

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6957448号
(P6957448)

(45) 発行日 令和3年11月2日(2021.11.2)

(24) 登録日 令和3年10月8日(2021.10.8)

(51) Int.Cl.	F 1		
A 6 1 K 39/05	(2006.01)	A 6 1 K	39/05
A 6 1 K 39/39	(2006.01)	A 6 1 K	39/39
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00

請求項の数 19 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-505505 (P2018-505505)
(86) (22) 出願日	平成28年4月15日 (2016.4.15)
(65) 公表番号	特表2018-511659 (P2018-511659A)
(43) 公表日	平成30年4月26日 (2018.4.26)
(86) 國際出願番号	PCT/AU2016/050275
(87) 國際公開番号	W02016/164980
(87) 國際公開日	平成28年10月20日 (2016.10.20)
審査請求日	平成31年4月9日 (2019.4.9)
(31) 優先権主張番号	2015901375
(32) 優先日	平成27年4月17日 (2015.4.17)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	オーストラリア(AU)

(73) 特許権者	517361867 バイオライフ、サイエンス、キューエルティー、リミテッド B I O L I F E S C I E N C E Q L D L I M I T E D オーストラリア連邦クイーンズランド州、 ブリスベン、イーグル、ストリート、66
(74) 代理人	100091982 弁理士 永井 浩之
(74) 代理人	100091487 弁理士 中村 行季
(74) 代理人	100082991 弁理士 佐藤 泰和
(74) 代理人	100105153 弁理士 朝倉 悟

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ワクチン組成物およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (i) 油中水型エマルションであるアジュバントと、
(ii) 担体タンパク質；および
(iii) 該担体タンパク質に結合する少なくとも 1 つの融合ペプチドとを含んでなり、

該担体タンパク質はジフテリア毒素変異体 CRM - 197 (配列番号 61) であり、かつ

該少なくとも 1 つの融合ペプチドは、配列番号 1 ~ 3 および 5 ~ 7 並びに前記のいずれかと少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列からなる群から選択される Her 2 /neu の 2 つ以上の不連続 B 細胞エピトープを含んでなる、

ワクチン組成物。

【請求項 2】

前記融合ペプチドが、配列番号 8 ~ 14 および前記のいずれかと少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 1 に記載のワクチン組成物。

【請求項 3】

前記融合ペプチドが、配列番号 8 ~ 14 のいずれかと少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、請求項 1 に記載のワクチン組成物。

【請求項 4】

10

前記融合ペプチドが、配列番号 8 ~ 14 のいずれかと少なくとも 95 % の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、請求項 1 に記載のワクチン組成物。

【請求項 5】

前記融合ペプチドが、配列番号 8 ~ 14 のいずれかと少なくとも 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、請求項 1 に記載のワクチン組成物。

【請求項 6】

前記融合ペプチドが、配列番号 8 もしくは配列番号 9 のアミノ酸配列または配列番号 8 もしくは配列番号 9 と少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、請求項 2 に記載のワクチン組成物。

【請求項 7】

前記融合ペプチドが、配列番号 8 または配列番号 9 と少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、請求項 2 に記載のワクチン組成物。

【請求項 8】

前記融合ペプチドが、配列番号 8 または配列番号 9 と少なくとも 95 % の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、請求項 2 に記載のワクチン組成物。

【請求項 9】

前記融合ペプチドが、配列番号 8 または配列番号 9 と少なくとも 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、請求項 2 に記載のワクチン組成物。

【請求項 10】

前記融合ペプチドが、配列番号 8 または配列番号 9 のアミノ酸配列からなる、請求項 6 に記載のワクチン組成物。

【請求項 11】

前記担体タンパク質が 2 ~ 39 の融合ペプチドを含んでなる、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項 12】

前記担体タンパク質が 6 ~ 12 の融合ペプチドを含んでなる、請求項 11 に記載のワクチン組成物。

【請求項 13】

チェックポイント阻害剤をさらに含んでなる、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のワクチン組成物と、薬学的に許容可能な担体とを含んでなる、必要とする患者において、Her2/neu の発現または過剰発現を特徴とする癌の治療または予防に使用するための、医薬組成物。

【請求項 15】

前記癌が乳癌である、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記癌が胃癌である、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

必要とする患者において、Her2/neu の発現または過剰発現を特徴とする癌の治療または予防に使用するための、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

。

【請求項 18】

前記癌が乳癌である、請求項 17 に記載のワクチン組成物。

【請求項 19】

前記癌が胃癌である、請求項 17 に記載のワクチン組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は一般に、癌関連タンパク質 Her2/neu のフラグメントを含んでなるワク

10

20

30

40

50

チン組成物、このような組成物を製造する方法、およびHer2/neuタンパク質の発現または過剰発現を特徴とする癌の予防または治療のためのその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

erbB2/neu癌原遺伝子によりコードされるHer2/neu腫瘍抗原は、ヒト上皮細胞増殖因子受容体ファミリーに属する185kDaのタンパク質である。この抗原はいくつかのグリコシル化部位を有するシステインに富んだ細胞外ドメイン(ECD、アミノ酸23～652)、疎水性膜貫通ドメイン(アミノ酸653～675)および細胞内チロシンキナーゼドメイン(アミノ酸676～1255)からなる。Her2/neu受容体は、様々な上皮細胞種の細胞膜で発現され、特定の増殖因子の結合を介して細胞増殖および分裂の側面を調節する。

10

【0003】

Her2/neuは、多くの正常細胞において低レベルで発現されるが、乳癌、卵巣癌、子宫内膜癌、胃癌、膵臓癌、前立腺癌および唾液腺癌を含む様々な癌では過剰発現される。例えば、転移性乳癌のおよそ30%はHer2/neuを過剰発現することが知られている。この過剰発現は、無再発期間の現象および生存期間の短縮に対応するので、乳癌患者の不良な予後に関連している。現在、乳癌治療の最も一般的な形態は、手術、化学的介入および/または放射線療法を含む。癌が境界領域に限定されていなければ、手術だけでは癌を除去することができない。さらに、放射線処置ならびに化学療法は、重篤な負の副作用を伴い得る。

20

【0004】

現行療法に付随する不利益を鑑みて、乳癌などの増殖性障害を処置するための、免疫療法をはじめとするさらなるアプローチを見出す試みがなされてきた。

【0005】

腫瘍におけるHer2/neu過剰発現の臨床的意味合いは、Her2/neuを、単独のまたは従来の化学療法との組合せとしての抗体媒介免疫療法の魅力的な標的にした。例えば、モノクローナル抗体(mAb)4D5は、アポトーシス、抗体依存性細胞媒介細胞傷害性(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)(ADC)または補体依存性細胞傷害性(complement-dependent cytotoxicity)(CDC)などの直接的および間接的機序により、マウスにおいてHer2/neu発現腫瘍の増殖を低減することが示されている。これらの結果に基づき、この抗体のヒト化型であるトラスツズマブ(ハーセプチニ(商標))が臨床試験で検討された。細胞傷害性処置+ハーセプチニ(商標)の後に、化学療法またはトラスツズマブ単独に比べてHer2/neuを過剰発現する乳房腫瘍を有する患者の全生存期間の延長が見られた。ハーセプチニ(商標)は、現在、単剤療法として使用されているが、細胞傷害性化学療法と組み合わせるとはるかに高い有効性を示す。しかしながら、トラスツズマブは一般に、Her2/neu受容体が過剰発現される乳癌においてのみ有効であることに留意されたい。さらに、多回の注入が典型的には必要とされ、高い治療コストとなる。

30

【0006】

トラスツズマブなどのモノクローナル抗体による受動免疫療法を用いるHer2/neu関連癌に対する別の治療または予防アプローチは、腫瘍特異的な体液性および/または細胞性免疫応答の誘導とヒトBリンパ球およびTリンパ球により認識される抗原の同定に基づくものである。例えば、Her2/neuの細胞外ドメイン(extracellular domain)(ECD)に対する多くの抗体が、Her2/neuを発現する細胞でマウスを免疫することにより生成されている。これらの抗体の生物学的效果はエピトープ特異的であると考えられ；すなわち、それはHer2/neu ECD内の短い部分配列の特異的認識に基づくものである。しかしながら、いくつかの抗体は効果が無いかまたは腫瘍増殖を活発に刺激しさえする。

40

【0007】

癌に対するこのようなワクチン免疫療法は、体液性および/または細胞性応答が惹起さ

50

れる抗原に基づくものであった。これらの抗原は、理想的には、もっぱら腫瘍細胞により発現または過剰発現されるべきであり、しばしば腫瘍関連抗原(tumour-associated antigens) (TAA) と呼ばれる。乳癌に関して記載された最初の TAA の 1 つが Her 2 / neu であった。一方、異なるエピトープを表す種々の TAA が試験されたが、これまでに首尾良く臨床実施に進んだものはない。

【0008】

一般に、意図される免疫応答のタイプ(すなわち、B 応答または T 細胞応答)によって、異なる戦略が典型的には適用される。例えば、B 細胞(すなわち、抗体)応答を誘導するためには、抗原は B 細胞エピトープを含んでなるべきである。当技術分野で一般に理解されているように、B 細胞エピトープは、B 細胞受容体により認識および結合される抗原の部分である。脂質、多糖およびタンパク質/ペプチドは、選択生物に導入される際に、B 細胞に、導入されたエピトープと特異的に結合する抗体を産生させる B 細胞エピトープを含有し得る。

10

【0009】

B 細胞エピトープを含む、Her 2 / neu の ECD の個々のフラグメントは当技術分野で公知である。例えば、WO 2002 / 068474 は、配列が Her 2 / neu タンパク質の細胞外部分に見られる、9 ~ 25 アミノ酸のペプチドを含んでなるワクチンを記載している。さらに、WO 2007 / 118660 は、Her 2 / neu タンパク質の細胞外部分に見られるような種々のアミノ酸配列を呈するペプチドの特定の組合せを含んでなるマルチペプチドワクチンを記載している。これらのペプチドは、個別に、またはそれ 20 好ましくは送達系に個々に結合した複数の離散型ペプチドの形態で組み合わせて投与することができる。さらに別の態様では、WO 2011 / 020604 は、ビロソーム送達系に結合された複数の Her 2 / neu B 細胞エピトープを含んでなる融合ペプチドを記載している。これらのビロソーム(virosome)は、モンタニドTM または ISCOM に基づく送達系とともに処方された同じ融合ペプチドに比べて、単一の B 細胞エピトープに対してより高い抗体力値を誘導することが示された。

20

【0010】

Her 2 / neu に対する免疫を誘導するための好適なワクチンを開発するいくつかの試みにもかかわらず、臨床使用に有効なワクチンはまだない。Her 2 / neu の発現または過剰発現を特徴とする癌などの病態を治療または予防するためのワクチンとして使用するのに好適な改良組成物を提供することが本発明の目的である。

30

【発明の概要】

【0011】

本明細書は、

(i) アジュvantと、
(ii) 担体タンパク質に結合した少なくとも 1 つの融合ペプチドと
を含んでなり、

前記担体タンパク質はジフテリア毒素変異体 CRM - 197 (GenBank 受託番号 1007216A ; 配列番号 61) であり、

前記少なくとも 1 つの融合ペプチドは、配列番号 1 ~ 7 および 15 ~ 60 ならびに前記のいずれかと少なくとも 85 % の同一性を有するアミノ酸配列からなる群から選択される Her 2 / neu の 2 つ以上の不連続 B 細胞エピトープを含んでなる、
ワクチン組成物を記載した。

40

【0012】

本明細書はまた、本明細書に記載のワクチン組成物と薬学的に許容可能な担体とを含んでなる医薬組成物を記載する。

【0013】

本明細書はまた、必要とする患者において Her 2 / neu の発現または過剰発現を特徴とする癌を治療または予防する方法であって、前記患者に有効量の本明細書に記載のワクチン組成物または本明細書に記載の医薬組成物を投与する工程を含んでなる方法を記載

50

する。

【0014】

本明細書はまた、必要とする患者においてH e r 2 / n e uの発現または過剰発現を特徴とする癌を治療または予防するための薬剤の製造における本明細書に記載のワクチン組成物の使用を記載する。

【0015】

本明細書はまた、必要とする患者においてH e r 2 / n e uの発現または過剰発現を特徴とする癌の治療または予防において使用するための本明細書に記載のワクチン組成物または医薬組成物を開示する。

【図面の簡単な説明】

10

【0016】

【図1】図1は、P 4 6 7もしくはP 6 4 7融合ペプチドまたはC R M 1 9 7 - 融合タンパク質コンジュゲート(C R M)を組み込んだいずれかのビロソームでの4回の免疫誘導の後に得られた血清サンプルの抗P 4 抗体力価を示す。データはO D値として表す。

【図2】図2は、P 4 6 7もしくはP 6 4 7融合ペプチドまたはC R M 1 9 7 - 融合タンパク質コンジュゲート(C R M)を組み込んだいずれかのビロソームでの4回の免疫誘導の後に得られた血清サンプルの抗P 6 抗体力価を示す。データはO D値として表す。

【図3】図3は、P 4 6 7もしくはP 6 4 7融合ペプチドまたはC R M 1 9 7 - 融合タンパク質コンジュゲート(C R M)を組み込んだいずれかのビロソームでの4回の免疫誘導の後に得られた血清サンプルの抗P 7 抗体力価を示す。データはO D値として表す。

20

【図4】図4は、P 4 6 7もしくはP 6 4 7融合ペプチドまたはC R M 1 9 7 - 融合タンパク質コンジュゲート(C R M)を組み込んだいずれかのビロソームでの4回の免疫誘導の後に得られた血清サンプルの抗P 4 6 7 抗体力価を示す。データはO D値として表す。

【図5】図5は、P 4 6 7もしくはP 6 4 7融合ペプチドまたはC R M 1 9 7 - 融合タンパク質コンジュゲート(C R M)を組み込んだいずれかのビロソームでの4回の免疫誘導の後に得られた血清サンプルの抗P 6 4 7 抗体力価を示す。データはO D値として表す。

【図6】図6は、P 4 6 7もしくはP 6 4 7融合ペプチドまたはC R M 1 9 7 - 融合タンパク質コンジュゲート(C R M)を組み込んだいずれかのビロソームでの2回目(B A 1 ; 1回目の採血)、3回目(B A 2 ; 2回目の採血)および4回目(B A 3 ; 3回目の採血)の免疫誘導から2週間後に得られた血清サンプルの抗P 4 6 7 抗体力価を示す。データはO D値として表す。

30

【図7】図7は、P 4 6 7もしくはP 6 4 7融合ペプチドまたはC R M 1 9 7 - 融合タンパク質コンジュゲート(C R M)を組み込んだいずれかのビロソームでの2回目(B A 1 ; 1回目の採血)、3回目(B A 2 ; 2回目の採血)および4回目(B A 3 ; 3回目の採血)の免疫誘導から2週間後に得られた血清サンプルの抗P 6 4 7 抗体力価を示す。データはO D値として表す。

【図8】図8は、P 4 6 7もしくはP 6 4 7融合ペプチド(15、30、50 μg)またはC R M 1 9 7 - 融合タンパク質コンジュゲート(C R M; 30 μg)を組み込んだビロソーム処方物での2回目(B A 1 ; 1回目の採血)および3回目(B A 2 ; 2回目の採血)の免疫誘導から2週間後に得られた血清サンプルからの抗体はH e r 2 / n e uの組換えE C Dに結合可能であることを示す。データはO D値として表す。

40

【図9】図9は、P 4 6 7もしくはP 6 4 7融合ペプチド(15、30、50 μg)またはC R M 1 9 7 - 融合タンパク質コンジュゲート(C R M; 30 μg)を組み込んだビロソーム処方物での2回目(B A 1 ; 1回目の採血)の免疫誘導から2週間後に得られた血清サンプルからの組換えH e r 2 / n e u特異的抗体を示す。データはO D値として表す。

【図10】図10は、P 4 6 7もしくはP 6 4 7融合ペプチド(15、30、50 μg)またはC R M 1 9 7 - 融合タンパク質コンジュゲート(C R M; 30 μg)を組み込んだビロソーム処方物での4回目(B A 3 ; 3回目の採血)の免疫誘導から2週間後に得られた血清サンプルからの組換えH e r 2 / n e u特異的抗体を示す。データはO D値として表す。

50

表す。

【図11】図11は、P467またはP647融合ペプチドを含んでなるCRM197-融合タンパク質コンジュゲート(CRM; 30 μg)での2回目、3回目および4回目の免疫誘導後の組換えHer2/neu特異的抗体力価の動態を示す。血清は1:4, 000希釈でアッセイした。データはOD値として表す。

【図12】図12は、ビロソームまたはCRM197に30 μgの濃度で結合したP467融合ペプチドでの2回目、3回目および4回目の免疫誘導後の抗体力価の直接比較を示す。各群の左から右に：プール前(免疫誘導前に採取した血液)；TIRIV(エンブティービロソーム)；P467-30mg/マウス(ビロソームコンジュゲート)；P467-30mg/マウス-CRM(CRM197コンジュゲート)。総ての血清を同じ希釈率でアッセイした。データはOD値として表す。
10

【図13】図13は、ビロソームまたはCRM197に30 μgの濃度で結合したP647融合ペプチドでの2回目、3回目および4回目の免疫誘導後の抗体力価の直接比較を示す。各群の左から右に：事前プール(免疫誘導前に採取した血液)；TIRIV(エンブティービロソーム)；P647-30mg/マウス(ビロソームコンジュゲート)；P647-30mg/マウス-CRM(CRM197コンジュゲート)。総ての血清を同じ希釈率でアッセイした。データはOD値として表す。

【図14】図14は、P467もしくはP647融合ペプチドまたはCRM197-融合タンパク質コンジュゲート(CRM)を組み込んだいずれかのビロソームでの免疫誘導は、SKBR-3乳癌細胞の表面に発現された天然Her2/neuに結合し得る抗体を誘導したことを見た。データはOD値として表す。
20

【図15A】図15Aは、単独で(P467-CRM)、Brenntagからのミョウバンとともに(P467-CRM+ミョウバン)、Servaからのミョウバンとともに(P467-CRM+ミョウバン(Serva))またはモンタニドとともに(P467-CRM+モンタニド)投与した10 μg、25 μgおよび50 μgの3種類の用量のP467-CRM197融合タンパク質の後のマウスにおける抗P467 IgG抗体力価を示す。抗体力価を、P467ペプチド単独(P467; 25 μg)、Brenntagからのミョウバン(ミョウバン(Brenntag))またはCRM197単独(CRM)を投与した対照動物で見られたレベルと比較した。データはOD値として表す；* p < 0.05、** p < 0.01および*** p < 0.001。
30

【図15B】図15Bは、単独で(P467-CRM)、Brenntagからのミョウバンとともに(P467-CRM+ミョウバン)、Servaからのミョウバンとともに(P467-CRM+ミョウバン(Serva))またはモンタニドとともに(P467-CRM+モンタニド)投与した10 μg、25 μgおよび50 μgの3種類の用量のP467-CRM197融合タンパク質の後のマウスにおける抗P467 IgG1抗体力価を示す。抗体力価を、P467ペプチド単独を投与した対照動物で見られたレベルと比較した。データはOD値として表す；* p < 0.05、** p < 0.01および*** p < 0.001。

【図15C】図15Cは、単独で(P467-CRM)、Brenntagからのミョウバンとともに(P467-CRM+ミョウバン)、Servaからのミョウバンとともに(P467-CRM+ミョウバン(Serva))とともにまたはモンタニドとともに(P467-CRM+モンタニド)投与した10 μg、25 μgおよび50 μgの3つの用量のP467-CRM197融合タンパク質の後のマウスにおける抗P467 IgG2a抗体力価を示す。抗体力価を、P467ペプチド単独(P467; 25 μg)、Brenntagからのミョウバン(ミョウバン(Brenntag))またはCRM197単独(CRM)を投与した対照動物で見られたレベルと比較した。データはOD値として表す；* p < 0.05、** p < 0.01および*** p < 0.001。
40

【図16A】図16Aは、単独で(P467-CRM)、Brenntagからのミョウバンとともに(P467-CRM+ミョウバン)、Servaからのミョウバンとともに(P467-CRM+ミョウバン(Serva))またはモンタニドとともに(P467
50

- CRM + モンタニド) 投与した 10 µg、25 µg および 50 µg の 3 つの用量の P 467 - CRM 197 融合タンパク質の後のマウスにおける抗細胞外 Her 2 / neu IgG 抗体力値を示す。抗体力値を、P 467 ペプチド単独 (P 467; 25 µg)、Brenntag からのミョウバン (ミョウバン (Brenntag)) または CRM 197 単独 (CRM) を投与した対照動物で見られたレベルと比較した。データは OD 値として表す; * p < 0.05、** p < 0.01 および *** p < 0.001。

【図 16 B】図 16 B は、単独で (P 467 - CRM)、Brenntag からのミョウバンとともに (P 467 - CRM + ミョウバン)、Serva からのミョウバンとともに (P 467 - CRM + ミョウバン (Serva)) またはモンタニドとともに (P 467 - CRM + モンタニド) 投与した 10 µg、25 µg および 50 µg の 3 つの用量の P 467 - CRM 197 融合タンパク質の後のマウスにおける抗細胞外 Her 2 / neu IgG 1 抗体力値を示す。抗体力値を、P 467 ペプチド単独 (P 467; 25 µg)、Brenntag からのミョウバン (ミョウバン (Brenntag)) または CRM 197 単独 (CRM) を投与した対照動物で見られたレベルと比較した。データは OD 値として表す; * p < 0.05、** p < 0.01 および *** p < 0.001。

【図 17 A】図 17 A は、単独で (P 467 - CRM)、Brenntag からのミョウバンとともに (P 467 - CRM + ミョウバン)、Serva からのミョウバンとともに (P 467 - CRM + ミョウバン (Serva)) またはモンタニドとともに (P 467 - CRM + モンタニド) 投与した 10 µg、25 µg および 50 µg の P 467 - CRM 197 融合タンパク質で免疫誘導したマウスに由来する、CRM 197 により活性化された脾細胞による IL-2 産生を示す。IL-12 レベル (pg / ml) を、ミョウバン単独 (ミョウバン (Brenntag))、モンタニド単独 (モンタニド) または CRM 197 単独 (CRM) を投与した対照動物に由来する、CRM 197 により活性化された脾細胞で見られた IL-2 レベルと比較した。データは pg / ml として表す; ** p < 0.01 および ns = 統計的に有意でない。

【図 17 B】図 17 B は、単独で (P 467 - CRM)、Brenntag からのミョウバンとともに (P 467 - CRM + ミョウバン)、Serva からのミョウバンとともに (P 467 - CRM + ミョウバン (Serva)) またはモンタニドとともに (P 467 - CRM + モンタニド) 投与した 10 µg、25 µg および 50 µg の P 467 - CRM 197 融合タンパク質で免疫誘導したマウスに由来する、P 467 により活性化された脾細胞による IL-2 産生を示す。IL-12 レベル (pg / ml) を、ミョウバン単独 (ミョウバン (Brenntag))、モンタニド単独 (モンタニド) または CRM 197 単独 (CRM) を投与した投与対照動物に由来する、P 467 により活性化された脾細胞で見られた IL-2 レベルと比較した。データは pg / ml として表す; * p < 0.05、** p < 0.01 および ns = 統計的に有意でない。

【図 18 A】図 18 A は、単独で (P 467 - CRM)、Brenntag からのミョウバンとともに (P 467 - CRM + ミョウバン)、Serva からのミョウバンとともに (P 467 - CRM + ミョウバン (Serva)) またはモンタニドとともに (P 467 - CRM + モンタニド) 投与した 10 µg、25 µg および 50 µg の P 467 - CRM 197 融合タンパク質で免疫誘導したマウスに由来する、CRM 197 により活性化された脾細胞による IFN 産生を示す。IFN レベル (pg / ml) を、ミョウバン単独 (ミョウバン (Brenntag))、モンタニド単独 (モンタニド) または CRM 197 単独 (CRM) を投与した対照動物に由来する、CRM 197 により活性化された脾細胞で見られた IFN レベルと比較した。データは pg / ml として表す; * p < 0.05 および ns = 統計的に有意でない。

【図 18 B】図 18 B は、単独で (P 467 - CRM)、Brenntag からのミョウバンとともに (P 467 - CRM + ミョウバン)、Serva からのミョウバンとともに (P 467 - CRM + ミョウバン (Serva)) またはモンタニドとともに (P 467 - CRM + モンタニド) 投与した 10 µg、25 µg および 50 µg の P 467 - CRM 197 融合タンパク質で免疫誘導したマウスに由来する、P 467 により活性化された脾

10

20

30

40

50

細胞によるIFN産生を示す。IFNレベル(pg/ml)を、ミョウバン単独(ミョウバン(Brenntag))、モンタニド単独(モンタニド)またはCRM197単独(CRM)を投与した対照動物に由来する、P467により活性化された脾細胞で見られたIFNレベルと比較した。データはpg/mlとして表す；ns=統計的に有意でない。

【図19A】図19Aは、単独で(P467-CRM)、Brenntagからのミョウバンとともに(P467-CRM+ミョウバン)、Servaからのミョウバンとともに(P467-CRM+ミョウバン(Serva))またはモンタニドとともに(P467-CRM+モンタニド)投与した10μg、25μgおよび50μgのP467-CRM197融合タンパク質で免疫誘導したマウスに由来する、CRM197により活性化された脾細胞によるIL-5産生を示す。IL-5レベル(pg/ml)を、ミョウバン単独(ミョウバン(Brenntag))、モンタニド単独(モンタニド)またはCRM197単独(CRM)を投与した対照動物に由来する、CRM197により活性化された脾細胞で見られたIL-5レベルと比較した。データはpg/mlとして表す；*p<0.05、**p<0.01およびns=統計的に有意でない。10

【図19B】図19Bは、単独で(P467-CRM)、Brenntagからのミョウバンとともに(P467-CRM+ミョウバン)、Servaからのミョウバンとともに(P467-CRM+ミョウバン(Serva))またはモンタニドとともに(P467-CRM+モンタニド)投与した10μg、25μgおよび50μgのP467-CRM197融合タンパク質で免疫誘導したマウスに由来する、P467により活性化された脾細胞によるIL-5産生を示す。IL-5レベル(pg/ml)を、ミョウバン単独(ミョウバン(Brenntag))、モンタニド単独(モンタニド)またはCRM197単独(CRM)を投与した対照動物に由来する、P467により活性化された脾細胞で見られたIL-5レベルと比較した。データはpg/mlとして表す；ns=統計的に有意でない。20

【図20A】図20Aは、Brenntagからのミョウバンとともに(P467-CRM+ミョウバン)、Servaからのミョウバンとともに(P467-CRM+ミョウバン(Serva))またはモンタニドとともに(P467-CRM+モンタニド)投与した10μg、25μgおよび50μgのP467-CRM197融合タンパク質で免疫誘導したマウスにおける、犠牲時のCD3+CD4+脾細胞(Tリンパ球)の分布を示す。CD3+CD4+脾細胞のパーセンテージを、ミョウバン単独(ミョウバン(Brenntag))、モンタニド単独(モンタニド)またはCRM197単独(CRM)を投与した対照動物で見られたCD3+CD4+脾細胞のパーセンテージと比較した。データは全細胞数に対するパーセンテージとして表す；ns=統計的に有意でない。30

【図20B】図20Bは、Brenntagからのミョウバンとともに(P467-CRM+ミョウバン)、Servaからのミョウバンとともに(P467-CRM+ミョウバン(Serva))またはモンタニドとともに(P467-CRM+モンタニド)投与した10μg、25μgおよび50μgのP467-CRM197融合タンパク質で免疫誘導したマウスにおける、犠牲時のCD3+CD8+脾細胞(Tリンパ球)の分布を示す。CD3+CD8+脾細胞のパーセンテージを、ミョウバン単独(ミョウバン(Brenntag))、モンタニド単独(モンタニド)またはCRM197単独(CRM)を投与した対照動物で見られたCD3+CD8+脾細胞のパーセンテージと比較した。データは全細胞数に対するパーセンテージとして表す；ns=統計的に有意でない。40

【図20C】図20Cは、Brenntagからのミョウバンとともに(P467-CRM+ミョウバン)、Servaからのミョウバンとともに(P467-CRM+ミョウバン(Serva))またはモンタニドとともに(P467-CRM+モンタニド)投与した10μg、25μgおよび50μgのP467-CRM197融合タンパク質で免疫誘導したマウスにおける、犠牲時のCD3-CD19+脾細胞(B細胞)の分布を示す。CD3-CD19+脾細胞のパーセンテージを、ミョウバン単独(ミョウバン(Brenntag))、モンタニド単独(モンタニド)またはCRM197単独(CRM)を投与し50

た対照動物で見られた CD 3 - CD 19 + 脾細胞のパーセンテージと比較した。データは全細胞数に対するパーセンテージとして表す； n s = 統計的に有意でない。

【図 20 D】図 20 D は、Brenntag からのミョウバンとともに (P 467 - CRM + ミョウバン)、Serva からのミョウバンとともに (P 467 - CRM + ミョウバン (Serva)) またはモンタニドとともに (P 467 - CRM + モンタニド) 投与した 10 µg、25 µg および 50 µg の P 467 - CRM 197 融合タンパク質で免疫誘導したマウスにおける、犠牲時の CD 335 + 脾細胞 (ナチュラルキラー (NK) 細胞) の分布を示す。CD 335 + 脾細胞のパーセンテージを、ミョウバン単独 (ミョウバン (Brenntag))、モンタニド単独 (モンタニド) または CRM 197 単独 (CRM) を投与した対照動物で見られた CD 335 + 脾細胞のパーセンテージと比較した。データは全細胞数に対するパーセンテージとして示す； * p < 0.05 および n s = 統計的に有意でない。10

【図 21 A】図 21 A は、Brenntag からのミョウバンとともに (P 467 - CRM + ミョウバン)、Serva からのミョウバンとともに (P 467 - CRM + ミョウバン (Serva)) またはモンタニド (P 467 - CRM + モンタニド) とともに投与した 10 µg、25 µg および 50 µg の P 467 - CRM 197 融合タンパク質で免疫誘導したマウスにおける、犠牲時の CD 3 + CD 4 + IFN + 脾細胞 (IFN 産生 T 細胞) の分布を示す。CD 3 + CD 4 + IFN + 脾細胞のパーセンテージを、ミョウバン単独 (ミョウバン (Brenntag))、モンタニド単独 (モンタニド) または CRM 197 単独 (CRM) を投与した対照動物で見られた CD 3 + CD 4 + IFN + 脾細胞のパーセンテージと比較した。データは全細胞数に対するパーセンテージとして表す； n s = 統計的に有意でない。20

【図 21 B】図 21 B は、Brenntag からのミョウバンとともに (P 467 - CRM + ミョウバン)、Serva からのミョウバンとともに (P 467 - CRM + ミョウバン (Serva)) またはモンタニドとともに (P 467 - CRM + モンタニド) 投与した 10 µg、25 µg および 50 µg の P 467 - CRM 197 融合タンパク質で免疫誘導したマウスにおける、犠牲時の CD 3 + CD 8 + IFN + 脾細胞 (IFN 産生 T 細胞) の分布を示す。CD 3 + CD 8 + IFN + 脾細胞のパーセンテージを、ミョウバン単独 (ミョウバン (Brenntag))、モンタニド単独 (モンタニド) または CRM 197 単独 (CRM) を投与した対照動物で見られた CD 3 + CD 8 + IFN + 脾細胞のパーセンテージと比較した。データは全細胞数に対するパーセンテージとして表す； * p < 0.05 および n s = 統計的に有意でない。30

【図 21 C】図 21 C は、Brenntag からのミョウバンとともに (P 467 - CRM + ミョウバン)、Serva からのミョウバンとともに (P 467 - CRM + ミョウバン (Serva)) またはモンタニドとともに (P 467 - CRM + モンタニド) 投与した 10 µg、25 µg および 50 µg の P 467 - CRM 197 融合タンパク質で免疫誘導したマウスにおける、犠牲時の CD 335 + IFN + 脾細胞 (IFN 産生 T 細胞) の分布を示す。CD 335 + IFN + 脾細胞のパーセンテージを、ミョウバン単独 (ミョウバン (Brenntag))、モンタニド単独 (モンタニド) または CRM 197 単独 (CRM) を投与した対照動物で見られた CD 335 + IFN + 脾細胞のパーセンテージと比較した。データは全細胞数のパーセンテージとして表す； * p < 0.05 および n s = 統計的に有意でない。40

【図 22】図 22 は、ミョウバン (P 467 - CRM + ミョウバン) またはモンタニド (P 467 - CRM + モンタニド) のいずれかとともに 10 µg、25 µg および 50 µg で投与した P 467 - CRM ペプチド構築物の最終投与後 3 週間 (BA 2)、8 週間 (BA 3)、16 週間 (BA 4) および 6 か月 (BA 5) の時点での P 467 ペプチド特異的 IgG 抗体力値を示す。データは OD 値として表す。各クラスターの左から右へ： BA 2、BA 3、BA 4、BA 5 および事前採血。

【図 23】図 23 は、ミョウバン (P 467 - CRM + ミョウバン) またはモンタニド (P 467 - CRM + モンタニド) のいずれかとともに 10 µg、25 µg および 50 µg 50

で投与した P 4 6 7 - C R M ベプチド構築物の最終投与後 3 週間 (B A 2) 、 8 週間 (B A 3) 、 16 週間 (B A 4) および 6 か月 (B A 5) の時点での H e r 2 / n e u 特異的 Ig G 抗体力値を示す。データは O D 値として表す。各クラスターの左から右へ : B A 2 、 B A 3 、 B A 4 、 B A 5 および事前採血。

【発明の具体的説明】

【 0 0 1 7 】

本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を記載するためのものに過ぎず、限定を意図しない。そうではないことが定義されない限り、本明細書で使用される総ての技術および科学用語は、本開示が属する技術分野の熟練者に一般に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似または等価ないしいずれの材料および方法も本発明を実施するために使用可能である。実務者であれば、当技術の定義および用語ならびに当業者に公知の他の方法について、 Sambrook et al. , (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual , 第2版, Cold Spring Harbor Press, Plainsview, N.Y., and Ausubel et al. (1999) Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York, Murphy et al. (1995) Virus Taxonomy Springer Verlag:79-87 を参照することができる。10

【 0 0 1 8 】

本明細書を通じ、文脈がそうではないことを要求しない限り、用語「含んでなる (comprise)」、または「含んでなる (comprises)」もしくは「含んでなる (comprising)」などの変形形態は、述べられた要素もしくは整数または要素もしくは整数の群の包含を意味するが、他の任意の要素もしくは整数または要素もしくは整数の群の排除を意味するものではないと理解される。20

【 0 0 1 9 】

「からなる」とは、「からなる」の句に続くものを含み、限定することを意味する。よって、「からなる」の句は、列挙された要素が必要または必須であること、および他の要素が存在してはいけないことを示す。「から本質的になる」とは、この句の後に列挙されるいずれの要素も含み、列挙された要素に関して本開示に明示された活性または作用に干渉しないまたは寄与する他の要素に限定されることを意味する。よって、「から本質的になる」の句は、列挙された要素が必要または必須であること、しかしながら、それらが列挙された要素の活性または作用に影響を及ぼすかどうかによって存在してもよく、または存在してはならないことを示す。30

【 0 0 2 0 】

本明細書で使用する場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、文脈がそうではないことを明示しない限り、複数の態様を含む。よって、例えば、「1つの細胞」という場合には、単細胞、ならびに2つ以上の細胞を含み；「1個の生物」という場合には、1個の生物、ならびに2個以上の生物を含むなどである。

【 0 0 2 1 】

スクレオチド配列およびアミノ酸配列は、配列識別子番号(配列番号)により表される。配列番号：配列識別子<400>1、<400>2などに数字的に対応する。配列識別子の要約は本明細書に示される。40

【 0 0 2 2 】

本開示は、少なくとも1つには、(i) アジュバントと、(ii) 非毒性ジフテリア毒素変異体 C R M - 1 9 7 (G e n B a n k 受託番号 1 0 0 7 2 1 6 A) に結合した H e r 2 / n e u の細胞外ドメイン (E C D) に由来する複数の B 細胞エピトープの融合ペプチドとを含んでなるワクチン組成物が、ビロソームなどの送達系を使用することにより達成可能なものよりはるかに優れた抗原特異的抗体応答を惹起できるという、本発明者らの驚くべき発見に基づく。

【 0 0 2 3 】

よって、1つの側面では、
(i) アジュバントと、

10

20

30

40

50

(i i) 担体タンパク質に結合した少なくとも 1 つの融合ペプチドとを含んでなり、

前記担体タンパク質はジフテリア毒素変異体 C R M - 1 9 7 (G e n B a n k 受託番号 1 0 0 7 2 1 6 A ; 配列番号 6 1) であり、

前記少なくとも 1 つの融合ペプチドは、配列番号 1 ~ 7 および 1 5 ~ 6 0 ならびに前記のいずれかと少なくとも 8 5 % の同一性を有するアミノ酸配列からなる群から選択される H e r 2 / n e u の 2 つ以上の不連続 B 細胞エピトープを含んでなる、

ワクチン組成物が提供される。

【 0 0 2 4 】

B 細胞エピトープ

10

本明細書で使用する場合、用語「B 細胞エピトープ」は、B 細胞受容体（抗体）により認識される分子の部分を意味する。よって、「B 細胞エピトープ」は、抗原の小さな部分配列であると理解されるべきであり、前記エピトープ部分配列は抗体により認識され得る。抗原は複数の B 細胞エピトープを含有してよく、従って、複数の異なる抗体により結合可能であるが、この抗原の所与のエピトープフラグメントは一般に、1 つの抗体によってのみ結合される。

【 0 0 2 5 】

本明細書で使用する場合、用語「ペプチド」および「ポリペプチド」は、それらの最も広い意味で、2 つ以上のアミノ酸残基、またはアミノ酸類似体の分子を意味して使用される。アミノ酸残基はペプチド結合により、あるいはまた例えはエステル、エーテルなどの他の結合により連結され得るが、ほとんどの場合、ペプチド結合により連結される。

20

【 0 0 2 6 】

本明細書で使用する場合、用語「アミノ酸」または「アミノ酸残基」は、自然に存在するおよび自然に存在しないまたは合成アミノ酸（D 型または L 型の両方を含む）とアミノ酸類似体の両方を包含する。「アミノ酸類似体」は、その対応する自然に存在するアミノ酸と 1 以上の原子で異なる自然に存在しないアミノ酸として理解されるべきである。例えば、システインのアミノ酸類似体はホモシステインであり得る。

【 0 0 2 7 】

当業者は、あるペプチドが H e r 2 / n e u の B 細胞エピトープであるかどうかをどのようにして決定すればよいかを知っている。実例では、ペプチドは、ヒトまたはマウス生殖細胞系によりコードされている抗体により認識されることが知られている既知の配列および / または部分配列のデータベースを用いて対象とするペプチドの配列を比較する、確立されたコンピュータープログラムを使用することにより、B 細胞エピトープである、または B 細胞エピトープを含んでなると高精度で同定され得る。あるいは、所与のペプチドまたはポリペプチド内の B 細胞エピトープは、表面接近性、鎖のフレキシビリティー、ヒドロバシー / 親水性(hydrophytivity/hydrophilicity)特性、予測される二次構造などの抗原性の相関物の種々の組合せを用いてコンピューター支援分析により同定することができる。あるいは、対象とするペプチドは、対象とするペプチドで動物を少なくとも 1 回免疫して免疫応答を惹起させ、次に、投与されるペプチドの少なくとも一部と特異的に結合する抗体について動物の血清を、例えは、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) 、ラジオイムノアッセイ、ウエスタンプロット解析またはスポット - プロット分析を用いて検定することによって、B 細胞エピトープである、または B 細胞エピトープを含んでなると同定され得る。対象とするペプチドが B 細胞エピトープであるかどうかを決定するための方法のより詳細な説明は、以下の例 6 および 7 に記載されている。

30

【 0 0 2 8 】

以下の表 1 は、H e r 2 / n e u の細胞外ドメインの B 細胞エピトープのアミノ酸配列を、その誘導体を含めて示す。

40

【 0 0 2 9 】

【表1】

表1

B細胞エピトープ	配列番号
RVLQGLPNEYVNARHS	1
YMPIWKFPDEEGAC	2
PESFDGDPASNTAPLQP	3
PESFDGDPASNTAPLQPGGGGGC	4
RVLQGLPNEYVNARHC	5
PESFDGDPASNTAPLQP	15
CAHYKDPPFCVARCPS	16
YGLGMEHLREVRAVTS	17
LGSGLALIHHNTHLCF	18
EVTAEDGTQRCEKCSK	19
GASCVTACPYNYLSTD	20
AAGCTGPKHSDCLACL	21
LEEITGYLYISAWPDS	22
TQRCEKCSKPCARVCY	23
GHCWGPPTQCVNCSQ	24
MPIWKFPDEEGACQPC	25
PASN TAPLQPEQLQVF	26
PEGRYTGFASCVTACP	27
ASTQVCTGTD MKLRLP	28
ACHPCSPMCKGSRCWG	29
QDTILWKDIFHKNNQL	30

B細胞エピトープ	配列番号
GPEADQCVACAHYKDP	31
SRCWGESSEDCQLSLTR	32
PASPETHLDMLRHLYQ	33
YVNARHCLPCHPECQP	34
HSDCLACLHFNHSGIC	35
ALTLIDTNRSRACHPC	36
ALAVLDNGDPLNNNTTP	37
ALVTYNTDTFESMPNP	38
RCKGPLPTDCCHEQCA	39
QPCPINCTHSCVVDLDD	40
VARCPGKVKPDLSYMP	41
VHTVPWDQLFRNPHQA	42
YISAWPDSLPDLSVFQ	43
CKKIFGSLAFLPESFD	44
NGDPLNNNTTPVTGASP	45
LQDIQEVTQGYVLAHN	46
VCAGGCARCKGPLPTD	47
HPECQPQNNSVTCFGP	48
GVLIQRNPQLCYQDTI	49
LQVIRGRILHNGAYSL	50
ESFDGDPASNTAPLQP	51

10

20

30

40

B細胞エピトープ	配列番号
ACPYNYLSTDVGGSCTL	52
PVTGASPGLRELQLR	53
CVDLDDKGCPAEQRAS	54
NHSGICELHCPALVY	55
GSVTCFGPEADQCVAC	56
WGLLLALLPPGAASTQ	57
FLRGQECVEECRVLQG	58
GTQLFEDNYALAVLDN	59
GVKPDLSYMPIWKFPD	60

10

20

【0030】

本明細書に開示される実施形態では、2つ以上のB細胞エピトープは、表1および2に示されるように配列番号1～7および15～60、ならびに前記のいずれかと少なくとも85%の同一性を有する（すなわち、配列番号1～7および15～60のいずれか1つと少なくとも85%の配列同一性を有する）アミノ酸配列からなる群から選択される。本明細書に開示される別の実施形態では、2つ以上のB細胞エピトープは、配列番号1～7および前記のいずれかと少なくとも85%の同一性を有する；すなわち、配列番号1～7のいずれか1つと少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる群から選択される。これらのB細胞エピトープはいずれも天然Her2/neuにおいて連続していないことに留意されたい。

30

【0031】

配列番号1～7および15～60のいずれか1つと少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列は、Her2/neu ECDの天然（すなわち、自然に存在する）B細胞エピトープ内の少なくとも1つのアミノ酸を、Her2/neuのその位置には存在しない別のアミノ酸で、そのアミノ酸置換が保存性を維持するように置換することにから生じる誘導体を含む。誘導体は、中間体および／もしくは最終産物において融合ペプチドの安定性を高めるために、または中間体および／もしくは最終産物において融合ペプチドの溶解度を高めるために、または融合ペプチドの免疫原性を高めるために作製され得る。好適な誘導体を作製するための方法は当業者に公知である。実例としては、誘導体の合成または変異型核酸分子を用いたその組換え生産を含む。さらに、誘導体は一般に、本明細書の他所に記載されるようにB細胞エピトープとしてのその質を保持する。よって、本明細書ではまた、天然配列に対するアミノ酸置換がB細胞エピトープとして機能するその誘導体の能力を無効にしない、または完全には無効にしない「機能的」誘導体も開示される。

40

【0032】

付加的または最適化免疫刺激融合ペプチドの同定はまた、誘導体による免疫エフェクター細胞の刺激の有効性の決定として、融合ペプチドによるB細胞の刺激と誘導体によるB細胞の刺激を比較する工程を含み得る。誘導体を既知の融合ペプチドと比較することによ

50

り、免疫細胞刺激増強特性を有するペプチドが作製できる。

【0033】

本明細書で使用する場合、「保存的置換」は、所与の位置で、およそ等価な大きさ、電荷および/または極性のアミノ酸での置換となるようにアミノ酸同一性を変化させることを意味する。アミノ酸の自然の保存的置換の例としては、以下の8つの置換群が含まれる（慣例の文字コードで記載する）：（1）M、I、L、V；（2）F、Y、W；（3）K、R、（4）A、G；（5）S、T；（6）Q、N；（7）E、D；および（8）C、S。

【0034】

誘導体はまた、機能的に等価なアミノ酸置換からも生じ得る。本明細書で使用する場合、これらは、実施された場合に、1または複数のエピトープフラグメントを含んでなる融合ペプチドが投与された動物由来の血清に基づき、相当する誘導体化が無い融合ペプチドと比べた際に同一または同等（例えば10%以内）のELISA読み取りを示す融合ペプチドをもたらすアミノ酸置換と理解されるべきである。融合ペプチドの抗原性は、例えば、動物の免疫誘導により惹起された抗体の力値を例えば、例6および7に記載されるようにELISAにより測定することによって決定され得る。類似の方法を用いて、保存的またはそれ以外のアミノ酸置換の機能的等価性をアッセイすることもできる。例えば、非誘導体化「親」フラグメントを含んでなる融合ペプチドにより惹起された免疫応答が、同じアッセイを用いて、誘導体化フラグメントを含んでなる融合ペプチドにより惹起されたものと比較される。誘導体化フラグメントを含んでなる融合ペプチドにより惹起された免疫応答が非誘導体化フラグメントを含む融合ペプチドにより惹起されたものと同等に強ければ、そのアミノ酸置換は、機能的に等価と見なすことができる。その誘導体化免疫応答が非誘導体化のものより優れていれば、そのアミノ酸置換は改良されたものと見なすことができる。

10

【0035】

本明細書で使用する場合、用語「天然」および「自然」は、自然界に通常存在するような分子の形態を意味する。従って、Her2/neuのEC-Dの「天然」配列は、従前に公開されているHer2/neuアミノ酸配列(Swiss-Protデータベース受託番号P04626; ERBB2_HUMAN)のアミノ酸残基23~652を意味する。逆に、「非天然リンカー」を含む「非天然」配列は、Her2/neuのEC-Dの天然配列に属さないアミノ酸配列である。よって、本明細書に開示されている実施形態では、ペプチド系「非天然リンカー」は、Her2/neuの隣接する天然配列に接続する、Her2/neuフラグメントいずれの延長物にも相当しない。

20

【0036】

融合ペプチド

複数のエピトープ/ペプチドに基づく、Her2/neu発現またはHer2/neu過剰発現癌のための免疫予防および/または免疫治療ワクチン組成物の設計は、離散型（すなわち、分離型）のペプチドとしてのこのようなペプチドの投与を含んでいた。これはある特定の暗黙の欠点を持つ。例えば、同じ組成物内で複数のペプチドを同時に投与することは、これらのペプチドが凝集し、それにより、宿主の免疫系に対して意図されるそれらのアベイラビリティーを低下させるというリスクを侵す。極端な場合、このような凝集物の溶解度が低下する場合があり、その結果、それらの凝集物が沈澱し、宿主の免疫系が利用できなくなる。同時に、このようなペプチドを異なる溶液で、異なる時点で別に投与すると、このようなペプチドの免疫原性効果が有利な形で組み合わせられる見込みが小さくなる。

30

【0037】

ビロソーム、リポソームまたはウイルス様粒子(VLP)などのある種の送達系で複数の単一のエピトープが使用される場合にはさらなる困難が生じる。再現性のあるワクチン生産を可能とするためには、定義された濃度のエピトープを提供することが有利である。しかしながら、複数のペプチドフラグメントをビロソームまたはリポソームなどの単一の

40

50

送達系にカップリングする（すなわち、共有結合させる）と、各送達系に同数のエピトープをカップリングさせることを保証するのが困難である。送達系当たりのカップリング数の変動は常に存在する。各実行可能な送達系が例えばエピトープAおよびBのそれぞれにカップリングされることは比較的確実であり得るが、いくつかの送達系は意図されるよりもやや多くのエピトープAと会合し、他のものでは、エピトープBが意図される量をやや超える。エピトープAおよびBのガウス分布はフラグメントA : Bの意図される比に集中する傾向があり、定義上はいずれのガウス分布もアウトライアーモードを含み、最大免疫原性有効性から外れている可能性があり、かつ、送達系において意図されるエピトープ比を維持するための要件がリストランジエントになるので除外するのにますますコストと労力がかかるにはこれらのアウトライアーモードである。同様の懸念が、あるHer 2/neu ECDフラグメントと別のものの所望の比を実現する試みにおいて、異なるエピトープフラグメントと会合されたビロソームなどの送達系を組み合わせた際にも当てはまる。

【0038】

本明細書では、上記の欠点を克服する、または少なくとも部分的に緩和するアプローチが開示される。単一の融合ペプチドにおいて、Her 2/neuのECDに由来する少なくとも2つの不連続B細胞エピトープ、またはそれらの誘導体を連結することにより、1種類のみの融合ペプチドが存在する均質な処方物が達成できる。融合ペプチドの要素（すなわち、天然ECDが不連続であるHer 2/neuのECDのエピトープ）はどのペプチドでも同じであり、所望でないポリペプチド内およびポリペプチド間相互作用が最小となるように選択（または選択および修飾）することができる。

【0039】

本明細書に記載の実施形態では、ワクチン組成物は單一種の融合ペプチドを含んでなる。よって、存在するB細胞エピトープの比は、最終的には、融合ペプチドにおけるこれらのフラグメントの比により記載される。これは、免疫原性応答を惹起するために望まれる比が、融合ペプチドの構築および設計のレベルで簡単かつ確実に固定され得ることを意味する。

【0040】

最後に、本明細書に記載の融合ペプチドを送達するための担体タンパク質としての非毒性ジフテリア毒素変異体CRM-197を使用した場合、あるHer 2/neu B細胞エピトープと他の任意のその天然に不連続のB細胞エピトープの比は、前述のようにこの比は単一の融合ペプチドのレベルで決定されるので、どのくらいの融合ペプチドが担体タンパク質と結合しているかに関わらずに一定を維持することから、ワクチン組成物中の各Her 2/neu B細胞エピトープの相対的分布に関連する変動は最小化または回避され得る。

【0041】

本明細書に開示される他の実施形態では、ワクチン組成物は、2種類以上の融合ペプチドを含んでなる。

【0042】

本明細書に開示されるワクチン組成物は、それが投与される宿主において抗原特異的抗体応答を惹起する。驚くべきことに、ワクチン組成物より惹起される抗原特異的応答は、個々にHer 2/neu B細胞エピトープを用いて、またはビロソームなどの代替送達系を用いて得ることのできる免疫応答の何倍も大きい。よって、本発明は、ペプチドをビロソームに組み込むための複雑な製造方法、多くの場合に複数の個々のペプチドを送達系に組み込む試みに関連した変動、および得られるワクチン組成物の有効性を損ない得る別個のB細胞エピトープフラグメント間の潜在的に有害な相互作用という欠点を回避または少なくとも最小にする。

【0043】

本明細書で使用する場合、用語「融合ペプチド」は、例えばペプチド（アミド）結合により互いに連結された、Her 2/neuのECDの2つ以上の不連続B細胞エピトープ（例えば、Her 2/neuのECDの2、3、4、5、6、7、8、9、10、11ま

たはそれを超える不連続 B 細胞エピトープ) から構成される非天然ペプチドを意味する。本明細書で開示される実施形態では、H e r 2 / n e u の E C D の 2 つ以上の B 細胞エピトープは、それらの天然状態で、すなわち、天然 H e r 2 / n e u の E C D において不連続である。

【 0 0 4 4 】

本明細書で開示される実施形態では、融合ペプチドは、H e r 2 / n e u の E C D の少なくとも 3 つの不連続 B 細胞エピトープを含んでなる。1 つの実施形態では、融合ペプチドは、配列番号 8 ~ 1 4 および前記のいずれかと少なくとも 8 5 % の同一性を有するアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる。

【 0 0 4 5 】

以下の表 2 は、選択された B 細胞エピトープ、ならびに本明細書に開示される実施形態のいくつかに従う融合ペプチドの一覧を示す。

【 0 0 4 6 】

【表2】

表2

ペプチド / フラグメント	アミノ酸配列	配列番号
P6	RVLQGLPREYVNARHS	1
P7	YMPIWKFPDEEGAC	2
P4	PESFDGDPASNTAPLQP	3
P3	PESFDGDPASNTAPLQPAGGGGGC	4
P5	RVLQGLPREYVNARHC	5
P8	YMPIWKFPDEEGAS	6
P9	PESFDGDPASNTAPLQPC	7
P467	PESFDGDPASNTAPLQPRVLQGLPREYVNARHSLP YMPIWKFPDEEGAC	8
P647	RVLQGLPREYVNARHSPESFDGDPASNTAPLQPYM PIWKFPDEEGAC	9
P467B	PESFDGDPASNTAPLQPRVLQGLPREYVNARHSYM PIWKFPDEEGAC	10
P485	PESFDGDPASNTAPLQPYMPIWKFPDEEGASRVLQ GLPREYVNARHC	11
P689	RVLQGLPREYVNARHSYM MPIWKFPDEEGASPESFD GDPASNTAPLQPC	12
P845	YMPIWKFPDEEGASPESFDGDPASNTAPLQPRVLQ GLPREYVNARHC	13
P869	YMPIWKFPDEEGASRVLQGLPREYVNARHSPESFD GDPASNTAPLQPC	14

【0047】

本明細書で開示される実施形態では、融合ペプチドは、上の表2に示されるように、配列番号8（融合ペプチドP467と呼称）または配列番号9（融合ペプチドP647と呼称）のアミノ酸配列または配列番号8もしくは配列番号9と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる。

10

20

30

40

50

【0048】

また、本明細書では、タンデムリピートとして2回以上連結した、配列番号1～7および15～60、または前記のいずれかと少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列からなる群から選択されるHer2/neuのECDの2つ以上のB細胞エピトープを含んでなる融合ペプチドが企図される。例えば、本明細書で企図される融合ペプチドは、配列番号1の2つ以上のタンデムリピート、配列番号2の2つ以上のタンデムリピート、配列番号3の2つ以上のタンデムリピート、配列番号4の2つ以上のタンデムリピート、配列番号5の2つ以上のタンデムリピートなどを含んでなり得る。しかしながら、2つ以上の異なるB細胞エピトープを融合ペプチドに組み込むと、ECDの複数のB細胞エピトープを特異的に認識する抗体を惹起することにより、より有益な免疫応答を生成する可能性が高くなると理解される。よって、本明細書に開示されている実施形態では、融合ペプチドは、配列番号1～7および15～60、または前記のいずれかと少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列からなる群から選択されるHer2/neuのECDの少なくとも2つの異なるB細胞エピトープを含んでなる。10

【0049】

本明細書で開示される実施形態では、融合ペプチドは、配列番号8～14からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。さらに別の実施形態では、融合ペプチドは配列番号8（融合ペプチドP467と呼称）または配列番号9（融合ペプチドP647と呼称）のアミノ酸配列からなる。20

【0050】

上の表2に示されるように、配列番号3および4の個々のB細胞エピトープでは、配列番号4は、配列番号3には見られないCys（すなわち、GGGGGCC）で終わる付加的なC末端リンカーを含んでなる。配列番号4のこのC末端リンカーはそれ自体Cysで終わり、これにより、以下に示す実施例のいくつかで例示されるように、この単一のエピトープを担体タンパク質とカップリングさせることができる。本発明の融合ペプチドの一部として使用する場合、配列番号4のB細胞エピトープは、この融合ペプチドに配列番号3の形で存在する。配列番号4のB細胞エピトープが採用される試みでは、それは、B細胞エピトープとして機能する配列番号3に相当する配列番号4の部分である。20

【0051】

本明細書に記載の融合ペプチドを作製する好適な方法は当業者に公知であろう。実例としては、ペプチド合成は、本明細書の他所に記載されるように、各B細胞エピトープとその個々に隣接するB細胞エピトープを連結するペプチド結合を順次形成すること、および前記融合ペプチドを回収することを含む。好適なペプチド合成法は、当技術分野で公知である。実例としては、「アミノ酸およびペプチド合成(Amino Acid and Peptide Synthesis)」(Oxford Chemistry Primers; John Jones, Oxford University Press)に記載されている方法が含まれる。合成ペプチドはまた、液相合成または種々の固相支持体（例えば、ポリスチレン、ポリアミド、またはPEG）上での固相ペプチド合成(SPPS)によって作製することもできる。SPPSは、F-moc(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニル)またはt-Boc(tert-ブトキシカルボニル)の使用を組み込んでもよい。また、商業的製造者から特注ペプチド入手することもできる。3040

【0052】

あるいは、融合ペプチドは組換え法によっても作製され得る。例えば、融合ペプチドをコードする核酸配列を含んでなる核酸分子は、前記核酸配列を発現し得る好適な宿主細胞にトランスフェクトし、前記宿主細胞を前記核酸配列の発現に好適な条件下でインキュベートし、前記融合ペプチドを回収することができる。対象とする1または複数の融合ペプチドをコードする核酸分子を作製するために好適な方法もまた、1または複数の組換え融合ペプチドを発現および/または分泌のために、使用する宿主細胞（例えば、微生物）の性質に基づきコドンを最適化することをおそらくは含む、遺伝コードの知識に基づけば、当業者には公知であろう。好適な宿主細胞もまた当業者には公知であり、その実例には、50

原核細胞(例えば、大腸菌(*E. coli*))および真核細胞(例えば、*P. pastoris*))が含まれる。“Short Protocols in Molecular Biology, 第5版, 2 Volume Set: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology”(by Frederick M. Ausubel(著者, 編者), Roger Brent(編者), Robert E. Kingston(編者), David D. Moore(編者), J. G. Seidman(編者), John A. Smith(編者), Kevin Struhl(編者), J Wiley & Sons, London)参照。

【0053】

本明細書で使用する場合、用語「コードする("encode"、"encoding")」などは、ある核酸の、別の核酸またはポリペプチドを提供する能力を意味する。例えば、核酸配列は、一般に宿主細胞内で転写および/または翻訳されてポリペプチドを生成し得る場合、または転写および/または翻訳されてポリペプチドを生成し得る形にプロセシングされ得る場合に、ポリペプチドを「コードする」と言われる。このような核酸配列は、コード配列またはコード配列と非コード配列の両方を含み得る。よって、用語「コードする」などは、DNA分子の転写から生じるRNA産物、RNA分子の翻訳から生じるタンパク質、DNA分子の転写によるRNA産物の形成とその後のそのRNA産物の翻訳から生じるタンパク質、またはDNA分子の転写によるRNA産物の提供、そのRNA産物のプロセシングによりプロセシングRNA産物(例えば、mRNA)の提供とその後のそのプロセシングRNA産物の翻訳にから生じるタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のB細胞エピトープまたは融合ペプチドをコードする核酸配列は、好適な宿主細胞での発現のためにコドンが最適化される。例えば、融合ペプチドがヒト対象においてHer2/neuに対する免疫応答を誘導するために使用される場合、これらの核酸配列はヒトコドン最適化を受け得る。コドンの最適化の好適な方法は、John Hopkins University Build a Genomeウェブサイトの「Software Tools」にある「Gene Design」ツールの「Reverse Translation」オプションを用いるなど、当業者には公知である。10 20

【0054】

本明細書に記載のHer2/neuの2つ以上の不連続B細胞エピトープは、当業者に公知の手段により融合ペプチド内で互いに連結することができる。用語「連結する」および「連結される」は、ペプチド結合を介した2つの不連続Her2/neu B細胞エピトープの直接結合を含み、すなわち、1つのHer2/neuエピトープのC末端は、ペプチド結合を介して、別の、本来不連続のエピトープのN末端と共有結合されている。用語「連結する」および「連結される」はまた、それらの意味の範囲内に、挿入リンカー要素を介した、本来不連続の2つのHer2/neuエピトープの連結を含む。30

【0055】

本明細書で開示される実施形態では、少なくとも2つの前記B細胞エピトープまたはそれらの誘導体は、非天然リンカーペプチド配列を介して互いに連結される。

【0056】

本明細書で使用する場合、用語「リンカー」は、融合ペプチド内の任意の2つの隣接するHer2/neu B細胞エピトープまたはそれらの誘導体間に挿入された短いポリペプチド配列を意味する。1つの実施形態では、リンカーは、1~10個、好ましくは、1、2、3、4または5個の自然に存在するまたは自然に存在しないアミノ酸のポリペプチドリンカーである。1つの実施形態では、リンカーは、炭水化物リンカーである。好適な炭水化物リンカーは当業者に公知である。本明細書に開示される別の実施形態では、融合ペプチドは、1以上のペプチドまたはポリペプチドリンカーを1以上の他の非ペプチドまたは非ポリペプチドリンカーとともに含んでなる。さらに、異なるタイプのペプチドまたは非ペプチドリンカーを、適切と思われる同じ融合ペプチドに組み込むことができる。ペプチドまたはポリペプチドリンカーがHer2/neuのECD由来の2つの個々のB細胞エピトープフラグメントを連結するために使用される場合、リンカーは、有利には、そのN末端がペプチド結合を介して一方のエピトープフラグメントのC末端に結合され、そのC末端がペプチド結合を介して他方のフラグメントのN末端と結合されるように組み込40 50

まれる。融合ペプチド内の個々のB細胞エピトープフラグメントはまた、いずれかの末端または両末端に、好ましくは、C末端に1以上のアミノ酸が付加されていてもよい。よって、例えば、不連続ペプチドを連結し、ペプチド同士の、および／またはアンカーとして働くビロソーム内の脂質分子を介したビロソームなどの送達系との、共有結合を可能とするように、ペプチドのN末端もしくはC末端または両末端にリンカーまたはスペーサーアミノ酸が付加されてもよい。好適なペプチドリンカーの実例は、例えば配列番号8に示されるように、L P(ロイシン-プロリン)である。

【0057】

当業者には、融合ペプチドと担体タンパク質のカップリングがリンカーを介する場合、N末端由来のリンカーカップリングは、場合によっては、惹起される所望の免疫応答に負の影響を及ぼすことがあるので、融合ペプチドのC末端由来の、このようなリンカー媒介カップリングを達成することが好ましいことが理解されるであろう。10

【0058】

配列同一性および配列類似性

「少なくとも85%」という言及には、例えば最適アラインメントまたはベストフィット分析の後に85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性または類似性を含む。よって、本発明の好ましい形態では、配列は、例えば最適アラインメントまたはベストフィット分析の後に、本明細書で特定される配列と少なくとも85%、好ましくは少なくとも86%、好ましくは少なくとも87%、好ましくは少なくとも88%、好ましくは少なくとも89%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも91%、好ましくは少なくとも92%、好ましくは少なくとも93%、好ましくは少なくとも94%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%または好ましくは100%の配列同一性または配列相同性を有する。20

【0059】

用語「同一性」、「類似性」、「配列同一性」、「配列類似性」、「相同性」、「配列相同性」などは、本明細書で使用する場合、アラインされた配列内の任意の特定のアミノ酸残基の位置において、そのアラインされた配列間でアミノ酸残基が同一であることを意味する。用語「類似性」または「配列類似性」は、本明細書で使用する場合、アラインされた配列内の任意の位置において、それらの配列間でアミノ酸残基が類似のタイプであることを示す。例えば、ロイシンは、イソロイシンまたはバリン残基に置換可能である。これは保存的置換と呼べる。1つの実施形態では、アミノ酸配列は、本明細書に含まれるアミノ酸残基のいずれかの保存的置換の方式により、修飾が非修飾ポリペプチドと比較して、修飾ポリペプチドの結合特異性または機能活性に影響を及ぼさないように修飾され得る。30

【0060】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドに関する配列同一性は、候補配列における、配列アラインおよび最大パーセンテージの相同性を達成するための必要に応じたギャップの導入の後の、配列同一性の一部として保存的置換を考慮しない、対応するポリペプチドの残基と同一であるアミノ酸残基のパーセンテージに関する。N末端もしくはC末端延長も挿入も配列同一性または相同性の低下と解釈されるべきではない。2つ以上のアミノ酸配列のアラインメントを実行し、それらの配列同一性または相同性を決定するための方法およびコンピュータープログラムは当業者に周知である。例えば、2つのアミノ酸配列の同一性または類似性のパーセンテージは、アルゴリズム、例えば、BLAST、FASTA、またはSmith-Watermanアルゴリズムを用いて容易に計算することができる。本発明は、本明細書に定義される配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、93%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性または配列相同性を有する配列、および本明細書に記載の方法におけるそれらの使用に及ぶ。40

【0061】

50

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドに関する配列同一性は、候補配列における、配列アラインおよび最大パーセンテージの相同性を達成するための必要に応じたギャップの導入の後の、配列同一性の一部として保存的置換を考慮しない、対応するポリヌクレオチドのヌクレオチドと同一であるヌクレオチドのパーセンテージに関する。2つ以上のポリヌクレオチドまたは核酸配列のアラインメントを実行し、それらの配列同一性または相同性を決定するための方法およびコンピュータープログラムは当業者に周知である。

【0062】

アミノ酸配列「類似性」を決定するための技術は当業者に周知である。一般に、「類似性」は、アミノ酸が同一であるか、または類似の化学的および／もしくは物理的特性、例えば、電荷または疎水性を有するような、2つ以上のポリペプチドまたは適当な場所における、正確なアミノ酸間比較を意味する。その後、比較されたポリペプチド配列間で、いわゆる「類似性パーセント」を決定することができる。核酸およびアミノ酸配列同一性を決定するための技術も当技術分野で周知であり、その遺伝子のmRNAのヌクレオチド配列を決定し（通常、cDNA中間体を介する）、それによりコードされているアミノ酸配列を決定すること、およびこれを第2の2回目アミノ酸配列と比較することを含む。一般に、「同一性」は、それぞれ2つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列のヌクレオチド間またはアミノ酸間の正確な一致を意味する。

【0063】

2つ以上のポリヌクレオチド配列もまた、それらの「同一性パーセント」を決定することにより比較することができる。2つ以上のアミノ酸配列も同様に、それらの「同一性パーセント」を決定することにより比較することができる。核酸配列であれまたはペプチド配列であれ、2配列間の同一性パーセントは、アラインされた2配列間で正確に一致した数を短い方の配列で割り、100を掛けた解として記載することができる。核酸配列の近似アラインメントは、Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981) のローカルホモロジーアルゴリズムによって提供される。このアルゴリズムは、Dayhoff, Atlas of Protein Sequences and Structure, M. O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3 :353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USAにより開発され、Gribskov, Nucl. Acids Res. 14(6):6745-6763 (1986)により標準化されたスコアリングマトリックスを用い、ペプチド配列との併用に拡張することができる。配列間の同一性または類似性パーセントを計算するための好適なプログラムは一般に当技術分野で公知である。

【0064】

核酸配列同一性を決定するための実例では、対象核酸配列を用い、プログラムBLASTNバージョン2.1 (Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Research 25:3389-3402に基づく)を使用してGenBankデータベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>でアクセス可能)などの核酸配列データベース検索を行う。このプログラムは、ギャップを含まないモードで使用することができる。低複雑性領域による配列ホモロジーを除去するためにデフォルトフィルタリングが使用される。BLASTNのデフォルトパラメーターが使用可能である。アミノ酸配列同一性を決定するための実例では、アミノ酸配列を用い、BLASTPプログラムを使用してGenBankデータベース(ウェブサイト<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>でアクセス可能)などのタンパク質配列データベースを検索する。プログラムはギャップを含まないモードで使用することができる。低複雑性領域による配列ホモロジーを除去するためにデフォルトフィルタリングが使用される。BLASTPのデフォルトパラメーターが使用可能である。低複雑性の配列に関するフィルタリングではSEGプログラムを使用することができる。

【0065】

比較ウインドウをアラインするための配列の最適アラインメントは、アルゴリズムのコンピューター実装形態(Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USAのGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)、または目視検査と選択される種々の方法のいずれかによ

10

20

30

40

50

り生成される最適アラインメント（すなわち、比較ウインドウで最高パーセンテージの相同性をもたらす）によって実行することができる。例えばAltschul et al., 1997, Nucl. Acids Res.25:3389により開示されているようなB L A S T 系列のプログラムも参照することができる。配列分析の詳細な考察は、Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15のユニット19.3に見出すことができる。

【0066】

担体タンパク質

C R M - 1 9 7 (G e n B a n k 受託番号 1 0 0 7 2 1 6 A ; 配列番号 6 1) は、アミノ酸残基 5 2 に単一のアミノ酸置換 (G l y - G l u) を含むジフテリア毒素の酵素的に不活性で無毒な形態である。G l u 5 2 置換をもたらす単一のG C A 突然変異は、C R M - 1 9 7 をその野生型種から区別する。C R M - 1 9 7 に毒性が無いことは、野生型種において感染細胞でタンパク質合成に不可欠な延長因子 2 (ランスロカーゼ) の化学修飾を触媒する、そのフラグメント A の酵素活性の欠如によるものと思われる。この非毒性特性はC R M - 1 9 7 をコンジュゲートワクチンの作製のために好適な担体タンパク質とする。

【0067】

配列番号 6 1 (C R M - 1 9 7 ; G e n B a n k 受託番号 1 0 0 7 2 1 6 A)

【化1】

GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYDDDWKEFY
STDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGL
SLTEPLMEQVGTEEFIKRGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEI
NFETRGKRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIES
LKEHGPIKNKMSESPNKTSEEKAKQYLEEFHQTALEHPESELKTVTGTNPVFAAG
ANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSLILPGIGSVVMGIADGAVHHNTEEIVA
QSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPA YSPGHKTQ
PFLHDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVN
KSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNGVHANLHVAFHRSSSEKIH
SNEISSDSIGVLGYQKTVVDHTKVNSKLSSLFEIKS

20

融合ペプチドがC R M - 1 9 7 にカップリングされる方法は当業者に公知である。

【0068】

実例としては、Chang et al. (1998, FEBS Letters, 427:362-366) およびBerti et al. (2004, Biophysical Journal, 86:3-9) により記載されているもの、ならびに以下の例 1 に示されるものが含まれる。

【0069】

本明細書に記載の融合ペプチドとC R M - 1 9 7 のコンジュゲーションは一般に、好適な架橋剤を用いたリシリル残基の活性化を介して達成される。C R M - 1 9 7 は 4 0 個のリシン残基を含有し、それらの多くが架橋に利用可能であるので、C R M - 1 9 7 コンジュゲーションの最終産物は、常にヘテロである。理論または特定の作用機序に縛られるものではないが、一般に、融合ペプチド：担体タンパク質の比は融合ペプチドの大きさまたは分子量に依存すると理解される。例えば、融合ペプチドが比較的小さい場合（例えば、約 1 0 アミノ酸長）、2 0 ~ 3 9 の融合ペプチドと結合した担体タンパク質を作製することが可能となり得る。逆に、より大きな融合ペプチドの場合、担体タンパク質は 2 0 まで、またはそれより少ない融合ペプチドと結合し得る。本明細書に記載の 1 つの実施形態では、担体タンパク質は、2 ~ 3 9 の融合ペプチドを含んでなる。別の実施形態では、担体タンパク質は、少なくとも 2 0 の融合ペプチドを含んでなる。さらに別の実施形態では、担体タンパク質は、6 ~ 1 2 の融合ペプチドを含んでなる。

30

【0070】

融合ペプチドは一般に、共有結合により担体タンパク質とカップリングされる。しかし

40

50

ながら、いくつかの実施形態では、融合ペプチドは、非共有結合により担体タンパク質とカップリングされ得る。融合ペプチドが担体タンパク質と非共有結合される場合、その非共有結合は一般に、融合ペプチドの1以上の原子と担体タンパク質の1以上の原子の間の電磁相互作用を含む。実例としては、イオン結合（すなわち、2つの反対の電荷を有するイオン間でこの反対の電荷により形成される引力）、ファンデルワールス力（すなわち、融合ペプチドおよび担体タンパク質内に存在する共有結合の永久双極子および／または誘起双極子の間の力）および／または疎水性相互作用（すなわち、本明細書に記載の1または複数の融合ペプチド内の疎水性部分／脂肪族部分の、担体タンパク質の疎水性部分と会合する傾向）から生じる力が含まれる。

【0071】

10

アジュバント

本明細書で使用する場合、用語「アジュバント」は一般に、融合ペプチド - 担体タンパク質コンジュゲートにより惹起される免疫応答の規模を、アジュバントの不在下での、本明細書に記載の融合ペプチド単独からまたは融合ペプチド - 担体タンパク質コンジュゲートから予想されるものを超えて増大させる物質種を意味する。

【0072】

好適なアジュバントは当業者に公知である。好適なアジュバントの限定されない例としては、アルミニウム塩（例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムおよび硫酸カリウムアルミニウム（ミヨウバンとも呼ばれる））、リポソーム、ビロソーム、油中水型または水中油型エマルション（例えば、フロイントのアジュバント、モンタニド（商標）、M F 5 9（商標）およびA S 0 3）、3 - O - デスマシル - 4' - モノホスホリル脂質A（M P L）およびM P L含有アジュバント（例えば、A S 0 1、A S 0 2およびA S 0 4）およびサポニンに基づくアジュバントが含まれる。サポニンに基づくアジュバントには、例えば、キラヤ・サボナリア(*Quillaja saponaria*)、チョウセンニンジン(*Panax ginseng*)、サンシチニンジン(*Panax notoginseng*)、アメリカニンジン(*Panax quinquefolium*)、キキョウ(*Platycodon grandiflorum*)、ヒメハギセネガ(*Polygala senega*)、イトヒイメハギ(*Polygala tenuifolia*)、キラヤ・ブラジリエンスシス(*Quillaja brasiliensis*)、キバナオウギ(*Astragalus membranaceus*)およびイノコズチ(*Achyranthes bidentata*)由来のサポニンまたはサポニン誘導体が含まれる。例示的なサポニンに基づくアジュバントには、i s c o m s、i s c o mマトリックス、I S C O M E T R I X^{T M}アジュバント、マトリックスM^{T M}アジュバント、マトリックスC^{T M}アジュバント、マトリックスQ^{T M}アジュバント、A b I S C O（商標）- 1 0 0アジュバント、A b I S C O（商標）- 3 0 0アジュバント、I S C O P R E P^{T M}、I S C O P R E P^{T M}誘導体、I S C O P R E P^{T M}またはI S C O P R E P^{T M}誘導体を含有するアジュバント、Q S - 2 1、Q S - 2 1誘導体、およびQ S - 2 1またはQ S 2 1誘導体を含有するアジュバントが含まれる。本明細書に記載のワクチン組成物はまた、例えば、サイトカイン、ケモカインおよび増殖因子を含む免疫調節薬と会合させることもできる。本明細書では、同じワクチン組成物内の2つ以上のアジュバントの混合物も企図される。

20

【0073】

30

1つの実施形態では、アジュバントは水酸化アルミニウムである。別の実施形態では、アジュバントはモンタニドである。

40

【0074】

本明細書で開示される実施形態では、ワクチン組成物は、チェックポイント阻害剤をさらに含んでなる。用語「チェックポイント阻害剤」は、1以上のチェックポイントタンパク質を完全にまたは部分的に阻害する、低減するまたはそうでなければそれに干渉するもしくは調節する分子を意味するものとして当業者に理解される。好適なチェックポイント阻害剤の実例としては、抗体およびそれらの抗原結合フラグメント（例えば、F a b フラグメント）が含まれる。好適なチェックポイントタンパク質は当業者に公知であり、その実例としては、C T L A - 4 およびそのリガンドC D 8 0 およびC D 8 6；P D 1 およびそのリガンドP D L 1 およびP D L 2；O X 4 0 およびそのリガンドO X 4 0 L；L A G

50

- 3 およびそのリガンドMHCクラスIまたはII；TIM-3 およびそのリガンドGA
L-9；およびB およびTリンパ球アテニュエーター（BTLA）およびそのリガンドで
あるヘルペスウイルスエントリーメディエーター（HVELM）が含まれる。

【0075】

医薬組成物

本明細書はまた、本明細書に記載のワクチン組成物と薬学上許容可能な担体とを含んで
なる医薬組成物に記載する。好適な薬学上許容可能な担体（例えば、賦形剤、希釈剤など
）は当業者に公知である。例えば、緩衝水、0.4%生理食塩水、0.3%グリシン、お
よびヒアルロン酸などの様々な水性（薬学上許容可能な）担体が使用可能である。これら
の組成物は従来の周知の滅菌技術により滅菌してもよく、または濾過除菌してもよい。
得られた水溶液はそのまま使用するために包装されてもよく、または凍結乾燥されてもよく
、凍結乾燥調製物は投与前に無菌溶液と合わせられる。これらの組成物は、必要に応じて
、生理学的条件に近づけるための薬学上許容可能な補助物質、例えば、他の多くのもの
の中でも、pH調整剤および緩衝剤、等張化剤、および湿潤剤など、例えば、酢酸ナトリウム
、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、モノラウリン酸
ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミン、スクロースまたは他の炭水化物をさらに
含んでなり得る。非経口的に投与可能な化合物を調製するために好適な方法は当業者には
公知であるか自明であり、例えば、A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice
of Pharmacy", 第20版, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms
and Drug Delivery Systems (1999) H. C. Ansel et al.編, 第7版, Lippincott, Williams,
& Wilkins; およびHandbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbe et al.編,
第3版Amer. Pharmaceutical Assocにより詳細に記載されている。
10

【0076】

医薬組成物は、非経口投与（例えば、皮下、筋肉内または静脈内注射）に好適な形態ま
たは鼻腔内吸入または経口吸入によるなどの吸入による投与に好適なエアゾール形態であ
り得る。

【0077】

本明細書に記載の医薬組成物はキットで提供されてもよい。キットは、投与装置、賦形
剤、および／または希釈剤など、本明細書に記載の方法の実施を補助するための付加的成
分を含んでなり得る。これらのキットは、種々の成分を収容する容器およびこのような方
法においてキット成分を使用するための説明書を含んでよい。
30

【0078】

本明細書で開示される実施形態では、医薬組成物は、本明細書の他所に記載されるよう
なチェックポイント阻害剤をさらに含んでなる。

【0079】

癌を治療または予防するための使用および方法

また、本明細書では、必要とする患者においてHer2/neuの発現または過剰発現を特徴と
する癌を治療または予防する方法が開示され、その方法は、前記患者に有効量の
本明細書に記載のワクチン組成物、または本明細書に記載の医薬組成物を投与する工程を
含んでなる。
40

【0080】

本開示はまた、必要とする患者においてHer2/neuの発現または過剰発現を特徴と
する癌を治療または予防するための薬剤の製造における本明細書に記載のワクチン組成
物の使用にも及ぶ。

【0081】

本開示はまた、必要とする患者においてHer2/neuの発現または過剰発現を特徴と
する癌の治療または予防において使用するための本明細書に記載のワクチン、または本
明細書に記載の医薬組成物にも及ぶ。

【0082】

当業者ならば、Her2/neuタンパク質の発現または過剰発現を特徴とする癌のタ
50

イブを知っている。実例としては、乳癌、卵巣癌、子宮内膜癌、胃癌、膵臓癌、前立腺癌および唾液腺癌が含まれる。1つの実施形態では、癌は乳癌である。別の実施形態では、癌は胃癌である。

【0083】

本明細書に記載のワクチンまたは医薬組成物は一般に、「有効な量」、すなわち、とりわけ治療または予防効果いずれか1以上を惹起するのに有用な量で投与される。当業者ならば、慣例の実験により、医薬組成物中に含むまたは所望の転帰のために投与される、有効で非毒性の量を決定することができるであろう。一般に、本明細書に開示されるワクチンおよび／または医薬組成物は、投与経路およびレシピエントの身体的特徴（健康状態を含む）に適合した様式で、所望の効果（すなわち、治療上有効、免疫原性および／または保護的）を惹起するような方法で投与することができる。例えば、組成物の適当な用量は、限定されるものではないが、対象の身体的特徴（例えば、年齢、体重、性別）、組成物が単剤として使用されるか、または補助療法の一部として使用されるか、基礎にある任意の癌の進行（すなわち、病的状態）、および当業者により認識され得る他の因子を含む、様々な因子によって異なり得る。例えば、組成物の適当な用量を決定する際に考慮され得る一般的な考慮事項の他の実例は、Gennaro (2000, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 第20版, Lippincott, Williams, & Wilkins; およびGilman et al., (編), (1990), "Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics", Pergamon Press)により考察されている。

【0084】

この量は、上記で概略を述べた考慮事項のいくつかを考慮して、当業者に公知の方法により決定可能な比較的広範囲にあると思われる。

【0085】

本明細書に記載されるような有効量の融合ペプチド（担体タンパク質に結合する）は一般に、対象当たり約5μg～約1.0mgの融合ペプチド、対象当たり10μg～約500μgの融合ペプチド、または対象当たり約15μg～約60μgの融合ペプチドの範囲である。有効量は、例えば、抗原特異的抗体力価の測定を含む標準的な方法によって確認することができる。本明細書に記載の組成物により提供される免疫性のレベルを監視して、もしあれば、追加免疫の必要を決定することができる。例えば、血清中の抗原特異的抗体力価の評価の後に、一般に、対象における組成物の最初の投与の数日または数週間後に、任意選択の追加免疫が必要とされる、かつ／または望まれる場合がある。抗原特異的抗体力価は、以下の実施例に示されるように、複数用量の使用により増強される可能性がある。

【0086】

本明細書に記載されるようにワクチンおよび／または医薬組成物は、それを必要とする対象に単独でまたは1または複数の付加的治療薬と組み合わせて、すなわち、補助療法の一部として投与することができる。補助療法に関して、投与は同時または逐次であってよく、すなわち、まずワクチンおよび／もしくは医薬組成物が投与され、その後、1もしくは複数の付加的治療薬および／もしくは予防薬が投与されるか、または1もしくは複数の付加的治療薬の投与の後にワクチンおよび／または医薬組成物が投与される。よって、2つ以上の実体が対象に「一緒に」投与される場合、それらは単一の組成物で同時に、または別個の組成物で同時に、または別個の組成物で別の時間に投与され得る。

【0087】

1または複数の治療薬は、本明細書の他所に記載されるようなチェックポイント阻害剤を含んでなり得る。よって、1つの実施形態では、本明細書に開示される方法は、前記患者に有効量の本明細書に記載のチェックポイント阻害剤を投与する工程をさらに含んでなる。

【0088】

所望の免疫応答を誘導するために必要とされる場合には、最適な量および個々の用量の間隔は、例えば、投与の形態、経路および部位、ならびに本発明の他所に記載されるよう

10

20

30

40

50

に、処置される特定の対象の性質により決定され得ることが当業者には明らかであろう。最適な条件は当業者に公知の慣例技術を用いて決定され得る。

【0089】

いくつかの場合では、本明細書に記載のワクチンおよび／または医薬組成物の数回または複数回の投与を含むことが望ましい場合がある。例えば、本組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10回またはそれを超える回数投与され得る。これらの投与は約1日間隔～約12週間隔、特定の実施形態では、約1週間～約4週間であり得る。腫瘍サイズの減少および／または転移発生の減少などの望ましい治療結果を達成するために間欠的再投与が必要とされる場合がある。また、最適な投与コースは慣例の治療コースまたは有効性もしくは免疫状態決定検査を用いて確認できることも当業者には明らかであろう。

10

【0090】

本明細書で企図されるような免疫または抗原特異的抗体応答を「誘導する」とは、腫瘍サイズの減少および／または転移発生の減少などの所望の生理学的效果得るための、免疫応答の惹起もしくは刺激および／または既存の免疫応答の増強を含む。前記効果は、癌の発生を完全にもしくは部分的に予防する、転移発生を完全にもしくは部分的に予防する、および／または前記癌に関連する症状を完全にもしくは部分的に予防するという点で予防的であり得る。

【0091】

本明細書で使用する場合、用語「投与」または「投与すること」は一般に、本明細書に記載のワクチンおよび／または医薬組成物を患者の身体に、患者の免疫系が1または複数の融合ペプチド内の複数のHer2/neu B細胞エピトープに対する応答を惹起するように導入する工程を意味する。本明細書で使用する場合、「必要とする患者」には、癌細胞がHer2/neuタンパク質を発現または過剰発現する癌と診断された個体を含む。また、これには、いずれの症状も呈したことはないが、例えば、癌の家族歴、従って、癌を発症する、疑いのある遺伝的素因を持ち得る個体など、まだ癌と診断されていない個体も含む。その最も広い意味において、用語「必要とする患者」は、すでに必要を呈している個体、ならびにHer2/neu関連癌を発症するリスクのある個体を包含する。

20

【0092】

本明細書で使用する場合、癌を「予防する」薬剤は、癌を発症するリスクを、理想的にはゼロまで引き下げる。さらに、この用語はまた、例えば原発腫瘍の手術後の癌の再発の予防も意味する。本明細書で使用する場合、癌を「治療する」薬剤は、理想的には、本組成物の投与の中止時に疾患が再発せず寛解に留まるようにその根本原因を除去することによって疾患全体を除去する。本明細書で使用する場合、癌を「改善する」薬剤は、疾患の根本原因を除去しないが、確立された任意のグレード体系により測られるおよび／または患者の福祉の改善、例えば、疼痛および／または不快の軽減の改善により測られる、疾患の重篤度を軽減する。

30

【0093】

「有効量」は、確立された投与計画に従って、単独でまたはさらなる用量とともに、本明細書の他所に述べられているような所望の予防、治療または改善を果たす、医薬製剤の量である。

40

【0094】

投与経路および計画は、処置される病態の病期または重篤度によって異なり、当業者によって決定されるべきである。例えば、本明細書に記載の本発明によるワクチンまたは医薬組成物は、皮下、皮内、リンパ管内または局所または粘膜（鼻腔）、または筋肉内形態で投与され得る。これらの形態は総て、製薬分野の熟練者に周知である。

【0095】

特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、当業者に公知の筋肉内、皮下、リンパ管内または鼻腔内経路で投与され得る。

【0096】

本明細書の他所に述べられているように、本明細書に記載の組成物を使用する投与計画

50

は、例えば、患者の年齢、体重および健康状態処置される病態の病期および重篤度、ならびに投与に意図される特定の融合ペプチドを含む様々な因子に従って選択される。熟練の医師であれば、悪性腫瘍を予防する、治療する、またはその進行もしくは重篤度を改善するために必要とされる例えは、担体タンパク質（それにカップリングされた1または複数の融合ペプチドを含んでなる）の有効量を容易に決定および指示することができる。投与計画はまた、投与するアジュvantの量も考慮し、それは被験体、患者の年齢、体重および健康状態などの、対象に投与される担体タンパク質／融合ペプチドの量を支配する因子の少なくともいくつかによって異なると思われる。担体タンパク質／融合ペプチドおよび／またはアジュvantの、毒性無くまたは許容可能な毒性だけで有効性を生じる範囲の濃度（すなわち、有効量）を達成するまでの最適精度は、少なくとも1つには、標的部位に対する担体タンパク質／融合ペプチドおよび／またはアジュvantのアベイラビリティーの動態に基づく計画を必要とする。このプロセスは一般に、担体タンパク質／融合ペプチドおよび／またはアジュvantの分布、平衡、および排出の考慮事項を含み、これらは当業者の能力の範囲内である。

【0097】

本明細書に述べられる総ての特許、特許出願および刊行物は、引用することによりそれらの全内容が本明細書の開示の一部とされる。

【0098】

当業者は、本明細書に記載の本発明が具体的に記載されているもの以外の変形および改変を許容すること認識するであろう。本発明は趣旨および範囲内にあるこのような総ての変形および改変を含むと理解されるべきである。本発明はまた、本明細書に言及または示唆される工程、特徴、組成物および化合物の総てを個々にまたは集合的に、また、2つ以上の任意の前記工程または特徴のいずれか、および総ての組合せを含む。

【0099】

以下、本発明の特定の実施形態を、下記の例を参照して説明するが、これらの例は例示を目的とするに過ぎず、上記の概論の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0100】

下記の例は、2つの融合ペプチド（Her2/neuに由来する不連続B細胞エピトープ）と組換え無毒化ジフテリア毒素CRM197のコンジュゲーションを対象とする。SDS-PAGEおよび免疫プロット法による融合ペプチド-担体タンパク質コンジュゲートの初期分析を行った。最後に、融合ペプチド-担体タンパク質コンジュゲートを、動物における最初の免疫原性試験のためにオーストラリアに輸送した。

【0101】

例1-Her2/neuペプチド抗原と組換え無毒化ジフテリア毒素変異体CRM-197のコンジュゲーション

ビロソームに基づく乳癌ワクチンPEV6A/Bは第I相臨床治験で試験され好結果が得られた(Wiedermann et al., Breast Cancer Res Treat. 2010)。しかしながら、このワクチン処方物には安定性および成分適合性に関する実質的な技術的限界という特徴があり、それは2つの別個の注射が避けられないという事実により最もよく説明される。

【0102】

PEV6Cアプローチは、PEV6A/Bのこの技術的限界を克服する。PEV6Cは、3つの抗原（それぞれP6、P7、およびP4；配列番号1～3）を総て単一のペプチド鎖に組合せ（WO2011/020604A1；Multi-epitope vaccine for her2/neu-associated cancers）、安定で凍結乾燥可能な単一用量適用形態として処方することができる。

【0103】

調製および結果

下記の融合タンパク質を担体タンパク質CRM-197とのコンジュゲーションに使用した：

10

20

40

50

ペプチド 1 : P 4 6 7 (コンジュゲーション前) :

【化 2】

H-Pro-Glu-Ser-Phe-Asp-Gly-Asp-Pro-Ala-Ser-Asn-Thr-Ala-Pro-Leu-Gln-Pro-Arg-Val-Leu-Gln-Gly-Leu-Pro-Arg-Glu-Tyr-Val-Asn-Ala-Arg-His-Ser-Leu-Pro-Tyr-Met-Pro-Ile-Trp-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Ala-Cys 酢酸塩(配列番号 8); および

ペプチド 2 : P 6 4 7 (コンジュゲーション前) :

【化 3】

H-Arg-Val-Leu-Gln-Gly-Leu-Pro-Arg-Glu-Tyr-Val-Asn-Ala-Arg-His-Ser-Pro-Glu-Ser-Phe-Asp-Gly-Asp-Pro-Ala-Ser-Asn-Thr-Ala-Pro-Leu-Gln-Pro-Tyr-Met-Pro-Ile-Trp-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Ala-Cys 酢酸塩(配列番号 9)。

10

【0104】

コンジュゲーション反応は、pH 7.4 の PBS バッファー中、架橋剤スルホスクシンイミジル - 4 - (N-マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (Sulfo-SMCC) を用いて行った。この試薬はまず CRM - 197 担体タンパク質上の第一級アミン (すなわち、リシン残基) と反応し、その後、チオール基 (すなわち、システイン残基) と反応可能となる。CRM - 197 では、理論的には 39 のリシン残基が架橋試薬との反応に利用可能であった。担体タンパク質上でペプチド抗原の良好な分布を達成するために、融合ペプチド : 担体タンパク質比を、CRM 197 分子当たりに 20 個の融合ペプチド分子の平均コンジュゲーションとなるように調整した。反応は次のように室温で 45 分間進行させた。

20

【0105】

【表 3】

表 3 : 材料

製品	供給者	製品番号	ロット番号	解説
ペプチド P467(脂質コンジュゲーション前)	Bachem	4088800	88800/1K	MW= 5498 Da; 49 aa, pI=4.7 PESFDGDPASNTAPLQPRVLOGL PREYVNARHSLPYMPWIKFPDEEGAC
ペプチド P647(脂質コンジュゲーション前)	Bachem	4088799	88799/1K	MW= 5287 Da; 47 aa, pI=4.7 RVLQGLPREYVNARHSLPYMPWIKFPDEEGAC
Sulfo-SMCC	ThermoFisher Scientific	0022622	PD199843	8x 2 mg Mr= 436.4
CRM197 ジフテリア毒素非毒性突然変異体	Merck (Calbiochem)	322327	D00149725	1mg アリコート 再構成後 PBS pH7.4 中 2mg/mL 溶液; MW 約 58 ~63kDa; pI=5.85, 39Lys 残基
EDTA pH 8.0, 0.5 M	Calbiochem / Merck	324506	D000165106	0.1 L
DMSO, LC-MS グレード	ThermoFisher Scientific	0085190	PG204999	50 mL
20 倍改変ダルベッコの PBS バッファー	ThermoFisher Scientific	0028344	PG201076	0.5 L
Zeba Spin 脱塩カラム, 40K, 10mL	ThermoFisher Scientific	0087772	PG202270	5 パック
WFI	Bema Biotech	100005	1004241	

30

【0106】

手順

1. 融合ペプチドを -20℃ から取り出し、室温で約 10 分間置き、その後、バイアルを開封する。

40

50

2 . 3 mL のガラスバイアルに融合ペプチドを秤量し :

(a) P 4 6 7 、 7 . 8 mg 、 7 8 0 μ L 注射水 (W F I) に再懸濁 ;

(b) P 4 6 7 、 7 . 1 mg 、 7 1 0 μ L ジメチルスルホキシド (D M S O) に再懸濁 ;

(c) P 6 4 7 、 6 . 9 mg 、 6 9 0 μ L W F I に再懸濁 ;

(d) P 6 4 7 、 9 . 0 mg 、 9 0 0 μ L D M S O に再懸濁 ;

総ての溶液が容易に再懸濁され、凝集塊または濁りは見られなかった。

3 . 20 倍リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) を M i l l i Q 水で 1 倍 P B S に希釈し、エチレンジアミン四酢酸 (E D T A) を終濃度 1 mM まで加える。

4 . 6 本のバイアルの C R M 1 9 7 を 0 . 5 mL W F I で再構成して 2 mg / mL とする。3 本のバイアルをプールして 2 バッチとし、4 で保存する (1 バッチ当たり 1 . 5 mL 、各 3 mg) 。 10

5 . S u l f o - S M C C (2 mg) のバイアル 1 本を取り、それに 2 0 0 μ L の P B S / 1 mM E D T A を加え、溶解させる (1 0 mg / mL 保存溶液 ; 溶液は濁ったまま) 。

6 . 3 mg C R M 1 9 7 の各バイアルに 7 5 μ L の S u l f o - S M C C (1 0 mg / mL) を加える。総容量 : 1 . 5 7 5 mL 。

7 . これらのバイアルを室温で 45 分間、ゆっくり混合 (回転 25 rpm) しながらインキュベートする。その間に 2 本の Z e b a S p i n 脱塩カラムを P B S / E D T A パッファーで平衡化する。 20

8 . インキュベーション工程 7 の後、反応物を平衡化した Z e b a S p i n カラムに移し (1 . 5 mL) 、 2 0 0 μ L の P B S / E D T A を加え、次いで、 1 0 0 0 × g で 4 分間遠心分離する。

9 . 1 . 8 mL の各溶液を回収した。

10 . 新しい 3 mL バイアルに次のように加える :

(a) バイアル 1 : 6 0 0 μ L P 4 6 7 (W F I 中 1 0 mg / mL) ; および

(b) バイアル 2 : 6 0 0 μ L P 6 4 7 (W F I 中 1 0 mg / mL) 。

11 . 各バイアルに、 5 0 μ L の 20 倍 P B S を加え、溶液の pH をおよそ 7 に上昇させる。

12 . 各バイアルに、 1 . 8 mL の脱塩 C R M 1 9 7 - S M C C を加える。 30

13 . これらのバイアルを室温で 45 分間、ゆっくり混合 (回転) しながらインキュベートし、その後、これらのバイアルを分析まで 4 で保存する。インキュベーション中、バイアル 2 では沈澱が見られるようになったことに注記しておく。しかしながら、その溶液を温めた後に沈澱は消失した。

【 0 1 0 7 】

要約

ペプチド P 4 6 7 - C R M 1 9 7 、およそ 2 . 4 4 9 mg / mL P 4 6 7 、およそ 1 . 2 2 mg / mL C R M 1 9 7 、およそ 2 4 5 0 μ L ; 1 倍 P B S / 1 mM E D T A 中、ロット 1 4 0 8 2 9 - 1 _ a m 。

ペプチド P 6 4 7 - C R M 1 9 7 、およそ 2 . 4 4 9 mg / mL P 6 4 7 、およそ 1 . 2 2 mg / mL C R M 1 9 7 、およそ 2 4 5 0 μ L ; 1 倍 P B S / 1 mM E D T A 中、ロット 1 4 0 8 2 9 - 2 _ a m 。

【 0 1 0 8 】

P 6 4 7 - C R M 1 9 7 ペプチドコンジュゲートは、反応進行中に凝集傾向を示すことが認められた。P 4 6 7 - C R M 1 9 7 ペプチドコンジュゲートでは、目に見える凝集は無かった。

【 0 1 0 9 】

例 2 - クーマシープルー染色およびマウス抗血清 E を用いた C R M 1 9 7 - 抗原コンジュゲートの免疫プロット

コンジュゲート処方物を S D S - P A G E により分析し、ゲルのクーマシープルー染色 50

により、また従前に作製した、破傷風トキソイドに結合したペプチド抗原 P 4、P 6 および P 7 の組合せに対するマウス血清（抗血清 E）を用いた免疫プロット法により評価した。

【 0 1 1 0 】

【表 4】

表 4 : 材料

製品	供給者	製品番号	ロット番号	解説	
ペプチド P467(脂質コンジュゲーション前)	Bachem	4088800	88800/1K	MW= 5498 Da; 49 aa, pI=4.7 PESFDGDPASNTAPLQPRVLQGL PREYVNDARHSLPYMPIWKFPDEE GAC	10
ペプチド P647(脂質コンジュゲーション前)	Bachem	4088799	88799/1K	MW= 5287 Da; 47 aa, pI=4.7 RVLQGLPREYVNARHRS PESFDGDPASNTAPLQP YMPIWKFPDEEGAC	
CRM197 ジフテリア毒素非毒性突然変異体	Merck (Calbiochem)	322327	D00149725	1mg アリコート 再構成後 PBS pH7.4 中 2mg/mL 液溶液; MW 約 58 ~63kDa; pI=5.85, 39Lys 残基	
ペプチド P467-CRM197	Mymetics	n.a.	140829-1_am	1 倍 PBS/1mM EDTA 中, およそ 2.449mg/mL P467, およそ 1.22mg/mL CRM197	
ペプチド P647-CRM197	Mymetics	n.a.	140829-2_am	1 倍 PBS/1mM EDTA 中, およそ 2.449mg/mL P647, およそ 1.22mg/mL CRM197	20
10倍トリス/グリシン/SDS	BioRad	161-0732	116812		
4倍 Laemmli パンクッパー	BioRad	161-0747	350002344		
Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards	BioRad	161-0377	310013154	(2-250kD), 9 本の青色染色バンド と 3 本の桃色参照バンド(2, 25, 75kD)	
Bio-Safe クーマシー染料	BioRad	161-0786	n.a.		
4-20%Mini-PROTEAN(商標)TGX™ ゲル	BioRad	456-1095	400093571	12 ウエル, 20 μl	
ニトロセルロース膜	Thermo Fisher/Pierce	88025	PE1844001	0.45μm, 8cm x 8cm	
Trans-Blot(商標)Turbo™ミニニトロセルロースransferアーベックス	BioRad	170-4158	400093907	7x8.5cm, ブレカットプロテイングトランスクッパー	
SuperBlock(PBS)ロックングバッファー	Thermo Fisher/Pierce	37580	PE201632		30
抗 P4/P6/P7 マウス血清 D ブルー	Univ Vienna	n.a.	n.a.	インフルエンザビロームに組み込んだベーフチトによる免疫誘導からのマウス血清	
抗 P4/P6/P7 マウス血清 E ブルー	Univ Vienna	n.a.	n.a.	破傷風トキソイドにコンjugateしたベーフチトによる免疫誘導からのマウス血清	
抗マウス IgG HRP	KPL	074-1802	101080		
TMB 基質溶液	Seramun	S-002-4-TMB			
20倍改変ダルベッコの PBS パッファー	ThermoFisher Scientific	0028344	PG201076	Milli Q 水で調製した 1L の 1 倍 PBS, 140902-am	
還元剤: β-ME	Sigma	63689	n.a.	14.3M 液溶液	
WFI	Bema Biotech	100005	1004241		

【 0 1 1 1 】

手順

2 枚の SDS - PA ゲルを次のように調製した：

- CRM197 (2 mg / mL) 保存溶液を PBS pH 7.4 で 1 : 10 希釈した。
- 抗コンジュゲート溶液を PBS pH 7.4 で 1 : 10 希釈した。
- 非コンジュゲート融合ペプチドを 10 mg / mL の保存溶液として調製し、 PBS pH 7.4 で 1 : 20 希釈した。

【 0 1 1 2 】

合計 36 μL の各サンプルを調製し、1 レーン当たり 15 μL をロードした。2 枚の同

じゲルを作製した：ゲル 1 はクーマシープルーで染色し、ゲル 2 はウエスタンプロットに使用した。ゲル 1 およびゲル 2 におけるサンプルの分布を以下の表 5 にまとめた。

【 0 1 1 3 】

【表 5 】

	サンプル説明	WFI [μL]	プローブ [μL]	LDS 4 倍 バッファ ー[μL]	還元剤 [μL]
1	Precision Plus Protein™ Dual Xtra	-	10	-	-
2	CRM197 - 0.25 ug [1:10]	23	3	9	1
3	CRM197 - 0.5 ug [1:10]	20	6	9	1
4	CRM197 - 1.0 ug [1:10]	14	12	9	1
5	P467-CRM197 - 0.25 ug [1:10]	22.2	3.8	9	1
6	P467-CRM197 - 1.0 ug [undil.]	24.5	1.5	9	1
7	P647-CRM197 - 0.25 ug [1:10]	22.2	3.8	9	1
8	P647-CRM197 - 1.0 ug [undil.]	24.5	1.5	9	1
9	P467 - 0.25 ug [1:20]	24.8	1.2	9	1
10	P467 - 1.0 ug [1:20]	21.2	4.8	9	1
11	P647 - 0.25 ug [1:20]	24.8	1.2	9	1
12	P647 - 1.0 ug [1:20]	21.2	4.8	9	1

【 0 1 1 4 】

結果

ゲル 1 - クーマシープルー染色

ゲル 1 を Bio - Safe クーマシープルー染料に振盪下、室温で 1 時間浸漬した後、室温で 1 時間、 Milli Q 水ですすいだ。

【 0 1 1 5 】

ゲル 2 - ウエスタンプロット

電気泳動後、ゲル 2 をカセットから取り出し、 Milli Q 水で簡単にすすいだ。次に、製造者の説明書 (BioRad) に従い、トランスファーサンドイッチを作製し、 Turbo Transfer Blot 機に設置した。転写後、予備染色したマーカータンパク質が完全に存在するようにニトロセルロース膜を調整した。 SDS PA ゲルで最少量のマーカーだけ見えるように残した。次に、この膜を Super Block バッファー中、室温で 1 時間インキュベートした。マウス血清プール E を Super Block で 1 : 500 希釈し、膜上、室温で 2 時間インキュベートした。その後、この膜を 1 倍 PBS で各 5 分間、3 回洗浄した。次に、この膜を Super Block で 1 : 5000 希釈した抗マウス IgG (KPL, 074-1802; Ab20) とともに室温で 1 時間インキュベートした。その後、この膜を 1 倍 PBS で各 5 分間 3 回洗浄し、3', 3', 5', 5' - テトラメチルベンジジン (TMB) を用い、室温で 5 分間現像した。

【 0 1 1 6 】

これらの結果は、各 CRM197 コンジュゲートの分子量がより大きい分子量へ明らかにシフトすることを示し、これは融合ペプチドと CRM197 の強いコンジュゲーションを示す。両場合に見られた幅広のコンジュゲートバンドはまた、コンジュゲーション反応から予想されたように、担体タンパク質上の融合ペプチドの比較的大きな分布を示した。また、これらの結果は、非コンジュゲート CRM197 タンパク質の残留が全くない（または最小である）ことを示唆した。他方、融合ペプチドの微量画分が見られ、使用した総融合ペプチドの < 10 % であると推定された。

【 0 1 1 7 】

結論

CRM197 コンジュゲートの明らかなシフトが見られ、これは P467 および P647 融合ペプチドと CRM197 担体タンパク質のコンジュゲーションの成功を示す。

【 0 1 1 8 】

10

20

30

40

50

P 4 6 7 - C R M 1 9 7 コンジュゲートと P 6 4 7 - C R M 1 9 7 コンジュゲートの間に見られる有意差は無かった。

【 0 1 1 9 】

両コンジュゲーション反応で限定された量の遊離融合ペプチドが見られた。

【 0 1 2 0 】

使用した抗血清による免疫プロットは、C R M 1 9 7 ジフテリア毒素とのいくらかの交差反応性を示したが、それは破傷風トキソイドペプチドコンジュゲートでは上昇した。このことからコンジュゲーション後の C R M 1 9 7 分子が確認されるが、これは 2 つの融合ペプチドに特異的ではないので、そのタンパク質とのコンジュゲーションは確認できない。抗血清は遊離非コンジュゲート融合ペプチドを染色し、P 4 6 7 の方が P 6 4 7 よりもやや良好であった。10

【 0 1 2 1 】

例 3 - マウス抗血清 D を用いた C R M 1 9 7 - 抗原コンジュゲートの免疫プロット

これらのコンジュゲート処方物を S D S - P A G E により分析し、従前に作製した、インフルエンザビロソームに結合したペプチド抗原 P 4 、 P 6 および P 7 の組合せに対するマウス血清（抗血清 D ）を用いた免疫プロット法により評価した。C R M 1 9 7 担体タンパク質上の融合ペプチド P 4 6 7 および P 6 4 7 の存在は、抗血清 D を用いた免疫プロットによりそれぞれ確認した。

【 0 1 2 2 】

【表6】

表6：材料

製品	供給者	製品番号	ロット番号	解説
ペプチド P467(脂質コンジュゲーション前)	Bachem	4088800	88800/1K	MW= 5498 Da; 49 aa, pi=4.7 PESFDGDPASNTAPLQPRVLQGL PREYVNARHSLPYMPIWKFPDEEGAC
ペプチド P647(脂質コンジュゲーション前)	Bachem	4088799	88799/1K	MW= 5287 Da; 47 aa, pi=4.7 RVLQGLPREYVNARHSLPYMPIWKFPDEEGAC
CRM197 ジフテリア毒素非毒性突然変異体	Merck (Calbiochem)	322327	D00149725	1mg アリコート 再構成後 PBS pH7.4 中 2mg/mL 溶液; MW 約 58~63kDa; pi=5.85, 39Lys 残基
ペプチド P467-CRM197	Mymetics	n.a.	140829-1_am	1倍 PBS/1mM EDTA 中, およそ 2.449mg/mL P467, およそ 1.22mg/mL CRM197
ペプチド P647-CRM197	Mymetics	n.a.	140829-2_am	1倍 PBS/1mM EDTA 中, およそ 2.449mg/mL P647, およそ 1.22mg/mL CRM197
10倍トリス/グリシン/SDS	BioRad	161-0732	116812	
4倍 Laemmli サンプルバッファー	BioRad	161-0747	350002344	
Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards	BioRad	161-0377	310013154	(2-250kD), 9本の青色染色バンドと 3 本の桃色参照バンド(2, 25, 75kD)
4-20%Mini-PROTEAN(商 標)TGX™ ゲル	BioRad	456-1095	400093571	12 ウエル, 20μl
Trans-Blot(商標)Turbo™ ミニニ トロセルローストランスファー パックス	BioRad	170-4158	400093907	7x8.5cm, ブレカットプロッティング トランスファーパック
抗 P4/P6/P7 マウス血清, D ブー ル	Univ Vienna	n.a.	n.a.	インフルエンザビロソームに組み 込んだペプチドによる免疫誘導か らのマウス血清
抗マウス IgG HRP	KPL	074-1802	101080	
TMB 基質溶液	Seramun	S-002-4-TMB		
20倍改変ダルベッコの PBS バッ ファー	ThermoFisher Scientific	0028344	PG201076	Milli Q 水で調製した 1L の 1 倍 PBS, 140902-am
還元剤 : β-ME	Sigma	63689	n.a.	14.3 M 溶液
WFI	Bema Biotech	100005	1004241	
Tween 20	Sigma	P9416	n.a.	
PBST	Mymetics	n.a.	140903	PBS + 0.05% Tween 20
MPBST	Mymetics	n.a.	140903	100mL PBST 中 5g 粉乳(5%)
MPBS	Mymetics	n.a.	140903	100mL PBS 中 5g 粉乳(5%)

【0123】

手順

1枚の SDS - PA ゲルを次のように作製した :

CRM197、融合ペプチド - CRM197 コンジュゲートまたは非コンジュゲート融合ペプチドを含んでなる溶液を総て pH 7.4 の PBS で 1 mg / mL に希釈した。合計 36 μL の各サンプルを調製し、1 レーン当たり 15 μL をロードした。ゲル 1 およびゲル 2 におけるサンプルの分布を以下の表 7 にまとめた。

【0124】

10

20

30

40

【表7】

表7

	サンプル説明	WFI [μL]	プローブ [μL]	LDS 4倍 バッファ ー[μL]	還元剤 [μL]
1	Precision Plus Protein™ Dual Xtra	-	10	-	-
2	CRM197 - 0.2 ug	25.5	0.5	9	1
3	CRM197 - 0.4 ug	25.0	1.0	9	1
4	CRM197 - 0.8 ug	24.0	2.0	9	1
5	P467-CRM197 - 0.2 ug	25.5	0.5	9	1
6	P467-CRM197 - 0.8 ug	24.0	2.0	9	1
7	P647-CRM197 - 0.2 ug	25.5	0.5	9	1
8	P647-CRM197 - 0.8 ug	24.0	2.0	9	1
9	P467 - 0.2 ug	25.5	0.5	9	1
10	P467 - 0.8 ug	24.0	2.0	9	1
11	P647 - 0.2 ug	25.5	0.5	9	1
12	P647 - 0.8 ug	24.0	2.0	9	1

【0125】

結果

ウェスタンプロット - 電気泳動後、ゲルをカセットから取り出し、Milli Q水で簡単にすすぐだ。製造者の説明書 (BioRad) に従い、トランスマーカーサンドイッチを作製し、Turbo Transfer Blot 機に設置した。転写後、予備染色したマーカータンパク質が完全に存在するようにニトロセルロース膜を調整した。SDS PAゲルで最少量のマーカーだけ見えるように残した。次に、このニトロセルロース膜をTween 20 (MPBS) を含むリン酸緩衝生理食塩水中5%ミルクで室温にて1時間インキュベートした。

【0126】

マウス血清プールDをMPBSで1:500希釈し、膜上、室温で2時間インキュベートした。その後、この膜を1倍MPBSで各5分間、3回洗浄した後、MPBSで1:5000希釈した抗マウスIgG (KPL、074-1802; Ab20)とともに室温で30分間インキュベートした。その後、この膜を1倍MPBSで各5分間3回洗浄し、TMB溶液を用い、室温で10分間現像した。

【0127】

結論

使用した抗血清Dによる免疫プロットは、CRM197 - 融合ペプチドコンジュゲートのみと反応性を示した。非コンジュゲートCRM197との交差反応性は見られなかった。これらの結果は、有意な量の融合ペプチドが担体タンパク質と結合したことを示し、CRM197 - 融合ペプチドコンジュゲートに関してゲルに見られた移動度のシフトは融合ペプチドと担体タンパク質のコンジュゲーションによるものであって、CRM197の分子間架橋によるものではないことが確認される。遊離非コンジュゲート融合ペプチドに帰属したシグナルが検出されたが、これは抗血清がそれらと反応しないため、または融合ペプチドがゲルの底部に移動し、ニトロセルロース膜に転写されなかつたためである。

【0128】

抗血清Dは、P467 - CRM197コンジュゲートよりもP647 - CRM197コンジュゲートとやや強く反応した。これらの結果は、この抗血清は遊離融合ペプチドよりもコンジュゲート融合ペプチドと強く反応したことを示唆した。

【0129】

例4 - P467 - CRM197およびP647 - CRM197スポットプロット

CRM197担体タンパク質に対する融合ペプチドP467およびP647の存在もまた、抗血清Dを用いたスポットプロット試験で確認した。

10

20

30

40

50

【0130】

サンプル

- CRM197、PBS pH7.4 中 1mg/mL;
- P467 抗原、PBS pH7.4 中 1mg/mL;
- P647 抗原、PBS pH7.4 中 1mg/mL;
- P467-CRM197、PBS pH7.4 中 1mg/mL (計算濃度); および
- P647-CRM197、PBS pH7.4 中 1mg/mL (計算濃度)

【0131】

【表8】

表8：材料

10

製品	供給者	製品番号	ロット番号	解説
ペプチド P467(脂質コンジュゲーション前)	Bachem	4088800	88800/1K	MW= 5498 Da; 49 aa, pI=4.7 PESFDGDPASNTAPLQPRVVLQQL PREYVNARHSLPYMPWKFDEEGAC
ペプチド P647(脂質コンジュゲーション前)	Bachem	4088799	88799/1K	MW= 5287 Da; 47 aa, pI=4.7 RVLQGLPREYVNARHS PESFDGDPASNTAPLQP YMPWKFDEEGAC
CRM197 ジフテリア毒素非毒性突然変異体	Merck (Calbiochem)	322327	D00149725	1mg アリコート 再構成後 PBS pH7.4 中 2mg/mL 溶液; MW 約 58 ~63kDa; pI=5.85, 39Lys 残基
ペプチド P467-CRM197	Mymetics	n.a.	140829-1_am	1倍 PBS/1mM EDTA 中, およそ 2.449mg/mL P467, およそ 1.22mg/mL CRM197
ペプチド P647-CRM197	Mymetics	n.a.	140829-2_am	1倍 PBS/1mM EDTA 中, およそ 2.449mg/mL P647, およそ 1.22mg/mL CRM197
ニトロセルロース膜	Thermo Fisher/Pierce	88025	PE1844001	0.45μm, 8cm x 8cm
抗 P4/P6/P7 マウス血清, D ブール	Univ Vienna	n.a.	n.a.	インフルエンザビロソームに組み 込んだペプチドによる免疫誘導か らのマウス血清
抗マウス IgG HRP	KPL	074-1802	101080	
TMB 基質溶液	Seramun	S-002-4-TMB		
20倍改変ダルベッコの PBS バッファー	ThermoFisher Scientific	0028344	PG201076	Milli Q 水で調製した 1L の 1 倍 PBS, 140902-am
WFI	Berna Biotech	100005	1004241	
Tween 20	Sigma	P9416	n.a.	
PBST	Mymetics	n.a.	140903	PBS + 0.05% Tween 20
MPBST	Mymetics	n.a.	140903	100mL PBS 中 5g 粉乳(5%)
MPBS	Mymetics	n.a.	140903	100mL PBS 中 5g 粉乳(5%)
低脂肪脱脂粉乳	Migros	n.a.	n.a.	

20

30

【0132】

手順

40

プレカットニトロセルロース膜を使用し、鉛筆で線を引いた。エッペンドルフ管にて、1mg/mL (1μg/μL) で始めて各サンプルの2倍希釈をpH7.4のPBSで行った。スポット (1μL)当たりの理論濃度は、1μg/500ng/250ng/125ng/62.5ng/31.25ngであった。各スポットについて、以下に概略を示すように、およそ1μLの各サンプルを膜に転写した（二反復）：

- レーンA CRM197;
- レーンB P467 抗原（脂質コンジュゲーション無しの遊離融合ペプチド）；
- レーンC P647 抗原（脂質コンジュゲーション無しの遊離融合ペプチド）；
- レーンD P467-CRM197 (1μgの融合ペプチドおよび0.5μgのCRM197で開始)； および

50

・レーンE P 6 4 7 - C R M 1 9 7 (1 μg の融合ペプチドおよび0.5 μg のC R M 1 9 7で開始)。

【0133】

この膜を室温で10分間風乾した後、P B S T (M P B S T) 中 5 % ミルクで、室温にて30分間ブロッキングした。次に、この膜を一次抗体(マウス抗血清プールD、M P B S Tで1:500希釈)とともに室温で1時間インキュベートした。その後、この膜をM P B S Tで各5分間、3回洗浄し、次いで、二次抗体(抗マウスIgG; K P L 、074-1802; A b 2 0 ; M P B S Tで1:5000希釈)とともに室温で30分間インキュベートした。このインキュベーションの後、膜をM P B S Tで各5分間、3回洗浄し、その後、T M B 溶液とともに室温でおよそ3分間インキュベートし、次いで、M i l l i 10 Q水で洗浄した後に乾燥させた。

【0134】

結論

マウス抗血清Dによるスポットプロットは、C R M 1 9 7 - 融合ペプチドコンジュゲートのみと反応性を示した。非コンジュゲートC R M 1 9 7タンパク質との交差反応性は最小であった。コンジュゲート中のC R M 1 9 7の量は融合ペプチドの量の約50%であったので、このサンプルの最小バックグラウンドはおそらくはジフテリア毒素変異体との交差反応性によるものであった。

【0135】

遊離(非コンジュゲート)融合ペプチド(脂質コンジュゲート無しの融合ペプチド)は、P 6 4 7の場合にのみ、この抗血清でシグナルを生じ、P 4 6 7の場合には生じなかった。この理由はすぐには明らかにならない。しかしながら、P 6 4 7の第1サンプル希釈では、シグナルは以降の希釈よりもいくらか弱かった。これは抗体結合部位に対する阻害剤の存在、またはニトロセルロース膜に対する結合の低下を示している可能性がある。この阻害剤の性質は分かっていないが、融合ペプチドの高濃度保存液(10 mg / m L)を調製するために、元々使用されていたD M S Oによるものであるかもしれない。20

【0136】

マウス抗血清DはP 4 6 7 - C R M 1 9 7およびP 6 4 7 - C R M 1 9 7コンジュゲートと極めて強く反応し、ほとんどの融合ペプチドと担体タンパク質のコンジュゲーションが確認された。30

【0137】

融合ペプチド - C R M 1 9 7コンジュゲートに比べての遊離融合ペプチドの不等な抗血清反応性のために、抗原の量を定量することはできなかった。しかしながら、コンジュゲーション反応の後に精製工程を適用しなかったことから、融合ペプチドの理論的開始濃度を用いて計算してもよい。

【0138】

要約すると、これらの結果は、この抗血清が遊離融合ペプチドよりもコンジュゲート融合ペプチドと強く反応したことを示唆する。

【0139】

例5 - マウスにおける用量漸増試験のためのサンプル調製

以下で、マウスにおける用量漸増試験のための融合ペプチド - C R M 1 9 7コンジュゲートの調製を述べる。

【0140】

【表9】

表9：材料

製品	供給者	製品番号	ロット番号	解説
ペプチド P467(脂質コンジュゲーション前)	Bachem	4088800	88800/1K	MW= 5498 Da; 49 aa, pI=4.7 PESFDGDPASNTAPLQPRVLQGL PREYVNARHSLPYMPIWKFPDEEGAC
ペプチド P647(脂質コンジュゲーション前)	Bachem	4088799	88799/1K	MW= 5287 Da; 47 aa, pI=4.7 RVLQGLPREYVNARHS PESFDGDPASNTAPLQP YMPIMWKFPDEEGAC
CRM197 ジフテリア毒素非毒性突然変異体	Merck (Calbiochem)	322327	D00149725	1mg アリコート再構成後 PBS pH7.4 中 2mg/mL 溶液; MW 約 58~63kDa; pI=5.85, 39Lys 残基
ペプチド P467-CRM197	Myometics	n.a.	140829-1_am	1倍 PBS/1mM EDTA 中, およそ 2.449mg/mL P467, およそ 1.22mg/mL CRM197
ペプチド P647-CRM197	Myometics	n.a.	140829-2_am	1倍 PBS/1mM EDTA 中, およそ 2.449mg/mL P647, およそ 1.22mg/mL CRM197
20倍改変ダルベッコの PBS バッファー	ThermoFisher Scientific	0028344	PG201076	Milli Q 水で調製した 1L の 1 倍 PBS, 140902-am
WFI	Bema Biotech	100005	1004241	

10

20

【0141】

手順

動物試験用のサンプル調製については、コンジュゲート反応溶液を定義された目的濃度に希釈した。以下の調製に関して、ペプチドとタンパク質のコンジュゲーション効率は少なくとも 90 % であったと仮定された。

【0142】

高用量群（群1）のサンプル調製：

これらのサンプルは、試験管当たりおよそ 420 μg のコンジュゲート融合ペプチド (1.2 mg / mL) を含有すると予想された。

試験管1：

30

- 1045 μL の P467-CRM197
- 880 μL (1倍) の PBS pH7.4

【0143】

この溶液をよく混合し、350 μL を 5 本のガラスバイアルに移し（各 2.5 mL）、次のように表示した：P467-CRM197；群1 - 高用量；推定 P467 濃度：約 1.2 mg / mL；ロット 140903-1_am。

【0144】

試験管2：

- 1045 μL の P647-CRM197 (強くボルテックス攪拌した後にピペット操作)

40

- 880 μL (1×) の PBS pH7.4

【0145】

この溶液をよく混合し、350 μL を 5 本のガラスバイアルに移し（各 2.5 mL）、次のように表示した：P647-CRM197；群1 - 高用量；推定 P647 濃度：約 1.2 mg / mL；ロット 140903-4_am。

【0146】

中用量群（群2）のサンプル調製：

これらのサンプルは、試験管当たりおよそ 210 μg のコンジュゲート融合ペプチド (0.6 mg / mL) を含有すると予想された。

試験管1：

50

- ・ 5 2 5 μ L の P 4 6 7 - C R M 1 9 7
- ・ 1 4 0 0 μ L (1倍) の P B S pH 7 . 4

【 0 1 4 7 】

この溶液をよく混合し、各 3 5 0 μ L を 5 本の 2 . 5 mL ガラスバイアルに移し、次のように表示した： P 4 6 7 - C R M 1 9 7 ; 群 2 - 中用量；推定 P 4 6 7 濃度：約 0 . 6 mg / mL ; ロット 1 4 0 9 0 3 - 2 _ a m。

【 0 1 4 8 】

試験管 2 :

- ・ 5 2 5 μ L の P 6 4 7 - C R M 1 9 7 (強くボルテックス搅拌した後にピペット操作)
- ・ 1 4 0 0 μ L (1倍) の P B S pH 7 . 4

10

【 0 1 4 9 】

この溶液をよくボルテックス搅拌し、3 5 0 μ L を 5 本の 2 . 5 mL ガラスバイアルに移し、次のように表示した： P 6 4 7 - C R M 1 9 7 ; 群 2 - 中用量；推定 P 6 4 7 濃度：約 0 . 6 mg / mL ; ロット 1 4 0 9 0 3 - 5 _ a m。

【 0 1 5 0 】

低用量群(群 3)のサンプル調製：

これらのサンプルは、試験管当たりおよそ 1 0 5 μ g のコンジュゲート融合ペプチド(0 . 3 mg / mL)を含有すると予想された。

試験管 1 :

- ・ 2 6 2 μ L の P 4 6 7 - C R M 1 9 7
- ・ 1 6 6 3 μ L (1倍) の P B S pH 7 . 4

20

【 0 1 5 1 】

この溶液をよく混合し、各 3 5 0 μ L を 5 本の 2 . 5 mL ガラスバイアルに移し、次のように表示した： P 4 6 7 - C R M 1 9 7 ; 群 3 - 低用量；推定 P 4 6 7 濃度：約 0 . 3 mg / mL ; ロット 1 4 0 9 0 3 - 3 _ a m。

【 0 1 5 2 】

試験管 2 :

- ・ 2 6 2 μ L の P 6 4 7 - C R M 1 9 7 (強くボルテックス搅拌した後にピペット操作)
- ・ 1 6 6 3 μ L (1倍) の P B S pH 7 . 4

30

【 0 1 5 3 】

この溶液をよくボルテックス搅拌し、3 5 0 μ L を 5 本の 2 . 5 mL ガラスバイアルに移し、次のように表示した： P 6 4 7 - C R M 1 9 7 ; 群 3 - 低用量；推定 P 6 4 7 濃度：約 0 . 3 mg / mL ; ロット 1 4 0 9 0 3 - 6 _ a m。

【 0 1 5 4 】

例 6 - 免疫試験

ペプチド抗原

2 つの融合ペプチド P 4 6 7 (配列番号 8) および P 6 4 7 (配列番号 9) は B a c h e m (スイス)で合成された。両ハイブリッドを、抗原送達系として好適で付加的アジュバントを必要としないビロソーム(不活化インフルエンザウイルス A / ブリスペーン / 5 9 / 2 0 0 7 由来のウイルスエンベロープ)とカップリングした。その融合ペプチドの量に対して計算した 3 種類の濃度を試験した：注射 1 回当たり 1 5 μ g 、 3 0 μ g および 5 0 μ g 。比較のため、両融合ペプチドを C R M 1 9 7 とカップリングし、注射 1 回当たり濃度 3 0 μ g で直接比較試験(head-to-head experiment)において使用した。総てのコンジュゲーション手順(C R M およびビロソーム)は M y m e t i c s (スイス)で実施された。

40

【 0 1 5 5 】

ビロソーム処方物は冷凍由来で、解凍後に濁りを生じた。

【 0 1 5 6 】

カップリング後、 C R M - P 6 4 7 コンジュゲートを沈澱処方物として受け取り、一方、 C R M - P 4 6 7 は水系バッファー中で可溶性を維持していた。

50

【0157】

3つのHer-2/neu由来B細胞エピトープP4（配列番号3）、P6（配列番号1）およびP7（配列番号2）がpIChem（オーストリア）で合成され、KLH（キーホールリンペットヘモシアニン）とカップリングされ、これらを単一ペプチドに対する抗体応答をELISAにより評価するためにコーティング抗原として使用した。

【0158】

非コンジュゲート融合ペプチドに対する抗体応答を評価するために、P467およびP647をELISAアッセイでコーティング抗原として使用した。

【0159】

免疫誘導プロトコール

以下の研究計画に従い、雌Balb/Cマウスに2~3週間隔で皮下免疫した。

10

【0160】

ビロソームコンジュゲート受容群を不活化インフルエンザウイルス（不活化A/ブリスベーン/59/2007）で1回プライムした。コンジュゲート構築物による免疫誘導はこのプライミングの16日後に開始した。総てのビロソーム処方物を使用準備が整った状態で送達し、添加剤を伴わずに注射1回当たり100μlを適用した。

【0161】

CRM-融合ペプチドコンジュゲートの保存液をNaCl溶液で希釈し、注射による投与前に水酸化アルミニウムゲル懸濁液と混合した。CRM-P647（沈澱）をボルテックス攪拌し、この懸濁液をCRM-P467と同様に使用した。

20

【0162】

対照群は、エンプティービロソーム（TIRIV）またはNaCl溶液+水酸化アルミニウムを受容した。

【0163】

動物

60個体の雌Balb/Cマウス、配送時（29.10.2014）に6~8週齢、起源：Charles River、ドイツ。

【0164】

10群：1群当たりマウスn=5 - 動物施設：General Hospital Vienna/Biomedical Unit。

30

【0165】

群

- ・群A - エンプティービロソーム（TIRIV） - 100μl / マウス；
- ・群B - P467 - ビロソーム - 100μl 中 50μg / マウス；
- ・群C - P467 - ビロソーム - 100μl 中 30μg / マウス；
- ・群D - P467 - ビロソーム - 100μl 中 15μg / マウス；
- ・群E - P647 - ビロソーム - 100μl 中 50μg / マウス；
- ・群F - P647 - ビロソーム - 100μl 中 30μg / マウス；
- ・群G - P647 - ビロソーム - 100μl 中 15μg / マウス；
- ・群H - NaCl + 水酸化アルミニウム（対象） - 100μl / マウス；
- ・群I - P467 - CRM + 水酸化アルミニウム - 150μl 中 30μg / マウス；および
- ・群J - P647 - CRM + 水酸化アルミニウム - 150μl 中 30μg / マウス。

40

【0166】

免疫誘導前、2回目の免疫誘導から3週間後、3回目の免疫誘導から2週間後および4回目の免疫誘導から2週間後に血液を採取した。次に、これらの血液サンプルを以下について分析した：

- ・ペプチド特異的抗体力値（IgG）；
- ・構築物特異的抗体力値（IgG）；
- ・組換え細胞外Her-2/neu（IgG）に特異的な抗体力値；および

50

・ SKBR - 3癌細胞で発現される天然Her - 2/neuに対する特異性。

【0167】

E L I S A プロトコール

1) ペプチド特異的 E L I S A

マイクロタイタープレートを0.5 μg / ウエルのKLH - 融合ペプチドコンジュゲートでコーティングした。バックグラウンド評価のため、ウェルをKLH単独でコーティングした。プロッキング後、希釈血清を加えた。結合したIgGをHRP標識抗体（ウサギ抗マウスIgG POX、Fcフラグメント特異的、Nr : 315 - 035 - 008；Jackson Immuno Research）とその後のTMB染色を用いて検出した。停止溶液を添加した後、プレートを450 nmと630 nmで読み取った。

10

【0168】

(2) 融合ペプチド特異的 E L I S A

非修飾融合ペプチドP467およびP647を炭酸バッファー中0.5 μg / ウエルの濃度でコーティング抗原として使用した。次に、希釈血清を加え、上記のペプチド特異的プロトコールに記載のとおりに分析した。

【0169】

(3) 細胞外 Her - 2 / neu 特異的 E L I S A

ヒトHer - 2 / neu (Her2 / neuのアミノ酸残基23 ~ 652) の組換え細胞外ドメインとヒトIgG1のFc領域とを含んでなる融合タンパク質 (Erbb2 / Fcキメラ、カタログ番号1129 - ER R&D Systems) をコーティング抗原として使用した。プレートを0.1 μg / ウエルのタンパク質およびバックグラウンド評価のためには0.1% BSAでコーティングした。次に、希釈血清を加え、BSA単独ウェルからのバックグラウンドシグナルを減算した後に、上記のように分析した。

20

【0170】

(4) SKBR3細胞を用いたHer - 2 / neu 特異的細胞アッセイ

Her - 2 / neuを過剰発現するヒト乳癌細胞株SKBR - 3 (HTB30、ATCC、USA) を天然Her2 / neuタンパク質の供給源として使用した。細胞を継代培養3日後に採取し、-80°で保存した。細胞溶解は、いくつかの軽微な点を変更してGoldell V and Disis ML J. Immunol. Meth (2005)に従前に記載されているとおりに行った：変異体1：プレートをヒト化抗Her - 2 / neu抗体ハーセプチン (General Hospital Viennaにより提供) でコーティングした；変異体2：プレートをヒト化抗Her - 2 / neu抗体Perjeta (General Hospital Viennaにより提供) でコーティングした。細胞溶解液のタンパク質含量は、使用前にPierce BCAタンパク質アッセイキット # 23227を用いて直接定量した。溶解液を1% BSA / PBSで100 μg / ウエルの濃度に希釈した。プロッキング後、細胞溶解液をウェルに加えた。個々のバックグラウンドのための対照には、BSA / PBSを加えた。IgG検出のために、HRP結合ヒツジ抗マウスIgG (Amer sham / GE Healthcare) を使用した。TMB染色を上記のとおりに行った。各血清サンプルについて、OD値を、SKBR - 3コーティングウェルのOD読み取り値とBSAコーティングウェルのOD読み取り値の間の差として計算した。

30

Hospital Viennaにより提供) でコーティングした；変異体2：プレートをヒト化抗Her - 2 / neu抗体Perjeta (General Hospital Viennaにより提供) でコーティングした。細胞溶解液のタンパク質含量は、使用前にPierce BCAタンパク質アッセイキット # 23227を用いて直接定量した。溶解液を1% BSA / PBSで100 μg / ウエルの濃度に希釈した。プロッキング後、細胞溶解液をウェルに加えた。個々のバックグラウンドのための対照には、BSA / PBSを加えた。IgG検出のために、HRP結合ヒツジ抗マウスIgG (Amer sham / GE Healthcare) を使用した。TMB染色を上記のとおりに行った。各血清サンプルについて、OD値を、SKBR - 3コーティングウェルのOD読み取り値とBSAコーティングウェルのOD読み取り値の間の差として計算した。

40

【0171】

例7 - ペプチド特異的抗体

最終採血（すなわち4回の免疫誘導の後）からの血清を使用した。ビロソームおよびCRM197免疫マウスの血清からの種々の希釈液を次のように分析した：

- ・ビロソーム処方物：1 : 5, 000 希釈で処理した群
- ・CRM - 融合ペプチドコンジュゲート：1 : 100, 000 希釈で処理した群。

【0172】

データはOD値で示した。KLHコーティングウェル上でのバックグラウンドを減算した（図1～3参照）。

【0173】

50

結果

総ての処置群において3種類の単一ペプチドの総てに対する抗体を生じさせた（群B～GおよびI～J）。対照群（群AおよびH）ではペプチド特異的抗体は検出されなかった。抗体力値には顕著な差が見られた。

【0174】

C R M - 融合ペプチドコンジュゲートによる4回の免疫誘導により、3種類の個々のペプチドの総てに対して、対応するビロソーム処方物による4回の免疫誘導のおよそ10倍の抗体力値が誘導された。

【0175】

両構築物（P 4 6 7 および P 6 4 7 ）は、カップリング相手にかかわらず、P 7 B 細胞エピトープ（配列番号2）に対して最高の抗体力値を誘導したが、P 4 B 細胞エピトープ（配列番号3）に対して誘導された力値は最低であった。

【0176】

図4および5に示されるように、融合ペプチドに結合された抗体もまた作製された。これらの結果は、4回目免疫誘導後の最終採血からの血清を用いた試験から導き出された。ビロソームで免疫誘導した群については、血清は1：5,000希釈した。C R M 1 9 7 - 融合ペプチドコンジュゲートで免疫誘導した群については、血清は1：100,000希釈した。図4および5に示されるデータは、OD値で示す。図1～3に示されるペプチド特異的結果と一致して、C R M 1 9 7 - 融合ペプチドコンジュゲートで免疫誘導した群では、対応するビロソーム処方物で免疫誘導したもののおよそ10倍の抗体力値が見られた。一般に、P 4 6 7 よりも P 6 4 7 でより高い力値が見られた。

【0177】

例8 - C R M コンジュゲートによる免疫誘導過程での抗体動態

血液は2回目、3回目および4回目の免疫誘導の2週間後に採取し、両融合ペプチド（P 4 6 7 および P 6 4 7 ）に特異的な抗体を測定した（血清は1：100,000希釈した）。図6および7に示されるように、融合タンパク質特異的抗体力値は2回目の免疫誘導の後にすでにかなり高く、3回目および4回目の免疫誘導の後にわずかに上昇した。3回目および4回目の免疫誘導の後の融合タンパク質特異的抗体力値における小さな上昇は、有効な免疫応答を生成するためにはC R M 1 9 7 - 融合ペプチドコンジュゲートによる2回または3回の免疫誘導（すなわち、連続2用量または3用量）で十分であり得ることを示す（B A 1 - 2回の免疫誘導の後の採血；B A 2 - 3回の免疫誘導の後の採血；B A 2 - 4回の免疫誘導の後の採血）。

【0178】

例9 - 細胞外H e r - 2 / n e u 特異的抗体

血液を2時点で採取した；B A 1（2回の免疫誘導の後の採血）およびB A 2（3回の免疫誘導の後の採血）。種々の血清希釈液を分析した - ビロソーム処方物で免疫誘導した群に由来する血清は1：400希釈し、C R M - 融合ペプチドコンジュゲートで免疫誘導した群に由来する血清は1：2,000希釈した。図8に示されるデータはOD値である。

【0179】

図8に示されるように、両融合ペプチド構築物（ビロソームコンジュゲートおよびC R M 1 9 7 コンジュゲート）は、組換え細胞外H e r - 2 / n e uタンパク質に結合する抗体を誘導した。偽処置マウスおよび免疫誘導前血清では有意なH e r - 2 / n e u反応性は見られなかった。ペプチド特異的および融合ペプチド特異的な結果によれば、C R M - 融合ペプチドコンジュゲートで免疫誘導した群では、30 μg濃度のビロソーム処方物に比べて有意に高いH e r - 2 / n e u特異的力値が見られた。また、ビロソームでの3回目の免疫誘導の後にも有意な抗体力値が見られた。2回目の免疫誘導の後にC R M - 融合ペプチドコンジュゲートですでに免疫化されたマウスでは、抗体力値は高く、3回目の免疫誘導の後に顕著に上昇することはなかった。

【0180】

10

20

30

40

50

2回目、3回目および4回目の免疫誘導の後の血清抗体力価の分析から、ビロソームコンジュゲートではCRMコンジュゲートとは異なる抗体応答動態が明らかとなった。2回目の免疫誘導の後（免疫誘導開始の6週間後）、ビロソームコンジュゲートに比べてCRM-融合ペプチドコンジュゲートで免疫誘導した動物では高い抗体力価が見られた（図9参照）。ビロソームコンジュゲートでの3回目の免疫誘導の後に、有意な抗体力価の上昇が見られた（図8参照）。4回目の免疫誘導の後では、Her-2/neu特異的抗体力価は、ビロソーム免疫マウスとCRM免疫マウスの間で同等であった（図10参照）。CRM-融合ペプチドコンジュゲートで免疫誘導したマウスでは、3回目と4回目の免疫誘導の間の抗体力価の上昇は小さく、2回目の免疫誘導の後の強い免疫原性、それとともに3回目の免疫誘導の後のさらに強い免疫原性を示す（図11参照）。

10

【0181】

図12に示されるように、30μgのP467-ビロソームコンジュゲートまたは30μgのP467-CRMコンジュゲートによる2回目、3回目および4回目の免疫誘導の後の組換えHer-2/neuに対する抗体応答動態の比較から、2回目の免疫誘導の後でさえ、CRMコンジュゲートによる免疫誘導後の抗Her-2/neu抗体力価（各クラスターの4本目の柱）は、対応するビロソームコンジュゲートによる免疫誘導後の抗体力価（各クラスターの3本目の柱）よりも有意に高かったことが明らかである。4回目の免疫誘導の後、両コンジュゲートは同等の組換え抗Her-2/neu抗体力価をもたらす。

20

【0182】

図13に示されるように、30μgのP647-ビロソームコンジュゲートまたは30μgのP647-CRMコンジュゲートによる2回目、3回目および4回目の免疫誘導の後の組換えHer-2/neuに対する抗体応答動態の比較から、2回目の免疫誘導の後でさえ、CRMコンジュゲートによる免疫誘導後の抗Her-2/neu抗体力価（各クラスターの4本目の柱）は、対応するビロソームコンジュゲートによる免疫誘導後の抗体力価（各クラスターの3本目のカラム）よりも有意に高かったことが明らかである。

30

【0183】

これらの結果は、融合ペプチドの送達系としてビロソームまたはCRM197のいずれかを用いる場合にHer-2/neu特異的抗体力価の動態に顕著な差を示す。ビロソームコンジュゲートを用いる場合に見られる抗体力価の上昇は、CRMコンジュゲートを用いる場合よりも有意に遅く、一般に、対応するCRM免疫誘導で見られるものと同等のレベルに達するためには4回の免疫誘導を必要とする（融合ペプチドP467に関する）。融合ペプチドP647に関しては、ビロソームコンジュゲートは、4回目の免疫誘導の後でさえ同等の抗体力価を誘導しなかったことから、CRMコンジュゲートよりも劣った（図13）。

【0184】

例10 - 天然Her-2/neuタンパク質に対する特異性

4回の免疫誘導後に採取した最終血液サンプルに由来する血清を分析した。データはOD値として表し、総ての血清を1:100希釈した。

40

【0185】

図14に示されるように、生成された抗体は、SKBR-3乳癌細胞で過剰発現される天然型のHer-2/neuを認識した。非精製細胞溶解液を用いるELISAの範囲内で機能するためには低い血清希釈率が必要であり、本発明者らの従前のデータと一致した。ビロソームコンジュゲートで免疫誘導した群では、ペプチドおよび組換え細胞外Her-2/neuタンパク質に対する抗体力価が有意に低いにもかかわらず、OD値はビロソームコンジュゲートとCRM197-融合ペプチドコンジュゲートの間で比較できる。これらの結果は、脂質結合またはビロソームのいくつかの部分に対する抗体とSKBR-3細胞溶解液中の成分（例えば、細胞膜）との反応性のより説明され得る。この結合はCRM197-融合ペプチドコンジュゲートには存在しない。

50

【0186】

例 11 - ミョウバン / A 1 (O H)₃ またはモンタニドを伴うペプチド P 4 6 7 - C R M での免疫誘導後の免疫応答の評価

試薬の調製

融合タンパク質 P 4 6 7 (4 9 アミノ酸長 ; Bachem、スイスで合成) を C R M 1 9 7 (ジフテリア毒素突然変異体 ; PiChem / Graz / オーストリアとカップリングし、0 . 4 mg / ml の保存液濃度で配送した。マウスにおいて P 4 6 7 - C R M 媒介免疫応答を 3 種類のアジュバントの存在下または不在下で評価した :

- 1) ALHYDROGEL (商標) 「 85 」 (Brenntag、デンマークからの水酸化アルミニウム ; アルミニウム含量 10 mg / ml 、バッチ番号 85563 ; 製造者の説明書に従って 1 / 10 希釈で使用) ;
- 2) Alu-Gel-S - 懸濁液 (Serva、ドイツからの水酸化アルミニウム ; 1 . 3 % 純度、無菌、アルミニウム含量 5 . 9 ~ 7 . 1 mg / ml 、カタログ番号 12261 、バッチ番号 111589 ; 製造者の説明書に従って 1 / 3 希釈で使用) ; および
- 3) モンタニド ISA 51VG (Seppic、フランスから、カタログ番号 36362ZFL2R3 ; バッチ番号 2423395) 。

【 0187 】

免疫誘導プロトコールは以下の「免疫誘導プロトコール」に記載されている。簡単に述べれば、3種類の濃度のペプチド構築物を試験した：注射 1 回当たり 10 µg 、 25 µg および 50 µg 。上記の例で概略を示した動物試験で使用した Serva からの水酸化アルミニウムを 2 つのマウス群で試験し (「免疫誘導プロトコール」参照) 、 Brenntag からの水酸化アルミニウムの使用と比較した。これら 2 群において Serva からの水酸化アルミニウムとともに使用した P 4 6 7 - C R M の量は 10 µg および 25 µg であった。

【 0188 】

モンタニドを用いたペプチド構築物の乳化

モンタニドを用いた P 4 6 7 - C R M 、 P B S または N a C l の乳化は製造者 (Seppic 、フランス) の説明書に従って行った。 P 4 6 7 - C R M ペプチド構築物を P B S (Brenntag 水酸化アルミニウムの場合) または N a C l (Serva 水酸化アルミニウムの場合) のいずれかと混合した。次に、この溶液にアジュバントを加え、室温で十分攪拌した。次に、これらの混合物を投与前、最低 45 分間室温で保持した。

【 0189 】

免疫誘導プロトコール

雌 Balb / C マウス (Charles River Germany 、配達時 6 ~ 8 週齢) (各群マウス n = 8 ; 対照群 n = 4) 。

【 0190 】

マウス群、すなわち A ~ O を次のように免疫誘導した。

群 A (P 4 6 7 - C R M 、 10 µg / 注射) : 1250 µl N a C l (1500 µl) とともに 250 µl の P 4 6 7 - C R M 。 150 µl / マウス (= 10 µg / マウス)

群 B (P 4 6 7 - C R M 、 25 µg / 注射) : 875 µl N a C l (1500 µl) とともに 625 µl の P 4 6 7 - C R M 。 150 µl / マウス (= 25 µg / マウス)

群 C (P 4 6 7 - C R M 、 50 µg / 注射) : 250 µl N a C l (1500 µl) とともに 1250 µl の P 4 6 7 - C R M 。 150 µl / マウス (= 50 µg / マウス)

群 D (P 4 6 7 - C R M - ミョウバン Brenntag 、 10 µg / 注射) : 175 µl ミョウバン Brenntag + 1325 µl P B S (1750 µl) とともに 250 µl の P 4 6 7 - C R M 。 175 µl / マウス (= 10 µg / マウス)

群 E (P 4 6 7 - C R M - ミョウバン Brenntag 、 25 µg / 注射) : 175 µl ミョウバン Brenntag + 950 µl P B S (1750 µl) とともに 625 µl の P 4 6 7 - C R M 。 175 µl / マウス (= 25 µg / マウス)

群 F (P 4 6 7 - C R M - ミョウバン Brenntag 、 50 µg / 注射) : 175 µl ミョウバン Brenntag + 325 µl P B S (1750 µl) とともに 1250 µ

10

20

30

40

50

1 の P 4 6 7 - C R M。1 7 5 μ l / マウス (= 5 0 μ g / マウス)

群 G (P 4 6 7 - C R M - ミョウバン S e r v a、1 0 μ g / 注射) : 1 0 0 0 μ l ミョウバン S e r v a + 2 5 0 μ l N a C l (1 5 0 0 μ l) とともに 2 5 0 μ l の P 4 6 7 - C R M。1 5 0 μ l / マウス (= 1 0 μ g / マウス)

群 H (P 4 6 7 - C R M - ミョウバン S e r v a、2 5 μ g / 注射) : 1 0 0 0 μ l ミョウバン S e r v a (1 6 2 5 μ l) とともに 6 2 5 μ l の P 4 6 7 - C R M。1 6 0 μ l / マウス (= 1 0 μ g / マウス)

群 I (P 4 6 7 - C R M - モンタニド、1 0 μ g / 注射) : 3 0 0 μ l N a C l + 6 0 0 μ l モンタニドとともに 3 0 0 μ l の P 4 6 7 - C R M。1 0 0 μ l / マウス

群 J (P 4 6 7 - C R M - モンタニド、2 5 μ g / 注射) : 7 0 0 μ l モンタニドとともに 7 0 0 μ l の P 4 6 7 - C R M。1 2 6 μ l / マウス 10

群 K (P 4 6 7 - C R M - モンタニド、5 0 μ g / 注射) : 1 3 0 0 μ l モンタニドとともに 1 3 0 0 μ l の P 4 6 7 - C R M。2 5 2 μ l / マウス

群 L (P 4 6 7 - モノマー、2 5 μ g / 注射) : 1 2 5 0 μ l N a C l とともに 2 5 0 μ l の P 4 6 7 - C R M。1 5 0 μ l / マウス (= 2 5 μ g / マウス)

群 M (モンタニド) : 1 0 0 0 μ l N a C l + 1 0 0 0 μ l モンタニド。2 5 2 μ l / マウス

群 N (ミョウバン B r e n n t a g) : 1 5 7 5 μ l P B S + 1 7 5 μ l ミョウバン B r e n n t a g。1 7 5 μ l / マウス

群 O (C R M、5 0 μ g / 注射) : 保存液濃度 : 2 m g / m l。N a C l で 1 : 4 希釀 (1 5 0 + 4 5 0 N a C l)。1 0 0 μ l / マウス 20

【 0 1 9 1 】

対照群は C R M、水酸化アルミニウム (B r e n n t a g) またはモンタニド単独のいずれかを受容した。

【 0 1 9 2 】

初回投与前 (B A 0)、2 回目の免疫誘導から 2 0 日後 (B A 1) および 3 回目の免疫誘導から 1 8 日後 (B A 2) に動物から血液を採取した。抗体力価動態の評価のために、3 回目の免疫誘導から 8 週間後 (B A 3) にも血液を採取した。

【 0 1 9 3 】

各群の残りの 4 個体のマウス (総てのマウスを犠牲にした対照群 M、N、および O を除く) で、3 回目の免疫誘導から 8 週間後と 1 6 週間後 (それぞれ B A 4 および B A 5) に抗体動態および必要な追加免疫間隔を確認するために抗体力価をさらに評価した。 30

【 0 1 9 4 】

脾臓細胞の調製および培養

マウス (n = 4 / 群) を犠牲にし、それらの脾臓を無菌条件下で摘出し、細断し、無菌フィルターで濾過した。細胞懸濁液を従前に記載されているように (Wiedermann et al, Int. Immunol. 1999; Oct;11(10):1717-24) 調製した。脾細胞を 9 6 ウェル丸底プレートにウェル当たり 0 . 5 \times 1 0 6 の密度で播種し、2 0 μ g / m l 濃度の C R M または P 4 6 7 で 7 2 時間刺激した。上清を分析まで - 2 0 で保存した。対照として C o n A による刺激を行った。 40

【 0 1 9 5 】

E L I S A プロトコール

(i) ペプチド特異的抗体レベルの測定

炭酸バッファーで希釈した非コンジュゲート融合ペプチド P 4 6 7 (B a c h e m 、イス) を、コーティング抗原として 0 . 5 μ g / マイクロタイターウェルの濃度で使用した。血清 (n = 8 / 群) を希釈し、これらのウェルに加え、結合した I g G 抗体をセイヨウワサビペルオキシダーゼ (H R P) 標識ウサギ抗マウス I g G P O X (F c フラグメント特異的、カタログ番号 3 1 5 - 0 3 5 - 0 0 8 ; J a c k s o n I mmuno R e s e a r c h) で検出した後、3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン (T M B) を加えた。停止溶液を加え、これらのプレートを 4 5 0 n m と 6 3 0 n m で読み取った 50

。

【0196】

IgGサブセットのIgG1およびIgG2aの検出のために、希釈血清をマイクロタイラプレートの抗原コーティングウェルに適用した後、ラット抗マウスIgG1またはラット抗マウスIgG2a抗体のいずれかを適用した。次に、二次抗体HRP標識マウス抗ラットIgG、次いで、TMBを検出に使用した。停止溶液を加え、これらのプレートを450nmと630nmで読み取った。

【0197】

(i) H e r - 2 / n e u 特異的抗体レベルの測定

マイクロタイラプレートのウェルを、ヒトIgG1のFc領域に結合したヒトH e r - 2 / n e uの組換え細胞外ドメイン(アミノ酸残基23~652)を含んでなる融合タンパク質でコーティングした。各ウェルを0.1μgの融合タンパク質でコーティングした。次に、希釈したマウス血清を上記のように分析した。

10

【0198】

IgGサブセットのIgG1およびIgG2aの検出のために、希釈血清を抗原コーティングウェルに適用した後、ラット抗マウスIgG1またはラット抗マウスIgG2aのいずれかを加えた。HRP標識マウス抗ラットIgG(H+L)二次抗体を検出に使用した。

【0199】

(ii) in vitro サイトカイン産生 - IL-2、IL-5 および IFN の測定

20

CRM-またはP467刺激脾細胞からの上清を採取し、製造者(Affymetrix eBioscience, USA)の説明書に従ってELISAにより、IL-2、IL-5 および IFN の濃度に関して分析した。これらの上清は無希釈で使用するか、分析前に1:10~1:20希釈した。

【0200】

蛍光活性化細胞選別(FACS)分析

FACSは新たに単離した脾臓細胞で行った(24ウェル平底プレート中2.5×10⁶細胞/ml)。これらの細胞をミリスチン酸酢酸ホルボール(PMA; 10ng/ml)およびイオノマイシン(1.25μM)の存在下で2時間、およびブレフェルジンA(10μg/ml)の存在下、37でさらに4時間インキュベートした。次に、細胞を4で一晩保持し、翌朝、以下の標的に対する抗マウス抗体で染色した。

30

【0201】

【表10】

抗体	色
CD3	Fitc
CD4	Percp
CD8a (Ly-2)	PE
IFNyMaB	APC
グランザイム B	Pe Cy7
CD335 (NKp46)	eFluor450
CD19	APCeFluor780

40

【0202】

50

(i) 染色プロトコール :

細胞を採取し、マイクロチューブに分割した（1チューブ当たり 1×10^6 / 細胞）。各マウスサンプルに対して上述の抗体カクテルで単染色を行った。

【 0 2 0 3 】

次に、細胞を洗浄し、Fcプロック（抗マウスCD16/32）でブロッキングし、CD3、CD4、CD8、CD19およびCD335に対する抗体で染色した後、固定／透過処理ならびにIFN およびグランザイムBに関する細胞内染色を行った。

【 0 2 0 4 】

脾細胞集団 - T細胞 (CD3+CD4+ および CD3+CD8+)、B細胞 (CD3-CD19+) およびNK細胞 (CD3-CD335+) に関する分析を行った。これらの分析にはまた、細胞内IFN タンパク質の検出も含んだ。

10

【 0 2 0 5 】**統計分析**

ELISA結果の分析に関しては、Prismで対応のないt検定（両側、信頼区間95%）を適用した。有意差は1以上のアスタリスクで示される (* P値 < 0.05、 ** 0.01 < P値 < 0.001、 *** P値 < 0.001)。有意性無しは「ns」で示す。3群以上を比較する場合にはPrismで一元配置分散分析(ANOVA)を適用した。FACS結果の分析に関しては、Prismでマン・ホイットニー検定（両側、信頼区間95%）を適用した。

【 0 2 0 6 】

20

結果**体液性応答****(i) ペプチド特異的抗体レベル**

3回の免疫誘導後の最終採血に由来する血清、ならびに免疫誘導前の血清を、1:100.000 (IgG および IgG1の場合) または1:100 (IgG2aの場合) 希釈した。全血清IgG、IgG1およびIgG2aの抗体力価をそれぞれ図15A~Cに示す。

【 0 2 0 7 】

これらの図では、以下の群（フレーム）を互いに比較し、統計学的に評価した。

- D、E、F : ミョウバン : 10 µg、25 µg、50 µg
- I、J、K : モンタニド : 10 µg、25 µg、50 µg

30

【 0 2 0 8 】

データは、P467-CRMで免疫誘導した総てのマウスで抗P467抗体が惹起されたことを示す。対照動物またはP467単独で免疫誘導したマウスでは抗体応答は誘導されなかった。ミョウバン(Brenntag)と比較して、P467-CRMがモンタニドとともに投与された場合には、IgG、IgG1およびIgG2aに対する抗体レベルは有意に高かった。IgG2a力価は一般にIgG1に関するものより低かったが、P467-CRM+モンタニドで免疫誘導した動物では、かなり高いIgG2a力価が明らかであった。

【 0 2 0 9 】

40

(ii) Her-2/neu特異的抗体レベル

3回の免疫誘導の後の最終採血に由来する血清、および免疫誘導前の血清を、1:2500 (~10.000) (IgG)、1:10.000 (IgG1) および1:100 (IgG2a) 希釈した。血清IgG、IgG1およびIgG2aの抗体力価をそれぞれ図16A~Cに示す。

【 0 2 1 0 】

P467-CRMで免疫誘導した総ての動物で、抗細胞外Her-2/neu IgG およびIgG1抗体の高い力価が明らかであった。対照群またはP467単独で免疫誘導したマウスでは抗Her-2/neu抗体応答は明らかでなかった。ミョウバン(Brenntag)と比較して、IgGおよびIgG1抗体力価は、P467-CRMペプチド

50

構築物がモンタニドとともに投与された場合には有意に高かった。

【0211】

サイトカイン (IL-2、IFN、IL-5) の *in vitro* 產生

(i) CRM または P467 で刺激した後の IL-2 产生

ミョウバンの存在下、P467-CRM で免疫誘導したマウスに由来する CRM 刺激脾細胞に比べ、モンタニドの存在下、P467-CRM で免疫誘導したマウスに由来する CRM 刺激脾細胞では IL-2 レベルが高かった (図 17A および 17B 参照)。

【0212】

(ii) CRM または P467 で刺激した後の IFN 产生

図 18A および 18B は、CRM (図 18A) または P467 (図 18B) の存在下、
in vitro で培養された脾細胞の上清における IFN の濃度を示す。モンタニドとともに 25 µg の P467-CRM で免疫誘導したマウスでは、IFN のレベルは範囲外であった。このマウスからのデータは除外し、図 18C (CRM による刺激) および 図 18D (P467 による刺激) に示されるように、さらなる分析を行った。

10

【0213】

ミョウバンまたはモンタニドの存在下、P467-CRM で免疫誘導した総てのマウスに由来する脾細胞において、CRM 刺激により IFN 产生が誘導された。モンタニドを用いた場合 (10 µg 群) の IFN レベルは、ミョウバン (Brenntag) の存在下、P467-CRM で免疫誘導した対応する群よりも高かった。P467-CRM で刺激した際、IFN レベルは、50 µg P467-CRM で免疫誘導したモンタニド群で最も高かった。

20

【0214】

(iii) CRM または P467 で刺激した後の IL-5 产生

図 19A および 19B は、CRM (図 19A) または P467 (図 19B) の存在下、
in vitro で培養された脾細胞の上清における IL-5 の濃度を示す。

【0215】

IL-5 レベルは、モンタニドの存在下、P467-CRM で免疫誘導したマウスに由来する CRM 刺激脾細胞で有意に高かった。P467-CRM ペプチド構築物で刺激した後、モンタニドで免疫誘導されたマウスにおいていくらかの IL-5 产生が誘導されたが、この IL-5 レベルは CRM 刺激後のレベルの約 10 分の 1 であった。

30

【0216】

FACS 分析による脾細胞の特性決定；IFN 产生の細胞内染色

異なるアジュバント (すなわち、ミョウバンとモンタニド) の使用がリンパ球分布、特に、CD8+ および CD4+ リンパ球を変更するかどうかを評価するために、モンタニドまたはミョウバンの存在下、種々の濃度の P467 での免疫誘導後に脾細胞の FACS 分析を行った。脾細胞をマウスから単離し、T 細胞 (CD3+ CD4+)、図 20A、および CD3+ CD8+、図 20B)、B 細胞 (CD3- CD19+)、図 20C) および NK 細胞 (CD3- CD335+)、図 20D) のパーセンテージを分析した。

【0217】

データは、ミョウバン (Brenntag) に比べ、モンタニドとともににより高用量 (すなわち、25 mg および 50 mg) の P467-CRM で免疫誘導したマウスに由来する脾細胞において、NK 細胞の有意な減少を示す。

40

【0218】

FACS 分析による IFN 产生脾細胞の検出

異なるアジュバントでの免疫誘導が IFN 产生 CD4+ または CD8+ 細胞の分布に変化をもたらすかどうかを検討するために、総ての群からのマウスの脾細胞を単離し、T 細胞 (CD4+)、図 21A、および CD8+、図 21B) および NK 細胞 (CD3- CD335+)、図 21C) で細胞内 IFN を測定した。

【0219】

データは、D4+ T 細胞は IFN を产生し、これは漸増濃度の P467-CRM で

50

免疫誘導したマウスにおいて顕著であったことを示す。総ての対照群（およびナイーブマウス）が同等の IFN レベルを示した。対照的に、モンタニドとともに 25 μg P467-CRM で免疫誘導したマウスに由来する CD8+ T 細胞の IFN レベルはより高かった。データはまた、P467-CRM + モンタニドで免疫誘導したマウスに由来する NK 細胞による IFN 産生も示す。

【0220】

抗 Her 2 および P467 ペプチド抗体応答の動態

抗体応答の動態を評価するために、最終の免疫誘導から 8 週間、16 週間および 6 か月後に血液サンプルを採取した。次に、本明細書に開示されている方法に従い、血液サンプルの Her 2/neu 特異的および P467 ペプチド特異的抗体力価を分析した。

10

【0221】

図 22 に示されるように、P467 ペプチド特異的 IgG 抗体力価は、ミョウバンまたはモンタニドのいずれかとともに最終用量の P467-CRM ペプチド構築物を投与した後 8 週間（BA3）、16 週間（BA4）および 6 か月（BA5）の時点で高いままであった。同様に、図 23 に示されるように、Her 2/neu 特異的 IgG 抗体力価は、ミョウバンまたはモンタニドのいずれかとともに最終用量の P467-CRM ペプチド構築物を投与した後 8 週間（BA3）、16 週間（BA4）および 6 か月（BA5）の時点で高いままであった。

【0222】

要約

20

CRM197 - 融合ペプチドコンジュゲートとこれらの融合ペプチドを含んでなるビロソーム処方物は両方とも単一の B 細胞エピトープ（P4、P6 および P7）、ならびに融合ペプチド（P467 および P647）に特異的な抗体を生成した。これらの抗体はまた Her-2/neu の組換え細胞外ドメインにも、また SKBR-3 乳癌細胞で発現される天然 Her 2/neu タンパク質にも結合することにも留意されたい。

【0223】

CRM197 - 融合ペプチドコンジュゲートは B 細胞エピトープ - および Her 2/neu 特異的抗体の誘導においてより有効であり、すなわち、対応するビロソーム処方物に比べて有意に高い抗体力価（およそ 10 ~ 20 倍）を生じた。

【0224】

30

組換え Her-2/neu に対する抗体力価に基づけば、免疫誘導の過程で抗体応答の動態には明らかな違いがあり、結果は、CRM コンジュゲートは抗体力価により早期の上昇をもたらし（すでに 2 回目の 2 回目の免疫誘導の後、3 回目の免疫誘導の後にピークがある）、一方、ビロソームコンジュゲートを用いた場合の抗体力価の上昇はより緩慢で、対応する CRM コンジュゲートで免疫誘導されたマウスで見られたレベルに達するには 4 回の免疫誘導を必要とした。

【0225】

ビロソームは一般に、好適な抗原送達系である。しかしながら、本明細書で明らかに開示される結果は、ビロソームコンジュゲートによる免疫誘導後には抗体力価の上昇の遅延とともに、対応する CRM コンジュゲートで免疫誘導された動物で見られるものと同等の力価を達成するために 4 回の免疫誘導の必要性を示す。最適な抗体応答のための時間および用量の両方が Her-2/neu ワクチン組成物の臨床適用に関して考慮されるべき重要な因子である。よって、これらの結果は、CRM197 がワクチン送達に関して Her-2/neu 融合ペプチドにより好適な担体タンパク質であることを示す。

40

【0226】

ミョウバン（Brenntag）およびモンタニドは、P467-CRM ペプチド構築物に対する上述の抗体応答をさらに増強することが示された。抗 P467 特異的 IgG ならびに IgG1 抗体力価は、モンタニドで免疫誘導された総てのマウスで（総ての用量）、ミョウバンに比べて有意に高かった。抗 P467 IgG2a 抗体力価もまた、モンタニドで免疫誘導されたマウスで（総ての用量）、ミョウバンに比べて高かった。抗 Her

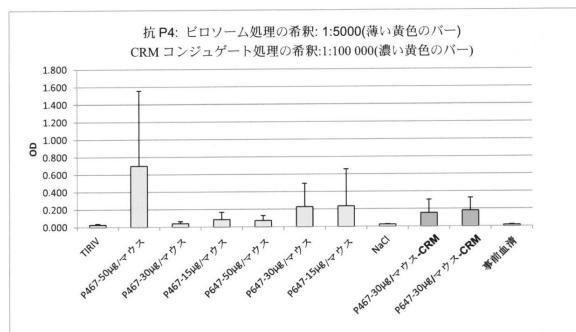
50

- 2 / neu Ig G および Ig G 1 抗体力価は、モンタニドで免疫誘導されたマウスにおいて、検討した総ての用量で、ペプチド構築物と併用投与した場合に有意に高かった。P 4 6 7 ペプチド特異的抗体とは対照的に、抗 Her - 2 / neu Ig G 2 a 抗体はほとんどまたは全く検出されなかった。

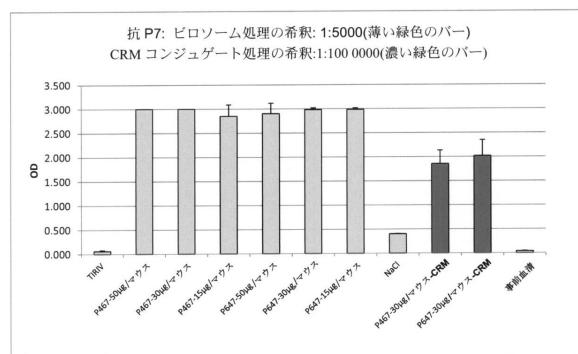
【 0 2 2 7 】

IFN は、脾細胞により、それらの細胞が *in vitro* にて CRM の存在下で培養された場合に、P 4 6 7 の存在下で培養された細胞に比べて有意に高い量で産生された。CRM による刺激の後、IFN レベルは、低用量のペプチド構築物とともに投与された群では、モンタニドとともに適用される場合に、ミョウバン (Brenntag) とともに適用される場合の同じ量の構築物を受容した群に比べて有意に高かった。このデータは、モンタニドがミョウバンよりも高い抗体力価を誘導するだけでなく、よりサイトカインレベルを誘導することを示す。10

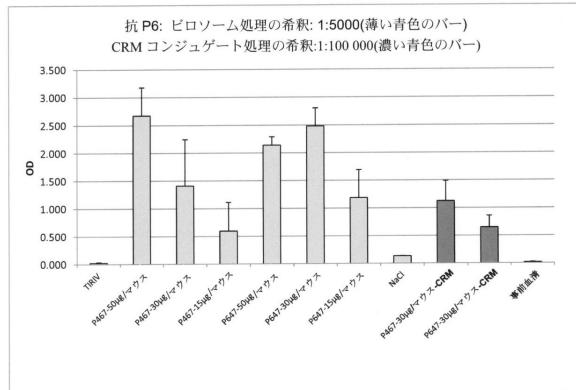
【 図 1 】



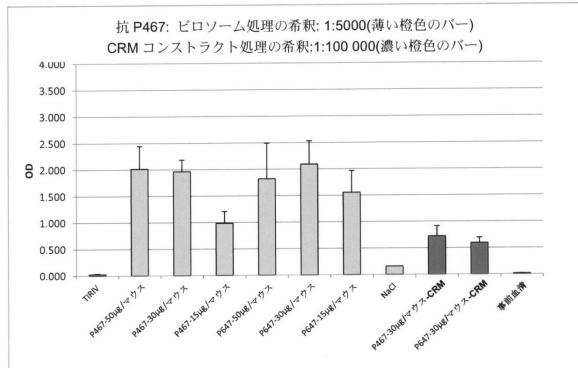
【 図 3 】



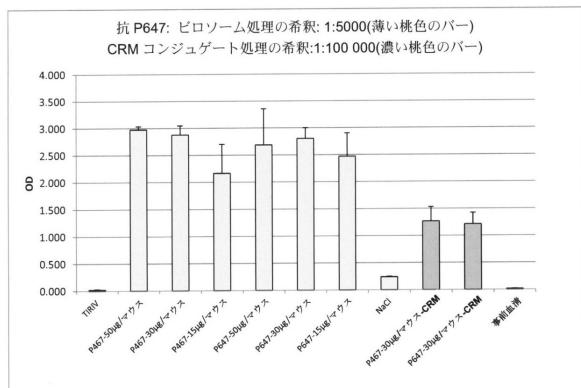
【 図 2 】



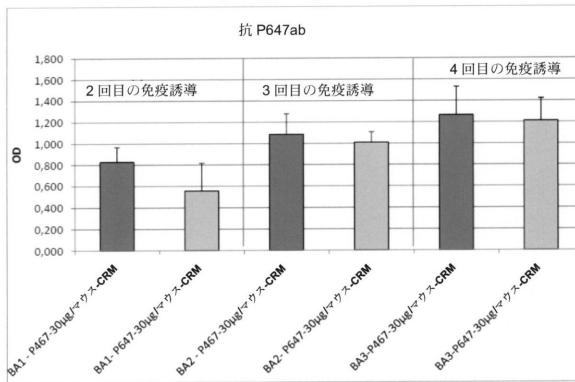
【 図 4 】



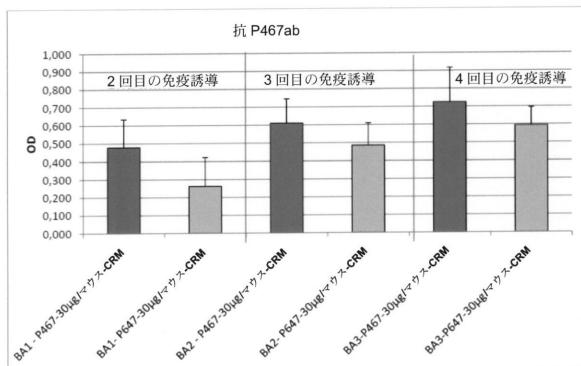
【図5】



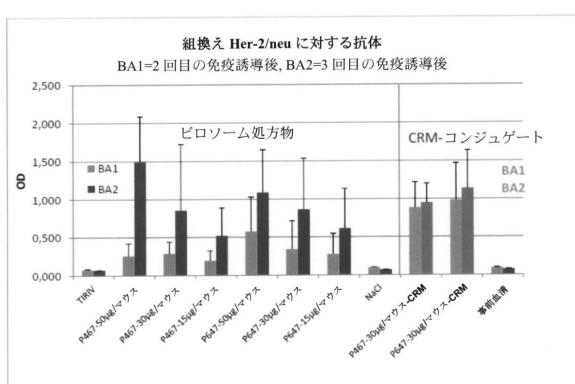
【図7】



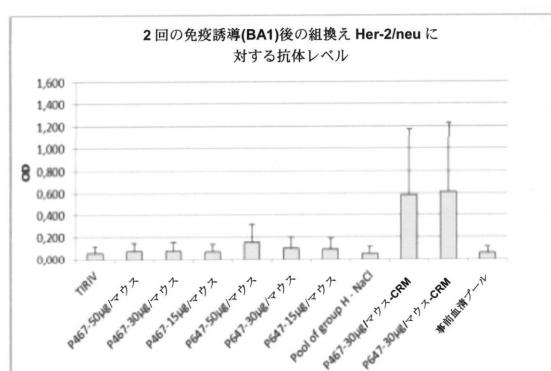
【図6】



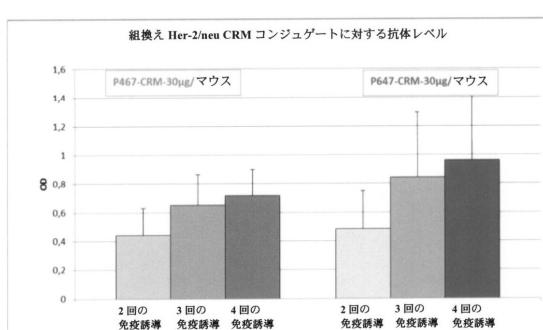
【図8】



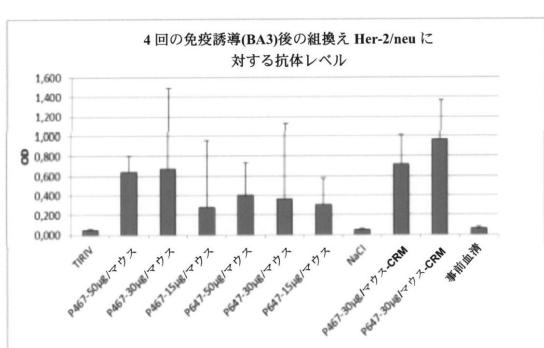
【図9】



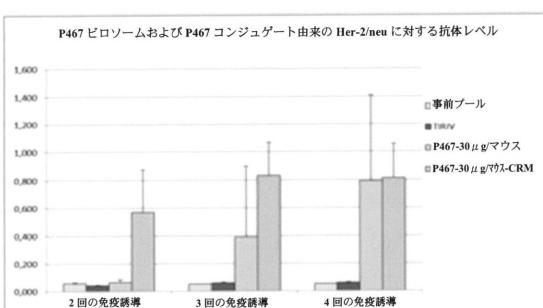
【図11】



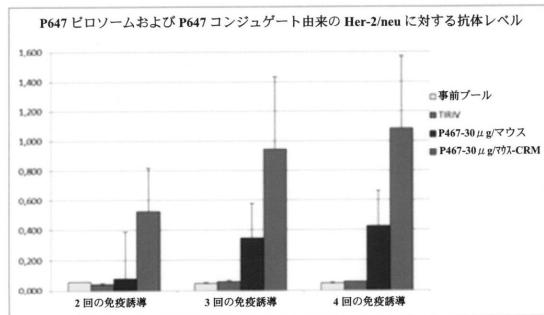
【図10】



【図12】



【図13】



【図14】

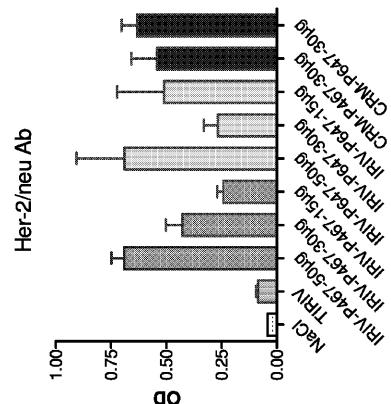
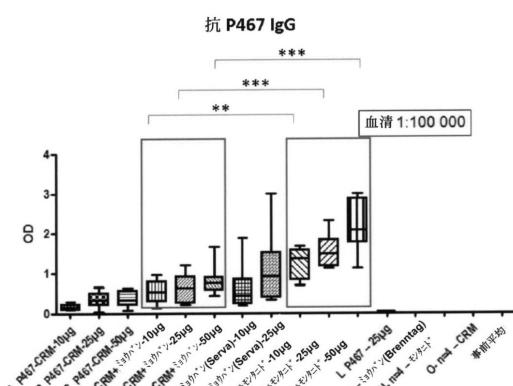
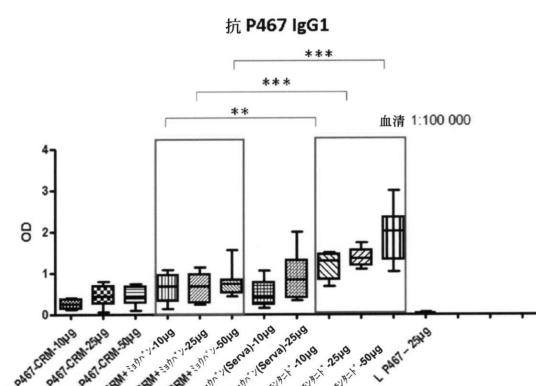


FIGURE 14

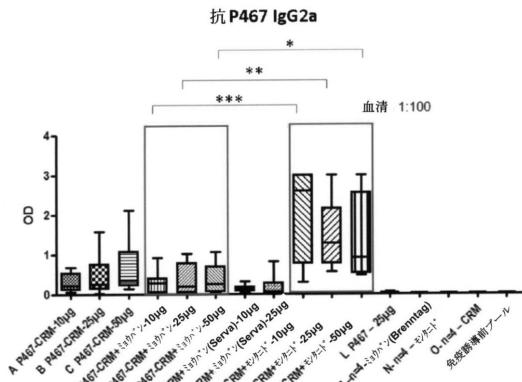
【図15A】



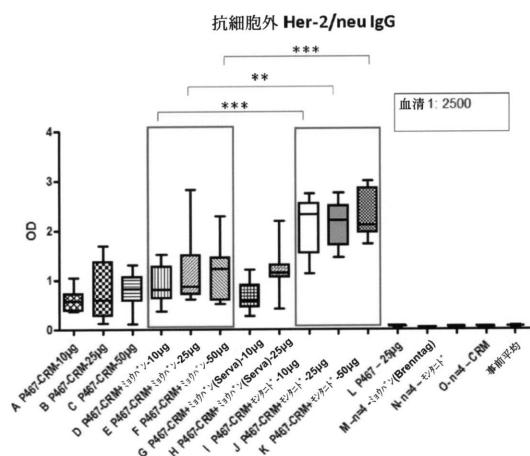
【図15B】



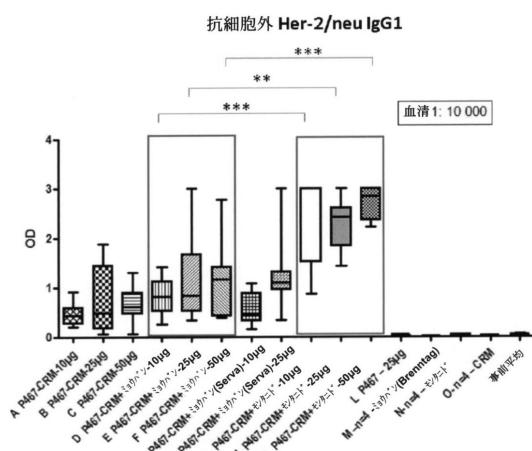
【図 15 C】



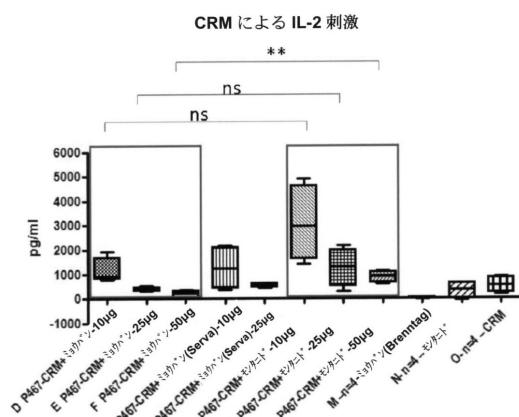
【図 16 A】



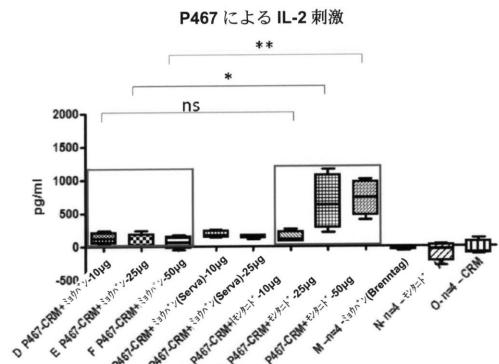
【図 16 B】



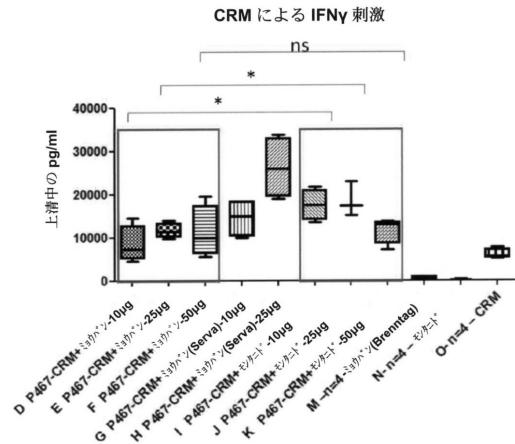
【図 17 A】



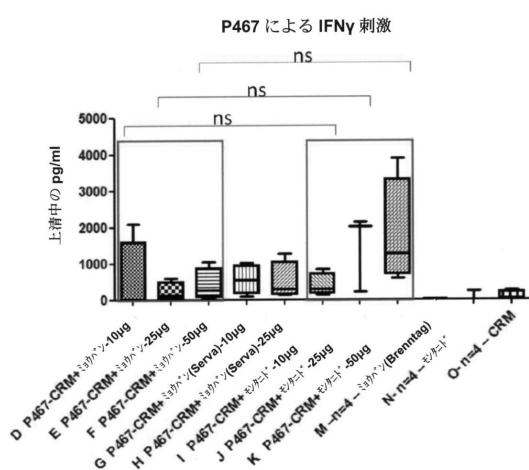
【図 17B】



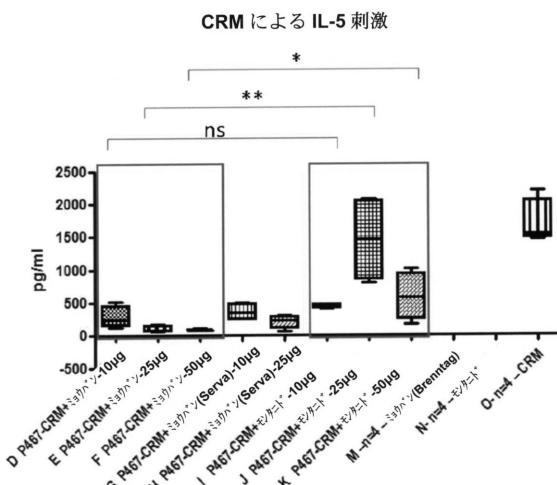
【図 18A】



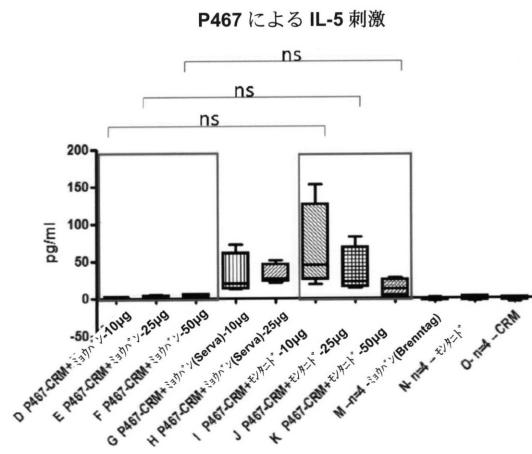
【図 18B】



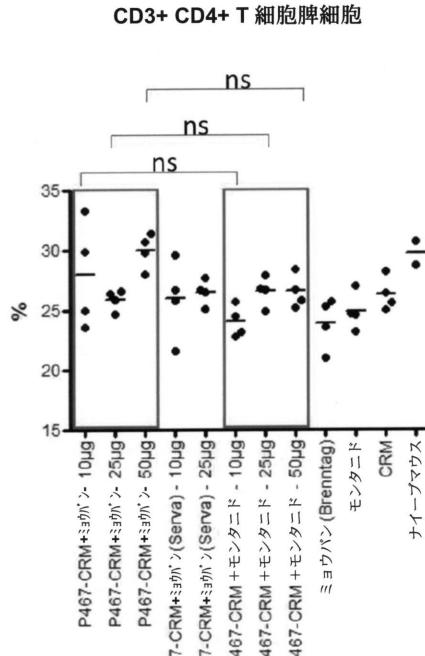
【図 19A】



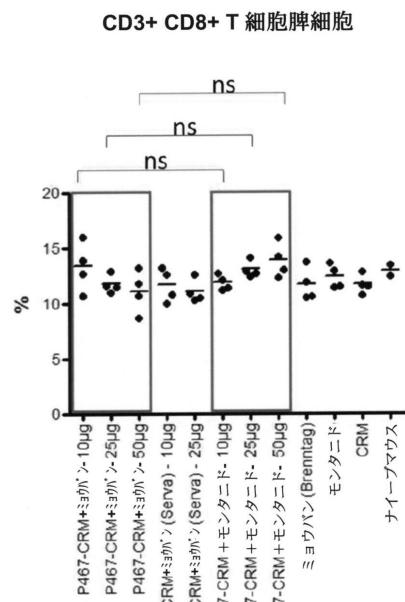
【図 19 B】



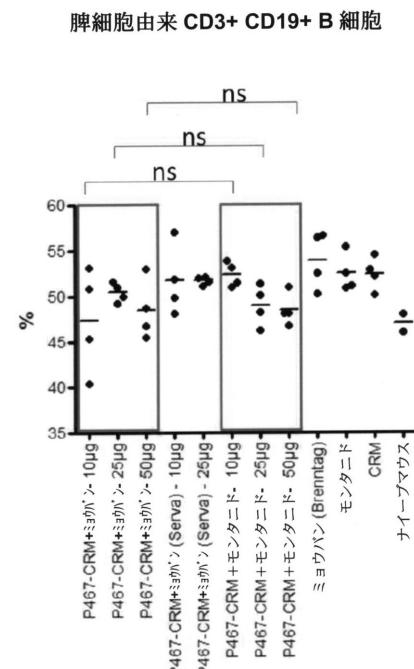
【図 20 A】



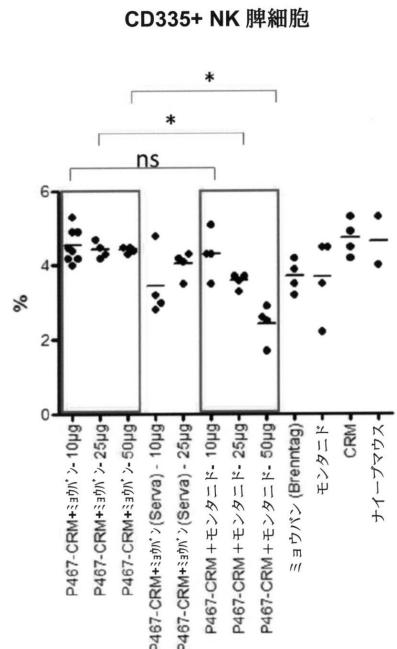
【図 20 B】



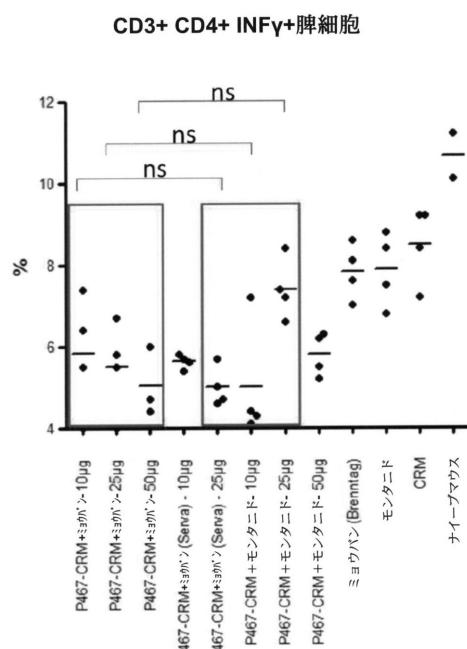
【図 20 C】



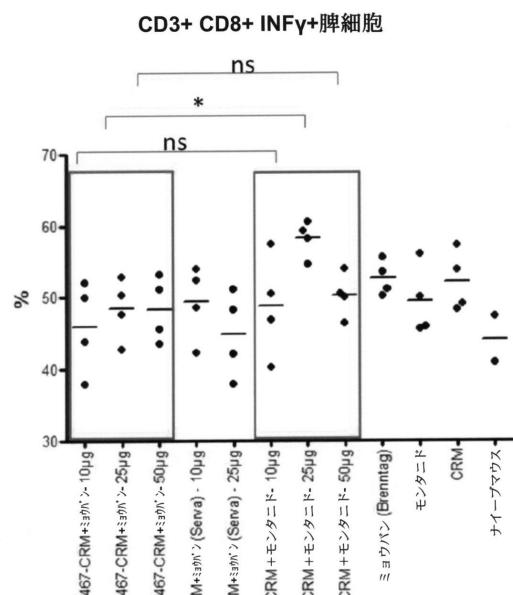
【図 20 D】



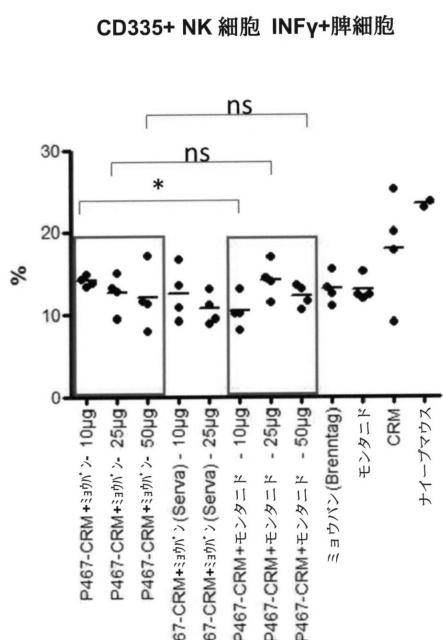
【図 21 A】



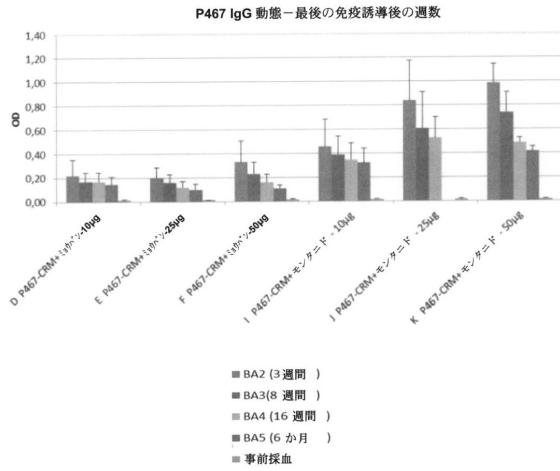
【図 21 B】



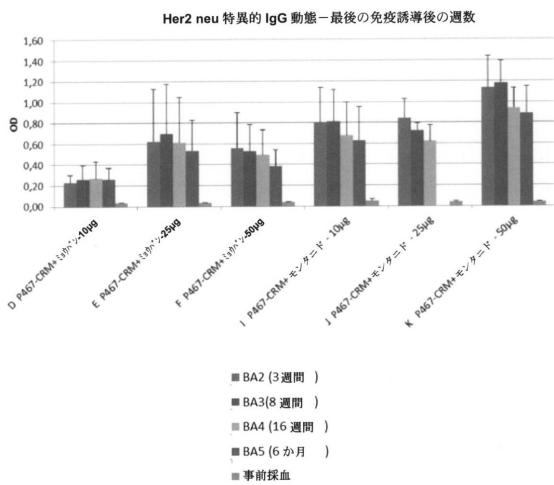
【図 21 C】



【図22】



【図23】



【配列表】

0006957448000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 45/00

(74)代理人 100120617
弁理士 浅野 真理
(74)代理人 100126099
弁理士 反町 洋
(74)代理人 100143971
弁理士 藤井 宏行
(72)発明者 ウルスラ、ウィーデルマン
オーストリア共和国ウィーン、ロアパッハーシュトラーセ、5 アー

審査官 横田 倫子

(56)参考文献 國際公開第2011/020604 (WO, A1)
Acc Chem Res., 2015 Feb, Vol.48, p.643-652
Biologicals, 2011, Vol.39, p.195-204
J Biochem., 2007, Vol.142, p.95-104

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 39 / 00
A 6 1 P 35 / 00
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)