グロブリン重鎖定常領域に融合し、Fc - 抗原融合タンパク質を産生することによって、哺乳動物においてこの予め選択されたタンパク質またはペプチド抗原の免疫原性を増強することが可能であることが、ここに発見された。次いで、得られるFc - 抗原融合タンパク質、またはFc - 抗原融合タンパク質をコードする核酸配列を、ワクチン形態で、哺乳動物（例えば、ヒト）に投与し、予め選択された抗原に対する免疫応答を誘発し得る。

【0028】

Fc - 抗原融合タンパク質は、この抗原を抗原提示細胞（APC）に選択的に標的化する。理論に拘束されることは望まないが、このFc - 抗原融合タンパク質のAPCへの結合が、多数の免疫細胞型（例えば、樹状細胞；マクロファージ；B細胞；および顆粒球を含む）上で発現されるFcレセプターを通じて媒介されと考えられる。このFc - 抗原融合タンパク質が、哺乳動物に投与されると、Fcレセプターを結合し、その後、このFc - 抗原融合タンパク質は、APCによってエンドサイトーシスされる。次いで、このエンドサイトーシス化融合タンパク質（予め選択された抗原を含む）は、小さなペプチドに分解され、次いで、この小さなペプチドが細胞表面上に提示されと考えられる。次いで、提示されたペプチドは、体液性および/または細胞性の免疫応答を媒介する。刺激された免疫応答の特定の型は、Fc - 抗原融合タンパク質をアジュバントとともに（例えば、アジュバント融合タンパク質）同時投与することによって調節され得る。

【0029】

投与の1つの様式において、Fc - 抗原融合タンパク質は、レシピエントに投与される。投与の別の様式において、Fc - 抗原融合タンパク質をコードする核酸配列は、レシピエントに投与される。投与されるFc - 抗原タンパク質においてか、または投与される核酸から発現されるかのいずれかである予め選択された抗原は、この抗原単独（すなわち、免疫グロブリン重鎖定常領域に対してポリペプチド結合によって融合されない抗原）よりも免疫原性が高い。さらに、特定の環境において、融合タンパク質の連続的な投与、続いて、同一の融合タンパク質をコードする核酸の投与、または融合タンパク質をコードする核酸の投与、続いて、同一の融合タンパク質の投与を使用して、予め選択された抗原の免疫原性を最大化し得る。Fc - 抗原融合タンパク質の両方の成分が活性である場合、最適な免疫応答が誘発されることが理解される。換言すると、Fc - 抗原融合タンパク質における予め選択された抗原は、免疫応答を誘発し得、そして免疫グロブリン重鎖定常領域は、APCの表面上でFcレセプターを結合し得る。

【0030】

さらに、議論されるように、予め選択された抗原に対して誘発された免疫応答の強度および型は、Fc - 抗原融合タンパク質および/またはFc - 抗原融合タンパク質をコードする核酸とともに特定のアジュバントを同時投与することによって調節され得る。化学的アジュバント（例えば、ミョウバンまたはフロイント完全アジュバントまたはフロイント不

10

20

30

40

50

完全アジュバント)が、特定の環境下で(例えば、獣医学的適用において)本発明の実施において有用であり得るが、それらの副作用(例えば、組織瘢痕化)は、ヒト使用に対して受容不可能にし得る。従って、好ましいアジュバントは、第2のFc融合タンパク質を含む。ここで免疫グロブリン重鎖定常領域は、アジュバントタンパク質に融合され、Fc-アジュバント融合タンパク質を産生する。Fc-抗原融合タンパク質と同様に、最適な免疫応答は、Fc-アジュバント融合タンパク質の両方の成分が活性である場合に誘発されることが理解される。換言すると、Fc-アジュバント融合タンパク質におけるアジュバントは、免疫応答を調節し得、そして免疫グロブリン重鎖定常領域は、APCの表面上でFcレセプターを結合し得る。

【0031】

本発明の好ましい実施形態において、Fc融合タンパク質またはこのような融合タンパク質をコードする核酸として抗原およびアジュバントの両方を投与する。換言すると、抗原を、Fc-抗原融合タンパク質として投与し、そしてアジュバントを、Fc-アジュバント融合タンパク質として投与する。本発明の実施に有用なFc融合タンパク質の特定の好ましい実施形態を、図1A~1Gに示す。

【0032】

図1Aは、代表的なFc融合タンパク質を示す。このタンパク質は、免疫グロブリン重鎖定常領域1のC末端が、予め選択された抗原またはアジュバント2のN末端に直接にかまたはポリペプチドリンカーによってかのいずれかで連結されている。本明細書中に使用される場合、用語「ポリペプチドリンカー」は、2つのタンパク質をともに連結する1つ以上のアミノ酸残基の配列を意味することが理解される。このポリペプチドリンカーは、多くの場合、例えば、グリシン残基および/またはセリン残基の反復を含む約10~15残基の長さの一連のアミノ酸である。図1Bは、代表的なFc融合タンパク質を示す。このタンパク質は、予め選択された抗原またはアジュバント2のC末端が、免疫グロブリン重鎖定常領域1のN末端に直接にかまたはポリペプチドリンカーによってかのいずれかで連結されている。

【0033】

図1Cは、2つのジスフィルド結合による共有結合によって連結されている2つのFc融合タンパク質を含む二量体構築物を示す。この二量体構築物は、2つのFc融合タンパク質を含む。これらのタンパク質は、免疫グロブリン重鎖定常領域1のそれぞれのC末端が予め選択された抗原のN末端またはアジュバント2に連結されている。同様に、図1Dは、2つのジスフィルド結合による共有結合によって連結されている2つのFc融合タンパク質を含む二量体構築物を示す。この二量体構築物は、2つのFc融合タンパク質を含む。このタンパク質では、予め選択された抗原またはアジュバント2のそれぞれのC末端が免疫グロブリン重鎖定常領域1のN末端に連結されている。

【0034】

図1Eは、2つのジスフィルド結合によって連結されている2つのFc融合タンパク質を含む二量体構築物を示す。この二量体構築物は、2つのFc融合タンパク質を含む。これらのタンパク質では、免疫グロブリン重鎖定常領域1のそれぞれのC末端が、予め選択された抗原またはアジュバント2のN末端に、直接的にかまたはポリペプチドリンカーを介するかのいずれかで連結され、この予め選択された抗原またはアジュバント2のC末端は、第二の抗原またはアジュバント2'に直接的にかまたはポリペプチドリンカーを介するかのいずれかで連結されている。

【0035】

図1Fは、2つのジスフィルド結合によってまた連結されている2つのFc融合タンパク質を含む二量体構築物を示す。この二量体構築物は、2つのFc融合タンパク質を含む。これらのタンパク質では、抗原またはアジュバント2のC末端が、免疫グロブリン重鎖定常領域1のN末端に、直接的にかまたはポリペプチドリンカーを介するかのいずれかで連結され、この免疫グロブリン重鎖定常領域1のC末端は、異なるアジュバントまたは抗原2'のN末端に直接的にかまたはポリペプチドリンカーを介するかのいずれかで連結され

10

20

30

40

50

ている。例えば、このような融合タンパク質は、予め選択された抗原 - 免疫グロブリン重鎖定常領域 - アジュバントをN末端からC末端の方向に含み得る。

【0036】

図1Gは、2つのジスフィルド結合によってまた連結されている2つのFc融合タンパク質を含む二量体構築物を示す。この二量体構築物は、2つのFc融合タンパク質を含む。これらのタンパク質では、抗原またはアジュバント2のC末端が、異なるアジュバントまたは抗原2'のN末端に直接的にかまたはポリペプチドリンカーを介するかのいずれかで連結されており、この異なるアジュバントまたは抗原2'のC末端は、免疫グロブリン重鎖定常領域1のN末端に直接的にかまたはポリペプチドリンカーを介するかのいずれかで連結されている。例えば、このような融合タンパク質は、予め選択された抗原 - アジュバント - 免疫グロブリン重鎖定常領域をN末端からC末端の方向に含み得る。

10

【0037】

本発明の実施において、アジュバント部分に関してN末端の位置にFc部分を配置することが、一般的に好ましい。次いで、このアジュバント部分がFc部分のN末端に配置される場合、アジュバント - Fc融合物は、免疫細胞上のアジュバントレセプターに結合し得、そして、抗体が細胞表面に結合する場合、Fc部分は、採用される方向と同一の方向である。ADCCまたは補体定着が生じ得る。しかし、Fc部分がアジュバント部分のN末端に配置される場合、ADCCおよび補体定着は、生じないようである。

【0038】

図1C~1Gに示される構築物は、近接するヒンジ領域上のシステインの間のジスフィルド結合の対によってクロスリンクされた二量体として示される。図において、ジスフィルド架橋を、これらの分子のネイティブ形態に特徴的なヒンジ領域を介して、2つの免疫グロブリン重鎖定常領域の一部をとともに連結するように示す。免疫グロブリンヒンジ領域を含む構築物が好ましいが、本発明は、他の部分におけるクロスリンクが所望されるように選択され得ることを意図する。さらに、いくつかの場合において、2つ以上のモノマーは、非共有結合で結合し、本発明の実施に有用なダイマーまたはマルチマーを産生し得る。

20

【0039】

本明細書中で使用される場合、用語「免疫グロブリン重鎖定常領域」は、用語「Fc領域」と相互変換可能に使用され、かつ免疫グロブリン重鎖定常領域のカルボキシ末端部分、またはFcレセプターを結合し得るそのアナログもしくは一部を意味することが理解される。公知のように、各々の免疫グロブリン重鎖定常領域は、4または5のドメインを含む。これらのドメインを、順に以下のように呼ぶ：CH1 - ヒンジ - CH2 - CH3 (-CH4)。CH4は、IgMに存在し、IgMは、ヒンジ領域を有さない。本発明の実施に有用である免疫グロブリン重鎖定常領域は、好ましくは免疫グロブリンヒンジ領域を含み、そして好ましくは、CH3ドメインもまた含む。免疫グロブリン重鎖定常領域は、最も好ましくは、免疫グロブリンヒンジ領域、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含む。本明細書中で使用される場合、用語免疫グロブリン「ヒンジ領域」は、免疫グロブリンヒンジ領域全体、または第二の免疫グロブリンヒンジ領域と1つ以上のジスフィルド結合を形成するに十分な免疫グロブリンヒンジ領域の少なくとも一部を意味することが理解される。

30

40

【0040】

安定な免疫グロブリン重鎖定常領域は、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMと称される免疫グロブリンクラスの各々に属する抗体由来であり得ることが考えられる。しかし、IgGクラス由来の免疫グロブリン重鎖定常領域が好ましい。さらに、免疫グロブリン重鎖定常領域は、IgG抗体サブクラス（当該分野においてIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4と称される）のいずれか由来であり得ると考えられる。

【0041】

免疫グロブリン重鎖定常領域ドメインは、免疫グロブリンクラス間で交叉相同性を有する。例えば、IgGのCH2ドメインは、IgAおよびIgDのCH2ドメインに相同であり、そしてIgMおよびIgEのCH3ドメインに相同である。好ましい免疫グロブリン

50

重鎖定常領域は、I g GのC H 2領域およびC H 3領域に対応するタンパク質ドメイン、または、その機能部分もしくは誘導体を含む。しかし、免疫グロブリン重鎖定常領域は、好ましくは、少なくともC H 1ドメインを欠く。さらに、F c - 抗原またはF c - アジュバントの融合タンパク質は、必要に応じて免疫グロブリン可変領域を欠く。より好ましい実施形態において、免疫グロブリン重鎖定常領域は、N末端からC末端へ方向において、免疫グロブリンヒンジ領域、C H 2ドメインおよびC H 3ドメインを含み、これらの全ては、I g G分子由来の配列に基づく。適切な免疫グロブリン重鎖定常領域の選択は、米国特許第5,541,087号および同5,726,044号に詳細に考察される。特定の結果に到達するための特定の免疫グロブリンクラスおよびサブクラス由来の特定の免疫グロブリン重鎖定常領域配列の選択は、当業者のレベル内であると見なされる。

10

【0042】

いくつかの環境において、免疫グロブリン重鎖定常領域を例えば、特定の活性（例えば、補体定着または抗体依存的細胞媒介細胞傷害性（ADCC）の刺激）が減少または排除されるような変異、欠失または遺伝子操作もしくは他の手法によって媒介される他の変化によって、改変することが有用であり得る。しかし、免疫グロブリン重鎖定常領域のF cレセプターに結合する能力を維持することが必要であると見なされる。

【0043】

本発明の実施において、F c - 抗原またはF c - アジュバントの融合タンパク質の免疫グロブリン重鎖定常領域成分は、好ましくは、意図されるレシピエントにおいて非免疫原性であるか、または弱い免疫原性である。免疫グロブリン重鎖定常領域が免疫グロブリン重鎖定常領域に対して検出可能な抗体応答を生成しない場合、F c領域は、非免疫原性であるか、または、弱い免疫原性である。従って、免疫グロブリン重鎖定常領域は、存在する免疫グロブリン由来であるべきか、または融合タンパク質の意図されるレシピエントと同じ種に存在する免疫グロブリンに対応するアミノ酸配列に基づくべきである。換言すると、ヒト免疫グロブリン定常重鎖領域配列は、F c融合構築物（F c - 抗原および/またはF c - アジュバントの融合タンパク質）がヒトに投与されるべき場合に使用されるべきである。ヒトF c I g Gのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、例えば、E l l i s o nら（1982）N U C L E I C A C I D S R E S . 10 : 4071 - 4079に記載される。同様に、マウスF c配列は、F c融合物がマウスに投与される場合に使用されるべきである。マウスF c I g G 2 aのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、例えば、B o u r g o i sら（1974）E U R . J . B I O C H E M . 43 : 423 - 435に開示される。F c融合タンパク質が愛玩動物（例えば、ネコおよびイヌ）ならびに家畜（例えば、ウシおよびウマ）を含むほかの動物に投与されるべき場合、同一の論理が適用される。

20

30

【0044】

本明細書中で使用される場合、用語「予め選択された抗原」は、任意のタンパク質またはそのフラグメント、あるいは単独でかまたは他の薬剤と組み合わせてのいずれかで動物における免疫応答を誘導し得るポリペプチドを意味することが理解される。目的の予め選択された抗原のいずれかが本発明のF c - 抗原融合タンパク質に含まれ得ることが意図される。好ましい実施形態において、予め選択された抗原は、以下からなる群より選択される：前立腺特異的膜抗原（PSMA）；サイトカインレセプターのエクストドメイン（例えば、ヒトIL - 4レセプターのエクストドメイン）；腫瘍特異的抗原（例えば、正常細胞と比較して腫瘍細胞においてアップレギュレートされたか、あるいは増加したレベルで存在する抗原）；およびウイルスタンパク質（例えば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）のゲノムによってコードされるタンパク質）。

40

【0045】

本明細書中で使用される場合、用語「アジュバント」は、例えば、予め選択された抗原に対する免疫応答（体液性かまたは細胞性のいずれか）を増強することによって、免疫調節因子として作用し得る任意の物質を意味することが理解される。本明細書中で使用される場合、用語「体液性」免疫は、体液（例えば、血漿またはリンパ液）に生じた抗体によっ

50

て媒介される免疫を意味することが理解される。ここで、当該分野において「細胞媒介性免疫」としてもまた称される用語「細胞性」免疫は、Ｔリンパ球によって開始し、そしてエフェクターＴリンパ球および／またはマクロファージによって媒介される免疫学的反応を意味することが理解される。

【 0 0 4 6 】

以前に記載されたように、種々の化学アジュバント（例えば、フロイント完全アジュバント）は、非ヒト動物を免疫するに有用であり得る。高力価の抗体または顕著な細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）応答を生成するために、動物で広範に使用されるにもかかわらず、このようなアジュバントの副作用（例えば、組織傷害）のために、ヒトへの使用は受容不可能である。従って、注射部位での炎症を伴わない強力な免疫応答を誘導する必要がある。本発明のＦｃ - アジュバント融合タンパク質を使用する明確な利点の１つは、化学アジュバント（例えば、フロイントアジュバント）の必要性なしに、強力な免疫応答を誘発する能力である。

【 0 0 4 7 】

本発明の実施に有用な好ましいアジュバントは、Ｆｃ - アジュバント融合タンパク質またはＦｃ - アジュバント融合タンパク質をコードする核酸を含む。Ｆｃ融合タンパク質に含まれる好ましいアジュバントタンパク質は、サイトカインを含む。本明細書中で使用される場合、用語「サイトカイン」は、任意のタンパク質またはそのペプチドアナログもしくはは機能的フラグメント（これらは、動物における免疫細胞（例えば：Ｔ細胞；Ｂ細胞；マクロファージ；好中球；好酸球；好塩基球；樹状細胞；およびこれらの前駆細胞）の活性を調節し得る）を意味することが理解される。好ましいサイトカインは、例えば、ＩＦＮ - γ 、ＩＬ - 2、ＩＬ - 4、ＩＬ - 12、ＩＬ - 18、ＴＮＦおよびＧＭＣＳＦを含む。ＣＤ４０リガンドの細胞外ドメインはまた、Ｆｃに融合しＦｃ - アジュバントを形成するために好ましいタンパク質である。Ｆｃ - アジュバントを投与する場合、Ｆｃ - 抗原融合タンパク質中の抗原は、Ｆｃ - 抗原融合タンパク質をＦｃ - アジュバント融合タンパク質なしに投与する場合よりも強力な免疫応答を誘発し得る。いくつかの場合において、Ｆｃ - アジュバントを伴うＦｃ - 抗原の免疫を２回だけ行った後に達成される抗体のレベルは、フロイントアジュバントで達成した抗体のレベルに比べて同程度であるかまたはより高く、そして皮膚の反応は検出されない。

【 0 0 4 8 】

Ｆｃ - 抗原またはＦｃ - アジュバント融合タンパク質の免疫グロブリン重鎖定常領域を用いる場合、アジュバントタンパク質は、好ましくは、意図されるレシピエントにおいて、免疫原性ではないか、または弱い免疫原性に過ぎない。このことは、意図されるレシピエントと同一の種から単離可能なサイトカインに対応するアミノ酸配列によって規定されるサイトカインがＦｃ - アジュバント融合タンパク質に組み込まれることによって達成され得る。例えば、Ｆｃ - アジュバント融合タンパク質がヒトに投与されるべき場合、アジュバントタンパク質（例えば、サイトカイン）は、好ましくはヒト起源である。

【 0 0 4 9 】

Ｆｃ - 抗原およびＦｃ - アジュバント融合タンパク質の同時投与（同時に、または一方を他方の後にかのいずれか）を使用して、予め選択された抗原に対して刺激される免疫応答の型を調節し得る。２つのクラスの免疫応答（Ｔ_h 1およびＴ_h 2と呼ぶ）は、異なる型の感染に応じて刺激され、かつ異なるサイトカインを含む。代表的には免疫応答に媒介されるＴ_h 1は、天然には細胞性であり、代表的には免疫応答に媒介されるＴ_h 2は、天然には体液性である。従って、Ｔ_h 1応答は、改変された細胞（例えば、腫瘍細胞またはウイルス感染細胞）を攻撃するに有用であり得、一方、Ｔ_h 2応答は、規制動物のような細胞外因子を攻撃するに有用であり得る。場合によって、免疫グロブリン重鎖定常領域に融合されたサイトカインを投与して一般的な免疫応答を刺激するか、あるいは特異的Ｔ_h 1応答または特異的Ｔ_h 2応答を開始または調節するかのいずれかをすることは有用である。

【 0 0 5 0 】

さらに、Fc - アジュバント融合タンパク質に存在する特定のサイトカインの選択は、Fc - 抗原融合タンパク質の予め選択された抗原に対して作製された抗体のクラスに影響し得る。例えば、Fc - IL12は、Th1サイトカイン（例えば、IFN- γ 、IL-2およびTNF）として公知のものの産生を刺激することによってヘルパーT細胞応答を刺激する。これは、強力な細胞性免疫および抗体のIgG2aクラスの産生を促進する。逆に、Fc - IL-4は、Th2サイトカイン（例えば、体液性免疫を促進するIL-5、IL-6、IL-10およびIL-4）の産生を刺激する。

【0051】

以前に議論されたように、好ましい実施形態において、方法は、Fc - 抗原融合タンパク質またはFc - 抗原融合タンパク質をコードする核酸を、Fc - アジュバント融合タンパク質と組み合わせて投与する工程を包含する。2つの融合タンパク質（各々が免疫グロブリン重鎖定常領域を含有する）を使用することによって、哺乳動物における同一または類似の細胞型で、予め選択された抗原およびアジュバントタンパク質（例えば、サイトカイン）の両方が同時局在することが可能である。例えば、マクロファージ、B細胞、顆粒球および樹状細胞は、これらの細胞表面上にFcレセプターを発現する。従って、Fcレセプターに結合し得るFc - 抗原およびFc - アジュバント融合タンパク質を同時投与することによって、抗原融合タンパク質の抗原およびアジュバント融合タンパク質のアジュバントが、APCの同じ細胞性成分に同時に局在し得る。次いで、アジュバントは、予め選択された抗原の近傍における免疫応答を増強し得るか、あるいは、調節し得る。

【0052】

Fc - サイトカインの組合せをまた相乗的な様式で使用して一般的な応答を刺激し得、次いで、細胞性応答（Th1）または体液性応答（Th2）のいずれが生じるかを左右し得る。例えば、Fc - GMCSFは、免疫応答の強力な一般的刺激因子である。しかし、細胞性免疫またはTh1媒介性免疫に関する応答をさらに調節するために、例えば、Fc - IL12またはFc - IFN γ のアジュバントタンパク質を、Fc - GMCSFと同時投与し得る。より体液性な応答またはTh2媒介性応答を促進するために、例えば、Fc - IL4アジュバントタンパク質を、Fc - GMCSFと同時投与して、Th2細胞の生成に関する応答を調節し得る。Fcとの融合物として使用した他のTh1促進サイトカインまたはTh2促進サイトカインをまた、所望の生理学的応答の正確な性質に依存して使用し得る。この一般的なアプローチをまた使用して、応答を特定の抗原に近づけ、かつ逆のTh型の新たな応答について免疫することにより有害なものから遠ざけることによって、存在する病原性応答（例えば、自己免疫（Th1媒介性疾患）およびアレルギー（Th2媒介性疾患））を調節し得ることが意図される。

【0053】

いくつかの環境において、Fc - 抗原融合タンパク質で動物を免疫する場合、アジュバントとして核酸を使用することが有用である。核酸（例えば、シトシンホスホジエステラーゼ連結グアノシン（CpG）に富んだ配列を含むオリゴヌクレオチド）は、免疫応答をTh1応答に偏らせ得、そして必要に応じて、サイトカインのような他のアジュバントと組み合わせて利用され得る（例えば、Brazoletta（1998）PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 95:15553-8; Liuら（1998）BLOOD 92:3730-6; およびKlinmanら（1997）IMMUNOL. 158:3635-3639を参照のこと）。従って、CpGを含むオリゴヌクレオチドをFc - 抗原融合物と同時投与し、増強されかつ適切に調節された免疫応答を達成し得ることが意図される。このような核酸分子は任意の長さの核酸分子であり得るが、8ヌクレオチド長より長いヌクレオチドが好ましい。核酸配列は、好ましくは、配列CpGを含み、そしてより好ましくは、配列プリン - プリン - C - G - ピリミジン - ピリミジンであり、ここで、中央のCpGのシトシンは、メチル化されていない。アジュバントDNA中のCpGジヌクレオチドの頻度は、好ましくは、少なくとも約5%であり、そしてより好ましくは、約10%である。例えば、二本鎖形態のオリゴヌクレオチドTCCATGACGTTCCCTGACGTT（配列番号22）を、アジュバントとして使用し得る。求められる免

疫応答の型に依存して、核酸をミョウバンに連結することが有用であり得る。

【 0 0 5 4 】

本発明は、本発明の実施に有用な F c 融合タンパク質を作製するために従来の組換え D N A 法を利用する。F c 融合構築物を、好ましくは、D N A レベルで作製し、そして得られた D N A を発現ベクターに組み込み、そして発現して、本発明の F c - 抗原または F c - アジュバントの融合タンパク質を産生する。本明細書中で使用される場合、用語「ベクター」は、宿主細胞ゲノムと読み換えられ、そして宿主細胞のゲノムに組み込まれるか、またはエピソームとして自発的に複製するにコンピテントなヌクレオチド配列を含む任意の核酸を意味することが理解される。このようなベクターとしては、核酸ベクター、プラスミドベクター、ファージミドベクター、コスミドベクター、R N A ベクター、ウイルスベクターなどが挙げられる。ウイルスベクターの限定されない例としては、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスが挙げられる。本明細書中で使用される場合、用語 F c 融合タンパク質の「遺伝子発現」または「発現」は、D N A 配列の転写、m R N A 転写物の翻訳、および F c 融合タンパク質産物の分泌を意味することが理解される。F c 融合タンパク質は、いずれも I L 2、C D 2 6、T a t、R e v、O S F - 2、b I G - H 3、I g E レセプター、P S M A または g p 1 2 0 を含み、本明細書中で議論される型の発現系を使用して発現された。同一または類似の発現構築物は、米国特許第 5, 5 4 1, 0 8 7 号および同 5, 7 2 6, 0 4 4 号に開示される。

10

【 0 0 5 5 】

遺伝子操作技術によるタンパク質の融合の代わりに、従来の化学的クロスリンカーを用いる化学的接合を使用して、タンパク質部分を融合し得る。

20

【 0 0 5 6 】

本発明の実施に有用な基本ベクターとして、例えば、S V 4 0 ウイルス由来の転写調節配列および E . c o l i でのプラスミドの選択および維持のための細菌性プラスミド配列によって駆動される選択マーカー（例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（D H F R））が挙げられる。F c 融合タンパク質配列の発現を、プロモーター配列そして必要に応じて、エンハンサー配列（例えば、サイトメガロウイルス（C M V）のプロモーター配列およびエンハンサー配列）によって駆動する。

【 0 0 5 7 】

F c 融合タンパク質またはこのような融合タンパク質をコードする核酸がヒトに投与されるべき場合、F c 融合タンパク質をコードする配列は、好ましくは、5' から 3' の方向に開始して、例えば、抗体軽（L）鎖由来で、免疫グロブリン重鎖またはその変異体形態の少なくとも一部（好ましくは、ヒト免疫グロブリン重鎖 g 1 遺伝子の F c y 1 領域由来）とインフレームで融合した「リーダー配列」を有する。免疫グロブリン F c y 1 遺伝子の F c y 1 領域は、好ましくは、少なくともヒンジドメインの一部および C H 3 ドメインを含み、そしてより好ましくは、少なくともヒンジドメイン、C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメインを含む。F c 融合タンパク質がマウスに投与されるべき場合、免疫グロブリン重鎖定常領域をコードする好ましい核酸配列は、マウス I g G 2 a 抗体由来のヒンジ領域、C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメインをコードする核酸配列を 5' から 3' の方向に含む。必要ならば、免疫グロブリン重鎖定常領域のカルボキシ末端を、予め選択された抗原（F c - 抗原の場合）または免疫刺激サイトカイン（F c - アジュバントサイトカインの場合）のいずれかをコードする配列とインフレームでの連結のために核酸レベルで改変する。選択カセットをコードする D N A は、そのゲノムの立体構造中または c D N A の立体構造中であり得る。

30

40

【 0 0 5 8 】

シグナル配列をコードする D N A の一部は、好ましくは、F c 融合タンパク質の分泌を指向し、その後 F c 融合タンパク質の残余から切断されるペプチドセグメントをコードする。本発明のシグナル配列は、小胞体の膜を横切るタンパク質の輸送を開始するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドである。本発明において有用なシグナル配列として、抗体軽鎖シグナル配列（例えば、抗体 1 4 . 1 8（G i l l i e s ら（1 9 8 9）J . O F

50

IMMUNOL. METH. 125:191))、抗体重鎖シグナル配列(例えば、MOPC141抗体重鎖シグナル配列(Sakanoら(1980)NATURE 286:5774))、および当該分野において公知の任意のほかのシグナル配列(例えば、Watson(1984)NUCLEIC ACIDS RESEARCH 12:5145を参照のこと)が挙げられる。

【0059】

シグナル配列は、当該分野において十分特徴付けられており、そして16~30アミノ酸残基を含むことが代表的に公知であり、より多いかまたはより少ないアミノ酸残基を含み得る。代表的なシグナルペプチドは、以下の3つの領域からなる：塩基性N末端領域、中央の疎水性領域、およびより極性のC末端領域。中央の疎水性領域は、4~12の疎水性残基を含み、これらの残基は、初期のポリペプチドの輸送の間、膜脂質二重層を横切るシグナルペプチドをアンカーする。開始に引き続き、シグナルペプチドは通常、シグナルペプチダーゼとして公知の細胞性酵素によって小胞体の内腔内で切断される。シグナルペプチドの潜在的な切断部位は、一般的に「(-3, -1)規則」に従う。従って、代表的なシグナルペプチドは、-1位および-3位で小さな中性のアミノ酸残基を有し、かつこの領域においてプロリン残基を欠く。シグナルペプチダーゼは、-1のアミノ酸と+1のアミノ酸との間でこのようなシグナルペプチドを切断する。従って、シグナル配列を、分泌の間に、融合タンパク質のアミノ末端から切断し得る。これによって、Fc融合タンパク質の分解が生じる。本発明の実施に有用なシグナルペプチド配列は、当該分野において周知である。例えば、von Heijne(1986)NUCLEIC ACIDS RES. 14:4683を参照のこと。

【0060】

当業者に明白であるように、分泌カセットにおける使用について特定のシグナル配列の適合は、いくつかの慣用的実験を要求し得る。このような実験は、Fc融合タンパク質の分泌を指向するシグナル配列の能力の決定、および/またはFc融合タンパク質の十分な分泌に達するために使用される配列の最適な立体構造(ゲノムまたはcDNA)を決定する工程を含む。さらに、当業者は、上記で参照したvon Heijneによって提示される規則に従う合成シグナルペプチドを作成し得、そして慣用的実験によってこのような合成シグナル配列の効力を試験し得る。用語「シグナル配列」「シグナルペプチド」「リーダー配列」または「リーダーペプチド」を、本明細書中で相互変換可能に使用する。

【0061】

Fc融合タンパク質またはこの融合タンパク質をコードする核酸配列の多くの異なる投与形態を使用して、予め選択された抗原に対してレシピエントを免疫し得ることが意図される。本発明の異なる2つの適用を使用して、CTL応答を産生し得る。一つは、Fc-抗原融合タンパク質をコードするDNAの注射に基づき、そして2番目は、タンパク質をMHCクラスIの経路に送達し得るFc-抗原融合タンパク質の投与に基づく。

【0062】

代表的に、タンパク質抗原の注射を使用して、哺乳動物における免疫応答を誘発する。しかし、本発明はまた、DNA注射によって抗原をAPCへ送達する方法を提供する。一般に使用される技術は、抗原性タンパク質をコードするDNA発現ベクターを筋肉中に注射することである。報告は、タンパク質抗原が筋肉細胞によって発現されるが、この抗原はこれらの細胞によって免疫系に提示されないということを示唆する。代替には、特定化されたAPC(例えば、マクロファージおよび樹状細胞)が注射部位に移動し、未だ詳述されていないプロセスを介して抗原を拾い上げかつ提示するということが考えられている。Fc-抗原融合タンパク質発現ベクターの使用は、このプロセスをより効率よくする。なぜなら、選択された融合タンパク質は、APCにネイティブな抗原タンパク質よりも効果的に結合するためである。

【0063】

DNA注射アプローチの1つの結果は、しばしば、体液性応答および細胞性応答の両方の生成を生じ得ることである。代表的には、外因性に投与されるタンパク質は、MHCクラ

ス I 分子の提示に関する経路に入るのに困難な時間を有する。にもかかわらず、本発明の F c 融合タンパク質の投与は、おそらく、予め選択された外因性抗原の M H C クラス I 提示を介して、細胞障害性の細胞の生成を増加する。D N A 免疫およびタンパク質免疫の組合せはまた相乗的に働き、まず免疫系をプライムし、次いで抗体産生および細胞傷害性の細胞性応答の両方の形態での応答のレベルをブーストする。F c - アジュバント融合タンパク質（例えば、F c - I L - 2、F c - G M C S F、F c - I L - 1 2 および F c - F l t 3 リガンド）を F c - 抗原融合タンパク質とともに同時投与することによって、融合タンパク質を A P C の同一の細胞区画へ同時に局在させることを確保し、それによって、予め選択された抗原に対するより強力な免疫応答を刺激する。

【 0 0 6 4 】

本発明の組成物（すなわち、F c - 抗原および / または F c - アジュバントの融合タンパク質、またはこのような融合タンパク質をコードする核酸配列）を、任意の適切な手段で直接（例えば、局所的に（組織の位置への注射、移植または局所投与によって））にかまたは全身的（例えば、非経口でかまたは経口で）に動物へ提供し得る。組成物が非経口で提供される場合（例えば、静脈内、皮下、眼、腹腔内、筋肉内、頬、直腸、膺、眼窩内、経皮、大脳内、頭蓋内、脊椎内、脳室内、髄腔内、槽内、包内、鼻腔内によってかまたはエアロゾル投与によって）、この組成物は、好ましくは、水性または生理学的に適合性のある液体の懸濁物または溶液の一部を含む。従って、キャリアまたはビヒクルは、生理学的に受容可能であり、その結果、所望の組成物の患者への送達に加えて、その他の点で患者の電解質および / または容積バランスに悪影響を及ぼさない。従って、薬剤のための液体培地は、正常の生理学的な生理食塩水（例えば、9 . 8 5 % の水溶性 N a C l、0 . 1 5 M、p H 7 ~ 7 . 4）を含み得る

F c - 抗原融合タンパク質の一投与当たりの好ましい投薬量は、 $50 \text{ ng} / \text{m}^2 \sim 1 \text{ g} / \text{m}^2$ 、より好ましくは $5 \mu \text{g} / \text{m}^2 \sim 200 \text{ mg} / \text{m}^2$ 、そして最も好ましくは $0.1 \text{ mg} / \text{m}^2 \sim 50 \text{ mg} / \text{m}^2$ の範囲内である。F c - アジュバント融合タンパク質の一投与当たりの好ましい投薬量は、 $1 \text{ ng} / \text{m}^2 \sim 0.1 \text{ g} / \text{m}^2$ 、より好ましくは $0.5 \mu \text{g} / \text{m}^2 \sim 20 \text{ mg} / \text{m}^2$ 、そして最も好ましくは $10 \mu \text{g} / \text{m}^2 \sim 5 \text{ mg} / \text{m}^2$ の範囲内である。F c - 抗原または F c - アジュバントの融合タンパク質をコードする核酸の一投与当たりの好ましい投薬量は、 $1 \mu \text{g} / \text{m}^2 \sim 100 \text{ mg} / \text{m}^2$ 、より好ましくは $20 \mu \text{g} / \text{m}^2 \sim 10 \text{ mg} / \text{m}^2$ 、そして最も好ましくは $400 \mu \text{g} / \text{m}^2 \sim 4 \text{ mg} / \text{m}^2$ の範囲内である。

【 0 0 6 5 】

最大免疫は、多数の別々の免疫（例えば、約 3 週間 ~ 6 ヶ月空けて 1 ~ 3 回の接種）を実施することによって達成され得ることが意図される。さらに、上記で議論したように、最大免疫応答を、F c 融合タンパク質とこのような F c 融合タンパク質をコードする核酸の投与との間で相互に行うことによって特定の環境下で達成し得る。F c - 抗原融合タンパク質またはこの融合タンパク質をコードする核酸は、F c - アジュバント融合タンパク質または F c - アジュバント融合タンパク質をコードする核酸を動物に投与する前か同時にかまたは後に、投与され得ることが意図される。しかし、投与、投薬量およびブーストのレジメンの最適形態は、十分当業者のレベル内である慣用的な実験によって決定され得ることが意図される。

【 0 0 6 6 】

本発明をさらに、以下の非限定的な実施例によって例示する。

【 0 0 6 7 】

（実施例）

（実施例 1 . F c - 抗原および F c - アジュバントの発現ベクターの構築物）

マウスモデルにおける F c 融合タンパク質の免疫原性を適切に試験するために、発現ベクターを、マウス I g G 2 a F c 領域をコードする核酸配列を使用して構築した。このベクターは、それぞれの融合タンパク質の F c 領域が動物において誘導する免疫応答の危険性を減少する。さらに、マウスサイトカインを、F c - アジュバント融合構築物における融合パートナーとして使用した。なぜなら、これらの生物学的活性は、高度に種特異的で

あり得るからである。従って、以前に報告されたベクター（L o r a (1 9 9 8) P R O T E I N E N G I N E E R I N G 1 1 : 4 9 5 - 5 0 0) を、マウス I g G 2 a F c をコードする c D N A (米国特許第 5 , 7 2 6 , 0 4 4 号) 由来の配列でヒト I g G 1 F c 配列を置換することによって改変した (図 2 を参照のこと) 。

【 0 0 6 8 】

マウス I g G 2 a F c 配列を、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 増幅によって、マウス脾細胞ライブラリーからクローニングした。P C R プライマーは、リーダー配列を連結するためのアダプター配列を 5 ' 末端に、そして抗原またはアジュバントサイトカインのいずれかをコードする配列との連結のために独特な S m a I / X m a I 制限部位を 3 ' 末端に含んだ。抗原配列およびアジュバント (サイトカイン) 配列を、5 ' S m a I 部位で調製し、F c と抗原またはアジュバントタンパク質との間のリーディングフレーム、そして翻訳終止シグナルの直後に位置される独特な X h o I 部位を維持した。

10

【 0 0 6 9 】

生じた DNA 構築物は、マウス I g G 2 a H 鎖のヒンジ領域に直接融合された軽鎖リーダー配列をコードし、そしてマウス I g G 2 a C H 2 エキソンおよび C H 3 エキソンならびに融合パートナー (抗原またはアジュバントサイトカインのいずれか) を通って続く。転写を、培養におけるほとんどの細胞型での発現に、ならびにインビボでの DNA 注射に引き続く筋肉および他の細胞型における発現に有用であることが見出されている C M V プロモーター / エンハンサーによって駆動した。E . c o l i i においてプラスミド DNA の維持に必要な配列と同様に、選択可能なジヒドロ葉酸レダクターゼ (D H F R) マーカー遺伝子を、安定にトランスフェクトされたクローンの選択を容易にするために各々のベクターに含んだ。

20

【 0 0 7 0 】

以下の例示的な F c - 抗原構築物を、設計したベクター (p d C s - m u F c) 中の独特な S m a I 部位から X h o I 部位の間に、適切に適合した配列を挿入することによって作製した。ここで、「m u」は F c がマウス起源であることを示す：

ヒト I L 4 レセプター (I L - 4 R) のエクドメイン (細胞外部分) を、P C R 増幅を介してヒト末梢血単核 (P B M C) からクローニングした。以下のプライマーを使用した：

【 0 0 7 1 】

30

【 化 1 】

5' GTCCCGGGTATGAAGGTCTTGCAGGAGC (配列番号

1) および 5' CCCCTCGAGCTAGTGCTGCTCGAAGGGCTCCCTG (配列番号 2),

これらのプライマーは、p d C s - m u F c ベクターへの挿入のためにそれぞれ S m a I 部位および X h o I 部位を含む。このクローニングおよび以下のクローニングのために使用された P C R 反応条件は以下の通りであった。A d v a n t a g e K l e n T a q および P o l y m e r a s e M i x (C l o n t e c h , P a l o A l t o , C A) ならびに特異的プライマーを使用して、目的の遺伝子を増幅した。反応混合物は、10 mM T r i s - H C l (p H 8 . 3)、50 mM K C l、1 . 5 mM M g C l 2、0 . 0 1 % ゼラチン (w / v)、各々 0 . 2 mM の d N T P および 1 . 2 5 ユニットの K l e n T a q を総量 100 m l に含んだ。30 回の P C R サイクルを実施し、各サイクルは、94 で 1 分間の熱変性、42 で 4 5 秒間のアニーリング、および 72 で 1 分間のプライマー伸長からなる。次いで、増幅された産物を、S K ベクター (S t r a t a g e n e , S a n D i e g o , C A) にサブクローニングし、そしてその DNA 配列は、標準的配列決定方法論によって確認した。

40

【 0 0 7 2 】

ヒト前立腺特異的膜抗原 (P S M A) のエクドメインを、以下のプライマーを使用する

50

P C Rを介して、L n C A P前立腺癌細胞株 (A T C C C R L 1 7 4 0) からクローニングした：

【 0 0 7 3 】

【 化 2 】

5' AAGCTTAAATCCTCCAATGAAGC (配列番号 3)および5'
CTCGAGTTAGGCTACTTCACTCAAAG (配列番号 4),

これらのプライマーは、それぞれセンス鎖およびアンチセンス鎖についてのものである。DNA配列を確認し、そしてP C Rフラグメントをp d C s - m u F cベクターに挿入して、p d C s - m u F c - P S M A融合構築物を作製した。

【 0 0 7 4 】

ほとんどの癌細胞においてアップレギュレートされる上皮細胞表面タンパク質であるヒトE p C A M (K S 抗原としても公知) のエクドメインを、以下のプライマーを使用するP C Rを介して、L n C A P細胞からクローニングした：

【 0 0 7 5 】

【 化 3 】

5' CCCCCGGGTAAACAGGAAGAATGTGTCTGTG (配列番号 5),
5) , 及び5' CTCGAGTCATTTTAGACCCTGCATTGAG (配列番号 6).

これらのプライマーは、それぞれセンス鎖およびアンチセンス鎖についてのものである。DNA配列を、標準的配列決定方法論によって確認し、そしてP C Rフラグメントをp d C s - m u F cベクターに挿入して、p d C s - m u F c - E p C A M融合構築物を作製した。N末端融合パートナーとしてE p C A Mエクドメインを使用して別のベクターを構築した。この場合において、P C R産物は、膜貫通 (s p a n n i n g) ドメインの境界にE p C A M c D N Aの天然のリーダー配列および成熟エクドメイン配列を含んだ。このP C R産物の3 ' 末端に、マウスF cフラグメントの5 ' A f 1 I I I部位との接合のための操作したA f 1 I I I部位を含んだ。使用したP C Rプライマーは、以下を含んだ：

【 0 0 7 6 】

【 化 4 】

TCTAGAGCAGCATGGCGCCCCCGC (配列番号 7)および5'
CCTTAAGCACCTGCATTGAGAATTGAG (配列番号 8)

この場合において、マウスF cは、融合タンパク質の挿入のための3 ' 挿入部位を欠くが、F cコード配列の最後に翻訳終止シグナルを含んだ。

【 0 0 7 7 】

H I V g p 4 1の膜近傍領域の相対的に保存される部分 (H i n d I I I部位から膜貫通領域に隣接するリジン残基に伸びている) を、短いペプチド抗原配列の例としてのF c融合タンパク質として発現した。H I V I I I B株由来のタンパク質配列を使用した。コード配列を、G C含量の高いコドンバイアスを使用することによって最適な真核生物細胞発現のために最適化した。以下の配列：

【 0 0 7 8 】

【 化 5 】

C CCG GGA TCC CTG ATC CAC TCC CTG ATC
 GAG GAA TCC CAG AAC CAG CAA GAG AAG AAC GAG CAG GAG CTG CTG
 GAG CTC GAC AAG TGG GCC TCC CTG TGG AAC TGG TTC AAC ATC ACC
 AAT TGG CTG TGG TAC ATC AAG TGA CTCGAG (配列番号 9)

を有するアミノ酸残基 626 ~ 669 をコードする DNA 配列を、化学的に合成し、そして p d C s - m u F c ベクターに連結した。融合ポリペプチドのアミノ酸配列は、以下であつた：

【 0 0 7 9 】

【 化 6 】

SLIHSLEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFNITNWLWYIK
 (配列番号 10)

。

【 0 0 8 0 】

他の HIV タンパク質をコードする配列を使用して、以前に記載されたように（米国特許第 5,541,087 号および同第 5,726,044 号）、原文の ヒト I g G 1 F c 以外のマウス I g G 2 a F c を用いて F c - 抗原融合タンパク質を構築した。これらの構築物は、さらに本発明の実施形態に示される。

【 0 0 8 1 】

マウス I g G 2 a F c およびいくつかのマウスサイトカインを含む一連の F c - アジュバント（サイトカイン）を、F c - 抗原融合タンパク質として同様の様式で構築した。特定のサイトカインおよびクローニングプライマーは、以下に議論される。

【 0 0 8 2 】

マウス I L - 2 を、以下の P C R プライマーを使用する P C R を介してマウス末梢血単核細胞（P B M C）からクローニングした：

【 0 0 8 3 】

【 化 7 】

(センス) 5'

GGCCCGGGTAAAGCACCCACTTCAAGCTCC (配列番号 11), および (アンチセンス) 5'

CCCTCGAGTTATTGAGGGCTTGTTG (配列番号 12)

。

【 0 0 8 4 】

マウス G M C S F を、以下の P C R プライマーを使用する P C R を介してマウス P B M C からクローニングした：

【 0 0 8 5 】

【 化 8 】

10

20

30

40

(セント) 5' CCCGGGAAAAGCACCCGCCCCTCACCC (配列番号 13), および
 (アンチセント) 5' CTCGAGTCATTTTGGCTTGGTTTTTGC (配列番号 14).

。

【0086】

マウス Flt3 リガンドを、以下の PCR プライマーを使用する PCR を介してマウス胸腺からクローニングした：

【0087】

【化9】

(セント) 5' CAAGCTTACACCTGACTGTTACTTCAGC (配列番号 15), および
 (アンチセント) 5' CTCGAGTCAAGGCTCTGGGAGCTCCGTGGC (配列番号 16).

。

【0088】

マウス IL-12 p35 を、以下の PCR プライマーを使用する PCR を介してマウス PBMC からクローニングした：

【0089】

【化10】

(セント) 5' CCCCGGGTAGGGTCATTCCAGTCTCTGG (配列番号 17), および
 (アンチセント) 5' CTCGAGTCAGGCGGAGCTCAGATAGC (配列番号 18)

。

【0090】

マウス IL-12 p40 を、以下の PCR プライマーを使用する PCR を介してマウス PBMC からクローニングした：

【0091】

【化11】

(セント) 5' TCTAGACCATGTGTCCTCAGAAGCTAAC (配列番号 19), および
 (アンチセント) 5' CTCGAGCTAGGATCGGACCCTGCAG (配列番号 20).

。

【0092】

全ての PCR 産物 (マウス IL-12 p40 を除く) を、Sma I から Xho I のフラグメントとしてクローニングし、標準的 DNA 配列方法論によって分析し、そしてその Fc 領域としてマウス IgG2a の Fc を含有する pDCs - muFc ベクターに連結した。マウス IL-12 p40 の PCR 産物を、同一の CMV プロモーター/エンハンサー、成熟マウス IL-12 の p40 サブユニット直接融合した軽鎖にリーダー配列、および pDCs - muFc ベクター中の DHFR 選択マーカー遺伝子の代わりにネオマイシン耐性遺

10

20

30

40

50

伝子を含むベクターにおいて (F c 融合タンパク質としてではなく) 別々に発現した。生じたベクターを、 p N C - m p 4 0 と称し、ここで、「 N 」はネオマイシン選択遺伝子を示す。

【 0 0 9 3 】

全てのプラスミド構築物は、ヒト腎臓 2 9 3 細胞での一過性の発現によって特異的融合タンパク質の合成および分泌を誘導した。簡単には、プラスミドを、リン酸カルシウムとの同時沈殿によってヒト腎臓単層細胞 2 9 3 に導入した (S a m b r o o l ら (1 9 8 9) M O L E C U L A R C L O N I N G - A L A B O R A T O R Y M A N U A L , C o l d S p r i n g H a r b o r , N . Y .) 。この細胞を一晩 (1 6 時間) 放置し、 P B S でリンスし、そして新鮮な細胞培養培地 (1 0 % 胎仔ウシ血清 (F B S) を含有する D M E M) で給餌した。さらなる 2 ~ 3 日の後に、培養培地を、マウス I g G - F c タンパク質に対して特異的な抗体を使用する F c 特異的 E L I S A (G i l l i e s ら (1 9 8 9) J . I M M U N O L . M E T H O D S 1 2 5 : 1 9 1) によって、分泌された融合タンパク質について試験した。マウス F c - I L 1 2 の場合において、 F c - p 3 5 発現プラスミド DNA および F c - p 4 0 発現プラスミド DNA の両方を、同一の細胞培養物に一過性に発現した。その結果、ヘテロ二量体のサイトカイン融合タンパク質がアセンブリされ、その後細胞外に分泌した (G i l l i e s ら (1 9 9 8) J . I M M U N O L . 1 6 0 : 6 1 9 5) 。

【 0 0 9 4 】

その後に、種々の F c 融合タンパク質を発現する安定にトランスフェクトされた細胞を、標準的なエレクトロポレーション技術によって、直線化した DNA をマウス N S / 0 ミエローマ細胞に導入することによって作製した。簡単には、細胞を、 G e n e P u l s e r C u v e t t e (B i o R a d) に 10^7 細胞 / m l で懸濁し、 0 . 5 m l の懸濁液を、 1 0 μ g の DNA と混合し、そしてこの混合液を、氷上で 1 0 分間冷却した。 G e n e P u l s e r (B i o R a d) を 0 . 2 5 V および 5 0 0 μ F に設定して使用して、エレクトロポレーションを、実施した。細胞を、 1 0 分間氷上で回復させた後、増殖培地中に再懸濁し、そして 9 6 ウェルプレートに移した。この細胞を、 0 . 1 μ M メトトレキサートを含む選択培地で 2 ~ 3 日ごとに給餌した (エレクトロポレーションの 2 日後に開始した) 。 9 6 ウェルプレート中で増殖する薬物耐性コロニーを、 F c E L I S A プロトコルによって発現について試験した。

【 0 0 9 5 】

マウス F c - I L 1 2 融合タンパク質の発現について、マウス I L - 1 2 の p 4 0 サブユニットをすでに発現している N S / 0 のトランスフェクトした細胞株を、マウス F c - p 3 5 サブユニット発現ベクターで上記のようにトランスフェクトした。上記の p N C - m p 4 0 ベクターを用いた N S / 0 細胞のエレクトロポレーションおよびネオマイシンアナログである G 4 1 8 (L i f e S c i e n c e s T e c h n o l o g i e s) を含有する培地中での選択によって、 p 4 0 発現株を得た。2 度目のトランスフェクションの後、生存する細胞クローンを、 F c E L I S A およびマウス I L - 1 2 E L I S A (G e n z y m e , C a m b r i d g e , M A) によってスクリーニングした。

【 0 0 9 6 】

生じた融合タンパク質の構造の保全性を、 S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) によって試験した。最初に、融合タンパク質を、少容量 (培地 1 m l 当たり 1 0 ~ 2 0 μ l) のプロテイン A S e p h a r o s e (R e p l i g e n , N e e d h a m , M A) に結合した。結合物質を、 T w e e n - 2 0 (0 . 0 1 %) を含有する P B S で洗浄し、次いで、 S D S 含有緩衝液中に溶出させ、次いで、 5 % の 2 - メルカプトエタノールの存在下で 2 分間煮沸した。次いで、還元したタンパク質を、 p r e - c a s t S D S - P A G E ゲルで電気泳動し、そしてクーマシーブルーで染色した。安定な細胞クローンからの大容量精製を、プロテイン A S e p h a r o s e カラム (R e p l i g e n , N e e d h a m , M A) を使用して、製造業者の説明書に従って実施した。

【 0 0 9 7 】

(実施例 2 . F c - 抗原の免疫原性および抗体産生に対する化学アジュバントまたは F c - サイトカインアジュバントの効果)

実施例 1 で調製したマウス F c - h u I L - 4 R α サブユニット構築物を抗原として使用して、動物モデルにおいてこれらのタンパク質の潜在的 A P C 標的化効果を試験した。I L - 4 R α サブユニットのエクトドメインは、ヒトとマウスとの間で 50 % より大きな配列同一性を有する種間で完全に保存された分子を示す。

【 0 0 9 8 】

マウスの群に、50 μ g の F c - 抗原融合タンパク質 (F c - I L - 4 R) を P B S でかまたはフロイント完全アジュバント (C F A) に乳化してかのいずれかで皮下注射した。いくつかの群はまた、5 μ g 用量 (F c - I L - 4 R と混合した) の F c - I L 2 または F c - G M C S F のいずれかの F c - アジュバントタンパク質を受けた。2 週間後、このマウスに、同一の混合物を注射したが、腹腔に投与した。C F A 処方物は、徐放性抗原の元を形成するように働き、免疫系の連続刺激を可能にするミセルを作成する。C F A 中のミコバクテリウムタンパク質はまた、サイトカイン刺激を通じて強力な炎症応答を誘導し、これによって、免疫応答をさらに増強する。しかし、C F A は、ヒトでは利用不可能にする皮膚損傷を含む重篤な副作用を生じる。しかし、P B S 中での F c - アジュバント融合タンパク質との混合物は、任意の動物における毒性の任意の可視的皮膚反応または任意の他の明白な徴候を誘発しないようである。

【 0 0 9 9 】

ブーストの 2 週間後 (すなわち、第 1 の注射の 28 日後) 、この動物から採血し、そして遠心管内で全血を塊らせることによって血清を調製し、細胞を遠心分離によって除き、そして物質を 5 分間の高速 (12000 R P M) で凝塊し、そして上清を回収した。生じた血清をアッセイ緩衝液 (0 . 01 % T w e e n - 20 を含有する P B S) で希釈し、そしてヒト I L - 4 R に反応する抗体について試験した。抗原特異的 E L I S A を、ヒト F c - h u I L - 4 R でコートした 96 ウェルプレート (P B S 中 5 μ g / m l を各ウェルに 100 μ l 添加し、そして 4 で (一晚) インキュベートした) を使用して実施した。次いで、抗原でコートしたプレートを洗浄し、そしてブロッキング緩衝液 (P B S 中に 1 % B S A 、 0 . 01 % T w e e n - 20) でブロックした後に使用した。試験血清の希釈液を、ウェル内で室温にて 2 時間インキュベートし、次いで、ウェルをアッセイ緩衝液で 8 回洗浄した。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗マウス F c 特異的二次抗体 (1 : 2000 希釈、J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h) を添加し、そしてプレートをさらに 1 時間インキュベートした。アッセイ緩衝液での 8 回のさらなる洗浄の後、25 m M クエン酸、50 m M N a₂H P O₄ (p H 5) および 0 . 03 % の直前に添加した H₂O₂ を含む o - フェニレンジアミンジヒドロクロリド (O P D) 溶液を添加した。約 30 分後に 100 μ L の 4 N H₂S O₄ を添加することによって反応を停止した。生じたプレートを、650 n m で読み取られるバックグラウンドを自動的に差し引くプレートリーダーにおいて 490 n m で読み取った。結果を、光学密度対抗血清の希釈としてプロットした。抗体の相対的力価を、光学密度が任意の値 (例えば 1 O . D . 単位) に低下するまで希釈されるべき血清の量によって決定した。

【 0 1 0 0 】

免疫プロトコルの結果を、図 3 に示す。このプロトコルによる P B S 中のマウス F c - I L - 4 R 融合タンパク質単独の注射によって、1 匹のマウスのみが抗体応答を誘導した (図 3 B) 。しかし、C F A の添加は、反応するより多くのマウスを生じたが、これらの力価は、P B S 中の F c - I L - 4 R 融合タンパク質単独での注射に反応するマウスに大まかには同一であった (図 3 C) 。マウス F c - I L 2 アジュバントを P B S 中の F c - I L 4 R との同時投与によって、全ての動物において反応を誘導したが、しかし、各々の場合において産生される抗体の量は変動した (図 3 D) 。C F A およびマウス F c - I L 2 アジュバントとの組合せ (図 3 A) は、いずれかの因子単独よりも高い抗体力価を生じた (図 3 C および 3 D) 。P B S 中のマウス F c - G M C S F アジュバントの同時投与は、F c - G M C S F アジュバントおよび C F A の両方の組合せで免疫された群を含む (図 3

F)全ての群で最も強力な免疫応答を誘導した(図3E)。換言すると、マウスFc-IL4R抗原と同時投与した場合、PBS中のマウスFc-GMCSFアジュバントは、CFAの使用の必要性を除く。このような方法は、ヒトにおける使用のためにより適切であることが意図される。

【0101】

(実施例3.Fc-PSMA融合タンパク質における癌抗原、PSMAに対して産生される抗体に対するFc-GMCSFアジュバント用量の効果)

PSMAは、その制限された正常な組織分布のため、魅力的なヒト腫瘍関連標的抗原を現在示す。PSMAを、目下、腫瘍ワクチン候補として臨床試験において試験している。本実施例において、Fc-PSMA融合タンパク質におけるPSMA抗原の免疫原性を評価した。

10

【0102】

マウスFc-PSMA融合タンパク質を実施例1に議論されるように調製した。マウスの群に、異なる濃度のFc-アジュバント融合タンパク質Fc-GMCSFと共に、PBS中の50μgのマウスFc-PSMAを皮下注射し、次いで、14日後に、腹腔内注射によりブーストした。抗体力価を、Fc-IL4R融合タンパク質について実施例2に記載される通り、Fc-PSMA抗原捕捉ELISAを介して測定した。結果を、抗体力価(ODが1まで減少する希釈)対最初の注射後の時間として、図4においてプロットした。

【0103】

Fc-GMCSFの非存在下において、マウスは、1000~およそ20,000までの範囲のPSMAに対する抗体力価を有した(図4A)。しかし、0.05μgと同じくらい少ないFc-GMCSFの同時投与は、30,000~140,000の範囲の力価を生じた(図4B)。Fc-GMCSFの10倍の増加は、さらに、この癌抗原に対する抗体力価を刺激した(図4Cおよび4D)。与えられた最も高い用量(1匹のマウスあたり5μgのFc-GMCSF融合タンパク質)は、なお、1回の注射あたり約2μgのGMCSF(マウス皮膚または動物が免疫された任意の全身性の徴候に対して効果を有さない用量)だけ示した(図4Dを参照のこと)。さらに、CFAと違って、脾臓に明らかな拡大は存在しなかった。

20

【0104】

(実施例4.免疫に対する抗体応答に関するPSMAのFc-媒介送達の効果)

30

Fc-抗原およびFc-アジュバント融合タンパク質の、Fc成分の特異的な効果を、融合タンパク質、非融合抗原またはアジュバントタンパク質、あるいは前述の混合物を注射したマウスにおいて誘導された免疫応答を比較することにより試験した。ヒトPSMA系を、この目的のために使用した。

【0105】

融合されないPSMAを、製造説明書に従って、ブラスミンを用いてヒトFc-PSMA融合タンパク質のタンパク分解消化により調製した(Loら、(1998)PROTEIN ENGINEERING 11:495-500)。関連Fcおよび未消化Fc-PSMAを、プロテインA Sepharose(Repligen, Needham, MA)に対する吸着により除去した。

40

【0106】

マウスの群(n=3)を、単回の皮下用量の50μgのPSMAを、単独(図5A)あるいは0.2μgの遊離GMCSF(図5B)または0.5μgのFc-GMCSF(図5C)(0.5μgのFc-GMCSFは、約0.2μgのGMCSFを含む)と組み合わせて注射した。マウスの別のセットにおいて、各マウスを、一回の皮下用量の50μgのマウスFc-PSMA融合タンパク質単独(図5D)あるいは0.2μgの遊離GMCSF(図5E)または0.5μgのFc-GMCSF(図5F)と共に注射した。全ての注射処方物は、化学的アジュバントを含まないPBS中にあった。マウスFc-PSMAと反応する抗体を、免疫して14日後に測定した。

【0107】

50

P S M A の免疫原性に対する、F c - P S M A 融合タンパク質における F c - 抗原融合タンパク質の F c 成分の重要性は、動物に化学的アジュバントを含有しない P B S 処方物を注射した場合に著しかった。P B S 中で投与された P S M A に対する 1 次免疫応答は、本質的に存在しなかった (図 5 A)。免疫に対する G M C S F または F c - G M C S F の添加は、ある動物における弱い応答 (図 5 B) を除いて、ほとんど効果を有さなかった (図 5 B および 5 C)。対照的に、F c - P S M A 単独で注射された動物は、全ての場合において、強い 1 次免疫応答を示した (図 5 D)。F c - P M S A への遊離 G M C S F の添加は、わずかな効果をブーストしたが (図 5 E)、F c 融合タンパク質としての抗原およびサイトカイン両方の同時投与は、最も高いレベルの応答を与えた (図 5 F)。

【 0 1 0 8 】

10

これらの結果は、F c - 抗原および F c - アジュバントの組み合わせが、免疫応答を生成するのに特に有用であることを示し、そしておそらく A P C に対して、インビボでの抗原および刺激サイトカインを同時に局在化する明らかな利益を示す。

【 0 1 0 9 】

(実施例 5 . 融合タンパク質 F c - G M C S F または F c - F l t 3 L のアジュバント効果の比較)

F l t 3 についてのリガンド (これは、当該分野で F l t 3 リガンド (F l t 3 L) とも呼ばれる) は、樹状細胞の発生および成熟に重要な役割を果たすことが示されている (S o l i g o ら (1998) B R . J . H A E M A T O L . 101 : 352 ~ 63)。樹状細胞は、組織マクロファージ細胞とともに、最も重要な A P C であると考えられる。マウスでの研究において、10 日間の毎日の注射が、リンパ組織および脾臓から回収可能な樹状細胞の数および A P C 活性を増加すること、ならびにこれらの細胞が C D 4⁺ T 細胞および C D 8⁺ T 細胞の両方に対する抗原提示において非常に強力であることが示された。皮膚のランゲルハンス細胞は、局所のリンパ節への取り込みおよび移動の後、抗原を提示し得る樹状細胞の 1 つの型を示すと考えられる。ほとんどの樹状細胞は、マクロファージで典型的に見出される F c レセプター (例えば、F c γ R I) のアレイを発現しないと考えられるので、F c 融合タンパク質の同時局在化効果がこの系統の A P C に関与するか否かは予測し得ない。

20

【 0 1 1 0 】

F l t - 3 L がアジュバントとして機能し得るか否かを試験するため、マウスの群に、マウス F c - G M C S F 融合タンパク質 (マクロファージおよび顆粒球の強力な刺激因子) を用いるのではなく、マウス F c - P S M A およびマウス F c - F l t 3 L を注射した。この場合、なんらかのアジュバント効果が樹状細胞による活性化および取り込みを介して媒介されることが予期された。これは、最終的には、P M S A に対する抗体応答を生じる。この結果を図 6 にまとめる。

30

【 0 1 1 1 】

この研究は、マウス F c - F l t 3 L が、同じ用量の F c - G M C S F と同様か、そうでなければより優れた、抗 P S M A 抗体を刺激する強力なアジュバントであることを示す。この結果は、F c - 抗原と F c - アジュバントの組合せが、免疫応答を誘導することにおいて特に強力であり得るという観察を支持する。この結果はまた、樹状 A P C が、明かに F c - 抗原および F c - サイトカインならびにマクロファージ A P C で標的され得ることを示し、このことは、F c レセプターの少なくとも 1 つの形態がこれらの細胞に存在することを示唆する。

40

【 0 1 1 2 】

(実施例 6 . F c - E p C A M および E p C A M - F c 融合タンパク質に対する免疫応答)

別の非常に重要なヒト癌抗原である E p C A M (K S A 抗原および 17 - 1 A 抗原とも呼ばれる) は、実施例 1 に記載のプラスミドおよび方法を用いて、マウス I g G 2 a F c 領域との融合タンパク質として生成され、そして単独でか、またはアジュバントとして F c - G M C S F と組合せてのいずれかで投与された。マウスに皮下注射し、そして 10 μ

50

g の F c - E p C A M および 1 μ g の F c - G M C S F を含有する P B S を用いて 3 週間後にブースト（追加免疫）した。コントロールマウスには F c - G M C S F を投与しなかった。E p C A M に対する抗体の力価を、ブースト後、7 日（図 7 A）および 14 日（図 7 B）に測定した。この結果は、F c - E p C A M が、単独で投与された場合、強力な免疫原であること（白の菱形）、および F c - G M C S F が、この抗原に対する応答をさらにブーストし得ること（黒の三角）を示す。

【0113】

さらに、E p C A M 抗原は、E p C A M - m u F c のような F c フラグメントに関して反対方向に発現された（実施例 1、図 1 B を参照のこと）。この分子を用いて、皮下注射により、B a l b / c マウスを免疫した。より高用量の E p C A M - F c 融合タンパク質を用い（1 用量あたり 25 μ g）、そしてアジュバントの量（2.5 μ g F c - G M C S F）をまた増加させた。E p C A M に対する抗体の力価を、免疫後、14 日（図 8 A）および 21 日（図 8 B）に測定した。E p C A M - F c 融合タンパク質単独は、F c - G M C S F の非存在下で、完全に免疫原性であった（図 8 A および 8 B（白の菱形））。F c - サイトカインの添加は、約 3 倍まで抗体力価を改善した（図 8 A および 8 B（黒い三角））。

【0114】

E p C A M に対する免疫応答が、この抗原を発現する腫瘍細胞から哺乳動物を防御し得るか否かを試験するため、免疫していないマウスまたは E p C A M - F c 融合タンパク質（そして、ある場合は、F c - サイトカイン）で免疫したマウスに、ヒト E p C A M でトランスフェクトした、 10^5 の C T 2 6 マウス結腸癌細胞を尾静脈注射した（G i l l i e s ら（1998）J . I M M U N O L . 160 : 6195）。21 日後、この動物を屠殺し、そして肺転移の程度を、（1）肺表面範囲の段階付け；および（2）肺を秤量し、そしてこれを正常な動物の肺と比較して、腫瘍塊に起因する異なる重量増加を決定すること、によって評価した。表 1 にまとめる結果は、免疫した全てのマウスが、コントロールマウス（E p C A M - F c 融合タンパク質単独で免疫した動物を含む）に比べて、腫瘍転移において、統計学的に有意な減少を示したことを示す。同様の結果が、抗原として F c - E p C A M 融合タンパク質を用いて得られた。

【0115】

【表 1】

表 1

処置群	転移スコア	平均肺重量 (mg)
コントロール	4, 4, 4, 1, 1,	412+/-130
EpCAM-Fc	0, 0, 0, 0, 0	210+/-21
EpCAM-Fc+Fc-GM	0, 0, 0, 0, 0	240+/-19
EpCAM-Fc+Fc-IL2	0, 0, 0, 0, 0	230+/-19

転移スコアは、以下のランク付けを用いて、肺の表面範囲に基いた：1 = 1 ~ 25 % の範囲；2 = 26 ~ 50 % の範囲；3 = 51 ~ 75 % の範囲；そして 4 = 76 ~ 100 % の範囲。

【0116】

（実施例 7 . 単一の融合タンパク質における抗原 - F c およびサイトカインアジュバントの組合せ）

実施例 6 に記載のタンパク質である E p C A M - F c は、カルボキシルタンパク質ドメインとして免疫グロブリン F c 領域に連結された、N 末端抗原を例示する。このタンパク質およびそのような他のタンパク質は、F c - アジュバント融合タンパク質（例えば、F c

- サイトカイン) と同時投与され、抗原に対する免疫応答をブーストし得る。あるいは、抗原、免疫グロブリン重鎖定常領域およびアジュバントタンパク質 (例えば、サイトカイン) は、単一の融合タンパク質として (例えば、E p C A M - F c - G M C S F 融合タンパク質) 産生され得る。

【0117】

このタンパク質についての発現プラスミドは、マウス I g G 2 a F c および G M - C S F の配列を用いて構築され、その結果この構築物はマウスモデルにおいて評価され得る。リーダー - E p C A M - F c コード配列を含有する短い X b a I ~ S m a I のフラグメントは、もとの E p C A M - F c 発現ベクターから得られ (実施例 1)、そして F c - G M C S F 発現ベクターの大きい S m a I ~ X b a I フラグメントに連結される (図 9)。

10

【0118】

得られたベクターである、p d C s - E p C A M - F c - G M C S F を、一過性発現のため、リン酸カルシウム沈殿法を用いて 293 細胞に、そして安定な発現のためにエレクトロポレーションにより N S / 0 細胞に導入する。安定なトランスフェクト体を、メトトレキセート含有培地中で細胞を培養することにより選択した (0.1 μM)。発現クローンを F c E L I S A により同定し (実施例 1 を参照のこと)、そして高レベルのプロデューサーを培養中で増殖させた。E p C A M - F c - G M C S F タンパク質を、プロテイン A S e p h a r o s e (R e p l i g e n , N e e d h a m , M A) への結合およびそれからの溶出によって馴化培地から精製し、そして構造的完全性を、2メルカプトエタノールで還元後の S D S - P A G E によって分析した。この結果は、このタンパク質が、E p C A M、F c および G M C S F の単鎖融合について予期されるように、約 90 k D の分子量を有したことを示した。

20

【0119】

組合せた融合タンパク質の相対的免疫原性を比較するため、マウスに等用量の E p C A M - F c - G M C S F、および以下: E p C A M - F c および F c - G M C S F と組合せた個々の融合タンパク質を皮下注射する。同じ注射を 14 日後に行い、そしてブースト 7 日後、ヒト E p C A M 7 に対する特異的抗体反応性について血清サンプルを試験した。同じアプローチを、他のタンパク質またはペプチド抗原について、ならびに他の刺激サイトカイン (例えば、I L - 2、I L - 12 および F l t 3 L) について用い得る。

【0120】

30

(実施例 8. DNA 注射による F c - 抗原での免疫)

哺乳動物細胞におけるマウス F c - E p C A M および E p C A M - F c のトランスフェクションおよび産生のために用いた同じ発現ベクター (実施例 1 を参照のこと) を、「裸の (naked)」プラスミド DNA として、B A l b / c マウスの群の後肢筋肉に注射した。DNA を 0.5 mg / ml の濃度で注射し、そして総量 100 μg を P B S または 25% (w / v) のスクロース溶液のいずれかにおいて投与した。注射を 3 週間ごと、全部で 3 回の注射を繰り返した。抗体応答を、異なる時点で測定し、そして捕捉のためにヒト F c - E p C A M でコートした 96 ウェルプレートを用いて、そして検出のために H R P - 結合体化抗マウス F c 特異的ポリクローナル抗体 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h) を用いて、E L I S A により定量した。図 10 に示されるデータは、注射後 14 日 (図 10 A)、27 日 (図 10 B)、55 日 (図 10 C)、および 69 日 (図 10 D) で記録した抗体力価を示す。

40

【0121】

図 10 に示される結果は、両方の処方物を用いて、最初の 1 ヶ月の間、低力価の抗 E p - C A M 抗体しか誘導されないことを示す (図 10 A および 10 B)。かなり高用量を、55 日 (図 10 C) で観察し、そして 69 日 (図 10 D) でさらに高いレベルを得た。同様の結果を、E p C A M - F c を発現するベクターの DNA 注射を用いて得たが、この力価はより低かった。これらのデータは、タンパク質抗原および免疫グロブリン F c 領域を含む融合分子として発現された抗原が、裸の DNA の注射により導入される場合、免疫応答を誘導し得ること、および永続的な抗原曝露がほとんどの動物において遅延型の応答

50

を導くことを示す。

【0122】

インビトロで異なる濃度のFc-EpCAMタンパク質で刺激した、DNAワクチン接種したマウスまたはタンパク質免疫したマウス（注射後70日）由来の脾細胞を培養することにより細胞性免疫応答を試験した。図11に示されるデータ（上部パネル）は、Fc-EpCAMタンパク質（十字）またはCMVプロモーター-EpCAM-Fc（白丸）を発現するベクターもしくはCMVプロモーター-Fc-EpCAM（黒の菱形）を発現するベクターでのDNAワクチン接種のいずれかで免疫した動物における抗原に対する増殖性反応（³Hチミジン取り込みにより測定される場合）を示す。タンパク質免疫した動物は、非常に低い用量でも、抗原に対するより大きい応答を示した。DNAワクチン接種した動物からの応答（図11の下部分パネルに異なるスケールで示される）は、用量依存性であるが、タンパク質注射されたマウスよりも程度が低かった。これらの応答は、MHCクラスII拘束CD4⁺T細胞応答の特徴であった。

10

【0123】

細胞傷害活性（一般に、MHCクラスII拘束T細胞応答の指標）について試験するため、DNAまたはタンパク質で免疫したマウスからの脾細胞培養を、約10U/mlのIL-2の存在下で、5日間培養した。エフェクター細胞は、培養した脾細胞であり、そして標的細胞は、標識したヒトEpCAM-発現CT26結腸癌細胞（Balb/cマウスと同系）、または標識した親（トランスフェクトしていないCT26細胞）のいずれかであった。エフェクター細胞および標的細胞を異なる比で混合し、そして溶解の程度を決定した。界面活性剤の存在下で標識した標的細胞をインキュベートすることにより、100%の溶解の値を達成し、そして遊離した標識の量を測定した。

20

【0124】

この結果を図12に示す。ここでは、図12Aは、ヒトEpCAMを発現するCT26細胞に対する脾細胞の活性を示すが、図12Bは、親のCT26細胞に対する脾細胞の活性を示す。両方の図について、白い菱形は、EpCAM構築物を運搬するDNAで免疫されたマウスから単離された脾細胞を示し、白の四角は、Fc-EpCAM融合構築物を運搬するDNAで免疫したマウスから単離された脾細胞を示し、白い三角は、Ep-CAM-Fc融合構築物を運搬するDNAで免疫したマウスから単離した脾細胞を示し、そして十字は、Fc-EpCAM融合タンパク質で免疫したマウスから単離した脾細胞を示す。

30

【0125】

図12は、DNAワクチン接種が両方の標的細胞に対して弱い細胞傷害性応答を生成したが、有意により高い細胞傷害性が、タンパク質で免疫したマウスで見られたことを示す。親のCT26腫瘍細胞およびEpCAMを発現するCT26腫瘍細胞の両方を、このアッセイにおいて殺傷した。親のCT26細胞に対して観察された細胞傷害性は、これらの細胞が高レベルのマウスEpCAMホモログ（アミノ酸レベルでヒトタンパク質に約81%同一である）を発現し得るためであり得る。それにもかかわらず、Fc-EpCAMタンパク質免疫は、ヒトEpCAMを発現するCT26腫瘍細胞に対して有意な細胞傷害活性を生じ、これにより、実施例6に記載される強力な腫瘍防御活性を説明する。

【0126】

（実施例9．タンパク質癌抗原の小領域を含むFc-融合タンパク質での免疫）
いくつかの全タンパク質は、免疫療法のための抗原として有用であるかもしれないが、このタンパク質のより小さい小領域が、ずっと効果的であるかもしれない。例えば、タンパク質はそれを低免疫原性にするために翻訳後修飾されるドメインを含み得、これにより実際のポリペプチド成分に対して免疫活性が低下する。大きいタンパク質は、抗原の非ポリペプチド部分とのみ反応する抗体、および抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を媒介しない抗体（抗腫瘍免疫応答の重要な成分）を誘導し得る。この状況の最適の実施例は、ヒト黒色腫特異的コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（MCS P）抗原により例示される。この抗原は、実質的に全ての黒色腫およびいくつかの型の脳癌で発現される。このタンパク質は、重度にグリコシル化され、そしていくつかのグリコサミノグリカン鎖の付着によ

40

50

りさらに修飾される。9.2.27として公知の抗体(Bumolら(1982)Proc. Natl. Acad. Sci. 79:1245~1249)は、高い親和性でこのタンパク質に結合するが、どんなエフェクター機能(ADCCまたは補体媒介性細胞傷害(CDC)のどちらか)も媒介しない。この抗体の部分的にヒト化された(キメラ)形態でさえ、このような活性を媒介し得ない。

【0127】

この高分子の最適標的領域に対してより集中した応答を惹起するため、タンパク質配列中の推定グリカン付着部位を同定した。(Pluskeら(1996)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9710~9715)。細胞表面膜にまたがる配列から遠からぬ小領域およびグリカン付着部位からいくらか離れた小領域を選択した。

10

【0128】

以下のペプチド配列：

Q G A T L R L D P T V L D A G E L A N R T G S V P R F R L L E G R H G R V V R V
P R A R T E P G G S Q L V E Q F T Q Q D L E D G R L G L E V G R P E G R A P G P
A G D (配列番号21)を逆翻訳し、得られたDNA配列を化学的に合成し、そして先の実施例において用いた同じ制限部位を用いてp d C s - F c - X発現ベクター中に連結した。翻訳終止部位を、3'末端(最終のアミノ酸をコードする配列の直後)に加え、これに唯一のX h o I部位が続いた。最終発現プラスミドをNS/O黒色腫細胞中にエレクトロポレーションし、そして所望のタンパク質を発現する安定なトランスフェクト体を、実施例1に記載のように得た。

20

【0129】

F c - M C S Pタンパク質をプロテインA Sepharoseクロマトグラフィー(R e p l i g e n , N e e d h a m , M A)を用いて培養上清から精製した。抗体力価を、アジュバントとして、5 μ gのF c - G M C S Fと組合せて、または単独のいずれかで、50 μ gのF c - M C S P融合タンパク質(P B S中)を用いて皮下免疫したB a l b / cマウスで測定した。この結果を図13に示す。黒の菱形は、正常血清における抗体力価を示し、白の四角は、F c - M C S Pで免疫したマウスの血清中の抗体力価を示し、そして黒の三角は、F c - M C S PおよびF c - G M C S Fアジュバントで免疫したマウスの血清における抗体力価を示す。

30

【0130】

M C S Pのこの小領域に対する特異的免疫応答は、14日までに検出され、そしてブースター免疫後有意に増加した。この結果は、F c - G M C S FおよびF c - M C S Pの両方で免疫したマウスが、F c - M C S P単独で免疫したマウス(白の四角)よりも、M C S Pに対してより高い抗体力価(黒の三角)を刺激したことを示す。

【0131】

(実施例10. ウイルス抗原を含有するF c - 融合タンパク質を用いた免疫)

ヒト免疫不全ウイルス(H I V)(このウイルスはA I D Sを起こす)に対する効果的なワクチンの開発は、ワクチン研究の最も重要な目的の1つである。近年、いくつかの報告により、このウイルスエンベロープの特定の特性が、免疫応答を、無関係なエピトープに対して応答させるように働き、これによりこのウイルス粒子の重要な領域および潜在的な中和領域をマスクすることが示された。これらは、デコイとして働く、非常にイムノドミナントな抗原性領域の存在、ならびに重要なエンベロープの免疫原性を物理的にマスクおよび減じる、過剰なグリコシル化を含む(W y a t t ら(1998)N a t u r e 393:705~11)。

40

【0132】

このデコイ機構を回避する1つの可能性のある方法は、ウイルスエンベロープ遺伝子の小さい領域を発現して、防御的でないイムノドミナントな反応を回避し、そして中和反応を誘導することである。小さいサブユニットワクチンに伴う問題の1つは、合成ペプチドまたは小タンパク質のいずれかでは免疫原性が低下することである。キーホールリンペットヘモシアニン(K L H)のような免疫原性キャリアタンパク質に対してこのタンパク質ま

50

たはペプチドを結合することが1つのアプローチであった。これにより、タンパク質またはペプチドに起因して、K L Hに対して、強力な応答を同様に誘導する。別のアプローチは、例えば、g p 4 1のエクトドメイン（ウイルスエンベロープ、g p 1 6 0のアンカードメイン）の小領域について、実施例1に記載のF cとの融合タンパク質を作製することである。他のキャリアと異なり、免疫グロブリン領域は、「自己」として示され、これによりいずれのイムノドミナンス効果も最小限にする。

【0133】

F c - g p 4 1 p e p 6 2 6 融合構築物は、マウス免疫グロブリンF c領域のカルボキシル末端に融合した44アミノ酸ポリペプチドを含んだ。この領域におけるH I V株I I I Bの配列は、N連結グリコシル化のためのシグナルを含み、これにより、一過性発現によって293細胞でか、または安定なトランスフェクションによりN S / 0黒色腫細胞かのいずれかで生成された、F c - g p 4 1 p e r p 6 2 6 融合タンパク質は、S D S - P A G E 分析の移動度で高い程度の変異を示し、それによりグリコシル化の程度における異質性を示す。

【0134】

このウイルス抗原が全く小さく（44アミノ酸残基長）、そして異質にグリコシル化されているという事実にもかかわらず、B a l b / cマウスにおいて免疫応答を惹起することは可能であった（図14を参照のこと）。この場合、5匹のマウスの群に、25μgのF c - g p 4 1 p e p 6 2 6を、単独でか（白菱形）、または2.5μgのF c - アジュバント融合タンパク質、F c - G M C S F（白四角）もしくはF c - I L 2（黒三角）と組み合わせるかのいずれかで、1日目、そして2週間間隔でさらに2回、皮内注射した。図14 Aおよび14 Bは、それぞれ、第2のブースト後、7日および33日後に得られた抗体力価を示す。

【0135】

免疫応答は、F c - サイトカインの同時投与により依存性であり、そして高力価に達するにはより長くかかる。より高い免疫応答がグリコシル化シグナル（実際には、多くの株がこの部位をコードしない）を含まないこの配列の改変体を用いて、またはインビトロで炭水化物糖側鎖を酵素的に除去することにより、惹起され得ることが予想される。

【0136】

（実施例11：細胞表面分子の細胞外ドメインを含有するF c - 融合タンパク質のアジュバント活性）

F c - アジュバント融合タンパク質を構築するため、膜結合し得るタンパク質の細胞外ドメインをF cに融合させることが、しばしば有用である。例えば、C D 4 0リガンド（C D 4 0 L）をF cのC末端のN末端に融合する。必要に応じて、リンカーを用いる。

【0137】

C D 4 0 Lは、有用である。なぜなら、そのレセプターであるC D 4 0は、B細胞の表面で発現され、そしてT細胞によるB細胞の刺激に関与するからである。腫瘍壊死因子と同様、C D 4 0 Lは、三量体であり、細胞表面上で、そのレセプターの二量体化または三量体化を生じる。結果として、細胞内レセプタードメインは、コンタクト内に入れられ、そしてシグナル伝達を生じる。またT N Fと同様、C D 4 0 Lは、膜結合され得るが、また細胞表面から切断され得、そしてサイトカインのように機能し得る。

【0138】

F c - C D 4 0 L 融合タンパク質は、F c - 抗原融合タンパク質とともに動物に同時投与される。コントロール実験では、F c - C D 4 0 L タンパク質およびF c - 抗原タンパク質は、異なるセットの動物に投与される。両方の融合タンパク質を注射された動物が、個々にそれぞれの融合タンパク質を注射された動物よりもより高い力価の抗体を産生するということが考えられる。

【0139】

あるいは、抗原およびC D 4 0 L 部分の両方を含む単一のF c 融合タンパク質を、F c とC D 4 0 L と抗原部分との間の任意のリンカー（L）とともに用いる。この融合タンパク

10

20

30

40

50

質は、N末端からC末端に順にFc - (L) - 抗原 - (L) - CD40L、Fc - (L) - CD40L - (L) - 抗原、抗原) L) - CD40L - (L) - Fc、CD40L - (L) - 抗原 - (L) - Fc - 抗原 - (L) - Fc - (L) - CD40L、またはCD40L - Fc - (L) - 抗原 - (L)であり得る。Fc - 抗原、およびCD40Lを含む融合タンパク質を、動物に注射し、次いで、抗体力価を測定する。CD40Lおよび抗原の両方の融合タンパク質の注射により生成された抗体力価は、Fcおよび抗原またはFcおよびCD40Lのみを含有する融合タンパク質の注射により得られる力価よりも高いことが考えられる。

【0140】

融合タンパク質の上記の投与において、動物を、静脈内注射、皮下注射、または投与の他の適切な様式で注射する。抗原および/またはアジュバントの初回投与およびブースト投与と、抗体力価の測定との間の時間は、前の実施例に記載されるとおりである。あるいは、標準的投与量およびアッセイレジメンを用いる。

10

【0141】

(等価物)

本発明は、その精神またはその本質的な特徴から逸脱することなく、他の特定の形態で具体化され得る。従って、前述の実施形態は、本明細書において記載される本発明を限定するのではなく、全ての例示的観点において考慮される。従って、本発明の範囲は、前述の発明の詳細な説明によるのではなく添付の特許請求の範囲により示される。従って、特許請求の範囲の意図および等価の範囲内である全ての変更は、本明細書に包含されることが意図される。

20

【0142】

(参考としての援用)

本明細書において上記される全ての特許書類および科学刊行物の教示は、参考として本明細書に特に援用される。

【図面の簡単な説明】

本発明の前記および他の目的、特徴、および利点ならびに本発明自体は、添付の図面とともに読まれる場合、好ましい実施形態の以下の説明からより十分に理解され得る。

【図1】 図1A~1Gは、本発明の実施において有用である例示のFc融合タンパク質の略図である。図1Aは、免疫グロブリン重鎖定常領域1が抗原またはアジュバント2のN末端に結合される、Fc - 抗原融合タンパク質またはFc - アジュバント融合タンパク質を示す。図1Bは、免疫グロブリン重鎖定常領域1が抗原またはアジュバント2のC末端に結合される、Fc - 抗原融合タンパク質またはFc - アジュバント融合タンパク質を示す。図1Cおよび1Dは、ポリペプチド鎖のいずれかもしくは両方が、Fc - 抗原融合タンパク質またはFc - アジュバント融合タンパク質を含むダイマータンパク質を示す。図1Cにおいて、少なくとも1つのポリペプチド鎖では、免疫グロブリン重鎖定常領域1は、抗原またはアジュバント2のN末端に結合され、そして図1Dでは、免疫グロブリン重鎖定常領域1は、抗原またはアジュバント2のC末端に結合される。図1Eは、ポリペプチド鎖のいずれかもしくは両方が、Fc - 抗原 - 抗原融合タンパク質、Fc - アジュバントアジュバント融合タンパク質、Fc - アジュバント抗原融合タンパク質またはFc - 抗原 - アジュバント融合タンパク質を含むダイマータンパク質を示す。図1Fは、ポリペプチド鎖のいずれかもしくは両方が、抗原 - Fc - アジュバント融合タンパク質またはアジュバント - Fc - 抗原融合タンパク質を含むダイマー融合タンパク質を示す。図1Gは、ポリペプチド鎖のいずれかもしくは両方が、抗原 - アジュバント - Fc融合タンパク質またはアジュバント - 抗原 - Fc融合タンパク質を含むダイマー融合タンパク質を示す。

30

40

【図2】 図2A~2Bは、本発明の実施において有用であるDNA配列の略図である。図2Aは、ヒトFc融合タンパク質発現ベクターを示す。図2Bは、マウスIgG 2a Fc融合タンパク質の発現のための遺伝子融合を示す。

【図3】 図3A~3Fは、Fc - 抗原融合タンパク質であるマウスFc - ヒトIL - 4レセプターエクストドメイン (Fc - IL - 4R) 融合タンパク質を用いて免疫したマウス

50

における抗体産生に対する化学的アジュバントおよびFc - サイトカインアジュバントの効果を示すグラフである。図3Aにおいて、マウスは、フロイント完全アジュバント(CFA)中Fc - IL - 4RおよびFc - IL - 2を用いて免疫された。図3Bにおいて、マウスは、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中Fc - IL - 4Rを用いて免疫された。図3Cにおいて、マウスは、CFA中Fc - IL - 4Rを用いて免疫された。図3Dにおいて、マウスは、PBS中Fc - IL - 4RおよびFc - IL - 2を用いて免疫された。図3Eにおいて、マウスは、CFA中Fc - IL - 4RおよびFc - GMCSFを用いて免疫された。図3Fにおいて、マウスは、PBS中Fc - IL - 4RおよびFc - GMCSFを用いて免疫された。図3A～3Fにおいて、四角、菱形および三角は、3匹の別個のマウス由来のデータを示す。抗原に対する抗体のレベルは、ELISAによって測定された；Y軸は、ELISA読み出しの光学密度を示す。

10

【図4】 図4A～4Dは、アジュバントとしてFc - GMCSFの種々の量を用いてFc - 抗原融合タンパク質の形態でヒト癌抗原、PSMAを用いてマウスを免疫することの効果を示すグラフである。図4Aにおいて、マウスは、50μgのFc - PSMA融合タンパク質単独で免疫された。図4Bにおいて、マウスは、50μgのFc - PSMAおよびアジュバントとして0.05μgのFc - GMCSFを用いて免疫された。図4Cにおいて、マウスは、50μgのFc - PSMAおよびアジュバントとして0.5μgのFc - GMCSFを用いて免疫された。図4Dにおいて、マウスは、50μgのFc - PSMAおよび5μgのFc - GMCSFを用いて免疫された。図4A～4Dにおいて、四角、菱形および三角は、3匹の別個のマウス由来のデータを示す。

20

【図5】 図5A～5Fは、ネイティブタンパク質(5A～5C)またはマウスFc - PSMA融合タンパク質(5D～5F)のいずれかとして投与されたPSMA抗原に対する特異的抗体応答を比較するグラフである。図5Aにおいて、マウスは、抗原として50μgのPSMAを用いて免疫された。図5Bにおいて、マウスは、抗原として50μgのPSMAおよびアジュバントとして0.2μgのGMCSFを用いて免疫された。図5Cにおいて、マウスは、抗原として50μgのPSMAおよびアジュバントとして0.5μgのFc - GMCSFを用いて免疫された。図5Dにおいて、マウスは、抗原として50μgのFc - PSMAを用いて免疫された。図5Eにおいて、マウスは、抗原として50μgのFc - PSMAおよびアジュバントとして0.2μgのGMCSFを用いて免疫された。図5Fにおいて、マウスは、抗原として50μgのFc - PSMAおよびアジュバントとして0.5μgのFc - GMCSFを用いて免疫された。図5A～5Fにおいて、三角、菱形、および三角は、3匹の別個のマウス由来のデータを示す。抗原に対する抗体のレベルは、ELISAによって測定された；Y軸は、ELISA読み出しの光学密度を示す。

30

【図6】 図6は、ヒトPSMAに対する抗体産生への、Fc - PSMAを用いて同時投与されたFc - GMCSFまたはFc - F3Lのアジュバント効果を比較する図である。全ての動物は、50μgのFc - PSMA単独か、またはアジュバントとして示されたFc - サイトカインと組み合わせられてのいずれかを受けた。1回の実験あたりに3匹のマウスが試験された。

【図7】 図7A～7Bは、Fc - EpCAM融合タンパク質単独か、またはFc - GMCSFアジュバントと組み合わせられてのいずれかの個々のマウスにおける免疫原性を示すグラフである。図7Aおよび7Bは、それぞれブーストから7日後および14日後に測定された抗体力価を示す。ブーストは、1次免疫から3週間後に与えられた。両方の図において、白菱形は、10μgのFc - EpCAM単独を用いて皮下に免疫されたマウスを示し、そして黒三角は、10μgのFc - EpCAMおよびアジュバントとして1μgのFc - GMCSFを用いて皮下に免疫されたマウスを示す。抗原に対する抗体のレベルは、ELISAによって測定された；Y軸は、ELISA読み出しの光学密度を示す。

40

【図8】 図8A～8Bは、EpCAM - Fc(Fc領域および抗原が逆方向)単独またはFc - GMCSFアジュバント融合タンパク質と組み合わせられてのいずれかでのマウスにおける免疫原性を示すグラフである。図8Aおよび8Bは、それぞれの免疫から14日

50

後および21日後(すなわち、ブーストから7日後)に測定した抗体力価を示す。両方の図において、白菱形は、25 μ gのEpCAM-Fc融合タンパク質を用いて免疫された3匹のマウスの平均力価を示し、そして黒三角は、25 μ gのEpCAM-Fcおよびアジュバントとして2.5 μ gのFc-GMCSFを用いて免疫したマウスを示す。抗原に対する抗体のレベルは、ELISAによって測定された; Y軸は、ELISA読み出しの光学密度を示す。

【図9】 図9は、EpCAM-Fc-CMCSF融合タンパク質をコードするプラスミドベクターを構築するための図を示す。この場合、抗原EpCAMは、免疫グロブリン重鎖定常領域(Fc領域)のアミノ末端に融合され、そしてアジュバントGMCSFは、このFc領域のカルボキシ末端に融合される。

【図10】 図10A~10Dは、キャリアビヒクルとしてPBSまたは25%(w/v)スクロース溶液のいずれかを用いてFc-EpCAM融合タンパク質をコードするプラスミドベクターを注射したマウスにおける抗体力価を示すグラフである。図10A~10Dは、それぞれ、最初の注射から14日後、27日後、55日後および69日後に記録された抗体力価を示す。この図全体にわたって、白菱形は、PBS中Fc-EpCAMコードプラスミドを注射した個々のマウスについての力価を示し、そして黒三角は、スクロース中Fc-EpCAMコードプラスミドを注射した個々のマウスについての力価を示す。抗原に対する抗体のレベルは、ELISAによって測定された; Y軸は、ELISA読み出しの光学密度を示す。

【図11】 図11A~11Bは、DNAワクチン接種またはタンパク質注射によって免疫されたマウスから単離された脾細胞の抗原でのインビトロ刺激に対する³Hチミジン取り込みの刺激を示すグラフである。図11Bは、図11Aのより低い区分におけるデータの拡大図を示す。この図全体にわたって、黒菱形は、CMV-Fc-EpCAM融合タンパク質をコードするプラスミドDNAの100 μ gを用いて免疫されたマウスから採取された脾細胞を示し、白丸は、CMV-EpCAM-Fc融合タンパク質をコードするプラスミドDNAの100 μ gを用いて免疫されたマウスから採取された脾細胞を示し、そして×印は、10 μ gのFc-EpCAMタンパク質を用いて免疫されたマウスから採取された脾細胞を示す。この脾臓は、プラスミドDNAまたはタンパク質の第1の注射および3週間間隔での2回のブースター注射から70日後にマウスから取り出された。

【図12】 図12A~Bは、プラスミドDNAまたはFc-EpCAMタンパク質で免疫したマウス由来の脾細胞を用いる細胞傷害性Tリンパ球(CTL)殺傷アッセイを示すグラフである。図12Aは、ヒトEpCAMタンパク質を発現するマウスCT26腫瘍細胞に対する脾細胞の活性を示す。図12Bは、親マウスCT26腫瘍細胞に対する脾細胞の活性を示す。両方の図について、白菱形は、(CMVプロモーター)-EpCAM構築物を保有するDNAを用いて免疫した脾細胞を示し、白四角は、(CMVプロモーター)-Fc-EpCAM融合構築物を保有するDNAを用いて免疫されたマウス由来の脾細胞を示し、白三角は、(CMVプロモーター)-EpCAM-Fc融合構築物を保有するDNAを用いて免疫されたマウス由来の脾細胞を示し、そして×印は、Fc-EpCAM融合タンパク質を用いて免疫されたマウス由来の脾細胞を示す。このCTLアッセイには、10 U/mlのIL-2を用いて5日間育てた免疫したマウス由来の脾細胞を用いた。標識化標的細胞は、示されたエフェクターと混合し、そして4時間インキュベートした。放射活性の放出を使用して、特異的溶解のパーセンテージを算定した。

【図13】 図13は、PBS中50 μ gのFc-MCSP融合タンパク質単独かまたはアジュバントとして5 μ gのFc-GMCSFと組み合わせられてのいずれかで皮下に免疫されたマウスにおける抗体力価を示すグラフである。黒菱形は、正常血清中の抗体力価を示し、白四角は、Fc-MCSP融合タンパク質単独を用いて免疫されたマウスの血清中の抗体力価を示す。そして黒三角は、Fc-GMCSFアジュバントと組み合わせられたFc-MCSP融合タンパク質を用いて免疫されたマウスの血清中の抗体力価を示す。抗原に対する抗体のレベルは、ELISAによって測定された; Y軸は、ELISA読み出しの光学密度を示す。

10

20

30

40

50

【図 1 4】 図 1 4 A ~ B は、F c - g p 4 1 p e p 6 2 6 融合タンパク質単独かまたは F c - サイトカインアジュバントと組み合わせてのいずれかで免疫したマウスにおける抗体力価を示すグラフである。図 1 4 A および 1 4 B は、それぞれ、第 2 のブーストから 7 日後および 3 3 日後に達成した抗体力価を示す。この図全体にわたって、白菱形は、2 5 μ g の F c - g p 4 1 p e p 6 2 6 抗原単独での皮内注射によって免疫したマウスにおける抗体力価を示し、白四角は、2 . 5 μ g の F c - G M C S F アジュバントと組み合わされた 2 5 μ g の F c - g p 4 1 p e p 6 2 6 抗原の皮内注射によって免疫したマウスにおける力価を示し、そして黒三角は、2 . 5 μ g の F c - I L 2 アジュバントと組み合わされた 2 5 μ g の F c - g p 4 1 p e p 6 2 6 抗原の皮内注射によって免疫したマウスにおける抗体力価を示す。抗原に対する抗体のレベルは、E L I S A によって測定された；Y 軸は、E L I S A 読み出しの光学密度を示す。

10

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Gillies, Stephen D.
 Lo, Kin-Ming
 Wesolowski, John
 Lexigen Pharmaceuticals Corp.

<120> Fc Fusion Proteins For Enhancing the Immunogenicity of
 Protein and Peptide Antigens

<130> LEX-007PC

<140>
 <141>

<150> US 60/144,965
 <151> 1999-07-21

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:IL-4R primer

<400> 1
 gtcccgggta tgaaggtctt gcaggagc 28

<210> 2
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:IL-4R primer

<400> 2
 cccctcgagc tagtgctgct cgaagggtc cctg 34

<210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:PSMA primer

<400> 3
 aagcttaaatt cctccaatga agc 23

<210> 4
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PSMA primer

<400> 4

ctcgagtttag gctacttcac tcaaag

26

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:EpCAM primer

<400> 5

ccccgggtaa acaggaagaa tgtgtctgtg

30

10

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:EpCAM primer

<400> 6

ctcgagtcac ttttagaccct gcattgag

28

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:EpCAM primer

<400> 7

tctagagcag catggcgccc ccgc

24

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:EpCAM primer

<400> 8

ccttaagcac cctgcattga gaattcag

28

30

<210> 9

<211> 148

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA encoding
amino acid residues 626-669 of HIV IIIB gp41

<400> 9

cccgggatcc ctgatccact ccctgatcga ggaatcccag aaccagcaag agaagaacga 60

gcaggagctg ctggagctcg acaagtgggc ctccctgtgg aactggttca acatcaccaa 120
 ttggctgtgg tacatcaagt gactcgag 148

<210> 10
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Fused
 polypeptide from pdC-muFC vector

<400> 10
 Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys
 1 5 10 15

10

Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn
 20 25 30

Trp Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys
 35 40

<210> 11
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primers for
 mouse IL2

20

<400> 11
 ggccccgggta aagcacccac ttcaagctcc 30

<210> 12
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer for
 mouse IL2

<400> 12
 ccctcgagtt attgagggct tgttg 25

30

<210> 13
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer for
 mouse GMCSF

<400> 13
 cccgggaaaa gcacccggcc gctcacc 28

<210> 14

<211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer for
 mouse GMCSF

 <400> 14
 ctcgagtcac ttttggcttg gttttttgc 29

 <210> 15
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 10

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer for
 mouse Flt3 ligand

 <400> 15
 caagcttaca cctgactgtt acttcagc 28

 <210> 16
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer for 20
 mouse Flt3 ligand

 <400> 16
 ctcgagtcac ggctctggga gctccgtggc 30

 <210> 17
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer for
 mouse IL-12p35

 <400> 17
 ccccggttag ggtcattcca gtctctgg 28 30

 <210> 18
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer for
 mouse IL-12p35

 <400> 18
 ctcgagtcag gcggagctca gatagc 26

 <210> 19

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer for
 mouse IL12 p40

<400> 19
 tctagaccat gtgtcctcag aagctaac 28

<210> 20
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

10

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer for
 mouse IL12 p40

<400> 20
 ctcgagctag gatcgacccc tgcag 25

<210> 21
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:MSCP peptide

20

<400> 21
 Gln Gly Ala Thr Leu Arg Leu Asp Pro Thr Val Leu Asp Ala Gly Glu
 1 5 10 15

Leu Ala Asn Arg Thr Gly Ser Val Pro Arg Phe Arg Leu Leu Glu Gly
 20 25 30

Arg His Gly Arg Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu Pro Gly
 35 40 45

Gly Ser Gln Leu Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu Glu Asp Gly
 50 55 60

Arg Leu Gly Leu Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg Ala Pro Gly Pro
 65 70 75 80

30

Ala Gly Asp

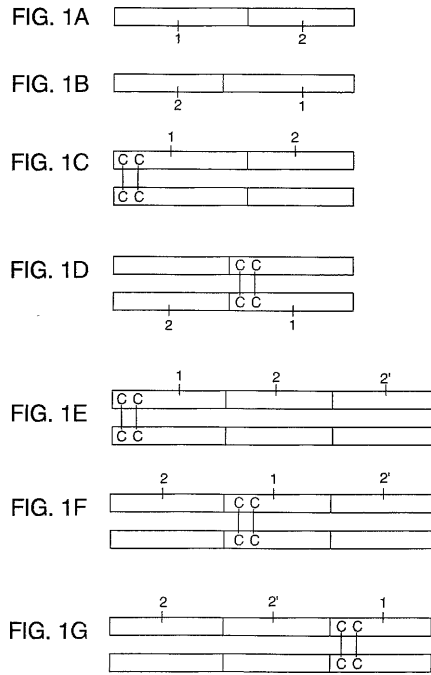
<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:oligodeoxynucleotide that may be used as
 an adjuvant

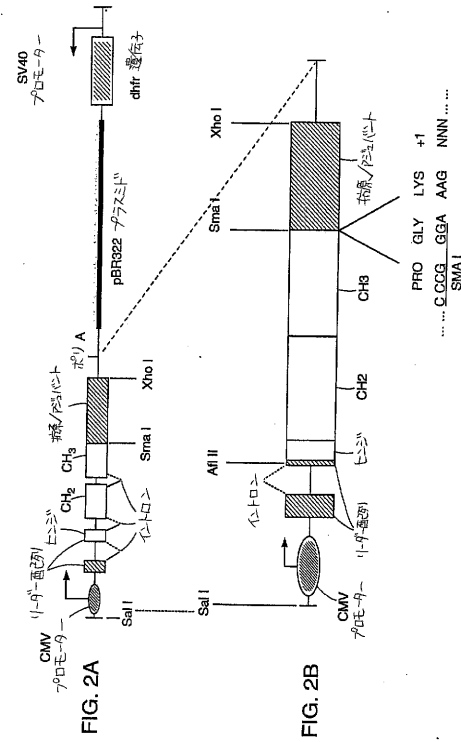
<400> 22
 tccatgacgt tctgacgtt 20

40

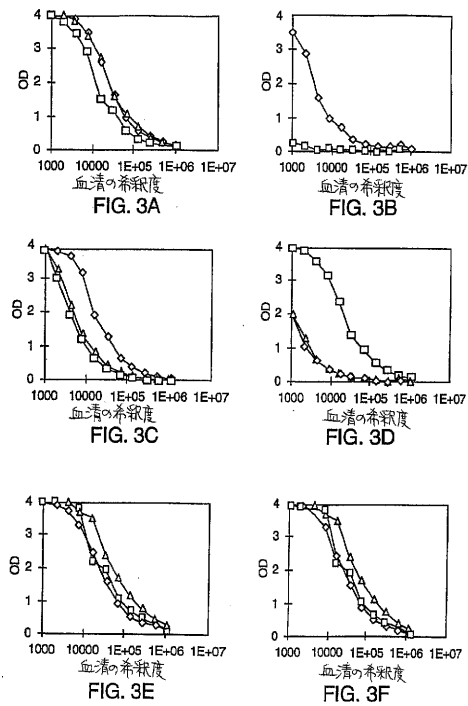
【図 1】



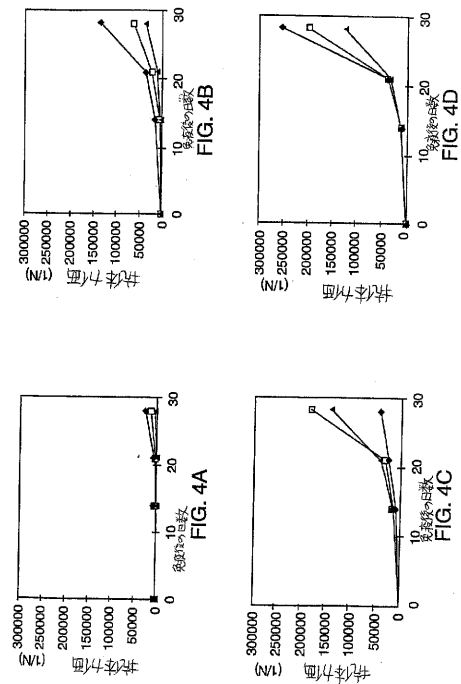
【図 2】



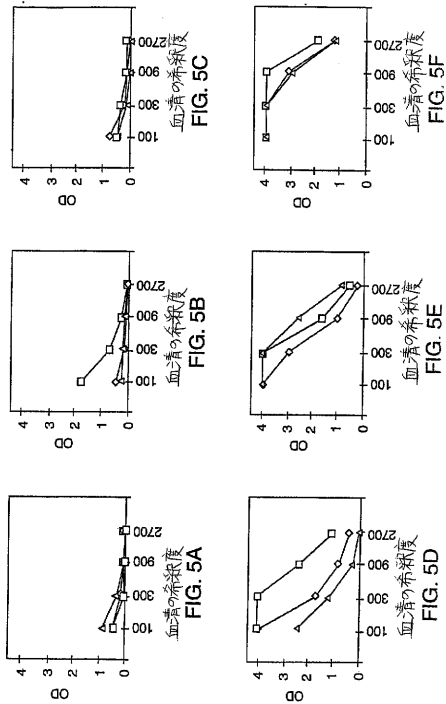
【図 3】



【図 4】



【図5】



【図6】

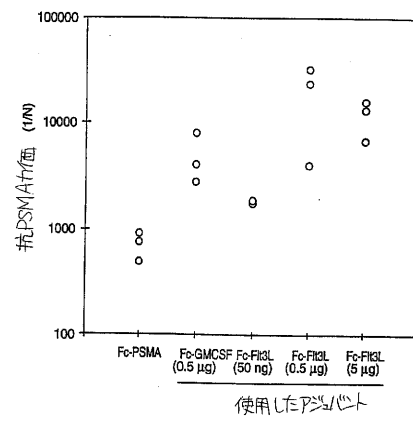


FIG. 6

【図7】

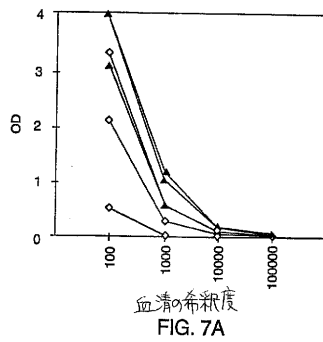


FIG. 7A

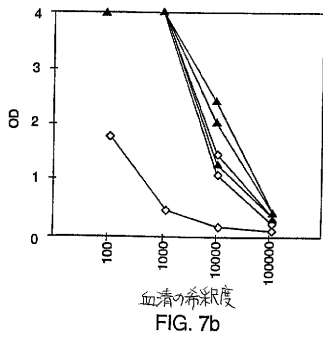


FIG. 7b

【図8】

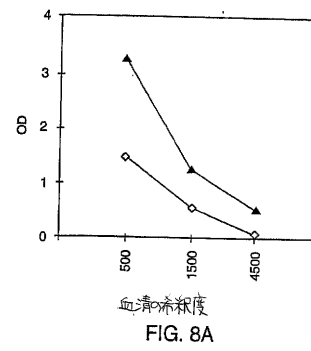


FIG. 8A

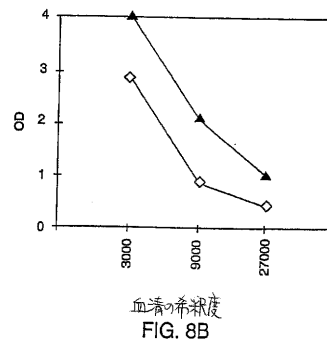


FIG. 8B

【図 9】

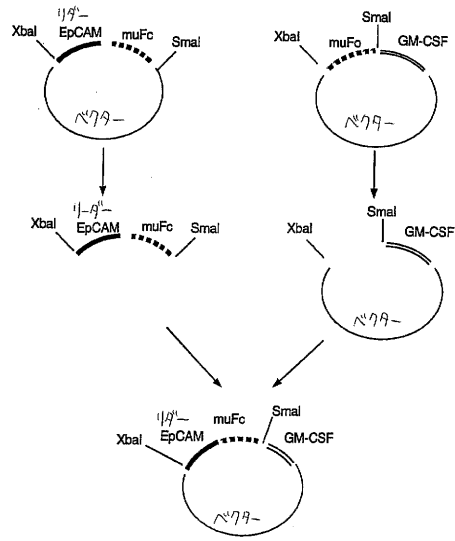
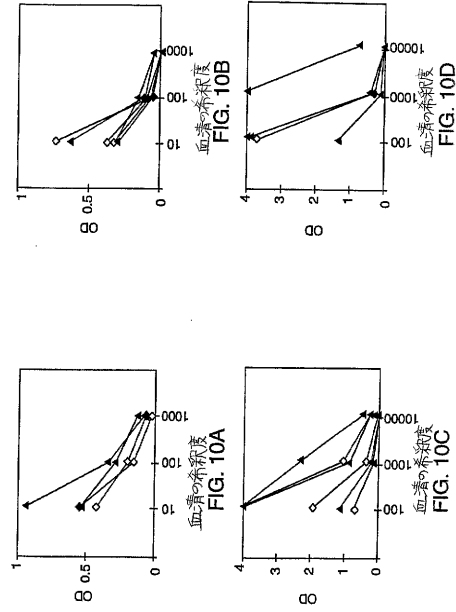


FIG. 9

【図 10】



【図 11】

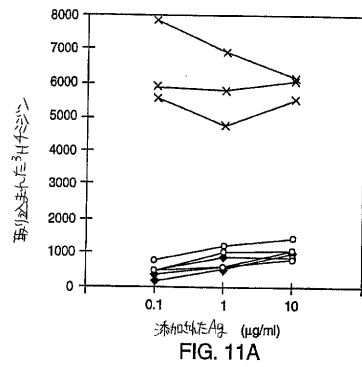


FIG. 11A

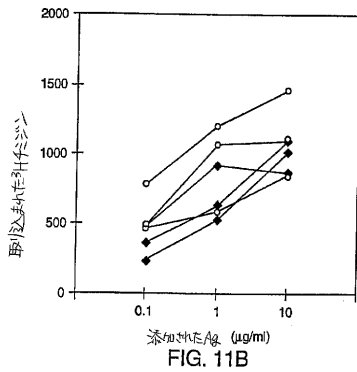


FIG. 11B

【図 12】

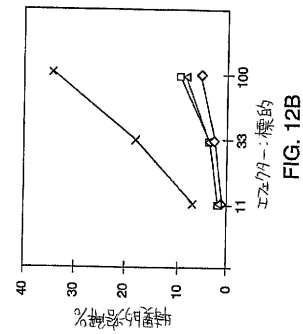


FIG. 12B

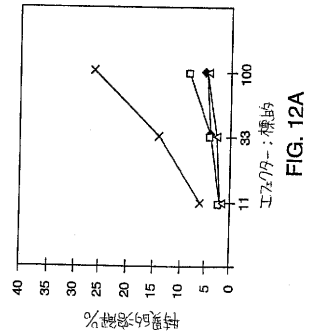


FIG. 12A

【図 13】

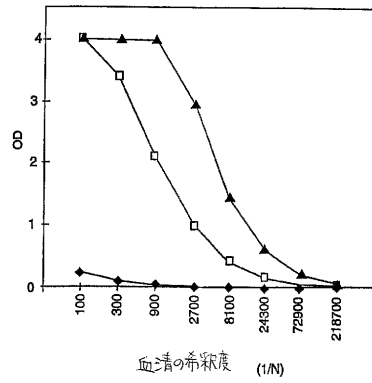


FIG. 13

【図 14】

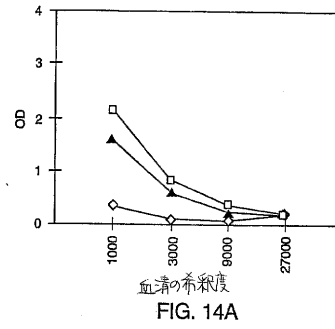


FIG. 14A

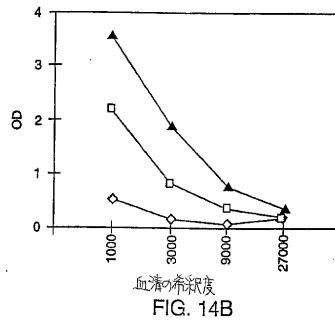


FIG. 14B

フロントページの続き

- (74)代理人 100082005
弁理士 熊倉 禎男
- (74)代理人 100084009
弁理士 小川 信夫
- (74)代理人 100084663
弁理士 箱田 篤
- (74)代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治
- (74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫
- (74)代理人 100137626
弁理士 田代 玄
- (72)発明者 ジリス, ステファン ディー .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01741, カーリスル, サンセット ロード 159
- (72)発明者 ロ, キン ミン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02420, レキシントン, キャロン レーン 6
- (72)発明者 ウェソロウスキー, ジョン エス. ジュニア
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02189, ウェイマウス, リバーティ ベル サークル 97

審査官 菊池 美香

- (56)参考文献 特表平10-506265(JP,A)
国際公開第97/028816(WO,A1)
特表平04-506663(JP,A)
Protein Engineering, 1998年, Vol.11, No.6, p.495-500

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/39
A61K 39/00
A61K 39/12
A61P 37/04
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	FC融合蛋白用于增强蛋白质抗原和肽抗原的免疫原性		
公开(公告)号	JP4764585B2	公开(公告)日	2011-09-07
申请号	JP2001511964	申请日	2000-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	利思进药品公司		
申请(专利权)人(译)	Rekishijen医药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	ジリースステファンディー ロキンミン ウェソロウスキージョンエスジュニア		
发明人	ジリース, ステファン ディー. ロ, キン ミン ウェソロウスキー, ジョン エス. ジュニア		
IPC分类号	A61K39/39 A61K39/00 A61K39/12 A61P37/04 A61K38/16 A61K39/21 A61K39/385 C07K14/16 C07K14/475 C07K14/52 C07K14/535 C07K14/705 C07K19/00 C12N15/62 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/12 A61K39/21 A61K39/385 A61K2039/53 A61K2039/54 A61K2039/545 A61K2039/55522 A61K2039/55533 A61K2039/55566 A61K2039/6056 C07K14/005 C07K14/475 C07K14/52 C07K14/535 C07K14/705 C07K19/00 C07K2319/00 C07K2319/02 C07K2319/40 C07K2319/75 C12N15/62 C12N2740/16122 C12N2740/16134 Y10S930/141		
FI分类号	A61K39/39 A61K39/00.Z A61K39/12 A61P37/04		
代理人(译)	小川伸男 山崎 一夫		
审查员(译)	菊地美香		
优先权	60/144965 1999-07-21 US		
其他公开文献	JP2003505431A JP2003505431A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文公开了用于增强哺乳动物中预选蛋白质或肽抗原的免疫原性的方法和组合物。通过将预先选择的抗原与免疫球蛋白重链恒定区融合以产生Fc-抗原融合蛋白来增强免疫原性。Fc-抗原融合蛋白结合抗原呈递细胞表面上的Fc受体，从而将抗原靶向哺乳动物中的抗原呈递细胞。另外，公开了佐剂家族，例如Fc-佐剂融合蛋白，其与Fc-抗原融合蛋白组合使用以增强或调节针对预选抗原的特定免疫应答。

表1

処置群	転移スコア	平均肺重量 (mg)
コントロール	4, 4, 4, 1, 1,	412+/-130
EpCAM-Fc	0, 0, 0, 0, 0	210+/-21
EpCAM-Fc+Fc-GM	0, 0, 0, 0, 0	240+/-19
EpCAM-Fc+Fc-IL2	0, 0, 0, 0, 0	230+/-19