

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3948751号
(P3948751)

(45) 発行日 平成19年7月25日(2007.7.25)

(24) 登録日 平成19年4月27日(2007.4.27)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 39/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/00 H

A 6 1 K 9/127 (2006.01)

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 37/02

A 6 1 K 38/21 (2006.01)

A 6 1 K 37/66 G

請求項の数 20 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願平9-529517

(86) (22) 出願日 平成9年2月13日(1997.2.13)

(65) 公表番号 特表2000-507214 (P2000-507214A)

(43) 公表日 平成12年6月13日(2000.6.13)

(86) 国際出願番号 PCT/US1997/002351

(87) 国際公開番号 W01997/029769

(87) 国際公開日 平成9年8月21日(1997.8.21)

審査請求日 平成14年6月25日(2002.6.25)

(31) 優先権主張番号 60/011, 783

(32) 優先日 平成8年2月16日(1996.2.16)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500153699

バイオミラ・ユーエスエイ・インコーポレ
イテッドアメリカ合衆国ニュージャージー州085
12, クランベリー, イーストパーク・ブ
ールヴァード 1002

(74) 代理人 100099623

弁理士 奥山 尚一

(74) 代理人 100096769

弁理士 有原 幸一

(74) 代理人 100107319

弁理士 松島 鉄男

(74) 代理人 100134142

弁理士 近藤 祐司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B細胞悪性疾患用ワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) リポソームに封入された少なくとも1種のB細胞悪性腫瘍関連抗原であって、免疫グロブリン、又はイディオタイプを含む免疫グロブリンフラグメントを含み、該免疫グロブリン又は該免疫グロブリンフラグメントが悪性B細胞関連である少なくとも1種のB細胞悪性腫瘍関連抗原と、

(b) 前記B細胞悪性腫瘍関連抗原と共に前記リポソームに封入されたIL-2単独、または少なくとも1種の他のサイトカインと組み合わせた該IL-2であって、哺乳動物において、悪性B細胞に対して体液性免疫応答または細胞免疫応答を誘導するのに十分な量のIL-2単独、または少なくとも1種の他のサイトカインと組み合わせた該IL-2と

、

(c) 前記リポソームを構成する少なくとも1種の脂肪分子とを含む治療的リポソーム組成物。

【請求項2】

前記悪性B細胞がリンパ腫、慢性リンパ性白血病、又は多発性骨髄腫と関連していることを特徴とする、請求項1に記載の治療的リポソーム組成物。

【請求項3】

前記リポソーム製剤中の前記IL-2が少なくとも 3×10^3 IU/mlの濃度であることを特徴とする、請求項1又は2に記載の治療的リポソーム組成物。

【請求項4】

10

20

前記 I L - 2 が少なくとも 1×10^4 I U / m l の濃度であることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の治療的リポソーム組成物。

【請求項 5】

前記 B 細胞悪性腫瘍関連抗原が約 1 ~ 200 μ g / m l で存在することを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の治療的リポソーム組成物。

【請求項 6】

免疫グロブリン又は免疫グロブリンフラグメントではない腫瘍関連抗原をさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の治療的リポソーム組成物。

【請求項 7】

非悪性 B 細胞によって産生されるか非悪性 B 細胞と関連のある B 細胞抗原をさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の治療的リポソーム組成物。 10

【請求項 8】

前記 B 細胞抗原がクラス 1 の H L A 抗原またはクラス 2 の H L A 抗原であることを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の治療的リポソーム組成物。

【請求項 9】

前記少なくとも 1 種の他のサイトカインが M - C S F、G M - C S F、および I F N - γ から成る群から選択されることを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の治療的リポソーム組成物。

【請求項 10】

前記脂質分子がリン脂質、糖脂質、コレステロール、および該脂質の誘導体から成る群から選択されることを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の治療的リポソーム組成物。 20

【請求項 11】

キャリアタンパクをさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の治療的リポソーム組成物。

【請求項 12】

前記キャリアタンパクがアルブミンであることを特徴とする、請求項 11 に記載の治療的リポソーム組成物。

【請求項 13】

治療的リポソーム組成物を作製する方法であって、 30

(a) (i)

(1) 悪性 B 細胞から抽出される免疫グロブリン又はイディオタイプを含む免疫グロブリンフラグメント、

(2) 悪性 B 細胞関連抗体を産生するハイブリドーマ細胞系から抽出される免疫グロブリン又はイディオタイプを含む免疫グロブリンフラグメント、

(3) 悪性 B 細胞から分泌される免疫グロブリン又はイディオタイプを含む免疫グロブリンフラグメント、又は

(4) 合成される免疫グロブリン又はイディオタイプを含む免疫グロブリンフラグメントを含む少なくとも 1 種の B 細胞悪性腫瘍関連抗原と、

(i i) 哺乳動物において、悪性 B 細胞に対して体液性免疫応答または細胞性免疫応答を誘導するのに十分な量の I L - 2 単独、または少なくとも 1 種の他のサイトカインと組み合わせた該 I L - 2 と、 40

(i i i) 少なくとも 1 種の脂質分子と

を混合するステップと、

(b) ステップ (a) の組成物を少なくとも 1 回凍結及び解凍して、治療的リポソーム組成物を得ることと、

を含む方法。

【請求項 14】

約 100 ~ 200 n m の最終サイズを産生するフィルターを通して治療的リポソーム組成物を押し出すことをさらに含む、請求項 13 に記載の方法。 50

【請求項 15】

前記悪性 B 細胞がリンパ腫、慢性リンパ性白血病、又は多発性骨髄腫からなる群から選択される疾患に関連していることを特徴とする、請求項 13 又は 14 に記載の方法。

【請求項 16】

少なくとも 1 種の前記 B 細胞悪性腫瘍関連抗原は、悪性 B 細胞から産生される抗体、抗体フラグメント、悪性 B 細胞から産生される非抗体抗原、または悪性 B 細胞に関連する非抗体抗原、及びその混合物からなる群から選択することを特徴とする、請求項 13 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

非悪性 B 細胞によって産生されるか非悪性 B 細胞と関連のある B 細胞抗原をさらに含む、請求項 13 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 18】

前記 B 細胞抗原がクラス 1 の H L A 抗原またはクラス 2 の H L A 抗原であることを特徴とする、請求項 13 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記少なくとも 1 種の他のサイトカインが M - C S F、G M - C S F、および I F N - γ から成る群から選択されることを特徴とする、請求項 13 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

前記脂質分子がリン脂質、糖脂質、脂質、ろう、ステロール、コレステロール、および該脂質の誘導体から成る群から選択されることを特徴とする、請求項 13 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

【発明の詳細な説明】

発明の背景

1. 発明の分野

本発明は、悪性 B 細胞に対する体液免疫応答および細胞免疫応答を誘導する方法に関する。特に、本発明は、B 細胞悪性疾患関連の抗原を使用して、腫瘍細胞に対する完全な免疫学的応答を惹起する方法に関する。

2. 背景

免疫療法の主な目的の 1 つは、腫瘍細胞または感染性生物に対する患者の免疫系を利用することである。癌治療に関しては、その目的は、腫瘍細胞と関連しているが正常な相対物とは関連がない抗原を標的とすることによって、患者の免疫系を腫瘍に向けることである。この腫瘍関連抗原 (T A A : tumor associated antigen) は、同定することが困難であった。ある腫瘍細胞は、胎児発育中には存在するが、成体では通常は発現しないか非常に低レベルで発現する抗原を発現する。このような腫瘍胎児性 T A A の 1 例は、肝癌細胞によって発現される α - フェトプロテイン (α - fetoprotein) である。別の腫瘍胎児性 T A A は、ほとんどの内肺葉由来消化系上皮の腺癌ならびに乳癌細胞および非小細胞性肺癌細胞に発現される癌胎児性抗原 (C E A) である。Thomas et al., Biochim. Biophys. Acta 1032:177(1990)。 30

T A A によく似た抗イディオタイプ抗体 (A b 2) の投与は、前途有望な癌免疫療法へのアプローチである。Goldenberg, Amer. J. Med. 94:297 (1993)。A b 2 は、従来の抗体 (A b 1) の可変領域に対する抗体である。ある A b 2 (「A b 2 β 」、「抗イディオタイプ」または「内部イメージ」抗体と呼ばれる) は、名目上の抗原の三次元構造によく似ている可能性があり、したがって、A b 2 と抗原は A b 1 結合部位の同一領域に結合する可能性がある。Jerne et al., EMBO J. 1:243(1982)、Losman et al., Int. J. Cancer 46:310(1990)、Losman et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88:3421(1991)、Losman et al., Int. J. Cancer 56:580(1994)。A b 2 β で免疫化した者には、抗 - 抗 - 抗体 (A b 3) が生じ、その一部は名目上の抗原に結合することができる。 40

抗イディオタイプ抗体には抗原模倣特性があるため、名目上の抗原を容易に入手できないときまたは宿主が名目上の抗原に耐性であるとき、A b 2 β を代理抗原 (またはイディオ 50

タイプワクチン)として使用するに至った。実験系では、あるTAAによく似ているAb2βで免疫化すると、TAAに対する特異的免疫性を惹起し、その後の腫瘍成長を防ぐ。たとえば、Nepom et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81:2864(1984)、Raychaudhuri et al., J. Immunol. 139:271(1987)。同様に、Streptococcus pneumoniae [McNamara et al., Science 226:1325(1984)]、B型肝炎ウイルス [Kennedy et al., Science 223:930(1984)]、Escherichia coli K13 [Stein et al., J. Exp. Med. 160:1001(1984)]、Schistosomiasis mansoni [Kresina et al., J. Clin. Invest. 83:912(1989)]、およびMoloneyネズミ肉腫ウイルス [Powell et al., J. Immunol. 142:1318(1989)]など、感染性生物に対する抗イディオタイプワクチンが開発されている。

しかし、このアプローチの有用性は限定されている。動物起源の抗TAAを受けている癌患者は通常、Ab1に対する抗体を産生し、これらの抗イムノグロブリン抗体はAb2を含む。Herlyn et al., J. Immunol. Methods 85:27(1985)、Traub et al., Cancer Res. 48:4002(1988)。抗イディオタイプ応答もT細胞(T2)の発生を含むと考えられる。Fagerberg et al., Cancer Immunol. Immunother. 37:264(1993)。さらに、Ab2はAb1、Id.と同じエピトープを認識することが可能な体液性抗-抗-イディオタイプおよび細胞性抗-抗-イディオタイプ応答を続いて誘導する(それぞれAb3およびT3)。これは、免疫応答の効果を低減する可能性があるため、問題である。

それ故、体液性免疫系と細胞性免疫系の両者を利用する免疫療法への取り組みを提供する機会がある。腫瘍細胞、特に悪性B細胞に対する完全な応答を誘発する本方法は、このアプローチの最初の結果である。

発明の概要

したがって、本発明の目的は、悪性B細胞、特にリンパ腫、慢性リンパ性白血病、および多発性骨髄腫に対する体液性免疫応答および細胞性免疫応答を誘導することによってワクチンおよび治療方法を提供することである。このワクチンは、抗原関連の少なくとも1種のB細胞悪性疾患、少なくとも1種のサイトカイン、および少なくとも1種の脂質分子を組み込んだリボソーム製剤を含む。したがって、この配合剤は、斬新で且つより強力なB細胞悪性疾患用ワクチンとなる。B細胞悪性疾患関連抗原は治療を受ける患者に由来し、したがって、このワクチンは患者の悪性疾患に好ましく向けられる。

それ故、1つの実施態様で、本発明は(1)少なくとも1種のB細胞悪性疾患関連抗原と、(2)単独でまたは少なくとも1種の他のサイトカインと組み合わせたIL-2と、(3)少なくとも1種の脂質分子とを含むリボソーム製剤を含むワクチンを提供する。

別の実施態様で、B細胞悪性疾患関連抗原は、悪性B細胞関連抗体または悪性B細胞によって産生された抗体の全部または一部を含む。このような悪性B細胞には、リンパ腫、慢性リンパ性白血病および多発性骨髄腫と関連したものが含まれる。さらなる実施態様で、本発明のワクチンは、抗体または抗体フラグメントではない腫瘍関連抗原をさらに含む。このような付加的TAAの例としては、たとえば、MUC-1、エプスタイン・バーウイルス(Epstein Barr Virus)(EBV)抗原、パーキットリンパ腫(Burkitt's lymphoma)関連抗原などがある。

代替実施態様で、本発明のワクチンは、HLA抗原など、正常B細胞抗原をさらに含む。

別の実施態様で、本発明のワクチンは別のサイトカインをさらに含み、付加的サイトカインの例としては、M-CSF、GM-CSFおよびIFN-γなどがある。

本発明のワクチンは、リン脂質、コレステロール、および糖脂質およびこれらの脂質類の誘導体から成る群から選択された少なくとも1種の脂質分子を含む。さらなる実施態様で、本発明のワクチンはキャリアタンパク、たとえば、アルブミンも含む。

別の実施態様では、(1)少なくとも1種のB細胞悪性疾患関連抗原と、(2)単独でまたは少なくとも1種の他のサイトカインと組み合わせたIL-2と、(3)少なくとも1種の脂質分子とを含むリボソーム製剤を含むワクチンを前記哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物で悪性B細胞に対する体液性免疫応答および細胞性免疫応答を誘導する方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

図 1 A、1 B および 1 C は、本発明に従って調製したリポソームの特徴を示す図である。
図 2 は、実施例 2 によって免疫化したマウスとコントロールマウスの生存率を示す図である。
図 3 は、実施例 3 によって免疫化したマウスとコントロールマウスの生存率を示す図である。
図 4 は、実施例 5 によって免疫化したマウスとコントロールマウスの生存率を示す図である。
図 5 は、実施例 6 に従って、抗イディオタイプ力価を I L - 2 の関数として示す図である。
図 6 は、実施例 7 に従って、T 細胞増殖をワクチン投与量の関数として示す図である。
図 7 は、実施例 8 によって免疫化したマウスとコントロールマウスの生存率を示す図である。

10

詳細な説明

ワクチンは、次の 3 つのカテゴリの分子を含む。

1. 少なくとも 1 種の B 細胞悪性疾患関連抗原。このような抗原は、抗体または抗体のフラグメントであることが好ましい。
2. I L - 2 のみ、または I L - 2 に I L - 2、M - C S F、G M - C S F または I F N - γ など 1 種以上の異なるサイトカインを加えた形の、サイトカイン。
3. 1 種以上のリン脂質のみ、またはコレステロールなど、1 種以上の異なる脂質と組合せた形の、少なくとも 1 種の脂質分子。

20

ワクチン構造は、脂質（類）、サイトカイン（類）および少なくとも 1 種の B 細胞悪性疾患関連抗原を含む微細小胞を含む。本発明のワクチンは、アジュバントまたはアルブミンなどのキャリアタンパクも含む。

1. 定義

抗原は、脊椎動物に導入されると、抗体の産生を刺激する物質である。

イディオタイプは、抗体の可変領域の抗原決定基である。

B 細胞悪性疾患関連抗原は、悪性 B 細胞によって産生されるか悪性 B 細胞と関連があるが、通常は非悪性 B 細胞によって発現されないか、または非常に低レベルで発現される分子である。B 細胞悪性疾患関連抗原の例としては、悪性 B 細胞によって産生される抗体、抗体フラグメント、および悪性 B 細胞によって産生されるか悪性 B 細胞と関連がある他の非抗体抗原などがある。通常、本発明による抗体フラグメントはイディオタイプを含む。

30

腫瘍細胞関連抗原 (T A A)は、悪性細胞によって産生されるか悪性細胞と関連があるが、通常は非悪性細胞によって発現されないか、または非常に低レベルで発現される分子である。

脂質は、アルコールなどの有機溶剤に可変的に溶解する生化学薬品である。脂質の例としては、リン脂質類、脂肪類、ワックス類およびコレステロールなどのステロール類などがある。

ワクチンは、脊椎宿主に物質を投与して宿主を同一物質に対して免疫化するための物質である。一般に、ワクチンはウイルス感染、細菌感染、および様々な悪性疾患など、病状と関連した物質を含む。

40

2. 抗原の生産

a. B 細胞悪性疾患関連抗原および抗体フラグメント

本発明による抗原は、悪性 B 細胞によって産生された抗体分子またはこのような抗体のフラグメントであってもよい。リンパ腫の場合、B 細胞関連抗体は一般に貫膜ドメインを含む。慢性リンパ性白血病の場合、このような抗体も貫膜ドメインを有する。多発性骨髄腫の場合、悪性 B 細胞は抗体のフラグメントを分泌することが多い。

1 つの実施態様では、これらの抗体は B 細胞悪性疾患の治療を受ける患者に由来する。抗体は、B 細胞悪性疾患患者から採取した悪性 B 細胞含有組織の試料から抽出することができる。一般に、このような組織試料は、患者のリンパ節から採取される。多発性骨髄腫患者では、患者の血清または尿から抗体を抽出することができる。ある抗体軽鎖分子が多発

50

性骨髓腫と関連していることは、当該技術上周知である。このようなタンパクの1例としては、ベンス・ジョーンズ (Bence-Jones) タンパクがある。当業者に周知のタンパク抽出手順および精製手順を使用して、B細胞抗体を単離し、精製することができる。このような単離技術および精製技術としては、たとえばプロテインAセファロースを用いたアフィニティクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどがある。たとえば、CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, VOL 1, 2.7.1-2.7.12ページ (John Wiley & Sone 1991)、METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 10, 79-104ページ (The Humana Press, Inc. 1992) を参照されたい。3種の主要なイディオタイプが慢性リンパ性白血病と関連していることも当該技術上周知である。

別の実施態様では、悪性B細胞含有患者組織試料を使用してin vitroでモノクローナル抗体を創る。一般に、悪性B細胞を含有する悪性組織をマウス細胞株と融合させて、悪性B細胞関連抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を生産する。モノクローナル抗体を創る技術は当業者に周知である。たとえば、Kohler and Millstein, Nature 256:495(1975)およびCURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, VOL 1, 2.5, 1-2.6.7ページ (John Wiley & Sone 1991) を参照されたい。

1つの実施態様で、抗原は悪性B細胞によって産生された抗体のフラグメントを含む。通常、このようなフラグメントは悪性B細胞と関連したイディオタイプを含む。本発明による抗体フラグメントは、(A)「半抗体」分子、すなわち、1つの重鎖：軽鎖対と、(B) 1価フラグメントF a bおよびF a b'、2価フラグメントF (a b')₂、1本鎖または2本鎖F vフラグメントなど、酵素的に切断された抗体フラグメントとを含む。抗体のF vフラグメントは、抗体の重鎖の可変領域 (V h) と抗体の掲載の可変領域 (V l) で構成される。

本発明によれば、本発明内のフラグメントは、ペプシンやパパインなどのプロテアーゼによる消化および/または化学的還元によるジスルフィド結合の切断を含む方法によって、抗体から入手することができる。たとえば、抗体をペプシンで酵素的に切断して抗体フラグメントを作り、F (a b')₂と表示される5 Sフラグメントとすることができる。チオール還元剤、および場合に依りて、ジスルフィド結合の切断によって生じるスルフィドリル基のブロッキング剤を使用して、このフラグメントをさらに切断し、3 . 5 S F a b' 1価フラグメントを創ることができる。あるいは、ペプシンを使用して酵素的に切断すると、1価F a bフラグメント2個とF cフラグメント1個が直接生じる。これらの方法は、たとえば、Goldenbergにより米国特許第4,035,945号および第4,331,647号およびその中に含まれている参考文献に記載されており、これらの特許をそっくりそのまま本願の一部を構成するものとする。Nisonoff et al., Arch Biochem. biophys. 89:230(1960)、Porter, Biochem. J. 73:119(1959)、Edelman et al., METHOD IN ENZYMOLOGY VOL. 1, 422ページ (Academic Press 1967)、およびColigan 2.8.1-2.8.10ページおよび2.10.1-2.10.4ページも参照されたい。

あるいは、本発明に含まれる抗体フラグメントは、Applied BiosystemsやMultiple Peptide Systemsから市販されている自動ペプチドシンセサイザーを使用して合成することができ、また、当該技術上周知の技術を使用して、手で創ることも可能である。たとえば、Geysen et al., J. Immunol. Methods 102:259(1978)を参照されたい。従来の技術を使用して、本発明による抗体の重鎖および軽鎖の可変領域のアミノ酸配列を直接決定することができる。

抗体をタンパク分解的に切断すると、V h領域とV l領域が非共有的に会合したままであり、且つ抗原結合能を保持している2本鎖F vフラグメントを創ることができる。2本鎖F vフラグメントは、当該技術上周知の組換え発現法で創ることもできる。Skerra et al., Science 240:1038(1988)、およびKing et al., Biochemical J. 290:723(1991)を参照されたい。簡単に記載すると、本発明による抗体の重鎖および軽鎖の可変領域のアミノ酸配列は、当該技術上周知の方法を使用した直接アミノ酸配列決定によって入手することができる。これらのアミノ酸配列から、これらの可変領域をコードする合成遺伝子を設計することができ、両者を発現ベクターに挿入することができる。哺乳動物宿主または細菌宿主

10

20

30

40

50

由来の2種のポリペプチドを同時に発現することが可能であり、その結果、活性なFvフラグメントが形成される。

本発明の抗原は「1本鎖抗体」であってもよく、この語句は、この説明では、抗原を特異性と結びつけ且つ抗体の重鎖および軽鎖の可変領域および超可変領域を含む線状ペプチドを表すために使用される。従来の方法論で、本発明による他の1本鎖抗体を創ることができる。ジフルフィド結合を挿入することによって、FvフラグメントのVh領域とVl領域を共有結合させ、安定化させることができる。Glockshuber, et al., Biochemistry 1362 (1990)を参照されたい。あるいは、ペプチドリinkerを挿入することによりVh領域とVl領域を結合することができる。組換え発現ベクターを使用して、Vh配列、Vl配列およびペプチドリinker配列をコード化している遺伝子を構築して発現させることができる。Colcher, et al., J. Nat'l Cancer Inst. 82:1991(1990)を参照されたい。本願明細書に記載の通り、ジスルフィド結合またはペプチドリinkerを使用して、Vh抗体鎖およびVl抗体鎖由来の超可変領域を含むアミノ酸配列も構築することができる。

別の形の抗体フラグメントは、相補性決定領域(CDR)1個を構成するペプチドである。CDR3など、CDRペプチド、「最小認識単位」は、関心事の抗体のCDRをコード化している遺伝子を構築して発現させることによって、入手することができる。このような遺伝子は、たとえばポリメラーゼ連鎖反応を使用して、抗体産生細胞のRNAから可変領域を合成することによって調製することができる。たとえば、Larrick et al., Enzymology 2:106(1991)のMethods: A Comparison to Methodsを参照されたい。

b. 非悪性疾患関連B細胞抗原

本発明のワクチンは、悪性B細胞と特に関連のないB細胞抗原(「非悪性疾患関連B細胞抗原」)も含む。これらの抗原の例は当該技術上周知であり、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD5、およびFMC7などがある。Foon, K. Stem Cells 13(1):10-21(1995)。この群には、クラス1HLA抗原およびクラス2HLA抗原も含まれる(組織適合性分子)。クラス1HLA抗原は、ほとんどすべての他の哺乳動物細胞でも見られる。

c. 他の腫瘍関連抗原(TAA)

本発明のワクチンは、他のTAAをさらに含んでもよい。このような腫瘍関連抗原の例は、MUC-1、EBV抗原およびパーキットリンパ腫である。

3. リポソームの調製

リポソームは、水性成分を包囲する1種以上の脂質2層構造体微細小胞である。一般に、Bakker-Woudenberg et al., Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12(Suppl. 1):S61(1993)、およびKim, Drugs 46:618(1993)。比較すると、リポソームは細胞膜に似ており、結果として、リポソームは一般に安全に投与され、且つ生物分解性である。リポソームは、調製方法によって1層であっても多層であってもよく、0.02 μmから10 μmより大きい範囲の直径でサイズが異なってもよい。様々な薬剤をリポソームで包むことができ、疎水性薬剤は2層構造体内に区分され、親水性薬剤は内部の水性空間内に区分される。たとえば、Machy et al., LIPOSOMES IN CELL BIOLOGY AND PHARMACOLOGY(John Libbey 1987)、およびOstro et al., American J. Hosp. Pharm. 46:1576(1989)を参照されたい。

リポソームは実質的にあらゆるタイプの細胞に吸着し、その後、包まれた薬剤を徐々に放出する。あるいは、吸着されたリポソームは、食細胞で飲食される可能性がある。食作用に続いて、リポソーム脂質のリポソーム内分解および包まれた薬剤の放出が起こる。Scherphof et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 446:368(1985)。

陽イオンリポソームは、in vitroでの哺乳動物細胞トランスフェクションの媒介に有効であるため、リポソームベクターの中で、陽イオンリポソームに関する研究が最も多い。陽イオンリポソームは、核酸のデリバリーに使用されることが多いが、薬剤やホルモンなど、他の治療法のデリバリーにも使用することができる。

陽イオンリポソームは自然界には存在せず、陰イオン分子が多いin vivoでの生理学的環境と相容れないと思われるため、細胞毒性の可能性がある。リポソームは内網系内に優先的に飲食される。しかし、多量のリポソーム粒子による飽和や薬理学的手段による選択的

10

20

30

40

50

マクロファージ不活化をはじめとする幾つかの方法、で、内網系を取り囲むことができる。Classen et al., Biochim. biophys. Acta 802:428(1984)。さらに、糖脂質誘導性脂質またはポリエチレングリコール誘導性脂質をリポソーム膜に組込むと、内網系による取り込みが有意に減少することが証明されている。Allen et al., Biochim. Biophys. Acta 1068:133(1991)、Allen et al., Biochim. Biophys. Acta 1150:9(1993)。

陰イオンリポソームベクターの試験も行われてきた。この中には、飲食作用およびエンドソーム酸性化後にエンドソーム膜を破壊したりエンドソーム膜と融合するpH感受性リポソームが含まれる。

リポソーム複合体は、相応する細胞受容体が同定されているリガンド（通常はポリペプチド）をリポソーム製剤に加えることによって、関心事の細胞タイプまたは組織に向けて送られる。標的にされることが出来る細胞受容体の例は、特に卵巣癌の卓越した腫瘍マーカーとして最近認定された葉酸受容体である。KB細胞は葉酸受容体を非常に過剰発現することが判明している。Cambell et al., Cancer Res. 51:6125-6132(1991)。トランスフェリン、プロテインA、ApoE、p-糖タンパク、 $\alpha 2$ -マクログロビン、インスリン、アシオロフェツイン、アシアロオルソムコイド、様々な組織特異性を具有するモノクローナル抗体、ピオチン、ガラクトースまたはラクトース含有ハプテン（1価で且つ3触覚）、マンノース、ジニトロフェノール、およびビタミンB12を含め、さらに他のターゲティングリガンドのリポソームターゲティングが試験されている。リガンドは、予め形成されたリポソーム中の脂質アンカーに共有結合されるか、リポソーム調製中に組込まれる。Lee and Low J. Biol. Chem. Acta 1233:134-144(1995)。

時には、合成ペプチドをDNA/リポソーム複合体に組込んで、その活性を増強したり、それらを核に向けて送ることがある。たとえば、細胞質に接近するためには、デリバリーすべき分子は原形質膜バリアーを乗り越えなければならない。事実上、ウイルス融合ペプチドは、原形質膜とのウイルス膜融合を促進することによって、細胞質へのデリバリーを促進する。この問題に関する最近の総説については、Stegmann et al., Ann. Rev. Biophys. Chem. 18:187-221(1989)を参照されたい。インフルエンザウイルスの場合、赤血球凝集素（3量体）HAペプチドN-末端セグメント（疎水性螺旋配列）は、エンドソーム内の酸性pH（pH5~6）によって誘導された配置の変化によって露出し、標的膜内に入り、ウイルスと標的エンドソーム膜との間の融合を媒介する。Weber et al., J. Biol. Chem. 269:18353-58(1994)。最近、ウイルス融合タンパクの挙動を模倣する幾つかの両親媒性螺旋形成オリゴペプチドが設計された。たとえば、Haensler and Szoka, Biocuj. Chem. 4:372-79(1993)を参照されたい。

従来の方法論で陽イオンリポソーム製剤を創ることができる。たとえば、Felgner et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 84:7413(1987)、Schreier, J. of Liposome Res. 2:145(1982)、Chang et al. (1988)、前出、を参照されたい。Lipofectin Ⅲ (Life Technologies, inc., Gaithersburg, Maryland USA)など、市販の製剤も利用できる。使用する方法に関する最近の総説については、Wassef et al., Immunomethods 4:217-222(1994)およびWeiner, A. L., 4:217-222(1994)を参照されたい。

リポソームサイズ、二層構造体の数、脂質組成、ならびにリポソームの電荷および表面特性を変えることによって、包まれた薬剤の治療利用率を調節することができる。リポソーム製剤は、1種以上のアジュバントを含んでもよい。さらに、血清アルブミンなどのキャリアタンパクを加えることができる。

4. リポソーム製剤のデリバリー

一般に、リポソーム製剤の投与量は、患者の年齢、体重、身長、性別、医学的全身状態およびこれまでの病歴などの因子によって異なる。個々の製剤の用量範囲は、適当な動物モデルを使用して決定することができる。

リポソームは、静脈内投与、腹腔内投与、鞘内投与、筋肉内投与、または皮下投与することが可能である。たとえば、Kim前出、Bakker-wounderberg et al., (1993)前出、Allen et al. (1993)前出、およびFielding et al., Clin. Pharmacokinetics 21:155(1991)を参照されたい。

10

20

30

40

50

治療用には、抗体またはフラグメントが治療上有効な量で哺乳動物に投与される。投与された量が生理学的に有意であった場合、抗体製剤は、「治療上有効な量で投与された」と言われる。薬剤の存在によって受容哺乳動物の生理学に検出可能な変化が生じた場合、その薬剤は生理学的に有意である。特に、本発明の抗体製剤は、その存在によって受容哺乳動物の体液性および/または細胞性免疫応答を惹起した場合、生理学的に有意である。

5. サイトカイン類

本発明のワクチンはサイトカイン類を含む。サイトカインの例としては、IFN- γ などのインターフェロン類(IFN)、インターロイキン類(IL)、M-CSF、GM-CSF、および腫瘍壊死因子などがある。IFN- γ は、マクロファージ、ならびにリンパ様細胞上および単球上の細胞表面クラスII組織適合性抗原を誘導する。たとえば、Klegerman et al., BIOTECHNOLOGY AND PHARMACYの"Lymphokines and Monokines", Pezzuto et al. (編)、53-70ページ(Chapman & Hall 1993)、およびRoitt et al., IMMUNOLOGY, 第3版、7.8-7.14ページ(Mosby 1993)。IL-2はT細胞成長因子であり、ナチュラルキラー細胞および腫瘍反応性T細胞ID₁の刺激因子である。それ故、IFN- γ およびIL-2が免疫応答増強に好ましいサイトカインである。

6. 実施例

oncovax材料

マウス抗原 38cID

DMPC:Survival Tech Lot RD 1426

MSA 25%) :Biocell Laboratories, CA lot#4002160

IL-2:Survival Tech Lot#RD 1534@9.38mg/ml)

OTx Buffer

PEG

50 ~ 200 mgのDMPCまたは4/1の比率のDMPC/DMPGに以下のものを加え、最終体積を0.4 ~ 1.0 mlとした。

抗原、すなわち、38cID 0.3 ~ 10 mg

IL-2 0.0 ~ 7×10^6 単位

マウス血清アルブミン 0.0 ~ 12 mg

実施例 1 (ワクチン調製用凍結 - 解凍法) :

水性成分を混合する。5 mLバイアルガラスバイアル中で、粉末になった液体に加える。35 ~ 39 °Cの水浴中で10分間温める。30秒間、渦巻き攪拌する。24 ~ 45 °Cで15分間、槽音波処理する。-80 °Cの乾燥した氷/エタノール槽内でバイアルを15分間凍結する。35 ~ 39 °Cの水浴中で10分間解凍する。渦巻き攪拌工程、音波処理工程、凍結工程および解凍を合計3回繰り返す。必要に応じて水性緩衝液を加えて希釈する。遠心分離によって試料を洗浄することが可能である。12,000 rpmで20分間遠心分離する。上清を除去し、さらに2回洗浄する。

実施例 2 (ワクチン調製用音波処理 - 融合法) :

水性緩衝液中、濃度100 ~ 300 mg/mLで脂質を水和する。30 ~ 45 °Cの槽音波処理装置内で透過するまで音波処理する。0.2 μ のフィルターを通過させて滅菌濾過する。抗原、IL-2および血清アルブミンを加える。試料を4 ~ 15 °Cに冷却する。これは、低温として-80 °Cから15 °Cまで、高温として23 °Cから50 °Cまで、任意の回数循環される温度である。実施例1と同様に、必要に応じて試料を希釈し、遠心分離によって洗浄することが可能である。

実施例 3 (PEG - 融合法) :

水性緩衝液中、濃度100 ~ 300 mg/mLで脂質を水和する。30 ~ 45 °Cの槽音波処理装置内で透過するまで音波処理した。0.2 μ のフィルターを通過させて滅菌濾過する。抗原、IL-2およびマウス血清アルブミンを加える。同量の分子量1,000 ~ 20,000のPEG溶液と混合する。PEG溶液は6 ~ 60 % (w/v) でなければならない。4 ~ 25 °Cで1 ~ 24時間インキュベートした後、遠心分離で洗浄してPEGおよび組込まれていない活性成分を除去する。

10

20

30

40

50

実施例 4 (押出法) :

実施例 1 ~ 3 の試料を 1 . 0 μ 、0 . 4 μ および 0 . 2 μ のポリカーボネートフィルターを通して押し出すことにより、小型化することが可能である。最終サイズは 1 0 0 ~ 2 0 0 nm でなければならない。

この開示に従ったワクチン製品を OncoVAX と呼ぶ。抗原 (I d)、I L - 2 および脂質の量、ならびに OncoVAX 粒子のサイズを測定することによって、各 OncoVax 製剤ならびに (KLH - Id) コントロールを分析した。

OncoVAX の構成成分の最終濃度 (範囲) は次の通りであった。

表 1

構成成分	実施例				コントロール
	# 1	# 2	# 3	# 4	(KLH - Id)
脂質 (mg/mL)	20 ~ 60	3 ~ 30	20 ~ 60	20 ~ 60	なし
抗原 I d mcg/mL	1 ~ 200	1 ~ 2,000		1 ~ 200	500 ~ 1,000
IL-2 (IU/mL) $\times 10^4$	1 ~ 200	1 ~ 200		1 ~ 200	なし
平均サイズ (μ)	2 ~ 4	1 ~ 2		0.1 ~ 0.3	可溶性 (粒子なし)

以下は、OncoVAX の特性化の例、および抗腫瘍免疫性、抗原含有量および I L - 2 含有量に関する有効なリポソーム投与量、リポソームワクチンによって誘導される体液性応答および細胞性応答、および *in vivo* T 細胞枯渇に対する作用を示すマウス試験である。抗原濃度は、ウサギ抗マウス I g M に結合した未知の抗原にビオチニル化したウサギ抗マウス I g M を加えたサンドイッチ E L I S A 法で決定した。これにストレプトアビジン - ユーロピウムを加えてユーロピウム発光を測定した。

実施例 5 (典型的な OncoVAX 製剤の特性化)

試料を、凍結防止剤を使用せずに液体プロパン中、銅地板の間で室温から急速に凍結し、Balzers 凍結破砕ユニットで繰返して Philips 3 0 0 電子顕微鏡で検査した。図 5 A は、形成した多層リポソームを示す。1 粒子オブティカルセンシング (S P O S) で決定したとき、平均サイズは凡そ 3 . 0 μ である。図 5 B は、多数の隆起がある表面構造および波状パターンにおける切形変化を示す。図 5 C、マウス血清アルブミンを含むコントロール D M C リポソームでわかるように、滑らかな波状パターンは室温での D M P C リポソームの特徴である。棒 = 0 . 4 μ 。

実施例 6 (免疫性試験)

I d のリポソーム製剤によって保護的抗腫瘍免疫性を獲得できるかどうかを決定するために、群当たり 1 0 匹の同系 C 3 H / H E N マウスをリポソーム I d 製剤またはコントロール I d 製剤、あるいは体積 0 . 2 ml の P B S 中 5 0 μ g 3 . 8 C 1 3 誘導 I d で腹腔内免疫化した。2 週間後、致死量である 2×10^3 個の 3 8 C 1 3 細胞をマウスに投与した。ノンパラメトリックマンテル対数順位 p 値に基づいて、生存率の統計学的比較を行った。腫瘍投与後 9 0 日を越えて生存しているマウスを安楽死させ、長期生存者として報告した。リポソーム I d で免疫化すると、有意に長い生存ならびに保護 (3 0 %) を示した。

実施例 7 (リポソームワクチン有効性の最適化および K L H 複合 I d ワクチンとの有効性の比較。)

投入 I d 抗原の段階希釈液を製作し、それ以外は同じであるリポソームワクチンを準備した。調製後、組込まれた I d の実際の量を、前述の通りに各ワクチンについて決定した。I d と K L H の比率 1 : 1 で、且つ括弧内に示した動物当たりの I d 投与量のグルテルア

10

20

30

40

50

ルデヒド複合体によってI d - K L Hを調製した。保護的抗腫瘍免疫製に対する明らかな用量依存性効果が認められ、マウス当たり40 μ g、10 μ gおよび2 μ gのI dをデリバするリボソームワクチン製剤を投与したマウスは、遊離I d (free I d)で免疫化したコントロールと比較して有意に優れた生存率を示した。マウス当たり0.4 μ gのI dをデリバするリボソームワクチンで免疫化したマウスは、その後の腫瘍投与から保護されなかった。

実施例 8

P B S中のI D - K L Hの段階希釈液と比較した、少量のI dを含有する代表的なリボソームワクチンの効果を試験した。以前の試験で、複合体製剤中に50 μ gのI dが最適投与量であることが証明されている。マウス当たり50 μ g、10 μ g、または2 μ gのI dを含有するI d - K L Hで免疫化した群当たり10匹のマウスは、それぞれ40%、30%、および0%の保護を示したのに対して、2 μ gのI dを含有するリボソームワクチンで免疫化したマウス9匹は、その後の致死量腫瘍投与を33%保護した(I d - K L H 2 μ g I d投与と比較して対数順位 $p = 0.007$)。

10

実施例 9

投入I L - 2の連続希釈液を含み、他の成分は一定に保った数種の製剤を調製することによって、リボソームI dワクチン製剤の成分としてのI L - 2必要量を試験した。このようにして得られたリボソーム製剤(すべて40 μ gのI dを含有する)を使用してマウスを免疫化した。2週間後、1つ腫瘍製剤から 2×10^3 個の38 C 13細胞をすべてのマウスに投与して、生存率を追跡調査した。対数順位 p 値はI d 3群に対する比較を示す。致死量の腫瘍投与後のマウスの生存率パターンは、保護的腫瘍免疫性の誘導に対して明らかなI L - 2用量依存性を示した。I L - 2を含有しないリボソームI dワクチンは有意な抗腫瘍免疫性を誘導できないことを示す他の実験によって、I L - 2はワクチン製剤の重要な成分であるが、投入I L - 2の量の1/10を含有するリボソームワクチンは、有意な保護的腫瘍免疫性を誘導することができるという結論が裏付けられる(遊離I d (free I d)に対して対数順位 $p 0.004$)。

20

実施例 10

リボソームI dワクチンが保護的抗腫瘍免疫性獲得を推進することによる細胞のメカニズムも調査しようとして、筆者らは、異なる用量のI dを含有する様々なリボソームワクチン製剤によってマウスに誘導された血清抗イディオタイプ抗体レベルを最初に測定した。個々の血清試料を、I d被覆微量滴定プレートへの結合について直接E L I S Aで分析した。イディオタイプの抗体応答の特異性は、コントロールI g Mタンパクに結合しないことによって証明された。免疫化の2週間後、腫瘍投与の直前に、群当たり5匹のマウスから血清試料を採取し、平均抗イディオタイプ抗体レベルを示した。リボソーム捕獲I dの明らかな用量依存性作用が見られ、平均抗イディオタイプ抗体レベル15 μ g/ml、7 μ g/ml、1 μ g/mlおよび0.1 μ g/mlがE L I S Aで検出された。2 μ g、10 μ gおよび40 μ gのI dを含有するリボソームワクチン3群で、イディオタイプに特異的な体液性が証明されたことは、1回免疫化したマウスでも検出可能な抗イディオタイプ抗体を誘導することができなかった遊離I d (free I d)と比較して完全に卓越している。しかし、リボソームI dワクチンによって誘導された抗イディオタイプの平均レベルはI D - K L Hによって誘導されたレベル(55 μ g/ml)よりかなり低かった。

30

40

実施例 11

抗イディオタイプ抗体応答の強さは、リボソームI dワクチンおよびI d - K L Hによって誘導される相対保護レベルと完全に相関関係があるわけではないため、筆者らは、イディオタイプ特異的T細胞活性化の証拠を調査した。2週間前に表示通りに腹腔内免疫化しておいた群当たり2~3匹のマウスから採取した脾細胞をプールし、ナイロンウールを通過させたT細胞で富化し、様々な濃度のI d(200 μ l、 2×10^5 細胞/ウェル)と一緒に96ウェル微量滴定プレートに入れた。正常な同系マウスの照射(2000 rad)脾細胞も抗原提示細胞源として脾細胞培養に加えた(2×10^5 個)。培養を37、5% $C O_2$ で5~7日間維持し、収穫の18~24時間前に、培地50 μ l中1 μ C i [3H -

50

チミジン] (2 Ci/mmol, New England Nuclear Research Products, Boston, MA) を各ウェルに加えた。組込まれた放射能を、LKB 1205β プレート液体シンチレーションカウンターで測定した。測定はすべて4重に実施し、データは平均CPMと平均の標準誤差で示した。2週間前にリボソームI d ワクチン、空のリボソーム、遊離I d、またはI d - K L H で1回免疫化したマウスから採取した脾臓T細胞の、様々な用量のI d に対する増殖応答についてin vitroで分析した。代表的実験で、I d に対する有意なT細胞増殖応答が認められたが、空のリボソームまたは遊離I d を投与した群では認められなかった。このようなT細胞活性化の証拠は、今までにI d - K L H による免疫化後に観察されることがなく、I d - サイトカイン融合タンパクで観察されなかったため、以上の結果も特に意味深い。

10

実施例 1 2

誘導された保護的抗腫瘍免疫性のエフェクター相におけるイディオタイプ特異的T細胞の役割を決定的に実証するために、筆者らはin vivoにおけるT細胞部分集合枯渇の影響を免疫化マウスで試験した。免疫化の2週間後、単一のリボソームI d ワクチン製剤でマウスを免疫化し、単一の腫瘍製剤を投与する直前に隔日に3回、C D 4 + T細胞 (B R P M 前臨床貯蔵所、Frederick, MDの、G K 1 . 5、硫酸アンモニウム精製品)、C D 8 + T細胞 (B R P M 前臨床貯蔵所、Frederick, MDの、5 3 . 6 ~ 7 2、硫酸アンモニウム精製品) のいずれかに特異的なm A b の枯渇、2種の抗体の組み合わせ、正常なラットI g G (Sigma, St. Louis, MO) のによる処理を受けるように群当たり8匹のマウスを無作為に割り当てた。免疫化の3週間後に、単一の腫瘍製剤から 2×10^3 個の3 8 c 1 3細胞をすべてのマウスに腹腔内投与し、生存率を追跡調査した、最終処置の2週間後に、並行してモノクローナル抗体を投与した正常マウスの脾細胞のサイトメトリー分析で、リンパ球枯渇を評価した。両分析時点で、95%を超える当該部分集合の枯渇が達成されたが、他の部分集合は正常レベルであった。免疫化されたマウスの中で、C D 4 + T細胞またはC D 8 + T細胞のいずれかが枯渇すると、保護的抗腫瘍免疫性が明らかに低減した (リボソームI d 免疫化した、正常なラットI g 投与マウスに対して対数順位 $p = 0 . 0 1 2$)。m A b 投与群は、遊離I d で免疫化したコントロールマウスと比較して有意差が認められなかった (遊離I d に対して、それぞれ対数順位 $p = 0 . 0 9$ おおよび $0 . 1 6$)。抗C D 4 m A b と抗C D 8 m A b を併用投与しても、保護はそれ以上破棄されなかった (遊離I d に対して、対数順位 $p = 0 . 1 0$)。それ故、リボソームI d ワクチン誘導性保護的抗腫瘍免疫性には、C D 4 + エフェクターT細胞とC D 8 + エフェクターT細胞の両者が絶対必要である。

20

30

実施例 1 3

先に確立された腫瘍に対するリボソームI d 免疫化を試験する初期段階として、筆者らは腫瘍投与を最初に実施し、その後、同日に、ワクチン投与する実験を実施した。この試験用に、筆者らは、悪性腫瘍の成長を遅らせるために第10日に非治療的用量のシクロホスファミド (C T X) 化学療法を必要とする皮下3 8 C 1 3腫瘍に対する既存のプロトコールワクチン投与を修正した。マウスの側腹に 10^4 個の腫瘍細胞を皮下注射し、リボソームI d、リボソームコントロールI d ワクチン、またはで腹腔内P B S のいずれかに無作為に割り当てた。生存率の代理エンドポイントとして腫瘍サイズをモニタリングすることが可能なため、皮下経路の腫瘍接種を使用した。第10日までに、すべてのマウスに肉眼で確認できる触知可能な直径約1 cmの腫瘍塊が発生した。C T X 投与 (7 5 mg/kg、腹腔内) は腫瘍の完全消失と関連があり、その消失は、すべてのコントロールマウスでは一様に一時的であったが、リボソームI d ワクチンで免疫化したマウスでは、多くはないがかなりの比率で持続した (コントロール群に対して、プールしたリボソームI d では対数順位 $P = 0 . 0 1$)。

40

表 2. 多量の皮下腫瘍接種材料に対するリポソーム I d ワクチンの治療効果

実験	免疫原	生存数／マウス総数
1	リポソーム I d (10 μ g)	2／10
	リポソームコントロール I d (10 μ g)	0／5
	PBS	0／5
2	リポソーム I d (20 μ g)	3／10
	PBS	0／10

10

C3Hマウスに 10^4 個の38C13腫瘍細胞を皮下注射し、その後、同日に(第0日)、表示の通りに免疫化した。第10日に、全ての群にCTX 75 mg/kg、腹腔内、を投与した。腫瘍が再発せずに60日を超えて生存しているマウスは明らかに治癒した。

また、以下の実施例14～25であってもよい。

(実施例14)

(a) 少なくとも1種のB細胞悪性腫瘍関連抗原と、

(b) 単独でまたは少なくとも1種の他のサイトカインと組み合わせたIL-2と、

(c) 少なくとも1種の脂質分子と

を含むリポソーム製剤を含むワクチン。

20

(実施例15)

前記悪性B細胞がリンパ腫関連であることを特徴とする実施例14に記載のワクチン。

(実施例16)

前記悪性B細胞が慢性リンパ性白血病関連であることを特徴とする実施例14に記載のワクチン。

(実施例17)

前記悪性B細胞が多発性骨髄腫関連であることを特徴とする実施例14に記載のワクチン。

(実施例18)

抗体または抗体フラグメントではない腫瘍関連抗原をさらに含み、前記腫瘍関連抗原がMUC-1、EBV抗原またはパーキットリンパ腫関連の抗原であることを特徴とする実施例15に記載のワクチン。

30

(実施例19)

非悪性B細胞によって産生されるか非悪性B細胞と関連のあるB細胞抗原をさらに含み、前記B細胞抗原がクラス1のHLA抗原またはクラス2のHLA抗原であることを特徴とする実施例14に記載のワクチン。

(実施例20)

前記少なくとも1種の他のサイトカインがM-CSF、GM-CSF、およびIFN- γ から成る群から選択されることを特徴とする実施例14に記載のワクチン。

40

(実施例21)

前記脂質分子がリン脂質、糖脂質、コレステロール、および前記各脂質の誘導体から成る群から選択されることを特徴とする実施例14に記載のワクチン。

(実施例22)

キャリアタンパクをさらに含む実施例14に記載のワクチン。

(実施例23)

前記キャリアタンパクがアルブミンであることを特徴とする実施例22に記載のワクチン。

(実施例24)

アジュバントをさらに含む実施例14に記載のワクチン。

50

(実施例 25)

哺乳動物において、悪性B細胞に対する体液性免疫応答または細胞性免疫応答を誘導する方法であって、前記哺乳動物に実施例14～24のいずれか1項に記載のワクチンを投与することを含む方法。

具体的な実施例について記載してきたが、本発明はこのように限定されるものではないことが理解されるであろう。当該技術上通常に熟練した者には、開示された実施態様に対して様々な修正が行われること、およびそのような修正は本発明の範囲内であることが理解されるであろう。

【図 1】

FIGURE 1A



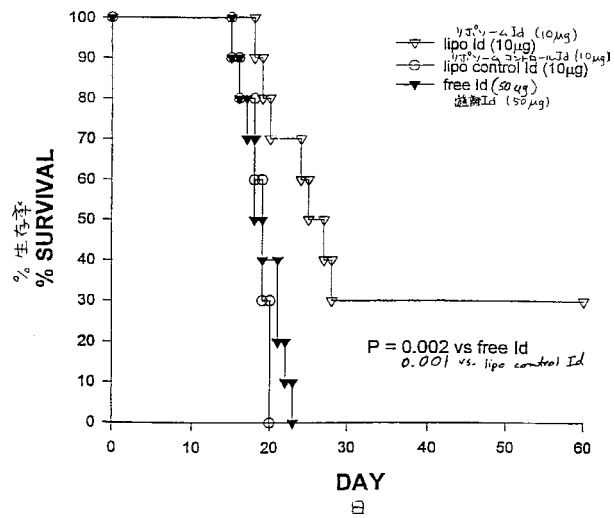
FIGURE 1C



FIGURE 1B

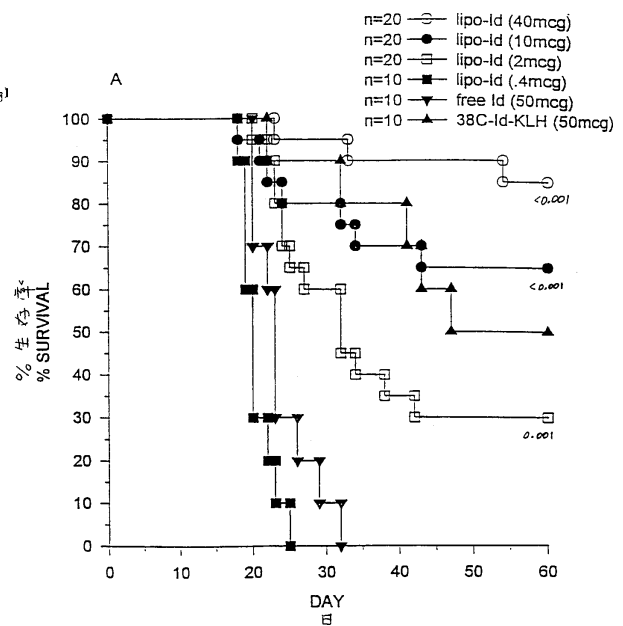
【 図 2 】

FIGURE 2



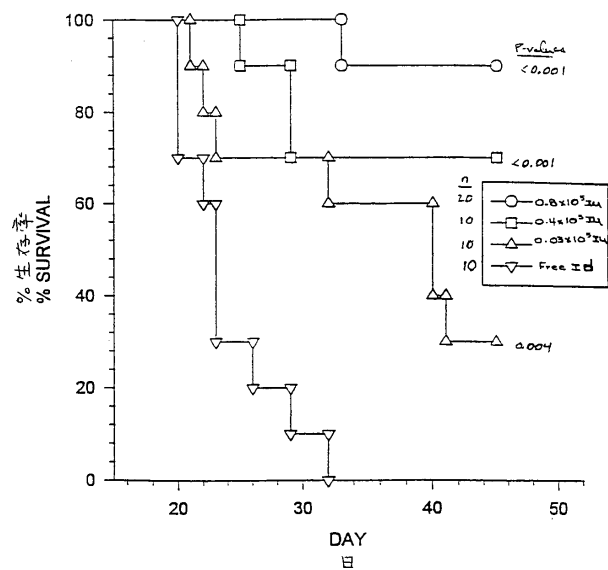
【 図 3 】

FIGURE 3

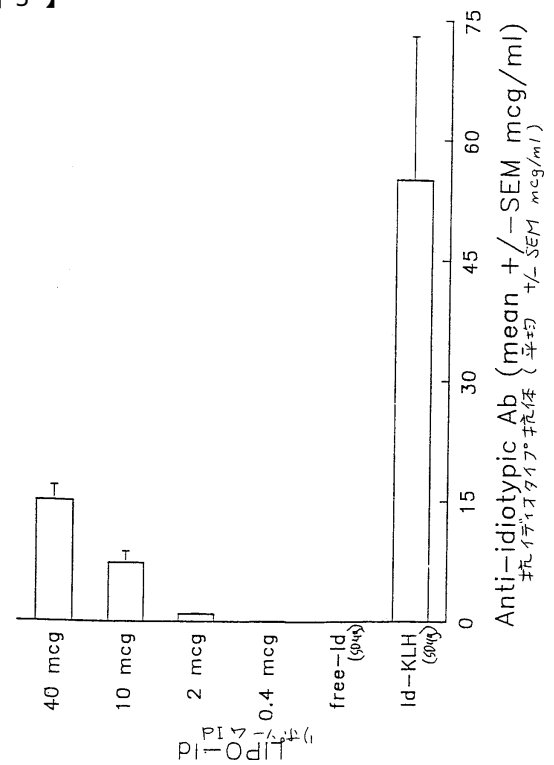


【 図 4 】

FIGURE 4

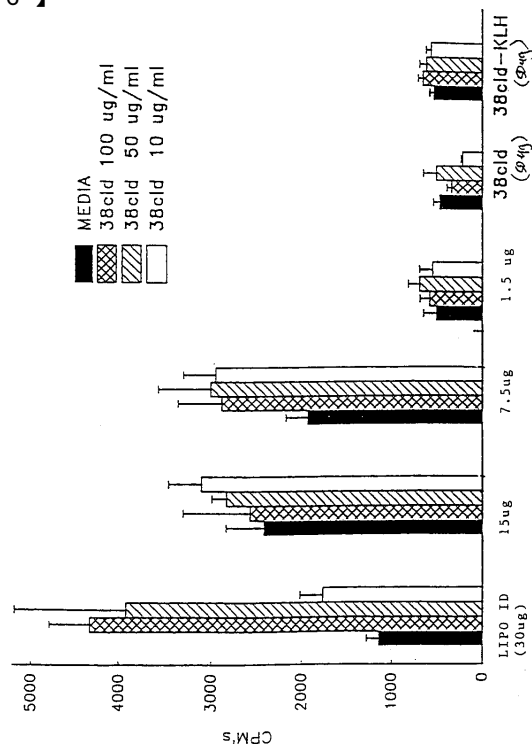


【 図 5 】



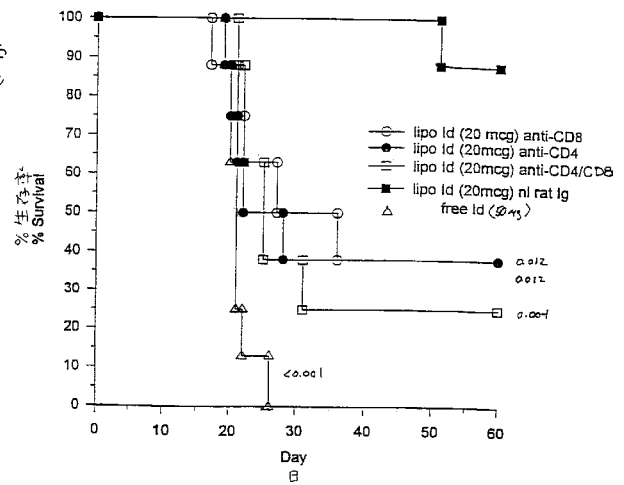
【 図 6 】

FIGURE 6



【 図 7 】

FIGURE 7



フロントページの続き

- (72)発明者 ボペスク, ミルセア・シー
アメリカ合衆国、 0 8 5 3 6 ニュー・ジャージー、プレインズボロ、パークウェイ・アヴェニ
ュー 5
- (72)発明者 クワク, ラリー
アメリカ合衆国、 2 1 7 0 2 メリーランド、フレデリック、メドウサイド・ドライブ 6 7 5 3
- (72)発明者 オチョア, アウグスト・シー
アメリカ合衆国、 2 1 7 0 2—1 2 1 0 メリーランド、フレデリック、アレッサンドラ・コー
ト 1 0 3、# 1 8 0
- (72)発明者 ボーニ, ラリー
アメリカ合衆国、 0 8 8 5 2 ニュー・ジャージー、モンマス・ジャンクション、カミングス・
ロード 4 0

審査官 八原 由美子

- (56)参考文献 国際公開第 9 5 / 0 1 4 0 8 0 (W O , A 1)
特開平 0 6 - 0 5 0 5 7 1 (J P , A)
特表平 0 4 - 5 0 1 5 6 2 (J P , A)
特表平 0 5 - 5 0 4 7 5 6 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 39/00
A61K 9/127
A61K 38/00
A61K 38/21
CA(STN)
MEDLINE(STN)
BIOSIS(STN)
EMBASE(STN)