

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7268958号
(P7268958)

(45)発行日 令和5年5月8日(2023.5.8)

(24)登録日 令和5年4月25日(2023.4.25)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02

F I

請求項の数 40 (全111頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2017-529013(P2017-529013)
 (86)(22)出願日 平成27年12月1日(2015.12.1)
 (65)公表番号 特表2017-537621(P2017-537621)
 A)
 (43)公表日 平成29年12月21日(2017.12.21)
 (86)国際出願番号 PCT/US2015/063174
 (87)国際公開番号 WO2016/089862
 (87)国際公開日 平成28年6月9日(2016.6.9)
 審査請求日 平成30年12月3日(2018.12.3)
 審判番号 不服2020-16728(P2020-16728/J
 1)
 審判請求日 令和2年12月4日(2020.12.4)
 (31)優先権主張番号 62/213,166
 (32)優先日 平成27年9月2日(2015.9.2)
 (33)優先権主張国・地域又は機関 最終頁に続く

(73)特許権者 500429103
 ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ ペンシルベニア
 アメリカ合衆国 19104 ペンシルベ
 ニア州 フィラデルフィア シビック セ
 ンター ブールバード 3600 ナインス
 フロア
 (73)特許権者 509320254
 イノビオ フーマシューティカルズ,
 インコーポレイティド
 アメリカ合衆国, ペンシルベニア 19
 462, ブリマス ミーティング, ウエ
 スト ジャーマンタウン パイク 660
 , スイート 110
 (74)代理人 100099759

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 DNA抗体構築物及びその使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象内で合成抗体を生成するための、配列番号80のアミノ酸配列を含む合成抗PSM A抗体をコードする組み換え核酸配列を有する核酸分子を含む組成物であって、前記組み換え核酸配列を有する核酸分子は、前記対象内で発現されて前記合成抗体を生成する、組成物。

【請求項2】

前記抗体が、重鎖ポリペプチドまたはその断片、及び軽鎖ポリペプチドまたはその断片を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記重鎖ポリペプチドまたはその断片が、第1の核酸配列によってコードされ、かつ、前記軽鎖ポリペプチドまたはその断片が第2の核酸配列によってコードされる、請求項2に記載の組成物。

【請求項4】

前記組み換え核酸配列が、前記第1の核酸配列及び前記第2の核酸配列を含む、請求項3に記載の組成物。

【請求項5】

前記組み換え核酸配列が、前記第1の核酸配列及び前記第2の核酸配列を单一転写産物として前記対象内で発現するプロモーターをさらに含む、請求項4に記載の組成物。

【請求項6】

前記プロモーターが、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーターである、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】

前記組み換え核酸配列が、プロテアーゼ切断部位をコードする第3の核酸配列をさらに含み、前記第3の核酸配列が、前記第1の核酸配列と前記第2の核酸配列との間に位置する、請求項5に記載の組成物。

【請求項8】

前記対象のプロテアーゼが、前記プロテアーゼ切断部位を認識し、切断する、請求項7に記載の組成物。

【請求項9】

前記組み換え核酸配列が、前記対象内で発現されて抗体ポリペプチド配列を生成し、前記抗体ポリペプチド配列が、前記重鎖ポリペプチドまたはその断片、前記プロテアーゼ切断部位、及び前記軽鎖ポリペプチドまたはその断片を含み、前記対象によって產生されたプロテアーゼが、前記抗体ポリペプチド配列のプロテアーゼ切断部位を認識し、切断することで、開裂重鎖ポリペプチド及び開裂軽鎖ポリペプチドを生成し、前記合成抗体が、前記開裂重鎖ポリペプチド及び前記開裂軽鎖ポリペプチドによって生成される、請求項8に記載の組成物。

10

【請求項10】

前記重鎖ポリペプチドが、可変重領域及び定常重領域1を含む、請求項2に記載の組成物。

20

【請求項11】

前記重鎖ポリペプチドが、可変重領域、定常重領域1、ヒンジ領域、定常重領域2、及び定常重領域3を含む、請求項2に記載の組成物。

【請求項12】

前記軽鎖ポリペプチドが、可変軽領域及び定常軽領域を含む、請求項2に記載の組成物。

【請求項13】

前記組み換え核酸配列が、Kozak配列をさらに含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項14】

前記組み換え核酸配列が、免疫グロブリン（Ig）シグナルペプチドをコードする核酸配列をさらに含む、請求項1に記載の組成物。

30

【請求項15】

前記Igシグナルペプチドが、IgEまたはIgGシグナルペプチドを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項16】

前記組み換え核酸配列が、配列番号79の少なくとも1つの核酸配列を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項17】

対象内で合成抗体を生成するための、重鎖ポリペプチドまたはその断片をコードする第1の組み換え核酸配列及び軽鎖ポリペプチドまたはその断片をコードする第2の組み換え核酸配列を含む核酸分子を含む組成物であって、前記第1の組み換え核酸配列が、前記対象内で発現されて第1のポリペプチドを生成し、前記第2の組み換え核酸配列を有する核酸分子が、前記対象内で発現されて第2のポリペプチドを生成し、前記合成抗体が、前記第1及び第2のポリペプチドによって生成され、前記合成抗体が配列番号80のアミノ酸配列を含む、組成物。

40

【請求項18】

前記第1の組み換え核酸配列が、前記第1のポリペプチドを前記対象内で発現する第1のプロモーターをさらに含み、前記第2の組み換え核酸配列が、前記第2のポリペプチドを前記対象内で発現する第2のプロモーターをさらに含む、請求項17に記載の組成物。

【請求項19】

前記第1のプロモーターと前記第2のプロモーターが、同一である、請求項18に記載

50

の組成物。

【請求項 20】

前記プロモーターが、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーターである、請求項19に記載の組成物。

【請求項 21】

前記重鎖ポリペプチドが、可変重領域及び定常重領域1を含む、請求項17に記載の組成物。

【請求項 22】

前記重鎖ポリペプチドが、可変重領域、定常重領域1、ヒンジ領域、定常重領域2、及び定常重領域3を含む、請求項17に記載の組成物。

10

【請求項 23】

前記軽鎖ポリペプチドが、可変軽領域及び定常軽領域を含む、請求項17に記載の組成物。

【請求項 24】

前記第1の組み換え核酸配列及び前記第2の組み換え核酸配列が、Kozak配列をさらに含む、請求項17に記載の組成物。

【請求項 25】

前記第1の組み換え核酸配列及び前記第2の組み換え核酸配列が、免疫グロブリン（Ig）シグナルペプチドをコードする核酸分子をさらに含む、請求項17に記載の組成物。

20

【請求項 26】

前記Igシグナルペプチドが、IgEまたはIgGシグナルペプチドを含む、請求項25に記載の組成物。

【請求項 27】

配列番号80のアミノ酸配列を含む抗体をコードする組み換え核酸配列を有する核酸分子を含む、対象内の疾患の予防または治療するための医薬組成物であって、当該対象に投与され、当該対象内で合成抗体が生成される、医薬組成物。

【請求項 28】

前記の抗体またはその断片をコードする組み換え核酸配列が、重鎖ポリペプチドまたはその断片をコードする第1の組み換え核酸配列、及び軽鎖ポリペプチドまたはその断片をコードする第2の組み換え核酸配列であり、当該対象内で合成抗体が前記第1及び第2のポリペプチドによって生成される、請求項27に記載の医薬組成物。

30

【請求項 29】

前記合成抗体が、自己抗原に特異的である、請求項27又は28に記載の医薬組成物。

【請求項 30】

前記自己抗原が、PSMAである、請求項29に記載の医薬組成物。

【請求項 31】

前記組み換え核酸配列が、配列番号79の核酸配列を含む、請求項28に記載の医薬組成物。

【請求項 32】

2つのロイシンからアラニン突然変異をFc領域のCH2領域に導入する、請求項2に記載の組成物。

40

【請求項 33】

インビオ產生された抗体が、脱フコシル化される、請求項2に記載の組成物。

【請求項 34】

病原体による感染からの対象の治療のための医薬組成物であって、前記病原体に特異的な合成抗体をコードするヌクレオチド配列を有する核酸分子を含み、当該合成抗体は配列番号80のアミノ酸配列を含む、医薬組成物。

【請求項 35】

前記対象内に免疫応答を生成するために、前記病原体の抗体をさらに含む、請求項34に記載の医薬組成物。

50

【請求項 3 6】

配列番号 7 9 に記載の核酸配列の核酸分子を含む、抗 P S M A 抗体をコードする核酸分子。

【請求項 3 7】

配列番号 8 0 に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列を含む、合成抗体をコードする核酸分子。

【請求項 3 8】

前記核酸分子が、発現ベクターを含む、請求項 3 6 または 3 7 に記載の核酸分子。

【請求項 3 9】

請求項 3 6 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む組成物。

10

【請求項 4 0】

薬学的に許容しうる賦形剤をさらに含む、請求項 3 9 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

(関連出願の相互参照)

本願は、2014年12月1日出願の米国仮特許出願第 6 2 / 0 8 6 , 1 5 7 号、及び 2015年9月2日出願の米国仮特許出願第 6 2 / 2 1 3 , 1 6 6 号に対する優先権を主張するものであり、これらの出願は、参照することでそれら全体が本明細書に組み入れられる。

20

【0 0 0 2】

本発明は、半減期が延長された合成抗体を生成し、抗体依存性感染増強を排除し、抗体依存性細胞傷害性を高め、二重特異性結合をもたらし、二機能性をもたらし、かつ他のものをもたらし得る抗体への種々の変更を含む、合成抗体及びその断片をインビポ生成する組み換え核酸配列を含む組成物、及び前記組成物を投与することによる対象内の疾患の予防及び / または治療方法に関する。

【背景技術】**【0 0 0 3】**

免疫グロブリン分子は、システイン残基間のジスルフィド結合 (S - S として示す) によって共有結合された軽 (L) 鎖及び重 (H) 鎖を 2 つずつ含む。重鎖 (V H) 及び軽鎖 (V L) の可変ドメインは、抗体分子の結合部位に寄与する。重鎖定常領域は、3 つの定常ドメイン (C H 1 、 C H 2 、及び C H 3) と、(柔軟な) ヒンジ領域とからなる。軽鎖も、定常ドメイン (C L) を有する。重鎖及び軽鎖の可変領域は、4 つのフレームワーク領域 (F R ; F R 1 、 F R 2 、 F R 3 、及び F R 4) と、3 つの相補性決定領域 (C D R : C D R 1 、 C D R 2 、及び C D R 3) とを含む。従って、これらは非常に複雑な遺伝系であり、インビポ組み立てが困難となっている。

30

【0 0 0 4】

標的モノクローナル抗体 (m A b) は、過去 2 5 年間で最も重要な医療用治療の進歩の 1 つである。この種の免疫療法は今や、多数の自己免疫疾患、癌及び感染の治療に対して日常的に用いられている。悪性腫瘍に対して、現在用いられている免疫グロブリン (I g) 療法の多くは、腫瘍に向けた細胞毒性化学療法レジメンを併用する。この併用法により全体的な生存率が著しく改善されている。特定の癌に対して用いる m A b 製剤が多数認可されており、例えば、非ホジキンリンパ腫治療のための C D 2 0 を標的とするキメラ m A b であるリツキサン (リツキシマブ) 、ならびに C T L A - 4 を阻害し、黒色腫及び他の悪性腫瘍の治療に用いられているヒト m A b であるイピリムマブ (エルボイ) が挙げられる。さらに、ベバシズマブ (アバスチン) は、V E G F 及び腫瘍新血管形成を標的とし、大腸癌の治療に用いられているもう一つの代表的なヒト化 m A b である。悪性腫瘍の治療に最も注目されている m A b は、恐らく H e r 2 / n e u を標的とするヒト化製剤であるトラスツズマブ (ハーセブチニ) であり、患者の一部の乳癌に対して大きな有効性を持つことが実証されている。さらに、多数の m A b が、自己免疫及び特定の血液疾患の治療に

40

50

用いられている。

【 0 0 0 5 】

癌治療に加えて、ジフテリア、A型及びB型肝炎、狂犬病、破傷風、水痘、及び呼吸器合胞体ウイルス（R S V）などの多くの感染に対する防御効力をポリクローナルI gの受動伝達により調節する。実際、いくつかのポリクローナルI g製剤は、積極的なワクチン接種を介して防御I gを生成するのに十分な時間がない状況下の疾患流行地を旅行している個人において特定の感染性因子に対する一時的な防御をもたらす。さらに、免疫不全の子供において、R S V感染を標的とするm A bであるパリビズマブ（シナジス）は、R S Vに対して防御することが臨床的に実証されている。

【 0 0 0 6 】

市場に存在する現在利用可能な治療抗体は、ヒトI g G 1アイソタイプである。これらの抗体には、抗体定常領域（F c）に結合した2つのN結合型二分岐複合型オリゴ糖をもつ糖タンパク質（オリゴ糖の大部分は、コアフコシル化されている）が含まれる。白血球受容体（F c R）または補体のいずれかとF cの相互作用を介して、抗体依存性細胞毒性（A D C C）及び補体依存性細胞障害（C D C）のエフェクター機能を発揮する。治療抗体の（インビトロに対する）インビボ有効性を減少させる現象があるため、治療抗体を大量に、時には、数百ミリグラムの週用量で投与する必要が生じる。これは、ナチュラルキラー（N K）細胞上でのF c R I I I aと結合する血清I g Gと治療抗体の競合に主に起因する。内因性ヒト血清I g Gは、治療抗体により誘発されたA D C Cを阻害する。したがって、ヒト内での非フコシル化治療抗体の有効性を向上させることができる。非フコシル化治療抗体は、フコシル化ヒト血清I g GよりもF c R I I I aに対する結合親和性がはるかに高く、これは、ヒト血漿I g Gによる干渉を征服するための好ましい特徴である。

【 0 0 0 7 】

抗体ベースの治療はリスクがないわけではない。1つかかるリスクは、抗体依存性感染増強（A D E）であり、非中和性抗ウイルスタンパク質が宿主細胞へのウイルス侵入をしやすくする場合に起こり、細胞の感染性の増加につながる。いくつかの細胞は、ウイルスが侵入するのに用いる表面上に通常の受容体を有していない。抗ウイルスタンパク質（すなわち、抗体）は、細胞膜内で、これらの細胞のいくつかが有する抗体F c受容体に結合する。ウイルスは、抗体の他方の末端で抗原結合部位に結合する。このウイルスは、このメカニズムを使用して、ヒトマクロファージに感染することができ、通常は軽症のウイルス感染を引き起こし、生命に関わるようになる。A D Eの最も広く知られている例は、デングウイルス（D E N V）による感染の状況で発生する。それは、ある血清型のD E N Vに以前感染したことがある人が、何カ月または何年も経ってから異なる血清型に感染する場合に観察される。かかる場合では、疾患の臨床経過はより深刻になり、これらの人々、A D Eが起こっていない人と比べてより高いウイルス血症を有する。これは、一次（最初の）感染は、子供においてほとんどが軽症の疾患（D F）を引き起こすが、二次感染（後日での再感染）は、子供及び成人の双方において深刻な疾患（D H F 及び / またはD S S）と関連付けられやすくなるという観察を説明している。4つの抗原性の異なる血清型のD E N V（D E N V - 1 ~ D E N V - 4）が存在する。D E N Vによる感染は、感染している血清型に対して終生免疫をもたらす中和同型免疫グロブリンG（I g G）抗体の産生を誘発する。D E N Vによる感染は、他の3つの血清型に対してある程度の交差防御免疫ももたらす。中和異型抗体の誘発に加えて、D E N Vによる感染は、ウイルスを部分的にのみまたは全く中和しない異型抗体も誘発することができる。かかる交差反応性であるが非中和性抗体の産生が、より深刻な二次感染の理由かもしれない。いったん白血球内部へ入ると、ウイルスは検出されないまま複製し、最終的に、深刻な疾患を引き起こす非常に高いウイルス力値を生成する。

【 0 0 0 8 】

m A b療法の臨床効力は素晴らしいものがある。しかしながら、この治療アプローチの使用及び普及を制限する問題が残っている。これらの問題のいくつかには、これらの複雑

10

20

30

40

50

な生物製剤の製造コストが高いことが挙げられ、より広範な人口、とりわけ、大きな影響をもたらし得る発展途上国における使用を限定してしまう。さらに、有効性を達成し維持するために mAb を反復投与する必要性がしばしばあることもロジスティクス及び患者のコンプライアンスという点で障害になり得る。血清 IgG との競合により治療抗体の低いインビボ有効性を減少させるかまたは除去する新規の抗体が必要とされている。デング、HIV、RSV、及び他のものなどのウイルスにおける抗体依存性感染増強を除去することができる新規の抗体が必要とされている。二重特異性抗体、二官能性抗体、及び抗体力クテルは、治療的または予防的であることを証明することが可能ないくつかの機能を行うために必要である。DNA ベースワクチンを含むワクチンによる免疫化を介した宿主系の免疫刺激と共に本明細書に記載の合成抗体を利用できる併用療法も必要である。また、これらの抗体製剤の長期安定性は短いことが多く、最適ではない。したがって、当該技術分野では、安全かつコスト効率のよい方法で対象に送達することができる合成抗体分子が必要とされている。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、対象内での合成抗体の生成方法に関する。本方法は、抗体またはその断片をコードする組み換え核酸配列を含む組成物を対象に投与することを含み得る。組み換え核酸配列は、対象内で発現されて合成抗体を生成し得る。

【0010】

生成された合成抗体は、脱フコシル化されてもよい。生成された合成抗体は、Fc 領域の CH2 領域において、2 つのロイシンからアラニン突然変異を含んでもよい。

【0011】

抗体は、重鎖ポリペプチドまたはその断片、及び軽鎖ポリペプチドまたはその断片を含み得る。重鎖ポリペプチドまたはその断片は、第 1 の核酸配列によってコードされ得、前記軽鎖ポリペプチドまたはその断片、第 2 の核酸配列によってコードされ得る。組み換え核酸配列は、第 1 の核酸配列及び第 2 の核酸配列を含み得る。組み換え核酸配列は、第 1 の核酸配列及び第 2 の核酸配列を单一転写産物として対象内で発現するプロモーターをさらに含み得る。プロモーターは、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターであってもよい。

【0012】

組み換え核酸配列は、プロテアーゼ切断部位をコードする第 3 の核酸配列をさらに含み得る。第 3 の核酸配列は、第 1 の核酸配列と第 2 の核酸配列との間に位置し得る。対象のプロテアーゼは、プロテアーゼ切断部位を認識し、切断し得る。

【0013】

組み換え核酸配列は、対象内で発現されて抗体ポリペプチド配列を生成し得る。抗体ポリペプチド配列は、重鎖ポリペプチドまたはその断片、プロテアーゼ切断部位、及び軽鎖ポリペプチドまたはその断片を含み得る。対象によって産生されたプロテアーゼは、抗体ポリペプチド配列のプロテアーゼ切断部位を認識し、切断することで、開裂重鎖ポリペプチド及び開裂軽鎖ポリペプチドを生成し得る。合成抗体は、開裂重鎖ポリペプチド及び開裂軽鎖ポリペプチドによって生成され得る。

【0014】

組み換え核酸配列は、第 1 の転写産物として第 1 の核酸配列を発現する第 1 のプロモーターと、第 2 の転写産物として第 2 の核酸配列を発現する第 2 のプロモーターとを含み得る。第 1 の転写産物は、第 1 のポリペプチドに翻訳され得、第 2 の転写産物は、第 2 のポリペプチドに翻訳され得る。合成抗体は、第 1 及び第 2 のポリペプチドによって生成され得る。第 1 のプロモーターと第 2 のプロモーターは、同一であり得る。プロモーターは、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターであり得る。

【0015】

重鎖ポリペプチドは、可変重領域及び定常重領域 1 を含み得る。重鎖ポリペプチドは、可変重領域、定常重領域 1 、ヒンジ領域、定常重領域 2 、及び定常重領域 3 を含み得る。

10

20

30

40

50

軽鎖ポリペプチドは、可変軽領域及び定常軽領域を含み得る。

【0016】

組み換え核酸配列は、Kozak配列をさらに含み得る。組み換え核酸配列は、免疫グロブリン(Ig)シグナルペプチドをさらに含み得る。Igシグナルペプチドは、IgEまたはIgGシグナルペプチドを含み得る。

【0017】

組み換え核酸配列は、配列番号1、2、5、41、43、45、46、47、48、49、51、53、55、57、59、61、及び80の少なくとも1つのアミノ酸配列をコードする核酸配列を含み得る。組み換え核酸配列は、配列番号3、4、6、7、40、42、44、50、52、54、56、58、60、62、63、及び79の少なくとも1つの核酸配列を含み得る。

10

【0018】

本発明は、対象内での合成抗体の生成方法にも関する。本方法は、重鎖ポリペプチドまたはその断片をコードする第1の組み換え核酸配列及び軽鎖ポリペプチドまたはその断片をコードする第2の組み換え核酸配列を含む組成物を対象に投与することを含み得る。第1の組み換え核酸配列は、対象内で発現されて第1のポリペプチドを生成し得、第2の組み換え核酸配列は、対象内で発現されて第2のポリペプチドを生成し得る。合成抗体は、第1及び第2のポリペプチドによって生成され得る。

【0019】

第1の組み換え核酸配列は、第1のポリペプチドを対象内で発現する第1のプロモーターをさらに含み得る。第2の組み換え核酸配列は、第2のポリペプチドを対象内で発現する第2のプロモーターをさらに含み得る。第1のプロモーターと第2のプロモーターは、同一であり得る。プロモーターは、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターであり得る。

20

【0020】

重鎖ポリペプチドは、可変重領域及び定常重領域1を含み得る。重鎖ポリペプチドは、可変重領域、定常重領域1、ヒンジ領域、定常重領域2、及び定常重領域3を含み得る。軽鎖ポリペプチドは、可変軽領域及び定常軽領域を含み得る。

【0021】

第1の組み換え核酸配列及び第2の組み換え核酸配列は、Kozak配列をさらに含み得る。第1の組み換え核酸配列及び第2の組み換え核酸配列は、免疫グロブリン(Ig)シグナルペプチドをさらに含み得る。Igシグナルペプチドは、IgEまたはIgGシグナルペプチドを含み得る。

30

【0022】

本発明はさらに、対象内の疾患の予防または治療方法に関する。本方法は、上記の方法のいずれか1つによって対象内での合成抗体を生成することを含み得る。合成抗体は、外来抗原に特異的であり得る。外来抗原は、ウイルス由来であり得る。ウイルスは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、チクングニヤウイルス(CHIKV)、またはデングウイルスであり得る。

【0023】

ウイルスは、HIVであり得る。組み換え核酸配列は、配列番号1、2、5、46、47、48、49、51、53、55、及び57の少なくとも1つのアミノ酸配列をコードする核酸配列を含み得る。組み換え核酸配列は、配列番号3、4、6、7、50、52、55、56、62、及び63の少なくとも1つの核酸配列を含み得る。

40

【0024】

ウイルスは、CHIKVであり得る。組み換え核酸配列は、配列番号59及び61の少なくとも1つのアミノ酸配列をコードする核酸配列を含み得る。組み換え核酸配列は、配列番号58及び60の少なくとも1つの核酸配列を含み得る。

【0025】

ウイルスは、デングウイルスであり得る。組み換え核酸配列は、配列番号45の少なく

50

とも 1 つのアミノ酸配列をコードする核酸配列を含み得る。組み換え核酸配列は、配列番号 4 4 少なくとも 1 つの核酸配列を含む。

【 0 0 2 6 】

合成抗体は、自己抗原に特異的であり得る。自己抗原は、H e r 2 であり得る。組み換え核酸配列は、配列番号 4 1 及び 4 3 の少なくとも 1 つのアミノ酸配列をコードする核酸配列を含み得る。組み換え核酸配列は、配列番号 4 0 及び 4 2 の少なくとも 1 つの核酸配列を含み得る。

【 0 0 2 7 】

合成抗体は、自己抗原に特異的であり得る。自己抗原は、P S M A であり得る。組み換え核酸配列は、配列番号 8 0 の少なくとも 1 つのアミノ酸配列をコードする核酸配列を含み得る。組み換え核酸配列は、配列番号 7 9 の少なくとも 1 つの核酸配列を含み得る。

10

【 0 0 2 8 】

本発明は、上述の方法のいずれか 1 つによって產生された生成物にも関する。生成物は、機能的抗体を発現することができる単一D N A プラスミドであり得る。生成物は、インビオで組み合わせて、機能的抗体を形成する、機能的抗体の成分を発現することができる 2 つ以上の異なるD N A プラスミドからなり得る。

【 0 0 2 9 】

本発明は、病原体に特異的な合成抗体をコードするヌクレオチド配列を投与することを含む、病原体による感染からの対象の治療方法にも関する。本方法は、対象内に免疫応答を生成するために、病原体の抗体を投与することをさらに含み得る。

20

【 0 0 3 0 】

本発明は、A D C C を誘発するために、癌マーカーをコードするヌクレオチド配列を投与することを含む、癌からの対象の治療方法にも関する。

【 0 0 3 1 】

本発明は、配列番号 7 9 に記載の核酸配列の全長にわたって少なくとも約 9 5 % の同一性を有する核酸配列を含む合成抗体をコードする核酸分子にも関する。

【 0 0 3 2 】

本発明は、配列番号 7 9 に記載の核酸配列を含む合成抗体をコードする核酸分子にも関する。

【 0 0 3 3 】

30

本発明は、配列番号 8 0 に記載のアミノ酸配列の全長にわたって少なくとも約 9 5 % の同一性を有するタンパク質をコードする核酸配列を含む合成抗体をコードする核酸分子にも関する。

【 0 0 3 4 】

本発明は、配列番号 8 0 に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列を含む合成抗体をコードする核酸分子にも関する。

【 0 0 3 5 】

上述の核酸分子のいずれか 1 つは、発現ベクターを含み得る。

【 0 0 3 6 】

本発明は、上述の核酸分子の 1 つ以上を含む組成物にも関する。組成物は、薬学的に許容しうる賦形剤も含み得る。

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 7 】

【 図 1 】実施例 1 に記載の I g G 重鎖をコードする核酸配列を示す。

【 図 2 】実施例 1 に記載の I g G 軽鎖をコードする核酸配列を示す。

【 図 3 】時間 (時) 対 O D 4 5 0 n m (組織培養上清を 1 : 1 0 0 に希釈) をプロットしたグラフを示す。

【 図 4 】ウエスタンプロットの画像を示す。

【 図 5 】p H I V - 1 E n v - F a b の生成及び発現確認を示す。 (図 5 A 及び図 5 B) p H I V - 1 E n v F a b 抗 g p 1 2 0 F a b 発現構築物の環状プラスミドマップは、

50

V R C 0 1 重 (H) 及び軽 (L) 可変鎖 I g 遺伝子を用いて設計した。発現レベルを増すために F a b プラスミドを構築する際にいくつかの修飾を含んだ。図 5 に示すように、 F a b V L 断片遺伝子及び V H 断片遺伝子は、 p V a x 1 ベクターの B a m H 1 及び X h o 1 制限部位間で別々にクローニングした。図 5 C は、 p H I V - 1 E n v F a b のインピトロ発現を示す。グラフは、 2 9 3 T 細胞トランスフェクション後の p H I V - 1 E n v F a b 発現の時間的動態を示した。発現を示す値は、 3 列ウェルの平均値 O D 4 5 0 n m ± 標準偏差である。対照として、 2 9 3 T 細胞も p V a x 1 バックボーンでトランスフェクトした。

【図 6 】 p H I V - 1 E n v F a b による抗 H I V E n v 特異的 F a b の時間的生成の測定を示す。図 6 A は、抗 H I V 1 F a b の経時的生成を示す。 p H I V - 1 E n v F a b の投与後、 E L I S A 法によって 1 : 1 0 0 に最終希釈した血清中で特異的 F a b の產生を 1 0 日間にわたって測定し、 O D 4 5 0 n m として示した。 p V a x 1 投与されたマウスの血清を陰性対照として用いた。図 6 B は、組み換え g p 1 2 0 (r g p 1 2 0) で免疫化した後の抗 g p 1 2 0 抗体反応の比較測定を示す。実施例 2 に記載のように、 r g p 1 2 0 を単回注射してマウスを免疫化した後、 1 0 日目までの抗 g p 1 2 0 抗体の產生を測定し、 O D 4 5 0 n m 値として示した。この研究において、 P B S を陰性対照注射として用いた。図 6 C は、免疫プロット分析によって結合している H I V 1 E n v - F a b の確認を示す。実施例に記載のように、 5 μ g または 1 0 μ g いずれかの g p 1 2 0 を S D S - P A G E 及びニトロセルロースプロッティングに供した後、 p H I V - 1 E n v F a b 投与されたマウスの血清とともにプロットを培養した。実験用血清が結合 r g p 1 2 0 を認識したことが免疫プロットにより示され、生成された F a b の特異性が確認された。図 6 D は、ヒト I g G 1 F a b の時間的定量化を示す。 p H I V - 1 E n v - F a b を投与後、マウス血清中の I g G 1 を測定した。標準 E L I S A キットにより、示された時点で I g G 1 を測定し、 F a b (μ g / m L) ± 標準偏差で表わした。 p V a x 1 投与されたマウスの血清を陰性対照として用いた。 x 軸上に示された時点で血清サンプルを分析した。図 6 A 、図 6 B 、及び図 6 D に示すグラフの矢印は、 D N A プラスミドを投与した時点を示す。

【図 7 】 H I V 1 E n v F a b のクレード A H I V E n v 糖タンパク質への F A C S 結合分析を示す。図 7 A は、抗 H I V 1 E n v - F a b の H I V - 1 クレード A E n v 糖タンパク質への結合を示す F A C S スキヤニングを示す。コンセンサス (p C o n - E n v - A) または「最適化」 (p O p t - E n v - A) H I V - 1 クレード A エンベロープのいずれかを発現する D N A を 2 9 3 T 細胞にトランスフェクトした。トランスフェクション 2 日後、精製された天然 V R C 0 1 I g 、 p H I V - 1 E n v F a b (プラスミド単回投与後 4 8 時間で回収) から生成された血清、または p I g G - E 1 M 2 投与から生成された対照 I g のいずれかで細胞を染色した。血清及び V R C 0 1 抗体を P B S 5 0 μ l 中でそれぞれ 1 : 4 または 1 : 1 0 0 に希釈し、室温で 3 0 分間培養した。その後、適切な二次フィコエリトリン (P E) に複合体化させた I g で細胞を染色し、 F A C S 分析用に単一及び生細胞としてゲートした。陽性細胞の結合率をスキヤニングごとに示した。図 7 B は、 F A C S 結合データのグラフ図を示す。 I g / 血清試験群ごとに染色した細胞数 (すなわち、発現レベルを示す) をバックグラウンド染色値で割り、試験した異なる H I V クレード A E n v 製剤の関数として y 軸上に特異結合率 (%) として示した。

【図 8 】 p H I V - 1 E n v - F a b 投与されたマウスの血清による H I V - 1 の経時中和を示す。中和活性の分析に用いた血清は、グラフに示された時点で回収した。中和分析を H I V - 1 偽型ウイルス : B a l 2 6 (図 8 A ; クレード B 、 T i e r 1) 、 Q 2 3 E n v 1 7 (図 8 B ; クレード A 、 T i e r 1) 、 S F 1 6 2 S (図 8 C ; クレード B 、 T i e r 1) 、 及び Z M 5 3 M (図 8 D ; クレード C 、 T i e r 2) のパネルを用いて T Z M - B L 細胞で行った。実施例 2 に記載した通り、 0 . 0 1 の M O I で細胞を感染させ、 p H I V - 1 E n v F a b 投与から生成された F a b を含む血清 (最終希釈 1 : 5 0) の存在下で培養した。中和値を % で示す。この計算は実施例 2 に記載した。なお、グラフごとに示した横線は、実験用血清が 5 0 % のウイルス中和を介在したおおよその時点を示

10

20

30

40

50

す。

【図9】実施例2～7に記載のHIV-1 Env Fabの重鎖(VH-CH1)をコードする核酸配列を示す。

【図10】実施例2～7に記載のHIV-1 Env Fabの軽鎖(VL-CL)をコードする核酸配列を示す。

【図11】HIV Envをコードするプラスミドでトランスフェクトした細胞の免疫蛍光を示す。pVAX1(左パネル)またはpHIV-Env-Fab(右パネル)からの製剤で細胞を染色した。

【図12】抗原の種類対血清濃度(n g / mL)をプロットしたグラフを示す。

【図13】合成ヒトIgG1抗体をコードする構築物を模式的に示す。

10

【図14】図13の構築物によってコードされる組み立て抗体(発現時)を模式的に示す。

【図15】VRC01 IgGのアミノ酸配列を示す。

【図16A】図16Aは、HIV-1 Env-PG9 Igをコードする構築物の模式図を示す。

【図16B】図16Bは、図16Aの構築物を含むベクターの模式図を示す。

【図16C】図16Cは、染色したゲルの画像を示す。

【図17A】図17Aは、HIV-1 Env-4E10 Igをコードする構築物の模式図を示す。

【図17B】図17Bは、図17Aの構築物を含むベクターの模式図を示す。

20

【図17C】図17Cは、染色したゲルの画像を示す。

【図18】フリンによる切断前のHIV-1 Env-PG9 Igのアミノ酸配列を示す。

【図19】フリンによる切断前のHIV-1 Env-4E10 Igのアミノ酸配列を示す。

【図20A】図20Aは、CHIKV-Env-Fabの重(VH-CH1)鎖をコードする構築物の模式図を示す。

【図20B】図20Bは、CHIKV-Env-Fabの重(VL-CL)鎖をコードする構築物を模式的に示す。

【図21】CHIKV-Env-Fabの重(VH-CH1)または軽(VL-CL)鎖をコードする構築物を含む発現ベクターを模式的に示す。

【図22】時単位の時間(hr)対OD450nmをプロットしたグラフを示す。

30

【図23】免疫プロットの画像を示す。

【図24】DNA投与のタイミング、事前採血及び採血を模式的に示す。

【図25】日単位の時間対OD450nmをプロットしたグラフを示す。

【図26】暴露後の日数対生存率(%)をプロットしたグラフを示す。

【図27】マウス群対TNF-のpg/mLをプロットしたグラフを示す。

【図28】マウス群対IL-6のpg/mLをプロットしたグラフを示す。

【図29】VH-CH1をコードするプロモーター制御下の構築物を模式的に示す。

【図30】VL-CLをコードするプロモーター制御下の構築物を模式的に示す。

【図31】発現ベクター内でクローニングした抗Her-2 FabのVH-CH1またはVL-CLをコードする構築物を模式的に示す。

40

【図32】抗Her-2 FabのVH-CH1をコードする核酸配列を示す。

【図33】図32の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列(すなわち、抗Her-2 FabのVH-CH1のアミノ酸配列)を示す。

【図34】抗Her-2 FabのVL-CLをコードする核酸配列を示す。

【図35】図34の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列(すなわち、抗Her-2 FabのVL-CLのアミノ酸配列)を示す。

【図36】トランスフェクト細胞の種類対IgG濃度(μg/mL)をプロットしたグラフを示す。

【図37】免疫グロブリンG(IgG)重鎖の可変重領域(VH)、可変重定常領域1(CH1)、ヒンジ領域、可変重定常領域2(CH2)、及び可変重定常3(CH3)をコ

50

ードし、かつ、IgG軽鎖の可変軽領域(VL)及び可変軽定常領域(CL)をコードする構築物を模式的に示す。IgGの重鎖及び軽鎖は、プロテアーゼ切断部位によって分離され、各々は、(リーダー配列によってコードされる)シグナルペプチドによって先行される。

【図38】抗デングウイルス(DENV)ヒトIgGをコードする核酸配列を示す。

【図39】図39の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列(すなわち、抗DENVヒトIgGのアミノ酸配列)を示す。このアミノ酸配列では、重鎖及び軽鎖を2つの別々のポリペプチドに分離させるプロテアーゼ切断がまだ起こっていない。

【図40】マウス群対OD450nmをプロットしたグラフを示す。

【図41】注射後の日数対ヒトIgG濃度(ng/mL)をプロットしたグラフを示す。

10

【図42】図1の核酸配列(すなわち、配列番号6)によってコードされるアミノ酸配列を示す。このアミノ酸配列は、以下の実施例1に記載のIgG重鎖のアミノ酸配列である。

【図43】図2の核酸配列に(すなわち、配列番号7)によってコードされるアミノ酸配列を示す。このアミノ酸配列は、以下の実施例1に記載のIgG軽鎖のアミノ酸配列である。

【図44】図9の核酸配列(すなわち、配列番号3)によってコードされるアミノ酸配列を示す。このアミノ酸配列は、実施例2~7に記載のHIV-1Env-Fabの重鎖(VH-CH1)のアミノ酸配列である。

【図45】図10の核酸配列(すなわち、配列番号4)によってコードされるアミノ酸配列を示す。このアミノ酸配列は、実施例2~7に記載のHIV-1Env-Fabの軽鎖(VL-CL)のアミノ酸配列である。

20

【図46】以下の実施例11に記載のHIV-1PG9一本鎖Fab(scFab)をコードする核酸配列を示す。

【図47】図46の核酸配列(すなわち、配列番号50)によってコードされるアミノ酸配列を示す。このアミノ酸配列は、以下の実施例11に記載のHIV-1PG9scFabのアミノ酸配列である。

【図48】以下の実施例13に記載のHIV-14E10一本鎖Fab(scFab)をコードする核酸配列を示す。

【図49】図48の核酸配列(すなわち、配列番号52)によってコードされるアミノ酸配列を示す。このアミノ酸配列は、以下の実施例13に記載のHIV-14E10scFabのアミノ酸配列である。

30

【図50】免疫グロブリンG(IgG)重鎖の可変重領域(VH)、可変重定常領域1(CH1)、ヒンジ領域、可変重定常領域2(CH2)、及び可変重定常3(CH3)をコードする構築物を模式的に示す。IgG重鎖をコードする核酸配列は、リーダー配列によって先行される。

【図51】IgG軽鎖の可変軽領域(VL)及び可変軽定常領域(CL)をコードする構築物を模式的に示す。IgG軽鎖をコードする核酸配列は、リーダー配列によって先行される。

【図52】以下の実施例9に記載のHIV-1VRC01IgG1重鎖をコードする核酸配列を示す。

【図53】図52の核酸配列(すなわち、配列番号54)によってコードされるアミノ酸配列を示す。このアミノ酸配列は、以下の実施例9に記載のHIV-1VRC01IgG1重鎖のアミノ酸配列である。

40

【図54】以下の実施例9に記載のHIV-1VRC01IgG軽鎖をコードする核酸配列を示す。

【図55】図54の核酸配列(すなわち、配列番号56)によってコードされるアミノ酸配列を示す。このアミノ酸配列は、以下の実施例9に記載のHIV-1VRC01IgG軽鎖のアミノ酸配列である。

【図56】以下の実施例14に記載のCHIKV-Env-Fabの重鎖(VH-CH1)をコードする核酸配列を示す。

【図57】図56の核酸配列(すなわち、配列番号58)によってコードされるアミノ酸

50

配列を示す。このアミノ酸配列は、以下の実施例 14 に記載の C H I K V - E n v - F a b の重鎖 (V H - C H 1) のアミノ酸配列である。

【図 5 8】以下の実施例 14 に記載の C H I K V - E n v - F a b の軽鎖 (V L - C L) をコードする核酸配列を示す。

【図 5 9】図 5 8 の核酸配列 (すなわち、配列番号 6 0) によってコードされるアミノ酸配列を示す。このアミノ酸配列は、以下の実施例 14 に記載の C H I K V - E n v - F a b の軽鎖 (V L - C L) のアミノ酸配列である。

【図 6 0】以下の実施例 12 に記載の H I V - 1 E n v - 4 E 1 0 I g をコードする核酸配列を示す。

【図 6 1】以下の実施例 10 に記載の H I V - 1 E n v - P G 9 I g をコードする核酸配列を示す。 10

【図 6 2】 V R C 0 1 I g G (配列番号 6 4) をコードする核酸配列を示す。

【図 6 3】ヒト抗 P S M A 抗体の構築物設計としてスクレオチド配列の直線配置の概略図を示す。

【図 6 4】抗 h u P S M A - I g G 1 抗体のインビトロ発現を提供するグラフを示す。左のグラフは、 2 9 3 T トランスフェクト細胞中の抗 h u P S M A 発現を示す。右のグラフは、 h u P S M A タンパク質と (陰性対照 : p V a x 1 - 空ベクター、及び陽性対照 : P S M A - m A b s - 市販のモノクローナル抗体に対する) インビトロトランスフェクト細胞との結合を示す。

【図 6 5】ヒト P S M A タンパク質に対する抗 h u P S M A - I g G 1 の定量化を提供するグラフを示す。 20

【図 6 6】 N u / J マウスの免疫化及び出血スケジュールを上パネルに示し、 N u / J マウス中の抗 h u P S M A I g G 1 結合のインビオ動態を下パネルに示す。

【図 6 7】抗 h u P S M A I g G 1 結合を確認するウエスタンプロットのゲル写真を示す。

【図 6 8】ヒト前立腺 (L N C a P) 細胞に結合する、処置マウスの血清 (N u / J) 中の抗 h u P S M A I g G 1 の特異性についての情報を提供する、異なる対象のいくつかのフローサイトメトリーグラフを示す。

【図 6 9】抗 P S M A - I g G D N A で処置したマウス由来の血清の存在下または不在下において L n C a p 細胞血清に対する細胞毒性についてエフェクター細胞を試験した際の抗 h u P S M A I g G 1 : A D C C 活性を詳述するグラフを示す。 30

【図 7 0】抗体発現プラスミドの概略設計、及び C H I K V - F a b 発現プラスミドの単回 E P 媒介注射後の抗体の発現及び結合速度の確認を示す。 (A) N C B I データベースから特定された選択された抗 C H I K V ヒトモノクローナルの可変軽鎖及び重鎖 (V L 及び V H) I g G 断片遺伝子を、 C H I K V - F a b 及び C H I K V - I g G について別々に、最適化 D N A プラスミドベクターにクローニングした。 (B) 抗 C H I K V V L 及び V H - F a b 遺伝子または C H I K V - I g G をコードする D N A プラスミドを、 E L I S A 法によってそれぞれのインビトロ発現を決定するために、 2 9 3 T 細胞に一緒にトランスフェクトした。空の対照である p V a x 1 プラスミドでトランスフェクトした細胞は、陰性対照として機能した。 (C) E P 介在送達後の抗 C H I K V - I g G 抗体のインビオ発現。マウス (B 6 . C g - F o x n 1 n u / J) に C H I K V - I g G プラスミド (合計で 1 0 0 μ g) を単回筋肉内注射で投与した後、 E P を行った (1 群当たり n = 5 マウス) 。空の p V a x 1 ベクターの注射は、陰性対照として用いた。 (D) C H I K V - E n v 抗原への特異的結合は、 C H I K V - I g G 及び組み換え C H I K V - E n v で免疫化されたマウス由来の血清を回収した E L I S A アッセイにより測定し、異なる時点での個々のマウスの O D 4 5 0 n m 値として表した。 (E) ヒト I g G 濃度の血清レベルは、材料及び方法に記載のように、 C H I K V - I g G を筋肉内に注射したマウスにおいて種々の時点で測定した。 (F) 抗体結合親和性及び特異性の評価。タンパク質を標的にするための C H I K V - I g G を注射したマウス (14 日目) 由来の血清の結合親和性機能性は、以下の実施例に記載のように、 C H I K V 感染細胞由来の細胞溶解物を用いてウエ

10

20

30

40

50

スタンプロットによって試験した。

【図71】図71A～71Cは、CHIKV-IgG発現プラスミドの単回電気穿孔媒介注射後のIgGの発現及び結合速度を示す。図71Aは、CHIKV-Fabを投与されたマウス由来の血清は、CHIKV-Env抗原に特異的であることを示す。ELISAプレートを組み換えCHIKV-EnvまたはHIV-1 Env（亜型B；MN）タンパク質で被覆し、CHIKV-IgGまたはpVax1を注射したマウス由来の血清は、最初の注射後に示したように得られた。CHIKV-Env抗原への特異的結合は、血清を回収したELISAアッセイにより測定し、異なる時点で個々のマウスのOD450nm値として表した。図71Bは、CHIKV-Fabを投与されたマウスから生成されたCHIKV-Fabが、CHIKV-Env糖タンパク質に結合できたことが、免疫蛍光検査法（IFA）結果により実証されたことを示す。CHIKV感染ベロ細胞を感染後24時間で固定し、次いで免疫蛍光検査法でCHIKV-Env抗原発現（緑色）を検出した。細胞核をDAPI（青色）で染色した。適量のCHIKV-Envタンパク質発現が、CHIKV-Fab抗体をもつベロ細胞中で観察された。pVax1免疫化マウス血清を陰性対照として用いた。図71Cは、プラスミドを注射したマウス由来の血清の、CHIKV感染細胞への結合のFACS分析を示す。x軸は、CHIKV-Envで補完したレンチウイルスGFP偽ウイルスを用いてGFP染色を示す。y軸は、マウス中で産生された試験ヒトIgGの染色を示す。二重陽性細胞は、CHIKV感染細胞への血清結合の示唆/測定である。

【図72】CHIKV-IgG+EPを注射したマウス由来の血清が、多数のCHIKV株に対して中和活性を呈すことを示す。図72A～72Fは、6つの異なるCHIKVウイルス株：Ross、LR2006-OPY1、IND-63-WB1、PC-08、B448-China、及びBianchiに対して測定した、CHIKV-IgGをEPで投与したマウス由来の血清の中和活性を示す。中和抗体（nAb）力価は、ベロ細胞中でCPEの少なくとも50%阻害をもたらした血清の最大希釈としてプロットする。各実験において1群当たり少なくとも10匹のマウスである2つの独立した実験において、同様の結果が観察された。IC-50値は、Prism GraphPadソフトウェアで行った。

【図73】抗CHIKV-Env IgG及び血清の耐久性、及びCHIKV-Fabで免疫化した後の粘膜IgG応答、並びにIgG発現及び暴露試験を示す。（A）IgGプラスミド免疫化及びCHIKV暴露の概略図。（B～C）BALB/cマウスに、0日目にpVax1、CHIKV-IgG、またはCHIKV-Fabを注射し、2日目（B）または30日目（C）にCHIKV-Del-03（JN578247）CHIKV株（25u1の全容量中1×10⁷PFU）で暴露した。マウスを毎日監視し、生存率は、ウイルス暴露後20日間記録した。（D～E）異なる経路のCHIKVウイルス感染からのマウスの防御。2つの群のマウスは、筋肉内（IM）注射により100ugのCHIKV-IgGで免疫化し、皮下（s.c.）（D）で2日目に暴露し（D）、別の群のマウスは、鼻腔内（i.n.）により暴露した。（E）CHIKVを接種。マウスを毎日監視し、生存率は、ウイルス暴露後20日間記録した。は、DNA投与を示し；は、ウイルス暴露を示した。各群は、10匹のマウスからなり、結果は、2つの独立した実験の代表例であった。

【図74】CHIKV暴露試験を介した即時的な防御及び持続的な防御の双方を示す。（A）CHIKV-IgGワクチン接種及び暴露試験の概略図。I群暴露：BALB/cマウスに、0日目にCHIKV-IgG、CHIKV-Env、またはpVax1を注射し、2日目にCHIKV-Del-03（JN578247）ウイルス株（25u1の全容量中1×10⁷PFU）で暴露した。II群暴露：BALB/cマウスに、0日目に単回CHIKV-IgG免疫化または示した日に多数のCHIKV-Env免疫化のいずれかを施した後、I群暴露と同じ条件下で35日目に暴露した。は、DNA投与を示し；は、ウイルス暴露を示した。各試験において、マウスを20日間監視し、生存率を記録した。（B）I群暴露試験からのマウスの生存率曲線。100%生存率は、CHIKV-I

10

20

30

40

50

g G 免疫化マウスで記録された点に留意されたい。(C) I I 群暴露試験からのマウスの生存率曲線。(D) 抗 C H I K V ヒト I g G レベルの濃度は、C H I K V - I g G + E P で免疫化した後の示した時点で測定した。(E) マウスにおける C H I K V - I g G 及び C H I K V - E n v 免疫化した後の抗 C H I K V - E n v 抗体の持続的かつ全身的な誘発。【図 75】C H I K V による感染に応答したエクスピボサイトカイン産生を示す。(A) 45 日目(すなわち、暴露後 10 日目)の I I 群暴露試験からの C H I K V - I g G 及び C H I K V - E n v 投与マウスにおけるウイルス力値。各データポイントは、10 匹のマウスからの平均ウイルス力値を表す。p V a x 1 免疫化マウスの群は、対照として機能した。ウイルス負荷は、p V a x 1 マウスと比べて C H I K V - I g G (p = 0.0244) 及び C H I K V - E n v (p = 0.0221) の両方において有意に減少した。(B & C) C H I K V 感染マウスからの血清炎症性サイトカインレベル (T N F - 及び I L - 6) の特徴付け。サイトカインレベルは、特異的 E L I S A アッセイによって 45 日目(暴露後 15 日目)にマウスで測定した。C H I K V - I g G 及び C H I K V - E n v を注射したマウスは、T N F - 及び I L - 6 の血清レベルが同様であり、かつ、対照群 (p < 0.0001) よりも T N F - 及び I L - 6 の血清レベルが有意に低かった。データは、マウス 1 匹当たり(1 群当たり n = 10)3 つのウェルの平均を表す。(D) C H I K V - I g G 及び / または C H I K V - E n v で免疫化した後、C H I K V 特異的ペプチドで刺激したマウスの脾細胞における T 細胞応答。示したデータは、少なくとも 2 つの別々の実験の代表例である。

【図 76】S N A P i によるヒト抗 D E N V 中和 m A b のインビトロ発現を示す。(a) S N A P i に使用した DNA プラスミドの概略図；抗体重鎖及び軽鎖配列は、フリン及び 2 A 切断部位の組み合わせによって分離する。(b) p D V S F - 3 WT または L A L A をトランスフェクトした 293 T 細胞の上清におけるヒト I g G の E L I S A 定量化分析。(c) D V S F - 3 WT を含有する、p D V S F - 3 WT をトランスフェクトした 293 T 上清のウエスタンプロット分析。抗体をプロテイン A スピンカラムで精製し、還元(左)及び非還元(右)条件下で S D S - P A G E で分離した。(d) ベロ細胞を非感染(モック)かまたは D E N V 1、2、3、または 4 で感染させるかのいずれかの後、固定し、透過処理し、p D V S F - 3 WT または L A L A をトランスフェクトした 293 T 細胞の上清で染色した。

【図 77】マウス血清中の中和 D E N V 抗体の長期発現の S N A P i 結果を示す。(a) ヒト I g G の全ての血清検出可能レベルは、抗 D E N V ヒト I g G 抗体 D V S F - 1 をコードする DNA プラスミドを F o x n 1 / N u J 免疫不全マウスに単回筋肉内注射した後、E L I S A 法で測定した。0 ~ 4 週目(左)及び 19 週目(右)のヒト I g G レベル。各線(左)または点(右)は、個々のマウスを表す(n = 5)。(b) 血清中の全ヒト I g G は、129 / S v マウスに p D V S F - 3 WT または p D V S F - 3 L A L A プラスミドを筋肉内注射した後に E L I S A 法で測定した(1 群当たり n = 4 ~ 5)。(c) ベロ細胞を非感染(モック)かまたは D E N V 1、2、3、または 4 で感染させるかのいずれかの後、固定し、透過処理し、p D V S F - 3 WT または p D V S F - 3 L A L A のいずれかの DNA 注射後 0 または 7 日目に採取した 129 / S v マウス血清で染色した(1 群当たり n = 5)。(d) 中和は、ベロ細胞に追加する前に p D V S F - 3 WT または p D V S F - 3 L A L A (1 群当たり n = 5) のいずれかの DNA 注射後 7 日目に採取した 129 / S v マウス血清の連続希釈物で D E N V 1、2、3、または 4 をインキュベートすることで評価した。感染細胞の割合を示す。

【図 78】S N A P i が、ウイルスのみ及び抗体感染増強疾患に対して防御することを示す。(a) ウイルスのみ暴露：A G 129 マウスは、亜致死量の D E N V 2 S 221 に暴露する 5 日前に p D V S F - 3 WT、p D V S F - 3 L A L A、または p V a x 空ベクターのいずれかの筋肉内注射を受けた(1 群当たり n = 5 ~ 6；p D V S F - 3 L A L A 及び p D V S F - 3 WT の比較に対する p = 0.0084)。(b) 抗体依存性感染増強暴露：A G 129 マウスは、高用量の非中和抗 D E N V m A b 2 H 2 を投与する 5 日前に p D V S F - 3 WT、p D V S F - 3 L A L A、または p V a x 空ベクターの

10

20

30

40

50

いずれかの筋肉内注射を受けた。30分後、マウスに亜致死量のDENV2 S221を暴露した（1群当たりn=5~6；pDVSF-3 LALA及びpDVSF-3 WTの比較に対するp=0.0072）。カプランマイヤー法による生存率曲線を示す（a~b）。

【図79】pDVSF-3 WT及びLALAコード抗体のインピトロ機能分析を示す。（a）精製した組み換えDENV Eタンパク質に対する、pDVSF-3 WTまたはLALAをトランスフェクトした293T細胞の上清中のヒトIgGのELISA結合分析。（b）抗体依存性感染増強は、K562細胞に追加する前にpDVSF-3 WTまたはLALAの上清の連続希釈物でDENV1、2、3、または4をインキュベートすることで評価した。感染細胞の割合を示す。

【図80】SNAPiを送達した後のAG129マウス中の抗DENVヒトIgGレベルの暴露前レベルを示す。（a）血清中のDVSF-3 WTまたはDVSF-3 LALAの全ヒトIgGは、AG129マウス中のそれぞれのプラスミドをDNA筋肉内注射（DENV2暴露1日前）及びEPした4日後にELISA法で測定した（1群当たりn=5~6；pDVSF-3 WT及びpVaxの比較に対するp=0.0005；pDVSF-3 LALA及びpVaxの比較に対するp=0.0001）。

【図81】マウスにおける多数のDENV抗体コードプラスミドの送達が、増加したDENV1-4抗血清を産生することを示す。（a）血清中のDVSF-3 WT、DVSF-1 WT、またはDVSF-3 WT、及びDVSF-1 WTの全ヒトIgGは、129/Svマウス中のそれぞれのプラスミドをDNA筋肉内注射及びEPした7日後にELISA法で測定した（1群当たりn=5；pDVSF-1 WT及びpDVSF-1+3の比較に対するp=0.0088；pDVSF-3 WT及びpDVSF-1+3の比較に対するp=0.0240）。

【図82】上部パネルには、DVSF-3 WTは、ヒトFcγR1aに結合するが、DVSF-3 LALAは、結合しないことを示す。下部の4つのパネルは、抗体依存性感染増強アッセイの結果を示す：DVSF-3 LALAによるDENVのインキュベーションは、ヒト単球（K562細胞株）感染をもたらさないが、DVSF-3 WTは、感染を高める。

【図83】回収した血清中のヒトIgG（μg/mL）の濃度に対する、抗PSMAプラスミドをC57BL/6ヌード（B6.Cg-Foxn1nu/J）マウスに注射後の日数をプロットしたグラフを示す。

【図84】OD450nmに対する時間（日目）をプロットしたグラフを示す。グラフにした結果は、インビボ抗PSMA抗体のヒト組み換えPSMAへの結合を調べたELISAからである。

【図85】ヒトIgG（μg/mL）の濃度に対する、抗PSMAプラスミドをC57BL/6マウスに注射後の日数をプロットしたグラフを示す。各マウスは、凡例で示すように別々の線で示す。

【図86】ヒトIgG（μg/mL）の濃度に対する、抗PSMAプラスミドをC57BL/6マウスに注射後の日数をプロットしたグラフを示す。示した結果は、グループ化したマウスである。

【図87】相対光単位（RLU）の発光に対する、10g10の抗PSMA抗体（g/mL）の濃度をプロットしたグラフを示す。

【図88】ルシフェラーゼ活性の誘導倍率に対する試料型をプロットしたグラフを示す。

【図89】pVax1または抗PSMA DNAプラスミドで免疫化したマウスの腫瘍移植（0日目）、免疫化（5または7日目）、及び腫瘍測定（7、14、21、28、35、42、49、56、及び63日目）のタイムラインを示す。

【図90】腫瘍移植後の日数と、腫瘍移植後5日目にpVax1で免疫化したマウスの腫瘍容積（mm³）とをプロットしたグラフを示す。

【図91】腫瘍移植後5日目に抗PSMA DNAプラスミドで免疫化したマウスの腫瘍容積（mm³）に対する腫瘍移植後の日数をプロットしたグラフを示す。

10

20

30

40

50

【図92】腫瘍移植後7日目に抗PSMA-DNAプラスミドで免疫化したマウスの腫瘍容積(mm^3)に対する腫瘍移植後の日数をプロットしたグラフを示す。

【図93】腫瘍をもつマウスの画像、及びそれぞれの腫瘍の測定を示す。マウスは、(1)腫瘍移植後5日目にpVax1で免疫化したマウス、(2)腫瘍移植後5日目に抗PSMA-DNAプラスミドで免疫化したマウス、または(3)腫瘍移植後7日目に抗PSMA-DNAプラスミドで免疫化したマウスであった。

【図94】示したマウス群の腫瘍容積(mm^3)に対する腫瘍移植後の日数をプロットしたグラフを示す。

【図95A】図95A～95Eは、最適化されたPSMA-dMAbプラスミドがインビトロでハイレベルなIgG産生をもたらすことを示す。図95Aは、PSMA-dMAbと本明細書で呼ばれる抗PSMAモノクローナル抗体をコードする最適化された抗PSMA-IgGプラスミドの設計を示す。図

10

【図95B】図95Bは、定量化ELISAを示す。

【図95C】図95Cは、pVax1-またはPSMA-dMAb-トランスフェクト293T細胞から48時間で回収した上清の1:50希釈の結合ELISAを示す。

【図95D】図95Dは、pVax1またはPSMA-dMAb-トランスフェクト293T細胞からの48時間上清の滴定結合ELISAを示す。

【図95E】図95Eは、PSMA-dMAb-トランスフェクト293T細胞からの上清の1:50希釈でプローブした組み換えPSMA(rPSMA)または無関係な組み換えHIV-Env(rHIV-Env)タンパク質のウエスタンプロット分析が、293T細胞で產生されたPSMA-dMAb-IgGの特異的結合を示すことを示す。

20

【図96A】図96A～96Cは、PSMA-dMAbプラスミドがマウス中でハイレベルなIgG産生をもたらすことを示す。図96Aは、100ugのPSMA-dMAbプラスミドの単回注射を筋肉内に接種した後、EPを行ったC57BL/6ヌード(B6.Cg-Foxn1nu/J)マウスから回収した血清で行った定量化ELISAを示す。1.2ug/mlのピークIgG濃度が、C57BL/6ヌードでは14日目に得られた。

【図96B】図96Bは、組み換えヒトPSMAで試験したマウスから回収した血清の滴定結合ELISAを示す。

【図96C】図96Cは、PSMA-dMAb-接種マウスからの血清の1:50希釈でプローブした組み換えPSMA(rPSMA)または無関係な組み換えHIV-Env(rHIV-Env)タンパク質のウエスタンプロット分析が、マウスで產生されたPSMA-dMAb-IgGの特異的結合を示すことを示す。

30

【図97A】図97A～97Bは、ヌードマウスで產生されたPSMA-dMAb-IgGが、PSMAを発現する細胞株に結合することを示す。図97Aは、空のpVax1ベクターまたはPSMA-dMAbプラスミドのいずれかを接種したマウスからの14日の血清の1:50希釈で染色した、PSMAを発現するLNCaP及びTRAMP-C2細胞株のフローサイトメトリー分析を示す。

【図97B】図97Bは、LNCaP及びTRAMP-C2細胞染色の平均蛍光指数(MFI)の定量化を示す。

【図98】C57BL/6ヌードマウスで產生されたPSMA-dMAbが、腫瘍組織中のPSMAを染色することを示す。

40

【図99A】図99A～99Cは、PSMA-dMAbがLNCaP細胞上のADCCを介することを示す。図99Aは、PSMA-dMAbのADCC活性を、ADCCリポーター-アッセイを用いて調べたことを示す。

【図99B】図99Bは、無抗体の陰性対照と比較して、PSMA-dMAb免疫化マウス血清により誘発されたADCC活性の誘導倍率を示す。

【図99C】図99Cは、PSMA-dMAb血清がLNCaP細胞の細胞死に与える影響を分析するためのフローサイトメトリーを示す。

【図100A】図100A～100Dは、PSMA-dMAbが、TRAMP-C2腫瘍暴露マウスマル中での抗腫瘍免疫を誘発することを示す。図100Aは、C57BL/6

50

マウスへの腫瘍投与、及び p V a x 1 または P S M A - d M A b プラスミド投与のスキームを示す。

【図 100 B】図 100 B は、腫瘍投与後に最大 10 週目までキャリパーで週 1 回測定した腫瘍容積を示す。

【図 100 C】図 100 C は、腫瘍投与後 50 日目の p V a x 1 及び P S M A - d M A b 群からの腫瘍をもつ代表的なマウスを示す。

【図 100 D】図 100 D は、P S M A - d M A b 投与前の抗 N K 1 . 1 Ig G の単回注射による N K 細胞の枯渇が、P S M A - d M A b が腫瘍致死に与える保護効果を無効にしたこと示す。

【発明を実施するための形態】

【0038】

本発明は、抗体、その断片、その変異体、またはその組み合わせをコードする組み換え核酸配列を含む組成物に関する。組成物を、それを必要とする対象に投与し、合成抗体のインピボ発現及び形成し易くすることができる。

【0039】

特に、組み換え核酸配列から発現した重鎖及び軽鎖ポリペプチドは、合成抗体に組み立てることができる。重鎖ポリペプチド及び軽鎖ポリペプチドは、抗原に結合することができ、本明細書に記載のように組み立てられていない抗体に比べてより免疫原性が強く、かつ、抗原に対して免疫応答を引き起こすかもしくは誘導することができる合成抗体をアセンブリがもたらすように、互いに相互作用することができる。

【0040】

また、これらの合成抗体は、抗原誘導の免疫応答に応じて産生される抗体よりもさらに速やかに対象内で生成される。合成抗体は、広範な抗原に効率的に結合し、中和することができる。合成抗体は、疾患に対して効率的に防御し、及び／または、疾患生存率を促進することもできる。

【0041】

1. 定義

特に定義していない限り、本明細書で使用する全ての技術的用語及び科学的用語は、当業者が一般的に理解するものと同じ意味を有する。矛盾が生じる場合には、定義を含めて本明細書が優先となる。本発明の実施または試験において、本明細書中に記載されたものと同様または同等の方法及び材料を用いることはできるが、好適な方法及び材料を以下に記載する。本明細書で言及する全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の引用文献は、引用によりそれらの全体が組み入れられる。尚、本明細書で開示した材料、方法、及び実施例は単なる例示であり、限定することを意図していない。

【0042】

本明細書で使用する「を含む (comprise (s))」、「を含む (incude (s))」、「を有する (having)」、「を有する (has)」、「できる (can)」、「を含む (contain (s))」という用語、及びその変形は、付加的な行為あるいは構造の可能性を妨げない、制限しない移行句、用語、または単語であることを意図している。単数形である「a」、「and」、及び「the」は、文脈上例外が明記されていない限り、複数形の意味を持つこともある。本開示は、明示的に記載されているかどうかに関わらず、本明細書に示される実施形態または要素「を含む (comprising)」、「からなる (consisting of)」、及び「から実質的になる (consisting essentially of)」他の実施形態も企図する。

【0043】

「抗体」は、クラス Ig G、Ig M、Ig A、Ig D、もしくは Ig E の抗体、またはその断片もしくは誘導体 (Fab、F(ab')2、Fd を含む)、ならびにその一本鎖抗体、及び誘導体を意味し得る。抗体は、哺乳動物の血清サンプルから単離された抗体、ポリクローナル抗体、親和性精製抗体、またはこれらの混合物のうち、所望のエピトープまたはそれに由来する配列に対する十分な結合特異性を示すものであり得る。

10

20

30

40

50

【0044】

本明細書で互換的に使用する、「抗体断片」または「抗体の断片」は、抗原結合部位または可変領域を含む完全抗体の一部分を指す。この部分は、完全抗体の Fc 領域のある特定の重鎖領域（すなわち、抗体アイソタイプに応じて CH2、CH3 または CH4）を含まない。抗体断片の例としては、Fab 断片、Fab' 断片、Fab' - SH 断片、F(ab')2 断片、Fd 断片、Fv 断片、ダイアボディ、一本鎖 Fv (scFv) 分子、1 つの軽鎖可変領域のみを含有する一本鎖ポリペプチド、軽鎖可変領域の 3 つの CDR を含有する一本鎖ポリペプチド、1 つの重鎖可変領域のみを含有する一本鎖ポリペプチド及び重鎖可変領域の 3 つの CDR を含有する一本鎖ポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0045】

「抗原」は、宿主内で免疫応答を引き起こすことが可能なタンパク質を指す。抗原は抗体により認識され結合される。抗原は体内または外部環境から生じる。

【0046】

本明細書で使用する、「コード配列」または「コード化核酸」は、本明細書に記載の抗体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸（RNA または DNA 分子）を意味し得る。コード配列は、核酸の投与先である個体または哺乳動物の細胞中の発現を誘導できるプロモーター及びポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントと機能的に連結した、開始及び終了シグナルをさらに含むことができる。コード配列は、シグナルペプチドをコードする配列をさらに含むことができる。

20

【0047】

本明細書で使用する、「相補体」または「相補的」は、ある核酸が、ヌクレオチド間または核酸分子のヌクレオチド類似体間にワトソン・クリック（例えば、A-T/U 及び C-G）またはフーツティーン塩基対を表わすことを意味し得る。

【0048】

本明細書で使用する、「定電流」は、組織、または該組織を規定する細胞が、同組織に送達される電気パルスの持続期間中に受容するまたは経験する電流を定義する。電気パルスは、本明細書に記載の電気穿孔装置から送達される。この電流は、電気パルスの寿命期間中、該組織に定電流量で留まるが、それは、本明細書で提供される電気穿孔装置が、好みしくは瞬間的フィードバックを有する、フィードバック素子を有するからである。フィードバック素子は、パルスの持続期間中の組織（または細胞）の抵抗を測定し、電気穿孔装置に自身の電気エネルギー出力を変化させる（例えば、電圧を上げる）ようにすることができる。同組織中の電流は、電気パルスの間ずっと（約マイクロ秒）、及びパルス間ににおいて、一定であり続ける。いくつかの実施形態において、フィードバック素子は、制御器を含む。

30

【0049】

本明細書で使用する、「電流フィードバック」または「フィードバック」は互換的に使用されており、提供される電気穿孔装置の活発な応答を意味し得るが、これは、電極間の組織の電流を測定することと、電流を一定レベルで維持するために、EP 装置が送達するエネルギー出力を適宜変化させることとを含む。この一定レベルは、パルスシーケンスまたは電気処理を開始する前に、ユーザーが予め設定する。電気穿孔装置の中の電気回路が、電極間の組織の電流を連続的にモニターし、そのモニターされた電流（または組織中の電流）を予め設定された電流と比較し、連続的にエネルギー出力の調整を行なって、モニターされた電流を予め設定されたレベルで維持することができる。フィードバックは、電気穿孔装置の電気穿孔構成要素、例えば、制御器によって達成され得る。フィードバックループは瞬時のものであり得、それは、フィードバックループがアナログ閉ループフィードバックであるからである。

40

【0050】

本明細書で使用する、「分散電流」は、本明細書に記載の電気穿孔装置の様々な針電極アレイから送達される電流のパターンを意味し得、これらのパターンは、電気穿孔される

50

任意の組織領域に対する電気穿孔関連の熱ストレスの発生を最小限に抑えるか、または好ましくは消失させる。

【0051】

本明細書で互換的に使用する、「電気穿孔」、「電気透過処理」、「界面動電増強」(「E P」)は、生体膜に微細経路(細孔)を生じさせるための膜貫通電場パルスの使用を意味し得る。こうした微細経路の存在により、プラスミド、オリゴヌクレオチド、s i R N A、薬剤、イオン、及び水などの生体分子が、細胞膜の片側から他方の側に通過することが可能になる。

【0052】

本明細書で使用する、「内因性抗体」は、体液性免疫応答を誘導するのに有効な量の抗原を投与されている対象内で生成される抗体を指し得る。

10

【0053】

本明細書で使用する、「フィードバック機構」は、ソフトウェアまたはハードウェア(もしくはファームウェア)のいずれかによって実行されるプロセスであって、(エネルギー・パルスの送達前、送達中、及び/または送達後の)所望の組織のインピーダンスを受容し、それを現在値、好ましくは電流と比較し、送達されるエネルギー・パルスを調整して、予め設定された値を達成するプロセスを指し得る。フィードバック機構は、アナログ閉ループ回路により実施され得る。

【0054】

「断片」は、機能、すなわち、所望の標的に結合でき、かつ、全長抗体と同じ意図した効果を有する抗体のポリペプチド断片を意味し得る。抗体の断片は、シグナルペプチド及び/または1位のメチオニンを備えているかまたは備えていないかのいずれの場合にも、N及び/またはC末端から少なくとも1つのアミノ酸が欠けている以外は全長と100%同一であってもよい。断片は、付加された任意の異種シグナルペプチドを除き、特定の全長抗体の長さの20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上を含んでいてもよい。断片は、抗体に95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上同一で、かつ、同一率を計算する際に含まれないN末端メチオニンまたは異種シグナルペプチドをさらに含むポリペプチドの断片を含んでいてもよい。断片はさらに、免疫グロブリンシグナルペプチド、例えば、IgEまたはIgGシグナルペプチドなどのN末端メチオニン及び/またはシグナルペプチドをさらに含んでいてもよい。N末端メチオニン及び/またはシグナルペプチドは、抗体の断片に結合し得る。

20

【0055】

抗体をコードする核酸配列の断片は、シグナルペプチド及び/または1位のメチオニンをコードする配列を備えているかまたは備えていないかのいずれの場合にも、5'及び/または3'末端から少なくとも1つのヌクレオチドが欠けている以外は全長と100%同一であってもよい。断片は、付加された任意の異種シグナルペプチドを除く特定の全長コード配列の長さの20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上を含んでいてもよい。断片は、抗体に95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上同一で、かつ、同一率を計算する際に含まれないN末端メチオニンまたは異種シグナルペプチドをコードする配列をさらに必要に応じて含むポリペプチドをコードする断片を含んでいてもよい。断片はさらに、免疫グロブリンシグナルペプチド、例えば、IgEまたはIgGシグナルペプチドなどのN末端メチオニン及び/またはシグナルペプチドに対するコード配列をさらに含んでいてもよい。N末端メチオニン及び/またはシグナルペプチドをコードするコード配列は、コード配列の断片に結合し得る。

30

40

50

【0056】

本明細書で使用する、「遺伝子構築物」は、抗体などのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むDNA分子またはRNA分子を指す。コード配列は、核酸分子の投与先である個体の細胞中の発現を誘導できるプロモーター及びポリアデニル化シグナルを含む調節エレメントと機能的に連結した、開始及び終了シグナルを含む。本明細書で使用する「発現可能な形態」という用語は、個体の細胞中に存在しているときにコード配列が発現するように、タンパク質をコードするコード配列に機能的に連結している必要な調節要素を含んでいる遺伝子構築物を指す。

【0057】

本明細書において2つ以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈で使用する「同一」または「同一性」は、当該配列が指定領域に渡って指定の割合の同一残基を有することを意味し得る。この割合を計算するには、2つの配列を最適に整列させ、指定領域に渡って2つの配列を比較し、両配列の同一残基が発生する位置の数を確定して一致位置の数を得て、一致位置の数を指定領域の総位置数で割り、計算結果に100を掛けることにより、配列同一性のパーセント値が得られる。2つの配列の長さが異なるか、アライメントにより1つ以上の付着末端が生じ、指定の比較領域に单一配列のみが含まれる場合には、单一配列の残基を計算の分母に含めるが、分子には含めない。DNAとRNAを比較する場合には、チミン(T)とウラシル(U)を同等とみなすことができる。同一性の計算は、手動で行っても、BLAST、BLAST 2.0等のコンピューター配列アルゴリズムを使用して行ってもよい。

10

【0058】

本明細書で使用する、「インピーダンス」は、フィードバック機構を論ずる際に用いられ、かつ、オームの法則に従って電流値に変換することができるため、予め設定された電流と比較することができる。

【0059】

本明細書で使用する、「免疫応答」は、1つ以上の核酸及び/またはペプチドの導入に応答して、宿主の免疫系、例えば哺乳動物の免疫系が活性化することを意味し得る。この免疫応答は、細胞性もしくは体液性の形態、またはその両方であり得る。

【0060】

本明細書で使用する、「核酸」または「オリゴヌクレオチド」または「ポリヌクレオチド」は、互いに共有結合している少なくとも2つのヌクレオチドを意味し得る。一本鎖を表現することにより、相補鎖の配列も定義される。したがって、核酸は、表現される一本鎖の相補鎖も包含する。ある核酸の多くの変異体を、所与の核酸として同一目的で使用できる。したがって、核酸は、実質的に同一の核酸及びその相補体も包含する。一本鎖は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で標的配列とハイブリダイズできるプローブを提供する。したがって、核酸は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするプローブも包含する。

30

【0061】

核酸は、一本鎖または二本鎖であってもよく、二本鎖と一本鎖の両方の配列の一部分を含むこともできる。核酸は、DNA、ゲノムDNA、cDNA、RNA、またはハイブリッドであってもよく、核酸はデオキシリボヌクレオチドトリボヌクレオチドの組み合わせを含むことができ、ウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、イソシトシン、及びイソグアニンを含む塩基の組み合わせを含むことができる。核酸は、化学合成法または組み換え法により取得できる。

40

【0062】

本明細書で使用する、「機能的に連結」は、遺伝子と空間的に接続しているプロモーターの制御下で遺伝子が発現することを意味し得る。プロモーターは、その制御下にある遺伝子の5' (上流) または3' (下流) に位置できる。プロモーターと遺伝子の間の距離は、プロモーターの派生元遺伝子において当該プロモーターが制御する遺伝子とプロモーターの間の距離とほぼ同一であってもよい。当技術分野で知られているように、プロモータ

50

一機能を失うことなく、この距離の変化に適応することができる。

【0063】

本明細書で使用する、「ペプチド」、「タンパク質」、または「ポリペプチド」は、アミノ酸の結合配列を意味することができ、天然、合成、または、天然及び合成の修飾あるいはその組み合わせであってもよい。

【0064】

本明細書で使用する、「プロモーター」は、核酸の細胞中発現を授与、活性化、または増強することのできる合成分子または天然由来分子を意味し得る。プロモーターは、発現をさらに増強し、かつ／または空間的発現及び／またはその一時的発現を改変する目的で、1つ以上の特定の転写調節配列を含むことができる。プロモーターは遠位のエンハンサー要素または抑制エレメントを含むこともでき、このエンハンサー要素または抑制エレメントは、転写開始部位から数千塩基対も離れた場所に位置できる。プロモーターは、ウイルス、細菌、真菌、植物、昆虫、及び動物を含む源に由来してよい。プロモーターは、発現が発生する細胞、組織、もしくは臓器に関して、もしくは発現が生じる発生段階に関して、恒常的もしくは差次的に遺伝子成分の発現を調節でき、または、例えば生理的ストレス、病原体、金属イオン、誘発剤等の外部刺激に応答して遺伝子成分の発現を調節できる。プロモーターの代表例として、バクテリオファージT7プロモーター、バクテリオファージT3プロモーター、SP6プロモーター、lacオペレータープロモーター、lacプロモーター、SV40後期プロモーター、SV40初期プロモーター、RSV-LTRプロモーター、CMV IEプロモーター、SV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、及びCMV IEプロモーターが挙げられる。

10

【0065】

「シグナルペプチド」及び「リーダー配列」は、本明細書で互換的に使用され、本明細書に記載のタンパク質のアミノ末端に結合することができるアミノ酸配列を指す。一般に、シグナルペプチド／リーダー配列は、タンパク質の局在化を指示する。本明細書で使用するシグナルペプチド／リーダー配列は、タンパク質を産生する細胞からタンパク質を分泌し易くすることが好ましい。シグナルペプチド／リーダー配列は、細胞からの分泌時に、タンパク質（しばしば成熟タンパク質と呼ばれる）の残余から切断されることが多い。シグナルペプチド／リーダー配列は、タンパク質のN末端に結合する。

20

【0066】

本明細書で使用する、「ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件」は、例えば核酸の複合混合物において、第1の核酸配列（例えばプローブ）が第2の核酸配列（例えばターゲット）とハイブリダイズする際の条件を意味し得る。ストリンジエントな条件は配列に依存するため、状況によって異なる。ストリンジエントな条件は、所定のイオン強度pHにおける特定の配列に対する融点（T_m）より約5～10℃低くなるように選択される。T_mは、（規定のイオン強度、pH、及び核酸濃度下で）標的に相補的なプローブの50%が、平衡状態で標的配列にハイブリダイズする温度である（標的配列は過剰に存在するので、T_mにおいて、プローブの50%が平衡状態で占有される）。ストリンジエントな条件は、塩濃度が、pH 7.0～8.3において約1.0M未満のナトリウムイオン、例えば約0.01～1.0Mのナトリウムイオン濃度（または他の塩）であり、温度が、短いプローブ（例えば10～50ヌクレオチド）では最低約30℃、長いプローブ（例えば約50ヌクレオチド超）では最低約60℃であり得る。ストリンジエントな条件は、ホルムアミド等の不安定化剤の添加によって達成することもできる。選択的または特異的ハイブリダイゼーションの場合、陽性シグナルはバックグラウンドハイブリダイゼーションの少なくとも2～10倍であり得る。ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件例には、以下の条件が含まれる：50%ホルムアミド、5倍SSC、及び1%SDS、42℃でのインキュベート。または、5倍SSC、1%SDS、65℃でのインキュベート、0.2倍SSC、0.1%SDS中65℃での洗浄。

30

【0067】

本明細書で互換的に使用する、「対象」及び「患者」は、任意の脊椎動物を指し、哺乳

40

50

動物（例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、及びマウス）、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザルもしくはアカゲザル、チンパンジーなどのサル）、及びヒトが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、対象は、ヒトあるいは非ヒトであってもよい。対象あるいは患者は、他の形態の治療を受けていてもよい。

【0068】

本明細書で使用する、「実質的に相補的」は、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100個またはそれ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸の領域に渡って、第1の配列が第2の配列の相補体と少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であること、あるいは、2つの配列がストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズすることを意味し得る。

10

【0069】

本明細書で使用する、「実質的に同一」は、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、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100個またはそれ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸の領域に渡って、第1の配列と第2の配列が少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であること、あるいは、核酸に関して、第1の配列が第2の配列の相補体と実質的に相補的である場合を意味し得る。

20

【0070】

本明細書で使用する、「合成抗体」は、本明細書に記載の組み換え核酸配列によってコードされ、対象内で生成される抗体を指す。

30

【0071】

本明細書で使用する、「治療」または「治療する」は、疾患を予防するか、抑制するか、抑圧するかまたは完全に除去することで対象を疾患から防衛することを意味することができる。疾患を予防することは、その疾患の発症前に対象に本発明のワクチンを投与することを含む。疾患を抑制することは、その疾患の誘導後でその疾患の臨床的出現前に、対象に本発明のワクチンを投与することを含む。疾患を抑圧することは、その疾患の臨床的出現後に、対象に本発明のワクチンを投与することを含む。

【0072】

核酸に関して本明細書で使用する、「変異体」は、(i)基準ヌクレオチド配列の一部分もしくは断片；(ii)基準ヌクレオチド配列もしくはその一部分の相補体；(iii)基準核酸もしくはその相補体と実質的に同一の核酸；または(iv)ストリンジエントな条件下で、基準核酸、その相補体、もしくはその実質的に同一の配列とハイブリダイズする核酸を意味し得る。

40

【0073】

ペプチドまたはポリペプチドに関して使用する、「変異体」は、アミノ酸の挿入、欠失、または保存的置換によりアミノ酸配列が異なっているが、少なくとも1つの生物活性を保持しているものである。また、変異体は、基準タンパク質と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、少なくとも1つの生物活性を保持するアミノ酸配列を有するタンパク質も意味し得る。アミノ酸の保存的置換、すなわち、あるアミノ酸を類似特性（例えば、荷電領域の親水性、程度、及び分布）の別のアミノ酸に置換することは、当技術分野では、通常は軽微な変化を伴うものと認識されている。こうした軽微な変化は、当技術分野で理解され

50

ているように、アミノ酸の疎水性親水性指標 (hydrophilic index) を検討することにより部分的に特定できる。Kyteら, J. Mol. Biol. 157: 105 - 132 (1982)。アミノ酸の疎水性親水性指標は、その疎水性と電荷の考察に基づく。類似の疎水性親水性指標を有するアミノ酸は置換可能であり、その後もタンパク質機能を維持することが当技術分野において公知である。一態様において、 ± 2 の疎水性親水性指標を有するアミノ酸が置換される。アミノ酸の親水性を用いて、生物機能を保持したタンパク質となる置換を明らかにすることもできる。ペプチドに関連してアミノ酸の親水性を検討することにより、そのペプチドの局所的な最大平均親水性を計算でき、抗原性及び免疫原性と良く相關すると報告されている有用な尺度となる。米国特許第4,554,101号(この文献は、参照により全体が本明細書に組み込まれる)。当技術分野で理解されているように、類似の親水性値を有するアミノ酸を置換すると、例えば免疫原性等の生物活性を保持したペプチドが得られる。親水性値が互いに ± 2 以内のアミノ酸を用いて、置換を実施できる。アミノ酸の疎水性指標と親水性値の両方とも、そのアミノ酸の特定の側鎖の影響を受ける。こうした知見と一致して、生物機能に適合するアミノ酸置換とは、アミノ酸の相対的類似性、特に当該アミノ酸の側鎖の相対的類似性に依存するものと理解されており、この相対的類似性は、疎水性、親水性、電荷、サイズ、その他の特性により明らかになる。

【0074】

変異体は、完全遺伝子配列またはその断片の全長にわたって実質的に同一な核酸配列であってもよい。核酸配列は、遺伝子配列またはその断片の全長にわたって 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% 同一であってもよい。変異体は、アミノ酸配列またはその断片の全長にわたって実質的に同一なアミノ酸配列であってもよい。アミノ酸配列は、アミノ酸配列またはその断片の全長にわたって 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% 同一であってもよい。

【0075】

本明細書で使用する、「ベクター」は、複製起点を含む核酸配列を意味し得る。ベクターは、プラスミド、バクテリオファージ、細菌人工染色体、または酵母人工染色体であってもよい。ベクターは、DNAベクターまたはRNAベクターであってもよい。ベクターは、自己複製過剰染色体ベクターまたは宿主ゲノムに組み込むベクターのいずれかであってもよい。

【0076】

本明細書中の数値範囲の記述について、同程度の精度でその間に入る各数が明示的に企図される。例えば、6 ~ 9 という範囲の場合、6 及び 9 に加えて 7 及び 8 という数が企図され、6.0 ~ 7.0 という範囲の場合、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、及び 7.0 という数が明示的に企図される。

【0077】

2. 組成物

本発明は、抗体、その断片、その変異体、またはその組み合わせをコードする組み換え核酸配列を含む組成物に関する。組成物は、それを必要とする対象に投与された場合、対象内で合成抗体の生成をもたらし得る。合成抗体は、対象内に存在する標的分子(すなわち、抗原)に結合することができる。かかる結合は、抗原を中和し、別の分子、例えば、タンパク質または核酸によって抗原の認識をブロックし、抗原に免疫応答を引き起こすかまたは誘発することができる。

【0078】

合成抗体は、組成物を投与された対象内の疾患を治療する、予防する、及び/または防御することができる。抗原に結合することで合成抗体は、組成物を投与された対象内の疾患を治療する、予防する、及び/または防御することができる。合成抗体は、組成物を投

10

20

30

40

50

与された対象内の疾患生存率を促進することができる。合成抗体は、組成物を投与された対象内の疾患生存率を少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%もたらすことができる。他の実施形態において、合成抗体は、組成物を投与された対象内の疾患生存率を少なくとも約65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、または80%もたらすことができる。

【0079】

組成物は、対象に組成物を投与後少なくとも約1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、20時間、25時間、30時間、35時間、40時間、45時間、50時間、または60時間以内にその対象内で合成抗体の生成をもたらし得る。組成物は、対象に組成物を投与後少なくとも約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または10日以内にその対象内で合成抗体の生成をもたらし得る。組成物は、対象に組成物を投与後約1時間～約6日、約1時間～約5日、約1時間～約4日、約1時間～約3日、約1時間～約2日、約1時間～約1日、約1時間～約72時間、約1時間～約60時間、約1時間～約48時間、約1時間～約36時間、約1時間～約24時間、約1時間～約12時間、または約1時間～約6時間以内にその対象内で合成抗体の生成をもたらし得る。

【0080】

組成物は、それを必要とする対象に投与された場合、抗原を投与された対象内で内因性抗体を生成するよりも迅速に対象内で合成抗体の生成をもたらし、体液性免疫応答を誘発することができる。組成物は、抗原を投与された対象内で内因性抗体を生成する少なくとも約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または10日前に合成抗体の生成をもたらし、体液性免疫応答を誘発することができる。

【0081】

本発明の組成物は、安全であることなど、有効な組成物に必要な特徴を有しているため、組成物は、病気または死を引き起こさず、病気に対して防御し、投与し易く、副作用もほとんどなく、生物学的安定性や投与量当たりの低コスト化をもたらすことができる。

【0082】

3. 組み換え核酸配列

上述したように、組成物は、組み換え核酸配列を含んでいてもよい。組み換え核酸配列は、抗体、その断片、その変異体、またはその組み合わせをコードし得る。以下により詳細に抗体について記載する。

【0083】

組み換え核酸配列は、異種核酸配列であってもよい。組み換え核酸配列は、少なくとも1つの異種核酸配列または1つ以上の異種核酸配列を含んでいてもよい。

【0084】

組み換え核酸配列は、最適化核酸配列であってもよい。かかる最適化により抗体の免疫原性を増大あるいは変化させることができる。最適化により転写及び/または翻訳も改善することができる。最適化とは、以下の1つ以上を含んでいてもよい：低G C含量リーダー配列により転写を増大させる；m R N A安定性及びコドン最適化；k o z a k配列（例えば、G C C A C C）を追加して翻訳を増大させる；シグナルペプチドをコードする免疫グロブリン（I g）リーダー配列を追加；シス作用配列モチーフ（すなわち、内部T A T Aボックス）を可能な限り取り除く。

【0085】

a. 組み換え核酸配列構築物

組み換え核酸配列は、1つ以上の組み換え核酸配列構築物を含んでいてもよい。組み換え核酸配列構築物は、1つ以上の構成要素を含んでいてもよい。以下により詳細に記載する。

【0086】

10

20

30

40

50

組み換え核酸配列構築物は、重鎖ポリペプチド、その断片、その変異体、またはその組み合わせをコードする異種核酸配列を含んでいてもよい。組み換え核酸配列構築物は、軽鎖ポリペプチド、その断片、その変異体、またはその組み合わせをコードする異種核酸配列を含んでいてもよい。組み換え核酸配列構築物は、プロテアーゼまたはペプチダーゼ切断部位をコードする異種核酸配列も含んでいてもよい。組み換え核酸配列構築物は、1つ以上のリーダー配列を含んでいてもよく、各リーダー配列は、シグナルペプチドをコードする。組み換え核酸配列構築物は、1つ以上のプロモーター、1つ以上のイントロン、1つ以上の転写終結領域、1つ以上の開始コドン、1つ以上の終結または終止コドン、及び／または1つ以上のポリアデニル化シグナルを含んでいてもよい。組み換え核酸配列構築物は、1つ以上のリンカーまたはタグ配列も含んでいてもよい。タグ配列は、ヘマグルチニン（H A）タグをコードすることができる。

10

【 0 0 8 7 】

（1）重鎖ポリペプチド

組み換え核酸配列構築物は、重鎖ポリペプチド、その断片、その変異体、またはその組み合わせをコードする異種核酸を含んでいてもよい。重鎖ポリペプチドは、可変重鎖（V H）領域及び／または少なくとも1つの定常重鎖（C H）領域を含んでいてもよい。少なくとも1つの定常重鎖領域は、定常重鎖領域1（C H 1）、定常重鎖領域2（C H 2）、定常重鎖領域3（C H 3）、及び／またはヒンジ領域を含んでいてもよい。

【 0 0 8 8 】

いくつかの実施形態において、重鎖ポリペプチドは、V H領域及びC H 1領域を含んでいてもよい。他の実施形態において、重鎖ポリペプチドは、V H領域、C H 1領域、ヒンジ領域、C H 2領域、及びC H 3領域を含んでいてもよい。

20

【 0 0 8 9 】

重鎖ポリペプチドは、相補性決定領域（「 C D R 」）セットを含んでいてもよい。C D Rセットは、V H領域の3つの超可変領域を含んでいてもよい。重鎖ポリペプチドのN-末端から開始して、これらのC D Rは、それぞれ、「 C D R 1 」、「 C D R 2 」、及び「 C D R 3 」と称せられる。重鎖ポリペプチドのC D R 1、C D R 2、及びC D R 3は、抗原への結合または抗原の認識に寄与することができる。

【 0 0 9 0 】

（2）軽鎖ポリペプチド

30

組み換え核酸配列構築物は、軽鎖ポリペプチド、その断片、その変異体、またはその組み合わせをコードする異種核酸配列を含んでいてもよい。軽鎖ポリペプチドは、可変軽鎖（V L）領域及び／または定常軽鎖（C L）領域を含んでいてもよい。

【 0 0 9 1 】

軽鎖ポリペプチドは、相補性決定領域（「 C D R 」）セットを含んでいてもよい。C D Rセットは、V L領域の3つの超可変領域を含んでいてもよい。軽鎖ポリペプチドのN-末端から開始して、これらのC D Rは、それぞれ、「 C D R 1 」、「 C D R 2 」、及び「 C D R 3 」と称せられる。軽鎖ポリペプチドのC D R 1、C D R 2、及びC D R 3は、抗原への結合または抗原の認識に寄与することができる。

40

【 0 0 9 2 】

（3）プロテアーゼ切断部位

組み換え核酸配列構築物は、プロテアーゼ切断部位をコードする異種核酸配列を含んでいてもよい。プロテアーゼ切断部位は、プロテアーゼまたはペプチダーゼによって認識することができる。プロテアーゼは、エンドペプチダーゼまたはエンドプロテアーゼであってもよく、フリン、エラスター、H t r A、カルパイン、トリプシン、キモトリプシン、トリプシン及びペプシンが挙げられるが、これらに限定されない。プロテアーゼは、フリンであってもよい。他の実施形態において、プロテアーゼは、セリンプロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、メタロプロテアーゼ、グルタミン酸プロテアーゼ、または内部ペプチド結合を切断する（すなわち、N - 末端またはC - 末端ペプチド結合を切断しない）任意のプロテアーゼであっても

50

よい。

【0093】

プロテアーゼ切断部位は、切断効率を促進するかまたは増大させる1つ以上のアミノ酸配列を含んでいてもよい。1つ以上のアミノ酸配列は、別々のポリペプチドの形成または生成効率を促進するかまたは増大させることができる。1つ以上のアミノ酸配列は、2Aペプチド配列を含んでいてもよい。

【0094】

(4) リンカー配列

組み換え核酸配列構築物は、1つ以上のリンカー配列を含んでいてもよい。リンカー配列は、本明細書に記載の1つ以上の構成要素を空間的に分離もしくは連結することができる。他の実施形態において、リンカー配列は、2つ以上のポリペプチドを空間的に分離もしくは連結するアミノ酸配列をコードすることができる。

10

【0095】

(5) プロモーター

組み換え核酸配列構築物は、1つ以上のプロモーターを含んでいてもよい。1つ以上のプロモーターは、遺伝子発現を推進し、かつ、調節することが可能な任意のプロモーターであってもよい。かかるプロモーターは、DNA依存RNAポリメラーゼ経由の転写に要するシス作用配列要素である。遺伝子発現の指示に用いられるプロモーターは、特定の用途に依って選択される。プロモーターは、組み換え核酸配列構築物の転写開始部から、これがその天然の設定における転写開始部位からの距離であるのとほぼ同じ距離に配置される。しかしながら、この距離の変動は、プロモーター機能の喪失を伴うことなく、適合させることができる。

20

【0096】

プロモーターは、重鎖ポリペプチド及び/または軽鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列に機能的に連結していてもよい。プロモーターは、真核細胞中での発現に対して有効であることを示すプロモーターであってもよい。コード配列に機能的に連結したプロモーターは、CMVプロモーター、SV40初期プロモーター及びSV40後期プロモーターなどのシミアンウイルス40(SV40)由来のプロモーター、マウス乳腺癌ウイルス(MMTV)プロモーター、ウシ免疫不全ウイルス(BIV)長末端反復(LTR)プロモーターなどのヒト免疫不全ウイルス(HIV)プロモーター、モロニーウイルスプロモーター、トリ白血病ウイルス(ALV)プロモーター、CMV前初期プロモーター、エプステインバーウイルス(EBV)プロモーター、またはラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーターなどのサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターでよい。プロモーターは、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチニン、ヒトポリヘドリン、またはヒトメタロチオネインなどのヒト遺伝子からのプロモーターであってもよい。

30

【0097】

プロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導的プロモーターであってもよく、後者は、宿主細胞がいくつか特定の外的刺激にさらされた場合にのみ転写を開始する。多細胞生物の場合、プロモーターは、特定の組織または臓器もしくは特定の発生段階に特異的であってもよい。プロモーターは、筋肉または皮膚特異的プロモーターなどの組織特異的プロモーターでよく、天然もしくは合成であってもよい。かかるプロモーターの例は、米国特許公開公報US20040175727に記載され、その内容は全体として本明細書に組み入れられる。

40

【0098】

プロモーターは、エンハンサーと関連していてもよい。エンハンサーは、コード配列の上流に位置してもよい。エンハンサーは、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチニン、または、CMV、FMDV、RSV、またはEBVなどのウイルスエンハンサーであってもよい。ポリヌクレオチド機能エンハンサーは、米国特許第5,593,972号、同第5,962,428号、及びW094/016737に記載されており、それぞれの内容は参照により全体が組み入れられる。

50

【0099】

(6) イントロン

組み換え核酸配列構築物は、1つ以上のイントロンを含んでいてもよい。各イントロンは、機能的スプライスドナー部位及び機能的スプライスアクセプター部位を含んでいてもよい。イントロンは、スプライシングのエンハンサーを含んでいてもよい。イントロンは、効率のよいスプライシングに必要な1つ以上のシグナルを含んでいてもよい。

【0100】

(7) 転写終結領域

組み換え核酸配列構築物は、1つ以上の転写終結領域を含んでいてもよい。転写終結領域は、効率よい終結を提供するためにコード配列の下流であってもよい。転写終結領域は、上述のプロモーターと同じ遺伝子から得てもよいし、あるいは、1つ以上の異なる遺伝子から得てもよい。

10

【0101】

(8) 開始コドン

組み換え核酸配列構築物は、1つ以上の開始コドンを含んでいてもよい。開始コドンは、コード配列の上流に位置してもよい。開始コドンは、コード配列と共にインフレームであってもよい。開始コドンは、効率のよい翻訳開始に必要な1つ以上のシグナルと関連していてもよく、例えば、リボソーム結合部位と関連していてもよいが、これに限定されない。

20

【0102】

(9) 終結コドン

組み換え核酸配列構築物は、1つ以上の終結または終止コドンを含んでいてもよい。終結コドンは、コード配列の下流であってもよい。終結コドンは、コード配列と共にインフレームであってもよい。終結コドンは、効率のよい翻訳終結に必要な1つ以上のシグナルと関連していてもよい。

【0103】

(10) ポリアデニル化シグナル

組み換え核酸配列構築物は、1つ以上のポリアデニル化シグナルを含んでいてもよい。ポリアデニル化シグナルは、効率のよい転写産物のポリアデニル化に必要な1つ以上のシグナルを含んでいてもよい。ポリアデニル化シグナルは、コード配列の下流に位置してもよい。ポリアデニル化シグナルは、S V 4 0 ポリアデニル化シグナル、L T R ポリアデニル化シグナル、ウシ成長ホルモン (b G H) ポリアデニル化シグナル、ヒト成長ホルモン (h G H) ポリアデニル化シグナル、またはヒト - グロビンポリアデニル化シグナルであってもよい。S V 4 0 ポリアデニル化シグナルは、p C E P 4 プラスミド (インビトロジェン、サンディエゴ、カリフォルニア州) からのポリアデニル化シグナルであってもよい。

30

【0104】

(11) リーダー配列

組み換え核酸配列構築物は、1つ以上のリーダー配列を含んでいてもよい。リーダー配列は、シグナルペプチドをコードすることができる。シグナルペプチドは、免疫グロブリン (Ig) シグナルペプチドであってもよく、例えば、Ig G シグナルペプチド及びIg E シグナルペプチドであるが、これらに限定されない。

40

【0105】

b. 組み換え核酸配列構築物の配置構成

上述したように、組み換え核酸配列は、1つ以上の組み換え核酸配列構築物を含んでいてもよく、各々の組み換え核酸配列構築物は、1つ以上の構成要素を含んでいてもよい。1つ以上の構成要素は、先に詳しく説明した通りである。1つ以上の構成要素は、組み換え核酸配列構築物に含まれる場合、互いに任意の順序で配置してもよい。いくつかの実施形態において、1つ以上の構成要素は、後述の組み換え核酸配列構築物に配置される。

【0106】

50

(1) 配置構成 1

一つの配置構成において、第1の組み換え核酸配列構築物は、重鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでいてもよく、第2の組み換え核酸配列構築物は、軽鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでいてもよい。

【0107】

第1の組み換え核酸配列構築物は、ベクターに配置してもよい。第2の組み換え核酸配列構築物は、第2もしくは別々のベクターに配置してもよい。組み換え核酸配列構築物をベクターに配置することは、以下により詳細に記載する。

【0108】

第1の組み換え核酸配列構築物は、プロモーター、イントロン、転写終結領域、開始コドン、終結コドン、及び／またはポリアデニル化シグナルも含んでいてもよい。第1の組み換え核酸配列構築物は、リーダー配列をさらに含んでもよく、該リーダー配列は、重鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列の上流（または5'）に位置する。従って、リーダー配列によってコードされるシグナルペプチドは、ペプチド結合によって重鎖ポリペプチドに連結する。

10

【0109】

第2の組み換え核酸配列構築物は、プロモーター、開始コドン、終結コドン、及びポリアデニル化シグナルも含んでいてもよい。第2の組み換え核酸配列構築物は、リーダー配列をさらに含んでもよく、該リーダー配列は、軽鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列の上流（または5'）に位置する。従って、リーダー配列によってコードされるシグナルペプチドは、ペプチド結合によって軽鎖ポリペプチドに連結する。

20

【0110】

従って、配置構成1の一例としては、VH及びCH1を含む重鎖ポリペプチドをコードする第1のベクター（従って、第1の組み換え核酸配列構築物）と、VL及びCLを含む軽鎖ポリペプチドをコードする第2のベクター（従って、第2の組み換え核酸配列構築物）とが挙げられる。配置構成1の第2例としては、VH、CH1、ヒンジ領域、CH2、及びCH3を含む重鎖ポリペプチドをコードする第1のベクター（従って、第1の組み換え核酸配列構築物）と、VL及びCLを含む軽鎖ポリペプチドをコードする第2のベクター（従って、第2の組み換え核酸配列構築物）とが挙げられる。

30

【0111】

(2) 配置構成 2

第2の配置構成において、前記組み換え核酸配列構築物は、重鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列及び軽鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでいてもよい。重鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列は、軽鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列の上流（または5'）に位置してもよい。あるいは、軽鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列は、重鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列の上流（または5'）に位置してもよい。

【0112】

組み換え核酸配列構築物は、ベクターに配置してもよく、以下により詳細に記載する。

【0113】

組み換え核酸配列構築物は、プロテアーゼ切断部位及び／またはリンカー配列をコードする異種核酸配列を含んでいてもよい。組み換え核酸配列構築物に含まれる場合、プロテアーゼ切断部位をコードする異種核酸配列は、重鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列と軽鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列との間に位置してもよい。従って、プロテアーゼ切断部位により発現時に重鎖ポリペプチド及び軽鎖ポリペプチドを別々のポリペプチドに分離することができる。他の実施形態において、リンカー配列が組み換え核酸配列構築物に含まれる場合、リンカー配列は、重鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列と、軽鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列との間に位置してもよい。

40

【0114】

組み換え核酸配列構築物は、プロモーター、イントロン、転写終結領域、開始コドン、

50

終結コドン、及び／またはポリアデニル化シグナルも含んでいてもよい。組み換え核酸配列構築物は、1つ以上のプロモーターを含んでいてもよい。組み換え核酸配列構築物は、1つのプロモーターが、重鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列と関連し、かつ、第2のプロモーターが、軽鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列と関連するように2つのプロモーターを含んでいてもよい。さらに別の実施形態において、組み換え核酸配列構築物は、重鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列及び軽鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列と関連する1つのプロモーターを含んでいてもよい。

【0115】

組み換え核酸配列構築物は、2つのリーダー配列をさらに含んでもよく、このうち、第1のリーダー配列は、重鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列の上流（または5'）に位置し、第2のリーダー配列は、軽鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列の上流（または5'）に位置する。従って、第1のリーダー配列によってコードされる第1のシグナルペプチドは、ペプチド結合によって重鎖ポリペプチドに連結し、第2のリーダー配列によってコードされる第2のシグナルペプチドは、ペプチド結合によって軽鎖ポリペプチドに連結する。

【0116】

従って、配置構成2の一例としては、VH及びCH1を含む重鎖ポリペプチドと、VL及びCLを含む軽鎖ポリペプチドとをコードするベクター（従って、組み換え核酸配列構築物）が挙げられ、ここで、リンカー配列は、重鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列と、軽鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列との間に位置する。

【0117】

配置構成2の第2例としては、VH及びCH1を含む重鎖ポリペプチドと、VL及びCLを含む軽鎖ポリペプチドとをコードするベクター（従って、組み換え核酸配列構築物）が挙げられ、ここで、プロテアーゼ切断部位をコードする異種核酸配列は、重鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列と、軽鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列との間に位置する。

【0118】

配置構成2の第3例としては、VH、CH1、ヒンジ領域、CH2、及びCH3を含む重鎖ポリペプチドと、VL及びCLを含む軽鎖ポリペプチドとをコードするベクター（従って、組み換え核酸配列構築物）が挙げられ、ここで、リンカー配列は、重鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列と、軽鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列との間に位置する。

【0119】

配置構成2の第4例としては、VH、CH1、ヒンジ領域、CH2、及びCH3を含む重鎖ポリペプチドと、VL及びCLを含む軽鎖ポリペプチドとをコードするベクター（従って、組み換え核酸配列構築物）が挙げられ、ここで、プロテアーゼ切断部位をコードする異種核酸配列は、重鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列と、軽鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列との間に位置する。

【0120】

c. 組み換え核酸配列構築物からの発現

上述したように、組み換え核酸配列構築物は、1つ以上の構成要素の中で、重鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列及び／または軽鎖ポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでいてもよい。従って、組み換え核酸配列構築物は、重鎖ポリペプチド及び／または軽鎖ポリペプチドを発現し易くすることができる。

【0121】

上述の配置構成1を用いた場合、第1の組み換え核酸配列構築物は、重鎖ポリペプチドを発現し易くすることができ、第2の組み換え核酸配列構築物は、軽鎖ポリペプチドを発現し易くすることができる。上述の配置構成2を用いた場合、組み換え核酸配列構築物は、重鎖ポリペプチド及び軽鎖ポリペプチドを発現し易くすることができる。

【0122】

10

20

30

40

50

発現時、例えば、限定されないが、細胞、生物、または哺乳動物内において、重鎖ポリペプチド及び軽鎖ポリペプチドを合成抗体に組み立てることができる。特に、重鎖ポリペプチド及び軽鎖ポリペプチドは、抗原に結合することが可能な合成抗体をアセンブリがもたらすように、互いに相互作用することができる。他の実施形態において、重鎖ポリペプチド及び軽鎖ポリペプチドは、本明細書に記載のように組み立てられていない抗体に比べて、より免疫原性である合成抗体をアセンブリがもたらすように、互いに相互作用することができる。さらに他の実施形態において、重鎖ポリペプチド及び軽鎖ポリペプチドは、抗原に対して免疫応答を引き起こすかもしくは誘導することが可能な合成抗体をアセンブリがもたらすように、互いに相互作用することができる。

【0123】

10

d. ベクター

上述の組み換え核酸配列構築物は、1つ以上のベクターに配置し得る。1つ以上のベクターは、複製起点を含んでもよい。1つ以上のベクターは、プラスミド、バクテリオファージ、細菌人工染色体、または酵母人工染色体であってもよい。1つ以上のベクターは、自己複製過剰染色体ベクターまたは宿主ゲノムに組み込むベクターのいずれかであってもよい。

【0124】

20

1つ以上のベクターは、異種発現構築物であってもよく、これは、一般に、特定の遺伝子をターゲット細胞を導入するのに使用されるプラスミドである。発現ベクターがいったん細胞中に入ると、組み換え核酸配列構築物によってコードされる重鎖ポリペプチド及び/または軽鎖ポリペプチドは、細胞性-転写及び翻訳機械であるリボソーム複合体によって産生される。1つ以上のベクターは、大量の安定したメッセンジャーRNA、従って、大量のタンパク質を発現することができる。

【0125】

30

(1) 発現ベクター

1つ以上のベクターは、環状プラスミドまたは線状核酸であってもよい。環状プラスミド及び線状核酸は、適切な対象細胞中で特定のヌクレオチド配列の発現を誘導することができる。組み換え核酸配列構築物を含む1つ以上のベクターは、キメラであってもよい。これは、その構成要素のうちの少なくとも1つが、他の構成要素のうちの少なくとも1つに対して異種であることを意味する。

【0126】

(2) プラスミド

1つ以上のベクターは、プラスミドであってもよい。プラスミドは、組み換え核酸配列構築物を備えた細胞をトランスフェクトするのに有用であり得る。プラスミドは、組み換え核酸配列構築物を対象に導入するのに有用であり得る。プラスミドは、調節配列も含んでもよく、これは、プラスミドを投与された細胞中での遺伝子発現に十分に適していてよい。

【0127】

40

プラスミドは、プラスミドを染色体外に維持し、かつ、細胞中でプラスミドの複数のコピーを产生するために哺乳類の複製起点も含んでもよい。プラスミドは、インビトロジェン(サンディエゴ、カリフォルニア州)からのpVAX1、pCEP4、またはpREp4であって、これらは、エピステイン・バー・ウイルスの複製起点と、核抗原EBNA-1のコード領域とを含んでもよく、統合しないで高いコピーのエピソーム複製を生じる。プラスミドのバックボーンは、pAV0242であってもよい。プラスミドは、複製欠損アデノウイルス5型(Ad5)プラスミドであってもよい。

【0128】

プラスミドは、pSE420(インビトロジェン、サンディエゴ、カリフォルニア州)であってもよく、それを大腸菌(E.Coli)中のタンパク質产生のために用いてもよい。プラスミドは、pYES2(インビトロジェン、サンディエゴ、カリフォルニア州)であってもよく、それを酵母のサッカロマイセス・セレビシエ株でのタンパク質产生に

50

用いてもよい。プラスミドは、MAXBAC（商標）完全バキュロウイルス発現系（インビトロジェン、サンディエゴ、カリフォルニア州）のものであってもよく、それを昆虫細胞中でのタンパク質産生に用いてもよい。プラスミドは、p c DNA I または p c DNA 3（インビトロジェン、サンディエゴ、カリフォルニア州）であってもよく、それを哺乳類細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞中でのタンパク質産生に用いてもよい。

【0129】

（3）環状及び線状ベクター

1つ以上のベクターは、環状プラスミドであってもよく、これは、標的細胞を統合によって細胞性ゲノムに形質転換してもよく、あるいは、染色体外に存在してもよい（例えば、複製起点をもつ自律複製プラスミド）。ベクターは、pVAX、p c DNA 3.0、p provax、または、組み換え核酸配列構築物によってコードされる重鎖ポリペプチド及び／または軽鎖ポリペプチドを発現可能な任意の他の発現ベクターであってもよい。

【0130】

また、本明細書で提供されるのは、線状核酸または線状発現力セット（「LEC」）であり、これは、電気穿孔を介して対象に効率よく送達され、かつ、組み換え核酸配列構築物によってコードされる重鎖ポリペプチド及び／または軽鎖ポリペプチドを発現することができる。LECは、任意のリン酸バックボーンを欠いた任意の線状DNAであってもよい。LECは、任意の抗生物質抵抗性遺伝子及び／またはリン酸バックボーンを含んでいなくてもよい。LECは、所望の遺伝子発現に関連しない他の核酸配列を含んでいなくてもよい。

【0131】

LECは、線状にすることが可能な任意のプラスミド由来であってもよい。プラスミドは、組み換え核酸配列構築物によってコードされる重鎖ポリペプチド及び／または軽鎖ポリペプチドを発現可能であってもよい。プラスミドは、pNP（ブルートリコ／34）またはpM2（ニューカレドニア／99）であってもよい。プラスミドは、WLVO09、pVAX、p c DNA 3.0、p provax、または、組み換え核酸配列構築物によってコードされる重鎖ポリペプチド及び／または軽鎖ポリペプチドを発現可能な任意の他の発現ベクターであってもよい。

【0132】

LECは、p c r M2 であってもよい。LECは、p c r N P であってもよい。p c r N P 及び p c r M R は、それぞれ p N P（ブルートリコ／34）及び p M2（ニューカレドニア／99）由来であってもよい。

【0133】

（4）ベクターを調製する方法

本明細書で提供されるのは、組み換え核酸配列構築物が配置されている1つ以上のベクターを調製する方法である。最終的なサブクローニングステップの後、ベクターを、当該技術分野で公知の方法を用いて、大規模発酵タンクで細胞培養物に接種するのに用いることができる。

【0134】

他の実施形態において、最終的なサブクローニングステップの後、ベクターを1つ以上の電気穿孔（EP）装置で用いることができる。EP装置を以下により詳細に記載する。

【0135】

1つ以上のベクターは、公知の装置及び技術の組み合わせを利用して配合または製造することができるが、好ましくはそれらは、2007年3月23日に出願された許諾対象である同時係属中の米国特許出願第60/939,792号に記載されたプラスミド製造技術を用いて製造される。幾つかの例において、本明細書に記載のDNAプラスミドは、10mg/mL以上の濃度で配合させることができる。その製造技術は、米国特許出願第60/939,792号に記載されたものに加えて、2007年7月3日発行の許諾対象特許である米国特許第7,238,522号に記載されたものをはじめとする、当業者に概

10

20

30

40

50

ね公知の様々な装置及びプロトコルも含み、組み入れている。先に参照された出願及び特許である、米国特許出願第 60 / 939,792 号及び米国特許第 7,238,522 号は、それぞれ全体が本明細書に組み入れられる。

【 0136 】

4. 抗体

上述したように、組み換え核酸配列は、抗体、その断片、その変異体、またはその組み合わせをコードすることができる。抗体は、抗原（以下により詳細に記載する）に結合するかまたは該抗原と反応することができる。

【 0137 】

抗体は、重鎖及び軽鎖相補性決定領域（「 C D R 」）セットを含んでいてもよく、それぞれ、 C D R に対する支持体をもたらし、互いに C D R の空間関係を規定する、重鎖及び軽鎖フレームワーク（「 F R 」）セットの間に介在する。 C D R セットは、重鎖または軽鎖 V 領域の 3 つの超可変領域を含んでいてもよい。重鎖または軽鎖の N - 末端から開始して、これらの領域は、それぞれ、「 C D R 1 」、「 C D R 2 」、及び「 C D R 3 」と称せられる。従って、抗原結合部位は、各々が重鎖及び軽鎖 V 領域からなる C D R セットを含む 6 つの C D R を含んでいてもよい。

10

【 0138 】

タンパク質分解酵素パパインは、 I g G 分子を優先的に切斷して、いくつかの断片を生じさせ、そのうちの 2 つ（ F (a b) 断片）は、各々無傷抗原結合部位を含む共有結合ヘテロ二量体を含む。酵素ペプシンは、 I g G 分子を切斷して、双方の抗原結合部位を含む F (a b ')₂ 断片を含めたいいくつかの断片を供することができる。従って、抗体は、 F a b または F (a b ')₂ であってもよい。 F a b は、重鎖ポリペプチド及び軽鎖ポリペプチドを含んでいてもよい。 F a b の重鎖ポリペプチドは、 V H 領域及び C H 1 領域を含んでいてもよい。 F a b の軽鎖は、 V L 領域及び C L 領域を含んでいてもよい。

20

【 0139 】

抗体は、免疫グロブリン（ I g ）であってもよい。 I g は、例えば、 I g A 、 I g M 、 I g D 、 I g E 、及び I g G であってもよい。免疫グロブリンは、重鎖ポリペプチド及び軽鎖ポリペプチドを含んでいてもよい。免疫グロブリンの重鎖ポリペプチドは、 V H 領域、 C H 1 領域、ヒンジ領域、 C H 2 領域、及び C H 3 領域を含んでいてもよい。免疫グロブリンの軽鎖ポリペプチドは、 V L 領域及び C L 領域を含んでいてもよい。

30

【 0140 】

抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であってもよい。抗体は、キメラ抗体、一本鎖抗体、親和性成熟抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、または完全ヒト抗体であってもよい。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の 1 つ以上の相補性決定領域（ C D R ）及びヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する所望の抗原に結合する非ヒト種由来の抗体であってもよい。

【 0141 】

抗体は、以下により詳細に記載されるように、二重特異性抗体であってもよい。抗体は、やはり以下により詳細に記載されるように、二官能性抗体であってもよい。

【 0142 】

上述のように、抗体は、組成物を対象に投与した際に対象内で生成することができる。抗体は、対象内で半減期を有してもよい。いくつかの実施形態において、抗体は、対象内でその半減期を延長させるかまたは短縮させるように修飾されてもよい。かかる修飾は、以下により詳細に記載される。

40

【 0143 】

抗体は、以下により詳細に記載されるように、脱フコシル化されてもよい。

【 0144 】

抗体は、以下により詳細に記載されるように、抗原と関連した疾患の抗体依存性感染増強（ A D E ）を低減または予防するように修飾されてもよい。

【 0145 】

50

a . 二重特異性抗体

組み換え核酸配列は、二重特異性抗体、その断片、その変異体、またはその組み合わせをコードすることができる。二重特異性抗体は、2つの抗原、例えば、以下により詳細に記載される抗原の2つに結合するかまたは該抗原と反応することができる。二重特異性抗体は、本明細書に記載の抗体の2つの断片からなってもよいため、二重特異性抗体は、2つの所望の標的分子に結合するかまたは該標的分子と反応することができる。該標的分子は、抗原（以下により詳細に記載する）、リガンド（例えば、受容体のリガンド）、受容体（例えば、受容体上のリガンド結合部位）、リガンド受容体複合体、及びマーカー（例えば、癌マーカー）を含み得る。

【 0 1 4 6 】

10

b . 二官能性抗体

組み換え核酸配列は、二官能性抗体、その断片、その変異体、またはその組み合わせをコードすることができる。二官能性抗体は、以下に記載される抗原に結合するかまたは該抗原と反応することができる。二官能性抗体は、抗原の認識及び抗原への結合を超えて、抗体にさらなる機能性を付与するように修飾されてもよい。かかる修飾は、因子Hまたはその断片へのカップリングであってもよいが、これに限定されない。因子Hは、補体活性化の可溶性調節因子であるため、補体介在性溶解（CML）を介して免疫応答に寄与し得る。

【 0 1 4 7 】

20

c . 抗体半減期の延長

上述のように、抗体は、対象中の抗体の半減期を延長させるかまたは短縮させるように修飾されてもよい。修飾は、対象の血清中の抗体の半減期を延長させるかまたは短縮させることができる。

【 0 1 4 8 】

修飾は、抗体の定常領域に存在してもよい。修飾は、抗体の定常領域における1つ以上のアミノ酸置換であってもよく、これは、1つ以上のアミノ酸置換を含有しない抗体の半減期と比べて抗体の半減期を延長させる。修飾は、抗体のCH2ドメインにおける1つ以上のアミノ酸置換であってもよく、これは、1つ以上のアミノ酸置換を含有しない抗体の半減期と比べて抗体の半減期を延長させる。

【 0 1 4 9 】

30

いくつかの実施形態において、定常領域における1つ以上のアミノ酸置換には、定常領域におけるメチオニン残基をチロシン残基に置換すること、定常領域におけるセリン残基をスレオニン残基に置換すること、定常領域におけるスレオニン残基をグルタミン酸残基に置換すること、またはその任意の組み合わせを含んでもよく、それにより抗体の半減期を延長させる。

【 0 1 5 0 】

他の実施形態において、定常領域における1つ以上のアミノ酸置換には、CH2ドメインにおけるメチオニン残基をチロシン残基に置換すること、CH2ドメインにおけるセリン残基をスレオニン残基に置換すること、CH2ドメインにおけるスレオニン残基をグルタミン酸残基に置換すること、またはその任意の組み合わせを含んでもよく、それにより抗体の半減期を延長させる。

40

【 0 1 5 1 】

R S V

d . 脱フコシル化

組み換え核酸配列は、フコシル化されていない抗体（すなわち、脱フコシル化された抗体または非フコシル化抗体）、その断片、その変異体、またはその組み合わせをコードすることができる。フコシル化には、分子へのフコース糖の付加、例えば、N-グリカン、O-グリカン及び糖脂質へのフコースの付着が含まれる。従って、脱フコシル化された抗体では、フコースは、定常領域の炭水化物鎖に付着していない。次に、このフコシル化の欠如は、フコシル化抗体と比較して、抗体によるFc R IIIa結合及び抗体指向性細

50

胞傷害性（A D C C）活性を改善し得る。従って、いくつかの実施形態において、非フコシル化抗体は、フコシル化抗体と比較して、A D C C活性の増加を呈し得る。

【0152】

抗体は、抗体のフコシル化を防ぐかまたは阻害するように修飾されてもよい。いくつかの実施形態において、そのような修飾抗体は、非修飾抗体と比較して、A D C C活性の増加を呈し得る。修飾は、重鎖、軽鎖、またはその組み合わせであってもよい。修飾は、重鎖の1つ以上のアミノ酸置換、軽鎖の1つ以上のアミノ酸置換、またはその組み合わせであってもよい。

【0153】

e. A D E 応答の低減

抗体は、抗原と関連する疾患の抗体依存性感染増強（A D E）を低減または防止するが、抗原を中和するように修飾されてもよい。例えば、抗体は、以下でより詳細に記載されるD E N Vと関連する疾患のA D Eを低減または防止するが、D E N Vを中和するように修飾されてもよい。

【0154】

いくつかの実施形態において、抗体は、F c y R 1 aへの抗体の結合を低減または防止する1つ以上のアミノ酸置換を含むように修飾されてもよい。1つ以上のアミノ酸置換は、抗体の定常領域であってもよい。1つ以上のアミノ酸置換は、抗体の定常領域におけるロイシン残基のアラニン残基への置換（すなわち、L A、L A突然変異、またはL A置換としても本明細書で知られる）を含んでもよい。1つ以上のアミノ酸置換は、抗体の定常領域における2つのロイシン残基の各々のアラニン残基への置換（L A L A、L A L A突然変異、またはL A L A置換としても本明細書で知られる）を含んでもよい。L A L A置換の存在は、抗体がF c y R 1 aに結合することを防止または遮断する場合があるため、修飾抗体は、抗体と関連する疾患のA D Eを高めるかまたは引き起こすことはないが、抗原を中和する。

【0155】

5. 抗原

合成抗体は、抗原またはその断片あるいはその変異体に向けられるものである。抗原は、核酸配列、アミノ酸配列、またはその組み合わせであってもよい。核酸配列は、D N A、R N A、c D N A、その変異体、その断片、またはその組み合わせであってもよい。アミノ酸配列は、タンパク質、ペプチド、その変異体、その断片、またはその組み合わせであってもよい。

【0156】

抗原は、任意の数の生物、例えば、ウイルス、寄生虫、細菌、真菌、または哺乳動物由来であってもよい。抗原は、自己免疫疾患、アレルギー、または喘息と関連し得る。他の実施形態において、抗原は、癌、ヘルペス、インフルエンザ、B型肝炎、C型肝炎、ヒト・パピローマウイルス（H P V）、またはヒト免疫不全ウイルス（H I V）と関連し得る。

【0157】

いくつかの実施形態において、抗原は外来である。いくつかの実施形態において、抗原は自己抗原である。

【0158】

a. 外来抗原

いくつかの実施形態において、抗原は外来である。外来抗原は、体内に導入された場合、免疫応答を刺激することが可能な任意の非自己物質（すなわち、対象の外部由来）である。

【0159】

（1）ウイルス抗原

外来抗原は、ウイルス抗原、またはその断片、またはその変異体であってもよい。ウイルス抗原は、以下の科：アデノウイルス科、アレナウイルス科、ブニヤウイルス科、カリシウイルス科、コロナウイルス科、フィロウイルス科、ヘパドナウイルス科、ヘルペスウ

10

20

30

40

50

イルス科、オルトミクソウイルス科、パボバウイルス科、パラミクソウイルス科、パルボウイルス科、ピコルナウイルス科、ポックスウイルス科、レオウイルス科、レトロウイルス科、ラブドウイルス科、またはトガウイルス科の一つからであってもよい。ウイルス抗原は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、チクングニヤウイルス（CHIKV）、デング熱ウイルス、パピローマウイルス、例えば、ヒトパピローマウイルス（HPV）、ポリオウイルス、肝炎ウイルス、例えば、A型肝炎ウイルス（HAV）、B型肝炎ウイルス（HBV）、C型肝炎ウイルス（HCV）、D型肝炎ウイルス（HDV）、E型肝炎ウイルス（HEV）、天然痘ウイルス（大痘瘡及び小痘瘡）、ワクシニアウイルス、インフルエンザウイルス、ライノウイルス、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス、黄熱病ウイルス、ノーウォークウイルス、A型肝炎ウイルス、ヒトT-細胞白血病ウイルス（HTLV-I）、毛様細胞白血病ウイルス（HTLV-II）、カリフォルニア脳炎ウイルス、ハンタウイルス（出血熱）、狂犬病ウイルス、エボラ出血熱ウイルス、マールブルグ・ウイルス、麻疹ウイルス、ムンブスウイルス、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）、1型単純ヘルペスウイルス（口腔ヘルペス）、2型単純ヘルペスウイルス（陰部ヘルペス）、帯状疱疹（水痘帯状疱疹、a.k.a.、水痘）、サイトメガロウイルス（CMV）（例えば、ヒトCMV）、エブステイン・バー・ウイルス（EBV）、フラビウイルス、口蹄疫ウイルス、ラッサ熱ウイルス、アレナウイルス、または発がん性ウイルス由来であってもよい。

【0160】

(a) ヒト免疫不全ウイルス（HIV）抗原

ウイルス抗原は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）ウイルス由来であってもよい。いくつかの実施形態において、HIV抗原は、サブタイプAエンベロープタンパク質、サブタイプBエンベロープタンパク質、サブタイプCエンベロープタンパク質、サブタイプDエンベロープタンパク質、サブタイプB Nef - Revタンパク質、GagサブタイプA、B、C、またはDタンパク質、MPolタンパク質、核酸、またはEnv A、Env B、Env C、Env D、B Nef - Rev、Gag、またはその任意の組み合わせのアミノ酸配列であってもよい。

【0161】

HIVに特異的な合成抗体は、配列番号3の核酸配列によってコードされる配列番号48のアミノ酸配列と配列番号4の核酸配列によってコードされる配列番号49のアミノ酸配列とを含むFab断片を含んでいてもよい。合成抗体は、配列番号6の核酸配列によってコードされる配列番号46のアミノ酸配列及び配列番号7の核酸配列によってコードされる配列番号47のアミノ酸配列を含んでいてもよい。Fab断片は、配列番号50の核酸配列によってコードされる配列番号51のアミノ酸配列を含む。Fabは、配列番号52の核酸配列によってコードされる配列番号53のアミノ酸配列を含んでいてもよい。

【0162】

HIVに特異的な合成抗体は、配列番号5のアミノ酸配列を含むIgを含んでいてもよい。Igは、配列番号62の核酸配列によってコードされる配列番号1のアミノ酸配列を含んでいてもよい。Igは、配列番号63の核酸配列によってコードされる配列番号2のアミノ酸配列を含んでいてもよい。Igは、配列番号54の核酸配列によってコードされる配列番号55のアミノ酸配列及び配列番号56の核酸配列によってコードされる配列番号57のアミノ酸配列を含んでいてもよい。

【0163】

(b) チクングニヤ熱ウイルス

ウイルス抗原は、チクングニヤウイルス由来であってもよい。チクングニヤウイルスは、トガウイルス科のアルファウイルス属に属する。チクングニヤウイルスは、ヤブカ属などの感染蚊の刺咬によってヒトに伝染する。

【0164】

CHIKVに特異的な合成抗体は、配列番号58の核酸配列によってコードされる配列番号59のアミノ酸配列と配列番号60の核酸配列によってコードされる配列番号61のアミノ酸配列とを含むFab断片を含んでいてもよい。

10

20

30

40

50

【0165】

(c) デングウイルス

ウイルス抗原は、デングウイルス由来であってもよい。デングウイルス抗原は、ウイルス粒子を形成する3つのタンパク質またはポリペプチド(C、p r M、及びE)の1つであってもよい。デングウイルス抗原は、ウイルスの複製に関わる7つの他のタンパク質またはポリペプチド(NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b、NS5)の1つであってもよい。デングウイルスは、DEN V - 1、DEN V - 2、DEN V - 3、及びDEN V - 4を含む、ウイルスの5つの株または血清型の1つであってもよい。抗原は、複数のデングウイルス抗原の任意の組み合わせであってもよい。

【0166】

10

デングウイルスに特異的な合成抗体は、配列番号44の核酸配列によってコードされる配列番号45のアミノ酸配列を含むIgを含んでいてもよい。

【0167】

(d) 肝炎抗原

ウイルス抗原は、肝炎ウイルス抗原(すなわち、肝炎抗原)、またはその断片、またはその変異体を含んでいてもよい。肝炎抗原は、A型肝炎ウイルス(HAV)、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、D型肝炎ウイルス(HDV)、及び/またはE型肝炎ウイルス(HEV)の1つ以上由来の抗原または免疫原であってもよい。

【0168】

肝炎抗原は、HAV由来の抗原であってもよい。肝炎抗原は、HAVカプシドタンパク質、HAV非構造タンパク質、その断片、その変異体、またはその組み合わせであってもよい。

20

【0169】

肝炎抗原は、HCV由来の抗原であってもよい。肝炎抗原は、HCVヌクレオカプシドタンパク質(すなわち、コアタンパク質)、HCVエンベロープタンパク質(例えば、E1及びE2)、HCV非構造タンパク質(例えば、NS1、NS2、NS3、NS4a、NS4b、NS5a、及びNS5b)、その断片、その変異体、またはその組み合わせであってもよい。

【0170】

肝炎抗原は、HDV由来の抗原であってもよい。肝炎抗原は、HDVデルタ抗原、その断片、またはその変異体であってもよい。

30

【0171】

肝炎抗原は、HEV由来の抗原であってもよい。肝炎抗原は、HEVカプシドタンパク質、その断片、またはその変異体であってもよい。

【0172】

肝炎抗原は、HBV由来の抗原であってもよい。肝炎抗原は、HBVコアタンパク質、HBV表面タンパク質、HBV-DNAポリメラーゼ、X遺伝子によってコードされるHBVタンパク質、その断片、その変異体、またはその組み合わせであってもよい。肝炎抗原は、HBV遺伝子A型コアタンパク質、HBV遺伝子B型コアタンパク質、HBV遺伝子C型コアタンパク質、HBV遺伝子D型コアタンパク質、HBV遺伝子E型コアタンパク質、HBV遺伝子F型コアタンパク質、HBV遺伝子G型コアタンパク質、HBV遺伝子H型コアタンパク質、HBV遺伝子A型表面タンパク質、HBV遺伝子B型表面タンパク質、HBV遺伝子C型表面タンパク質、HBV遺伝子D型表面タンパク質、HBV遺伝子E型表面タンパク質、HBV遺伝子F型表面タンパク質、HBV遺伝子G型表面タンパク質、HBV遺伝子H型表面タンパク質、その断片、その変異体、またはその組み合わせであってもよい。

40

【0173】

いくつかの実施形態において、肝炎抗原は、HBV遺伝子A型、HBV遺伝子B型、HBV遺伝子C型、HBV遺伝子D型、HBV遺伝子E型、HBV遺伝子F型、HBV遺伝子G型、またはHBV遺伝子H型由来の抗原であってもよい。

50

【0174】

(e) ヒト・パピローマウイルス(HPV)抗原

ウイルス抗原は、HPV由来の抗原を含んでいてもよい。HPV抗原は、子宮頸癌、直腸癌、及び／またはその他の癌を引き起こすHPV型16、18、31、33、35、45、52、及び58由来であってもよい。HPV抗原は、性器疣を引き起こし、かつ、頭部癌及び頸部癌の原因としても知られるHPV型6及び11由来であってもよい。

【0175】

HPV抗原は、各HPV型からのHPV E6またはE7領域であってもよい。例えば、HPV型16(HPV16)において、HPV16抗原は、HPV16 E6抗原、HPV16 E7抗原、断片、変異体、またはその組み合わせを含んでいてもよい。同様に、HPV抗原は、HPV6 E6及び／またはE7、HPV11 E6及び／またはE7、HPV18 E6及び／またはE7、HPV31 E6及び／またはE7、HPV33 E6及び／またはE7、HPV52 E6及び／またはE7、HPV58 E6及び／またはE7、断片、変異体、またはその組み合わせであってもよい。

10

【0176】

(f) RSV抗原

ウイルス抗原は、RSV抗原を含んでいてもよい。RSV抗原は、ヒトRSV融合タンパク質(本明細書では、「RSV F」、「RSV Fタンパク質」、及び「Fタンパク質」と称することもある)、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。ヒトRSV融合タンパク質は、RSVサブタイプA及びBの間で保存されてもよい。RSV抗原は、RSV長株(ジェンバンク(GenBank)AAAX23994.1)由来のRSV Fタンパク質、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。RSV抗原は、RSV A2株(ジェンバンクAAB59858.1)由来のRSV Fタンパク質、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。RSV抗原は、RSV Fタンパク質の单量体、二量体、三量体、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。

20

【0177】

RSV Fタンパク質は、前融合形態または後融合形態であってもよい。RSV Fの後融合形態は、免疫動物中で高い中和抗体力値を引き起こし、該動物をRSV暴露から防御する。

30

【0178】

RSV抗原は、ヒトRSV付着糖タンパク質(本明細書では、「RSV G」、「RSV Gタンパク質」、及び「Gタンパク質」と称することもある)、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。ヒトRSV Gタンパク質は、RSVサブタイプA及びB間で異なる。抗原は、RSV長株(ジェンバンクAAAX23993)由来のRSV Gタンパク質、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。RSV抗原は、RSVサブタイプB单離体H5601、RSVサブタイプB单離体H1068、RSVサブタイプB单離体H5598、RSVサブタイプB单離体H1123由来のRSV Gタンパク質、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。

【0179】

他の実施形態において、RSV抗原は、ヒトRSV非構造タンパク質1(「NS1タンパク質」)、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。例えば、RSV抗原は、RSV長株(ジェンバンクAAAX23987.1)由来のRSV NS1タンパク質、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。RSV抗原は、RSV非構造タンパク質2(「NS2タンパク質」)、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。例えば、RSV抗原は、RSV長株(ジェンバンクAAAX23988.1)由来のRSV NS2タンパク質、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。さらに、RSV抗原は、ヒトRSVヌクレオカプシド(「N」)タンパク質、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。例えば、RSV抗原は、RSV長株(ジェンバンクAAAX23989.1)由来のRSV Nタンパク質、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。RSV抗原は、ヒトRSVリン(「P」)タンパク質、またはその断片あるいは

40

50

その変異体であってもよい。例えば、RSV抗原は、RSV長株（ジェンバンクAAX23990.1）由来のRSV Pタンパク質、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。RSV抗原は、ヒトRSV基質（「M」）タンパク質、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。例えば、RSV抗原は、RSV長株（ジェンバンクAAX23991.1）由来のRSV Mタンパク質、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。

【0180】

さらに別の実施形態において、RSV抗原は、ヒトRSV疎水性低分子（「SH」）タンパク質、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。例えば、RSV抗原は、RSV長株（ジェンバンクAAX23992.1）由来のRSV SHタンパク質、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。RSV抗原は、ヒトRSV基質2-1（「M2-1」）タンパク質、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。例えば、RSV抗原は、RSV長株（ジェンバンクAAX23995.1）由来のRSV M2-1タンパク質、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。さらに、RSV抗原は、ヒトRSV基質2-2（「M2-2」）タンパク質、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。例えば、RSV抗原は、RSV長株（ジェンバンクAAX23997.1）由来のRSV M2-2タンパク質、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。RSV抗原は、ヒトRSVポリメラーゼL（「L」）タンパク質、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。例えば、RSV抗原は、RSV長株（ジェンバンクAAX23996.1）由来のRSV Lタンパク質、またはその断片あるいはその変異体であってもよい。

10

20

【0181】

別の実施形態において、RSV抗原は、NS1、NS2、N、P、M、SH、M2-1、M2-2、またはLタンパク質の最適化アミノ酸配列を有し得る。RSV抗原は、ヒトRSVタンパク質または組み換え抗原であってもよく、これは、ヒトRSVゲノムによってコードされるタンパク質のいずれか一つである。

【0182】

他の実施形態において、RSV抗原は、RSV長株由来のRSV Fタンパク質、RSV長株由来のRSV Gタンパク質、最適化アミノ酸RSV Gアミノ酸配列、RSV長株のヒトRSVゲノム、最適化アミノ酸RSV Fアミノ酸配列、RSV長株由来のRSV NS1タンパク質、RSV長株由来のRSV NS2タンパク質、RSV長株由来のRSV Nタンパク質、RSV長株由来のRSV Pタンパク質、RSV長株由来のRSV Mタンパク質、RSV長株由来のRSV SHタンパク質、RSV長株由来のRSV M2-1タンパク質、RSV長株由来のRSV M2-2タンパク質、RSV長株由来のRSV Lタンパク質、RSVサブタイプB単離体H5601由来のRSV Gタンパク質、RSVサブタイプB単離体H1068由来のRSV Gタンパク質、RSVサブタイプB単離体H5598由来のRSV Gタンパク質、RSVサブタイプB単離体H1123由来のRSV Gタンパク質、またはその断片、またはその変異体であってもよいが、これらに限定されない。

30

【0183】

40

(g) インフルエンザ抗原

ウイルス抗原は、インフルエンザウイルス由来の抗原を含んでいてもよい。インフルエンザ抗原は、1つ以上のインフルエンザ血清型に対して哺乳動物中で免疫応答を引き起こすことができるものである。抗原は、全長翻訳産物HA0、サブユニットHA1、サブユニットHA2、その変異体、その断片、またはその組み合わせを含んでいてもよい。インフルエンザヘマグルチニン抗原は、複数株のA型インフルエンザ血清型H1、複数株のA型インフルエンザ血清型H2由来であっても、異なる複数株セットのA型インフルエンザ血清型H1由来のハイブリッド配列であっても、あるいは、複数株のB型インフルエンザ由来であってもよい。インフルエンザヘマグルチニン抗原は、B型インフルエンザ由来であってもよい。

50

【0184】

インフルエンザ抗原は、免疫応答が誘発される特定のインフルエンザ免疫原に対して効果的な少なくとも1つの抗原エピトープを含んでいてもよい。抗原は、無傷インフルエンザウイルス内に存在する免疫原性部位及びエピトープの全てのレパートリーを供し得る。抗原は、血清型H1または血清型H2の複数のA型インフルエンザウイルス株など、1つの血清型の複数のA型インフルエンザウイルス株からのヘマグルチニン抗原配列由来であってもよい。抗原は、2つの異なるヘマグルチニン抗原配列またはその一部分の組み合わせ由来であるハイブリッドヘマグルチニン抗原配列であってもよい。2つの異なるヘマグルチニン抗原配列の各々は、血清型H1の複数のA型インフルエンザウイルス株など、1つの血清型の複数のA型インフルエンザウイルス株の異なるセット由来であってもよい。抗原は、複数のB型インフルエンザウイルス株からのヘマグルチニン抗原配列由来であるヘマグルチニン抗原配列であってもよい。

10

【0185】

いくつかの実施形態において、インフルエンザ抗原は、H1 HA、H2 HA、H3 HA、H5 HA、またはBHA抗原であってもよい。

【0186】

(h)エボラウイルス

ウイルス抗原は、エボラウイルス由来であってもよい。エボラウイルス疾患(EVD)またはエボラ出血熱(EHF)としては、5つの公知のエボラウイルス、ブンディブギヨウイルス(BDBV)、エボラウイルス(EBOV)、スーダンウイルス(SUDV)、及びタイフォレストウイルス(TAFV)、コートジボワールエボラウイルス(象牙海岸エボラウイルス、CIEBOV)とも呼ばれる)の任意の4つが挙げられる。

20

【0187】

(2)細菌性抗原

外来抗原は、細菌性抗原またはその断片あるいはその変異体であってもよい。細菌は、以下の門：アシドバクテリウム門、アクチノバクテリア門、アクウイフェクス門、バクテロイデス門、カルディセリクム門、クラミジア門、クロロビウム門、クロロフレクサス門、クリシオゲネス門、シアノバクテリア門、デフェリバクター門、ディノコックス・テルムス門、ディクチオグロムス門、エルシミクロビウム門、フィプロバクター門、フィルミクテス門、フソバクテリウム門、ゲマティモナス門、レンティスファエラ門、ニトロスピラ門、プランクトミケス門、プロテオバクテリア門、スピロヘータ門、シネルギステス門、テネリクテス門、サーモデスルフォバクテリア門、テルモトガ門、及びウェルコミクロビウム門の任意の1つ由来であってもよい。

30

【0188】

細菌は、グラム陽性菌またはグラム陰性菌であってもよい。細菌は、好気性細菌または嫌気性細菌であってもよい。細菌は、独立栄養細菌または従属栄養細菌であってもよい。細菌は、中温菌、好中菌、好極限菌、好酸菌、好アルカリ菌、好熱菌、低温菌、好塩菌、または好濃菌であってもよい。

【0189】

細菌は、炭疽菌、抗生物質耐性菌、病原菌、食中毒菌、感染性菌、サルモネラ菌、ブドウ球菌、連鎖球菌属細菌、または破傷風菌であってもよい。細菌は、抗酸菌、破傷風菌、ペスト菌、炭疽菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)、またはクロストリジウム・ディフィシレ菌であってもよい。細菌は、結核菌であってもよい。

40

【0190】

(a)結核菌抗原

細菌性抗原は、結核菌抗原(すなわち、TB抗原またはTB免疫原)、またはその断片、またはその変異体であってもよい。TB抗原は、TB抗原のAg85科、例えば、Ag85A及びAg85B由来であってもよい。TB抗原は、TB抗原のEsx科、例えば、EsxA、EsxB、EsxC、EsxD、EsxE、EsxF、EsxH、EsxO、EsxQ、EsxR、EsxS、EsxT、EsxU、EsxV、及びEsxW由来であ

50

つてもよい。

【0191】

(3) 寄生虫抗原

外来抗原は、寄生虫抗原またはその断片あるいはその変異体であってもよい。寄生虫は、原虫、寄生蠕虫、または外部寄生虫であってもよい。寄生蠕虫（すなわち、蠕虫）は、扁虫（例えば、吸虫及び条虫）、鉤頭虫、または回虫（例えば、蟻虫）であってもよい。外部寄生虫は、シラミ、ノミ、マダニ、及びダニであってもよい。

【0192】

寄生虫は、以下の疾患のうちの任意の1つの原因となる任意の寄生虫であってもよい：アカントアメーバ角膜炎、アメーバ症、回虫症、バベシア症、バランチジウム症、回虫症（*Baylisascariasis*）、シャーガス病、肝吸虫症、コクリオミイヤ症、クリプトスボリジウム症、裂頭条虫症、メジナ虫症、エキノコックス症、象皮病、蟻虫症、肝蛭症、肥大吸虫症、フィラリア症、ランブル鞭毛虫症、顎口虫症、膜様条虫症、イソスボーラ症、片山熱、リーシュマニア症、ライム病、マラリア、メタゴニムス症、ハエ蛆症、オソコセルカ症、シラミ寄生症、疥癬、住血吸虫症、睡眠病、糞線虫症、条虫症、トキソカラ症、トキソプラズマ症、旋毛虫病、及び鞭虫症。

10

【0193】

寄生虫は、アカントアメーバ、アニサキス、回虫（*Ascaris lumbricoides*）、ウマバエ、大腸バランチジウム、トコジラミ、条虫綱（条虫）、ツツガムシ、ラセンウジバエ、赤痢アメーバ、肝蛭、ランブル鞭毛虫、鉤虫、リーシュマニア、鼻腔舌虫、肝吸虫、ロア糸状虫、肺吸虫（肺吸虫）、蟻虫、熱帯熱マラリア原虫、住血吸虫、糞線虫、ダニ、条虫、トキソプラズマ原虫、トリパノソーマ、鞭虫、またはバンクロフト糸状虫であってもよい。

20

【0194】

(a) マラリア抗原

外来抗原は、マラリア抗原（すなわち、P F 抗原またはP F 免疫原）、またはその断片、またはその変異体であってもよい。抗原は、マラリアの原因となる寄生虫由来であってもよい。マラリア病原性の寄生虫は、熱帯熱マラリア原虫であってもよい。熱帯熱マラリア原虫抗原は、スプロゾイト周囲（C S）抗原を含んでいてもよい。

30

【0195】

いくつかの実施形態において、マラリア抗原は、熱帯熱マラリア原虫免疫原C S；L S A 1；T R A P；C e l T O S；及びA m a 1の1つであってもよい。免疫原は、全長タンパク質またはその免疫原性断片であってもよい。

【0196】

他の実施形態において、マラリア抗原は、S S P 2とも呼ばれるT R A Pであってもよい。さらに別の実施形態において、マラリア抗原は、A g 2とも呼ばれ、かつ、高度に保存されたプラスモジウム抗原であるC e l T O Sであってもよい。別の実施形態において、マラリア抗原は、高度に保存されたプラスモジウム抗原であるA m a 1であってもよい。いくつかの実施形態において、マラリア抗原は、C S 抗原であってもよい。

40

【0197】

他の実施形態において、マラリア抗原は、本明細書に記載のP F タンパク質の2つ以上の組み合わせを含む融合タンパク質であってもよい。例えば、融合タンパク質は、互いに隣接して直接結合しているか、スペーサーと結合しているか、あるいは、1つ以上のアミノ酸の間で結合しているC S 免疫原、C o n L S A 1 免疫原、C o n T R A P 免疫原、C o n C e l T O S 免疫原、及びC o n A m a 1 免疫原の2つ以上を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、2つのP F 免疫原を含み、いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、3つのP F 免疫原を含み、いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、4つのP F 免疫原を含み、いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、5つのP F 免疫原を含む。2つのP F 免疫原を持つ融合タンパク質は、C S 及びL S A 1；C S 及びT R A P；C S 及びC e l T O S；C S 及びA m a 1；L S A

50

1及びT R A P ; L S A 1及びC e 1 T O S ; L S A 1及びA m a 1 ; T R A P及びC e 1 T O S ; T R A P及びA m a 1 ; または、C e 1 T O S及びA m a 1を含んでいてよい。3つのP F免疫原を持つ融合タンパク質は、C S、L S A 1、及びT R A P ; C S、L S A 1、及びC e 1 T O S ; C S、L S A 1、及びA m a 1 ; L S A 1、T R A P、及びC e 1 T O S ; L S A 1、T R A P、及びA m a 1 ; または、T R A P、C e 1 T O S 、及びA m a 1を含んでいてよい。4つのP F免疫原を持つ融合タンパク質は、C S、L S A 1、T R A P、及びC e 1 T O S ; C S、L S A 1、T R A P、及びA m a 1 ; C S、L S A 1、C e 1 T O S 、及びA m a 1 ; C S、T R A P、C e 1 T O S 、及びA m a 1 ; または、L S A 1、T R A P、C e 1 T O S 、及びA m a 1を含んでいてよい。5つのP F免疫原を持つ融合タンパク質は、C SまたはC S - a l t 、L S A 1、T R A P、C e 1 T O S 、及びA m a 1を含んでいてよい。

【0198】

(4) 真菌抗原

外来抗原は、真菌抗原またはその断片あるいはその変異体であってもよい。真菌は、アスペルギルス種、ブラストミセス・デルマチチジス、カンジダ属酵母（例えば、カンジダ・アルビカンス）、コクシジオイデス、クリプトコックス・ネオフォルマンス、クリプトコッカス・ガッティ、皮膚糸状菌、フザリウム属種、ヒストプラスマ カブスラーツム、ケカビ亜門、ニューモシスチス・イロベチ、スプロトリックス シエンキィ、エクセロヒルム、またはクラドスボリウムであってもよい。

【0199】

b. 自己抗原

いくつかの実施形態において、抗原は、自己抗原である。自己抗原は、免疫応答を刺激することが可能な対象自身の体の構成要素であってもよい。いくつかの実施形態において、自己抗原は、対象が疾患状態、例えば、自己免疫疾患でなければ、免疫応答を誘発しない。

【0200】

自己抗原としては、サイトカイン、H I V及びデング熱を含む上に列挙したウイルスに対する抗体、癌の進行または発生に影響を及ぼす抗原、細胞表面受容体、または膜貫通タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0201】

(1) W T - 1

自己抗原は、ウィルムス腫瘍抑制遺伝子1 (W T 1)、その断片、その変異体、またはその組み合わせであってもよい。W T 1は、プロリン / グルタミンリッチD N A - 結合領域をN - 末端に、かつ、4つの亜鉛フィンガー モチーフをC - 末端に含む転写因子である。W T 1は、泌尿生殖器系の正常な発達に関与しており、多くの因子、例えば、腫瘍抑制因子として知られるp 5 3、及び細胞毒性薬による治療後に多数の部位でW T 1を切断するセリンプロテアーゼH t r A 2と相互作用する。W T 1の突然変異により、腫瘍または癌形成、例えば、W T 1を発現するウィルムス腫瘍または腫瘍がもたらされる。

【0202】

(2) E G F R

自己抗原は、上皮成長増殖因子受容体 (E G F R)、またはその断片あるいはその変異体を含んでいてもよい。E G F R (E r b B - 1及びH E R 1とも呼ばれる)は、細胞外タンパク質リガンドの上皮細胞増殖因子ファミリー (E G F ファミリー) メンバーの細胞表面受容体である。E G F Rは、受容体のE r b B ファミリーメンバーであり、4つの密接に関連した受容体チロシン・キナーゼであるE G F R (E r b B - 1)、H E R 2 / c - n e u (E r b B - 2)、H e r 3 (E r b B - 3)、及びH e r 4 (E r b B - 4)を含む。E G F R発現または活性に影響を及ぼす突然変異は癌になり得る。

【0203】

抗原は、E r b B - 2抗原を含んでいてもよい。E r b - 2 (ヒト上皮成長増殖因子受容体2)は、N e u、H E R 2、C D 3 4 0 (分化340のクラスター)、またはp 1 8

10

20

30

40

50

5としても知られ、E R B B 2 遺伝子によってコードされる。この遺伝子の増幅または過剰発現が、ある侵攻性の乳癌の発生及び進行に役割を果たすことが実証されている。乳癌の女性の約25～30%において、E R B B 2 遺伝子で遺伝子変化が起きており、腫瘍細胞の表面上でH E R 2 の産生量が増している。H E R 2 の過剰発現により急速な細胞分裂が促進されるため、H E R 2 は腫瘍細胞をマークする。

【0204】

H E R 2 に特異的な合成抗体は、配列番号40の核酸配列によってコードされる配列番号41のアミノ酸配列及び配列番号42の核酸配列によってコードされる配列番号43のアミノ酸配列を含むF a b 断片を含んでいてもよい。

【0205】

(3) コカイン

自己抗原は、コカイン受容体抗原であってもよい。コカイン受容体は、ドーパミン輸送体を含む。

【0206】

(4) P D - 1

自己抗原は、プログラム死1(P D - 1)を含んでいてもよい。プログラム死1(P D - 1)及びそのリガンドであるP D - L 1 及びP D - L 2 は、T細胞活性化、耐性、及び免疫病理学間のバランスを調節する抑制シグナルを送達する。P D - 1 は、膜貫通領域及び細胞内尾部に続く細胞外IgV領域を含む288アミノ酸細胞表面タンパク質分子である。

【0207】

(5) 4 - 1 B B

自己抗原は、4 - 1 B B リガンドを含んでいてもよい。4 - 1 B B リガンドは、T N F 上科に属する2型の膜貫通糖タンパク質である。4 - 1 B B リガンドは、活性化Tリンパ球上で発現されてもよい。4 - 1 B B は、活性化誘発性T細胞共刺激分子である。4 - 1 B B 経由のシグナル伝達により、生存遺伝子が上方制御され、細胞分裂が高められ、サイトカイン産生が誘発され、T細胞の活性化誘発性細胞死が防止される。

【0208】

(6) C T L A 4

自己抗原は、C D 1 5 2 (分化152のクラスター)としても知られるC T L A - 4 (細胞毒性Tリンパ球抗原4)を含んでいてもよい。C T L A - 4 は、T細胞の表面上に見られるタンパク質受容体であり、抗原への細胞性免疫攻撃をもたらす。抗原は、細胞外V領域、膜貫通領域、細胞質尾部、またはその組み合わせなどのC T L A - 4 の断片であってもよい。

【0209】

(7) I L - 6

自己抗原は、インターロイキン6(I L - 6)を含んでいてもよい。I L - 6 は、限定されないが、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、鬱病、アルツハイマー病、全身性エリテマトーデス、多発性骨髄腫、癌、ベーチェット病、及び関節リウマチを含む多くの疾患において炎症及び自己免疫プロセスを刺激する。

【0210】

(8) M C P - 1

自己抗原は、単球走化性タンパク質-1(M C P - 1)を含んでいてもよい。M C P - 1 は、ケモカイン(C - C モチーフ)リガンド2(C C L 2)または小誘導性サイトカインA 2とも呼ばれる。M C P - 1 は、C C ケモカインファミリーに属するサイトカインである。M C P - 1 は、組織傷害または感染のいずれかによって産生された炎症部位に、単球、記憶T細胞、及び樹枝状細胞を補充する。

【0211】

(9) アミロイドベータ

自己抗原は、アミロイドベータ(A)またはその断片あるいはその変異体を含んでい

10

20

30

40

50

てもよい。A 抗原は、A (X - Y) ペプチドを含み、X 及び Y 両方を含むヒト配列 A タンパク質のアミノ酸位置 X からアミノ酸位置 Y のアミノ酸配列であり、特に、アミノ酸配列 D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V V I A T V I V I (アミノ酸位置 1 ~ 47 に対応；ヒトクエリ配列) のアミノ酸位置 X からアミノ酸位置 Y のアミノ酸配列またはその変異体である。A 抗原は、A (X - Y) ポリペプチドの A ポリペプチドを含んでいてもよく、X は、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、または 32 であってもよく、Y は、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、または 15 であってもよい。A ポリペプチドは、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、少なくとも 20、少なくとも 21、少なくとも 22、少なくとも 23、少なくとも 24、少なくとも 25、少なくとも 30、少なくとも 35、少なくとも 36、少なくとも 37、少なくとも 38、少なくとも 39、少なくとも 40、少なくとも 41、少なくとも 42、少なくとも 43、少なくとも 44、少なくとも 45、または少なくとも 46 アミノ酸である断片を含んでいてもよい。

【0212】

(10) I P - 10

自己抗原は、インターフェロン (IFN) ガンマ誘発タンパク質 10 (I P - 10) を含んでいてもよい。I P - 10 は、小誘導性サイトカイン B 10 または C - X - C モチーフケモカイン 10 (CXCL10) としても知られる。CXCL10 は、IFN- に応答して、単球、内皮細胞、及び線維芽細胞などのいくつかの細胞型から分泌される。

【0213】

(11) PSMA

自己抗原は、前立腺特異的膜抗原 (PSMA) を含んでいてもよい。PSMA は、グルタミン酸カルボキシペプチダーゼ II (GCP II)、N - アセチル - L - アスパルチル - L - グルタミン酸ペプチダーゼ I (NAALADase I)、NAAG ペプチダーゼ、または葉酸加水分解酵素 (FOLH) としても知られる。PMSA は、前立腺癌細胞によって高発現される内在性膜タンパク質である。

【0214】

いくつかの実施形態において、PSMA (抗 PSMA 抗体) に対する抗体をコードする組み換え核酸配列は、以下でより詳細に記載し、かつ、図 63 に示す配置構成 2 における組み換え核酸配列構築物を含む、組み換え核酸配列であってもよい。図 63 は、プロモーター、リーダー配列、IgG 重鎖、切断部位、第 2 のリーダー配列、IgG 軽鎖、及びポリ (A) 尾を含む組み換え核酸配列構築物を示す。

【0215】

さらに他の実施形態において、組み換え核酸配列によってコードされる抗 PSMA 抗体は、本明細書で記載されるように修飾されてもよい。1 つのそのような修飾は、実施例で示したように、市販の抗体と比較して ADC C 活性の増加を呈した、脱フコシル化された抗体である。修飾は、重鎖、軽鎖、またはその組み合わせであってもよい。修飾は、重鎖の 1 つ以上のアミノ酸置換、軽鎖の 1 つ以上のアミノ酸置換、またはその組み合わせであってもよい。

【0216】

PSMA に特異的であり、かつ、フコシル化されないように修飾された抗体は、配列番号 79 に記載の核酸配列によってコードされてもよい。配列番号 79 は、配列番号 80 に記載のアミノ酸配列をコードする。

【0217】

c. 他の抗原

いくつかの実施形態において、抗原は、外来抗原及び / または自己抗原以外の抗原であ

10

20

30

40

50

る。

【0218】

(a) HIV-1 VRC01

他の抗原は、HIV-1 VRC01であってもよい。HIV-1 VCR01は、HIVの中和CD4結合部位抗体である。HIV-1 VCR01は、HIV-1のgp120ループD、CD4結合ループ、及びV5領域内をはじめとするHIV-1の一部分と接觸する。

【0219】

(b) HIV-1 PG9

他の抗原は、HIV-1 PG9であってもよい。HIV-1 PG9は、HIV(HIV-1)エンベロープ(Env)糖タンパク質(gp)三量体に優先的に結合し、かつ、ウイルスを広く中和するグリカン依存ヒト抗体の拡大ファミリーの創立メンバーである。

10

【0220】

(c) HIV-1 4E10

他の抗原は、HIV-1 4E10であってもよい。HIV-1 4E10は、中和抗HIV抗体である。HIV-1 4E10は、HIV-1の膜近接外部領域(MPER)にマップした線状エピトープに対するものであり、gp41細胞外ドメインのC末端に位置する。

【0221】

(d) DV-SF1

20

他の抗原は、DV-SF1であってもよい。DV-SF1は、4つのデングウイルス血清型のエンベローピタンパク質に結合する中和抗体である。

【0222】

(e) DV-SF2

他の抗原は、DV-SF2であってもよい。DV-SF2は、デングウイルスのエピトープに結合する中和抗体である。DV-SF2は、DEN4血清型に特異的であり得る。

【0223】

(f) DV-SF3

他の抗原は、DV-SF3であってもよい。DV-SF3は、デングウイルスエンベローピタンパク質のEDIII A鎖に結合する中和抗体である。

30

【0224】

6. 組成物の賦形剤及び他の成分

組成物は、薬学的に許容しうる賦形剤をさらに含んでいてもよい。薬学的に許容しうる賦形剤は、ビヒクリ、担体、または希釈剤としての機能的分子であり得る。薬学的に許容しうる賦形剤は、界面活性剤を含みうるトランスフェクション促進剤、例えば免疫刺激複合体(ISCOMS)、フロイント不完全アジュバント、モノホスホリル脂質AをはじめとするLPS類似体、ムラミルペプチド、キノン類似体、スクアレン及びスクアレンなどの小胞、ヒアルロン酸、脂質、リポソーム、カルシウムイオン、ウイルスタンパク質、ポリアニオン、ポリカチオン、もしくはナノ粒子、または他の公知のトランスフェクション促進剤であり得る。

40

【0225】

トランスフェクション促進剤は、ポリ-L-グルタマート(LGS)をはじめとするポリアニオン、ポリカチオン、または脂質である。トランスフェクション促進剤は、ポリ-L-グルタマートであり、ポリ-L-グルタマートは、6mg/ml未満の濃度で組成物中に存在してもよい。トランスフェクション促進剤は、界面活性剤、例えば免疫刺激複合体(ISCOMS)、フロイント不完全アジュバント、モノホスホリル脂質AをはじめとするLPS類似体、ムラミルペプチド、キノン類似体、ならびにスクアレン及びスクアレンなどの小胞を含んでいてもよく、ヒアルロン酸を用いて、組成物と一体化させて投与してもよい。組成物は、トランスフェクション促進剤、例えば脂質、レシチンリポソームまたはDNAリポソーム混合物(例えば、W09324640参照)などの当該技術分野で

50

公知の他のリポソームをはじめとするリポソーム、カルシウムイオン、ウイルスタンパク質、ポリアニオン、ポリカチオン、もしくはナノ粒子、または他の公知トランスフェクション促進剤を含んでいてもよい。トランスフェクション促進剤は、ポリ-L-グルタマート(LGS)をはじめとするポリアニオン、ポリカチオン、または脂質である。ワクチン中のトランスフェクション剤の濃度は、4 mg / ml 未満、2 mg / ml 未満、1 mg / ml 未満、0.750 mg / ml 未満、0.500 mg / ml 未満、0.250 mg / ml 未満、0.100 mg / ml 未満、0.050 mg / ml 未満、または0.010 mg / ml 未満である。

【0226】

組成物は、1994年4月1日出願の米国特許出願第021,579号に記載された遺伝子促進剤をさらに含んでいてもよく、参照により完全に組み入れられる。

10

【0227】

組成物は、DNAを約1ナノグラム～約100ミリグラム；約1マイクログラム～約10ミリグラム；好ましくは約0.1マイクログラム～約10ミリグラム；さらに好ましくは約1ミリグラム～約2ミリグラムの量で含んでいてもよい。いくつかの好ましい実施形態において、本発明による組成物は、DNAを約5ナノグラム～約1000マイクログラム含む。いくつかの好ましい実施形態において、組成物は、DNAを約10ナノグラム～約800マイクログラム含んでいてもよい。いくつかの好ましい実施形態において、組成物は、DNAを約0.1～約500マイクログラム含んでいてもよい。いくつかの好ましい実施形態において、組成物は、DNAを約1～約350マイクログラム含んでいてもよい。いくつかの好ましい実施形態において、組成物は、DNAを約25～約250マイクログラム、約100～約200マイクログラム、約1ナノグラム～100ミリグラム；約1マイクログラム～約10ミリグラム；約0.1マイクログラム～約10ミリグラム；約1ミリグラム～約2ミリグラム、約5ナノグラム～約1000マイクログラム、約10ナノグラム～約800マイクログラム、約0.1～約500マイクログラム、約1～約350マイクログラム、約25～約250マイクログラム、約100～約200マイクログラム含んでいてもよい。

20

【0228】

組成物は、用いられる投与様式に従って配合してもよい。注射可能な医薬組成物は、滅菌されたバイロジエンフリー及び微粒子フリーであってもよい。等張性配合剤または溶液が用いられてもよい。等張性のための添加剤として、塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトール及びラクトースを挙げることができる。組成物は、血管収縮剤を含んでいてもよい。等張性溶液は、リン酸緩衝生理食塩水を含んでいてもよい。組成物は、ゼラチン及びアルブミンをはじめとする安定化剤をさらに含んでいてもよい。LGSまたはポリカチオンまたはポリアニオンなどの安定剤により、配合剤を室温または周囲温度で長時間安定にさせることができる。

30

【0229】

7. 合成抗体の生成方法

また、本発明は、合成抗体の生成方法に関する。本方法は、組成物を、以下により詳細に記載の送達方法を用いてそれを必要とする対象に投与することを含んでいてもよい。従って、合成抗体は、組成物を対象に投与した際に、対象内もしくはインビボで生成される。

40

【0230】

本方法は、組成物を1つ以上の細胞中に導入することも含んでいてもよい。従って、合成抗体は、1つ以上の細胞中で生成もしくは産生されてもよい。本方法は、組成物を、1つ以上の組織、例えば、限定されないが、皮膚及び筋肉中に導入することをさらに含んでよい。従って、合成抗体は、1つ以上の組織中で生成もしくは産生されてもよい。

【0231】

8. 抗体の特定方法またはスクリーニング方法

さらに、本発明は、上述の抗原に反応するかもしくは結合する上述の抗体の特定方法またはスクリーニング方法に関する。抗体を特定またはスクリーニングする本方法を当業者

50

に公知の方法論で抗原に用いて、抗体を特定またはスクリーニングすることができる。かかる手法としては、ライプラリ（例えば、ファージディスプレイ）からの抗体の選択、動物の免疫化、続いて、抗体の単離及び／または精製が挙げられるが、これらに限定されない。

【0232】

9. 組成物の送達方法

また、本発明は、組成物をそれを必要とする対象に送達する方法に関する。送達方法は、組成物を対象に投与することを含んでいてもよい。投与としては、インピボ電気穿孔付き及び無しのDNA注射、リポソーム介在送達、及びナノ粒子促進送達が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0233】

組成物の送達を受ける哺乳動物は、ヒト、靈長類、非ヒト靈長類、ウシ、畜牛、ヒツジ、ヤギ、レイヨウ、バイソン、水牛、バイソン、ウシ属、シカ、ハリネズミ、ゾウ、ラマ、アルパカ、マウス、ラット、及びニワトリであってもよい。

【0234】

組成物を、経口、非経口、舌下、経皮、経直腸、経粘膜、局所、吸入、口腔投与、胸腔内、静脈内、動脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、鼻内、髄腔内、及び関節内、またはそれらの組み合わせをはじめとする異なる経路で投与してもよい。獣医学的使用では、通常の獣医学的実践に従い、組成物を適切に許容しうる配合剤として投与してもよい。獣医は、特定の動物に最も適した投与レジメン及び投与経路を、容易に決定することができる。組成物を、伝統的なシリンジ、針なし注射装置、「微粒子衝撃遺伝子銃」、または他の物理的方法、例えば電気穿孔法（EP）、「水力学的方法」、または超音波により投与してもよい。

20

【0235】

a. 電気穿孔

電気穿孔による組成物の投与は、細胞膜に可逆的な孔を形成させるのに効果的なエネルギー・パルスを哺乳動物の所望の組織に送達するように構成することができる電気穿孔装置を用いて達成され得、好ましくは、エネルギー・パルスは、ユーザーにより入力されたプリセット電流に近い定電流である。電気穿孔装置は、電気穿孔構成要素及び電極アセンブリまたはハンドルアセンブリを含んでいてもよい。電気穿孔構成要素は、制御器、電流波形発生器、インピーダンステスタ、波形ロガー、入力要素、ステータス報告要素、コミュニケーションポート、メモリー成分、電源、及び電源スイッチをはじめとする電気穿孔装置の1種以上の様々な要素を含み、それらを組み込んでいてもよい。電気穿孔は、プラスミドによる細胞のトランスフェクションを容易化するインピボ電気穿孔装置、例えば、CELLLECTRA EPシステム（イノビオファーマ・シューティカルズ社製、ペンシルベニア州プリマス・ミーティング）またはEugenエレクトロポレーター（イノビオファーマ・シューティカルズ社製、ペンシルベニア州プリマス・ミーティング）を用いて達成され得る。

30

【0236】

電気穿孔構成要素は、電気穿孔装置の一要素として機能してもよく、他の要素は、電気穿孔構成要素と連通する別々の要素（または構成要素）である。電気穿孔構成要素は、電気穿孔装置の1つを超える要素として機能してもよく、それが電気穿孔構成要素とは別々の電気穿孔装置の他の要素とも連通していてもよい。1つの電気機械的または機械的装置の一部として存在する電気穿孔装置の要素は、その要素が1つの装置として、または互いに連通する別々の要素として機能しうるよう限定しなくてもよい。電気穿孔構成要素は、所望の組織内で定電流を生成するエネルギー・パルスを送達することができてもよく、ファイードバック機構を含む。電極アセンブリは、空間的配置内に複数の電極を有する電極アレイを含んでいてもよく、電極アセンブリは、電気穿孔構成要素からエネルギー・パルスを受け、電極を介して所望の組織にそれを送達する。複数の電極のうちの少なくとも1つは、エネルギー・パルスの送達時にはニュートラルであり、所望の組織中のインピーダンスを

40

50

測定して、そのインピーダンスを電気穿孔構成要素に連通する。フィードバック機構は、測定されたインピーダンスを受けてもよく、電気穿孔構成要素により送達されたエネルギー・パルスを調整して定電流を維持することができる。

【0237】

複数の電極が、分散パターンでエネルギー・パルスを送達してもよい。複数の電極は、プログラムされたシーケンス下の電極制御を介して、分散パターンでエネルギー・パルスを送達してもよく、プログラムされたシーケンスは、ユーザーにより電気穿孔構成要素に入力される。プログラムされたシーケンスは、順に送達された複数のパルスを含んでいてもよく、複数のパルスの各パルスが、インピーダンスを測定する1つのニュートラル電極を含む少なくとも2つの活性電極により送達され、複数のパルスの次のパルスが、インピーダンスを測定する1つのニュートラル電極を含む少なくとも2つの活性電極の異なる1つにより送達される。

【0238】

フィードバック機構は、ハードウェアまたはソフトウェアのいずれかにより実施してもよい。フィードバック機構は、アナログ閉回路により実施してもよい。フィードバックは、50 μs、20 μs、10 μsまたは1 μsごとに起こるが、好ましくは実時間フィードバックまたは瞬時（すなわち、応答時間を決定するための入手可能な技術により決定すると実質的に瞬時）である。ニュートラル電極で所望の組織中のインピーダンスを測定してもよく、そのインピーダンスをフィードバック機構に連通し、フィードバック機構がインピーダンスに応答してエネルギー・パルスを調整し、プリセット電流と類似の値の定電流を維持する。フィードバック機構は、エネルギー・パルスの送達時に定電流を連続及び瞬時に維持してもよい。

【0239】

本発明の組成物の送達を促進しうる電気穿孔装置及び電気穿孔法の例としては、内容が全体として参照により本明細書に組み入れられた、Draghia-Akliによる米国特許第7,245,963号、Smithによる提出された米国特許公開第2005/0052630号に記載されたそれらのものが挙げられる。組成物の送達を促進するのに用いられる他の電気穿孔装置及び電気穿孔法としては、その全てが全体として参照により本明細書に組み入れられた、2006年10月17日出願の米国特許仮出願第60/852,149号及び2007年10月10日出願の同第60/978,982号に対して35 USC 119(e)による利益を主張する、2007年10月17日出願の同時係属中及び共有の米国特許出願第11/874072号に提供されたものが挙げられる。

【0240】

Draghia-Akliによる米国特許第7,245,963号には、体内または植物内の選択された組織の細胞中への生体分子の導入を促進するためのモジュラー電極システム及びその使用が記載されている。モジュラー電極システムは、複数の針電極；皮下注射針；プログラム可能な定電流パルス制御器から複数の針電極への導電的連結を提供する電気コネクター；及び電源を含んでいてもよい。オペレータが、支持構造上に搭載された複数の針電極を掴み、体内または植物内の選択された組織にそれらをしっかりと挿入することができる。その後、皮下注射針を介して、生体分子を選択された組織へ送達する。プログラム可能な定電流パルス制御器を活性化して、定電流の電気パルスを複数の針電極に印加する。印加された定電流電気パルスは、複数の電極間での細胞への生体分子導入を促進する。米国特許第7,245,963号の全体的内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0241】

Smithによる提出された米国特許公開第2005/0052630号には、体内または植物内の選択された組織の細胞中への生体分子導入を効果的に促進するために用いられる電気穿孔装置が記載されている。該電気穿孔装置は、操作がソフトウェアまたはファームウェアに特定される電気運動装置（「EKD装置」）を含む。EKD装置は、ユーザー制御に基づく一列の電極とパルスパラメータ入力との間で一連のプログラム可能な

10

20

30

40

50

定電流パルスパターンを生成し、電流波形データの保存及び取得を可能にする。電気穿孔装置は、針電極、注射針用の中央注入チャネル、及び取り外し可能なガイドディスクのアレイを有する交換可能な電極ディスクも含む。米国特許公開第2005/0052630号の全体的内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0242】

米国特許第7,245,963号及び米国特許公開第2005/0052630号に記載された電極アレイ及び方法は、筋肉などの組織だけでなく、他の組織または臓器にも深く浸透させるように適合され得る。電極アレイの形態によって、注射針（選択された生体分子を送達する）が、ターゲット臓器にも完全に挿入され、電極によってあらかじめ描かれた領域のターゲット組織に垂直に注射投与される。米国特許第7,245,963号及び米国特許公開第2005/0052630号に記載された電極は、好ましくは20mm長及び21ゲージである。

10

【0243】

加えて、電気穿孔装置及びその使用を組み込んだいくつかの実施形態で予期される通り、以下の特許：1993年12月28日発行の米国特許第5,273,525号、2000年8月29日発行の米国特許第6,110,161号、2001年7月17日発行の同第6,261,281号、2005年10月25日発行の同第6,958,060号、及び2005年9月6日発行の米国特許第6,939,862号に記載された電気穿孔装置が存在する。さらに、様々な装置のいずれかを用いたDNAの送達に関する2004年2月24日発行の米国特許第6,697,669号、及びDNA注入の方法が注目された2008年2月5日発行の米国特許第7,328,064号に提供された主題を含む特許が、本明細書で企図される。先の特許は、全体として参照により組み入れられる。

20

【0244】

10. 治療方法

また、本明細書で提供されるのは、合成抗体を対象内で生成することで、疾患に対する治療、防御、及び/または予防を、それを必要とする対象において行う方法である。本方法は、組成物を対象に投与することを含んでいてもよい。対象への組成物の投与は、上述の送達方法を用いて行うことができる。

【0245】

対象内で合成抗体を生成する際、合成抗体は、抗原に結合するかもしくは抗原と反応することができる。かかる結合により、抗原を中和し、別の分子、例えば、タンパク質または核酸による抗原の認識をブロックし、抗原への免疫応答を引き起こすかまたは誘発することにより、対象内の抗原と関連する疾患を治療、防御、及び/または予防することができる。

30

【0246】

組成物の用量は、1μg～10mg有効成分/kg体重/時間であってもよく、20μg～10mg有効成分/kg体重/時間であってもよい。組成物は、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、または31日おきに投与することができる。効果的な治療のための組成物の投与回数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であってもよい。

40

【0247】

本発明は、以下の非限定的な実施例によって示される多くの態様を有する。

【0248】

11. 実施例

以下に実施例を用いて本発明をさらに説明する。これらの実施例は本発明の好ましい実施形態を示すものであるが、説明のためだけに記載されるものと理解されるべきである。上記の説明及びこれらの実施例から、当業者であれば、本発明の必須の特徴を確認することができ、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、種々の用途及び条件に適合させるために本発明の種々の変更例及び改変例を作ることができる。したがって、本明細書中

50

に示され説明されているものに加え、本発明の種々の改変例が上記の説明から当業者には明らかであろう。そのような改変例も特許請求の範囲に含まれることが意図される。

【実施例 1】

【0249】

インビボ免疫グロブリン (Ig) 生成の高発現システムを構築した。具体的には、完全に組み立てられた Ig 分子のインビボ発現を改善するために、2 つの重鎖ポリペプチド及び 2 つの軽鎖ポリペプチドを含む Ig 重鎖及び軽鎖配列を修飾した。g p 1 2 0 Ig G - 重鎖分子及び軽鎖分子の構築物を作成し、p V A X 1 ベクター (ライフテクノロジーズ社、カリフォルニア州カールズバッド) に別々に挿入した。この抗体は、後述の特徴付け研究に用いることが可能な規定の特性を持つ。Ig 発現を最適化する構築物を作成する際にいくつかの修飾を含んだ。最適化には、コドン最適化及び k o z a k 配列 (G C C A C C) の導入を含んでいた。Ig の重鎖及び軽鎖について最適化された構築物の核酸配列は、配列番号 6 及び配列番号 7 にそれぞれ記載されている (それぞれ図 1 及び図 2)。図 1 及び図 2 において、下線及び二重下線は、構築物を p V A X 1 ベクターにクローニングするのに用いた B a m H I (G G A T C C) 及び X h o I (C T C G A G) 制限酵素部位を示し、太字は、開始 (A T G) 及び終止 (T G A T A A) コドンを示す。配列番号 6 は、配列番号 4 6 に記載のアミノ酸配列、すなわち、Ig G 重鎖のアミノ酸配列 (図 4 2) をコードする。配列番号 7 は、配列番号 4 7 に記載のアミノ酸配列、すなわち、Ig G 軽鎖のアミノ酸配列 (図 4 3) をコードする。

10

【0250】

天然 Ig 構築物 (すなわち、非最適化) または配列番号 6 及び 7 を含む構築物 (すなわち、最適化) のいずれかで細胞をトランスフェクトした。トランスフェクション後、トランスフェクト細胞から Ig G 分泌を測定した。Ig G 合成の動態を図 3 に示す。図 3 に示すように、非最適化構築物及び最適化構築物の両方とも Ig の重鎖及び軽鎖を発現して、Ig G を形成したが、最適化構築物の方が Ig G 抗体の蓄積をより早くもたらした。配列番号 6 及び 7 (すなわち、最適化 Ig 配列) を含むプラスミドでトランスフェクトした細胞は、非最適化 Ig 配列を含むプラスミドでトランスフェクトした細胞よりも、完全に組み立てられた Ig 分子のより多い産生を示した。従って、構築物の最適化または修飾により Ig 発現は実質的に増した。換言すれば、配列番号 6 及び 7 を含む構築物は、配列番号 6 及び 7 の作成に用いた最適化または修飾により、天然構築物と比較して顕著により高い Ig 発現をもたらした。Ig の重鎖及び軽鎖がプラスミドシステムからインビボで効率よく組み立てられることもこれらのデータにより実証された。

20

【0251】

配列番号 6 及び 7 を含む構築物をさらに調べるために、配列番号 6 及び 7 に記載の配列を含むプラスミドをマウスに投与した。特に、電気穿孔を用いてプラスミドを投与した。投与後、免疫化マウスで免疫応答 (すなわち、Ig G レベル) の誘導をウエスタンプロット法 (すなわち、マウスの血清を用いて g p 1 2 0 抗原を検出した) により評価した。図 4 に示すように、配列番号 6 及び 7 を含むプラスミドを投与されたマウスは、抗体の結合がウエスタンプロット分析で観察されたため、強い抗体産生を示した。この抗体産生を観察するために要した投与はたった 1 回であった。

30

【0252】

要するに、Ig 重鎖及び軽鎖をコードする核酸配列が、p V A X 1 などの発現ベクターに含まれる場合、トランスフェクト細胞及び発現ベクターを投与されたマウスで、組み立てられた Ig G (すなわち、重鎖及び軽鎖がまとまって、抗原に結合する抗体を形成する) の発現をもたらすことがこれらのデータにより示された。さらに、Ig 重鎖及び軽鎖をコードする核酸配列を最適化または修飾することで Ig 産生が著しく増大したこともこれらのデータにより示された。

40

【実施例 2】

【0253】

実施例 3 ~ 7 の材料及び方法

50

細胞及び試薬。293T細胞及びTZM-B1細胞を、10%ウシ胎仔血清(FBS)及び抗生物質を添加したダルベッコ変法イーグル培地(DMEM; Gibco:インビトロジェン社製、カリフォルニア州)中で維持し、コンフルエンス時に継代させた。組み換えHIV-1 p24及びgp120 Env(rgp120)タンパク質をプロテインサイエンス社(Protein Science Inc.)から取得し、ペルオキシダーゼ共役ストレプトアビシンをジャクソン研究所(Jackson Laboratory)から取得した。記載されている細胞株及び他の試薬は、AIDS研究及び参照用試薬プログラム(AIDS Research and Reference Reagent Program)、Division of AIDS、NIADD、NIHから入手した。

【0254】

動物、タンパク質、ならびにプラスミドの投与及び送達。雌BALB/cマウス(8週齢)を、タコニックファームズ(Taconic Farms)(ニューヨーク州ジャーマンタウン)から購入した。これらの投与には、体積50μl(pVax1またはpHIV-1 Env-Fab)中のプラスミドDNA 25μgを筋肉内注射(IM)した後、MID-EPシステム(CELLLECTRA(登録商標);イノビオ・ファーマシューティカルズ、ペンシルベニア州ブルーベル)によってEP介在の送達を増強した。送達用パルスパラメータは、0.5アンペア定電流の3パルスで、1秒おきで52ミリ秒の長さであった。各動物は、実験用プラスミド製剤または対照プラスミド製剤のいずれかの単回投与を受けた。JRF株(Immune Technology Corp社から購入、ニューヨーク州)由来のHIV-1組み換えgp120(rgp120)をタンパク質免疫分析に用いた。タンパク質免疫研究では、rgp120の単回用量25μgをTitrationとアジュバントと混合し、皮下注射した。pHIV-1 Env Fabまたはrgp120を投与されたマウスの血清を特定の分析に応じて異なる時点で回収した。

【0255】

HIV-1 Env-FabプラスミドDNAの構築。抗Env VRC01ヒトmAbからのHIV-1 Env-Fab配列(VH及びVL)を、いくつかの修飾を持つ合成オリゴヌクレオチドを用いて生成した。重鎖(VH-CH1)は、配列番号3に記載の核酸配列によってコードされ、軽鎖(VL-CL)は、配列番号4に記載の核酸配列によってコードされる(それぞれ図9及び図10)。図9及び図10において、下線及び二重下線は、コード化核酸配列をpVAX1にクローニングするのに用いた HindIII(AAGCTT)及びXhoI(CTCGAG)制限酵素部位を示し、太字は、開始(ATG)及び終止(TGAまたはTAA)コドンを示す。配列番号3は、配列番号48に記載のアミノ酸配列、すなわち、HIV-1 Env-FabのVH-CH1のアミノ酸配列(図44)をコードする。配列番号4は、配列番号49に記載のアミノ酸配列、すなわち、HIV-1 Env-FabのVL-CLのアミノ酸配列(図45)をコードする。

【0256】

発現を向上させるために、効率的なIgEリーダー配列をEnv抗原遺伝子配列に組み込んだ。得られた修飾及び強化されたHIV-1 Env-Fab DNA免疫原は、コドン及びRNA最適化され、GenScript(ニュージャージー州ピスカッタウェイ)によってpVax1発現ベクターにクローニングした後、これらの構築物を大規模に產生した。VH及びVL遺伝子(それぞれ配列番号3及び4)をBamH1及びXho1制限部位の間に挿入した。精製プラスミドDNAに水を配合した後、マウスに投与した。陰性対照プラスミドとして、「無関係な」対照Igを生成するpIGE1M2を用いた。

【0257】

HIV-1 Env-Fab発現及び免疫プロット分析。製造者によって推奨された方法によって、非リポソームFUGENE6トランスフェクション試薬(プロメガ、ウィスconsin州)を用いた発現分析に293T細胞株を利用した。簡単に言えば、細胞を50~70%のコンフルエンス(35mm培養皿のウェル2mLあたり1~3×10⁵細胞)で24時間播種した後、5μgのpVax1対照またはpHIV-1 Env-Fabでトランسفектした。70時間までの様々な時点で上清を回収し、標準的なELISA法に

10

20

30

40

50

よって特異的 F a b 分子のレベルを評価した。p V a x 1 トランスフェクト細胞からの上清を陰性対照として用いた。さらに、2 9 3 T 細胞を H I V - g p 1 6 0 E n v タンパク質遺伝子でトランスフェクトした。

【 0 2 5 8 】

さらに、生成された F a b による天然 H I V - 1 E n v タンパク質の認識確認を免疫プロット分析で行った。この研究では、上述の r g p 1 2 0 を 1 2 % S D S - P A G E 上で電気泳動を行った。ニトロセルロース膜（マサチューセッツ州ベッドフォードのミリポア）上でゲルをプロットし、P B S - T (0 . 0 5 %) 中で 5 % w / v の脱脂粉乳でブロックした。その後、ニトロセルロースを別々のストリップに切断して、分析した。p H I V - 1 E n v F a b 投与されたマウスの血清を、投与から 4 8 時間後に回収し、P B S 中で 1 : 1 0 0 に希釈し、個々のニトロセルロースストリップと 1 時間反応させた。その後、ストリップをトリス緩衝生理食塩水 - 0 . 2 % ツイーンで 4 時間洗浄し、マウス I g G (ジャクソン研究所、メイン州) に対するペルオキシダーゼ結合抗血清と反応させ、ジアミノベンジジン基質（シグマ社、ミズーリ州セントルイス）とともに培養し、生成された H I V - 1 E n v F a b の g p 1 2 0 への適正な結合を視覚化させた。

【 0 2 5 9 】

I g 結合分析 - E L I S A。F a b または抗 r g p 1 2 0 抗体を生成した D N A プラスミドの r g p 1 2 0 への結合を E L I S A で評価した。p H I V - 1 E n v F a b 、p V a x 1 、または r g p 1 2 0 タンパク質のいずれかを投与された個体動物の血清で I g 結合アッセイを行った。ここでも、基本的な I g 免疫測定分析において、D N A プラスミド単回投与から 4 8 時間後に血清サンプルを回収した。簡単に言えば、9 6 ウェル高結合ポリスチレンプレート（ニューヨーク州コーニング）をクレード B H I V M N r g p 1 2 0 (2 μ g / m L) で一晩 4 でコーティングし、P B S で希釈した。翌日、プレートを P B S - T (P B S 、0 . 0 5 % ツイーン 2 0) で洗浄し、P B S - T 中の 3 % B S A で 1 時間ブロックし、免疫化マウス及びナイーブマウスの血清の 1 : 1 0 0 希釈物とともに 1 時間 3 7 で培養した。1 : 5 , 0 0 0 に希釈したヤギ抗マウス I g G - H R P (リサーチ・ダイアグノスティックス社、ニュージャージー州) を用いて結合 I g G を検出した。色原体基質溶液 T M B (R & D S y s t e m s) を添加して結合酵素を検出し、B i o t e k 製 E L 3 1 2 e B i o - K i n e t i c s r e a d e r 上で 4 5 0 n m で読んだ。全ての血清サンプルを 2 度重複して試験した。追加の免疫測定分析を行い、市販の I g G 1 定量 E L I S A キットを用いて p H I V - 1 E n v F a b 投与されたマウスの血清中の F a b 濃度を定量化した。この分析は、製造者仕様に従って行った。

【 0 2 6 0 】

フローサイトメトリー分析 (F A C S)。フローサイトメトリー分析 (F A C S) では、コンセンサスクレード A E n v プラスミド (p C o n - E n v - A) 、または、一次ウイルス単離体 (Q 2 3 E n v 1 7) から E n v を発現する最適化クレード A プラスミド (p O p t - E n v - A) のいずれかで 2 9 3 T 細胞をトランスフェクトした。標準的な方法によってトランスフェクションを行った。トランスフェクションを確認後、細胞を氷冷した緩衝液 A (P B S / 0 . 1 % B S A / 0 . 0 1 % N a N 3) で洗浄し、一次 I g (精製 V R C 0 1 、または、p H I V - 1 E n v F a b または対照 p I g G - E 1 M 2 プラスミドのいずれかを投与されたマウスの血清のいずれか、プラスミド投与から 4 8 時間後に回収) の 1 : 1 0 0 希釈物とともに 2 0 分間 4 で培養した。次いで、これを洗浄し、フィコエリトリン (P E) に共役した蛍光標識二次 I g の 1 : 1 0 0 希釈物の 5 0 μ l とともにさらに 2 0 分間培養した。その後、細胞を洗浄し、フローサイトメーター (F A C S : ベクトン・ディッキンソン社製) で直ちに分析した。培養及び洗浄は全て氷冷した緩衝液 A で 4 で行った。細胞をシングレット及び生細胞にゲートした。G F P を評価するため、G F P 陽性細胞の発現を C e l l Q u e s t ソフトウェア (B D B i o s c i e n c e) を用いた F A C S - L S R 計器で行った。F l o w J o ソフトウェアでデータを分析した。

【 0 2 6 1 】

10

20

30

40

50

シングルサイクルHIV-1中和アッセイ。Fab介在HIV-1中和分析をTZM-B1(HeLa細胞由来)ベースアッセイで測定し、ここで、ルシフェラーゼ遺伝子発現の減少を中和の終点として用い、次いで実験用血清または対照血清の存在下または非存在下でEnv偽型ウイルスに1ラウンド感染させた。TZM-B1細胞を操作して、CD4及びCCR5を発現させ、萤ルシフェラーゼのレポーター遺伝子を含有させた。このアッセイでは、pVax1のみまたはpHIV-1Env-Fab投与されたマウスの血清をウェルで1:50に希釈後、0.01の感染多重量(MOI)で、偽型HIV-1Ba126、Q23Env17、SF162S、またはZM53M無細胞ウイルスを添加した。Ba126及びSF162Sは両方ともクレードB Tier1ウイルスであり、Tierステータスは、ウイルスの中和感度が高かったもしくは平均以上であったことを示す。Q23Env17及びZM53Mは、それぞれ、クレードAのTier1ウイルス及びクレードCのTier2ウイルスである。Tier2ステータスは、ウイルスの中和感度が平均的もしくは中程度であったことを示す。次いで、このアッセイでは、10⁴TZM-BL細胞を各ウェルに添加し、48時間培養し、溶解させ、Bright-Glo基質(ルシフェラーゼアッセイシステム、プロメガ、ウィスコンシン州)を100μl添加した後、ルミノメータを用いてルシフェラーゼを定量化した。このアッセイはRLU(相対発光量)で読み取った。RLU減少率は、(1 - (実験用サンプルの平均RLU - 対照) / 対照からの平均RLU - 非添加対照ウェル)) × 100として算出した。HIV-1中和はRLUの減少率(%)で表わし、これは、感染阻害率を示すものであった。

【実施例3】

【0262】

抗HIV-1 Env-Fab発現構築物の生成

ヒトmAb VRCA01を広く中和する抗HIV-1エンベロープのVH及びVL-Ig(免疫グロブリン)鎖コード配列の両方のcDNAを、NIH AIDS Research and Reference Reagent Program経由でVRCA(ワクチンリサーチセンター、NIH)から入手し、pVax1ベクターにクローニングした。上記の実施例2に示すように、生物活性のあるIg分子の産生を最大化及び最適化するために、いくつかの修飾を発現ベクターに組み込んだ。すなわち、これらの修飾により、コドン及びRNAの最適化及び安定化がもたらされ、リーダー配列の活用が増強され、プラスミドが高濃度で産生され、EP経由でインビボプラスミド送達が促進された。生成された構築物をヒトサイトメガロウイルス(CMV)由来の前初期プロモーターの制御下に置いた。これは、哺乳類細胞及び組織中で適切かつ効率のよい発現に重要である。この研究に用いた構築物の模式的なマップを図5A及び図5Bに示す。

【0263】

さらに、抗HIV-1 Env-FabをpHIV-Env-Fabから調製し、これを用いて、HIV Envをコードするプラスミドでトランスフェクトした細胞を染色した。pVAX1を対照として用いた。図11に示すように、抗HIV-1 Env-Fabが、HIV Envをコードするプラスミドでトランスフェクトした細胞を染色したため、ベクターpHIV-Env-Fabにより抗HIV-1 Env-Fabを調製できることが免疫蛍光染色により実証された。従って、抗HIV-1 Env-Fabは、HIV Env糖タンパク質への結合に特異的であった。

【実施例4】

【0264】

トランスフェクト細胞によるIg産生

pHIV-1Env-Fabの発現を評価するため、構築物を293T細胞にトランスフェクトした。コンセンサスHIV-1クレードB gp120タンパク質を用いたELISA免疫測定により、トランスフェクション後早ければ24時間でトランスフェクト293T細胞由来の上清中に抗HIV-1 Env-Fabの存在が確認された(図5C)。トランスフェクション後24~72時間で高OD450nm値(すなわち、約0.5~0.8の範囲)が細胞抽出物中で検出され、48時間でピーク及び平坦域に到達した。H

10

20

30

40

50

I V E n v 糖タンパク質に対する抗H I V - 1 E n v F a b の特異性が、これらの結果により確認された。図5 Cに示したデータの統計解析は以下の通りであった：p H I V - 1 E n v - F a b 投与されたマウスの血清のOD 450 nm値は、22～72時間の時点における測定において、p V a x 1 対照と比較して有意($p < 0.05$ 、スチュードントt検定)であった。

【実施例5】

【0265】

H I V - 1 E n v F a b のインビボ特性

D N A プラスミドからのインビボ F a b 産生を実証するため、マウスにp H I V - 1 E n v F a b を筋肉内経路で投与し、次いでE P を介して送達を増強させた。D N A プラスミドを単回注入で送達し、投与してから12時間、1日、2日、3日、4日、7日、及び10日後に血清を回収した。その後、図6 Aに示すように、E L I S A 分析により血清(1:100の希釈)のI g / F a b レベルを評価した。図6 Aのデータ(p V a x 1 及びH I V - 1 E n v - F a b 両方の群からの個体マウスから)は、OD 450 nmとして示され、I g / F a b レベルに比例していた。p H I V - 1 E n v - F a b の単回投与後のF a b の相対レベルは、1日目に検出可能となり、その後、経時的に増大したことが、これらのデータにより実証された。比較の目的で、実施例2に記載されているようr g p 120の単回投与/免疫化をB a l b / C マウスに施した後、血清を回収し、特定の抗g p 120 抗体レベルの程度及び寿命を判断するために、E L I S A で経時的な分析(1:100希釈物)を行った。その結果を図6 Bに示す。

【0266】

このタンパク質送達研究では、バックグラウンド上で抗原特異的なI g レベルは、免疫化した後10日目になってやっと検出可能となった。これは、OD 450 nm 値が、投与後1日目で少なくとも0.1OD 450 nm ユニットに達し、10日目で0.28～0.35 OD ユニット間のレベルで平坦域となったp H I V - 1 E n v F a b 投与(図6 A)により引き起こされたF a b レベルと対照的であった。従って、p H I V - 1 E n v F a b の送達により、従来のタンパク質免疫よりも特定のF a b のより急速な生成がもたらされた。この発見は、生物活性のあるI g の生成によるD N A プラスミドの送達方法の潜在的な臨床的有用性を強調するものであった。

【0267】

D N A 送達技術によって産生された組み換えF a b の質と量を確保するためにさらなる分析を行った。すなわち、電気泳動された後プロットされた組み換えH I V - 1 g p 1 2 0 タンパク質を用いて免疫プロット分析を行い、投与してから48時間後にp H I V - 1 E n v - F a b マウスの血清でプローブした(図6 C)。このプロットにより、g p 1 2 0 タンパク質の分子量に適したバンドであることが示され、機能的でありかつg p 1 2 0 に結合可能であることが確認された。同様に、ヒトF a b 定量をE L I S A によって行い、プラスミド投与後の時間(すなわち、日数)の関数として示した(図6 D)。結果は、生成されたF a b レベルが2～3 μ g / m l でピークに達したことを示す。生成されたV R C 0 1 ベースのF a b のV H鎖及びV L鎖のポリペプチドアセンブリが、正確であり、なおかつ、H I V - 1 E n v タンパク質を認識し、それに特異的に結合する能力を有することが、これらの結果により実証された。

【0268】

図6に示したデータの統計解析は以下の通りである。図6 Aにまとめたデータでは、p H I V - 1 E n v - F a b 投与されたマウスの血清のOD 450 nm 値は、1日目～10日目の時点の測定において、p V a x 1 投与されたマウスの血清と比較して統計的($p < 0.05$ 、スチュードントt検定)に増大した。図6 Bにまとめたデータでは、r p g 120群からのOD 450 nm 値は、10日目～14日目の時点の測定において、P B S 対照と比較して有意($p < 0.05$ 、スチュードントt検定)に増大した。図6 Dにまとめたデータでは、p H I V - 1 E n v - F a b 投与されたマウスからのOD 450 nm 値は、2日目～10日目の時点の測定において有意($p < 0.05$ 、スチュードントt検定)に増大した。

10

20

30

40

50

定)に増大した。

【実施例 6】

【0269】

異なる H I V - 1 E n v タンパク質を発現する細胞への F a b / I g s の結合: F A C S ベース分析

p H I V - 1 E n v - F a b 投与されたマウスの血清を用いて、生成された F a b の、293 T 細胞によって一時的に発現された異なる H I V - E n v タンパク質への結合について試験した。天然型の V R C 0 1 - m A b を陽性対照として用いて、細胞の表面上に E n v タンパク質を適切に発現させ、確実に検出した。先に示した通り、「無関係な / 無関連な」 I g (I g - E 1 M 2) を陰性対照として用いた。図 7 A 及び図 7 B に示した通り、基本的に、異なる I g s / F a b s で p V a x 1 (すなわち、E n v インサートを欠いた) トランスフェクト細胞に背景染色しただけであった。しかしながら、精製 V R C 0 1 m A b と、p H I V - 1 E n v - F a b 投与されたマウスの血清との両方において、コンセンサスクレード A E n v プラスミド (p C o n - E n v - A) 、または、一次 H I V - 1 単離体である p Q 2 3 E n v 1 7 から E n v を発現する最適化クレード C プラスミド (p O p t - E n v - A) のいずれかを発現するトランスフェクト細胞で著しい正の染色があった。さらに、p I g - E 1 M 2 投与されたマウスの血清では、H I V 1 E n v トランスフェクト細胞のいずれにおいてもバックグラウンドレベルを上回る染色が示されなかった。これらの結果を示す F A C S 分析を図 7 A に示す。この実験の F A C S 分析 (すなわち、図 7 A) からのデータを示す代表的なグラフを図 7 B に示した。

10

20

【0270】

図 7 B に示したデータの統計解析は以下の通りである。天然 V R C 0 1 抗体と、p H I V - 1 E n v - F a b 投与されたマウスの血清間で、p C o n - E n v - A によって生成されたエンベロープ糖タンパク質への特異結合における有意差 (p < 0 . 0 5 、スチュードント t 検定) はなかった。しかしながら、p O p t - E n v - A によって生成されたエンベロープ糖タンパク質への V R C 0 1 抗体の結合は、p H I V - 1 E n v - F a b 投与されたマウスの血清による結合よりも有意に高かった (p < 0 . 0 5 、スチュードント t 検定)。

【実施例 7】

【0271】

p H I V - 1 E n v F a b によって產生された I g の H I V 中和活性

30

p H I V - 1 E n v - F a b 投与されたマウスの血清を用いて、H I V - E n v F a b の、トランスフェクト 293 T 細胞によって一時的に発現される H I V - 1 E n v タンパク質への結合について試験した。p H I V - 1 E n v - F a b の投与 6 日後のマウスの血清を入手した。具体的に、クレード A、B、または C 株由来の H I V - 1 E n v を発現するプラスミドで細胞をトランスフェクトした。クレード A、B、及び C 株は、92 R W 0 2 0 、 S F 1 6 2 、及び Z M 1 9 7 であった。図 1 2 に示すように、p H I V - 1 E n v - F a b 投与されたマウスの血清が、クレード A、B、及び C H I V - 1 株由来の H I V - 1 E n v に結合したことで、H I V - 1 の多数のサブタイプ由来の H I V - 1 E n v と交差反応した抗体 (すなわち、H I V - E n v F a b) を血清が含んでいたことが示された。

40

【0272】

この研究で製造された H I V - E n v F a b の潜在的な H I V - 1 中和活性を評価するために、T Z M - B 1 標的細胞を用いて蛍光ベース中和アッセイを行った。T Z M - B 1 標的細胞を、実施例 2 に記載されているように、実験用血清または対照血清の存在下または非存在下で 4 つの異なる偽型 H I V ウィルス単離体に感染させた。

【0273】

図 8 は、p H I V - 1 E n v F a b 投与されたマウスの血清の H I V 偽型ウイルスに対する中和曲線を示す。具体的には、H I V - 1 T i e r 1 ウィルスである B a l 2 6 及び S F 1 6 2 S (両方ともクレード B) ならびに Q 2 3 E n v (クレード A) について

50

試験した。さらに、HIV-1クレードC Tier 2ウイルスであるZM53Mに対しても血清を試験した。HIV感染の中和率／阻害率としてデータを示した。グラフの水平斜線は、アッセイにおいて50%の中和／阻害レベルを示した。この研究では、中和の陽性対照mAb（データ不図示）を利用して、この分析法の有用性及び信頼性について確認した。簡単に言えば、mAbを中和する陽性対照は、4つ全てのウイルス偽型の感染を少なくとも50%阻害することができた。

【0274】

プラスミド投与してから経時的にHIV中和活性が増大し、Bal25、Q23Env 17、及びSF162Sに対する中和率が2日目で50%に達したことが、pHIV-1Env-Fab投与されたマウスの血清により実証された。これら3つのウイルスに対する平坦域での中和率は、それぞれ、約62、60、及び70%であった。ZM53Mに対しては、3日目まで50%の中和閾値には到達せず、平坦域での中和率も50%を超えるかなかった。試験した他の3つと比べたこのロバスト性の低い中和プロファイルは、ZM53Mが中和可能性の低いTier 2ウイルスであったことを反映しているようであった。要するに、この研究で生成されたFabは、広範なHIV単離体を効果的に中和することができた。図8に示したデータの統計解析は以下の通りである。クラスカル・ワリスノンパラメトリック解析に基づいて、pHIV-1Env-Fab投与されたマウスの血清によって誘発されたZM53MクレードCウイルス（図8D）のHIV中和レベルのみ、試験した他のウイルス（図8A、図8B、及び図8C）と著しく異なっていた。この差は、50%中和の達成に要する時間（日目）のみならず、達した最大の中和レベルでもあった。

10

【0275】

実施例3～7をまとめると、pHIV-1Env-Fab投与されたマウス中のVR01Fabの血清濃度は、注入してから12日後に2～3μg/mLでピークに達した。この範囲は、FDAによって現在認可されている多くのモノクローナル抗体に匹敵するものであり、我々の抗体アプローチによって、有意かつ生物学的に関連したレベルの抗体が小動物モデル中で産生されたことが示された。特に、尋常性乾癬及び関節炎などの自己免疫疾患に対して使用される、ウステキヌマブ（商品名：Stelara）及びゴリムマブ（Simumponi）の2つの抗体は、それぞれ、0.31±0.33μg/mL及び1.8±1.1μg/mLの平均値±標準偏差の血清濃度を有する。さらに、TNFインヒビターであるアダリムマブ（Humira）は、およそ6μg/mLの平均血清濃度を有する。これに関し、抗体をコードするDNAを生物に送達することで、有意かつ生物学的に関連したレベルの抗体が生物中に存在するように、インピボ組み立てがもたらされたことが、実施例4～8に記載のデータにより実証された。

20

【0276】

従来のタンパク質投与によって産生されたIgs（図6A及び図6B）と比べて、pHIV-1Env-FabのEP増強単回投与後、Fabsをインピボでさらに速やかに産生する能力がこれらのデータにより実証された。さらに、難しいワクチン標的に対しても機能性防御Ig様分子を生成する能力が示された。今日まで、積極的なワクチン接種後にHIV-1中和抗体を誘導することは非常に困難であり、一次感染中、伝染してから何年も後になるまで中和抗体は作り出されない。このDNAプラスミドアプローチでは、送達後1～2日内で中和力価が観察され、ピークの中和Fab血清濃度（3.31±0.13μg/mL）は、投与後1週間で起こった（図6D）。このレベルのIgは、近年の研究において感染から完全に防御することが実証されている8.3μg/mL濃度と比較的同様であった。生物活性のあるIg断片が急速に誘導されることがこれらのデータにより実証された。

30

【0277】

中和抗体力価及びHIV-1一次単離体に対する反応がHIV-1Env-Fab DNA投与によって引き起こされたこともこれらのデータにより示された。クレードA、B、及びCの例を表わす、異なるウイルスTier 1及びTier 2ウイルス単離体のパネルに対して血清を試験した。これらのウイルスに対する潜在的な中和活性を生成する結果

40

50

が示された(図8)。

【0278】

従って、このDNAプラスミドベースの方法により、特異的かつ生物活性のあるFabまたはIg分子をインビオ生成し、抗体生成において従来の抗原ベースのワクチン接種を用いる必要性を避けて、Igsをインビトロで生成し精製する必要性を除去した。

【実施例8】

【0279】

ヒトIg抗体をコードするプラスミドの構築

上述したように、Fabは、VRC01抗体、すなわち、HIV-Env Fabから生成され、これは、コード化核酸を対象に投与した際にインビオ生成された。これらの研究をさらに拡張するため、VRC01抗体由来のIgG1抗体をコードする核酸配列を作成した。図13の模式図に示すように、IgG重鎖及び軽鎖をコードする核酸配列を、フリン切断部位とP2Aペプチド配列をコードする核酸配列とで分離した。P2Aペプチド配列は、プロテアーゼによって切断効率が増すため、別々のポリペプチドが切断後にもたらされた。

【0280】

IgG重鎖は、可変重(VH)領域、定常重1(CH1)領域、ヒンジ領域、定常重2(CH2)領域、及び定常重3(CH3)領域を含んでいた。IgG軽鎖は、可変軽(VL)領域及び定常軽(CL)領域を含んでいた。この構築物をサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、例えば、発現ベクターpVAX1の制御下に置いた。この構築物により、gp120(すなわち、VRC01抗体によって認識された抗原)に反応性があった完全に組み立てられたIgG抗体(図14示すように)の産生がもたらされた。本明細書では、この完全に組み立てられたIgGのことを「VRC01 IgG」と呼ぶ。VRC01 IgG(フリンによる切断前の)のアミノ酸配列は、図15に示し、配列番号5に記載されている。

【0281】

特に、VRC01 IgG(フリンによる切断前；配列番号5及び図15)のアミノ酸配列は、以下の構造を有する：免疫グロブリンE1(IgE1)シグナルペプチド、可変重領域(VH)、定常重領域1(CH1)、ヒンジ領域、定常重領域2(CH2)、定常重領域3(CH3)、フリン切断部位、GSGリンカー、P2Aペプチド、IgE1シグナルペプチド、可変軽領域(VL)、及び定常軽領域(CL、特にカッパ)である。構造(その全ては、上述の順序かつ図13に示すように配列番号15内に含まれる)の各部分の配列を以下に示す。

【0282】

VRC-1 IgGのIgE1シグナルペプチド-(配列番号8)。

【0283】

VRC01 IgGの可変重領域-(配列番号9)。

【0284】

VRC01 IgGの定常重領域1(CH1)-(配列番号10)。

【0285】

VRC01 IgGのヒンジ領域-(配列番号11)。

【0286】

VRC01 IgGの定常重領域2(CH2)-(配列番号12)。

【0287】

VRC01 IgGの定常重領域3(CH3)-(配列番号13)。

【0288】

VRC01 IgGのフリン切断部位-(配列番号14)。

【0289】

VRC01 IgGのGSGリンカー及びP2Aペプチド-(配列番号15)。

【0290】

10

20

30

40

50

V R C 0 1 Ig G の Ig E 1 シグナルペプチド - (配列番号 8)。

【0291】

V R C 0 1 Ig G の可変軽領域 (V L) - (配列番号 16)。

【0292】

V R C 0 1 Ig G の定常軽領域 (C L、カッパ) - (配列番号 17)。

【実施例 9】

【0293】

2つのプラスミドによってコードされた H I V - 1 V R C 0 1 Ig G

上記の実施例 2 ~ 8 に記載したように、F a b (各鎖は別々のプラスミドから発現) は、V R C 0 1 抗体、すなわち、H I V - E n v F a b から生成され、I g G (単一プラスミドから発現) は、V R C 0 1 抗体、すなわち、V R C 0 1 Ig G から生成された。これらの研究をさらに拡張するため、I g G は、V R C 0 1 抗体から生成され、ここで、重鎖 (すなわち、可変重領域 (V H)、定常重領域 1 (C H 1)、ヒンジ領域、定常重領域 2 (C H 2)、及び定常重領域 3 (C H 3)) 及び軽鎖 (すなわち、可変軽領域 (V L) 及び定常軽領域 (C L)) は、別々の構築物によってコードされた (図 50 及び図 51)。本明細書では、この I g G のことを「H I V - 1 V R C 0 1 Ig G」と呼ぶ。

【0294】

各構築物は、インビオでいったん生成された抗体の分泌を最適化するリーダー配列も含んでいた。各構築物を p V A X 1 ベクターの B a m H I 及び X h o I 部位でクローニングすることで、構築物をサイトメガロウイルス (C M V) プロモーターの制御下に置いた (図 50 及び図 51)。従って、V R C 0 1 Ig G をインビオ形成または生成するため、プラスミドの混合物、すなわち、重鎖をコードする構築物を含むプラスミドと軽鎖をコードする構築物を含むプラスミドとを対象に投与しなければならない。

【0295】

また、各構築物をさらに最適化した。最適化には、k o z a k 配列 (G C C A C C) の添加及びコドン最適化を含んでいた。H I V - 1 V R C 0 1 Ig G の Ig G 1 重鎖をコードする核酸配列は、配列番号 54 及び図 52 に記載されている。図 52 において、下線及び二重下線は、核酸配列を p V A X 1 ベクターにクローニングするのに用いた B a m H I (G G A T C C) 及び X h o I (C T C G A G) 制限酵素部位を示し、太字は、開始 (A T G) 及び終止 (T G A T A A) コドンを示す。配列番号 54 は、配列番号 55 及び図 53 に記載のアミノ酸配列、すなわち、H I V - 1 V R C 0 1 Ig G の Ig G 1 重鎖のアミノ酸配列をコードする。

【0296】

H I V - 1 V R C 0 1 Ig G の Ig G 軽鎖をコードする核酸配列は、配列番号 56 及び図 54 に記載されている。図 54 において、下線及び二重下線は、核酸配列を p V A X 1 ベクターにクローニングするのに用いた B a m H I (G G A T C C) 及び X h o I (C T C G A G) 制限酵素部位を示し、太字は、開始 (A T G) 及び終止 (T G A T A A) コドンを示す。配列番号 56 は、配列番号 57 及び図 55 に記載のアミノ酸配列、すなわち、H I V - 1 V R C 0 1 Ig G の Ig G 軽鎖のアミノ酸配列をコードする。

【実施例 10】

【0297】

H I V - 1 E n v - P G 9 Ig

V R C 0 1 Ig G に加えて、H I V - 1 E n v に反応性のある Ig G をコードする別の構築物を作成した。この構築物は H I V - 1 E n v - P G 9 であり、これを最適化し、発現ベクター内でクローニングした (図 16 A 及び図 16 B)。最適化には、k o z a k 配列 (例えば、G C C A C C)、リーダー配列の導入及びコドン最適化を含んでいた。H I V - 1 E n v - P G 9 Ig をコードする核酸配列を含む発現ベクターが作成されたことが、図 16 C に示すような制限酵素消化によって確認された。図 16 C において、レーン 1 は未消化の発現ベクターであり、レーン 2 は B a m H I 及び X h o I で消化された発現ベクターであり、レーン M はマーカーであった。

10

20

30

40

50

【0298】

H I V - 1 E n v - P G 9 I g をコードする核酸配列は、配列番号 6 3 及び図 6 1 に記載されている。図 6 1 において、下線及び二重下線は、核酸配列を p V A X 1 ベクターにクローニングするのに用いた B a m H I (G G A T C C) 及び X h o I (C T C G A G) 制限酵素部位を示し、太字は、開始 (A T G) 及び終止 (T G A T A A) コドンを示す。配列番号 6 3 は、配列番号 2 及び図 1 8 に記載のアミノ酸配列、すなわち、H I V - 1 E N v - P G 9 I g (フリンによる切断前) のアミノ酸配列をコードする。

【0299】

このアミノ酸配列では、シグナルペプチドが、重鎖及び軽鎖の各々にペプチド結合で結合されることで、インビオ生成された抗体の分泌が向上する。また、P 2 A ペプチドをコードする核酸配列が、重鎖及び軽鎖をコードする核酸配列間に位置するので、翻訳されたポリペプチドを、重鎖または軽鎖を含む別々のポリペプチドにより効率的に切断することができる。

【0300】

特に、H I V - 1 E n v - P G 9 I g (フリンによる切断前 ; 配列番号 2 及び図 1 8) のアミノ酸配列は、以下の構造を有する : ヒト I g G 重鎖シグナルペプチド、可変重領域 (V H) 、定常重領域 1 (C H 1) 、ヒンジ領域、定常重領域 2 (C H 2) 、定常重領域 3 (C H 3) 、フリン切断部位、G S G リンカー、P 2 A ペプチド、ヒトラムダ軽鎖シグナルペプチド、可変軽領域 (V L) 、及び定常軽領域 (C L 、特にラムダ) である。構造 (その全ては、上述の順序で配列番号 2 内に含まれる) の各部分の配列を以下に示す。

【0301】

H I V - 1 E n v - P G 9 I g のヒト I g G 重鎖シグナルペプチド - (配列番号 1 8)。

【0302】

H I V - 1 E n v - P G 9 I g の可変重領域 - (配列番号 1 9)。

【0303】

H I V - 1 E n v - P G 9 I g の定常重領域 1 (C H 1) - (配列番号 2 0)。

【0304】

H I V - 1 E n v - P G 9 I g のヒンジ領域 - (配列番号 2 1)。

【0305】

H I V - 1 E n v - P G 9 I g の定常重領域 2 (C H 2) - (配列番号 2 2)。

【0306】

H I V - 1 E n v - P G 9 I g の定常重領域 3 (C H 3) - (配列番号 2 3)。

【0307】

H I V - 1 E n v - P G 9 I g のフリン切断部位 - (配列番号 2 4)。

【0308】

H I V - 1 E n v - P G 9 I g のG S G リンカー及びP 2 A ペプチド - (配列番号 2 5)。

【0309】

H I V - 1 E n v - P G 9 I g のヒトラムダ軽鎖シグナルペプチド - (配列番号 2 6)。

【0310】

H I V - 1 E n v - P G 9 I g の可変軽領域 (V L) - (配列番号 2 7)。

【0311】

H I V - 1 E n v - P G 9 I g の定常軽領域 (C L 、ラムダ) - (配列番号 2 8)。

【実施例 1 1】

【0312】

H I V - 1 P G 9 一本鎖 F a b (s c F a b)

上述の H I V - 1 E n v - P G 9 I g に加えて、一本鎖 F a b (すなわち、単一転写産物に転写され、単一ポリペプチドに翻訳される核酸配列によってコードされた V H / C

10

20

30

40

50

H 1 及び V L / C L) を P G 9 抗体 (本明細書では、「 H I V - 1 P G 9 s c F a b 」と呼ぶ) に基づいて作成した。 H I V - 1 P G 9 s c F a b をコードする核酸配列は、配列番号 5 0 及び図 4 6 に記載されている。図 4 6 において、下線及び二重下線は、この核酸配列を p V A X 1 ベクターにクローニングするのに用いた B a m H I (G G A T C C) 及び X h o I (C T C G A G) を示し、太字は、開始 (A T G) 及び終止 (T G A T A A) コドンを示す。配列番号 5 0 に記載の核酸配列は、k o z a k 配列 (G C C A C C) 、コドン最適化、及びリーダー配列を含む最適化核酸配列であった。リーダー配列は、構築物の 5' 末端、すなわち、一本鎖 F a b の前に位置していたため、リンカー配列によってコードされたシグナルペプチドは、一本鎖 F a b のアミノ末端にペプチド結合で結合された。配列番号 5 0 に記載の核酸配列は、V H / C H 1 をコードする核酸配列と、V L / C L をコードする核酸配列との間に位置するリンカー配列も含んでいた。従って、配列番号 5 0 によってコードされるポリペプチドにおいて、アミノ酸配列は、V H / C H 1 及び V L / C L を一緒にするリンカー配列によってコードされた。配列番号 5 0 は、配列番号 5 1 及び図 4 7 に記載のアミノ酸配列、すなわち、H I V - 1 P G 9 s c F a b のアミノ酸配列をコードする。

【実施例 1 2】

【 0 3 1 3 】

H I V - 1 E n v - 4 E 1 0 I g

V R C 0 1 I g G 及び H I V - 1 E n v - P G 9 I g に加えて、H I V - 1 E n v に反応性のある I g G をコードする別の構築物を作成した。この構築物は H I V - 1 E n v - 4 E 1 0 であり、これを最適化し、発現ベクター内でクローニングした (図 1 7 A 及び図 1 7 B)。最適化には、k o z a k 配列 (例えば、G C C A C C) 、リーダー配列の導入及びコドン最適化を含んでいた。H I V - 1 E n v - 4 E 1 0 I g をコードする核酸配列を含む発現ベクターが作成されたことが、図 1 7 C に示すような制限酵素消化によって確認された。図 1 7 C において、レーン 1 は未消化の発現ベクターであり、レーン 2 は B a m H I 及び X h o I で消化された発現ベクターであり、レーン M はマーカーであった。

【 0 3 1 4 】

H I V - 1 E n v - 4 E 1 0 I g をコードする核酸配列は、配列番号 6 2 及び図 6 0 に記載されている。図 6 0 において、下線及び二重下線は、核酸配列を p V A X 1 ベクターにクローニングするのに用いた B a m H I (G G A T C C) 及び X h o I (C T C G A G) 制限酵素部位を示し、太字は、開始 (A T G) 及び終止 (T G A T A A) コドンを示す。配列番号 6 2 は、配列番号 1 及び図 1 9 に記載のアミノ酸配列、すなわち、H I V - 1 E N v - 4 E 1 0 I g (フリンによる切断前) のアミノ酸配列をコードする。

【 0 3 1 5 】

このアミノ酸配列では、シグナルペプチドが、重鎖及び軽鎖の各々にペプチド結合で結合されることで、インビオ生成された抗体の分泌が向上する。また、P 2 A ペプチドをコードする核酸配列は、重鎖及び軽鎖をコードする核酸配列間に位置するので、翻訳されたポリペプチドを、重鎖または軽鎖を含む別々のポリペプチドにより効率的に切断することができる。

【 0 3 1 6 】

特に、H I V - 1 E n v - 4 E 1 0 I g (フリンによる切断前 ; 配列番号 1 及び図 1 9) のアミノ酸配列は、以下の構造を有する : ヒト I g G 重鎖シグナルペプチド、可変重領域 (V H) 、定常重領域 1 (C H 1) 、ヒンジ領域、定常重領域 2 (C H 2) 、定常重領域 3 (C H 3) 、フリン切断部位、G S G リンカー、P 2 A ペプチド、ヒトカッパ軽鎖シグナルペプチド、可変軽領域 (V L) 、及び定常軽領域 (C L 、特にカッパ) である。構造 (その全ては、上述の順序で配列番号 1 内に含まれる) の各部分の配列を以下に示す。

【 0 3 1 7 】

H I V - 1 E n v - 4 E 1 0 I g のヒト I g G 重鎖シグナルペプチド - (配列番号 2 9) 。

10

20

30

40

50

【0318】

HIV-1 Env-4E10 Ig の可変重領域 - (配列番号 30)。

【0319】

HIV-1 Env-4E10 Ig の定常重領域 1 (CH1) - (配列番号 31)。

【0320】

HIV-1 Env-4E10 Ig のヒンジ領域 - (配列番号 32)。

【0321】

HIV-1 Env-4E10 Ig の定常重領域 2 (CH2) - (配列番号 33)。

【0322】

HIV-1 Env-4E10 Ig の定常重領域 3 (CH3) - (配列番号 34)。

10

【0323】

HIV-1 Env-4E10 Ig のフリン切断部位 - (配列番号 35)。

【0324】

HIV-1 Env-4E10 Ig のGSGリンカー及びP2Aペプチド - (配列番号 36)。

【0325】

HIV-1 Env-4E10 Ig のヒトカッパ軽鎖シグナルペプチド - (配列番号 37)。

【0326】

HIV-1 Env-4E10 Ig の可変軽領域 (VL) - (配列番号 38)。

20

【0327】

HIV-1 Env-4E10 Ig の定常軽領域 (CL、カッパ) - (配列番号 39)。

【実施例13】

【0328】

HIV-1 4E10 scFab

上述のHIV-1 Env-PG9 Ig に加えて、一本鎖Fab (すなわち、単一転写産物に転写され、単一ポリペプチドに翻訳される核酸配列によってコードされたVH / C H1 及びVL / CL) を4E10抗体 (本明細書では、「HIV-1 4E10 scFab」と呼ぶ) に基づいて作成した。HIV-1 4E10 scFabをコードする核酸配列は、配列番号52及び図48に記載されている。図48において、下線及び二重下線は、この核酸配列をpVAX1ベクターにクローニングするのに用いたBamHI (GGATCC) 及びXhoI (CTCGAG) を示し、太字は、開始 (ATG) 及び終止 (TGA TAA) コドンを示す。配列番号52に記載の核酸配列は、kozak配列 (GCC ACC) 、コドン最適化、及びリーダー配列を含む最適化核酸配列であった。リーダー配列は、構築物の5'末端、すなわち、一本鎖Fabの前に位置していたため、リンカー配列によってコードされたシグナルペプチドは、一本鎖Fabのアミノ末端にペプチド結合で結合された。配列番号52に記載の核酸配列は、VH / CH1をコードする核酸配列と、VL / CLをコードする核酸配列との間に位置するリンカー配列も含んでいた。従って、配列番号52によってコードされるポリペプチドにおいて、アミノ酸配列は、VH / CH1 及びVL / CLを一緒にするリンカー配列によってコードされた。配列番号52は、配列番号53及び図49に記載のアミノ酸配列、すなわち、HIV-1 4E10 scFabのアミノ酸配列をコードした。

30

【実施例14】

【0329】

CHIKV-Env-Fab

上述したように、HIV-1 Env-Fabの重 (VH - CH1) 鎮及び軽 (VL - CL) 鎮をコードする核酸配列を細胞またはマウスに送達する際に、HIV-1 Envに反応性のあるFabをインビオで組み立てたかもしくは生成した。コード化核酸配列を細胞または対象に送達する際に、他の抗原に反応性のあるFabsをインビオ生成することができるか判定するため、チクングニヤウイルス (CHIKV) のエンベロープタンパク

40

50

質 (Env) に反応性のある抗体の重 (VH - CH1) 鎮及び軽 (VL - CL、ラムダ型) 鎮をコードする構築物を作成した。各構築物は、図20A、図20B、及び図21に示すようにリーダー配列及びkozak配列を含んでいた。VH - CH1及びVL - CLをコードする構築物を発現ベクター内でクローニングしたこと、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター (図21) の制御下に置いた。VH - CH1及びVL - CLをコードする構築物を含む発現ベクターは、それぞれ、CHIKV - H及びCHIKV - Lとして知られている。CHIKV - H及びCHIKV - Lベクターの混合物は、pCHIKV - Env - Fabとして知られており、これは、インビボ (すなわち、細胞または対象内に導入時) 生成されたCHIKV - Env - Fabである。換言すれば、以下により詳細に記載のCHIKV - Env - Fabをインビボ生成するには両方のベクターが必要であった。

【0330】

構築物を発現のために最適化も行った。具体的に、CHIKV - Env - Fabのインビボ生成時にCHIKV - Env - Fabの分泌効率を増大させるため、各構築物にはリーダー配列が含まれた。各構築物をコドン最適化し、kozak配列 (GCCACCC) を含んだ。CHIKV - Env - Fabの重鎖 (VH - CH1) をコードする核酸配列は、配列番号58及び図56に記載されている。図56において、下線及び二重下線は、核酸配列をpVAX1ベクターにクローニングするのに用いたBamHI (GGATCC) 及びXhoI (CTCGAG) 制限酵素部位を示し、太字は、開始 (ATG) 及び終止 (TGAATA) コドンを示す。配列番号58は、配列番号59及び図57に記載のアミノ酸配列、すなわち、CHIKV - Env - Fabの重鎖 (VH - CH1) のアミノ酸配列をコードする。

【0331】

CHIKV - Env - Fabの軽鎖 (VL - CL) をコードする核酸配列は、配列番号60及び図58に記載されている。図58において、下線及び二重下線は、核酸配列をpVAX1ベクターにクローニングするのに用いたBamHI (GGATCC) 及びXhoI (CTCGAG) 制限酵素部位を示し、太字は、開始 (ATG) 及び終止 (TGAATA) コドンを示す。配列番号60は、配列番号61及び図59に記載のアミノ酸配列、すなわち、CHIKV - Env - Fabの軽鎖 (VL - CL) のアミノ酸配列をコードする。

【0332】

CHIKV - Env - Fabのインビボ生成の時間的動態を測定するため、pVAX1、CHIKV - H、CHIKV - L、またはpCHIKV - Env - Fabで細胞をトランスフェクトした。トランスフェクション後、ELISAを用いて、CHIKV - Env - Fabの経時的な生成レベルを測定した。図22に示すように、pVAX1、CHIKV - H、またはCHIKV - Lでトランスフェクトした細胞は、CHIKV Env抗原に反応性のある抗体を産生しなかった。これに対し、pCHIKV - Env - Fabでトランスフェクトした細胞は、CHIKV Env抗原に反応性のある抗体 (すなわち、CHIKV - Env - Fab、CHIKV - Fabとしても知られる) を産生した。従って、CHIKV - Env - Fabの重 (VH - CH1) 鎮及び軽 (VL - CL) 鎮をコードする核酸配列を送達することでCHIKV - Env抗原に結合するかまたは該抗原に反応性のあるFabが生成されたことが、これらのデータにより示された。

【0333】

また、pCHIKV - Envでトランスフェクトした細胞から得た溶解物のウエスタンプロットにCHIKV - Env - Fabを用いた。これは、CHIKV - Env抗原をコードするプラスミドである。図23に示すように、CHIKV - Env抗原がCHIKV - Env - Fabを介して検出され、これは、このFabが抗原に結合したことを示唆するものである。

【0334】

CHIKV - Env - Fabのインビボ生成またはインビボ組み立てをさらに調べるために、pCHIKV - Env - Fab (すなわち、12.5 μgのCHIKV - Hと12.

10

20

30

40

50

5 μ g の C H I K V - L) をマウスに投与した。さらに、25 μ g の p V A X 1、C H I K V - H、及び C H I K V - L を、対照としての第2群、第3群、及び第4群のマウスにそれぞれ投与した。具体的には、事前採血のサンプルを得た後、それぞれのマウス群に0日目にプラスミドを投与した。1日目、2日目、3日目、5日目、7日目、及び10日目に血液を採取した(図24)。これらの血液に E L I S A 測定を行い、C H I K V - E n v 抗原に反応性のある抗体のレベルを測定した。図25に示すように、p C H I K V - E n v - F a b を投与されたマウスは、C H I K V - E n v 抗原に反応性のある抗体(すなわち、C H I K V - E n v - F a b)を生成した。p V A X 1、C H I K V - H、またはC H I K V - L を投与されたマウスは、C H I K V - E n v 抗原に著しい反応性を持つ抗体を生成しなかった。従って、C H I K V - E n v - F a b の重(V H - C H 1)鎖及び軽(V L - C L)鎖をコードする核酸配列の送達時に、このF a b はインビボ(すなわち、マウス内)生成され、その抗原(すなわち、C H I K V - E n v)に反応性のあることがこれらのデータにより実証された。これにより、F a b がインビボで正しく組み立てられたことが実証された。

【0335】

C H I K V - E n v - F a b が C H I K V 感染に対して防御することができるかどうか判断するため、C 5 7 B L / 6 マウス(2~3週齢；約20~25グラム量)に p C H I K V - E n v - F a b (50 μ g) または p V A X 1 を0日目に投与した。p C H I K V - E n v - F a b を投与してから6時間後、各マウスに全容量25 μ l 中の7ログ10P FUを鼻腔内経路により接種した。その後毎日、各マウスの体重を測定し、体重減少30%以上のマウスは犠牲にした。

【0336】

図26に示すように、p C H I K V - E n v - F a b を投与されたマウスのうち約75%が、本研究14日目の時点で C H I K V 感染から生き残ったが、p V A X 1 を投与されたマウスは全て14日目までに死んだ。さらに、p C H I K V - E n v - F a b を投与されたマウスは、p V A X 1 を投与されたマウスと比較して、低レベルのサイトカイン T N F - 及び I L - 6 を伴った(図27及び図28)。T N F - 及び I L - 6 のレベルを、マウスから得た血清で測定した。これらの生き残ったマウスは、病気や体重減少の兆候を示さず、サイトカイン T N F - 及び I L - 6 は低レベルであった。従って、p C H I K V - E n v - F a b の投与により、C H I K V 感染からマウスを防御し、C H I K V 感染からの生存が促進されたことが、これらのデータにより示された。換言すれば、マウス内における C H I K V - E n v - F a b のインビボ生成により、C H I K V 感染に対して防御し、C H I K V 感染からの生存が促進された。

【実施例15】

【0337】

抗 H e r - 2 F a b

上述したように、H I V - 1 E n v F a b または C H I K V E n v - F a b の重(V H - C H 1)鎖及び軽(V L - C L)鎖をコードする核酸配列を細胞またはマウスに送達する際に、H I V - 1 E n v または C H I K V E n v に反応性のある F a b (すなわち、V H / C H 1 及び V L / C L) をインビボ組み立てまたはインビボ生成した。コード化核酸配列を細胞または対象に送達する際に、自己抗原(すなわち、F a b をコードする核酸配列を投与された対象における内因性の抗原)に反応性のある F a b s をインビボ生成することができるか判断するため、ヒト上皮成長増殖因子受容体2(H e r - 2; E r b 2 としても知られる)に反応性のある抗体の重(V H - C H 1)鎖及び軽(V L - C L、カッパ型)鎖をコードする構築物を作成した。各構築物は、リーダー配列及び k o z a k 配列(G C C A C C)を含み、これらは、図28、図30、及び図31示すように抗 H e r - 2 F a b の V H - C H 1 または V L - C L をコードする核酸配列の前に来た。従って、これらの構築物は、リーダー配列及び k o z a k 配列の導入により最適化され、コドン使用にさらに最適化された。

【0338】

10

20

30

40

50

V H - C H 1 及び V L - C L をコードする構築物を p V A X 1 発現ベクター内、すなわち、B a m H I 及び X h o I 制限部位間でクローニングすることで、サイトメガロウイルス (C M V) プロモーターの制御下に置いた。具体的に、V H - C H 1 及び V L - C L をコードする構築物を 2 つの別々の p V A X 1 ベクターにクローニングすることで、得られた 2 つのプラスミドは、抗 H e r - 2 F a b をインビボ生成するのに必要とされた。

【 0 3 3 9 】

抗 H e r - 2 F a b の V H - C H 1 をコードする核酸配列が、配列番号 4 0 及び図 3 2 に記載されている。図 3 2 において、下線及び二重下線は、核酸配列を p V A X 1 ベクターにクローニングするのに用いた B a m H I (G G A T C C) 及び X h o I (C T C G A G) 制限酵素部位を示し、太字は、開始 (A T G) 及び終止 (T G A T A A) コドンを示す。配列番号 4 0 は、配列番号 4 1 に記載のアミノ酸配列、すなわち、抗 H e r - 2 F a b の V H - C H 1 のアミノ酸配列 (図 3 2 及び図 3 3) をコードする。

10

【 0 3 4 0 】

抗 H e r - 2 F a b の V L - C L をコードする核酸配列が、配列番号 4 2 及び図 3 4 に記載されている。図 3 4 において、下線及び二重下線は、核酸配列を p V A X 1 ベクターにクローニングするのに用いた B a m H I (G G A T C C) 及び X h o I (C T C G A G) 制限酵素部位を示し、太字は、開始 (A T G) 及び終止 (T G A T A A) コドンを示す。配列番号 4 2 は、配列番号 4 3 に記載のアミノ酸配列、すなわち、抗 H e r - 2 F a b の V L - C L のアミノ酸配列 (図 3 4 及び図 3 5) をコードする。

20

【 0 3 4 1 】

抗 H e r - 2 F a b の V H - C H 1 及び V L - C L をコードするプラスミドの混合物が抗 H e r - 2 F a b をインビボ生成したかどうか判断するため、抗 H e r - 2 F a b または p V A X 1 の重 (V H - C H 1) 鎖及び軽 (V L 及び C L) 鎖をコードするプラスミドの混合物で 2 9 3 T 細胞をトランスフェクトした。トランスフェクション後、図 3 6 に示すように全 I g G 濃度を測定した。図 3 6 において、エラーバーは標準偏差を表わす。抗 H e r - 2 F a b の V H - C H 1 または V L - C L をそれぞれコードする 2 つのプラスミドを導入した際に、抗 H e r - 2 F a b がインビボ生成されたことが、これらのデータにより示された。

【 実施例 1 6 】

【 0 3 4 2 】

30

抗デングウイルスヒト I g G

単一プラスミド系を作成して、抗デングウイルス (D E N V) ヒト I g G 抗体をインビボ生成した。具体的には、図 3 7 に模式的に示すように構築物を生成した。すなわち、リーダー配列を、 I g G 重鎖 (すなわち、可変重領域 (V H) 、定常重領域 1 (C H 1) 、ヒンジ領域、定常重領域 2 (C H 2) 、及び定常重領域 3 (C H 3)) をコードする核酸配列の上流に位置づけた。次に、プロテアーゼ切断部位をコードする配列を、 I g G 重鎖をコードする核酸配列の下流に位置づけた。 I g G 軽鎖 (すなわち、可変軽領域 (V L) 及び定常軽領域 (C L)) をコードする核酸配列を、プロテアーゼ切断部位 (すなわち、フリン切断部位) をコードする配列の後に置いた。この構築物によってコードされるシグナルペプチドは、同種のシグナルペプチドであるため、発現時に抗体の適切な分泌をもたらした。さらに、発現時に、单一転写産物は単一ポリペプチドに翻訳され、これは、プロテアーゼによって、抗 D E N V ヒト I g G の重鎖及び軽鎖に対応するポリペプチドに処理される。これらの重鎖及び軽鎖ポリペプチドを、その後、機能性抗 D E N V ヒト I g G 、すなわち、その同種抗原に結合する抗体に組み立てる。

40

【 0 3 4 3 】

この構築物を発現ベクター p V A X 1 (すなわち、B a m H I 及び X h o I 部位) にクローニングすることで、プロモーターの制御下に置いた。抗デングウイルスヒト I g G をコードする構築物は、配列番号 4 4 (図 3 8) に記載の核酸配列を持ち、これは、発現用に最適化されている。図 3 8 において、下線及び二重下線は、構築物を p V A X 1 ベクターにクローニングするのに用いた B a m H I (G G A T C C) 及び X h o I (C T C G A G) を示す。

50

A G) 制限酵素部位を示し、太字は、開始 (A T G) 及び終止 (T G A T A A) コドンを示す。最適化には、k o z a k 配列 (G C C A C C) の包含とコドン最適化とが含まれていた。配列番号 4 4 は、配列番号 4 5 及び図 3 9 に記載のアミノ酸配列、すなわち、重鎖及び軽鎖をプロテアーゼによって 2 つの別々のポリペプチドに分離する前の抗 D E N V ヒト I g G のアミノ酸配列をコードする。

【 0 3 4 4 】

抗デングウイルスヒト I g G をコードする核酸配列を含むプラスミドをマウスに投与し、抗デングウイルスヒト I g G がインビボ (すなわち、マウス内) 生成されたかどうか判断した。プラスミドの投与後、マウスから血清を得て、E L I S A によって分析し、4 つのデングウイルス血清型、すなわち、D E N V - 1、D E N V - 2、D E N V - 3、及び D E N V - 4 由来のデング熱 E タンパク質に反応性のある抗体を血清が含んでいたかどうか判定した。図 4 0 に示すように、抗 D E N V ヒト I g G をコードする核酸配列を含むプラスミドを投与されたマウスの血清は、血清型 D E N V - 1、- 2、- 3、及び - 4 由来の D E N V E タンパク質に反応性があった。同形抗体を陽性対照として用いた。従って、プラスミドをマウス内に導入した際に、抗 D E N V ヒト I g G をコードする核酸配列を転写し、ポリペプチドに翻訳され、処理されることで、抗 D E N V ヒト I g G の重鎖及び軽鎖を含むポリペプチドを生成することが、これらのデータにより示された。これらのポリペプチドを抗 D E N V ヒト I g G に組み立てることで、D E N V E タンパク質に結合するかまたは該タンパク質に反応性のある機能性抗体がもたらされた。

単一プラスミドの投与による抗 D E N V ヒト I g G のインビボ生成をさらに調べるため、抗 D E N V ヒト I g G をコードする核酸配列を含むプラスミドをマウスに注射投与した。具体的には、5 0 μ g または 1 0 0 μ g のプラスミドをマウスに投与した。各群はマウス 5 匹であった。注射してから 3 日目及び 6 日目に、マウスの血清反応反転を調べた。図 4 1 に示すように、両群のマウスは、抗 D E N V I g G 抗体に対する血清反応が陽性であった。具体的には、5 0 μ g のプラスミドを投与されたマウスは、約 1 1 0 n g / m L のヒト I g G があり、1 0 0 μ g のプラスミドを投与されたマウスは、約 1 7 0 n g / m L のヒト I g G があった。従って、抗 D E N V ヒト I g G をコードするプラスミドの投与後、抗 D E N V ヒト I g G がインビボ生成されることが、これらのデータによりさらに実証された。また、抗 D E N V ヒト I g G 抗体産生が 1 週間以内に起こったことで、抗 D E N V ヒト I g G を急速に産生できることが、これらのデータにより実証された。

【 実施例 1 7 】

【 0 3 4 5 】

P S M A

ヒト抗 P S M A I g G 1 抗体は、抗 P S M A 抗体の文献検索によって得られた。実施例 2 に記載されたものと同様に、ヒト抗 P S M A I g G 1 は、図 6 3 に示すような直線配置で構築された。発現を改善するために、効率的な I g E リーダー配列 (配列番号 8) を抗 P S M A I g G 1 遺伝子配列に組み込んだ。得られた修飾かつ強化された抗 P S M A I g G 1 配列をコドン - 及び R N A - 最適化し、G e n S c r i p t (P i s c a t a w a y 、 N J) によって p V a x 1 発現ベクターにクローニングした後に、これらの構築物を大規模生産した。抗 P S M A 抗体遺伝子配列番号 7 9 を、B a m H 1 及び X h o 1 制限部位の間に挿入した。配列番号 7 9 は、配列番号 8 0 に記載のアミノ酸配列をコードする。

【 0 3 4 6 】

抗 P S M A 抗体は、単一プラスミド系中で発現した。インビボ発現は、脱フコシル化された抗体 (すなわち、フコース残基が欠如している抗体) をもたらした。これは、ヒト P S M A に結合し、P S M A 発現細胞の抗体指向性細胞傷害性 (A D C C) 殺傷の強化を示した。

【 0 3 4 7 】

インビトロ発現

【 0 3 4 8 】

10

20

30

40

50

5マイクログラムの抗h u P S M A プラスミドを293T細胞中にトランスフェクトした。トランスフェクション後48日目に試料を採取し、結合分析を行った。抗体力価結果を図64に示す。図64の右パネルは、ヤギ抗ヒトIgGに対するヒト抗P S M A IgG上清の結合を比較する。抗体結合の定量化を図65に示す。プロットした棒グラフは、抗P S M A プラスミド(5ug)でトランスフェクトした293T細胞を示し、37及び5%CO₂で一晩インキュベートし、定量化に使用した最終上清をトランスフェクション後48時間で採取した。

【0349】

抗P S M A IgG定量化マウス血清 - N u / J マウス

【0350】

10
5匹のN u / J マウスにヒト抗P S M A 抗体プラスミドを0日目に投与した。抗P S M A DNAプラスミドをC E L L E C T R A エレクトロポレーションデバイス (Inovio Pharmaceuticals, Plymouth Meeting PA) を用いて筋肉内に送達した。血清を種々の時点で回収した - 図66のタイムラインを参照されたい。血清をP B S T + 1% F B S 中で1:100に希釈した。IgGの濃度を図66のグラフに示す。およそ1~5ug / mLの検出可能なヒトIgG1が、免疫不全マウスの血清中で得られた。

【0351】

IgG結合活性は、以下のように確認した：1マイクログラムの組み換えタンパク質をロードし、S D S - P A G E を施した後、図67に示す種々の供給源（市販の供給源、注入マウス、及び組織培養）からの血清でプロットをインキュベーションした。イムノプロットは、抗体の特異性を示す。さらなる結合研究は、產生された抗h u P S M A IgG 1の特異性を明らかにする。抗P S M A 血清(7日目から)のL N C a P 細胞への結合は、フローサイトメトリー分析によって調べた。P S M A 陽性L N C a P 細胞で強い反応性が観察された。試験した血清を分析のために1:4に希釈した。図68を参照されたい。

【0352】

抗P S M A IgG定量化 - マウス血清 - C 5 7 B L / 6 (B 6 . C g - F o x n 1 n u / J) マウス

【0353】

さらに、5匹のC 5 7 B L / 6 ヌード (B 6 . C g - F o x n 1 n u / J) マウスを100μgの抗P S M A DNAプラスミドで筋肉内にて免疫化した後、エレクトロポレーションを行った。図83に示す時点で眼窩後方出血によってマウス血清を採取した。各時点でのIgGの濃度も図83に示す。インビボ抗P S M A 抗体を発現させて、図84に示すように組み換えヒトP S M A に結合させた；示したE L I S A 結果において、抗P S M A 抗体を1:50に希釈した。1~1.5μg / mLの検出可能なヒトIgG1を產生した。

【0354】

抗P S M A IgG定量化 - マウス血清 - 免疫能マウス

【0355】

5匹のC 5 7 B L / 6 マウスを100μgの抗P S M A DNAプラスミドで筋肉内にて免疫化した後、エレクトロポレーションを行った。図85及び図86に示す時点で眼窩後方出血によってマウス血清を採取した。免疫能マウス中のインビボ抗P S M A 抗体は、ヒトIgGの0.5~0.9μg / mLで検出された。具体的には、図85は、マウスごとの抗P S M A 抗体のIgG定量化を示す一方、図86は、抗P S M A 抗体のグループ化したIgG定量化を示す。

【0356】

抗ヒトP S M A IgG1 A D C C 活性の測定

【0357】

抗ヒトP S M A IgG1 A D C C 活性を測定した。免疫化マウス由来の血清の存在下または不在下で、L n C a p 細胞に対する細胞毒性についてエフェクター細胞を試験した

10

20

30

40

50

。図69、図87、及び図88のグラフを参照されたい。LNCaP細胞に対するPSMA血清の生物学的活性は、市販のPSMA抗体よりもはるかに高いADCC活性を示した。抗PSMA抗体の脱フコシル化が、脱フコシル化されなかった市販のPSMA抗体と比較してADCCのトリガーを増加させることが、これらの結果により支持された。

【0358】

また、図95A～95Eは、最適化されたPSMA-dMAbプラスミドがインビトロでハイレベルなIgG産生をもたらすことを示す。図95Aは、PSMA-dMAbと本明細書で呼ばれる抗PSMAモノクローナル抗体をコードする最適化された抗PSMA-IgGプラスミドの設計を示す。図95Bは、定量化ELISAを示し、図95Cは、pVax1-またはPSMA-dMAb-トランスフェクト293T細胞から48時間で回収した上清の1:50希釈の結合ELISAを示す。図95Dは、pVax1またはPSMA-dMAb-トランスフェクト293T細胞からの48時間上清の滴定結合ELISAを示す。図95Eは、PSMA-dMAb-トランスフェクト293T細胞からの上清の1:50希釈でプローブした組み換えPSMA(rPSMA)または無関係な組み換えHIV-Env(rHIV-Env)タンパク質のウエスタンプロット分析が、293T細胞で產生されたPSMA-dMAb-IgGの特異的結合を示すことを示す。

【0359】

また、図96A～96Cは、PSMA-dMAbプラスミドがマウス中でハイレベルなIgG産生をもたらすことを示す。図96Aは、100ugのPSMA-dMAbプラスミドの単回注射を筋肉内に接種した後、EPを行ったC57BL/6ヌード(B6.Cg-Foxn1nu/J)マウスから回収した血清で行った定量化ELISAを示す。1.2ug/mlのピークIgG濃度が、C57BL/6ヌードでは14日目に得られた。図96Bは、組み換えヒトPSMAで試験したマウスから回収した血清の滴定結合ELISAを示す。図96Cは、PSMA-dMAb-接種マウスからの血清の1:50希釈でプローブした組み換えPSMA(rPSMA)または無関係な組み換えHIV-Env(rHIV-Env)タンパク質のウエスタンプロット分析が、マウスで產生されたPSMA-dMAb-IgGの特異的結合を示すことを示す。

【0360】

図97A～97Bは、ヌードマウスで產生されたPSMA-dMAb-IgGが、PSMAを発現する細胞株に結合することを示す。図97Aは、空のpVax1ベクターまたはPSMA-dMAbプラスミドのいずれかを接種したマウスからの14日目の血清の1:50希釈で染色した、PSMAを発現するLNCaP及びTRAMP-C2細胞株のフローサイトメトリー分析を示す。図97Bは、LNCaP及びTRAMP-C2細胞染色の平均蛍光指数(MFI)の定量化を示す。

【0361】

図98は、C57BL/6ヌードマウスで產生されたPSMA-dMAbが、腫瘍組織中のPSMAを染色することを示す。PSMA-dMAb接種マウス由来の血清(14日の血清)によるヒトホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織切片中の膀胱及び腎臓の免疫染色は、各腫瘍組織にわたって均質に分散した強いレベルのPSMA染色を示す。間接的な免疫蛍光分析を使用して、抗体発現を確認した。

【0362】

図99A～99Cは、PSMA-dMAbがLNCaP細胞上のADCCを仲介することを示す。図99Aは、PSMA-dMAbのADCC活性を、ADCCリポーターアッセイを用いて調べたことを示す。このアッセイで利用したエフェクター細胞は、FcR_{IIIA}受容体、V158(高親和性)変異体、及び蛍ルシフェラーゼの発現をもたらすNFKB応答エレメントを安定的に発現する遺伝子改変Jurkat細胞であった。抗体の生物学的活性は、NFKB経路活性化の結果として產生されたルシフェラーゼを介して測定する。標的LNCaP細胞を、遺伝子改変Jurkatエフェクター細胞、及び14日の試料由来の種々の希釈のPSMA-dMAb免疫化マウス血清で6時間インキュベートした後、ルシフェラーゼ活性を定量化した。図99Bは、無抗体の陰性対照と比較し

10

20

30

40

50

て、P S M A - d M A b 免疫化マウス血清により誘発された A D C C 活性の誘導倍率を示す。このデータは、A D C C 活性が無抗体の陰性対照と比較して有意の上昇 (P < 0 . 0 5) したことを実証することによって、P S M A - d M A b の機能プロファイルが強調される。図 9 9 C は、P S M A - d M A b 血清が L N C a P 細胞の細胞死に与える影響を分析するためのフローサイトメトリーを示す。初期アポトーシス (ヒストグラムにおける Q 2 及び Q 3 画分) 及び後期アポトーシス及び壊死 (ヒストグラムにおける Q 2 画分) の統計的に有意な増加が、異なる濃度の血清で処置した p V a x 1 対照細胞と比較して、P S M A - d M A b 血清で処置した L N C a P 細胞で観察された。P S M A - d M A b 抗体と組み合わせた P B M C の添加は、A n n e x i n V / P I 染色 L n C a P 細胞によって評価した場合に、細胞死の有意な誘発をもたらした。

10

【実施例 1 8】

【 0 3 6 3 】

チクングニヤ S N A P i

C H I K V エンベロープ (E n v) タンパク質を標的にする F a b 断片 (C H I K V - F a b) または全長抗体 (C H I K V - I g G) のいずれかをコードする最適化 D N A プラスミドを設計し、比較した。いずれかの S N A P i 構築物をマウスに筋肉内送達することで、それらのコード抗体の急速な産生、並びに C H I K V への早期及び後期暴露からの予防効果が得られた。C H I K V - I g G 免疫化マウス由来の血清も、多数の臨床 C H I K V 分離株をエクスピボで中和できた。特に、C H I K V - I g G による単回免疫化により、従来の抗原誘導性 D N A プラスミドよりも格段に優れた早期のウイルス暴露からの防御、並びに C H I K V への早期及び後期暴露からの同等レベルの防御が実証された。

20

【 0 3 6 4 】

材料及び方法

【 0 3 6 5 】

細胞

【 0 3 6 6 】

上述したように、ヒト胚腎臓 (H E K) 2 9 3 T 細胞及びベロ細胞を、1 0 % ウシ胎児血清 (F B S) 、1 m l 当たり 1 0 0 I U のペニシリン、1 m l 当たり 1 0 0 u g のストレプトマイシン、及び 2 m M L - グルタミンが補充されたダルベッコ改変イーグル培地 (G i b c o - インビトロゲン社) で維持した。

30

【 0 3 6 7 】

C H I K V - F a b 及び C H I K V - I g G の構築。

【 0 3 6 8 】

抗 C H I K V E n v 抗体発現プラスミドを構築するため、抗体の可変重 (V H) 及び可変軽 (V L) 鎖セグメントを、いくつかの修飾をもつ合成オリゴヌクレオチドを使用するこで生成した。F a b 断片または全長抗体をクローニングするため、重鎖及び軽鎖、重鎖及び軽鎖の間の挿入フリン切断部位及び P 2 A 自己プロセシングペプチド部位を含有する單一オープントリーディングフレームを組み立てた。これは、單一オープントリーディングフレームから全長抗体を発現するために組み込んだ。両方のプラスミドで、発現を高めるために、リーダー配列を各遺伝子に組み込んだ。得られた配列をコドン及び R N A 最適化で修飾及び強化し、p V a x 1 発現ベクター中にクローニングし、得られた構築物を本研究用に大規模に产生した (G e n S c r i p t 、ニュージャージー州) 。精製プラスミド D N A に水を配合した後、マウスに投与した。空の対照 p V a x 1 発現ベクターを陰性対照をとして用いた。すなわち、本研究で使用した可変軽 (V L) 及び可変重 (V H) (すなわち、F a b) 鎖または完全免疫グロブリン (I g) の D N A は、N C B I データベースからの配列に基づいて、確立された抗 E n v 特異的 C H I K V 中和ヒトモノクローナル抗体 / ハイブリドーマから生成された。

40

【 0 3 6 9 】

ウエスタンプロット分析による C H I K V F a b または C H I K V - I g G 由来の抗 C H I K V E n v 抗体の発現の測定。

50

【0370】

TurboFection 8.0 トランスフェクション試薬 (Origene 社) を用いて発現分析にヒト 293T 細胞株を利用した。これらの細胞を 35 mm 培養皿中で 50 ~ 70 % のコンフルエンス (2 mL の総培地容積で ウェルあたり 1 ~ 3 × 10⁵ 細胞) で 24 時間播種した。24 時間後、細胞を 10 µg の pVax1 対照ベクター、CHIKV-Fab (5 µg の VH 及び 5 µg の VL DNA) または CHIKV-IgG (100 g) でトランスフェクトした。トランスフェクションしてから 48 時間後に上清を回収し、被覆抗原として CHIKV-Env 組み換えタンパク質を用いて E L I S A 法によって抗 CHIKV 抗体レベルを評価した。pVax1 試料からの上清を陰性対照として用いた。

【0371】

ウエスタンプロット分析は、CHIKV-Fab または CHIKV-IgG によるトランスフェクションによって產生された抗体の特異的結合を確認するために行った。CHIKV エンベロープタンパク質の供給源を生成するため、293T 細胞を、CHIKV-Env を発現する 10 µg の DNA プラスミドでトランスフェクトした。トランスフェクション 2 日後、細胞を溶解させ、12 % SDS-PAGE ゲル上を電気泳動させた。iBlot 2 (ライフテクノロジーズ) を用いてゲルをニトロセルロース膜に転写した。試料をポリアクリルアミドゲル (12 % NuPAGE Novex、インビトロゲン社) 上に分離し、PDF 膜 (インビトロゲン社) に転写した。市販の緩衝液 (Odysssey ブロッキング緩衝液、LiCor Biosciences) を用いて膜をブロックし、マウス中で育てた特異的一次抗体並びに - アクチン (サンタクルーズ) で 4 にて一晩インキュベートした。IRDye 800 及び IRD700 ヤギ抗ウサギまたは抗マウス二次抗体を用いて検出した (LiCor Biosciences)。

【0372】

ウイルス特異的結合アッセイ：免疫蛍光分析。

【0373】

チャンバースライド (ナルジーン・ヌンク、ネーパービル、I11.) に保存培養からベロ細胞 (1 × 10⁴) を播種した。細胞をおおよそ 80 % の密集度に到達するまで成長させた後、感染の多重度 (m.o.i.) 1 で細胞を CHIKV に 2 時間感染させた。37 で 2 時間吸着させた後、ウイルス接種を吸引し、細胞シートを Iscove-10 % FBS 培地で 3 回すすいだ。感染 24 時間後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、冷メタノールで 20 分間室温にて固定した後、空気乾燥させた。CHIKV-Fab を投与されたマウス由来の免疫血清 (1 : 100 希釈物) を加湿チャンバーに 90 分間 37 で添加することで抗体結合を検出した。PBS で 2 回洗浄した後、FITC コンジュゲートヤギ抗ヒト IgG (サンタクルーズバイオテクノロジーズ社) で細胞を 37 にて 60 分間インキュベートした。4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) で室温にて 20 分間さらに核染色した。各インキュベーション工程後に 1 × PBS 洗浄を行った。その後、DAKO を用いて試料をガラススライドに載せ、共焦点顕微鏡 (LSM 710；カール・ツァイス) 下で観察した。Zen ソフトウェア (カール・ツァイス) を用いて得られた画像を分析した。さらに、CHIKV-IgG 免疫化血清の免疫反応を CHIKV-Env ウイルス感染ベロ細胞で偽型化した HIV-1 GFP で試験し、フローサイトメトリーによって結合活性を試験した。

【0374】

E L I S A 法による抗体定量化分析。

【0375】

抗体構築物の発現速度、及びその標的抗原である CHIKV-Env に結合する能力を測定するために、CHIKV-Fab、CHIKV-IgG、または pVax1 を投与したマウス由来の血清で E L I S A アッセイを行った。血清試料をプラスミド注射マウスから種々の時点で回収した。回収した血清試料中の全ヒト Fab の定量化において、96 ウェル高結合ポリスチレンプレート (コーニング) を 1 µg / ウェルのヤギ抗ヒト IgG-Fab 断片抗体 (ベチルラボラトリーズ) で 4 にて一晩被覆した。抗体構築物がその標

10

20

30

40

50

的抗原である C H I K V - E n v タンパク質に結合する能力を測定するため、 E L I S A プレートを組み換え C H I K V - E n v タンパク質で一晩 4 にて被覆した。翌日、プレートを P B S - T (P B S 、 0 . 0 5 % T w e e n 2 0) で洗浄し、 P B S - T 中の 3 % B S A で 1 時間室温にてブロックした。さらに洗浄後、試料を P B S - T 中の 1 % F B S で 1 : 1 0 0 に希釈し、プレートに添加し、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを洗浄し、 H R P コンジュゲートヤギ抗ヒトカッパ軽鎖（ベチルラボラトリーズ）を室温で 1 時間添加した。その後、 B i o t e k E L 3 1 2 e B i o - K i n e t i c s リーダーを用いてプレートを 4 5 0 n m で読み取った。 S I G M A F A S T O P D (シグマアルドリッヂ社) で試料を検出した。定量化において、精製したヒト I g G / カッパ（ベチルラボラトリーズ）を用いて標準曲線を生成した。全ての血清試料を 2 通りで試験した。

10

【 0 3 7 6 】

C H I K V - E n v 偽型產生及び F A C S 分析。

【 0 3 7 7 】

5 μ g の p N L 4 - 3 e n v - G F P (3 8) 及び 1 0 μ g のプラスミドコード C H I K V ウィルスエンベロープを用いて C H I K V - E n v G F P 偽型を產生した。偽型 V S V を產生した。 2 0 % スクロースクッショングリセリンを介して、 S o r v a l l L y n x 4 0 0 超高速遠心分離機（サーモサイエンティフィック）で 2 8 , 0 0 0 r p m で 4 にて 1 . 5 時間超遠心分離濃縮によって偽ウィルスを濃縮した。ペレットを H B S S 中で 4 にて一晩再懸濁した。 p 2 4 E L I S A 分析後、レンチウイルス偽ウイルスを正規化し、同じ数のウイルス粒子を含むようにした。感染 2 4 時間前に、 4 8 ウェルプレート中の 2 . 5 \times 1 0 4 で細胞を播種した。感染 1 8 時間後に細胞を剥がし、 P B S 中の 1 % P F A で 1 0 分間固定し、 0 . 1 % (w / v) サボニン洗浄剤溶液で透過処理した。 p C H I K V - I g G 投与マウス由来の血清と A l e x a 5 9 4 コンジュゲートヤギ抗ヒト I g G 二次抗体（ライフテクノロジーズ）とで C H I K V 感染細胞をインキュベートした。フローサイトメトリー（ B e c t o n - D i c k i n s o n ）で感染を評価し、 F l o w J o ソフトウェアを用いて感染を分析した。

20

【 0 3 7 8 】

マウスへの I g G 投与及び C H I K V 暴露試験。

【 0 3 7 9 】

B 6 . C g - F o x n 1 n u / J (ジャクソン研究所) マウスを F a b 及び全長 I g G 生成、定量化、及び機能特徴付けのために使用した。 p V a x 1 D N A (1 0 0 μ g) 、 C H I K V - F a b D N A (5 0 μ g の V H 及び 5 0 μ g の V L) 、または C H I K V - I g G (1 0 0 μ g) のいずれかを全容量 5 0 μ l でマウスの大腿四頭筋に注射した。 D N A プラスミドの投与後、直ちに最適化 E P 介在送達（ C E L L E C T R A (登録商標) ；イノビオファーマシューティカルズ社）を行った。 E P 送達のパルスパラメータは、 0 . 5 アンペア定電流の 3 パルスで、 1 秒おきで 5 2 ミリ秒の長さであった。

30

【 0 3 8 0 】

C H I K V 暴露試験では、 C H I K V - F a b または C H I K V - I g G または空の対照 p V a x 1 プラスミド (1 0 0 μ g) を全容量 1 0 0 μ l で B A L B / c マウスに筋肉内注射した後、上述のように直ちに O p t - E P 介在送達を行った。 D N A 送達 2 日後、各後足の背側における皮下経路を介して合計で 1 \times 1 0 7 P F U (2 5 μ l) の C H I K V - D e l - 0 3 (J N 5 7 8 2 4 7) (4 1) をマウスに暴露した。デジタルノギスを用いて、足の浮腫（縦横高さ）を 0 から 1 4 d p i まで毎日測定した。暴露後の観察期間 3 週間にわたって生存率及び感染の兆候（すなわち、体重及び嗜眠）についてマウスを毎日監視した。 3 0 % 以上の体重を失った動物を安楽死させ、サイトカイン定量化及び他の免疫分析のために血清試料を回収した。暴露後 7 ~ 1 4 日目に尾部採血から血液試料を回収し、血小板アッセイ (P F U / m l) によってウィルス血症を分析した。 2 つの独立した実験を行った。

40

【 0 3 8 1 】

免疫サイトカイン分析。

50

【0382】

C H I K V - F a b または C H I K V - I g を注射してウイルス暴露したマウスから血清を回収した（暴露後 10 日目）。製造者の指示に従って E L I S A 法を用いて T N F - 、 I L - 1 、 I P - 10 、及び I L - 6 の血清サイトカインレベルを測定した（R & D システムズ社）。

【0383】

C H I K V 中和アッセイ。

【0384】

C H I K V - F a b または C H I K V - I g G を投与したマウスの血清中のウイルス中和抗体力値を決定した。簡単に言えば、96 ウェルプレート（ヌンク社）に 1 ウェル当たり 15,000 個の細胞でベロ細胞（アメリカンタイプカルチャーコレクション）をプレートした。加熱不活性化されたマウス血清の連続 2 倍希釈物を 96 ウェルプレートで 3 通りで調製し、C H I K V ウィルス分離株懸濁液の 100 T C I D 50 を各ウェルに添加した。37 でインキュベーション 1 時間後、試料をベロ細胞単層に添加し、3 日間インキュベートした。その後、ベロ細胞単層を固定し、0.05% クリスタル・バイオレット、20% メタノール（シグマアルドリッヂ社）で染色した。中和力値は、最後の希釈物の逆数を取ることで決定し、ここで、ベロ細胞単層は、完全に無傷なままであり、細胞変性効果の 100% 抑制をなおもたらす血清の最大希釈の逆数として表した。グラフ及び統計は、グラフパッドプリズム 5 ソフトウェアパッケージ（グラフパッドソフトウェア）で生成した。シグモイド用量応答（可変勾配）による非線形回帰フィッティングを用いて、I C 50 を決定した。

10

【0385】

統計分析。

【0386】

スチューデント t 検定またはノンパラメトリックスピアマン相関検定のいずれかを用いた統計分析を、グラフパッドプリズムソフトウェア（プリズム社）を用いて行った。対照群及び実験群における変数間の相関は、スピアマン・ランク相関検定を用いて統計的に評価した。全ての検定において、0.05 未満の p 値は、有意であると見なした。

20

【0387】

結果

30

【0388】

C H I K V モノクローナル抗体の構築物及び機能性

【0389】

C H I K V - F a b 及び全長 I g G 構築物は、発現を増大させるために最適化した。P u b M e d で利用可能な配列（寄託番号）から產生した C H I K V - E n v に特異的な新規の完全ヒト m A b を合成した。図 70 A は、最適化された抗 C H I K V - F a b 及び C H I K V - I g G プラスミドの設計を示す。C H I K V - F a b において、V H 及び V L 遺伝子を次いで、実施例 14 及び 17 に上述のように p V a x 1 プラスミドベクターに別々にクローニングした。

40

【0390】

インビトロで產生した C H I K V - F a b 及び I g G の発現及び機能性を調べるため、ヒト 293 T 細胞を C H I K V - F a b の等量の重鎖及び軽鎖両方のプラスミドまたは C H I K V - I g G のプラスミドでトランスフェクトし、トランスフェクト細胞からの上清をトランスフェクション後 48 時間で回収した。図 70 B で示したように、C H I K V - F a b または C H I K V - I g G プラスミドでトランスフェクトした細胞のみが、組み換え C H I K V エンベロープタンパク質を用いた結合 E L I S A 法によって測定した際に、測定可能なレベルの抗 C H I K V 抗体を產生し、これは、C H I K V - F a b または単一全長 I g G の 2 つのプラスミド設計により、正しく組み立てられかつ機能的な C H I K V 抗体がインビトロで生成できることを示している。

【0391】

50

E P 介在送達後の C H I K V - I g G のインビオ発現速度及び定量化の増大

【 0 3 9 2 】

モノクローナル抗体送達に対するこの新規の D N A 送達アプローチを特徴付けするため、 C H I K V - I g G が機能的な C H I K V 抗体をインビオ産生する能力の効果について次に試験し、上述の全長 I g G 構築物を用いて検証試験を行った。 B 6 . C g - F o x n 1 n u / J マウスには、 I g G プラスミドまたは p V a x 1 ベクターを I M 注射で投与した後、直ちに図 7 0 C に示したように E P を行った。比較の目的のために C H I K V - I g G に加えて、組み換え C H I K V - E n v タンパク質の単回投与でもマウスを免疫化した。全てのマウス由来の血清を示したように実験中の種々の時点で回収し、 C H I K V エンベロープタンパク質に結合している標的抗原を E L I S A 法で測定した。 C H I K V - I g G を投与したマウスは、 C H I K V エンベロープタンパク質に結合することができる抗体を検出可能なレベルで産生し、投与後 1 ~ 3 日目で誘発された。ここで、組み換え C H I K V - E n v 免疫化マウスは、投与後 8 日目までに示し（図 7 0 D ）、従来のタンパク質投与よりも I g G 送達が急速に生成されたことを示す。さらに、マウス中の E P による C H I K V - I g G の単回投与により、血清中で検出可能なヒト C H I K V - A b の急速な生成がもたらされた。 C H I K V - A b の血清レベルは、5 日目までに 6 0 0 ~ 8 0 0 n g / m L に到達し、14 日目に 1 3 0 0 ~ 1 6 0 0 n g / m L でピークに達し、35 日目まで > 8 0 0 n g / m L のレベルを維持した（図 7 0 E ）。インビオ産生された C H I K V - I g G の発現を調べるため、免疫化マウスから産生した抗 C H I K V 抗体の結合特異性は、組み換え C H I K V タンパク質を用いてウエスタンプロット分析によって確認され、 C H I K V - I g G の I g G - プラスミド設計により、正しく切断され組み立てられた機能的な C H I K V - I g G 抗体がインビオ生成できることを示した（図 7 0 F ）。これらの実験は、 D N A を送達した C H I K V - モノクローナル抗体は、インビトロだけでなく動物中でも複数日の期間にわたって安定しているというエビデンスを提供する。

【 0 3 9 3 】

C H I K V 感染細胞の結合特異性及び免疫組織化学の特徴付け

【 0 3 9 4 】

予備研究を拡張し、次に感染を用いて、新規の D N A を送達する抗 C H I K V モノクローナル抗体の治療可能性を特徴付けた。 C H I K V - a b は、 C H I K V - E n v に特異的に結合するが、他のタンパク質には特異的に結合しない。 C H I K V - A b の特異性及び標的結合特性は、 C H I K V 感染細胞を用いた結合 E L I S A 法、 F A C S 分析、及び免疫組織化学によって評価した。検出抗体は、その標的抗原、すなわち、 C H I K V - E n v タンパク質に特異的に結合できるが、組み換え H I V - 1 エンベロープタンパク質には特異的に結合できないことが、 C H I K V - I g G または C H I K V - F a b 抗体を注射した14日目のマウスの試験連続希釈物により実証された（図 7 1 A ）。インビオ産生された抗 C H I K V - I g G 抗体の結合特異性をさらに分析するため、マウス由来の血清を C H I K V ウィルスに感染している固定ベロ細胞でインキュベートした。免疫蛍光イメージングにより、 C H I K V エンベロープタンパク質を発現する細胞上の結合抗 C H I K V - I g G の存在が強調されるが、構築物 p V a x 1 のみのマウス由来のマウス血清では強調されない（図 7 1 B ）。加えて、感染細胞に対してインビオ産生した抗体を F A C S で分析した（図 7 1 C ）。 C H I K V - I g G 投与マウス由来の実験血清試料は、 C H I K V - E n v 標的抗原に結合した。

【 0 3 9 5 】

C H I K V - I g G 注射マウス由来の血清は、臨床 C H I K V 分離株に対する広い中和活性を実証する。

【 0 3 9 6 】

C H I K V - I g G 投与マウスから回収した血清の潜在的な抗 C H I K V 活性を評価するため、多数の C H I K V 分離株、具体的には、 C H I K V 株 R o s s 、 L R 2 0 0 6 - O P Y 1 、 I N D - 6 3 W B 1 、 R o s s 、 P C 0 8 、 B i a n c h i 、及び D R D E - 0 6 に対する中和活性を測定した。ウィルス分離株ごとの I C ₅₀ 値（少なくとも 5 0 % の

10

20

30

40

50

阻害をもたらした血清の最大希釈)を決定した(図72A~72F)。CHIKV-IgG注射マウス由来の血清は、試験した6つ全てのウイルス分離株を効果的に中和し、CHIKV-IgGをコードするDNAの単回注射によりマウス中でヒト抗CHIKV-Igの中和力値を產生したことが実証された。その結果は、CHIKV-IgGの投与から生成された抗体がインビボ送達後に関連性のある生物学的活性を呈することを示す。

【0397】

CHIKV-IgGは、ハイレベルなウイルス特異的抗体活性に著しく寄与し、CHIKV暴露からマウスを防御した。

【0398】

現在のCHIKVワクチンの限界は、恐らくは不十分な免疫原性による持続感染を除去することができないことがある(45)。さらに、従来の予防接種は、遅延期間の要件があり、生産的な免疫応答を高める。ますます多くの研究が、感染の結果を制御する鍵となる要因として、ウイルスへの早期免疫の発症に集中している(5、20)。CHIKV-IgG構築物がCHIKVへの早期暴露から防御をもたらし得るかどうかを決定するため、マウスの群に、CHIKV-IgGまたはCHIKV-Fabプラスミドのいずれかを0日目に注射した後、2日目にウイルスに暴露した。マウスの第3群は、陰性対照として機能するように空のpVax1プラスミドを受けた。生存率及び体重変化を20日間記録した。pVax1プラスミドを注射した全てのマウスは、ウイルス暴露1週間以内に死亡した(図73A)。暴露したマウスでは、暴露後20日間の観察期間中にCHIKV-IgGまたはCHIKV-Fabのいずれかを投与したマウスにおいて100%の生存率が観察された。これは、両方のCHIKV構築物が送達後すぐにCHIKVに対する防御免疫をもたらしたことを示唆している(図73B)。

10

20

30

【0399】

次に、CHIKV-IgG及びCHIKV-Fabが長期にわたる防御免疫をもたらしたかどうかを評価した。CHIKV-IgG、CHIKV-Fab、またはpVax1プラスミドを単回注射した後、マウスの群をCHIKVウイルスに30日間暴露した。その後、20日間にわたってマウスの生存率を監視した。CHIKV-Fabを注射したマウスは、50%の生存率を有したが、CHIKV-IgGを注射したマウスは、暴露後の観察期間中に90%の生存率が観察された。両方のSNAPi戦略構築物は、長期にわたる防御免疫をインビボでもたらし得るが、CHIKV-IgGによりもたらされた防御は、CHIKV-Fab注射($p = 0.0075$)で示されたものよりもより持続的で長期にわたり得ることが、これらの結果により示される(図73C)。

40

【0400】

CHIKVのような蚊媒介性ウイルスは、ヒト(7)に深刻な脳炎を引き起こし得る。CHIKVによるマウスの鼻腔内、皮下、及びフットパッド感染などの異なるモードのウイルス暴露は、感染後6~9日以内に高い死亡率をもたらすことを、種々の群からの先行研究が示している(13、14)。加えて、CHIKVは、種々の度合いの病因をもつマウスに感染させた後6~9日以内に高い死亡率を引き起こす。ウイルス感染に対するCHIKV抗体療法の有効性と鼻腔内及び皮下ウイルス暴露とを比較するために実験を行った。pVax1及びCHIKV-IgGの各々における20匹のマウスは、単回免疫化を受け、各群のマウスの半分には、(25μlのPBS中)CHIKVの鼻腔内投与を介して暴露し、残りのマウスには、2日目にCHIKVを皮下注射して暴露し、CHIKV-IgGの防御効果は、体重減少、後肢衰弱、及び嗜眠を決定することで測定した。両方の免疫化は、皮下(図73D)($p < 0.0024$)または鼻腔内(図73E)($p < 0.0073$)でもたらされ、対照マウスと比べてCHIKV感染から有意な防御をもたらした。皮下暴露を受けたマウスは、鼻腔内暴露に対して平均体重減少が遅延した。我々のデータを一緒にすると、DNAを送達したCHIKV-IgGが、従来のCHIKV暴露並びに粘膜CHIKV暴露に対して防御し得る広い反応性中和抗体応答を生成することが、結果により示される。

【0401】

50

ウイルス暴露時の即時及び持続的な C H I K V 特異的 I g G 特異性の評価

【 0 4 0 2 】

C H I K V - I g G が C H I K V - F a b 構築物と同じように急速であるがより持続的な防御免疫応答をインビポ生成したことを実証した後、 C H I K V - I g G によって生成した防御効果を、全長 C H I K V エンベロープタンパク質(17)を発現する従来の D N A ワクチンプラスミドである C H I K V - E n v プラスミドと比べた。重要なことに、従来のワクチンストラテジーは標的抗原を認識し該抗原に応答する宿主免疫系に依存しているが、 S N A P i 構築物は、宿主免疫応答とは独立した防御免疫をもたらす。この差を考えながら、 S N A P i 構築物が C H I K V への早期暴露から防御液性免疫のより即時な供給源を提供できた。

10

【 0 4 0 3 】

従って、マウスの群に C H I K V - I g G 、 C H I K V - E n v 、または p V a x 1 の単回投与を施した後、プラスミド免疫化の 2 日後に C H I K V に暴露した(図 74 A)。 C H I K V - E n v または p V a x 1 を投与した全てのマウスは、ウイルス暴露の 6 日間以内に死亡したが、 C H I K V - I g G で免疫化したマウスでは、 100% の生存率が観察された(図 74 B)。これは、従来の抗原生成 D N A ワクチンである C H I K V - E n v よりも C H I K V - I g G による投与後に防御免疫がはるかに早くもたらすことを示す。

【 0 4 0 4 】

次いで、 C H I K V - I g G 及び C H I K V - E n v によって生成された抗 C H I K V 応答の持続期間を評価した。 C H I K V - E n v によるロバストな免疫応答の誘導を確実にするよう異なる免疫化レジメンを利用した。したがって、 0 日目に C H I K V - I g G の単回免疫化または 35 日目にウイルス暴露前に C H I K V - E n v (0 日目、 14 日目、及び 28 日目) の多数の免疫化のいずれかをマウスに施した。マウスの第 3 群には、 0 日目に p V a x 1 の単回免疫化、 35 日目にウイルス暴露を受けた(図 74 A、 II 群)。 C H I K V - E n v による複数回のブースト免疫化レジメンを受けたマウスの 100% 生存率を記録し(図 74 C)、これは、同じ D N A ワクチンの単回注射で予め免疫化したマウスの生存率と際立って対照的であった(図 74 B)。これらの所見は、適応免疫応答の速度と一致しており、これには、以下の抗原暴露を発症するのにおよそ 2 週間かかり、防御免疫を生成するのに多数の抗原暴露を要することが多い。

20

【 0 4 0 5 】

さらに、 20 日間の観察期間中に C H I K V - I g G 接種マウスでは 90% の生存率が確認され($p = 0.0005$)(図 74 C)；図は、 43 日までの C H I K V - I g G 免疫化マウスにおける生存率が < 80% であることを示す。しかしながら、プラスミド/ワクチン投与後の早期及び後期の時点でマウス血清中で検出された異なるレベルのヒト I g G が上記の暴露結果にどのような影響を及ぼし得るかについて評価した。抗 C H I K V E n v 特異的ヒト I g G は、 C H I K V - I g G の単回注射の 48 時間以内に検出可能であり、ピークレベルは、注射後 14 日目に測定した(~ 1400 ng / mL)。重要なことは、ヒト I g G は、 2 日目に最初に測定した値を上回るレベルで、注射後 45 日目でも検出可能であった。この防御の低減は、抗 C H I K V I g G の測定血清レベルに対応する(図 74 D)。防御抗体レベルの低減は、抗体の正常なクリアランスによる可能性が高く、 C H I K V - I g G のレベルは、再投与しなければ長い期間の後に防御を下回るレベルに減弱し得ることが示唆される。要するに、 C H I K V - I g G の単回注射により、複数回のブースト免疫化を要する従来のワクチン誘発免疫応答と質及び持続性において同様の防御応答を生成し得ることが、これらの所見により示される。

30

【 0 4 0 6 】

C H I K V - I g G 及び C H I K V - E n v 免疫化後の持続的かつ全身的な抗 C H I K V - E n v 抗体の誘発

40

【 0 4 0 7 】

C H I K V - I g G 及び C H I K V - E n v の両方の防御応答が、 C H I K V - I g G 及び C H I K V - E n v で免疫化したマウスで見られたことを考え、抗体レベルを評価す

50

るためにさらなる支援研究を行った。B A L B / c マウスを、0日目にC H I K V - I g G DNAで免疫化するかまたは0、14、及び21日目にC H I K V - E n v DNAで免疫化した。図74Eは、C H I K V - I g GまたはC H I K V - E n vのいずれかで免疫化したマウスからの示した時点での抗C H I K V I g Gのレベルを示す。重要な差は、抗C H I K VヒトI g Gは、C H I K V - I g G免疫化マウスで測定し、抗C H I K V マウスI g Gは、C H I K V - E n v免疫化マウスで測定したことである。C H I K V - I g G免疫化マウス中のヒトI g Gの早期検出及び急速な増加が、結果により示される。C H I K V - E n vによって誘発されたマウスI g Gの力価は、免疫化2週間以内に同様のピークレベルに到達するが、著しくゆっくりとしたレベルの抗体産生を呈する。

【0408】

10

C H I K Vウイルス負荷及びサイトカインレベルの低下は、対照の感染をもたらす。

【0409】

C H I K Vウイルス負荷及び前炎症性サイトカインのパネルを含む、C H I K V関連疾患の重症度の多数の分子相関物が、先行研究により同定されている。したがって、ウイルス暴露後の早期及び後期時点でのこれらの関連疾患マーカーを抑制するC H I K V - I g Gの能力を評価した。C H I K V - I g GまたはC H I K V - E n vのいずれかで免疫化したマウス由来の血清は、p V a x 1 対照動物と比べて有意に減少したウイルス負荷を示した（それぞれ、p = 0.0244及び0.0221）（図75A）。特に、C H I K V - I g G免疫化マウスは、C H I K V - E n vマウスと同等レベルのウイルス負荷低減を示した。選択した前炎症性サイトカインについても、ウイルス暴露後5日目のC H I K V - I g G免疫化マウス及びC H I K V - E n v免疫化マウスから測定した（T N F - 及びI L - 6）。p V a x 1免疫化動物と比べて、C H I K V - I g G及びC H I K V - E n vは、早期及び後期時点で両方のサイトカインの血清レベルを同様のレベルに劇的に減少させた（図75B及び75C）。C H I K Vウイルス、T N F - 、及びI L - 6の血清レベルは疾患の重症度と相關しているため、C H I K V - I g Gによる単回免疫化により、従来のDNAワクチンに匹敵するレベルでC H I K V関連病変から持続的なレベルの防御をもたらし得ることが、これらの所見により示される。

20

【0410】

C T Lはウイルス感染細胞の排除に重要である場合があり、さらなる分析を行って、ワクチン誘発T細胞応答を評価し、これは、総T細胞応答のかなりの割合から成了ことを示すため、C H I K V - E n v免疫化マウス中のI F N - レベルを試験し、C H I K Vペプチド刺激後に比較的高いバックグラウンドレベルのI F N - 応答を示し、I F N - 産生細胞が全ての免疫化マウスで検出された。図75Dは、C H I K V - I g G、C H I K V - E n v、または両方で予め免疫化したマウスからT細胞応答の測定であった。C H I K V - E n vは、強いT細胞応答を誘発するが、C H I K V - I g Gは誘発しないことが、結果により示される。この別のマルチモーダルの新規アプローチは、ロバストで、即時、かつ持続的な全身性液性及び細胞性免疫を引き起こした。

30

【0411】

C H I K V - F a b 及びC H I K V - I g G試験では、全長I g Gの急速な産生は、投与後最初の48～72時間以内に見られた。産生の速度及びレベルは、早期時点で抗体のF a b 及びI g Gバージョンの間で同様であり、これは、感染性疾患の予防に重要である。両方の形態の抗体モダリティにより、免疫化の2日後の致死的なC H I K V暴露に対してマウスを防御した。しかしながら、ワクチン送達後の後期時点（免疫化の30日後）でマウスを暴露した場合、防御の差は明らかであった：C H I K V - I g Gで免疫化したマウスの90%が生存したが、C H I K V - F a b 免疫化マウスでは50%の生存率を記録した。したがって、両方の抗体構築物は、同一の抗原特異性を有し、及び送達後に急速に発現したが、全長I g Gは、F a b 構築物よりも長い半減期が実証され、これは、防御免疫を維持するのに重要であることが判明した。

40

【0412】

C H I K V - E n vと呼ばれる、C H I K V感染用のDNAベースワクチンが以前に生

50

成されている。米国特許公開第 2011 / 0104198 号を参照されたい。CHIKV-IgG または CHIKV-Env のいずれかの単回用量をマウスに注射し、2 日後にウイルスで暴露した場合、CHIKV-IgG 注射群の全てのマウスが生存し、これは、マウスが感染から 1 匹も生存しなかった CHIKV-Env 群と全く対照的である。しかしながら、完全免疫化レジメン（3 週間の期間にわたって 3 回接種）後に、CHIKV-Env による完全防御が観察された。特に、同様レベルの防御は、単回用量の CHIKV-IgG を投与したマウスで見られたが、この防御は、長期間にわたって 75% 生存率に減少した。これらの所見は、各プラットフォームの利点を実証しており、組み合わせアプローチが即時かつ持続的な防御に必要な場合があることを示唆する。DNA ベースワクチンは、抗ベクター免疫を干渉または生成しないため、組み合わせアプローチに対して理想的なプラットフォームを提供する。CHIKV 及び他の病原体に対して急速かつ長続きする免疫をもたらす手段としての SNAPi プラスミド及び従来の DNA ワクチンの順次送達または共送達は、現在、我々の研究所での活発な調査領域である。

【実施例 19】

【0413】

DNA プラスミド介在抗体遺伝子伝達を用いた、DENV に対する交差反応性の中和抗体の血流への送達

Fc R 結合を無効にする Fc 領域突然変異をもつ、抗 DENV ヒト IgG1 mAb をコードする DNA プラスミドの筋肉内送達は、ウイルスのみの DENV 感染、及び抗体強化致死感染の両方からマウスを防御する。

【0414】

DENV1-3 を中和する能力をもつヒト IgG1 mAb である抗 DENV 抗体 DV87.1 の重鎖及び軽鎖をコードする高最適化 DNA プラスミドを設計し、構築した。2 つの最適化プラスミド： DV87.1 の重鎖及び軽鎖をコードする pDVSF-3 WT と、CH2 領域における 2 つのロイシンをアラニン (LALA) に突然変異させることで Fc R 結合を無効にした Fc 領域修飾バージョンの DV87.1 をコードする pDVSF-3 LALA とを構築した。これは、抗体依存性感染増強を排除するために行った。構築物中の重鎖及び軽鎖遺伝子は、フリン切断部位及び P2A 自己プロセシングペプチドによって分離した。各導入遺伝子を遺伝子的に最適化し、合成し、修飾 pVax1 哺乳類発現ベクターにサブクローニングした（図 76a）。

【0415】

プラスミドをヒト胎児腎臓（HEK）293T 細胞中にトランスフェクトし、上清の分泌抗体レベルを酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）によって 48 時間後に定量化した（図 76b）。両方の pDVSF-3 WT 及び pDVSF-3 LALA は、600 ng / mL のヒト IgG をもたらし、プラスミドがヒト IgG を発現することができ、LALA 突然変異が抗体発現レベルにインピトロで効果を有さないことが確認された。適切な抗体アセンブリを確認するため、DVSF-3 及び DVSF-3 LALA 抗体をトランスフェクト HEK293T 細胞の上清から回収し、ウエスタンプロット分析の SDS-PAGE ゲルによって分離した（図 76c）。重鎖及び軽鎖タンパク質は、それらの期待分子量であり、適切なタンパク質切断及び抗体アセンブリを示した。

【0416】

抗体の生物学的活性を評価するため、抗体含有上清が組み換え DENV1-3 E タンパク質に結合できるかどうかを測定する結合 ELISA アッセイを最初に行った。DVSF-3 WT または DVSF-3 LALA 抗体のいずれかを分泌した HEK293T 細胞の上清は、DENV1-3 E タンパク質を認識することができたが、DENV4 は、予想通り認識できなかった（図 79）。さらに、DVSF-3 WT 及び DVSF-3 LALA を含有する上清は、DENV1-3 に感染したベロ細胞を染色することができたが、DENV4 に感染したベロ細胞は、上清によって染色されなかった（図 76d）。各構築物は、DENV1-3 のインピトロ中和を示し（データ不図示）、DVSF-3 WT は、Fc R 搾持ヒト K562 細胞の DENV 感染を増強したが、DVSF-3 LALA

10

20

30

40

50

Aは、そのようなA D E活性をインビトロで有さなかった(図7 9 b)。

【0 4 1 7】

抗体産生速度をインビトロで調査するために、ヌードマウス中のDNAプラスミドコードヒトIgG発現の持続期間(これは、免疫適合宿主における抗体発現をモデリングする)を決定した。マウスに、別のヒトIgG1抗DENV抗体をコードするDNAプラスミドであるDVSF-1 WTを100 μg筋肉内注射した後、直ちにEPを行った。血清中のヒトIgG濃度は、注射後5日以内に検出可能であり、そのピークレベルは、注射後2週間で約1000 ng/mLであった(図2a、左パネル)。ヒトIgG発現の持続期間は、少なくとも19週間続いたため(図77a、右パネル)、DNAプラスミドで達成可能な持続的な発現レベルを示した。マウスDENV暴露モデルが、129/Svバックグラウンドからのマウスを用いたことを考えると、抗体コードDNAプラスミド構築物を試験して、このバックグラウンド株における血清検出可能レベルのDVSF-3 WTまたはLALAの産生を決定した。pDVSF-3 WTまたはpDVSF-3 LALAのいずれかを受けた129/Svマウス由来の血清は、同等のヒトIgGレベルを示し(図77b)、DENV1-3に感染したベロ細胞を染色した(図77c)。さらに、WT及びLALAの両方を含有する血清は、DENV1-3を中和することができた(図77d)。

10

【0 4 1 8】

DNAプラスミドコード抗DENV中和mAbsを発現するマウスがDENV暴露から防御されたかどうかを評価するため、AG129マウスモデルを用いた。このマウスモデルは、I型及びII型インターフェロン(IFN)受容体を欠いており、DENV感染時に、ヒト疾患の多くの態様を繰り返す。重要なことは、これらのマウスは、ADEを呈することを示し、低用量の血清型特異的及び交差反応性の抗体が両方とも感染を増強させた。これらの試験では、マウスをマウス適合DENV2株S221に感染させ、これは、サブ中和量の抗DENVmAb 2H2の存在下で、亜致死量でのAG129マウスにおいて、抗体増強された深刻な疾患及び急性致死性(感染4~6日後)を引き起こす。

20

【0 4 1 9】

pDVSF-3 LALAを発現するAG129マウスがウイルスのみの感染及び抗体依存性感染増強(ADE)に対して防御されたかどうかを評価するため、AG129マウスにpDVSF-3 WTまたはpDVSF-3 LALAを単回筋肉内注射した後、直ちにEPを行った。陰性対照は、pVax1空ベクターの単回筋肉内注射を受けた後、EPを行った。5日後、外因性抗DENVmAb 2H2の存在下(ADE)または不在下(ウイルスのみ感染)でマウスを亜致死量(1×10^9 GE)のDENV2 S221に暴露させた。pDVSF-3 WT、pDVSF-3 LALA、及びpVax1コホート中のマウスは、暴露1日前にそれぞれ、750 ng/mL、1139 ng/mL、及び検出不能なレベルの平均ヒトIgG濃度を有した(補足の図2; pDVSF-3 WTとpDVSF-3 LALAの間の比較についてp = 0.0930)。ウイルスのみの感染条件下では、DENVとDVSF-3 WT抗体によって形成された免疫複合体は、感染の増大¹⁴をもたらさなければならないため、pDVSF-3 WT処置マウスは、ADE及び急性致死性を示すと考えられる。反対に、pVax1-及びpDVSF-3 LALA処置マウスは、深刻な疾患から防御されると考えられる。実際、pDVSF-3 LALA処置マウス6匹のうちの5匹と、5匹全てpVax1マウスは、深刻な疾患から防御され；全てのpDVSF-3 WT処置マウスは、5日までに疾患で死亡し(図78a; pDVSF-3 LALAとpDVSF-3 WTの間の比較についてp = 0.0084)、ウイルスのみの感染に対するpDVSF-3 LALAの防御能力が実証された。ADE条件下では、pDVSF-3 WT処置マウス及びpVax1処置マウスの両方は、増強感染による急性致死性を受けると考えられるが、pDVSF-3 LALA処置マウスは、深刻な疾患から防御されなければならない。pDVSF-3 LALAを受けた5匹のマウスは全てADE条件下で生存したが、pDVSF-3 WTまたはpVax1空ベクターのいずれかを受けたマウスは、4~5日以内に急性の抗体感染増強疾患で死亡した(図78b; pDVSF-3 LALAとpDVSF-3 WTの間の比較についてp = 0.00

30

40

50

72)。まとめると、pDVSF-3 LALAの注射により、ウイルスのみ及びADEの両方の条件下で深刻な疾患に対して防御したことが、これらのデータにより示され、このプラットフォームから機能的抗体を正確に処理し、発現する筋肉の概念が支持される。

【0420】

修飾ヒト抗DENV1-3中和抗体をコードするDNAプラスミドの単回筋肉内注射により、ウイルスのみの疾患及び抗体増強DENV疾患に対してマウスを防御することができた。SNAPiによって発現された抗DENVmAbを中和することによりもたらされた防御は非常に急速であり、pDVSF-3 LALA投与後1週間未満で暴露したマウスでは完全な生存率が得られる。さらに、プラスミドコード抗体送達は、送達後5日以内に防御をもたらし、これは、ワクチンによって誘起された防御よりも著しくより急速である。

10

【0421】

DNAプラスミドが保護Fc領域修飾LALA抗体をコードする能力は、DENV予防接種または自然感染時に我々の免疫系ではADE予防抗体変異体を產生することができないために新規である。

【0422】

多価のDENVワクチン

【0423】

DENV血清型は、中和を逃れる¹⁵ことが示されていることを考えると、1つの戦略は、予防のためのDENVウイルス粒子上の多数のエピトープを標的にする抗体カクテルを設計することである。129/Svマウスの一方の足にpDVSF-3 WT(抗DENV1-3)を注射し、他方の足にpDVSF-1 WT(抗DENV1-4)を注射した。両方のプラスミドを注射したマウスは、単一プラスミドを受けたマウスと比べて7日目に著しく高い血清ヒト抗体レベルを有した(図81; pDVSF-1 WTとpDVSF-1+3の間の比較についてp=0.0088; pDVSF-3 WTとpDVSF-1+3の間の比較についてp=0.0240)。さらに、両方のプラスミドを注射したマウス由来の血清により、4つ全てのDENV血清型に感染したベロ細胞を染色した(データ不図示)。

20

【実施例20】

【0424】

30

抗PSMA抗体による腫瘍暴露

DNAプラスミドから発現された実施例17の抗PSMA抗体を腫瘍暴露研究で調べた。具体的には、3つの群のC57BL/6マウスには、 1×10^6 個のTRAMP-C2細胞/マウスを皮下に接種した。各群には10匹のマウスがいた。腫瘍移植後5日目に、対照群は、100 μ gのpVax1プラスミドで免疫化し、1つの実験群は、100 μ gの抗PSMA DNAプラスミドで免疫化した。第2の実験群は、腫瘍移植後7日目に、100 μ gの抗PSMA DNAプラスミドで免疫化した。図89は、群ごとの腫瘍移植及び免疫化のそれぞれのタイムラインを示す概略図を示す。腫瘍は、図89に示す時点で週1回測定した。

40

【0425】

pVax1免疫化群中の全てのマウスが腫瘍を発症した(10/10, 100%; 図90)。抗PSMAの5日目に免疫化した群のマウスの半分が腫瘍を発症した(5/10, 50%; 図91)。抗PSMAの7日目に免疫化した群のマウスの約1/3が腫瘍を発症した(3/10, 30%; 図92)。

【0426】

さらなる分析を行って、マウスの各それぞれの群の平均腫瘍容積を決定した。この分析により、pVax1プラスミドで免疫化した群と比較して、抗PSMA DNAプラスミドで免疫化した両方の群における腫瘍サイズの減少が実証された。図93及び図94を参照されたい。図93は、3つの群からのマウス及びそれぞれの腫瘍の画像を示す。pVax1免疫化群と抗PSMAの7日目に免疫化された群の間には、統計的に異なる腫瘍サイ

50

ズが観察された ($p = 0.0184$ 、図 94)。

【 0 4 2 7 】

抗 P S M A 抗体を発現させた D N A プラスミドの投与が腫瘍容積を減少させたことが、これらの結果により示された。この観察は、空 D N A プラスミド p V a x 1 がレシピエントマウス中の腫瘍容積を減少させなかつたため、抗 P S M A 抗体を発現する D N A プラスミドに依存した。要するに、脱フコシル化され、A D C C 活性の増加を呈した、抗 P S M A 抗体をコードする D N A の送達は、この抗体の発現をもたらし、この D N A を受けたマウス中の腫瘍容積を減少させた。

【 0 4 2 8 】

また、図 1 0 0 A ~ 1 0 0 D は、P S M A - d M A b が、T R A M P - C 2 腫瘍暴露マウスモデル中の抗腫瘍免疫を誘発することを示す。図 1 0 0 A は、C 5 7 B L / 6 マウスへの腫瘍投与、及び p V a x 1 または P S M A - d M A b プラスミド投与のスキームを示す。マウスは、右脇腹の皮下に 1×10^6 個の T R A M P - C 2 細胞を受け、一週間後に、1 0 0 μ g のプラスミドをマウスに筋肉内接種し、その後に E P を行った。図 1 0 0 B は、腫瘍投与後に最大 1 0 週目までキャリバーで週 1 回測定した腫瘍容積を示す。P S M A - d M A b プラスミドを接種したマウスは、腫瘍成長の遅延を呈した。図 1 0 0 C は、腫瘍投与後 5 0 日目の p V a x 1 及び P S M A - d M A b 群からの腫瘍をもつ代表的なマウスを示す。図 1 0 0 D は、P S M A - d M A b 投与前の抗 N K 1 . 1 I g G の単回注射による N K 細胞の枯渇が、P S M A - d M A b が腫瘍致死に与える保護効果を無効にしたことを示す。

10

【 0 4 2 9 】

上記の詳細な説明及び付随する実施例は、単に例示的なものであり、付随した特許請求の範囲及びそれらの等価物によってのみ定義された、本発明の範囲の制限と見られるべきではないと理解すべきである。

20

【 0 4 3 0 】

開示された実施形態に対する種々の変化及び改変は、当業者に明らかになるであろう。化学構造、置換、誘導体、中間体、合成物、組成物、製剤、または本発明の使用の方法に関するものを限定されるものではないが含む、そのような変化及び改変は、この精神及び範囲から離れないで実施し得る。

【 0 4 3 1 】

30

条項 1。対象内での合成抗体の生成方法であつて、抗体またはその断片をコードする組み換え核酸配列を含む組成物を前記対象に投与することを含み、前記組み換え核酸配列は、前記対象内で発現されて前記合成抗体を生成する、前記方法。

【 0 4 3 2 】

条項 2。前記抗体が、重鎖ポリペプチドまたはその断片、及び軽鎖ポリペプチドまたはその断片を含む、条項 1 に記載の方法。

【 0 4 3 3 】

条項 3。前記重鎖ポリペプチドまたはその断片が、第 1 の核酸配列によってコードされ、かつ、前記軽鎖ポリペプチドまたはその断片が第 2 の核酸配列によってコードされる、条項 2 に記載の方法。

40

【 0 4 3 4 】

条項 4。前記組み換え核酸配列が、前記第 1 の核酸配列及び前記第 2 の核酸配列を含む、条項 3 に記載の方法。

【 0 4 3 5 】

条項 5。前記組み換え核酸配列が、前記第 1 の核酸配列及び前記第 2 の核酸配列を单一転写産物として前記対象内で発現するプロモーターをさらに含む、条項 4 に記載の方法。

【 0 4 3 6 】

条項 6。前記プロモーターが、サイトメガロウイルス (C M V) プロモーターである、条項 5 に記載の方法。

【 0 4 3 7 】

50

条項 7。前記組み換え核酸配列が、プロテアーゼ切断部位をコードする第3の核酸配列をさらに含み、前記第3の核酸配列が、前記第1の核酸配列と前記第2の核酸配列との間に位置する、条項5に記載の方法。

【0438】

条項8。前記対象のプロテアーゼが、前記プロテアーゼ切断部位を認識し、切断する、条項7に記載の方法。

【0439】

条項9。前記組み換え核酸配列が、前記対象内で発現されて抗体ポリペプチド配列を生成し、前記抗体ポリペプチド配列が、前記重鎖ポリペプチドまたはその断片、前記プロテアーゼ切断部位、及び前記軽鎖ポリペプチドまたはその断片を含み、前記対象によって產生されたプロテアーゼが、前記抗体ポリペプチド配列のプロテアーゼ切断部位を認識し、切断することで、開裂重鎖ポリペプチド及び開裂軽鎖ポリペプチドを生成し、前記合成抗体が、該開裂重鎖ポリペプチド及び該開裂軽鎖ポリペプチドによって生成される、条項8に記載の方法。

10

【0440】

条項10。前記組み換え核酸配列が、第1の転写産物として前記第1の核酸配列を発現する第1のプロモーターと、第2の転写産物として前記第2の核酸配列を発現する第2のプロモーターとを含み、前記第1の転写産物が、第1のポリペプチドに翻訳され、前記第2の転写産物が第2のポリペプチドに翻訳され、前記合成抗体が、前記第1及び第2のポリペプチドによって生成される、条項4に記載の方法。

20

【0441】

条項11。前記第1のプロモーターと前記第2のプロモーターが、同一である、条項10に記載の方法。

【0442】

条項12。前記プロモーターが、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターである、条項11に記載の方法。

【0443】

条項13。前記重鎖ポリペプチドが、可変重領域及び定常重領域1を含む、条項2に記載の方法。

30

【0444】

条項14。前記重鎖ポリペプチドが、可変重領域、定常重領域1、ヒンジ領域、定常重領域2、及び定常重領域3を含む、条項2に記載の方法。

【0445】

条項15。前記軽鎖ポリペプチドが、可変軽領域及び定常軽領域を含む、条項2に記載の方法。

【0446】

条項16。前記組み換え核酸配列が、Kozak配列をさらに含む、条項1に記載の方法。

【0447】

条項17。前記組み換え核酸配列が、免疫グロブリン(Ig)シグナルペプチドをさらに含む、条項1に記載の方法。

40

【0448】

条項18。前記Igシグナルペプチドが、IgEまたはIgGシグナルペプチドを含む、条項17に記載の方法。

【0449】

条項19。前記組み換え核酸配列が、配列番号1、2、5、41、43、45、46、47、48、49、51、53、55、57、59、61、及び80の少なくとも1つのアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む、条項1に記載の方法。

【0450】

条項20。前記組み換え核酸配列が、配列番号3、4、6、7、40、42、44、5

50

0、52、54、56、58、60、62、63、及び79の少なくとも1つの核酸配列を含む、条項1に記載の方法。

【0451】

条項21。対象内での合成抗体の生成方法であって、重鎖ポリペプチドまたはその断片をコードする第1の組み換え核酸配列及び軽鎖ポリペプチドまたはその断片をコードする第2の組み換え核酸配列を含む組成物を前記対象に投与することを含み、前記第1の組み換え核酸配列が、前記対象内で発現されて第1のポリペプチドを生成し、前記第2の組み換え核酸配列が、前記対象内で発現されて第2のポリペプチドを生成し、前記合成抗体が、前記第1及び第2のポリペプチドによって生成される、前記方法。

【0452】

条項22。前記第1の組み換え核酸配列が、前記第1のポリペプチドを前記対象内で発現する第1のプロモーターをさらに含み、前記第2の組み換え核酸配列が、前記第2のポリペプチドを前記対象内で発現する第2のプロモーターをさらに含む、条項21に記載の方法。

【0453】

条項23。前記第1のプロモーターと第2のプロモーターが、同一である、条項22に記載の方法。

【0454】

条項24。前記プロモーターが、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターである、条項23に記載の方法。

【0455】

条項25。前記重鎖ポリペプチドが、可変重領域及び定常重領域1を含む、条項21に記載の方法。

【0456】

条項26。前記重鎖ポリペプチドが、可変重領域、定常重領域1、ヒンジ領域、定常重領域2、及び定常重領域3を含む、条項21に記載の方法。

【0457】

条項27。前記軽鎖ポリペプチドが、可変軽領域及び定常軽領域を含む、条項21に記載の方法。

【0458】

条項28。前記第1の組み換え核酸配列及び前記第2の組み換え核酸配列が、Kozak配列をさらに含む、条項21に記載の方法。

【0459】

条項29。前記第1の組み換え核酸配列及び前記第2の組み換え核酸配列が、免疫グロブリン(Ig)シグナルペプチドをさらに含む、条項21に記載の方法。

【0460】

条項30。前記Igシグナルペプチドが、IgEまたはIgGシグナルペプチドを含む、条項29に記載の方法。

【0461】

条項31。対象内の疾患の予防または治療方法であって、条項1または21に記載の方法によって対象内での合成抗体を生成することを含む、前記方法。

【0462】

条項32。前記合成抗体が、外来抗原に特異的である、条項31に記載の方法。

【0463】

条項33。前記外来抗原が、ウイルス由来である、条項32に記載の方法。

【0464】

条項34。前記ウイルスが、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、チクングニヤウイルス(CHIKV)、またはデングウイルスである、条項33に記載の方法。

【0465】

条項35。前記ウイルスが、HIVである、条項34に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0466】

条項36。前記組み換え核酸配列が、配列番号1、2、5、46、47、48、49、51、53、55、及び57の少なくとも1つのアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む、条項35に記載の方法。

【0467】

条項37。前記組み換え核酸配列が、配列番号3、4、6、7、50、52、55、56、62、及び63の少なくとも1つの核酸配列を含む、条項35に記載の方法。

【0468】

条項38。前記ウイルスが、CHIKVである、条項34に記載の方法。

【0469】

条項39。前記組み換え核酸配列が、配列番号59及び61の少なくとも1つのアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む、条項38に記載の方法。

10

【0470】

条項40。前記組み換え核酸配列が、配列番号58及び60の少なくとも1つの核酸配列を含む、条項38に記載の方法。

【0471】

条項41。前記ウイルスが、デングウイルスである、条項34に記載の方法。

【0472】

条項42。前記組み換え核酸配列が、配列番号45、70、74、または78の少なくとも1つのアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む、条項41に記載の方法。

20

【0473】

条項43。前記組み換え核酸配列が、配列番号44、69、73、または77の少なくとも1つの核酸配列を含む、条項41に記載の方法。

【0474】

条項44。前記合成抗体が、自己抗原に特異的である、条項31に記載の方法。

【0475】

条項45。前記自己抗原が、Her2である、条項44に記載の方法。

【0476】

条項46。前記組み換え核酸配列が、配列番号41及び43の少なくとも1つのアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む、条項45に記載の方法。

30

【0477】

条項47。前記組み換え核酸配列が、配列番号40及び42の少なくとも1つの核酸配列を含む、条項45に記載の方法。

【0478】

条項48。前記自己抗原が、PSMAである、条項44に記載の方法。

【0479】

条項49。前記組み換え核酸配列が、配列番号80の少なくとも1つのアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む、条項48に記載の方法。

【0480】

条項50。前記組み換え核酸配列が、配列番号79の少なくとも1つの核酸配列を含む、条項48に記載の方法。

40

【0481】

条項51。2つのロイシンからアラニン突然変異をFc領域のCH2領域に導入する、条項2に記載の方法。

【0482】

条項52。インビオ產生された抗体が、脱フコシル化される、条項2に記載の方法。

【0483】

条項53。条項1～52の方法のいずれか1つによって產生された生成物。

【0484】

条項54。前記生成物が、機能的抗体を発現することができる单一DNAプラスミドで

50

ある、条項 5 3 に記載の生成物。

【 0 4 8 5 】

条項 5 5。前記生成物が、インビオで組み合わせて、機能的な抗体を形成する、機能的な抗体の成分を発現することができる 2 つ以上の異なる D N A プラスミドからなる、条項 5 3 に記載の生成物。

【 0 4 8 6 】

条項 5 6。病原体による感染からの対象の治療方法であって、前記病原体に特異的な合成抗体をコードするヌクレオチド配列を投与することを含む、前記方法。

【 0 4 8 7 】

条項 5 7。前記対象内に免疫応答を生成するために、前記病原体の抗体を投与することをさらに含む、条項 5 6 に記載の方法。

10

【 0 4 8 8 】

条項 5 8。癌からの対象の治療方法であって、A D C C を誘発するために、癌マーカーをコードするヌクレオチド配列を投与することを含む、前記方法。

【 0 4 8 9 】

条項 5 9。配列番号 7 9 に記載の核酸配列の全長にわたって少なくとも約 9 5 % の同一性を有する核酸配列を含む合成抗体をコードする核酸分子。

【 0 4 9 0 】

条項 6 0。配列番号 7 9 に記載の核酸配列を含む合成抗体をコードする核酸分子。

【 0 4 9 1 】

条項 6 1。配列番号 8 0 に記載のアミノ酸配列の全長にわたって少なくとも約 9 5 % の同一性を有するタンパク質をコードする核酸配列を含む合成抗体をコードする核酸分子。

20

【 0 4 9 2 】

条項 6 2。配列番号 8 0 に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列を含む合成抗体をコードする核酸分子。

【 0 4 9 3 】

条項 6 3。前記核酸分子が、発現ベクターを含む、条項 5 9 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【 0 4 9 4 】

条項 6 4。条項 5 9 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む組成物。

30

【 0 4 9 5 】

条項 6 5。薬学的に許容しうる賦形剤をさらに含む、条項 6 4 に記載の組成物。

40

50

【四面】

【 図 1 】

図 1

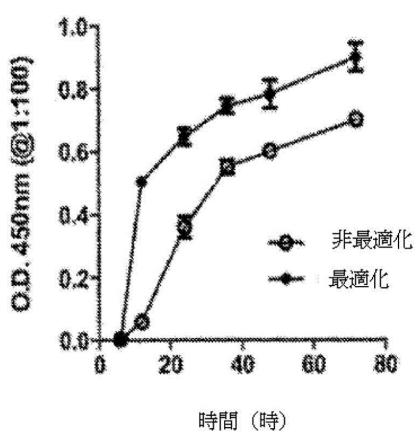
leg 重複をコードする最適な核酸配列
GGCTGCGCCGACATGGAAACATCTGGCTGCGGAGCTGGTGCCTGCTGCGGGTCAACAGGGTCAACGGCG
GCTCAGGGTCCAGCTGGACAGCTGGAGCTGTGATCAAGACCCCTGAGCTCCCTGATCAAGCAGGAGCTGGTCA
GCTTACAACCTCCGGGAACTATAGATCACTACCTGGCTGGCGTGAATCTCTGATAAGGGATTGTTGACTGGATC
GCGCAATGGGGTGGCTTACAGGAGCTGGCTGGGGCTTACAGGAGCTGGAGCTGGGGTGGCTTACAGGAGCTGG
AGAACATCCGGGAACTATAGATCACTACCTGGCTGGCGTGAATCTCTGATAAGGGATTGTTGACTGGATC
CGGAGAGGACTCTGGCAACTACTGGGGACTCTGGGGACTCTGGGGACTCTGGGGACTCTGGGGACTCTGGGG
CATCAAGGAAAGTAACTTCCCGAGGCTGGACCTGGTGAATCTGGGGACTCTGGGGACTCTGGGGACTCTGGGG
TCCCGGTGCTGCTGGAGCTGGTGAATCTGGGGACTCTGGGGACTCTGGGGACTCTGGGGACTCTGGGGACTCTGGGG
CATATACTGGCAACGTCATCATAGGCAACGAGTAACTAATAGGAGACAGAAAGTCAACCCAAATCATGTTACCC
ATAGGAGCTGCTTATGATGATCAAGGCAACGAGTAACTAATAGGAGACAGAAAGTCAACCCAAATCATGTTACCC
(配列番号6)

【図2】

図 2

〔 3 〕

図 3

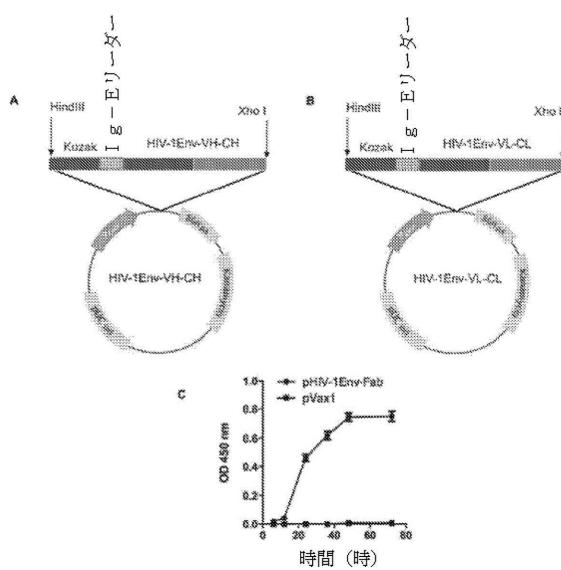


〔 4 〕

FIG. 4

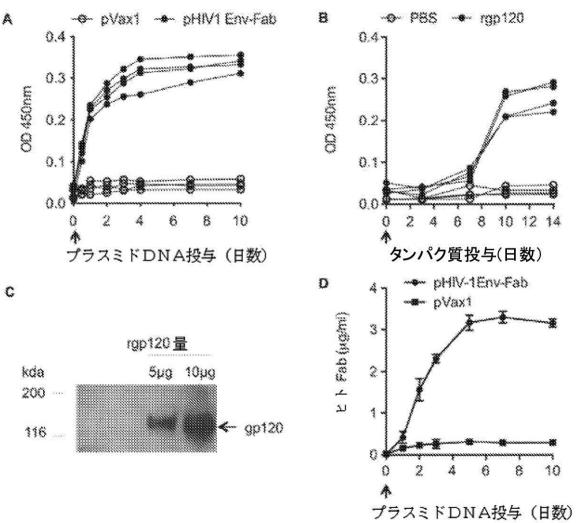
【図 5】

図 5



【図 6】

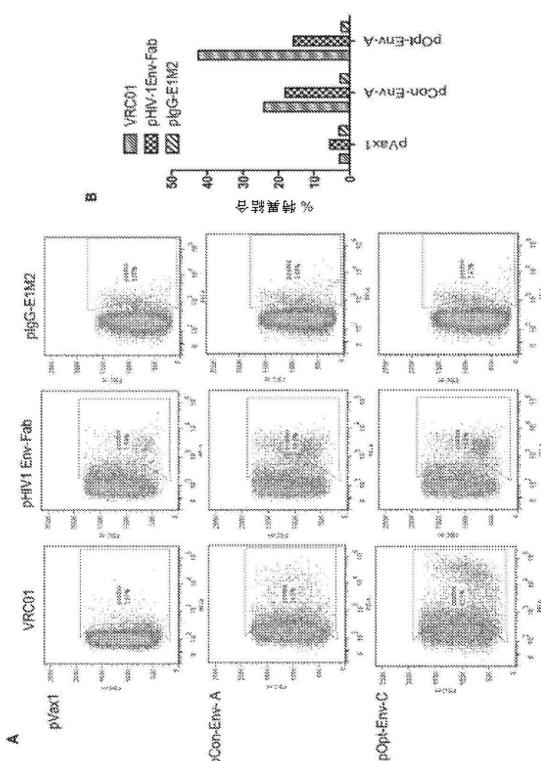
図 6



10

【図 7】

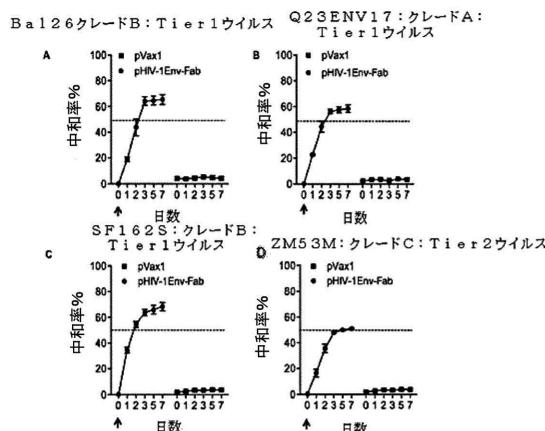
図 7



20

【図 8】

図 8



30

40

50

【図 9】

図 9

HIV-1 Env Fabの重鎖 (VH-CH1) をコードする核酸配列
 AAGCTTGCGCCACCATGGAGACTGATAACACTGCTGCTGGTCTGCTGCTGCTGG
 GTGCCAGGGTCAACCGGAGATGGGGCTCAGGTCCAAGCTGCTGCTGAGCGGGGAC
 GATGAAGAACCCGGCAGAGCATGAGGATCTCCTGAGAGCATCTGGATACGAGT
 TCATCGACTGACCTGACTGGATAGGCTGCTCTGGAAAGAGACAGAGATGG
 ATGGGGTGGCTGAAACCACGAGGGGGAGCAGTGAATTACGCCGGCCCTGAGGG
 ACCAGTGACCATGACCAAGGGACGTGACAGCGATAACCGCCTTCTGGAGCTGGGT
 CCTGACAGTGGACGATACTGCTGCTACTCTGACACCGGAAAGAACCTGACT
 ATAATTGGGATTTGAACACTGGGGCGGGGAACACCGTGTGCTAGCTCCCCA
 GTACTAAGGGACCTCACTGGCCACTGGCCCCTAGTAATCCACCTCTGGAG
 GGACAGCGCTCTGGATCCCTGGTAAAGATTATTCGGCAACCTGTGACCGTCA
 GTTGGACTAGGGCTCTGACTCTGGCTGACACCTTCTGGAGCTGGCAGT
 CAAGCGGGCTGACAGTCTCTCTGGTCACTGTGCTAGTTCAAGGCTGGCA
 CTAGACCTATATTGTAACGTGAATCATAGGCACTCAATACAAAAGTGGACAAA
 AAAGCCGAACCCAAATCTGTTACCCCTATGATGTGCCGACTACGCCGACTCGAG
 (配列番号3)

【図 10】

図 10

HIV-1 Env Fabの軽鎖 (VL-CL)
 AAGCTTGCGCCACCATGGAAACCGATAACACTGCTGCTGGTCTGCTGCTGG
 GTGCCAGGAAGTACCGGGGATGGGGCTCAGGTCCAAGATITGCTGACTCAGTCCC
 GGGACCTGCTCTGAGTCCAGCGAGACAGCTATCTTCATGCCGAACTAGCCAG
 TACGGCAGCCTGGCTTGGTATCAGCAGCGACAGGACAGGACACACGACTGGTCA
 TACTCAGCAGCACAGGGCGCTGGCATCCGACAGGTTCTCGGCGACAGG
 GGGGGCTGATTACAACCTGACTATCTCTAACTCTGGAGGTGGGACTTGGGT
 ACTATGCCAGCAGTGAAGTTCTGGCCAGGGAACTAAGGTGAGGTGGACATC
 AAAAGAACCGTGGCAGCCCACCGTCTCTATTTTCCCCCTGTATGAGCAGCTG
 AAGTCAGGACACGGACTCCAAAGGATTACATATAGCTGAGCAGCACCTGAC
 GACCGAACAGGACTCCAAAGGATTACATATAGCTGAGCAGCACACATCAGGG
 GTAAAGCAGATTACGAGAACGACAAAGTGTATGCTGTGAAGTCAACACATCAGGG
 CTGAGGAGGCCGTGACTAAAGTTCAACCGAGGAGGTGCTACCCCTATGATGT
 CCCGACTACGCCCTAACTCGAG (配列番号4)

10

【図 11】

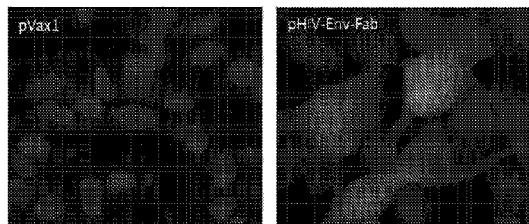
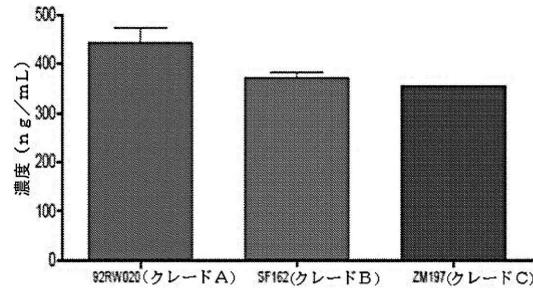


FIG. 11

【図 12】

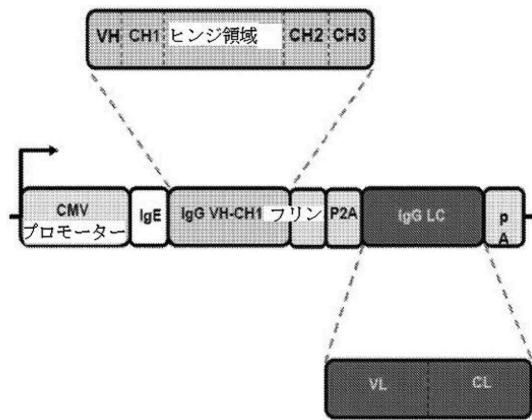
図 12



20

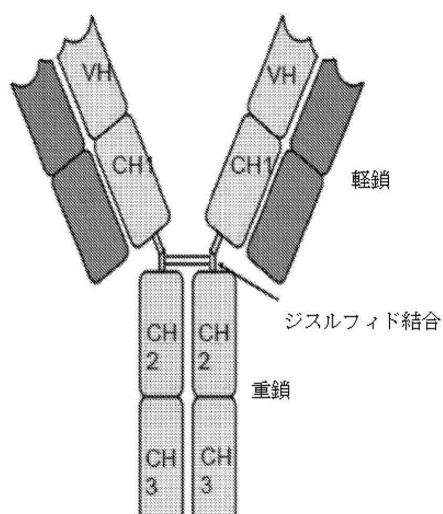
【図 13】

図 13



【図 14】

図 14



30

40

50

【図 15】

図 15

VRC01 IgG

MDWTWILFLVAAATRVHSQVQLVQSGGQMKKPGESMRISCRASGYEFIDCTLNWIRLA
 PGKRPPEWMGWLKPREGAVNYARPLQGRVTMTRDVYSDTAFLERSLTVDDTAVYFCT
 RGKNCDYNWDFEIHWRGRTPVIVSSPSTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYPPE
 PVTWSWNSGALTSGVHTEPAVLQSSGLYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
 KKAEPKSCPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPETCVVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTKISAKGQQREPQVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSPDIAVEWES
 NGQPENNYKTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQNVFSCSVMEALHNHYTQKSL
 SLSPGKRGKRKRRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMDWTVILFLVAAATRVHSEIVLTQ
 SPTGLSLSPGETAJIISCRTSQYGS LAWYQQRPGQAPRLIVYSGSTRAAGIPDRFSGSRWGP
 DYNLTISNLESQDFGVVYCCQYEFFGQGTKVQVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
 VVCLNNFYPREAKVQWQKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEH
 KVYACEVTHQGLRSPVTKSFNRGEC (配列番号5)

【図 16 A】

図 16 A



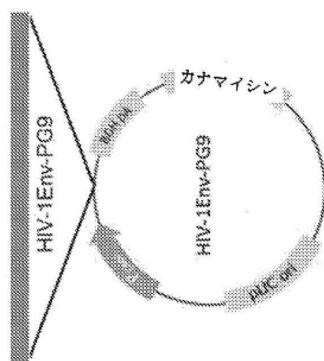
10

20

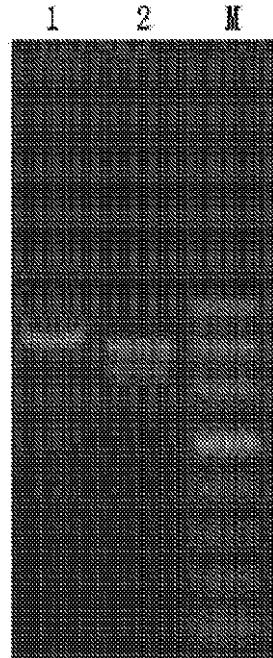
30

【図 16 B】

図 16 B



【図 16 C】



40

FIG. 16C

50

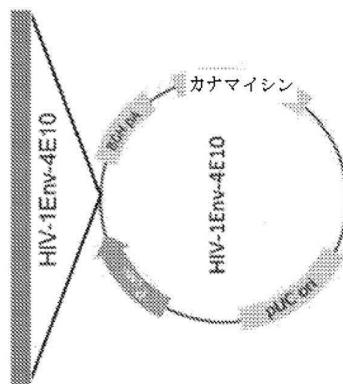
【図 17A】

図 17A



【図 17B】

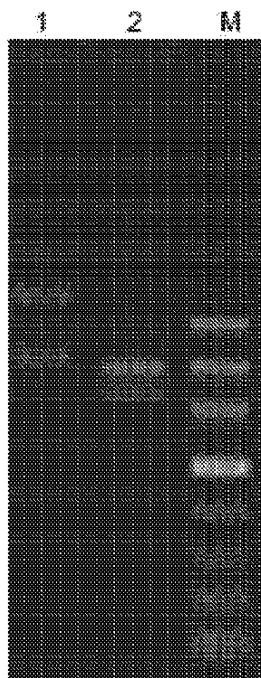
図 17B



10

20

【図 17C】



【図 18】

図 18

HIV-1 Env-PG9 IgGのアミノ酸配列(プロテアーゼ開裂前)
MDWTWRLFLVAAATGTHAEFGLSWVFLVAFLRGVQCQRLVESGGGVVQPGSSLRLSC
AASGPDFSRQGMHWVRQAPGQGLEWVAFIKYHADSVWGRSLISRDNSQLTL
YLQMNSSLRVEDTATYFCVREAGGPDYRNGNNYDFYDGYYNNYHYMDVWKGKTTVT
VSSASTKGPSVPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYLSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPCEAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDILMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWVYDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISAKGQPREGVYTLPS
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVPLSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFCSVMHEALIINHYTQKSLSLSPGKGRKRRSGSGATNFSLLKQAGD
VEENPGPMAWTPFLFLITCPGGNSNSQALITQPAVSGSPGQSITISCGNTISNDVGGYE
SVSWYQQHPGKAPKVVIYDVSKRPSGVSNRFSGSKGNTASLTISGLQAEDEGDYYCKS
LTSTRRRVFGTGTKLTVLGQPKAAPSVLFPSSSEELQANKATLVCCLISDFYPGAVTVAW
KADSSPVKAGVETTPSKQSNKKYAASSYLSLPEQWKSHKSYSQVTHEGSTVEKTV
APTECS (並列番号2)

30

40

FIG. 17C

50

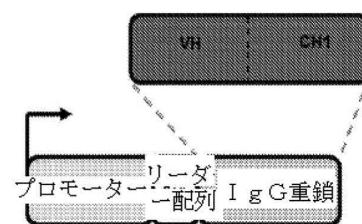
【図 19】

図 19

HIV-1 Env-4E10 Igのアミノ酸配列(プロテアーゼ開裂前)
MDWTWRLFLVAAATGTHAQVQLVQSGAEVKRPGSSVTVSCKASGGFSTYALSWVR
QAPGRGLEWMGGVPLPLITNYAPRFGRITITADRSSTAYLELNSLRPDTAVYYCAR
EGTTGKGWLKGPIGAFAHWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPVEKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGKGRKRKRGSGATNSLLKQAGDVEENPGMVLQTQVFISLLWISGAYGEIVL
TQSPGTQSLSPGERATLSCRASQSVGNNKLAWYQORPGQAPRLLIYGASSRPSGVADRF
SGSGSGTDFTLTISRLPEDFAVYCCQYQQSLSTFGQGKTVEKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKGSTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFRNGE(配列番号1)

【図 20 A】

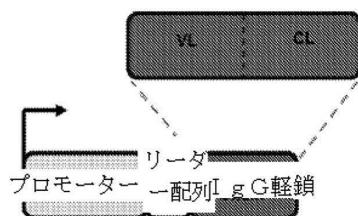
図 20 A



10

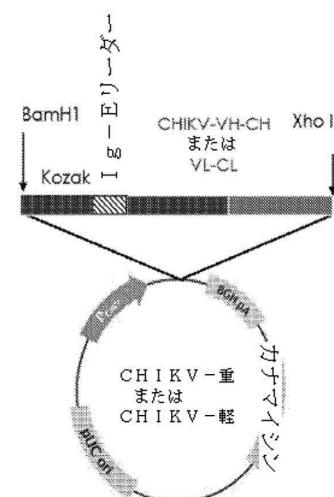
【図 20 B】

図 20 B



【図 21】

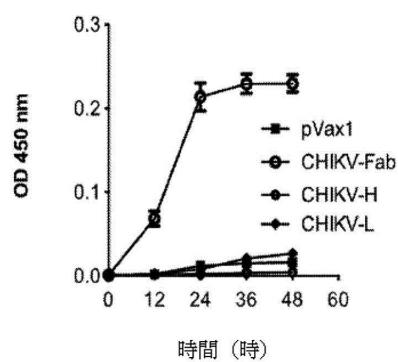
図 21



20

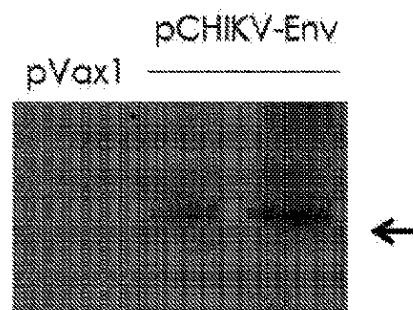
【図 22】

図 22



【図 23】

図 23



30

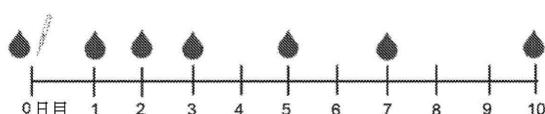
40

FIG. 23

50

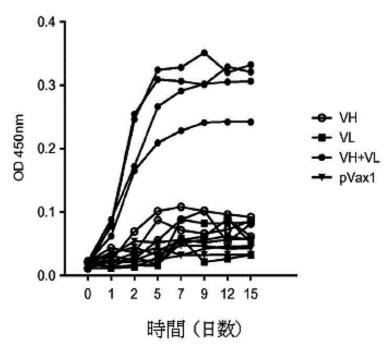
【図 2 4】

図 2 4



【図 2 5】

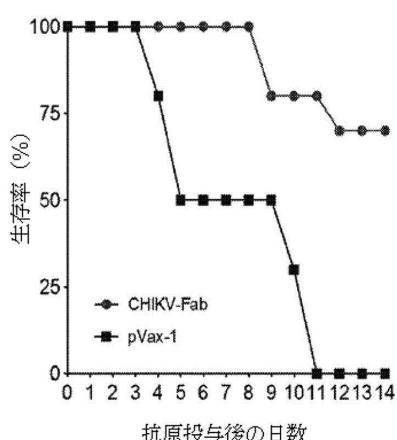
図 2 5



10

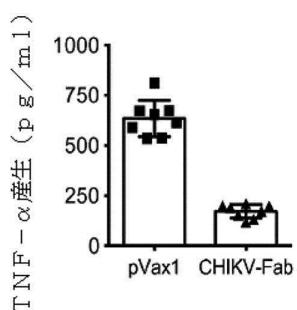
【図 2 6】

図 2 6



20

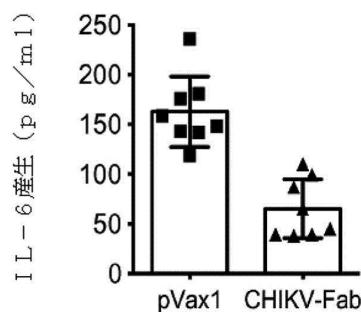
図 2 7



30

【図 2 8】

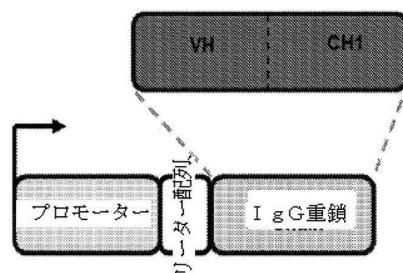
図 2 8



40

【図 2 9】

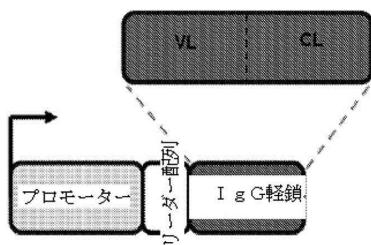
図 2 9



50

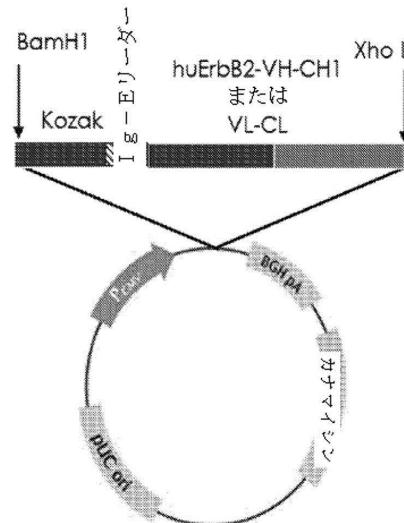
【図30】

図 3 0



【図31】

図 3-1



【図32】

FIG. 32

【図33】

アヒル-Her-2-abのVH-CH1のアミノ配列
MIDWTLWFLFVATRHYSEQLVQPGSLRLSACASGHTFDYMTDWYRQAFGKLEWWADVNPNSSGIVN
ORFQKFLGFTSYLDRSKNTYLOMNLNSRAIDTAVYARNLGPSPYFDWQGQTLTVTSSASTKGPSPVFLPLASPSKTSGGTA
ALCGVQKLYDPTVPEPTVWSNGALTSGVHTFPAVQLSGGYLSLSVYTPSSSLGTQTYCINCNHKSNTKVKDVKVPEKSC
（参考文献）41）

FIG. 33

【図34】

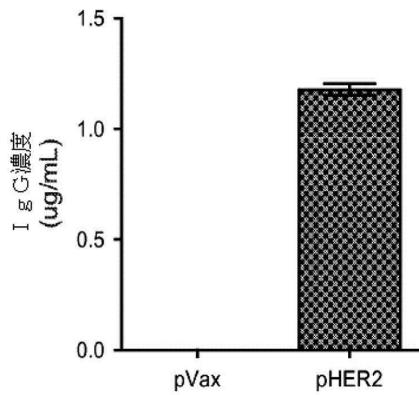
図 3-4

【図35】

図35

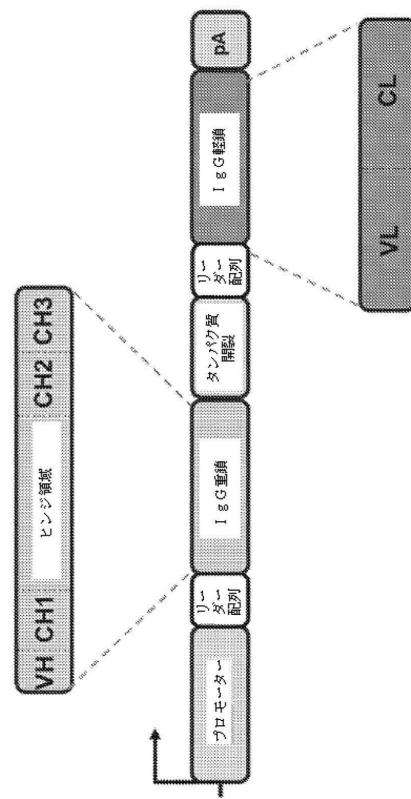
【図36】

図36



【図37】

図37



【図38】

【 図 3 9 】

図39 おひな祭り用の花束の構成

花束の構成は、花材と緑材の割合によって3種類に分類される。

1. おひな祭り用花束 (A) おひな祭り用花束は、おひな様の髪飾りや衣装を表現する花材と緑材を主に構成する。花材には、主に春の花であるツバキやヒナゲシなどが使われる。緑材には、モモの葉やスイカの葉などが使われる。

2. おひな祭り用花束 (B) おひな祭り用花束は、おひな様の髪飾りや衣装を表現する花材と緑材を主に構成する。花材には、主に春の花であるツバキやヒナゲシなどが使われる。緑材には、モモの葉やスイカの葉などが使われる。

3. おひな祭り用花束 (C) おひな祭り用花束は、おひな様の髪飾りや衣装を表現する花材と緑材を主に構成する。花材には、主に春の花であるツバキやヒナゲシなどが使われる。緑材には、モモの葉やスイカの葉などが使われる。

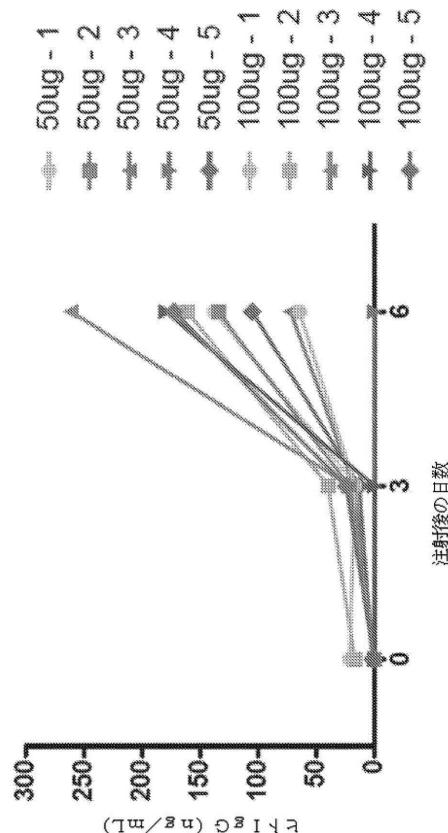
【図40】

Figure 4-0 is a line graph showing the Optical Density (OD) at 450 nm (Y-axis, ranging from 0.12 to 0.17) versus DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4 (X-axis). The graph displays four data series, each represented by a vertical bar with an error bar. The legend indicates two types of antibodies: '抗DENV1-4金屈' (Antibody to DENV1-4 Gold Spike) represented by a solid circle (●), and 'アイソタイプト金対照' (Isotype Control Gold Spike) represented by an open square (□). The data points are as follows:

Antibody Type	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
抗DENV1-4金屈 (●)	~0.165	~0.165	~0.165	~0.165
アイソタイプト金対照 (□)	~0.145	~0.145	~0.145	~0.145

The Y-axis is labeled 'OD 450' and the X-axis is labeled 'DENV-1 DENV-2 DENV-3 DENV-4'. A label 'Eタンパク質' (E protein) is located at the bottom right of the graph area.

【 図 4-1 】



【図42】

図42

HIV-1 Env Fabの重鎖(VH-CH1)のアミノ酸配列
METDTLLWVLLWPGSTGDAQVQLVQSGAVIQLPSSVYKPRGG
AVNYAIPLOQRVMTMRDVYSSDTAFLERSLTVDTAVYFCTRGNKCDYNNDFEWGRGTPVIVSSPSTKGPSPVPLAPSX
STSGTAAALGCLVKDIFPEPDVTVWSNSGALTSGVHTPAVLOSSGLYSSVTVFSSSLGTQTYCIVNHPSPNTVKDKKA
EPKSCYPYDVPDYA (配列番号48)

IgG重鎖
METDTLLWVLLWPGSTGDAQVQLVQSGAVIQLPSSVYKPRGG
SYAROLOGRVSMTIQLSODPDPDVGAYMFGTIPADTAEFCYRGSODYCDDFWOYWCOTTVVSSASTKPS
VFPPLAPSSKTSGGTAALGCLVKDIFPEPDVTVWSNSGALTSGVHTPAVLOSSGLYSSVTVFSSSLGTQTYCIVNHPSP
NTKVDKKEPKSCYPYDVPDYA (配列番号46)

【図43】

図43

HIV-1 Env Fabの軽鎖(VL-CL)のアミノ酸配列
METDTLLWVLLWPGSTGDAQVQLVQSGAVIQLPSSVYKPRGG
RPGSRWGPDPYNTISNLQSGNSQESVTEQDSKDTSYLSSTL
VOWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDTSYLSSTL
HIV-1 Env Fabの軽鎖(VL-CL)のアミノ酸配列
METDTLLWVLLWPGSTGDAQVQLVQSGAVIQLPSSVYKPRGG
RPGSRWGPDPYNTISNLQSGNSQESVTEQDSKDTSYLSSTL
VOWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDTSYLSSTL

10

【図44】

図44

HIV-1 Env Fabの重鎖(VH-CH1)のアミノ酸配列
METDTLLWVLLWPGSTGDAQVQLVQSGAVIQLPSSVYKPRGG
AVNYAIPLOQRVMTMRDVYSSDTAFLERSLTVDTAVYFCTRGNKCDYNNDFEWGRGTPVIVSSPSTKGPSPVPLAPSX
STSGTAAALGCLVKDIFPEPDVTVWSNSGALTSGVHTPAVLOSSGLYSSVTVFSSSLGTQTYCIVNHPSPNTVKDKKA
EPKSCYPYDVPDYA (配列番号48)

IgG重鎖
METDTLLWVLLWPGSTGDAQVQLVQSGAVIQLPSSVYKPRGG
SYAROLOGRVSMTIQLSODPDPDVGAYMFGTIPADTAEFCYRGSODYCDDFWOYWCOTTVVSSASTKPS
VFPPLAPSSKTSGGTAALGCLVKDIFPEPDVTVWSNSGALTSGVHTPAVLOSSGLYSSVTVFSSSLGTQTYCIVNHPSP
NTKVDKKEPKSCYPYDVPDYA (配列番号46)

【図45】

図45

HIV-1 Env Fabの軽鎖(VL-CL)のアミノ酸配列
METDTLLWVLLWPGSTGDAQVQLVQSGAVIQLPSSVYKPRGG
RPGSRWGPDPYNTISNLQSGNSQESVTEQDSKDTSYLSSTL
VOWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDTSYLSSTL
HIV-1 Env Fabの軽鎖(VL-CL)のアミノ酸配列
METDTLLWVLLWPGSTGDAQVQLVQSGAVIQLPSSVYKPRGG
RPGSRWGPDPYNTISNLQSGNSQESVTEQDSKDTSYLSSTL
VOWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDTSYLSSTL

30

40

50

【図46】

図4.6

【 図 4 8 】

図 4-8

【 図 4 7 】

13

【 図 4 9 】

図 4.9

40

30

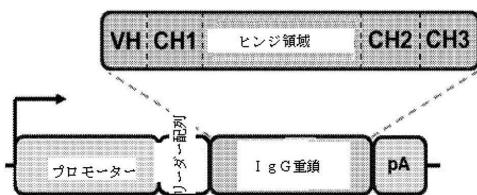
10

20

50

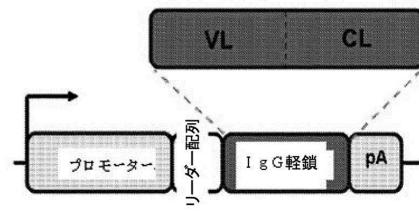
【図 5 0】

図 5 0



【図 5 1】

図 5 1



【図 5 2】

図 5 2

HIV-1 VRC01 IgG1重鎖 (VH/CH1/ヘンジ/CH2/CH3) をコードする塩基配列

GGATCCGCCACATGGATTGACATGGATTCCTGCTGGATGCCGCAACTATAGTCATTCACAGGTGAGCTGG
ACCTGACCCCAACTCGATGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
CTGGAAATTCAGCCAGACCCATGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
ACACATGGGCAAGTCACTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
TAGTAAAGTACTCTAGAGGACACCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
TGGAACTCAGGGCAAGGGGAACTCTAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
TCCTGGTGTACAGGGCAAGGGGAACTCTAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
AGTGGACAGAAAGCCGAGCTAAAGCTGGGAACTGGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
CTCCGAACCTGGGGCCCATCCGGGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
TGAGTCACCTGGTGTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
ATGTCATAATGCAAGACAAACCCGGGGAGGAAACAGTACAACCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
GCACTGGGACTGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
AACTCCAGGAAAGCCAGGAAAGCCAGGAAAGCCAGGAAAGCCAGGAAAGCCAGGAAAGCCAGGAAAGCCAGGAAAG
CAGGCTCTCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
GAGAACAAATTCAAGAACCCACACGGGAAAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
AAAGCCGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG
CTCTGAGCTGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAG (配列番号54)

【図 5 3】

図 5 3

HIV-1 VRC01 IgG1重鎖 (VH/CH1/CH2/CH3) のアミノ酸配列

MDWTWLFELVAATRVHSQYQVQVQSGGOMKPGESMRISCRASYEFIDCILWVRLAPGKRPFWWIGWLKPRGGAVNYA
RPLQGRVIMTRDVSIDTAFLELSLTDDAVYICITRKQKNDYWNDFEHWGKQTPVIVSSPKPSVPLPSKSTSGIT
AALGCLVKDFFEPYTVSWINSGALITSCGVHTPPVQSSGLYSLSVVTPISSGLYVHKEPSNTKVKAEPSNS
PKSCDKTHICPPEPAPELLGQPSVFLPPKPKDULMISERTEPVTCVWDVNSHEPEVKNWYDVEVHNAKTKPRPEEGYNS
TYRAVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKQREQVYTLPSRDELTKNQSLTCLVKGFYPSDAVE
WESNCQPPENNYKTPVLDSDGFLYSKLTVDSRWQGQNVFSCSVMEALHNHYTOSLSLSPK (配列番号55)

【図5-4】

図 5 4

【図56】

図 5 6

【図55】

図 5-5

【図57】

图 5

HIV-1 VR C01 1 g 組織 (VL/C) ⑦ 〔醣配列〕
MDTWLILWVAAATRMSIEVLTQSPTLISLSPGETAISCRTSQYSLAWYQRPQGAPRLVYSGSTRAQIPDRESGSRW
GPDYQNLISSESDGIVYQCYEERFQYQVDRIFVYAAPIVSPDPEOLKQASVCLLQVYQVYRQVWQKVVD
NATLQGNSNSVETDGTSTVSTSTTSTT SKADYVYKHYA, FEVTHVY, JPSVTP SENPDRG (醣配列番号は57)

【図58】

図 5.8

【図59】

图 5

【図60】

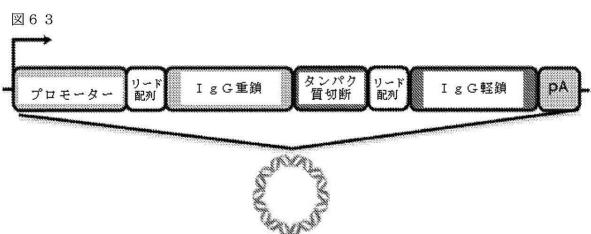
図 6 0

【図61】

【図62】

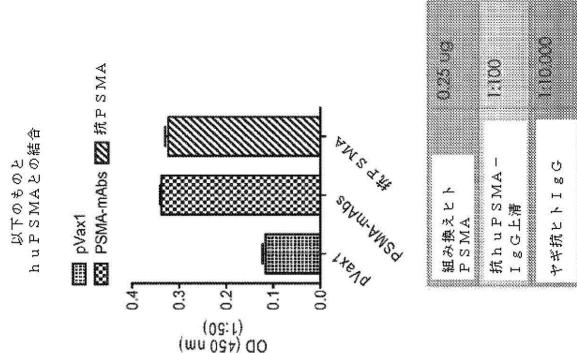
図 6-2

【図63】



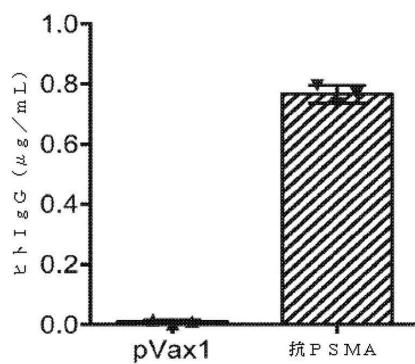
【図 6 4】

四 6 4

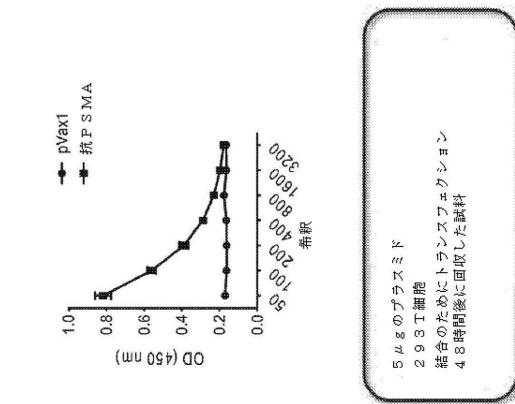


【図 6 5】

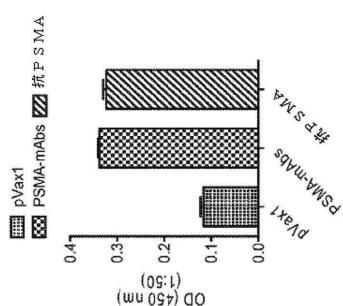
図 6 5



抗 h u P S M A 発現
インビトロ 293T トランスフェクト細胞)



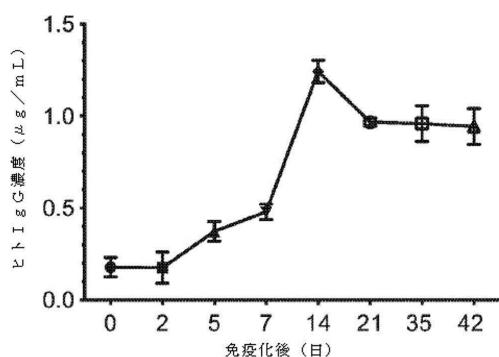
以下のものと
uPSMAとの結



5.5 g のプラスミド
293T細胞
結合のためのトランスクエーション
48 時間後に回収した試料

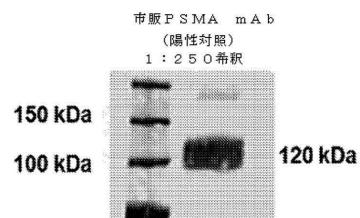
【図 6 6】

図 6 6

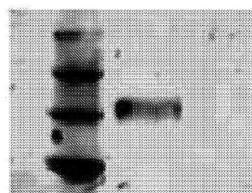


【図 6 7】

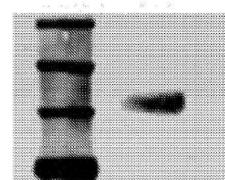
図 6 7



抗 PSMA 293T
トランスフェクション上清
1 : 50 希釈

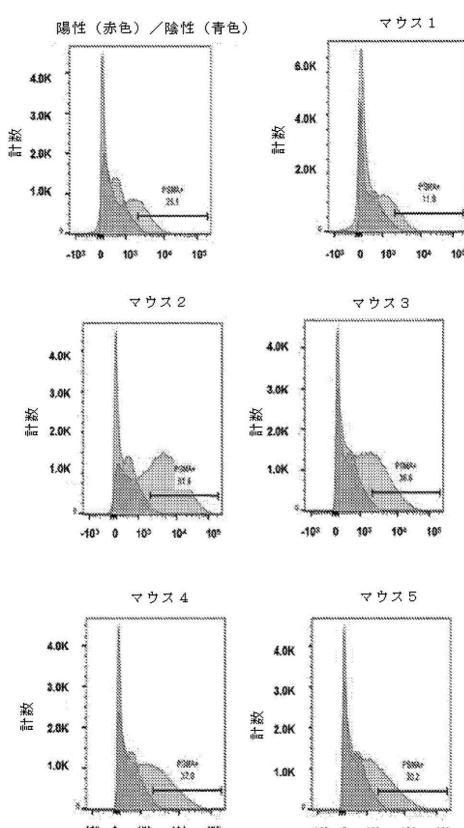


抗 PSMA プールした
7 日目の血清 1 : 50 希釈



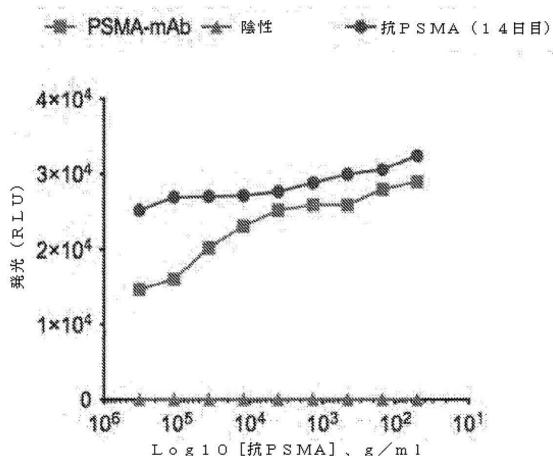
【図 6 8】

図 6 8



【図 6 9】

図 6 9



10

20

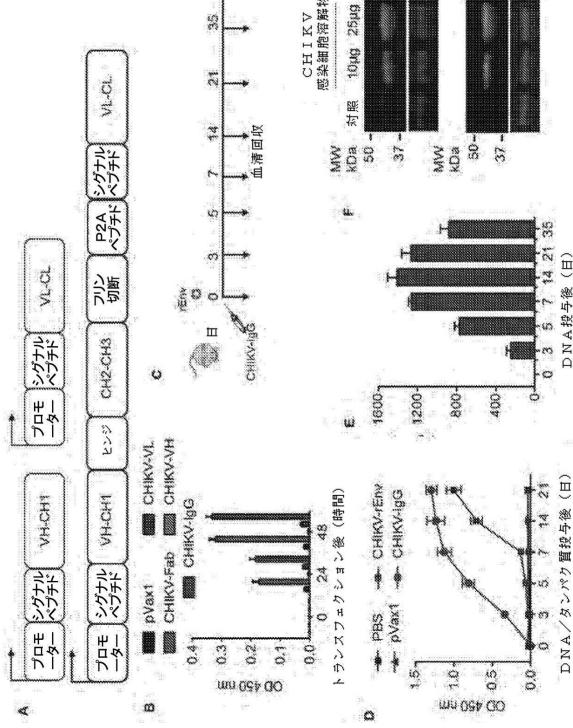
30

40

50

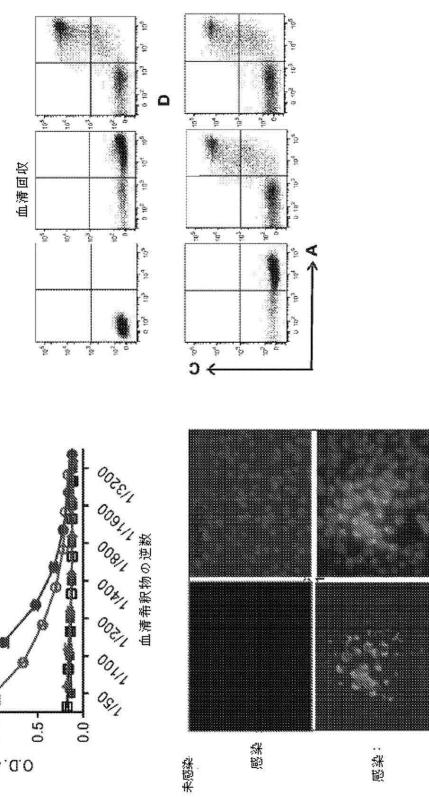
【図 7 0】

図 7 0



【図 7 1】

図 7 1

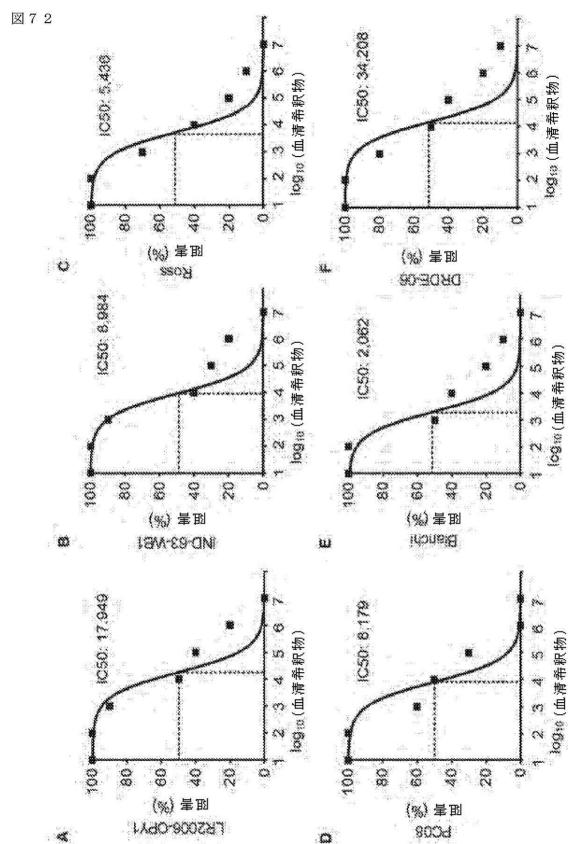


10

20

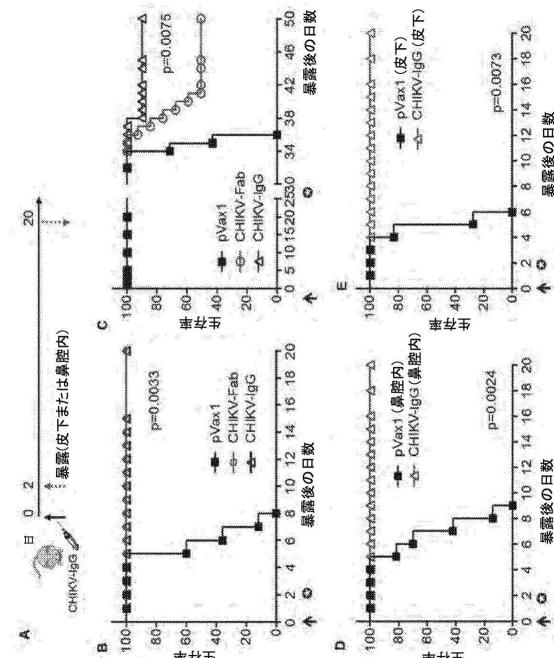
30

【図 7 2】



【図 7 3】

図 7 3

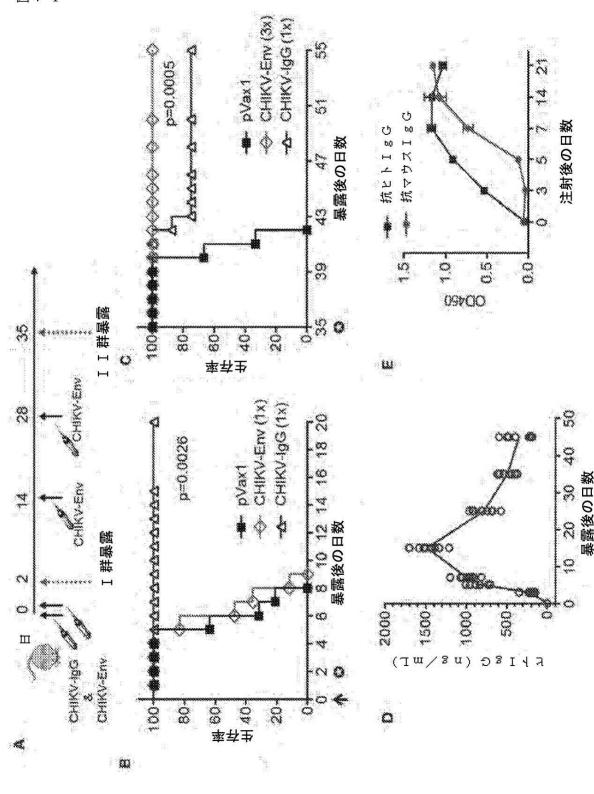


40

50

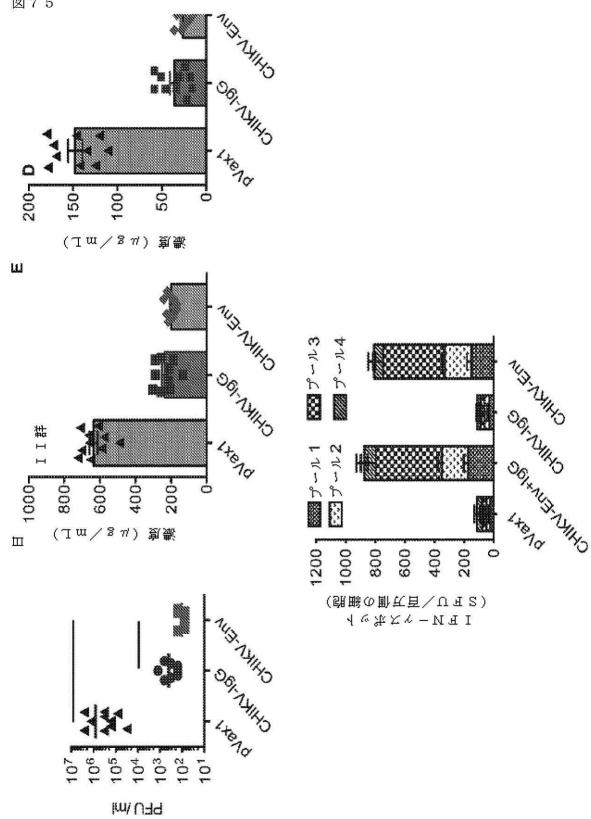
【図 7 4】

図 7 4



【図 7 5】

図 7 5



10

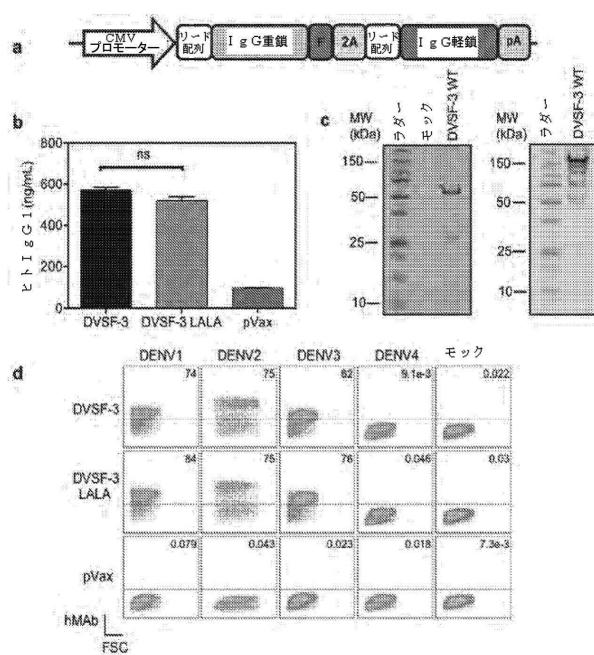
20

30

40

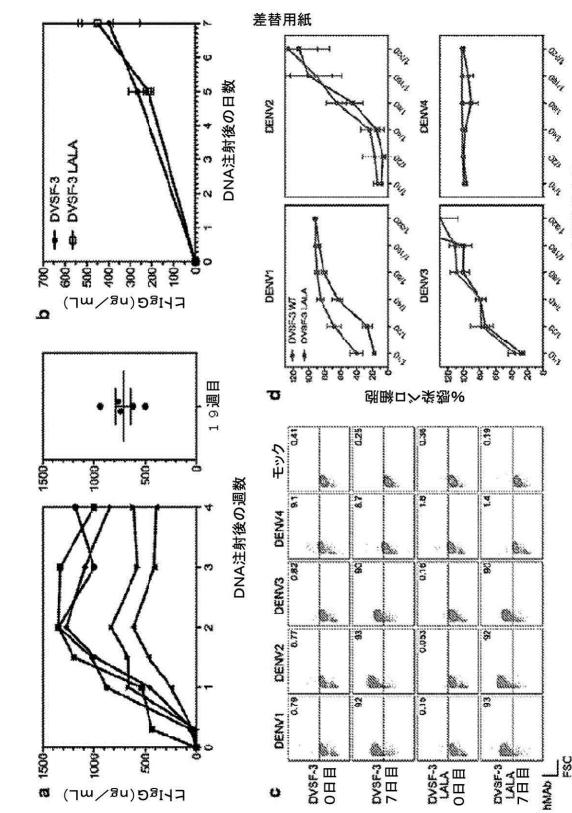
【図 7 6】

図 7 6



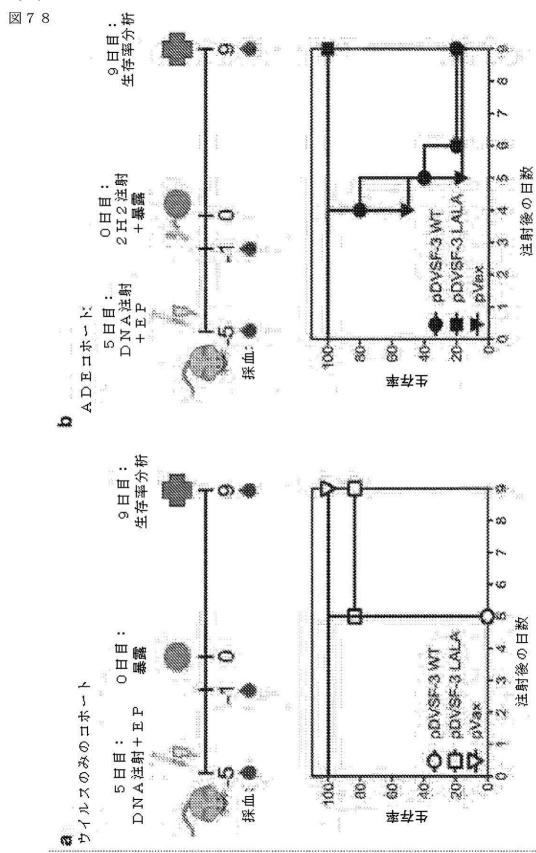
【図 7 7】

図 7 7

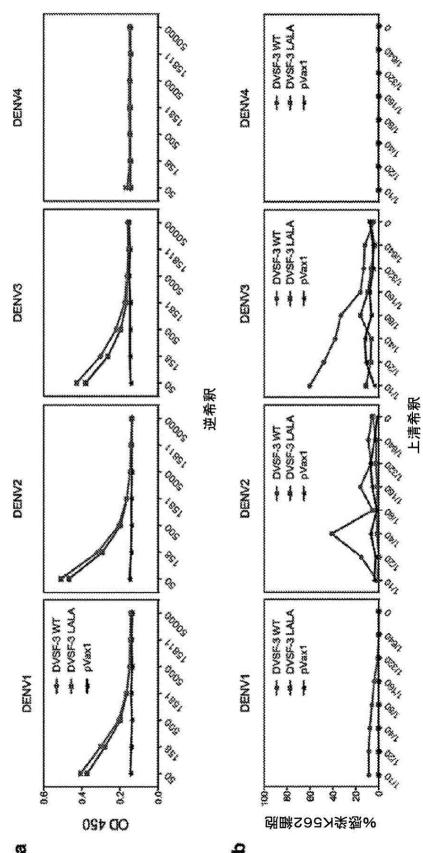


50

【図 7 8】



【図 7 9】



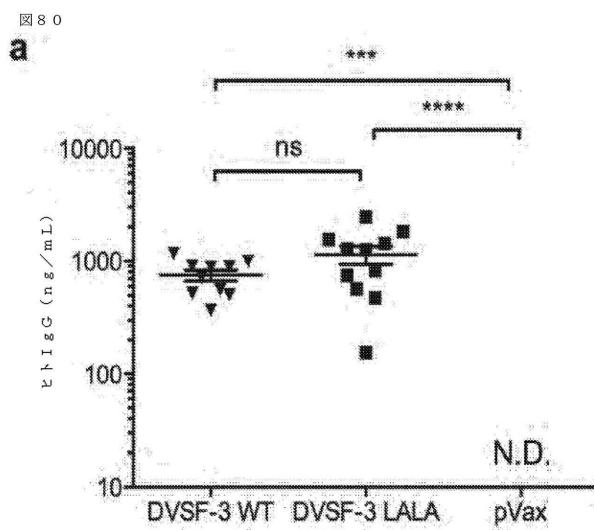
10

20

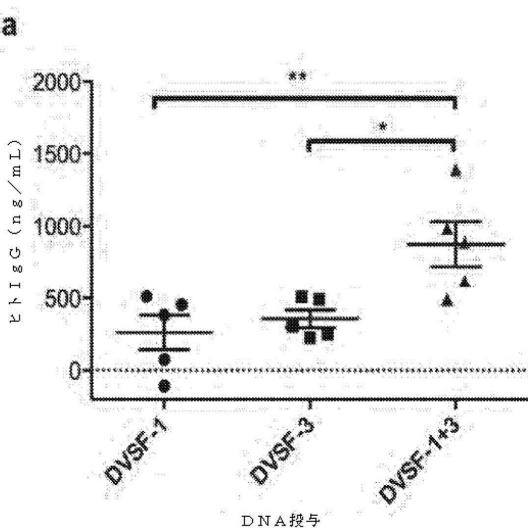
30

40

【図 8 0】



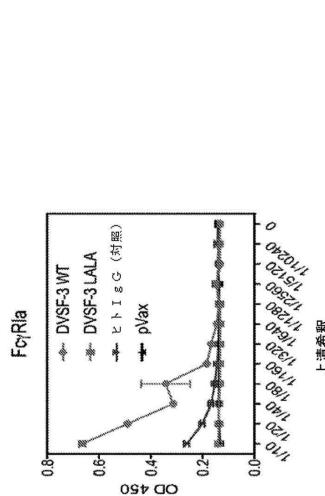
【図 8 1】



50

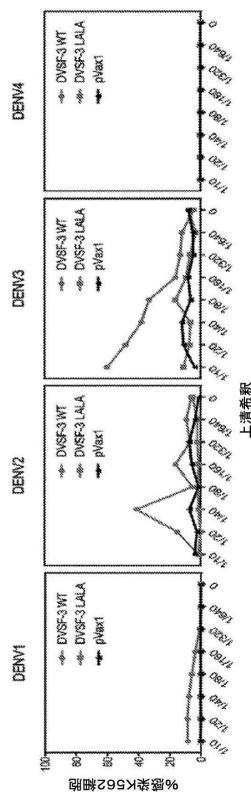
【図 8 2】

図 8 2



【図 8 3】

図 8 3

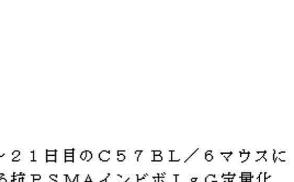


抗PSMAインビボ IgG定量化
0日目～105日目にグループ分け
n = 5

10

20

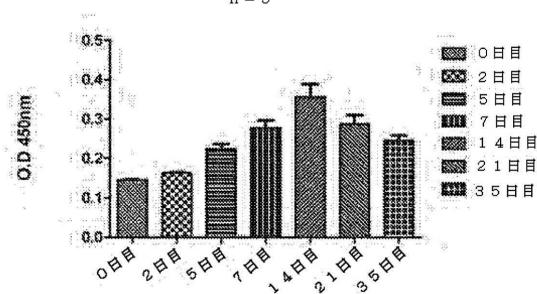
30



【図 8 4】

図 8 4

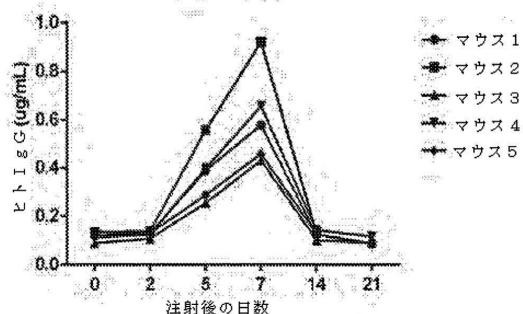
抗PSMAインビボ結合ELISA
1 : 50 希釈
n = 5



【図 8 5】

図 8 5

0日目～21日目のC57BL/6マウスにおける抗PSMAインビボ IgG定量化



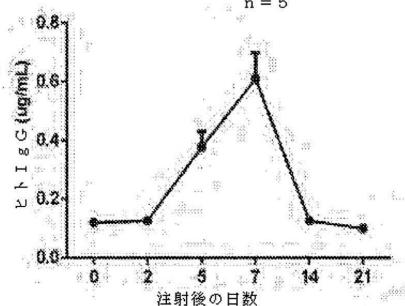
40

50

【図 8 6】

図 8 6

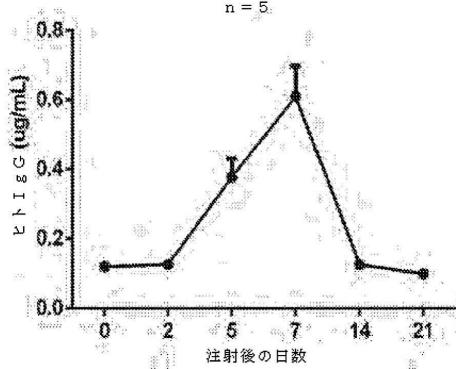
C 57 BL/6 マウスにおける抗PSMA インビボ IgG 定量化
0 日目～21 日目にグループ分け
n = 5



【図 8 7】

図 8 7

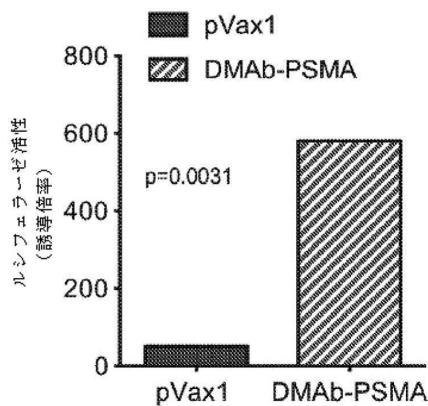
C 57 BL/6 マウスにおける抗PSMA インビボ IgG 定量化
0 日目～21 日目にグループ分け
n = 5



10

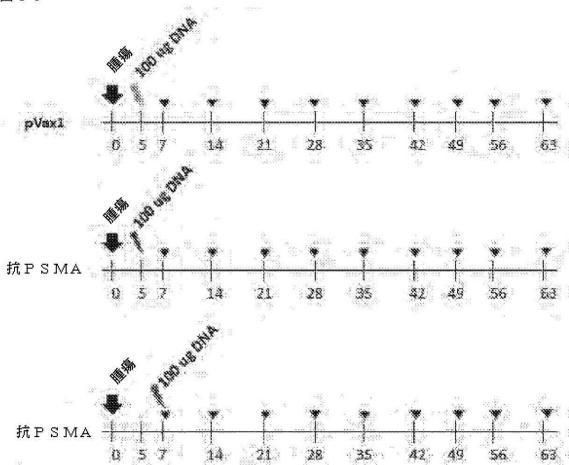
【図 8 8】

図 8 8



【図 8 9】

図 8 9



20

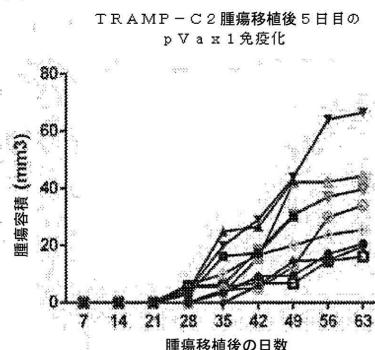
30

40

50

【図 9 0】

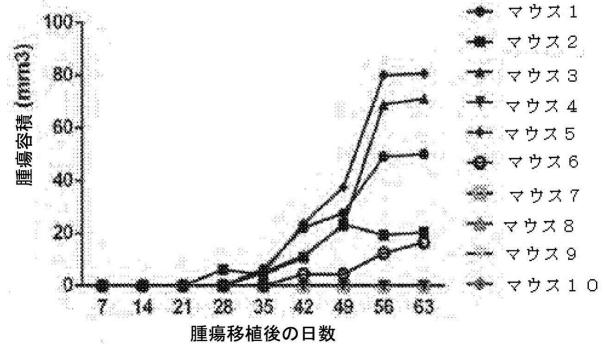
図 9 0



【図 9 1】

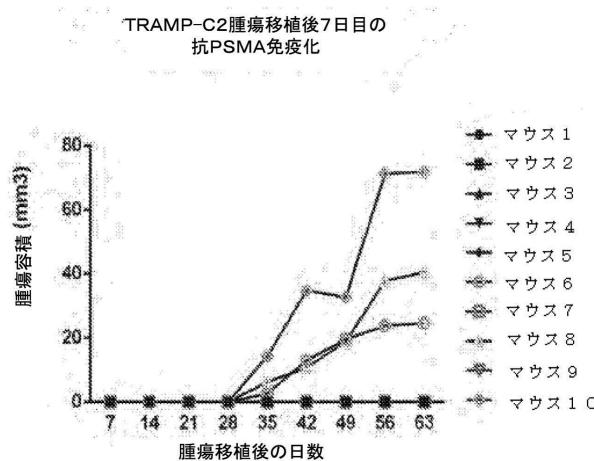
図 9 1

TRAMP-C2腫瘍移植後5日目の
抗PSMA免疫化



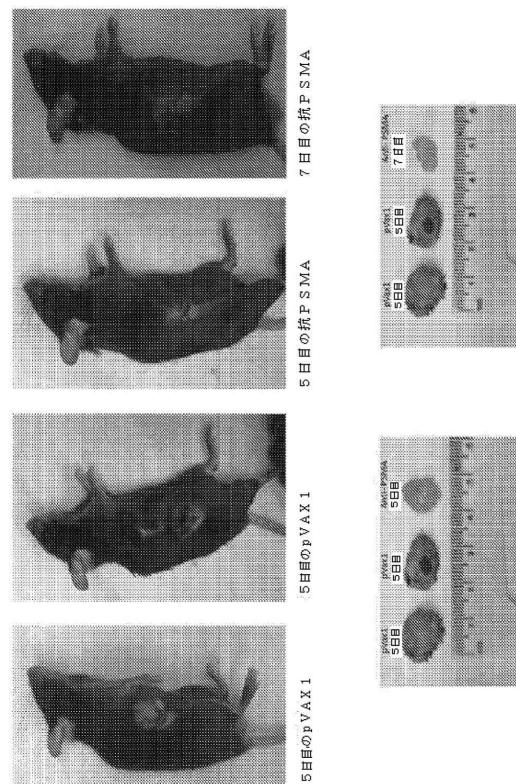
【図 9 2】

図 9 2



【図 9 3】

図 9 3



10

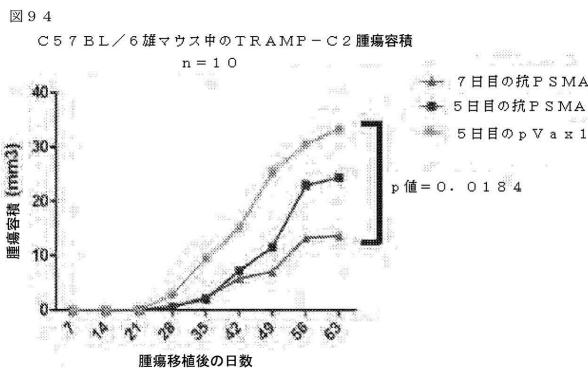
20

30

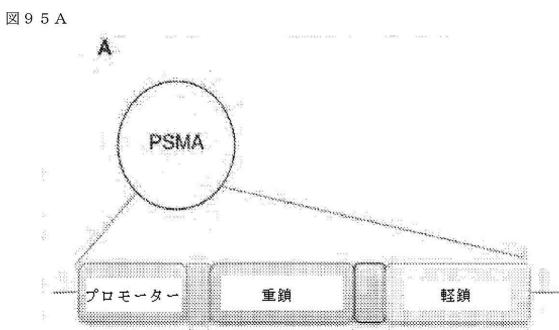
40

50

【図 9 4】

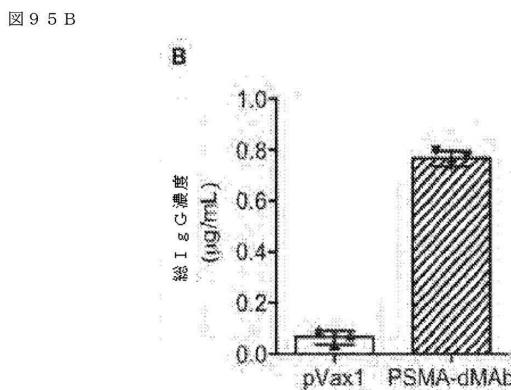


【図 9 5 A】

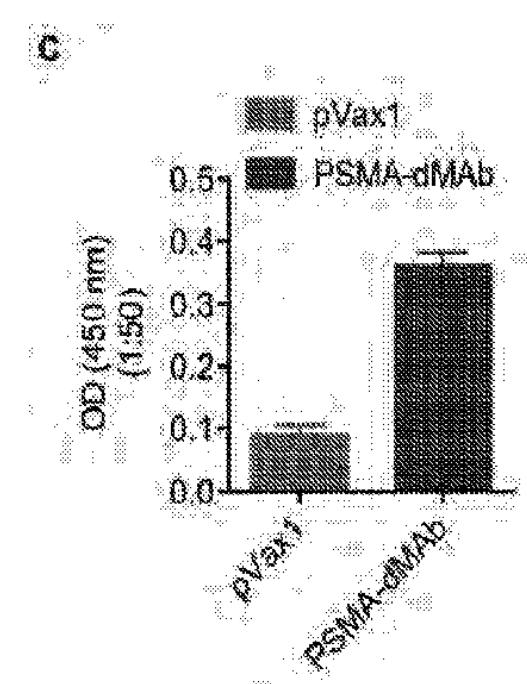


10

【図 9 5 B】



【図 9 5 C】



20

30

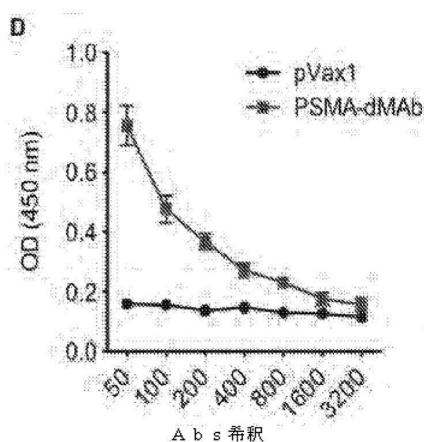
FIG. 95C

40

50

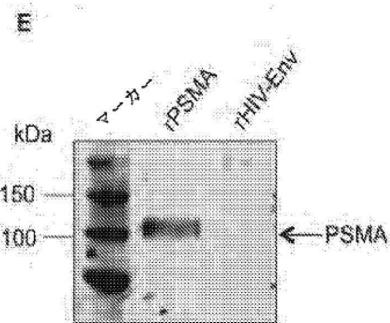
【図95D】

図95D



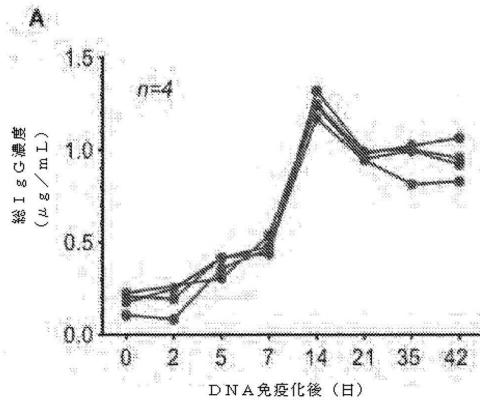
【図95E】

図 95 E



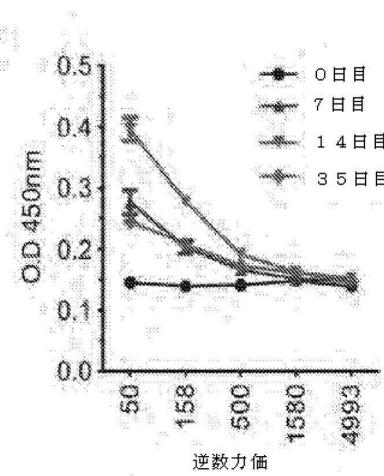
【図96A】

図 96 A



【図96B】

图 9-6 B



10

20

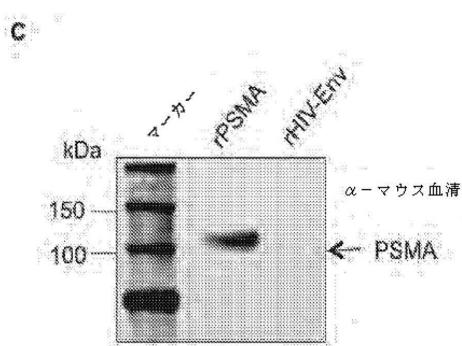
30

40

50

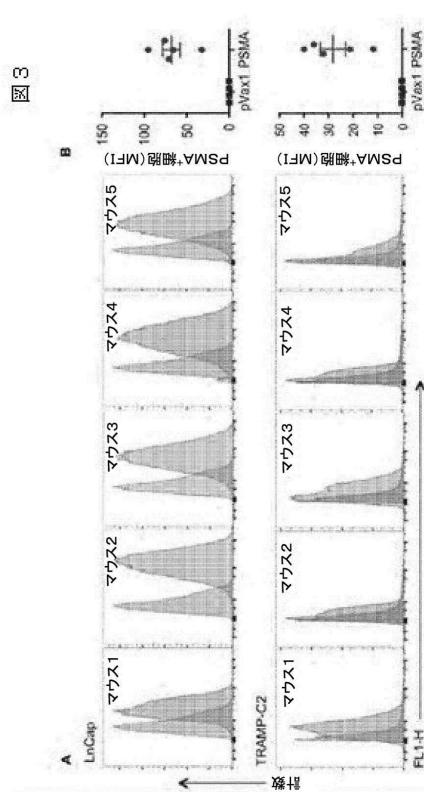
【図 9 6 C】

図 9 6 C



【図 9 7 A】

図 9 7 A



10

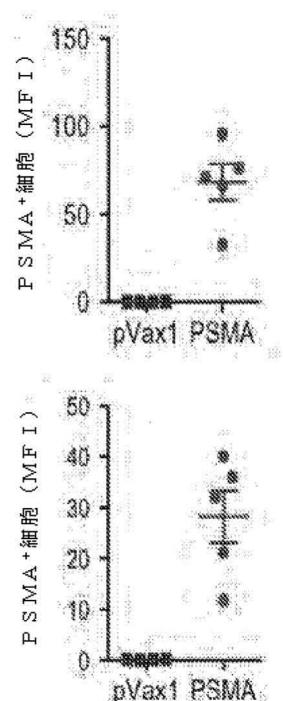
20

30

40

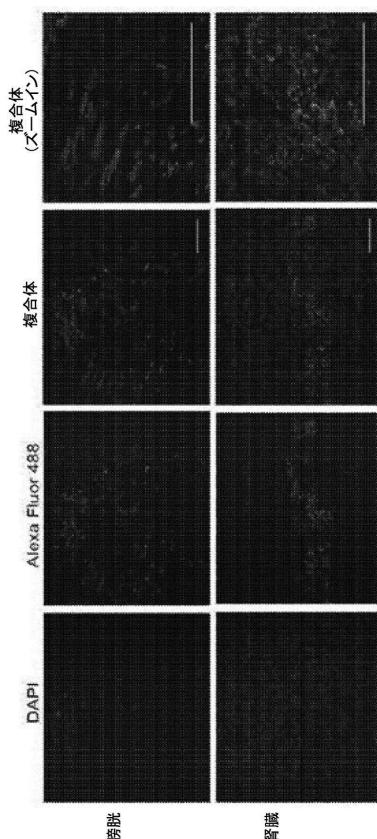
【図 9 7 B】

図 9 7 B



【図 9 8】

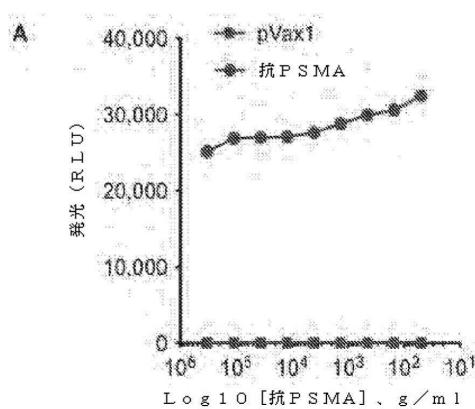
図 9 8



50

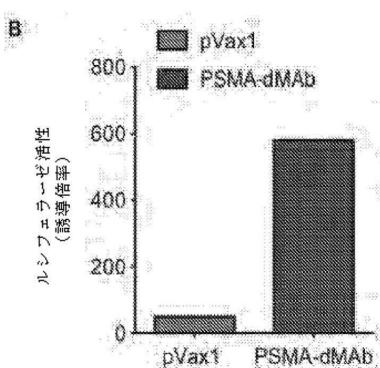
【図 9 9 A】

図 9 9 A



【図 9 9 B】

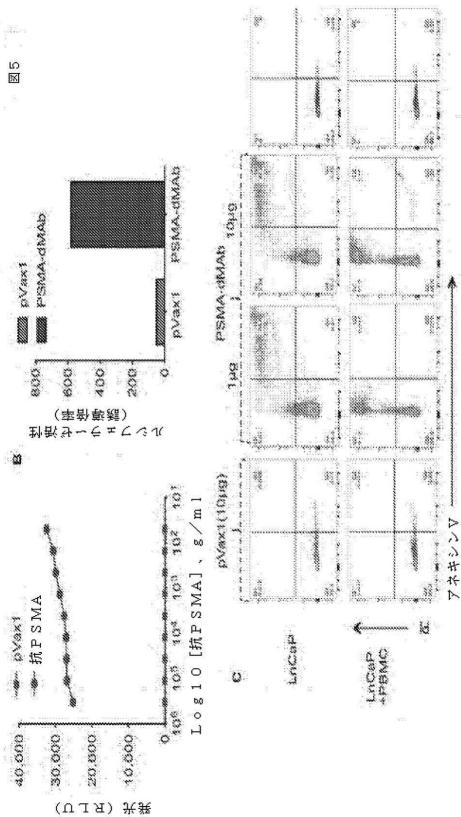
図 9 9 B



10

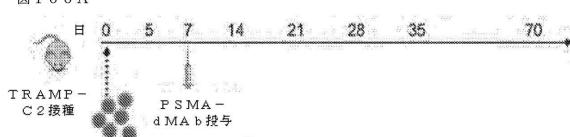
【図 9 9 C】

図 9 9 C



【図 1 0 0 A】

図 1 0 0 A



20

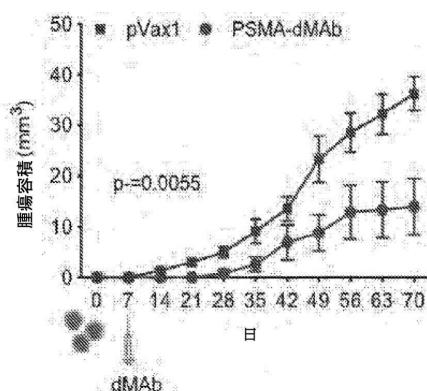
30

40

50

【図 100 B】

図 100 B



【図 100 C】

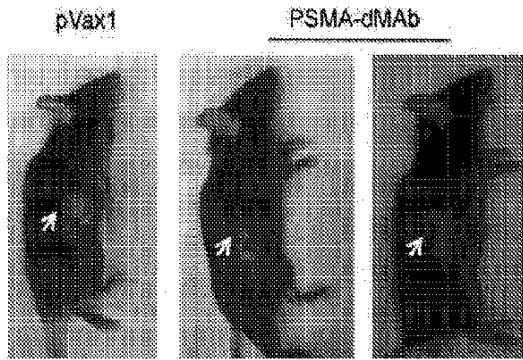
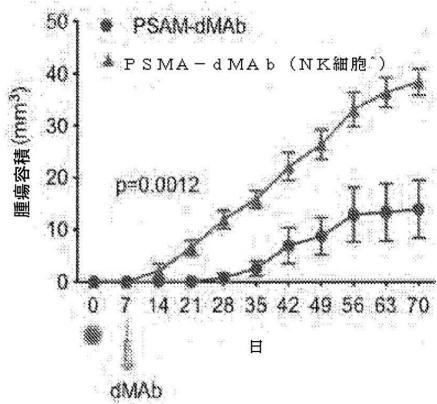


FIG. 100C

【図 100 D】

図 100 D



【配列表】

0007268958000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 0 7 K 16/28 (2006.01)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)

F I

C 0 7 K 16/28
C 1 2 P 21/08

Z N A

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/086,157

(32)優先日 平成26年12月1日(2014.12.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 青木 篤

(74)代理人 100123582

弁理士 三橋 真二

(74)代理人 100092624

弁理士 鶴田 準一

(74)代理人 100114018

弁理士 南山 知広

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100173107

弁理士 胡田 尚則

(72)発明者 デイビッド ビー. ウェイナー

アメリカ合衆国, ペンシルベニア 19066, メリオン, ビーコン レーン 717

(72)発明者 カルッピアー ムスマニ

アメリカ合衆国, ニュージャージー 08002, チェリー ヒル, アイビー レーン 52

(72)発明者 セリーケ フリンガイ

アメリカ合衆国, ミネソタ 55411, ミネアポリス, ペン アベニュー ノース 1623

(72)発明者 ニランジャン ワイ. サーデサイ

アメリカ合衆国, ペンシルベニア 19422, ブルーベル, マラード サークル 480

合議体

審判長 上條 肇

審判官 福井 悟

審判官 宮岡 真衣

(56)参考文献 国際公開第2014/093894 (WO, A2)

国際公開第2009/026274 (WO, A1)

特表2008-530243 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N15/00-90

C07K16/00-46

C12P21/00-08

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / B I O S I S / E M B A S E / W P

I D S / W P I X (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q / U n i P r o t