

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6068368号
(P6068368)

(45) 発行日 平成29年1月25日 (2017. 1. 25)

(24) 登録日 平成29年1月6日 (2017. 1. 6)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 39/00 (2006. 01)

A 6 1 K 39/00 H

A 6 1 K 45/00 (2006. 01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 36/064 (2006. 01)

A 6 1 K 36/064

A 6 1 K 36/062 (2006. 01)

A 6 1 K 36/062

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 33 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-558234 (P2013-558234)
 (86) (22) 出願日 平成24年3月19日 (2012. 3. 19)
 (65) 公表番号 特表2014-509595 (P2014-509595A)
 (43) 公表日 平成26年4月21日 (2014. 4. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/029636
 (87) 国際公開番号 W02012/125998
 (87) 国際公開日 平成24年9月20日 (2012. 9. 20)
 審査請求日 平成27年3月11日 (2015. 3. 11)
 (31) 優先権主張番号 61/453, 656
 (32) 優先日 平成23年3月17日 (2011. 3. 17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 505226437
 グローブイミュン、インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国、コロラド州 80027
 , ルイヴィル、インフィニト ドライブ
 1450

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵母－ブラキユリ免疫治療組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌を有する個体における癌の転移進行の抑制、停止、逆転、遅延又は予防に使用するための免疫治療組成物であって、

a) 酵母ビヒクル；及び

b) 少なくとも1つのブラキユリ抗原を含む癌抗原
 を含有し、

前記ブラキユリ抗原が、配列番号6、配列番号6の2～435位、配列番号18、配列番号18の2～435位、又は、配列番号18と少なくとも85%同一であり且つ配列番号18の254位のロイシンからパリンへの置換に相当する置換部を含むアミノ酸配列を有する、免疫治療組成物。

【請求項 2】

前記組成物を最初に投与する時点で、前記個体の癌にブラキユリ発現が検出されない、請求項1に記載の免疫治療組成物。

【請求項 3】

前記組成物を最初に投与する時点で、前記個体の癌にブラキユリ発現が検出される、請求項1に記載の免疫治療組成物。

【請求項 4】

前記個体が、I期癌、II期癌、III期癌、又はIV期癌を有する、請求項1に記載の免疫治療組成物。

【請求項 5】

ブラキュリ発現癌の発症の予防、又は遅延に使用するための免疫治療組成物であって、

a) 酵母ビヒクル；及び

b) 少なくとも 1 つのブラキュリ抗原を含む癌抗原

を含有し、

前記ブラキュリ抗原が、配列番号 6、配列番号 6 の 2 ～ 4 3 5 位、配列番号 1 8、配列番号 1 8 の 2 ～ 4 3 5 位、又は、配列番号 1 8 と少なくとも 8 5 % 同一であり且つ配列番号 1 8 の 2 5 4 位のロイシンからバリンへの置換に相当する置換部を含むアミノ酸配列を有する、免疫治療組成物。

【請求項 6】

10

前記個体が、別の癌療法で治療中であるか、又は別の癌療法で治療を受けたことがある、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の免疫治療組成物。

【請求項 7】

前記療法が、化学療法、標的型癌療法、放射線療法、養子 T 細胞移入、又は前記個体からの腫瘍の外科的切除である、請求項 6 に記載の免疫治療組成物。

【請求項 8】

前記療法が、1 つ以上の別の免疫治療組成物の投与である、請求項 6 に記載の免疫治療組成物。

【請求項 9】

前記別の免疫治療組成物が、酵母ビヒクルと、ブラキュリ抗原を含まない第 2 癌抗原とを含有する、請求項 8 に記載の免疫治療組成物。

20

【請求項 10】

前記第 2 癌抗原が、以下：突然変異 R a s、癌胎児性抗原 (C E A)、M U C - 1、E G F R、B C R - A b 1、M A R T - 1、M A G E - 1、M A G E - 3、G A G E、G P - 1 0 0、M U C - 2、P S M A、チロシナーゼ、T R P - 1 (g p 7 5)、N Y - E S O - 1、T R P - 2、T A G 7 2、K S A、C A - 1 2 5、P S A、H E R - 2 / n e u / c - e r b / B 2、h T E R T、p 7 3、B - R A F、腺腫性結腸ポリープ症 (A P C)、M y c、フォン・ヒッペル・リンドウタンパク質 (V H L)、R b - 1、R b - 2、アンドロゲン受容体 (A R)、S m a d 4、M D R 1、F l t - 3、B R C A - 1、B R C A - 2、p a x 3 - f k h r、e w s - f l i - 1、H E R V - H、H E R V - K、T W I S T、メソテリン、及び N G E P からなる群から選択される、請求項 9 に記載の免疫治療組成物。

30

【請求項 11】

前記癌が、乳癌、小腸癌、胃癌、膵臓癌、腎臓癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、肺癌、結腸癌、前立腺癌、慢性リンパ性白血病 (C L L)、エプスタイン・バーウイルス形質転換 B 細胞、パーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、及びこれらの転移性癌からなる群から選択される、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の免疫治療組成物。

【請求項 12】

癌患者における腫瘍細胞の化学療法耐性又は放射線療法耐性の軽減又は予防に使用するための免疫治療組成物であって、前記患者は、癌を有し、かつ化学療法及び／又は放射線療法を受けており、

40

a) 酵母ビヒクル；及び

b) 少なくとも 1 つのブラキュリ抗原を含む癌抗原

を含有し、

前記ブラキュリ抗原が、配列番号 6、配列番号 6 の 2 ～ 4 3 5 位、配列番号 1 8、配列番号 1 8 の 2 ～ 4 3 5 位、又は、配列番号 1 8 と少なくとも 8 5 % 同一であり且つ配列番号 1 8 の 2 5 4 位のロイシンからバリンへの置換に相当する置換部を含むアミノ酸配列を有する、免疫治療組成物。

【請求項 13】

ブラキュリ発現が検出されていない癌を有する個体における癌の治療用の免疫治療組成物

50

であって、

a) 酵母ビヒクルと、ブラキュリ抗原を含まない第1癌抗原とを含有する第1免疫治療組成物；及び

b) 酵母ビヒクルと、ブラキュリ抗原を含む第2癌抗原とを含有する第2免疫治療組成物であって、前記第1免疫治療組成物の投与前、投与と同時に、若しくは連続して、又は投与後に投与される、第2免疫治療組成物

を含み、

前記ブラキュリ抗原が、配列番号6、配列番号6の2～435位、配列番号18、配列番号18の2～435位、又は、配列番号18と少なくとも85%同一であり且つ配列番号18の254位のロイシンからバリンへの置換に相当する置換部を含むアミノ酸配列を有する、免疫治療組成物。

10

【請求項14】

癌を有する個体における癌の治療用の免疫治療組成物であって、

a) 酵母ビヒクルと突然変異Ras抗原を含有する第1免疫治療組成物；

b) 酵母ビヒクルと、癌胎児性抗原(CEA)及びムチン-1(MUC-1)からなる群から選択される抗原とを含有する第2免疫治療組成物；並びに

c) 酵母ビヒクルとブラキュリ抗原を含有する第3免疫治療組成物

を含有し、

前記ブラキュリ抗原が、配列番号6、配列番号6の2～435位、配列番号18、配列番号18の2～435位、又は、配列番号18と少なくとも85%同一であり且つ配列番号18の254位のロイシンからバリンへの置換に相当する置換部を含むアミノ酸配列を有し、

20

前記第1免疫治療組成物、前記第2免疫治療組成物、前記第3免疫治療組成物は、同時、又は順次投与される、免疫治療組成物。

【請求項15】

前記癌が、乳癌、小腸癌、胃癌、膵臓癌、腎臓癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、肺癌、結腸癌、前立腺癌、慢性リンパ性白血病(CLL)、エプスタイン・バーウイルス形質転換B細胞、パーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、及びこれらの転移性癌からなる群から選択される、請求項13又は14に記載の免疫治療組成物。

【請求項16】

30

前記ブラキュリ抗原が、配列番号18又は配列番号6の246～254位を含む、請求項1～15のいずれか1項に記載の免疫治療組成物。

【請求項17】

前記ブラキュリ抗原が、配列番号18の246～254位を含む、請求項1～15のいずれか1項に記載の免疫治療組成物。

【請求項18】

前記ブラキュリ抗原が、配列番号18の254位のロイシンからバリンへの置換に相当する置換部を含む、請求項1～15のいずれか1項に記載の免疫治療組成物。

【請求項19】

癌抗原が、配列番号8又は配列番号20で示されるアミノ酸配列を有する、融合タンパク質である、請求項1～18のいずれか1項に記載の免疫治療組成物。

40

【請求項20】

前記融合タンパク質は、CUP1プロモータの制御下で発現される、請求項19に記載の免疫治療組成物。

【請求項21】

前記酵母ビヒクルが、死滅している全酵母である、請求項1～20のいずれか1項に記載の免疫治療組成物。

【請求項22】

前記全酵母が、熱不活性化されている、請求項21に記載の免疫治療組成物。

【請求項23】

50

前記酵母ビヒクルが、前記抗原を発現する、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の免疫治療組成物。

【請求項 2 4】

前記酵母が、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) からのものである、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の免疫治療組成物。

【請求項 2 5】

前記組成物が、被験者への投与に好適な薬学的に許容される賦形剤で製剤化されている、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の免疫治療組成物。

【請求項 2 6】

免疫治療組成物が、

a) 酵母ビヒクル；

b) 前記酵母ビヒクルに含まれる組換え抗原であって、少なくとも 1 つのブラキュリ抗原を含んでおり、前記ブラキュリ抗原は、配列番号 1 8 と少なくとも 8 5 % 同一であるアミノ酸配列を含むとともにに 2 5 4 位のロイシンがバリンに置換されている、抗原；及び

c) ヒトへの投与に好適な薬学的に許容される賦形剤を含む、酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物。

【請求項 2 7】

前記ブラキュリ抗原が、配列番号 1 8 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 2 6 に記載の酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物。

【請求項 2 8】

前記ブラキュリ抗原が、配列番号 1 8 と少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 2 6 に記載の酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物。

【請求項 2 9】

前記ブラキュリ抗原が、配列番号 1 8 の 2 ~ 4 3 5 位を含む、請求項 2 6 に記載の酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物。

【請求項 3 0】

酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物であって、

a) 不活性化全酵母；及び

b) 配列番号 6 の 2 ~ 4 3 5 位のアミノ酸配列を含むブラキュリ融合タンパク質；を含む、

前記ブラキュリ融合タンパク質が、前記酵母に含まれる組換えタンパク質であり；

該組成物が、ブラキュリ特異的 T 細胞応答を誘発する、酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物。

【請求項 3 1】

酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物であって、

a) 不活性化全酵母；及び

b) 配列番号 1 8 の 2 ~ 4 3 5 位のアミノ酸配列を含むブラキュリ融合タンパク質；を含む、

前記ブラキュリ融合タンパク質が、前記酵母に含まれる組換えタンパク質であり；

該組成物が、ブラキュリ特異的 T 細胞応答を誘発する、酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物。

【請求項 3 2】

請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の免疫治療組成物又は請求項 2 6 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物を製造する方法であって、

a) 酵母が対数増殖期中期に達するまで、 CuSO_4 の非存在下の好適な培地において、CUP 1 プロモータの制御下で、ブラキュリ抗原をコードする組換え核酸分子で形質転換した酵母を培養するステップ；

b) 前記培地に CuSO_4 を添加することによって、前記酵母における前記ブラキュリ抗原の発現を誘導するステップ；

c) ステップ (b) 後の前記酵母を 6 ~ 8 時間以下の時間にわたって培養するステップ

10

20

30

40

50

; 及び

d) 前記酵母を回収するステップ

を含む、方法。

【請求項 33】

疾患の治療に使用するための、請求項 26 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、概して、酵母ベースの免疫治療組成物、並びにブラキュリの発現若しくは過剰発現を特徴とする癌の予防及び/又は治療方法に関する。

【背景技術】

【0002】

「T」としても知られるブラキュリ(Brachyury)は、中胚葉転写因子であり、また、遺伝子のTボックス複合体のメンバーである。ブラキュリをコードする遺伝子(ヒトの場合、T遺伝子又はブラキュリ遺伝子と呼ばれる)は、ヘテロ接合型マウスの尾の長さ及び仙椎に影響を及ぼしたマウスの突然変異によって、ナディン・ドブロボルスカヤ - ザバドスカヤ(Nadine Dobrovolskaia - Zavadskaia)により、1927年に初めて同定された。ブラキュリ遺伝子は、ハーマン(Hermann)ら(非特許文献1)により1990年にマウスで、また、エドワーズ(Edwards)ら(非特許文献2)により、1996年、ヒトにおいてクローン化された。エドワーズ(Edwards)らは、ヒトブラキュリの推定アミノ酸配列も記載している。

【0003】

転写因子のTボックスファミリーのメンバーとして、ブラキュリは、「Tボックス」又はTドメインと呼ばれる、高度に保存されたDNA結合ドメインモチーフを含むが、これは、パリンδροーム共通配列に結合している。ブラキュリは、他のTボックスタンパク質と同様、発生初期に特定の役割を果たすことがわかっており、脊椎動物における後期中胚葉の形成及び分化及び体軸形成に不可欠である(例えば、(非特許文献3); (非特許文献4); (非特許文献5); (非特許文献6); (非特許文献7)を参照)。さらに近年、パレナ(Palena)らは、ブラキュリが、様々なヒト腫瘍組織及び癌細胞系に発現することを証明し、また、ブラキュリのペプチドを用いて、正常なドナー及び癌患者にブラキュリ特異的T細胞系を産生させることができることを明らかにした(非特許文献8)。フェルナンド(Fernando)らによる研究から、ブラキュリは、ヒト腫瘍細胞において上皮間葉移行(EMT: epithelial-mesenchymal transition)を促進し、腫瘍細胞に間葉表現型、並びに遊走及び侵入能力を付与すると共に、腫瘍細胞周期進行を減衰させることがわかっている(非特許文献9)。従って、ブラキュリは、癌の転移進行に関与している。

【0004】

癌は、世界中で主要な死亡原因であり、癌の有効な治療法の開発は、依然として研究及び臨床開発の最も活発な分野の1つである。癌を治療及び予防する様々な革新的手法が提案されているが、多くの癌が依然として高い死亡率を有し、治療が困難であったり、又は従来の治療法に比較的不応性であったりする場合がある。ブラキュリ発現に関連する癌は、乳房、小腸、胃、腎臓、膀胱、子宮、卵巣、精巣、肺、結腸及び前立腺などの様々な組織にみいだされることがあり、転移性及び進行期癌も含まれる。さらに、ブラキュリは、例えば、慢性リンパ性白血病(CLL: chronic lymphocytic leukemia)、エプスタイン - バーウイルス形質転換B細胞、パーキット及びホジキンリンパ腫などのB細胞由来の腫瘍にも発現する。従って、ブラキュリは、多種のヒト癌において特定の役割を果たすようである。ブラキュリは、癌免疫療法の標的とすることが提案されている(例えば、(非特許文献8)、前掲、(非特許文献9)、前掲、及び特許文献1を参照)が、これは比較的新しい癌標的であるため、当分野では、ブラキュリ発現又

10

20

30

40

50

は過剰発現に関連する癌を有効に治療及び／又は予防する新規の免疫療法製剤が依然として求められている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】国際公開第2008/106551号

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】ハーマン(Herrmann)ら著、1990年、ネイチャー(Nature)、343:617~622

10

【非特許文献2】エドワーズ(Edwards)ら著、1996年、ゲノム・リサーチ(Genome Res.)、6:226~223

【非特許文献3】ウィルキンソン(Wilkinson)ら著、1990年、ネイチャー(Nature)、343(6259):657~659

【非特許文献4】ベッディントン(Beddington)ら著、1992年、デベロップメント(Development)(増刊):157~165

【非特許文献5】シュルト-マーカ(Schulte-Merker)ら著、1994年、デベロップメント(Development)、120:1009~1015

【非特許文献6】キスパート(Kispart)及びハーマン(Herrmann)著、1994年、ディベロップメンタル・バイオロジー(Dev. Biol.)161:179~193

20

【非特許文献7】ショーウェル(Showell)ら著、2004年、ディベロップメンタル・ダイナミックス(Dev Dyn)、229:201~218

【非特許文献8】パレナ(Palena)ら著、2007年、クリニカル・カンサー・リサーチ(Clin. Cancer Res.)13(8):2471~2478

【非特許文献9】フェルナンド(Fernando)ら著、2010年、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(J. Clin. Invest.)120(2):533~544

【図面の簡単な説明】

【0007】

30

【図1A】U2及びUL2培地の両方を用いた、酵母-ブラキユリ免疫治療組成物におけるブラキユリの発現の抗ブラキユリによる検出を示すウエスタンブロットのデジタル化画像である。

【図1B】U2及びUL2培地の両方を用いた、酵母-ブラキユリ免疫治療組成物におけるブラキユリの発現の抗Hisによる検出を示すウエスタンブロットのデジタル化画像である。

【図1C】ブラキユリ融合タンパク質上のヘキサヒスチジンタグを識別するための抗Hisを用いた、GI-6305におけるブラキユリアゴニスト抗原の頑健な発現を示す図である。

【図2】酵母-ブラキユリ免疫治療組成物におけるブラキユリの発現を示すウエスタンブロットのデジタル化画像であり、抗原誘導時の細胞密度及び抗原誘導後の回収時点が異なる。

40

【図3A】2サイクルの刺激のために酵母-ブラキユリをパルスした後、ブラキユリCTLペプチドをパルスした、3人の正常なドナーのうち2人からの末梢血液単核細胞(PBMC: peripheral blood mononuclear cells)が、MCF7癌(HLA-A2陽性/ブラキユリ低)の最小溶解で、SW480癌細胞(HLA-A2陽性/ブラキユリ高)を死滅させることができるCD8⁺CTLを産生できることを示すグラフである；(図3A、ドナー07706)。

【図3B】2サイクルの刺激のために酵母-ブラキユリをパルスした後、ブラキユリCTLペプチドをパルスした、3人の正常なドナーのうち2人からの末梢血液単核細胞(PB

50

MC: peripheral blood mononuclear cells) が、MCF7 癌 (HLA-A2 陽性/ブラキュリ低) の最小溶解で、SW480 癌細胞 (HLA-A2 陽性/ブラキュリ高) を死滅させることができる CD8⁺CTL を産生できることを示すグラフである (図3B、ドナー17663)。

【図3C】2サイクルの刺激のために酵母-ブラキュリをパルスした後、ブラキュリCTLペプチドをパルスした、3人の正常なドナーのうち2人からの末梢血液単核細胞 (PBMC: peripheral blood mononuclear cells) が、MCF7 癌 (HLA-A2 陽性/ブラキュリ低) の最小溶解で、SW480 癌細胞 (HLA-A2 陽性/ブラキュリ高) を死滅させることができる CD8⁺CTL を産生できることを示すグラフである (図3C、ドナー26532)。

10

【図4A】酵母-ブラキュリ免疫治療組成物で刺激した健康なドナーPBMC由来のブラキュリ特異的T細胞が、H226 癌細胞 (HLA-A2 陰性/ブラキュリ高) に対して、適切なMHCを有する腫瘍細胞 (SW480、HLA-A2 陽性/ブラキュリ高) を特異的に溶解することを示すグラフである。

【図4B】図4Aに示す実験で用いたSW480及びH226腫瘍細胞において、対照遺伝子 (GAPDH) の発現に対するブラキュリmRNAの発現を示すグラフである。

【図5】精製ブラキュリタンパク質又は対照 - gal タンパク質の表示用量に応答する、酵母-ブラキュリ (GI-6301、丸) 又は対照酵母 (酵母対照、三角) を接種したマウスの脾臓から単離したCD4⁺T細胞の増殖を示すグラフである。

【図6】本発明の酵母-ブラキュリ免疫治療組成物 (GI-6301、丸) の投与が、酵母のみ (ブラキュリ抗原なし) を受けたマウスと比較して、マウスにおけるブラキュリ発現腫瘍を低減する傾向を示すことを明らかにするグラフである。

20

【図7A】ブラキュリ特異的T細胞系、T-2-BR-Aは、HLA-A2四量体と結合する (図7B) が、対照四量体とは結合しない (図7A) ことを示す、フローサイトメトリ分析である。

【図7B】ブラキュリ特異的T細胞系、T-2-BR-Aは、HLA-A2四量体と結合する (図7B) が、対照四量体とは結合しない (図7A) ことを示す、フローサイトメトリ分析である。

【図8】ブラキュリアゴニストペプチドをパルスしたオートログスB細胞による刺激後、ブラキュリ特異的T細胞系、T-2-BR-Aにおけるパーフォリンの発現を示す、フローサイトメトリ分析である。

30

【発明を実施するための形態】

【0008】

本発明の一実施形態は、癌を有する個体における癌の転移進行を抑制、停止、逆転、遅延又は予防する方法に関する。本方法は、転移進行中である癌を有する、転移進行に陥る危険性がある、又は転移進行の開始が予測される個体に、(a) 酵母ビヒクル；及び(b) 少なくとも1つのブラキュリ抗原を含む癌抗原を含有する免疫治療組成物を投与するステップを含む。本発明の別の実施形態は、癌を有する個体における癌の転移進行の抑制、停止、逆転、遅延又は予防を目的とする、酵母ビヒクルと、少なくとも1種のブラキュリ抗原を含む癌抗原とを含有する免疫治療組成物の使用に関する。

40

【0009】

本発明のこれらの実施形態の一態様では、組成物を最初に投与する時点で、個体の癌にブラキュリは検出されない。一態様では、組成物を最初に投与する時点で、個体の癌にブラキュリ発現が検出される。個体は、I期癌、II期癌、III期癌、又はIV期癌を有する。

【0010】

本発明の別の実施形態は、ブラキュリ発現癌の発症を予防する、又は遅延させる方法に関する。本方法は、(a) 酵母ビヒクル；及び(b) 少なくとも1つのブラキュリ抗原を含む癌抗原を含有する免疫治療組成物を個体に投与するステップを含む。本発明の別の実施形態は、ブラキュリ発現癌の発症の予防又は遅延を目的とする、酵母ビヒクルと、少な

50

くとも1つのブラキユリ抗原を含む癌抗原とを含有する免疫治療組成物の使用に関する。

【0011】

本発明の一態様では、個体において癌は検出されていない。一態様において、個体は、癌を発生するリスクが高い（例えば、遺伝的素因により）。一態様において、個体は、前癌病変を有する。

【0012】

これら実施形態の一態様において、個体は、癌を有するが、ブラキユリ発現癌細胞は、この癌に検出されていない。一態様では、癌は、まだ転移性ではない。一態様では、癌は、転移するリスクが高い。一態様では、被験者は、I期癌を有する。一態様では、被験者は、II期癌を有する。

10

【0013】

本発明の別の実施形態は、癌を有する患者における腫瘍細胞の化学療法耐性又は放射線耐性を軽減又は予防する方法に関する。本方法は、癌を有し、かつ、化学療法及び/又は放射線療法を受けている個体に、(a)酵母ビヒクル；及び(b)少なくとも1つのブラキユリ抗原を含む癌抗原を含有する免疫治療組成物を投与するステップを含む。本発明の別の実施形態は、癌を有する患者における腫瘍細胞の化学療法耐性又は放射線耐性の軽減又は予防を目的とする、酵母ビヒクルと、少なくとも1つのブラキユリ抗原を含む癌抗原とを含有する免疫治療組成物の使用に関する。本発明のこの実施形態の一態様では、組成物を最初に投与する時点で、個体の癌にブラキユリは検出されない。一態様では、組成物を最初に投与する時点で、個体の癌にブラキユリ発現が検出される。

20

【0014】

本発明のさらに別の実施形態は、癌を治療する方法に関する。本方法は、(a)ブラキユリ発現が検出されていない癌を有する個体に、酵母ビヒクルと、ブラキユリ抗原を含まない第1癌抗原とを含有する第1免疫治療組成物を投与するステップ；及び(b)個体に、第1免疫治療組成物の投与前、投与と同時に、連続して、又は投与後に、酵母ビヒクルと、ブラキユリ抗原を含む第2癌抗原とを含有する第2免疫治療組成物を投与するステップを含む。一態様では、本方法は、ステップ(a)において、1つ以上の別の免疫治療組成物を投与することをさらに含み、ここで、1つ以上の別の免疫治療組成物の各々は、別の癌抗原を含む。前述したいずれかの実施形態の一態様では、癌抗原は、以下のものから選択される：突然変異Ras、癌胎児性抗原(CEA: carcinoembryonic antigen)、MUC-1、EGFR、BCR-Ab1、MART-1、MAGE-1、MAGE-3、GAGE、GP-100、MUC-2、PSMA、チロシナーゼ、TRP-1(gp75)、NY-ESO-1、TRP-2、TAG72、KSA、CA-125、PSA、HER-2/neu/c-erb/B2、hTERT、p73、BRAF、腺腫性結腸ポリープ症(APC: adenomatous polyposis coli)、Myc、フォン・ヒッペル・リンドウタンパク質(VHL: von Hippel-Lindau protein)、Rb-1、Rb-2、アンドロゲン受容体(AR: androgen receptor)、Smad4、MDR1、Flt-3、BRCA-1、BRCA-2、pax3-fkhr、ews-flt-1、HERV-H、HERV-K、TWIST、メソテリン、及びNGEP。一態様では、癌抗原は、突然変異Ras、癌胎児性抗原(CEA)、及びMUC-1からなる群から選択される。本発明の別の実施形態は、癌の治療を目的とする、免疫治療組成物の組合せの使用に関し、免疫治療組成物は、(a)酵母ビヒクルと、ブラキユリ抗原を含まない第1癌抗原とを含有する第1免疫治療組成物；及び(b)酵母ビヒクルと、ブラキユリ抗原を含む第2癌抗原とを含有する第2免疫治療組成物を含む。

30

40

【0015】

本発明のまた別の実施形態は、癌を治療する方法に関する。本方法は、(a)癌を有する個体に、酵母ビヒクルと、突然変異Rasを含有する第1免疫治療組成物を投与するステップ；(b)(a)の個体に、酵母ビヒクルと癌胎児性抗原(CEA)及びムチン-1(MUC-1)からなる群から選択される抗原とを含有する第2免疫治療組成物を投与す

50

るステップ；並びに（ｃ）（ａ）及び（ｂ）の個体に、酵母ビヒクルとブラキュリ抗原を含有する第３免疫治療組成物を投与するステップを含む。一態様において、（ａ）、（ｂ）及び（ｃ）の投与ステップは同時に行う。本発明の別の実施形態は、癌の治療を目的とする、免疫治療組成物の組合せの使用に関し、免疫治療組成物は、（ａ）酵母ビヒクルと突然変異 R a s 抗原を含有する第１免疫治療組成物；（ｂ）酵母ビヒクルと、癌胎児性抗原（C E A）及びムチン - 1（M U C - 1）からなる群から選択される抗原とを含有する第２免疫治療組成物；並びに（ｃ）酵母ビヒクルとブラキュリ抗原を含有する第３免疫治療組成物を含む。

【 0 0 1 6 】

個体が、癌又は前癌病変を有する、上記又は本明細書の他所に記載される本発明の実施形態若しくは態様のいずれかにおいて、本発明の一態様では、個体は治療中であるか、又は別の癌療法で治療したことがある。例えば、このような療法としては、限定するものではないが、化学療法、標的癌療法、放射線療法、T細胞移入、及び／又は１種以上の別の免疫治療組成物の投与が挙げられる。一態様では、別の免疫治療組成物は、酵母ビヒクルと、ブラキュリ抗原を含まない第２癌抗原とを含有する。第２癌抗原としては、限定するものではないが、以下のものを挙げることができる：突然変異 R a s、癌胎児性抗原（C E A）、M U C - 1、E G F R、B C R - A b 1、M A R T - 1、M A G E - 1、M A G E - 3、G A G E、G P - 1 0 0、M U C - 2、P S M A、チロシナーゼ、T R P - 1（g p 7 5）、N Y - E S O - 1、T R P - 2、T A G 7 2、K S A、C A - 1 2 5、P S A、H E R - 2 / n e u / c - e r b / B 2、h T E R T、p 7 3、B - R A F、腺腫性結腸ポリープ症（A P C）、M y c、フォン・ヒッペル・リンドウタンパク質（V H L）、R b - 1、R b - 2、アンドロゲン受容体（A R）、S m a d 4、M D R 1、F l t - 3、B R C A - 1、B R C A - 2、p a x 3 - f k h r、e w s - f l i - 1、H E R V - H、H E R V - K、T W I S T、メソテリン、及び N G E P。一態様では、第２癌抗原は、突然変異 R a s、癌胎児性抗原（C E A）、及び M U C - 1 から選択される。

【 0 0 1 7 】

上記又は本明細書の他所に記載される本発明の実施形態若しくは態様のいずれかの一態様では、本方法又は使用によって、個体における腫瘍負荷が軽減し、個体の生存期間が延び、及び／又は個体における腫瘍増殖が阻害される。

【 0 0 1 8 】

上記又は本明細書の他所に記載される本発明の実施形態若しくは態様のいずれかの一態様では、本方法は、個体からの腫瘍の外科的切除をさらに含む。

上記又は本明細書の他所に記載される本発明の実施形態若しくは態様のいずれかの一態様では、癌は、上皮細胞に由来する。一態様では、癌として、限定するものではないが、乳癌、小腸癌、胃癌、膵臓癌、腎臓癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、肺癌、結腸癌、前立腺癌、慢性リンパ性白血病（C L L）、エプスタイン・バーウイルス形質転換 B 細胞、パーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、又はこれらの転移性癌が挙げられる。

【 0 0 1 9 】

上記又は本明細書の他所に記載される本発明の実施形態若しくは態様のいずれかの一態様では、ブラキュリ抗原は、完全長ヒトブラキュリである。一態様では、ブラキュリ抗原は、完全長ヒトブラキュリではない。一態様では、ブラキュリ抗原は、配列番号 6、配列番号 1 8、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列、又は配列番号 6、配列番号 1 8、若しくは配列番号 2 と少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を有する。一態様では、ブラキュリ抗原は、配列番号 6、配列番号 1 8、若しくは配列番号 2 の少なくとも 1 又は 2 位から、2 5 5 位～C 末端の間までを含む。一態様では、ブラキュリ抗原は、配列番号 6、配列番号 1 8、若しくは配列番号 2 の少なくとも 1 又は 2 位から、4 3 0 位～C 末端の間までを含む。一態様では、ブラキュリ抗原は、配列番号 6、配列番号 1 8、若しくは配列番号 2 の 2 4 6 位～2 5 4 位を含む。一態様では、ブラキュリ抗原は、配列番号 6、配列番号 6 の 2～4 3 5 位、又は配列番号 6 と少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含む。一態様では、ブラキュリ抗原は、配列番号 1 8、配列番号 1 8 の 2～4 3 5 位、又は配

10

20

30

40

50

列番号 18 と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む。一態様では、ブラキュリ抗原は、配列番号 2、配列番号 2 の 2 ~ 435 位、又は配列番号 2 と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む。一態様では、ブラキュリ抗原は、配列番号 6、配列番号 6 の 2 ~ 435 位、又は配列番号 6 と少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を含む。一態様では、ブラキュリ抗原は、配列番号 18、配列番号 18 の 2 ~ 435 位、又は配列番号 18 と少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を含む。一態様では、ブラキュリ抗原は、配列番号 2、配列番号 2 の 2 ~ 435 位、又は配列番号 2 と少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を含む。一態様では、癌抗原は、長さが少なくとも 25 アミノ酸である。一態様では、ブラキュリ抗原は、長さが少なくとも 25 アミノ酸である。一態様では、ブラキュリ抗原は、長さが 30 超のアミノ酸である。一態様では、癌抗原は、ブラキュリの 2 つ以上の免疫原性ドメインを含む。

10

【0020】

上記又は本明細書の他所に記載される本発明の実施形態若しくは態様のいずれかの一態様において、癌抗原は、融合タンパク質である。一態様では、融合タンパク質は、配列番号 8 で示されるアミノ酸配列、又は配列番号 8 と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を有する。一態様では、融合タンパク質は、配列番号 20 で示されるアミノ酸配列、又は配列番号 20 と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を有する。

【0021】

本発明の別の実施形態は、酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物に関し、免疫治療組成物は、(a) 酵母ビヒクル；及び (b) 酵母ビヒクルによって発現され、少なくとも 1 つのブラキュリ抗原を含む抗原を含有し、ここで、ブラキュリ抗原は、配列番号 6、配列番号 18 若しくは配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の 30 超アミノ酸を含む。一態様では、ブラキュリ抗原は、配列番号 6、配列番号 18 若しくは配列番号 2 と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を有する。一態様では、ブラキュリ抗原は、配列番号 6、配列番号 18 若しくは配列番号 2 の少なくとも 1 又は 2 位から、255 位と C 末端との間までを含む。一態様では、ブラキュリ抗原は、配列番号 6、配列番号 18 若しくは配列番号 2 の少なくとも 1 又は 2 位から、430 位 ~ C 末端の間までを含む。一態様では、ブラキュリ抗原は、配列番号 6、配列番号 18 若しくは配列番号 2 の 246 ~ 254 位を含む。一態様では、ブラキュリ抗原は、配列番号 6、配列番号 6 の 2 ~ 435 位、又は配列番号 6 と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む。一態様では、ブラキュリ抗原は、配列番号 18、配列番号 18 の 2 ~ 435 位、又は配列番号 18 と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む。一態様では、ブラキュリ抗原は、配列番号 2、配列番号 2 の 2 ~ 435 位、又は配列番号 2 と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む。一態様では、ブラキュリ抗原は、配列番号 6、配列番号 6 の 2 ~ 435 位、又は配列番号 6 と少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を含む。一態様では、ブラキュリ抗原は、配列番号 18、配列番号 18 の 2 ~ 435 位、又は配列番号 18 と少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を含む。一態様では、ブラキュリ抗原は、配列番号 2、配列番号 2 の 2 ~ 435 位、又は配列番号 2 と少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を含む。一態様では、癌抗原は、融合タンパク質である。一態様では、融合タンパク質は、配列番号 8 であるアミノ酸配列、又は配列番号 8 と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を有する。一態様では、融合タンパク質は、配列番号 20 のアミノ酸配列、又は配列番号 20 と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を有する。一態様では、酵母ビヒクルは、全酵母である。一態様では、全酵母を熱不活性化する。

20

30

40

【0022】

本発明の別の実施形態は、(a) 不活性化全酵母；及び (b) 配列番号 6 の 2 ~ 435 位のアミノ酸配列を含むブラキュリ融合タンパク質を含有する酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物に関する。ブラキュリ融合タンパク質の発現は、プロモータ CUP1 の制御下であり、ブラキュリ融合タンパク質は、酵母によって発現され、上記組成物は、ブラキュリ特異的 T 細胞応答を誘発する。一態様では、融合タンパク質は、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む。

50

【 0 0 2 3 】

本発明のさらに別の実施形態は、(a) 不活性化全酵母；及び(b) 配列番号 1 8 の 2 ~ 4 3 5 位のアミノ酸配列を含むブラキュリ融合タンパク質を含有する酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物に関する。ブラキュリ融合タンパク質の発現は、プロモータ C U P 1 の制御下にあり、ブラキュリ融合タンパク質は、酵母によって発現され、上記組成物は、ブラキュリ特異的 T 細胞応答を誘発する。一態様では、融合タンパク質は、配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 2 4 】

上記又は本明細書の他所に記載される本発明の実施形態若しくは態様のいずれかの一態様において、酵母ビヒクルは、全酵母である。一態様では、全酵母を死滅させる。一態様では、全酵母を熱不活性化する。一態様では、酵母は、抗原を発現する。一態様では、酵母は、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*)、カンジダ属 (*Candida*)、クリプトコッカス属 (*Cryptococcus*)、ハンセヌラ属 (*Hansenula*)、クルイベロミセス属 (*Kluyveromyces*)、ピキア属 (*Pichia*)、ロドトルラ属 (*Rhodotorula*)、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*) 及びヤロウィア属 (*Yarrowia*) からなる群から選択される属からのものである。一態様では、酵母は、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) からのものである。一態様では、酵母は、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) からのものである。

【 0 0 2 5 】

上記又は本明細書の他所に記載される本発明の実施形態若しくは態様のいずれかの一態様において、組成物は、被験者への投与に好適な薬学的に許容される賦形剤で製剤化される。

【 0 0 2 6 】

本発明のさらにまた別の実施形態は、疾患の治療を目的とする、本明細書に記載の酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物のいずれかの使用に関する。一態様では、疾患は癌である。一態様では、疾患は、感染因子に関連する。一態様では、疾患は、ウイルス又はウイルス感染に関連する。このようなウイルスとして、限定するものではないが、エプスタイン・バーウイルス (E B V : Epstein Barr Virus) を挙げることができる。

【 0 0 2 7 】

本発明の別の実施形態は、エプスタイン・バーウイルス (E B V) 感染に関連する疾患若しくは状態を治療又は予防する方法に関する。本方法は、本明細書に記載する酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物のいずれかを個体に投与するステップを含む。

【 0 0 2 8 】

本発明のまた別の実施形態は、酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物を製造する方法に関する。本方法は、(a) 酵母が、対数増殖期中期に達するまで、C u S O ₄ の非存在下、好適な培地において、C U P 1 プロモータの制御下でブラキュリ抗原をコードする組換え核酸分子で形質転換した酵母を培養するステップ；(b) 培地に C u S O ₄ を添加することによって、酵母においてブラキュリ抗原の発現を誘導するステップ；(c) ステップ (b) 後の酵母を 6 ~ 8 時間以下の時間にわたって培養するステップ；及び(d) 酵母を回収するステップを含む。一態様では、ステップ (a) の酵母を、総培養量の 1 ミリリットル当たり 1 . 0 ~ 2 . 0 Y . U . の細胞密度まで培養する。一態様では、ステップ (a) の酵母を、総培養量の 1 ミリリットル当たり 1 . 0 ~ 1 . 5 Y . U . の細胞密度まで培養する。一態様では、ステップ (a) ~ (c) において、p H が p H 5 . 5 以上に維持された培地中で酵母を培養する。一態様では、ステップ (d) 後の酵母を熱不活性化するステップをさらに含む。例えば、一態様では、約 5 6 °C で約 1 時間酵母を熱不活性化する。この実施形態の別の態様では、薬学的に許容される賦形剤を用いて、注射用に酵母を製剤化することができる。一態様では、酵母は、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) からのものである。一態様では、酵母は、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) からのものである。

10

20

30

40

50

haromyces cerevisiae)からのものである。

【0029】

(発明の詳細な説明)

本発明は、概して、ブラキュリを発現若しくは過剰発現する癌の予防及び/又は治療を目的とする、酵母ベースの免疫治療組成物並びに方法に関する。本発明は、酵母ビヒクルと、ブラキュリ抗原又はその免疫原性ドメインとを含有する酵母ベースの免疫治療組成物(酵母ベース免疫療法とも呼ぶ)(また、本明細書では、「酵母-ブラキュリ免疫療法」又は「酵母-ブラキュリ免疫治療組成物」とも呼ぶ)の使用に関する。本発明者らは、本明細書において、新規の酵母-ブラキュリ免疫治療製剤の構築及び製造について説明し、酵母-ブラキュリ免疫療法が、正常な個体及び癌患者由来の、ブラキュリ特異的T細胞(CD8⁺CTLなど)を増殖させることを証明する。さらに、酵母-ブラキュリ免疫治療組成物で免疫したマウスは、*in vivo*でブラキュリ特異的T細胞応答を起こし、これらのマウスにおいて、ブラキュリ発現腫瘍の増殖が阻害された。これらを考え合わせると、本明細書に提示するデータは、酵母-ブラキュリ免疫療法が、ブラキュリ特異的細胞性免疫応答(CD4⁺及びCD8⁺)の誘発、並びにブラキュリ発現腫瘍の予防及び治療に有用であり、転移性癌及び関連する状態の予防及び/又は治療のための新規療法を提供することを示している。

【0030】

本発明において有用な酵母-ブラキュリ免疫治療組成物は、複数の理由のために、ブラキュリ発現癌を有効にターゲティングするように独自に設計される。第1に、ブラキュリは、EMTプロセスに関与しているため、特定の理論に拘束されるわけではないが、本発明者らは、これが、進行期腫瘍及び転移プロセスに特定の役割を果たしていると考えられる。従って、本発明の一態様では、酵母-ブラキュリ免疫療法は、腫瘍細胞が運動性を獲得し始め、他の組織に侵入する前、又はその間の時点で、腫瘍細胞をターゲティングし、これによって、転移性癌及び/又は癌の進行、特に転移性癌の発症を予防、阻害、停止、逆転若しくは遅延させるのに有効である。従来の癌療法が失敗すると、治療の選択肢がほとんどなくなりうる進行期癌、特に転移性癌の有効な治療法が強く求められている。酵母-ブラキュリは、このような癌を治療する、若しくは遅延、阻害、逆転させる、又は完全に予防する新規の手法を提供する。さらに、酵母-ブラキュリ免疫療法は、早期癌を有する個体における転移性癌若しくは癌の進行を予防又は遅延させるのに用いることができる。この療法は、一実施形態において、転移進行の速度が高い癌に有用であり、また、癌の進行を停止させるのに有用となりうる。さらには、酵母-ブラキュリ免疫療法は、前癌(前悪性)病変又は腫瘍を有する個体、癌(特に転移速度が高いもの)を発生する危険性が高い個体に有用であり、また、癌の予防のための予防薬として、正常な個体にも有用であり、これは、本明細書に記載するような他の癌予防療法と併用してもよい。

【0031】

酵母-ブラキュリ免疫療法はまた、化学療法及び放射線療法などの他の癌治療を受けている個体にも利益を提供する。より具体的には、転移性癌は、いくつかの症例において、原発癌より、化学療法及び/又は放射線療法に対して耐性であることがわかっている。従って、本発明の酵母-ブラキュリ免疫治療組成物を用いて、癌におけるブラキュリ発現を阻害する(そして、これによって、抗増殖への影響を阻害する)ことにより、転移性癌に起こりうる化学療法耐性又は放射線耐性を排除することができるため、本発明の組成物は、個体における化学療法又は放射線療法の性能を増強しうる。

【0032】

酵母-ブラキュリ免疫療法はまた、本来非腫瘍学的である、又は悪性形質転換に先立って起こりうるブラキュリ発現に関連する状態又は疾患を治療するのに用いることもできる。例えば、感染因子、例えば、エプスタイン・バーウイルス(EBV)に感染した細胞において、ブラキュリを上方制御してもよい。従って、酵母-ブラキュリ免疫治療を用いて、ブラキュリ発現に関連するあらゆる疾患又は状態、例えば、限定するものではないが、感染症、例えば、限定するものではないが、EBV関連の病状(例えば、単核症)などの

ウイルス感染症を治療又は予防することができる。

【 0 0 3 3 】

さらに、酵母 - ブラキユリ免疫療法は、同じ酵母組成物内の別の腫瘍抗原の使用、又は他の腫瘍抗原を（連続的又は同時に）ターゲティングする他の酵母ベース免疫治療薬、若しくはその他の癌免疫治療薬及び治療／療法との併用に合わせて容易に改変可能である。従って、酵母 - ブラキユリ免疫療法は、癌の種類、癌の段階、癌の悪性度、腫瘍によって発現される抗原、及び個体の健康状態全般に合わせて（すなわち、この療法は、容易に個人化される）、並びにすでに癌を有する個体のために、改変することができ、様々な腫瘍段階で最大の効果をもたらすために、その使用は、個体における癌の進行に応じて変更することができる。酵母 - ブラキユリ免疫療法は、多様な癌の広範囲の予防的及び／又は治療的治療のための、精巧かつ有効な、個人化された手法を設計する機会を提供する。

10

【 0 0 3 4 】

本明細書に記載する酵母 - ブラキユリ組成物は、先天性免疫応答、並びに標的抗原（ブラキユリ）に対する適応免疫応答、例えば、CD4 依存性 TH17 及び TH1 T 細胞応答並びに抗原特異的 CD8⁺ T 細胞応答（細胞傷害性 T リンパ球（CTL）応答など）を誘導するが、これらはすべて、外来性アジュバント、サイトカイン、又は他の免疫刺激分子（これらの多くが毒性の問題を有する）を使わずに行われる。さらに、酵母 - ブラキユリ免疫治療組成物は、調節 T 細胞（Treg）の数及び／又は機能性を阻害することにより、通常、例えば、腫瘍の存在によって抑制される可能性があるエフェクター T 細胞応答を増強する。さらにまた、抗体応答を引き起こすことにより免疫する免疫治療組成物と比較して、酵母 - ブラキユリ免疫療法によって誘発される抗原特異的で、広範囲かつ強力な細胞性免疫応答は、腫瘍細胞をターゲティングするのに特に有効であると考えられる。実際に、多くの研究から、MHC クラス I 分子に関して、腫瘍細胞が、腫瘍ペプチドを認識する CD8⁺ CTL を介してターゲティングされると、免疫治療手法が増強されることが証明されている。

20

【 0 0 3 5 】

酵母 - ブラキユリ免疫療法は、抗原提示細胞を活性化することに非常に優れており、免疫応答をクロスプライミングする特有の能力を有し、他の場合であれば抑制的な環境となりうるものであっても、腫瘍に対して一般的に有効な CD8⁺ CTL 応答を引き起こす。このタイプの免疫療法は、関連免疫原を提示する抗原提示細胞の天然の能力を利用するため、本発明の有効な免疫治療薬を生産するのに、ブラキユリの CTL エピトープ又は MHC クラス II エピトープの正確なアイデンティティを知る必要がない。実際、単一の酵母 - ブラキユリ免疫治療組成物において、複数の CD4⁺ 及び CD8⁺ T 細胞エピトープをターゲティングすることができるため、本発明の酵母 - ブラキユリ免疫治療薬は、短いペプチドの使用に限定されず、実際に、これらの組成物では、より長いポリペプチド及び融合タンパク質の使用が効果的である。従って、酵母 - ブラキユリ免疫療法を用いることによって、推定 T 細胞エピトープを同定するためのアルゴリズム及び複雑な式を使用する必要がなくなる。

30

【 0 0 3 6 】

さらに、ブラキユリは、ほとんどの正常な（非腫瘍）組織によって発現されず、典型的に、腫瘍細胞に過剰発現されることから、正常な組織に関する「オフターゲット（off-target）」効果の心配がない。前述したように、酵母 - ブラキユリは、外来性アジュバント、免疫刺激剤若しくは分子、共刺激分子、又はサイトカインを使用せずに、免疫プロトコル（予防又は治療）に用いることができるが、必要に応じて、このような薬剤を含んでもよい。さらに、酵母 - ブラキユリ免疫療法は、他のタイプの免疫療法では問題となるような、効力の喪失なしに、繰返し投与することができる。

40

【 0 0 3 7 】

本発明の組成物

本発明の一実施形態は、ブラキユリ発現又は過剰発現を特徴とする癌（早期には、検出可能なブラキユリを発現する細胞を含まないこともあるが、癌発生の進行期に、ブラキユ

50

りを発現する細胞を含みうる、又は含むことになる癌を含む)を予防及び/又は治療するために用いることができる酵母ベースの免疫療法組成物に関する。この組成物は、(a)酵母ビヒクルと;(b)1つ以上のブラキユリ抗原及び/又はその免疫原性ドメインを含む癌抗原とを含有する酵母-ブラキユリ免疫療法組成物である。ブラキユリ抗原又はその免疫原性ドメインは、最も一般的には、酵母ビヒクルによって(例えば、インタクトな酵母又は酵母スフェロプラストにより;尚、これらは、任意選択で、酵母サイトプラスト、酵母ゴースト、若しくは酵母膜抽出物又はその画分にさらに処理してもよい)、組換えタンパク質として発現されるが、本明細書に記載するように、1つ以上のブラキユリ抗原を酵母ビヒクルにロードするか、又はそうでなければ酵母ビヒクルと複合体形成する、結合する、混合若しくは投与して、本発明の組成物を形成することは、本発明の一実施形態である。

10

【0038】

「酵母-ブラキユリ免疫療法組成物」は、少なくとも1つのブラキユリ抗原又はその免疫原性ドメインを含有する特定のタイプの「酵母ベースの免疫療法組成物」である。「酵母ベースの免疫療法組成物」というフレーズは、「酵母ベースの免疫療法製剤」、「酵母ベースの免疫療法組成物」、「酵母ベースの組成物」、「酵母ベースの免疫療法薬」、「酵母ベースのワクチン」、又はこれらのフレーズの派生語と置換え可能に用いられうる。

「免疫療法組成物」は、被験者において少なくとも1つの治療利益を達成するのに十分な免疫応答を誘発する組成物である。本明細書で用いる場合、酵母ベースの免疫療法組成物とは、酵母ビヒクル成分を含み、かつ、被験者において少なくとも1つの治療利益を達成するのに十分な免疫応答を誘発する組成物を指す。さらに具体的には、酵母ベースの免疫療法組成物は、酵母ビヒクル成分と、典型的には、抗原成分を含み、かつ、免疫応答、例えば、限定するものではないが、T細胞性免疫応答などの細胞性免疫応答を誘発又は誘導することができる組成物である。一態様では、本発明で有用な酵母ベースの免疫療法組成物は、CD8⁺及び/又はCD4⁺T細胞性免疫応答を、また一態様では、特に標的抗原(例えば、癌抗原)に対して、CD8⁺及びCD4⁺T細胞性免疫応答を誘導することができる。CD4⁺免疫応答としては、TH1免疫応答、TH2免疫応答、TH17免疫応答、又はこれらのいずれかの組合せを挙げることができる。酵母ベースの免疫療法薬は、特に、TH1及びTH17応答を引き起こすことができる。CD8⁺免疫応答としては、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答が挙げられ、酵母ベースの免疫療法薬は、このような応答を引き起こすことができる。一態様では、酵母ベースの免疫療法組成物は、被験者における調節T細胞(Treg)の数及び/又は機能性を調節する。酵母ベースの免疫療法はまた、例えば、サイトカイン、抗体の添加、及び/又は酵母の製造過程を調節することにより、1つのタイプの応答を別の応答に対して促進するように改変することもできる。任意選択で、酵母ベースの免疫療法組成物は、液性免疫応答を誘発することができる。

20

30

【0039】

本発明の酵母-ブラキユリ免疫療法組成物は、「予防的」又は「治療的」のいずれであってもよい。予防的に提供される場合、本発明の組成物は、ブラキユリ発現癌の発生前、又は発生の検出前に、ブラキユリ発現腫瘍の発生を予防、阻害又は遅延させる目的で;並びに/又は腫瘍の遊走及び/若しくは他の組織の腫瘍侵入(転移)を予防若しくは遅延させる、並びに/又は一般的には、個体における癌の進行を予防若しくは阻害することを目的として提供する。本明細書に述べるように、ブラキユリは、進行期癌などの複数の癌に発現され、EMTプロセスに関与することが明らかにされているが、これは、転移性癌などの腫瘍の侵襲性及び遊走に関連する過程である。従って、予防的組成物は、癌がないと思われる個体(健康、若しくは正常な個体)、又は前癌性(前悪性病変)を有する個体、及び癌を有するが、ブラキユリはまだ検出されていない(すなわち、癌における腫瘍細胞によるブラキユリの発現前の)個体に、投与することができる。癌、特に、ブラキユリ発現及び/又は転移が典型的に関連する癌を発生する危険性が高い個体は、本発明の組成物で、予防的に治療することができる。治療として提供される場合、免疫療法組成物は、ブラキユリ発現癌を有する個体に、例えば、個体における腫瘍負荷を低減する;個体におけ

40

50

る腫瘍増殖を阻害する；個体の生存期間を延ばす；腫瘍遊走及び／若しくは他の組織の腫瘍侵入の発生（転移性癌）を予防、阻害、逆転若しくは遅延させる、並びに／又は個体における癌の進行を予防、阻害、逆転若しくは遅延させることによって、癌を改善することを目標として提供される。一態様では、酵母－ブラキュリ免疫療法を治療的に用いて、癌におけるブラキュリ発現を阻害することによって、転移性癌に起こりうる化学療法又は放射線療法耐性を阻害、軽減若しくは排除する。従って、本発明の組成物は、個体における化学療法又は放射線療法の性能を増強しうる。

【0040】

典型的に、酵母ベースの免疫治療組成物は、酵母ビヒクルと、ブラキュリ抗原又はその免疫原性ドメインを含む少なくとも1つの癌抗原とを含有し、ここで、癌抗原は、酵母ビヒクルによって発現させるか、これに結合、ロード、又はこれと混合する。いくつかの実施形態では、癌抗原、ブラキュリ抗原、又はその免疫原性ドメインは、融合タンパク質として提供される。本発明の組成物及び方法に使用するのに好適な複数のブラキュリタンパク質及び融合タンパク質を以下に記載する。いくつかの実施形態では、癌抗原及びブラキュリ抗原は、同じエレメントである。いくつかの実施形態では、癌抗原は、ブラキュリ抗原以外に、他の癌抗原などの別の癌抗原を含む。本発明の一態様では、癌抗原として有用な融合タンパク質は、2種以上の抗原、例えば、ブラキュリ抗原と、ブラキュリ抗原ではない別の癌抗原、又は2つの異なるブラキュリ抗原を含んでもよい。一態様では、融合タンパク質は、1種以上の抗原の2つ以上の免疫原性ドメイン、例えば、ブラキュリ抗原の2つ以上の免疫原性ドメイン、又は1種以上の抗原の2つ以上のエピトープ、例えば、ブラキュリ抗原の2つ以上のエピトープを含んでもよい。

【0041】

本発明によれば、酵母－ブラキュリ免疫治療組成物に用いられる酵母ビヒクルは、任意の酵母細胞（例えば、全酵母若しくはインタクトな細胞）又はその誘導体（以下を参照）であり、本発明の組成物（例えば、治療又は予防組成物）において、1種以上の抗原、その免疫原性ドメイン若しくはそのエピトープと一緒に用いことができる。従って、酵母ビヒクルとして、限定するものではないが、以下のものを挙げることができる：生存しているインタクトな（全）酵母微生物（すなわち、細胞壁などのその成分をすべて有する酵母細胞）、死滅（死んだ）若しくは不活性化インタクトな酵母微生物、又はインタクトな酵母の誘導体、例えば、酵母スフェロプロスト（すなわち、細胞壁のない酵母細胞）、酵母サイトプラスト（すなわち、細胞壁と核がない酵母細胞）、酵母ゴースト（すなわち、細胞壁、核、及び細胞質のない酵母細胞）、細胞下（subcellular）酵母膜抽出物又はその画分（酵母膜粒子とも呼ばれ、以前は細胞下酵母粒子と呼ばれていた）、その他あらゆる酵母粒子、又は酵母細胞壁調製物。

【0042】

酵母スフェロプラストは、典型的に、酵母細胞壁の酵素消化によって製造される。このような方法は、例えば、フランズソフ（Franzusoﬀ）ら著、1991年、メソッズ・イン・エンザイモロジー（Meth. Enzymol.）194、662～274に記載されており、この文献は、その全文を参照として本明細書に組み込むものとする。

【0043】

酵母サイトプラストは、典型的に、酵母細胞の除核によって製造される。このような方法は、例えば、クーン（Coon）著、1978年、国立癌研究所モノグラフ、48、45～55に記載されており、この文献は、その全文を参照として本明細書に組み込むものとする。

【0044】

酵母ゴーストは、典型的に、透過処理又は溶解した細胞を再封入することによって製造され、その細胞の細胞小器官の少なくとも一部を含んでもよいが、必ずしも含む必要はない。このような方法は、例えば、フランズソフ（Franzusoﬀ）ら著、1993年、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.）258、3608～3614及びブッセイ（Bussey）ら著、1979年、バイオキミ

カ・エトバイオフィジカ・アクタ (*Biochim. Biophys. Acta*)、553、185～196に記載されており、これらの文献は各々、その全文を参照として本明細書に組み込むものとする。

【0045】

酵母膜粒子 (細胞下酵母膜抽出物又はその画分) とは、天然の核又は細胞質が欠失した酵母膜を指す。粒子は、どんな大きさであってもよく、天然酵母膜の大きさから、音波破碎又は当業者には公知の他の膜破碎方法に続く再封入によって製造される微粒子までの大きさが含まれる。細胞下酵母膜抽出物を製造する方法は、例えば、フランズソフ (*Franzuso*) ら著、1991年、メソツズ・イン・エンザイモロジー (*Meth. Enzymol.*) 194、662～274に記載されている。また、酵母膜部分を含む酵母膜粒子の画分、さらには、酵母膜粒子の製造前に、抗原又は他のタンパク質を酵母により組換え技法で発現させた場合には、目的の抗原又は他のタンパク質も含む酵母膜粒子の画分を用いてもよい。目的の抗原又は他のタンパク質は、膜の内側、膜のいずれかの表面、又はそれらの組合せに担持させることができる (すなわち、タンパク質は、膜の内側及び外側にあってもよいし、及び/又は酵母膜粒子の膜を貫通していてもよい)。一実施形態では、酵母膜粒子は、組換え酵母膜粒子であり、これは、膜の表面に、又は膜内に少なくとも部分的に埋め込まれた状態で、少なくとも1つの所望の抗原若しくは目的とする他のタンパク質を含む、インタクトな、破碎された、若しくは破碎され、再封入された酵母膜であってよい。

【0046】

酵母細胞壁調製物の一例は、この酵母細胞壁調製物が、動物に投与されると、疾患標的に対して所望の免疫応答を刺激するように、その表面に、又は細胞壁内に少なくとも部分的に埋め込まれた状態で、抗原を担持する、単離された酵母細胞壁の調製物である。

【0047】

本発明の酵母ビヒクルを製造するのに、あらゆる酵母株を用いることができる。酵母は、次の3つの綱：子囊菌 (*Ascomycetes*)、担子菌 (*Basidiomycetes*) 及び不完全菌 (*Fungi Imperfecti*) の1つに属する単細胞微生物である。免疫調節成分として用いる酵母の種類の選択に考慮すべきことの1つは、酵母の病原性である。一実施形態では、酵母は、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などの非病原性株である。非病原性酵母株の選択により、酵母ビヒクルを投与される個体へのあらゆる有害な作用を最小限にする。しかし、当業者には公知のいずれかの手段 (例えば、突然変異株) によって、酵母の病原性を無効にすることができれば、病原性酵母を用いてもよい。本発明の一態様では、非病原性酵母株を用いる。

【0048】

本発明で用いることができる酵母株の属としては、限定するものではないが、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*)、カンジダ属 (*Candida*) (病原性でありうる)、クリプトコッカス属 (*Cryptococcus*)、ハンセヌラ属 (*Hansenula*)、クルイペロミセス属 (*Kluyveromyces*)、ピキア属 (*Pichia*)、ロドトルラ属 (*Rhodotorula*)、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*) 及びヤロウィア属 (*Yarrowia*) が挙げられる。一態様では、酵母属は、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*)、カンジダ属 (*Candida*)、ハンセヌラ属 (*Hansenula*)、ピキア属 (*Pichia*) 又はシゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*) から選択され、一態様では、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) が用いられる。本発明で用いることができる酵母株の種として、限定するものではないが、以下のものが挙げられる：サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・カールスベルゲンシス (*Saccharomyces carlsbergensis*)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、カンジダ・ケフィア (*Candida kefyr*)、カンジダ・トロピカリス (*C*

andida tropicalis)、クリプトコッカス・ラウレンティ(*Cryptococcus laurentii*)、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ(*Cryptococcus neoformans*)、ハンセヌラ・アノマラ(*Hansenula anomala*)、ハンセヌラ・ポリモルファ(*Hansenula polymorpha*)、クルイベロミセス・フラギリス(*Kluyveromyces fragilis*)、クルイベロミセス・ラクチス(*Kluyveromyces lactis*)、クルイベロミセス・マルキシアヌス・バー・ラクチス(*Kluyveromyces marxianus var. lactis*)、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)、ロドトルラ・ルブラ(*Rhodotorula rubra*)、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)、及びヤロウシア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)。これら種の多くが、様々な亜種、タイプ、サブタイプなどを含み、これらは、前述した種に含まれることが意図されることは、理解すべきである。一態様では、本発明で用いられる酵母種として、サッカロミセス・セレビスエ(*S. cerevisiae*)、カンジダ・アルビカンス(*C. albicans*)、ハンセヌラ・ポリモルファ(*H. polymorpha*)、ピキア・パストリス(*P. pastoris*)及びシゾサッカロミセス・ポンベ(*S. pombe*)がある。サッカロミセス・セレビスエ(*S. cerevisiae*)は、処理するのが比較的容易であり、食品添加物としての使用に「一般に安全と認められる(Generally Recognized As Safe)」又は「GRAS」(GRAS; 食品医薬品局(FDA: Food and Drug Administration)による提案規定(FDA proposed Rule) 62 FR 18938、1997年4月17日)であることから、有用である。本発明の一実施形態は、プラスミドを特に高いコピー数に複製することができる酵母株、例えば、サッカロミセス・セレビスエ(*S. cerevisiae*) *cir* 株である。サッカロミセス・セレビスエ(*S. cerevisiae*)株は、1つ以上の標的抗原及び/又は抗原融合タンパク質及び/又は他のタンパク質を高レベルで発現させることを可能にする発現ベクターを支持することができる株である。本発明で有用な別の酵母株は、サッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*) W303 である。さらに、任意の突然変異酵母株を本発明に用いることができ、こうした株として、発現した標的抗原又は他のタンパク質の翻訳後修飾低減を呈示するもの、例えば、N連結グルコシル化を伸長する酵素の突然変異がある。

【0049】

本発明の酵母・ブラキュリ免疫治療組成物は、ブラキュリ抗原を含む少なくとも1種の癌抗原を含有する。本発明によれば、用語「抗原」を本発明で用いる場合、一般に、タンパク質のいずれかの部分(例えば、ペプチド、部分的タンパク質、完全長タンパク質)(ここで、タンパク質は、天然に存在するもの、又は合成により誘導若しくは設計したものである)、細胞組成物(全細胞、細胞溶解物若しくは破碎された細胞)、生物(全生物、溶解物若しくは破碎された細胞)、又は炭水化物、又は他の分子、あるいはこれらの部分を指す。抗原は、免疫系の要素(例えば、T細胞、抗体)と遭遇した同一又は類似の抗原に対する抗原特異的免疫応答(例えば、液性及び/若しくは細胞性免疫応答)を誘発する。

【0050】

抗原は、単一エピトープ、単一免疫原性ドメインのように小さくても、それより大きくてもよく、複数のエピトープ又は免疫原性ドメインを含んでもよい。従って、抗原の大きさは、約8~11アミノ酸のように小さくても(すなわち、ペプチド)、完全長タンパク質、多量体、融合タンパク質、キメラタンパク質、全細胞、全微生物、又はこれらの任意の部分(例えば、全細胞のタンパク質断片(ポリペプチド)溶解物若しくは微生物の抽出物)のように大きくてもよい。本発明の酵母・ブラキュリ免疫治療薬に有用な抗原は、ペプチド、ポリペプチド、完全長タンパク質、多量体、融合タンパク質及びキメラタンパク質である。さらに、抗原は、炭水化物を含んでもよく、これは、酵母ビヒクル、又は本発

明の組成物中にロードすることができる。いくつかの実施形態では（例えば、組換え核酸分子から酵母ビヒクルによって抗原を発現させる場合）、抗原は、全細胞又は微生物であるよりも、むしろタンパク質、融合タンパク質、キメラタンパク質、又はこれらの断片であることは理解されたい。酵母での発現のために、抗原が、酵母により発現させようとする全タンパク質である場合には、抗原は、酵母内で組換えにより発現させることができる最小限の大きさのものであり、典型的には、25アミノ酸以上の長さ、又は26アミノ酸以上、27アミノ酸以上、28アミノ酸以上、29アミノ酸以上、30アミノ酸以上、31アミノ酸以上、32アミノ酸以上、33アミノ酸以上、34アミノ酸以上、35アミノ酸以上、36アミノ酸以上、37アミノ酸以上、38アミノ酸以上、39アミノ酸以上、40アミノ酸以上、41アミノ酸以上、42アミノ酸以上、43アミノ酸以上、44アミノ酸以上、45アミノ酸以上、46アミノ酸以上、47アミノ酸以上、48アミノ酸以上、49アミノ酸以上、50アミノ酸以上の長さ、又は25～50アミノ酸以上の長さ、又は30～50アミノ酸以上の長さ、又は35～50アミノ酸以上の長さ、又は40～50アミノ酸以上の長さ、又は45～50アミノ酸以上の長さであるが、これより小さいタンパク質を発現させることも可能であり、また、かなり大きいタンパク質（例えば、数百アミノ酸の長さ、あるいは、数千アミノ酸の長さでも）を発現させることも可能である。一態様では、完全長タンパク質、又はN末端及び／若しくはC末端から1～20アミノ酸が欠失したタンパク質を発現させてもよい。融合タンパク質及びキメラタンパク質も、本発明で発現させることができる抗原である。「標的抗原」は、本発明の免疫治療組成物によって特異的にターゲティングされる抗原（すなわち、免疫応答の誘発が所望される抗原）である。「癌抗原」は、抗原のターゲティングが癌もターゲティングするように、腫瘍細胞によって発現される抗原などの、癌に関連する少なくとも1つの抗原を含む抗原である。癌抗原は、1つ以上の腫瘍関連タンパク質などの、1つ以上のタンパク質に由来する1つ以上の抗原を含んでもよい。「ブラキユリ抗原」は、ブラキユリタンパク質から誘導、設計、又は産生された抗原である。

【0051】

免疫応答の刺激について述べる時、用語「免疫原」は、用語「抗原」のサブセットであり、従って、場合によっては、用語「抗原」と置換え可能に用いられうる。本明細書で用いる場合、免疫原とは、個体への免疫原の投与によって、個体の免疫系と遭遇した同一又は類似抗原に対する抗原特異的免疫応答が増大するように、液性及び／若しくは細胞性免疫応答を誘発する（すなわち、免疫原性）抗原を意味する。一実施形態では、免疫原は、CD4⁺T細胞応答（例えば、TH1、TH2及び／若しくはTH17）並びに／又はCD8⁺T細胞応答（例えば、CTL応答）などの細胞性免疫応答を誘発する。

【0052】

所与の抗原の「免疫原性ドメイン」は、動物に投与されると、免疫原として作用しうる少なくとも1つのエピトープを含む抗原の任意の部分、断片若しくはエピトープ（例えば、ペプチド断片若しくはサブユニット又は抗体エピトープ又は他の構造エピトープ）であってよい。従って、免疫原性ドメインは、単一のアミノ酸より大きく、少なくとも、免疫原として作用することができる少なくとも1つのエピトープを含むのに十分な大きさである。例えば、単一タンパク質は、複数の異なる免疫原性ドメインを含んでよい。免疫原性ドメインは、液性免疫応答の場合（この場合、構造ドメインが考慮される）のように、タンパク質内で線状配列である必要はない。

【0053】

本明細書において、エピトープは、免疫系に付与されると、適切な共刺激シグナル及び／又は免疫系の活性化細胞に関して、免疫応答を誘発するのに十分な所与の抗原内の単一免疫原性部位として定義される。言い換えれば、エピトープは、免疫系の成分によって認識される抗原の部分であり、抗原決定基と呼ぶこともできる。当業者は、T細胞エピトープは、B細胞又は抗体エピトープとは、大きさ及び組成が異なること、また、クラスI MHC経路を介して提示されるエピトープは、クラスII MHC経路を介して提示されるエピトープとは、大きさ及び構造属性が異なることを認識されよう。例えば、クラスI

MHC分子によって提示されるT細胞エピトープは、典型的に、長さが8～11アミノ酸であるが、クラスII MHC分子によって提示されるエピトープは、長さがそれほど限定的ではなく、25アミノ酸以下であってもよいし、又はそれより長くてもよい。さらに、T細胞エピトープは、エピトープが結合する特定のMHC分子に応じて異なる推定構造的特徴を有する。エピトープは、線状配列エピトープ又は構造エピトープ（保存結合領域）であってよい。ほとんどの抗体は、構造エピトープを認識する。

【0054】

ブラキュリ（「T」とも呼ばれる）は、複数の異なる動物種の間で高度に保存されており、「Tボックス」ドメイン又は「Tドメイン」、すなわち、複数の異なるタンパク質（集合的に、Tボックスファミリーのタンパク質と呼ばれる）の間で共有されているDNA結合ドメインモチーフを含む転写因子である。ヒトブラキュリは、1996年に初めてクローン化された（エドワーズ（Edwards）ら、前掲）。ヒトブラキュリをコードする1つのヌクレオチド配列は、本明細書では配列番号1で示され、これは、GENBANK（登録商標）アクセッション番号NM_003181（GI：19743811）から得られたmRNA配列である。配列番号1は、435アミノ酸ヒトブラキュリタンパク質をコードするが、そのアミノ酸配列は、本明細書では、配列番号2（これも、GENBANK（登録商標）アクセッション番号NP_003172（GI：4507339）にみいだされる）として表される。

【0055】

本明細書に開示する別のヒトブラキュリタンパク質は、配列番号2で示されるヒトブラキュリタンパク質の変異型であり、配列番号6のアミノ酸配列を有する。配列番号6（これも、435アミノ酸タンパク質である）は、本明細書では配列番号5で示されるヌクレオチド配列によってコードされる。配列番号6は、タンパク質の全長にわたって、配列番号2と約99%同一である。配列番号6は、配列番号2と、177位（それぞれ、Asp及びGly）、368位（それぞれ、Thr及びSer）並びに409位（それぞれ、Asn及びAsp）において異なる。

【0056】

本明細書に開示する別のヒトブラキュリタンパク質は、配列番号2又は配列番号6で示されるヒトブラキュリタンパク質のアゴニストである。本明細書で一般に用いられる場合、「アゴニスト」は、いずれかの化合物又は物質であり、例えば、限定するものではないが、受容体又はリガンドに結合して、応答を発生若しくはトリガーする、小分子、タンパク質、ペプチド、抗体、核酸結合物質などが挙げられ、受容体又はリガンドに結合する天然に存在する物質の作用を模倣若しくは増強する物質を含んでもよい。本発明のブラキュリ抗原に関して用いる場合、「アゴニスト」抗原又はタンパク質は、「ミモトープ」とも呼ばれる、少なくとも1つのT細胞アゴニストエピトープを含む抗原又はタンパク質を指す。ミモトープペプチドは、野生型エピトープの構造を模倣するペプチドであり、アゴニストとして、ミモトープは、天然のエピトープの作用（生物学的機能）を模倣又は増強する。例えば、配列番号12のアミノ酸配列（WLLPGTSTL）は、野生型ブラキュリタンパク質のT細胞エピトープである。配列番号13のアミノ酸配列（WLLPGTSTV）は、配列番号12のT細胞エピトープのミモトープ又はアゴニストである。

【0057】

1つのヒトブラキュリアゴニスト抗原は、本明細書において、配列番号18で示される。配列番号18は、435アミノ酸タンパク質であり、本明細書では配列番号17で示されるヌクレオチド配列によってコードされる。配列番号18は、配列番号6では254位のロイシンが、配列番号18においてバリンで置換されている以外は、配列番号6と同じである。この置換により、配列番号18の246～254位に、T細胞アゴニストエピトープが形成され、これは、特定の理論に拘束されるものではないが、野生型エピトープ（配列番号6の246～254位）と比較して、ブラキュリに対する増強されたT細胞応答を誘導すると考えられる。

【0058】

配列番号 2、配列番号 6 又は配列番号 18 のいずれかの 41 ~ 223 位は、ヒトブラキュリの T ボックス DNA 結合ドメインを表しており、他の種由来のブラキュリ配列などの他のブラキュリ配列における T ボックスドメインは、これらの配列との比較によって容易に同定することができる。本明細書で用いる場合、本明細書に記載され、又は当分野では公知であり、本発明で使用されるブラキュリタンパク質の T ボックスドメインについて述べる時、これは、規定 T ボックスドメインの N 末端及び / 又は C 末端（例えば、配列番号 2、6 又は 18 の 41 ~ 223 位のいずれかの側）に、ブラキュリ配列の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、又は 40 個の連続したアミノ酸をさらに含みうる。本明細書に記載する 2 つのヒトブラキュリタンパク質などのヒトブラキュリはまた、様々な CD4⁺ 及び CD8⁺ T 細胞エピトープも含む。このようなエピトープは、例えば、国際公開第 2008 / 106551 号に記載されており、例えば、配列番号 2 又は配列番号 6 の 246 ~ 254 位における、CD8⁺ CTL エピトープ、WLLPGTSTL（本明細書では、Tp2（配列番号 2）とも呼ばれる）がある。前述したように、配列番号 18 は、本明細書では配列番号 13 で示される、配列番号 12 のアゴニストエピトープを含む。

【0059】

ヒトブラキュリは、他の動物種由来のブラキュリに対して非常に高い相同性を有しているため、特にこれらの配列が同一であり、実質的に相同性で、かつ標的抗原（例えば、腫瘍細胞によって発現される天然ブラキュリ）に対して有効な免疫応答を誘発する場合には、本発明の酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物の製造に、他の生物由来のブラキュリの配列を用いることができる。例えば、1990 年に（ハーマン（Herrmann）ら、前掲）によって初めてクローン化されたマウスブラキュリは、ヌクレオチドレベルで、ヒトブラキュリと約 85 % 同一であり、アミノ酸レベルでは約 91 % 同一である。その他の動物由来のブラキュリに関して、ヒトブラキュリは、アミノ酸レベルで、チンパンジー（Pan troglodytes）由来のブラキュリに対して 99.5 % 同一であり、イエイヌ（Canis lupus familiaris）由来のブラキュリに対して 90.1 % 同一であり、ウシ（Bos Taurus）由来のブラキュリに対して 88.5 % 同一であり、ドブネズミ（Rattus norvegicus）由来のブラキュリに対して 92.2 % 同一であり、また、セキショクヤケイ（Gallus gallus）由来のブラキュリに対して 80.9 % 同一である。T ボックスドメインを含む、ブラキュリのアミノ酸 1 ~ 223 内で、マウス及びヒトブラキュリは、たった 2 つのアミノ酸（26 及び 96 位）しか違わない。マウスブラキュリをコードするヌクレオチド配列は、本明細書では配列番号 3 で示されるが、これは、GENBANK（登録商標）アクセッション番号 NM_009309（GI: 118130357）から得られた mRNA 配列である。配列番号 3 は、436 アミノ酸マウスブラキュリタンパク質をコードし、これは、本明細書では配列番号 4 で示されるアミノ酸配列である。配列番号 4 の 41 ~ 223 位は、マウスブラキュリの T ボックス DNA 結合ドメインを表す。

【0060】

本発明の一実施形態では、ブラキュリ抗原は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 18 で示されるアミノ酸配列、又は少なくとも 1 つのその免疫原性ドメインを含むか、又はこれから構成される。一実施形態では、ブラキュリ抗原は、ブラキュリの 2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、若しくは 6 以上の免疫原性ドメインを含むか、又はこれから構成される。本発明の一実施形態では、ブラキュリ抗原は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6 若しくは配列番号 18 の 1 又は 2 位から、C 末端の最後の 25 アミノ酸の 1 つまで（すなわち、配列番号 2 又は配列番号 6 又は配列番号 18 の 441 ~ 435 位のいずれか 1 つまで、あるいは、配列番号 4 の 442 ~ 436 位のいずれか 1 つまで）のアミノ酸で示されるアミノ酸配列を含むか、又はこれから構成される。本発明で有用な別のブラキュリ抗原は、少なくとも、ブラキュリの 1 ~ 223 位（例えば、配列番号 2、配列番号 4、

配列番号 6 若しくは配列番号 18 の 1 ~ 223 位) 又はブラキュリの 41 ~ 223 位 (例えば、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6 若しくは配列番号 18 の 41 ~ 223 位) のアミノ酸も含む。本発明で有用な別のブラキュリ抗原は、少なくとも、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6 又は配列番号 18 の 1 ~ 85 位から、255 位 ~ C 末端の間までのアミノ酸を含む。本発明で有用な別のブラキュリ抗原は、少なくとも、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6 又は配列番号 18 の 1 ~ 85 位から、430 位 ~ C 末端の間までのアミノ酸を含む。本発明で有用な別のブラキュリ抗原は、少なくとも、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6 又は配列番号 18 の 1、2、3、4、5、6、7、8、9 若しくは 10 位から、255 位 ~ C 末端の間までのアミノ酸を含む。

【0061】

本発明のいずれかの実施形態によれば、「完全長」タンパク質 (又は完全長機能性ドメイン若しくは完全長免疫学的ドメイン) と言うとき、これは、本明細書に記載する、あるいは、一般に入手可能な配列において公知である、又は記載されているような、タンパク質又は機能性ドメイン若しくは免疫学的ドメインの完全長アミノ酸配列を包含する。タンパク質の 1 種の相同体でもある、「ほぼ完全長」のタンパク質又はドメインは、完全長タンパク質又はドメインと、このような完全長タンパク質又は完全長ドメインの N 及び / 又は C 末端から、1、2、3、4、5、6、7、8、9 若しくは 10 アミノ酸が付加若しくは欠失若しくは省略されている点が異なる。例として、本明細書に記載する融合タンパク質のいくつかは、抗原が、1 位のメチオニンを省き、N 末端ペプチドを置換することから、「ほぼ完全長」ブラキュリ抗原を含む。一般に、タンパク質又はドメイン若しくは抗原と言うとき、これは、完全長タンパク質及びほぼ完全長タンパク質、並びに他のそれらの相同体を包含する。

【0062】

ブラキュリ抗原に関するいずれかの実施形態の一態様では、癌抗原又はブラキュリ抗原は、酵母によって抗原を発現させることができる最小限の大きさのものである。酵母での発現の場合、タンパク質は、典型的に、少なくとも約 25 アミノ酸の長さであるが、より小さいタンパク質を発現させることも可能であるし、これよりかなり大きいタンパク質を酵母によって発現させることも可能である。例えば、本発明で有用なブラキュリ抗原は、酵母によって組換えにより発現させることができ、かつ、ブラキュリの 1 つの免疫原性ドメインを含むブラキュリタンパク質の断片であり、また、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6 又は配列番号 18 のいずれかの少なくとも 1 つの免疫原性ドメインを含むものであってよい。一態様では、このような抗原は、少なくとも 25 アミノ酸の長さであり、ブラキュリの少なくとも 1 つの免疫原性ドメインを含む。一態様では、このような抗原は、30 アミノ酸を超える長さであり、ブラキュリの少なくとも 1 つの免疫原性ドメインを含む。一態様では、このような抗原は、少なくとも 25 ~ 50 アミノ酸の長さであり、ブラキュリの少なくとも 1 つの免疫原性ドメインを含む。一態様では、このような抗原は、少なくとも 30 ~ 50 アミノ酸の長さであり、ブラキュリの少なくとも 1 つの免疫原性ドメインを含む。一態様では、このような抗原は、少なくとも 35 ~ 50 アミノ酸の長さであり、ブラキュリの 1 つの免疫原性ドメインを含む。一態様では、このような抗原は、少なくとも 40 ~ 50 アミノ酸の長さであり、ブラキュリの少なくとも 1 つの免疫原性ドメインを含む。一態様では、このような抗原は、少なくとも 45 ~ 50 アミノ酸の長さであり、ブラキュリの少なくとも 1 つの免疫原性ドメインを含む。一実施形態では、本発明で有用なブラキュリ抗原は、少なくとも 25 アミノ酸の長さであるか、又は少なくとも 30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、40

10

20

30

40

50

0、405、410、415、420、425、又は430アミノ酸の長さであり、これは、配列番号2、配列番号4、配列番号6又は配列番号18の上記長さの少なくともいずれかの任意の断片を含んでよい。

【0063】

一態様では、ブラキユリ抗原は、1つ以上のCTLエピトープを含み、これは、本明細書に記載するCTLエピトープのいずれか1つ、2つ、3つ、若しくは4つ以上の2以上のコピーを含んでもよい。一態様では、ブラキユリ抗原は、1つ以上のCD4⁺T細胞エピトープを含む。一態様のT細胞、ブラキユリ抗原は、1つ以上のCTLエピトープと、1つ以上のCD4⁺T細胞エピトープを含む。一態様では、T細胞エピトープは、アゴニストエピトープである。

10

【0064】

一態様では、ブラキユリ抗原は、WLLPGTSTLのアミノ酸配列（配列番号12、また、配列番号2若しくは配列番号6の245～254位によっても表される）を含む。一態様では、ブラキユリ抗原は、WLLPGTSTVのアミノ酸配列（配列番号13、また、配列番号18の245～254位によっても表される）を含む。一態様では、配列番号12又は配列番号13のいずれかの4位のアミノ酸（これらの配列では、プロリン（P））は、セリン（S）、トレオニン（T）、イソロイシン（I）、又はバリン（V）で置換される。

【0065】

一態様では、ブラキユリ抗原は、SQYPSLWSV（配列番号14）のアミノ酸配列を含む。一態様では、配列番号14の2位のアミノ酸（この配列では、グルタミン（Q））は、ロイシン（L）で置換される。一態様では、配列番号14の4位のアミノ酸（この配列では、プロリン（P））は、セリン（S）、トレオニン（T）、ロイシン（L）、又はバリン（V）で置換される。一態様では、配列番号14の7位のアミノ酸（この配列では、トリプトファン（W））は、バリン（V）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、セリン（S）、又はトレオニン（T）で置換される。一態様では、配列番号14の9位のアミノ酸（この配列では、バリン（V））は、ロイシン（L）で置換される。配列番号14における上記置換の1つ以上の任意の組合せを有する配列を含む抗原も、本発明によって考慮される。

20

【0066】

一態様では、ブラキユリ抗原は、RLIASWTPV（配列番号15）のアミノ酸配列を含む。一態様では、配列番号15の1位のアミノ酸（この配列では、アルギニン（R））は、チロシン（Y）又はトリプトファン（W）で置換される。一態様では、配列番号15の6位のアミノ酸（この配列では、トリプトファン（W））は、バリン（V）、リシン（L）、イソロイシン（I）、セリン（S）、又はトレオニン（T）で置換される。配列番号15における上記置換の一方又は両方の任意の組合せを有する配列を含む抗原も、本発明によって考慮される。

30

【0067】

一態様では、ブラキユリ抗原は、AMYSFLLD FV（配列番号16）のアミノ酸配列を含む。一態様では、配列番号16の2位のアミノ酸（この配列では、メチオニン（M））は、ロイシン（L）で置換される。

40

【0068】

本発明の一実施形態では、ブラキユリ抗原は、配列番号8のアミノ酸配列を有する融合タンパク質を含むか、これから実質的に構成される、又は構成される。配列番号8の融合タンパク質は、N末端からC末端までのフレーム内に、融合した以下の配列要素を含む単一ポリペプチドである：（1）プロテオソーム分解に対する耐性を付与すると共に、酵素内での発現を安定化させるためのN末端ペプチド（配列番号8の1～6位）；（2）配列番号6の2～435位から構成されるヒトブラキユリ抗原（配列番号8の7～440位）；及び（3）ヘキサヒスチジンタグ（配列番号8の441～446位）。配列番号8のアミノ酸配列は、配列番号7のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

50

【0069】

本発明の別の実施形態では、ブラキュリ抗原は、配列番号10のアミノ酸配列を有する融合タンパク質を含むか、これから実質的に構成される、又は構成される。配列番号10の融合タンパク質は、N末端からC末端までのフレーム内に、融合した以下の配列要素を含む単一ポリペプチドである：(1)プロテオソーム分解に対する耐性を付与すると共に、酵素内での発現を安定化させるためのN末端ペプチド(配列番号10の1~6位)；(2)配列番号4の2~436位から構成されるマウスブラキュリ抗原(配列番号10の7~441位)；及び(3)ヘキサヒスチジンタグ(配列番号10の442~447位)。配列番号10のアミノ酸配列は、配列番号9のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

10

【0070】

別の実施形態では、ブラキュリ抗原は、配列番号20のアミノ酸配列を有する融合タンパク質を含むか、これから実質的に構成される、又は構成される。配列番号20の融合タンパク質は、N末端からC末端までのフレーム内に、融合した以下の配列要素を含む単一ポリペプチドである：(1)プロテオソーム分解に対する耐性を付与すると共に、発現を安定化させるためのN末端ペプチド(配列番号20の1~6位、本明細書では配列番号11によっても示されるペプチド配列)；2)配列番号18のアミノ酸2~435(配列番号20の7~440位)、完全長ヒトブラキュリアゴニストタンパク質を表す配列番号18；及び(3)ヘキサヒスチジンタグ(配列番号20の441~446位)。アゴニストエピトープ(配列番号13)は、配列番号20の251~259位(配列番号18の246~254位)に位置する。配列番号20のアミノ酸配列は、配列番号19のポリヌクレオチド配列によってコードされる。

20

【0071】

本発明で有用なブラキュリ抗原は、本明細書に記載するブラキュリタンパク質若しくは抗原のいずれかのアミノ酸配列と、タンパク質の全長にわたって、又はこのタンパク質の一部を形成する規定断片若しくはそのドメイン(例えば、免疫学的ドメイン若しくは機能性ドメイン(少なくとも1つの生物活性を有するドメイン))に対して、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質も含む。例えば、本明細書に記載するブラキュリタンパク質のドメインは、Tボックスドメインを含む。免疫学的ドメインについては、上に詳しく記載している。

30

【0072】

本発明のいくつかの態様では、アミノ酸挿入、欠失、及び/又は置換を、野生型又は基準ブラキュリタンパク質の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、若しくは11以上のアミノ酸について実施することができる。ただし、ここで、得られるブラキュリタンパク質は、本発明の酵母-ブラキュリ免疫治療組成物で抗原として用いられると、野生型又は基準ブラキュリタンパク質と同様に天然ブラキュリタンパク質に対して免疫応答を誘発するものとし、この応答には、増強された免疫応答、低減された免疫応答、又は実質的に同等の免疫応答が含まれる。例えば、本発明は、ブラキュリアゴニスト抗原の使用を含むが、これは、例えば、MHC分子に対する、又はMHC提示に関してエピトープを認識するT細胞受容体に対するエピトープの結合活性若しくは親和性を改善することにより、ブラキュリアゴニストに対するT細胞応答を増強するように突然変異させた1つ以上のT細胞エピトープを含んでもよい。従って、ブラキュリアゴニストは、腫瘍細胞によって発現される天然ブラキュリに対するT細胞応答の効力又は効率を改善しうる。配列番号18のアミノ酸配列を有するブラキュリ抗原は、ブラキュリアゴニスト(又はアゴニストエピトープを含むブラキュリ抗原)の非制限的例である。

40

【0073】

さらに、配列番号8、配列番号10、又は配列番号20の融合タンパク質に関して、前述したものなどのN末端発現配列及びC末端タグは任意選択であるが、タンパク質の発現、安定性を改善若しくは促進する、及び/又はタンパク質の同定及び/若しくは精製を可

50

能にするために、本明細書の他所に記載した複数の異なる配列から選択してもよい。また、酵母での使用に適した多数の異なるプロモータが当分野では公知である。さらに、様々な理由で（例えば、クローン化を促進するための制限酵素部位の導入、宿主食胞プロテアーゼのための切断部位として、タンパク質若しくは抗原プロセッシングを加速するため、並びに構築物の将来の操作のために）、ブラキュリ抗原を含む融合タンパク質の部分同士の間、短い介在リンカー配列（例えば、1、2、3、4、又は5アミノ酸ペプチド）を導入してもよい。

【0074】

任意選択で、本発明の酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物の成分として用いられるタンパク質（融合タンパク質など）は、酵母において異種抗原の発現を改善又は安定化するのに特に有用な抗原構築物を用いて作製する。一実施形態では、所望の抗原タンパク質又はペプチドを、それらのアミノ末端で、以下と融合させる：（a）酵母ビヒクルにおける融合タンパク質の発現を安定化するか、又は発現した融合タンパク質の翻訳後修飾を阻止する特定の合成ペプチド（このようなペプチドは、例えば、2004年8月12日に公開された米国特許出願公開第2004-0156858A1号明細書に詳しく記載されている；尚、この文献は、参照としてその全文を本明細書に組み込む）；（b）いずれかの融合相手が、酵母内でのタンパク質の発現の安定性改善をもたらす、及び／又は酵母細胞によるタンパク質の翻訳後修飾を阻止する、内在性酵母タンパク質、例えば、限定するものではないが、酵母因子リーダー配列（このようなタンパク質も、例えば米国特許出願公開第2004-0156858A1号明細書（前掲）に詳しく記載されている）；及び／又は（c）酵母の表面に融合タンパク質を発現させる酵母タンパク質の少なくとも一部（例えば、本明細書にさらに詳しく記載されるAgaタンパク質）。さらに、本発明は、任意選択で、特に、タンパク質の選択及び同定に用いるための、抗原コード構築物のC末端に融合したペプチドの使用を含む。このようなペプチドとして、限定するものではないが、ペプチドタグ（例えば、6XHis若しくはヘキサペプチド）又は他のいずれかの短いエプーブタグなどの任意の合成若しくは天然ペプチドが挙げられる。本発明の抗原のC末端に結合したペプチドは、前述したN末端ペプチドを付加して、又は付加せずに用いることができ、また、その逆も可能である。

【0075】

一実施形態では、酵母内に発現させようとする融合タンパク質に有用な合成ペプチドを抗原のN末端に結合させるが、このペプチドは、抗原に対し異種である少なくとも2つのアミノ酸位置から構成されており、このペプチドは、酵母ビヒクルにおける融合タンパク質の発現を安定化させるか、又は発現した融合タンパク質の翻訳後修飾を阻止する。合成ペプチドと、抗原のN末端部分は一緒に、以下の要件を有する融合タンパク質を形成する：（1）融合タンパク質の1位のアミノ酸残基は、メチオニンである（すなわち、合成ペプチドの最初のアミノ酸はメチオニンである）；（2）融合タンパク質の2位のアミノ酸残基は、グリシンでもプロリンでもない（すなわち、合成ペプチドの2番目のアミノ酸は、グリシンでもプロリンでもない）；（3）融合タンパク質の2～6位のアミノ酸位置のいずれも、メチオニンではない（すなわち、合成ペプチドが6アミノ酸より短い場合、合成ペプチド又はタンパク質の部分のいずれであっても、2～6位のアミノ酸は、メチオニンを含まない）；並びに（4）融合タンパク質の2～6位のアミノ酸のいずれも、リシンでもアルギニンでもない（すなわち、合成ペプチドが5アミノ酸より短い場合、合成ペプチド又はタンパク質の部分のいずれであっても、2～6位のアミノ酸は、リシンもアルギニンも含まない）。合成ペプチドは、2アミノ酸のように短くてもよいが、一態様では、2～6アミノ酸（3、4、5アミノ酸を含む）であり、整数で、6アミノ酸より長く、約200アミノ酸、300アミノ酸、400アミノ酸、500アミノ酸まで、又はそれ以上であってもよい。

【0076】

一実施形態では、融合タンパク質は、M-X2-X3-X4-X5-X6のアミノ酸配列を含み、ここで、Mは、メチオニンであり；X2は、グリシン、プロリン、リシン若し

10

20

30

40

50

くはアルギニン以外のいずれかのアミノ酸であり；X3は、メチオニン、リシン若しくはアルギニン以外のいずれかのアミノ酸であり；X4は、メチオニン、リシン若しくはアルギニン以外のいずれかのアミノ酸であり；X5は、メチオニン、リシン若しくはアルギニン以外のいずれかのアミノ酸であり；X6は、メチオニン、リシン若しくはアルギニン以外のいずれかのアミノ酸である）。一実施形態では、X6残基は、プロリンである。酵母細胞における抗原の発現の安定性を増加する、及び／又は酵母におけるタンパク質の翻訳後修飾を阻止する合成配列の1例は、配列M-A-D-E-A-P（本明細書では配列番号11で示される）を含む。発現産物の安定性増加に加えて、この融合相手は、構築物における免疫抗原に対する免疫応答に負の影響を与えないようである。さらに、合成融合ペプチドは、抗体などの選択因子によって認識されうるエピトープを付与するように設計することもできる。

10

【0077】

本発明の一態様では、酵母ビヒクルは、酵母ビヒクルの表面上で、部分的若しくは全体的に、抗原が発現されるか、又は発現したタンパク質産物の輸送若しくは転位によってもたらされる（細胞外発現）ように操作する。本発明のこの態様を達成する一方法は、酵母ビヒクルの表面に、1つ以上のタンパク質を配置するためのスペーサームを用いることである。例えば、スペーサームを用いて、目的の抗原又は他のタンパク質と、目的の抗原又は他のタンパク質を酵母細胞壁にターゲティングするタンパク質との融合タンパク質を形成することができる。例えば、他のタンパク質をターゲティングするのに用いることができるこのようなタンパク質の1つは、抗原又は他のタンパク質が、酵母の表面に位置するように、抗原又は他のタンパク質を酵母細胞壁にターゲティングすることを可能にする酵母タンパク質（例えば、細胞壁タンパク質2（cwp2）、Aga2、Pir4若しくはFlo1タンパク質）である。酵母タンパク質以外のタンパク質をスペーサームに用いてもよいが、いずれのスペーサームの場合も、スペーサームタンパク質ではなく、標的抗原に対して免疫原性応答を向かわせることが最も望ましい。従って、スペーサームに他のタンパク質を用いる場合には、用いられるスペーサームタンパク質は、スペーサームタンパク質自体にそうした大きな免疫応答を引き起こさず、標的抗原に対する免疫応答が優るようにしなければならない。当業者は、標的抗原の免疫応答と比較して、スペーサームタンパク質に対しては小さな免疫応答を目標とすべきである。スペーサームは、必要に応じて、抗原を酵母から容易に除去、若しくはプロセッシングすることを可能にする切断部位（例えば、プロテアーゼ切断部位）を有するように構築することができる。免疫応答の大きさを決定する任意の公知の方法（例えば、抗体生産、溶菌アッセイなど）を用いることができ、これらは当業者には容易に分かる。

20

30

【0078】

酵母表面に露出するように標的抗原又は他のタンパク質を配置する別の方法は、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）のようなシグナル配列を用いて、酵母細胞壁に標的を固定するものである。あるいは、配置は、抗原が、細胞壁に結合したタンパク質（例えば、cwp）と結合するように、小胞体（ER）への転位により、分泌経路へと目的の抗原又は他のタンパク質をターゲティングするシグナル配列を付加することによって達成することができる。

40

【0079】

一態様では、スペーサームタンパク質は、酵母タンパク質である。酵母タンパク質は、酵母タンパク質の約2～約800アミノ酸からなりうる。一実施形態では、酵母タンパク質は、約10～700アミノ酸である。別の実施形態では、酵母タンパク質は、約40～600アミノ酸である。本発明の別の実施形態は、少なくとも250アミノ酸、少なくとも300アミノ酸、少なくとも350アミノ酸、少なくとも400アミノ酸、少なくとも450アミノ酸、少なくとも500アミノ酸、少なくとも550アミノ酸、少なくとも600アミノ酸、又は少なくとも650アミノ酸である酵母タンパク質を含む。一実施形態では、酵母タンパク質は、少なくとも450アミノ酸の長さである。必要に応じて、抗原表面発現を最適化するための別の考慮事項は、抗原とスペーサームの組合せを、モノ

50

マー若しくは二量体若しくは三量体、又は互いに結合したそれより大きいユニットとして発現させるべきか否かである。単量体、二量体、三量体などの使用によって、全部ではないにしろ、抗原の一部が、それをより免疫原性にするような様式で、酵母ビヒクルの表面に展示されるように、抗原の適切なスペーシング又はフォールディングが可能になる。

【0080】

酵母タンパク質の使用により、酵母ビヒクルにおける融合タンパク質の発現を安定化することができ、発現した融合タンパク質の翻訳後修飾を阻止し、及び/又は融合タンパク質を酵母内の特定のコンパートメントにターゲティングする(例えば、酵母細胞壁表面に発現させるために)。酵母分泌経路への送達のために、用いる酵母タンパク質の例として、限定するものではないが、Aga(限定しないが、Aga1及び/又はAga2); SUC2(酵母インペルターゼ); 因子シグナルリーダー配列; CPY; 細胞壁における局在化及び保持のためのCwp2p; 娘細胞形成の初期段階での酵母細胞芽への局在化のためのBUD遺伝子; Flo1p; Pir2p; 及びPir4pが挙げられる。

【0081】

他の配列を用いて、タンパク質を酵母ビヒクルの他の部分、例えば、細胞質ゾル又はミトコンドリア又は小胞体又は核内に、ターゲティング、保持及び/若しくは安定化することができる。前述した実施形態のいずれにも用いることができる好適な酵母タンパク質の例として、限定するものではないが、以下のものが挙げられる: TK、AF、SEC7; グルコース及び細胞質ゾル局在化におけるその抑制発現を目的とする、ホスホエノールピルビン酸カルボキシナーゼPCK1、ホスホグリセロキナーゼPGK及びトリオースリン酸イソメラーゼTPI遺伝子産物; 熱ショックタンパク質SSA1、SSA3、SSA4、SSC1(その発現は誘導され、そのタンパク質は、熱処理に細胞を暴露する際、より熱安定的である); ミトコンドリアへの移入のためのミトコンドリアタンパク質CYC1; ACT1。

【0082】

酵母ビヒクルを作製し、目的の抗原並びに/又は他のタンパク質及び/若しくは物質を発現させ、これらと酵母ビヒクルを組み合わせ、並びに/又は結合させて、酵母ベースの免疫治療組成物を製造する方法が本発明によって考慮される。

【0083】

本発明によれば、「酵母ビヒクル-抗原複合体」又は「酵母-抗原複合体」という用語は、酵母ビヒクルと抗原の任意の結合を表すために一般的に用いられ、このような組成物が、前述したように、免疫応答を誘発するために用いられる場合、「酵母ベースの免疫治療組成物」と置換え可能に用いることができる。このような結合は、例えば、バッファー又はその他の溶液若しくは製剤中での、酵母(組換え酵母)による抗原の発現、酵母への抗原の導入、抗原と酵母の物理的結合、並びに酵母と抗原の混合を含む。これらのタイプの複合体については、以下に詳しく記載する。

【0084】

一実施形態では、酵母ビヒクルを作製するのに用いられる酵母細胞は、タンパク質が酵母細胞によって発現されるように、タンパク質(例えば、抗原)をコードする異種核酸分子でトランスフェクトする。このような酵母は、本明細書において、組換え酵母又は組換え酵母ビヒクルとも呼ばれる。次に、酵母細胞を薬学的に許容される賦形剤で製剤化し、患者に直接投与する、後の投与のために貯蔵する、又はインタクトな細胞として樹状細胞にロードすることができる。酵母細胞はまた、死滅させてもよいし、あるいは、例えば、酵母スフェロプラスト、サイトプラスト、ゴースト、又は細胞下粒子の形成などにより、誘導体化することができ、これらのいずれかに続いて、誘導体を貯蔵、投与するか、又は樹状細胞にロードしてよい。酵母スフェロプラストはまた、抗原を発現する組換えスフェロプラストを生産するために、組換え核酸分子で直接トランスフェクトすることができる(例えば、全酵母からスフェロプラストを生産した後、これらをトランスフェクトする)。抗原を組換えにより発現する酵母細胞又は酵母スフェロプラストを用いて、酵母サイトプラスト、酵母ゴースト、又は酵母膜粒子若しくは酵母細胞壁粒子、又はこれらの画分を

含む酵母ビヒクルを作製することも可能である。

【0085】

一般に、酵母ビヒクルと抗原及び／又は他の物質は、本明細書に記載するいずれの技術によっても結合することができる。一態様では、酵母ビヒクルに、抗原及び／又は物質を細胞内ロードする。別の態様では、抗原及び／又は物質を酵母ビヒクルと、共有又は非共有結合させた。また別の態様では、酵母ビヒクルと抗原及び／又は物質を混合によって結合させた。別の態様では、また一実施形態において、抗原及び／又は物質を、組換えにより、酵母ビヒクル、又は酵母ビヒクルを誘導した酵母細胞若しくは酵母スフェロプラストによって発現させる。

【0086】

本発明の酵母ビヒクルによって産生させようとする抗原及び／又は他のタンパク質の数は、酵母ビヒクルが妥当に産生することができる任意の数の抗原及び／又は他のタンパク質であり、典型的には、少なくとも1から少なくとも約6以上の範囲であり、約2～約6の抗原及び／又は他のタンパク質を含む。

【0087】

本発明の酵母ビヒクルにおける抗原又は他のタンパク質の発現は、当業者には公知の技術を用いて達成される。簡潔に述べると、少なくとも1つの所望の抗原又は他のタンパク質をコードする核酸分子を発現ベクターに挿入することにより、核酸分子が、転写制御配列と機能的に連結して、宿主酵母細胞に形質転換されると、核酸分子の構成的又は調節された発現のいずれかを実施することができるようにする。抗原及び／又は他のタンパク質をコードする核酸分子は、1つ以上の発現制御配列と機能的に連結した1つ以上の発現ベクター上にあってもよい。特に重要な発現制御配列は、転写開始を制御するもの、例えば、プロモータ及び上流活性化配列である。任意の好適な酵母プロモータを本発明で用いることができ、このようなプロモータは多種が当業者には公知である。サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) での発現用のプロモータとして、限定するものではないが、以下の酵母タンパク質：アルコールデヒドロゲナーゼI (ADH1) 又はII (ADH2)、CUP1、ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK)、トリオースリン酸イソメラーゼ (TPI)、翻訳伸長因子EF-1 (TEF2)、グリセラルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH; トリオースリン酸デヒドロゲナーゼについては、TDH3とも呼ばれる)、ガラクトキナーゼ (GAL1)、ガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ (GAL7)、UDP-ガラクトースエピメラーゼ (GAL10)、シトクロムc1 (CYC1)、Sec7タンパク質 (SEC7) 及び酸性ホスファターゼ (PHO5) をコードする遺伝子のプロモータが挙げられ、このようなものとして、例えば、ADH2 / GAPDH 及び CYC1 / GAL10 プロモータなどのハイブリッドプロモータ、細胞中のグルコース濃度が低い (例えば、約0.1～約0.2%) とき誘導されるADH2 / GAPDH プロモータ、並びにCUP1 プロモータ及びTEF2 プロモータがある。同様に、いくつかの上流活性化配列 (UAS: upstream activation sequence) (エンハンサーとも呼ばれる) が公知である。サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) での発現用の上流活性化配列として、限定するものではないが、以下のタンパク質：PCK1、TPI、TDH3、CYC1、ADH1、ADH2、SUC2、GAL1、GAL7 及び GAL10 をコードする遺伝子のUAS、並びにGAL4 遺伝子産物によって活性化される他のUASが挙げられ、一態様では、ADH2 UAS が用いられる。ADH2 UAS は、ADR1 遺伝子産物によって活性化されることから、異種遺伝子がADH2 UAS に機能的に連結されるとき、ADR1 遺伝子を過剰発現するのが好ましいであろう。サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) における発現のための転写終結配列には、因子、GAPDH、及びCYC1 遺伝子の終結配列がある。

【0088】

メチルトローフ酵母において遺伝子を発現する転写制御配列として、アルコールオキシ

10

20

30

40

50

ダーゼ及びギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の転写制御領域がある。

本発明の酵母細胞への核酸分子のトランスフェクションは、核酸分子を細胞に導入することができるいずれの方法によっても達成することができ、そのような方法として、限定するものではないが、拡散、能動輸送、音波破碎浴、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、吸着、及び原形質体融合などがある。トランスフェクトされた核酸分子は、当業者には公知の技術を用いて、酵母染色体に組み込むか、又は染色体外ベクター上に維持することができる。このような核酸分子を担持する酵母ビヒクルの例は、本明細書に詳しく開示されている。前述したように、酵母細胞質体、酵母ゴースト、並びに酵母膜粒子若しくは細胞壁調製物は、インタクトな酵母微生物又は酵母スフェロプラストを所望の核酸分子でトランスフェクトし、そこに抗原を産生させた後、所望の抗原又は他のタンパク質を含有する細胞質体、ゴースト若しくは細胞下酵母膜抽出物又はこれらの画分を生産するのに当業者には公知の技術を用い、上記微生物又はスフェロプラストを操作することによって、組換えにより作製することもできる。

【0089】

組換え酵母ビヒクルの作製並びに酵母ビヒクルによる抗原及び/又は他のタンパク質の発現のために効果的な条件として、酵母株を培養することができる有効培地が挙げられる。有効培地は、典型的に、同化可能な炭水化物、窒素及びリン酸供給源、並びに適切な塩、ミネラル類、金属及びその他の栄養素、例えば、ビタミン及び増殖因子を含む水性培地である。培地は、複合栄養素を含んでもよいし、又は規定最少培地であってもよい。本発明の酵母株は、様々な容器内で培養することができ、こうした容器として、限定するものではないが、バイオリアクター、三角フラスコ(Erlenmeyer flask)、試験管、マイクロタイタープレート、及びベトリプレートなどがある。培養は、酵母に適切な温度、pH及び酸素濃度で実施する。こうした培養条件は、当業者には周知のものである(例えば、グスリー(Guthrie)ら(編)、1991年、メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology)、第194巻、アカデミックプレス(Academic Press)、サンディエゴ)。例えば、一プロトコルによれば、酵母-ブラキュリ免疫治療組成物の接種プレート及び/又は接種培養物から得られた培養物を用いて、好適な培地を含む液体培養物を接種し、250回転毎分(rpm)で撹拌しながら、30で約20時間増殖させる。次に、必要に応じて、初代培養物をより大きな培養物に増殖させてもよい。酵母を形質転換するのに用いたベクターからのタンパク質発現(例えば、ブラキュリ発現)は、使用したプロモータが構成プロモータであれば、構成性となる可能性があり、又は使用したプロモータが、誘導プロモータであれば、プロモータに適した誘導条件(例えば、CUP1プロモータの場合には、硫酸銅)の付加により、誘導することができる。誘導プロモータの場合には、タンパク質発現の誘導は、培養物を好適な細胞密度(約0.2 Y.U./ml)以上まで増殖させた後、開始してよい。

【0090】

本発明の酵母-ブラキュリ免疫治療組成物の培養に好適な培地の非制限的例の1つは、U2培地である。U2培地は、以下の成分: 20g/Lのグルコース、6.7g/Lの硫酸アンモニウム含有酵母窒素原礎培地、並びに各々0.04mg/mLのヒスチジン、ロイシン、トリプトファン、及びアデニンを含む。本発明の酵母-ブラキュリ免疫治療組成物の培養に好適な培地の別の非制限的例は、UL2培地である。UL2培地は、以下の成分: 20g/Lのグルコース、硫酸アンモニウム含有の6.7g/Lの酵母窒素原礎培地、並びに各々0.04mg/mLのヒスチジン、トリプトファン、及びアデニンを含む。

【0091】

本発明の一実施形態では、本発明の酵母ビヒクルにおいてブラキュリタンパク質を発現させるのに、誘導プロモータ(例えば、CUP1プロモータ)を用いる場合、タンパク質発現の誘導は、このようなプロモータを用いて酵母により発現されるほとんどのタンパク質に好適な細胞密度に比べて、高い細胞密度で開始する。さらに具体的には、本発明者らは、酵母内でのブラキュリ抗原の発現前に、少なくとも0.5 Y.U./ml~約2.0

Y . U . / m l、一態様では、0 . 5 Y . U . / m l ~ 約 1 . 5 Y . U . / m l、一態様では、少なくとも 1 . 0 Y . U . / m l ~ 約 2 . 0 Y . U . / m l、及び別の態様では、少なくとも 1 . 0 Y . U . / m l の細胞密度まで、ブラキュリを発現する酵母を増殖させることができる、C U P 1 プロモータによって駆動される最適なブラキュリ抗原発現が起こることをみいだした。本発明は、ブラキュリ発現の誘導後、酵母は、約 1 X ~ 1 . 5 X しか倍加しないことをみいだした。さらに、ブラキュリ発現の誘導後、本発明者らは、約 2 . 0 Y . U . / m l より高い細胞密度までの酵母の増殖、又は約 6 ~ 8 時間を超える時間にわたる増殖によって、培養物の生存能力低下が起こり、酵母内の抗原蓄積が実質的に改善されないことをみいだした。従って、本発明の一実施形態では、C U P 1 プロモータなどの誘導プロモータの制御下での抗原発現を有する酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物は、対数増殖期中期まで増殖させた後、抗原発現を誘導する。一態様では、約 1 ~ 2 Y . U . / m l まで細胞を増殖させた後、抗原発現を誘導する。一態様では、抗原発現を誘導し（例えば、硫酸銅の添加により）、6、6 . 5、7、7 . 5、又は 8 時間まで継続する。一態様では、誘導は、温度約 30 及び攪拌速度 250 r p m で行う。

【0092】

本発明のいくつかの実施形態では、酵母は、中性 p H 条件下で増殖させる。本明細書で用いる場合、用語「中性 p H」を一般的に用いるとき、p H 約 5 . 5 ~ p H 約 8、一態様では、p H 約 6 ~ p H 約 8 の p H 範囲を指す。当業者であれば、p H メータで測定する際、微細な変動（例えば、1 / 10 又は 1 / 100）が起こりうることは理解されよう。従って、酵母細胞を増殖させるための中性 p H の使用とは、酵母細胞を培養している大部分の時間にわたって、これら酵母細胞を中性 p H で増殖させることを意味する。一実施形態では、少なくとも 5 . 5 の p H レベルに維持した培地（すなわち、培地の p H は、p H 5 . 5 を下回らないようにする）中で酵母を増殖させる。別の態様では、約 6、6 . 5、7、7 . 5、又は 8 に維持した p H レベルで酵母を増殖させる。酵母を培養する中性 p H の使用は、免疫調節用のビヒクルとして酵母を用いるのに望ましい特性である複数の生物学的効果を促進する。例えば、中性 p H での酵母の培養により、細胞産生時間に負の作用（例えば、倍加時間の減速）をもたらすことなく、酵母の良好な増殖を可能にする。酵母は、その細胞壁柔軟性を失うことなく、高い密度まで増殖し続けることができる。中性 p H の使用により、柔軟な細胞壁を有する酵母及び / 又は細胞壁消化酵素（例えば、グルカナーゼ）に対してより感受性の高い酵母の生産が、すべての回収密度で可能になる。柔軟な細胞壁を有する酵母は、より酸性の条件下で増殖させた酵母と比較して、例えば、酵母を貪食した抗原提示細胞によるサイトカイン（例えば、限定するものではないが、I F N - 、インターロイキン - 12（I L - 12）、及び I L - 2 などの T H 1 型サイトカイン、並びに I L - 6 などの炎症誘発性サイトカイン）の分泌を促進することにより、異なる又は改善された免疫応答を誘導することができるため、上記の特徴は望ましい。さらに、このような培養方法により、細胞壁内に位置する抗原との高い接触性がもたらされる。別の態様では、いくつかの抗原についての中性 p H の使用は、ジチオトレイトール（D T T）での処理により、ジスルフィドの放出を可能にするが、これは、このような抗原 - 発現酵母をより低い p H（例えば、p H 5）の培地で培養した場合、不可能である。

【0093】

一実施形態では、酵母グリコシル化の量の制御を用いて、特に表面での、酵母による抗原の発現を制御する。酵母グリコシル化の量は、糖部分が嵩高になりやすいため、抗原の免疫原性及び抗原性、特に、表面に発現したものに影響を及ぼしうる。従って、酵母表面上の糖部分の存在、及び標的抗原周辺の 3 次元空間へのその影響を本発明の酵母の調節において考慮すべきである。任意の方法を用いて、酵母のグリコシル化の量を低減（又は、所望であれば、増加）することができる。例えば、低グリコシル化をもたらすように選択された酵母突然変異株（例えば、m n n 1、o c h 1 及び m n n 9 突然変異体）を用いることもできるし、又は、標的抗原へのグリコシル化アクセプター配列を突然変異により排除することもできる。あるいは、短縮グリコシル化パターンを有する酵母、例えば、ピキア（P i c h i a）を用いることもできる。また、グリコシル化を低減又は改変する方法

を用いて、酵母を処理することも可能である。

【0094】

本発明の一実施形態では、酵母ビヒクルでの組換えによる抗原又は他のタンパク質の発現に代わるものとして、タンパク質若しくはペプチド、又は抗原として作用する、及び／又は本発明の免疫調節物質若しくは生体応答調節物質として有用な炭水化物若しくは他の分子を、酵母ビヒクルに細胞内ロードする。続いて、今、細胞内に抗原及び／又は他のタンパク質を含有する酵母ビヒクルを個体に投与するか、あるいは、樹状細胞などの担体にロードすることができる。ペプチド及びタンパク質は、拡散、能動輸送、リポソーム融合、エレクトロポレーション、食作用、凍結解凍サイクル及び音波破碎浴など、当業者には公知の技術によって、本発明の酵母ビヒクルに直接挿入することができる。ペプチド、タンパク質、炭水化物、又は他の分子を直接ロードすることができる酵母ビヒクルとして、インタクトな酵母、並びにスフェロプラスト、ゴースト若しくは細胞質体などがあり、これらに、作製後、抗原及び他の物質をロードすることができる。あるいは、インタクトな酵母に、抗原及び／又は物質をロードした後、これらから、スフェロプラスト、ゴースト、細胞質体、又は細胞下粒子を調製することもできる。この実施形態では、いくつかの抗原及び／又は他の物質を酵母ビヒクルにロードしてもよく、例えば、微生物又はその部分のローディングによって提供されるものなど、少なくとも1、2、3、4、又は数百若しくは数千までの整数の抗原及び／又は他の物質をロードすることができる。

10

【0095】

本発明の別の実施形態では、抗原及び／又は他の物質を酵母ビヒクルに物理的に結合させる。酵母ビヒクルへの抗原及び／又は他の物質の物理的結合は、当分野において好適な方法によっても達成することができ、こうした方法として、限定するものではないが、酵母ビヒクルの外側表面への抗原及び／又は他の物質の化学的架橋、又は酵母ビヒクルの外側表面への抗原及び／又は他の物質の生物学的連結（例えば、抗体若しくは他の結合相手を用いて）などの共有及び非共有結合方法がある。化学的架橋は、例えばグルタルアルデヒド結合、光親和性標識、カルボジイミドによる処理、ジスルフィド結合が可能な化学物質による処理、並びに当分野で標準的な他の架橋化学物質による処理などの方法によって達成することができる。あるいは、酵母の外側表面が、特定の電荷特性を有する抗原及び／又は他のタンパク質と融合若しくは結合しやすくなるように、酵母膜の脂質二層の電荷又は細胞壁の組成を改変する化学物質を酵母ビヒクルと接触させることができる。抗体、結合ペプチド、可溶性受容体、及び他のリガンドなどのターゲティング物質を、融合タンパク質として抗原に組み込んでもよいし、あるいは、抗原と酵母ビヒクルとの結合のために抗原と結合させてもよい。

20

30

【0096】

抗原又は他のタンパク質を酵母の表面に発現させるか、又は物理的に結合させる場合、一態様では、表面上の抗原若しくは他のタンパク質発現又は含量を最適化するように、スペーサアームを注意深く選択することができる。スペーサアームの大きさは、どのくらいの抗原又は他のタンパク質を、酵母の表面への結合のために露出させるかに影響を及ぼしうる。従って、どの抗原又は他のタンパク質が用いられているかに応じて、当業者は、酵母表面上の抗原又は他のタンパク質の適切なスペーシングを達成するスペーサアームを選択する。一実施形態では、スペーサアームは、少なくとも450アミノ酸の酵母タンパク質である。スペーサアームについては、上に詳しく述べている。

40

【0097】

また別の実施形態では、より受動的、非特異的若しくは非共有結合機構、例えば、バッファー又は他の好適な製剤（例えば、混合物）中で、酵母ビヒクルと抗原又は他のタンパク質を穏やかに混合することなどによって、酵母ビヒクルと抗原又は他のタンパク質を互いに結合させる。

【0098】

一実施形態では、酵母細胞壁断片、酵母膜粒子若しくは酵母断片（すなわち、インタクトではない）を製造するような様式で、インタクトな酵母（異種抗原又は他のタンパク質

50

の発現を含む、又は含まない)を粉碎するか、又は処理することができ、酵母断片は、いくつかの実施形態では、免疫応答を増強するための抗原(例えば、DNAワクチン、タンパク質サブユニットワクチン、死滅若しくは不活性化病原体、ウイルスベクターワクチン)を含む他の組成物と一緒に、提供若しくは投与することができる。例えば、酵素処理、化学処理又は物理的力(例えば、機械的せん断若しくは音波破碎)を用いて、酵母を小片に粉碎してもよく、これをアジュバントとして用いる。

【0099】

一実施形態では、本発明において有用な酵母ビヒクルには、死滅又は不活性化した酵母ビヒクルが含まれる。酵母の死滅又は不活性化は、当分野では公知の様々な好適な方法のどれを用いても達成することができる。例えば、酵母の熱不活性化は、酵母を不活性化する標準的方法であり、当業者は、必要に応じて、当分野では公知の標準的方法により、標的抗原の構造変化をモニターすることができる。あるいは、酵素を不活性化する別の方法、例えば、化学、電気、放射性若しくはUV方法などを用いることもできる。例えば、メソッズ・オブ・エンザイモロジー(Methods of Enzymology)、第194巻、コールド・スプリング・ハーバー出版(Cold Spring Harbor Publishing)(1990年)などの標準的酵母培養テキストに開示されている方法を参照されたい。用いられる不活性化方法のいずれも、標的抗原の二次、三次、若しくは四次構造を考慮に入れて、その免疫原性を最適化するような構造を保存すべきである。

【0100】

当業者には公知のいくつかの方法を用いて、酵母ビヒクルを本発明の酵母ベース免疫治療組成物又は製品に製剤化することができる。例えば、酵母ビヒクルを凍結乾燥により乾燥させることができる。酵母ビヒクルを含む製剤は、ベーキング又は醸造処理に用いられる酵母についてなされるものなど、ケーキ若しくは錠剤に酵母を充填することによっても製造することができる。さらに、酵母ビヒクルを薬学的に許容される賦形剤、例えば、宿主若しくは宿主細胞に許容される等張バッファーなどと混合してもよい。このような賦形剤の例として、水、塩水、リンガー液(Ringer's solution)、デキストロース溶液、ハンクス液(Hank's solution)、及びその他の水性生理的平衡食塩水が挙げられる。また、不揮発性油、ゴマ油、オレイン酸エチル、若しくはトリグリセリドなどの非水性ビヒクルを用いてもよい。他の有用な製剤として、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール、グリセロール若しくはデキストランなどの増粘剤を含有する懸濁液がある。賦形剤はまた、等張力及び化学的安定性を高める物質のような添加剤を少量含んでもよい。バッファーの例として、リン酸バッファー、重炭酸バッファー及びトリス(Tris)バッファーがあり、保存料の例としては、チメロサル、m-又はo-クレゾール、ホルマリン及びベンジルアルコールが挙げられる。標準的製剤は、注射液、又は注射用の懸濁液若しくは溶液として好適な液体に溶解させることができる固体のいずれであってもよい。従って、非液体製剤の場合、賦形剤は、例えば、デキストロース、ヒト血清アルブミン、及び/又は保存料を含んでよく、投与前に、これらに滅菌水又は塩水を添加することができる。

【0101】

本発明の一実施形態では、組成物は、別の物質(これらは、生体応答調節化合物とも呼ぶこともできる)、又はこのような物質/調節剤を生成する能力を含んでもよい。例えば、酵母ビヒクルを少なくとも1つの抗原及び少なくとも1つの抗原/生体応答調節化合物でトランスフェクトするか、又はこれらを酵母ビヒクルにロードしてもよいし、あるいは、本発明の組成物を少なくとも1つの抗原/生体応答調節剤と一緒に投与してもよい。生体応答調節剤としては、免疫応答を調節することができるアジュバント及び他の化合物(免疫調節化合物と呼ばれる)、並びに酵母ベース免疫治療薬などの別の化合物若しくは物質の生物活性を改変する化合物(生物活性は免疫系作用に限定されない)を挙げることができる。防御免疫応答を刺激することができる免疫調節化合物もあれば、有害な免疫応答を抑制することができるものもあり、免疫調節剤が、所与の酵母ベース免疫治療薬と併用

して有用であるか否かは、少なくとも部分的に、治療若しくは予防しようとする病態若しくは状態、及び／又は治療しようとする個体に左右されうる。特定の生体応答調節剤は、細胞性免疫応答を優先的に増強し、他のものは、体液性免疫応答を優先的に増強する（すなわち、体液性免疫に比べて、高いレベルの細胞性免疫が存在する免疫応答を刺激することができ、その逆も可能である）。特定の生体応答調節剤は、酵母ベース免疫治療薬の生物学的特性と共通する一つ以上の特性を有するか、又は酵母ベース免疫治療薬の生物学的特性を増強又は補足する。免疫応答の刺激又は抑制を測定するために、並びに体液性免疫応答から細胞性免疫応答を識別するために、及び細胞性免疫応答の１タイプを別のタイプから識別する（例えば、ＴＨ１７応答とＴＨ１応答）ための、当業者には公知の多数の方法がある。

10

【 0 1 0 2 】

本発明で有用な物質／生体応答調節剤としては、限定するものではないが、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、脂質誘導体、ペプチド、タンパク質、多糖、小分子薬剤、抗体及びその抗原結合断片（限定するものではないが、抗サイトカイン抗体、抗サイトカイン受容体抗体、抗ケモカイン抗体）、ビタミン、ポリヌクレオチド、核酸結合部分、アプタマー、及び増殖調節剤などが挙げられる。いくつかの好適な物質として、限定するものではないが、以下のものが挙げられる：ＩＬ－１又はＩＬ－１若しくはＩＬ－１Ｒのアゴニスト、抗ＩＬ－１若しくは他のＩＬ－１アンタゴニスト；ＩＬ－６又はＩＬ－６若しくはＩＬ－６Ｒのアゴニスト、抗ＩＬ－６若しくは他のＩＬ－６アンタゴニスト；ＩＬ－１２又はＩＬ－１２若しくはＩＬ－１２Ｒのアゴニスト、抗ＩＬ－１２若しくは他のＩＬ－１２アンタゴニスト；ＩＬ－１７又はＩＬ－１７若しくはＩＬ－１７Ｒのアゴニスト、抗ＩＬ－１７若しくは他のＩＬ－１７アンタゴニスト；ＩＬ－２１又はＩＬ－２１若しくはＩＬ－２１Ｒのアゴニスト、抗ＩＬ－２１若しくは他のＩＬ－２１アンタゴニスト；ＩＬ－２２又はＩＬ－２２若しくはＩＬ－２２Ｒのアゴニスト、抗ＩＬ－２２若しくは他のＩＬ－２２アンタゴニスト；ＩＬ－２３又はＩＬ－２３若しくはＩＬ－２３Ｒのアゴニスト、抗ＩＬ－２３若しくは他のＩＬ－２３アンタゴニスト；ＩＬ－２５又はＩＬ－２５若しくはＩＬ－２５Ｒのアゴニスト、抗ＩＬ－２５若しくは他のＩＬ－２５アンタゴニスト；ＩＬ－２７又はＩＬ－２７若しくはＩＬ－２７Ｒのアゴニスト、抗ＩＬ－２７若しくは他のＩＬ－２７アンタゴニスト；Ｉ型インターフェロン（ＩＦＮ－ など）又はＩ型インターフェロンのアゴニスト若しくはアンタゴニスト又はその受容体；ＩＩ型インターフェロン（ＩＦＮ－ ）又はＩＩ型インターフェロンのアゴニスト若しくはアンタゴニスト又はその受容体；抗ＣＤ４０、ＣＤ４０Ｌ、リンパ球活性化遺伝子３（ＬＡＧ３）タンパク質及び／又はＩＭＰ３２１（ＬＡＧ３の可溶型に由来するＴ細胞免疫刺激因子）、抗ＣＴＬＡ－４抗体（例えば、抗原Ｔ細胞を放出するため）；Ｔ細胞共刺激因子（例えば、抗ＣＤ１３７、抗ＣＤ２８、抗ＣＤ４０）；アレムツマブ（例えば、ＣａｍＰａｔｈ（登録商標））、デニロイキン・ディフティトックス（例えば、ＯＮＴＡＫ（登録商標））；抗ＣＤ４；抗ＣＤ２５；抗ＰＤ－１、抗ＰＤ－Ｌ１、抗ＰＤ－Ｌ２；ＦＯＸＰ３をブロックする物質（例えば、ＣＤ４＋／ＣＤ２５＋Ｔ調節細胞の活性を無効にする／これらを死滅させるために）；Ｆ１ｔ３リガンド、イミキモド（アルダラ（Ａｌｄａｒａ）（商標））、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）；顆粒球－コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、サルグラモスチム（ロイキン（Ｌｅｕｋｉｎｅ）（登録商標））；限定するものではないが、プロラクチン及び成長ホルモンなどのホルモン；Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）アゴニスト、例えば、限定するものではないが、ＴＬＲ－２アゴニスト、ＴＬＲ－４アゴニスト、ＴＬＲ－７アゴニスト、及びＴＬＲ－９アゴニスト；ＴＬＲアンタゴニスト、例えば、限定するものではないが、ＴＬＲ－２アンタゴニスト、ＴＬＲ－４アンタゴニスト、ＴＬＲ－７アンタゴニスト、及びＴＬＲ－９アンタゴニスト；抗炎症剤及び免疫調節剤、例えば、限定するものではないが、ＣＯＸ－２阻害剤（例えば、セレコキシブ、ＮＳＡＩＤＳ）、グルココルチコイド、スタチン、並びにタリドミド及びその類似体、例えば、ＩＭｉＤ（商標）（これらは、タリドミド（例えば、ＲＥＶＬＩＭＩＤ（登録商標）（レナリドミド）、ＡＣＴＩＭＩＤ（登録商標）（ボマリドミド）の構造的かつ機能

20

30

40

50

的類似体である)；真菌若しくは細菌成分などの炎症誘発性物質、又はいずれかの炎症誘発性サイトカイン若しくはケモカイン；免疫治療ワクチン、例えば、限定するものではないが、ウイルスベースのワクチン、細菌ベースのワクチン、又は抗体ベースのワクチン；並びにその他いずれかの免疫調節剤、免疫増強剤、抗炎症剤、炎症誘発性物質、並びに、抗原提示細胞又はT H 1 7、T H 1、及び/又はT r e g細胞の数を調節する、その活性化状態を調節する、及び/又は生存期間を調節するいずれかの物質。このような物質のあらゆる組合せが本発明によって考慮され、酵母ベース免疫治療薬と併用される上記物質、又は酵母ベース免疫治療薬を含む(例えば、これと同時に、順次、若しくはその他のフォーマットで)プロトコルで投与される上記物質のいずれも、本発明に包含される組成物である。このような物質は当分野では公知である。これらの物質は、単独で用いても、又は

10

【0103】

薬剤は、所与のタンパク質若しくはペプチド又はそのドメインのアゴニスト及びアンタゴニストを含んでよい。本明細書で用いる場合、「アゴニスト」は、受容体又はリガンドに結合して、応答を発生若しくはトリガーする、任意の化合物若しくは物質であり、例えば、限定するものではないが、小分子、タンパク質、ペプチド、抗体、核酸結合物質などが挙げられ、受容体又はリガンドに結合する天然に存在する物質の作用を模倣若しくは増強する物質を含みうる。「アンタゴニスト」は、アゴニストの作用をブロック若しくは阻害若しくは抑制する、任意の化合物若しくは物質であり、限定するものではないが、小分子、タンパク質、ペプチド、抗体、核酸結合物質などが挙げられる。

20

【0104】

本発明の組成物は、癌を予防若しくは治療するのに有用ないずれか他の薬剤若しくは組成物若しくはプロトコル、又は癌、特にブラキユリ発現若しくは過剰発現に関連する癌のあらゆる症状を治療若しくは軽減するあらゆる化合物をさらに含む、あるいは、これらと一緒に(同時に、順次、若しくは断続的に)投与することができる。さらに、本発明の組成物は、他の免疫治療組成物(予防的及び/又は治療的免疫療法を含む)と一緒に用いることができる。実際、本発明の組成物は、癌におけるブラキユリ発現を阻害する(従って、抗増殖への影響を阻害する)ことによって、転移性癌に起こりうる化学療法耐性若しくは放射線耐性を阻害若しくは低減するのに用いることができ、あるいは、本発明の組成物は、個体における化学療法又は放射線療法の性能を高めることができる。癌の治療に有用な別の薬剤、組成物若しくはプロトコル(例えば、治療プロトコル)としては、限定するものではないが、以下のものが挙げられる：化学療法、腫瘍の外科的切除、放射線療法、同種若しくはオートロガス幹細胞移植、及び/又は標的型癌療法(例えば、小分子薬剤、生物製剤、又は腫瘍増殖及び進行に関与する分子を特異的にターゲティングするモノクローナル抗体療法、例えば、限定するものではないが、選択的エストロゲン受容体モジュレーター(S E R M)、アロマターゼ阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、セリン/トレオニンキナーゼ阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ(H D A C)阻害剤、レンチノイド受容体活性化物質、アボトシス刺激剤、血管新生阻害剤、ポリ(A D P - リボース__)ポリメラーゼ(P A R P)阻害剤、若しくは免疫賦活剤)。これら別の治療薬及び/又は治療プロトコルはいずれも、本発明の免疫療法組成物の前に、これと同時に、交互に、若しくはその後、又は異なる時点で投与してよい。例えば、化学療法又は標的癌療法と同時に個体に投与する場合、免疫療法組成物の効果を最大限にするために、化学療法又は標的癌療法の投与の間の「休薬期間(h o l i d a y)」中に酵母-ブラキユリ免疫療法組成物を投与するのが望ましいであろう。腫瘍の外科的切除は、酵母-ブラキユリ免疫療法組成物の投与前に行われることが多いが、酵母-ブラキユリ免疫療法組成物を投与中又は投与後に、追加的手術若しくは初回手術を行ってもよい。

30

40

【0105】

本発明はまた、本明細書に記載する組成物のいずれか、又は本明細書に記載する組成物の個々の成分のいずれかを含むキットも含む。キットは、別の試薬、並びにブラキユリ発現若しくは過剰発現に関連する癌を予防又は治療するために本発明の組成物のいずれかを

50

用いる上での説明書又は使用書を含んでいてもよい。

【0106】

本発明の組成物の投与又は使用方法

本発明の酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物は、ブラキュリ発現若しくは過剰発現に関連する、又はこれの特徴とする癌を、例えば、このような癌の出現を予防し、癌の進行を停止する、又は癌を排除することなどによって、予防又は治療するための使用を目的として設計される。より具体的には、酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物は、個体におけるブラキュリ発現腫瘍の発生を予防、阻害若しくは遅延させるために、並びに / 又は腫瘍遊走及び / 若しくは他の組織の腫瘍侵入（転移）を予防、阻害若しくは遅延させるために、並びに / 又は癌の進行を一般的に予防若しくは阻害するために、用いることができる。酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物はまた、例えば、個体における腫瘍負荷を低減する；個体における腫瘍増殖を阻害する；個体の生存期間を延ばす；腫瘍の遊走の発生及び / 若しくは他の組織の腫瘍侵入（転移性癌）を予防、阻害、逆転若しくは遅延させる、並びに / 又は個体における癌の進行を予防、阻害、逆転若しくは遅延させることなどによって、癌の少なくとも1つの症状を軽減するために用いることができる。また、癌におけるブラキュリ発現を阻害することによって、転移性癌に起こりうる化学療法又は放射線療法耐性を阻害、軽減若しくは排除するために、酵母 - ブラキュリ免疫療法を治療として用いることができ、本発明の組成物は、個体における化学療法又は放射線療法の性能を増強しうる。

10

【0107】

本発明の組成物及び方法に関連する癌は、ブラキュリを発現する、若しくは発現する可能性があるあらゆる癌、又はブラキュリを発現する、若しくは発現する可能性がある癌の近傍にある癌であり、そのようなものとして、限定するものではないが、乳房、小腸、胃、腎臓、膀胱、子宮、卵巣、精巣、肺、結腸、脾臓、若しくは前立腺の癌が挙げられ、転移性及び進行期癌を含む。さらに、ブラキュリは、例えば、慢性リンパ性白血病（CLL）、エプスタイン - バーウイルス形質転換B細胞、パーキット及びホジキンリンパ腫などのB細胞由来の腫瘍、並びにそれらの転移性癌にも発現する。

20

【0108】

本発明の一実施形態は、癌を有する個体における腫瘍遊走を阻害する、及び / 又は癌の転移進行を抑制、停止（停止）、逆転若しくは予防する方法、あるいは、癌における転移イベントの発生を逆転する方法に関する。前述したように、ブラキュリは、ヒト腫瘍細胞において上皮間葉移行（EMT）を促進し、腫瘍細胞に間葉表現型、並びに遊走及び侵入能力を付与すると共に、腫瘍細胞周期進行を減衰する。従って、進行過程へのブラキュリの関与は、前転移期での癌の停止を含む転移プロセスの予防又は阻害のための理想的な標的となる。本発明の酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物の使用は、化学療法又は放射線療法などの伝統的治療法からの癌の逃避（又は逃避の試み）にもかかわらず、転移性癌を予防若しくは治療（癌の進行の停止など）する上で有効となりうる。本方法は、癌を有する個体に、本明細書に記載する本発明の酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物を投与するステップを含み、この組成物は、限定するものではないが、（a）酵母ビヒクルと；（b）少なくとも1つのブラキュリ抗原を含む癌抗原を含有する。

30

【0109】

一態様では、組成物を最初に投与する時点で、ブラキュリは個体の癌に検出されていない。一般に、個体の癌にブラキュリが検出されないとき、個体は、ブラキュリ発現がまだ現れていない早期癌（例えば、I期又はII期）、又はブラキュリ発現が、いずれのイベントにおいてもまだ検出可能ではない（すなわち、ブラキュリは、低レベルで若しくは少数の腫瘍細胞において発現しているか、又はしていない可能性があるが、標準的検出方法を用いて、まだ容易に検出可能でない）早期癌を有しうる。本発明のこの態様では、酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物の使用により、ブラキュリ発現腫瘍細胞の発生が予防、遅延若しくは阻害される。その結果、腫瘍遊走及び / 又は腫瘍の転移進行を招くその他の転移プロセスが、予防、遅延若しくは阻害され、及び / 又は個体において腫瘍進行の全体的停止が起こる。

40

50

【 0 1 1 0 】

別の態様では、組成物を最初に投与する時点で、個体の癌にブラキユリ発現が検出されるか、又は検出することができる。本発明のこの態様では、個体は、Ⅰ期、ⅠⅠ期、ⅠⅠⅠ期、若しくはⅠⅣ期の癌を有しうる。この態様では、酵母 - ブラキユリ免疫治療組成物の使用により、ブラキユリを発現する腫瘍の増殖が抑制、排除若しくは緩慢化又は停止され、その結果、個体における腫瘍負荷の軽減、ブラキユリ発現腫瘍増殖の阻害、及び/又は個体の生存期間の延長を達成することができる。個体は、転移プロセスの停止、緩慢化若しくは逆転を被ることができ、患者の生存期間及び健康を改善し、さらには、他の治療プロトコルによって癌を治療することも可能になる。

【 0 1 1 1 】

実際に、転移癌は、化学療法、放射線、若しくは標的癌療法などの癌治療法に対する耐性、又は耐性増加と関連する可能性があり、癌は、上記治療法から「逃避」するか、又は単純に、治療法による作用を受けにくくなり、進行する。従って、治療法の効力を改善若しくは増強して、患者の健康及び生存期間を改善するためには、こうした治療法に対する耐性を低減又は排除する必要がある。従って、本発明の一実施形態は、癌患者における化学療法耐性、標的癌療法耐性、又は放射線耐性を低減又は予防する方法に関する、本方法は、癌を有し、その癌のための化学療法及び/又は放射線療法を受けている個体に、本発明に記載する酵母 - ブラキユリ免疫治療組成物を投与するステップを含み、この組成物は、(a) 酵母ビヒクルと；(b) 少なくとも1つのブラキユリ抗原を含む癌抗原を含有する組成物を含んでいてよい。また、本方法は、限定するものではないが、標的癌療法などの癌の他の治療的治療に関連する耐性を治療するために用いてもよい。

【 0 1 1 2 】

本発明の一態様では、組成物を最初に投与する時点で、ブラキユリは個体の癌に検出されていない。この態様では、酵母 - ブラキユリ免疫治療組成物の投与は、癌におけるブラキユリ発現腫瘍細胞の発生を阻害することにより、化学療法若しくは放射線に対する耐性の開始を予防若しくは阻害する。別の態様では、組成物を最初に投与する時点で、ブラキユリ発現が個体の癌に検出される。この態様では、個体は、化学療法若しくは放射線に対する耐性をすでに有していても、有していなくてもよい。いずれの場合も、本発明の酵母 - ブラキユリ免疫治療組成物の投与は、患者におけるブラキユリ発現腫瘍細胞を低減又は排除することにより、化学療法若しくは放射線療法に対する耐性を予防若しくは阻害するか、又は個体を治療する化学療法若しくは放射線療法の能力を増強する。

【 0 1 1 3 】

本発明の別の実施形態は、癌、特に、ブラキユリ発現癌を治療する方法に関する。本方法は、ブラキユリ発現癌を有する個体に、本発明に記載する酵母 - ブラキユリ免疫治療組成物を投与するステップを含み、この組成物は、(a) 酵母ビヒクルと；(b) 少なくとも1つのブラキユリ抗原を含む癌抗原を含有する組成物を含んでよい。一態様では、本方法は、患者における腫瘍負荷を軽減する。一態様では、本方法は、患者の生存期間を延ばす。一態様では、本方法は、個体における腫瘍増殖を阻害する。一態様では、本方法は、腫瘍の転移進行を予防、停止又は逆転する。

【 0 1 1 4 】

ブラキユリ発現は、癌が、より高い段階（例えば、具体的癌に応じて、Ⅰ期からⅠⅠ期、ⅠⅠⅠ期、ⅠⅣ期へ）増進又は進行するにつれて、優勢になると考えられ、進行過程と関連していることから、本発明の一実施形態では、ブラキユリ発現癌の発症を予防若しくは遅延させる、又は前転移又は前悪性段階にある癌を停止する方法を提供する。このような方法は、ブラキユリ発現癌が検出されていない個体に、本発明に記載する酵母 - ブラキユリ免疫治療組成物を投与するステップを含み、この組成物は、(a) 酵母ビヒクルと；(b) 少なくとも1つのブラキユリ抗原を含む癌抗原を含有する組成物を含んでよい。この実施形態の一態様では、癌は、癌を有する個体の少なくともサブセットにおいて、癌のいずれかの段階で、ブラキユリを発現するか、又は発現しやすいことがわかっている。この実施形態の一態様では、個体は、すでに癌を有するが、組成物を最初に投与する時点で

、ブラキユリは癌に検出されていないが、これは、個体が、ブラキユリ発現がまだ現れていない早期癌、又はブラキユリ発現が、いずれのイベントにおいてもまだ検出可能ではない(すなわち、ブラキユリは、低レベルで若しくは少数の腫瘍細胞において発現しているか、又はしていない可能性があるが、標準的検出方法を用いて、まだ容易に検出可能でない)早期癌を有しうることを意味する。いくつかの症例では、このタイプの癌が、高い転移進行速度を有することがわかっている場合もある。この態様では、酵母-ブラキユリ免疫治療組成物の投与によって、患者の癌におけるブラキユリ発現腫瘍細胞の発生が予防、遅延又は阻害されるため、ブラキユリ発現を伴う転移プロセスが予防、停止、遅延又は阻害される。別の態様では、個体は、組成物を投与する際、癌を有していない。このような個体は、恐らく、家族病歴若しくは遺伝子マーカーのために、又は前癌性細胞若しくは病変の徴候を示しているか、前癌性(前悪性)細胞若しくは病変を有するために、癌を発生する「素因がある」か、又は癌を発生しやすいと考えられる。

10

【0115】

一態様では、癌の治療に有用な、少なくとも1つの他の治療化合物若しくは治療プロトコルで、個体をさらに治療する。このような治療薬及びプロトコルについては、本明細書の他所で詳述している。例えば、本明細書に記載する本発明の方法に関する実施形態のいずれかにおいて、一態様では、個体が癌を有する(腫瘍細胞における検出可能なブラキユリ発現の状態とは関係なく)場合、個体は、癌の別の治療法で治療中であるか、治療を受けたことがある。このような治療法は、本明細書ですでに記載した治療プロトコルのいずれか又はあらゆる治療化合物若しくは物質の使用を含んでいてもよく、限定するものではないが、化学療法、放射線療法、標的型癌療法、腫瘍の外科的切除、幹細胞移入、サイトカイン療法、T細胞移入、及び/又は第2免疫治療組成物の投与が挙げられる。第2免疫治療組成物を投与する場合、このような組成物として、限定するものではないが、別の酵母ベース免疫療法、組換えウイルスベース免疫療法(ウイルスベクター)、サイトカイン療法、免疫刺激剤療法(免疫刺激特性を有する化学療法など)、DNAワクチン、並びにその他の免疫治療組成物が挙げられる。

20

【0116】

一態様では、第2免疫治療組成物は、ブラキユリ抗原を含まない第2癌抗原を含有する。例えば、酵母-ブラキユリ免疫治療組成物との併用に有用な第2免疫治療組成物は、別の癌抗原を含む酵母-免疫治療組成物である。このような癌抗原として、限定するものではないが、以下のものが挙げられる: 癌胎児性抗原(CEA)、点突然変異Ras腫瘍性タンパク質、MUC-1、EGFR、BCR-Ab1、MART-1、MAGE-1、MAGE-3、GAGE、GP-100、MUC-2、正常及び点突然変異p53腫瘍性タンパク質、PSMA、チロシナーゼ、TRP-1(gp75)、NY-ESO-1、TRP-2、TAG72、KSA、CA-125、PSA、HER-2/neu/c-erb/B2、hTERT、p73、B-Raf、腺腫様多発性結腸ポリープ(APC)、Myc、フォン・ヒッペル・リンドウタンパク質(VHL)、Rb-1、Rb-2、アンドロゲン受容体(AR)、Smad4、MDR1、Flt-3、BRCA-1、BRCA-2、pax3-fkhr, ewsfli-1、HERV-H、HERV-K、TWIST、メソテリン、NGEP、このような抗原の修飾物、このような抗原のスプライス変異体、及びこのような抗原のエピトープアゴニスト、並びにこのような抗原の組合せ、及び/又はそれらの免疫原性ドメイン、それらの修飾物、それらの変異体、及び/又はそれらのエピトープアゴニスト。

30

40

【0117】

本明細書で用いる場合、癌を「治療する」、又はそのあらゆる変化形(例えば、「癌のために治療される」など)とは、概して、少なくとも1つの治療目標(その治療の非存在と比較して)のために、癌が発生した(例えば、癌と診断された、又は個体に検出された)とき、本発明の組成物を投与することを意味し、治療目標としては、以下のものが挙げられる: 腫瘍負荷の軽減、腫瘍増殖の阻害、個体の生存の増加、転移性癌の発症又は発生の遅延、阻害、停止若しくは予防(例えば、腫瘍遊走及び/又は原発癌の外部組織の腫瘍

50

侵入及び／又は癌の転移進行に関連する過程の発生開始の遅延、阻害、停止若しくは予防などにより）、癌進行の遅延若しくは停止、腫瘍に対する免疫応答の改善、腫瘍抗原に対する長期記憶免疫応答の改善、並びに／又は個体の健康全般の改善。癌を「予防する」若しくは癌から「防御する」又はそのあらゆる変化形（例えば、「癌の予防」など）とは、概して、少なくとも１つの治療目標（その治療の非存在と比較して）のために、癌が発生する前、又は特定段階の癌、若しくは癌における腫瘍抗原の発現が起こる前（例えば、癌にブラキユリ発現が検出される前）に、本発明の組成物を投与することを意味し、治療目標としては、以下のものが挙げられる：癌の発症又は発生の予防又は遅延、あるいは、万一治療後に癌が発生した場合には、少なくとも癌の重症度の軽減（例えば、腫瘍増殖レベルの低減、癌進行の停止、癌に対する免疫応答の改善、転移プロセスの阻害）又は個体の転帰の改善（例えば、生存期間の延長）。

10

【 0 1 1 8 】

本発明は、本発明の酵母 - ブラキユリ免疫治療組成物の被験者若しくは個体への送達（投与、免疫）を含む。投与は、*ex vivo*又は*in vivo*で実施することができるが、典型的には、*in vivo*で実施する。*ex vivo*投与とは、調節ステップの一部を患者の外部で行うことを指し、例えば、酵母ビヒクル、抗原及びいずれか他の物質若しくは組成物が細胞にロードされるような条件下で、患者から採取した細胞（樹状細胞）の集団に本発明の組成物を投与して、これらの細胞を患者に戻すことを意味する。本発明の治療組成物は、いずれか好適な投与方法によって、患者に戻す、又は投与することができる。

20

【 0 1 1 9 】

組成物の投与は、全身、粘膜及び／又は標的部位の位置の近位（例えば、腫瘍部位付近）に行うことができる。投与の好適な経路は、当業者には明らかであり、予防若しくは治療しようとする癌のタイプ及び／又は標的細胞集団若しくは組織に応じて異なる。許容される様々な投与方法としては、限定するものではないが、静脈内投与、腹腔内投与、筋内投与、結節内投与、冠内投与、動脈内投与（例えば、頸動脈内）、皮下投与、経皮送達、気管内投与、関節内投与、脳室内投与、吸入（例えば、エアロゾル）、頭蓋内、脊髄内、眼内、耳、鼻内、経口、肺投与、カテーテルの含浸、並びに組織への直接注射が挙げられる。一態様では、投与経路には、静脈内、腹腔内、皮下、皮内、結節内、筋内、経皮、吸入、鼻内、経口、眼内、関節内、頭蓋内及び脊髄内がある。非経口的送達としては、皮内、筋内、腹腔内、胸膜内、肺内、静脈内、皮下、動脈カテーテル及び静脈カテーテル経路を挙げることができる。耳送達としては、点耳薬があり、鼻内送達としては、点鼻薬若しくは鼻内注射があり、また眼内送達としては、点眼薬が挙げられる。エアロゾル（吸入）送達は、当分野では標準的な方法（例えば、ストリブリング（*Stribbling*）ら著、米国科学アカデミー紀要（*Proc. Natl. Acad. Sci.*）米国、189：11277～11281、1992年）を用いて実施することができる。一態様では、本発明の酵母 - ブラキユリ免疫治療組成物を皮下投与する。一態様では、本発明の酵母 - ブラキユリ免疫治療組成物を腫瘍環境（*tumor milieu*）中に直接投与する。

30

【 0 1 2 0 】

一般に、酵母 - ブラキユリ免疫治療組成物の好適な単一用量は、好適な期間にわたって１回以上投与すると、１つ以上のブラキユリ抗原若しくはエピトープに対する抗原特異的免疫応答を誘発するのに有効な量で、患者身体の所与の細胞型、組織、若しくは領域に、酵母ビヒクル及びブラキユリ抗原を有効にもたらすことができる用量である。例えば、一実施形態では、本発明の酵母 - ブラキユリの単一用量は、組成物が投与される生物の体重 1 kg 当たり約 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7$ 酵母細胞当量である。一態様では、本発明の酵母ビヒクルの単一用量は、用量当たり（すなわち 1 生物につき）、約 0.1 酵母単位（*Y.U.*、これは 1×10^6 酵母細胞若しくは酵母細胞当量である）～約 100 *Y.U.*（ 1×10^9 細胞）であり、0.1 $\times 10^6$ 細胞の増分（すなわち、1.1 $\times 10^6$ 、1.2 $\times 10^6$ 、1.3 $\times 10^6$ 、...）毎に、これらの間の用量を含む。一実施形態では、好適な用量は、1 *Y.U.* ～ 40 *Y.U.* の用量を含み、一態様では、10 *Y.U.* ～ 40

40

50

Y・U・の用量を含む。一実施形態では、個体の様々な部位に用量を投与するが、同じ投薬期間中に行う。例えば、1投薬期間中、個体の4つの異なる部位に10 Y・U・の用量を注射することにより、40 Y・U・の用量を投与する。本発明は、個体の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10若しくは11以上の異なる部位に、単一用量を形成する量の酵母-ブラキュリ免疫治療組成物(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 Y・U・以上)を投与することを含む。1酵母単位(Y・U・: Yeast Unit)は、 1×10^7 酵母細胞若しくは酵母細胞当量である。

【0121】

例えば、抗原に対する免疫応答が衰えたとき、又は特定の1つ若しくは複数の抗原に対する免疫応答又は記憶応答を付与する必要に応じて、治療組成物の「ブースター」若しくは「ブースト」を投与する。ブースターは、治療しようとする個体の状態及び投与時点の治療の目標(例えば、予防、能動治療、維持)に応じて、初回投与から、約1、2、3、4、5、6、7、若しくは8週間の間隔で、又は毎月、2ヵ月毎、3ヵ月毎、毎年、及び/又は2、3年若しくは数年毎に投与することができる。一実施形態では、投与スケジュールは、数週間から、数か月、数年の期間にわたり、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、若しくは11回以上酵母-ブラキュリ免疫治療組成物の用量を投与するものである。一実施形態では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10若しくは11回以上の用量を毎週又は2週間毎に投与した後、所望する癌の予防的若しくは治療的治療を達成する必要に応じて、2週間毎若しくは毎月投与する。その後、必要に応じて、維持若しくは寛解療法として、同等若しくはより長い間隔(数ヵ月又は数年毎)で、追加のブースターを投与することができる。

【0122】

本発明の一態様では、酵母-ブラキュリ免疫療法組成物の投与と連続して、及び/又は同時に、1つ以上の別の治療薬若しくは治療プロトコルを投与若しくは実施する(例えば、腫瘍の外科的切除、化学療法の投与、放射線療法の投与、別の免疫療法組成物若しくはプロトコルの投与、サイトカイン療法、T細胞移入、又は幹細胞移植)。例えば、初回用量の酵母-ブラキュリ免疫療法組成物の前、又は初回用量を投与後に、1つ以上の療法を投与若しくは実施することができる。一実施形態では、1つ以上の療法の投与若しくは実施は、例えば、化学療法若しくは他の療法の1以上の用量の連続した投与の間に、処方された間隔で酵母-ブラキュリ組成物を投与するプロトコルで、酵母-ブラキュリ免疫療法組成物の投与と交互に行うことができる。一実施形態では、酵母-ブラキュリ免疫療法組成物は、別の療法の開始前に、一定期間にわたって1以上の用量を投与する。言い換えれば、酵母-ブラキュリ免疫治療組成物を一定期間にわたり単剤療法として投与した後、酵母-ブラキュリ免疫療法の新しい用量と同時に、又は酵母-ブラキュリ免疫療法と交互に、別の療法(例えば、化学療法)を追加する。あるいは、又はこれに加えて、酵母-ブラキュリ免疫治療組成物の投与開始前の一定期間にわたり別の療法を投与してもよく、これらのコンセプトを組み合わせてもよい(例えば、腫瘍の外科的切除後、数週間にわたり酵母-ブラキュリ免疫療法での単剤療法を行い、次に、化学療法と酵母-ブラキュリ免疫療法の用量を数週間又は数ヵ月間交互に投与し、続いて、任意選択で、酵母-ブラキュリ免疫療法若しくは別の療法を用いた単剤療法を行うか、又は併用療法の新しいプロトコルで、各療法を順次、同時、若しくは交互に行う)。酵母-ブラキュリ免疫療法を用いた癌の治療のための様々なプロトコルが本発明によって考慮され、これらの例は、考えられる各種プロトコルの非制限的例であると考慮すべきである。

【0123】

本発明の一態様では、酵母-ブラキュリ免疫療法を用いて、ブラキュリのターゲティングに加え、ブラキュリ以外の別の抗原もターゲティングする。このような別の標的抗原は、治療しようとする個体、当該タイプの癌若しくは個体の特定の腫瘍によって発現される抗原に応じて、及び/又は個体における癌の段階、若しくは個体の治療の段階に応じて、所望のように、ブラキュリ抗原として同じ酵母ビヒクル内に含有させてもよいし、異なる

抗原をターゲティングする別の酵母ベース免疫療法組成物を製造した後、併用してもよい。例えば、以下を包含する抗原の組合せを選択してもよい：（１）突然変異 R a s などの癌発生における重要なイベントに關与する抗原、C E A などの細胞プロセスの異常調節に關与する、若しくは關連する抗原、及び（３）転移プロセスに關与するブラキュリ。例えば、１つ以上の他の酵素ベース免疫療法組成物は、限定するものではないが、以下に挙げる１つ以上の抗原を発現してもよい：癌胎児性抗原（C E A）、点突然変異 R a s 腫瘍性タンパク質、M U C - 1、E G F R、B C R - A b 1、M A R T - 1、M A G E - 1、M A G E - 3、G A G E、G P - 1 0 0、M U C - 2、正常及び点突然変異 p 5 3 腫瘍性タンパク質、P S M A、チロシナーゼ、T R P - 1 (g p 7 5)、N Y - E S O - 1、T R P - 2、T A G 7 2、K S A、C A - 1 2 5、P S A、H E R - 2 / n e u / c - e r b / B 2、h T E R T、p 7 3、B - R A F、腺腫様多発性結腸ポリープ（A P C）、M y c、フォン・ヒッペル・リンドウタンパク質（V H L）、R b - 1、R b - 2、アンドロゲン受容体（A R）、S m a d 4、M D R 1、F l t - 3、B R C A - 1、B R C A - 2、p a x 3 - f k h r、e w s - f l i - 1、H E R V - H、H E R V - K、T W I S T、メソテリン、N G E P、このような抗原の修飾物、このような抗原のスプライス変異体、及びこのような抗原のエピトープアゴニスト、並びにこのような抗原の組合せ、及び／又はそれらの免疫原性ドメイン、それらの修飾物、それらの変異体、及び／又はそれらのエピトープアゴニスト。個体の腫瘍における抗原のターゲティングを最適化するために、これら酵素ベース免疫療法組成物の１、２、３、若しくは４つ以上を酵母・ブラキュリ免疫療法組成物の投与の前、これと同時に若しくは交互に、及び／又はその投与後に投与してもよい。前述のように、このようなプロトコルに、別の療法（腫瘍の外科的切除、化学療法、標的癌療法、放射線療法など）を用いることもできる。

【 0 1 2 4 】

本発明の一実施形態では、癌を治療する方法が提供される。本方法は、（a）ブラキュリ発現が検出されていない癌を有する個体に、酵母ビヒクルとブラキュリ抗原を含まない第１癌抗原とを含有する第１免疫治療組成物を投与するステップ；及び（b）第１免疫治療組成物の投与の前、同時、若しくはその後に、酵母ビヒクルと、ブラキュリ抗原を含む第２癌抗原とを含有する第２免疫治療組成物を上記個体に投与するステップを含む。別の実施形態では、本方法は、１つ以上の別の免疫治療組成物を投与するステップを含み、ここで、１つ以上の別の免疫治療組成物の各々は、別の癌抗原を含む。別の抗原は、当分野では公知の、又は本明細書に記載のいずれであってもよく、限定するものではないが、突然変異 R a s、癌胎児性抗原（C E A）、及び M U C - 1 が挙げられる。

【 0 1 2 5 】

本発明の別の実施形態では、癌を治療する方法は、以下：（a）癌を有する個体に、酵母ビヒクルと突然変異 R a s 抗原とを含有する第１免疫治療組成物を投与するステップ；（b）酵母ビヒクルと、癌胎児性抗原（C E A）及びムチン - 1（M U C - 1）からなる群から選択される抗原を含有する第２免疫治療組成物を（a）の個体に投与するステップ；並びに（c）酵母ビヒクルとブラキュリ抗原とを含有する第３免疫治療組成物を（a）及び（b）の個体に投与するステップを含む。（a）、（b）及び（c）の投与ステップの１つ以上を同時、又は順次実施することができる。特定の個体の癌を治療する必要に応じて、ステップを反復してもよく、また、特定の個体の癌に特異的に取り組む治療の前又は治療中に、癌抗原を修飾することもできる。

【 0 1 2 6 】

本発明の方法において、組成物及び治療組成物は、あらゆる脊椎動物を含む動物、特に、脊椎動物種、哺乳動物のあらゆるメンバー（限定するものではないが、霊長類、げっ歯類、家畜及び家庭用ペットなど）に投与することができる。家畜には、消費される哺乳動物又は有用な製品を生産する哺乳動物（例えば、羊毛生産のためのヒツジ）が含まれる。本発明を用いて治療又は保護する哺乳動物として、ヒト、ヒト以外の霊長類、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、畜牛、ウマ及びブタが挙げられる。

【 0 1 2 7 】

「個体」は、哺乳動物などの脊椎動物であり、限定するものではないが、ヒトが挙げられる。哺乳動物としては、限定するものではないが、家畜、スポーツ用動物、ペット、霊長類、マウス及びラットが挙げられる。用語「個体」は、用語「動物」、「被験者」又は「患者」と置換え可能に用いられうる。

【0128】

本発明に有用な一般的方法

本発明の実施には、別途記載のない限り、当業者には公知の分子生物学（組換え技術など）、微生物学、細胞生物学、生化学、核酸化学、及び免疫学の従来技術を使用する。こうした技術は、例えば、以下に挙げるような文献に十分に説明されている：「メソズ・オブ・エンザイモロジー（Methods of Enzymology）」、第194巻、グスリー（Guthrie）ら編、コールド・スプリング・ハーバー研究所プレス（Cold Spring Harbor Laboratory Press）（1990年）；「酵母の生物学及び活性（Biology and activities of yeasts）」、スキナー（Skinner）ら編、アカデミックプレス（Academic Press）（1980年）；「酵母遺伝学の方法：実験手順マニュアル（Methods in yeast genetics: a laboratory course manual）」、ローズ（Rose）ら著、コールド・スプリング・ハーバー研究所プレス（Cold Spring Harbor Laboratory Press）（1990年）；「酵母サッカロミセス：細胞周期と細胞生物学（The Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology）」、プリングル（Pringle）ら編、コールド・スプリング・ハーバー研究所プレス（Cold Spring Harbor Laboratory Press）（1997年）；「酵母サッカロミセス：遺伝子発現（The Yeast Saccharomyces: Gene Expression）」、ジョーンズ（Jones）ら編、コールド・スプリング・ハーバー研究所プレス（Cold Spring Harbor Laboratory Press）（1993年）；「酵母サッカロミセス：ゲノムダイナミクス、タンパク質合成、及びエネルギー論（The Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics）」、ブローチ（Broach）ら編、コールド・スプリング・ハーバー研究所プレス（Cold Spring Harbor Laboratory Press）（1992年）；「分子クローン化：実験マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」、第2版（サンプルック（Sambrook）ら著、1989年）及び「分子クローン化：実験マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」、第3版（サンプルック（Sambrook）及びラッセル（Russell）著、2001年）、（本明細書では、これらを合わせて「サンプルック（Sambrook）」として示す）；「分子生物学の最新プロトコル（Current Protocols in Molecular Biology）」（F.M. オースベル（F.M. Ausubel）ら編、1987年、2001年までの増補版を含む）；「PCR：ポリメラーゼ連鎖反応（PCR: The Polymerase Chain Reaction）」（ムリス（Mullis）ら著、1994年）；ハーロウ（Harlow）及びレーン（Lane）（1988年）、「抗体、実験マニュアル（Antibodies, A Laboratory Manual）」、コールド・スプリング・ハーバー出版（Cold Spring Harbor Publications）、ニューヨーク；ハーロウ（Harlow）及びレーン（Lane）（1999年）、「抗体の使用：実験マニュアル（Using Antibodies: A Laboratory Manual）」、コールド・スプリング・ハーバー研究所プレス（Cold Spring Harbor Laboratory Press）、コールド・スプリング・ハーバー（Cold Spring Harbor）、ニューヨーク（NY）（本明細書では、これらを合わせて「ハーロウ（Harlow）及びレーン（Lane）」として

10

20

30

40

50

示す)、ボーケージ(Beaucage)ら編、「核酸化学の最新プロトコル(Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry)」、ジョン・ウィリー&サンズ社(John Wiley & Sons, Inc.)、ニューヨーク、2000年);カサレット(Casarett)及びドウル(Doull)の「毒物学、毒物の基礎化学(Toxicology The Basic Science of Poisons)」、C.クラッセン(Klaassen)編、第6版(2001年)、並びに「ワクチン(Vaccines)」、S.プロトキン(S. Plotkin)、W. オエンSTEIN(W. Orenstein)、及びP. オフィット(P. Offit)編、第5版(2008年)。

【0129】

一般的定義

「タルモゲン(TARMOGEN)(登録商標)」「グロブイミューン社(Globe Immune, Inc.)、ルイスビル、コロラド)は、一般に、細胞外(その表面)に、細胞内(内部若しくは細胞質体)に、又は細胞外及び細胞内の両方に、1つ以上の異種抗原を発現する酵母ビヒクルを指す。タルモゲン(TARMOGEN)(登録商標)については、概要が記載されている(例えば、米国特許第5,830,463号明細書を参照)。いくつかの酵母ベース免疫療法組成物、並びにその製造方法及び一般的使用方法についても、例えば、米国特許第5,830,463号明細書、米国特許第7,083,787号明細書、米国特許第7,736,642号明細書、スタップス(Stubbs)ら著、ネイチャー・メディスン(Nat. Med.)7:625~629(2001年)、ルー(Lu)ら、「癌研究(Cancer Research)」、64:5084~5088(2004年)、並びにバーンSTEIN(Bernstein)ら著、「ワクチン(Vaccine)」、2008年、1月24日;26(4):509~21(これらの各々は、その全文を参照として本明細書に組み込むものとする)に詳しく記載されている。

【0130】

本明細書で用いる場合、用語「類似体」とは、別の化合物と構造的に類似しているが、組成が若干異なる(例えば、異なる元素の原子による1原子の置換、又は特定の官能基の存在、又は別の官能基による1官能基の置換のように)化学化合物を指す。従って、類似体は、機能及び外観が類似、若しくは同等であるが、基準化合物に対して、異なる構造若しくは由来を有する化合物である。

【0131】

化合物を表すのに用いる場合、用語「置換された」、「置換誘導体」及び「誘導体」とは、非置換化合物に結合した少なくとも1つの水素を、異なる原子若しくは化学部分で置換することを意味する。

【0132】

誘導体は、親化合物と類似した物理的構造を有するが、誘導体は、親化合物とは異なる化学的及び/又は生物学的特性を有する。このような特性として、限定するものではないが、親化合物の活性増大若しくは低減、親化合物と比較して新しい活性、生物利用能の増大若しくは低減、効力の増強若しくは低減、in vitro及び/若しくはin vivoでの安定性の増大若しくは低減、並びに/又は吸収性の増大若しくは低減が挙げられる。

【0133】

一般に、用語「生物学的に活性の」とは、化合物(タンパク質若しくはペプチドを含む)が、in vivo(すなわち、天然の生理学的環境)又はin vitro(すなわち、実験室条件下)で測定若しくは観察される、細胞、組織、若しくは生物の代謝、生理学的、化学的プロセス、若しくはその他のプロセスに対する作用を有する少なくとも1つの検出可能な活性を有することを意味する。

【0134】

本発明によれば、用語「調節する(modulate)」は、「調節する(regulate)

10

20

30

40

50

a t e) 」と置換え可能に用いることができ、一般に、特定の活性の上方制御若しくは下方制御を指す。本明細書で用いる場合、用語「上方制御する」は、一般に、特定の活性に対して、誘発、開始、増加、増大、増進、改善、増強、増幅、促進、若しくは付与のいずれかを表すのに用いることができる。同様に、用語「下方制御する」は、一般に、特定の活性に対して、減少、抑制、阻害、緩和、縮小、低下、ブロッキング、若しくは阻止のいずれかを表すのに用いることができる。

【 0 1 3 5 】

本発明の一実施形態では、本明細書に記載するアミノ酸配列のいずれも、指定アミノ酸配列のC及び/又はN末端の各々にフランキングする少なくとも1個～約20個までの別の異種アミノ酸から作製することができる。得られたタンパク質若しくはポリペプチドは、指定アミノ酸配列から「実質的に構成される」と言うことができる。本発明によれば、異種アミノ酸は、指定アミノ酸配列にフランキングする、天然に存在しない(すなわち、*in vivo*では、本来存在しない)、又は指定アミノ酸配列の機能とは関係ない、又は、天然に存在する配列のヌクレオチドが、所与のアミノ酸配列が由来する生物の標準コドン使用頻度を用いて翻訳された場合に、遺伝子で起こるように、指定アミノ酸配列をコードする天然に存在する核酸配列にフランキングするヌクレオチドによってコードされないアミノ酸の配列である。同様に、本明細書で核酸配列に関して用いる場合、「～から実質的に構成される」というフレーズは、指定アミノ酸配列をコードする核酸配列の5'及び/又は3'末端の各々で、少なくとも1個～多くとも約60個までの別の異種ヌクレオチドによってフランキングされうる指定アミノ酸配列をコードする核酸配列を指す。異種ヌクレオチドは、天然の遺伝子で起こるように、指定アミノ酸配列をコードする天然に存在する核酸配列にフランキングした状態で天然に存在しない(すなわち、*in vivo*では、本来存在しない)か、又はタンパク質にいずれか別の機能を付与する、若しくは指定アミノ酸配列を有するタンパク質の機能を変更するタンパク質をコードしない。

【 0 1 3 6 】

本発明によれば、「～に選択的に結合する」というフレーズは、指定タンパク質に優先的に結合する、本発明の抗体、抗原結合フラグメント若しくは結合相手の能力を指す。さらに具体的には、「～に選択的に結合する」というフレーズは、1つのタンパク質と別のタンパク質(例えば、抗体、そのフラグメント、若しくは抗原との結合相手)の特異的結合を指し、ここで、任意の標準的アッセイ(例えば、免疫検定)によって測定される結合のレベルは、アッセイのバックグラウンド対照より統計的に優位に高い。例えば、免疫検定を実施する場合、対照は、典型的に、抗体若しくは抗原結合フラグメントのみを含む(すなわち、抗原の非存在下で)反応ウェル/管を包含し、この場合、抗原の非存在下での、抗体若しくはその抗原結合フラグメントによる反応性の量(例えば、ウェルとの非特異的結合)が、バックグラウンドであるとみなされる。結合は、酵素免疫検定(例えば、ELISA、免疫プロットアッセイなど)などの、当分野では標準的な様々な方法を用いて、測定することができる。

【 0 1 3 7 】

本発明で用いるタンパク質若しくはポリペプチドと一般的に言うとき、これは、完全長タンパク質、ほぼ完全長タンパク質(上に定義)、又はいずれかの断片、ドメイン(構造、機能、若しくは免疫原性)、構造エピトープ、又は所与のタンパク質の相同体若しくは変異体を包含する。また、融合タンパク質は、一般にタンパク質若しくはポリペプチドと呼ぶこともある。本発明の単離されたタンパク質は、天然の環境から取り出された(すなわち、人為的操作を受けた)タンパク質(ポリペプチド若しくはペプチドを含む)であり、例えば、精製タンパク質、部分的精製タンパク質、組換えにより作製されたタンパク質、並びに合成により作製されたタンパク質などを挙げることができる。従って、「単離された」は、タンパク質が精製された程度を表すわけではない。好ましくは、本発明の単離されたタンパク質は、組換えにより作製される。本発明によれば、「修飾」及び「突然変異」という用語は、特に、本明細書に記載するタンパク質若しくはその部分のアミノ酸配列(又は核酸配列)に対する修飾/突然変異に関して、置換え可能に用いることができる

。

【0138】

本明細書で用いる場合、用語「相同体」又は「変異体」は、基準タンパク質若しくはペプチドに対する軽微な修飾によって、基準タンパク質若しくはペプチド（すなわち、「始原型」若しくは「野生型」タンパク質）と異なるが、天然に存在する形態の基本的なタンパク質及び側鎖構造を維持するタンパク質若しくはペプチドを指すのに用いられる。このような変化としては、限定するものではないが、1個又は数個のアミノ酸側鎖の変化；欠失（例えば、タンパク質若しくはペプチドの切断型）、挿入及び／若しくは置換などの、1個又は数個のアミノ酸側鎖の変化；1個又は数個の原子の立体配位の変化；並びに／又は限定するものではないが、メチル化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ミリスチル化、プレニル化、パルミチン酸化、アミド化、及び／若しくはグリコシルホスファチジルイノシトールの付加など、軽微な誘導体化などがある。相同体又は変異体は、基準タンパク質若しくはペプチドと比較して、増強、低減した特性、若しくは実質的に同等の特性を有してよい。相同体若しくは変異体は、タンパク質のアゴニスト又はタンパク質のアンタゴニストを含みうる。相同体又は変異体は、タンパク質を作製するための当分野では公知の技術を用いて作製することができ、こうした方法として、限定するものではないが、単離された基準タンパク質の直接修飾、タンパク質の直接合成、又は、例えば、ランダム若しくは標的型突然変異誘発を実施するための古典的DNA技術若しくは組換えDNA技術を用いたタンパク質をコードする核酸配列の修飾により、タンパク質変異体をコードすることが挙げられる。さらに、基準タンパク質の天然に存在する変異体（例えば、

10

20

【0139】

所与のタンパク質の相同体又は変異体は、基準タンパク質のアミノ酸配列（例えば、本明細書で指定するアミノ酸配列、又は指定タンパク質のアミノ酸配列）に対して、少なくとも約45%、又は少なくとも約50%、又は少なくとも約55%、又は少なくとも約60%、又は少なくとも約65%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約75%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約85%、又は少なくとも約86%同一、又は少なくとも約87%同一、又は少なくとも約88%同一、又は少なくとも約89%同一、又は少なくとも約90%同一、又は少なくとも約91%同一、又は少なくとも約92%同一、又は少なくとも約93%同一、又は少なくとも約94%同一、又は少なくとも約95%同一、又は少なくとも約96%同一、又は少なくとも約97%同一、又は少なくとも約98%同一、又は少なくとも約99%同一（すなわち、45%から99%までの任意の整数のパーセントで同一）であるアミノ酸配列を含む、から実質的になる、又はから構成される。一実施形態では、相同体又は変異体は、基準タンパク質のアミノ酸配列に対して、100%未満同一、約99%未満同一、約98%未満同一、約97%未満同一、約96%未満同一、約95%未満同一などであり、同様に、1%刻みで約70%未満まで同一である、アミノ酸配列を含む、このアミノ酸配列から実質的に構成される、若しくは構成される。

30

。

【0140】

本明細書で用いる場合、別途記載のない限り、パーセント（%）同一性と言うとき、これは、以下を用いて実施される相同性の評価を指す：（1）標準デフォルトパラメータと共に、アミノ酸検索にはblastpを、また核酸検索にはblastnを用いた、ベーシック・ローカル・アラインメント検索ツール（BLAST：Basic Local Alignment Search Tool）基本相同性検索、ここで、問合せ配列は、デフォルトにより低複雑性領域についてフィルタリングされる（例えば、アルシュール，S.F.（Altschul，S.F.）、マッデン，T.L.（Madden，T.L.）、シェーファ，A.A.（Shaeffer，A.A.）、チャン，J.（Zhang，J.）、チャン，Z.（Zhang，Z.）、ミラー，W.（Miller，W.）及びリップマン，D.J.（Lipman，D.J.）（1997年）「ギャッ

40

50

プ有りBLAST及びPSI-BLAST：新世代のタンパク質データベース検索プログラム（Gapped BLAST and PSI-BLAST：a new generation of protein database search programs）」、ニュークレック・アシッド・リサーチ（Nucleic Acids Res.）25：3389～3402に記載のものなど（これらの文献は、その全文を参照として本明細書に組み込むものとする）；（2）2つの配列のBLASTアラインメント（例えば、以下に記載するパラメーターを用いて）；（3）及び／又は標準デフォルトパラメーターを有するPSI-BLAST（部位特異的反復BLAST（Position-Specific Iterated BLAST））。2つの配列についてのベーシックBLAST（Basic BLAST）とBLASTとの間の標準パラメーターのいくつかの相違のために、BLASTプログラムを用いると、2つの特定の配列は、有意な相同性を有するものとして認識されうるが、配列の一方を問合せ配列として用いるベーシックBLAST（Basic BLAST）で実施される検索は、他方の配列を上位マッチで識別しない場合があることに留意されたい。さらに、PSI-BLASTは、「プロフィール」検索の自動化された、使用しやすいバージョンを提供し、これは、配列相同体を検索する高感度の方法である。プログラムは初めにギャップ有りBLASTデータベース検索を実施する。PSI-BLASTプログラムは、部位特異的スコアマトリックスを構築するために戻される任意の有意なアラインメントからの情報を使用し、これが、データベース検索の次のラウンドの問合せ配列に代わって用いられる。従って、これらのプログラムのどれを用いても、同一性（％）を決定できることを理解すべきである。

【0141】

タツソバ（Tatusova）及びマッデン（Madden）、（1999年）、「Blast2配列 - タンパク質及びヌクレオチド配列を比較する新たなツール（Blast2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences）」、FEMSマイクロバイオロジー・レターズ（FEMS Microbiol Lett.）174：247～250（この文献は、その全文を参照として本明細書に組み込むものとする）に記載されているように、BLASTを用いて、2つの特定の配列を互いにアラインメントすることができる。このような配列アラインメントは、BLAST2.0アルゴリズムを用いて、blastp又はblastnで実施することにより、2つの配列同士のギャップ有りBLAST（Gapped BLAST）検索（BLAST2.0）を実施し、得られるアラインメントにギャップ（欠失及び挿入）の導入を可能にする。本明細書では、明瞭にするために、2つの配列のBLAST配列アラインメントは、以下のような標準デフォルトパラメーターを用いて実施する。

【0142】

【表 1】

blastnの場合、0 BLOSUM62マトリックスを用いて：

(For blastn, using 0 BLOSUM62 matrix:)

マッチについての報酬= 1

(Reward for match = 1)

ミスマッチについてのペナルティ=- 2

(Penalty for mismatch = -2)

オープンギャップ (5) 及び延長ギャップ (2) ペナルティ

(Open gap (5) and extension gap (2) penalties)

(1 0) 語長 (1 1) フィルター (適用) を予期、ギャップx__ドロップオフ (5 0)

(gap x_dropoff (50) expect (10) word size (11) filter (on))

10

blastpの場合、0 BLOSUM62マトリックスを用いて：

(For blastp, using 0 BLOSUM62 matrix:)

オープンギャップ (1 1) 及び延長ギャップ (1) ペナルティ

(Open gap (11) and extension gap (1) penalties)

(1 0) 語長 (3) フィルター (適用) を予期、ギャップx__ドロップオフ (5 0)

(gap x_dropoff (50) expect (10) word size (3) filter (on).)

単離された核酸分子は、その天然の環境（すなわち、人為的操作を受けた可能性のあるもの）から取り出された核酸分子であり、その天然の環境は、核酸分子が天然に存在するゲノム若しくは染色体である。従って、「単離された」とは、核酸分子が精製された程度を必ずしも表すわけではなく、この分子が、核酸分子が天然に存在する全ゲノム又は全染色体又は2以上の遺伝子を含むゲノムのセグメントを含まないことを意味する。単離された核酸分子は完全な遺伝子を含みうる。1遺伝子を含む単離された核酸分子は、このような遺伝子を含む染色体の断片ではなく、むしろ、この遺伝子に関連するコード領域及び調節領域を含むが、同じ染色体に天然に存在する別の遺伝子に関連するものは含まない。単離された核酸分子は、遺伝子の部分を含んでもよい。また、単離された核酸分子は、天然では指定核酸配列に通常フランキングしない別の核酸分子によってフランキングされる（すなわち、配列の5'及び/又は3'末端で）指定核酸配列（すなわち、異種配列）も含んでよい。単離された核酸分子は、DNA、RNA（例えば、mRNA）、又はDNA若しくはRNAのいずれかの誘導體（例えば、cDNA）を含みうる。「核酸分子」というフレーズは、主として物理的核酸分子を指し、また「核酸配列」というフレーズは、主として核酸分子のヌクレオチドの配列を指すが、2つのフレーズは、特に、タンパク質若しくはタンパク質のドメインをコードすることができる核酸分子、又は核酸配列に関して、置換え可能に用いることができる。

20

30

【0143】

組換え核酸分子は、トランスフェクトしようとする細胞において核酸分子の発現を有効に調節することができるあらゆる転写制御配列の少なくとも1つと機能的に連結した、本明細書に記載するいずれか1つ以上のタンパク質をコードするあらゆる核酸配列の少なくとも1つを含みうる分子である。「核酸分子」というフレーズは、主として物理的核酸分子を指し、また、「核酸配列」というフレーズは、主として核酸分子のヌクレオチドの配列を指すが、2つのフレーズは、特に、タンパク質をコードすることができる核酸分子、又は核酸配列に関して、置換え可能に用いることができる。さらに、「組換え核酸分子」というフレーズは、主として転写制御配列と機能的に連結した核酸分子を指すが、動物に投与される「核酸分子」というフレーズと置換え可能に用いることができる。

40

【0144】

組換え核酸分子は、組換えベクターを含むが、これは、本発明の融合タンパク質をコードする単離された核酸分子に機能的に連結され、融合タンパク質の組換え生産を可能にすることができ、また、本発明に従い、核酸分子を宿主細胞に送達することができる、いず

50

れかの核酸配列、典型的には異種配列である。このようなベクターは、ベクターに挿入しようとする単離された核酸分子に接続して、天然に存在しない核酸配列を含んでよい。このベクターは、原核若しくは真核いずれのRNA若しくはDNAのいずれであってもよく、好ましくは、本発明では、酵母をトランスフェクトするのに有用なプラスミドである。組換えベクターは、クローン化、配列決定、及び/又はさもなければ核酸分子の操作に用いることができ、このような分子の送達（例えば、DNA組成物若しくはウイルスベクターベースの組成物として）にも用いることができる。組換えベクターは、好ましくは、核酸分子の発現に用いられ、発現ベクターとも呼ぶことができる。好ましい組換えベクターは、酵母などのトランスフェクトされた宿主細胞に発現させることができる。

【0145】

10

本発明の組換え分子において、核酸分子は、転写制御配列、翻訳制御配列、複製起点、並びに宿主細胞と適合性で、かつ本発明の核酸分子の発現を制御する他の調節配列などの調節配列を含む発現ベクターと機能的に連結している。特に、本発明の組換え分子は、1つ以上の発現制御配列と機能的に連結した核酸分子を含む。「機能的に連結した」というフレーズは、宿主細胞にトランスフェクトされた（すなわち、形質転換、形質導入、若しくはトランスフェクトされた）とき、核酸分子が発現されるように、核酸分子を発現制御配列に連結することを意味する。

【0146】

本発明によれば、用語「トランスフェクション」は、外来性の核酸分子（すなわち、組換え核酸分子）を細胞に挿入することができる任意の方法を指すのに用いられる。用語「形質転換」は、藻類、細菌及び酵母などの微生物細胞への核酸分子の導入を指すのに用いられる場合、用語「トランスフェクション」と置換え可能に用いることができる。微生物系では、用語「形質転換」は、微生物による外来性核酸の獲得による遺伝性変化を表すのに用いられ、用語「トランスフェクション」と実質的に同義である。従って、トランスフェクション技術には、限定するものではないが、形質転換、細胞の化学処理、パーティクル・ガン、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、吸着、感染及び原形質体融合などが含まれる。

20

【0147】

以下の実験結果は、例示の目的で提供されるものであり、本発明の範囲を限定する意図はない。

30

（実施例）

実施例 1

以下の実施例により、酵母 - ブラキユリ免疫治療組成物の作製を説明する。

【0148】

本実施例では、酵母（サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*））を銅誘導プロモータ、CUP1、又は構成性プロモータ、TEF2の制御下で、ヒトブラキユリを発現するように操作して、酵母 - ブラキユリ免疫療法組成物を生産した。いずれの場合も、ブラキユリ抗原を含む融合タンパク質は、配列番号8で示される、NからC末端のフレーム内で融合した以下の配列要素との単一のポリペプチドとして作製した：（1）プロテアソーム分解に対する耐性を付与して、発現を安定化させるためのN末端ペプチド（配列番号8の1～6位、このペプチド配列は、本明細書では、配列番号11によっても表される）；2）配列番号6のアミノ酸2～435、ここで、配列番号6は、ほぼ完全長のヒトブラキユリタンパク質を表す（配列番号8の7～440位）；並びに（3）ヘキサヒスチジンタグ（配列番号8の441～446位）。この融合タンパク質に用いられるアミノ酸配列は、必要に応じて、ブラキユリ抗原のいずれかの末端にフランキングする追加若しくは交互のアミノ酸の使用により修飾することができ、また、ブラキユリ抗原のより短い部分を使用してもよい。配列番号8の融合タンパク質をコードする核酸配列（酵母発現のために最適化されたコドン）は、本明細書では配列番号7で示される。

40

【0149】

50

簡潔に述べると、国立癌研究所（ジェフリー・シュロム博士（Dr. Jeffrey Schlom））により提供されたブラキュリ-PCR II プラスミド由来の完全長ヒトブラキュリタンパク質をコードするDNAを、PCRを用いて増幅し、次に、酵母2 μ m発現ベクター内のCUP1プロモータ（ベクターpGI-100）又はTEF2プロモータ（ベクターplu011若しくはpGI-172）の後ろのEcoRI及びSpeIクローン化部位に挿入した。N末端安定化ペプチド、MADEAP（配列番号11）及びC末端ヘキサヒスチジンペプチドをコードするヌクレオチド配列をプラスミドベクターに付加して、配列番号8で示される完全融合タンパク質をコードした。得られたプラスミドを、プラスミド保存のためにDH5 に、また、酵母-ブラキュリ免疫治療組成物の作製のためにサッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）W303 に、形質転換した。

10

【0150】

サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）への形質転換は、酢酸リチウム/ポリエチレングリコールトランスフェクションによって実施し、一次トランスフェクタントをウラシル欠失固形最少プレート（UDM: uridine dropout medium; ウリジンドロップアウト培地）上で選択した。U2（ウリジンドロップアウト培地）又はUL2（ウリジン及びロイシンドロップアウト培地）培地において30 で増殖させることにより、コロニーを選択した。

【0151】

CUP1プロモータの制御下、配列番号8で示されるヒトブラキュリ融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む酵母-ブラキュリ免疫療法組成物は、本明細書において、GI-6301とも呼ばれる。TEF2プロモータ（ベクターplu011内）の制御下、配列番号8で示されるヒトブラキュリ融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む酵母-ブラキュリ免疫療法組成物は、本明細書において、GI-6302とも呼ばれる。TEF2プロモータ（ベクターpGI-172内）の制御下、配列番号8で示されるヒトブラキュリ融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む酵母-ブラキュリ免疫療法組成物は、本明細書において、GI-6303とも呼ばれる。

20

【0152】

前述したプレート及び接種菌を用いて、ウリジン欠失の液体培養物（U2）若しくはウリジン及びロイシン欠失の液体培養物（UL2）に接種し、30、250 rpmで20時間増殖させた。4.2 g/LのBis-Trisを含有するpH緩衝培地にも接種して（BT-U2; BT-UL2）、中性pH製造条件下で生産された酵母-ブラキュリ免疫治療薬を評価した（データは示していない）。一次培養物を用いて、同じ配合の最終培養物に接種した。

30

【0153】

U2液体培地の配合：

- ・15 g/Lのグルコース
- ・6.7 g/Lの硫酸アンモニウム含有酵母窒素原礎培地
- ・各々0.04 g/Lのヒスチジン、トリプトファン、アデニン、及び0.06 g/Lのロイシン

40

UL2液体培地の配合：

- ・15 g/Lのグルコース
- ・6.7 g/Lの硫酸アンモニウム含有酵母窒素原礎培地
- ・各々0.04 g/Lのヒスチジン、トリプトファン、及びアデニン。

【0154】

様々なプロモータの制御下での酵母-ブラキュリ免疫治療組成物を比較する初期実験において、酵母-ブラキュリ培養物が約0.2 Y.U./mlの密度に達した後、0.5 mM硫酸銅の添加により、CUP1駆動（誘導性発現）酵母-ブラキュリ発現を開始し、培養物が0.5 ~ 1.5 Y.U.の密度に達するまで継続した（酵母-ブラキュリは、硫酸銅の添加後、約1 ~ 1.5 しか倍加しなかったが、細胞によって多量のブラキュリタンバ

50

ク質が産生された)。T E F 2 駆動酵母 - ブラキュリ発現は構成性であり、これらの細胞の増殖は、培養物が、 $1.1 \sim 4.0 \text{ Y.U. / ml}$ の密度に達するまで継続した。次に、各培養物からの細胞を回収し、洗浄した後、P B S 中で1時間56にて熱により死滅させた。また、各培養物からの生存細胞も比較のために処理した。

【0155】

熱による培養物の死滅後、細胞をP B Sで3回洗浄した。T C A 沈殿 / ニトロセルロース結合アッセイ、並びに抗 h i s タグモノクロナール抗体及び抗ブラキュリ抗体 (アブカム (A b c a m)、ケンブリッジ、M A) を用いたウエスタンブロットにより、全タンパク質発現を測定した。半定量デジタル画像化方法を用いて、タンパク質含量を定量した。

【0156】

初期発現実験の結果 (データは示していない) から、本発明の酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物の各々が、ブラキュリ融合タンパク質を発現し (つまり、C U P 1 プロモータ又はT E F 2 プロモータのどちらを用いても)、また、いずれの培地 (U 2 及びU L 2) を用いても発現が検出されたことが明らかにされた。さらに、抗原発現は、熱死滅及び生存酵母細胞のいずれにおいても検出可能であった (データは示していない)。ブラキュリ発現は、C U P 1 プロモータ (G I - 6301) を含む酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物において有意に高かったことから、この組成物を、発現最適化などのさらなる研究、並びに i n v i t r o 及び i n v i v o 実験のために選択した (以下の実施例を参照のこと)。

【0157】

図1Aは、検出用の抗ブラキュリ抗体を用いるU 2 及びU L 2 培地の両方を用いたG I - 6301におけるブラキュリの発現を示す。非ブラキュリ抗原を発現する対照酵母は、抗体で染色されなかった。図1Bは、ブラキュリ融合タンパク質上のヘキサヒスチジンタグを識別するための抗H i sを用いた、同じG I - 6301調製物におけるブラキュリの発現を示す。非ブラキュリ抗原を発現するが、ヘキサヒスチジンを有する対照酵母も示す。これらの結果は、いずれの培地を用いても良好なブラキュリ発現を示したが、U L 2 培地での発現が有意に高かった。

【0158】

実施例2

以下の実施例は、抗原発現及び酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物G I - 6301の生産のための条件の決定について説明する。

【0159】

G I - 6301 抗原発現の銅誘導についての最適密度を決定するために、上記実施例1に記載したU L 2 培地における標準的増殖条件を用いて、G I - 6301の出発及び中間培養物を調製した。次に、培養物のアリコートをも、 0.5 Y.U. / ml 、 1.0 Y.U. / ml 及び 1.5 Y.U. / ml に希釈し、30で1時間インキュベートした。 0.5 mM CuSO_4 を培養物に添加して、ブラキュリ発現を誘導し、培養を続けた。6時間及び14時間の時点で、細胞を収集及び計数して、細胞密度を測定した。各条件から得られた 20 Y.U. の熱死滅酵母を溶解させ、全タンパク質を測定し、抗H i sを用いて、ウエスタンブロットを生成した。

【0160】

【表2】

テーブル1

細胞密度 (Y.U./ml)	誘導時間		
	0時間	6時間	14時間
	0.5	1.03	0.96
	1.0	1.88	1.74
	1.5	3.14	2.7

10

20

30

40

50

テーブル 1 に示すように、銅誘導後に酵母は約 1 倍しか倍加せず（他の実験では、1.5 X までの倍加を示した）、細胞密度及び生存能力（示していない）は、銅誘導の 6 時間後に減少した。図 2 は、3 つの誘導濃度すべてが、ブラキュリの有意な発現をもたらした、誘導密度が高いほどブラキュリ発現も高くなる傾向があることを示している。しかし、2.1 Y. U. / ml 及び 2.8 Y. U. / ml の誘導開始密度及び 375 μ M CuSO₄ を用いた別の実験からは、銅誘導の開始時の培養物の密度が増加するにつれ、タンパク質発現は低下し始め、約 6 ~ 8 時間後も有意に改善しないことがわかった（データは示していない）。

【0161】

次に、ブラキュリ発現に対する CuSO₄ の量の影響を調べた。実施例 1 に記載のように、UL2 培地において GI-6301 を出発及び中間培養物から増殖させた。その後、培養物のアリコート量を 1.0 Y. U. / ml まで希釈し、30 で 1 時間インキュベートした。CuSO₄ を 375 μ M 又は 500 μ M のいずれかの濃度で各培養物に添加して、タンパク質発現の誘導を様々な時点（2 時間、4 時間、6 時間、8 時間、24 時間）まで進行させ、これらの時点で細胞を回収し、熱死滅させた後、前述のように抗 His ウエスタンプロットを用いたタンパク質発現の評価のために処理した。いずれの濃度の CuSO₄ によっても、ブラキュリの良好な発現が得られたが、特に、後の時点になるほど、375 μ M を用いたタンパク質発現がやや優れているようであった（データは示していない）。

【0162】

従って、CUP1 駆動の酵母 - ブラキュリ（誘導性発現）について、本発明者らは、酵母の対数増殖期中期での抗原発現の誘導が抗原生産に最適であることをみいだした。以下の実施例で用いる酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物（GI-6301）の生産のために、実施例 1 に記載したように、1 ~ 2 Y. U. / ml まで細胞を UL2 培地中で増殖させた後、30、250 rpm で、6 ~ 8 時間以下の時間にわたって、0.375 ~ 0.5 mM 硫酸銅の添加によって誘導した。細胞を回収し、洗浄した後、PBS 中で 1 時間 56 にて熱死滅させた。

【0163】

実施例 3

以下の実施例は、ブラキュリ抗原が T 細胞アゴニストエピトープを含む、別の酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物の構築及び生産について記載する。

【0164】

この実験では、酵母（サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*））を、アゴニストエピトープである T 細胞エピトープ WLLPGTSTV（配列番号 13）を含むほぼ完全長ブラキュリタンパク質であるヒトブラキュリ抗原を発現するように操作した。例えば、配列番号 6 又は 8 に存在するネイティブブラキュリ T 細胞エピトープは、WLLPGTSTL（配列番号 12）である。ヒトブラキュリアゴニスト抗原を、銅誘導性プロモータである CUP1 の制御下で発現させて、酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物を生産した。より具体的には、ブラキュリアゴニスト抗原（すなわち、少なくとも 1 つのアゴニストエピトープを含むブラキュリ抗原）を含む融合タンパク質を、N 末端から C 末端までのフレーム内で融合した以下の配列要素を含む単一ポリペプチド（配列番号 20 で示される）として生産した：（1）プロテオソーム分解に対する耐性を付与すると共に、発現を安定化させるための N 末端ペプチド（配列番号 20 の 1 ~ 6 位、本明細書では配列番号 11 でも示されるペプチド配列）；2）配列番号 18 のアミノ酸 2 ~ 435（配列番号 20 の 7 ~ 440 位で示される；配列番号 18 は、野生型ブラキュリタンパク質と比較して 254 位に単一のアミノ酸置換を有する完全長ヒトブラキュリアゴニストタンパク質を表す）；及び（3）ヘキサヒスチジンタグ（配列番号 20 の配列 441 ~ 446 位）。アゴニストエピトープ（配列番号 13）は、配列番号 20 の 251 ~ 259 位（配列番号 18 の 246 ~ 254 位）に位置する。この融合タンパク質に用いるアミノ酸配列は、必要に応じて、ブラキュリ抗原のいずれかの末端にフランキングする

追加若しくは交互のアミノ酸の使用により修飾することができ、また、ブラキユリ抗原のより短い部分を使用してもよい。配列番号20の融合タンパク質をコードする核酸配列（酵母発現のために最適化されたコドン）は、本明細書では配列番号19で示される。

【0165】

簡潔に述べると、実施例1に記載のほぼ完全長ヒトブラキユリタンパク質（すなわち、完全長ブラキユリからN末端メチオニンが欠失している）コードするDNAを、完全長ブラキユリタンパク質に対し、254位のロイシンのバリンによる置換を導入する部位指定突然変異誘発によって修飾し、このDNAをPCRで増幅した後、酵母2 μ m発現ベクター内のCUP1プロモータ（ベクターpGI-100）の後ろのEcoRI及びSpeIクローン化部位に挿入した。N末端安定化ペプチド、MADEAP（配列番号11）及びC末端ヘキサヒスチジンペプチドをコードするヌクレオチド配列をプラスミドベクターに付加することにより、配列番号20で示される完全融合タンパク質をコードした。得られたプラスミドを、プラスミド保存のためにDH5 α に、また、酵母-ブラキユリ免疫治療組成物の生産のためにサッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）W303に、形質転換した。

10

【0166】

サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）への形質転換は、酢酸リチウムノリエチレングリコールトランスフェクションによって実施し、一次トランスフェクタントをウラシル欠失固形最少プレート（UDM；ウリジンドロップアウト培地）上で選択した。UL2（ウリジン及びロイシンドロップアウト培地）培地において30 \times で増殖させることにより、コロニーを選択した。

20

【0167】

CUP1プロモータの制御下、配列番号20で示されるヒトブラキユリアゴニスト融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む酵母-ブラキユリ免疫療法組成物は、本明細書において、GI-6305とも呼ばれる。

【0168】

実施例1に記載のように、UL2培地においてGI-6305を1 \times 2Y.U./mlまで増殖させた後、実施例2に記載のように、GI-6301について本発明者らが開発した条件を用いて、30 \times 、250rpmで6 \sim 8時間以下の時間にわたって、0.375 \sim 0.5mM硫酸銅の添加により誘導した。細胞を回収し、洗浄した後、PBS中で1時間56 \times にて熱死滅させた。

30

【0169】

培養物の熱死滅後、細胞をPBSで3回洗浄した。TCA沈殿ノニトロセルロース結合アッセイ、並びに抗hisタグモノクローナル抗体及び抗ブラキユリ抗体（アブカム（Abcam）、ケンブリッジ、MA）を用いたウエスタンブロットにより、全タンパク質発現を測定した。タンパク質含量は、半定量的デジタル画像化方法を用いて定量した。

【0170】

図1Cは、ブラキユリ融合タンパク質上のヘキサヒスチジインタグを識別するための抗Hisを用いた、GI-6305におけるブラキユリアゴニスト抗原の頑健な発現を示す。この実験でのUL2培地において増殖したGI-6305の抗原近似含有率は、>22615ng/Y.U.であった。

40

【0171】

実施例4

以下の実施例では、本発明の酵母-ブラキユリ免疫治療組成物を用いたブラキユリ特異的T細胞の増殖を証明する。

【0172】

正常なドナー由来のT細胞が、ブラキユリ抗原に特異的なT細胞を産生することができるか否かを決定するために、2人の正常なドナーの末梢血液単核細胞（PBMC）から樹状細胞（DC：dendritic cell）を調製した。簡潔に述べると、単離したPBMCを、GM-CSF及びIL-4の存在下で5日間培養し、続いて、対照酵母（「

50

Y V E C」とも称し、空のベクター、すなわち、抗原コード挿入片を含まないベクターで形質転換したサッカロミセス・セレピシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 酵母である) 又はブラキュリ酵母 (G I - 6 3 0 1、上の実施例 1 及び 2 に記載) と一緒に、酵母 : D C 比 = 1 : 1 でインキュベートした。48 時間の共培養後、オートロガス T 細胞の刺激のための A P C として D C を用いた。刺激の各サイクルは、I V S (in vitro 刺激) と称し、I L - 2 の非存在下で 3 日間の培養、続いて、組換え I L - 2 (20 U / m l) の存在下でさらに 4 日間の培養から構成される。I V S 2 の終了時に、対照四量体又はブラキュリペプチド T p 2 (W L L P G T S T L、配列番号 2 又は配列番号 6 の 2 4 6 ~ 2 5 4 位) に特異的な四量体で、T 細胞を染色した。テーブル 2 は、各四量体で陽染された C D 8 + T 細胞のパーセンテージを示す。

【0173】

【表 3】

テーブル 2

ドナー	刺激	対照 四量体	ブラキュリ 四量体
07706	対照酵母	0.21	0.30
	ブラキュリ酵母	0.28	0.67
17663	対照酵母	0.04	0.29
	ブラキュリ酵母	0.05	0.54

第 2 の実験では、前述したように、G M - C S F 及び I L - 4 の存在下で 5 日間の培養を用いて、9 人の正常なドナーの P B M C から樹状細胞 (D C) を作製した後、ブラキュリ酵母 (G I - 6 3 0 1) と一緒に、酵母 : D C 比 = 1 : 1 でインキュベートした。48 時間の共培養後、オートロガス T 細胞の刺激のための A P C として D C を用いた。I V S の各サイクルは、前述したものと同様に実施した。I V S 2 の終了時に、対照四量体又はブラキュリペプチド T p 2 に特異的な四量体で、T 細胞を染色した。テーブル 3 は、各四量体で陽染された C D 8 + T 細胞のパーセンテージを示す。

【0174】

【表 4】

テーブル 3

ドナー	刺激	対照 四量体	ブラキュリ 四量体
07706	ブラキュリ酵母	0.28	0.67
17663	ブラキュリ酵母	0.05	0.54
32249	ブラキュリ酵母	0.01	1.24
29004	ブラキュリ酵母	0.02	0.36
19063	ブラキュリ酵母	0.10	2.57
06852	ブラキュリ酵母	0.05	0.33
26532	ブラキュリ酵母	0.07	0.11
12172	ブラキュリ酵母	0.01	0.11
26725	ブラキュリ酵母	0.01	0.20

テーブル 2 及び 3 に示す結果から、本発明の酵母 - ブラキュリ免疫治療薬を用いた正常なドナー T 細胞の刺激によって、対照と比較して、ほとんどの正常なドナーで、四量体陽

性CD8⁺T細胞のパーセンテージが増加することがわかるが、これは、正常なヒトT細胞が、ブラキュリを免疫原として認識する能力を有することを示している。

【0175】

実施例5

以下の実施例では、ブラキュリ発現標的を溶解する正常なドナーのPBMCからブラキュリ特異的CTLを産生する酵母-ブラキュリ免疫治療組成物の能力を証明する。

【0176】

この実験では、ブラキュリ酵母(GI-6301)と一緒にインキュベートしたDCを用いて、上のテーブル2の正常なドナーのうち3人からのブラキュリ特異的T細胞を、2周期のIVS(実施例4に記載の通り)にわたり、*in vitro*で増殖させた。CD40Lの存在下で成熟させ、ブラキュリ特異的Tp2ペプチド(WLLPGTSTL、配列番号2又は配列番号6の246~254位)でパルスしたDCを用いて、第3のIVSを実施した。5日目に、CD8⁺T細胞を単離し、表示のエフェクター：標的(ET)比(図3参照)で、SW480(HLA-A2⁺/ブラキュリ高)及びMCF7(HLA-A2⁺/ブラキュリ低)腫瘍細胞標的に対する一晚の細胞傷害性Tリンパ球(CTL)アッセイに用いた。テーブル4には、対照四量体対ブラキュリ特異的Tp2四量体で陽染されたCD8⁺T細胞のパーセンテージを示す。

【0177】

【表5】

テーブル 4

正常なドナー	刺激	対照四量体	ブラキュリ四量体
07706	ブラキュリ酵母 /Tp2	0.33	1.84
17663	ブラキュリ酵母 /Tp2	0.11	0.65
26532	ブラキュリ酵母 /Tp2	0.05	0.11

図3A(ドナー07706)、3B(ドナー17663)及び3C(ドナー26532)は、3人の正常なドナーのうち2人からのPBMCが、ブラキュリを発現する標的を死滅させることができるCD8⁺T細胞を産生することができたことを示している。以上を考え合わせると、これらのデータは、酵母-ブラキュリ免疫治療組成物が、ブラキュリ発現腫瘍細胞を死滅させることができるブラキュリ特異的CTLを産生することができることを証明している。

【0178】

酵母-ブラキュリ免疫療法が、特定のペプチドによるパルスの非存在下で(すなわち、潜在的に複数の異なるCTLエピトープに対してCTLを産生することにより)ブラキュリ特異的CTLを誘導することができることを証明するために、酵母-ブラキュリ免疫治療組成物、GI-6301のみを用いて(すなわち、ペプチドパルスなしで)、*in vitro*で増殖させた正常なドナーのT細胞を用いて、別の実験を実施した。簡潔に述べると、GI-6301と一緒にインキュベートしたDCを用いることにより、正常なドナーのPBMC(ドナー19063)由来のブラキュリ特異的T細胞を、2周期のIVS(実施例4に記載の通り)にわたり、*in vitro*で増殖させた。5日目に、CD8⁺T細胞を単離し、15:1のエフェクター：標的(ET)比で、SW480(HLA-A2陽性/ブラキュリ高)及びH226(HLA-A2陰性/ブラキュリ高)腫瘍細胞に対する一晚のCTLアッセイに用いた。図4Aは、SW480及びH226腫瘍細胞の特異的溶解のパーセンテージを示す。図4Bは、リアルタイムRT-PCRによる、SW480及びH226腫瘍細胞におけるGAPDHの発現に対する、ブラキュリmRNAの発現

を示す。これらの実験もまた、酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物が、ブラキュリ発現腫瘍細胞を死滅させることができるブラキュリ特異的 C T L を産生することができることを証明している。

【 0 1 7 9 】

実施例 6

以下の実施例では、本発明の酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物が、癌患者由来のブラキュリ特異的 T 細胞を増殖することができることを証明する。

【 0 1 8 0 】

この実験では、C E A 及び M U C - 1 抗原を含むウイルスベクターワクチンによるワクチン接種後に、2 人の乳癌患者の P B M C から D C を作製した。実施例 4 に記載のように、G M - C S F 及び I L - 4 の存在下で 5 日培養して D C を作製した後、酵母 : D C 比 = 1 : 1 のブラキュリ酵母 (G I - 6 3 0 1) の存在下でインキュベーションを行った。4 8 時間の共培養後、D C をオートロガス T 細胞の刺激のための A P C として D C を用いた。I V S の各サイクルは、I L - 2 の非存在下で 3 日、続いて、2 0 U / m l の組換え I L - 2 の存在下でさらに 4 日から構成された。テーブル 5 に、対照四量体又はブラキュリペプチド T p 2 特異的四量体で陽染された C D 8 ⁺ T 細胞 (I V S 1) のパーセンテージを示す。

【 0 1 8 1 】

【表 6】

テーブル 5

患者	刺激	対照 四量体	ブラキュリ 四量体
乳癌患者 01	ブラキュリ酵母	0.11	0.42
乳癌患者 10	ブラキュリ酵母	0.23	0.91

テーブル 5 の結果から、本発明の酵母 - ブラキュリ免疫治療薬を用いた、乳癌ドナー由来の T 細胞の刺激が、対照と比較して、ほとんどのドナーで、四量体陽性 C D 8 ⁺ T 細胞のパーセンテージが増加することがわかるが、これは、進行中の癌を有するドナー由来の T 細胞が、ブラキュリを免疫原として認識する能力を有することを示している。

【 0 1 8 2 】

実施例 7

以下の実施例では、酵母 - ブラキュリ免疫療法を用いた、i n v i v o でのブラキュリ特異的な C D 4 ⁺ T 細胞応答の発生を証明する。

【 0 1 8 3 】

この実験では、C 5 7 B L / 6 マウスに、4 Y U の酵母 - h ブラキュリ (G I - 6 3 0 1) を合計 4 回毎週接種したが、これは、1 部位につき 1 Y U で 4 つの個別の注射部位に投与した。最後のブーストから 2 週間後、マウスを死なせ、C D 4 ⁺ T 細胞を精製し、様々な濃度のブラキュリ精製タンパク質 (昆虫細胞から得た) の存在下での増殖についてアッセイした。対照として、- G a l を 4 0 μ g / m l で用いた。

【 0 1 8 4 】

酵母対照 (Y V E C 、実施例 4 を参照) 及び酵母 - h ブラキュリ (G I - 6 3 0 1) を予防接種した動物の脾臓から単離した C D 4 ⁺ T 細胞の増殖を表す結果を図 5 に示す。図 5 は、酵母 - ブラキュリ (G I - 6 3 0 1) での免疫によって、ブラキュリ特異的 C D 4 ⁺ T 細胞が産生されることを示している。

【 0 1 8 5 】

実施例 8

以下の実施例では、酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物を用いた免疫によって、ブラキュ

リ発現腫瘍が *in vivo* で抑制されることを証明する。

【0186】

この実験では、C57BL/6マウスに、尾静脈から 1×10^6 個のMC38-phブラキュリ細胞（組換えヒトブラキュリを発現するMC38腫瘍細胞）を投与した（第0日）。腫瘍移植から4日後、マウスに、酵母対照（YVEC、実施例4を参照）及び酵母-hブラキュリ（GI-6301）による毎週のワクチン接種を開始したが、これは、1部位につき1YUの用量で4つの異なる注射部位に投与した（用量当たり合計4YU）。腫瘍移植から40日後にマウスを死なせ、肺腫瘍結節の数を評価した。2つの実験を合わせた結果を図6に示す。テーブル6は、平均肺腫瘍数（ \pm SEM）と、5つ以下の肺結節を有するマウスの数（及びパーセンテージ）を示す。

10

【0187】

【表7】

テーブル6

ワクチン処理	肺腫瘍 (平均 \pm SEM)	5つ以下の肺結節を有する動物 (%)
酵母-対照 (YVEC)	4.1 \pm 1.2	7/15 (46.7%)
酵母-ブラキュリ (GI-6301)	1.9 \pm 0.5	2/15 (13.3%)

20

図6及びテーブル6の結果から、本発明の酵母-ブラキュリ免疫治療組成物の投与により、酵母のみを受けたマウス（ブラキュリ抗原なし）と比較して、マウスにおけるブラキュリ発現腫瘍を抑制することができることを証明している。

【0188】

実施例9

以下の実施例では、健康なドナーから得たヒト末梢血液単核細胞（PBMC）において、酵母-ブラキュリ免疫療法を用いて、*in vitro*でのブラキュリ特異的CD4⁺T細胞応答の発生を証明する。

【0189】

以下の実験では、バキュロウイルス発現を介して昆虫細胞に完全長ヒトブラキュリタンパク質を発現させた後、精製した。

30

GM-CSF及びIL-4と一緒に5日培養することにより、健康なドナーのPBMCから樹状細胞（DC）を作製した後、酵母対照（YVEC、実施例4を参照）又は酵母-ブラキュリ（GI-6301、実施例1及び2を参照）（酵母：DC比 = 1：1）を用いて、*in vitro*で処理した。48時間後、DCを回収し、照射（30Gy）した後、オートロガスPBMCの刺激のために、DC：PBMC比 = 1：10で用いた。3日目に、IL-2（10U/ml）を培養物に添加した。7日目に、刺激したT細胞を回収した後、オートロガスの照射済PBMC（T細胞：PBMC比 = 1：3）に単独で、又は10µg/mlの精製ブラキュリタンパク質若しくは対照ヒト血清アルブミンタンパク質の存在下で、応答するIFN- γ 産生について試験した。96時間の刺激後、上澄みを収集し、ELISAアッセイによってIFN- γ レベルについて評価した。合計9人の健康なドナーを評価したところ、9分の3のドナーが、酵母-ブラキュリ処理DCによる*in vitro*での刺激後、ブラキュリ特異的CD4⁺T細胞応答を示した。3人の陽性ケースについての結果をテーブル7に示す（値は、対照ヒト血清アルブミンタンパク質での刺激により誘導されたバックグラウンドレベルを差し引いた後の、ブラキュリタンパク質に

40

応答するIFN- γ レベルを示す；ドナー3については、2サイクルの刺激を実施した後、ブラキュリタンパク質に対する応答を評価した）。

【0190】

【表 8】

テーブル7

ドナーID	DC刺激	Δ IFN- γ (pg/ml)
1	酵母-対照	1500.0
	酵母-ブラキュリ	2950.0
2	酵母-対照	13.4
	酵母-ブラキュリ	889.0
3	酵母-対照	17.4
	酵母-ブラキュリ	102.8

CD4⁺T細胞中のIFN- γ の細胞内サイトカイン染色により、酵母-ブラキュリ(GI-6301)処理DCでの*in vitro*刺激後のブラキュリタンパク質に対するCD4⁺T細胞応答について、さらに6人の別の健康なドナーを評価した。GMCSF及びIL-4と一緒に5日培養することにより、健康なドナーのPBMCから樹状細胞を作製した後、酵母対照(YVEC)又は酵母-ブラキュリ(GI-6301)(酵母:DC比=1:1)を用いて、*in vitro*で処理した。48時間後、DCを回収し、照射(30Gy)した後、オートロガスPBMCの刺激のために、DC:PBMC比=1:10で用いた。3日目に、IL-2(10U/ml)を培養物に添加した。7日目に、刺激したT細胞を回収した後、オートロガスPBMC(T細胞:PBMC比=1:3)に単独で、又は10 μ g/mlの精製ブラキュリタンパク質若しくは対照ヒト血清アルブミンタンパク質の存在下で、応答するIFN- γ 産生について試験した。2時間の刺激後、BD GOLGISTOP(商標)タンパク質輸送阻害剤(Protein Transport Inhibitor)(BDバイオサイエンス(BD Biosciences))を培養物に添加した。4時間の刺激後、細胞を回収し、透過処理してから、抗CD4 PerCP-Cy5.5及び抗IFN- γ FITC抗体(BDバイオサイエンス(BD Biosciences))を用いて、CD4及びIFN- γ について染色した。合計6人の健康なドナーを評価し、6人のうち2人が、酵母-ブラキュリ処理DCによる*in vitro*での刺激後にブラキュリ特異的CD4⁺T細胞応答を示した。陽性のケースについての結果をテーブル8に示す(値は、PBMC単独の刺激により誘導されたバックグラウンドレベルを差し引いた後の、対照ヒト血清アルブミン(HSA)又はブラキュリタンパク質に応答するCD4及び細胞内IFN- γ について同時に陽性であったT細胞のパーセンテージを示す)。

【0191】

10

20

30

【表 9】

テーブル 8

ドナー	in vitroでの 刺激の数	% CD4 ⁺ /IFN-γ ⁺ 細胞	
		HSA	ブラキュリ
4	1	0.07	0.24
5	2	0.00	1.00

10

実施例 10

以下の実施例では、ブラキュリアゴニスト抗原を発現する酵母 - ブラキュリ免疫療法組成物が、前立腺癌患者からブラキュリ特異的 T 細胞を産生することを証明する。

【0192】

ブラキュリ特異的 T 細胞系を作製するために、未成熟オートロガス樹状細胞 (DC) を、GI-6305 (実施例 3 参照) として知られる酵母 - ブラキュリ免疫療法組成物に、DC : GI-6305 比 = 1 : 1 で 48 時間暴露した後、オートロガス非接着性細胞を刺激するために、10 : 1 のエフェクター : APC 比で、抗原提示細胞 (APC) として用いた。培養物を、5% CO₂ 含有加湿雰囲気において、37 °C で 3 日間インキュベートした後、さらに 7 日にわたり、20 U/ml の濃度で、組換えヒト IL-2 を補充した。10 日間の培養は、1 回の in vitro 刺激 (IVS) サイクルに相当した。11 日目に、T 細胞を前述の GI-6305 暴露オートロガス DC で再刺激して、次の IVS サイクルを開始した。GI-6305 暴露オートロガス DC を 3 回の IVS サイクルの APC として用いた。3 回目の IVS の後、アゴニストブラキュリペプチド、WLLPGTSTV (配列番号 13) でパルスした照射済 (23, 000 ラド) オートロガス EBV-形質転換 B 細胞を APC として用いた。T-2-BR-A と称するブラキュリ特異的 T 細胞系を樹立した。この T 細胞系を以下に記載する免疫検定に用いた。

20

【0193】

テーブル 9 は、ブラキュリ特異的 T 細胞 (T-2-BR-A) が、GI-6305 で処理した同種異系 DC による刺激後に、有意なレベルの IFN-γ を放出するが、対照酵母 (YVEC、実施例 4 を参照) は、T-2-BR-A 細胞による IFN-γ の放出を刺激しなかったことを示している。結果を pg/ml / 10⁵ T 細胞で表す。簡潔に述べると、正常なドナー由来の同種異系 HLA-A2 陽性 DC を、様々な酵母 : DC 比 (テーブル 9 に示す) で、48 時間にわたって GI-6305 で処理した後、ブラキュリアゴニストエピトープ特異的 T 細胞 (T-2-BR-A) を刺激するのに用いた。この実験では、DC : T 細胞比は、1 : 10 であった。

30

【0194】

【表 10】

テーブル 9

樹状細胞	処理	酵母 /DC 比	T 細胞	IFN-γ
+	対照酵母	10:1	-	<15.6
+	対照酵母	10:1	+	<15.6
-	-	-	+	52.1
+	GI-6305	10:1	-	<15.6
+	GI-6305	10:1	+	589.0
+	GI-6305	5:1	-	<15.6
+	GI-6305	5:1	+	661.1
+	GI-6305	2.5:1	-	<15.6
+	GI-6305	2.5:1	+	341.3
+	GI-6305	1:1	-	<15.6
+	GI-6305	1:1	+	388.2

テーブル 10 は、G I - 6 3 0 5 処理 D C を用いて樹立したブラキュリ特異的 T 細胞が、H L A - A 2 陽性 / ブラキュリ陽性である M D A - M B - 2 3 1 乳癌細胞を有効に溶解することができるが、H L A - A 2 陰性 / ブラキュリ陽性である A S P C - 1 膵臓癌細胞は溶解しないことを示している。簡潔に述べると、M D A - M B - 2 3 1 (H L A - A 2 ⁺ / ブラキュリ ⁺) 及び A S P C - 1 (H L A - A 2 ⁻ / ブラキュリ ⁺) 腫瘍細胞標的に対する一晚の細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) アッセイにおいて、I V S - 6 にて、表示のエフェクター : 標的 (E T) 比 (テーブル 10 参照) で、ブラキュリ特異的 T 細胞系 T - 2 - B R - A を用いた。結果は、特定の溶解のパーセンテージとして表す。

【 0 1 9 5 】

【表 11】

テーブル 10

E:T 比	MDA-MB-231	ASPC-1
25:1	52.2 (2.8)	-5.1 (2.6)
12.5:1	23.8 (1.4)	0.2 (5.6)
6.25:1	13.9 (4.4)	2.3 (3.3)

別の実験では、ブラキュリ特異的 H L A - A 2 四量体に結合する T - 2 - B R - A 細胞

系の能力を評価した。簡潔に述べると、T - 2 - B R - A (I V S - 4 で用いられる) を対照四量体又はブラキュリアゴニストペプチドに特異的な四量体で染色した。図 7 A 及び 7 B は、G I - 6 3 0 5 処理 D C で作製した T - 2 - B R - A 細胞系における C D 8 + T 細胞の 1 0 . 8 % が、ブラキュリ - H L A - A 2 四量体に特異的に結合し (図 7 B) 、対照四量体には結合しない (図 7 A) ことを示している。

【 0 1 9 6 】

T - 2 - B R - A T 細胞系のパーフォリン発現をフローサイトメトリーによって分析した (パーフォリンは、細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) の細胞傷害活性の媒介因子である) 。簡潔に述べると、ブラキュリアゴニストペプチドをパルスしたオートロガス E B V 形質転換 B 細胞による再刺激から 5 日後に、T 細胞を試験した。図 8 は、ブラキュリアゴニストペプチドをパルスしたオートロガス B 細胞による刺激後の T - 2 - B R - A 細胞系におけるパーフォリンの発現を示し、さらに、G I - 6 3 0 5 処理 D C で作製したブラキュリ特異的 T 細胞系の細胞傷害能力を証明している。

【 0 1 9 7 】

実施例 1 1

以下の実施例では、ブラキュリ陽性癌を有する被験者における第 1 相臨床試験を説明する。

【 0 1 9 8 】

実施例 1、2、及び 4 ~ 9 に記載の G I - 6 3 0 1 として既知の酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物を用いて、非盲検の連続用量漸増第 1 相臨床試験を開始した。この臨床試験プロトコルに従い、9 ~ 1 8 人の癌患者 (用量コホートにつき 3 ~ 6 患者) に、皮下投与で、4 Y . U . (1 Y . U . x 4 部位、これは、来院毎に、患者の身体の 4 つの異なる部位に 1 Y . U . の G I - 6 3 0 1 を投与することを意味する) 、1 6 Y . U . (4 Y . U . x 4 部位) 及び 4 0 Y . U . (1 0 Y . U . x 4 部位) の用量範囲を用いる連続用量コホート漸増プロトコルにおいて、G I - 6 3 0 1 として既知の酵母 - ブラキュリ免疫療法組成物を投与した。G I - 6 3 0 1 は、計 7 回の来院 (約 3 ヶ月) で 2 週間毎に投与した後、患者がオフスタディー (o f f - s t u d y) 基準を満たすまで、毎月投与した。追加試験のために、最大耐用量 (M T D) 又は観測された最適用量の患者の展開コホート (n = 1 0) を選択した。結果は、主要エンドポイントとして、安全性及び忍容性のモニタリングであり、展開コホートでは、T 細胞前駆体の有意な変化が検出可能であるか否かであり、これは、E L I S p o t アッセイにおけるブラキュリ特異的 T 細胞の増加及びブラキュリタンパク質に応答する増殖 (例えば、治療による、ブラキュリ特異的 T C D 8 + 若しくは C D 4 + 細胞の出現又は増殖) によって測定される。副次エンドポイントである臨床的有用性、例えば、無増悪生存期間、臨床 X 線撮影による応答、血清マーカーの減少、及び / 又は循環腫瘍細胞の減少などを測定し、さらには、末梢血液中の免疫細胞サブセットの頻度 (C D 8 + 記憶 / エフェクター T 細胞、C D 4 + 記憶 / エフェクター T 細胞、T r e g s、NK 細胞、D C) 及びサイトカイン (例えば、I F N - 、I L - 1 0、I L - 1 2、I L - 2、I L - 4、T G F - など) の血清レベルの変化などの一般的免疫活性化のパラメーターも測定する。

【 0 1 9 9 】

G I - 6 3 0 1 は、有意な毒性なしに、安全で、十分に忍容されると思われる。さらに、G I - 6 3 0 1 は、治療下で発生するブラキュリ特異的 T 細胞応答を生み出す、又は少なくとも一部又は大部分の患者において既存のブラキュリ特異的ベースライン T 細胞応答の改善をもたらすと思われる。また、一部の患者が、安定化した病状を有することも予想される。

【 0 2 0 0 】

本試験の追加試験又は展開試験では、上で決定した最大耐用量又は実測の最適用量を用いて、別の患者コホートに、G I - 6 3 0 5 (実施例 3 を参照) として既知の酵母 - ブラキュリ免疫治療組成物を投与し、同じ主要及び副次エンドポイントを測定した。G I - 6 3 0 5 もまた、有意な毒性なしに、安全で、十分に忍容されること、並びに、治療下で発

生するブラキユリ特異的 T 細胞応答を生み出す、又は少なくとも一部又は大部分の患者において既存のブラキユリ特異的ベースライン T 細胞応答の改善をもたらすと思われる。また、一部の患者が、安定化した病状を有することも予想される。

【 0 2 0 1 】

実施例 1 2

以下の実施例では、酵母 - ブラキユリ免疫治療組成物を用いた第 2 相臨床試験を説明する。

【 0 2 0 2 】

実施例 1 及び 2 (例えば、G I - 6 3 0 1) 又は実施例 3 (G I - 6 3 0 5) に記載の酵母 - ブラキユリ免疫治療組成物を用いて、乳癌を有する患者に対するランダム化第 2 相臨床試験を実施した。I 期、I I 期若しくは I I I 期ブラキユリ陽性乳癌を有する少なくとも 1 0 0 人以上の被験者を参加させる。被験者選択基準は、悪性度 1、2 若しくは 3 癌を有する被験者を含んでよい。被験者選択基準はまた、「トリプルネガティブ」乳癌 (エストロゲン受容体 (E R)、プロゲステロン受容体 (P R) 及び H E R 2 の各々が陰性の癌) を有する被験者を含んでもよい。被験者選択基準は、リンパ節陰性癌を有する被験者を含んでもよい。

10

【 0 2 0 3 】

試験は、二重盲検若しくは非盲検、プラセボ対照、多施設試験として実施した。患者全員が標準的治療を受けており、治療群の患者は、治療中に、酵母 - ブラキユリ免疫治療組成物の連続注射を数回受けている。主要エンドポイントは、再発のない生存期間又は全生存期間である。別のエンドポイントは、抗原特異的 T 細胞応答 (例えば、治療下で発生又は増殖するブラキユリ特異的 C D 8 ⁺ T 細胞)、リンパ節陰性の維持、転移への進行、腫瘍細胞におけるブラキユリ発現を含んでもよい。

20

【 0 2 0 4 】

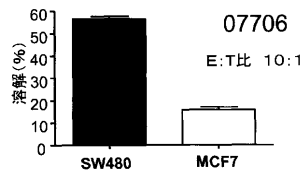
酵母 - ブラキユリ免疫治療組成物は、有意な毒性なしに、安全で、十分に忍容されられると思われる。さらに、酵母 - ブラキユリ免疫治療組成物は、治療下で発生するブラキユリ特異的 T 細胞応答を生み出す、及び / 又は少なくとも一部若しくは大部分の患者における既存のブラキユリ特異的ベースライン T 細胞応答の改善をもたらすと思われる。また、一部若しくは大部分の患者が、安定化した病状を有し、リンパ節陰性を維持し、及び / 又は転移性進行を予防、抑制若しくは停止することも予想される。

30

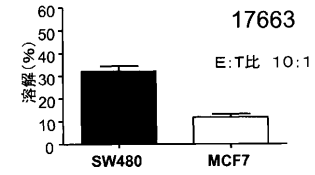
【 0 2 0 5 】

本発明の様々な実施形態について詳しく説明してきたが、これら実施形態の変更及び改変を、当業者が為しうることは明らかである。しかし、このような変更形態及び改変形態が、例として示す以下の請求項に記載するように、本発明の範囲に含まれることは、明確に理解されるべきである。

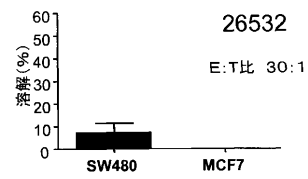
【 図 6 】



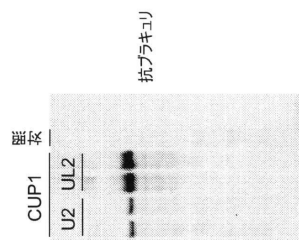
【 図 3 B 】



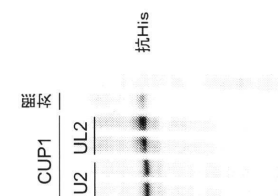
【 図 3 C 】



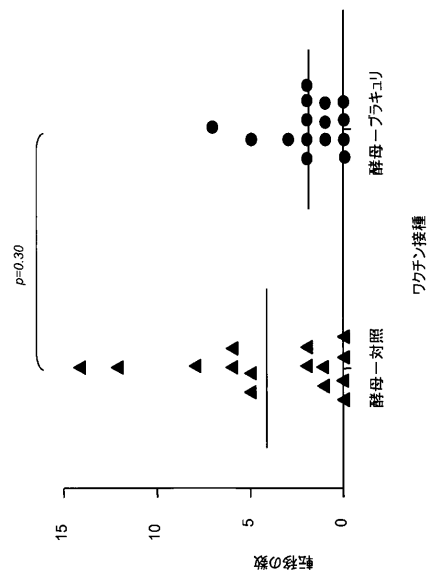
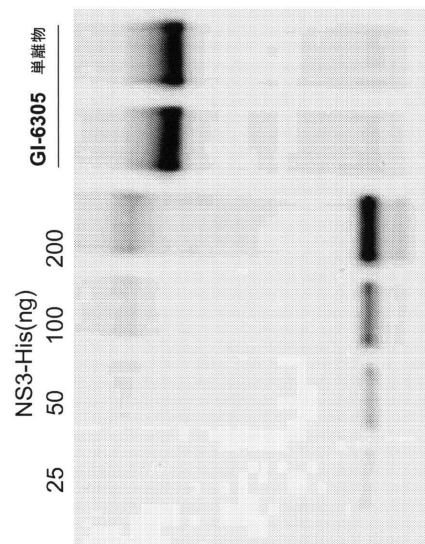
【 図 1 A 】



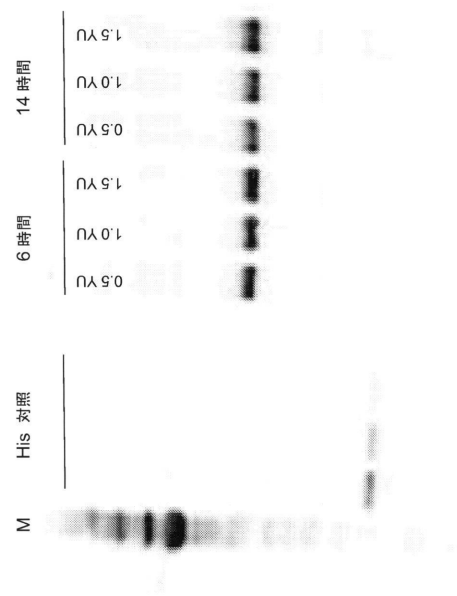
【 圖 1 B 】



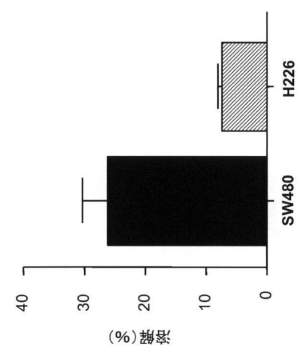
【 図 1 C 】



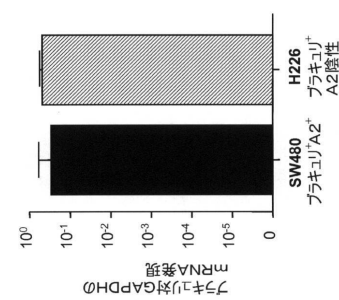
【図 2】



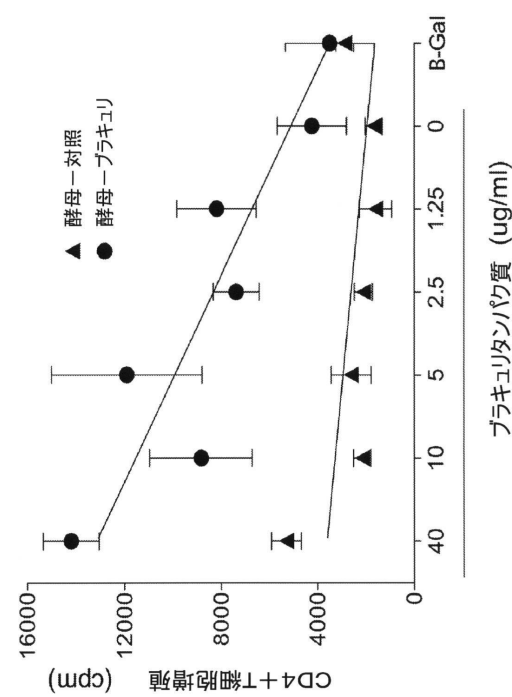
【図 4 A】



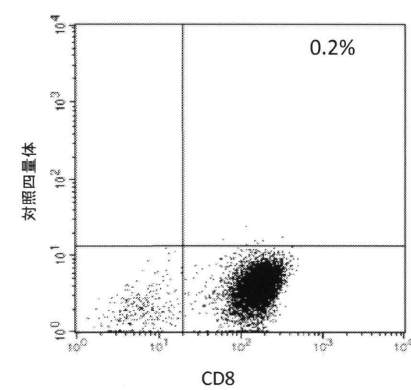
【図 4 B】



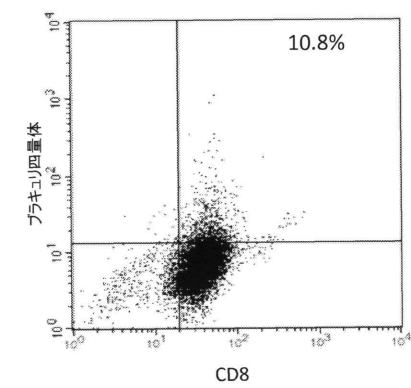
【図 5】



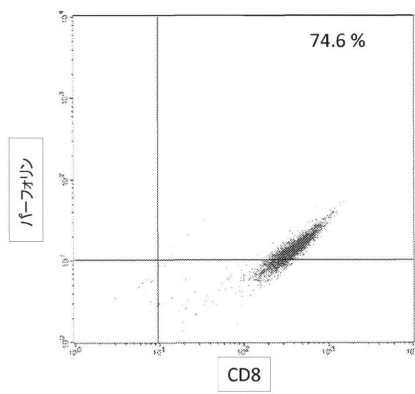
【図 7 A】



【図 7 B】



【図 8】



【配列表】

0006068368000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)		A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)		A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 P 37/04 (2006.01)		A 6 1 P 37/04	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)		C 0 7 K 14/47	Z N A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	A

(73)特許権者 508285606

ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ, アズ リプレゼンテッド バイ ザ セクレタリー, デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サービス
 アメリカ合衆国 メリーランド 20892-7660, ベセスダ, エグゼクティブ プールバード 6011, スイート 325, エムエスシー 7660, オフィス オブ テクノロジー トランスファー ナショナル インスティテューツ オブ ヘルス

(74)代理人 100105957

弁理士 恩田 誠

(74)代理人 100068755

弁理士 恩田 博宣

(74)代理人 100142907

弁理士 本田 淳

(72)発明者 パレナ、クラウディア

アメリカ合衆国 20851 メリーランド州 ロックビル シェトランド コート 2

(72)発明者 グオ、ジミン

アメリカ合衆国 80027 コロラド州 スーペリア ヒューロン ピーク アベニュー 3130

(72)発明者 アベリアン、デイビッド

アメリカ合衆国 07005 ニュージャージー州 ブラントン タウンシップ オールド ビーチ グレン ロード 3

(72)発明者 シュロム、ジェフリー

アメリカ合衆国 20854 メリーランド州 ポトマック ソレル アベニュー 10301

審査官 平林 由利子

(56)参考文献 特表2010-519904(JP,A)

特表2009-528987(JP,A)

特表2009-500454(JP,A)

特表2009-531068(JP,A)

国際公開第2010/121180(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 39/00 - 39/44

A 6 1 K 36/00 - 36/9068

A 6 1 K 45/00 - 45/08

C 0 7 K 14/00 - 14/825

C 1 2 N 15/00

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)