

(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2007-508272

(P2007-508272A)

(43) 公表日 平成19年4月5日(2007.4.5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 39/245 (2006.01)	A 6 1 K 39/245	
A 6 1 K 39/29 (2006.01)	A 6 1 K 39/29	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-530155 (P2006-530155)	(71) 出願人	397062700
(86) (22) 出願日	平成16年10月11日 (2004.10.11)		グラクソスミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
(85) 翻訳文提出日	平成18年6月9日 (2006.6.9)		ベルギー国 リキセンザール ビー 1 3 3 0 ルー デ ランスティテュート 8 9
(86) 国際出願番号	PCT/EP2004/011620	(71) 出願人	597173680
(87) 国際公開番号	W02005/039634		スミスクライン ビーチャム コーポレーション
(87) 国際公開日	平成17年5月6日 (2005.5.6)		アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9 1 0 1 フィラデルフィア市 フランクリン プラザ 1 番
(31) 優先権主張番号	0323965.4	(74) 代理人	100091096
(32) 優先日	平成15年10月13日 (2003.10.13)		弁理士 平木 祐輔
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インターロイキン18およびサポニンアジュバント系を含むワクチン組成物

(57) 【要約】

本発明は、併用療法に関する。この併用療法は、感染性疾患、癌、自己免疫疾患および関連する病状の処置または予防において有用であることがわかる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

安全かつ有効な量の1)IL-18ポリペプチドまたはその生物活性断片もしくは変異体と、2)抗原またはその免疫原性誘導体およびサポニンアジュバントを含む免疫原性組成物とを哺乳動物に投与することを含む、該哺乳動物において抗原に対する免疫応答を増強する方法。

【請求項2】

前記抗原またはその免疫原性誘導体が、ヒト免疫不全ウイルスHIV-1、ヒト単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、ロタウイルス、エプスタインバー・ウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス、肝炎ウイルス、例えば、B型肝炎ウイルス、A型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスおよびE型肝炎ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、パラインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ヒトパピローマウイルス、フラビウイルスまたはインフルエンザウイルス、ナイセリア属細菌種 (*Neisseria* spp)、モラクセラ属細菌種 (*Moraxella* spp)、ボルデテラ属細菌種 (*Bordetella* spp)、マイコバクテリウム・ツベルクロシス (*M. tuberculosis*) を含むマイコバクテリウム属細菌種 (*Mycobacterium* spp)、腸管毒性大腸菌 (*enterotoxigenic E. coli*) を含むエシェリキア属細菌種 (*Escherichia* spp)、サルモネラ属細菌種 (*Salmonella* spp)、リステリア属細菌種 (*Listeria* spp)、ヘリコバクター属細菌種 (*Helicobacter* spp)、スタフィロコッカス・アウレウス (*S. aureus*)、スタフィロコッカス・エピデルミディス (*S. epidermidis*) を含むスタフィロコッカス属細菌種 (*Staphylococcus* spp.)、ボレリア属細菌種 (*Borrelia* spp)、クラミジア・トラコマチス (*C. trachomatis*)、クラミジア・ニューモニエ (*C. pneumoniae*) を含むクラミジア属細菌種 (*Chlamydia* spp.)、熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) を含むプラスモジウム属の種 (*Plasmodium* spp.)、トキソプラズマ属の種 (*Toxoplasma* spp.)、カンジダ属真菌種 (*Candida* spp.) を含む群から選択される生物に由来する、請求項2に記載の方法。

10

20

【請求項3】

安全かつ有効な量の1)IL-18ポリペプチドまたはその生物活性断片もしくは変異体と、2)腫瘍関連抗原またはその免疫原性誘導体およびサポニンアジュバントを含む免疫原性組成物とを、必要とする患者に投与することを含む、患者における癌の重篤度を軽減する方法。

30

【請求項4】

腫瘍関連抗原またはその免疫原性誘導体が、MAGEファミリー、PRAME、BAGE、LAGE 1、LAGE 2、SAGE、HAGE、XAGE、PSA、PAP、PSCA、プロステイン (prostein)、P501S、HASH2、クリプト (Cripto)、B726、NY-BR1.1、P510、MUC-1、プロスターゼ (Prostase)、STEAP、チロシナーゼ、テロメラゼ、スルビピン (survivin)、CASB616、P53、またはher 2 neuに由来する抗原を含む群から選択される、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記IL-18ポリペプチドまたはその生物活性断片もしくは変異体と免疫原性組成物とが同時に、別々にまたは任意の順序で逐次的に投与される、請求項1~4のいずれかに記載の方法。

40

【請求項6】

TH-1サイトカインおよび免疫原性組成物が複合医薬剤の形態で同時に投与される、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記IL-18ポリペプチドまたはその生物活性断片もしくは変異体がヒトまたはマウスに由来する、請求項1~6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】

IL-18が、配列番号6もしくは配列番号7またはその生物活性断片もしくは誘導体のポリペプチドである、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

50

前記サポニンアジュバントが、QS-21またはQS-17である、請求項1～8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】

1)IL-18ポリペプチドまたはその生物活性断片もしくは変異体と、2)抗原およびサポニンアジュバントを含む免疫原性組成物との個々の成分を活性成分として含み、該活性成分が、感染症、癌、自己免疫疾患および関連する症状の予防および/または治療のための同時、別々または逐次的使用に用いられる複合製剤。

【請求項11】

成分(1)および(2)が1つの組成物中に混合されている、請求項10に記載の複合製剤。

【請求項12】

前記免疫原性組成物が、腫瘍関連抗原またはその免疫原性誘導体を含み、癌に対して予防的または治療的活性を有する、請求項10または11に記載の複合製剤。

【請求項13】

前記腫瘍関連抗原またはその免疫原性誘導体が、MAGEファミリー、PRAME、BAGE、LAGE 1、LAGE 2、SAGE、HAGE、XAGE、PSA、PAP、PSCA、プロステイン(prostein)、P501S、HASH2、クリプト(Cripto)、B726、NY-BR1.1、P510、MUC-1、プロスターゼ(Prostase)、STEAP、チロシナーゼ、テロメラゼ、スルビピン(survivin)、CASB616、P53、またはher 2 neuに由来する抗原を含む群から選択される、請求項12に記載の複合製剤。

【請求項14】

前記IL-18ポリペプチドまたはその生物活性断片もしくは誘導体がヒトまたはマウスに由来する、請求項10～13のいずれかに記載の複合製剤。

【請求項15】

IL-18が、配列番号6もしくは配列番号7またはその生物活性断片もしくは誘導体のポリペプチドである、請求項14に記載の複合製剤。

【請求項16】

前記サポニンアジュバントが、QS-21またQS-17である、請求項10～15のいずれかに記載の複合製剤。

【請求項17】

前記免疫原性組成物が、3D-MPL、コレステロール、少なくとも1つの免疫賦活性CGジヌクレオチドを含有するCpGオリゴヌクレオチド、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、トコフェロール、および水中油型エマルジョンまたは前記アジュバントの2種以上の組合せを含む群から選択される免疫賦活性化学物質をさらに含む、請求項10～16のいずれかに記載の複合製剤。

【請求項18】

前記免疫原性組成物アジュバントが、3D-MPL、QS21、コレステロール、水中油型エマルジョンを含む、請求項17に記載の複合製剤。

【請求項19】

前記水中油型エマルジョンが、スクアレン、トコフェロールおよびポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート(Tween 80)を含む、請求項18に記載の複合製剤。

【請求項20】

前記免疫原性組成物が、QS21、コレステロールおよび少なくとも1つの免疫賦活性CGジヌクレオチドを含有するCpGオリゴヌクレオチドを含む、請求項17に記載の複合製剤。

【請求項21】

双方の活性成分が、注射可能な溶液の形態である、請求項10～20のいずれかに記載の複合製剤。

【請求項22】

1)IL-18ポリペプチドまたはその生物活性断片と、2)抗原もしくはその免疫原性誘導体およびサポニンアジュバントを含む免疫原性組成物との個々の成分を活性成分として含み、該活性成分が、感染症、癌および自己免疫疾患の予防および/または治療のための同時、別々または逐次的使用に用いられる医薬品キット。

10

20

30

40

50

【請求項 23】

前記免疫原性組成物が、腫瘍関連抗原またはその免疫原性誘導体を含み、癌に対して予防的または治療的活性を有する、請求項22に記載の医薬品キット。

【請求項 24】

前記腫瘍関連抗原またはその免疫原性誘導体が、MAGEファミリー、PRAME、BAGE、LAGE 1、LAGE 2、SAGE、HAGE、XAGE、PSA、PAP、PSCA、プロステイン (prostein)、P501S、H ASH2、クリプト (Cripto)、B726、NY-BR1.1、P510、MUC-1、プロスターゼ (Prostase)、S TEAP、チロシナーゼ、テロメラゼ、スルビピン (survivin)、CASB616、P53、または her 2 neuに由来する抗原を含む群から選択される、請求項23に記載の医薬品キット。

【請求項 25】

医療に用いるための、請求項10～20のいずれかに記載の複合製剤。

10

【請求項 26】

請求項10～20のいずれかに記載の複合製剤の使用を含む、請求項1～9のいずれかに記載の方法。

【請求項 27】

感染症、癌、自己免疫疾患および関連する症状に罹患しまたは罹りやすく、かつ抗原またはその免疫原性誘導体とサポニンアジュバントとを含む免疫原性組成物で既にプライミングされた患者の予防および/または治療のための医薬品の製造における、IL-18ポリペプチドまたはその生物活性断片もしくは変異体の使用。

【請求項 28】

感染症、癌、自己免疫疾患および関連する症状に罹患しまたは罹りやすく、かつIL-18ポリペプチドまたはその生物活性断片もしくは変異体で既にプライミングされた患者の治療のための医薬品の製造における、抗原またはその免疫原性誘導体とサポニンアジュバントとを含む免疫原性組成物の使用。

20

【請求項 29】

前記抗原が、腫瘍関連抗原であり、前記癌が、乳癌、肺癌、NSCLC、大腸癌、黒色腫、卵巣癌、膀胱癌、頭頸部扁平上皮癌、食道癌を含む群から選択される、請求項27または28に記載の使用。

【請求項 30】

前記IL-18ポリペプチドまたはその生物活性断片もしくは変異体がヒトまたはマウスに由来する、請求項27～29のいずれかに記載の使用。

30

【請求項 31】

IL-18が、配列番号6もしくは配列番号7またはその生物活性断片もしくは誘導体のポリペプチドである、請求項30に記載の使用。

【請求項 32】

前記サポニンアジュバントが、QS-21またQS-17である、請求項27～31のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、感染症、癌、自己免疫疾患および関連する症状の治療または予防における有用性を見出す併用療法に関する。特に、この併用療法は、TH-1サイトカイン、特にIL-18、および免疫原性組成物、特に抗原およびサポニンアジュバントを含むワクチンの投与を含む。特に本発明は、IL-18またはその生物活性断片もしくは変異体と、腫瘍関連抗原およびサポニンアジュバントを含む免疫原性組成物との、前癌病変部または癌の治療のための使用に関する。本発明はさらに、本発明による使用に適した複合製剤および医薬品キットに関する。これらの治療法および医薬品製剤は予防および免疫療法の用途、特に腫瘍の予防および/または治療に適した免疫応答の刺激に特に有用である。

40

【背景技術】

【0002】

50

癌は、遺伝的变化によって単一の細胞から発症する疾患である。資金および人材の莫大な投資にも関わらず、癌は依然として主要な死亡原因の1つである。これらの腫瘍の臨床検出は主に、手術によって原発腫瘍を除去することができる疾患の比較的末期に行われ、そして多くの場合、異なる器官中に定着した微小転移の存在が既に見出される。癌を引き起こすメカニズムの理解における大きな進歩にも関わらず、転移性癌の治療、ならびに初期段階の腫瘍のより悪性および転移性の病変への進行の予防においてはあまり進歩していない。化学療法は多くの場合、これらの細胞を完全には除去せず、その結果、これらの細胞が再発病変の源として残る。

【0003】

TH-1型サイトカイン、例えば、IFN-、TNF、IL-2、IL-12、IL-18などは、投与された抗原に対する細胞仲介性免疫応答の誘導を助長する傾向がある。一方、高レベルのTh-2型サイトカイン（例えば、IL-4、IL-5、IL-6およびIL-10）は、体液性免疫応答の誘導を助長する傾向がある。インターフェロン-ガンマ（IFN γ ）誘導因子としても知られているインターロイキン18（IL-18）は、疾患（例えば、癌）に対する患者自身の免疫系を刺激する免疫調節効果を有する多面的サイトカインとして記載されている。IL-18は免疫応答の初期に発現され、体液性免疫応答および細胞性免疫応答の両方に作用し、より良いTH-1型プロファイルに関する応答を促進する。IL-18は活性化された抗原提示細胞によって産生され、幾つかの生物活性を有することが報告されており、具体的には、ナイーブCD4 T細胞のTh1細胞への分化を促進し、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞を刺激し、かつ活性化T細胞、主に細胞傷害性T細胞（CD8+表現型）の増殖を誘導してガンマインターフェロン（IFN-ガンマ）を分泌する（Okamura H. ら、1998、Adv. Immunol. 70: 281-312）。IL-18はまた、Fas誘導性腫瘍死を仲介し、IL-1 α およびGM-CSF（Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor; 顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子）の産生を促進し、抗血管形成活性を有する。

【0004】

IL-18は先天性免疫と、Th1およびTh2仲介性応答の双方とを刺激する能力を有する。IL-12の存在下において、IL-18はTh1細胞、非極性T細胞、NK細胞、B細胞および樹状細胞に作用し、IFN γ を産生することができる。IL-12の補助がない場合、IL-18はT細胞、NK細胞、マスト細胞および好塩基球中でIL-4およびIL-13の産生を誘導する能力を有する。

【0005】

IL-18は、内因性およびサイトカイン誘導性の抗腫瘍免疫応答の重要な構成要素であるIFN-ガンマの産生によって、腫瘍の退縮を誘導することが示されている。有効性は、異なる腫瘍動物モデルにおいて実証されている（Jonak Z ら、2002、J. Immunother. 25, S20-S27; Akamatsu S ら、2002、J. Immunother. 25, S28-S34）。他の薬剤と組み合わせられたIL-18を含む組成物、特に化学療法剤と組み合わせられたIL-18が記載されている（US 6,582,689）。IL-18はまた、ワクチン用アジュバントとして作用することが記載されている（WO 99/56775; WO 03/031569）。

【0006】

サポニン、Lacaille-Dubois, MおよびWagner H(1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine vol 2 pp 363-386) に教示される。サポニンは、植物界および海洋動物界に幅広く分布するステロイド配糖体またはトリテルペン配糖体である。サポニンは、水中において振動すると泡立つコロイド状溶液を形成し、およびコレステロールを沈殿させるために注目される。サポニンが、細胞膜に近接している場合、この細胞膜に孔様構造を生じ、これによって膜の破裂を生じる。赤血球の溶血は、この現象の一例であり、特定の、しかし全てではないサポニンの特性である。

【0007】

サポニンは、全身投与のためのワクチンにおけるアジュバントとして知られている。個々のサポニンのアジュバントおよび溶血活性は、当該分野において広く研究されている（Lacaille-DuboisおよびWagner、前出）。例えば、Quil A(南アメリカの樹木キラヤ・サポナ

10

20

30

40

50

リア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の樹皮に由来する)、およびその一部は、US 5,057,540および「Saponins as vaccine adjuvants」, Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12(1-2):1-55;およびEP 0 362 279 B1に記載されている。Quil Aまたはその一部を含む免疫刺激複合体 (Immune Stimulating Complexes (ISCOMS)) と称される微粒子構造は、ワクチンの製造に用いられている (Morein, B., EP 0 109 942 B1)。これらの構造は、アジュバント活性を有することが報告されている (EP 0 109 942 B1; WO 96/11711)。溶血性サポニンQS21およびQS17(Quil AのHPLC精製画分)は、効果的な全身アジュバントとして記載されており、その製造方法は、米国特許第5,057,540号およびEP 0 362 279 B1に開示されている。また、これらの参考文献には、全身ワクチンのための効果的なアジュバントとして作用するQS7(Quil-Aの非溶血性画分)の使用が記載される。QS21の使用はさらに、Kensilら (1991. J. Immunology vol 146, 431-437)にも記載されている。QS21とポリソルベイトまたはシクロデキストリンとの組合せもまた、知られている (WO 99/10008)。Quil Aの画分、例えば、QS21およびQS7を含む微粒子アジュバント系は、WO 96/33739およびWO 96/11711に記載されている。

【0008】

全身ワクチン接種研究に用いられている他のサポニンには、他の植物種、例えば、ジブソフィラ (Gypsophila) およびサポナリア (Saponaria) に由来するものを含む (Bomfordら、Vaccine, 10(9):572-577, 1992)。

【0009】

サポニンはまた、粘膜を介して適用されるワクチンの研究に用いられていることが知られており、この研究は、免疫応答の誘導において可変的な成果を得ている。Quil-A サポニンはこれまでに、抗原が鼻腔を介して投与された場合には、免疫応答の誘導に効果を及ぼさないことが示されている (Gizurarsonら、1994. Vaccine Research 3, 23-29)。Whilts および他の著者らはこのアジュバントを用いて成果を得た (Maharajら、Can. J. Microbiol, 1986, 32(5):414-20; ChavaliおよびCampbell, Immunobiology, 174(3):347-59)。Quil A サポニンを含むISCOMは、胃内および鼻腔内ワクチンの処方に用いられ、アジュバント活性を示している (McI Mowatら、1991, Immunology, 72, 317-322; McI MowatおよびDonachie, Immunology Today, 12, 383-385)。Quil Aの非毒性画分であるQS21はまた、経口または鼻腔内アジュバントとして記載されている (Suminoら、J. Virol., 1998, 72(6):4931-9; WO 98/56415)。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、IL-18などのTH-1サイトカインと、抗原およびサポニンアジュバント (例えば、QS-21であるが限定されない) を含む免疫原性組成物との併用投与が、非常に有効であり、感染症、原発性および転移性の腫瘍性疾患 (すなわち癌)、自己免疫疾患および関連する症状の効率的かつ耐容性良好な予防または治療を提供し、腫瘍関連抗原を発現するヒト癌細胞の増殖の阻害に特に有効であるという驚くべき発見に関する。

【0011】

発明の説明

従って、安全かつ有効な量の i) 抗原またはその免疫原性誘導体およびサポニンアジュバントを含む免疫原性組成物、特にワクチンと、ii) IL-18ポリペプチドまたはその生物活性断片もしくは変異体とを患者に投与することを含む、患者内の抗原に対する増強された免疫応答を誘発する方法が提供される。別の実施形態において、本発明は、予め樹立された腫瘍 (原発腫瘍および転移性腫瘍) を処置することまたは癌再発を防止することを含む患者の癌の重篤性を軽減する方法を提供する。この方法は、それを必要とする患者に安全かつ有効な量の i) IL-18ポリペプチドまたはその生物活性断片もしくは変異体と、ii) 腫瘍関連抗原またはその免疫原性誘導体およびサポニンアジュバントを含む免疫原性組成物、特にワクチンとを投与することを含む。

【0012】

10

20

30

40

50

1つの実施形態において、IL-18ポリペプチドは、マウスまたはヒトのIL-18ポリペプチドまたはその免疫原性断片もしくは変異体である。別の実施形態において、抗原は腫瘍関連抗原である。さらに別の実施形態において、サポニン、Quil Aの非毒性画分、例えば、QS-17またはQS-21である。1つの具体例において、サポニンは、QS21である。従って、1つの実施形態において、本発明は、予め樹立された腫瘍（原発腫瘍および転移性腫瘍）を処置することまたは癌再発を防止することを含む、患者の癌の重篤性を軽減する方法に関する。癌は、特に乳癌、肺癌（特に非小細胞肺癌）、黒色腫、大腸癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、頭頸部扁平上皮癌、胃癌および他のGI（消化管）癌、特に食道癌である。この方法は、i) 腫瘍関連抗原またはその免疫原性誘導体およびQS-21を含む免疫原性組成物、特にワクチンと、ii) IL-18ポリペプチドまたはその生物活性断片もしくは変異体とを哺乳動物に投与することを含む。

10

【0013】

本発明はまた、(1)IL-18ポリペプチドまたはその生物活性断片もしくは変異体と、(2)抗原およびサポニンアジュバントを含む免疫原性組成物との個々の成分を活性成分として含み、この活性成分が、感染症、原発性腫瘍および転移性腫瘍を含む癌、自己免疫疾患および関連する症状の予防および/または治療のために、同時に、別々にまたは逐次的に用いられる複合製剤に関する。1つの実施形態において、複合製剤中の免疫原性組成物は、コレステロール、3D-MPL、免疫賦活性オリゴヌクレオチド、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、トコフェロール、および水中油型エマルジョンまたは前記アジュバントの2種以上の組合せを含む群から選択される付加的な免疫賦活性化学物質を含む。例えば、この付加的なアジュバントは免疫賦活性オリゴヌクレオチドであってもよい。

20

【0014】

関連した態様において、本発明はまた、(1)IL-18ポリペプチドまたはその生物活性断片もしくは変異体と、(2)抗原もしくはその免疫原性誘導体およびサポニンアジュバントを含む免疫原性組成物との個々の成分を活性成分として含み、この活性成分が、感染症、原発性腫瘍および転移性腫瘍を含む癌および自己免疫疾患の予防および/または治療のために、同時に、別々にまたは逐次的に用いられる医薬品キットを提供する。

【0015】

本発明はさらに、防御免疫反応の達成または患者の疾患の重篤性を軽減するための医薬品の製造における、(1)IL-18ポリペプチドまたはその生物活性断片もしくは変異体と、(2)抗原もしくはその免疫原性誘導体およびサポニンアジュバントとを含む免疫原性組成物との両成分を、安全かつ有効な量で患者へ投与することによる使用に関する。

30

【0016】

本発明はさらに、疾患、特に癌の予防および/または治療のためにこのような組成物を使用し、およびこのような組成物を、ヒトを含む哺乳動物の腫瘍または癌細胞の増殖を阻害するために使用するための、免疫原性組成物を製造するための方法に関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

発明の詳細な説明

本発明の一つの形態において、免疫原性組成物内のサポニンアジュバントは、Quil Aの非毒性画分（QS-17またはQS-21など）であって、例えば、QS-21である。抗原は、感染生物に由来する抗原であり、例えば、腫瘍関連抗原もしくは免疫原性誘導体またはそれらの誘導体でありうる。一つの実施形態において、TH-1サイトカインは、マウスまたはヒトのIL-18またはそれらの生物活性断片である。免疫原性組成物およびIL-18は、抗原特異的抗体の誘導において相乗的に作用することができ、体液性免疫応答または/および通常TH-1型の免疫系に関連した細胞性免疫応答の誘導または増強に効力を有しうる。免疫応答の増強とは、体液性免疫応答および/もしくは細胞性免疫応答によって、または腫瘍の大きさおよび/もしくは負荷の縮小によって測定される免疫応答全体の増大を意味する。相乗効果とは、IL-18ポリペプチドまたはその免疫原性断片もしくは変異体が、本発明の免疫原性組成物を用いた併用療法において投与された場合に、免疫応答を誘導することが可

40

50

能であり、このような免疫原性組成物の存在は、IL-18ポリペプチドまたはその免疫原性断片もしくは変異体の有効性を増強できることを意味する。免疫応答の誘導の成果は、予防、疾患の重篤性の軽減（癌の場合、予め樹立された腫瘍、原発性もしくは転移性の癌の軽減、または癌の再発の予防を含む）、および/または治療である。

【0018】

従って、1つの実施形態において、i) 感染性生物に由来する抗原または腫瘍関連抗原およびQS-21を含む有効量の免疫原性組成物と、ii) IL-18ポリペプチドまたはその生物活性断片もしくは変異体を哺乳動物に投与することを含み、この哺乳動物中で抗原に対する免疫応答を誘発する方法が提供される。1つの実施形態において、前記治療の双方の成分が、逐次的に与えられる。すなわち、この免疫原性組成物は、IL-18の投与によってプライムされた体液性免疫応答および/または細胞性免疫応答を高めるために用いられる。あるいは、別の実施形態において、本発明による免疫原性組成物は、逐次的にIL-18を受け入れるであろう個体中の体液性免疫応答および/または細胞性免疫応答をプライムするために用いられる。さらに別の実施形態において、前記治療の双方の成分は、2つの異なる部位において同時に投与されるかまたは同じ製剤中に混合されるか、そのいずれかによって同時に与えられる。当業者は、免疫原性組成物とIL-18ポリペプチドまたは免疫原性断片もしくはその変異体との双方を1度にまたは繰り返し与えることが可能であることを理解するだろう。

10

【0019】

本発明の範囲内に意図される併用療法は、いずれかの成分を単独に用いることと比較すると、例えば、効率を向上させることに少なくとも効果的である。特に癌の分野では、併用治療は有利である。なぜなら、2つの抗癌剤を組合せ、各抗癌剤は異なる作用メカニズムを通して付加的な方法で、例えば、相乗的に機能し、ヒト腫瘍細胞に対する増強された細胞傷害性応答をもたらすからである。

20

【0020】

関連する実施形態において、(1)IL-18ポリペプチドまたはその生物活性断片もしくは変異体と、(2)抗原およびサポニンアジュバントを含む免疫原性組成物を活性成分として含み、この活性成分が、感染症および癌の予防および/または治療のために、同時に、別々にまたは逐次的に用いられる複合製剤（例えば、医薬品マルチバイアルパック）が提供される。

30

【0021】

複合製剤とは、医薬製剤、または活性成分を含有する1つ以上の単位剤形を含むことができる医薬品（マルチバイアル）パックもしくはディスペンサー装置を意味する。このパックは、例えば、プリスターパックなどの金属またはプラスチックのホイルを含むことができる。パックまたはディスペンサー装置は、投与のための使用説明書を伴ってもよい。IL-18ポリペプチドまたはその生物活性断片または変異体および免疫原性組成物が2つの分離した組成物として投与されることが意図されている場合、これらは、例えば、マルチバイアルパックの形態で存在することが可能である。本発明により同時に、または別々に、または逐次的に投与される活性成分は、既知の薬剤の単なる集合体を表すのではなく、IL-18ポリペプチドまたはその免疫原断片または変異体の使用という驚くほど有益な特性を有する新たな組合せによって、NK（ナチュラルキラー）細胞の活性化、ならびにT細胞仲介型免疫応答およびサイトカイン産生を含む、免疫系の先天的成分および適応成分の両方の刺激が可能となり、その結果前記免疫原性組成物の有効性が増大する。これによって、新しい効果的な治療が生じる。複合製剤は、キットのパーツとして指定された製剤もまた、複合製剤の成分が必ずしも、分離または逐次的適用に利用するために、例えば組成物において結合体としては存在しなくてもよいということの意味することが理解される。従って、キットのパーツという表現は、構成要素の物理的分離の観点からすると、必ずしも真の組合せ物ではないということの意味する。

40

【0022】

複合製剤は、癌の治療または予防のいずれにも用いることが可能であり、特に癌の重篤

50

性の軽減または癌再発の防止に用いることができる。本明細書中に記載される、併用療法の利益を受けることができる癌は、無制限な細胞の成長および増殖、前癌病変部、原発腫瘍ならびに転移性の腫瘍性病変に特徴付けられるいずれかの疾患を含み、かつ、これに限定するものではないが、乳癌、肺癌（特に非小細胞肺 - NSCLC - 癌）、黒色腫、大腸癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、頭頸部扁平上皮癌、胃癌および他のGI（消化管）癌、特に食道癌、白血病、リンパ種、骨髄腫、プラズマ細胞腫を含む。

【0023】

ペプチド（すなわち約50以下のアミノ酸）を含む、典型的な抗原またはその誘導体および断片は、癌（-精巢）抗原として公知のMAGE（Melanoma Antigen-encoding Genes:黒色腫抗原コーディング遺伝子）のファミリーによってコードされる抗原を含む（Gaugler B. 10
ら、J. Exp. Med., 1994, 179: 921; Weynants P. ら、Int. J. Cancer, 1994, 56: 826; Patard J.J.ら、Int. J. Cancer, 1995, 64: 60）。MAGEタンパク質を発現する癌は、MAGE関連腫瘍として知られている。MAGE遺伝子は密接に関連した遺伝子のファミリーに属し、X染色体上に位置してコーディング配列内に互いに64~85%の相同性を共有するMAGE 1、MAGE 2、MAGE 3（黒色腫抗原コーディング遺伝子3）、MAGE 4、MAGE 5、MAGE 6、MAGE 7、MAGE 8、MAGE 9、MAGE 10、MAGE 11、MAGE 12を含む（De Plaen E. ら、Immunogenetics, 1994, 40, 360-369）。これらの遺伝子は、MAGE A1、MAGE A2、MAGE A3、MAGE A4、MAGE A5、MAGE A6、MAGE A7、MAGE A8、MAGE A9、MAGE A10、MAGE A11、MAGE A12（MAGE Aファミリー）として知られる場合もある。2つの他のタンパク質群もまた、MAGEファミリーの一部であるが、より離れた関係である。これらは、MAGE BおよびMAGE C群である。MAGE B 20
ファミリーは、MAGE B1（MAGE Xp1、およびDAM 10としても知られる）、MAGE B2（MAGE Xp2およびDAM 6としても知られる）MAGE B3およびMAGE B4を含む。MAGE Cファミリーは現在、MAGE C1およびMAGE C2を含む。一般論としては、MAGEタンパク質は、タンパク質のC末端に向けて位置するコア配列シグネチャー（signature）を含むと定義することができる（例えば、309アミノ酸タンパク質であるMAGE A1に関しては、コアシグネチャーはアミノ酸195~279に対応する）。

【0024】

従って、コアシグネチャーのコンセンサスパターンは、以下のように記載され、ここでxは、小文字の残基が保存されており（保存された変異体が許容される）、大文字の残基が完全に保存されている任意のアミノ酸を表す。 30

【0025】

コア配列シグネチャー:

LixvL(2x)l(3x)g(2x)apEExiWexl(2x)m(3-4x)Gxe(3-

4x)gxp(2x)llt(3x)VqexYLxYxqVPxsxP(2x)yeFLWGprA(2x)Et(3x)kv

保存された置換は周知であり、通常、配列アライメントのコンピュータープログラムにおいては、初期値スコアリングマトリクスとして設定されている。これらのプログラムは、PAM250を含む（Dayhoft M.O. ら、1978, "A model of evolutionary changes in proteins" "Atlas of Protein sequence and structure" 5(3) M.O. Dayhoft(ed.), 345-352)中、National Biomedical Research Foundation, Washington, および Blosum 62(Steven Henikof & Jorja G. Henikof(1992), "Amino acid substitution matrices from protein blocks"), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(Biochemistry): 10915-10919。 40

【0026】

一般論としては、下記の群内の置換は保存された置換であるが、群間の置換は非保存的であると考えられている。群は、以下のとおりである。

【0027】

i)アスパラギン酸/アスパラギン/グルタミン酸/グルタミン

ii)セリン/トレオニン

iii)リシン/アルギニン

iv)フェニルアラニン/チロシン/トリプトファン

v)ロイシン/イソロイシン/バリン/メチオニン

vi) グリシン/アラニン

一般的に、および本発明との関連から、MAGEタンパク質は、MAGE A1のアミノ酸195~279を有するこのコア領域とおよそ50%同一であるだろう。

【0028】

MAGE-3は、69%の黒色腫で発現しており(Gaugler B.ら, J. Exp. Med., 1994, 179: 921)、44%のNSCLC(非小細胞肺癌)(Yoshimatsu T. J Surg Oncol., 1998, 67,126-129)、75%の小細胞肺癌(SCLC)(Traversari C.ら, Gene Ther. 1997, 4: 1029-1035)、48%の頭頸部扁平上皮癌、34%の膀胱移行上皮癌、57%の食道癌、32%の大腸癌および24%の乳癌においても検出されることが可能である(Van Pel A.ら, Immunol. Rev., 1995, 145: 229; Inoue H.ら, Int. J. Cancer, 1995, 63: 523; Nishimura S.ら, Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi 1997, Apr, 20(2): 95-101)。幾つかのCTLエピトープは、MHCクラスI分子であるHLA.A1またはHLA.A2(Van der Bruggen P.ら, Eur. J. Immunol., 1994, 24, 3038-3043)のいずれかおよびHLA.B44(Herman, J.ら, Immunogenetics, 1996, 43, 377-383)の対立遺伝子の各々に対して特異的結合モチーフを有するMAGE-3タンパク質上で同定されている。

【0029】

MAGE-3は、黒色腫、肺癌および食道癌においては検出されるが、MAGE関連腫瘍の患者におけるこれら抗原の発現レベルは、制限され、免疫認識の閾値を下回るようである(Weiser T.S.ら, Ann. Thorac. Surg. 2001, 71: 295-302)。

【0030】

他の例示的な抗原またはそれらに由来する誘導体もしくは断片は、WO 99/40188に開示されたMAGE抗原、PRAME(WO 96/10577)、BAGE、RAGE、LAGE 1(WO 98/32855)、LAGE 2(NY-E S0-1としても知られる、WO 98/14464)、XAGE(Liuら, Cancer Res, 2000, 60:4752-4755、WO 02/18584) SAGE、およびHAGE(WO 99/53061)またはGAGE(RobbinsおよびKawakami, 1996, Current Opinions in Immunology 8, pps 628-636、Van den Eyndeら, International Journal of Clinical & Laboratory Research(1997年提出)、Correaleら(1997)、Journal of the National Cancer Institute 89, p293を含む。実際、これらの抗原は、黒色腫、肺癌、肉腫および膀胱癌などの広い範囲の腫瘍型において発現している。

【0031】

1つの実施形態において、前立腺抗原は、前立腺癌抗原または前立腺特異的分化抗原(PSA)、PAP、PSCA(PNAS 95(4) 1735 -1740 1998)、PSMAなどの前立腺抗原またはプロステースとして知られる抗原が用いられている。

【0032】

別の実施形態において、前立腺抗原は、P501Sまたはその断片である。P501Sは、プロステインとも名付けられ(Xuら, Cancer Res. 61, 2001, 1563-1568)、W098/37814の配列番号113として公知であり、553アミノ酸タンパク質である。免疫原性断片およびその一部は、上記に参照された特許出願に開示されているような20もしくは少なくとも20、50もしくは少なくとも50、または100もしくは少なくとも100の連続したアミノ酸を含み、本発明によって明確に意図されている。用いられうる断片は、WO 98/50567(PS108抗原)に開示されており、前立腺癌関連タンパク質として、WO 99/67384の配列番号9に開示されている。用いられうる他の断片は、完全長P501Sタンパク質のアミノ酸51~553、34~553または55~553である。特に、構築物1、2および3(図2を参照のこと。配列番号27~32)が、意図されており、酵母系において発現することが可能である。例えば、このようなポリペプチドをコードするDNA配列は、酵母系で発現することが可能である。

【0033】

プロステースは、前立腺特異的セリンプロテアーゼ(トリプシン様)であり、254アミノ酸長であって、保存されたセリンプロテアーゼの触媒三連構造H-D-Sおよび、潜在的な分泌機能を示すアミノ末端前プロペプチド配列を有する(P. Nelson, Lu Gan, C. Ferguson, P. Moss, R. Linas, L. HoodおよびK. Wand, "Molecular cloning and characterization of prostatic serine protease with prostate restricted

expression, In Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1999) 96, 3114-3119)。推定糖鎖付加部位が記載されている。予測構造は、他の公知のセリンプロテアーゼに非常に似ており、成熟ポリペプチドが単独のドメインに折り畳まれていることを示している。成熟タンパク質は、224アミノ酸長で、少なくとも1つのA2エピトープを有し、天然にプロセシングされることが示されている。プロステースヌクレオチド配列ならびに推定ポリペプチド配列およびホモログは、Fergusonら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 3114-3119)および国際特許出願WO 98/12302(およびまた対応認可特許米国第5,955,306号)、WO 98/20117(およびまた対応認可特許米国第5,840,871号および米国第5,786,148号)(前立腺特異的カリクレイン)およびWO 00/04149(P703P)に開示されている。

【0034】

他の前立腺特異的抗原は、W098/37418およびW0/004149から公知である。別の前立腺特異的抗原は、STEAP(PNAS 96 14523 14528 7 -12 1999)である。

【0035】

他の腫瘍関連抗原は、Plu -1 J Biol. Chem 274(22) 15633 -15645, 1999、HASH -1、HASH-2(Alders, M. ら、Hum. Mol. Genet. 1997, 6, 859-867)、クリプト(Cripto)(Salomonら、Bioassays 199, 21 61 -70、米国特許第5654140号)、CASB616(WO 00/53216)、クリプティン(Criptin)(US 5,981,215)を含む本発明との関連で有用である。さらに、癌治療におけるワクチンと特に関連性がある抗原はまた、チロシナーゼ、テロメラゼ、P53、NY-Br1.1(WO 01/47959)およびWO 00/43420、B726(WO 00/60076、配列番号469および463; WO 01/79286、配列番号474および475)、P510(WO 01/34802 配列番号537および538)などに開示されているそれらの断片およびソルビビン(survivin)を含む。

【0036】

本発明はまた、Her-2/neu、マンマグロビン(米国特許第5,668,267号)、B305D(W000/61753配列番号299、304、305および315)、またはW000/52165、W099/33869、W099/19479、W098/45328に開示された乳癌抗原との組合せにおいて有用である。Her-2/neu抗原は、とりわけ米国特許第5,801,005号に開示されている。Her-2/neuは、細胞外ドメイン(およそアミノ酸1~645を含む)全体またはその断片を含むことが可能であり、かつおよそC末端580アミノ酸の細胞内ドメインの少なくとも1つの免疫原性部分または全体を含むことができる。特に、細胞内部分は、リン酸化ドメインまたはその断片を含みうる。このような構築物は、W000/44899に開示されている。用いられうる1つの構築物は、ECD-PhDとして知られており、第2の構築物は、ECD デルタPhD(W000/44899を参照)として知られており、dHer2とも名付けられている。本明細書中で用いられた場合、Her-2/neuは、例えば、ラット、マウスまたはヒト由来であってもよい。

【0037】

特定の腫瘍抗原は、小さなペプチド抗原(すなわち、約50以下のアミノ酸)である。典型的なペプチドは、MUC-1などのムチン由来のペプチドを含む(例えば、US 5,744,144、US 5,827,666、W088/05054、US 4,963,484を参照のこと)。具体的に意図されるのは、MUC-1ペプチドの少なくとも1つの反復単位を含み、または少なくとも2つのこのような反復を含み、SM3抗体(US 6,054,438)によって認識されるMUC-1由来ペプチドである。他のムチン由来ペプチドは、MUC-5由来のペプチドを含む。

【0038】

あるいは、前記抗原はIL13およびIL14などのインターロイキンであってもよい。または、抗原は全長ゴナドトロピン(性腺刺激)ホルモン放出ホルモン(GnRH、W095/20600)などの自己ペプチドホルモンであってもよい。このGnRHは、短い10アミノ酸長のペプチドであり、多くの癌の治療または免疫去勢において有用である。他の腫瘍特異的抗原は、これに限定するものではないが、GM2およびGM3などの腫瘍特異的ガングリオシドを含む。

【0039】

抗原は、例えば、以下のような、ウイルス、細菌または寄生生物を含む、ヒトに対して病原性のものに由来しうる：ヒト免疫不全ウイルスHIV-1(例えば、tat、nef、逆転写酵素、gag、gp120およびgp160)、ヒト単純ヘルペスウイルス(HSV)、例えば、gDもしくはそ

10

20

30

40

50

の誘導体または前初期タンパク質、例えば、HSV1またはHSV2に由来するICP27、サイトメガロウイルス（（特にヒト）（例えば、gBまたはその誘導体））、ロタウイルス（生-弱毒化ウイルスを含む）、エプスタインバー・ウイルス（例えば、gp350またはその誘導体）、水痘・帯状疱疹ウイルス（例えば、gpl、IIおよびIE63）、または肝炎ウイルス、例えば、B型肝炎ウイルス（例えば、B型肝炎表面抗原またはその誘導体）、A型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスおよびE型肝炎ウイルス、または他のウイルス性病原体、例えば、パラミクソウイルス：呼吸器合胞体ウイルス（RSウイルス）（例えば、FおよびGタンパク質またはその誘導体）、ラインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ヒトパピローマウイルス（例えば、HPV6、11、16、18、...）、フラビウイルス（例えば、黄熱ウイルス、デングウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス）、またはインフルエンザウイルス（全生または不活化ウイルス、スプリットインフルエンザウイルス、卵またはMDCK細胞内で培養されたもの、または全fluウイルス（R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920に記載のとおり）またはそれらの精製もしくは組換えタンパク質、例えば、HA、NP、NAまたはMタンパクまたはそれらの組合せ）、または細菌性病原体、例えば、ナイセリア属細菌種（*Neisseria* spp）、例えば、ナイセリア・ゴノレエ（*N. gonorrhoea*）およびナイセリア・メニンジティディス（*N. meningitidis*）（例えば、莢膜多糖およびそのコンジュゲート、トランスフェリン結合タンパク質、ラクトフェリン結合タンパク質、PilC、アドヘジン）；エス・ピロゲネス（*S. pyogenes*）（例えば、Mタンパク質またはそれらの断片、C5Aプロテアーゼ、リポテイコ酸）、エス・アガラクティエ（*S. agalactiae*）、エス・ミュータンス（*S. mutans*）；エイチ・デュクレイ（*H. ducreyi*）；モラクセラ属細菌種（*Moraxella* spp）、例えば、ブランハメラ・カタラーリス（*Branhamella catarrhalis*）としても公知であるモラクセラ・カタラーリス（*M. catarrhalis*）（例えば、高分子量または低分子量のアドヘジンおよびインベシ）；ボルデテラ属細菌種（*Bordetella* spp）、例えば、ボルデテラ・ペルツシス（*B. pertussis*）（例えば、ペルタクチン、百日咳毒素またはその誘導体、線維状赤血球凝集素、アデニル酸シクラーゼ、線毛）、ボルデテラ・パラペルツシス（*B. parapertussis*）およびボルデテラ・ブロンキセプチカ（*B. bronchiseptica*）；マイコバクテリウム属細菌種（*Mycobacterium* spp.）、例えば、マイコバクテリウム・ツベルクローシス（*M. tuberculosis*）（例えば、ESAT6、抗原85A、BまたはC）、マイコバクテリウム・ボビス（*M. bovis*）、マイコバクテリウム・レプレ（*M. leprae*）、マイコバクテリウム・アビウム（*M. avium*）、マイコバクテリウム・パラツベルクローシス（*M. paratuberculosis*）、マイコバクテリウム・スメグマチス（*M. smegmatis*）；レジオネラ属細菌種（*Legionella* spp）、例えば、レジオネラ・ニューモフィラ（*L. pneumophila*）；エシェリキア属細菌種（*Escherichia* spp）、例えば、腸管毒性大腸菌（enterotoxigenic *E. coli*）（例えば、定着因子、熱不安定性毒素またはその誘導体、熱安定性毒素またはその誘導体）、腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *E. coli*）、腸管病原性大腸菌（enteropathogenic *E. coli*）（例えば、志賀毒素様毒素またはその誘導体）；ビブリオ属細菌種（*Vibrio* spp）、例えば、ビブリオ・コレラ（*V. cholera*）（例えば、コレラ毒素またはその誘導体）；シゲラ属細菌種（*Shigella* spp）、例えば、シゲラ・ソンネイ（*S. sonnei*）、シゲラ・ディセンテリエ（*S. dysenteriae*）、シゲラ・フレクスネリ（*S. flexnerii*）；エルシニア属細菌種（*Yersinia* spp）、例えば、エルシニア・エンテロコリチカ（*Y. enterocolitica*）（例えば、Yopタンパク質）、エルシニア・ペスティス（*Y. pestis*）、エルシニア・シュードツベルクローシス（*Y. pseudotuberculosis*）；カンピロバクター属細菌種（*Campylobacter* spp）、例えば、カンピロバクター・ジェジュニ（*C. jejuni*）（例えば、毒素、アドヘジンおよびインベシ）およびカンピロバクター・コリ（*C. coli*）；サルモネラ属細菌種（*Salmonella* spp）、例えば、サルモネラ・ティフィ（*S. typhi*）、サルモネラ・パラティフィ（*S. paratyphi*）、サルモネラ・コレラスイス（*S. choleraesuis*）、サルモネラ・エンテリティディス（*S. enteritidis*）；リステリア属細菌種（*Listeria* spp）、例えば、リステリア・モノサイトゲネス（*L. monocytogenes*）；ヘリコバクター属細菌種（*Helicobacter* spp）、例えば、ヘリコバクター・ピロリ（*H. pylori*）（例えば、ウレアーゼ、カタラーゼ、空砲化毒素）；シュードモナス属細菌

10

20

30

40

50

菌種 (*Pseudomonas* spp.)、例えば、シュードモナス・エルジノーサ (*P. aeruginosa*) ; スタ
 フィロコッカス属細菌種 (*Staphylococcus* spp.)、例えば、スタフィロコッカス・アウ
 レウス (*S. aureus*)、スタフィロコッカス・エピデルミディス (*S. epidermidis*) ; エ
 ンテロコッカス属細菌種 (*Enterococcus* spp.)、例えば、エンテロコッカス・フェカーリ
 ス (*E. faecalis*)、エンテロコッカス・フェシウム (*E. faecium*) ; クロストリジウム属細
 菌種 (*Clostridium* spp.)、例えば、クロストリジウム・テタニ (*C. tetani*) (例えば、破傷
 風毒素およびその誘導体)、クロストリジウム・ボツリナム (*C. botulinum*) (例えば、ボツ
 リヌス毒素およびその誘導体)、クロストリジウム・ディフィシレ (*C. difficile*) (例えば
 、クロストリジウム毒素AまたはBおよびそれらの誘導体) ; パシラス属細菌種 (*Bacillus* s
 pp.)、例えば、パシラス・アンスラシス (*B. anthracis*) (例えば、ボツリヌス毒素および
 その誘導体) ; コリネバクテリウム属細菌種 (*Corynebacterium* spp.)、例えば、コリネバ
 クテリウム・ジフテリア (*C. diphtheriae*) (例えば、ジフテリア毒素およびその誘導体) ;
 ボレリア属細菌種 (*Borrelia* spp.)、例えば、ボレリア・ブルグドルフェリ (*B. burgdor
 feri*) (例えば、OspA、OspC、DbpA、DbpB)、ボレリア・ガリニイ (*B. garinii*) (例えば、O
 spA、OspC、DbpA、DbpB)、ボレリア・アフゼリイ (*B. afzelii*) (例えば、OspA、OspC、Dbp
 A、DbpB)、ボレリア・アンデルソニイ (*B. andersonii*) (例えば、OspA、OspC、DbpA、DbpB
)、ボレリア・ヘルムシイ (*B. hermsii*) ; エールリキア属細菌種 (*Ehrlichia* spp.)、例え
 ば、エールリキア・エクイ (*E. equi*) およびヒト顆粒球エールリッヒ病 (Human Granuloc
 ytic Ehrlichiosis) の因子 ; リケッチア属細菌種 (*Rickettsia* spp.)、例えば、リケッチ
 ア・リケチイ (*R. rickettsii*) ; クラミジア属細菌種 (*Chlamydia* spp.)、例えば、クラミ
 ジア・トラコマチス (*C. trachomatis*) (例えば、MOMP、ヘパリン結合性タンパク質)、ク
 ラミジア・ニューモニエ (*C. pneumoniae*) (例えば、MOMP、ヘパリン結合性タンパク質)
 、クラミジア・シッタシ (*C. psittaci*) ; レプトスピラ属細菌種 (*Leptospira* spp.)、例え
 ば、レプトスピラ・インタロガンス (*L. interrogans*) ; トレポネーマ属細菌種 (*Treponema*
 spp.)、例えば、トリポネーマ・パリダム (*T. pallidum*) (例えば、レア (rare) 外膜タン
 パク質)、トレポネーマ・デンチコラ (*T. denticola*)、トレポネーマ・ヒオディセンチリ
 エ (*T. hyodysenteriae*) ; 寄生生物、例えば、プラスモジウム属の種 (*Plasmodium* spp.)、
 例えば、熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) ; トキソプラズマ属の種 (*Toxoplasma* spp
 .)、例えば、トキソプラズマ・ゴンヂ (*T. gondii*) (例えば、SAG2、SAG3、Tg34) ; エント
 アメーバ属の種 (*Entamoeba* spp.)、例えば、赤痢アメーバ (*E. histolytica*) ; バベシア属
 の種 (*Babesia* spp.)、例えば、バベシア・ミクロチ (*B. microti*) ; トリパノソーマ属の種
 (*Trypanosoma* spp.)、例えば、トリパノソーマ・クルージ (*T. cruzi*) ; ギアルディア属の
 種 (*Giardia* spp.)、例えば、ランブル鞭毛虫 (*G. lamblia*) ; リーシュマニア属の種 (*Leshm
 ania* spp.)、例えば、リーシュマニア・メジャー (*L. major*) ; ニューモシスチス属の種 (*P
 neumocystis* spp.)、例えば、ニューモシスティス・カリニ (*P. carinii*) ; トリコモナス
 属の種 (*Trichomonas* spp.)、例えば、膣トリコモナス (*T. vaginalis*) ; シストストーマ属
 の種 (*Schistosoma* spp.)、例えば、マンソン住血吸虫 (*S. mansoni*) ; 、あるいは酵母、カ
 ンジダ属真菌種 (*Candida* spp.) など、例えば、カンジダ・アルビカンス (*C. albicans*) ;
 クリプトコックス属真菌種 (*Cryptococcus* spp.)、例えば、クリプトコックス・ネオファ
 ルマンズ (*C. neoformans*) に由来するもの。

【 0 0 4 0 】

マイコバクテリウム・ツベルクロシス (*M. tuberculosis*) の他の抗原は、例えば、Tb
 Ra12、Tb H9、Tb Ra35、Tb38-1、Erd 14、DPV、MTI、MSL、mTTC2およびhTCC1である (WO 9
 9/51748)。マイコバクテリウム・ツベルクロシス (*M. tuberculosis*) のタンパク質はま
 た、融合タンパク質およびそれらの変異体も含み、このタンパク質においては少なくとも
 2つ、または少なくとも3つのマイコバクテリウム・ツベルクロシスポリペプチドがより大
 きなタンパク質に融合している。融合体の例としては、Ra12-TbH9-Ra35、Erd14-DPV-MTI
 、DPV-MTI-MSL、Erd14-DPV-MTI-MSL-mTCC2、Erd14-DPV-MTI-MSL、DPV-MTI-MSL-mTCC2、Tb
 H9-DPV-MTIが挙げられる (WO 99/51748)。

【 0 0 4 1 】

10

20

30

40

50

クラミジア(*Chlamydia*)の抗原としては、例えば、高分子量タンパク質(HWMP)(W0 99/17741)、ORF3(EP 366 412)、および推定膜タンパク質(Pmps)が挙げられる。ワクチン製剤の他のクラミジア(*Chlamydia*)抗原は、W0 99/28475に記載の群から選択されうる。

【0042】

細菌性抗原は、ストレプトコッカス属細菌種(*Streptococcus* spp)、例えば、ストレプトコッカス・ニューモニエ(*S. pneumoniae*)(例えば、莢膜多糖およびそのコンジュゲート、PsaA、PspA、ストレプトリシン、コリン結合タンパク質)、ならびにタンパク質抗原ニューモリジン(Pneumolysin:肺炎球菌産生毒素)(*Biochem Biophys Acta*, 1989, 67, 1007; Rubins ら、*Microbial Pathogenesis*, 25, 337-342)およびその突然変異解毒化誘導体(W0 90/06951; W0 99/03884)に由来してもよい。他の細菌性抗原は、ヘモフィルス属細菌種(*Hemophilus* spp.)、例えば、ヘモフィルス・インフルエンザB型(*H. influenzae* type B)(例えば、PRPおよびそのコンジュゲート)、型分類不能のヘモフィルス・インフルエンザ、例えば、OMP26、高分子量アドヘジン、P5、P6、タンパク質Dおよびリポタンパク質D、ならびにフィンプリンおよびフィンプリン由来ペプチド(US 5,843,464)またはそれらの多コピー変異体もしくは融合タンパク質に由来する。

10

【0043】

B型肝炎表面抗原の誘導体は、当該技術分野において周知であり、とりわけ、欧州特許出願EP-A-414 374、EP-A-0304 578およびEP 198-474に記載のPreS1、PreS2 S抗原を含む。1つの実施形態において、HBV抗原はHBVポリメラーゼである(Ji Hoon Jeongら、1996, B BRC 223, 264-271; Lee H.J.ら、*Biotechnol. Lett.* 15, 821-826)。HIV-由来抗原についてもまた意図されており、例えば、特にCHO細胞内で発現される場合のHIV-1抗原gp120が挙げられる。

20

【0044】

本発明の免疫原性組成物は、ヒトパピローマウイルス(HPV 6a、6b、11、16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59および68)に由来する抗原、特に陰部疣を引き起こすと考えられるHPV血清型(HPV 6またはHPV 11など)、および子宮頸癌を引き起こすHPVウイルス(HPV16、HPV18など)に由来する抗原を含んでもよい。適当なHPV抗原は、E1、E2、E4、E5、E6、E7、L1およびL2である。陰部疣の予防または治療用の融合体の形態の例としては、L1粒子またはキャプソマー、ならびにHPV 6およびHPV 11タンパク質E6、E7、L1およびL2から選択される1以上の抗原を含む融合タンパク質が挙げられる。融合タンパク質の例としては、W096/26277に開示されているL2E7、およびW099/10375に開示されているタンパク質D(1/3)-E7が挙げられる。HPVの子宮頸部感染症または癌の予防または治療用のワクチンの組成物はHPV 16または18抗原を含み得る。例えば、L1もしくはL2抗原単量体、またはウイルス様粒子(VLP)として共に存在するL1もしくはL2抗原、またはVLPもしくはキャプソマー構造中に単独で存在するL1タンパク質である。このような抗原、ウイルス様粒子およびキャプソマーは、それ自体公知である。例えば、W094/00152、W094/20137、W094/05792およびW093/02184を参照のこと。

30

【0045】

付加的な初期タンパク質は、単独で、またはE7、E2もしくはE5などの融合タンパク質として含まれていてもよい。他の実施形態は、L1E7融合タンパク質を含むVLPを含む(W096/11272)。HPV 16抗原は、HPV 16由来の、タンパク質D - E6もしくはE7融合体を形成するようにタンパク質D担体と融合した初期タンパク質E6もしくはE7、またはそれらの組合せ、あるいはE6もしくはE7とL2との組合せを含み得る(W096/26277)。あるいは、HPV 16または18初期タンパク質E6およびE7は、単一の分子、例えば、タンパク質D - E6/E7融合体中に存在し得る。他の融合体は、必要な場合にはHPV 18由来のE6およびE7タンパク質の一方または双方を含む。例えば、タンパク質D - E6もしくはタンパク質D-E7融合タンパク質またはタンパク質D E6/E7融合タンパク質の形態で含み得る。融合体は、他のHPV株、例えば、HPV 31株または33株由来の抗原を含むことができる。

40

【0046】

マラリアを引き起こす寄生生物に由来する抗原についてもまた意図されている。例えば

50

、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodia falciparum*) に由来する抗原は、RTS,S およびTRAPを含む。RTSは、B型肝炎表面抗原のpreS2部分の4アミノ酸を介してB型肝炎ウイルスの表面(S)抗原に連結された熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) の環状スポロゾイト(CS)タンパク質のC末端部分を実質的に全て含むハイブリッドタンパク質である。RTSの全構造は、W093/10152に開示されている。酵母内で発現された場合、RTSはリポタンパク質粒子として産生され、HBV由来のS抗原と共発現された場合、RTSは、RTS,Sとして公知の混合粒子を産生する。TRAP抗原は、W090/01496に記載されている。本発明の1つの実施形態は、抗原調製物がRTS,S抗原とTRAP抗原との組合せを含む融合体である。この融合体の成分の候補となりうる他のプラスモジウム抗原としては、熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) MSP1、AMA1、MSP3、EBA、GLURP、RAP1、RAP2、セクエストリン (Sequestrin)、PfEMP1、Pf332、LSA1、LSA3、STARP、SALSA、PfEXP1、Pfs25、Pfs28、PFS27/25、Pfs16、Pfs48/45、Pfs230およびそのプラスモジウム属種 (*Plasmodium spp.*) におけるそれらの類似体が挙げられる。

【0047】

本明細書において用いられる場合、「免疫原性組成物」という用語は、患者に投与されると、この患者の免疫応答に正に作用する組成物を意味する最も広い意味に用いられる。免疫原性組成物は患者に、細胞性免疫応答、例えば、CTLまたは体液性免疫応答、例えば、抗体誘発のいずれかの、増強された全身性または局所的免疫応答を提供する。特に、本発明による免疫原性組成物は、有効量の抗原ポリペプチド/タンパク質、特に腫瘍関連抗原、およびその免疫原性誘導体、例えば、その断片、またはコード化ポリヌクレオチド、および製薬上許容可能な担体を含む製剤に関連することが可能である。安全かつ有効な量とは、必要であればアジュバントに関連して、ヒトに投与された場合に、検出可能な免疫応答、例えば、体液性応答(抗体)もしくは細胞性応答を生じるか、または典型的なワクチンにおける重大で有害な副作用を起こすことなく免疫系を免疫調節する能力を有するタンパク質の用量を意味する。このような量は、特定のどの免疫原が用いられ、それがどのように与えられるかによって異なる。一般的には、各用量には、1~5000 μ gのタンパク質、例えば、1~1000 μ gのタンパク質、例えば、1~500 μ gのタンパク質、例えば、1~100 μ gのタンパク質、例えば、1~50 μ gのタンパク質が含まれるであろうと予期される。特定のワクチンの最適量は、被験者における適切な免疫応答の観察を含む標準的な調査によって確認することができる。初回ワクチン接種に続いて、被験者は、十分に間隔をあけた1回または数回の追加免疫付与を受けることが可能である。ワクチン製剤は、通常Vaccine Design("The subunit and adjuvant approach"(eds. Powell M.F. & Newman M.J).(1995) Plenum Press New York)に記載されている。リポソーム内へのカプセル化は、Fullertonによる米国特許第4,235,877号に記載されている。

【0048】

免疫原性抗原ポリペプチドとは、このポリペプチドを発現する患者に由来する抗血清および/またはT細胞についての免疫アッセイ(例えば、ELISAまたはT細胞活性化アッセイ)中で検出可能に反応するポリペプチドをいう。当業者に周知の技術を用いて免疫原性活性のスクリーニングを行うことができる。例えば、このようなスクリーニングは、HarlowおよびLane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988に記載されたような方法を用いて実施することができる。1つの具体例においては、ポリペプチドは固体支持体上に固定化され、患者の血清に接触させられて、血清中の抗体が固定されたポリペプチドに結合することを可能としうる。非結合性の血清はその後除去され、例えば、¹²⁵I-標識タンパク質Aを用いて結合した抗体を検出することができる。

【0049】

本発明のポリペプチド抗原は、SDS PAGEで可視化されるように例えば、少なくとも純度80%または例えば、純度90%で提供される。このポリペプチド抗体は、SDS PAGEによって単一のバンドとして現れうる。

【0050】

免疫原性誘導体、例えば、抗原(腫瘍関連抗原または腫瘍特異的抗原など)の免疫原性

断片または部分もまた、本発明に包含される。本明細書中に使用する場合、「免疫原性断片」とは、ポリペプチドを認識するB細胞および/またはT細胞表面抗原受容体とそれ自体が免疫学的に反応性を有する（すなわち、特異的に結合する）断片である。免疫原性部分は通常、周知の技術、例えば、Paul, *Fundamental Immunology*, 3rd ed., 243-247 (Raven Press, 1993) およびそこに引用されている参考文献中に要約されている技術などを用いて同定することができる。これらの技術は、抗原特異的抗体、抗血清および/またはT細胞株もしくはT細胞クローンと反応する能力についてポリペプチドのスクリーニングすることを含む。本明細書において使用される抗血清および抗体は、これらが1つの抗原に特異的に結合する（すなわち、ELISAまたは他の免疫アッセイにおいてタンパク質と反応し、無関係のタンパク質とは検出可能に反応しない）場合、「抗原特異的」である。このよう
10
な抗血清および抗体は、本明細書中に記載されるとおりに、周知の技術を用いて調製することができる。

【0051】

1つの実施形態において、ポリペプチドの免疫原性部分は、実質的には全長ポリペプチドの反応性を超えるレベルで、抗血清および/またはT細胞と（例えば、ELISAおよび/またはT細胞反応性アッセイで）反応する部分である。この免疫原性部分の免疫原性活性のレベルは、全長ポリペプチドの免疫原性の少なくとも約50%、少なくとも約70%、または90%以上でありうる。ある場合には、免疫原性部分は、対応する全長ポリペプチドの免疫原性活性より大きい免疫原性活性のレベルを有する、例えば、約100%もしくは150%またはそれ以上の免疫原性活性を有することが確認されるであろう。特定の他の実施形態において
20
、具体的な免疫原性部分は、N末端リーダー配列および/または膜貫通型ドメインが欠失されているペプチドを含むことができる。他の具体的な免疫原性部分は、成熟タンパク質と比較してN末端および/またはC末端のわずかな欠失（例えば、約1~50アミノ酸、例えば、約1~30アミノ酸、例えば、約5~15アミノ酸）を含むであろう。

【0052】

別の実施形態において、本発明の具体的な免疫原性組成物、例えば、ワクチン組成物は、上記のポリペプチドを1つ以上コードするポリヌクレオチドを含み、そのためこのポリペプチドは *in situ* で生成される。このポリヌクレオチドは、多様な公知の送達系のいずれかの送達系で投与することが可能である。実際、多数の遺伝子送達技術が当該技術分野において周知であり、例えば、Rolland, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems* 15:1
30
43-198, 1998 および引用された参考文献に記載された送達技術が知られている。適当なポリヌクレオチド発現系は、当然、患者内で発現するために必要なDNA調節配列（好適なプロモータ、および終結シグナル）を含むであろう。あるいは、細菌性送達系は細胞表面にポリペプチドの免疫原性部分を発現するか、またはそのようなエピトープを分泌する細菌（例えば、*Bacillus-Calmette-Guerrin*）の投与を含むことができる。

【0053】

本発明の1つの実施形態において、ポリヌクレオチドは「裸の (naked)」DNAとして投与/送達される。例えば、Ulmerら、*Science* 259:1745-1749, 1993 およびCohenによって概説された *Science* 259:1691-1692, 1993. に記載のとおりである。裸のDNAの取り込みは、細胞内に効率的に輸送されるDNAを生分解性ビーズ上にコーティングすることによって増大
40
させることが可能である。1つの実施形態において、組成物は皮内に送達される。特に、組成物は遺伝子銃（特に微粒子銃）投与技術によって送達される。この投与技術は、例えば、Haynesら、*J Biotechnology* 44: 37-42(1996)に記載されるように、ベクターをビーズ（例えば、金）上にコーティングし、その後、高圧で表皮内に投与することを含む。

【0054】

1つの具体例においては、Powderject Pharmaceuticals PLC(Oxford, UK) および Powderject Vaccines Inc.(Madison, WI)によって製造された装置などを用いて、ガス推進粒子加速 (gas-driven particle acceleration) を達成することができる。幾つかの例が、米国特許第5,846,796号、同上第6,010,478号、同上第5,865,796号、同上第5,584,807号および欧州特許第0500 799号に記載されている。この方法は無針デリバリー法を提供し、微細
50

粒子のドライパウダー製剤、例えば、ポリヌクレオチドは、携帯型デバイスによって生成されたヘリウムガス噴射によって高速まで加速される。この携帯型デバイスは、粒子を目的の標的組織、主に皮膚内へと発射する。粒子は、 $0.4 \sim 4.0 \mu\text{m}$ 、例えば、 $0.6 \sim 2.0 \mu\text{m}$ 直径の金ビーズとこれらの上にコートされたDNAとのコンジュゲートであってよく、「遺伝子銃」内に取り付けるためのカートリッジまたはカセット内に収納される。

【0055】

関連する実施形態において、本発明による組成物のガス推進式無針注入に有用な他のデバイスおよび方法は、Bioject, Inc. (Portland, OR)より提供されるデバイスおよび方法を含み、その幾つかの例は米国特許第4,790,824号、同上第5,064,413号、同上第5,312,335号、同上第5,383,851号、同上第5,399,163号、同上第5,520,639号および同上第5,993,412号に記載されている。 10

【0056】

従って、特定の実施形態において、本明細書中に記載されている免疫原性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、多数の、ウイルスに基づく公知の系のいずれかを用いて発現するために適当な哺乳動物の宿主細胞に導入される。1つの具体的な実施形態において、レトロウイルスが遺伝子送達系のための便利で有効なプラットフォームを提供する。本発明によるポリペプチドをコードする、選択されたヌクレオチド配列は、当該技術分野において公知の技術を用いてベクターに挿入され、レトロウイルス粒子中にパッケージングすることが可能である。この組換えウイルスは、その後単離し、被験者に送達することが可能である。多数の具体的なレトロウイルス系が記載されている(例えば、米国特許番号第5,219,740号、MillerおよびRosman(1989) *BioTechniques* 7:980-990、Miller, A. D.(1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14、Scarpaら(1991) *Virology* 180:849-852、Burnsら(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037、ならびにBoris-LawrieおよびTemin(1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109。 20

【0057】

さらに、多数の具体的なアデノウイルスに基づく系もまた記載されている。宿主ゲノムに組み込まれるレトロウイルスとは異なり、アデノウイルスは、染色体外性を維持し、このため挿入性変異原性に伴うリスクを最小化する(Haj-AhmadおよびGraham(1986) *J. Virology* 57:267-274、Bettら(1993) *J. Virol.* 67:5911-5921、Mitterederら(1994) *Human Gene Therapy* 5:717-729、Sethら(1994) *J. Virol.* 68:933-940、Barrら(1994) *Gene Therapy* 1:51-58、Berkner, K. L.(1988) *BioTechniques* 6:616-629およびRichら(1993) *Human Gene Therapy* 4:461-476)。ヒトはAdHu5などの一般的なヒトアデノウイルス血清型に感染することがあるため、かなりの割合の人々が、アデノウイルスに反応する中和抗体を有し、この中和抗体は、組換えワクチンに基づく系において異種抗原に対する免疫応答に影響を及ぼし得る。チンパンジーアデノウイルス68(AdC68, Fitzgeraldら(2003) *J. Immunology* 170(3):1416-22)などの非ヒト霊長類アデノウイルスベクターは、既存の中和抗体応答の不利益を受けることなく代替的なアデノウイルス系を提供することができる。 30

【0058】

多様なアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター系もまたポリヌクレオチド送達のために開発されている。AAVベクターは、当該技術分野において周知の技術を用いて容易に構築することができる。例えば、米国特許第5,173,414号および同上第5,139,941号、国際公開W0 92/01070およびW0 93/03769、Lebkowskiら(1988) *Molec. Cell. Biol.* 8:3988-3996、Vincentら(1990) *Vaccines* 90(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、Carter, B. J.(1992) *Current Opinion in Biotechnology* 3:533-539、Muzyczka, N.(1992) *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158:97-129、Kotin, R. M.(1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801、ShellingおよびSmith(1994) *Gene Therapy* 1:165-169、およびZhouら(1994) *J. Exp. Med.* 179:1867-1875を参照のこと。 40

【0059】

遺伝子導入による、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子の送達に有用なさらなるウイルスベクターは、ワクシニア・ウイルスおよび禽痘ウイルスなどのポックスウイルス 50

ス族に由来するウイルスベクターを含む。一例として、新規な分子を発現するワクシニア・ウイルス組換え体を下記のように構築することができる。まず、ポリペプチドをコードするDNAが適当なベクターに挿入されて、それによって、このDNAはワクシニアプロモーターに隣接し、ワクシニアDNA配列、例えば、チミジンキナーゼ(TK)をコードする配列に隣接する。このベクターはその後、細胞をトランスフェクトするために用いられ、この細胞は同時にワクチン感染させられる。相同組換えは、ワクシニアプロモーターに加えて目的のポリペプチドをコードする遺伝子をウイルスゲノムに挿入するのに役立つ。得られたTK sup.(-)組換え体は、5-プロモデオキシウリジンの存在下でこの細胞を培養し、5-プロモデオキシウリジン抵抗性のウイルスプラークを選ぶことによって選択することができる。

【0060】

ワクシニアベースの感染/トランスフェクション系は、本明細書中に記載される1つ以上のポリペプチドの、生物の宿主細胞における誘導可能な、一過的発現または共発現を提供するために有利に用いることが可能である。この特定の系において、細胞は先ずバクテリオファージT7 RNAポリメラーゼをコードするワクシニア・ウイルス組換え体に *in vitro* で感染させる。このポリメラーゼは、この組換え体中で優れた特異性を示し、T7プロモーターを保有する鋳型のみを転写する。感染後、細胞はポリヌクレオチド、すなわちT7プロモーターによって作動する目的のポリヌクレオチドでトランスフェクトする。細胞質でワクシニア・ウイルス組換え体から発現されたポリメラーゼは、トランスフェクトされたDNAをRNAへと転写し、このRNAはその後、宿主の翻訳機構によってポリペプチドへと翻訳される。この方法によって、大量のRNAの、高レベル、一過性の細胞質産生およびその翻訳生成物を提供する。例えば、Elroy-Steinおよび Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1990) 87:6743-6747; Fuerstら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1986) 83:8122-8126を参照のこと。

【0061】

あるいは、目的のコーディング配列を送達するために、アビボックス・ウイルス、例えば、鶏痘ウイルスおよびカナリア痘ウイルスを使用することも可能である。哺乳動物の病原菌に由来する免疫原を発現する組換えアビボックス・ウイルスは、非トリ類種に投与された場合には、防護免疫を与えるということが知られている。アビボックスベクターの使用は、ヒトおよび他の哺乳類種において特に望ましい。なぜなら、アビボックス属のメンバーは、感受性のトリ種においてのみ生産的に複製することが可能であり、従って哺乳類の細胞には感染性ではないからである。組換えアビボックス・ウイルスの製造方法は、当該技術分野において公知であり、ワクシニア・ウイルスの製造に関して上記のとおり、遺伝子組換えを用いる。例えば、WO 91/12882、WO 89/03429およびWO 92/03545を参照のこと。

【0062】

多数のアルファウイルスベクターのいずれかを、本発明のポリヌクレオチド組成物の送達に用いることもできる。例えば、米国特許第5,843,723号、同上第6,015,686号、同上第6,008,035号および同上第6,015,694号に記載のベクターである。ベネズエラウマ脳炎(Venezuelan Equine Encephalitis)(VEE)に基づく特定のベクターもまた使用することが可能であり、その具体例は米国特許第5,505,947号および同上第5,643,576号に見出すことができる。

【0063】

抗原ペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクターは、予防または治療上有効でありうる量で投与する。投与量は一回の服用量あたりヌクレオチドにして、1pg~16mg、例えば、粒子による送達については1pg~10μg、他の経路については、例えば、10μg~16mgの範囲内であろう。正確な量は、免疫される患者の体重および投与経路によって相対的に異なる。

【0064】

裸のポリヌクレオチドまたはベクターを患者に導入するための適切な技術はまた、適当なビヒクルを用いた局所的な適用も含む。核酸は、皮膚または粘膜表面に対して局所的に投与することができる。例えば、鼻腔内、経口、腔内または直腸内投与である。裸のポリ

10

20

30

40

50

ヌクレオチドまたはベクターは、製薬上許容可能な賦形剤、例えば、リン酸緩衝食塩水（PBS）と共存することができる。DNAの取り込みは、プピバカインなどの促進剤の使用によってさらに促進することが可能であり、この促進剤はDNA製剤と別個であっても、またはDNA製剤に含まれていてもよい。核酸を直接受容者に投与するための他の方法は、超音波、電気刺激、エレクトロポレーションおよびUS 5,697,901に記載されているマイクロシーディング（microseeding）を含む。

【0065】

核酸構築物の取り込みは、例えば、トランスフェクション剤の使用を含む幾つかの公知のトランスフェクション技術によって増強することが可能である。これらの薬剤の例としては、カチオン性薬剤、例えば、リン酸カルシウムならびにDEAE-デキストランおよびリポフェクタント、例えば、リポフェクタムおよびトランスフェクタムが挙げられる。投与されるべき核酸の用量は、変更することができる。

10

【0066】

さらに別の実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、抗体、または血清、またはFabおよびF(ab')₂断片などの抗体のドメインを含む。抗体は、モノクローナル抗体またはその断片であってもよい。有効量は通常、患者の体重1kgにつき、100μg～500mg、例えば、1mg～50mgである。従って、本発明の方法は、受動免疫療法または受動免疫学的予防を含む。

【0067】

本発明の免疫原性組成物およびIL-18ポリペプチドは、筋肉内、皮下、腹腔内または静脈内などの多数の経路によって送達することができる。

20

【0068】

本発明によるIL-18ポリペプチドまたはその生物活性断片は、Th1型優位の免疫応答を誘導するものである。高レベルのTh1型サイトカイン（例えば、IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-12、IL-18など）は、投与された抗原に対する細胞仲介性免疫応答の誘導を助長する傾向がある。一方、高レベルのTh2型サイトカイン（例えば、IL-4、IL-5、IL-6およびIL-10）は、体液性免疫応答の誘導を助長する傾向がある。サイトカインのファミリーの概説については、MosmannおよびCoffman, Ann. Rev. Immunol. 7:145-173, 1989を参照のこと。「IL-18」または「IL-18ポリペプチド」とは、EP0692536、EP 0712931、EP0767178およびW09/72441中に開示されたIL-18ポリペプチドを意味する。IL-18ポリペプチド誘導體または変異体は、図1に示される配列番号6（ヒトIL-18）または配列番号7（マウスIL-18）のアミノ酸配列と、配列番号6および配列番号7各々の全長にわたって、少なくとも70%の同一性、例えば、少なくとも80%の同一性、例えば、少なくとも90%の同一性、例えば、少なくとも95%の同一性、例えば、少なくとも97～99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを含む。このようなポリペプチドは、配列番号6および配列番号7のアミノ酸を各々含有するポリペプチドを含む。IL-18ポリペプチドは、配列番号6および配列番号7に示されたアミノ酸配列であってもよい。IL-18断片もまた意図されており、これはIL-18の生物学的（抗原性または免疫原性）活性、例えば、IFN- γ の誘導を示すことができるIL-18断片である。IL-18生物活性断片を用いることができ、IL-18免疫原性断片を用いることができる。

30

40

【0069】

IL-18ポリペプチドは、成熟タンパク質の形態であってもよく、融合タンパク質などのより大きなタンパク質の一部であってもよい。IL-18変異体もまた意図されており、この変異体は、保存アミノ酸の置換によって変化したポリペプチドであって、その残基が似た特質をもつ別の残基に置換されている。典型的なこのような置換は、Ala、Val、LeuおよびIleとの間、SerとThrとの間、酸性残基のAspとGluとの間、AsnとGlnとの間、塩基性残基のLysとArgとの間、または芳香族残基のPheとTyrとの間で生じる。例えば、変異体の、幾つかの、5～10、1～5、1～3、1～2または1アミノ酸は、任意の組合せで置換され、欠失されまたは付加される。IL-18生物活性断片についてもまた意図されている。「生物活性断片」とは、実質的に全長IL-18と同一の生物活性を保持しているIL-18断片を意味する。

50

生物活性とは、下記の特性のいずれかを意味する：ナチュラルキラー（NK）細胞活性およびTh1細胞応答の増強（NK；NKT細胞の活性化、活性化T細胞の増殖の誘導）、抗血管新生活性、活性化NK、NKT細胞およびT細胞上のFasリガンドの発現の増強、IFNg、GM-CSFおよび他のサイトカイン、例えば、Th1型サイトカインの産生増大、自然免疫ならびにTh1-およびTh2-仲介応答の双方を刺激する能力。

【0070】

特に、IL-18の生物活性断片は、KG-1アッセイ系によってin vitroで測定されるような、IFNg産生を増大させる能力を保持している断片である。ヒトIL-18受容体を発現するヒト骨髓単球性細胞株（KG-1）は、IL-18を用いた処理に対して、（ELISAで測定される）IFNgの産生（分泌）およびNfKBの活性化を増大させることによって応答するであろう（Matsuko Taniguchiら、J. Immunological Methods, 1998, 217, 97-102）。

10

【0071】

本発明によるIL-18ポリペプチドは、任意の適当な方法で調製することができる。この方法は、天然のポリペプチドを単離すること、ポリペプチドを組換えまたは合成によって作製することを含む。このような調製方法は、当該技術分野においてよく理解されている。

【0072】

本発明による免疫原性組成物は、製薬上許容可能な賦形剤または担体を有利に含むことができる。担体分子は、担体生物、例えば、生細菌性ベクターもしくは細菌性担体株、水、生理食塩水、または他の免疫賦活化学物質を含む幾つかの形態を包含することができる。担体は、水、生理食塩水、または他の緩衝生理溶液でありうる。担体分子はまた、多孔質ポリマー粒子、例えば、マイクロビーズまたはナノ粒子、および金属塩粒子を含むことが可能であり、この金属塩粒子としては、例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムもしくはリン酸カルシウム、もしくはリン酸マグネシウム、リン酸鉄、炭酸カルシウム、炭酸マグネシウム、硫酸カルシウム、水酸化マグネシウム、または複塩、例えば、リン酸アンモニウム-鉄、リン酸カリウム-鉄、リン酸カルシウム-鉄、炭酸カルシウム-マグネシウム、またはこれらの塩の任意の混合物が挙げられる。

20

【0073】

本明細書において提供される複合製剤の投与によって、患者はTh1-およびTh2-型応答を含む免疫応答を維持するであろう。

30

【0074】

本発明による免疫原性組成物およびIL-18ポリペプチドもしくは生物活性断片またはそれらの変異体は、複数の経路、例えば、筋肉内、皮下、腹腔内または静脈内の経路によって送達できる。

【0075】

抗原ペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクターは、予防または治療上有効である量で投与する。投与されるべき量は一般に、1回の用量あたりヌクレオチドにして1 pg~16 mgの範囲であり、例えば、微粒子仲介性送達については1 pg~10 mg、および他の経路については10 mg~16 mgの範囲である。厳密な量は、免疫化される患者の体重および投薬経路によって相当に異なる。

40

【0076】

裸のポリヌクレオチドまたはベクターを患者に導入するための好適な手法にはまた、適切なビヒクルによる局所的な適用も含む。核酸は、皮膚または粘膜の表面に、例えば、鼻腔内、経口、腔内または直腸内投与によって局所的に投与できる。裸のポリヌクレオチドまたはベクターは、製薬上許容される賦形剤、例えば、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）と一緒に存在しうる。DNAの取り込みは、DNA処方剤とは別個のまたはDNA処方剤に含められた助長剤、例えば、プピカインの使用によってさらに容易にされうる。核酸を受容者に直接的に投与する他の方法には、超音波、電気刺激、エレクトロポレーションおよびUS 5,697,901に記載されているマイクロシーディング（microseeding）を含む。

【0077】

50

核酸構築物の取り込みは、複数の公知のトランスフェクション手法、例えば、トランスフェクション試薬の使用を含む手法によって増強できる。これらの試薬の例としては、カチオン試薬、例えば、リン酸カルシウムならびにDEAE-デキストランおよびリポフェクタント (lipofectant)、例えば、リポフェクタン (lipofectam) およびトランスフェクタン (transfectam) が挙げられる。投与されるべき核酸の用量は変えることができる。

【0078】

本発明によるIL-18ポリペプチドまたはその生物活性断片は、Th1型優位の免疫応答を誘導するものである。高レベルのTh1型サイトカイン (例えば、IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-12、IL-18など) は、投与した抗原に対する細胞仲介性免疫応答の誘導を助長する傾向がある。一方、高レベルのTh2型サイトカイン (例えば、IL-4、IL-5、IL-6およびIL-10) は、体液性免疫応答の誘導を助長する傾向がある。サイトカインファミリーの評論については、MosmannおよびCoffmanによるAnn. Rev. Immunol. 7:145-173, 1989を参照のこと。これらサイトカインのレベルは、標準的なアッセイを用いて容易に調べることができる。「IL-18」とは、EP0692536、EP 0712931、EP0767178およびW097/2441に記載されるようなIL-18ポリペプチドを意味する。IL-18ポリペプチドには、図1に示されるような配列番号1(ヒトIL-18)または配列番号2(マウスIL-18)と、配列番号1および配列番号2の全長にわたって、それぞれ、少なくとも70%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または少なくとも97~99%の同一性を有するアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチドを含む。このようなポリペプチドには、それぞれ、配列番号1および配列番号2のアミノ酸を有するものを含む。IL-18ポリペプチドは、配列番号1および配列番号2に示すようなアミノ酸配列を有しうる。IL-18断片はまた、IL-18の断片を意図し、この断片は、IL-18の生物学的 (抗原性または免疫原性) 活性、例えば、IFN- γ の誘導を示すことが可能である。

【0079】

IL-18ポリペプチドは、成熟タンパク質の形態であってもよいし、より大きなタンパク質、例えば融合タンパク質の一部であってもよい。IL-18変異体はまた、保存アミノ酸置換によって変化するポリペプチドであると意図される。この保存アミノ酸置換によって、残基は似た特性を有する別のものに置換される。典型的なこのような置換は、Ala、Val、LeuおよびIleとの間；SerおよびThrとの間；酸残基であるAspおよびGluとの間；AsnおよびGlnとの間；塩基残基であるLysおよびArgとの間；または芳香族残基であるPheおよびTyrとの間のものである。例えば、変異体については、その複数個の、5~10個、1~5個、1~3個、1~2個または1個のアミノ酸が、任意の組合せで置換、欠失または付加される。

【0080】

本発明によるIL-18ポリペプチドは、任意の好適な方法で調製できる。この方法には、天然のポリペプチドを単離すること、組換えまたは合成によってポリペプチドを作製する工程を含む。このような調製方法は、当該分野にて十分に理解されている。

【0081】

本明細書中に提供されるような複合調製剤の投与によって、患者はTh1型およびTh2型免疫応答を含む免疫応答を維持する。

【0082】

本発明の実施形態において、免疫原性組成物はさらに、別のアジュバント、例えば、Th1型優位の免疫応答を誘導するものを含む。TH-1誘導アジュバントは、リポ多糖由来アジュバント、例えば、腸内細菌性リポ多糖 (LPS)、3D-MPL、コレステロール、およびCpGオリゴヌクレオチド、または2つもしくはそれ以上のこれらアジュバントの混合物を含むアジュバントの群から選択されうる。Th1型優位の免疫応答を誘導するためのアジュバントには、例えば、アルミニウム塩とのモノホスホリル脂質A (3-O-脱アシル化モノホスホリル脂質Aなど) の組合せを含みうる。MPL (登録商標) アジュバントは、Corixa Corporationから入手可能である (Seattle, WA; 例えば、米国特許第4,436,727号; 同上第4,877,611号; 同上第4,866,034号および同上第4,912,094号を参照のこと)。

【0083】

10

20

30

40

50

一つの実施形態において、本発明による免疫原性組成物はさらに、免疫賦活性CpGオリゴヌクレオチドを含む。

【0084】

CpG含有オリゴヌクレオチド(その中のCpGジヌクレオチドはメチル化されていない)はまた、Th1優位の応答を誘導する。このようなオリゴヌクレオチドは周知であり、例えば、WO 96/02555、WO 99/33488ならびに米国特許第6,008,200号および同第5,856,462号に記載されている。免疫賦活性DNA配列はまた、例えば、SatoらによってScience 273:352, 1996に記載されている。

【0085】

CpG含有オリゴヌクレオチドは当該分野にて、全身のかつ粘膜経路によって投与される場合のアジュバントとして知られている(WO96/02555、EP 468520、Davisら、J.Immunol, 1998, 160(2):870-876; McCluskieおよびDavis, J.Immunol., 1998, 161(9):4463-6)。CpGとは、DNAに存在するシトシン-グアノシン・ジヌクレオチドモチーフの略語である。歴史的に、BCGのDNA画分が、抗腫瘍効果を及ぼすことが観察されていた。さらなる研究にて、BCG遺伝子配列に由来する合成オリゴヌクレオチドが、in vitroおよびin vivoの両方において免疫賦活性効果を誘導することが可能であることが示された。これらの研究の著者らは、中央のCGモチーフを含む特定のパ lindローム配列がこの活性を保持していたと結論付けた。免疫賦活性におけるCGモチーフの主要な機能は、後にKriegのNature 374, p546, 1995による公表によって明らかにされた。詳細な分析によって、CGモチーフが、特定の配列関係の中になくはならず、そしてこのような配列は、細菌のDNAでは一般的であるが、脊椎動物のDNAでは希少であることが示された。免疫賦活性配列はしばしば：プリン、プリン、C、G、ピリミジン、ピリミジンであり、この中のジヌクレオチドCGモチーフは、メチル化されていないが、他のメチル化されていないCpG配列は、免疫賦活性であることが知られており、また本発明に用いることができる。

【0086】

6つのヌクレオチドの特定の組合せにおいて、パ lindローム配列が存在する。複数のこれらのモチーフ(1つのモチーフの繰り返しまたは異なるモチーフの組合せのいずれか)が、同一のオリゴヌクレオチドに存在しうる。オリゴヌクレオチドを含有する1つまたは複数のこれら免疫賦活性配列の存在が、ナチュラルキラー細胞(これは、インターフェロンを産生し、かつ細胞溶解活性を有する)およびマクロファージ(Wooldridgeら、Vol 8 9(no. 8), 1977)を含む種々の免疫サブセットを活性化できる。しかし、このコンセンサス配列を有さない他のメチル化されていないCpG含有配列は現在、免疫調製剤として示されている。

【0087】

本発明において使用するためのオリゴヌクレオチドは、少なくとも3つ、少なくとも6つまたはそれ以上のヌクレオチドによって分けられた2つまたはそれ以上のジヌクレオチドCpGモチーフを含みうる。本発明のオリゴヌクレオチドは、デオキシヌクレオチドでありうる。一つの実施形態において、オリゴヌクレオチド中のインターヌクレオチドは、ホスホロジチオエート結合またはホスホロチオエート結合であるが、ホスホジエステル結合および他のインターヌクレオチド結合は、混合したインターヌクレオチド結合を有するオリゴヌクレオチドを含む本発明の意図する範囲内である。ホスホロチオエート・オリゴヌクレオチドまたはホスホロジチオエートを製造するための方法は、US5,666,153、US5,278,302およびWO95/26204に記載されている。

【0088】

オリゴヌクレオチドの例は、以下の配列を有する。これらの配列は、ホスホロチオエート改変インターヌクレオチド結合を含みうる。

【0089】

オリゴ1(配列番号3) : TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT(CpG 1826)

オリゴ2(配列番号4) : TCT CCC AGC GTG CGC CAT(CpG 1758)

オリゴ3(配列番号5) : ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

10

20

30

40

50

オリゴ4(配列番号6) : TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT(CpG 2006、またCpG 7909としても知られている)

オリゴ5(配列番号7) : TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT(CpG 1668)

代替的なCpGオリゴヌクレオチドは、上記配列を含み、その配列中に、それらに対して重要ではない欠失または付加を有しうる。

【0090】

本発明において有用であるCpGオリゴヌクレオチドは、当該分野にて公知である任意の方法(例えば、EP 468520)によって合成できる。好都合なことに、このようなオリゴヌクレオチドは、自動合成器を用いて合成できる。

【0091】

本発明において有用であるオリゴヌクレオチドは、デオキシヌクレオチドでありうる。1つの実施形態において、オリゴヌクレオチド中のインターヌクレオチド結合は、ホスホロジチオエート結合またはホスホロチオエート結合であるが、しかしホスホジエステルは本発明の意図する範囲内である。異なるインターヌクレオチド結合を有するオリゴヌクレオチドが予期される(例えば、混合したホスホロチオエート・ホスホジエステル)。オリゴヌクレオチドを安定させる他のインターヌクレオチド結合が用いられうる。

【0092】

ワクチンに処方される場合にCpGは一般に、遊離抗原と共に遊離溶液に投与されるか(WO 96/02555; McCluskieおよびDavis、前出)、または抗原に共有結合されるか(PCT公開WO 98/16247)、または水酸化アルミニウムのような担体と処方される((肝炎表面抗原) Davisら、(前出); Brazolot-Millanら、Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 1998, 95(26), 15553-8)。

【0093】

1つの強化された製剤は、CpG含有オリゴヌクレオチドとサポニン誘導体との組合せを含むことが可能であり、特に、W000/09159およびW000/62800中に開示されているCpGとQS21との組合せが挙げられる。このような製剤は、水中油型エマルジョンおよびトコフェロールを付加的に含むことができる。従って、さらなる実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、CpGオリゴヌクレオチドとサポニン、例えば、QS21との組合せを含み、必要な場合には水中油型エマルジョン中に製剤化される。この製剤は、必要な場合には3D-MPL(登録商標)アジュバントを付加的に含む。QS-21は、そのより低い反応原性組成物中で提供されることが可能であり、この組成物中ではQS-21はWO 96/33739中に記載のとおりコレステロールでクエンチされる。

【0094】

別の実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、腸内細菌性リポ多糖誘導アジュバント、例えば、モノホスホリルリピドA、例えば、3-O-脱アシル化モノホスホリルリピドAを付加的に含む。

【0095】

腸内細菌性リポ多糖(LPS)は、アジュバント中での使用はその毒性作用によって縮小されるが、免疫系の有効な刺激因子であることが長く公知となっている。還元末端グルコサミンからのコア炭水化物群およびリン酸の除去によって作製される、LPSの非毒性誘導体、モノホスホリルリピドA(MPL)は、Ribiら(1986, Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p407-419)により記載されており、下記の構造を有する:

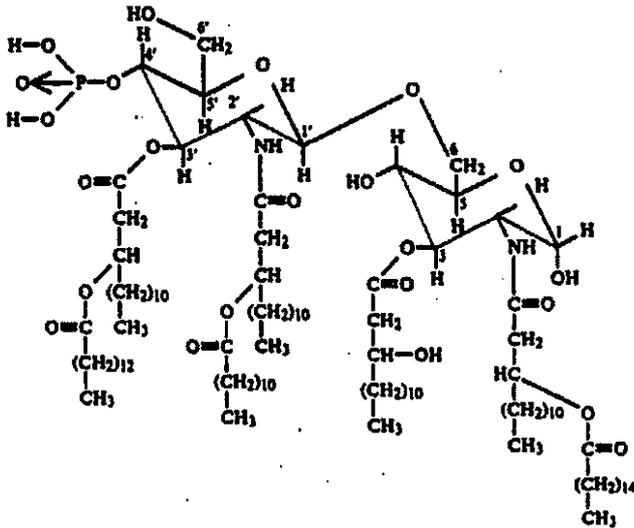
10

20

30

40

【化1】



10

【0096】

モノホスホリルリピドA (MPL) のさらなる解毒型は、二糖類骨格の3位からのアシル鎖の除去によって生じ、3-O-脱アシル化モノホスホリルリピドA(3D-MPL)と呼ばれる。3D-MPLは、GB 2122204B中に教示される方法によって精製および調製することが可能であり、その参考文献もまた、ジホスホリルリピドA、およびその3-O-脱アシル化変異体の調製を開示する。3D-MPLの1つの形態は、直径0.2 μm未満の小さな粒子サイズを有するエマルションの形態であり、その製造方法はW094/21292に開示されている。モノホスホリルリピドAと界面活性剤とを含む水性製剤は、W098/43670A2に開示されている。

20

【0097】

本発明のアジュバント化合物中に製剤化されるべき細菌リポ多糖誘導アジュバントは、細菌源から精製および加工することが可能であるか、あるいは合成することが可能である。例えば、精製されたモノホスホリルリピドAは、Ribiら1986(前出)に記載されており、サルモネラ種 (*Salmonella* sp.) に由来する3-O-脱アシル化モノホスホリルまたはジホスホリルリピドAは、GB 2220211およびUS 4,912,094に記載されている。他の精製されたおよび合成のリポ多糖が、記載されている (W098/01139、US 6,005,099 およびEP 0 729 473 B1、Hilgersら、1986、Int. Arch. Allergy. Immunol., 79(4):392-6、Hilgersら、1987、Immunology, 60(1):141-6、およびEP 0549074B1)。細菌リポ多糖アジュバントは、US 6,005,099およびEP0729 473B1に記載されている3D-MPLおよび (1-6)グルコサミン二糖を含む。

30

【0098】

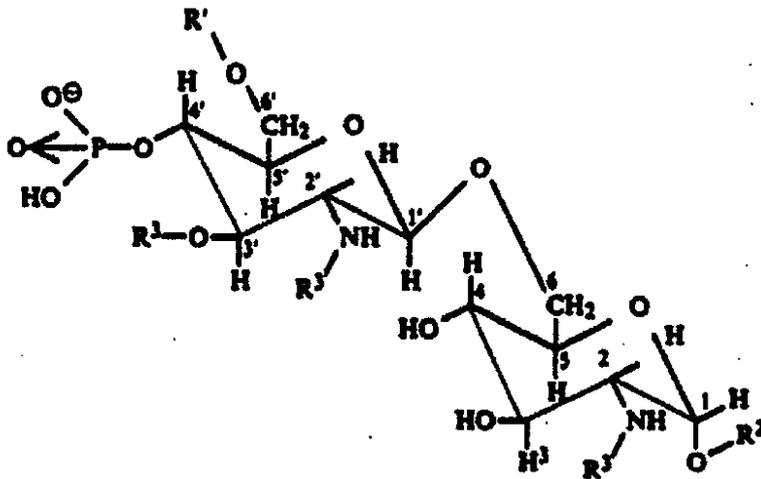
従って、本発明において使用できるLPS誘導体は、LPSまたはMPLまたは3D-MPLと構造が類似する、これらの免疫賦活剤である。本発明の別の態様においては、LPS誘導体は、MPLの上記構造の一部であるアシル化単糖であってもよい。

【0099】

1つの二糖アジュバントの例は、以下の式：

40

【化2】

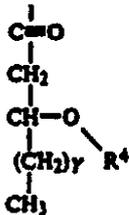


10

【0100】

[式中、 R^2 はHまたは PO_3H_2 であってよく、 R^3 は1つのアシル鎖または -ヒドロキシミリストールまたは以下の式：

【化3】



20

ここで $R^4 = -C(=O)-(CH_2)_x-CH_3$

【0101】

(式中、XおよびYは、0から約20までの値を有する)
 で表される3-アシルオキシアシル残基であってもよい]
 で表される精製されたまたは合成のリピドAである。

30

【0102】

3D-MPLとキラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria molina*) の樹皮に由来するサポニンアジュバントとの組合せは、EP 0 761 231Bに記載されている。WO 95/17210は、スクアレン、 α -トコフェロール、およびポリオキシエチレンソルビタンモノオレート (TWEEN80) に基づくアジュバントエマルジョン系を開示し、このエマルジョン系は免疫賦活剤QS21と共に、必要な場合には3D-MPLと共に製剤化される。

【0103】

従って、別の実施形態において、本発明による免疫原性組成物は、(1)抗原またはその免疫原性断片、および(2)サポニン、例えば、QS21 (例えば、コレステロールでクエンチされたその形態) とCpG免疫賦活性オリゴヌクレオチド、3D-MPLおよび水中油型エマルジョンを含むリストから選択される1つ以上のアジュバントとの組合せを含む。

40

【0104】

1つの実施形態において、免疫原性組成物は、モノホスホリルリピドAのサポニンアジュバントとの組合せ、例えば、WO94/00153に記載されるような、3D-MPL (登録商標) アジュバントとQS21との組合せを含むか、またはWO96/33739に記載のように、QS21がコレステロールでクエンチされる、より反応性の低い組成物を含む。他の製剤は、QS-21に加えて水中油型エマルジョンおよびトコフェロールを含むことができる。水中油型エマルジョン中の、QS21、3D-MPL (登録商標) アジュバントおよびトコフェロールの組合せを用いる別の製剤は、WO95/17210に記載されている。従って、本発明による免疫原性組成物は、抗原

50

、例えば、腫瘍関連抗原、サポニンアジュバント、例えば、3D-MPL（登録商標）アジュバントを伴うQS-21、必要な場合にはQS-21に加えて水中油型エマルジョンとトコフェロールを含む。例えば、QS-21は、コレステロールでクエンチされる。

【0105】

別の製剤は、サポニン誘導体とのCpG含有オリゴヌクレオチドの組合せ、例えば、W000/09159およびW000/62800に開示されるようなCpGとQS21との組合せを含む。このような製剤はさらに、水中油型エマルジョンおよびトコフェロールを含むことができる。従って、さらなる実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、サポニン（例えば、QS21）とCpGオリゴヌクレオチド（必要な場合には水中油型エマルジョンに処方される）との組合せを含む。この製剤は必要な場合にはさらに、3D-MPL（登録商標）アジュバントを含むことができる。QS-21は、W096/33739に記載されるように、コレステロールを用いてクエンチされる、低い反応性を有する組成物に供給することができる。

10

【0106】

あるいは、本発明の免疫原性組成物中のサポニンアジュバントは、キトサンまたは他のポリカチオン性ポリマー、ポリラクチドおよびポリラクチド-コ-グリコリド粒子、ポリ-N-アセチルグルコサミンベースのポリマーマトリクス、多糖または化学改変多糖からなる粒子、リポソームおよびリピドに基づく粒子、グリセロールモノエステルからなる粒子などからなるワクチンビヒクルと組み合わせることが可能である。サポニンはまた、コレステロールの存在下、リポソームまたは免疫賦活性複合体（ISCOM）などの粒状構造を形成するように製剤化することが可能である。さらに、サポニンは、非粒状溶液もしくは懸濁液中、または寡層薄膜（paucilamellar）リポソームもしくは免疫賦活性複合体（ISCOM）などの粒状構造中のいずれかにおいて、ポリオキシエチレンエーテルまたはエステルと共に製剤化することができる。サポニンはまた、粘度を増大させるためにCarbopol（登録商標）などの賦形剤と共に製剤化することが可能であり、またはラクトースなどの粉末賦形剤と共にドライパウダー形態に製剤化することが可能である。

20

【0107】

ワクチンおよび免疫原性組成物は、単位用量または多用量容器、例えば、密封されたアンプルまたはバイアル中に存在することが可能である。このような容器は、使用するまで製剤の無菌性を保つために密封することが可能である。一般的には、製剤は油性もしくは水性ビヒクル中の懸濁液、溶液またはエマルジョンとして保存することが可能である。あるいは、ワクチンまたは免疫原性組成物は、使用直前に無菌液体担体の添加のみを必要とする凍結乾燥状態で保存することが可能である。

30

【0108】

多様な送達ビヒクルのいずれかを、腫瘍細胞を標的とする抗原特異的免疫応答の産生を促進するために、免疫原性組成物およびワクチン中に用いることができる。本発明の一つの実施形態によれば、本明細書中に記載されている免疫原性組成物は、抗原提示細胞（APC）例えば、樹状細胞、マクロファージ、B細胞、単球および効率的な抗原提示細胞（APC）となるように操作されうる他の細胞を介して宿主へと送達される。抗原提示細胞（APC）は、抗原提示能力を増大し、T細胞応答の活性化および/または維持を改善し、それ自体で抗腫瘍効果を有し、および/または受容者と免疫学的に適合する（すなわち、HLAハプロタイプが適合する）ように遺伝子改変されても、されなくともよい。抗原提示細胞（APC）は、通常、腫瘍および腫瘍周辺組織を含む、多様な生体液および器官のいずれかから単離することが可能であり、自系、同種異系、同系または異種細胞でありうる。

40

【0109】

本発明の特定の実施形態は、抗原提示細胞として樹状細胞またはその前駆体を用いる。樹状細胞は非常に有効な抗原提示細胞（APC）であり（Banchereau J. およびSteinman R.M., Nature, 1998, 392:245-251）、予防または治療の抗腫瘍免疫を誘発するための生理的アジュバントとして有効であることが示されている（Timmerman J.M. およびLevy R., Ann. Rev. Med, 1999, 50:507-529を参照のこと）。一般的に、樹状細胞はその典型的な形状（in situにおいては星状、in vitroにおいては際立った細胞質突起（樹状突起）がみられ

50

る)、高い効率で抗原を取込み、処理し、提示する能力、およびナイーブT細胞の応答を活性化する能力に基づいて同定することができる。樹状細胞は当然、*in vivo*または*ex vivo*において通例は樹状細胞上に見られない特定の細胞表面受容体またはリガンドを発現するように操作することが可能であり、そしてこのように改変された樹状細胞は本発明に意図されている。樹状細胞の代替として、分泌小胞抗原を取込んだ樹状細胞(エキソソームと呼ばれる)をワクチンに用いることができる(Zitvogel L.ら、Nature Med., 1998, 4:594-600を参照のこと)。従って、*in vitro*で本明細書中に記載されるポリペプチドを取込むことによって改変されるか、または*in vitro*で本明細書中に記載されるポリペプチドを発現するように遺伝子改変された有効量の樹状細胞または抗原提示細胞、および製薬上有効な担体を含む免疫賦活製剤、例えば、ワクチンが提供される。

10

【0110】

樹状細胞および前駆体は、末梢血、骨髓、腫瘍浸潤細胞、腫瘍周囲組織浸潤細胞、リンパ節、脾臓、皮膚、臍帯血、または他の適当な組織もしくは体液のいずれかから得ることができる。例えば、樹状細胞はGM-CSF、IL-4、IL-13および/またはTNFなどのサイトカインの組合せを末梢血から回収した単球の培養物に添加することによって*ex vivo*で分化することができる。あるいは、末梢血、臍帯血または骨髓から回収されたCD34陽性細胞は、GM-CSF、IL-3、TNF、CD40リガンド、リポ多糖LPS、flt3リガンドおよび/または樹状細胞の分化、成熟および増殖を誘導する他の化合物の組合せである培養培地へ添加することにより樹状細胞へと分化することができる。樹状細胞は、便宜上「未成熟」および「成熟」細胞として分類されており、それによって簡単な方法で2つのよく特徴付けられた表現型を識別することが可能となる。しかし、この名称は、生じうる全ての分化の中間段階を排除すると解釈されるべきではない。未成熟樹状細胞は、Fc受容体およびマンノース受容体の高発現と相関する抗原取込みおよびプロセッシングの高い能力を有する抗原提示細胞(APC)として特徴付けられる。成熟表現型は典型的に、これらのマーカーの低発現、T細胞活性化に關与する細胞表面分子、例えば、MHCクラスIおよびクラスII、接着分子(例えば、CD54およびCD11)ならびに共刺激分子(例えば、CD40、CD80、CD86および4-1BB)の高発現によって特徴付けられる。

20

【0111】

抗原提示細胞(APC)は通常、腫瘍ポリペプチドまたはその免疫原性部分が細胞表面に発現されるように、腫瘍タンパク質(例えば、MAGE-3、Her2/neu、またはそれらの誘導體)をコードするポリヌクレオチドでトランスフェクトすることが可能である。このようなトランスフェクションは*ex vivo*で生じ、このようにトランスフェクトされた細胞を含む組成物またはワクチンはその後、本明細書中に記載されるように治療目的に用いられる。あるいは、樹状または他の抗原提示細胞を標的とする遺伝子送達ビヒクルを患者に投与することが可能であり、その結果*in vivo*でトランスフェクションが生じる。樹状細胞の*in vivo*および*ex vivo*トランスフェクションは通常、当該技術分野において公知のいずれかの方法、例えば、WO 97/24447中に記載される方法、またはMahvi D.M.らImmunology and Cell Biology, 1997, 75:456-460により記載される遺伝子銃アプローチを用いて実施することができる。樹状細胞の抗原取込みは、樹状細胞または前駆細胞を、腫瘍ポリペプチド、DNA(ネイキッドもしくはプラスミドベクター内)もしくはRNAと共に、または抗原発現組換え細菌もしくはウイルス(例えば、ワクシニア、鶏痘、アデノウイルスもしくはレトロウイルスのベクター)と共にインキュベートすることによって達成することが可能である。

30

40

【0112】

他の適当な送達系は、ミクロスフェアを含み、このミクロスフェアにおいて、抗原物質が生分解性ポリマー/ミクロスフェアに組み込まれるか、またはコンジュゲートして、その結果、抗原物質は適当な医薬担体と混合され、ワクチンとして使用することができる。「ミクロスフェア」という用語は通常、実質的に球状で、10nm~2mmの範囲内の直径を有するコロイド状粒子を表すために用いられる。非常に広範囲な天然および合成ポリマーから製造されるミクロスフェアは、多様な生物医学的用途を有することが見出されている。

50

この送達系は、効力を得るために複数の処理を要する、in vivoにおいて短い半減期を有するタンパク質、または生体液中で不安定であるか、もしくはその相対的に高い分子量のために消化管から完全には吸収されないタンパク質に特に有利である。幾つかのポリマーがタンパク質放出用のマトリクスとして記載されている。適当なポリマーには、ゼラチン、コラーゲン、アルギナート、デキストランが含まれる。送達系には、生分解性ポリ(DL-乳酸)(PLA)、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)(PLG)、ポリ(グリコール酸)(PGA)、ポリ(-ε-カプロラクトン)(PCL)および共重合体ポリ(DL-乳酸-コ-グリコール酸)(PLGA)が含まれる。他の系には、不均一ヒドロゲル、例えば、親水性ポリ-(エチレングリコール)(PEG)および疎水性ポリ(ブチレンテレフタレート)(PBT)をベースとする反復ブロックを含有するポリ(エーテル エステル)多ブロック共重合体、またはポリ(エチレングリコール)-テレフタル酸/ポリ(-ブチレンテレフタレート)(PEGT/PBT)(Sohier ら Eur. J. PharmおよびBio pharm, 2003, 55, 221-228)が含まれる。系は、例えば、PLGA、PLAおよびPEGT/PBTのように1~3月間にわたり徐放をもたらすことができる。

10

【0113】

治療レジメンは、当該患者の大きさおよび種、投与される核酸ワクチンおよび/またはタンパク質組成物の量、投与経路、使用されるいずれかのアジュバント化合物の力価および用量ならびに熟練した医師にとっては明らかな他の要因によって大きく異なる。

【0114】

本発明は、下記の非限定的な実施例を参照することによりさらに説明される。

【実施例】

20

【0115】

実施例 I

QS-21をベースとする免疫原性組成物を使用するワクチン製剤

1.1. - 水中油型エマルジョン中のQS21 & 3-O-脱アシル化モノホスホリル脂質A(3D-MPL)含有免疫原性製剤(AS02製剤):

このアジュバント系AS02は、以前にW095/17210に記載されている。

【0116】

3D-MPL: これは、グラム陰性細菌のサルモネラ・ミネソタ(*Salmonella minnesota*)のリポ多糖(LPS)に由来する免疫賦活剤である。MPLは脱アシル化されており、脂質A部分のリン酸基を欠いている。この化学処理によって、免疫賦活剤特性は保ちながら、毒性を劇的に減少させる(Ribi, 1986)。Ribi免疫化学によって、MPLをSB-Biologicalsに製造および提供する。

30

【0117】

QS21: これは、南米の樹木であるキラヤ・サポナリア・モリナ(*Quillaja Saponaria Mollina*)の樹皮から抽出される天然のサポニン分子である。精製技術が、樹皮の粗製抽出物から個々のサポニンを分離するために開発され、特定のサポニンであるQS21の単離を可能とした。このQS21は、親成分と比べて強いアジュバント活性および低い毒性を示すトリテルペン配偶体である。QS21は、幾つかのサブユニットAgに対するMHCクラスI拘束性CTLを活性化し、ならびに、Ag特異的リンパ球増殖を刺激する(Kensil, 1992)。Aquila(正式にはCambridge Biotech Corporation)は、QS21を製造し、SB-Biologicalsに供給している。

40

【0118】

水中油型エマルジョンは、2つの油状物(トコフェロールおよびスクアレン)から成る有機相と、乳化剤としてTween 80を含有するPBSの水相とから構成される。エマルジョンは、5%スクアレン、5%トコフェロール、0.4% Tween 80から構成され、かつ180 nmの平均粒子サイズを有した。またこのエマルジョンはSB62として知られている(W095/17210を参照のこと)。

【0119】

エマルジョンSB62の調製(2倍濃縮):

Tween 80は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶解して、PBS中2%溶液を得た。2倍の濃度

50

のエマルジョンを100 ml得るために、5gのDL トコフェロールおよび5mlのスクアレンをボルテックスして完全に混合した。90mlのPBS/Tween溶液を添加して完全に混合する。得られたエマルジョンを次に、シリンジに通し、最終的にM110Sマイクロフルイディスク装置を用いてマイクロ流動化する。得られた油滴は、およそ180 nmのサイズを有する。

【0120】

処方：

水中油型エマルジョン中の3D-MPLおよびQS21を含有する典型的な処方は、以下：20 µg ~ 25 µgのC-LytA P2-P501SをSB62(50 µl)、MPL(20 µg)、QS21(20 µg) (必要な場合に、CpGオリゴヌクレオチド(100 µg)を含む) および保存剤として1 µg/mlのチオメルサルを逐次的に添加するまえに、10倍の濃度のPBS pH 6.8 およびH₂Oに希釈する。各成分の量は、必要な場合に変えることができる。すべてのインキュベーションは、攪拌しながら室温にて行う。

10

【0121】

1.2. - リポソーム製剤にQS21 & CpGを含有する免疫原性製剤(AS15アジュバント)：

このアジュバント系AS15は、WO 00/62800に以前に記載されている。

【0122】

AS15は、2つのアジュバント系である、AS01BおよびAS07Aの新規な組合せである。AS01Bは、3D-MPLとQS21とを含むリポソームからなり、AS07Aはリン酸緩衝食塩水(PBS)中のCpG 7909(CpG 2006としても公知)からなる。

【0123】

QS21は、上記のとおりである。

20

【0124】

CpG: CpG ODN 7909は、24塩基長の合成一本鎖ホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)である。その塩基配列である5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3' は、ヒト免疫系の賦活のために最適化されている。CpG DNA、またはCpG モチーフを含有する合成ODNは、樹状細胞、単球およびマクロファージを活性化してTH1様サイトカインを分泌し、細胞溶解性T細胞の産生を含むTH1 T細胞応答を誘導し、ナチュラルキラー細胞を賦活してIFNγを分泌し、その溶解活性を増大させることが知られている。これらCpG DNA、またはCpG モチーフを含有する合成ODNはまた、B細胞を活性化して増殖させる(Krieg Aら1995 Nature 374: 546、Chu Rら1997 J. Exp. Med.186: 1623)。CpG 7909は、ヒトゲノムの任意の既知配列に対するアンチセンスではない。CpG 7909は、Coley Pharmaceutical Group, Inc., MA, USによって開発され、製造されている専売アジュバントである。

30

【0125】

CpGを用いた処方：

処方は、注入期間実施された。1匹のマウスに対する注入量は、50または100 µlであった。リポソーム中にCpG、3D-MPLおよびQS21を含む典型的な処方は、以下のとおりに実施される：20 µg ~ 25 µgの抗原は、等張性のためにH₂OおよびPBS (pH 7.4)を用いて希釈した。5分後、QS21/コレステロールが1/5の重量比(DQと呼ばれる)でリポソームと混合したQS21(0.5 µg)を処方物に加えた。30分後、10 µgのCpG(ODN 2006)を、保存剤としての1 µg/mlチオマーサル添加の30分前に加えた。全てのインキュベーションは、室温にて攪拌しながら行った。

40

【0126】

実施例II

E7-Tgマウスおよび非E7-TgマウスのTC1 Her2治療モデルにおける、AS02を用いてアジュバント化したHPV16プロテインD-E7との組合せにおけるmIL18の効果

II.1. 実験計画

5匹のメスE7 Tgマウス(C. Ledentら、PNAS(USA) 1990, 87; 6176-6180)または非Tg C57 Bl/6マウス(Iffa Credo)の7群は、0日目に200 µlの10e6 TC1 細胞(SC)の腫瘍摂取を受けた。

【0127】

50

HPV16 E7タンパク質を発現するトランスジェニックマウス：

トランスジェニックマウス系統は、IRIBHN(ULB)にてM. ParmentierおよびC. Ledent によって作製された(PNAS(USA) 1990, 87; 6176-6180を参照)。トランスジェニックマウスが生まれつきE7 HPV16遺伝子をもって生存している場合に、これらのトランスジェニックマウスはこの遺伝子に対して「耐性」を有すると考えられる。すなわち、この状況下において、HPV 16に由来するE7は「自己抗原」として考えられる。導入遺伝子の発現は、チログロブリン・プロモータによって誘導される。チログロブリンが甲状腺にのみ構成的に発現されるため、E7は甲状腺に発現される。この発現の結果、甲状腺細胞は増殖し、マウスは甲状腺腫および結節を発症する。これらは6ヶ月～1年の後に、侵襲性癌に発展しうる。

【0128】

腫瘍細胞株TC1：

C57BL/6マウスに由来する初代肺上皮細胞を、HPV 16 E6およびE7によって不死化し、次に活性化ras 癌遺伝子を用いて形質転換し、E6およびE7を発現する腫瘍形成性細胞株を作製した(Lin KYら、1996)。このE7発現は、マウス抗HPV 16 E7 Mabを用いて固定しかつ透過性にしたTC1細胞のFACS分析によって確認された(Triton Corp. Alameda, CA)。

【0129】

ワクチン： W099/10375に記載されるように調製した5 μ gのPD1/3E7(PDE7バッチ02/025)を含み、QS-21含有AS02Bアジュバント(ヒト用量(MPL20 μ g/ QS21 20 μ g/ SB62 50 μ l)の5分の1)中でアジュバント化したワクチンを、7日目および14日目に筋肉内(IM)投与した。

【0130】

マウスIL18： mL-18(1 mg/mlのバッチ SB-528775ロットMJG-28800-176)を、3週間(7日目に開始する)、毎日100 μ lをS.C.投与した。

【0131】

11.2. In vivo における腫瘍増殖：

TC1細胞が増殖するin vitroにおける培養物を、トリプシン処理し、無血清培地中で2回洗浄し、そしてマウスの右大腿部にS.C.注射した。

【0132】

樹立した腫瘍の処置を評価するために、TC1細胞を、 1×10^6 細胞/マウスの用量で注射した。腫瘍細胞を注射して1および2週間の後、マウスを、W099/10375に記載されるように調製した、QS-21含有AS02アジュバント中でアジュバント化した100 μ lのプロトD(protoD) 1/3 E7 Hisを5 μ gを用いて、あるいはPBS単独で用いて、IMにてワクチン接種した。各群に5匹のマウスを用いた。

【0133】

マウスの群

- 1群：PBS
- 2群：PDE7 AS02B
- 3群：PDE7 AS02B + 100 μ g mL-18
- 4群：PDE7 AS02B + 1 μ g mL-18
- 5群：PDE7 AS02B + 0.1 μ g mL-18
- 6群：1 μ g mL18
- 7群：0.1 μ g mL18

マウスを、5週間(35日まで) in vivo における腫瘍増殖について1週間に2回、モニターした。血清学(Igの全体(tot)およびアイソタイプ)を、35日目に分析した。腫瘍質量/群の平均値(各群5匹の動物について mm^2 で表される)を、図2(対照である非Tgマウス)および図3(E7 Tgマウス)に示す。図2Aは、1 μ gのIL-18を用いて得られた結果を示し、図2Bは、100 μ gのIL-18を用いて得られた結果を示す。図3Aは、1 μ gのIL-18を用いて得られた結果を示し、図3Bは、100 μ gのIL-18を用いて得られた結果を示す。

【0134】

以下の表1は、組合せにおけるワクチン接種によってまたはIL-18を繰り返し注射することなく、腫瘍を完全に拒絶したマウスの割合(%)をまとめて示し、またワクチンと高用

10

20

30

40

50

量のIL18との組合せによる利益を明確に示す。

【表 1】

マウスの群	完全な退縮 (%) 対照マウス	完全な退縮 (%) E7Tg マウス
PBS	0	0
PDE7 + AS02B	20	0
PDE7 + AS02B 0.1 μ g IL18	20	0
PDE7 + AS02B 1 μ g IL18	0	0
PDE7 + AS02B 100 μ g IL18	100	100
0.1 μ g mlIL18	0	0
1 μ g mlIL18	0	0
100 μ g mlIL18 (従来の実験に由来)	20	0

10

20

【 0 1 3 5 】

11.3. 結論

この実験において得られたデータは、以下のことを示す：

- IL-18とQS21含有AS02Bを用いてアジュバント化したE7ワクチンとを組み合わせることによって、対照の非トランスジェニックマウスおよびE7Tgマウスの両方において腫瘍の退縮(regression)に対する明らかな利益が存在する。

30

【 0 1 3 6 】

- 腫瘍接種の後に腫瘍が非存在であり続けるマウスの群が、ワクチンおよびIL18の両方を受けているものである。

【 0 1 3 7 】

- 組合せの利益はまた用量に依存する。

【 0 1 3 8 】

11.4 血清学 - 免疫学的読み取り

抗体応答およびアイソタイプのプロファイル(プールされた血清における)を、以下に記載されるようにコーティング抗原としてPD1/3E7-16(02/025)を用いたELISAによって測定した。

40

【 0 1 3 9 】

個々の血清を器官を採取すると同時に採取し、そして直接ELISAに付する。2 μ g/mlの精製E7タンパク質を、被覆用抗原として用いた。PBS(0.1% tween 20、1% BSAを含む)に1時間、37 $^{\circ}$ Cにて飽和した後、この血清を、飽和緩衝液に連続的に希釈し(1/100より開始する)、そして37 $^{\circ}$ Cにて90分間インキュベートした。PBS(Tween 20 0.1%含有)で洗浄した後、ビオチン化ヤギ抗マウスIg(1/5000)またはヤギ抗マウスIgサブクラス(IgG、IgG1、IgG2a、IgG2bのすべて)抗血清(1/5000)を、二次抗体として用いて、37 $^{\circ}$ Cにて90分間のインキュベーションの後、ペルオキシダーゼに結合したストレプトアビジンを加え、そしてTMB(テトラ-メチルベンジジン/ペルオキシド)を基質として用いた。10分後に、この反応を0.5 M H₂SO₄を用いて停止し、O.D.450を測定した。図4は、対照である非Tgマウスを

50

用いて得られた結果を示し、一方、図5は、E7 Tgマウスを用いて得られた結果を示す。

【0140】

11.5 結論

IL-18のみを受けている対照マウスでは、予測されたように、E7特異的抗体は検出されない。どの群であっても全Ig応答における大きな違いは見られなかった。IL-18の添加によって、特に高用量でのワクチンとの組合せにおいてTH1アイソタイプのプロファイルを改善する傾向がある。

【0141】

E7Tgマウスでは、IL-18の用量とE7に対する抗体レベルとの間に逆の関係が存在すると思われる。IL-18の添加によるアイソタイプのプロファイルに対する主な影響はない。

10

【0142】

11.6 全体的な結論

- ・ IL-18自体は、用量依存的な様式でTC1腫瘍増殖に影響を与える。

【0143】

・ 注射を組み合わせることによって、特に、高用量のmIL-18(100 µg)を、E7 + AS02B ワクチン接種と組み合わせた場合に、対照マウスおよびE7Tgマウスの両方において、TC1腫瘍増殖に対する明確な効果がある。

【0144】

・ IL-18は、ワクチン接種による抗体応答誘導(対照マウスにおけるより良いTH1アイソタイププロファイルおよびE7Tgマウスにおけるよりよいタイター)にやや影響する。

20

【0145】

実施例 III

TC1 Her2治療モデルにおけるAS15を用いてアジュバント化したHer2/neuワクチンとの組合せにおけるmIL18の効果

III.1. 実験計画

ワクチン

Her-2/neuワクチンは、ECD-PhDであり、細胞外ドメイン全体(アミノ酸1~645を含む)と、リン酸化ドメインを含む細胞内ドメインの免疫原性部分とを含む。このようなワクチン構築物は、W000/44899中に開示されており、dHER2と呼ばれる。

【0146】

このdHER2タンパク質は、抗原をH₂O、サッカロースおよびNaH₂PO₄/K₂HPO₄の混合物中に希釈することによってCpGと共凍結乾燥された。5分後、凍結乾燥前にCpG ODN 7909を添加し、625 µg/mlのHer2neu、1250 µg/mlのCpG、3.15%のサッカロースおよび5 mMのPO₄ (pH 7)を含有する最終バルクを得た。最終バルクは、3日サイクルで凍結乾燥した。即席製法のため、CpGおよび抗原を含有する凍結乾燥させたケーキは、100 µg / mlのMPLおよびDQを含有する625 µlのAS01B 希釈液で再懸濁した。

30

【0147】

動物に、25 µgのHer2/neu、50 µgのCpGならびに5 µgのMPLおよびDQを含む50 µlを注入した。

【0148】

HER-2/neuを発現する腫瘍モデル

これらの実験中で用いた腫瘍モデル：TC1HER2は、HER-2/neuをコードする組換えレトロウイルスを用いたTC1細胞(John's Hopkins University, Baltimoreの Dr T.C. Wuより提供)のレトロウイルス形質導入によって作製した。

40

【0149】

個々のクローンを、単離し、増幅して、HER2/neuおよびMHCクラスI発現の安定性をフロー・サイトメトリーによって確認した。

【0150】

マウス群：

5匹のメスのCB6F1マウスの4つの群は、0日目に2 × 10⁶ TC1Her2 cl8細胞の皮下(SC)投

50

与を受け、その後以下のいずれかのワクチン接種を受けた：

1群：PBS

2群：7日目から27日目まで100 μ gのmIL18(マウス)を毎日注入(SC)

3群：7日目と14日目に25 μ gのAS15中dHER2タンパク質(IM)

4群：ワクチンとmIL18との組合せ

11.2 In vivoでの腫瘍の成長および死亡率

結果は、図6および表2に示す。

【表2】

TC1HER2 腫瘍接種の27日後、依然として腫瘍に罹患していないマウスの百分率

PBS	0%
mIL18	20% (死亡率: 2/5)
dHER2/AS15	0%
dHER2/AS15 mIL18	60% (2/5 小さな腫瘍の発症)

10

【0151】

11.3 結論

マウス組換えIL-18の反復注入と組み合わせた、アジュバント(AS15)中に製剤化した組換え精製HER-2/neuタンパク質(dHER2)の使用に基づくワクチン・ストラテジーによって、ワクチン組成物、またはIL-18のみを用いたワクチン接種ストラテジーと比較した場合に、HER-2/neu抗原を発現する予め樹立された腫瘍に関して、改善された結果が得られた。AS15アジュバント中に製剤化された組換えdHERタンパク質の使用に基づくワクチン接種は、HER-2/neu抗原を発現するこれらの腫瘍細胞の摂取に対してマウスを非常に効率的に保護することが以前に示されている。この保護は、HER-2/neu抗原に対して特異的であり、長期免疫記憶の誘導に関連する。このさらにストリンジентな治療モデルにおいて、腫瘍が予め樹立されていた場合、ワクチン接種の有効性は低く、成長している腫瘍に対して限られた効果のみを有することが示されている(これらの条件下で完全に腫瘍を拒絶したマウスはない)。しかし驚くべきことに、両方の処理が同時に行われた場合、相乗効果が観察され、60%のマウスが完全に腫瘍に罹患しないままである一方、40%のマウスのみが小さな腫瘍を発症する。結論としては、表2に示されるように、mIL-18とワクチンとを組み合わせることには明らかに利点がある。これは、ワクチンによるHER-2/neu特異的T細胞応答の誘導とIL-18の反復注入による免疫系の活性化との両方が腫瘍退縮を得るために重要であることを意味しうる。

20

30

【0152】

実施例IV

TC1 Mage3治療モデルにおける、??でアジュバント化したMAGE-3ワクチンとの組み合わせにおけるmIL18の効果

40

11.1. 実験計画

ワクチン

Mage3腫瘍抗原を発現する腫瘍モデルは、Mage3をコードするDNAプラスミド(PcDNA3 Mage3)の伝統的なトランスフェクションによるTC1親細胞の遺伝子改変によって作製した(TC1Mage3)。この腫瘍モデルは、Mage3をコードするPcDNA3プラスミドで親TC1細胞(John's Hopkins University, Baltimore のT.C. Wuにより提供)をトランスフェクトすることによって作製した。このトランスフェクションは、キットの提供者(Gibco BRL Life Technologies, cat no 18324-012)の推奨に従ってリポフェクタミンを用いて実施した。

【0153】

50

これらの細胞は腫瘍原性であり、 2×10^6 TC1 Mage3細胞を接種したマウスの100%が腫瘍を発症した。

【0154】

5匹のメスのC57BL/6マウスの4つの群は、0日目に 2×10^6 TC1 Mage3細胞の皮下(SC)摂取を受け、その後以下のいずれかのワクチン接種を受けた：

1群：PBS

2群：7日目から27日目まで $100 \mu\text{g}$ のmIL18(マウス)を毎日注入(SC)

3群：7日目と14日目に $10 \mu\text{g}$ のAS15中Mage3タンパク質(IM)

4群：ワクチンとmIL18との組合せ。

【0155】

AS15中Mage3のワクチン接種、IL18注入および併用治療の腫瘍退縮を誘導する能力を評価する。ワクチン接種または/およびIL18治療の免疫パラメータに及ぼす効果もまた測定する(リンパ増殖、サイトカイン産生など)。

【図面の簡単な説明】

【0156】

【図1A】ヒトIL-18ポリペプチド配列を示す。

【図1B】マウスIL-18ポリペプチド配列を示す。

【図2】対照非Tgマウスにおけるin vivoでの腫瘍増殖の結果を示すグラフである。Aは、IL-18 $1 \mu\text{g}$ +E7とAS02を用いたワクチン接種の結果を示し、Bは、IL-18 $100 \mu\text{g}$ +E7とAS02を用いたワクチン接種の結果を示す。

【図3】E7 Tgマウスにおけるin vivoでの腫瘍増殖の結果を示すグラフである。Aは、IL-18 $1 \mu\text{g}$ +E7とAS02を用いたワクチン接種の結果を示し、Bは、IL-18 $100 \mu\text{g}$ +E7とAS02を用いたワクチン接種の結果を示す。

【図4】対照非Tgマウスにおける抗体応答およびアイソタイププロファイルを示すグラフである。Aは、抗体(全Ig)応答を示す。Bは、アイソタイプのプロファイルを示す。

【図5】E7 Tgマウスにおける抗体応答およびアイソタイププロファイルを示すグラフである。Aは、抗体(全Ig)応答を示す。Bは、アイソタイプのプロファイルを示す。

【図6】TC1 Her2治療モデルにおけるin vivoでの腫瘍の増殖を示すグラフである。

10

20

【 図 1 A 】

IL-18 ポリペプチド

ヒト IL-18 ポリペプチド配列

```

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
1           5           10          15
Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp
20          25          30
Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
35          40          45
Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
50          55          60
Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
65          70          75          80
Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys
85          90          95
Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
100         105        110
Met Gln Phe Glu Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu
115        120        125
Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
130        135        140
Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
145        150        155

```

【 図 1 B 】

マウス IL-18 ポリペプチド配列

```

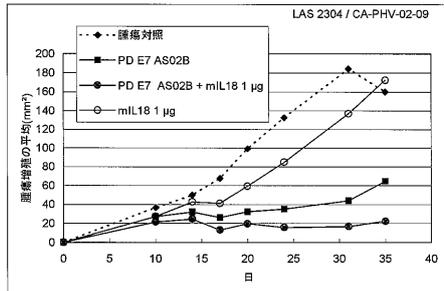
Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn
1           5           10          15
Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met
20          25          30
Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile
35          40          45
Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser
50          55          60
Val Lys Asp Ser Lys Met Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile
65          70          75          80
Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser
85          90          95
Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu
100         105        110
Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu
115        120        125
Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp
130        135        140
Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser
145        150        155

```

【 図 2 】

対照非 Tg マウスにおける in vivo での腫瘍増殖

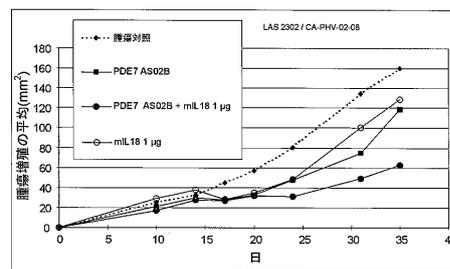
2A - IL-18 1 µg + E7 と AS02 を用いたワクチン接種



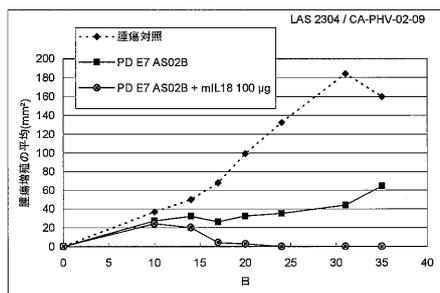
【 図 3 】

E7 Tg マウスにおける in vivo での腫瘍増殖

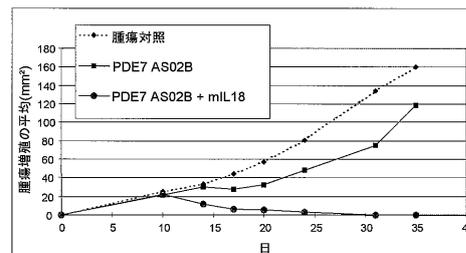
3A - IL-18 1 µg + E7 と AS02 を用いたワクチン接種



2B - IL-18 100 µg + E7 と AS02 を用いたワクチン接種



3B - IL-18 100 µg + E7 と AS02 を用いたワクチン接種

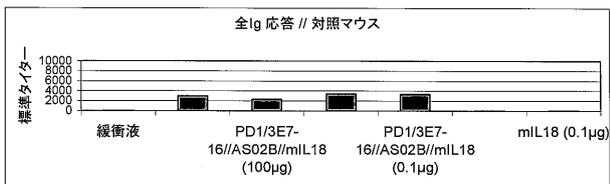


【 図 4 】

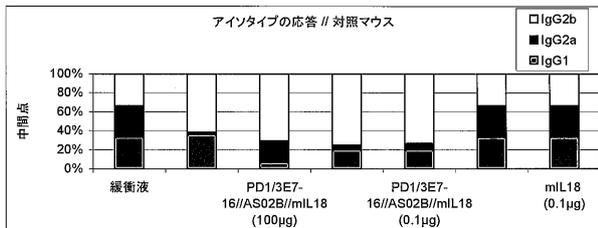
対照非 Tg マウスにおける抗体応答およびアイソタイププロフィール

4A - 抗体応答

全 Ig 応答 (標準タイターを EU/ml で表す)



4B - アイソタイププロフィール

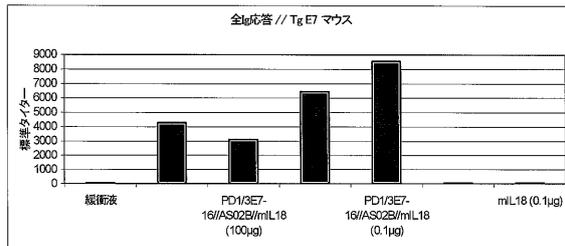


【 図 5 】

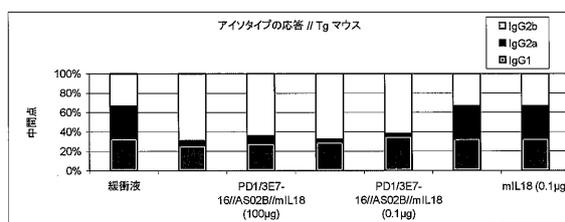
E7 Tg マウスにおける抗体応答およびアイソタイププロフィール

5A - 抗体応答

全 Ig 応答 (標準タイターを EU/ml で表す)

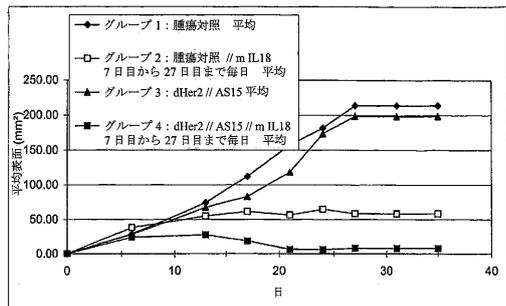


5A - アイソタイププロフィール



【 図 6 】

TCI Her2 治療モデルにおける in vivo で腫瘍の増殖



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/011620

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 A61K39/39 A61P31/02 A61P31/12 A61P37/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 375 945 B1 (BOON THIERRY ET AL) 23 Apr11 2002 (2002-04-23) column 1, line 14 - line 24 column 3, line 31 - column 4, line 33 claims; examples	1-32
X	WO 99/56775 A (AKZO NOBEL N.V.; NICOLSON, LESLEY; RIJKE, ERIC, ONNO) 11 November 1999 (1999-11-11) page 2, line 22 - page 3, line 19 page 4, line 15 - line 26 claims; examples	1-32
X	US 6 355 256 B1 (NOGUCHI YUJI ET AL) 12 March 2002 (2002-03-12) column 1, line 10 - line 27 claims; examples	1-32
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
9 February 2005		17/02/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Rankin, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/011620

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIM J J ET AL: "MODULATION OF AMPLITUDE AND DIRECTION OF IN VIVO IMMUNE RESPONSES BY CO-ADMINISTRATION OF CYTOKINE GENE EXPRESSION CASSETTES WITH DNAIMMUNOGENS" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WEINHEIM, DE, vol. 28, 1998, pages 1089-1103, XP000914724 ISSN: 0014-2980 the whole document	1-32
A	WO 98/18810 A (THE UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION; KRIEG, ARTHUR, M; KLINE, J) 7 May 1998 (1998-05-07) page 27, line 34 page 50, line 19 claim 27	1-32
A	WO 01/58956 A (BASF AKTIENGESELLSCHAFT; GHAYUR, TARIQ; DIXON, RICHARD, W; ROGUSKA, MI) 16 August 2001 (2001-08-16) page 14; table 5	1-32
A	WO 01/57219 A (SCHERING CORPORATION) 9 August 2001 (2001-08-09) figure 1	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2004/011620**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-9 and 26 are directed to a method of treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2. Claims Nos.:
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:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 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

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/011620

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 6375945	B1	23-04-2002	CA 2293614 A1	23-12-1998
			EP 0977589 A1	09-02-2000
			JP 2002504135 T	05-02-2002
			CA 2294051 A1	23-12-1998
			WO 9857659 A1	23-12-1998
			WO 9857660 A1	23-12-1998
			EP 1001808 A1	24-05-2000
			JP 2002504136 T	05-02-2002
			US 2002160011 A1	31-10-2002
			WO 9956775	A
CA 2328059 A1	11-11-1999			
WO 9956775 A1	11-11-1999			
EP 1075275 A1	14-02-2001			
JP 2002513547 T	14-05-2002			
US 6355256	B1	12-03-2002	AU 3735095 A	26-04-1996
			WO 9610423 A1	11-04-1996
			ZA 9508230 A	15-07-1996
WO 9818810	A	07-05-1998	US 6207646 B1	27-03-2001
			AU 5242498 A	22-05-1998
			CA 2270345 A1	07-05-1998
			CN 1235609 A	17-11-1999
			EP 0948510 A1	13-10-1999
			JP 2001503267 T	13-03-2001
			JP 2003286174 A	07-10-2003
			JP 2004041224 A	12-02-2004
			KR 2000052994 A	25-08-2000
			NZ 335397 A	24-11-2000
			WO 9818810 A1	07-05-1998
			US 2003100527 A1	29-05-2003
			US 6429199 B1	06-08-2002
			US 2003191079 A1	09-10-2003
			US 6653292 B1	25-11-2003
			US 2004106568 A1	03-06-2004
			US 2004147468 A1	29-07-2004
			US 2004087538 A1	06-05-2004
			US 2004132685 A1	08-07-2004
			US 2004167089 A1	26-08-2004
			US 2004198688 A1	07-10-2004
			US 2003050261 A1	13-03-2003
			US 2005004061 A1	06-01-2005
US 2004229835 A1	18-11-2004			
US 6239116 B1	29-05-2001			
WO 0158956	A	16-08-2001	AU 3680701 A	20-08-2001
			BG 107045 A	30-05-2003
			BR 0108188 A	25-02-2003
			CA 2399148 A1	16-08-2001
			CN 1461310 T	10-12-2003
			EP 1257585 A2	20-11-2002
			HU 0300423 A2	28-06-2003
			JP 2004500086 T	08-01-2004
			NO 20023788 A	09-10-2002
			PL 356836 A1	12-07-2004
			SK 12942002 A3	02-05-2003
			WO 0158956 A2	16-08-2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/011620

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0158956	A	ZA 200206266 A	06-11-2003
WO 0157219	A	AU 3321201 A	14-08-2001
	09-08-2001	WO 0157219 A2	09-08-2001
		US 2002102234 A1	01-08-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/155 (2006.01)	A 6 1 K 39/155	
A 6 1 K 39/145 (2006.01)	A 6 1 K 39/145	
A 6 1 K 39/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/04	
A 6 1 K 39/095 (2006.01)	A 6 1 K 39/095	
A 6 1 K 39/108 (2006.01)	A 6 1 K 39/108	
A 6 1 K 39/112 (2006.01)	A 6 1 K 39/112	
A 6 1 K 39/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/02	
A 6 1 K 39/002 (2006.01)	A 6 1 K 39/002	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	

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

(74) 代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(74) 代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(72) 発明者 ブルック, クラウディン, エルビア, マリエ

アメリカ合衆国 1 9 4 0 6, ペンシルベニア州, キング オブ プルシア, スウィードランド
ロード 7 0 9, グラクソスミスクライン

(72) 発明者 ジェラルド, キャサリン, マリー, ギスレーヌ

ベルギー国 ビー - 1 3 3 0 リキセンザール, リュ ド ランスティテュ 8 9, グラクソスミ
スクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

(72) 発明者 ジョナック, ゼンカ, ルードミラ

アメリカ合衆国 1 9 4 0 6, ペンシルベニア州, キング オブ プルシア, スウィードランド
ロード 7 0 9, グラクソスミスクライン

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA03 BA01 BA08 BA22 BA23 BA44 CA62 DA12 MA02
MA05 MA17 MA66 NA05 ZB071 ZB072 ZB091 ZB092 ZB261 ZB262
ZB321 ZB322
4C085 AA03 BA02 BA07 BA09 BA13 BA16 BA17 BA20 BA21 BA24
BA45 BA49 BA51 BA55 BA57 BA58 BA69 BA76 BA78 BA79
BA80 BA83 BA87 BA88 BA89 BB11 EE03 EE06 FF01 FF02
FF11 FF14 FF17 FF18