

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5564181号  
(P5564181)

(45) 発行日 平成26年7月30日 (2014. 7. 30)

(24) 登録日 平成26年6月20日 (2014. 6. 20)

(51) Int. Cl.	F I		
<b>A 6 1 K 38/00</b> (2006. 01)	A 6 1 K 37/02	Z N A	
<b>A 6 1 K 39/00</b> (2006. 01)	A 6 1 K 39/00	H	
<b>A 6 1 K 39/385</b> (2006. 01)	A 6 1 K 39/385		
<b>C 0 7 K 19/00</b> (2006. 01)	C 0 7 K 19/00		
<b>C 1 2 N 15/09</b> (2006. 01)	C 1 2 N 15/00	A	
請求項の数 6 (全 70 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2008-544500 (P2008-544500)	(73) 特許権者	512312060
(86) (22) 出願日	平成18年12月7日 (2006. 12. 7)		シルワン, ハヴアル
(65) 公表番号	特表2009-518426 (P2009-518426A)		アメリカ合衆国 4 0 2 4 5 ケンタッキ
(43) 公表日	平成21年5月7日 (2009. 5. 7)		ー州, ルーイビル, マレット ヒル ドラ
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/046662		イブ 1 7 0 1 8
(87) 国際公開番号	W02007/067681	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成19年6月14日 (2007. 6. 14)		弁理士 平木 祐輔
審査請求日	平成21年12月1日 (2009. 12. 1)	(74) 代理人	100118773
(31) 優先権主張番号	60/748, 177		弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成17年12月8日 (2005. 12. 8)	(74) 代理人	100122389
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 新井 栄一
(31) 優先権主張番号	60/771, 179	(74) 代理人	100111741
(32) 優先日	平成18年2月6日 (2006. 2. 6)		弁理士 田中 夏夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100171505
			弁理士 内藤 由美
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 免疫刺激組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

( a ) 4-1BBL免疫共刺激ポリペプチドとアビジン又はストレプトアビジンとを含むコンジュゲート、及び

( b ) 抗原  
を含む組合せ。

【請求項 2】

前記抗原は ( a ) 腫瘍関連抗原、及び ( b ) 感染因子又は感染因子に関連する抗原よりなる群から選択される、請求項1に記載の組合せ。

【請求項 3】

前記抗原は前記4-1BBLコンジュゲートに結合する、請求項1に記載の組合せ。

【請求項 4】

前記抗原はビオチン部分とコンジュゲートすることにより抗原-ビオチンコンジュゲートを形成し、さらに該抗原-ビオチンコンジュゲートは該ビオチン部分を介して前記4-1BBLコンジュゲートに結合する、請求項1に記載の組合せ。

【請求項 5】

前記抗原は前記4-1BBLコンジュゲートと結合しない、請求項1に記載の組合せ。

【請求項 6】

配列番号8のアミノ酸配列からなる、4-1BBL免疫共刺激ポリペプチドとストレプトアビジンとを含むコンジュゲート。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願についての相互参照

本願は、35 U.S.C. § 119(e)に基づき、次の米国仮出願：60/748,177（出願日2005年12月8日）；60/771,179（2006年2月6日）；60/799,643（出願日2006年5月12日）；および60/863,173（出願日2006年10月27日）の出願日の利益を主張する。前記出願は各々、その全文を参照により本明細書に組み込むものとする。

## 【0002】

発明の分野

本発明は、概して、免疫応答（抗原に対する免疫応答など）を生じさせるかまたは増強する方法、該方法を実施するための組成物、ならびにこのような方法に有用な改変免疫細胞に関する。

## 【背景技術】

## 【0003】

発明の背景

免疫欠損を特徴とする、あるいは、より攻撃的な免疫応答により消散可能な疾患および症状に対処すべく宿主の免疫応答を増強するためのアプローチが記載されている。このようなアプローチが有利となりうる疾患または症状の例として、癌、インフルエンザおよびヒト免疫不全ウイルス（HIV）などが挙げられる。

## 【0004】

外科手術、化学療法および放射線療法を含む癌治療が一般に用いられているが、これらのアプローチは、腫瘍特異性に欠けており、その結果有害な副作用を招き、満足のゆく臨床応答とはいえない。従って、正常な細胞に有意な有害作用をもたらさずに、標的癌細胞に対して免疫応答を特異的に向けることにより、癌に対する免疫応答を増強する方法であれば、従来癌治療に比べて明らかな利点をもたらすであろう。

## 【0005】

免疫監視機構は腫瘍の予防および根絶にある役割を果たし、また、T細胞により媒介される養子免疫はこの過程においてある役割を果たすという一致した見解がある。例えば、非特許文献1~3を参照されたい。T細胞媒介免疫はまた、症状発現前および限定された臨床設定において効能を呈示する様々な免疫療法アプローチにおいてもある役割を果たす。例えば、非特許文献1、3及び4を参照。腫瘍は、突然変異型のもしくは過剰/異常発現した自己タンパク質、または癌ウイルス由来のタンパク質のいずれかである腫瘍関連抗原（TAA）を発現するため、免疫系により標的化される。例えば、非特許文献3及び4を参照のこと。生理学的条件下で、腫瘍抗原は樹状細胞（DC）により補足され、末梢リンパ器官に運ばれて、ナイーブT細胞の活性化およびエフェクター細胞（ $T_{eff}$ ）への分化を可能にする免疫原性条件下でナイーブT細胞に提示される。これらの細胞は次に、腫瘍部位に輸送され、腫瘍根絶のための抗腫瘍応答を生じさせる。例えば、非特許文献5~7を参照されたい。

## 【0006】

生産的T細胞応答は、3つの異なるシグナル：シグナル1、2および3を必要とする。シグナル1は、プロフェショナル抗原提示細胞（APC）表面上の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子により提示されるノミナル（nominal）ペプチドと相互作用するT細胞受容体（TCR）により生じる。シグナル2は、一連の共刺激分子により媒介され、持続的免疫応答に不可欠である。シグナル3は、活性化リンパ球およびACP（例えば、マクロファージおよびDC）により合成されたサイトカインを介して伝達され、エフェクター免疫応答の維持に重要である。

## 【0007】

腫瘍は免疫監視機構を回避するための多様な機構を発達させている。このような機構として、以下のものが挙げられる：（i）シグナル1の欠失、これはMHC/腫瘍抗原二分子複

10

20

30

40

50

合体の腫瘍細胞上での非効率的な提示、このシグナルの伝達欠損、またはMHCホモログであるMICの発現のいずれかによって起こり、NKG2阻害性受容体を発現するナチュラルキラー（NK）細胞を阻害する；（ii）腫瘍細胞での共刺激分子の欠失、または共阻害分子の発現に起因するシグナル2の非存在；（iii）抗炎症分子の分泌、腫瘍反応性T細胞におけるアネルギーの誘導、アポトーシスによる $T_{eff}$ 細胞の物理的排除、または天然に存在する $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T調節（Treg）細胞の誘導、を介した免疫応答の腫瘍媒介抑制、ならびに（iv）腫瘍間質による免疫性の調節。このような証拠の積み重ねは、これらの機構の多くが、大きな腫瘍組織量を有する患者において同時に作動しうることを示唆している。

【0008】

標的癌由来の抗原を含む癌ワクチンは、有望な特異性、安全性、および効能、ならびに癌の再発を予防しうる長期の免疫記憶によって、特に注目を集めている。免疫系が癌から個体を保護する上で重要な役割を果たし、動物モデルにおける既存の腫瘍を根絶するようにモジュレートできることがいったん証明されると、治療ワクチンの開発に多大な努力が注がれた。例えば、非特許文献3、8及び9を参照されたい。現在のワクチン戦略は、非特異的または特異的アジュバント；全腫瘍細胞溶解物；共刺激分子、サイトカインおよび/またはケモカインを発現するように遺伝子的に改変した腫瘍細胞；腫瘍抗原でパルスした、または腫瘍RNAもしくはDNAでトランスフェクトしたDC；ならびに、各種免疫刺激分子をコードする様々なベクターの腫瘍内注射と組み合わせて、特異的TAAを使用することを含む。これらアプローチの効果が制限されるのは、進行する腫瘍が1または複数の免疫回避戦略を用いて免疫応答を制御する能力、あるいは、免疫抑制機構、TAAの非効率的提示、

【非特許文献1】Pardoll, Nat. Rev. Immunol. 2002, 2:227-38

【非特許文献2】Rosenberg, Nature 2001, 411: 380-84

【非特許文献3】Finn, OJ. Nat. Rev. Immunol. 2003, 3:630-41

【非特許文献4】Antoniaら、Curr. Opin. Immunol 2004, 16:130-6

【非特許文献5】Spiottoら、Immunity. 2002; 17:737-47

【非特許文献6】Ochsenbeinら、Nature 2001 ;411:1058-64

【非特許文献7】Yuら、Nat. Immunol. 2004; 5:141-9

【非特許文献8】Berofskyら、J. Clin. Invest 2004, 113:1515-25

【非特許文献9】Plastsoucasら、Anticancer Res. 2003 ; 23, 1969-96

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、免疫刺激組成物および方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

一実施形態によれば、本発明は、（a）（i）第1免疫共刺激ポリペプチドを含むコンジュゲートメンバーと（ii）結合対の第1メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第1コンジュゲート；および（b）（i）第1抗原を含むコンジュゲートメンバーと（ii）結合対の第2メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第2コンジュゲート、を含む組合せを提供する。一実施形態では、結合対の第1メンバーは、アビジンまたはストレプトアビジンを含み、結合対の第2メンバーはビオチンを含むことができる。別の実施形態では、第1コンジュゲートは、第1免疫共刺激ポリペプチドと結合対の第1メンバーとを含む融合ポリペプチドを含むことができる。具体的な一実施形態では、第1免疫共刺激ポリペプチドは、4-1BBL、CD86、ICOSL、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、OX40L、CD27L、CD30L、LIGHT、BAFF、APRIL、CD80およびCD40Lからなる群より選択される。

【0011】

具体的な一実施形態では、第1抗原は、ヒトもしくはトリインフルエンザまたはヒト免疫不全ウイルスなどの感染因子に関連する。別の具体的実施形態では、第1抗原は腫瘍関連抗原である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 2 】

一実施形態では、前記組合せは、(i) 第2免疫共刺激ポリペプチドと結合対の第1メンバーとを含むコンジュゲートメンバー、および(ii) 第2抗原と結合対の第2メンバーとを含むコンジュゲートメンバーを含む、第3コンジュゲートをさらに含む。この実施形態では、第2免疫共刺激ポリペプチドは、第1免疫共刺激ポリペプチドと同じでも、違うものでもよく；第2抗原は第1抗原と同じでも、違うものでもよく；第3コンジュゲートの第1および第2結合対メンバーは、第1および第2コンジュゲートの第1および第2結合対メンバーと同じでも、違うものでもよい。加えて、第1コンジュゲートメンバーは、第1および第2結合対メンバー間の結合により、第2コンジュゲートメンバーと結合しているもよい。

10

## 【 0 0 1 3 】

別の実施形態では、前記組合せの第2コンジュゲートは、(i) 感染因子を含むコンジュゲートメンバーと、(ii) 結合対の第2メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む。

## 【 0 0 1 4 】

本発明の別の形態によれば、第1腫瘍関連抗原を発現する腫瘍に対する免疫応答を生じさせるかまたは増強する方法であって、該腫瘍を有する患者に、(a) (i) 第1免疫共刺激ポリペプチドを含むコンジュゲートメンバーと(ii) 結合対の第1メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第1コンジュゲート、および(i) 第1腫瘍関連抗原を含むコンジュゲートメンバーと(ii) 結合対の第2メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第2コンジュゲート；または(b) 第1および2コンジュゲートでin vitro処理した免疫細胞、を投与することを含む、上記方法が提供される。

20

## 【 0 0 1 5 】

一実施形態では、第1および第2コンジュゲートを個別または同時に、例えば、単一組成物の一部として、前記患者に投与する。

## 【 0 0 1 6 】

別の実施形態では、第1および2コンジュゲートでin vitro処理した免疫細胞を前記患者に投与する。具体的な一実施形態では、この免疫細胞は、免疫共刺激ポリペプチドの受容体を含み、その際、第1コンジュゲートは、免疫共刺激ポリペプチドと該受容体との間の結合により該免疫細胞にコンジュゲートしており、第2コンジュゲートは、第1および第2結合対メンバー間の結合を介して該免疫細胞にコンジュゲートしている。

30

## 【 0 0 1 7 】

一実施形態において、本方法は、(i) 第2免疫共刺激ポリペプチドと結合対の第1メンバーとを含むコンジュゲートメンバー、および(ii) 第2腫瘍関連抗原と結合対の第2メンバーとを含むコンジュゲートメンバーを含む、第3コンジュゲートを投与することをさらに含む。この実施形態では、第2免疫共刺激ポリペプチドは、第1免疫共刺激ポリペプチドと同じでも、違うものでもよく；第2抗原は第1抗原と同じでも、違うものでもよく；第3コンジュゲートの第1および第2結合対メンバーは、第1および第2コンジュゲートの第1および第2結合対メンバーと同じでも、違うものでもよい。加えて、第1コンジュゲートメンバーは、第1および第2結合対メンバー間の結合を介して第2コンジュゲートメンバーに結合しているもよい。

40

## 【 0 0 1 8 】

本発明の別の態様によれば、免疫細胞を改変することにより、腫瘍関連抗原を発現する腫瘍または感染因子に対する免疫応答を生じさせるかまたは増強する方法であって、(a) (i) 第1免疫共刺激ポリペプチドを含むコンジュゲートメンバーと(ii) 結合対の第1メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第1コンジュゲート；および(b) (i) 腫瘍もしくは感染因子に関連する抗原または感染因子を含むコンジュゲートメンバーと(ii) 結合対の第2メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第2コンジュゲートに、第1免疫共刺激ポリペプチドの受容体を発現する免疫細胞を接触させることを含む、上記方法が提供される。第1コンジュゲートは、免疫共刺激ポリペプチドと受容体

50

との間の結合により上記免疫細胞に結合してもよく、第2コンジュゲートは、第1および第2結合対メンバー間の結合を介して上記免疫細胞に結合してもよい。

【0019】

一実施形態では、前記免疫細胞は、T細胞、例えば、CD4+細胞もしくはCD8+細胞、または好中球、ナチュラルキラー細胞、単球もしくは樹状細胞である。

【0020】

別の実施形態では、前記免疫細胞は、第2免疫共刺激ポリペプチドの受容体を含み、前記方法は、(i)第2免疫共刺激ポリペプチドと結合対の第1メンバーとを含むコンジュゲートメンバー、および(ii)前記腫瘍もしくは感染因子に関連する第2抗原または感染因子と結合対の第2メンバーとを含むコンジュゲートメンバーを含む、第3コンジュゲートに、上記免疫細胞を接触させることをさらに含む。この実施形態では、第2免疫共刺激ポリペプチドは、第1免疫共刺激ポリペプチドと同じでも、違うものでもよく；第2抗原は、存在する場合には、第1抗原が存在する場合にはこれと同じでも、違うものでもよく；第3コンジュゲートの第1および第2結合対メンバーは、第1および第2コンジュゲートの第1および第2結合対メンバーと同じでも、違うものでもよい。加えて、第1コンジュゲートメンバーは、第1および第2結合対メンバー間の結合を介して第2コンジュゲートメンバーに結合してもよい。

10

【0021】

本発明の別の態様によれば、第1免疫共刺激ポリペプチドの受容体を発現する改変免疫細胞が提供され、その際、該改変免疫細胞は(a)(i)第1免疫共刺激ポリペプチドを含むコンジュゲートメンバーと(ii)結合対の第1メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第1コンジュゲート、および(b)(i)第1抗原または感染因子を含むコンジュゲートメンバーと(ii)結合対の第2メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第2コンジュゲートで改変されているが、ここで、第1コンジュゲートは、免疫共刺激ポリペプチドと受容体との間の結合により該免疫細胞に結合し、第2コンジュゲートは、第1および第2結合対メンバー間の結合を介して該免疫細胞に結合している。一実施形態では、前記免疫細胞は、T細胞、例えば、CD4+細胞もしくはCD8+細胞、または好中球、ナチュラルキラー細胞、単球もしくは樹状細胞である。

20

【0022】

本発明の別の態様によれば、感染因子に対する免疫応答を生じさせるかまたは増強する方法であって、(a)(i)第1免疫共刺激ポリペプチドを含むコンジュゲートメンバーと(ii)結合対の第1メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第1コンジュゲート；および(b)(i)感染因子に関連する第1抗原を含むかまたは感染因子を含むコンジュゲートメンバーと(ii)結合対の第2メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第2コンジュゲートを、該感染因子による感染症に罹患しているかまたはその危険性がある患者に投与することを含む、上記方法が提供される。一実施形態では、第1および第2コンジュゲートの少なくとも1つを感染部位への直接注射により投与する。

30

【0023】

具体的な一実施形態では、前記感染症は、ヒトまたはトリインフルエンザであり、第1抗原はH、N、M1、M2e、NS1、NS2(NEP)、NP、PA、PB1、およびPB2からなる群より選択される。別の具体的実施形態では、前記感染症はHIVであり、第1抗原は、Gagタンパク質、Pol、Vif、Vpr、Rev、Vpu、エンペロープエピトープ、Tat、およびNefからなるHIV抗原の群より選択される。

40

【0024】

一実施形態において、前記方法は、(i)第2免疫共刺激ポリペプチドと結合対の第1メンバーとを含むコンジュゲートメンバー、および(ii)前記感染症に関連する第2抗原または前記感染因子と結合対の第2メンバーとを含むコンジュゲートメンバーを含む、第3コンジュゲートを投与することをさらに含み、その際、第2免疫共刺激ポリペプチドは、第1免疫共刺激ポリペプチドと同じか、または違うものであり；第2抗原は、存在する場合には、第1抗原が存在する場合にはこれと同じか、または違うものであり；第3コン

50

ジュゲートの第1および第2結合対メンバーは、第1および第2コンジュゲートの第1および第2結合対メンバーと同じか、または違うものであり、第1コンジュゲートメンバーは、第1および第2結合対メンバー間の結合を介して第2コンジュゲートメンバーに結合している。

【0025】

本発明の別の態様によれば、免疫共刺激ポリペプチドとアビジンもしくはストレプトアビジンとを含むコンジュゲートが提供される。

【0026】

本発明の別の態様によれば、動物において免疫刺激応答を誘導する方法が提供され、この方法は、免疫共刺激ポリペプチドとアビジンもしくはストレプトアビジンとを含むコンジュゲートを動物に投与することを含む。いくつかの実施形態では、この方法は、抗原を動物に投与することをさらに含む。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

#### 詳細な説明

本発明は、抗原、例えば、TAA、またはヒトおよびトリインフルエンザもしくはHIVのような感染因子に関連する抗原に対する免疫応答などの免疫応答を生じさせるかまたは増強する方法および組成物を提供する。本発明はまた、抗原に対する免疫応答を生じさせるかまたは増強するのに有用な改変免疫細胞も提供する。本発明はまた、免疫療法も提供し、このような方法として、腫瘍サイズを縮小する方法および腫瘍細胞の増殖を阻害する方法のような癌免疫療法、ならびに感染症を治療または予防する方法などが挙げられる。

20

【0028】

生産的適応免疫応答は、二次リンパ器官の組織化構造内でのナイーブTエフェクター（Teff）細胞とAPC間の協調的かつ適時の相互作用を必要とする。この相互作用は、Teff細胞およびAPCの相互活性化を促進し、応答の開始、維持および長期記憶に重要な各種細胞表面リガンドおよび受容体ならびに可溶性タンパク質の発現をもたらす。前述したように、少なくとも3つのシグナル（シグナル1、2および3）がナイーブT細胞の初期活性化に関与している。数個の免疫共刺激分子がこれらシグナルの1以上の刺激に関係があるとされている。

30

【0029】

本発明は、腫瘍または感染因子に対する有効な免疫応答が誘導されるように、抗原を免疫細胞に提示する方法における、1以上の免疫共刺激ポリペプチド、および腫瘍または感染因子に関連する1以上の抗原の使用に関する。あるいは、感染因子関連抗原の代わりに、感染因子を用いることもできる。特定の理論に束縛されるわけではないが、本発明は、抗原提示を促進し、免疫応答を活性化することにより、有利な結果を達成すると考えられる。別の実施形態では、本発明は、免疫応答を刺激するのに有用な、免疫共刺激ポリペプチドを含む免疫刺激部分を提供する。

【0030】

本願のために、以下の用語は下記のような定義を有する。

【0031】

本明細書で用いる「1つの（aまたはan）」は、ただ1つを意味すると特に記載されない限り、1以上を意味する。

40

【0032】

本発明で用いる「投与」は、患者に物質を与えるあらゆる好適な手段を包含する。一般的経路として、経口、舌下、経粘膜、経皮、直腸、膣、皮下、筋内、静脈内、動脈内、鞘内、カテーテル経由、インプラント経由などが挙げられる。いくつかの実施形態では、組成物を腫瘍付近、または腫瘍に直接投与するが、これは、例えば、腫瘍への直接注射、または、例えば、腫瘍が血液の腫瘍である場合、血液への注射により実施する。

【0033】

本明細書において「抗原」は、限定せずに用いられる。抗原としては、免疫応答を誘導

50

するタンパク質、脂質、糖、核酸、化学的部分、およびその他の部分が挙げられる。抗原には、例えば、環状化した、または脂質に結合したタンパク質も含まれ、グリコシル化またはメチル化により改変されてもされなくてもよい。感染因子または疾患に関連する抗原には、感染因子の一部である抗原、例えば、エンベロープタンパク質、キャプシドタンパク質、表面タンパク質、毒素、細胞壁、抗原脂質などが含まれる。その他に、宿主の存在下でのみ発現し得る抗原もある。いくつかの実施形態では、他の好適な抗原として、宿主の抗原が含まれ、例えば、感染症または疾患のマーカーとして誘導、改変、あるいは過剰発現されるものが挙げられる。感染因子、感染症、症状または疾患に由来するかまたはこれらに関連する抗原はすべて本発明での使用に適している。また、全長タンパク質の抗原部分を含むペプチド、例えば、免疫原性エピトープのように、免疫応答を誘導するタンパク質の一部を含むペプチドも、本発明の「抗原」としての使用に好適である。例えば、好適な抗原として、免疫応答を誘導する合成ペプチドなどを挙げるができる。

10

**【0034】**

「結合対」とは、多様な分子力、例えば、イオン、共有、疎水性、ファンデルワールス、および水素結合のいずれかにより互いに相互作用することにより、上記対が他方と互いに特異的に結合する特性を有する2つの分子を意味する。特異的結合とは、結合対メンバーが、別の分子に結合しない条件下で、他方との結合を示すことを意味する。結合対の例としては、ピオチン - アビジン、ホルモン - 受容体、受容体 - リガンド、酵素 - 基質、IgG - プロテインA、抗原 - 抗体などが挙げられる。

**【0035】**

「免疫共刺激ポリペプチド」とは、病原体（感染因子など）または腫瘍に対する個体の免疫応答を増加するポリペプチドを意味する。

20

**【0036】**

本明細書で用いる「免疫細胞」とは、後天性または先天性免疫系の発生、調節もしくは効果に関与するあらゆる細胞を含む。免疫細胞として、CD4+細胞、CD8+細胞およびその他の多種T細胞サブセット、B細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球および樹状細胞、ならびに好中球が挙げられる。

**【0037】**

本明細書で用いる「患者」とは、あらゆる脊椎動物を包含し、例えば、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ブタ、トリ、イヌ、ネコおよび霊長類などの種が挙げられる。一実施形態では、患者はヒトである。当業者であれば、特定の種に関して述べる特定の免疫共刺激分子、シグナル伝達分子、細胞マーカー、細胞型、感染因子などが、別の種でも対応する類似体を有しうること、また、このような類似体、ならびに対応のおよび関連の種におけるそれらの使用も本発明に含まれることを認識するだろう。

30

**【0038】**

本明細書で用いる「腫瘍」は、固形または非固形腫瘍（例えば、白血病）；前癌病変および良性腫瘍から癌性、悪性および転移性腫瘍まで、腫瘍発達の様々な段階を包含する。

**【0039】**

概して、本発明は、(a)(i)第1免疫共刺激ポリペプチドを含むコンジュゲートメンバーと(ii)結合対の第1メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第1コンジュゲート、および(b)(i)第1抗原を含むコンジュゲートメンバーと(ii)結合対の第2メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第2コンジュゲートを用いて、第1抗原に対する免疫応答を生じさせるかまたは増強する方法を提供する。上記抗原は、TAAもしくは感染因子に関連する抗原、または感染因子そのものでもよい。上記コンジュゲートは、抗原または感染因子を含む患者に直接投与してもよいし、あるいは、これを用いて免疫細胞を処理した後、該免疫細胞を患者に投与してもよい。本発明はまた、上記コンジュゲートを含む組成物、該コンジュゲートで処理した免疫細胞、ならびに処理免疫細胞を作製する方法も提供する。

40

**【0040】**

本発明はまた、免疫共刺激ポリペプチドを含む免疫刺激部分、例えば、免疫共刺激ポリ

50

ペプチドとアビジンまたはストレプトアビジンとを含むコンジュゲートまたは融合タンパク質を提供する。本発明はまた、動物において免疫刺激応答を誘導する方法も提供し、この方法は、該動物に免疫刺激部分を投与することを含む。いくつかの実施形態では、抗原も動物に投与する。また、上記部分を含む組成物も提供される。

**【0041】**

本発明の一態様によれば、1種以上の免疫細胞を選択的に標的化する免疫共刺激ポリペプチド（例えば、以下に記載する免疫共刺激ポリペプチドのいずれか）を含むコンジュゲートの一部として、抗原または感染因子が免疫細胞に提示される。従って、一実施形態によれば、本発明は、免疫共刺激ポリペプチドと、腫瘍もしくは感染因子に関連する抗原または感染因子とを含むコンジュゲートを提供する。任意の手段、例えば、共有結合により、直接もしくはリンカーを介して、または結合対メンバーを介して、抗原または感染因子を免疫共刺激ポリペプチドにコンジュゲートすることができる。

10

**【0042】**

一実施形態では、結合対の結合相互作用を介して抗原または感染因子を免疫共刺激ポリペプチドにコンジュゲートさせる。この実施形態によれば、抗原（または感染因子）および免疫共刺激ポリペプチドの各々を結合対のメンバーにコンジュゲートさせると、結合対メンバーの結合相互作用により、抗原（または感染因子）と免疫共刺激ポリペプチドとが、コンジュゲート（例えば、免疫共刺激ポリペプチド - 第1結合対メンバー::第2結合対メンバー - 抗原（または感染因子）コンジュゲート）として一緒に連結する。

**【0043】**

この実施形態によれば、本発明は、(a)(i)第1免疫共刺激ポリペプチドを含むコンジュゲートメンバーと(ii)結合対の第1メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第1コンジュゲート；および(b)(i)腫瘍もしくは感染因子に関連する第1抗原（または感染因子そのもの）を含むコンジュゲートメンバーと(ii)結合対の第2メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第2コンジュゲートを含む組合せを提供する。

20

**【0044】**

別の実施形態では、前記組合せは、(i)第2免疫共刺激ポリペプチドを含むコンジュゲートメンバーと、(ii)腫瘍もしくは感染因子に関連する第2抗原（または感染因子そのもの）を含むコンジュゲートメンバーとを含む、第3コンジュゲートを含み、その際、第3コンジュゲートの免疫共刺激ポリペプチドは、第1コンジュゲートの免疫共刺激ポリペプチドと同じでも、違うものでもよく、また、第2抗原は第1抗原と同じでも、違うものでもよい。この実施形態の具体的態様では、第3コンジュゲートの免疫共刺激ポリペプチドと第2抗原は、該免疫共刺激ポリペプチドおよび第2抗原の各々と結合した結合対メンバー間の結合を介して互いに結合している。この実施形態によれば、第3コンジュゲートの結合対メンバーは、第1および第2コンジュゲートの第1および第2結合対メンバーと同じでも、違うものでもよい。

30

**【0045】**

第1、第2および任意の第3コンジュゲートは、個別の組成物として提供することができる。あるいは、第1および第2コンジュゲートを単一の組成物として提供し、第3コンジュゲートを別の組成物として提供してもよい。さらに別の実施形態では、上記第1、第2および第3コンジュゲートを単一の組成物として提供してもよい。別の実施形態では、第1コンジュゲートを1つの組成物として提供し、第2および第3コンジュゲートを別の組成物として提供する。

40

**【0046】**

随意に、各組成物は薬学的に許容可能な担体を含んでもよい。薬学的に許容可能な担体は、組成物のピヒクルとして用いることができる物質である。何故なら、このような物質は不活性であるか、あるいは薬剤として許容され、かつ、投与に関して、活性物質と適合性だからである。薬学的に許容可能な担体は、当分野で周知の、通常の医薬添加剤を含んでもよい。

50

## 【 0 0 4 7 】

免疫共刺激ポリペプチド

免疫共刺激分子は、ナイーブT細胞と抗原提示細胞との自然相互作用に関与し、その結果、それらの相互活性化が起こり、これによって、免疫応答の開始、維持および長期記憶に寄与する様々な細胞表面リガンドおよび受容体、ならびに可溶性タンパク質の発現が促進される。前述のように、ナイーブT細胞の初期活性化には、少なくとも3つのシグナルが必要である。シグナル1は、T細胞受容体(TCR)と、プロフェショナルAPC、例えば、樹状細胞(DC)の表面に主要組織適合複合体(MHC)により提示されるノミナルペプチドとの相互作用により生じる。シグナル2は、数個の異なる分子により媒介されると考えられ、持続的免疫応答に重要である。シグナル3は、活性化T細胞およびAPCにより合成されるサイトカインを介して伝達され、エフェクター免疫応答の維持に重要である。

10

## 【 0 0 4 8 】

免疫共刺激分子の数は確認されていない。本発明において有用な免疫共刺激分子(ポリペプチド)の例として、限定するものではないが、以下のものが挙げられる: LIGHT、CD80(B7-1)、CD86(B7-2)、ICOS、ICOSL(例えばB7h、B7-H2、B7RP-1、GL-50およびLICOS)、CD94(KP43)、CD40L(CD154)、ICAM-1(CD54)、ICAM-2、ICAM-3、SLAM(CD150)、HAS(CD24)、4-1BB(CDw137)、4-1BBL(CDw137L)、OX40L、CD28、CD40(BP50)、CD25(IL-2R)、リンホトキシン(LT またはLT)、TNF、Fas-L、GITR(活性化誘導性TNR)、GITRリガンド、CD11a(L<sub>L</sub>インテグリン)、CD11b(M<sub>M</sub>インテグリン)、L-セレクチン(CD62L)、CD69(超早期活性化抗原)、CD70(CD27L)、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、OX40L、4-1BBL、CD27L、CD30L、LIGHT、BAFF、およびAPRIL。例えば、WattsおよびDe Benedette, 1999, Curr. Opin. Immunol., 11:286-93を参照されたい。

20

## 【 0 0 4 9 】

本明細書において「全長」と記載しない限り、免疫共刺激ポリペプチドと称するものは、全長ポリペプチド、および免疫共刺激機能を示すその断片または一部分を包含し、限定するものではないが、以下に具体的に記載する断片および一部分が挙げられる。従って、例えば、4-1BBLポリペプチドと称するとき、免疫共刺激機能を示す全長4-1BBLの断片または一部分を含むポリペプチド(例えば、4-1BBLの細胞外ドメインまたは全長4-1BBLタンパク質)を意味する。一実施形態では、免疫共刺激ポリペプチドは免疫共刺激分子の膜貫通ドメインを含まない。一実施形態では、免疫共刺激ポリペプチドは、免疫共刺激分子の細胞外ドメイン、またはその受容体結合断片を含む。

30

## 【 0 0 5 0 】

代表的な核酸配列およびコード免疫共刺激ポリペプチドの例として、以下のGenBank登録番号で示されるものが挙げられる: AB029155(マウスLIGHT); NM\_172014(ヒトTNFSF14 mRNA転写産物変異体2); NM\_003807(ヒトTNFSF14 mRNA転写産物変異体1); NM\_005191(ヒトCD80 mRNA); NM\_009855(マウスCD80 mRNA); NM\_214087 イノシシ(*Sus scrofa*) CD80 mRNA); NM\_009404(マウスTnfsf9 mRNA); NM\_003811(ヒトTNFSF9 mRNA); NM\_181384(ドブネズミ(*Rattus norvegicus*) Tnfsf9 mRNA); BAA88559(マウスLIGHTタンパク質); Q9QYH9(マウスTNFSF14 膜結合タンパク質および可溶性タンパク質); AAH18058(ヒトTNFSF14タンパク質); NP\_005182(ヒトCD80タンパク質); NP\_033985(マウスCD80タンパク質); NP\_037058(ドブネズミCD80タンパク質); NP\_003802(ヒトTNFSF9タンパク質); NP\_033430(マウスTNFSF9タンパク質); NP\_852049(ドブネズミTNFSF9タンパク質); NM\_012967(ドブネズミICAM-1 mRNA); X69711(ヒトICAM-1 mRNA); X52264(マウスICAM-1 mRNA); X69819(ヒトICAM-3 mRNA); AF296283(マウスICAM-4 mRNA); NM\_021181(ヒトSLAMF7 mRNA); NM\_033438(ヒトSLAMF9 mRNA); NM\_029612(マウスSLAMF9 mRNA); NM\_144539(マウスSLAMF7 mRNA); L13944(マウスCD18遺伝子); X53586(ヒトインテグリン $\alpha$ 6 mRNA); X68742(ヒトインテグリン $\alpha$ 6 mRNA); J04145(ヒト好中球接着受容体 $\alpha$ -MサブユニットmRNA); AJ246000(ヒト白血球接着受容体、L-セレクチンmRNA); AY367061(ヒトL-セレクチンmRNA、部分cds); Y13636(マウスCD70 mRNA); NM\_001252(ヒトTNFSF7 mRNA); BC000725(ヒトTNFSF7 mRNA(cDNAクローンMGC: 1597

40

50

IMAGE:3506629)、完全cds); X69397(ヒトCD24遺伝子および完全CDS); NM\_013230(ヒトCD24 mRNA); NM\_012752(ドブネズミCD24 mRNA); Y00137(マウス主要壊死因子(リンホトキシン)遺伝子); X02911(ヒト腫瘍壊死因子(リンホトキシン)遺伝子); D00102(ヒトリンホトキシンmRNA、完全CDS); X01393(ヒトリンホトキシンmRNA); ならびにA06316((ヒトリンホトキシンmRNA)。同じまたは別の免疫共刺激ポリペプチドをコードする他の核酸配列および/または共刺激ポリペプチドのアミノ酸配列は、例えば、一般に利用可能なGenBankデータベース(例えば、World Wide Web(ncbi.nlm.nih.gov)上で利用可能)を検索することにより、見出すことができる。

#### 【0051】

CD28とCD80/CD86間の相互作用は、シグナル2の伝達に重要な役割を果たすようである。例えば、HardingおよびAllison, J. Exp. Med. 1993, 177: 1791-96; Ramarathinamら、J. Exp. Med. 1994, 179: 1205-14; TownsendおよびAllison, Science 1993, 259: 368-70; Gauseら、J. Immunol. 1997, 159: 1055-58を参照されたい。CD80は通常、休止B細胞には発現されず、末梢血液単球およびDCに低いレベルで発現されるが、これら両細胞、ならびにマクロファージおよびその他のAPCは、活性化後にCD80の発現をアップレギュレートする。例えば、Lenschowら、Ann. Rev. Immunol. 1996, 14: 233-58; Freemanら、J. Immunol 1989, 143:2714-22を参照されたい。対照的に、CD86は、末梢血液単球およびDCに構成的に発現され、B細胞でより迅速にアップレギュレートされる。例えば、Lenschowら(前掲)、Inabaら、J. Exp. Med. 1994, 180: 1849-60を参照されたい。APC上のMHC/ペプチド複合体とのTCR相互作用により、CD28とCD80/86分子との同時結合が可能になり、これによって脂質キナーゼホスファチジルイノシトール3-キナーゼのチロシンリン酸化が起こり、次にはこれが一連の複雑な細胞内事象を開始し、その結果、II-2遺伝子発現、細胞増殖、およびエフェクター機能への分化が誘導される。例えば、Slavikら、Immunol. Res. 1999, 19: 1-24; Azumaら、Nature 1993, 366: 76-79; Allison & Krummel, Science 1995, 270: 932-33を参照されたい。

#### 【0052】

シグナル2は、抗アポトーシス遺伝子(例えば、Bcl-xL)の調節により細胞死を阻止することにより、生産的免疫応答をさらに高めうる。例えば、Radvanyiら、J. Immunol. 1996, 156: 1788-98; Boiseら、Immunity 1995, 3: 87-98; BoiseおよびThompson, Science 1996, 274: 67-68を参照されたい。免疫活性化の初期段階の後、多数の別の受容体-リガンド対がT細胞およびAPCの表面でアップレギュレートされる。これらの「二次」受容体/リガンド対(例えば、4-1BBL/4-1BB)は、初期活性化後事象の維持、免疫ホメオスタシス、および免疫記憶の発生に重要な役割を果たす。例えば、Yuら、Nat. Immunol. 2004, 5: 141-49; Armitageら、Nature 1992, 357: 80-82; Zhaiら、J. Clin. Invest. 1998, 102: 1142-51; Bourgeoisら、Science 2002, 297: 2060-63; Kikuchiら、Nat. Med. 2000, 6: 1154-59を参照されたい。

#### 【0053】

##### 1. 4-1BBL

本発明の具体的な一実施形態では、免疫共刺激ポリペプチドは4-1BBLポリペプチドである。4-1BBL(4-BB-L、4-BBリガンド、TNFSF9、ILAリガンドとしても知られる)は、活性化から2~3日後、活性化B細胞、マクロファージ、およびDC上に発現されるII型タンパク質である。例えば、Aldersonら、Eur. J. Immunol. 1994, 24: 2219-27; Goodwinら、Eur. J. Immunol. 1993, 23: 2631-41; Pollokら、Eur. J. Immunol. 1994, 24: 367-74; DeBenedetteら、J. Immunol. 1997, 158: 551-59を参照されたい。その受容体である4-1BB(CD137)は、活性化CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞、ナチュラルキラー細胞、単球および休止DCの表面に発現される。例えば、Pollock(前掲); Wilcoxら、J. Immunol. 2002, 169: 4230-36; Futagawaら、Int. Immunol. 2002, 14: 275-86; Pollokら、J. Immunol. 1993, 150: 771-81を参照されたい。

#### 【0054】

4-1BB/4-1BBL相互作用はまた、CD28非依存的様式で、CD8<sup>+</sup>T細胞にシグナル2を伝達

し、該細胞を刺激してサイトカインを産生させ、増殖させて、エフェクター機能を獲得させる。例えば、Cannonsら、*J. Immunol.* 2001, 167: 1313-24 ;Hurtadoら、*J. Immunol.* 1995, 155: 3360-67. Kim & Broxmeyer, *J. Hematother. Stem Cell Res.* 2001, 10: 441-49 ;Saoulliら、*J. Exp. Med.* 1998, 187: 1849-62 ;Shufordら、*J. Exp. Med.* 1997, 186:47-55 ;Tanら、*J. Immunol.* 1999, 163: 4859-68 ;Vinay & Kwon, *Semin. Immunol.* 1998, 10: 481-89を参照されたい。また、4-1BB / 4-1BBL相互作用は、単球およびDCの活性化、サイトカインの合成、ならびにNK細胞との連絡にも重要である。例えば、Futagawaら（前掲）；Wilcoxら、*J Clin. Invest* 2002, 109: 651-9を参照のこと。同様に、サイクリンD2およびEのアップレギュレーションと、サイクリン依存性キナーゼインヒビター-p27kip1のダウンレギュレーションとによる抗原特異的T細胞の増殖を促進する上でのその役割以外に、4-1BBシグナル伝達は、抗アポトーシスBcl-xLおよびBcl-2のアップレギュレーションならびに長期免疫記憶の確立により、活性化誘導細胞死を阻止することから、T細胞生存にも一定の役割を果たす。例えば、Takahashiら、*J. Immunol.* 1999, 162: 5037-40 ;Hurtadoら、*J. Immunol.* 1997, 158: 2600-09 ;Kimら、*Eur. J. Immunol.* 1998, 28: 881-90を参照されたい。4-1BB / 4-1BBL相互作用はまた、1型サイトカイン、例えば、IL-2、IFN- $\gamma$ 、およびTNF- $\alpha$  を選択的に促進することもわかっており、これは、4-1BBが、1型エフェクターT細胞に特異的な共刺激分子（これは腫瘍根絶に一定の役割を果たす）でありうることを示唆している。

10

## 【 0 0 5 5 】

近年、 $T_{reg}$ 細胞が構成的に4-1BB受容体を発現し、4-1BB受容体を介したシグナル伝達がこれら細胞の抑制機能を阻害することがわかっている。例えば、Choiら（前掲）；Morrisら（前掲）、及び下記実施例を参照されたい。 $T_{reg}$ 細胞は免疫系の腫瘍回避に重要な役割を果たすため、これは重要である。複数の臨床実験により、 $T_{reg}$ 細胞数と腫瘍進行との間に直接相関が存在することが証明された。Curielら、*Nat. Med.* 2004, 10:942-49。実際、動物モデルで $T_{reg}$ 細胞を根絶すると、大きな腫瘍が根絶され、これによって腫瘍進行におけるその主要な役割についての直接的な証拠が得られた。Yuら、*J. Exp. Med.* 2005, 201: 779-91。同様に、HIVのような感染因子も免疫回避に $T_{reg}$ 細胞を用いると考えられる。

20

## 【 0 0 5 6 】

特定の理論に束縛されるわけではないが、本発明の免疫共刺激ポリペプチドとして4-1BBLを使用すると、T細胞上の4-1BBコグネイト（cognate）受容体を活性化し、これによって、複数の重要な免疫刺激作用がもたらされると考えられる。このような作用の1つとして、CD28非依存的様式でのCD8<sup>+</sup>T細胞へのシグナル2の伝達が挙げられ、これはT細胞を刺激して、サイトカインを産生させ、増殖させて、エフェクター機能を獲得させる。4-1BB / 4-1BBL相互作用の別の作用は、サイトカインの合成および放出を引き起こす単球およびDCの活性化であり得る。4-1BBシグナル伝達のさらに別の作用は、活性化誘導細胞死（AICD）を阻止することによるT細胞生存の促進および長期免疫記憶の確立であり得る。4-1BB / 4-1BBL相互作用のさらに別の作用は、腫瘍根絶に重要な1型エフェクターT細胞に作用する、T細胞、DCおよびマクロファージからの1型サイトカイン、例えば、IL-2、IL-12、IFN- $\gamma$ 、およびTNF- $\alpha$  の選択的産生であり得る。また、すでに説明したように、4-1BB / 4-1BBL相互作用は、 $T_{reg}$ 細胞のサプレッサー機能を阻害すると考えられる。従って、例えば、4-1BBL - 抗原コグネイトは、4-1BB受容体を発現するDCに特異的に結合し、抗原提示を促進し、DCを活性化して一次T細胞応答を生じさせ、活性化T細胞（ $T_{reg}$ 細胞など）およびNK細胞に直接作用して抗原に対するそれらの応答を増強させ、 $T_{reg}$ 細胞の抑制機能を阻害すると考えられる。

30

40

## 【 0 0 5 7 】

4-1BBLは254個のアミノ酸（26624 Da）を含む。Aldersonら、*Eur J Immunol.* 1994 Sep ;24(9):2219-27を参照。ヒト4-1BBLの全アミノ酸配列は、Swiss-Protデータベースにおいて登録番号P41273で見いだすことができる。4-1BBLは、潜在的細胞質ドメインを形成する残基1~28と、単一の推定膜貫通ドメインを形成する残基29~49と、潜在的細胞外ドメイ

50

ンを形成する残基50～254と、ポリ-Leuストレッチを呈示する残基35～41とを含むII型糖タンパク質である。4-1BBLをコードするヒトヌクレオチド配列は、GenBank登録番号NM\_03811に見いだすことができる。

【0058】

前述のように、4-1BBLは、活性化から2～3日後、活性化抗原提示細胞（例えば、活性化B細胞、マクロファージ、およびDCなど）により発現される。4-1BBLの受容体である4-1BBLは、活性化CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞の表面、ナチュラルキラー細胞、単球および休止DC上に発現される。4-1BBLのコグネイト受容体4-1BBに結合することができる4-1BBLの残基50～254またはその断片は、本発明で使用する結合対メンバーとの融合物として結合または発現させることができる。例えば、図3AおよびBは、CSAマウス4-1BBL融合タンパク質のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す（配列番号5および6）。図4AおよびBは、ヒト4-1BBLの細胞外ドメインとコアストレプトアビジンとを含む融合タンパク質のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す（配列番号7および8）。

10

【0059】

2. CD80およびCD86

CD80（B7.1、CD28LG、LAB7としても知られる）とCD86（B7.2、CD28LG2、LAB72としても知られる）は共刺激ポリペプチドの例であり、いずれも、T細胞が発現したCD28/CTLA4共受容体に結合する。CD80は288個のアミノ酸（33048 Da）を含む。Freemanら、J. Immunol. 143（8）、2714-2722（1989）を参照。ヒトCD80の全アミノ酸配列は、Swiss-Protデータベースにおいて登録番号P33681で見いだすことができる。CD80は、分泌シグナルを形成する残基1～34と、潜在的細胞外ドメインを形成する残基35～242と、潜在的膜貫通ドメインを形成する残基243～263と、潜在的細胞質ドメインを形成する残基264～288とを含むI型糖タンパク質である。従って、その分泌シグナル配列を含まない成熟CD80分子は、アミノ酸35～288を呈示する。CD80をコードするヒトヌクレオチド配列は、GenBank登録番号NM\_005191に見いだすことができる。

20

【0060】

CD80のコグネイト受容体CD28に結合することができるCD80の残基35～242またはその断片は、本発明で使用する結合対メンバーとの融合物として結合または発現させることができる。例えば、図2Aおよび2Bは、ヒトCD80（B7.1）の細胞外ドメインとコアストレプトアビジンとを含む融合タンパク質のヌクレオチド（配列番号3）およびアミノ酸配列（配列番号4）を示す。

30

【0061】

CD86（B7.2）は329個のアミノ酸（37696 Da）を含む。Freemanら、Science 262（5135）、909-911（1993）を参照。ヒトCD86の全アミノ酸配列は、Swiss-Protデータベースにおいて登録番号P42081で見いだすことができる。CD86は、分泌シグナルを形成する残基1～23と、潜在的細胞外ドメインを形成する残基24～247と、潜在的膜貫通ドメインを形成する残基248～268と、潜在的細胞質ドメインを形成する残基269～329とを含むI型糖タンパク質である。従って、その分泌シグナル配列を含まない成熟CD86分子は、アミノ酸24～329を呈示する。CD80をコードするヒトヌクレオチド配列は、GenBank登録番号NM\_175862に見いだすことができる。

40

【0062】

CD86のコグネイト受容体CD28に結合することができるCD86の残基24～247またはその断片は、本発明で使用する結合対メンバーとの融合物として結合または発現させることができる。例えば、図5Aおよび5Bは、ヒトCD86（B7.2）の細胞外ドメインとコアストレプトアビジンとを含む融合タンパク質のヌクレオチド（配列番号9）およびアミノ酸（配列番号10）配列を示す。

【0063】

CD86は通常、休止B細胞には発現されず、末梢血液単球（PBC）およびDCに低いレベルで発現される。しかし、その発現は、活性化後、B細胞、ならびにマクロファージおよびDCのようなその他のAPCでアップレギュレートされる。対照的に、CD86は、PBCおよびDCに

50

構成的に発現され、B細胞ではより迅速にアップレギュレートされる。APC上のMHC/ペプチド複合体とのT細胞受容体(TCR)相互作用により、T細胞上のCD28とCD80/86との同時結合が可能になり、これによって脂質キナーゼホスファチジルイノシトール3-キナーゼのチロシンリン酸化が起こり、次にはこれが一連の細胞内事象を開始し、その結果、11-2遺伝子発現、細胞増殖、およびエフェクター機能への分化が誘導される。シグナル2は、抗アポトーシス遺伝子(例えば、Bcl-xL)の調節を通じた細胞死の阻止により、生産的免疫応答をさらに高めることができる。

【0064】

### 3. LIGHT

免疫活性化の初期段階後、「二次」受容体/リガンド対、例えば、4-1BBL/4-1BB(前述)およびLIGHT/HVEMはT細胞およびAPCの表面でアップレギュレートされることになる。これらの受容体/リガンド対は、初期活性化後事象の維持、免疫ホメオスタシス、および免疫記憶の発生に参与している。

【0065】

LIGHTポリペプチド(TNFS14、HVEM-L、LTg、TR2としても知られる)は、リンホトキシンと相同のTNFスーパーファミリーメンバーである。Mauriら、Immunity 8(1)、21-30(1998)を参照。ヒトLIGHTの全アミノ酸配列は、Swiss-Protデータベースにおいて登録番号043557で見いだすことができる。LIGHTは240個のアミノ酸(26351 Da)を含み、潜在的細胞質ドメインを形成する残基1~37と、単一の推定膜貫通ドメインを形成する残基38~58と、潜在的細胞外ドメインを形成する残基59~240とを含むII型糖タンパク質である。切断部位は残基82~83を含む。LIGHTをコードするヒトヌクレオチド配列は、GenBank登録番号NM\_172014に見いだすことができる。

【0066】

LIGHTのコグネイト受容体HVEM、LT RもしくはTR6に結合することができるLIGHTの残基59~240またはその断片は、本発明で使用する結合対メンバーとの融合物として結合または発現させることができる。例えば、図1Aおよび1Bは、コアストレプトアビジンとマウスLIGHTの細胞外ドメインとを含む融合物のヌクレオチド配列(配列番号1)およびアミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【0067】

LIGHTは主として活性化T細胞、NK細胞、および未成熟樹状細胞に発現され、免疫応答の様々な側面を調節する働きをする。LIGHTは、膜結合タンパク質として合成されるが、その細胞表面発現はいくつかの翻訳後機構により調節される。LIGHTはその発現から数分以内にマトリックスメタロプロテイナーゼにより細胞表面から切断され、可溶性分子として蓄積する(イソ型1;概して残基83~240を呈示する;Swiss-Prot 043557-1)。細胞表面細胞質セグメントはイソ型2(Swiss-Prot 043557-2)を呈示する。加えて、様々な細胞型が小胞にLIGHTを貯蔵し、多様な生理学的刺激による活性化の際にそれらを分泌する。LIGHTの可溶性形態の役割は十分に明らかにされていないが、負のフィードバックループとして働き、HVEMおよびLT Rについての競合により膜結合形態の機能を阻害すると考えられる。

【0068】

LIGHTは、異なる3つの受容体:(1)T細胞上のヘルペスウイルス侵入仲介因子(HVEM)、(2)主として上皮および間質細胞に発現されるLT R、および(3)様々な細胞上の可溶性おとり受容体3と相互作用する。これら相互作用は、LIGHTに様々な機能を賦与する。間質細胞上のLT Rとの相互作用は、各種サイトカイン/ケモカインの産生、リンパ節(LN)器官形成、および二次リンパ系構造の回復に関連する。これに対し、リンパ球上のHVEM受容体とLIGHTとの相互作用により、サイトカインの活性化および産生が起こるが、IFN- およびGM-CSFが優勢となる。これに関して、LIGHT/HVEM軸(axis)は、腫瘍根絶に重要な役割を果たすTh1型応答の活性化に関連する共刺激シグナルを送達するようである。

【0069】

10

20

30

40

50

LIGHTはリンパ器官形成およびTh1型応答の発生に一定の役割を果たす。例えば、Yangら、2002, J. Biol. Regul. Homeost. Agents, 16:206-10; Schneiderら、2004, Immunol. Rev., 202:49-66を参照されたい。

#### 【 0 0 7 0 】

LIGHTの効果はin vitroおよびin vivo両方の様々な腫瘍モデルで認められている。LIGHTを発現する単純ヘルペスウイルスアンプリコンにより伝達される慢性リンパ性白血病細胞は、混合リンパ球反応においてT細胞増殖を増強すると報告されている。MDA-MB-231ヒト乳癌細胞上でのLIGHTの過剰発現は、腫瘍増殖を抑制することがわかっている。様々な癌細胞株へのLIGHTのトランスフェクションはこれら細胞におけるICAM-1発現を刺激する。ICAM-1の存在は、腫瘍細胞における抗腫瘍活性を生み出す上で有効なシグナル伝達を可能にするため、有益であると考えられる。T細胞活性化以外に、LIGHTのもう一つの重要な機能は、LT<sub>R</sub>を介してシグナルを伝達できることであり、これは、ケモカイン発現の誘導を通じて媒介される二次リンパ系構造の発生、ならびに間質細胞における接着分子の発生に重要な役割を果たす。間質細胞上のLT<sub>R</sub>とLIGHTとの相互作用はCCL21の発現を調節するが、これによって、リンパ系組織へのナイーブT細胞のホーミングが制御される。

#### 【 0 0 7 1 】

免疫共刺激ポリペプチドがLIGHTである本発明の実施形態の一利点として、LIGHTがリンパ器官形成を刺激し、Th1型応答の発生を支持することができる点が挙げられる。もう一つの利点としては、LIGHTが腫瘍に対する免疫応答を刺激し、腫瘍間質を活性化してこれらの応答をさらに増強できる点が挙げられる。

#### 【 0 0 7 2 】

間質は、腫瘍部位へのリンパ球浸潤を阻止する物理的バリアとして働く。間質はまた、腫瘍微小環境内でのリンパ球活性化も阻害する。これは、T細胞活性化に必要な共刺激シグナルの欠如および/または間質繊維芽細胞および腫瘍細胞の両方によって合成および分泌される様々な免疫阻害性可溶性媒介因子（例えば、TGF- $\beta$  およびIL-10）の存在によるものと考えられる。間質は、腫瘍細胞を腫瘍部位に閉じ込め、これによって腫瘍細胞が局所リンパ節にトラフィッキングするのを阻止することにより、免疫学的無視を促進する。

#### 【 0 0 7 3 】

腫瘍間質細胞はまた、LT<sub>R</sub>のような各種免疫受容体も発現するため、これらは、本発明に従って抗腫瘍免疫の増強に利用することができる。

#### 【 0 0 7 4 】

##### 4 . OX40L

OX40Lは、樹状細胞およびその他のAPCにより発現され、活性化T細胞上に存在するOX40に結合する。OX40Lは、183個のアミノ酸（21950 Da）を含む。Miuraら、Mol. Cell. Biol. 11:1313-1325（1991）を参照。OX40Lの全アミノ酸配列は、Swiss-Protデータベースにおいて登録番号P23510で見いだすことができる。OX40Lは、残基1～23で細胞質ドメインを、残基24～50で膜貫通ドメインを、そして残基51～183で細胞外ドメインを含むII型糖タンパク質である。OX40Lのヌクレオチド配列は3510bpであり、コード配列は157-708である（GenBank登録番号NM\_003326.2参照）。OX40Lのコグネイト受容体OX40に結合することができるOX40Lの残基51～183またはその断片は、本発明で使用する結合対メンバーとのC末端融合物として結合または発現させることができる。

#### 【 0 0 7 5 】

##### 5 . CD40L

CD40Lは、活性化T細胞により発現され、タンパク質分解プロセッシングにより膜形態から誘導される細胞外可溶性形態としても存在する。CD40L（a.k.a. TNFSF5）は、261個のアミノ酸（29350 Da）を含む。Villingerら、Immunogenetics 53:315-328（2001）を参照。CD40Lの全アミノ酸配列は、登録番号Q9BDN3で見いだすことができる。CD40Lは、残基1～22で細胞質ドメインを、残基23～43で膜貫通ドメインを、そして残基44～261で細胞外ドメインを含むII型糖タンパク質である。CD40Lのヌクレオチド配列は1834 bpであり、コード配列は73-858である（GenBank登録番号NM\_000074参照）。CD40Lのコグネイト受容体C

10

20

30

40

50

D40に結合することができるCD40Lの残基44～261またはその断片は、本発明で使用する結合対メンバーとのN末端融合物として結合または発現させることができる。

【0076】

#### 6. PD-L1

PD-L1は、活性化TおよびB細胞、樹状細胞、ケラチノサイトおよび単球上に発現される。PD-L1 (a.k.a. B7-H; B7H1; PDL1; PDCD1L1) は290個のアミノ酸 (33275 Da) を含む。Dongら、*Nat. Med.* 5: 1365-1369 (1999) を参照。PD-L1の全アミノ酸配列は、Swiss-Protデータベースにおいて登録番号Q9NZQ7で見いだすことができる。PD-L1は、290個のアミノ酸を含み、そのうちN末端の18アミノ酸がシグナル配列を呈示する。細胞外ドメインはアミノ酸19～238に位置し、膜貫通ドメインは残基239～259に位置し、細胞質ドメインは残基260～290に位置する。PD-L1 (1553 bp) のヌクレオチド配列は公開データベース (GenBank登録番号NM\_014143参照) (コード配列は53-925) で入手可能である。PD-L1のイソ型は選択的プライシングを経ることで存在する。PD-L1のコグネイト受容体PDCD1に結合することができるPD-L1の細胞外ドメインまたはその断片は、本発明で使用する結合対メンバーとのN末端融合物として結合または発現させることができる。

10

【0077】

#### 7. GL50

GL50イソ型1は広範に発現され (脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、膵臓、胎盤、骨格筋、骨髄、結腸、卵巣、前立腺、精巣、リンパ節、白血球、脾臓、胸腺および扁桃) ; GL50イソ型2 (swissprot 075144) はリンパ節、白血球および脾臓において、また、活性化単球および樹状細胞上で発現される。GL50 (a.k.a. B7-H2; B7H2; B7RP-1; B7RP1; ICOS-L; ICOSLG; KIAA0653; およびLICOS) は290個のアミノ酸 (33275 Da) を含む。Wangら、*Blood* 96:2808-2813 (2000) を参照。GL50の全アミノ酸配列は、Swiss-Protデータベースにおいて登録番号075144で見いだすことができる。GL50は、302個のアミノ酸を含み、そのうちN末端の18アミノ酸がシグナル配列を呈示する。細胞外ドメインはアミノ酸19～256に位置し、膜貫通ドメインは残基257～277に位置し、細胞質ドメインは残基278～302に位置する。GL50 (3239 bp) のヌクレオチド配列は公開データベース (GenBank登録番号NM\_015259参照) (コード領域は135-1043) で入手可能である。GL50のイソ型は選択的プライシングを経ることで存在する。GL50のコグネイト受容体ICOSに結合することができるGL50の細胞外ドメインまたはその断片は、本発明で使用する結合対メンバーとのN末端融合物として結合または発現させることができる。

20

30

【0078】

表1は様々な共刺激分子およびその受容体の例をまとめて示すものであり、共受容体リガンド対コンジュゲートの実施形態を含む。

【表 1】

構築物名および配向	受容体	受容体発現
CD80-CSA	CD28	ほぼすべてのヒト CD4 T 細胞および約 50%の CD8 T 細胞上で構成的
GL50-CSA	ICOS	休止 T 細胞上で検出可能 活性化 CD4 <sup>+</sup> T および CD8 <sup>+</sup> T 細胞および NK 細胞上でアップレギュレート
PD-L1-CSA	PD-1	CD4 <sup>+</sup> および CD8 <sup>+</sup> T 細胞、B 細胞、および単球上で誘導性 NK-T 細胞上では低レベル
CSA-CD40L	CD40	B 細胞、単球、DC、内皮および上皮細胞上で構成的
CSA-4-1BBL	CD137	活性化 T 細胞（ピーク 48h、低下 96h）ならびにサイトカイン処理 NK 細胞で誘導性 DC のサブセット（低）、ヒト単球、濾胞 DC、CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 調節性 T 細胞上で構成的。
CSA-OX40L	OX40	活性化 CD4（優先的に）および CD8（強力な抗原応答）T 細胞（ピーク 48h、低下 96h）上で誘導性
CSA-LIGHT	HVEM	休止 T 細胞、単球、および未成熟 DC で構成的 T 細胞活性化および DC 成熟時にダウンレギュレート

10

20

## 【 0 0 7 9 】

他の免疫共刺激ポリペプチドを本発明で用いてもよい。例えば、US 2003/0219419（その全内容を参照により本明細書にすべて組み込むものとする）は、本発明で有用な IL-2-  
SA融合タンパク質、および CSA-CD40L 融合タンパク質を記載している。要約すると、本発  
明において有用な免疫共刺激ポリペプチドの例として以下のものが挙げられる。

30

【表 2】

表 2：B7 および CD28 ファミリーメンバー

リガンド	受容体
CD80 (B7.1)	CD28、CTLA-4 (CD152)
CD86 (B7.2)	CD28、CTLA-4
ICOSL (B7h、B7-H2、B7RP-1、GL50、LICOS)	ICOS (AILIM)
PD-L1 (B7-H1)	PD-1
PD-L2 (B7-DC)	PD-1
B7-H3	未知
B7-H4 (B7x ; B7S1)	未知(BTLA?)
未知(HVEM*)	BTLA

40

\*これは TNF メンバーである。

## 【表 3】

表 3 : TNF ファミリーメンバー

リガンド	受容体
OX40L	OX40 (CD134)
4-1BBL	4-1BB (CD137)
CD40L (CD154)	CD40
CD27L (CD70)	CD27
CD30L	CD30
LIGHT	HVEM、LTBR、DcR3
GITRL	GITR
BAFF (BLyS) **	BAFF-R、TACI、BCMA
APRIL **	TACI、BCMA

\*\* これらはB細胞関連である。

10

## 【表 4 A】

表 4A : B7 ファミリーメンバーのヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列についての参考文献

リガンド (ヒト)	参考文献
CD80 (B7.1)	Freeman ら、J. Immunol. 143: 2714-2722(1989)
CD86 (B7.2)	Freeman ら、Science 262: 909-911(1993)
ICOSL	Wang ら、Blood 96: 2808-2813(2000) Yoshinaga ら、Int. Immunol. 12: 1439-1447(2000)
PD-L1	Dong ら、Nat. Med. 5: 1365-1369(1999) Freeman ら、J. Exp. Med. 192: 1027-1034(2000)
PD-L2	Tseng ら、J. Exp. Med. 193: 839-846(2001) Latchman ら、Nat. Immunol. 2: 261-268(2001)
B7-H3	Steinberger ら、EMBL/GenBank/DDBJ データベースに提出 (SEP-2003)。 Mingyi ら、J. Immunol 168: 6294-6297(2002)
B7-H4 (B7x; B7S1)	Zang ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100: 10388-92(2003) Sica ら、EMBL/GenBank/DDBJ データベースに提出 (APR-2003)。

20

30

40

## 【表 4 B】

表 4 B : TNF ファミリーメンバーのヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列についての参照文献

リガンド	参照文献
OX40L	Baum ら、Circ. Shock 44: 30-34(1994) Miura ら、Mol. Cell. Biol. 11: 1313-1325(1991) Godfrey ら、J. Exp. Med. 180: 757-762(1994)
4-1BBL	Alderson ら、Eur. J. Immunol. 24: 2219-2227(1994)
CD40L	Graf ら、Eur. J. Immunol. 22: 3191-3194(1992) Hollenbaugh ら、EMBO J. 11: 4313-4321(1992)
CD27L (CD70)	Goodwin ら、Cell 73: 447-456(1993)
CD30L	Smith ら、Cell 73: 1349-1360(1993)
LIGHT	Mauri ら、Immunity 8: 21-30(1998)
GITRL	Gurney ら、Curr. Biol. 9: 215-218(1999)
BLyS	Moore ら、Science 285: 260-263(1999)
APRIL	Hahne ら、J. Exp. Med. 188: 1185-1190(1998)

10

20

## 抗原および感染因子

本発明の方法および組成物は、任意の抗原または感染因子（例えば、TAA、感染因子関連抗原、および感染因子そのものなど）に対する免疫応答を生じさせるかまたは増強するのに有用である。本発明によれば、標的腫瘍もしくは感染因子に関連する抗原（または感染因子そのもの）を免疫細胞に提示することによって、免疫応答を生じさせるかまたは増強する。

## 【 0 0 8 0 】

## 1 . TAA

一実施形態では、前記抗原はTAAであり、本発明は、腫瘍に対する患者の免疫応答を生じさせるかまたは増強するのに有効な癌免疫療法を提供する。この実施形態によれば、本発明は、腫瘍サイズを縮小する方法と、腫瘍細胞の増殖を阻害する方法とを提供する。

## 【 0 0 8 1 】

本発明が有用となる代表的な腫瘍細胞として、限定するものではないが、癌が挙げられ、これは、肺、肝臓、乳房、膀胱、胃、結腸、膵臓、皮膚などの各種身体器官のいずれに由来するものであり得る。癌としては、器官または腺で発達する腺癌、扁平上皮に由来する扁平上皮癌などを挙げることができる。治療が可能なその他の癌として、以下のものが挙げられる：肉腫、例えば、骨肉種または骨原性肉腫（骨）、軟骨肉腫（軟骨）、平滑筋肉腫（平滑筋）、横紋筋肉腫（骨格筋）、中皮肉腫または中皮腫（体腔の内膜）、繊維肉腫（繊維組織）、血管肉腫または血管内皮腫（血管）、脂肪肉腫（脂肪組織）グリオーマまたは星状細胞腫（脳に存在する神経結合組織）、粘液肉腫（原始胚結合組織）、esenchymousまたは中胚葉性混合腫瘍（混合結合組織型）。これらに加え、骨髄腫、白血病、およびリンパ腫も治療可能である。

40

## 【 0 0 8 2 】

具体的な腫瘍タイプに関連する多数のTAAが確認されている。このようなものとして、以下のものが挙げられる：ヒトテロメラーゼ逆転写酵素（hTERT）、サバイピン、MAGE-1、MAGE-3、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、癌胎児抗原、フェトプロテイン、膵腫瘍胎児抗原、MUC-1、CA 125、CA 15-3、CA 19-9、CA 549、CA 195、前立腺特異抗原；前立腺特異膜抗原、Her2/neu、gp-100、突然変異K-rasタンパク質、突然変異p53、トランケート型表

50

皮成長因子受容体、キメラタンパク質<sup>P210</sup>BCR-ABL；ヒトパピローマウイルスのE7タンパク質、およびエプスタイン-バーウイルスEBNA3タンパク質。患者の抗腫瘍免疫応答を生じさせるかまたは増強するために、上記抗原、その抗原断片、抗原および/または断片の混合物のいずれを本発明に従い用いてもよい。表5に、いくつかのTAAとこのようなTAAに関連する疾患の例を挙げる。

【表5】

抗原	疾患
cTAGE-1 および変異体	皮膚T細胞リンパ腫
BLA またはグロボトリアオシルセラミド (P <sup>k</sup> 抗原)	バーキットリンパ腫
ヒトT細胞白血病ウイルス関連細胞膜抗原 (HTLV-MA)	成人T細胞白血病リンパ腫 (ATL)
胸腺細胞表面抗原 JL1	大部分の急性白血病
成人T細胞白血病関連、ヒトレトロウイルス関連抗原 (ATLA)	成人T細胞白血病
エプスタイン-バーウイルス (EBV) 抗原	バーキットリンパ腫、ホジキン病
未分化リンパ腫キナーゼ (ALK)、融合タンパク質 (NPM/ALK および変異体)	CD30+未分化大細胞リンパ腫 (ALCL)
一般的な急性リンパ芽球性白血病抗原 (CALLA)	ほとんどのリンパ芽球性白血病
免疫グロブリン Id; II型糖タンパク質 (例: HM1.24; KW-2, KW-4, KW-5, KW-12); 腫瘍胎児抗原未成熟ラミニン受容体タンパク質 (OFA-iLRP); EBV タンパク質 (例: LMP2A)	リンパ球増殖性疾患

10

20

30

## 【0083】

T細胞により認識されるその他のヒトTAAは、例えば、Novellinoら、「A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update」Cancer Immunology and Immunotherapy, 54: 187-207 (2005) (参照により本明細書に組み込まれる) 中に見いだすことができる。これら疾患の動物コレラリー (correllaries)、および他の動物疾患に対応する多数の動物TAAが当分野において周知であり、これらも本発明の範囲に含まれる。

## 【0084】

本発明の一実施形態では、TAAとして、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) およびサバイピンからなる群よりTAAを選択する。hTERTはヒト癌の85%超で発現されるが、正常組織ではその発現は制限される。例えば、Vonderheideら、Immunity 1999, 10:673-79を参照。同様に、サバイピンは、アポトーシスの阻害剤として確認されており、正常細胞には存在しないが、肺、結腸、膵臓、前立腺および乳癌など、ほとんどの種類の腫瘍で発現される。例えば、Ambrosiniら、Nat. Med. 1997, 3:917-21を参照。これらTAAは大部分の種類の癌で発現され、正常組織には稀であるが、存在しないため、本発明の癌免疫療法に使用するのに魅力的な抗原である。

40

## 【0085】

本発明の別の実施形態では、TAAは子宮頸癌に関連する。世界中で毎年約500,000人の女

50

性が子宮頸癌を発症しており、女性の癌による死亡原因の第2位となっている。子宮頸癌はヒトパピローマウイルス（HPV）による性器ウイルス感染に直接関連しており、世界規模での健康問題である。特にHPV16型は子宮頸癌のほぼ半分に認められる。性器HPV16および18型、また、これより頻度は少ないが、31、33、35、45、51および56型は、子宮頸部およびその他の肛門性器癌の病因に関与している。癌細胞に認められるHPV型は、in vitro 実験でトランスフォーミング活性を有し、ウイルストランスフォーミングタンパク質E6およびE7（「初期」タンパク質としても知られる）が子宮頸癌細胞株およびHPV関連癌に一貫して発現されている。E6およびE7は、腫瘍抑制剤であるp53および網膜芽細胞腫（Rb）にそれぞれ結合することがわかっている。HPV関連悪性トランスフォーメーションの場合、後期遺伝子（L1およびL2）といくつかの初期遺伝子（E1およびE2）は通常消失し、癌に頻繁に認められる唯一のオープンリーディングフレームとしてE6およびE7が残る。E6およびE7の発現は、p53およびRbのようなタンパク質により通常媒介される細胞増殖の調節に打ち勝ち、非制御増殖を可能にし、悪性トランスフォーメーションの可能性をもたらすと考えられる。

10

#### 【0086】

従って、本発明の一具体的実施形態によれば、TAAはE6およびE7の1以上である。本発明によるE6およびE7の使用により、複数の利点をもたらすことができる。第1に、E6およびE7がほとんどの子宮頸癌に一貫して発現されることである。第2に、ほとんどの腫瘍抗原が正常なタンパク質または突然変異した自己タンパク質に由来するのに対し、E6およびE7は完全に外来のウイルスタンパク質であり、突然変異型タンパク質より多くの抗原ペプチドまたはエピトープを保有しうることである。第3に、E6およびE7が、悪性表現型の誘導および維持に重要な役割を果たし、機能的E6およびE7がなければ、これらの細胞は腫瘍発生を停止することである。

20

#### 【0087】

様々な種（例えば、ヒト、ウシ）に由来する、及び様々なパピローマウイルス型（例えば、HPV16および18）についてのE6およびE7タンパク質のヌクレオチドおよびアミノ酸配列が当分野では周知である。例えば、<http://www.stdgen.lanl.gov/stdgen/virus/hpv/index.html>でHPV配列データベースを参照されたい。HPV16 E6、HPV16 E6変異体、およびE7のアミノ酸配列をそれぞれ図6A（配列番号11）、6B（配列番号12）および6C（配列番号13）に記載する。

30

#### 【0088】

### 2. 感染因子

本発明が有用である代表的な感染因子には、限定するものではないが、あらゆるウイルス、細菌、真菌または原生動物が含まれる。表6に感染因子の例を挙げる。

【表6】

	病原体	属	関連疾患
細菌	結核菌		結核
	炭疽菌		炭疽
	黄色ブドウ球菌		敗血症
ウイルス	アデノウイルス	マストアデノウイルス	イヌの伝染性肝炎
	アレナウイルス	アレナウイルス	リンパ球性脈絡髄膜炎
	カリチウイルス	ノロウイルス	ノーウォークウイルス感染症
	コロナウイルス	コロナウイルス	重症急性呼吸器症候群
		トロウイルス	
	フィロウイルス	マールブルグウイルス	ウイルス性出血熱
		エボラウイルス	ウイルス性出血熱
	フラビウイルス	フラビウイルス	西ナイル脳炎
		ヘパシウイルス	C型肝炎ウイルス感染症
		ペスチウイルス	ウシウイルス性下痢、古典的なブタコレラ
	ヘパドナウイルス	オルソヘパドナウイルス	肝炎
	ヘルペスウイルス	シンプレックスウイルス	口辺ヘルペス、性器ヘルペス、ウシ乳頭炎
		ワリセロウイルス	水痘、帯状ヘルペス、ウマの流産、家畜の脳炎
		サイトメガロウイルス	感染性単核細胞症
		マルディウイルス	マレック病
	オルソミクソウイルス	インフルエンザウイルスA	インフルエンザ
		インフルエンザウイルスB	インフルエンザ
パピローマウイルス	パピローマウイルス	皮膚いぼ、皮膚癌、子宮頸癌	

10

20

30

40

	病原体	属	関連疾患
	ピコルナウイルス	エンテロウイルス	ポリオ
		ライノウイルス	感冒
		アフトウイルス	口蹄疫
		肝炎ウイルス	肝炎
	ポックスウイルス	オルソポックスウイルス	牛痘、ワクシニア、痘瘡
	レオウイルス	ロタウイルス	下痢
		オルビウイルス	ブルータング病
	レトロウイルス	ガンマレトロウイルス	ネコ白血病
		デルタレトロウイルス	ウシ白血病
		レンチウイルス	ヒト免疫不全症、FIV、およびSIV
	ラブドウイルス	リッサウイルス	狂犬病
		エフェメロウイルス	ウシ流行熱
		トガウイルス	東部および西部ウマ脳炎
寄生体		マラリア原虫	マラリア
		リーシュマニア	リーシュマニア症
真菌		アスペルギルス	
		カンジダ	
		コクシジウム	
		クリプトコックス	
		ジオトリカ	
		ヒストプラズマ	
		ミクロスポリジア	
		ニューモシチス	

## 【0090】

感染因子の代表例として、ヒトおよびトリインフルエンザ、HIV、C型肝炎、結核、西  
 ナイルウイルス、クリプトコッカス性（髄膜炎）ヘルペス、クラジミア、および炭疽菌が  
 挙げられる。感染因子に関連する抗原のいずれかを本発明に用いることができる。

## 【0091】

一実施形態によれば、本発明のコンジュゲートに感染因子そのものを用いる。この実施  
 形態によれば、ウイルスのような感染因子と、結合対メンバーとを含むコンジュゲート  
 を用いる。ヒトまたはトリインフルエンザもしくはHIVのようなウイルス、またはその  
 他のウイルスなど、任意の感染因子を用いてもよい。その感染力を減弱または排除す  
 るために、感染因子を改変または弱毒化してもよい。

## 【0092】

インフルエンザを参照にして、この本発明の態様をさらに詳細に記載するが、これは説

10

20

30

40

50

明を目的にするに過ぎない。インフルエンザは、インフルエンザウイルスを原因とする感染性の疾患であり、気道に作用し、多くの場合、鼻、喉および肺における諸症状、ならびに熱、頭痛、疲労感および痛みを引き起こす。インフルエンザはまた、肺炎、気管支炎、もしくは副鼻腔および耳感染のような合併症をもたらし、または慢性症状を悪化させることもある。インフルエンザウイルスはA、BまたはC型に分類される。AおよびB型に属する系統は集団内を循環し、ヒトインフルエンザの大部分のケースに関連している。A型インフルエンザは、ヒトにおける公衆衛生問題の圧倒的大多数の原因となっている。

【0093】

A型インフルエンザウイルスは、そのタンパク質の2つ、すなわち、標的細胞へのウイルスの結合および侵入を促進するタンパク質である血球凝集素(H)、および感染細胞からの新しく形成されたウイルス粒子の放出および身体全体へのその拡散に関するタンパク質であるノイラミダーゼ(N)、の組成によってさらに細分類される。15の血球凝集素サブタイプ(H1~H15)および9のノイラミダーゼサブタイプ(N1~N9)が確認されている。ヒトにおけるインフルエンザの大発生は、3つの血球凝集素サブタイプ(H1、H2およびH3)と2つのノイラミダーゼサブタイプ(N1およびN2)に起因している。例えば、1918年のインフルエンザウイルスの血球凝集素はH1であり、そのノイラミダーゼはN1であったことから、これはH1N1サブタイプと呼ばれる。他の大発生として、1957年のH2N2サブタイプ、1968年のH3N2、ならびに近年、東南アジア、中国、そして今では、欧州および中東においてトリおよびヒトで大発生したH5N1が挙げられる。

【0094】

A型インフルエンザウイルスは、血球凝集素およびノイラミダーゼの反応性または抗原部位における突然変異または改変を含む機構によって、または1つの血球凝集素およびノイラミダーゼサブタイプが別のサブタイプで突然置換されることによって、絶えず進化する。これらの機構により、新型ウイルスサブタイプが生まれ、これによってインフルエンザウイルスが免疫系の防御を回避し、拡散することが可能になる。A型インフルエンザウイルスの抗原変異体が毎年出現し、世界保健機構により進行中のインフルエンザウイルスの国際的監視に基づいて更新されたワクチン製剤が必要になる。新型インフルエンザウイルスサブタイプ(例えば、近年ではH5N1など)が絶えず出現するこのような現象によって、さらに大規模なインフルエンザの発生が起こると予想される。あるもっともらしいパイオテロのシナリオでは、実験室由来のウイルスは、抗原改変を生じさせ、それにより確立された宿主防御を回避する大発生を生じさせるように同様に設計されるだろう。

【0095】

本発明のコンジュゲートは、短時間で作製および製造するのが容易であり、最新の衛生上の需要に基づきその抗原成分を困難なく変更および更新することができ、ウイルス機構および感染細胞を選択的に標的化し、かつ治療効果のため感染後および予防のため感染前に投与することができる、インフルエンザワクチンに用いることができる。

【0096】

このように、一実施形態によれば、インフルエンザ抗原(またはその抗原断片)を本発明のコンジュゲートの抗原成分として用いる。例えば、上記抗原は、H1およびN1の1以上(いずれも高度に免疫原性)および/または核タンパク質(NP)およびマトリックスタンパク質1(MP1)の1以上および/またはマトリックスタンパク質2(MP2)の1以上(すべて高度に保存された構造タンパク質)を含んでもよい。また、H5のような汎発流行系統由来のタンパク質を本発明の抗原として用いることもできる。特定の理論に束縛されるわけではないが、NPおよびMP2のような細胞内タンパク質は、ほとんどまたは全く分散を呈示しないことから、毎年の調節を必要とせずに、異種ウイルス感染を予防することができるため、より万能なワクチンを提供すると考えられる。例えば、NPは、A型インフルエンザ分離株間で90%超のタンパク質配列相同性を示し、優性細胞傷害性T細胞標的エピトープを含む。本発明に有用なその他のインフルエンザ抗原としては、PA、PB1およびPB2(PNAポリマーゼサブユニット)ならびにNS1およびNS2(インターフェロン応答インヒビターおよびRNP核輸出)が挙げられる。また、Brown, 2000, Biomed. Pharmacother. 54: 196-

10

20

30

40

50

209 ; Steinhauerら、2002, 36: 305-32 ; De Jongら , 2000, 40: 218-28 ; Alexander, Vet . Microbiol. 74: 3-13も参照されたい。

【 0 0 9 7 】

従って、一実施形態によれば、A型インフルエンザ血球凝集素タンパク質（またはその抗原断片）を本発明のコンジュゲートの抗原成分として用いる。現在、インフルエンザの予防は、主要成分としてHを含むインフルエンザワクチンの皮下注射により達成されている。例えば、A型インフルエンザウイルス / PuertoRico / 8 / 34 (PR8) 由来のH1 (H1N1) が主に流通しているHタンパク質であり、十分に特性決定されており、本発明で用いることができる。別の実施形態では、A型インフルエンザノイラミダーゼタンパク質（またはその抗原断片）をコンジュゲートの抗原成分として用いる。Hタンパク質含有コンジュゲートまたはNタンパク質含有コンジュゲートのいずれかを含む組成物はインフルエンザに対するワクチンとして有用である（例えば、現行のインフルエンザワクチンは、主要成分としてHタンパク質を含み、同種のウイルスの流行を予防するのに十分な免疫を誘導することがわかっている）。あるいは、Hタンパク質を含むコンジュゲートとNタンパク質を含むコンジュゲートの両方、または抗原の任意の組合せ（例えば、可変および保存抗原の組合せ）を投与するのも有利であると考えられる。これは、各々が単一抗原含有コンジュゲートを含む2種以上の組成物を投与することによって、または単一の組成物として2種以上のコンジュゲート（従って、2種以上の抗原）を提供することにより、実施することができる。一実施形態では、コンジュゲートの抗原成分は、最新の公衆衛生上の需要に基づいて選択する。

【 0 0 9 8 】

一実施形態では、コンジュゲートは、免疫共刺激ポリペプチドとして4-1BBLを含む。特定の理論に束縛されるわけではないが、このコンジュゲートは、in vivoで患者に投与すると、4-1BBLとDC上の4-1BB受容体との間の相互作用によりDCに結合するため、ワクチンの内在化、DCの表面へのインフルエンザ抗原の提示、ならびにDCの活性化および成熟をもたらすと考えられる。次には、DCの活性化が、CD8およびCD4 T細胞との相互作用およびこれら細胞の活性化をもたらさう。続いて、活性化CD4 T細胞がB細胞と相互作用し、それらを活性化して抗体分泌細胞に分化させ、液性応答をもたらすことができる。また、CD8 T細胞の活性化も、さらに多くのCD8 T細胞の分化および増殖をもたらすことができ、該細胞はウイルス感染細胞を死滅させる機能を果たす。上記コンジュゲートはまた、4-1BB受容体を発現する活性化CD8およびCD4 T細胞に直接結合し、さらにシグナルを増幅させることもできる。加えて、上記コンジュゲートは（4-1BBLを介して）活性化ナチュラルキラー（NK）細胞に直接結合することもでき、該細胞もウイルス感染細胞を死滅させるように機能し、このすべてによってさらに強力な免疫応答が得られる。従って、上記コンジュゲートは、治療および予防ワクチンにおいてその効果を支持する細胞性および液性応答の両方を生じさせる。

【 0 0 9 9 】

他の感染因子に対するワクチンとして有用なコンジュゲートの抗原成分は、感染因子に関連する抗原に基づき、同様にして当業者が選択することができる。例えば、HIV関連抗原として、以下のものが挙げられる：HIVエンベロープgp120エピトープ（例えば、V3のような可変ループ）、またはその他のHIVタンパク質、例えば、Gagタンパク質（Pr55<sup>gag</sup>、マトリックスポ17、キャプシドp24、ヌクレオキャプシドp7）、p5；Pol（ポリメラーゼ）、Vif（ウイルス感染性因子p23）；Vpr（ウイルスタンパク質R p15）；Rev（ウイルス遺伝子発現の調節因子p19）；Vpu（ウイルスタンパク質U）；Env（gp 160、gp120、gp41）；Tat（転写活性化因子p14）；およびNef（負のエフェクターp24）。例えば、Peters, 201, Vaccine 2: 688-705；Michael, 2003, Clin. Med. 3: 269-72；Gandhi & Walker, 2002, Ann. Rev. Med. 53: 149-72；Haseltine, 1991, FASEB 5: 2349-60を参照されたい。ワクチンに有用なその他の抗原として、b型インフルエンザ（Haemophilus influenzae type b）の莢膜多糖、髄膜炎菌（Neisseria meningitidis）の莢膜多糖、肺炎レンサ球菌（Streptococcus pneumoniae）の莢膜多糖、B型肝炎の表面抗原、ならびにジフテリアの不活

性化外毒素および破傷風毒素などが挙げられる。これらの抗原は、インフルエンザ抗原に関して前述したように、本発明に従って用いることができる。

#### 【0100】

##### 結合対

結合対の例としてビオチンおよびストレプトアビジン (SA) またはアビジンが挙げられる。また、ビオチンに対する実質的な結合活性 (例えば、それぞれ天然SAまたはアビジンの結合親和性の少なくとも50%またはそれ以上) を保持するSAまたはアビジン断片を用いてもよい。このような断片として、「コアストレプトアビジン (CSA)」、すなわち、全長ストレプトアビジンポリペプチドのトランケート型があり、これはストレプトアビジン残基13~138、14~138、13~139及び14~139を含みうる。例えば、Pahlerら、*J. Biol. Chem.* 1987, 262:13933-37を参照。ビオチンとの強力な結合を保持するストレプトアビジンおよびアビジンの他のトランケート型を用いてもよい。例えば、Sanoら、*J Biol Chem.* 1995 Nov 24, 270(47): 28204-09 (コアストレプトアビジン変異体16~133および14-138を記載) (米国特許第6,022,951号) を参照されたい。また、実質的なビオチン結合活性または増大したビオチン結合活性を保持するストレプトアビジンの突然変異体およびストレプトアビジンのコア形態を用いてもよい。Chilcotiら、*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Feb 28;92(5):1754-8; Reznikら、*Nat Biotechnol.* 1996 Aug;14(8):1007-11を参照されたい。例えば、免疫原性が低減した突然変異体、例えば、潜在的T細胞エピトープまたはリンパ球エピトープを除去する部位指定突然変異により突然変異させた突然変異体を用いることができる。Meyerら、*Protein Sci.* 2001 10: 491-503を参照。同様に、実質的なビオチン結合活性または増大したビオチン結合活性を保持するアビジンの突然変異体およびアビジンのコア形態を用いてもよい。Hillerら、*J. Biochem.* (1991) 278: 573-85; Livnahら、*Proc Natl Acad Sci USA* (0: 5076-80) (1993)。便宜上、本記載において、本明細書で用いる用語「アビジン」および「ストレプトアビジン」は、ビオチン結合断片、これら結合対メンバーの突然変異体およびコア形態を包含することを意図する。アビジンおよびストレプトアビジンは商業的供給者から入手することができる。さらに、ストレプトアビジンおよびアビジンをコードする核酸配列ならびにストレプトアビジンおよびアビジンのアミノ酸配列は、例えば、GenBank登録番号X65082; X03591; NM\_205320; X05343; Z21611; およびZ21554に見いだすことができる。

#### 【0101】

本明細書で用いる用語「ビオチン」とは、表面、例えば、細胞表面 (腫瘍細胞表面など) に結合することができるビオチン含有部分、例えば、NHS - ビオチンおよびEZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) などを含む。このようなビオチンのタンパク質反応性形態は市販されている。

#### 【0102】

ビオチンとその結合パートナー、アビジンまたはストレプトアビジンとの相互作用により、本発明に関して複数の利点をもたらされる。例えば、ビオチンは、ストレプトアビジン ( $10^{13}M^{-1}$ ) およびアビジン ( $10^{15}M^{-1}$ ) の両方に対して極めて高い親和性を有する。加えて、ストレプトアビジンおよびアビジンはいずれも、各々が4分子のビオチンに結合する四量体ポリペプチドである。従って、ストレプトアビジンまたはアビジンを含む免疫共刺激部分は四量体およびさらに高次の構造を形成する傾向がある。その結果、これらは、対応する免疫細胞受容体に架橋して、例えば、受容体の凝集により、さらに強力なシグナル伝達を達成することができる。

#### 【0103】

当業者は、他の機構 (例: 例えば、他の結合部分または化学もしくは遺伝的架橋を用いる他のコンジュゲート方法) を用いて、さらに高次構造の免疫共刺激分子、例えば、二量体、三量体、四量体およびさらに高次の多量体の免疫共刺激分子を含むコンジュゲートを提供することができ、これらも有利な特性を呈示する。このようなコンジュゲートも本発明の範囲に含まれる。

#### 【0104】

## コンジュゲート

免疫共刺激ポリペプチド、抗原または感染因子および結合対のメンバーを含むコンジュゲートは、当該分野で周知の方法により作製することができる。例えば、ポリペプチド/抗原/感染因子および結合対メンバーを互いに共有結合させる、あるいは、これらを直接またはリンカーを介して互いにコンジュゲートさせることができる。一実施形態によれば、ポリペプチド/抗原/感染因子および結合対メンバーは、融合タンパク質の成分である。当該分野で周知の多数の異なる方法のいずれかにより融合タンパク質を製造することができる。例えば、融合タンパク質の1以上の成分ポリペプチドを化学的に合成する、または周知の組換え核酸技術を用いて作製することができる(本明細書で用いる「核酸」とはRNAまたはDNAを指す)。本発明において有用な核酸配列は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて取得することができる。様々なPCR方法、例えば、PCR Primer: A Laboratory Manual, Dieffenbach 7 Dveksler編、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995に記載されている。

10

### 【0105】

一実施形態によれば、免疫共刺激ポリペプチドは、そのC末端を介して結合対メンバーのN末端に結合する。例えば、免疫共刺激ポリペプチドは、そのC末端を介してコアストレプトアビジン(CSA)のN末端に結合する。従って、本発明は、CD80部分はそのC末端を介してCSAのN末端に結合する場合に、CD80-CSA融合タンパク質を含む。別の実施形態によれば、免疫共刺激ポリペプチドは、そのN末端を介して結合対メンバーのC末端に結合する。例えば、免疫共刺激ポリペプチドは、そのN末端を介してCSAのC末端に結合することができる。例えば、本発明は、CSA部分はそのC末端を介して免疫共刺激ポリペプチドのN末端に結合する場合に、CSA-4-1BBL、CSA-LIGHT、CSA-CD40L、およびCSA-OX40L融合タンパク質を含む。免疫共刺激ポリペプチドは、結合対メンバーに直接結合してもよいし、また、1以上の結合部分(例えば、1以上の結合ポリペプチドなど)を介して結合してもよい。

20

### 【0106】

一実施形態によれば、免疫共刺激ポリペプチド、抗原または感染因子をビオチン化する。ビオチン化コンジュゲートは、当該分野で周知の方法により作製ことができ、以下の実施例で例示する。

### 【0107】

例えば、Avidity, Inc. (コロラド州デンバー)のBiotin AviTag技術を用いて、ビオチン化タンパク質または感染因子を作製することができる。Biotin AviTagは、ビオチンリガーゼであるBirA(ペプチド配列内のリシン残基にビオチンを結合させる)により認識される固有のユニークな15アミノ酸ペプチドからなる。Schatz, 1993, Biotechnology, 11: 1138-43。目的とする任意のタンパク質にBiotin AviTagを遺伝子的に融合させ、該タンパク質をビオチン分子でタグ付けすることもできる。

30

### 【0108】

Biotin AviTag技術に関して考えられる欠点の1つは、この系はタグ領域における単一のユニークなリシン残基でタンパク質をビオチン化するため、ビオチン化の程度が低くなりうることである。このような問題を解決するため、精製ビオチンリガーゼを用いて、精製済のタグ付きタンパク質をin vitroで改変することができる。ビオチン化は酵素的に実施されるため、反応条件はより穏やかであり、標識は高度に特異的で、その反応は、ビオチン誘導体を用いたタンパク質の化学的改変より効率的である。あるいは、Jordanら、2003, Clin. Diag. Lab. Immunol. 10: 339-44に記載される方法を用いて、遺伝子的に操作したビオチン化タンパク質を生産することができる。

40

### 【0109】

免疫共刺激ポリペプチド、結合対メンバー、抗原、または感染因子の断片は、該断片が、各全長部分の活性を保持する限り、本発明において有用である。従って、例えば、免疫共刺激断片はその免疫共刺激活性を保持(例えば、その受容体またはリガンドに結合する能力を保持)し、結合メンバー断片はその結合パートナーに結合する能力を保持し、

50

そして抗原または感染因子断片は各全長抗原または感染因子に対して免疫応答を誘導する能力を保持しなければならない。断片は、当分野で慣用の方法により、保持された活性についてスクリーニングすることができる。免疫共刺激ポリペプチドの断片の例については前文に記載している。

#### 【0110】

コンジュゲートは、結合対メンバーと免疫共刺激ポリペプチド、抗原、または感染因子との間にペプチドリンカーのようなリンカーを含んでもよい。リンカーの長さおよび組成は、コンジュゲート（例えば、共刺激ポリペプチド/抗原、感染因子または結合対メンバー）の片方または両方の機能的末端の活性を増強するように選択することができる。リンカーは、一般に約3～約15アミノ酸長、さらに好ましくは約5～約10アミノ酸長であるが、これより長いまたは短いリンカーを用いてもよいし、あるいは、リンカーを一切用いなくてもよい。これに関して、一本鎖抗体の重鎖と軽鎖とを結合させるのに用いられているようなフレキシブルリンカー（例：(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>）を用いてもよい。Hustonら、(1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883；米国特許第5,091,513号、第5,132,405号、第4,956,778号；第5,258,498号、および第5,482,858号を参照されたい。他のリンカーとしてFENDAQPKSまたはLQNDAQPKSがある。また、免疫グロブリンFc領域の1以上のドメイン（例えば、CH1、CH2および/またはCH3）をリンカーとして用いてもよい。化学的リンカーを用いてもよい。

10

#### 【0111】

また、改変、変更、もしくは突然変異した核酸およびポリペプチドも、それらが各核酸またはポリペプチドの活性を保持している限り、本発明において有用である。例えば、本発明での使用に好適な核酸およびポリペプチド配列は、各核酸またはポリペプチド、すなわち、既知の免疫共刺激ポリペプチドまたは結合対メンバーをコードする核酸に対し、少なくとも約80%の配列同一性（少なくとも80%の配列同一性を含む）を有することができる。いくつかの実施形態では、核酸配列またはポリペプチドは、各核酸またはポリペプチドに対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有する。

20

#### 【0112】

本発明は、同一のアミノ酸をコードする点で「サイレント」である塩基変更を有する核酸（すなわち、縮重核酸配列）を包含する。本発明はまた、保存的アミノ酸置換を含むポリペプチドをコードする核酸、およびそのようなポリペプチドも包含する。保存的アミノ酸置換（例えば、1個の疎水性残基を異なる疎水性残基で置換する）は当分野において周知であり、例えば、点突然変異などにより実施することができる。所与の改変配列、変異体または突然変異体の適切さについては、当分野で周知の受容体結合および/または生物学的スクリーニング方法、例えば、断片に関して前述したものなどを用いて、確認することができる。

30

#### 【0113】

本明細書で用いる「配列同一性%」は、アライメントした核酸またはポリペプチド配列において一致する位置の数を決定し、それぞれアライメントしたヌクレオチドまたはアミノ酸の総数で一致位置数を割った後、100を掛けることにより算出する。一致位置とは、アライメントした配列の同じ位置に同一のヌクレオチドまたはアミノ酸が存在する位置を意味する。アライメントしたヌクレオチドまたはアミノ酸の総数とは、第2配列をアライメントするのに必要なヌクレオチドまたはアミノ酸の最小数を意味し、これは、非相同配列、例えば、目的とする配列のN末端またはC末端で融合できる配列（すなわち、免疫共刺激ポリペプチドまたは結合対メンバーをコードする配列）とのアライメント（例えば、強制アライメント）は含まない。アライメントしたヌクレオチドまたはアミノ酸の総数は、全コード配列に対応してもよいし、または本明細書に定義する全長配列の断片に対応してもよい。

40

#### 【0114】

World Wide Web (ncbi.nlm.nih.gov) 上で入手可能な、BLAST (basic local alignment

50

search tool) プログラムに組み込まれているAltschulら(1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402)により記載されたアルゴリズムを用いて、配列をアライメントすることができる。BLAST検索又はアライメントは、Altschulアルゴリズムを用いて、核酸分子(「クエリ配列」とその他の任意の配列またはその部分配列との配列同一性を決定するために実施することができる。BLASTNを用いて、核酸配列をアライメントし、両者の同一性を比較することができ、また、BLASTPを用いて、アミノ酸配列をアライメントし、両者の同一性を比較することができる。BLASTプログラムを使用して治療ポリペプチドをコードする核酸配列と別の配列との同一性(%)を計算する場合には、各プログラムのデフォルトパラメーター(ギャップペナルティーのデフォルトを含む)を用いることができる。

【0115】

10

サザンもしくはノーザンプロット分析(すなわち、ハイブリダイゼーション)、PCR、またはin situハイブリダイゼーション分析のような方法により、本発明の核酸を検出することができる。一般に、トランスフェクトした細胞株での免疫細胞化学、あるいは、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の後、クマシーブルー染色、または特定のポリペプチドに対する特異的結合親和性を有する抗体(モノクローナルまたはポリクローナル)を用いたウェスタンプロット分析により、ポリペプチドを検出する。これら方法の多くは、Sambrookら(1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)に詳細に記載されている。

【0116】

20

従来の分子生物学的技術を用いて、免疫共刺激ポリペプチドおよび結合対メンバーをコードする核酸配列を構築物中で互いに機能的に結合させることができる。例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrookら、2001、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press)またはShort Protocols in Molecular Biology (Ausubelら、2002、第5版、Current Protocols)を参照されたい。これらの方法に用いるのに好適な構築物は市販されており、当分野で慣用的に使用されている。構築物は、プロモーター配列のような発現に必要なエレメント、エンハンサー配列のような調節エレメント、ならびに核酸配列の発現を調節する応答エレメントおよび/または誘導エレメントなどを含むことができる。本明細書で用いられる「機能的に結合した」とは、(i)核酸の発現を指令または調節するように、該核酸配列に対してプロモーターおよび/または他の調節エレメントが配置されること;および/または(ii)コード配列が「インフレーム」である、すなわち、構築物が免疫共刺激ポリペプチドと結合対メンバーとを含む融合タンパク質をコードするように、免疫共刺激ポリペプチドをコードする核酸と結合対メンバーをコードする核酸とが配置されることを意味する。

30

【0117】

当分野で公知の方法により、宿主細胞中で構築物を増殖または発現させてポリペプチドを産生させることができる。本明細書で用いる用語「宿主」または「宿主細胞」は、大腸菌(E.coli)のような原核生物だけではなく、酵母、昆虫、植物および動物細胞のような真核細胞も含むものとする。動物細胞として、例えば、COS細胞およびHeLa細胞などが挙げられる。当業者に一般的に知られる方法のいずれかを用いて、DNA分子(例えば、構築物)で宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトすることができ、このような方法として、リン酸カルシウムまたは酢酸リチウム沈殿、エレクトロポレーション、リポフェクションおよび粒子衝撃などが挙げられる。本発明のベクターを含む宿主細胞は、既述したように、ベクターの増殖、核酸(例:DNAまたはRNA)の生産、免疫共刺激ポリペプチドもしくはその断片の発現、または融合タンパク質の発現などの目的に用いることができる。

40

【0118】

図1Aおよび1B、2Aおよび2B、3Aおよび3B、4Aおよび4B、5Aおよび5B、ならびに7Aおよび7Bは、コアストレプトアビジンと免疫共刺激ポリペプチドとを含む免疫共刺激部分のコード配列を含む代表的な核酸配列(配列番号1、3、5、7、9および14)と、対応するコードアミノ酸配列(配列番号2、4、6、8、10および15)を

50

示す。

【0119】

#### 免疫療法

本発明の一実施形態は、(a)(i)第1免疫共刺激ポリペプチドを含むコンジュゲートメンバーと(ii)結合対の第1メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第1コンジュゲート、および(b)(i)第1抗原または感染因子を含むコンジュゲートメンバーと(ii)結合対の第2メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第2コンジュゲートを、それを必要とする患者に投与することにより、第1抗原または感染因子に対する免疫応答を生じさせるかまたは増強する方法を提供する。別の実施形態では、免疫細胞を第1および第2コンジュゲートで処理した後、患者に投与する。既述したように、いずれの免疫共刺激ポリペプチド、ならびに、腫瘍もしくは感染因子に関連するいずれの抗原(または感染因子そのもの)を用いてもよく、いずれの結合対を用いてもよい。

10

【0120】

本発明は、目的の抗原とコンジュゲートした又はコンジュゲートしていないキメラ共刺激分子の使用を含む。

【0121】

コンジュゲートを患者に直接投与する実施形態では、第1コンジュゲートおよび第2コンジュゲートを実質的に同時にまたは異なる時点で投与することができる。一実施形態では、患者への投与前に結合対メンバーの結合活性によりコンジュゲートを互いに結合させる。例えば、第1および第2コンジュゲートをin vitroで結合させ、単一組成物として投与することができる。別の実施形態では、第1コンジュゲートを最初に投与した後、免疫共刺激ポリペプチドが免疫細胞に結合するのに十分な時間が経過した後、第2コンジュゲートを投与する。この時間間隔は、例えば、1～数時間、1日～数日、1週間またはそれ以上と、変動しうる。

20

【0122】

患者への第1および第2コンジュゲートの投与は、全身または局所的に、例えば、静脈内、鼻内、腹腔、または皮下注射により実施することができる。一実施形態では、1以上の組成物を、腫瘍部位への直接注射を介して、例えば腫瘍内注射により、または局所感染の部位に、局所的に投与する。別の実施形態では、様々な経路により1以上の組成物を投与する。例えば、1以上の組成物を局所的に投与し、1以上の組成物を全身に投与することができる。

30

【0123】

コンジュゲートを用いて免疫細胞を処理した後、これを患者に直接投与する実施形態では、第1および第2コンジュゲートでほぼ同時にまたは異なる時点で免疫細胞を処理することができる。一実施形態では、免疫細胞の処理に使用する前に、結合対メンバーの結合活性によって第1および第2コンジュゲートを互いに結合させる。例えば、第1および第2コンジュゲートを単一組成物において結合させ、これを用いて、例えば、該組成物と免疫細胞を接触させることにより、免疫細胞をin vitroで処理することができる。別の実施形態では、免疫細胞を第1コンジュゲートで処理し、一定時間が経過した後、第2コンジュゲートで処理する。この時間間隔は、例えば、1～数時間、1日～数日、1週間またはそれ以上と変動しうる。処理した免疫細胞の患者への投与は、前述したいずれかの手段により実施するが、そのような手段として、全身または局所投与、例えば、腫瘍内注射、または局所感染部位への注射などが挙げられる。

40

【0124】

一実施形態によれば、本方法はさらに、第3コンジュゲートを投与すること、または免疫細胞を第3コンジュゲートで処理することを含む。一実施形態では、この第3コンジュゲートは、(i)免疫共刺激ポリペプチドを含むコンジュゲートメンバーと(ii)腫瘍もしくは感染因子に関連する第2抗原または感染因子そのものを含むコンジュゲートメンバーとを含む。第3コンジュゲートの免疫共刺激ポリペプチドは、第1コンジュゲートの免疫共刺激ポリペプチドと同じでも、違うものでもよく、また、第2抗原は、第1抗原と同

50

じでも、違うものでもよい。この実施形態の具体的な一態様では、免疫共刺激ポリペプチドと第2抗原とが、免疫共刺激ポリペプチドおよび第2抗原がその各々に関連する結合対メンバーの相互作用により互いに結合される。この実施形態によれば、第3コンジュゲートの第1および第2結合対メンバーは、第1および第2コンジュゲートの第1および第2結合対メンバーと同じでも、違うものでもよい。

【0125】

一実施形態では、第1コンジュゲートは、構成的受容体、例えば、CD80、LIGHT、およびCD40Lに結合する免疫共刺激ポリペプチドを含み、第3コンジュゲートは、誘導性受容体、例えば、4-1BBLおよびOX40Lに結合する免疫共刺激ポリペプチドを含む。

【0126】

以下の表7に構成的なおよび誘導性の共刺激分子の一覧を示す。

【表7】

構成的	誘導性
CD80-CSA	CSA-4-1BBL
CSA-CD40L	CSA-OX40L
CSA-LIGHT	PD-L1-CSA
	GL50-CSA

【0127】

癌免疫療法の効果は、腫瘍細胞増殖および/または腫瘍サイズの減少を決定することにより評価することができる。腫瘍細胞の数は静的ではなく、細胞分裂中の細胞数と、死滅していく（例えば、アポトーシスによる）細胞数の両方を反映する。腫瘍細胞に対する個体の免疫応答を増加すれば、細胞の増殖を阻害し得る。本発明で用いる腫瘍細胞の増殖とは、所与の期間（例えば、数時間、数日、数週、もしくは数ヶ月）にわたる腫瘍細胞数の増加（*in vitro*または*in vivo*）を意味する。腫瘍細胞の増殖の阻害は、腫瘍細胞の増加速度の減少、腫瘍細胞の完全な消失、または前記減少と前記消失の間の任意の増殖減少により測定することができる。固形腫瘍のサイズ減少は、腫瘍細胞増殖の阻害を示すものである。

【0128】

本発明は、免疫共刺激ポリペプチド（4-1BBLなど）とその受容体との相互作用を介して、TAAを特異的にDCに対して標的化する能力を賦与することにより、従来の癌ワクチン以上の利点を提供する。さらに、本発明は、注射により患者に投与することができ、かつ*in vivo*でDCが取り込むことができ、DCの単離および*ex vivo*操作または遺伝子治療の使用を必要とせずに、抗原提示および活性化をもたらすことができるワクチンを提供する。

【0129】

感染症に対する免疫治療の効果は、患者の感染による苦痛を判定し、臨床的評価項目、例えば、熱または腫脹を評価することにより、評価することができる。

【0130】

本発明によるアビジン/ビオチン結合対（またはさらに高次構造の免疫共刺激ポリペプチドをもたらすその他の機構）の使用により、さらに強力な応答のために免疫共刺激受容体の架橋を可能にする、およびDCへの複数の抗原分子の送達を可能にする四量体構造（またはその他の多量体構造）を提供する、という別の利点も与える。一実施形態では、第1結合対メンバー、すなわち、第1コンジュゲート（第1免疫共刺激ポリペプチドを含む）の結合対メンバーはアビジン、ストレプトアビジンもしくはコアストレプトアビジンであり、第2結合対メンバー、すなわち、第2コンジュゲート（第1抗原または感染因子を含む）の結合対メンバーはビオチンである。別の実施形態では、第1結合対メンバーがビオ

10

20

30

40

50

チンで、第2結合対メンバーがアビジン、ストレプトアビジンもしくはコアストレプトアビジンである。

【0131】

4-1BBLでDCを刺激すると、免疫系の腫瘍回避に主要な役割を果たす $T_{reg}$ 細胞の抑制機能を無効にすることがわかっているため、免疫共刺激ポリペプチドとして4-1BBLを用いれば、さらなる利点を与えることができる。従って、4-1BBLおよびTAAを含む本発明のコンジュゲートは、有効な提示のためにDCにTAAを送達し、様々なサイトカインの合成のためにDCを活性化させて、 $T_{reg}$ 細胞の機能を無効にすると同時に、腫瘍根絶のためにTeffおよびNK細胞の機能を増強する。

【0132】

改変免疫細胞

本発明はまた、前述したように、免疫療法に有用な改変免疫細胞、ならびにこれらを作製する方法を提供する。本発明のこの態様によれば、免疫細胞を改変することにより、第1腫瘍関連抗原を発現する腫瘍または感染因子に対する免疫応答を生じさせるかまたは増強する方法が提供される。本方法は、(a)(i)第1免疫共刺激ポリペプチドを含むコンジュゲートメンバーと(ii)結合対の第1メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第1コンジュゲート；および(b)(i)腫瘍もしくは感染因子に関連する抗原または感染因子を含むコンジュゲートメンバーと(ii)結合対の第2メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第2コンジュゲートに、第1免疫共刺激ポリペプチドの受容体を発現する免疫細胞を接触させることを含む。この方法によれば、第1コンジュゲートは、免疫共刺激ポリペプチドと受容体との間の結合により上記免疫細胞にコンジュゲートし、また、第2コンジュゲートは、第1および第2結合対メンバー間の結合を介して上記免疫細胞にコンジュゲートする。

【0133】

前記免疫細胞は任意の手段により第1および第2コンジュゲートと接触させることができ、これは、in vivoまたはin vitroのいずれで実施してもよい。例えば、in vivo方法は、前記免疫細胞を含み、かつ、腫瘍もしくは感染因子を含むか又は含む危険性がある患者に、第1および第2コンジュゲートを投与することを含むことができる。本方法によれば、第1および第2コンジュゲートの投与は、実質的に同時(同じもしくは個別の組成物として)または順次(個別組成物として)のいずれで実施してもよい。患者が腫瘍を有する一実施形態では、第1および第2コンジュゲートの少なくとも一方を腫瘍内注射により投与する。

【0134】

例示的なin vitro方法は、例えば、第1および第2コンジュゲートを含む単一組成物と接触させるか、またはそれぞれ第1および第2コンジュゲートを含む第1および第2組成物と接触させることにより、免疫細胞を第1および第2コンジュゲートとin vitroで接触させることを含むことができる。コンジュゲートが単一組成物として提供される場合には、これらを第1および第2結合対メンバー間の結合により互いに結合させて当該組成物として提供することができる。

【0135】

本発明のこの太陽には、前記の各々を含む、任意の免疫共刺激ポリペプチド、抗原もしくは感染因子、および結合対メンバーを用いることができる。

【0136】

本方法に従い、第1免疫共刺激ポリペプチドの受容体を発現する任意の免疫細胞を改変することができる。一実施形態では、免疫細胞はT細胞または好中球である。T細胞の例として、CD4+細胞、CD8+細胞、ナチュラルキラー細胞、単球および樹状細胞などが挙げられる。

【0137】

本発明のこの態様の別の形態では、免疫細胞は第2免疫共刺激ポリペプチドの受容体を含み、前記方法は、(i)第2免疫共刺激ポリペプチドを含む第1コンジュゲートメンバ

10

20

30

40

50

ーと(ii)腫瘍もしくは感染因子に関連する抗原(または感染因子そのもの)を含む第2コンジュゲートメンバーとを含む、第3コンジュゲートに、前記免疫細胞を接触させることをさらに含む。この実施形態では、第2免疫共刺激ポリペプチドは、第1免疫共刺激ポリペプチドと同じでも、違うものでもよく;第2抗原(存在する場合には)は第1抗原(存在する場合には)と同じでも、違うものでもよい。別の具体的な実施形態では、第1および第2コンジュゲートメンバーは、それぞれ結合対の第1メンバーおよび第2メンバーをさらに含む。この実施形態によれば、第3コンジュゲートの第1および第2結合対メンバーは、第1および第2コンジュゲートの第1および第2結合対メンバーと同じでも、違うものでもよい。加えて、第1コンジュゲートメンバーは、第1および第2結合対メンバー間の結合を介して第2コンジュゲートメンバーに結合していてもよい。

10

## 【0138】

既述した第1および第2コンジュゲートの場合と同様に、第3コンジュゲートは、任意の免疫共刺激ポリペプチド、抗原もしくは感染因子、および結合対メンバー(前記の各々を含む)を含んでもよい。

## 【0139】

関連する態様において、本発明は、この方法により作製された免疫細胞の集団を提供する。このような免疫細胞は、他の免疫細胞に接触させると、腫瘍に対する免疫応答を生じるかまたは増強する。

## 【0140】

本発明はまた、第1免疫共刺激ポリペプチドの受容体を発現する改変免疫細胞であって、(a)(i)第1免疫共刺激ポリペプチドを含むコンジュゲートメンバーと(ii)結合対の第1メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第1コンジュゲート;および(b)(i)第1抗原または感染因子を含むコンジュゲートメンバーと(ii)結合対の第2メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第2コンジュゲートで改変されている、上記改変免疫細胞を提供する。この実施形態によれば、第1コンジュゲートは、免疫共刺激ポリペプチドと受容体との間の結合により上記免疫細胞にコンジュゲートしており、また、第2コンジュゲートは、第1および第2結合対メンバー間の結合を介して上記免疫細胞にコンジュゲートしている。

20

## 【0141】

既述した方法と同様、本発明のこの態様では、前記の各々を含む、任意の免疫共刺激ポリペプチド、抗原もしくは感染因子、および結合対メンバーを用いることができる。

30

## 【0142】

さらに、第1免疫共刺激ポリペプチドの受容体を発現する任意の免疫細胞は本発明の方法に従い改変することができる。一実施形態では、免疫細胞はT細胞または好中球である。T細胞の例として、CD4+細胞、CD8+細胞、ナチュラルキラー細胞、単球および樹状細胞などが挙げられる。

## 【0143】

免疫刺激部分

本発明はまた、免疫刺激活性を有する免疫刺激部分を提供する。免疫刺激部分は、単独で投与するとき、または抗原もしくはその他の免疫刺激物質の投与と一緒にアジュバントとして使用するとき有用である。例えば、免疫刺激部分は、ワクチン、癌免疫療法、ならびに免疫に基づく障害の治療に有用である。免疫刺激部分は、動物への投与に適した組成物として製剤化することができ、免疫刺激を必要とする動物、例えば、ワクチン、癌免疫療法を受けている動物、または免疫に基づく障害の治療中である動物に投与することができる。

40

## 【0144】

一実施形態によれば、免疫刺激部分は、既述の免疫共刺激ポリペプチド、例えば、4-1BBL、CD86、ICOSL、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、OX40L、CD27L、CD30L、LIGHT、BAFF、APRIL、CD80およびCD40Lのいずれかを含む。別の実施形態では、免疫共刺激ポリペプチドは、4-1BBL、ICOSL、PD-L1、PD-L2、OX40L、CD27L、CD30L、LIGHT、BAFF、およびAPRILか

50

らなる群より選択される。さらに別の実施形態では、免疫共刺激ポリペプチドは4-1BBLである。

【0145】

この実施形態の具体的な一態様によれば、前記免疫刺激部分は、ストレプトアビジンまたはコアストレプトアビジンをさらに含む。例えば、免疫刺激部分は、免疫刺激ポリペプチドとコアストレプトアビジンとを含むコンジュゲートまたは融合タンパク質であってもよい。

【0146】

別の実施形態では、免疫刺激部分は、実質的に、免疫共刺激ポリペプチドと、ストレプトアビジンまたはコアストレプトアビジンからなる。この実施形態によれば、免疫刺激部分は、他の任意の免疫刺激物質、例えば、別の免疫共刺激ポリペプチドまたは抗原を含まないか、又はこれらとコンジュゲート、もしくは結合していない。

10

【0147】

本発明はまた、免疫刺激が必要な患者に免疫刺激部分を投与することを含む免疫刺激方法を含む。この方法の一実施形態では、免疫刺激部分は、免疫共刺激ポリペプチドとストレプトアビジンまたはコアストレプトアビジンとを含む。別の実施形態では、免疫刺激部分は、実質的に、免疫共刺激ポリペプチドとストレプトアビジンまたはコアストレプトアビジンとからなる。別の実施形態では、本方法は、免疫刺激部分の投与と同時に、または連続的に（該投与前または後に）抗原を患者に投与することをさらに含む。同時投与のいくつかの実施形態では、免疫刺激部分と抗原とを単一組成物（例えば、免疫刺激部分と抗原とを含む混合物）として投与する。同時投与の他の実施形態では、免疫刺激部分と抗原とをそれぞれ個別の組成物として投与する。いくつかの実施形態では、既述のような抗原含有コンジュゲート、例えば、抗原と結合対のメンバーとを含むコンジュゲートとして抗原を投与する。別の実施形態では、結合対のメンバーを含むコンジュゲートとして抗原を投与しない。

20

【0148】

免疫刺激方法の別の実施形態は、実質的に免疫共刺激ポリペプチドとストレプトアビジンまたはコアストレプトアビジンとからなる免疫刺激部分を投与することから実質的になる。この実施形態によれば、上記免疫共刺激ポリペプチドとコンジュゲートされるかもしくはこれに結合する他の免疫刺激物質（例えば、別の免疫共刺激ポリペプチドまたは抗原）は投与されない。従って、例えば、ビオチン化細胞またはビオチンを含むタンパク質コンジュゲートのようなビオチン化分子は投与されない。

30

【0149】

特定の理論に束縛されるわけではないが、本発明の免疫刺激部分は、細胞表面免疫受容体とそのリガンドとの間の相互作用を刺激し、これにより、液性または細胞性免疫応答を促進すると考えられる。ストレプトアビジン（またはコアストレプトアビジン）を含む免疫刺激部分は、受容体と有効に係合して、サイトカイン、ケモカインの産生、および免疫刺激分子のアップレギュレーションのためにB細胞、単球、ならびに樹状細胞を刺激する、安定な四量体およびオリゴマーを形成する。

40

【0150】

以下の実施例により、本発明をさらに詳細に説明するが、これは本発明の範囲をどの態様においても限定するものではない。

【実施例】

【0151】

実験方法

動物 . Jackson Laboratories (Bar Harbor、メイン州) から成体の近交系BALB/c (H-2<sup>d</sup>) およびC57BL/6マウスを購入する。TCRトランスジェニックOT-1、D011.10、C57BL/6.SJL動物をTaconics (Germantown、ニューヨーク州) から購入し、NIH指針に従って維持する。

【0152】

50

OVAを発現するA20細胞の樹立 . ルイスビル大学のTom Mitchell博士からOVA構築物を取得し、BglIIおよびEcoRIで制限処理したpcDNA3ベクター (Invitrogen、カリフォルニア州サンディエゴ) に一方向的にクローニングした。細菌形質転換およびアンピシリン培地での選択の後、複数のクローンをミニプラスミドの調製に用い、BglII / EcoRIで消化して、陽性クローンを確認した。次に、インサートを含むクローンをラージプラスミドの調製、およびLipofectamine™2000 (Invitrogen) キットを製品説明書に従って用いたA20細胞へのトランスフェクションに用いた。G418 (Geneticin) を含む培地で細胞を選択した後、ウェスタンブロットおよびOVAに対する抗体、またはT細胞増殖アッセイを用いて、OVAの発現を測定する。

【 0 1 5 3 】

10

TC-1移植可能な子宮頸癌モデルの樹立 . C57BL/6マウスにTC-1腫瘍モデルを樹立した。腫瘍形成TC-1細胞株は、HPV-16E6およびE7および活性化ras癌遺伝子による一次C57BL/6マウス肺上皮細胞の共形質転換により取得したもので、ヒト子宮頸癌のモデルとして特性決定されている。TC-1細胞は、同系C57BL/6マウスに腫瘍を形成する。このモデルを樹立するために、 $1 \times 10^5$ 個の腫瘍細胞をC57BL/6マウスの右側腹部に移植し、腫瘍増殖についてこれらのマウスをモニターした。

【 0 1 5 4 】

昆虫DES発現系を用いた組換え4-1BBLの発現および精製 . ショウジョウバエ (*Drosophila*) DES発現系 (Invitrogen; カリフォルニア州カールスバド) を用いて4-1BBLを発現する安定な形質転換体をSinghら、2003, *Cancer Res.* 63:4067-73に記載のように樹立する。25 および105 rpmに設定したインキュベーター振盪器中で72時間、1 mM硫酸銅を補充したショウジョウバエ無血清培地 (Gibco; カリフォルニア州カールスバド) 中で、形質転換体を組換えタンパク質発現のために誘導する。遠心分離により培養上清を回収した後、該タンパク質に施した6x-His-タグを利用して、カルボキシメチルアスパラギン酸コバルト (II) 架橋アガロース固定化金属親和性樹脂 (BD-Talon, BD Biosciences) またはNi-NTA金属親和性樹脂 (Qiagen) を用いたラージスケール精製に付す。

20

【 0 1 5 5 】

手短に言えば、10%エタノールの最終濃度に達するまで95%エタノールを滴状添加することにより、4-1BBLを含む培地を沈殿させる。4 で一晩インキュベートした後、結合バッファー (50 mMリン酸ナトリウムpH7.0; 500 mM塩化ナトリウム; 0.5% Tween-20; 1%グリセロール; 5 mM 2-メルカプトエタノール) を含むその出発容量の1/10に、沈殿した4-1BBLを再溶解させる。結合バッファーの5Xゲルベッド容量を用いて金属親和性樹脂を平衡化し、4-1BBLを含む再溶解タンパク質溶液に添加した後、室温で45分、前方回転させながらインキュベートする。金属親和性樹脂に結合した4-1BBLを50~100mlの洗浄バッファー (50 mMリン酸ナトリウムpH7.0; 500mM塩化ナトリウム) で2回洗浄する。溶出バッファー (50 mMリン酸ナトリウムpH7.0; 500mM塩化ナトリウム; 150mMイミダゾール) の2Xゲルベッド容量で、金属親和性樹脂から結合4-1BBLを溶出する。

30

【 0 1 5 6 】

精製した4-1BBL溶出液をプールし、30 kDモル重量カットオフ膜を備えたAmicon Ultra™ (Millipore; マサチューセッツ州ベッドフォード) 遠心分離フィルター装置に充填する。遠心分離フィルター装置を4 にて3,000 rpm (2,000 xg) で15分遠心分離する。滅菌PBSを残留物 (retentate) に添加し、フィルターを3,000 rpm (2,000 xg) で再び遠心分離する。濃縮 / 脱塩した4-1BBLを含む残留物を遠心フィルター装置から吸引し、滅菌クライオバイアルに入れ、液体窒素中に保存する。単離したタンパク質の純度をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により評価する。BCAタンパク質アッセイ (Pierce) を製品説明書に従って用いて、タンパク質濃度を測定する。

40

【 0 1 5 7 】

ビオチン化OVAの発現および精製 . 前述したOVA構築物をAvidity, Inc. (コロラド州デンバー) 製のpANおよびpACベクターにサブクローニングすることにより、それぞれN末端およびC末端AviTagタンパク質融合物を発現させる。アンピシリン培地での細菌形質転換

50

および選択後、複数のクローンをミニプラスミドの調製に用い、適切な制限酵素で消化して、陽性クローンを確認する。インサートを含むクローンをラージプラスミド調製に用いる。プラスミドを用いて、染色体に安定に組み込まれたbirAリガーゼ遺伝子を含む菌株であるAVB 100 E. coliを形質転換する。ビオチンタグの付いたOVAの高レベル発現のためにL-アラビノースでタンパク質発現を誘導する。AviTag抗体アガロースを用いて、発現したタンパク質を精製する。ウェスタンブロットおよびプロービングのためのアルカリホスファターゼコンジュゲート型ストレプトアビジンを用いて、精製OVAを濃度、内毒素レベル、およびビオチン化について評価する。必要であれば、Detoxi-Gel Endotoxin Removing Kit (Pierce) を用いて内毒素を除去する。ビオチン化OVAをCSA-4-1BBL融合タンパク質とコンジュゲートし、以下に記載するように、OT-1 TCRトランスジェニック細胞を用いて *in vivo* 増殖アッセイで試験する。タンパク質をアリコートに分け、使用まで -70 で冷凍する。

10

#### 【0158】

増殖アッセイ . *in vivo* 増殖アッセイのために、OT-1 (OVA<sub>257-264</sub>/K<sup>b</sup>) TCRトランスジェニックマウスから脾細胞およびリンパ節細胞を採取する。細胞を 5 μM CFSE (カルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステル) で標識し、100万個のCFSE標識細胞を、尾静脈注射によりCD45.1<sup>+</sup>コンジェニック (congenetic) B6-SJLマウスに移入する。24時間後、10 μgOVAのみ、CSAまたはCSA-4-1BBLと混合またはコンジュゲートさせたOVAでマウスをチャレンジする。3日後脾細胞およびリンパ節細胞を採取し、リンパゲートにおいてCD8<sup>+</sup>CD45.1<sup>-</sup> (OT-1) 細胞集団中のCFSE希釈物を分析することにより、増殖を判定する。OVAタンパク質が投与されなかった数匹のマウスから採取した細胞を用いて分析のために親集団を判定する。

20

#### 【0159】

*in vitro* 増殖アッセイは次のように実施する: BALB/cマウス由来のCFSE標識D011.10 (OVA<sub>323-339</sub>/I-A<sup>d</sup>) TCRトランスジェニック細胞を、様々な比率で3日間放射線照射したOVA発現A20形質転換体に対するレスポンドとして用いる。培養物を回収し、増殖についてフローサイトメトリーで分析する。

#### 【0160】

フローサイトメトリー . 初めに目的の一次および二次抗体を滴定した後、フローサイトメトリーにおける最適濃度を用い、そして標準的手順を用いることにより、フローサイトメトリー分析を実施する。例えば、Mhoyanら、1997, Transplantation 64: 1665-70を参照されたい。負の対照としてイソタイプが適合した抗体を用いる。サンプルはFACS CaliburまたはVantage (Becton Dickinson; カリフォルニア州マウンテンビュー) を通過させて、FlowJoソフトウェア (TreeSoft) を用いて分析を実施する。

30

#### 【0161】

免疫療法 : ワクチン接種を次のように実施する。手短には、CSA-4-1BBL融合タンパク質を様々なモル比でPBS中のビオチン化OVAと混合した後、BALB/cマウスに腹腔内注射することにより、前ワクチン接種、または致死量の生存A20 (1 × 10<sup>6</sup>) 細胞を側腹部に皮下接種しておいたマウスの免疫療法を実施する。対照は、ワクチン接種していないマウス、または対照タンパク質を接種したマウスを含む。腫瘍が検出されたら、カリパスを用いて一日おきに腫瘍を測定し、最長直径の平均および垂直直径 ± 標準誤差として腫瘍サイズを記録する。苦痛を避けるため、腫瘍サイズが約20 mmの直径に達したらマウスを安楽死させる。

40

#### 【0162】

統計 . カプラン - マイヤー曲線を用いて腫瘍生存に対する治療の効果を推定する。異なる群間での生存率の差はログランク検定 (一般化Savage/Mantel Cox) を用いて評価する。個々のマウスの群から得たデータの比較を含む手順は、第1に、F 検定 (2群) またはレーベン検定 (複数群) を用いて検定される分散の同等性を有する。分散が等しくない場合には、対数変換を実施する。正規分布したサンプル平均を比較する必要があるときは、スチューデントの t - 検定 (2群) またはノイマン-ケウルス検定 (複数群) を用いる

50

。データが正規分布していない場合には、マン - ホイットニーU検定 ( 2 群 ) またはクラスカル - ワオリス検定 ( 複数群 ) を用いる。統計上の有意性は  $P < 0.05$  と定義する。

【 0 1 6 3 】

**実施例 1** : CSA-4-1BBLはアロ抗原駆動の応答を増大させる

既述のように、4-1BBLは適応および先天性免疫応答の調節に重要な役割を果たす。4-1BBLは、 $CD4^+$ および $CD8^+$  T細胞、NK細胞およびDCの活性化のための共刺激分子として働き、 $T_{reg}$ 細胞の抑制機能を阻害する。従って、この分子は、癌治療に有効な腫瘍応答の発生のための特異的アジュバントとして働くことができる。

【 0 1 6 4 】

CSA-4-1BBL融合タンパク質は、コアストレプトアビジン部分の存在により、四量体 / オリゴマー構造を形成し、可溶性分子である。以下のように、同種異系混合リンパ球反応 ( MLR ) を用いて、T細胞応答に対するCSA-4-1BBLの免疫刺激活性を明らかにした。

【 0 1 6 5 】

CSA-4-1BBLの存在または非存在下でBALB/c放射線照射済脾細胞に対する応答細胞として、C57BL/6マウスリンパ節細胞を用いた。培養期間の最後の18時間、培養物を $[^3H]$ チミジンで標識し、増殖を評価した。CSA-4-1BBLで補充した培養物は、対照と比較して強力な増殖活性を示した ( 図 8 ) 。

【 0 1 6 6 】

**実施例 2** : CSA-4-1BBLはT細胞増殖を増強する

4-1BBに対する4-1BBL融合タンパク質対モノクローナル抗体の相対活性を評価するために、フローサイトメトリーにより選別した $CD4^+$ および $CD8^+$  T細胞を、増殖アッセイにおいて、様々な量の4-1BBL融合タンパク質及び抗体の存在下で、準最適濃度のポリクローナル抗CD3抗体で刺激した。T細胞の増殖に対する融合タンパク質の活性は前記抗体の70倍であった ( 図 9 ) 。

【 0 1 6 7 】

この抗体Abは癌免疫療法の動物モデルにおいて強力な活性を有することがわかっている。例えば、Meleroら、1998, Cell Immunol. 190: 167-72 ; Meleroら、1997 Nat. Med. 3: 682-85を参照されたい。このデータは、CSA-4-1BBL融合タンパク質が、アジュバントとして、さらにはTAAをDCに送達するビヒクルとして、癌ワクチンの有用な成分であることを示している。

【 0 1 6 8 】

**実施例 3** :  $CD8^+$  T細胞に対するビオチン化OVA / CSA-4-1BBLコンジュゲートの効果

市販のキット ( Pierce Biotechnology、イリノイ州ロックフォード ) を用いて、オボアルブミン ( OVA ) をビオチン化した。ビオチン化OVAを様々な比でコンジュゲート用のCSA-4-1BBL融合タンパク質と *in vitro* で前混合し、百万個のOT-1 T細胞を養子免疫的に移入したナイーブC57BL/6.SJLマウスに腹腔内注射した。具体的には、百万個のOT-1  $CD8^+$  T細胞をCFSEで標識し、これを、ビオチン化オボアルブミン (  $10 \mu g$  / 注射 ) ( 「OVA」 )、およびビオチン化OVAと混合したCSA-4-1BBL (  $1 \mu g$  / 注射 ) ( 「41BBL+OVA」 ) またはコンジュゲート型OVA-ビオチン / CSA-4-1BBL ( 41BBL-OVA ) で免疫したB/6.SJLマウスに移入した ( 図10 )。図10の最後のパネル ( 「41BBL-OVA<sup>+</sup>」 ) は、 $10 \mu g$  ビオチン化OVAにコンジュゲートさせた  $5 \mu g$  のCSA-4-1BBLに対する応答を示す。対照として、CSA-4-1BBLと等モルレベルのコアストレプトアビジン ( 「SA」 ) を用いた。

【 0 1 6 9 】

図10に示すように、4-1BBL-OVAコンジュゲートは、対照の「SA / OVA」コンジュゲート ( 33.6% ) または非コンジュゲート型の単一タンパク質である「41BBL+OVA」 ( 35.5% ) と比較して、OT-1細胞に強力な ( 73.5% ) 増殖応答を生じさせた。  $5 \mu g$  用量のCSA-4-1BBLで、  $1 \mu g$  用量 ( 73.5% ) よりはるかに優れた応答 ( 94.5% ) が生じていることから、増殖応答は用量依存的であった。

【 0 1 7 0 】

この実施例は、CSA-4-1BBL融合タンパク質が抗原特異的 $CD8^+$  T細胞の増殖応答を高める

10

20

30

40

50

ことを明らかにしたが、これは、4-1BBL-CSA / ビオチン化抗原構築物が、プロフェショナルAPCに抗原を伝達することに成功し、これらの細胞を活性化して有効な免疫応答を生じさせることを示している。

【 0 1 7 1 】

**実施例 4** : CSA-4-1BBLはDCに抗原を送達する

この実施例は、CSA-41BBLがDCに抗原を有効に送達することを明らかにする。蛍光抗原としてビオチン化PEを用いた。ビオチン化PE (250 ng) を氷上で250 ngのCSA-41BBLと30分間コンジュゲートさせた。Jaws II 樹状細胞 ( $5 \times 10^5$  / ウェル) をビオチン化PE (250 ng/ml) またはビオチン化PE / CSA-41BBLコンジュゲートと一緒に16時間培養した。フローサイトメトリーを用いてPEのレベルを検出した。図11 A は、PE+細胞を示すヒストグラムである。グレーで塗りつぶした部分は非処理細胞を、黒い点線はビオチン化PEで処理した細胞を、また、黒い線はビオチン化PE/CSA-41BBLコンジュゲートで処理した細胞を示す。図11 B は、各処理についてのPEの平均蛍光強度 (MFI) を示すが、これにより、コンジュゲートで処理した細胞が有意に高い応答を提示することが明らかにされた。

10

【 0 1 7 2 】

**実施例 5** : CSA-4-1BBLはDCを活性化する

この実施例では、4-1BBLが樹状細胞を活性化することを明らかにする。Jaws II 樹状細胞 ( $5 \times 10^5$  / ウェル) は未処理のままか、または5 ng/mlのGM-CSFの存在下、5  $\mu$ g/mlのCSA-41BBLコンジュゲートもしくは5  $\mu$ g/mlのりボ多糖 (LPS) で24ウェルプレート中で48時間処理した。図12 A に示すように、フローサイトメトリーを用いて、CD86およびMHCクラスIIレベルを分析した。薄いグレーで塗りつぶした部分はイソタイプ処理細胞を示し、濃いグレーで塗りつぶした部分は未処理細胞を、黒い線はCSA-4-1BBL処理細胞を、また点線はLPSを示す。図12 B は、CD86およびMHCクラスIIの平均蛍光強度 (MFI) を示すが、これにより、CSA-4-1BBLで処理した細胞が有意に高い応答を呈示することが明らかにされた。

20

【 0 1 7 3 】

**実施例 6** : CSA-4-1BBLはDCに抗原を送達し、DCを *in vivo* で活性化する

この実施例では、CSA-4-1BBLがビオチン化抗原を樹状細胞に送達し、これらの細胞を *in vivo* で活性化へと駆動することを明らかにする。ビオチン化OVAをCSA-41BBLと接触させることにより、ビオチン化OVA / CSA-4-1BBLコンジュゲートを取得した。該コンジュゲートまたはビオチン化OVA / CSAコンジュゲートをナイーブC57BL/6マウスに静脈内注射した。24時間後、マウスを安楽死させ、脾細胞を採取した。CD11c+細胞集団においてフローサイトメトリーを用いて樹状細胞活性化を分析した。図13に示すように、ナイーブビオチン化OVA-SA処理、およびビオチン化OVA / CSA-41-BBL処理マウス由来の樹状細胞上でのCD40、CD86およびMHCクラスII発現の平均蛍光強度 (MFI) を測定した。この図から、ビオチン化OVA / CSA-41-BBL処理マウスが有意に高い応答を呈示することがわかる。

30

【 0 1 7 4 】

**実施例 7** : CSA-4-1BBLはTreg Cellの抑制機能を中和する

前述のように、天然に存在するCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg細胞は、4-1BB受容体を構成的に発現し、それ自体4-1BBL刺激に応答する。以下の実施例により、Treg細胞に対する4-1BBL融合タンパク質の刺激活性を明らかにする。

40

【 0 1 7 5 】

フロー選別を用いて、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Teff細胞およびCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg細胞を単離し、放射線照射済同系細胞および抗CD3抗体の存在下、1 : 1の比で培養した。共培養実験においてCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (DP) とCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (SP) T細胞の増殖を識別するために、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T細胞をカルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステル (CFSE、Molecular Probes、オレゴン州) で染色してから、抑制アッセイに用いた。手短には、細胞をPBSで洗浄し、4 mlの2.5  $\mu$ M CFSE /  $1 \times 10^6$ 細胞 (これより少量の細胞を標識したとき、比率を保持した) において室温で7分インキュベートした。次に、2容量のウシ胎仔血清中で1分細胞をインキュベートし、PBSで2回洗浄することにより、過剰CFSEのすべてを確実に除去し

50

た。フローサイトメトリーを用いて増殖を評価した。

【0176】

Treg細胞はアネルギーであるため、抗CD3刺激に応答しなかったが、4-1BBLに反応して中程度の増殖を呈示した(図15)。注目すべきは、Treg細胞がTeff細胞の増殖応答を阻害したことであり、この作用は、4-1BBLの添加により逆転することができた。これは、ナイーブTreg細胞を用いて得られたデータと一致し、その際、増殖細胞の抑制作用はCSA-4-1BBLの存在により中和された(後述参照)。

【0177】

これらのデータから、4-1BBLの免疫調節作用と、癌免疫療法におけるその有用性が確認される。例えば、4-1BBL融合タンパク質は、Teff機能を増強すると同時に、Treg細胞の阻

10

【0178】

**実施例8**：4-1BBLの二重の役割

Treg機能の調節における4-1BB / 4-1BBL媒介シグナル伝達の役割は、2つの近年の研究の主題であり、これらはそれぞれ相反する知見を有する。一方の研究では、4-1BBシグナル伝達がTreg細胞の抑制機能を中和することを明らかにした(Choiら、2004, J. Leukoc. Biol. 75: 785-91)のに対し、他方は、4-1BBシグナル伝達が、抑制機能に大きな作用をもたらすことなく、Treg増殖を媒介すると報告した(Zhengら、2004, J. Immunol. 173: 2428-34)。この矛盾を解明するため、CSA-4-1BBL融合タンパク質を用いて、Treg機能に

20

【0179】

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>(単一陽性; SP)およびCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>(二重陽性; DP) T細胞をナイーブBALB/cマウスの脾臓および末梢リンパ節から選別し、単独もしくは1:1の比で3日間培養した。放射線照射済脾細胞、抗CD3抗体(0.5 μg/ml)、ならびに、図14Aに記載した濃度(μg/ml)の4-1BBLまたは等モル量の対照CSAタンパク質を培養物に補充した。フロー選別を用いてナイーブBALB/cマウスから精製したCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>二重陽性(DP) T細胞は、共培養実験において、CD3に対する抗体により誘導された単一陽性(SP) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T細胞の増殖応答を顕著に阻害した。この抑制作用は、培養物に1 μg/mlのCSA-4-1BBLを補充することにより有効かつ特異的に逆転したが、等モルレベルで用いた対照CSAでは逆転しなかつた。

30

【0180】

観察されたCSA-4-1BBL融合タンパク質による抑制の逆転が、SP細胞の増殖応答の回復によるものであるか否かを試験するために、SP細胞をCFSEで標識し、CSA-4-1BBL(0.5 μg/ml)又は対照タンパク質としてのCSAの存在下で共培養実験に用いた。CSA-4-1BBLは、SP細胞の増殖を対照の44%およびCSAタンパク質の46%から60%まで高めた。DP細胞はSP T細胞の増殖を有意に低減(16%)し、これは4-1BBLにより有意に回復された(34%)が、CSA対照タンパク質では回復しなかった(17%)(図14B)。これらのデータから、4-1BBL融合タンパク質がTreg細胞の抑制機能をダウンレギュレートすることがわかる。

【0181】

従って、以上の実験結果は、CSA-4-1BBL融合タンパク質が、Treg細胞に対し2つの相反する活性を現すことを示している。一方で、これは抗CD3抗体およびIL-2と相乗作用して、Treg細胞増殖を促進した。他方で、該融合タンパク質はナイーブおよび活性化Treg細胞両方の抑制機能を阻止したが、培養培地からこれを除去すると抑制機能が回復したことから、これは、Treg細胞が4-1BBL融合タンパク質と接触しているときだけ起こった。

40

【0182】

4-1BBLの後者の作用は、免疫回避機構としてTreg細胞を用いる腫瘍および感染症に関して、いくらか重要であり得る。

【0183】

**実施例9**：癌ワクチンとしての抗原-4-1BBLコンジュゲートの使用

(a) 可溶性タンパク質としてOVAを発現するA20形質転換体の作製

50

Lipofectamine™2000キットを、製造者 (Invitrogen) プロトコルに従って用い、前述したOVA構築物をA20にトランスフェクトする。G418選択培地において安定な形質転換体を選択し、単細胞レベルでクローニングし、ウェスタンブロットを用いてOVAの発現について試験する。有意なレベルのOVA発現を有するクローンを、図10を参照にして説明したCFS E増殖アッセイにおいてOVAに特異的なDO11.10 CD4<sup>+</sup>T細胞のスティミュレーターとして用いる。OVA発現について陽性であると確認したら、百万個のA20生細胞をBALB/cマウスの右側腹部に皮下注射する。腫瘍発達および生存についてマウスを一日おきにモニターし、腫瘍が直径20 mmのサイズに達したら安楽死させる。親A20細胞を接種したマウスを腫瘍増殖の対照として用いる。OVAを発現するA20細胞形質転換体は、同系BALB/cマウスに注射すると、腫瘍を形成する。

10

## 【0184】

(b) 昆虫DES系を用いたCSA-4-1BBL融合タンパク質の作製

DES発現系 (Invitrogen) と、本発明者らが確立したプロトコルを用いて、CSA-4-1BBLタンパク質を作製する。例えば、Singhら、2003, Cancer Res. 63: 4067-73; Yolcuら、2002, Immunity 17: 795-808を参照されたい。CSA-4-1BBL融合タンパク質に施した6XHisタグを利用した固定化金属ベースのアフィニティークロマトグラフィーを用いて、融合タンパク質を精製する。タンパク質を脱塩し、超ろ過により濃縮し、SDS-PAGEにより純度について分析する。ピシンコニン酸 (BCA) アッセイ (Pierce) を用いて、タンパク質調製物を濃度について評価し、CambrexのQCL-1000 (登録商標) Chromogenic LALエンドポイントアッセイを用いて、内毒素の存在について試験する。

20

## 【0185】

(c) OVAのビオチン化

DSB-X Biotin Labeling Kitを製造者 (Molecular Probes、カリフォルニア州サンディエゴ) のプロトコルに従って用いて、マレイミド活性型の、内毒素を含まないニワトリOVA (Pierce) をビオチン化する。PBSでの十分な透析後、ウェスタンブロット、およびプロービングのためのアルカリホスファターゼコンジュゲート型ストレプトアビジンを用いて、濃度、内毒素レベル、およびビオチン化について、ビオチン化OVAを評価する。必要であれば、Detoxi-Gel Endotoxin Removing Kit (Pierce) を用いて、内毒素を除去する。ビオチン化OVAをCSA-4-1BBL融合タンパク質とコンジュゲートさせる。タンパク質コンジュゲートをアリコートに分け、使用まで - 80 で凍凍する。

30

## 【0186】

(d) 癌ワクチンとしてのビオチン化OVA / CSA-4-1BBLコンジュゲートの使用

CSA-4-1BBLとビオチン化OVAをPBS中で様々な4-1BBL : OVAのモル比、例えば、1 : 1、1 : 5、1 : 10、5 : 1、および10 : 1で前混合し、3週間毎に様々な用量 (例えば、10、50および100 μgのOVA) でBALB/cマウスの群に腹腔内注射する。ビオチン化OVAにコンジュゲートしたストレプトアビジン、ビオチン化OVAのみ、またはCSA-4-1BBLと混合した非ビオチン化OVAを注射したマウスを対照として用いる。

## 【0187】

百万個のA20腫瘍生細胞を右側腹部に皮下投与してマウスをチャレンジし、1日おきに腫瘍発達および生存についてモニターし、腫瘍が直径20 mmのサイズに達したら安楽死させる。

40

## 【0188】

ビオチン化OVA / CSA-4-1BBLコンジュゲートのワクチン接種により、強力な抗腫瘍免疫応答が起こり、腫瘍増殖が阻止される。非コンジュゲート型の4-1BBLとOVAのワクチン接種でも応答は起こりうるが、このような応答はいずれも抗原 / 4-1BBLコンジュゲートが生じさせるものより小さいであろう。OVAのみまたはCSA-OVAのワクチン接種では、最小限の応答しか起こらず、従って、腫瘍増殖を阻止する上で効果的ではないと考えられる。

## 【0189】

**実施例10：抗原 - 4-1BBLコンジュゲートにより早期 / 後期ワクチン接種**

既述のように、腫瘍は、腫瘍増殖の過程で発達する多様な機構により、免疫系を回避す

50

る。腫瘍進行の早期における本発明のコンジュゲートの効能は、免疫回避機構が確立されていないとき、腫瘍チャレンジと同時に動物にワクチン接種することにより証明される。樹立された腫瘍に対する本発明のコンジュゲートの効能については、いったん腫瘍が樹立され、免疫回避機構が完全に発達した動物をワクチン接種することにより証明される。

【0190】

(a) 腫瘍進行の早期における効能

BALB/cマウスに百万個のA20生細胞を右側腹部にチャレンジし、同時に、ビオチン化OVA / CSA-4-1BBLコンジュゲートを腹腔内にワクチン接種する。抗原 / 4-1BBLコンジュゲートによるワクチン接種を4週間の間(この時点までに対照動物における腫瘍は直径10~15mmのサイズに達する予定である)に週に1回繰り返す。非操作マウスと、CSA-OVAコンジュゲートをワクチン接種したマウスを対照として用いる。

10

【0191】

(b) 樹立腫瘍に対する効能

百万個のA20腫瘍生細胞をBALB/cマウスの右側腹部に皮下接種する。腫瘍発達についてマウスをモニターし、腫瘍が直径4~6mmのサイズに達したとき、ビオチン化OVA / CSA-4-1BBLコンジュゲートをワクチン接種する。ワクチン接種プロトコルはまず、腫瘍が消失するか、直径20mmのサイズに達するまで、毎週腹腔内注射することを含む。

【0192】

腫瘍を有効に根絶したマウスに対し、腫瘍消失から60日後に2百万個のA20生細胞でチャレンジすることにより、記憶応答を試験する。

20

【0193】

特定の理論に束縛されるわけではないが、本発明の抗原 / 4-1BBLコンジュゲートは、腫瘍進行の早期に投与する場合、いったん腫瘍が樹立されてからの投与と比較して、腫瘍の増殖を阻止する上で大きな効果があると考えられる。これは、早期の腫瘍進行過程では多様な抑制機構を欠くためである。それにもかかわらず、抗原 / 4-1BBLコンジュゲートは、効率的抗原提示のためのDCに対する抗原の特異的標的化、危険シグナル発生のためのDCの活性化(アジュバント効果)、およびTreg細胞の抑制機能のダウンレギュレーションにより、樹立腫瘍を根絶するのに効能を示すであろう。DCへの間接的作用に加えて、ワクチンを繰返し注射すれば、活性化TおよびNK細胞に4-1BB受容体を結合させ、活発な増殖、生存および記憶T細胞機能をもたらすことにより、免疫系をさらに増強することができる。

30

【0194】

**実施例11: バイスタンダー効果による抗原 / 4-1BBLコンジュゲートの効果**

以下の実施例では、ビオチン化OVA / CSA-4-1BBLコンジュゲートが、バイスタンダー効果またはエピトープ拡散のいずれかにより、不定のA20腫瘍抗原(OVA以外)に対する免疫応答を生じさせることを明らかにする。

【0195】

BALB/cマウスに対し、OVAを発現するA20を右側腹部に、また非改変A20親細胞を左側腹部に接種する。いったん腫瘍が触知可能になったら、ビオチン化OVA / CSA-4-1BBLコンジュゲートをマウスにワクチン接種する。前文に概説したワクチン接種スケジュールに従うが、効能を増強するため必要に応じて変更してもよい。両腫瘍タイプの増殖についてマウスをモニターする。

40

【0196】

あるいは、ビオチン化OVA / CSA-4-1BBLコンジュゲートのワクチン接種後に腫瘍の根絶を達成したマウスに対し、OVAを発現するA20腫瘍の根絶から60日後、2百万個のA20親細胞を反対側の側腹部に皮下投与してチャレンジする。

【0197】

ビオチン化OVA / CSA-4-1BBLコンジュゲートワクチンは、TAAとしてOVAが欠失した親A20腫瘍に対する効能を示すであろう。例えば、OVAに対する有効な免疫応答は、腫瘍の死滅、腫瘍抗原の脱落、APCによる捕捉および提示をもたらす、これによって新たなセットのTAAに対するT細胞応答の発生が起こる。A20-OVA腫瘍に対して生じるバイスタンダー効果

50

により親腫瘍の根絶をさらに促進することができる。

【0198】

**実施例12：細菌発現系を用いたビオチン化抗原の作製**

いくつかの状況では、本発明のワクチンの抗原成分として用いる目的で、遺伝子的にビオチン化した抗原を作製するのが有利な場合もある。これに関して、Avidity, Inc. (コロラド州デンバー)のBiotin AviTag技術を用いることができる。Biotin AviTagは、ビオチンリガーゼであるBirA(ペプチド配列内のリシン残基にビオチンを結合させる)により認識される固有の15個のアミノ酸ペプチドから構成される。Biotin AviTagは、目的とする任意のタンパク質に遺伝子的に融合させ、該タンパク質をビオチン分子でタグ付けすることもできる。

10

【0199】

OVAをコードするcDNAをpANおよびpACベクターにサブクローニングし、それぞれN末端およびC末端AviTagタンパク質融合物を発現させる。染色体に安定に組み込まれたbirA遺伝子を有するAVB100 E.coli B株を形質転換し、L-アラビノースで誘導することにより、ビオチンタグを保有するOVAの高レベル発現を達成する。AviTag抗体アガロースを用いて、発現タンパク質を精製する。BCAキット、QCL-1000(登録商標)Chromogenic LALキット、およびアルカリホスファターゼコンジュゲート型ストレプトアビジンでプローブしたウェスタンブロットを用いて、精製OVAを濃度、内毒素レベル、およびビオチン化について評価する。必要であれば、Detoxi-Gel Endotoxin Removingキット(Pierce)を用いて内毒素を除去する。

20

【0200】

前述のように、ビオチン化OVAをCSA-4-1BBLとコンジュゲートさせる。タンパク質コンジュゲートをアリコートに分け、使用まで-80℃で冷凍する。

【0201】

**実施例13：TERTまたはサバイピンを含む抗原/4-1BBLコンジュゲートの使用**

ビオチン化OVA/CSA-4-1BBLを伴う上で例示したビオチン化抗原/4-1BBLコンジュゲートは、任意の抗原を含むあらゆるワクチン設定で用いることができる。癌ワクチンに関しては、2つの万能ヒトTAAであるテロメラゼ逆転写酵素とサバイピンが、本発明のビオチン化抗原/CSA-4-1BBLコンジュゲートの有利な抗原成分となりうる。

【0202】

30

**実施例14：E7/4-1BBLコンジュゲート**

前述したように、抗原成分としてヒトパピローマウイルスE7を含む本発明のコンジュゲートは子宮頸癌に対して有用である。この実施例は、本発明のこの具体的実施形態に関する。

【0203】

(a) ビオチン化HPV-16E7の作製

HPVワクチンとして有用な本発明のコンジュゲートの抗原成分としてビオチン化E7を用いる。一実施形態では、全長E7タンパク質を用いて、最大数のエピトープを与える。TC-1細胞由来の全RNAを用いたRT-PCRにより、全長HPV-16E7をコードするcDNAをクローニングする。配列確認後、6X-Hisタグを含むpMIB/V5-Hisベクター(Invitrogen)にcDNAをインフレームでサブクローニングして、構成的発現およびDES系での分泌を達成する。前述のように金属親和性樹脂を用いて分泌タンパク質を精製する。EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinを製造者のプロトコル(Pierce)に従って用い、精製したE7をin vitroでビオチン化する。手短には、精製、濃縮したE7をリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)でバッファー交換し、EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinと一緒に室温で1時間インキュベートする。接線流濾過(Spectrum Labs、ニュージャージー州)を用いて、非結合ビオチンを除去する。

40

【0204】

(b) E7/4-1BBLコンジュゲートの作製

前述の概略の手順に従い、ビオチン化E7およびCSA-4-1BBL融合タンパク質を用いて、E7と4-1BBLとを含むコンジュゲートを作製する。比較のために、以下のようにE7/4-1BBL融

50

合タンパク質を作製する。E7および4-1BBLをコードするcDNAを、6X-Hisタグを含むpM1B/V5-Hisベクター（Invitrogen）にインフレームでサブクローニングして、構成的発現およびDES系での分泌を達成し、前記のようにタンパク質を発現させ、精製する。

【0205】

(c) E7 / 4-1BBLコンジュゲートの結合活性

E7 / 4-1BBLコンジュゲートのビオチン結合および4-1BB受容体結合活性を以下のように評価する。

【0206】

ビオチン結合のために、TC-1細胞をビオチン化し、氷上でPBS中のCSA-4-1BBL（100 ng / 10<sup>6</sup>細胞）と一緒にインキュベートする。細胞をPBSで十分に洗浄してから、4-1BBLに対する蛍光色素標識抗体で染色し、フローサイトメトリーを用いて分析する。CSAとコンジュゲートさせたビオチン化細胞を対照として用いる。

10

【0207】

上記コンジュゲートまたは融合タンパク質と、活性化T細胞上の4-1BB受容体との結合を試験するために、C57BL/6マウス由来の脾細胞を5 μg/mlのコンカナバリンA（Con A）で36時間活性化させ、PBSで洗浄し、様々な濃度のコンジュゲートまたは融合タンパク質と共に氷上でインキュベートする。細胞を十分に洗浄してから、4-1BBL、コアストレプトアビジン、もしくはE7に対する適切な蛍光色素標識抗体で染色し、フローサイトメトリーで分析する。

【0208】

CSA - ビオチン結合の化学量論に従い、1 : 4比（CSA-4-1BBL : E7）のタンパク質を用いて最初にコンジュゲートを形成させ、該コンジュゲートをサンドイッチELISAで試験することにより、CSA-4-1BBLコンジュゲートとビオチン化E7との結合を判定する。手短には、抗E7抗体でコーティングした96ウェルプレートに上記コンジュゲート型タンパク質を結合させ、洗浄した後、反応性抗ストレプトアビジン抗体と一緒にインキュベートして、存在するE7 / 4-1BBL複合体の量を測定する。コンジュゲートの形成を確認した後、前述と同様、活性化T細胞上の4-1BB受容体に結合する能力についてこれら进行评估する。

20

【0209】

実施例15 : E7 / 4-1BBLコンジュゲートにより誘導される免疫応答

(a) 用量の最適化

E7 / 4-1BBLコンジュゲートを含むワクチンの最適用量は次のように評価することができる。1、10もしくは50 μgのビオチン化E7を用いて、2つの比（例えば、1 : 4および1 : 8のCSA-4-1BBL : E7）でビオチン化E7とCSA-4-1BBLとを混合することにより、ビオチン化E7とCSA-4-1BBLとを含むコンジュゲートを形成する。また、同程度の量の対照非ビオチン化E7も用いる（E7の上記用量は、50 μgのE7がTC-1細胞に対する防御免疫応答を生じさせるのに有効であることを証明した研究に基づく）。4-1BBL : E7の最適比および抗原の最適量は、以下に説明するような様々なプロトコルに従ってワクチンに対する免疫応答を評価することにより、実験的に決定および調整することができる。

30

【0210】

(b) 四量体分析

四量体染色により、CD8<sup>+</sup>T細胞の増殖に関するワクチン効能を評価することができる。C57BL/6雌マウスに対し、PBS中の前記ワクチン調製物を腹腔内注射する。PBS、CSA-4-1BBL、CSA-4-1BBL + 非ビオチン化E7、もしくはE7-4-1BBL融合タンパク質を注射したマウスを対照として用いる。10日後、同等用量で2回目の腹腔内投与を行い、最後のワクチン接種から3日後に、脾細胞を採取し、四量体技術およびフローサイトメトリーを用いて、E7特異的CD8<sup>+</sup>T細胞数を定量する。手短には、FITC-抗-CD8抗体と、E7の免疫優性エピトープであるペプチド49~57（RAHYNIVTF）をロードしたMHCクラスIIH-2D<sup>b</sup>分子のPE-四量体で、免疫化マウス由来の脾細胞を標識する（この四量体は、National Institutes of Health Tetramer Facility（ジョージア州アトランタ）から入手することができる）。センダイウイルス核タンパク質324~332ペプチド（FAPGNYPAL）をロードしたクラスIIH-2D<sup>b</sup>分子を

40

50

陰性対照として用いる。染色後、フローサイトメトリーにより細胞を分析して、四量体についてCD8<sup>+</sup>T細胞陽性の%を求める。

【0211】

(c) 細胞内IFN- 分析

エフェクターCD8<sup>+</sup>T細胞のシグネチャーサイトカインである、IFN- の発現についてワクチン誘導CD8<sup>+</sup>T細胞を特性決定することにより、T細胞の機能の評価が可能になる。雌C57BL/6マウスに対し、最適用量のビオチン化E7/CSA-4-1BBLコンジュゲートワクチン(前述のように決定)を腹腔内注射し、10日後、免疫化マウス由来の脾細胞を採取し、E7を発現する放射線照射済TC-1細胞と一緒に5日間共培養した後、ゴルジ輸送阻害因子のプレフェルジンAを一晩補充する。フィコール勾配を用いて生細胞を採取し、抗マウスFc 受容体抗体(アメリカンタイプカルチャーコレクションから2.4G2)と一緒に1時間インキュベートした後、FITC標識抗CD8抗体で染色する。次に細胞を固定、透過性にし、PE-標識抗IFN- 抗体(Pharmingen)について染色し、フローサイトメトリーにより分析する。イソタイプ抗体で染色した細胞を対照として用いる。PBS、E7-4-1BBL融合タンパク質、もしくはCSa-4-1BBL+非ビオチン化E7で免疫したマウス由来の脾細胞を対照として用いる。

【0212】

(d) 死滅応答

ワクチン誘導CD8<sup>+</sup>T細胞がE7分子を発現するTC-1細胞を溶解する能力を以下のように評価する。前述のようにワクチン接種したマウスから採取した脾細胞を100 µg/ml E7タンパク質の存在下で5日間共培養する。培養物に50 U/mlの外因性IL-2を補充して、CD8<sup>+</sup>T細胞の増殖を支持する。フィコール勾配を用いて、生存脾細胞を回収し、JAMアッセイにおいて様々なエフェクター:標的比(例えば、1:1、10:1、20:1、40:1、および80:1)でTC-1標的細胞に対するエフェクター細胞として用いる。例えば、Singhら、2003, Cancer Res. 63: 4067-73を参照。癌免疫療法には、CD8<sup>+</sup>T細胞による腫瘍細胞の直接死滅が重要であるため、このアッセイでの効能の証明は、子宮頸癌に対するワクチンの効能をさらに支持することになる。

【0213】

(e) CD4<sup>+</sup>T細胞増殖応答

CD4<sup>+</sup>T細胞応答の誘導におけるビオチン化E7/CSA-4-1BBLの効能を以下のように評価する。免疫化マウスからの脾細胞をCFSEで標識し、IL-2を培養物に添加しない以外は、前記と同じ培養条件下で組換えE7タンパク質と一緒に共培養する。培養中、様々な日に細胞を回収し、APC-CD4抗体で染色してから、フローサイトメトリーを用いて増殖について分析する。E7タンパク質を含まない、またはOVAタンパク質を含む培養物を対照として用いる。CD4<sup>+</sup>T細胞応答はCD8<sup>+</sup>T細胞およびB細胞応答に重要であることについて一般に見解が一致しているため、このアッセイにおける効能の証明は子宮頸癌に対するワクチンの効能をさらに支持することになる。

【0214】

(f) 液性応答

ビオチン化E7/CSA-4-1BBLワクチンによるin vivo処理が液性応答を生じさせる能力を次のように評価する。ワクチン接種したマウス由来の血液を採取し、血清を単離して、E7タンパク質をコーティングしたMaxisorb ELISAプレート(Nalgene Nunc International)をスクリーニングする。セイヨウワサビペルオキシダーゼコンジュゲート型ヤギ抗マウスIgGおよびヤギ抗マウスIgM抗体を用いて、抗E7 IgGおよびIgMを検出する。対照は、PBSおよび前記のような対照タンパク質で免疫したマウスから採取した血清を含む。

【0215】

ビオチン化E7/CSA-4-1BBLコンジュゲートワクチンは、これらアッセイにおいて強力な応答を生じさせる。E7-4-1BBL融合タンパク質によるワクチン接種でも応答を生じさせるであろうが、このような応答はいずれもより小さいことが予想される。CSA-4-1BBL+非ビオチン化E7によるワクチン接種は、応答を生じさせると考えられるが、APCによるE7抗原の取込みはランダム事象であるため、そのような応答はいずれもコンジュゲートワクチン

10

20

30

40

50

ほど強くなく、しかも、該コンジュゲートにより達成されるAPCへのE7の標的送達のように効率的ではないだろう。

【0216】

実施例16：E7 / 4-1BBLコンジュゲートの治療効果

TC-1移植性腫瘍モデルにおいて、腫瘍形成の阻止および根絶における本発明のE7 / 4-1BBLコンジュゲートを含むワクチンの効果を2つの異なる設定で評価する。第1の設定は、免疫回避機構がまだ発達していない、腫瘍注射前のワクチン接種を含む。第2の設定は、免疫回避機構が十分に発達した樹立腫瘍に対するワクチン接種を含む。C57BL/6マウスにTC-1細胞を注射して、腫瘍形成を誘発し、TC-1注射の前および後に、ピオチン化E7 / CSA-4-1BBLコンジュゲートを免疫する。前記のように免疫応答を評価する。腫瘍発達および生存についても1日おきにマウスをモニターし、腫瘍が直径20 mmのサイズに達したら安楽死させる。

10

【0217】

(a) 後の腫瘍チャレンジに対するE7 / 4-1BBLコンジュゲートの効能

以下の実施例では、本発明のE7 / 4-1BBLコンジュゲートによる免疫が後の腫瘍チャレンジに対する防御免疫を生じさせることを証明する。

【0218】

雌C57BL/6マウスに対し、PBSのみ、CSA-4-1BBLのみ、非ピオチン化E7と混合したCSA-4-1BBL、本発明のピオチン化E7 / CSA-4-1BBLコンジュゲート、およびE7-4-1BBL融合タンパク質を腹腔内注射する。前記のように最適化した用量を用いる。最初の投与から14日後に、同じ用量で2回目の皮下投与を実施する。TC-1細胞を採取し、滅菌PBSに再懸濁させて、最後の免疫から14日後の注射に使用する。1 × 10<sup>5</sup>TC-1細胞を右側腹部に皮下投与してマウスをチャレンジし(第0日)、60日間観察する。E7<sup>+</sup>腫瘍に対するコンジュゲートの特異性を確認するための対照として、1セットの免疫化マウスをA20癌細胞でチャレンジする。腫瘍発達および生存について1日おきにマウスをモニターし、腫瘍が直径20 mmのサイズに達したら安楽死させる。最初の腫瘍チャレンジから60日後に、腫瘍を発達してしないマウスを1 × 10<sup>6</sup>TC-1細胞で再度チャレンジして、記憶応答を試験する。14日おきに各群からのマウスを犠牲にして、その脾細胞を採取する。脾細胞を用いて、前記と同様に、四量体染色およびサイトカイン染色を用いて、CD8<sup>+</sup>T細胞応答を判定する。

20

【0219】

(b) 既存の腫瘍に対するE7 / 4-1BBLコンジュゲートの効能

既存の腫瘍に対する本発明のE7 / 4-1BBLコンジュゲートの治療効果を以下のように証明する。

【0220】

TC-1細胞を雌C57BL/6マウスの右側腹部に皮下注射し、100%のマウスが触知可能な腫瘍を有したとき、ワクチン接種する。前記のように最適化した用量のワクチンを、腫瘍が直径20 mmのサイズに達するまで毎週腹腔内投与し、その時点でマウスを安楽死させる。腫瘍の増殖速度と罹患率を60日間評価する。加えて、90日にわたり長期生存を評価および追跡する。

【0221】

本発明のピオチン化E7 / CSA-4-1BBLコンジュゲートをワクチン接種すると、いずれの設定でも強力な抗腫瘍免疫応答が生じ、腫瘍増殖の阻止および既存の腫瘍の根絶が達成される。非コンジュゲート型のCSA-4-1BBLとE7による免疫接種、およびE7 / 4-1BBL融合タンパク質によるワクチン接種でも抗腫瘍応答を生じるであろうが、このような応答はいずれも最小限であり、腫瘍増殖の阻止または既存の腫瘍の根絶には有効ではないと考えられる。

40

【0222】

実施例17：A型インフルエンザ抗原を含むコンジュゲート

A型インフルエンザRNAからの逆転写酵素 - ポリメラーゼ連鎖反応により、目的のインフルエンザタンパク質(例えば、H1、N1、NPおよび/またはMP2)のcDNAを作製する。cDNAをpCSAベクターにサブクローニングし、ショウジョウバエ(Drosophila)昆虫細胞にト

50

ランスフェクトすることにより、安定な形質転換体を確立する。

【0223】

前記タンパク質に施した6X-Hisタグを利用して、分泌されたH1、N1、NPおよびMP2タンパク質を、金属アフィニティー樹脂および接線流濾過（ApoImmuneによりすでに使用された方法および技術）を用いてショウジョウバエ培養培地から精製する。ゲル電気泳動、イムノブロット技術、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析（MALDI-MS）、および分析超遠心分離により、精製タンパク質を分析する。

【0224】

CSA-4-1BBL（前記のように作製）を1：4のモル比でピオチン化H1、N1、NPもしくはMP2と混合することにより、A型インフルエンザ抗原/4-1BBLコンジュゲートを形成させる。手短には、ピオチン化H1、N1、NPもしくはMP2をCSA-4-1BBLと一緒に4で1時間インキュベートする。非ピオチン化H1、N1、NPもしくはMP2をCSA-4-1BBLと一緒にインキュベートし、これらを非コンジュゲート型対照として用いる。上記コンジュゲートはワクチンとして有用な組成物に製剤化することができる。

【0225】

実施例18：A型インフルエンザに対するワクチン接種

(a) 用量最適化

前記A型インフルエンザ抗原/4-1BBLコンジュゲートを様々な用量でC57BL/6マウスにワクチン接種する。既述のように、四量体技術、サイトカイン染色、細胞傷害性アッセイ、および液性応答の測定を含む標準的な免疫学的技術を用いて、マウスにおける免疫応答を測定する。初期結果を用いて、ワクチンの最適な投与計画を決定する。

【0226】

(b) 感染チャレンジによるワクチン接種

以下のようにA型インフルエンザでチャレンジしたマウスにおいて、A型インフルエンザ抗原/4-1BBLコンジュゲートワクチンの予防および治療効果を明らかにする。ヒトインフルエンザウイルスに感染したマウスをA型インフルエンザ抗原/4-1BBLコンジュゲートワクチンで感染前および感染後に治療し、ウイルス力価を測定することにより、治療の効果を判定した。ワクチン接種した感染マウスおよび対照の感染マウス由来の肺を感染から1、3、5、7および9日後に採取する。罹患率の間接的測定として体重減少を毎日測定する。

【0227】

別のシリーズの実験では、肺病理学を評価し、肺ウイルス力価を測定する。このために、肺をホモジナイズし、1,500 × gで15分ホモジネートの遠心分離を実施した後にウイルス上清を回収し、次の分析まで-80で凍凍する。肺由来のウイルス上清の希釈物を96ウェルのU底プレート中の3 × 10<sup>4</sup> MDCK細胞/ウェルに37で24時間添加し、培地をウェルから除去し、無血清培地を添加する。4日後、培養上清がニワトリ赤血球をもはや凝集しなくなる希釈度を確認した後、公知のウイルス濃度の標準曲線およびTCID<sub>50</sub>のReed - Munc h計算を用いて、ウイルス力価を決定する。

【0228】

実施例19：免疫共刺激CD40L部分

この実施例で用いるヒト単球性白血病THP-1およびマウスA20 B細胞リンパ腫株は、アメリカタイプカルチャーコレクション（ATCC、米国メリーランド州ロックビル）から購入した。A20細胞は、10%熱不活性化ウシ胎仔血清（FBS；Valley Biomedical、米国バージニア州ウィンチェスター）、12 mM L-グルタミン、100 U/mlペニシリン、100 μg/mlストレプトマイシン（すべてGIBCO製）および50 μM 2-メルカプトエタノール（Sigma、米国ミズーリ州セントルイス）を補充したDMEM（GIBCO、米国メリーランド州ゲイサースバーグ）中で培養した。THP-1細胞は、加湿5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにおいて37で、5%FBS、100 U/mlペニシリンおよび0.1 mM HEPESバッファー（GIBCO）を補充したRPMI中で培養した。

【0229】

この実施例で用いるチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) および安定なマウスCD154形質転換CHO (CHO-mCD40L) 株は、Gail Bichop博士 (アイオワ大学) により提供され、100 mM HEPES、50  $\mu$ g/ml ゲンタマイシンおよび5% FBSを含むRPMI 1640 (GIBCO) 中で維持した。

#### 【0230】

ヒト末梢血液単核細胞からの向流水篩により単離した一次単球は、Larry Wahl博士 (NIH) から贈与されたものである。

#### 【0231】

既に記載されているように、v-mycおよびv-raf癌遺伝子を含むマウス組換えJ2レトロウイルスで骨髓細胞を感染させることにより、CD40ノックアウトマウス (CD40KO細胞株) 由来の不死化マクロファージ細胞株を樹立した。例えば、Clemon-Millerら、2000, Immunobiology, 202:477-92を参照されたい。

10

#### 【0232】

安定なヒトCD40を発現する形質転換体の作製のために、J2形質転換株に、10  $\mu$ gのDNAを600 V、20  $\mu$ 秒、および2パルスでエレクトロポレートした。トランスフェクションから24時間後、ゼオシン (100  $\mu$ g/ml) を培地に添加し、耐性コロニーをCD40の表面発現について染色した。FACS Vantage SE (Becton Dickinson、米国カリフォルニア州サンノゼ) を用いて、高度にCD40を発現する細胞を選別し、これらの試験で使用するために維持した。

#### 【0233】

20

(a) CSA-CD40L部分のクローニングおよび発現

PCRにおいて、鋳型としてのストレプトミセス・アビジニ (*Streptomyces avidinii*) から単離したゲノムDNAと、特異的プライマーとを用いて、CSAをコードする遺伝子をクローニングした (図16のaおよびb)。PCRにおいて、鋳型としてフィトヘマグルチニン (PHA) 活性化ヒト末梢血液リンパ球から単離した全RNAから作製した第1鎖cDNAを用い、CD40L特異的プライマーを使用して、ヒトCD40Lの細胞外ドメインをクローニングした (図16のcおよびd)。コンカナバリンA (ConA) で活性化したマウス脾細胞から単離した全RNAを用いて、CSA-hCD40Lと同様にマウスCD40Lをクローニングした。

#### 【0234】

次に、ショウジョウバエ (*Drosophila*) S2発現系 (DES; Invitrogen、米国カリフォルニア州サンディエゴ) への発現用のpMT/BiP/V5-HisCuSO<sub>4</sub>誘導ベクターに、インフレームでCSA/CD40L遺伝子をサブクローニングした。Calcium Phosphate Transfectionキットを製造者 (Invitrogen) のプロトコルに従って用いて、20  $\mu$ gの組換えベクターでショウジョウバエS2細胞をトランスフェクトした。1  $\mu$ gのpCoHygroベクターでの共トランスフェクションと、300  $\mu$ g/ml ハイグロマイシンの存在下での維持により安定な形質転換体を確立した。最終濃度500  $\mu$ Mの硫酸銅を用いて、組換えタンパク質の発現を達成した。培養物上清を誘導の3日後に回収し、40%過硫酸アンモニウムで沈殿させ、PBSに対して透析した。

30

#### 【0235】

既に記載されている改変型金属イオンアフィニティークロマトグラフィー法を用いて、組換えタンパク質を精製した。例えば、Lehrら、2000, Protein Expression Purif., 19:362-68を参照。手短には、キレーティングセファロースファストフローを備えたPharmacia XK 16カラム (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) に培養物上清または沈殿タンパク質を通過させ、50 mMイミダゾールで組換えタンパク質を溶出させた。Bradford色素結合法またはELISA (R&D Systems、米国ミネソタ州ミネアポリス) を用いて、タンパク質濃度を測定した。

40

#### 【0236】

(b) ウェスタンブロットおよびELISAによるCSA-CD40L部分の特性決定

Quantikine CD40Lイムノアッセイ (製品説明書 (R&D Systems) に記載されているように、マイクロプレートに予めコーティングしたCD40Lに特異的なポリクローナルAbを用い

50

る)を用いて、CSA-hCD40Lの発現を検出および定量した。ウェスタンブロット分析のために、まず、天然および変性条件下で、ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりCSA-hCD40LおよびCSA-mCD40Lの上清を分画し、次に、セミドライブロット装置 (BioRad、米国カリフォルニア州ハークリーズ)を用いて、ニフッ化ポリビニリデン膜に移した。最初にブロッキングバッファー中で、次に、1:1,000希釈でヤギ抗SA Ab (Pierce、米国イリノイ州Rockford)を含むブロッキングバッファー中で、室温で1時間膜をインキュベートした。その後、膜を十分に洗浄し、1:4,000希釈のセイヨウワサビペルオキシダーゼコンジュゲート型抗ヤギ抗体と一緒に1時間インキュベートした。最後に、化学発光基質を製品説明書 (ECL、Amercham Bioscience、英国)に従って用いて、タンパク質を検出した。

10

## 【0237】

形質転換体は、高レベルのCSA-CD40L部分を発現し、該部分は、非変性PAGE条件下で、安定な四量体、及びより高次の構造を形成した。単量体への解離は、100 °Cでの加熱後の変性条件下でのみ起こり、60 °Cでは起こらなかった。これらのデータから、免疫共刺激部分のCD40LポリペプチドはCSAの発現、適正なフォールディング、およびオリゴマーとしての存在を干渉しないことがわかる。

## 【0238】

## (c) 受容体結合および活性化アッセイ

百万個のCD40陽性マウスA20 B細胞リンパ腫またはヒトマクロファージTHP-1細胞を200 ng/mlのCSA-CD40L (ヒトもしくはマウス)部分または対照CSAタンパク質と一緒に4 20  
で30分インキュベートした。PBSで数回洗浄した後、フローサイトメトリーにおいてFITC  
コンジュゲート型抗ストレプトアビジン抗体 (Vector Laboratories、米国カリフォルニ  
ア州バーリングガム)を用いて、結合タンパク質を検出した。陰性対照としてCSAを用いて  
非特異的結合を検出した。CD80およびMHCクラスII分子の発現に対するCSA-CD40Lでの刺激  
の効果について、 $0.5 \times 10^6$  THP-1細胞を100 ng/mlのCSA-hCD40LもしくはCSAと一緒に培  
養するかまたは膜形態のCD40Lでトランスフェクトした $0.5 \times 10^6$  CHO細胞と一緒に共培養  
することにより (48時間) 判定した。次に、細胞を洗浄し、飽和濃度のFITCコンジュゲ  
ート型抗CD80 (L307.4) およびHLAクラスII (TU36) 抗体 (BD-Pharmlngen、米国カリフォル  
ニア州サンディエゴ) で染色した後、フローサイトメトリーで分析した。

## 【0239】

フローサイトメトリーにより測定され、図17に示されるように、CSA-mCD40Lはヒトおよ  
びマウスCD40受容体の両方に結合した (図17AおよびB、濃い線)。対照的に、CSA-hCD4  
0Lは、ヒト細胞上のその受容体としか相互作用せず、マウス細胞に対しては最小限から検  
出不能なレベルであった (図17CおよびD、濃い線) が、このことは、その種特異性を示  
している。対照タンパク質としてCSAを用いたときには検出可能な結合がなかった (図17  
、グレーで塗りつぶした部分) ため、上記相互作用はCD40特異的であった。

30

## 【0240】

試験したすべてのCSA-hCD40Lタンパク質濃度でのフローサイトメトリーにおいて、HLA  
クラスII (図18A) およびCD80 (図18B) 分子に対する抗体を用いて、THP-1細胞の表面  
でMHCクラスIIおよびCD80分子両方の発現のアップレギュレートを検出したが、最大アッ  
プレギュレーションは48時間の刺激後に100 ng タンパク質 /  $5 \times 10^5$  細胞で達成された。  
CSA-hCD40L (細い実線) は、HLAクラスII分子のアップレギュレートにおいて、CHO細胞上  
に発現されたCD40Lの膜結合形態 (太い実線) より有効であった (MFI: 55.8対35.5)。対  
照的に、CD40Lの両形態によるCD80のアップレギュレーションはほぼ同等であった (MFI:  
33.6対36.2)。CSAタンパク質とのインキュベーション (塗りつぶしたヒストグラム) で  
は、バックグラウンドレベルを超えるCD80およびHLAクラスII分子の発現に有意に作用し  
なかったことから、アップレギュレートした発現は、CSA-hCD40Lに特異的であった。

40

## 【0241】

## (d) 骨髄由来DCの作製

生後6~8週間のマウスの大腿骨から骨髄を洗い流し、ピペット操作により単細胞に分

50

散させ、塩化カリウムアンモニウム (ACK) 溶液で赤血球を溶解させた。次に、氷上で30分、TIB 105、TIB 146およびクローンRL-172ハイブリドーマ細胞培養物飽和上清のカクテルを用いて、TおよびB細胞について単細胞懸濁液を枯渇させた(培養上清は、Tatiana Zoria博士(ピッツバーグ大学、ペンシルバニア州)から贈与されたものである)。ウサギ補体と一緒に単細胞を37℃で30分インキュベートし、6ウェルプレート中の完全培地(RPMI 1640、2 mM L-グルタミン、100 µg/mlペニシリンおよびストレプトマイシン、10% FBS、0.1 mM非必須アミノ酸、1 mMピルビン酸ナトリウム、1 µg/mlインドメタシンおよび50 µM N-メチル-L-アルギニン)(Sigma)中、10<sup>6</sup>細胞/mlの濃度で一晩(37℃、5% CO<sub>2</sub>)培養した。非接着細胞を穏やかなピペット操作により回収し、計数し、組換えマウス顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(5 ng/ml)およびrIL-4(5 ng/ml)(すべてUS Biological(米国マサチューセッツ州スワンプスコット)製)を補充した完全培地において10<sup>5</sup>細胞/mlの濃度で再懸濁させた。6ウェルプレート(4 ml/ウェル)で細胞を5日間培養した。

#### 【0242】

第5日に、培養物中に存在するDCを細胞表面MHCおよび共刺激分子の発現について分類し、様々な濃度(0.1~0.5 µg/10<sup>6</sup>細胞)のCA-mCD40L、培地のみ、もしくはCSAと一緒にインキュベートした。様々な日に細胞を回収し、CD11cに対するPE標識モノクローナル抗体(HL3)と、CD80(16-10A1)およびCD86(GL1)に対するFITC標識mAb(すべてPharMingen製)とを用いて、成熟マーカーの発現について分析した。

#### 【0243】

様々な濃度(0.1~0.5 µg/10<sup>6</sup>細胞)のマウスCSA-CD40Lと一緒に48時間インキュベートした、第5日のマウス骨髄培養物からの未熟樹状細胞がCD80およびCD86共刺激分子両者の発現の増加を示し(図19AおよびB)、10<sup>6</sup>細胞当たり0.2 µgタンパク質濃度では、CD80発現のアップレギュレーションへの効果がCD86に対するものより大きかった(3倍対2倍)。これよりCSA-CD40L融合タンパク質の濃度を高くするか、またはインキュベーション時間を長くしても、これ以上のアップレギュレーションは起こらなかった(データは示していない)。この効果は、CSAタンパク質と共にインキュベートした細胞が、バックグラウンドレベルを超える共刺激分子の発現について最小から検出不能な変化しか示さなかったことから、免疫共刺激部分に特異的であった。

#### 【0244】

(e) 前炎症サイトカイン産生の分析

ヒト単球を96ウェルマイクロタイタープレートに塗布し、1 µg/mlの市販の三量体組換えヒトCD40L(rhsCD40L)+1 µg/mlのエンハンサー(Alexis Biochemicals、米国カリフォルニア州サンディエゴ)と100 ng/mlのCSA-hCD40L、CSA-mCD40L、もしくはCSAとを用いて刺激した。18時間のインキュベーション後、上清を回収し、全サイトカイン用のOptEIA™セット(PharMingen)を用いたELISAによりアッセイした。E-max Precisionマイクロプレートリーダー(Molecular Devices、米国カリフォルニア州サニーバール)を用いて分析を実施した。

#### 【0245】

CSA-hCD40Lとヒト単球のライゲーションにより、CSAのみと比較して、ヒトIL-1 産生に5倍の刺激が起こったが、これはrhsCD40Lにより誘導されたレベルと同等である(図20AおよびB)。同様に、CSA-mCD40Lでヒト単球を刺激すると、ヒトIL-6の強力な刺激がもたらされた(図20CおよびD)。従って、ヒトおよびマウスCSA-CD40L融合タンパク質はいずれも、ヒト単球上のCD40を刺激して、IL-1 およびIL-6を産生することができる。

#### 【0246】

(f) RNAse保護アッセイ

サイトカインmRNA合成の分析をRNAse保護アッセイにより実施した。細胞を6ウェルプレートに塗布し、CSA-CD40L部分を用いて、CD40を介して3~4時間刺激した。エンハンサーと共にCD40LおよびrhsCD40Lを発現するCHO形質転換体を対照として用いた。Trizolを製品説明書(Invitrogen)に記載されるとおりに使用してRNAを抽出した。ヒトサイトカ

10

20

30

40

50

イン/RNA鋳型セットから作製された放射線標識プローブであるmCK-3b (RiboQuant、BD-P harMingen、米国カリフォルニア州サンディエゴ)と共にRNA (5  $\mu$ g)を55 で一晩ハイブリダイズした。RNAse処理を37 で45分実施した後、保護されたプローブを精製し、TBEバッファー中の5%ポリアクリルアミドゲル (BioRad)を用いた電気泳動により分離した。ゲルを乾燥させ、Kodak Biomax XL X線フィルム (Eastman Kodak、米国ニューヨーク州ロチェスター)に暴露した。非消化プローブをマーカーとして、片対数紙に、泳動距離対ヌクレオチド長の標準曲線をプロットした。次に、サンプルにおけるRNAse保護バンドの同一性をグラフから推定した。

【0247】

図20Dに示すように、CSA-hCD40Lで刺激すると、CSA単独を超えて、IL-6mRNAは2.8倍に達した。

【0248】

以上を考え合わせると、これらのデータは、ヒトおよびマウスCSA-CD40Lの両方が、単球およびマクロファージにおけるCD40シグナル伝達を誘導できることを示している。

【0249】

(g) CSA-hCD40LはIFN- 初回免疫マクロファージにおいてiNOS産生を刺激する

IFN- 初回免疫マクロファージのCD40ライゲーションにより、一酸化窒素産生の刺激が起こるが、これは、マクロファージの殺菌および細胞傷害活性に重要な役割を果たす。誘導性一酸化窒素シンターゼ (iNOS) は、L-アルギニンからの一酸化窒素の合成を触媒する一酸化窒素シンターゼのファミリーに属する。Th1およびTh2ヘルパー細胞は、マクロファージにおけるアルギニン代謝を示差的に調節することができる。Th1細胞はマクロファージによるiNOS産生を誘導するのに対し、Th2細胞はマクロファージを誘導して、抗炎症機能に関連するアルギナーゼを産生させる。従って、マクロファージiNOS産生は、Th1型免疫応答の特質である。

【0250】

以下に、CSA-CD40L部分がマウスマクロファージにおいてiNOS産生を刺激する能力を明らかにする。CD40KO-ヒトCD40細胞をIFN- で24時間初回免疫した後、CSA-hCD40L、rhsCD40L、もしくはCSAのみで24時間刺激した。細胞溶解物を標準化し、抗iNOS Abを用いたウェスタンブロットにより分析した。図21に示すように、CSA-hCD40LまたはrhsCD40Lでマクロファージを刺激するとiNOS産生の刺激が起こったが、CSAでは起こらなかった。1  $\mu$ g/mlの市販のrhsCD40Lで刺激すると、バックグラウンドに対して6倍のiNOS刺激が起こり、300 ng/mlのCSA-hCD40Lで刺激すると、CSA単独の場合と比較して、9倍のiNOS刺激が起こった。これらのデータは、CSA-hCD40LがマクロファージiNOS産生の強力なステミュレーターであることを示している。

【0251】

実施例20 : CSA-4-1BBLにより誘導されるin vivo死滅応答

抗原として50  $\mu$ gのオボアルブミン (OVA) を、そしてアジュバントとして2用量 (それぞれ、12.5  $\mu$ gと25  $\mu$ g) のCSA-4-1BBLまたはLPSをナイーブC57BL/6マウスに静脈内免疫した。ナイーブ動物を対照として用いた。

【0252】

7日後、全てのマウスにCFSE標識した標的細胞を投与したが、この細胞は次のように調製した。ナイーブC57BL/6マウス由来の脾細胞を2つの集団に分けた。第1の集団を0.25  $\mu$ M CFSEで標識し (CFSE<sup>low</sup>)、第2の集団は2.5  $\mu$ M CFSEで標識した後、2  $\mu$ g/ml OVA<sub>57-264</sub> ペプチド (SIINFEKL) で1時間パルスした (CFSE<sup>hi</sup>)。細胞を1:1の比で混合し、総数  $1 \times 10^7$  個の細胞をレシピエントマウスに静脈内注射した。48時間後に脾臓を採取し、フローサイトメトリーにより、CFSE蛍光強度を分析した。結果を図22に示し、ナイーブマウスに標準化した参照CFSE<sup>low</sup>ピークと比較したペプチドパルスCFSE<sup>hi</sup>ピークの溶解%として表示する。図22からわかるように、OVAおよびCSA-4-1BBLでの免疫により、標的細胞における強力なin vivo死滅応答が発生し、CSA-4-1BBLは、試験したいずれの濃度でもLPSより強力なアジュバント効果を示した。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 5 3 】

**実施例21**：4-1BBLによる共刺激は、マウスにおけるHPV16 E7タンパク質に対する免疫応答を大幅に増強し、TC-1腫瘍を制御し、抗腫瘍記憶を誘導した

HPV16 E7エピトープP1（アミノ酸配列RAHYNIVTFを有する）のCD8+T細胞エピトープの投与に基づくワクチン接種プロトコルにおいて、ヒトパピローマウイルス - 16 E7タンパク質を安定に発現する  $1 \times 10^5$  個のTC-1生細胞をナイーブB6マウスの右側腹部に皮下チャレンジした。図23は、このTC-1腫瘍モデルにおけるマウスの生存率を示す。10日後、マウスに対し、(i) PBS（黒ひし形、n = 20）；(ii) 50  $\mu$ g P1 + 12.5  $\mu$ g CSA（黒四角、n = 6）(iii) 25  $\mu$ g CSA-4-1BBL（黒三角、n = 10）；(iv) 50  $\mu$ g P1 + 25  $\mu$ g CSA-4-1BBL（白三角、n = 13）；または(v) 50  $\mu$ g P1 + 10  $\mu$ g CpG（白四角、n = 7）のいずれかを1回皮下注射した。

10

## 【 0 2 5 4 】

図23からわかるように、P1またはCSA-4-1BBLで免疫すると、ある程度免疫療法が成功したが、P1とCSA-4-1BBLの両方で免疫すれば、さらに優れた結果（生存率の増加を含む）が達成された。PBSのみ投与したすべてのマウスは腫瘍を発達させた。

## 【 0 2 5 5 】

第60日に生存マウスを再度チャレンジした（黒い矢印）。腫瘍増殖を週に3回モニターした。腫瘍チャレンジ後にCSA-4-1BBLとP1とを一緒に投与すると、P1もしくはCSA-4-1BBL単独、またはP1およびCpGの場合と比較して、マウスの生存率が有意に増加した。重要なことには、P1 + CSA-4-1BBL群の生存マウスのうち、二次チャレンジの際に腫瘍を発達させたものはなく、これは免疫記憶を証明するものである。

20

## 【 0 2 5 6 】

**実施例22**：OVA / CSA-4-1BBLによるワクチン接種は腫瘍増殖を阻止する

25  $\mu$ g CSA-4-1BBLにコンジュゲートさせた50  $\mu$ g OVAまたは50  $\mu$ gピオチン化OVAでナイーブC57BL/6マウスを免疫した。対照として、何匹かのマウスは非処理のままにした。7日後、 $1 \times 10^5$  個のOVA発現性EG.7腫瘍細胞をマウスの右側腹部に皮下チャレンジした。カリパスを用いて腫瘍増殖を週に3回モニターした。結果（腫瘍無含生存率）を図24に示す。図示するように、対照マウスと、OVAをワクチン接種したマウスはすべて腫瘍を発達させたのに対し、ピオチン化OVA / CSA-4-1BBLをワクチン接種したマウスはすべて腫瘍を発達させなかった。これは、ピオチン化OVA / CSA-4-1BBLによるワクチン接種により、甲状腺腫瘍の増殖が100%阻止されたことを証明するものである。

30

## 【 0 2 5 7 】

**実施例23**：4-1BBLはin vivoで抗原特異的CTL応答を強力に増強する

ナイーブC57BL/6マウスに(i) 50  $\mu$ g OVA、(ii) 50  $\mu$ g OVAと25  $\mu$ g CSA-4-1BBL、(iii) 50  $\mu$ g OVAと25  $\mu$ g 抗CD137抗体または(iv) 50  $\mu$ g OVAおよび25  $\mu$ g LPSを静脈内に免疫した。ナイーブマウスを対照として用いた。7日後、全マウスにCFSE標識標的細胞を投与した。手短には、ナイーブC57BL/6由来の脾細胞を2つの集団に分けた。第1の集団を0.25  $\mu$ M CFSEで標識した（CFSElow）。第2の集団は2.5  $\mu$ M CFSEで標識した後、2  $\mu$ g/ml OVA<sub>257-264</sub> SIINFEKLペプチドで1時間パルスした（CFSEhi）。細胞を1 : 1の比で混合し、総数  $1 \times 10^7$  個の細胞をレシピエントマウスに静脈内注射した。48時間後に脾臓を採取し、フローサイトメトリーにより、CFSE蛍光強度を分析したところ、図25に示す結果が得られた。結果は、ナイーブマウスに標準化した参照CFSElowピークと比較したペプチドパルスCFSEhiピークの溶解%として各パネルの隅に表示する。このアッセイから、4-1BBLが、抗原（OVA）のみ（24.2%）、または抗原とLPS（35%）と比較して、高レベル（95%）まで抗原特異的CTL応答を増強することができ、その結果、大部分の標的細胞を死滅させることを明らかにした。

40

## 【 0 2 5 8 】

**実施例24**：4-1BBL共刺激は、in vivoでCD8+T細胞に対する抗原提示を増大させる

ナイーブB6-SJL（CD45.1+）マウスに(i) 10  $\mu$ g OVA、(ii) 10  $\mu$ g OVAおよび5  $\mu$ g 4-1BBLを静脈内免疫するか、または(iii) 非処理のままにした。2日後、 $1 \times 10^6$  個のCFSE

50

標識OT-1細胞 (CD45.2+) を静脈内注射により投与した。3日後脾臓を採取し、図26に示すように、フローサイトメトリーを用いてOT-1細胞の増殖を分析した。抗原と一緒に4-1BBLを投与すると、大部分のOT-1細胞の増殖からわかるように、CD8+T細胞に対する抗原提示が増大した (OVA + 4-1BBLは83.2% ; OVAは13.7% ; 非処理は8.8%)。

【0259】

実施例25 : 4-1BBL共刺激は樹状細胞による抗原取込みを増大する

ナイーブBALB/cマウスに、25 µg OVA-FITC、25 µg OVA-FITCおよび10 µg CSA、または25 µg OVA-FITCおよび25 µg CSA-4-1BBLを皮下注射した。3時間後、注射部位の鼠径リンパ節を採取した。フローサイトメトリーを用いて、CD11c+集団におけるFITC+細胞を分析し、図27に示すように、in vivo蛍光標識抗原取込みを測定した。図からわかるように、4-1BBLシグナル伝達は、CD11c+DCによる抗原取込みを増大したが、対照CSAタンパク質は何の作用も与えなかった。

【0260】

本発明について、当業者がこれを作製および使用するのに十分詳細に説明および例示してきたが、本発明の精神および範囲を逸脱することなく、様々な代用、改変および改良が明らかである。本明細書に記載した実施例は、好ましい実施形態の代表的なものであり、例であって、本発明の範囲に関して制限を意図するものではない。本発明に対する改変およびその他の使用も当業者には想起されるであろう。これらの改変は、本発明の精神に含まれ、請求の範囲に定義される。

【0261】

当業者には、本発明の精神および範囲を逸脱することなく、様々な代用および改変をここに開示した本発明に実施できることは容易に明らかであろう。

【0262】

本明細書に記載した特許および刊行物はすべて、本発明に関する分野の当業者のレベルを示すものである。これらの特許および刊行物はすべて、個々の刊行物が参照により組み込まれることを具体的かつ個別に示されているのと同程度に、参照により本明細書に組み込むものとする。

【0263】

本明細書に例示的に記載した本発明は、本明細書に具体的に開示されていないあらゆる要素、制限が存在しなくても好適に実施することができる。従って、例えば、各例において、用語「含む」、「から実質的になる」および「からなる」のいずれも、他の2つと置き換えが可能である。使用してきた用語および表現は、説明の用語として用いたもので、制限のためではなく、このような用語および表現に関して、ここに図示および記載した特徴のあらゆる同等物およびその部分を排除する意図はなく、請求する本発明の範囲内で、多様な改変が可能であることを認識されたい。従って、好ましい実施形態および最適な特徴により本発明を具体的に開示してきたが、ここに開示した概念の改変および変更を当業者は利用してもよく、このような改変および変更が、添付の請求項に定義される本発明の範囲内にあるとみなされることを理解すべきである。

【0264】

その他の実施形態例を以下に挙げる。また、添付の請求項にも記載する。

【0265】

実施形態例

1. (a) (i) 第1免疫共刺激ポリペプチドを含むコンジュゲートメンバーと(ii) 結合対の第1メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第1コンジュゲート ; および

(b) (i) 第1抗原を含むコンジュゲートメンバーと(ii) 結合対の第2メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第2コンジュゲートを含む組合せ。

【0266】

2. 結合対の第1メンバーがアビジンまたはストレプトアビジンを含み、結合対の第2メ

10

20

30

40

50

ンバーがビオチンを含む、実施形態 1 に記載の組合せ。

【 0 2 6 7 】

3 . 結合対の第 1 メンバーがコアストレプトアビジンを含む、実施形態 2 に記載の組合せ。

【 0 2 6 8 】

4 . 第 1 コンジュゲートが、第 1 免疫共刺激ポリペプチドと結合対の第 1 メンバーとを含む融合ポリペプチドを含む、実施形態 1 に記載の組合せ。

【 0 2 6 9 】

5 . 第 1 免疫共刺激ポリペプチドが、4-1BBL、CD86、ICOSL、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、OX40L、CD27L、CD30L、LIGHT、BAFF、APRIL、CD80およびCD40Lからなる群より選択される、実施形態 1 に記載の組合せ。

10

【 0 2 7 0 】

6 . 第 1 免疫共刺激ポリペプチドが4-1BBLである、実施形態 5 に記載の組合せ。

【 0 2 7 1 】

7 . 第 1 コンジュゲートが、配列番号 8 のアミノ酸配列を含んでなる融合ポリペプチドを含む、実施形態 6 に記載の組合せ。

【 0 2 7 2 】

8 . 第 1 抗原が感染因子に関連する、実施形態 1 に記載の組合せ。

【 0 2 7 3 】

9 . 感染因子が、ヒトまたはトリインフルエンザおよびヒト免疫不全ウイルスからなる群より選択される、実施形態 8 に記載の組合せ。

20

【 0 2 7 4 】

10 . 第 1 抗原が腫瘍関連抗原である、実施形態 1 に記載の組合せ。

【 0 2 7 5 】

11 . 腫瘍関連抗原が、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、サバイピン、MAGE-1、MAGE-3、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、癌胎児抗原、フェトプロテイン、臍腫瘍胎児抗原、MUC-1、CA 125、CA 15-3、CA 19-9、CA 549、CA 195、前立腺特異的抗原；前立腺特異的膜抗原、Her2/neu、gp-100、突然変異K-rasタンパク質、突然変異p53、トランケート型表皮成長因子受容体、キメラタンパク質<sup>P210</sup>BCR-ABL；HPV E6、HPV E7；エプスタイン - バーウイルスEBNA3タンパク質、ならびにそれらの断片の混合物からなる群より選択される、実施形態 10 に記載の組合せ。

30

【 0 2 7 6 】

12 . 第 1 および第 2 コンジュゲートが個別の組成物として提供される、実施形態 1 に記載の組合せ。

【 0 2 7 7 】

13 . 第 1 および第 2 コンジュゲートが単一の組成物として提供される、実施形態 1 に記載の組合せ。

【 0 2 7 8 】

14 . 前記組成物が、薬学的に許容可能な担体、賦形剤もしくは希釈剤を含む、実施形態 13 に記載の組合せ。

40

【 0 2 7 9 】

15 . 前記組成物として提供する際、第 1 コンジュゲートが、第 1 および第 2 結合対メンバー間の結合を介して第 2 コンジュゲートに結合している、実施形態 13 に記載の組合せ。

【 0 2 8 0 】

16 . 第 1 免疫共刺激ポリペプチドが、免疫共刺激分子の膜貫通ドメインを含まない、実施形態 1 に記載の組合せ。

【 0 2 8 1 】

17 . 第 1 免疫共刺激ポリペプチドが、免疫共刺激分子の細胞外ドメイン、またはその受容体結合部分を含む、実施形態 1 に記載の組合せ。

【 0 2 8 2 】

50

18. (i) 第2免疫共刺激ポリペプチドと結合対の第1メンバーとを含むコンジュゲートメンバー、および(ii) 第2抗原と結合対の第2メンバーとを含むコンジュゲートメンバー、を含む第3コンジュゲートをさらに含み、

その際、第2免疫共刺激ポリペプチドは、第1免疫共刺激ポリペプチドと同じであるかまたは違うものであり；第2抗原は第1抗原と同じであるかまたは違うものであり；第3コンジュゲートの第1および第2結合対メンバーは、第1および第2コンジュゲートの第1および第2結合対メンバーと同じであるかまたは違うものであり、

第1コンジュゲートメンバーは、第1および第2結合対メンバー間の結合を介して前記第2コンジュゲートメンバーに結合している、実施形態1に記載の組合せ。

【0283】

19. (a) (i) 第1免疫共刺激ポリペプチドを含むコンジュゲートメンバーと(ii) 結合対の第1メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第1コンジュゲート；および

(b) (i) 感染因子を含むコンジュゲートメンバーと(ii) 結合対の第2メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第2コンジュゲートを含む組合せ。

【0284】

20. 第1腫瘍関連抗原を発現する腫瘍に対する免疫応答を生じさせるかまたは増強する方法であって、該腫瘍を有する患者に：

(a) (i) 第1免疫共刺激ポリペプチドを含むコンジュゲートメンバーと(ii) 結合対の第1メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第1コンジュゲート；および(i) 第1腫瘍関連抗原を含むコンジュゲートメンバーと(ii) 結合対の第2メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第2コンジュゲート；または

(b) 第1および第2コンジュゲートでin vitro処理した免疫細胞を投与することを含み、上記方法。

【0285】

21. 第1および第2コンジュゲートを前記患者に投与する、実施形態20に記載の方法。

【0286】

22. 第1および第2コンジュゲートを個別に投与する、実施形態21に記載の方法。

【0287】

23. 第1および第2コンジュゲートを同時に投与する、実施形態21に記載の方法。

【0288】

24. 第1および第2コンジュゲートを単一組成物として投与する、実施形態20に記載の方法。

【0289】

25. 前記組成物として提供する際、第1コンジュゲートが、第1および第2結合対メンバー間の結合を介して第2コンジュゲートに結合している、実施形態24に記載の方法。

【0290】

26. 第1および第2コンジュゲートの少なくとも1つを腫瘍内注射により投与する、実施形態21に記載の方法。

【0291】

27. 第1腫瘍関連抗原が、ヒトテロメラゼ逆転写酵素、サバイピン、MAGE-1、MAGE-3、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、癌胎児抗原、フェトプロテイン、隣腫瘍胎児抗原、MUC-1、CA 125、CA 15-3、CA 19-9、CA 549、CA 195、前立腺特異的抗原；前立腺特異的膜抗原、Her2/neu、gp-100、突然変異K-rasタンパク質、突然変異p53、トランケート型表皮成長因子受容体、キメラタンパク質<sup>P210</sup>BCR-ABL；HPV E6、HPV E7；エプスタイン-バーウイルスEBNA3タンパク質、ならびにそれらの断片の混合物からなる群より選択される、実施形態20に記載の方法。

【0292】

28. (i) 第2免疫共刺激ポリペプチドと結合対の第1メンバーとを含むコンジュゲート

10

20

30

40

50

トメンバー、および(ii)第2腫瘍関連抗原と結合対の第2メンバーとを含むコンジュゲートメンバーを含む、第3コンジュゲートを投与することをさらに含み、

その際、第2免疫共刺激ポリペプチドは、第1免疫共刺激ポリペプチドと同じであるかまたは違うものであり；第2抗原は第1抗原と同じであるかまたは違うものであり；第3コンジュゲートの第1および第2結合対メンバーは、第1および第2コンジュゲートの第1および第2結合対メンバーと同じであるかまたは違うものであり、

第1コンジュゲートメンバーは、第1および第2結合対メンバー間の結合を介して第2コンジュゲートメンバーに結合している、実施形態20に記載の方法。

【0293】

29. 第2腫瘍関連抗原が、ヒトテロメラゼ逆転写酵素、サバイピン、MAGE-1、MAGE-3、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、癌胎児抗原、フェトプロテイン、臍腫瘍胎児抗原、MUC-1、CA 125、CA 15-3、CA 19-9、CA 549、CA 195、前立腺特異的抗原；前立腺特異的膜抗原、Her2/neu、gp-100、突然変異K-rasタンパク質、突然変異p53、トランケート型表皮成長因子受容体、キメラタンパク質<sup>P210</sup>BCR-ABL；HPV E6、HPV E7；エプスタイン-バーウイルスEBNA3タンパク質、ならびにそれらの断片の混合物からなる群より選択される、実施形態28に記載の方法。

10

【0294】

30. 結合対の第1メンバーがアビジンまたはストレプトアビジンを含み、前記結合対の第2メンバーがビオチンを含む、実施形態20に記載の方法。

【0295】

31. 結合対の第1メンバーがコアストレプトアビジンを含む、実施形態30に記載の方法。

20

【0296】

32. 第1コンジュゲートが、第1免疫共刺激ポリペプチドと結合対の第1メンバーとを含む融合ポリペプチドを含む、実施形態20に記載の方法。

【0297】

33. 第1免疫共刺激ポリペプチドが、4-1BBL、CD86、ICOSL、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、OX40L、CD27L、CD30L、LIGHT、BAFF、APRIL、CD80およびCD40Lからなる群より選択される、実施形態20に記載の方法。

【0298】

34. 第1免疫共刺激ポリペプチドが4-1BBLである、実施形態33に記載の方法。

30

【0299】

35. 第1コンジュゲートが、配列番号8のアミノ酸配列を含んでなる融合ポリペプチドを含む、実施形態34に記載の方法。

【0300】

36. 免疫共刺激ポリペプチドが、免疫共刺激分子の膜貫通ドメインを含まない、実施形態20に記載の方法。

【0301】

37. 免疫共刺激ポリペプチドが、免疫共刺激分子の細胞外ドメイン、またはその受容体結合部分を含む、実施形態20に記載の方法。

40

【0302】

38. 第1および第2コンジュゲートでin vitro処理した免疫細胞を前記患者に投与する、実施形態20に記載の方法。

【0303】

39. 免疫細胞は免疫共刺激ポリペプチドの受容体を含み、第1コンジュゲートは免疫共刺激ポリペプチド及び受容体間の結合を介して免疫細胞にコンジュゲートされ、かつ第2コンジュゲートは第1および第2結合対メンバー間の結合を介して免疫細胞にコンジュゲートされる、実施形態38に記載の方法。

【0304】

40. 免疫細胞を第1および第2コンジュゲートで同時に処理する、実施形態38に記載の

50

方法。

【0305】

41．免疫細胞を第1および第2コンジュゲートで個別に処理する、実施形態38に記載の方法。

【0306】

42．免疫細胞を改変することにより、腫瘍関連抗原を発現する腫瘍または感染因子に対する免疫応答を生じさせるかまたは増強する方法であって、第1免疫共刺激ポリペプチドの受容体を発現する免疫細胞を、

(a)(i)第1免疫共刺激ポリペプチドを含むコンジュゲートメンバーと(ii)結合対の第1メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第1コンジュゲート；および

(b)(i)前記腫瘍もしくは感染因子に関連する抗原または該感染因子を含むコンジュゲートメンバーと(ii)結合対の第2メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第2コンジュゲート、

と接触させることを含み、

その際、第1コンジュゲートは、免疫共刺激ポリペプチドと受容体との間の結合により免疫細胞にコンジュゲートされ、かつ、第2コンジュゲートは、第1および第2結合対メンバー間の結合を介して免疫細胞にコンジュゲートされる、上記方法。

【0307】

43．第1コンジュゲートおよび第2コンジュゲートと個別に接触させる、実施形態42に記載の方法。

【0308】

44．第1および第2コンジュゲートと同時に接触させる、実施形態42に記載の方法。

【0309】

45．第1および第2コンジュゲートを単一の組成物として提供する、実施形態44に記載の方法。

【0310】

46．前記組成物として提供する際、第1コンジュゲートは、第1および第2結合対メンバー間の結合を介して第2コンジュゲートに結合している、実施形態45に記載の方法。

【0311】

47．免疫細胞を含む患者に、第1および第2コンジュゲートを投与することにより前記接触を実施する、実施形態42に記載の方法。

【0312】

48．第2コンジュゲートが腫瘍関連抗原を含み、前記患者が前記腫瘍をさらに含み、第1および第2コンジュゲートの少なくとも1つを腫瘍内注射により投与する、実施形態47に記載の方法。

【0313】

49．免疫細胞がT細胞または好中球である、実施形態42に記載の方法。

【0314】

50．T細胞が、CD4+細胞、CD8+細胞、ナチュラルキラー細胞、単球および樹状細胞からなる群より選択される、実施形態49に記載の方法。

【0315】

51．第2コンジュゲートが腫瘍関連抗原を含む、実施形態42に記載の方法。

【0316】

52．腫瘍関連抗原が、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、サバイピン、MAGE-1、MAGE-3、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、癌胎児抗原、フェトプロテイン、臍腫瘍胎児抗原、MUC-1、CA 125、CA 15-3、CA 19-9、CA 549、CA 195、前立腺特異的抗原；前立腺特異的膜抗原、Her2/neu、gp-100、突然変異K-rasタンパク質、突然変異p53、トランケート型表皮成長因子受容体、キメラタンパク質<sup>P210</sup>BCR-ABL；HPV E6、HPV E7；エプスタイン-バーウイルスEBNA3タンパク質、ならびにそれらの断片の混合物からなる群より選択される、実施形態51に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【 0 3 1 7 】

5 3 . 第 2 コンジュゲートが感染因子関連抗原または感染因子を含む、実施形態42に記載の方法。

## 【 0 3 1 8 】

5 4 . 感染因子が細菌である、実施形態42に記載の方法。

## 【 0 3 1 9 】

5 5 . 細菌が、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) ; 炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) ; 黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) からなる群より選択される、実施形態54に記載の方法。

## 【 0 3 2 0 】

5 6 . 感染因子がウイルスである、実施形態42に記載の方法。

## 【 0 3 2 1 】

5 7 . ウイルスが、アデノウイルス科 ; アレナウイルス科 ; カリチウイルス科 ; コロナウイルス科 ; フィロウイルス科 ; フラビウイルス科 ; ヘパドナウイルス科 ; ヘルペスウイルス科 ; オルソミクソウイルス科 ; パピローマウイルス科 ; ピコルナウイルス科 ; ポックスウイルス科 ; レオウイルス科 ; レトロウイルス科 ; ラブドウイルス科 ; およびトガウイルス科からなる群より選択される、実施形態56に記載の方法。

## 【 0 3 2 2 】

5 8 . 感染因子が寄生体である、実施形態42に記載の方法。

## 【 0 3 2 3 】

5 9 . 寄生体が、マラリア原虫 (*Plasmodium*) およびリーシュマニア (*Leishmania*) からなる群より選択される、実施形態58に記載の方法。

## 【 0 3 2 4 】

6 0 . 前記感染因子が真菌である、実施形態42に記載の方法。

## 【 0 3 2 5 】

6 1 . 真菌が、アスペルギルス (*Aspergillus*) ; カンジダ (*Candida*) ; コクシジウム (*Coccidia*) ; クリプトコックス (*Cryptococci*) ; ジオトリカ (*Geotricha*) ; ヒストプラズマ (*Histoplasma*) ; ミクロスポリジア (*Microsporidia*) ; およびニューモシチス (*Pneumocystis*) からなる群より選択される、実施形態60に記載の方法。

## 【 0 3 2 6 】

6 2 . 前記患者が、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ブタ、トリ、イヌ、ネコおよび霊長類の各種からなる群より選択される、実施形態47に記載の方法。

## 【 0 3 2 7 】

6 3 . 前記患者がヒトである、実施形態47に記載の方法。

## 【 0 3 2 8 】

6 4 . 前記免疫細胞が、第 2 免疫共刺激ポリペプチドの受容体を含み、前記方法が、前記免疫細胞を、 ( i ) 第 2 免疫共刺激ポリペプチドと結合対の第 1 メンバーとを含むコンジュゲートメンバー、および ( ii ) 前記腫瘍もしくは感染因子に関連する第 2 抗原または該感染因子と結合対の第 2 メンバーとを含むコンジュゲートメンバーを含む、第 3 コンジュゲートと接触させることをさらに含み、その際、

第 2 免疫共刺激ポリペプチドは、第 1 免疫共刺激ポリペプチドと同じであるかまたは違うものであり ; 第 2 抗原は、存在する場合には、第 1 抗原が存在する場合にこれと同じであるかまたは違うものであり ; 第 3 コンジュゲートの第 1 および第 2 結合対メンバーは、第 1 および第 2 コンジュゲートの第 1 および第 2 結合対メンバーと同じであるかまたは違うものであり、

第 1 コンジュゲートメンバーは、第 1 および第 2 結合対メンバー間の結合を介して第 2 コンジュゲートメンバーに結合している、実施形態42に記載の方法。

## 【 0 3 2 9 】

6 5 . 結合対の第 1 メンバーが、アビジンまたはストレプトアビジンを含み、結合対の第 2 メンバーがビオチンを含む、実施形態42に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【0330】

66. 結合対の第1メンバーが、コアストレプトアビジンを含む、実施形態65に記載の方法。

## 【0331】

67. 第1コンジュゲートが、第1免疫共刺激ポリペプチドと結合対の第1メンバーとを含む融合ポリペプチドを含む、実施形態42に記載の方法。

## 【0332】

68. 第1免疫共刺激ポリペプチドが、4-1BBL、CD86、ICOSL、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、OX40L、CD27L、CD30L、LIGHT、BAFF、APRIL、CD80およびCD40Lからなる群より選択される、実施形態42に記載の方法。

10

## 【0333】

69. 第1免疫共刺激ポリペプチドが4-1BBLである、実施形態68に記載の方法。

## 【0334】

70. 第1コンジュゲートが、配列番号8のアミノ酸配列を含んでなる融合ポリペプチドを含む、実施形態69に記載の方法。

## 【0335】

71. 免疫共刺激ポリペプチドが、免疫共刺激分子の膜貫通ドメインを含まない、実施形態42に記載の方法。

## 【0336】

72. 免疫共刺激ポリペプチドが、免疫共刺激分子の細胞外ドメイン、またはその受容体結合部分を含む、実施形態42に記載の方法。

20

## 【0337】

73. 実施形態42に記載の方法により作製された免疫細胞の集団であって、他の免疫細胞に接触させると、該免疫細胞が前記腫瘍に対する免疫応答を生じさせるかまたは増強する、上記集団。

## 【0338】

74. 第1免疫共刺激ポリペプチドの受容体を発現する改変免疫細胞であって、該改変免疫細胞は、

(a) (i) 第1免疫共刺激ポリペプチドを含むコンジュゲートメンバーと(ii) 結合対の第1メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第1コンジュゲート；および

30

(b) (i) 第1抗原または感染因子を含むコンジュゲートメンバーと(ii) 上記結合対の第2メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第2コンジュゲートを含み、その際、第1コンジュゲートは、免疫共刺激ポリペプチドと受容体との間の結合を介して免疫細胞にコンジュゲートされ、かつ、第2コンジュゲートは、第1および第2結合対メンバー間の結合を介して免疫細胞にコンジュゲートされている、上記改変免疫細胞。

## 【0339】

75. 免疫細胞が、T細胞、好中球、ナチュラルキラー細胞、単球および樹状細胞からなる群より選択される、実施形態74に記載の免疫細胞。

## 【0340】

76. T細胞が、CD4+細胞およびCD+細胞からなる群より選択される、実施形態75に記載の免疫細胞。

40

## 【0341】

77. 結合対の第1メンバーが、アビジンまたはストレプトアビジンを含み、かつ結合対の第2メンバーがビオチンを含む、実施形態76に記載の免疫細胞。

## 【0342】

78. 結合対の第1メンバーが、コアストレプトアビジンを含む、実施形態76に記載の免疫細胞。

## 【0343】

79. 第1コンジュゲートが、第1免疫共刺激ポリペプチドと結合対の第1メンバーとを含む融合ポリペプチドを含む、実施形態74に記載の免疫細胞。

50

## 【 0 3 4 4 】

80 . 第1免疫共刺激ポリペプチドが、4-1BBL、CD86、ICOSL、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、OX40L、CD27L、CD30L、LIGHT、BAFF、APRIL、CD80およびCD40Lからなる群より選択される、実施形態74に記載の免疫細胞。

## 【 0 3 4 5 】

81 . 第1免疫共刺激ポリペプチドが4-1BBLである、実施形態80に記載の免疫細胞。

## 【 0 3 4 6 】

82 . 感染因子に対する免疫応答を誘導または増強する方法であって、感染因子による感染症に罹患しているかまたはその危険性がある患者に、

( a ) ( i ) 第1免疫共刺激ポリペプチドを含むコンジュゲートメンバーと ( ii ) 結合対の第1メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第1コンジュゲート；および

( b ) ( i ) 前記感染因子に関連する第1抗原を含むかまたは該感染因子を含むコンジュゲートメンバーと ( ii ) 結合対の第2メンバーを含むコンジュゲートメンバーとを含む、第2コンジュゲート

を投与することを含む、上記方法。

## 【 0 3 4 7 】

83 . 第1および第2コンジュゲートを個別に投与する、実施形態82に記載の方法。

## 【 0 3 4 8 】

84 . 第1および第2コンジュゲートを同時に投与する、実施形態82に記載の方法。

## 【 0 3 4 9 】

85 . 第1および第2コンジュゲートを単一の組成物として提供する、実施形態84に記載の方法。

## 【 0 3 5 0 】

86 . 前記組成物として提供する際、第1コンジュゲートが、第1および第2結合対メンバー間の結合を介して第2コンジュゲートに結合している、実施形態85に記載の方法。

## 【 0 3 5 1 】

87 . 第1および第2コンジュゲートの少なくとも1つを、経口；舌下；経粘膜；経皮；直腸；膺；皮下；筋内；静脈内；動脈内；鞘内；カテーテルを介して；インプラントを介して；および腫瘍への直接投与からなる群より選択される経路により投与する、実施形態82に記載の方法。

## 【 0 3 5 2 】

88 . 感染因子が細菌である、実施形態82に記載の方法。

## 【 0 3 5 3 】

89 . 細菌が、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) ；炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) ；黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) からなる群より選択される、実施形態88に記載の方法。

## 【 0 3 5 4 】

90 . 感染因子がウイルスである、実施形態82に記載の方法。

## 【 0 3 5 5 】

91 . ウイルスが、アデノウイルス科；アレナウイルス科；カリチウイルス科；コロナウイルス科；フィロウイルス科；フラビウイルス科；ヘパドナウイルス科；ヘルペスウイルス科；オルソミクソウイルス科；パピローマウイルス科；ピコルナウイルス科；ポックスウイルス科；レオウイルス科；レトロウイルス科；ラブドウイルス科；およびトガウイルス科からなる群より選択される、実施形態90に記載の方法。

## 【 0 3 5 6 】

92 . 感染因子が寄生体である、実施形態82に記載の方法。

## 【 0 3 5 7 】

93 . 寄生体が、マラリア原虫 (*Plasmodium*) およびリーシュマニア (*Leishmania*) からなる群より選択される、実施形態92に記載の方法。

## 【 0 3 5 8 】

10

20

30

40

50

94．感染因子が真菌である、実施形態82に記載の方法。

【0359】

95．真菌が、アスペルギルス (Aspergillus) ; カンジダ (Candida) ; コクシジウム (Coccidia) ; クリプトコックス (Cryptococci) ; ジオトリカ (Geotricha) ; ヒストプラズマ (Histoplasma) ; ミクロスポリジア (Microsporidia) ; およびニューモシチス (Pneumocystis) からなる群より選択される、実施形態94に記載の方法。

【0360】

96．前記患者が、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ブタ、トリ、イヌ、ネコおよび霊長類の各種からなる群より選択される、実施形態82に記載の方法。

【0361】

97．前記患者がヒトである、実施形態96に記載の方法。

【0362】

98．感染症がヒトまたはトリインフルエンザであり、第1抗原が、H、N、M1、M2e、NS1、NS2 (NEP)、NP、PA、PB1、およびPB2からなる群より選択される、実施形態82に記載の方法。

【0363】

99．感染症がHIVであり、第1抗原が、Gagタンパク質、Pol、Vif、Vpr、Rev、Vpu、エンペロープエピトープ、Tat、およびNefからなるHIV抗原の群より選択される、実施形態82に記載の方法。

【0364】

100．(i) 第2免疫共刺激ポリペプチドと結合対の第1メンバーとを含むコンジュゲートメンバー、および(ii) 前記感染症に関連する第2抗原または前記感染因子と結合対の第2メンバーとを含むコンジュゲートメンバーを含む、第3コンジュゲートを投与することをさらに含み、その際、

第2免疫共刺激ポリペプチドは、第1免疫共刺激ポリペプチドと同じであるかまたは違うものであり；第2抗原は、存在する場合には、第1抗原が存在する場合にはこれと同じであるかまたは違うものであり；第3コンジュゲートの第1および第2結合対メンバーは、第1および第2コンジュゲートの第1および第2結合対メンバーと同じであるかまたは違うものであり、

第1コンジュゲートメンバーは、第1および第2結合対メンバー間の結合を介して第2コンジュゲートメンバーに結合している、実施形態82に記載の方法。

【0365】

101．感染症がヒトまたはトリインフルエンザであり、第2抗原が、H、N、M1、M2e、NS1、NS2 (NEP)、NP、PA、PB1、およびPB2からなる群より選択される、実施形態100に記載の方法。

【0366】

102．感染症がHIVであり、第2抗原が、Gagタンパク質、Pol、Vif、Vpr、Rev、Vpu、エンペロープエピトープ、Tat、およびNefからなるHIV抗原の群より選択される、実施形態101に記載の方法。

【0367】

103．結合対の第1メンバーが、アビジンまたはストレプトアビジンを含み、結合対の第2メンバーがビオチンを含む、実施形態82に記載の方法。

【0368】

104．結合対の第1メンバーが、コアストレプトアビジンを含む、実施形態103に記載の方法。

【0369】

105．第1コンジュゲートが、第1免疫共刺激ポリペプチドと結合対の第1メンバーとを含む融合ポリペプチドを含む、実施形態82に記載の方法。

【0370】

106．第1免疫共刺激ポリペプチドが、4-1BBL、CD86、ICOSL、PD-L1、PD-L2、B7-H3、

10

20

30

40

50

B7-H4、OX40L、CD27L、CD30L、LIGHT、BAFF、APRIL、CD80およびCD40Lからなる群より選択される、実施形態82に記載の方法。

【0371】

107．第1免疫共刺激ポリペプチドが4-1BBLである、実施形態106に記載の方法。

【0372】

108．第1コンジュゲートが、配列番号8のアミノ酸配列を含んでなる融合ポリペプチドを含む、実施形態107に記載の方法。

【0373】

109．免疫共刺激ポリペプチドが、免疫共刺激分子の膜貫通ドメインを含まない、実施形態82に記載の方法。

10

【0374】

110．免疫共刺激ポリペプチドが、免疫共刺激分子の細胞外ドメイン、またはその受容体結合部分を含む、実施形態82に記載の方法。

【0375】

111．実質的に免疫共刺激ポリペプチドとアビジンまたはストレプトアビジンとから構成されるコンジュゲートであって、免疫共刺激ポリペプチドが、4-1BBL、CD86、ICOSL、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、OX40L、CD27L、CD30L、LIGHT、BAFF、APRIL、CD80およびCD40Lからなる群より選択される、上記コンジュゲート。

【0376】

112．コアストレプトアビジンを含む、実施形態111に記載のコンジュゲート。

20

【0377】

113．前記免疫共刺激ポリペプチドが、4-1BBL、ICOSL、PD-L1、PD-L2、OX40L、CD27L、CD30L、LIGHT、BAFF、およびAPRILからなる群より選択される、実施形態111に記載の方法。

【0378】

114．動物において免疫刺激応答を誘導する方法であって、実質的に免疫共刺激ポリペプチドとアビジンまたはストレプトアビジンとから構成されるコンジュゲートを動物に投与することから実質的に構成される、上記方法。

【0379】

115．前記コンジュゲートがコアストレプトアビジンを含む、実施形態114に記載の方法。

30

【0380】

116．免疫共刺激ポリペプチドが、4-1BBL、CD86、ICOSL、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、OX40L、CD27L、CD30L、LIGHT、BAFF、APRIL、CD80およびCD40Lからなる群より選択される、実施形態114に記載の方法。

【0381】

117．免疫共刺激ポリペプチドが、4-1BBL、ICOSL、PD-L1、PD-L2、OX40L、CD27L、CD30L、LIGHT、BAFF、およびAPRILからなる群より選択される、実施形態116に記載の方法。

【0382】

118．免疫共刺激ポリペプチドとアビジンまたはストレプトアビジンとを含むコンジュゲートであって、免疫共刺激ポリペプチドが、4-1BBL、CD86、ICOSL、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、OX40L、CD27L、CD30L、LIGHT、BAFF、APRIL、CD80およびCD40Lからなる群より選択される、上記コンジュゲート。

40

【0383】

119．動物において免疫刺激応答を誘導する方法であって、免疫共刺激ポリペプチドとアビジンまたはストレプトアビジンとを含むコンジュゲートを動物に投与することを含み、その際、免疫共刺激ポリペプチドが、4-1BBL、CD86、ICOSL、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、OX40L、CD27L、CD30L、LIGHT、BAFF、APRIL、CD80およびCD40Lからなる群より選択される、上記方法。

【0384】

50

120. 抗原を動物に投与することをさらに含む、実施形態119に記載の方法。

【0385】

121. 抗原と結合対メンバーを含むコンジュゲートとして抗原を投与する、実施形態120に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0386】

【図1A】コアストレプトアビジンとマウスLIGHTタンパク質の細胞外ドメインとを含む融合タンパク質のヌクレオチド配列（配列番号1）を示す図である。

【図1B】コアストレプトアビジンとマウスLIGHTタンパク質の細胞外ドメインとを含む融合タンパク質のアミノ酸配列（配列番号2）を示す図である。下線はコアストレプトアビジン配列である。

10

【図2A】ヒトCD80の細胞外ドメインとコアストレプトアビジンとを含む融合タンパク質のヌクレオチド配列（配列番号3）を示す図である。

【図2B】ヒトCD80の細胞外ドメインとコアストレプトアビジンとを含む融合タンパク質のアミノ酸配列（配列番号4）を示す図である。下線はコアストレプトアビジン配列である。

【図3A】マウス4-1BBLの細胞外ドメインとコアストレプトアビジンとを含む融合タンパク質のヌクレオチド配列（配列番号5）を示す図である。

【図3B】マウス4-1BBLの細胞外ドメインとコアストレプトアビジンとを含む融合タンパク質のアミノ酸配列（配列番号6）を示す図である。下線はコアストレプトアビジン配列である。

20

【図4A】コアストレプトアビジンとヒト4-1BBLの細胞外ドメインとを含む融合タンパク質のヌクレオチド配列（配列番号7）を示す図である。

【図4B】コアストレプトアビジンとヒト4-1BBLの細胞外ドメインとを含む融合タンパク質のアミノ酸配列（配列番号8）を示す図である。下線はコアストレプトアビジン配列である。

【図5A】コアストレプトアビジンとヒトCD86の細胞外ドメインとを含む融合タンパク質のヌクレオチド配列（配列番号9）を示す図である。

【図5B】コアストレプトアビジンとヒトCD86の細胞外ドメインとを含む融合タンパク質のアミノ酸配列（配列番号10）を示す図である。下線はコアストレプトアビジン配列である。

30

【図6】図6A、6B及び6Cは、HPV16 E6（配列番号11）、HPV16 E6変異体（配列番号12）及びHPV16 E7（配列番号13）のアミノ酸配列を示す図である。

【図7A】実施例で使用したCSA-ヒトCD40L構築物のヌクレオチド配列（配列番号14）を示す図である。

【図7B】実施例で使用したCSA-ヒトCD40L構築物のアミノ酸配列（配列番号15）を示す図である。

【図8】レスポンダーとしてナイーブBALB/cリンパ球を、そしてステイミュレーターとして同種異系C57BL/6放射線照射脾細胞を用いた同種異系混合リンパ球反応の結果を示す。表示した培養物には1 µg/mlのCSA-41BBL融合タンパク質を補充した。

40

【図9】CSA-41BBL融合タンパク質（0.5 µg/ml）、対照CSAタンパク質（0.19 µg/ml）、または抗4-1BBLモノクローナル抗体クローン3H3（5 µg/ml）の存在または非存在下で、C57BL/6マウスから選別したCD8<sup>+</sup>T細胞を可溶性抗CD3モノクローナル抗体（0.5 µg/ml）と放射線照射脾細胞とで刺激した、ex vivo T細胞増殖の結果を示す図である。

【図10】百万個のOT-I CD8<sup>+</sup>T細胞をCFSEで標識し、ビオチン化OVA（1注射につき10 µg）、およびビオチン化OVAと混合したCSA-41BBL融合タンパク質（41BBL+OVA）（1注射につき1 µg）、またはビオチン化OVAとCSA-41BBLとを含むコンジュゲートで免疫したB6.SJLマウスに移入した際の抗原特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の増殖応答を示す。最後のパネル（\*）は、10 µgのビオチン化OVAにコンジュゲートさせた5 µgのCSA-41BBLについての応答を示す。コアストレプトアビジン（SA）は4-1BBLと等モルレベルで用いた。

50

【図 1 1】図11Aは、未処理DC（グレーで塗りつぶした部分）、ビオチン化PEで処理したDC（点線）、およびビオチン化PE / CSA-41BBLコンジュゲートで処理したDC（実線）のPE+細胞を示すヒストグラムである。図11Bは、各処理を受けたDCについてのPEの平均蛍光強度（MFI）を示す図である。

【図 1 2】図12Aは、未処理のDC（濃いグレー）、またはGM-CSFの存在下でCSA-41BBLで処理したDC（実線）もしくはLPSで処理したDC（点線）のCD86およびMHCクラスIIレベルを分析するために実施したフローサイトメトリーの結果を示す。図12Bは、CD86およびMHCクラスIIの平均蛍光強度を示す。

【図 1 3】ナイーブ、ビオチン化OVA/CSA処理、およびビオチン化OVA / CSA-4-1BBL処理マウス由来のDC細胞に対するCD40、CD86およびMHCクラスII発現の平均蛍光強度を示す図である。

10

【図 1 4】図14Aは、ナイーブBALB/cマウスの脾臓および末梢リンパ節から、CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>（単一陽性、SP）およびCD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>（二重陽性、DP）T細胞を選別し、放射線照射脾細胞、抗CD3抗体（0.5 μg/ml）、および表示した濃度（μg/ml）の4-1BBLまたは等モル量の対照CSAタンパク質を補充した培地において、単独でまたは1：1の比で3日間培養した、共培養実験の結果を示す。図14Bは、CFSEで標識したSP T細胞を、4-1BBLを0.5 μg/mlで用いた以外は、図14Aについて記載した条件下で抑制アッセイに用いたCFSEアッセイの結果を示す。各ヒストグラムについて、分裂細胞の%を示す。

【図 1 5】ナイーブBALB/cマウスの脾臓および末梢リンパ節から、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>（単一陽性、SP）およびCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>（二重陽性、DP）T細胞を選別し、0.5 μg/mlの抗CD3抗体および放射線照射脾細胞の存在下で、1 μg/mlの4-1BBLを添加して、または添加せずに、単独でまたは1：1の比で3日間培養した、ex vivo T細胞増殖の結果を示す図である。

20

【図 1 6】CSA-hCD40LおよびCSA-mCD40L構築物の構築を示す。矢印は、クローニング目的で用いられるプライマー（a、b、c、d）およびその配向を示す。

【図 1 7】ヒトTHP-1とマウスA20細胞株とをCSA-mCD40LまたはCSA-hCD40Lと一緒にインキュベートし、FITC標識抗ストレプトアビジン抗体で染色した後、フローサイトメトリーで分析した際の、CSA-mCD40LおよびCSA-hCD40LとCD40受容体との結合を示すフローサイトメトリー分析を示す図である。パネル（a）および（b）は、CSA-mCD40Lとヒトおよびマウス細胞株との結合をそれぞれ示し、パネル（c）および（d）は、CSA-hCD40Lとヒトおよびマウス細胞株との結合をそれぞれ示す。

30

【図 1 8】ヒトTHP-1細胞株を100ng/mlのCSA-hCD40Lで48時間刺激し（細い実線）、フローサイトメトリーにおいてHLAクラスII（図18A）およびCD80（図18B）分子に対する抗体を用いて分析した際の、CSA-hCD40Lで刺激したマクロファージに対するHLAクラスIIおよび共刺激分子のアップレギュレーションを示すフローサイトメトリー分析を示す図である。CSAタンパク質（塗りつぶしたヒストグラム）と一緒にインキュベートした細胞及び膜結合マウスCD40Lを発現するCHO細胞形質転換体（濃い実線）をそれぞれ負および正の対照として用いた。

【図 1 9】骨髄由来の未成熟CDを様々な濃度のCSA-mCD40L（白地のヒストグラム）で様々な時間刺激し、CD80（図19A）およびCD86（図19B）の発現について特異的抗体を用いて分析した際の、CSA-mCD40Lで刺激したマウスDCの表現型成熟を示すフローサイトメトリー分析を示す図である。刺激しないままの細胞（細い実線）またはCSAタンパク質で刺激した細胞（塗りつぶしたヒストグラム）を対照として用いた。48時間刺激した細胞10<sup>6</sup>個当たり200ngのタンパク質についてのデータを示す。

40

【図 2 0】1 μg/mlの各rhsCD40L + エンハンサー（図20A）および100ng/mlのCSA-hCD40L（図20B）または250ng/mlのCSA-mCD40L（図20C）もしくはCSAで、一次水簸ヒト単球を18時間刺激し、ELISAによりIL-1 およびEL-6含量について上清を分析した際の、CSA-CD40Lで刺激したヒト単球によるサイトカインの分泌を示す図である。図20Dは、ヒトCD40を発現するように遺伝的に改変したマウスマクロファージ細胞株（CD40KO）をCSAまたはCSA-hCD40L（1 μg/ml）で3時間刺激した後、RNAを抽出し、鋳型mck-3bと共にRiboQuantマルチプローブRNアーゼ保護系を用いたRNase保護アッセイにより分析した際の結果を

50

示す。IL-6、L32およびGAPDHについての保護プローブを示す。このヒストグラムは、ハウスキーピング遺伝子L32で基準化した後のIL-6のバンド密度を示す。

【図2 1】ヒトCD40を発現するようにトランスフェクトしたマウスCD40KOマクロファージ株をIFN- $\gamma$ で24時間初回免疫し、次に、エンハンサーを含む1  $\mu$ g/mlの市販のrhsCD40L、または300 ng/mlのCSA-hCD40LもしくはCSAタンパク質で24時間刺激した後、抗iNOS抗体を用いたウエスタンブロットにより細胞溶解物を分析した際の、CSA-hCD40Lで刺激したマクロファージにおけるiNOS発現の刺激を示す図である。ヒストグラムは、iNOSバンドの密度を示す。

【図2 2】50  $\mu$ g OVAを抗原として用いた、12.5および25  $\mu$ gの用量のLPSと比較して強力なCSA-4-1BBLのin vivoアジュバント効果を示す図である。結果は、in vivo死滅%として表示する。

10

【図2 3】(i) PBS (黒ひし形、n = 20) ; (ii) 50  $\mu$ g P1 + 12.5  $\mu$ g CSA (黒四角、n = 6) ; (iii) 25  $\mu$ g CSA-4-1BBL (黒三角、n = 10) ; (iv) 50  $\mu$ g P1 + 25  $\mu$ g CSA-4-1BBL (白三角、n = 13) ; または (v) 50  $\mu$ g P1 + 10  $\mu$ g CpG (白四角、n = 7) によるワクチン接種の、既存の子宮頸部腫瘍に対する効果を示す。P1またはCSA-4-1BBLいずれかによるワクチン接種によりある程度免疫療法は成功したが、P1とCSA-4-1BBLとを併用したワクチン接種により、生存率が有意に上昇した。

【図2 4】腫瘍増殖阻止におけるビオチン化OVA / CSA-4-1BBLコンジュゲートによるワクチン接種の結果を示す。OVA (白三角)、ビオチン化OVA / CSA-4-1BBLコンジュゲート (黒三角) および対照マウス (黒丸) によりワクチン接種したマウスの腫瘍無含生存率を示す。ビオチン化OVA / CSA-4-1BBLコンジュゲートによりワクチン接種したマウスは100%生存率を示した。

20

【図2 5】CFSE染色細胞のフローサイトメトリーを示す図である。この図から、4-1BBLが、抗原のみ、または抗原及びLPSと比較して、高レベルまで抗原特異的CTL応答をin vivoで増強できることが立証された。結果は、ナイーブマウスに対して標準化した対照CFSE最低ピークと比較したペプチドパルスCFSEhi最高ピークの溶解%として各パネルの隅に表示する。

【図2 6】4-1BBL共刺激がin vivoで抗原提示を増加することを証明するフローサイトメトリーデータを示す。

【図2 7】4-1BBL共刺激がin vivoで樹状細胞による抗原取込みを増加させることを証明するフローサイトメトリーデータを示す。

30

【 図 1 A 】

CSA-LIGHT スクレオチド構築物 (配列番号1)

ACCCGTGTATAAGCCCGTTTCCAAAATGTATAAACCCGAGAGCATCTGGCCAAATG
TGCATCAGTTGTGGTCAGCAGCAAAATCAAGTGAATCATCTCAGTGCACAAATAAGGG
GGGATCCGATCTCAATATGAAGTTATGCATATACTGGCCGTCTGGCCCTTTGTGTTGG
CCTCTCGCTCGGGAGATCTCATCATACCATCACCATACCCATACCCGGACCTGGTACAA
CCAGCTCGGCTCGACCTTTCATCGTACCCGGCCGCGATGGCCCTGACCCGGAAC
CTACGAGTCCGGCCGTCGGCAACCCGAGAGCCGCTACGCTTGAACCGTCTGTACGA
CAGCCCGCCCGCCACCCGACGCGCAGCCGACCCGCTCGGTTGGACGTTGGCCCTGGAA
GAATAACTACCCGCAACGCCACTCCGGGACCCAGTGGAGCGGCCAGTACGTCGGCCG
CGCCGAGGCGAGGATCAACACCCAGTGGCTGCTGACCTCCGGCCACCAGGCCCAA
CCCTCGAAGTCCACGCTGGTCCGGACCCGACCTTCCACCAAGTGAAGCCGTCGCCG
CGCCTCAAGCAATCCAACGATCTCACCAGGCCAACCCAGCAGCACATCTTACAGC
AGCCCAACGCCGCTGATAGGTATTTGGTGGACCTCTGTATGGAGACAGCACTTGG
CCTGGCCCTTCTTGGAGGCTTGGAGTATCATGATGGGGCCCTGGTGACCATGGAGCC
CGGTTACTACTATGTGTACTCCAAAGTGCAGCTGAGCGGCTGGGCTGCCCCAGGG
GCTGGCCAAATGGCCCTCCCATCACCATGGACTATACAAAGCCGACATCCCGCTACCC
GAAGGAGTTAGAACTGATAGGTATTTGGTGGACCTCTGTATGGAGACAGCACTTGG
CCGAGTCTGGTGGGACAGCAGCTTCCGCGGCGGTGGTACATCTGGAGGCTGGGGA
AGAGGTGGTGGTCCGCTGCGTGGAAACCCGCTGGTCCAGACAGTGCAGCCAGCAG
GTCCTATTTCCGAGCTTTCATGGTCTGAAGGCTCGGTCGACAAATGTATTTTGTGGAG
GGACCTCTCAGGACTCACCTCGAGTCTGAGAGGCCCTTCCGAAGTAAAGCCTATCC
CTAACCCCTCTCTCGGCTCGATTTCCAGCGTACCCGTCATCATCACCATCACCATT
GAGTTTAAACCCCGCTG

【 図 1 B 】

CSA-LIGHT 融合タンパク質 (配列番号2)

MKLCILLAVVAVVGLSLGRSHHHHHHTGTWYNQLGSGTFIVTAGADGALRGTYESAV
GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVANKNNYRNHSAATFWSGQYVGGAEARI
NTQNLTSGATEANANKSTLVGHDTFTKVKPSAASSEFQRSHQANPAHLTGANASL
IGIGPPLWETRLGLALFRGLTYHDGALVTMEPGYVYVYSKVLQSGVGCQQGLANGL
PITHGLYKRTSRYPKELELLVSRSPCGRANSSRVWDDSSFLGGVVHLEAGEEVVVR
VPGNRLVPRDGTSTRSYGFAMV

【 図 2 B 】

CD80-CSA 融合タンパク質 (配列番号4)

M K L C I L L A V V A F V G L S L G R S I H V T K E V K E
V A T L S C G H N V S V E E L A Q T R I Y W Q K E K K M V
L T M M S G D M N I W P E Y K N R T I F D I T N N L S I V
I L A L R P S D E G T Y E C V L K Y E K D A F K R E H L
A E V T L S V K A D F P T P S I S D F E I P T S N I R R I
I C S T S G G F P E P H L S W L E N G E E L N A I N T V
S Q D P E T E L Y A V S S K L D F N M T T N H S F M C L I
K Y G H L R V N Q T F N W N T T K Q E R S H H H H H H T
G T W Y N Q L G S T F I V T A G A D G A L T G T Y E S A V
G N A E S R Y V L T G R Y D S A P A T D G S G T A L G W T
V A W K N N Y R N A H S A T F W S G Q Y V G G A E A R I N
F Q W L L F S G A F E A N A W K S T L V G H D T F T K V R
F S A A S R I L Q I S S T V A A A R V

【 図 2 A 】

CD80-CSA スクレオチド構築物 (配列番号3)

CATCTCCAGTGCACAAATAAGGGGGATCCGATCTCAATATGAAGTTATGTC
ATATTACTGGCCGTCTGGCCCTTTGTGGCCCTCGCTCGGGAGATCTAT
CCAGTGCACCAAGGAAGTGAAGAAGTGGCAACCGTCTCTGTGGTCCACA
ATGTTTCTGTTGAAGAGCTGGCACAACCTCGCATCTACTGGCAAAAGGAG
AAGAAAATGGTCTGACTATGATCTCGGGACATGAATATATGGCCCGA
GTACAAGAACCCGACCATCTTGTATATCACTAATAACCTCCCATTTGTGA
TCTTGGCTCTGGCCCATCTGACGAGGGCACATACGAGTGTGTGTCTG
AAGTATGAAAAAGACGCTTTCAGCGGGAAACCTGGCTGAAGTGCAGTT
ATCAGTCAAAGTGCATTCCTTACACCTAGTATATCTGACTTTGAAATTC
CAACTTCAATATAGAAGGATAATTTGCTCAACCTCTGGAGTTTCCA
GAGCCTCACCTCTCTGGTGGAAAATGGAGAAGAATTAATGCCATCAA
CACAACAGTTTCCAAGATCCTGAAACTGAGCTCTATGCTGTAGCAGCA
AATGGATTTCAATATGACAACCAACCCAGCTTCAATGTGTCTCATCAAG
TATGGACATTTAAGATGAATCAGACCTTCAACTGGAAATACAAACAGCA
AGAGAGATCTCATCAATCACCATCACCATATCACCAGCCTGGTACACCC
AGCTCGGCTCGACCTTCACTCGTGCAGCGGGCCGCGAGCCGCTGACCC
GGAACCTCAGAGTCCGCGTCCGCAACCCGAGAGCCGCTACCTCTGAC
CGTCTGTACGACAGCCCGCCGACCGAGCGGACCGCCGCTCG
GTTGAGCGGTGCTTGAAGAATAACTACCGCAACGCCCACTCCGCGACC
ACGTGGAGCGGCCAGTACGTCGGCGCGCCGCGAGCGGATCAACACCCA
GTGGCTGTGACTCCGCGCCACCAGGCGCAACCGCTGGAAAGTCCACGC
TGGTCCGCGCACGACCTTCAACAGGTGAAGCGCTCCGCGCCCTCAAGC
CGAATTCGAGATATCCAGCACAGTGGCGCCGCTCGAGTCTAGAGGGC
CCTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCTCGGCTCGATCTTACG
CGTACCGTCACTACCAACCATCACCATTGAGTTTAAACCCCGCTGATCAGC
CTCGACTGTCTTCTTAA

【 図 3 A 】

CSA-4-IBBL スクレオチド構築物 (配列番号5)

TTCATGCAACTAAAGGGGGATCCGATCTCAATATGAAGTTATGTCATAT
ACTGGCCGTCTGGCCCTTTGTGGCCCTCGCTCGGGAGATCTCATCATC
ACCATCACCATATCACCAGCCTGTACACCCAGCTCGGCTCGACCTTC
ATCGTGACCCGCGCGCCGATGGCCCTGACCCGAACTACGAGTCCGC
CGTCCGCAACCGGAGAGCCGCTACGTCCTGACCCGTCGTTACGACCGC
CCCCGCCACCAGCGGACCGCCAGCCGCTCGGTTGGACGGTGGCCCTGG
AAGAATAACTACCGCAACGCCCACTCCGCGACCACTGGAGCGGCAAGTA
CGTCCGCGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCAAGTGGCTGTTGACCTCCG
CGCCACCAGGCGCAACGCCGGAAGTCCAGCTGGTCCGCCACGACACC
TTCACCAAGGTGAAGCCGTCGCGCCCTCAAGCGAATTCGACCCAGGCC
TCGGCCAGCGCTCACAATCACCACCTCGCCCAACCTGGGTACCCGAGAGA
ATAATGGAGACAGGTCACCCCTGTTCACCATTTGGCTGCCCAACACT
ACACAACAGGCTCTCTGTGTTCGCCAAGCTACTGGCTAAAACCAAGC
ATCGTTGTGCAATACACTCTGAACTGGCACAGCAAGATGGAGCTGGGA
GCTCATACCTATCTCAAGTCTGAGGTACGAAAGACAAAAGGAGTTG
GTGTAGACAGTCCCGGCTCTACTACGTAATTTTGGAACTGAAGCTCAG
TCCACATTCACAAACACAGGCCACAAGTGCAGGGCTGGGCTCTCTCTTG
TTTGGCAAGCAAGCCCTCAGGTAGATGACTTTGACAACCTGGCCCTGACA
GTGAACTGTTCCTTGTCTCCATGGAGAACAAGTTAGTGGACCGTTCCGTG
GAGTCAACTGTTCCTCTGAAGGCTGGCCACCCTCAGTGTGGTCTGTA
GGCTTATCTGATGGAGCCAGGATGCATACAGAGACTGGGAGCTGTCTG
TATCCCAACACCAGCTTTGGACTCTTTCTGTGAAACCCGACAACCC
ATGGGAATGAGAATCTCTTCTGTGACTCTAGTGTGCTAAGTCTCTCAA
GCTGCTATGCTCAGTCTAGAGGGCCCTCGAAGTAAAGCCTATCCCTAA
CCCTCTCTCGGCTCGATCTACGCGTACCGCTCATCATCACCATCACC
ATTGAGTTTAAACCCCGCTGATCAGCCTCGACTGTCTTCTTAA

【 図 3 B 】

CSA-マウス-4-1BBL融合タンパク質 (配列番号6)

MKLCILLAVVAVFVGLSLGRSHHHHHHITG
TWNQLGSTFIVTAGADGALGTYESAVG
NAESRYVLTGRYDSAPATDGSGLTALGWTY
AWKNNYRNAHSATTWSEQQYVGGAEARINT
QWLLTSGATEANAWKSTLVGHDTFTKVKP
SAASSSEFRTEPRPALTIITTSPLNGTREN
ADQVTFPVSHIGCPNFTTQQGSPVFAKLLAK
NQASLNCNTTLNWHSQDGAAGSSYLSQGLRY
EEDKKELVVDSPLGLYVVFLELKLSPFTFN
TGHKVQGWVSLVLQAKPQVDDFDNLALTV
ELFPSCSMENKLVDRSWSQLLLKAGHRLS
VGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNNTTSFGL
FLVKPDPNPE

【 図 4 B 】

CSA-ヒト-4-1BBL融合タンパク質 (配列番号8)

MKLCILLAVVAVFVGLSLGRSHHHHHHITG
TWNQLGSTFIVTAGADGALGTYESAVG
GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGLTALGWTY
AWKNNYRNAHSATTWSEQQYVGGAEARINT
QWLLTSGATEANAWKSTLVGHDTFTKVKP
SAASSSEFRTEPRPALTIITTSPLNGTREN
ADQVTFPVSHIGCPNFTTQQGSPVFAKLLAK
NQASLNCNTTLNWHSQDGAAGSSYLSQGLRY
EEDKKELVVDSPLGLYVVFLELKLSPFTFN
TGHKVQGWVSLVLQAKPQVDDFDNLALTV
ELFPSCSMENKLVDRSWSQLLLKAGHRLS
VGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNNTTSFGL
FLVKPDPNPE

【 図 4 A 】

CSA-ヒト4-1BBLヌクレオチド配列 (配列番号7)

TTCATGCAACTAAAGGGGGATCCGATCTCAATATGAAGTTATGCATATTACTGGCC
GTCGTCGGCCCTTGTGGCCCTCGCTCGGAGATCTCATCATACCATCACCATATC
ACCGGCACCTGGTACAACAGCTCGGCTCGACCTTCATCGTGAACCGGGCCGCGAT
GGCCCTGACCGGAACCTACGAGTTCGGCCGTCGGCAACGCGAGAGCCGCTACGTC
CTGACCGTCCGTACGACAGCCGCGCCGCAACCGAGAGAGCCGAGCCGCGCCCTCGGT
TGGACGCTGCCGGAAGAATAACTACCGCAACGCCACTCGCGACCACTGAGG
GGCCAGTACGTCGGCCGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCCAGTGGCTGTGACCTCC
GGCCACCGAGGCAACCGCTGGAAGTCCAGCTGCTGGCCACGACACCTTCAAC
AAGGTGAAGCGTCCGCGCCCTCAAGCGAATTCGCTGCCCCGTCGGCCGTCGCGG
GCTCGCCCTCGCCCGCTCCGCGCCAGCCGAGACTCCGCGAGGTCGCGAGCTT
TCGCGCGAGTCCCGCCGCTCTTGGACCTCGCGAGGCGATGTTGCGCAGCTG
GTGGCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGCCCTGAGCTGCTACAGTACCCAGG
CTGGCAGCGTCTCCGACGCGGCGCTGAGCTACAAGAGGACACAGAAAGGAGCTG
GTGGTGGCCAAAGGCTGAGTCTACTATGCTTCTTCAACTAGAGCTGCGCGCCGCTG
GTGGCCGCGAGGCTCAGGCTCCGCTTCACTCCGCTGACCTGACAGCCATCCGCG
TCTGCTGCTGGGCGCCGCGCTGCTGCTTACCGTGGACTGCCACCGCCCTCCCTCC
GAGGCTCGGAACCTCGGCTTCGCTTCCAGGGCCGCTTCTGCACTGAGTCCGCGC
CAGCGCTTGGCGTCCATCTCACTAGGCGCAGGCGCCATGCTGCGAGCTT
ACCCAGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTCCGCGTACCCCGAAATCCAGCCGCA
CTCCCTTACCGAGGTCCGAATAACGCCAGCCCTGGTGCAGCCCACTGGACAGAG
TCCGATCTACTCCATCTCTCGAGTCTAGAGGGCCCTTCGAAGTAAAGCTATCC
CTAACCTCTCTCGGTCGATCTACGCGTACCGGCTCATCATCACCATCACCATT
GAGTTAAACCGCTGATCAGCTCGACTGTGCTTCTAA

【 図 5 B 】

CD86-CSA 融合タンパク質 (配列番号10)

MKLCILLAVVAVFVGLSLGRSAPLKIQAYFNETADLFCQFANSQNSLSELVVWFQDQ
ENLVLNEVYLKKEKFDVSHSKYMGRTSFDSDSWTLRLHLNLKIDKGLYQCIHHKKP
TGMIRIHMNSLSVLAMFQPEIIVPISNITENVYINLTCSSIHGVPEPKMSVLLR
TKNSTIEYDQIMQKQDNVTELYDVSLSVSPDVTNMTIFCILELDRTRLLSSP
FSIELEDPPPPDHI PRSHHHHHITG
TWNQLGSTFIVTAGADGALGTYESAVGN
AESRYVLTGRYDSAPATDGSGLTALGWTY
AWKNNYRNAHSATTWSEQQYVGGAEARINT
QWLLTSGATEANAWKSTLVGHDTFTKVKP
SAASS

【 図 5 A 】

CD86-CSA ヌクレオチド構築物 (配列番号9)

CATCTCCAGTCAACTAAAGGGGGATCCGATCTCAATATGAAGTTATGCATATTAC
TGGCCGTCGTCGGCCCTTGTGGCCCTCGCTCGGAGATCTGCTCCTCTGAAGATTC
AAGCTTATTTCAATGAGACTGCAGACCTGCCATGCCAAATTCGAACTCTCAAAAC
AAAGCCGAGTGAAGTAGTATTTTGGCAGGACAGGAAAACCTGGTCTGTAATG
AGGTATCTTAGGCAAGAGAAATTTGACAGTGTTCATCCAGTATATGGCCGCA
CAAGTTTGTATTCGGACAGTGGACCTGAGACTTCACAATCTTCAGATCAAGGACA
AGGCTTGTATCAATGATATCCATCAAAAAGCCACAGGAATGATTCGATCC
ACCAGATGAATCTGAACTGTAGTCTTGTCACTTCACTCAACCTGAAATAGTAC
CAATTTCTAATAACAGAAATGTGTACATAAATTTGACCTGCTCATATACAG
GTTACCCAGAACCTAAGAGATGAGTGTGCTAAGAACCAAGAAATCAACTATCC
AGTATGATGGTATATATGCAGAAATCTCAAGATAATGTACAGAACTGTACGAGTTC
CCATCAGCTTGTCTGTTCATTCCTCGATGTACGAGCAATATGACCATCTTCTGTA
TTCTGGAAACTGACAAGACCGGCTTTTATCTTCACTTCTCTATAGAGCTTGAGG
ACCTCAGCTCCCGCAGACCAATTCCTAGATCTCATCATCACCATCACCATATCA
CCGCACTGGTACAACAGCTCGGCTCGACCTTCAFCGTGACCGGGCGCCGAGC
CGCCCTGACCGGACCTACGAGTTCGGCCGTCGGCAACGCGAGAGCCGCTACGTC
TGACCGGTCGTTACGACAGCCCGCCGCAACGCGGAGCGGACCGCCCTCGGTT
GGACGTTGGCTGGAAGAATAACTACCGCAACGCCACTCCGCGACCACTGAGGCG
GCCAGTACGTCGGCGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCCAGTGGCTGTGACCTCCG
GCGCCACCGAGGCCAACGCTGGAAGTCCAGCTGGTGGCCACGACACTTCAACCA
AGTGAAGCCGTCGCGCCCTCAAGCCGAATCTGCGAGATATCCAGCACAGTGGCGG
CCGCTCGATCTAGAGGGCCCTTCGAAGTAAAGCTATCCCTAACCTCTCTCGGT
CTCGATCTACGCTACCGGCTCATCATCACCATCACCATTGAGTTAAACCCGCTGA
TCAGCTCAGCTGTGCTTCTAA

【 図 6 】

6A

HPV16 E6 アミノ酸配列 (配列番号11)

MHQKRTAMFQDFQERPRKLFQLCTELQTTIHDIIILECVYCKQLLRREVVDFAFRDL
CIVYRDQNPYAVCDKCLKFYSKISEYRHYCYSLYGTTLBQQYNKPLCDLLIRCIQCQ
KPLCPKQRHLDDKQRFHNRGRWTRCSCCRSSRTRRETQL

6B

変異体HPV16 E6アミノ酸配列 (配列番号12)

MHQDFQERPTKLPDLCTELQTTIHDIIILECVYCKQLLRREVVDFAFRDL
CIVYRDQNPYAVCDKCLKFYSKISEYRHYCYSLYGTTLBQQYNKPLCDLLIRCIQCQ
KQRHLDDKQRFHNRGRWTRCSCCRSSRTRRETQL

6C

HPV16 E7 アミノ酸配列 (配列番号13)

MHGDTPLHEYMLDLQFETDLYCYBQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPRAHYNIIVTF
CCKCDSTLRLCVQSTHVDIRLTDLLMGTGLIVCPICSQKP

【 図 7 A 】

CSA-hCD40Lヌクレオチド構築物(配列番号14)

```

CCGATCTCAATATGAAAGTTATGATATATTACTGGCCGTCGTGGCCTTTGTT
GGCCTCTCGCTCGGGAGATCTCATCATCACCATCACCATATCACCGGCAC
CTGGTACAACAGCTCGGCTCGACCTTCATCTGACCGGGCCGCGGATG
CGCCCTGACCCGGAACCTACGAGTCGGCCGTCGGCAACGCCGAGAGCCGC
TAGCTCTGACCGTTCGTACGACAGCCCGCCCGCCACCGACCGCAGCGG
CACCGCCCTCGGTTGGACGTTGGCTGGAAGAATACTACCGCAACGCC
ACTCCGCGACACGTTGGAGCGCCAGTACGTCGGCCGCGCCGAGGCGAGG
ATCAACACCCAGTGGCTGTGACCTCCGCGCCACCGAGGCCAACGCCTG
GAAGTCCACGCTGGTCCGCCACGACCTTCACCAAGGTGAAGCCGTCGG
CCGCTCAAGCGAATTCCTGGACAAGATAGAAGTGAAGGAATCTTCAT
GAAGATTTTCATTCATGAAAACGATACAGAGATGCAACACAGGAGAAAG
ATCCTTATCCTTACTGACTGTGAGGAGATTAAGCCAGTTTGAAGGCT
TTGTGAAGGATATAATGTTAAACAAGAGGAGACGAAGAAGAAAACAGC
TTTGAATGCAAAAAGGTGATCAGAACTCCTCAAATTCGCGGCATATGTCAT
AAGTGAAGCCAGCATAAAACAACATCTGTGTACAGTGGGCTGAAAAG
GATACACACCATGAGCAACAACCTGGTAACCTGGAATAATGGGAAAACAG
CTGACCGTTAAAAGACAAGGACTTATTATCTATGCCCACAGTCACTT
CTGTTCCAATCGGGAAGCTTCGAGTCAAGCTCCATTTATAGCCAGCCCTT
GCCTAAAGTCCCGGTAGATTCGAGGAGATCTTACTCAGAGCTGCAART
ACCCACAGTTCGCCAAACCTTCGCGGCAACAATCCAATTCACCTGGGAGG
AGTATTTGAATGCAACACAGGTGCTTCGGTGTTCATGTCATGTCGACTGATC
CAAGCCAAAGTGAGCCATGGCACTGGCTTCACGTCCTTTGGCTTACTCAA
CTCTGACAGTGTACCTTCGAGGAGCTCTAAGCCGAATTCGACGATAT
CCAGCACAGTGGCGCCGCTCGAGTACAGAGGCCCTTCGAAGGTAGCC
TATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCACCGCTACCGGTCATCATC
ACCATCACCATTTGAGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTTC
TAA

```

【 図 7 B 】

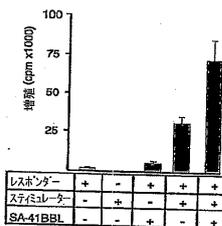
CSA-hCD40L融合タンパク質(配列番号15)

```

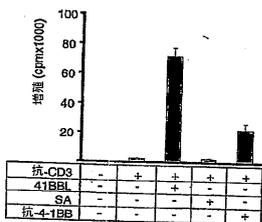
MKLCLILLAVVAFVGLSLGRSHHHHHHITG
TWYNQLGSTFTFIVTAGADGALGTYESAVG
NAESRYVLTGRYDSAPATDGSSTALGWTY
AWKNNYRNNAHSATTWSSGQYVGGAEARINT
QWL L T S G A T E A N A W K S T L V G H D T F T K V K P
S A A S S E F L D K I E D E R N L H E D F V F M K T I Q R
CNTGERSLSLLLNCEBIKSQFEGFVKDIML
NKEETKKNENSPFEMQKGDQNPQIAAHVISE
ASSKTTSV L Q W A E K G Y Y T M S N N L V T L E N G
K Q L T V K R Q G L Y I Y A Q V T F C S N R E A S S Q A
P F I A S L C L K S P G R F E R I L L R A A N T H S S A K
P C G Q Q S I H L G G V F E L Q P G A S V F V N V T D P S
Q V S H G T G F T S F G L L K L

```

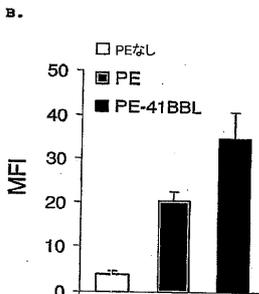
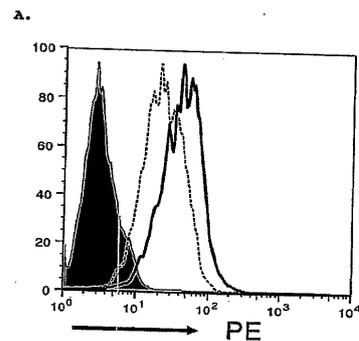
【 図 8 】



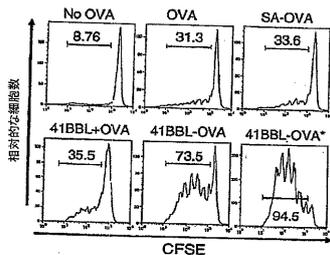
【 図 9 】



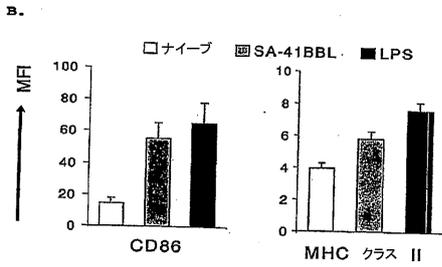
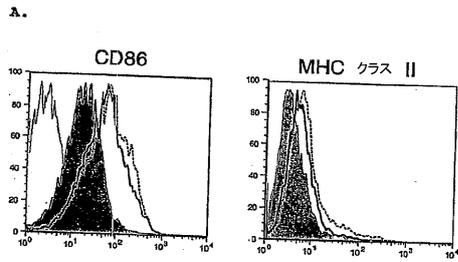
【 図 1 1 】



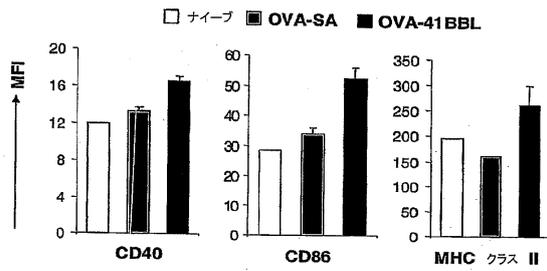
【 図 1 0 】



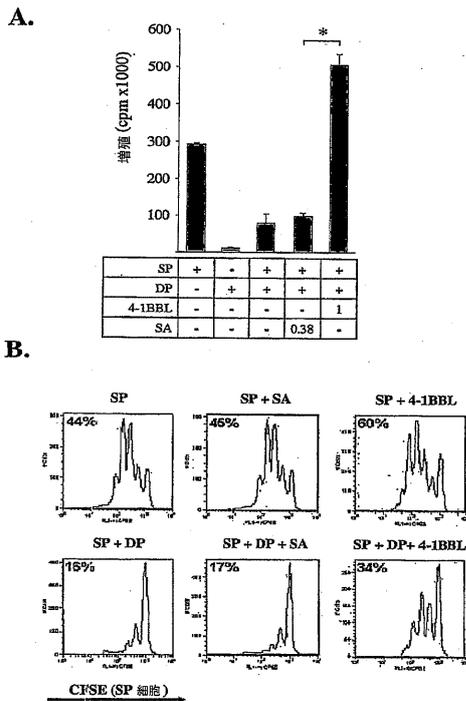
【 図 1 2 】



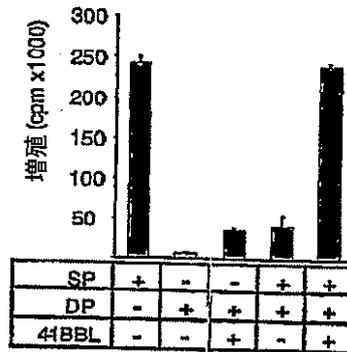
【 図 1 3 】



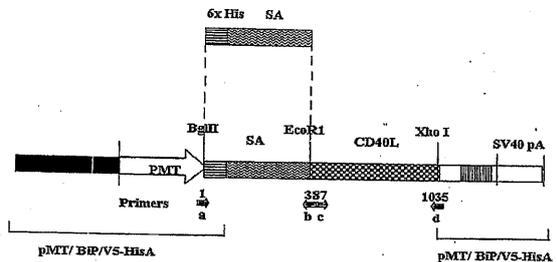
【 図 1 4 】



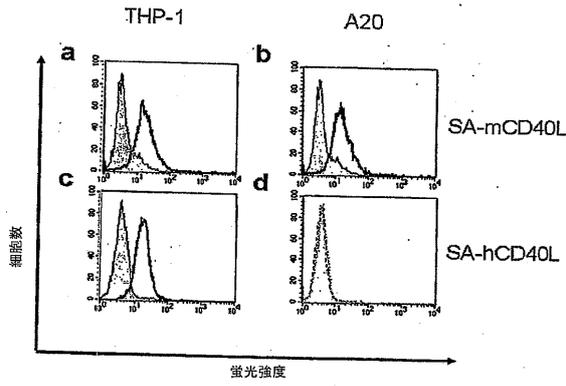
【 図 1 5 】



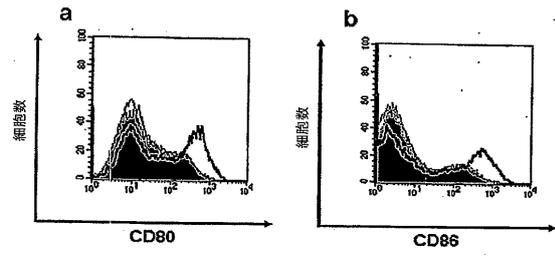
【 図 1 6 】



【 図 17 】

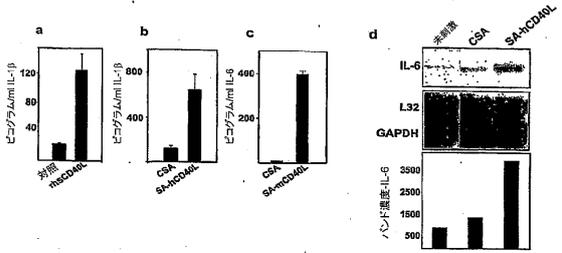
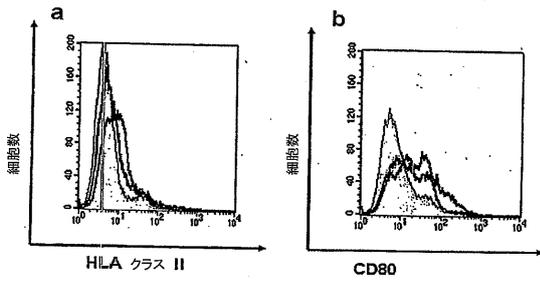


【 図 19 】

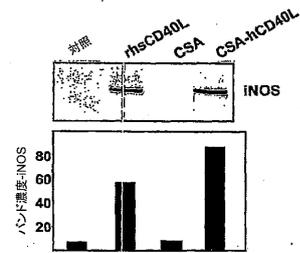


【 図 20 】

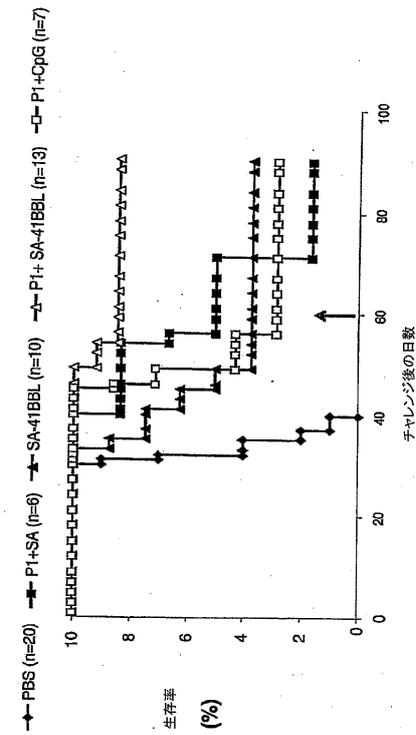
【 図 18 】



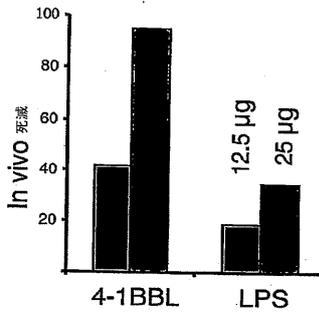
【 図 21 】



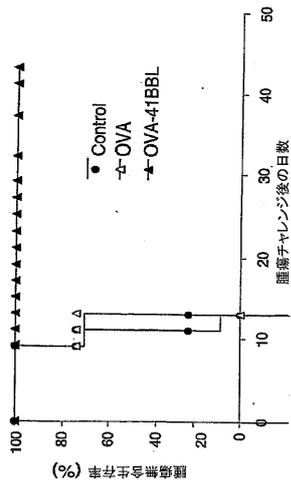
【 図 23 】



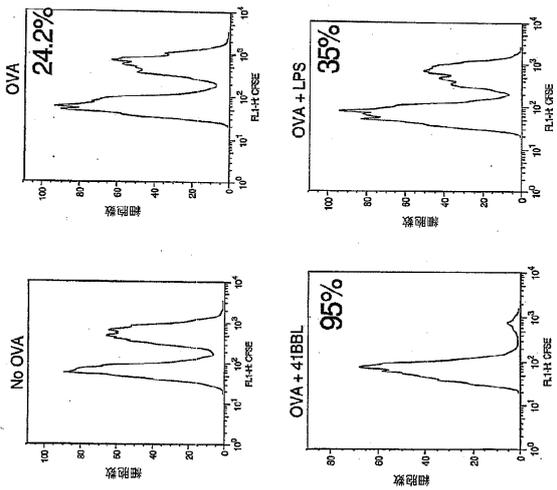
【 図 22 】



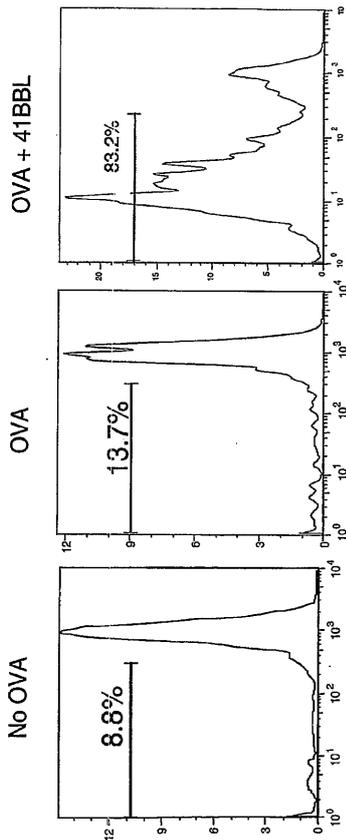
【 図 2 4 】



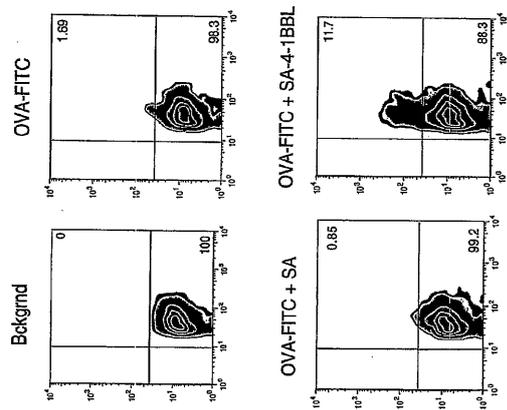
【 図 2 5 】



【 図 2 6 】



【 図 2 7 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 31/14	(2006.01)	A 6 1 P 31/14

(31)優先権主張番号 60/799,643  
 (32)優先日 平成18年5月12日(2006.5.12)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/863,173  
 (32)優先日 平成18年10月27日(2006.10.27)  
 (33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 シルワン, ハヴァル  
 アメリカ合衆国 4 0 2 4 5 ケンタッキー州, ルーイビル, マレット ヒル ドライブ 1 7 0  
 1 8  
 (72)発明者 エルベック, クトゥル, ジー.  
 アメリカ合衆国 4 0 2 0 6 ケンタッキー州, ルーイビル, ロイヤー コート 6 1 2  
 (72)発明者 ヨルク, エスマ, エス.  
 アメリカ合衆国 4 0 2 4 5 ケンタッキー州, ルーイビル, マレット ヒル ドライブ 1 7 0  
 1 8

審査官 中尾 忍

(56)参考文献 Rabu,C., et al., "Production of Recombinant Human Trimeric CD137L (4-1BBL): CROSS-LINKING IS ESSENTIAL TO ITS T CELL CO-STIMULATION ACTIVITY", J. Biol. Chem., 2005年10月4日, Vol.280, No.50, P.41472-41481, [検索日 2013年8月7日], インターネット<URL: <http://www.jbc.org/content/280/50/41472.full.pdf+html>>  
 Singh,N.P. et al., A novel approach to cancer immunotherapy: Tumor cells decorated with CD80 generate effective antitumor immunity, Cancer Res., 2003年7月15日, Vol.63, No.14, P.4067-4073  
 Singh,N.P. et al., ProtExTM: A novel technology to display exogenous proteins on the cell surface for immunomodulation, Ann. N.Y. Acad. Sci., 2005年11月, Vol.1056, P.344-358

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 A 6 1 K 3 8 / 0 0  
 A 6 1 K 3 9 / 0 0  
 A 6 1 K 3 9 / 3 8 5

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