

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4409097号  
(P4409097)

(45) 発行日 平成22年2月3日(2010.2.3)

(24) 登録日 平成21年11月20日(2009.11.20)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A D
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 A
<b>A 6 1 K</b>	<b>39/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 39/00 H
<b>A 6 1 K</b>	<b>48/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00
<b>A 6 1 P</b>	<b>1/04</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 1/04

請求項の数 23 (全 81 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-586927 (P2000-586927)  
 (86) (22) 出願日 平成11年11月12日 (1999.11.12)  
 (65) 公表番号 特表2002-531133 (P2002-531133A)  
 (43) 公表日 平成14年9月24日 (2002.9.24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US1999/026866  
 (87) 国際公開番号 W02000/034494  
 (87) 国際公開日 平成12年6月15日 (2000.6.15)  
 審査請求日 平成17年2月22日 (2005.2.22)  
 (31) 優先権主張番号 60/111,582  
 (32) 優先日 平成10年12月9日 (1998.12.9)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

微生物の受託番号 ATCC 203482  
 微生物の受託番号 ATCC 203481

(73) 特許権者 502006782  
 アメリカ合衆国  
 アメリカ合衆国 メリーランド州 208  
 52, ロックヴィル, エグゼクティブ・  
 ブールバード 6011, スイート 32  
 5, ナショナル インスティテューツ・オ  
 ブ・ヘルス, オフィス・オブ・テクノロジ  
 ー・トランスファー

(73) 特許権者 501233710  
 セリオン・バイオロジックス・コーポー  
 レーション  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O  
 2142 ケンブリッジ サード ストリ  
 ート 222 スイート 2300

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複数の共刺激分子を発現する組換えベクターおよびその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

B 7 - 1、I C A M - 1 及び L F A - 3 をコードする外来核酸配列を含む組換えベク  
 ー。

【請求項2】

さらに、少なくとも1つのサイトカイン、ケモカイン、F l t - 3 L、又はその組合  
 わせをコードする外来核酸配列を含む、請求項1記載の組換えベクター。

【請求項3】

組換えベクターが組換えボックスウイルスである、請求項1又は2記載の組換えベク  
 ー。

【請求項4】

組換えベクターが ( a ) 少なくとも1のボックスウイルスのプロモーター ; ( b ) B 7  
 - 1、I C A M - 1 及び L F A - 3 をコードする外来核酸配列 ; 及び ( c ) 前記エレメン  
 ト ( a ) 及び ( b ) の構築物に隣接する D N A 配列であって、ここで前記隣接配列の 5 '  
 末端及び 3 ' 末端は共に、エレメント ( a ) 及び ( b ) が挿入される、親ウイルスゲノム  
 の領域と相同であり、前記エレメント ( a ) 及び ( b ) は、B 7 - 1、I C A M - 1 及び  
 L F A - 3 をコードする外来核酸配列を発現することができる組換えボックスウイルスを  
 産生するように設計されたボックスウイルスとの組換えのために挿入される ; を含む、請  
 求項1 ~ 3 いずれか1項記載の組換えベクター。

【請求項5】

10

20

p T 5 0 6 4 と表示される、A T C C に寄託番号 2 0 3 4 8 2 又は p T 5 0 4 9 と表示される、A T C C に寄託番号 2 0 3 4 8 1 で寄託された、請求項 4 記載の組換えベクター。

【請求項 6】

さらに、少なくとも 1 つのターゲット抗原又はその免疫エピトープをコードする外来核酸配列を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の組換えベクター。

【請求項 7】

ターゲット抗原のアミノ酸配列が、配列番号 2 ~ 4 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列である、請求項 6 記載の組換えベクター。

【請求項 8】

標的抗原が、C E A、M A R T - 1、M A G E - 1、M A G E - 3、G P - 1 0 0、M U C - 1、M U C - 2、点変異ラット癌遺伝子、正常又は点変異 p 5 3、過剰発現 p 5 3、C A - 1 2 5、P S A、C - e r b / B 2、B R C A I、B R C A I I、P S M A、チロシナーゼ、T R P - 1、T R P - 2、N Y - E S O - 1、T A G 7 2、K S A、H E R - 2 / n e u、b c r - a b l、p a x 3 - f k h r、及び、e w s - f l i - 1 からなる群から選択される、請求項 6 記載の組換えベクター。

10

【請求項 9】

抗原が、アミノ酸位置 5 7 6 がアスパラギン酸である C E A ( 6 D ) である、請求項 8 に記載の組換えベクター。

【請求項 10】

抗原が P S A 又は P S M A である、請求項 8 に記載の組換えベクター。

20

【請求項 11】

抗原が、シグナル配列、10 コピーの縦列反復配列及び 3 ' 側コード配列を含む一部切除 ( t r u n c a t e d ) M U C - 1 遺伝子でコードされる M U C - 1 である、請求項 8 に記載の組換えベクター。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項記載の少なくとも 1 つの組換えベクター及び医薬的に許容できるキャリアーを含む、医薬組成物。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の少なくとも 1 つの組換えベクター、少なくとも 1 つのターゲット抗原又はその免疫エピトープをコードする少なくとも 1 つの核酸配列を含む第 2 組換えベクター及び医薬的に許容できるキャリアーを含む、医薬組成物。

30

【請求項 14】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項記載の組換えベクターを含む、単離された細胞。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の少なくとも 1 つの組換えベクター及び、少なくとも 1 つのターゲット抗原又はその免疫エピトープをコードする少なくとも 1 つの外来核酸配列を含む第 2 組換えベクターを含む単離された細胞。

【請求項 16】

請求項 1 4 又は 1 5 に記載の少なくとも 1 の細胞及び医薬的に許容できるキャリアーを含む、医薬組成物。

40

【請求項 17】

請求項 1 4 又は 1 5 に記載の少なくとも 1 の細胞、医薬的に許容できるキャリアー及びターゲット抗原又はその免疫エピトープを含む、医薬組成物。

【請求項 18】

個体の免疫応答を増強するための、請求項 1 6 又は 1 7 記載の医薬組成物。

【請求項 19】

請求項 4 又は 5 に記載のプラスミドベクターを含む、組換えボックスウイルス作製用キット。

【請求項 20】

50

請求項 4 又は 5 に記載のプラスミドベクター及び親ポックスウイルスを含む、組換えポックスウイルス作製用キット。

【請求項 2 1】

個体の免疫応答を増強するための、請求項 1 2 又は 1 3 記載の医薬組成物。

【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項記載の組換えベクターを含む抗原提示細胞の存在下でターゲット抗原特異性リンパ球の数を測定する、ターゲット抗原に対するワクチンの有効性を評価する *in vitro* の方法であって、ターゲット抗原特異性リンパ球の数が増大する場合はそのワクチンが有効であることを示す、前記方法。

【請求項 2 3】

多数のペプチドから新規な免疫原ペプチドをスクリーニングするための方法であって、  
 ( a ) 請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項記載の組換えベクターを感染させた抗原提示細胞を多数のペプチドでパルス処理して、ペプチドパルスした抗原提示細胞を形成し；  
 ( b ) ペプチドパルスした抗原提示細胞の存在下でリンパ球の免疫反応性を測定し、免疫反応性が増大した場合はペプチドパルスした抗原提示細胞上に免疫原ペプチドがあることを示す；  
 ことを含む前記方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

発明の属する分野

本発明は、複数の共刺激分子をコードする外来遺伝子、および、場合により、標的抗原をコードする外来遺伝子を含む、組換えベクターに関連する。本発明はさらに、少なくとも三つの共刺激分子をコードする外来遺伝子、および、場合により、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来遺伝子を含む、組換えウイルスに関連する。さらに具体的には、本発明は、少なくとも B7 ファミリー、LFA-3、および、ICAM-1 の中の一つの分子である共刺激分子をコードする外来遺伝子、および、場合により、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来遺伝子を含む、組換えポックスウイルス、および、免疫原およびワクチンとしてのその使用に関連する。本発明はさらに、複数の共刺激分子をコードする外来遺伝子、および、場合により、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来遺伝子を含む、組換えベクターによって、トランスフェクション、感染、あるいは、形質導入された抗原提示細胞に関連する。

【0 0 0 2】

発明の背景

T細胞の活性化、拡大、および、分化に関わる、T細胞の初期応答の程度は、抗原に対する好結果の免疫応答に最も重要である。免疫応答の開始には、ナイーブT細胞を活性化するために、抗原提示細胞 (APC) による少なくとも二つのシグナルが必要である。第一のシグナルは抗原特異的であり、ペプチド / 主要組織適合遺伝子複合体経路でT細胞受容体を通して伝えられ、また、T細胞を細胞周期に入らせる。第二の、あるいは“共刺激の”シグナルは、サイトカイン産生および増殖のために必要とされる。プロフェッショナルAPCの表面に通常見出される、少なくとも三つの異なる分子、B7.1 (CD80)、細胞内接着分子 1 (ICAM-1 ; CD54)、およびリンパ球機能関連抗原 3 (LFA-3 ; ヒトCD58 ; マウスCD48) が、T細胞活性化に重要な第二のシグナルを提供可能であることが提唱されている。これらの共刺激分子に対するT細胞リガンドは異なる。B7-1はCD28およびCTLA-4分子と相互作用し、ICAM-1はCD11a/CD18 (LFA-1/2インテグリン) 複合体と相互作用し、また、LFA-3はCD2 (LFA-2) 分子と相互作用する。これらの共刺激分子が等しい機能を果たすのか、あるいは、免疫応答の特異的な段階において特異的な機能を果たすのかは、知られていない (2)。これらの分子は *in vitro* において個々にT細胞増殖を共刺激することが示された (6)。

【0 0 0 3】

10

20

30

40

50

しかしながら、それらはAPC上に同時に発現されうるため、T細胞増殖誘導における個々の共刺激分子の有効性の比を調べることは困難だった(2)。

T細胞および共刺激受容体に適切にco-engageするためには抗原および共刺激分子の両方がお互いに近接して発現しなければならないと提唱されたので(8、9)、共刺激分子の可能性がある協同作用を調べるために、いくつかの組換えウイルスの混合物を利用することが可能だった。しかしながら、この方法の不都合な点は、三つあるいはそれ以上のウイルスの混合は、統計的に、同じ細胞に共感染する可能性を減少させることで、そのため、複数の共刺激分子を使用するためには多遺伝子構築物の作成がさらにより望ましかった。

【0004】

1991年3月7日に発行されたWO 91/02805は、標的抗原、MHC蛋白質、および、標的細胞に欠損している、もしくは、十分に発現していない、免疫相互作用に関わる他の蛋白質を発現させる組換えレトロウイルスベクター構築物を開示する。

【0005】

Akagiら、1997, J. Immunotherapy Vol. 20 (1): 38-47は、改変したMUC 1遺伝子を含む組換えワクシニアウイルス(rV-MUC1)、および、マウス共刺激分子B7の遺伝子を含む組換えワクシニアウイルス(rV-B7)の混合を開示する。

【0006】

Cavallo, P.ら、1995, Eur. J. Immunol, 25: 1154-1162は、B7-1 cDNAの三つのICAM-1<sup>+</sup>腫瘍細胞株へのトランスフェクションが、同系マウスの拒絶を誘導するために十分であることを開示する。

【0007】

Chen, L.ら、1994, J. Exp. Med., 179: 523-532は、マウスB7のcDNAを含む組換えレトロウイルスベクター、および、種々の腫瘍にそのベクターを導入する利用法を開示する。

【0008】

Damle, N. K.ら、1992, J. Immunol Vol 148 (No. 7): 1985-1992は、異なる4つのAPC関連共刺激分子がT細胞増殖を刺激する能力を比較するため、不動化したTCR/CD3複合体に対する(directed at)モノクローナル抗体、および、これらの分子の可溶性Igキメラ(RG)の組み合わせを含む、抗原提示細胞(APC)非依存的なin vitroにおける培養系の利用を開示する。

【0009】

Dubey, C.ら、1995, J Immunol 155: 45-57は、抗CD28抗体を用いて、あるいは、I-E<sup>k</sup>をトランスフェクションした、共刺激分子はなく、ICAM-1のみ、B7-1のみ、または、ICAM-1およびB7-1を同時に発現する線維芽細胞株を用いて、ナイーブT細胞の活性化におけるICAM-1:LFA-1およびB7:CD28/CTLA-4共刺激経路の寄与の比率についての研究を開示する。

【0010】

Fenton, R. G.ら、1998 Vol. 21, No. 2, pp 95-108は、共刺激分子B7-1遺伝子の三つのHLA-A2発現ヒトメラノーマ細胞株へのトランスフェクション、および、それらが初代ヒトT細胞を刺激する能力を開示する。その三つのメラノーマ細胞株もまた、検出可能なレベルの共刺激分子であるICAM-1(CD54)およびLFA-3(CD58)を発現した。

【0011】

GjorloffWingren, A.ら、Critical Reviews in Immunol 15 (3 & 4): 235-253は、HLA-DR、B7、および、LFA-3のCHO細胞へのコトランスフェクションにより、これらの分子がナイーブT細胞およびメモリーT細胞の両方の活性化に協同作用し、また、抗原であるブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB)にpM濃度において応答を示すことを開示する。

【0012】

Goldbach-Mansky, R. ら、1992, International Immunol. 4 (No. 12): 1351-1360は、LFA-3、ICAM-1、および、B7陽性赤白血病細胞株K562、マウスL細胞、および、B7をトランスフェクションしたL細胞の存在下、CD4<sup>+</sup>T細胞がブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB)に反応することを開示する。

【0013】

10

20

30

40

50

Hodge, J. W. ら、1994, Cancer Research 54: 5552-5555は、マウスB7.1およびB7.2遺伝子を含む、組換えワクシニアウイルスの構築、および、特徴付けを開示する。

【0014】

Hodge, J. W. ら、1995, Cancer Research 55: 3598-3603 Cancer Research 55: 3598-3603は、マウスB7.1組換えワクシニア (rV-B7) にヒト癌胎児性抗原遺伝子を発現する組換えワクシニア (rV-CEA) を加えた混合物、および、この抗腫瘍活性のための混合物の利用を開示する。

【0015】

Parra, ら、1993, Scand J. Immunol 38: 508-514, Parra, E. ら、1994, J. Immunol 153: 2479-2487、および、Parra ら、1997, J. Immunol., 458: 637-642は、ヒトHLA-DR4分子 (CHO-DR4)、HLA-DR4およびB7 (CHO-DR4/B7)、HLA-DR4およびLFA-3 (CHO-DR4/LFA3)、HLA-DR4およびICAM-1 (CHO-DR4/ICAM-1)、あるいは、DR4、B7、および、LFA-3 (CHO-DR4/B7/LFA-3) 遺伝子をトランスフェクションしたCHO細胞を開示する。

【0016】

Thomas, R. ら、1993 J. Immunol. 151: 6840-6852は、フレッシュに得られた樹状細胞 (DC) が、HLA-DR、および、アクセサリー分子であるLFA-3、ICAM-1、および、B7を、単球と同密度に発現することを開示する。

【0017】

Uzendoski, K ら、May 1997, Human Gene Therapy 8: 851-860は、マウス共刺激分子であるICAM-1を発現する組換えワクシニアウイルスの構築、特徴付け、および、免疫学的結果を開示する。

【0018】

1996年4月11日に発行されたPCT/US95/12624のWO 96/10419は、一つあるいはそれ以上の、免疫刺激分子をコードする遺伝子もしくはその一部、および、一つあるいはそれ以上の、疾患状態の抗原をコードする遺伝子もしくはその一部を取り込ませた、一つの組換えウイルスベクターに関連する内容を開示する。

【0019】

Robinson ら、アメリカ合衆国特許番号5,738,852は、感染病原体の標的抗原をコードするポリヌクレオチド配列、および、B7共刺激分子をコードするポリヌクレオチド配列を含む、レトロウイルスベクターを開示する。

本発明は、感染させた宿主細胞においてそれぞれの外来DNAを機能的に発現させる、少なくとも三つの共刺激分子そののみ、あるいは、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来DNAとの組み合わせをコードする、外来DNAを含むベクターである。

【0020】

発明の概要

本発明は、複数の共刺激分子をコードする、外来または外因性遺伝子、あるいはその一部を含む、組換えベクターを提供する。本発明において有用性をもつ、共刺激分子をコードする遺伝子もしくはその機能的な一部分は、B7ファミリーメンバー、ICAM-1、LFA-3、4-1 BBL、CD59、CD40、CD70、VCAM-1、OX-40L、それらの機能的な部分、および、ホモログを含むが、これらには限定はしない。本発明のベクターは、複数の共刺激分子をコードする外来遺伝子との組み合わせで、少なくとも一つの標的抗原、あるいは、その免疫学的エピトープをコードする外来遺伝子を、さらに提供し得る。少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来遺伝子は、ウイルス、細菌、原生動物、寄生虫、酵母、腫瘍細胞、前新生物の細胞、過形成の細胞、組織特異的な細胞といった、細胞、組織、あるいは、生物体、あるいは合成抗原に由来することが可能である。そのベクターはさらに、少なくとも一つのサイトカイン、ケモカイン、および、flt-3L、あるいはサイトカイン、ケモカイン、および、flt-3Lの組み合わせをコードする外来遺伝子を提供し得る。

【0021】

10

20

30

40

50

本発明群で使用する組換えベクターは、バクテリアベクター、ウイルスベクター、核酸を基にした (based) ベクター、および、その類似物からなる。組換えウイルスベクターは、ボックスウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、アルファウイルス、レトロウイルス、ピコルナウイルス、イリドウイルス、および、その類似物を含むが、これらには限定されない。ボックスウイルスは、オルトボックス、鳥類のボックス、suipox、および、カプリボックスを含むが、これらには限定されない。

【0022】

本発明は、標的細胞、標的抗原、あるいは、その免疫学的エピトープに対する増強された免疫応答を提供する、複数の共刺激分子をコードする外来遺伝子あるいはその一部を含む、組換えウイルスを提供し、それは、一つあるいは二つの共刺激分子をコードする1または複数の遺伝子を含む組換えウイルスにより提供される応答より強い。本発明の組換えウイルスは、複数の共刺激分子をコードする外来遺伝子と組み合わせた、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来遺伝子をさらに提供し得る。その組換えウイルスは、IL-2、IL-12、GM-CSF、および、その類似物を含むが、これらには限定されない、サイトカイン；MIP1、MIP2、RANTES、および、その類似物といったケモカイン；および、DC増殖を刺激するFlt-3L；といった、他のクラスの免疫刺激分子をコードする外来遺伝子をさらに提供し得る。

10

【0023】

本発明は、標的細胞、標的抗原、あるいは、その免疫学的エピトープに対する増強された免疫応答を提供する、複数の共刺激分子をコードする外来遺伝子あるいはその一部を含む組換えボックスウイルスをさらに提供し、それは一つあるいは二つの共刺激分子をコードする1または複数の遺伝子を含む組換えボックスウイルスにより提供される応答より強い。本発明の組換えボックスウイルスは、複数の共刺激分子をコードする外来遺伝子と組み合わせた、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来遺伝子をさらに提供し得る。

20

【0024】

本発明はまた、複数の共刺激分子をコードしそして発現する核酸配列を含む組換えボックスウイルスを提供し、前記核酸配列は、共刺激分子のB7ファミリーに由来する少なくとも一つの分子をコードする核酸配列、ICAM-1共刺激分子をコードする核酸配列、および、LFA-3共刺激分子をコードする核酸配列を含む。その組換えウイルスは、さらに、それぞれの外来遺伝子の発現を制御する、ボックスウイルスプロモーターの多様性を提供する。

30

【0025】

本発明は、複数の共刺激分子をコードする外来DNAを含むプラスミドベクターを、親となるウイルスゲノムへ組換えを行なって、そのゲノムに外来DNAを挿入された組換えウイルスを作成することにより、産生される組換えウイルスを提供する。組換えによって産生される組換えウイルスは、さらに、プラスミドベクターにより提供される、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来遺伝子を含み得る。

【0026】

本発明はまた、共刺激分子LFA-3、ICAM-1および、B7ファミリーに由来する少なくとも一つの分子をコードする外来DNAを含むプラスミドベクターを、親となるボックスウイルスゲノムへ組換えを行なって、そのゲノムに外来DNAを挿入された組換えウイルスを作成することにより産生される組換えボックスウイルスを提供し、また、外来DNAの発現を制御可能にするボックスウイルスプロモーターの多様性を提供する。組換えによって産生される組換えボックスウイルスは、さらに、プラスミドベクターにより提供される、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来遺伝子を含み得る。

40

【0027】

本発明の目的は、複数の共刺激分子をコードする外来核酸配列をもつ組換えベクターを含む、標的細胞、標的抗原、あるいは、その免疫学的エピトープに対する免疫応答を増強する免疫原を提供することである。そのベクターは、さらに、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来核酸配列を含み得る。

50

## 【0028】

本発明の別の目的は、三つあるいはそれ以上の共刺激分子をコードする外来核酸配列をもつ組換えウイルスベクターを含む、標的細胞、標的抗原、あるいは、その免疫学的エピトープに対する免疫応答を増強する免疫原を提供することである。その組換えウイルスベクターは、さらに、少なくとも一つまたはそれ以上の標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来核酸配列を含み得る。

## 【0029】

さらに本発明の別の目的は、共刺激分子LFA-3、ICAM-1、および、B7ファミリー由来の少なくとも一分子、をコードする外来核酸配列、および、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来核酸配列を含む、組換えボックスウイルスベクターを含む、標的細胞、標的抗原、あるいは、その免疫学的エピトープに対する免疫応答を増強する免疫原を提供することである。

10

## 【0030】

本発明のベクターは、標的細胞、標的抗原、あるいは、そのエピトープに対する免疫応答の誘導、および、増強により、疾患状態の保護および/または治療のための、ワクチンを提供する。そのベクターワクチンは、複数の共刺激分子をコードする外来核酸配列を含む。そのベクターワクチンは、疾患に対する一価あるいは多価のワクチンを産生するために、一つまたはそれ以上の標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来核酸配列もまた、含み得る。

## 【0031】

本発明は、複数の共刺激分子をコードする外来核酸配列をもつベクター、および、薬剤的に許容できる担体を含む、薬剤組成物を提供する。そのベクターは、さらに、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来核酸配列を含み得る。そのベクターは、さらに、サイトカイン、ケモカイン、flt-3L、あるいは、それらの組み合わせをコードする、核酸配列を含み得る。

20

## 【0032】

本発明は、三つまたはそれ以上の共刺激分子をコードする、外来または外因性の遺伝子、あるいは、その機能的な一部を含む組換えウイルスベクター、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来遺伝子、および、薬剤的に許容できる担体を含む、薬剤組成物を提供する。

30

## 【0033】

本発明はまた、複数の共刺激分子をコードする、外来遺伝子あるいはその一部を含む組換えボックスウイルス、および、薬剤的に許容できる担体を含む、薬剤組成物を提供する。その組換えボックスウイルスは、さらに、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来核酸配列を含み得る。

## 【0034】

本発明の別の観点では、三つまたはそれ以上の共刺激分子をコードする、外来遺伝子あるいはその一部を含む、組換えボックスウイルスを含む薬剤組成物であり、また、さらに、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来遺伝子あるいはその一部、および、薬剤的に許容できる担体あるいはその免疫学的エピトープを含み得る。

40

## 【0035】

本発明はまた、複数の共刺激分子をコードする、外来遺伝子あるいはその機能的な一部を含む第一のベクター、および、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来遺伝子を含む第二のベクター、および、薬剤的に許容できる担体を含む、薬剤組成物を提供する。

## 【0036】

本発明は、宿主細胞内で複数の共刺激分子の発現をひき起こす、複数の共刺激分子をコードする外来遺伝子を含む第一のベクターを、感染、トランスフェクション、あるいは、形質導入した宿主細胞を提供する。第一のベクターあるいは第二のベクターは、さらに、少

50

なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来遺伝子を、宿主細胞に提供し得る。

【0037】

本発明は、複数の共刺激分子の発現あるいは過剰発現をひき起こす、複数の共刺激分子をコードする、外来あるいは外因的に提供された遺伝子を含む第一のベクターを、感染、トランスフェクション、あるいは、形質導入した、抗原提示細胞（APC）、あるいは、腫瘍細胞を提供する。第一のベクターあるいは第二のベクターは、さらに、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来遺伝子を、宿主細胞に提供し得る。

【0038】

本発明はさらに、複数の共刺激分子の発現を引き起こす、また、場合により標的抗原あるいはその免疫学的エピトープの発現を引き起こす、組換えボックスウイルスを感染させた宿主細胞を提供する。

【0039】

本発明の別の観点は、感染、トランスフェクション、あるいは、遺伝子的操作をして、複数の外因性共刺激分子をコードする遺伝子を過剰発現させた樹状細胞（DC）およびその前駆細胞である。DCおよびその前駆細胞は、さらに操作して、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来遺伝子を発現させ得る。

【0040】

さらに本発明の別の観点は、遺伝子的に操作して、少なくとも三つの外因性共刺激分子をコードする遺伝子を過剰発現させた、DCおよびその前駆細胞である。DCおよびその前駆細胞は、さらに操作して、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来遺伝子を発現させ得る。

【0041】

本発明は、遺伝子的に操作して、少なくとも一つのB7分子、ICAM-1、および、LFA-3をコードする遺伝子を過剰発現させた、DCおよびその前駆細胞を提供する。DCおよびその前駆細胞は、さらに操作して、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来遺伝子を発現させ得る。

【0042】

本発明は、(a) 様々なウイルスプロモーター、(b) 複数の共刺激分子をコードする外来核酸配列、(c) エlement (a) および (b) の構築物に隣接するDNA配列を含む、複数の共刺激分子をコードする外来核酸配列を発現することができる組換えウイルスを産生するように計画した、親となるウイルスの組換えの方法およびプラスミドベクターを提供し、ここで隣接配列はその5'端、および、3'端の両方で、Element (a) と (b) が挿入される、親となるウイルスゲノムの領域と相同である。プラスミドベクターは、さらに、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来核酸配列を提供し得る。プラスミドベクターはまた、選択可能なマーカーをコードする遺伝子を提供し得る。

【0043】

本発明はまた、(a) 様々なボックスウイルスプロモーター、(b) LFA-3、ICAM-1、および、少なくとも一つのB7分子をコードする外来核酸配列、(c) Element (a) および (b) の構築物に隣接するDNA配列を含む、共刺激分子LFA-3、ICAM-1、および、少なくとも一つのB7分子をコードする外来核酸配列を発現することができる組換えボックスウイルスを産生するように計画した、親となるボックスウイルスの組換えの方法、および、プラスミドベクターを提供し、ここで隣接配列はその5'端、および、3'端の両方で、Element (a) と (b) が挿入される、親となるウイルスゲノムの領域と相同である。プラスミドベクターは、さらに、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来核酸配列を提供し得る。プラスミドベクターはまた、選択可能なマーカーをコードする遺伝子を提供し得る。

【0044】

10

20

30

40

50

本発明の一つの観点は、複数の共刺激分子をコードする外来核酸配列を含む、第一のベクターの投与を含む、少なくとも一つの標的細胞、標的抗原、あるいは、その免疫学的エピトープに対する、哺乳動物における免疫学的応答を増強する方法であり、各共刺激分子は、哺乳動物において少なくとも一つの免疫学的応答を増強するのに効果的な量で、哺乳動物の細胞に発現される。本発明において有用性をもつ、共刺激分子をコードする遺伝子あるいはその機能的な部分は、B7ファミリーメンバー、ICAM-1、LFA-3、4-1BBL、CD59、CD40、CD70、VCAM-1、OX-40Lおよびそのホモログ、および、その一部を含むが、これらには限定されない。少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来核酸配列は、第一のベクター、あるいは、第二のベクターによる方法において、さらに、提供され得る。

10

## 【0045】

複数の共刺激分子をコードする遺伝子あるいはその部分に加えて、他のクラスの免疫刺激分子の少なくとも一つあるいは組み合わせをコードする外来または外因性核酸配列、あるいは、その機能的な部分もまた、第一のベクター、第二のベクター、あるいは、第三のベクターにより、提供され得る。他のクラスの免疫刺激分子は、IL-2、IL-12、GM-CSF、および、その類似物といったサイトカイン；MIP1、MIP2、RANTES、および、その類似物といったケモカイン；および、Flt-3L；を含む。

## 【0046】

本発明の観点は、複数の共刺激分子LFA-3、ICAM-1、および、少なくとも一つのB7分子をコードする核酸配列を含む、外来組換えポックスウイルスの投与を含む、標的細胞、標的抗原、あるいは、その免疫学的エピトープに対する、哺乳動物における抗原特異的T細胞の免疫学的応答を増強する方法であり、各共刺激分子は、一つ、あるいは、その増強が二つの共刺激分子の投与により提供される増強の和よりも大きい、少なくとも一つのT細胞免疫応答を増強するのに効果的な量で、哺乳動物において細胞に発現される。

20

## 【0047】

免疫学的応答を増強させる他の方法では、外来あるいは外因性に提供される複数の共刺激分子を発現するAPCあるいは腫瘍細胞は、免疫学的応答の増強に効果的な量で哺乳動物に提供される。APCあるいは腫瘍細胞は、免疫応答の増強のために、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする外来遺伝子をさらに発現し得る。標的抗原あるいはその免疫学的エピトープはAPCあるいは腫瘍細胞の投与より先行して、または同時に、または続いて哺乳動物に投与することができる。加えて、または、二者択一的に、APCあるいは腫瘍細胞を、哺乳動物に投与する前に、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープで、パルスする。

30

## 【0048】

本発明は、哺乳動物において、体液性応答の増強に効果的な量で、複数の共刺激分子をコードする外来核酸配列を含む組換えベクターを哺乳動物に対して投与することを含む、標的細胞、標的抗原あるいはその免疫学的エピトープに対する体液性の応答を増強する方法を提供する。そのベクターは、さらに、少なくとも一つの標的抗原あるいはその免疫学的エピトープをコードする核酸配列を含み得る。本発明は、さらに、本方法により産生された、標的細胞、標的抗原あるいはその免疫学的エピトープに対する、単離された抗体あるいはその機能的な部分を提供する。

40

## 【0049】

本発明はまた、B7、ICAM-1、および、LFA-3をコードする外来遺伝子、および、一つまたはそれ以上の標的抗原あるいはそのエピトープをコードする遺伝子を含む、組換えポックスウイルスの投与に応答して産生される、標的抗原もしくはその免疫学的エピトープに特異的な抗体を提供する。

## 【0050】

発明の詳細な記述

本発明は、複数の共刺激分子を組み合わせたものまたは共刺激分子それぞれの機能性活性部分をコードする外来遺伝子を含む組換えベクターである。本明細書中で用いる複数の共

50

刺激分子は、少なくとも3つ以上の共刺激分子である。本明細書中で用いる機能性活性部分は、その各リガンドに結合して免疫細胞活性化に適した共刺激信号をトリガーするのに関与する分子部分である。機能性活性を測定するための1方法は、本明細書に記載するように *in vitro* で共刺激分子をターゲット細胞へ運搬することによる天然T細胞増殖の誘発を利用するものである。共刺激分子の機能性部分は、T細胞増殖を少なくとも20%高める。

#### 【0051】

本明細書中で用いる外来遺伝子もしくは外来核酸配列またはその機能性部分という用語は、宿主細胞または宿主生物に組換えベクターにより外から供給された遺伝子、核酸配列またはその機能性部分である。宿主細胞または宿主生物に供給される外因性遺伝子またはその部分は、宿主細胞または宿主生物に内在しないものであってもよく、あるいは内在し、機能性または非機能性であってもよい。機能性内因性遺伝子が宿主細胞または宿主生物中に存在する場合、外来の、すなわち外から供給される遺伝子またはその機能性部分はその遺伝子の生成物を過剰発現する。

10

#### 【0052】

本発明の組換えベクターは、Tリンパ球、Bリンパ球、NK細胞、抗原提示細胞（APC）など（これらに限定されない）を含めた免疫系細胞に増強した免疫応答を与えるのに有用である。複数の共刺激分子を発現する組換えベクターによる免疫応答増強は、免疫応答の増強に単一の共刺激分子を用いる場合または2つの共刺激分子を用いる場合と比較して、相乗的である。免疫応答は、細胞性および/または体液性免疫応答であってもよく、特定のターゲット抗原またはそのエピトープに向けられてもよく、あるいはサイトカイン放出増加、免疫細胞増殖の増大、マイトジェン応答性増大などにより証明されるような、全般的免疫増強作用またはアップレギュレーション作用であってもよい。好ましくは、免疫応答の増強には、本発明の組換えベクターを用いて、または本発明の組換えベクターによりトランスフェクション、トランスダクションまたは誘発された細胞を用いて刺激した結果としての過剰刺激または高力T細胞刺激（high intensity T cell stimulation, HITS）が含まれる。

20

#### 【0053】

共刺激分子をコードする外来遺伝子は、多様な供給源から得ることができる。共刺激分子をコードする外来遺伝子の供給源の選択は、その組換えベクターを用いて免疫化または処理する種に依存するであろう。

30

#### 【0054】

共刺激分子をコードする外来遺伝子は、ネズミ由来、ヒト由来、サル由来、他の哺乳動物の相合体であってもよく、哺乳動物遺伝子に基づいて化学的に合成できる。共刺激分子をコードする外来遺伝子は、鳥類由来であってもよく、または鳥類の共刺激分子遺伝子に基づいて化学的に合成されてもよい。本発明の組換えベクターは、免疫原として、またターゲット細胞、ターゲット抗原およびその免疫エピトープに対する免疫応答の増強を刺激するワクチンとして有用である。複数の共刺激分子をコードする遺伝子を含む本発明の組換えベクターを用いたそのようなレベルの免疫応答増強は、単一または2つの共刺激分子を用いては得られなかった。

40

#### 【0055】

本発明に有用な共刺激分子をコードする遺伝子またはその機能性部分には、B7.1、B7.2、ICAM-1、LFA-3、4-1BBL、CD59、CD40、CD70、VCAM-1、OX-40L、哺乳動物相合体などが含まれるが、これらに限定されない。本発明の組換えベクターは、単一または2つの共刺激分子を用いては得られない相乗的な免疫応答増強を得るために、少なくとも3つの共刺激分子をコードする遺伝子を含む。組換えベクターに用いるための種々の組合わせの共刺激分子をコードする遺伝子は本発明の範囲に含まれ、目的とする免疫応答および処置すべき疾患または状態に応じて下記の組合わせを含むことができる：B7.1、B7.2、ICAM-1、LFA-3；B7.1、B7.2、ICAM-1、LFA-3；B7.1、B7.2、ICAM-1、4-1BBL；B7.1、B7.2、ICAM-1、LFA-3、4-1BBL；CD59、VCAM-1；およびB7.1、B7.2；CD59、CD40、4-1BBL、CD70およびVCAM-

50

1、B7.1、B7.2；OX-40L、4-1BBLなど。1つまたは2つの共刺激分子をコードする組換えベクターの使用と比較して3つの共刺激分子をコードする組換えベクターを用いて達成される著しい相乗的免疫応答に基づけば、4、5またはそれ以上の共刺激分子をコードする組換えベクターは、相乗的免疫応答、または3つの共刺激分子をコードする組換えベクターを用いた場合と同等またはより大きな免疫応答を生じるであろう。

【0056】

B7はIg遺伝子スーパーファミリーのメンバーである共刺激分子ファミリーを表す。このメンバーには、ネズミB7.1 (CD80) およびB7.2 (CD86) が含まれる。B7.1およびB7.2はCD28 / CTLA-4 (CD152) の天然リガンドである。ネズミB7.1の遺伝子配列は、Freeman et al. (*J. Immunol.*, 143 : 2714-2722, 1989) 中に、およびGENEBANKに寄託No. X60958で開示されている。ネズミB7.2の遺伝子配列は、Azuma et al. (*Nature*, 366, 76-79, 1993)、ならびにGENEBANKに寄託No. L25606およびMUSB72Xで開示されている。

10

【0057】

ネズミB7共刺激分子のヒト相同体およびその機能性部分は本発明の範囲に含まれ、ヒトの臨床用組換えベクターに特に有用である。ネズミB7共刺激分子のヒト相同体には、CD80、すなわちネズミB7.1の相同体、CD86、すなわちB7.2の相同体が含まれる。ヒトB7.1 (CD80) の遺伝子配列はGENEBANKに寄託No. M27533で開示され、ヒトB7.2 (CD86) の遺伝子配列は寄託No. U04343およびAF099105で開示されている。本発明を実施するにはライセンスが要求されるであろう。

【0058】

本発明に用いるためには、組換えベクターは、他の共刺激分子のほかにB7共刺激分子ファミリーのうちの少なくとも1つの分子またはB7共刺激分子もしくはその機能性部分の組合わせをコードする外来核酸配列を含むことができる。B7共刺激分子の組合わせには、2以上のB7.1分子、2以上のB7.2分子、B7.1とB7.2などが含まれるが、これらに限定されない。1態様において、組換えベクターは、B7.1分子をコードする外来核酸配列を、LFA-3およびICAM-1をコードする外来核酸配列と共に含む。

20

【0059】

細胞間接着分子 (ネズミICAM-1、CD54) およびヒト相同体CD54も共刺激分子として作用する。そのリガンドは、リンパ球および顆粒球の表面に発現する白血球機能関連抗原-1 (leucocyte function-associated antigen-1, LFA-1、CD11a / CD18) である。ネズミICAM-1の遺伝子はGenBankに寄託No. X52264で開示され、ヒトICAM-1相同体 (CD54) の遺伝子は寄託No. J03132で開示されている。1態様において、本発明の組換えベクターは、2以上の他の共刺激分子をコードする外来核酸配列のほかに、少なくとも1つのネズミICAM-1分子、ヒト相同体、他の哺乳動物相同体またはその機能性部分をコードする外来核酸配列を含む。

30

【0060】

共刺激分子白血球機能抗原3であるネズミLFA-3 (CD48) およびそのヒト相同体LFA-3 (CD58)、すなわちグリコシル-ホスファチジルイノシトール結合糖タンパク質は、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリー内のCD2ファミリーのメンバーである。LFA-3の天然リガンドは、胸腺細胞、T細胞、B細胞およびNK細胞上に発現するCD2 (LFA-2) である。ネズミLFA-3の遺伝子はGenBankに寄託No. X53526で開示され、ヒト相同体の遺伝子は寄託No. Y00636で開示されている。

40

【0061】

T細胞抗原4-1BBLは、抗原刺激した一次T細胞培養物およびレクチン駆動による胸腺細胞活性化において共刺激信号を中継する共刺激分子である (Hurtado, J. C. et al., *J. Immunol.*, 158 (6) : 2600-2609, 1997)。4-1BBLは腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、すなわちサイトカインに富む一群の細胞表面分子に属する (Vinay, D. S. et al., *Seminars in Immunol.*, 1998, Vol. 10, pp. 481-489)。ネズミ4-1BBLに対する遺伝子はGenBankに寄託No. U02567で開示されている。ヒト相同体hu4-1BBLの遺伝子はGenBankに寄託No. U03397で開示されている。

50

## 【 0 0 6 2 】

OX-40Lは、TNFとの相同体が限られたII型膜タンパク質であり、*in vitro*でOX-40<sup>+</sup>T細胞に対し刺激性である。ネズミとヒトのOX-40L cDNAはヌクレオチドレベルで68%、アミノ酸レベルで46%の相同性をもつ。ヒトOX-40LはヒトT細胞のみを刺激するが、ネズミOX-40Lはヒトとマウスの両方の細胞を刺激する。APCはOX-40Lを発現し、CD<sup>+</sup>T細胞に抗原を提示する際、OX-40L：OX-40R信号を伝達することができる。OX-40L信号伝達はヒト樹状細胞の分化にとって重要であり、またIL-12、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ およびIL-6の産生を増加させる（Weinberg, A. D. et al., 1998, Seminars in Immunol., Vol. 10 : 471-480）。OX-40Lは一次CD4<sup>+</sup>T細胞応答の持続に有効な共刺激分子であり、B7-1と組み合わせて用いられる（Gramaglia, I. et al., 1989, J. Immunology, Vol. 161 : 6510-7）。

10

## 【 0 0 6 3 】

本発明に有用なベクターは、少なくとも3またはそれより多い外来遺伝子、好ましくは5以上の外来遺伝子を発現させることができる。本発明に有用なベクターには、宿主細胞において少なくとも3つの外来共刺激分子遺伝子生成物を機能性発現しうる任意のベクターが含まれる。このベクターは、少なくとも3つの外来共刺激分子をコードする遺伝子のほかに、少なくとも1つのターゲット抗原またはその免疫エピトープ、ならびに選択性マーカーをコードする少なくとも1つの外来遺伝子を発現させることができる。

## 【 0 0 6 4 】

本発明のベクターには、細菌（たとえばSalmonella）ベクター、ウイルスベクター、核酸ベースベクターなどが含まれるが、これらに限定されない。ウイルスベクターには、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、アルファウイルス、レトロウイルス、ピコルナウイルス、イリドウイルスなどが含まれるが、これらに限定されない。本発明に有用なポックスウイルスには、複製性および非複製性ベクターが含まれる。そのようなポックスウイルスには、オルトポックス、たとえばワクシニア、アライグマ（raccoon）ポックス、ウサギポックスなど、アビポックス、スイポックス、カプリポックスなどが含まれるが、これらに限定されない。ポックスウイルスは、ワクシニア-コペンハーゲン、ワクシニア-Wyeth株、ワクシニア-MVA株、NYVAC、ニワトリポックス（fowlpox）、TROVAC、カナリアポックス、ALVAC、ブタポックスよりなる群から選択できる。1態様において、組換えベクターはワクシニアウイルスである。他の態様において、組換えベクターはニワトリポックスである。

20

30

## 【 0 0 6 5 】

本発明の好ましいベクターは、組換えウイルス、好ましくはポックスウイルスである。本発明に有用な組換えポックスウイルスは、下記を含めた多数の利点をもつ：(i) APCおよび腫瘍細胞を含めた多数の細胞タイプへの効率的な遺伝子運搬；(ii) 高レベルのタンパク質発現；(iii) 免疫系への最適な抗原提示；(iv) 細胞仲介による免疫応答および抗体応答を誘発する能力；(v) 永久的ではなく一過性の細胞遺伝子修飾、ならびに(vi) 異なる属に由来するポックスウイルスの併用が可能であること（それらは免疫学的に交差反応性ではないので）。本発明の組換えポックスウイルスの構築に有用な親ポックスウイルスには下記のものが含まれるが、これらに限定されない：オルトポックスウイルス、たとえば複製性ワクシニアウイルス（Perkus et al., Science, 229 : 981-984, 1985 ; Kaufman et al., Int. J. Cancer, 48 : 900-907, 1991 ; Moss, Science, 252 : 1662, 1991）、高弱毒化ワクシニアウイルス、たとえばMVA、修飾ワクシニア-アンカラ（Sutter and Moss, Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A., 89 : 10847-10851 ; Sutter et al., Virology, 1994）、ワクシニア-コペンハーゲンおよびNYVAC；アビポックスウイルス（15）、たとえばニワトリポックスウイルス（15）、カナリアポックスウイルス、たとえばALVACなど（Baxby and Paoletti, Vaccine, 10 : 8-9, 1992 ; Rinns, M. M. et al. (編), Recombinant Poxviruses, CRC Press社, Boca Raton, 1992 ; Paoletti, E., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 93 : 11349-11353, 1996）、ならびにスイポックスウイルス、カプリポックスウイルスなど。

40

## 【 0 0 6 6 】

50

1 態様において、親ボックスウイルスはワクシニアウイルスである。具体的な態様において、ワクシニアウイルスはWyeth株またはそれに由来する株である。Wyeth株に由来する株には、機能性K1L遺伝子を欠如するvTBC33などが含まれるが、これらに限定されない。さらに他の態様において、ウイルスは天然痘ワクチンとしてCenters for Disease Control (ジョージア州アトランタ) から入手できるDry-Vaxである。他の態様において、親ウイルスはニワトリボックスの株、たとえばPOXVAC-TC (Schering-Plough社) などである。

【0067】

本発明の組換えベクターは、宿主において宿主細胞を感染、トランスフェクションまたはトランスダクションさせることができる。宿主には哺乳動物、鳥類、魚類などが含まれるが、これらに限定されない。宿主細胞は、組換えベクターにより感染、トランスフェクションまたはトランスダクションされやすく、かつ組換えベクターからの外来遺伝子を機能的レベルで発現できる任意の細胞である。宿主細胞には、プロフェッショナルAPC、および抗原提示前駆細胞、たとえば単球、マクロファージ、DC、ランゲルハンス細胞などが含まれるが、これらに限定されない。本発明の組換えベクターは、腫瘍細胞、または他の細胞タイプ、たとえば線維芽細胞もしくは筋細胞を感染させることもできる。宿主細胞の感染により外来の外因性共刺激分子それぞれが発現し、またターゲット抗原(1以上)が組換えベクター中にある場合にはターゲット抗原をコードする外来核酸配列が発現することができる。宿主細胞は、CD4<sup>+</sup>および/またはCD8<sup>+</sup>T細胞に適切に抗原を提示するのに適したMHC (HLA) クラスIまたはII分子を発現するか、あるいは発現するように工学的に処理される。したがって、実質的にいかなる哺乳動物細胞も、複数の共刺激分子を発現する適切な抗原提示細胞になるように工学的に処理することができる。

【0068】

本発明の組換えベクターは、機能可能な状態で核酸配列に結合した少なくとも1つの発現制御要素を含む。発現制御要素は、核酸配列の発現を制御および調節するためにベクターに挿入される (Ausubel et al., 1987, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, ニューヨーク州ニューヨーク)。発現制御要素は当技術分野で既知であり、プロモーターがこれに含まれる。本発明に有用なプロモーターは当技術分野で既知のボックスウイルスプロモーターであり、30K、I3、sE/L、7.5K、40K、C1などが含まれるが、これらに限定されない。30Kプロモーターの核酸配列は、GenBank寄託No. M35027の塩基番号28,012~28,423 (アンチセンス) に開示されている。I3の核酸配列は、GenBank寄託NoJ03399の塩基番号1100~1301 (アンチセンス) に開示されている。7.5Kプロモーターの核酸配列は、GenBank寄託No. M35027の塩基番号186550~186680に開示されている。40Kプロモーターの核酸配列は、GenBank寄託No. M13209の塩基番号9700~9858 (アンチセンス) に開示されている。C1プロモーターの核酸配列は、GenBank寄託No. M59027の塩基番号1~242、およびUSP 5,093,258に開示されている。sE/Lプロモーターの配列は、参考文献16に開示されている。他のボックスウイルスプロモーター、たとえばDavison and Mos (*J. Mol. Biol.*, 210:749-769 (1989)) により記載されるものを使用できる。これらのプロモーターはいずれも当技術分野の標準法により合成できる。適切なプロモーターの選択は、その発現のタイミングおよびレベルに基づく。初期または初期/後期プロモーターが好ましい。好ましい態様においては、用いるプロモーターまたは組合わせプロモーターにより、感染宿主中でそれぞれの共刺激分子を相乗的免疫応答を得るのに最適な状態で発現させることができる。好ましい態様においては、共刺激分子をコードする外来遺伝子それぞれを、離れた別個のプロモーターにより制御する。

【0069】

核酸ベースベクターの場合、構築体は脂質キャリアーと結合した/またはそれに封入された核酸 (DNAまたはRNA) であってよい。所望により、脂質キャリアー分子および/または構築体を特定のターゲット細胞タイプ (1以上) にターゲティングさせ、および/またはそこで発現させることができる。裸のDNAベクターは、USP 5,827,703に記載の方法で調製できる。転写開始領域またはプロモーター要素については、そのDNA配列を目的レベルで転写するものであればいかなる領域も使用できる。転写開始領域は、宿主細胞および/ま

10

20

30

40

50

たは転写されるDNAに対して天然または相同であってもよく、あるいは宿主細胞および/または転写されるDNA配列に対して外来または異種であってもよい。裸のDNAの転写開始に効果的なプロモーター要素には、SV40(シミアンウイルス40)初期プロモーター、RSV(ラウス肉腫ウイルス)プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター、ヒトCMV(サイトメガロウイルス)極初期Iプロモーターなどが含まれるが、これらに限定されない。核酸ベクターは、注射器、カテーテル、または注射針を用いない注入、たとえば遺伝子銃により宿主に運搬できる。

【0070】

本発明の1態様においては、第1共刺激分子またはその機能性部分をコードする第1プロモーター制御下の外来核酸配列、第2共刺激分子またはその機能性部分をコードする第2プロモーター制御下の外来核酸配列、および第3共刺激分子またはその機能性部分をコードする第3プロモーター制御下の外来核酸配列を含む組換えベクターが提供される。この組換えベクターはさらに、ターゲット抗原またはその免疫性部分をコードする第4プロモーター制御下の外来核酸配列を備えていてもよい。

10

【0071】

本発明の1態様においては、LFA-3またはその機能性部分をコードする30Kボックスウイルスプロモーター制御下の核酸配列、ICAM-1またはその部分をコードするI3ボックスウイルスプロモーター制御下の核酸配列、およびB7.1またはその部分をコードするsE/Lボックスウイルスプロモーター制御下の核酸配列を含む組換えボックスウイルスが提供される。そのような組換えボックスウイルス構築体の一例は、図11Aに示すワクシニアvT171である。この組換えボックスウイルスは、さらに腫瘍関連抗原またはその免疫性部分をコードする核酸配列を備えていてもよい。この本発明の1態様は、図4Cに示す組換えワクシニアvT172である。

20

【0072】

本発明の1態様においては、B7.1をコードするsE/Lボックスウイルスプロモーター制御下の核酸配列、LFA-3またはその部分をコードするI3ボックスウイルスプロモーター制御下の核酸配列、およびICAM-1またはその部分をコードする7.5Kボックスウイルスプロモーター制御下の核酸配列を含む組換えボックスウイルスが提供される。この構築体は、さらに少なくとも1つのターゲット抗原またはその免疫エピトープをコードする核酸配列、および/または選択性マーカーをコードする核酸配列を備えていてもよい。そのような組換えボックスウイルス構築体の1態様は、選択性マーカーとしてlacZ遺伝子を含む、図4Bに示すワクシニアvT199である。

30

【0073】

本発明の1態様において、組換えニワトリボックスウイルスは、B7.1またはその部分をコードするsE/Lボックスウイルスプロモーター制御下の核酸配列、LFA-3またはその部分をコードするI3ボックスウイルスプロモーター制御下の核酸配列、およびICAM-1またはその部分をコードする7.5Kボックスウイルスプロモーター制御下の核酸配列を含む。この態様の一例は、図4Aに示すニワトリボックスvT222である。組換えニワトリボックスウイルスはさらに、ターゲット抗原CEAをコードする40Kボックスウイルスプロモーター制御下の核酸配列、および選択性マーカーlacZをコードするC1ボックスウイルスプロモーター制御下の核酸配列を含むことができる。この態様の一例は、図4Bに示すニワトリボックスvT194である。

40

【0074】

他の態様において、組換えニワトリボックスウイルスは、腫瘍関連抗原MUC-1またはその部分をコードする40Kプロモーター制御下の核酸配列、LFA-3またはその部分をコードする30Kプロモーター制御下の核酸配列、ICAM-1またはその部分をコードするI3プロモーター制御下の核酸配列、およびB7.1またはその部分をコードするsE/Lボックスウイルスプロモーター制御下の核酸配列を含む(図14Cに示す)。この組換えニワトリボックスウイルスは、いずれかの腫瘍関連抗原またはその部分をコードする核酸配列、ならびにLFA-3、ICAM-1およびB7.1をコードする、多数のプロモーターの制御下にある核酸配列を含むこと

50

ができる（図4Dに示す）。

【0075】

本発明の他の態様は、共刺激分子LFA-3、B7およびICAM-1のヒト相同体をコードする核酸配列を含む組換えベクターである。この組換えベクターはさらに、感染した宿主細胞中で各配列を発現させるのに適したプロモーターを備えていてもよい。この組換えベクターの1態様は、図9に示すvT224である。

【0076】

本発明は、複数の共刺激分子をコードする外来核酸配列を含むプラスミドベクターを提供する。1態様において外来核酸配列は、B7、ICAM-1、LFA-3、4-1BBL、CD59、CD40、CD70、VCAM-1、OX-40Lなどよりなる群から選択される少なくとも3つ、またはそれより多い共刺激分子をコードするように選択される。本発明の1態様においては、少なくとも1つのB7共刺激分子をコードする外来核酸配列、ICAM-1共刺激分子をコードする外来核酸配列、およびLFA-3共刺激分子をコードする外来核酸配列を含むプラスミドベクターが提供される。本発明のプラスミドベクターはさらに、共刺激分子の発現を制御するための少なくとも1つのプロモーター配列を備えている。好ましい態様において、共刺激分子をコードするそれぞれの核酸配列は、離れた別個のプロモーター配列により制御される。組換えボックスウイルスの作成に用いるには、本発明のプラスミドベクターはさらに、ボックスウイルスゲノムの非必須領域に由来する隣接するウイルス核酸配列を備えている。隣接するウイルス核酸配列は、相同組換えによる、外来配列への親ボックスウイルスゲノムの挿入を指令する。本発明のプラスミドベクターはさらに、当技術分野で既知のように、挿入された外来DNAを含む組換え子孫の選択および同定のための1以上の選択性マーカーを含んでもよい。これにはワクシニアK1L宿主域遺伝子、大腸菌（E. coli）lacZ遺伝子、抗生物質耐性遺伝子、 $\beta$ -グルクロニダーゼをコードする遺伝子などが含まれるが、これらに限定されない。

【0077】

1態様において本発明のプラスミドベクターは、LFA-3をコードする30Kプロモーター制御下の核酸配列、ICAM-1をコードするI3プロモーター制御下の核酸配列、およびB7をコードするsE/Lプロモーター制御下の核酸配列を、ワクシニアゲノムのHind III M領域の各部分に隣接した状態で含む。1態様において、このプラスミドベクターは図1にpT5032として示される。

【0078】

他の態様において本発明のプラスミドベクターは、B7をコードするsE/Lプロモーター制御下の核酸配列、LFA-3をコードするI3プロモーター制御下の核酸配列、およびICAM-1をコードする7.5Kプロモーター制御下の核酸配列を含む。このプラスミドベクターはさらに、別個のプロモーター配列により駆動されるlacZ遺伝子またはその部分を含むことができる。これらの配列は、ワクシニアゲノムのHind III J領域の各部分に隣接している。このプラスミドベクターの具体的態様を、図2にpT5047として示す。

【0079】

他の態様において本発明のプラスミドベクターは、B7、ICAM-1およびLFA-3をコードする核酸配列と組み合わせて、少なくとも1つのターゲット抗原またはその免疫エピトープをコードする核酸配列を含む。ターゲット抗原の発現を制御するためのプロモーターが備えられている。このプラスミドベクターの具体的態様は図3にpT5031として示され、ターゲット抗原CEAをコードする核酸配列を含む。

【0080】

他の態様において本発明のプラスミドベクターは、腫瘍関連抗原CEAをコードする40Kプロモーター制御下の核酸配列、B7をコードするsE/Lプロモーター制御下の核酸配列、LFA-3をコードするI3プロモーター制御下の核酸配列、およびICAM-1をコードする核酸配列を含む。図6にpT5049として示すように、このプラスミドベクターはさらにlacZ遺伝子をC1プロモーター制御下に含むことができる。プラスミドpT5049は、1998年11月13日、ブダペスト条約の協定に基づいてAmerican Type Culture Collection（10801 University Bouleva

10

20

30

40

50

rd, Manassa, VA20110) にATCC寄託No. 203481として寄託された。

【0081】

さらに他の態様において本発明のプラスミドベクターは、huLFA-3をコードする30Kプロモーター制御下の核酸配列、huICAM-1をコードする13Kプロモーター制御下の核酸配列、およびhuB7.1をコードするsE/Lプロモーター制御下の核酸配列を含む。このプラスミドベクターの具体的態様を図8にpT5064として示す。これは、1998年11月13日、ブダペスト条約の協定に基づいてATCCにATCC寄託No. 203482として寄託された。

【0082】

本発明のプラスミドベクターは、組換えベクター作成方法に用いるためのキットの形で提供することができる。このキットはさらに、親ウイルス、および組換え法に用いる他の試薬を備えていてもよい。

【0083】

本発明はさらに、複数の共刺激分子をコードする核酸配列を含む組換えボックスウイルスの作成方法を提供する。組換えボックスウイルスを作成するための1方法は、USP 5,093,258に開示されるように、親ボックスウイルスゲノムDNAと挿入すべき異種配列を保有するプラスミドベクターとの間でのin vivo相同組換えにより達成される。外来配列をボックスウイルスに挿入するためのプラスミドベクターは、組換えDNA技術の標準法により構築される(36)。プラスミドベクターは、それぞれタンパク質コード配列に結合したボックスウイルスプロモーターを含む1以上のキメラ外来遺伝子を、ボックスウイルスゲノムの非必須領域に由来するウイルス配列に隣接した状態で含む。親ボックスウイルスに感染させた細胞内へ、受け入れられているトランスフェクション法によりこのプラスミドをトランスフェクションすると、プラスミド上のボックスウイルス配列と親ウイルスゲノム中の対応するDNAとの間の組換えにより、ウイルスゲノム中へプラスミドからのキメラ外来遺伝子が挿入される。組換えウイルスは、当技術分野で既知の任意の多様な選択系およびスクリーニング系を用いて選択および精製される(14)。ワクシニアゲノム中への外来遺伝子の挿入は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)分析により確認される。外来遺伝子の発現は、ウェスタンブロット分析により証明される。組換えボックスウイルスを作成するための別法は、直接ライゲーションにより達成される(Pleiderer et al., *J. Gen. Virol.*, 76:2957-2962, 1995; Merchlinsky et al., *Virol.*, 238:444-451, 1997)。

【0084】

複数の共刺激分子をコードする核酸配列を、少なくとも1つのターゲット抗原またはそのエピトープをコードする核酸配列と組み合わせて含む組換えベクターの使用は、このターゲット抗原またはそのエピトープに対する免疫応答を増強し、かつこのターゲット抗原またはそのエピトープを発現する細胞に対する免疫応答を増強するのに有用である。本発明の組換えベクターを用いて得られる、ターゲット抗原、エピトープ、またはターゲット抗原を発現する細胞に対する免疫応答の程度は、単一または2つの共刺激分子を用いる系により達成されるものより著しく大きい。

【0085】

本発明の組換えベクターは、ターゲット抗原またはそのエピトープに対する相乗的免疫応答を得るために、ターゲット抗原またはその免疫エピトープをコードする核酸配列と共に、少なくとも3つまたはそれ以上の共刺激分子をコードする。1態様において組換えボックスウイルスは、B7、ICAM-1およびLFA-3をコードする核酸配列を、少なくとも1つのターゲット抗原またはその免疫エピトープをコードする核酸配列と共に備えている。場合により、多価ワクチンを得るために、1以上の核酸配列を用いて複数のターゲット抗原またはその免疫エピトープを生成することが有益であろう。

【0086】

本明細書中で用いるターゲット抗原は、哺乳動物における病原性物質または疾病状態の免疫認識および最終的排除または制御に際して重要な抗原またはその抗原上の免疫エピトープである。免疫認識は細胞性および/または体液性であってよい。細胞内病原体および癌の場合、免疫認識は好ましくはTリンパ球応答である。

## 【 0 0 8 7 】

ターゲット抗原は、たとえば下記のウイルスのような病原性微生物から誘導または単離することができる：HIV (Korber et al. 編, HIV Molecular Immunology Database, Los Alamos National Laboratory, ニューメキシコ州ロスアラモス, 1977)、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス、ヒトパピローマウイルス (USP 5,719,054)、B型肝炎ウイルス (USP 5,780,036)、C型肝炎ウイルス (USP 5,709,995)、EBV、サイトメガロウイルス (CMV) など。ターゲット抗原は、微生物細菌、たとえばChlamydia (USP 5,869,608)、Mycobacteria、Legionella、Meningioccus、A群Streptococcus、Salmonella、Listeria、Hemophilus influenzae (USP 5,955,596) などから誘導または単離することができる。

10

## 【 0 0 8 8 】

ターゲット抗原は、Aspergillus、侵襲性Candida (USP 5,645,992)、Nocardia、Histoplasmosis、Cryptosporidiaなどを含めた病原性酵母から誘導または単離することができる。

## 【 0 0 8 9 】

ターゲット抗原は、病原性原虫および病原性寄生虫から誘導または単離することができ、これにはPneumocystis carinii、Trypanosoma、Leishmania (USP 5,965,242)、Plasmodium (USP 5,589,343) およびToxoplasma gondiiが含まれるが、これらに限定されない。

## 【 0 0 9 0 】

ターゲット抗原には、前新生物状態または過形成状態に関連する抗原が含まれる。ターゲット抗原は、癌関連または癌原性であってもよい。そのようなターゲット抗原は、腫瘍特異性抗原、腫瘍関連抗原 (TAA) または組織特異性抗原、そのエピトープ、およびそのエピトープアゴニストであってもよい。そのようなターゲット抗原には下記のものが含まれるが、これらに限定されない：癌胎児性抗原 (CEA) およびそのエピトープ、たとえばCAP-1、CAP-1-6D (46) など (GenBank寄託No. M29540)、MART-1 (Kawakami et al., J. Exp. Med., 180 : 347-352, 1994)、MAGE-1 (USP 5,750,395)、MAGE-3、GAGE (USP 5,648,226)、GP-100 (Kawakami et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 91 : 6458-6462, 1992)、MUC-1、MUC-2、点変異ラット癌遺伝子、正常および点変異p53癌遺伝子 (Hollstein et al., Nucleic Acids Res., 22 : 3551-3555, 1994)、PSMA (Israeli et al., Cancer Res., 53 : 227-230, 1993)、チロシナーゼ (Kwon et al., PNAS, 84 : 7473-7477, 1987)、TRP-1 (gp75) (Cohen et al., Nucleic Acids Res., 18 : 2807-2808, 1990 ; USP 5,840,839)、NY-ESO-1 (Chen et al., PNAS, 94 : 1914-1918, 1997)、TRP-2 (Jackson et al., EMBO J, 11 : 527-535, 1992)、TAG72、KSA、CA-125、PSA、HER-2 / neu / C-erb / B2 (USP 5,550,214)、BRC-I、BRC-II、bcr-abl、pax3-fkhr、ews-fli-1、TAA類および組織特異性抗原の修飾体、TAA類のスプライス変異体、エピトープアゴニストなど。他のTAA類は、当技術分野で既知の方法、たとえばUSP 4,514,506に開示された方法により同定、単離およびクローン化することができる。ターゲット抗原には、1以上の成長因子およびそれぞれのスプライス変異体も含まれる。

20

30

## 【 0 0 9 1 】

本発明を用いてターゲットングできるヒト腫瘍抗原および組織特異性抗原ならびにその免疫エピトープには表1に例示したものが含まれるが、これらに限定されない。

40

## 【 0 0 9 2 】

## 【表1】

表 1

## T細胞が認識する抗原およびエピトープ

ターゲット抗原	制限要素	免疫ペプチドエピトープ	配列番号	
T細胞が認識するヒトターゲット腫瘍抗原				
gp 100	HLA-A2	KTWGQYWZY		
	HLA-A2	ITDQVPPSV	2	
	HLA-A2	YLEPGPVTA	3	
	HLA-A2	LLDGTATLRL	4	
	HLA-A2	VLRYGFSFSV	5	
MART1-/Melan A	HLA-A2	AAGIGILTV	6	
	HLA-A2	ILTVILGVL	7	
	HLA-A31	MSLQRQFLR	8	
TRP-1 (GP75) チロシナーゼ	HLA-A2	MLLA VLYCL	9	
	HLA-A2	YMNGTMSQV	10	
	HLA-B44	SEIWRDIDF	11	
	HLA-A24	AFLPWHLRF	12	
	HLA-DR4	QNILLSNAPLGPQFP	13	
	HLA-DR4	SYLQSDPDSFQD	14	
	MAGE-1	HLA-A1	EADPTGHSY	15
		HLA-Cw16	SAYGEPRKL	16
	MAGE-3	HLA-A1	EVDPIGHLY	17
		HLA-A2	FLWGPRLV	18
BAGE	HLA-Cw16	AARAVFLAL	19	
GAGE-1,2 N-アセチルグルコサミン トランスフェラーゼ-V p15 CEA	HLA-Cw6	YRPRPRRY	20	
	HLA-A2	VLPDVFIRC	21	
	HLA-A24	AYGLDFYIL	22	
		YLSGANLNL(CAP1)	23	
	YLSGADLNL (CAP1-6D)	24		
		37		
β-カテニン	HLA-A24	SYLDSGIHF	25	
	HLA-B44	EEKLIVVLF	26	
MUM-1	HLA-A2	ACDPHSGHFV	27	
CDK4	HLA-A2	IISAVVGIL	28	
HER-2/neu	HLA-A2		28	
(乳癌および卵巣癌) ヒトパピローマウイルス	HLA-A2	KIFGSLAFL	29	
	HLA-A2	YMLDLQPETT	30	
E6,E7 (子宮頸癌)	非MHC制限	PDTRPAPGSTAPPAHGV TSA	31	
	MHC制限	(およびその部分)		
(乳癌、卵巣癌および肺癌) PSA	A2, A3	FLTPKKLQCVDLHVISNDVCA-	32	
		QVHPQKVTK		
		FLTPKKLQCV	33	
		KLQCVDLHV	34	
		VISNDVCAQV	35	
		QVHPQKVTK	36	

## 【 0 0 9 3 】

DNAゲノムを含む生物については、目的とするターゲット抗原またはその免疫エピトープをコードする遺伝子をゲノムDNAから単離する。RNAゲノムをもつ生物については、ゲノムのcDNAコピーから目的遺伝子を単離できる。ゲノムの制限地図が得られれば、当技術分野でルーティンな方法で制限エンドヌクレアーゼ消化により目的遺伝子を含むDNAフラグメントを開裂させる。目的遺伝子が既にクローン化されている場合、それらの入手可能なクローンから遺伝子を容易に得ることができる。あるいは、遺伝子のDNA配列が分かっている場合、デオキシリボ核酸の合成に慣用される任意の方法で遺伝子を合成できる。

## 【 0 0 9 4 】

目的抗原をコードする遺伝子は、その遺伝子を細菌性宿主にクローニングすることにより増幅できる。この目的に種々の原核細胞クローニングベクターを使用できる。その例はブ

40

50

ラスミドpBR322、pUCおよびpEMBLである。

【0095】

少なくとも1つのターゲット抗原またはその免疫エピトープをコードする遺伝子を、標準法によりウイルスと組み換えるために設計したプラスミドベクターへの挿入用に調製できる。一般にクローン化遺伝子を制限酵素消化により原核細胞性クローニングベクターから切り取ることができる。大部分の場合、切り取ったフラグメントは遺伝子の全コード領域を含むであろう。クローン化遺伝子を保有するDNAを、必要に応じて、たとえばウイルスとの組換えに用いるDNAベクターの挿入部位と適合するフラグメント末端を形成するために修飾し、次いで精製した後、本明細書に記載するように制限エンドヌクレアーゼ開裂部位（クローニング部位）に挿入することができる。

10

【0096】

本発明により疾病を治療または予防することができ、これらの疾病にはウイルス、細菌、酵母、寄生虫、原虫、癌細胞などにより引き起こされる疾病が含まれる。複数の共刺激分子を含む組換えベクターは普遍的免疫エンハンサーとして使用でき、したがって病因が未知である疾病の処置に有用である。

【0097】

本発明の組換えベクターを用いて治療または予防できる前新生物状態または過形成状態には結腸ポリープ、クローン病、潰瘍性大腸炎、胸部病変などの前新生物状態または過形成状態が含まれるが、これらに限定されない。

【0098】

本発明の組換えベクターを用いて治療または予防できる癌には、原発性または転移性の黒色腫、腺癌、扁平上皮癌、腺扁平上皮癌、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺癌、肝癌、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、子宮癌、胸部癌、前立腺癌、卵巣癌、膵癌、大腸癌、多発骨髄腫、神経芽細胞腫、NPC、膀胱癌、子宮頸癌などが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0099】

本発明は、複数の共刺激分子をコードする外来遺伝子を含む組換えベクターを医薬的に許容できるキャリアー中に含む医薬組成物を提供する。共刺激分子をコードする少なくとも3つの遺伝子が組換えベクターの一部を構成し、これらはB7、ICAM-1、LFA-3、4-1BBL、CD59、CD40、CD70、VCAM-1、OX-40Lなどをコードする遺伝子群から選択できる。組換えベクターはさらに、少なくとも1つのターゲット抗原またはその免疫エピトープをコードする核酸配列を含むことができる。他の態様において医薬組成物は、複数の共刺激分子をコードする外来遺伝子を含む第1組換えベクター、少なくとも1つのターゲット抗原またはその免疫エピトープをコードする核酸配列を含む第2組換えベクター、ならびに医薬的に許容できるキャリアーを含む。本発明の医薬組成物を投与すると、複数の共刺激分子をコードする外来遺伝子が宿主細胞に供給される。

30

【0100】

1態様において医薬組成物は、複数の共刺激分子をコードする外来遺伝子を含む組換えボックスウイルスを、医薬的に許容できるキャリアー中に含む。この組換えボックスウイルスはさらに、少なくとも1つのターゲット抗原またはその免疫エピトープをコードする核酸配列を含むことができる。あるいは、少なくとも1つのターゲット抗原またはその免疫エピトープをコードする第2組換えボックスウイルスを供給してもよい。

40

【0101】

本発明は、B7.1~B7.2をコードする核酸配列、ICAM-1をコードする核酸配列、およびLFA-3をコードする核酸配列をコードする組換えボックスウイルス、ならびに医薬的に許容できるキャリアーを含む、医薬組成物を提供する。このB7、ICAM-1、LFA-3構築体のほかに、本発明の医薬組成物の組換えボックスウイルスはさらに、少なくとも1つのターゲット抗原またはその免疫エピトープをコードする核酸配列を含むことができる。あるいは、少なくとも1つのターゲット抗原またはその免疫エピトープをコードするこの核酸配列は、第2組換えボックスウイルスにより組成物中に供給されてもよい。

50

## 【0102】

本発明の医薬組成物は、外から添加した当技術分野で既知の免疫刺激分子、たとえば共刺激分子B7、ICAM-1、LFA-3、4-1BBL、CD59、CD40、CD70、VCAM-1、OX-40Lなど、ならびに／あるいはサイトカインおよびケモカイン、たとえばIL2、GM-CSF、TNF、IFN、IL-12、RANTES、MIP-1、Flt-3L (USP 5,554,512; 5,843,423) など(これらに限定されない)を、免疫応答の相乗効果または増強の追加のために含むことができる。サイトカインおよびケモカイン自体を組成物に供給してもよく、あるいはサイトカインまたはケモカインをコードする組換えウイルスベクターによりサイトカインおよびケモカインを供給してもよい。

## 【0103】

本発明には、病原性微生物または本明細書に示す癌により引き起こされる疾病の治療または予防のための方法も含まれる。

この処置方法では、本発明の組換えベクターの投与は”予防”または”療法”のいずれのためであってもよい。予防的に供給する場合、何らかの症状が出る前に本発明の組換えベクターを投与する。予防のための組換えベクター投与は、その後の感染症または疾病を阻止または軽減するために役立つ。治療のために投与する場合、感染症または疾患の症状が発症したとき、または発症後に、組換えベクターを供給する。このように本発明は、予想される病因物質への曝露もしくは疾病状態の前に、または感染症もしくは疾病の発症後に供給することができる。

## 【0104】

接種物に関して”1回量”という用語は、哺乳動物に1回の投与量として適切な物理的に独立した単位を表し、各1回量は目的とする免疫原効果を生じるように計算された予め定められた量の組換えベクターを必要な希釈剤と共に含有する。本発明の新規な接種物の1回量の詳細は、組換えウイルス独自の特性および達成すべき個々の免疫効果により支配され、それらに依存する。

## 【0105】

接種物は一般に、水性医薬組成物を形成するための許容できる(受容できる)希釈剤、たとえば食塩水、リン酸緩衝食塩水、または生理学的に許容できる他の希釈剤中の溶液として調製される。

## 【0106】

接種経路は、乱刺法、静脈内(I.V.)、筋肉内(I.M.)、皮下(S.C.)、皮内(I.D.)、腹腔内(I.P.)、腫瘍内など、病因物質に対する保護応答を誘導するものであってよい。この用量を少なくとも1回投与する。後続量は指示に従って投与することができる。

## 【0107】

1態様においては、異種の初回免疫-追加免疫方式を用いる。一例では、核酸ベースベクターなどの第1ベクターで少なくとも1回、宿主を免疫化する。後続免疫化をボックスウイルスベクターにより行う。他の例では、宿主をまず第1ボックスウイルスベクターで免疫化し、次いで異なる属の第2ボックスウイルスベクターで免疫化する。

## 【0108】

哺乳動物(好ましくはヒト)に本発明の組換えベクターを投与する場合、投与する組換えベクターの量は、哺乳動物の年齢、体重、身長、性別、全般的な医学的状态、医学的前歴、疾病の進行、腫瘍発症などの要因に応じて異なるであろう。

## 【0109】

一般に、約 $10^5$ ~約 $10^{10}$ プラーク形成単位の量の組換えウイルスをレシピエントに投与することが望ましい。ただし、これより低い用量または高い量も投与できる。

## 【0110】

腫瘍関連抗原および腫瘍特異性抗原の遺伝子決定により、癌療法のためのターゲティングした抗原特異的ワクチンを開発できる。組換えボックスウイルスのゲノムに、複数の共刺激分子をコードする遺伝子と共に腫瘍抗原遺伝子を挿入すると、癌発症のリスクが高い個体における予防として特異的免疫応答を誘導するために(予防免疫化)、外科処置前に腫

10

20

30

40

50

瘍を縮小させるために、初回外科処置後の疾病再発を防止するために（抗転移ワクチン接種）、またはin vivoで細胞毒性リンパ球（CTL）数を増加させ、これにより散在性腫瘍の根絶におけるそれらの有効性を改善するために（樹立疾病の治療）、有効な系が得られる。本発明の組換えウイルスは、オートロガスリンパ球（CD8<sup>+</sup>）、細胞毒性Tリンパ球および/またはCD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞、あるいはNK細胞において、腫瘍患者に戻す前にex vivoで免疫応答を誘導することができる（適応免疫療法）。

**【0111】**

癌の処置においては、腺癌などの癌の徴候前に、または腺癌などの癌に冒された哺乳動物において疾病の退縮を仲介するために、組換えベクターを哺乳動物に導入することができる。

10

**【0112】**

処置すべき疾病または状態および処置方法に応じて、組換えベクターは複数の共刺激分子をコードする遺伝子のほかにターゲット抗原またはその免疫エピトープをコードする核酸配列を含んでもよく、含まなくてもよい。ターゲット抗原またはその免疫エピトープは、組換えベクターを感染させる宿主細胞により内因性供給されてもよい。たとえば腫瘍細胞は腫瘍関連抗原またはそのエピトープを内因性発現する可能性があり、外因性腫瘍関連抗原をコードする外来遺伝子を添加する必要はないかもしれない。宿主に腫瘍関連抗原が存在しない場合、発現しないかまたは発現レベルが低い場合、外因性腫瘍関連抗原をコードする外来遺伝子を供給してもよい。さらに、数種類の異なる腫瘍関連抗原をコードする遺伝子を供給してもよい。外因性腫瘍関連抗原をコードする外来遺伝子は、複数の共刺激分子をコードする遺伝子を含む同じ組換えベクターにより供給するか、あるいは第1組換えベクターと混合した第2組換えベクターにより供給することができる。

20

**【0113】**

組換えベクターを哺乳動物に投与方法の例には、ex vivoでの組換えベクターへの腫瘍細胞の曝露、または静脈内、S.C.、I.D.もしくはI.M.ウイルス投与による罹患宿主への組換えベクターの注射が含まれるが、これらに限定されない。あるいは、組換えベクターもしくは組み合わせた組換えベクターを癌病変部もしくは腫瘍に直接注射するか、または医薬的に許容できるキャリアー中で局所適用することにより、局部的に投与できる。1以上の腫瘍関連抗原（TAA）の配列を、投与すべき複数の共刺激分子をコードする核酸配列と組み合わせる保有する組換えベクターの量は、ウイルス粒子の力価に基づく。好ましい免疫原投与範囲は、哺乳動物（好ましくはヒト）当たり $10^5 \sim 10^{10}$ ウイルス粒子である。免疫化すべき哺乳動物が既に癌または転移癌に冒されている場合、本発明のワクチンを他の療法処置と併用してもよい。

30

**【0114】**

ある処置方法においては、オートロガス細胞毒性リンパ球または腫瘍浸潤性リンパ球を、癌患者由来の血液、リンパ節、腫瘍などから得ることができる。特異的ターゲット抗原、および複数の外来共刺激分子を発現する抗原提示細胞またはターゲット抗原パルス処理した本発明のAPCの存在下で培養することにより、リンパ球を増殖させ、抗原特異性リンパ球を増加させる。次いでこの抗原特異性リンパ球を患者に再注入する。

**【0115】**

免疫化の後、その抗原を認識する抗体または免疫細胞の産生によりワクチンの効力を評価することができる（特異的な細胞溶解活性または特異的なサイトカイン産生により、あるいは腫瘍の退縮により評価）。当業者には前記パラメーターを評価するための慣用法が既知である。

40

**【0116】**

本発明は、複数の共刺激分子およびターゲット抗原をコードする有効量の組換えベクターを哺乳動物に単独で投与することにより、あるいはターゲット細胞にベクター、ターゲット抗原またはその免疫エピトープを感染させることにより、抗原特異性T細胞応答を増強する方法を含む。この方法の1態様においては、B7ファミリーからの少なくとも1分子、ICAM-1およびLFA-3をコードする組換えベクターを単独で、またはターゲット細胞、ターゲ

50

ット抗原またはその免疫エピトープと混合して投与する。この免疫化法は、ターゲット抗原により生じる免疫応答を補足または増強して、単一または2つの共刺激分子の使用と比較して相乗的な応答をもたらす。複数の共刺激分子をコードする遺伝子を含む組換えベクターを投与する方法により、単一または2つの共刺激分子の使用と比較してターゲット抗原特異性リンパ球増殖が増大し、細胞溶解活性が増大し、サイトカイン分泌が増加し、ターゲット抗原に対する免疫性がより長期間持続する。組換えベクターはさらに、ターゲット抗原特異性免疫応答を相乗的に増強させるために、少なくとも1つの抗原またはその免疫エピトープをコードする核酸配列を含むことができる。あるいは、少なくとも1つの抗原またはその免疫エピトープをコードする核酸配列は、複数の共刺激分子をコードするベクターとは別個の第2組換えベクターにより供給される。抗原特異性T細胞応答を増強する方法の1態様においては、哺乳動物、好ましくはヒトを、rV-HIV-1エピトープ/B7-1/ICAM-1/LFA-3構築体で免疫化する。処置の有効性は、*in vitro*および/または*in vivo*で、ターゲット抗原特異性リンパ球増殖、ターゲット抗原特異性細胞溶解応答、臨床応答などの測定により監視できる。

10

## 【0117】

抗原特異性T細胞応答を増強する本発明方法は、いかなるターゲットまたはその免疫エピトープについても利用できる。特に重要なものは、腫瘍関連抗原、組織特異性抗原および感染性物質の抗原である。

## 【0118】

患者に組換えベクターを投与するほか、処置すべき状態に応じて、他の外因性免疫調節薬または免疫刺激分子、化学療法薬、抗体、抗真菌薬、抗ウイルス薬などを単独で、または組み合わせて投与することができる。外から添加する他の薬剤の例には、外因性IL-2、IL-6、 $\gamma$ -IFN、またはIFN- $\gamma$ -インターフェロン、GM-CSF、腫瘍壊死因子、Flt-3L、シクロホスファミド、シスプラチン、ガンシクロビル、アンホテリシンB、5-フルオロウラシルなどが含まれる。

20

## 【0119】

本発明は、複数の外因性外来共刺激分子を発現する宿主細胞であって、それらの分子が複数の共刺激分子をコードする外来核酸配列を含む組換えベクターにより供給される宿主細胞を提供する。宿主細胞は1以上の内因性ターゲット抗原またはその免疫エピトープをも発現してもよい。あるいは宿主細胞は1以上の外因性外来ターゲット抗原またはその免疫エピトープを発現するように工学的に処理されてもよく、これらは同様に複数の共刺激分子をコードする組換えベクターにより供給されてもよく、または第2組換えベクターにより供給されてもよい。

30

## 【0120】

抗原特異性免疫応答を刺激するのに使用できる本発明の宿主細胞は、本発明の組換えウイルスにより感染させることができ、かつ複数の外因性共刺激分子を発現でき、さらに、1以上の外因性ターゲット抗原またはその免疫エピトープを発現するように遺伝子工学的に処理することができるいかなる細胞であってもよい。そのような宿主細胞には、腫瘍細胞、抗原提示細胞、たとえばPBMC、樹状細胞、皮膚または筋肉の細胞などが含まれるが、これらに限定されない。抗原提示細胞には、単球、マクロファージ、樹状細胞、樹状細胞前駆体、ランゲルハンス細胞、脾細胞、B細胞、腫瘍細胞、筋細胞、上皮細胞などが含まれるが、これらに限定されない。

40

## 【0121】

1態様において、宿主細胞は腫瘍細胞であり、腫瘍細胞を*in situ*または*in vitro*で組換えベクターに曝露して、腫瘍細胞において複数の外来または外因性共刺激分子を発現させる。腫瘍細胞は内因性ターゲット抗原を発現してもよく、腫瘍細胞はさらに、ターゲット抗原(たとえばTAA)またはその免疫エピトープを発現するように遺伝子工学的に処理されてもよい。TAAおよび複数の免疫刺激分子の両方を発現する腫瘍細胞を、癌に冒された哺乳動物において腫瘍を軽減または排除するのに有効な量で哺乳動物に投与する。

## 【0122】

50

本発明は、複数の共刺激分子を過剰発現する樹状細胞前駆体、樹状細胞（DC）、DCサブpopulation、およびその誘導体をも提供し、その際、複数の共刺激分子は複数の共刺激分子をコードする核酸配列をもつ組換えベクターにより外から供給される。本発明のDC前駆体およびDCは、未処理のDC前駆体またはDCが内因性発現するレベルより高いレベルの共刺激分子を発現する。APC、たとえば樹状細胞前駆体および樹状細胞は、1以上の内因性ターゲット抗原またはその免疫エピトープを発現してもよく、あるいは外因性ターゲット抗原は複数の共刺激分子をコードする組換えベクターまたは第2組換えベクターにより供給されてもよい。本発明はさらに、複数の共刺激分子を過剰発現するAPC、たとえば複数の共刺激分子を過剰発現する樹状細胞前駆体、および複数の共刺激分子を過剰発現する樹状細胞を、1以上のターゲット細胞、ターゲット抗原またはその免疫エピトープに対するワクチン接種および免疫療法応答のために、*in vivo*または*in vitro*でT細胞を活性化するのに使用する方法を提供する。

10

**【0123】**

供給源から単離したAPC、たとえば樹状細胞前駆体、樹状細胞、DCサブpopulation、およびその誘導体を、少なくとも3つの共刺激分子をコードする外因性遺伝子を含む組換えベクターで、複数の共刺激分子が機能性発現するのに十分な期間、感染、トランスフェクションまたはトランスダクションする。複数の共刺激分子を過剰発現するような抗原提示性の樹状細胞前駆体および樹状細胞を、少なくとも1つのターゲット細胞、ターゲット細胞溶解物、ターゲット細胞膜、ターゲット抗原もしくはその免疫エピトープ、または少なくとも1つのターゲット細胞のRNAもしくはDNAでパルス処理するか、あるいはそれらと共にインキュベートし、そしてある種に*in vivo*での関連T細胞応答の活性化に十分な量で投与することもできる。他の態様において、抗原提示性の樹状細胞前駆体および樹状細胞はさらに、少なくとも1つの外来ターゲット抗原もしくはその免疫エピトープを過剰発現する。

20

**【0124】**

複数の外因性共刺激分子を発現する宿主細胞を、 $10^3 \sim 10^9$ 個の用量で投与できる。採用できる投与経路には、静脈内、皮下、リンパ内、腫瘍内、皮内、筋肉内、腹腔内、直腸内、膈内、鼻内、経口、膀胱点滴注入、または乱刺法が含まれる。

**【0125】**

1態様においては、複数の共刺激分子を過剰発現する抗原提示性の樹状細胞前駆体または樹状細胞を、ターゲット細胞、ターゲット細胞溶解物、ターゲット細胞膜、ターゲット抗原もしくはその免疫エピトープ、または少なくとも1つのターゲット細胞に由来するDNAもしくはRNAに*in vitro*で曝露し、そして初回免疫化した、または初回免疫化していないT細胞と共に*in vitro*でインキュベートして関連T細胞応答を活性化する。次いで活性化T細胞を単独で、またはDC前駆体またはDCと組み合わせて、ヒトなどの種に、ターゲット細胞、ターゲット抗原またはその免疫エピトープに対するワクチン接種および免疫療法応答のために投与する。1使用方法においてこれらの樹状細胞前駆体または樹状細胞は、癌細胞に対し免疫療法による増殖阻害応答を誘導するために有利に用いられる。

30

**【0126】**

他の態様においては、複数の共刺激分子を過剰発現する抗原提示細胞、好ましくはDC前駆体またはDCと、関連のターゲット抗原またはその免疫エピトープを発現するターゲット細胞を、当技術分野で既知の方法により融合させて、APCとターゲット細胞のヘテロカリオンを形成する（Gong, J. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 95:6279-6283, 1998）。そのような融合細胞、すなわちキメラAPC/ターゲット抗原細胞は、複数の共刺激分子とターゲット抗原またはその免疫エピトープの両方を発現する。好ましい態様において、ターゲット細胞は過形成細胞、悪性前細胞または悪性細胞である。キメラAPC/ターゲット抗原細胞は、*in vivo*および*in vitro*の両方で、TおよびBリンパ球の免疫応答を増強するのに使用できる。

40

**【0127】**

樹状細胞前駆体は、患者の骨髄、末梢血およびリンパ節から得られる。患者を予めワクチ

50

ン接種するか、あるいはFlt-3Lなどの化合物で処理して、抗原提示細胞数を増加させてもよい。樹状細胞は、任意の組織、たとえば皮膚の上皮（ランゲルハンス細胞）から、ならびにリンパ組織、たとえば脾臓、骨髄、リンパ節および胸腺にみられるものから、ならびに血液およびリンパを含めた循環系から（ペール細胞）得られる。臍帯血はもうひとつの樹状細胞源である。

#### 【0128】

樹状細胞を本発明に使用するために、当技術分野で既知の方法、たとえばUSP 5,788,963に記載の方法で富化または単離することができる。樹状細胞前駆体、樹状細胞、およびその誘導体得られると、それらを適切な培養条件下で培養して、細胞集団を拡張し、および/または細胞を組換えベクターによる最適な感染、トランスフェクションまたはトランスダクションのための、また最適なターゲット抗原取込み、プロセッシングおよび提示のための状態に維持する。in vitro培養において樹状細胞の適正な成熟状態を維持するのに特に有利なことは、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）およびインターロイキン4（IL-4）が両方とも存在することである。樹状細胞のサブポピュレーションを、附着性および/または細胞表面マーカーに基づく成熟度により単離することができる。DC前駆体、DCおよびそのサブポピュレーションの表現型は、Banchereau and Steinman, Nature, 392: 245-252, 1998に開示されている。

10

#### 【0129】

1態様においては、GM-CSFおよびIL-4をそれぞれ約500単位/mlの濃度で約6日間供給する（41, 42）。他の態様においては、DC前駆体またはDCを成熟させるためにTNF および/またはCD40を用いる。

20

#### 【0130】

樹状細胞前駆体または樹状細胞は処置すべき個体から得ることができるので、関連HLA抗原に関してオートログスである。あるいは、関連HLA抗原（I群およびII群の両方、たとえばHLA-A、B、CおよびDR）が処置すべき個体と一致する個体から細胞を得ることができる。あるいは、処置を受ける個体に適した関連HLA抗原を発現するように樹状細胞前駆体を工学的に処理する。

#### 【0131】

樹状細胞前駆体または樹状細胞を、USP 5,788,963に開示されるEBV形質転換などの方法でさらに遺伝子修飾して、それらの寿命を延長することができる。

30

樹状細胞前駆体または樹状細胞を、生理学的に許容できる媒質中の組成物の形で供給してもよい。この組成物はさらに、ターゲット細胞、ターゲット細胞溶解物、ターゲット細胞膜、ターゲット抗原またはその免疫エピトープを含むことができる。この組成物はさらに、免疫応答をさらに相乗的に増強するためにサイトカインおよび/またはケモカイン、たとえばIL-4およびGM-CSFを含むことができる。

#### 【0132】

他の態様において、複数の共刺激分子を過剰発現する本発明のAPCは、抗原特異性リンパ球の増殖および機能の測定によりワクチンの効力を評価する方法に有用である。そのような方法では、ターゲット細胞溶解物、ターゲット細胞膜、ターゲット抗原またはその免疫エピトープを接種した個体からリンパ球を回収する。これらのリンパ球をin vitroで本発明のAPCと共に、ターゲット細胞、ターゲット細胞溶解物、ターゲット細胞膜、ターゲット抗原またはその免疫エピトープの存在下で培養し、抗原特異性リンパ球の数および機能を当技術分野で既知の方法により測定する。数および/または機能の増大は、そのワクチンが有効であることを示す。この方法は、ペプチドワクチンが適切な免疫応答を刺激する効力を測定するのに特に有用である。

40

#### 【0133】

他の態様において、複数の外因性共刺激分子を発現する本発明のAPCは、多数のペプチドから新規な免疫原ペプチドをスクリーニングする方法に有用である。このスクリーニング法においては、複数の共刺激分子またはその機能性部分をコードする組換えベクターに感染させた抗原提示細胞を多数のペプチドでパルス処理して、ペプチドパルス処理した抗原

50

提示細胞を形成する。このペプチドパルス処理した抗原提示細胞をリンパ球と共にインキュベートし、リンパ球の免疫反応性を測定する。ペプチドパルス処理APCの存在下でのリンパ球の免疫反応性増強は、そのペプチドに対する抗原特異性応答を示すものである。応答増強を誘導するペプチドは、腫瘍からの溶出、HLA結合の分析などにより同定できる。多数のペプチドの供給源は、多数のランダムペプチドを発現するコンビナトリアルライブラリーであってもよい。免疫反応性の増強は体液性または細胞仲介性応答であってよく、当技術分野で既知の標準法、たとえば抗原誘発性の増殖、細胞毒性、抗体分泌、信号伝達などにより測定できる。同定された新規ペプチドを免疫原、ワクチンまたは診断薬として使用できる。それらのペプチドを含むタンパク質をサブトラクションライブラリーおよびディファレンシャルディスプレイ遺伝子法により同定できる。

10

## 【0134】

本発明の組換えベクター、および本発明の組換えベクターで感染、トランスフェクションまたは誘発した宿主細胞は、*in vivo*および*in vitro*の両方において体液性応答の増強を刺激する方法に有用である。そのような増強した体液性応答は、モノクローナル性またはポリクローナル性であってよい。複数の共刺激分子による体液性応答の増強は、単一または2つの共刺激分子による体液性応答と比較して相乗的である。体液性応答の相乗的増強は、CD4<sup>+</sup>T細胞の増殖および/またはサイトカイン分泌の増大、B細胞の増殖または抗体産生の増大、抗体依存性細胞毒性(ADCC)の増大、相補体仲介による細胞溶解の増大などにより判定できる。本発明の組換えベクターにより、または本発明の組換えベクターで感染、トランスフェクションまたは誘発した宿主細胞により誘導される抗体は、標準法により誘導される抗体より高いアフィニティーおよび/またはアビディティーならびに高い力価をもつと期待される。本発明の組換えベクターを用いる方法により誘導される抗体は、免疫優性ターゲットエピトープまたは非優性ターゲットエピトープを認識できる。

20

## 【0135】

本発明はさらに、本発明の組換えベクターで免疫化することにより誘導された抗体(1以上)を含む。この抗体は、目的とするターゲット抗原またはその免疫エピトープに対する特異性を持ち、それと反応または結合する。本発明のこの態様において、抗体の由来はモノクローナル性またはポリクローナル性であってよい。

## 【0136】

抗体分子の例は、無傷の免疫グロブリン分子、実質的に無傷の免疫グロブリン分子、または当技術分野でF(ab)、F(ab')、F(ab')<sub>2</sub>およびF(v)として知られる免疫グロブリン分子部分を含めた抗原結合部位を含む免疫グロブリン分子部分である。ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、当技術分野で既知の方法により産生させることができる(Kohler and Milstein (1975), *Nature*, 256, 495-497; Campbell "モノクローナル抗体技術、齧歯類とヒトのハイブリドーマの産生と解明", Burdon et al. (編) (1985) "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Vol. 13, Elsevier Science Publishers, アムステルダム)。抗体または抗原結合性フラグメントは、遺伝子工学的に製造することもできる。大腸菌においてH鎖およびL鎖を発現させる方法はいずれも、国際特許出願: W0901443、W0901443、およびW09014424、ならびにHuse et al. (1989), *Science*, 246: 1275-1281の対象である。

30

40

## 【0137】

1態様において、本発明の抗体は生物学的試料中の新規な目的抗原を検出するための免疫アッセイに用いられる。

1態様において、TAAを発現し、かつB7-1、ICAM-1およびLFA-3を発現する組換えワクシニアウイルスを用いる免疫化により産生される本発明の抗体は、TAAを発現する癌に冒された哺乳動物の組織生検体からTAAの存在を免疫細胞化学により評価するために使用される。罹患組織におけるこのようなTAA抗原デリネーション(delineation)の評価を利用して、その疾病に冒された哺乳動物における疾病の進行または免疫療法の有効性を予後判定することができる。この態様において、TAAの例にはCEA、PSAおよびMUC-1が含まれるが、これらに限定されない。慣用される免疫組織化学的方法は、Harlow and Lane (編) (198

50

8), "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー; Ausubel et al. (編) (1987), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons (ニュー YORK 州 ニュー YORK) に記載されている。

【0138】

他の態様において、本発明の抗体は免疫療法に用いられる。本発明の抗体は、受動免疫療法に使用できる。

抗体または抗原結合フラグメントをレシピエント哺乳動物（好ましくはヒト）に供給する際、投与される抗体または抗原結合フラグメントの量は、哺乳動物の年齢、体重、身長、性別、一般的な医学的状態、過去の医学的状態などの要因に応じて異なるであろう。

10

【0139】

本発明の抗体または抗原結合フラグメントは、疾病または感染症を予防し、程度、範囲または期間を縮小または減退させるのに十分な量でレシピエント対象に供給されるものとする。

【0140】

抗イデオタイプ抗体は普通は免疫応答中に生成し、抗イデオタイプ抗体の一部は元の免疫応答を誘発したエピトープに類似する。本発明において、その結合部位が疾病状態のターゲット抗原を反映する抗体の免疫グロブリン遺伝子またはその部分を単独で、また複数の免疫刺激分子の遺伝子またはその部分と組み合わせてウイルスゲノムのゲノムまたはその部分に取り込ませると、得られる組換えウイルスはその抗原に対する細胞性および体液性免疫応答を誘導することができる。

20

【0141】

具体的態様の記載は本発明の全般性を十分に明らかにするものであり、全般性概念から逸脱することなくそのような具体的態様を種々の目的で改変および/または適合させることができる。したがってそのような適合および改変は開示した態様の均等物の意味および範囲に含まれるものとする。

【0142】

引用したすべての参考文献および特許を参考として本明細書に援用する。

【0143】

【実施例】

30

実施例1

組換えワクシニア、rV-TRICOM (mu1) No. vT171の生成

ワクシニア親ウイルスの起源は、ニューヨーク市衛生委員会 (New York City Board of Health) 株であり、そしてニューヨーク市衛生委員会のWyethより得て、そして子ウシ中で継代し、痘瘡 (smallpox) ワクチン種を生成した。Flow研究室は、ChanockおよびMoss両博士 (米国国立衛生研究所) から痘瘡ワクチン種、ロット3197、継代数28の凍結乾燥バイアルを得た。本種ウイルスをエーテル処理し、そして3回プラーク精製した。

【0144】

rV-TRICOM (mu1) の生成のため、ワクシニアゲノムのHindIII M領域に位置するM2L (30K) 遺伝子への外来 (foreign) 配列の挿入を指示する、pT5032と称されるプラスミドベクターを構築した。ネズミLFA-3遺伝子は、ワクシニア30K (M2L) プロモーター (34) の転写調節下にあり、ネズミICAM-1遺伝子は、ワクシニアI3 (18) プロモーターの調節下にあり、そしてネズミB7.1遺伝子は、合成初期/後期 (sE/L) プロモーター (32) の調節下にある。これらの外来配列に、ワクシニアゲノムのHindIII M領域由来のDNA配列が隣接する (図1を参照されたい)。これらの隣接配列は、ワクシニアK1L宿主範囲遺伝子 (33) を含む。組換えワクシニアウイルスの構築において、ワクシニアのWyeth株の誘導体を親ウイルスとして用いた。本親ウイルスはvTBC33と称され、機能するK1L遺伝子を欠き、そしてしたがってウサギ腎臓RK<sub>13</sub>細胞上で効率的に複製することが不可能である (38)。組換えワクシニアウイルスの生成は、vTBC33ワクシニアゲノム中のワクシニア配列およびpT5032でトランスフェクションされているワクシニア感染RK<sub>13</sub>細胞におけるpT5032中の対応す

40

50

る配列の間の相同組換えを介して達成した。組換えウイルスはvT171と称され、RK<sub>13</sub>細胞（ATCC、CCL 37）上の増殖により選択した。プラークを細胞単層から摘み取り、そしてその子孫をさらに増殖させた。プラーク単離およびRK<sub>13</sub>細胞上での再プレーティングを2回繰り返し、望ましい組換え体を精製した。組換えvT171のゲノム構造は、図4Aに示される。

#### 【 0 1 4 5 】

##### 実施例2

##### 組換えワクシニア、rV-TRICOM (mu2) No. vT199の生成

rV-TRICOM (mu2) の生成のため、ワクシニアゲノムのHindIII J領域に位置するチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子への外来配列の挿入を指示する、pT5047と称されるプラスミドベクターを構築した。ネズミB7.1遺伝子はsE/Lプロモーターの調節下にあり、ネズミLFA-3遺伝子は、I3プロモーターの転写調節下にあり、そしてネズミICAM-1遺伝子は、ワクシニア7.5Kプロモーター (39) の調節下にある。さらに、鶏痘 (fowlpox) ウイルスC1プロモーター (15) の調節下にある大腸菌 (E. coli) lacZ遺伝子を組換え子孫のスクリーニングとして含む。これらの外来配列に、ワクシニアゲノムのHindIII J領域由来のDNA配列が隣接する (図2を参照されたい)。本組換えワクチンには、ワクシニアのWyeth (ニューヨーク市衛生委員会) 株由来のプラーク精製単離体を親ウイルスとして用いた。組換えワクシニアウイルスの生成は、Wyethワクシニアゲノム中のワクシニア配列およびpT5047でトランスフェクションされているワクシニア感染Hu143TK<sup>-</sup>細胞 (BacchettiおよびGraham 1977) におけるpT5047中の対応する配列の間の相同組換えを介して達成した。組換えウイルスは、以前記載されるように (31)、プロモデオキシウリジン (BudR) の存在下でのTK<sup>-</sup>ウイルスの選択を、ハロゲン化インドリル-ベータ-D-ガラクトシド (Blue-gal) の存在下でlacZ遺伝子産物の発現を検出する、in situのウイルスプラーク上で行う色原体アッセイと組み合わせて行い、同定した。lacZを発現するウイルスプラークは、透明な背景に対し、青く見えた。vT199と称される陽性プラークを細胞単層から摘み取り、そしてその子孫を上述の選択条件下で再度プレーティングした。本方式で選択されそして精製された他の組換えウイルスのうち、これらの選択条件下で出現したプラークは青のみであり、そしてこれらの青いプラークは、容易に単離し、そして精製された。しかし、vT199の場合、プラーク精製の第二の周期で、白いプラークのみが観察され；青いプラークは現れなかった。青いプラークの新たな組を摘み取りそして再度プレーティングし；再び、プラーク精製の第二の周期で白いプラークのみが観察された。最後の試みとして、青いプラークのさらに別の組を用い、プラーク精製の第二の周期後、青と白両方のプラークを得た。青いプラークを選択し、そして再度プレーティングした。プラーク精製をさらに2回 (総数4回) 行い、100% 青い組換えウイルスを得た。組換えvT199のゲノム構造は、図4Bに示される。

#### 【 0 1 4 6 】

##### 実施例3

##### 組換えワクシニア、rV-TAA / TRICOM (mu) の生成

rV-TAA / TRICOM (mu) の生成のため、ワクシニアゲノムへの外来配列の挿入を指示する、プラスミドベクターを構築する。TAA遺伝子、ネズミLFA-3遺伝子、ネズミICAM-1遺伝子、およびネズミB7.1遺伝子は、多数のプロモーターの調節下にある。これらの外来配列に、外来配列を挿入しようとする、ワクシニアゲノムのDNA配列が隣接する。組換えワクシニアウイルスの生成は、ワクシニアゲノム中のワクシニア配列およびプラスミドベクターでトランスフェクションされているワクシニア感染細胞における該プラスミドベクター中の対応する配列の間の相同組換えを介して達成する。組換えプラークを選択条件下で細胞単層から摘み取り、そしてその子孫をさらに増殖させる。プラーク単離および再プレーティングをさらに繰り返し、望ましい組換えウイルスを精製する。

#### 【 0 1 4 7 】

##### 実施例4

##### 組換えワクシニア、rV-MUC-1 / TRICOM (mu) の生成

rV-MUC-1 / TRICOM (mu) の生成のため、ワクシニアゲノムへの外来配列の挿入を指示する

、プラスミドベクターを構築する。MUC-1遺伝子、ネズミLFA-3遺伝子、ネズミICAM-1遺伝子、およびネズミB7.1遺伝子は、多数のプロモーターの調節下にある。これらの外来配列に、外来配列を挿入しようとする、ワクシニアゲノムのDNA配列が隣接する。組換えワクシニアウイルスの生成は、ワクシニアゲノム中のワクシニア配列およびプラスミドベクターでトランスフェクションされているワクシニア感染細胞における該プラスミドベクター中の対応する配列の間の相同組換えを介して達成する。組換えプラークを選択条件下で細胞単層から摘み取り、そしてその子孫をさらに増殖させる。プラーク単離および再プレatingをさらに繰り返し、望ましい組換えウイルスを精製する。

【 0 1 4 8 】

#### 実施例5

##### 組換えワクシニア、rV-CEA / TRICOM ( mu ) No . vT172の生成

rV-CEA / TRICOM ( mu ) の生成のため、ワクシニアゲノムのHindIII M領域に位置するM2L ( 30K ) 遺伝子への外来配列の挿入を指示する、pT5031と称されるプラスミドベクターを構築した ( 図3を参照されたい ) 。CEA遺伝子は、40Kプロモーター ( 13 ) の調節下であり、ネズミLFA-3遺伝子は、30Kプロモーターの転写調節下であり、ネズミICAM-1遺伝子は、13プロモーターの調節下であり、そしてネズミB7.1遺伝子は、sE / Lプロモーターの調節下にある。これらの外来配列に、ワクシニアK1L宿主範囲遺伝子を含む、ワクシニアゲノムのHindIII M領域由来のDNA配列が隣接する。組換えワクシニアウイルスの構築において、上述のvTBC33を親ウイルスとして用いた。組換えワクシニアウイルスの生成は、vTBC33ワクシニアゲノム中のワクシニア配列およびpT5031でトランスフェクションされているワクシニア感染RK<sub>13</sub>細胞におけるpT5031中の対応する配列の間の相同組換えを介して達成した。組換えウイルスはvT172と称され、上述のように、RK<sub>13</sub>細胞上の増殖により選択した。プラークを細胞単層から摘み取り、そしてその子孫をさらに増殖させた。プラーク単離およびRK<sub>13</sub>細胞上での再プレatingを2回繰り返し、望ましい組換え体を精製した。組換えvT172のゲノム構造は、図4Cに示される。

【 0 1 4 9 】

#### 実施例6

##### 組換え鶏痘、rF-TRICOM ( mu ) No . vT222の生成

組換え体の生成に用いた親鶏痘ウイルスの起源は、Schering-Plough Corporationにより製造される、USDA認可家禽ワクチン、POXVAC-TCのバイアルからプラーク精製した。POXVAC-TC産生のための出発物質は、Schering-Ploughから得た、Vineland研究室のニワトリ胚起源鶏痘ワクチンのバイアルであった。鶏卵の漿尿膜上でウイルスを2回継代し、マスター種ウイルスを生じた。ニワトリ胚線維芽細胞中でマスター種ウイルスをさらに27回継代し、POXVAC-TCマスター種を調製した。POXVAC-TC製品ロットの生成のためのウイルスストックを調製するため、ニワトリ胚線維芽細胞上で、POXVAC-TCマスター種を2回継代した。POXVAC-TCの1つのバイアル、連続番号96125を、初代ニワトリ胚皮膚細胞上で3回精製した。

【 0 1 5 0 】

rF-TRICOM ( mu ) の生成のため、鶏痘ゲノムのBamHI J領域への外来配列の挿入を指示する、pT8001と称されるプラスミドベクターを構築した。ネズミB7.1遺伝子は、sE / Lプロモーターの調節下であり、ネズミLFA-3遺伝子は、13プロモーターの調節下であり、ネズミICAM-1遺伝子は、7.5Kプロモーターの調節下であり、そしてlacZ遺伝子は、C1プロモーターの調節下にある。これらの外来配列に、鶏痘ゲノムのBamHI J領域由来のDNA配列が隣接する ( 図5を参照されたい ) 。本組換えワクチンは、鶏痘のPOXVAC-TC ( Schering-Plough Corporation ) 株由来のプラーク精製単離体を親ウイルスとして用いた。組換え鶏痘ウイルスの生成は、鶏痘ゲノム中の鶏痘配列およびpT8001でトランスフェクションされている鶏痘感染初代ニワトリ胚皮膚細胞におけるpT8001中の対応する配列の間の相同組換えを介して達成した。組換えウイルスは、上述のように、lacZ遺伝子産物に関する色原体アッセイを用い、同定した。lacZを発現するウイルスプラークは、透明な背景に対し、青く見えた。vT222と称される陽性プラークを細胞単層から摘み取り、そしてその子孫を再度プレ

10

20

30

40

50

ーティングした。Bluo-Galの存在下でブランク単離および再プレーティングを6回繰り返し、望ましい組換え体を精製した。組換えvT222のゲノム構造は、図7Aに示される。

【0151】

#### 実施例7

##### 組換え鶏痘rF-TAA / TRICOM (mu) の生成

rF-TAA / TRICOM (mu) の生成のため、鶏痘ゲノムのBamHI J領域への外来配列の挿入を指示する、プラスミドベクターを構築する。TAA遺伝子、ネズミLFA-3遺伝子、ネズミICAM-1遺伝子、およびネズミB7.1遺伝子は、多数のプロモーターの調節下にある。さらに、lacZ遺伝子は、C1プロモーターの調節下にある。これらの外来配列に、鶏痘ゲノムのBamHI J領域由来のDNA配列が隣接する。本組換えワクチンには、鶏痘のPOXVAC-TC (Schering-Plough Corporation) 株由来のブランク精製単離体を親ウイルスとして用いる。組換え鶏痘ウイルスの生成には、鶏痘ゲノム中の鶏痘配列およびプラスミドベクターでトランスフェクションされている鶏痘感染初代ニワトリ胚皮膚細胞における該プラスミドベクター中の対応する配列の間の相同組換えを介して達成する。組換えウイルスは、上述のように、lacZ遺伝子産物に関する色原体アッセイを用い、同定する。lacZを発現するウイルスブランクは、透明な背景に対し、青く見える。陽性ブランクを細胞単層から摘み取り、そしてその子孫を再度プレーティングする。Bluo-Galの存在下でブランク単離および再プレーティングをさらに繰り返し、望ましい組換え体を精製する。

10

【0152】

#### 実施例8

##### 組換え鶏痘rF-MUC-1 / TRICOM (mu) の生成

rF-MUC-1 / TRICOM (mu) の生成のため、鶏痘ゲノムのBamHI J領域への外来配列の挿入を指示する、プラスミドベクターを構築する。MUC-1遺伝子、ネズミLFA-3遺伝子、ネズミICAM-1遺伝子、およびネズミB7.1遺伝子は、多数のプロモーターの調節下にある。さらに、lacZ遺伝子は、C1プロモーターの調節下にある。これらの外来配列に、鶏痘ゲノムのBamHI J領域由来のDNA配列が隣接する。本組換えワクチンには、鶏痘のPOXVAC-TC (Schering-Plough Corporation) 株由来のブランク精製単離体を親ウイルスとして用いる。組換え鶏痘ウイルスの生成は、鶏痘ゲノム中の鶏痘配列およびプラスミドベクターでトランスフェクションされている鶏痘感染初代ニワトリ胚皮膚細胞における該プラスミドベクター中の対応する配列の間の相同組換えを介して達成する。組換えウイルスは、上述のように、lacZ遺伝子産物に関する色原体アッセイを用い、同定する。lacZを発現するウイルスブランクは、透明な背景に対し、青く見える。陽性ブランクを細胞単層から摘み取り、そしてその子孫を再度プレーティングする。Bluo-Galの存在下でブランク単離および再プレーティングをさらに繰り返し、望ましい組換え体を精製する。

20

30

【0153】

#### 実施例9

##### 組換え鶏痘、rF-CEA / TRICOM (mu) No. vT194の生成

rF-CEA / TRICOM (mu) の生成のため、鶏痘ゲノムのBamHI J領域への外来配列の挿入を指示する、pT5049と称されるプラスミドベクターを構築した。CEA遺伝子は、ワクシニア40Kプロモーターの調節下にあり、ネズミB7.1遺伝子は、sE/Lプロモーターの調節下にあり、ネズミLFA-3遺伝子は、I3プロモーターの転写調節下にあり、ネズミICAM-1遺伝子は、ワクシニア7.5Kプロモーターの転写調節下にあり、そしてlacZ遺伝子は、C1プロモーターの調節下にある。これらの外来配列に、鶏痘ゲノムのBamHI J領域由来のDNA配列が隣接する(図6を参照されたい)。本組換えワクチンには、鶏痘のPOXVAC-TC (Schering-Plough Corporation) 株由来のブランク精製単離体を親ウイルスとして用いた。組換え鶏痘ウイルスの生成は、鶏痘ゲノム中の鶏痘配列およびpT5049でトランスフェクションされている鶏痘感染初代ニワトリ胚皮膚細胞におけるpT5049中の対応する配列の間の相同組換えを介して達成した。組換えウイルスは、上述のように、lacZ遺伝子産物に関する色原体アッセイを用い、同定した。lacZを発現するウイルスブランクは、透明な背景に対し、青く見えた。vT194と称される陽性ブランクを細胞単層から摘み取り、そしてその子孫を再度プレ

40

50

ーティングした。Bluo-Galの存在下でプラーク単離および再プレーティングを5回繰り返し、望ましい組換え体を精製した。組換え鶏痘vT194のゲノム構造は、図7Bに示される。

【 0 1 5 4 】

#### 実施例10

##### 組換えワクシニア、rV-TRICOM ( hu ) No . vT224の生成

rV-TRICOM ( hu ) の生成のため、ワクシニアゲノムのHindIII J領域に位置するチミジンキナーゼ ( TK ) 遺伝子への外来配列の挿入を指示する、pT5064と称されるプラスミドベクターを構築した。ヒトLFA-3遺伝子は、30Kプロモーターの調節下にあり、ヒトICAM-1遺伝子は、I3プロモーターの調節下にあり、そしてヒトB7.1遺伝子は、sE / Lプロモーターの調節下にある。さらに、C1プロモーターの調節下にある大腸菌lacZ遺伝子を組換え子孫のスクリーニングとして含む。これらの外来配列に、ワクシニアゲノムのHindIII J領域由来のDNA配列が隣接する ( 図8を参照されたい ) 。本組換えワクチンには、ワクシニアのWyeth ( ニューヨーク市衛生委員会 ) 株由来のプラーク精製単離体を親ウイルスとして用いた。組換えワクシニアウイルスの生成は、Wyethワクシニアゲノム中のワクシニア配列およびpT5064でトランスフェクションされているワクシニア感染CV-1細胞 ( ATCC、CCL 70 ) におけるpT5064中の対応する配列の間の相同組換えを介して達成した。組換えウイルスは、上述のように、lacZ遺伝子産物に関する色原体アッセイを用い、同定した。lacZを発現するウイルスプラークは、透明な背景に対し、青く見えた。vT224と称される陽性プラークを細胞単層から摘み取り、そしてその子孫を再度プレーティングした。Bluo-Galの存在下でプラーク単離および再プレーティングを5回繰り返し、望ましい組換え体を精製した。組換えvT224のゲノム構造は、図9Aに示される。

【 0 1 5 5 】

#### 実施例11

##### 組換えワクシニア、rV-TAA / TRICOM ( hu ) の生成

rV-TAA / TRICOM ( hu ) の生成のため、ワクシニアゲノムのHindIII J領域に位置するチミジンキナーゼ ( TK ) 遺伝子への外来配列の挿入を指示する、プラスミドベクターを構築する。TAA遺伝子、ヒトLFA-3遺伝子、ヒトICAM-1遺伝子、ヒトB7.1遺伝子、および大腸菌lacZ遺伝子は、多数のポックスウイルス ( poxvirus ) プロモーターの調節下にある。これらの外来配列に、ワクシニアゲノムのHindIII J領域由来のDNA配列が隣接する。本組換えワクチンには、ワクシニアのWyeth ( ニューヨーク市衛生委員会 ) 株由来のプラーク精製単離体を親ウイルスとして用いる。組換えワクシニアウイルスの生成は、Wyethワクシニアゲノム中のワクシニア配列およびプラスミドでトランスフェクションされているワクシニア感染CV-1細胞 ( ATCC、CCL 70 ) における該プラスミドベクター中の対応する配列の間の相同組換えを介して達成する。組換えウイルスは、上述のように、lacZ遺伝子産物に関する色原体アッセイを用い、同定する。lacZを発現するウイルスプラークは、透明な背景に対し、青く見える。陽性プラークを細胞単層から摘み取り、そしてその子孫を再度プレーティングする。Bluo-Galの存在下でプラーク単離および再プレーティングをさらに繰り返し、望ましい組換え体を精製する。

【 0 1 5 6 】

#### 実施例12

##### 組換え鶏痘rV-TAA / TRICOM ( hu ) の生成

rV-TAA / TRICOM ( hu ) の生成のため、鶏痘ゲノムのBamHI J領域への外来配列の挿入を指示する、プラスミドベクターを構築する。TAA遺伝子、ヒトLFA-3遺伝子、ヒトICAM-1遺伝子、ヒトB7.1遺伝子、および大腸菌lacZ遺伝子は、多数のポックスウイルスプロモーターの調節下にある。これらの外来配列に、鶏痘ゲノムのBamHI J領域由来のDNA配列が隣接する。本組換えワクチンには、鶏痘のPOXVAC-TC ( Schering-Plough Corporation ) 株由来のプラーク精製単離体を親ウイルスとして用いる。組換え鶏痘ウイルスの生成は、鶏痘ゲノム中の鶏痘配列およびプラスミドベクターでトランスフェクションされている鶏痘感染初代ニワトリ胚皮膚細胞における該プラスミドベクター中の対応する配列の間の相同組換えを介して達成する。組換えウイルスは、上述のように、lacZ遺伝子産物に関する色原体ア

10

20

30

40

50

ッセイを用い、同定する。lacZを発現するウイルスプラークは、透明な背景に対し、青く見える。陽性プラークを細胞単層から摘み取り、そしてその子孫を再度プレーティングする。Bluo-Galの存在下でプラーク単離および再プレーティングをさらに繰り返し、望ましい組換え体を精製する。

【 0 1 5 7 】

#### 実施例13

##### 組換えワクシニアウイルス、rV-CEA (6D) / TRICOM (hu) No. vT238の生成

rV-CEA (6D) / TRICOM (hu) の生成のため、ワクシニアゲノムのHindIII J領域に位置するチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子への外来配列の挿入を指示する、pT8016と称されるプラスミドベクターを構築した。CEA遺伝子は、1つの修飾エピトープを含む全長タンパク質を発現するように、in vitro突然変異誘発により改変した。本突然変異は、576位にコードされるアミノ酸をアスパラギンからアスパラギン酸に変化させた。CEA (6D) と称される修飾遺伝子は、CEAの免疫原性を亢進するよう設計された (Zarembaら, 1997, Cancer Res. 57: 4570-4577)。CED (6D) 遺伝子は、40Kプロモーターの調節下にある。ヒトLFA-3遺伝子は、30Kプロモーターの調節下にあり、ヒトICAM-1遺伝子は、I3プロモーターの調節下にあり、そしてヒトB7.1遺伝子は、sE/Lプロモーターの調節下にある。さらに、C1プロモーターの調節下にある大腸菌lacZ遺伝子を組換え子孫のスクリーニングとして含む。これらの外来配列に、ワクシニアゲノムのHindIII J領域由来のDNA配列が隣接する (図10を参照されたい)。本組換えワクチンには、ワクシニアのWyeth (ニューヨーク市衛生委員会) 株由来のプラーク精製単離体を親ウイルスとして用いた。組換えワクシニアウイルスの生成は、Wyethワクシニアゲノム中のワクシニア配列およびpT8016でトランスフェクションされているワクシニア感染CV-1細胞 (アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC)、メリーランド州ロックビル、CCL 70) におけるpT8016中の対応する配列の間の相同組換えを介して達成した。組換えウイルスは、上述のように、lacZ遺伝子産物に関する色原体アッセイを用い、同定した。lacZを発現するウイルスプラークは、透明な背景に対し、青く見えた。vT238と称される陽性プラークを細胞単層から摘み取り、そしてその子孫を再度プレーティングした。Bluo-Galの存在下でプラーク単離および再プレーティングを6回繰り返し、望ましい組換え体を精製した。組換えワクシニアウイルスvT238のゲノム構造は、図11に示される。

【 0 1 5 8 】

#### 実施例14

##### 組換え鶏痘ウイルス、rF-TRICOM (mu) No. vT251の生成

rF-TRICOM (mu) の生成のため、鶏痘ゲノムのBamHI J領域への外来配列の挿入を指示する、pT8019と称されるプラスミドベクターを構築した。ネズミLFA-3遺伝子は、30Kプロモーターの調節下にあり、ネズミICAM-1遺伝子は、I3プロモーターの調節下にあり、ネズミB7.1遺伝子は、sE/Lプロモーターの調節下にあり、そしてlacZ遺伝子は、C1プロモーターの調節下にある。これらの外来配列に、鶏痘ゲノムのBamHI J領域由来のDNA配列が隣接する (図12を参照されたい)。本組換えワクチンには、鶏痘のPOXVAC-TC (Schering-Plough Corporation) 株由来のプラーク精製単離体を親ウイルスとして用いた。組換え鶏痘ウイルスの生成は、鶏痘ゲノム中の鶏痘配列およびpT8019でトランスフェクションされている鶏痘感染初代ニワトリ胚皮膚細胞におけるpT8019中の対応する配列の間の相同組換えを介して達成した。組換えウイルスは、上述のように、lacZ遺伝子産物に関する色原体アッセイを用い、同定した。lacZを発現するウイルスプラークは、透明な背景に対し、青く見えた。vT251と称される陽性プラークを細胞単層から摘み取り、そしてその子孫を再度プレーティングした。Bluo-Galの存在下でプラーク単離および再プレーティングを3回繰り返し、望ましい組換え体を精製した。組換えワクシニアウイルスvT251のゲノム構造は、図13Aに示される。

【 0 1 5 9 】

#### 実施例15

##### 組換え鶏痘ウイルス、rF-TRICOM (hu) No. vT232の生成

rF-TRICOM ( hu ) の生成のため、鶏痘ゲノムのBamHI J領域への外来配列の挿入を指示する、pT5072と称されるプラスミドベクターを構築した。ヒトLFA-3遺伝子は、30Kプロモーターの調節下にあり、ヒトICAM-1遺伝子は、I3プロモーターの調節下にあり、ヒトB7.1遺伝子は、sE/Lプロモーターの調節下にあり、そしてlacZ遺伝子は、C1プロモーターの調節下にある。これらの外来配列に、鶏痘ゲノムのBamHI J領域由来のDNA配列が隣接する(図14を参照されたい)。本組換えワクチンには、鶏痘のPOXVAC-TC ( Schering-Plough Corporation ) 株由来のブランク精製単離体を親ウイルスとして用いた。組換え鶏痘ウイルスの生成は、鶏痘ゲノム中の鶏痘配列およびpT5072でトランスフェクションされている鶏痘感染初代ニワトリ胚皮膚細胞におけるpT5072中の対応する配列の間の相同組換えを介して達成した。組換えウイルスは、上述のように、lacZ遺伝子産物に関する色原体アッセイを用い、同定した。lacZを発現するウイルスブランクは、透明な背景に対し、青く見えた。vT232と称される陽性ブランクを細胞単層から摘み取り、そしてその子孫を再度プレATINGした。Bluo-Galの存在下でブランク単離および再プレATINGを4回繰り返す、望ましい組換え体を精製した。組換えワクチンウイルスvT232のゲノム構造は、図13Bに示される。

【 0 1 6 0 】

#### 実施例16

##### 組換え鶏痘ウイルス、rF-MUC-1 / TRICOM ( mu ) No . vT250の生成

rF-MUC-1 / TRICOM ( mu ) の生成のため、鶏痘ゲノムのBamHI J領域への外来配列の挿入を指示する、pT8020と称されるプラスミドベクターを構築した。シグナル配列、10コピーのタンデム反復配列、および3' 特有コード配列からなる、一部切除 ( truncated ) 型MUC-1遺伝子を用いた ( 配列番号41 ) 。タンデム反復領域のヌクレオチド配列は、アミノ酸配列を変化させることなく、反復間の相同性を最小限にするように、改変した。該遺伝子は、一部切除コード配列、6ヌクレオチドの5' 非翻訳領域、および186ヌクレオチドの3' 非翻訳領域を含む、1881 bp断片上に含まれた ( Gendlerら , 1990 , *J. Biol. Chem.* 265 : 15286-15293 ) 。ネズミLFA-3遺伝子は、30Kプロモーターの転写調節下にあり、ネズミICAM-1遺伝子は、I3プロモーターの調節下にあり、ネズミB7.1遺伝子は、sE/Lプロモーターの調節下にあり、そしてlacZ遺伝子は、C1プロモーターの調節下にある。これらの外来配列に、鶏痘ゲノムのBamHI J領域由来のDNA配列が隣接する(図15を参照されたい)。本組換えワクチンには、鶏痘のPOXVAC-TC ( Schering-Plough Corporation ) 株由来のブランク精製単離体を親ウイルスとして用いた。組換え鶏痘ウイルスの生成は、鶏痘ゲノム中の鶏痘配列およびpT8020でトランスフェクションされている鶏痘感染初代ニワトリ胚皮膚細胞におけるpT8020中の対応する配列の間の相同組換えを介して達成した。組換えウイルスは、上述のように、lacZ遺伝子産物に関する色原体アッセイを用い、同定した。lacZを発現するウイルスブランクは、透明な背景に対し、青く見えた。vT250と称される陽性ブランクを細胞単層から摘み取り、そしてその子孫を再度プレATINGした。Bluo-Galの存在下でブランク単離および再プレATINGを4回繰り返す、望ましい組換え体を精製した。組換えワクチンウイルスvT250のゲノム構造は、図16Aに示される。

【 0 1 6 1 】

#### 実施例17

##### 組換え鶏痘ウイルス、rF-MUC-1 / TRICOM ( hu ) No . vT242の生成

rF-MUC-1 / TRICOM ( hu ) の生成のため、鶏痘ゲノムのBamHI J領域への外来配列の挿入を指示する、pT2186と称されるプラスミドベクターを構築した。上の実施例16に記載されるような、一部切除型MUC-1遺伝子を用いた。MUC-1遺伝子は、40Kプロモーターの調節下にある。ヒトLFA-3遺伝子は、30Kプロモーターの調節下にあり、ヒトICAM-1遺伝子は、I3プロモーターの調節下にあり、ヒトB7.1遺伝子は、sE/Lプロモーターの調節下にあり、そしてlacZ遺伝子は、C1プロモーターの調節下にある。これらの外来配列に、鶏痘ゲノムのBamHI J領域由来のDNA配列が隣接する(図17を参照されたい)。本組換えワクチンには、鶏痘のPOXVAC-TC ( Schering-Plough Corporation ) 株由来のブランク精製単離体を親ウイルスとして用いた。組換え鶏痘ウイルスの生成は、鶏痘ゲノム中の鶏痘配列およびpT2186

でトランスフェクションされている鶏痘感染初代ニワトリ胚皮膚細胞におけるpT2186中の対応する配列の間の相同組換えを介して達成した。組換えウイルスは、上述のように、lacZ遺伝子産物に関する色原体アッセイを用い、同定した。lacZを発現するウイルスプラークは、透明な背景に対し、青く見えた。vT242と称される陽性プラークを細胞単層から摘み取り、そしてその子孫を再度プレーティングした。Bluo-Galの存在下でプラーク単離および再プレーティングを4回繰り返し、望ましい組換え体を精製した。組換えワクシニアウイルスvT242のゲノム構造は、図16Bに示される。

【 0 1 6 2 】

#### 実施例18

##### 組換え鶏痘ウイルス、rF-CEA (6D) / TRICOM (hu) No. vT236の生成

rF-CEA (6D) / TRICOM (hu) の生成のため、鶏痘ゲノムのBamHI J領域への外来配列の挿入を指示する、pT2187と称されるプラスミドベクターを構築した。CEA (6D) 遺伝子は、40Kプロモーターの調節下にある。ヒトLFA-3遺伝子は、30Kプロモーターの調節下にあり、ヒトICAM-1遺伝子は、13プロモーターの調節下にあり、ヒトB7.1遺伝子は、sE/Lプロモーターの調節下にあり、そしてlacZ遺伝子は、C1プロモーターの調節下にある。これらの外来配列に、鶏痘ゲノムのBamHI J領域由来のDNA配列が隣接する(図18を参照されたい)。本組換えワクチンには、鶏痘のPOXVAC-TC (Schering-Plough Corporation) 株由来のプラーク精製単離体を親ウイルスとして用いた。組換え鶏痘ウイルスの生成は、鶏痘ゲノム中の鶏痘配列およびpT2187でトランスフェクションされている鶏痘感染初代ニワトリ胚皮膚細胞におけるpT2187中の対応する配列の間の相同組換えを介して達成した。組換えウイルスは、上述のように、lacZ遺伝子産物に関する色原体アッセイを用い、同定した。lacZを発現するウイルスプラークは、透明な背景に対し、青く見えた。vT236と称される陽性プラークを細胞単層から摘み取り、そしてその子孫を再度プレーティングした。Bluo-Galの存在下でプラーク単離および再プレーティングを8回繰り返し、望ましい組換え体を精製した。組換えワクシニアウイルスvT236のゲノム構造は、図16Cに示される。

【 0 1 6 3 】

#### 実施例19

##### 組換え鶏痘ウイルス、rF-PSA / PSMA / TRICOM (hu) No. vT257の生成

rF-PSA / PSMA / TRICOM (hu) の生成のため、鶏痘ゲノムのBamHI J領域への外来配列の挿入を指示する、pT5080と称されるプラスミドベクターを構築した。PSAをコードする遺伝子は、ヒトLNCaP細胞株 (CRL 1740、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC)、メリーランド州ロックビル) 由来のRNAから得たcDNAのポリメラーゼ連鎖反応増幅により、単離した。該遺伝子は、PSAの全コード配列、41ヌクレオチドの5'非翻訳領域、および552ヌクレオチドの3'非翻訳領域を含む、1346 bp断片上に含まれた (Lundwall および Lilja, 1987, *FEBS Lett.* 214: 217-322)。PSMAをコードする遺伝子は、ヒトLNCaP細胞株由来のRNAから得たcDNAのポリメラーゼ連鎖反応増幅により、単離した。該遺伝子は、PSMAの全コード配列、26ヌクレオチドの5'非翻訳領域、および19ヌクレオチドの3'非翻訳領域を含む、2298 bp断片上に含まれた (Israeliら, 1993, *Cancer Res.* 53: 227-230)。PSA遺伝子は、40Kプロモーターの調節下にあり、そしてPSMA遺伝子は、7.5Kプロモーターの調節下にある。ヒトLFA-3遺伝子は、30Kプロモーターの調節下にあり、ヒトICAM-1遺伝子は、13プロモーターの調節下にあり、ヒトB7.1遺伝子は、sE/Lプロモーターの調節下にあり、そしてlacZ遺伝子は、C1プロモーターの調節下にある。これらの外来配列に、鶏痘ゲノムのBamHI J領域由来のDNA配列が隣接する(図19を参照されたい)。本組換えワクチンには、鶏痘のPOXVAC-TC (Schering-Plough Corporation) 株由来のプラーク精製単離体を親ウイルスとして用いた。組換え鶏痘ウイルスの生成は、鶏痘ゲノム中の鶏痘配列およびpT5080でトランスフェクションされている鶏痘感染初代ニワトリ胚皮膚細胞におけるpT5080中の対応する配列の間の相同組換えを介して達成した。組換えウイルスは、上述のように、lacZ遺伝子産物に関する色原体アッセイを用い、同定した。lacZを発現するウイルスプラークは、透明な背景に対し、青く見えた。vT257と称される陽性プラークを細胞単層から摘み取り、そしてその子孫を再度プレーティングした。Bluo-Galの

存在下でブランク単離および再プレーティングを5回繰り返し、望ましい組換え体を精製した。組換えワクシニアウイルスvT257のゲノム構造は、図16Dに示される。

【0164】

#### 実施例20

##### 組換えMVAウイルス、rMVA/TRICOM(mu) No. vT264の生成

修飾ワクシニアAnkara(MVA)は、ワクシニアウイルスのAnkara株の弱毒化誘導体である(Meyerら, 1991, *J. Gen. Virol.* 72:1031-1038)。ヒトにおいて痘瘡ワクチンとして使用されるMVAワクチン由来の種ストックを、Anton Mayr博士(Instisute for Medical Microbiology、ミュンヘン)から得た。種ストックを、初代ニワトリ胚皮膚細胞上で、2回ブランク精製した。

10

【0165】

rMVA-TRICOM(mu)の生成のため、MVAゲノムの欠失III領域(Meyerら, 1991, *J. Gen. Virol.* 72:1031-1038)への外来配列の挿入を指示する、pT5085と称されるプラスミドベクターを構築した。ネズミLFA-3遺伝子は、30Kプロモーターの調節下にあり、ネズミICAM-1遺伝子は、13プロモーターの調節下にあり、ネズミB7.1遺伝子は、sE/Lプロモーターの調節下にあり、そしてlacZ遺伝子は、C1プロモーターの調節下にある。これらの外来配列に、MVAゲノムの欠失III領域由来のDNA配列が隣接する(図20を参照されたい)。本組換えワクチンには、MVAワクチン種ストック由来のブランク精製単離体を親ウイルスとして用いた。組換えMVAの生成は、MVAゲノム中のMVA配列およびpT5085でトランスフェクションされているMVA感染初代ニワトリ胚皮膚細胞におけるpT5085中の対応する配列の間の相同組換えを介して達成した。組換えウイルスは、上述のように、lacZ遺伝子産物に関する色原体アッセイを用い、同定した。lacZを発現するウイルスブランクは、透明な背景に対し、青く見えた。vT264と称される陽性ブランクを細胞単層から摘み取り、そしてその子孫を再度プレーティングした。Biuo-Galの存在下でブランク単離および再プレーティングを4回繰り返し、望ましい組換え体を精製した。組換え体MVA vT264のゲノム構造は、図21Aに示される。

20

【0166】

#### 実施例21

##### 組換えMVAウイルス、rMVA-PSA/PSMA/TRICOM(hu) No. vT260の生成

rMVA-PSA/PSMA/TRICOM(hu)の生成のため、MVAゲノムの欠失III領域への外来配列の挿入を指示する、pT5084と称されるプラスミドベクターを構築した。PSA遺伝子は、40Kプロモーターの調節下にあり、そしてPSMA遺伝子は、7.5Kプロモーターの調節下にある。ヒトLFA-3遺伝子は、30Kプロモーターの調節下にあり、ヒトICAM-1遺伝子は、13プロモーターの調節下にあり、ヒトB7.1遺伝子は、sE/Lプロモーターの調節下にあり、そしてlacZ遺伝子は、C1プロモーターの調節下にある。これらの外来配列に、MVAゲノムの欠失III領域由来のDNA配列が隣接する(図22を参照されたい)。本組換えワクチンには、MVAワクチン種ストック由来のブランク精製単離体を親ウイルスとして用いた。組換えMVAの生成は、MVAゲノム中のMVA配列およびpT5084でトランスフェクションされているMVA感染初代ニワトリ胚皮膚細胞におけるpT5084中の対応する配列の間の相同組換えを介して達成した。組換えウイルスは、上述のように、lacZ遺伝子産物に関する色原体アッセイを用い、同定した。lacZを発現するウイルスブランクは、透明な背景に対し、青く見えた。vT260と称される陽性ブランクを細胞単層から摘み取り、そしてその子孫を再度プレーティングした。Biuo-Galの存在下でブランク単離および再プレーティングを4回繰り返し、望ましい組換え体を精製した。組換え体MVA vT260のゲノム構造は、図21Bに示される。

30

40

【0167】

#### 実施例22

##### 組換えボックスウイルス

ネズミ補助的刺激分子B7-1をコードする遺伝子(rV-B7-1と称される)またはネズミ細胞間接着分子-1をコードする遺伝子(rV-ICAM-1と称される)いずれかを含む、個々の組換えワクシニアウイルスが記載されてきている(10、11)。ネズミCD48の遺伝子を含む組換

50

えワクシニアウイルス (rV-LFA-3と称される ; ネズミCD48は、ヒトLFA-3 (CD58) の相同体 (6) ) は、rV-B7-1およびrV-ICAM-1と同様の方式で構築され、そして記載されてきている (12) 。これらの単一の組換えワクシニアウイルスの各々で、補助的刺激分子をコードする遺伝子を、ワクシニアウイルス初期 / 後期40Kプロモーター (15) の調節下に置き、そして導入遺伝子を、記載されるような (13) 、ワクシニアウイルスWyeth株のゲノムのHindIII M領域に挿入した。組換え鶏痘ウイルスは、記載されるような (14) 、鶏痘ウイルスのPOXVAC-TC (Schering Corporation) 株のゲノムのBamHI J領域に、外来遺伝子を挿入することにより、構築した。単一の外来遺伝子を含む組換えウイルスでは、該遺伝子は、ワクシニア40Kプロモーターの調節下にある。rV-B7-1 / ICAM-1は、合成初期 / 後期 (sE / L) プロモーター (16) の調節下にあるネズミB7.1遺伝子および40Kプロモーターの調節下にあるネズミICAM-1遺伝子を含む、組換えワクシニアウイルスである。rV-B7-1 / ICAM-1 / LFA-3は、ワクシニア30L (M2L) プロモーター (17) の調節下にあるネズミLFA遺伝子、ワクシニアI3プロモーター (18) の調節下にあるネズミICAM-1遺伝子、および合成初期 / 後期 (sE / L) プロモーターの調節下にあるネズミB7.1遺伝子を含む、組換えワクシニアウイルスである。rF-CEA / B7-1 / ICAM-1 / LFA-3は、40Kプロモーターの調節下にあるヒト癌胎児性抗原 (CEA) 遺伝子、sE / Lプロモーターの調節下にあるネズミB7-1遺伝子、I3プロモーターの調節下にあるネズミLFA-3遺伝子、およびワクシニア7.5Kプロモーター (19) の調節下にあるネズミICAM-1遺伝子を含む、組換え鶏痘ウイルスである。非組換えワクシニアウイルスは、V-Wyethと称し、一方、非組換え鶏痘ウイルスは、WT-FPと称した。

【 0 1 6 8 】

#### 実施例23

##### 組換え補助的刺激分子の発現

各組換えベクターが、単数または複数の適切な導入遺伝子を発現することが可能であることを確認するため、ネズミ腺癌細胞株MC38を、多様な組換えワクシニアまたは鶏痘構築物に感染させ、そして単数または複数の導入遺伝子の細胞表面発現を、フローサイトメトリーにより明示した (図23) 。未感染細胞 (データ未提示) および野生型ワクシニアに感染した細胞は、3つの補助的刺激分子のいずれも発現しなかった。この観察はPCRにより確認した (データ未提示) 。対照的に、rV-B7-1に感染した細胞は、B7-1タンパク質に関し、非常に陽性になり ; rV-ICAM-1に感染した細胞は、ICAM-1に関し、非常に陽性になり ; そしてrV-LFA-3に感染した細胞は、LFA-3タンパク質に関し、非常に陽性になった。2つの補助的刺激分子を含む構築物 (rV-B7-1 / ICAM-1) の同様の解析により、B7-1 (78% 陽性で1012の平均蛍光強度 (MFI) ) およびICAM-1 (70% 陽性で690のMFI) の発現が示された。さらに、ワクシニア多遺伝子構築物rV-B7-1 / ICAM-1 / LFA-3に感染した細胞は、3つすべての補助的刺激分子を同時発現した。組換え鶏痘ウイルスがその組換えタンパク質を発現したかどうか決定するため、MC38細胞を同様の方式で鶏痘構築物に感染させた (図23) 。再び、野生型鶏痘ウイルスWT-FPに感染した細胞は、いかなる補助的刺激分子も発現しなかった。rF-B7-1に感染した細胞は、B7-1タンパク質に関し、陽性になり、そしてrF-ICAM-1に感染した細胞は、ICAM-1タンパク質に関し、陽性になった。rF-LFA-3ベクターは構築しなかった。しかし、鶏痘多遺伝子構築物rF-CEA / B7-1 / ICAM-1 / LFA-3に感染した細胞は、3つすべての補助的刺激分子を同時発現した。

【 0 1 6 9 】

##### 組換えウイルスの性質決定 : タンパク質表面発現の蛍光解析

MC38ネズミクロン性腺癌細胞株が記載されてきている (20) 。集密な (confluent) MC38細胞を、ワクシニア構築物 (V-Wyeth、rV-B7-1、rV-ICAM-1、rV-LFA-3、rV-B7-1 / ICAM-1 / LFA-3) または鶏痘構築物 (WT-FP、rF-B7-1、rF-ICAM-1、rF-CEA / B7-1 / ICAM-1 / LFA-3) に、5 MOI (感染多重度 ; PFU / 細胞) で、5時間、感染させた。CEAは、1つのrF構築物で、マーカー遺伝子としてのみ、用いた。感染後、細胞を採取し、そしてネズミCD80 (B7-1) 、CD54 (ICAM-1) 、またはCD48 (LFA-3 ; PharMingen、カリフォルニア州サンディエゴ) に特異的なFITC結合モノクローナル抗体 (MAb) で免疫染色した。Lysis IIソフト

ウェアを用い、FACSCAN血球計算装置 (cytometer) (Becton Dickinson、カリフォルニア州マウンテンビュー) で、細胞蛍光を解析した。

【0170】

#### in vitro補助的刺激解析

雌C57BL/6マウス (6-8週齢) は、Taconic Farms (ニューヨーク州ジャーマンタウン) から得た。単細胞懸濁物を単離するため、70 m細胞ろ過器 (Falcon、Becton Dickinson、ニュージャージー州フランクリンレークス) を通じて機械的に分散させた脾臓から未処理T細胞を単離し、そしてFicoll-Hypaque勾配 (密度 = 1.119 g/ml) (Sigma、ミズーリ州セントルイス) 上の遠心分離により、赤血球および死んだ細胞を除去した。およそ95% T細胞からなる集団は、2つのナイロンウールカラム (Robbins Scientific Corp.、カリフォルニア州サニーベール) 上に、連続して脾臓単核細胞を通過させることにより、得た。10  
 特定の試験には、抗CD4または抗CD8常磁性ビーズ (MiniMACS、Miltenyi Biotec、カリフォルニア州オーバーン) を利用した陰性選択により、T細胞をさらにCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>集団に分画した。T細胞を、96ウェル平底プレート (Costar、マサチューセッツ州ケンブリッジ) 中に10<sup>5</sup>/ウェルで添加した。未感染MC38細胞、あるいはワクシニア構築物 (V-Wyeth、rV-B7-1、rV-ICAM-1、rV-LFA-3、rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3) または鶏痘構築物 (WT-FP、rF-B7-1、rF-ICAM-1、rF-CEA/B7-1/ICAM-1/LFA-3) に、5 MOI (感染多重度; PFU/細胞) で、5時間、感染させた細胞からなる刺激細胞を、2%パラホルムアルデヒドで固定し、そして10<sup>4</sup>/ウェルで添加した。すべてのウェル中の細胞は、いくつかの希釈 (5ないし0.625 μg/mlで2日間) のコンカナバリン-A (Con A、Sigma) の存在下で、総体積200  
 20 μlの完全培地 (CM) (ウシ胎児血清 (10%)、グルタミン (2 mM)、ピルピン酸ナトリウム (1 mM)、Hepes (7 mM)、ゲンタマイシン (50 μg/ml)、2-メルカプトエタノール (50 μM)、および非必須アミノ酸 (0.1 mM) (Biofluids、メリーランド州ロックビル) ) 中で培養した。コントロールウェルには、T細胞、刺激細胞および培地のみを与えた。示される試験では、プレート結合抗CD3 (1.5 μg/ウェル-0.012 μg/ウェル) をCon Aに代用した。細胞は、インキュベーションの最後の12-18時間、1 Ci/ウェルの<sup>3</sup>H-チミジン (New England Nuclear、デラウェア州ウィルミントン) で標識し、そしてTomtec細胞採取装置 (Wallac Incorporated、メリーランド州ガイザーズバーグ) で採取した。取り込み放射能は、液体シンチレーション計測 (Wallac 1205 Betaplate、Wallac, Inc.) で測定した。3つ組ウェルの結果を平均し、そして平均CPM ± SEMとして報告する。示される  
 30 試験では、発現される補助的刺激分子に特異的なMAbまたは一致アイソタイプコントロール抗体 (アルメニアハムスター (Armenian hamster) IgG、ポリクローナル) のいずれかの存在下で、in vitro補助的刺激解析を行った。T細胞増殖を遮断するのに用いた抗体は、すべてPharMingenからの、ハムスター抗ネズミCD80 (B7-1; クローン16-10A1)、ハムスター抗ネズミCD54 (ICAM-1; クローン3E2)、またはハムスター抗ネズミCD48 (BCM-1; クローンHM48-1) であった。すべての抗体は、25 μg/mlの最終濃度で用いた。

【0171】

#### 補助的刺激分子能力の測定

T細胞および刺激細胞は、上述のように調製した。1つまたはそれ以上の補助的刺激分子を発現する固定刺激細胞を、総数10<sup>4</sup>/細胞まで、V-Wyeth感染/固定刺激細胞と組み合わせ、多様な比でウェルに添加した。その後、T細胞 (10<sup>5</sup>/ウェル) を添加し、そして細胞を、2.5 μg/ml Con Aの存在下で、総体積200 μlのCM中で2日間培養し、そしてインキュベーションの最後の12-18時間、1 μCi/ウェルの<sup>3</sup>H-チミジンで標識した。取り込み放射能は、先のように、液体シンチレーション計測により、測定した。

【0172】

#### サイトカイン解析

CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞集団を上述のように調製し、そして6ウェルプレート (Costar) 中に2.5 × 10<sup>6</sup>/ウェルで添加した。刺激細胞集団を上述のように調製し、そして2.5 × 10<sup>5</sup>/ウェルで添加した。細胞を、2.5 μg/ml Con Aの存在下で、総体積5 mlのCM中で24時間培養した。上清流体を収集し、そしてネズミIL-2、IFN、TNF-、GM-CSF、およびIL-  
 50

4に関し、以前記載されたような捕捉ELISA(21)により、解析した。検出感度は、それぞれ、30、100、20、20、および20 pg/mlであった。

【0173】

刺激細胞由来のRNA集団もまた、多プローブRNアーゼ保護アッセイ(mprPA)により、解析した。ネズミサイトカインの明示されたりボプローブは、PharMingenより購入した。アッセイは、以前記載されたように行った(22)。保護プローブタグ付加二重鎖は、6%ポリアクリルアミド上の電気泳動により、分離した。乾燥ゲルは、-70 で24-72時間、Biomaxフィルム(Kodak)に曝露した。Storm系ホスホイメジャー(Molecular Dynamics、カリフォルニア州サニーベール)を用い、バンドに含まれる放射能を定量化した。既定のバンドの純CPMは、以下の式(サイトカイン遺伝子のcpm・マイナス・バックグラウンドのcpm)により計算し、そしてハウスキーピング遺伝子転写物L32のパーセントとして表した。

【0174】

#### 実施例24

##### B7-1、ICAM-1、およびLFA-3は相乗的に働き、T細胞増殖を亢進する

B7-1、ICAM-1、およびLFA分子は、個々にT細胞増殖を補助的刺激することが示されてきている。しかし、これらは同時にAPC上に発現される可能性があるため、T細胞増殖誘導中の個々の補助的刺激分子の相対的役割を調べることは困難であった(2)。B7-1、ICAM-1および/またはLFA-3分子の未処理T細胞増殖の誘導への寄与を解析するため、T細胞活性化の第一のシグナルが、薬理的試薬(Con A)を介し搬送される、修飾in vitroモデル(23、24)を使用した。補助的刺激分子を発現するよう設計された多様な組換えワクシニア(図24A)または鶏痘(図24B)ウイルスに感染したMC38細胞株を用い、補助的刺激分子のみが異なる一団の刺激細胞を生成した。第二の、または「補助的刺激」シグナルを、これらの「刺激」MC38細胞の表面上に発現される1つまたはそれ以上の補助的刺激分子を介し、T細胞に搬送した。図24Aに示されるように、未感染MC38細胞およびMC38/V-Wyeth両方が、Con Aの調べたレベルすべてで、T細胞の最小限の増殖を誘導した。MC38/LFA-3は、T細胞増殖において、小さい(2.1倍)しかし有意な( $P < 0.05$ )増加を誘導した。MC38/ICAM-1を介したシグナル-2搬送は、2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Con AでのT細胞増殖において、3.5倍の増加を誘導した。MC38/B7-1は、2.5および1.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Con Aでの増殖において、それぞれ、7.8倍および16倍の増加を誘導した。しかし、MC38/B7-1/ICAM-1/LFA-3(3つの補助的刺激分子すべてを同時発現するMC38細胞)は、2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Con AでのT細胞増殖において、17.5倍の増加、および1.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Con Aで34倍の増加を誘導した。さらに、低いCon Aレベル(0.625  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )では、ICAM-1およびLFA-3の発現は、T細胞増殖を誘導しなかった。B7-1は、0.625  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Con Aで測定可能な増殖(20,000 CPM)を誘導したが、3つの補助的刺激分子すべての同時発現は、さらにより高いレベルの増殖(100,000 CPM)を誘導した(図24A)。これらの実験を4回繰り返し、同様の結果を得た。

【0175】

MC38刺激細胞はまた、組換え鶏痘ウイルスでの感染によっても調製した(図24B)。再び、未感染MC38またはMC38/WT-FPは、Con Aの調べたレベルすべてで、T細胞の最小限の増殖を誘導した。2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Con AでのT細胞増殖において、MC38/rF-ICAM-1は2倍の増加を支持し、MC38/rF-B7-1は3.2倍の増加を支持し、そしてMC38/rF-B7-1/ICAM-1/LFA-3は6倍の増加を支持した。本実験をさらに2回繰り返し、同様の結果を得た。第一のシグナルが固定抗CD3を介して搬送される場合もまた、同様の結果が観察された(データ未提示)。MC38/rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3およびMC38/rF-CEA/B7-1/ICAM-1/LFA-3により支持される増殖で注目される相違(17.5倍対6倍)は、5時間の感染期間後に発現される単数または複数の組換えタンパク質のレベルのためである可能性が最も高い(図23)。特に、rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3に感染した細胞のおよそ70%が、補助的刺激分子を発現し、一方、rF-CEA/B7-1/ICAM-1/LFA-3に感染した細胞のおよそ40%が陽性である。使用した条件で、rFベクターに感染した陽性細胞は、rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3に感染したものの50%のレベルで、組換えB7-1およびICAM-1を発現する。

【0176】

実施例25T細胞増殖に対する補助的刺激分子の寄与の特異性

B7-1、ICAM-1、またはLFA-3の増殖寄与の特異性をさらに確認するため、V-Wyeth、rV-B7-1、rV-ICAM-1、またはrV-LFA-3での感染により、MC38刺激細胞を再び調製し、そして既定の補助的刺激分子に特異的なMAbの存在下または非存在下で、未処理ネズミT細胞およびCon Aと同時培養した。図3Bに示されるように、MC38 / B7-1は、MC38 / V-Wyethのものより4.5倍、T細胞増殖を亢進した(図25A)。この増殖増加は、ネズミB7-1の遮断抗体を添加することにより、83%阻害された。同様に、MC38 / ICAM-1(図25C)は、増殖を2.25倍増加させ、これはその後、抗ネズミICAM-1 MAbの存在下で、88%減少した。最後に、MC38 / LFA-3(図25D)は、増殖を2.1倍増加させ、これはその後、抗ネズミCD48 MAbの存在下で98%減少した。各群に関し、(材料および方法に明記されるような)適切なアイソタイプコントロール抗体を用いたインキュベーションは、注目される増殖を遮断しなかった。本実験をさらに2回繰り返し、同様の結果を得た。

【0177】

実施例26補助的刺激分子能力の測定

in vitro補助的刺激アッセイの修飾法により、T細胞増殖の第二のシグナルを搬送する、B7-1、ICAM-1、および/またはLFA-3の相対的能力の定量的概算が可能になった。本目的のため、刺激細胞(多様な組換えワクシニアウイルスに感染したMC38細胞)を、V-Wyethに感染した多様な量のMC38細胞での希釈により力価測定し(titered out)、そして2.5 μg / ml Con Aの存在下で、一定数のT細胞と同時培養した。これらの実験において、MC38対T細胞比は、1:10で一定のままであった。図4に見られるように、MC38 / LFA-3(黒い三角形)は、濃度40%まで、MC38 / V-Wyeth(白い正方形)のものより、T細胞増殖を亢進させた(すなわちウェル中の刺激細胞のうち、40%がrV-LFA-3に感染し、そして残った60%がV-Wyethに感染した)。MC38 / ICAM-1(黒い円)またはMC38 / B7-1(黒いひし形)は、それぞれ濃度13%および6%まで、増殖増加を支持した。対照的に、MC38 / B7-1 / ICAM-1 / LFA-3は、3%未満の刺激細胞が3つ組ベクターを含む場合、増殖を亢進した(直線最小二乗解析を介し、1%未満と推定される)。これらの個々の補助的刺激分子の力価測定(titration)曲線を得ると、ICAM-1およびB7-1により仲介されるT細胞増殖の度合いは、それぞれ、3倍および6倍であり、LFA-3単独で仲介されるものより強力であるようであった。しかし、明らかに、最も強い増殖は、B7-1 / ICAM-1 / LFA-3により仲介される。比較的低い刺激細胞濃度では(すなわち、MC38細胞の3%-6%が刺激細胞として作用する場合)、LFA-3、ICAM-1、およびB7-1でさえ、単独の発現ではT細胞活性化を亢進しないが、3つの補助的刺激分子を発現する刺激細胞は、実質的にT細胞活性化を亢進する。図26(挿入図)のデータは、3%のMC38刺激細胞が、示されるベクターに感染している場合に得た結果である。各ウェルは、10<sup>4</sup>の総MC38細胞および10<sup>5</sup>未処理T細胞を含むため、これらの培養において、実際の刺激細胞対T細胞比は、0.003である。2遺伝子構築物に感染したMC38細胞(rV-B7-1 / ICAM-1)は、これらの条件下で、あるとしてもわずかのT細胞増殖しか誘導しない一方、MC38 / B7-1 / ICAM-1 / LFA-3は、実質的に増殖を増加させた(p < 0.0001)ことに注目されたい。

【0178】

実施例27CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞の補助的刺激

単一でまたは組み合わせで発現される補助的刺激分子に対するT細胞反応をさらに性質決定するため、B7-1、ICAM-1、およびLFA-3が精製CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞を補助的刺激する能力を試験した。図5は、最適以下の濃度のCon Aで活性化した精製CD4<sup>+</sup>(図27A)およびCD8<sup>+</sup>(図27B)細胞の増殖を示す。増殖に対する刺激細胞効果の層別化は、CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>細胞両方に関し、同様であった: MC38 / LFA-3は、最も弱い増殖を刺激し、MC38 / ICAM-1およびMC38 / B7-1が続いた。MC38 / B7-1 / ICAM-1 / LFA-3がCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞の最も強力な刺激細胞であった。これらの実験をさらに3回繰り返し、同様の結果を得た。非常

10

20

30

40

50

に低い濃度のCon A (0.625 µg/ml、図5、パネルCおよびD)では、第二のシグナルを提供するのに、ICAM-1、LFA-3、B7-1、またはB7-1/ICAM-1の組み合わせのいずれを用いても、CD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup> T細胞活性化において、有意な亢進はなかったことに注目すべきである。しかし、3つ組の補助的刺激分子を同時発現するワクシニアウイルスを使用した場合、両T細胞サブセットの実質的な活性化が観察された。第一のシグナルが固定抗CD3を介し搬送された場合、同様の結果が見られた(データ未提示)。

#### 【0179】

B7-1補助的刺激がIL-2 mRNA半減期を延長させ、そしてIL-2転写を上方制御し、かなりの量の分泌IL-2産生を生じることが報告されてきている(4、25)。さらに、LFA-3でのT細胞補助的刺激は、多様なサイトカイン、特にIL-2およびIFN- $\gamma$ に対する影響を有することが報告されてきている(6)。サイトカイン産生に対する、単一のまたは多数の補助的刺激分子による補助的刺激の定性的および定量的影響を決定するため、精製CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞を再び、2.5 µg/ml Con Aの存在下で、単独でまたは組み合わせてB7-1、ICAM-1、およびLFA-3を発現する多様な刺激細胞と同時培養した。24時間後、上清流体を、IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF、およびIL-4に関し、解析した。未感染MC38(データ未提示)およびMC38/V-Wyethは、CD4<sup>+</sup>細胞から、最小限の量のIL-2を誘導し(図28A)、一方、MC38/B7-1は3,979 pg/mlを誘導した。しかし、MC38/B7-1/ICAM-1/LFA-3でのT細胞刺激は、10倍多い量のIL-2を誘導した。同様に、MC38/B7-1は、CD8<sup>+</sup>細胞から、最小限の量のIL-2を誘導した(図28B)が、MC38/B7-1/ICAM-1/LFA-3は、20倍多い量(6,182 pg/ml)のIL-2を誘導した。刺激したT細胞によるIFN- $\gamma$ 産生もまた調べた。MC38/B7-1およびMC38/LFA-3は、CD4<sup>+</sup>細胞から、中程度の量のIFN- $\gamma$ しか誘導しなかった(図28C)。対照的に、MC38/B7-1/ICAM-1/LFA-3でのCD4<sup>+</sup>細胞の刺激は、他の構築物のいずれでの刺激より、4倍多いIFN- $\gamma$ を誘導した。MC38/B7-1/ICAM-1/LFA-3でのCD8<sup>+</sup>細胞の刺激は、他の構築物のいずれで刺激したCD8<sup>+</sup>細胞より6倍以上多い、最大量のIFN- $\gamma$ を誘導した(図28D)。いかなる構築物でのいずれかの細胞種の刺激も、分泌されるTNF- $\alpha$ 、GM-CSF、またはIL-4のレベルにおいて、有意な変化を仲介しなかった( $p > 0.05$ )(データ未提示)。3つ組構築物(rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3)を介した刺激の主な頂点は、CD4<sup>+</sup>細胞からのIL-2分泌およびCD8<sup>+</sup> T細胞からのIFN- $\gamma$ 分泌であるようである。これらの実験をさらに3回繰り返し、同様の結果を得た。T細胞によるサイトカイン産生を亢進する能力に関し、2遺伝子構築物(rV-B7-1/ICAM-1)対多遺伝子構築物(rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3)に感染させた刺激細胞を比較した研究もまた、行った。CD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup>細胞いずれかによるIFN- $\gamma$ 産生、あるいはCD8<sup>+</sup>細胞によるIL-2産生では、2つの間の小さい相違しか観察されなかった。しかし、CD4<sup>+</sup>細胞によるIL-2産生の刺激では、実質的な相違が見られた(MC38/B7-1/ICAM-1を使用した5000 pg/ml対MC38/B7-1/ICAM-1/LFA-3を使用した39,600 pg/ml)。

#### 【0180】

単一のまたは多数の補助的刺激分子で刺激したCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞からのサイトカイン発現もまた、多プローブRNアーゼ保護アッセイ(mRPA)を利用し、RNAレベルで解析した。2つの別個の実験のそれぞれの放射線写真プロフィールおよび定量的解析を示す(図29)。IL-4、IL-5、IL-10、IL-15、およびIL-6は、MC38/V-Wyeth、MC38/B7-1、MC38/ICAM-1、MC38/LFA-3、またはMC38/B7-1/ICAM-1/LFA-3で刺激したCD4<sup>+</sup> T細胞で同様であった(図29、パネルB柱状図)。IL-2およびIFN- $\gamma$ 発現レベルは、いかなる単一の補助的刺激分子を発現するMC38細胞で刺激したCD4<sup>+</sup>細胞と比較した場合も、MC38/B7-1/ICAM-1/LFA-3で刺激したCD4<sup>+</sup> T細胞で最も高かった(図29B)。わずかにより高いレベルのIL-13、IL-9、およびIL-6もまた、MC38/B7-1/ICAM-1/LFA-3で刺激したCD4<sup>+</sup>細胞で見られた。サイトカイン遺伝子の発現はまた、刺激したCD8<sup>+</sup> T細胞でも解析した。解析したサイトカインRNAのうち、IL-2および特にIFN- $\gamma$ レベルは、これらの細胞をMC38/B7-1/ICAM-1/LFA-3で刺激した場合、いかなる単一の補助的刺激分子を発現するMC38細胞で刺激したT細胞に比較しても、有意に高かった。したがって、サイトカイン産生における補助的刺激分子の3つ組の主な相乗効果は、CD4<sup>+</sup>細胞におけるIL-2およびCD8<sup>+</sup> T細胞におけるIFN-

10

20

30

40

50

であった。

【0181】

#### 実施例28

##### 刺激したT細胞のアポトーシスに対するTRICOM補助的刺激の影響

##### アポトーシス研究

シグナル1およびrV-TRICOMでのT細胞の刺激が、細胞生存またはプログラム細胞死(PCD)を導くかどうか決定するため、CD8<sup>+</sup>T細胞を、シグナル1としてCon Aで活性化し、V-WT、rV-B7-1またはrV-TRICOM感染MC38細胞と48時間培養し、そして培地中に24時間再プレATINGし、アポトーシスを測定した。アポトーシスは、Gavrieli, Yら, J. Cell Biol 119: 493-501, 1992に記載されるように、TUNELアッセイを用いて評価した。MC38およびCon AまたはMC38/V-WTおよびCon Aの組み合わせにより、補助的刺激シグナルの非存在下で活性化されたT細胞は、高レベルの自発的アポトーシスを示した(それぞれ82.9±1)。Con AおよびMC38/B7-1またはCon AおよびMC38/TRICOMにより活性化されたT細胞は、実質的により少ない自発的アポトーシスを示した(それぞれ31.3±3.8および30.7±1)。

10

【0182】

結果は、明らかに、V-WT感染を伴いまたは伴わず、Con Aの存在下で(すなわち、シグナル2の非存在下で)刺激したT細胞におけるアポトーシスを示した。MC38/TRICOMを伴うCon Aは、明らかにMC38/B7-1を伴うCon Aより、はるかに高いレベルまで、CD8<sup>+</sup>細胞を刺激し、そしてより高いレベルのIFN- $\gamma$  およびIL-2の産生を生じ、これはいかなるより高い度合いのアポトーシスも生じなかった。

20

【0183】

#### 実施例29

##### in vivoのrV-CEA/TRICOMの抗腫瘍効果

TRICOMベクターを用い、抗原特異的免疫反応を亢進することが可能であるか決定する研究を行った。本明細書に開示されるように、ヒトCEA遺伝子およびB7-1、ICAM-1およびLFA-3遺伝子を含み、rV-CEA/TRICOMと称される、4遺伝子ワクチニア組換え体を構築した。6ないし8週齢の雌C57BL/6マウス(Taconic Farms)またはヒトCEAのトランスジェニックC57BL/6マウス(Kass, Eら, Cancer Res. 59: 676-683, 1999)を、Hank's平衡化塩溶液(HBSS)あるいは一度10<sup>7</sup> pfu rV-CEA, rV-CEA/B7-1またはrV-CEA/TRICOMいずれかで尾乱切(scarification)によりワクチン接種し、そして22日後、脾臓を採取した。脾臓細胞のリンパ球増殖活性を、先に記載されるように解析した(5)。

30

【0184】

図30(挿入図)に見られるように、rV-TRICOMをワクチン接種したマウスの脾臓T細胞は、rV-CEAをワクチン接種したマウスから得たT細胞と比較し、より高いレベルのCEA特異的的刺激を示した; オボアルブミンおよびCon Aをコントロールとして用いた。その後、rV-CEA/TRICOMが長期免疫を誘導することが可能であるかどうか決定する実験を行った。マウス(5匹/群)に一度、V-WT、rV-CEA、またはrV-CEA/TRICOMのいずれかをワクチン接種した。100日後、CEAを発現している高用量(1×10<sup>6</sup>)のMC38結腸癌細胞(5)にマウスを曝露した。V-WTおよびrV-CEAを受けたすべてのマウスは腫瘍で死亡し、一方、rV-TRICOMをワクチン接種したすべてのマウスは、曝露50日後、生存していた(図30)。

40

【0185】

ヒトCEA遺伝子が正常成獣胃腸組織で発現され、そして血清がCEA陽性である、CEAトランスジェニックマウス(Kass 1999、同; Thompson, J. A. ら, J. Clin. Lab. Anal. 5: 344-366, 1999)を使用し、rV-CEA/TRICOMベクターが自己抗原に対するT細胞反応を亢進することが可能であるかどうか決定した。CEAトランスジェニックマウスを5マウス/群に分けた。2匹のマウスに一度、10<sup>7</sup> pfu rV-CEA、rV-CEA/B7-1、rV-CEA/TRICOMまたは緩衝液をワクチン接種し、そして第30日に安楽死させ、CEA特異的T細胞反応を解析した。rV-CEA/TRICOMをワクチン接種した後に得られたT細胞反応は、rV-CEAで得られたものより、実質的に大きかった(表2)。オボアルブミンおよびCon Aに対する反応をコント

50

ロールとして用いた。各群の残った3匹のCEAトランスジェニックマウスを用い、TRICOMベクターを使用し、CEA発現腫瘍に対する抗腫瘍反応を亢進することが可能であるか決定した。これらのマウスに最初に、s.c.で、CEA遺伝子を発現しているMC38癌細胞(5)  $4 \times 10^5$ を接種した。4日後、マウスに一度、 $10^7$  pfuウイルス組換え体または緩衝液を、末梢部位に、ワクチン接種した。rV-CEA/TRICOMをワクチン接種したマウスでは、腫瘍は増殖しなかったが、一方、緩衝液、rV-CEAおよびrV-CEA/B7-1をワクチン接種したマウスでは腫瘍が増殖しつづけた(表2)。これらの結果は、TRICOMベクターのin vivo活性を支持する。

【0186】

表2. CEAトランスジェニックマウスにおけるrV-CEA/TRICOMの亢進した免疫反応および抗腫瘍反応

10

【0187】

【表2】

免疫原	刺激指数 (SI)				腫瘍値	
	Con A	OvaI	CEA	CEA	第14日	第35日
	(5 $\mu$ g/ml)	(100 $\mu$ g/ml)	(100 $\mu$ g/ml)	(25 $\mu$ g/ml)		
HBSS	109	1.0	1.3	2.0	698 $\pm$ 928	3,674 $\pm$ 3,107
rV-CEA	123	0.9	4.9	4.0	259 $\pm$ 0	1,112 $\pm$ 1,685
rV-CEA/B7-1	93	1.3	7.1	4.3	150 $\pm$ 236	2,696 $\pm$ 1,936
rV-CEA/TRICOM	111	1.1	19.2	15.9	0 $\pm$ 0	$\pm$ 0

20

【0188】

C57BL/6トランスジェニックマウス(群当たり5匹)に、皮膚乱切を介し、緩衝液またはワクシニア組換え体( $10^7$  pfu)を、第0日に一度、ワクチン接種した。第30日、2匹のマウスを殺し、そしてT細胞増殖反応に関し、脾臓T細胞を解析した。各値は、培地に対する、3つ組試料の平均CPMのSIを示す。標準偏差は10%を越えることはなかった。第4日、群当たり3匹のマウスに、CEAを発現しているMC38結腸癌細胞 $4 \times 10^5$ を投与した。腫瘍体積はワクチン接種後、第14日および35日に得る。

【0189】

実施例30

30

rV-B7/ICAM-1/LFA-3に感染した先駆樹状細胞および樹状細胞によるCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞の補助的刺激

Inabara(41)の方法により、新鮮なCD34<sup>+</sup>骨髄細胞(樹状細胞先駆体)をC57BL/6マウスから得た。これらの先駆細胞は、直ちに用い、またはGM-CSFおよびIL-4(42)中で6日間培養し、成熟樹状細胞(DC)を生成した。CD34<sup>+</sup>先駆細胞およびDCを、多数の補助的刺激分子をコードする組換えワクシニアウイルスrV-B7/ICAM-1/LFA-3(rV-Tricom)、 $10^{10}$  MOIに18時間感染させた。感染5時間後、細胞試料を採取し、そして表現型解析を行った。樹状細胞は当業では「究極の」APCであると考えられ、多数の補助的刺激分子を高レベルで発現している。表3は、ネズミDCが実際に補助的刺激分子B7-1、B7-2、ICAM-1、およびLFA-3を、比較的高レベルで発現することを示す(平均蛍光強度、MFI;括弧内に示される)。しかし、DCがrV-B7/ICAM-1/LFA-3に感染している場合、補助的刺激分子発現レベルと共に、多数の補助的刺激分子を発現している細胞のパーセンテージも両方、有意に増加した。B7-1を発現している細胞のパーセンテージは、65%から86%に増加し、一方、MFIは4倍増加し;ICAM-1を発現している細胞のパーセンテージは32%から68%に増加し、一方、MFIは2.5倍増加し;LFA-3を発現している細胞のパーセンテージは44%から75%に増加した。

40

【0190】

表3

rV-COS<sup>2</sup>での感染前および感染後<sup>1</sup>の先駆DCの表現型解析

【0191】

50

【表3】

感染	マーカー							
	H2-K <sup>b</sup>	I-A <sup>b</sup>	CD11b	CD11c	B7-2	B7-1	ICAM-1	LFA-3
なし	90 <sup>3</sup> (994) <sup>4</sup>	64 (621)	63 (397)	29 (223)	38 (319)	65 (300)	32 (336)	44 (378)
V-Wyeth	75 (554)	60 (633)	59 (398)	27 (218)	36 (317)	65 (311)	33 (296)	43 (322)
rV-B7	76 (516)	67 (755)	70 (419)	34 (213)	41 (320)	83 (661)	43 (363)	51 (333)
rV-B7/ICAM/ LFA-3	79 (579)	63 (696)	63 (408)	30 (203)	42 (360)	86 (1253)	68 (810)	75 (484)

10

## 【0192】

<sup>1</sup>10 MOIで5時間の感染

<sup>2</sup>rV-COS = 外来補助的刺激分子をコードする組換えワクシニア

<sup>3</sup> = % マーカー発現細胞

<sup>4</sup> = 平均蛍光強度

刺激細胞として使用するため、感染CD34<sup>+</sup>先駆細胞およびDCに放射線照射し(2000 rad)、そして図31に略述されるように、Con Aの存在下で、未処理CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞を刺激するのに用いた。

20

## 【0193】

B7.1、ICAM-1、およびLFA-3をコードする組換えボックスウイルスに感染している先駆樹状細胞は、CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞を両方、刺激することが可能であった。B7.1、ICAM-1、LFA-3発現先駆樹状細胞によるCD8<sup>+</sup> T細胞の刺激は、未感染成熟CD34<sup>+</sup>樹状細胞を用いて達成されるものより大きかった(図32)。さらに、成熟CD34<sup>+</sup>樹状細胞(IL-4およびGM-CSFで前処理されているもの)における、3つの補助的刺激分子の感染および発現は、CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞両方の刺激の劇的な増加を生じた(図33)。

30

## 【0194】

当業者はまた、アロ反応性反応(混合リンパ球反応、MLR)を支持する能力により、樹状細胞集団の特性を測定することが可能である(43)。図34は、rV-TRICOMに感染した樹状細胞を用いた、混合リンパ球培養の結果を示す。混合リンパ球反応は、Ba1b/c由来のTリンパ球を刺激するC57BL/6由来のDCを用いる(すなわち抗アロタイプ反応)。

## 【0195】

これらのデータは、混合リンパ球反応における増殖の度合いが、未感染DCまたは野生型ワクシニアに感染しているDCに比較し、rV-TRICOMに感染しているDCを用いると、劇的により高いことを示す。

## 【0196】

図35は、rV-TRICOMに感染しているDCは、CEAペプチド特異的ネズミT細胞株の刺激において、標準的DCより、はるかに優れていることを示す。本T細胞株はCD8<sup>+</sup>であり、そしてCEA D<sup>b</sup>クラスI制限エピートープEAQNTTYL(CAP-M8)に特異的である。CEAペプチド(1 μg/ml)でパルス処理し、そして先にrV-TRICOMに感染させた組み合わせのDCは、特に、低いT細胞対DC比で、CEA特異的T細胞反応を刺激する際、明らかに優れている。

40

## 【0197】

## 実施例31

rV-またはrF-TRICOM感染ネズミ骨髄由来樹状細胞を用いた、in vitroおよびin vivoのネズミT細胞刺激

## 実験プロトコル

## ペプチド

50

H-2k<sup>b</sup>制限ペプチドOVA (オボアルブミン<sub>257-264</sub>、SIINFEKL)<sup>41</sup>およびVSVN (水疱性口内炎ウイルスN<sub>52-59</sub>、RGYVYQGL)<sup>42</sup>、およびH-2D<sup>b</sup>制限ペプチドCAP-M8 (CEA<sub>526-533</sub>、EAQNTYL) およびFLU-NP (NP<sub>366-374</sub>、ASNENMDAM)<sup>43</sup>は、購入する (Multiple Peptide System s、カリフォルニア州サンディエゴ) か、または社内で合成した (Applied Biosystems 43 2A Synergy Peptide Synthesizer、カリフォルニア州フォスターシティー)。

【0198】

#### 細胞株および細胞培養

OVAおよびCap-M8 CD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞株は、社内で、C57BL/6マウスから生成し、そしてそれぞれOVAおよびCap-M8ペプチドを認識した。CTL株は、1 μg/mlの特異的ペプチドおよび10 U/mlのネズミIL-2 (Boehringer Mannheim、インディアナ州インディアナポリス) を補った完全培地 (CM) (ウシ胎児血清 (10%)、グルタミン (2 mM)、ピルビン酸ナトリウム (1 mM)、Hepes (7 mM)、ゲンタマイシン (50 μg/ml)、2-メルカプトエタノール (50 μM)、および非必須アミノ酸 (0.1 mM) (Biofluids、メリーランド州ロックビル) ) 中の放射線照射未処理脾臓細胞を用い、毎週のin vitro刺激周期により維持した。抗原特異的増殖アッセイにおいて、これらの細胞を反応因子として使用する24時間前に、細胞をFicoll-Hypaque勾配 (密度 = 1.119 g/ml、Sigma Chemical Co.、ミズーリ州セントルイス) 上の遠心分離により精製し、そして10 U/mlネズミIL-2のみを補ったCM中で、6ウェル培養プレート (10<sup>6</sup>細胞/ml、5 ml/ウェル) に再プレatingした。細胞傷害性アッセイでは、使用した標的腫瘍細胞株は、EL-4 (C57BL/6、H-2<sup>b</sup>、胸腺腫、ATCC TIB-39) であった。

【0199】

#### DC調製

骨髄は、6ないし8週齢の雌C57BL/6マウス (Taconic Farms、ニューヨーク州ジャーマンタウン) から得た。本研究に用いた方法は、Inabaら<sup>41</sup>に記載されるものをわずかに修飾したものであった。簡潔には、骨髄を肢の長骨から洗い出し、そしてFicoll-Hypaque勾配上を通過させた。CD4、CD8、および抗MHCクラスIIに特異的な磁気ビーズカクテル (MiniM ACS、Miltenyi Biotec、カリフォルニア州オーバーン) を用い、骨髄細胞のリンパ球およびIa<sup>+</sup>細胞を枯渇させた。細胞は、10 ng/ml GM-CSFおよび10 ng/ml IL-4 (R&D Systems、ミネソタ州ミネアポリス) を補ったCM中で、6ウェル培養プレート (10<sup>6</sup>細胞/ml、5 ml/ウェル) にプレatingした。第2および4日に、細胞を新鮮なサイトカインを補った培地中で再プレatingした。培養6日目、感染、解析および免疫感作のため、細胞を採取した。明記された実験には、培養の最後の24時間に、DCをネズミTNF- (100 ng/ml、Boehringer Mannheim、インディアナ州インディアナポリス) またはCD40 mAb (5 μg/ml、PharMingen、カリフォルニア州サンディエゴ) で処理した。

【0200】

#### 組換えボックスウイルス

合成初期/後期 (sE/L) プロモーターの調節下のネズミ補助的刺激分子B7-1 (CD80) をコードする遺伝子を含むrVウイルス (rV-B7-1と称される) が、本明細書に記載されてきている。ワクシニア30K (M2L) プロモーターの調節下のネズミLFA-3遺伝子 (CD48)、ワクシニアI3プロモーターの調節下のネズミICAM-1 (CD54)、および合成初期/後期 (sE/L) プロモーターの調節下のネズミB7-1遺伝子を含むrVウイルスは、rV-TRICOMと名づけられている。ベクターrF-B7-1およびrF-B7-1/ICAM-1/LFA-3 (rF-TRICOMと称される) は、それぞれrV-B7-1およびrV-TRICOMと同様に構築されたrFウイルスである。レポーター遺伝子、ヒトCEAを含む鶏痘-TRICOM構築物を特定の実験に用いた。非組換え野生型ワクシニアウイルス (Wyeth株) はV-WTと称され、一方、野生型鶏痘ウイルスはFP-WTと称された。

【0201】

#### DC感染

DCは第6日に採取し、そしてOpti-Mem (Gibco-BRL、メリーランド州ガイザーズバーグ) で洗浄した。その後、細胞をHBSSにニセ (mock) 感染させ、Opti-Mem中で、5時間、25 MOI (感染多重度; PFU/細胞) で、V-WT、rV-B7-1、またはrV-TRICOMに感染させ、あるいは5

10

20

30

40

50

0 MOIで、FP-WT、rF-B7-1、またはrF-TRICOMに感染させた。感染後、温CMを添加し、そして細胞を37 °Cで一晩インキュベーションした。感染後、免疫染色、in vitro補助的刺激解析、およびin vivo投与のため、細胞を採取した。

【0202】

#### フローサイトメトリー解析

細胞表面染色は3色免疫蛍光を利用した。染色は、一次FITC標識抗体、CD11c、CD11b、H-2K<sup>b</sup>、H-2D<sup>b</sup>、CD19、Pan-NK；一次PE標識抗体、IA<sup>b</sup>、CD48 (mLFA-3)、CD86 (B7-2)、CD3、CD14；およびビオチン標識抗体、CD80 (B7-1)、CD57 (ICAM-1)、CD40で行った。ビオチン標識抗体は、続いて、シトクロム・ストレプトアビジンで標識した。すべての抗体は、PharMingenより購入した。Lysis IIソフトウェアを用いたFACSCAN血球計算装置 (Becton Dickinson、カリフォルニア州マウンテンビュー) で、細胞蛍光を解析し、そして適切なアイソタイプ一致コントロール (PharMingen) と比較した。

10

【0203】

#### in vitro補助的刺激解析：薬理的シグナル-1

雌の6ないし8週齢のC57BL/6マウスを得て (Taconic Farms、ニューヨーク州ジャーマンタウン)、そして先に記載されるように<sup>5</sup>、未処理T細胞を単離した。T細胞は、96ウェル平底プレート (Costar、マサチューセッツ州ケンブリッジ) 中に、10<sup>5</sup>/ウェルで添加した。未感染DC、ニセ感染DC、あるいはワクシニアベクター (V-WT、rV-B7-1、rV-TRICOM) または鶏痘ベクター (FP-WT、rF-B7-1または、rF-TRICOM) に感染したDCのいずれかからなる刺激細胞に放射線照射 (20 Gy) し、そして10<sup>5</sup>/ウェルで添加した。すべてのウェル中の細胞は、いくつかの濃度 (2.5ないし0.9 μg/ml) のCon A (Sigma) の存在下で、総体積200 μlのCM中で、2日間培養した。細胞は、インキュベーションの最後の12-18時間、1 μCi/ウェルの<sup>3</sup>H-チミジン (New England Nuclear、デラウェア州ウィルミントン) で標識し、そしてTomtec細胞採取装置 (Wallac Incorporated、メリーランド州ガイザーズバーグ) で採取した。取り込み放射能は、液体シンチレーション計測 (Wallac 1205 Beta plate、Wallac, Inc.) で測定した。3つ組ウェルの結果を平均し、そして平均CPM ± SEMとして報告する。

20

【0204】

#### 混合リンパ球反応

MLRを用い、同種異系および同系未処理T細胞に対するDCの刺激機能を評価した。T細胞は、先のように、Balb/CまたはC57BL/6マウスから単離した。刺激細胞は、未感染；ニセ感染；あるいはV-WT、rV-137-1、rV-TRICOM、FP-WT、rF-B7-1またはrF-TRICOMに感染したDCのいずれかからなり、そして放射線照射 (20 Gy) した。T細胞 (5 × 10<sup>4</sup>/ウェル) を平底96ウェル培養プレート中で、CM中の段階的な数の刺激細胞と同時培養し、そして37 °C、5% CO<sub>2</sub>で4日間インキュベーションし、先のように、インキュベーションの最後の12-18時間、1 μCi/ウェルの<sup>3</sup>H-チミジンで標識し、採取し、そして解析した。

30

【0205】

#### in vitro補助的刺激解析：ペプチド特異的シグナル

休止OVAまたはCAP-M8 T細胞 (反応因子) を、96ウェル平底プレートに、5 × 10<sup>4</sup>/ウェルで添加した。刺激細胞は、未感染あるいはV-WT、rV-137-1、またはrV-TRICOMに感染したDCのいずれかからなり、そして放射線照射 (20 Gy) した。すべてのウェル中の細胞は、総体積200 μlのCM中で培養した。補助的刺激アッセイは、2組の条件を用いて行った：(1) 10:1の固定比の反応因子：刺激細胞、いくつかの濃度の特異的ペプチドまたは適切なコントロールペプチドの存在下で培養、あるいは(2) 固定濃度の特異的ペプチドまたはコントロールペプチド、多様な反応因子：刺激細胞比で培養。細胞を72時間培養し、先のように、インキュベーションの最後の12-18時間、1 μCi/ウェルの<sup>3</sup>H-チミジンで標識し、採取し、そして解析した。

40

【0206】

#### in vivoのCTL誘導および細胞傷害性解析

未感染、あるいはV-WTまたはrV-TRICOMに感染したDCいずれか (1 × 10<sup>6</sup>) をOpti-Memで2回

50

洗淨し、そして10  $\mu$ MのOVAまたはCAP-M8ペプチドいずれかを含む同じ培地1 mlに再懸濁した。37  $^{\circ}$ Cで2時間インキュベーションした後、細胞をHBSSで2回洗淨し、そして注射のためHBSSに再懸濁した。ペプチドパルス処理DC ( $1 \times 10^5$ 細胞/マウス)を、7日間隔で、1-3回、静脈内注射した。コントロールマウスは、Ribi / Detoxアジュバント (Ribi ImmunoChem Research、モンタナ州ハミルトン) 中の100  $\mu$ gの示されるペプチドで皮下免疫した。最後の接種の14日後、群当たり2匹の動物から脾臓を除去し、単細胞懸濁に分散させ、プールし、そして10  $\mu$ g/mlの適切なペプチドと6日間、同時インキュベーションした。バルクのリンパ球を密度勾配 (LSM、Organon Teknika、ペンシルバニア州ウェストチェスター) を通じた遠心分離により回収した。先のように $^{45}$ 、 $^{111}$ Inを用いた標準的細胞溶解アッセイにおける標的として使用するために、EL-4細胞を調製した。標的細胞を、10  $\mu$ Mの特異的ペプチドで、37  $^{\circ}$ Cで1時間、パルス処理し、一方、第二の群の標的細胞は、コントロールペプチドでパルス処理した。リンパ球およびペプチドパルス処理標的 ( $5 \times 10^3$ 細胞/ウェル) をCMに懸濁し、96ウェルU底プレート (Costar) 中で80:1ないし10:1のエフェクター:標的比で合わせ、そして37  $^{\circ}$ Cで5時間、5% CO<sub>2</sub>と共にインキュベーションした。インキュベーション後、Supernatant Collection System (Skantron、バージニア州スターリング) を用い上清を集め、そしてガンマカウンター (Cobra Autogamma、Packard、イリノイ州ダウナーズグローブ) を用い、放射能を定量化した。 $^{111}$ Inの特異的放出のパーセンテージは、標準的等式: %特異的溶解 = [(実験-自発) / (最大-自発)] / 100により決定した。示される場合、Wunderlichら、1994に記載されるように、CTL活性を溶解単位 (LU) に変換した。

10

20

【0207】

#### 抗ワクシニア抗体解析

V-WTを $5 \times 10^5$ /ウェルで塩化ポリビニルプレート (Dynatech、バージニア州シャンティリー) に添加し、37  $^{\circ}$ Cで一晩乾燥させ、そして5% BSAでブロッキングした。免疫マウス由来血清の段階的希釈を3つ組で添加し、そして37  $^{\circ}$ Cで1時間インキュベーションした。プレートを洗淨し、そしてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG (Kirkgaard and Perry Laboratories、メリーランド州ガイザーズバーグ) とさらに1時間インキュベーションした。ウェルをo-フェニレンジアミン二塩酸 (Sigma、ミズーリ州セントルイス) およびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で染色した。Bio-Tek EL312eマイクロプレートELISA読取装置 (バーモント州ウィヌースキー) を用い、各ウェルの吸光度を405 nmで読み取った。

30

【0208】

#### 結果

##### DC上の補助的刺激分子の発現増加

DCのボックスウイルス感染の効率を測定するため、これらの細胞を、B7-1、ICAM-1、およびLFA-3をコードするrVウイルス (rV-TRICOMと称される) またはB7-1、ICAM-1、LFA-3およびヒト癌胎児性抗原 (CEA) をコードするrFウイルス (rF-CEA / TRICOMと称される) いずれかに感染させた。後者の場合、鶏痘構造タンパク質が感染細胞で発現されないため、CEAはレポーター遺伝子として用いられる。18時間後、特定のウイルス感染に関連する、細胞表面マーカーの発現に関し、細胞を解析した。未感染コントロールDCはCD11bを発現し (97%)、そしてワクシニアタンパク質の発現に関し、陰性であった。rV-TRICOMでの感染後、94%のDCはCD11bおよびワクシニアタンパク質を共に同時発現した。rF-CEA / TRICOMに感染したDCは、CD11bおよびCEAを共に同時発現した (87%)。これらのDCは、ポリクローナルウサギ抗鶏痘血清により検出されるように、鶏痘タンパク質を発現せず (データ未提示)、これは鶏痘が哺乳動物細胞で複製しないと明記する報告と一致した。総合すると、これらのデータは、DCがrVおよびrFベクター両方に、効率的に感染することを示す。

40

【0209】

DCの重要な特性は、組織適合抗原および補助的刺激分子両方を高レベルで発現することである。ウイルス感染後のDCの表現型をさらに性質決定するため、細胞を野生型ワクシニアウイルス (V-WT)、rV-B7-1、rV-TRICOM、野生型鶏痘 (FP-WT) またはrF-TRICOMに感染さ

50

せ、そしてDC表現型と関連する、細胞表面マーカーの発現に関し解析した(表4)。期待されるように、未感染および二重感染DCは、高レベルのMHCクラスIおよびII、CD11b、B7-2およびCD40分子と共に、高レベルのB7-1、ICAM-1、およびLFA-3を発現した。V-WT感染DCは、(MFIにより測定されるように)より低い細胞表面密度のいくつかの分子を発現し、一方、rV-B7-1感染DCは、未感染DCより5倍多いB7-1を発現した(MFI 329から1689)。rV-TRICOMでのDCの感染は、MFI並びにB7-1、ICAM-1、およびLFA-3に関し陽性の細胞のパーセンテージを実質的に増加させた。FP-WT感染DCは、未感染DCのものと同様の表現型プロフィールを有した。rF-TRICOMでのDCの感染もまた、MFI並びにB7-1、ICAM-1、およびLFA-3に関し陽性の細胞のパーセンテージを実質的に増加させた。すべてのDC集団は、rFまたはNベクターでの感染前および感染後とも、T細胞(CD3)、B細胞(CD19)、単球/好中球(CD14)、およびNK細胞(Pan NK)マーカーに関し、陰性のままであった(表4)。

10

【 0 2 1 0 】

表4

rV-TRICOMまたはFP-TRICOMでのBMDCの感染は、B7-1、ICAM-1、およびLFA-3の発現レベルを増加させる

【 0 2 1 1 】

【表 4】

感染	DC 団 (%陽性細胞 (MFI))										非DCマーカー			
	I-A <sub>b</sub>	H-2K <sub>b</sub> /Db	CD11b	CD11c	B7-2	CD40	B7-1	ICAM-1	LFA-3	CD14	CD19	CD3	Pan NK	
なし	88 (1124)	89 (125)	93 (935)	20 (74)	68 (490)	68 (82)	91 (329)	96 (595)	88 (153)	2 (20)	2 (26)	0.3 (33)	2 (56)	
ニセ	87 (989)	88 (125)	90 (1129)	25 (49)	77 (432)	71 (99)	85 (330)	97 (519)	86 (189)	1 (42)	4 (30)	0.6 (37)	2 (29)	
V-WT	87 (890)	86 (83)	86 (588)	29 (54)	61 (274)	79 (98)	90 (197)	95 (241)	70 (196)	3 (20)	3 (45)	1 (59)	5 (50)	
rV-B7-1	85 (856)	85 (104)	81 (693)	25 (62)	73 (304)	73 (103)	94 (1689)	97 (364)	72 (131)	3 (42)	3 (40)	0.8 (67)	4 (37)	
rV-TRICOM	87 (901)	78 (103)	77 (558)	22 (54)	66 (298)	71 (81)	96 (1442)	94 (1528)	92 (304)	3 (32)	4 (29)	0.9 (70)	4 (31)	
FP-WT	91 (985)	98 (126)	89 (889)	24 (69)	65 (487)	71 (90)	94 (382)	97 (464)	91 (130)	2 (18)	2 (10)	1 (60)	2 (31)	
rF-B7-1	88 (987)	99 (114)	86 (793)	28 (72)	74 (404)	68 (90)	95 (1559)	98 (437)	90 (180)	2 (30)	2 (29)	1 (45)	2 (54)	
rF-TRICOM	90 (900)	99 (115)	84 (789)	27 (66)	76 (499)	73 (93)	99 (1824)	98 (1697)	95 (530)	3 (22)	3 (13)	1 (50)	3 (33)	

## 【 0 2 1 2 】

DCは、未感染、ニセ感染、あるいは25 MOIのV-WT、rV-B7、またはrV-TRICOMいずれか、または50 MOIのWT-FPまたはFP-TRICOMに5時間感染させた。18時間インキュベーションした後、3色フローサイトメトリー解析により、細胞を表現型決定した。太字の数字は、細胞表面発現 (MFI) の >100% 変化を示す。

## 【 0 2 1 3 】

TRICOMベクターでのDC感染は、未処理T細胞を刺激する能力の亢進を示す

in vitroモデルを用い、増加したレベルのB7-1、ICAM-1およびLFA-3発現が、どのように未処理T細胞増殖誘導を補助するかを解析した。本モデルでは、T細胞活性化の第一のシグナルは、薬理的剤 (Con A) を介し、搬送し、そしてさらなる、または補助的刺激シグ

10

20

30

40

50

ナルは、DCまたは組換えポックスウイルス感染の結果としてより高いレベルのTRICOMを発現しているDCを介し、T細胞に搬送した。これらのそして本明細書に報告されるすべての続く研究において、V-WTおよびEP-WTもまた用い、ベクター単独による影響を排除した。図36Aに示されるように、未感染およびニセ感染DCは共に、T細胞増殖を誘導した。V-WT感染DC (DC / V-TRICOMと称される) は未感染DCより少ないT細胞増殖を誘導した。rV-B7-1に感染したDC (DC / rV-B7-1と称される) を介したさらなる補助的刺激的搬送は、未感染DCに比較し、増殖を増加させた。しかし、rV-TRICOMに感染したDC (DC / rV-TRICOMと称される) は、Con Aのすべての濃度で、T細胞増殖をさらに増加させた。さらに、T細胞をDC / rV-TRICOMで刺激した場合、未感染DCのものと匹敵するレベルの増殖を誘導するのに、28倍少ないCon Aしか必要でなかった。鶏痘ベクターを用い、これらの実験を繰り返すと、DC / rF-TRICOMはDCまたはDC / rF-B7-1と異なり、すべてのCon A濃度でT細胞増殖増加を誘導した (図36B)。これらの実験を4回繰り返し、同様の結果を得た。

【 0 2 1 4 】

#### TRICOMベクターに感染したDCによるアロ刺激活性の亢進

DC刺激能力に対するrV-TRICOM (図37A、C、E) またはrF-TRICOM (図37B、D、E) 感染の効果、アロ特異的混合リンパ球反応で評価した。未感染DCおよびニセ感染DC集団は共に、同種異系T細胞の強い増殖 (78,000 CPM) を誘導した (図37A、B)。rV-B7-1感染後、DCの刺激能力は増加した (図37C)。rV-TRICOMでのDC感染は、すべてのDC / 反応因子比で、DCおよびDC / rV-B7-1よりも、刺激能力を増加させた (図37C)。重要なことに、rV-TRICOMに感染したDC集団は、同系T細胞を刺激しなかった (図37E)。鶏痘ベクターを用い、これらの実験を繰り返すと (図37B、D)、DC / rF-TRICOMはDCおよびDC / rF-B7-1より同種異系T細胞増殖のより多い増加を誘導したが、DC-rF-TRICOMは同系T細胞を刺激しなかった (図37F)。これらの実験を3回繰り返し、同様の結果を得た。

【 0 2 1 5 】

#### in vitro補助的刺激的解析：エフェクターT細胞へのペプチドの提示

ペプチドパルス処理DCの刺激能力を、DCをrV-TRICOMに感染させることにより、亢進させることが可能であるかどうか決定する研究を行った。本目的のため、H-2k<sup>b</sup>制限OVA (オオアルブミン<sub>257-264</sub>、SIINFEKL) およびOVA特異的CD8<sup>+</sup>エフェクターT細胞株を用いた。DCを異なる濃度のOVAペプチドに曝露し、そしてOVA T細胞株の存在下でインキュベーションした (図38A-38F)。慣用的な (すなわち未感染の) DCは、OVAペプチドとインキュベーションした際、OVA特異的T細胞の強い増殖を誘導した (図38A)。これらのDCは、コントロールペプチド、VSVN (水疱性口内炎ウイルスN<sub>52-59</sub>、RGYVYQGL) とインキュベーションした際、OVA特異的T細胞の増殖を誘導しなかった (図38A、白い正方形)。DC / rV-B7-1は、これらの細胞の全体的なペプチド特異的増殖を、1.8倍増加させた (図38C)。さらに、DC / rV-B7-1は、4倍少ないペプチドの存在下で、未感染またはニセ感染DCのものと同様の増殖を誘導した。対照的に、DC / rV-TRICOMは、これらのT細胞の全体的な増殖を、数倍増加させ、そして32倍少ないOVAペプチドの存在下で、未感染DCのものと匹敵する増殖を誘導した (図38C)。ワクシニア感染DCがペプチドを提示する能力をさらに評価するため、DCを単一濃度のOVAペプチド (1 μM) でパルス処理し、そしていくつかの比のT細胞の存在下でインキュベーションした (図38E)。細胞当たりに基づき、DCのものと匹敵する増殖レベルを誘導するのに、4倍少ないDC / rV-B7-1が必要であった (白い三角形対黒い正方形)。最大刺激効果は、DC / rV-TRICOMのものであり、これは32倍少ない細胞で、DCのものと匹敵する増殖レベルを誘導した (白い円対黒い正方形)。

【 0 2 1 6 】

ペプチドパルス処理DCおよび樹立T細胞株を使用する第二のペプチド系を使用し、OVAペプチドで得られたものと同様の結果が見られるかどうか決定した。これらの実験は、H-2D<sup>b</sup>制限ペプチドCAP-M8 (CEA<sub>526-533</sub>、EAQNTTYL) およびCAP-M8特異的CD8<sup>+</sup>エフェクターT細胞株を用いて行い；同様の結果が見られた (図38B、D、F)。これらの実験をさらに5回繰り返し、同様の結果を得た。

【 0 2 1 7 】

10

20

30

40

50

TNF- またはCD40成熟DCに対する rV-TRICOM感染の影響

DCの機能的成熟は、T細胞補助的刺激分子の上方制御と関連すると考えられるため、TNF- またはCD40 mAbいずれかとの同時培養により成熟したDCに対する rV-TRICOM感染の影響を調べる実験を行った。培養の最後の24時間にTNF- でDCを処理すると、その結果、フローサイトメトリー解析により測定されるように、MHC-II、B7-2、およびICAM-1がいくらか上方制御され(表5)、一方、CD40 mAbでDCを処理すると、その結果、ICAM-1発現が上方制御され、そしてMHC-IIがわずかに上方制御される。機能上、TNF- またはCD40 mAbでのDCの処理は、ペプチド特異的増殖において、未操作DCのものより、それぞれ、28%および16%増加させた(図39A)。DCをリポ多糖(LPS)で処理した後もまた、同様のデータが得られた。未処理DCを rV-TRICOMに感染させると、T細胞増殖の実質的な増加が生じた(図39A対39B)。しかし、TNF- またはCD40 mAbで前処理した後、 rV-TRICOMに感染させると、 rV-TRICOM感染単独で見られたものより、わずかに高い刺激能力が与えられたのみであった。これらの実験をさらに3回繰り返し、同様の結果を得た。

10

【 0 2 1 8 】

表5rV-TRICOM感染前のTNF- またはCD40 mAbでのDCの前処理の影響

【 0 2 1 9 】

【 表 5 】

DC 固 (%陽性細胞 (MF I))

感染	前処理	I-A <sup>b</sup>	H-2K <sup>b</sup> /D <sup>b</sup>	CD11b	CD11c	B7-2	CD40	B7-1	ICAM-1	LFA-3
DC (未感染)	なし	90 (924)	93 (225)	90 (835)	26 (174)	65 (340)	62 (182)	93 (389)	96 (415)	90 (253)
DC (未感染)	TNF-α	95 (1189)	91 (195)	84 (729)	20 (149)	71 (412)	65 (159)	85 (320)	97 (421)	87 (249)
DC (未感染)	CD40 mAb	91 (990)	89 (183)	87 (788)	22 (154)	68 (374)	69 (198)	90 (297)	95 (690)	86 (216)
DC/rV-TRICOM	なし	87 (756)	89 (214)	85 (684)	24(98)	69 (301)	66 (103)	95 (1989)	98 (1487)	93 (413)
DC/rV-TRICOM	TNF-α	92 (991)	90 (230)	79 (558)	21 (62)	72 (398)	68 (81)	96 (1442)	94 (1998)	90 (394)
DC/rV-TRICOM	CD40 mAb	91 (905)	90 (216)	81 (614)	23 (69)	65 (387)	71 (120)	94 (1382)	97 (1444)	89 (310)

10

20

30

40

【 0 2 2 0 】

DCは、培養の最後の24時間、TNF- (100 ng/ml) またはCD40 mAb (1 μg/ml) で処理した。その後、DCまたは処理DCを25 MOIのrV-TRICOMに5時間感染させた。18時間インキュベーションした後、3色フローサイトメトリー解析により、細胞を表現型決定した。

【 0 2 2 1 】

W-TRICOMに感染したDCは、in vivoのCTL反応の誘発 (priming) に、より有効である Con A (図36E-F)、混合リンパ球反応 (図37) および2エフェクターT細胞モデル (図38) を用い、in vitroで見られたDC/rV-TRICOMの刺激能力の亢進が、in vivoの未処理T細胞反応誘発の有効性の亢進に転換されるかどうか決定する実験を行った。本目的のため、DC、DC/rV-WT、およびDC/rV-TRICOMを10 μMのOVAペプチドでパルス処理し、そしてC57BL/

50

6マウスに静脈内注射した。コントロールマウスは、Ribi / Detoxアジュバント中のOVAペプチドで皮下免疫した。ワクチン接種の14日後、脾臓細胞を採取し、in vitroで6日間再刺激し、そしてOVAパルス処理EL-4細胞に対し、そのペプチド特異的溶解能に関し、評価した。VSVNペプチドでパルス処理したEL-4細胞をコントロール標的細胞として用いた。図40Aに見られるように、ペプチド / アジュバントで免疫したマウスから生成されたCTLは、中程度のレベルのCTL活性を示した (図40A)。ペプチドパルス処理DCで免疫したマウスは、より大きいペプチド特異的CTL反応を示した (図40B)。誘導CTL反応は、DC / v-WTで免疫されたマウスで、いくらか鈍っていた (図40C、 $< 2.5$ 溶解単位 (LU) 対 $5.2$  LU)。対照的に、ペプチドパルス処理DC / rV-TRICOMで免疫したマウス (図40D) は、DCのものより有意に強いCTL反応を示した (LU =  $14.3$ 、 $p = 0.001$ )。その後、第二のモデルペプチド、CEAペプチドCAP-M8を用い、同様の実験を行った (図40E-H)。再び、ペプチドパルス処理DCは、ペプチド / アジュバントにより引き出されるものより、はるかに高いCTL活性を引き出した ( $5.7$  LU対 $< 2.5$  LU)。さらに、ペプチドパルス処理DC / rV-TRICOMで免疫されたマウス (図40H) は、ペプチドパルス処理DCにより誘導されるもの ( $5.7$  LU) に比較し、強いCTL反応 ( $> 20$  LU、 $p = < 0.001$ ; 図40F) を示した。

#### 【 0 2 2 2 】

##### 多ベクター感染DCワクチン接種の有効性

抗ワクシニア抗体の生成は、免疫原としてのワクシニアウイルスの反復使用を防ぐことが可能であると、一般的に考えられる。しかし、免疫原としてのワクシニア感染細胞の反復使用に関しては、ほとんど知られていない。この問題に取り組むため、CAP-M8ペプチドパルス処理DC免疫原を、7日間隔で、1、2、または3回投与する、免疫計画を実行した。以前のように、最後の免疫の14日後に脾臓細胞を採取し、in vitroで6日間再刺激し、そしてCAP-M8パルス処理EL-4細胞に対するそのペプチド特異的溶解能に関し、評価した。図41Aに見られるように、ペプチドパルス処理DC / rV-TRICOMは、ペプチドパルス処理DCに比較し、より高いレベルのCTL活性を誘導した。これらのデータは図40E-Hに見られるものと同様である。このDC / V-WTまたはDC / rV-TRICOMの単回投与により、定性的ELISAにより決定されるように、 $1:4,000$ ないし $1:9,000$ の範囲の値で、有意な抗ワクシニアIgG抗体力価が誘導された。しかし、これらの力価は、これらの免疫原が、続く免疫感作でCTL活性を高める能力に対し、いかなる影響も持たなかった (図41Bおよび41C)。第二のワクチン接種後の抗ワクシニアウイルス力価は $1:12,000$ ないし $1:50,000$ の範囲であり、一方、すべての群で、ペプチド特異的CTLの誘導の上昇が見られた。再びDC / rV-TRICOMパルス処理細胞を使用して観察されるCTL活性は、ペプチドパルス処理DCで観察されるものより高かった。

#### 【 0 2 2 3 】

##### 実施例32

##### TRICOMベクターに感染した脾臓細胞または骨髄前駆細胞は、樹状細胞に匹敵するT細胞活性化を誘導する

##### 材料および方法

##### 骨髄先駆細胞および樹状細胞培養の生成

骨髄由来DCの生成に用いた方法は、Inabaらに記載されるものに重要でない修飾を加えたものであった。簡潔には、6-8週齢の雌C57BL / 6マウス (Taconic Farms、ニューヨーク州ジャーマンタウン) から大腿骨を採取し、そして骨髄を洗い出し、そしてFicoll-Hypaque勾配上に通過させた。CD4、CD8、およびMHCクラスIIに特異的な磁気ビーズカクテル (MiniMACS、Miltenyi Biotec、カリフォルニア州オーバーン) を用い、骨髄細胞のリンパ球およびIa<sup>+</sup>細胞を枯渇させた。その後、樹状細胞先駆体と称されるこれらの枯渇骨髄細胞を、感染のため調製し、または樹状細胞培養のため、枯渇骨髄細胞を、 $10$  ng / ml GM-CSFおよび $10$  ng / ml IL-4 (R & D Systems、ミネソタ州ミネアポリス) を補ったCM中で、6ウェル培養プレート ( $10^6$ 細胞 / ml、 $5$  ml / ウェル) にプレーティングした。第2および4日に、新鮮なサイトカインを補ったCM中にDC培養を再プレーティングし、第4日に新たなプレートに分配した。培養7日目、解析、in vitroアッセイおよびin vivo免疫感作のため、

細胞を採取した。

【0224】

#### 脾臓細胞刺激細胞の生成

未処理の雌C57BL/6マウスから脾臓を採取し、押しつぶして単細胞懸濁物にし、そしてFicoll-Hypaque勾配上に通過させた。脾臓細胞は、CD90、およびMHCクラスIIに特異的な磁気ビーズカクテルを用い、リンパ球およびIa<sup>+</sup>細胞を枯渇させた。その後、精製脾臓細胞をOpti-Mem (Gibco-BRL) で2回洗浄し、そして組換えポックスウイルスでの感染のため調製した。

【0225】

#### 刺激細胞の感染

骨髄由来樹状細胞先駆体および脾臓細胞をOpti-Memで2回洗浄し、そしてニセ感染させ、あるいは25 MOIのV-WT、rV-B7-1、rV-TRICOM、または50 MOIのFP-WT、rF-B7-1またはrF-TRICOMに、25 MOI (感染多重度、PFU/細胞) で、最終体積1 mlのOpti-Mem中で5時間、感染させた。感染後、温かい(37 )CMを添加し、そして細胞を37 で一晩インキュベーションした。感染後、免疫染色、in vitro補助的刺激解析、およびin vivo投与のため、細胞を採取した。

【0226】

#### 補助的刺激解析

休止CAP-M8 T細胞 (反応因子) を、96ウェル平底プレート (Costar、マサチューセッツ州ケンブリッジ) 中に、 $5 \times 10^4$  / ウェルで添加した。刺激細胞は、未感染、ニセ感染、あるいはV-WT、rV-B7-1、rV-TRICOM、FP-WT、またはrF-TRICOMいずれかに感染した、BMDC、脾臓細胞、または骨髄先駆体のいずれかからなり、そして放射線照射した (20 Gy)。ウェル中の細胞は、総体積200 mlのCM中で培養した。補助的刺激アッセイは、2組の条件を用いて行った: a) 非BMDC刺激因子には、2.5 : 1、そしてBMDCには10 : 1の固定比の反応因子: 刺激細胞、シグナル1としてのいくつかの濃度のCon-A、特異的ペプチド、または適切なコントロールペプチドの存在下で培養、あるいはb) シグナル1としての固定濃度のCon-A、特異的ペプチド、またはコントロールペプチド、多様な反応因子: 刺激細胞比で培養。細胞を、Con-Aおよびペプチド特異的アッセイのため、それぞれ、48または72時間培養し、そして先のように、インキュベーションの最後の12-18時間、1mCi / ウェルの<sup>3</sup>H-チミジンで標識し、採取し、そして解析した。

【0227】

表6は、組換えベクターでの感染後、補助的刺激分子の脾臓細胞および骨髄 (BM) 細胞表面発現を示す。精製ネズミ脾臓細胞または骨髄細胞は、25 MOIのワクシニアベクターまたは50 MOIの鶏痘ベクターに5時間感染させた。細胞表現型をDCのものと比較した。すべての細胞は、フルオレセイン・イソチオシアネート、フィコエリトリン、またはビオチン/ストレプトアビジン-シトクロムで標識した、補助的刺激分子特異的mAbで免疫染色した。アイソタイプコントロールは陰性であった (データ未提示)。数字は陽性細胞パーセントを、そして括弧内の数字は平均蛍光強度を示す。

【0228】

#### 表6

rV-TricomまたはrF-TRICOMでのBMDC、脾臓細胞、およびBMDC先駆細胞の感染は、B7-1、ICAM-1、およびLFA-3の発現レベルを増加させる<sup>1</sup>

【0229】

【表6】

10

20

30

40

DC <sup>2</sup>	I- $\Lambda$ <sup>b</sup>	H-2k <sup>b</sup> /D <sup>b</sup>	CD11b	CD11c	CD40	D7-2	B7-1	ICAM-1	LFA-3	CD19
脾臓細胞 <sup>3</sup>	未感染 <sup>1</sup>	88(124)	93(935)	20(74)	68(82)	91(329)	91(329)	96(595)	88(153)	2(26)
	未感染	92(102)	3(136)	1(54)	87(494)	49(61)	46(540)	85(258)	77(40)	42(25)
	V-WT	91(114)	3(182)	0.7(82)	75(408)	63(92)	55(490)	76(257)	47(32)	25(24)
	rV-B7	91(123)	3(89)	1(159)	81(369)	61(89)	87(1134)	85(315)	45(29)	33(27)
	rV-Tricom	93(188)	3(41)	3(83)	81(327)	49(69)	87(1104)	92(788)	97(192)	27(33)
	FP-WT	90(104)	2(162)	0.9(92)	79(418)	60(72)	55(460)	70(157)	49(32)	53(29)
	rF-B7-1	91(133)	1(81)	1(149)	85(399)	55(96)	83(830)	83(215)	51(29)	52(31)
	rF-Tricom	89(238)	3(91)	2(80)	86(387)	51(99)	86(1001)	92(588)	99(292)	48(33)
	未感染	9(289)	80(114)	1(909)	26(136)	28(72)	79(115)	68(144)	37(89)	1(147)
	V-WT	8(218)	66(144)	1(1131)	19(161)	19(98)	75(131)	63(151)	33(64)	5(50)
BM <sup>1</sup>	rV-B7	8(192)	71(144)	2(394)	25(233)	22(125)	89(1117)	56(204)	31(65)	2(106)
	rV-Tricom	7(242)	70(129)	1(875)	16(171)	16(91)	92(880)	80(490)	38(112)	3(62)
	FP-WT	8(318)	64(133)	1(1101)	23(175)	22(88)	74(121)	60(112)	35(69)	2(30)
	rF-B7-1	7(292)	75(129)	2(1001)	26(245)	26(101)	91(652)	50(104)	34(72)	1(86)
	rF-Tricom	8(213)	72(118)	1(984)	25(111)	13(99)	96(1880)	79(310)	39(109)	1(52)

10

20

30

【0230】

<sup>1</sup>細胞は未感染、あるいは25 MOIのV-WT、rV-B7-1、rV-Tricom、または50 MOIのFP-WT、rF-B7-1またはrF-TRICOMに5時間感染させた。18時間のインキュベーション期間後、3色フローサイトメトリ解析により、細胞を表現型決定した。値は、%陽性細胞(平均蛍光強度)で示す。太字の数字は、細胞表面発現(MFI)における、>2倍の変化を示す。

40

【0231】

<sup>2</sup>BMDC: 第6日骨髓由来樹状細胞(10 ng/ml GM-CSF/IL-4中で培養)。

<sup>3</sup>-CD90(Thy 1.2)磁気ビーズを介し、T細胞を枯渇させた脾臓細胞。

<sup>4</sup>BMDC先駆体: 骨髓細胞は、-CD4、-CD8、-MHCII磁気ビーズを介し、T細胞およびMHC-II細胞を枯渇させた。

【0232】

図42Aから46は、TRICOM感染脾臓細胞が、T細胞反応の刺激において、TRICOM感染骨髓細胞と匹敵することを示す。

【0233】

50

実施例33

ペプチドでパルス処理した同種異系 rF-TRICOM 感染ヒト樹状細胞を用いたヒト T 細胞刺激ヒト樹状細胞を、ロイコフェレーシス (leucopheresis) により、健常個体から単離した。ヒト樹状細胞は、GM-CSF および IL-4 の存在下で 6-9 日間培養した後、樹状細胞の感染のため、rF-TRICOM または rF-コントロールを添加した。rF-TRICOM 感染樹状細胞を CEA ペプチド (CAP-1 または CAP 1、6D) (図 47) ; PSA ペプチド (PSA-3) (図 48) ; インフルエンザ ペプチド (Flu ペプチド 58-66) (図 49 および 50) ; または HPV ペプチド (11-20) (図 51-45) で 1 時間、パルス処理した。末梢血単核細胞 (PBMC) から単離したヒト T 細胞は、ペプチドパルス処理 rF-TRICOM 感染樹状細胞の存在下で培養し、そして T 細胞による IFN- $\gamma$  の産生を測定した。図 47-54 は、ペプチドパルス処理 rF-TRICOM 感染ヒト樹状細胞が、コントロールより高い度合いで T 細胞を刺激したことを示す。図 47-54 と共に表 7 は、rF-TRICOM に感染した同種異系ヒト樹状細胞が、いかなる抗原性ペプチドも T 細胞に効果的に提示し、免疫反応を亢進することが可能であることを示す。

【 0 2 3 4 】

表 7

HPV E7 (11-20) ペプチドでパルス処理した DC を用いることによる T 細胞株の CTL 活性

【 0 2 3 5 】

【表 7】

標的	T 細胞株樹立に用いたもの			
	A rF-Tricom + P	rF-B7.1 + P	rF-FPV + P	B DC + P
C1R-A2 + HPV	39.6 (3.1)	24.7 (0.4)	19.9 (2.9)	7.3 (0.4)
C1R-A2	5.1 (2.0)	6.9 (4.0)	7.6 (2.0)	8.0 (0.2)

【 0 2 3 6 】

E : T 比 = 25 : 1

6 時間の 111-In 放出アッセイを行った。C1R-A2 細胞は、10  $\mu$ g / ml の濃度の HPV E7 ペプチド (11-20) YMDLQPETT でパルス処理した。

【 0 2 3 7 】

表 7 に示される結果は、どちらもペプチドでパルス処理した場合、rF-TRICOM (A) に感染した DC は、標準的 DC (B) よりも、CTL を生成する APC として優れていることを示す。

【 0 2 3 8 】

実施例34rV-huTRICOM、rV-CEA hu TRICOM ワクチンおよび rF-CEA TRICOM のヒト臨床試験

ヒト臨床試験の目的は、宿主抗腫瘍反応を引き出し、そして進行した CEA 発現腺癌の患者において許容可能な毒性と結び付けられる、組換え rV-hu TRICOM および rV-CEA-hu TRICOM ワクチンの最適容認用量 (OTD) を決定することである。

【 0 2 3 9 】

rV-hu TRICOM および rV-CEA-hu TRICOM ワクチンは、第 I 相および第 II 相ヒト臨床試験に適した条件下で産生する。

最初の試験では、初期用量 10<sup>6</sup> pfu ウイルス、I.M. の後、10<sup>7</sup> pfu ウイルス、I.M.、その後、10<sup>8</sup> pfu ウイルスまたは 10<sup>9</sup> pfu ウイルス、S.C. または乱切で、増大する用量の組換え rV または rF CEA-hu TRICOM 生ウイルスワクチンまたは rV-CEA を加えた rV-hu TRICOM を提供する。

【 0 2 4 0 】

各組換えワクチンに対する抗腫瘍反応は、当業に知られるように、新たな型の療法に対する腫瘍反応を測定するのに許容される標準的規準を用い、腫瘍サイズ、度合いおよび増殖の臨床的、実験室のおよび放射線医学的徴候を用い、決定する。

【 0 2 4 1 】

組換えワクチンに対する患者の免疫反応は、抗 CEA 抗体アッセイ、抗ボックスウイルス抗

10

20

30

40

50

体アッセイ、免疫複合体アッセイ、CEA特異的リンパ球増殖アッセイ、CEA特異的細胞傷害性Tリンパ球アッセイ、ガンマ-インターフェロン放出T細胞アッセイにおけるCEA反応性T細胞の先駆体頻度、ELISPOT、T細胞反応のためのFast Immune、Tetramereアッセイ (Scheibenhogenら, Int. J. Cancer 71:932-936, 1997)、HLAアッセイおよびそれらに匹敵するものを含む、多様な免疫学的アッセイを用い、評価する。処置前および処置後試料の比較を行い、CEA腫瘍抗原に対して向けられる体液性および細胞性免疫反応の発展を立証する。

【0242】

#### 実施例35

##### 組換え鶏痘CEA-hu TRICOMのヒト臨床試験

最初の試験では、 $10^6$  pfuウイルス、 $10^7$  pfuウイルスおよび $10^8$  pfuウイルスの増大する用量の組換え鶏痘CEA hu TRICOMワクチンを、進行したCEA発現腺癌の患者の腫瘍塊に直接注射する。

【0243】

組換えワクチンに対する特異的抗腫瘍および免疫反応を、実施例34に記載されるように決定する。

#### 実施例36

##### 多補助的刺激分子過剰発現樹状細胞により活性化されたTリンパ球のヒト臨床試験

末梢血リンパ球および樹状細胞は、進行した前立腺癌の患者から得る。末梢血リンパ球をCD8+リンパ球に関し濃縮する。樹状細胞を、PSAエピトープの発現および多数の補助的刺激分子の過剰発現を可能にするのに十分な期間、rV-PSAエピトープQVHPQKVTK/B7.1/ICAM-1/LFA-3に感染させる。PSAエピトープ特異的CD8+リンパ球を、これらの処理樹状細胞の存在下で活性化し、そして拡大する。活性化PSAエピトープ特異的CD8+自己Tリンパ球を単独で、そしてPSAエピトープと組み合わせて注射する。処理に対する特異的抗腫瘍およびPSA特異的免疫反応は、実施例34に記載されるものと匹敵する方法により、決定する。

【0244】

本発明の組換えベクター内で、別のTAAをコードする遺伝子でCEAをコードする遺伝子を置き換えることにより、他のTAAを発現する癌患者の治療のための、同様のヒト臨床試験を実施してもよい。

【0245】

#### 実施例37

##### rF-TRICOMに感染したDCを用いた、免疫原性ペプチドおよび/または特異的ペプチドと免疫反応するヒトT細胞に関するスクリーニング

本発明は、腫瘍特異的CTLを活性化するための腫瘍関連抗原を持つウイルスベクターでのDCのex vivo操作を用いた抗癌療法を含む。TRICOM補助的刺激分子と組み合わせたrF-CEAに感染したDCを用い、CEA特異的免疫反応を増大させた。rF-CEA/TRICOMおよびrF-TRICOMに感染したDCのCTL誘導能力を評価する。四量体MHCクラスI CAP-1複合体を用い、CAP-1特異的CTLを視覚化する。本プロトコルは、腫瘍関連抗原、CEAに限定されず、癌、病原性細菌、ウイルス、原生動物、酵母およびそれらに匹敵するものに対する免疫療法のため、いかなる抗原性ペプチドまたはその免疫原性エピトープでもよいものに関する抗原特異的免疫反応を引き出すよう、修飾してもよい。さらに、該方法を修飾し、天然タンパク質、組換えタンパク質、合成タンパク質、または各々由来の断片、コンビナトリアル・ライブラリー、およびそれらに匹敵するものなどの供給源から免疫原性ペプチドをスクリーニングし、そして同定してもよい。

【0246】

#### 材料および方法

##### 細胞培養

結腸直腸癌細胞株SW1463 (HLA-A1, 2)、LS174T (HLA-A2, -) は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (メリーランド州マナサス) から購入した。培養はマイコプラズマを含まず、そして完全培地 (10% ウシ胎児血清、2 mM グルタミン、100単位/ml ペ

10

20

30

40

50

ニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン (Life Technologies, Inc., ニューヨーク州グランドアイランド) を補ったDMEM (Life Technologies, Inc.) 中で維持した。C1R細胞株は、ヒト血漿白血球細胞株であり、内因性HLA-AまたはB抗原を発現しない (Storkus, W. J. ら, J. Immunol. 138 (6) : 1657-1659, 1987)。C1R-A2細胞は、トランスフェクションされたHLA-A2.1のゲノムクローンを発現するC1R細胞である (Hogan, K. T. ら, J. Exp. Med. 168 (2) : 725-736, 1988)。これらの細胞は、William E. Biddison博士 (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, NIH、メリーランド州ベセスダ) から得た。C1R-A2培養は、マイコプラズマを含まず、そしてRPMI 1640完全培地 (Life Technologies, Inc.) 中で維持した。CAP-1エピトープに対して向けられるCTL株、V8T細胞株は、rV-CEAを用いた第I相試験に登録した、転移性結腸癌を持つ患者から樹立した (Tsang, K. Y. ら, Clin. Cancer Res. 3 (12) : 2439-2449, 1997)。V8T細胞は、10%ヒトAB血清およびIL-2 (National Cancer Institute, Surgery Branchより供給、20単位/ml) を含むRPMI 1640完全培地中で培養した。V8T細胞は、エフェクター細胞対APC比1:3で先に再刺激した後、第16日にCAP-1ペプチド (25 µg/ml) で再刺激した。放射線照射 (23, 000ラド) 自己EBV形質転換B細胞をAPCとして用いた。

【0247】

#### 末梢血単核細胞由来のDCの培養

末梢血単核細胞 (PBMC) は、rV-CEAおよびALVAC-CEAの組み合わせを用いた第I相試験に登録した、転移性骨盤癌を持つ患者 (#15) 由来のヘパリン処理血から得た。患者材料を含むすべての実験は、NIHガイドラインにしたがって実施し、そして書面のインフォームド consentをすべての個人から得た。以前記載されるような (Boyum, A. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 97 : 51-76, 1968)、リンパ球分離培地勾配 (Organon Teknika、ノースカロライナ州ダーラム) を用い、PBMCを分離した。DCは、Sallustoら (Sallusto, F. ら, J. Exp. Med. 179 (4) : 1109-1118, 1994) に記載される方法の修飾法を用い、調製した。PBMC ( $1.5 \times 10^8$ ) を、2 mM グルタミン、50 µg/ml ストレプトマイシン、10 µg/ml ゲンタマイシン (Life Technologies, Inc.) を含むAIM-V培地に再懸濁し、そしてT-150フラスコ (Corning Costar Corp., マサチューセッツ州ケンブリッジ) に付着させた。37 °Cで2時間インキュベーションした後、穏やかにリンスし、非付着細胞を除去した。50 ng/mlの組換えヒトGM-CSF (rhGM-CSF) および0.5 ng/mlの組換えヒトIL-4 (rhIL-4) を含むAIM-V培地中で、付着細胞を6-7日間培養した。培地は、3日ごとに補充した。

【0248】

#### 組換えウイルス、並びにCEA、CEA/TRICOMおよびTRICOMを含むアビボックス (avipox) ウイルスでのDCの感染

CEAの全オープンリーディングフレームをコードする2109 bpのDNA断片は、Kaufmanら (Kaufman, F. ら, Int. J. Cancer 48 (6) : 900-907, 1991) に記載されるように得た。組換えCEAアビボックスウイルス (鶏痘CEA; vCP248) は、Taylorら (Taylor, J. ら, Virology 187 (1) : 321-328, 1992)、Coxら (Cox, W. I. ら, Virology 187 (1) : 321-328, 1992) およびPerkusら (Perkus, M. E. ら, J. Virol. 63 (9) : 3829-3836) に記載される方法を用い、Therion Corpにより供給された。CEAおよびヒトTricom 遺伝子 (rF-CEA-Tricomと称される) および組換えヒト鶏痘-TRICOM (rF-Tricom) をコードする組換えアビボックスウイルスは、本明細書に開示されるように作成した。選択された実験で、野生型鶏痘 (FP-WT) を陰性コントロールとして用いた。DC ( $1 \times 10^6$ ) を、1 mlのOpti-MEM培地 (Life Technologies, Inc.) 中で、37 °Cで、rF TRICOM、rF-CEA、rF-CEA/TRICOM、FP-WTとインキュベーションした。力価測定実験は、感染多重度 (MOI) 40 : 1に等しい  $2 \times 10^7$  プラーク形成単位/mlが、感染DCのおよそ75%でCEAの発現を恒常的に誘導することが可能であったことを示した。感染DCは、50 ng/mlのrhGM-CSFおよび0.5 ng/mlのrhIL-4を含む新鮮な温かいRPMI-1640完全培地10 mlに懸濁し、24時間培養し、そしてその後、続いて、刺激因子として用いた。

【0249】

10

20

30

40

50

ペプチド

96%以上純粋な、CAP-1 (Tsang, K. Y. ら, J. Natl Cancer Inst. 87 (13) : 982-990, 1995)、CEAアミノ酸位571-579 YLSGANLNL、CAP1-6D (Zaremba, S. ら, Cancer Res. 57 (20) : 4570-4577, 1997) YLSGADLNLおよびFluペプチド、インフルエンザマトリックスタンパク質ペプチド58-66 GILGFVTLは、Multiple Peptide System (カリフォルニア州サンディエゴ) により作成された。

【0250】

T細胞株の生成

Tsang ら (Tsang, K. Y. ら, J. Natl Cancer Inst. 87 (13) : 982-990, 1995) に記載されるプロトコルの修飾法を用い、CEA特異的CTLを生成した。未感染DCおよびrF-TRICOM、rF-CEA、またはrF-CEA / TRICOMに感染したDCをAPCとして用いた。CAP-1ペプチドは、最終濃度25 µg / mlで、未感染またはrF-TRICOM感染DCに添加した。その後、自己非付着細胞を、APC対エフェクター比1 : 10でAPCに添加した。その後、5% CO<sub>2</sub>を含む加湿大気中で、37 °Cで3日間、培養をインキュベーションした。その後、ペプチド含有培地を除去した後、培養に、20単位 / mlの濃度で組換えヒトIL-2を7日間補い、IL-2含有培地を3日ごとに補充した。ペプチドでの3日間のインキュベーションおよび7日間のIL-2補充は、1つのIVS周期を構成した。初代培養を第11日にCAP-1ペプチド (25 µg / ml) で再刺激し、次のIVS周期を開始した。放射線照射 (23, 000ラド) 自己EBV形質転換B細胞をAPCとして用いた。CAP-1ペプチドが刺激にないことを除き、rF-CEAまたはrF-CEA / TRICOMに感染したDCをAPCとして用いる場合、CTL生成のため、同様の方法を使用した。

【0251】

ペプチドMHC四量体の構築

ペプチド-MHC複合体は、Altman ら (Altman, J. D. ら, Science 274 (5284) : 94-95, 1996) に記載されるように合成した。簡潔には、<sub>2</sub>ミクログロブリン (<sub>2</sub>M) クローンはGarboczi 博士 (ハーバード大学、マサチューセッツ州ケンブリッジ) (Garboczi, D. N. ら, Proc Natl Acad Sci USA 89 (8) : 3429-3433, 1992) から得て、そしてHLA-A2構築物はImmunotech (Beckman-Coulter、フランス・マルセーユ) から得た。HLA-A2重鎖のCOOH末端へのBirA依存ピオチン化のための15アミノ酸基質ペプチドを含む可溶性HLA-A2分子および<sub>2</sub>Mは、大腸菌中で別個に増殖させ、そして封入体として単離した。HLA-A2および<sub>2</sub>Mを可溶化し、そしてCAP-1またはFlu-M1 58-66ペプチドの存在下で再生した。複合体は、Superdex 200 (Pharmacia、ニュージャージー州ピスカタウェイ) 上のFPLCにより精製した。精製ペプチド-MHC複合体はBirA酵素 (Avidity、コロラド州デンバー) を用いてピオチン化した。四量体は、ピオチン化ペプチド-MHC複合体をフィコエリトリン標識UltraAvidin (Leinco Technologies, Inc.、ミズーリ州ボールウィン) と、モル比4 : 1で混合することにより、産生した。

【0252】

フローサイトメトリー

染色およびT細胞選別 (sorting) : フローサイトメトリー解析およびT細胞選別には、CAP-1-MHC四量体-PEを用いた。四量体染色には上述のものと同様の方法を用いた。CAP-1-MHC四量体-PEは、0.33 µg / 2 × 10<sup>5</sup>細胞の濃度で用いた。細胞は、CAP-1 MHC四量体-PEで、4 °Cで1時間染色し、そしてその後、抗CD8 FITCでさらに1時間染色した。細胞を洗浄し、そしてCellQuestソフトウェア (Becton Dickinson) を用い、Vantage細胞選別装置 (Becton Dickinson) またはFACScan (Becton Dickinson) 上で解析した。選別細胞を先に記載されるように培養し、そして拡大した。UltraAvidin-PEおよびFlu-MHC四量体で染色した細胞を、陰性コントロールとして用いた。

【0253】

細胞傷害アッセイ

標的細胞を、50 µCiの<sup>111</sup>インジウム標識オキシキノリン (Medi-Physics Inc.、イリノイ州アーリントン) で、室温で15分間標識した。100 µlのRPMI-1640完全培地中の標的細胞 (0.3 × 10<sup>4</sup>) を、平底アッセイプレート (Corning Costar, Corp.) の96ウェルの各

10

20

30

40

50

々に添加した。エフェクター細胞を添加する前に、標識標的細胞を5% CO<sub>2</sub>中で、37 °Cで60分間、ペプチドとインキュベーションした。癌細胞株を標的として用いる場合、いかなるペプチドも用いなかった。プールしたヒトAB血清10%を補ったRPMI-1640完全培地100 μlにエフェクター細胞を懸濁し、そして標的細胞に添加した。その後、プレートを5% CO<sub>2</sub>中で、37 °Cで4または16時間インキュベーションした。採取フレーム (Skatron, Inc., バージニア州スターリング) を用い、ガンマ計測のため、上清を採取した。測定は3つ組で行い、そして標準偏差を計算した。特異的溶解は、以下の式 (すべての値はcpm) を用い、計算した :

$$\% \text{溶解} = (\text{観察放出} - \text{自発放出}) / (\text{総放出} - \text{自発放出}) \times 100$$

自発放出は、100 μlのRPMI-1640完全培地を添加したウェルから測定した。総放出可能放射能は、標的を2.5% Triton x-100で処理した後、得た。

【 0 2 5 4 】

#### HLA型決定

HLA表現型決定は、標準的抗体依存微量細胞傷害アッセイおよび明示された抗HLA抗血清団を用い、Blood Bank of the National Institute of Healthにより、行った。V8T細胞株および患者 # 15のクラスI表現型は、それぞれ、HLA-A2, - ; B18 (W6)、44 (12, W4) およびHLA-A2, 28 ; B13 (BW4) , B51 (BW4) ; CW6であった。

【 0 2 5 5 】

#### サイトカイン検出

IL-2不含培地中で、rF-CEA、rF-CEA / TRICOMに感染したDCまたはペプチドパルス処理未感染DCおよびrF-TRICOM感染DCに、多様な反応因子 : 刺激因子比で、24時間曝露されたT細胞の上清を、ELISAキット (R&D Systems、ミネソタ州ミネアポリス) を用い、IFN  $\gamma$  の分泌に関し、スクリーニングした。結果はpg/mlで示した。

【 0 2 5 6 】

#### ELISPOTアッセイ

Scheibenbogenら (Scheibenbogen, C. ら, *Clin Cancer Res* 3 (2) : 221-226, 1997) に記載される方法の修飾法を用い、IFN  $\gamma$  産生を測定し、CAP-1特異的T細胞を決定した。簡潔には、96ウェルMilliliter HAプレート (Millipore Corporation、マサチューセッツ州ベッドフォード) を、10 μg/mlの濃度の、ヒトIFN  $\gamma$  に対する捕捉抗体100 μlで被覆した。室温で24時間インキュベーションした後、10%ヒトプールAB血清を含むRPMI-1640でプレートを30分間ブロッキングした。アッセイしようとする $1 \times 10^5$ 細胞を各ウェルに添加した。CAP-1-6Dパルス処理C1R-A2細胞をAPCとして、エフェクター : APC比1 : 3で各ウェルに添加した。非パルス処理C1R-A2細胞を陰性コントロールとして用いた。HLA-A2結合Fluマトリックスペプチド58-66 (GILGFVFTL) もまた、コントロールとして用いた。反応細胞は、Domino Image Analyzer (Otpomax、ニューハンプシャー州ホリス) を使用し、決定した。

【 0 2 5 7 】

#### 統計解析

平均間の相違の統計解析は、両側t検定を用いて行った。

#### 考察

未処理T細胞が抗原と出会った際、増殖、サイトカイン分泌、およびエフェクター細胞への分化と共に、不活性化、死、および無応答性 (アネルギー) を含む、いくつかの異なる結果の可能性がある。生理学的な条件下での主な結果は、適切な補助的刺激シグナルが反応するT細胞に搬送されるかどうかにより決定される可能性がある (26)。通常、プロフェッショナルAPCの表面上には、少なくとも3つの異なる分子 : B7-1、ICAM-1、およびLFA-3がT細胞活性化に必須のシグナルを提供することが可能であると考えられている。ここで、未処理T細胞活性化における補助的刺激分子の役割を、B7-1、ICAM-1、LFA-3、または3つすべての分子の組み合わせを発現するよう操作されたベクターを利用することにより、調べた。

【 0 2 5 8 】

10

20

30

40

50

いくつかのグループが、T細胞補助的の刺激におけるこれらの分子の2つの協力を調べている。Dubeyらは、B7-1およびICAM-1両方による補助的の刺激が未処理T細胞活性化に欠くことができないと報告しており(26)、一方、Cavalloらは、抗腫瘍記憶反応を確立するにはB7-1およびICAM-1が腫瘍細胞により同時発現されていなければならないと決定した(27)。さらに、B7-1およびLFA-3による補助的の刺激が、T細胞増殖およびサイトカイン産生両方に際し、付加的に作用することが示されてきている(6、23、24)。これらの以前の研究は、2つの補助的の刺激分子およびレトロウイルスベクターを用いて行われた。1つの遺伝子を標的細胞株に形質導入し、薬剤選択し、そしてその後、第二の組換えレトロウイルス構築物を再び形質導入し、その後、異なる剤で選択した。この方法は、しばしば、何週間または何ヶ月間を要する。組換えボックスウイルスベクターを利用することにより、感染5時間後に3つの補助的の刺激分子の同時発現を達成することが可能である。rV-B7-1 / ICAM-1 / LFA-3またはrF-CEA / B7-1 / ICAM-1 / LFA-3いずれかに感染したin vitro MC38細胞は、いかなる単一の補助的の刺激分子の遺伝子を含むベクターに感染したMC38細胞よりも、はるかに高い度合いで、T細胞増殖を亢進することが示された。さらに、補助的の刺激分子の組み合わせによりT細胞に搬送される第二のシグナルの相対強度は、いかなる単一の補助的の刺激分子を発現するMC38細胞により搬送されるものより、数倍(>6倍)高いようであった。Dubeyらは、B7-1およびICAM-1を用い、低い刺激因子対T細胞比で、中程度ないし強い相乗作用が見られることを示した(26)。我々の研究はこれらの知見を確認する。しかし、非常に低い刺激細胞対T細胞比または弱いシグナル-1(0.625 μg/ml Con A)では、2遺伝子構築物(rV-B7-1 / ICAM-1)は、増殖に対しあるとしてもわずかな影響しか持たなかった；対照的に、3つ組構築物(rV-B7-1 / ICAM-1 / LFA-3)を介した刺激は、増殖に対し、実質的および統計的に有意な影響を有した。多遺伝子構築物(rV-B7-1、ICAM-1、LFA-3)を介した刺激の主な影響は、CD4<sup>+</sup>細胞からのIL-2同化およびCD8<sup>+</sup>細胞からのIFN 同化であり、一方、2型サイトカインは、あるとしても少量しか産生されなかった。RNアーゼ保護によるサイトカイン発現解析は、in vitroサイトカインアッセイと適合したプロフィールを提供し、いかなるものでもよい単一の補助的の刺激分子による刺激に比較し、すべての3つの補助的の刺激分子で刺激されたCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞両方において、有意により高いIL-2およびIFN- 発現が示された。これらのデータは、低いCD28補助的の刺激の背景で、T細胞は低レベルのIL-1を産生するが、強いCD28補助的の刺激は、IL-2、IFN- およびIL-13の産生を支持することを立証した先の研究と一致する(28)。さらに、T細胞のIFN- 合成の制御において、IL-13がIL-2と相乗作用することが報告されてきている(29)。興味深いことに、我々の結果は、MC38 / B7-1 / ICAM-1 / LFA-3でのCD4<sup>+</sup> T細胞の刺激が高レベルのIL-2およびIFN- 発現を生じ、IL-13のいくぶん増加した発現を生じるというこの観察を支持する。さらに、MC38 / B7-1 / ICAM-1 / LFA-3での刺激に際し、CD4<sup>+</sup> T細胞において、IL-9発現がさらに亢進することが注目された。我々の研究で注目された、IL-2の上方制御と関連したIL-9の発現増加は、IL-9の最適産生が、IL-2により制御されることを立証した、以前の研究と一致する(30)。総合すると、これらの結果は、最適未処理T細胞反応は、以前考えられていたよりも、より高いレベルの補助的の刺激を必要とし、そしてこれは3つの補助的の刺激分子を組み合わせた作用により提供することが可能であることを示唆する。

#### 【0259】

おそらく、最も研究されているT細胞補助的の刺激分子はB7-1である。本分子がT細胞活性化を亢進する能力は、レトロウイルスベクター、抗CTLA-4抗体、およびボックスウイルスベクターを用い、よく確立されている。ここに報告される研究は、単一の補助的の刺激分子によるT細胞活性化の順序を、B7-1 > ICAM-1 > LFA-3と段階付ける。しかし、3つの補助的の刺激分子の使用は、T細胞増殖およびサイトカイン産生両方において、B7-1単独または第二の補助的の刺激分子と組み合わせたB7より、はるかに優れていた。

#### 【0260】

理論に束縛されるわけではないが、B7-1、ICAM-1およびLFA-3の間の効率的な協力には、いくつかの可能な機構がある。ICAM-1 / LFA-3相互作用は、TCR結合により生成されるのと

10

20

30

40

50

同じ細胞内第二メッセンジャーの増加を維持することにより、TCRが仲介するT細胞活性化を補助的刺激すると報告される。本観察は、ICAM-1によるLFA-1の結合が、CD3 / TCR複合体を介して搬送されるシグナルを亢進することにより、T細胞を補助的刺激することを示唆する(6)。ICAM-1 / LFA-1相互作用は、T細胞上のIL-2R-アルファ鎖およびCD28の発現を上方制御するのに必要であり、これはT細胞にIL-2およびB7-1補助的刺激に反応する能力を与えるのに必要である。一方、B7-1 / CD28相互作用は、IL-2および他の免疫制御リンホカインの発現を転写的におよび転写後的に増加させる、TCR独立補助的刺激シグナルを搬送する。LFA-3 / CD2相互作用は、いくつかの細胞内第二メッセンジャーのチロシンリン酸化、Ca<sup>2+</sup>動員、およびcAMP産生を誘導し、多様なサイトカイン、特にIL-2およびIFN- $\gamma$ の同化を生じる(6)。したがって、3つの補助的刺激分子は、T細胞の抗原依存活性化と共に、オートクリンおよびパラクリン増殖因子の産生および該増殖因子に対する反応を亢進することにより、協力する可能性があるようである。

10

## 【0261】

結論として、本発明は、初めて、3つまたはそれ以上の補助的刺激分子を細胞に導入し、そしてCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞集団両方を、これらの補助的刺激分子の1つまたは2つを用いた場合達成されるものより、はるかに高いレベルに、迅速にそして効率的に活性化するベクターの能力を立証する。T細胞活性化のこの新たな閾値はワクチン設計および開発に広い関連を有する。

## 【0262】

DCに対する3つ組の補助的刺激分子の影響は、完全に期待されないものであった。DCは、当業者に最も強力なAPCとして知られる。本発明に示されるデータは、DCを「Tricom」ベクターに感染させた際、T細胞を活性化するその能力が劇的に増加することを立証する。これらの研究は、DCが最も強力なAPCではないことを初めて立証する。

20

## 【0263】

## 参考文献

1. Hellstrom, K. E., Chen, L. & Hellstrom, I. (1996) *Cancer Chemother Pharmacol* 38, S40-1.
2. Damle, N. K., Klussman, K., Linsley, P. S. & Aruffo, A. (1992) *J Immunol* 148, 1985-92.
3. Green, J. M., Zheng, X. G., Shimizu, Y., Thompson, C. B. & Turka, L. A. (1994) *Eur J Immunol* 24, 265-72.
4. Guinan, E. C., Gribben, J. G., Boussiotis, V. A., Freeman, G. J. & Nadler, L. M. (1994) *Blood* 84, 3261-82.
5. Hodge, J. W., McLaughlin, J. P., Abrams, S. I., Shupert, W. L., Schlom, J. & Kantor, J. A. (1995) *Cancer Res* 55, 3598-603.
6. Wingren, A. G., Parra, E., Varga, M., Kalland, T., Sjogren, H. O., Hedlund, G. & Dohlsten, M. (1995) *Crit Rev Immunol* 15, 235-53.
7. Parra, E., Wingren, A. G., Hedlund, G., Sjogren, H. O., Kalland, T., Sansom, D. & Dohlsten, M. (1993) *Scand J Immunol* 38, 508-14.
8. Harding, F. A. & Allison, J. P. (1993) *J Exp Med* 177, 1791-6.
9. Hellstrom, K. E., Hellstrom, I., Linsley, P. & Chen, L. (1993) *Ann N Y Acad Sci* 690, 225-30.
10. Hodge, J. W., Abrams, S., Schlom, J. & Kantor, J. A. (1994) *Cancer Res* 54, 552-5.
11. Uzendoski, K., Kantor, J. A., Abrams, S. I., Schlom, J. & Hodge, J. W. (1997) *Hum Gene Ther* 8, 851-60.
12. Lorenz, M. G. O., Kantor, J. A., Schlom, J. & Hodge, J. W. (1998) *Human Gene Therapy In Press*.
13. Gritz, L., Destree, A., Cormier, N., Day, E., Stallard, V., Caiazzo, T., Mazza, G. & Panicali, D. (1990) *J Virol* 64, 5948-57.

30

40

50

14. Mazzara, G. P., Destree, A. & Mahr, A. (1993) *Methods Enzymol* 217, 557-81.
15. Jenkins, S., Gritz, L., Fedor, C. H., O'Neill, E. M., Cohen, L. K. & Panicali, D. L. (1991) *AIDS Res Hum Retroviruses* 7, 991-8.
16. Chakrabarti, S., Sisler, J. R. & Moss, B. (1997) *BioTechniques* 23, 1094-7.
17. Perkus, M. E., Piccini, A., Lipinskas, B. R. & Paoletti, E. (1985) *Science* 229, 9814.
18. Schmitt, J. F. & Stunnenberg, H. G. (1988) *J Virol* 62, 1889-97.
19. Venkatesan, S., Baroudy, B. M. & Moss, B. (1981) *Cell* 25, 805-13.
20. Fox, B. A., Spiess, P. J., Kasid, A., Puri, R., Mule, J. J., Weber, J. S. & Rosenberg, S. A. (1990) *J Biol Response Mod* 9, 499-511. 10
21. Abrams, S. I., Dobrzanski, M. J., Wells, D. T., Stanziale, S. F., Zaremba, S., Masuelli, L., Kantor, J. A., Schlom, J. & Masuelle, L. (1995) *Eur J Immunol* 25, 2588-97.
22. Sabzevari, H., Propp, S., Kono, D. H. & Theofilopoulos, A. N. (1997) *Eur J Immunol* 27, 1901-10.
23. Parra, E., Wingren, A. G., Hedlund, G., Bjorklund, M., Sjogren, H. O., Kalland, T., Sansom, D. & Dohlsten, M. (1994) *J Immunol* 153, 2479-87.
24. Parra, E., Wingren, A. G., Hedlund, G., Kalland, T. & Dohlsten, M. (1997) *J Immunol* 158, 637-42.
25. Sperling, A. I., Auger, J. A., Ehst, B. D., Rulifson, I. C., Thompson, C. B. & Bluestone, J. A. (1996) *J Immunol* 157, 3909-17. 20
26. Dubey, C., Croft, M. & Swain, S. L. (1995) *J Immunol* 155, 45-57.
27. Cavallo, F., Martin-Fontecha, A., Bellone, M., Heltai, S., Gatti, E., Tornaghi, P., Freschi, M., Forni, G., Dellabona, P. & Casorati, G. (1995) *Eur J Immunol* 25, 1154-62.
28. Delespesse, G., Yang, L. P., Ohshima, Y., Demeure, C., Shu, U., Byun, D. G. & Sarfati, M. (1998) *Vaccine* 16, 1415-9.
29. Minty, A., Chalon, P., Derocq, J. M., Dumont, X., Guillemot, J. C., Kaghad, M., Labit, C., Leplatois, P., Liauzun, P., Miloux, B. & et al. (1993) *Nature* 362, 248-50. 30
30. Schmitt, E., Germann, T., Goedert, S., Hoehn, P., Huels, C., Koelsch, S., Kuhn, R., Muller, W., Palm, N. & Rude, E. (1994) *J Immunol* 153, 3989-96.
31. Chakrabarti, S., Brechling, K. and Moss, B (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3403-3409.
32. Chakrabarti, S., Sisler, J.R., and Moss, B. (1997) *BioTechniques* 23:1094-1097.
33. Gillard, S., Spehner, D., Drillien, R., and Kirn, A. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5573-5577.
34. Morgan, J.R, and Roberts, B.E. (1994) *J. Virol.* 51:283-297.
35. Panicali, D., Grzelecki, A., and Huang, C. (1986) *Gene* 47:193-199. 40
36. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., eds. *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
37. Schmitt, J.F.C. and Stunnenberg, H.G. (1988) *J. Virol.* 62:1889-1897.
38. Smith, K., Stallard, V., Ross, J., Hart, C., Cormier, N., Cohen, L., Roberts, B., and Payne, L. (1993) *Vaccine* 11:43-53.
39. Venkatesan, S., Baroudy, B.M., and Moss, B. (1981) *Cell* 125:805-813.
40. Bacchetti, S. and Graham, F.L. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 74:1590-1594, 1977.
41. Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S. & Steinman, R.M. (1992) J. Exp. Med. 176, 1693-702. 50

42. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. (1994) J. Exp. Med. 179, 1109-8.  
 43. Fields, R.C., Osterholzer, J. J., Fuller, J.A., Thomas, E.K., Geraghty, P.J. & Mule, J.J. (1998) J. Immunother. 21, 323-39.  
 44. Zaremba et al Cancer Res. 57:4570-4577, 1997.  
 45. Gong, J. et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6279-6283, 1998.  
 46. Correale, P. et al 1998, J Immunol. 161(6):3186-94.

【図面の簡単な説明】

本発明のこれらおよびその他の目的、特徴、および、附随する多くの利点は、発明の詳細な説明を読むことで、より良く理解されるだろう。

【図 1】 ワクシニアゲノムのHind III M領域部分に隣接された (flanked by) マウスLFA-3、ICAM-1およびB7.1をコードする核酸配列を含むプラスミドpT5032のゲノム構造。

10

【図 2】 ワクシニアゲノムのHind III J領域部分に隣接されたマウスLFA-3、ICAM-1、B7.1およびlacZ遺伝子をコードする核酸配列を含むプラスミドpT5047のゲノム構造。

【図 3】 ワクシニアゲノムのHind III M領域部分に隣接されたマウスLFA-3、ICAM-1およびB7.1をコードする核酸配列、および、CEAをコードする核酸配列を含むプラスミドpT5031のゲノム構造。

【図 4】 三つのマウス共刺激分子と共に、腫瘍関連抗原を発現する (図4C)、または、発現しない (図4AおよびB)、組換えワクシニアウイルスのゲノム構造。図4Aは、組換えワクシニアvT171のゲノム構造を示す。図4Bは、組換えワクシニアvT199のゲノム構造を示す。図4Cは、組換えワクシニアvT172のゲノム構造を示す。Hind III Mおよび、Hind III Jは、ボックスウイルスゲノムにおける外来遺伝子挿入部位である。プロモーター30K、I3、sE/L、7.5K、40KおよびCIはボックスウイルスのプロモーターである。挿入配列中のBam HIおよびHind III制限部位を、各部位の上の括弧内に記載の、挿入部の5'端 (0) から各部位までの距離 (kbp) (縮尺どおりに書かれていない) と共に示す。

20

【図 5】 鶏痘ウイルスゲノムのBamHI J領域部分に隣接されたマウスB7.1、LFA-3、ICAM-1およびlacZ遺伝子をコードする核酸配列を含む、プラスミドpT8001のゲノム構造。

【図 6】 鶏痘ウイルスゲノムのBamHI J領域部分に隣接された、腫瘍関連抗原、CEAおよび、マウスB7.1、LFA-3、および、ICAM-1、コードする核酸配列を、lacZ遺伝子と組み合わせて含む、プラスミドpT5049のゲノム構造。

【図 7】 図7Aから7D。腫瘍関連抗原 (TAA) と共に (図7B、7Cおよび7D) または、なしで (図7A)、三つのマウス共刺激分子を発現する、組換え鶏痘ウイルスのゲノム構造。図7Aは、組換え鶏痘vT222のゲノム構造を示す。図7Bは、組換え鶏痘vT194のゲノム構造を示す。図7Cは、MUC-1、B7.1、ICAM-1およびLFA-3を発現する組換え鶏痘のゲノム構造を示す。図7Dは、腫瘍関連抗原、B7.1、ICAM-1およびLFA-3を発現する組換え鶏痘のゲノム構造を示す。BamHI Jは、鶏痘ウイルスゲノム中の外来遺伝子挿入部位である。sE/L、I3、7.5K、CI、40Kおよび30Kはボックスウイルスプロモーターである。P1-P5は五つの異なるボックスウイルスプロモーターを示す。挿入配列中のBam HIおよびHind III制限部位を、各部位の上の括弧内に記載の、挿入部の5'端 (0) から各部位までの距離 (kbp) (縮尺どおりに書かれていない) と共に示す。

30

【図 8】 ワクシニアゲノムのHind III J領域部分に隣接された、ヒトLFA-3、ヒトICAM-1、ヒトB7.1およびlacZ遺伝子をコードする核酸配列を含む、プラスミドpT5064のゲノム構造。

40

【図 9】 腫瘍関連抗原と共に (図9B、C) または、なしで (図9A)、lacZ遺伝子と共に三つのヒト共刺激分子LFA-3、ICAM-1、および、B7.1を発現する組換えボックスウイルスのゲノム構造。Hind III Jはワクシニアウイルスゲノムにおける外来遺伝子挿入部位である。BamHI Jは鶏痘ウイルスゲノムにおける挿入部位である。30K、I3、sE/L、40KおよびCIは、ボックスウイルスのプロモーターである。挿入配列中のBgl IIおよびHind III制限部位を、各部位の上の括弧内に記載の、挿入部の5'端 (0) から各部位までの距離 (kbp) (縮尺どおりに書かれていない) と共に示す。

【図 10】 ワクシニアゲノムのHind III J領域部分に隣接された、CEA (6D) およびヒ

50

トLFA-3、ICAM-1、B7.1およびE. coli lacZ遺伝子をコードする核酸配列を含むプラスミドpT8016のゲノム構造。

【図11】 CEA(6D)および、三つのヒト共刺激分子を発現する、組換えワクシニアウイルスvT238のゲノム構造。HindIII Jは、ボックスウイルスゲノムにおける外来遺伝子挿入部位である。40K、30K、I3、sE/L、およびC1は、ボックスウイルスのプロモーターである。

【図12】 鶏痘ゲノムのBamHI J領域部分に隣接された、マウスLFA-3、ICAM-1、B7.1およびE. coli lacZ遺伝子をコードする核酸配列を含むプラスミドpT8019のゲノム構造。

【図13】 マウスあるいはヒトの共刺激分子を発現する、組換え鶏痘ウイルスのゲノム構造。図13Aは、組換え鶏痘vT251のゲノム構造を示す。図13Bは、組換え鶏痘vT232のゲノム構造を示す。BamHI Jは、鶏痘ゲノムにおける外来遺伝子挿入部位である。30K、I3、sE/LおよびC1はボックスウイルスのプロモーターである。

【図14】 鶏痘ゲノムのBamHI J領域部分に隣接された、ヒトLFA-3、ICAM-1、B7.1およびE. coli lacZ遺伝子をコードする核酸配列を含むプラスミドpT5072のゲノム構造。

【図15】 鶏痘ゲノムのBamHI J領域部分に隣接された、MUC-1、マウスLFA-3、ICAM-1、B7.1およびE. coli lacZ遺伝子をコードする核酸配列を含むプラスミドpT8020のゲノム構造。

【図16】 少なくとも一つの腫瘍関連抗原と共に、マウスあるいはヒトの共刺激分子を発現する組換え鶏痘ウイルスのゲノム構造。図16Aは組換え鶏痘vT250のゲノム構造を示す。図16Bは組換え鶏痘vT242のゲノム構造を示す。図16Cは組換え鶏痘vT236のゲノム構造を示す。図16Dは組換え鶏痘vT257のゲノム構造を示す。BamHI Jは、ボックスウイルスゲノム中の外来遺伝子挿入部位である。40K、7.5K、30K、I3、sE/L、および、C1はボックスウイルスのプロモーターである。

【図17】 鶏痘ゲノムのBamHI J領域部分に隣接された、MUC-1、ヒトLFA-3、ICAM-1、B7.1およびE. coli lacZ遺伝子をコードする核酸配列を含むプラスミドpT2186のゲノム構造。

【図18】 鶏痘ゲノムのBamHI J領域部分に隣接された、CEA(6D)、ヒトLFA-3、ICAM-1、B7.1およびE. coli lacZ遺伝子をコードする核酸配列を含むプラスミドpT2187のゲノム構造。

【図19】 鶏痘ゲノムのBamHI J領域部分に隣接された、PSA、PSMA、ヒトLFA-3、ICAM-1、B7.1、およびE. coli lacZ遺伝子をコードする核酸配列を含むプラスミドpT5080のゲノム構造。

【図20】 MVAゲノムの欠損III領域部分に隣接された、マウスLFA-3、ICAM-1、B7.1およびE. coli lacZ遺伝子をコードする核酸配列を含むプラスミドpT5085のゲノム構造。

【図21】 腫瘍関連抗原と共に、または、なしで、マウスあるいはヒトの共刺激分子を発現する、組換えMVAウイルスのゲノム構造。図21Aは、組換えMVA vT264のゲノム構造を示す。図21Bは、組換えMVA vT260のゲノム構造を示す。欠損IIIは、ボックスウイルスゲノム中の外来遺伝子挿入部位である。40K、7.5K、30K、I3、sE/L、および、C1はボックスウイルスのプロモーターである。

【図22】 MVAゲノムの欠損III領域部分に隣接された、PSA、PSMA、ヒトLFA-3、ICAM-1、B7.1、およびE. coli lacZ遺伝子をコードする核酸配列を含むプラスミドpT5084のゲノム構造。

【図23】 組換えウイルス感染による共刺激分子の表面発現。MC38腫瘍細胞を示されたウイルスで5 MOI (multiplicity of infection; pfu/細胞) で、5時間感染させた。感染後、細胞を共刺激分子特異的な、FITCラベルされたモノクローナル抗体 (MAb) を用いて、免疫染色した。影をつけた領域は特異的MAbの蛍光強度であり、一方、影のついていない領域は適当なアイソタイプの対照抗体の蛍光強度である (材料および方法を参照)。

【図24】 複数の共刺激分子のT細胞増殖への効果。第一のシグナルを与えるための、様々な濃度のCon A存在下、マウスナイーブT細胞を組換えワクシニア (図24A) または組換え鶏痘 (図24B) ベクターのいずれかを感染させたMC38刺激細胞と共培養した。組換え

10

20

30

40

50

ベクターは、野生型（すなわち、V-WyethまたはWT-FP [白抜き四角]）、rV-LFA-3（黒三角）、rV-ICAM-1またはrF-ICAM-1（黒丸）、rV-B7-1またはrF-B7-1（黒菱形）、および、rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3またはrF-CEA/B7-1/ICAM-1/LFA-3（黒四角）である。未感染のMC38細胞は白抜き丸である。増殖アッセイは材料および方法に記載の通りである。

【図25】 組換えワクシニアウイルスにより伝えられる共刺激の特異性。Con A存在下、T細胞と、白抜き丸で示される、V-Wyeth（図25A）、rV-B7-1（図25B）、rV-ICAM-1（図25C）、および、rV-LFA-3（図25D）で感染させたMC38刺激細胞と共培養した。共刺激分子特異的なMab存在下で感染させた刺激細胞は黒丸で示されており、また、アイソタイプの対照抗体は黒三角で示されている。

【図26】 T細胞増殖のための第二のシグナルを伝えるための、B7-1、ICAM-1、LFA-3およびこれら共刺激分子三つ全ての共発現の相対的な能力。Con A存在下（2.5 g/ml）、100,000 T細胞を10,000 MC38細胞と共培養した。一つあるいは全ての共刺激分子を発現している刺激MC38細胞を、V-Wyeth感染細胞と様々な割合で組み合わせて全量で $10^4$  MC38細胞/ウェルとなるように、ウェルに加えた。MC38細胞をV-Wyeth（白抜き丸）、rV-LFA-3（黒三角）、rV-ICAM-1（黒丸）、rV-B7-1（黒菱形）、または、rV-B7-1-ICAM-1-LFA-3（黒四角）で感染させた。細胞を48時間共培養した。最後の18時間にT細胞増殖を測るため、 $^3\text{H}$ -チミジンを加えた。はめ込んだパネルは、3%のMC38刺激細胞が、示したベクターに感染している培養から得られる、増殖の値を示す。つまり、この実験において、T細胞に対する刺激細胞の最終割合は0.003であった。これらの条件下では、rV-B7/ICAM/LFA-3と比べて、rVB7.1/ICAMの方が比較的效果が弱いことに注意せよ。

【図27】 特異的T細胞ポピュレーションへの共刺激の効果。マウスCD4<sup>+</sup>（図27A）あるいはCD8<sup>+</sup> T細胞（図27B）を、様々な濃度のCon A存在下、未感染MC38細胞（白抜き丸）、あるいは、V-Wyeth（白抜き四角）、rV-LFA-3（黒三角）、rV-ICAM-1（黒丸）、rV-B7-1（黒菱形）またはrV-B7-1/ICAM-1/LFA-3（黒四角）を感染させた細胞と、10:1の比で、48時間共培養した。最後の18時間にT細胞増殖を測るため、 $^3\text{H}$ -チミジンを加えた。図27Cおよび27Dは、低濃度のCon A（0.625  $\mu\text{g/ml}$ ）において、ベクターを感染させたMC38刺激細胞存在下、共培養した場合、精製したCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>細胞の増殖応答をそれぞれ示す。

【図28】 サイトカイン産生への共刺激の効果。マウスCD4<sup>+</sup>（図28Aおよび28C）またはCD8<sup>+</sup>（図28Bおよび28D）T細胞は、材料および方法に記載の通り精製され、また、示されたMC38ベクター感染刺激細胞と、2.5  $\mu\text{g/ml}$  Con A存在下、共培養した。上清液を、捕捉（capture）ELISAにより、IL-2（図28Aおよび図28B）、および、IFN-（図28Cおよび図28D）の産生を分析した。

【図29】 サイトカインRNA発現への共刺激の効果。図29A：マウスCD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup> T細胞をV-Wyeth（レーンA）、rV-B7-1（レーンB）、rV-ICAM-1（レーンC）、rV-LFA-3（レーンD）またはrV-B7-1/ICAM-1/LFA-3（レーンE）を感染させたMC38刺激細胞と、T細胞対刺激細胞比、10:1で24時間、2.5pg/ml Con A存在下、共培養した。培養後、T細胞RNAをマルチプローブRNAseプロテクションアッセイにより分析した。図29B（CD4<sup>+</sup>細胞）および、図29C（CD8<sup>+</sup>細胞）において、オートラジオグラフによる結果の定量的表示は、ハウスキーピング遺伝子L32の発現により標準化した。ヒストグラムバーの順序（左から右）は、MC38/V-Wyeth、MC38/B7-1、MC38/ICAM-1、MC38/LFA-3、およびMC38/B7-1/ICAM-1/LFA-3である。

【図30】 C57BL/6マウス（5/群）にHBSS（黒四角）を投与、あるいは、 $10^7$  pfu rV-CEA（黒三角）またはrV-CEA/TRICOM（黒丸）を接種した。100日後、 $1 \times 10^6$ のCEA発現MC38癌細胞を接種し、生存をモニターした。CEA/TRICOM群以外の全てのマウスでは腫瘍が成長しており、また、腫瘍の長さあるいは幅が20mmを超えた場合、または、マウスが瀕死の場合、屠殺した。図30：二番目の実験では、C57BL/6マウス（5/群）に $10^7$  pfu rV-CEA、rV-CEA/B7.1、rV-CEA/TRICOMまたはHBSSパufferを接種した。接種22日後にプールした脾臓T細胞により、リンパ球増殖応答を解析した。値は、培地に対して、3回の同一条件の平均cpmの刺激インデックスを示す。標準偏差は、10%を超えることはなかった。抗原は、Con A（5  $\mu\text{g/ml}$ ）、CEA（100  $\mu\text{g/ml}$ ）およびオボアルブミン（100  $\mu\text{g/ml}$ ）を使用した。

10

20

30

40

50

【図31】 図31はin vitroにおける樹状細胞の共刺激アッセイの概略図を示した。

【図32】 図32Aおよび32Bは、Con A存在下、rV-B7/ICAM-1/LFA-3を感染させた前駆DC、または、(未感染の、すなわち、CD 34<sup>+</sup>細胞をGM-CSF +IL-4で6日間処理した) DCにより刺激された、ナイーブCD4<sup>+</sup>(図32A)またはナイーブCD8<sup>+</sup>(図32B) T細胞の増殖応答を示す。

【図33】 図33Aおよび33Bは、rV-B7/ICAM-1/LFA-3を感染させた前駆DC、あるいは、rV-B7/ICAM-1/LFA-3またはV-Wyeth(対照)を感染させたDCにより刺激された、ナイーブCD4<sup>+</sup>(図33A)またはナイーブCD8<sup>+</sup>(図33B) T細胞の増殖応答を示す。

【図34】 図34は、Balb/C脾臓細胞対、25 MOIのV-WyethまたはrV TRICOMを感染させ、放射線照射したC57bl/6樹状細胞の、混合リンパ球反応(MLR)を示す。<sup>3</sup>H-チミジンは3日目にパルスし、4日目に回収した。DC(白、未感染)、DC(ドット、V-Wyeth感染)、DC(斜線、rV-TRICOM感染)である。

【図35】 図35は、rV-TRICOMで感染させペプチドパルスしたDCで刺激後5日目に回収し、2日間(APCまたはペプチドなしで)10 u/ml IL2中に置いた、様々なAPC比での応答T細胞(CEAペプチド8特異的なCAP-M8 T細胞株)の増殖応答を示す。アッセイにおいてペプチド8-(EAQNTTYL)の終濃度は1 ug/mlである。<sup>3</sup>H-チミジンは2日目に加え、T細胞は3日目に回収した。0=DC(v-Wyeth)-pepおよび、=DC(rV-TRICOM)-pepの結果はベースラインである。

【図36】 マウス樹状細胞(DC)のポックスウイルス感染の効率。DCに、25 MOIのrV-TRICOMまたは50 MOIのrF CEA/TRICOMを5時間感染させた。TRICOMベクターを感染させたDCは、ナイーブT細胞を刺激する能力の増強を示した。すべてのDC集団はT細胞と10:1の割合で、シグナル1を与える異なる濃度のCon A存在下、48時間共培養した。<sup>3</sup>H-チミジンを最後の18時間の間、加えた。図36A:未感染DC(黒四角)、モック感染DC(黒菱形)、または、V-WT(黒逆三角)、rV-B7.1(白抜き三角)またはrV-TRICOM(白抜き丸)を感染させたDC。図36B:DC(黒四角)、モック感染DC(黒菱形)、または、WT-FP(黒逆三角)、rF-B7.1(白抜き三角)またはrF TRICOM(白抜き丸)を感染させたDC。

【図37】 ワクシニア(図37A、C、E)または鶏痘(図37B、D、F)ベクターを感染させたDCによる、同種刺激活性の増強。未感染DC(黒四角);モック感染DC(黒菱形);または、野生型鶏痘ベクター(V-WTあるいはF-WT、黒逆三角)、rV-B7.2またはrF-B7.1(白抜き三角)、またはrV-TRICOMあるいはrF-TRICOM(白抜き丸)を感染させたDCを同種(図37A-D)あるいは同系T細胞(図37E-F)と、5日間共培養した。<sup>3</sup>H-チミジンは最後の18時間に加えた。

【図38】 ペプチド特異的T細胞増殖におけるDCのワクシニア感染の効果。未感染DC(黒四角)、または、V-WT(黒逆三角)、rV-B7.1(白抜き三角)またはrV-TRICOM(白抜き丸)感染DCをOVAペプチド特異的T細胞(図38A、C、E)またはCAP-M8ペプチド特異的T細胞(図38B、D、F)と共培養した。実験条件は、様々な濃度の適するペプチド(図38A-D)、負の対照ペプチド(白抜き四角)、VSVN(図38A)、またはFLU-NP(図38B)のどちらかの存在下、固定化した10:1のエフェクター:刺激細胞比、あるいは、様々なエフェクター:刺激細胞比での存在下、1 μMに固定化したペプチド濃度(図38EおよびF)を含んだ。

【図39】 TNF- またはCD40で成熟化させたDCへのrV-TRICOM感染の効果。DC(黒四角)、または、培養の最後の24時間、100 ng/mlのTNF-(白抜き三角)、または5 μg/mlのCD40 mAb(白抜き丸)のどちらかと共に培養したDCを用いて、CAP-M8特異的エフェクターT細胞を刺激した(図39A)。25 MOI rV-TRICOMを感染させた後の、これらDC集団に対するCAP-M8 T細胞の増殖(図39B)。すべてのパネルについて、T細胞:DC比は10:1であり、一方、CAP-M8ペプチド濃度は1 μg/mlであった。黒丸は1 μg/mlのVSVNペプチド存在下、全てのDC集団に刺激された、CAP-M8 T細胞の増殖を示す。

【図40】 CTL活性の誘導に対するDCへのワクシニア感染による効果。DC(図40B)、または、V-WT(図40C)、あるいはrV-TRICOM(図40D)を感染させたDCを10 μM OVAペプチドで2時間パルスした。DC集団をマウスに静脈内投与した(1 × 10<sup>5</sup>細胞/マウス)。対照マウスにはRibi/Detoxアジュバントを用いて100 μgのOVAペプチドを皮下に免疫した(図40A)

10

20

30

40

50

。14日後、脾臓を回収し、相当するペプチドで6日間再刺激し、そして、OVA（黒四角）またはVSVNペプチド（白抜き四角）のどちらかでパルスしたEL-4細胞に対する溶菌能を調べた。書き入れた数は、溶菌単位で表現したCTL活性を示す。CTL活性の誘導に対するDCへのワクシニア感染による効果もまた示す。DC（図40F）、または、V-WT（図40G）、またはrV-TRICOM（図40H）を感染させたDCを10  $\mu$ M CAP-M8ペプチドで、2時間パルスした。DC集団をマウスに静脈内投与した（ $1 \times 10^5$ 細胞/マウス）。対照マウスにはRibi/Detoxアジュバントを用いて100  $\mu$ gのCAP-M8ペプチドを皮下に免疫した（図40E）。14日後、脾臓を回収し、相当するペプチドで6日間再刺激し、そして、CAP-M8（黒四角）またはFLU-NPペプチド（白抜き四角）のどちらかでパルスしたEL-4細胞に対する溶菌能を調べた。書き入れた数は、溶菌単位で表現したCTL活性を示す。

10

【図41】 CTL活性の誘導に対するワクシニアを感染させたDCの多重免疫の効果。DC（黒四角）、またはV-WT（黒逆三角）またはrV-TRICOM（白抜き丸）を感染させたDCを10  $\mu$ MのCAP-M8ペプチドで2時間パルスした。DC集団を7日間隔で1、2、または、3回、マウスに静脈内投与した（ $1 \times 10^5$ 細胞/マウス）。対照マウスにはRibi/Detoxアジュバントを用いて100  $\mu$ gのCAP-M8ペプチドを皮下に免疫した（十字）。最後の免疫から14日後に脾臓を回収し、CAP-M8ペプチドで6日間再刺激し、そして、CAP-M8または対照ペプチドVSVN（示していない）でパルスしたEL-4細胞に対する溶菌能を調べた。

【図42】 ワクシニアおよび鶏痘TRICOM感染脾細胞T細胞増殖への効果。マウスナイーブT細胞を組換えワクシニアまたは鶏痘ベクターのどちらかを感染させた自己の脾細胞と共培養した。シグナル1であるCon Aの様々な濃度において共培養を行った。組換えベクターは、野生型（すなわち、V-WT、FP-WT、白抜き菱形）、rV-B7-1またはrF-B7-1（白抜き丸）、あるいはrV-TRICOMまたはrF-TRICOM（黒四角）であった。未感染脾細胞は白抜き三角で示される。

20

【図43】 TRICOMベクター感染脾細胞の同種T細胞への効果。ナイーブBalb/C T細胞を、組換えワクシニア（図43AおよびC）または鶏痘（図43BおよびD）ベクターを2日間（図43AおよびB）または5日間（図43CおよびD）感染させたC57B1/6脾細胞と共培養した。組換えベクターは、V-WTまたはFP-WT（白抜き菱形）、rV-B7-1またはrF-B7-1（白抜き丸）、あるいはrV-TRICOMまたはrF-TRICOM（黒四角）であった。未感染脾細胞は白抜き三角で示される。DCにより誘導される増殖は黒四角で示される。

【図44】 rV-TRICOM感染脾細胞の特異的T細胞集団への効果。マウスナイーブT細胞をCD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、および、CD8<sup>+</sup>亜集団に分画した。T細胞を、未感染自己BMDC、または、組換えワクシニアベクターを感染させた脾細胞のどちらかと共培養した。様々なCon A濃度（図44A-C）、または、様々な刺激細胞の数（図44D-F）により第一のシグナルが与えられた。成熟BMDCに应答するT細胞増殖は、白抜き四角で示され、また、未感染脾細胞は白抜き三角で示される。組換えベクターは、野生型（V-WT、白抜き菱形）またはrV-TRICOM（黒四角）であった。

30

【図45】 rV-TRICOM感染骨髄細胞の特異的T細胞への効果。マウスナイーブT細胞をCD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、および、CD8<sup>+</sup>亜集団に分画した。T細胞を、未感染自己BMDC、または、組換えワクシニアベクターを感染させた脾細胞のどちらかと共培養した。様々なCon A濃度（図45A-C）、または、様々な刺激細胞の数（図45D-F）により第一のシグナルが与えられた。成熟BMDCに应答するT細胞増殖は、白抜き四角により示され、また、未感染脾細胞は白抜き三角で示される。組換えベクターは、野生型（V-WT、白抜き菱形）またはrV-TRICOM（黒四角）であった。

40

【図46】 rV-TRICOM感染脾細胞または骨髄（BM）細胞の、ペプチド特異的メモリーCD8<sup>+</sup> T細胞への効果。CAP-M8-特異的T細胞を自己の脾細胞（図46AおよびB）、または組換えワクシニアベクターを感染させた骨髄細胞（図46CおよびD）と共培養した。二組の条件を使用して分析を実行した：a) 应答細胞：刺激細胞の比を10：1に固定化し、いくつかの濃度のCAP-M8ペプチド存在下で培養（図46Aおよび46C）、または、b) 固定化したペプチド濃度（1  $\mu$ M）で、様々な应答細胞：刺激細胞の比で培養した（図46Bおよび46D）。組換えベクターは、野生型（白抜き菱形）、および、rV-TRICOM（黒四角）であった。未感染脾

50

細胞は白抜き三角で示される。BMは白抜き四角で示される。

【図47】 CEAペプチド、CAP-1またはCAP1、6DでパルスしたrF-TRICOM感染ヒト樹状細胞を使用したときの、末梢血骨髄細胞(PBMC)から単離したヒトT細胞によるIFN- $\gamma$ の産生を示す。

【図48】 PSAペプチド、PSA-3でパルスしたrF-TRICOM感染ヒト樹状細胞を使用したときの、ヒトT細胞によるIFN- $\gamma$ の産生を示す。

【図49】 Fluペプチド58-66でパルスしたrF-TRICOM、または、rF-B7.1感染ヒト樹状細胞を使用したときの、PBMCから単離したヒトT細胞によるIFN- $\gamma$ の産生を示す。

【図50】 様々なエフェクター：APC比で、Fluペプチド58-66でパルスしたrF-TRICOM感染、または、rF-B7.1感染ヒト樹状細胞を使用したときの、PBMCから単離したヒトT細胞によるIFN- $\gamma$ の産生を示す。

10

【図51】 1、または、2回のin vitro刺激(IVS)後、HPVペプチド(11-20)でパルスしたrF-TRICOM感染ヒト樹状細胞を使用したときの、ドナー868からのヒトT細胞によるIFN- $\gamma$ の産生を示す。

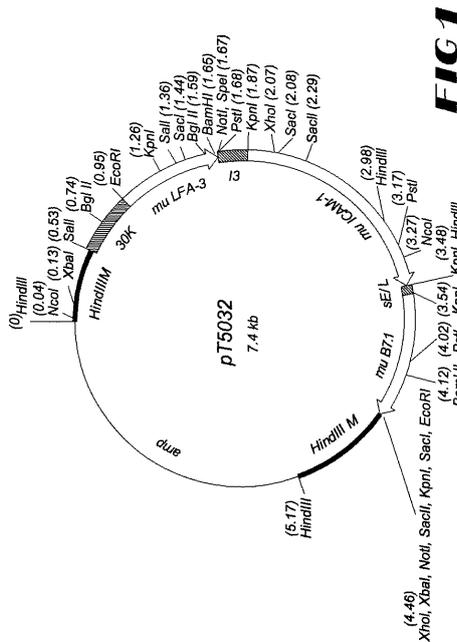
【図52】 HPVペプチド(11-20)でパルスしたrF-TRICOM、または、rF-B7.1感染ヒト樹状細胞を使用したときの、ヒトT細胞株によるIFN- $\gamma$ の産生を示す。

【図53】 様々な濃度のHPVペプチド(11-20)でパルスしたrF-TRICOM、または、rF-B7.1感染ヒト樹状細胞を使用したときの、ヒトT細胞株によるIFN- $\gamma$ の産生を示す。

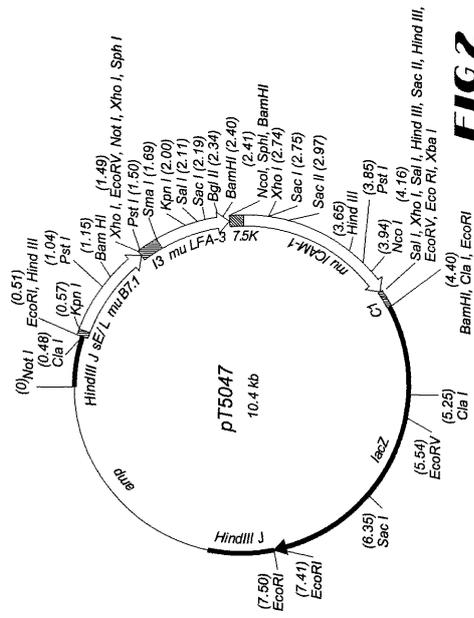
【図54】 様々なエフェクター：APC比で、HPV E7ペプチド11-20でパルスしたrF-TRICOM、または、rF-B7.1感染ヒト樹状細胞を使用したときの、ヒトT細胞によるIFN- $\gamma$ の産生を示す。

20

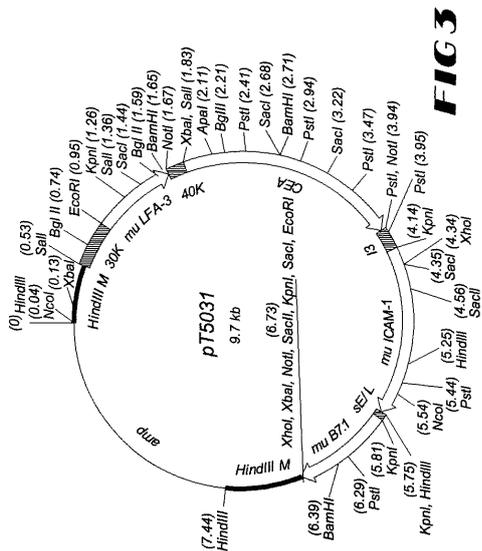
【図1】



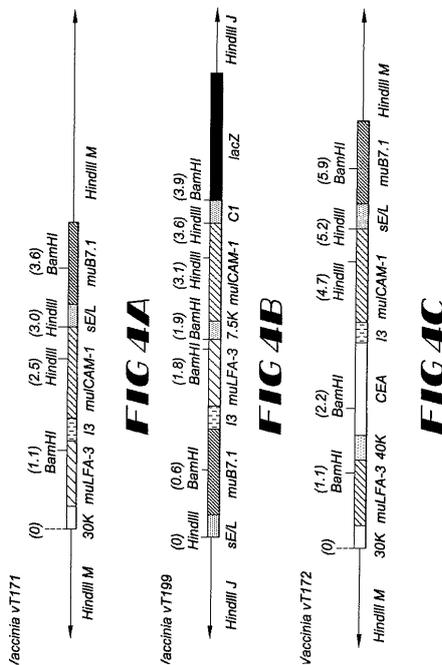
【図2】



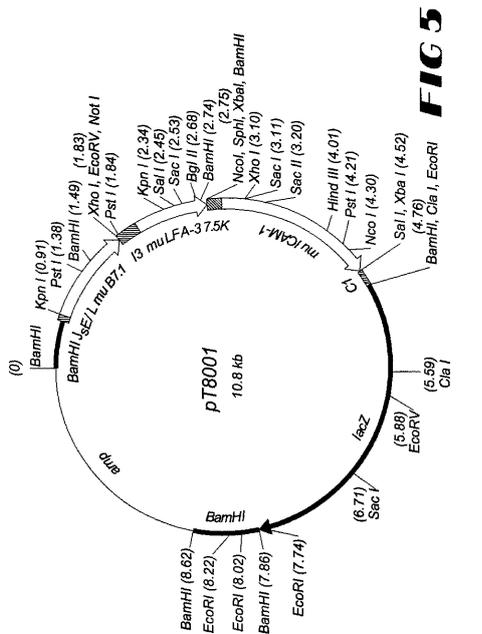
【 3 】



【 4 】



【 5 】



【 6 】

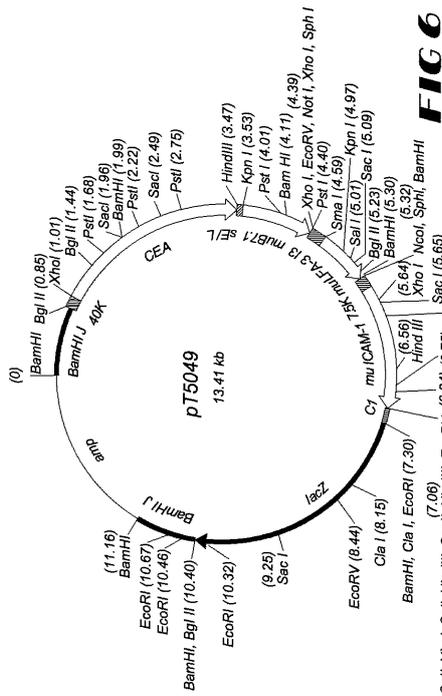






FIG 11



FIG 13A



FIG 13B

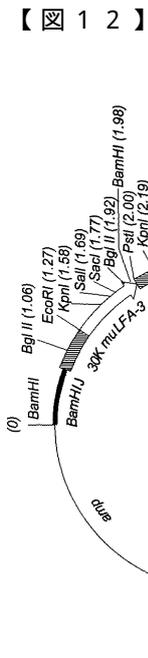


FIG 12

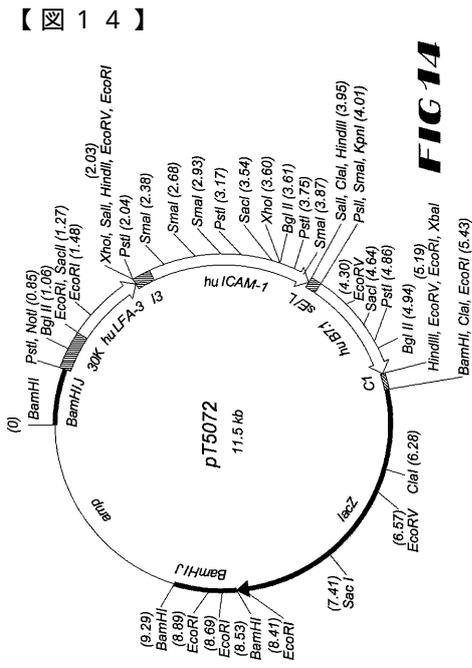
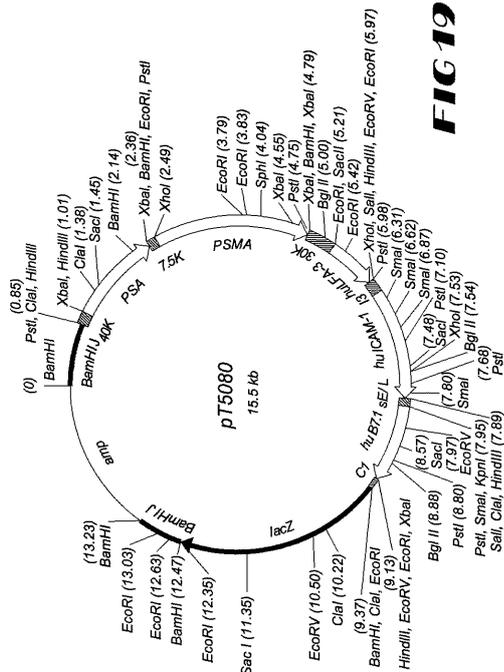


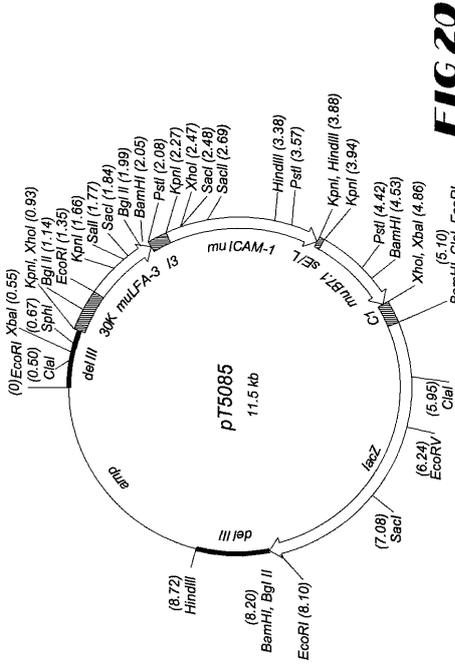
FIG 14



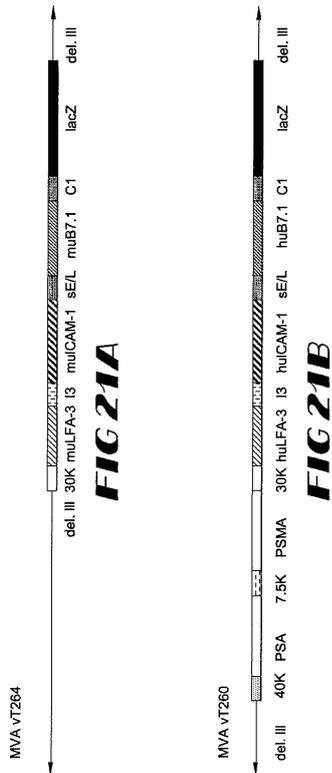
【 19 】



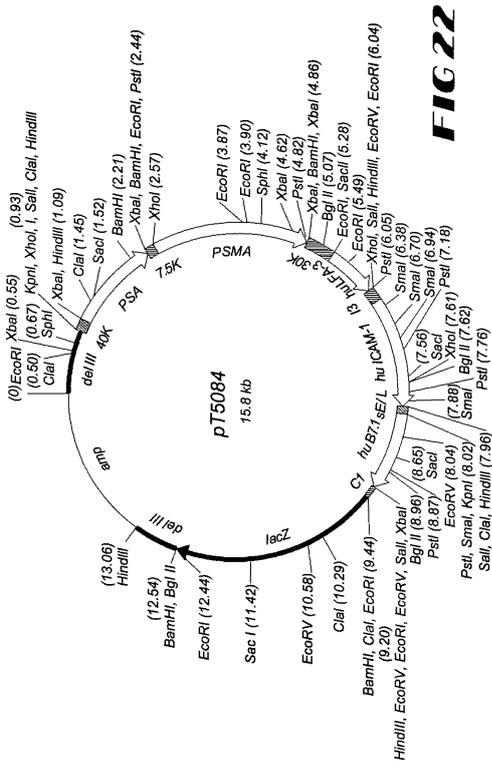
【 20 】



【 21 】



【 22 】



【 図 2 3 】

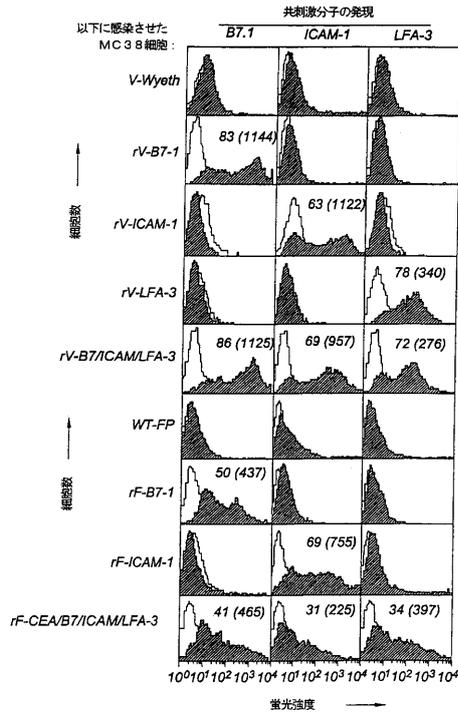


FIG 23

【 図 2 4 】

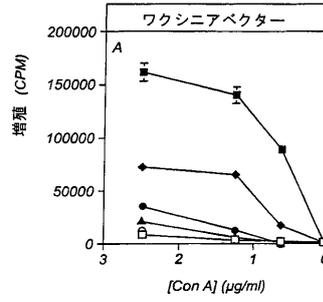


FIG 24A

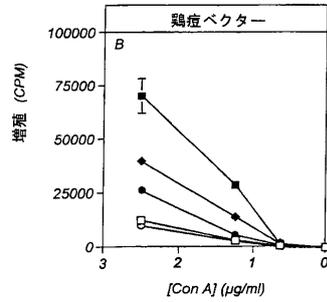


FIG 24B

【 図 2 5 】

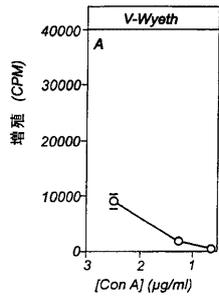


FIG 25A

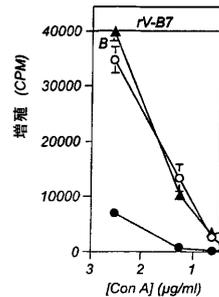


FIG 25B

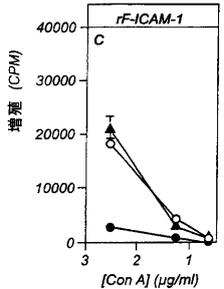


FIG 25C

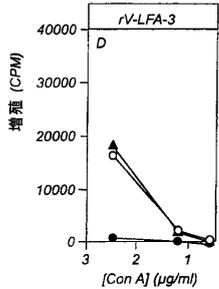


FIG 25D

【 図 2 6 】

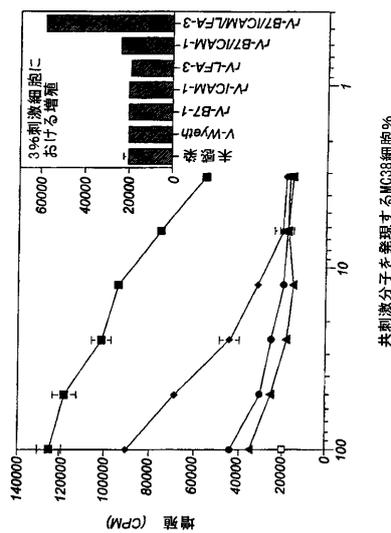
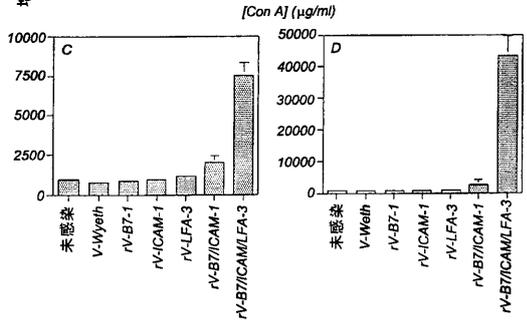
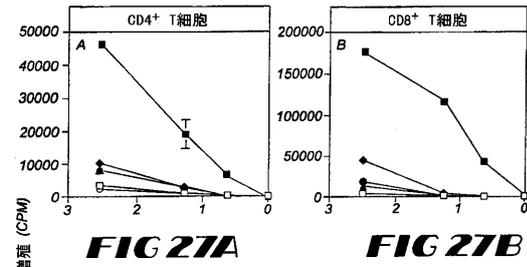


FIG 26

【 図 27 】

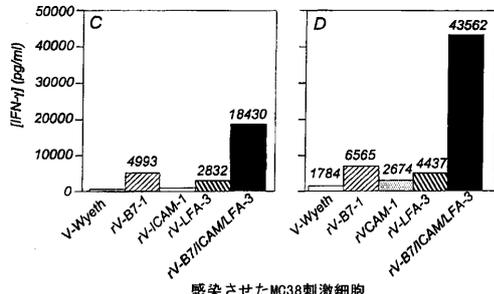
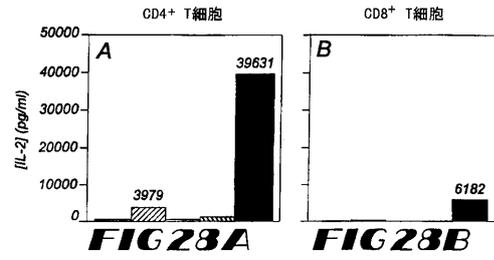


感染させたM038刺激細胞

FIG 27C

FIG 27D

【 図 28 】



感染させたM038刺激細胞

FIG 28C

FIG 28D

【 図 29 】

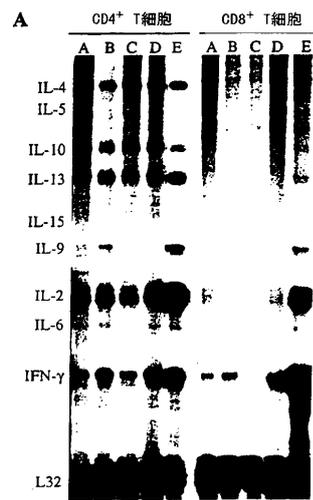


FIG 29A

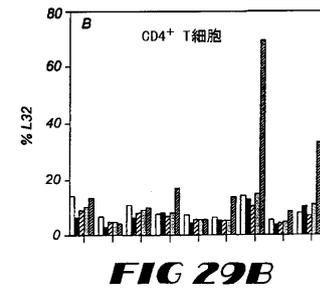


FIG 29B

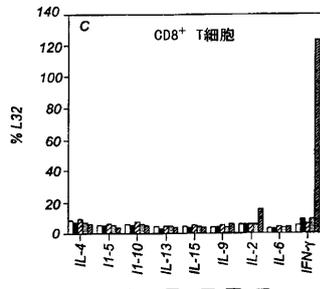


FIG 29C

【 図 30 】

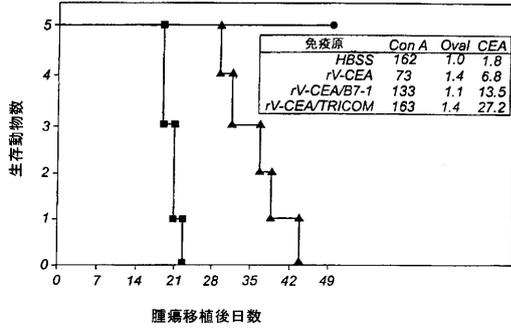


FIG 30

【 図 31 】

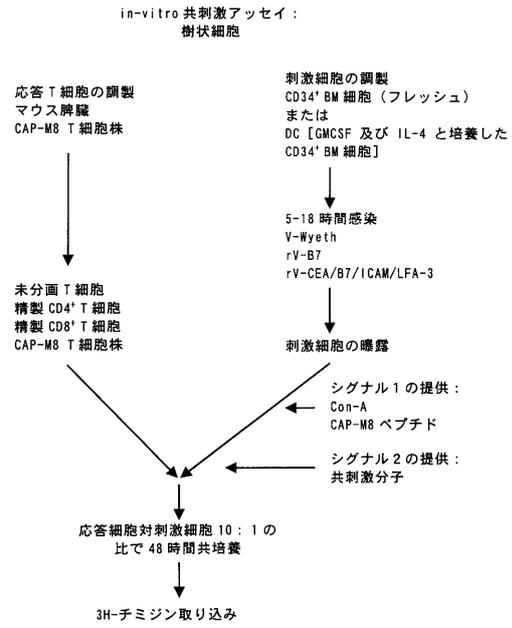


FIG 31

【 図 32 】

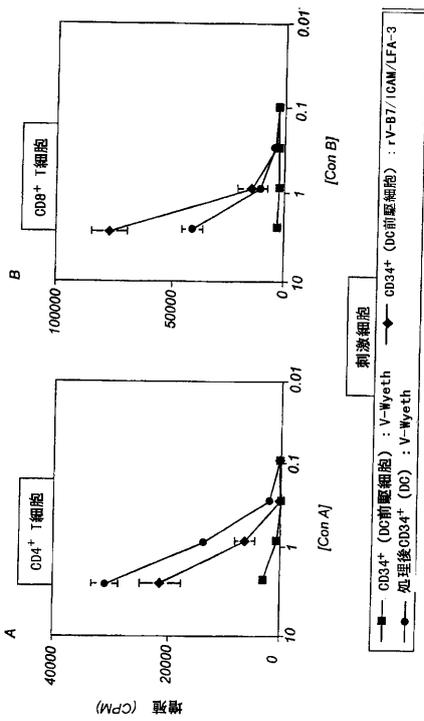


FIG 32A

FIG 32B

【 図 33 】

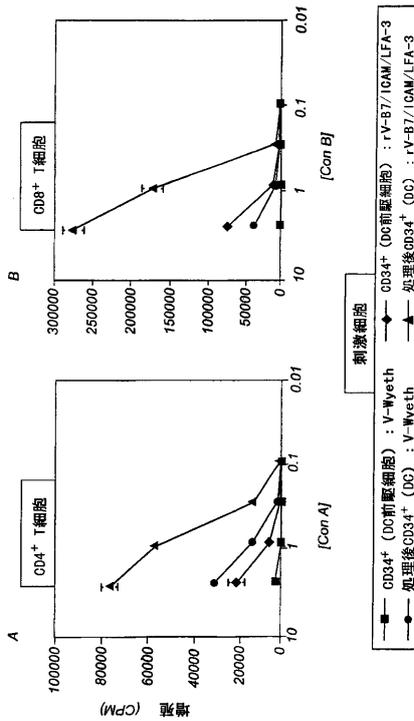
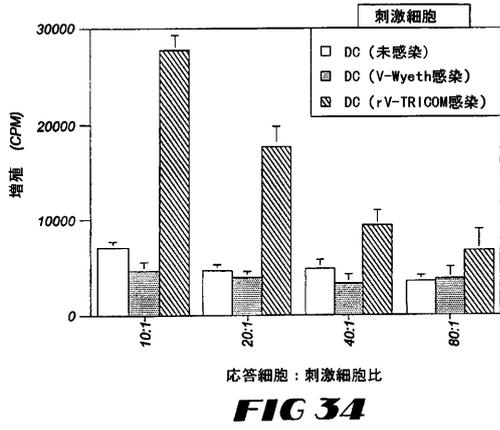


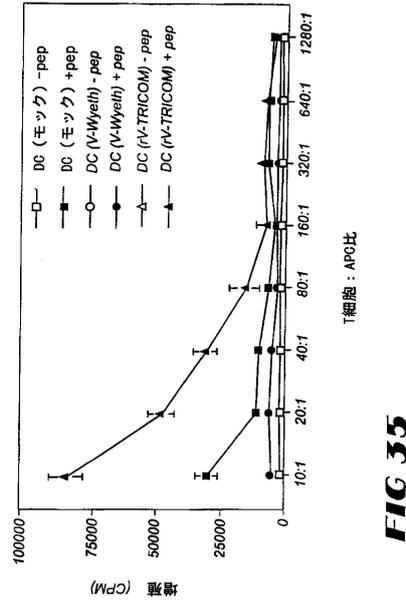
FIG 33A

FIG 33B

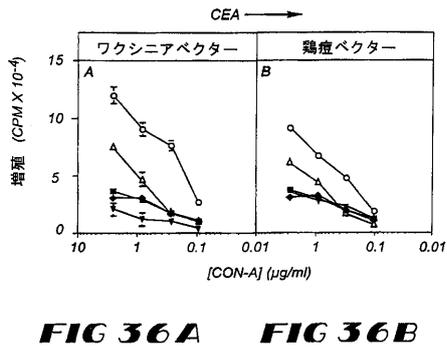
【 図 3 4 】



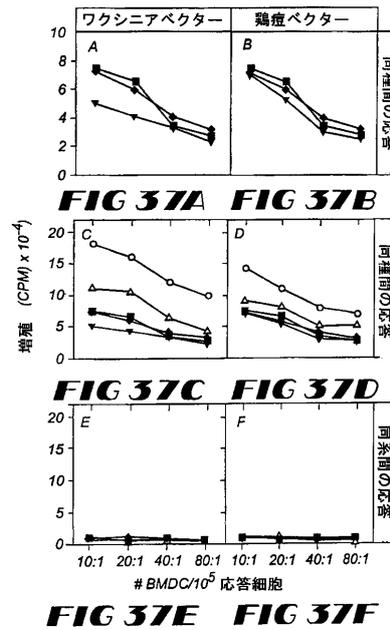
【 図 3 5 】



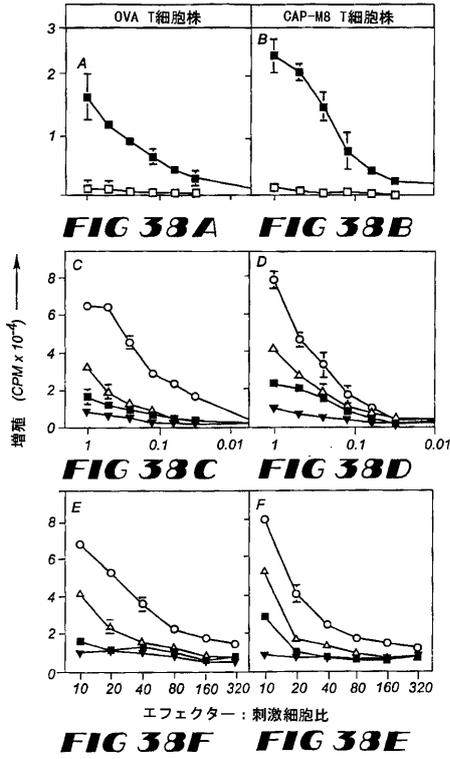
【 図 3 6 】



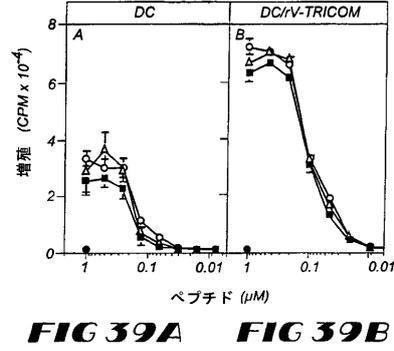
【 図 3 7 】



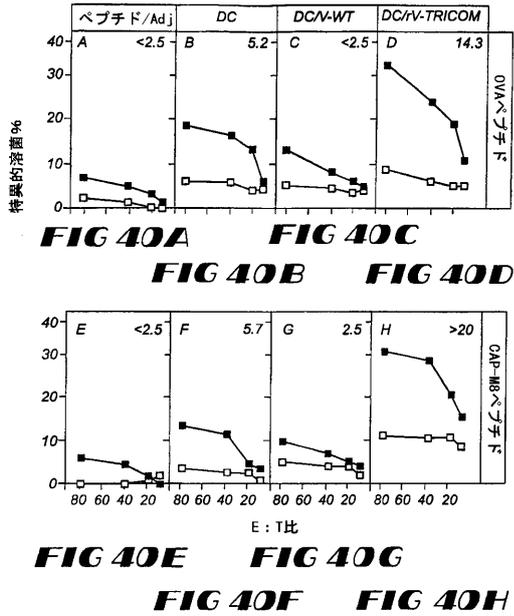
【 図 38 】



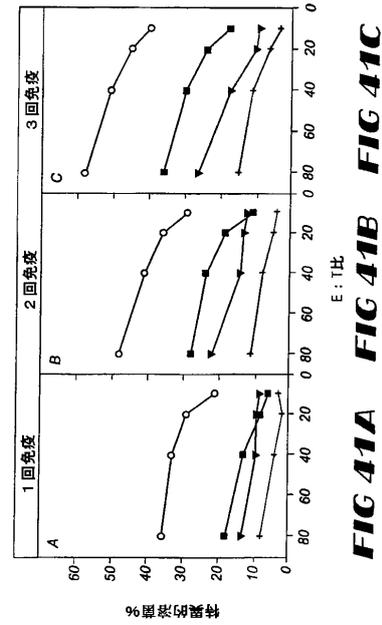
【 図 39 】



【 図 40 】



【 図 41 】



【 図 4 2 】

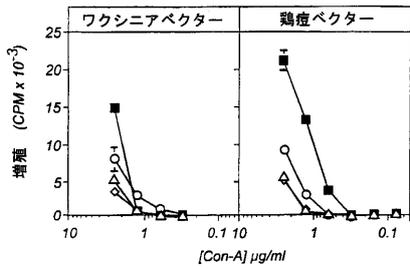


FIG 42A FIG 42B

【 図 4 3 】

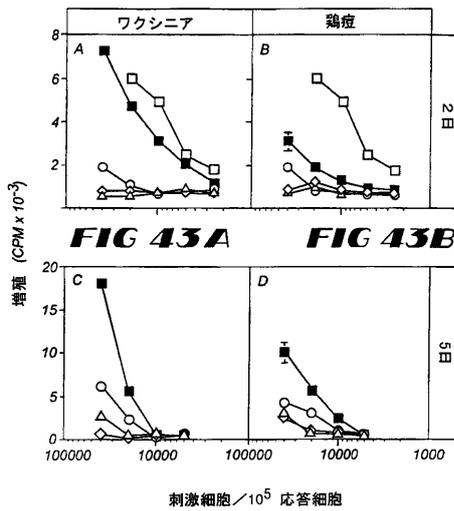


FIG 43A FIG 43B

FIG 43C FIG 43D

【 図 4 4 】

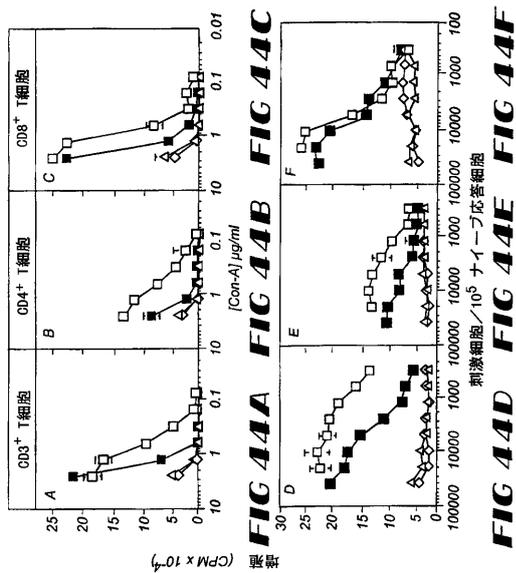


FIG 44A FIG 44B FIG 44C  
FIG 44D FIG 44E FIG 44F

【 図 4 5 】

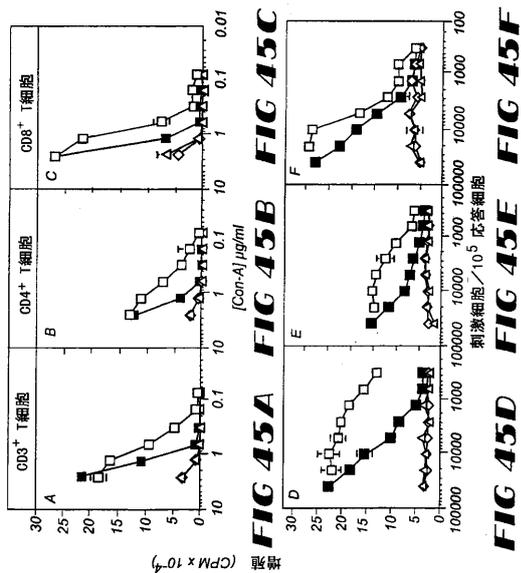
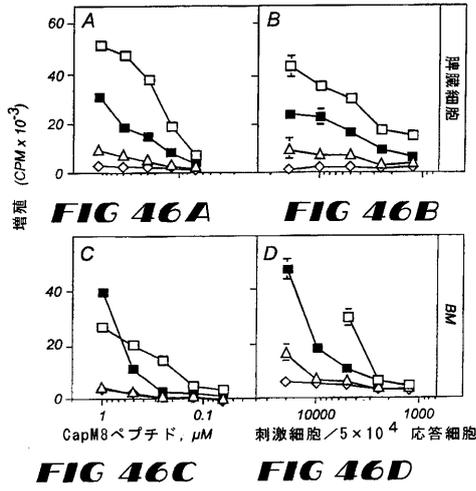
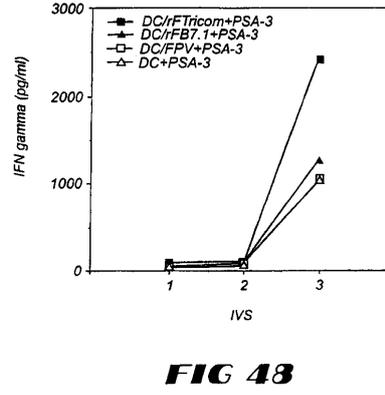


FIG 45A FIG 45B FIG 45C  
FIG 45D FIG 45E FIG 45F

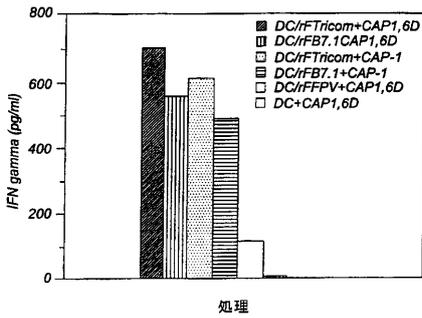
【 図 4 6 】



【 図 4 8 】

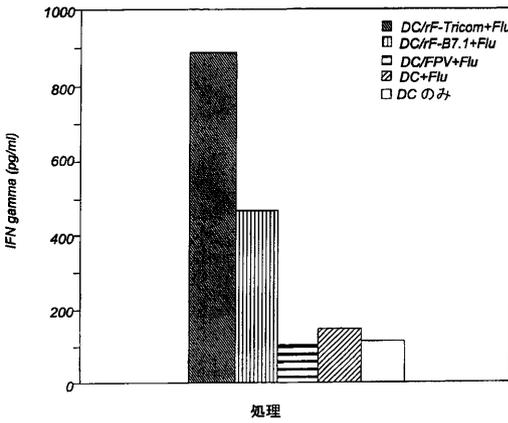


【 図 4 7 】



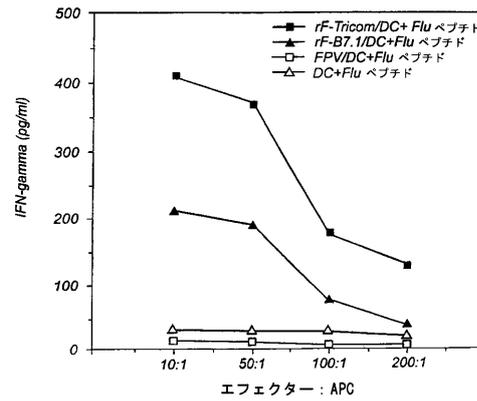
**FIG 47**

【 図 4 9 】



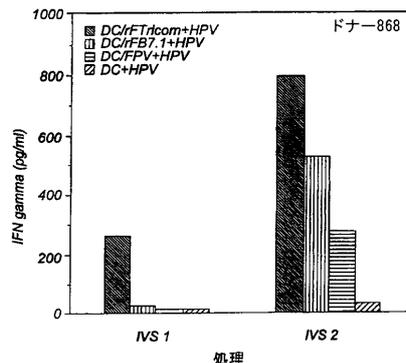
**FIG 49**

【 図 5 0 】



**FIG 50**

【 図 5 1 】



**FIG 51**

【 5 2 】

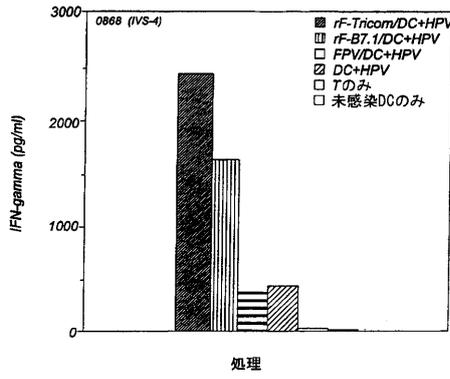


FIG 52

【 5 3 】

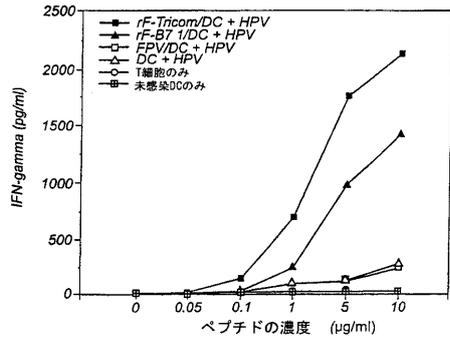


FIG 53

【 5 4 】

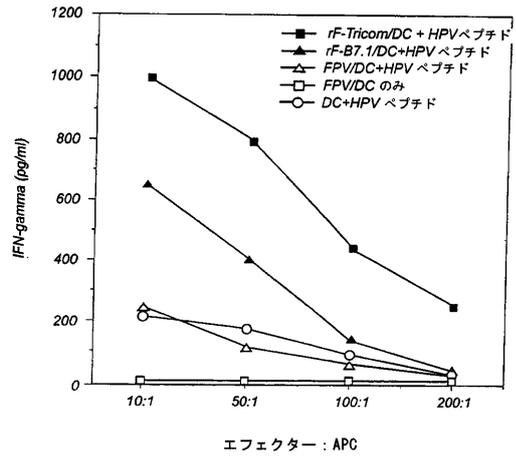


FIG 54

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 P	31/10 (2006.01)	A 6 1 P	31/10
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	7/00 (2006.01)	C 1 2 N	7/00
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53

Z

(74)代理人 100089705

弁理士 社本 一夫

(74)代理人 100071124

弁理士 今井 庄亮

(74)代理人 100076691

弁理士 増井 忠弼

(74)代理人 100075270

弁理士 小林 泰

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100091638

弁理士 江尻 ひろ子

(72)発明者 シュロム, ジェフリー

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

(72)発明者 ホッジ, ジェームズ

アメリカ合衆国メリーランド州20879, ゲイザーズバーグ, モントゴメリー・ビレッジ・アベニュー 19030

(72)発明者 パニカリ, デニス

アメリカ合衆国マサチューセッツ州01720, アクトン, ノンセット・パース 114

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 特表平10-506902(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C12N 1/00-1/38

C12Q 1/00-1/70

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)