

(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2007-511534**(P2007-511534A)**(43) 公表日 **平成19年5月10日(2007.5.10)**

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/00	H	4 B O 2 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00		4 C O 8 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	Z N A A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2006-539955 (P2006-539955) (86) (22) 出願日 平成16年11月15日 (2004.11.15) (85) 翻訳文提出日 平成18年7月10日 (2006.7.10) (86) 国際出願番号 PCT/US2004/038022 (87) 国際公開番号 W02005/048943 (87) 国際公開日 平成17年6月2日 (2005.6.2) (31) 優先権主張番号 60/519,498 (32) 優先日 平成15年11月13日 (2003.11.13) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 500544004 スローン-ケッタリング インスティトゥ ート フォー カンサー リサーチ アメリカ合衆国 ニューヨーク州 100 21 ニューヨーク ヨーク アヴェニュー 1275 (74) 代理人 100073184 弁理士 柳田 征史 (74) 代理人 100090468 弁理士 佐久間 剛 (72) 発明者 グレガー, ポリー アメリカ合衆国 ニューヨーク州 100 25 ニューヨーク リヴァーサイド ド ライヴ 400 アpartment 6ディ ー 最終頁に続く
--	--

(54) 【発明の名称】 抗腫瘍免疫の相乗的誘導のための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、腫瘍関連抗原をコードするワクチンと腫瘍内皮マーカー8 (TEM8) をコードするワクチンとの相乗効果について開示する。それらワクチンの併用によって強力な抗腫瘍免疫が誘導された。このアプローチを用いて、脈管構造によって支持されかつ腫瘍関連抗原が特定されている腫瘍を治療することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (i) 腫瘍関連抗原またはその断片をコードする核酸配列を含むベクター；
- (ii) 腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片をコードする核酸配列を含むベクター；および
- (iii) 医薬的に許容されるキャリア；を含有するワクチン組成物。

【請求項 2】

前記腫瘍関連抗原が、HER2/neu、チロシナーゼ関連タンパク 1 (gp75)、チロシナーゼ関連タンパク 2 (TRP-2) および前立腺特異膜抗原より成る群から選択されることを特徴とする請求項 1 記載の組成物。

10

【請求項 3】

前記腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片をコードする核酸配列が、マウスまたはヒト由来のものであることを特徴とする請求項 1 記載の組成物。

【請求項 4】

マウス由来の腫瘍内皮マーカー 8 が、配列番号 1 の核酸配列を有することを特徴とする請求項 3 記載の組成物。

【請求項 5】

前記腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片をコードする核酸配列が、配列番号 2 または 3 の配列を有する腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片をコードすることを特徴とする請求項 4 記載の組成物。

20

【請求項 6】

ヒト由来の腫瘍内皮マーカー 8 が、配列番号 4 の核酸配列を有することを特徴とする請求項 3 記載の組成物。

【請求項 7】

前記腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片をコードする核酸配列が、配列番号 5 または 3 の配列を有する腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片をコードすることを特徴とする請求項 6 記載の組成物。

【請求項 8】

前記腫瘍内皮マーカー 8 が、配列番号 2、3 または 5 の配列に対して少なくとも 80% 相同であるアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 3 記載の組成物。

30

【請求項 9】

前記腫瘍内皮マーカー 8 が、配列番号 2、3 または 5 の配列に対して少なくとも 90% 相同であるアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 3 記載の組成物。

【請求項 10】

前記ベクターがプラスミドであることを特徴とする請求項 1 記載の組成物。

【請求項 11】

- (i) 腫瘍関連抗原またはその断片をコードする核酸配列と腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片をコードする核酸配列とを含むベクター；および
- (ii) 医薬的に許容されるキャリア；を含有するワクチン組成物。

【請求項 12】

前記腫瘍関連抗原が、HER2/neu、チロシナーゼ関連タンパク 1 (gp75)、チロシナーゼ関連タンパク 2 (TRP-2) および前立腺特異膜抗原より成る群から選択されることを特徴とする請求項 11 記載の組成物。

40

【請求項 13】

前記腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片をコードする核酸配列が、マウスまたはヒト由来のものであることを特徴とする請求項 11 記載の組成物。

【請求項 14】

マウス由来の腫瘍内皮マーカー 8 が、配列番号 1 の核酸配列を有することを特徴とする請求項 13 記載の組成物。

【請求項 15】

50

前記腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片をコードする核酸配列が、配列番号 2 または 3 の配列を有する腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片をコードすることを特徴とする請求項 1 4 記載の組成物。

【請求項 1 6】

ヒト由来の腫瘍内皮マーカー 8 が、配列番号 4 の核酸配列を有することを特徴とする請求項 1 3 記載の組成物。

【請求項 1 7】

前記腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片をコードする核酸配列が、配列番号 5 または 3 の配列を有する腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片をコードすることを特徴とする請求項 1 6 記載の組成物。

10

【請求項 1 8】

前記腫瘍内皮マーカー 8 が、配列番号 2、3 または 5 の配列に対して少なくとも 80 % 相同であるアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 1 3 記載の組成物。

【請求項 1 9】

前記腫瘍内皮マーカー 8 が、配列番号 2、3 または 5 の配列に対して少なくとも 90 % 相同であるアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 1 3 記載の組成物。

【請求項 2 0】

前記ベクターがプラスミドであることを特徴とする請求項 1 1 記載の組成物。

【請求項 2 1】

個体に請求項 1 記載の組成物を投与する工程を含むことを特徴とする、個体において抗腫瘍免疫応答を誘導する方法。

20

【請求項 2 2】

前記組成物が、筋肉注射、皮内注射、皮下注射、鼻腔内スプレーおよび経口投与より成る群から選択される手段により投与されることを特徴とする請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

前記組成物中の 2 つのベクターが、同時にまたは連続して前記個体に投与されることを特徴とする請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 4】

前記組成物中のベクターが、リポソームおよび細菌より成る群から選択される送達手段によって運ばれることを特徴とする請求項 2 1 記載の方法。

30

【請求項 2 5】

前記個体が、癌を有するかまたは癌を発生する危険性を有すると診断されたものであることを特徴とする請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 6】

請求項 1 記載の組成物および該組成物中のベクターによりコードされるタンパク質より成る群から選択される核酸またはタンパク質を包含する樹状細胞を個体に投与する工程を含むことを特徴とする、個体において抗腫瘍免疫を誘導する方法。

【請求項 2 7】

前記個体が、癌を有するかまたは癌を発生する危険性を有すると診断されたものであることを特徴とする請求項 2 6 記載の方法。

40

【請求項 2 8】

請求項 1 1 記載の組成物を個体に投与する工程を含むことを特徴とする、個体において抗腫瘍免疫を誘導する方法。

【請求項 2 9】

前記組成物が、筋肉注射、皮内注射、皮下注射、鼻腔内スプレーおよび経口投与より成る群から選択される手段により投与されることを特徴とする請求項 2 8 記載の方法。

【請求項 3 0】

前記組成物中のベクターが、リポソームおよび細菌より成る群から選択される送達手段によって運ばれることを特徴とする請求項 2 8 記載の方法。

【請求項 3 1】

50

前記個体が、癌を有するかまたは癌を発生する危険性を有すると診断されたものであることを特徴とする請求項 28 記載の方法。

【請求項 32】

請求項 11 記載の組成物および該組成物中のベクターによりコードされるタンパク質より成る群から選択される核酸またはタンパク質でパルスされるかまたはそれらを発現するように誘導された樹状細胞を個体に投与する工程を含むことを特徴とする、個体において抗腫瘍免疫を誘導する方法。

【請求項 33】

前記個体が、癌を有するかまたは癌を発生する危険性を有すると診断されたものであることを特徴とする請求項 32 記載の方法。

10

【請求項 34】

- (a) 腫瘍関連抗原またはその断片をコードする核酸配列を含むベクター；
- (b) 腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片を含む組換えタンパク質；および
- (c) 医薬的に許容されるキャリア；を含有するワクチン組成物。

【請求項 35】

前記腫瘍関連抗原が、HER2/neu、チロシナーゼ関連タンパク 1 (gp75)、チロシナーゼ関連タンパク 2 (TRP-2) および前立腺特異膜抗原より成る群から選択されることを特徴とする請求項 34 記載の組成物。

【請求項 36】

前記腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片を含む組換えタンパク質が、マウスまたはヒト由来のものであることを特徴とする請求項 34 記載の組成物。

20

【請求項 37】

マウス由来の腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片が、配列番号 2 または 3 のアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 36 記載の組成物。

【請求項 38】

前記アミノ酸配列が、配列番号 1 の核酸によってコードされることを特徴とする請求項 37 記載の組成物。

【請求項 39】

ヒト由来の腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片が、配列番号 5 または 3 のアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 36 記載の組成物。

30

【請求項 40】

前記アミノ酸配列が、配列番号 4 の核酸によってコードされることを特徴とする請求項 39 記載の組成物。

【請求項 41】

前記腫瘍内皮マーカー 8 が、配列番号 2、3 または 5 の配列に対して少なくとも 80% 相同であるアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 36 記載の組成物。

【請求項 42】

前記腫瘍内皮マーカー 8 が、配列番号 2、3 または 5 の配列に対して少なくとも 90% 相同であるアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 36 記載の組成物。

【請求項 43】

40

前記ベクターがプラスミドであることを特徴とする請求項 34 記載の組成物。

【請求項 44】

個体に請求項 34 記載の組成物を投与する工程を含むことを特徴とする、個体において抗腫瘍免疫応答を誘導する方法。

【請求項 45】

前記組成物が、筋肉注射、皮内注射、皮下注射、鼻腔内スプレーおよび経口投与より成る群から選択される手段により投与されることを特徴とする請求項 44 記載の方法。

【請求項 46】

前記組成物中のベクターと組換えタンパク質とが、同時にまたは連続して前記個体に投与されることを特徴とする請求項 44 記載の方法。

50

【請求項 47】

前記組成物中のベクターが、リボソームおよび細菌より成る群から選択される送達手段によって運ばれることを特徴とする請求項 44 記載の方法。

【請求項 48】

前記個体が、癌を有するかまたは癌を発生する危険性を有すると診断されたものであることを特徴とする請求項 44 記載の方法。

【請求項 49】

腫瘍関連抗原またはその断片を含む組換えタンパク質；
腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片を含む組換えタンパク質；および
医薬的に許容されるキャリア；を含有するワクチン組成物。

10

【請求項 50】

前記腫瘍関連抗原が、HER2/neu、チロシナーゼ関連タンパク 1 (gp75)、チロシナーゼ関連タンパク 2 (TRP-2) および前立腺特異膜抗原より成る群から選択されることを特徴とする請求項 49 記載の組成物。

【請求項 51】

前記腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片を含む組換えタンパク質が、マウスまたはヒト由来のものであることを特徴とする請求項 49 記載の組成物。

【請求項 52】

マウス由来の腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片が、配列番号 2 または 3 のアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 51 記載の組成物。

20

【請求項 53】

前記アミノ酸配列が、配列番号 1 の核酸によってコードされることを特徴とする請求項 52 記載の組成物。

【請求項 54】

ヒト由来の腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片が、配列番号 5 または 3 のアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 51 記載の組成物。

【請求項 55】

前記アミノ酸配列が、配列番号 4 の核酸によってコードされることを特徴とする請求項 54 記載の組成物。

【請求項 56】

前記腫瘍内皮マーカー 8 が、配列番号 2、3 または 5 の配列に対して少なくとも 80% 相同であるアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 51 記載の組成物。

30

【請求項 57】

前記腫瘍内皮マーカー 8 が、配列番号 2、3 または 5 の配列に対して少なくとも 90% 相同であるアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 51 記載の組成物。

【請求項 58】

個体に請求項 49 記載の組成物を投与する工程を含むことを特徴とする、個体において腫瘍免疫応答を誘導する方法。

【請求項 59】

前記組成物が、筋肉注射、皮内注射、皮下注射、鼻腔内スプレーおよび経口投与より成る群から選択される手段により投与されることを特徴とする請求項 58 記載の方法。

40

【請求項 60】

前記組成物中の組換えタンパク質が、同時にまたは連続して前記個体に投与されることを特徴とする請求項 58 記載の方法。

【請求項 61】

前記個体が、癌を有するかまたは癌を発生する危険性を有すると診断されたものであることを特徴とする請求項 58 記載の方法。

【請求項 62】

腫瘍関連抗原またはその断片を含む組換えタンパク質；
腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片をコードする核酸配列を含むベクター；および

50

医薬的に許容されるキャリア；を含有するワクチン組成物。

【請求項 6 3】

前記腫瘍関連抗原が、HER2/neu、チロシナーゼ関連タンパク 1（gp75）、チロシナーゼ関連タンパク 2（TRP-2）および前立腺特異膜抗原より成る群から選択されることを特徴とする請求項 6 2 記載の組成物。

【請求項 6 4】

前記腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片をコードする核酸配列が、マウスまたはヒト由来のものであることを特徴とする請求項 6 2 記載の組成物。

【請求項 6 5】

マウス由来の腫瘍内皮マーカー 8 が、配列番号 1 の核酸配列を有することを特徴とする請求項 6 4 記載の組成物。 10

【請求項 6 6】

前記腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片をコードする核酸配列が、配列番号 2 または 3 の配列を有する腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片をコードすることを特徴とする請求項 6 5 記載の組成物。

【請求項 6 7】

ヒト由来の腫瘍内皮マーカー 8 が、配列番号 4 の核酸配列を有することを特徴とする請求項 6 4 記載の組成物。

【請求項 6 8】

前記腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片をコードする核酸配列が、配列番号 5 または 3 の配列を有する腫瘍内皮マーカー 8 またはその断片をコードすることを特徴とする請求項 6 7 記載の組成物。 20

【請求項 6 9】

前記腫瘍内皮マーカー 8 が、配列番号 2、3 または 5 の配列に対して少なくとも 80% 相同であるアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 6 4 記載の組成物。

【請求項 7 0】

前記腫瘍内皮マーカー 8 が、配列番号 2、3 または 5 の配列に対して少なくとも 90% 相同であるアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 6 4 記載の組成物。

【請求項 7 1】

前記ベクターがプラスミドであることを特徴とする請求項 6 2 記載の組成物。 30

【請求項 7 2】

個体に請求項 6 2 記載の組成物を投与する工程を含むことを特徴とする、個体において抗腫瘍免疫応答を誘導する方法。

【請求項 7 3】

前記組成物が、筋肉注射、皮内注射、皮下注射、鼻腔内スプレーおよび経口投与より成る群から選択される手段により投与されることを特徴とする請求項 7 2 記載の方法。

【請求項 7 4】

前記組成物中のベクターと組換えタンパク質とが、同時にまたは連続して前記個体に投与されることを特徴とする請求項 7 2 記載の方法。

【請求項 7 5】

前記組成物中のベクターが、リポソームおよび細菌より成る群から選択される送達手段によって運ばれることを特徴とする請求項 7 2 記載の方法。 40

【請求項 7 6】

前記個体が、癌を有するかまたは癌を発生する危険性を有すると診断されたものであることを特徴とする請求項 7 2 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は概して、抗腫瘍免疫の分野に関する。より詳細には、本発明は、腫瘍関連抗原および腫瘍内皮の両方をターゲティングすることによって抗腫瘍免疫応答を誘導する組成 50

物および方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

抗腫瘍遺伝子療法の試みの多くは実質的に、ワクチンによってもたらされるような永続的な全身免疫応答を確立することを狙った免疫学的アプローチに基づくものである。癌ワクチンへの関心は、ある患者における免疫原性腫瘍関連抗原に対するB細胞およびT細胞免疫応答の存在によって示されるように、免疫原性腫瘍関連抗原が存在することが明らかになったときに再燃した。

【0003】

周知の腫瘍関連抗原の1つは、HER2/neu癌遺伝子産物である膜貫通タンパク質p185である。p185タンパク質は、細胞増殖ならびに発癌に関連するチロシンキナーゼ受容体である。例えば、乳癌、卵巣癌、子宮癌、胃癌、前立腺癌および肺癌のような多くのヒト癌において、p185の過剰発現が観察されている。p185の細胞外ドメインをコードするDNA配列がプラスミドに挿入され、最近、臨床免疫療法において用いられている。 10

【0004】

それにも関わらず、ほんの僅かな腫瘍抗原のみが免疫療法ターゲットとして選択され、いくつかの重要な試みにも関わらず、遺伝子療法はまだ想定される臨床結果をもたらしていない。成功しないことの理由の1つは、単一の治療ターゲットを使用することにより、それでは癌の発生を効果的に停止させることができないと思われる。腫瘍細胞は遺伝学的に不安定であることが分かっており、そのことは、高い突然変異率によって腫瘍発生が達成されることを意味する。結果として、ある抗原に対して誘起された免疫応答は、突然変異が生じた場合は最早有効ではなく、免疫系はその抗原の変異体を認識できない。それらの問題を克服するために、多くのエピトープを同じワクチンにおいて組み合わせるかまたは複数のターゲットを標的とする、新しい世代のワクチンが現在開発されている。 20

【0005】

微小転移を越えた固形腫瘍の増殖は、独立した血液供給の形成を必要とする。腫瘍脈管構造への宿主内皮の補充が、腫瘍の進行および転移に重要な役割を果たすと考えられている。この理由で、腫瘍脈管構造で発現される分子は、化学療法および免疫療法のターゲットとして開発されている。

【0006】

生理的および病理的状态に関連する血管新生は、部分的に重複する一連の分子を利用する。例えば、胚形成、黄体および創傷治癒のような生理的新血管形成において、血管新生分子および抗血管新生分子がアクセサリ細胞によって遊離される。それら因子は、内皮細胞の遊走および増殖、それらの形態形成（毛細血管）分化および同時に生じる間質マトリックスのリモデリングを制御する。それら過程は生理的状态においてきちんと調節されているが、永続的な自由な(deregulated)血管新生が癌ならびに他の疾患において観察される。しかしながら、内皮細胞それ自体は変わらず、従って、腫瘍細胞よりも調節しやすい。腫瘍の脈管構造を攻撃することによる腫瘍増殖の阻害は、抗血管新生への介入のための主要なターゲットを提供する。実際、エンドスタチン、アンギオスタチン、VEGFアンタゴニストおよび多くの他の新世代血管新生阻害剤を用いて開発された前臨床動物モデルが、この概念の指針となる原理を十分に実証し、臨床試験を実現した。しかしながら、前臨床試験においてこれら薬剤によって示されたかなりの裏づけにも関わらず、腫瘍細胞を標的とする標準的細胞減少療法と比較したときに、有意な永続的臨床反応は観察されなかった。 40

【0007】

異種（ヒト）内皮細胞（HUVEC）から成るワクチンがマウスモデルにおいて抗腫瘍免疫を誘導することが報告された（Wey et al., 2000）。より最近では、乳癌のトランスジェニック（HER-2/neu+）マウスモデルにおいて、ヒト臍帯静脈内皮細胞ワクチンが評価された。異種ヒト臍帯静脈内皮細胞とHER-2/neu+ DNAワクチンとを組合せて、筋肉注射によってHER-2/neu+トランスジェニックマウスを免疫した。これら実験において、個々の免疫学的 50

刺激は、限られた腫瘍防御を示すか(neu DNAワクチン)、または全く示さなかった(ヒト臍帯静脈内皮細胞)が、組合せて投与されたマウスは、攻撃的な乳癌から防御された。このような乳癌発癌の防御は、癌細胞と腫瘍内皮の両方に対する免疫応答を組み合わせることが、腫瘍ワクチンの設計における重要な進歩となるという原理の証拠を示す。

【0008】

最近、Carson-Walterら(2001)は、腫瘍関連内皮において特異的に上昇する腫瘍内皮マーカー(TEM)と称される少なくとも46の転写物の存在を開示する。腫瘍内皮マーカーとして、インテグリン、別の増殖因子受容体、ならびに下流シグナリング事象に関連する他の分子が挙げられる。腫瘍内皮マーカーは、ヒトおよびマウスの両方で腫瘍の脈管構造において明らかに検出できる。

10

【0009】

TEM8の発現パターンは、その遺伝子が腫瘍血管新生に非常に特異的であり正常な成体の血管新生に必要とされないことを示唆することから、特に興味深い。ヒトおよびマウスのTEM8タンパク質は共に、少なくとも7つの潜在的リン酸化部位を共有する大きな細胞質テイル(large cytoplasmic tail)を有し、TME8が細胞への細胞外シグナルの伝達に関連するという仮説を支持する。

【0010】

ヒト患者をマウス内皮細胞株で免疫することは理論的には可能であるが、法的理由から、臨床品質のワクチンにおいてヒト臍帯静脈内皮細胞を代用する個々の分子を同定することがより現実的である。異種ヒト臍帯静脈内皮細胞に代わる1つの非常に見込みのある選択は、HER-2/neuのような腫瘍特異的DNAワクチンの抗腫瘍効果を増強するために腫瘍内皮マーカー8(TEM8)抗原を使用することである。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

腫瘍関連抗原または腫瘍血管新生に関連する分子をターゲティングすることによって個々に誘導される抗腫瘍免疫を増強するアプローチが必要とされており、先行技術において欠けている。本発明は、同一ワクチンにおいて腫瘍関連抗原とTEM8分子の両方をターゲティングする組成物および方法を提供することによって、当業界におけるこの長年の要求および要望を満たす。

30

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、腫瘍内皮マーカー8遺伝子(TEM8)の産物が、免疫原として用いられたときに腫瘍関連抗原に対する免疫応答を高めることができ、それによって効果的でかつ長期間持続する腫瘍発生の免疫防御をもたらすことができるという驚くべき発見を報告する。

【0013】

腫瘍内皮マーカー8(TEM8)は、腫瘍の新生脈管構造、胎児の肝臓および脳において発現されるが、正常な成体組織では発現されない。炭疽毒素受容体(ATR)は、TEM8のスプライス変異体であり、細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインに亘るアミノ酸配列において一致する。

40

【0014】

最初の免疫実験は、乳癌のトランスジェニックマウスモデルにおいてTEM8/ATRexおよびHER2/neuの細胞外ドメインを用いて実施した。ラットneuプロト癌遺伝子の遺伝子を導入したマウスを、TEM8/ATRexをコードするDNA 100mgおよびラットneuの細胞外ドメインをコードするDNAで、隔週の間隔で3回筋肉注射によって免疫した。FVB/neuマウス系統に由来する同系腫瘍株をマウスに攻撃接種した。この実験で、TEM8/ATRex単独で免疫したマウスは腫瘍増殖に対して全く防御を示さなかったが、HER2 neuでの免疫は部分的な防御をもたらした。一方、HER2/neu+TEM8での免疫は、65日間に亘りほぼ完全な防御をもたらした(図4)。

【0015】

50

TEM8ワクチンの効果が広範囲の腫瘍に対する免疫を高めることを示すために、TEM8+ヒトチロシナーゼ関連タンパク1 (hgp75) (メラノーマ分化抗原) でマウスを免疫した。最初の実験では、粒子射撃法により4mg (腹部の各四分区間のそれぞれに1mgずつ) のpINGTEM8 DNAを全てのマウスに週1回ずつ5回注射した。毎週、pINGTEM8 DNA注射の3日後、粒子射撃法により4mg (腹部の各四分区間のそれぞれに1mgずつ) のhgp75 DNAでマウスを免疫した。最後のhgp75 DNA注射の5日後、免疫マウスにB16腫瘍細胞を皮内に攻撃接種した。少なくとも2週間の間、2-3日ごとに腫瘍をキャリパーで計測した。

【0016】

HER2/neuで免疫しFVB/neu腫瘍を攻撃接種した場合のように、pINGTEM8 ワクチン接種単独ではB16腫瘍増殖に全く影響を及ぼさなかった。図5に示すように、腫瘍の攻撃接種後40日目、hgp75免疫単独では57%の腫瘍防御をもたらしたが、hgp75+pINGTEM8は、87%腫瘍無し生存(tumor free survival)を示した。従って、その効果は相乗的であり、付加的なものではない。

【0017】

さらに、本発明者は、hgp75により誘導される免疫がTEM8に依存するか否かも調べた。図6に示すように、TEM8 DNA、PSMA DNAのいずれか単独、またはPSMA DNAとhgp75 DNAの両方のいずれで免疫しても、B16腫瘍に対する免疫をもたらさなかった。しかしながら、TEM8 DNAとhgp75 DNAの両方で免疫すると、B16腫瘍に対して最大の防御をもたらした。このことは、hgp75により誘導される免疫がTEM8に依存することを示した。さらには、図7に示すように、抗腫瘍効果の誘導におけるTEM8とhgp75との相乗的效果は、CD8+T細胞を欠くマウスでは完全に失われた。このことは、CD8+T細胞がTEM8により誘導される免疫を媒介することを示す。さらに、図8に示すように、TEM8はB16メラノーマの外科的切除モデルにおいても腫瘍免疫を高めることが観察された。

【0018】

本発明の目的は、癌の予防的または治療的処置のために同時にまたは別個にまたは連続して用いられる、腫瘍関連抗原およびTEM8遺伝子産物あるいはそれらの免疫原性断片または誘導体をコードする核酸分子を含有する調製物を提供することである。脈管構造によって支持され、さらに例えば分化抗原のような腫瘍関連抗原が特定されている、任意の腫瘍をこのアプローチで処置することができる。

【0019】

本発明は、ワクチンとして有用な組成物、およびその組成物を用いて抗腫瘍免疫を誘導する方法に関する。本発明の1つの実施形態では、ワクチンとして有用な組成物を提供する。その組成物は、腫瘍関連抗原またはその断片をコードする核酸配列を含むベクター、腫瘍内皮マーカ-8またはその断片をコードする核酸配列を含むベクター、および医薬的に許容されるキャリアを含有する。

【0020】

本発明の別の実施形態では、ワクチンとして有用な関連組成物を提供する。その組成物は、腫瘍関連抗原またはその断片をコードする核酸と腫瘍内皮マーカ-8またはその断片をコードする核酸配列とを含むベクター、および医薬的に許容されるキャリアを含有する。

【0021】

本発明のさらに別の実施形態では、ワクチンとして有用な別の関連組成物を提供する。その組成物は、腫瘍関連抗原またはその断片をコードする核酸配列を含むベクター、腫瘍内皮マーカ-8またはその断片を含む組換えタンパク質、および医薬的に許容されるキャリアを含有する。

【0022】

本発明のさらに別の実施形態では、ワクチンとして有用な別の関連組成物を提供する。その組成物は、腫瘍関連抗原またはその断片を含む組換えタンパク質、腫瘍内皮マーカ-8またはその断片を含む組換えタンパク質、および医薬的に許容されるキャリアを含有する。

10

20

30

40

50

【0023】

本発明のさらに別の実施形態では、ワクチンとして有用な別の関連組成物を提供する。その組成物は、腫瘍関連抗原またはその断片を含む組換えタンパク質、腫瘍内皮マーカー8またはその断片をコードする核酸配列を含むベクター、および医薬的に許容されるキャリアを含む。

【0024】

さらには、本発明の他の実施形態において、それらワクチン組成物を用いてヒトにおいて抗腫瘍免疫を誘導する方法を提供する。

【0025】

本発明の他のおよび追加の態様、特徴および利点は、以下の本発明の現在好ましい実施形態の記載から明らかであろう。それら実施形態は、開示目的で記載されている。 10

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

本明細書で用いられている「抗原」または「免疫原」は、免疫応答を誘起できるかまたは誘起される免疫応答のターゲットとなり得る分子である。

【0027】

本明細書で用いられている「腫瘍抗原」または「腫瘍関連抗原」は、腫瘍に関連するタンパク質、あるいは癌細胞内またはその表面に発現されるタンパク質であって、MHC分子と関連して抗原提示細胞の表面に提示されるかあるいはその細胞表面上に無傷のタンパク質として提示されたときに免疫応答を誘起できるものである。腫瘍関連タンパク質は、共有抗原(shared antigen) (正常細胞にも存在する抗原)、ウイルス抗原、分化抗原、あるいは、B細胞および／またはT細胞免疫応答を誘導することができる突然変異抗原であってもよい。抗原は、癌細胞の粗抽出物を調製することによって、組換え技術により抗原を部分的に精製することによって、あるいは公知抗原のde novo合成によって、調製することができる。腫瘍関連抗原として、限定はされないが、ペプチド、ポリペプチド、多糖、複合多糖、脂質および糖脂質などが挙げられる。腫瘍細胞または腫瘍細胞抽出物を腫瘍関連抗原調製物として用いてもよい。 20

【0028】

「癌を発生する危険性を有するヒト」は、(i) 例えばタバコ、アスベストまたは他の化学毒素、ウイルス、または放射線のような発癌物質への環境曝露に曝されたヒト；(ii) 既に癌の治療を受けていてさらに低いまたは検出できない全身腫瘍組織量を有するが、再発を統計的に見積もることができる対象；(iii) その遺伝子的疾病素質、病状または以前の処置、ウイルス感染、あるいは癌を発生する高い可能性との関連性が実証されている遺伝形質に基づき、癌を発生する高い確率を有するヒトである。 30

【0029】

「癌を有するヒト」は、検出可能な癌細胞を有するヒトである。癌または腫瘍は、限定はされないが、例えば、胆道癌、脳腫瘍、乳癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸癌、子宮内膜癌、食道癌、胃癌、上皮内新生物、リンパ腫、肝癌、肺癌（小細胞および非小細胞）、メラノーマ（黒色腫）、神経芽細胞腫、口腔癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、直腸癌、肉腫、皮膚癌、膀胱癌、甲状腺癌、腎癌、ならびに他の癌および肉腫を含む。 40

【0030】

理想的な癌治療薬は、体の複数の部位で全身腫瘍をターゲティングするのに十分な親和性および特異性を有するが、一方で、新生物細胞と非新生物細胞とを識別する必要がある。これに関して、抗原特異的癌免疫療法および腫瘍新生脈管構造の免疫ターゲティングは、癌の予防および治療のための2つの魅力的な戦略を表す。本発明は、それら2つの抗腫瘍免疫誘導の戦略を組み合わせ、結果として予想外の相乗的応答をもたらす新規なアプローチを開示する。

【0031】

腫瘍内皮マーカー8 (TEM8) は、正常および新生物ヒト結腸における内皮細胞の差別的発現スクリーニングによって同定された(Carson-Walter et al., 2001)。TEM8転写物は、 50

腫瘍脈管構造を裏打ちする内皮細胞において差別的におよび豊富に発現される。マウスの対応物は96%同一であり、in situ PCRで示されるように、自然発生マウスメラノーマB16において高発現される。マウス由来のTEM8の核酸配列は配列番号1の配列を有するが、一方、ヒトTEM8の核酸配列は配列番号4の配列を有する。マウスTEM8核酸は、Iドメイン（接着モチーフ）を有する561アミノ酸（配列番号2）のI型膜貫通タンパク質をコードする。一方、ヒトTEM8は、564アミノ酸（配列番号5）のタンパク質をコードする。TEM8の生理的機能は知られていない。TEM8の細胞外ドメインの部分は、インテグリンの細胞外ドメインにおいてよく見られるフォン・ヴィレブランド因子A型ドメインと高い相同性を共有する。

【0032】

10

興味深いことに、TEM8遺伝子の他のスプライス産物は、炭疽受容体（ATR）タンパク質を作り出し、それは、完全な細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインを含む最初の364アミノ酸に関してTEM8と一致し、その後、TEM8とは相違する4アミノ酸の後、終結する。炭疽毒素受容体タンパク質は、突然変異誘発物質により炭疽耐性にしたCHO細胞の単離および分析によって炭疽受容体として同定された(Bradley et al., 2001)。

【0033】

腫瘍脈管構造におけるその発現のために、研究者は、TEM8を、単独でまたは他の腫瘍関連抗原と組み合わせて、腫瘍免疫療法のためのターゲットとして調べた。本発明は、TEM8の細胞外ドメインをコードするDNAワクチンが、腫瘍において発現される分化マーカーをコードするDNAワクチンと組み合わせて用いられたときに、その後の腫瘍攻撃接種からマウスを防御することを示す。従って、腫瘍関連抗原とTEM8遺伝子産物とを1つのワクチンにおいて組み合わせることによって、強力な抗腫瘍免疫を誘導できる。

20

【0034】

本発明は、腫瘍関連抗原をコードする核酸配列とTEM8遺伝子産物をコードする核酸配列との組合せを提供する。例えばプラスミドまたは修飾ウイルスのような適切な発現ベクターに核酸配列を挿入することができ、それらベクターは、プロモーター、エンハンサー、シグナルまたはターゲット配列を含んでいてよく、それらの全てが対応ポリペプチドの発現および亜細胞局在化に適したものである。異なる抗原をコードする複数の配列を別個にまたは融合して、同じベクターに挿入してもよい。本発明はまた、腫瘍関連抗原とTEM8組換えタンパク質とをコードする核酸配列を含む組成物を提供する。

30

【0035】

本発明の好ましい実施形態では、組み合わせた活性成分をワクチンとして用いてもよい。ワクチン調製の原理および方法は、Paul, "Fundamental Immunology", Raven Press, New York (1989)またはCryz, S. J., "Immunotherapy and vaccines", VCH Verlagsgesellschaft (1991)に記載されているように、当業者に公知である。DNAワクチンは通常、CTLまたは抗体誘導エпитープを含む1以上の抗原をコードするプラスミドDNAから構成される(Wolff et al., 1990)。周知技術に従って、プラスミドを調製してワクチンとして用いることができる(Donnelly et al., 1994)。

【0036】

ワクチン組成物は通常、乳化剤、緩衝剤のような添加剤、および不完全フロイントアジュバント、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウムまたはミョウバンのようなアジュバントをさらに含む。ワクチン組成物はまた、例えば、免疫応答をさらに高めることができるGM-CSF、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18またはCD40Lのようなサイトカインを含んでいてよい。

40

【0037】

腫瘍抗原およびTEM8遺伝子産物、あるいはそれらの断片または誘導体のいずれか、あるいはそれらをコードする核酸分子、の組合せを含有する製剤を、癌を発生する危険性を有する対象の予防的治療において用いることができる。本発明の1つの実施形態では、製剤は、腫瘍抗原としてHER2プラスミドDNAを含有し、乳癌、子宮癌、前立腺癌、結腸癌、肺癌、頭部癌および頸部癌の予防または治療的処置において用いられる。別の実施形態にお

50

いて、製剤は、腫瘍抗原としてgp75プラスミドDNAまたはTRP-2プラスミドDNAを含有し、悪性黒色腫の治療に用いられる。当業界で周知である他の腫瘍関連抗原を本発明において同様に腫瘍関連抗原として用いてもよい。

【0038】

腫瘍関連抗原およびTEM8遺伝子産物は、別個のDNA分子によってコードされていてもよい。あるいは、腫瘍関連抗原およびTEM8遺伝子産物は、融合タンパク質またはポリシストロン性のポリペプチドとして構成されてもよい。さらには、TEM8の細胞外ドメインをワクチン組成物に配合できるのみならず、完全長TEM8配列をワクチンとして用いてもよい。

【0039】

DNAワクチンとして用いるプラスミドは、様々な非経口、粘膜および局所経路によって送達できる。例えば、筋肉内、皮内、皮下(PNAS 83:9551(1986); 国際公開第90/11092号)または他の経路によって、プラスミドDNAを注射できる。鼻腔内スプレーまた点滴剤、直腸用の座薬により、あるいは経口で投与してもよい。遺伝子銃(Johnston, 1992)またはバイオジェクター(Biojector)を用いて、表皮または粘膜表面に投与してもよい。プラスミドは、水溶液中に提供してもよく、金粒子上で乾燥させて提供してもよく、あるいは、限定はされないが、リポソーム、デンドラマー(dendramers)、蝸牛状物(cochleate)およびマイクロカプセル化等の別のDNA送達システムに関連させて提供してもよい。免疫系への送達手段(delivery vehicle)として作用するサルモネラ菌のような、細菌の修飾形態に遺伝子担持プラスミドを導入できることが最近発見された。形質転換された細菌は、経口によりまたは他の当業界で周知の手段により宿主に投与することができる。

10

20

【0040】

例えばmRNAのような核酸を、ワクチンとして用いられる自系樹状細胞に負荷させてもよい。樹状細胞が強力な抗原提示細胞であることは当業界で周知であり、さらに、抗原負荷樹状細胞による免疫応答を誘導する方法およびプロトコルも当業界で周知である。

【0041】

腫瘍抗原ワクチンおよびTEM8ワクチンは、同時に投与しても別個に投与してもよい。治療は、腫瘍診断の前、疾患が出現したとき、または腫瘍の外科的切除の直後のいずれに開始してもよい。様々な間隔で投与を繰返してもよく、患者の症状が改善する限り、組み合わせた活性成分の用量は当業界で周知であるプロトコルに基づき変化させることができる。

30

【0042】

いずれにしても、組み合わせた成分がペプチドであっても核酸であっても、それらは適切な薬剤組成物中に含まれるであろう。医薬組成物は、腫瘍抗原およびTEM8抗原の両方の効果量を含有し、その効果量はB細胞またはT細胞免疫応答を誘起できる量である。

【0043】

本発明は、ワクチンとして有用な物質の組成物に関する。その組成物は、腫瘍関連抗原(TAA)またはその断片をコードする核酸配列、および腫瘍内皮マーカー8(TEM8)またはその断片をコードする核酸配列を含有する。あるいは、その組成物は、腫瘍関連抗原またはその断片をコードする核酸配列、および腫瘍内皮マーカー8(TEM8)またはその断片を含む組換えタンパク質を含有する。さらには、その組成物は、腫瘍関連抗原またはその断片と腫瘍内皮マーカー8(TEM8)またはその断片とを含む組換えタンパク質を含有する。さらに、その組成物は、腫瘍関連抗原またはその断片を含む組換えタンパク質、および腫瘍内皮マーカー8(TEM8)またはその断片をコードする核酸配列を含有する。腫瘍関連抗原およびTEM8抗原をコードする配列は、異なるベクターに組み込んでも、あるいは単一のベクターに組み込んでもよい。腫瘍関連抗原の代表的例示として、HER2/neu、チロシナーゼ関連タンパク1(gp75)、チロシナーゼ関連タンパク2(TRP-2)、および任意の種由来の前立腺特異膜抗原が挙げられる。1つの実施形態において、TEM8タンパク質またはその断片は、マウスまたはヒト由来のものである。マウス由来TEM8は配列番号1の核酸配列を有し、その配列は、それぞれ配列番号2または3の配列を有するTEM8タンパク質またはその断片をコードする。ヒト由来のTEM8は配列番号4の核酸配列を有し、その配列は、それぞれ配列

40

50

番号5または3の配列を有するTEM8タンパク質またはその断片をコードする。さらには、当業者は、TEM8アミノ酸配列を操作して、配列番号2、3または5のいずれかに100%同一ではない有用なTEM8を作ることができることを容易に認識するであろう。例えば、当業者は、配列番号2、3または5の配列に80%または90%相同であるタンパク質が有用であることに気づくであろう。

【0044】

本発明はまた、本発明のワクチン組成物を用いて、例えばヒトのような対象において抗腫瘍免疫を誘導する方法に関する。通常、対象は、癌を有するか、または癌を発生する危険性を有する。ワクチン組成物のベクターは、例えば、リポソームまたは修飾細菌のような送達手段に担持させることができる。ワクチン組成物が別個のベクターを含有する場合、異なるベクターは、同時にまたは連続して対象に投与してよい。好ましくは、筋肉注射、皮内注射、皮下注射、鼻腔内スプレーまたは経口投与によりワクチンを投与する。あるいは、ワクチンまたはワクチンによってコードされるタンパク質を負荷した樹状細胞を用いて対象を免疫してもよい。

10

【0045】

以下の実施例は、本発明の様々な実施形態を説明する目的で記載されており、いずれの態様においても本発明を限定することを意図しない。それら実施例は、本明細書に記載されている方法、手順、処置、分子および特定化合物と共に、現在における好ましい実施形態の例示である。当業者は、本明細書に記載の目的、目標および利点、ならびに本来備わっている目的、目標および利点を達成するために、本発明をうまく適合させることを容易に行うであろう。当業者は、請求の範囲によって特定される本発明の精神に包含される変化および他の用途を考え付くであろう。

20

【実施例1】

【0046】

プラスミドDNA構築物

鋳型としてHindIIIで切断したpCDneuNT(Invitrogen)、および以下のプラーマー：センス5'-CGCAAGCTTCATCATGGAGCTGGC-3'（配列番号6）；アンチセンス5'-GCAGAATTCTTATGTCACCGGGCT-3'（配列番号7）を用いたPCRクローニングによってpVAXXCneuを調製した。PCR条件は以下の通りである：工程1、94℃で10分；工程2、95℃で1分、58℃で1分、72℃で2分、28サイクル；工程3、72℃で10分。

30

【0047】

Concert Qiagen キットによるおよびさらにQiaex ゲル抽出キット（Qiagen）によるPCR産物の精製の後、HindIIIおよびEcoRI消化；T4 DNAライゲーション（1晩）；エレクトロポレーション（BioRad装置）によるDH5α細胞（Takara）の形質転換；の工程に続いて、HER2の細胞外ドメインに対応する断片をpVAX（Invitrogen、臨床品質）中にクローン化した。得られたクローンをシーケンシングにより確認した（ABI Prism, Perkin-Elmer）。

【0048】

プラスミドpATRexを構築するため、FVB/neuTトランスジェニックマウスで生じた乳癌から抽出した全RNAから、TEM8 cDNAを調製した。次に、TEM8 cDNAを以下のプライマーを用いてPCR増幅した：センス-GGACTCTGCGTGGCTGCACTCGTGC（配列番号8）；アンチセンス-AGAGCAGCGCCAGGGCCAGCAGCAG（配列番号9）。PCR条件：工程1、95℃で5分；工程2、95℃で1分、64℃で1分、72℃で2分、35サイクル；工程3、72℃で10分。これによって、pGEMへのアミノ酸13-278のクローニングが達成され、この構築物を用いて核酸分析用のリボプローブを作成した。

40

【0049】

TEM8のアミノ酸配列27-279（配列番号3）に対応する配列をクローン化するために、このプラスミドからさらに抽出を実施した。以下のプライマーを用いて、新規な配列をPCRクローニングした。FWKpnIm8センス-GGGGGTACCGCAATGGGCCGCCGC GAGGATGGGGGA（配列番号10）；RVEcoRIIm8アンチセンス-GGTGAATTCCTAGCACAGCAAATAAGTGTCTTC（配列番号11）。プライマーは、ATG転写開始コドン、終止コドン、および哺乳類細胞で発現させる

50

ためにpcDNA3.1中にクローニングするための制限部位を導入するように設計した。PCR条件：工程1、95℃で5分；工程2、95℃で1分、64℃で1分、72℃で2分、35サイクル；工程3、72℃で10分。

【0050】

増幅後、その断片をKpnIおよびEcoRIで消化し、pcDNA3.1中にクローン化した。続いて、EcoRIおよびKpnI制限酵素を用いてTME8配列を切り出し、臨床品質のベクターpINGのEcoRIおよびKpnI部位に挿入して、pINGTEM8を作成した。pINGTEM8内でのTEM8配列の配向および配列をシーケシングにより確認した。

【0051】

TEM8組換えタンパク質に用いたプライマーは：attB1bis-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGGGCGCCGCGAGGATGGGGGA（配列番号12）、attB2bis-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGCACAGCAAATAAGTGTCTTC（配列番号13）である。

【0052】

完全長ヒト前立腺特異膜抗原（PSMA）（Isreali et al., 1993）およびマウスPSMA cDNA（Bacich et al. 1998）を臨床品質のベクターpING（Bergman et al., 2003）中にクローン化した。hgp75 DNAは報告されている（Weber et al., 1998）。DNA免疫の方法は報告されている（Ross et al., 1997；Weber et al., 1998）。

【実施例2】

【0053】

乳癌に対する免疫および防御

ヒト乳癌のマウスモデルにおいて抗腫瘍免疫に関する本発明の治療的効果を試験した。マウス乳癌ウイルスプロモーター／エンハンサーの転写制御下にラット癌遺伝子neu(neuT)を導入されたメスFVBマウスは、性成熟後に散発性の乳癌を発生した。それら「自然発生」腫瘍由来の細胞を単離およびクローン化して、皮下接種により同じマウスに腫瘍攻撃接種を行うのに用いた。FVB/neuトランスジェニックマウスから単離されVSG A1と称される癌細胞を、neu癌タンパク質(oncoprotein)およびMHCクラスI分子の両方の発現に関するFACS分析に基づき特徴づけした。20%FBSを含有する標準的培地において細胞を拡大させた。スクラッピングにより接着細胞を剥がし、脇腹に皮下注射する直前に生存性を管理した。

【0054】

100μgのプラスミを含有する100μlの滅菌生理食塩水を大腿四頭筋に注射することにより、DNA免疫を実施した。通常、2週間間隔で3回筋肉注射するスケジュールを用いた。

【0055】

次に、マウスに攻撃接種し、隔日で触診によって腫瘍の発症を観察した。腫瘍が2mm径に達し成長し続けると、状態を記録した。小さい方の径（mm）の2乗に、2で割った大きい方の径を掛けることによって腫瘍塊の質量（mg）を計算した。急速に成長する腫瘍を切除し、ホルマリンに固定し、組織学的評価および血管免疫染色のために準備した。別の場合として、TEM8 mRNA分析のために、腫瘍を直ぐに液体窒素で凍結させた。腫瘍が進行している（通常約1cmのサイズ）ことが確認されると、マウスを屠殺した。

【0056】

図4に示すように、pATRex単独で免疫したマウスは腫瘍増殖からの防御を全く示さなかったが、HER2neuで免疫すると部分的な防御をもたらした。一方、HER2/neu+pATRexで免疫すると、65日間に亘りほぼ完全な防御をもたらした。

【実施例3】

【0057】

メラノーマに対する免疫および防御

プラスミドDNAをプラスチックチューブに掛けて以前記載したようにマウスの皮膚に注射した（Hawkins et al., 2000）。簡単に説明すると、マウスの腹部の毛を除去し、ヘリウム駆動銃（Accell, PowderJect, Madison, WI）を用いて、腹部四分区画にプラスミドDNAを送達させた（四分区画当たり1μgプラスミドDNA）。これらの実験のために、マウス（

15匹／群）に週1回の間隔で5週間pINGTEM8注射を行った。同じスケジュールでhgp75もマウスに注射する場合は、hgp75ワクチンがpINGTEM8ワクチンの3日後に与えられるように時差をつけて行われた。hgp75のみで免疫したマウスは、同じhgp75抗原を受けた他のマウスと同じ日に5週間ワクチンを受けた。

【0058】

最後のhgp75 DNA免疫の5日後に、 3×10^4 のB16メラノーマ細胞をマウスの右脇腹に皮内注射した。pINGTEM8のみを受けたマウスに関しては、最後のpINGTEM8ワクチンの8日後に攻撃接種を行った。その後、隔日で触診により腫瘍の発生に関してマウスを追跡した。腫瘍が2mm径に達し成長し続けると、その状態を記録した。腫瘍が進行している（通常約1cmのサイズ）ことが確認されると、マウスを屠殺した。

10

【0059】

図5に示すように、TEM8ワクチン接種単独は、B16腫瘍の増殖に全く影響を及ぼさなかった。しかしながら、腫瘍の攻撃接種の40日後に、hgp75免疫単独は57%腫瘍防御をもたらし、一方でhgp75+pINGTEM8免疫は87%腫瘍なし生存をもたらした。従って、抗腫瘍効果は相乗的であり、付加的ではない。

【0060】

さらに、hgp75およびTEM8 DNAワクチンでの免疫により誘導される免疫の改善がTEM8に依存するか否かを調べた。これを達成するために、同じ免疫条件を用いて実験を繰返した。PSMA DNA、またはPSMA DNAおよびhgp75 DNAの両方の何れかでマウスを免疫した、2つの追加のマウス群を含めた。図6に示すように、TEM8免疫単独およびPSMA免疫単独は、腫瘍防御をもたらさなかった。さらには、PSMAおよびhgp75 DNAワクチンの両方での免疫も、腫瘍防御をもたらさなかった。しかしながら、TEM8 DNAおよびhgp DNAの両方での免疫は、最大の腫瘍防御をもたらした。このことは、hgp75により誘導された免疫がTEM8に依存することを示す。

20

【0061】

次に、pINGTEM8+hgp75で免疫したマウスにおいて腫瘍攻撃接種の2日前から4週間CD8+T細胞を枯渇させた追加の群を含めたことを除いて、同じ免疫条件を用いて実験を繰返した。図6に示すように、pINGTEM8は、hgp75ワクチンとの相乗効果を再び示し、さらにこの相乗効果はCD8+T細胞を欠くマウスにおいて完全に失われた。このことは、pINGTEM8免疫がCD8+T細胞エフェクターによって媒介されているという考えを強く支持する。

30

【実施例4】

【0062】

B16メラノーマの外科的切除モデルにおける腫瘍免疫

以前記載した外科的切除モデル(Hawkins et al., 2002)を用いて、原発腫瘍の切除後の肺転移に関して免疫を提供する本発明の治療的效果を実証した。簡単に説明すると、マウスの脚部にB16メラノーマ腫瘍細胞を注射した。腫瘍サイズが6-8mmになったとき（21-28日後）、腫瘍を有する脚（後脚）を切除した。マウスを4つの異なる処置群に分けた。1つのマウス群（n=25）は、全く治療を受けなかった（未処置）。第2のマウス群（n=18）は、TRP-2（チロシナーゼ関連タンパク2）DNAワクチンで週1回免疫を受けた。第3のマウス群（n=22）は、TRP-2およびTEM8 DNAワクチンの両方で週1回免疫を受けた。第4のマウス群（n=25）は、TEM8 DNAワクチン単独で週1回免疫を受けた。21-28日目に、肺転移がセンチネルリンパ節に現れる。従って、マウスを21-28日後に屠殺し、表面の肺転移の数を記録した。

40

【0063】

図8に示すように、TEM8 DNA単独での免疫は、腫瘍に対する免疫をもたらさなかった。TRP-2 DNA単独で免疫したマウスは表面肺転移の数の減少を示したが、最大免疫はTRP-2 DNAおよびTEM8 DNAの両方で免疫した群で観察された。このことは、TEM8が肺への腫瘍細胞の転移を阻害することによって腫瘍免疫を増強することを示した。

【実施例5】

【0064】

50

前立腺癌の脈管構造におけるTEM8発現

ワクチンを用いた任意の臨床試験の設計において重要な検討材料は、所定の腫瘍系においてその抗原を使用することを支持するために、および有害な自己免疫の潜在的部位を強調するのに、抗原の組織分布を特定することである。TEM8 RNAは、いくつかのヒト腫瘍における内皮細胞で検出されているが、前立腺癌またはBPHおよびPIN領域に特徴的ではなかった。TEM8は、ヌードマウスで増殖するPC3細胞の脈管構造において発現されるが、これはヒトでの発現パターンを反映しないであろう。さらには、開示された報告は、ハイブリダイゼーションに用いられるプローブの詳細を提供せず、それらはTEM8とATR転写物とを区別しなかった。

【0065】

10

in situ PCRを用いて、ヒトおよびマウス前立腺癌切片においてTEM8およびATR RNA転写物を定量化することができる。TEM8およびATRを別個に評価できるように、2つの転写物に特異的なプライマー対を同定することができる。正常および新生物ヒト組織の追加のin situ PCR分析は、各転写物がどこに発現されているかを特定することを可能にするであろう。臨床標本に加えて、TEM8ワクチンを評価するために前立腺癌のマウスモデルを利用できる。

【実施例6】

【0066】

TEM8/ATRexに特異的な抗体の作成

in situハイブリダイゼーションまたはPCRは、抗体なしでTEM8転写物の可視化を可能にするが、それはTEM8タンパク質発現のレベルに関する情報を提供しない。さらには、TEM8翻訳後修飾、代謝、および他のタンパク質との相互作用に関するより詳細な説明はいずれも抗体試薬を必要とする。

20

【0067】

完全長TEM8から作られたワクチンを特徴付けするために、細胞表面上の天然TEM8に結合する抗体を同定し、完全長hTEM8をクローン化しさらにマウス3T3細胞において安定に発現させることができる。TRM8に対する抗体を誘導する能力に関して、TEM8/ATRex、完全長hTEM8およびTEM8-Flt-3 (TEM8と造血サイトカインFlt3リガンドとの融合タンパク質)を含む様々なDNAワクチンを比較することができる。ウェスタンブロットおよび／または免疫組織化学的方法、および完全長TEM8を発現する3T3細胞を用いたフローサイトメトリーによって、血清をアッセイした。このやり方で、様々な有用な特異性を有する抗体を同定できることは間違いないであろう。標準的技術を用いてモノクローナル抗体を作成できる。

30

【0068】

以下の参考文献を本明細書において列挙した：

【参考文献】

【0069】

- Bacich et al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 39:129 (1998).
- Bergman et al., Clin. Cancer Res. 9:1284-1290 (2003).
- Bradley et al., Nature 414:225-29 (2001).
- Carson-Walter et al., Cancer Res. 61:6649-55 (2001).
- Donnelly et al., The Immunologist 2:1 (1994).
- Guevara et al, Basic Aspects of Tumor Immunology, Keystone, CO, (2003).
- Hawkins et al., Surgery 128:273-280 (2000). 10
- Hawkins et al., J Surg Res. 102:137-143 (2002).
- Isreali et al., Cancer Res. 53:227-230 (1993).
- Johnston, Nature 356:152 (1992).
- Ross et al., Clin. Cancer Res. 3:2191-2196 (1997).
- Venanzi et al., AACR Annual Meeting, San Francisco, CA (2002).
- Weber et al., J Clin. Invest. 6:1258-1264 (1998).
- Wey et al., Nature Med. 6:1160-66 (2000). 20
- Wolff et al., Science 247:1465-68 (1990).

【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 0 】

【図 1】 図 1 は、pECDrneuのプラスミドマップである。

【図 2 A】 図 2 A は、pcDNA3TEM8のプラスミドマップである。

【図 2 B】 図 2 B は、pINGTEM8のプラスミドマップである。

【図 3】 図 3 は、FVB/neuトランスジェニックマウスでの自然発生乳癌におけるTEM8 mRNA発現のノーザンブロット分析を示す。健康な(N)および腫瘍に冒された(T)乳腺を、アンチセンス (T7) またはセンス (SP6) TEM8/ATRプローブ、あるいはアクチンリボプローブを用いて調べた。 30

【図 4】 図 4 は、対照の非免疫マウス、あるいは、HER2/neu DNAワクチン (nex)、pcDNA3TEM8 DNAワクチン (TEM8) またはHER2/neuワクチンとTEM8 DNAワクチンの両方 (nex+TEM8) で免疫したマウスにおける乳癌発生を示す。

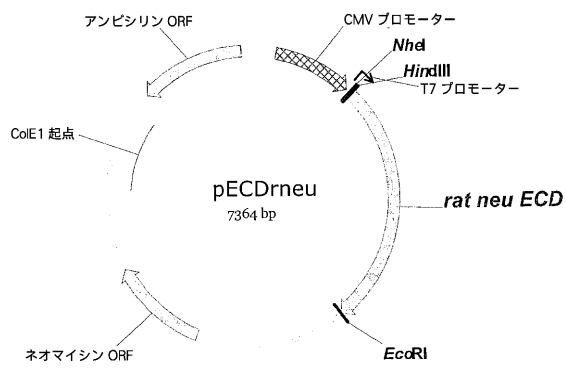
【図 5】 図 5 は、対照の非免疫マウス、あるいはhgp75 DNAワクチン、pINGTEM8 DNAワクチン、またはhgp75ワクチン+pINGTEM8 DNAワクチンで免疫したマウスでのメラノーマの発生を示す。

【図 6】 図 6 は、hgp75により誘導される免疫を、TEM8は増進させるが、PSMAは増進させないことを示す。マウスを免疫しない (処置なし) か、あるいは、hgp75 DNAワクチン、PSMA (擬似タンパク質) DNAワクチン、PSMA DNAワクチンとhgp75 DNAワクチンの両方、pINGTEM8 DNAワクチン単独またはpINGTRM8 DNAワクチンとhgp75 DNAワクチンの両方で免疫した。 40

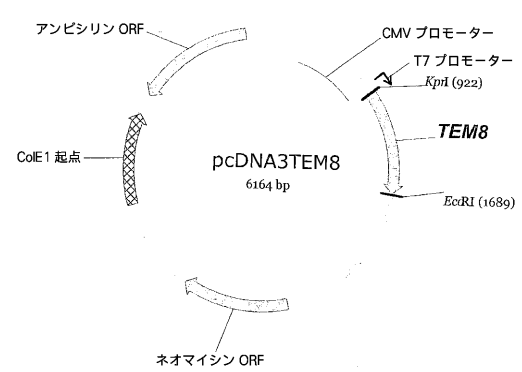
【図 7】 図 7 は、hgp75 DNAワクチンおよびpINGTEM8 DNAで誘導された抗腫瘍免疫におけるCD8+T細胞の役割を示す。CD8+T細胞を枯渇させたまたは枯渇させていないマウスにおいて、マウスを免疫しない (未処置) か、あるいは、hgp75 DNAワクチン、pINGTEM8 DNAワクチン、またはhgp75 DNAワクチンとpINGTRM8 DNAワクチンの両方で免疫した。

【図 8】 図 8 は、B16メラノーマの外科的切除モデルにおいてTEM8が腫瘍免疫を高めることを示す。マウスを免疫しない (未処置) か、あるいは、TRP-2 (チロシナーゼ関連タンパク 2)、TRP-2とpINGTEM8 DNAワクチンの両方、またはpINGTEM8 DNAワクチン単独で免疫した。 50

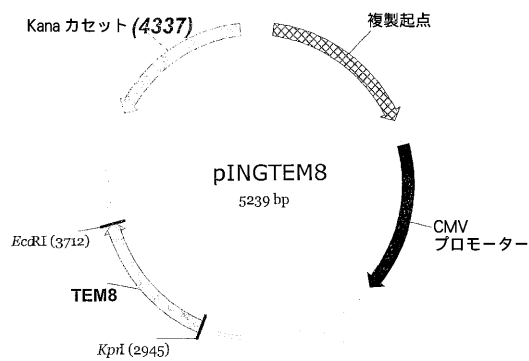
【図 1】



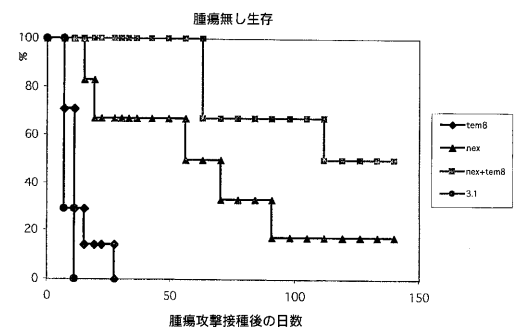
【図 2 A】



【図 2 B】

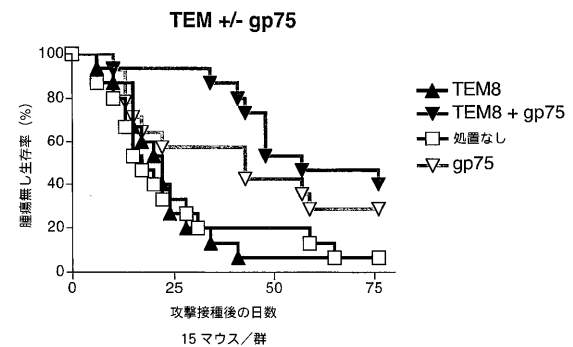
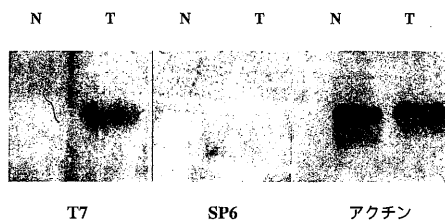


【図 4】

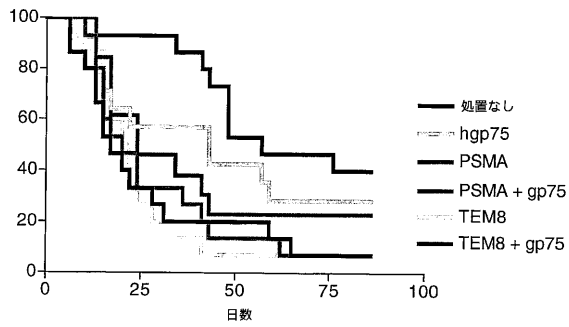


【図 5】

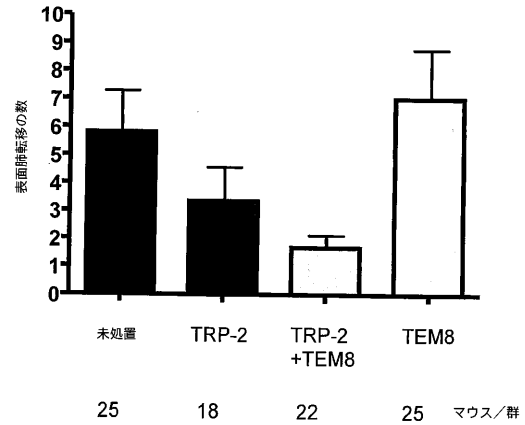
【図 3】



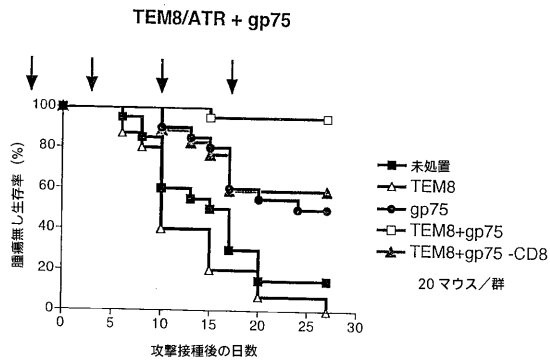
【図 6】



【図 8】



【図 7】



【配列表】

[2007511534000001.xml](#)

【手続補正書】

【提出日】平成18年12月11日(2006.12.11)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

[2007511534000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/38022

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : C12N 15/63, 15/74, 15/00, 5/00; A61K 48/00

US CL : 435/320.1, 325, 455; 514/2, 44; 424/93.1, 93.2, 93.21

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)

U.S. : 435/320.1, 325, 455; 514/2, 44; 424/93.1, 93.2, 93.21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
NoneElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LIU, S. et al. Cell surface Tumor Endothelium Marker 8 cytoplasmic tail-independent anthrax toxin binding, proteolytic processin, oligomer formation, and internalization. J. Biol. Chem. 14 February 2003, Vol. 278, No. 14, pages 5227-5234, see entire document.	1-3,10-13,20-36,43-51,58-64,71-76
Y	CARSON-WALTER, E. B. et al. Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans. Cane. Res. 15 September 2001, Vol. 61, pages 6649-6655, see entire document, especially page 6650.	1-3,10-13,20-36,43-51,58-64,71-76
Y	BRADLEY, K. A. et al. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. Nature. 08 November 2001, Vol. 414, pages 225-229, see entire document.	1-3,10-13,20-36,43-51,58-64,71-76
Y	US 2003/0148410 A1 (BERGER et al.) 07 August 2003 (07.08.2003), see pages 6 and 30-31.	1-3,10-13,20-36,43-51,58-64,71-76
Y	SERODY, J.S. et al. T cell activity after dendritic cell vaccination is dependent on both the type of antigen and the mode of delivery. J. Immunol. 2000, Vol. 164, pages 4961-4967, entire document.	26-27, 32-33
Y	WO 01/41787 A1 (EPIMUNE, INC.) 14 June 2001 (14.06.2001), see entire document.	1-3,10-13,20-36,43-51,58-64,71-76

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent 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

15 September 2005 (15.09.2005)

Date of mailing of the international search report

18 NOV 2005

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner of Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

Anne Marie S. Wehbe

Telephone No. 703-308-1235

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/38022

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claim Nos.: 4-9, 14-19, 37-42, 52-57 and 65-70
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Please See Continuation Sheet
3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US04/38022

Continuation of Box I Reason 2:

A meaningful search for claims 4-9, 14-19, 37-42, 52-57, and 65-70 could not be conducted as the claims recite specific SEQ ID NOS and the applicant has failed to provide the sequence listing in computer readable form such that these sequences could be searched by this office. Please note that applicant was invited to provide the nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form by this Authority in a communication mailed to applicants on 15 November 2004. No response to this communication was received.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

DIALOG-medicine database; BRS/EAST-USPATFUL, EPO, JPO, Derwint, PG-Pubs

search terms: tem-8, tumor endothelial marker 8, vector?, plasmid?, adenovir?, retrovir?, her2/neu, psma, trp-2, vaccine?, dendritic

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, 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

(72)発明者 ホートン, アラン

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10025 ニューヨーク ヨーク アヴェニュー 1233
アパートメント 23ビー

(72)発明者 コンチェッティ, アントニオ

イタリア国 I-62036 カメリーノ ヴィーア デル バスティオーネ 3

(72)発明者 ヴェナンツィ, フランコ マリーア

イタリア国 I-62032 カメリーノ ヴィーア カメリーニ ナンバー2

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA36 CA03 CA05 DA02 HA11

4C085 AA03 AA26 BB01 BB11 EE01 GG01