

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4540033号
(P4540033)

(45) 発行日 平成22年9月8日(2010.9.8)

(24) 登録日 平成22年7月2日(2010.7.2)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 38/00	(2006.01) A 61 K 37/02
A 61 K 48/00	(2006.01) A 61 K 48/00
A 61 K 31/7088	(2006.01) A 61 K 31/7088
A 61 K 39/275	(2006.01) A 61 K 39/275
A 61 K 39/235	(2006.01) A 61 K 39/235

請求項の数 12 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-532799 (P2001-532799)
(86) (22) 出願日	平成12年10月20日 (2000.10.20)
(65) 公表番号	特表2003-512437 (P2003-512437A)
(43) 公表日	平成15年4月2日 (2003.4.2)
(86) 國際出願番号	PCT/CA2000/001253
(87) 國際公開番号	W02001/030382
(87) 國際公開日	平成13年5月3日 (2001.5.3)
審査請求日	平成18年8月7日 (2006.8.7)
(31) 優先権主張番号	60/160,879
(32) 優先日	平成11年10月22日 (1999.10.22)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	60/223,325
(32) 優先日	平成12年8月7日 (2000.8.7)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	506076695 サノフィ パストゥール リミテッド S A N O F I P A S T E U R L I M I T E D カナダ国 エム2アール 3ティー4 オ ンタリオ州 トロント スティールズ ア ヴェニュー ウエスト 1755
(74) 代理人	100073184 弁理士 柳田 征史
(74) 代理人	100090468 弁理士 佐久間 剛
(72) 発明者	ペーリンスタン, ネイル カナダ国 エム5ピー 1ヴィー1 オン タリオ州 トロント バートン ロード 31

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】腫瘍抗原に対する免疫応答を誘発および／または増強する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

動物において腫瘍抗原に対する免疫応答を誘発するための組成物であって、単離された腫瘍抗原ペプチドIMDQVPFSY(配列番号1)およびYLEPGPVTV(配列番号2)を含有し、腫瘍抗原IMDQVPFSY(配列番号1)およびYLEPGPVTV(配列番号2)をコードする核酸が動物中のリンパ節に直接投与された後に、前記動物中のリンパ節に直接投与されることを特徴とする組成物。

【請求項2】

前記核酸が、ウィルス核酸、細菌DNA、プラスミドDNA、裸／遊離DNA、およびRNAから群より選択されることを特徴とする請求項1記載の組成物。 10

【請求項3】

前記ウィルス核酸が、アデノウィルス、アルファウィルスおよびポックスウィルス核酸からなる群より選択されることを特徴とする請求項2記載の組成物。

【請求項4】

前記ポックスウィルス核酸が、アビポックス、オルトポックスおよびスイポックス核酸からなる群より選択されることを特徴とする請求項3記載の組成物。

【請求項5】

前記ポックスウィルス核酸が、ワクチニア、ニワトリポックス、カナリアポックスおよびブタポックス核酸からなる群より選択されることを特徴とする請求項3記載の組成物。

【請求項6】

20

前記ポックスウィルス核酸が、MVA、NYVAC、TROVAC、およびALVAC核酸からなる群より選択されることを特徴とする請求項3記載の組成物。

【請求項7】

前記核酸が、ベクター中に含まれることを特徴とする請求項1から6いずれか1項記載の組成物。

【請求項8】

前記ベクターが、組換えウィルスまたは細菌であることを特徴とする請求項7記載の組成物。

【請求項9】

前記組換えウィルスが、アデノウィルス、アルファウィルスおよびポックスウィルスからなる群より選択されることを特徴とする請求項8記載の組成物。 10

【請求項10】

前記ポックスウィルスが、アビポックス、オルトポックスおよびスイポックスからなる群より選択されることを特徴とする請求項9記載の組成物。

【請求項11】

前記ポックスウィルスが、ワクチニア、ニワトリポックス、カナリアポックスおよびブタポックスからなる群より選択されることを特徴とする請求項9記載の組成物。

【請求項12】

前記ポックスウィルスが、MVA、NYVAC、TROVAC、およびALVACからなる群より選択されることを特徴とする請求項9記載の組成物。 20

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、腫瘍抗原に対する免疫応答を誘発および／または増強する方法に関する。

【0002】

発明の背景

腫瘍細胞は自己由来性でありしたがって細菌およびウィルスのような外因性の病原体のようにには免疫原性ではないので、癌治療に免疫学的アプローチを使用することは困難である。その結果、癌の免疫治療の見込みは、免疫系により認識できる腫瘍関連抗原(TAA)の同定に依存する。特に、T細胞媒介応答を誘発する標的抗原は、非常に関心がある。このことは、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)が、動物モデル(Kast W. et al (1989) Cell 59:6035; Greenberg P. (1991) Adv. Immunol. 49:281)およびヒト(Boon T. et al. (1994) Annu. Rev. Immunol. 12:337)において腫瘍後退を誘発し得るという証拠から生ずる。現在まで、多くの腫瘍関連抗原が同定されている。これらには、抗原MAGE、BAGE、GAGE、gp100、 MART - 1/Melan - A、チロシナーゼ、癌胎児性抗原(CEA)並びに多くの他の抗原が含まれる(Horig and Kaufman (1999) Clinical Immunology 92:211-223)。これらの腫瘍関連抗原のいくつかを以下に記載する。 30

【0003】

第1の特徴付けられたヒト腫瘍関連抗原は、黒色腫から同定された。この抗原(当初MAGE1と称された)は、腫瘍DNAによりトランスフェクションされたHLA A1標的細胞をスクリーニングするためにHLA A1+黒色腫患者から単離されたCTLを使用して同定された(van der Bruggen P. (1991) Science, 254:1643; これらの腫瘍関連抗原は現在はMAGE - A1、MAGE - 2等と称される)。興味深いことに、MAGE - 1はX染色体上に位置する少なくとも12の非常に関連する遺伝子のファミリーに属することが分かった(de Plaen, E. et al. (1994) Immunogenetics 40:360)。11のさらなるMAGE遺伝子の核酸配列は、MAGE - 1のものと65 - 85%の同一性を共有する(de Smet, C. et al. (1994) Immunogenetics 39:121)。MAGE1および3はいずれも正常な組織中に存在するが、精巣中でのみ発現される(de Plaen, E. et al. (1994) Supra; de Smet, C. et al. (1994) Supra; Takahashi, K. et al. (1995) Cancer Res. 55:3478; Chyomey, P. et al. (1995) Immunogenetics 43:97)。これらの初期の結果はその後、すべてが通常は正常な組織(精巣を除く)中で発現されないが様々の種類の 40

腫瘍中で発現される、新しい遺伝子ファミリー（すなわち、RAGE、BAGE、GAGE）が同定されたために拡張された。

【0004】

ヒト癌胎児性抗原(CEA)は、結腸、直腸、胃および胰臓癌の大部分で(Muaro et al. (1985) *Cancer Res.* 45:5769)、乳癌の約50%(Steward et al. (1974) *Cancer* 33:1246)および肺癌の70%(Vincent, R.G. and Chu, T.M. (1978) *J. Thor. Cardiovas. Surg.* 66:320)で発現される180kDの糖タンパク質である。CEAは、1965年にヒト消化管の腺癌中の癌特異的胎児性抗原として当初記載された(Gold, P. and Freeman, S.O. (1965) *Exp. Med.* 121:439)。その時から、CEAはヒト胃腸管のほとんどすべての固形腫瘍中で過剰に産生される細胞表面抗原として特徴付けられている。ヒトCEAタンパク質についての遺伝子がクローニングされている(Oikawa et al (1987) *Biochim. Biophys. Res.* 142:511-518；欧州特許出願第EP 0346710号)。CEAはまた、胎児性消化管組織中でおよびより少ない程度で正常な結腸上皮において発現される。いくつかの研究には、患者中の抗-CEA抗体の存在が報告されているが(Gold et al. (1973) *Nature New Biology* 239:60; Pompecki R. (1980) *Eur. J. Cancer* 16:973; Ura et al. (1985) *Cancer Lett.* 25:283; Fuchs et al. (1988) *Cancer Immunol. Immunother.* 26:180)、他の研究は報告しておらず(LoGerfo et al. (1972) *Int. J. Cancer* 9:344; MacSween, J.M. (1975) *Int. J. Cancer* 15:246; Chester K.A. and Begent, H.J. (1984) *Clin. Exp. Immunol.* 58:685)、CEAの免疫原性は不明瞭である。

【0005】

Gp100は、通常メラノソームで見られ、メラニン細胞、網膜細胞、および他の神経冠誘導体で発現される。gp100の機能は現在はわかっていない。質量分光測定法により、3つの免疫優性HLA-A2結合gp100エピトープが同定された：g9-154（アミノ酸154 - 162）、g9-209（アミノ酸209 - 217）、およびg9-280（アミノ酸280 - 288）。特に、これらのエピトープ（ペプチドとして）の内の2つは、合成により変化されて、原T細胞クローラン中でより強い免疫応答を誘発する：gp-209中の位置2におけるトレオニンがメチオニンに変えられ、gp-280中の位置9におけるアラニン残基がバリンに変えられる。これらの変化により、T細胞レセプター(TCR)により認識される内在性の天然のエピトープを変化することなくHLA-A2分子に対するエピトープ-ペプチドの結合親和性が増加する。Rosenberg等(NIH)はすでに、これらの修飾されたペプチドの1つにより黒色腫患者を免疫化することに成功し、ある患者において目的の臨床的応答を達成したことを報告している。

【0006】

癌治療に対する免疫学的アプローチに関して得られる大きな利点にもかかわらず、当該技術において癌の免疫療法を改良する必要が依然存在する。

【0007】

発明の概要

本発明は、腫瘍抗原に対する免疫応答を誘発および／または増強する改良された方法に関する。

【0008】

本発明者は、腫瘍抗原またはそれをコードする核酸をリンパ部位（例えばリンパ節）中に直接投与することにより、腫瘍抗原に対する免疫応答が誘導および／または大きく増強されるおよび／または腫瘍抗原に対する耐性が破壊され、これは癌の免疫療法の従来の方法における主な課題であった。

【0009】

したがって、ある態様において本発明により、腫瘍抗原に対する動物中の免疫応答を誘発および／または増強する方法であって、有効量の腫瘍抗原、それをコードする核酸、該核酸を含むベクターまたは細胞、または前記のものを含むワクチンを動物中のリンパ部位に投与する工程を含む方法が提供される。

【0010】

別の態様において、本発明により、動物中の腫瘍抗原に対する免疫耐性を破壊する方法で

10

20

30

40

50

あって、有効量の腫瘍抗原、それをコードする核酸、該核酸を含むベクターまたは細胞、または前記のものを含むワクチンを動物中のリンパ部位に投与する工程を含む方法が提供される。

【0011】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、本発明の好ましい実施の形態を示す詳細な説明および特定の実施例は、説明のためにのみ記載されるものであり、本発明の意図および範囲内で様々の変化および修飾がこの詳細な説明から当業者にとって自明であるということを理解しなければならない。

【0012】

図面の簡単な説明

10

本発明は、以下の図面に関して記載される。

【0013】

図1は、腫瘍抗原の結節内注射を受けた動物のIFN- γ -ELISPOT分析の結果を示す棒グラフである。

【0014】

図2は、腫瘍抗原の結節内注射を受けた動物のIFN- γ -ELISPOT分析の結果を示す棒グラフである。

【0015】

図3は、腫瘍抗原の皮下投与を受けた動物のIFN- γ -ELISPOT分析の結果を示す棒グラフである。

20

【0016】

図4は、腫瘍抗原の皮下投与を受けた動物のIFN- γ -ELISPOT分析の結果を示す棒グラフである。

【0017】

図5は、ALVAC-修飾されたgp100 / 修飾されたgp100ペプチド免疫原の結節内（グループ2）および皮下（グループ3）投与の摂生後の抗体反応を示すグラフである。

【0018】

図6は、修飾されたgp100M cDNAの核酸配列である（配列番号109）。

【0019】

図7は、修飾されたgp100Mタンパク質の推定アミノ酸配列である（配列番号110）。

30

【0020】

図8は、修飾されたCEAの核酸およびアミノ酸配列である（配列番号111および112）。

【0021】

発明の詳細な説明

上述のように、本発明は、腫瘍抗原に対する免疫応答を誘発および／または増強する改良された方法に関する。したがって、本発明により、腫瘍抗原に対する動物中の免疫応答を誘発および／または増強する方法であって、有効量の腫瘍抗原、腫瘍抗原をコードする核酸配列、該核酸配列を含むベクターまたは細胞、または前記腫瘍抗原を含むワクチン、該腫瘍抗原をコードする核酸配列、または該腫瘍抗原をコードする核酸配列を含むベクターを動物中のリンパ部位に投与する工程を含む方法が提供される。

40

【0022】

「免疫応答を誘発および／または増強する」という用語は、本発明の方法により動物の免疫系の任意の応答を引き起こすおよび／または高めることを意味する。

【0023】

「免疫応答」とは、免疫系、例えば細胞媒介（すなわち細胞障害性Tリンパ球媒介）または体液性（すなわち抗体媒介）の性質の任意の応答として定義される。これらの免疫応答は、抗体アッセイ（例えばELISAアッセイ）、抗原特異的細胞障害性アッセイ、サイトカインの産生（例えばELISPOTアッセイ）、腫瘍抗原を発現する腫瘍の後退、腫瘍抗原を発現する癌細胞の抑制などが含まれるがこれに限定されない当業者によく知られる多くのインビオまたはインビトロのアッセイにより評価することができる。

50

【0024】

「リンパ部位」という用語は、リンパ器官、組織、細胞、結節または脾臓、胸腺、扁桃腺、パイエル板、骨髄、リンパ球、胸管並びに体のすべてのリンパ結節のような腺を含むリンパ系と関連する体内の部位を意味する。

【0025】

ここで用いたように「動物」という用語は、動物界のすべてのメンバーを含み、好ましくはヒトである。

【0026】

ここで用いたように「有効量」という用語は、所望の結果を達成するために必要な投与量および期間において有効な量を意味する。

10

【0027】

ここで用いたように「腫瘍抗原」という用語は、腫瘍関連抗原(TAA)および腫瘍特異的抗原(TSA)の両方を含む。腫瘍関連抗原とは、正常な細胞で観察されるよりも多い量で腫瘍細胞の表面で発現される抗原または胎児の成長中に正常な細胞において発現される抗原を意味する。腫瘍特異的抗原は、腫瘍細胞に独特であり正常な細胞で発現されない抗原である。腫瘍抗原という用語は、すでに同定されたおよびまだ同定されていないTAAまたはTSAを含み、断片、エピトープおよび腫瘍抗原への任意のおよびすべての修飾を含む。

【0028】

腫瘍関連抗原は、gp100(Kawakami et al., J. Immunol. 154:3961-3968 (1995); Cox et al., Science, 264:716-719 (1994))、MART-1/Melan A(Kawakami et al., J. Exp. Med., 180:347-352(1994); Castelli et al., J. Exp. Med., 181:363-368(1995))、gp75(TRP-1)(Wang et al., J. Exp. Med., 186:1131-1140(1996))、およびチロシナーゼ(Wolfel et al., Eur. J. Immunol., 24:759-764(1994); Topalian et al., J. Exp. Med., 183:1965-1971(1996))、黒色腫プロテオグリカン(Hellstrom et al., J. Immunol., 130:1467-1(1983); Ross et al., Arch. Biochem Biophys., 225:370-383(1983))、腫瘍特異的、広く共有される抗原、例えば：MAGEファミリーの抗原、例えばMAGE-1、2、3、4、6および12(Van der Bruggen et al., Science, 254:1643-1647(1991); Rogner et al., Genomics, 29:729-731(1995))、BAGEファミリーの抗原(Boel et al., Immunity, 2:167-175(1995))、GAGEファミリーの抗原、例えばGAGE-1、2(Van den Eynde et al., J. Exp. Med., 182:689-698(1995))、RAGEファミリーの抗原、例えばRAGE-1(Gaugler et al., Immunogenetics, 44:323-330(1996))、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ-V(Guilloux et al., J. Exp. Med., 183:1173-1183(1996))、およびp15(Robbins et al., J. Immunol. 154:5944-5950(1995))

20

)；腫瘍特異的突然変異抗原；突然変異 - カテニン(Robbins et al., J. Exp. Med., 183:1185-1192(1996))、突然変異MUM-1(Coulie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7976-7980(1995))、および突然変異サイクリン依存性キナーゼ-4(CDK4)(Wolfel et al., Science, 269:1281-1284(1995))；突然変異オンコジーン産物：p21 ras(Fossum et al., Int. J. Cancer, 56:40-45(1994))、BCR-abl(Bocchia et al., Blood, 85:2680-2684(1995))、p53(Theobald et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:11993-11997(1995))、およびp185 HER2/neu(Fisk et al., J. Exp. Med., 181:2109-2117(1995))；Peoples et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92:432-436(1995))；突然変異上皮増殖因子レセプター(EGFR)(Fujimoto et al., Eur. J. Gynecol. Oncol., 16:40-47(1995))；Harris et al., Breast Cancer Res. Treat., 29:1-2(1994)；癌胎児性抗原(CEA)(Kwong et al., J. Natl. Cancer Inst., 85:982-990(1995))；癌関連突然変異ムチン、例えばMUC-1遺伝子産物(Jerome et al., J. Immunol., 151:1654-1662(1993)、Ioannides et al., J. Immunol., 151:3693-3703(1993)、Takahashi et al., J. Immunol., 153:2102-2109(1994))；EBVのEBNA遺伝子産物、例えばEBNA-1遺伝子産物(Rickinson et al., Cancer Surveys, 13:53-80(1992))；ヒト乳頭腫ウイルスのE7、E6タンパク質(Ressing et al., J. Immunol., 154:5934-5943(1995))；前立腺特異的抗原(PSA)(Xue et al., The Prostate, 30:73-78(1997))；前立腺特異的膜抗原(

30

40

50

PSMA)(Israeli, et al., Cancer Res., 54:1807-1811(1994)) ; PCTA-1(Sue et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:7252-7257(1996)) ; イディオタイプエピトープまたは抗原、例えは免疫グロブリンイディオタイプまたはT細胞レセプターイディオタイプ(Chen et al., J. Immunol., 153:4775-4787(1994)) ; Syrengelas et al., Nat. Med., 2:1038-1040(1996)) ; KSA (米国特許第5348887号) ; NY-ESO-1 (国際特許出願公開第98/14464号) を含むがこれに限定されない任意の腫瘍関連抗原でもよい。

【0029】

また、修飾された腫瘍抗原および／またはそこからのエピトープ／ペプチド誘導体（修飾されないおよび修飾された）が含まれる。実施例は、gp100（国際特許出願公開第98/02598号；同第95/29193号；同第97/34613号；同第93/33810号）；CEA（国際特許出願公開第99/19478号；S. Zaremba et al. (1997) Cancer Research 57:4570-7; K.T. Tsang et al. (1995) J. Int. Cancer Inst. 87:982-90）；MART-1（国際特許出願公開第98/58951号、同第98/02538号；D. Valmeri et al. (2000) J. Immunol. 164:1125-31）；p53（M. Eura et al. (2000) Clinical Cancer Research 6:979-86）；TRP-1およびTRP-2（国際特許出願公開第97/29195号）；チロシナーゼ（国際特許出願公開第96/21734号；同第97/11669号；同第97/34613号；同第98/33810号；同第95/23234号；同第97/26535号）；KSA（国際特許出願公開第97/15597号）；PSA（国際特許出願公開第96/40754号）；NY-ESO-1（国際特許出願公開第99/18206号）；HER2/neu（米国特許第5869445号）；関連するMAGEファミリー（L. Heidecker et al. (2000) J. Immunol. 164:6041-5；国際特許出願公開第95/04542号；同第95/25530号；同第95/25739号；同第96/26214号；同第97/31017号；同第98/10780号）に由来する修飾されたおよび修飾されないエピトープ／ペプチドを含むがこれに限定されない。

【0030】

好ましい実施の形態において、腫瘍関連抗原は、gp100、修飾されたgp100またはその断片である。特に、本発明者は、図6に示される核酸配列（配列番号109）および図7に示される推定アミノ酸配列（配列番号110）を有する、gp100Mと称される修飾されたgp100ペプチドを調製した。本発明者は、修飾されたgp100（修飾されたエピトープ209(2M)（IMDQVPF SY、配列番号1）および290(9V)（YLEPGPVTV、配列番号2））の断片をコードする核酸を含む組変えアビポックス(avipox)ウィルスの結節内注射およびその後修飾されたエピトープ／ペプチドにより後押しされることにより、同じ抗原が皮下投与された場合より数倍高い体液性および細胞媒介応答が誘発されるということを示した。事件の詳細および結果は、実施例1に記載される。

【0031】

別の実施の形態において、腫瘍関連抗原は、癌胎児性抗原(CEA)、修飾されたCEAまたはその断片である。修飾されたCEA抗原の核酸配列は、図8および配列番号111に示される。対応するアミノ酸配列は、図8および配列番号112に示される。好ましくは、修飾されたCEA抗原は、配列YLSGADLN、配列番号113を有する。

【0032】

本発明のさらなる実施の形態には、ここに記載されるように腫瘍抗原およびその断片または修飾形態をコードする配列を含む核酸配列が含まれる。「核酸配列」という用語は、天然に発生する塩基、糖および糖間（バックボーン）結合からなるヌクレオチドまたはヌクレオシド単量体の配列を称する。この用語はまた、同様に機能する天然に発生しない単量体およびその一部を含む修飾されたまたは置換された配列を含む。本発明の核酸配列は、リボ核酸(RNA)またはデオキシリボ核酸(DNA)でもよく、アデニン、グアニン、シトシン、チミジンおよびウラシルを含む天然に発生する塩基を含有してもよい。配列は、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、6-メチル、2-プロピル、および他のアルキルアデニン、5-ハロウラシル、5-ハロシトシン、6-アザウラシル、6-アザシトシンおよび6-アザチミン、ブソイドウラシル、4-チオウラシル、8-ハロアデニン、8-アミノアデニン、8-チオールアデニン、8-チオ-アルキルアデニン、8-ヒドロキシリルアデニンおよび他の8-置換アデニン、8-ハログアニン、8-アミノグアニン、8-チオールグア

10

20

30

40

50

ニン、8-チオールアルキルグアニン、8-ヒドロキシルグアニンおよび他の8-置換グアニン、他のアザおよびデアザウラシル、チミジン、シトシン、アデニン、またはグアニン、5-トリフルオロメチルウラシルおよび5-トリフルオロシトシンを含有してもよい。

【0033】

本発明の腫瘍抗原をコードする核酸配列は、ウィルス核酸、プラスミド、細菌DNA、裸の／遊離DNAおよびRNAを含むがこれに限定されない。核酸は、一本鎖および二本鎖形態を含む。これらの核酸は、前記の腫瘍抗原をコードする関連する基本的な配列を含む。明確にするために、「前記のポリペプチドをコードす関連する基本的な配列」はさらに、相補的な核酸配列を含む。このようにして、本発明の実施の形態には、それ自体が前記の腫瘍抗原をコードする核酸配列、または腫瘍抗原をコードする前記核酸配列が挿入された組換え核酸（以下に記載される）が含まれる。10

【0034】

本発明の組換え核酸の実施の形態において有用な細菌DNAは、当業者に知られている。細菌DNAの供給源には例えば、赤痢菌、サルモネラ、ビブリオコレラ(*Vibrio cholerae*)、乳酸桿菌、バシリカルメットグエリン(*Bacille Calmette Guerin*)(BCG)、および連鎖球菌が含まれる。本発明の細菌DNAの実施の形態において、本発明の核酸は、細菌のゲノム中に挿入されてもよく、遊離状態のままでよい、またはプラスミド上に供給されてもよい。

【0035】

本発明のウィルス組換え核酸の実施の形態は、ポックスウィルスまたは他のアデノウィルスまたはアルファウィルスのようなウィルスに由来してもよい。好ましくはウィルス核酸は、受容体の動物細胞中に統合することができない。該核酸からの発現のための要素には、受容体の動物細胞における発現に適切なプロモーターが含まれてもよい。20

【0036】

本発明の特定のウィルス組換え核酸の実施の形態には、ポックスウィルス、アルファウィルス、およびアデノウィルス核酸が含まれるがこれに限定されない。ポックスウィルス核酸は、アビポックス、オルトポックス、およびスイポックス核酸からなる群より選択されてもよい。特定の実施の形態には、ワクシニア、鶏痘、カナリヤ痘および豚痘から選択されるポックスウィルス核酸が含まれる；特定の実施例には、TROVAC、NYVAC、ALVAC、MVA、Wyeth and Poxvac-TCが含まれる（以下により詳細に記載される）。

【0037】

本発明の組換え核酸はさらに、サイトカイン、リンフォカイン、および補助的刺激分子からなる群より選択される少なくとも一つをコードする核酸配列を含むということがさらに予期される。実施例には、インターロイキン2、インターロイキン12、インターロイキン6、インターフェロンガンマ、腫瘍壊死因子アルファ、GM-CSF、B7.1、B7.2、ICAM-1、LFA-3、およびCd72が含まれる（がこれに限定されない）。

【0038】

Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al. (Eds.), John Wiley and Sons, Inc, N.Y., U.S.A. (1998), Chpts. 1,2 and 4; Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed.), J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., U.S.A. (1989), Chpts. 1,2,3 and 7)に記載されるように、当業者によく知られる核酸を調製および精製するための分子生物学の標準技術を、本発明の組換え核酸の調製の態様において使用できる。40

【0039】

本発明の態様にはさらに、前記の核酸を含むベクターが含まれる。ある実施の形態において、該ベクターは、組換えウィルスまたは細菌でもよい（以下に記載される）。

【0040】

アデノウィルスベクターおよびその作製の方法が記載されている（例えば、すべてここに引用される米国特許第5994132号、同第5932210号、同第6057158号および国際特許出願公開第9817783号、同第9744475号、同第9961034号、同第9950292号、同第9927101号、同第9720575号、同第9640955号、同第9630534号）。アルファウィルスベクターが記載されてお50

り、本発明の実施の形態において使用でき、(例えば、ここに引用される米国特許第5792462号、同第5739026号、同第5843723号、同第5789245号、および国際特許出願公開第9210578号、同第9527044号、同第9531565号、同第5932210号、同第9815636号)、レンチウィルスも同様である(例えば、すべてここに引用される米国特許第6013516号、同第5994136号および国際特許出願公開第9817816号、同第9712622号、同第9817815号、同第9839463号、同第9846083号、同第9915641号、同第9919501号、同第9930742号、同第9931251号、同第9851810号、同第0000600号)。使用できるポックスウィルスには、例えば、アビポックス、オルトポックスまたはスイポックスポックスウィルスが含まれてもよい(米国特許第5364773号、同第4603112号、同第5762938号、同第5378457号、同第5494807号、同第5505941号、同第5756103号、同第5833975号および同第5990091号に記載される)。腫瘍抗原をコードする核酸を含むポックスウィルスは、当業者に知られるように相同組換えにより得ることができる。これによって、腫瘍抗原をコードする核酸は、哺乳類細胞中での発現に適切な条件下でウィルスゲノム中に挿入される(以下に記載される)。

【0041】

本発明のある実施の形態において、ポックスウィルスベクターは、ALVAC(1)またはALVAC(2)である(いずれもカナリアポックスウィルスに由来する)。ALVAC(1)またはALVAC(2)は、鳥類以外の宿主中では増殖的に複製せず、安全な特性を改良すると考えられる特徴である。ALVAC(1)は、認可されたカナリアポックスワクチンであるKanapox(Tartaglia et al. (1982) *Virology* 188:217; ここに引用される米国特許第5505941号、同第5756103号および同第5833975号)のブラーククローニングされた誘導体である弱毒カナリアポックスウィルスに基づくベクターである。ALVAC(1)は、Kanapoxの一般的特性と同じ一般的特性を有する。外因性免疫原を発現するALVACに基づく組換えウィルスは、ワクチンベクターとして有効であることも示されている(Tartaglia et al., In AIDS Research Reviews (vol. 1.3) Koff W., Wong-Staal F. and Kenedy R.C. (eds.), Marcel Dekker NY, pp. 361-378(1993a); Tartaglia, J. et al. (1993b) *J. Virol.* 67:2370)。例えば、狂犬病ウィルス糖タンパク質を発現するALVAC(1)組換え体により免疫化されたマウスを、ワクチンベクターとしてALVAC(1)に対する潜在性を示す狂犬病ウィルスによる致死抗原投与から保護した(Tartaglia, J. et al., (1992) *supra*)。ALVACに基づく組換え体は、イヌジステンパーーウィルス(Taylor, J. et al. (1992) *Virology* 187:321)および狂犬病ウィルスにより抗原投与されたイヌにおいて(Perkus, M.E. et al., 化合したワクチンおよび同時投与:現在の問題および展望、*Annals of the New York Academy of Sciences* (1994))、ネコ白血病ウィルスにより抗原投与されたネコにおいて(Tartaglia, J. et al., (1993b) *supra*)、およびウマインフルエンザウィルスにより抗原投与されたウマにおいて(Taylor, J. et al., In Proceedings of the Third International Symposium on Avian Influenza, Univ. of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, pp. 331-335(1993))有効であることも示された。

【0042】

ALVAC(2)は、ワクチニア転写要素E3LおよびK3LがC6遺伝子座内に挿入された第2世代ALVACベクターである(ここに引用される米国特許第5990091号)。E3Lは、dsRNAに特異的に結合し得るタンパク質をコードする。K3L ORFは、E1F-2に大きい相同性を有する。ALVAC(2)内で、E3L遺伝子は天然のプロモーターの転写調節下であるのに対し、K3Lは初期/後期ワクチンH6プロモーターの調節下に配置される。E3LおよびK3L遺伝子は、ALVAC(1)により感染された細胞中でPKR活性を抑制する作用をし、外来の遺伝子の発現のレベルおよび生存を増強する。

【0043】

さらなるウィルスベクターには、天然の宿主-制限ポックスウィルスが含まれる。ニワトリポックスウィルス(FPV)は、ポックスウィルスファミリーのアビポックス類の基本型ウイルスである。アビポックスウィルスの複製は鳥類に限定され(Matthews, R.E.F. (1982) *Intervirology* 17:42)、ヒトを含む任意の鳥類以外の種において増殖性の感染を起こすアビポックスウィルスの文献には報告されていない。この宿主制限により、ウィルスを他

10

20

30

40

50

の種に供給することに対する固有の安全な障壁が提供され、興味のある問題である家畜およびヒトの投与におけるアビポックスウィルスに基づくベクターが使用される。

【0044】

FPVは、家禽病原体からの免疫原を発現するベクターとして有効に使用されている。毒性鳥類インフルエンザウィルスの血球凝集素タンパク質がFPV組換え体が発現された。ニワトリおよび七面鳥への組換え体の接種後、免疫応答が誘発され、これは相同または異種の血球凝集素ウィルス抗原投与に対して保護的であった(Taylor, J. et al. (1988) Vaccine 6:504)。ニューカッスル病ウィルスの表面痘タンパク質を発現するFPV組換え体が開発された(ここに引用されるTaylor, J. et al. (1990) J. Virol. 64:1441; Edbauer, C. et al. (1990) Virology 179:901; 米国特許第5766599号)。

10

【0045】

MVAと称される、ワクチニアの高度に弱毒された菌株を、ポックスウィルスに基づくワクチンに対するベクターとして使用した。MVAの使用は、米国特許第5,185,146号に記載される。

【0046】

他の弱毒ポックスウィルスベクターを、ワクチニアの野生型の菌株に対する遺伝的修飾により調製した。例えば、NYVACベクターは、ワクチニアのコペンハーゲン(Copenhagen)菌株からの特定の毒性および宿主域遺伝子の欠損に由来し(ここに引用されるTartaglia, J. et al. (1992), supra; 米国特許第5364773号および同第5494807号)、発現された外来抗原に対する保護的免疫応答の誘導における組換えベクターとして有用であることが示された。

20

【0047】

組換えウィルスは、当業者に知られる方法により作製できる(例えば、ここに引用される、ワクチニアおよびポックスウィルスについて前記の米国特許第4769330号、同第4722848号、4603112号、同第5110587号、および5174993号)。

【0048】

本発明のさらなる態様において、生存および/または弱毒細菌をベクターとして使用してもよい。例えば、非毒物発生のビブリオコレラ突然変異菌株は、本発明の実施の形態において細菌ベクターとして有用である;米国特許第4,882,278号(機能的なコレラ毒素が產生されないように2つのctxA対立遺伝子のそれぞれのコード配列の実質的な量が欠失される菌株が開示される)、国際特許出願公開第92/11354号(irgA遺伝子座が突然変異により不活性化される菌株;この突然変異は、ctxA突然変異による単一の菌株と組み合わせてもよい)、および国際特許出願公開第94/1533号(機能的ctxAおよびattRS1 DNA配列を有しない欠失突然変異体)に記載される。国際特許出願公開第94/19482号に記載されるように、これらの菌株は、遺伝子工学的処理によって、異種抗原を発現することができる。(前記のすべての特許/特許出願はここに引用される。)

30

異種抗原の組換え発現に対して遺伝子工学的に処理された弱毒ネズミチフス菌株およびその経口免疫原としての使用が、例えば国際特許出願公開第92/11361号に記載される。

【0049】

既述のように、当業者は、本発明の実施の形態において細菌ベクターとして有用な他の細菌菌株には、フレクスナー赤痢菌、ストレプトコッカスゴルドニ(*Streptococcus gordoni*)、およびバシリカルメットグエリンが含まれる(がこれに限定されない)ことを容易に認識するであろう(ここに引用される国際特許出願公開第88/6626号、同第90/0594号、同第91/13157号、同第92/1796号、および同第92/21376号に記載される)。本発明の細菌ベクターにおいて、腫瘍抗原をコードする核酸は、細菌のゲノム中に挿入されてもよく、遊離状態のままでもよく、プラスミド上に供給されてもよい。

40

【0050】

本発明には、サイトカイン、リンフォカインおよび免疫刺激分子からなる群より選択される少なくとも一つのメンバーをコードする核酸を含むベクターが含まれてもよいということがさらに考えられる。該核酸配列は、腫瘍抗原をコードする配列と接触してもよいまた

50

は別個の核酸上でコードされてもよい。

【0051】

前記の腫瘍抗原、それをコードする核酸、および／またはベクターを含む細胞はさらに、本発明の実施の形態を含む。これらの細胞には、前記の腫瘍抗原、核酸、および／またはベクターが導入されたおよび／またはトランスフェクションされたおよび／または感染された任意の潜在的な細胞を含む（例えば、細菌、COS細胞、Vero細胞、ニワトリ胚纖維芽細胞、腫瘍細胞、抗原提示細胞、樹状細胞など）。細胞への導入および／またはトランスフェクションおよび／または感染の方法の選択は、導入される物質（例えば遊離DNA、プラスミド、組換えウィルス）の内在性の性質に依存し、当業者に知られるであろう（例えば、Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al. (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., N.Y., U.S.A. (1998), Chpt.9: Molecular Cloning: A Laboratory Manual(2nd Ed.), J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., U.S.A. (1989), Chpts. 1,2,3 and 16に記載される）。 10

【0052】

本発明のさらなる実施の形態には、前記の腫瘍抗原および／またはそれをコードする核酸および／またはベクターおよび／または細胞を含むワクチンが含まれる。

【0053】

腫瘍抗原を含む本発明のワクチンは、多価ワクチンでもよく、さらにいくつかのペプチド、エピトープまたは特定の腫瘍抗原の断片を含有してもよいまたは予防的にまたは治療的に有効な態様で他の腫瘍抗原および／または感染物質に関連するペプチドを含有してもよい。癌に対する多価ワクチンは、単独でまたは化合して、癌に対する免疫応答を調節するのに有効な多くの個々のTAA、またはその免疫原性の断片を含有してもよい。 20

【0054】

本発明のワクチンは、本発明の腫瘍抗原をコードする核酸分子を含有してもよい。そのようなワクチンは、核酸ワクチンと称されるが、遺伝的ワクチン、ポリヌクレオチドワクチンまたはDNAワクチンとも称され、すべて本発明の範囲内である。そのような実施の形態において、腫瘍抗原は宿主動物中でインビボで産生される。本発明のさらなる実施の形態には、前記の核酸を含むベクター（すなわち細菌、組換えウィルス）が含まれる。

【0055】

本発明はまた、腫瘍抗原、それをコードする核酸、該核酸を含むベクター、前記のものを含む細胞および／またはワクチン、およびサイトカイン、リンフォカイン、免疫刺激分子からなる群より選択される少なくとも一つのメンバー、およびそれをコードする核酸の混合物を考慮する。本発明のさらなる実施の形態にはさらに、インビボにおける投与に適切な薬学的に許容できる形態で被験者に投与するための前記の腫瘍抗原、それをコードする核酸、ベクター、細胞、ワクチンまたは混合物を含む薬剤が含まれる。「インビボにおける投与に適切な生物学的に親和性の形態」とは、毒性効果よりも治療効果がまさっている投与される物質の形態を意味する。治療上活性のある量の、または「有効量」の本発明の薬剤の投与とは、動物中で免疫応答を誘発するという所望の結果を達成するために必要な、投与量および期間において有効な量を意味する。物質の治療上有効な量は、患者の病気の状態／健康、年齢、性別、および体重、および特定の腫瘍抗原、それをコードする核酸、ベクター、細胞、または所望の免疫応答を誘発するワクチンの固有の能力のような因子により変化し得る。投与量の投薬計画を調節して、最適の治療反応を提供し得る。例えば、いくつかに分けた投与量を毎日、または周期的な間隔で投与してもよい、および／または状況の緊急性により示されるように投与量を比例的に減少してもよい。 30 40

【0056】

ここに記載される薬剤は、有効量の活性物質（すなわち、腫瘍抗原、核酸、組換えウィルス、ワクチン）が薬学的に許容できる賦形剤との混合物中で組み合わされるように動物に投与できる薬学的に許容できる組成物を調製する、それ自体既知の方法により調製できる。適切な賦形剤は、例えば、「薬剤添加物のハンドブック」(Michael and Irene Ash, Gower Publishing Limited, Aldershot, England(1995)により編集された)に記載されてい 50

る。この原理に基づいて、組成物には、たとえそれのみではなくても、1つ以上の薬学的に許容できる賦形剤または希釈剤と会合した物質の溶液が含まれ、適切なpHを有する緩衝溶液中に含まれてもよいおよび／または生理的溶液により等浸透性でもよい。この点に関して、米国特許第5,843,456号を参照してもよい。これらの組成物はさらに、アジュvantを含んでもよい（以下に記載するように）。

【0057】

本発明のさらなる実施の形態には、患者中で癌細胞を発現する腫瘍抗原を抑制する方法であって、該患者に有効量の本発明の腫瘍抗原、それをコードする核酸、ベクター、細胞またはワクチンを投与する工程を含む方法が含まれる。腫瘍抗原を発現する固体腫瘍を有する患者には、結腸癌、肺癌、膵臓癌、子宮内膜癌、乳癌、甲状腺癌、黒色腫、口癌、喉頭癌、精上皮腫、肝細胞癌、胆管癌、扁平上皮細胞癌、および前立腺癌が含まれる（がこれに限定されない）。このようにして、免疫応答を誘発するおよび／または腫瘍抗原発現細胞を抑制する前記の方法を含む癌患者を治療する方法が、本発明の態様／実施の形態と考えられる。

10

【0058】

既述のように、本発明の腫瘍抗原、それをコードする核酸、ベクター、細胞またはワクチンをリンパ部位に投与することにより、動物を免疫化してもよい。投与は、単一の投与量で行ってもよいまたは間隔をおいて反復してもよい。適切な投与量は、当業者によって理解される様々のパラメーター、例えば免疫原自体（すなわちポリペプチド対核酸およびそのよりはっきりした種類）、投与の経路およびワクチン化される動物の状態（体重、年齢など）に依存する。

20

【0059】

前記のように、核酸（特にプラスミドおよび／または本発明の腫瘍抗原をコードする遊離／裸DNAおよび／またはRNA）を、免疫応答を誘発／誘導する目的で動物に投与してもよい（例えば、米国特許第5589466号；McDonnell and Askari, NEJM 334:42-45(1996)；Kowalczyk and ErtIm Cell Mol. Life Sci. 55:751-770(1999)）。通常、この核酸は、標的の動物細胞中で複製できず該動物のゲノム中に統合できない形態である。腫瘍抗原をコードするDNA/RNA分子はまた、通常は動物の細胞中で発現に適切なプロモーターの調節下に配置される。プロモーターは、偏在的にまたは組織特異的に機能し得る。非-組織特異的プロモーターの実施例は、初期サイトメガロウィルス(CMV)プロモーター（米国特許第4,168,062号に記載される）およびニワトリ肉腫ウイルスプロモーターを含む。デスマシンプロモーターは、組織特異的であり、筋肉細胞中で発現させる。より一般には、有用なベクターについて記載されている（すなわち国際特許出願公開第94/21797号）。

30

【0060】

腫瘍抗原をコードする核酸を投与するために、該核酸は、ポリペプチド／タンパク質の前駆体または成熟形態をコードできる。前駆体形態をコードする場合、前駆体形態は相同または異種でもよい。後者の場合、組織-タイププラスミノーゲン因子(tPA)のリーダー配列のような真核生物のリーダー配列を使用してもよい。

【0061】

免疫原として使用するために、本発明の核酸は、当業者に既知の様々な方法により調製できる。まず、核酸を、任意の供給賦形剤（例えば、陰イオン性リポソーム、陽イオン性脂質、微粒子（例えば金微粒子）、沈降剤（例えばリン酸カルシウム）または任意の他のトランسفェクション-促進剤）を有しない、裸／遊離形態で使用することができる。この場合、核酸はキャリアを有するまたは有しない生理的に許容できる溶液（例えば無菌食塩水または無菌緩衝食塩水）中に希釈するだけでもよい。存在する場合には、キャリアは好みしくは等張性、低張性、または弱い高張性であり、比較的低いイオン強度を有する（例えばショ糖溶液（例えば20%のショ糖を含有する溶液）により提供される）。

40

【0062】

あるいは、核酸は細胞吸収を支持する物質と会合させてもよい。すなわち、(i)細胞の浸透性を修飾する化学物質（例えばブピバカイン；例えば国際特許出願公開第94/16737号参

50

照)で捕捉してもよい、(ii)リポソーム中に被包してもよい、または(iii)陽イオン性脂質またはシリカ、金、またはタンゲステン微粒子と会合してもよい。

【0063】

陽イオン性脂質は当該技術においてよく知られており、遺伝子供給に通常使用される。そのような脂質には、リポフェクチン(Lipofectin) (DOTMA (N-[1-(2,3-ジオーレイロキシプロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロライドとともに知られる)、DOTAP(1,2-ビス(オレイロキシ)-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン)、DDAB(ジメチルジオクタデシル-アンモニウムプロミド)、DOGS(ジオクタデシルアミドログリシルスペルミン)およびD C-Chol(3ベータ-(N-(N',N'-ジメチルアミノメタン)-カルバモイル)コレステロール)のようなコレステロール誘導体が含まれる。これらの陽イオン性脂質は、¹⁰ 欧州特許第187702号、国際特許出願公開第90/11092号、米国特許第5283185号、国際特許出願公開第91/15501号、同第95/26385号、および米国特許第5527928号に記載されている。遺伝子供給のための陽イオン性の脂質は、好ましくは、例えば国際特許出願公開第90/11092号に記載されるDOPEのような中性脂質と会合して使用する。

【0064】

他のトランスフェクション促進化合物を、陽イオン性リポソームを含有する製剤に加えてもよい。これらの多くは、例えば国際特許出願公開第93/18759号、同第93/19768号、同第94/25608号、および同第95/2397号に記載される。これらには、例えば核膜を通してのDNAの輸送の促進に有用なスペルミン誘導体(例えば国際特許出願公開第93/18759号参照)およびGALA、グラミシジンS、および陽イオン性胆汁酸塩(例えば国際特許出願公開第93/19768号参照)のような膜浸透性化合物が含まれてもよい。²⁰

【0065】

金またはタンゲステンの微粒子を、核酸の供給に使用してもよい(国際特許出願公開第91/359号および同第93/17706号に記載される)。この場合、ポリヌクレオチドをコーティングされた微粒子を、針を使用しない注射装置(例えば米国特許第4,945,050号、同第5,015,580号、および国際特許出願公開第94/24263号に記載されるような「遺伝子銃」)を使用して内皮または表皮内経路により注射してもよい。

【0066】

陰イオン性のおよび中性のリポソームも、当該技術においてよく知られており(リポソームを作製する方法の詳細な説明について例えば、リポソーム: A Practical Approach, RP C New Ed, IRL Press(1990)参照)、核酸を含む広範囲の産物の供給に有用である。³⁰

【0067】

前記の方法(すなわち免疫応答を誘発/誘導するための)の特定の実施の形態には、本発明の免疫原を投与するための点火-後押しプロトコルが含まれる。より詳細には、これらのプロトコルには、腫瘍抗原、または該核酸を含むベクター(すなわち組換えウイルス、細菌)をコードする免疫原(すなわち核酸(例えば、プラスミド、細菌/ウイルス/遊離または裸))の特定の/独特的の形態による「点火」段階およびその後の腫瘍抗原(すなわちタンパク質またはその断片(例えばエピトープ/ペプチド))、腫瘍抗原をコードする核酸(またはその断片)、または該核酸を含むベクターの変化した(すなわち「点火」のために使用されたのと別個の)形態を投与する工程を含む少なくとも1つの「後押し」段階が含まれる。「点火-後押し」原理の実施例は、当業者に知られている(例えば国際特許出願公開第98/58956号、同第98/56919号、同第97/39771号に記載される)。該プロトコルの1つの利点は、免疫原またはその断片をコードする核酸を挿入される/組み込まれるベクター自体(すなわち組換えウイルス)に対して免疫応答の中立化を產生する問題を回避するという潜在性である(例えばR.M. Conry et al. (2000) Clin. Cancer Res. 6:34-41)。⁴⁰

【0068】

当業者によく知られるように、投与形態(すなわち組換えウイルス、核酸、ポリペプチド)にかかわりなく、免疫原がアジュバントとともに投与される場合に、免疫原が免疫応答を誘導/誘発する能力を改良することができる。アジュバントは、「ワクチン作製-サブ⁵⁰

ユニットおよびアジュバントアプローチ」(Powell and Newman, Pleum Press, New York, U.S.A., pp. 61-79 and 141-228(1995)により編集された)に記載される。アジュバントは通常、免疫原の免疫原性を強めるが、それ自体は必ずしも免疫原性ではない。アジュバントは、投与部位の位置的に近くに免疫原を保有することにより作用して、免疫系の細胞に免疫化物質をゆっくりと、継続して放出することを促進する貯蔵効果を產生し得る。アジュバントはまた、免疫系の細胞に免疫原貯蔵を誘引し、そのような細胞を刺激して免疫応答を誘導させることができる。これによって、本発明の実施の形態には、さらにアジュバントを含む組成物が含まれる。

【0069】

理想的なアジュバントの所望の特徴には以下のものが含まれる；

10

- 1) 毒性を有しない；
- 2) 長く持続する免疫応答を刺激する能力
- 3) 製造が簡単なことおよび長期間の保存における安定性
- 4) 所望なら、様々の経路により投与される抗原に対する細胞性および体液性応答を誘発する能力
- 5) 他のアジュバントとの共同作用
- 6) 抗原提示細胞(APC)の個体群との選択的な相互作用をする能力
- 7) 適切なTH1またはTH2細胞特異的免疫応答を特異的に誘発する能力
- 8) 抗原 / 免疫原に対する適切な抗体イソタイプレベル(例えばIgA)を選択的に増加する能力。

20

【0070】

しかしながら、多くのアジュバントは毒性であり、所望でない効果を引き起こし得るので、ヒトおよび多くの動物において使用に適切でない。例えば、あるアジュバントは、肉芽腫、急性および慢性炎症(すなわちフロイト完全アジュバント(FCA))、細胞溶解(すなわちサポニンおよびプルロニック(pluronic)ポリマー)および発熱性、関節炎および前部ブドウ膜炎(すなわちムラミルジペプチド(MDP)およびリポ多糖(LPS))を誘発し得る。実際は、水酸化アルミニウムおよびリン酸アルミニウム(まとめて一般にミョウバンと称される)は通常、ヒトおよび家畜のワクチンにおけるアジュバントとして使用される。ジフェリアおよび破傷風トキソイドに対する抗体反応を増加することにおけるミョウバンの効力が確立されている。にもかかわらず、制限がある。例えば、ミョウバンはインフルエンザワクチン化には無効であり、他の免疫原による細胞媒介免疫応答を誘発できない。ミョウバンをアジュバントとする抗原により誘発される抗体は、主にマウス中のIgG1イソタイプのものであり、これはワクチン化における保護に最適ではない。

30

【0071】

アジュバントは、「内因性」または「外因性」として特徴付けられてもよい。内因性アジュバント(例えばリポ多糖)は、それ自体ワクチンとして使用される物質(すなわち殺されたおよび弱毒された細菌)の完全なおよび通常の成分である。外因性アジュバントは通常、一般に抗原に非共有結合した不完全な免疫モジュレーターであり、宿主免疫応答を増強するように調製される。

40

【0072】

本発明の実施の形態において、アジュバントは、サイトカイン、リンフォカイン、および補助的刺激分子からなる群より選択される少なくとも1つである。実施例には、インターロイキン2、インターロイキン12、インターロイキン6、インターロイキンガンマ、腫瘍壞死因子アルファ、GM-CSF、B7.1、B7.2、ICAM-1、LFA-3、およびCD72が含まれる(がこれに限定されない)。特定の実施の形態には、アジュバントとしてGM-CSFを使用することが含まれる(例えば、すべてここに引用される米国特許第5679356号、同第5904920号、同第5637483号、同第5749535号、同第5254534号、欧州特許出願第211684号、および国際特許出願公開第97/28816号に記載される)。

【0073】

様々の潜在的な該陰性のアジュバントが記載されている。これらには、膜タンパク質抗原

50

に複合されたサポニン(免疫刺激複合体)、鉱油を有するフルロニックポリマー、殺されたミコバクテリアおよび鉱油、フロイト完全アジュバント、ムラミルジペプチド(MDP)のような細菌産物およびリポ多糖(LPS)、並びに脂質A、およびリポソームが含まれる(がこれに限定されない)。

【0074】

アジュバントとしてのサポニン自体の使用はよく知られている(Lacaille-Dubois, M. and Wagner, H. (1995) *Phytomedicine* 2:363)。例えば、クイルA(Quil A) (South American tree Quillaja Saponaria Molinaに由来する)およびその画分は、広く記載されている(すなわち、米国特許第5057540号; Kensil, C.R. (1996) *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 12; および欧州特許第362279号)。溶血サポニンQS21およびQS17(クイルAのHPLC精製画分)は、潜在的な全身性アジュバントとして記載されている(米国特許第5057540号; 欧州特許第362279号)。これらの文献には、全身性のワクチンについての潜在的なアジュバントとして作用するQS7(クイルAの非溶血画分)の使用も記載されている。QS21の使用がさらに、Kensil et al. ((1991) *J. Immunol.* 146:431)に記載されている。QS21およびポリソルベートまたはシクロデキストリンの組合せも知られている(国際特許出願公開第9910008号)。クイルAの画分(例えばQS21およびQS7)を含む特定のアジュバント系は、国際特許出願公開第9633739号および同第9611711号に記載されている。

【0075】

別の好ましいアジュバント/免疫促進剤は、非メチル化CpGジヌクレオチド("CpG")を含有する免疫刺激オリゴヌクレオチドである。CpGは、DNA中に存在するシトシン-グアノシンジヌクレオチドモチーフについての省略である。CpGは、全身性および粘膜経路により投与した場合のアジュバントであることが当該技術において知られている(国際特許出願公開第9602555号; 欧州特許第468520号; Davies et al. (1998) *J. Immunol.* 160:87; Mc Cluskie and Davis (1998) *J. Immunol.* 161:4463)。多くの研究において、BCG遺伝子配列に由来する合成オリゴヌクレオチドは、免疫刺激効果を誘発することができることが示されている(インビトロおよびインビボで; Krieg, (1995) *Nature* 374:546)。免疫刺激オリゴヌクレオチド配列の詳細な分析により、CGモチーフは必ずある配列中に存在し、そのような配列は細菌DNA中で共通であるが脊椎動物のDNAではまれであるということが示された。(例えば、免疫刺激配列はしばしば、プリン、プリン、C、G、ピリミジン、ピリミジンであるのに対し、CGモチーフは、メチル化されない; しかしながら、たの非メチル化CpG配列は免疫刺激性であることが知られているので、本発明において使用し得る。)当業者にとって自明であるように、前記CGモチーフ/配列は、本発明の核酸それ自体の中に組み込んでもよい、または別個の核酸上に存在してもよい。

【0076】

様々の他のアジュバントは当該技術において知られており、本発明の実施の形態に含まれる。Lockhoff et al. の米国特許第4,855,283号(ここに引用される)には、糖脂質類似体およびそのアジュバントとしての使用が記載される。これらには、N-グリコシルアミド、N-グリコシルウレアおよびN-グリコシルカルバメートが含まれ、これはそれぞれ免疫モジュレーターまたはアジュバントとして、糖残基においてアミノ酸により置換される。さらに、Lockhoff et al. ((1991) *Chem. Int. Ed. Engl.* 30:1611)は、天然に発生する糖脂質(例えばリン酸糖脂質およびグリセロ糖脂質)に構造類似性を示すN-糖脂質類似体もまた、単純ヘルペスウィルスワクチンおよび仮性狂犬病ウィルスワクチンにおいて強い免疫応答を誘発することができるということを報告している。

【0077】

Moloneyの米国特許第4,258,029号(ここに引用される)には、破傷風毒素およびホルマリン不活性化タイプI、IIおよびIIIポリオウィルスワクチンと複合した場合にアジュバントとしてオクタデシルチロシンヒドロクロライド(OTH)が作用することが記載される。Nixon-George et al. ((1990) *J. Immunol.* 144:4798)はまた、組換え肝炎B表面抗原と複合した芳香性のアミノ酸のオクタデシルエステルは肝炎Bウィルスに対する宿主免疫応答を増強するということを報告している。

10

20

30

40

50

【0078】

アジュバント複合体は、アクリルまたはメタクリル酸のポリマーおよびマレイン無水物およびアルケニル誘導体のコポリマーから選択されてもよい。アジュバント複合体は、特に糖またはポリアルコールのポリアルケニルエーテルと架橋したアクリルまたはメタクリル酸のポリマーである。これらの複合体は、カルボマーの用語で知られている(Pharmeuropa Vol.8, No.2, June 1996)。好ましくは、特にカルボマーの本発明によるアジュバントの溶液は、好ましくは塩化ナトリウムの存在下で滅菌水中で調製され、酸性のpHで得られる溶液である。この保存溶液は、所望の量のまたはその実質的な部分のNaClを満たした水、好ましくは生理的塩類溶液(NaCl 9g/l)にいくつかの部分を一度に加えることにより希釈し(所望の最終濃度を得るために)、同時にまたはその後に好ましくはNaOHで中和する(pH7.3から7.4まで)。生理的pHにおけるこの溶液は、免疫化物質と混合するために使用する；該混合物は、凍結乾燥した、液体のまたは冷凍した形態で保存できる。10

【0079】

当業者はまた、少なくとも3つのヒドロキシル基(好ましくは8より大きくない)を有するポリヒドロキシル化化合物と架橋したアクリルポリマーを含み、少なくとも3つのヒドロキシルの水素原子が少なくとも2つの炭素原子を有する不飽和脂肪族ラジカルにより置換されるアジュバントを記載する米国特許第2,909,462号(ここに引用される)を参照することができる。好ましいラジカルは、2から4までの炭素原子を含有するものである(例えばビニル、アリルおよび他のエチレン不飽和基)。不飽和ラジカルは、それ自体メチルのような他の置換基を含有してもよい。Carbopol(BF Goodrich, Ohio, USA)の名称の下で市販される産物が特に好ましい。これは、アリルショ糖またはアリルペンタエリトリトルと架橋する。これらの中に、記載されたCarbopolが存在するかもしれない(例えば974P、934Pおよび971P)。マレイン無水物およびアルケニル誘導体のうち、コポリマーEMA(Monsanto; 直線状または架橋した(例えばジビニルエーテルと架橋した)マレイン無水物およびエチレンのコポリマーである)が好ましい。これらの化学物質のさらなる記載についてJ. Fields et al. ((1960) Nature 186:778)を参照してもよい。20

【0080】

本発明のさらなる態様において、免疫化物質の非経口投与に有用なアジュバントには、アルミニウム化合物が含まれる(例えば水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、およびリン酸水素ナトリウム；であるが、カルシウム、鉄または亜鉛の塩であってもよく、アシル化チロシンの不溶性の乳剤、またはアシル化糖、陽イオン性または陰イオン性に誘導された多糖、またはポリホスファゼン(polyphosphazene)でもよい)。抗原は、当業者によく知られる標準プロトコルによりアルミニウム化合物とともに沈降させてもよい、またはその上に吸着させてもよい。30

【0081】

本発明の実施の形態に含まれる他のアジュバントは、リピドAを含む(特に3-de-0-アシル化モノホスホリルリピドA(3D-MPL))。3D-MPLは、Ribi Immunochem, Montanaにより製造されるよく知られるアジュバントである。これはしばしば、3-de-0-アシル化モノホスホリルリピドAと4、5、または6アシル化鎖として化学的に供給される。これは英国特許第2122204B号に記載される方法によって調製できる。3D-MPLの好ましい形態は、直径0.2 μmより小さい粒子の大きさを有する特定の製剤の形態である(欧州特許第689454号)。40

【0082】

粘膜免疫化のためのアジュバントには、細菌の毒素が含まれる(例えば、コレラ毒素(CT)、大腸菌熱不安定性毒素(LT)、クロストリディウムディフィシル(Clostridium difficile)毒素Aおよび百日咳毒素(PT)、またはその組合せ、サブユニット、トキソイド、または突然変異体)。例えば、天然のコレラ毒素サブユニットB(CTB)の精製された製剤を使用してもよい。任意のコレラの毒素に対する断片、類似体、誘導体、または融合は、アジュバント活性を有する場合は適切である。毒性が減少した突然変異体を使用してもよい。突然変異体について記載されている(例えば、国際特許出願公開第95/17211号(Arg-7-Lys CT突然変異体)、同第96/6627号(Arg-192-Gly LT突然変異体)、および同第95/34323(Arg-50

-9-LysおよびGlu-129-Gly PT突然変異体)。さらなるLT突然変異体には、例えば、Ser-63-Lys、Ala-69-Gly、Glu-110-Asp、およびGlu-112-Asp突然変異が含まれる。様々の供給源(例えば大腸菌、サルモネラミネソタ(Salmonella minnesota)、ネズミチフス菌、またはフレクスナー赤痢菌)の他のアジュバント(例えば細菌モノホスホリルリピドA(MPLA))を、免疫化物質の粘膜投与に使用してもよい。

【0083】

粘膜および非経口免疫化に有用なアジュバントには、ポリホスファゼン(例えば国際特許出願公開第95/2415号)、DC-chol(3 b-(N-(N',N'-ジメチルアミノメタン)-カルバモイル)コレステロール(例えば米国特許第5,283,185号および国際特許出願公開第96/14831号)およびQS-21(例えば国際特許出願公開第88/9336号)が含まれてもよい。

10

【0084】

ここに記載されるアジュバント/免疫刺激物質は、リポソーム、水中油型乳剤(oil in water emulsion)、および/またはアルミニウム塩(例えば水酸化アルミニウム)を含む金属塩のようなキャリアとともに調製してもよい。例えば、3D-MPLは、水酸化アルミニウム(欧州特許第689454号に記載される)または水中油型乳剤(国際特許出願公開第9517210号に記載される)とともに調製してもよい; QS21は、リポソームを含有するコレステロール(国際特許出願公開第9633739号に記載される)、水中油型乳剤(国際特許出願公開第9517210号に記載される)またはミョウバン(国際特許出願公開9815287号)とともに都合よく調製される。ワクチンに調製する場合、免疫刺激オリゴヌクレオチド(すなわちCpG)は通常、抗原に共有結合された(国際特許出願公開第9816247号に記載される)、または水酸化アルミニウムまたはミョウバンのようなキャリアとともに調製された(Davies et al. Supra; Brazolot-Millan et al (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. 95:15553)遊離抗原(国際特許出願公開第9602555号; McCluskie and Davis (1989) Supra)とともに自由溶液中で投与する。

20

【0085】

アジュバント/免疫刺激物質もまた本発明の範囲内である。例えば、モノホスホリルリピドAおよびサポニン誘導体(国際特許出願公開第9400153号、同第9517210号、同第9633739号、同第9856414号、同第9912565号、同第9911214号に記載される)、またはより詳しくはQS21と3D-MPLとの組合せ(国際特許出願公開第9400153号に記載される)を使用してもよい。免疫刺激性オリゴヌクレオチドとサポニン(例えばQS21)との組合せ、またはアルミニウム塩と組み合わせたモノホスホリルリピドAの組合せ(好ましくは3D-MPL)もまた、本発明において使用する潜在的なアジュバントを形成する。

30

【0086】

以下の限定のない実施例は、本発明を説明するものである。

【0087】

実施例

実施例1

この実施例は、代表的な腫瘍抗原(修飾されたgp100)の結節内注射と皮下注射とを比較する。

【0088】

40

方法および実験計画

テストシステム

カニクイザル(Macaca fascicularis)特定の目的に応ずるように育てられた動物

供給者: Siconbrec "Simian Conservation Breeding & Research Center Inc.", Fema Building, 44 Gil Puyat Avenue Makati, Metro Manila, Philippines.

研究における動物の数: 12匹(オス6匹およびメス6匹)。

【0089】

処理開始時の年齢: 26から38ヶ月。

【0090】

・処理開始時の体重範囲(1日目):

50

・オス：1.73から2.34kg。

【0091】

・メス：1.71から2.65kg。

【0092】

畜産

・住居：1つの空気調節をした部屋。

【0093】

・温度：19 から25 まで（標的範囲）。

【0094】

・相対湿度：> 40%。

10

【0095】

・空気交換：1時間につき8分間の空気交換。

【0096】

・照明周期：12時間明るい（人工的に）/ 12時間暗い。

【0097】

・おり：動物は、ステンレス鋼のメッシュのおり（約540×810×760mm）に一匹ずつ入れた。

【0098】

・食餌：化学物質および細菌の汚染について分析した拡大された完全な市販される靈長類の食餌(Mazuri diet, Special Diet Services Ltdk Witham, Essex, CM8, 3AD, Great Britain)。

20

【0099】

分配される量：100g食餌 / 動物 / 日。

【0100】

さらに、動物はフルーツの食餌（リンゴまたはバナナ）を与えられた。

【0101】

動物を、臨床実験の調査のための血液サンプリングの前におよび死体解剖の前に少なくとも16時間断食させた。

【0102】

・水；任意に水を飲む（ボトルにより）。

30

【0103】

・汚染物質：研究の目的の達成を妨げ得るレベルで食餌または水中に存在する汚染物質は認識されなかった。

【0104】

前処理方法

・動物の健康の処置；すべての動物は、到着時に不健康についての臨床実験および順化期間中に獣医臨床実験を受けた。

【0105】

・順化期間：動物の到着から処理を開始するまで少なくとも3週間

実験計画

40

・処理群に対する配分は、体重クラスに基づく無作為の配分方法を使用して順化期間中に行った。

【0106】

・表1に示されるように動物を処理群に割り当てた。投与された投与量レベルは表2に示される。

【0107】

テスト / 対照物質の投与

グループ1および2の動物

・投与の方法：左鼠径リンパ節における注射。

【0108】

50

動物は、ケチミン塩酸塩(Imalgen 500-Merial, Lyon, France)の筋肉内注射によるそれぞれの投与前に弱い麻酔をかけた。同じリンパ節を時折注射した（左側）。それぞれの注射の後、ヨード(Vetedine-Vetoquinal, Lure, France)で局所消毒した。

【0109】

グループ3

・経路：皮下。

【0110】

・投与の方法：滅菌注射器および皮下導入された針を使用して巨丸剤注射をする。4つの注射部位を使用した後、ヨード(Vetedine-Vetoquinal, Lure, France)で局所消毒した。

グループ1および2の動物と同じ条件下になるように動物を、ケチミン塩酸塩(Imalgen 500-Merial, Lyon, France)の筋肉内注射によるそれぞれの投与前に弱い麻酔をかけた。 10

【0111】

表3に示されるように背側頸部／肩甲骨間領域の4つの注射部位を使用した。

【0112】

・ELISPOT分析

ELISPOT分析を使用して、様々な処理群におけるサルにおいて産生される細胞媒介免疫応答を評価した。特に、ELISPOT IFN アッセイを使用して、gp100抗原に応答するサルから得られるTリンパ細胞からのIFN 産生を測定した。

【0113】

材料および方法

プレート：ミリポアマルチスクリーンHAプレート / MAHA S45.10 (96ウェル)。 20

【0114】

捕獲抗体：MABTECHモノクローナル抗-IFN 抗体 / G-Z4 1mg/mL。

【0115】

検出抗体：MABTECHモノクローナル抗-IFN 抗体 / 7-B6-1-ビオチン 1mg/mL。

【0116】

酵素：SIGMA, Extravidin-PA抱合体 / E2636.

基質：BIORAD, NBT/BCIP - アルカリ性ホスファターゼ抱合体基質kit/ref: 170-64 32。

【0117】

コーティング

マルチウェルプレート中にカルボネートビカルボネート緩衝剤0.1M pH9.6で1/1000に希釈した1 μg/mLの捕獲抗体をウェルごとに100 μL配置する。4度で一晩インキュベートする。1X PBSで四度洗浄する。 30

【0118】

飽和

実質的なアミノ酸、ピルビン酸、ヘペス緩衝剤およびPeni-Streptoを有しない10%FCSを加えたRPMIをウェルごとに200 μL配置する。37度で2時間インキュベートする。

【0119】

テスト

免疫化動物からの細胞を、(a)培地のみ；(b)1mg/mLの濃度でプールされたペプチド；および(c)非特異的刺激(PMA-Iono)に対してテストする。IFN- 産生を刺激するためにこの実施例において使用されるプールされたペプチドは、gp100に由来し、表4から7までに記載される。それぞれのサンプルの最終量は200 μLである。37度で20時間インキュベートする。 40

【0120】

1X PBSおよび0.05% Tween 20で四度洗浄する。

【0121】

検出

1X PBS、1% BSAおよび0.05% Tween 20で1/1000に希釈した1 μg/mLの検出抗体をウェルごとに100 μL配置する。室温で2時間インキュベートする。1X PBSおよび0.05% Tween 20で 50

四度洗浄する。

【0122】

反応

1X PBS、1% BSAおよび0.05% Tween 20で1/6000に希釈したExtravidin-PA抱合体をウェルごとに100 μL配置する。室温で45時間インキュベートする。1X PBSおよび0.05% Tween 20で四度洗浄する。

【0123】

基質の追加

予め調製した基質をウェルごとに100 μL配置する。例えば、1プレートにつき、調製する : 9.6mLの滅菌水、0.4mLの25X緩衝剤、0.1mLの溶液A(NBT)および0.1mLの溶液B(BCIP)。室温で30 - 45分間インキュベートする。滅菌水で洗浄する。乾燥させプラスチックフィルムに移す。Zeiss画像解析機を使用してスポットの数を計数する。それぞれのスポットは、T細胞を分泌するそれぞれのIFN- γ に対応する。

【0124】

結果

ELISPOT分析において陽性であることがテストされた動物は、図1 - 4に示される。全体的に、この結果により、gp100抗原の結節内投与を受けた動物の2匹のうち2匹（すなわち100%）、およびgp100抗原の皮下投与を受けた動物の4匹のうち2匹（すなわち50%）は陽性の細胞媒介免疫応答を有したことが示される。

【0125】

ELISA分析

当該技術において知られる標準の原理を使用してELISAを行った。簡単に言えば、ヒトgp100（“hgp100”；バキュロウィルスで產生される）をコーティング緩衝剤（カルボネート-ビカルボネート、pH9.6）で希釈し、0.5 μg/ウェルで96ウェルに加えた。プレートを4度一晩配置した。次にプレートを洗浄し、阻止緩衝剤（リン酸緩衝化生理食塩水 / 0.5% Tween 20/1.0% BSA、pH7.2）を37℃で2時間加えた。その後プレートを洗浄し、血清を希釈緩衝剤で希釈した（リン酸緩衝化生理食塩水 / 0.5% Tween 20/1.0% BSA、pH7.2）。この研究のために、サル血清を1:800まで希釈し、テストしたそれぞれのサンプルについて”7”つの連続した3倍希釈を行った。ヒト血清対照を、希釈緩衝剤中で1:50に希釈し、“7”つの連続した2倍希釈を行った。それぞれの希釈は、2度行った。プレートを、37℃でさらに2時間インキュベートした。プレートを洗浄し、希釈緩衝剤で1:100に希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)-抱合された抗-ヒト二次抗体（すべてヒツジからの抗-ヒトIg(Amersham Life Science, NA933)）をウェルに加え、37℃で1時間インキュベートした。プレートを洗浄し、基質緩衝剤（50mM リン酸塩 / 25mM クエン酸塩、pH7.2）中でH₂O₂を有するOPD(o-フェニレンジアミンジヒドクロライド)基質をウェルに加えた。速度論ELISAについては、プレートを連続的に（「停止」緩衝剤を使用せず）反復的に（15分間につき2分間の間隔で）読み取った。プレートを450nmで読み取った。

【0126】

結果

上述の実験の結果は、表8および図5に示される。グループ2は、ALVAC(2)-gp100(mod)の結節内注射を受け、その後修飾されたgp100ペプチド209(2M)および290(9V)により後押しされる；グループ3の動物は、ALVAC(2)構成体の皮下注射を受け、その後ペプチドにより後押しされる；グループ1の動物は、対照として食塩水の結節内注射を受けた。

【0127】

図5から分かるように、抗原の結節内注射により、抗原が皮下注射された場合よりずっと大きい体液性応答が誘発された。

【0128】

簡単に言えば、実施例の結果により、腫瘍抗原の皮下注射によって投与の従来の皮下経路により腫瘍抗原が注射された場合よりもずっと大きい体液性および細胞媒介応答が誘発されるということが示される。

10

20

30

40

50

【0129】

本発明は好ましい実施例であると目下考えられているものに関して記載されているが、本発明は開示される実施例に限定されるものではないことを理解すべきである。反対に、本発明は、添付の特許請求の意図および範囲内に含まれる様々の修飾および同等の組合せを範囲とするものである。

【0130】

すべての文献、特許および特許出願は、それぞれの文献、特許または特許文献が明確にそれぞれここに引用されたのと同じ程度までここに完全に引用される。

【0131】

【表1】

10

表1

グループ番号	投与の経路	処理日数および投与した化合物	動物の数
1	結節内	食塩水(NaCl 0.9%)：日数28, 42, 56 その後70, 71, 72, 73, 74 その後84, 85, 86, 87および88	4
2	結節内	ALVAC(2)-gp100 mod: 日数28, 42, 56 * mgp100 ペプチド：日数70, 71, 72, 73, 74 その後84, 85, 86, 87および88	4
3	皮下	食塩水(NaCl 0.9%)：日数1 ALVAC(2)-gp100 mod: 日数28, 42, 56 * mgp100 ペプチド：日数70および84	4

20

*209(2M)-IMDQVPFSY; 290(gV)YLEPGPVTV

- ・グループ1の動物（対照）は、対照物質（注射のための食塩水(NaCl 0.9%)）を与えられた。
- ・グループ3の動物は、1日だけ対照物質（注射のための食塩水(NaCl 0.9%)）を与えられた。

【表2】

30

表2

グループ番号	投与量レベル	投与量 (ml/投与)
1	食塩水(NaCl 0.9%) : 0	0.250
2	投与量 : 0.25×10^7 ^4CCID 50 ALVAC(2)-gp100 mod: 0.25×10^7 ^4CCID 50 投与量 : ペプチドIMDQVPFSY(209(2M))および YLEPGPVTV(290(9V))(それぞれ100 μg)の200 μg (合計)	0.250 0.2
3	食塩水(NaCl 0.9%) ALVAC(2)-gp100 mod: 0.25×10^7 ^4CCID 50 投与量 : ペプチドIMDQVPFSY(209(2M))および YLEPGPVTV(290(9V))(それぞれ100 μg)の200 μg (合計)	0.250 0.250 0.2

40

- ・グループ1の動物（対照）は、対照物質（注射のための食塩水(NaCl 0.9%)）を与えられた。
- ・グループ3の動物は、1日だけ対照物質（注射のための食塩水(NaCl 0.9%)）を与えられた。

50

【表3】

表3

日数	使用した部位
1 および28	左下
42	左上
56	右上
70	左下
84	右下

10

【表4】

表4

ペプチドプール#1

ペプチド	配列	配列番号
1329	HLAVIGALLAVGATK	配列番号3
1330	GALLAVGATKVPRNQ	配列番号4
1331	VGATKVPRNODWLGV	配列番号5
1332	VPRNQDWLGVSRQLR	配列番号6
1333	DWLGVSRLRTKAWN	配列番号7
1334	SRQLRTKAWNROLYP	配列番号8
1335	TKAWNRQLYPEWTEA	配列番号9
1336	RQLYPEWTEAQRLDC	配列番号10
1337	EWTEAQRLDCWRGGQ	配列番号11
1338	QRLLCWRGGQVSLKV	配列番号12
1339	WRGGQVSLKVSNDGP	配列番号13
1340	VSLKVSNDGPTLIGA	配列番号14
1344	IALNFPGSOKVLPDG	配列番号15
1345	PGSQKVLPDGQVIWV	配列番号16
1346	VLPDGQVIWVNNTII	配列番号17
1347	QVIWVNNTIINGSQV	配列番号18
1348	NNTIJNGSQVWGGQP	配列番号19
1349	NGSQVWGGQPVYPQE	配列番号20
1350	WGGQPVYPQETDDAC	配列番号21
1351	VYPQETDDACIFPDG	配列番号22
1352	TDDACIFPDGGPCPS	配列番号23
1353	IFPDGGPCPSGSWSQ	配列番号24
1355	GSWSQKRSFVYVWKT	配列番号25
1356	KRSFVYVWKTWGQYW	配列番号26
1357	YVWKTWGQYWQVLGG	配列番号27
1358	WGQYWQVLGGPVSGL	配列番号28
1359	QVLLGGPVSGLSIGTG	配列番号29

20

30

40

【表5】

表5

ペプチドプール#2

ペプチド	配列	配列番号
1360	PVSGLSIGTGRAMLG	配列番号30
1361	SIGTGRAMLGTHME	配列番号31
1362	RAMLGTHTMEVTVYH	配列番号32
1363	THTMEVTVYHRRGSR	配列番号33
1364	VTVYHRRGSRSYVPL	配列番号34
1365	RRGSRSYVPLAHSSS	配列番号35
1366	SYVPLAHSSSAFTIT	配列番号36
1368	AFTITDQVPFSVSVS	配列番号37
1369	DQVPFSVSVSQRLAL	配列番号38
1370	SVSVSQRLALDGGNK	配列番号39
1372	DGGNKHFLRNQPLTF	配列番号40
1373	HFLRNQPLTFALQLH	配列番号41
1374	OPLTFALQLHDPSGY	配列番号42
1375	ALQLHDPSGYLAED	配列番号43
1379	DFGDSSGTISRALV	配列番号44
1380	STGLISRALVVTHTY	配列番号45
1381	SRALVVTHTYLEPGP	配列番号46
1382	VTHTYLEPGPVTAQV	配列番号47
1383	LEPGPVTAQVVLQAA	配列番号48
1384	VTAQVVLQAAIPLTS	配列番号49
1385	VLOAAIPLTSCGSSP	配列番号50
1386	IPLTSCGSSPVPGTT	配列番号51
1388	VPGTTDGHRTAEAP	配列番号52
1389	DGHRTAEAPNTTAG	配列番号53
1390	TAEAPNTTAGQVPTT	配列番号54
1392	QVPTTEVVGTTPGQA	配列番号55
1393	EVVGTTPGQAPTAEP	配列番号56

10

20

30

【表6】

表6

ペプチドプール#3

ペプチド	配列	配列番号
1394	TPGQAPTAEPSTGTT	配列番号57
1395	PTAEPSTGTTSVQVPT	配列番号58
1396	SGTTSVQVPTTEVIS	配列番号59
1397	VQVPTTEVIS TAPVQ	配列番号60
1398	TEVISTAPVQMPTAE	配列番号61
1399	TAPVOMPTAESTGMT	配列番号62
1400	MPTAESTGMTPEKVP	配列番号63
1401	STGMTPEKVPVSEVM	配列番号64
1402	PEKVPVSEVMGTTLA	配列番号65
1403	VSEVMGTTLAEMSTP	配列番号66
1404	GTTLAEMSTPEATGM	配列番号67
1405	EMSTPEATGMTPAEV	配列番号68
1408	SIVVLSGTTAAQVTT	配列番号69
1409	SGTTAAQVTTTEWVE	配列番号70
1410	AQVTTTEWVETTARE	配列番号71
1411	TEWVETTARELPIPE	配列番号72
1412	TTARELPIPEPEGPD	配列番号73
1413	LPIPEPEGPDASSIM	配列番号74
1414	PEGPDASSIMSTESI	配列番号75
1415	ASSIMSTESITGSLG	配列番号76
1416	STESITGSLGPLLDG	配列番号77
1417	TGSLGPLLDGTATLR	配列番号78
1418	PLLDGTATLRLVKRQ	配列番号79
1419	TATLRLVKRQVPLDC	配列番号80
1420	LVKRQVPLDCVLYRY	配列番号81
1421	VPLDCVLYRYGSFSV	配列番号82
1422	VLYRYGSFSVTLDIV	配列番号83

10

20

30

【表7】

表7

ペプチドプール#4

ペプチド	配列	配列番号
1424	TLDIVQGIESAEILQ	配列番号84
1425	QGIESAEILQAVPSG	配列番号85
1426	AEILQAVPSGEGDAF	配列番号86
1427	AVPSGEGDAFELTVS	配列番号87
1428	EGDAFELTVSCQGGL	配列番号88
1429	ELTVSCQGGLPKEAC	配列番号89
1430	CQGGLPKEACMEISS	配列番号90
1431	PKEACMEISSLPGCQP	配列番号91
1432	MEISSLPGCQPPAQRL	配列番号92
1434	PAQRLCQPVLPSPAC	配列番号93
1435	CQPVLSPACQLVLH	配列番号94
1436	PSPACQLVLHQILKG	配列番号95
1437	QLVLHQILKGGSGTY	配列番号96
1441	LADTNSLAVVSTQLI	配列番号97
1442	SLAVVSTOLIMPGQE	配列番号98
1443	STQLIMPGQEAGLGQ	配列番号99
1444	MPGQEAGLGQVPLIV	配列番号100
1445	AGLGQVPLIVGILLV	配列番号101
1448	LMAVVVLASLIYRRRL	配列番号102
1450	YRRRLMKQDFSVPOL	配列番号103
1451	MKQDFSVPQLPHSSS	配列番号104
1452	SVPQLPHSSSHWLRL	配列番号105
1453	PHSSSHWLRLPRIFC	配列番号106
1454	HWLRLPRIFCSCPIG	配列番号107
1455	PRIFCSCPGENSPL	配列番号108

10

20

30

【表8】

表8

サル#	日数(mOD/分)			
	0	57	68	96
1	3	5	2	2
2	4	6	12	10
3	7	6	10	8
4	7	6	8	8
5	5	9	20	15
6	11	8	10	12
7	11	23	51	30
8	7	30	70	22
9	1	7	5	3
10	2	6	6	4
11	3	7	14	8
12	6	9	15	6

10

20

【図面の簡単な説明】

【図1】 腫瘍抗原の結節内注射を受けた動物のIFN- β -ELISPOT分析の結果を示す棒グラフ

【図2】 腫瘍抗原の結節内注射を受けた動物のIFN- γ -ELISPOT分析の結果を示す棒グラフ

【図3】 腫瘍抗原の皮下投与を受けた動物のIFN- β -ELISPOT分析の結果を示す棒グラフ

【図4】 腫瘍抗原の皮下投与を受けた動物のIFN- γ -ELISPOT分析の結果を示す棒グラフ

【図5】 ALVAC - 修飾されたgp100 / 修飾されたgp100ペプチド免疫原の結節内(グループ2)および皮下(グループ3)投与の摂生後の抗体反応を示すグラフ

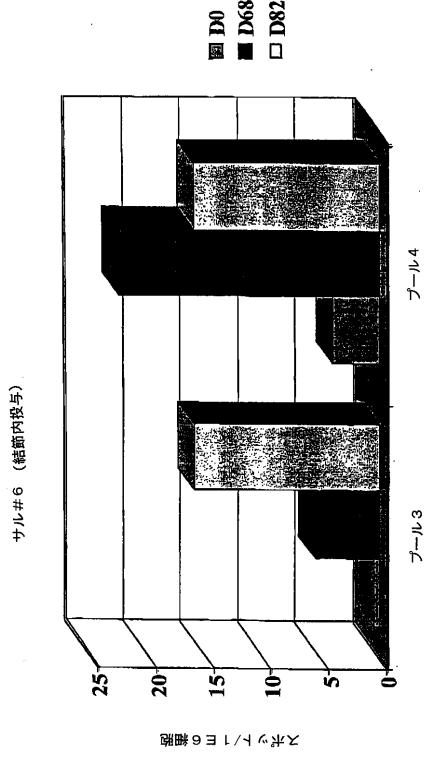
【図6】 修飾されたgp100M cDNAの核酸配列(配列番号109)

30

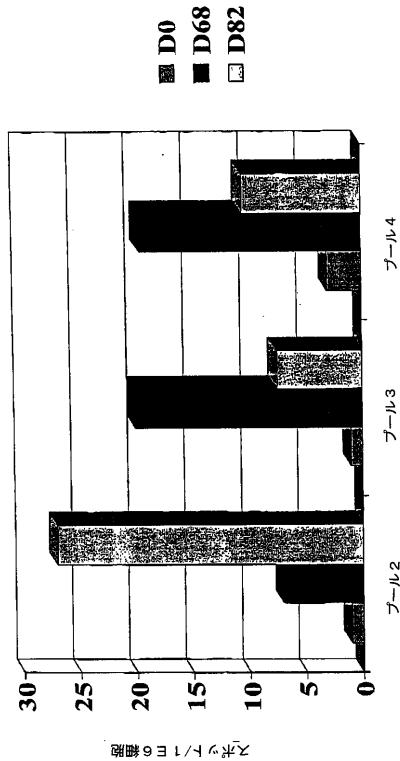
【図7】 修飾されたgp100Mタンパク質の推定アミノ酸配列(配列番号110)

【図8】 修飾されたCEAの核酸およびアミノ酸配列(配列番号111および112)

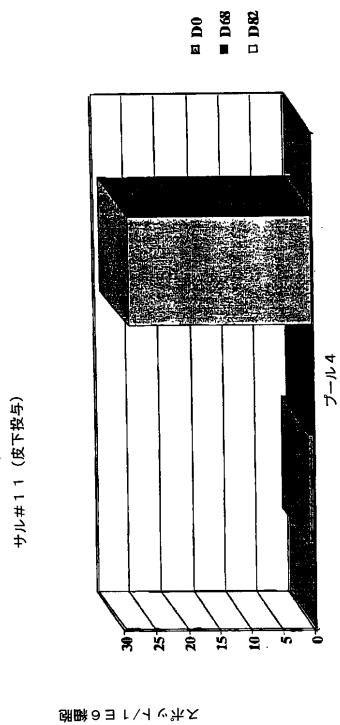
【図1】



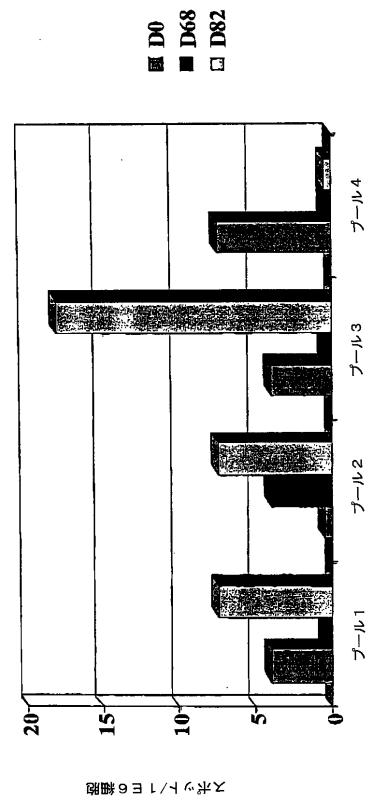
【図2】



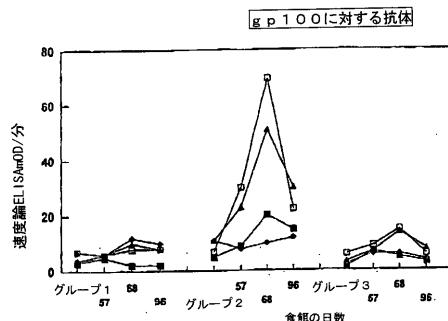
【図3】



【図4】



【 义 5 】



【 义 6 】

FIGURE 6

FIGURE 7 (CONT'D)

Ala Glu Ser Thr Gly Met Thr Pro Glu Lys Val Pro Val Ser Glu Val
 370 375 380
 Met Gly Thr Thr Leu Ala Glu Met Ser Thr Pro Glu Ala Thr Gly Met
 380 390 400
 Thr Pro Ala Glu Val Ser Ile Val Val Leu Ser Gly Thr Thr Ala Ala Glu
 405 410 415
 Gln Val Thr Thr Glu Trp Val Glu Thr Thr Ala Arg Glu Leu Pro
 420 425 430
 Ile Pro Glu Pro Glu Gly Pro Asp Ala Ser Ser Ile Met Ser Thr Glu
 435 440 445
 Ser Ile Thr Gly Ser Leu Gly Pro Leu Leu Asp Gly Thr Ala Thr Leu
 450 455 460
 Arg Leu Val Lys Arg Gln Val Pro Leu Asp Cys Val Leu Tyr Arg Tyr
 465 470 475 480
 Gly Ser Phe Ser Val Thr Leu Asp Ile Val Gln Gly Ile Glu Ser Ala
 485 490 495
 Glu Ile Leu Gln Ala Val Pro Ser Gly Glu Asp Ala Phe Glu Leu
 500 505 510
 Thr Val Ser Cys Gln Gly Glu Leu Pro Lys Glu Ala Cys Met Glu Ile
 515 520 525
 Ser Ser Pro Gly Cys Gln Pro Pro Ala Gln Arg Leu Cys Gln Pro Val
 530 535 540
 Leu Pro Ser Pro Ala Cys Gln Leu Val Leu His Gln Ile Leu Lys Gly
 545 550 555 560
 Gly Ser Gly Thr Tyr Cys Leu Asn Val Ser Leu Ala Asp Thr Asn Ser
 565 570 575
 Leu Ala Val Val Ser Thr Gln Leu Ile Met Pro Gly Gln Glu Ala Gly
 580 585 590
 Leu Gly Gln Val Leu Pro Ile Val Gly Ile Leu Leu Val Leu Met Ala
 595 600 605
 Val Val Leu Ala Ser Leu Ile Tyr Arg Arg Arg Leu Met Lys Gln Asp
 610 615 620
 Phe Ser Val Pro Gln Leu Pro His Ser Ser Ser His Trp Leu Arg Leu
 625 630 635 640
 Pro Arg Ile Phe Cys Ser Cys Pro Ile Gly Glu Asn Ser Pro Leu Leu
 645 650 655
 Ser Gly Gln Gln Val

【 四 7 】

FIGURE 7

Met Asp Leu Val Leu Lys Arg Cys Leu Leu His Leu Ala Val Ile Gly
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Ala Val Gly Ala Thr Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp
 20 25 30 35
 Leu Gly Val Ser Arg Gln Leu Arg Thr Lys Ala Trp Asn Arg Gln Leu
 35 40 45
 Tyr Pro Glu Trp Thr Gln Ala Gln Arg Leu Asp Cys Trp Arg Gly Gly
 50 55 60
 Gln Val Ser Leu Lys Val Ser Asn Asp Gly Pro Thr Leu Ile Gly Ala
 65 70 75 80
 Asn Ala Ser Phe Ser Ile Ala Leu Asn Phe Pro Gly Ser Cln Lys Val
 85 90 95
 Leu Pro Asp Gly Gln Val Ile Trp Val Asn Asn Thr Ile Ala Asn Gly
 100 105 110
 Ser Gln Val Trp Gly Gly Gln Pro Val Tyr Pro Gln Gln Thr Asp Asp
 115 120 125
 Ala Cys Ile Phe Pro Asp Gly Gln Pro Cys Pro Ser Gly Ser Trp Ser
 130 135 140
 Gln Lys Arg Ser Phe Val Tyr Val Trp Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp
 145 150 155 160
 Gln Val Leu Gly Gly Pro Val Ser Gly Ser Ile Gly Leu Gly Arg
 165 170 175
 Ala Met Leu Gly Thr His Thr Met Gln Val Thr Val Tyr His Arg Arg
 180 185 190
 Gly Ser Arg Ser Tyr Val Pro Leu Ala His Ser Ser Ser Ala Phe Thr
 195 200 205
 Ile Met Asp Gln Val Pro Phe Ser Val Ser Val Ser Gln Leu Arg Ala
 210 215 220
 Leu Asp Gly Gly Asn Lys His Phe Leu Arg Asn Gln Pro Leu Thr Phe
 225 230 235 240
 Ala Leu Gln Leu His Asp Pro Ser Gly Tyr Leu Ala Gln Ala Asp Leu
 245 250 255
 Ser Tyr Thr Trp Asp Phe Gly Asp Ser Ser Gly Thr Leu Ile Ser Arg
 260 265 270
 Ala Leu Val Val Thr His Thr Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Val
 275 280 285
 Gln Val Val Leu Gln Ala Ala Ile Pro Leu Thr Ser Cys Gly Ser Ser
 290 295 300
 Pro Val Pro Gly Thr Thr Asp Gly His Arg Pro Thr Ala Glu Ala Pro
 305 310 315 320
 Asn Thr Thr Ala Gly Gln Val Pro Thr Thr Gln Val Val Gly Thr Thr
 325 330 335
 Pro Gly Gln Ala Pro Thr Ala Glu Pro Ser Gly Thr Thr Ser Val Gln
 340 345 350
 Val Pro Thr Thr Ala Val Ile Ser Thr Ala Pro Val Gln Met Pro Thr
 355 360 365

【図 8】

FIGURE 8

FIGURE 8 (CONT'D)

ACCAATTCGGCTTAAACACATCCTAGACGTCGGGGAAAATCTGCACCTTCGGCCAC
 780
 TGTGAACTGGGGGGATTTTGAGGTATGCTTCCTCCATTAGCTTGAGGAGGAGGCT

 a T I S P L N T S Y T C R A G C N L N L S C H -
 CGACGCTTAAACACCACCGCAGTACTCTGGTGTCTCAAGGAGCTTCACCAACCTC
 840
 CTGGCGAGATGGCTGGCTGGCTGATAGCAGAACRAGCTTACCTCCGAAAGGGTGTAGG

 a R A S P F P A Q Y O S W F V N G T F Q P S -
 ACCAACAGGCTTCTTACCTCCACATCAGCTGGAATATACTGGAGCTTCATACCGCTCCA
 900
 TGGGTTCTGGGAGAATTAAGGGTGTACTGGCTCATCTTATTAACCTCTGGATATGCAAGGT

 a T Q E P P R P N I T V D H N N S G Y T T C Q -
 GGCCTCATACCTGGACACATCTGGCTTAACTGGAGCACAGCTCAGCCAGCTCAGCTGGAT
 960
 CGGGATTTAGCTGTGTCAGCGGCTTCTGGCTCTGGCTGGCTGAGCTGAGGATCTC

 a A H N S D T G L R T T V T U Y T V E -
 CCNCCARACCTGGCTACACGGACACATCCTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 1020
 GGG

 a F P K P X N S N N S V P E D D A V -
 GGCCTAACCTGGACACCTGGTACGGTACACGGCTACCTGGCTGGGGGGTAAAPRPMG
 1080
 CGGAACTTGAGCAACTGAGCTCAAGCTGTTGGTGTAGTGGACACCCCCATTTTAGTC

 a A L T C C E P R I Q T N L H N V N N Q -
 AGCTCCGGCTGGCTGGCGGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCT
 1140
 TGGAGGG

 a S L P V S P R L Q L S L N D N R T L T L L -
 AGTGTCAACAGGAAAGTGTAGTGGGCCCTATGAGTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 1200
 TCAAGGGATTTCTTACTACATCTGGGGATACACCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG

 a S V T R N D V G P Y E C G L S M L S V -
 GACGACAGGG
 1260
 CTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGAGCTCTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG

 a D H S P D V L N L V Y G P T I S -
 CCCCTGAACTCATCTTACGGCTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 1320
 GGG

 a P S Y T T Y D V L N L S L C H A S -
 AACCCACCTGGCGAGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG
 1380
 TTGGGGTGG

 a N P P A Q Y S W M L D G N I Q H T E -
 CCTGGTATCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG
 1440
 GAGRAATTTAGGAGGTTGAGGAGCTTCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG

FIGURE 8 (CONT'D)

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 K 39/245 (2006.01)	A 6 1 K 39/245
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00

(72)発明者 タータグリア , ジェイムズ
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 12303 スケネクタディー クリストイナ ドライヴ
 7

(72)発明者 モワンジェオン , フィリップ
 フランス国 F - 69480 ポンミエ ル シャリエ

(72)発明者 バーバー , ブライアン
 カナダ国 エル5ジー 3ティ-5 オンタリオ州 ミシソーガ ブロードムーア アヴェニュー
 1428

審査官 横井 宏理

(56)参考文献 特表平10-505481 (JP, A)
 国際公開第99/019478 (WO, A1)
 特開平11-106355 (JP, A)
 国際公開第97/028259 (WO, A1)
 国際公開第98/017323 (WO, A1)
 国際公開第98/021354 (WO, A1)
 国際公開第96/040241 (WO, A1)
 WISEMAN, C.L., et al., Clinical Responses With Active Specific Intralymphatic Immunotherapy for Cancer - A Phase I-II Trial, THE WESTERN JOURNAL OF MEDICINE, 1989年9月, Vol.151, No.3, p.283-288
 PARDOLL, D.M., Cancer vaccines: a road map for the next decade, Current Opinion in Immunology, 1996年10月, Vol.8, No.5, p.619-621
 RAO, V.S., et al., PARTIAL CHARACTERIZATION OF TWO SUBPOPULATIONS OF T4 CELLS INDUCED BY ACTIVE SPECIFIC INTRALYMPHATIC IMMUNOTHERAPY, PROCEEDINGS AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, 1986年, Vol.27, p.325
 JUILLARD, G.J.F., et al., Intralymphatic Infusion of Autochthonous Tumor Cells in Canine Lymphoma, International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 1976年, Vol.1, No.5-6, p.497-503

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00
 A61K 31/00-7088
 A61K 35/00-76
 A61K 39/00-275
 A61K 48/00
 A61P 35/00
 CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)