

(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2005-530493

(P2005-530493A)

(43) 公表日 平成17年10月13日(2005. 10. 13)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/015	A 6 1 K 39/015	4 B O 6 5
A 6 1 K 39/04	A 6 1 K 39/04	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/118	A 6 1 K 39/118	4 H O 4 5
A 6 1 K 39/12	A 6 1 K 39/12	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 33 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-585746 (P2003-585746)	(71) 出願人	505049076
(86) (22) 出願日	平成15年4月22日 (2003. 4. 22)		レコファーマ アーバー
(85) 翻訳文提出日	平成16年12月14日 (2004. 12. 14)		スウェーデン国 エス-1 0 3 9 5 ス
(86) 国際出願番号	PCT/IB2003/002207		トックホルム, ドロットニングガータン
(87) 国際公開番号	W02003/088995		3 3, ボックス 7 7 1 0
(87) 国際公開日	平成15年10月30日 (2003. 10. 30)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/375, 095		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成14年4月22日 (2002. 4. 22)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	ホルガーソン, ヤン
			スウェーデン国 エス-1 4 1 3 3 フ
			ディング, ヴィーナスヴァーゲン 6ア
			ー
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ムチン融合ポリペプチドワクチン、組成物およびそれらの使用方法

(57) 【要約】

本発明は、ムチン-免疫グロブリン融合タンパク質を使用して、ワクチン免疫原性を増強するための組成物および方法を提供する。本発明のワクチンは、以下を含む：(a) 第2のポリペプチドに作動可能に連結された第1のポリペプチドを含むアジュバントポリペプチドであって、ここで第1のポリペプチドは、ムチンポリペプチドであり、 α 1, 3ガラクトシルトランスフェラーゼによりグリコシル化され、第2のポリペプチドは、免疫グロブリンポリペプチドの少なくとも1つの領域を含む、アジュバントポリペプチド、ならびに(b) 抗原。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

精製ワクチンであって、該ワクチンは以下：

(a) 第 2 のポリペプチドに作動可能に連結された第 1 のポリペプチドを含むアジュバントポリペプチドであって、該第 1 のポリペプチドは、ムチンポリペプチドであり、 $\alpha 1$ 、3 ガラクトシルトランスフェラーゼによりグリコシル化され、該第 2 のポリペプチドは、免疫グロブリンポリペプチドの少なくとも 1 つの領域を含む、アジュバントポリペプチド、ならびに

(b) 抗原、
を含む、精製ワクチン。

10

【請求項 2】

請求項 1 に記載のワクチンであって、前記アジュバントポリペプチドは、前記抗原に作動可能に連結される、ワクチン。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のワクチンであって、前記アジュバントポリペプチドは、前記抗原に共有結合されている、ワクチン。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のワクチンであって、前記第 1 のポリペプチドは、PSGL-1、MUC 1、MUC 2、MUC 3、MUC 4、MUC 5 a、MUC 5 b、MUC 5 c、MUC 6、MUC 11、MUC 12、CD 34、CD 43、CD 45、CD 96、GlyCAM-1、MAdCAM、またはそれらのフラグメントからなる群より選択される、ワクチン。

20

【請求項 5】

請求項 1 に記載のワクチンであって、前記第 1 のポリペプチドは、P-セレクチン糖タンパク質リガンド-1 の少なくとも 1 つの領域を含む、ワクチン。

【請求項 6】

請求項 1 に記載のワクチンであって、前記第 1 のポリペプチドは、P-セレクチン糖タンパク質リガンド-1 の細胞外部分を含む、ワクチン。

【請求項 7】

請求項 1 に記載のワクチンであって、前記第 1 のポリペプチドは、ヒト P-セレクチン糖タンパク質リガンド-1 のアミノ酸 19～319 を含む、ワクチン。

30

【請求項 8】

請求項 1 に記載のワクチンであって、前記第 1 のポリペプチドは、複数の Gal α 1, 3 Gal エピトープを含む、ワクチン。

【請求項 9】

請求項 6 に記載のワクチンであって、前記第 1 のポリペプチドは、野生型 P-セレクチン糖タンパク質リガンド-1 ポリペプチドより多くの Gal α 1, 3 Gal エピトープを含む、ワクチン。

【請求項 10】

請求項 6 に記載のワクチンであって、前記第 1 のポリペプチドは、野生型 P-セレクチン糖タンパク質リガンド-1 ポリペプチドより 2 倍多くの Gal α 1, 3 Gal エピトープを含む、ワクチン。

40

【請求項 11】

請求項 6 に記載のワクチンであって、前記第 1 のポリペプチドは、野生型 P-セレクチン糖タンパク質リガンド-1 ポリペプチドより 3 倍多くの Gal α 1, 3 Gal エピトープを含む、ワクチン。

【請求項 12】

請求項 1 に記載のワクチンであって、前記第 2 のポリペプチドは、重鎖免疫グロブリンポリペプチドの領域を含む、ワクチン。

【請求項 13】

請求項 1 に記載のワクチンであって、前記第 2 のポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖の

50

F c 領域を含む、ワクチン。

【請求項 14】

請求項 1 に記載のワクチンであって、前記アジュバントポリペプチドは、二量体である、ワクチン。

【請求項 15】

請求項 1 に記載のワクチンであって、前記抗原は、C 型肝炎、H I V、B 型肝炎、パピローマウイルス、マラリア、結核、単純ヘルペスウイルス、クラミジア、およびインフルエンザ、またはこれらの生物学的成分からなる群より選択される、ワクチン。

【請求項 16】

請求項 1 に記載のワクチンであって、前記抗原は、腫瘍関連抗原である、ワクチン。

10

【請求項 17】

請求項 16 に記載のワクチンであって、前記腫瘍関連抗原は、乳房、肺、結腸、前立腺、膵臓、頸部および黒色腫の腫瘍関連抗原からなる群より選択される、ワクチン。

【請求項 18】

請求項 2 に記載のワクチンをコードする、単離された核酸。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項 20】

請求項 19 に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項 21】

20

アジュバント化合物をさらに含む、請求項 1 に記載のワクチン。

【請求項 22】

癌を発症させる危険性のあるヒト被験体における免疫の方法であって、該方法は、請求項 1 に記載のワクチンを該被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 23】

癌に罹患した被験体における癌の症状を防止または改善する方法であって、該方法は、有効用量の請求項 1 に記載のワクチンを該被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 24】

請求項 23 に記載の方法であって、前記癌は、乳房、肺、結腸、前立腺、膵臓、頸部および黒色腫からなる群より選択される、方法。

30

【請求項 25】

細胞における抗体分泌を増大させる方法であって、該方法は、該細胞と精製ワクチンとを接触させる工程を包含し、該ワクチンは、以下：

(a) 第 2 のポリペプチドに作動可能に連結された第 1 のポリペプチドを含むアジュバントポリペプチドであって、ここで該第 1 のポリペプチドは、ムチンポリペプチドであり、 $\alpha 1$, 3 ガラクトシルトランスフェラーゼによりグリコシル化され、該第 2 のポリペプチドは、免疫グロブリンポリペプチドの少なくとも 1 つの領域を含む、アジュバントポリペプチド、ならびに

(b) 抗原、
を含み、その結果、該細胞における該抗体分泌が増大される、精製ワクチンである、方法

40

【請求項 26】

請求項 25 に記載の方法であって、前記細胞は、B 細胞および T 細胞からなる群より選択される、方法。

【請求項 27】

免疫細胞活性化を増す方法であって、該方法は、該免疫細胞と精製ワクチンとを接触させる工程を包含し、該ワクチンは、以下：

(a) 第 2 のポリペプチドに作動可能に連結された第 1 のポリペプチドを含むアジュバントポリペプチドであって、該第 1 のポリペプチドは、ムチンポリペプチドであり、 $\alpha 1$, 3 ガラクトシルトランスフェラーゼによりグリコシル化され、該第 2 のポリペプチドは

50

、免疫グロブリンポリペプチドの少なくとも1つの領域を含む、アジュバントポリペプチド、ならびに

(b) 抗原、

を含み、その結果、該細胞の活性化が増大される、精製ワクチンである、方法。

【請求項28】

請求項27に記載の方法であって、前記細胞は、B細胞およびT細胞からなる群より選択される、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

(発明の分野)

本発明は、癌のような疾患を予防および処置する際のタンパク質ワクチンの組成物および方法ならびにそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

α -Gal ($\text{Gal } \alpha 1, 3 \text{ Gal } \beta 1, 4 \text{ GlcNAc } \beta 1 - \text{R}$) 糖質エピトープは、特に、旧世界サル (Old World Monkey)、サル (ape) およびヒトを除いて、動物界全体を通じて発現される。これらの種は、その生合成を担う $\alpha 1, 3$ ガラクトシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子における不活性変異が原因で、そのエ 20
ピトープを欠いている。この変異が存在する動物において、この変異は、脂質によって、および種々のキャリアタンパク質上の両方に保持される。このエピトープを欠く種 (例えば、ヒト) は、おそらく、腸内細菌叢の細菌莢膜多糖に対する免疫応答の結果として、 α -Gal を認識する抗体を有する。抗 α -Gal (抗 Gal) 抗体は、全ての抗体のクラスおよびサブクラスにあり、ヒト IgG の 1% 程度が、この特異性を有する。

【0003】

ムチン (例えば、MUC1)、および高度に O-グリコシル化されたドメイン (例えば、P-セレクトリン糖タンパク質リガンド-1 (PSGL-1)) を有するムチン様分子は、広くグリコシル化された高分子量 ($> 200 \text{ kD}$) タンパク質であり、 $\alpha 1, 3$ ガラクトシルトランスフェラーゼの標的である。ムチンは、通常の細胞 (例えば、白血球) にお 30
いて、および上皮起源の多くのヒト癌において豊富に発現される。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0004】

(発明の要旨)

本発明は、Gal $\alpha 1, 3$ Gal 置換タンパク質がワクチンの免疫原性を増すという発見に一部基づく。ムチン (これは、 $\alpha 1, 3$ ガラクトシルトランスフェラーゼの標的である) は、ワクチンにおいて特に有用である。

【0005】

本発明は、アジュバントポリペプチドおよび1種以上の抗原部分を含む精製ワクチンを 40
特徴とする。このアジュバントポリペプチドは、第1のポリペプチドを含み、第2のポリペプチドに作動可能に連結されている。このアジュバントポリペプチドは、多量体 (例えば、二量体) である。

【0006】

アジュバントポリペプチドの第1のポリペプチドは、ムチンポリペプチドを含み、 $\alpha 1, 3$ ガラクトシルトランスフェラーゼによってグリコシル化される。ムチンポリペプチドとしては、例えば、PSGL-1、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5a、MUC5b、MUC5c、MUC6、MUC11、MUC12、CD34、CD43、CD45、CD96、GlyCAM-1、MAdCAM、それらの細胞外領域、またはそれらのフラグメントが挙げられる。その第1のポリペプチドは、複数の Gal $\alpha 1, G$ 50

a l エピトープを含む。好ましくは、その第 1 のポリペプチドは、野生型ヒト P-セレクチン糖タンパク質リガンド-1 ポリペプチドより多くの G a l α 1, 3 G a l エピトープを含む。そのアジュバントポリペプチドの第 2 のポリペプチドは、免疫グロブリンポリペプチドの領域を含む。

【0007】

抗原は、例えば、ウイルス、細菌または真菌である。例えば、その抗原は、C 型肝炎、H I V、B 型肝炎、パピローマウイルス、マラリア、結核、単純ヘルペスウイルス、クラミジア、もしくはインフルエンザ、またはそれらの生物学的成分（例えば、ペプチド、タンパク質、脂質、糖質、ホルモンまたはこれらの組み合わせ）である。あるいは、その抗原は、腫瘍関連抗原（例えば、乳房、肺、結腸、前立腺、膵臓、頸部または黒色腫の腫瘍関連抗原）である。抗原は、アジュバントポリペプチドに作動可能に連結されている。例えば、その抗原は、共有結合されている。あるいは、その抗原は、アジュバントポリペプチドに非共有結合により会合している。

【0008】

その第 2 のポリペプチドは、重鎖免疫グロブリンポリペプチドの領域（例えば、F c 領域または F a b 領域）を含む。

【0009】

本発明はさらに、アジュバントポリペプチドをコードする単離された核酸、その単離された核酸を含むベクター、およびこのベクターを含む細胞に関する。このベクターはさらに、その抗原ポリペプチドをコードする核酸を含む。

【0010】

本発明はまた、免疫の方法を特徴とする。被験体は、本発明に従うワクチンを、その免疫の必要がある被験体に投与することによって免疫される。さらなる局面において、本発明は、癌に罹患したかまたは癌を発症させる危険性のある、癌の症状を予防または改善する方法の必要な被験体を同定し、本発明に従うワクチンをその被験体に投与することによって、癌の症状を予防または改善する方法を包含する。例えば、その被験体は、黒色腫、乳癌、肺ガン、結腸癌、前立腺癌、膵臓癌、頸部癌に罹患しているかまたはこれらを発症する危険性がある。癌に罹患しているかまたは癌を発症する危険性を有する被験体は、特定の障害について当該分野で公知の方法によって同定される。

【0011】

本発明はさらに、細胞と本発明に従うワクチンとを接触させることによって、抗体分泌または免疫細胞活性化を増大させる方法の特徴とする。その細胞は、B 細胞または T 細胞である。

【0012】

別段規定されなければ、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解されているのと同じ意味を有する。本明細書中で記載されるものと同様かまたは同じ方法および材料が、本発明の実施または試験において使用され得るが、適切な方法および材料が、以下に記載される。本明細書中で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、それらの全体が本明細書中で参考として援用される。矛盾する場合は、本明細書（定義を含む）が、支配する。さらに、この材料、方法、および例は、単なる例示に過ぎず、限定することを意図しない。

【0013】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明、および特許請求の範囲から明らかである。

【0014】

（発明の詳細な説明）

本発明は、G a l α 1, 3 g a l エピトープを有するムチン融合タンパク質が有効なアジュバントであるという発見に一部基づく。

【0015】

ヒトに存在する天然の抗 G a l 抗体は、自己腫瘍ワクチン免疫原性の普遍的な増強因子

(augmentor)として提唱されている(Galili, 1997, Immunol Today 18(6):281-5; Galili, 2001, J Hematother Stem Cell Res. 10(4):501-11)。腫瘍細胞膜に結合する抗Gal抗体は、抗原提示細胞(APC)による腫瘍細胞膜のレセプター媒介性の、および補体レセプター媒介性のFcファゴサイトーシスを容易にし得、その後、これらのAPCによりTヘルパーリンパ球および細胞傷害性Tリンパ球を活性化する。腫瘍関連抗原由来のペプチドと複合体化した自己MHCに対して感作された細胞傷害性Tリンパ球が生成され、腫瘍細胞の細胞溶解に利用可能である。この概念の有効性は、 $\alpha 1, 3$ ガラクトシルトランスフェラーゼノックアウトマウスをB16-B6マウス黒色腫細胞のレシピエントとして使用したマウス腫瘍モデルにおいて確認した。 α -Galエピトープを欠く親B16-B6細胞ではなく、 $\alpha 1, 3$ ガラクトシルトランスフェラーゼを発現するB16-B6黒色腫細胞の安定なトランスフェクト体をこれらのマウスにワクチン接種すると、生きている親B16-BL6細胞での第2のチャレンジからマウスを保護する。

【0016】

本明細書中で使用される場合、以下の規定は、この場合の理解を容易にするために、提供される。この定義が、当業者に公知の意味から変化する程度まで、以下の定義が支配する。

【0017】

「ムチン」とは、 $\alpha 1, 3$ ガラクトシルトランスフェラーゼの標的である、1種以上のOグリコシル化ドメインを有する任意のポリペプチドを意味する。

【0018】

「生物学的成分」とは、細胞、組織、細菌、ウイルス、または他の生物学的実体(ペプチド、タンパク質、脂質、糖質、ホルモン、またはこれらの組み合わせを含む)によって作製されるかまたはこれらと関連する、任意の化合物を意味する。

【0019】

「アジュバント化合物」とは、抗原またはワクチンの免疫原性応答または免疫原性を増大させる任意の化合物を意味する。

【0020】

「抗原」とは、免疫原性応答を誘導し得る任意の化合物を意味する。

【0021】

「免疫グロブリン」とは、形質細胞によって分泌され、特定の抗原と結合することによって免疫応答において抗体として機能する任意のポリペプチドまたはタンパク質複合体を意味する。免疫グロブリンは、本明細書中で使用される場合、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMを含む。免疫グロブリンの領域は、Fc領域およびFab領域、ならびに重鎖または軽鎖の免疫グロブリンを含む。

【0022】

「抗原提示」とは、1種以上の主要組織適合複合体クラスIまたはクラスII分子と会合した、細胞表面上での抗原の発現を意味する。抗原提示は、当該分野で公知の方法によって測定される。例えば、抗原提示は、Gillisら, J. Immunol. 120:2027-1978に記載されるインビトロ細胞アッセイを使用して測定される。

【0023】

「免疫原性」とは、物質が免疫応答を刺激する能力を意味する。免疫原性は、例えば、その物質に対して特異的な抗体の存在を決定することによって測定される。抗体の存在は、当該分野で公知の方法(例えば、ELISAアッセイ)によって検出される。

【0024】

「免疫応答」または「免疫原性応答」とは、抗原によって誘導される細胞活性(例えば、抗体の生成、または抗原もしくは抗原フラグメントの提示)を意味する。

【0025】

「タンパク質分解性分解」とは、ペプチド結合の加水分解によるポリペプチドの分解を意味する。用語「ペプチド」によって、特定の長さは示されない。タンパク質分解性分解

10

20

30

40

50

は、例えば、ゲル電気泳動を使用して測定される。

【0026】

「細胞」とは、抗原提示が可能な任意の細胞を含む。例えば、その細胞は、体細胞、B細胞、マクロファージまたは樹状細胞である。

【0027】

本発明は、ムチンポリペプチドおよび抗原と組み合わせてワクチンとして有用な免疫グロブリンの領域を含むアジュバントポリペプチド融合タンパク質（本明細書中、「ムチン-Ig融合タンパク質」といわれる）を提供する。このワクチンは、被験体（例えば、ヒト）における免疫の方法において有用である。

【0028】

（ワクチン）

本発明のワクチンは、アジュバントポリペプチドおよび抗原を含む。このアジュバントポリペプチドは、融合タンパク質であり、抗原は、免疫応答が哺乳動物において誘導される任意の化合物または分子である。

【0029】

（アジュバントポリペプチド）

種々の局面において、本発明は、糖タンパク質（例えば、ムチンポリペプチド）の少なくとも一部を含む第1のポリペプチドを含むアジュバント融合タンパク質を提供し、この第1のポリペプチドは、第2のポリペプチドに作動可能に連結されている。「少なくとも一部分」とは、ムチンポリペプチドが少なくとも1つのムチンドメイン（例えば、O結合型グリコシル化部位）を含むことを意味する。本明細書中で使用される場合、「融合タンパク質」または「キメラタンパク質」とは、非ムチンポリペプチドに作動可能に連結されたムチンポリペプチドの少なくとも一部分を含む。「ムチンポリペプチド」とは、ムチンドメインを有するポリペプチドをいう。このムチンポリペプチドは、1個、2個、3個、5個、10個、20個またはそれ以上のムチンドメインを有する。このムチンポリペプチドは、O-グリカンで置換されたアミノ酸配列によって特徴づけられる任意の糖タンパク質である。例えば、ムチンポリペプチドは、2つ毎または3つ毎のアミノ酸がセリンまたはスレオニンである。ムチンポリペプチドは、分泌タンパク質である。あるいは、このムチンポリペプチドは、細胞表面タンパク質である。

【0030】

ムチンドメインは、アミノ酸であるスレオニン、セリンおよびプロリンが豊富である。これらのアミノ酸において、オリゴ糖が、ヒドロキシアミノ酸に対してN-アセチルガラクトサミンを介して結合される（O-グリカン）。ムチンドメインは、O結合型グリコシル化部位を含むか、あるいはそれからなる。ムチンドメインは、1、2、3、5、10、20、50、100またはそれ以上のO結合型グリコシル化部位を有する。あるいは、そのムチンドメインは、N結合型グリコシル化部位を含むか、あるいはそれからなる。ムチンポリペプチドは、グリカンに起因して、その質量の50%、60%、80%、90%、95%または100%を有する。それに対して、「非ムチンポリペプチド」とは、その質量が少なくとも40%未満がグリカンに起因するポリペプチドをいう。ムチンポリペプチドは、MUC遺伝子によってコードされる任意のポリペプチドである（すなわち、MUC 1、MUC 2、MUC 3、MUC 4、MUC 5a、MUC 5b、MUC 5c、MUC 6、MUC 11、MUC 12など）。あるいは、ムチンポリペプチドは、P-セ렉チン糖タンパク質リガンド1（PSGL-1）、CD34、CD43、CD45、CD96、GlyCAM-1、MAdCAM、赤血球グリコホリン、グリコカリチン（glycocalicin）、グリコホリン、シアロホリン（sialophorin）、ロイコシアリン（leukosialin）、LDL-R、ZP3、およびエピグリカニン（epiglycanin）である。好ましくは、このムチンは、PSGL-1である。

【0031】

ムチンポリペプチドは、ムチンタンパク質の全ての部分または一部分を含む。あるいは、そのムチンタンパク質は、ポリペプチドの細胞外部分を含む。例えば、そのムチンポリ

10

20

30

40

50

ペプチドは、P S G L-1の細胞外部分またはその一部（例えば、G e n B a n k登録番号A 5 7 4 6 8に開示されるアミノ酸19～319）を含む。そのムチンポリペプチドはまた、P S G L-1のシグナル配列部分（例えば、アミノ酸1～18）、膜貫通ドメイン（例えば、アミノ酸320～343）、および細胞質ドメイン（例えば、アミノ酸344～412）を含む。

【0032】

第1のポリペプチドは、 $\alpha 1, 3$ ガラクトシルトランスフェラーゼによりグリコシル化される。いくつかの局面において、その第1のポリペプチドは、 $\alpha 1, 3$ ガラクトシルトランスフェラーゼおよび $\alpha 1, 2$ フコシルトランスフェラーゼの両方、 $\alpha 1, 3$ N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ、またはポリペプチドをグリコシル化することが当業者に公知の別の酵素によってグリコシル化される。 $\alpha 1, 3$ ガラクトシルトランスフェラーゼに適切な供給源は、G e n B a n k登録番号A A A 7 3 5 5 8、L 3 6 1 5 0、B A B 3 0 1 6 3、A K 0 1 6 2 4 8、E 4 6 5 8 3またはP 5 0 1 2 7を含み、それらの全体が本明細書中に参考として援用される。

10

【0033】

第1のポリペプチド、および／または第1のポリペプチドをコードする核酸は、当該分野で公知のムチンコード配列を用いて構築される。ムチンポリペプチドおよびムチンポリペプチドをコードする核酸の適切な供給源は、それぞれ、G e n B a n k登録番号A 5 7 4 6 8、N P 6 6 3 6 2 5およびN M 1 4 5 6 5 0、C A D 1 0 6 2 5およびA J 4 1 7 8 1 5、X P 1 4 0 6 9 4およびX M 1 4 0 6 9 4、X P 0 0 6 8 6 7およびX M 0 0 6 8 6 7およびN P 0 0 3 3 1 7 7 7およびN M 0 0 9 1 5 1を含み、それらの全体が本明細書中に参考として援用される。

20

【0034】

そのムチンポリペプチド部分は、増大した糖質含有量を生じる（非変異配列に対して）、天然に存在するムチン配列（野生型）において変異を有する改変体ムチンポリペプチドとして提供される。例えば、改変体ムチンポリペプチドは、野生型ムチンと比較して、さらなるO結合型グリコシル化部位を含む。あるいは、その改変体ムチンポリペプチドは、野生型ムチンポリペプチドと比較して、増大した数のセリン、スレオニン、またはプロリン残基を生じるアミノ酸配列変異体を含む。この増大した糖質含有量は、当業者に公知の方法によって、ムチンのタンパク質：糖質の比を決定することによって評価される。

30

【0035】

ムチンポリペプチド部分は、タンパク質分解に対してより耐性の（非変異配列に対して）ムチン配列を生じる、天然に存在するムチン配列（野生型）において変異を有する改変体ムチンポリペプチドとして提供される。

【0036】

第1のポリペプチドは、全長P S G L-1を含む。あるいは、この第1のポリペプチドは、全長P S G L-1ポリペプチド（例えば、P S G L-1の細胞外部分）未満を含む。例えば、400アミノ酸長未満（例えば、300、250、150、100、50、または25アミノ酸長以下）の第1のポリペプチド。例示的なP S G L-1ポリペプチドおよび核酸配列は、G e n B a n k登録番号A 5 7 4 6 8；X P 0 0 6 8 6 7；X M 0 0 6 8 6 7；X P 1 4 0 6 9 4およびX M 1 4 0 6 9 4を含む。

40

【0037】

第2のポリペプチドは、免疫グロブリンポリペプチドの少なくとも1つの領域を含む。「少なくとも1つの領域」とは、免疫グロブリン分子の任意の一部（例えば、軽鎖、重鎖、F C領域、F a b領域、F v領域またはそれらの任意のフラグメント）を含むことを意味する。免疫グロブリン融合ポリペプチドは、当該分野で公知であり、例えば、米国特許第5, 516, 964号；同第5, 225, 538号；同第5, 428, 130号；同第5, 514, 582号；同第5, 714, 147号；および同第5, 455, 165号に記載される。

【0038】

50

第2のポリペプチドは、全長免疫グロブリンポリペプチドを含む。あるいは、その第2のポリペプチドは、全長免疫グロブリンポリペプチド未満（例えば、重鎖、軽鎖、F a b、F a b₂、F vまたはF c）を含む。好ましくは、第2のポリペプチドは、免疫グロブリンポリペプチドの重鎖を含む。より好ましくは、第2のポリペプチドは、免疫グロブリンポリペプチドのF c領域を含む。

【0039】

本発明の別の局面において、この第2のポリペプチドは、野生型免疫グロブリン重鎖のF c領域のエフェクター機能より少ないエフェクター機能を有する。F cエフェクター機能としては、例えば、F cレセプター結合、補体結合およびT細胞枯渇活性が挙げられる（例えば、米国特許第6, 136, 310号を参照のこと）。T細胞枯渇活性、F cエフ
10
エクター機能、および抗体安定性をアッセイする方法は、当該分野で公知である。一実施形態において、第2のポリペプチドは、F cレセプターに対して低い親和性を有するかまたは全く親和性を有さない。代替的实施形態において、第2のポリペプチドは、補体タンパク質C1qに対して低い親和性を有するかまたは全く親和性を有さない。

【0040】

（抗原）

本発明のワクチンはまた、抗原を含む。「抗原」は、免疫応答が望まれる任意の化合物を含む。抗原は、身体に導入される場合、免疫応答（例えば、B細胞からの抗体の生成、T細胞の活性化および増大、ならびにサイトカイン発現（例えば、インターロイキン））を刺激する任意の物質を含む。「B細胞」または「Bリンパ球」とは、活性化される場合
20
、抗体の生成を担う免疫細胞を意味する。「T細胞」または「Tリンパ球」とは、細胞傷害性T細胞およびヘルパーT細胞としてさらに規定される、リンパ球のクラスのメンバーを意味する。T細胞は、抗原を特徴づけるエピトープを同定し、T細胞が外来物質として認識する罹患した細胞を攻撃および破壊する、免疫応答全体を調節および調整する。抗原としては、例えば、毒素、細菌、外来血球、および移植した器官の細胞が挙げられる。好ましくは、その抗原は、C型肝炎、H I V、B型肝炎、パピローマウイルス、マラリア、結核、単純ヘルペスウイルス、クラミジア、およびインフルエンザ、またはそれらの生物学的成分（例えば、ウイルスポリペプチドまたは細菌ポリペプチド）である。本発明の実施形態において、アジュバントポリペプチドは、抗原に共有結合される。

【0041】

ワクチンは、抗原に作動可能に連結されたアジュバントポリペプチドを含む。「作動可能に連結される」は、アジュバントポリペプチドの第1および第2のポリペプチドが、第1のポリペプチドのO結合型グリコシル化を可能にする様式で（例えば、ペプチド結合のような共有結合を介して）化学的に連結されていることを示すことが意図される。融合ポリペプチドをコードする核酸をいうために使用される場合、この用語、作動可能に連結されるは、ムチンポリペプチドおよび非ムチンポリペプチドをコードする核酸が、互いにインフ
30
レームで融合されていることを意味する。非ムチンポリペプチドは、ムチンポリペプチドのN末端またはC末端に融合される。抗原は、アジュバントポリペプチドに作動可能に連結される。例えば、アジュバントポリペプチドは、共有結合（例えば、ペプチド結合）を介して抗原に連結される。抗原は、ムチンポリペプチドのN末端またはC末端に融合
40
されている。あるいは、抗原は、ムチンポリペプチドの内部アミノ酸に融合される。「内部アミノ酸」とは、ポリペプチドのN末端またはC末端にはないアミノ酸を意味する。同様に、その抗原は、アジュバントポリペプチドの第2のポリペプチドに作動可能に、最も代表的には、共有結合（例えば、ペプチド結合）を介して、連結される。抗原は、アジュバントポリペプチドの第2のポリペプチドのN末端またはC末端に融合される。あるいは、その抗原は、アジュバントポリペプチドの第2のポリペプチドの内部アミノ酸に融合される。

【0042】

ワクチンまたはアジュバントポリペプチドは、1つ以上のさらなる部分に連結される。例えば、ワクチンは、GST融合タンパク質（ムチン-I g融合タンパク質配列がG S T（
50

すなわち、グルタチオンS-トランスフェラーゼ)配列のC末端に融合される)にさらに連結され得る。このような融合タンパク質は、ワクチンまたはアジュバントポリペプチドの精製を容易にし得る。あるいは、ワクチンまたはアジュバントポリペプチドは、固体支持体にさらに連結され得る。種々の固体支持体は、当業者に公知である。このような組成物は、抗血液型抗体の除去を容易にし得る。例えば、ワクチンまたはアジュバントポリペプチドは、例えば、金属化合物、シリカ、ラテックス、ポリマー材料から作製される粒子；マイクロタイタープレート；ニトロセルロースもしくはナイロンまたはそれらの組み合わせに連結される。

【0043】

融合タンパク質は、異種シグナル配列（すなわち、ムチン核酸によってコードされるポリペプチドに存在しないポリペプチド配列）をそのN末端に含む。例えば、ネイティブのムチンシグナル配列が除去され、別のタンパク質由来のシグナル配列で置換される。特定の宿主細胞（例えば、哺乳動物宿主細胞）において、ポリペプチドの発現および／または分泌は、異種シグナル配列の使用を介して増大される。

【0044】

本発明のキメラタンパク質または融合タンパク質は、標準的な組換えDNA技術によって生成される。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNAフラグメントは、従来の方法に従って（例えば、連結のための平滑末端または粘着末端（stagger end）、適切な末端を提供するための制限酵素消化、適切な場合、粘着末端（cohesive end）の充填、所望でない連結を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的連結を使用することによって）インフレイムでともに連結される。別の実施形態において、融合遺伝子は、自動化DNA合成機を含む従来の技術によって合成される。あるいは、遺伝子フラグメントのPCR増幅は、2つの連続する遺伝子フラグメント（これらのフラグメントは、後でキメラ遺伝子配列を生成するためにアニールされ、再増幅され得る）の間に相補的な突出部を生じるアンカープライマーを使用して行われる（例えば、Ausubelら（編）CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992を参照のこと）。さらに、融合部分（例えば、免疫グロブリン重鎖のFc領域）をコードする多くの発現ベクターが市販されている。ムチンコード核酸は、融合部分が、免疫グロブリンタンパク質にインフレイムで連結されるように、そのような発現ベクターにクローニングされる。

【0045】

ワクチンポリペプチドまたはアジュバントポリペプチドは、オリゴマー（例えば、二量体、三量体、または五量体）として存在し得る。好ましくは、ワクチンまたはアジュバントポリペプチドは、二量体である。より好ましくは、ワクチンまたはアジュバントポリペプチドは、二量体PSGL-1タンパク質、またはそれらの細胞外領域である。

【0046】

（ムチン-免疫グロブリン融合タンパク質含有ワクチンの発現）

本発明の別の局面は、ムチンポリペプチド、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログをコードする核酸を含むベクター、好ましくは、発現ベクターに関する。種々の局面において、そのベクターは、免疫グロブリンポリペプチド、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログをコードする核酸に作動可能に連結されたムチンポリペプチドをコードする核酸を含む。さらに、そのベクターは、 $\alpha 1, 3$ ガラクトシルトランスフェラーゼ、またはポリペプチドをグリコシル化するために有用な類似の酵素をコードする核酸、および抗原をコードする核酸を含む。本明細書中で使用される場合、用語「ベクター」とは、別の核酸（これに対してそのベクターが連結される）を輸送し得る核酸分子をいう。ベクターの1つの型は、「プラスミド」であり、プラスミドとは、さらなるDNAセグメントが連結される管状の二本鎖DNAループをいう。ベクターの別の型は、ウイルスベクターであり、ここでさらなるDNAセグメントは、ウイルスゲノムに連結される。特定のベクターは、これが導入される宿主細胞において自己複製し得る（例えば、細菌の複製機点を有する細菌ベクターおよび哺乳動物のエピソームベクター

）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主動物に導入される際に、宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは、これらが作動可能に連結される遺伝子の発現を指向し得る。このようなベクターは、本明細書中で「発現ベクター」といわれる。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしば、プラスミドの形態である。本明細書中において、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドがベクターの最も一般的に使用される形態であるので、交換可能に使用される。しかし、本発明は、等価な機能を提供する、ウイルスベクターのような他の形態の発現ベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）を含むことが意図される。

【0047】

10

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞中の核酸の発現に適切な形態で本発明の核酸を含み、このことは、組換え発現ベクターが、発現されるべき核酸配列に作動可能に連結された1以上の調節配列（これは、発現のために使用される宿主細胞に基づいて選択される）を含むことを意味する。組換え発現ベクター内で、「作動可能に連結される」とは、目的のヌクレオチド配列が、そのヌクレオチド配列の発現を（例えば、インビトロ転写／翻訳系、またはベクターが宿主細胞に導入された場合の宿主細胞において）可能にする様式で調節配列に連結されていることを意味すると意図される。

【0048】

用語「調節配列」とは、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことが意図される。このような調節配列は、例えば、Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)に記載される。調節配列は、多くの型の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指向するもの、および特定の宿主細胞においてのみヌクレオチド配列の発現を指向するもの（例えば、組織特異的調節配列）を含む。発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質発現レベルなどのような要因に依存しうるのは、当業者によって理解される。本発明の発現ベクターは、宿主細胞によって導入され、それによって、本明細書中に記載の核酸によってコードされるタンパク質またはペプチド（融合タンパク質またはペプチドを含む）（例えば、ムチン-Ig融合ポリペプチド、ムチン-IG融合ポリペプチドの変異形態など）が生成される。

20

30

【0049】

本発明の組換え発現ベクターは、原核生物細胞または真核生物細胞におけるムチン-Ig融合ポリペプチドの発現のために設計される。例えば、ムチン-Ig融合ポリペプチドを含むワクチンは、細菌細胞（例えば、Escherichia coli）、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを使用する）、酵母細胞または哺乳動物細胞において発現される。適切な宿主細胞は、Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)においてさらに議論される。あるいは、組換え発現ベクターは、例えば、T7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを用いて、インビトロで転写および翻訳される。

40

【0050】

原核生物におけるタンパク質の発現は、Escherichia coliにおいて、融合タンパク質または非融合タンパク質の発現を指向する構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むベクターを用いて最も頻繁に行われる。融合ベクターは、多くのアミノ酸をそのベクター中にコードされるタンパク質に（通常は組換えタンパク質のアミノ末端に）加える。このような融合ベクターは、代表的に、3つの目的に寄与する：(i) 組換えタンパク質の発現を増大するため；(ii) 組換えタンパク質の可溶性を上昇させるため；および(iii) アフィニティ精製においてリガンドとして作用することにより、組換えタンパク質の精製を補助するため。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タン

50

パク質溶解性切断部位は、融合部分と組換えタンパク質との接合部で導入され、融合部分からの組換えタンパク質の分離を可能にし、その後、融合タンパク質の精製が続く。このような酵素およびそのコグネイト認識配列 (cognate recognition sequence) としては、因子 Xa、トロンピンおよびエンテロキナーゼが挙げられる。代表的な融合発現ベクターとしては、それぞれ標的の組換えタンパク質に対し、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST)、マルトース E 結合タンパク質、またはタンパク質 A を融合する、pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith および Johnson, 1988. Gene 67: 31-40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) ならびに pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N. J.)、が挙げられる。 10

【0051】

適切な誘導性非融合 E. coli 発現ベクターの例としては、pTrc (Amrann ら, (1988) Gene 69: 301-315) および pET 11d (Studier ら, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89) が挙げられる。

【0052】

E. coli における組換えタンパク質発現を最大にする 1 つの戦略は、タンパク質溶解的に組換えタンパク質を切断する能力が損なわれた宿主細菌においてタンパク質を発現することである。例えば、Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128 を参照のこと。別の戦略は、発現ベクターに挿入されるべき核酸の核酸配列を変え、それによって各アミノ酸についての個々のコドンが E. coli において優先的に利用されるコドンとなるようにすることである (例えば、Wada ら, 1992. Nucl. Acids Res. 20: 2111-2118 を参照のこと)。このような本発明の核酸配列の変更は、標準的 DNA 合成技術によって実行される。 20

【0053】

ワクチン発現ベクターまたはアジュバントポリペプチド発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における発現のためのベクターの例としては、pYepSec1 (Baldari ら, 1987. EMBO J. 6: 229-234)、pMFa (Kurjan および Herskowitz, 1982. Cell 30: 933-943)、pJRY88 (Schultz ら, 1987. Gene 54: 113-123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.), ならびに picZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.) が挙げられる。 30

【0054】

あるいは、ワクチンまたはアジュバントポリペプチドは、バキュロウイルス発現ベクターを用いて、インタクトな細胞において発現される。培養昆虫細胞 (例えば、SF9 細胞) におけるタンパク質の発現のための入手可能なバキュロウイルスベクターとしては、pAc 系列 (Smith ら, 1983. Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165) および pVL 系列 (Lucklow および Summers, 1989. Virology 170: 31-39) が挙げられる。 40

【0055】

本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを使用して、哺乳動物細胞において発現される。哺乳動物発現ベクターの例としては、pCDM8 (Seed, 1987. Nature 329: 840) および pMT2PC (Kaufman ら, 1987. EMBO J. 6: 187-195) が挙げられる。哺乳動物細胞において使用される場合、発現ベクターの制御機能は、しばしば、ウイルス調節エレメントによって提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス 2、サイトメガロウイルス、 50

およびシミアンウイルス40に由来する。原核細胞および真核細胞の両方についての他の適切な発現系については、例えば、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989の第16章および第17章を参照のこと。

【0056】

本発明は、本発明の組換え発現ベクターが導入されている宿主細胞に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中で、相互交換可能に使用される。このような用語は、特定の目的細胞だけでなく、このような細胞の子孫または潜在的な子孫をも指す。続く産生において、変異または環境的影響のいずれかに起因して特定の改変が起こり得るため、実際には、このような子孫は、親細胞と同一でない場合があるが、なお、本明細書中で使用される用語の範囲内に含まれる。

10

【0057】

宿主細胞は、任意の原核細胞または真核細胞である。例えば、アジュバントポリペプチドおよび／またはワクチンは、E. coliのような細菌細胞、昆虫細胞、酵母細胞または哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）またはCOS細胞）において発現される。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0058】

ベクターDNAは、従来の形質転換技術または従来のトランスフェクション技術を紹介して、原核細胞または真核細胞に導入される。本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」および「トランスフェクション」は、外来核酸（例えば、DNA）の宿主細胞への導入のための、分野で認められた（art-recognized）種々の技術を意図する。これらの技術としては、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウムの共沈殿、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが挙げられる。宿主細胞を形質転換するかまたはトランスフェクトするための適した方法は、Sambrookら（MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989）および他の研究室マニュアルにおいて見出される。

20

30

【0059】

哺乳動物細胞の安定なトランスフェクトのために、使用される発現ベクターおよびトランスフェクト技術に依存して、細胞の小さい画分のみが、外来DNAをそれらのゲノム中に組み込むことが公知である。これらの組み込み物を同定し、選択するために、一般的に、選択マーカー（例えば、抗体に対する耐性）をコードする遺伝子が、目的の遺伝子とともに宿主細胞に導入される。種々の選択マーカーとしては、薬物に対する耐性を与える選択マーカー（例えば、G418、ハイグロマイシンおよびメトトレキサート）が挙げられる。選択マーカーをコードする核酸が、ムチン融合ポリペプチドを含有するワクチンをコードする同一ベクターにより宿主細胞に導入されるかまたは別のベクターにより導入される。導入された核酸で安定にトランスフェクトされた細胞は、薬物選択（例えば、選択マーカー遺伝子を組み込んだ細胞は、生存するのに対して、他の細胞は死滅する。）により同定される。

40

【0060】

本発明の宿主細胞（例えば、培養された原核宿主細胞または真核宿主細胞）は、アジュバントポリペプチドおよび／またはワクチンを産生する（すなわち、発現する）ために使用される。従って、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を使用するアジュバントポリペプチドおよび／またはワクチンを産生する方法を提供する。その方法は、アジュバントポリペプチドおよび／またはワクチンが産生されるような適した培地中での本発明の宿主細胞（アジュバントポリペプチドおよび／またはワクチンをコードする組換え発現ベクターが

50

導入される)の培養を包含する。その方法はさらに、アジュバントポリペプチドおよび／またはワクチンの培地もしくは宿主細胞からの単離を包含する。

【0061】

ムチンIg融合ポリペプチドを含有するワクチンは、従来の条件(例えば、抽出、沈殿、クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動など)に従って単離され、かつ精製される。例えば、ワクチンは、溶液を、固定化したAタンパク質またはGタンパク質(これらは融合タンパク質のFc部分に選択的に結合する)を含むカラムに通すことによって精製される。例えば、Reis, K. J. ら、J. Immunol. 132: 3098~3102 (1984); PCT出願公開番号WO87/00329を参照のこと。融合ポリペプチドは、カオトロピック塩で処理することにより、または酢酸水溶液(1M)で溶出することにより溶出され得る。

【0062】

あるいは、本発明に従うアジュバントポリペプチドおよび／またはワクチンは、当該分野で公知の方法を使用して化学的に合成される。ペプチド合成機を使用する合成を含めて、種々のタンパク質合成方法が当該分野で一般的である。ポリペプチドの化学的合成は、例えば、以下に記載される。例えば、Peptide Chemistry, A Practical Textbook, Bodansky, 編 Springer-Verlag, 1998; Merrifield, Science 232: 241~247 (1986); Barany ら、Intl. J. Peptide Protein Res. 30: 705~739 (1987); Kent, Ann. Rev. Biochem. 57: 957~989 (1988) および Kaiser ら、Science 243: 187~198 (1989) を参照のこと。このポリペプチドは、標準的ペプチド精製技術を使用してそれらが化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まないように精製される。用語「化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」とは、そのペプチドの合成に参与する化学的前駆体または他の化学物質からそのペプチドが分けられるペプチドの調製を含む。1つの実施形態において、用語「化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」とは、約30%未満(乾重量による)の化学的前駆体または非ペプチド化学物質を有するペプチドの調製、より好ましくは約20%未満の化学的前駆体または非ペプチド化学物質を有するペプチドの調製、さらにより好ましくは約10%未満の化学的前駆体または非ペプチド化学物質を有するペプチドの調製、そして最も好ましくは約5%未満の化学的前駆体または非ペプチド化学物質を有するペプチドの調製を含む。

【0063】

ポリペプチドの化学合成は、D-アミノ酸および他の小さな有機分子を含む改変されたアミノ酸または非天然のアミノ酸の取り込みを促進する。ペプチド中の1つ以上のLアミノ酸アイソフォームの対応するD-アミノ酸との置換は、ペプチドの酵素的加水分解に対する抵抗を増加させ、かつ生物学的に活性なペプチドの1つ以上の特性(例えば、レセプターの結合、作用の機能的な潜在性または持続性)を増強するために使用される。例えば、Doherty ら、1993. J. Med. Chem. 36: 2585-2594; Kirby ら、1993. J. Med. Chem. 36: 3802-3808; Morita ら、1994. FEBS Lett. 353: 84-88; Wang ら、1993. Intl. J. Pept. Protein Res. 42: 392-399; Faucher および Thiunieu, 1992. Adv. Drug Res. 23: 127-159 を参照のこと。

【0064】

ペプチド配列の中への共有結合性架橋の導入は、立体配置的にトポグラフィックにポリペプチド骨格を束縛し得る。この戦略は増加した性能、選択性および安定を備えた融合ポリペプチドのペプチドアナログを開発するために使用される。環状ペプチドの立体配置的エントロピーがその線形の対応物より低いので、特異的な立体配置の受け入れが非環状アナログより環状アナログのためのエントロピーにおいてより小さな減少が生じ得、それにより、より好まれる結合のための自由エネルギーを生じる。大環状化は、ペプチドN末端

とC末端との間のアミド結合、および側鎖とN末端もしくはC末端との間のアミド結合（例えば、pH 8.5で $K_3Fe(CN)_6$ とともに）（Samsonら, *Endocrinology*, 137:5182-5185 (1996)）、あるいはアミノ酸側鎖間のアミド結合の形成によりしばしば遂行される。例えば、DeGrado, *Adv Protein Chem*, 39:51-124 (1988)を参照のこと。二硫化物架橋もまた、それらの柔軟性を減少させるために線形配列へ導入される。例えば、Roseら, *Adv Protein Chem*, 37:1-109 (1985)；Mosbergら, *Biochem Biophys Res Commun*, 106:505-512 (1982)を参照のこと。さらに、システイン残基のペニシラミン（Pen、3-メルカプト-（D）バリン）との置換は、あるオピオイド受容体相互作用の選択性を増加させるために使用された。LipkowskiおよびCarr, *Peptides: Synthesis, Structures, and Applications*, Gutte編, Academic Press pp. 287-320 (1995)。

10

20

【0065】

（薬学的組成物）

本発明のワクチンおよび融合タンパク質および核酸は、薬学的組成物に処方され得る。これらの組成物は、上記の物質のうちの1つに加えて、薬学的に受容可能な賦形剤、キャリア、緩衝液、安定化剤または当業者に周知の他の物質を含み得る。このような物質は、非毒性であるべきであり、活性成分の有効性を妨害するべきでない。キャリアまたは他の物質の正確な性質は、投与経路（例えば、経口、静脈内、皮内または皮下、経鼻、筋肉内、腹腔内またはパッチ経路）に依存し得る。

【0066】

経口投与のための薬学的組成物は、錠剤、カプセル剤、散剤、または液体形態であり得る。錠剤は、ゼラチンまたはアジュバントのような固体キャリアを含み得る。液体薬学的組成物は、一般に、液体キャリア（例えば、水、石油、動物油または植物油、鉱油または合成油）を含む。生理食塩水溶液、デキストロースまたは他の糖類溶液またはグリコール（例えば、エチレングリコール、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール）が含まれ得る。

【0067】

静脈内注射、皮内注射または皮下注射、あるいは罹患部位での注射のためには、活性成分は、非経口的に受容可能な水溶液の形態である。この水溶液は、発熱物質を含まず、適切なpH、等張性および安定性を有する。当業者が、適切な溶液を、例えば、等張性ビヒクル（例えば、塩化ナトリウム溶液注射、リンゲル液注射、乳酸付加リンゲル液注射）を使用して調製することは十分可能である。保存剤、安定化剤、緩衝液、抗酸化剤および／または他の添加剤は、所望される場合、含まれ得る。

30

【0068】

それが、ポリペプチドであるか、ペプチドであるか、または核酸分子であるかに拘わらず、本発明に従って、他の薬学的に有用な化合物は、個体に与えられ、投与は、好ましくは、「予防的有効量」または「治療的有効量」（場合によって、治療であり得るが、予防は治療と考えられ得る）において好ましく、これは、個体に利益を示すに十分である。投与される実際の量、ならびに投与の割合および過程は、処置されるものの性質および重篤度に依存する。処置の処方（例えば、投薬量の決定など）は、一般開業医および他の医師の責任の範囲内であり、代表的には、処置される障害、個々の患者の状態、送達部位、投与方法および開業医に公知の他の要因を考慮に入れる。上記で言及される技術およびプロトコルの例は、REMYINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第16版, Osol, A. (編), 1980において見いだされ得る。

40

【0069】

あるいは、治療の標的化は、標的化システム（例えば、抗体または細胞特異的リガンド）を使用することによって、活性薬剤を特定の細胞の型により特異的に送達するために使用され得る。標的化は、種々の理由により望ましくあり得る：例えば、薬剤が受容できな

50

い程度に毒性である場合、またはそうでなければ、非常に高い投薬量を必要とする場合、またはそうでなければ標的細胞に入ることができない場合。

【0070】

これらの薬剤を直接投与する代わりに、それらは、細胞に導入されるコード遺伝子（例えば、ウイルスベクター（VDEPT技術の改変—以下を参照のこと）中の）からの発現によって、標的細胞中で生成され得る。このベクターは、処置されるべき特定の細胞に標的化され得るか、または調節エレメントを含み得、このエレメントは、標的細胞によって多かれ少なかれ選択的にスイッチが入れられる。

【0071】

あるいは、この薬剤は、処置される細胞において生成されるかまたは処置される細胞に標的化される活性化薬剤によって活性形態に変換するために、前駆体形態において投与され得る。この型のアプローチは、ときおり、ADEPTまたはVDEPTとして公知であり；前者は、活性化薬剤を細胞特異的抗体に結合体化することによって細胞に標的化することを含む一方で、後者は、ウイルスベクター中でコードDNAからの発現によって、ベクターにおける活性化薬剤（例えば、ワクチンまたは融合タンパク質）を生成することを包含する（例えば、EP-A-415731およびWO90/07936を参照のこと）。

【0072】

本発明の特定の実施形態において、ワクチンをコードする配列、またはその機能的改変体を含む核酸は、遺伝子治療によって、免疫細胞活性化を調節するために投与される。より特定の実施形態において、ワクチンもしくは融合タンパク質、またはその機能的誘導体をコードする核酸は、遺伝子治療によって投与される。遺伝子治療は、特定の核酸を被験体に投与することによって行われる治療をいう。本発明のこの実施形態において、核酸は、そのコードされるペプチドを生成し、このペプチドは、次いで、疾患または障害の機能を調節することによって、治療効果を発揮するようにはたらく。当該分野で利用可能な遺伝子治療に関する任意の方法論は、本発明の実施において使用され得る。例えば、Goldspielら、1993. Clin Pharm 12:488-505を参照のこと。

【0073】

好ましい実施形態において、治療剤は、ワクチン、融合タンパク質、またはそのフラグメント、誘導体もしくはアナログのうちのいずれか1以上を適切な宿主内で発現する発現ベクターの一部である核酸を含む。特定の実施形態において、このような核酸は、融合タンパク質のコード領域に作動可能に連結されるプロモーターを含む。このプロモーターは、誘導性であっても構成性であってもよく、必要に応じて、組織特異性であってもよい。別の特定の実施形態において、コード配列（および任意の他の所望の配列）が、ゲノム内の所望の部位で相同組換えを促進する領域に隣接する、従って、核酸の染色体内発現を提供する核酸分子が、使用される。例えば、KollerおよびSmithies, 1989. Proc Natl Acad Sci USA 86:8932-8935を参照のこと。

【0074】

患者への治療剤核酸の送達は、直接的（すなわち、患者が核酸または核酸含有ベクターに直接曝される）または間接的（すなわち、細胞が、まずインビトロにおいて核酸で形質転換され、次いで、患者に移植される）のいずれかであり得る。これら2つのアプローチは、インビボ遺伝子治療またはエキソビボ遺伝子治療として、それぞれ公知である。本発明の特定の実施形態において、核酸は、インビボで直接投与され、ここでこの核酸が発現されて、コードされる産物を生成する。このことは、当該分野で公知の多くの方法のいずれかによって達成され得る。これらの方法としては、例えば、以下が挙げられる：適切な核酸発現ベクターの一部として核酸を構築し、これを細胞内で生じるような様式で投与すること（例えば、欠損性のまたは弱毒化された、レトロウイルスまたは他のウイルスベクターを使用して感染させる）；米国特許第4,980,286号を参照のこと）；裸のD

NAを直接注射すること；微粒子銃を使用すること（例えば、「Gene Gun（登録商標）；Biolistic, DuPont）；核酸を脂質でコーティングすること；会合した細胞表面レセプター/トランスフェクト剤を使用すること；リポソーム、微粒子またはマイクロカプセル中にカプセル化すること；核に入ることが公知のペプチドに連結させて投与すること；あるいはレセプター媒介性エンドサイトーシスを受ける傾向があるリガンドに連結させて投与すること（例えば、WuおよびWu, 1987. J Biol Chem 262:4429-4432を参照のこと）。これらの技術は、目的のレセプターなどを特異的に発現する細胞型を「標的化」するために使用され得る。

【0075】

本発明の実施における遺伝子治療に対するさらなるアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム媒介性トランスフェクション、ウイルス感染などのような方法によって遺伝子を細胞にインビトロで組織培養にて移入することを包含する。一般に、移入の方法は、選択マーカーを細胞に同時に移入することを包含する。次いで、細胞を選択圧（例えば、抗生物質耐性）下に配置して、移入された遺伝子に応じた細胞または移入された遺伝子を発現する細胞の単離を容易にする。これらの細胞は、次いで、患者に送達される。特定の実施形態において、得られる組換え細胞のインビボ投与の前に、核酸は、当該分野で公知の任意の方法（例えば、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、目的の核酸配列を含むウイルスもしくはバクテリオファージベクターでの感染、細胞融合、染色体媒介性遺伝子移入、核小核体媒介性遺伝子移入、スフェロプラスト融合、およびレシピエント細胞の必要な発生機能および生理学的機能が移入によって破壊されないことを確実にする類似の方法論を含む）によって細胞に導入される。例えば、LoefflerおよびBehr, 1993. Meth Enzymol 217:599-618を参照のこと。選択された技術は、細胞への核酸の安定な移入を提供し、その結果、その核酸が、細胞により発現されるべきである。好ましくは、移入された核酸は、細胞子孫により遺伝され、発現可能である。

【0076】

本発明の好ましい実施形態において、得られた組換え細胞は、当該分野で公知の種々の方法によって患者に送達され得る。これらの方法としては、例えば、上皮細胞の注射（例えば、皮下に）、患者への皮膚移植としての組換え皮膚細胞の適用、および組換え血球の静脈内注射（例えば、造血幹細胞または前駆細胞）が挙げられる。使用が想定される細胞の総量は、所望の効果、患者の状態などに依存し、当業者によって決定され得る。

【0077】

遺伝子治療が目的で核酸が導入され得る細胞は、任意の所望の利用可能な細胞型を包含し、異種（xenogeneic）、異種遺伝子型（heterogeneic）、同系（syngeneic）または自家（autogeneic）であり得る。細胞型としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：分化した細胞（例えば、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞および血球）、または種々の幹細胞もしくは前駆細胞、特に胚性心筋細胞、肝臓幹細胞（国際特許出願公開WO94/08598）、神経幹細胞（StempleおよびAnderson, 1992, Cell 71:973-985）、造血幹細胞もしくは前駆細胞、（例えば、骨髄細胞、臍帯血、末梢血、胎児肝臓などから得られる）。好ましい実施形態において、遺伝子治療のために利用される細胞は、患者に対して自己である。

【0078】

本発明のワクチンはまた、1以上のアジュバント化合物を含む。アジュバント化合物は、デポーとして機能することにより、ワクチンの長期放出を増強し得るという点で有用である。ワクチンに対する長期露出は、プロセッシングおよび抗体応答の持続のために免疫系が抗原に提示される時間の長さを増大するはずである。アジュバント化合物はまた、例えば、免疫細胞を刺激または調節することによって、免疫細胞と相互作用する。さらに、アジュバント化合物は、微粒子としてワクチンを結合した後に、マクロファージ食作用を増強する（キャリア／ビヒクル機能）。

【0079】

本発明において有用なアジュバント化合物としては、完全フロイントアジュバント（CFA）；不完全フロイントアジュバント（IFA）；Montanide ISA（不完全seppicアジュバント）；Ribiaアジュバントシステム（RAS）；Titer Max；Syntex Adjuvant Formulation（SAF）；アルミニウム塩アジュバント；ニトロセルロース吸着抗原；カプセル化された抗原もしくは捕捉された抗原；免疫刺激複合体（ISCOM）；およびGerb（登録商標）アジュバントが挙げられる。

【0080】

（免疫方法）

本発明のワクチンは、アジュバントポリペプチドを欠く他のワクチンより、優れた免疫防御特性および免疫治療特性を有する。ムチン-Ig融合タンパク質含有ワクチンは、増強した免疫原性、安全性、寛容性および有効性を有する。例えば、本発明のワクチンの増強した免疫原性は、免疫応答（例えば、抗体生成および／または分泌、活性化ならびにT細胞の増殖、およびサイトカイン発現（例えば、インターロイキンの生成））の刺激によって測定されるように、比較する非アジュバントポリペプチド含有ワクチンより、1.5倍、2倍、3倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、またはそれ以上大きいものであり得る。

【0081】

癌細胞の細胞表面は、しばしば、非癌性細胞の表面には存在しない、特定の糖質、ポリペプチドおよび他の潜在的な抗体エピトープを含む。この抗原の不一致は、身体の免疫系が癌細胞を検出および応答することを可能にする。ムチンポリペプチドは、多くの癌と関連している。例えば、PSGL-1は、癌（肺癌および急性骨髄性白血病を含む（Kappelmayerら, Br J Haematol. 2001, 115（4）：903-9を参照のこと））と関連している。また、MUC1特異的抗体は、乳癌、膵臓癌、および結腸癌の患者由来の血清中で検出された。ムチンがヒト免疫系によって認識され得ることは明らかであり；従って、特異的抗原を発現する腫瘍細胞に対する免疫は、ムチン-Ig融合タンパク質および腫瘍細胞特異的抗原を含むワクチンによって誘導される。腫瘍細胞に対する免疫は、腫瘍サイズの減少の程度、腫瘍血管新生の減少、被験体の生存の増加、または腫瘍細胞アポトーシスの増加によって測定される。

【0082】

本発明は、被験体の免疫の方法を提供する。被験体は、アジュバントポリペプチドおよび抗原を含むワクチンを被験体に投与することによって免疫される。この被験体は、感染（例えば、細菌、ウイルスまたは真菌）を発生させる危険性にあるか、またはその感染に罹っている。感染としては、以下が挙げられる：C型肝炎、HIV、B型肝炎、パピローマウイルス、マラリア、結核、ヘルペス単純ウイルス、クラミジア、またはインフルエンザ。あるいは、被験体は、癌を発症している危険性にあるか、または癌に罹患している。癌は、例えば、乳癌、肺癌、結腸癌、前立腺癌、膵臓癌、子宮頸癌（cervical cancer）または黒色腫である。

【0083】

本明細書中に記載の方法は、感染または癌の1以上の症状の重篤度の減少またはその症状の緩和をもたらす。感染および癌は、代表的には、標準的な方法論を使用して医師により診断またはモニターされる。免疫を必要とする被験体は、当該分野で公知の方法によって同定される。例えば、被験体は、CDCのGeneral Recommendation on Immunization（51（RR02）pp1-36）に概説されるように免疫される。癌は、例えば、身体検査、生検、血液検査、またはx線により診断される。

【0084】

被験体は、例えば、任意の哺乳動物、例えば、ヒト、霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタである。処置は、障害の診断の前に施される。あるいは、処置は

10

20

30

40

50

、診断の後に施される。

【0085】

処置の有効性は、特定の障害を診断または処置するための任意の公知の方法と関連して決定される。この障害の1以上の症状の緩和は、化合物が臨床的利益を付与することを示す。「有効な」とは、その処置が、被験体の癌のサイズ、拡がり、または転移能を減少させることを意味する。処置が予防的に適用される場合、「有効な」とは、その処置が、腫瘍が癌を形成することを遅らせるかまたは防止するか、あるいは癌の症状を遅延させるか、予防するか、または緩和することを意味する。癌の評価は、標準的な臨床的プロトコルを使用して行われる。同様に、増大した免疫臨床的利益は、例えば、通院する回数が減少すること、および共同体の疾患による負担の減少によって決定される。

10

【0086】

(抗体分泌を増大する方法)

本発明は、細胞における抗体の生成および／または分泌を増大または刺激する方法を提供する。この細胞は、抗体を形成する細胞(例えば、B細胞)である。あるいは、この細胞は、B細胞による抗体生成を増大させる細胞(例えば、T細胞(T_hおよびT_c)、マクロファージ、樹状細胞)である。

【0087】

細胞による抗体分泌は、細胞と、アジュバントポリペプチドおよび抗原を含むワクチンとを接触させることによって増大される。細胞による抗体分泌は、直接、例えば、B細胞を刺激することによって増大され得るか、または間接的に、例えば、T細胞(例えば、ヘルパーT細胞)を刺激することによって、増大され得る。活性化T細胞は、次いで、B細胞を刺激する。増大した抗体生成および／または分泌は、当業者に公知の方法によって測定される。これらの方法としては、ELISA、沈降反応、および凝集反応が挙げられる。

20

【0088】

(免疫細胞活性化を増大する方法)

本発明は、免疫細胞(例えば、B細胞またはT細胞)を活性化または刺激する方法を提供する。T細胞活性化は、カルシウム媒介性細胞内cGMPの増加、またはIL-2の細胞表面レセプターの増加によって規定される。例えば、T細胞活性化の増加は、T細胞とワクチンとを接触させた後の、ワクチン非存在下と比較した、カルシウム媒介性細胞内cGMPおよびIL-2レセプターの増加によって特徴づけられる。細胞内cGMPは、例えば、市販の試験キットを用いた競合的免疫アッセイまたはシンチレーション近接アッセイによって測定される。細胞表面IL-2レセプターは、例えば、IL-2レセプター抗体(例えば、PC61抗体)への結合を決定することによって測定される。免疫細胞活性化はまた、当該分野で公知の方法により、B細胞増殖活性、ポリクローナル免疫グロブリン(Ig)生成、および抗原特異的抗体形成を測定することによって、決定され得る。

30

【0089】

本発明は、以下の非限定実施例においてさらに例示される。

【実施例】

【0090】

40

(実施例1：アジュバントポリペプチドの生成)

(発現ベクターの構築)

ブタα1, 3 GTを、ブタ脾臓cDNAから、そのコード配列の5'末端に相補的な6つのコドン、Kozak翻訳開始コンセンサス配列およびHind3制限部位を有する正方向プライマー、ならびにそのコード配列の3'末端に相補的な6つのコドン、翻訳停止およびNotI制限部位を有する逆方向プライマーを用いてPCR増幅した。増幅した1, 3 GT cDNAを、Hind3およびNotIを用いてCDM8のポリリンカーにクローニングした。P-セレクトリン糖タンパク質リガンド-1コード配列を、HL-60 cDNAライブラリーからPCRによって得て、Hind3およびNotIを用いてCDM8にクローニングし、DNA配列決定によって確認した。ムチン/免疫グロブリン発

50

現プラスミドを、PSGL-1の細胞外部分のPCR増幅したcDNAをインフレームで、BamHI部位を介して、CDM7において発現カセットとして運ばれるマウスIgG2bのFc部分（ヒンジ、CH2およびCH3）に連結することによって構築した。

【0091】

（分泌PSGL-1/mIgG_{2b}キメラのトランスフェクションおよび生成）

トランスフェクションカクテルを、39μlの20%グルコース、39μgのプラスミドDNA、127μlのdH₂O、および15.2μlの0.1M ポリエチレンイミン（25kDa; Aldrich, Milwaukee, WI）を5mlポリスチレン管中に混合することによって調製した。全てのトランスフェクション混合物において、13μgのPSGL-1/mIgG_{2b}プラスミドを使用した。種々のグリコシルトランスフェラーゼについて13μgのプラスミドを添加し、必要な場合、CDM8プラスミドを添加して、合計39μgのプラスミドDNAにした。混合物を、10mlの培養培地中、約70%コンフルエントのその細胞に添加する前に、室温で10分間放置した。7日後、細胞上清を回収し、細片を遠沈し（1400×g、15分）、NaN₃を最終濃度0.02%（w/v）になるように添加した。

【0092】

（SDS-PAGEおよびウェスタンブロット分析のための分泌PSGL-1/mIgG_{2b}の精製）

PSGL-1/mIgG_{2b}融合タンパク質を、4℃において一晩転倒混和することによって、50μlのヤギ抗mIgGアガロースビーズ（100:1スラリー; Sigma）で回収した上清から精製した。融合タンパク質を有するビーズを、PBS中で3回洗浄し、その後の分析のために使用した。代表的には、サンプルを、50μlの2×還元サンプル緩衝液中に溶解し、10:1のサンプルを、各ウェルにロードした。

【0093】

（アフィニティー精製PSGL-1/mIgG_{2b}のPNGaseF処置）

PNGaseFキット（Roche Diagnostics, Indianapolis, IN）を、N-グリカン脱グリコシル化のために使用した。製造業者によって提供されたプロトコルをわずかに改変して、使用した。1.5mlのエッペンドルフチューブに、20μlの反応緩衝液を、アガロースビーズ上の精製PSGL-1/mIgG_{2b}と混合し、3分間沸騰させた。その混合物を遠沈し、10μlの上清を新しいエッペンドルフチューブに移した。10μlのPNGaseF、またはネガティブコントロールとして10μlの反応緩衝液を添加した。チューブを、1.5時間、37℃でインキュベートした。インキュベーション後、20μlの2×還元サンプル緩衝液および10μlのH₂Oを添加し、サンプルを、3分間沸騰させた。

【0094】

（上清中のPSGL-1/mIgG_{2b}濃度を決定するためのELISA）

96ウェルELISAプレート（Costar 3590, Corning, NY）に、50μlの50mM 炭酸緩衝液（pH9.6）中、0.5μg/ウェルのアフィニティー精製ヤギ抗mIgG特異的抗体（Sigma）を室温で2時間コーティングした。0.05% Tween含有PBS（PBS-T）中の3%ウシ血清アルブミン（BSA）300μlを用いて4℃で一晩ブロッキングし、その後の洗浄の後、50μlのサンプル上清を添加し、培養培地で連続希釈した。洗浄した後、プレートを、50μlのヤギ抗mIgM-HRP（Sigma）（ブロッキング緩衝液中で1:10, 000希釈）とともに2時間インキュベートした。発色溶液については、1錠の3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（Sigma）を、11mlの0.05M クエン酸/リン酸緩衝液（3μlの30%（w/v）H₂O₂を含有）中に溶解した。100μlの発色溶液を添加した。その反応を、25μlの2M H₂SO₄で停止した。そのプレートを、450nmおよび540nmで自動化マイクロプレートリーダー（Bio-Tek Instruments, Winooski, VT）で読み取った。標準物質として、精製mIgGFcフラグメント（Sigma）の培養培地中での希釈系列を、三連で使用した。

【0095】

(SDS-PAGEおよびウェスタンブロッティング)

SDS-PAGEを、5%濃縮ゲルおよび8%の分離ゲルを用いてLaemmliの方法(1970)によって行い、分離したタンパク質を、以前に記載されたように(Liura, 1997)、HybondTM-C-extra膜に電気泳動的にブロットした。0.05% Tween-20含有Tris緩衝化生理食塩水(TBS-T)(3% BSAを含む)中で一晩ブロッキングした後、膜をTBS-Tで3回洗浄した。次いで、それらを、マウス抗ヒト血液型A(全ての型)(mIgM, Dako, Carpinteria, CA)または抗ヒトH型1(mIgG₃, Signet; Dedham, MA)、H型2(mIgM, Dako)もしくはH型3(mIgM, ハイブリドーマHH14, ATCC HB9299)とともに、1時間室温にてインキュベートした。全ての抗体を、TBS-T中の3% BSAで1:200に希釈した。例外として、H型3抗体は、TBS-T中3% BSAで1μg/mlの濃度に希釈した。膜をTBS-Tで3回希釈し、その後、TBS-T中の3% BSAで1:2000希釈した、二次西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合体化抗体であるヤギ抗mIgM(Cappel, Durham, NC)またはヤギ抗mIgG₃(Serotec, Oxford, England)とともに、室温で1時間インキュベートした。結合した二次抗体を、ECLキット(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)を使用して、製造業者の説明書に従って、化学発光によって可視化した。PSGL-1/mIgG_{2b}自体を検出するために、HRP標識ヤギ抗mIgG(Sigma)を、上記のように、TBS-T中の3% BSAで1:10,000希釈で使用したが、二次抗体とはインキュベートしなかった。

【0096】

(ヒトIgG、IgMおよびIgAの精製)

ヒトIgG、IgMおよびIgAを、ヤギ抗ヒトIgG(Fc特異的; A-3316, Sigma)、ヤギ抗ヒトIgM(μ-鎖特異的; A-9935, Sigma)、およびヤギ抗ヒトIgA(α-鎖特異的; A-2691, Sigma)のアガロースビーズを使用して20名を超える健常な血液ドナーからプールしたヒトAB血清から精製した。簡潔には、5mlのスラリー(2.5mlの包装されたビーズ)を、カラム(10mm直径)に注ぎ、PBSで洗浄した。10μlのヒトプールAB血清を、蠕動ポンプを用いて1ml/分でアプライし、数カラム容量のPBSで洗浄し、0.1Mグリシン、0.15M NaCl、pH2.4で、流速1ml/分を用いて溶出した。1ml画分を0.7mlの中和緩衝液(0.2M Tris/HCl, pH9)を含むチューブに回収した。280nmの吸光度を分光光度計で読み取り、タンパク質を含む管をプールし、1% PBSに対して透析し、凍結乾燥した。凍結乾燥した免疫グロブリンを、蒸留水中に再懸濁し、濃度を、IgGについては16mg/mlに、IgAについては4mg/mlに、そしてIgMについては2mg/mlに調節した。

【0097】

(PSGL-1/mIgG_{2b}融合タンパク質の発現および特徴付け)

ブタα1, 3GTプラスミドとともに、ベクタープラスミドCDM8、PSGL-1/mIgG_{2b}プラスミド、またはPSGL-1/mIgG_{2b}でトランスフェクトしたCOS-7 m6細胞からの上清を、トランスフェクションして約7日後に回収した。分泌ムチン/Ig融合タンパク質を、抗マウスIgGアガロースビーズに吸収することによって精製し、SDS-PAGEおよび検出のためにBanderia simplificaイソレクチンB4(BSA 1134)を用いるウェスタンブロッティングに供した。図1において認められるように、その融合タンパク質は、145kDの見かけの分子量を有する広いバンドとして還元条件下で移動し、これは、銀染色でも比較的弱くしか染色されなかった。サイズの不均一性(約125~165kDa)および弱い染色は、高度にグリコシル化されたムチン型タンパク質の挙動に関して、前の観察と一致している。この融合タンパク質は、ホモダイマーとして生成される可能性が最も高い。なぜなら、

非還元条件下でのSDS-PAGEにより、250kDaを超える見かけの分子量の2本のバンドが明らかになったからである。それぞれ、同数のPSGL-1/mIgG_{2b}プラスミド単独または $\alpha 1, 3$ GTプラスミドとともにトランスフェクトしたCOS細胞に由来する2つの上清からアフィニティー精製した融合タンパク質の量は、同様であった。BSA 1134でエレクトロブロットされた膜をブローニングすると、ブタ $\alpha 1, 3$ GTで同時トランスフェクトした後に得た融合タンパク質の強い染色が明らかになった(図1)。 $\alpha 1, 3$ GT cDNAの同時トランスフェクトなしのCOS-7 m6細胞において生成されたPSGL-1/mIgG_{2b}融合タンパク質はまた、COS細胞が、類人猿に由来し、旧世界ザルが $\alpha 1, 3$ GT活性を欠くという事実にもかかわらず、BSA IB41レクチンで弱い染色を示した。このことは、BSA 1134レクチンがGal $\alpha 1, 3$ Galエピトープよりわずかに広い特異性を有することを示す。にもかかわらず、ブタ $\alpha 1, 3$ GT cDNAの同時トランスフェクションは、高度にGal $\alpha 1, 3$ Gal置換されたPSGL-1/mIgG_{2b}融合タンパク質の発現を支持した。

【0098】

トランスフェクトされたCOS細胞の上清中の、および吸収後のヤギ抗マウスIgGアガロースビーズのPSGL-1/mIgG_{2b}キメラ定量については、サンドイッチELISAを用いて、トランスフェクトされたCOS細胞の上清中のPSGL-1/mIgG_{2b}の量を定量した。代表的には、70%コンフルエントのCOS細胞を有する5つの培養フラスコ(260mlフラスコ, Nunc lon TM)を、材料および方法に記載のようにトランスフェクトレインキュベートした。1フラスコあたり10mlのAIM V培地中で7日間インキュベーションした後、培地を回収した。このようなトランスフェクションからの上清中の融合タンパク質の濃度、抗マウスIgGアガロースビーズ(50 μ lの包装されたビーズに対応する)の100 μ lのゲルスラリーに吸収させた後の上清の異なる体積中の融合タンパク質の濃度を、精製マウスIgG Fcフラグメントで校正したELISAによって決定した(図2)。上清中のPSGL-1/mIgG_{2b}の濃度は、150~200ng/ μ lの範囲であり、この特定の実験において、それは、約160ng/ μ lであった(図2A、非吸収カラム)。50 μ lの包装された抗マウスIgGアガロースビーズに吸収した後の2、4および8mlの上清中に残っているPSGL-1/mIgG_{2b}の濃度は、それぞれ、32、89および117ng/ μ lであった。このことは、それぞれ、2、4および8mlの上清から50 μ lの包装された抗マウスIgGアガロースビーズに吸収されている、260、290および360ngのPSGL-1/mIgG_{2b}の量に対応する。B. simplicifolia 1134レクチンでのウェスタンブロット分析は、50 μ lの包装されたビーズが、PSGL-1/mIgG_{2b}融合タンパク質を1ml上清から検出可能未満まで、および2mlからわずかに検出可能なレベルまで吸収しつくすことができることを明らかにした。

【0099】

略語：BSA、ウシ血清アルブミン；DXR、遅延型異種拒絶(delayed xeno rejection)；ELISA、酵素結合免疫ソルベントアッセイ；FT、フコシルトランスフェラーゼ；Gal、D-ガラクトース；GT、ガラクトシルトランスフェラーゼ；Glc、D-グルコース；GlcNAc、D-N-アセチルグルコサミン；GlyCAM-1、グリコシル化依存性細胞接着分子-1；HAR、超急性拒絶；Ig、免疫グロブリン；MAadCAM、粘膜アドレシン細胞接着分子(mucosal addressin cell adhesion molecule)；PAEC、ブタ大動脈内皮細胞；P13MC、末梢血単核球；RBC、赤血球；SDS-PAGE、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動。

【0100】

(実施例2：PSGL-1/mIg-オボアルブミンワクチンの生成)

本明細書中に記載のデータを、以下の試薬および方法を使用して生成した。

【0101】

(細胞培養)

COS-7 m6細胞 (Seed, 1987)、CHO-K1 (ATCC CCL-61)、およびSV40ラージT抗原発現293ヒト胚性腎臓細胞株 (293T; B. Seedにより提供された腎臓) を、10% ウシ胎仔血清 (GibcoBrl, Life Technologies)、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸ゲンタマイシン (Sigma, St. Louis, MO) および2mM グルタミン (GibcoBrl, Life Technologies) を補充したダルベッコ改変イーグル培地 (GibcoBrl, Life Technologies, Paisley, Scotland) 中で培養した。細胞を2~4日ごとに継代した。そのHH14ハイブリドーマ (ATCC HB-9299; 米国特許第4, 857, 639号) を、10% ウシ胎仔血清、100 U/mlのペニシリン、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトマイシン、および2mM グルタミンを補充したRPMI 1640 (GibcoBrl, Life Technologies) 中で培養した。 10

【0102】

(材料)

架橋剤N-[γ -マレイミドブチリルオキシ]スルホスクシンイミドエステル (Sulfo-GMBS) (22324, PIERCE, Rockford, IL 61105)。オボアルブミン (A-7641, Sigma, St. Louis, Mo 63178)。Gal α 1, 3Gal置換PSGL1/mIgG_{2b}。カップリング緩衝液: 20mM リン酸ナトリウム、0.15M NaCl、0.1M EDTA、pH7.2 HiTrapTM 脱塩カラム (17-1408-01, Amersham Biosciences, SE-75184 Uppsala, Sweden)。HiPrepTM 16/60 SephacrylTM S-200カラム (17-1166-01, Amersham Biosciences, SE-75184 Uppsala, Sweden)。 20

【0103】

(ワクチン生成法)

実施例1に記載のGal α 1, 3Gal置換PSGL1/mIgG_{2b}を、カップリング緩衝液で濃度2mg/mlに再懸濁した。200 μl の再懸濁Gal α 1, 3Gal置換PSGL1/mIgG_{2b}を、10mlの管に移した。2mgのSulfo-GMBSを、1mlの結合緩衝液に溶解し、100 μl のSulfo-GMBS溶液を、Gal α 1, 3Gal置換PSGL1/mIgG_{2b}を含む試験管にすぐに移した。室温で2時間インキュベートする。脱塩カラムを15mlのカップリング緩衝液で平衡化する。300 μl の反応溶液をHiTrapTM 脱塩カラムにFPLCシステムを用いてアプライする。カップリング緩衝液の0.5mlのアリコートを出す。280nmの吸光度により溶出したタンパク質をモニターする。マレイミド活性化Gal α 1, 3Gal置換PSGL1/mIgG_{2b}は、画分5~6に溶出するはずである。500 μl のカップリング緩衝液中に2mgのオボアルブミンを室温で一晩溶解する。オボアルブミン溶液を、マレイミド活性化Gal α 1, 3Gal置換PSGL1/mIgG_{2b}を含むプールした画分に添加する。室温で3時間インキュベートする。8M グアニジン溶液を、グアニジンの濃度が6Mに達するまで結合体化オボアルブミン-PSGL-1/mIgG_{2b}タンパク質を含む試験管に添加する。HiPrepTM 16/60 SephacrylTM S-200カラムを100mlのPBSで平衡化する。4.5mlの反応容量を、FPLCシステムでそのカラムにアプライする。1.0mlのアリコートのPBSで溶出する。280nmの吸光度により、タンパク質溶出をモニターする。カップリングタンパク質は、画分35~38に溶出するはずである (図6および7を参照のこと)。水に対する透析によりPBSを除去する。カップリングタンパク質を凍結し、凍結乾燥する。そのカップリングタンパク質をELISAおよびウェスタンブロッティング分析によって特徴付けする。 30 40

【0104】

(他の実施形態)

本発明は、その詳細な説明と共に記載されてきたが、前述の説明は、例示することが意 50

図されるのであって、本発明の範囲を制限しない。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって規定される。他の局面、利点、および改変は、上記の特許請求の範囲の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

【0105】

【図1】図1は、1, 3 gal 置換 P S G L-1 / m I g G 2 b タンパク質のウェスタンブロットの写真である。ベクター単独 (C D M 8)、P S G L-1 / m I g G 2 b、または P S G L-1 / m I g G 2 b および ブタ α 1, 3 G T 発現プラスミドでトランスフェクトした C O S 細胞の上清から単離したタンパク質の 6 % の S D S-P A G E。抗マウス I g G アガロースビーズを融合タンパク質のイムノアフィニティー精製のために使用した。完全に洗浄した後、ビーズを、還元条件下および非還元条件下でサンプル緩衝液中で沸騰させて、吸着したタンパク質を放出させた。並行したゲルの泳動を、銀染色するか、またはニトロセルロース膜に分離したタンパク質の電気泳動的転写に使用したかのいずれかであった。その後、これらをペルオキシダーゼ結合体化 B a n d e i r e i a s i m p l i c i f o l i a イソレクチン B 4 レクチンでプローブし、化学発光によって可視化して、免疫精製タンパク質上の G a l α 1, 3 G a l エピトープを検出した。分子量 220, 97 および 66 k D a のタンパク質のそのゲル移動長を、左側に示す。

10

【図2】図2は、50 μ l の抗マウス I g G アガロースビーズに吸着させる前および後に、トランスフェクト C O S 細胞上清の漸増用量において、P S G L 1 / m I g G 2 b 融合タンパク質濃度の抗マウス I g G F c E L I S A によって、定量を示すグラフである。三連のサンプルを分析した。

20

【図3】図3は、⁵¹ C r 放出アッセイにおいて予測されるように、約 300 n g の G a l α 1, 3 G a l 置換または非置換 P S G L-1 / m I g G 2 b を保持する、50 μ l の抗マウス I g G アガロースビーズに対して吸収させた後に、種々の容量のヒト A B 血清によって、抗体依存性の補体媒介性 P E C-A 細胞傷害性を示すグラフである。

【図4】図4は、イムノアフィニティー精製ヒト I g G、I g M、および I g A の 10 % S D S-P A G E のグラフである。4 μ g の各サンプルを、還元条件下および非還元条件下で泳動させ、タンパク質を銀染色により可視化した。分子量 220、97、66、46 および 30 k D a タンパク質のゲル移動長を、左側に示す。

【図5】図5は、G a l α 1, 3 G a l 置換 P S G L I / i n I g G 2 b に対する吸収の前および後の、イムノアフィニティー精製ヒト I g G、I g M および I g A の抗体依存性の補体媒介性 P E C-A 細胞の細胞傷害性を、⁵¹ C r 放出アッセイによって調べたことを示すグラフである (Y 軸の右側; % 殺傷)。G a l α 1, 3 G a l 置換 P S G L-1 / m I g G 2 b に対する吸収の前および後での、イムノアフィニティー精製 I g G、I g M および I g A の P E C-A 細胞結合を、細胞 E L I S A によって推定した (Y 軸の左側; 405 n m の O. D.)。吸収されたおよび吸収されていない I g 画分に対して2つのアッセイを並行して行った。

30

【図6】図6は、本発明のアジュバントポリペプチドに対するオボアルブミンの溶出ピークプロファイルを示すチャートである。

【図7】図7は、本発明のアジュバントポリペプチドに対する抗原オボアルブミンのカップリンを示すウェスタンブロットの写真である。

40

【 図 1 】

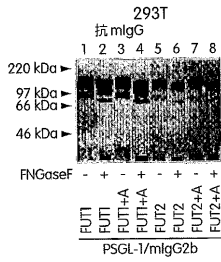


Fig. 1A

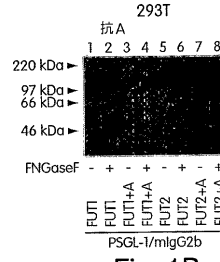


Fig. 1B

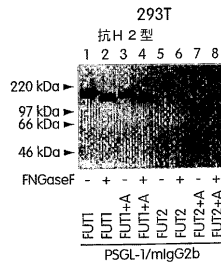


Fig. 1C

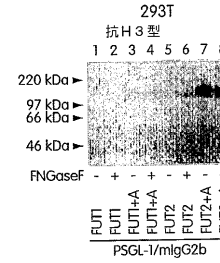


Fig. 1D

【 図 2 】

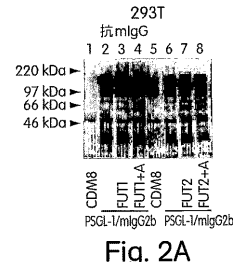


Fig. 2A

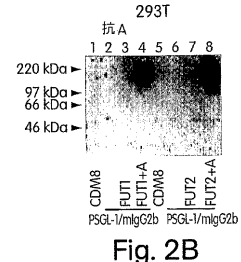


Fig. 2B

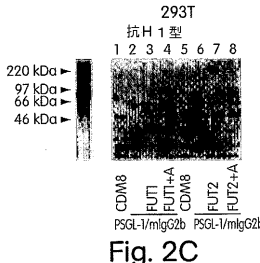


Fig. 2C

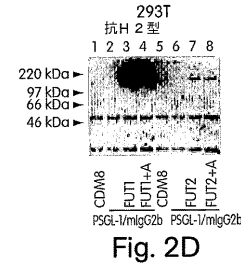


Fig. 2D

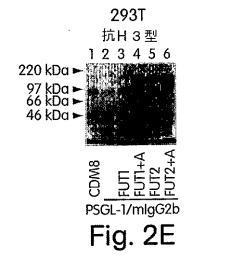


Fig. 2E

【 図 3 】

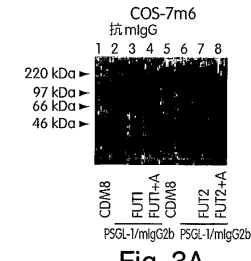


Fig. 3A

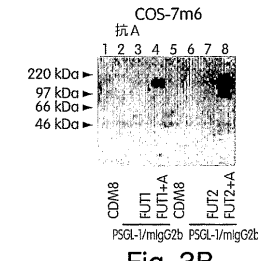


Fig. 3B

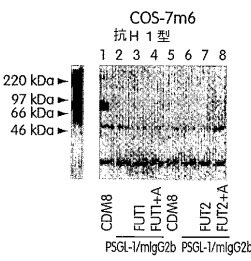


Fig. 3C

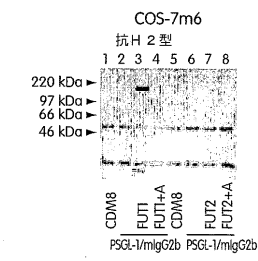


Fig. 3D



Fig. 3E

【 図 4 】

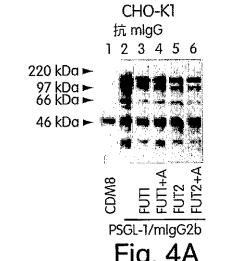


Fig. 4A

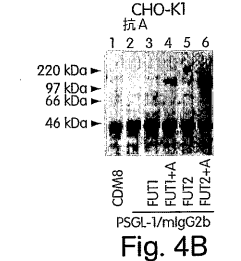


Fig. 4B

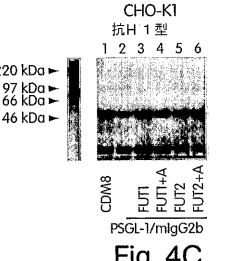


Fig. 4C

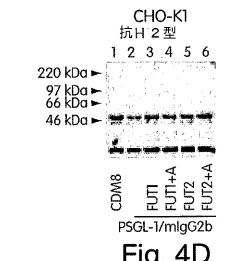


Fig. 4D

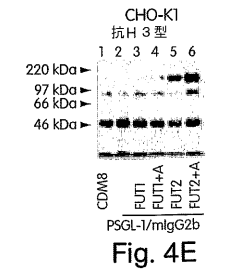


Fig. 4E

【図 5】

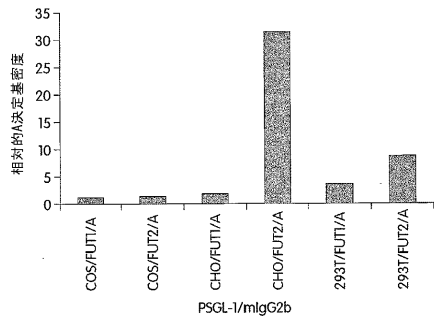


Fig. 5

【図 6】

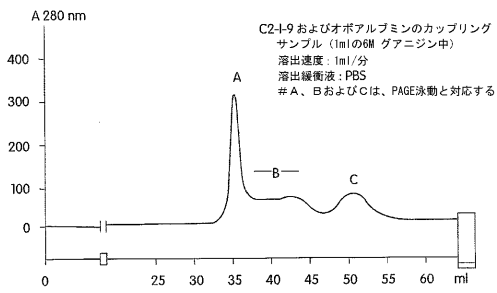


Fig. 6

【図 7】

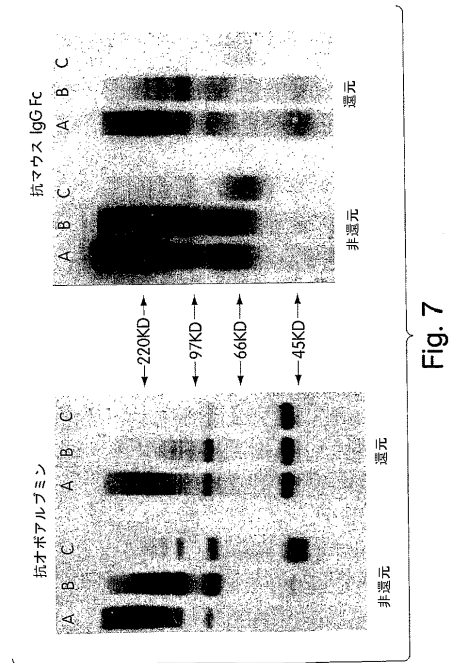


Fig. 7

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internat	Application No
		PCT/IB	03/02207
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
IPC 7	A61K39/00	A61K39/39	A61P31/00 A61P33/00 A61P35/00
	C07K14/47	C12N15/62	
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 C07K C12N A61P			
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, BIOSIS			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
Y	US 6 361 775 B1 (GALILI URI ET AL) 26 March 2002 (2002-03-26) the whole document	1-28	
Y	WO 95 24924 A (GALILI URI ; PENNSYLVANIA MED COLLEGE (US); REPIK PATRICIA M (US)) 21 September 1995 (1995-09-21) the whole document	1-28	
Y	DENISE C. LATEMPLE ET AL: "Enhancement of Autologous Tumor Vaccine Immunogenicity by Anti-Gal" SUBCELLULAR BIOCHEMISTRY, vol. 32, 1999, pages 361-379, XP002260812 the whole document	1-28	
	--- -/--		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.			
* Special categories of cited documents:			
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report	
12 November 2003		05.12.2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL- 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer MICAEL OWALD	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internati Application No
PCT/IB 03/02207

C.(Continuation)-DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT.

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TIMOTHY R. HENION ET AL: "Synthesis of alpha-gal epitopes on influenza virus vaccines, by recombinant alpha 1,3galactosyltransferase, enables the formation of immune complexes with the natural anti-Gal antibody" VACCINE, vol. 15, no. 11, 1997, pages 1174-1182, XP002260813 the whole document ---	1-28
Y	WO 98 34957 A (LEUNG SHUI ON ;QU ZHENGXING (US); IMMUNOMEDICS INC (US)) 13 August 1998 (1998-08-13) the whole document ---	1-28
~~Y~~	~~US 6 344 203 B1 (MCKENZIE IAN FARQUAR CAMPBELL ET AL) 5 February 2002 (2002-02-05) the whole document ---~~	~~1-28~~
Y	WO 98 42750 A (KAROLINSKA INNOVATIONS AB ;HOLGERSSON JAN (SE); LIU JINING (SE)) 1 October 1998 (1998-10-01) the whole document and see specially page 34, lines 34-39 - page 35, lines 1-5 ---	1-28
Y	US 5 225 538 A (CAPON DANIEL J ET AL) 6 July 1993 (1993-07-06) the whole document -----	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB-03/02207

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.: 22-28
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/IB 03/02207

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 22-28

Claims 22-28 relates to methods of treatment of the human or animal body by surgery or by therapy or diagnostic methods practised on the human or animal body (PCT Rule 39.1(iv)). Nevertheless, a search has been executed for these claims. The search has been based on the alleged effects of the compounds or compositions.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internati	Application No
PCT/IB	03/02207

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6361775	B1	26-03-2002	US 5879675 A 09-03-1999
		AU 2158995 A 03-10-1995	
		DE 69517683 D1 03-08-2000	
		DE 69517683 T2 07-06-2001	
		EP 0754057 A1 22-01-1997	
		CA 2185470 A1 21-09-1995	
		WO 9524924 A1 21-09-1995	
WO 9524924	A	21-09-1995	AU 2158995 A 03-10-1995
		CA 2185470 A1 21-09-1995	
		DE 69517683 D1 03-08-2000	
		DE 69517683 T2 07-06-2001	
		EP 0754057 A1 22-01-1997	
		WO 9524924 A1 21-09-1995	
		US 6361775 B1 26-03-2002	
		US 5879675 A 09-03-1999	
WO 9834957	A	13-08-1998	AU 6054398 A 26-08-1998
		EP 1007569 A1 14-06-2000	
		JP 2001512438 T 21-08-2001	
		US 6090381 A 18-07-2000	
		WO 9834957 A1 13-08-1998	
		US 2002176856 A1 28-11-2002	
		US 6472511 B1 29-10-2002	
US 6344203	B1	05-02-2002	AU 7079396 A 17-04-1997
		AU 707223 B2 08-07-1999	
		AU 7079496 A 17-04-1997	
		WO 9711963 A1 03-04-1997	
		WO 9711715 A1 03-04-1997	
		CA 2233447 A1 03-04-1997	
		EP 0859627 A1 26-08-1998	
		JP 2000506493 T 30-05-2000	
		NZ 318729 A 28-01-2000	
WO 9842750	A	01-10-1998	AU 751760 B2 29-08-2002
		AU 6755198 A 20-10-1998	
		BR 9804826 A 25-01-2000	
		EP 0923606 A1 23-06-1999	
		JP 2000511782 T 12-09-2000	
		WO 9842750 A1 01-10-1998	
		US 2002028205 A1 07-03-2002	
US 5225538	A	06-07-1993	US 5098833 A 24-03-1992
		US 5116964 A 26-05-1992	
		US 2003143220 A1 31-07-2003	
		US 5455165 A 03-10-1995	
		US 5514582 A 07-05-1996	
		US 5714147 A 03-02-1998	
		US 6406697 B1 18-06-2002	
		US 5428130 A 27-06-1995	
		US 5840844 A 24-11-1998	
		US 5216131 A 01-06-1993	
		AT 199261 T 15-03-2001	
		CA 2072642 A1 23-05-1991	
		DE 69033705 D1 29-03-2001	
		DE 69033705 T2 02-08-2001	
		DK 526452 T3 18-06-2001	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Intern

Application No

PCT/IB-03/02207

Patent document- cited in search report	Publication- date	Patent family- member(s)	Publication date
US 5225538 A		EP 0526452 A1	10-02-1993
		EP 1029870 A2	23-08-2000
		ES 2155819 T3	01-06-2001
		GR 3035856 T3	31-08-2001
		JP 5503009 T	27-05-1993
		WO 9108298 A2	13-06-1991

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/145	A 6 1 K 39/145	
A 6 1 K 39/21	A 6 1 K 39/21	
A 6 1 K 39/245	A 6 1 K 39/245	
A 6 1 K 39/29	A 6 1 K 39/29	
A 6 1 K 39/385	A 6 1 K 39/385	
A 6 1 K 39/39	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 14/025	C 0 7 K 14/025	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00	B

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,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,M W,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA31 BA32 BA44 CA04 CA07 DA02 EA04 GA11
 4B065 AA90X AA90Y AA95Y AB01 BA02 CA24 CA45
 4C085 AA03 BA09 BA45 BA51 BA55 BA69 BA78 BA89 BA92 BB01
 CC07 CC08 FF13
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA41 BA53 CA01 CA40 DA75 DA86 EA31
 FA74