(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2010-522550
(P2010-522550A)
(43)公表日　平成22年7月8日(2010.7.8)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
A61K 39/00	(2006.01)	A61K	39/00	H	4C085
A61K 39/39	(2006.01)	A61K	39/39		4C086
A61K 31/7088	(2006.01)	A61K	31/7088		
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 78 頁）　最終頁に続く

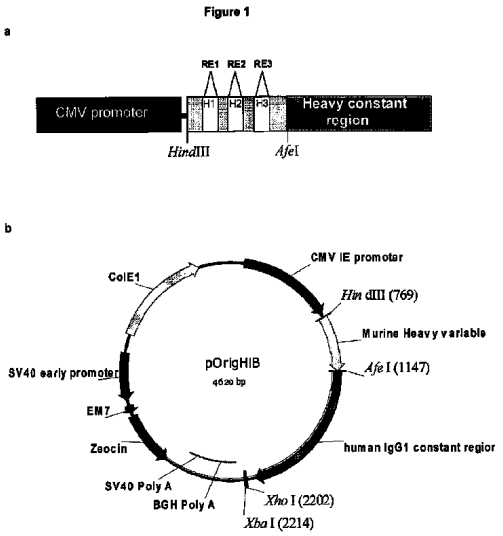
(21)出願番号　特願2010-500296 (P2010-500296)
(86)(22)出願日　平成20年3月28日 (2008.3.28)
(85)翻訳文提出日　平成21年11月13日 (2009.11.13)
(86)国際出願番号　PCT/EP2008/053761
(87)国際公開番号　WO2008/116937
(87)国際公開日　平成20年10月2日 (2008.10.2)
(31)優先権主張番号　0706070.0
(32)優先日　平成19年3月28日 (2007.3.28)
(33)優先権主張国　英国(GB)

(71)出願人　509258599
スキャンセル　リミテッド
ＳＣＡＮＣＥＬＬ　ＬＩＭＩＴＥＤ
イギリス国，エヌジー５　１ピービー　ノッティンガム，　ハックノール　ロード，シティ　ホスピタル，　ディパートメント　オブ　クリニカル　オンコロジー
(74)代理人　100116850
弁理士　廣瀬　隆行
(72)発明者　デュラント，リンダ　ギリアン
イギリス国，エヌジー５　１ピービー　ノッティンガムシャー，ノッティンガム，ハックノール　ロード，シティ　ホスピタル，　ディパートメント　オブ　クリニカル　オンコロジー

最終頁に続く

(54)【発明の名称】核酸

(57)【要約】
本発明は，非特異的プロモーターと，少なくとも１つの異種Ｔ細胞エピトープを有するが制御性Ｔ細胞エピトープを有しないポリペプチドをコードする少なくとも１つの配列と，を含む核酸を提供する。ポリペプチドは，ヘテロ二量体の一方の鎖であり，異種Ｔ細胞エピトープは，ヘテロ二量体の他方の鎖と結合することができないようなヘテロ二量体の破断を引き起こす。核酸は，前記少なくとも１つの異種Ｔ細胞に対するＴ細胞反応を引き起こすのに利用しうる。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
非特異的プロモーターと，
少なくとも１つの異種Ｔ細胞エピトープを有するが，制御性Ｔ細胞（ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ　Ｔ　ｃｅｌｌ）エピトープを有しないポリペプチドをコードする少なくとも１つの配列と，
を含む核酸。
【請求項２】
前記ポリペプチドは，ヘテロ二量体の一方の鎖であり，
前記異種Ｔ細胞エピトープは，該ヘテロ二量体の鎖が該ヘテロ二量体の他方の鎖と結合することができないような該ヘテロ二量体の鎖の破断を引き起こす，
請求項１に記載の核酸。
【請求項３】
前記ヘテロ二量体の両方の鎖をコードし，
一方の鎖は，異種細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）エピトープを含み，発現されると分泌され，
他方の鎖は，異種ヘルパーエピトープを含み，発現されても分泌されない，
請求項２に記載の核酸。
【請求項４】
前記ヘテロ二量体は，免疫グロブリン分子である，
請求項１又は２に記載の核酸。
【請求項５】
前記免疫グロブリン分子の重鎖は，異種細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）エピトープを含み，発現されると分泌され，
前記免疫グロブリン分子の軽鎖は，異種ヘルパーエピトープを含み，発現されても分泌されない，
請求項４に記載の核酸。
【請求項６】
非特異的プロモーターと，
免疫グロブリン分子の組み換え重鎖をコードする少なくとも１つの配列と，
を含む核酸であって，
該重鎖は，核酸が発現されても該重鎖が未変性コンフォメーションをとることができないような少なくとも１つの異種Ｔ細胞エピトープを有する，
核酸。
【請求項７】
免疫グロブリン分子の軽鎖をコードする少なくとも１つの配列をさらに含む，
請求項６に記載の核酸。
【請求項８】
免疫グロブリン分子の軽鎖をコードする少なくとも１つの配列を含む核酸と結合した，
請求項６に記載の核酸。
【請求項９】
前記軽鎖は，少なくとも１つの異種Ｔ細胞エピトープを有する，
請求項７又は８に記載の核酸。
【請求項１０】
前記Ｔ細胞エピトープは，前記核酸が発現されても前記軽鎖が未変性コンフォメーションをとることができない，
請求項９に記載の核酸。
【請求項１１】
前記少なくとも１つのＴ細胞エピトープは，前記重鎖及び／又は前記軽鎖の可変領域に存在する，

請求項４～１０のいずれか１項に記載の核酸。
【請求項１２】
前記少なくとも１つのＴ細胞エピトープは，前記抗体の前記重鎖及び／又は前記軽鎖の前記少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）に存在する，
請求項１１に記載の核酸。
【請求項１３】
前記相補性決定領域は，ＣＤＲＬ１，ＣＤＲＨ１，及び／又はＣＤＲＨ２である，
請求項１２に記載の核酸。
【請求項１４】
前記少なくとも１つのＴ細胞エピトープをコードする前記配列は，前記重鎖又は前記軽鎖をコードする前記配列に挿入される，
請求項４～１３のいずれか１項に記載の核酸。
【請求項１５】
前記少なくとも１つのＴ細胞エピトープをコードする前記配列は，前記重鎖又は前記軽鎖をコードする前記配列に置換される，
請求項４～１３のいずれか１項に記載の核酸。
【請求項１６】
抗体をコードする，
請求項１～１５のいずれか１項に記載の核酸。
【請求項１７】
前記抗体は，モノクローナル抗体である，
請求項１６に記載の核酸。
【請求項１８】
前記少なくとも１つのＴ細胞エピトープは，細胞傷害性Ｔ細胞エピトープである，
請求項１～１７のいずれか１項に記載の核酸。
【請求項１９】
前記少なくとも１つのＴ細胞エピトープは，ヘルパーＴ細胞エピトープである，
請求項１～１８のいずれか１項に記載の核酸
【請求項２０】
前記重鎖及び／又は前記軽鎖は，
少なくとも１つの細胞傷害性Ｔ細胞エピトープと，
少なくとも１つのヘルパーＴ細胞エピトープと，
を有する，
請求項４～１９のいずれか１項に記載の核酸
【請求項２１】
非特異的プロモーターと，
免疫グロブリン分子の組み換え重鎖をコードする少なくとも１つの配列と，
を含む核酸であって，
該重鎖は，核酸が発現されても該重鎖が未変性コンフォメーションをとることができないような少なくとも１つの異種Ｔ細胞エピトープを有する，
核酸。
【請求項２２】
請求項６～２０のいずれか１項の特徴により改変される，
請求項２１に記載の核酸。
【請求項２３】
請求項１～２２のいずれか１項に記載の核酸と，
アジュバントと，
を含むワクチン。
【請求項２４】
請求項１～２２のいずれか１項に記載の核酸と，

薬学的に許容されるキャリア，賦形剤，又は希釈剤と，
を含む医薬組成物。
【請求項２５】
医薬用の請求項１～２２のいずれか１項に記載の核酸。
【請求項２６】
少なくとも１つの前記Ｔ細胞エピトープに対する免疫反応を刺激するのに用いるための請求項２５に記載の核酸。
【請求項２７】
少なくとも１つの前記Ｔ細胞エピトープに対する免疫反応を刺激するための薬剤の製造における請求項１～２２のいずれか１項に記載の核酸の利用。
【請求項２８】
Ｔ細胞エピトープに対する免疫反応を刺激するための方法であって，
該方法は，該免疫反応を必要とする被験者に請求項１～２２のいずれか１項に記載の核酸の治療効果のある量を投与するステップを含む，
方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は，核酸，及び核酸のワクチンとしての利用に関し，該核酸は，免疫反応が引き起こされうるＴ細胞エピトープをコードする。該ワクチンは，腫瘍の治療に利用することができる。
【背景技術】
【０００２】
癌ワクチン及び慢性ウイルス感染の分野において，頻度以外の要因，例えば，腫瘍特異的Ｔ細胞の機能的活性やプライミングの経路，がワクチンの有効性を最大化する重要な決定要因であることが近年明らかになりつつある。高活性のＣＤ８$^{+}$ Ｔ細胞が優れた抗腫瘍活性を示すことを多くのグループが示している（Ａｌｅｘａｎｄｅｒ－Ｍｉｌｌｅｒ，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２００５；３１：１３－２４，Ｈｏｄｇｅ ｅｔ ａｌ，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２００５；１７４：５９９４－６００４，Ｖａｌｍｏｒｉ ｅｔ ａｌ，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２００２；１６８：４２３１－４０，Ｚｅｈ ｅｔ ａｌ，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １９９９；１６２：９８９－９４）。高活性のＴ細胞が患者の腫瘍退縮において重要な役割を果たすことが示唆されている。これは，高活性の抗原特異的腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）が腫瘍が劇的に退縮した患者において検出された一研究に例示されている（Ｋｈｏｎｇ ＆ Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２００２；１６８：９５１－６）。インビトロ刺激による自己腫瘍特異的Ｔ細胞の養子免疫伝達が成功するのは，おそらくインビトロ刺激が高活性のＴ細胞の選択を可能にするためであるということを示す証拠も出てきている（Ｖｉｇｎａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２００５；１７５：４７９７－８０５，Ｄｕｄｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｊ ｌｍｍｕｎｏｔｈｅｒ ２００１；２４：３６３－７３，Ｍｏｒｇａｎ ｅｔ ａｌ，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２００３；１７１：３２８７－９５，Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ ＆ Ｄｕｄｌｅｙ，Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａ ２００４；１０１ Ｓｕｐｐｌ ２：１４６３９－４５）。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００３】
これまでに，多くのグループが，抗体をエピトープのキャリアとして用いて，所定のエピトープに対する細胞性免疫反応を引き起こそうと試みてきた。例えば，国際公開第９６／１９５８４号パンフレット（Ｂｏｎａ ｅｔ ａｌ．）は，Ｔ細胞エピトープが抗体の

相補性決定領域（ＣＤＲ）に挿入されるキメラ抗体を開示し，該キメラ抗体が細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）反応を引き起こすのに適している旨主張している。しかしながら，該文献は，ＤＮＡが機能タンパク質をコードしなければならないことを説いている。よって，要約書には，「エピトープ及び親免疫グロブリンの機能性が保持される」旨記載されている。同様に，２１ページ目には，所望のエピトープの挿入は，親免疫グロブリン分子の発現や機能にとって不可欠ではない親免疫グロブリン分子をコードする核酸の領域でなされるべきである旨記載されている。さらに，国際公開第９６／１９５８４号パンフレットに記載のすべての実施例は，無傷免疫グロブリンがＴ細胞エピトープの挿入後に生成されることを示している。

【０００４】

米国特許第７，０６７，１１０号明細書は，ポリペプチド結合により抗原と融合する免疫グロブリン可変領域ドメインを欠く抗体の融合タンパク質を用いて抗原に対する免疫反応を引き起こす方法を開示している。該融合タンパク質は，Ｆｃに結合する能力を保持する。

【０００５】

欧州特許第０７５９９４４号明細書は，無傷免疫グロブリンタンパク質として分泌され，腫瘍に対するＣＴＬエピトープを標的とすることでＣＴＬの良好な標的とすることができるＴ細胞エピトープを抗体分子内に取り込む方法を開示している。

【０００６】

国際公開第００／６４４８８号パンフレットは，核酸がＢ細胞における発現を指向していれば，ＣＤＲ（但し，その可変領域を除く。）に挿入される異種Ｔ細胞エピトープを有するキメラ抗体をコードする核酸によってＣＴＬ反応を引き起こすことができる旨開示している。Ｂ細胞はナイーブＴ細胞反応を刺激することができないので，国際公開第００／６４４８８号パンフレットに記載のワクチンは，既存のＴ細胞反応を促進するのに有用であるだけであろう。

【０００７】

国際公開第０２／０９２１２６号パンフレットは，異種Ｔ細胞と高アフィニティＣＤ６４レセプターに結合するヒトＦｃの一部とを含むポリペプチドによってＣＴＬ反応を引き起こすことができる旨開示している。しかしながら，本願発明者（ら）は，Ｔ細胞エピトープを，例えば，不適切なＣＤＲや抗体の可変領域に挿入することによる抗体配列の破断は，重鎖及び軽鎖の結合を防ぎ，機能性抗体が分泌されないことを示している。これらのミスフォールドした抗体をコードするＤＮＡは，突然強力なＴ細胞反応を引き起こす。さらに，これは，ＣＤ６４により媒介されない。なぜなら，ヒトＩｇＧ２は，マウス又はヒトＣＤ６４に結合せず，ヒトＩｇＧ１同様効率的に働くためである。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

本発明の一側面において，非特異的プロモーターと，少なくとも１つの異種Ｔ細胞エピトープを有するが制御性Ｔ細胞エピトープを有しないポリペプチドをコードする少なくとも１つの配列と，を含む核酸が提供される。

【０００９】

該ポリペプチドは，好ましくは，同種キャリアである。例えば，ヒトにＴ細胞反応を起こすのに用いられる場合，ヒトタンパク質，又は異種タンパク質，又はすべてのＴ制御性エピトープを同定及び除去したヒト／異種キメラタンパク質でありうる。

【００１０】

該ポリペプチドは，好ましくは，ヘテロ二量体の一方の鎖であり，異種Ｔ細胞エピトープは，ヘテロ二量体の他方の鎖と結合できないようなヘテロ二量体の鎖の破断を引き起こす。多くの分子は，一方の鎖がフォールディング及び分泌を他方の鎖に依存したヘテロ二量体である。異種Ｔ細胞エピトープの挿入により二次構造が破断されると，フォールディング及び分泌が抑制される。ある実施形態において，一方の鎖は，分泌され異種ＣＴＬエピトープを含み，他方の鎖は，異種ヘルパーエピトープを含むが，二次フォールディング

の破断により，分泌されない。このため，核酸は，ヘテロ二量体の両方の鎖をコードしうる。この場合，一方の鎖は，異種細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）エピトープを含み，発現されると分泌され，他方の鎖は，異種ヘルパーエピトープを含み，発現されても分泌されない。あるいは，各々のヘテロ二量体の鎖は，別の核酸分子上にコードされうる。

【００１１】

ヘテロ二量体は，免疫グロブリン分子でありうる。免疫グロブリン分子の重鎖は，異種細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）エピトープを含み，発現されると分泌され，免疫グロブリン分子の軽鎖は，異種ヘルパーエピトープを含み，発現されても分泌されない。

【００１２】

本発明の第１の側面の核酸は，制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）エピトープを含まないポリペプチドをコードする。該ポリペプチドは，Ｔ細胞エピトープの不活性キャリアとして作用し，免疫システムにより免疫反応を刺激するのに用いられうる分子又は分子の一部でありうる。なぜなら，これらの分子は，その名の通り，競合Ｔｒｅｇエピトープを発現しないためである。適切な分子には，ＨＬＡ分子，Ｔ細胞レセプター，ＴＯＬレセプター，ＴＯＬリガンド，サイトカインレセプター，ケモカイン，ケモカインレセプターが含まれる。分子は，抗体又はその一部であることが好ましい。

【００１３】

理論に束縛されるものではないが，本発明は，少なくとも一部，Ｔ細胞エピトープを含むが制御性Ｔ細胞エピトープを含まないポリペプチドをコードする核酸の投与によって，特異的Ｔ細胞エピトープ（ＣＴＬエピトープなど）に対するＴ細胞反応を生成することができる，という概念に基づく。核酸は，抗原提示細胞（ＡＰＣ）に取り込まれ，リンパ節に移動し，直接提示されるか，又は，発現されて，分泌されその後他のＡＰＣに取り込まれるポリペプチドを生成する，と考えられている。前者の核酸は，ヘルパーＴ細胞エピトープを刺激するのに適しており，後者は，ＣＴＬ反応を刺激するのに適している。核酸によってコードされるポリペプチドは，理想的にはナチュラルＴ細胞エピトープを有しない。この点において適切なポリペプチドは，抗体などの免疫分子である。軽鎖がＡＰＣにとどまり，重鎖が分泌されるように結合することができない抗体の重鎖と軽鎖が，本発明の実施に適しているが，本発明は，Ｔ細胞エピトープのキャリアとしての抗体の利用に限定されるものではない。

【００１４】

サプレッサーＴ細胞集団がおよそ４０年前に同定されたが，細胞を同定する特別な技術の欠如により，また，抑制の存在に関する科学的懐疑主義のために進展が阻まれた。しかしながら，Ｓａｋａｇｕｃｈｉ ｅｔ ａｌは，ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$Ｔ細胞を枯渇したリンパ球の無胸腺マウスへの移入が，受容マウスにさまざまな自己免疫疾患の発症を引き起こすこと，また，ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$Ｔ細胞による再構成は，該マウスの自己免疫反応を阻止することを証明することによって１９９５年にサプレッサー細胞への関心を復活させた（Ｓａｋａｇｕｃｈｉ ｅｔ ａｌ Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ １９９５；１５５：１１５１－１１６４）。その後，制御性活性を有するさまざまなＴ細胞集団が，自己抗原（自己寛容制御）（Ｓａｋａｇｕｃｈｉ ｅｔ ａｌ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １９９５；１５５：１１５１－１１６４）及び異種抗原（Ｓｈｅｖａｃｈ，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ ２００６；２５：１９５－２０１，Ｃｏｌｅｍａｎ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．２００７；１１：１２９１－１３２５）に対する免疫反応（先天性免疫反応及び適応的免疫反応の両方）の抑制において重要な役割を果たすことが多数のマウス及びヒトにおける研究により示されてきている。癌のマウスモデルにおけるＴｒｅｇ細胞の枯渇は，内因性免疫介在性腫瘍拒絶（Ｓｈｉｍｉｚｕ，ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９９；１６３：５２１１－５２１８，Ｏｎｉｚｕｋａ ｅｔ ａｌ，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １９９９；５９：３１２８－３１３３）及び抗原特異的抗腫瘍免疫（Ｔａｎａｋａ，ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００２；２５：２０７－２１７）を改善することが証明されている。また，Ｔｒｅｇ細胞の枯渇は，ワクチン接種を含む腫瘍免疫療法（Ｔａｎａｋａ，ｅｔ ａｌ，

Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００２；２５：２０７－２１７，Ｄａｎｎｕｌｌ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．２００５；１１５：３６２３－３６３３）及びＣＴＬＡ－４遮断（Ｓｕｔｍｕｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．２００１；１９４：８２３－８３２）を増強させる。さらに，多数のＴｒｅｇ細胞は，末梢血において増加し，さまざまな癌患者の腫瘍微小環境及び流入領域リンパ節を占めさせる（ｐｏｐｕｌａｔｅ）。胃癌（Ｓａｓａｄａ ｅｔ ａｌ，Ｃａｎｃｅｒ ２００３；９８：１０８９－１０９９，Ｉｃｈｉｈａｒａ ｅｔ ａｌ，Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２００３；９：４４０４－４４０８）及び卵巣癌（Ｃｕｒｉｅｌ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ２００４；１０：９４２－９４９）の患者において，予後不良及び生存率の低下は，Ｔｒｅｇ細胞の高頻度と関連していた。Ｔｒｅｇ細胞はまた，腫瘍特異的ＣＤ８$^+$（Ｌｉｙａｎａｇｅ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２００２；１６９：２７５６－２７６１，Ｐｉｃｃｉｒｉｌｌｏ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２００１；１６７：１１３７－１１４０，Ｍｅｍｐｅｌ ｅｔ ａｌ，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ ２０６；２５：１２９－１４１，Ａｎｎａｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２００１；１６６：３００８－３０１８，Ｗｏｏ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２００２；１６８：４２７２－４２７６）及びＣＤ４$^+$（Ｌｉｙａｎａｇｅ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２００２；１６９：２７５６－２７６１，Ｉｃｈｉｈａｒａ ｅｔ ａｌ，Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２００３；９：４４０４－ ４４０８，Ｎｉｓｈｉｋａｗａ ｅｔ ａｌ，Ｂｌｏｏｄ ２００５；１０６：１００８－１０１１）Ｔ細胞の増殖，サイトカイン生成（ＩＦＮγ，ＩＬ－２），及び細胞溶解活性を抑制することが証明されている。また，Ｔｒｅｇ細胞は，樹枝状細胞（Ｒｏｍａｇｎａｎｉ ｅｔ ａｌ，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００５；３５：２４５２－２４５８），ＮＫ細胞（Ｒａｌａｉｎｉｒｉｎａ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｌｅｕｋｏｃ．Ｂｉｏｌ．２００７；８１：１４４－１５３）及びＢ細胞（Ｌｉｍ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２００５；１７５：４１８０－４１８３）の機能を抑制しうる。まとめると，これらの研究は，腫瘍免疫病理学におけるＴｒｅｇ細胞の重要な役割を示唆し，Ｔｒｅｇ細胞の頻度と腫瘍の成長との間の密接な相関関係を示している。

【００１５】

Ｔｒｅｇ細胞は，ナチュラルＣＤ４$^+$ＣＤ２５$^+$ Ｔ細胞及び誘発／適応Ｔｒｅｇ細胞のさまざまな集団に分けられる（Ｓｈｅｖａｃｈ，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ ２００６；２５：１９５－２０１，Ｂｌｕｅｓｔｏｎｅ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００５；６：３４５－３５２）（表１）。マウス及びヒトのＣＤ４$^+$ Ｔ細胞の約５％～１０％は，ナチュラルＴｒｅｇ細胞である（Ｓａｋａｇｕｃｈｉ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２００５；６：３４５－３５２）。ナチュラルＴｒｅｇ細胞は，自己ペプチドとの強力なＴＣＲ相互作用によって胸腺に発生し（Ｐｉｃｃａ ｅｔ ａｌ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２００５；１７：１３１－１３６，Ｊｏｒｄａｎ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２００１；２（４）：３０１－３０６，Ｐｉｃｃａ ｅｔ ａｌ，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ ２００６；２１２：７４－８５），一方，誘発Ｔｒｅｇ細胞は，非制御性Ｔ細胞から末梢に発生する。該胸腺外変換は，低用量抗原への連続暴露，全身性末梢抗原への暴露，ＴＧＦβへの暴露といった特殊な免疫学的条件を必要とする（Ｓｈｅｖａｃｈ，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ ２００６；２５：１９５－２０１，Ａｋｂａｒ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００７；７：２３１－２３７）。Ｔｒｅｇ細胞は，以下のメカニズム：ｉ）細胞間接触依存性メカニズム，ｉｉ）ＩＬ－１０やＴＧＦβなどの免疫抑制サイトカインの分泌によって，ｉｉｉ）標的細胞パーフォリン・グランザイム経路（ｐｅｒｆｏｒｉｎ－ｇｒａｎｚｙｍｅ ｐａｔｈｗａｙ）の直接殺傷，の１つ又は組み合わせによって抑制を媒介しうる（ｖｏｎ Ｂｏｅｈｍｅｒ，Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２００５；６（４）：３３８

－３４４）。
【００１６】
これまで，ヒトＴｒｅｇ細胞の抗原特異性についてはほとんど知られていない。Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌは，癌患者におけるＬＡＧＥ－１特異的ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$ＧＩＴＲ$^{+}$機能性Ｔｒｅｇ細胞クローンの同定を報告した（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ， Ｉｍｍｕｎｉｔｙ ２００４；２０：１０７－１１８）。Ｖｅｎｃｅ ｅｔ ａｌは，転移性メラノーマ患者の末梢血における腫瘍抗原特異的ＣＤ４$^{+}$ Ｔｒｅｇ細胞の存在を証明した。該Ｔｒｅｇ細胞は，ＴＲＰ１，ＮＹ－ＥＳＯ－１，ｇｐ１００，及びスルビビンを含むさまざまな腫瘍抗原を識別した。また，Ｖｅｎｃｅ ｅｔ ａｌは，ＮＹ－ＥＳＯ－１分子内におけるＮＹ－ＥＳＯ－１特異的Ｔｒｅｇ細胞エピトープの存在を最初に証明した。さらに，合成ペプチド又は腫瘍溶解物を含む樹枝状細胞を有するメラノーマ患者のワクチンは，Ｔｒｅｇ細胞の頻度増加を誘発し，腫瘍特異的ＣＤ８$^{+}$ Ｔ細胞の増殖を伴うことが分かった。これは，該ワクチンが，未同定Ｔｒｅｇ細胞エピトープ及びＣＤ８$^{+}$ Ｔ細胞エピトープを含み，Ｔｒｅｇ細胞Ｔ細胞レセプター（ＴＣＲ）を通じたリガンド特異的活性化によるＴｒｅｇ細胞のインビボでの増殖につながる可能性を示唆している。Ｔｒｅｇ細胞は，ＴＣＲ識別／関与を通じた抗原特異的活性化を必要とするが，抗原非特異的バイスタンダー抑制を媒介することが広く認められている（Ｔｈｏｒｔｏｎ ＆ Ｓｈｅｖａｃｈ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２０００；１６４： １８３１９０）。さらに，Ｌｉ ｅｔ ａｌは，感染患者のＨＣＶ特異的Ｔｒｅｇ細胞を刺激するＣ型肝炎ウイルスコアタンパク質内の優性Ｔｒｅｇエピトープの存在を示唆した（Ｌｉ ｅｔ ａｌ， Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．２００７；８５（３）：１９７－２０４）。まとめると，これらの研究，及びＨＨＤトランスジェニックマウスの抗内皮ＤＮＡコンストラクトＣ２００Ｆｃによる免疫は，有意なＴｉｅ－２$_{1-196}$特異的抗腫瘍免疫反応を刺激しないとの最近の発見，並びに（４００μｇのＰＣ６１モノクローナル抗体の投与による）ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$ Ｔｒｅｇ細胞の枯渇後，Ｃ２００Ｆｃ ＤＮＡ免疫前に（Ｍｉｄｄｌｅｔｏｎ，ＰｈＤ Ｔｈｅｓｉｓ．Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｎｏｔｔｉｎｇｈａｍ， Ｎｏｖｅｍｂｅｒ ２００７）ＨＨＤマウスの脾細胞から細胞を分泌するＴｉｅ－２$_{1-196}$特異的ＩＦＮγの頻度の増加は，ＤＮＡワクチン内のＴｉｅ－２$_{1-196}$が未同定のＴｒｅｇ細胞エピトープ及びＣＤ８$^{+}$エピトープを含んでいることを示す。これは，ワクチンが自己抗原Ｔｉｅ－２に対するトレランスを破壊しないこと，及び細胞媒介性抗腫瘍免疫反応を抑制する豊富な抗原特異的増殖Ｔｒｅｇ細胞によってＨＨＤマウスに抗腫瘍免疫を引き起こさないことを説明するものである。よって，エフェクターエピトープに対する免疫反応を管理して優勢Ｔｒｅｇ反応の刺激を阻止するＴｒｅｇエピトープを発現しない不活性免疫キャリアでＴエフェクターエピトープを発現することには利点がある。
【００１７】
有利には，本発明の核酸は，発現ポリヌクレオチドを分泌可能にする，リーダー配列などの配列をコードする配列を含む。これは，ポリヌクレオチドの抗原提示細胞（ＡＰＣ）への移入を可能にする。配列は，ポリヌクレオチドで自然に発現されるリーダー配列や，免疫グロブリンリーダー配列などの添加される異種リーダー配列でありうる。後者は，ポリヌクレオチドが膜結合分子をコードする場合に特に適している。
【００１８】
本発明の別の側面によれば，非特異的プロモーターと，免疫グロブリン分子の組み換え重鎖をコードする少なくとも１つの配列を含む核酸が提供され，ここで，重鎖は，核酸が発現されると重鎖が未変性コンフォメーションをとることができないように少なくとも１つの異種Ｔ細胞エピトープを含む。
【００１９】
本発明の該側面の核酸は，免疫グロブリン分子の組み換え重鎖をコードする。該重鎖の構造は，当業者に知られており，通常，可変領域と定常領域とを含む。重鎖は，抗体由来のものでありうる。抗体は，モノクローナル又はポリクローナルであり，ＩｇＡ，ＩｇＤ

，ＩｇＥ，ＩｇＧ，又はＩｇＭでありうるが，ＩｇＧが好ましい。ＩｇＧ抗体は，任意のＩｇＧサブクラス，例えば，ヒトＩｇＧ１，ＩｇＧ２，ＩｇＧ３，ＩｇＧ４，又は，マウスＩｇＧ１，ＩｇＧ２ａ，ＩｇＧ２ｂ，ＩｇＧ３，でありうる。ＩｇＧ抗体は，ヒトＩｇＧ２　Ｆｃ結合ドメインを有するヒトＩｇＧ１抗体，又はＩｇＧ１　Ｆｃ結合ドメインを有するヒトＩｇＧ２抗体でありうる。重鎖は，ヒト抗体の定常領域，及び異種Ｔ細胞エピトープが挿入されたマウスモノクローナル抗体の可変又は超可変（ＣＤＲ）領域を有しうる。超可変領域を除く可変領域もまた，ヒト抗体の可変領域に由来しうる。抗体に適用されると（すなわち，重鎖と軽鎖とを含む），該抗体は，ヒト化と呼ばれる。ヒト化抗体の作製方法は，当業者に周知である。該方法は，例えば，Ｗｉｎｔｅｒによる米国特許第５，２２５，５３９号明細書に記載されている。マウス超可変領域を除く重鎖の可変領域もまた，マウスモノクローナル抗体に由来しうる。この場合，全可変領域は，マウスモノクローナル抗体に由来し，抗体に適用されると，該抗体は，キメラ化と呼ばれる。キメラ化抗体の作製方法は，当業者に周知である。該方法には，例えば，Ｂｏｓｓ（Ｃｅｌｌｔｅｃｈ）及びＣａｂｉｌｌｙ（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）による米国特許明細書に記載のものが含まれる。それぞれ，米国特許第４，８１６，３９７号明細書及び第４，８１６，５６７号明細書を参照のこと。

【００２０】

ある実施形態において，本発明の核酸は，免疫グロブリン分子の軽鎖をコードする少なくとも１つの配列をさらに含む。あるいは，免疫グロブリン分子の軽鎖をコードする別の核酸が提供されうる。軽鎖は，少なくとも１つの異種Ｔ細胞エピトープを有しうる。Ｔ細胞エピトープは，核酸が発現されるても軽鎖が未変性コンフォメーションをとることができないようなものでありうる。軽鎖は，軽鎖に関して本明細書に記載した特徴のいずれかを有しうる。したがって，本発明はまた，免疫グロブリン分子の組み換え軽鎖をコードする核酸を提供し，ここで，軽鎖は，核酸が発現されるても軽鎖が未変性コンフォメーションをとることができないように少なくとも１つの異種Ｔ細胞エピトープを有する。核酸は，非特異的プロモーターを含みうる。該核酸は，抗体などの免疫グロブリン分子をコードする。

【００２１】

このように，本発明の別の側面によれば，非特異的プロモーターと，組み換え免疫グロブリン分子をコードする少なくとも１つの配列とを含む核酸が提供され，ここで，免疫グロブリン分子は，核酸が発現されても免疫グロブリン分子が未変性コンフォメーションをとることができないように少なくとも１つの異種Ｔ細胞エピトープを有する。組み換え免疫グロブリン分子並びに上記の重鎖及び軽鎖は，制御性Ｔ細胞エピトープを有しないことが好ましい。

【００２２】

本発明はまた，以下を提供する：

・本発明の核酸とアジュバントとを含むワクチン；

・本発明の核酸と，薬学的に許容されるキャリア，賦形剤，又は希釈剤とを含む医薬組成物；

・医薬用の本発明の核酸；

・少なくとも１つのＴ細胞エピトープに対する免疫反応を刺激するための薬剤の製造における本発明の前記核酸の利用；

・少なくとも１つのＴ細胞エピトープに対する免疫反応を刺激するための本発明の核酸；及び

・Ｔ細胞エピトープに対する免疫反応を刺激するための方法であって，該免疫反応を必要とする被験者に本発明の核酸の治療効果のある量を投与するステップを含む方法

【００２３】

驚くべきことに，本願発明者（ら）は，ヒトか非ヒトかを問わず，一次抗体構造を破断し，フォールディングを抑制し，及び／又は，重鎖又はごく少量の無傷抗体への分泌を制限するように可変領域でクローニングされた所定のＴ細胞エピトープを有する抗体が，強

力なヘルパー及び抗原特異的Ｔ細胞反応を刺激することを発見した。本願発明者（ら）はまた，該効果が該抗体の重鎖をコードする核酸を用いて得られることを発見した。Ｔ細胞エピトープは，免疫プロテアソームによって処理されるが破壊はされないと考えられている。ある実施形態において，本発明は，Ｔ細胞反応の頻度及び活性を強化する変性免疫グロブリン内の所定のＴ細胞エピトープを提示するＤＮＡワクチンを提供する。本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを，本明細書において「ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ」と呼ぶことにする。

【００２４】

Ｔ細胞エピトープに対する免疫反応が，免疫グロブリンが未変性コンフォメーションをとることができないようにＴ細胞エピトープが挿入される免疫グロブリンの重鎖を少なくともコードする核酸によって刺激されうるとの発見は，抗体は機能的な形で発現されなければならないと説く当該技術分野の予想に反するものである。例えば，上述のように，国際公開第９６／１９５８４号パンフレットは，核酸がＴ細胞エピトープが抗体のＣＤＲに挿入される抗体をコードする場合，該核酸は，機能的抗体をコードしなければならない旨説いている。同様に，欧州特許第０７５９９４４号明細書は，無傷免疫グロブリンタンパク質として分泌されるＴ細胞エピトープを抗体分子へ取り込む方法を記載している。米国特許第７，０６７，１１０号明細書は，抗体の融合タンパク質によって抗原に対する免疫反応を引き起こすことができる旨開示しているが，該抗体は，免疫グロブリン可変領域を欠くものとして開示されている。また，該融合タンパク質は，抗原中に制御性Ｔ細胞エピトープを有する。よって，該タンパク質は，抗体反応を刺激しうるが，抗原中の制御性Ｔ細胞エピトープにより高活性Ｔ細胞反応を刺激しないであろう。

【００２５】

上述したように，国際公開第００／６４４８８号パンフレットは，ＣＤＲ（その可変領域を除く）に挿入される異種Ｔ細胞エピトープを有するキメラ抗体をコードする核酸を開示しており，該核酸は，Ｂ細胞における発現を指向している。本発明の核酸は，Ｂ細胞における発現を指向しておらず，したがって，インビトロでもインビボでも特にＢ細胞を標的としない。本発明の核酸は，樹枝状核酸を含む任意の抗原提示細胞に取り込まれうり，したがって，ナイーブＣＴＬ及びヘルパーＴ細胞反応をプライミングすることができるのに対し，国際公開第００／６４４８８号パンフレットに記載のワクチンは，既存のＴ細胞反応を促進する上でしか有用でないであろう。

【００２６】

本発明による核酸によって誘発される反応の機能的活性の分析は，合成ペプチドによる免疫と比べて高活性反応を生成しうることを示した。これはまた，インビトロ及びインビボで腫瘍細胞を識別し殺傷する能力の強化と相関関係があった。該観察は，良好な抗腫瘍活性が高活性ＴＲＰ２特異的ＣＴＬにより示される他の研究における報告に匹敵するものである（Ｚｅｈ ｅｔ ａｌ，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １９９９；１６２：９８９－９４，Ｈａｒａｄａ ｅｔ ａｌ，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２００１；１０４：６７－７４）。

【００２７】

本発明の核酸は，非特異的プロモーター，すなわち，核酸の発現を促進するが発現が促進される細胞に対する特異性は有さないプロモーター，を有する。該プロモーターは，好ましくは，樹枝状細胞及び／又はケラチン生成細胞における核酸の発現を引き起こす。適切なプロモーターの例には，ＣＭＶプロモーター，ＳＶ４０プロモーター，及び当業者に周知の他の非特異的プロモーターが含まれる。あるいは，本発明の核酸は，樹枝状細胞（例えば，Ｃｄ１１ｂプロモーター）及びケラチン生成細胞（例えば，ＭＨＣＩＩプロモーター，Ｃｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，２００１ Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６７，５５４９－５５５７）において特異的発現を引き起こす１つ以上のプロモーターを有しうる。

【００２８】

本発明のある側面の核酸は，免疫グロブリン分子，好ましくは，抗体の主要な特徴のす

べて，すなわち，可変領域及び定常領域を含む重鎖及び軽鎖，を含む抗体をコードする。該抗体は，モノクローナル又はポリクローナルであり，ＩｇＡ，ＩｇＤ，ＩｇＥ，ＩｇＧ，又はＩｇＭでありうるが，ＩｇＧが好ましい。ＩｇＧ抗体は，任意のＩｇＧサブクラス，例えば，ヒトＩｇＧ１，ＩｇＧ２，ＩｇＧ３，ＩｇＧ４，又は，マウスＩｇＧ１，ＩｇＧ２ａ，ＩｇＧ２ｂ，ＩｇＧ３，でありうる。ＩｇＧ抗体は，ヒトＩｇＧ２　Ｆｃ結合ドメインを有するヒトＩｇＧ１抗体でありうる。該抗体は，ヒト抗体の定常領域，及び異種Ｔ細胞エピトープが挿入されたマウスモノクローナル抗体の可変又は超可変（ＣＤＲ）領域を有しうる。超可変領域を除く可変領域もまた，ヒト抗体の可変領域に由来しうる。該抗体は，ヒト化と呼ばれる。ヒト化抗体の作製方法は，当業者に周知である。該方法は，例えば，Ｗｉｎｔｅｒによる米国特許第５，２２５，５３９号明細書に記載されている。マウス超可変領域を除く抗体の可変領域もまた，マウスモノクローナル抗体に由来しうる。この場合，全可変領域は，マウスモノクローナル抗体に由来し，該抗体は，キメラ化と呼ばれる。キメラ化抗体の作製方法は，当業者に周知である。該方法には，例えば，Ｂｏｓｓ（Ｃｅｌｌｔｅｃｈ）及びＣａｂｉｌｌｙ（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）による米国特許明細書に記載のものが含まれる。それぞれ，米国特許第４，８１６，３９７号明細書及び第４，８１６，５６７号明細書を参照のこと。

【００２９】

本発明のある側面の核酸は，重鎖，軽鎖，又は発現される免疫グロブリン分子が，重鎖，軽鎖，又は免疫グロブリン分子が未変性コンフォメーションをとることができないように，少なくとも１つの異種Ｔ細胞エピトープを有する。該Ｔ細胞エピトープは，例えば，免疫グロブリンの重鎖が抗原に結合することができないように，又は，重鎖及び軽鎖（存在する場合）が結合することができないように，又は，重鎖又は免疫グロブリン分子が適切に分泌されえないように，発現タンパク質を破断しうる。該破断は，免疫グロブリン分子の三次構造で起こりうり，ジスルフィド結合（ｄｉｓｕｌｐｈｉｄｅ　ｂｏｎｄ）の形成を阻止しうる。

【００３０】

以下でより詳細に述べるように，免疫グロブリン分子が抗体である場合，Ｔ細胞エピトープは，抗体のＣＤＲ１領域及びＣＤＲ２領域に挿入されるか，置換されうる。ＣＤＲ１及びＣＤＲ２は，抗体のβシート構造の一部を形成し，フォールドされた分子内に一部が沈殿している。長さ，アミノ酸組成や荷電のいかなる変化も，この構造を破断し，重鎖及び軽鎖のフォールディング及び結合を阻止する。ＣＤＲＨ３は，免疫グロブリン分子の表面に暴露され，したがって，変化に対して許容状態である。本発明において，ＣＤＲ１及び／又はＣＤＲ２がＴ細胞エピトープで置換されるのが好ましい。事実，ある実施形態において，ＣＤＲＨの接点におけるフレームワーク領域の欠損は，抗体のフォールディングを完全に破断するが，これらの領域におけるエピトープの挿入は，良好なＴ細胞反応を与える。ＣＤＲＨ１（５アミノ酸の長さ）又はＣＤＲＨ２（１７アミノ酸の長さ）へのエピトープの取り込みは，軽鎖が天然配列を有していても，ごく少量の無傷抗体を除く重鎖の分泌を可能にするほどの破断を引き起こす。これは，二次構造が重鎖と軽鎖の組み合わせにとって重要であることを示している。軽鎖のＣＤＲＬ１内へのエピトープの取り込みは，重鎖のＣＤＲＨ３へ取り込まれる唯一のエピトープが存在するとしても，軽鎖の分泌は低レベルとなる。

【００３１】

「異種Ｔ細胞エピトープ」とは，抗体にとって異種であるＴ細胞エピトープを意味している。例えば，異種Ｔ細胞エピトープは，抗体中にこれまでに存在していなかったものでありうる。異種Ｔ細胞エピトープは，挿入されるアミノ酸配列から構成されうるが，第２の部分の隣接アミノ酸とともに，全体として挿入されうる。これは，挿入されるエピトープが，異種核酸に元の抗原由来のものと同様の処理プロファイルを有することを確実にするためである。一つ以上のＣＴＬ／ヘルパーエピトープを同じ可変領域に挿入しうる。

【００３２】

Ｔ細胞エピトープは，重鎖又は軽鎖のどこにでも挿入しうる。該又は各エピトープは，

重鎖及び／又は軽鎖の可変領域に挿入されるのが好ましいが，重鎖及び／又は軽鎖の定常領域にのみ，又は定常領域と可変領域に挿入されるＴ細胞エピトープを有する抗体や重鎖をコードする核酸が本発明に含まれる。本発明の核酸において，Ｔ細胞エピトープをコードする配列は，重鎖及び／又は軽鎖をコードする配列に挿入される（すなわち，追加される），又は重鎖及び／又は軽鎖をコードする配列に置換されうる。

【００３３】

可変領域において，Ｔ細胞エピトープは，重鎖及び／又は軽鎖のいずれか１つ以上のＣＤＲ，すなわち，Ｌ１，Ｌ２，Ｌ３，Ｈ１，Ｈ２，又はＨ３，に挿入されるか，又は置換されうる。当然ながら，Ｌ１，Ｈ１及びＨ２が目下好ましい。ある実施形態において，Ｔ細胞エピトープは，ＣＤＲＬ１及び／又はＨ１及び／又はＨ２に挿入されるか，又は置換される。好ましくは，取り込まれるＴ細胞エピトープは，抗体が未変性コンフォメーションをとらないように，すなわち，フォールドせず，また，正しく分泌されないように，抗体の元のＣＤＲのアミノ酸と同じ大きさ及び荷電ではない。あるいは又は加えて，それらは，ＣＤＲを取り囲むフレームワーク領域に挿入されるか，置換されうる。

【００３４】

挿入されるＴ細胞エピトープは，好ましくは，細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ又はＣＤ８）エピトープである。あるいは又は加えて，ヘルパーＴ細胞（ＣＤ４）エピトープが挿入されうる。Ｔ細胞エピトープは，周知のＴ細胞アルゴリズムを用いて予測されうる，又は，ペプチドとして合成て標準的なＴ細胞アッセイを用いてスクリーニングされうる。Ｔ細胞エピトープは，５～５０，７～４０，８～３０，又は９～２０アミノ酸，例えば，９，１０，１１，１２，１３，１４，１５，１６，１７，１８，１９，２０，２１，２２，２３，２４，２５，２６，２７，２８，２９，又は３０の範囲のアミノ酸長を有しうる。エピトープは，抗原エピトープをコードする相補オリゴヌクレオチドを用いて挿入されうり，それらはアニールされ，ＣＤＲ（又は他の領域）が特異的制限酵素部位に置換された抗体フレームワークの特異的部位にクローニングされる。組み換え抗体がヘルパー及び細胞傷害性Ｔ細胞反応を刺激する能力は，本明細書に例示されているようなかたちでスクリーニングすることができる。

【００３５】

本発明の範囲内においてさまざまな組み合わせが可能である。ある実施形態において，１つ以上のＣＤ８エピトープが，重鎖又は抗体のＣＤＲ　Ｈ１及び／又はＨ２又は非ＣＤＲの可変領域に挿入されうる及び／又は置換されうる。あるいは又は加えて，１つ又は複数のＣＤ４エピトープが，軽鎖又は抗体のＣＤＲ　Ｌ１又は非ＣＤＲ可変領域に挿入されうる及び／又は置換されうる。複数のＴ細胞エピトープが存在する場合，Ｔ細胞エピトープは，同じである又は異なりうる。当業者であれば，以下を含め，多数の組み合わせが可能であることを理解するであろう。

・ＣＤＲ　Ｈ１のＣＤ８エピトープ，及びＣＤＲ　Ｌ１のＣＤ４エピトープ；
・ＣＤＲ　Ｈ２のＣＤ８エピトープ，及びＣＤＲ　Ｌ１のＣＤ４エピトープ；
・ＣＤＲ　Ｈ１及びＣＤＲ　Ｈ２のＣＤ８エピトープ，及びＣＤＲ　Ｌ１のＣＤ４エピトープ；
・ＣＤＲ　Ｈ１の２つのＣＤ８エピトープ，及びＣＤＲ　Ｌ１のＣＤ４エピトープ；
・ＣＤＲ　Ｈ２の２つのＣＤ８エピトープ，及びＣＤＲ　Ｌ１のＣＤ４エピトープ；など

【００３６】

本発明の核酸は，ＭＨＣクラスＩ分子及びＭＨＣクラスＩＩ分子両方の大部分と結合しうる単一の標的抗原からの複数のＴ細胞エピトープを取り込みうる。これにより，広範囲の集団ワクチン接種において利用可能なワクチンを製造しうる。あるいは，本発明に有用な核酸は，最も一般的なクラスＩ及びクラスＩＩ表現型に結合可能な複数の標的抗原からの複数のＴ細胞エピトープを取り込みうる。これにより，抗原が欠損した変異体の選択を阻止しうるワクチンを製造しうる。標的抗原は，単一の病原体又は腫瘍型由来であるか，又は様々な病原体又は癌に対して免疫反応を示すように選択されうる。特異的共通ＨＬＡ表現型を標的とする本発明に有用な核酸は，さまざまな癌及び／又は病原体からの多数の

Ｔ細胞エピトープを取り込み，病気を予防する単一のワクチンを提供しうる。

【００３７】

ヘルパー及び／又は細胞傷害性Ｔ細胞反応を刺激するものであれば，任意のＴ細胞エピトープを挿入しうる。ＨＩＶ，Ｃ型肝炎，及びその他の感染症などの潜伏感染を除去するのにＣＴＬを必要とする病原体由来のＴ細胞エピトープを用いうるが，該エピトープは，「自己ペプチド」であること，すなわち，癌などの細胞増殖に関連する状態／疾患に関連する場合が好ましい。好ましくは，Ｔ細胞エピトープは，重鎖又は抗体が正しくフォールドされえず，分泌されえない。したがって，挿入されるエピトープは，元の可変領域と同様の大きさ及びアミノ酸組成ではないことが好ましい。核酸は，さまざまなＴ細胞反応を引き起こすように複数の異なるＴ細胞エピトープを有しうる。核酸は，単一の抗原由来の複数のエピトープを取り込みうり，それにより，異なるＨＬＡ型を有する個人の大多数が単一のワクチンに反応することを確実にしうる。あるいは，制限された範囲のＨＬＡ型を標的とする複数の抗原由来の複数のＴ細胞エピトープを用いうる。本発明の核酸分子は，単一の病原体又は癌型由来のさまざまな抗原を含みうる，又は，それらは，さまざまな固形腫瘍又は病原体を標的とする異種抗原を含みうる。本発明の核酸分子は，腫瘍内の異なる細胞集団，例えば，上皮腫瘍及び内皮抗原，を標的とするように設計されうる。

【００３８】

驚くべきことに，本願発明者（ら）は，Ｔ細胞エピトープが重鎖の構造的に制限されたＣＤＲ又は非ＣＤＲ領域に挿入されると，それらは，優れたＣＴＲ反応を示すことを発見した。これは，巨大なエピトープの可変領域への挿入により軽鎖と弱くしか結合することができない大量の重鎖の分泌によるものと思われる。これは，「抗原提示細胞により内因性に合成されたタンパク質のみがＭＨＣクラスＩ分子上に提示されＣＴＬにより識別される」（国際公開第９６／１９５８４号パンフレット）旨記述する教義に反している。外因性抗原の取り込み及びＭＨＣクラスＩ上の提示は，交差提示として知られるプロセスであり，通常，特異的レセプターによる取り込みを必要とする。これは，ヒトＦｃγ１抗体のＣＤ６４レセプターでありうる。しかしながら，大量の無傷抗体又は抗原抗体複合体がこのレセプターをうまく標的とするであろうことは予測されるであろう。一方，本明細書に提示された結果は，ＣＤ６４に結合せずにすぐれたＣＴＬ反応を示す非常に低レベルの無傷抗体及び大量の自由重鎖を明確に示している。実際，ＣＴＬエピトープが，ＣＤ６４に結合することができない抗体，例えば，ＣＤ６４結合領域がＩｇＧ２由来の非ＣＤ６４結合領域で置換されたＩｇＧ２抗体やＩｇＧ１分子，に挿入されると，ＣＴＬ反応を刺激しうることが本明細書において示されている。

【００３９】

重鎖をコードする核酸は，好ましくは，分泌を可能にするリーダー配列を含む。本願発明者（ら）は，重鎖のリーダー配列が，分泌を阻止し，内因性タンパク質の生成を可能にするために除去されると，これによりＣＴＬ反応が低減することを発見した。これは，完全に予想に反するのものである。発明者（ら）は，理論に束縛されることを望んではいないが，これは，核酸が，高レベルの重鎖及び後に抗原提示細胞に取り込まれうる微量の天然タンパク質を分泌する非抗原提示細胞において発現されることを意味するものと考えている。あるいは，核酸は，排出リンパ節へ移動する抗原提示細胞を直接トランスフェクトしうる。該排出リンパ節において，抗原提示細胞は，微量の天然タンパク質，及び同じ又は隣接する抗原提示細胞に取り込まれ，ナイーブＣＴＬに対するＭＨＣクラスＩ上に提示される大量の重鎖を分泌する。したがって，核酸ワクチンが，効果的なＣＴＬ反応を刺激するために，核酸は，好ましくは，非常に低レベルで分泌される及び／又は同時に大量の変性タンパク質を分泌するタンパク質内のＣＴＬエピトープをコードする。しかしながら，ＣＴＬ反応は，ヘルパー反応非存在下では，高アフィニティ記憶反応に発達しえない。したがって，Ｔヘルパーエピトープが重鎖又は免疫グロブリン分子，好ましくは，抗体の軽鎖の可変領域，に挿入されるのが好ましい。さらに，驚くべきことに，また，「標的細胞に外因性に取り込まれるタンパク質のみがＭＨＣクラスＩＩ分子によって提示され，ヘルパーＴ細胞によって識別される」旨述べる教義に反して，軽鎖は，ごく少量しか分泌さ

れなかった。軽鎖の分泌を阻止するリーダー配列の除去は，ヘルパー反応に何ら影響を及ぼさなかった。したがって，本発明の核酸は，抗体の軽鎖のリーダー配列を有する場合もあれば有しない場合もある。これらの結果は，核酸は，ＭＨＣクラスＩＩとの関連で，内因性に合成されたタンパク質由来のＴヘルパーエピトープを提示する抗原提示細胞，場合によってはオートファジー，に取り込まれることを暗示している。ヘルパーＴ細胞がＣＴＬ反応を助けるために，ヘルパーＴ細胞が識別する両Ｔ細胞エピトープは，結合Ｔ細胞ヘルプとして知られるプロセスにおいて同じ抗原提示細胞上に発現される必要がある。これは，核酸によってコードされる，軽鎖を合成する抗原提示細胞は，ＣＴＬエピトープ自体をも合成，分泌及び交差提示するか，又は隣接ＡＰＣから重鎖を取り込む必要があることを暗示している。

【００４０】

本発明はまた，内因性に生成された軽鎖由来の異種ヘルパーＴ細胞エピトープ，及び交差提示された重鎖由来の異種ＣＴＬエピトープをＭＨＣクラスＩＩ上に提示する単離樹枝状細胞を提供する。該樹枝状細胞は，本明細書に記載の治療に利用しうる。

【００４１】

本発明の核酸は，Ｔ細胞反応の頻度と活性の両方を増大させる変性抗体をコードすることにより，既存のＴ細胞エピトープをより免疫原性のあるものにしうる。

【００４２】

本発明の核酸は，クローニングにより得られる，又は，化学合成によって全体的又は部分的に生成される，ＤＮＡ，ｃＤＮＡ，又はｍＲＮＡなどのＲＮＡでありうる。治療用として，核酸は，治療を受ける被験者において発現されうるかたちであることが好ましい。

【００４３】

本発明の核酸は，組み換え型であるか，又は，分離された及び／又は精製された形で提供されうる。それは，１つ以上の発現用調節配列を除き，ヒトゲノム中に核酸隣接遺伝子を含まないか，又は実質上含まないことがある。本発明による核酸がＲＮＡを含む場合，本明細書に示される配列への言及は，ＵをＴと置き換えたＲＮＡ等価物への言及と解釈されるべきである。

【００４４】

本発明の核酸は，核酸配列及びクローンが入手可能であることを所与として，例えば，本明細書に記載の情報及び参考文献や当技術分野で周知の技術（例えば，Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ，“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ”，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９８９，及びＡｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ，Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，１９９２を参照のこと）を用いて，当業者が容易に作製することができる。これらの技術は，（ｉ）例えば，ゲノムソースからの該核酸のサンプルを増幅するポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）の利用，（ｉｉ）化学合成，又は（ｉｉｉ）ｃＤＮＡ配列の作製，を含む。ポリペプチドをコードするＤＮＡは，当業者に周知の任意の適切な方法を用いて生成し使用することができ，例えば，コードするＤＮＡの取り込み，発現される部位の両側における適切な制限酵素認識部位の同定，及びＤＮＡからの該部位の除去，がある。該部位は，後に，標準的な市販の発現系における適切なプロモーターと動作可能に結合しうる。他の組み換えアプローチは，ＤＮＡの関連部位を適切なＰＣＲプライマーで増幅することである。例えば，部位特異的突然変異誘発法を用いて，修飾ペプチドの発現につながるように，又は，核酸の発現に使用される宿主細胞のコドン選択を考慮するように，配列の修飾を行うことができる。

【００４５】

核酸配列の発現を得るために，該配列を，動作可能に核酸に結合してその発現を制御する１つ以上の制御配列を有するベクターに取り込むことができる。ベクターは，例えば，挿入される核酸の発現を促進するプロモーターやエンハンサーなどの他の配列，ポリペプチドを溶解として生成するような核酸配列，及び／又は宿主細胞で生成されるポリペプチ

ドが細胞から分泌されるような分泌信号をコードする核酸を含みうる。必要に応じ，ベクターをベクターが機能する宿主細胞に変え，ポリペプチドが生成されるように宿主細胞を培養し，宿主細胞又は周囲媒質からポリペプチドを回収することによってポリペプチドを生成しうる。原核細胞及び真核細胞が当技術分野において該目的のために用いられる。その中には，大腸菌株，酵母菌株，及び，昆虫細胞や動物細胞などの真核細胞，例えば，ＣＯＳ細胞，ＣＨＯ細胞，ボウズメラノーマ細胞，及びその他の適切なヒト細胞，が含まれる。本発明が抗体の重鎖及び軽鎖をコードする核酸に関連する場合，個々の核酸は，同じ又は異なるプロモーターに刺激されて，同じ発現ベクター又は別の発現ベクターに存在しうる。

【００４６】

本発明の核酸は，ヒトを含む哺乳動物などの患者の少なくとも１つのＴ細胞エピトープに対する免疫反応を刺激するために利用されうる。ヘルパー及び／又は細胞傷害性Ｔ細胞反応を刺激しうる。本発明により得られる特定のエピトープに対するＴ細胞反応は，単純なペプチドと同じエピトープによる免疫によって，又は，ペプチド又は核酸と同じ抗体内でコードされるエピトープによる免疫によって得られるものよりも高い結合活性を有しうる。本発明の核酸は，併用療法，すなわち，軽鎖をコードする核酸及び重鎖をコードする核酸，として投与されうる。核酸は，静脈内投与，経皮投与，筋肉内投与，経口投与，又は他の投与法で投与されうる。経皮投与又は筋肉内投与が好ましい。というのも，これらの組織は，樹枝状細胞を含むからである。

【００４７】

本明細書において，「治療」の語は，ヒト又は非ヒト動物のためになりうるいかなる養生法を含む。治療は，遺伝性疾患又は後天性疾患のためのものでありうる。好ましくは，治療は，癌や感染症といった細胞増殖に関連する状態／疾患のためのものである。核酸で治療可能な癌の種類の例には，固形腫瘍，結腸直腸癌，肺腫瘍，乳房腫瘍，胃腫瘍，卵巣腫瘍，子宮腫瘍，肝腫瘍，腎腫瘍，膵臓腫瘍，メラノーマ腫瘍，膀胱腫瘍，頭頸部腫瘍，脳腫瘍，食道腫瘍，膵臓腫瘍，骨腫瘍，並びに軟部組織癌及び白血病，が含まれる。核酸で治療可能な感染症の例には，ＨＩＶ感染症，Ｃ型肝炎感染症や，クリアランス用Ｔ細胞免疫を必要とする慢性感染症，が含まれる。

【００４８】

核酸は，薬学的に許容されるキャリアと併用しうる。該キャリアには，これらに限定されるものではないが，生理食塩水，緩衝生理食塩水，デキストロース，リポソーム，水，グリセロール，エタノール，及びこれらの組み合わせ，が含まれる。

【００４９】

宿主の免疫反応の刺激を促進するためにアジュバントを用いうる。アジュバントには，水酸化アルミニウム，リゾレシチン，プルロニック，ポリオール，ポリアニオン，ペプチド，タンパク質，及び油乳剤，が含まれる。

【００５０】

本発明に有用な核酸は，医薬組成物で処方しうる。これらの組成は，上記物質の一つに加え，薬学的に許容される賦形剤，キャリア，緩衝剤，安定剤，又は当業者に周知の他の物質を含みうる。キャリアや他の物質の正確な特質は，投与経路，例えば，経皮経路，経口経路，静脈内経路，皮膚経路又は皮下経路，経鼻経路，筋肉内経路，腹腔内経路，に依存しうる。処方は，好ましくは，微小な金粒子の表面上に沈殿し，遺伝子銃による注入に適した安定乾燥粉末としての核酸である。処方は，エレクトロポレーションを用いた経皮又は筋肉内投与に適しうる。

【００５１】

核酸を含む，又は核酸の送達のための組成物は，好ましくは，「治療効果のある量」個人に投与され，これは，個人にとっての利益を示すのに十分である。投与される実際の量，及び投与の割合及び経時変化は，治療対象の特質及び重症度に依存する。治療の処方，例えば，投与量に関する決定など，は，一般開業医その他の医師の責任内にあり，通常，治療対象の疾患，個々の患者の状態，送達部位，投与方法，及び開業医に周知の他の要因

を考慮に入れる。本発明の核酸は，特に，既存の癌の治療，及び最初の治療又は手術後の癌の再発予防に関連している。上述の技術及び手順の例は，Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１６ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｏｓｌｏ，Ａ.（ｅｄ），１９８０に見出すことができる。

【００５２】

好ましくは，本発明の核酸は，効果のある量ヒトに投与すると腫瘍細胞の成長を有意に抑制しうるヘルパー及び／又は細胞傷害性Ｔ細胞を刺激する。適量は，多数のパラメーター，例えば，年齢，性別，体重，治療対象の状態の重症度，投与される活性成分，及び投与経路，に基づいて医師により決定されうる。例えば，１～１０００μｇのＤＮＡの投与量は，ヘルパー及び細胞傷害性Ｔ細胞反応の両方を刺激するのに十分である。

【００５３】

本発明の核酸は，追加の薬学的に許容される成分とともに投与されうる。該成分には，例えば，免疫系刺激剤が含まれる。

【００５４】

組成物は，治療対象の状態に応じて，単独で，又は他の治療と組み合わせて，同時に又は連続して投与されうる。他の癌治療には，当技術分野において周知の，他のモノクローナル抗体，他の化学療法剤，他の放射線治療技術や免疫療法が含まれる。本発明の組成物の一つの特定の用途は，手術の補助，すなわち，腫瘍除去後の癌再発のリスクを低下させる手助けをすることである。

【００５５】

注射（ｉｄ）は，本発明の核酸の治療的投与のための第一の経路でありうる。

【００５６】

核酸は，局所的に腫瘍部位や他の所望の部位に投与され，又は腫瘍や他の細胞を標的とするような方法で送達されうる。

【００５７】

核酸の投与量は，利用される作用物質の特性，例えば，その結合活性及びインビボ血中濃度半減期，製剤中のポリペプチド濃度，投与経路，投与部位及び割合，関係患者の臨床的耐性，患者を苦しめている病的状態，など，十分に医師の技能の範囲内にあるもの，に依存する。例えば，一患者一回につき１００μｇの核酸の投与量が好ましいが，投与量は，一回あたり約１０μｇから１ｍｇの幅がありうる。一連の連続的接種中に異なる摂取量が用いられる。開業医は，最初の接種を行い，次に，比較的少量の核酸で促進しうる。

【００５８】

他の実施形態において，本発明は，標的抗原からのＴ細胞エピトープを可変領域の抗体へ改変する方法，及び，ヘルパー及び細胞傷害性Ｔ細胞反応の両方を刺激するワクチンとしての該改変抗体の利用に関する。

【００５９】

本発明のさらなる側面は，本明細書に開示される核酸を含む宿主細胞を提供する。本発明の核酸は，宿主細胞のゲノム（例えば，染色体）に組み込まれうる。組み込みは，標準的な技術に従ってゲノムとの組み換えを促進する配列を含むことにより促進されうる。核酸は，細胞内の染色体外ベクター上にありうる，あるいは，細胞に対し識別可能に異種又は異質でありうる。

【００６０】

さらなる側面は，本発明の核酸を宿主細胞に導入するステップを含む方法を提供する。該導入は，（特にインビトロ導入の場合は）一般的に制限なく「形質転換」と呼ぶことができるが，任意の利用可能な技術を利用しうる。真核細胞の場合，適切な技術には，リン酸カルシウムトランスフェクション，ＤＥＡＥデキストラン，エレクトロポレーション，リポソーム媒介トランスフェクション，及びレトロウイルス又は他のウイルス，例えば，ワクシニア，昆虫細胞の場合はバキュロウイルス，を用いた形質導入が含まれうる。

【００６１】

細菌性細胞の場合，適切な技術には，塩化カルシウム形質転換，エレクトロポレーショ

ン，及びバクテリオファージを用いたトランスフェクションが含まれる。他の方法として，核酸の直接注入を用いることができる。

【００６２】

抗生物質抵抗性遺伝子や感受性遺伝子といった標識遺伝子を，当技術分野において周知のように，関心のある核酸を含むクローンを同定するのに利用しうる。

【００６３】

導入に続いて，核酸からの発現が引き起こされるか可能となりうる。例えば，コードされたポリペプチド（又はペプチド）が生成されるように，遺伝子発現の条件下で宿主細胞（実際に形質転換された細胞を含みうる。おそらく，該細胞は，形質転換された細胞の子孫であるだろうが）を培養することによって。ポリペプチドが適切なシグナルリーダーペプチドを結合して発現される場合，細胞から培養培地へ分泌されうる。発現による生成の後に，ポリペプチド又はペプチドは，宿主細胞，及び／又は場合によっては培養培地から単離及び／又は精製されうり，その後，所望するように，例えば，１種類以上の追加の成分を含みうる組成，例えば，１種類以上の薬学的に許容される賦形剤，媒体，又はキャリア（例えば，以下を参照のこと）を含む医薬組成物など，の製剤において利用されうる。

【００６４】

本発明はまた，候補抗原のＴ細胞エピトープを同定する方法を提供する。該方法は，非ヒト動物のＴ制御性細胞を枯渇させるステップと，非ヒト動物を候補抗原で免疫するステップと，Ｔ細胞反応が，候補抗原の予測エピトープに対するペプチド又は候補抗原内のすべての可能性のある重複ペプチドに対して引き起こされたかどうかを確かめるためにスクリーニングするステップと，を含む。

【００６５】

該方法は，マウスやラットなどの非ヒト動物において実施されうる。Ｔ制御性細胞は，Ｏｎｔａｋなどの毒素と随意に接合しうる抗ＣＤ２５抗体を用いて，又は，Ｔ制御性細胞を選択的に殺すシクロフォスファミドなどの化学療法によって非ヒト動物において枯渇されうる。Ｔ制御性細胞が枯渇すると，非ヒト動物は，候補抗原をコードするＤＮＡによって，又は候補抗原自体によって免疫されうる。候補抗原は，抗原Ｆｃ融合タンパク質として提供されるのが好ましい。スクリーニングステップにおいて，非ヒト動物においてＴ細胞反応が刺激されるペプチドが同定される。これは，ＥＬＩＳＰＯＴなどの技術を用いてインビトロで行うことができる。Ｔ細胞反応が候補エピトープに対して引き起こされる場合，このエピトープを非ヒト動物に免疫するのに用いることができる。このペプチドがＴ細胞反応を引き起こす場合，結合活性及び頻度は，本発明による核酸内のエピトープをコードすることにより強化することができる。この方法は，免疫プロテアソームによって処理されるＴ細胞エピトープの同定を可能にする。

【００６６】

本発明の各側面の好ましい特徴は，各々の他の側面に変更すべきところは変更して関係する。本明細書に記載の先行技術文献は，法律が許す最大限の範囲で組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【００６７】

以下，本発明を以下の実施例（これらに限定されない）においてさらに述べる。以下の図面を参照する。

【００６８】

【図１】重鎖ベクターｐＯｒｉｇＨＩＢの特徴を示す図　抗体ＳＣ１００の野生型脱免疫重可変領域を，ヒトＩｇＧ１Ｆｃ定常領域のフレームのＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩを用いてクローニングした。Ｆｃ領域は，ＣＨ１領域，ＣＨ２領域，ＣＨ３領域及びヒンジ領域を含む。哺乳類細胞における高レベル発現は，ヒトサイトメガロウィルス前初期プロモーターから排除される。ＢＧＨポリアデニル化は，ｍＲＮＡ安定性と有効な終止を確保するために，Ｏｒｉｇ　ＨＩＢヒトＩｇＧ１鎖の下流に信号を送る。ＥＭ７は，大腸菌における抗生物質選択を可能にするｚｅｏｃｉｎ耐性遺伝子の発現を制御する細菌プロモーターであり，一方，該耐性遺伝子のＳＶ４０早期プロモーター上流は，哺乳類細胞における選

択を可能にする。ＳＶ４０ポリアデニル化は，ｚｅｏ「ｍＲＮＡの３’末端の適切な処理を管理するために該耐性遺伝子の下流に信号を送る。ベクターはまた，その内部に，細菌における増殖のためのＣｏｌＥ１複製起点を含む。相補性決定ＤＮＡ配列は，効果的に除去され，制限部位ＲＥ１，ＲＥ２，ＲＥ３（それぞれ，ＦｓｐＩ，ＭｓｃＩ，ＳｒｆＩ）と単独で及び組み合わさって交換される。

【００６９】

【図２】重鎖ベクターｐＯｒｉｇＬＩＢの特徴を示す図　抗体ＳＣ１００の野生型脱免疫された軽可変領域を，ヒトカッパ定常領域のフレームのＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩを用いてクローニングした。哺乳類細胞における高レベル発現は，ヒトサイトメガロウィルス前初期プロモーターから排除される。ＢＧＨポリアデニル化は，ｍＲＮＡ安定性と有効な終止を確保するために，Ｏｒｉｇ　ＬＩＢ鎖の下流に信号を送る。ベクターはまた，細菌における増殖及び選択を可能にするアンピシリン用抗体耐性遺伝子及びＣｏｌＥ１複製起点を含む。相補性決定領域は，効果的に除去され，制限部位ＲＥ４，ＲＥ５，ＲＥ６（それぞれ，ＥｃｏＲＶ，ＳｓｐＩ，ＨｐａＩ）と単独で及び組み合わさって交換される。

【００７０】

【図３】野生型ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙキメラ重鎖の配列　ヌクレオチド及び翻訳中のアミノ酸配列が完全長キメラＩｇＧ１重鎖に図示されている。ＣＤＲの位置は，カバット番号付与体系によって定義されるボックス内にある。ストップコンドンは赤のアスタリスクで描かれている。重可変領域の転移に利用されるＨｉｎｄｌｌｌ／Ａｆｅｌ制限部位が強調されている。

【００７１】

【図４】野生型ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙキメラカッパ鎖の配列　ヌクレオチド及び翻訳中のアミノ酸配列が完全長キメラカッパ鎖に図示されている。ＣＤＲの位置は，カバット番号付与体系によって定義されるボックス内にある。ストップコンドンはアスタリスクで描かれている。軽可変領域の転移に利用されるＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【００７２】

【図５】重複伸長ＰＣＲ　ＣＤＲを取り除き，重複ＰＣＲによって独特の制限部位に置換した。フォワードプライマーＨ１，Ｈ２，Ｈ３，Ｌ１，Ｌ２，及びＬ３（表２）を，重鎖及び軽鎖の各々の可変領域内のＣＤＲ１，２，３を置換するように設計した。中央に配置された各プライマーは，取り除かれ（緑色部分）１０～２０ｂｐの野生型配列の横に配置するようにＣＤＲ配列を欠く選択された独特の酵素認識配列を含んでいた。フォワードプライマーを，野生型コンストラクトｐＯｒｉｇＨＩＢ及びｐＯｒｉｇＬＩＢの各々の内部のヒト重・軽定常領域にアニールする，一般的なリバースプライマーｈｕＨｅＣｌｏｎＲ又はｈｕＬｉＣｌｏｎＲ（表２）とともにＰＣＲの第一段階において使用した。生成されたフラグメントは，野生型ＣＤＲ配列（赤色部分）を含んでいないが，制限部位と効果的に交換される。可変重・軽領域全体を増幅するために，ＰＣＲの第二段階は，単一のプラスミド内のＣＭＶプロモーターにアニールする一般的なＣＭＶフォワードプライマーとともにリバースプライマーとして第一段階から生成されるＰＣＲ生成物を用いることが要求される。第二段階のＰＣＲ生成物を，ｐｃｒ２．１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にサブクローニングし，配列確認後，Ｈ１，Ｈ２，Ｈ３，Ｌ１，Ｌ２，Ｌ３バージョンを単独，組み合わせて及び一緒に含む重／軽（ＶＨ及びＶＬ）可変領域を，単一のコンストラクトｐＯｒｉｇＨＩＢ及びｐＯｒｉｇＬＩＢに挿入し，野生型領域をＨｉｎｄＩＩＩ／Ａｆｅｌ及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩそれぞれを用いて交換した。

【００７３】

【図６Ａ】ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ重鎖可変領域の配列　ＣＤＲが対応する酵素部位Ｈ１，Ｈ２，Ｈ３（単独，組み合わせて及び一緒に）で置換された重可変領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。独特の制限酵素部位が強調されている。ＣＤＲ１，２，３を，それぞれ，ＦｓｐＩ，ＭｓｃＩ，ＳｒｆＩと置換した。

【図６Ｂ】続き

【図６Ｃ】続き
【００７４】
【図７Ａ】ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙカッパ鎖可変領域の配列　ＣＤＲが対応する酵素部位Ｌ１，Ｌ２，Ｌ３（単独，組み合わせて及び一緒に）で置換された重可変領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。独特の制限酵素部位が強調されている。ＣＤＲ１，２，３を，それぞれ，ＥｃｏＲＶ，ＳｓｐＩ，ＨｐａＩと置換した。
【図７Ｂ】続き
【図７Ｃ】続き
【００７５】
【図８】二重発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇの特徴を示す図　すべてのエピトープが単一ベクター内の可変重部位及び可変軽部位に組み込まれると，それらは，各々ヒト定常領域のフレームの強調されたＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩを用いて二重発現に導入される。重鎖のＦｃ領域は，ＣＨ１，ＣＨ２，ＣＨ３領域及びヒンジ領域からなる。哺乳類細胞における重鎖及び軽鎖の両方の高レベルの発現は，ヒトサイトメガロウイルス前初期プロモーターから排除される。ＢＧＨポリアデニル化は，ｍＲＮＡ安定性と有効な終止を確保するために，両鎖の下流に信号を送る。ＥＭ７は，大腸菌における抗生物質選択を可能にするｚｅｏｃｉｎ耐性遺伝子の発現を制御する細菌プロモーターであり，一方，該耐性遺伝子のＳＶ４０早期プロモーター上流は，哺乳類細胞における選択を可能にする。ＳＶ４０ポリアデニル化は，ｚｅｏ「ｍＲＮＡの３’末端の適切な処理を管理するために該耐性遺伝子の下流に信号を送る。ベクターはまた，そのバックボーンの内部に，細菌における増殖のためのＣｏｌＥ１複製起点を含む。
【００７６】
【図９】ＦＣ領域の合成を防止するストップコンドンを含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙＩＢ１５重鎖の配列　キメラ重鎖ｐＤＣＯｒｉｇ　ＩＢ１５　ＣＨ１ストップのヌクレオチド及びアミノ酸配列。ストップコンドンは，アスタリスクで描かれるヒトＩｇＧ１　Ｆｃ定常領域のＣＨ１の後に部位特異的な突然変異生成により挿入される。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ１のＧＰ１００２１０Ｍエピトープ（ＴＩＭＤＱＶＰＦＳＶ）及びＨ２のＴＲＰ２エピトープ（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ）を表す。単一のコンストラクトからの可変重領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位が強調されている。
【００７７】
【図１０】リーダーを有さないＤＣＩＢ１５重可変領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列　リーダーは，重可変（V_H）領域を効果的に再増幅するヒトＩｇＧ１　ＣＨ１領域に結合するリバースプライマーｈｕＨｅＣｌｏｎＲ（表２）とともにフォワードプライマーｐＯｒｉｇ重非リーダーを用いてＰＣＲにより取り除かれた。配列確認後，リーダーを除くV_H領域を，ヒトＩｇＧ１定常領域のフレームのＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩを用いて二重発現コンストラクトＤＣＩＢ１５にクローニングした。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ１のＧＰ１００２１０Ｍエピトープ（ＴＩＭＤＱＶＰＦＳＶ）及びＨ２のＴＲＰ２エピトープ（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ）を表す。可変重領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位が強調されている。
【００７８】
【図１１】リーダーを有さないＤＣＩＢ１５カッパ可変領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列　リーダーを，軽可変（V_L）領域を効果的に再増幅するリバースプライマーｈｕＬｉＣｌｏｎＲ（表２）とともにフォワードプライマーｐＯｒｉｇ軽非リーダーを用いてＰＣＲにより取り除いた。配列確認後，リーダーを除くV_L領域を，ヒトカッパ定常領域のフレームのＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩを用いて二重発現コンストラクトＤＣＩＢ１５にクローニングした。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ）を表す。可変軽領域の移転に利用されるＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。
【００７９】
【図１２】ヒトＩｇＧ２定常領域の配列　増幅された重ヒトＩｇＧ２定常領域のヌクレオ

チド及びアミノ酸配列。二重発現ベクターＤＣＩＢ１５のｈｕｉｇＧ１定常領域の移転及び置換に利用されるＡｆｅＩ及びＳａｐＩ制限部位が強調されている。

【００８０】

【図１３】ヒトｉｇＧ３定常領域の配列　増幅される重ヒトｉｇＧ２定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。二重発現ベクターＤＣＩＢ１５のｈｕｉｇＧ１定常領域の移転及び置換に利用されるＡｆｅＩ及びＳａｐＩ制限部位が強調されている。

【００８１】

【図１４】ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ二重発現ベクターのヒトアイソタイプ　図Ａは，二重発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇＩＢ１５　ｈｕｉｇＧ２を示す。図Ｂは，二重発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇＩＢ１５　ｈｕｉｇＧ３を示す。可変重領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【００８２】

【図１５】Ｇ２モチーフを含むＤＣＩＢ６６重鎖の配列　キメラ重鎖のヌクレオチド及びアミノ酸配列。高アフィニティＦｃγＲ１（ＣＤ６４）との相互作用のための臨界結合モチーフ内のアミノ酸Ｅ２３３　Ｌ２３４　Ｌ２３５は，ヒトＩｇＧ２からのＰ２３３　Ｖ２３４　Ａ２３５（ボックス内にボールドで強調）で置換されている。ボックス内の他のアミノ酸は，Ｈ１のＧＰ１００２１０Ｍエピトープ（ＴＩＭＤＱＶＰＦＳＶ）及びＨ２のＴＲＰ２エピトープ（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ）を表す。ｐＤＣＯｒｉｇＩＢ１５　ｈｕｉｇＧ１への置換を含む部分の移転に利用されるＡｇｅＩ／ＡｈｄＩ部位が強調されている。可変重領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位はボールドで示されている。

【００８３】

【図１６】Ｇ１結合モチーフを含むＤＣＩＢ６７重鎖の配列　キメラ重鎖のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ヒトＩｇＧ２定常領域内のアミノ酸Ｐ２３３　Ｖ２３４　Ａ２３５は，ヒトｉｇＧ１からの高アフィニティＦｃγＲ１（ＣＤ６４）Ｅ２３３　Ｌ２３４　Ｌ２３５　Ｇ２３６（ボックス内にボールドで強調）との相互作用のための臨界結合モチーフで置換されている。ボックス内の他のアミノ酸は，Ｈ１のＧＰ１００２１０Ｍエピトープ（ＴＩＭＤＱＶＰＦＳＶ）及びＨ２のＴＲＰ２エピトープ（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ）を表す。ｐＤＣＯｒｉｇＩＢ１５　ｈｕｉｇＧ２への置換を含む部分の移転に利用されるＡｇｅＩ／ＡｈｄＩ部位が強調されている。可変重領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位はボールドで示されている。

【００８４】

【図１７】マウスＩｇＧ２ａＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ発現ベクター　図Ａは，一本鎖ｐＭｏＯｒｉｇＨＩＢベクターを示す。図Ｂは，Ｈ１のＧＰ１００２１０Ｍエピトープ（ＴＩＭＤＱＶＰＦＳＶ），Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ），及びＬ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ）を含む二重発現ベクターＤＣＩＢ５３を示す。図Ｃは，Ｈ１のＨＬＡ－ＤＲ７制限ｇｐ１００　ＣＤ４エピトープ（ＧＴＧＲＡＭＬＧＴＨＴＭＥＶＴＶＹＨ），Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ），及びＨ３のＨＬＡ－ＤＲ４制限ｇｐ１００　ＣＤ４エピトープ（ＷＮＲＱＬＹＰＥＷＴＥＡＱＲＬＤ）を含む二重発現ベクターＤＣＩＢ６３を示す。利用される制限部位が示されている。

【００８５】

【図１８】規制準拠プラスミドｐＶＡＸＤＣＩＢ５４の構造を示す概略図　重一本鎖ベクターｐＶａｘＩＢ５４　ＨＩＢ（図Ａ）は，Ｎｒｕｌを用いて線形化された。ｐＯｒｉｇＬＩＢからの軽鎖発現カセット（図Ｂ）は，Ｎｒｕｌ及びＨｐａｌを用いて摘出され，線形化されたプラスミドにクローン化され，二重発現ベクターｐＶａｘＤＣＩＢ５４（図Ｃ）を生成した。可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【００８６】

【図１９】ＤＣＩＢ１５の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローン化された重・

軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ１のＧＰ１００２１０Ｍエピトープ（ＴＩＭＤＱＶＰＦＳＶ），Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ），及びＬ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【００８７】

【図２０Ａ】低レベルの無傷タンパク質を生成するＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトＡ：ｇｐ１００／Ｈ１，ＴＲＰ２／Ｈ２，及びＨｅｐＢ　ＣＤ４／Ｌ１（ＤＣＩＢ１５）を含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙを導入されたＣＨＯ－Ｓ細胞の上清からのサンドウィッチＥｌｉｓａによるｉｍｍｕｎｏＢｏｄｙ重鎖のレベルの定量化。上清は，そのまま使用し，培地で１／３，１／１０，及び１／３０に希釈し，ヒトＩｇＧ陽性対照と比較した。Ｂ：陽性対照と比較したサンドウィッチＥｌｉｓａによるｇｐ１００／Ｈ１，ＴＲＰ２／Ｈ２，及びＨｅｐＢ　ｈｅｌｐ／Ｌ１（ＤＣＩＢ１５）を含む精製ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙの分析　Ｃ及びＤ：サンドウィッチＥｌｉｓａによるＣＨＯ－Ｓトランスフェクションの上清からの重鎖及び無傷ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙの発現の測定。プレートを抗ヒトＦｃ特異抗体でコーティングした。重鎖を検出するために，抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ特異ＨＲＰ抗体を使用し，無傷ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙを検出するために，抗ヒトカッパ鎖特異ＨＲＰ抗体を使用した。　Ｅ：サンドウィッチＥｌｉｓａによるＣＨＯ－Ｓトランスフェクション（ＤＣＩＢ１５，ＤＣＩＢ３１，ＤＣＩＢ３２，ＤＣＩＢ３６，ＤＣＩＢ４８，ＤＣＩＢ４９，ＤＣＩＢ５２，ＤＣＩＢ５４）の上清からの重鎖，軽鎖，及び無傷ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙの測定。プレートを抗ヒトＦｃ特異抗体又は抗ヒトカッパ鎖抗体でコーティングした。重鎖を検出するために，抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ特異ＨＲＰ抗体を抗ヒトＦｃ特異コーティング抗体と組み合わせて使用した。無傷ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙを検出するために，抗ヒトカッパ鎖特異ＨＲＰ抗体を抗ヒトＦｃ特異コーティング抗体と組み合わせて使用した。軽鎖を検出するために，抗ヒトカッパ鎖特異ＨＲＰ抗体を抗ヒトカッパ鎖特異抗体を組み合わせて使用した。

【図２０Ｂ】続き

【００８８】

【図２１】ＤＣＩＢ２４の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローニングした重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ２のオボアルブミンエピトープ（ＳＩＩＮＦＥＫＬ），及びＬ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【００８９】

【図２２】ＤＣＩＢ２５の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローニングした重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ１のＧＰ１００２１０Ｍエピトープ（ＴＩＭＤＱＶＰＦＳＶ），Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ），及びＬ３のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【００９０】

【図２３】ＤＣＩＢ３１の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローン化された重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ３のＴＲＰ２エピトープ（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【００９１】

【図２４】ＤＣＩＢ３２の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローニングした重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ３のＴＲＰ２エピトープ（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ）及びＬ３のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープを示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【００９２】

【図２５】ＤＣＩＢ３６の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローニングした重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｌ３のＴＲＰ２エピトープ（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【００９３】

【図２６】ＤＣＩＢ３４９の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローニングした重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ）及びＨ３のＨＬＡ－ＤＲ４制限ｇｐ１００　ＣＤ４エピトープ（ＷＢＲＱＬＹＰＥＷＴＥＡＱＲＬＤ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【００９４】

【図２７】ＤＣＩＢ５２の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローン化された重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ３のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【００９５】

【図２８】ＤＣＩＢ５４の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローニングした重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ）及びＨ３のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【００９６】

【図２９】ＤＣＩＢ３６の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローニングした重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ１のＨＬＡ－ＤＲ７制限ｇｐ１００　ＣＤ４エピトープ（ＧＴＧＲＡＭＬＧＴＨＴＭＥＶＴＶＹＨ），Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ），及びＨ３のＨＬＡ－ＤＲ４制限ｇｐ１００　ＣＤ４エピトープ（ＷＮＲＱＬＹＰＥＷＴＥＡＱＲＬＤ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【００９７】

【図３０】ＤＣＩＢ１８の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローニングした重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ）及びＬ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【００９８】
【図３１Ａ】ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙフレームワークに取り込まれるＣＴＬエピトープは，処理され，発現され，インビボで免疫反応を引き起こす。　Ａ：Ｃ５７ＢＩ／６マウスに０日目，７日目，１４日目にＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ及びＣＤＲ　Ｌ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープを含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクト（ＤＣＩＢ１８）で免疫した。１９日目に，ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，ＩＦＮγ脾細胞を，ＴＲＰ２ペプチド，ＨｅｐＢヘルパーペプチド，及び培地制御に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｂ：ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにおけるペプチド濃度の増加に対する反応を測定することによって，免疫マウスからの脾細胞のＴＲＰ２エピトープに対する活性を分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定し，５０％の最大エフェクター機能を与える濃度として活性を与えた。　Ｃ：免疫マウスからの脾細胞からＣＤ８　Ｔ細胞を枯渇させ，ＴＲＰ２ペプチド，ＨｅｐＢヘルパーペプチド，及び培地制御に対してＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにおけるエピトープ特異反応の有無を分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｄ：インビトロＴＲＰ２ペプチド刺激の６日後のＢ１６Ｆ１０，Ｂ１６Ｆ１０　ＩＦＮα，及びＢ１６Ｆ１０　ｓｉＫｂメラノーマ細胞（株）に対する４時間におよぶ^{51}Ｃｒ放出アッセイにおける免疫マウスからの脾細胞の細胞毒性　Ｅ：Ｃ５７ＢＩ／６又はＨＬＡ－ＤＲ４トランスジェニックマウスに０日目，７日目，１４日目にＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡ（ＤＣＩＢ１５，ＤＣＩＢ３１，ＤＣＩＢ３２，ＤＣＩＢ３６，ＤＣＩＢ４８，ＤＣＩＢ５２，及びＤＣＩＢ５４）で免疫した。１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，ＴＲＰ２ペプチド及び培地制御に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｆ：ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにおけるペプチド濃度の増加に対する反応を測定することによって，免疫マウスからの脾細胞のＴＲＰ２エピトープに対する活性を分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定し，５０％の最大エフェクター機能を与える濃度として活性を与えた。　Ｇ：Ｃ５７ＢＩ／６又はＨＬＡ－ＤＲ４マウスに０日目，７日目，１４日目にＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡ（ＤＣＩＢ１５，ＤＣＩＢ４８，ＤＣＩＢ４９，ＤＣＩＢ５２，及びＤＣＩＢ５４）で免疫した。１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，ＨｅｐＢヘルパーペプチド（ＤＣＩＢ１５，ＤＣＩＢ４９，及びＤＣＩＢ５２）又はｇｐ１００　ＤＲ４ヘルパーペプチド（ＤＣＩＢ４８及びＤＣＩＢ５４），及び培地制御に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。
【図３１Ｂ】続き
【００９９】
【図３２Ａ】ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡ免疫は，ペプチド免疫又は全抗原による免疫よりもよい。　Ａ：ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙＤＮＡ免疫（ＤＣＩＢ１８）を，フロイント不完全アジュバントのペプチドエピトープによるＳＣ免疫又はＴＲＰ２抗原を発現するＤＮＡによる免疫と比較した。Ｃ５７ＢＩ／６マウスに０日目，７日目，１４日目に免疫し，１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，ＴＲＰ２ペプチド（■），ＨｅｐＢヘルパーペプチド（■（薄灰色）），及び培地制御（□）に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｂ：ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにおけるペプチド濃度の増加に対する反応を測定することによって，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡ（◇）及びペプチド（◆）免疫マウスからの脾細胞のＴＲＰ２エピトープに対する活性を分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定し，５０％の最大エフェクター機能を与える濃度として活性を与えた。　Ｃ：インビトロＴＲＰ２ペプチド刺激の６日後のＢ１６Ｆ１０（■），Ｂ１６Ｆ１０　ＩＦＮα（■（薄灰色）），及びＢ１６Ｆ１０　ｓｉＫｂ（□）メラノーマ細胞株に対する４時間におよぶ^{51}Ｃｒ放出アッセイにおける免疫マウスからの脾細胞の細胞毒性　Ｄ：ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡ免疫（ＤＣＩＢ１８）を，ＴＲＰ２ペプチドパルスＤＣによる免疫と比較した。Ｃ５７ＢＩ／６マウスに０日目，７日目，１４日目に免疫し，１９日目に

，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，滴定量のＴＲＰ２ペプチドに対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定し，５０％の最大エフェクター機能を与える濃度として活性を与えた。　Ｅ：ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡ免疫（ＤＣＩＢ１８）を，ＴＲＰ２ペプチドパルスＤＣによる免疫と比較した。Ｃ５７ＢＩ／６マウスに０日目，７日目，１４日目に免疫し，１９日目に，脾細胞を，ＴＲＰ２ペプチドパルスＬＰＳ　Ｂｂｌａｓｔによりインビトロで刺激した。刺激の６日後，クロム遊離アッセイにより，ＣＴＬ株のＢ１６Ｆ１０又はＢ１６Ｆ１０　ｓｉＫｂメラノーマ株を溶解させる能力を評価した。反応は，％細胞毒性として測定した。　Ｆ：ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡ免疫（ＤＣＩＢ２４）を，ＳＩＩＦＥＫＬペプチドによる免疫と比較した。Ｃ５７ＢＩ／６マウスに０日目，７日目，１４日目に免疫し，１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，ＳＩＩＮＦＥＫＬペプチド及び培地制御に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｇ：ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡ免疫（ＤＣＩＢ１５）を，ｇｐ１００　２１０Ｍペプチドによる免疫と比較した。ＨＨＤＩＩマウスに０日目，７日目，１４日目に免疫し，１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，滴定量のｇｐ１００　２１０Ｍペプチド及び培地制御に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｈ：ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡ免疫（ＤＣＩＢ２４）を，ＳＩＩＦＥＫＬペプチドによる免疫と比較した。Ｃ５７ＢＩ／６マウスに０日目，７日目，１４日目に免疫し，１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，滴定量のＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドに対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定し，５０％の最大エフェクター機能を与える濃度として活性を与えた。　Ｉ：ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡ免疫（ＤＣＩＢ１５）を，ｇｐ１００　２１０Ｍペプチドによる免疫と比較した。ＨＨＤＩＩマウスに０日目，７日目，１４日目に免疫し，１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，滴定量のｇｐ１００　２１０Ｍペプチドに対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定し，５０％の最大エフェクター機能を与える濃度として活性を与えた。

【図３２Ｂ】続き

【図３２Ｃ】続き

【０１００】

【図３３】ＤＣＩＢ２１の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローニングした重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ２のＨｅｐＢ　Ｓ　Ａｇエピトープ（ＩＰＱＳＬＤＳＷＷＴＳＬ）及びＬ１のＩ－Ａｄ制限Ｆｌｕ　ＨＡ　ＣＤ４エピトープ（ＦＥＲＦＥＩＦＰＫＥ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【０１０１】

【図３４】複数のエピトープは，ＣＤＲ　Ｈ２部位から処理されうる。　Ａ：Ｃ５７ＢＩ／６マウスに０日目，７日目，１４日目にＣＤＲ　Ｈ２のＳＩＩＮＦＥＫＬエピトープ及びＣＤＲ　Ｌ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープを含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクト（ＤＣＩＢ２４）で免疫した。１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，ＳＩＩＮＦＥＫＬペプチド，無関係ペプチド，ＨｅｐＢ　ＣＤ４ペプチド，及び培地制御に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｂ：Ｂａｌｂ／ｃマウスに０日目，７日目，１４日目にＣＤＲ　Ｈ２のＨｅｐＢ　ＣＤ８エピトープ及びＣＤＲ　Ｌ１のＦｌｕ　ＨＡ　ＣＤ４エピトープを含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクト（ＤＣＩＢ２１）で免疫した。１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，ＨｅｐＢ　ＣＤ８ペプチド，無関係ペプチド，Ｆｌｕ　ＨＡ　ＣＤ４ペプチド，及び培地制御に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。

【０１０２】

【図３５】ＤＣＩＢ１７の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローニングした重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ１のＧＰ１００２１０Ｍエピトープ（ＴＩＭＤＱＶＰＦＳＶ）及びＬ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【０１０３】

【図３６】ＤＣＩＢ２６の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローニングした重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ１のＴｉｅ－２　Ｚ８４エピトープ（ＦＬＰＡＴＬＴＭＶ）及びＬ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【０１０４】

【図３７】複数のＣＴＬエピトープは，可変領域から処理されうる。　Ａ：ＨＨＤＩＩマウスに０日目，７日目，１４日目にＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００　ＩＭＤＱＶＰＦＳＶエピトープ（フレームワーク部分を除く。）及びＣＤＲ　Ｌ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープを含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクト（ＤＣＩＢ１７）で免疫した。１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，ｇｐ１００　ＩＭＤＱＶＰＦＳＶペプチド，ＨｅｐＢ　ＣＤ４ペプチド，及び培地制御に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｂ：ＨＨＤＩＩマウスに０日目，７日目，１４日目にＣＤＲ　Ｈ１のＴｉｅ２エピトープ（フレームワーク部分を除く。）及びＣＤＲ　Ｌ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープを含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクト（ＤＣＩＢ２６）で免疫した。１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，Ｔｉｅ２ペプチド，ＨｅｐＢ　ＣＤ４ペプチド，及び培地制御に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。

【０１０５】

【図３８】複数のＣＴＬ反応は，同じＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクト内の異なるエピトープから生成されうる。　Ａ：ＨＨＤＩＩマウスに０日目，７日目，１４日目にＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙＤＮＡで免疫した。１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，ｇｐ１００ペプチド，ＴＲＰ２ペプチド，ＨｅｐＢヘルパーペプチド，及び培地制御に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｂ：ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにおけるペプチド濃度の増加に対する反応を測定することによって，免疫マウスからの脾細胞のｇｐ１００修飾ＩＭＤＱＶＰＦＳＶ（◆）エピトープ，ｇｐ１００　ｗｔ　ＩＴＤＱＶＰＦＳＶエピトープ（▲），及びＴＲＰ２ペプチド（■）ＴＲＰ２エピトープに対する活性を分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定し，５０％の最大エフェクター機能を与える濃度として活性を与えた。　Ｃ：ｇｐ１００　ＩＭＤＱＶＰＦＳＶペプチドでパルスされたＴ２細胞，ＴＲＰ２ペプチド又は対照，並びに，Ｂ１６Ｆ１０及びＢ１６Ｆ１０　ＨＨＤメラノーマ細胞株に対する４時間に及ぶ^{51}Ｃｒ放出アッセイにおける免疫マウスからの脾細胞の細胞毒性　Ｄ：ＨＨＤＩＩマウスに０日目，７日目，１４日目に，ｉ）ＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００エピトープ，ＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ，及びＣＤＲ　Ｌ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＤＣＩＢ１５），又は，ｉｉ）ＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ及びＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＤＣＩＢ１８），を含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡで免疫した。１９日目に，ＩＦＮγｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，ｇｐ１００ペプチド（■），ＴＲＰ２ペプチド（■（濃灰色）），ＨｅｐＢヘルパーペプチド（■（薄灰色）），及び培地制御（□）に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｅ：Ｃ５７ＢＩ／６マウスに，１０μｇのＤＮＡ溶液をエレクトロポレーションを併用して筋肉内免疫した。免疫は，頸骨筋に週間隔で３回行った。ＤＣＩＢ２４又はＤＣＩＢ１８単体で，両者を混合して同じ部位に，又は両者を同

時ではあるが別々の部位に，マウスに免疫した。１９日目に，ＴＲＰ２，ＳＩＩＮＦＥＫＬペプチド特異的免疫反応の有無に関し脾細胞を分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。

【０１０６】

【図３９】ＤＣＩＢ３７の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローニングした重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ１のＧＰ１００　Ｆ７Ｌエピトープ（ＴＩＴＤＱＶＰＬＳＶ）及びＬ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【０１０７】

【図４０】ＤＣＩＢ４０の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローニングした重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ１のＧＰ１００　Ｆ７Ｉエピトープ（ＴＩＴＤＱＶＰＩＳＶ）及びＬ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【０１０８】

【図４１】ＤＣＩＢ４１の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローニングした重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ１のＧＰ１００野生型エピトープ（ＴＩＴＤＱＶＰＦＳＶ）及びＬ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【０１０９】

【図４２】ＤＣＩＢ４２の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローニングした重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ１のＧＰ１００　Ｆ７Ｙエピトープ（ＴＩＴＤＱＶＰＹＳＶ）及びＬ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【０１１０】

【図４３】ＤＣＩＢ４３の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローニングした重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ１のＧＰ１００　Ｖ５Ｌエピトープ（ＴＩＴＤＱＬＰＦＳＶ）及びＬ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【０１１１】

【図４４】非係留性残基における改変はエピトープ免疫原性を強化しうる。　ＨＨＤＩＩマウスに０日目，７日目，１４日目にＣＤＲ　Ｈ１領域の改変ｇｐ１００エピトープＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクト（ＤＣＩＢ３７，ＤＣＩＢ４０，ＤＣＩＢ４１，ＤＣＩＢ４２，及びＤＣＩＢ４３）で免疫した。１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，ｇｐ１００野生型ペプチド及び培地制御に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。

【０１１２】

【図４５】ＤＣＩＢ３５の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローニングした重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ１のＧＰ１００２１０Ｍエピトープ（ＴＩＭＤＱＶＰＦＳＶ），Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ），及びＬ１のＨＬＡ－

ＤＲ４制限ｇｐ１００　ＣＤ４エピトープ（ＷＮＲＱＬＹＰＥＷＴＥＡＱＲＬＤ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【０１１３】

【図４６】複数のＣＤ４ヘルパー反応は，インビボで免疫反応を引き起こすように処理及び提供されうる。　Ａ：ＨＨＤＩＩ又はＣ５７ＢＩ／６マウスに０日目，７日目，１４日目にＣＤＲ　Ｌ１領域のＩ－Ａｂ制限ＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープを含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクト（ＤＣＩＢ１５）で免疫した。　Ｂ：Ｂａｌｂ／ｃマウスに０日目，７日目，１４日目にＣＤＲ　Ｌ１領域のＩ－Ａｂ制限Ｆｌｕ　ＨＡ　ＣＤ４エピトープを含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクト（ＤＣＩＢ２１）で免疫した。　Ｃ：ＨＬＡ－ＤＲ４トランスジェニックマウスに０日目，７日目，１４日目にＣＤＲ　Ｌ１のＨＬＡ－ＤＲ４制限ｇｐ１００　ＣＤ４エピトープを含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクト（ＤＣＩＢ３５）で免疫した。１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，対応ペプチド，無関係ペプチド，及び培地制御に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｄ：ＨＬＡ－ＤＲ４トランスジェニックマウスに０日目，７日目，１４日目にＣＤＲ　Ｌ１，ＣＤＲ　Ｈ３（ＤＣＩＢ５４），及びＣＤＲ　Ｌ３（ＤＣＩＢ５０）のＨＬＡ－ＤＲ４制限ｇｐ１００　ＣＤ４エピトープを含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトで免疫した。１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，対応ペプチド，無関係ペプチド，及び培地制御に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。

【０１１４】

【図４７】ＤＣＩＢ５０の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローニングした重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ１のＧＰ１００２１０Ｍエピトープ（ＴＩＭＤＱＶＰＦＳＶ），Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ），及びＬ３のＨＬＡ－ＤＲ４制限ｇｐ１００　ＣＤ４エピトープ（ＷＮＲＱＬＹＰＥＷＴＥＡＱＲＬＤ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【０１１５】

【図４８】ＣＤ８　Ｔ細胞反応は，分泌重鎖に部分的に依存するが，ヘルパー反応は，分泌軽鎖を必要としない。　Ａ：ＨＨＤＩＩマウスに，０日目，７日目，１４日目に，ｉ）ＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００エピトープ，ＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ，及びＣＤＲ　Ｌ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＤＣＩＢ１５），ｉｉ）ＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００エピトープ，ＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ，及びＣＤＲ　Ｌ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（重鎖上にリーダー配列なし），ｉｉｉ）ＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００エピトープ，ＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ，及びＣＤＲ　Ｌ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（軽鎖上にリーダー配列なし），を含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡで免疫した。１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，ｇｐ１００（■）及びＨｅｐＢ　ＣＤ４（■（薄灰色）），及び培地制御（□）に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｂ：サンドウィッチＥｌｉｓａによるＣＨＯ－Ｓトランスフェクションの上清からの重鎖，軽鎖，及び無傷ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙの測定。プレートを抗ヒトＦｃ特異抗体又は抗ヒトカッパ鎖抗体でコーティングした。重鎖を検出するために，抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ特異ＨＲＰ抗体を抗ヒトＦｃ特異コーティング抗体と組み合わせて使用した。無傷ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙを検出するために，抗ヒトカッパ鎖特異ＨＲＰ抗体を抗ヒトＦｃ特異コーティング抗体と組み合わせて使用した。軽鎖を検出するために，抗ヒトカッパ鎖特異ＨＲＰ抗体を抗ヒトカッパ鎖特異抗体を組み合わせて使用した。　Ｃ：Ｃ５７ＢＩ／６マウスに，０日目，７日目，１４日目に，ｉ）ＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００エピトープ，ＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ，及びＣＤＲ　Ｌ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＤＣＩＢ１５），ｉｉ）ＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００エピトープ，ＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ，及びＣＤＲ　Ｌ１のＨｅｐＢ　ＣＤ

４エピトープ（重鎖上にリーダー配列なし，を含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙＤＮＡで免疫した。１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，ＴＲＰ２ペプチドに対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｄ：Ｃ５７ＢＩ／６マウスに，０日目，７日目，１４日目に，ｉ）ＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００エピトープ，ＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ，及びＣＤＲ　Ｌ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＤＣＩＢ１５），ｉｉ）ＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００エピトープ，ＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ，及びＣＤＲ　Ｌ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（重鎖上にリーダー配列なし，を含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙＤＮＡで免疫した。１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，ＨｅｐＢヘルパーペプチドに対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。

【０１１６】

【図４９Ａ】ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　Ｆｃ領域は，効果的な免疫反応を確立するのに有用である。　Ａ：Ｃ５７ＢＩ／６マウスに，０日目，７日目，１４日目に，ｉ）ＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００エピトープ，ＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ，及びＣＤＲ　Ｌ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＤＣＩＢ１５），ｉｉ）ＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００エピトープ，ＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ，及びＣＤＲ　Ｌ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（Ｆｃ領域なし），を含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡで免疫した。１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，ＴＲＰ２（■（濃灰色）），培地制御（□），Ｂ１６Ｆ１０メラノーマ株（■），及びＢ１６Ｆ１０ｓｉＫｂ陰性対照細胞株（■（薄灰色））に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｂ：Ｃ５７ＢＩ／６マウスに，０日目，７日目，１４日目に，ｉ）ＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００エピトープ，ＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ，及びＣＤＲ　Ｌ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＤＣＩＢ１５），ｉｉ）ＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００エピトープ，ＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ，及びＣＤＲ　Ｌ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（Ｆｃ領域なし），を含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡで免疫した。１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，ＴＲＰ２ペプチドに対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｃ：同じマウスを，ＨｅｐＢヘルパーペプチドに特異的な反応に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｄ：ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにおけるペプチド濃度の増加に対する反応を測定することによって，ＤＣＩＢ１５又はＦｃ領域を有さないＤＣＩＢ１５（ＤＣＩＢ１５　ＦｃＳｔｏｐ）での免疫マウスからの脾細胞のＴＲＰ２エピトープに対する活性を分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定し，５０％の最大エフェクター機能を与える濃度として活性を与えた。　Ｅ：Ｃ５７ＢＩ／６マウスに，０日目，７日目，１４日目に，ｉ）ＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００エピトープ，ＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ，及びＣＤＲ　Ｌ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＤＣＩＢ１５），ｉｉ）ヒトＩｇＧ２定常領域を有する同じコンストラクト（ＤＣＩＢ３３），ｉｉｉ）ヒトＩｇＧ３定常領域を有する同じコンストラクト（ＤＣＩＢ６５），ｉｖ）ヒトＩｇＧ２からの結合モチーフと置換されたヒトＩｇＧ１結合モチーフを有する同じコンストラクト（ＤＣＩＢ６６），及びｖ）ヒトＩｇＧ１（ＤＣＩＢ６７）からのモチーフに置換された結合モチーフを有するＤＣＩＢ３３，を含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡコンストラクトで免疫した。１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，ＴＲＰ２ペプチド（■），培地制御（□），及びＨｅｐＢヘルパーペプチド（■（薄灰色））に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｆ：サンドウィッチＥｌｉｓａによるＣＨＯ－Ｓトランスフェクション（ＤＣＩＢ１５，ＤＣＩＢ３３，ＤＣＩＢ６５，ＤＣＩＢ６６，及びＤＣＩＢ６７）の上清からの重鎖，軽鎖，及び無傷ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙの測定。プレートを抗ヒトＦｃ特異抗体又は抗ヒトカッパ鎖抗体でコーティングした。重鎖を検出するために，抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ特異ＨＲＰ抗体を抗ヒトＦｃ特異コーティング抗体と組み合わせて使用した。無傷ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙを検出するために，抗ヒトカッパ鎖特異ＨＲＰ抗体を抗ヒトＦｃ特異コーティング抗体と組み合わせて使用した。軽鎖を検出するために，抗ヒトカッ

パ鎖特異ＨＲＰ抗体を抗ヒトカッパ鎖特異抗体を組み合わせて使用した。　Ｇ：サンドウィッチＥｌｉｓａによるＤＣＩＢ５３を導入されたＣＨＯ－Ｓトランスフェクションの上清からの重鎖ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙの測定。プレートを抗マウスＦｃ特異抗体でコーティングした。重鎖を検出するために，抗マウスＩｇＧ２ａ特異ＨＲＰ抗体を使用した。

【図４９Ｂ】続き

【０１１７】

【図５０Ａ】ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ免疫は，免疫反応を強化し，全抗原から観察される制御を克服する。　Ａ：ＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックマウス（ＨＨＤＩＩ）に，０日目，７日目，１４日目に，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡコンストラクトＤＣＩＢ１５又はｐｃＤＮＡ３ベクターの全ｇｐ１００抗原で免疫した。１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，ｇｐ１００ペプチド又は対照に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｂ：抗ＣＤ２５抗体（ＰＣ６１）４００μｇを腹腔内に注入することにより，Ｃ５７ＢＩ／６マウスからＣＤ２５陽性細胞を枯渇させた。続いて，ＣＤ２５枯渇マウス及び非枯渇動物の両方に，４日目，１１日目，１８日目に，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡコンストラクトＤＣＩＢ１５又はｐＯｒｉｇベクターの全ＴＲＰ２抗原で免疫した。２３日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，ＴＲＰ２ペプチド又は対照に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｃ及びＤ：ＨＨＤＩＩマウスを，未処理（ｃ），又は，４００μｇのＰＣ６１ｍＡｂを腹腔内投与にて処理した（ｄ）。４日後，全てのマウスにＴｉｅ２　Ｃ２００ＨＦｃ　ＤＮＡコンストラクトで免疫した。ＤＮＡ免疫を７日間隔で計３回繰り返した。最後の免疫の６日後，脾細胞を採取し，インビトロＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイにより，１μｇ／ｍｌのＴｉｅ－２からの各予測ＣＴＬエピトープで再び刺激した。バーは，背景制御に正規化された個々のマウスの三重値の平均を示し，エラーバーは，平均からの標準偏差を示す。　Ｅ及びＦ：ＨＨＤＩＩマウスを，未処理（ｅ）（ｎ＝３），又は，４００μｇのＰＣ６１抗体を腹腔内投与にて処理した（ｆ）（ｎ＝２）。４日後，全てのマウスに１００μｇのＺ１２ペプチド及び１００μｇのＺ４８ペプチドをＩＦＡで１：１に混合して（皮下）免疫した。最初のペプチド免疫の７日後，反復ペプチド免疫を施した。最後の免疫の１４日後，脾細胞を採取し，インビトロＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイにより，１μｇ／ｍｌのＺ１２ペプチド（ブラックバー）又は培地単体（オープンバー）で再び刺激した。バーは，三重値の平均を示し，エラーバーは，平均からの標準偏差を示す。　Ｇ：ＨＨＤＩＩマウスに，ＩＦＡ（皮下）で１：１に混合した１００μｇのＺ１２ペプチドで免疫した。最初のペプチド免疫の７日後及び１４日後に，反復ペプチド免疫を施した。最後の免疫の７日後，脾細胞を採取し，インビトロＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，ペプチド濃度の増加に対するエピトープ特異的反応の有無を分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定し，５０％の最大エフェクター機能を与える濃度として活性を与えた。　Ｈ：ＨＨＤＩＩマウスに，０日目，７日目，１４日目に，遺伝子銃により，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡコンストラクトＤＣＩＢ７１で免疫した。最後の免疫の７日後，脾細胞を採取し，インビトロＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，ペプチド濃度の増加に対するエピトープ特異的反応の有無を分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定し，５０％の最大エフェクター機能を与える濃度として活性を与えた。

【図５０Ｂ】続き

【０１１８】

【図５１】ＤＣＩＢ７１の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローニングした重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ１のＴｉｅ－２　Ｚ１２エピトープ（ＩＬＩＮＳＬＰＬＶ）及びＬ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【０１１９】

【図５２】ＤＣＩＢ７２の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローニングした重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ２のＴｉｅ－２　Ｚ１２エピトープ（ＩＬＩＮＳＬＰＬＶ及びＬ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【０１２０】

【図５３】ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙフレームワークに取り込まれるＣＴＬエピトープは，処理され，発現され，インビボで免疫反応を引き起こす。　Ａ：Ｃ５７ＢＩ／６マウスに０日目，７日目，１４日目にＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００エピトープ又はＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ（それぞれ，ＩＢ１７及びＩＢ１８）を含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙＤＮＡコンストラクトで免疫した。１９日目に，ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，ＩＦＮγ脾細胞を，ｇｐ１００ペプチド又はＴＲＰ２ペプチド，及び対照に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｂ：ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにおけるペプチド濃度の増加に対する反応を測定することによって，ＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープを含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ重鎖での免疫マウスからの脾細胞のＴＲＰ２エピトープに対する活性を分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定し，５０％の最大エフェクター機能を与える濃度として活性を与えた。　Ｃ：Ｃ５７ＢＩ／６マウスに０日目，７日目，１４日目に，ＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００エピトープ，ＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ，及びＣＤＲ　Ｌ１ヒトＩｇＧ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４（ＤＣＩＢ１５），又は，ＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００エピトープ，ＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ，及びマウスＩｇＧ２ａ定常領域を有するＣＤＲ　Ｌ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＤＣＩＢ５３），を含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙＤＮＡコンストラクトで免疫した。１９日目に，ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，ＩＦＮγ脾細胞を，ＴＲＰ２ペプチド，ＨｅｂＢヘルパーペプチド，及び対照に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｄ：ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにおけるペプチド濃度の増加に対する反応を測定することによって，ＤＣＩＢ１５又はＤＣＩＢ５３での免疫マウスからの脾細胞のＴＲＰ２エピトープに対する活性を分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定し，５０％の最大エフェクター機能を与える濃度として活性を与えた。　Ｅ：ＨＬＡ－ＤＲ４トランスジェニックマウスに０日目，７日目，１４日目に，ＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００ＤＲ４エピトープ，ＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ，及びＣＤＲ　Ｈ３ヒトＩｇＧ１のｇｐ１００ＤＲ７（ＤＣＩＢ５４），又は，ＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００ＤＲ４エピトープ，ＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ，及びマウスＩｇＧ２ａ定常領域を有するＣＤＲ　Ｈ３のｇｐ１００ＤＲ７エピトープ（ＤＣＩＢ６４），を含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡコンストラクトで免疫した。１９日目に，ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，ＩＦＮγ脾細胞を，ＴＲＰ２ペプチド，ｇｐ１００ＤＲ４ヘルパーペプチド，及び対照に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｆ：ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにおけるペプチド濃度の増加に対する反応を測定することによって，ＤＣＩＢ５４又はＤＣＩＢ６４での免疫マウスからの脾細胞のＴＲＰ２エピトープに対する活性を分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定し，５０％の最大エフェクター機能を与える濃度として活性を与えた。

【０１２１】

【図５４Ａ】ＤＣＩＢ５３の配列　発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ　ｍｏｉｇＧ２ａ内のマウス重・軽完全長鎖のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ１のＧＰ１００２１０Ｍエピトープ（ＴＩＭＤＱＶＰＦＳＶ），Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ），及びＬ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【図５４Ｂ】続き

【０１２２】
【図５５Ａ】ＤＣＩＢ６４の配列　発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ　ｍｏｉｇＧ２ａ内のマウス重・軽完全長鎖のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ１のｇｐ１００　ＣＤ４エピトープ（ＧＴＧＲＡＭＬＧＴＨＴＭＥＶＴＶＹＨ），Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ），及びＨ３のＨＬＡ－ＤＲ４制限ｇｐ１００　ＣＤ４エピトープ（ＷＮＲＱＬＹＰＥＷＴＥＡＱＲＬＤ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。
【図５５Ｂ】続き
【０１２３】
【図５６】免疫プロテアソーム処理は，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクト内のエピトープからの反応の生成において重要である。　ＨＨＤＩＩマウスに０日目，７日目，１４日目に，ＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００$^{209-217}$エピトープ（ＤＣＩＢ４１），又は修飾型ＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００２１０Ｍエピトープ（ＤＣＩＢ１５），を含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトで免疫した。１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，ｇｐ１００$^{209-217}$ペプチド又はｇｐ１００２１０Ｍペプチド，及び対照に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。
【０１２４】
【図５７】異なる免疫方法は，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙワクチンからの免疫反応を引き起こすのに効果的である。　Ａ：Ｃ５７ＢＩ／６マウスに０日目，７日目，１４日目に，遺伝子銃により，エレクトロポレーションとともに又は伴わずに筋肉内で，又はエレクトロポレーションとともに又は伴わずに皮肉内で，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡ（ＤＣＩＢ１５）で免疫した。１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，ＴＲＰ２ペプチド，ＨｅｐＢヘルパーペプチド，及び培地制御に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。　Ｂ：ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにおけるペプチド濃度の増加に対する反応を測定することによって，異なるルートによる免疫マウスからの脾細胞のＴＲＰ２エピトープに対する活性を分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定し，５０％の最大エフェクター機能を与える濃度として活性を与えた。
【０１２５】
【図５８】ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ免疫は，白斑様色素脱失を引き起こし，腫瘍攻撃を阻止する　Ａ：ＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ及びＣＤＲ　Ｌ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープ（ＤＣＩＢ１８）を含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡによる免疫Ｃ５７ＢＩ／６マウスは，免疫部位における発毛において色素脱失を示す。　Ｂ：免疫Ｃ５７ＢＩ／６マウスを，２ｘ１０^{4}のＢ１６Ｆ１０　ＩＮＦα細胞による３回目と４回目の静脈内免疫の間に攻撃した。肺の全身腫瘍組織量を腫瘍攻撃後４９日目に評価した。全身腫瘍組織量は，全肺面積に対する平均腫瘍面積で表される。免疫マウスを，２ｘ１０^{4}のＢ１６Ｆ１０　ＩＮＦα細胞による最後の皮下免疫後７日目に攻撃した。腫瘍の大きさを３～４日間隔で測定し，腫瘍の大きさが限度を超えたらマウスを安楽死させた。　Ｃ：腫瘍注入後４６日目に評価した腫瘍の大きさ　Ｄ：生存
【０１２６】
【図５９】ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ免疫は，腫瘍の成長を著しく遅らせる。　Ａ：Ｃ５７Ｂ１６マウスに，２ｘ１０^{4}のＢ１６Ｆ１０細胞を皮下注入した。腫瘍注入後４日目に，マウスにＤＣＩＢ５２　ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡで免疫した。反復免疫を腫瘍注入後１１日目及び１８日目に施した。腫瘍の大きさを３～４日間隔で測定し，腫瘍の大きさが最大許容限度を超えたらマウスを安楽死させた。経時的な腫瘍の体積をプロットした。Ｂ：Ｃ５７Ｂ１６マウスに，２ｘ１０^{4}のＢ１６Ｆ１０　ＩＦＮα細胞を皮下注入した。腫瘍注入後１４日目に，マウスにＤＣＩＢ５２　ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡで免疫した。反復免疫を腫瘍注入後２１日目及び２８日目に施した。１１日目の免疫は，抗ＣＴＬ

Ａ－４抗体の腹腔内注入と適宜組み合わせて行った。腫瘍の大きさを３～４日間隔で測定し，腫瘍の大きさが最大許容限度を超えたらマウスを安楽死させた。腫瘍移植後４７日目における腫瘍の体積が示されている。　Ｃ：Ｃ５７Ｂ１６マウスに，２ｘ１０^{4}のＢ１６Ｆ１０細胞を皮下にて，及び抗ＣＤ２５抗体を腹腔内にて，適宜注入した。腫瘍注入後４日目に，マウスにＤＣＩＢ５２　ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡ又は対照ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡで免疫した。反復免疫を腫瘍注入後１１日目及び１８日目に施した。１１日目の免疫は，抗ＣＴＬＡ－４抗体の腹腔内注入と適宜組み合わせて行った。腫瘍の大きさを３～４日間隔で測定し，腫瘍の大きさが最大許容限度を超えたらマウスを安楽死させた。経時的な腫瘍の体積をプロットした。

【０１２７】

【図６０】ＤＣＩＢ６８の配列　ヒトＩｇＧ１　Ｆｃのフレームにクローニングした重・軽可変領域及び発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ内のカッパ定常領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列。ボックス内のアミノ酸は，Ｈ１及びＬ３のＨＬＡ－ＤＲ７制限ｇｐ１００　ＣＤ４エピトープ（ＧＴＧＲＡＭＬＧＴＨＴＭＥＶＴＶＹＨ），Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ），及びＨ３及びＬ１のＨＬＡ－ＤＲ４制限ｇｐ１００　ＣＤ４エピトープ（ＷＮＲＱＬＹＰＥＷＴＥＡＱＲＬＤ）を示す。単一のコンストラクトからの可変重・軽領域の移転に利用されるＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ制限部位及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ制限部位が強調されている。

【０１２８】

【図６１】免疫反応は，異なるベクターバックボーンから発現されたＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトから生成されうる。　Ｃ５７ＢＩ／６マウスに，０日目，７日目，１４日目に，ＣＤＲ　Ｈ１のｇｐ１００ＤＲ４エピトープ，ＣＤＲ　Ｈ２のＴＲＰ２エピトープ，及びｐＶａｘベクター（ＶａｘＤＣＩＢ５４，Ｃ１－３）の等価コンストラクトであるＣＤＲ　Ｈ３ヒトＩｇＧ１（ＤＣＩＢ５４，Ｂ１－３）のｇｐ１００ＤＲ７エピトープ，を含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡコンストラクトで免疫した。１９日目に，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイにより，脾細胞を，ＴＲＰ２ペプチド及び培地制御に対して分析した。反応は，ｓｐｏｔｓ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞として測定した。

【発明を実施するための形態】

【０１２９】

［実施例］

［方法］

ＤＮＡベクターの生成

ベクターｐＳＶｇｐｔＨｕｉｇＧ１及びｐＳＶｈｙｇＨｕＣｋ（Ｂｉｏｖａｔｉｏｎ　Ｌｔｄ）内のＳＣ１００クローンＶＨｄ　ＶＫｂ（ＷＯ０１／８８１３８）の脱免疫されたマウスの重・軽可変領域をＰＣＲによって増幅した。ＶＨ及びＶＬ領域ＰＣＲ生成物を，ＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ部位を用いてヒトＩｇＧ１及びカッパ定常領域のフレームにクローニングし，単一鎖コンストラクトｐＯｒｉｇＨＩＢ及びｐＯｒｉｇＬＩＢ（図１及び図２を参照）を生成した。完全長キメラ重鎖及びカッパ鎖の配列をジデオキシ鎖終結法によって確認した（Ｓａｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ，Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ａｃａｄｅｍｙ　ｏｆ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　ｏｆ　Ａｍｅｒｉｃａ　１９７７；７４：　５４６３－７）。キメラ重・鎖鎖のＤＮＡ及び翻訳されたタンパク質配列を，それぞれ，図３及び図４に示す。相補性決定領域（ＣＤＲ）の位置が示されている。

【０１３０】

６つのアミノ酸を保持する重ＣＤＲ２領域を除いて，重・軽鎖のＣＤＲを完全に取り除き，独特な制限酵素部位と交換した。これは，制限酵素部位の生成を可能にする除去用配列の片側の領域を入念に検討することによって達成した。これらの独特な制限部位を使用してＤＮＡを開き，抗原エピトープをコードするオリゴヌクレオチドを挿入することができる。制限部位を生成し損なったほとんどのフレームワーク配列は，エピトープにプライマーを含むことで置換され，翻訳中にアミノ酸が保持されること，及び配列がフレーム中

にとどまることを確実にする。表１は，すべてのＣＤＲの選択された酵素部位及びエピトープオリゴヌクレオチド配列を記載している。

【０１３１】

ＣＤＲ領域を取り除き，図５に示すように重複伸長ＰＣＲによって独特な制限部位を置換した。重可変領域の場合，オリゴヌクレオチドＨ１，Ｈ２，及びＨ３（表２を参照）を３つのＣＤＲの各々を置換するように設計した。各特異的プライマーは，酵素部位の両側が取り込まれる１０～２０ｂｐの配列を含む。ヒトＩｇＧ１定常領域に結合する一般的なリバースプライマーｈｕＨｅＣｌｏｎＲ（表２を参照）と併用して，一回目のＰＣＲは，１μｌの鋳型プラスミドｐＯｒｉｇＨＩＢ，２μｌのｄＮＴＰＳ（２．５ｍＭ），５μｌの１０　ｘ　ｔａｑポリメラーゼ緩衝剤，１μｌのフォワード・リバースプライマー（２５ｐｍｏｌｓ），滅菌蒸留水で最終体積が５０μｌとなるように作り上げた５ユニットのｔａｑポリメラーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）から構成した。反応は，最初の変性を９５℃で５分受け，その後，９５℃で３０秒が３５サイクル，５５℃で１分（アニーリング），７２℃で１分（伸長）と続いた。最後のサイクルは，ＴｅｃｈｎｅＰＨＣ－１プログラム可能循環反応器を用いた１０分の伸長を含んだ。同様に，軽可変領域の場合，オリゴヌクレオチドＬ１，Ｌ２，及びＬ３を３つのＣＤＲの各々を置換するように設計した（表２を参照）。一回目のＰＣＲは，ヒトカッパ鎖及び鋳型ｐＯｒｉｇＬＩＢの定常領域に結合するリバースプライマーｈｕＬｉＣｌｏｎＲ（表２を参照）を用いた以外は，上述のとおり構成した。

【０１３２】

（表１）ＣＤＲ置換酵素及びエピトープオリゴヌクレオチド配列のリスト

CDR	制限部位	エピトープオリゴ
H1	*Fsp I*	5'NNNNNNTGGGTTCG3' 3'NNNNNNACCCAAGC5'
H2	*Msc I*	5'TNNNNNNCGATTCA3' 3'ANNNNNNGCTAAGT5'
H3	*Srf I*	5'GANNNNNNTG3' 3'CTNNNNNNAC5'
L1	*Eco RV*	5'CTCTTGCNNNNNNTGGT3' 3'GAGAACGNNNNNNACCA5'
L2	*Ssp I*	5'CTACNNNNNNAG3' 3'GATGNNNNNNTC5'
L3	*Hpa I*	5'TATTACTGCNNNNNNTTCGGTGGAGG3' 'ATAATGACGNNNNNNAAGCCACCTCC5'

Ｎは，エピトープＤＮＡ配列を表す。
残りの文字は，取り込まれる必要のあるフレームワークヌクレオチドを表す。

【０１３３】

次に，１μｌの結果として生じるＰＣＲ生成物を，上記のように構成したＣＭＶフォワードプライマーとともに，リバースプライマーとして後続のＰＣＲで使用した。４５０ｂｐの増幅されたＤＮＡ断片を，ＴＡ　ＴＯＰＯベクターｐＣＲ２．１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）並びにＣＤＲを欠く$Ｖ_{Ｈ}$及び$Ｖ_{Ｌ}$領域の増幅及び制限部位の置換を確認するよう配列したクローンへ直接クローニングした。

【０１３４】

可変重・軽内のＣＤＲを対応酵素Ｈ１，Ｈ２，Ｈ３，Ｌ１，Ｌ２，及びＬ３単体，組み合わせ，及び全体と置換した（図６及び図７）。次に，ＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩ及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩを用いて，親の野生型脱免疫ＳＣ１００　$Ｖ_{Ｈ}$及び$Ｖ_{Ｌ}$領域の直接置換により，異なるバージョンをｐＯｒｉｇＨＩＢ及びｐＯｒｉｇＬＩＢに挿入した。これにより，単一又は複数のエピトープ（同じ又は異なる抗原からのもの）を含む分子の生成が可能になった。

【０１３５】

（表２）プライマー

オリゴヌクレオチド	配列
H1	*Fsp*I 5'-CCT GAG AAT GTC CTG C**TG CGC A**GG CTC CGG GGA AG-
H2	*Msc*I 5'-CAT TGG TAG TGG **TGG CCA** TTT CCA GAG AC-3'
H3	*Srf*I 5'-CCG TGT ATT ACT GT**G CCC GGG CC**A AGG AAC CAC GGT C-3'
L1	*Eco*RV 5'-GGA GCC AGC CTC **GAT ATC** TGC AGA AAC CAG GC-3'
L2	*Ssp*I 5'-CCA CAG CTC CT**A ATA TT**C AGT GGC AGT GGA TC-3'
L3	*Hpa*I 5'-GCT GAG GAT ACC GGA **GTT AAC** CAA GGT GGA AAT C-3'
huHeClonR	5'- CGC CTG AGT TCC ACG ACA CC-3'
huLiClonR	5'-CAG GCA CAC AAC AGA GGC-3'
CMV Forward	5'-GGC GTG GAT AGC GGT TTG AC-3'
OrigstophuHeCH 1 For	5'-CCA AGG TGG ACA AGA AAG TTT GAC CCA AAT CTT GTG ACA
OrigstophuHeCH 1 Rev	5'-GAG TTT TGT CAC AAG ATT TGG GTC AAA CTT TCT TGT CCA CCT TGG-3'
pOrig light no leader For	5'-AGG ATC CAC CAT GGA TGT GTT GAT GAC CC-3'

オリゴヌクレオチド	配列
pOrig heavy no leader For	5'-AAA GCT TAT GCA GGT GCA GCT GGT G-3'
huigG3rev2	5'-ATC GAT ATC ATT TAC CCG GAG ACA GG-3'
IgG3hufor2	5'-ACT GTC TCC AGC GCT TCC ACC AAG-3'
IgG2 for	5'-AGT CAC CGT TTC CAG CGC TTC CAC-3'
IgG2 rev	5'-AGT GGA TAT CAT TTA CCC GGA GAC AGG-3'
HIBF	5'-AAC AGT CTG AGG GCT GAG GA-3'
huigG1PVA REV	5'-A GAC TGA CGG TCC CCC CGC GAC TGG AGG TGC TGG-3'
HuigG2ELLGRev	5'-A GAC TGA CGG TCC TCC TAA CAG TTC TGG TGC TGG-3'
SV40premFOR	5'-A GCT AGC ATC AGC ACG TGT TGA CAA TTA ATC ATC-3'
SV40premREV	5'-AAC GAT TCC GAA GCC CAA CCT TTC ATA G-3'
migG2aC1Afe1F2	5'-TTT ACA GCG CTA AAA CAA CAG CCC CAT CGG TC-3'
migG2aXbaRA	5'-TCT AGA TCA TTT ACC CGG AGT CCG GGA GAA GCT C-3'
MoLC1BsiF1	5'-TTT CGT ACG GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC-3'
MoLCXhoR1	5'-TTT CTC GAG TCA ACA CTC ATT CCT GTT GAA GC-3'
MoIgG2BamHI For	5'-CC TTG ACC TGG AAC TCT GGT TCC CTG TCC AGT GGT G-3'
MoigG2BamHI Rev	5'-C ACC ACT GGA CAG GGA ACC AGA GTT CCA GGT CAA GG-3'
MoigG2XhoI For	5'-GC AGC TCA GTG ACT GTA ACT TCG AGC ACC TGG CCC AGC-3'
MoigG2XhoI Rev	5'-GCT GGG CCA GGT GCT CGA AGT TAC AGT CAC TGA GCT GC-3'
wtkappavarL1for	5'-C TCT TGC AGA TCT AGT CAG AGC CTG GTA CAT AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA GAA TGG T-3'
wtkappavarL1rev	5'-A CCA TTC TAA ATA GGT GTT TCC ATT ACT ATG TAC CAG GCT CTG ACT AGA TCT GCA AGA G-3'
Murine TRP2 Forward	5'-TTT CTA AGC TTA TGG GCC TTG TGG GAT GGG GGC TTC-3'
Murine TRP2 Reverse	5'-TTT CTG ATA TCT CAG GCT TCC TCC GTG TAT CTC TTG C-3'

オリゴヌクレオチド	配列
GP100 Forward	5'-TTT CTG ATA TCA TGG GTG TCC AGA GAA GGA GCT TC-3'
Gp100 Reverse	5'-TTT CTC TCG AGT CAG ACC TGC TGT CCA CTG AGG AGC-3'

【０１３６】

抗原エピトープの一本鎖ベクターのＣＤＲ部位への挿入

多数のＣＤ８　ＣＴＬ及びＣＤ４ヘルパーエピトープが表３にリストアップされている。もっとも，任意のエピトープを一本鎖ベクター内の任意の部位に容易に挿入することができるが。例えば，ＴＲＰ２エピトープのｐＯｒｉｇＨＩＢのＨ２部位への挿入を以下のように行った。

【０１３７】

相補オリゴヌクレオチドを，翻訳中エピトープを発現するヌクレオチド配列をコードするように設計した。エピトープをコードするＤＮＡ配列の横には，対応ＣＤＲヌクレオチドが配置され，翻訳中アミノ酸が保持されること，及び配列がフレームにとどまることを確実にする（表１を参照）プライマーは，合成（ＭＷＧ）及び５’末端リン酸化のために送られる。

【０１３８】

S V Y D F F V W L
5'-Phosphorylated-T AGT GTT TAT GAT TTT TTT GTG TGG CTC CGA TTC A-3'
3'- A TCA CAA ATA CTA AAA AAA CAC ACC GAG GCT AAG T-Phosphorylated-5'

【０１３９】
相補オリゴヌクレオチドを滅菌再蒸留水で最終濃度１ｍｇ／ｍｌまで再懸濁し，１０μｌの各プライマーとの反応を起こすことにより，ＴＥ緩衝剤とともに最終体積が５０μｌになるまでアニールした。反応は，９５℃で５分（０．１℃／秒），７２℃で２０分（０．１℃／秒），５５℃で２０分，と繰り返し，その後４℃で保持した。
【０１４０】
Ｈ２部位への挿入のため，ベクターｐＯｒｉｇＨＩＢ　Ｈ２及び／又はｐＯｒｉｇＨＩＢ　Ｈ１Ｈ２をＭｓｃｌ制限消化を引き起こすことにより線状化し，３７℃で一晩培養した。該消化を１．５％のアガロースゲルで電気泳動し，切断ベクターをゲル抽出により精製した。線状化ベクターのセルフライゲーション（ｓｅｌｆ　ｌｉｇａｔｉｏｎ）を防止するために，仔牛小腸由来アルカリホスファターゼ（ＣＩＡＰ）５ユニット及び滅菌蒸留水で最終体積１００μｌに作製した１０　ｘ　ＮＥＢ　Ｂｕｆｆｅｒ　３により処理及び３７℃で一晩培養することでベクターの５’末端のリン酸基を除去した。脱リン酸化ベクターを精製し，。ユニバーサルプライマーＣＭＶフォワードを使用して単一ベクター内に配列することにより，エピトープの挿入を確認した。
【０１４１】
（表３）ＣＴＬ及びヘルパーエピトープ

タンパク質	座標	配列	HLA制限
TRP2	180-188	SVYDFFVWL agtgtttatgatttttttgtgtgactc	A2, Kb
GP100	209-217	ITDQVPFSV accattactgaccaggtgcctttctccgtg	A2
GP100 (210M)	209-217(M)	IMDQVPFSV accattatggaccaggtgcctttctccgtg	A2
GP100 (F7L)	209-217	ITDQVPLSV accattactgaccaggtgcctttgtccgtg	A2
GP100	44-59	WNRQLYPEWTEAQRLD tggaacaggcagctatatccagagtggacagaaagcccagagacttgac	DR0401
HEPB S AG	28-39	IPQSLDSWWTSL ataccgcagagtctagactcgtggtggacttctctc	Kd (CTL)
HepB nucleoprotein	128-140	TPPAYRPPNAPIL actcctccagcttatagaccaccaaatgccctatccta	I-Ab (helper)
MAGE3	271-279	FLWGPRALV ttcctgtgggtccaagggccctcgtt	A2
Tie2 (Z83)	124-132	FLPATLTMT ttcctaccagctacttttaactatgact	A2
Tie2 (Z84)	124-132	FLPATLTMV ttcctaccagctacttttaactatggtt	A2
Tie2 (Z9)	431-439	GMVEKPFNI gggatggtggaaaagcccttcaacatt	A2
Tie2 (mZ9)	431-439	GMVEKPFNV gggatggtggaaaagcccttcaacgtt	A2

タンパク質	座標	配列	HLA制限
FLU HA	111-120	FERFEIFPKE tttgaaaggtttgagatatttccccaaggaa	I-Ad (helper)
ovalbumin	258-265	SIINFEKL agtataatcaacttttgaaaaactg	Kb
Triosephosphate isomerase (wt)	23-37	GELIGTLNAAKVPAD ggggagctcatcggcattctgaacggcgccaaggtgccggccgac	DR0101
Triosephosphate Isomerase (mI)	23-37	GELIGILNAAKVPAD ggggagctcatcggcactctgaacggcgccaaggtgccggccgac	DR0101
VEGFR2	773-781	VIAMFFWLL gtgattgccatattcttctggctactt	A2
mVEGFR2	773-781	VLAMFFWLL gtgcttgccatggttcttctggctactt	A2

【０１４２】
二重発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇへの移転
すべてのエピトープが単一ベクター内のV_H及びV_L部位に取り込まれると，各々のヒト定常領域のフレームのＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩを用いて二重発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇに移転される。ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ二重発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇを生成するために，ＣＭＶプロモーターに隣接位置にある平滑末端制限エンドヌクレアーゼＮｒｕｌを用いて線状化した。ｐＯｒｉｇＬＩＢを平滑末端Ｎｒｕｌ及びＨｐａｌエンドヌクレアーゼにより消化して，ＣＭＶプロモーター，脱免疫ヒトカッパ鎖及びＢＧＨ　ｐｏｌｙＡシグナルからなる全軽鎖発現カセットを摘出した。ゲル電気泳動，並びに線状化ベクターｐＯｒｉｇＨＩＢ及び軽鎖発現カセットの単離及びゲル抽出の後に，ベクターを脱リン酸化し，軽鎖発現カセットを結合してコンストラクトｐＤＣＯｒｉｇを形成した（図８）。ｐＤＣＯｒｉｇ内の軽鎖カセットの配向を制限分析により確認した。
【０１４３】
ｐＤＣＯｒｉｇは，同じコンストラクト内に結合した重・軽鎖両方の遺伝子コード配列を含み，イントロン配列及び２つのベクター系を除去する。発現は，高レベルＣＭＶ前初期プロモーターその他のＤＮＡ制御要素（ウシ成長ホルモン）により促進される。選択マ

ーカーｚｅｏｃｉｎもまた，発現及び生成効率を最大化するために含まれている。該ベクターの慎重な設計は，可変領域及び定常領域の接点における独特の制限酵素を保持し，可変領域の異なる組み合わせを作る手早く簡単な方法を提供する（エピトープ挿入。図８を参照のこと）。

【０１４４】

（表４）ｐＤＣＯｒｉｇコンストラクト

	H1	H2	H3	L1	L3
DCIB15	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL	
DCIB17	Gp100 210M TIMDQVPFSV			HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL	
DCIB18		TRP2 SVYDFFVWL		HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL	
DCIB21		HepB S Ag IPQSLDSWWTSL		Flu HA FERFEIFPKE	
DCIB24		OVALBUMIN SIINFEKL		HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL	
DCIB25	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL			HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL
DCIB26	Tie-2 Z84 FLPATLTMV			HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL	
DCIB30	Gp100 F7L TITDQVPLSV	TRP2 SVYDFFVWL		HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL	
DCIB31			TRP2 SVYDFFVWL		
DCIB32			TRP2 SVYDFFVWL		HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL
DCIB33 huigG2	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL	
DCIB35	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		Gp100 WNRQLYPEWTEAQRLD	
DCIB36					TRP2 SVYDFFVWL
DCIB37	Gp100 F7L TITDQVPLSV			HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL	
DCIB40	Gp100 F7I TITDQVPISV			HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL	

	H1	H2	H3	L1	L3
DCIB41	Gp100 wt TITDQVPFSV			HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL	
DCIB42	Gp100 F7Y TITDQVPYSV			HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL	
DCIB43	Gp100 V5L TITDQLPFSV			HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL	
DCIB48		TRP2 SVYDFFVWL	Gp100 WNRQLYPEWTEAQRLD		
DCIB49			HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL		
DCIB50	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL			Gp100 WNRQLYPEW TEAQRLD
DCIB52		TRP2 SVYDFFVWL	HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL		
DCIB53 MoigG2a	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL	
DCIB54	Gp100 GTGRAMLGTHTM EVTVYH	TRP2 SVYDFFVWL	Gp100 WNRQLYPEWTEAQRLD		
DCIB64 MoigG2a	Gp100 GTGRAMLGTHTM EVTVYH	TRP2 SVYDFFVWL	Gp100 WNRQLYPEWTEAQRLD		
DCIB65 huigG3	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL	
DCIB66 huigG1 + G2 motif	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL	
DCIB67 huigG2 + G1 motif	Gp100 210M TIMDQVPFSV	TRP2 SVYDFFVWL		HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL	
DCIB68	Gp100 GTGRAMLGTHTM EVTVYH	TRP2 SVYDFFVWL	Gp100 WNRQLYPEWTEAQRLD	Gp100 WNRQLYPEWTEAQRLD	Gp100 GTGRAMLGTHTM EVTVYH
DCIB69 MoigG2a	Gp100 GTGRAMLGTHTM EVTVYH	TRP2 SVYDFFVWL	Gp100 WNRQLYPEWTEAQRLD	Gp100 WNRQLYPEWTEAQRLD	Gp100 GTGRAMLGTHTM EVTVYH
DCIB71	Tie-2 Z12 ILINSLPLV			HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL	
DCIB72		Tie-2 Z12 ILINSLPLV		HepB nucleoprotein TPPAYRPPNAPIL	

【０１４５】

ｐＤＣＯｒｉｇ　ＩＢ１５　ＣＨ１ストップの生成

Ｑｕｉｋ　ｃｈａｎｇｅ　ｓｉｔｅ　ｄｉｒｅｃｔｅｄ　ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　ｋｉｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）並びに相補オリゴヌクレオチドｏｒｉｇｓｔｏｐｈｕＨｅＣＨ１　Ｆｏｒｗａｒｄ及びＯｒｉｇｓｔｏｐｈｕＨｅＣｈ１リバースプライマー（表２を参照のこと）を製造者の指示する通りに用いて，ストップコンドンを，コンストラクトｐＤＣＯｒｉｇ　ＩＢ１５内のヒトＩｇＧ１定常領域のＣＨ１ドメインの後に取り込んだ。ストップコンドンの取り込みは，ＤＮＡシーケンシングにより確認した（図９）。

【０１４６】

ｐＤＣＯｒｉｇ　ＩＢ１５からのリーダー配列の除去

ベクターｐＤＣＯｒｉｇ　ＩＢ１５の重・軽鎖のリーダー配列を除去するために，鋳型ｐＤＣＯｒｉｇ　ＩＢ１５を，リバースプライマーｈｕＨｅＣｌｏｎＲ及びｈｉＬｉＣｌ

ｏｎＲそれぞれと結合したフォワードプライマーｐＯｒｉｇ軽ノーリーダー及びｐＯｒｉｇ重ノーリーダーとともに使用してＰＣＲを引き起こした。増幅断片は，ベクターｐＣＲ２．１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に結合したＴＡ　ＴＯＰＯ及びシーケンシングにより確認したクローンであった。リーダーを欠くＩＢ１５　ＶＨ及びＶＬ領域の両方を，ＨｉｎｄＩＩＩ／Ａｆｅｌ及びＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩ部位を用いてｐＤＣＯｒｉｇ　ＩＢ１５にクローニングした。ＶＨ及びＶＬ領域のＤＮＡ配列及び翻訳を図１０及び図１１それぞれに示す。

【０１４７】

ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ二重発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇのヒトＩｇＧ２及びＩｇＧ３アイソタイプの設計

ＡｆｅＩ及びＥｃｏＲＶそれぞれを鋳型ｐＯＴＢｈｕｉｇＧ３（イメージクローン４５６６２６７ＭＧＣ４５８０９）とともに取り込むｈｕｉｇｇ３フォワード及びリバースプライマー（表２）を用いてＰＣＲにより，ヒトＩｇＧ３定常領域を増幅した。同様に，鋳型ｐＴＯＢ７　ｈｕｉＧ２（イメージクローン６２８１４５２ＭＧＣ７１３１４）とともにｉｇＧ２フォワード及びリバースプライマー（表２）を用いて，ヒトＩｇＧ２定常領域を増幅した。

【０１４８】

両断片は，ｐＣＲ２．１に結合したＴＯＰＯ及び確認した配列であった（表１２及び表１３）。コンストラクトｐＤＣＯｒｉｇＩＢ１５内のｈｕｉｇＧ１定常領域を，ＡｆｅＩ及びＳａｐＩ部位を用いて重可変のフレームにクローニングされたｈｕｉｇＧ２及びｈｕｉｇＧ３の両方と効果的に置換し，ｐＤＣＯｒｉｇＩｂ１５　ｈｕｉｇＧ２及びｐＤＣＯｒｉｇＩＢ１５　ｈｕｉｇＧ３（図１４）を生成した。両ベクターは，可変・定常領域の接点に同じ独特の制限部位を保持する。これにより，すべてのヒトアイソトープ単一及び二重鎖ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙベクター間の可変領域の容易な交換が可能となる。

【０１４９】

ヒトＩｇＧ１　Ｆｃγ及びヒトＩｇＧ２レセプター結合ドメインの突然変異

ＣＨ２ドメイン内のｈｕｉｇＧ１結合モチーフのアミノ酸Ｅ２３３　Ｌ２３４　Ｌ２３５をｈｕｉｇ２のＰ２３３　Ｖ２３４　Ａ２３５と置換するために，突然変異を組み込んだＰＣＲによって短い部分を再増幅した。置換及び構成的制限部位ＡｈｄＩを含むリバースプライマーｈｕｉｇＧ１　ＰＶＡ　Ｒｅｖをフォーワードプライマー ＨＩＢＦ（表２）及び鋳型ｐＤＣＯｒｉｇ　ＩＢ１５とともに利用した。結果として生じる断片はベクターｐＣＲ２．１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に結合した。配列確認後，プラスミドｐＤＣＯｒｉｇ　ＩＢ１５　ｈｕｉｇＧ１（図１５）の単一カッターＡｇｅＩ／ＡｈｄＩ部位に挿入することにより，野生型配列を突然変異を含む部分と効果的に置換した。

【０１５０】

コンストラクトｐＤＣＯｒｉｇ　ＩＢ１５　ｈｕｉｇＧ２のｈｕｉｇＧ２定常領域内のアミノ酸Ｐ２３３　Ｖ２３４　Ａ２３５もまた，ｈｕｉｇＧ１結合モチーフＥＬＬＧと置換した。前述同様に，置換及び構成的制限部位ＡｈｄＩを含むリバースプライマーｈｕｉｇＧ２　ＥＬＬＧ　Ｒｅｖ（表２）をフォーワードプライマーＨＩＢＦ（表２）及び鋳型ｐＤＣＯｒｉｇ　ＩＢ１５ヒトＩｇＧ２とともに利用した。断片は，ベクターｐＣＲ２．１に結合したＴＡ　ＴＯＰＯであった。配列確認後，プラスミドｐＤＣＯｒｉｇ　ＩＢ１５　ｈｕｉｇＧ２（図１６）のＡｇｅＩ／ＡｈｄＩ部位を用いて，野生型配列をｈｕｉｇＧ１結合モチーフを含む部分と置換した。

【０１５１】

ｐＤＣＯｒｉｇマウスＩｇＧ２ａプラスミドＤＣＩＢ５３及びＤＣＩＢ６３の生成

二重発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇのマウスＩｇＧ２ａ型を生成するために，ハイブリドーマ細胞株３３７から単離したｔｏｔａｌ　ＲＮＡからｃＤＮＡを合成した。マウスＩｇＧ２ａ定常領域の増幅のために，制限部位ＡｆｅＩを含むフォワードプライマーｍｉｇＧ２ａＣ１ＡｆｅＦ２を，ストップコンドンの後のＸｂａｌ部位を含むリバースプライマーｍｉｇＧ２ａＸｂａＲＡとともに用いた。ＰＣＲ断片は，ベクターｐＣＲ２．１に結合し

たＴＯＰＯであった。配列確認後，マウスＩｇＧ２ａ定常領域を摘出し，マウス重可変領域のフレームでヒトＩｇＧ１を効果的に置換するベクターｐＯｒｉｇＨＩＢのＡｆｅＩ／ＸｂａＩ部位へクローニングした。ＢａｍＨＩ及びＸｈｏＩ部位を，翻訳中，マウスＩｇＧ２ａ定常領域のアミノ酸配列を変更することなく，連続してＱｕｉｋ ｃｈａｇｅ ｓｉｔｅ ｄｉｒｅｃｔｅｄ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｋｉｔ（Ｉｎｃｉｔｒｏｇｅｎ）及び相補プライマーＭｏｉｇＧ２ＢａｍＨＩＦＯＲ及びＲＥＶ，ＭｏｉｇＧ２ＸｈｏｌＦＯＲ及びＲＥＶそれぞれを用いて部位特異的突然変異誘発法により除去した。これは，ファンいつ鎖ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙベクターｐＭｏＯｒｉｇＨＩＢ（図１７ａ）を生成した。ＭｏｉｇＧ２ａ定常領域を含むｐＭｏｇＯｒｉｇＨＩＢの部分は，ＡｆｅＩ及びＳＶ４０プロモーターに位置する単一カッターＡｖｒＩＩを用いて，単一コンストラクトからマウス重可変領域のフレームの二重発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ ＩＢ１５へ移動し，ヒトカッパ領域をなお含む中間ベクターｐＤＣＯｒｉｇＩＢ１５ＭｏｉｇＧ２ａ ｈｕｋａｐｐａを生成した。

【０１５２】

マウスカッパ領域の増幅のために，ストップコンドンの後のＸｈｏＩ部位を取り込むＢｓｉＷＩ部位及びＭｏＬＣＸｈｏＩを含むプライマーＭｏＬＣ１ＢｓｉＦ１とともに，ｃＤＮＡを鋳型として用いた。増幅断片は，前述同様に，ベクターｐＣＲ２．１にクローニングしたＴＯＰＯであった。マウスカッパ領域を摘出し，ＢｓｉＷＩ／ＸｈｏＩを用いてヒトカッパ領域を置換するＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙベクターｐＤＣＯｒｉｇＬＩＢ Ｌ１及びｐＤＣＯｒｉｇＬＩＢ ｈｅｐＢ ｈｅｌｐ／Ｌ１へ結合し，中間ベクターｐＭｏＬＩＢＬ１Ｂｓｉ及びｐＭｏＬＩＢ ＨｅｐＢ ｈｅｌｐ／Ｌ１Ｂｓｉを生成した。Ｉｍｍｎｏｂｏｄｙシステムは，可変領域及び定常領域の接点における独特の制限部位を用いた可変領域の移動を伴う。一方，マウス重可変及びｍｏｉｇＧ２ａ定常間の接点は，ＡｆｅＩ部位（すべてのヒトＩｍｕｎｏＢｏｄｙベクターに存在）に適応することができ，翻訳中アミノ酸配列を変更しない。マウス可変及びカッパ間の領域は疑わしい。この接点における配列を分析すると，アミノ酸配列を変更しない独特の制限部位を全く取り込むことができない。この接点のＢｓｉＷＩ部位を除去して野生型配列に戻した。これは，全マウス完全長鎖を重複ＰＣＲによって増幅することにより実現した。最初のＰＣＲは，接点及び隣接領域に野生型配列を含むフォワードプライマーＭｏＫａｐｐａＳＤＭｆｏｒを用いて構成し，ＢｓｉＷＩ，ＢＧＨリバースプライマー，及び鋳型としての中間軽鎖ベクターｐＭＯＬＩＢ１Ｂｓｉ及びｐＭｏＬＩＢ ｈｅｐＢ ｈｅｌｐ／Ｌ１ Ｂｓｉ，のそれぞれを除去した。一回目のＰＣＲのおよそ４３０ｂｐの増幅断片をＢａｍＨＩ部位を含むフォワードプライマーＩｍｍｕｎｏＬｉｋｏｚＦｏｒとともにリバースプライマーとして用いた。増幅した完全長マウスカッパ鎖は，ｐＣＲ２．１に結合したＴＯＰＯ及び確認した配列であった。ｐＣＲ２．１のＬ１部位にｈｅｐＢ ｈｅｌｐを含む完全長マウスカッパ鎖を摘出して，ヒトカッパ鎖を置換する中間二重発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇＩＢ１５ＭｏｉｇＧ２ａＨ ｈｕｋａｐｐａのＢａｍＨＩ／ＸｈｏＩ部位にクローニングし，マウス二重発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇＩＢ ＧＰ２００２１０ｍ／Ｈ１ ＴＲＰ２／Ｈ２ ＨｅｐＢ ｈｅｌｐ／Ｌ１ ｍｏｉｇＧ２ａ（ＤＣＩＢ５３，図１７Ｂ及び図５４）を生成した。

【０１５３】

同様に，Ｌ１部位を含む完全長マウスカッパ鎖を摘出して，ヒトカッパ鎖を置換する中間二重発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇＩＢ１５ＭｏｉｇＧ２ａＨ ｈｕｋａｐｐａのＢａｍＨＩ／ＸｈｏＩ部位にクローニングし，空のＬ１部位を有するマウス二重発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇＩＢ１５ｍｏＩｇＧ２ａを生成した。野生型軽可変領域を有するコンストラクトを生成するために，相補５’リン酸化プライマーｗｔｋａｐｐａｖａｒＬ１ｆｏｒ及びｒｅｖ（表２）をアニールして，上述したＥｃｏＲＶによる線状化後にＬ１部位に挿入した。最後に，ＧＰ１００ＤＲ７／Ｈ１ ＴＲＰ２／Ｈ２及びＧＰ１００ＤＲ４／Ｈ３を含むＤＣＩＢ５４の重可変領域を，ＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｆｅＩを用いて移動し，ｐＤＣＯｒｉｇ ＧＰ１００ＤＲ７／Ｈ１ ＴＲＰ２／Ｈ２ ＧＰ１００ＤＲ４／Ｈ３ ｍｏｉｇ

Ｇ２ａ野生型カッパ（ＤＣＩＢ６８，図１７ｃ及び図６０）を生成した。

【０１５４】

調節ＤＮＡワクチン要件のためのＩｍｍｕｎｏｂｏｄｙ二重発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇからの真核ＳＶ４０プロモーターの除去

Ｎｈｅ１部位を取り込むフォワードプライマーＳＶ４０ＰｒｅｍＦＯＲ及び鋳型ｐＯｒｉｇＨＩＢを有するＳＶ４０ｒｅｍＲＥＶリバースプライマー（表２）を用いて，ＥＭ７細菌プロモーター及びｚｅｏｃｉｎ遺伝子を増幅した。結果として生じる５１１ｂｐＰＣＲ断片は，結合しシーケンシングにより確認したｐＣＲ２．１　ＴＯＰＯであった。ＥＭ７プロモーター及びｚｅｏｃｉｎ遺伝子の一部をｐＣＲ２．１のＮｈｅＩ及びＦｓｅＩを用いて摘出し，ｐＯｒｉｇＨＩＢ　Ｈ１に直接クローニングし，効果的にＳＶ４０プロモーターを除去した。ＮｈｅＩ部位は，ＳＶ４０プロモーターの前に存在し，一方，ＦｓｅＩ認識配列は，ベクターのｚｅｏｃｉｎ遺伝子内の単一カッターである。配列確認後，より大きな部分が単一ベクターからｈｕｉｇＧ１，ＢＧＨ　ｐｏｌｙＡ，ＥＭ７の末端をコードするｐＤＣＯｒｉｇ　ＩＢ６８ベクター並びにＳａｐＩ及びＦｓｅＩで消化するｚｅｏｃｉｎ遺伝子の一部に移動し，二重発現ベクターからＳＶ４０プロモーターを効果的に除去する。

【０１５５】

ＦＤＡ規制準拠ｐＶａｘ１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）用ｐＤＣＯｒｉｇ骨格の変更

Ｉｍｍｕｎｏｂｏｄｙ完全長ヒトＩｇＧ１重鎖をＨｉｎｄＩＩＩ及びＸｂａＩを用いてコンストラクトＤＣＩＢ５４から摘出し，ベクターｐＶａｘ１のＭＣＳ内のこれらの部位（図１８Ａ）に挿入した。二重鎖発現ベクターのｐＶａｘ型を生成するために，ＣＭＶプロモーターの隣接位置にある平滑末端制限エンドヌクレアーゼＮｒｕＩを用いてｐＶａｘＩＢ５４ＨＩＢを線状化した。平滑末端ＮｒｕＩ及びＨｐａＩエンドヌクレアーゼによりｐＯｒｉｇＬＩＢ（図１８Ｂ）を消化し，ＣＭＶプロモーター，Ｉｍｍｕｎｏｂｏｄｙヒトカッパ鎖，及びＢＧＨ　ｐｏｌｙＡシグナルからなる全軽鎖発現カセットを摘出した。ゲル電気泳動，並びに線状化ベクターｐＶａｘＩＢ５４ＨＩＢ及び軽鎖発現カセットの単離及びゲル抽出の後に，ベクターはリン酸化し，軽鎖発現カセットは結合してコンストラクトｐＶａｘＤＣＩＢ５４（図１８Ｃ）を形成した。ｐＶａｘＤＣＩＢ５４内の軽鎖カセットの配向は，制限分析により確認した。ｐＶａｘＤＣＩＢ５４は可変／定常領域の接点に同じ独特の制限部位を保持し，全てのヒトアイソタイプ単一及び二重鎖Ｉｍｍｕｎｏｂｏｄｙベクター間の可変領域の容易な交換を可能にする。例えば，ｐＶａｘＤＣＩＢ６８（図６０）を生成するために，Ｇｐ１００ＤＲ４／Ｌ１及びＧｐ１００ＤＲ７／Ｌ３を含むマウス軽可変領域をＢａｍＨＩ／ＢｓｉＷＩを用いてＤＣＩＢ６８から摘出し，ｐＶａｘＤＣＩＢ５４にクローニングし，軽野生型可変領域を効果的に置換した。

【０１５６】

ｐＯｒｉｇマウスＴＲＰ２及びｐＣＤＮＡ３　Ｇｐ１００の生成

ｐＯｒｉｇマウスＴＲＰ２を生成するために，細胞株Ｂ１６Ｆ１０から単離したｔｏｔａｌ　ＲＮＡ５μｇから合成したｃＤＮＡを，プライマーマウスＴＲＰ２フォワード及びリバース（表２）をＨｉｎｄＩＩＩ又はＥｃｏＲＶ部位それぞれとともに用いて，完全長マウスチロシナーゼ関連タンパク質２の増幅用鋳型として用いた。完全長ＴＲＰ２は，ベクターｐＯｒｉｇＨＩＢのＨｉｎｄＩＩＩ／ＥｃｏＲＶ複数クローニング部位に結合した。完全長マウスＧＰ１００もまた，ＥｃｏＲＶ及びＸｈｏＩ部位をそれぞれ含む設計されたマウスＧＰ１００フォワード及びリバースプライマーを用いてｃＤＮＡから増幅した。ＰＣＲ生成物は，哺乳類発現ベクターｐＣＤＮＡ３（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）のＥｃｏＲＶ／ＸｈｏＩ部位にクローニングした。両プラスミドは，制限分析により同定し，ＤＮＡシーケンシングにより確認した。

【０１５７】

サンドウィッチＥｌｉｓａ

Ｆａｌｃｏｎ社製の９６－ウェルフレキシブルプレートを５０μｌの抗ヒトＩｇＧ，Ｆｃ特異抗体（Ｓｉｇｍａ　Ｉ２１３６）又はＰＢＳで１０μｇ／ｍｌの抗ヒトカッパ軽鎖

抗体（Ｄａｋｏ　Ａ０１９１）で一晩４℃でコーティングした。プレートは，Ｓｋａｎ　Ｗａｓｈｅｒ　４００（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）を用いて２００μｌ／ｗｅｌｌ　ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ　２０（０．０５％）で３回洗浄し，ウェルは，ＰＢＳ（１％　ＦＳＧ／ＰＢＳ）の１％　Ｆｆｉｓｈ　ｓｋｉｎ　ｇｅｌａｔｉｎ（Ｓｉｇｍａ）で塞いだ。発現ＩｍｍｎｏＢｏｄｙ又は精製ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙタンパク質（５０μｌ）を含む組織培養上清を三重にウェルに添加し，プレートを室温で１時間培養した。プレートを１％ＦＳＧ／ＰＢＳで洗浄し，結合したＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙを５０μｌ／ｗｅｌｌのペルオキシダーゼ抱合抗ヒトＩｇＧ，Ｆｃ特異抗体（Ｓｉｇｍａ　Ａ０１７０）又は抗ヒトカッパ軽鎖抗体（Ｓｉｇｍａ　Ａ７１６４）を添加することにより検出し，１％ＦＳＧ／ＰＢＳで１／２０００に希釈し，室温で１時間培養した。プレートを１％ＦＳＧ／ＰＢＳで洗浄し，ＴＭＢ基質（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を５０μｌ／ｗｅｌｌで添加することにより育成した。吸光度をＶＥＲＳＡマックスマイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）により６５０ｎｍで測定した。

【０１５８】

マウス及び免疫

英国内務省認定のプロジェクトライセンスの下，動物実験を行った。６週齢～１２週齢の雌雄のＣ５７ＢＩ／６（Ｈａｒｌａｎ）又はＨＬＡ－Ａ２トランスジェニック（ＨＨＤＩＩ）（Ｐａｓｔｅｕｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ，Ｐａｒｉｓ）を用いた。合成ペプチド（ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｅｄ　ｂｙ　Ｊｏｈｎ　Ｋｅｙｔｅ，　Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，　Ｎｏｔｔｉｎｇｈａｍ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，　ＵＫ）をフロイント不完全アジュバントにより乳状にし，皮下投与により注入した。製造者の使用説明書を用いて１．０μｍの金粒子上にＤＮＡをコーティングし，Ｈｅｌｉｏｓ　Ｇｅｎｅ　Ｇｕｎ（ＢｉｏＲａｄ）により皮内投与した。各マウスは，１μｇのＤＮＡ／免疫を受けた。極短電気パルスにより直後注射とともに裸のＤＮＡ溶液をも皮内又は筋肉内（１０μｇ／免疫）投与した。マウスに０，１，２週間隔で免疫し，３週目に脾臓を除去した。免疫の４日前における４００μｇの抗ＣＤ２５抗体（ＰＣ６１）の腹腔内注入により，又は，２回目の免疫と同時の２００μｇの抗ＣＴＬＡ－４抗体の腹腔内注入により，インビボでの細胞サブセットの枯渇を行った。

【０１５９】

インビトロ再刺激

最後の免疫の５日後，１０％ＦＢＳ，２ｍＭのグルタミン，２０ｍＭのＨＥＰＥＳバッファ，１００ユニット／ｍｌのペニシリン，１００μＧ／ｍｌ$^{-1}$のストレプトマイシン，及び10^{-5}Ｍの２－メルカプトエタノールを有する２ｍｌのＲＰＭＩ－１６４４のペプチドパルスリポ多糖類（ＬＰＳ）ブラストとともに２４ウェルプレートにて３７℃で共培養した。３７℃で３日間，２５μｇ／ｍｌのＬＰＳ（Ｓｉｇｍａ）及び７μｇ／ｍｌの硫酸デキストラン（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｍｉｌｔｏｎ　Ｋｅｙｎｅｓ，ＵＫ）により脾細胞（1.5×10^{6}細胞／ｍｌ）を活性化させることにより，ＬＰＳブラストを得た。使用前に，2×10^{7}のＬＰＳブラストを１００μｇ／ｍｌの合成ペプチドで１時間培養した。６日目に^{51}Ｃｒ放出アッセイにより培養を分析した。

【０１６０】

^{51}Ｃｒ放出アッセイ

標的細胞を，１００μｇ／ｍｌのペプチドとともに又は含まずに，１．８５Ｍｂｑのクロム酸（^{51}Ｃｒ）ナトリウム（Ａｍｅｒｓｈａｍ，Ｅｓｓｅｘ，ＵＫ）で１時間標識化した。培養後，ＲＰＭＩで３回洗浄し，１００μｇ／ｍｌのペプチドとともにさらに１時間培養した。５ｘ１０３ｔａｒｇｅｔ／ｗｅｌｌの９６ウェルＶ底プレートをセットし，最終容積２００μｌの異なる密度のエフェクター細胞で共培養した。３７℃で４時間後，５０μｌの上清を各ウェルから除去し，Ｌｕｍａｐｐｌａｔｅ（Ｐａｃｋａｒｄ，Ｒｉｇａｗｅｇ，ｔｈｅ　Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）に移動させた。Ｔｏｐｃｏｕｎｔ　Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅ　Ｓｃｉｎｔｉｌｌａｔｉｏｎ　Ｃｏｕｎｔｅｒ（Ｐａｃｋａｒｄ）でプレートを読み取った。特異的溶解度を以下の式を用いて計算した。

特異的溶解＝１００×［（実験的放出－自然放出）／（最大放出－自然放出）］

【０１６１】

インビトロＥｌｉｓｐｏｔアッセイ

製造者の使用説明書（Ｍａｂｔｅｃｈ，Ｓｗｅｄｅｎ）に従って，マウスＩＦＮγ捕捉・検出試薬を用いてＥｌｉｓｐｏｔアッセイを行った。手短に説明すると，抗ＩＦＮγ抗体を９６ウェルＩｍｍｕｎｏｂｉｌｉｎ－Ｐプレートのウェル上にコーティングし，複製ウェルに５ｘ１０^{5}の脾細胞を播種した。（さまざまな濃度の）合成ペプチド又は５ｘ１０^{4}の標的メラノーマ細胞をこれらのウェルに添加し，３７℃で４０時間培養した。培養後，ビオチン化抗ＩＦＮγ抗体，並びにストレプトアビジンアルカリホスファターゼ（ｓｔｒｅｐａｔａｖｉｄｉｎ ａｌｋａｌｉｎｅ ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ）及び発色基質の成長により捕捉ＩＦＮγを検出した。自動プレートリーダー（ＣＴＬ）を用いてスポットを分析し数えた。エフェクター機能対ペプチド濃度のグラフを用いて，機能活性を５０％最大エフェクター機能を媒介する濃度として計算した。製造者の使用説明書に従って，ＣＤ８ Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（Ｄｙｎａｌ）を用いてＣＤ８ Ｔ細胞の脾細胞集団からの枯渇を行い，次に，インビトロｅｌｉｓｐｏｔアッセイに追加した。

【０１６２】

腫瘍の研究

Ｃ５７ＢＩ／６マウスを治療群に無作為に抽出し，週間隔で５週間免疫した。３回目と４回目の免疫の間に，尾静脈に１ｘ１０^{4}のＢ１６Ｆ１０ ＩＦＮαメラノーマ細胞で静脈注入することによりマウスを攻撃した。静脈注入すると，Ｂ１６Ｆ１０細胞は，肺へ移動し，転移を形成した。腫瘍の増殖及び苦痛に関しマウスを観察した。腫瘍攻撃後４９日目に，マウスを安楽死させ，転移の有無について肺を分析した。インビトロｅｌｉｓｐｏｔアッセイによりエピトープ及び腫瘍特異的免疫反応の有無について脾臓を分析した。

【０１６３】

ＨＨＤＩＩマウスを週間隔で３週間免疫し，最後の免疫後７日間，２ｘ１０^{4}のＢ１６Ｆ１０ ＨＨＤメラノーマ細胞で右側腹部への皮下注射により攻撃した。腫瘍の増殖を３～４日間隔で観察し，腫瘍の大きさをキャリパーを用いて測定した。

【０１６４】

実施例１ ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトは低レベルの無傷抗体を生成する。

ＣＤＲ Ｈ１及びＣＤＲ Ｈ２それぞれのｇｐ１００ エピトープＩＭＤＱＶＰＦＳＶ及びＴＲＰ２エピトープＳＶＹＤＦＦＶＷＬ及びＣＤＲ Ｌ１のＨｅｐＢ ＣＤ４エピトープＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ（ＤＣＩＢ１５，図１９）により，安定ＣＨＯ－Ｓ細胞トランスフェクタントを生成した。

【０１６５】

これらのトランスフェクタントの上清を，サンドウィッチｅｌｉｓａにより，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙタンパク質の発現について分析した。プレートを，抗ヒトＩｇＧ Ｆｃ特異抗体及び添加上清でコーティングした。結合ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙを重鎖を検出する抗ヒトＦｃ特異ＨＲＰ抗体を用いて検出した。対照と比較して，およそ１μｇ／ｍｌの濃度の上清に重鎖を検出した（図２０ａ）。タンパク質Ａアフィニティカラムを用いて上清からＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙを精製し，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙｎｏ有無を分析した。ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙの精製は，対照と比較して，予め予想したよりはるかに低い量のタンパク質を生じた（図２０ｂ）。このように低い量の無傷タンパク質が精製されうる可能性のため，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトを，サンドウィッチＥｌｉｓａにより，トランスフェクト細胞の上清における重鎖及び無傷抗体の両方の発現について分析した。ＣＤＲ Ｌ１のＨｅｐＢ ＣＤ４エピトープ及びＣＤＲ Ｈ２のＳＩＮＫＥＦＬエピトープ（ＤＣＩＢ２４，図２１）又はＣＤＲ Ｈ１及びＣＤＲ Ｈ２それぞれにｇｐ１００エピトープＩＭＤＱＶＰＦＳＶ及びＴＲＰ２エピトープＳＶＹＤＦＦＶＥＬをＣＤＲ Ｌ３のＨｅｐＢ ＣＤ４エピトープＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ（ＤＣＩＢ２５，図２２）とともに有

するコンストラクトもまた検査した。プレートを抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ特異抗体及び添加上清でコーティングした。結合ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙを，重鎖を検出する抗ヒトＦｃ特異ＨＲＰ抗体，又は無傷ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙを検出する抗ヒトカッパ鎖特異ＨＲＰ抗体を用いて検出した。ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙトランスフェクタントは，高レベルの重鎖分泌を示しているが，非常に低レベルの無傷ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙを示している（図２０ｃ及び図２０ｄ）。

【０１６６】

このデータは，ＣＤ８及びＣＤ４　Ｔ細胞エピトープの重・軽鎖可変領域への取り込みが，無傷抗体の形成を防止するＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙの全体構造を崩壊させることを示している。

【０１６７】

トランスフェ区とＣＨＯ－Ｓ細胞の上清の分析に関する追加データは，ＣＤＲＨ３又はＣＤＲＬ３に取り込まれたＣＴＬエピトープを有するコンストラクトのみが無傷抗体として分泌されるということを示している（図２０ｅ）。対照的に，ＣＤＲＨ１又はＣＤＲＨ２内のエピトープの取り込みは重の分泌を可能にはするが，軽鎖に取り込まれるものはなく分泌されても無傷抗体の量は少ない。ＣＤＲＬ１内のエピトープの取り込みは，重鎖のＣＤＲＨ３に取り込まれるエピトープしか存在しない場合，軽鎖の低レベルの分泌をもたらす。

【０１６８】

実施例２　ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙフレームワークに取り込まれたＣＴＬエピトープはインビボで免疫反応を引き起こすように処理され発現される

既刊のＴＲＰ２のＣＴＬエピトープａａ２８０－２８８（Ｂｏｏｍ　ｅｔ　ａｌ，Ｔｈｅ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　１９９７；１８５：４５３－９）をＣＤＲ　Ｌ１のＢ型肝炎ユニバーサルＣＤ４エピトープと一緒にＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトのＣＤＲ　Ｈ２領域に改変した。Ｃ５７ＢＩ／６マウスに遺伝子銃によりＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡを週間隔で三度経皮で免疫した。その後，脾細胞を，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔにより，ＴＲＰ２特異的反応について分析した。ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡを免疫したマウスは，対照と比べてかなりのＴＲＰ２ペプチド特異的反応を示す一方，ＨｅｐＢ　ＣＤ４ペプチドに特異的な反応は低レベルであった（図３１ａ）。ＴＲＰ２特異的反応の活性もまた，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔでペプチド滴定により研究した。５つの異なる実験で試験した１５匹のマウスにおいて，反応の活性は，10^{-9}～10^{-11}Ｍペプチドに及んでいる。代表例を図３１ｂに示す。

【０１６９】

ＴＲＰ２特異的反応がＣＤ８　Ｔ細胞により媒介されることを確認するために，Ｃ５７ＢＩ／６マウスに週間隔で３回ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡを免疫した。最後の免疫の６日後，脾細胞を単離し，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔにより特異的反応についてインビトロで分析した。ＴＲＰ２特異的反応がＣＤ８　Ｔ細胞により媒介されるかどうかを判定するために，ＣＤ８　Ｔ細胞をｅｌｉｓｐｏｔアッセイによる分析前に枯渇させた。ＣＤ８　Ｔ細胞の枯渇は，ＴＲＰ２特異的反応の廃止につながった。しかしながら，ＣＤ８の枯渇は，ＨｅｐＢ　ＣＤ４ペプチド反応に影響を与えなかった。これは，ＣＤ４　Ｔ細胞により媒介される可能性が高いことを示している（図３１ｃ）。

【０１７０】

ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡ免疫により起こされる反応がインビトロで標的細胞を殺傷することができるかどうかを判定するために，ＴＲＰ２ペプチドパルスＬＰＳブラストによりインビトロで刺激を与え，Ｂ１６Ｆ１０メラノーマ細胞に対するクロム遊離アッセイにより分析した。ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡ免疫マウスの脾細胞は，Ｈ－２Ｋｂ分子（Ｂ１６Ｆ１０　ｓｉＫｂ）を発現しないＢ１６Ｆ１０に比べ，低レベルの表面ＭＨＣクラスＩ発現を有するＢ１６Ｆ１０細胞，及び高い表面ＭＨＣクラスＩ発現を有するＢ１６Ｆ１０　ＩＦＮα細胞の両方のすぐれた溶解を示した。Ｂ１６Ｆ１０　ｓｉＫｂ細胞株に対する殺傷の廃止は，殺傷がＣＤ８に依存し，Ｈ－２Ｋｂにより制限されることを示す

（図３１ｄ）。

【０１７１】

これらの結果は，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙフレームワークのＣＤＲ Ｈ２領域に組み込まれるＴＲＰ２（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ）ＣＤ８エピトープは，ＭＨＣクラスＩにより媒介される高頻度の反応を引き起こすよう処理され発現されることを示す。ＨｅｐＢ ＣＤ４エピトープもまた，ＭＨＣクラスＩＩとの関係で，ＤＮＡ免疫の良好なＣＤ４媒介反応を引き起こすように処理され発現される。

【０１７２】

ＴＲＰ２エピトープ特異的反応もまた，同じ方法を用いてコンストラクトを含む他のＴＲＯ２エピトープから分析した。ＴＲＰ２エピトープの重鎖内のＣＤＲへの取り込みは，高頻度のペプチド特異的反応につながった（図３１ｅ）。対照的に，ＣＴＬエピトープの軽鎖への取り込みは，ＣＴＬ頻度の有意な減少につながった（ＤＣＩＢ３６）。ＴＲＰ２エピトープ特異的反応の活性の分析は，該反応が重鎖内のエピトープから引き起こされた場合には高い活性を示すが，軽鎖からのエピトープの発現の場合にはこれが著しく低いことを明らかにしている（図３１ｆ）。すべてのコンストラクトについて観察された高頻度・高活性ヘルパー反応（図３１ｇ）は，重鎖の分泌は，ＣＴＬ反応を刺激するには好都合であるが，ヘルパー反応には好都合でないことを示している。

【０１７３】

実施例３ ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ ＤＮＡ免疫はペプチド免疫又は全抗原免疫よりも好ましい

ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ ＤＮＡ免疫の効率を分析するために，これを，フロイント不完全アジュバントにおけるペプチドエピトープによる皮下免疫，又はＴＲＰ２抗原を発現するＤＮＡによる免疫と比較した。

【０１７４】

Ｃ５７ＢＩ／６マウスは，ＩＦＡのユニバーサルヘルパーエピトープに結合したＴＲＰ２エピトープからなるペプチド又はＤＮＡによる免疫を週間隔で３回受けた。ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ免疫マウスに引き起こされたＴＲＰ２及びヘルパーペプチド特異的反応は，ペプチド免疫又は全ＴＲＰ２抗原による免疫により起こされる反応よりも規模の点ではるかに上回っていた。これらのペプチド特異的反応の活性のさらなる分析は，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ ＤＮＡによる免疫マウスにより引き起こされる反応は，ペプチド免疫個体の反応よりもログ活性が高いことを明らかにした（図３２ｂ）。その後，Ｃ５７ＢＩ／６マウスに引き起こされる反応を，Ｂ１６Ｆ１０細胞株，及び陰性対照としてＢ１６Ｆ１０ ｓｉＫｂ細胞株に対するインビトロでの細胞傷害能力について分析した。図３２ｃは，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ ＤＮＡ免疫マウスは，Ｈ－２Ｋｂ拘束性のインビトロでの抗腫瘍活性を示し，ペプチド免疫マウス及び全抗原免疫マウスは，同じメラノーマ細胞株の殺傷に失敗することを示している。

【０１７５】

ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ免疫をＤＣ＋ペプチドによる免疫とも比較した。Ｃ５７ＢＩ／６マウスは，ＤＮＡ又はＤＣ＋ペプチドによる免疫を週間隔で３回受けた。ＴＲＰ２ペプチド特異的反応は，同等の頻度であったが，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ免疫マウスは，ＤＣ＋ペプチド免疫マウスに比べ，高い活性反応を引き起こした（図３２ｄ）。これらの反応をインビトロでＢ１６Ｆ１０メラノーマ細胞を殺傷する能力において分析した場合もこのことが証明された。ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ免疫による引き起こされる反応は，ＤＣ＋ペプチド免疫マウスの反応よりも目標比率に対して低いエフェクターでの高いＢ１６Ｆ１０メラノーマの殺傷を示した。これらはまた、Ｈ－２Ｋｂのレベルを下げたＢ１６Ｆ２０ ｓｉＫｂメラノーマ株の高い特異的溶解を示した。

【０１７６】

Ｈ－２Ｋｂ拘束性オボアルブミンエピトープ，ＳＩＩＮＦＥＫＬ，及びアンカー修飾ＨＬＡ－Ａ２拘束性ｇｐ１００エピトープ，ＩＭＤＱＶＰＦＳＶ（２１０Ｍ）を含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトを，Ｃ５７ＢＩ／６又はＨＨＤＩＩマウスそれぞれにおけ

る対応するエピトープペプチド免疫と比較した。マウスは，ＩＦＡのＤＮＡ又はペプチドによる免疫を週間隔で３回受けた。最後の免疫後の反応の分析は，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ

ＤＮＡ免疫マウスは，ペプチド免疫マウスに比べ，高頻度のペプチド特異的反応を引き起こすことを明らかにしている（図３２ｆ及び図３２ｇ）。これらの反応を，ペプチド滴定による活性についても分析した。ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ免疫は，ペプチド免疫より著しく高い活性反応を引き起こす（図３２ｈ及び図３２ｉ）。

【０１７７】

ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡワクチンにより引き起こされるＴＲＰ２特異的反応の大きさは，合成ペプチド又は全ＴＲＰ２抗原により引き起こされる反応をはるかに上回る。しかしながら，臨床試験による証拠は，高頻度の腫瘍特異的ＣＤ８　Ｔ細胞の存在が必ずしも腫瘍退縮にはつながらず，一般的にワクチンの試用において客観的な臨床的反応率は非常に低いことを示している（Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ　ｅｔ　ａｌ，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　２００５；１７５：６１６９－７６；　Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ　ｅｔ　ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　２００４；１０：９０９－１５）。腫瘍特異的Ｔ細胞の機能活性やプライミング経路などの頻度以外の要因は、ワクチンの有効性を最大化する上で主要な決定要因であることが現在明らかになりつつある。多数のグループが、高活性ＣＤ８Ｔ細胞が抗腫瘍活性を示すことを示している（Ａｌｅｘａｎｄｅｒ－　Ｍｉｌｌｅｒ，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃ　ｒｅｓｅａｒｃｈ，　２００５；３１　：　１３－２４；　Ｈｏｄｇｅ　ｅｔ　ａｌ，　Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　２００５；１７４：　５９９４－６００４；　Ｖａｌｍｏｒｉ　ｅｔ　ａｌ，　Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　２００２；１６８：　４２３１　－４０；　Ｚｅｈ　ｅｔ　ａｌ，　Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　１９９９；１６２：　９８９－９４；　Ａｌｅｘａｎｄｅｒ－Ｍｉｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ，　Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ａｃａｄｅｍｙ　ｏｆ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　ｏｆ　Ａｍｅｒｉｃａ　１９９６；　９３：４１０２－７）。我々の研究では，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ誘発ＴＲＰ２特異的反応の機能活性の分析は，合成ペプチドによる免疫に比べ，高活性反応を生成することができることを実証した。この高活性反応はまた，インビトロで腫瘍細胞を識別し殺傷する能力の増大と相互に関連があった。ＡＰＣからの信号又は反応のプライミングの経路もまた，高活性免疫反応の誘発にとって極めて重要である（Ｏｈ　ｅｔ　ａｌ，　Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　２００３；１７０：　２５２３－３０）。

【０１７８】

実施例４　複数のエピトープはＣＤＲ　Ｈ２部位から処理されうる

複数のエピトープを免疫反応を引き起こすようにＣＤＲ　Ｈ２から処理され発現されうることを実証するために，オボアルブミンのＨ－２Ｋｂ拘束性エピトープＳＩＩＮＦＥＫＬ（ＤＣＩＢ２４：図２１）及びＨ－２Ｋｄ拘束性Ｂ型肝炎エピトープＩＰＱＳＬＤＳＷＷＴＳＬ（ＤＣＩＢ２１，図３３）を重可変領域のＨ２部位に改変した。これらのＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトはまた，軽可変領域にＩ－Ａｂ拘束性（ＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ）エピトープＢ型肝炎ＣＤ４エピトープ又はＩ－Ａｄ拘束性インフルエンザ赤血球凝集素（ＦＥＲＦＥＩＦＰＫＥ）エピトープを含んでいた。

【０１７９】

Ｃ５７ＢＩ／６又はＢａｌｂ／ｃマウスに，遺伝子銃により，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡを週間隔で３回皮内で免疫した。その後，脾細胞をＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔによりエピトープ特異的ＣＤ８及びＣＤ４反応の有無について分析した。

【０１８０】

Ｃ５７ＢＩ／６マウスは，高頻度ＳＩＩＮＦＥＫＬ特異的反応を示す一方，低いヘルパーエピトープ特異的反応を示した（図３４ａ）。Ｂａｌｂ／ｃマウスもまた，ヘルパーエピトープと同程度の反応を有する高頻度Ｂ型肝炎エピトープ特異的ＣＤ８反応を引き起こした。

【０１８１】

このデータは，ＣＤＲ　Ｈ２からのＣＤ８エピトープの処理及び発現は，特異的エピト

ープの配列又は長さに制限されないことを示している。

【０１８２】

実施例５　複数のＣＴＬエピトープは可変領域から処理されうる

エピトープがＣＤＲ領域だけでなく可変領域から処理及び発現されうることを実証すべく，フレームワーク領域の一部の除去とともにエピトープをＣＤＲ　Ｈ１部位に組み込んだ。

【０１８３】

エピトープの例は，改変されたＨＬＡ－Ａ２拘束性のエピトープであるｇｐ１００のＩＭＤＱＶＰＦＳＶ（ＤＣＩＢ１７，図３５）及びＴｉｅ－２のＦＬＰＡＴＬＴＭＶ（ＤＣＩＢ２６，図３６）である。ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトはまた，ＣＤＲ　Ｌ１部位にＢ型肝炎ＣＤ４エピトープを含んでいた。

【０１８４】

ＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックマウス（ＨＨＤＩＩ）に，遺伝子銃により，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡを週間隔で３回皮内で免疫した。その後，脾細胞をＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔによりエピトープ特異的ＣＤ８及びＣＤ４反応の有無について分析した。

【０１８５】

ＨＨＤＩＩマウスは，ＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープに対する相当の反応とともに高頻度ｇｐ１００　２１０Ｍ特異的反応を引き起こした（図３７ａ）。コンストラクトを含むＴｉｅ２エピトープで免疫したＨＨＤＩＩマウスにおける反応は，高頻度のものではなかったが，Ｔｉｅ２エピトープ及びＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープの両方に特異的なかなりの反応を引き起こした（図３７ｂ）。

【０１８６】

この例のデータは，可変領域に挿入されたエピトープは，インビボで免疫反応を起こすよう処理及び発現されうることを示している。これは１つのエピトープ配列に制限されないことも明らかである。

【０１８７】

実施例６　複数のＣＴＬ反応は同じＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクト内の異なるエピトープから生成されうる

前述のＨＬＡ－Ａ２拘束性ｇｐ１００エピトープＩＭＤＱＶＰＦＳＶを，同じコンストラクトのＣＤＲ　Ｈ２部位のＨＬＡ－Ａ２により同様に拘束されているＴＲＰ２エピトープＳＶＹＤＦＦＶＷＬとともにＣＤＲ　Ｈ１に改変した。ＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープはＣＤＲ　Ｌ１部位に存在した（ＤＣＩＢ１５，図１９）。

【０１８８】

ＨＨＤＩＩマウスに，遺伝子銃により，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡを週間隔で３回皮内で免疫した。その後，脾細胞をＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔによりエピトープ特異的ＣＤ８及びＣＤ４反応の有無について分析した。

【０１８９】

図３８ａは，ｇｐ１００及びＴＲＰ２エピトープの両方に特異的な反応が生成される様子を示すが，ＴＲＰ２特異的反応の頻度は少ない。ＨｅｐＢ　ＣＤ４ペプチドに対する反応もまた生成される。ＴＲＰ２特異的反応の活性もまた，ＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔでペプチド摘定により研究した。反応の活性は，ｇｐ１００エピトープの場合，１０－１０Ｍ～１０$^{-11}$Ｍペプチドの範囲であり，ＴＲＰ２エピトープの場合，１０$^{-9}$Ｍ～１０$^{-10}$Ｍペプチドの範囲である。代表例を図３８ｂに示す。反応がインビトロで標的細胞を殺傷することができるかどうかを判定するために，脾細胞をＴＲＰ２及びｇｐ１００ペプチドパルスＬＰＳブラスにより６日間インビトロで刺激し，ペプチド標識Ｔ２細胞及びＢ１６Ｆ１０　ＨＨＤメラノーマ細胞に対してクロム遊離アッセイで分析した。対照Ｂ１６Ｆ１０メラノーマ株に比べ，Ｂ１６Ｆ１０　ＨＨＤメラノーマ株の特異的殺傷。反応はまた，対照と比較したペプチド標識Ｔ細胞の特異的溶解を実証した（図３８ｃ）。

【０１９０】

単一のＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトの２つのＣＤ８エピトープを結合させるこ

とは，エピトープ間のある程度の免疫優勢をもたらすように思われる。免疫優勢エピトープは，ＭＨＣクラスＩに対する最高のアフィニティを有するエピトープである。ｇｐ１００及びＴＲＰ２　ＣＤ８エピトープの両方を含むコンストラクトにより免疫されたマウスとＴＲＰ２　ＣＤ８エピトープのみを含むコンストラクトで免疫されたマウスとを比較すると，ＴＲＰ２反応の頻度は減少する（図３８ｄ）。

【０１９１】

このデータは，エピトープ特異的免疫反応が２つの異なるＣＤ８エピトープに特異的な同じＤＮＡコンストラクトから生成されうることを実証している。これらはまた，インビトロでの抗腫瘍活性を示す。しかしながら，サブドミナントエピトープに対する反応の頻度を抑制するある程度の免疫優勢が存在する。

【０１９２】

ＣＤＲＨ２（ＤＣＩＢ１８）のＴＲＰ２エピトープ又はＣＤＲＨ２（ＤＣＩＢ２４）のＳＩＩＮＦＥＫＬを含む個別のＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトを用いて同様の研究を行った。マウスに，ＤＣＩＢ１８又はＤＣＩＢ２４を単体で，ＤＣＩＢ及びＤＣＩＢ２４を組み合わせて同じ部位に，又はＤＣＩＢ１８とＤＣＩＢ２４を同時にしかし別の部位にて，免疫した。免疫は週間隔で３回行い，ＤＮＡをエレクトロポレーションと併用して頚骨筋に筋肉内注入した。生成された免疫反応の分析は，マウスをＤＣＩＢ１８又はＤＣＩＢ単体で免疫した場合に高頻度ペプチド特異的反応を引き起こすことができることを示している（図３８ｅ）。同じ部位においてこれらのコンストラクトによりマウスに免疫することは，ＴＲＰ２ペプチド特異的反応の顕著な減少につながる。これは，ＳＩＩＮＦＥＫＬエピトープがＴＲＰ２エピトープに対して優勢であることを示す。ＴＲＰ２特異的反応は，マウスに別々の部位（ｐ＝０．００２６）のコンストラクトにより免疫すると回復することができる。このデータは，免疫優勢は，ＩＢ免疫により生成される免疫反応に実際影響を与えるが，これは空間的に離れた部位における免疫により解決されうることを示す。

【０１９３】

実施例７　無アンカー残留物改変はＴ細胞識別を強化しうる

前述の例は，改変ｇｐ１００エピトープＩＭＤＱＶＰＦＳＶが免疫優勢であり，ＨＬＡ－Ａ２に対する高いアフィニティを有することを示している（ＳＹＦＰＥＩＴＨＩアルゴリズムを用いて予測したように。また，Ｔ２安定化アッセイで実証したように。表５）。野生型ｇｐ１００エピトープＩＴＤＱＶＰＦＳＶは，免疫原性を持たないため，野生型エピトープと同様のＨＬＡ－Ａ２結合活性を有しながらなおかつ免疫原性を高める無アンカー残留物で改変を行った。これらの改変エピトープをＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトのＣＤＲ　Ｈ１部位に改変し，野生型エピトープとともに試験した（ＤＣＩＢ３７，ＤＣＩＢ４０，ＤＣＩＢ４１，ＤＣＩＢ４２，ＤＣＩＢ４３，図３９～図４３）。

【０１９４】

ＨＨＤＩＩマウスに，遺伝子銃により，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ重鎖ＤＮＡ単体で週間隔で３回皮内で免疫した。その後，脾細胞をＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔによりエピトープ特異的ＣＤ８反応の有無について分析した。ＨＬＡ－Ａ２（表５）に対するアフィニティを保持する野生型ｇｐ１００エピトープへの２つの改変（Ｆ７Ｌ及びＦ７Ｉ，ＤＣＩＢ３７，図３９，ＤＣＩＢ４０，図４０）は，野生型エピトープに比べ，エピトープ特異的免疫反応を誘発する優れた能力を実証した（図４４ａ）。

【０１９５】

（表５）

抗原	エピトープ	T2安定化アッセイ(m.f.i)	SYFPEITHIスコア
Gp100 (210M)	IMDQVPFSV	23.1	22
Gp100 (wt)	ITDQVPFSV	18.5	18
Gp100 (F7L)	ITDQVPLSV	18	19
Gp100 (F7I)	ITDQVPISV	Nd	18
TRP2	SVYDFFVWL	19	21
Control		7.29	-

【０１９６】
実施例８　複数のＣＤ４ヘルパー反応はインビボで免疫反応を起こすように処理及び発現されうる

ＣＤ４ヘルパーエピトープをインビボで免疫反応を起こすように処理及び発現されうるかどうかを分析するために，異なるエピトープをＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトのＣＤＲ　Ｌ１部位に独立に改変した。これらは，インフルエンザ赤血球凝集素のＩ－Ａｄ拘束性エピトープＦＥＲＦＥＩＦＰＫＥ（ＤＣＩＢ２１，図３３），ＨＢｃＡｇのＩ－Ａｂ拘束性エピトープＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ（ＤＣＩＢ１５，図１９），及びｇｐ１００のＨＬＡ－ＤＲ４拘束性エピトープＷＮＲＱＬＹＰＥＷＴＥＡＱＲＬＤ（ＤＣＩＢ３５，図４５）を含んでいた。

【０１９７】
Ｂａｌｂ／ｃ，Ｃ５７ＢＩ／６又はＨＨＤＩＩ及びＤＲ４トランスジェニックマウスに，遺伝子銃により，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡで週間隔で３回皮内で免疫した。その後，脾細胞をＩＦＮγ　ｅｓｌｉｓｐｏｔによりエピトープ特異的ＣＤ４反応の有無について分析した。図４６ａ，ｂ，ｃは，３つのＣＤ４ヘルパーエピトープのすべてがエピトープ特異的免疫反応をインビボで起こすようにＣＤＲ　Ｌ１部位から処理及び発現されうることを示している。

【０１９８】
ｇｐ１００ＨＬＡ－ＤＲ４拘束性エピトープを異なるＣＤＲからの処理及び発現についても試験した。エピトープをＣＤＲＬ１（ＤＣＩＢ３５，図４５），ＤＣＲＨ３（ＤＣＩＢ５４，図２９），又はＣＤＲＬ３（ＤＣＩＢ５０，図４７）に組み込むコンストラクトを使用して，ＨＬＡ－ＤＲ４トランスジェニックマウスに週間隔で３回免疫した。図４６ｄは，ヘルパーエピトープは高頻度ヘルパー反応を起こすように異なるＣＤＲから効率よく処理されうることを示している。

【０１９９】
実施例９　ＣＴＬ反応は分泌重鎖に部分的に依存するが，ヘルパー反応は分泌軽鎖を必要としない

古典的に，ＣＤ４　Ｔ細胞エピトープは，体外から獲得したタンパク質から処理され，ＣＤ８　Ｔ細胞エピトープは，体外で生成されたタンパク質から処理される。体外から獲得した抗原からのエピトープの交差提示がＣＤ８　Ｔ細胞媒介反応を起こす証拠が現在存在する。このプライミング経路はまた，ＣＤ８　Ｔ細胞媒免疫反応の開発の点でより効率的なものであることが提案されている。最近，ＣＤ４媒介反応についても同様の発見があった。山のような証拠は，細胞内タンパク質由来のＣＤ４　Ｔ細胞エピトープはＭＨＣクラスＩＩとの関連で処理及び発現されうることを示している。

【０２００】
分泌ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙがＣＤ８及びＣＤ４　Ｔ細胞反応に必要であるかどうかを判定するために，ＣＤＲ　Ｈ１部位のＨＬＡ－Ａ２拘束性ｇｐ１００エピトープＩＭＤＱＶＰＦＳＶ及びＣＤＲ　Ｌ１部位のＩ－Ａｂ拘束性ＨｅｐＢヘルパーエピトープＴＯＯＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬを含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトを重鎖又は軽鎖上にリーダー配列なしで作った（図１０及び図１１）。

【０２０１】
ＨＨＤＩＩマウスに，遺伝子銃により，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡにより週間隔で３回皮内で免疫した。その後，脾細胞をＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔによりエピトープ特異的ＣＤ８及びＣＤ４　Ｔ細胞反応の有無について分析した。反応をｇｐ１００特異的ＣＤ８反応について分析すると，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトの重鎖からのリーダー配列の除去は，エピトープ特異的反応の減少につながるが，ＣＤ４４反応には影響を及ぼさないことが観察された（図４８ａ）。重鎖からのリーダー配列の除去は，トランスフェクトＣＨＯ－Ｓ細胞による重鎖の分泌に影響を及ぼした（図４８ｂ）。軽鎖からのリーダー配列の除去，これによる軽鎖の分泌防止，は，エピトープ特異的ＣＤ８又はＣＤ４反応に影響を与えないように思われる（図４８ｃ）。ＣＤ８反応は，重鎖上にリーダー配列が

存在しない場合顕著に減少したが，ＣＤ４反応は，影響を受けなかった（図４８ｃ及び図４８ｄ）。

【０２０２】

このデータは，重鎖の分泌がＣＤ８　Ｔ細胞反応の効率的誘発にとって重要であることを意味し，ＣＤ８エピトープは交差提示を受けていることを示している。第二に，それは，ＣＤ４エピトープは免疫反応を起こす細胞内ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙに由来することを意味している。

【０２０３】

実施例１０　タンパク質分泌の欠乏によるＦｃのない低下したＣＴＬ反応

この実験は，Ｆｃ領域の存在が効率的な免疫反応を達成する上で有用であるかどうかを観察するものである。転写及び翻訳を防止するストップコンドンをＦｃの前に組み込むことにより，ＣＤＲ　Ｈ２のＨ－２Ｋｂ拘束性ＴＲＰ２エピトープＳＶＹＤＦＦＶＷＬ及びＩ－Ａｂ拘束性ＨｅｐＢ　ＣＤ４エピトープＴＰＰＡＹＲＰＰＮＡＰＩＬ（ＤＣＩＢ１５）を含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトからＦｃ領域を除去した（図９）。

【０２０４】

Ｃ５７ＢＩ／６マウスに，遺伝子銃により，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡを週間隔で３回経皮で免疫した。その後，脾細胞をＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔによりエピトープ特異的ＣＤ８及びＣＤ４　Ｔ細胞反応の有無について分析した。

【０２０５】

Ｆｃ領域を有さないＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトにより免疫したマウスは，Ｆｃ領域を有するコンストラクトに比べ，非常に低レベルの腫瘍細胞株Ｂ１６Ｆ１０の識別が可能な低レベルのＴＲＰ２ペプチド特異的反応を生成した（図４９ａ）。多数の実験からのＴＲＰ２及びＨｅｐＢヘルパーペプチド特異的反応の両方の分析は，Ｆｃ領域を有さないコンストラクトは著しく低いＴＲＰ２ペプチド特異的反応を生成することを示している（図４９ｂ）。しかしながら，ＨｅｐＢヘルパー反応は，Ｆｃ領域の除去により影響を受けない（図４９ｃ）。これは，ヘルパーが分泌されず，よって直接提示により機能している軽鎖においてヘルパーが最もよく機能することを示す我々の前述の結果と一致するものである。対照的に，ＣＴＬ反応は，直接提示及び間接提示の両方により刺激され，後者はＦｃ標的の恩恵を受けうる。あるいは，Ｆｃストップコンストラクトは，低下した反応を説明しうる欠失重鎖の低い分泌につながる。したがって，ＴＲＰ－２をコードするＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙは，ＩｇＧ２（ＤＣＩＢ３３）及びＩｇＧ３定常領域（ＤＣＩＢ６５）により改変される。前者は，ＣＤ６４に結合しないはずだが，ＣＤ３２に結合しうる。また，マウスのＦｃレセプターIVにも結合しうる。ヒトＩｇＧ３は，ＣＤ３２及びＣＤ６４の両方に結合しうる。両ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙは，強力なＣＴＬ反応を刺激した（図４９ｅ）。これは，Ｆｃ標的が間接提示の強力な要因ではないことを示している。この問題をさらに検証するために，ＩｇＧ１のＦｃ標的ドメインを同等のＩｇＧ２ドメインと置換し，又はその逆を行った（ＤＣＩＢ６６，６７，図１５及び図１６）。両コンストラクトは，強力なＣＴＬ反応を刺激した（図４９ｅ）。これは，Ｆｃ結合に関連せずに可能にする重鎖のみを分泌するＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙワクチンのためでありうる。

【０２０６】

実施例１１　ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ免疫は，免疫反応を強化し全抗原で観察された規制を克服する。それはまた，新しいＴ細胞エピトープの同定を可能にする

これは，ほとんどの自己抗原と対照的に，制御性エピトープを発現しない不活性担体であるＴ細胞エピトープをコードするヒト抗体により免疫することの第二の利点につながる。ｇｐ１００エピトープ又はＴＲＰ－２エピトープを発現するＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙは，高頻度・高活性のＴ細胞反応（頻度１／10^{3}，活性10^{-10}Ｍ）を刺激する一方，ＴＲＰ－２のｇｐ１００全抗原は，低頻度かつ低活性でＴ細胞を刺激した（頻度１／10^{5}，活性10^{-7}Ｍ）。ＣＤ２５の枯渇は，抗原に対する反応を部分的に回復させたが，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙはなお１００倍優れていた（図５０ａ及び図５０ｂ）。

【０２０７】

同様に，Ｆｃに結合するＴｉｅ－２の最初の２００アミノ酸をコードするＤＮＡによる免疫は，上位１０の予測エピトープに対する免疫反応を刺激しなかった。Ｔｉｅ－２の最初の１９６アミノ酸の配列をＥｐｉｊｅｎ及びＮｅｔＣＴＬオンライン予測アルゴリズムに入れた。これらの方法は両方ともＨＬＡ－Ａ＊０２０１結合アフィニティに加え，プロテアソーム切断及びＴＡＰ輸送を考慮に入れている。ＭＨＣｐｒｅｄ及びＳｙｆｐｅｉｔｈｉアルゴリズムをも予測ＭＨＣ結合アフィニティのみを考慮に入れる古い予測アルゴリズムの例として用いた。全Ｔｉｅ－２分子は，最初の１９６アミノ酸に存在するエピトープに対して免疫優勢の影響を及ぼしうる追加のＣＴＬエピトープを含みえた。したがって，全分子からの各予測エピトープのランクを得るために，Ｔｉｅ－２の全配列も同じアルゴリズムに入れた。ヒトとマウスで相同でないペプチドは考慮に入れなかった。複数の異なる予測アルゴリズムにより良好なＣＴＬエピトープを発現すると確実に予測された残存ペプチドのうちの６つを選択した。これらのペプチドの各々に対して異なるアルゴリズムにより得られた相対スコアを，Ｚ８３（これまでに同定されたエピトープ）の結果とともに，表６にまとめている。

【０２０８】

トランスフェクトＣＨＯ－Ｓ細胞からの上清の分析に関する追加データは，ＣＤＲＨ３又はＣＤＲＬ３に組み込まれるＣＴＬエピトープを有するコンストラクトのみが無傷抗体として分泌されることを示している（図２０ｅ）。対照的に，ＣＤＲＨ１又はＣＤＲＨ２内の任意のエピトープの組み込みは，軽鎖内に組み込まれるものがなく分泌されても重だが少量の無傷抗体の分泌を可能にした。任意の軽鎖のＣＤＲＬ１内の任意のエピトープの組み込みは，重鎖のＣＤＲＨ３に組み込まれるエピトープしか存在しない場合でも，軽鎖の低レベルの分泌につながった。

【０２０９】

Ｔ細胞レパートリーが任意のＴｉｅ－２からの予測ＣＴＬエピトープを識別するＨＬＡ－Ａ＊０２０１トランスジェニックマウスに存在するかどうかを判定するために，動物にｎａｔｉｖｅ　Ｔｉｅ２　Ｃ２００ｈＦｃ　ＤＮＡコンストラクトで免疫し（Ｒａｍａｇｅ　ｅｔ　ａｌ，　Ｉｎｔ．　Ｊ．　Ｃａｎｃｅｒ　２００４：１１０：２４５－２５０），脾細胞をＥＬＩＳＰＯＴアッセイでペプチド特異的ＩＦＮγ反応についてスクリーニングした。別のグループのマウスには，ＤＮＡ免疫の４日前に，前述同様に，ＰＣ６１　ｍＡｂによる処理を行った後に，Ｃ２００ｈＦｃにより免疫した。

【０２１０】

ｎａｔｉｖｅ　Ｃ２００ｈＦｃ　ＤＮＡにより免疫したマウスは，該動物が免疫の前にＣＤ２５$^{+}$制御性Ｔ細胞を枯渇していたか否かにかかわらず，Ｚ８３を識別するＩＦＮγ反応を開始しなかった。免疫前に制御性Ｔ細胞を枯渇していなかった動物から試験した任意の新しいペプチドに対する著しいＩＦＮγ反応は見られなかったが，例外として，Ｚ２８４は，平均６９ＳＦＣ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞で１つの動物（Ｍ３）において反応を刺激しているように見えた（図５０ｃ及び図５０ｄ）。ＤＮＡ免疫前に制御性Ｔ細胞を枯渇した動物からは，２／３の動物（Ｍ１及びＭ３）がＺ２８２ペプチドによる再刺激に対するＩＦＮγ反応を示し，平均値は，それぞれ，３２０及び９４ＳＦＣ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞であった。Ｍ１はまた，Ｚ２８５による再刺激に対する部分的反応を示し，平均が８５ＳＦＣ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞であった。

【０２１１】

Ｔｉｅ－２からの予測ＣＤ８$^{+}$エピトープのインビボスクリーニングの明らかに矛盾する結果は，免疫優勢の結果であろう。なぜなら，ＣＤ２５$^{+}$細胞がない場合ｎａｔｉｖｅ　Ｃ２００ＨＦｃにより免疫したマウスからのＩＦＮγ反応は，１つの優勢ペプチドに偏るように思われるためである。他の潜在ＣＤ８$^{+}$エピトープからの競争がない場合，Ｚ２８２エピトープに反応することのできるＴ細胞レパートリーをさらに調査するために，ＨＨＤマウスのグループに，ＣＤ２５$^{+}$制御性Ｔ細胞の存在下又は非存在下で，ＩＦＡのＺ２８２ペプチドにより免疫した。

【０２１２】

Ｚ２８２を免疫したマウスはすべて，ＣＤ２５$^{+}$制御性Ｔ細胞の存在下で免疫された場合でも，ペプチド特異的ＩＦＮγ反応を開始した。非枯渇動物のマウス３は，最高の反応を開始し，平均値が２１５ＳＦＣ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞であった。枯渇動物からの最高の反応はマウス２から観察され，平均値が１３７ＳＦＣ／ｍｉｌｌｉｏｎ脾細胞であった（図５０ｅ及び図５０ｆ）。

【０２１３】

ペプチド免疫により誘発された反応は低頻度のままである。エピトープを全抗原により生成される制御作用から除去した場合に高頻度反応が生成されるかどうかを観察するために，ｚ２８２（ｚ１２としても知られる）エピトープをＬ１のＨｅｐＢ　ＣＤ４とともにＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトのＨ１部位に改変した（ＤＣＩＢ７１，図５１）。その後，ＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックマウスに（遺伝子銃により）ｚ１２ペプチド又はＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡで週間隔で３回免疫し，その後，エピトープ特異的免疫反応について分析した。ｚ１２ペプチドにより免疫したすべてのマウスは，低頻度及び低活性エピトープ特異的反応を示す（図５０ｇ）。しかしながら，ｚ１２エピトープをＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトに改変すると，高頻度及び高活性反応がすべてのマウスに誘発される（図５０ｈ）。

【０２１４】

要約すると，免疫前にＣＤ２５細胞を枯渇させると，免疫反応がＴｉｅ２エピトープの３／１０にまで刺激された。同様に，これらのエピトープの１つがペプチドとして発現されると，弱い免疫反応が生成されえた。しかしながら，このエピトープがＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクト内で発現されると，高頻度及び高活性のＴ細胞反応が生成された。これらの結果は，Ｔｉｅ－２の最初の２００アミノ酸内にはＣＴＬ反応を抑制するＴｒｅｇエピトープが存在することを示している。これらのＴｒｅｇ又はそのエピトープを除去すると，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ内での発現によりさらに強化されうる自己抗原に対する反応を発見することが可能である。

【０２１５】

（表６）予測されたＴｉｅ－２からのＨＬＡ－Ａ＊０２０１拘束性ＣＴＬエピトープ

名称[1]	開始[2]	ペプチド[3]	Epijen[4]		NetCTL[5]		Syfpeithi[6]		MHCPred[7]	
			スコア (IC50nM)	ランク	スコア	ランク	スコア	ランク	スコア (IC50nM)	ランク
Z83	124	FLPATLTMT	---	---	0.73	9 (27)	19	18 (55)	2978	96 (633)
Z282	27	ILINSLPLV	0.05	1	1.39*	1	29	1 (2)	16	2 (6)
Z283	146	VLIKEEDAV	0.23	2 (5)	0.7	10 (31)	24	5 (11)	89	9 (34)
Z284	64	LMNQHQDPL	0.98	3 (7)	0.88*	3 (11)	21	9 (32)	113	11 (51)
Z285	8	VLCGVSLLL	1.19	4 (10)	0.94*	2 (9)	24	4 (10)	242	21 (125)
Z286	34	LVSDAETSL	---	---	0.74	8 (26)	19	15 (52)	887	65 (349)
Z287	26	LILINSLPL	---	---	0.88*	4 (12)	23	7 (16)	607	57 (271)
Z18	*(flu)*	*GILGFVFTL*	*0.19*	*(1)*	*1.29*	*(2)*	*30*		*419*	*(87)*

１：ペプチド名。

２：Ｔｉｅ－２分子内のアミノ酸残基開始位置。

３：ペプチド配列。

４：Ｅｐｉｊｅｎウェブサーバを用いた予測。スコアは，IC_{50}ｎＭの単位で与えられ，スコアが低いほど高アフィニティのペプチドであることを表す。

５：ＮｅｔＣＴＬ　１．２ウェブサーバを用いた予測。スコアは，３つの個々の予測方法の加重和を表し，１に対するＭＨＣ結合の相対的重み付けを伴う。＊は，周知のエピトープに対して得られるデータセットからのＣＴＬエピトープのカットオフ値として認定される閾値０．７５以上のスコアを示す。

６：ＳＹＦＰＥＩＴＨＩプログラムを用いた予測。ＨＬＡ－Ａ＊０２０１結合ペプチドの最大スコアは３６である。

７：ＭＨＣ及びＴＡＰに対するペプチドアフィニティを予測するＭＨＣＰｒｅｄ相加法

を用いた予測。スコアは再びＩＣ５０ｎＭの単位で与えられ，スコアが低いほど高いアフィニティのペプチドであることを表す。推奨されるＩＣ５０値は，０．０１～５０００ｎＭである。

すべての予測方法において，ランク値は，１９６アミノ酸断片からエピトープが予測される順序を示し，括弧内の値は，全Ｔｉｅ－２分子からのランク予測を表す。インフルエンザＡ型ウイルスのマトリクスタンパク質由来の周知のＺ１８　ＣＴＬエピトープに対して得られる値が比較のために含まれている。

【０２１６】

実施例１２　Ｔ細胞ヘルプの提供における異種Ｆｃの役割及び抗原特異的Ｔ細胞ヘルプの要件

高活性Ｔ細胞反応の刺激は，通常，プライミング中Ｔ細胞ヘルプを必要とする。これは，軽鎖内にコードされるＨｅｐ　Ｂ外来ヘルパーエピトープによって提供されるであろうと従来考えられていた。実際，強力なヘルパー反応は，このエピトープに対して生成された。しかしながら，重鎖と軽鎖の両方の鎖が同じＡＰＣにより生成される場合，ＨｅｐＢエピトープは直接提示のためのヘルプを提供することができたが，重鎖は分泌され，軽鎖は分泌されなかったため，間接提示重鎖のためのヘルプを提供しえたとは考えにくい。なぜなら，これは，同じ抗原提示細胞によって取り込まれるとは考えにくいからである。したがって，マウスに，重鎖のみをコードするＤＮＡベクターにより免疫した。高頻度・高活性のＣＴＬ反応がなお生成された（図５３ａ及び図５３ｂ）。これは，ヘルプを必要としないか，あるいは，マウスにおいて移出であるヒトＦｃが結合外来ヘルプを提供していることを意味する。したがって，マウスＩｇＧ２ａコンストラクトを重鎖及び軽鎖について分析し（図４９ｇ），免疫反応の生成についてスクリーニングした（ＤＣＩＢ５３，図５４）。なお高頻度・高活性のＴ細胞反応を生成したが，ヒトコンストラクトと同程度には強力でなく，異種Ｆｃは結合ヘルプを提供していた（図５３ｃ及び図５３ｄ）。その後，ＣＴＬ生成のための結合ヘルプ，及び腫瘍環境内の炎症を刺激する抗原特異的Ｔ細胞ヘルプの両方を提供するようにＨＬＡ－ＤＲ４　ｇｐ１００エピトープをマウスＩｇＧ２ａコンストラクト（ＤＣＩＢ６４，図５５）に組み込んだ。これらのコンストラクトは，高頻度・高活性のＣＴＬ及びヘルパー反応を刺激する（図５３ｅ及び図５３ｆ）。同じエピトープを発現するｇＩｇＧ１コンストラクトをヒト患者に用いることができる。

【０２１７】

実施例１３　免疫プロテアソーム処理はＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクト内のエピトープからの反応の生成において重要である

免疫プロテアソームは，異なるパターンの分裂を有するため，自己抗原から生成されるエピトープの配列を変更する能力を有することが示唆されている。ある場合には，新しいエピトープは，免疫プロテアソームの上方調節により生成され，またある場合には，エピトープは破壊される。免疫プロテアソームは，メラノーマ抗原，すなわち，ＭｅｌａｎＡ／ＭＡＲＴ－１，ｇｐ１００$^{209-217}$，及びＴｙｒｏｓｉｎａｓｅ$^{369-377}$に由来する複数のエピトープを生成することができないという証拠がある（Ｃｈａｐｉｒｏ　ｅｔ　ａｌ　２００６．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ；１７６：１０５３－６１）。Ｃｈａｐｉｒｏ及び同僚は，ｇｐ１００エピトープを処理及び発現する能力は，免疫プロテアソームの上方調節に関連があることを示唆した。成熟ＤＣは，免疫反応のプライミングに関与すると考えられており，また，免疫プロテアソームを構成的に発現することが知られている（Ｍａｃａｇｎｏ　ｅｔ　ａｌ，２００１．Ｅｕｒ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ；３１：３２７１－８０）。そこで，ｇｐ１００$^{209-217}$エピトープをＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトのＣＤＲＨ１部位に改変し，ＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックマウスにおけるペプチド特異的免疫反応を誘発する能力を試験した。このコンストラクトからはペプチド特異的反応は観察されなかった（図５６）。しかしながら，該エピトープを２１０（２１０Ｍ）の位置においてトレオニンの代わりにメチオニンを有するように改変すると，これは，免疫プロテアソームによる分裂を防止し，エピトープ特異的反応が観察された（図５６）。

【０２１８】
ＶＥＧＦＲ２（ａａ７７３－７８１　ＶＩＡＭＦＦＷＬＬ）由来のＨＬＡ－Ａ２拘束性ペプチド及び２つの改変ｈＴＥＲＴペプチド（ａａ５７２－５８０　ＹＬＦＦＹＲＫＳＶ及びａａ９８８－９９７　ＹＬＱＶＮＳＬＱＴＶ）もまたＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトからの反応の生成について試験した。これらのエピトープは最初コンピュータによるエピトープ予測及びペプチド免疫により発見されたため，プロテアソーム処理の要件を否定する。しかしながら，これらは，宿主内皮／腫瘍細胞の表面にて発現され，このことは，これらが構成的プロテアソームにより全抗原から処理されることを示唆している。これらのエピトープのいずれもが，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトに改変された場合に反応を生成しなかったが，このことは，プロテアソームによる処理が免疫反応の効率的な生成に必要とされうることを示唆している。

【０２１９】
実施例１４　異なる免疫方法は，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙワクチンからの免疫反応を引き起こすのに効率的である

ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙワクチンは，遺伝子銃により投与した場合に，高頻度・高活性のＣＤ８及びＣＤ４反応を引き起こすのに効率的であることが示されている。その後，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙワクチンを他の免疫方法を用いてＴ細胞反応の生成について試験した。

【０２２０】
Ｃ５７ＢＩ／６マウスに，ＣＤＲＨ２のＴＲＰ２エピトープを含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡにより皮内又は筋肉内経路で免疫した。免疫は，エレクトロポレーションと組み合わせて又は組み合わせずに，週間隔で３回行った。

【０２２１】
遺伝子銃で免疫したマウスは，高頻度ＴＲＰ２ペプチド特異的反応を示す。これらは，エレクトロポレーションと組み合わせて皮内又は筋肉内経路で免疫したマウスと同程度である。エレクトロポレーションを伴わずに皮内又は筋肉内経路で免疫した場合は，低頻度のＴＲＰ２ペプチド特異的反応を生成した（図５７ａ）。すべてのＴＲＰ２ペプチド特異的反応は，ペプチド摘定により測定した（図５７ｂ）。

【０２２２】
実施例１５　ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ免疫は白斑様色素脱失を誘発し腫瘍攻撃から保護する

ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡにより免疫したマウスは，高転移性かつ低免疫原性の腫瘍細胞株Ｂ１６Ｆ１０に対する細胞毒性能力のある免疫反応を生成するため，ワクチンをインビボでの予防効果について試験した。

【０２２３】
マウスに遺伝子銃で週間隔で５回腹部の毛を剃った皮膚にＩＢ　ＤＮＡ（ＤＣＩＢ１８，図３０）により免疫した。免疫スケジュールの途中，マウスに，肺に転移性腫瘍を形成するＩＦＮαを発現する1×10^4のＢ１６Ｆ１０細胞により静脈内注入した。最後の免疫後，毛を元の状態に生えさせると，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡにより免疫したマウスの免疫に部位に白い毛が生えてくるのが観察された（図５８ａ）。腫瘍細胞注入の７週間後，マウスを犠牲にし，内部及び外部の肺転移数を分析した。ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡを免疫したマウスは，非処理の対照マウスに比べ，肺転移の数に著しい減少が見られた。

【０２２４】
また，マウスに遺伝子銃で週間隔で３回ＩＢ　ＤＮＡ（ＤＣＩＢ１８）により免疫した。最後の免疫の７日後，マウスを皮下でＩＦＮαを発現する2×10^4のＢ１６Ｆ１０細胞で攻撃した。マウスを腫瘍の成長及び生存について監視した。腫瘍が内務省の規制による最大限度に達するとマウスを安楽死させた。ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡ免疫マウスは，著しく低い腫瘍の成長及び長期生存を示した。

【０２２５】
ＴＲＰ２特異的反応は，ＣＤ８＋細胞が反応を無効にするので，ＣＤ８に媒介される。

ＣＤ８　Ｔ細胞は，抗腫瘍免疫において主役であると見なされており，我々の結果は，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡ免疫がマウスモデルにおいてインビボ抗腫瘍免疫を引き起こすことを示している。病気の兆候がないすべての免疫マウスは，免疫の部位において毛皮の白斑様色素脱失を示した。これまで白斑はしばしばマウスの腫瘍保護と関連があり，転移性メラノーマの患者における良好なＩＬ－２免疫療法と大いに相関性がある（Ｏｖｅｒｗｉｊｋ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａ １９９９；９６：２９８２－７；Ｌａｎｅ ｅｔ ａｌ，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２００４；６４：１５０９－１４；Ｓｔｅｉｔｚ ｅｔ ａｌ，Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ ２００６；５５：２４６－５３；Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ ＆ Ｗｈｉｔｅ，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ Ｅｍｐｈａｓｉｓ Ｔｕｍｏｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ １９９６；１９：８１－４）。

【０２２６】

実施例１６　ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ免疫は腫瘍の成長を著しく遅らせる

ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ免疫は，腫瘍攻撃を有意に阻止することがこれまで示されている。その後，ワクチンを治療環境における有効性について試験した。

【０２２７】

Ｃ５７ＢＩ／６マウスに2×10^4のＢ１６Ｆ１０腫瘍細胞で皮下注入した。注入の４日後，マウスに，ＣＤＲＨ２のＴＲＰ２エピトープを含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡ又は対照ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡで免疫した。腫瘍注入後１１日目及び１８日目に反復免疫を行った。腫瘍の成長を３～４日間隔で監視した。ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ免疫マウスは，対照免疫マウスに比べ，攻撃的Ｂ１６Ｆ１０メラノーマの成長に有意な遅延を示した。

【０２２８】

また，攻撃性の弱いＢ１６Ｆ１０　ＩＦＮα腫瘍株を用いて同様の研究を行った。Ｃ５７ＢＩ／６マウスに，2×10^4の腫瘍細胞を皮下で注入し，１４日目にＩｍｕｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡまたは対照ＤＮＡで免疫した。腫瘍注入後２１日目及び２８日目に反復免疫を行った。ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ免疫マウスは，腫瘍注入後４７日目に対照免疫マウスに比べ優位に低い腫瘍の成長を示した。以前のデータは，Ｔ制御性細胞の枯渇が免疫反応の生成を強化し，よって，抗腫瘍の研究が行われることを示唆していた。この研究において，マウスに2×10^4のＢ１６Ｆ１０腫瘍細胞を皮下で注入し，４日目，１１日目，１８日目にＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ　ＤＮＡ又は対照ＤＮＡで免疫した。０日目に抗ＣＤ２５抗体（ＰＣ６１）の注入によりマウスからＴ制御性細胞を枯渇させた。２回目の免疫と同時に，マウスには抗ＣＴＬＡ－４抗体も注入した。なぜなら，ＣＴＬＡ－４の遮断もまた制御性Ｔ細胞の抑制に有用であることが分かったためである。腫瘍の成長を監視した。ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ免疫は，腫瘍の成長（ｐ＝０．０１８８）を有意に遅らせたが、これは、抗ＣＤ２５及び抗ＣＴＬＡ－４抗体（ｐ＝０．００１）による処理によりさらに強化された（図５９ｃ）。抗ＣＤ２５抗体による処理は、ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ免疫マウスで観察された腫瘍の成長を有意に遅らせないようであった。

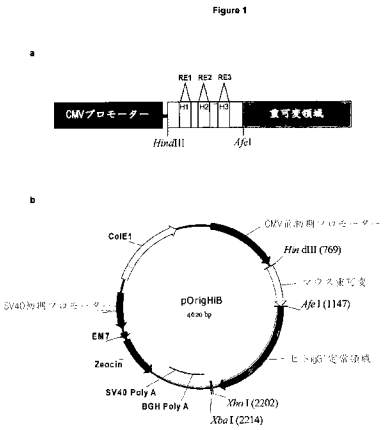
【０２２９】

実施例１７　免疫反応は異なるベクターバックボーンから発現されるＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトから生成されうる

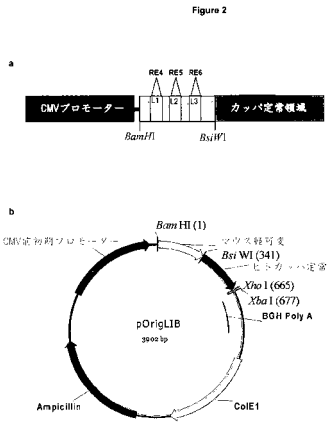
ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトが異なるベクターバックボーンから発現される場合の反応を分析した。ＣＤＲＨ１のｇｐ１００ＤＲ７エピトープ，ＣＤＲＨ２のＴＲＰ２エピトープ，及びＣＤＲＨ３のｇｐ１００ＤＲ４を野生型軽鎖とともに含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトを二重発現ベクターＤＣＯｒｉｇ及びＤＣＶａｘに改変した（ＤＣＩＢ５４，図１８及び図２９）。ＨＬＡ－ＤＲ４トランスジェニックマウスに遺伝子銃により週間隔で３回免疫し，反応をＩＦＮγ　ｅｌｉｓｐｏｔアッセイによりインビトロで分析した。

【０２３０】
ＣＤＲＨ１及びＣＤＲＬ３のｇｐ１００ＤＲ７，ＣＤＲＨ２のＴＲＰ２２エピトープ，ＣＤＲＨ３及びＣＤＲＬ１のｇｐ１００ＤＲ４エピトープを含むＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトを用いて同様の実験を行った（ＤＣＩＢ６８，図６０）。このコンストラクトを，ＤＣＯｒｉｇ，及びＳＶ４０プロモーター及びＤＣＶａｘベクターバックボーンを欠くＤＣＯｒｉｇの両方に改変した。
【０２３１】
Ｏｒｉｇベクター（Ｂ１－３）のＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトで免疫したマウスは，ｐＶａｘベクター（Ｃ１－３）のＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙコンストラクトに比べ，同様の頻度のエピトープ反応を示した（図６１）。
【０２３２】
要約すると，ＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙ技術は，非免疫原性の抗体フレームワークから高頻度・高活性のＣＤ８・ＣＤ４免疫反応を引き起こす優れた能力を有し，インビボでの腫瘍の成長を効果的に防ぐことができる。それは，６つの異なる抗原を同時に標的にする能力を有し，また，全抗原免疫原を使用する場合にしばしば発生する制御性Ｔ細胞の問題を回避する能力を有する。この技術は，ワクチン接種への新しいアプローチを提供し，他の多くの癌型及び微生物関連疾患用の多価ワクチンとして用いられるＩｍｍｕｎｏＢｏｄｙシステムの可能性を示す。

【図１】

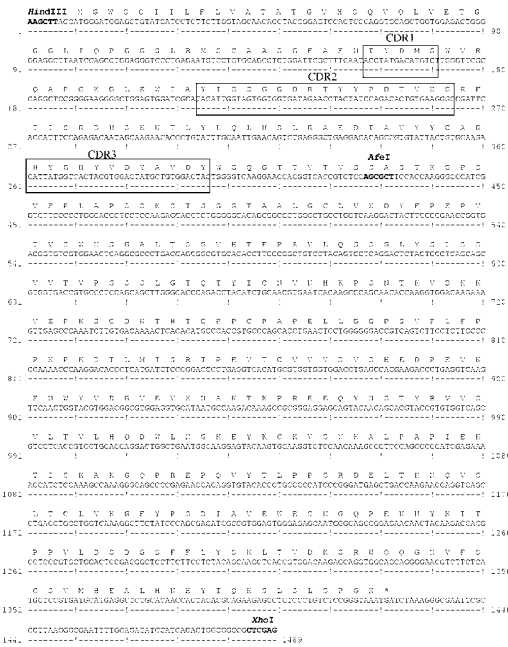


【図２】



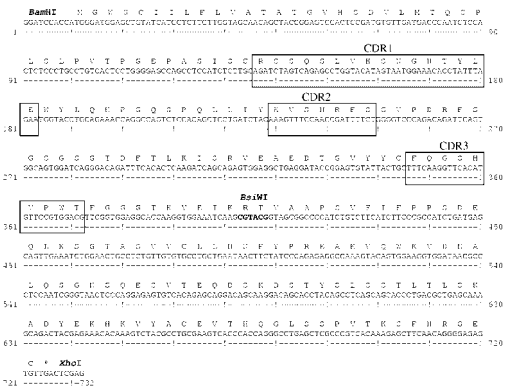
【図３】

Figure 3



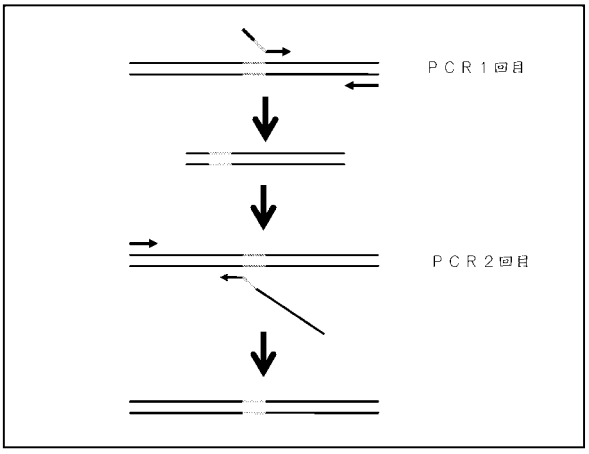
【図４】

Figure 4



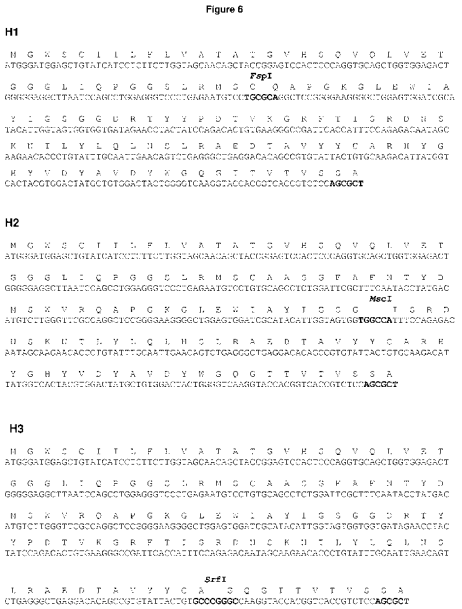
【図５】

Figure 5

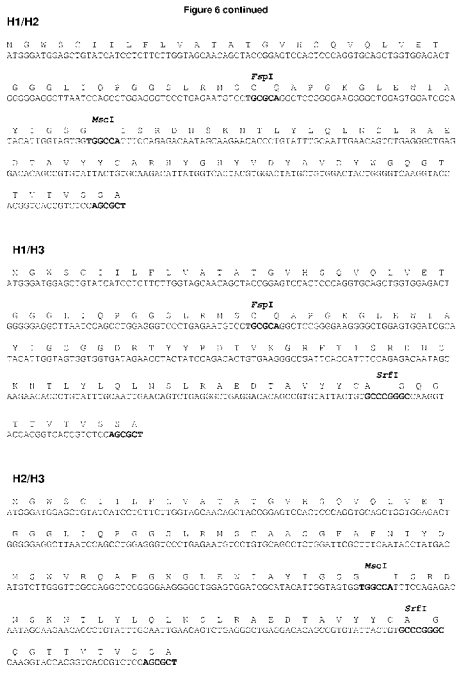


【図６Ａ】

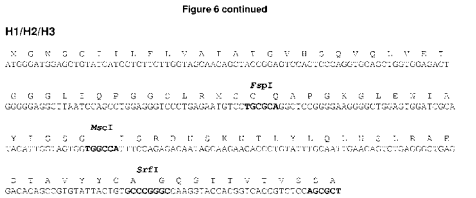
Figure 6



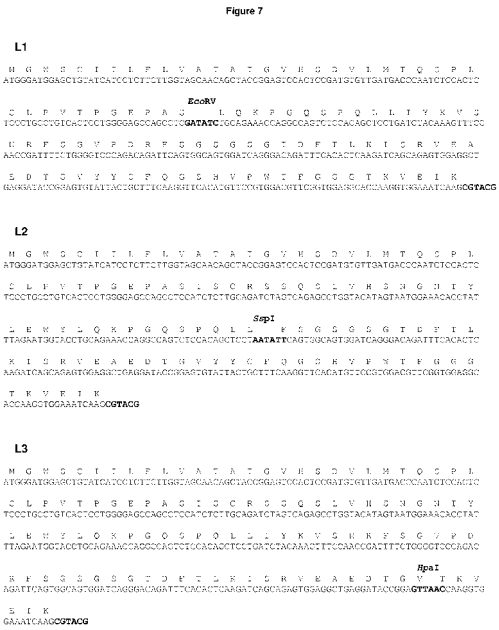
【図６Ｂ】



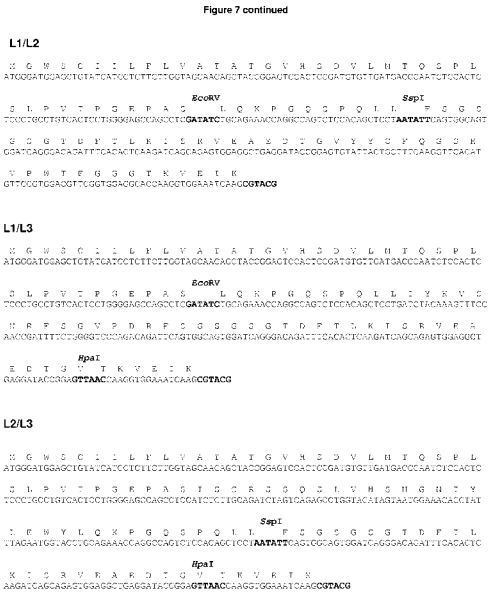
【図６Ｃ】



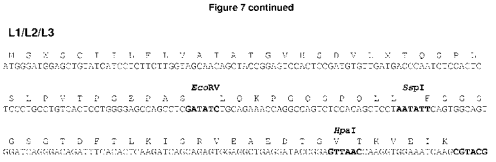
【図７Ａ】



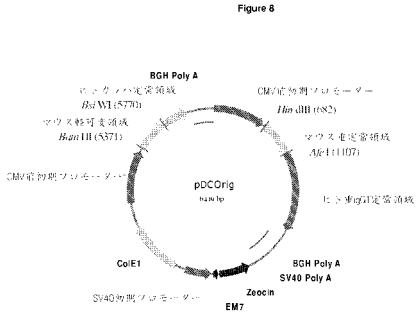
【図７Ｂ】



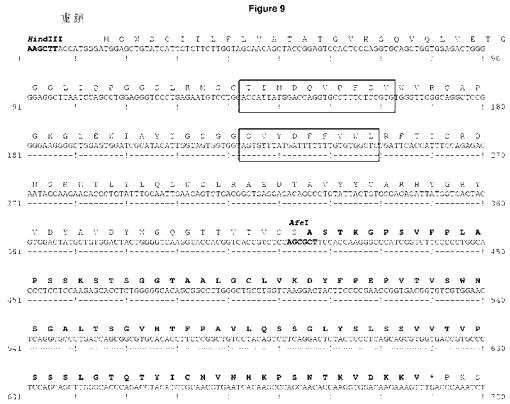
【図７Ｃ】



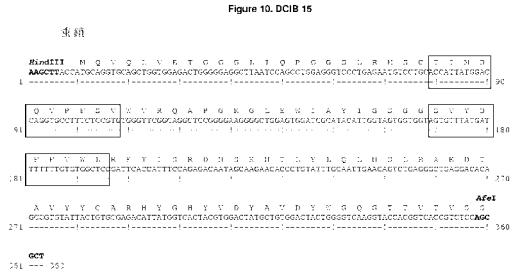
【図８】



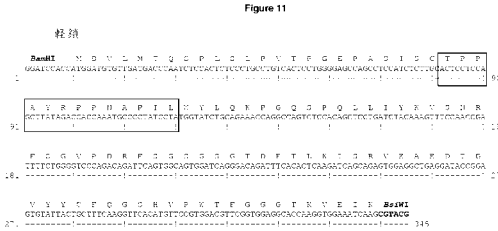
【図９】



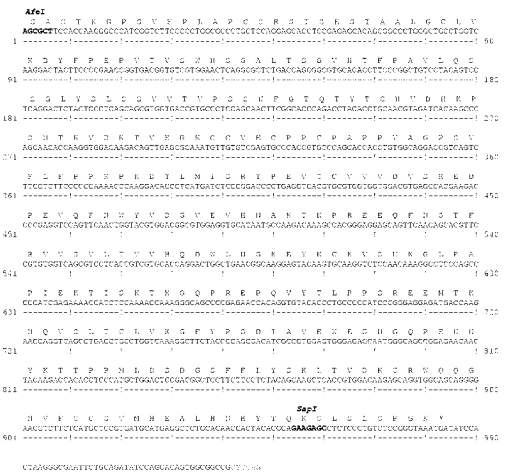
【図１０】



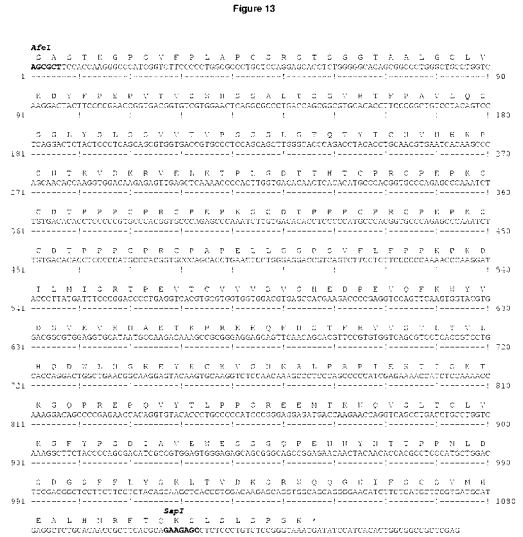
【図１１】



【図１２】



【図１３】



【図１４】

Figure 14

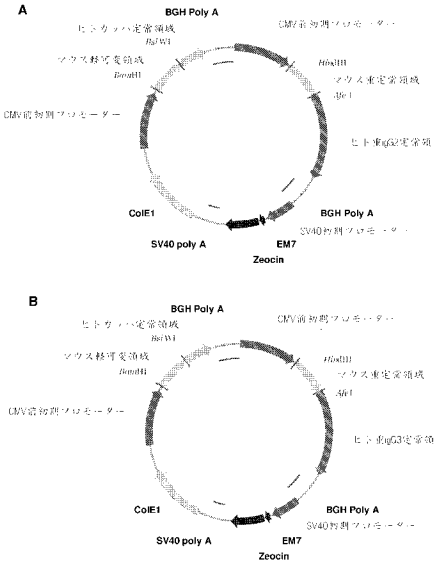
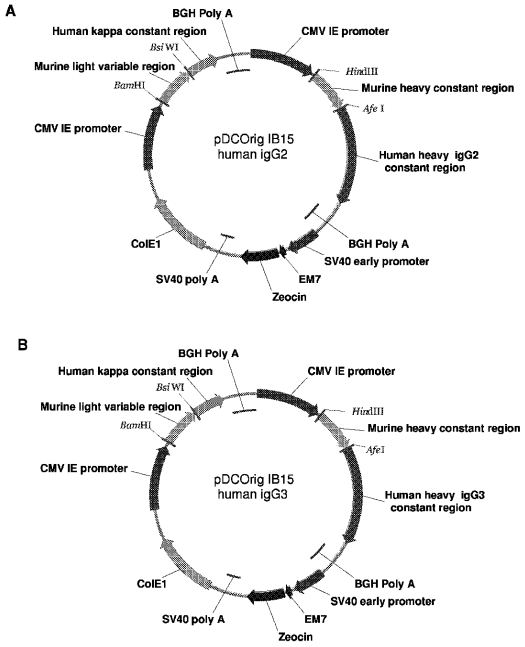
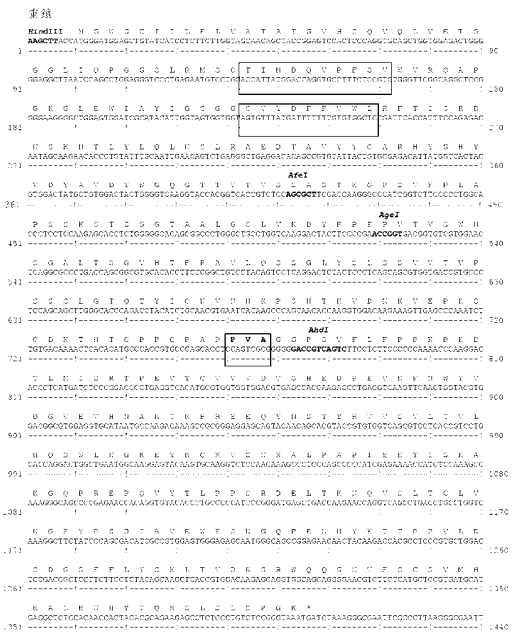


Figure 14



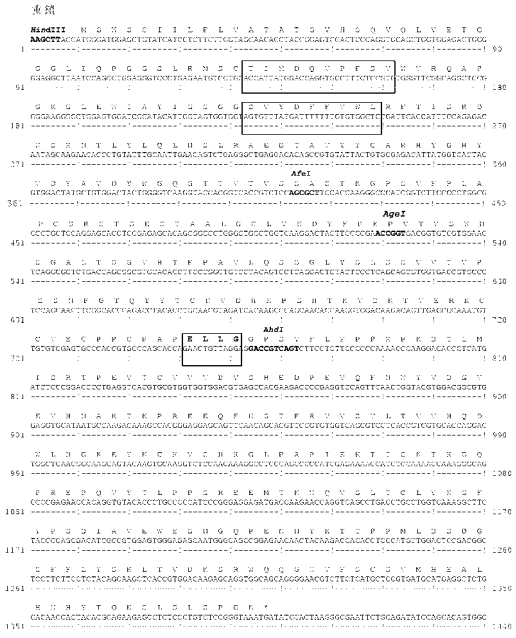
【図１５】

Figure 15

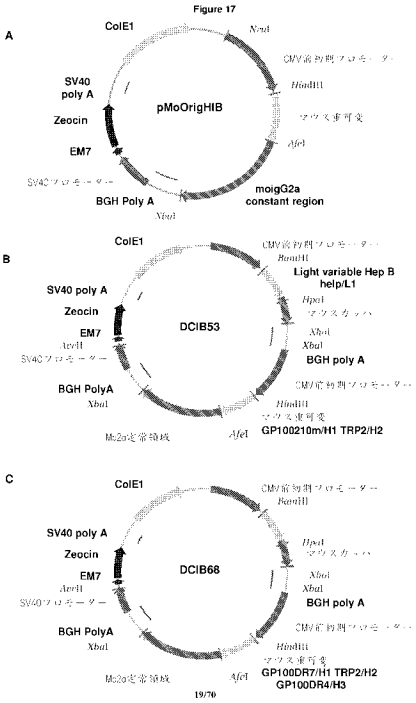


【図１６】

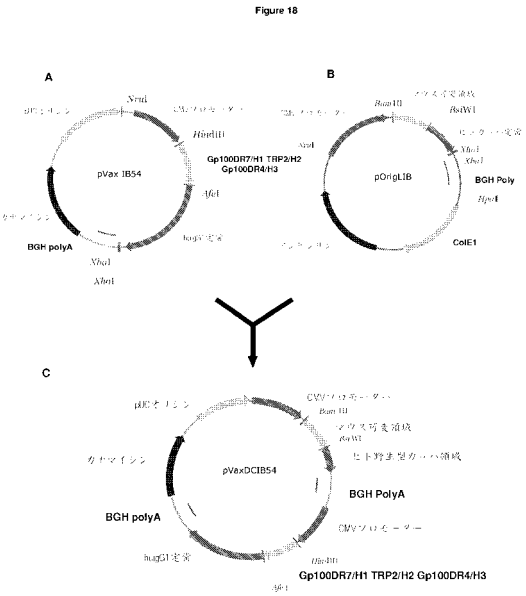
Figure 16



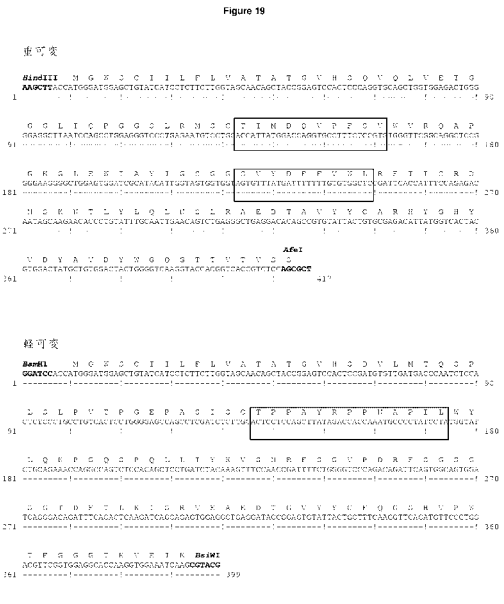
【図１７】



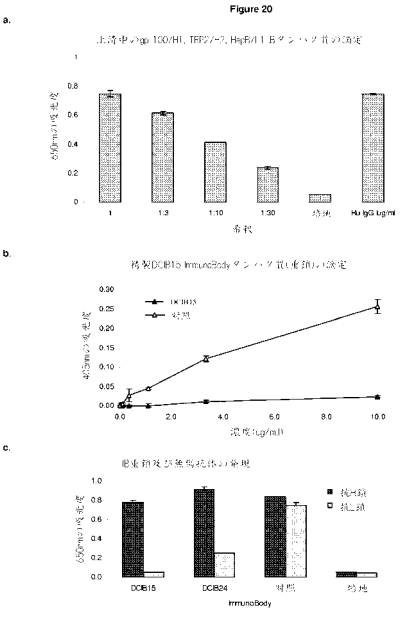
【図１８】



【図１９】

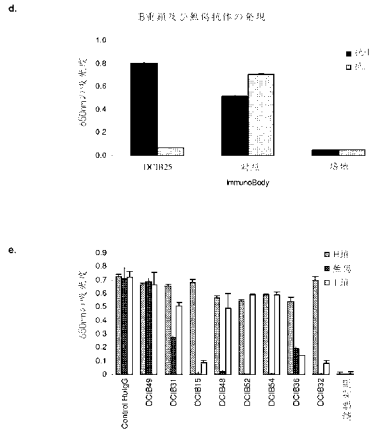


【図２０Ａ】



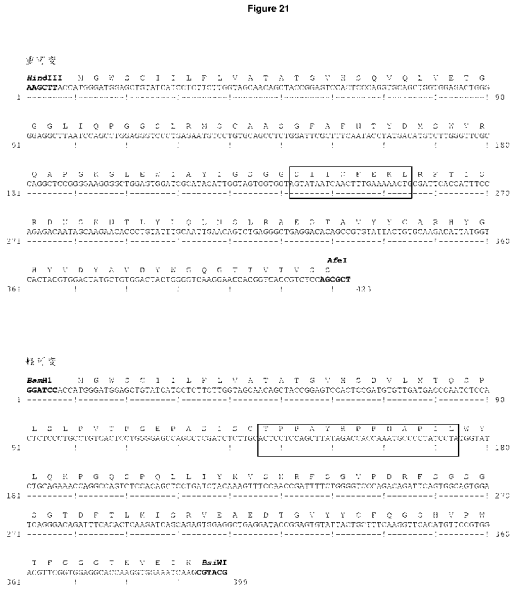
【図２０Ｂ】

Figure 20 continued



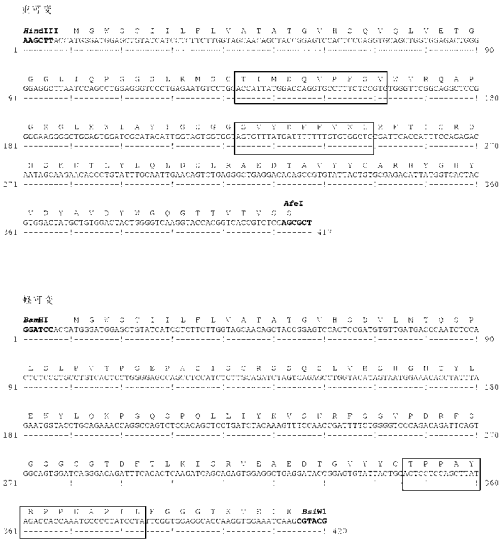
【図２１】

Figure 21



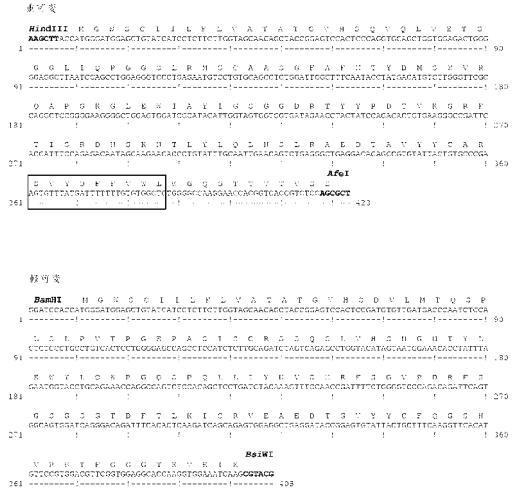
【図２２】

Figure 22



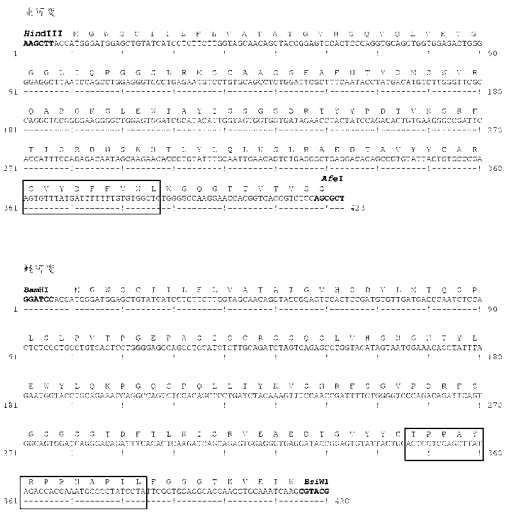
【図２３】

Figure 23



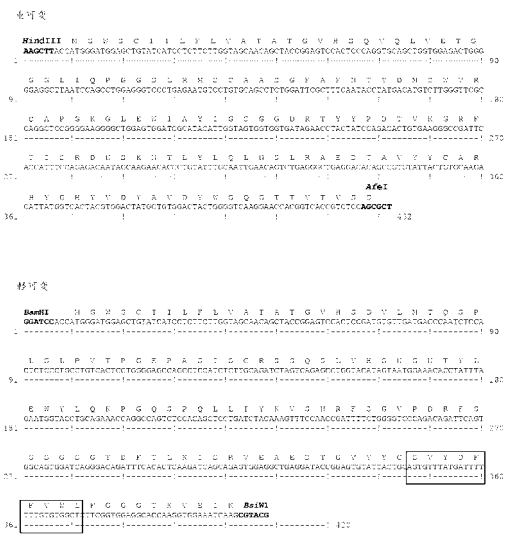
【図２４】

Figure 24



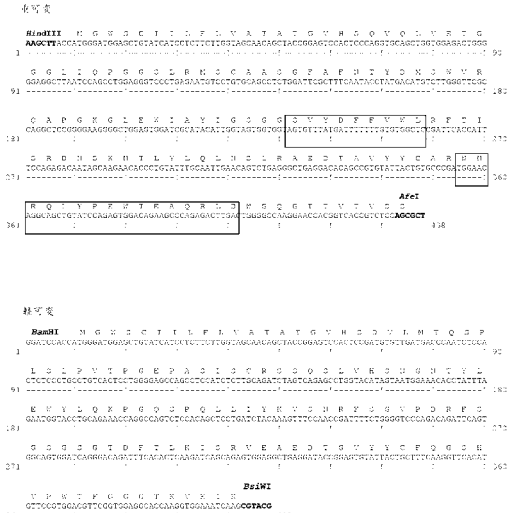
【図２５】

Figure 25



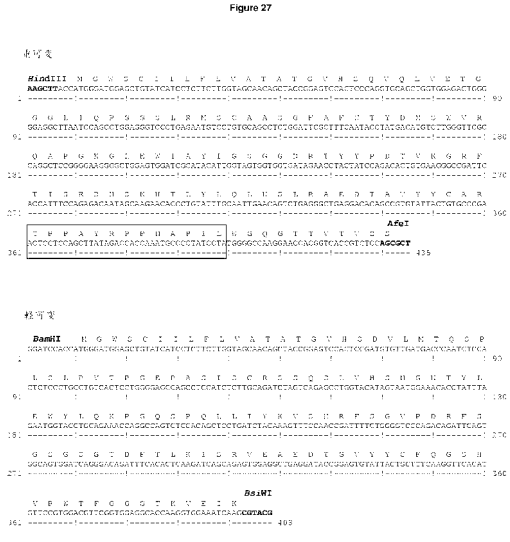
【図２６】

Figure 26



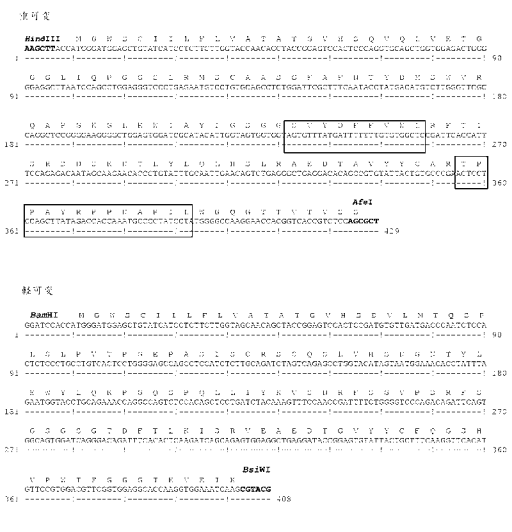
【図２７】

Figure 27



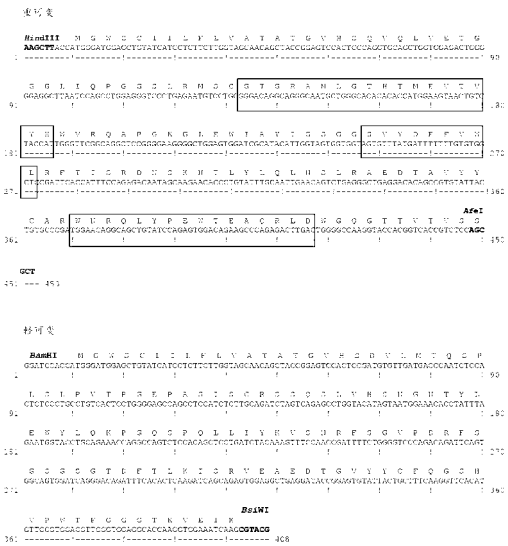
【図２８】

Figure 28



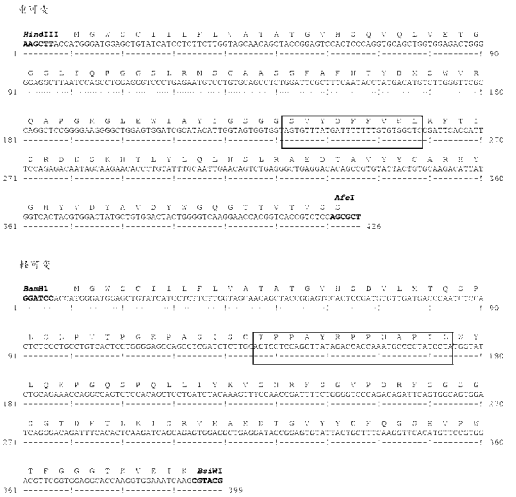
【図２９】

Figure 29



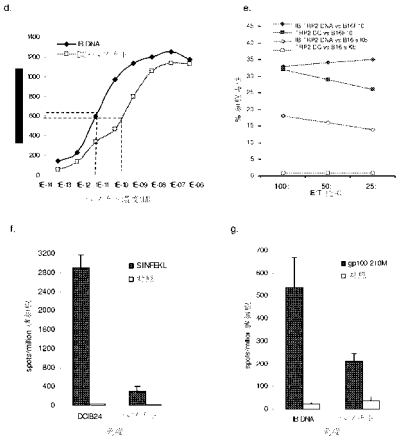
【図３０】

Figure 30



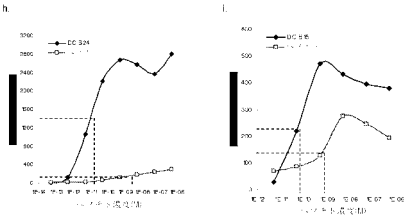
【図３２Ｂ】

Figure 32 continued



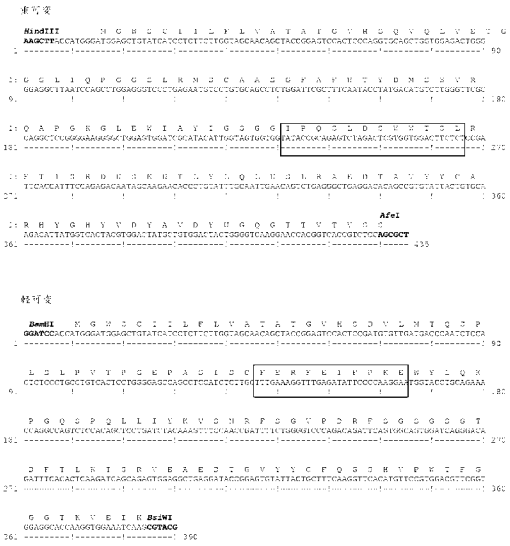
【図３２Ｃ】

Figure 32 continued



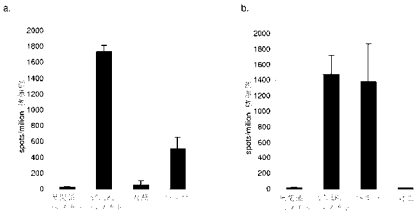
【図３３】

Figure 33



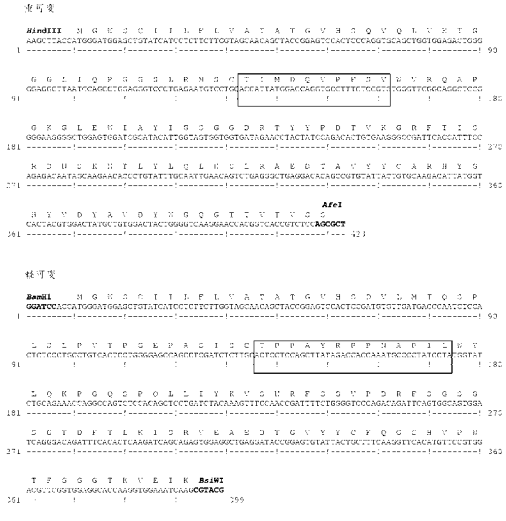
【図３４】

Figure 34



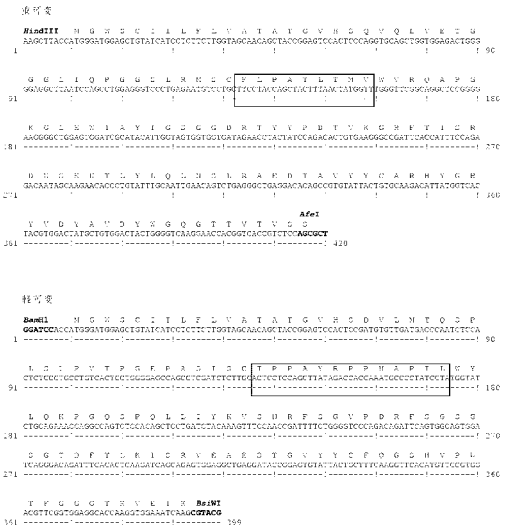
【図３５】

Figure 35

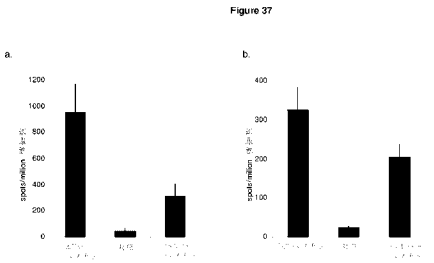


【図３６】

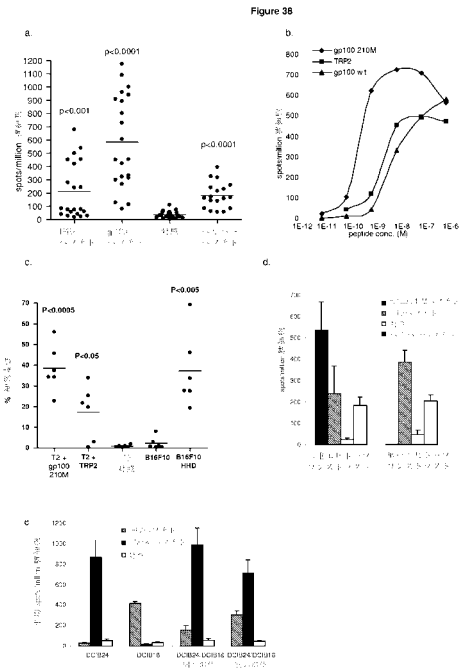
Figure 36



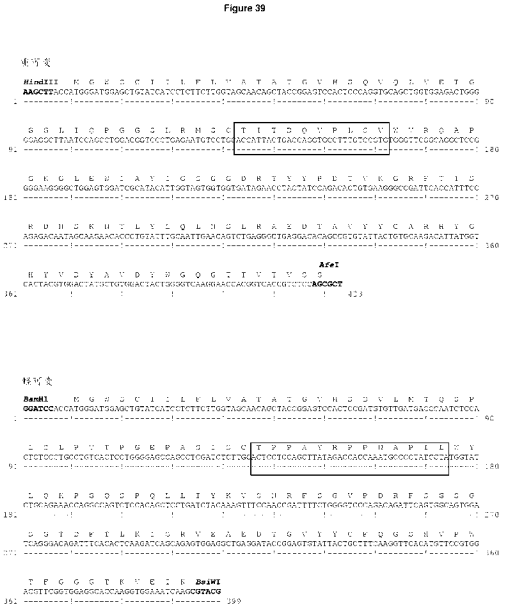
【図３７】



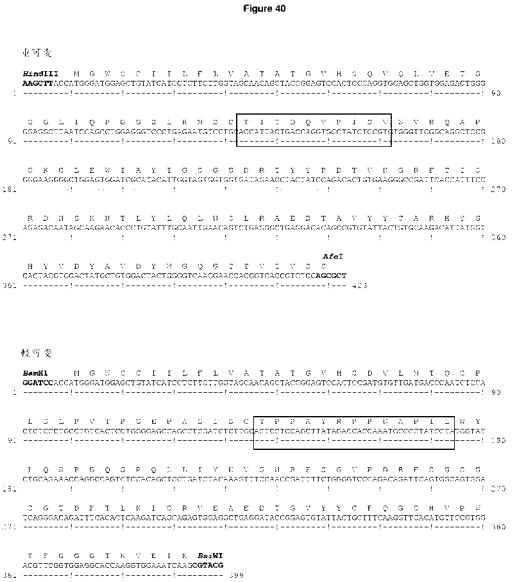
【図３８】



【図３９】

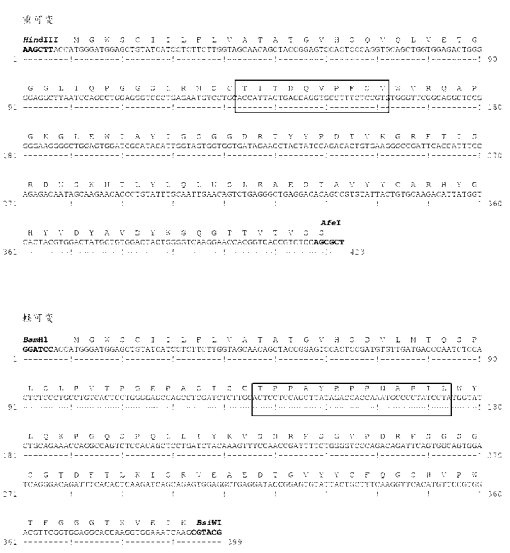


【図４０】



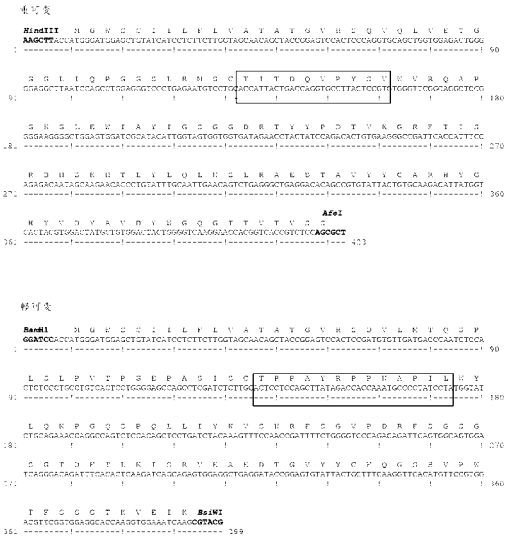
【図４１】

Figure 41



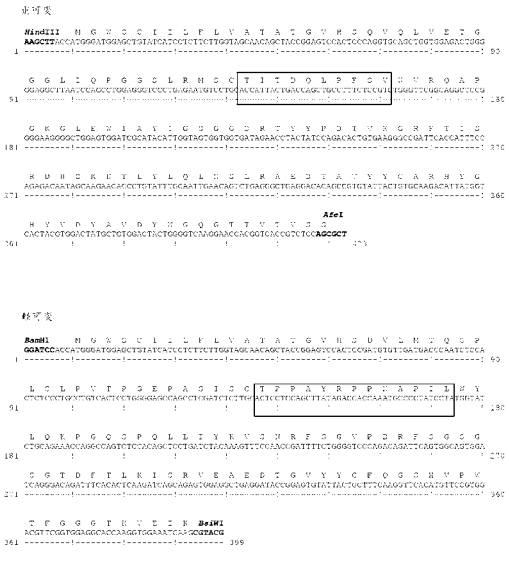
【図４２】

Figure 42



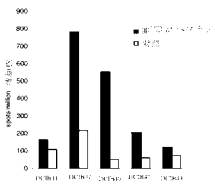
【図４３】

Figure 43



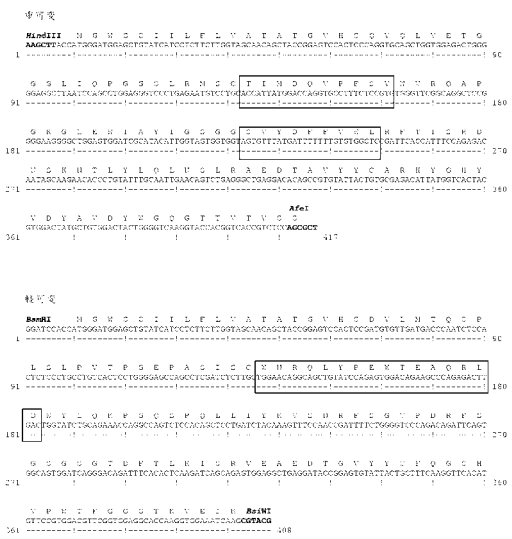
【図４４】

Figure 44



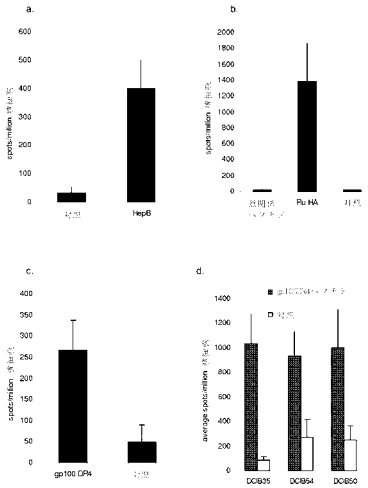
【図４５】

Figure 45



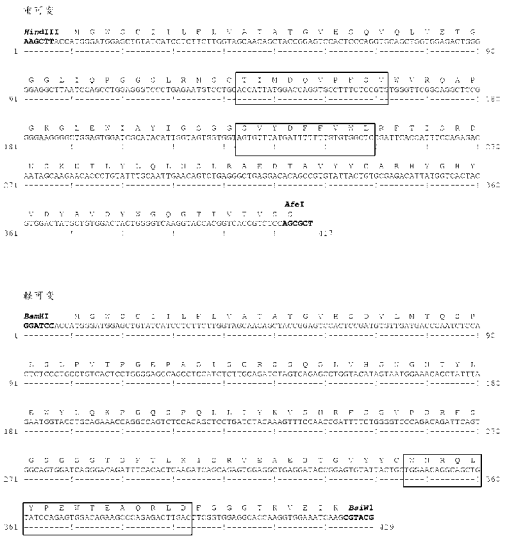
【図４６】

Figure 46



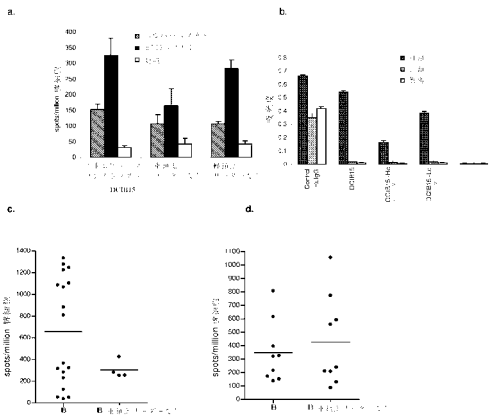
【図４７】

Figure 47

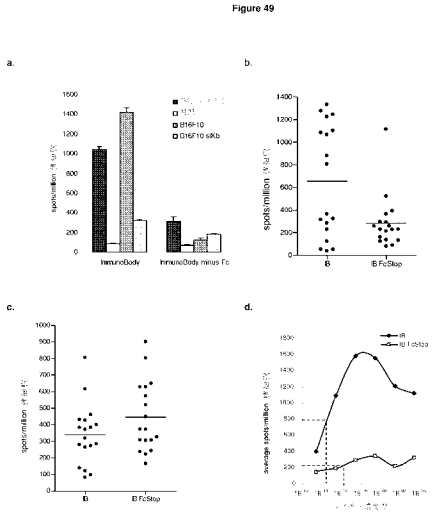


【図４８】

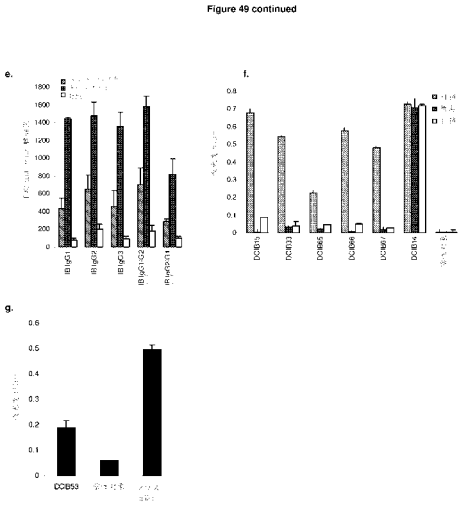
Figure 48



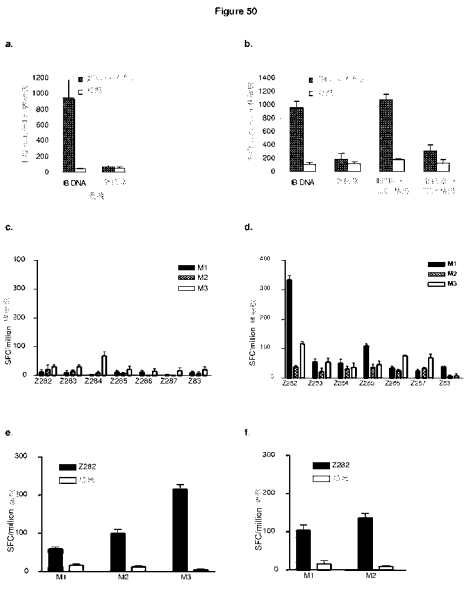
【図４９Ａ】



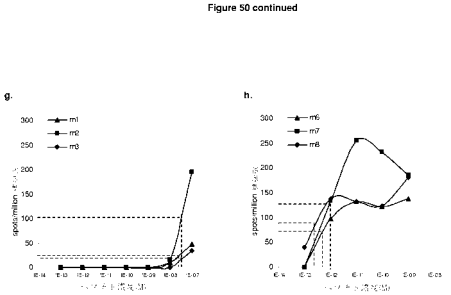
【図４９Ｂ】



【図５０Ａ】

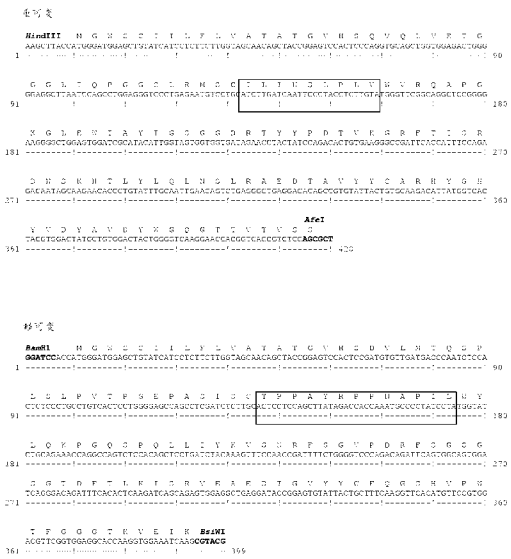


【図５０Ｂ】



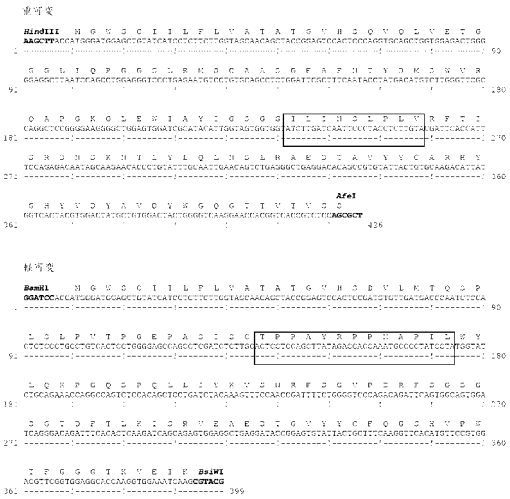
【図５１】

Figure 51



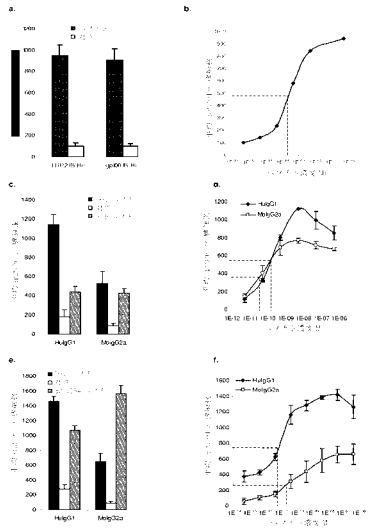
【図５２】

Figure 52



【図５３】

Figure 53



【図５４Ａ】

Figure 54

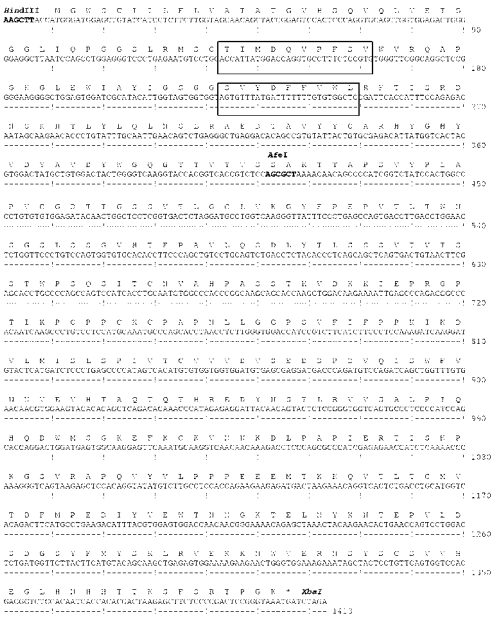
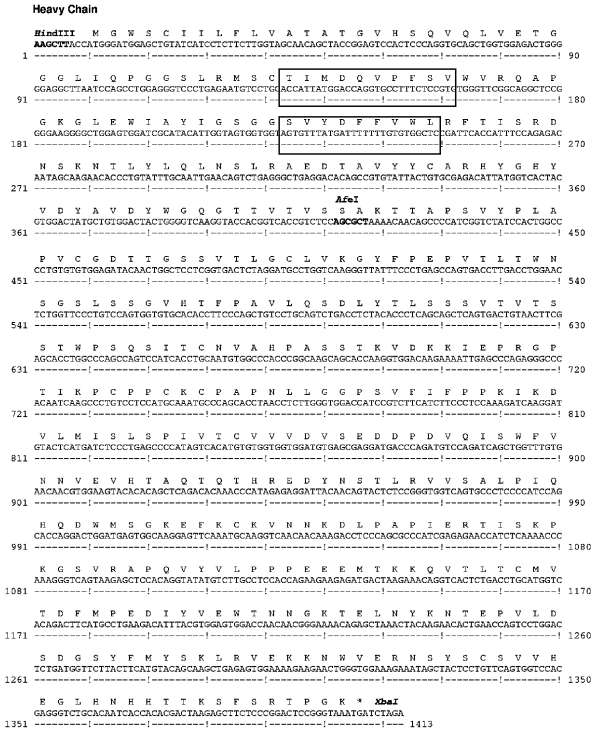
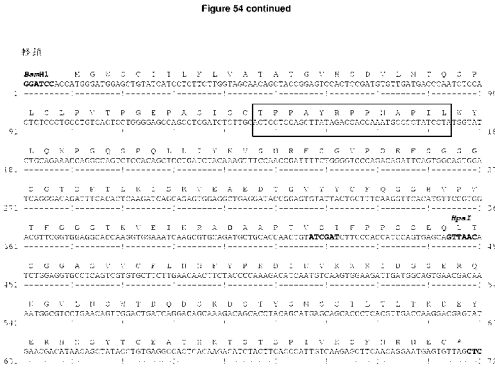


Figure 54



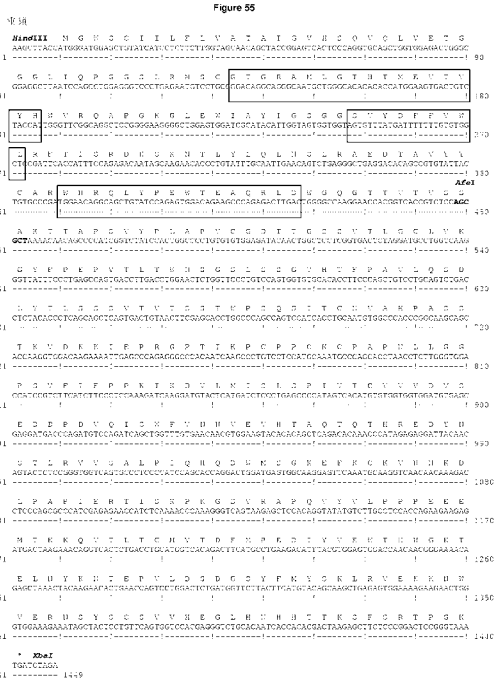
【図５４Ｂ】

Figure 54 continued



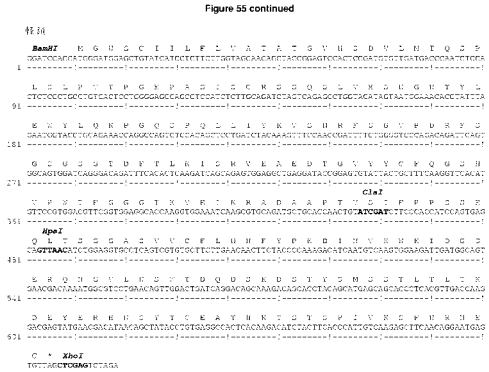
【図５５Ａ】

Figure 55



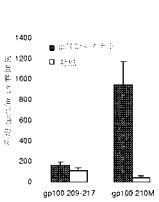
【図５５Ｂ】

Figure 55 continued



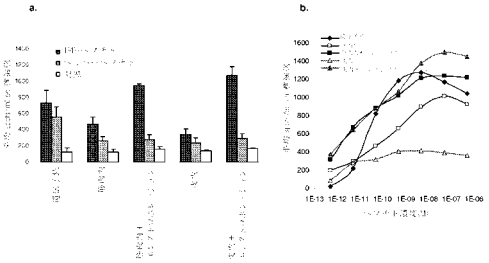
【図５６】

Figure 56



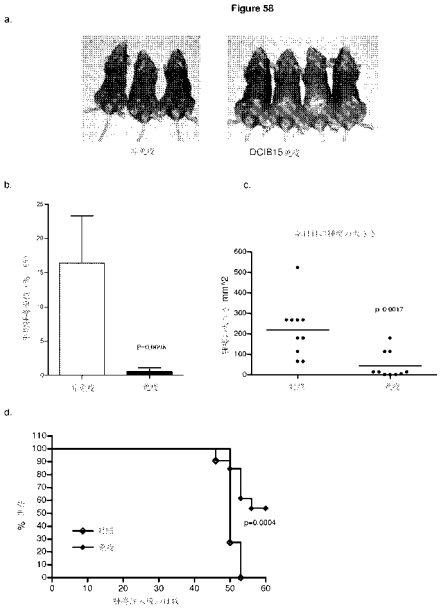
【図５７】

Figure 57



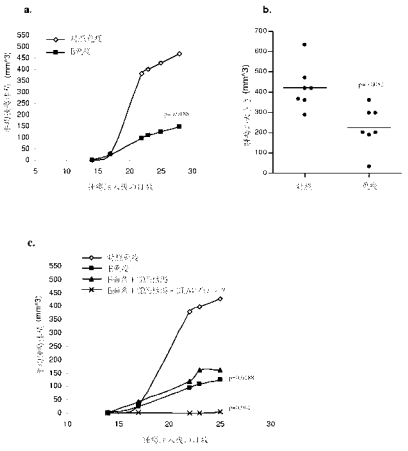
【図５８】

Figure 58



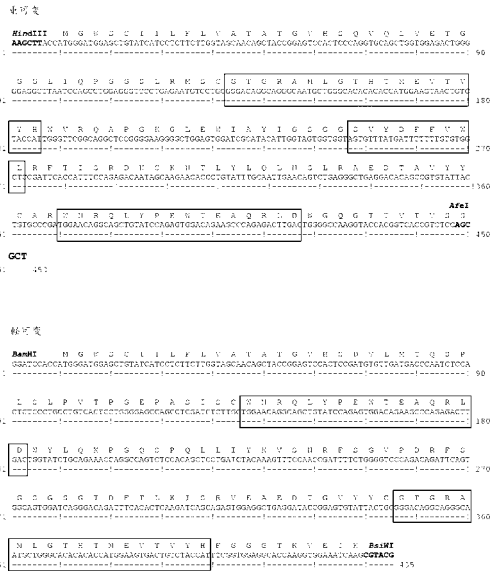
【図５９】

Figure 59



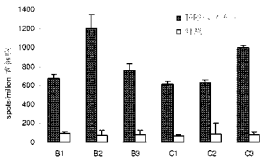
【図６０】

Figure 60



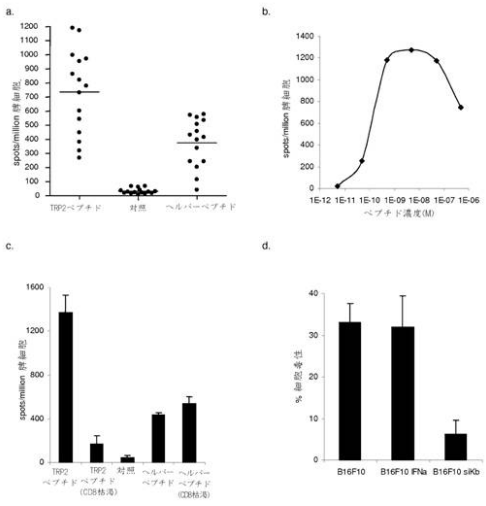
【図６１】

Figure 61

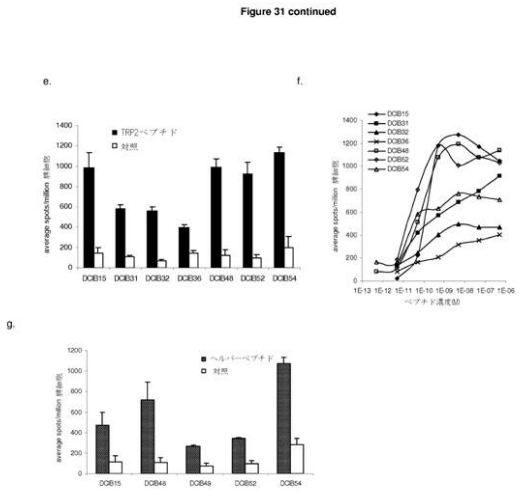


【図３１Ａ】

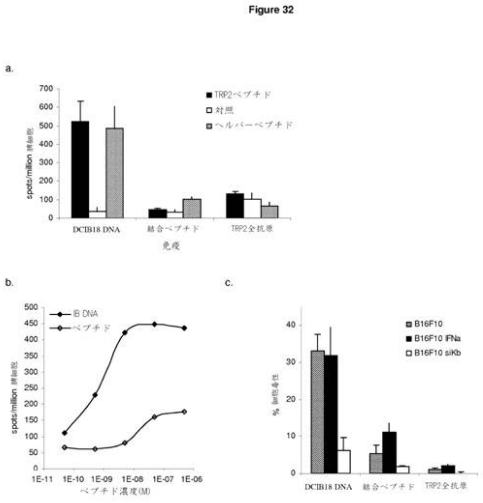
Figure 31



【図３１Ｂ】



【図３２Ａ】



【配列表】

2010522550000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/053761

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/00
ADD. C12N15/13

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)
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, EMBASE, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/25379 A (EURO CELTIQUE SA [US]) 27 May 1999 (1999-05-27) the whole document -----	1,4,6-8, 11-19, 21-28
X	ZAGHOUANI H ET AL: "Engineered immunoglobulin molecules as vehicles for T cell epitopes" INTERNATIONAL REVIEWS OF IMMUNOLOGY, HARWOOD ACADEMIC PUBLISHERS, LONDON, GB, vol. 10, no. 2-3, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 265-278, XP002177699 ISSN: 0883-0185 the whole document ----- -/--	1,4, 11-19, 21-28

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier 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
30 October 2008	12/11/2008

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Marinoni, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/053761

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 7 067 110 B1 (GILLIES STEPHEN D [US] ET AL) 27 June 2006 (2006-06-27) cited in the application	
A	WO 02/058728 A (SCANCELL LTD [GB]; CANCER RES CAMPAIGN TECH [GB]; DURRANT LINDA GILLIA) 1 August 2002 (2002-08-01)	
A	WO 96/19584 A (SINAI SCHOOL MEDICINE [US]) 27 June 1996 (1996-06-27) cited in the application	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2008/053761

Box No. 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:

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 No. 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:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers 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 and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2008/053761

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1 completely; 2-5,13-20,23-28 partially

A polynucleotide encoding a polypeptide comprising an heterologous T-cell epitope, wherein the polypeptide does not contain a regulatory T cell epitope

---

2. claims: 6-13, 21,22 completely, 2-5,13-20,23-28 partially

A polynucleotide encoding a immunoglobulin heavy chain comprising an heterologous T-cell epitope such that the heavy chain cannot take its native conformation

---

3. claims: 21,22 completely; 2-5, 23-28 partially

A polynucleotide encoding an immunoglobulin having at least a heterologous T cell epitope therein such that the immunoglobulin molecule cannot take its native conformation.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2008/053761

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9925379	A	27-05-1999	AU	763029 B2	10-07-2003
			AU	1459799 A	07-06-1999
			AU	737457 B2	23-08-2001
			AU	1459899 A	07-06-1999
			AU	2003252902 A1	06-11-2003
			BR	9815289 A	26-12-2001
			BR	9815580 A	29-01-2002
			CA	2309990 A1	27-05-1999
			CA	2310269 A1	27-05-1999
			CN	1294517 A	09-05-2001
			CN	1327388 A	19-12-2001
			EP	1032420 A1	06-09-2000
			EP	1030684 A1	30-08-2000
			JP	2001526021 T	18-12-2001
			JP	2002507544 T	12-03-2002
			WO	9925378 A1	27-05-1999
US 7067110	B1	27-06-2006	NONE		
WO 02058728	A	01-08-2002	AT	307209 T	15-11-2005
			CA	2435672 A1	01-08-2002
			DE	60206731 T2	20-07-2006
			DK	1354054 T3	13-02-2006
			EP	1354054 A2	22-10-2003
			ES	2254663 T3	16-06-2006
			JP	2004520376 T	08-07-2004
			US	2004146505 A1	29-07-2004
WO 9619584	A	27-06-1996	AU	4643596 A	10-07-1996

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	***37/04***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	37/04	
Ａ６１Ｐ	*31/18*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/18	
Ａ６１Ｐ	*31/14*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/14	
Ａ６１Ｐ	*31/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/00	
Ａ６１Ｐ	*35/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02	

(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,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,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,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 メセリンガム，ラケル ルイズ
イギリス国，エヌジー５ １ピービー ノッティンガムシャー，ノッティンガム， ハックノールロード，シティ ホスピタル， ディパートメント オブ クリニカル オンコロジー
(72)発明者 プドニー，ビクトリア アン
イギリス国，エヌジー５ １ピービー ノッティンガムシャー，ノッティンガム， ハックノールロード，シティ ホスピタル， ディパートメント オブ クリニカル オンコロジー

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA41 CA01 DA02 GA11 HA08 HA17
4C085 AA03 AA38 BB23 EE06 FF24 GG02 GG03 GG04 GG08
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB09 ZB26
ZB27 ZB31 ZB33