

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6549560号
(P6549560)

(45) 発行日 令和1年7月24日(2019.7.24)

(24) 登録日 令和1年7月5日(2019.7.5)

(51) Int. Cl.		F I	
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K 19/00 Z N A
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 14 (全 50 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-513220 (P2016-513220)	(73) 特許権者	515318234
(86) (22) 出願日	平成26年5月14日 (2014.5.14)		上海 ハイチャーム インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2016-526026 (P2016-526026A)		SHANGHAI HYCHARM INC.
(43) 公表日	平成28年9月1日 (2016.9.1)		中華人民共和国 上海 200131、ブードン ニュー エリア、チャイナ (上海) パイロット フリー トレード ゾーン、フウ トウ イースト ファースト
(86) 国際出願番号	PCT/CN2014/077522		ロード 458、フラット 5-518 Flat 5-518, 458 Fu Te East 1st Road, China (Shanghai) Pilot Free Trade Zone, Pudong New Area, S
(87) 国際公開番号	W02014/183649		最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成26年11月20日 (2014.11.20)		
審査請求日	平成29年3月27日 (2017.3.27)		
(31) 優先権主張番号	201310178135.2		
(32) 優先日	平成25年5月14日 (2013.5.14)		
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		

(54) 【発明の名称】 低免疫原性タンパク質に対するエピトープワクチンおよびその製造方法と使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原エピトープを持つ組換えタンパク質であって、

担体タンパク質由来の構造骨格を有し、かつ前記担体タンパク質は少なくとも一つの T 細胞エピトープを持ち、かつ前記担体タンパク質の分子表面のアミノ酸残基領域の少なくとも一つに置換および/または挿入によって前記抗原エピトープが導入されており、

ここで担体タンパク質が、ジフテリア毒素の膜貫通ドメイン(または D T T)であり、および分子表面のアミノ酸残基領域が、D T T における 290 ~ 297 番目のアミノ酸であり；

ここで抗原エピトープが低免疫原性タンパク質由来のエピトープであり、抗原エピトープペプチドのアミノ酸配列の長さが 5 ~ 40 個のアミノ酸配列であり；

ここで低免疫原性タンパク質が、VEGF、TNF- α 、Her2 タンパク、血液凝固因子、インターロイキン、線維芽細胞活性化タンパク質、EGFR、PDL1 またはこれらの組み合わせからなる群から選ばれることを特徴とする、前記組換えタンパク質。

【請求項 2】

前記低免疫原性タンパク質はヒトのタンパク質を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の組換えタンパク質。

【請求項 3】

抗原エピトープは、(a) モノエピトープを有する抗原エピトープ；または (b) ポリエピトープを有する抗原エピトープからなる群より選択されることを特徴とする、請求項

10

20

1 に記載の組換えタンパク質。

【請求項 4】

前記低免疫原性タンパク質は、VEGF、TNF- α 、血液凝固因子、インターロイキン、線維芽細胞活性化タンパク質、EGFR、PD-L1 またはこれらの組み合わせからなる群から選ばれることを特徴とする、請求項 2 に記載の組換えタンパク質。

【請求項 5】

前記抗原エピトープペプチドのアミノ酸配列の長さが 8 ~ 30 アミノ酸配列の長さであることを特徴とする、請求項 1 に記載の組換えタンパク質。

【請求項 6】

低免疫原性タンパク質が VEGF に由来することを特徴とする、請求項 1 に記載の組換えタンパク質。 10

【請求項 7】

前記分子表面のアミノ酸残基領域は、DTT における 291 ~ 297 番目のアミノ酸、DTT における 292 ~ 297 番目のアミノ酸、DTT における 293 ~ 297 番目のアミノ酸、DTT における 294 ~ 297 番目のアミノ酸、DTT における 295 ~ 297 番目のアミノ酸、DTT における 296 ~ 297 番目のアミノ酸からなる群から選ばれる、

ことを特徴とする、請求項 6 に記載の組換えタンパク質。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の組換えタンパク質をコードすることを特徴とする、ポリヌクレオチド 20

【請求項 9】

請求項 8 に記載のポリヌクレオチドを含むことを特徴とする、発現ベクター。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の発現ベクターを含むか、或いはゲノムに請求項 8 に記載のポリヌクレオチドが組み込まれていることを特徴とする、宿主細胞。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の組換えタンパク質、請求項 8 に記載のポリヌクレオチドあるいは請求項 9 に記載の発現ベクターあるいは請求項 10 に記載の宿主細胞と、薬学的に許容される担体および/または助剤とを含有することを特徴とする、薬物組成物。 30

【請求項 12】

前記組成物がワクチンであることを特徴とする、請求項 11 に記載の薬物組成物。

【請求項 13】

請求項 1 に記載の組換えタンパク質、請求項 8 に記載のポリヌクレオチドあるいは請求項 9 に記載の発現ベクターあるいは請求項 10 に記載の宿主細胞と、免疫学的に許容される担体および/または助剤とを含有することを特徴とする、ワクチン組成物。

【請求項 14】

(a) 前記抗原エピトープに対する抗体の製造に、および/または

(b) 前記抗原エピトープに関連する疾患を治療する薬物の製造に

使用されることを特徴とする、請求項 1 に記載の抗原エピトープを持つ組換えタンパク質の使用。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物および医薬の分野に属し、具体的に、低免疫原性タンパク質のエピトープに対するワクチンおよびその製造方法と使用に関する。本発明は、有効に生体の低免疫原性タンパク質の特定のエピトープに対する免疫反応を引き起こす。

【背景技術】

【0002】

慢性病は、心脳血管疾患や癌を含み、経済の発展と生活・栄養のレベルの持続的な向上 50

とともに、発症率および死亡率が急速に上がり、人類の発病・致死の要因になってきた。モノクローナル抗体薬物による治療の利点は、標的が明確で、治療効果が確実であるというところであるが、薬剤の使用量が高く、重複回数が多く、治療のコストが高い。

予防用ワクチンは、伝染性疾患およびその合併症を抑える重要な手段として、すでに数億人の命を救い、人類の健康に大いに貢献してきた。従来のワクチンの抗原は、病原体由来のもので、人体にとって外来物質は当然生体の免疫保護反応を引き起こす。一方、慢性病の病因および治療・関与の標的は自己物質で、もしワクチンを設計して能動免疫によって生体の免疫反応を引き起こすことができれば、モノクローナル抗体薬物と類似の治療効果を持つ自己抗体の製造は非常に魅力的な治療手段になる。治療効果の持続時間が長く、治療のコストが低く、施用が便利で経済的で、さらに発症を予防する可能性もある。

【0003】

しかし、生体に自己物質に対する免疫寛容の保護機序があり、正常の健康状態では、生体の自己物質に対する免疫反応が生じない。現在、Le Buanecらと仏国NeoVacs社(<http://neovacs.fr/>)は、グルタルアルデヒドで数十個のヒトタンパク質(数種類のサイトカイン、成長因子を含む。)をキーホールリンペットヘモシニアン(the keyhole limpet hemocyanin, KLH)とカップリングした後、さらにホルムアルデヒドで長時間に処理してヒトタンパク質分子の生物活性をなくし、kinoid抗原ワクチンを製造した。KLHをTNF- α とカップリングしたTNF α 抗原は、マウス炎症モデルにおいて治療作用があり、臨床試験では人体において免疫反応を誘導することができることが証明された[Le Buanec H, et al. TNF α kinoid vaccination-induced neutralizing antibodies to TNF α protect mice from autologous TNF α -driven chronic and acute inflammation. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103(51):19442-7]。このワクチンの有効性が部分的に検証されたが、このような数十個のヒトタンパク質分子とKLH分子がカップリングし、さらにホルムアルデヒドで長時間に処理して形成する複雑な凝集物質は、臨床薬品に対する成分が明瞭で、構造が明確で、品質が制御可能という要求を満足させるには様々な困難と説明の難しい安全上のリスクが存在する。

そのため、本分野では、有効に生体の低免疫原性タンパク質に対する免疫応答を引き起こし、そして臨床薬品に対する成分が明瞭で、構造が明確で、品質が制御可能という要求を満足させるワクチン抗原技術の開発が切望されている。

【発明の概要】

【0004】

本発明の目的は、有効に生体の低免疫原性タンパク質に対する免疫応答を引き起こす方法および関連の組換えタンパク質と組成物(例えばワクチン組成物)を提供することである。

【0005】

本発明の第一は、抗原エピトープを持つ組換えタンパク質であって、担体タンパク質の構造骨格を有し、かつ前記担体タンパク質は少なくとも一つのT細胞エピトープを持ち、かつ前記担体タンパク質の分子表面のアミノ酸残基領域の少なくとも一つにスプライス、置換、および/または挿入によって前記の抗原エピトープが導入されている、組換えタンパク質を提供する。

もう一つの好適な例において、前記「分子表面のアミノ酸残基領域」は、ループ領域、-ターン領域、N末端またはC末端を含む。

一つの好適な例において、前記組換えタンパク質は前記エピトープに対する免疫応答を誘導する。

【0006】

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープは、B細胞エピトープまたはT細胞エピトープである。

もう一つの好適な例において、前記の担体タンパク質は、病原体のタンパク質で、ウイルスのタンパク質、細菌のタンパク質、クラミジアのタンパク質、マイコプラズマのタンパク質、またはこれらの組み合わせを含む。

10

20

30

40

50

もう一つの好適な例において、前記の抗原は、前記担体タンパク質由来のものではない。

もう一つの好適な例において、前記の抗原エピトープは、哺乳動物のタンパク質由来のものである。

【0007】

もう一つの好適な例において、前記の抗原エピトープは、

(a) モノエピトープの抗原エピトープ、好ましくは長さが5~30個、より好ましくは6~15個のアミノ酸のモノエピトープの抗原エピトープ(ペプチド)、あるいは

(b) ポリエピトープの抗原エピトープ、好ましくは長さが15~500個、より好ましくは20~300個、さらに好ましくは30~200個のアミノ酸のポリエピトープの抗原エピトープ(ペプチド)、

からなる群から選ばれる。

もう一つの好適な例において、前記の担体タンパク質のCまたはN末端に前記のポリエピトープの抗原エピトープ(ペプチド)が導入されている。

もう一つの好適な例において、前記の組換えタンパク質がヒトに施用されると、ヒトの前記エピトープに対する免疫応答が誘導される。

【0008】

もう一つの好適な例において、前記の置換は、前記担体タンパク質の前記表面のアミノ酸残基の領域のアミノ酸配列の一部の置換または全部の置換を含む。

もう一つの好適な例において、前記の一部の置換は、前記担体タンパク質の表面のアミノ酸残基の領域のうちの1~15個のアミノ酸、好ましくは2~10個のアミノ酸の置換を含む。

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープは、低免疫原性タンパク質のエピトープである。好ましくは、前記の低免疫原性タンパク質は、ヒトおよび非ヒト哺乳動物のタンパク質を含む。

もう一つの好適な例において、前記の低免疫原性タンパク質は、自己免疫疾患関連タンパク質、腫瘍関連タンパク質、心血管疾患関連タンパク質を含む。

【0009】

もう一つの好適な例において、前記の低免疫原性タンパク質は、

(a) VEGF、TNF-、Her2タンパク、血液凝固因子、インターロイキン、線維芽細胞活性化タンパク質(Fibroblast Activation Protein、FAP)、EGFR、PDL1またはこれらの組み合わせ、

(b) (a)におけるタンパク質が一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と組換えると当該低免疫原性タンパク質に対する免疫応答を引き起こすタンパク質、

を含む。

【0010】

もう一つの好適な例において、前記低免疫原性タンパク質は、TNF- またはTNF- が一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と組換えると当該TNF- に対する免疫応答を引き起こすタンパク質である。

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープは、TNF- 由来のもので、かつTNF- にA145RとY87Hの2つの点突然変異がある。

【0011】

もう一つの好適な例において、前記の抗原エピトープは、TNF- 由来のもので、かつ

(1) 配列番号10または配列番号12で表されるアミノ酸配列、

(2) 配列番号10または配列番号12で表されるアミノ酸配列が一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と融合すると免疫反応を引き起こす機能を有する誘導ポリペプチド、

もう一つの好適な例において、前記の抗原エピトープは、からなる群から選ばれる1つまたは2つ以上である。

10

20

30

40

50

- (1) VSRFAISYQEKVNLLSA、
 (2) LDFAESGQV、
 (3) WLNRRANA、
 (4) GMDLKDNLV、
 (5) VSRFAISYQEKVNLLSAV、
 (6) ISRIAVSYQTKVNLLSA、
 (7) ISRIAVSYQTKVNLLSAI、および
 (8) ほかのTNF-タンパク質における(1)～(7)のエピトープ配列に相当するペプチド断片、
 からなる群から選ばれる。

10

【0012】

もう一つの好適な例において、前記の低免疫原性タンパク質は、血液凝固因子である。
 もう一つの好適な例において、前記血液凝固因子は、FXIである。
 もう一つの好適な例において、前記の抗原エピトープは、

- (1) FYGVESPK、
 (2) QYKMAESGYDI、
 (3) WGYRKLDRKIQ、
 (4) TNEECQKRYRGHKITH、
 (5) ACIRDIF、
 (6) TTKIKPRIVGGTASVRGE、および
 (7) ほかのFXIタンパク質における(1)～(6)のエピトープ配列に相当するペプチド断片

20

からなる群から選ばれる1つまたは2つ以上である。

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープは、血液凝固因子FXIの触媒ドメインを含む。

【0013】

もう一つの好適な例において、前記FXIの触媒ドメインは、
 (a) 配列番号45のアミノ酸配列を有するポリペプチド、
 (b) 配列番号45のアミノ酸配列が一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と融合すると免疫反応を引き起こす機能を有する
 (a) から誘導されるポリペプチド、
 からなる群から選ばれる。

30

もう一つの好適な例において、前記血液凝固因子は、FXIIである。

【0014】

もう一つの好適な例において、前記の抗原エピトープは、

- (1) EAFSPVSYQHDLA、
 (2) EGFSSITYQHDLA、および
 (3) ほかのFXIIタンパク質における(1)、(2)のエピトープ配列に相当するペプチド断片

40

からなる群から選ばれる1つまたは2つ以上である。

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープは、血液凝固因子FXIIの触媒ドメインを含む。

【0015】

もう一つの好適な例において、前記FXIIの触媒ドメインは、
 (a) 配列番号129または配列番号130のアミノ酸配列を有するポリペプチド、
 (b) (a)におけるアミノ酸配列が一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と融合すると免疫反応を引き起こす機能を有する
 (a) から誘導されるポリペプチド、
 からなる群から選ばれる。

【0016】

50

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープのペプチドは、FAP由来のもので、かつ前記抗原エピトープのペプチドはYGDEQYPRを含む。

もう一つの好適な例において、前記低免疫原性タンパク質は、FAPである。

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープは、FAP由来のもので、かつ前記抗原エピトープはYGDEQYPRを含む。

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープは、FAPの触媒ドメイン由来のものである。

【0017】

もう一つの好適な例において、前記FAPの触媒ドメインは、

(a) 配列番号108のアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) 配列番号108のアミノ酸配列が一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と融合すると免疫反応を引き起こす機能を有する(a)から誘導されるポリペプチド、

からなる群から選ばれる。

10

【0018】

もう一つの好適な例において、前記組換えタンパク質のアミノ酸配列は、

(a) 配列番号50または配列番号51のアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) (a)におけるポリペプチドが一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、免疫反応を引き起こす機能を有する(a)から誘導されるポリペプチド、

からなる群から選ばれる。

20

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープは、VEGF由来のものである。

【0019】

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープは、

(a) 配列番号63のアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) 配列番号63のアミノ酸配列が一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と融合すると免疫反応を引き起こす機能を有する(a)から誘導されるポリペプチド、

からなる群から選ばれる。

【0020】

もう一つの好適な例において、前記組換えタンパク質のアミノ酸配列は、

(a) 配列番号62のアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) 配列番号62のアミノ酸配列が一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、免疫反応を引き起こす機能を有する(a)から誘導されるポリペプチド、

からなる群から選ばれる。

30

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープは、PDL1由来のものである。

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープは、PDL1E由来のものである。

【0021】

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープは、

(a) 配列番号67、配列番号68、配列番号122、配列番号123、配列番号124または配列番号125で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) (a)におけるポリペプチドが一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と融合すると免疫反応を引き起こす機能を有する(a)から誘導されるポリペプチド、

からなる群から選ばれる。

40

【0022】

もう一つの好適な例において、前記組換えタンパク質は、

(a) 配列番号69、配列番号70、配列番号126または配列番号127で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

50

(b) (a)におけるポリペプチドが一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と融合すると免疫反応を引き起こす機能を有する(a)から誘導されるポリペプチド、
からなる群から選ばれる。

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープは、上皮成長因子受容体EGFR由来のものである。

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープは、上皮成長因子受容体EGFRのドメインIII由来のものである。

【0023】

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープは、上皮成長因子受容体EGFR由来のもので、かつ前記抗原エピトープのペプチドは

(a) 配列番号83、配列番号109、配列番号110、配列番号111で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) (a)におけるポリペプチドが一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と融合すると免疫反応を引き起こす機能を有する(a)から誘導されるポリペプチド、
からなる群から選ばれる。

もう一つの好適な例において、前記組換えタンパク質の前記抗原エピトープは、上皮成長因子受容体EGFR由来のもので、かつ配列番号83または配列番号109で表されるアミノ酸配列の少なくとも一つと、

配列番号110および配列番号111のうちの少なくとも一つとを含む。

【0024】

もう一つの好適な例において、前記組換えタンパク質は、

(a) 配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号119または配列番号120で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) (a)におけるポリペプチドが一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と融合すると免疫反応を引き起こす機能を有する(a)から誘導されるポリペプチド、
から選ばれる。

【0025】

もう一つの好適な例において、前記のエピトープの長さは5~40個のアミノ酸、好ましくは8~30個のアミノ酸である。

もう一つの好適な例において、前記の担体タンパク質は、ジフテリア毒素DT、ジフテリア毒素の膜貫通ドメインDTT、ロタウイルスVP7、リーシュマニアの熱ショックタンパク質、カンピロバクター・ジェジュニのフラジェリン、クラミジア・トラコマチスの主要外膜タンパク質、キーホールリンペットヘモシニアン(Keyhole Limpet Hemocyanin、KLH)、ウシ血清アルブミン(Bovine Serum Albumin、BSA)、オボアルブミン(Ovalbumin、OVA)、フィブリノゲン、ポリリジン(PLL)を含む。

【0026】

もう一つの好適な例において、前記の表面のアミノ酸残基の領域は、DTTにおける287~299番目のアミノ酸の間あるいはDTTのC末端またはN末端にあり、好ましくは前記表面のアミノ酸残基の領域は、DTTにおける290~297番目のアミノ酸、DTTにおける291~297番目のアミノ酸、DTTにおける292~297番目のアミノ酸、DTTにおける293~297番目のアミノ酸、DTTにおける294~297番目のアミノ酸、DTTにおける295~297番目のアミノ酸、DTTにおける296~297番目のアミノ酸からなる群から選ばれる。

もう一つの好適な例において、前記表面のアミノ酸残基の領域は、DTTにおける305~310番目のアミノ酸およびDTTにおける295~310番目のアミノ酸からなる群から選ばれる。

もう一つの好適な例において、1~5個(好ましくは1~3個)の表面のアミノ酸残基の領域に抗原エピトープが導入されている。

【0027】

10

20

30

40

50

もう一つの好適な例において、前記の表面のアミノ酸残基の領域は、担体タンパク質のC末端を含む。

もう一つの好適な例において、前記の表面のアミノ酸残基の領域は、担体タンパク質のN末端を含む。

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープは、前記担体タンパク質のC末端および/またはN末端に連結している。

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープと前記担体タンパク質の間に連結ペプチドがある。好ましくは前記連結ペプチドの長さは3~30個のアミノ酸である。より好ましくは前記連結ペプチドの長さは4~20個のアミノ酸である。最も好ましくは前記連結ペプチドの長さは5~10個のアミノ酸である。

10

【0028】

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープと前記担体タンパク質の間に連結ペプチドがない。

もう一つの好適な例において、前記担体タンパク質のC末端および/またはN末端の1~50個のアミノ酸が前記抗原エピトープで置換されている。好ましくは前記担体タンパク質のC末端および/またはN末端の5~30個のアミノ酸が前記抗原エピトープで置換されている。より好ましくは前記担体タンパク質のC末端および/またはN末端の10~20個のアミノ酸が前記抗原エピトープで置換されている。

【0029】

もう一つの好適な例において、前記の担体タンパク質はジフテリア毒素の膜貫通ドメインDTTで、かつ前記の抗原エピトープの挿入が可能な表面のアミノ酸残基の領域は以下のものを含む。

20

【表1】

ジフテリア毒素の膜貫通ドメイン(DTT)の抗原エピトープの導入が可能な表面のアミノ酸残基の領域

番号	1F0L.pdbにおけるアミノ酸番号	1F0L.pdbにおけるアミノ酸配列
DTT-1	221-225	KEHGP
DTT-2	230-241	MSESPNKTVSEE
DTT-3	255-261	LEHPELS
DTT-4	267-277	TGTNPVFAGAN
DTT-5	287-299	QVIDSETADNLEK
DTT-6	305-311	SILPGIG
DTT-7	317-325	ADGAVHHNT

30

【0030】

本発明の第二は、本発明の第一に記載の組換えタンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。

本発明の第三は、第四に記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを提供する。

40

本発明の第四は、第三に記載の発現ベクターを含有するか、あるいはゲノムに本発明の第二に記載のポリヌクレオチドが組み込まれた宿主細胞を提供する。

もう一つの好適な例において、前記の宿主細胞は、原核細胞および真核細胞を含む。

もう一つの好適な例において、前記の宿主細胞は、大腸菌、酵母、CHO細胞、DC細胞などを含む。

【0031】

本発明の第五は、第一に記載の組換えタンパク質、第二に記載のポリヌクレオチドあるいは第三に記載の発現ベクターあるいは第四に記載の宿主細胞と、薬学的に許容される担体および/または助剤とを含有する薬物組成物を提供する。

もう一つの好適な例において、前記の組成物は、ワクチンである。

50

【0032】

本発明の第六は、第一に記載の組換えタンパク質、第二に記載のポリヌクレオチドあるいは第三に記載の発現ベクターあるいは第四に記載の宿主細胞と、免疫学的に許容される担体および/または助剤とを含有するワクチン組成物を提供する。

もう一つの好適な例において、前記のワクチン組成物は、さらにアジュバントを含有する。

もう一つの好適な例において、前記ワクチン組成物は核酸ワクチン組成物で、前記核酸ワクチン組成物は第二に記載のポリヌクレオチドあるいは第三に記載の発現ベクターを含む。

もう一つの好適な例において、前記のアジュバントは、酸化アルミニウム、サポニン、quil A、ムラミルジペプチド、鉱物油または植物油、小嚢に基づいたアジュバント、非イオンブロック共重合体またはDEAE-デキストラン、サイトカイン (IL-1、IL-2、IFN- γ 、GM-CSF、IL-6、IL-12、およびCpGを含む。)を含む。

10

【0033】

本発明の第七は、第一に記載の抗原エピトープを持つ組換えタンパク質の使用であって、(a) 前記抗原エピトープに対する抗体の製造、および/または (b) 前記抗原エピトープに関連する疾患を治療する薬物の製造に用いられる使用を提供する。

もう一つの好適な例において、前記の疾患は、自己免疫疾患 (例えば関節リウマチ)、腫瘍、心血管疾患などを含む。

本発明の第八は、必要な対象に第一に記載の組換えタンパク質、第四に記載の薬物組成物あるいは第三に記載のワクチン組成物を施用する、治療方法を提供する。

20

【0034】

本発明の第九は、抗原エピトープペプチドであって、哺乳動物 (例えばヒト) の低免疫原性タンパク質由来のもので、かつ1つまたは2つ以上の抗原エピトープを含み、

かつ前記抗原エピトープペプチドのアミノ酸配列の長さが相応の低免疫原性タンパク質の全長の5~100%で (好ましくは前記抗原エピトープペプチドのアミノ酸配列の長さが相応の低免疫原性タンパク質の全長の5~70%で、より好ましくは前記抗原エピトープペプチドのアミノ酸配列の長さが相応の低免疫原性タンパク質の全長の5~50%で、最も好ましくは前記抗原エピトープペプチドのアミノ酸配列の長さが相応の低免疫原性タンパク質の全長の5~30%、例えば10%、15%、20%、25%で)、かつ前記抗原エピトープペプチドの長さが5~500個のアミノ酸で、

30

かつ前記抗原エピトープペプチドと本発明の担体タンパク質で形成される組換えタンパク質は、同種の前記哺乳動物の当該低免疫原性タンパク質に対する免疫反応を引き起こす、

ペプチドを提供する。

好ましくは前記抗原エピトープペプチドのアミノ酸配列の長さが3~57である。より好ましくは前記抗原エピトープペプチドのアミノ酸配列の長さが5~17である。

もう一つの好適な例において、前記の低免疫原性タンパク質は、VEGF、TNF- α 、Her2タンパク、血液凝固因子、インターロイキン、FAP、PDL1、EGFRを含む。

【0035】

40

もう一つの好適な例において、前記の抗原エピトープペプチドは、TNF- α 由来のもので、かつ

(1) 配列番号10または配列番号12で表されるアミノ酸配列、

(2) 配列番号10または配列番号12で表されるアミノ酸配列が一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と融合すると免疫反応を引き起こす機能を有する誘導ポリペプチド、

からなる群から選ばれる。

【0036】

もう一つの好適な例において、前記の抗原エピトープペプチドは、TNF- α 由来のもので、かつ前記抗原エピトープペプチドは、

50

(a) 配列番号5～8、配列番号34、配列番号117または配列番号118で表されるポリペプチド、

(b) 配列番号5～8または配列番号34で表されるポリペプチドが一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と融合するとTNF-に対する免疫反応を引き起こす機能を有する(a)から誘導されるポリペプチド、
からなる群から選ばれる。

【0037】

もう一つの好適な例において、前記の抗原エピトープペプチドは、血液凝固因子FXI由来のもので、かつ前記抗原エピトープペプチドは、

(a) 配列番号40または配列番号41で表されるポリペプチド、

(b) 配列番号40または配列番号41で表されるポリペプチドが一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と融合すると免疫反応を引き起こす機能を有する(a)から誘導されるポリペプチド、
からなる群から選ばれる。

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープペプチドは、FXIの触媒ドメインまたはその相同配列を含む。

もう一つの好適な例において、前記FXIの触媒ドメインのタンパク質配列は、配列番号45で表されるものである。

【0038】

もう一つの好適な例において、前記の抗原エピトープペプチドは、血液凝固因子FXI由来のもので、かつ前記抗原エピトープペプチドは、

(a) 配列番号45で表されるポリペプチド、

(b) 配列番号45で表されるポリペプチドが一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と融合すると免疫反応を引き起こす機能を有する(a)から誘導されるポリペプチド、
からなる群から選ばれる。

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープペプチドは、FXII由来のものである。

【0039】

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープペプチドは、

(1) EAFSPVSYQHDLA、

(2) EGFSSITYQHDLA、および

(3) ほかのFXIIタンパク質における(1)、(2)のエピトープ配列に相当するペプチド断片、

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープペプチドは、血液凝固因子FXIIの触媒ドメインを含む。

からなる群から選ばれる1つまたは2つ以上である。

もう一つの好適な例において、前記FXIIの触媒ドメインは、

(a) 配列番号129または配列番号130のアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) (a)におけるアミノ酸配列が一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と融合すると免疫反応を引き起こす機能を有する(a)から誘導されるポリペプチド、

からなる群から選ばれる。

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープペプチドは、FAPの触媒ドメイン由来のものである。

【0040】

もう一つの好適な例において、前記FAPの触媒ドメインは、

(a) 配列番号108のアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) 配列番号108のアミノ酸配列が一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と融合すると免疫反応を引き起こす機能を有する

10

20

30

40

50

(a) から誘導されるポリペプチド、
からなる群から選ばれる。

【0041】

もう一つの好適な例において、前記の抗原エピトープペプチドは、FAP由来のもので、
かつ前記抗原エピトープペプチドは、

(a) 配列番号49で表されるポリペプチド、

(b) 配列番号49で表されるポリペプチドが一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と融合すると免疫反応を引き起こす機能を有する(a)から誘導されるポリペプチド、

からなる群から選ばれる。

10

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープペプチドは、VEGF由来のものである。

【0042】

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープペプチドは、

(a) 配列番号63のアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) 配列番号63のアミノ酸配列が一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と融合すると免疫反応を引き起こす機能を有する

(a) から誘導されるポリペプチド、

からなる群から選ばれる。

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープペプチドは、PDL1由来のものである

20

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープペプチドは、PDL1E由来のものである。

【0043】

もう一つの好適な例において、前記の抗原エピトープペプチドは、PDL1由来のもので、
かつ前記抗原エピトープペプチドは、

(a) 配列番号67、配列番号68、配列番号122、配列番号123、配列番号124または配列番号125のアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) (a) におけるアミノ酸配列が一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と融合すると免疫反応を引き起こす機能を有する

(a) から誘導されるポリペプチド、

からなる群から選ばれる。

30

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープペプチドは、上皮成長因子受容体EGFR由来のものである。

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープペプチドは、上皮成長因子受容体EGFRのドメインIII由来のものである。

【0044】

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープペプチドは、上皮成長因子受容体EGFR由来のもので、かつ前記抗原エピトープのペプチドは

(a) 配列番号83、110、111で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) (a) におけるポリペプチドが一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と融合すると免疫反応を引き起こす機能を有する

(a) から誘導されるポリペプチド、

からなる群から選ばれる。

40

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープペプチドは、上皮成長因子受容体EGFR由来のもので、かつ配列番号83で表されるアミノ酸配列と、

配列番号110および配列番号111のうちの少なくとも一つを含む。

【0045】

本発明の第十は、本発明の第九に記載の抗原エピトープペプチドと担体タンパク質で形成される融合タンパク質を提供する。

50

もう一つの好適な例において、前記担体タンパク質と前記抗原ペプチド断片は同一のタンパク質由来のものではなく、前記担体タンパク質は少なくとも一つのT細胞エピトープを含み、前記担体タンパク質は前記エピトープペプチドの免疫原性を増加することができる。

もう一つの好適な例において、前記担体タンパク質は、ジフテリア毒素DT、ジフテリア毒素の膜貫通ドメインDTT、ロタウイルスVP7、リーシュマニアの熱ショックタンパク質、カンピロバクター・ジェジュニのフラジェリン、クラミジア・トラコマチスの主要外膜タンパク質、キーホールリンペットヘモシニアン(Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH)、ウシ血清アルブミン(Bovine Serum Albumin, BSA)、オボアルブミン(Ovalbumin, OVA)、フィブリノゲンを含む。

10

【0046】

もう一つの好適な例において、前記担体タンパク質の分子表面のアミノ酸残基領域の少なくとも一つにスプライス、置換および/または挿入によって前記抗原エピトープペプチドが導入され、前記融合タンパク質になる。

もう一つの好適な例において、前記「分子表面のアミノ酸残基領域」は、ループ領域、-ターン領域、N末端またはC末端を含む。

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープペプチドは、前記担体タンパク質のC末端および/またはN末端に連結して前記融合タンパク質になる。

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープと前記担体タンパク質の間に連結ペプチドがある。好ましくは前記連結ペプチドの長さは3~30個のアミノ酸である。より好ましくは前記連結ペプチドの長さは4~20個のアミノ酸である。最も好ましくは前記連結ペプチドの長さは7~17個のアミノ酸である。

20

もう一つの好適な例において、前記抗原エピトープと前記担体タンパク質の間に連結ペプチドがない。

【0047】

もう一つの好適な例において、前記融合タンパク質は、

(a) 配列番号：9、11、13、35、37、39、42、43、44、50、51、62、69、70、84、85、86、87、112、119、120、126または127で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) (a)におけるポリペプチドが一つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によって形成する、担体タンパク質と融合すると免疫反応を引き起こす機能を有する

30

(a)から誘導されるポリペプチド、

から選ばれる。

もちろん、本発明の範囲内において、本発明の上述の各技術特徴および下述(例えば実施例)の具体的に記述された各技術特徴は互いに組合せ、新しい、または好ましい技術方案を構成できることが理解される。紙数に限りがあるため、ここで逐一説明しない。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】図1は、実施例におけるオーバーラップPCRによる増幅の原理図を示す。

【図2】図2は、実施例1におけるmTNFワクチンによる発症の抑制効果を示す。図2Aは、免疫後のDT抗血清に対するTNF28のマウスおよびヒトのTNFタンパク質に対するウェスタンブロットティング実験を示す。図2Bは、各群のネズミの免疫および発症期間の平均発症点数を示し、コントロール群Alumに対してmTNF28群は発症率で顕著な遅延および炎症を軽減する治療作用が現れたことがわかる。図2Cは、各融合タンパク質の生物活性を示す。図2Dは、各群のネズミの免疫および発症期間の平均発症点数を示し、コントロール群に対してDTT-mTNFt群は発症点数で顕著な発症の抑制効果があったことがわかる。

40

【0049】

【図3】図3は、実施例2におけるmTNF28-1抗原タンパク質が免疫反応を引き起こす効果を示す。図3Aは、mTNF28-1の四回目の強化免疫から60日後マウスの血を採取して抗体のアイソタイプを同定したところ、IgG1に対する力価がまだ10000以上であったことを示す。図3Bは、各群のネズミの免疫および発症期間の平均発症点数を示し、コントロール群に対し

50

てmTNF28-1群は発症点数で顕著な発症の抑制効果があったことがわかる。

【図4】図4は、実施例3におけるFXIワクチンの抗血栓効果を示す。図4Aは、各群の抗原免疫後のマウスの致死肺塞栓モデルにおける生存率を示す。図4Bは、ヒト胎盤浸出液の注射からのマウスの呼吸困難が始まった時間を示す。図4Cおよび図4Dは、29番の抗原によって免疫されたマウスの血栓の形態(C)および湿重量(D)を示す。

【図5】図5は、実施例3におけるFXIワクチンによって免疫されたマウスの抗体は、正常ヒト血漿APTT値(A)および(B)FXIに特異的な血漿APTT値を延ばしたことを示す。

【図6】図6は、実施例4におけるFXIIワクチンによって免疫されたマウスの血栓の形態(A)および湿重量(B)を示す。

【0050】

【図7】図7は、実施例5における融合ワクチンDTT-FAPの腫瘍生長に対する抑制効果を示す。図7Aは、腫瘍を接種したマウスの生存率である。図7Bは、腫瘍体積の変化傾向を示す。図7Cは、接種4週後の腫瘍の大きさを示す。

【図8】図8は、実施例6におけるDTT-VEGFによる免疫後、担腫瘍マウスの生存時間を顕著に延長させたことを示す。

【図9】図9は、実施例6における各実験群の腫瘍周囲血管の状況、腫瘍内部の病理学的形態、腫瘍重量および腫瘍体積の変化傾向を示す。

【図10】図10は、実施例7におけるDTT-PDL1EおよびDTT-PDL1E組換えタンパク質ワクチンの腫瘍生長に対する抑制効果を示す。図10Aは、免疫治療におけるマウスの腫瘍体積の変化を示す。図10B、図10Cおよび図10Dは、それぞれ実施例7におけるDTT-PDL1EおよびDTT-PDL1E組換えタンパク質ワクチンによって免疫治療されたマウスの腫瘍重量の変化(図10B)、担腫瘍マウスの体重(図10C)および腫瘍と担腫瘍マウスの体重の比(図10D)を示す。

【0051】

具体的な実施形態

本発明者は、幅広く深く研究したところ、初めて意外に、適切な担体タンパク質の構造骨格に基づき、前記担体タンパク質の少なくとも一つの表面のアミノ酸残基の領域にスプライス、置換および/または挿入によって低免疫原性タンパク質由来のペプチド断片を導入すると、新規な組換えタンパク質を製造できることを見出した。前記組換えタンパク質は、有効に生体(例えば哺乳動物)の前記組換えタンパク質に対する免疫応答を引き起こすだけでなく、有効に前記低免疫原性タンパク質由来のペプチド断片に対し、抗体の発生を含む免疫応答を引き起こすことができる。これに基づき、本発明を完成させた。

【0052】

用語

ここで用いられるように、用語「担体タンパク質」とは、本発明の組換えタンパク質におけるタンパク質の構造骨格となるタンパク質である。通常、前記の担体タンパク質は免疫原性の強いタンパク質で、例えば病原体のタンパク質で、代表的な例として、ウイルスのタンパク質、細菌のタンパク質、クラミジアのタンパク質、マイコプラズマのタンパク質などを含むが、これらに限定されない。

【0053】

ここで用いられるように、用語「抗原エピトープ(ペプチド)」とは動物の免疫反応を誘導するほかのタンパク質のペプチド断片で、当該エピトープは担体タンパク質にとってのもので、担体タンパク質自身が免疫反応を引き起こすペプチド断片ではない。通常、抗原エピトープとは免疫反応の標的になるペプチド断片で、好ましくは哺乳動物(例えばヒト)のタンパク質のペプチド断片で、前記担体タンパク質由来のものではない。

ここで用いられるように、用語.pdbとはタンパク質の三次構造のデータファイルで、Protein Data Bank(www.pdb.org)からのものである。

ここで用いられるように、用語DTTとはジフテリア毒素の膜貫通ドメインである。

【0054】

ここで用いられるように、用語T細胞エピトープとは、T細胞のエピトープで、T細胞抗

10

20

30

40

50

原エピトープとも言われ、抗原分子が抗原提示細胞において酵素による分解で加工されて形成するペプチド断片で、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子と結合し、細胞の表面に提示されてT細胞受容体（TCR）と結合し、T細胞を活性化するが、ヘルパーT細胞エピトープなどを含む。

ここで用いられるように、用語「低免疫原性タンパク質」とは単独で動物を免疫させる場合、十分な免疫反応を引き起こせないタンパク質である。

ここで用いられるように、用語「分子表面のアミノ酸残基領域」または「表面のアミノ酸残基の領域」とは、タンパク質分子の表面にあるアミノ酸残基からなる領域で、好ましくは前記「分子表面のアミノ酸残基領域」はループ領域、 β -ターン領域、N末端またはC末端を含む。

10

【0055】

代表的な担体タンパク質

1. ジフテリア毒素およびその膜貫通ドメイン

ジフテリア毒素（diphtheria toxin、DT）は ファージに感染したジフテリア（*Corynebacterium diphtheriae*）によって生成される外毒素で、臨床で使用されるジフテリア百日咳 破傷風混合ワクチンの成分に存在する。安全性は長年の臨床での使用によって検証され、重度の不良反応がまれで、現在まだジフテリア成分によるアレルギー反応が報告されていない。

ジフテリア毒素の分子は、535個のアミノ酸残基で構成され、空間上で比較的独立の触媒ドメイン（1-193AAs）、膜貫通ドメイン（205-378AAs）および受容体結合ドメイン（386-535AAs）からなる。膜貫通ドメインおよび受容体結合ドメイン自身は毒性がなく、その機能は細胞の表面の受容体を介して結合し、触媒ドメインを細胞内に導入することである。

20

【0056】

ジフテリア毒素のアミノ酸配列（P00588、DTX_CORBE）は、以下の通りである。

```
GADDVVDSSK SFVMENFSSY HGTKPGYVDS IQKGIQKPKS GTQGNYYDDW KGFYSTDNKY
DAAGYSVDNE NPLSGKAGGV VKVTYPGLTK VLALKVDNAE TIKKELGLSL TEPLMEQVGT EEFIKRFGDG
ASRVVLSLPF AEGSSSVEYI NNWEQAKALS VELEINFETR GKRGQDAMYE YMAQACAGNR VRRSVGSSLS
CINLDWDVIR DKTKTKIESL KEHGPIKNKM SESPNTVSE EKAKQYLEEF HQTALHPHEL SELKTVTGTN
PVFAGANYAA WAVNVAQVID SETADNLEKT TAALSILPGI GSVMGADGA VHHNTEEIVA QSIALSSLMV
AQAIPLVGEL VDIGFAAYNF VESIINLFQV VHNSYNRPAY SPGHKTQPFL HDGYAVSWNT VEDSIIRTGF
QGEGSHDIKI TAENTPLPIA GVLLPTIPGK LDVNSKSTHI SVNGRKIRMR CRAIDGDVTF CRPKSPVYVG
NGVHANLHVA FHRSSSEKIH SNEISSDSIG VLG YQKTVDH TKVNSKLSLF FEIKS
```

30

（配列番号1）

【0057】

ジフテリア毒素の分子における5つのヘルパーT細胞エピトープは80%以上ものヒトMHCクラスIIに識別される。そのうち、4つのヘルパーT細胞エピトープはジフテリア毒素の膜貫通ドメイン（T領域、DTT）に存在し、それぞれDTT-Thエピトープ271-290（271-PVFAGAN YAAWAVNVAQVID-290）、DTT-Thエピトープ321-340（321-VHHNTEEIVAQSI AL SSLMV-340）、DTT-Thエピトープ331-350（QSIALSSLMVAQAIPLVGEL-350）、DTT-Thエピトープ351-370（351-VDIGFAAYNFVESIINLFQV-370）で、主に三つの長いヘリックス構造（276-ANYAAWAVNVA-286；327-EIVAQSIALSSLMVAQAIPLV-347；353-IGFAA YN FV ESIINLFQVVHNSYN-376）に分布する。

40

【0058】

本発明者はジフテリア毒素のタンパク質構造に対するシミュレーションを行い、構造の安定性に必要なヘリックス、シートエレメントおよびT細胞エピトープを残し、代わりに抗原エピトープを導入することが可能な表面のアミノ酸残基の領域の位置は下記表に示す。

【表 2】

ジフテリア毒素(DT)の表面のアミノ酸残基の領域の導入可能な位置のまとめ

番号	エピトープ導入位置 (アミノ酸残基)	替えられた残基数	
DT-1	6-10	5	
DT-2	26-34	9	
DT-3	26-43	18	
DT-4	26-48	23	10
DT-5	68-76	9	
DT-6	86-88	3	
DT-7	107-112	6	
DT-8	129-133	5	
DT-9	169-177	9	
DT-10	222-224	3	
DT-11	232-239	8	
DT-12	256-258	3	20
DT-13	268-271	4	
DT-14	289-296	8	
DT-15	317-320	4	
DT-16	348-354	7	
DT-17	438-440	3	
DT-18	463-467	5	
DT-19	495-502	8	30
DT-15	516-523	8	

【 0 0 5 9 】

ジフテリア毒素の膜貫通ドメイン(DTT)自身は毒性がなく、核心の骨格が主にヘリックスエレメントで構成され、ヘリックスエレメント同士は活動可能なループ領域によって連結している。

DTTアミノ酸配列(1F0L.pdb:202-378)は以下の通りである。

202 INLDWDVIRD KTKTKIESLK EHGPIKNKMS ESPNKTVSEE KAKQYLEEFH QTALEHPELS

262 ELKTVTGTNP VFAGANYAAW AVNVAQVIDS ETADNLEKTT AALSILPGIG SVMGIADGAV

322 HHNTEEIVAQ SIALSSLMVA QAIPLVGELV DIGFAAYNFV ESIINLFQVV HNSYNRP(配列番号2)

40

【 0 0 6 0 】

本発明者はDTTのタンパク質構造に対するシミュレーションを行い、構造の安定性に必要なヘリックス、シートエレメントおよびT細胞エピトープを残し、代わりに抗原エピトープを導入することが可能な位置は下記表に示す。

【表3】

DTTの抗原エピートープの導入が可能な表面のアミノ酸残基の領域のまとめ

番号	汎用の導入可能な位置(アミノ酸残基)	好ましい導入可能な位置(アミノ酸残基)	好ましい替えられる残基数
DTT-1	220-226	222-224	3
DTT-2	228-241	230-239	10
DTT-3	253-262	255-260	6
DTT-4	265-276	267-274	8
DTT-5	285-298	287-296	10
DTT-6	303-312	305-310	6
DTT-7	313-327	315-325	11
DTT-8	315-322	317-320	4

10

【0061】

本発明の好適な例において、薬物で関与しようとする標的タンパク質のペプチド断片を選択してDTTに導入し、ヘリックスエレメントの間のループ領域のアミノ酸残基を含むDTTの表面のアミノ酸残基の領域を置換する。

20

本発明の研究によって、ジフテリア毒素の膜貫通構造と標的タンパク質由来のペプチド断片が融合した場合、各自のフォールディングに影響しないか、あるいは基本的に影響しない。組換えタンパク質において、DTTがタンパク質の骨格とされ、標的タンパク質のペプチド断片がDTTに導入されると、動物の前記標的タンパク質に対する免疫反応を引き起こす。そのため、DTTは非常に適切なタンパク質骨格である。

【0062】

組成物および施用方法

また、本発明は、(i)本発明の組換えタンパク質または本発明の組換えタンパク質をコードするポリヌクレオチドと、(ii)薬学的にまたは免疫学的に許容される賦形剤またはアジュバントとを含有する組成物を提供する。

30

本発明において、用語「含有」は、各種の成分が一緒に本発明の組成物に使用されるか、あるいは存在することを指す。そのため、用語「主に～からなる」および「～からなる」は、用語の「含有」に含まれる。

【0063】

本発明の組成物は、薬物組成物およびワクチン組成物を含む。

本発明の組成物は、単価組成物(一種類だけの組換えタンパク質またはポリヌクレオチドを含有する。)でもよく、多価組成物(複数種類の組換えタンパク質またはポリヌクレオチドを含有する。)でもよい。

本発明の薬物組成物またはワクチン組成物は、様々な通常の剤形に調製することができ、注射剤、顆粒剤、錠剤、丸剤、坐剤、カプセル、懸濁液、噴霧剤などを含むが、これらに限定されない。

40

【0064】

(1) 薬物組成物

本発明の薬物組成物は、治療有効量の本発明の組換えタンパク質またはポリヌクレオチドを含む(または含有する)。

ここで使用される用語「治療有効量」とは、治療剤として目的の疾患や病状を治療、緩和又は予防できる量、又は検出できる治療・予防効果を表す量を指す。その効果は例えば抗原のレベルによって検出することができる。治療効果は、生理的症状の減少も含む。ある対象に対する正確な有効量は、その対象の体型や健康状況、病症の性質や程度、及び選ばれた治療剤及び/又は治療剤の組合せにもよる。そのため、予め指定される精確な有効

50

量は意味がない。しかしながら、ある指定された状況に対して、通常の実験で当該有効量を確定することができる。

【0065】

本発明の目的のため、効果のある使用量は、個体に約0.001mg/kg～1000mg/kg、好ましくは0.01mg/kg～100mg/kg体重の組換えタンパク質を給与する量である。

薬物組成物は、さらに、薬学的に許容される担体を含有してもよい。用語「薬学的に許容される担体」とは、治療剤（例えば本発明の組換えタンパク質）の投与のために使用される担体である。当該用語は、自身がその組成物を受ける個体に有害な抗体を誘導せず、且つ投与後過剰な毒性がないという条件を満足するような薬剤担体を指す。適切な担体は、大きくて代謝の遅い大分子、例えばタンパク質、多糖、ポリ乳酸（polylactic acid）、ポリグリコール酸などでもよい。これらの担体は、本分野の技術者に熟知である。Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Pub. Co., N.J. 1991)において、薬学的に允許される担体または賦形剤に関する十分な検討が見つけれられる。

組成物において、薬学的に許容される担体は液体、例えば水、塩水、グリセリンやエタノールを含んでもよい。さらに、これらの担体には、補助的な物質、例えば湿潤剤或いは乳化剤、pH緩衝物質等が存在してもよい。通常、組成物は注射剤、例えば液体溶液または懸濁液に調製してもよく、注射直前に適切に溶液または懸濁液、液体賦形剤を配合する固体形態に調製してもよい。リポソームも薬学的に許容される担体の定義に含まれる。

【0066】

(ii) ワクチン組成物

本発明のワクチン（組成物）は、予防性の（すなわち疾患を予防する）ものでも治療性の（すなわち発症後疾患を治療する）ものでもよい。

これらのワクチンは、免疫性抗原（本発明の組換えタンパク質を含む。）を含み、かつ通常、「薬学的に許容される担体」と組み合わせるが、これらの担体は自身がその組成物を受ける個体に有害な抗体を誘導しない任意の担体を含む。適切な担体は、通常、大きくて代謝の遅い大分子、例えばタンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、アミノ酸重合体、アミノ酸共重合体、脂質凝集物（例えば油滴またはリポソーム）などである。これらの担体は、本分野の技術者に熟知である。また、これらの担体は免疫刺激剤（「アジュバント」として働くことができる。さらに、抗原は、細菌類の毒素（例えばジフテリア、破傷風、コレラ、ピロリ菌などの病原体のトキソイド）とカップリングしても良い。

【0067】

免疫組成物の効果を強化する好適なアジュバントは、(1)アルミニウム塩(alum)、たとえば水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムなど、(2)水中油型乳剤の配合、たとえば、(a)MF59(WO 90/14837を参照)、(b)SAF、および(c)Ribi（登録商標）アジュバントシステム(RAS)(Ribi Immunochem, Hamilton, MT)、(3)サポニンアジュバント、(4)完全フロイントアジュバント(CFA)および不完全フロイントアジュバント(IFA)、(5)サイトカイン、たとえばインターロイキン(たとえばIL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12など)、インターフェロン(たとえば インターフェロン)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CFS)、腫瘍壊死因子(TNF)など、(6)細菌ADP-リボース化毒素(たとえば大腸菌の易熱性エンテロトキシンLT)の解毒変異体、および(7)免疫刺激剤として組成物の効果を強化するほかの物質を含むが、これらに限定されない。

【0068】

免疫原性組成物を含むワクチン組成物（たとえば、抗原、薬学的に許容される担体およびアジュバントを含んでもよい。）は、通常、希釈剤、たとえば水、塩水、グリセリン、エタノールなどを含有する。さらに、このようなビヒクルには、補助的な物質、たとえば湿潤剤或いは乳化剤、pH緩衝物質などが存在してもよい。

より具体的に、免疫原性組成物を含むワクチンは、免疫学的有効量の免疫原性ポリペプチド、および上記ほかの必要な成分を含む。「免疫学的有効量」とは、個体に一回あるいは連続投与の一部として投与すると治療または予防に有効な量を指す。当該使用量は、治療される個体の健康状況および生理状況、治療される個体の種類（たとえばヒト）、個

10

20

30

40

50

体の免疫系の抗体を合成する能力、必要な保護の程度、ワクチンの配合、治療医師の医療状況に対する評価、およびほかの関連要素による。当該使用量は比較的広い範囲にあると推測されるが、通常の実験によって確定することができる。

通常、ワクチン組成物または免疫原性組成物は注射剤、例えば液体溶液または懸濁液に調製してもよく、注射直前に適切に溶液または懸濁液、液体賦形剤を配合する固体形態に調製してもよい。当該製剤は、乳化し、あるいはリポソームに綴じ込んで、アジュバントの効果を強化することもできる。

また、本発明のワクチン組成物は、単価ワクチンでも多価ワクチンでもよい。

【0069】

(iii) 投与形態および投与量

一旦本発明の組成物としたら、直接給与対象に与えられる。治療される対象は、哺乳動物、特にヒトでもよい。

ワクチンとして使用される場合、既知の方法で本発明の組換えタンパク質を直接個体に施用することができる。通常、普通のワクチンと同様の施用形態を使用し、かつ/または病原体感染の経路を模倣してこれらのワクチンを施用する。

本発明の薬物組成物またはワクチン組成物を投与する形態は、筋肉内、皮下、皮内、肺内、静脈内、経鼻、経口投与またはほかの胃腸外の投与形態を含むが、これらに限定されない。必要によって、投与形態を組み合わせ、または疾患の状況によって調整することができる。ワクチン組成物は、単回でも複数回で投与してもよく、かつ強化投与量で投与することによって免疫力を引き出しかつ/または維持することができる。

「有効量」で組換えタンパク質ワクチンを投与し、すなわち組換えタンパク質の量は使用される投与形態では免疫応答を引き起こすのに十分で、有効に宿主を関連の疾患から守ることを促進することができる。

【0070】

代表的な疾患は、自己免疫疾患、腫瘍などを含むが、これらに限定されない。

各ワクチン剤に使用される組換えタンパク質の量は、保護性免疫応答を引き起こし、かつ顕著な副作用がないように決められる。通常、宿主細胞に感染した後、各ワクチンは、約1 μ g~1000mg、好ましくは1 μ g~100mg、より好ましくは10 μ g~50mgのタンパク質を含有する。対象における抗体の力価およびほかの反応の観察を含む標準研究方法によって具体的なワクチンの最適な使用量を決めることができる。ワクチンによる免疫力のレベルをモニタリングすることによって強化投与量が必要かを定めることができる。血清における抗体の力価を評価し、強化投与量で免疫接種を行うことが必要になることもある。アジュバントおよび/または免疫刺激剤を施用すると、本発明のタンパク質の免疫応答を向上させることができる。

好適な方法は、胃腸外（皮下または筋肉内）の形態によって注射で免疫原性組成物を投与する方法である。

また、本発明のワクチンは、ほかの免疫調節剤と併せて投与してもよく、ほかの治療剤と併せて投与したもよい。

【0071】

本発明の主な利点は以下の通りである。

- (1) 有効に生体の低免疫原性標的の特定のエピトープに対する免疫反応を引き起こす。
- (2) 抗原エピトープを持つ組換えタンパク質の製造コストが低く、投与が便利である。
- (3) 担体タンパク質と化学的にカップリングした製剤と比べ、抗原の構造が明確で、品質のコントロールが可能で、より安全である。

【0072】

以下、具体的な実施例によって、さらに本発明を説明する。これらの実施例は本発明を説明するために用いられるものだけで、本発明の範囲の制限にはならないと理解されるものである。下述実施例で具体的な条件が示されていない実験方法は、通常、例えばSambro

10

20

30

40

50

okら、「モレキュラー・クローニング：研究室マニュアル」(ニューヨーク、コールド・スプリング・ハーバー研究所出版社、1989)に記載の条件などの通常の条件に、或いは、メーカーのお薦めの条件に従う。特に説明しない限り、百分率および部は重量百分率および重量部である。

【0073】

実験方法：

方法1 組換えタンパク質抗原の構造の設計

モノエピトープの組換えタンパク質抗原の構造の設計は、標的タンパク質の抗原エピトープペプチドのアミノ酸配列を元のアミノ酸残基の代わりにDTTのエピトープ提示位置に導入し、新しいタンパク質の構造を形成した。ポリエピトープの組換えタンパク質抗原の構造の設計は、標的タンパク質のポリ抗原エピトープペプチド断片またはドメインをDTTのC末端に挿入し、あるいはリンカーを介してDTTのC末端に挿入し、新しいタンパク質の構造を形成した。

10

【0074】

方法2 組換えタンパク質の発現ベクターの構築

GeneBankにおけるDTT遺伝子のmRNAおよび標的タンパク質の遺伝子のmRNAの読み枠の抗原エピトープ領域の配列に基づき、DTT遺伝子のプライマー(DTT-FとDTT-R)および標的タンパク質の遺伝子のプライマーを設計し、オーバーラップPCRの原理でDTTの対応のエピトープ展示位置に抗原エピトープ領域の配列を導入し、かつ首尾に酵素切断部位BamHIとXhoIを導入し、3つの保護塩基を導入した(図1)。各プライマーは南京genscript社によって合成された。

20

【0075】

(1) 抗原エピトープをDTTの途中に導入/置換する組換えタンパク質の発現ベクターの構築：DTT遺伝子のDNAを鋳型とし、プライマーDTT-F(BamHI酵素切断部位を含む。)および標的タンパク質-2Rで1回目のPCR増幅を行った。同時に、DTT遺伝子のDNAを鋳型とし、プライマーDTT-R(XhoI酵素切断部位を含む。)および標的タンパク質-3FでPCR増幅を行った。以上の2種類の増幅産物を混合した後、プライマーDTT-FおよびDTT-Rで組換えタンパク質の遺伝子のPCR増幅を行った。

(2) 抗原エピトープをDTTのC末端に導入/置換する組換えタンパク質の発現ベクターの構築：DTT遺伝子のDNAを鋳型とし、プライマー対DTT-F(BamHI酵素切断部位およびエンテロキナーゼ切断部位DDDDKの配列を含む。)で1回目のPCR増幅を行った。さらに、標的タンパク質の遺伝子のプライマー対(リバースプライマーがXhoI酵素切断部位を含む。)で標的タンパク質の抗原エピトープの遺伝子のPCR増幅を行った。以上の2種類の増幅産物を混合した後、プライマー対DTT-Fおよび標的タンパク質の遺伝子のリバースプライマーで組換えタンパク質の遺伝子のPCR増幅を行った。

30

【0076】

組換えタンパク質の遺伝子は、BamHIおよびXhoIで酵素切断してプラスミドpGEX 6p-1に連結して発現プラスミドpGEX-DTT-標的タンパク質抗原エピトープを得、シクエンシングで正確性を確認した。

PCRシステムを調製した後、94 で2 min変性させ、94 ,15s、55 ,30s、68 ,2 minで35サイクルを行い、68 で10 min維持した。2 μLの増幅産物を取って電気泳動を行い、Go ldiviewで染色して観察したところ、目的のバンドが現れた。PCR産物およびpEGX-6P-1ベクターを二重酵素切断した後、回収して精製し、AXYGENゲルクリーンキットでクリーンした。PCR装置においてT4リガーゼで16 で連結反応を5 h行った。連結産物を熱刺激して大腸菌に導入し、5 μLの連結産物を感受性細胞に入れて軽く混合し、氷浴で20 min後、42 の水浴で90s、さらに氷浴で2 min後、900 μLの37 で加熱しておいたLB培地を入れ、37 でシェーカーにおいて150rpmで1h回復させ、200 μL取ってアンピシリンを含有するLBプレートに塗布し、37 で20 h培養し、さらに形質転換体を同定して選別した。抽出したベクタープラスミドを首尾のプライマーでPCR増幅した後、同定された陽性クローンを最終濃度が15%の無菌グリセリンに入れ、-80 の超低温冷蔵庫で保存して使用に備え、組

40

50

換えタンパク質発現プラスミドを含有する大腸菌の菌種であった。陽性クローンはシクエンシングで理論的配列と比べて連結が成功したか判断した。

【 0 0 7 7 】

【表 4】

表 1 DTT 遺伝子の C 末端へエピトープの挿入の汎用プライマー表

プライマー名称	プライマー配列
DTT-F(配列番号 3)	CGCGGATCCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCATAAATCTTGATTGGGATGTC
DTT-R(配列番号 4)	CCGCTCGAGCTAGGGACGATTATACGAATTATG

10

【 0 0 7 8 】

方法3 組換えタンパク質の発現・同定および大規模製造

組換えタンパク質発現プラスミドを含有する大腸菌の単集落を5mLのLB培地に接種し、37℃で一晩培養した。その後、1:50で50ng/Lのアンピシリンを含有するLB培地に希釈し、 D_{600} 値が約0.6になるように約4時間培養し、最終濃度が1mMになるまでIPTGを入れ、37℃4時間誘導し、取り出して発現状況を確認した。50 mLの誘導された培養物を取り、氷の上に30 min置き、12000rpmで8 min遠心し、菌体を収集し、上清を捨てた。沈殿を1×PBS(5 mL/100mL培養物)で等体積の冷たい无菌水を入れて懸濁させた。300 µg/mLのリゾチームを入れ、氷の上で軽く30 min振とうした後、-70℃で12h冷凍保存した。サンプルを流れる水で解凍してプロテアーゼ阻害剤を入れ、氷浴において超音波で破碎し(出力200W)、間欠破碎で、破碎5s、間隔5sで繰り返し、合計8min破碎した(顕微鏡で破碎結果を観察することができる。)。混合物を4℃で12,000gの回転数で12min遠心した。混合、上清、沈殿のサンプルを4℃で保存して使用に備えた。

20

【 0 0 7 9 】

混合、上清、沈殿のサンプルを取ってそれぞれクマシーブリリアントブルー法でタンパク質の含有量を定量に測定し、所定の濃度に希釈した後、200 µLとって50 µLの5×サンプル緩衝液に入れ、5min沸騰させ、取り出して冷却した後、12,000 rpmで8min遠心し、サンプルをセットした。微量サンプラーで上記混合液を20 µL取り、SDS-PAGE電気泳動で誘導発現のタンパク質の分子量および発現量を分析し、理論の分子量との一致性および発現可溶性を判断した。

30

陽性発現の菌種を取り、50mLの選択性アンピシリンLB液体培地に接種し、37℃で200rpm/minで一晩振とうし、2日目に1mL取って1LのLB液体培地に接種し、同様の操作は合計4本、37℃で180rpmで4h培養した後、1本はIPTGサンプルを入れずにコントロールとし、ほかは最終濃度が1 mMになるように1 mol/LのIPTGを入れ、10時間培養を続けた。全部誘導した後、菌液を6000rpmで8 minで遠心して菌体沈殿を収集し、1mLのPBS(pH = 7.3)で再懸濁させて1回洗浄し、遠心して菌体を収集し、体積250 mLのPBS(pH = 7.3)を入れて再懸濁させた後、超音波で15min破碎し、パルス破碎後50 mL遠心管で15000rpmで40min遠心した後、気をつけて上清を取り、4℃で保存して使用に備えた。

【 0 0 8 0 】

GEの5mLのGSTを充填しておいたカラムをまず1×PBS(140mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na₂HPO₄、2mM KH₂PO₄)で平衡化し、流速を4mL/min程度とし、カラム体積の5倍で平衡化し、上記処理されたタンパク質サンプルをセットし、流速を1mL/minとした。サンプルをセットした後、1×PBSで洗浄し、流速を4mL/minとし、カラム体積の10倍以上で洗浄した。その後、1×PSP緩衝液でカラムを5倍以上の体積で平衡化した後、800 µlのPSP切断酵素をGSTカラムに通し、カラムを均一に満たし、4℃で12~16時間切断した後、カラム体積の2~3倍の溶離液(50mM Tris-HCl、10mM GSH、pH8.0)でタンパク質を溶離させ、溶離流速を2mL/minとし、使用したカラムと器材を20%エタノールで洗浄した。その後、タンパク質を生理食塩水に透析し、定量後、タンパク質を0.5mg/mLに希釈し、電気泳動で測定された純度が90%以上に達した。タンパク質を生理食塩水で透析した後、-20℃の冷蔵庫で保存して使用に備えた。調製された3種類のタンパク質はいずれも純度が90%以上であった。

40

50

【 0 0 8 1 】

方法4 融合タンパク質の動物免疫および抗原力価の測定

融合タンパク質抗原を0.5mg/mL希釈した後、希釈後濃度が2mg/mLの水酸化アルミニウム (sigma) アジュバントまたはフロインドアジュバントと均一に混合した後、背部皮下の数箇所注射し、1週間ごとに強化免疫し、このように強化免疫を2回行った後、マウスの目縁から採血し、37℃で2h静置した後、4000rpmで10min遠心した後、上清の血清を取って使用に備えた。

【 0 0 8 2 】

コーティング緩衝液 (50mmol/L炭酸水素塩緩衝液、pH 9.6) で標的タンパク質または標的細胞を濃度が100ng/100 μ lになるように希釈した後、ポリスチレンの96ウェルプレート (各ウェルに100 μ lずつ) に移し、4℃で一晩インキュベートし、PBST(0.02 M リン酸塩、0.15 M NaCl、0.15% ツイン-20, pH 7.4) で毎回5分間で6回洗浄した。さらに、300 μ lの脱脂粉乳 (PBSTに溶解、タンパク質濃度が5%) を入れ、37℃で2時間インキュベートしてブロッキングした。PBST(0.02 M リン酸塩、0.15 M NaCl、0.15% ツイン-20, pH 7.4) で毎回5分間で6回洗浄した。その後、300 μ lの脱脂粉乳 (PBSTに溶解、タンパク質濃度が5%) で免疫血清を所定の倍数に希釈した後、各ウェルに100 μ lずつ入れ、37℃で1時間インキュベートし、PBST(0.02 M リン酸塩、0.15 M NaCl、0.15% ツイン-20, pH 7.4) で毎回5分間で6回洗浄した。100 μ lのヒツジ抗ネズミ-IgG-ペルオキシダーゼ架橋物 (1:5,000に希釈) を入れ、37℃で1時間インキュベートし、PBST(0.02 M リン酸塩、0.15 M NaCl、0.15% ツイン-20, pH 7.4) で毎回5分間で6回洗浄した。最後に、100 μ lの基質溶液 (10mM基質溶液に1mgテトラメチルベンジジン (TMB)、0.0969gクエン酸ナトリウム、0.3496g Na₂HPO₄ · 12H₂O、32 μ l 0.75% H₂O₂が含まれる) を入れ、37℃で30分間インキュベートした。50 μ lの2mol/L H₂SO₄を入れて反応を終止させた。マイクロプレートリーダーで各ウェルの450nmおける値を測定した。

【 0 0 8 3 】

実験5 マウスコラーゲンモデルの構築

マウスを3回免疫させた後、関節リウマチモデルの構築を始め、具体的な操作は、42日目にウシのII型コラーゲン (2mg/mL) とCFA (1mg/mLのM. tuberculosisを含有) を1:1で氷の上で背部の数箇所に合計200 μ l注射し、63日目にウシのII型コラーゲン (4mg/mL) とCFA (1mg/mLのM. tuberculosisを含有) を比率1:1で、低温で氷の上でかき混ぜて乳化し (清水に一滴入れるとすぐに分散しないのを乳化が完成した基準とする。)、マウスの尾根部から1.5cmのところから50 μ l注射し、70日目にウシのII型コラーゲン (4mg/mL) とCFA (1mg/mLのM. tuberculosisを含有し、かつ1ml CFAにさらに3mgのM. tuberculosisを入れた。) を比率1:1で、低温で氷の上で乳化した後、マウスの尾根部から1.5cmのところから50 μ l注射した。その後、ネズミの体重および発症状況を週に2回測定し、記録した。

採点基準：4点制でマウスの発症程度を評価した。0点：赤い腫れやむくみが見られない。1点：赤い斑点および軽度のむくみが足の中段 (足根骨) または踝関節に留まる (1つの足の指に軽度の赤い腫れがある。)。2点：赤い斑点および軽度のむくみが踝関節から足の中段に蔓延した (2つまたは2つ以上の足の指が赤く腫れた。)。3点：赤い斑点および中度のむくみが踝関節から趾関節に蔓延した (踝関節または寛関節が赤く腫れた。)。4点：赤い斑点および重度のむくみが踝、足および趾に及んだ (すべての関節および足の指が赤く腫れ、曲げられない。)。四肢はそれぞれ単独で採点するため、最高点数が16点である。

【 0 0 8 4 】

方法6 ウェスタン同定

元のサンプルは通常20~30 μ gの量で、初期電圧が45Vの時の電流強度で定電流電気泳動を行い、電圧が65Vになったら定電圧電気泳動に変え、目的のタンパク質がゲルの下側から1cm以上に移動したら終了した。ゲルを転写緩衝液に浸漬して10min平衡化した。ゲルの大きさに応じて膜およびろ紙6枚を切り、転写緩衝液に入れて10min平衡化した。PVDF膜を使用する場合、純メタノールで3~5分間浸漬して飽和させる。転写サンドイッチの組立：

スポンジ/3層ろ紙/ゲル/膜/3層ろ紙/スポンジで、各層をセットした後、試験管で気泡を出した。転写槽を氷浴に置き、サンドイッチ（黒い面を黒い面に向ける。）を入れ、転写緩衝液を入れ、電極を入れ、10mAで一晩あるいは100Vで1h行った。（調整時間に注意）膜への転写が終了後、電源を切り、ハイブリダイゼーション膜を取り出した。

【0085】

膜を電気転写槽から取り出し、脱イオン水とTTBSで少し洗浄し、ブロッキング液に浸漬して1hゆっくり振とうした。希釈された一次抗体を10mLあるいは50mLの遠心管に入れた。ウェスタン膜をブロッキング液から取り出し、ろ紙を一角に接触して水分を吸いて乾燥し、正面が下に向くように一次抗体に貼り合わせ、4で一晩静置した（正面に鉛筆で印をつけた。）。一次抗体のインキュベーションが終わった後、TTBSで膜を洗浄して毎回10minで3回浸漬して洗浄した。一次抗体に合わせて適切な二次抗体を選び、同定方法に応じてHRP標識抗体を選択し、相応の比率で希釈し（1:5000）、室温で軽く1h振とうした。二次抗体のインキュベーションが終わった後、TTBSで膜を洗浄して毎回10minで3回浸漬して洗浄した。A、B発光液を配合比率で希釈して混合した。膜を脱イオン水で少し洗浄し、ろ紙を一角に接触して水分を吸いて乾燥し、逆貼り付け法でA、B混合液の液滴に被覆し、ラップの中に置いてフィルムボックスに固定し、フィルムを素早く被覆し、ゲルボックスを閉め、露出強度を調節した。

【0086】

方法7 T細胞増殖実験

50ml遠心管8本を洗浄し、滅菌し、15 ml遠心管16本を洗浄し、滅菌した。無菌細胞篩8個、300 mlの75%エタノール、滅菌したピンセット2本、鉗2本、滅菌したPBS、RPM1640+20%FCSそれぞれ1本を用意した。6ウェル培養プレート2つ、10ml使い捨て注射器8本を用意した。マウスを頸椎脱臼で殺めた後、75%エタノールに入れて15分間浸漬し、浸漬の間に、リンパ細胞分離液を取り出して室温で平衡化し、クリーンベンチで滅菌した鉗とピンセットを取り出し、エタノール綿で拭いて10cm細胞シャーレに置き、6ウェルプレートを用意し、フィルターを50ml遠心管につけた。

【0087】

浸漬したマウスを仰向きで尻尾が外に向くようにプレートに置き、右側の鼠蹊部から上1cmで腹腔を開き、ピンセットで肝臓を払って気をつけて脾臓を出し、6ウェルプレートの2 mlのPBSが入ったウェルに入れ、注射器のシリンダーの端部で気をつけて脾臓を潰し、かつ完全に潰れるように回転して研磨した。細胞懸濁液が全部ろ過するまで、得られた細胞懸濁液を気をつけて遠心管のフィルターに移し、1ml PBSを入れてウェルを洗浄し、かつ吸いてフィルターから1回流した。15ml遠心管を用意し、事前に3mlのリンパ細胞分離液を入れ、説明書に従って操作し、リンパ細胞を分離した。細胞沈殿をPBSでさらに1回洗浄し、10%FCSを含有する1640で細胞を 5×10^6 /mlに調整し、各ウェルに100 μ Lずつプレートに入れ、各ウェルの最終濃度が10 μ g/mlで、抗原で刺激し、5% CO₂、37度で72時間培養した。10 μ L MTTを入れて培養を4時間続け、培養上清および懸濁細胞を吸い出した。100 μ L ジメチルスルホキシドを入れ、室温で振とうし、青色の沈殿を溶解させた。550 nm、630 nmで吸光値を読み取り、OD₅₇₀-OD₆₃₀を最終数値とし、各ウェルの活細胞数を判断した。抗原刺激群-コントロール群の数値を細胞増殖活性とした。

【0088】

方法8 CTL殺傷実験

CFSE staining buffer および7AAD staining bufferは7AAD/CFSE Cell-mediated cytotoxicity Assay kit (Abnova, US) の説明書に従って用意した。

標的細胞の標識：腫瘍細胞をパンクレアチンで消化した後、1000 rpmで5 min遠心して上清を捨てた。3 ml Cell-Based Assay Bufferを入れて再懸濁させ、カウントした後1000 rpmで5 min遠心して上清を捨てた。10⁶細胞/mlになるようにCFSE staining bufferで再懸濁させ、コントロール細胞は同体積のCell-Based Assay Bufferで再懸濁させ、室温で光を避けて15minインキュベーションした。1000 rpmで5 min遠心し、上清を捨て、細胞が10⁶細胞/mlになるように10%FBSを含有する1640で再懸濁させた。1000 rpmで5 min遠心して

10

20

30

40

50

上清を捨て、細胞が 10^6 細胞/mlになるように10%FBSを含有する1640で再懸濁させた。インキュベーターで30min~1時間培養して使用に備えた。T細胞増殖実験における方法に従って脾臓リンパ細胞を分離し、 10^7 細胞/mlになるように6ウェルプレートに各2 mlずつ入れた。最終濃度が $10 \mu\text{g/ml}$ の抗原ペプチドおよび10単位/mlのIL-2を入れて刺激し、5% CO_2 、37度で5日培養した後使用に備えた。

【0089】

測定： 標識された標的細胞を 10^4 細胞/mlになるように96ウェルプレートに入れた。刺激されたエフェクター細胞を10:1、20:1、50:1と標的細胞の比で標的細胞に入れ、かつ培地を各ウェルの合計体積が200 μL になるように補充し、5% CO_2 、37度で6時間インキュベートした。400g/5minで細胞沈殿を収集し、各管に50 μl 7-AAD Staining Solutionを入れ、細胞を再懸濁させた。4度で光を避けて15minインキュベートし、400g/5minで細胞を収集し、0.2ml Assay Bufferを入れて再懸濁させ、400g/5minで細胞を収集し、0.2ml Assay Bufferを入れて再懸濁させ、フローサイトメトリーを行い、データを記録した。細胞を20000個収集した。CFSE陽性細胞(CFSE+)における二重陽性細胞(CFSE+7AAD+)の百分率を算出して最終の殺傷率とした。

【0090】

方法9 腫瘍細胞の培養およびマウス移植癌モデルの構築および免疫治療の効果の評価

細胞および腫瘍の接種： 材料は、DMEM培地、1640培地、ウシ胎児血清、抗生物質、トリプターゼ（いずれもInvitrogen社から購入）、PBS（Takara説明書を参照して調製した。）を含む。Binderインキュベーター、飛鳩遠心機、万和金属水浴鍋。

腫瘍細胞の培養および移植：CT26、B16 F10、Lewisなどの腫瘍細胞はいずれも中国科学院上海細胞ライブラリーから購入され、異なる腫瘍細胞の特性に応じて通常の継代培養を行い、5% CO_2 インキュベーターで37度で培養した。細胞の融合程度が90%に達したら、0.25%パンクレアチンで消化し、細胞を収集して無血清の培養液に入れ、軽く振とうし、500gで5min遠心し、1回洗浄し、PBSで再懸濁させ、濃度を 10^6 とし、トリパンブルーで染色し、かつ血球計算板でカウントしたところ、活細胞の比率が95%以上であった。実験の要求に応じ、固形腫瘍を前肢の脇下に $10^5 \sim 10^6$ 個で接種した。

【0091】

見かけの効果の評価： 腫瘍接種から約7日後（異なる腫瘍の種類による）、1日おきにノギスで腫瘍の長さおよび幅を測定し、腫瘍体積の計算式：腫瘍体積 = 幅² × 長さ × $\pi/2$ で算出した。腫瘍体積が 2000mm^3 または 3000mm^3 よりも大きい場合（異なる腫瘍の種類による）、理論上でマウスを死亡と判断し、生存状況を統計し、生存曲線を作った。腫瘍接種から20~30日後、マウスを殺処分し、腫瘍重量を測定し、公式：抑制率 = (コントロール群における平均腫瘍重量 - 実験群における平均腫瘍重量) / コントロール群における平均腫瘍重量 × 100%で算出した。マウスの群分けの前および殺処分の前に、電子天秤でマウスの体重を測定して記録し、腫瘍重量と体重の比を計算した。

【0092】

実施例1 TNF- α を標的とする組換えタンパク質ワクチン

抗TNF- α モノクローナル抗体薬物は、関節リウマチの臨床治療分野において大きな成功を得たが、抗体薬物は投与量が多く、使用が頻繁で、使用コストが高いという点は、より幅広くより多くの患者に使用されることを阻んでいる。本実施例では、関節リウマチを予防・治療するTNF- α を標的とする組換えタンパク質ワクチンを開発した。

工程1 抗原の構造の設計

表におけるmTNF抗原エピトープ配列をDTTの置換される位置に導入して、相応の抗原mTNF28、mTNF31、mTNF37、mTNF25、DTT-mTNFt、DTT-hTNFtを構成した。TNF分子の87番目のチロシンYをヒスチジンH、145番目のおアラニンAをアルギニンRに突然変異させたTNF-生物活性が極めて低い突然変異体mTNFtおよびhTNFt（tは部位特異的突然変異）を、DTTのC末端に導入して組換え抗原DTT-mTNFtおよびDTT-hTNFtを構成した。本実施例で使用されたほかの組換え抗原の構造の導入の情報を表2に示す。

【0093】

10

20

30

40

50

【表5】

表2 TNF 組換え抗原の設計

抗原の名称	mTNF における位置	mTNF 抗原エピトープ配列	DTT の置換される位置
mTNF28	80-96	VSRFAISYQEKNLLSA (配列番号 5)	295-297
mTNF31	142-150	LDFAESGQV(配列番号 6)	305-310
mTNF37	28-35	WLNRRANA(配列番号 7)	291-297
mTNF25	40-50	GMDLKDNLVV (配列番号 8)	295-297
DTT-mTNFt	全 mTNF(A145R/Y87H)		DTT の C 末端
DTT-hTNFt	全 hTNF(A145R/Y87H)		DTT の C 末端

10

【0094】

DTT-mTNFt (A145R/Y87H) 抗原タンパク質のアミノ酸配列:

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPINKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIDGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYN
FVESIINLFQVVHNSYNRPMRLRSSQNSSDKPVAHVANHQVEEQLEWLSQRANALLANGMDLKDNLVVPADGLYLVYS
QVLFKGGQCPDYVLLTHTVSRFAISHQEKNLLSAVKSPCKDTPEGAELKPWYEPYILGGVFQLEKGDQLSAEVLNPKY
LDFRESGQVYFGVIAL(配列番号9)

20

【0095】

mTNFt (A145R/Y87H) のアミノ酸配列:

MLRSSQNSSDKPVAHVANHQVEEQLEWLSQRANALLANGMDLKDNLVVPADGLYLVYSQVLFKGGQCPDYVLLTHTV
SRFAISHQEKNLLSAVKSPCKDTPEGAELKPWYEPYILGGVFQLEKGDQLSAEVLNPKYLDFRESGQVYFGVIAL(配
列番号10)

【0096】

DTT-hTNFt (A145R/Y87H) 抗原タンパク質のアミノ酸配列:

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPINKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAW
AVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIDGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFV
ESIINLFQVVHNSYNRPMVRSSSRTPSDKPVAHVANPQAEQQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYL IYSQV
LFKGGQCPSTHVLLTHTISRIVSHQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAELKPWYEPYILGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYL
DFRESGQVYFGVIAL(配列番号11)

30

【0097】

hTNFt (A145R/Y87H) のアミノ酸配列:

MVRSSSRTPSDKPVAHVANPQAEQQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYL IYSQVLFKGGQCPSTHVLLT
HTISRIVSHQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAELKPWYEPYILGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFRESGQVYFGVIAL
(配列番号12)

【0098】

mTNF31抗原タンパク質のアミノ酸配列:

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPINKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAW
AVNVAQVIDSETADNLEKTTAALLDFAESGQVGSVMGIDGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAY
NFVESIINLFQVVHNSYNRP(配列番号13)

40

【0099】

mTNF28抗原タンパク質のアミノ酸配列(配列番号112)

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPINKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQVIDSETAVSRFAISYQEKNLLSAEKTAAALSILPGIGSVMGIDGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIP
LVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRP

【0100】

mTNF28抗原タンパク質の核酸配列、例えば、配列番号121。

50

【 0 1 0 1 】

工程2 組換えタンパク質の発現・精製および免疫原性の観察

方法2に従って操作し、表3におけるTNF組換え抗原遺伝子のプライマーでそれぞれ各抗原の発現プラスミドを構築し、シクエンシングで正確性を検証した。

DTT-mTNFt (A145R/Y87H) 抗原タンパク質の遺伝子配列は配列番号14に示す。

DTT-hTNFt (A145R/Y87H) 抗原タンパク質の遺伝子配列は配列番号15に示す。

mTNF32抗原タンパク質の遺伝子配列は配列番号16に示す。

mTNF31抗原タンパク質の遺伝子配列は配列番号17に示す。

【 0 1 0 2 】

【表 6】

表 3 TNF 組換え抗原遺伝子のプライマー

抗原の名称	プライマー名称	プライマー配列
DTT3	DTT-F	CGCGGATCCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCATAAATCTTGATTGGGATGTC (配列番号 18)
	DTT-R	CCGCTCGAGCTAGGGACGATTATACGAATTATG(配列番号 19)
mTNF28	mT80-96 下段のフォワード-P2	GAAAAGACAACCTGCTGCTC(配列番号 20)
	mT80-96 下段のフォワード-P4	TCAACCTCCTCTCTGCCGAAAAGACAACCTGCTGCTC(配列番号 21)
	mT80-96 上段のリバーース-P3	TCCTGGTATGAGATAGCAAATCGGCTGACAGCTGTTTCGCTATCGATAACTT (配列番号 22)
	mT80-96 上段のリバーース-P1	AGCTGTTTCGCTATCGATAACTTGC(配列番号 23)
mTNF31	mT142-150 下段のフォワード-P2	GGTAGCGTAATGGGCATTGCAGAC(配列番号 24)
	mT142-150 下段のフォワード-P4	TTAGACTTTGCGGAGTCCGGGCAGGTTCGGTAGCGTAATGGGCATTGCAG (配列番号 25)
	mT142-150 上段のリバーース-P3	GACCTGCCCGGACTCCGCAAAGTCTAAAAGAGCAGCAGTTGTCTTTCCAAATT (配列番号 26)
	mT142-150 上段のリバーース-P1	AAGAGCAGCAGTTGTCTTTCC(配列番号 27)
mTNF37	mT28-35 下段のフォワード-P2	GAAAAGACAACCTGCTGCTCTTTTCGATACT(配列番号 28)
	mT28-35 下段のフォワード-P4	TGGCTGAGCCAGCGCGCCAACGCCGAAAAGACAACCTGCTGCTCTTTTCGATACT (配列番号 29)
	mT28-35 上段のリバーース-P3	GGCGTTGGCGCGCTGGCTCAGCCAATCGATAACTTGCGCAACGTTT (配列番号 30)
	mT28-35 上段のリバーース-P1	ATCGATAACTTGCGCAACGT(配列番号 31)
mTNF25	上段のリバーース-P1	CACTAGTTGGTTGTCTTTGAGATCCATGCCAGCTGTTTCGCTATCG(配列番号 32)
	下段のフォワード-P2	GGATCTCAAAGACAACCAACTAGTGGTGGAAAAGACAACCTGCTGCTC (配列番号 33)

【 0 1 0 3 】

組換えタンパク質抗原の発現・精製は方法3に従って操作し、純度が90%～95%に達した組換え抗原を製造した。マウスの免疫の操作は方法4に従い、コーティング抗原はmTNFを使用し、最終のELISAの結果では、抗血清を100倍に希釈した後、TNF28のmTNFに対するOD₄₅₀平均値が0.33で、mTNF31のmTNFに対するOD₄₅₀平均値が0.09で、mTNF37のmTNFに対するOD₄₅₀平均値が0.11であったが、AlumのmTNFに足しうるOD₄₅₀平均値が0.05で、TNF28はコントロールのAlum群に比べて生じたmTNFに対する抗体がmTNF31、mTNF37のいずれよりも優れたことが示された。免疫後、血清のウェスタンの結果では、TNF28群はDTT群（DTTだけで免疫させたマウスの血清）に比べて顕著な抗体バンドがあり、かつヒトTNFバンドは

10

20

30

40

50

マウスTNFバンドよりも反応信号が強かったことが示された（図2A）。

【0104】

工程3 タンパク質の突然変異後の生物活性の測定

対数増殖期のL292細胞（25cm²培養瓶で2d培養した。）を取り、培養液を捨てた後、1×PBSで2回洗浄し、1×PBSを吸い取った後0.7mLの消化液を入れて37℃で3min消化し、1000rpm/minで4min遠心し、消化液を吸い取り、5mLの1640培養液で細胞を2回洗浄し、パンクレアチンを除去した。1640培養液で細胞濃度を2×10⁵/mlとし、96ウェル細胞培養プレートを取り、各ウェルに0.1mlのL929細胞懸濁液を入れ、CO₂インキュベーターで一晩または24時間培養し、壁に付着した細胞が95%以上に達したら、サンプルを入れた。AcD-1640培地で必要によって測定されるTNFを10倍に段階希釈し、各ウェルに希釈物を100μLずつ入れ、各希釈度は3つの重複ウェルとし、CO₂インキュベーターで20h培養し、直接各ウェルにMTT（碧雲天）を20μLずつ入れ、37℃で4hインキュベートし、マイクロプレートリーダーで波長450nm、参照波長600-650nmで各ウェルのOD値を検出した。殺傷率の計算式：（コントロール群OD₄₅₀-実験群OD₄₅₀）/コントロール群OD₄₅₀×100%。最大殺傷濃度は0.2ng/mlから100000以上低下し（できた最大濃度）、部位特異的突然変異後、組換えタンパク質の活性が100000倍以上低下した（図2C）。

10

【0105】

工程4 コラーゲンによって誘導されたマウス関節炎モデルの観察

方法5における工程に従ってコラーゲンによって誘導されたマウス関節炎モデルを構築した。標的抗原mTNF28、mTNF31、mTNF37に対し、改造後のエピトープ導入タンパク質mTNF28は、マウス関節炎動物モデルにおいてAlumコントロール群と比べ、発症点数では60～120日の期間で3-4点低く、mTNF31およびmTNF37群は1-2点しか違わなく、mTNF28はmTNF31およびmTNF37よりも優れた治療効果を示した（図2B）。部位特異的突然変異後の融合タンパク質DTT-mTNFtはマウス関節炎動物モデルにおいてAlumコントロール群と比べ、図2Dに示すように、発症点数では20～32日の期間で5-6点低かった。DTT-mTNFtはAlumコントロール群に対して発症点数で顕著な発症の抑制効果があった。

20

【0106】

実施例2 TNF80-96エピトープワクチンの最適化

工程1 抗原の構造の設計

実施例1から、TNF80-96エピトープを持つmTNF28の効果が優れたことがわかったため、本実施例で当該エピトープに対して改良した。実施例1と同様の方法を使用したが、異なる点は、下記表で示されたタンパク質エピトープおよび置換の位置でmTNF21、mTNF26、mTNF28、mTNF30、mTNF32、mTNF28-1、mTNF29という一連の組換えタンパク質を構築した。

30

【表7】

表4 エピトープおよび置換の位置

名称	mTNFにおける位置	DTの置換される位置	エピトープ配列
mTNF21	80-96	296-297	VSRFAISYQEKVNLLSA
mTNF26	80-96	293-297	VSRFAISYQEKVNLLSA.
mTNF28	80-96	295-297	VSRFAISYQEKVNLLSA
mTNF30	80-96	292-297	VSRFAISYQEKVNLLSA
mTNF32	80-96	291-297	VSRFAISYQEKVNLLSA
mTNF28-1	80-97	290-297	VSRFAISYQEKVNLLSAV (配列番号 34)
mTNF29	80-96	C 末端	VSRFAISYQEKVNLLSA

40

【0107】

hTNFにおける90-96のアミノ酸配列：

ISRIVASYQTKVNLLSA(配列番号117)

hTNFにおける90-97のアミノ酸配列：

50

ISR IAVSYQTKVNLLSAI (配列番号118)

hTNF28-1抗原タンパク質のアミノ酸配列

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGP IKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQV I ISR IAVSYQTKVNLLSAI EKTTAALS I LPG I GSVMG I ADGAVHHNTEE I VAQS I ALSSLMVAQA I PLVGE
LVDIGFAAYNFVESI INLFQVVHNSYNRP (配列番号35)

hTNF28-1抗原タンパク質の遺伝子配列は配列番号36に示す。

【0108】

mTNF28-1抗原タンパク質のアミノ酸配列

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGP IKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQV I VSRFA I SYQEKVNLLSAE EKTTAALS I LPG I GSVMG I ADGAVHHNTEE I VAQS I ALSSLMVAQA I PLVGE
LVDIGFAAYNFVESI INLFQVVHNSYNRP (配列番号37)

mTNF28-1抗原タンパク質の遺伝子配列は配列番号38に示す。

【0109】

mTNF32抗原タンパク質のアミノ酸配列：

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGP IKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQV I DVSRFA I SYQEKVNLLSAE EKTTAALS I LPG I GSVMG I ADGAVHHNTEE I VAQS I ALSSLMVAQA I PLVGE
LVDIGFAAYNFVESI INLFQVVHNSYNRP (配列番号39)

【0110】

工程2 組換えタンパク質の発現・精製および免疫原性の観察

具体的な組換えタンパク質抗原の構築および発現・精製方法は方法2、3を参照する。製造された組換えタンパク質はいずれも95%以上で、一連の組換えタンパク質は、4 で2日と10日置いた後、SDS-PAGE電気泳動を行ったところ、mTNF28-1の構造安定性はほかのタンパク質よりもはるかに優れたことが示された。mTNF28-1とDTTの円二色性スペクトルを比較すると、二つのタンパク質の全体の構造式が一致し、タンパク質の核心骨格は変わらないことが示された。80-96エピトープに対して最適化して得られた一連のタンパク質は、DSCによるTm値では、mTNF28-1 (Tm=66.58) はDTT (Tm=69.85) のTm値と比較的に近く、mTNF28 (Tm=61.01) のTm値よりもはるかに高かった。mTNF28-1とmTNF28のタンパク質は、一

つのアミノ酸しか違わないが、mTNF28-1は構造安定性でより高い安定性を示した。
抗原免疫後生成した血清の力価は方法4に従って操作し、コーティング抗原はそれぞれmTNFとDTTであった。3回目の強化免疫後、応答できたマウスの百分率ではmTNF28-1が80%で、mTNFタンパク質の抗血清を100倍希釈した後のOD₄₅₀平均値が0.28で、mTNF32はそれぞれ50%と0.22で、mTNF21およびmTNF28はそれぞれ25%と0.17、および25%と0.15で、mTNF28-1の抗原性が最高であった。免疫の結果から、mTNF28-1はほかの導入と比べてより優れた免疫結果を示したことがわかる。

【0111】

工程3 コラーゲンによって誘導されたマウス関節炎モデルの観察

4回目の強化免疫後60日にマウスの血を採取して抗体のアイソタイプを同定したところ、図3Aに示すように、強化免疫後60日に、マウスの体内におけるmTNFに対する抗体の種類は主にIgG1で、かつ力価がまだ10000もあったことが示された。これは、本発明の組換えタンパク質によって引き起こされた免疫反応は体内で長く維持できることを示した。方法4の方法でmTNF28-1のコラーゲンによって誘導されたマウス関節炎モデルに対する治療効果を測定したところ、図3Bのように、55-80日の期間で、mTNF28-1治療群はAlumアジュバント群およびDTT担体タンパク質群と比べてマウス関節炎の発症抑制率が40%以上に達したことを見出した。

【0112】

実施例3 血液凝固因子FXIを標的とする抗血栓ワクチン

FXIは内因系血液凝固経路の血液凝固因子で、近年の文献および病理統計のデータによ

10

20

30

40

50

ると、FXIの欠失は生体の抗血栓に有利であるが、生体に微量の出血しか生じないため、FXIは安全で有効な抗血栓の標的と考えられる。本実施例では、血液凝固因子FXIに対する抗血栓ワクチンを構築し、その免疫原性および抗血栓効果を検証した。

【 0 1 1 3 】

工程1：組換え抗原の設計

本実施例で使用された抗原はヒトFXIの候補のエピトープ配列をDTTの置換位置に導入して構成した。17番抗原はヒトFXI(523-538aa)のアミノ酸配列のTNEECQKRYRGHKITH(配列番号40)をDTTの291-297の位置に導入して構成し、20番抗原はヒトFXI(363-380aa)のTTKIKPRIVGGTASVRGE(配列番号41)アミノ酸配列をDTTの291-297位置に導入して構成した。29番抗原はヒトFXI(381-625aa)の触媒ドメインをDTTのC末端に導入して構成した。

10

【 0 1 1 4 】

具体的な抗原のアミノ酸配列は以下のとおりである。

17番抗原のアミノ酸配列：

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPINKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQVIDTNEECQKRYRGHKITHEKTTAALSILPGIGSVMGADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGEL
VDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRP(配列番号42)

20番抗原のアミノ酸配列：

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPINKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQVIDTTKIKPRIVGGTASVRGEEKTTAALSILPGIGSVMGADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVG
ELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRP(配列番号43)

20

【 0 1 1 5 】

29番抗原のアミノ酸配列：

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPINKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYN
FVESIINLFQVVHNSYNRPTTKIKPRIVGGTASVRGEWPWQVTLHTTSPTQRHLCGGSIIIGNQWILTAAHCFYGVESPKI
LRVYSGILNQSEIKEDTSFFGVQEIIHDQYKMAESGYDIALLKLETTVNYTDSQRPICLPSKGDNRVIYTDCCWVTGWGY
RKLDRDKIQNTLQKAKIPLVTNEECQKRYRGHKITHKMICAGYREGGKDACKGDSGGPLSCKHNEVWHLVGITSWGEGCAQ
RERPGVYTNVVEYVDWILEKTQAV(配列番号44)

ヒトFXI(381-625aa)の触媒ドメインのアミノ酸配列：

TTKIKPRIVGGTASVRGEWPWQVTLHTTSPTQRHLCGGSIIIGNQWILTAAHCFYGVESPKILRVYSGILNQSEIKEDT
SFFGVQEIIHDQYKMAESGYDIALLKLETTVNYTDSQRPICLPSKGDNRVIYTDCCWVTGWGYRKLDRDKIQNTLQKAKI
LVTNEECQKRYRGHKITHKMICAGYREGGKDACKGDSGGPLSCKHNEVWHLVGITSWGEGCAQRERPGVYTNVVEYVDWI
LEKTQAV(配列番号45)

30

17番抗原タンパク質の遺伝子配列は配列番号46に示す。

20番抗原タンパク質の遺伝子配列は配列番号47に示す。

29番抗原タンパク質の遺伝子配列は配列番号48に示す。

【 0 1 1 6 】

工程2：組換え抗原の担体の構築、タンパク質の発現・同定および大規模製造

方法2に従って組換え抗原の遺伝子を構築し、方法3で組換えタンパク質の発現・同定および製造を行った。12% SDS-PAGEで検出したところ、組換え抗原29の分子量は約45KDで、17番抗原および29番抗原の分子量は約20KDで、理論上の分子量と一致し、抗原純度はいずれも90%以上であった。

40

【 0 1 1 7 】

工程3：動物の免疫および抗体の力価の測定

マウスの免疫方法および抗体反応の測定は方法4に従って行い、ここで使用されたマウスは雌C57BL/6J(上海SLACから購入)で、免疫の投与量は30ng/匹で、各群に8匹ずつであった。2回目の強化免疫後1週間で採血して血清を調製し、ELISAでFXIに対する抗体反応を測定した。

ヒトFXIをELISAコーティング抗原として17番、20番、29番抗原で免疫させたマウスの抗

50

血清は1:100で希釈し、ELISAの結果、OD₄₅₀値はそれぞれ0.52±0.11、0.43±0.08、2.52±0.3（陰性血清の値は0.14±0.03）で、17番、20番、29番抗原はマウスにヒトFXIを識別する抗体を生成させることができることが示された。

ヒトFXIをELISAコーティング抗原として29番抗原で免疫させたマウスの抗血清は1:100で希釈し、ELISAの結果、OD₄₅₀値は1.87±0.5（陰性血清の値は0.14±0.03）で、29番抗原がマウスに生成させた抗体は交差反応によってマウスのFXIを識別することができることが示された。

【0118】

工程4：免疫のマウスの血液凝固時間に対する作用

マウスの免疫方法および抗体反応の測定は方法4を参照し、ここで使用されたマウスは雌C57BL/6J（上海SLACから購入）で、免疫の投与量は30ng/匹で、各群に5匹ずつであった。2回目の強化免疫後14日で、マウスをペントバルビタールナトリウムで麻酔した（100mg/kgで腹腔注射）。腹部の真ん中を縦に切開し、内蔵を退けて下大静脈を露出させた。50μlの3.2%クエン酸ナトリウムを含有する注射器で450μlの血液を取り出し、注射器を軽く回して血液と抗凝固剤を均一に混合した。すべてのサンプルを室温で3000gで15min遠心し、血小板を含まない血漿を調製した。APTT値およびPT値は4h内でそれぞれ活性化部分トロンボプラスチン時間測定キット（エラグ酸）（凝固法）、プロトロンビン時間測定キット（凝固法）（上海太陽生物技術有限公司）でthromboscreen 400c（pacific hemostasis）半自動凝血分析装置で測定した。

【0119】

PBS、DTT、17番抗原、29番抗原で免疫させたマウスのAPTT値はそれぞれ25.2±1.8s、24.5±2.1s、26.7±1.8s、30.3±2.5sであった。PBSで免疫させたマウスのAPTT値は野生型マウスの値に近く（野生型マウスのAPTT値は25.1s）、PBSは生体内における血液凝固経路の機能を阻害しないことが示された。29番抗原で免疫させたマウスのAPTT値はPBS群のマウスの値に対して1.2倍延長し（ $p < 0.05$ 、 t 検定）、当該抗原はFXIが関与する内因系血液凝固経路の機能を阻害できることが示された。

PBS、DTT、17番抗原、29番抗原で免疫させたマウスのPT値はそれぞれ10.4±0.2s、10.6±0.1s、10.2±0.2s、11.2±0.1sであった。17番抗原で免疫させたマウスのPT値は顕著に延長せず、29番抗原で免疫させたマウスのPT値はわずかに延長し（臨床的意義がない）、設計した組換え抗原は正常の外因系血液凝固経路の機能を阻害しないことが示された。

【0120】

工程5：抗原の肺塞栓の血栓に対する予防

マウスの免疫方法および抗体反応の測定は方法4を参照し、ここで使用されたマウスは雌C57BL/6J（上海SLACから購入）で、免疫の投与量は30ng/匹で、各群に8匹ずつであった。2回目の強化免疫後14日で、致死肺塞栓モデルで各群のマウスの抗血栓効果を評価した。具体的な工程は以下のとおりである。thromborel s（siemens）は説明書に従って10mlの蒸留水で再溶解させた。マウスにペントバルビタールナトリウムを50mg/kgで腹腔注射して麻酔した後、下大静脈を分離して露出させた。7.5μl/g体重で再溶解させたthromborel sを3s内で下大静脈に注入し、すぐ時間のカウントを始め、動物の呼吸の有無を観察し、20分の時点で動物の呼吸が止まっていなければ動物を生存とした。

【0121】

図4Aに示すように、PBS、DTT、17番、20番、29番抗原で免疫させたマウスの20分の時点における生存率はそれぞれ20%、0%、37.5%、25%、50%で、17番および29番抗原はマウスの抗肺塞栓に貢献することが示された。

マウスの免疫方法および抗体反応の測定は方法4を参照し、ここで使用されたマウスは雌C57BL/6J（上海SLACから購入）で、免疫の投与量は30ng/匹で、各群に14匹ずつであった。2回目の強化免疫後14日で、肺塞栓モデルで29番抗原の抗血栓効果を評価した。マウスにペントバルビタールナトリウムを50mg/kgで腹腔注射して麻酔した後、下大静脈を分離して露出させた。30μgヒト胎盤浸出液/g体重の投与量で下大静脈から注射し、各群のマウスの呼吸困難が始まった時間を記録した。

図4Bに示すように、PBS、DTTおよび29番抗原で免疫させたマウスの呼吸困難が始まった時間はそれぞれ $121 \pm 21s$ 、 $118 \pm 35s$ 、 $182 \pm 33s$ で、29番抗原で免疫させたマウスの呼吸困難が始まった時間は1.5倍延長し ($p < 0.01$, t検定)、29番抗原はマウスの抗肺塞栓に貢献することが示された。

【0122】

工程6：抗原の下大静脈狭窄血栓に対する予防

マウスの免疫方法および抗体反応の測定は方法4を参照し、ここで使用されたマウスは雌C57BL/6J（上海SLACから購入）で、免疫の投与量は $30ng/匹$ で、各群に6匹ずつであった。2回目の強化免疫後14日で、下大静脈狭窄血栓モデルで29番抗原の抗血栓効果を評価した。具体的な工程は以下の通りである。マウスの体重を量り、 $100mg/kg$ 体重でペントバルビタールナトリウムで麻酔し、腹部の毛を剃り、ヨードフォアを塗って消毒した。眼科用はさみで気をつけて腹部を切開し、内蔵を出して生理食塩水を含浸させたガーゼで包み、下大静脈を露出させ、左腎静脈の分枝の下方で下大静脈と腹部大動脈を分離し、6-0系（上海金環）で下大静脈を $30g$ の針に結紮した。針を取り、静脈狭窄を作った。腰部の分枝の部位で下大静脈と腹部大動脈を分離し、結紮系の下方および腰部の分枝の部位でそれぞれ2つの血管鉗子で血管を $20s$ ずつ閉めた。同時に操作の時刻を記録した。順番に腸を腹腔に戻し、5-0ナイロン系（上海金環）で順に筋肉と皮膚を縫合し、ヨードフォアを塗って消毒した後、クリーンケージに戻した。24h後血栓を取り出し、生理食塩水で洗浄した後、4%パラホルムアルデヒドで24h以上固定し、撮影した。ろ紙で水分を吸って乾燥した後、湿重量を測定した。

図4C、4Dに示すように、PBS、DTT、29番抗原で免疫させたマウスの血栓はそれぞれ $11.2 \pm 2.1mg$ 、 $8.2 \pm 4.5mg$ 、 $4.5 \pm 2.3mg$ で、29番抗原で免疫させたマウスの体内の血栓はコントロール群のマウスの血栓の重量に対して60%減少し、29番抗原はマウスの下大静脈狭窄血栓の予防に貢献することが示された。

【0123】

工程7 抗体のヒト血漿のAPTT値およびPT値に対する影響

各抗原で免疫させたマウスの血漿における抗体はプロテインA-Sepharoseで精製した後、BCA定量キットで定量し、 $10mM$ PBS (pH7.4) で希釈した後、ヒト血漿と体積比1:1で混合した後、APTT値、PT値およびFXIの活性を測定した。

マウスが29番抗原で刺激されて生成した抗体は顕著に正常ヒト血漿のAPTT値を延長し、かつその抑制効果は顕著な量と効果の関係が存在し（図5Aに示すように）、最終濃度 $0.75mg/ml$ の抗体は正常ヒト血漿のAPTT値を $151s$ に延長させ、コントロール群は $54s$ であった。マウスが29番抗原で刺激されて生成した抗体は顕著にヒトFXIの活性を抑制し、かつその抑制効果は顕著な量と効果の関係が存在し（図5Bに示すように）、抗体（最終濃度 $0.75mg/ml$ ）と正常ヒト血漿を混合した後、抗体血漿混合物をFXI欠失ヒト血漿に入れ、後者はAPTT値を $121s$ に延長させ、コントロール群は $63s$ であった。

正常ヒト血漿はそれぞれマウスが29番抗原およびDTTで刺激されて生成した抗体とインキュベートした後、測定されたPT値はそれぞれ $41s$ 、 $42s$ で、マウスが29番抗原で刺激されて生成した抗体はヒトの正常の止血に必要な外因系血液凝固経路の機能を阻害しないことが示された。

【0124】

工程8 抗原の安全性の測定

PT測定では、29番抗原はマウスの外因系血液凝固経路の機能を阻害せず、この抗原は出血に対する毒性・副作用がないことが示された。さらに抗原の安全性を説明するために、本発明ではマウスの体表および内蔵に出血があるか検査した。解剖して比較したところ、DTT、29番抗原免疫群のマウスは各内蔵（心臓、肝臓、脾臓、肺、腎臓、腸、胃など）にいずれも異常な出血点がなかったことがわかった。また、マウスの肝臓の形態と色を検査した。肉眼で観察したところ、29番抗原免疫群のマウスは肝臓の形態と色がDTT免疫群のマウスと変わらないことがわかった。

【0125】

実施例4 血液凝固因子FXIIを標的とする抗血栓ワクチン

FXIIは内因系血液凝固経路の血液凝固因子で、近年の文献および病理統計のデータによると、FXIIの欠失は生体の抗血栓に有利であるが、生体に異常な出血がないため、FXIIは安全で有効な抗血栓の標的と考えられる。本実施例では、血液凝固因子FXIIに対する抗血栓ワクチンを構築し、その免疫原性および抗血栓効果を検証した。

【 0 1 2 6 】

工程1：組換え抗原の設計

本実施例で使用された抗原はヒトFXIIの候補のエピトープ配列をDTTの置換位置に導入して構成した。38番抗原はヒトFXIIのEAFSPVSYQHDLA (79-91) (配列番号128)のアミノ酸配列をDTTの295-297の位置に導入して構成し、48番抗原はヒトFXIIの触媒ドメイン(345-596)をDTTのC末端に導入して構成した。

mFXIIの79-91番のアミノ酸
EGFSSITYQHDLA(配列番号131)

hFXIIの触媒ドメイン(345-596)
RKSLSSMTRVVGGGLVALRGAHPYIAALYWGHSFCAGSLIAPCWVLTAAHCLQDRPAPEDLTVVLGQERRNHSCEPCQT
LAVRSYRLHEAFSPVSYQHDLALLRLQEDADGSCALLSPYVQPVCLPSGAARPSETTLCQVAGWGHQFEGAEYASFLQE
AQVPFSLERCSAPDVHGSSILPGMLCAGFLEGGTDACQGDGSGPLVCEQAAERRLTLQGIISWGS GCGDRNKPGVYTD
VAYYLAWIREHTVS (配列番号129)

mFXIIの触媒ドメイン(345-596)
RKGLSSFMTRVVGGGLVALPGSHPIAALYWGNNFCAGSLIAPCWVLTAAHCLQNRPAPEELTVVLGQDRHNQSCIEWCQT
LAVRSYRLHEGFSSITYQHDLALLRLQESKTNSCAILSPHVQPVCLPSGAAPPSETVLCEVAGWGHQLEGAEEYSTFLQE
AQVPFIALDRCSNSNVHGDAIIPGMLCAGFLEGGTDACQGDGSGPLVCEEETAEHQLTLRGVSWGS GCGDRNKPGVYTD
VANYLAWIQKHIAS(配列番号130)

【 0 1 2 7 】

38番抗原のアミノ酸配列：

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPINKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQVIDSETAEAFSPVSYQHDLAEKTTAALSILPGISVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGE
LVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRP (配列番号113)

48番抗原のアミノ酸配列：

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPINKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGISVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYN
FVESIINLFQVVHNSYNRP
RKSLSSMTRVVGGGLVALRGAHPYIAALYWGHSFCAGSLIAPCWVLTAAHCLQDRPAPEDLT
VVLGQERRNHSCEPCQTLAVRSYRLHEAFSPVSYQHDLALLRLQEDADGSCALLSPYVQPVCLPSGAARPSETTLCQVAG
WGHQFEGAEYASFLQEAQVPFSLERCSAPDVHGSSILPGMLCAGFLEGGTDACQGDGSGPLVCEQAAERRLTLQGIISWGS
GCGDRNKPGVYTDVAYYLAWIREHTVS (配列番号114)

38番抗原をコードする核酸配列は配列番号115に示す。

48番抗原をコードする核酸配列は配列番号116に示す。

【 0 1 2 8 】

工程2：組換え抗原の担体の構築、タンパク質の発現・同定および大規模製造

方法2に従って組換え抗原の遺伝子を構築し、方法3で組換えタンパク質の発現・同定および製造を行った。12% SDS-PAGEで検出したところ、組換え抗原48の分子量は約45KDで、38番抗原の分子量は約20KDで、理論上の分子量と一致し、抗原純度はいずれも90%以上であった。

【 0 1 2 9 】

工程3：動物の免疫および抗体の力価の測定

マウスの免疫方法および抗体反応の測定は方法4を参照し、ここで使用されたマウスは雌C57BL/6J（上海SLACから購入）で、免疫の投与量は30ng/匹で、各群に8匹ずつであった。2回目の強化免疫後1週間で採血して血清を調製し、ELISAでFXIIに対する抗体反応を測定した。

ヒトFXIIをELISAコーティング抗原として38番、48番抗原で免疫させたマウスの抗血清は1:100で希釈し、 OD_{450} 値はそれぞれ 0.38 ± 0.07 、 1.32 ± 0.51 （陰性血清の値は 0.11 ± 0.03 ）で、38番、48番抗原はマウスにヒトFXIIを識別する抗体を生成させることができることが示された。

ヒトFXIIをELISAコーティング抗原として38番、48番抗原で免疫させたマウスの抗血清は1:100で希釈し、 OD_{450} 値はそれぞれ 0.11 ± 0.04 、 1.75 ± 0.21 （陰性血清の値は 0.12 ± 0.03 ）で、48番抗原がマウスに生成させた抗体は交差反応によってマウスのFXIIを識別することができることが示された。

【0130】

工程4：免疫のマウスの血液凝固時間に対する作用

マウスの免疫方法および抗体反応の測定は方法4を参照し、血小板を含有しない血漿の調製およびAPTT値とPT値の測定は実施例3の工程4を参照する。

PBS、DTT、38番抗原、48番抗原で免疫させたマウスのAPTT値はそれぞれ $25.2 \pm 1.8s$ 、 $24.5 \pm 2.1s$ 、 $31.2 \pm 3.2s$ 、 $27.1 \pm 5.1s$ であった。PBSまたはDTTで免疫させたマウスのAPTT値は野生型マウスの値に近く（野生型マウスのAPTT値は $25.1s$ ）、PBSまたはDTTは生体内における血液凝固経路の機能を阻害しないことが示された。38番抗原で免疫させたマウスのAPTT値はPBS群のマウスの値に対して1.24倍延長し（ $p < 0.05$ 、 t 検定）、当該抗原はFXIIが関与する内因系血液凝固経路の機能を阻害できることが示された。

PBS、DTT、38番抗原、48番抗原で免疫させたマウスのPT値はそれぞれ $10.4 \pm 0.2s$ 、 $10.6 \pm 0.1s$ 、 $10.1 \pm 0.5s$ 、 $10.2 \pm 0.4s$ であった。PBSまたはDTTで免疫させたマウスのPT値は野生型マウスの値に近く（野生型マウスのPT値は $10.6s$ ）、PBSまたはDTTは生体内における血液凝固経路の機能を阻害しないことが示された。38番または48番抗原で免疫させたマウスのPT値は顕著に延長せず、設計した組換え抗原はマウスの外因系血液凝固経路の機能を阻害しないことが示された。2.5mgのワーファリンを800mlの飲用水に溶解させてマウスに自由に3日飲ませ、マウスのPT値は $60.1 \pm 38.7s$ で、野生型マウスのPT値に対して5.7倍延長し、この結果は臨床でよく使用される抗凝血薬物ワーファリンに対して、本特許の抗原による免疫は生体の異常出血を起こさないことを示した。

【0131】

工程5：抗原の肺塞栓の血栓に対する予防

マウスの免疫方法および抗体反応の測定は方法4を参照し、肺塞栓血栓実験の操作は実施例3の工程5を参照する。

PBS、DTT、38番抗原で免疫させたマウスの20分の時点における生存率はそれぞれ20%、0%、37.5%で、38番抗原はマウスの抗肺塞栓に貢献することが示された。

【0132】

工程6：抗原の下大静脈狭窄血栓に対する予防

マウスの免疫方法および抗体反応の測定は方法4を参照し、下大静脈狭窄血栓実験の操作は実施例3の工程6を参照する。

実験結果は図6に示すように、PBS、DTT、38、48番抗原で免疫させたマウスの血栓はそれぞれ $11.2 \pm 2.1mg$ 、 $8.2 \pm 4.5mg$ 、 $4.7 \pm 2.7mg$ 、 $4.8 \pm 2.5mg$ で、38番、48番抗原で免疫させたマウスの体内の血栓はPBSコントロール群のマウスの血栓の重量に対してそれぞれ58%、57%減少し、38番、48番抗原はマウスの下大静脈狭窄血栓の予防に貢献することが示された。

【0133】

実施例5 FAPを標的とする腫瘍ワクチンの開発

線維芽細胞活性化タンパク質（fibroblast activation protein、FAP）は、特異的に腫

10

20

30

40

50

瘍関連線維芽細胞 (carnicinoma associated fibroblasts、CAFs) で発現される膜タンパク質で、その細胞質部分は6個のアミノ酸の短ペプチド鎖で、膜貫通部分は19個のアミノ酸の疎水断片で、細胞外部分は一つのヘリックス領域と一つのヒドロラーゼ領域を含む (アミノ酸配列500~760)。FAPは特異的に悪性上皮性腫瘍 (乳癌、肺癌、結腸癌などを含む。) の基質で発現され、正常の人体組織で発現されない。FAPの腫瘍関連線維芽細胞における発現は腫瘍生長の微環境の形成に重要である。研究によると、FAPの過剰発現は腫瘍の微血管の生成を促進し、ひいては腫瘍の生長を促進するが、FAPのノックアウトは腫瘍の免疫回避を抑制し、生体の腫瘍に対する免疫応答を実現することができる。また、FAPは腫瘍抗原に比べ、ゲノムはより安定している。そのため、多くの研究者はFAPを腫瘍治療の標的に選択した。FAP酵素活性阻害剤は動物実験において優れた抗腫瘍効果を示し、現在臨床実験に入っている。FAPを標的とするDNAワクチンは動物実験においてCTL効果を引き起こし、優れた抗腫瘍効果を示す。そのため、本特許はFAPを標的に選択し、腫瘍ワクチンを開発し、かつその免疫原性および抗腫瘍効果を研究した。

10

【0134】

工程1: 組換え抗原の設計

方法1を参照し、ヒトFAPの触媒ドメイン (アミノ酸配列500~760) をDTTのC末端と融合し、ドメインワクチンDTT-FAPを設計した。また、方法1を参照し、FAPエピトープ配列239-246 (YGDEQYPR (配列番号49)) でDTTのアミノ酸配列291-297 (SETADNLE) を置換し、モノエピトープワクチンDTT-4Bを設計した。抗原のアミノ酸配列は以下のとおりである。

20

> DTT-FAPアミノ酸配列

DDDKI NLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGP IKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAG ANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMG IADGAVHHNTEE I VAQSI ALSSLMVAQA I PLVGELVDIGF AAYNFVESI I NLFQVVHNSYNRPGGGGGNIQLPKEEIKKLEVDEITLWYKMI LPPQFDRSKKYPLL I QVYGGPCSQSVRS VFAVNW I SYLASKEGMVIALVDGRGTAFQGDKLLYAVYRKLGVYEVEDQITAVRKF I EMGFI DEKRI A I WGSYGGYVSS LALASGTGLFKCG I AVAPVSSWEYYASVYTERFMGLPTKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVDYLL I HGTADDNVHFQNSA QIAKALVNAQVDFQAMWYSDQNHGLSGLSTNHLYTHMTHFLKQCFSLSD (配列番号50)

注: DDDKはびエンテロキナーゼ切断部位で、融合タンパク質の原核生物における可溶性発現を促進する。GGGGGは5個の個グリシン残基で、リンカーとする。

【0135】

FAPの触媒ドメイン (アミノ酸配列500~760)

NIQLPKEEIKKLEVDEITLWYKMI LPPQFDRSKKYPLL I QVYGGPCSQSVRSVFAVNW I SYLASKEGMVIALVDGRGT AFQGDKLLYAVYRKLGVYEVEDQITAVRKF I EMGFI DEKRI A I WGSYGGYVSSLALASGTGLFKCG I AVAPVSSWEYYA SVYTERFMGLPTKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVDYLL I HGTADDNVHFQNSAQ I AKALVNAQVDFQAMWYSDQNHGLS GLSTNHLYTHMTHFLKQCFSLSD (配列番号108)

> DTT-4Bアミノ酸配列

I NLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGP IKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA AWAVNVAQVIDYGDEQYPRKTTAALSILPGIGSVMG IADGAVHHNTEE I VAQSI ALSSLMVAQA I PLVGELVDIGFAAYN FVESI I NLFQVVHNSYNRP (配列番号51)

注: ここで、YGDEQYPRはFAPエピトープである。

40

【0136】

工程2: 組換え抗原の担体の構築、タンパク質の発現・同定および大規模製造

方法2を参照し、DTT遺伝子を含むpGEX-6p-1プラスミドを鋳型とし、プライマー1およびプライマー2でPCRを行ってDTT遺伝子を得た。合成されたFAP触媒ドメインの遺伝子配列を鋳型とし、プライマー3およびプライマー4でPCRを行ってFAP触媒ドメインの遺伝子を得た。上記操作で得られたDTT遺伝子およびFAPドメイン遺伝子を鋳型とし、プライマー1およびプライマー4でオーバーラップPCRを行って、DTT-FAP融合タンパク質の遺伝子配列を構築した。同様に、DTT遺伝子を含むpGEX-6p-1プラスミドを鋳型とし、それぞれプライマー5およびプライマー6、プライマー7およびプライマー8で増幅してDTTの上段遺伝子および下段遺伝子を得、プライマー5およびプライマー7でオーバーラップPCRを行ってDTT-4Bの

50

遺伝子を得た。電気泳動で同定したところ、DTT-FAPおよびDTT-4B遺伝子の大きさはそれぞれ1300 bpおよび520 bpで、理論値と一致し、シクエンシングで融合遺伝子配列が正確であったことが示された。組換えタンパク質配列およびプライマー配列は以下の通りである。

> DTT-FAP核酸配列は配列番号52に示す。

【 0 1 3 7 】

【表 8】

>DTT-FAP プライマー配列:

プライマー	配列 5' -3'	
プライマー1:	CGCGGATCCGATGATGATGATAAGATAAAATCTTGATTGGGATGTCATAAGG	
DTT フォワード (エンテロキナーゼ 切断部位を含む)	(配列番号 53)	
プライマー2:	CTCTTTAGGCAGCTGGATATTACCACCACCACCACCGGGACGATTATACGAATTATG	
DTT リバース	(配列番号 54)	
プライマー3:	CATAATTCGTATAATCGTCCCGGTGGTGGTGGTAAATATCCAGCTGCCTAAAGAG	
FAP フォワード	(配列番号 55)	
プライマー4:	CCGCTCGAGCTAGTCTGACAAAGAGAAACAC	
FAP リバース	(配列番号 56)	

10

> DTT-4B核酸配列は配列番号57に示す。

【 0 1 3 8 】

【表 9】

>DTT-4B プライマー配列

プライマー名称	配列 5' -3'	
プライマー5:	CGCGGATCCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCATAAAATCTTGATTGGGATGTC	
DTT(フォワード)	(配列番号 58)	
プライマー6:	CCGCTCGAGCTAGGGACGATTATACGAATTATG	
DTT(リバース)	(配列番号 59)	
プライマー7:	CACGCGGGTACTGTTTCGTACCCGTAATCGATAACTTGCACAACGTTTACTGC	
4B-1(リバース)	(配列番号 60)	
プライマー8:	TTACGGTGACGAACAGTACCCGCGTGATAATTTGGAAAAGACAACACTGCTGC	
4B-2(フォワード)	(配列番号 61)	

20

30

組換え遺伝子をpGEX-6P-1ベクターに組み込み、かつBL21 (DE3) で原核生物における発現を行った。方法3を参照し、組換えタンパク質の発現を行い、GST-sepharoseで親和性精製を行い、電気泳動で分析したところ、DTT-FAPおよびDTT-4B抗原の大きさはそれぞれ51 kDおよび20 kDで、理論の分子量と一致し、かつ純度はいずれも90%以上であった。

【 0 1 3 9 】

工程3: 動物の免疫および抗体の力価の測定

方法4を参照し、マウスを免疫させ、ここで使用されたマウスは雌Balb/Cで(常州CAVEN Sから購入)、DTT-FAP群、DTT-4B群およびコントロール群はそれぞれ10、8、8匹で、フロインドアジュバントを使用し、免疫の投与量は30 ng抗原/製剤であった。3回目の強化免疫後1週間で採血して血清を調製した。

方法4を参照し、ELISA測定を行った。ヒトFAP(米国R&D Systemから購入)をコーティング抗原とし、マウス抗血清サンプルを100倍に希釈して一次抗体とし、ELISAで測定されたDTT-FAPおよびDTT-4B群の A_{450} 値はそれぞれ 0.55 ± 0.3 および 0.48 ± 0.5 で、陰性血清の値は 0.16 ± 0.06 ($p < 0.01$) で、DTT-FAPおよびDTT-4BはいずれもマウスのヒトFAPに対する抗体を誘導できることが示された。血清用サンプルを希釈液でそれぞれ100倍、500倍、1000倍、5000倍、10000倍、50000倍、100000倍に希釈した。ELISAで測定し、かつ A_{450} の希

40

50

積倍数に対する曲線図を作った。 $A_{450} > 0.2$ かつP/N 2.1の時(すなわち、実験群とコントロール群の吸光値の比 2.1の時)の最大希釈倍数を抗血清の力価とした。測定したところ、DTT-FAPおよびDTT-4B群の力価はそれぞれ5000および1000であった。

【0140】

工程4：抗腫瘍効果の研究

方法9を参照し、3回目の強化免疫後1週間でマウスにネズミ結腸癌CT26腫瘍を接種した。DTT-FAP群ではマウスの腫瘍形成速度はコントロール群よりも遅く、腫瘍の接種から12日後、DTT-FAP群の腫瘍形成率は90%だけで、コントロール群の腫瘍形成率は100%であった。腫瘍の接種から7日後、1日おきにノギスで腫瘍の長さと幅を測定し、腫瘍体積を計算して生存曲線を作成し(図7B)、腫瘍の接種から18日後、DTT-FAP群の腫瘍体積はコントロール群の53.8%だけであった($p < 0.01$)。腫瘍の接種から27日後、マウスを殺処分し、腫瘍を取り出し、かつ観察して撮影した。DTT-FAP群のマウスの腫瘍はDTT群と比べ、顕著に小さかった(図7C)。腫瘍の接種から27日後、DTT-FAP群のマウスの生存率は80%、ほかの2つの群のマウスの生存率はいずれも30%以下であった($p < 0.01$) (図7A)。以上の結果から、DTT-FAPワクチンは顕著な抗腫瘍作用を有することがわかる。

10

【0141】

実施例6 VEGFを標的とする抗腫瘍ワクチン

VEGFを標的とする抗腫瘍薬物はすでに臨床で多くの癌患者の命を延長してきた。本特許の発明者はVEGFを標的とするDTT-VEGFワクチン抗原を開発し、マウス腫瘍モデルにおいて顕著な抗腫瘍効果を有することが実証された。

20

【0142】

工程1 DTT-VEGF抗原タンパク質の構造の設計

方法1に従って操作し、発明者はVEGF(8-109)を選んでDTT(202-378)のC末端に導入してDTT-VEGF抗原タンパク質を構成し、DTT-VEGFと名付けた。

DTT-VEGF抗原タンパク質のアミノ酸配列

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPINKMSESPNKTVSEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGADGAVHHNTEEIVASIALSSLMVAQAIPLVGGELVDIGFAAYN
FVESIINLFQVVHNSYNRPGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRGCGCCNDEGLEC
VPTEESNITMQIMRIKPHQQQHI GEMSFLQHNCCECRPKKD(配列番号62)

VEGF(8-109)のアミノ酸配列:

GQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRGCGCCNDEGLECVPTTEESNITMQIMRIKPH
HQQQHI GEMSFLQHNCCECRPKKD(配列番号63)

30

【0143】

工程2 抗原タンパク質の製造

方法2に従い、具体的に、プライマー対VEGF-FおよびVEGF-Rを標的タンパク質遺伝子プライマーとして発現ベクターpGEX-DTT-VEGFを構築し、シクエンシングデータで正確と証明された。発現ベクターpGEX-DTT-VEGFをE. coli BL21に導入した後培養し、誘導し、SDS-PAGEで分析したところ、タンパク質の分子量は30KD程度で、DTT-VEGFタンパク質を発現できることが証明された。培養を1Lに拡大し、方法3に従ってDTT-VEGFタンパク質を製造し、12%SDS-PAGE電気泳動で分析したところ、純度は90%に達した。

40

【表10】

VEGF-F:	CAAGTAGTTCATAATTTCGTATAATCGTCCCGGTCAGAACCACCACGAGGTTGT (配列番号64)
VEGF-R:	CCGCTCGAGCTAATCTTTCTTCGGACGGCATTTCGCACTTGTTGT(配列番号65)

DTT-VEGF抗原の遺伝子配列は配列番号66に示す。

【0144】

工程3 マウスの免疫

免疫は方法4に従って行い、コーティング抗原は0.1 μg/Lの組換えhVEGFタンパク質であった(北京義翹神州生物技術有限公司から購入)。ELISAの結果は、DTT-VEGFで免疫さ

50

せた後、マウスの抗血清を100倍に希釈した後、hVEGF165に対するOD450は1.3に達した、単独のVEGFで免疫させた後、抗血清のOD450は0.1程度だけで、コントロールのDTTおよびAlumアジュバント群の抗血清のOD450はいずれも0.05未満であった。当該結果は、本特許における抗原の設計は単独のVEGFによる免疫と比べてVEGFに対する抗原性を顕著に向上させたことを証明した。また、DTT-VEGFで免疫させた後、抗血清のマウスVEGF(mVEGF164)に対するOD450は0.4に達し、DTT-VEGFで免疫させた後マウスのVEGFと交差反応が存在することが証明された。

【0145】

工程4 体液免疫および細胞免疫反応の測定

(1) 体液免疫反応の測定

設計した抗原が免疫寛容を突破できるか検証するために、発明者はDTT-VEGFで水酸化アルミニウムをアジュバントとしてマウスを免疫させたところ、高強度のhVEGF165に対する抗体を誘導し、抗体はマウスのVEGFにも交差反応があったことを見出した。抗体は有効にVEGFと受容体VEGF2の結合を中和することができる。VEGFをDTTと融合しなければ、抗体の発生を誘導することができない。DTTにおけるThエピトープは生体がVEGFのB細胞の免疫寛容を突破することに重要な作用を果たすことが示された。

【0146】

(2) 毒性Tリンパ細胞の測定

3回目の免疫後1週間で、マウスを殺処分し、脾臓細胞を取り出した。 10^6 細胞の濃度で6ウェルプレートに入れ、かつ最終濃度25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の相応の抗原を入れ、刺激して3日培養し、エフェクター細胞とした。B16-F10腫瘍細胞を標的細胞とした。所定の比率で96ウェルプレートに入れ、37 $^{\circ}\text{C}$ のインキュベーターで合計4 h培養し、50 μl の上清を取り、CytoTox96 nonradioactive cytotoxicity assay(Promega)キットで標準プロトコルに沿ってLDHの濃度を測定し、かつ説明書で提供された公式で分裂率を計算した。

CTL測定では、エフェクター細胞：標的細胞の比率の増加につれ、標的細胞の分裂率が上がり、エフェクター細胞と標的細胞の比が5：1の場合、DTT-VEGF免疫群の分裂率が5%程度だけで、エフェクター細胞と標的細胞の比が40：1の場合、DTT-VEGF免疫群の分裂率が40%程度に達し、コントロールDTT担体タンパク質群は15%だけであった。両者は顕著な差異があった。DTT-VEGFは抗原特異性CTLを誘導できることが証明された。

【0147】

工程5 ワクチンの腫瘍抑制の治療効果の測定

1) B16-F10モデルにおける予防性効果

マウスを無作為に8匹ずつ4群に分け、Group A: D23V、Group B: VEGF(8-109)、Group C: DTT、Group D: アジュバントであった。0.03mg/匹の投与量で、背部皮下で免疫を行い、2週間に1回強化免疫を行い、合計3回で、毎回の免疫後1週間で尾部静脈から採血し、-70 $^{\circ}\text{C}$ で保存して使用に備えた。2回目の免疫から1週間後、皮下および尾静脈からB16-F10細胞懸濁液を注射し(10⁵細胞/匹)、腫瘍の出現を観察し、生存率およびほかの異常状況を記録した。

【0148】

2) B16-F10モデルにおける治療性効果

マウス黒色腫B16-F10細胞の培養は、10%ウシ胎児血清、100 U/mlペニシリンおよび100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシンを含有するDMEM培地を使用し、5%CO₂インキュベーターで37 $^{\circ}\text{C}$ で培養した。指数増殖期の細胞を0.25%パンクレアチンで消化し、収集して無血清の培養液に入れ、軽く振とうし、500gで5 min遠心し、1回洗浄し、PBSで再懸濁させ、濃度を10⁶とし、トリパンブルーで染色し、測定したところ、細胞活力が95%以上であった。75%エタノールでマウスの脇の皮膚を消毒し、密度が調整されたB16-F10マウス黒色腫細胞を皮下に、100 μl /匹で各マウスに10⁵細胞ずつ接種し(予備実験で10⁵細胞/匹では100%腫瘍になることが確認され、すなわち腫瘍になったとする)、腫瘍の接種後2日目に、0.03mg/匹の投与量でワクチンを注射して治療し、毎週1回、3週間続けた。腫瘍の接種後、毎日腫瘍の出現を観察し、生存率およびほかの異常状況を記録した。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 9 】

3) CT26.WTにおける治療性効果

40匹の6-8週齢のBaIb/Cマウスを無作為に20匹ずつ2群に分け、1群目はDTT-VEGFで0.03mg/匹の投与量で背部皮下で免疫させ、2週間に1回強化免疫を合計3回行い、ほかの20匹はPBSだけで同じ手順で免疫を行い、コントロールとした。毎回の免疫後1週間で尾部静脈から採血し、-70℃で保存して使用に備えた。2回目の免疫から1週間後、皮下からCT26.WT細胞懸濁液を注射し(3×10⁵細胞/匹)、腫瘍の出現を観察し、生存率およびほかの異常状況を記録した。

B16-F10モデルにおける予防性効果の結果は、マウスの平均生存時間がコントロール群の25日からDTT-VEGF群の35日に延長し(図8B、C)、生存期間が大幅に増加したことを示した。B16-F10モデルにおける治療実験では、DTT-VEGF群のマウスの生存期間が顕著に延長し、平均生存時間がコントロール群の25日から32日に延長したことを見出した(図8E、F)。CT26腫瘍治療モデルにおいて、DTT-VEGFはワクチンとして腫瘍細胞の生長を顕著に抑制できた(図9G)。マウスの平均生存時間は同様にコントロール群の25日からDTT-VEGF群の35日に延長し、DTT-VEGF免疫後担腫瘍マウスの生存期間が顕著に延長することが証明された。

10

【 0 1 5 0 】

工程6 腫瘍組織の病理切片

周縁に顕著な壊死のない腫瘍組織を取り、通常のパラフィン病理切片を作り、HE染色し、CD8およびCD31の免疫組織化学の検出を行った。結果は、腫瘍の接種から14日後、DTT-VEGF免疫群の腫瘍の平均重量は0.5g未満で、コントロールPBS群は1gに達し、腫瘍の接種から19日後、DTT-VEGF免疫群の腫瘍の平均重量は0.5gに達し、コントロールPBS群は2.5gを超えたことを示した(図9A)。これはDTT-VEGF免疫後腫瘍の生長を顕著に抑制したことを証明した。さらなる観察・測定から、DTT-VEGF群では腫瘍の周囲は顕著な赤い血管の包囲がなかったが、コントロール群では腫瘍の周囲が大量の血管に包囲されたことが示され(図9B)、これはDTT-VEGF免疫後腫瘍の血管新生を顕著に抑制したことを証明した。さらなるHE切片では、DTT-VEGF免疫後、腫瘍内部の細胞核と細胞膜の境界ははっきりせず、核膜と細胞膜は不完全で、大量の細胞が壊死したことが示された(図9C)。一方、コントロール群では、腫瘍内部の細胞核と細胞質の境界ははっきりで、細胞の形状は規則正しく、大半は活細胞であった(図9C)。さらに、腫瘍内部の血管密度を分析した。anti-CD31抗体で免疫組織化学の分析をしたところ、DTT-VEGF群では、腫瘍内部の血管密度が3%だけで、コントロール群では8%に達した(図9E、F)。

20

30

さらに、腫瘍内部のリンパ球浸潤の状況を分析した。Anti-CD8抗体で染色したところ、DTT-VEGF群では腫瘍内部に大きなCD8⁺細胞浸潤領域が存在したが、コントロール群では腫瘍に点在のCD8⁺リンパ球しか見られなかった(図9D)。以上の結果は、DTT-VEGF免疫後、腫瘍の血管新生を抑制し、リンパ球の浸潤および壊死を促進したことを示唆した。

【 0 1 5 1 】

実施例7 PDL1を標的とする組換え腫瘍ワクチン

PDL1およびPD1経路が活性化すると、Tリンパ細胞の活性化を抑制し、免疫関連サイトカインの分泌を低下させることができる。PDL1/PD1などの免疫調節シグナル経路は免疫系の腫瘍マーカーに対する識別を低下させることによって、腫瘍に免疫回避をさせることができる。PDL1を標的とするモノクローナル抗体はすでに臨床に入り、本特許で設計されたPDL1に対する組換えワクチンも優れた腫瘍抑制効果を有する。

40

【 0 1 5 2 】

工程1: 抗原の構造の設計

方法1に従い、PDL1の細胞外ドメインPDL1E、およびPDL1とPD1の結合部位のない細胞外ドメインPDL1E1を選択し、それぞれPDL1EおよびPDL1E1をDTTのC末端に導入し、DTT-PDL1E組換えタンパク質およびDTT-PDL1E1組換えタンパク質。

mPDL1のアミノ酸配列:

50

MRIFAGIIFTACCHLLRAFTITAPKDLVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVVYWEKEDEQVIQFVAGEEDLKPQH
SNFRGRASLPKDQLLKGNAALQITDVKLQDAGVYCCIISYGGADYKRI TLKVNAPYRKINQRISVDPATSEHELICQAE
YPEAEVIWTNSDHQPVSGKRSVTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTAELIPEL
PATHPPQNRT
HWVLLGSI LLFLIVVSTVLLFLRKQVRMLDVEKCGVEDTSSKNRNDTQFEET (配列番号122)

【0153】

mPDL1Eのアミノ酸配列：

FTITAPKDLVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVVYWEKEDEQVIQFVAGEEDLKPQHSNFRGRASLPKDQLLKG
NAALQITDVKLQDAGVYCCIISYGGADYKRI TLKVNAPYRKINQRISVDPATSEHELICQAE
GYPEAEVIWTNSDHQPVSG
KRSVTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTAELIPEL (配列番号67)

10

mPDL1E1のアミノ酸配列：

APYNKINQRILVVDVPTSEHELTCQAE
GYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYC
TFRRLDPEENHTAELVIPEL 10 (配列番号68)

【0154】

DTT-PDL1E組換えタンパク質の全配列

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPINKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGADGAVHHNTEEIVAQSI ALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYN
FVESIINLFQVVHNSYNRPFTITAPKDLVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVVYWEKEDEQVIQFVAGEEDLKPQHS
NFRGRASLPKDQLLKGNAALQITDVKLQDAGVYCCIISYGGADYKRI TLKVNAPYRKINQRISVDPATSEHELICQAE
GYPEAEVIWTNSDHQPVSGKRSVTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTAELIPEL (配列番号69
)

20

DTT-PDL1E1組換えタンパク質の全配列

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPINKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGADGAVHHNTEEIVAQSI ALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYN
FVESIINLFQVVHNSYNRPAPYNKINQRILVVDVPTSEHELTCQAE
GYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPEL (配列番号70)

【0155】

hPDL1のアミノ酸配列：

MRIFAVFIFMTYWHLNNAFTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIQFVHGEEDLKVQHSS
YRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRI TVKVNAPYNKINQRILVVDVPTSEHELTCQAE
GYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTH
LVI LGA ILLCLGVALTFIFRLRKGMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET (配列番号123)

30

hPDL1E1のアミノ酸配列：

FTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGN
AALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRI TVKVNAPYNKINQRILVVDVPTSEHELTCQAE
GYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPEL (配列番号124)

【0156】

hPDL1E1のアミノ酸配列：

APYNKINQRILVVDVPTSEHELTCQAE
GYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYC
TFRRLDPEENHTAELVIPEL (配列番号125)

40

DTT-hPDL1E1組換えタンパク質の全配列

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPINKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGADGAVHHNTEEIVAQSI ALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYN
FVESIINLFQVVHNSYNRPFTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIQFVHGEEDLKVQHS
SYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRI TVKVNAPYNKINQRILVVDVPTSEHELTCQAE
GYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPEL (配列番号1
26)

50

【 0 1 5 7 】

DTT-hPDL1E1組換えタンパク質の全配列

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYN
FVESIINLFQVVHNSYNRPAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFN
VTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVPEL_(配列番号127)

【 0 1 5 8 】

工程2 プラスミドの構築およびタンパク質の発現

感受性BL21、Top10はTransGen Biotechから、ベクターpGEX-6p-1、PMD18-T、ExTaq酵素、T4リガーゼ、逆転写キットはTaKaRaから購入された。PDL1遺伝子は黒色腫、結腸癌、肺癌の細胞において高度に発現され、CT26、B16-F10を回復させ、継代培養し、細胞を収集し、凍結融解して破碎し、mRNAを抽出し、cDNAを逆転写した。cDNAを鋳型として、プライマーP1、P2でPCRを行い、シクエンシングによって正確なmus-PDL1全長遺伝子を得たことが検証された。方法2に従い、DTT遺伝子およびPDL1全長遺伝子を鋳型として、プライマーP3、P4、P5、P6でネステッドPCRを行い、プラスミドmus-PDL1-DTT-E1-pGEX-6p-1を得た。DTT遺伝子およびPDL1全長遺伝子を鋳型として、プライマーP7、P8、P9、P10でネステッドPCRを行い、プラスミドmus-PDL1-DTT-E-pGEX-6p-1を得た。PDL1全長遺伝子を鋳型として、プライマーP11、P12でPCRを行い、プラスミドmus-PDL1-E-pGEX-6p-1を得た。以上のプラスミドは、シクエンシングによってPDL1組換え発現関連ベクターの構築に成功したことが検証された。方法3に従い、DTT(20KD)、DTT-PDL1E(42KD)、DTT-PDL1E1(30KD)、PDL1E(23KD)などの組換えタンパク質の精製を行い、かつSDS-pageで検出したところ、目的のタンパク質の大きさの単一バンドが得られ、分析純度が90%以上に達し、ワクチンとして動物の免疫に使用できる。

【 0 1 5 9 】

10

20

【表 1 1】
プライマーのリスト

プライマー名称	プライマー配列 5'-3'
Mus-PdL1-F (P1)	AGGATATTTGCTGGCATTATATTC(配列番号 71)
Mus-PdL1-R (P2)	TTACGTCTCCTCGAATTGTGT(配列番号 72)
mus-DTT-PDL1E1-P1 (P3)	CGGAATTCGATGATGATGATAAGATAAATCTTGATTGGGATGT CAT(配列番号 73)
mus-DTT-PDL1E1-P2 (P4)	CTCTGGTTGATTTTGC GG TATGGGGCGGGACGATTATACGAAT TATGAACTACTTG (配列番号 74)
mus-DTT-PDL1E1-P3 (P5)	CAAGTAGTTCATAATTCGTATAATCGTCCCGCCCCATACCGCA AAATCAACCAGAG (配列番号 75)
mus-DTT-PDL1E1-P4 (P6)	CGGCTCGAGCAGTTCTGGGATGATCAGCTC (配列番号 76)
mus-DTT-PDL1E-P1 (P7)	CGGAATTCGATGATGATGATAAGATAAATCTTGATTGGGATGT CAT(配列番号 77)
mus-DTT-PDL1E-P2 (P8)	CCTTTGGAGCCGTGATAGTAAAGGGACGATTATACGAATTATG (配列番号 78)
mus-DTT-PDL1E-P3 (P9)	CATAATTCGTATAATCGTCCCTTTACTATCACGGCTCCAAAGG (配列番号 79)
mus-DTT-PDL1E-P4 (P10)	CTCGAGATTGACTTTCAGCGTGATTTCGC (配列番号 80)
mus-PDL1E-F (P11)	GGAATTCTTTACTATCACGGCTCCAAAG (配列番号 81)
mus-PDL1E-R (P12)	GCTCGAGTCACAGTTCTGGGATGATC (配列番号 82)

10

20

【 0 1 6 0 】

工程3：動物の免疫保護

北京VITAL RIVER実験動物有限公司から混入された18匹の9週齢の雌Balb/cマウス。実験前、実験対象として体重 21 ± 1 のマウスを選び、無作為にDTT群、DTT-PDL1E群、DTT-PDL1E1の3群に6ずつ分けた。方法4に従い、動物の免疫を行い、免疫前に血清を採取し、その後毎回の免疫の前日に血清を採取した。3回目の免疫後、方法9に従い、腫瘍細胞の培養および腫瘍の接種を行った。腫瘍の接種から7日後、1日おきに腫瘍体積の変化を観測し、記録した。マウスの腫瘍体積の変化(腫瘍体積=幅²×長さ×1/2)の傾向(図10Aを参照)は、DTT-PDL1E群、DTT-PDL1E1群はコントロール群よりも保護の効果があったことが示された($P < 0.05$, $n=6$)。腫瘍の接種から22日後、安楽死させ、解剖して腫瘍を検査し、各群の腫瘍重量を測定した(図10Bを参照)。統計学分析では、DTTとDTT-PDL1Eは差異が顕著で($P < 0.05$)、DTTとDTT-PDL1E1は差異が非常に顕著で($P < 0.001$)、2つの免疫保護群は有意差がなかった($P > 0.05$)。腫瘍重量と体重の比率では、DTTコントロール群とDTT-PDL1E群は差異が顕著で($P < 0.05$)、DTTコントロール群とDTT-PDL1E1群は差異が顕著で($P < 0.05$)、2つの免疫保護群は有意差がなかった($P > 0.05$) (図10C、D)。方法9によって、DTT-PDL1Eの腫瘍抑制率が24.6%で、DTT-PDL1E1の腫瘍抑制率が30%であった。結果から、DTT-PDL1を標的とするワクチンは顕著な抗腫瘍効果を有することがわかる。

30

40

【 0 1 6 1 】

実施例8 EGFRを標的とする抗腫瘍ワクチン

工程1：抗原の設計

上皮成長因子受容体(epidermal growth factor receptor、EGFR)は、幅広く人体の各組織の細胞膜に分布する多機能タンパク質である。その阻害剤(たとえばゲフィチニブやエルロチニブ)およびモノクローナル薬物(たとえばセツキシマブやパニツムマブ)はすで

50

に市販され、晩期結腸癌の治療に使用されている。EGFRの細胞外領域は、I、II、III、IVの4つのドメインで構成される。ドメインIIIは主要な保存アミノ酸残基でリガンドと作用する。ドメインIIは二量体の形成を仲介する主要な部位である。本発明者はEGFRのドメインIIIをDTTのC末端に融合し、かつドメインIIにおける二量体の形成に關与する主要なエピトープ (hEGFR 237-267 DTCPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCV (配列番号83)、PPLMLYNPTTYQMDVNPE (入れ番号109)) のポリペプチドをDTTのC末端-N末端の近いほうの適切な位置に導入し、ポリエピトープワクチンを設計した。設計の工程は方法1を参照する。

【 0 1 6 2 】

本実施例では、合計4つの抗原タンパク質を設計し、それぞれDTT-mEGFRIII、DTT-hEGFRIII、DTT-mEGFRIII-pep、DTT-pep-mEGFRIIIである。融合後のアミノ酸配列は以下のとおりである。

DTT-mEGFRIII抗原タンパク質のアミノ酸配列：

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPINKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYN
FVESIINLFQVVHNSYNRPRKVCNGIGIGEFKDTLSINATNIKHFKYCTAISGDLHILPVAFKGDSTFTRTPPLDPRELEI
LKTVKEITGFLLIQAWPDNWTDLHAFENLEIRGRTKQHGGQFSLAVVGLNITSLGLRSLKEISDGDVISGNNRNLCYANT
INWKKLFGTPNQTKIMNNRAEKDCKAVNHV (配列番号84)

mEGFRドメインIIIのアミノ酸配列：

RKVCNGIGIGEFKDTLSINATNIKHFKYCTAISGDLHILPVAFKGDSTFTRTPPLDPRELEILKTVKEITGFLLIQAWP
DNWTDLHAFENLEIRGRTKQHGGQFSLAVVGLNITSLGLRSLKEISDGDVISGNNRNLCYANTINWKKLFGTPNQTKIM
NNRAEKDCKAVNHV (配列番号110)

【 0 1 6 3 】

DTT-hEGFRIII抗原タンパク質のアミノ酸配列：

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPINKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYN
FVESIINLFQVVHNSYNRPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELD
LKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVISGNKNLCYANT
INWKKLFGTSGQKTKISNRGENKCKATGQV (配列番号85)

hEGFRドメインIIIのアミノ酸配列：

RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDLKTVKEITGFLLIQAWP
ENRTDLHAFENLEIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKI
SNRGENKCKATGQV (配列番号111)

【 0 1 6 4 】

DTT-mEGFRIII-pep抗原タンパク質のアミノ酸配列：

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPINKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYN
FVESIINLFQVVHNSYNRPRKVCNGIGIGEFKDTLSINATNIKHFKYCTAISGDLHILPVAFKGDSTFTRTPPLDPRELEI
LKTVKEITGFLLIQAWPDNWTDLHAFENLEIRGRTKQHGGQFSLAVVGLNITSLGLRSLKEISDGDVISGNNRNLCYANT
INWKKLFGTPNQTKIMNNRAEKDCKAVNHVGGGGSDTCPPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCV (配列番号86)

【 0 1 6 5 】

DTT-hEGFRIII-pep抗原タンパク質のアミノ酸配列：

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPINKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYN
FVESIINLFQVVHNSYNRPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELD
LKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVISGNKNLCYANT
INWKKLFGTSGQKTKISNRGENKCKATGQVGGGGSDTCPPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCV (配列番号119)

【 0 1 6 6 】

DTT-pep-mEGFRIII抗原タンパク質のアミノ酸配列 (DTTにおけるDSETADNをPPLMLYNPTTYQMDVNPEに置換した。)：

INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPINKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA

AWAVNVAQV I PPLMLYNPTTYQMDVNPELEKTTAALS I LPG I GSVMG I ADGAVHHNTEE I VAQS I ALSSLMVAQA I PLVG
ELVD I GFAAYNFVES I INLFQVVHNSYNRPRKVCNG I G I GEFKDTLS I NATN I KHFKYCTA I SGDLHI LPVAFKGDSTH
TPPLDPRELE I LKTVKE I TGFLI I QAWPDNWTDLHAFENLE I I RGRTKQHGQFSLAVVGLN I TSLGLRSLKE I SDGDV I I
SGNRNLCYANT I NWKCLFGTPNQKTK I MNRAEKDCKAVNHV (配列番号87)

【 0 1 6 7 】

DTT-pep-hEGFR III 抗原タンパク質のアミノ酸配列 (DTTにおけるDSETADNをPPLMLYNPTTYQMDVNPEに置換した。) :

INLDWDV I RDKTKTK I ESLKEHGP I KNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQV I PPLMLYNPTTYQMDVNPELEKTTAALS I LPG I GSVMG I ADGAVHHNTEE I VAQS I ALSSLMVAQA I PLVG
ELVD I GFAAYNFVES I INLFQVVHNSYNRPRKVCNG I G I GEFKDSLS I NATN I KHFKNCTS I SGDLHI LPVAFRGSFTH
TPPLDPQELD I LKTVKE I TGFLI I QAWPENRTDLHAFENLE I I RGRTKQHGQFSLAVVSLN I TSLGLRSLKE I SDGDV I I
SGNKNLCYANT I NWKCLFGTSGQKTK I I SNRGENKCKATGQV (配列番号120)

10

【 0 1 6 8 】

工程2：ベクターの構築、融合タンパク質の発現と精製

GeneBankにおけるDTのTドメインの遺伝子mRNAおよびmEGFRとhEGFRの遺伝子mRNAの読み枠の配列に基づき、プライマーを設計してオーバーラップPCRの原理でDTのTドメインにおける相応の位置にBエピトープを導入した。プライマーおよび鋳型は南京genscript社によって合成された。オーバーラップPCR法でPCR産物を得、各タンパク質はそれぞれ1Fおよび3R、2Fおよび4Rの2つのプライマー対で一回目のPCRを、1Fおよび4Rプライマーで二回目のPCRを行った。PCRおよびベクターの構築の工程は方法2を参照する。

20

陽性クローンを得た後、プラスミドを抽出してPCRによる同定を行ったところ、4つの抗原タンパク質 (DTT-mEGFR III、DTT-hEGFR III、DTT-mEGFR III-pepおよびDTT-pep-mEGFR III) のPCR産物はいずれも120KD程度で、予想と一致した。陽性クローンはgenscript社によってシクエンシングされ、その結果は予想の設計と一致した。組換えタンパク質および調製工程は方法3を参照する。SDS-PAGEでタンパク質の検出を行った結果、DTT-mEGFR、DTT-hEGFR、DTT-pep-mEGFR、DTT-mEGFR-pepの分子量は約40KDで、予想と一致した。タンパク質の純度はいずれも90%以上であった。

【 0 1 6 9 】

本特許で設計された4つの抗原タンパク質に相応する核酸およびプライマーの配列は以下の通りである。

30

【表 1 2】

実施例 7 のプライマーのリスト

プライマー名称	プライマー配列
DTT-mEGFRIII-1F:	CGCGGATCCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCCGCAAAGTT TGTAATGGCATAGGC(配列番号 88)
DTT-mEGFRIII-2F:	GTAGTTCATAATTCGTATAATCGTCCCCGCAAAGTTTGTAATG GCATAGGC (配列番号 89)
DTT-mEGFRIII-3R:	GCCTATGCCATTACAAACTTTGCGGGGACGATTATACGAATTA TGAACTAC(配列番号 90)
DTT-mEGFRIII-4R:	CCGCTCGAGCTAGACGTGGTTCACGGCCTTGCAGTCTTTC (配列番号 91)
DTT-hEGFRIII-1F:	CGCGGATCCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCCGCAAAGTT TGTAATGGCATAGGC(配列番号 92)
DTT-hEGFRIII-2F:	GTAGTTCATAATTCGTATAATCGTCCCCGCAAAGTGTGTAACG GAATAGGTATTGG(配列番号 93)
DTT-hEGFRIII-3R:	CCAATACCTATTCCGTTACACACTTTGCGGGGACGATTATACG AATTATGAACTAC(配列番号 94)
DTT-hEGFRIII-4R:	CCGCTCGAGCTAGACCTGGCCTGTGGCCTTGCAGCTGTTTTTC (配列番号 95)
DTT-pep-mEGFRIII-1F:	CGCGGATCCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCCGCAAAGTT TGTAATGGCATAGGC(配列番号 96)
DTT-pep-mEGFRIII-2F	CAACCCACACCTATCAGATGGATGTCAACCCTGAATTGGA AAAGACAACCTGCTGCTC(配列番号 97)
DTT-pep-mEGFRIII-3R:	GTTGACATCCATCTGATAGGTGGTGGGGTTGTACAGCATGAG TGGTGGGATAACTTGCGCAACGTTTACTG(配列番号 98)
DTT-pep-mEGFRIII-4R	CCGCTCGAGCTAGACGTGGTTCACGGCCTTGCAGTCTTTC (配列番号 99)
DTT-mEGFRIII-pep-1F	CGCGGATCCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCCGCAAAGTT TGTAATGGCATAGGC(配列番号 100)
DTT-mEGFRIII-pep-2F	GTAGTTCATAATTCGTATAATCGTCCCCGCAAAGTTTGTAATG GCATAGGC(配列番号 101)
DTT-mEGFRIII-pep-3R	GCCTATGCCATTACAAACTTTGCGGGGACGATTATACGAATTA TGAACTAC(配列番号 102)
DTT-mEGFRIII-pep-4R	CCGCTCGAGCTACACACAGGTGGCACCAAAGCTGTACTTC (配列番号 103)

【 0 1 7 0 】

DTT-mEGFRIII抗原タンパク質の遺伝子配列は配列番号104に示す。

DTT-hEGFRIII抗原タンパク質の遺伝子配列は配列番号105に示す。

DTT-pep-mEGFRIII抗原タンパク質の遺伝子配列は配列番号106に示す。

TT-mEGFRIII-pep抗原タンパク質の遺伝子配列は配列番号107に示す。

【 0 1 7 1 】

工程3 免疫原性の測定

各群からマウス10匹の血清を採取して検出し、mEGFR標準品（北京義翹神州生物技術有限公司から購入）をコーティングし、ELISA検出を行い、具体的な工程は方法4を参照する。ELISA検出では、PBS群の平均値は0.31で、DTT群の平均値は0.34で、DTT-mEGFRの平均値は1.84、DTT-hEGFRの平均値は1.65で、DTT-pep-mEGFRの平均値は1.91で、DTT-mEGFR-pepの平均値は1.31であった。4つの実験群ではいずれもmEGFRに対していい抗体が生成し、本特許の方法は免疫寛容の突破に成功し、mEGFRに対する抗体が生じることが示された（p <

0.05)。

【0172】

Her1標準品をコーティングしたELISAの結果では、PBS群の平均値は0.17で、DTT群の平均値は0.20で、DTT-mEGFRの平均値は0.60、DTT-hEGFRの平均値は1.25で、DTT-pep-mEGFRの平均値は0.87で、DTT-mEGFR-pepの平均値は0.29であった。4つの実験群ではいずれもmEGFRに対していい抗体が生成し、私たちの方法は免疫寛容の突破に成功し、自己タンパク質に対する抗体が生じることが示された ($p < 0.05$)。mEGFRはHer1に対しても抗体が発生し、同時にHer1はmEGFRに対してもいい抗体があったため、交差反応が存在することが示された。

【0173】

工程4 ウェスタン同定

A431細胞分裂液を電気泳動のサンプルとして検出し、同時にB16F10細胞分裂液を陰性コントロールとした。具体的な実験の工程は方法6を参照する。呈色反応によって、実験群ではA431細胞分裂液に対して顕著な抗体バンドがあり、かつ105KD程度に位置し、EGFRの分子量の大きさに一致した。こらは私たちの抗体が細胞表面のEGFRに対して特異的に結合することを示す。

【0174】

工程5 担腫瘍マウスの免疫治療

マウスの免疫の工程は方法4を参照し、腫瘍細胞の培養、移植および見かけ効果の評価の具体的な工程は方法9を参照する。Lewisマウス肺癌細胞で腫瘍モデルを構築し、接種量は 5×10^5 個/匹であった。接種日数を横軸とし、腫瘍体積を縦軸とし、腫瘍生長曲線を作った。結果は、16日目から、本特許の4つの実験群はPBSおよびDTTのコントロール群に対していずれも有意差があったことを示す ($p < 0.05$)。DTT-mEGFR群はPBS群に対し、腫瘍抑制率は16%であった。DTT-hEGFR群はPBS群に対し、腫瘍抑制率は32%であった。DTT-mEGFR-pep群はPBS群に対し、腫瘍抑制率は21%であった。DTT-pep-mEGFR群はPBS群に対し、腫瘍抑制率は37%であった。結果は、私たちのワクチンは自己免疫寛容を突破し、優れた腫瘍抑制効果があることを示す。

【0175】

工程6 T細胞増殖実験

mEGFR標準品(北京義翹神州生物技術有限公司から購入)を抗原として脾細胞を刺激し、実験の工程は方法7を参照する。各群からマウスを3匹選んだが、PBS群の平均値は0.12で、DTT群の平均値は0.12で、DTT-pep-mEGFR群の平均値は0.20で、実験群は2つのコントロール群に対していずれも有意差があった ($p < 0.05$)。DTT-pep-mEGFRワクチンはT細胞の増殖を刺激することができ、細胞の免疫寛容を突破したことが示された。

【0176】

工程7 CTL殺傷実験

mEGFR標準品(北京義翹神州生物技術有限公司から購入)を抗原として脾細胞を刺激し、Lewisマウス肺癌細胞を標的細胞とし、実験の具体的な工程は方法8を参照する。各群からマウスを3匹選んだが、PBS群ではLewis細胞に対する殺傷率は4%で、DTT群の殺傷率の平均値は8%で、DTT-pep-mEGFR群の殺傷率の平均値は29.8で、実験群は2つのコントロール群に対していずれも有意差があった ($p < 0.05$)。DTT-pep-mEGFRワクチンは標的細胞に対してCTL殺傷作用が生じたことが示された。

【0177】

各文献がそれぞれ単独に引用されるように、本発明に係るすべての文献は本出願で参考として引用する。また、本発明の上記の内容を読み終わった後、この分野の技術者が本発明を各種の変動や修正をすることができるが、それらの等価の様態のものは本発明の請求の範囲に含まれることが理解されるはずである。

10

20

30

40

【 図 1 】

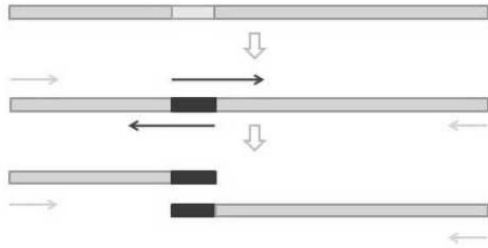


図 1

【 図 2 】

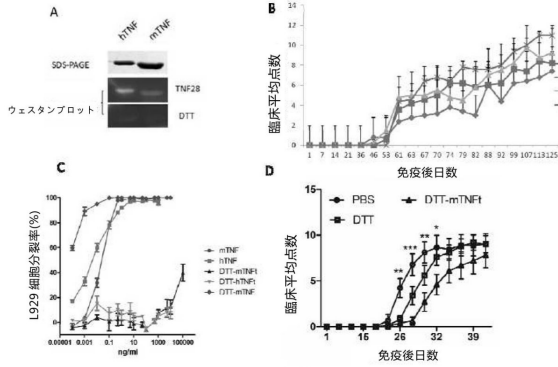


図 2

【 図 3 】

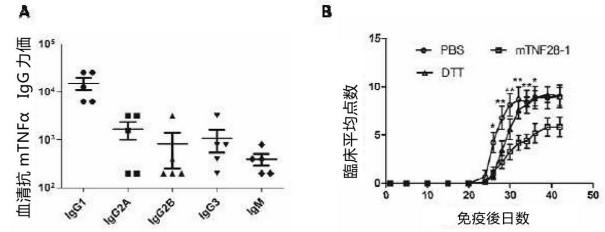


図 3

【 図 4 】

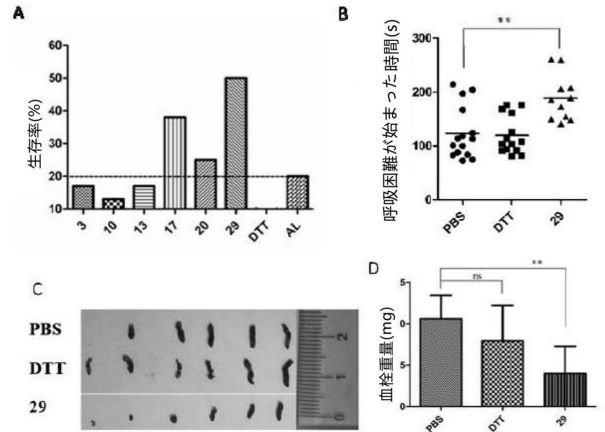


図 4

【 図 5 】

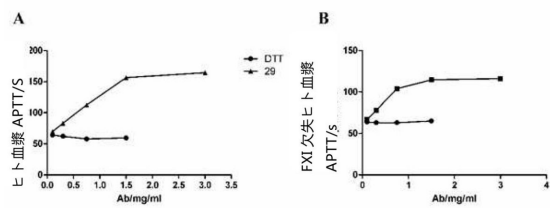


図 5

【 図 7 】

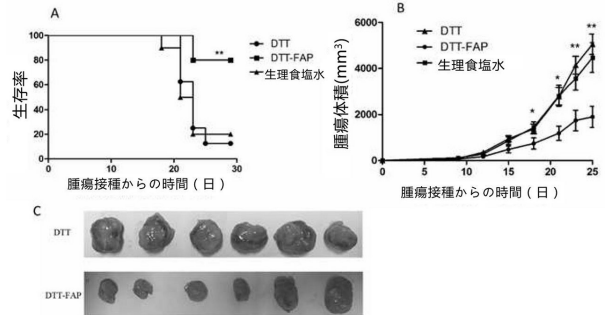


図 7

【 図 6 】

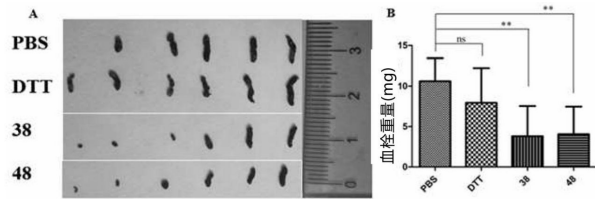


図 6

【 図 8 】

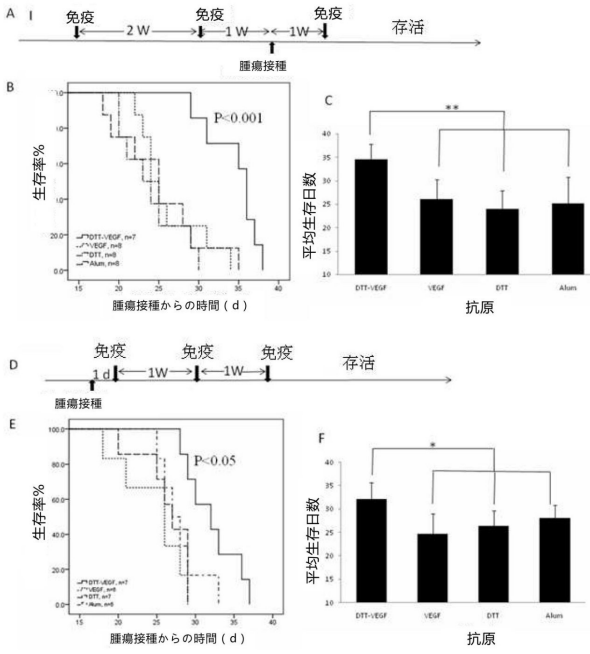


図 8

【 図 9 】

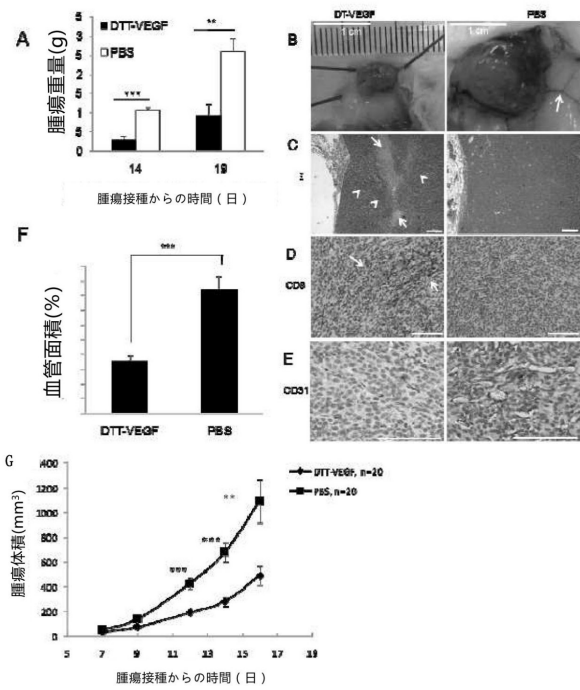


図 9

【 図 10 】

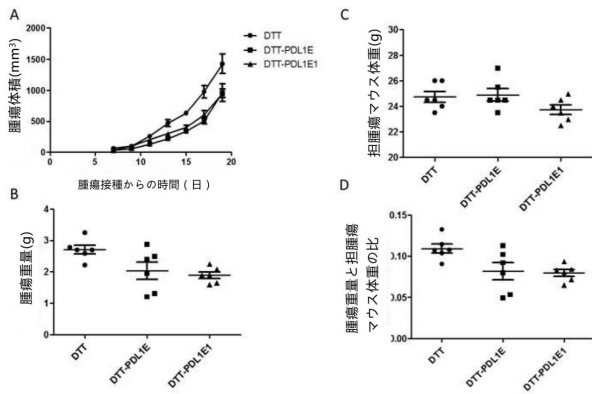


図 10

【配列表】

0006549560000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 K	38/02 (2006.01)	A 6 1 K	38/02
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17
A 6 1 K	38/18 (2006.01)	A 6 1 K	38/18
A 6 1 K	38/19 (2006.01)	A 6 1 K	38/19
A 6 1 K	38/36 (2006.01)	A 6 1 K	38/36
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00 1 0 1
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	7/02 (2006.01)	A 6 1 P	7/02
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00 H
A 6 1 K	31/7088 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
C 0 7 K	14/195 (2006.01)	C 0 7 K	14/195
C 0 7 K	14/435 (2006.01)	C 0 7 K	14/435
C 0 7 K	14/525 (2006.01)	C 0 7 K	14/525
C 0 7 K	14/745 (2006.01)	C 0 7 K	14/745
C 0 7 K	14/475 (2006.01)	C 0 7 K	14/475
C 0 7 K	14/725 (2006.01)	C 0 7 K	14/725
C 0 7 K	14/71 (2006.01)	C 0 7 K	14/71

(73)特許権者 515318234

上海 ハイチャーム インコーポレーテッド
 SHANGHAI HYCHARM INC.
 中華人民共和国 上海 200131、プードン ニュー エリア、チャイナ(上海) パイロット
 フリー トレード ゾーン、フウ トウ イースト ファースト ロード 458、フラット
 5 - 5 1 8
 Flat 5 - 5 1 8 , 4 5 8 Fu Te East 1st Road , China (Shanghai) Pilot Free Trade Zone , Pudong New
 Area , Shanghai 200131 China

(74)代理人 100102842

弁理士 葛和 清司

(72)発明者 リー, ロンシウ

中華人民共和国 上海 200131、プードン ニュー エリア、チャイナ(上海) パイロット
 フリー トレード ゾーン、フウ トウ イースト ファースト ロード 458、フラット
 5 - 5 1 8

(72)発明者 チャン, リー

中華人民共和国 上海 200131、プードン ニュー エリア、チャイナ(上海) パイロット
 フリー トレード ゾーン、フウ トウ イースト ファースト ロード 458、フラット
 5 - 5 1 8

(72)発明者 ツォン, コンハオ

中華人民共和国 上海 200131、プードン ニュー エリア、チャイナ(上海) パイロット
 フリー トレード ゾーン、フウ トウ イースト ファースト ロード 458、フラット
 5 - 5 1 8

(72)発明者 チェン, チャオ

中華人民共和国 上海 200131、プードン ニュー エリア、チャイナ(上海) パイロ

ト フリー トレード ゾーン、フウ トウ イースト ファースト ロード 458、フラット
5 - 518

(72)発明者 チャン, リー

中華人民共和国 上海 200131、プードン ニュー エリア、チャイナ(上海) パイロ
ト フリー トレード ゾーン、フウ トウ イースト ファースト ロード 458、フラット
5 - 518

(72)発明者 スウ, アイツァン

中華人民共和国 上海 200131、プードン ニュー エリア、チャイナ(上海) パイロ
ト フリー トレード ゾーン、フウ トウ イースト ファースト ロード 458、フラット
5 - 518

(72)発明者 ルウ, ウーグァン

中華人民共和国 上海 200131、プードン ニュー エリア、チャイナ(上海) パイロ
ト フリー トレード ゾーン、フウ トウ イースト ファースト ロード 458、フラット
5 - 518

(72)発明者 リン, ツィーピン

中華人民共和国 上海 200131、プードン ニュー エリア、チャイナ(上海) パイロ
ト フリー トレード ゾーン、フウ トウ イースト ファースト ロード 458、フラット
5 - 518

審査官 斉藤 貴子

(56)参考文献 米国特許出願公開第2008/0305108(US, A1)

特表平09-505031(JP, A)

特表2010-530895(JP, A)

特表2007-513992(JP, A)

国際公開第2012/163289(WO, A1)

Liger, D., et al., The diphtheria toxin transmembrane domain as a pH sensitive membran
e anchor for human interleukin-2 and murine interleukin-3, Protein Engineering, 199
8年, 11(11), 1111-1120

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K

C12N

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)