

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6744318号
(P6744318)

(45) 発行日 令和2年8月26日(2020.8.26)

(24) 登録日 令和2年8月3日(2020.8.3)

(51) Int.Cl.

F 1

A61K 48/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

A 61 K 48/00 Z N A
A 61 K 39/395 V
A 61 K 38/17
A 61 P 43/00 1 2 1
A 61 P 43/00 1 0 5

請求項の数 14 (全 81 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-539659 (P2017-539659)
(86) (22) 出願日 平成28年2月5日(2016.2.5)
(65) 公表番号 特表2018-509888 (P2018-509888A)
(43) 公表日 平成30年4月12日(2018.4.12)
(86) 國際出願番号 PCT/US2016/016682
(87) 國際公開番号 WO2016/127015
(87) 國際公開日 平成28年8月11日(2016.8.11)
審査請求日 平成31年2月4日(2019.2.4)
(31) 優先権主張番号 62/174,942
(32) 優先日 平成27年6月12日(2015.6.12)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31) 優先権主張番号 62/113,153
(32) 優先日 平成27年2月6日(2015.2.6)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73) 特許権者 517258947
ヒート バイオロジクス、インコーポレイ
テッド
アメリカ合衆国、ノースカロライナ州 2
7713, ベイ 12 ダーラム, 801
キャビトラ ドライブ
(74) 代理人 100114775
弁理士 高岡 亮一
(74) 代理人 100121511
弁理士 小田 直
(74) 代理人 100202751
弁理士 岩堀 明代
(74) 代理人 100191086
弁理士 高橋 香元

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ワクチンおよび共刺激分子を共発現するベクター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分泌可能な g p 9 6 - I g 融合タンパク質をコードする第一のヌクレオチド配列と、T 細胞共刺激融合タンパク質をコードする第二のヌクレオチド配列とを含む発現ベクターを含む組成物であって、

対象に投与されると前記 T 細胞共刺激融合タンパク質が抗原特異的 T 細胞の活性化を増進し、

前記 T 細胞共刺激融合タンパク質は、O X 4 0 L - I g、もしくは O X 4 0 に結合するその一部、I C O S L - I g、もしくは I C O S に結合するその一部、4 - 1 B B L - I g 10
、もしくは 4 - 1 B B R に結合するその一部、T L 1 A - I g、もしくは T N F R S F 2 5 に結合するその一部、G I T R L - I g、もしくは G I T R に結合するその一部、C D 4 0 L - I g、もしくは C D 4 0 に結合するその一部、または C D 7 0 - I g、もしくは C D 2 7 に結合するその一部から選択される、組成物。

【請求項 2】

前記ベクターが、D N A ベースの哺乳動物の発現ベクターである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記 g p 9 6 - I g 融合タンパク質が、g p 9 6 K D E L (配列番号 3) 配列を欠く、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

g p 9 6 - I g 融合タンパク質中の I g タグが、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A、または I g E の F c 領域を含む、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記 T 細胞共刺激融合タンパク質中の I g タグが、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A、または I g E の F c 領域を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記発現ベクターが、ウイルスもしくはウイルス様粒子中に組み込まれる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記発現ベクターが、ヒト腫瘍細胞中に組み込まれる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記ヒト腫瘍細胞が、樹立された N S C L C、膀胱癌、メラノーマ、卵巣癌、腎臓細胞癌、前立腺癌、肉腫、乳癌、扁平上皮癌、頭頸部癌、肝細胞癌、膵臓癌、または結腸癌細胞株からの細胞である、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

対象を処置するための請求項 1 に記載の組成物であって、

前記対象は、分泌可能な g p 9 6 - I g 融合タンパク質をコードする第一のヌクレオチド配列と、T 細胞共刺激融合タンパク質をコードする第二のヌクレオチド配列とを含む発現ベクターを含む組成物の有効量を投与され、前記 T 細胞共刺激融合タンパク質は、O X 4 0 L - I g、もしくは O X 4 0 に結合するその一部、I C O S L - I g、もしくは I C O S に結合するその一部、4 - 1 B B L - I g、もしくは 4 - 1 B B R に結合するその一部、T L 1 A - I g、もしくは T N F R S F 2 5 に結合するその一部、G I T R L - I g、もしくは G I T R に結合するその一部、C D 4 0 L - I g、もしくは C D 4 0 に結合するその一部、または C D 7 0 - I g、もしくは C D 2 7 に結合するその一部から選択され、前記対象に投与されると前記 T 細胞共刺激融合タンパク質は抗原特異的 T 細胞の活性化を増進し、かつ

前記ベクターは、ウイルスもしくはウイルス様粒子中に組み込まれ、前記ベクターは、照射されているかまたは生存していて弱毒化しているヒト腫瘍細胞中に組み込まれる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 10】

対象における抗原特異的 T 細胞の活性化において使用するための、分泌可能な g p 9 6 - I g 融合タンパク質をコードする第一のヌクレオチド配列と、T 細胞共刺激融合タンパク質をコードする第二のヌクレオチド配列とを含む発現ベクターを含む組成物であって、前記 T 細胞共刺激融合タンパク質は、O X 4 0 L - I g、もしくは O X 4 0 に結合するその一部、I C O S L - I g、もしくは I C O S に結合するその一部、4 - 1 B B L - I g、もしくは 4 - 1 B B R に結合するその一部、T L 1 A - I g、もしくは T N F R S F 2 5 に結合するその一部、G I T R L - I g、もしくは G I T R に結合するその一部、C D 4 0 L - I g、もしくは C D 4 0 に結合するその一部、または C D 7 0 - I g、もしくは C D 2 7 に結合するその一部から選択され、

前記対象は前記組成物の有効量を投与され、前記対象に投与されると前記 T 細胞共刺激融合タンパク質は抗原特異的 T 細胞の活性化を増進し、かつ

前記ベクターは、ウイルスもしくはウイルス様粒子中に組み込まれ、前記ベクターは、照射されているかまたは生存していて弱毒化しているヒト腫瘍細胞中に組み込まれる、組成物。

【請求項 11】

対象における抗原特異的 T 細胞の活性化のための医薬の製造における、分泌可能な g p 9 6 - I g 融合タンパク質をコードする第一のヌクレオチド配列と、T 細胞共刺激融合タンパク質をコードする第二のヌクレオチド配列とを含む発現ベクターを含む組成物の使用

10

20

30

40

50

であって、

前記対象は前記組成物の有效量を投与され、前記対象に投与されると前記T細胞共刺激融合タンパク質は抗原特異的T細胞の活性化を増進し、前記T細胞共刺激融合タンパク質は、OX40L-Ig、もしくはOX40に結合するその一部、ICOSL-Ig、もしくはICOSに結合するその一部、4-1BBL-Ig、もしくは4-1BBRに結合するその一部、TL1A-Ig、もしくはTNFRSF25に結合するその一部、GITRL-Ig、もしくはGITRに結合するその一部、CD40L-Ig、もしくはCD40に結合するその一部、またはCD70-Ig、もしくはCD27に結合するその一部から選択され、かつ

前記ベクターは、ウイルスもしくはウイルス様粒子中に組み込まれ、前記ベクターは、照射されているかまたは生存していて弱毒化しているヒト腫瘍細胞中に組み込まれる、使用。 10

【請求項12】

前記対象はヒト癌患者であり、かつ前記患者への前記組成物の投与が、前記患者における腫瘍抗原特異的T細胞の活性化または増殖を増大し、前記患者における前記腫瘍抗原特異的T細胞の活性化または増殖が、前記投与の前の患者における腫瘍抗原特異的T細胞の活性化または増殖のレベルに比較して少なくとも25%増大される、請求項11に記載の使用。

【請求項13】

前記対象は、腫瘍細胞によって產生される免疫抑制分子を阻害する薬剤と組み合わせて前記組成物を投与されるヒト癌患者であり、前記薬剤が、PD-1に対する抗体である、請求項11または12に記載の使用。 20

【請求項14】

前記対象はヒト癌患者であり、かつ前記ヒト癌患者への前記組成物の投与が、病原性抗原特異的T細胞の活性化または増殖を刺激するか、または前記T細胞共刺激分子が、gp96-Igワクチン接種単独よりも高いレベルに前記対象における抗原特異的T細胞の活性化を増進する、請求項11～13のいずれか一項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2015年2月6日出願の米国特許仮出願第62/113,153号および2015年6月12日出願の同第62/174,942号への優先権を主張するものであり、それらの全てが参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

技術分野

本文書は、特に、單一ベクターからワクチン（例えば、gp96-Ig）およびT細胞共刺激分子を共発現するための材料および方法を含む、ワクチン接種およびT細胞共刺激を利用して対象における臨床状態を処置するための材料および方法に関する。

【0003】

電子的手段で提出された文書ファイルの説明

本明細書と共に電子的手段で提出された文書ファイルの内容は、全体として参照により本明細書に組み入れられる：配列表のコンピュータでの読み取り可能な書式のコピー（ファイル名：HTB-021PC-SequenceListing.txt；記録日：2016年2月4日；ファイルサイズ：73KB）。

【背景技術】

【0004】

背景

癌は、正常細胞の寿命を延長する長い期間の遺伝的不安定性から生じる疾患である。この期間の開始を特色づける触発的事象は細胞の型によって様々であるが、一般にはp53

10

20

30

40

50

もしくはR bなどの腫瘍抑制遺伝子中の突然変異の獲得、K R A Sもしくはm y cなどの癌原遺伝子中の突然変異の獲得、またはH P V 1 6もしくはE B Vなどの発癌遺伝子ウイルスによる細胞の感染である。起源が何であれ、正常な成長の制御または細胞死経路を回避させる遺伝子中の突然変異を獲得する細胞は、さらなる突然変異を獲得する可能性がより高い。細胞が「十分な」、典型的には少なくとも6つの、突然変異を獲得すると、細胞はもはや、その発育を抑制するまたはアポトーシスを惹起する内在性のまたは外来性のシグナルに応答しなくなる。

【0005】

腫瘍は宿主細胞から生じるため、身体の免疫系はそれらの細胞に対して最初は耐容性である。腫瘍原性突然変異の獲得は、免疫原性になるのに十分に非自己であるエピトープを含む変異タンパク質の生成を誘導する場合もあれば、そうでない場合もある。細胞が免疫原性突然変異を獲得する場合、免疫監視として知られる過程である宿主免疫系によって探索され、破壊され得る(Smyth et al., Adv Immunol 2006, 90:1-50)。ネズミでの研究により、免疫監視の仮説の裏づけがもたらされ(Dunn et al., Nat Immunol 2002, 3:991-998; Shankaran et al., Nature 2001, 410:1107-1111; およびDunn et al., Annu Rev Immunol 2004, 22:329-360)、いわゆる適応免疫応答に加えて自然免疫応答が、免疫原性腫瘍の拒絶を促進し得ることも示唆された(Unni et al., Proc Natl Acad Sci USA 2008, 105:1686-1691; Taieb et al., Nat Med 2006, 12:214-219; およびRaulet and Guerra, Nat Rev Immunol 2009, 9:568-580)。NKG2Dリガンド発現などのNK活性化シグナルの発現誘導によって、または突然変異のもしくはウイルスの過程の結果として受けたDNA障害の後に、自然免疫応答が誘発され得る。免疫原性突然変異を獲得するいくつかの細胞は、抗自己免疫応答(anti-self immune responses)をくじく正常な免疫調節系に関与する能力も得る(Rabinovich et al., Annu Rev Immunol 2007, 25:267-296)。宿主調節機構の活性化を駆動する経路は、ほとんど理解されていない。さらに他の細胞が、宿主免疫系の活性化を誘導する免疫原性ペプチドを全く生成することなく複数の発癌性突然変異を得る場合もある。それゆえ、これらの形質転換の間に免疫原性ペプチドを生成する腫瘍細胞は、生存するために抗腫瘍免疫応答を回避し続けなければならないが、免疫系を活性化せずに形質転換される腫瘍は、生存のためにそのような免疫調節機構に依存し得ない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

概要

1種または複数のチェックポイント阻害剤、1種または複数のワクチン、および1種または複数のT細胞共刺激分子の組み合わせまたは部分的組み合わせを含む併用療法は、免疫療法によって利益を受ける癌患者の基盤を拡大する可能性がある。ワクチンは、腫瘍抗原特異的CD8+ T細胞の頻度およびそれらのCD8+ T細胞によって認識される腫瘍抗原の数も増加させることにより、この応答に寄与し得る。T細胞共刺激分子は、腫瘍抗原特異的T細胞の頻度をさらに増加させること、および/またはそれらの活性化を増進することにより、そしてCD8+ T細胞による腫瘍殺傷エフェクター分子の発現を増加させることによっても、応答を増強し得る。チェックポイント阻害剤との併用で用いられる場合、それは、腫瘍に浸潤できかつ浸潤が起こると様々なチェックポイント経路によって阻害されない、多様な高活性化CD8+ T細胞を生成し得る。しかし、併用療法の成功への障壁は、それらが少なくとも3種の異なる薬物製品(ワクチン、T細胞共刺激物質、およびチェックポイント阻害剤)の投与を従来は必要とし、そのそれぞれが少なからぬコスト、そして場合により毒性を有する、ということである。

10

20

30

40

50

【0007】

本文書は少なくとも一部が、ワクチン接種、例えば g p 9 6 - I g ワクチン接種と、特に O X 4 0 、 I C O S 、 4 - 1 B B 、 T N F R S F 2 5 、 C D 4 0 、 C D 2 7 、および/または G I T R のうちの 1 種または複数のアゴニストでの T 細胞共刺激と、の組み合わせが相乗的な抗腫瘍性の利益を提供するという発見に基づく。前臨床モデルにより O X 4 0 、 I C O S 、 4 - 1 B B 、および T N F R S F 2 5 を標的とするアゴニスト抗体と組み合わせされる g p 9 6 - I g ワクチンの独立の組成物が評価されており、機構的かつ抗腫瘍的な相補性に及ぼす様々な効果が実証された。本明細書に記載された材料および方法は、特に、それらが独立した製品を必要とせずに例えば g p 9 6 - I g でのワクチン接種および T 細胞共刺激の両方を実現し得る単一組成物を提供することにおいて、有利である。これらの材料および方法は、T 細胞共刺激を提供するために、非限定的に I C O S L - I g 、 4 - 1 B B L - I g 、 T L 1 A - I g 、 O X 4 0 L - I g 、 C D 4 0 L - I g 、 C D 7 0 - I g 、または G I T R L - I g などの融合タンパク質を含む共刺激分子を同時に発現するように遺伝的に修飾された単一のワクチンタンパク質（例えば、 g p 9 6 - I g ）発現ベクターを作製することによって、この目標を実現する。ベクター、およびそれらの使用のための方法は、抗原特異的 C D 8 + T 細胞の活性化を増進するさらなる抗体療法を必要とせずに共刺激の利益を提供できる。したがって、併用免疫療法は、ワクチン / 抗体 / 融合タンパク質レジメンの必要性を排除するためのベクター再変更（ r e - e n g i n e e r i n g ）によって実現でき、このことは治療コストおよび全身毒性のリスクの両方を低減し得る。

10

20

【課題を解決するための手段】**【0008】**

一態様において、本文書は、分泌可能なワクチンタンパク質をコードする第一のヌクレオチド配列と、T 細胞共刺激融合タンパク質をコードする第二のヌクレオチド配列とを含む発現ベクターであって、対象に投与されると T 細胞共刺激融合タンパク質が抗原特異的 T 細胞の活性化を増進する発現ベクターを特色とする。幾つかの実施形態において、本文書は、分泌可能な g p 9 6 - I g 融合タンパク質をコードする第一のヌクレオチド配列と、T 細胞共刺激融合タンパク質をコードする第二のヌクレオチド配列とを含む発現ベクターであって、対象に投与されると T 細胞共刺激融合タンパク質が抗原特異的 T 細胞の活性化を増進する発現ベクターを特色とする。発現ベクターは、哺乳動物発現ベクターであり得る。一実施形態において、分泌可能な g p 9 6 - I g 融合タンパク質は、 g p 9 6 K D E L (S E Q I D N O : 3) 配列を欠いていてよい。 g p 9 6 - I g 融合タンパク質中の T g タグは、ヒト I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 、 I g G 4 、 I g M 、 I g A 、または I g E の F c 領域を含み得る。 T 細胞共刺激融合タンパク質は、とりわけ、 O X 4 0 L - I g もしくは O X 4 0 に結合するその一部、 I C O S L - I g もしくは I C O S に結合するその一部、 4 - 1 B B L - I g もしくは 4 - 1 B B R に結合するその一部、 T L 1 A もしくは T N F R S F 2 5 に結合するその一部、 G I T R L - I g もしくは G I T R に結合するその一部、 C D 4 0 - I g もしくは C D 4 0 に結合するその一部、または C D 7 0 - I g もしくは C D 2 7 に結合するその一部であり得る。 T 細胞共刺激融合タンパク質中の I g タグは、ヒト I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 、 I g G 4 、 I g M 、 I g A 、または I g E の F c 領域を含み得る。発現ベクターは、 D N A または R N A を含み得る。

30

40

【0009】

別の態様において、本文書は、分泌可能な g p 9 6 - I g 融合タンパク質などの分泌可能なワクチンタンパク質をコードする第一のヌクレオチド配列と、T 細胞共刺激融合タンパク質をコードする第二のヌクレオチド配列とを含む発現ベクターを含有する組成物であって、対象に投与されると T 細胞共刺激融合タンパク質が抗原特異的 T 細胞の活性化を増進する組成物を特色とする。ベクターは、 D N A を基剤とする哺乳動物発現ベクターであり得る。一実施形態において、分泌可能な g p 9 6 - I g 融合タンパク質は、 g p 9 6 K D E L (S E Q I D N O : 3) 配列を欠いていてよい。 g p 9 6 - I g 融合タンパク質中の I g タグは、ヒト I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 、 I g G 4 、 I g M 、 I g A 、

50

または I g E の F c 領域を含み得る。T 細胞共刺激融合タンパク質は、OX40L - Ig もしくは OX40 に結合するその一部、ICOSL - Ig もしくは ICOS に結合するその一部、4 - 1BBL - Ig もしくは 4 - 1BBR に結合するその一部、TL1A もしくは TNFRSF25 に結合するその一部、GITRL - Ig もしくは GITR に結合するその一部、CD40 - Ig もしくは CD40 に結合するその一部、または CD70 - Ig もしくは CD27 に結合するその一部であり得る。T 細胞共刺激融合タンパク質中の Ig タグは、ヒト Ig G1、Ig G2、Ig G3、Ig G4、Ig M、Ig A、または Ig E の F c 領域を含み得る。発現ベクターは、ウイルスもしくはウイルス様粒子中に組み込まれ得るか、またはヒト腫瘍細胞（例えば、樹立された細胞株からのヒト腫瘍細胞、例えば NSCLC、膀胱癌、メラノーマ、卵巣癌、腎臓細胞癌、前立腺癌、肉腫、乳癌、扁平上皮癌、頭頸部癌、肝細胞癌、肺臓癌、または結腸癌細胞株）中に組み込まれ得る。
10

【0010】

別の態様において、本文書は、分泌可能なワクチンタンパク質をコードする第一のヌクレオチド配列と、T 細胞共刺激融合タンパク質をコードする第二のヌクレオチド配列とを含む発現ベクターを含有する組成物を含む細胞であって、対象に投与されると T 細胞共刺激融合タンパク質が抗原特異的 T 細胞の活性化を増進する細胞を特色とする。幾つかの実施形態において、本文書は、分泌可能な gp96 - Ig 融合タンパク質をコードする第一のヌクレオチド配列と、T 細胞共刺激融合タンパク質をコードする第二のヌクレオチド配列とを含む発現ベクターを含有する組成物を含む細胞であって、対象に投与されると T 細胞共刺激融合タンパク質が抗原特異的 T 細胞の活性化を増進する細胞を特色とする。様々な実施形態において、そのような細胞は、既製の治療としての使用に適し得る。様々な実施形態において、そのような細胞は、照射される。様々な実施形態において、そのような細胞は、生存していて弱毒化されている。様々な実施形態において、これらの細胞は、本発明の組成物のワクチンタンパク質（例えば、gp96）によって介添えされ得る腫瘍抗原を発現する。様々な実施形態において、そのような細胞は、樹立された細胞株、例えば、樹立された NSCLC、膀胱癌、メラノーマ、卵巣癌、腎臓細胞癌、前立腺癌、肉腫、乳癌、扁平上皮癌、頭頸部癌、肝細胞癌、肺臓癌、または結腸癌細胞株からのヒト腫瘍細胞に由来し得る。様々な実施形態において、そのような細胞は、樹立された前立腺癌細胞株に由来し得る。様々な実施形態において、そのような細胞は、樹立された肺癌細胞株に由来し得る。様々な実施形態において、そのような細胞は、樹立された膀胱癌細胞株に由来し得る。様々な実施形態において、そのような細胞は、樹立された肉腫細胞株に由来し得る。様々な実施形態において、そのような細胞は、樹立された纖毛癌細胞株に由来し得る。
20
30

【0011】

別の態様において、本文書は、対象を処置するための方法を特色とする。方法は、例えば、分泌可能な gp96 - Ig 融合タンパク質などの分泌可能なワクチンタンパク質をコードする第一のヌクレオチド配列と、T 細胞共刺激融合タンパク質をコードする第二のヌクレオチド配列とを含む発現ベクターであって、対象に投与されると T 細胞共刺激融合タンパク質が抗原特異的 T 細胞の活性化を増進する発現ベクターを含有する、本明細書に記載された組成物の有効量を対象に投与することを含み得る。ベクターは、ウイルスもしくはウイルス様粒子中に組み込まれ得るか、またはヒト腫瘍細胞内に組み込まれ得る。対象は、ヒト癌患者であり得る。ヒト患者への組成物の投与は、患者における腫瘍抗原特異的 T 細胞の活性化または増殖を増進し得る。例えば、患者における腫瘍抗原特異的 T 細胞の活性化または増殖は、投与前の患者における腫瘍抗原特異的 T 細胞の活性化または増殖のレベルに比較して、少なくとも 25%（例えば、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、または少なくとも 75%）上昇し得る。方法は、組成物を、腫瘍細胞によって産生される免疫抑制分子を阻害する薬剤と組み合わせて、ヒト癌患者に投与することを含み得る。薬剤は、PD-1に対する抗体であり得る。対象は、急性または慢性の感染（例えば、C型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、またはマラリアによる感染）を有するヒトであり得る。ヒ
40
50

ト患者への組成物の投与は、病原性抗原特異的T細胞の活性化または増殖を刺激し得る。T細胞共刺激分子は、対象における抗原特異的T細胞の活性化を、g p 9 6 - I g ワクチン接種単独よりも高いレベルに増進し得る。

【0012】

他に断りがなければ、本明細書で用いられる全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されたものと類似または同等の方法および材料が、本発明を実践するために用いられ得るが、適切な方法および材料を以下に記載する。本明細書で言及された全ての発行物、特許出願、特許、および他の参考資料は、全体として参照により組み入れられる。矛盾する場合には、定義を含み、本明細書が管理する。さらに、材料、方法、および実施例は、例示に過ぎず、限定を意図するものではない。

10

【0013】

本発明の1つまたは複数の実施形態の詳細は、添付の図面および以下の説明に示されている。本発明の他の特色、目的、および利点は、それらの説明および図面、ならびに特許請求の範囲から明白となろう。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】第一のカセット内のg p 9 6 - I g 融合タンパク質と、第二のカセット内のT細胞共刺激融合タンパク質とをコードする、細胞を基にした組み合わせ生成物を作製するための、最初のg p 9 6 - I g ベクターの再改変の略図である。I C O S - F c、4 - 1 B B L - F c、およびO X 4 0 L - F cを、説明のため示している。

20

【図2】1つの発現カセット中に分泌可能なg p 9 6 - I g 融合タンパク質および、第二のカセット中にT細胞共刺激融合タンパク質（非限定的例示として、I C O S L - I g G 4 - F c）をコードする哺乳動物発現ベクター（B 4 5）の略図である。

【図3】2つの分泌可能なタンパク質をコードするベクターでトランスフェクトされた同種腫瘍細胞の例示である。第一のタンパク質g p 9 6 - I gは、細胞の外側で細胞由来抗原を介添えする分泌可能な二量体（平滑）を形成する。第二のタンパク質は、ワクチン細胞によって分泌され、T細胞表面上で付近にある共刺激受容体に自由に結合し得る、三量体の分泌可能なT細胞共刺激融合タンパク質（粗い）である。

【図4 A - 4 G】g p 9 6 - I g 細胞ワクチンと組み合わされたO X 4 0 アゴニスト抗体は抗原特異的C D 8 増殖を促進するが、F O X P 3 + T r e gは影響を受けないままであることを示す。図4 A ~ 4 Dは、g p 9 6 - I g 細胞ワクチンの作用機序を示す。図4 Aにおいて、ワクチン細胞は細胞由来抗原と共にg p 9 6 - I g を分泌し、または図5、6、および8の場合にはワクチン細胞はg p 9 6 - I g をこのワクチン細胞株中で安定に発現される单一抗原ニワトリオボアルブミンと共に分泌する。図4 Bにおいて、g p 9 6 - I g / 抗原複合体はA P C によって取り込まれ、抗原はM H C クラスI分子に移入される。図4 Cにおいて、抗原交差提示はC D 8 + 特異的T細胞の活性化を誘導する。図4 Dにおいて、腫瘍に関連して、活性化C D 8 + T細胞は離れた腫瘍上の共通の腫瘍抗原を認識して、それらを破壊できる。図4 Eは、I m P A C T（本明細書で用いられる通り、これは、修飾された（例えば、K D E L 欠失）g p 9 6 - I g 融合タンパク質、または場合によりg p 9 6 - I g 融合タンパク質を発現するように設計された改変細胞株を指す）を単独で、またはI C O S、4 - 1 B B L、もしくはO X 4 0 のためのアゴニストT細胞共刺激抗体との組み合わせでワクチン接種した後の抗原特異的（O T - I ）細胞増殖をプロットしたグラフである。データは、最初のワクチン接種後5日目および40日目（それぞれ、プライムおよびメモリー）について示されている。後者はまた、2回目のブーストワクチン接種後5日目に対応する。I m P A C T / O X 4 0 (a b) の組み合わせだけが、単独でのI m P A C Tよりも有意に大きなO T - I 増殖を生成した（*、p < 0 . 0 5）。実験の反復が列挙されている。プロットされた値は平均であり、誤差はS E Mである。

30

。図4 Eの各データセットについて、ヒストグラムの順は左から右に：ワクチンなし、I m P A C T 単独、I m P A C T + I C O S 抗体、I m P A C T + O X 4 0 抗体、およびI m P A C T / O X 4 0 (a b)。図4 Eの各データセットについて、ヒストグラムの順は左から右に：ワクチンなし、I m P A C T 単独、I m P A C T + I C O S 抗体、I m P A C T + O X 4 0 抗体、およびI m P A C T / O X 4 0 (a b)。

40

50

mPACT + 4 - 1BB 抗体である。図4Fは、全CD4+細胞に対する割合%としてFOXP3+Tregをプロットしたグラフである。FOXP3+細胞が増加から減少に変動したImPACT / 4 - 1BB処置マウス以外では、ImPACT処置後のTregにおける有意な変動はなく、CD8+増殖に対するそれらの特異性が強調された。実験の反復が列挙されている。プロットされた値は平均であり、誤差はSEMである。図4Fの各データセットについて、ヒストグラムの順は左から右に、ワクチンなし、ImPACT単独、ImPACT + ICOS抗体、ImPACT + OX40抗体、およびImPACT + 4 - 1BB抗体である。図4Gは、アジュバントAlumに応答する第二のモデル系でのOT-I / CD8およびFOXP3+細胞増殖をプロットした一対のグラフである。ここでも、ImPACTとOX40(a b)の組み合わせは、FOXP3+細胞の中等度の増加に加えて、有意なOT-I増殖をもたらした。実験の反復が列挙されている。プロットされた値は平均であり、誤差はSEMである。図4Gの各データセットについて、ヒストグラムの順は左から右に、ワクチンなし、IgG対照、およびImPACT + OX40抗体である。

【図5A - 5D】T細胞共刺激物質OX40がImPACT(gp96 - Ig)細胞ワクチンと相乗的に機能してT細胞を活性化し、抗原特異的CD8+増殖を生成することを示す。図5Aは、T細胞とT細胞活性化を促進する抗原提示細胞(APC)との間の、受容体(OX40、ICOS、および4 - 1BB)およびリガンド(OX40L、ICOSL、および4 - 1BBL)の相互作用の略図である。図5Bは、ワクチン投与後の抗原特異的T細胞増殖(OT-I細胞)を追跡するために、单一抗原ニワトリオボアルブミンと共にgp96 - Ig / HLA-A1(ImPACT)を発現する細胞のクローン集団の選択を通して樹立されたワクチン細胞株を示す図解である。図5Cは、T細胞増殖の促進における相乗性についてImPACTと組み合わせてテストされたネズミT細胞共刺激物質アゴニスト抗体の列挙である(これらの抗体全てが、併用療法剤として様々な実施形態において有用である)。図5Dは、0日目のImPACT単独、またはOX40、ICOS、もしくは4 - 1BBのためのアゴニストT細胞共刺激抗体100 μgと組み合わせたImPACTのいずれかでのワクチン接種後の43日間のフローサイトメトリーによって検出された、-1日目に尾静脈注射を介してGFP標識された抗原特異的OT-I(CD8)細胞を播種されたFOXP3 - RFPレポーターマウスにおけるOT-Iレベルをプロットしたグラフである。非ワクチン接種(ワクチンなし)マウスを、対照として並行して評価した。マウスは、35日目に再度、ワクチンまたはワクチン / 抗体の組み合わせでブーストされた。ワクチン接種日は、シリングで示されている。初期(プライム)応答は5日目がピークであり、ワクチン / OX40(a b)処置マウスのみがブースト後に中等度のメモリー応答を示した(矢印)。プロットされた値は全てのCD8+細胞からのOT-I細胞に対する平均割合%を表し、誤差はSEMである。実験の反復の数および試料間の統計学的有意性について、図4A ~ Gも参照されたい。

【図6A - 6C】新しいワクチンベクター中のT細胞共刺激物質OX40LとImPACTの組み合わせ(「ComPACT」)が、OX40アゴニスト抗体の共投与と比較して、驚くほど優れた抗体特異的CD8+T細胞増殖を生じたことを示す。図6Aは、(a) OX40アゴニスト抗体と組み合わせた最初のワクチンImPACT(Gp96 - Ig)を、(b)新しいワクチンComPACT(この図ではGp96 - Ig / OX40L - Fc)、と比較するための実験計画を表す。図6Bは、対照ワクチン、オボアルブミンを発現するワクチン、オボアルブミンおよびgp96 - Igを発現するワクチン(ImPACT)、OX40アゴニスト抗体と組み合わせたImPACT、またはComPACTによるプライマリー免疫付与後の抗原特異的CD8+T細胞増殖のピークを表す。図6Bにおける各データセットでは、ピークの順は左から右に、ワクチンなし、Ovaのみの対照、ImPACT、ImPACT + OX40アゴニスト抗体、およびComPACTである。図6Cは、-1日目にOT-I(CD8)細胞を播種されたFOXP3 - RFPマウスを用いたOT-I増殖タイムコース(図5Dと類似)をプロットしたグラフである。OT-I / GFP細胞を、46日間にわたりワクチンなし、Ovaのみ対照細胞、ImP

ACT、ImPACT + 100 µg OX40 (ab)、およびComPACTで処置され、0日目に初回ワクチン接種および35日目にブーストされた（シリングで示される）マウスにおいて、フローサイトメトリーによって分析した。プライム応答およびメモリー応答の両者は、ImPACT + OX40 (ab)と比較した場合でも、ComPACTで処置されたマウスで最大であった。ComPACTマウスはまた、驚くべきことに、タイムコース（およそ7～20日目）全体を通して高いOT-Iレベルを保持した。プロットされた値は平均を表し、誤差はSEMである。実験の反復の数および試料群間の統計学的有意性について、図7A～7Fも参照されたい。

【図7A～7F】ComPACTにおけるgp96-IgとOX40L、ICOSL、または4-1BBL発現の組み合わせが、高レベルのCD8抗原特異的T細胞応答をもたらすことを示す。図7A～7Dは、図6Cで用いられたComPACTの3T3バージョンの特徴づけを示す。3T3細胞をニワトリオボアルブミン(Ova)を発現するプラスミドでトランスフェクトし、1つの高発現クローンを樹立して、ワクチンベクター(gp96-Ig単独、gp96-Ig/OX40L-Fc、gp96-Ig/ICOSL、またはgp96-Ig/4-1BBLのいずれか)で再トランスフェクトするのに用いた。それゆえ、ワクチンは、同じOva親クローン中で樹立された。非ワクチン接種マウス(ワクチンなし)を、Ovaのみを発現する細胞(追加の対照として)、ImPACT(Ova-gp96-Ig)、ImPACT+OX40アゴニスト抗体(OX40(ab))、ComPACT(Ova-gp96-Ig/ICOSL)、ComPACT(Ova-gp96-Ig/OX40L-Fc)、またはComPACT(Ova-gp96-Ig/1BBL)で処置されたマウスと比較した。図7Aは、ELISAによって確認されたOva分泌をプロットしたグラフであり、分泌がOvaのみの対照と、ImPACTと、様々なComPACT細胞との間で本質的に同一であることを示している。値は、最少で6回の反復の平均であり、誤差はSEMである。図7Aの各データセットについて、ヒストグラムの順は左から右に：Ovaのみの対照、ImPACT(3T3-ova-gp96-Ig)、ComPACT(Ova-gp96-Ig/ICOSL)、ComPACT(Ova-gp96-Ig/OX40L-Fc)、およびComPACT(Ova-gp96-Ig/1BBL)である。

図7Bは、ELISAによって決定されたgp96-Ig分泌(IgGとして検出)をプロットしたグラフであり、同等のレベルを分泌した個々のImPACTおよびComPACTクローンが樹立されたことを示している。値は、最少で6回の反復の平均であり、誤差はSEMである。図7Bの各データセットについて、ヒストグラムの順は左から右に：Ovaのみの対照、ImPACT(3T3-ova-gp96-Ig)、ComPACT(Ova-gp96-Ig/ICOSL)、ComPACT(Ova-gp96-Ig/OX40L-Fc)、およびComPACT(Ova-gp96-Ig/1BBL)である。

図7Cは、qRT-PCRによって確認されたICOSL、OX40L、または4-1BBLのmRNA発現をプロットしたグラフであり、ComPACT細胞中での発現を示している。グラフの値は、最少で3回の異なる反復の平均であり、誤差はSEMである。図7Cの各データセットについて、ヒストグラムの順左から右に：Ovaのみの対照、ImPACT(3T3-ova-gp96-Ig)、ComPACT(Ova-gp96-Ig/ICOSL)、ComPACT(Ova-gp96-Ig/OX40L-Fc)、およびComPACT(Ova-gp96-Ig/1BBL)である。

図7Dは、ComPACT細胞におけるOX40L、ICOSLおよび4-1BBL発現の確認を示すウェスタンプロットを提供する。ImPACTおよびComPACT細胞をブレフェルジンA(BFA)で16時間処置して、タンパク質輸送および分泌を予防した。その後、細胞を回収し、溶解してSDS PAGE/ウェスタンプロット分析に供した。プロットを、OX40L(CD252としても公知)、ICOSL、または4-1BBLに対する抗体、およびローディング対照としてのヒストンH3またはアクチンB(ACTB)に対する抗体でプローブした。OX40L、ICOSL、および4-1BBLは、ComPACT細胞のみで検出された。図7Eは、示されたプライマリー免疫付与後5日目のCD4+FoxP3+調節T細胞の頻度をプロットしたグラフで

10

20

30

40

50

ある。図7 E の各データセットについて、ヒストグラムの順は左から右に：ワクチンなし、Ovaのみの対照、ImPACT、ImPACT+OX40抗体、およびComPACT（この図では、Ova-gp96-Ig/OX40L-Fc）である。図7 F は、左に示される、42日目（ブースト免疫付与後7日目）の末梢血中の抗原特異的CD8+T細胞（OT-I）の頻度と、末梢血中の同じ日のCD4+FoxP3+調節T細胞のピークをプロットした一対のグラフである。図6 C に示されるように、Ovaのみを発現する細胞株、ImPACT、OX40(ab)と組み合わせたImPACTおよびComPACT（この場合、Ova-gp96-Ig/OX40L-Fc）でのワクチン接種後の抗原特異的（OT-I）細胞増殖が、初回ワクチン接種後5日目および40日目（それぞれプライムおよびメモリー）で示される。後者はまた、2回目のブーストワクチン接種後5日目に対応する。ImPACT、ImPACT+OX40(ab)およびComPACT処置マウスにおけるOT-Iレベルは、Ovaのみの対照処置マウスに比較して有意に上昇している。ComPACT処置マウスはOT-I細胞の最大増殖を示し、それはプライムおよびメモリー応答ポイントの両方でImPACT+OX40(ab)よりも有意に高い。実験の反復が列挙されており、誤差はSEMである。図7 F の各データセットについて、ヒストグラムの順は左から右に：ワクチンなし、Ovaのみの対照、ImPACT、ImPACT+OX40抗体、およびComPACT（この図では、Ova-gp96-Ig/OX40L-Fc）である。

【図8 A - 8 E】ComPACTは抗原特異的CD8+増殖を誘起したが、OX40抗体は非特異的T細胞活性化をもたらしたことを示す。図8 A は、未処置の、またはImPACT、ImPACT+OX40(ab)、もしくはComPACT（この図では、Gp96-Ig/OX40L-Fc）をワクチン接種されたマウスにおける単核（MNC）、CD4、CD8、OT-I、およびOT-II細胞の総数をプロットした一連のグラフである。図5 D および6 C と同様に、FoxP3+RFPレポーターマウスは、-1日目に尾静脈注射によってOT-1細胞を播種され、0日目にワクチン接種されて、8日目に、腹腔洗浄液から得られた細胞のフローサイトメトリーを含む分析のために殺処分された。ComPACT処置はロバストなOT-I（CD8）特異的応答を生じたが、OX40(ab)処置は、FoxP3+CD4細胞を含む全てのT細胞サブタイプの増加をもたらした。プロットされた値は、最少で3匹のマウスの平均であり、誤差はSEMである。図8 A の各データセットについて、ヒストグラムの順は左から右に：未処置、ImPACT、ImPACT+OX40抗体、およびComPACT（この図では、Gp96-Ig/OX40L-Fc）である。図8 B は、プライマリー免疫付与後8日目の、それぞれメモリー前駆体細胞、短命のエフェクター細胞、およびメモリー細胞に対応するCD127⁺KLRG1⁻、CD127⁻KLRG1⁺、およびCD127⁺KLRG1⁺細胞の数をプロットした一連のグラフである。細胞は、脾臓（上のパネル）および腹腔（下のパネル）から得られた。図8 B の各データセットについて、ヒストグラムの順は左から右に：未処置、Ovaのみ、ImPACT、ComPACT(Ova-gp96-Ig/ICOSL)、ComPACT(Ova-gp96-Ig/OX40L-Fc)、およびComPACT(Ova-gp96-Ig/1BBL)である。図8 C は、INF、TNF、IL2、IL6、およびIL5のレベルをプロットした一連のグラフである。全血清を8日に、先の図8 A に表される同じマウスから採取して、BioLegendのLEGENDPLEX（商標）およびフローサイトメーターを用いるサイトカイン分析に供した。図8 A のデータと一致して、OX40(ab)処置は、INF、TNF およびIL2のみならず、IL6およびIL5の上昇したレベルを伴う非特異的全身免疫応答を生じた。プロットされた値は、最少で3匹のマウスの平均であり、誤差はSEMである。図8 C の各データセットについて、ヒストグラムの順は左から右に：未処置、ImPACT、ImPACT+OX40抗体、およびComPACT（この図では、Gp96-Ig/OX40L-Fc）である。図8 D は、FN、TNF、およびグランザイム-B(GZMB)について遺伝子発現レベルをプロットした一連のグラフである。qRT-PCRによるT細胞活性化遺伝子の分析は、内在性(OT-I-)および抗原特異的CD8(OT-I) 10 20 30 40 50

+) 細胞の両方を非特異的に活性化するOX40 (ab) に比較して、抗原特異的CD8 (OT-I+) 細胞を活性化するのみであるComPACTの特異性を実証した。先の図8Aの腹腔洗浄液から得られた細胞を、OT-I- およびOT-I+ CD8細胞の集団に選別した。全RNAを回収して逆転写し、qPCRにより分析した。IFN、TNF、およびGZMBの遺伝子発現レベルを、最初のImPACTのみで処置された複製を1に設定し18S mRNAに正規化して、示す。プロットされた値は、最少で3匹のマウスの平均であり、誤差はSEMである。図8Dの各データセットについて、ヒストグラムの順は左から右に：ImPACT、ImPACT+OX40抗体、およびComPACT（この図では、Gp96-Ig/OX40L-Fc）である。図8Eは、マウスの脾臓細胞および腫瘍流出リンパ節（TDLN）におけるFOXP3調節T細胞（Treg）の数を示す。図8Eの各データセットについて、ヒストグラムの順は左から右に：未処置、ImPACT、ImPACT+OX40抗体、およびComPACT（この図では、Gp96-Ig/OX40L-Fc）である。

【図9A - 9C】ComPACT（この図では、Gp96-Ig/OX40L-Fc）処置は抗原特異的CD8 T細胞活性化をもたらすが、OX40(ab) 処置の共投与は、脾臓およびリンパ節の両方でのFOXP3 Tregの増加を含む非特異的免疫細胞活性化を誘起することを示す。図9Aは、未処置、またはImPACT、ImPACT+OX40(ab)、もしくはComPACTをワクチン接種されたマウスについてMNC、CD4、CD8、OT-I、およびOT-II細胞の総数をプロットした一連のグラフである。図5Dおよび6Cと同様に、FIRレポーターマウスは、-1日目に尾静脈注射によってOT-I細胞を播種され、0日目にワクチン接種されて、8日目に、脾臓から得られた細胞のフローサイトメトリーを含む分析のために殺処分された。OX40(ab) 処置マウスは、CD4/FOXP3+細胞を含む全てのT細胞サブタイプの増加を示した。ComPACT処置マウスは、OX40(ab) 応答よりも有意に高い、ロバストなOT-I(CD8)特異的応答を生じた。プロットされた値は、最少で3匹のマウスの平均であり、誤差はSEMである。図9Aの各データセットについて、ヒストグラムの順は左から右に：未処置、ImPACT、ImPACT+OX40抗体、およびComPACTである。図9Bは、末梢リンパ節以外では図9Aと同様の、未処置、またはImPACT、ImPACT+OX40(ab)、もしくはComPACTをワクチン接種されたマウスについてMNC、CD4、CD8、OT-I、およびOT-II細胞の総数をプロットした一連のグラフである。図9Bの各データセットについて、ヒストグラムの順は左から右に：未処置、ImPACT、ImPACT+OX40抗体、およびComPACTである。図9Cは、T細胞活性化遺伝子（ACTB、IL2、およびパーソン1（PRF1））についてmRNA発現をプロットした一連のグラフである。qRT-PCRは、OX40(ab)で処置されたマウスにおける内在性のおよび抗原特異的なOT-1 CD8細胞の両方の非特異的活性化に比べ、ComPACTで処置されたマウスにおける抗原特異的OT-1(CD8)活性化を明らかにした。先の図8Aの腹腔洗浄液から得られた細胞を、OT-1+ およびOT-1- CD8細胞の集団に選別した。全RNAを回収して逆転写し、qPCRにより分析した。ACTBレベルは、細胞集団と処置との間で一致しており、対照として働いた。IL2レベルは、ImPACT、ImPACT+OX40抗体、およびComPACTで処置されたマウスのOT-1+細胞において有意に上昇しており、全てのワクチン/組み合わせでの有意なT細胞活性化を示唆する。図8Cと一致して、PRF1のレベルは、OX40(ab)で処置されたマウスのOT-1+ およびOT-1+ CD8細胞の両方で非特異的に上昇したが、ComPACT処置マウスのOT-1+細胞で増加したのみであった。プロットされた値は、最少で3匹のマウスの平均であり、誤差はSEMである。図9Cの各データセットについて、ヒストグラムの順は左から右に：ImPACT、ImPACT+OX40抗体、およびComPACTである。

【図10A - 10C】腫瘍担持マウスにおいて、ComPACT（この図では、Gp96-Ig/OX40L-Fc）処置が最大数の腫瘍浸潤リンパ球および腫瘍退縮をもたらしたことを示す。図10Aは、実験構成の略図である。BALB/Cマウスに2×10⁵

10

20

30

40

50

C T 2 6 細胞を真皮下に接種して、0日目とした。6日目および11日目に、マウスをワクチン接種しないか、またはI m P A C T、I m P A C T + O X 8 6 (a b)、C o m P A C T、もしくはO X 8 6 (a b)単独でワクチン接種した。ワクチン処置は、 1×10^6 細胞および抗体 $100 \mu g$ で構成された。図10Bは、0日目での腫瘍接種に続く示された日での腫瘍面積をプロットしたグラフであり、試料群あたり最少で実験マウス5匹の平均と、S E Mとして誤差がプロットされている。図10Cは、試験21日目の腫瘍面積をプロットしたグラフである。図10Cの各データセットについて、ヒストグラムの順は左から右に：ワクチンなし、C T 2 6 のみの対照、O X 4 0 抗体のみ、I m P A C T、I m P A C T + O X 4 0 抗体、およびC o m P A C Tである。

【図11A - 11E】C o m P A C T（この図では、G p 9 6 - I g / O X 4 0 L - F c）処置が、C T 2 6 大腸癌モデルにおいて、C D 8 + 特異的腫瘍浸潤、腫瘍成長の妨害、増加した全生存率および有意な腫瘍拒絶をもたらしたことを示す。図11Aにおいて、0日目に 5×10^5 個のC T 2 6 腫瘍細胞を、マウスの脇腹後部へ皮下注射することにより接種した。マウスは、非処置であるか、または4、7および10日目にC T 2 6 親細胞、O X 4 0 (a b) 単独、I m P A C T 単独、I m P A C T + O X 4 0 (a b) またはC o m P A C T をワクチン接種された。マウスの1コホートを、腫瘍遺伝子分析のために12日目に殺処分した。残りのマウスを30日間モニタリングして、腫瘍面積および全生存率を測定した。図11Bは、12日目の腫瘍遺伝子発現の分析を示す。全R N Aを切除された腫瘍から単離し、逆転写し、q P C Rによって分析した。値は、18 S m R N Aに正規化して、最初の「未処置」のみの複製を1に設定した。図11Bの各データセットについて、ヒストグラムの順は左から右に：未処置、C T 2 6 のみの対照、O X 4 0 抗体のみ、I m P A C T、I m P A C T + O X 4 0 抗体、およびC o m P A C Tである。図11Cにおいて、A H 1 - 四量体 / 抗原特異的C D 8 + 細胞を処置マウスで分析した。図11Cの各データセットについて、ピークの順は左から右に：未処置、C T 2 6 のみの対照、O X 4 0 抗体のみ、I m P A C T、I m P A C T + O X 4 0 抗体、およびC o m P A C Tである。図11Dは、初回腫瘍接種後に21日間連日測定された腫瘍面積を示す。図11Eにおいて、全生存は、30日間のタイムコースで決定された。C o m P A C T 処置マウスの80%は、実験基準により生存し、マウスの47%（15匹中7匹）は、確立した腫瘍を完全に拒絶した。1匹のO X 4 0 (a b)のみで処置したマウスは、24日目まで腫瘍を拒絶し、1匹のI m P A C T + O X 4 0 (a b) 処置マウスは、25日まで拒絶した。

【図12A - 12D】C o m P A C T（この図では、G p 9 6 - I g / O X 4 0 L - F c）が、アグレッシブなB 1 6 . F 1 0 - o v a メラノーマモデルにおいて、抗原特異的C D 8 + 増殖、腫瘍成長の遅延、増加した全生存率および腫瘍拒絶を生成することを示す。図12Aにおいて、マウスは-1日目にO T - I 細胞 5×10^5 個を養子移入され、その後、0日目に 5×10^5 個のB 1 6 . F 1 0 - o v a 腫瘍細胞を脇腹後部へ皮下注射で接種された。マウスは、未処置であるか、または4、7および10日目にB 1 6 . F 1 0 - o v a 親細胞、O X 4 0 (a b) 単独、I m P A C T 単独、I m P A C T + O X 4 0 (a b) もしくはC o m P A C T をワクチン接種された。図12Bは、25日のタイムコースにわたる処置に続く抗原特異的C D 8 + (O T - I) 増殖を示す。図12Cにおいて、腫瘍面積を、初回腫瘍接種後25日のタイムコース全体で測定した。図12Dにおいて、全生存率を、30日のタイムコースにわたり決定した。C o m P A C T 処置マウスのおよそ78%が生存し、C o m P A C T 処置マウスの11%が確立された腫瘍を完全に拒絶した。C o m P A C T 処置群のみが、完全な腫瘍拒絶動物を有した（9匹中1匹、またはおよそ11%）。

【図13】-1日目にO T - 1 (C D 8) 細胞を播種されたF O X P 3 - R F P マウスを用いた、O T - I 増殖タイムコース（図5Dおよび6Cと類似）をプロットしたグラフである。O T - 1 / G F P 細胞を、0日目に初回ワクチン接種および35日目にブーストで、46日間にわたり、ワクチンなし、O v a のみの対照細胞、C o m P A C T (g p 9 6 - I g / O X 4 0 L またはg p 9 6 - I g / T L 1 A) またはC o m P A C T² (g p 9 6 - I g / O X 4 0 L + T L 1 A) で処置されたマウスにおいてフローサイトメトリーに

よって分析した。プロットされた値は平均を表し、誤差はSEMである。ComPACT²(gp96-Ig/OX40L+TL1A)は、ComPACT-OX40LおよびComPACT-TL1Aを含む組み合わせ注射(即ち、同じシリンジ中の2種の異なる細胞株)を表す。

【図14】オボアルブミン特異的CD8+T細胞(OTI)の増殖および活性化に及ぼすComPACTの影響を示すグラフである。C57BL/6マウスを0日目に、ImPACT単独またはComPACT(gp96-Ig/OX40L)、ComPACT(gp96-Ig/4-ICOSL)、もしくはComPACT(gp96-Ig/4-1BBL)で免疫付与した。OT-Iの頻度を、示された日に末梢血でモニタリングした。

【図15】CT26大腸癌モデルにおける腫瘍成長速度に及ぼすComPACTの影響を示すグラフである。マウスは0日目に 5×10^5 個のCT26腫瘍細胞を、脇腹後部での皮下注射により接種された。マウスは、非処置であるか、または4、7および10日目にCT26親細胞、ImPACT単独、ImPACT+TNFRSF25アゴニスト(4C12ab)、4C12(ab)単独、PD-1(ab)単独、4C12(ab)+PD-1(ab)、ComPACT(gp96-Ig/OX40L)またはgp96-Ig/TL1A)、ComPACT(gp96-Ig/OX40L)+PD-1(ab)、もしくはComPACT²(gp96-Ig/OX40L+TL1A)をワクチン接種された。マウスを30日間モニタリングして、腫瘍面積を測定した。ComPACT²(gp96-Ig/OX40L+TL1A)は、ComPACT-OX40LとComPACT-TL1Aを含む組み合わせ注射(即ち、同じシリンジ中の2種の異なる細胞株)を表す。

【図16】CT26大腸癌モデルにおける全マウス生存率に及ぼすComPACTの影響を示すグラフである。マウスは、図15に記載された通り、CT26腫瘍細胞で処置されて、ワクチン接種された。

【図17】ヒト前立腺特異的ワクチン(HS-1020、PC-3細胞株)によって産生されたヒトOX40Lの量を示すグラフである。

【図18】ヒト肺特異的ワクチン(HS-120、AD100細胞株)によって産生されたヒトOX40Lの量を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0015】

詳細な説明

様々な分泌可能なタンパク質、即ち本明細書に記載されたワクチンタンパク質を用いてインビボで免疫応答を刺激することができる。例えば、分泌可能なヒートショックプロテインgp96-Igを基にした同種細胞ワクチンは、インビボでの抗原交差プライミングを通してフェムトモル濃度の腫瘍抗原への高頻度ポリクローナルCD8+T細胞応答を実現できる(Oizumi et al., J Immunol 2007, 179(4): 2310-2317)。しかし、確立された腫瘍により複雑にされる複数の免疫抑制機構は、このワクチンアプローチの活性をくじく可能性がある。進行疾患の患者のための併用療法の潜在的使用を評価するために、長期確立B16-F10メラノーマのマウスマodelにおけるPD-1、PD-L1、CTLA-4、およびLAG-3遮断抗体の系統的比較を実施して(本明細書の実施例を参照)、他のチェックポイントとの比較で、gp96-Igワクチン接種とPD-1遮断との優れた組み合わせを実証した。相乗的な抗腫瘍性の利益は、gp96-Igワクチン接種と、PD-1遮断と、OX40のアゴニスト(例えば、OX40リガンド-Ig(OX40L-Ig)融合体、またはOX40に結合するその断片)、誘導性T細胞共刺激物質(ICOS)のアゴニスト(例えば、ICOSリガンド-Ig(ICOSL-Ig)融合体、またはICOSに結合するその断片)、CD40のアゴニスト(例えば、CD40L-Ig融合タンパク質、またはその断片)、CD27のアゴニスト(例えば、CD70L-Ig融合タンパク質、またはその断片)、4-1BBのアゴニスト(例えば、4-1BBリガンド-Ig(4-1BBL-Ig)融合体、または4-1BBに結合するその断片)、TNFRSF25のアゴニスト(例えば、TL1A-Ig融合体、またはTNFRSF25に結合するその断片)、またはグルコ

10

20

30

40

50

コルチコイド誘導腫瘍死因子受容体 (G I T R) のアゴニスト (例えば、G I T R リガンド - I g (G I T R L - I g) 融合体、または G I T R に結合するその断片) の 1 種を用いる T 細胞共刺激との三重の組み合わせから生じる得る。しかし、そのような三重の組み合わせの開発に関する情熱は、そのような治療の予想経費によって静められる。この問題を回避するために、ワクチンタンパク質発現ベクター (例えば、g p 9 6 - I g 発現ベクター) を再改変して、T 細胞共刺激タンパク質 (例えば、I C O S L - I g、4 - 1 B B L - I g、または O X 4 0 L - I g) を同時に発現させ、さらなる抗体療法を必要とせずに共刺激の利益を提供した。再改変されたベクターが、その使用方法と同様に、本明細書において提供される。g p 9 6 - I g およびこれらの共刺激融合タンパク質が同種細胞株によって分泌されると、抗原特異的 C D 8 + T 細胞の活性化増進が観察された (本明細書の実施例を参照)。したがって併用免疫療法は、完全に分離されたワクチン / 抗体 / 融合タンパク質レジメンの必要を排除するベクター再改変によって実現され得る。

【 0 0 1 6 】

ワクチンタンパク質

ワクチンタンパク質は、本発明において用途を見出す免疫応答を誘導し得る。様々な実施形態において、本発明は、分泌可能なワクチンタンパク質をコードする第一のヌクレオチド配列と T 細胞共刺激融合タンパク質をコードする第二のヌクレオチド配列とを含む発現ベクターを提供する。本発明の発現ベクターを含む組成物もまた、提供される。様々な実施形態において、そのような組成物は、対象における抗原特異的 T 細胞の活性化を増進することを含む、対象における免疫応答を刺激するために対象を処置する方法において利用される。本発明の組成物は、癌を含む様々な疾患の処置に用途を見出す。

【 0 0 1 7 】

小胞体 (E R) 中に局在するヒートショックプロテイン (h s p) g p 9 6 は、M H C クラス I および I I 分子へ向かうペプチドのシャペロンとして働く。腫瘍細胞から得られワクチンとして用いられる g p 9 6 は、抗原提示細胞 (A P C) への腫瘍特異的ペプチドの輸送をおそらく通して、特異的腫瘍免疫を誘導し得る (J Immunol 1999, 163 (10) : 5178 - 5182)。例えば g p 9 6 関連ペプチドは、樹状細胞 (D C) によって C D 8 細胞に交差提示される。

【 0 0 1 8 】

腫瘍細胞内へ g p 9 6 - I g G 1 - F c 融合タンパク質をトランスフェクトすることによる抗腫瘍療法のためにワクチン接種システムが開発され、介在される腫瘍タンパク質との複合体で g p 9 6 - I g の分泌がもたらされた (J Immunother 2008, 31 (4) : 394 - 401、およびそれに引用された参考資料を参照)。g p 9 6 - I g を分泌する腫瘍細胞の非経口投与は、自然免疫系の活性化と併せて、ロバストな抗原特異的 C D 8 細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) 増殖を惹起する。腫瘍に分泌される g p 9 6 は、g p 9 6 分泌の部位に D C およびナチュラルキラー (N K) 細胞を動員させ、D C 活性化を仲介する。さらに、g p 9 6 およびその介在されるペプチドのエンドサイトーシスによる取り込みは、主要な M H C クラス I を介するペプチド交差提示、および C D 4 細胞と独立した強い同族 C D 8 活性化を惹起する。

【 0 0 1 9 】

本明細書で提供されるベクターは、g p 9 6 - I g 融合タンパク質をコードする第一のヌクレオチド配列を含む。ヒト g p 9 6 のコード領域は 2 , 4 1 2 塩基長 (S E Q I D N O : 1) であり、アミノ末端の 2 1 アミノ酸シグナルペプチドと、疎水性残基に富む潜在的膜貫通領域と、カルボキシ末端の E R 保持ペプチド配列と、を含む 8 0 3 アミノ酸タンパク質 (S E Q I D N O : 2) をコードする (G E N B A N K (登録商標) アクセション番号 . X 1 5 1 8 7 ; M a k i e t a l . , P r o c Natl Acad Sci U S A 1990, 87 : 5658 - 5562 参照)。ヒト g p 9 6 の D N A およびタンパク質配列は、以下の通りである：

10

20

30

40

【化 1】

atatggagatagaatagaaagaatgctcgccctcagttgaacattgaccctgatgcaaagggtgga
 agaagagcccgagaagaagaacactgaagagacagcagaagacacaacagaagacacagagcaa
 gacgaagatgaagaaatggatgtgggaacagatgaagaagaacagcaaaggaaatctaca
 gctgaaaaagatgaattgtaa (SEQ ID NO:1)

MRALWVLGLCCVLLTFGSVRADDEVDVDGTVEEDLGKSREG
 SRTDDEVVQREEEAIQLDGLNASQIRELREKSEKFAFQAEVNR 10
 MMKLIINSLYKNKEIFLRELISNASDALDKIRLISLTDENALSG
 NEELTVKIKCDKEKNLLHVTDTGVGMTREELVKNLGTTIAGSG
 TSEFLNKMTEAQEDGQSTSELIGQFGVGFYSAFLVADKVIVTS
 KHNNDTQHIWESDSNEFSVIADPRGNTLGRGTTITVLKEEAS
 DYLELDTIKNLVKKYSQFINFPIYVWSSKTETVEEPMEEEEAA
 KEEKEESDDEAAVEEEEEKKPKTKKVEKTVWDWELMNDIK
 PIWQRPSKEVEEDEYKAFYKSFSKESDDPMAYIHFTAEGEVTF 20
 KSILFVPTSAPRGLFDEYGSKKSDYIKLYVRRVFITDDFHDM
 PKYLNFVKGVVDSDDLPLNVSRETLQQHKLLKVIRKVLVRKT
 LDMIKKIADDKYNDTFWKEFGTNIKLGVIDHSNRTRLAKLL
 RFQSSHPTDITSLDQYVERMKEKQDKIYFMAGSSRKEAESSP
 FVERLLKKGYEVYLTEPVDEYCIQALPEFDGKRFQNVAKEG
 VKFDESEKTGESREAVEKEFEPLLWNWMKDKALKDKIEKAVV 30
 SQRLTESPCALVASQYGWSGNMERIMKAQAYQTGKDISTNY
 YASQKKTFEINPRHPLIRDMRLRIKEDEDKTVLDLAVVLFET
 ATLRSGYLLPDTKAYGDRIERMLRLSLNIDPDAKVEEEPEEEP
 EETAEDTTEDTEQDEDEEMDVGTDEEEETAKESTAEKDEL

(SEQ ID NO:2).

【 0 0 2 0 】

g p 9 6 - I g 融合体配列をコードする核酸は、全体として参照により本明細書に組み入れられる米国特許第 8 , 6 8 5 , 3 8 4 号に記載された方法を利用して生成され得る。幾つかの実施形態において、g p 9 6 - I g 融合タンパク質の g p 9 6 部分は、野生型 g p 9 6 配列 (SEQ ID NO : 2 に示されたヒト配列) の全てまたは一部を含有し得る。例えば分泌可能な g p 9 6 - I g 融合タンパク質は、C 末端 K D E L (SEQ ID NO : 3) 配列が欠如するように、SEQ ID NO : 2 の最初の 7 9 9 アミノ酸を含み得る。あるいは融合タンパク質の g p 9 6 部分は、野生型ポリペプチドに対する少なくとも 9 0 % (例えば、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 1 % 、少なくとも 9 2 % 、少なくとも 9 3 % 、少なくとも 9 4 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、または少なくとも 9 9 %) の配列同一性を有するように、野生型 g p 9 6 配列の最初の 7 9 9 アミノ酸に比較して 1 つまたは複数の置換、欠失、または 40
 50

付加を含むアミノ酸配列を有し得る。

【0021】

本開示全体で用いられる、核酸またはアミノ酸配列と、特定の配列同定番号によって参照される配列との配列同一性%は、以下の通り決定される。最初に、核酸またはアミノ酸配列を、BLASTNバージョン2.0.14およびBLASTPバージョン2.0.14を含むBLASTZのスタンドアローンバージョンからのBLAST 2 Sequence (B12seq) プログラムを用いて、特定の配列同定番号で示される配列と比較する。このBLASTZのスタンドアローンバージョンは、fr.com/blastまたはncbi.nlm.nih.govからオンラインで得ることができる。B12seq プログラムを使用する方法を説明する取扱説明書は、BLASTZに添付されたりードミーファイル中に見出すことができる。B12seqは、BLASTNまたはBLASTPアルゴリズムのいずれかを用いて2つの配列間の比較を実施する。BLASTNは核酸配列を比較するために用いられ、BLASTPはアミノ酸配列を比較するために用いられる。2つの核酸配列を比較するために、オプションが以下の通り設定されている： -i は、比較される第一の核酸配列を含むファイル（例えば、C:\seq1.txt）に設定され； -j は、比較される第二の核酸配列を含むファイル（例えば、C:\seq2.txt）に設定され； -p は、blastnに設定され； -o は、任意の所望のファイル名（例えば、C:\output.txt）に設定され； -q は、-1に設定され； -r は、2に設定され；他のオプション全ては、デフォルト設定のままである。 例えれば、以下のコマンドを用いて2つの配列間の比較を含む出力ファイルを作成できる：C:\B12seq -i C:\seq1.txt -j C:\seq2.txt -p blastn -o C:\output.txt -q -1 -r 2。2つのアミノ酸配列を比較するために、B12seqのオプションは以下の通り設定される： -i は、比較される第一のアミノ酸配列を含むファイル（例えば、C:\seq1.txt）に設定され； -j は、比較される第二のアミノ酸配列を含むファイル（例えば、C:\seq2.txt）に設定され； -p は、blastpに設定され； -o は、任意の所望のファイル名（例えば、C:\output.txt）に設定され；他のオプション全ては、デフォルト設定のままである。 例えれば、以下のコマンドを用いて2つのアミノ酸配列間の比較を含む出力ファイルを作成できる：C:\B12seq -i C:\seq1.txt -j C:\seq2.txt -p blastp -o C:\output.txt -r 2。2つの比較された配列が相同性を共有する場合、指定された出力ファイルは、それらの相同性領域を整列された配列として提示する。2つの比較された配列が、相同性を共有しない場合、指定された出力ファイルは、整列された配列を提示しない。

【0022】

整列されると、両配列中で同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基が存在する位置の数をカウントすることによって、マッチの数が決定される。配列同一性%は、マッチの数を、同定された配列（例えば、SEQ_ID NO:1）中に示された配列の長さで、または連結された長さ（例えば、同定された配列中に示される配列からの100の連続するヌクレオチドまたはアミノ酸残基）で割り、その後、得られた値に100を掛けることにより決定される。 例えれば、SEQ_ID NO:1に示される配列と整列された時に2,200のマッチを有する核酸配列は、SEQ_ID NO:1に示される配列に91.2%同一である（即ち、 $2,000 \div 2,412 \times 100 = 91.2$ ）。配列同一性%の値は最も近い10分の1に丸められることに留意されたい。 例えれば、75.11、75.12、75.13、および75.14は、75.1に切り下げられ、75.15、75.16、75.17、75.18、および75.19は、75.2に切り上げられる。長さの値が常に整数であることにも留意されたい。

【0023】

したがって、幾つかの実施形態において、gp96-Ig融合ポリペプチドをコードする核酸のgp96部分は、1つまたは複数の他の種からの保存的置換、非保存的置換、スプライスバリエント、アイソフォーム、相同体、および多型を含むように、1つまたは複

10

20

30

40

50

数のアミノ酸位置で野生型 g p 9 6 ポリペプチドと異なるアミノ酸配列をコードし得る。

【0024】

本明細書で定義される「保存的置換」は、別の生物学的に類似した残基によるアミノ酸残基の交換を意味する。典型的には、先に参照されたように、生物学的類似性は、保存されたアミノ酸による野生型配列上の置換を反映する。例えば、保存的アミノ酸置換は、特にそれらがポリペプチドまたはタンパク質中の残基の総数の 10 % 未満であれば、生物活性に及ぼす影響がほとんど、または全くないと予測される。保存的置換は、例えば、関与するアミノ酸残基の極性、電荷、サイズ、溶解度、疎水性、親水性、および / または両親媒性における類似性に基づいて行われ得る。20 種の天然由来アミノ酸は、以下の 6 つの標準的アミノ酸群に分類することができる：(1) 疎水性：Met、Ala、Val、Leu、Ile；(2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn, Gln；(3) 酸性：Asp, Glu；(4) 塩基性：His、Lys、Arg；(5) 鎮の配向に影響を及ぼす残基：Gly、Pro；および(6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。したがって、保存的置換は、あるアミノ酸を、先に示された 6 つの標準的アミノ酸群の同じ群の中に列挙される別のアミノ酸で交換することによって実行され得る。例えば、Glu による Asp の交換は、そのように修飾されたポリペプチドにおいて 1 つの負電荷を保持する。加えて、グリシンとプロリンは、-ヘリックスを破壊するそれらの能力に基づいて、互いに置換され得る。保存的アミノ酸置換のさらなる例としては、1 つの疎水性残基の、別の疎水性残基、例えばイソロイシン、バリン、ロイシン、もしくはメチオニンでの置換、または 1 つの極性残基の、別の極性残基での置換、例えばリシンによるアルギニンの置換、アスパラギン酸によるグルタミン酸の置換、もしくはアスパラギンによるグルタミンの置換などが挙げられるが、これらに限定されない。用語「保存的置換」は、非置換の親アミノ酸残基の代わりの、置換されたアミノ酸残基の使用も含むが、但し置換されたポリペプチドに対して得られた抗体が非置換のポリペプチドとも免疫反応することが条件である。

【0025】

本明細書で定義された「非保存的置換」は、あるアミノ酸の、先に示された 6 つの標準的アミノ酸群(1)～(6)の異なる群に列挙される別のアミノ酸による交換と定義される。

【0026】

様々な実施形態において、置換は、非古典的アミノ酸（例えば、セレノシステイン、ピロリシン、N - ホルミルメチオニン - アラニン、GABA、- アミノレブリン酸、4 - アミノ安息香酸 (PABA) ）、一般的アミノ酸の D - 异性体、2 , 4 - ジアミノ酪酸、- アミノイソ酪酸、4 - アミノ酪酸、Abu、2 - アミノ酪酸、- Abu、- Ahx、6 - アミノヘキサン酸、Aib、2 - アミノイソ酪酸、3 - アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコスム (sarcosme) ）、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t - ブチルグリシン、t - ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、- アラニン、フルオロアミノ酸、デザイナーアミノ酸、例えば メチルアミノ酸、C - メチルアミノ酸、N - メチルアミノ酸、および一般的なアミノ酸類似体）を含み得る。

【0027】

突然変異は、コドン縮退を考慮することを含み、遺伝子コードを参照して本発明の融合タンパク質のスクレオチド配列に施すこともできる。

【0028】

g p 9 6 - Ig 融合タンパク質の Ig 部分（「タグ」）は、例えば、免疫グロブリン分子（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、または IgE 分子）の非可変部分を含み得る。典型的には、そのような部分は、免疫グロブリン重鎖の定常領域の少なくとも機能的 CH2 および CH3 ドメインを含む。融合は、定常ドメインのFc 部分カルボキシル末端、または重鎖もしくは軽鎖の CH1 に隣接するアミノ末端側の領域を用いて行なうこともできる。Ig タグは哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、サル

、またはラット)の免疫グロブリン由来であり得るが、gp96-Ig融合体がヒトのためのインピボ使用を意図される場合には、ヒト免疫グロブリンが特に有用であり得る。

【0029】

免疫グロブリンの軽鎖または重鎖定常領域をコードするDNAは、公知であるか、またはcDNAライブラリーから容易に入手可能である。例えば、Adams et al., Biochemistry 1980, 19:2711-2719; Gough et al., Biochemistry 1980 19:2702-2710; Dolby et al., Proc Natl Acad Sci USA 1980, 77:6027-6031; Rice et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79:7862-7865; Falkner et al., Nature 1982, 298:286-288; およびMorrison et al., Ann Rev Immunol 1984, 2:239-256を参照されたい。多くの免疫試薬および標識系が免疫グロブリンの検出に使用可能であるため、gp96-Ig融合タンパク質は、当該技術分野で知られる様々な免疫技術、例えば酵素免疫測定法(ELISA)、免疫沈降法、および蛍光活性化細胞選別(FACS)によって容易に検出および定量できる。同様に、ペプチドタグが、容易に入手可能な抗体をもつエピトープであれば、そのような試薬を、先に言及された技術によって使用して、gp96-Ig融合体を検出、定量、および単離できる。

【0030】

様々な実施形態において、gp96-Ig融合タンパク質および/または共刺激分子融合体は、リンカーを含む。様々な実施形態において、リンカーは、天然由来マルチドメインタンパク質に由来してよく、または例えば、全体として参照により本明細書に組み入れられるChichilli et al., (2013), Protein Sci. 22(2):153-167, Chen et al., (2013), Adv Drug Deliv Rev. 65(10):1357-1369に記載されるように、経験的なリンカーである。幾つかの実施形態において、リンカーは、全体の内容が参照により本明細書に組み入れられるChen et al., (2013), Adv Drug Deliv Rev. 65(10):1357-1369およびCrasstro et al., (2000), Protein Eng. 13(5):309-312に記載されたものなどのリンカー設計データベースおよびコンピュータプログラムを用いて設計できる。

【0031】

幾つかの実施形態において、リンカーは、PEGなどの合成リンカーである。

【0032】

他の実施形態において、リンカーは、ポリペプチドである。幾つかの実施形態において、リンカーは、約100未満のアミノ酸長である。例えばリンカーは、約100未満、約95未満、約90未満、約85未満、約80未満、約75未満、約70未満、約65未満、約60未満、約55未満、約50未満、約45未満、約40未満、約35未満、約30未満、約25未満、約20未満、約19未満、約18未満、約17未満、約16未満、約15未満、約14未満、約13未満、約12未満、約11未満、約10未満、約9未満、約8未満、約7未満、約6未満、約5未満、約4未満、約3未満、または約2未満のアミノ酸長であり得る。幾つかの実施形態において、リンカーは、可撓性である。別の実施形態において、リンカーは、剛性である。様々な実施形態において、リンカーは、実質的にグリシンおよびセリン残基で構成される(例えば、約30%、または約40%、または約50%、または約60%、または約70%、または約80%、または約90%、または約95%、または約97%のグリシンおよびセリン)。

【0033】

様々な実施形態において、リンカーは、抗体の(例えば、サブクラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、ならびにIgA1およびIgA2)を含む、IgG、IgA、IgD、IgEの)) ヒンジ領域である。IgG、IgA、IgD、

および Ig E クラス抗体中で見出されるヒンジ領域は可撓性スペーサとして作用し、 F a v 部分を空間中で自由に移動させる。定常領域とは対照的に、ヒンジドメインは構造的に多様であり、免疫グロブリンクラスおよびサブクラスの中で配列および長さの両方において様々である。例えば、ヒンジ領域の長さおよび可撓性は、 Ig G サブクラスの中で様々である。 Ig G 1 のヒンジ領域はアミノ酸 216 ~ 231 を含み、ヒンジ領域が自由に可撓性であるため、 F a b 断片は対称軸を中心として回転でき、 2 つの重鎖間ジスルフィド架橋の最初のものを中心とする球内を移動できる。 Ig G 2 は Ig G 1 よりも短いヒンジを有し、 12 のアミノ酸残基および 4 つのジスルフィド架橋を有する。 Ig G 2 のヒンジ領域はグリシン残基を欠き、相対的に短く、かつ剛性のポリプロリン二重らせんを含み、追加の重鎖間ジスルフィド架橋によって安定化される。これらの特性は Ig G 2 分子の可撓性を制限する。 Ig G 3 は、 62 のアミノ酸を含み(21 のプロリンおよび 11 のシステインを含む)、非可撓性のポリプロリン二重らせんを形成する、その特有の延長したヒンジ領域(Ig G 1 ヒンジの約 4 倍もの長さ)により他のサブクラスと異なる。 Ig G 3 において、 F a b 断片は F c 断片から相対的に離れており、分子により大きな可撓性を与えている。 Ig G 3 中の延長したヒンジはまた、他のサブクラスと比較してより大きなその分子量の原因である。 Ig G 4 のヒンジ領域は Ig G 1 よりも短く、その可撓性は Ig G 1 と Ig G 2 の中間である。ヒンジ領域の可撓性は、報告によれば Ig G 3 > Ig G 1 > Ig G 4 > Ig G 2 の順に低下する。
10

【 0034 】

さらなる例示的リンカーとしては、配列 L E 、 G G G G S (SEQ ID NO : 26) 、 (G G G G S)_n (n = 1 ~ 4) (SEQ ID NO : 27) 、 (Gly)₈ (SEQ ID NO : 28) 、 (Gly)₆ (SEQ ID NO : 29) 、 (E A A A K)_n (n = 1 ~ 3) (SEQ ID NO : 30) 、 A (E A A A K)_n A (n = 2 ~ 5) (SEQ ID NO : 31) 、 A E A A A K E A A A K A (SEQ ID NO : 32) 、 A (E A A A K)₄ A L E A (E A A A K)₄ A (SEQ ID NO : 33) 、 P A P A P (SEQ ID NO : 34) 、 K E S G S V S S E Q L A Q F R S L D (SEQ ID NO : 35) 、 E G K S S G S G S E S K S T (SEQ ID NO : 36) 、 G S A G S A A G S G E F (SEQ ID NO : 37) 、および (X P)_n (ここで X は、任意のアミノ酸、例えば A l a 、 L y s または G l u を指す) が挙げられるが、これらに限定されない。
20

【 0035 】

様々な実施形態において、リンカーは、機能的であり得る。例えば非限定的に、リンカーは、本発明の組成物のフォールディングおよび / もしくは安定性を改善するように、発現を改善するように、薬物動態を改善するように、そして / または生物活性を改善するように機能し得る。別の実施例において、リンカーは、特定の細胞型または位置に組成物を標的させるように機能し得る。

【 0036 】

幾つかの実施形態において、 g p 96 ペプチドは、ネズミ Ig G 1 のヒンジ、 C H 2 および C H 3 ドメインに融合され得る(Bowen et al . , J Immunol 1996 , 156 : 442 - 449)。 Ig G 1 分子のこの領域は、通常は Ig 分子内の他のシステインとのジスルフィド結合に関与する、 3 つのシステイン残基を含む。システインのいずれもが、タグとして機能するペプチドに必要とされないため、これらのシステイン残基の 1 つまたは複数は、別のアミノ酸残基、例えばセリンなどによって置換され得る。
40

【 0037 】

当該技術分野で知られる様々なリーダー配列もまた、細菌および哺乳動物細胞からの g p 96 - Ig 融合タンパク質の効率的な分泌のために用いられ得る(von Heijnen , J Mol Biol 1985 , 184 : 99 - 105 参照)。リーダーペプチドは、意図する宿主細胞に基づいて選択され得、細菌、酵母、ウイルス、動物、および哺乳動物配列を含む得る。例えばヘルペスウイルス糖タンパク質 D リーダーペプチドは、
50

種々の哺乳動物細胞における使用に適する。哺乳動物細胞で使用される別のリーダーペプチドは、マウス免疫グロブリン鎖のV-J2-C領域から得ることができる(Bernard et al., Proc Natl Acad Sci USA 1981, 78: 5812-5816)。ペプチドタグまたはリーダーペプチドをコードするDNA配列は、公知であるか、またはライブラリーもしくは商標的な供給業者から容易に得ることができ、本明細書に記載された融合タンパク質に適する。

【0038】

さらに、様々な実施形態において、本開示のgp96を1つまたは複数のワクチンタンパク質で置換できる。例えば、様々なヒートショックプロテインは、ワクチンタンパク質の1種である。様々な実施形態において、ヒートショックプロテインは、それらの断片、変種、突然変異体、誘導体または組み合わせを含む、低分子量hsp、hsp40、hsp60、hsp70、hsp90、およびhsp110ファミリーメンバーの1つまたは複数である(Hickey, et al., 1989, Mol. Cell. Biol. 9: 2615-2626; Jindal, 1989, Mol. Cell. Biol. 9: 2279-2283)。

【0039】

T細胞共刺激

gp96-Ig融合タンパク質に加えて、本明細書で提供される発現ベクターは、1つまたは複数の生物学的応答修飾物質をコードし得る。様々な実施形態において、本発明の発現ベクターは、1つまたは複数のT細胞共刺激分子をコードし得る。

【0040】

様々な実施形態において、本発明の発現ベクターは、ロバストな抗原特異的CD8細胞傷害性T細胞リンパ球(CTL)増殖を可能にする。様々な実施形態において、本発明の発現ベクターはCD8細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を選択的に増強し、腫瘍促進性(pro-tumor)であり得るT細胞型を実質的に増強せず、非限定的にTrereg、1つまたは複数のチェックポイント阻害性受容体を発現するCD4+および/またはCD8+T細胞、Th2細胞およびTh17細胞を包含する。チェックポイント阻害性受容体は、未制御の免疫応答を予防または阻害する免疫細胞上で発現される受容体(例えば、CTLA-4、B7-H3、B7-H4、TIM-3)を指す。例えば、本発明の発現ベクターは、FOXP3+調節T細胞を実質的に増強しない。幾つかの実施形態において、この選択的CD8T細胞増強は、gp96-Ig融合体とT細胞共刺激分子に対する抗体との併用療法で観察された非特異的T細胞増強と対照的である。

【0041】

例えば、ベクターは、OX40のアゴニスト(例えば、OX40リガンド-Ig(OX40L-Ig)融合体、またはOX40に結合するその断片)、誘導性T細胞共刺激物質(ICOS)のアゴニスト(例えば、ICOSリガンド-Ig(ICOSL-Ig)融合体、またはICOSに結合するその断片)、CD40のアゴニスト(例えば、CD40L-Ig融合タンパク質、またはその断片)、CD27のアゴニスト(例えば、CD70L-Ig融合タンパク質またはその断片)、または4-1BBのアゴニスト(例えば、4-1BBリガンド-Ig(4-1BBL-Ig)融合体、または4-1BBに結合するその断片)をコードし得る。幾つかの実施形態において、ベクターは、TNFRSF25のアゴニスト(例えば、TL1A-Ig融合体、またはTNFRSF25に結合するその断片)、またはグルココルチコイド誘導腫瘍壞死因子受容体(GITR)のアゴニスト(例えば、GITRリガンド-Ig(GITRL-Ig)融合体、またはGITRに結合するその断片)、またはCD40のアゴニスト(例えば、CD40リガンド-Ig(CD40L-Ig)融合体、またはCD40に結合するその断片)、またはCD27のアゴニスト(例えば、CD27リガンド-Ig(CD27L-Ig)融合体、またはCD40に結合するその断片)をコードし得る。

【0042】

ICOSは、CD28およびCTLA-4に対して若干の相同性を示し、抗原提示細胞

10

20

30

40

50

の表面で発現される B7-H2 と相互作用する、誘導性 T 細胞共刺激受容体分子である。ICOS は、細胞性および液性免疫応答の調節に関係づけられている。

【0043】

4-1BB は TNF スーパーファミリーに属する 2 型膜貫通糖タンパク質であり、活性化 T リンパ球上で発現される。

【0044】

OX40 (CD134 または TNFRSF4 とも称される) は OX40L に関与する T 細胞共刺激分子であり、抗原提示細胞および他の細胞型でしばしば誘導される。OX40 は、サイトカイン発現およびエフェクター T 細胞の生存率を増大することが知られている。

10

【0045】

GITR (TNFRSF18) は GITRL に関与する T 細胞共刺激分子であり、FoxP3+ 調節 T 細胞で優先的に発現される。GITR は、腫瘍微小環境内の Treg の維持および機能において重要な役割を担う。

【0046】

TNFRSF25 は、抗原刺激に続いて CD4+ および CD8+ T 細胞で優先的に発現される T 細胞共刺激分子である。TNFRSF25 を介したシグナル伝達が TL1A によって提供され、同族抗原依存的な様式で IL-2 受容体を介する増殖に対する T 細胞感受性を増強するよう機能する。

20

【0047】

CD40 は様々な抗原提示細胞上で見出される共刺激タンパク質でありそれらの活性化において役割を担う。TH 細胞上の CD40L (CD154) の CD40 への結合は抗原提示細胞を活性化し、様々な下流での影響を誘導する。

【0048】

CD27 は TNF スーパーファミリーに属する T 細胞共刺激分子であり T 細胞免疫の生成および長期維持において役割を担う。それは、様々な免疫過程においてリガンド CD70 に結合する。

【0049】

本発明において使用され得るさらなる共刺激分子としては、HVEM、CD28、CD30、CD30L、CD40、CD70、LIGHT (CD258)、B7-1、および B7-2 が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0050】

gp96-Ig 融合体に関し、T 細胞共刺激融合タンパク質の Ig 部分 (「タグ」) は、免疫グロブリン分子 (例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、または IgE 分子) の非可変部分を含み得る。先に記載された通り、典型的にはそのような部分は、免疫グロブリン重鎖の定常領域の少なくとも機能的 CH2 および CH3 ドメインを含む。幾つかの実施形態において、T 細胞共刺激ペプチドは、ネズミ IgG1 のヒンジ、CH2 および CH3 ドメインに融合され得る (Bowen et al., J Immunol 1996, 156:442-449)。Ig タグは哺乳動物 (例えば、ヒト、マウス、サル、またはラット) 免疫グロブリン由来であり得るが、融合タンパク質がヒトへのインビオ使用を意図される場合にはヒト免疫グロブリンが特に有用であり得る。同じく、免疫グロブリン軽鎖または重鎖定常領域をコードする DNA は公知であるか、または cDNA ライブラリーから容易に入手可能である。先に記載されたようにリーダー配列もまた、細菌および哺乳動物細胞からの T 細胞共刺激融合タンパク質の分泌に用いられ得る。

40

【0051】

Ig に融合されたヒト ICOSL の細胞外ドメインをコードする代表的なヌクレオチド最適化配列 (SEQ ID NO: 4)、およびコードされた融合体のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 5) が提供される：

【化2】

ATGAGACTGGGAAGCCCTGGCCTGCTGTTCTGCTGTTCA
CAGCCTGAGAGCCGACACCCAGGAAAAAGAAGTGCAGGC
CATGGTGGGAAGCGACGTGGAACGTGAGCTGCGCCTGTC
GAGGGCAGCAGATTGACCTGAACGACGTGTACGTGTACT
GGCAGACCAGCGAGAGCAAGACCCTGACCTACCAT
CCCCCAGAACAGCTCCCTGGAAAACGTGGACAGCCGGTAC 10
AGAAACCGGGCCCTGATGTCTCCTGCCGGCATGCTGAGAG
GCGACTTCAGCCTGCGGCTGTTAACGTGACCCCCCAGGA
CGAGCAGAAATTCCACTGCCTGGTGCTGAGCCAGAGCCTG
GGCTTCCAGGAAGTGCTGAGCGTGGAAAGTGACCCCTGCACG
TGGCCGCCAATTTCAGCGTGCCAGTGGTGTCTGCC
AGCCCTTCTCAGGATGAGCTGACCTCACCTGTACCA
GACATCAACGGCTACCCCCAGACCCAATGTGTACTGGATCAACAAG 20
ACCGACAAACAGCCTGCTGGACCAGGCCCTGCAGAACGATA
CCGTGTTCCCTGAACATGCCGGGCCTGTACGACGTGGTGTCC
GTGCTGAGAACGCCAGAACCCCCAGCGTGAACATCGGCT
GCTGCATCGAGAACGTGCTGCTGCAGCAGAACCTGACCGT
GGCAGCCAGACCGGCAACGACATCGCGAGAGAGACAA
GATCACCGAGAACCCC GTGTCCACCGGCGAGAAGAACGCC 30
GCCACCTCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTTGTCC
CCCTGAATTCTGGCGGACCCCTCCGTGTTCTGTT
CAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGA
AGTGACCTGCGTGGTGGATGTGTCCCAGGAAGATCCC
GAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGGTGGAAGTGC
ACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGAGAACAGTTCAACA
GCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCA
GATTGGCTGAGCGGAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCA 40
GCAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAAAAGACCATCAGCAA
CGCCACCGGCCAGCCCAGGGAACCCCAGGTGTACACACTG
CCCCCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAAGGTGTCCC

TGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATGCC
GTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCAGAGAACAACTAC
AAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCT
TCCTGTACTCCCGGCTGACAGTGGACAAGAGCAGCTGGCA
GGAAGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAAGCC
CTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTGTCCCT
GGGCAAATGA (SEQ ID NO:4) 10

MRLGSPGLLFLFSSLRADTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEG
SRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSLENVDSRYRNRA
LMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQLGFQEVL
SVEVTLHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELFTCTSINGYPRPNV
YWINKTDNSLLDQALQNDTVFLNMRGGLYDVSVLRIARTPS
VNIGCCIENVLLQQNLTVGSGTGNDIGERDKITENPVSTGEKN
AATSKYGPPCPSCPAPAPEFLGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVT
CVVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYR
VVSVLTVLHQDWLSGKEYKCKVSSKGLPSSIEKTISNATGQPR
EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSSWQEGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:5). 20

【 0 0 5 2 】

Igに融合されたヒト4-1BBLの細胞外ドメインをコードする代表的なヌクレオチド最適化配列(SEQ ID NO:6)、およびコードされたアミノ酸配列(SEQ ID NO:7)が提供される:

10

20

30

【化3】

ATGTCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTAGCTGCCCTGCC
TGAATTCTGGCGGACCCAGCGTGTCCCTGTTCCCCCAA
AGCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGT
GACCTGCGTGGTGGATGTGTCCCAGGAAGATCCCGAG
GTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCACA
ACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTAACAGCA
CCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAT
TGGCTGAGCGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAGCA
AGGGCCTGCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGAACGC
CACCGGCCAGCCCAGGAAACCCAGGTGTACACACTGCC
CCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAAGGTGTCCCTGA
CCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATGCCGTG
GAATGGGAGAGCAACGCCAGCCTGAGAACAACTACAAG

10

20

ACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTCCT
 GTACAGCAGACTGACCGTGGACAAGAGCAGCTGGCAGGA
 AGGCAACGTGTTAGCTGCAGCGTATGCACGGAGGCCCTG
 CACAACCAACTACACCCAGAACAGTCCCTGTCTCTGAGCCTGG
 GCAAGGCCTGTCCATGGGCTGTGTCTGGCGCTAGAGCCTCT
 CCTGGATCTGCCGCCAGCCCCAGACTGAGAGAGGGACCTG
 AGCTGAGCCCCGATGATCCTGCCGGACTGCTGGATCTGAG
 ACAGGGCATGTTGCCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTG
 CTGATCGATGGCCCCCTGAGCTGGTACAGCGATCCTGGACT
 GGCTGGCGTGTCACTGACAGGCCCTGAGCTACAAAGAG
 GACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACT
 ACGTGTCTTCAGCTGGAACCTGCGGAGAGTGGTGGCCGG
 CGAAGGATCCGGCTCTGTGTCTGGCTCTGCATCTGCAGC
 CCCTGAGATCTGCTGGCGCTGCTGCTCTGGCCCTGACA
 GTGGACCTGCCTCCTGCCTCTAGCGAGGCCAGAACAGCG
 CATTGGGTTCAAGGCAGACTGCTGCACACAGAGGCCAGAGCCA
 CAGAGACTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGAGCCA
 GGCACGCCTGGCAGCTGACTCAGGGCGCTACAGTGTGGG
 CCTGTTCAAGAGTGAACCCCCGAGATTCCAGCCGGCTGCCTA
 GCCCCAGATCCGAATGA (SEQ ID NO:6)

MSKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLPPPKDLMISRTPEVTCV
 VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFNSTYRV
 VSVLTVLHQDWLSGKEYKCKVSSKGLPSSIEKTISNATGQP
 PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSSWQEGNVFSCSVMH
 EALHNHYTQKSLSLSGKACPWAVGARASPGSAASPRLREG
 PELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVANVLLIDGPLSWYSDPGL
 AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE
 GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG
 FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVGLFR
 VTPEIPAGLPSPRSE (SEQ ID NO:7).

【 0 0 5 3 】

Igに融合されたヒトTL1Aの細胞外ドメインをコードする代表的なヌクレオチド最適化配列(SEQ ID NO:8)、およびコードされたアミノ酸配列(SEQ ID NO:9)が提供される:

【化4】

ATGTCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTAGCTGCCCTGCCCT
 TGAATTCTGGCGGACCCAGCGTGTCCCTGTTCCCCCAA
 AGCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGT
 GACCTGCGTGGTGGATGTGTCCCAGGAAGATCCGAG
 GTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCACA
 ACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTAACAGCA
 CCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAAGGAT
 10
 TGGCTGAGCGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAGCA
 AGGGCCTGCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAACGC
 CACCGGCCAGCCCAGGGAACCCCAGGTGTACACACTGCC
 CCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAAGGTGTCCCTGA
 CCTGTCTCGTAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATGCCGTG
 GAATGGGAGAGCAACGCCAGCCTGAGAACAACTACAAG
 ACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTCCT
 GTACAGCAGACTGACCGTGGACAAGAGCAGCTGGCAGGA
 20
 AGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGTGACGAGGCCCTG
 CACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTTGAGCCTGG
 GCAAGATCGAGGGCCGGATGGATAGAGCCCAGGGCGAAG
 CCTGCGTGCAGTTCCAGGCTCTGAAGGGCCAGGAATTCGC
 CCCCAGCCACCAGCAGGTGTACGCCCTCTGAGAGCCGAC
 GGCATAAGCTAGAGCCCACCTGACAGTCGTGCGGCAGA
 CCCCTACCCAGCACTTCAAGAACATCAGTTCCCCGCCCTGCAC
 30
 TGGGAGCACGAACTGGGCCTGGCCTTCACCAAGAACAGAA
 TGAACTACACCAACAAGTTCTGCTGATCCCCGAGAGCGG
 CGACTACTCATCTACAGCCAAGTGACCTCCGGGCATGA
 CCAGCGAGTGCAGCGAGATCAGACAGGCCGGCAGACCTAA
 CAAGCCGACAGCATACCGTCGTGATCACCAAAGTGACC
 GACAGCTACCCGAGCCCACCCAGCTGCTGATGGGCACCA
 AGAGCGTGTGCGAAGTGGGCAGCAACTGGTCCAGCCCAT
 CTACCTGGGCCATGTTAGTCTGCAAGAGGGCGACAAG
 CTGATGGTCAACGTGTCCGACATCAGCCTGGTGGATTACAC
 CAAAGAGGACAAGACCTTCTCGCGCCCTTCTGCTCTGA
 (SEQ ID NO:8)

MSKYGPPCPSCPAPAPEFLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQFNSTYRV

VSVLTVLHQDWLSGKEYKCKVSSKGGLPSSIEKTISNATGQP
 PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSSWQEGNVFSCSVMH
 EALHNHYTQKSLSLSGKIEGRMDRAQGEACVQFQALKGQE
 FAPSHQQVYAPLRADGDKPRAHTVVRQTPTQHFKNQFPAL
 HWEHELGLAFTKNRMNYTNKFLLIPESGDYFIYSQVTFRG
 SECSEIRQAGRPNKPDSITVVITKVTDSYPEPTQLLMGT
 VGSNWFQPIYLGAMFSLQEGDKLMVNVDISLVDTYTKEDKTF
 FGAFL (SEQ ID NO:9).

【0054】

ヒトOX40L- Igをコードする代表的なヌクレオチド最適化配列(SEQ ID NO:10)、およびコードされたアミノ酸配列(SEQ ID NO:11)が提供される:

【化5】

ATGTCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTAGCTGCCCTGCCCT
 TGAATTCTGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAA
 AGCCCAAGGACACCCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGT
 GACCTGCGTGGTGGATGTGTCCCAGGAAGATCCGAG
 GTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCACA
 ACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGAGGAACAGTTAACAGCA
 CCTACCGGGTGGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAT
 TGGCTGAGCGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAGCA
 AGGGCCTGCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGAACGC
 CACCGGCCAGCCAGGGAACCCCAGGTGTACACACTGCC
 CCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCCAGGTGTCCCTGA
 CCTGTCTCGTAAGGGCTCTACCCCTCCGATATGCCGTG
 GAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAG
 ACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTCCT
 GTACAGCAGACTGACCGTGGACAAGAGCAGCTGGCAGGA
 AGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGTGACCGAGGCTG
 CACAACCAACTACACCCAGAACGTCCCTGTCTTGAGCCTGG
 GCAAGATCGAGGGCCGGATGGATCAGGTGTACACAGATA
 CCCCCGGATCCAGAGCATCAAAGTGCAGTTACCGAGTAC
 AAGAAAGAGAAGGGTTATCCTGACCAGCCAGAAAGAG
 GACGAGATCATGAAGGTGCAGAACACAGCGTGATCATCA
 ACTGCGACGGGTTCTACCTGATCAGCCTGAAGGGCTACTTC
 AGTCAGGAAGTGAACATCAGCCTGCACTACCAGAAGGACG
 AGGAACCCCTGTTCCAGCTGAAGAAAGTGCAGCGTGAA

10

20

30

40

50

CAGCCTGATGGTGGCCTCTCTGACCTACAAGGACAAGGTG
TACCTGAACGTGACCACCGACAACACCAGCCTGGACGACT
TCCACGTGAACGGCGCGAGCTGATCCTGATTCAACCAGAA
CCCCGGCGAGTTCTGCGTGCTCTGA (SEQ ID NO:10)

MSKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVLFPPPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLSGKEYKCKVSSKGLPSSIEKTISNATGQP10
PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSSWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLLGKIEGRMDQVSHRYPRIQSIKVQFTEY
KKEKGFIITSQKEDEIMKVQNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEV
NISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVT
DNTSLDDFHVNNGGELILIHQNPGFCVL (SEQ ID NO:11).

【 0 0 5 5 】

ヒト T L 1 A の代表的なヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、それぞれ S E Q I D
N O : 1 2 および S E Q I D N O : 1 3 に示す：

10

20

【化6】

TCCCAAGTAGCTGGACTACAGGAGCCCACCACCACCCCC
GGCTAATTTTGTATTTTAGTAGAGACGGGTTTCACCG
TGTTAGCCAAGATGGTCTTGATCACCTGACCTCGTGATCCA
CCCGCCTTGCCTCCAAAGTGCTGGATTACAGGCATGA
GCCACCGCGCCCGCCCTCCATTCAAGTCTTATTGAATATC
TGCTATGTTCTACACACTGTTCTAGGTGCTGGGATGCAAC
AGGGGACAAAATAGGCAAAATCCCTGTCCTTGGGTTG
ACATTCTAGTGAUTCTCATGTAGTCTAGAAGAAGCTCAGT
GAATAGTGTCTGTGGTTTACCAAGGGACACAATGACAGG
AACATTCTGGGTAGAGTGAGAGAGGCCTGGGAGGGAGGG
TCTCTAGGATGGAGCAGATGCTGGCAGTCTTAGGGAGCC
CCTCCTGGCATGCACCCCTCATCCCTCAGGCCACCCCGT
CCCTTGCAGGAGCACCCCTGGGAGCTGTCCAGAGCGCTGT
GCCGCTGTCTGTGGCTGGAGGCAGAGTAGGTGGTGTGCTG
GGAATGCGAGTGGAGAACTGGGATGGACCGAGGGAGGG
CGGGTGAGGAGGGGGCAACCACCCAACACCCACAGCTG
CTTCAGTGTCTGGGTCCAGGTGCTCCTGGCTGGCCTTGT
GGTCCCCCTCCTGCTGGGCCACCCCTGACCTACACATACC
GCCACTGCTGGCCTCACAGCCCCCTGGTTACTGCAGATGA
AGCTGGGATGGAGGCTCTGACCCCACCACCGGCCACCCAT

10

20

30

CTGTCACCCTGGACAGCGCCCACACCCTCTAGCACCTCC
 TGACAGCAGTGAGAAGATCTGCACCGTCCAGTTGGTGGGT
 AACAGCTGGACCCCTGGCTACCCCGAGACCCAGGAGGCAG
 TCTGCCCGCAGGTGACATGGTCTGGGACCAGTTGCCAG
 CAGAGCTCTGGCCCCGCTGCTGCCAACACTCTGCCAG
 AGTCCCCAGCCGGCTGCCAGCCATGATGCTGCAGCCGGG
 CCCGCAGCTCTACGACGTGATGGACGCCAGCGCTCCAGCGCG
 CGCTGGAAGGAGTTCGTGCACGCTGGGCTGCGCGAGG
 CAGAGATCGAAGCCGTGGAGGTGGAGATCGGCCGCTTCCG
 AGACCAGCAGTACGAGATGCTCAAGCGCTGGCGCCAGCAG
 CAGCCCGCGGGCCTCGGAGCCGTTACGCCGCCCTGGAGC
 GCATGGGCTGGACGGCTCGTGGAAAGACTTGCAGCCG
 CCTGCAGCGGGCCCGTGACACGCCGCCACTGCCACCT
 AGGCCTCTGGTGGCCCTGCAGAACGCCCTAAGTACGGTT
 ACTTATCGTGTAGACATTATGTCACTTATTAAGCCGCT
 GGCACGGCCCTGCGTAGCAGCACCGCCGGCCCCACCCCT
 GCTCGCCCTATCGCTCCAGCCAAGGCGAAGAACGACGAA
 CGAATGTCGAGAGGGGTGAAGACATTCTCAACTTCTCG
 GCCGGAGTTGGCTGAGATCGCGGTATTAAATCTGTGAAA
 GAAAACAAAACAAAACAA (SEQ ID NO:12)

MEQRPRGCAAVAAALLVLLGARAQGGTRSPRCDCAGDFHK
 KIGLFCCRGCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLVCPQDTFLAWEN
 HHNSECARCQACDEQASQVALENCSAVADTRCGCKPGWFVE
 CQVSQCVSSSPFYCQPCLDCGALHRHTRLLCSRRTDCGTCL
 PGFYEHGDGCVSCPPTPPPSLAGAPWGAVQSAVPLSVAGGRV
 GVFWVQVLLAGLVVPLLGATLTYYTYRHCWPHKPLVTADEA
 GMEALTTPPPATHLSPLDSAHTLLAPPDSSEKICTVQLVGN
 SWTPGYPETQEALCPQVTWSWDQLPSRALGPAAAPTLSPE
 SPAGS PAMMLQPGPQLYDVMDAVPARRWKEFVRTLGLREAE
 IEAVE VEIGFRDQQYEMLKRWRQQPAGLGAVYAA
 LERMG LDGC VEDLRSRLQRGP (SEQ ID NO:13).

【 0 0 5 6 】

ヒトHVE Mの代表的なヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、それぞれSEQ ID NO:38(アクセション番号CR456909)およびSEQ ID NO:39(アクセション番号CR456909)に示す:

10

20

30

40

50

【化7】

ATGGAGCCTCCTGGAGACTGGGGGCCTCCTCCCTGGAGAT
 CCACCCCCAAAACCGACGTCTGAGGCTGGTGTATCTC
 ACCTTCCTGGAGCCCCCTGCTACGCCAGCTGCCGTC
 CTGCAAGGAGGACGAGTACCCAGTGGGCTCCGAGTGCTGC
 CCCAAGTGCAGTCCAGGTTATCGTGTGAAGGAGGCCTGCG
 GGGAGCTGACGGGCACAGTGTGAACCCCTGCCCTCCAGG
 CACCTACATTGCCAACCTCAATGCCCTAAGCAAGTGTCTGC
 AGTGCCAAATGTGTGACCCAGCCATGGCCTGCGCGAG
 CCGGAACTGCTCCAGGACAGAGAACGCCGTGTGGCTGC
 AGCCCAGGCCACTTCTGCATCGTCCAGGACGGGACCACT
 GCGCCCGTGCCTACGCCACCTCCAGCCGGCCA
 GAGGGTGCAGAAGGGAGGCACCGAGAGTCAGGACACCC
 GTGTCAGAACTGCCCGGGACCTTCTCTCCCAATGGGA
 CCCTGGAGGAATGTCAGCACAGACCAAGTGCAGCTGGCT
 GGTGACGAAGGCCGGAGCTGGACCAGCAGCTCCACTGG
 GTATGGTGGTTCTCTCAGGGAGCCTCGTCATCGTCATTGT
 TTGCTCACAGTTGGCTAATCATATGTGTAAAAGAAGA
 AAGCCAAGGGGTGATGTAGTCAAGGTGATCGTCTCCGTCC
 AGCGGAAAAGACAGGAGGCAGAAGGTGAGGCCACAGTCA
 TTGAGGCCCTGCAGGCCCTCCGGACGTCACCACGGTGGC
 CGTGGAGGAGACAATACCCCTATTCACGGGGAGGAGCCCA
 AACCATCAA (SEQ ID NO:38) 30

MEPPGDWGPWRSTPKTDVRLVLYLTFLGAPCYAPALPSC
 KEDEYPVGSECCPKCSPGYRVKEACGELTGTVCCEPCPPGTYIA
 HLNGLSKCLQCQMCMDPAMGLRASRNCSRTEAVCGCSPGHF
 CIVQDGDHCAACRAYATSSPGQRVQKGGTESQDTLCQNCPP
 GTFSPNGTLEECQHQTCKCSWLVTKAGAGTSSSHWWWFLSG
 SLVIVIVCSTVGLIICVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGE
 ATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPSFTGRSPNH (SEQ ID NO:39). 40

【0057】

ヒトCD28の代表的なヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、それぞれSEQ ID NO:40(アクセション番号NM_006139)およびSEQ ID NO:41に示す:

【化8】

TAAAGTCATAAAACAACGTTATATCCTGTGTGAAATGCTG
CAGTCAGGATGCCTTGTGGTTGAGTGCCTGATCATGTGC
CCTAAGGGATGGTGGCGGTGGTGGTGGCCGTGGATGACG
GAGACTCTCAGGCCTTGGCAGGTGCGTCTTCAGTTCCCCT

CACACTTCGGGTTCTCGGGAGGAGGGCTGGAACCTA
GCCCATCGTCAGGACAAAGATGCTCAGGCTGCTCTGGCTC
TCAACTTATTCCCTCAATTCAAGTAACAGGAAACAAGATT
TTGGTGAAGCAGTCGCCATGCTGTAGCGTACGACAATG
CGGTCAACCTAGCTGCAAGTATTCCCTACAATCTCTTCTCA
AGGGAGTTCCGGGCATCCCTCACAAAGGACTGGATAGTG
CTGTGGAAGTCTGTGTTGATATGGGAATTACTCCCAGCAG
CTTCAGGTTACTCAAAAACGGGTTCACTGTGATGGGA
AATTGGGCAATGAATCAGTGACATTCTACCTCCAGAATTG
TATGTTAACCAAACAGATATTACTTCTGCAAAATTGAAGT
TATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATG
GAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTGTCCAAG
TCCCCTATTCCCGGACCTCTAACGCCCTTGGGTGCTGGT
GGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTGCTATAGCTGCTAGTAA
CAGTGGCCTTATTATTTCTGGTGAGGAGTAAGAGGAGC
AGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCC
GCCCGGGCCCACCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCC
ACCACCGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCTGACACGGACGC
CTATCCAGAACGCCAGCCGGCTGGCAGCCCCCATCTGCTCA
ATATCACTGCTCTGGATAGGAAATGACCGCCATCTCAGCC
GGCACCTCAGGCCCTGTTGGGCCACCAATGCCAATT
CTCGAGTGACTAGACCAATATCAAGATCATTGAGACTC
TGAAATGAAGTAAAAGAGATTCCTGTGACAGGCCAGTC
TTACAGTGCATGGCCCACATTCAAACCTTACCATGTACTTA
GTGACTTGACTGAGAAGTTAGGGTAGAAAACAAAAAGGG
AGTGGATTCTGGAGCCTCTCCCTTCACTCACCTGCA
CATCTCAGTCAAGCAAAGTGTGGTATCCACAGACATT
TTGCAGAAGAAAGGCTAGGAAATCATTCTTGGTAAAT
GGGTGTTAATCTTGGTAGTGGTAAACGGGTAAGT
TAGAGTAGGGGGAGGGATAGGAAGACATATTAAAAAC
ATTAACACTGTCTCCACTCATGAAATGAGCCACGTAGT
TCCTATTAAATGCTGTTCTTCTTAGTTAGAAATACATAGA
CATTGTCTTATGAATTCTGATCATATTAGTCATTGAC
CAAATGAGGGATTGGTCAAATGAGGGATTCCCTCAAAGC
AATATCAGGTAAACCAAGTTGCTTCTCACTCCCTGTCAT

10

20

30

40

GAGACTTCAGTGTTAATGTTACAATATACTTCGAAAGAA
TAAAATAGTTCTCCTACATGAAGAAAGAATATGTCAGGAA
ATAAGGTCACTTATGTCAAAATTATTGAGTACTATGGGA
CCTGGCGCAGTGGCTCATGCTTGTAATCCCAGCACTTGGG
AGGCCGAGGTGGGCAGATCACTGAGATCAGGACCAGCCT
GGTCAAGATGGTGAAGACTCCGTCTGTACTAAAAATACAAA
ATTTAGCTTGGCCTGGTGGCAGGCACCTGTAATCCCAGCTG
CCCAAGAGGCTGAGGCATGAGAATCGCTGAACCTGGCAG
GCGGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATAGTGCCACAGCTCTCC
AGCCTGGCGACAGAGTGAGACTCCATCTCAAACAACAAAC
AACAAACAACAACAACAAACAAACCAAAATTATTGA
GTACTGTGAAGGATTATTGTCTAACAGTTCAATTCCAATCA
GACCAGGTAGGAGCTTCCTGTTCATATGTTCAGGGTTG
CACAGTTGGTCTTTAATGTCGGTGTGGAGATCAAAGTG
GGTTGTGGAAAGAGCGTCCATAGGAGAAAGTGAGAATACTG
TGAAAAAAGGGATGTTAGCATTAGAGTATGAGGATGA
GTCCCAAGAAGGTTCTTGAAGGAGGACGAATAGAATGG
AGTAATGAAATTCTGCCATGTGCTGAGGAGATAGCCAGC
ATTAGGTGACAATCTTCCAGAAGTGGTCAGGCAGAAGGTG
CCCTGGTAGAGGCTCCTTACAGGGACTTATGTGGTTAG
GGCTCAGAGCTCCAAAACTCTGGGCTCAGCTGCTCCTGTAC
CTTGGAGGTCCATTACATGGAAAGTATTTGGAATGTGT
CTTTGAAGAGAGCATCAGAGTTCTAAGGGACTGGTAA
GGCCTGACCCCTGAAATGACCATGGATATTTCTACCTACA
GTTTGAGTCAACTAGAATATGCCTGGGACCTTGAAGAAT
GGCCCTTCAGTGGCCCTCACCATTTGTTCATGCTTCAGTTA
ATTCAGGTGTTGAAGGAGCTAGGTTAGAGGCACGTAG
ACTTGGTTCAAGTCTCGTTAGTAGTTGAATAGCCTCAGGCA
AGTCACTGCCAACCTAACAGATGATGGTCTTCAACTATAAAA
TGGAGATAATGGTTACAAATGTCTCTCCTATAGTATAATC
TCCATAAGGGCATGGCCAAGTCTGTCTTGAECTCTGCCTA
TCCCTGACATTAGCATGCCGACATACAATGTTAGCT
ATTGGTATTATTGCCATATAGATAAATTATGTATAAAAATT
AAACTGGCAATAGCCTAACAGAAGGGGGAAATTGTAACA
CAAATTAAACCCACTACGCAGGGATGAGGTGCTATAATA

10

20

30

40

TGAGGACCTTTAACCCATCATTCTGTTCTGAAAT
AGTTTATCTTGTAAATGAAATATAAGGCACCTCCCACTTTA
TGTATAGAAAGAGGTCTTTAATTTCATGAGAA
GGAAGGGAGGAGTAGGAATCTTGAGATTCCAGATCGAAAA
TACTGTACTTGGTTGATTTCAGTGGCTCCATTCCATG
GATTTAACAGTCCAAGAACAGATCAAACACTCAGCAGTACTT
GGGTGCTGAAGAACTGTTGATTACCTGGCACGTGTGCC
ACTTGCCAGCTCTGGCACACAGAGTCTCAATCCAAG
TTATCAGATTGTATTGAAAATGACAGAGCTGGAGAGTTT
TTGAAATGGCAGTGGCAAATAAATAACTTTTTAA
TGGAAAGACTGATCTATGGTAATAAAATGATTTGTTCT
GACTGGAAAAATAGGCCTACTAAAGATGAATCACACTTGA
GATGTTCTACTCACTCTGCACAGAAACAAAGAAGAAAT
GTTATACAGGAAGTCCGTTTCACTATTAGTATGAACCAA
GAAATGGTCAAAAACAGTGGTAGGAGCAATGCTTCATA
GTTTCAGATATGGTAGTTATGAAGAAAACAATGTCATTG
TGCTATTATTGTAAAGAGTCTTATAATTAAATGGTACTCCTAT
AATTTTGATTGTGAGCTCACCTATTGGTTAACATGCC
AATTAAAGAGACCAAGTGTATGTACATTATGTTCTACATA
TTCAGTGATAAAATTACTAAACTACTATATGCTGTTAA
ATTIGTACTTTAATATTGCTTTGGTATTAAGAAAGATAT
GCTTCAGAATAGATATGCTTCGCTTGGCAAGGAATTGG
ATAGAACTTGCTATTAAAAGAGGTGTGGGTAAATCCTTG
TATAAATCTCCAGTTAGCCTTTGAAAAAGCTAGACTT
TCAAATACTAATTCACTTCAAGCAGGGTACGTTCTGGTT
TGTTGCTGACTTCAGTCACAATTCTTATCAGACCAATG
GCTGACCTCTTGAGATGTCAGGCTAGGCTACCTATGTGT
TCTGTGTCATGTGAATGCTGAGAAGTTGACAGAGATCCA
ACTTCAGCCTGACCCCATCAGTCCCTCGGGTTAACTAACT
GAGCCACCGGTCTCATGGCTATTAAATGAGGGTATTGAT
GGTTAAATGCATGTCTGATCCCTTATCCCAGCCATTGCAC
TGCCAGCTGGAACTATACCAGACCTGGATACTGATCCCA
AAAGTGTAAATTCAACTACATGCTGGAGATTAGAGATGGT
GCCAATAAAGGACCCAGAACCCAGGATCTGATTGCTATAG
ACTTATTAAATAATCCAGGTCAAAGAGAGTGACACACACTC

10

20

30

40

TCTCAAGACCTGGGTGAGGGAGTCTGTGTTATCTGCAAG
GCCATTGAGGCTCAGAAAGTCTCTCTTCCTATAGATATA
TGCATACTTCTGACATATAGGAATGTATCAGGAATACTCA
ACCATCACAGGCATGTTCTACCTCAGGGCCTTACATGTC
CTGTTACTCTGTCTAGAATGTCCTCTGTAGATGACCTGG
CTTGCCTCGTCACCCTCAGGTCTTGCTCAAGTGTATCTT
CTCCCCTAGTTAAACTACCCCACACCCTGTCTGCTTCCTG
CTTATTTCTCCATAGCATTACCATCTCTTACATTAGAC
ATTTTCTTATTATTTGTAGTTATAAGCTTCATGAGGCAA
GTAACCTTGCTTGTCTTGCTGTATCTCAGTGCCCAGAG
CAGTGCCTGGTATATAATAATATTATTGACTGAGTGAAA
AAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO:40)

MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKY
SYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQQLQVYSKTGF
NCDGKLGNESVTFYLQNLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNE
KSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGVLACYSLL
VTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAP
PRDFAAYRS (SEQ ID NO:41).

【 0 0 5 8 】

ヒト C D 3 0 L の代表的なヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、それぞれ S E Q I D
N O : 4 2 (アクセション番号 L 0 9 7 5 3) および S E Q I D N O : 4 3 に示す
:

10

20

【化9】

CCAAGTCACATGATTCA
GAGGGGGAGAATCCTTCTT
GGAACAGAGATGGGCCAGAACTGAATCAGATGAAGAGA
GATAAGGTGTGATGTGGGAAGACTATATAAAGAATGGAC
CCAGGGCTGCAGCAAGCACTCAACGGAATGGCCCCTCCTG
GAGACACAGCCATGCATGTGCCGGCGGCTCCGTGGCCAG
CCACCTGGGACCACGAGCCGCAGCTATTCTATTGACCA
CAGCCACTCTGGCTCTGTGCCTTGTCTCACGGTGGCCACT
ATTATGGTGTGGTCGTTCA
CTCACCTGACAACGTCCCCCTCAAAGGAGGAAATTGCTCA
GAAGACCTCTTATGTATCCTGAAAAGAGCTCCATTCAAGA
AGTCATGGGCCTACCTCCAAGTGGCAAAGCATCTAACAA
AACCAAGTTGTCTTGAACAAAGATGGCATTCTCCATGGA
GTCAGATATCAGGATGGGAATCTGGTGATCCAATTCCCTG
GTTTGTACTTCATCATTGCCAACTGCAGTTCTTGACAAAT
GCCCAAATAATTCTGTCGATCTGAAGTTGGAGCTTCTCATC

10

20

AACAAGCATATCAAAAAACAGGCCCTGGTGACAGTGTGTG
AGTCTGGAATGCAAACGAAACACGTATAACCAGAACATCTCTC
TCAATTCTGCTGGATTACCTGCAGGTCAACACCACCATAT
CAGTCAATGTGGATACATTCCAGTACATAGATACAAGCAC
CTTCCTCTGAGAATGTGTTGTCCATCTTCTTATACAGTAA
TTCAGACTGAACAGTTCTCTGGCCTCAGGAAGAAAGCG
CCTCTCTACCATACAGTATTCATCCCTCCAAACACTGGG
CAAAAAGAAAACCTTAGACCAAGACAAACTACACAGGGTA
TTAAATAGTATACTTCTCCTCTGTCTCTGGAAAGATACA
GCTCCAGGGTAAAAAGAGAGTTTAGTGAAGTATCTTC
AGATAGCAGGCAGGAAGCAATGTAGTGTGGTGGCAGA
GCCCCACACAGAACATCAGAAGGGATGAATGGATGTCCCAGC
CCAACCACCAATTCACTGTATGGTCTTGTCTATTCTTCTG
TTTGAGAGCCTCCAGTAAATGGGGCTTCAGTACCAAGA
GCAGCTAGCAACTCTGCCCTAATGGAAATGAAGGGAGC
TGGGTGTGAGTGTACACTGTGCCCTCACGGGATACTTC
TTTATCTGCAGATGGCTTAATGCTTAGTTGTCCAAGTCGC
GATCAAGGACTCTCACACAGGAAACTCCCTATACTGGC
AGATACACTGTGACTGAACCATGCCAGTTATGCCTGTC
TGACTGTCACTTGGCACTAGGAGGCTGATCTGTACTCCA
TATGACCCCACCCCTAGGAACCCCCAGGGAAAACCAGGCT
CGGACAGCCCCCTGTCCTGAGATGGAAAGCACAAATTAA
ATACACCACCAATGGAAAACAAGTCAAAGACTTTAC
TTACAGATCCTGGACAGAAAGGGCATAATGAGTCTGAAGG
GCAGTCCTCCTCCAGGTTACATGAGGCAGGAATAAGA
AGTCAGACAGAGACAGCAAGACAGTTAACACGTAGGTA
AAGAAAATAGGGTGTGGTCACTCTCAATTCACTGGCAAATG
CCTGAATGGTCTGTCTGAAGGAAGCAACAGAGAAGTGGGG
AATCCAGTCTGCTAGGCAGGAAAGATGCCCTCAAGTTCTG
TCTCTGGCCAGAGGTGTGGTATAGAACAGAAACCCATAT
CAAGGGTACTAACGCCGGCTCCGGTATGAGAAATTAAA
CTTGTATACAAATGGTGCACAGCAACATAAAATTATA
AGAATTG (SEQ ID NO:42)

MDPGLQQALNGMAPPGDTAMHVPAGSVASHLGTSRSYFYL
TTATLALCLVFTVATIMVLVVQRTDSIPNSPDNVPLKGGNCSE

10

20

30

40

DLLCILKRAPFKKSWAYLQVAKHLNKTLSWNKDGLHGVR
YQDGNLVIQFPGLYFIICQLQFLVQCPNNSVDLKLELLINKHIK
KQALVTVCESGMQTKHVYQNLSQFLLDYLQVNNTTISVNVDT
FQYIDTSTFPLENVLSIFLYSNSD (SEQ ID NO:43).

【 0 0 5 9 】

ヒト C D 4 0 の代表的なヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、それぞれ S E Q I D N O : 4 4 (アクセション番号 N M _ 0 0 1 2 5 0) および S E Q I D N O : 4 5 に示す：

【化10】

TTTCCTGGCGGGGCCAAGGCTGGGCAGGGAGTCAGCA
GAGGCCTCGCTCGGGGCCAGTGGTCTGCCGCTGGTCT
CACCTCGCTATGGTCGTCTGCCCTGCAGTGCCTCTG
GGGCTGCTTGCTGACCGCTGCCATCCAGAACCAACCACTG
CATGCAGAGAAAAACAGTACCTAATAAACAGTCAGTGCTG
TTCTTGCTGCCAGGCCAGGACAGAAACTGGTGAGTGACTGC
ACAGAGTTCACTGAAACGGAATGCCTCCTGCGGTGAAA
GCGAATTCTAGACACCTGGAACAGAGAGACACACTGCCA
CCAGCACAAATACTGCGACCCAACCTAGGGCTCGGGTC
CAGCAGAAGGGCACCTCAGAAACAGACACCACACTGCACCT
GTGAAGAAGGCTGGCACTGTACGAGTGAGGCTGTGAGAG
CTGTGTCCTGCACCGCTCATGCTGCCCGCTTGGGTCA
AGCAGATTGCTACAGGGTTCTGATACCATCTGCGAGCCC
TGCCCAGTCGGCTTCTCCAATGTGTCATCTGCTTCGA
AAAATGTCACCCCTGGACAAGCTGTGAGACCAAAGACCTG
GTTGTGCAACAGGCAGGCACAAACAAGACTGATGTTGTCT
GTGGTCCCCAGGATCGGCTGAGAGGCCCTGGTGGTGAATCCC
CATCATCTCGGGATCCTGTTGCCATCCTCTGGTGCTGGT
CTTATCAAAAGGTGGCCAAGAAGCCAACCAATAAGGCC
CCCCACCCAAAGCAGGAACCCAGGAGATCAATTTCGG
ACGATCTCCTGGCTCCAACACTGCTGCTCCAGTGCAGGAG
ACTTACATGGATGCCAACCGGTACCCAGGAGGATGGCA
AAGAGAGTCGCATCTCAGTGCAGGAGAGACAGTGAGGCTG
CACCCACCCAGGAGTGTGGCCACGTGGCAAACAGGCAGT
TGGCCAGAGAGCCTGGTGTGCTGCTGTGGCGTGAGG
GTGAGGGCTGGCACTGACTGGCATAGCTCCCCGCTTCT
GCCTGCACCCCTGCAGTTGAGACAGGAGACCTGGCACTG
GATGCAGAACAGTTCACCTGAAGAACCTCTCACTTCACC
CTGGAGCCATCCAGTCTCCAACTTGTATTAAAGACAGA

10

20

30

40

GGCAGAAGTTGGTGGTGGTGTTGGGTATGGTTAGT
AATATCCACCAGACCTCCGATCCAGCAGTTGGTGCCAG
AGAGGCATCATGGTGGCTCCCTGCGCCCAGGAAGCCATA
TACACAGATGCCATTGCAGCATTGTTGTGATAGTGAACA
ACTGGAAGCTGCTTAAGTGTCCATCAGCAGGAGACTGGCT
AAATAAAATTAGAATATATTATACAACAGAACCTCAAAA
ACACTGTTGAGTAAGGAAAAAAAGGCATGCTGCTGAATGA
TGGGTATGGAACCTTTAAAAAAAGTACATGCTTTATGTAT
GTATATTGCCTATGGATATATGTATAAATACAATATGCATC
ATATATTGATATAACAAGGGTCTGGAAGGGTACACAGAA
AACCCACAGCTCGAAGAGTGGTACGTCTGGGTGGGAA
GAAGGGTCTGGGGG (SEQ ID NO:44)

MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQ
PGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCD
PNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSP
GFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNSSAFEKCHPWTSCETK
DLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRLRALVVIPIIFGILFAILLVLVF
IKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHG
COPVTOEDGKESRISVOERO (SEQ ID NO:45).

【 0 0 6 0 】

ヒト C D 7 0 の代表的なヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、それぞれ S E Q I D
N O : 4 6 (アクセション番号 N M _ 0 0 1 2 5 2) および S E Q I D N O : 4 7 に
示す：

10

20

30

【化11】

CCAGAGAGGGCAGGCTGGTCCCCTGACAGGTTGAAGCAA
 GTAGACGCCAGGAGCCCCGGGAGGGGGCTGCAGTTCCCT
 TCCTTCCTTCTCGGCAGCGCTCCGCGCCCCATCGCCCCCTC
 CTGCGCTAGCGGAGGTGATGCCGCGCGATGCCGGAGGA
 GGGTTCGGGCTGCTCGGTGCAGGCAGGCCCTATGGGTGC
 GTCCTGCAGGGCTGCTTGTCATTGGTCGCAGGGCTTGGT
 GATCTGCCTCGTGGTGTGCATCCAGCGCTCGCACAGGCTC
 AGCAGCAGCTGCCGCTCGAGTCACTGGGTGGGACGTAGC
 TGAGCTGCAGCTGAATCACACAGGACCTCAGCAGGACCCC
 AGGCTATACTGGCAGGGGGCCCAGCACTGGGCCGCTCCT
 TCCTGCATGGACCAGAGCTGGACAAGGGCAGCTACGTAT
 CCATCGTGATGGCATCTACATGGTACACATCCAGGTGACG
 CTGGCCATCTGCTCCTCCACGACGGCCTCCAGGCACCACCC
 CACCACCCCTGGCCGTGGAAATCTGCTCTCCGCCTCCCGTA
 GCATCAGCCTGCTCGTCTCAGCTTCCACCAAGGTTGTACC
 ATTGCCTCCCAGCGCCTGACGCCCTGGCCCGAGGGGACA
 CACTCTGCACCAACCTCACTGGGACACTTTGCCTCCGA
 AACACTGATGAGACCTTCTTGGAGTGCAGTGGGTGCGCC
 CCTGACCACTGCTGCTGATTAGGGTTTTAAATTTATTT
 ATTTTATTAAGTTCAAGAGAAAAAGTGTACACACAGGGG
 CCACCCGGGTTGGGTGGAGTGTGGTGGGGTAGTGG
 TGGCAGGACAAGAGAAGGCATTGAGCTTTCTTCATT
 CCTATTAAAAAAATACAAAAATCA (SEQ ID NO:46)

MPEEGSGCSVRRRPYGVLRALVPLVAGLVICLVVCIQRFA
 QAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALG
 RSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMHIQVTLAICSSTASRHHP
 TTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCT
 NLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP(SEQ ID NO: 47).

【0061】

ヒトLIGHトの代表的なヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、それぞれSEQ ID NO: 48 (アクセション番号CR541854) およびSEQ ID NO: 49に示す：

10

20

30

40

【化12】

ATGGAGGAGAGTGTCTACGGCCCTCAGTGTGTGGTGG
 ATGGACAGACCGACATCCCATTACGAGGCTGGGACGAAG
 CCACCGGAGACAGTCGTGCAGTGTGGCCGGTGGGTCTG
 GGTCTCTGCTGTTGCTGATGGGGGCCGGCTGCCGTCCA
 AGGCTGGTCTCCTGCAGCTGCAGCTGGCGTAGGAGAG
 ATGGTCACCCGCCTGCCTGACGGACCTGCAGGCTCCTGGG
 AGCAGCTGATACAAGAGCGAAGGTCTCACGAGGTCAACCC
 AGCAGCGCATCTCACAGGGCCAACCTCCAGCTTGACCGGC
 AGCGGGGGCCGCTGTTATGGGAGACTCAGCTGGCCTGG
 CCTTCCTGAGGGGCCTCAGCTACCACGATGGGGCCCTGTG
 GTCACCAAAGCTGGCTACTACTACATCTACTCCAAGGTGCA
 GCTGGCGGTGTGGCTGCCGCTGGCCTGCCAGCACC
 ATCACCCACGGCCTCTACAAGCGCACACCCCGTACCCCG
 AGGAGCTGGAGCTGTTGGTCAGCCAGCAGTCACCCTGCGG
 ACGGGCCACCAGCAGCTCCGGTCTGGTGGGACAGCAGC
 TTCCTGGGTGGTGTGGTACACCTGGAGGCTGGGAGGAGG
 TGGTCGTCCGTGTGGATGAACGCCTGGTTCGACTGCGT
 GATGGTACCCGGTCTTACTTCGGGGCTTCATGGTGTGA
 (SEQ ID NO:48)

MEESVVRPSVFVVDGQTDIPFTRLGRSHRRQSCSVARVGLGL
 LLLLMGAGLAVQGWFLQLHWRLGEMVTRLPDGPAGSWEQ
 LIQERRSHEVNPAAHLTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLR
 GLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGGVGCPGLLASTITHGL
 YKRTPRYPEEELLVSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVH
 LEAGEEVVVRVLDERLVRLLRDGTRSYFGAFMV (SEQ ID
 NO:49).

【0062】

様々な実施形態において、本発明は、本明細書に記載された配列のいずれか、例えば本明細書に開示された配列（例えば、SEQ ID NO：1～13および38～49）のいずれかと少なくとも約60%、または少なくとも約61%、または少なくとも約62%、または少なくとも約63%、または少なくとも約64%、または少なくとも約65%、または少なくとも約66%、または少なくとも約67%、または少なくとも約68%、または少なくとも約69%、または少なくとも約70%、または少なくとも約71%、または少なくとも約72%、または少なくとも約73%、または少なくとも約74%、または少なくとも約75%、または少なくとも約76%、または少なくとも約77%、または少なくとも約78%、または少なくとも約79%、または少なくとも約80%、または少なくとも約81%、または少なくとも約82%、または少なくとも約83%、または少なくとも約84%、または少なくとも約85%、または少なくとも約86%、または少なくとも約87%、または少なくとも約88%、または少なくとも約89%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%）を用いること。

6 %、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有する配列を含むバリエントを提供する。

【0063】

様々な実施形態において、本発明は、本明細書に記載されたタンパク質配列のいずれかに関係する1つまたは複数のアミノ酸突然変異を有するアミノ酸配列を提供する。幾つかの実施形態において、1つまたは複数のアミノ酸突然変異は独立して、本明細書に記載される保存的または非保存的置換、挿入、欠失、およびトランケーションから選択され得る。

【0064】

チェックポイント遮断 / 腫瘍免疫抑制の遮断

10

いくつかのヒト腫瘍は、患者の免疫系によって排出され得る。例えば、免疫「チェックポイント」分子に標的されるモノクローナル抗体の投与は、完全な応答および腫瘍寛解を導き得る。そのような抗体の作用機序は、腫瘍が抗腫瘍免疫応答からの防御として共選択した免疫調節分子の阻害を介する。これらの「チェックポイント」分子を阻害することによって（例えば、アンタゴニスト抗体を用いて）、患者のCD8+ T細胞は増殖し腫瘍細胞を破壊することができる。

【0065】

例えば、限定ではなく例としてCTLA-4またはPD-1に標的されるモノクローナル抗体の投与は、完全な応答および腫瘍寛解を導き得る。そのような抗体の作用機序は、腫瘍が抗腫瘍免疫応答からの防御として共選択したCTLA-4またはPD-1の阻害を介する。これらの「チェックポイント」分子を阻害することによって（例えば、アンタゴニスト抗体を用いて）、患者のCD8+ T細胞は増殖し腫瘍細胞を破壊することができる。

20

【0066】

したがって本明細書で提供されるベクターは、免疫「チェックポイント」分子に標的される1つまたは複数の遮断抗体と併せて用いることができる。例えば幾つかの実施形態において、本明細書で提供されるベクターは、CTLA-4またはPD-1などの分子に標的される1つまたは複数の遮断抗体と併せて用いることができる。例えば本明細書で提供されるベクターは、PD-1およびPD-L1もしくはPD-L2ならびに/またはPD-1とPD-L1もしくはPD-L2との結合を遮断、低減および/または阻害する薬剤（非限定的例として、ニボルマブ（ONO-4538/BMS-936558、MDX1106、OPDIVO、BRISTOL MYERS SQUIBB）、ペンブロリズマブ（KEYTRUDA、Merck）、ピジリズマブ（p idilizumab）（CT-011、CURE TECH）、MK-3475（MERCK）、BMS 936559（BRISTOL MYERS SQUIBB）、MPDL3280A（ROCHE）の1つまたは複数）と併せて用いることができる。一実施形態において、本明細書で提供されるベクターは、CTLA-4の活性および/またはCTLA-4と1つもしくは複数の受容体との結合を遮断、低減および/または阻害する薬剤（例えば、CD80、CD86、AP2M1、SHP-2、およびPPP2R5A）と併せて用いることができる。例えば、幾つかの実施形態において、免疫調整剤は、非限定的にイピリムマブ（MDX-010、MDX-101、Yervoy、BMS）および/またはトレメリムマブ（Pfizer）などの抗体である。これらの分子に対する遮断抗体は、例えばBristol Myers Squibb（ニューヨーク州ニューヨーク所在）、Merck（ニュージャージー州、ケニルワース所在）、MedImmune（メリーランド州ゲイザースバーグ所在）、およびPfizer（ニューヨーク州ニューヨーク所在）から得ることができる。

30

【0067】

さらに、本明細書で提供されるベクターは、例えばBTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160（HY55とも称される）、CEN-15049、CHK1およびCHK2キナーゼ、Azar、CEACAM（

40

50

例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)、GITR、GITRL、ガレクチン-9、CD244、CD160、TIGIT、SIRP、ICOS、CD172a、およびTMIGD2ならびに様々なB-7ファミリーリガンド(非限定的にB7-1、B7-2、B7-DC、B7-H1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H5、B7-H6およびB7-H7など)などの免疫「チェックポイント」分子に標的される1つまたは複数の遮断抗体と併せて用いることができる。

【0068】

ベクターおよび宿主細胞

この文書は、原核細胞および真核細胞において発現され得る、ワクチンタンパク質融合タンパク質(例えば、gp96-Ig融合タンパク質)およびT細胞共刺激融合タンパク質をコードする核酸構築物を提供する。例えば、この文書は、ワクチンタンパク質融合体(例えば、gp96-Ig融合体)およびT細胞共刺激融合タンパク質(例えば、OX40L-IgもしくはOX40に特異的に結合するその一部、ICOSL-IgもしくはICOSに特異的に結合するその一部、4-1BBL-Ig、もしくは4-1BBLに特異的に結合するその一部、CD40L-Ig、もしくはCD40に特異的に結合するその一部、CD70L-Ig、もしくはCD27に特異的に結合するその一部、TL1A-IgもしくはTNFRSF25に特異的に結合するその一部、またはGITRL-IgもしくはGITRに特異的に結合するその一部)をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクター(例えば、DNAまたはRNAを基剤とするベクター)を提供する。加えて、この文書は、本明細書に記載されたベクターを作製するための方法、およびコードされたポリペプチドの発現のために適当な宿主細胞中にベクターを導入するための方法を提供する。一般に、本明細書で提供される方法は、ワクチンタンパク質融合タンパク質(例えば、gp96-Ig融合タンパク質)およびT細胞共刺激融合タンパク質をコードする核酸配列を構築すること、融合タンパク質をコードする配列を発現ベクター中にクローニングすること、を含む。発現ベクターは、宿主細胞中に導入されまたはウイルス粒子中に取り込まれてよく、そのいずれかが対象に投与されて、例えば癌または感染を処置できる。例えば、類人猿免疫不全ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、C型肝炎ウイルスおよびマラリアによって発現される個々の抗原に対する抗原特異的免疫応答を刺激するために、gp96-Igを基剤とするワクチンを作製することができる。これらのワクチンに対する免疫応答は、gp96-IgベクターによるT細胞共刺激融合タンパク質の共発現を通して増強され得る。

【0069】

ワクチンタンパク質融合体(例えば、gp96-Ig融合体)およびT細胞共刺激融合タンパク質をコードするcDNAまたはDNA配列は、従来のDNAクローニングおよび突然変異誘発法、DNA增幅法、ならびに/または合成法を利用して得ることができる(そして所望なら修飾することができる)。一般に、ワクチンタンパク質融合タンパク質(例えば、gp96-Ig融合タンパク質)および/またはT細胞共刺激融合タンパク質をコードする配列は、発現前に、遺伝子修飾および複製を目的としてクローニングベクター中に挿入できる。各コード配列は、コードされたタンパク質をインピトロおよびインピボで適切な宿主細胞で発現する目的で、プロモーターなどの調節要素に動作可能に連結され得る。

【0070】

発現ベクターは、分泌されるワクチンタンパク質(例えば、gp96-Ig)およびT細胞共刺激融合タンパク質を生成するために宿主細胞中に導入され得る。核酸を生存可能な細胞中に導入するために利用可能な種々の技術が存在する。核酸をインピトロで哺乳動物細胞中に移入させるのに適した技術は、リポソームの使用、電気穿孔、マイクロインジェクション、細胞融合、ポリマーを基にした系、DEAE-デキストラン、ウイルス形質導入、リン酸カルシウム沈殿法などを含む。インピボ遺伝子移入のために、リポソーム；キトサンおよびゼラチンなどの天然ポリマーを基にした送達ビヒクルを含む多数の技術および試薬を用いることができ、ウイルスベクターもインピボ形質導入に適する。幾つかの

10

20

30

40

50

状況において、細胞表面膜タンパク質に特異的な抗体またはリガンドなどの標的物質を提供することが望ましい。リポソームが用いられる場合、エンドサイトーシスに関連する細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質を、例えば特定の細胞型に親和性の (trop i c) カプシドタンパク質またはその断片、循環において内在化を受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在を標的とし細胞内半減期を延長するタンパク質、を標的とするため、かつ / またはその取り込みを促進するために用いられ得る。受容体を介したエンドサイトーシスの技術は、例えば Wu et al., J. Biol. Chem. 262, 4429 - 4432 (1987); および Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410 - 3414 (1990) に記載される。

10

【0071】

適当ならば、遺伝子送達剤、例えば組み込み配列 (integration sequences) を用いることもできる。数多くの組み込み配列が、当該技術分野で公知である(例えば、Nunes-Duby et al., Nucleic Acids Res. 26: 391 - 406, 1998; Sadwoski, J. Bacteriol., 165: 341 - 357, 1986; Bestor, Cell, 122(3): 322 - 325, 2005; Plasterk et al., TIG 15: 326 - 332, 1999; Kootstra et al., Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43: 413 - 439, 2003 参照)。これらは、リコンビナーゼおよびトランスポザーゼを含む。例として、Cre (Sternberg and Hamilton, J. Mol. Biol., 150: 467 - 486, 1981)、ラムダ(Nash, Nature, 247, 543 - 545, 1974)、FIP(Broach, et al., Cell, 29: 227 - 234, 1982)、R(Matsuzaki, et al., J. Bacteriology, 172: 610 - 618, 1990)、cpC31(例えば、Groth et al., J. Mol. Biol. 335: 667 - 678, 2004 参照)、マリナー(mariner)ファミリーのトランスポザーゼであるスリーピングビューティー(Plasterk et al., 上掲)、ならびにAAV、レトロウイルス、およびレトロウイルスまたはレンチウイルスのLTR配列およびAAVのITR配列などのウイルス組み込みを提供する成分を有するアンチウイルスなどのウイルスを組み込むための成分(Kootstra et al., Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43: 413 - 439, 2003) が挙げられる。

20

【0072】

細胞は、例えば、インビトロで培養されまたは遺伝的に改変されてよい。宿主細胞は、健常なヒト、癌患者、および感染疾患有する患者、私の研究室の寄託物、American Type Culture Collectionなどの公的培養収集物を含む、正常なもしくは罹患した対象から、または商業的供給業者から得ることができる。

30

【0073】

インビオデ g p 96 - Ig 融合タンパク質および T 細胞共刺激融合タンパク質の生成および分泌に用いられ得る細胞としては、上皮細胞、内皮細胞、角化細胞、線維芽細胞、筋細胞、肝細胞；Tリンパ球、Bリンパ球、单球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、もしくは顆粒球などの血液細胞；造血幹細胞もしくは前駆細胞(例えば、骨髄から得られるような)などの様々な幹細胞もしくは前駆細胞、臍帯血、末梢血、胎児肝臓など、および腫瘍細胞(例えば、ヒト腫瘍細胞)が挙げられるが、これらに限定されない。細胞型の選択は、処置または予防される腫瘍または感染性疾患の型に依存し、かつ当業者によって決定され得る。

40

【0074】

異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳後プロセシングおよび修飾に特徴的かつ特異的なメカニズムを有する。レシピエントがそのヒートショックプロテイン(hsps)を処理

50

する方法と類似の特異的な様式で、発現された遺伝子産物を修飾および処理する宿主細胞が選択され得る。多量の gp 96 - Ig を生成する目的では、宿主細胞の型が異種遺伝子の発現に用いられていて、合理的に十分特徴づけられ、大規模生産工程用に開発されていることが好ましいかもしれない。幾つかの実施形態において、宿主細胞は、本発明の融合体、または本発明の融合タンパク質を分泌する組換え細胞が後に投与される患者に対して自家性である。

【 0 0 7 5 】

幾つかの実施形態において、本明細書で提供される発現構築物は、抗原性細胞中に導入され得る。本明細書で用いられるように、抗原性細胞は、例えば、ウイルスなどの癌原性感染物質に感染しているがまだ腫瘍性でない前新生物細胞、またはDNA損傷物質または放射線などの変異原または癌原性物質に暴露された抗原性細胞を包含し得る。用いられ得る他の細胞は、形態学または生理学的もしくは生化学的機能による特徴づけられるように正常形態から新生物形態への移行にある前新生物細胞である。10

【 0 0 7 6 】

典型的には、本明細書で提供される方法で用いられる癌細胞および前新生物細胞は、哺乳動物起源のものである。企図される哺乳動物としては、ヒト、コンパニオンアニマル（例えば、イヌおよびネコ）、家畜動物（例えば、ヒツジ、ウシ、ヤギ、ブタおよびウマ）、実験動物（例えば、マウス、ラットおよびウサギ）、および捕獲されたまたは自由な野生動物が挙げられる。20

【 0 0 7 7 】

幾つかの実施形態において、癌細胞（例えば、ヒト腫瘍細胞）が、本明細書に記載された方法で用いられ得る。癌細胞は、発現された gp 96 - Ig 融合タンパク質と非共有結合でつながるようになる抗原性ペプチドを提供する。前新生物病変、癌組織、または癌細胞に由来する細胞株もまた用いることができるが、但し、その細胞株の細胞が、標的癌細胞上の抗原と共通のなくとも 1 つまたは複数の抗原決定基を有することを条件とする。癌組織、癌細胞、癌原性物質に感染した細胞、他の前新生物細胞、およびヒト起源の細胞株を用いることができる。最終的に融合タンパク質が投与されることになる患者から切除された癌細胞が特に有用であり得るが、同種細胞を用いることもできる。幾つかの実施形態において、癌細胞は、樹立された腫瘍細胞株、例えば非限定的に、樹立された非小細胞肺癌（NSCLC）、膀胱癌、メラノーマ、卵巣癌、腎細胞癌、前立腺癌、肉腫、乳癌、扁平上皮癌、頭頸部癌、肝細胞癌、肺腺癌、または結腸癌細胞株由来であり得る。30

【 0 0 7 8 】

様々な実施形態において、本発明の融合タンパク質は、T 細胞の共刺激および様々な腫瘍抗原の提示の両方を可能にする。例えば、幾つかの実施形態において、本発明のワクチンタンパク質融合体（例えば、gp 96 融合体）は、これらの様々な腫瘍抗原を介添えする。様々な実施形態において、腫瘍細胞は、種々の抗原を分泌する。例示的で非限定的な、分泌され得る抗原は、MART-1 / Melan-A、gp 100、ジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP IV)、アデノシンデアミナーゼ結合タンパク質 (ADA bp)、シクロフィリン b、大腸関連抗原 (CRC) - 0017-1A / GA733、癌胎児性抗原 (CEA) ならびにその免疫原性エピトープ CAP-1 および CAP-2、etv6、aml1、前立腺特異的抗原 (PSA) ならびにその免疫原性エピトープ PSA-1、PSA-2、および PSA-3、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、T 細胞受容体 / CD3 - ゼータ鎖、腫瘍抗原の MAGE ファミリー（例えば、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2 (MAGE-B2)、MAGE-Xp3 (MAGE-B3)、MAGE-Xp4 (MAGE-B4)、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5）、腫瘍抗原の GAGE ファミリー（例えば、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9）、BAGE、RAGE、LAGE-1、40

NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、チロシナーゼ、p53、MUCファミリー、HER2/neu、p21ras、RCAS1、-フェトプロテイン、E-カドヘリン、-カテニン、-カテニン、および-カテニン、p120ctn、gp100 Pmel1117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、腺腫様多発結腸ポリーブタンパク質(APC)、フォドリン、コネキシン37、Ig-イディオタイプ、p15、gp75、GM2およびGD2ガングリオシド、ヒトパピローマウイルスタンパク質などのウイルス産物、腫瘍抗原のSmadファミリー、1mp-1、NA、EBVにコードされる核抗原(EBNA)-1、脳グリコーゲンホスホリラーゼ、SSX-1、SSX-2(HOM-MEL-40)、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1 CT-7、c-erbB-2、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD56、CD70、CD74、CD138、AGS16、MUC1、GPNMB、Ep-CAM、PD-L1、PD-L2、PMSA、膀胱癌抗原、例えばACTL8、ADAM22、ADAM23、ATAD2、ATAD2B、BIRC5、CASC5、CEP290、CEP55、CTAGE5、DCAF12、DDX5、FAM133A、IL13RA2、IMP3、KIAA0100、MAGEA11、MAGEA3、MAGEA6、MPHOSPH10、ODF2、ODF2L、OIP5、PBK、RQCD1、SPA G1、SPAG4、SPAG9、TMEFF1、TTK、および前立腺癌抗原、例えばPRAME、BIRC5、CEP55、ATAD2、ODF2、KIAA0100、SPAG9、GPATCH2、ATAD2B、CEP290、SPAG1、ODF2L、CTAGE5、DDX5、DCAF12、IMP3である。幾つかの実施形態において、抗原はヒト内在性レトロウイルス抗原である。例示的抗原として、非限定的に、Gagの少なくとも一部、Tatの少なくとも一部、Revの少なくとも一部、Nefの少なくとも一部、およびgp160の少なくとも一部に由来するエピトープを含むヒト内在性レトロウイルスからの抗原を挙げることもできる。

【0079】

さらに、幾つかの実施形態において、本発明のワクチンタンパク質融合体(例えば、gp96融合体)は、本明細書に記載された様々な方法で用いられる場合に、目的の疾患に対抗して患者の免疫系をさらに活性化させるアジュバント効果を提供する。

【0080】

原核生物および真核生物ベクターの両者が、本明細書で提供された方法でのワクチンタンパク質(例えば、gp96-Ig)およびT細胞共刺激融合タンパク質の発現に用いられ得る。原核生物ベクターとしては、大腸菌配列に基づく構築物が挙げられる(例えば、Makrides, Microbiol Rev 1996, 60:512-538 参照)。大腸菌における発現に用いられ得る調節領域の非限定的例としては、lac、trp、lpp、phoA、recA、tac、T3、T7およびP_Lが挙げられる。原核生物発現ベクターの非限定的例としては、gt11などのgtベクターシリーズ(Huynh et al., "DNA Cloning Techniques", Vol. I: A Practical Approach, 1984, (D. Glover, ed.), pp. 49-78, IRL Press, Oxford)、およびpETベクターシリーズ(Studier et al., Methods Enzymol 1990, 185:60-89)を挙げることができる。しかし、原核生物宿主ベクター系は、哺乳動物細胞の翻訳後プロセシングの多くを実施することができない。したがって、真核生物宿主ベクター系が特に有用であり得る。

【0081】

種々の超節領域を、哺乳動物宿主細胞におけるワクチンタンパク質(例えば、gp96-Ig)およびT細胞共刺激融合体の発現に用いることができる。例えば、SV40初期および後期プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)前初期プロモーター、ならびにラウス肉腫ウイルスロングターミナルリピート(RSV-LTR)プロモーターを用いることができる。哺乳動物細胞において用いられ得る誘導性プロモーターとしては、非限定的に、メタロチオネインII遺伝子、マウス乳腺腫瘍ウイルスグルコルチコイド応答

10

20

30

40

50

性ロングターミナルリピート(MMTV - LTR)、 - インターフェロン遺伝子、および hsp70 遺伝子に関するプロモーターが挙げられる(Williams et al . , Cancer Res 1989 , 49 : 2735 - 42 ; および Taylor et al . , Mol Cell Biol 1990 , 10 : 165 - 75)。ヒートショックプロモーターまたはストレスプロモーターもまた、組換え宿主細胞での融合タンパク質の発現を駆動するのに有利であり得る。

【 0082 】

一実施形態において、本発明は、合図に応答して一過的に高レベルの発現を実行できる誘導性プロモーターの使用を企図する。例示的な誘導性発現制御領域としては、低分子量化学物質などの合図で刺激される誘導性プロモーターを含むものが挙げられる。特定の例は、例えば米国特許第 5,989,910 号、同第 5,935,934 号、同第 6,015,709 号、および同第 6,004,941 号に見出すことができ、それらのそれぞれは、全体として参照により本明細書に組み入れられる。

【 0083 】

組織特異性を示しトランスジェニック動物において用いられてきた動物調節領域もまた、特定の組織タイプの腫瘍細胞で用いることができる：胰腺房細胞中で活性なエラスターーゼ I 遺伝子制御領域(Swift et al . , Cell 1984 , 38 : 639 - 646 ; Ornitz et al . , Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 1986 , 50 : 399 - 409 ; および McDonald , Hepatology 1987 , 7 : 425 - 515)；胰ベータ細胞中で活性なインスリン遺伝子制御領域(Hanahan , Nature 1985 , 315 : 115 - 122)、リンパ細胞中で活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域(Grosschedl et al . , Cell 1984 , 38 : 647 - 658 ; Adames et al . , Nature 1985 , 318 : 533 - 538 ; および Alexander et al . , Mol Cell Biol 1987 , 7 : 1436 - 1444)、精巣細胞、乳房細胞、リンパ細胞および肥満細胞中で活性なマウス乳腺腫瘍ウイルス制御領域(Ledermann et al . , Cell 1986 , 45 : 485 - 495)、肝臓中で活性なアルブミン遺伝子制御領域(Pinkert et al . , Genes Devel , 1987 , 1 : 268 - 276)、肝臓中で活性な - フェトプロテイン遺伝子制御領域(Krumlauf et al . , Mol Cell Biol 1985 , 5 : 1639 - 1648 ; および Hammer et al . , Science 1987 , 235 : 53 - 58)、肝臓中で活性な 1 - アンチトリプシン遺伝子制御領域(Kelsay et al . , Genes Devel 1987 , 1 : 161 - 171)、骨髄細胞中で活性な - グロブリン遺伝子制御領域(Mogram et al . , Nature 1985 , 315 : 338 - 340 ; および Kollia et al . , Cell 1986 , 46 : 89 - 94)；脳中の乏突起膠細胞中で活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域(Readhead et al . , Cell 1987 , 48 : 703 - 712)；骨格筋中で活性なミオシン軽鎖 - 2 遺伝子制御領域(Sani , Nature 1985 , 314 : 283 - 286)、ならびに視床下部中で活性なゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御領域(Mason et al . , Science 1986 , 234 : 1372 - 1378)。

【 0084 】

発現ベクターは、 SV40 ウィルス、 B 型肝炎ウィルス、サイトメガロウィルス、免疫グロブリン遺伝子、メタロチオネイン、および - アクチンで見出されるものなどの転写促進要素も含み得る(Bittner et al . , Meth Enzymol 1987 , 153 : 516 - 544 ; および Gorman , Curr Op Biotechnol 1990 , 1 : 36 - 47 参照)。加えて、発現ベクターは、 1 つよりも多くの型の宿主細胞におけるベクターの維持および複製、または宿主染色体へのベクターの組み込みを可能にする配列を含み得る。そのような配列としては、複製起点、自律複

10

20

30

40

50

50

製配列(ARS)、セントロメアDNA、およびテロメアDNAが挙げられるが、これらに限定されない。

【0085】

加えて、発現ベクターは、本明細書に記載された融合タンパク質をコードするDNAを含む宿主細胞を最初に単離すること、同定すること、または追跡することのために、1つまたは複数の選択可能なまたはスクリーニング可能なマーカー遺伝子を含み得る。g p 9 6 - Ig およびT細胞共刺激融合タンパク質の長期の高収率生産のために、哺乳動物細胞における安定発現が有用であり得る。多くの選択システムが、哺乳動物細胞に用いられ得る。例えば、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wigler et al., Cell 1977, 11:223)、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Szybalski and Szybalski, Proc Natl Acad Sci USA 1962, 48:2026)、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowy et al., Cell 1980, 22:817)の遺伝子を、それぞれtk⁻、hgprt⁻、またはaprt⁻細胞において用いることができる。加えて、代謝拮抗薬耐性を、メトレキサートへの耐性を付与するジヒドロ葉酸レダクターゼ(dhfr)(Wigler et al., Proc Natl Acad Sci USA 1980, 77:3567; O'Hare et al., Proc Natl Acad Sci USA 1981, 78:1527)；ミコフェノール酸への耐性を付与するgpt(Mulligan and Berg, Proc Natl Acad Sci USA 1981, 78:2072)；アミノグリコシドG-418への耐性を付与するネオマイシンホストランスフェラーゼ(neo)(Colberre-Garapin et al., J Mol Biol 1981, 150:1)；およびハイグロマイシンへの耐性を付与するハイグロマイシンホストランスフェラーゼ(hyg)(Santerre et al., Gene 1984, 30:147)の選択の原理として用いることができる。他の選択マーカー、例えばヒスチジノールおよびZeocin(商標)を用いることもできる。

【0086】

有用な哺乳動物宿主細胞としては、ヒト、サル、およびげっ歯類由来の細胞(例えば、Kriegler in "Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual," 1990, New York, Freeman & Co. 参照)が挙げられるが、これらに限定されない。これらは、SV40によって形質転換されたサル腎臓細胞株(例えば、COS-7、ATCC CRL 1651)；ヒト胎児腎臓株(例えば、懸濁培養での生育のためにサブクローニングされた293、293-EBNA、または293細胞、Graham et al., J Gen Virol 1977, 36:59)；ベビーハムスター腎臓細胞(例えば、BHK、ATCC CCL 10)；チャイニーズハムスター卵巣細胞-DHFR(例えば、CHO、ウルラウブおよびチャシン(Chasin)、Proc Natl Acad Sci USA 1980, 77:4216)；マウスセルトリ細胞(Mather, Biol Reprod 1980, 23:243-251)；マウス線維芽細胞(例えば、NIH-3T3)、サル腎臓細胞(例えば、CV1、ATCC CCL 70)；アフリカミドリザル腎臓細胞(例えば、VERO-76、ATCC CRL-1587)；ヒト子宮頸癌細胞(例えば、HELA、ATCC CCL 2)；イヌ腎臓細胞(例えば、MDCK、ATCC CCL 34)；バッファロー ラット肝細胞(例えば、BRL 3A、ATCC CRL 1442)；ヒト肺細胞(例えば、W138、ATCC CCL 75)；ヒト肝細胞(例えば、Hep G2、HB 8065)；およびマウス乳腺腫瘍細胞(例えば、MMT 060562、ATCC CCL 51)を含む。本明細書に記載された融合タンパク質を発現するための例示的な癌細胞型としては、マウス線維芽細胞株：NIH 3T3、マウスルイス肺癌細胞株：LLC、マウス肥満細胞腫細胞株：P815、マウスリンパ腫細胞株：EL4 およびそのオボアルブミントラン

スフェクタント：E . G 7、マウスマラノーマ細胞株：B 1 6 F 1 0、マウス線維肉腫細胞株：M C 5 7、ヒト小細胞肺癌細胞株：S C L C # 2 および S C L C # 7、ヒト肺腺癌細胞株、例えば A D 1 0 0、ならびにヒト前立腺癌細胞株、例えば P C - 3 が挙げられる。

【 0 0 8 7 】

多数の、ウイルスに基づく発現系もまた、g p 9 6 - I g および T 細胞共刺激融合タンパク質を生成するために哺乳動物細胞と共に用いられ得る。D N A ウィルスバックボーンを用いるベクターは、サルウイルス 4 0 (S V 4 0) (Hamer et al . , C e l l 1 9 7 9 , 1 7 : 7 2 5) 、アデノウイルス (Van Doren et al . , M o l C e l l B i o l 1 9 8 4 , 4 : 1 6 5 3) 、アデノ随伴ウイルス (McLaughlin et al . , J Virol 1 9 8 8 , 6 2 : 1 9 6 3) 、およびウシパピローマウイルス (Zinn et al . , Proc Natl Acad Sci USA 1 9 8 2 , 7 9 : 4 8 9 7) から得られた。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、ドナー D N A 配列は、アデノウイルス転写 / 翻訳制御複合体、例えば後期プロモーターおよび三分節リーダー配列 (t r i p a r t i t e leader sequence) にライゲートされ得る。この融合遺伝子は、その後、インビトロまたはインビオ組換えによってアデノウイルスゲノム内に挿入され得る。ウイルスゲノムの非必須領域 (例えば、領域 E 1 または E 3) における挿入は、非感染宿主において生存可能で異種生成物を発現できる組換えウイルスをもたらし得る (例えば、Logan and Shenk , Proc Natl Acad Sci USA 1 9 8 4 , 8 1 : 3 6 5 5 - 3 6 5 9 参照) 。

【 0 0 8 8 】

ウシパピローマウイルス (B P V) はヒトを含む高等な脊椎動物の多くに感染することができ、その D N A はエピソームとして複製する。多数のシャトルベクターが組換え遺伝子発現用に開発され、それらは哺乳動物細胞において安定したマルチコピー (2 0 ~ 3 0 0 コピー / 細胞) 染色体外要素として存在する。典型的にはこれらのベクターは、ベクターを大腸菌内で増殖させる B P V D N A のセグメント (ゲノム全体または 6 9 % のトランسفォーミング断片) 、広い宿主範囲を含むプロモーター、ポリアデニル化シグナル、スプライスシグナル、選択マーカー、および「無毒」プラスミド配列を含む。細菌での構築および増幅に続いて、発現遺伝子構築物は、例えばリン酸カルシウム共沈法によって、培養哺乳動物細胞中へトランスフェクトされる。形質転換された表現型を明示しない宿主細胞について、形質転換体の選択を、ヒスチジノールおよび G 4 1 8 耐性などの主要な選択マーカーの使用によって実現する。

【 0 0 8 9 】

あるいは、ワクチニア 7 . 5 K プロモーターが用いられ得る (例えば、Mackett et al . , Proc Natl Acad Sci USA 1 9 8 2 , 7 9 : 7 4 1 5 - 7 4 1 9 ; Mackett et al . , J Virol 1 9 8 4 , 4 9 : 8 5 7 - 8 6 4 ; および Panicali et al . , Proc Natl Acad Sci USA 1 9 8 2 , 7 9 : 4 9 2 7 - 4 9 3 1 . 参照) 。ヒト宿主細胞が用いられる場合、エプスタイン・バーウイルス (E B V) 起点 (O r i P) および E B V 核抗原 1 (E B N A - 1 ; トランスに作用する複製因子) に基づくベクターが用いられ得る。そのようなベクターは、広範囲のヒト宿主細胞、例えば E B O - p C D (Spickofsky et al . , DNA Prot Eng Tech 1 9 9 0 , 2 : 1 4 - 1 8) ; p D R 2 および D R 2 (Clontech Laboratories から入手) と共に用いることができる。

【 0 0 9 0 】

g p 9 6 - I g および T 細胞共刺激融合タンパク質は、レトロウイルスを基にした発現系で作製することもできる。ウイルス遺伝子配列のほとんどは、取り出して外来のコード配列と交換することができ、一方で失ったウイルス機能をトランスに供給し得るため、モロニーネズミ白血病ウイルスなどのレトロウイルスを用いることができる。トランスフェ

クションとは異なり、レトロウイルスは効率的に感染し、例えば初代造血細胞を含む、広範囲の細胞型に遺伝子を移入できる。その上、レトロウイルスベクターによる感染のための宿主範囲は、ベクターパッケージングに用いられるエンベロープの選択によって操作され得る。

【0091】

例えば、レトロウイルスベクターは、5' ロングターミナルリピート (LTR)、3' LTR、パッケージングシグナル、細菌複製起点、および選択マーカーを含み得る。例えば、g p 96 - Ig 融合タンパク質をコードする配列を 5' LTR と 3' LTR の間の位置に挿入でき、それにより 5' LTR プロモーターからの転写がクローン化された DNA を転写する。5' LTR は、プロモーター（例えば、LTR プロモーター）、R 領域、U 5 領域、およびプライマー結合部位をこの順序で含む。これらの LTR 要素のヌクレオチド配列は、当該技術分野で周知である。異種プロモーターおよび多剤選択マーカーもまた、感染した細胞の選択を促進するために発現ベクターに含まれ得る。McLauchlin et al., Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 1990, 38: 91-135; Morgenstern et al., Nucleic Acid Res 1990, 18: 3587-3596; Choulika et al., J Virol 1996, 70: 1792-1798; Boesen et al., Biotherapy 1994, 6: 291-302; Salmons and Gunzberg, Human Gene Ther 1993, 4: 129-141; および Grossman and Wilson, Curr Opin Genet Devel 1993, 3: 110-114 を参考されたい。
10
20

【0092】

本明細書に記載されるクローニングおよび発現ベクターのいずれも、当業者に知られる技術を利用して既知の DNA 配列から合成し組立てることができる。調節領域およびエンハンサー要素は、天然のおよび合成の両方の、種々の起源のものであり得る。幾つかのベクターおよび宿主細胞は、商業的に得ることができる。有用なベクターの非限定的例は、参照により本明細書に組み入れられる Appendix 5 of Current Protocols in Molecular Biology, 1988, ed. Ausubel et al., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience、ならびに Clontech Laboratories、Stratagene Inc.、および Invitrogen, Inc などの商標的供給業者のカタログに記載される。
30

【0093】

処置の方法

本明細書で提供される発現ベクターは、対象（例えば、研究用動物または哺乳動物、例えば癌または感染などの臨床状態を有するヒト）への投与のために組成物中に組み込まれ得る。例えば、発現ベクターは、癌または感染の処置のために対象に投与され得る。したがって本文書は、癌または感染などの臨床状態を、本明細書で提供された発現ベクターで処置するための方法を提供する。感染は、例えば、急性感染または慢性感染であり得る。幾つかの実施形態において、感染は、C 型肝炎ウイルス、B 型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、またはマラリアによる感染であり得る。方法は、発現ベクター、発現ベクターを含む細胞、または発現ベクターを含むウイルスもしくはウイルス様粒子を、対象の臨床状態の進行または症状が治療的様式で低減される条件下で、対象に投与することを含み得る。
40

【0094】

様々な実施形態において、本発明は、癌および/または腫瘍に、例えば癌および/または腫瘍の処置または予防に関係する。癌または腫瘍は、身体の臓器または系の正常な機能を妨害する細胞の非制御的生育および/または細胞生存率の異常な上昇および/またはアポトーシスの阻害を指す。良性および悪性の癌、ポリープ、過形成に加え、休止状態の腫
50

瘍または微小転移が含まれる。また、免疫系によって妨げられない異常な増殖を有する細胞（例えば、ウイルス感染細胞）が含まれる。癌は、原発癌または転移癌であり得る。原発癌は、臨床的に検出可能になる発生部位での癌細胞のエリアであり、原発腫瘍であり得る。これに対して転移癌は、1つの臓器または部分から別の非隣接臓器または部分への疾患の広がりであり得る。転移癌は、局所領域において周辺の正常組織を透過および浸潤する能力を獲得した癌細胞によって誘発され得、新しい腫瘍を形成し、これは局所転移であり得る。癌はまた、リンパ管および／または血管の壁を透過する能力を獲得した癌細胞によっても誘発され、その後、癌細胞は血流を通して体内の他の部位および組織へ循環できる（それにより循環する腫瘍細胞である）。癌は、リンパ行性または血行性播種などの過程によるものであり得る。癌は、別の部位に定置し、血管または壁を再透過し、増殖し続け、かつ最終的に別の臨床的に検出可能な腫瘍を形成するようになる腫瘍細胞によっても誘発され得る。癌は、この新しい腫瘍でもあり得、これは転移（または続発性）腫瘍であり得る。

【0095】

癌は、続発性のまたは転移性の腫瘍であり得る、転移された腫瘍細胞によって誘発され得る。腫瘍の細胞は、元の腫瘍におけるものと類似し得る。例として、乳癌または結腸癌が肝臓に転移すると、続発性腫瘍は、肝臓に存在しながら、異常な肝臓細胞ではなく、異常な乳腺細胞または結腸細胞で構成される。したがって肝臓での腫瘍は、肝臓癌ではなく、転移性乳癌または転移性結腸癌であり得る。

【0096】

癌は、任意の組織からの起源を有し得る。癌は、メラノーマ、結腸、乳房、または前立腺を起源とし得、したがってそれぞれ、元は皮膚、結腸、乳房、または前立腺であった細胞から構成され得る。癌は、血液の悪性腫瘍もあり得、リンパ腫であり得る。癌は、肝臓、肺、膀胱、または腸などの組織に浸潤し得る。

【0097】

処置され得る例示的な癌としては、癌腫、例えば様々なサブタイプ、例として腺癌、基底細胞癌、扁平上皮癌および移行上皮細胞癌）、肉腫（例えば、骨および軟組織など）、白血病（例えば、急性骨髓性、急性リンパ芽球性、慢性骨髓性、慢性リンパ球性、および毛様細胞など）、リンパ腫および骨髓腫（例えば、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫、軽鎖、非分泌性、M G U S、ならびに形質細胞腫など）、および中枢神経系癌（例えば、脳（例えば、グリオーマ（例えば、星細胞腫、オリゴデンドログリオーマ、および上皮腫）、髄膜腫、下垂体腺腫、神経腫、および骨髓腫（例えば、髄膜腫および神経線維腫）など）などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0098】

本発明の代表的な癌および／または腫瘍としては、基底細胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系の癌、乳癌、腹膜癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸および直腸癌、結合組織癌、消化器系の癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部癌、胃癌（胃腸癌を含む）、グリオblastoma、肝臓癌、肝臓腫、上皮内新生物、腎臓癌、咽頭癌、白血病、肝癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、および肺の扁平上皮癌）、メラノーマ、骨髓腫、神經芽腫、口腔癌（唇、舌、口、および咽頭）、卵巣癌、脾臓癌、前立腺癌、網膜芽腫、横紋筋芽細胞腫、直腸癌、呼吸器系の癌、唾液腺癌、肉腫、皮膚癌、扁平上皮癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌または子宮内膜癌、泌尿器系の癌、外陰部癌、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫、ならびにB細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む、小リンパ球性（SL）NHL、中悪性度／濾胞性NHL、中悪性度びまん性NHL、高悪性度免疫芽球性NHL、高悪性度リンパ芽球性NHL、高悪性度小非切れ込み細胞NHL、巨大腫瘍病変NHL、外套細胞リンパ腫、AIDS関連リンパ腫、およびワルデンストレームマクログロブリン血症、慢性リンパ球性白血病（CLL）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、毛様細胞リンパ腫、慢性骨髓芽急性白血病、ならびに他の癌腫および肉腫、および移植後リンパ増殖性疾患（PTLD）、ならびに母斑症、浮腫（脳腫瘍に関連するものなど）、およびメイグス

10

20

30

40

50

症候群と関連する異常な血管増殖が挙げられるが、これらに限定されない。

【0099】

幾つかの態様において、本発明の融合体は、細胞内病原を排出するのに用いられる。幾つかの態様において、本発明の融合体は、1つまたは複数の感染を処置するのに用いられる。幾つかの実施形態において、本発明の融合タンパク質は、ウイルス感染（例えば、HIVおよびHCVなど）、寄生虫感染（例えば、マラリアなど）、および細菌感染を処置するための方法において用いられる。様々な実施形態において、感染は、免疫抑制を誘導する。例えば、HIV感染は多くの場合、感染された対象において免疫抑制をもたらす。したがって、本明細書の他の箇所に記載された通り、そのような感染の処置は、様々な実施形態において、免疫系を本発明の融合タンパク質で調整して、免疫阻害よりも免疫刺激を優先させることを含み得る。あるいは、本発明は、免疫活性化を誘導する感染を処置するための方法を提供する。例えば、腸蠕虫感染は、慢性免疫活性化に関連づけられている。これらの実施形態において、そのような感染の処置は、免疫系を本発明の融合タンパク質で調整して、免疫刺激よりも免疫阻害を優先させることを含み得る。10

【0100】

様々な実施形態において、本発明は、非限定的に、例えば呼吸管の、パピローマウイルス感染の、単純ヘルペスウイルス（HSV）感染の、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染の、および肝炎ウイルス感染などの内部臓器のウイルス感染の、急性または慢性のウイルス感染を含むウイルス感染を処置するための方法を提供する。幾つかの実施形態において、ウイルス感染は、ラビウイルス科のウイルスによって誘発される。幾つかの実施形態において、ラビウイルス科のウイルスは、黄熱ウイルス、西ナイルウイルス、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、およびC型肝炎ウイルスから選択される。他の実施形態において、ウイルス感染は、ピコルナウイルス科のウイルス、例えばポリオウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルスによって誘発される。他の実施形態において、ウイルス感染は、オルトミクソウイルス科のメンバー、例えばインフルエンザウイルスによって誘発される。他の実施形態において、ウイルス感染は、レトロウイルス科のメンバー、例えばレンチウイルスによって誘発される。他の実施形態において、ウイルス感染は、パラミクソウイルス科、例えば呼吸系発疹ウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス、ルプラウイルス（例えば、ムンプスウイルス）、麻疹ウイルス、およびヒトメタニューモウイルスによって誘発される。他の実施形態において、ウイルス感染は、ブニヤウイルス科のメンバー、例えばハンタウイルスによって誘発される。他の実施形態において、ウイルス感染は、レオウイルス科のメンバー、例えば口タウイルスによって誘発される。20

【0101】

様々な実施形態において、本発明は、原生動物または蠕虫感染などの寄生虫感染を処置する方法を提供する。幾つかの実施形態において、寄生虫感染は、寄生性原虫による。幾つかの実施形態において、*oritzia* 寄生虫は、消化管内原虫、組織内原虫、または血液原虫から選択される。例示的な寄生性原虫としては、赤痢アメーバ、ジアルディア・ランブリア、クリプトスボリジウム・ムリス、トリパノソーマ・ガンビエンス、トリパノソーマ・ローデシエンス、トリパノソーマ・クルージ、リーシュマニア・メキシカーナ、リーシュマニア・ブラジリエンシス、リーシュマニア・トロピカ、リーシュマニア・ドノバニ、トキソプラズマ・ゴンジイ、プラスモジウム・ビバクス、プラスモジウム・オバレ、プラスモジウム・マラリア、プラスモジウム・ファルシパルム、トリコモナス・バギナリス、およびヒストモナス・メレグリディスが挙げられるが、これらに限定されない。幾つかの実施形態において、寄生虫感染は、線虫（例えば、双器網）などの寄生性蠕虫による。幾つかの実施形態において、寄生虫は、双腺網（例えば、トリキュリス・コリキウラ、アスカリス・ルンブリコイデス、エンテロウイルス・ベルミキュラリス（*Enteroobius vermicularis*）、アンシロストマ・デュオデナレ、ネカトール・アメリカヌス、ストロンギロイデス・ステロコラリス、ウウェレリア・バンクロフチ、ドラクンクルス・メディネンシス）から選択される。幾つかの実施形態において、寄生304050

虫は、トレマトーデス属（例えば、住血吸虫、肝吸虫、腸肝吸虫、および肺吸虫）から選択される。幾つかの実施形態において、寄生虫は、シストソーマ・マンソニ、シストソーマ・ヘマトビウム、シストソーマ・ジャポニクム、ファシオラ・ヘパチカ、ファシオラ・ギガンチカ、ヘテロフィエス・ヘテロフィエス、パラゴニウム・ウェステルマニから選択される。幾つかの実施形態において、寄生虫は、条虫（例えば、タエニア・ソリウム、タエニア・サギナタ、ヒメノレプシス・ナナ、エヒノコッカス・グラニュローサス）から選択される。

【0102】

様々な実施形態において、本発明は、細菌感染を処置する方法を提供する。様々な実施形態において、細菌感染は、グラム陽性菌、グラム陰性菌、好気性および／または嫌気性細菌による。様々な実施形態において、細菌は、非限定的に、ブドウ球菌、乳酸菌、連鎖球菌、サルシナ属、エシェリヒア属、エンテロバクター属、クレブシエラ属、シュードモナス属、アシネットバクター属、マイコバクテリウム属、变形菌属、カンピロバクター属、シトロバクター属、ナイセリア属、バチルス属、バクテロイデス属、ペプトコッカス属、クロストリジウム属、サルモネラ属、赤痢菌属、セラチア属、ヘモフィルス属、ブルセラ属および他の生物体から選択される。幾つかの実施形態において、細菌は、非限定的に緑膿菌、蛍光菌、シュードモナス・アシドボランス、シュードモナス・アルカリゲネス、シュードモナス・プチダ、ステノトロホモナス・マルトフィリア、パークホルデリア・セパシア、エロモナス・ヒドロフィラ、大腸菌、シトロバクター・フロインディ、ネズミチフス菌、チフス菌、バラチフス菌、腸炎菌、志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、ソンネ赤痢菌、エンテロバクター・クロアカエ、エンテロバクター・エロゲネス、肺炎桿菌、クレブシエラ・オキシトカ、靈菌、野兔病菌、モルガン菌、ミラビリス变形菌、尋常变形菌、プロビデンシア・アルカリファシエンス、プロビデンシア・レットゲリ、プロビデンシア・スチュアルティ、アシネットバクター・バウマニ、アシネットバクター・カルコアセチカス、アシネットバクター・ヘモリティカス、腸炎エルシニア菌、ペスト菌、偽結核エルシニア菌、エルシニア・インターメディア、百日咳菌、パラ百日咳菌、気管支敗血症菌、インフルエンザ菌、パラインフルエンザ菌、ヘモフィルス・ヘモリティクス、ヘモフィルス・バラヘモリティクス、軟性下疳菌、パスツレラ・ムルトシダ、パスツレラ・ヘモリチカ、プランハメラ・カタラーリス、ヘリコバクター・ピロリ、カンピロバクター・フェタス、カンピロバクター・ジェジュニ、カンピロバクター・コリ、ボレリア・ブルグドルフェリ、コレラ菌、腸炎ビブリオ菌、在郷軍人病菌、リステリア菌、淋菌、髄膜炎菌、キンゲラ属、モラクセラ属、ガードネラ・バジナリス、バクテロイデス・フラジリス、バクテロイデス・ディスタソニス、バクテロイデス3452Aホモロジー群、バクテロイデス・ブルガータス、バクテロイデス・オバタス、バクテロイデス・シータイオタオミクロン、バクテロイデス・ユニフォルミス、バクテロイデス・エガーシイ、バクテロイデス・スプランクニカス、クロストリジウム・ディフィシレ、ヒト型結核菌、トリ型結核菌、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ、ライ菌、ジフテリア菌、コリネバクテリウム・ウルセランス、肺炎連鎖球菌、ストレプトコッカス・アガラクティエ、化膿連鎖球菌、エンテロコッカス・フェカリス、エンテロコッカス・フェシウム、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、スタフィロコッカス・サブロフィティクス、スタフィロコッカス・インターメジウス、スタフィロコッカス・ヒカス亜種ヒカス、スタフィロコッカス・ヘモリチカス、スタフィロコッカス・ホミニス、またはスタフィロコッカス・サッカロリティカスから選択される。投与される発現ベクター（複数可）、細胞、または粒子は、他の分子、分子構造、または化合物の混合物、例えば 取り込み、分配、および／または吸收を支援するためのリポソーム、受容体もしくは細胞標的分子、または経口、局所もしくは他の配合剤などと混和、封入、コンジュゲート、またはその他の方法で会合させることができる。幾つかの例において、発現ベクターは、対象に投与される細胞内に含まれ得るか、またはウイルスもしくはウイルス様粒子の中に含まれ得る。投与されるベクター、細胞、または粒子は、医薬的に許容し得る担体と組み合わせて投与され得る。

【0103】

10

20

30

40

50

それゆえ本文書は、生理学的および医薬的に許容し得る担体と組み合わせた、本明細書に記載された分泌される g p 9 6 - I g 融合ポリペプチドと T 細胞共刺激融合ポリペプチドとをコードするベクターを含有するベクターまたは腫瘍細胞もしくはウイルス粒子を含有する組成物を提供する。生理学的および医薬的に許容し得る担体は、免疫付与に有用な周知成分のいずれかを含み得る。担体は、ワクチン中で投与される抗原への免疫応答を促進または増強し得る。細胞配合剤は、抗原への免疫応答を刺激する組成物中で、好ましい pH 範囲、塩または個体に抗原を提示する他の構成要素を維持する緩衝液を含有し得る。生理学的に許容し得る担体はまた、抗原に対する免疫応答を増強する 1 種または複数のアジュバントを含有し得る。医薬的に許容し得る担体としては、例えば対象に化合物を送達するための、医薬的に許容し得る溶媒、懸濁剤、または任意の他の薬理学的に不活性なビヒクルが挙げられる。医薬的に許容し得る担体は、液体または固体であり得、所与の医薬的組成物の 1 種または複数の治療化合物および任意の他の成分と組み合わされる場合に、所望の嵩、粘稠度、ならびに他の適切な輸送特性および化学的特性を提供するように、計画された投与手法を念頭に選択され得る。典型的な医薬的に許容し得る担体としては、水、生理食塩溶液、結合剤（例えば、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；充填剤（例えば、ラクトースもしくはデキストロースおよび他の糖、ゼラチン、または硫酸カルシウム）、滑沢剤（例えば、デンプン、ポリエチレングリコール、または酢酸ナトリウム）、崩壊剤（例えば、デンプンまたはデンブングリコール酸ナトリウム）、および湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）が挙げられるが、これらに限定されない。組成物は、皮下、筋肉内もしくは皮内投与のために、または免疫付与のために許容される任意の手法で配合され得る。
10
20

【 0 1 0 4 】

アジュバントは、分泌されるワクチンタンパク質（例えば、g p 9 6 - I g ）および T 細胞共刺激融合ポリペプチドを発現する腫瘍細胞などの免疫原性剤に添加された場合に、混合物への暴露によってレシピエントの宿主において薬剤への免疫応答を非特異的に増進または強化する物質を指す。アジュバントとしては、例えば水中油エマルジョン、油中水エマルジョン、アルム（アルミニウム塩）、リポソームおよび微粒子、例えばポリスチレン、デンプン、ポリホスファゼンおよびポリラクチド／ポリグリコシドを挙げることができる。

【 0 1 0 5 】

アジュバントとしては、例えばスクアレン混合物（ S A F - I ）、ムラミルペプチド、サポニン誘導体、マイコバクテリウム細胞壁調製物、モノホスホリルリピッド A 、ミコール酸誘導体、非イオン性ロックコポリマー界面活性剤、 Q u i l l A 、コレラ毒 B サブユニット、ポリホスファゼンおよび誘導体、ならびに免疫刺激複合体（ I S C O M ）、例えば T a k a h a s h i e t a l . , N a t u r e 1 9 9 0 , 3 4 4 : 8 7 3 - 8 7 5 に記載されたものなども挙げることもできる。獣医学的使用および動物における抗体産生のために、フロイントアジュバント（完全および不完全の両方）の分裂促進性成分を用いることができる。ヒトでは、不完全フロイントアジュバント（ I F A ）が有用なアジュバントである。様々な適当なアジュバントが、当該技術分野で周知である（例えば、 W a r r e n a n d C h e d i d , C R C C r i t i c a l R e v i e w s i n I m m u n o l o g y 1 9 8 8 , 8 : 8 3 ; および A l l i s o n a n d B y a r s , i n V a c c i n e s : N e w A p p r o a c h e s t o I m m u n o l o g i c a l P r o b l e m s , 1 9 9 2 , E l l i s , e d . , Butterworth - Heinemann , Boston 参照）。さらなるアジュバントとしては、例えばカルメット・ゲラン桿菌（ B C G ）、 D E T O X （マイコバクテリウム・フレイの細胞壁骨格（ C W S ）およびサルモネラ・ミネソタ由来のモノホスホリルリピッド A (M P L) ）などが挙げられる（例えば、 Hoo v e r e t a l . , J C l i n O n c o l 1 9 9 3 , 1 1 : 3 9 0 ; および Woodlock e t a l . , J I m m u n o t h e r 1 9 9 9 , 2 2 : 2 5 1 - 2 5 9 参照）。

【 0 1 0 6 】

30

40

50

幾つかの実施形態において、ベクターは、対象へ1回または複数回（例えば、1回、2回、2～4回、3～5回、5～8回、6～10回、8～12回、または12回よりも多く）投与され得る。本明細書で提供されるベクターは、1日あたり1回もしくは複数回、1週あたり1回もしくは複数回、1週ごとに、1ヶ月あたり1回もしくは複数回、2～3ヶ月ごとに1回、3～6ヶ月ごとに1回、または6～12ヶ月ごとに1回、投与され得る。ベクターは、約1日～約12ヶ月の期間など、任意の適切な期間にわたって投与され得る。幾つかの実施形態において、例えば投与期間は、約1日～90日、約1日～60日、約1日～30日、約1日～20日、約1日～10日、約1日～7日であり得る。幾つかの実施形態において、投与期間は、約1週間～50週間、約1週間～50週間、約1週間～40週間、約1週間～30週間、約1週間～24週間、約1週間～20週間、約1週間～16週間、約1週間～12週間、約1週間～8週間、約1週間～4週間、約1週間～3週間、約1週間～2週間、約2週間～3週間、約2週間～4週間、約2週間～6週間、約2週間～8週間、約3週間～8週間、約3週間～12週間、または約4週間～20週間であり得る。

【0107】

幾つかの実施形態において、ベクターの初回用量（時には「プライミング」用量と称される）が投与されて、最大抗原特異的免疫応答が達成された後、本明細書で提供されるベクターの1つまたは複数のブースト用量が投与され得る。例えばブースト用量は、プライミング用量後約10～30日、約15～35日、約20～40日、約25～45日、または約30～50日に投与され得る。

【0108】

幾つかの実施形態において、本明細書で提供される方法は、腫瘍の成長（例えば、乳腺、前立腺、メラノーマ、腎臓、結腸、または子宮頸の腫瘍の成長）および／または転移を制御するために用いられ得る。方法は、本明細書に記載された発現ベクターの有効量を、それを必要とする対象に投与することを含み得る。幾つかの実施形態において、対象は、哺乳動物（例えば、ヒト）である。

【0109】

本明細書で提供されるベクターおよび方法は、腫瘍に対する免疫応答を刺激するのに有用であり得る。そのような免疫応答は、腫瘍に関連する徴候または症状を処置または緩和するのに有用である。本明細書で用いられる「処置すること」は、本明細書に記載されたベクターが投与された個体における症状を、処置されていない個体の症状に比較して、低減する、予防する、および／または回復させることを意味する。実施担当者は、本明細書に記載された方法が熟練の実施担当者（医師または獣医師）による連続した臨床評価と付随して用いられて、後の治療が決定されるべきであることを認識するであろう。そのような評価は、特定の処置用量、投与方式などを増進、低減、または継続するか否かを評価する上で支援および情報を与えるであろう。

【0110】

したがって本明細書で提供される方法は、例えば癌などの腫瘍を処置するのに用いられ得る。方法を利用して、例えば、さらなる腫瘍成長を予防することにより、腫瘍成長を緩徐にすることにより、または腫瘍退縮を誘発することにより、腫瘍の成長を阻害することができる。したがって、方法を用いて、例えば肺癌などの癌を処置することができる。化合物が投与される対象が、特定の外傷状態に罹患している必要がないことは、理解されよう。実際に、本明細書に記載されるベクターは、症状の発症以前に防護的に投与され得る（例えば、癌が軽減している患者）。用語「治療的な」および「治療的に」、そしてこれらの用語の交換は、治療的、苦痛軽減的、および防護的使用を包含するために使用される。したがって本明細書で用いられる「症状を処置または緩和すること」は、組成物の治療有効量が投与された個体の症状を、そのような投与を受けていない個体の症状に比較して、低減する、予防する、および／または回復させることを意味する。

【0111】

本明細書で用いられる用語「有効量」および「治療有効量」は、対象（例えば、癌また

は感染を有すると診断されたヒト)において所望の治療的(例えば、抗癌、抗腫瘍または抗感染)効果を提供するのに十分な量を指す。抗腫瘍および抗癌効果としては、腫瘍成長(例えば、腫瘍成長の遅延)、腫瘍サイズ、または転移の調整、特定の抗癌剤に関連する毒性および副作用の低減、癌の臨床的損傷または症状の軽減または最小化、そのような処置を行わなかった場合に予測されるものを超える対象の生存期間延長、ならびに投与前に腫瘍形成を有さない動物における腫瘍成長の予防、即ち防護的投与が挙げられるが、これらに限定されない。幾つかの実施形態において、ベクター、またはベクターを含有する組成物、細胞もしくはウイルス粒子の有効量の投与は、対象における腫瘍抗原特異的T細胞の活性化または増殖を增加させ得る。例えば対象における腫瘍抗原特異的T細胞の活性化または増殖は、投与前の対象における腫瘍抗原特異的T細胞の活性化または増殖のレベルに比較して、少なくとも10%(例えば、少なくとも25%、少なくとも50%、または少なくとも75%)増加され得る。

【0112】

抗感染効果としては、例えば感染性物質(例えば、ウイルスまたは細菌)の数の減少が挙げられる。処置される対象における臨床状態が感染である場合、本明細書で提供されるベクターの投与は、対象における病原性抗原特異的T細胞の活性化または増殖を刺激できる。例えば、ベクターの投与は、g p 96 - Igワクチン接種のみで実現される場合よりも大きなレベルに、対象における抗原特異的T細胞活性化を誘導し得る。

【0113】

当業者は、精密な調整によりおよび/または1用量を超える投与により(例えば、ベクターを含有する2種の異なる遺伝的に修飾された腫瘍細胞の同時投与により)、または治療効果を増強するために(例えば、相乗的に)別の薬剤(例えば、PD-1のアンタゴニスト)と共にベクターを投与することにより、ベクターの有効量を減少または増加させ得ることを認識するであろう。それゆえ本文書は、所与の哺乳動物に特異的な特定の要件に投与/処置を適合させるための方法を提供する。治療有効量は、例えば相対的に低い量で開始して、有益効果を同時に評価しながら段階的な増加を用いることにより、決定され得る。したがって本明細書で提供される方法は、腫瘍を有する患者を処置するために、単独でまたは他の周知の腫瘍治療と併せて用いられる。当業者は、例えば癌患者の寿命を延長させることおよび/または癌患者(例えば、肺癌患者)の生活の質を改善することにおける、本明細書で提供されるベクターおよび方法の有利な使用を、容易に理解するであろう。

【0114】

併用療法およびコンジュゲーション

幾つかの実施形態において、本発明は、追加的薬剤を対象に投与することをさらに含む方法を提供する。幾つかの実施形態において、本発明は、共投与および/または共配合に関係する。

【0115】

幾つかの実施形態において、ワクチンタンパク質(例えば、g p 96 - Ig)および1種または複数の共刺激分子の投与は、別の薬剤と共に投与されると相乗的に作用し、かつそのような薬剤が単剤療法として用いられる場合に一般に用いられる用量よりも低い用量で投与される。

【0116】

幾つかの実施形態において、本発明は、非限定期に癌適用を含む、追加的薬剤としての化学療法剤に関係する。化学療法剤の例としては、チオテバおよびCYTOXANシクロホスファミドなどのアルキル化剤; プスルファン、インプロスルファンおよびピポスルファンなどのスルホン酸アルキル; ベンゾドパ、カルボコン、メツレドパ、およびウレドパなどのアジリジン; アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミドおよびトリメチロールメラミンを含むエチレンイミンおよびメチラメラミン; アセトゲニン(例えば、プラタシンおよびプラタシノン); カンプトテシン(合成類似体トポテカンを含む); ブリオスタチン; カリストチン; C C -

10

20

30

40

50

1065 (そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成類似体を含む) ; クリプトフィシン(例えば、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8) ; ドラスタチン；デュオカルマイシン(合成類似体、KW-2189およびCB1-TM1を含む)；エレウテロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スponギスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノベンビチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスターなどのナイトロジエンマスター；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチンなどのニトロソウレア(*n i t r o s u r e a s*)；抗生物質、例えばエネジイン抗生物質(例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシン1IおよびカリケアマイシンオメガI(例えば、*A g new, Chem. Int'l. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994) 参照))；ダイネマイシンAを含むダイネマイシン；クロドロネートなどのビスホスホネート；エスペラマイシン；ならびにネオカルチノスタチン発色団および関連の色素タンパク質エネジイン抗生物質発色団、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIMYCINドキソルビシン(モルホリノ-ドキソルビシン、シアノモルホリノ-ドキソルビシン、2-ピロリノ-ドキソルビシンおよびデオキシドキソルビシンを含む)、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトイシンCなどのマイトイシン、マイコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；代謝拮抗薬、例えばメトトレキサートおよび5-フルオロウラシル(5-FU)；葉酸類似体、例えば、デノブテリン、メトトレキサート、ブテロブテリン、トリメトレキサート；プリン類似体、例えばフルダラビン、6-メルカブトプリン、チアミブリン、チオグアニン；ピリミジン類似体、例えばアンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロキシウリジン；アンドロゲン、例えばカルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド(minoglutethimide)、ミトタン、トリロスタン；葉酸リプレニッシャー、例えばフロリン酸；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビサントレン；エダトラキサート；デメコルシン；ジアジクオン；エルフォルミチン；酢酸エリプチニウム；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダミン；メイタンシノイド、例えばメイタンシンおよびアンサミトシン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモール；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK多糖類複合体(JHS Natural Products、オレゴン州ユージーン所在)；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン(sizofuran)；スピロゲルマニウム；テニュアゾン酸；トリアジコン；2,2',2"-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン(例えばT-2毒素、ベラクリンA(verruckurin A)、ロリジンAおよびアンギイジン)；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン；アラビノシド('Ara-C')；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えばTAXOLパクリタキセル(Bristol-Myers Squibb Oncology、ニュージャージー州プリンストン所在)、ABRAXANE クレモホールフリー、パクリタキセルのアルブミン改変ナノ粒子配合剤(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, 111.)、およびTAXOTEREドキセタキセル(Rhone-Poulenc Rorer、フランス アントニ

10

20

30

40

50

ー所在) ; クロラムブシリ(chlorambucil) ; GEMZAR ゲムシタピン ; 6 - チオグアニン ; メルカプトプリン ; メトレキサート ; 白金類似体、例えばシスプラチン、オキサリプラチンおよびカルボプラチン ; ピンプラスチン ; 白金 ; エトポシド(VP-16) ; イホスファミド ; ミトキサントロン ; ピンクリスチニン ; NAVELBINE ビノレルビン ; ノバントロン ; テニポシド ; エダトレキサート ; ダウノマイシン ; アミノブテリン ; Xeloda ; イバンドロナート ; イリノテカン(Camptostar, CPT-11) (イリノテカンと 5-FU およびロイコボリンの処置レジメンを含む) ; トポイソメラーゼインヒビター RFS 2000 ; ジフルオロメチルオルニチン(DMFO) ; レチノイン酸などのレチノイド ; カペシタピン ; コンプレタスタチン ; ロイコボリン(LV) ; オキサリプラチン処置レジメン(FOLFOX) を含むオキサリプラチン ; ラバチニブ(TYKERB) ; 細胞増殖を低減する PKC- 、 Raf 、 H-Ras 、 EGFR (例えば、エルロチニブ(Tarceva)) および VEGF-A の阻害剤、ならびに上述のいずれかの医薬的に許容し得る塩、酸または誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。加えて処置方法は、放射線の使用をさらに含み得る。加えて処置方法は、光力学的療法の使用をさらに含み得る。

【0117】

幾つかの実施形態において、本発明は、非限定的に感染疾患適用を含む、追加的薬剤としての抗感染症剤に関する。幾つかの実施形態において、抗感染症剤は、非限定的に、アバカビル、アシクロビル、アデフォビル、アンプレナビル、アタザナビル、シドフォビル、ダルナビル、デラビルジン、ジダノシン、ドコサノール、エファビレンツ、エルビテグラビル、エムトリシタピン、エンフィルチド、エトラビリン、ファムシクロビル、およびホスカルネットを含む抗ウイルス薬である。幾つかの実施形態において、抗感染症剤は、非限定的にセファロスボリン系抗生物質(セファレキシン、セフロキシム、セファドロキシル、セファゾリン、セファロチン、セファクロル、セファマンドール、セフォキシチン、セフプロジル、およびセフトビプロール)；フルオロキノロン系抗生物質(シプロ、Levquin、フロキシン、Tequin、アベロックス、およびノルフロックス)；テトラサイクリン系抗生物質(テトラサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、およびドキシサイクリン)；ペニシリン系抗生物質(アモキシシリン、アンピシリン、ペニシリンV、ジクロキサシリン、カルベニシリン、パンコマイシン、およびメチシリン)；モノバクタム系抗生物質(アズトレオナム)；およびカルバペネム系抗生物質(エルタペネム、ドリペネム、イミペネム/シラスタチン、およびメロペネム)を含む抗菌剤である。幾つかの実施形態において、抗感染症剤として、抗マラリア薬(例えば、クロロキン、キニン、メフロキン、プリマキン、ドキシサイクリン、アルテメーテル/ルメファントリル、アトバコン/プログアニルおよびスルファドキシン/ピリメタミン)、メトロニダゾール、チニダゾール、イベルメクチン、パモ酸ピランテル、およびアルベンダゾールが挙げられる。

【0118】

免疫「チェックポイント」分子を標的とする遮断抗体を含む他の追加的薬剤は、本明細書の他の箇所に記載される。

【0119】

対象および/または動物

本明細書に記載される方法は、これらの方法の利益を享受し得る任意の対象での使用が意図される。したがって「対象」、「患者」および「個体」(互換的に用いられる)は、ヒトおよび非ヒト対象、特に飼育動物を包含する。

【0120】

幾つかの実施形態において、対象および/または動物は、哺乳動物、例えばヒト、マウス、ラット、モルモット、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ウサギ、ヒツジ、または非ヒト靈長類、例えばサル、チンパンジー、またはヒヒである。他の実施形態において、対象および/または動物は、非哺乳動物、例えばゼブラフィッシュなどである。幾つかの実施形態において、対象および/または動物は、蛍光標識された細胞(例えば、GFP を用い

るなど)を含み得る。幾つかの実施形態において、対象および/または動物は、蛍光細胞を含むトランスジェニック動物である。

【0121】

幾つかの実施形態において、対象および/または動物は、ヒトである。幾つかの実施形態において、ヒトは、小児のヒトである。他の実施形態において、ヒトは、成人のヒトである。他の実施形態において、ヒトは、老人のヒトである。他の実施形態において、ヒトは、患者を指し得る。

【0122】

特定の実施形態において、ヒトは、約0ヶ月～約6ヶ月齢、約6ヶ月～約12ヶ月齢、約6ヶ月～約18ヶ月齢、約18ヶ月～約36ヶ月齢、約1～約5歳、約5～約10歳、約10～約15歳、約15～約20歳、約20～約25歳、約25～約30歳、約30～約35歳、約35～約40歳、約40～約45歳、約45～約50歳、約50～約55歳、約55～約60歳、約60～約65歳、約65～約70歳、約70～約75歳、約75～約80歳、約80～約85歳、約85～約90歳、約90～約95歳または約95～約100歳の範囲の年齢を有する。10

【0123】

別の実施形態において、対象は、非ヒト動物であり、それゆえ本発明は、獣医学的使用に関係する。具体的な実施形態において、非ヒト動物は、家庭用ペットである。別の具体的な実施形態において、非ヒト動物は、家畜動物である。特定の実施形態において、対象は、化学療法を受けることができないヒト癌患者であり、例えば患者は、化学療法に非応答性であるか、またはあまりに体調が悪く化学療法の適切な手段を有さない(例えば、用量またはレジメンを限定する副作用を過度に有する)。特定の実施形態において、対象は、進行疾患および/または転移性疾患を有するヒト癌患者である。20

【0124】

本明細書で用いられる「同種細胞」は、その細胞が投与される個体に由来しない細胞、即ちその個体と異なる遺伝的構成を有する細胞を指す。同種細胞は、一般にはその細胞が投与される個体と同じ種から得られる。例えば、同種細胞は、癌患者などのヒト患者に投与するための、本明細書に開示されるような、ヒト細胞であり得る。本明細書で用いられる「同種腫瘍細胞」は、その同種細胞が投与される個体に由来しない腫瘍細胞を指す。一般に、同種腫瘍細胞は、その細胞が投与される個体において腫瘍に対する免疫応答を刺激し得る1種または複数の腫瘍抗原を発現する。本明細書で用いられる「同種癌細胞」、例えば肺癌細胞は、その同種細胞が投与される個体に由来しない癌細胞を指す。30

【0125】

本明細書で用いられる「遺伝的に修飾された細胞」は、例えばトランスフェクションまたは形質導入によって、外来の核酸を発現するように遺伝的に修飾された細胞を指す。

【0126】

本明細書で用いられる技術的および科学的用語は、他に定義されない限り、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味を有する。

【0127】

本明細書で用いられる単数形の「a」、「a n」および「t h e」は、他に明白な断りがなければ、それらが指す用語の複数形も包含する。本明細書で用いられる言語「または」は、他に具体的に示されなければ、「および/または」の「包括的」意味で使用され、「いずれか一方/または」の「排他的」意味ではない。本明細書および添付の特許請求の範囲において、単数形は、文脈に他に明白に示されなければ、複数の対象を包含する。40

【0128】

用語「a b o u t」は、およそ、領域内で、大まかに、または前後で、を意味するために本明細書で用いられる。用語「約」は、数値範囲と連結して用いられる場合、境界を示された数値より上および下へ拡大することによりその範囲を修正する。一般に用語「約」は、20%の変動によって述べられた値より上および下の数値を修正するために本明細書で用いられる。本明細書で用いられる用語「含む」および「含んでいる」は、特許請求の50

範囲の過渡的語句で用いられるか、または主要部で用いられるかにかかわらず、制限のない意味を有すると解釈されなければならない。即ちこれらの用語は、「少なくとも有している」または「少なくとも含んでいる」という語句と同義に解釈されなければならない。工程の文脈で用いられる場合の用語「含んでいる」は、その工程が少なくとも列挙されたステップを含むが、追加のステップを含み得ることを意味する。化合物または組成物の文脈で用いられる場合の用語「含んでいる」は、化合物または組成物が少なくとも列挙された特色または成分を含むが、追加的特色または成分も含み得ることを意味する。

【0129】

本発明を以下の実施例にさらに記載するが、それは特許請求の範囲に記載された本発明の範囲を限定するものではない。

10

【0130】

実施例

実施例 1 - gp96 - Ig および T 細胞共刺激融合タンパク質を組み込んだベクター- 改変免疫療法 (vector engineered immunotherapy) は、優れた抗原特異的 CD8+ T 細胞応答を誘発する

分泌可能なヒートショックプロテイン gp96 - Ig に基づく同種細胞ワクチンは、インビオでの抗原交差プライミングを通して、フェムトモル濃度の腫瘍抗原への頻度ポリクローナル CD8+ T 細胞応答を実現できる。確立された腫瘍によって進化した多重免疫抑制メカニズムは、このワクチンアプローチの活性をくじく可能性がある。以下に記載される通り、長期確立 B16 - F10 メラノーマのマウスモデルにおける PD-1、PD-L1、CTLA-4、および LAG-3 遮断抗体の系統的比較により、他のチェックポイントと比べて優れた、gp96 - Ig ワクチン接種と PD-1 遮断との組み合わせが実証された。OX40、ICOS、または 4-1BB アゴニストを用いる gp96 - Ig ワクチン接種と PD-1 遮断と T 細胞共刺激との三重の組み合わせは、相乗的な抗腫瘍利益を提供した。

20

【0131】

gp96 - Ig 発現ベクターを再改変して、ICOSL - Ig、4-1BBL - Ig、または OX40L - Ig を同時に共発現し、これにより追加の抗体療法を必要とせずに共刺激の利益を提供した。以下に記載される通り、同種細胞株における gp96 - Ig およびこれらの共刺激融合タンパク質の共分泌は、抗原特異的 CD8+ T 細胞の活性化増進をもたらした。したがって併用免疫療法は、ベクター再改変によって実現され、ワクチン / 抗体 / 融合タンパク質レジメンの必要性を排除し、重要なことに治療コストおよび全身毒性リスクの両方を抑制し得る。

30

【0132】

実施例 2 - ワクチン + 共刺激物質ベクター再改変

ベクター再改変戦略を利用して、単一ベクター内へワクチンおよび T 細胞共刺激融合タンパク質を組み込んだ。具体的には、元の gp96 - Ig ベクターを再改変して、gp96 - Ig 融合タンパク質および様々な T 細胞共刺激融合タンパク質の両方を分泌する、細胞に基づく併用 IO 生成物を作製した（図 1 および 2）。ワクチンと共に刺激融合タンパク質との組み合わされた局所分泌（図 3）は腫瘍抗原特異的 T 細胞を活性化でき、特に腫瘍細胞によって産生される免疫抑制分子を阻害する薬剤（例えば、PD-1 に対する抗体）の投与と併せた場合、制限されたコストおよび全身毒性で抗原特異的免疫を増大すると予測される。

40

【0133】

実施例 3 - IMPACT 対 COMPACT のインビオ試験

材料および方法

細胞培養およびワクチン細胞株作製：3T3 細胞は、グルタミンおよび 10% ウシ成長血清 (Bovine Growth Serum) (BGS) を含有する IMDM 中、37 度 5% CO₂ に保持した。3T3 - オボアルブミン - ハイグロ親細胞株を、製造業者の指導に従い 4D - NUCLEOFECTOR (商標) および Cell Line NU

50

C L E O F E C T O R (商標) K i t S E (L o n z a) を用いるヌクレオフェクションにより、ニワトリオボアルブミン (O v a) をコードするハイグロマイシン耐性プラスミドバックボーン p c D N A 3 . 1 を用いて樹立した。高レベルの O v a を分泌する単一細胞クローニングを、E L I S A によってスクリーニングし、ネズミ G p 9 6 - I g または G p 9 6 - I g のいずれかと O X 4 0 L - F c の細胞外ドメインとをコードする G 4 1 8 耐性プラスミド p B 4 5 のヌクレオフェクションを通して 3 T 3 - O v a - G p 9 6 - I g (I m P A C T) および 3 T 3 - O v a - G p 9 6 - I g / O X 4 0 L - F c (C o m P A C T) をそれぞれ作製するのに使用した。同じく、I m P A C T および C o m P A C T の両方の単一細胞クローニングを抗生物質選択により作製し、類似レベルのマウス I g G を分泌するクローニングをさらにスクリーニングして、次の分析に使用した。O X 4 0 L m R N A 発現を q R T - P C R によって確認し、タンパク質レベルをウェスタンプロットによって評価した。
10

【 0 1 3 4 】

C T 2 6 細胞は、グルタミンおよび 1 0 % ウシ胎児血清を含む I M D M 中、3 7 で 5 % C O₂ に保持した。I m P A C T (C T 2 6 - G p 9 6 - I g) および C o m P A C T (C T 2 6 - G p 9 6 - I g / O X 4 0 L - F c) の C T 2 6 バージョンを、上記と同じ発現プラスミドを用いて作製したが、製造業者の指導に従い E F F E C T E N E (登録商標) T r a n s f e c t i o n R e a g e n t s (Q i a g e n) を用いて C T 2 6 細胞株中にトランスフェクトした。単一細胞クローニングを抗生物質選択により単離し、E L I S A によりマウス I g G 分泌についてスクリーニングした。O X 4 0 L m R N A 発現を q R T - P C R によって確認した。
20

【 0 1 3 5 】

B 1 6 . F 1 0 細胞株を、o v a 親クローニング (B 1 6 . F 1 0 - o v a : 3 T 3 細胞に関して先に記載された通り) を作製することによって最初に樹立した。その後、I m P A C T (B 1 6 . F 1 0 - o v a - g p 9 6 - I g) および C o m P A C T (B 1 6 . F 1 0 - o v a - g p 9 6 - I g / F c - O X 4 0 L) の B 1 6 . F 1 0 - o v a バージョンを、上記と同一のプラスミドで再度トランスフェクトし、高レベルの g p 9 6 - I g 分泌について選択した。

【 0 1 3 6 】

マウスモデル O T - I / O T - I I の移入および分析：抗原特異的 C D 8 T 細胞を、H 2 K^b M H C クラス I 抗原交差提示の際にオボアルブミン残基 2 5 7 ~ 2 6 4 を認識する T 細胞受容体トランスジーン T C R - V 2 および T C R - V 5 を担持する O T - I / E G F P マウスの脾臓から、単離した。抗原特異的 C D 4 T 細胞を、C D 4 強受容体と相補性があり I - A^b M H C クラス I I 抗原交差提示の際にニワトリオボアルブミン残基 3 2 3 ~ 3 3 9 に特異的なマウス - および - 鎮 T 細胞受容体を発現する、O T - I I マウスの脾臓から単離した。
30

【 0 1 3 7 】

手短に述べると、マウスを C O₂ 窒息とそれに続く頸椎脱臼により殺処分して、脾臓を滅菌 P B S + 2 m M E D T A 中へ切り出した。脾臓細胞を組織から分離して、1 0 0 μ M ストレイナーに通した。細胞を 1 , 2 0 0 R P M で 5 分間ペレット化して、室温で 1 ~ 2 分間 1 × A C K 溶解緩衝液 (1 5 0 m M N H₄ C l 、1 0 m M K H C O₃ および 1 m M E D T A) 5 m L を添加することにより赤血球細胞を溶解した。溶解に続いて、同容量の 1 × P B S を添加して、細胞を再度 1 , 2 0 0 R P M で 5 分間ペレット化した。O T - I (C D 8) および O T - I I (C D 4) を、製造業者の指導に従って、S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s の C D 4 および C D 8 単離キットを利用して全脾臓細胞から単離した。O T - I (0 . 5 × 1 0⁶ 細胞 / マウス) および O T - I I (1 × 1 0⁶ 細胞 / マウス) を、尾静脈への静脈内 (I V) 注射によって F O X P 3 - R F P (調節 T 細胞 T r e g を追跡するため) 用にトランスジェニックのマウスへ移入した。I V 注射日は、実験の - 1 日目に対応した。
40

【 0 1 3 8 】

0日目および35日目(ブーストされたマウスの場合)に、マウスは未処置か、対照として3T3-Ova親クローンをワクチン接種、またはIMPACT(単独で、またはICOS(BioLegend #313512)、4-1BB(3H3抗体、Bio-X-Cel11)またはOX40(OX86抗体、Bio-X-Cel11)に対するアゴニスト抗体100μgと組み合わせて)をワクチン接種、またはComPACTをワクチン接種された。ワクチン接種物は 1×10^6 細胞からなり、腹腔内注射(IP)により投与された。末梢血から採取されたリンパ球を、経過時間全体にわたりフローサイトメトリーにより分析した。

【0139】

CT26腫瘍モデルおよび分析：CT26腫瘍試験では、BALB/Cマウスを、 2×10^5 または 5×10^5 腫瘍細胞のいずれかで皮下注射により脇腹後部に接種し、0日目とした。B16.F10-ova試験では、C57BL/6マウスを、 5×10^5 腫瘍細胞で脇腹後部に接種し、0日目とした。ワクチン接種日には、腫瘍担持マウスは、未処置か、またはマイトイシンC(Sigma)処置IMPACT、IMPACT+100mg抗OX86(全体を通してOX40(ab)と称する)またはComPACT細胞をワクチン接種された。腫瘍面積(mm^2)および全生存率を、タイムコースを通して評価した。30日生存規準は、腫瘍潰瘍形成の兆候を有さない 175 mm^2 未満の総腫瘍面積を含んだ。腫瘍が確立し次に続く処置が拒絶された完全な応答者を、図12のパネルDおよび図11のパネルEに列挙する。 2×10^5 細胞を接種されたマウスのコホートを、腫瘍接種後11日目に殺処分した。腫瘍をこれらのマウスから切り出し、37で10分間トリプシン処理し、分離し、100μg細胞ストレイナーに通した。細胞をペレット化し、赤血球を溶解し(上記の通り)、RNAを単離して逆転写し、qPCRによって分析した(以下参照)。CT26実験マウスのコホートを、脾臓細胞中のAH1四量体分析および腫瘍組織の遺伝子解析のために、12日目に安楽死させた。腫瘍をこれらのマウスから切り出し、37で10~15分間トリプシン処理し、分離して100mMストレイナーでホモジナイズした。細胞をペレット化して、RNA単離のために処理した(以下参照)。

【0140】

フローサイトメトリー：フローサイトメトリーおよびセルソーティングを、Sony SH800で実施した。細胞外染色のために、細胞ペレットを、1%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.02%アジ化ナトリウム、および2mM EDTA、ならびに適当な抗体を含有する $1 \times$ PBS緩衝液中に再懸濁し、暗室で氷上にて30分間インキュベートした。その後、細胞をフローサイトメトリー緩衝液中で洗浄し、再懸濁しその後分析した。細胞内染色では、細胞を、BioLegendのFOXP3 Fix/Permキットを用いて固定し浸透処理し、上記の通り染色し、フローサイトメトリー緩衝液中で洗浄し、再懸濁しその後分析した。用いられた抗体は、PE/Cy7-CD4(Sony、1102640)、AF700-CD8a(Sony、1103650)、APC-TCR V5.1, 5.2(Sony、1297530)、Pacific Blue-TCR V2(Sony、1239080)、APC-KLRG1(BioLegend、138412)、BV421-CD44(BioLegend、103039)、BV605-CD127(BioLegend、135025)、APC-Ki67(BioLegend、652406)、PE/Cy7-IFN(BioLegend、505826)、およびBV421-IL2(BioLegend、503825)であった。

【0141】

ELISA：標準のELISA条件を、 1×10^6 細胞を培地1mL中に播種し上清を24時間後に分析するように、設定した。高結合ELISAプレートを、重炭酸ナトリウム緩衝液中の $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ IgG(Jackson Laboratories #115-005-062)でコーティングした。コーティングされたプレートを4で一晩インキュベートした。翌朝、プレートをTBS-T(50mM Tris、150mM NaClおよび0.05% Tween 20)で3回洗浄し、Casein Block

10

20

30

40

50

king Buffer (Sigma) で 1 時間ブロックし再度 TBS-T で 3 回洗浄した。プレートに、細胞上清 50 μL を、11 点マウス IgG 標準セット (11-point mouse IgG standard set) の試料と共に、コーティングされた ELISA プレートに添加して、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを TBS-T で 3 回洗浄し、検出抗体 (Jackson Laboratories #115-035-071) 50 μL を添加し、暗室において室温で 1 時間インキュベートした。プレートを TBS-T で 3 回洗浄し SUREBLUE (商標) TMB Microwell 1 Peroxidase Substrate (KPL) 100 μL を各ウェルに添加し、暗室において室温で 20 分間インキュベートした。反応を停止するために、硫酸 100 μL を各ウェルに添加し、即座にプレートを Biotek プレートリーダーで読み取った。試料は、複数の希釈倍率で少なくとも三重測定で実施された。
10

【0142】

RNA 単離および qRT-PCR : 全 RNA を、オンカラム DNase 处理を含み、製造業者の推奨に従い RNeasy および RNeasy Micro Kit (Qiagen) を用いて調製した。総量 1 μg (RNeasy を使用) または 100 ng (RNeasy Micro を使用) を用いて、Origene の First-strand cDNA 合成キットで cDNA を合成した。qPCR を、KAPA SYBR FAST、SYBR Green Master Mix (Kapa Biosystems) を用いて実施し、その後 Roche Lightcycler で分析した。値は 18S mRNA に正規化されており、最少で 3 つ生物学的複製物について平均 ± 平均の標準誤差 (SEM) を表し、全てを三重測定で実施した。用いられたプライマー配列は、
20

【化13】

IFN-γ: F: 5'-CTGCCACGGCACAGTCATTG-3' (SEQ ID NO:14)

R: 5'-gcagttctccagatatcc-3' (SEQ ID NO:15)

TNF-α: F: 5'-CCACGCTCTGTCTACTG-3' (SEQ ID NO:16)

R: 3'-gccatagaactgtgagagg-3' (SEQ ID NO:17)
30

グラニズイム-B F: 5'-CTACTGCTGACCTTGTCTCTG-3' (SEQ ID NO:18)

R: 3'-agttagccatgtggcg-3' (SEQ ID NO:19)

IL-2 F: 5'-CTGCGGCATGTTCTGGATTGACT-3' (SEQ ID NO:20)

R: 5'-AGTCCACCACAGTTGCTGACTCAT-3' (SEQ ID NO:21)

ペーフォリン-1 F: 5'-GACACAGTAGAGTGTGCGATG-3' (SEQ ID NO:22)

R: 5'-aagcatctgtggagctg-3' (SEQ ID NO:23)
40

β-アクチン F: 5'-aaggccaaccgtgaaaagat-3' (SEQ ID NO:24)

R: 5'-gttgtacgaccagaggcatac-3' (SEQ ID NO:25)

【0143】

ウェスタンプロット分析 : IMPACT および COMPACT 細胞を、Briefelidin-A で 16 時間処置して、タンパク質輸送および分泌を阻害した。その後、細胞を、1 × 完全プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) を含有する RIPA 緩衝液 (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% デオキシコール酸
50

ナトリウムおよび0.1% SDS) 中で、氷上にて10分間溶解した。タンパク質濃度を、DC Protein Assayキット(Bio-Rad)を用いて測定し、タンパク質20 µgをプローブした。抗体は、CD252(OX40L、Abcam #ab156285、1:1000希釈)、ヒスチジンH3(Active Motif #61278、1:10,000)、ヒスチジンH4(Active Motif #61300、1:10,000)、およびアクチン(Abcam #ab8226、1:10,000)であった。

【0144】

LEGENDplexサイトカイン分析：実験用マウスを、CO₂窒息および頸椎脱臼により安樂死させ、全血を心穿刺により採取した。赤血球細胞を室温で1時間、重力により沈降させ、残りの細胞を1,200 RPMで5分間ペレット化した。その後、血清を新しい1.5 mLエッペンドルフチューブに移した。サイトカイン分析を、製造業者の推奨に従いLEGENDPLEX(商標) Cytokine Analysisキット(BioLegend)を用いて実施し、Sony SH800で分析した。

10

【0145】

統計解析：実験の複製物(N)を、図に示している。他に記載がなければ、プロットされた値は、最少で3回の異なる実験から得られた平均を表し、誤差はSEMである。統計学的有意性(p値)を、ウェルチの集計による対応のないパラメトリックt検定を利用して決定した。有意なp値をアスタリスク(*)で標識し、対応するp値を各図の中に標識した。

20

【0146】

結果

多くの新しい試験は、治療ワクチンまたはT細胞共刺激抗体の添加が、応答する患者の割合および臨床応答の期間を増加させるのに効果的な方策であるか否かを調査する。そのような方策の実行は、どの薬剤が相乗的利益を提供し得るか、そのような併用の毒性は許容し得るか、そして最終的にどのように医療システムでそのような併用を管理するか、が完全に理解されていないことを含む、複数の要因によって制限されている。

【0147】

ワクチンと個々のT細胞共刺激分子との潜在的相乗作用を調査するために、一連の直接比較試験を、前臨床マウスマルクスモデルで実施した。修飾された分泌可能なgp96-Ig融合タンパク質を発現する細胞を基にしたワクチン(図4A)を用いて、OX40、4-1BB、またはICOSを標的とするアゴニスト抗体の共投与が抗原特異的CD8+T細胞のさらなる共刺激を提供するか否かを調査する試験を実施した(図5A~5C)。オボアルブミン特異的CD8+T細胞(OT-I)を養子移入されたC57BL/6マウスの3T3-ova-gp96-Igワクチンでの免疫付与は、末梢血CD8+T細胞の10%までのOT-I細胞の増殖をもたらした。この応答は、OX40アゴニスト抗体の追加投与によって倍増し得たが、4-1BBまたはICOS共刺激抗体では倍増し得なかつた(図5D)。

30

【0148】

OX40LによるT細胞共刺激は、2~5日の過程にわたる抗原提示細胞による空間的に制限された微小環境における局所炎症によって惹起される。OX40受容体アゴニスト抗体の投与は、数週間持続し得る全身的共刺激を提供する。ワクチンは典型的には局所投与されるため、全身性共刺激を制限して単一化合物との併用免疫療法を可能にするための方策としてOX40L融合タンパク質(Fc-OX40L)がgp96-Ig含有プラスミドの第二のカセット中で共発現され得るか否かを決定するための実験を実施した(図6A)。概念実証として、可溶性オボアルブミンと、gp96-Ig単独('Impact')またはgp96-IgとFc-OX40L、ICOSL、または4-1BBLのいずれかとを共発現する3T3細胞を作製した。これらの細胞株は、ovaおよびgp96-Igの両方を類似の量で分泌するようにしっかりと選択された(図7Aおよび7B)。Fc-OX40L、ICOSL、または4-1BBLの発現を、RT-PCRおよびウェス

40

50

タンプロットにより評価し(図7Cおよび7D)、初代脾臓細胞からのIL-2分泌アッセイにより細胞培養上清中で機能的に活性であることを示した。

【0149】

IMPACTのインビボ活性を単独で、またはOX40アゴニスト抗体との組み合わせで、図5に記載されたOT-Iモデルを使用してComPACTと比較した。上記のコトランスフェクションが図5のovaを発現するネオマイシン耐性カセットでは可能でなかったため、この実験では異なる細胞株を用いた。ComPACTは局所的に投与されたため、全身投与されたIMPACTとOX40アゴニスト抗体の組み合わせに対比すると劇的なプライムおよびブースト効果を予測することができなかった。しかし図6Bおよび6Cに示された通り、ComPACT免疫付与は、IMPACT単独またはOX40アゴニスト抗体との組み合わせのいずれかでのプライマリー免疫付与後にOT-I細胞の驚くべき、そして有意に改善された増殖を提供した。末梢血におけるピーク増殖は、ComPACTで5日目に増加したが、より重要なことに、6~20日の応答期間でそうであった。

【0150】

ワクチンと組み合わされたOX40アゴニスト抗体へのメモリー応答は、抗原特異的CD8コンパートメント内では相対的に弱い。ブースト応答を、プライマリー免疫付与後35日目にマウスを再度免疫付与することによって評価した(図6C)。OX40アゴニスト抗体の組み合わせは、OT-I応答の相対的に弱いブーストをもたらしたが、ComPACT処置マウスは、一次応答の規模とほぼ一致したブースト応答を示した(図6C)。ComPACTを投与されたマウス由来の脾臓細胞および腹膜細胞のフローサイトメトリー分析から、他の群と比較してCD127⁺KLRG1⁻細胞での顕著な増加が明らかとなり、メモリー前駆細胞の増加が示された(図8B)。この効果は、ComPACT(OX40L)、ComPACT(ICOSL)およびComPACT(4-1BBL)を含む様々なComPACTで観察されたが、OX40アゴニスト抗体処置では観察されなかった。様々なComPACTは、OX40アゴニスト抗体処置と同様の短命エフェクター細胞(CD127⁻KLRG1⁺、図8B)の増加を誘導しなかった。しかしComPACTは、脾臓内のメモリーティー細胞(CD127⁻KLRG1⁺)を増加させた(図8B)。これらのデータは、OX40L、ICOSLまたは4-1BBLアゴニスト融合タンパク質の局所投与が抗原特異的CD8コンパートメントでのプライマリー応答およびブースト応答の両方を有意に増加させ、これはメモリー前駆細胞の増加およびプライミング後の収縮期の延長と相關することを示す。加えて、これらのデータは、IMPACT+/-OX40アゴニスト抗体と比較した、ComPACT処置マウスでの新規で予想外の作用機序も明らかにした。

【0151】

局所的に提供されたOX40Lによる抗原特異的CD8コンパートメントにおける増加したプライマリー応答およびブースト応答の原因は、OX40アゴニスト抗体の全身投与により提供されたオフターゲット活性化の減少によるという可能性があった。この仮説を検証するために、腹膜細胞、脾臓細胞および腫瘍流出リンパ節(TDLN)細胞を、IMPACT+/-OX40アゴニスト抗体またはComPACTで免疫付与されたマウスから8日目に単離し、フローサイトメトリーおよび定量RT-PCR(qRT-PCR)によって分析してオフターゲット免疫活性化と抗原特異的応答を識別した。プライマリー免疫付与後8日目に単離された腹膜細胞の分析から、ComPACT処置マウスで全単球、OT-I、およびOT-II細胞の数の増加が示されたが、OX40アゴニスト抗体で処置されたマウスでも全CD40細胞数の増加が示された(図8A)。全CD4+細胞およびFOXP3+調節T細胞(Treg)の増加したレベルが、OX40アゴニスト抗体で処置されたマウスの腹腔、脾臓およびTDLNにおいて検出された(図8Aおよび8E)。これに対して、ComPACT処置マウスは、Treg細胞の明白な刺激なしに抗原特異的OT-I(CD8+)およびOT-II(CD4+)細胞を特異的に増幅した(図8Aおよび8E)。類似の結果が、脾臓およびリンパ節においても観察され、全CD4細胞および抗原特異的CD4細胞の全身的増殖を示唆する(図9Aおよび9B)。CD4+F

10

20

30

40

50

$\text{OX}3 +$ 調節T細胞(T reg)もまた、 $\text{OX}40$ アゴニストで増加したが、ComPACT処置動物では増加しなかった。血清サイトカイン分析は、 $\text{OX}40$ アゴニスト抗体で処置されたマウスにおけるIFN、TNF、IL-5およびIL-6の全身的増加をさらに実証した(図8C)。全身的なサイトカイン増加の細胞内供給源を調査するために、RT-PCRを、免疫付与後8日目に全CD8+細胞またはOT-I細胞のいずれかで実施した。ComPACT処置マウスは、OT-I集団に単離されたIFN、TNFおよびグランザイム-Bの増加を示したが、 $\text{OX}40$ アゴニスト抗体で処置されたマウスは、OT-Iおよび全CD8集団の両方の増加を示した(図8D)。

【0152】

これらのデータは、 $\text{OX}40\text{L}$ 融合タンパク質が、ヒートショックプロテインgp96-Igに基づくワクチンを共発現するプラスミドの安定なトランスフェクションにより局所的に提供され得ることを示す。共刺激を提供するのに十分な濃度のFc-OX40Lが分泌されるか否かに関する初期実行可能性は、これが実現可能であり、かつ驚くべきことに $\text{OX}40$ アゴニスト抗体の全身投与よりも効果的であることを実証した。共刺激されたOT-I細胞は、 $\text{OX}40$ 抗体で共刺激されたOT-I細胞と同レベルのエフェクターサイトカインを産生し、標的細胞に対して増加された細胞傷害活性を発揮すると予測される。

【0153】

ネズミ腫瘍モデルにおいてImPACT+/-OX40抗体対ComPACTの機能的活性を調査するために、CT26細胞を、図7の3T3細胞に概説されたように、これらの構築物で安定にトランスフェクトした(図10A~10C)。一つの実験において、0日目にマウスにCT26細胞を接種し、その後、腫瘍接種後6および11日目にマイトイシンC処置CT26細胞、CT26-gp96-Ig、OX40アゴニスト抗体とともにCT26 ComPACTと組み合わせたCT26-gp96-Igで処置した。二つの実験では、0日目にマウスにCT26細胞を接種し、その後、腫瘍接種後4、7および10日目にマイトイシンC処置CT26細胞、CT26-ImPACT、OX40アゴニスト抗体とともにCT26 ComPACTと組み合わせたCT26-ImPACT

で免疫付与した(図11A)。腫瘍接種後12日目に単離された腫瘍組織での定量RT-PCRにより、OX40アゴニスト抗体、ImPACT、ComPACTおよびImPACT+OX40アゴニスト抗体の組み合わせで処置された群におけるCD8a、IL-2およびIFNの発現増加が明らかとなり、免疫細胞活性化および腫瘍浸潤が示された。予測通り、OX40アゴニスト抗体(単独で、またはImPACTと一緒に)を投与されたマウスのみが腫瘍内でのCD4およびFOXP3発現増加を示した(図11B)。CT26抗原特異的CD8+増殖は、AH1四量体染色によって検出された通り、未処置群に比較して、ImPACT+OX40抗体ではおよそ4倍、およびComPACT処置マウスではおよそ5倍、有意に上昇した(図11B)。腫瘍進行は、ImPACT+OX40アゴニストまたはComPACT処置を受けたマウスでは、対照または単剤療法群に比較して強く遮断されることが示された(図11D)。これは、B16.F10腫瘍モデルで本発明者らが観察したものと比較して、ComPACT処置マウスにおける長期生存率の有意な上昇および高割合の完全腫瘍拒絶をもたらした(図11E、それぞれ80%およびおよそ47%)。したがってComPACTは、強力な抗原特異的T細胞増殖および腫瘍浸潤、腫瘍成長の遅延および著しい生存利益を生成する。

【0154】

B16.F10マウスマラノーマ腫瘍モデルは、アグレッシブな腫瘍であり、典型的にはOX40アゴニスト抗体で効果的に処置されない。B16.F10腫瘍モデルにおけるgp96-Igを基にしたワクチンを評価するために、B16.F10-ova細胞株を作製した。加えて、B16.F10-ova-ImPACTおよび-ComPACTワクチンを、それぞれgp96-Igおよびgp96-Ig-Fc-OX40Lベクターの安定なトランスフェクションによって次に作製した。B16.F10-ImPACTおよび-ComPACT細胞株からの同等レベルのgp96-Ig分泌がELISAによって確

10

20

30

40

50

認められ、B16.F10-ova-ComPACT細胞株におけるFc-OX40L発現もまたqRT-PCRによって確認された。B16.F10-ova腫瘍接種前1日目にマウスにOT-I細胞を養子移入した(-1日と表示、図12A)。次に、OT-I細胞の抗原特異的応答を、4日目、7日目および10日目にマイトイシンC処置B16.F10-ova細胞、B16.F10-ova-ImPACT、OX40アゴニスト抗体とまたはB16.F10-ova-ComPACTと組み合わせたB16.F10-ova-ImPACTでワクチン接種した後のマウスで調査した(図12B)。3T3-Ovaモデル系で得られたデータと一致して、B16.F10-ova-ComPACT処置マウスは10日目~19日目(初回ワクチン接種後6日目~15日目に対応)にロバストなOT-I細胞増殖を示し、それはImPACT+/-OX40アゴニスト抗体で観察されたものよりも大きく、過去に観察されたものと類似の、収縮期における持続的動態を有した。したがって、B16.F10-ova-ComPACTワクチン接種マウスは、ImPACT+/-OX40アゴニスト抗体ワクチン接種の両方よりも強力な抗腫瘍効果を示した(図12C)。ComPACT処置マウスでの長期生存率はおよそ78%であり、マウスの11%がアグレッシブな腫瘍の完全な拒絶を示した。比較すると、ImPACT単独ワクチン接種マウスおよびImPACT+OX40アゴニストAb処置マウスは、それぞれ50%および62.5%の全生存率を示した(図12D)。

【0155】

追加的なComPACTの機能的活性を、過去に記載された免疫アッセイおよびOT-I移入アッセイを利用して調査した。具体的には、OT-I/GFP細胞を、0日目に初回ワクチン接種および35日目にブーストして、ワクチンなし、Ovaのみの対照細胞、ComPACT(gp96-Ig/OX40Lまたはgp96-Ig/TL1A)またはComPACT-OX40細胞株とComPACT-TL1A細胞株との混合物であるComPACT²(gp96-Ig/OX40L+TL1A)で46日間にわたり処置されたマウスにおいて、フローサイトメトリーにより分析した(図13)。プライム応答およびメモリー応答の両方が、ComPACT(gp96-Ig/OX40Lまたはgp96-Ig/TL1A)またはComPACT²(gp96-Ig/OX40L+TL1A)で処置されたマウスで強力であった。ComPACTまたはComPACT²マウスはまた、驚くべきことにタイムコース全体を通して(およそ7日目~20日目)高レベルのOT-1を保持した。加えて、C57BL/6マウスを、0日目にImPACT単独またはComPACT(gp96-Ig/OX40L、gp96-Ig/4-1BBLまたはgp96-Ig/ICOS-L)で免疫付与した(図14)。結果は、ImPACTに比較して様々なComPACTがOT-I細胞の増殖を増進したことを示す。

【0156】

追加のComPACTのインビボ活性を、CT26大腸癌モデルでさらに調査した。具体的には、マウスは未処置であるか、または4日目、7日目および10日目にCT26親細胞、ImPACT単独、ImPACT+TNFRSF25アゴニスト(4C12ab)、4C12(ab)単独、PD-1(ab)単独、4C12(ab)とPD-1(ab)、ComPACT(gp96-Ig/OX40Lまたはgp96-Ig/TL1A)、ComPACT(gp96-Ig/OX40L)+PD-1(ab)、またはComPACT²(gp96-Ig/OX40L+TL1A)をワクチン接種された(図15)。結果は、ComPACT処置単独(gp96-Ig/OX40Lまたはgp96-Ig/TL1A)およびPD-1との組み合わせが、腫瘍成長を有意に減少したことを示す。図16に示される通り、ComPACT処置単独(gp96-Ig/OX40Lまたはgp96-Ig/TL1A)およびPD-1との組み合わせはまた、マウス生存率を有意に増大させた。

【0157】

ヒト癌細胞株におけるComPACTの発現をテストした。具体的には、ComPACT(gp96-Ig/OX40L)を、ヒト前立腺癌細胞株(例えば、PC-3)またはヒト肺腺癌細胞株(例えば、AD100)中へトランスクレクトした。それぞれ、図17

および18を参照されたい。結果は、両方の細胞株がOX40Lを生成し排出したことを見示す。

【0158】

総括すると、これらのデータは、1つの組成物中に複数の相補的なモダリティー、この場合はワクチンとT細胞共刺激融合タンパク質、を組み込むことにより、併用免疫療法に近づき得ることを実証した。ベクターにコードされかつ細胞から分泌されるFc-OX40LによるT細胞共刺激の提供は実行可能であり、OX40アゴニスト抗体に比較して、プライムおよびブーストの両方の時点で抗原特異的CD8+ T細胞増殖の増進をもたらした。組み合わせたワクチンと共に刺激物質により活性化されたT細胞は、IFN、IL-2、TNF、およびグランザイム-Bを産生し、OX40アゴニスト抗体で観察されたオフターゲットT細胞増殖および全身の炎症性サイトカイン增加を伴わなかった。重要なことに、このアプローチは、確立されたネズミ結腸癌モデルにおいて治療的腫瘍免疫も増大させた。まとめると、これらの結果は、二種または三種の抗体の組み合わせに依存しない併用免疫療法を実行するための方策を提供し、これは、低減されたオフターゲットT細胞活性化によりより大きな安全性および有効性を患者に提供し得る。

【0159】

他の実施形態

本発明を、詳細な説明と併せて記載したが、前述の説明が例示であり、本発明の範囲を限定する意図がなく、それが添付の特許請求の範囲によって定義されることが、理解されなければならない。他の様様、利点、および改良は、以下の特許請求の範囲に含まれる。

【0160】

任意の個々の節の内容は、全ての節に等しく適用可能である。

【0161】

参照による組み入れ

本明細書で参照される全ての特許および発行物は、全体として参照により本明細書に組み入れられる。

【0162】

本明細書で議論された発行物は、本出願の提出日以前に単にそれらの開示ために提供されている。本明細書内のいずれも、先行の発明のせいで本発明がそのような発行物よりも前の日付けにする権利を与えられないことの承認として解釈されるべきではない。

【0163】

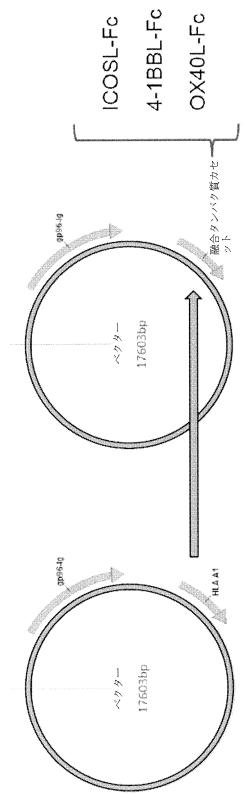
本明細書で用いられる全ての見出しあは、単に組織化のためにあり、本開示を限定するものではない。

10

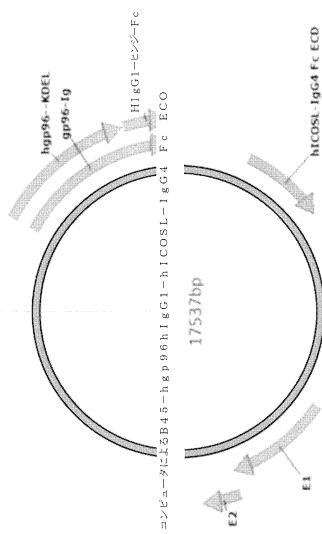
20

30

【図1】



【図2】



【図3】

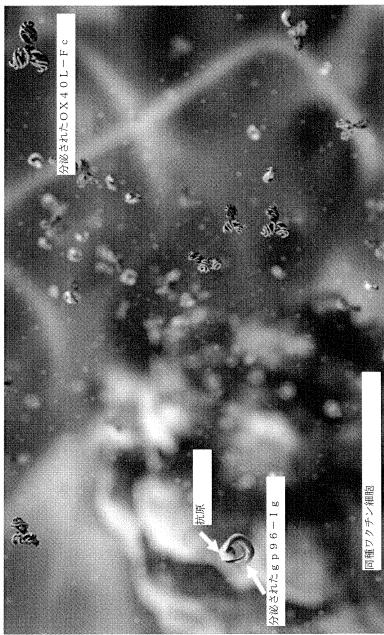


図3

【図4 A - D】

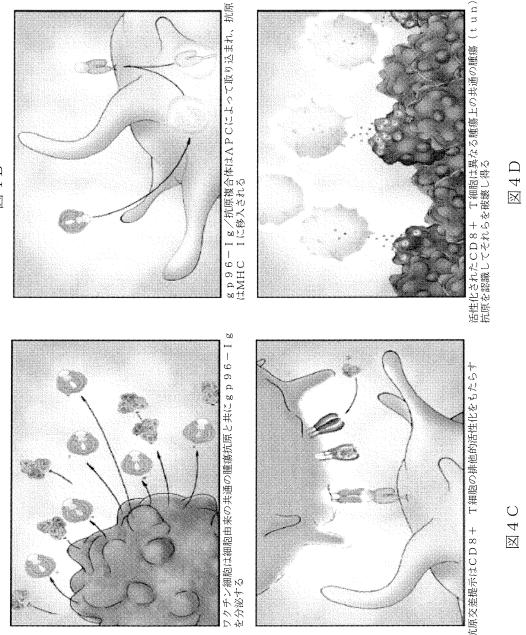
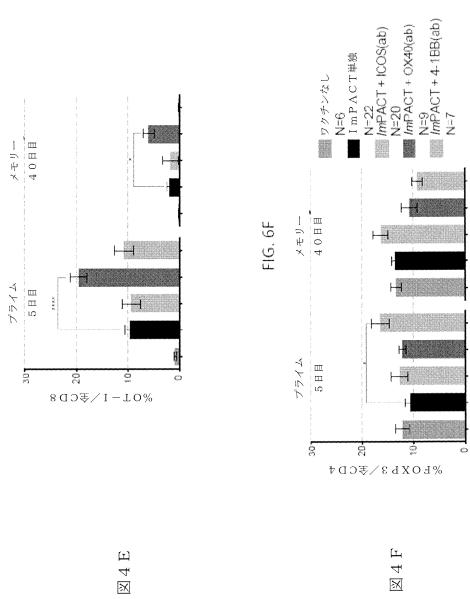


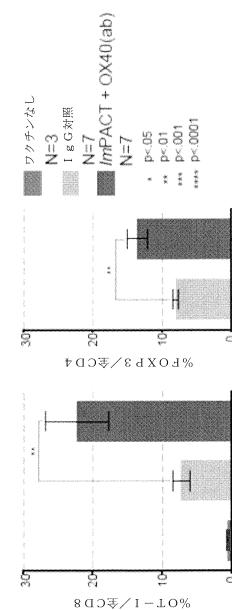
図4 D

図4 C

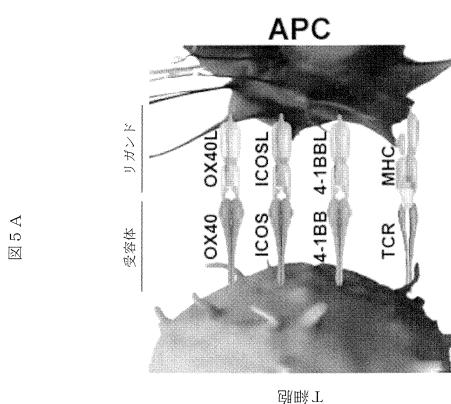
【図 4 E - F】



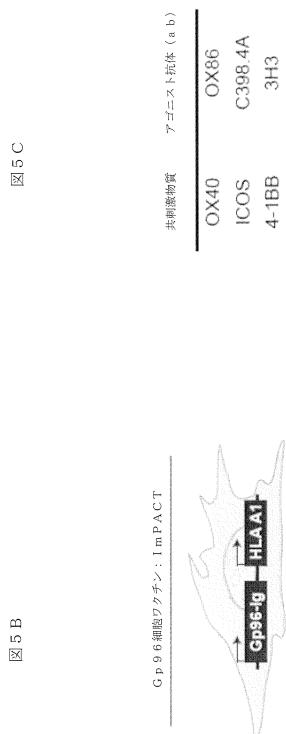
【図 4 G】



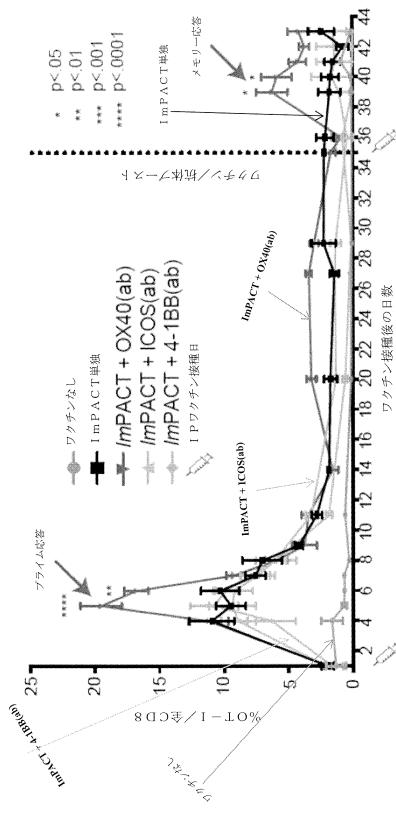
【図 5 A】



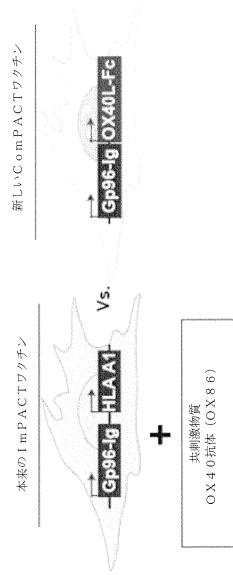
【図 5 B - C】



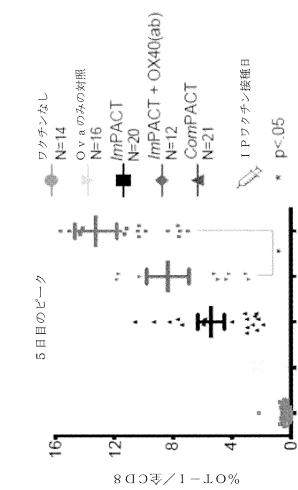
【図 5 D】



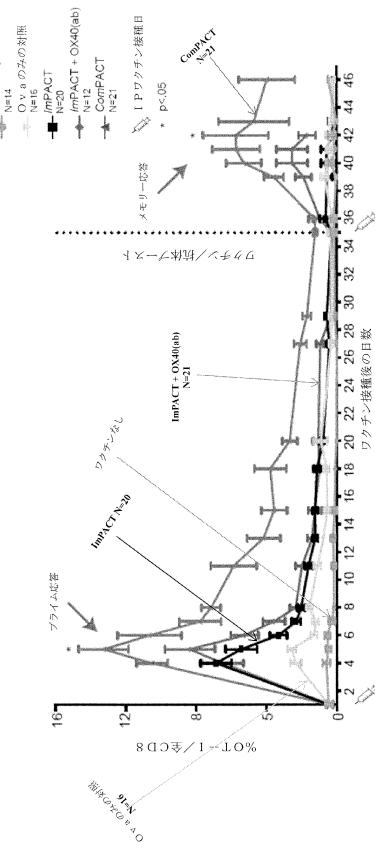
【図 6 A】



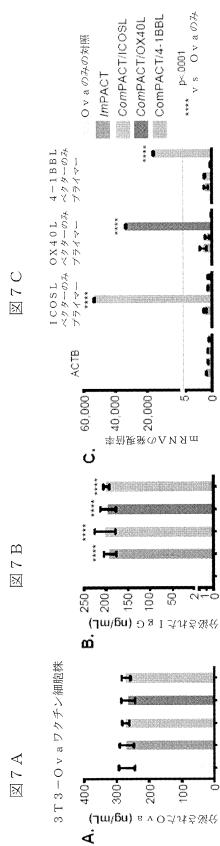
【図 6 B】



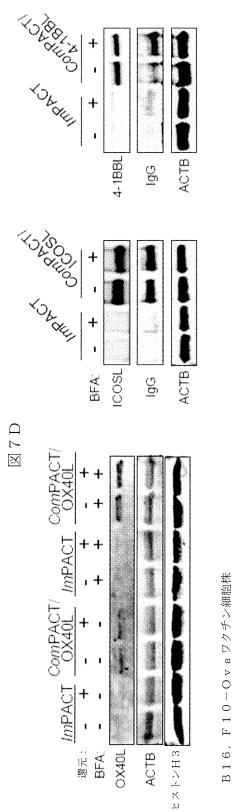
【図 6 C】



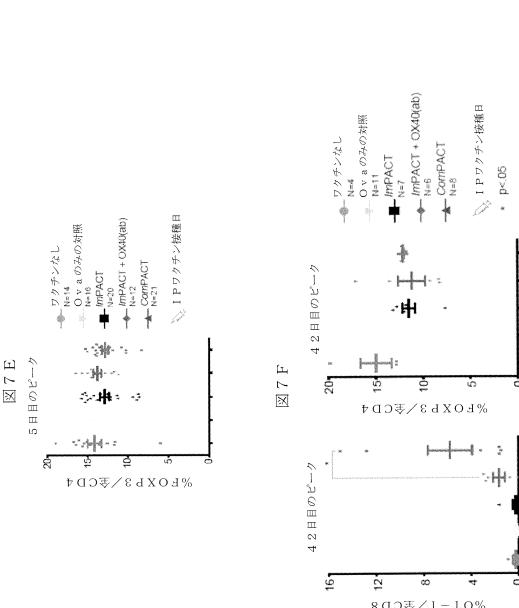
【図 7 A - C】



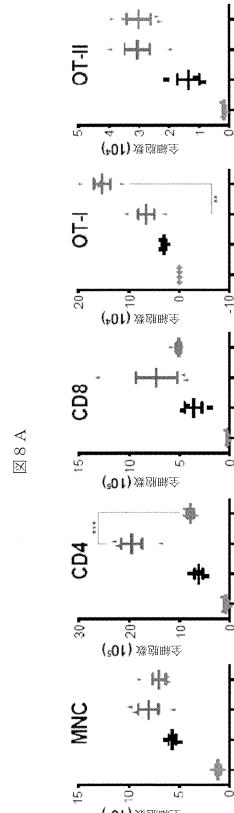
【図 7 D】



【図 7 E - F】



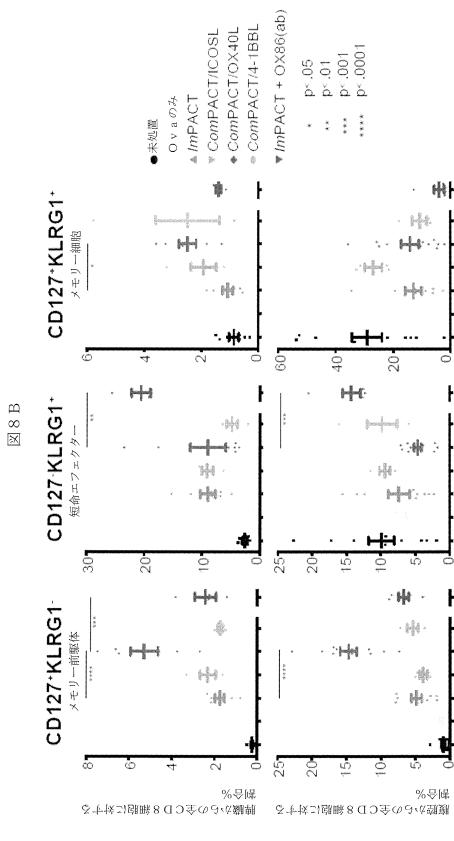
【図 8 A】



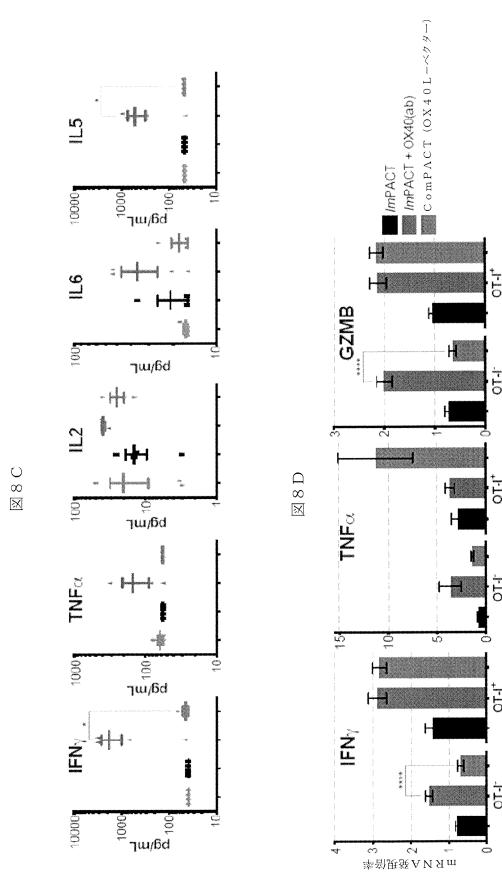
● 未処置
■ ImPACT
▲ ImPACT + OX40(ab)
▼ CompACT (OX40L → ヒーク)
* p<0.05
** p<0.01
*** p<0.001
**** p<0.0001

B 16. F 1 0 - Ova ワクチン細胞株

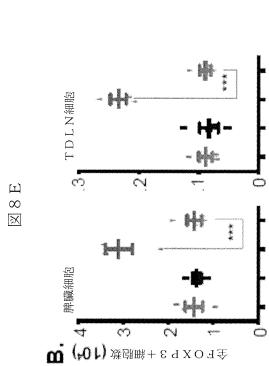
【図 8 B】



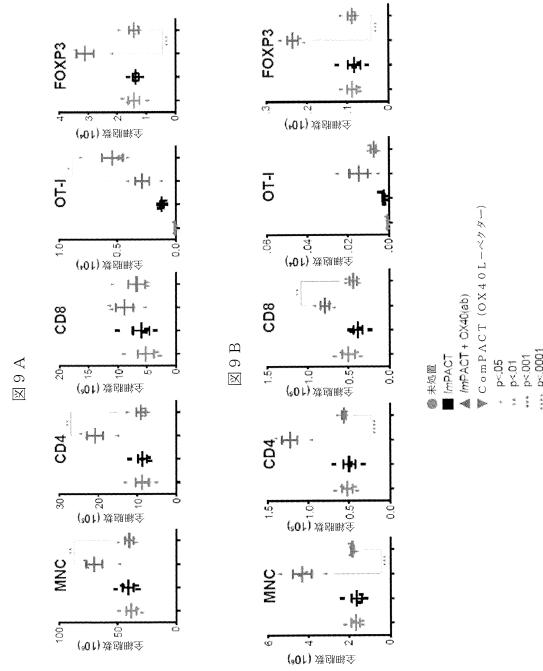
【図 8 C - D】



【図 8 E】



【図 9 A - B】



【図 9 C】

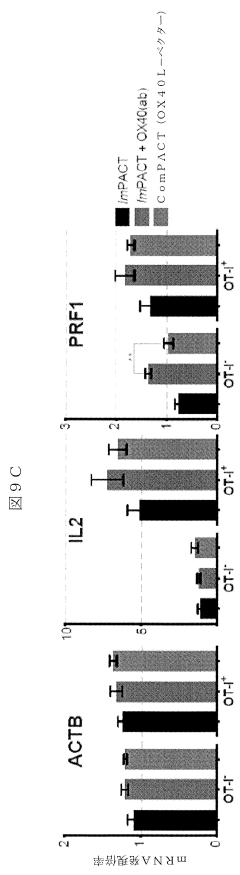


図 9 C

【図 10 A - B】

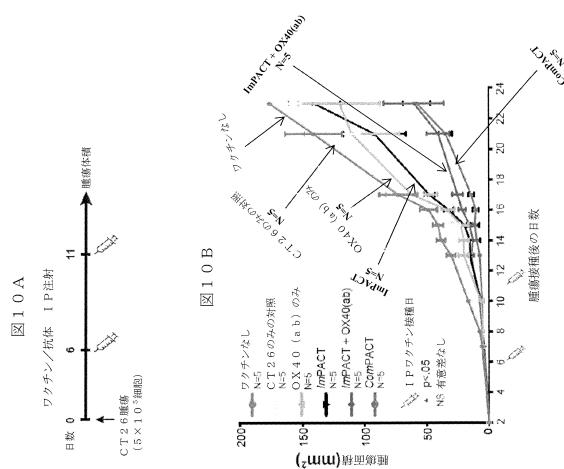
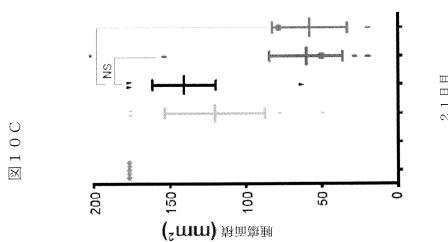


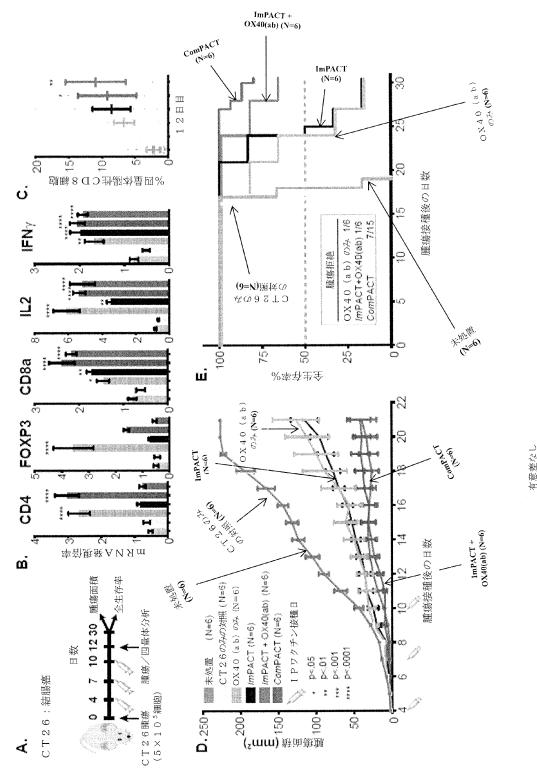
図 10 A

図 10 B

【図 10 C】



【図 11】

A. 細胞癌
C T 2 (5x10³)B. CD4, CD8a, FOXP3, IL2, IFN γ

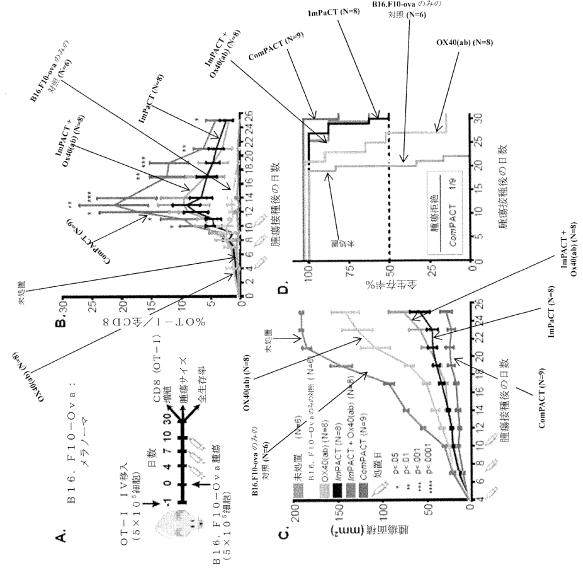
C. % positive cells

D. 全生存率 (%)

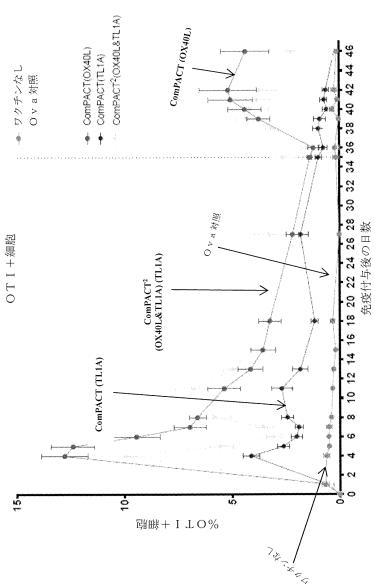
E. 脳腫瘍の大きさ (mm²)

有意差なし

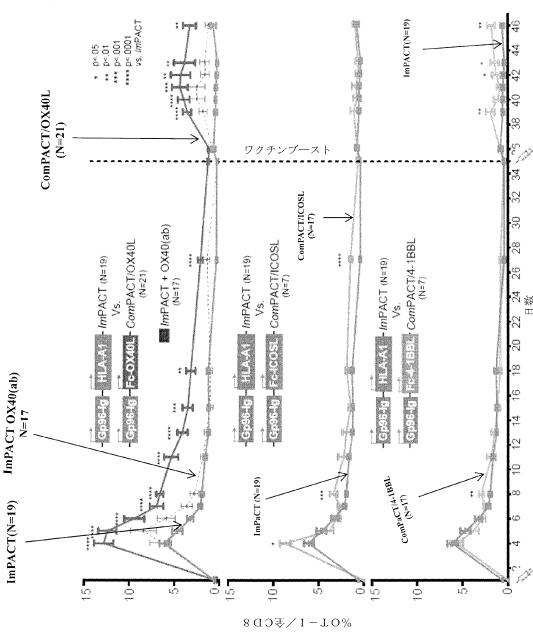
【図12】



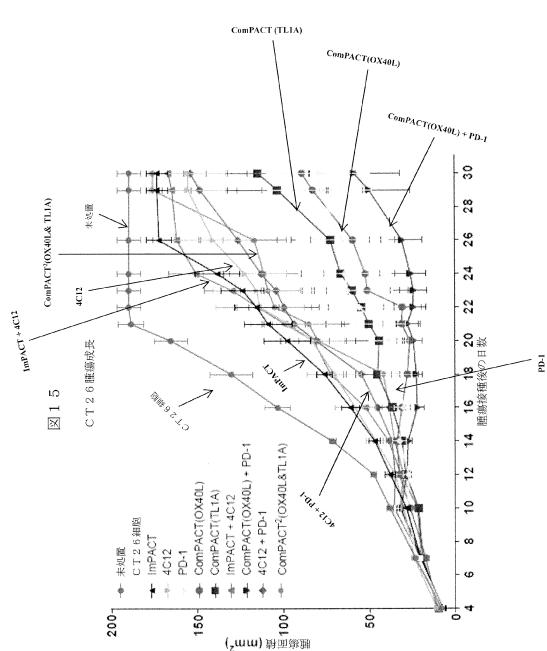
【図13】



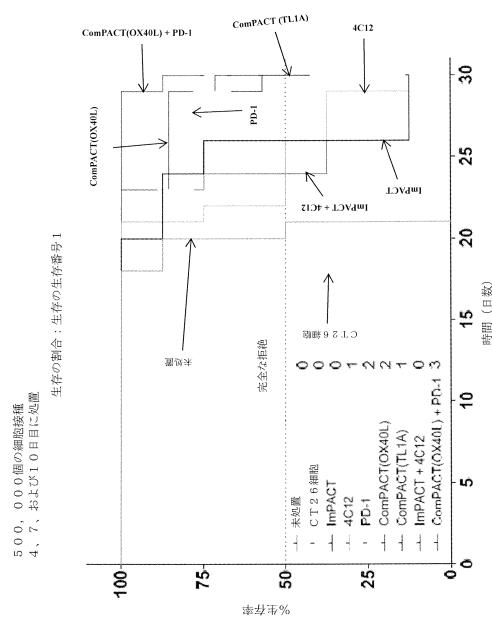
【図14】



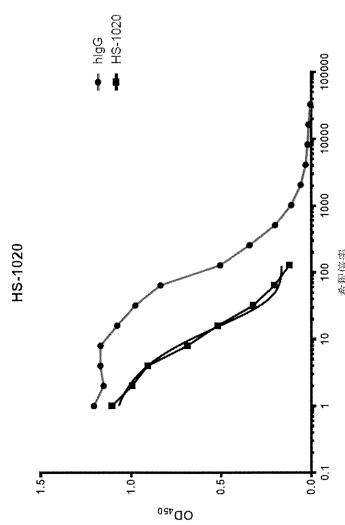
【図15】



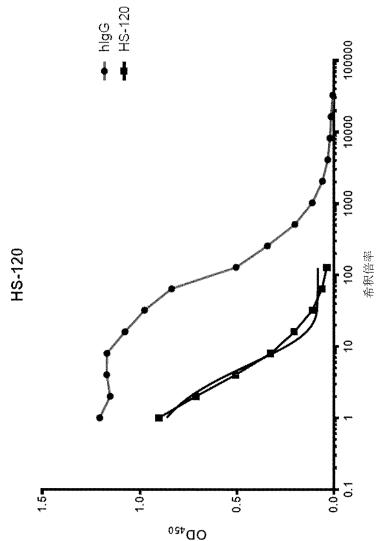
【図16】



【図17】



【図18】



【配列表】

0006744318000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 0 7 K 19/00
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z
		C 1 2 N 7/01

(72)発明者 シュレイバー, テイラ
アメリカ合衆国, ノースカロライナ州 27713, ベイ 12 ダーラム, 801 キャピトラ
ドライブ
(72)発明者 フロムー, ジョージ
アメリカ合衆国, ノースカロライナ州 27713, ベイ 12 ダーラム, 801 キャピトラ
ドライブ

審査官 菊池 美香

(56)参考文献 特表2011-515399 (JP, A)
特表2014-508762 (JP, A)
特表2013-526582 (JP, A)
特表2011-513399 (JP, A)
Journal of Immunology, 2011, Vol.186, No.1, Supp., Meeting Abstract, Abstract No. 165.
10

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 48 / 0 0
A 6 1 K 38 / 1 7
A 6 1 K 39 / 3 9 5
A 6 1 P 35 / 0 0
A 6 1 P 43 / 0 0
C 0 7 K 19 / 0 0
C 1 2 N 7 / 0 1
C 1 2 N 15 / 6 2
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)