

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-520853

(P2005-520853A)

(43) 公表日 平成17年7月14日(2005.7.14)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/21	A 6 1 K 39/00	H 4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	J
A 6 1 K 39/002	A 6 1 K 39/002	
A 6 1 K 39/02	A 6 1 K 39/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-577932 (P2003-577932)	(71) 出願人	398051143
(86) (22) 出願日	平成15年3月21日 (2003. 3. 21)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ カリフォルニア
(85) 翻訳文提出日	平成16年11月18日 (2004. 11. 18)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 946 07-5200, オークランド, 12ティ ーエイチ フロア, フランクリン ストリ ート 1111
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/009136	(74) 代理人	100064355
(87) 国際公開番号	W02003/080106		弁理士 川原田 一穂
(87) 国際公開日	平成15年10月2日 (2003. 10. 2)	(72) 発明者	マヌエル・エル・ベニチェト
(31) 優先権主張番号	60/366, 917		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 90 034 ロス アンゼルス メントーン アヴェニュー 3767 アpartment 413
(32) 優先日	平成14年3月21日 (2002. 3. 21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	10/118, 473		
(32) 優先日	平成14年4月5日 (2002. 4. 5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛋白質ワクチン接種の有効なアジュバントとしての抗体融合蛋白質

(57) 【要約】

本発明はワクチン接種した対象に体液性及び/又は細胞性免疫応答を誘発するための抗原蛋白質ワクチン接種のアジュバントとしての種々の抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質の使用方法を提供する。これらの融合蛋白質と内在及び/又は外来抗原蛋白質を含む組成物も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質を含む組成物であって、融合蛋白質が疾患関連抗原の有効なアジュバントを含む前記組成物。

【請求項 2】

更に抗原を含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質が前記抗原に対して抗体特異性をもつ請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質がサイトカインドメイン、サイトカイン配列、サイトカインのサブ配列、ケモカインドメイン、ケモカイン配列、ケモカインのサブ配列、又はサイトカインもしくはケモカイン以外の免疫刺激剤を含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質がサイトカイン、ケモカイン、インターロイキン、インターフェロン、C - X - C ケモカイン、C - C ファミリーケモカイン、C ケモカイン、CX3C ケモカイン、スーパー抗原、成長因子、IL - 1、IL - 2、IL - 4、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 10、IL - 12、IL - 13、IL - 17、IL - 18、RANTES、mip1、mip1、GMCSF、GCSF、インターフェロン、インターフェロン、TNF、CSF、mip2、mip2、PF4、血小板塩基性蛋白質、hIP10、LD78、Act-2、MCAF、1309、TCA3、IP-10、リンホタクチン、フラクタルカイン、KLH、及びそのフラグメントから構成される群から選択される免疫刺激剤ドメインを含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質がリンカーを含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質の抗体ドメインがHER2/neu 抗原に特異的な抗体を含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質の抗体ドメインが腫瘍抗原、細菌抗原、ウイルス抗原、マイコプラズマ抗原、真菌抗原、プリオン抗原、自己免疫疾患抗原、又は寄生虫抗原に特異的な抗体を含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 9】

抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質の抗体ドメインが腫瘍抗原以外の抗原に特異的な抗体を含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 10】

抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質が抗体フラグメント、Fab ドメイン、Fab' ドメイン、F(ab')₂ ドメイン、F(ab)₂ ドメイン及びscFv ドメインから構成される群から選択されるドメインを含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質がIgG、IgA、IgE、IgM、IgD、IgG1、IgG2、及びIgG3 から構成される群から選択されるドメインを含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 12】

抗原が可溶性抗原、マトリックスに結合した可溶性抗原、マトリックスに結合した不溶性抗原、抗原の不溶性凝集物、生存不能細胞関連抗原、もしくは生存不能生物関連抗原、又はリポソームに封入した抗原から構成される群から選択される 1 種以上の抗原を含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 13】

抗原がHER2/neu 又は腫瘍細胞から脱落したHER2/neu、そのフラグメン

10

20

30

40

50

トを含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 1 4】

抗原が腫瘍抗原以外の抗原を含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 1 5】

抗原が対象に由来するか、対象の体内の疾患状態に由来するか、又は対象の体内の疾患関連生物に由来する抗原を含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 1 6】

対象の体内の疾患状態が腫瘍、細菌、ウイルス、マイコプラズマ、真菌、プリオン、自己免疫疾患、又は感染性寄生虫の 1 種以上に起因する請求項 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 7】

抗原が腫瘍抗原、細菌抗原、ウイルス抗原、マイコプラズマ抗原、プリオン抗原、自己免疫疾患関連抗原又は感染性寄生虫抗原を含む請求項 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 8】

抗原が外来抗原を含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 1 9】

外来抗原が対象の体内の疾患状態に由来するか、又は対象の体内の疾患関連生物に由来する抗原と実質的に同一の抗原を含む請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 2 0】

抗原が第 1 の数の分子を含み、抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質が第 2 の数の分子を含む請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 2 1】

第 1 の数の分子と第 2 の数の分子の比が約 1 : 1 であるか、第 1 の数の分子が第 2 の数の分子よりも多いか、第 1 の数の分子が第 2 の数の分子よりも少ないか、又は第 2 の数の分子が第 1 の数の分子により実質的に飽和されている請求項 2 0 に記載の組成物。

【請求項 2 2】

抗原と抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質を選択時間にわたって選択条件下でインキュベートする請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 2 3】

組成物が更に賦形剤又は医薬的に許容可能な賦形剤を含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質を提供する段階と、融合蛋白質を対象に投与する段階を含む免疫組成物の投与方法であって、融合蛋白質が疾患関連抗原に有効なアジュバントを含み、融合蛋白質と抗原が共同して対象に免疫応答を誘発する前記方法。

【請求項 2 5】

免疫組成物の投与が抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質を提供する段階と、疾患関連抗原を提供する段階と、融合蛋白質と抗原を対象に投与する段階を含み、融合蛋白質が抗原の有効なアジュバントを含む請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質がサイトカインドメイン、サイトカイン配列、サイトカインのサブ配列、ケモカインドメイン、ケモカイン配列、ケモカインのサブ配列、又はサイトカインもしくはケモカイン以外のドメインを含む請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 7】

抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質がサイトカイン、ケモカイン、インターロイキン、インターフェロン、C - X - C ケモカイン、C - C ファミリーケモカイン、C ケモカイン、CX3C ケモカイン、スーパー抗原、成長因子、IL - 1、IL - 2、IL - 4、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 10、IL - 12、IL - 13、IL - 17、IL - 18、RANTES、mip1、mip1、GMCSF、GCSF、インターフェロン、インターフェロン、TNF、CSF、mip2、mip2、PF4、血小板塩基性蛋白質、hIP10、LD78、Act - 2、MCAF、1309、TCA3、IP - 10、リンホタクチン、フラクタルカイン、KLH、及びそのフラグメントから構成される

10

20

30

40

50

群から選択される免疫刺激剤ドメインを含む請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 8】

抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質の抗体ドメインが H E R 2 / n e u 抗原に特異的な抗体を含む請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 9】

抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質の抗体ドメインが腫瘍抗原、細菌抗原、ウイルス抗原、マイコプラズマ抗原、真菌抗原、プリオン抗原、自己免疫疾患抗原、又は寄生虫抗原に特異的な抗体を含む請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 0】

抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質の抗体ドメインが腫瘍抗原以外の抗原に特異的な抗体を含む請求項 2 4 に記載の方法。 10

【請求項 3 1】

抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質が抗体フラグメント、F a b ドメイン、F a b ' ドメイン、F (a b ')₂ ドメイン、F (a b)₂ ドメイン及び s c F v ドメインから構成される群から選択されるドメインを含む請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 2】

抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質が I g G、I g A、I g E、I g M、I g D、I g G 1、I g G 2、又は I g G 3 を含む請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 3】

抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質が前記抗原に対して特異性をもつ請求項 2 4 に記載の方法 20

【請求項 3 4】

抗原が腫瘍抗原、細菌抗原、ウイルス抗原、マイコプラズマ抗原、プリオン抗原、自己免疫疾患関連抗原、又は感染性寄生虫抗原を含む請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 5】

抗原が腫瘍抗原以外の抗原を含む請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

抗原が対象に由来するか、対象の体内の疾患状態に由来するか、又は対象の体内の疾患関連生物に由来する抗原を含む請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 7】

対象の体内の疾患状態が腫瘍、細菌、ウイルス、マイコプラズマ、真菌、プリオン、自己免疫疾患、又は感染性寄生虫の 1 種以上に起因する請求項 3 6 に記載の方法。 30

【請求項 3 8】

抗原が外来抗原を含む請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 9】

外来抗原が対象に由来するか、対象の体内の疾患状態に由来するか、又は対象の体内の疾患関連生物に由来する疾患関連抗原と実質的に同一である請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質を対象に投与する前、抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質を対象に投与した後、又は抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質を対象に投与するとほぼ同時に外来抗原を投与する請求項 3 8 に記載の方法。 40

【請求項 4 1】

同時投与前に外来抗原を選択時間にわたって選択条件下で抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質と共にインキュベートする請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

抗原が H E R 2 / n e u 又は腫瘍細胞から脱落した H E R 2 / g M、そのフラグメントを含む請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 4 3】

抗原が第 1 の数の分子を含み、抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質が第 2 の数の分子を含む請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 4 4】

第 1 の数の分子と第 2 の数の分子の比が約 1 : 1 であるか、第 2 の数の分子が第 1 の数の分子により実質的に飽和されているか、第 1 の数の分子が第 2 の数の分子よりも多いか、又は第 2 の数の分子が第 1 の数の分子よりも多い請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質が第 1 の免疫刺激剤ドメインをもつ第 1 の融合蛋白質と少なくとも第 2 の免疫刺激剤ドメインをもつ少なくとも第 2 の抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質を含む請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

第 1 のドメインと少なくとも第 2 のドメインが異なる免疫刺激剤ドメインを含む請求項 4 5 に記載の方法。 10

【請求項 4 7】

第 1 のドメインと少なくとも第 2 のドメインがケモカイン、サイトカイン、又は非サイトカイン / 非ケモカイン免疫刺激分子の 1 種以上を含む請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 8】

第 1 のドメインと少なくとも第 2 のドメインがサイトカイン、ケモカイン、インターロイキン、インターフェロン、C - X - C ケモカイン、C - C ファミリーケモカイン、C ケモカイン、CX3C ケモカイン、スーパー抗原、成長因子、IL - 1、IL - 2、IL - 4、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 10、IL - 12、IL - 13、IL - 17、IL - 18、RANTES、mip1、mip1、GMCSF、GCSF、インターフェロン、インターフェロン、TNF、CSF、mip2、mip2、PF4、血小板塩基性蛋白質、hIP10、LD78、Act - 2、MCAF、1309、TCA3、IP - 10、リンホタクチン、フラクタルカイン、KLH、及びそのフラグメントから構成される群から選択される請求項 4 5 に記載の方法。 20

【請求項 4 9】

第 1 の融合蛋白質が第 1 の抗体特異性をもち、少なくとも第 2 の融合蛋白質が第 2 の抗体特異性をもつ請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 5 0】

第 1 の抗体特異性と少なくとも第 2 の抗体特異性が単一分子に存在する異なる抗原、単一細胞に存在する異なる抗原、単一腫瘍細胞に存在する異なる抗原、単一生物に存在する異なる抗原に対する特異性である請求項 4 9 に記載の方法。 30

【請求項 5 1】

単一生物がウイルス、細菌、真菌、マイコプラズマ、プリオン、又は感染性寄生虫を含む請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

投与が対象に免疫応答を誘発する請求項 2 4 又は 2 5 に記載の方法。

【請求項 5 3】

有効量の抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質を対象に投与する段階を含む対象の疾患状態の予防又は治療処置方法であって、融合蛋白質が対象に由来するか、対象の体内の疾患状態に由来するか、又は対象の体内の疾患関連生物に由来する疾患関連抗原の有効なアジュバントを含み、前記投与が疾患関連抗原に対する免疫応答を対象の体内に誘発する前記方法。 40

【請求項 5 4】

前記方法が有効量の抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質を対象に投与する段階と疾患関連抗原を対象に投与する段階を含み、融合蛋白質が疾患関連抗原の有効なアジュバントを含む請求項 5 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願とのクロスリファレンス)

35 USC § 119 (e) 及び § 120 に従い、本願は米国予備特許出願第 60 / 36 50

6917号(出願日2002年3月21日)と米国特許出願第10/118473号(出願日2002年4月5日)の優先権を主張し、その開示内容全体を全目的で本明細書に組込む。

【0002】

(連邦政府支援研究開発から創出された発明の権利に関する陳述)

本発明は米国国立衛生軍事研究所により交付された助成番号第CA86915及びDAMD17-99-1-9098号として政府助成下に創出された。

【背景技術】

【0003】

種々の腫瘍及び癌の治療はめざましい進歩を遂げているが、残留疾患は依然としてこれらの疾患の臨床管理における大きな問題である。更に、感染性疾患の治療と特に予防は例えばHIV等のウイルス性疾患の伝染や結核、ブドウ球菌感染等の周知疾患の治療耐性変種の出現により相変わらず問題である。

10

【0004】

腫瘍治療の場合、化学療法ストラテジーは重度毒性により必然的に制限され、非増殖性腫瘍細胞に対する効力が制限されている。従って、化学療法以外のアプローチを重視した新規方法が望ましい。例えば、HER2/neuの細胞外ドメインに対するヒト化抗HER2/neuモノクローナル抗体であるトラスツズマブ(従来rhuma b HER2として知られる)を使用してHER2/neuを発現する進行腫瘍(例えば乳癌)をもつ患者を治療すると、HER2/neu癌蛋白質を過剰発現する腫瘍をもつ所定の患者に測定可能な応答を生じることができる。しかし、客観的応答を示すのはトラスツズマブを投与した患者の一部に過ぎず、トラスツズマブを化学療法と併用すればその抗腫瘍活性は増強するが、全患者が陽性応答するわけではない。更に、(例えば特に特定癌の家族歴をもつ個体では)このような腫瘍は有効な治療よりも有効な予防が一層望ましい。

20

【0005】

従来、抗体-(IL-2)融合蛋白質は最良に特性決定され、動物モデルを使用した抗腫瘍実験で最も広く使用され、成功している(例えば非特許文献1参照)。多数の研究が腫瘍細胞の直接ターゲティング剤として抗体と例えばIL-2の種々の組合せを利用している。例えば、B細胞リンパ腫38C13の表面に発現されるIgのイディオタイプ(I_d)に特異的なヒトIgG3とC_H3ドメインの末端に融合したヒトIL-2から構成される腫瘍特異抗体-(IL-2)融合蛋白質が本発明者らにより既に開発されている。非特許文献2。この抗体融合蛋白質IgG3-C_H3-(IL-2)はSp2/0で発現され、適正に会合して分泌された。抗IdIgG3-C_H3-(IL-2)は半減期がマウスで約8時間であり、IL-2(即ち別のドメインに融合していない場合)に報告されている半減期の17倍であり、マウスで抗Id IgG3自体よりも皮下腫瘍の良好な局在を示した。最も重要な点として、抗IdIgG3-C_H3-(IL-2)は抗体とIL-2の併用投与に比較して高い抗腫瘍活性を示した。同じく非特許文献2(Penichetら, 1998), 前出参照。更に、P3X63Ag8.653で発現されたキメラ抗IdIgG1-(IL-2)融合蛋白質(chS5A8-IL-2)は抗Id抗体とIL-2の組合せ又は無関係な特異性をもつ抗体-(IL-2)融合蛋白質よりも38C13腫瘍の*in vivo*根絶に高い効力を示した。非特許文献3参照。

30

40

【0006】

癌治療における従来の抗体融合蛋白質の別の例としてはSp2/0細胞で産生されたキメラ抗GD₂ IgG1-(IL-2)融合蛋白質(ch14.18-IL-2)が挙げられる。非特許文献4; 非特許文献5; 及び非特許文献6参照。肺及び肝転移をと皮下GD₂を発現するB16メラノーマをもつマウスにch14.18-IL-2を投与した結果、特異的な強い抗腫瘍活性が生じた。この抗腫瘍活性は抗体(ch14.18)とIL-2又は無関係な抗体-(IL-2)融合蛋白質に比較して有意であり、多数の動物で腫瘍の完全な根絶を生じた。Becker前出文献参照。CT26-KSA肝及び肺転移をもつマウスにNS0で産生されたヒト化抗KSA抗体-IL-2融合蛋白質(huKS1/

50

4 - I L - 2) を投与した場合にも同様の結果が得られた。非特許文献 7 及び非特許文献 8 参照。

【 0 0 0 7 】

抗体融合分子の他の例としては N S 0 で発現されたキメラ抗ヒト M H C クラス I I I g G 1 - G M C S F 融合体 (c h C L L - 1 / G M C S F) (非特許文献 9 参照) や、 P 3 X 6 3 A g 8 . 6 5 3 で発現されたヒト化抗 H E R 2 / n e u I g G 3 と I L - 1 2 (非特許文献 1 0 参照)、 I L - 2 (非特許文献 1 1) 及び G M C S F (非特許文献 1 2 参照) の融合体が挙げられる。

【 0 0 0 8 】

上記全報告では、 I L - 2、 I L - 1 2、又は G M C S F 等を含む抗体 - サイトカイン融合蛋白質は動物モデルで腫瘍を直接標的とする直接抗腫瘍剤として使用されていることに留意することが重要である。抗体融合蛋白質は腫瘍表面上の抗原と結合し、腫瘍周囲の例えば I 1 - 2 等の局所濃度を増加する。例えば I L - 2 が増加すると、場合により抗腫瘍活性が生じる。例えば非特許文献 1 1 (P e n i c h e t ら、 2 0 0 1)、前出参照。

10

【 0 0 0 9 】

更に、本発明者らによる従来報告には簡便なハプテン抗原であるダンシル (D N S) に対して親和性をもつ I g G 3 - (I L - 2) 融合蛋白質により抗原を I L - 2 と結合することが記載されている。非特許文献 1 3 参照。この報告で使用された抗原は疾患関連抗原よりも著しく人工的 (ウシ血清アルブミン) であった。ハプテンと結合したウシ血清アルブミン (D N S - B S A) をモデル抗原として使用して本発明者らは抗 D N S - I g G 3 - (I L - 2) に結合した D N S - B S A をマウスに注射すると、 D N S - B S A - セファロース、抗 D N S - I g G 3 と結合した D N S - B S A、又は非特異的 I g G 3 - (I L - 2) と結合した D N S - B S A よりも高い抗体応答が誘発されることを示した。抗体 - (I L - 2) 融合蛋白質を抗原と結合 (非共有物理的結合) すると免疫応答が増強することが判明した (非特許文献 1 3 (H a r v i l l ら、 1 9 9 6)、前出参照) が、1 種の抗体融合蛋白質 (抗体 - (I L - 2) 融合蛋白質) しか使用されず、試験は体液性 (抗体) 免疫応答の特性決定に限定されていた。また、残念ながら、ダンシル基を使用すると抗原と抗体の間に低レベルの安定性しか得られないと思われる。このような不安定は適正な i n v i v o 免疫刺激処置に問題となり得る。更に、ダンシル基を使用すると、ダンシル基がこれと結合する抗原上の特定エピトープをマスク又は変異させ、対象の適正な免疫応答刺激を妨げる恐れがある。

20

30

【 0 0 1 0 】

感染性疾患の場合には、多数の細菌 (例えば黄色ブドウ球菌 S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s)、ウイルス、マイコプラズマ、真菌、寄生虫等が深刻な問題となる。例えば、細菌である黄色ブドウ球菌は高致死率をもたらす院内感染の一般原因である。黄色ブドウ球菌は例えば肺炎、心内膜炎、骨髄炎、敗血性関節炎、術後創傷感染、敗血症、毒素性ショック等の原因となり得る。残念ながら、多数の黄色ブドウ球菌株を含む多くの細菌は合成ペニシリン (例えばメチシリン) 等の第一選択薬に耐性である。一部の黄色ブドウ球菌株を含む他の細菌は所謂最後の手段の抗生物質であるバンコマイシンを含む複数の薬剤に耐性である。他の感染因子 (例えばウイルス、真菌等) の場合には、有効な薬剤治療は存在しないと思われる。例えば非特許文献 1 4 ; 非特許文献 1 5 ; 非特許文献 1 6 ; 及び非特許文献 1 7 参照。細菌 (及び、実際に真菌、マイコプラズマ等の他の感染因子) の多剤耐性株の存在は治療不能な感染の恐怖を生じており、医療及び公衆衛生の目下の課題である。多数の感染性生物 (特にウイルス) に対するワクチン (例えば D N A 及び蛋白質ワクチンの両者) の作製について従来多くの研究が行われており、このような研究は当業者に周知である。

40

【 0 0 1 1 】

腫瘍及び感染性疾患の抗原に対する有効な免疫応答 (体液性及び / 又は細胞性) を増強するための簡便な治療及び / 又は予防処置法が当分野で望まれている。本発明はこれらの方法や他の処置アプローチ及び方法を提供する。

50

- 【非特許文献1】Penichet and Morrison, 2001, "Antibody-cytokine fusion protein for the therapy of cancer" *J Immunol Met* 248:91-101
- 【非特許文献2】Penichet $\bar{\Delta}$, 1998 "An IgG3-IL-2 fusion protein recognizing a murine B cell lymphoma exhibits effective tumor imaging and antitumor activity" *J Interferon Cytokine Res* 18:597-607
- 【非特許文献3】Liu $\bar{\Delta}$, 1998 "Treatment of B-cell lymphoma with chimeric IgG and single-chain Fv antibody-interleukin-2 fusion protein" *Blood* 92:21030-12 10
- 【非特許文献4】Becker $\bar{\Delta}$, 1996 "T cell-mediated eradication of murine metastatic melanoma induced by targeted interleukin 2 therapy" *J Exp Med* 183:2361-6
- 【非特許文献5】Becker $\bar{\Delta}$, 1996 "An antibody-interleukin 2 fusion protein overcomes tumor heterogeneity by induction of a cellular immune response" *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7826-31 20
- 【非特許文献6】Becker $\bar{\Delta}$, 1996 "Long-lived and transferable tumor immunity in mice after targeted interleukin-2 therapy" *J Clin Invest* 98:2801-4
- 【非特許文献7】Xiang $\bar{\Delta}$, 1997 "Elimination of established murine colon carcinoma metastases by antibody-interleukin 2 fusion protein therapy" *Cancer Res* 57:4948-55
- 【非特許文献8】Xiang $\bar{\Delta}$, 1999 "T cell memory against colon carcinoma is long-lived in the absence of antigen" *J Immunol* 163:3676-83 30
- 【非特許文献9】Hornick $\bar{\Delta}$, 1997 "Chimeric CLL-1 antibody fusion protein containing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interleukin-2 with specificity for B-cell malignancies exhibit enhanced effector functions while retaining tumor targeting properties" *Blood* 89:4437-47
- 【非特許文献10】Peng $\bar{\Delta}$, 1999, "A single-chain IL-12 IgG3 antibody fusion protein retains antibody specificity and IL-12 bioactivity and demonstrates antitumor activity" *J Immunol* 163:250-8 40
- 【非特許文献11】Penichet $\bar{\Delta}$, 2001, "A recombinant IgG3-(IL-2) fusion protein for the treatment of human HER2/neu expressing tumors" *Human Antibodies* 10:43-49
- 【非特許文献12】Dela Cruz $\bar{\Delta}$, 2000, "Recombinant anti-human HER2/neu IgG3-(GM-CSF) fusion pr 50

rotein retains antigen specificity, cytokine function and demonstrates anti-tumor activity" J Immunol 165:5112-21

【非特許文献13】Harvill \bar{a} , 1996 "In vivo properties of an IgG3-IL-2 fusion protein. A general strategy for immune potentiation" J Immunol 147:3165-70

【非特許文献14】Nickerson \bar{a} , 1995 "Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control" J Dairy Sci 78:1607-18

【非特許文献15】Lowy, 1998 "Staphylococcus aureus infections" N Engl J Med 339:520-32

【非特許文献16】McKenney \bar{a} , 1999 "Broadly protective vaccine for Staphylococcus aureus based on an in vivo-expressed antigen" Science 284:1523-7

【非特許文献17】Lorenz \bar{a} , 2000 "Human antibody response during sepsis against targets expressed by methicillin resistant Staphylococcus aureus" FEMS Immunol Med Microbiol 29:145-53

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明は抗原蛋白質ワクチン接種用アジュバントとしての種々の抗体-免疫刺激剤蛋白質融合体の使用方法と、対象の疾患状態の予防及び/又は治療処置方法を提供する。本発明の融合蛋白質と抗原を含む組成物も提供する。

【課題を解決するための手段】

【0013】

1側面において、本発明は抗体-免疫刺激剤融合蛋白質の組成物に関し、融合蛋白質は疾患関連抗原の有効なアジュバントを含む。この側面の所定態様において、組成物は更に疾患関連抗原を含む。付加態様によると、抗体-免疫刺激剤融合蛋白質は疾患関連抗原に対して抗体特異性をもつ。これらの組成物における融合蛋白質の免疫刺激剤ドメインは場合によりサイトカイン(又はその配列もしくはサブ配列)、ケモカイン(又はその配列もしくはサブ配列)、又はケモカインもしくはサイトカイン以外の免疫刺激剤を含む。(例えば本発明の組成物の選択的態様に含まれるような)このような免疫刺激剤ドメインの例としては限定されないが、例えばサイトカイン、ケモカイン、インターロイキン、インターフェロン、C-X-Cケモカイン、C-Cファミリーケモカイン、Cケモカイン、CX3Cケモカイン、スーパー抗原、成長因子、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18、RANTES、mip1、mip1、GMCSF、GCSF、インターフェロン、インターフェロン、TNF、CSF、mip2、mip2、PF4、血小板塩基性蛋白質、hIP10、LD78、Act-2、MCAF、1309、TCA3、IP-10、リンホタクチン、フラクタルカイン、KLH、及び上記の任意のもののフラグメントが挙げられる。更に、上記態様の任意のものは場合により更にリンカーをもつ。

【0014】

本発明の組成物における融合蛋白質の抗体ドメインは限定されないが、例えばHER2/neu抗原、腫瘍抗原、細菌抗原、ウイルス抗原、マイコプラズマ抗原、真菌抗原、プリオン抗原、自己免疫疾患抗原、又は寄生虫(例えば感染性哺乳動物寄生虫)に由来する抗原に特異的な抗体を場合により含む。他の態様では、このような融合蛋白質は腫瘍抗原

10

20

30

40

50

以外の抗原に特異的な抗体ドメインを含む。更に、他の態様では、本発明の組成物における抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質は抗体フラグメント、F a b ドメイン、F a b ' ドメイン、F (a b ')₂ ドメイン、F (a b)₂ ドメイン、s c F v ドメイン、I g G、I g A、I g E、I g M、I g D、I g G 1、I g G 2、又は I g G 3 を含む。

【 0 0 1 5 】

更に本発明の組成物の所定態様では、抗原は例えば可溶性抗原、マトリックスに結合した可溶性抗原、マトリックスに結合した不溶性抗原、抗原の不溶性凝集物、生存不能細胞関連抗原、もしくは生存不能生物関連抗原、又はリポソームに封入した抗原を含む。更に、このような抗原は例えば H E R 2 / n e u (又は腫瘍細胞から脱落した H E R 2 / n e u) 又はそのフラグメントを含むことができる。更に、このような組成物における抗原は 10
場合により腫瘍抗原以外の抗原、対象に由来する抗原、対象の体内の疾患状態に由来する抗原、対象の体内の疾患関連生物に由来する抗原 (例えば腫瘍、細菌、ウイルス、マイコプラズマ、真菌、プリオン、自己免疫疾患、又は哺乳動物の感染性寄生虫等の感染性寄生虫の 1 種以上に起因する疾患状態) を含む。抗原は更に腫瘍抗原、細菌抗原、ウイルス抗原、マイコプラズマ抗原、プリオン抗原、自己免疫疾患関連抗原、又は感染性寄生虫抗原を含むこともできる。本発明の所定態様では、抗原は (場合により対象に由来するか、対象の体内の疾患状態に由来するか、又は対象の体内の疾患関連生物に由来する抗原と実質的に同一の) 外来抗原である。

【 0 0 1 6 】

本発明の組成物の他の態様では、抗原分子数と融合蛋白質分子数が場合により約 1 : 1 20
である。他の態様では、これらの分子数は場合により抗原分子数が融合蛋白質分子数よりも多いか又は少ないか、又は融合蛋白質分子数が抗原分子数により実質的に飽和されるか、又は抗原分子数が融合蛋白質分子数により実質的に飽和されるような比である。

【 0 0 1 7 】

本発明の組成物は場合により選択時間にわたって選択条件下で (例えば 4 等で一晚又は 1 秒以下等の短時間) インキュベートする。本発明の組成物は更に場合により賦形剤 (例えば医薬的に許容可能な賦形剤) を含む。

【 0 0 1 8 】

別の側面では、本発明は抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質を提供し、融合蛋白質を対象に投与することによる免疫組成物の投与方法に関し、融合蛋白質は疾患関連抗原に有効なアジュバントを含み、融合蛋白質と抗原が共同して対象に免疫応答を誘発する。更に、この側面の所定態様では疾患関連抗原を提供すると共に前記融合蛋白質を投与する (例えば融合蛋白質と抗原を対象に投与し、融合蛋白質は抗原の有効なアジュバントである) 。所定態様では、融合蛋白質はサイトカイン (又はその配列もしくはサブ配列) 、ケモカイン (又はその配列もしくはサブ配列) 、又はケモカインもしくはサイトカイン以外の免疫刺激剤を含む。この側面の他の態様では、方法は (限定されないが) 例えばサイトカイン、ケモカイン、インターロイキン、インターフェロン、C - X - C ケモカイン、C - C ファミリーケモカイン、C ケモカイン、C X 3 C ケモカイン、スーパー抗原、成長因子、I L - 1、I L - 2、I L - 4、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 10、I L - 12、I L - 13、I L - 17、I L - 18、R A N T E S、m i p 1、m i p 1、G M C S F 40
、G C S F、インターフェロン、インターフェロン、T N F、C S F、m i p 2、m i p 2、P F 4、血小板塩基性蛋白質、h I P 10、L D 7 8、A c t - 2、M C A F、1 3 0 9、T C A 3、I P - 10、リンホタクチン、フラクタルカイン、K L H、及び上記の任意のもののフラグメント等の免疫刺激剤ドメインを含む融合蛋白質を使用する。

【 0 0 1 9 】

本発明のこの側面の方法で使用される融合蛋白質の抗体ドメインは場合により例えば H E R 2 / n e u 抗原、腫瘍抗原、細菌抗原、ウイルス抗原、マイコプラズマ抗原、真菌抗原、プリオン抗原、自己免疫疾患抗原又は感染性寄生虫抗原 (例えば哺乳動物の寄生虫) に特異的である。他の態様では、抗体ドメインは腫瘍抗原以外の抗原を含む抗原に特異的 50

である。本発明のこの方法の側面における融合蛋白質の抗体ドメインは場合により（限定されないが）例えば抗体フラグメント、F a b ドメイン、F a b ' ドメイン、F (a b ')₂ ドメイン、F (a b)₂ ドメイン、s c F v ドメイン、I g G、I g A、I g E、I g M、I g D、I g G 1、I g G 2、又はI g G 3である。これらの方法の所定態様では、融合蛋白質は抗原に対して抗体特異性をもつ。

【0020】

本発明のこれらの方法は抗原が例えば腫瘍抗原、細菌抗原、ウイルス抗原、マイコプラズマ抗原、プリオン抗原、自己免疫疾患抗原、寄生虫抗原（例えば哺乳動物に感染するもの）、腫瘍抗原以外の抗原、対象に由来する抗原、対象の体内の疾患状態に由来する抗原、又は対象の体内の疾患関連生物に由来する抗原を含む態様を包含する。場合によりこの
10
ような抗原をもたらす対象の体内の疾患状態は場合により例えば腫瘍、細菌、ウイルス、マイコプラズマ、真菌、プリオン、自己免疫疾患、又は寄生虫（例えば哺乳動物に感染するもの）に起因する。本発明のこの側面における抗原は更に場合により外来抗原であり、場合により、対象に由来するか、対象の体内の疾患状態に由来するか、又は対象の体内の疾患関連生物に由来する疾患関連抗原と実質的に同一でもよい。このような外来抗原は場合により抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質を投与する前、又は場合により融合蛋白質を対象に投与した後、又は融合蛋白質を対象に投与するとほぼ同時に投与する。選択的同時投与前に抗原と融合蛋白質を特定時間にわたって特定条件下で（例えば4 等で1秒又は殆ど瞬時のインキュベーションから一晚以上まで）インキュベートすることができる。本発明のこの側面における方法で使用される抗原は更に場合により例えば例えばH E R 2 / n e u
20
、腫瘍細胞から脱落したH E R 2 / n e u、又はこのようなH E R 2 / n e uのフラグメントを含む。方法の所定態様では、抗原分子数と融合蛋白質分子数は場合により約1 : 1である。他の態様では、抗原分子数と融合蛋白質分子数は場合により抗原分子数が融合蛋白質分子数よりも多いか又は少ないか、又は融合蛋白質分子数が抗原分子数により実質的に飽和されるか、又は抗原分子数が融合蛋白質分子数により実質的に飽和されるような比である。これらの方法の他の態様では2個以上の融合蛋白質を場合により使用する。このような多重融合蛋白質は各種免疫刺激剤ドメイン（例えば（限定されないが）非サイトカイン / 非ケモカイン分子、サイトカイン、ケモカイン、インターロイキン、インターフェロン、C - X - Cケモカイン、C - Cファミリーケモカイン、Cケモカイン、C X 3 Cケモカイン、スーパー抗原、成長因子、I L - 1、I L - 2、I L - 4、I L - 6、I L -
30
7、I L - 8、I L - 10、I L - 12、I L - 13、I L - 17、I L - 18、R A N T E S、m i p 1、m i p 1、G M C S F、G C S F、インターフェロン、インターフェロン、T N F、C S F、m i p 2、m i p 2、P F 4、血小板塩基性蛋白質、h I P 10、L D 7 8、A c t - 2、M C A F、1 3 0 9、T C A 3、I P - 10、リンホタクチン、フラクタルカイン、K L H、及び上記の任意のもののフラグメントから選択されるような免疫刺激剤ドメイン）を含むことができる。更に、この側面の方法における多重融合蛋白質は場合により異なる特異性をもつ。選択的多重融合蛋白質は例えば単一分子上の異なる抗原、単一細胞上の異なる抗原、単一腫瘍上の異なる抗原、又は単一生物（例えばウイルス、細菌、真菌、マイコプラズマ、プリオン、寄生虫）上の異なる抗原等に特異的であってもよい。免疫組成物の投与方法は更にこのような投与が対象に免疫応答
40
を誘発する態様を含む。

【0021】

更に別の側面では、本発明は対象の疾患状態の予防及び / 又は治療処置方法に関する。このような方法は有効量の抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質を対象に投与する段階を含み、融合蛋白質は疾患関連抗原（例えば対象に由来するか、対象の体内の疾患状態に由来するか、又は対象の体内の疾患関連生物に由来する疾患関連抗原）の有効なアジュバントを含み、前記投与が疾患関連抗原（又は近縁抗原）に対する免疫応答を対象の体内に誘発する。このような疾患状態の予防及び / 又は治療処置方法は更に場合により有効量の抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質を対象に投与する段階と疾患関連抗原を対象に投与する段階を含み、融合蛋白質が疾患関連抗原の有効なアジュバントを含む。

【 0 0 2 2 】

本発明の上記及び他の目的及び特徴は添付図面を参照して以下の詳細な説明から更に明瞭に理解されよう。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 2 3 】

定義

本欄又は明細書の他の箇所で特に定義しない限り、本明細書で使用する全科学技術用語は本発明が属する分野の当業者に通常理解されている通りの意味をもつ。

【 0 0 2 4 】

本明細書で使用する「対象」なる用語は限定されないが、哺乳類（例えばヒト、非ヒト霊長類（例えばサル）、マウス、ブタ、ウシ、ヤギ、ウサギ、ラット、モルモット、ハムスター、ウマ、サル、ヒツジ、又は他の非ヒト哺乳動物）と非哺乳類（例えば鳥類（例えばニワトリ又はアヒル）や魚類等の非哺乳類脊椎動物と非哺乳類無脊椎動物）を意味する。所定態様では、本発明の方法及び組成物は非ヒト動物を（予防及び／又は治療の両者で）処置するために使用される。多くの商業的に重要な動物は種々の癌や、特に問題となる種々のウイルス／細菌等の感染にかかり易く、本発明では場合によりこれらを処置する。

【 0 0 2 5 】

本明細書において「医薬組成物」なる用語は動物又はヒトを含む対象で医薬として使用するのに適した組成物を意味する。医薬組成物は一般に有効量の活性剤（例えば本発明の抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質及び抗原蛋白質ワクチン）と医薬的に許容可能なキャリアー（例えば緩衝液、アジュバント等）を含む。

【 0 0 2 6 】

「有効量」なる用語は所望結果を生じるために十分な用量又は量を意味する。所望結果は前記用量又は量のレシピエントにおける客観的又は主観的改善（例えば長期生存、腫瘍数及び／又はサイズの減少、疾患状態の有効な予防等）を含むことができる。

【 0 0 2 7 】

「予防処置」とは疾患、疾病ないし病態の徴候もしくは症状を示さないか、又は疾患、疾病ないし病態の初期徴候もしくは症状しか示さない対象に投与する処置であり、疾患、疾病ないし病態を発症する危険を軽減、防止又は低下させる目的で投与する。予防処置は疾患ないし病態に対する予防的処置として機能する。「予防活性」とは疾患、疾病ないし病態の徴候又は症状を示さない（か又は疾患、疾病ないし病態の初期徴候又は症状しか示さない）対象に投与した場合に対象が疾患、疾病ないし病態を発症する危険を軽減、防止又は低下させる蛋白質ワクチン接種とその抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質アジュバント、又はその組成物等の物質の活性である。「予防的に有用な」物質又は化合物（例えば蛋白質ワクチン接種とその抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質アジュバント）とは疾患、疾病ないし病態の発現を軽減、防止、処置又は低下させるのに有用な物質又は化合物を意味する。

【 0 0 2 8 】

「治療処置」とは疾患、疾病ないし病態の徴候又は症状を示す対象に投与する処置であり、疾患、疾病ないし病態の徴候又は症状を軽減又は除去する目的で投与する。「治療活性」とは疾患、疾病ないし病態の徴候又は症状を示す対象に投与した場合にこのような徴候又は症状を除去又は軽減する蛋白質ワクチン接種とその抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質アジュバント、又はその組成物等の物質の活性である。「治療的に有用な」物質又は化合物（例えば蛋白質ワクチン接種とその抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質アジュバント）とは疾患、疾病ないし病態の徴候又は症状を軽減、処置又は除去するのに有用な物質又は化合物を意味する。

【 0 0 2 9 】

本明細書で使用する「抗体」とは免疫グロブリン遺伝子又は免疫グロブリン遺伝子のフラグメントにより実質的又は部分的にコードされる 1 種以上のポリペプチドを含む蛋白質を意味する。認識される免疫グロブリン遺伝子としては、 κ 、 λ 、 μ 、 δ 、 ϵ 、及び μ 定常領域遺伝子と、無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。軽鎖は κ 又は λ と

して分類される。重鎖は μ 、 γ 、 α 、 δ 、 ϵ 、 κ 、 λ 、又は μ 、 γ 、 α 、 δ 、 ϵ 、 κ 、 λ として分類され、夫々免疫グロブリンクラス I g G、I g M、I g A、I g D 及び I g E に相当する。典型的な免疫グロブリン（例えば抗体）構造単位はテトラマーを含む。各テトラマーはポリペプチド鎖の同一対 2 個から構成され、各対は 1 個の「軽」鎖（約 25 kD）と 1 個の「重」鎖（約 50 ~ 70 kD）をもつ。各鎖の N 末端は抗原認識に主に関与する約 100 ~ 110 又はそれ以上のアミノ酸の可変領域を規定する。可変軽鎖（ V_L ）及び可変重鎖（ V_H ）なる用語は夫々これらの軽鎖と重鎖を意味する。

【0030】

抗体は無傷免疫グロブリンとして又は各種ペプチダーゼによる消化により生成された多数の明確なフラグメントとして存在する。即ち、例えばペプシンはヒンジ領域のジスルフィド結合下の抗体を消化し、ジスルフィド結合により $V_H - C_H 1$ と結合した軽鎖である Fab のダイマー $F(ab')_2$ を生じる。 $F(ab')_2$ を温和な条件下で還元してヒンジ領域のジスルフィド結合を破壊すると、 $F(ab')_2$ ダイマーを Fab' モノマーに変換することができる。 Fab' モノマーは主にヒンジ領域の部分をもつ Fab' である（他の抗体フラグメントのより詳細な記載については *Fundamental Immunology*, W. E. Paul, ed., Raven Press, N. Y. (1999) 参照）。種々の抗体フラグメントが無傷の抗体の消化により定義されているが、当業者に自明の通り、前記 Fab' フラグメント等は化学的又は組換え DNA 技術により *de novo* 合成することもできる。従って、本明細書で使用する抗体なる用語は完全抗体の修飾により生産されるか又は組換え DNA 技術により *de novo* 合成された抗体フラグメントも意味する。抗体としては可変重鎖と可変軽鎖を（直接又はペプチドリンカーを介して）相互に結合して連続ポリペプチドを形成した 1 本鎖 Fv (sFv ないし $scFv$) 抗体等の 1 本鎖抗体が挙げられる。

【0031】

本明細書において「免疫刺激剤」又は「免疫刺激」分子又はドメイン等とは対象で（細胞性又は体液性又は両者の）免疫応答又は免疫作用を刺激又は誘発するように作用する（又は作用するのを補助する）分子又はドメイン等を意味する。このような分子の典型例としては限定されないが、例えばサイトカインとケモカインが挙げられる。サイトカインは例えば体液性及び/又は細胞性免疫応答を刺激するように作用する。サイトカインの典型例としては、例えば IL-2、IL-12 等のインターロイキンが挙げられる。ケモカインは例えば種々の白血球を対象の体内の特定位置に選択的に吸引するように作用する。ケモカインは細胞移動と細胞活性化の両者を誘導することができる。ケモカインの一般例としては例えば RANTES、C-X-C ファミリー分子、IL-8、mip1、mip1 等が挙げられる。その他の情報については例えば Arai, K. B., 1990, "Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses" *Annu Rev Biochem* 59: 783+; Taub, 1996 "Chemokine - Leukocyte Interactions. The Voodoo That They Do So Well" *Cytokine Growth Factor Rev* 7: 355 - 76 参照。

【0032】

「疾患関連抗原」とは疾患状態（例えば癌又は自己免疫疾患）又は感染性生物（例えば細菌、ウイルス、プリオン、マイコプラズマ、真菌、寄生虫等の生物ないし感染因子による対象の感染）により対象に発生又は存在する抗原蛋白質、ペプチド、炭水化物、脂質、核酸、又はこれらの任意のものの組合せを意味する。疾患関連抗原は場合により蛋白質ワクチン接種として使用した場合に完全又は部分的に可溶性であり、あるいは前記抗原はマトリックス（例えばラテックスビーズ又は他のビーズ等）に結合した可溶性抗原、マトリックス（例えばラテックスビーズ又は他のビーズ等）に結合した不溶性抗原、抗原の不溶性凝集物、生存不能細胞関連抗原、生存不能生物関連抗原、又はリポソームに封入した抗原等である。所定態様では、融合蛋白質は場合により死滅しているか又は死につつあり（例えばアポトーシス）、1 種以上の疾患関連抗原を含む疾患関連細胞/生物を標的とする

。本発明の所定態様では、疾患関連抗原は外来抗原である。換言するならば、前記抗原は対象の外部に由来する。外来疾患関連抗原は場合により内在ないし非外来疾患関連抗原（例えば対象に由来するか、対象の体内の疾患状態及び／又は感染性生物に由来する抗原等）と同一であるか又は実質的に同一である。

【0033】

蛋白質ワクチン接種のアジュバントとしての抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質

本発明は特定細胞（例えば腫瘍細胞、又は感染性細菌等）を直接標的として破壊するためなどに抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質を使用するのではなく、抗原の可溶性形態（又は別の状態、下記参照）を標的とするものである。抗原はそのアジュバント（例えば免疫応答を増加するように作用又は補助する物質又は分子）として作用する抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質と共同して抗原（例えば腫瘍細胞、感染性生物等に存在するもの等の疾患関連抗原）に対する免疫応答（体液性及び／又は細胞性）を対象の体内に誘発する。従って、「疾患関連抗原の有効なアジュバント」（即ち本発明の抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質）とは、（例えば本明細書に記載するような）前記抗原に対する免疫応答を対象の体内に誘発するという所望効果を生じるアジュバントである。抗体免疫刺激剤融合蛋白質がアジュバントとして作用する抗原は多くの態様では可溶性抗原であることが多いが、必ずしもその必要はない。他の態様では、抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質がアジュバントとして作用する抗原としては限定されないが、ビーズ等のマトリックスに結合した（可溶性又は不溶性）抗原、（いずれも例えば凝集し易くするなどのために他の材料を含んでもよい）抗原の不溶性凝集物もしくは可溶性抗原の凝集物、生存不能細胞関連抗原（例えば細菌、ウイルス等に由来する生存不能生物関連抗原も含む）、リポソームに封入した抗原等が挙げられる。更に、別の態様では、抗原に対してアジュバントとして作用する抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質自体を例えばリポソーム等に封入してもよく、抗原はリポソームに封入してもしなくてもよい。

10

20

【0034】

本発明は抗原蛋白質ワクチン接種のアジュバントとしての種々の抗体 - 免疫刺激剤蛋白質融合体の使用方法と、対象の疾患状態の予防及び／又は治療処置方法を提供する。本発明の融合蛋白質と抗原を含む組成物も提供する。

【0035】

更に、本発明の方法及び組成物により誘発される免疫応答は以下に詳述するように、対象の体内に存在する（か又は予防処置に使用する場合には対象の体内に存在すると予想もしくは不確定に予想される）疾患関連抗原又は近縁抗原分子に対して特異的である。従って、例えば本発明の1態様は場合により抗腫瘍関連（TAA）抗原抗体 - 免疫刺激剤と治療処置として使用される可溶性疾患関連抗原（例えば、この場合にはTAA）を含む。このような処置により誘発される免疫応答は場合により例えば対象の体内に存在する腫瘍の細胞表面に存在する前記抗原（又は近縁抗原）に対して誘発される。

30

【0036】

当然のことながら、上記及び本明細書の他の項では例えば抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質と共に対象に投与する抗原として「抗原」を記載する。この使用は特に指定しない限り、例えば従来記載されているような疾患関連抗原を意味すると理解すべきである。

40

【0037】

本発明の抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質は疾患関連抗原（例えば腫瘍細胞によりもしくは腫瘍細胞上に提示されるか又は腫瘍細胞から脱落した腫瘍抗原（例えばHER2/neu）、あるいはウイルス、細菌（例えば黄色ブドウ球菌由来プロテインA抗原）、真菌、プリオン、寄生虫、自己免疫疾患等の感染性生物により又はこれらの生物上に提示される抗原）のアジュバントとして作用する。本発明は対象における疾患関連抗原の存在を惹起又は誘導した生物又は疾患に対する対象の治療及び／又は予防処置手段として、疾患関連抗原（とその抗体 - 免疫刺激剤アジュバント）により発生した体液性及び／又は細胞性免疫応答を利用する。

【0038】

50

対象の免疫応答は場合により夫々の抗原（即ち夫々の疾患関連抗原）と結合して抗体 - 抗原免疫複合体を形成する抗体融合蛋白質により誘発される。図2参照。当然のことながら、このような選択的作用メカニズムは限定的であるとみなすべきではない。他の可能及び/又は付加的な作用メカニズムも場合により本発明の有効な方法及び組成物により使用される。場合により、この免疫複合体は抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質とDC又はAPC上の表面受容体（例えばGMCSF、IL-2、IL-12受容体等）の相互作用により樹状細胞（DC）又は別の適当な抗原提示細胞（APC）に疾患関連抗原を送達する。図2参照。例えば融合蛋白質で使用される特定免疫刺激分子（例えば特定サイトカイン、ケモカイン等）に応じて抗原のDC又はAPC提示は場合により一方又は両方即ち細胞性（ $T_H 1$ ）と体液性（ $T_H 2$ ）の免疫応答の活性化（例えば強力な活性化）をもたらす。この
10
ような活性化は場合により（例えばワクチン接種した対象を同一抗原又は所定態様では近縁疾患関連抗原で攻撃した場合に）特定疾患関連抗原に対して有意免疫防御活性を生じる。更に他の態様では、本発明により発生される免疫応答は（例えばワクチン接種した対象を再攻撃した場合に）疾患関連抗原に対して免疫防御性の応答を含む。更に他の態様では、本発明は免疫状態に検出可能な変化（例えば疾患関連抗原に対する細胞性及び/又は体液性免疫レベル又は応答の変化）を生じる。更に、場合により所定態様では、本発明の融合蛋白質は死滅しているか又は死につつつある細胞（例えばアポトーシス細胞）又は細胞フラグメントを標的とする（細胞/細胞フラグメントは癌細胞等の疾患関連状態に由来するか又は1種以上の疾患関連抗原を含む）。従って、細胞/細胞フラグメントをコートする
20
融合蛋白質は場合により細胞/細胞フラグメントが他の細胞（例えばAPC）により食菌し易くし、場合によりAPCへのトラフィッキングと提示を改善する。

【0039】

この場合も、本発明は無数の融合体と無数の疾患/病態に対するその使用も包含することにも留意すべきである。本発明の多くの実施例では、抗HER2/neu抗体融合体等を1例として使用しているが、これは限定的であるとみなすべきでない。HER2/neu防御等に関する記載は本発明の方法及び組成物の一般概念を例証するためのものであり、即ち抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質を抗原ワクチン接種のアジュバントとして使用すると、体液性及び/又は細胞性免疫応答を対象に誘発するので、このような抗原を示す疾患又は感染に対する対象の治療及び/又は予防処置として使用できることを例証するためのものである。
30

【0040】

抗体 - 免疫刺激剤融合体及び疾患関連抗原とAPC又はDCの選択的相互作用は図2に示すように（例えば処置に使用される疾患関連抗原のみで生じるものから）抗原提示量及び/又は品質を変化させ、その結果、（同様に例えば抗体と融合した特定免疫刺激剤に応じて）疾患関連抗原に対して強力なT及び/又はB細胞免疫応答を生じることができる。更に、本発明の抗体融合蛋白質と融合する多くの免疫刺激剤（例えばサイトカイン）の一般免疫刺激活性は場合により標的抗原に対する免疫応答の増強（例えばIL-2更に増殖シグナル、GMCSF-APC活性化及びIL-12による $T_H 1$ 側への移行等）をそれ自体助長（又は場合によりこれを増強）することもできる。この場合も、このような選択的作用メカニズムは限定的であるとみなすべきではなく、本発明の方法及び組成物の効果
40
はこれらの作用メカニズムのみに限定されない。

【0041】

誘発される（即ち本発明の方法等を使用することにより発生される）免疫応答は例えば癌細胞又は感染因子の表面に発現される疾患関連抗原（体液性免疫応答）だけでなく腫瘍細胞又は感染因子細胞等の表面のMHCクラスIに関連する疾患関連抗原ペプチド（細胞性免疫応答）に対しても誘発される。所定態様では、本発明は更に他の近縁抗原（例えば蛋白質ワクチン接種として使用される抗原に構造的又は立体構造的に近縁の抗原）に対する体液性及び/又は細胞性免疫応答も誘発する。例えば、HER2/neuは上皮成長因子受容体1、2、及び3（EGF1、EGF2、EGF3）等の他の成長因子受容体と高い相同性をもつので、本発明からHER2/neuに対して誘発される（体液性及び/又
50

は細胞性)免疫応答は場合により標的疾患関連抗原(H E R 2 / n e u)だけでなく、癌細胞上に発現される他の相同受容体に対しても誘発される。

【0042】

所定態様では、本発明の方法等(及び本発明の毒物試験、使用試験等)は動物モデル(例えば下記実施例I及びII参照)で実施されるが、本発明はヒト対象を使用する態様(臨床試験等を含む)も含む。ヒトでは、他の動物対象と同様に、抗体-免疫刺激剤融合蛋白質を予防又は治療両者のワクチン接種における例えば可溶性抗原のアジュバントとして利用する。従って、本発明は特定抗原を発現する腫瘍(例えばH E R 2 / n e u乳癌等)と、感染性生物(ウイルス、細菌等)により提示される疾患関連抗原をもつ患者を標的とし、腫瘍/感染性生物等が対象の体内に存在するとき(治療)又はこのような疾患/感染が対象に発生する前(予防)に処置することができる。従って、本発明の方法及び組成物により可能な用途は癌及び微生物感染を含む多数の疾患状態に対する防御におけるヒト及び他の動物の広範な処置を含む。

10

【0043】

例えば、予防ワクチン接種では、腫瘍(例えばH E R 2 / n e uを発現する腫瘍)を発症する危険の高い患者に場合により抗体-免疫刺激剤融合蛋白質と適切な腫瘍抗原(例えばH E R 2 / n e u等)の混合物をワクチン接種する。例えば、家族歴から乳癌を発症する確率の高い女性を場合により本発明の1態様で予防処置する。例えば、H E R 2 / n e uに特異的な抗体を例えばI L - 2、I L - 12、及びG M C S Fと融合した抗体-免疫刺激剤融合蛋白質(即ち種々の抗体構築物)を場合により適量のH E R 2 / n e u抗原と共に女性に投与する(下記参照)。一般に、このような融合蛋白質と抗原は対象に投与する前に適切な免疫複合体を形成するように一緒にインキュベートする。従って、本発明の使用により女性の免疫系にH E R 2 / n e u蛋白質に対する免疫応答を生じ、こうして女性は発生したH E R 2 / n e uを発現する癌をより有効に治療できるようになり、場合により長期生存の機会を増すことができる。

20

【0044】

この場合も、本発明の他の態様では別の疾患/病態、従って別の抗原等に対して別の抗体/免疫刺激剤組合せが使用されることに留意すべきである。従って、本発明は場合により対象を特定ウイルス、細菌等との接触から予防処置するためにも使用される。例えば、本発明は場合により特定ウイルス/細菌と接触する危険が高い環境におかれる医療従事者等のヒトを予防処置するために使用される。例えば、場合により例えば黄色ブドウ球菌汚染を受け易い医療従事者を抗プロテインA抗体-免疫刺激剤融合蛋白質とプロテインA抗原で予防処置する(例えばマウスを使用した類似例については下記実施例II参照)。あるいは、例えば所定ウイルス(例えば性産業労働者のH I V等)と接触する可能性の高いヒトを場合により適切なH I V抗原に対して特異的な適切な抗体-免疫刺激剤融合体とこの特定抗原で予防処置する。

30

【0045】

治療処置ワクチン接種では、患者(例えば特定抗原を発現する腫瘍をもつ患者)に抗原特異的抗体-免疫刺激剤融合蛋白質と抗原(場合により可溶性抗原、上記参照)の混合物をワクチン接種する。この場合も、治療用ワクチン接種は例えば無数の腫瘍型(及び同一腫瘍上に提示される種々の抗原)とウイルス、細菌等の種々の感染の治療処置に適用可能である。従って、予防処置(上記参照)と同様に、標的抗原は腫瘍関連、ウイルス関連、細菌関連抗原等とすることができる。本発明の方法及び組成物を使用する治療処置は対象が疾患状態に対して有効な免疫応答を発生するのが困難な状況で特に有用である。例えば、疾患関連抗原がA P C等と適切に相互作用していない場合や、疾患関連抗原が免疫系により「自己」認識される場合等である。

40

【0046】

状況によっては、患者は高レベルの特定標的抗原が患者の体内に存在する疾患プロフィールを示すことに留意すべきである。例えば、所定の腫瘍は(例えば腫瘍から抗原の脱落により)高循環レベルの可溶性抗原を発現する。所定のH E R 2 / n e uを発現する腫瘍

50

がこのようなケースに該当し、腫瘍から高レベルの抗原が脱落する。更に、所定感染では、高レベルの標的抗原が患者に存在する可能性がある。所定の例えば細菌感染の結果、標的可能な内在抗原レベルが高くなる場合がある。例えば、種々の敗血症は場合により対象の血流中に高レベルの可溶性抗原を示す可能性がある。従って、場合によっては、抗体-免疫刺激剤融合蛋白質単独を注射すれば所望抗原を標的するために十分である。換言するならば、患者の内在抗原（例えば可溶性HER2/neu、細菌抗原等）レベルは抗体-免疫刺激剤融合蛋白質により標的するのに十分高いので、所望免疫応答を誘発することができる。しかし、高レベルの内在抗原が存在する場合であっても、このような患者に場合により抗体-免疫刺激剤融合蛋白質と標的抗原の混合物を注射することもできる。

【0047】

本発明の種々の抗体-免疫刺激剤融合蛋白質と抗原は別々に使用してもよいし、併用してもよく、こうして付加的又は相乗的效果を生じる。本発明の種々の態様では、場合により種々の免疫刺激剤ドメインを同一抗体フレームワーク（即ち同一抗原に対する同一抗体-異なる融合体の場合と同様に下記実施例I参照）と併用する。別法及び/又は付加法として、複数抗原（例えば細菌細胞、マイコプラズマ等に存在する2種の異なる表面抗原、又は2種の異なる腫瘍関連抗原）を場合により使用する（即ち異なる抗原は各々これらの抗原を標的とする1種以上の抗体-免疫刺激剤融合蛋白質をもつ）。こうすると、各種微調整特異性層が本発明に組込まれるので、対象の疾患処置のより正確な制御とターゲティングが可能になる。

【0048】

更に、（例えば抗HER2/neu抗体融合蛋白質等による処置により例証されるような）本発明の方法は必ずしも組換え抗体トラスツズマブ（ハーセプチン、Genentech, San Francisco, CA）処置等の治療技術の代法ではない。その代わりに、本発明は場合により代用療法として他の処置（例えば化学療法及び/又は放射線療法、抗生物質等の抗癌アプローチ）と併用される。例えば、状況によっては、（例えばECD^{HER2}を脱落する腫瘍で見られるように）循環抗原レベルの高い患者やトラスツズマブ処置に応答しない抗原の突然変異形（例えばHER2/neuの突然変異形）をもつ患者（例えばBaselgら, 1996 "Phase I study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer" J Clin Oncol 14:737-44参照）は場合により本発明の方法等が有効である。

【0049】

更に、本発明の所定態様は成熟樹状細胞のex vivo作製にも有用である。このような場合には、対象から取得した樹状細胞を抗体-免疫刺激剤融合蛋白質と適切な可溶性抗原（又はラテックスビーズに固定した抗原等の他のフォーマット）の混合物で（in vitro）処理する。その後、成熟プログラム樹状細胞を患者に再移植する。これは所定側面で上記所定選択的態様と同様であり、即ち、抗体-免疫刺激剤複合体が形成され、APC等と相互作用するが、この場合にはこのような相互作用がex vivoで生じる。

【0050】

抗体-免疫刺激剤融合蛋白質及び抗原ワクチンの成分と構築

本発明の実施例では例えば抗HER2/neuやIL-2、IL-12、及びGMCSFの抗体-サイトカイン融合蛋白質を使用した。当然のことながら、本発明は本発明で使用する抗体-免疫刺激剤融合蛋白質に免疫刺激分子と抗体の無数の他の組合せを含む。換言するならば、該当ないし処置する特定病態/疾患に応じて免疫刺激分子（例えばサイトカイン、ケモカイン等）と抗体（例えば各種抗体フラグメント、各種アイソタイプの抗体、及び各種抗原に対する特異性をもつ各種抗体）の種々の組合せが本発明に含まれる。

【0051】

10

20

30

40

50

例えば、実施例 I 等では（詳細な実施例ではサイトカインを使用して）ヒト腫瘍関連抗原 HER2/neu (ECD^{HER2}) の細胞外ドメインに特異的な抗体-免疫刺激剤融合蛋白質を構築し、使用した。これらの抗体融合蛋白質はトラスツズマブ（ハーセプチン, Genentech, San Francisco, CA) の可変領域を含むヒト IgG3 を免疫刺激サイトカインであるインターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-12 (IL-12)、又は顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) と遺伝子工学的に融合することにより構成した。これらの組換え蛋白質を図 1 に示す。

【0052】

本発明で使用する融合蛋白質の免疫刺激剤ドメインが多様であることに加え、使用する特定抗体ドメインも場合により多様である。本発明の実施例で使用した抗体ドメインは限定的であるとみなすべきではない。例えば、（例えば細菌抗原、ウイルス抗原、各種腫瘍関連抗原、マイコプラズマ抗原、寄生虫の抗原、プリオン、自己免疫疾患等に対する）種々の抗体はいずれも本発明の選択的態様である。抗原特異性のこの選択的多様性により、本発明の方法及び組成物を使用して無数の特定病態、疾患状態等を治療及び/又は予防することができる。抗体ドメインの抗原特異性が多様であるのみならず、蛋白質融合体を含む抗体フレームワークの型も種々のものを利用できる。例えば、本発明の抗体融合蛋白質の抗体ドメインは場合により Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, Fv, scFv、抗体フラグメント、及び種々のその組合せ等を含むことができる。

【0053】

抗体

本発明は抗体-免疫刺激剤融合蛋白質を蛋白質ワクチン接種のアジュバントとして使用する。使用される抗体-免疫刺激剤融合蛋白質は一般に蛋白質ワクチン接種で使用される抗原に特異的な免疫グロブリン分子（又はその一部）を含む。典型的態様では、抗体は疾患関連抗原に特異的である。

【0054】

融合蛋白質の抗体ドメインは場合により免疫グロブリン分子の全部又は一部を含み、場合により免疫グロブリン可変領域（即ち疾患関連抗原に対する特異性領域）の全部又は一部を含み、場合により V 遺伝子、及び/又は D 遺伝子及び/又は J 遺伝子によりコードされる領域を含む。

【0055】

上記に説明したように（上記定義参照）、本発明で 사용되는抗体は場合により態様の特定要件に応じて F(ab)₂、F(ab')₂、Fab, Fab', scFv 等を含む。所定態様は IgG ドメインを含む融合蛋白質を使用する。他方、他の態様は IgM、IgA、IgD、及び IgE 等の代替免疫グロブリンを含む。更に、種々の免疫グロブリンの考えられる全アイソタイプも本態様に含まれる。即ち、IgG1、IgG2、IgG3 等はいずれも本発明で 사용되는抗体-免疫刺激剤融合蛋白質の抗体ドメインに含まれると予想される分子である。免疫グロブリンとアイソタイプの型の選択に加え、本発明の各種態様は種々のヒンジ領域（又はその機能的等価物）を含む。このようなヒンジ領域は抗体-免疫刺激剤融合蛋白質の各種ドメイン間にフレキシビリティを提供する。例えば Penichetら, 2001 "Antibody-cytokine fusion proteins for the therapy of cancer" J Immunol Methods 248: 91-101 参照。

【0056】

種々の免疫刺激剤と融合した抗体ドメインの使用は当分野で比較的良好に知られており、適切な免疫グロブリンの使用、選択、及び構築（又は購入）は当業者に公知である。例えばいずれも全目的で本明細書に組込む Dela Cruzら, 2000 "Recombinant anti-human HER2/neu IgG3-(GM-CSF) fusion protein retains antigen specificity, cytokine function and demonstrates anti-tumor activity" J Immunol 165: 5112-21; Pe

10

20

30

40

50

nichetら, 2001, "A recombinant IgG3 - (IL-2) fusion protein for the treatment of human HER2/neu expressing tumors" Human antibodies 10:43-49; Penichetら, 2001 "Antibody-cytokine fusion proteins for the therapy of cancer" J Immunol Methods 248:91-101 (及びその引用文献); 及び Pengら, 1999, "A single-chain IL-12 IgG3 antibody fusion protein retains antibody specificity and IL-12 bioactivity and demonstrates antitumor activity" J Immunol 163:250-8 参照。 10

【0057】

免疫刺激剤

本発明の抗体-免疫刺激剤融合蛋白質を構成する別のドメインは免疫刺激剤ドメインである。上述のように、免疫刺激分子(又はドメイン)は対象の免疫応答又は免疫系の作用を刺激又は誘発するように作用する。抗体-免疫刺激剤融合蛋白質の一部である免疫刺激剤ドメインは一般に(但し限定されないが)数種の広範な型である。一般に、態様としては限定されないが、サイトカインとケモカインが挙げられる。一般に、サイトカインは例えば体液性及び/又は細胞性免疫応答を刺激するように作用し、ケモカインは一般に免疫細胞移動及び活性化を誘導する。特定態様にどの免疫刺激剤を使用するかという選択は例えばどの特定免疫応答効果が所望されるか、例えば体液性応答であるか細胞性免疫応答であるか、その両者であるかに依存する。典型的態様では、疾患関連抗原に対する細胞性と体液性の両者の免疫応答が所望される。従って、下記実施例I及びIIに示すように、本発明の方法及び組成物では場合により種々の免疫刺激剤ドメインをもつ多重融合蛋白質を使用する。 20

【0058】

当然のことながら、例示分子(例えばIL-2等)を含む免疫刺激剤に関する本明細書の記載は限定的であるとみなすべきでない。換言するならば、本発明の種々の態様は免疫刺激分子(例えば本明細書に例示するもの以外又はそれに加えて他のサイトカイン、ケモカイン等)の種々の組合せを含むとみなすべきである。従って、本発明の抗体融合体で融合される特定サイトカイン/ケモカイン等(例えば種々のインターロイキン分子、インターフェロン、IL-2、IL-10、IL-12、IL-17、IL-18、RANTES、mip1、mip1、GM-CSF、G-CSF、インターフェロン、インターフェロン等)は限定的ではなく、種々の特定サイトカイン、ケモカイン、免疫刺激剤等を種々の用途に利用することができ、いずれも本発明を構成する。 30

【0059】

例えば、本発明で使用することができる1個の一般免疫刺激剤ドメインはサイトカインを含む。サイトカインは白血球から主に分泌される成長因子の大ファミリーを含み、例えばIL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-13、インターフェロン、インターロイキン、IFN(インターフェロン)、TNF(腫瘍壊死因子)及びCSF(コロニー刺激因子)が挙げられる。種々のサイトカインは対象で体液性及び/又は細胞性免疫応答を刺激することができ、食細胞を活性化することができる。インターロイキンは白血球により分泌され、同様に白血球の種々の細胞性応答/作用に影響するサイトカインの1種(例えばIL-2, IL-12等)である。種々の態様において、インターロイキンが本発明の方法/組成物の免疫刺激剤ドメインとして使用される。更に、本発明の他の態様では、非インターロイキンサイトカインが抗体-免疫刺激剤融合体の免疫刺激剤ドメインを構成する。例えばMire-Sluis 1993 TIBTECH 11:74-77; Colomboら, 1992 Cancer Res 52:4853-4857; Arai, K.ら, 1990, "Cytokines: coordinators of immune and inflammatory respon 40 50

ses" Annu Rev Biochem 59:783+等参照。

【0060】

本発明の特定態様で使用される可能なサイトカインのより特定の例としては、(限定されないが)以下のものが挙げられる。

【0061】

IL-2。IL-2は抗体-免疫刺激剤融合蛋白質を構築するために使用される一般免疫刺激剤である。例えばPenichetら, 2001 "Antibody-Cytokine fusion proteins for the therapy of cancer" J Immunol Methods 248:91-101とその引用文献参照。IL-2はT細胞を刺激して増殖させ、細胞毒性にさせる。更に、IL-2は細胞(例えば腫瘍細胞)に対して高い細胞毒性で応答するようにNK細胞を誘導する。更に、IL-2は血管浸透性を増し、血管内液を血管外領域へ流出させる。

10

【0062】

IL-12。IL-12は一般にプロフェッショナル抗原提示細胞により放出され、細胞性免疫を促進する。IL-12はナイーブCD4+細胞をT_H1細胞に分化するように誘導することによりこの作用を行う。IL-12は更にNK及びCD8+T細胞の細胞毒性を増強することができる。IL-12により刺激されたT及びNK細胞により産生されたIFN- γ は他の免疫作用を生じることできる。IL-12は1本鎖又は2本鎖(ヘテロダイマー)変異体として存在することができる。本発明では場合によりどちらの型のIL-12も本発明で使用される抗体-免疫刺激剤の免疫刺激剤ドメインとして使用される。

20

【0063】

GM-CSF。GM-CSFは造血細胞の増殖と分化に関係があり、多面効果(例えば多数の細胞における抗原提示の増加)をもつ強力な免疫刺激剤である。更に、単球上のMHC IIや顆粒球及び単球上の接着分子の発現増加にも関与している。更に、GM-CSFはT細胞増殖の増幅にも関与している。本発明の所定態様では、GM-CSFは本発明で使用される抗体-免疫刺激剤誘導体の免疫刺激剤ドメインを構成する。

【0064】

本発明の他の一般態様では、免疫刺激剤ドメインはケモカイン(又はそのフラグメント)を含む。ケモカインは例えば種々の白血球を特定位置に選択的に吸引し、細胞移動のみならず活性化も誘導することができる。ケモカインは一般に、 α 、 β 及び γ サブタイプに分類される。その分類は蛋白質のアミノ末端の第1システイン残基のコンフィギュレーションにより分けられる。各種分類のケモカインは各種の類の炎症細胞を吸引するように作用する。従って、本発明で使用される融合蛋白質でこのような各種ケモカインを使用すると、このような融合蛋白質で処置した対象で各種免疫応答を活性化することができる。本発明で使用される融合蛋白質で使用することができるケモカインとしては(限定されないが)C-X-Cグループケモカイン、IL-8、mip2、mip2、PF4、血小板塩基性蛋白質、hIP10、C-Cファミリーケモカイン、LD78、Act-2、MCAF、1309、RANTES、TCA3、IP-10、Cケモカイン、リンホタクチン、CX3C(又はc-x3-c)ケモカイン、フラクタルカイン等が挙げられる。

30

40

【0065】

本発明の他の態様はサイトカイン又はケモカイン以外の免疫刺激剤を含む抗体-免疫刺激剤融合蛋白質を含む。例えば、抗体-免疫刺激剤融合蛋白質は場合によりKLH(キーホールリンペットヘモシアニン)又は他の同様の免疫原化合物や、直接抗原提示なしにT細胞及び/又はB細胞の直接刺激を誘導する「スーパー抗原」を含む。スーパー抗原やKLH等の化合物(とその使用等)は当業者に周知である。例えばJohnsonら, "Superantigens in human disease" Scientific American April 1992, p.92-101, 及びSekaly, R. (ed.) "Bacterial Superantigens" Seminars in Immunol. Vol. 5, 1993参照。

50

【0066】

この場合も、(サイトカイン、ケモカイン等のいずれを含むかに関係なく)本発明で使用される融合蛋白質の各種態様における実際の特異免疫刺激分子は例えば特定疾患状態/病態、特定標的抗原、特定所望作用(例えば体液性免疫応答、細胞性免疫応答、又は両者の誘発)等に依存する。

【0067】

構築

抗体-免疫刺激剤融合蛋白質の構築は当業者に周知である。例えば Penichet ら, 2001 "A recombinant IgG3-(IL-2) fusion protein for the treatment of human Her2/neu expressing tumors" Hum Antibodies 10: 43+; Peng, 1999, 前出; 及び Dela Cruz, 2000, 前出はいずれも抗体-免疫刺激剤融合蛋白質とその構築について記載している。文献には多数の他の資料も十分に存在する。

【0068】

本発明で使用される特定抗体-免疫刺激剤融合蛋白質は場合により(市販品の購入を含めて)当分野で公知の任意方法により取得又は作製される。例えば、適切な抗体フレームワーク(上記参照)をコードする核酸配列を場合により適切なベクター(例えば原核又は真核生物用の例えば発現ベクター)にクローニングし、ライゲーションする。更に、ベクターからの発現により抗体-免疫刺激剤融合蛋白質が産生されるように適切な向きと位置で適切な免疫刺激分子をコードする核酸配列を場合により同一ベクターにクローニングする。所定の選択的態様は更に発現後修飾、例えば抗体サブユニットの会合等も必要である。上記(及び同様の)操作技術及び手法は当業者に周知である。関連指示は例えば Sambrook ら, Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2nd Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989 及び Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel ら, eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (1999年補遺版)に記載されている。所定の代替態様では、抗体ドメインと免疫刺激剤ドメインを例えば化学的手段により発現後会合する。

【0069】

蛋白質ワクチン接種のアジュバントとしての抗体-免疫刺激剤の投与組成物

抗体-免疫刺激剤融合蛋白質及び/又は蛋白質ワクチン接種(例えば疾患関連抗原)は場合により適切な任意滅菌医薬キャリアーと共に(治療又は予防)処置を必要とする対象に投与する。このような医薬キャリアーは融合蛋白質と抗原の可溶性と作用を維持するように作用する。所定態様では、融合蛋白質/抗原と共に付加成分を投与することが所望される場合がある。例えば、所定処置レジメンでは、化学療法剤、抗生物質、成長因子を含む付加抗体融合蛋白質等をいずれも場合により本発明の組成物と共に加える。

【0070】

典型的態様では、対象に投与する製剤としては滅菌水性又は非水性溶液、懸濁液、及びエマルションが挙げられる。このような態様としてはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油(例えばオリーブ油)、有機エステル(例えばオレイン酸エチル)及び当業者に公知の他の溶媒等の非水性溶媒が挙げられる。本発明の所定態様では生理的に許容可能なキャリアー(又は賦形剤)を場合により使用する。このようなキャリアーの例としては例えば食塩水、PBS、リンゲル溶液、乳酸リンゲル溶液等が挙げられる。更に、安定性や無菌性を確保し易くするために防腐剤や添加剤を場合により組成物に加える。例えば、抗生物質や他の殺菌剤、酸化防止剤、キレート剤等もいずれも場合により本発

10

20

30

40

50

明の組成物の種々の態様に加える。

【0071】

本発明の組成物の製造では、典型的態様によると組成物を対象に投与する前に抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質と特定疾患関連抗原を選択（又は特定）時間（例えば抗原と融合蛋白質の適切な免疫複合体を形成するように）インキュベートする。典型的態様では、このようなインキュベーションは4で例えば一晚実施される。しかし、他の態様ではインキュベーション温度及び時間は異なる。例えば、組成物を種々の時間と温度でインキュベーションすることができる。条件 / 温度の決定は例えば該当特定抗原、該当特定抗体融合蛋白質、抗原と抗体の親和性等に応じて決定する。本発明の所定態様では、抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質の分子数と適切な抗原の分子数の比はほぼ等しい（例えば1 : 1）。しかし、他の態様では、この比は場合により1 : 1ではない。例えば、所定態様では場合により抗体融合蛋白質分子数が抗原分子数よりも多いか、又は抗原分子数が抗体融合蛋白質分子数よりも多い。所定態様では、抗原分子数は抗体融合蛋白質分子数を完全に飽和するに十分に大きい。換言するならば、利用可能な全抗体は抗原と免疫複合体を形成する。他の態様では、抗原は制限的である（例えば利用可能な全抗原が抗体と免疫複合体を形成するために十分な数を上回る抗体が存在する）。他の態様では、成分間に等モル（又はほぼ等モル）が存在するように疾患関連抗原と抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質の各種量を配分する。所定の典型的態様では、各成分の結合単位当量が等しくなるように又はほぼ等しくなるように各成分の量を配分する。下記実施例I参照。

10

【0072】

所定態様では、組成物の各種成分を予め測定及び / 又はプレパッキング及び / 又は付加測定の必要なしに即使用可能にする等の処理を行う。本発明は更に場合により本発明の方法及び / 又は組成物を実施 / 使用するためのキットを含む。特に、これらのキットは場合により例えば適切な抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質（及び場合により相乗処置を実施するための多数のこのような蛋白質の混合物、上記参照）と、場合により適切な疾患関連抗原も含む。更に、前記キットは本発明の治療及び / 又は予防処置を実施するための適切な賦形剤（例えば医薬的に許容可能な賦形剤）も含むことができる。前記キットは場合により本発明の組成物の構成及び / 又は使用のための付加成分を含み、これらの成分としては限定されないが、例えば希釈剤、アジュバント等が挙げられる。

20

【0073】

本明細書に記載する組成物は場合により本発明の方法を実施するため又は本発明の組成物を使用するために必要な全（又はほぼ全）成分（場合により例えば本発明の方法 / 組成物の使用説明書を含む）を含むようにパッケージングされる。例えば、キットは場合により例えば緩衝液、試薬、血清蛋白質、抗体、基質等を含むことができる。プレパッキング試薬の場合には、キットは場合により測定せずに方法に即利用できるように予め測定又は予め配分した量、例えば予め測定した液体アリコート、又はキットの最終使用者が容易に再構成することができるように予め計量もしくは予め測定した固体試薬を含む。

30

【0074】

このようなキットは一般に本発明の方法を実施するため及び / 又は本発明の組成物を使用するための適切な説明書も含む。所定態様では、キット / パッケージの成分は長期保存中の分解又は他の損失、例えば漏出を防ぐように安定化形態で提供される。多数の安定化方法 / 薬剤が保存しようとする試薬等に広く使用されており、例えば化学安定剤（即ち酵素阻害剤、殺菌剤 / 制菌剤、抗凝血剤）の添加等が挙げられる。

40

【0075】

所定態様では、複数組成物を使用して対象を処置する。例えば、融合蛋白質 / 抗原混合物を場合により所定期間にわたって複数回対象に投与する。このような用量の範囲は場合により例えば対象の処置応答、処置の毒性及び / 又は副作用等に応じて大幅に異なり、場合により各処置レジメン / 対象に適合するように調節する。更に、融合蛋白質は場合により抗原との混合物でなく別個の組成物として対象に投与する。例えば、場合により融合蛋白質組成物を対象に投与する前、それとほぼ同時、又はその後抗原組成物を対象に投与

50

する。更に、本明細書に記載するように、疾患状態/病態によっては疾患関連抗原を別個に投与しない状況もある。例えば、HER2/neuを発現する腫瘍には多量のHER2/neu抗原を脱落させるものがある。選択的態様では、本発明は場合により投与した融合蛋白質と共に免疫複合体を形成するように使用することによりこのような脱落抗原を利用する。この場合も、このような選択的作用メカニズムは本発明の方法及び組成物の効果を制限するとみなすべきではない。

【0076】

本発明の所定態様では、本発明は抗体-免疫刺激剤融合蛋白質の組成物に関し、前記融合蛋白質は疾患関連抗原の有効なアジュバントを含む。所定態様では、組成物は更に疾患関連抗原も含む。付加態様では、抗体-免疫刺激剤融合蛋白質は疾患関連抗原に対する抗体特異性をもつ。これらの組成物における融合蛋白質の免疫刺激剤ドメインは場合によりサイトカイン(又はその配列もしくはサブ配列)、ケモカイン(又はその配列もしくはサブ配列)、又はケモカインもしくはサイトカイン以外の免疫刺激剤を含む。(例えば本発明の組成物の選択的態様に含まれるような)このような免疫刺激剤ドメインの例としては限定されないが、例えばサイトカイン、ケモカイン、インターロイキン、インターフェロン、C-X-Cケモカイン、C-Cファミリーケモカイン、Cケモカイン、CX3Cケモカイン、スーパー抗原、成長因子、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18、RANTES、mip1、mip1、GMCSF、GCSF、インターフェロン、インターフェロン、TNF、CSF、mip2、mip2、PF4、血小板塩基性蛋白質、hIP10、LD78、Act-2、MCAF、1309、TCA3、IP-10、リンホタクチン、フラクタルカイン、KLH、及び上記の任意のもののフラグメントが挙げられる。更に、上記態様の任意のものは場合により更にリンカーをもつ(他の態様は場合によりリンカーをもたない)。リンカー領域ないドメインは場合により例えば融合蛋白質の免疫刺激剤ドメインと抗体ドメインの間等に配置される。

【0077】

本発明の組成物における融合蛋白質の抗体ドメインは限定されないが、例えばHER2/neu抗原、腫瘍抗原、細菌抗原、ウイルス抗原、マイコプラズマ抗原、真菌抗原、プリオン抗原、自己免疫疾患抗原又は寄生虫(例えば感染性哺乳動物寄生虫)に由来する抗原に特異的な抗体を場合により含む。他の態様では、このような融合蛋白質は腫瘍抗原以外の抗原に特異的な抗体ドメインを含む。更に、他の態様では、本発明の組成物における抗体-免疫刺激剤融合蛋白質は抗体フラグメント、Fabドメイン、Fab'ドメイン、(Fab')₂ドメイン、(Fab)₂ドメイン、scFvドメイン、IgG、IgA、IgE、IgM、IgD、IgG1、IgG2、又はIgG3を含む。

【0078】

更に、本発明の組成物の所定態様では、抗原は例えば可溶性抗原、マトリックスに結合した可溶性抗原、マトリックスに結合した不溶性抗原、抗原の不溶性凝集物、生存不能細胞関連抗原、もしくは生存不能生物関連抗原、又はリポソームに封入した抗原を含む。更に、このような抗原は例えばHER2/neu(又は腫瘍細胞から脱落したHER2/neu)又はそのフラグメントを含むことができる。更に、このような組成物における抗原は場合により腫瘍抗原以外の抗原、対象に由来する抗原、対象の体内の疾患状態に由来する抗原、又は対象の体内の疾患関連生物に由来する抗原(例えば腫瘍、細菌、ウイルス、マイコプラズマ、真菌、プリオン、自己免疫疾患、又は哺乳動物の感染性寄生虫等の感染性寄生虫の1種以上に起因する疾患状態)を含む。抗原は更に腫瘍抗原、細菌抗原、ウイルス抗原、マイコプラズマ抗原、プリオン抗原、自己免疫疾患関連抗原又は感染性寄生虫抗原も含むことができる。本発明の所定態様では、抗原は(場合により対象に由来するか、対象の体内の疾患状態に由来するか、又は対象の体内の疾患関連生物に由来する抗原と実質的に同一の)外来抗原である。

【0079】

本発明の組成物の他の態様では、抗原分子数と融合蛋白質分子数は場合により約1:1

10

20

30

40

50

である。他の態様では、これらの分子数は場合により抗原分子数が融合蛋白質分子数よりも多いか又は少ないか、又は融合蛋白質分子数が抗原分子数により実質的に飽和されるか、又は抗原分子数が融合蛋白質分子数により実質的に飽和されるような比である。

【0080】

本発明の組成物は場合により選択（又は特定）時間にわたって選択（又は特定）条件下で（例えば4等で一晚又は1秒以下等の短時間）インキュベーションする。本発明の組成物は更に場合により賦形剤（例えば医薬的に許容可能な賦形剤）を含む。

【0081】

下記実施例I及びIIは本発明の組成物と組成物の投与の数種の非限定例を示す。下記参照。当然のことながら、抗体と免疫刺激剤の他の組合せには場合により他の投与プロファイルが必要になる（例えば所定免疫刺激剤ドメインには場合により特定緩衝液等が必要である）。更に、所定処置レジメンは場合により付加治療及び/又は予防成分（例えば抗生物質等）を含む。

10

【0082】

投与

典型的態様では、抗体-免疫刺激剤融合蛋白質と抗原ワクチン接種を対象に非経口（例えば静脈内、腹腔内、筋肉内、又は皮下）注射する。他の態様では、本発明の組成物を非注射手段（下記参照）により送達する。一般に、このような投与の用量範囲は対象に所望効果を誘発（例えば疾患関連抗原に対する体液性及び/又は細胞性免疫応答及び/又は例えば明確な抗腫瘍もしくは抗感染活性を誘発）するのに十分広い範囲とする。用量は場合により例えば対象の年齢、性別、種、及び体重、並びに（治療又は予防）処置する疾患状態の程度又は存在に基づいて各対象に最適化される。例えば、融合蛋白質/抗原組成物の用量は0.1mg未満/kg対象体重から200mg以上/kg対象体重とすることができる。用量は例えば特定対象（年齢、体重、一般健康状態、性別、種等）、疾患状態の存在及び/又は進行もしくは段階、特定抗原、特定抗体融合蛋白質、及び免疫刺激剤により異なる。例えば、所定の選択的免疫刺激剤は高用量で毒性を示す（従って、組成物を多くしても必ずしも効果は増さない）。従って、投与を場合により各対象に個別設計する。用量は場合により連続投与する。換言するならば、複数用量を場合により処置期間にわたって投与する。投薬期間は場合により対象の応答に基づいて処置中に変更する。例えば、対象が特定期間内で十分に応答しない場合には用量及び/又は投薬タイミングを場合により増加又は変更する。

20

30

【0083】

更に、下記実施例I及びIIは本発明の組成物を使用する投薬（量及びタイミング）スケジュールの非限定的な例を示す。このような処置スケジュールは同実施例ではマウス等で使用するよう設計した例に過ぎず、限定的であるとみなすべきではない。

【0084】

本発明は更に疾患ないし病態の治療又は予防処置方法に関し、本方法は対象に（体液性及び/又は細胞性）免疫応答を誘発する段階と、本明細書に記載するような本発明の1種以上の核酸又はポリペプチド/融合蛋白質/抗原（又は医薬的に許容可能な賦形剤と1種以上の前記核酸又はポリペプチド及び/又は融合蛋白質及び/又は抗原を含む組成物）を対象（例えば哺乳動物（例えばヒト、霊長類、マウス、ブタ、ウシ、ヤギ、ウサギ、ラット、モルモット、ハムスター、ウマ、ヒツジ）；又は鳥類（例えばニワトリ又はアヒル）もしくは魚類等の非哺乳類脊椎動物又は無脊椎動物）に*in vivo*又は*ex vivo*投与することにより免疫組成物を投与する段階を含む。

40

【0085】

本発明の1選択的側面では、*ex vivo*法において対象の1種以上の目的細胞又は細胞集団（例えば樹状細胞、抗原提示細胞等）を対象から取得又は取出し、疾患、疾病、又は他の病態を予防又は治療処置するのに有効な量の本発明の融合蛋白質及び抗原と接触させる。接触させた細胞を次に対象のこれらの細胞を取得した部位又は治療する対象の別の目的部位に（例えば筋肉内注射等により）再導入又は送達する。本発明の方法/組成物

50

は前記細胞を必要部位（例えば腫瘍又は感染部位）に送達するか又は無関係の部位（例えば遠位体部分等）に送達するかに関係なく、場合により有効な免疫応答を誘発する。所望により、接触させた細胞を周知の標準付着、注射及び移植技術により対象の目的組織、臓器、又は系部位（例えば腫瘍細胞、腫瘍組織サンプル、臓器細胞、血液細胞、皮膚、肺、心臓、筋肉、脳、粘膜、肝臓、腸、脾臓、胃、リンパ系、子宮、膣、前立腺、口腔、舌等の細胞）に付着、注射、移植等してもよいし、又は例えば標準送達もしくは輸液技術を使用して血液もしくはリンパ系に送達してもよい。

【0086】

本発明は更に場合により疾患、疾病、又は他の病態を予防又は治療処置するのに有効な量の本発明の抗体融合蛋白質及び/又は抗原と対象の1種以上の目的細胞又は細胞集団を直接又は間接的に接触させる *in vivo* 方法も提供する。いずれのフォーマットでも、組織、臓器又は皮膚部位に導入する種々のフォーマット（例えば局所投与、（例えば注射針又は注射器を使用することによる）注射、又はワクチンもしくは遺伝子銃送達）の任意のものにより、抗体融合蛋白質及び/又は抗原を場合により細胞（例えば腫瘍細胞、腫瘍組織サンプル、感染部位（例えば腫瘍等）臓器細胞、血液細胞、皮膚、肺、心臓、筋肉、脳、粘膜、肝臓、腸、脾臓、胃、リンパ系、子宮、膣、前立腺、口腔、舌等の細胞）に投与ないし導入する。分子は例えば筋肉内、皮内、真皮下、皮下、経口、腹腔内、クモ膜下、静脈内に送達してもよいし、（例えば手術中等に）体腔内に配置してもよいし、吸入や膣もしくは直腸投与により導入してもよい。より典型的な態様では、本発明の抗体融合蛋白質及び/又は抗原は場合により処置を直接必要としない部位等に投与又は導入される。例えば、典型的態様では、本発明の抗体融合蛋白質及び/又は抗原を例えば腫瘍、感染部位等から遠位の部位に例えば筋肉内又は静脈内注射する（例えば上記参照）（例えば治療しようとする腫瘍が肺等に存在する場合には動物の脇腹に注射）。この場合でも免疫応答は本発明の抗体-免疫刺激剤融合蛋白質/抗原組成物により発生される。

【0087】

別の選択的側面では、本発明は対象の1種以上の目的細胞又は細胞集団（例えば腫瘍細胞、腫瘍組織サンプル、臓器細胞、血液細胞、皮膚、肺、心臓、筋肉、脳、粘膜、肝臓、腸、脾臓、胃、リンパ系、子宮、膣、前立腺、口腔、舌等の細胞）を対象から取得又は取出し、疾患、疾病、又は他の病態を予防又は治療処置するのに有効な生体活性分子として本発明で使用される抗体-免疫刺激剤融合蛋白質及び/又は抗原をコードするターゲット核酸を含むポリヌクレオチド構築物と前記1種以上の細胞又は細胞集団を接触させることにより形質転換させる *ex vivo* 方法を提供する。（例えば抗体-免疫刺激剤融合蛋白質及び/又は抗原を発現する）ポリヌクレオチド構築物（及び前記核酸配列の発現を制御するプロモーター）の細胞取込みが生じ、本発明のターゲット核酸配列が十分に発現される結果として疾患、疾病、又は他の病態を予防又は治療処置するのに有効な量の生体活性分子が産生されるように十分な量のポリヌクレオチド構築物及びプロモーターと1種以上の細胞又は細胞集団を接触させる。ポリヌクレオチド構築物は本発明の核酸配列の発現を制御するプロモーター配列（例えばCMVプロモーター配列）及び/又は、所望により、本発明の別の目的分子等（例えばサイトカイン、アジュバント、又は補助刺激分子、又は他のポリペプチド等）の少なくとも1種以上をコードする1種以上の付加ヌクレオチド配列を含むことができる。

【0088】

トランスフェクション後に、形質転換細胞を取得した対象の組織部位もしくは系又は対象の別の部位（例えば腫瘍細胞、腫瘍組織サンプル、臓器細胞、血液細胞、皮膚、肺、心臓、筋肉、脳、粘膜、肝臓、腸、脾臓、胃、リンパ系、子宮、膣、前立腺、口腔、舌等の細胞）にこれらの細胞を場合により再導入、送達又は導入する。所望により、周知の標準移植技術を使用して細胞を対象の目的組織、皮膚、臓器又は体系に移植してもよいし、標準送達もしくは輸液技術を使用して血液又はリンパ系に送達してもよい。形質転換細胞のこのような送達、投与又は導入は一般に上記投与経路又は方式の1種以上を使用することにより実施される。ターゲット核酸の発現は自然に発現させてもよいし、コードされる抗

体 - 免疫刺激剤融合蛋白質及び / 又は抗原が疾患又は病態を処置するために十分且つ有効な量で発現されるように誘導してもよい。組成物等の発現部位は対象の必要部位又はその近傍である必要はない。本明細書全体に説明するように、本発明の組成物における抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質及び / 又は抗原は例えば腫瘍又は感染に対する免疫応答を誘発するために例えば腫瘍細胞、感染性生物等と必ずしも直接接触する必要はない。

【 0 0 8 9 】

別の選択的側面では、本発明は疾患、疾病、又は他の病態を予防又は治療処置するのに有効な本発明で使用される生体活性抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質及び / 又は抗原をコードする核酸を含むポリヌクレオチド構築物と対象の 1 種以上の目的細胞又は細胞集団（例えば上記細胞及び細胞系及び対象を含む）を接触させる（か又は上記投与経路又は方式の 1 種以上を使用して細胞又は細胞集団に投与もしくは導入することにより細胞又は細胞集団を対象の体内で形質転換させる *in vivo* 方法を提供する。

10

【 0 0 9 0 】

生体活性分子をコードする核酸配列と前記核酸配列の発現を制御するプロモーターを含むポリヌクレオチド構築物（及びプロモーター）の細胞取込みが生じ、本発明の核酸配列が十分に発現される結果として疾患又は病態を予防又は治療処置するために有効な量の生体活性抗体融合蛋白質及び / 又は抗原が産生されるように十分な量のポリヌクレオチド構築物と細胞を上記投与経路又は方式の 1 種以上によりまず直接接触させることによりポリヌクレオチド構築物を場合により細胞に投与又は導入することができる。ターゲット核酸の発現は自然に発現させてもよいし、コードされる抗体融合蛋白質及び / 又は抗原が適切な免疫応答を誘発することにより疾患又は病態を処置するために十分且つ有効な量で発現されるように誘導してもよい。ポリヌクレオチド構築物は核酸配列の発現を制御するプロモーター配列（例えば CMV プロモーター配列）及び / 又は、所望により、本発明で使用される別の目的分子（例えばサイトカイン、アジュバント、又は補助刺激分子、又は他の同様の分子）の少なくとも 1 種以上をコードする 1 種以上の付加ヌクレオチド配列を含むことができる。

20

【 0 0 9 1 】

上記 *in vivo* 及び *ex vivo* 処置方法の各々において、本発明で使用される賦形剤と抗体融合蛋白質及び / 又は抗原又は前記蛋白質をコードする核酸を含む組成物を投与又は送達することができる。1 側面では、本発明で使用される医薬的に許容可能な賦形剤と前記分子又は核酸を含む組成物は疾患又は病態を処置するために有効な量を上記のように対象に投与又は送達される。

30

【 0 0 9 2 】

別の側面では、上記各 *in vivo* 及び *ex vivo* 処置方法において、細胞又は対象に投与されるポリヌクレオチドの量は対象の 1 種以上の細胞に前記ポリヌクレオチドが取込まれ、前記核酸配列が十分に発現される結果として対象で免疫応答を増強又は誘発するために有効な量の生体活性分子が産生されるように十分な量とすることができる。別の側面では、前記各方法で細胞又は対象に投与される分子の量は対象で免疫応答を増強又は誘発するために十分な量とすることができる。

【 0 0 9 3 】

更に別の側面では、ポリヌクレオチド構築物（又はポリヌクレオチド構築物を含む組成物）を使用する *in vivo* 又は *ex vivo* 処置方法において、誘導型オンオフ遺伝子発現システムを使用することによりポリヌクレオチド構築物の発現を誘導することができる。このようなオンオフ遺伝子発現システムの例としては夫々 Tet - On（登録商標）遺伝子発現システムと Tet - Off（登録商標）遺伝子発現システムが挙げられる。他の制御可能ないし誘導型のオンオフ遺伝子発現システムも当業者に公知である。このようなシステムを使用すると、ポリヌクレオチド構築物のターゲット核酸の発現を精密、可逆的且つ定量的に調節することができる。ターゲット核酸の遺伝子発現は例えばターゲット核酸を含むポリヌクレオチド構築物を含む安定なトランスフェクト細胞を目的組織部位、臓器又は系に送達又は導入又はこれらと接触させた後に誘導することができる。この

40

50

ようなシステムは（例えば手術の完了及び／又は手術後の治癒に要する時間を考慮；ターゲット核酸を含むポリヌクレオチド構築物が発現用部位、細胞、系又は組織に到達するまでの時間を考慮；構築物で形質転換された細胞を含む移植片がこれをスプライス又は結合した組織又は臓器に取込まれるまでの時間を考慮する等の点で）ターゲット核酸の発現を遅延又は精密に制御することが望ましい処置方法及びフォーマットで特に有益である。

【0094】

所定態様では、本発明は抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質を提供し、融合蛋白質を対象に投与することにより免疫組成物を投与する方法に関し、融合蛋白質は疾患関連抗原の有効なアジュバントを含み、融合蛋白質と抗原は共同して対象に免疫応答を誘発する。更に、所定態様では疾患関連抗原を提供すると共に前記融合蛋白質を投与する（例えば融合蛋白質と抗原を対象に投与し、融合蛋白質は抗原の有効なアジュバントである）。所定態様では、融合蛋白質はサイトカイン（又はその配列もしくはサブ配列）、ケモカイン（又はその配列もしくはサブ配列）、又はケモカインもしくはサイトカイン以外の免疫刺激剤を含む。他の態様では、本発明の方法は（限定されないが）例えばサイトカイン、ケモカイン、インターロイキン、インターフェロン、C-X-Cケモカイン、C-Cファミリーケモカイン、Cケモカイン、CX3Cケモカイン、スーパー抗原、成長因子、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18、RANTES、mip1、mip1、GMCSF、GCSF、インターフェロン、インターフェロン、TNF、CSF、mip2、mip2、PF4、血小板塩基性蛋白質、hIP10、LD78、Act-2、MCAF、1309、TCA3、IP-10、リンホタクチン、フラクタルカイン、KLH、及び上記の任意のもののフラグメント等の免疫刺激剤ドメインを含む融合蛋白質を使用する。

【0095】

本発明の方法の態様で使用される融合蛋白質の抗体ドメインは場合により例えばHER2/neu抗原、腫瘍抗原、細菌抗原、ウイルス抗原、マイコプラズマ抗原、真菌抗原、プリオン抗原、自己免疫疾患抗原、感染性寄生虫抗原（例えば哺乳動物の寄生虫）に特異的である。他の態様では、抗体ドメインは腫瘍抗原以外の抗原を含む抗原に特異的である。本発明のこのような態様における融合蛋白質の抗体ドメインは場合により（限定されないが）例えば抗体フラグメント、Fabドメイン、Fab'ドメイン、F(ab')₂ドメイン、F(ab)₂ドメイン、scFvドメイン、IgG、IgA、IgE、IgM、IgD、IgG1、IgG2、又はIgG3である。これらの方法の所定態様では、融合蛋白質は抗原に対して抗体特異性をもつ。

【0096】

本発明のこれらの方法は更に抗原が例えば腫瘍抗原、細菌抗原、ウイルス抗原、マイコプラズマ抗原、プリオン抗原、自己免疫疾患抗原、寄生虫抗原（例えば哺乳動物に感染する寄生虫）、腫瘍抗原以外の抗原、対象に由来する抗原、対象の体内の疾患状態に由来する抗原、又は対象の体内の疾患関連生物に由来する抗原を含む態様を包含する。場合によりこのような抗原を生じる対象の体内の疾患状態は場合により例えば腫瘍、細菌、ウイルス、マイコプラズマ、真菌、プリオン、自己免疫疾患、又は寄生虫（例えば哺乳動物に感染する寄生虫）に起因する。本発明のこのような態様における抗原は更に場合により外来抗原であり、場合により対象に由来するか、対象の体内の疾患状態に由来するか、又は対象の体内の疾患関連生物に由来する疾患関連抗原に実質的に一致するものでもよい。このような外来抗原は場合により抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質を対象に投与する前、又は場合により融合蛋白質を対象に投与した後、又は融合蛋白質を対象に投与するとほぼ同時に投与する。選択的同時投与前に抗原と融合蛋白質を選択（又は特定）時間にわたって選択（又は特定）条件下で（例えば4等で1秒もしくはほぼ瞬時インキュベーションから一晩以上まで）インキュベーションすることができる。本発明のこのような態様で使用される抗原は更に場合により例えば例えばHER2/neu、腫瘍細胞から脱落したHER2/neu、又はこのようなHER2/neuのフラグメントを含む。所定態様では前記方法において抗原分子数と融合蛋白質分子数は場合により約1：1である。他の態様では、抗

原分子数と融合蛋白質分子数は場合により抗原分子数が融合蛋白質分子数よりも多いか又は少ないか、又は融合蛋白質分子数が抗原分子数により実質的に飽和されるか、又は抗原分子数が融合蛋白質分子数により実質的に飽和されるような比である。これらの方法の他の態様では2種以上の融合蛋白質を場合により使用する。このような多重融合蛋白質は異なる免疫刺激剤ドメイン（例えば（限定されないが）非サイトカイン/非ケモカイン分子、サイトカイン、ケモカイン、インターロイキン、インターフェロン、C-X-Cケモカイン、C-Cファミリーケモカイン、Cケモカイン、CX3Cケモカイン、スーパー抗原、成長因子、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18、RANTES、mip1、mip1、GMCSF、GCSF、インターフェロン、インターフェロン、TNF、CSF、mip2、mip2、PF4、血小板塩基性蛋白質、hIP10、LD78、Act-2、MCAF、1309、TCA3、IP-10、リンホタクチン、フラクタルカイン、KLH、及び上記の任意のもの（フラグメントから選択されるもの）を含むことができる。更に、これらの方法における多重融合蛋白質は場合により異なる特異性をもつ。選択的多重融合蛋白質は例えば単一分子上の異なる抗原、単一細胞上の異なる抗原、単一腫瘍上の異なる抗原、又は単一生物（例えばウイルス、細菌、真菌、マイコプラズマ、プリオン、寄生虫）上の異なる抗原等に特異的であることができる。免疫組成物の投与方法は更にこのような投与が対象に免疫応答を誘発する態様を含む。

10

【0097】

更に他の態様では、本発明は対象の疾患状態の予防及び/又は治療処置方法に関する。このような方法は有効量の抗体-免疫刺激剤融合蛋白質を対象に投与する段階を含み、融合蛋白質は疾患関連抗原（例えば対象に由来するか、対象の体内の疾患状態に由来するか、又は対象の体内の疾患関連生物に由来するもの）の有効なアジュバントを含み、前記投与が疾患関連抗原（又は近縁抗原）に対する免疫応答を対象の体内に誘発する。このような疾患状態の予防及び/又は治療処置方法は更に場合により有効量の抗体-免疫刺激剤融合蛋白質を対象に投与する段階と疾患関連抗原を対象に投与する段階を含み、融合蛋白質が疾患関連抗原の有効なアジュバントを含む。

20

【0098】

HER2/neu腫瘍抗原とブドウ球菌プロテインA抗原に対する免疫応答を誘発するための本発明の使用

30

所定疾患/病態/等（例えば薬物処置が無効な微生物（例えば多剤耐性細菌等）感染や、所定癌、例えばHER2/neuを提示する癌）の治療及び/又は予防処置における問題を解決するために可能な手段の1つは発現する腫瘍又は感染因子等に対して強力な免疫応答を誘発するように特定蛋白質で免疫する方法である。例えば、以下に詳述するように、本発明の所定態様では腫瘍細胞に対する免疫応答を患者に誘発することを見込んで癌患者を適切な抗原で処置（例えば注射/ワクチン接種）する。更に、このような処置（例えば適切な抗原によるワクチン接種）は所定型の感染性生物（例えばウイルス等）に対して免疫応答を誘発する一般アプローチである。感染性生物に対する伝統的なワクチン接種ストラテジーは当業者に周知である。

【0099】

40

本発明は例えば腫瘍、感染因子（例えばウイルス等）に由来する疾患関連抗原に対する体液性及び/又は細胞性両者の免疫応答を対象に誘発するための有効な手段として蛋白質ワクチン接種のアジュバントとして抗体-免疫刺激剤融合蛋白質を使用する（例えばHER2/neu蛋白質について詳述する下記実施例I及び黄色ブドウ球菌プロテインAについて詳述する実施例II参照）。例えば下記実施例Iに示すように、抗HER2/neu IgG3-(IL-2)、抗HER2/neu IgG3-(IL-12)、及び抗HER2/neu IgG3-(GMCSF)を含む抗体-免疫刺激剤融合蛋白質を蛋白質ワクチン接種として使用する抗原（同様に本明細書ではHER2/neuにより例証）の可溶性形態のアジュバント（即ち免疫エンハンサー）として使用した。当然のことながら、他の態様では、他の抗原を使用に選択する。上記参照。

50

【0100】

本発明は例えば腫瘍又は感染因子の直接ターゲティングに抗体-免疫刺激剤融合蛋白質を使用するのではなく、その代わりに、抗体融合体と抗原を併用して特定抗原（例えば腫瘍又は感染性生物）に対する体液性及び/又は細胞性免疫応答を誘発する。このアプローチでは、抗腫瘍活性又は感染因子に対する免疫活性を誘発するために抗体融合蛋白質による腫瘍の直接ターゲティング又は感染因子の直接ターゲティングは必要ないことを特筆することが重要である。例えば、強力な抗腫瘍活性を生じる強力な細胞性及び体液性免疫応答を誘発するには、抗体-免疫刺激剤融合蛋白質をその特定抗原（例えば実施例IではHER2/neuの細胞外ドメイン（ECD^{HER2}））と混合すれば十分である（即ち本発明の融合蛋白質等は内在体液性/細胞性免疫応答を刺激する）。

10

【0101】

当然のことながら、本明細書全体に説明するように、種々の疾患/病態に種々の免疫刺激剤と抗体の組合せを使用できるだけでなく、種々の態様では、抗体-免疫刺激剤融合蛋白質の種々の組合せを併用することができる。例えば、所定処置レジメンでは、免疫応答を刺激する相乗効果を生じるように（例えば下記実施例IにおいてIgG3-IL-2、IgG3IL-12等を使用して実施したように）種々の抗体-免疫刺激剤融合体を同一処置期間に対象に投与することができる。更に、所定の選択的態様では、同一腫瘍又は感染因子上の種々の抗原を同一処置期間にターゲティングする。例えば、感染性細菌上の2種以上の表面抗原を場合により本発明の2種以上の異なる抗体-免疫刺激剤融合蛋白質でターゲティングする。

20

【0102】

上記記載から明らかなように、本発明の方法、組成物等を使用すると対象の処置時間を節約することができる。迅速な応答と作用は多くの病態の処置（例えば後期癌、進行細菌感染等の治療）で最も重要である。例えば、抗体融合蛋白質を抗原ワクチンのアジュバントとして使用すると、その抗原に対する抗体の高親和性を利用できる。従って、本発明の使用は疾患関連抗原と免疫刺激剤（例えばサイトカイン又は他の免疫刺激分子）を併用する簡単な方法であり、免疫刺激剤（例えばサイトカイン又は他の免疫刺激剤）と遺伝子工学的に融合した抗原から構成される抗体融合蛋白質を構築する必要がない。このような融合体は扱いにくく、共有結合パートナーの一方又は両方の活性が低減（即ち抗体又は免疫刺激剤の活性が低減）しかねない。更に、本発明のような抗体-免疫刺激剤融合蛋白質の使用は循環抗原（例えばin vivo脱落可溶性HER2/neu、感染性微生物からの可溶性抗原等）をターゲティングする唯一の方法である。当然のことながら、この場合も、（本明細書の実施例で使用するような）HER2/neuを提示する癌及び黄色ブドウ球菌感染の処置における本発明の使用の利点は本明細書に記載する情報から明らかなように、多数の他の疾患状態、感染、癌等の処置でも得られる。

30

【0103】

本発明の特性を例証するために本明細書で使用する全例示蛋白質（例えば抗HER2/neu IgG3-(IL-2)、抗HER2/neu IgG3-(IL-12)、抗HER2/neu IgG3-(GM-CSF)）は適正に会合及び分泌されるように決定した。従って、融合蛋白質はSDS-PAGE上を還元及び非還元両者の条件下に予想分子量で泳動した。更に、融合蛋白質は適切な抗原と結合し、リガンド及び抗体関連機能を実施した。より重要な点として、例示抗体融合蛋白質による直接処置（例えば静脈内（i.v.）注射又は他の投与方法）の結果、抗体単独（同一可変領域を含む抗HER2/neu IgG3）では防御を付与できない条件下でヒトHER2/neuを発現するマウス腫瘍モデルで有意な抗腫瘍活性が得られた（下記及びPengら, 1999; Delacruzら, 2000; Penichetら, 2001, いずれも前出参照）。

40

【0104】

本発明の非限定的な1例としては、動物モデルにおけるECD^{HER2}ワクチン接種の免疫エンハンサーとしての抗体-サイトカイン融合蛋白質（抗HER2/neu IgG3-(IL-2)、抗HER2/neu IgG3-(IL-12)、及び抗HER2/

50

ne u I g G 3 - (G M C S F)) の使用が挙げられる (より詳細なプロトコールの記載については下記参照)。当然のことながら、E C D^{H E R 2} は H E R 2 / n e u の細胞外ドメインを含む (例えば腫瘍細胞により脱落されるドメイン; 本発明の実施例で使用される組換え型は対象で脱落されるこのような細胞外ドメインと同じである)。要約すると、マウスにヒト E C D^{H E R 2}、E C D^{H E R 2} と抗 H E R 2 / n e u 抗体、又は E C D^{H E R 2} と各抗 H E R 2 / n e u 抗体 - サイトカイン融合蛋白質を (別々に) ワクチン接種した。ブースター後にラット H E R 2 / n e u 蛋白質 (T U B O) を発現する同系癌でマウスを攻撃した。E C D^{H E R 2} + 全 3 種の抗体 - サイトカイン融合蛋白質をワクチン接種したマウスには対照群 (即ち P B S, E C D^{H E R 2} 又は E C D^{H E R 2} + 抗 H E R 2 / n e u 抗体) のマウスと比較して腫瘍増殖速度の有意低下と長期生存数の増加が認められた。E C D^{H E R 2} + 抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質をワクチン接種したマウスには対照群と比較して高い E C D^{H E R 2} 特異抗体力価が検出された。E C D^{H E R 2} + 抗体 - (G M C S F) をワクチン接種した群は最高の抗体力価を示した。これらのマウスからの免疫血清は S K - B R - 3 (H E R 2 / n e u を過剰発現するヒト乳癌) に対して有意 *i n v i t r o* 抗増殖活性を示した。S K - B R - 3 の阻害レベルは抗 E C D^{H E R 2} 抗体の阻害レベルに相関した。更に、E C D^{H E R 2} + 抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質をワクチン接種したマウスは高レベルの E C D^{H E R 2} 特異的 I g G 2 a 抗体を産生し、T_H 1 型免疫応答が誘発されたことが判明した。可溶性 E C D^{H E R 2} と共にインキュベーションすると、E C D^{H E R 2} + 抗体 - (G M C S F) 融合蛋白質をワクチン接種したマウスからの脾細胞は他の群と比較して有意刺激と I F N - 分泌を示した。これらの結果から、本発明の組成物により体液性と細胞性の両者の応答が誘発されたために抗腫瘍活性が観察されたと思われる。更にこれらの結果から、抗 H E R 2 / n e u 抗体 - サイトカイン融合蛋白質は患者で H E R 2 / n e u を発現する腫瘍に対する有効な予防及び治療剤となり得るとと思われる (下記参照)。この場合も、当然のことながら、抗 H E R 2 / n e u 抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質に関する記載は本発明で蛋白質ワクチン接種のアジュバントとして使用される抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質の一般分類の例証として使用される。

【 0 1 0 5 】

ヒト G M C S F とヒト I L 1 2 はマウスでは不活性であるため、本発明の所定実施例ではマウス G M C S F とマウス I L - 1 2 を使用した。本発明の融合蛋白質の実施例ではマウス G M C S F 及び I L - 1 2 を使用してマウスモデルで本発明を試験することができた。このような構築は限定的であるとみなすべきではなく、従って、本発明は他の動物系 (例えばヒト等) 及び他の動物分子 (例えばヒト G M C S F、ヒト I L - 1 2 等) にも適用可能である。更に、本明細書の例証ではヒト I g G 3 を使用したが、任意免疫グロブリンアイソタイプを使用することができる (上記参照)。更に、本発明の概念は s c F v 等の他種の抗体フレームワークにも直接適用することができる。上記参照。

【 0 1 0 6 】

実施例 I の考察

実施例 I はマウスを (E C D^{H E R 2}) + 抗体 - サイトカイン融合蛋白質で免疫する結果ととして細胞性 (T_H 1) と体液性 (T_H 2) の両面の免疫応答が強力に活性化されることを例証する。この活性化は H E R 2 / n e u を発現する腫瘍で免疫応答マウスを攻撃した場合の有意抗腫瘍活性に結び付けられる。抗体 - 免疫刺激剤 (例えばサイトカイン) 融合蛋白質は図 2 に示すように抗体 - サイトカイン融合蛋白質と G M C S F、I L - 2、I L - 1 2 受容体等の D C 表面受容体の相互作用を介するか、及び / 又は場合により抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質自体が標的抗原 (疾患関連抗原) に対する免疫応答の増強を助長 (例えば I L - 2 細胞増殖シグナル、G M C S F A P C 活性化、I L - 1 2 による T_H 1 側への移行等) することにより E C D^{H E R} を樹状細胞 D C (又は他の抗原提示細胞 (A P C)) にターゲティング及び送達するが、場合により、上記のような効果が生じるとと思われる。上記に説明したように、本発明の方法及び組成物の選択的作用メカニズムは限定的であるとみなすべきではなく、本発明の方法及び組成物の効果と範囲を限定するとみなすべきでもない。

【0107】

実施例Iでは、HER2/neu蛋白質を発現する腫瘍に対して使用することにより本発明の方法及び組成物を例証する。HER2/neuプロト癌遺伝子(c-erbB-2としても知られる)は上皮成長因子受容体と一部相同であって前記受容体に固有のチロシンキナーゼ活性をもつHER2/neu又はp185^{HER2}として知られる185kDa膜貫通糖蛋白質受容体をコードする。Coussensら, 1985 "Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene" *Science* 230:1132-9; Akiyamaら, 1986 "The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity" *Science* 232:1644-6; 及びSternら, 1986 "p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptor like protein associated with tyrosine kinase activity" *Mol Cell Biol* 6:1729-40 参照。この遺伝子はシステインリッチ細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン及び短い細胞質ドメインの3個のドメインから構成される(例えばCoussens, Akiyama, 及びStern, いずれも前出参照)。ヒト乳癌(Hayesら, 2001 "Circulating HER-2/erbB-2/c-neu(HER-2) extracellular domain as a prognostic factor in patients with metastatic breast cancer: Cancer and Leukemia Groups B Study 8662" *Clin Cancer Res* 7:2703参照)の25~30%(又は他の文献では20~40%)と、卵巣癌、子宮内膜癌、非小細胞肺癌、胃癌、膀胱癌、前立腺癌(例えばEssermanら, 2001 "Vaccination with the extracellular domain of p185 neu prevents mammary tumor development in neu transgenic mice" *Cancer Immunol Immunother* 47:337参照)及び肺癌(例えばKaptainら, 2001 "Her-2/neu and breast cancer" *Diagn Mol Pathol* 10:139参照)にHER2/neuの過剰発現が認められる。この過剰発現はHER2/neu遺伝子増殖の結果として正常組織の100倍になる場合もある(例えばYarden, 2001 "Biology of HER2 and its importance in breast cancer" *Oncology* 61:1参照)。HER2/neu過剰発現は乳癌患者における非再発率と総合生存率の両面の独立予測因子である。例えばSlamonら, 1987 "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of HER-2/neu oncogene" *Science* 234:177-82; Slamonら, 1989 "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer" *Science* 244:707-12; Pressら, 1993 "Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis" *Cancer Res* 54:5675-82; 及びSeshadriら, 1993 "Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer" *J Clin Oncol* 11:1936-42参照。HER2/neuの過剰発現は卵巣癌(Slamonら, 1989, 前出参照)、胃癌(Yonemuraら, 1991,

“ Evaluation of immunoreactivity for erbB-2 protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer ” Cancer Res 51:1034-1038 参照)、子宮内膜癌 (Berchuckら, 1991 “ Overexpression of HER-2/neu in endometrial cancer is associated with advanced stage disease ” Am J Obstet Gynecol 164:15-21 参照)、及び唾液腺癌 (Pressら, 1994 “ Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinoma of the salivary gland: correlation with poor prognosis ” Cancer Res 54:5675-82 参照) 患者の予後にも重要である。HER2/neu 過剰発現患者では内臓転移と微小転移性骨髄疾患の発生率が高く、HER2/neu が転移に関与していることを示唆している (Pantelら, 1993 “ Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells ” J Nat Cancer Inst 85:1419-1424; 及び Kallioniemiら, 1994 “ Association of c-erbB-2 protein over-expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer ” Int J Cancer 49:650-5 参照)。

【0108】

HER2/neu は成長因子受容体として機能し、細胞分化、接着及び運動に役割を果たすと考えられている。例えば Kaptain, 前出参照。HER2/neu の過剰発現は腫瘍の病因と攻撃性に直接役割を果たすことが文献に示唆されており (Kaptain, 前出参照)、新規に診断された原発性乳癌患者における臨床効果不良に関係することも示唆されている (Hayes, 前出参照)。現今では、HER2/neu を発現する進行乳癌患者に抗 HER2/neu 抗体 (Ab) である trastuzumab (ハーセプチン, Genentech, San Francisco, CA) を投与すると、客観的応答を誘導することができる。Kaptain, 前出参照。化学療法を併用すると、trastuzumab と相乗作用してその抗腫瘍活性を強化することができる。しかし、明確な応答が観察されるのは一部の患者に限られており (Kaptain, 前出参照)、臨床転帰を改善するように設計した付加処方が依然として必要である。

【0109】

悪性腫瘍では HER2/neu 蛋白質レベルが高く、この分子は細胞外に接触し易く、更に可溶性 ECD HER2/neu が随時腫瘍から脱落すること (及び前記蛋白質が関連する癌の重篤度と有病率) から、HER2/neu は腫瘍特異的ワクチン接種の優れた腫瘍関連抗原 (TAA) である。しかし、残念ながら、HER2/neu 蛋白質を使用した免疫は動物 (非ヒト) モデルで非常に期待外れであった。例えば、Disis, M. L., and K. Schifman. 2001 “ Cancer vaccines targeting the HER2/neu oncogenic protein ” Semin Oncol 28:12 参照。腫瘍細胞を直接標的とする抗体-サイトカイン融合体 (例えば IL-2 とハーセプチンの可変領域の抗体融合蛋白質、例えば Penichet 2001 (Human Antibodies), 前出, Peng, 1999, 前出、及び Dela Cruz 2000, 前出参照) を使用してある程度成功しているが、このような抗体は所定腫瘍の処置に欠点がある (例えば血管新生不良により腫瘍に接近できなかつたり、抗体が脱落抗原と結合するために腫瘍に接近できない等)。当然のことながら、このような従来の抗体-サイトカイン腫瘍処置はウイルス、細菌等の感染

因子に起因する疾患/病態の(治療又は予防)処置にも応用できない。

【0110】

HER2/neuは正常組織での発現率が低く、多数の異なる型の癌で過剰発現することから能動的免疫療法の魅力的なターゲットになっている。Kaptein, 前出参照。HER2/neu蛋白質に特異的なワクチンは多数の異なるヒト悪性腫瘍の治療及び/又は予防に広く利用されよう。例えばDisisら, 2001 "Clinical translation of peptide-based vaccine trials: the HER-2/neu model" Crit Rev Immunol 21:263参照。実際に、DNAワクチンはneutランスジェニック動物でラットHER2/neu(neu)を発現する腫瘍に対して防御免疫を誘導することが従来示されている。例えばRoveroら, 2000 "DNA vaccination against her-2/Neu p185 more effectively inhibits carcinogenesis than transplantable carcinomas in transgenic BALB/c mice" J Immunol 165:5133; Lachmanら, 2001 "DNA vaccination against neu reduces breast cancer incidence and metastasis in mice" Cancer Gene Ther 8:259; Chenら, 1998 "DNA vaccines encoding full-length or truncated Neu induce protective immunity against Neu-expressing mammary tumors" Cancer Res 58:9165; 及びPupaら, "Prevention of spontaneous neu-expressing mammary tumor development in mice transgenic for rat proto-neu by DNA vaccination" Gene Ther 8:75参照。HER2/neuのペプチドワクチンも動物モデルで耐性を「克服」し、抗腫瘍活性を発生することができた。例えばNagataら, 1997 "Peptides derived from a wild-type murine proto-oncogene c-erbB-2? HER2/neu can induce CTL and tumor suppression in syngeneic hosts" J Immunol 159:1336; 及びDisisら, 1996 "Peptide-based, but not whole protein, vaccines elicit immunity to HER-2/neu, oncogenic self-protein" J Immunol 156:3151参照。しかし、不完全フロイントアジュバント中のneuで免疫したラットはneu特異的応答を示さなかった(Disis, 1996 前出参照)。ヒトHER2/neu ECD蛋白質でラットを免疫するとneuに対する免疫応答を生じた(Taylorら, 1996 "Humoral and cellular responses raised against the human HER2 oncoprotein are cross-reactive with the homologous product of the new proto-oncogene, but do not protect rats against B104 tumors expressing mutated neu" Cancer Immunol Immunother 42:179参照)ことから、「自己」腫瘍抗原と高相同性の外来蛋白質は「自己」腫瘍抗原に対する応答を発生するのに有効であるらしいことが示唆された(Disisら, 1998 "HER-2/neu oncogenic protein: issues in vaccine development", Crit Rev Immunol 18:37)が、neuを発現する腫瘍に対する防御は付与しなかった(Taylor, 前出参照)。従って、自己腫瘍抗原に対する耐性を克服しても腫瘍防御を付与するには不十分であるらしい。この点は異種免疫原性ヒトHER2/neu蛋白質を発現する同系腫瘍を拒絶しない免疫応答マウスでも実

証された。Foyら, 2001 "Vaccination with Her-2/neu DNA or protein subunits protects against growth of a Her-2/neu-expressing murine tumor" Vaccine 19:2598; Shikuら, 2000 "Development of a cancer vaccine: peptides, proteins, and DNA" Cancer Chemother Pharmacol 46:S77; 及び Penichetら, 1999 "In vivo properties of three human HER2/neu-expressing murine cell lines in immunocompetent mice" Lab Anim Sci 49:179 参照。特に、ヒトHER2/neu細胞内ドメイン(ICD)及び細胞外ドメイン(ECD)をワクチン接種するといずれも検出可能な免疫応答を誘発したが、抗腫瘍活性を示したのはHER2/neu ICDをワクチン接種したマウスのみであった(Foy, 前出参照)。このように、免疫応答の誘発が必ずしも抗腫瘍応答に結びつくわけではない。従って、耐性の克服に加え、腫瘍増殖に対する防御を生じるために適切な応答の強化が不可欠である。

【0111】

HER2/neuをもつ悪性腫瘍患者に腫瘍関連抗原(TAA)であるHER2/neuに対する所定レベルの体液性及び細胞性免疫が存在することは示されている(Disisら, 1998 "HER-2/neu oncogenic protein: issues in vaccine development" Crit Rev Immunol 18:37; Yipら, 2001 "Identification of epitope regions recognized by tumor inhibitory and stimulatory anti-ErbB-2 monoclonal antibodies: implications for vaccine design" J Immunol 166:5271; 及び Disis, M.L.ら, 2001 "Cancer vaccines targeting the HER2/neu oncogenic protein" Semin Oncol 28:12 参照)が、このような免疫は患者に防御を付与するには明らかに不十分である。既存免疫を増強すると治療効果があるらしいと予想されている(Disis 1998, 前出参照)が、ペプチド又はペプチドパルス樹状細胞(DC)ワクチンを使用してHER2/neuに対する免疫のブーストを目的とした最近の臨床試験はまだ臨床効果を示していない。例えばDisis 1999, "Generation of immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with breast and ovarian cancer using a peptide-based vaccine" Clin Cancer Res 4:1289+; Brossart, P.ら, 2000 "Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells" Blood 96:3102; 及び Murray, J.ら, 2000 "Clinical trials of HER-2/neu-specific vaccines" Semin Oncol 27:71 参照。従って、HER2/neu蛋白質を標的とするワクチン処方として、免疫耐性を克服して既存免疫をブーストするだけでなく、癌を根絶することが可能な免疫応答を発生するように設計された処方依然として必要である。この点で、本発明の方法、組成物等はHER2/neuを提示する癌等の疾患状態の処置に適用可能である。

【0112】

ECD^{HER2}の低免疫原性は樹状細胞(DC)におけるECD^{HER2}の不適正な取込みとトラフィッキングに関係があり、その結果としてMHCクラスII提示欠損を生じることは示唆されている。Hiltboldら, 2000, "The mechanism of unresponsiveness to circulating tumo

r antigen MUC1 is a block in intracellular sorting and processing by dendritic cells" J Immunol 165:3730-41 参照。しかし、図2に示す選択的相互作用（例えば抗原と複合体化した抗体-免疫刺激剤がAPC又はDCと相互作用するという本発明の概念）は場合により抗原提示量及び/又は品質を変化させ、その結果、HER2/neuを発現する腫瘍に対して強力なT及びB細胞免疫応答を生じる。更に、本発明の抗体融合蛋白質に融合した免疫刺激剤（例えばサイトカイン）の選択的免疫刺激活性は場合により標的抗原に対する免疫応答の増強（例えばIL-2-細胞増殖シグナル、GMCSF-APC活性化及びIL-12による T_H1 側への移行）をそれ自体助長する。この場合も、このような選択的作用メカニズムは限定的であるとみなすべきではない。上記参照。 10

【0113】

誘発される（即ち本発明の方法等の使用により発生される）免疫応答は癌細胞の表面に発現されるHER2/neu（体液性免疫応答）だけでなく癌細胞の表面のMHCクラスIに関連するHER2/neuペプチド（細胞性免疫応答）に対しても誘発される。この場合も、種々の態様で他の抗原/腫瘍/細胞を標的とする場合には、本発明は更にこれらの抗原等に対する体液性及び/又は細胞性免疫応答も誘発する。実施例Iでは、HER2/neuが上皮成長因子受容体1、2、及び3（EGF1, EGF2, EGF3）等の他の成長因子受容体と高い相同性をもつので、誘発される（体液性及び/又は細胞性）免疫応答は標的抗原（HER2/neu）だけでなく、癌細胞上に発現される他の相同受容体 20

【0114】

例証する実施例Iでは、ECD^{HER2}蛋白質ワクチン接種のアジュバントとしての抗HER2/neu抗体-免疫刺激剤融合蛋白質の効力を試験した。HER2/neu蛋白質で免疫すると、腫瘍細胞増殖を刺激する抗体を誘導することにより有害な効果を生じるらしいことは示唆されている（Yip, 前出参照）が、本発明を使用した場合にこのような活性は観察されなかった。逆に、どの抗体-免疫刺激剤融合蛋白質をワクチン接種した場合にもヒトHER2/neuでなくラットneu蛋白質を発現するマウス細胞（TUBO）に対する有意防御がマウスに付与された。換言するならば、TUBO細胞はラットneu蛋白質を発現し、ワクチン接種したマウスはこの蛋白質に対して防御された。下記参照。TUBO細胞のin vitro増殖は抗ECD^{HER2}抗体により変化しなかったが、SK-BR-3細胞は増殖を阻害され、高レベルの抗ECD^{HER2}IgGを含有する血清を使用した場合に最高の阻害が観察された。3種の異なる抗体-免疫刺激剤融合蛋白質を使用して同程度の抗腫瘍活性が生じたが、抗体及び細胞性免疫応答を分析した処、これらの高度防御機序は異なる経路で機能することが示唆された。更に、上記知見は本発明により発生される免疫応答が場合により近縁及び/又は類似抗原に対する応答も発生できることを例証するものである。下記実施例I参照。 30

【0115】

実施例Iでは、抗ECD^{HER2}抗体応答の品質と量は免疫スケジュールに依存した。高い T_H2 （Sura, 2002 "IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage Plasmodium chabaudi AS malaria infection in mice" J Immunol 168:1348 参照）抗ECD^{HER2}IgG1応答が観察されたのはIgG3-（GMCSF）とECD^{HER2}+IgG3-（IL-2）をワクチン接種したマウスのみであった。ECD^{HER2}+IgG3-（IL-12）をワクチン接種したマウスは高い T_H1 （Sura, 前出参照）抗ECD^{HER2}IgG2a及びIgG3応答を示したが、ECD^{HER2}+IgG3-（IL-2）をワクチン接種したマウスでは低い応答しか誘発されなかった。ECD^{HER2}+IgG3-（GMCSF）をワクチン接種したマウスでは更に低いIgG2及びIgG3応答しか誘発されなかった。これらのレジメンから得られた血清移行 40

によると、体液性経路を介してTUBOに対する防御を媒介できると思われる。移行した免疫血清の特性決定によると、腫瘍防御には抗ECD^{H E R 2}抗体応答の品質と量が重要であるらしいことが示唆された(例えば抗ECD^{H E R 2}IgG1レベルは例えば腫瘍防御レベルと相関を示さなかった)。ECD^{H E R 2}単独をワクチン接種したマウスからの未防御血清中の抗ECD^{H E R 2}IgG2aレベルがECD^{H E R 2}+IgG3-(IL-2)をワクチン接種したマウスからの防御血清と同等であったという知見は、腫瘍防御が抗ECD^{H E R 2}IgG2aにより媒介されないことを示唆した。他方、抗ECD^{H E R 2}IgG3レベルは防御レベルと相関しており、観察される防御におけるその関与が示唆された。しかし、当然のことながら、抗ECD^{H E R 2}IgG1又はIgG2aを介する防御が本発明を使用する他の免疫条件で生じる可能性がないという訳ではない。

10

【0116】

実施例Iでは、可溶性ECD^{H E R 2}の存在下におけるIFN-の脾細胞増殖及び分泌の量はワクチン接種レジメンに依存した。これはユニークな細胞性免疫レパートリーがワクチン接種マウスで発生したことを意味し、従って、TUBO攻撃に対して観察された防御におけるその重要性を示唆している。実際に、免疫血清がナイーブマウスを防御する能力と細胞活性化レベルには逆の相関が認められた。例えば、ナイーブマウスに最強防御を付与したのはECD^{H E R 2}+IgG3-(GMCSF)をワクチン接種したマウスではなく、ECD^{H E R 2}+IgG3-(IL-12)をワクチン接種したマウスからプールした移行血清であった。他方、ECD^{H E R 2}+IgG3-(GMCSF)をワクチン接種したマウスの脾細胞は可溶性ECD^{H E R 2}に対する応答の増幅を示したが、ECD^{H E R 2}+IgG3-(IL-12)をワクチン接種したマウスは示さず、体液性経路による防御が不十分な条件では細胞性応答の活性化が必要であるらしいことが判明した。

20

【0117】

以上の結果をまとめると、ECD^{H E R 2}+IgG3-(IL-12)をワクチン接種したマウスの防御は主に体液性経路により媒介され、ECD^{H E R 2}+IgG3-(GMCSF)をワクチン接種したマウスの防御には細胞性応答が関与している。更に、ECD^{H E R 2}+IgG3-(IL-2)をワクチン接種したマウスの防御は体液性と細胞性の両者の応答に依存した。従って、これらの結果から、体液性と細胞性の両者の応答を併用すると、相乗効果が生じ、より強力な抗腫瘍応答が得られると思われる。このような例として、ECD^{H E R 2}+IgG3-(IL-2)をワクチン接種したマウスはTUBO攻撃から19日後に5頭で腫瘍が検出されなかったが、ECD^{H E R 2}+IgG3-(IL-12)又はECD^{H E R 2}+IgG3-(GMCSF)をワクチン接種したマウスでは3頭であり、対照群では皆無であった。

30

【0118】

TUBOに対する抗腫瘍応答を増強するには、IFN-による細胞毒性エフェクター細胞の活性化が場合により必要である。in vivoでは、ワクチン接種したマウスをTUBO細胞で攻撃すると、腫瘍微小環境内のAPCがラットneu蛋白質(ヒトHER2/neuと>90%相同)を含むTUBO細胞抗原をプロセッシングし(Taylorら, 1998 "Manipulation of the immune response of mice against neu/HER2-expressing tumours" Oncol Rep 5:1535参照)、ECD^{H E R 2}でプライミングされたT細胞に抗原を提示することができる。in vitro細胞アッセイによると、ECD^{H E R 2}+IgG3-(GMCSF)とECD^{H E R 2}+IgG3-(IL-2)をワクチン接種したマウスでは活性化T細胞によるIFN-の強力な分泌が顆粒球、マクロファージ、及び単球等のエフェクター細胞の細胞毒性能(例えばAraiら, 1990 "Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses" Annu Rev Biochem 59:783; Chenら, 1995 "Monocyte-mediated lysis of acute myeloid leukemia cells in the presence of the bispecific antibody 251

40

50

x 22 (anti-CD33 x antiCD64) "Clin Cancer Res 1:1319; 及び Vaickusら, 1990 "Interferon gamma augments Lym-1-dependent, granulocyte-mediated tumor cell lysis" Blood 75:2408 参照)を誘導し、更に抗体依存性細胞毒性(ADCC)でマウスIgG2a抗体(例えば Rodolfoら, 1998 "IgG2a induced by interleukin(IL)12-producing tumor cell vaccines but not IgG1 induced by IL-4 vaccine is associated with the eradication of experimental metastases" Cancer Res 58:5812 参照)により選択的に利用されるFc RI受容体のアップレギュレーション(例えば Chen, 前出; Vaickus, 前出; Hartnellら, 1992 "IFN-gamma induces expression of Fc gamma RIII(CD16) on human eosinophils" J Immunol 148:1471; te Veldeら, 1992 "IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10" J Immunol 149:4048; Anselminoら, 1989 "Human basophils selectively express the Fc gamma RII(CDw32) subtype of IgG receptor" J Allergy Clin Immunol 84:907; Buckleら, 1989 "The effect of IFN-gamma and colony-stimulating factors on the expression of neutrophil cell membrane receptors" J Immunol 143:2295; 及び Klebanoffら, 1992 "Effects of gamma-interferon on human neutrophils: protection from deterioration on storage" Blood 80:225 参照)を誘導すると思われる。従って、エフェクター細胞が有効なADCCを媒介するように多数のFc RI受容体をもっているという条件で、 $EC D^{HER2} + IgG3 - (GMCSF)$ をワクチン接種したマウスで検出されるように比較的低い抗 $EC D^{HER2}$ IgG2aレベルでTUBOに対する防御応答を生じることが可能である。実際に、*in vitro*においてマウスIgG2a抗体を介してIFN-により誘導されたADCCの増加はFc RI誘導の効果であると推測された(Vaickus, 前出参照)。更に、活性化エフェクター細胞は場合により抗 $EC D^{HER2}$ 抗体によりTUBOにターゲットィングされる。ナイーブマウスでは活性化エフェクター細胞が最適に達しないか又は他の点で欠損しているので高レベルの抗 $EC D^{HER2}$ IgGを含有する移行血清の防御効果が弱い、これは上記の理由から説明することができる。実際に、neu-DNAをワクチン接種した防御マウスに移植されたTUBOはPMNが多量に浸潤しており、誘発された抗neu抗体により媒介されていることが示唆されている(Rovero, 前出参照)。

【0119】

HER2/neuを標的とするワクチンストラテジー(例えば本発明のストラテジーを含む)は場合によりモノクローナル抗HER2/neu抗体の受動的注入よりもHER2/neuを発現する癌患者の処置に有効である。受動的モノクローナル抗体注入の1つの欠点は循環期間が短く(Disis 2001, 前出参照)、その治療能が弱まるという点である。患者に臨床応答を誘導するためには最適循環レベルのトラスツズマブが不可欠であることが判明した(Baselgaら, 1996 "Phase II study of weekly intravenous recombinant human

ized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer" J Clin Oncol 14:737参照)。従って、HER2/neuを標的とする有効なワクチンは場合によりHER2/neu特異的細胞性応答を含む抗HER2/neu抗体の能動的連続供給(Disis 2001, 前出参照)を可能にし、より有効なHER2/neu悪性腫瘍に対する免疫を生じると思われる。内在体液性応答の内在性はモノクローナル抗体の長期使用を制限する免疫原性の付加欠点を回避できると思われる(Disis 2001, 前出参照)。

【0120】

本発明は免疫強化性抗体-免疫刺激剤(例えばサイトカイン等)をアジュバントとして使用する完全ECD^{HER2}による蛋白質ワクチン接種を提供し、本明細書の実施例に例証するように、動物モデルで強力な抗腫瘍活性を提供する。抗腫瘍活性は場合により本発明では最適用量及びレジメンスケジュールの決定と各種抗体-免疫刺激剤融合蛋白質間の潜在的相乗効果により最適化される。更に場合により、本発明ではワクチン接種時の抗体-免疫刺激剤融合蛋白質と疾患関連抗原(例えば本発明では可溶性ECD^{HER2})の予想される相互作用を試験し、例えば腫瘍防御等を助長するように最適化する。しかし、抗体-免疫刺激剤と疾患関連抗原のこのような最適相互作用が必要であるか否かに関係なく、抗HER2/neu抗体-免疫刺激剤融合蛋白質は患者の治療において疾患関連抗原蛋白質ワクチン接種のアジュバントとして使用することができる(例えば抗HER2/neuとHER2/neuを発現する腫瘍等)。例えば抗BSA抗体応答を増強するためにはダンシル化BSAと抗ダンシル-(IL-2)抗体-融合蛋白質の相互作用が必要であったことを示すHarvillら, 1996 "In vivo properties of an IgG3-IL-2 fusion protein. A general strategy for immune potentiation" J Immunol 157:3165参照。

【0121】

実施例IIの考察

(治療及び/又は予防)抗腫瘍処置としての使用に加え、本発明の方法及び組成物は場合により感染性疾患因子に対する(同様に、治療及び/又は予防)処置として(例えばウイルス、細菌、マイコプラズマ、真菌、プリオン、又は寄生虫感染等の処置として)も使用される。このような使用は細菌である黄色ブドウ球菌を使用して実施例II(下記参照)で例証される。

【0122】

黄色ブドウ球菌はグラム陽性細菌であり、院外感染の一般原因であり、高致死率をもたらす院内感染の最高頻度の単離細菌病原体である。例えばNickersonら, 1995 "Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control" J Dairy Sci 78:1607-18; Lowy, 1998 "Staphylococcus aureus infections" N Engl J Med 339:520-32; McKenneyら, 1999 "Broadly protective vaccine for Staphylococcus aureus based on an in vivo-expressed antigen" Science 284:1523-7; 及びLorenzら, 2000 "Human antibody response during sepsis against targets expressed by methicillin resistant Staphylococcus aureus" FEMS Immunol Med Microbiol 29:145-53参照。黄色ブドウ球菌に起因するヒト疾患としては肺炎、心内膜炎、骨髄炎、敗血性関節炎、術後創傷感染、敗血症、及び毒素性ショック症候群が挙げられる。例えばNickersonら, 前出; Lowy, 前出; McKenneyら, 前出; 及び

10

20

30

40

50

Lorenzら, 前出参照。更に、黄色ブドウ球菌は経済的に重要な動物の深刻な病原体でもある。例えばNickersonら, 前出; 及びMcKenneyら, 前出参照。更に、この細菌の所定株は合成ペニシリン(例えばメチシリン)等の第一選択薬に耐性である。大病院のブドウ球菌単離株の40~60%にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)株が含まれる。例えばNickersonら, 前出; Lowy, 前出; 及びMcKenneyら, 前出参照。他方、所謂最後の手段の抗生物質であるバンコマイシンに対して低感受性のMRSA株が最近出現し、更に大きな問題となっている。例えばMcKenneyら, 前出参照。これらのバンコマイシン耐性(又は中間)黄色ブドウ球菌(VISA)株の出現は治療不能なブドウ球菌感染の恐怖を生じている。そこで、黄色ブドウ球菌感染に対処する代替ストラテジーが緊急に必要であり、この細菌は本発明の方法及び組成物を例証するための理想的ターゲットである。 10

【0123】

黄色ブドウ球菌プロテインA(SpA)は全黄色ブドウ球菌株の95%に存在する42kDa蛋白質である。この蛋白質はドメインE, D, A, B, 及びCと呼ばれるタンデムに配置された5個の高相同性細胞外Ig結合ドメインを含む(例えばBoyle, 1990, in *Bacterial Immunoglobulin-Binding Proteins*, ed. Boyle, M. P. D. (Academic, San Diego), Vol. 1, pp. 17-28; 及びGrailleら, 2000 "Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity" *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5399-404参照)。この蛋白質は分泌型と膜結合型の両者で存在し、そのメカニズムは明確でないが、実験モデルによると、分泌型プロテインA(SpA)はブドウ球菌ビルレンスを増強することが分かっている(例えばPatelら, 1987 "Virulence of protein A-deficient and alpha-toxin-deficient mutants of Staphylococcus aureus isolated by allele replacement" *Infect Immun* 55: 3103-10; 及びGrailleら, 2000, 前出参照)。 20 30

【0124】

プロテインAは2種の異なる抗体結合活性をもち、まず各結合ドメインはFc(エフェクター機能に關与するIgGの定常領域)と結合することができ、第2に、各ドメインはFab(抗原認識に關与する抗体フラグメント)と結合することができる。例えばBoyle, 前出; 及びGrailleら, 前出参照。Fc結合部位(即ちプロテインAが抗体と結合する部位)は大半のIgGサブクラスのC_H2とC_H3の界面のL字領域に局限されている。この結合性は抗体の標識と精製に広く使用されている(例えばTashiroら, 1995 "Structures of bacterial immunoglobulin-binding domains and their complexes with immunoglobulins" *Curr Opin Struct Biol* 4: 471-81; 及びGrailleら, 前出参照)。プロテインAのFab結合特異性は十分に特性決定されていないが、抗体重鎖の可変領域上の1部位に關与することが示されている。例えばVidalら, 1985 "Alternative mechanism of protein A-immunoglobulin interaction: the V_H-associated reactivity of a monoclonal human IgM" *J Immunol* 135: 1232-8; 及びGrailleら, 前出参照。抗体配列使用との相関によると、プロテインAのFab結合特異性はFab重鎖V_H3ファミリーのヒト可変領域の産物に限定されると思われる。V_H3ファミリーは遺伝性V_H遺伝子のほぼ半数を占める。例えばHill 40 50

sonら, 1993 "The structural basis of germline-encoded V_H3 immunoglobulin binding to staphylococcal protein A" J Exp Med 178: 331-6; 及び Graillera, 前出参照。Fab重鎖 (V_H) の可変領域は抗原認識に關与する超可変領域を介さず、フレームワーク残基を介してプロテインAと相互作用する。

【0125】

プロテインAが黄色ブドウ球菌株の(全部ではないとしても)大半に存在するという事実と、ビルレンス因子としてのその役割と、黄色ブドウ球菌細菌の表面に発現されることから、プロテインAは蛋白質ワクチン接種の優れた候補である。下記実施例IIに説明するように、蛋白質ワクチン接種のアジュバントとして使用される抗体-免疫刺激剤融合蛋白質が防御免疫応答を誘発する能力を試験した。下記参照。

10

【0126】

IgG3-(IL-2)及びIgG3-(GMCSF)抗体融合蛋白質の存在下でマウスに可溶性プロテインAをワクチン接種すると(ブースターの必要あり)、可溶性及び不溶性両形態のプロテインA(即ち遊離可溶性プロテインAとCowan Iの表面に結合したプロテインA)に対する抗体応答を増強する能力が認められる。下記参照。従って、抗体融合蛋白質の有用性は融合免疫刺激剤(例えばサイトカイン)に依存する。以上の結果から、抗体融合蛋白質はマウスでプロテインAに対する抗体免疫応答の有効なエンハンサーであり、ヒト及び動物の両方で黄色ブドウ球菌感染の予防と治療にこの技術を潜在的に使用できると考えられる。

20

【実施例】

【0127】

以下の実施例ではHER2/neu抗原/抗体及び種々のサイトカイン(例えばIL-2, IL-12, GMCSF)と黄色ブドウ球菌に由来するプロテインA抗原を利用する。しかし、この場合も、本発明の方法(例えば、抗原送達のアジュバントとしての抗体-免疫刺激剤融合体の使用)は抗体と免疫刺激剤等の多種多様な組合せに適用することができ、無数の疾患/病態の処置に有用である(即ちHER2/neuを提示する腫瘍やブドウ球菌感染の処置に止まらない)ことに留意すべきである。

【0128】

実施例I:細胞外ドメインHER2/neu蛋白質ワクチン接種の有効なエンハンサーとしての抗HER2/neu抗体融合蛋白質

HER2/neu分子は多数のヒト癌(例えば乳癌、卵巣癌、前立腺癌及び肺癌)で過剰発現され、予後不良に結び付けられる。上述のように、HER2/neuを標的とする所定のDNA及びペプチドワクチンは動物モデルでHER2/neuを発現する癌に対して有意防御を誘発した。しかし、HER2/neu(ECD^{HER2})の完全細胞外ドメインを使用したワクチンは同一効力を示さなかった。本明細書に詳述するように、本発明は免疫刺激サイトカインとしてIL-2, IL-12又はGMCSFを含む数種の抗ヒトHER2/neu抗体(Ab)-免疫刺激剤融合蛋白質とその使用を例証する(この場合も、例えば治療する特定疾患、増強すべき特定作用等に応じて場合により他の免疫刺激分子を融合して本発明で使用される分子を構築する)。

30

40

【0129】

実施例Iで使用される抗体-免疫刺激剤融合蛋白質(及び本発明の同様の関連融合体)は免疫刺激剤(例えばサイトカイン)活性とHER2/neu結合能をもつ。これらの抗体-免疫刺激剤融合蛋白質がECD^{HER2}ワクチン接種の免疫エンハンサーとして作用するか否かを調べるために、ヒトECD^{HER2}、ECD^{HER2}+抗HER2/neu抗体(IgG3)、又はECD^{HER2}+各抗体-免疫刺激剤融合蛋白質をマウスにワクチン接種した。ブースター投与後にラットHER2/neu蛋白質を発現する同系癌(即ちTUBO)でマウスを攻撃した。ECD^{HER2}+全3種の抗体-免疫刺激剤融合蛋白質をワクチン接種したマウス群では対照群のマウス(即ちPBS、ECD^{HER2}又はE

50

C D^{H E R 2} + I g G 3 を投与したマウス) に比較して腫瘍増殖速度の有意低下と長期生存数の増加が認められた。

【0130】

全ワクチン接種群で抗 E C D^{H E R 2} 体液性免疫応答が検出され、E C D^{H E R 2} + I g G 3 - (G M C S F) 及び E C D^{H E R 2} + I g G 3 - (I L - 2) をワクチン接種したマウスは高レベルを示した。これらの2群は対照群に比較して抗 E C D^{H E R 2} I g G 1 及び I g G 2 a 抗体レベルが高かった。これらの結果から T_H 2 及び T_H 1 両者の免疫応答が誘発されたことが判明した。E C D^{H E R 2} + I g G 3 - (I L - 1 2) をワクチン接種したマウスは高レベルの I g G 2 a 抗体を示したが、I g G 1 抗体レベルは高くなく、T_H 1 免疫応答が誘発されたことが分かった(上記参照)。

10

【0131】

マウスからの免疫血清は S K - B R - 3 (H E R 2 / n e u 蛋白質を過剰発現するヒト乳癌) に対して有意 *in vitro* 抗増殖活性を示し、阻害レベルは抗 E C D^{H E R 2} 抗体のレベルに相関した。可溶性 E C D^{H E R 2} と共にインキュベーションすると、E C D^{H E R 2} + 抗体 - (G M C S F) をワクチン接種したマウスからの脾細胞は他の群に比較して有意増殖と有意 I F N - 分泌を示した。このような結果は(本実施例に例証するような)本発明が体液性と細胞性の両者の応答を誘発することを示す。従って、体液性と細胞性の両者の応答が(本実施例で認められるように)観察される抗腫瘍活性を助長することができる。本実施例は本発明の使用により、患者で例えば H E R 2 / n e u を発現する腫瘍に対する予防及び治療レジメンとしての蛋白質ワクチン接種のアジュバントとして

20

【0132】

本発明を例証する本実施例では、雌性 B A L B / c マウスに種々の組成でヒト E C D^{H E R 2} 蛋白質をワクチン接種した。ラット n e u 蛋白質を過剰発現する移植可能な癌である T U B O でワクチン接種マウスを攻撃した。例えば R o v e r o , S . A . ら , 2 0 0 0 , “ D N A v a c c i n a t i o n a g a i n s t r a t h e r - 2 / N e u p 1 8 5 m o r e e f f e c t i v e l y i n h i b i t s c a r c i n o g e n e s i s t h a n t r a n s p l a n t a b l e c a r c i n o m a s i n t r a n s g e n i c B A L B / c m i c e ” J I m m u n o l 1 6 5 : 5 1 3 3 参照。下記の通り、可溶性 E C D^{H E R 2} 単独で免疫したマウスは対照群に比較して低い抗腫瘍免疫しか示さなかった。他方、免疫増強用サイトカイン I L - 2 , I L - 1 2 又は G M C S F を抗 H E R 2 / n e u 抗体(ヒト I g G 3) と融合してワクチンアジュバントとして使用すると(即ち本発明の方法自体)、抗腫瘍活性の顕著な増強が認められた。抗 H E R 2 融合蛋白質に関する詳細な情報については、例えばいずれも全目的で本明細書に組込む P e n g , L . S . ら , 1 9 9 9 “ A s i n g l e - c h a i n I L - 1 2 I g G 3 a n t i b o d y f u s i o n p r o t e i n r e t a i n s a n t i b o d y s p e c i f i c i t y a n d I L - 1 2 b i o a c t i v i t y a n d d e m o n s t r a t e s a n t i t u m o r a c t i v i t y ” J I m m u n o l 1 6 3 : 2 5 0 ; P e n i c h e t , M . L . ら , 2 0 0 1 “ A r e c o m b i n a n t I g G 3 - (I L - 2) f u s i o n p r o t e i n f o r t h e t r e a t m e n t o f h u m a n H E R 2 / n e u e x p r e s s i n g t u m o r s ” H u m A n t i b o d i e s 1 0 : 4 3 ; 及び D e l a C r u z , J . S . ら , 2 0 0 0 “ R e c o m b i n a n t a n t i - h u m a n H E R 2 / n e u I g G 3 - (G M C S F) f u s i o n p r o t e i n r e t a i n s a n t i g e n s p e c i f i c i t y a n d c y t o k i n e f u n c t i o n a n d d e m o n s t r a t e s a n t i t u m o r a c t i v i t y ” J

30

40

50

Immunol 165:5112 参照。

【0133】

材料と方法

マウス

本実施例では Taconic Farms, Inc. (Germantown, NY) から入手した 10~12 週齢雌性 BALB/c マウスを使用した。全実験 (実施例 I 及び実施例 II の両者) は実験動物の飼育と使用に関する米国国立衛生研究所指針 (National Institutes of Health (NIH) (Bethesda, MD) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) に従って実施した。

10

【0134】

細胞株

TUBO は neu 蛋白質を過剰発現するクローン化細胞株である。この細胞株はマウス乳腺癌ウイルスプロモーターにより誘導したトランスフォーミングラット neu 癌遺伝子を導入したトランスジェニック BALB/c 雌性マウスで自然発生した小葉癌から樹立された。Rovero, S. ら, 前出参照。TUBO 細胞は正常 BALB/c マウスで進行的に増殖し、BALB-neuT-トランスジェニックマウスに出現する癌と組織学的に類似する小葉癌を生じる。同じく Rovero, S., 前出参照。本実施例では、グルタマックス、グルコース、25mM HEPES 緩衝液、ピリドキシン-HCl (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD)、及び 20% 胎仔ウシ血清 (Atlas Biologicals, Fort Collins, CO) を加えたダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) で TUBO 細胞を培養した。本実施例では、HER2/neu 蛋白質を過剰発現するヒト乳癌細胞株である SK-BR-3 (ATCC, Rockville, MD) も使用した。SK-BR-3 細胞は L-グルタミン、ペニシリン、及びストレプトマイシンと 5% ウシ胎仔血清 (Atlanta Biologicals, Norcross, GA) を加えたイスコブ変法ダルベッコ培地 IMDM で培養した。

20

【0135】

抗体-免疫刺激剤融合蛋白質と ECD^{HER2}

IgG3、IgG3-(GMCSF)、IgG3-(IL-2) 及び IgG3-(IL-12) 免疫刺激剤融合蛋白質の構築、精製及び生物活性の分析については文献に記載されている。いずれも全目的で本明細書に組込む Peng, L.S. ら, 1999 "A single-chain IL-12 IgG3 antibody fusion protein retains antibody specificity and IL-12 bioactivity and demonstrates antitumor activity" J Immunol 163:250; Penichet, M.L. ら, 2001 "A recombinant IgG3-(IL-2) fusion protein for the treatment of human HER2/neu expressing tumors" Hum Antibodies 10:43; 及び Dela Cruz, J.S. ら, 2000 "Recombinant anti-human HER2/neu IgG3-(GMCSF) fusion protein retains antigen specificity and cytokine function and demonstrates antitumor activity" J Immunol 165:5112 参照。本実施例で使用される IgG3 と抗体-免疫刺激剤融合蛋白質はモノクローナル抗 HER2/neu であるハーセプチンと同一の可変領域を含む。可溶性ヒト ECD^{HER2} を分泌する細胞株である BHK/erbB2 は James D. Marks 博士 (University of California at San Francisco, San Francisco, CA) から入手した。可溶性 ECD^{HER2} は Sepharose 4B (CNBr 活性化 Sepharose 4B, Amersham Pharmacia

30

40

50

B i o t e c h , U p s a l a , スウェーデン) に固相化した I g G 3 によるアフィニティークロマトグラフィーを使用して B H K / e r b B 2 培養上清から精製した。全精製蛋白質を透析用緩衝液(脱イオン水中 5 0 m M T r i s ベース, 1 5 0 m M N a C l , p H 7 . 8) で透析し、ピシンコニン酸蛋白質アッセイ(B C A p r o t e i n A s s a y , P i e r c e C h e m i c a l C o . , R o c k f o r d , I L) により濃度を測定した。使用前に蛋白質を S D S - P A G E で分析し、クーマシーブルー染色して純度、サイズ及び完全性を評価した。

【 0 1 3 6 】

マウスワクチン接種と T U B O 攻撃

マウス 8 頭 2 群に 0 日目と 3 5 日目(5 週目「ブースター」) に E C D ^{H E R 2} 単独 8 μ g、E C D ^{H E R 2} 8 μ g + I g G 3 1 4 μ g、E C D ^{H E R 2} 8 μ g + I g G 3 - (G M C S F) 1 6 μ g、E C D ^{H E R 2} 8 μ g + I g G 3 - (I L - 2) 1 6 μ g、又は E C D ^{H E R 2} 8 μ g + I g G 3 - (I L - 1 2) 2 7 μ g を右脇腹に皮下注射した。当然のことながら、成分を異なる容量で使用したのは組成物の成分間に 1 : 1 当量の結合単位を達成するようにモル濃度を等しくするためである。マウス 1 頭当たり 1 5 0 μ l を注射する濃度で 1 E C D ^{H E R 2} : 1 F (a b ') ₂ 比となるように抗体又は抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質を E C D ^{H E R 2} と混合した。混合物を注射前に一晩 4 で放置した。希釈剤(P B S) を注射したマウスを対照群とした。ブースターから 3 週間後(即ち 3 5 日目から 3 週間後) に各ワクチン接種群の 1 組のワクチン接種マウスの左脇腹にハンクス平衡塩類溶液 H B S S (G I B C O B R L , L i f e T e c h n o l o g i e s , R o c k v i l l e , M D) 1 5 0 μ l 中 T U B O 細胞 1 0 ⁶ 個を攻撃注射した。E C D ^{H E R 2} + I g G 3 - (I L - 2) をワクチン接種したマウス 8 頭のうちの 1 頭はワクチン接種とは無関係の理由で T U B O 細胞攻撃前に死亡した。

【 0 1 3 7 】

マウスの腫瘍増殖をモニターし、腫瘍攻撃後 7 日目からキャリパーで測定した。直径 1 . 5 c m 以上の腫瘍をもつマウスを安楽死させた。同日にワクチン接種マウスを T U B O で攻撃し、他方の未攻撃ワクチン接種マウス群から血液(血清試験と受動免疫移行に使用)と脾細胞を採取し、下記付加試験で処理及び使用した。

【 0 1 3 8 】

E C D ^{H E R 2} に対するマウス抗体応答の特性決定

T U B O 攻撃の 2 日目のマウス又は未攻撃ワクチン接種マウスから採取した血清について E C D ^{H E R 2} に対する抗体を E L I S A により分析した。E L I S A は濃度 1 μ g / m l の E C D ^{H E R 2} 5 0 μ l をコートした 9 6 ウェルマイクロタイタープレートを使用して実施した。プレートを洗浄し、P B S 中 3 % ウシ血清アルブミン(B S A) (S i g m a C h e m i c a l , S t . L o u i s , M O) でブロックした。洗浄後に、1 % B S A を添加した P B S 中の血清の希釈液をウェルに加え、一晩 4 でインキュベーションした。1 時間 3 7 で A P 標識ウサギ抗マウス I g G (Z y m e d , S a n F r a n c i s c o , C A) と共にインキュベーションすることにより結合した I g G を検出した。洗浄後、ジエタノールアミン緩衝液(S i g m a C h e m i c a l , S t . L o u i s , M O) に溶かした p - ニトロフェニルリン酸 2 ナトリウムを 2 時間加え、プレートを 4 1 0 n m で読取った。同齢のナイーブマウスからの血清を陰性対照として使用した。全 E L I S A は各プレートに内部陽性対照曲線を使用して 2 回ずつ行った。上記のように作製した 9 6 ウェルマイクロタイタープレートと検出剤として A P 標識ラット抗マウス I g G 1、I g G 2 a (Z y m e d , S a n F r a n c i s c o , C A) 又は A P 標識ヤギ抗マウス I g G 3 (S o u t h e r n B i o t e c h n o l o g y A s s o c i a t e s , I n c . , B i r m i n g h a m , A L) を使用してマウス抗 E C D ^{H E R 2} I g G 1、I g G 2 a 及び I g G 3 応答を E L I S A により分析した。

【 0 1 3 9 】

T U B O 及び S K - B R - 3 i n v i t r o 増殖アッセイ

I M D M (L - グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン及び 5 % ウシ胎仔血清を

添加) 100 μ l 中の TUBO 細胞 5×10^3 個又は SK-BR-3 細胞 2×10^4 個を 96 ウェル丸底組織培養プレートの各ウェルに加えた。56 で 30 分間インキュベーションすることにより各細胞レジメンからのプール血清から補体を除去した後、L-グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン及び 5% ウシ胎仔血清を加えた IMDM で希釈し、100 倍及び 300 倍の最終検量線用希釈液とした。容量 100 μ l の免疫血清を TUBO 細胞又は SK-BR-3 細胞に加えて最終容量 200 μ l / ウェルとした。これらの細胞を次に 48 時間又は 6 日間 (夫々 TUBO 及び SK-BR-3) 5% CO₂, 37 インキュベーターでインキュベーションした。インキュベーション時間の終点から 12 時間前にプレートのウェルに ³H-チミジン (ICN, Costa Mesa, CA) を最終濃度 5 μ Ci/ml となるようにパルスした。次に Micro Cell Harvester (Skatron, ノルウェー) を使用して細胞を回収し、グラスファイバーフィルター (Wallac Oy, Turku, フィンランド) に通した。活発に増殖する細胞による DNA への ³H-チミジン取込みを 1205 Betaplate Liquid Scintillation Counter (Wallac Oy, Turku, フィンランド) で測定した。全アッセイは 3 回ずつ実施した。

【0140】

培養 TUBO 細胞は SK-BR-3 細胞に比較して迅速に増殖するので、TUBO 細胞 *in vitro* アッセイに必要な細胞数のほうが少なく、インキュベーション時間が短くてすむ。本データは免疫血清と共にインキュベーション後の TUBO 細胞又は SK-BR-3 細胞による ³H-チミジン取込み (CPM) として示す。ハーセプチンと同一の可変領域を含む IgG3 は SK-BR-3 の *in vitro* 増殖を阻害するのに有効であるので、陽性対照として使用した。TUBO 細胞で使用するのに利用可能な陽性対照は入手できなかった。

【0141】

免疫血清の移行

マウスをランダムに各群 6 頭ずつに分けた。-1 日目にナイーブマウスにプール免疫血清 175 μ l を静脈内注射した。0 日目に HBSS (GIBCO BRL, Life Technologies, Rockville, MD) 150 μ l 中 TUBO 細胞 10^6 個をマウスの右脇腹に注射した。同齢の未処置マウス群も TUBO 細胞で攻撃した。腫瘍増殖をモニターし、7 日目から 21 日目まで 3 日毎にキャリパーで測定した。

【0142】

マウス脾細胞単離、可溶性 ECD^{H E R}2 蛋白質による刺激及び IFN- 定量

ワクチン接種マウスからの脾臓を抽出してプールし、無菌法を使用してすりガラス試料スライドで解離した。分離した脾細胞を 100 μ m セルストレーナー (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) に通して大型破片を除去した。赤血球 (RBC) を脱イオン水中 0.85% 塩化アンモニウムに溶解した。50 IU/ml マウス IL-2 (Peprotech, Inc., Rocky Hill, NJ)、10% 胎仔ウシ血清及び 1 μ g/ml 可溶性 ECD^{H E R}2 蛋白質を加えた RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD) と共に脾細胞 5×10^6 個/ml / ウェルを 24 ウェル組織培養プレートのウェルに加えた。ウェル内容物を 5% CO₂, 37 インキュベーターでインキュベーションした。84 時間後にウェルに ³H-チミジン 5 μ Ci を最終濃度約 5 μ Ci/ml まで 12 時間 (合計刺激時間 96 時間) パルスした。24 ウェル組織培養プレートの単一ウェルからの細胞を 96 ウェル丸底組織培養プレートのウェル 4 個ずつに移し、回収した。DNA への ³H-チミジン取込みを上記のように測定した。本データは実験ウェルの平均 ³H CPM を対照ウェル (PBS をワクチン接種したマウスの脾細胞) の平均 ³H CPM で割った値として定義される刺激指数 (SI) として表す。

【0143】

IFN- 分泌レベルを測定するために、24 ウェル組織培養プレートの単一ウェルからの上清を 36 時間及び 84 時間刺激後に取出し、抗 IFN- 捕獲抗体 (PharMi 50

ngen, San Diego, CA)を予めコートした96ウェルマイクロタイタープレートのウェル2個ずつに加えた。上清を系列希釈(2倍)し、4で一晩放置した。翌日、プレートを洗浄し、検出用AP標識抗体(PharMingen, San Diego, CA)を加えた。次にプレートを37で1時間放置した。洗浄後にジエタノールアミン緩衝液(Sigma Chemical, St. Louis, MO)に溶かしたp-ニトロフェニルリン酸2ナトリウムをウェルに加え、プレートを410nmで読取った。各プレートで作成したIFN- γ (PharMingen, San Diego, CA)標準曲線を使用して結果の定量を行った。この読取りからのデータはIFN- γ 濃度(pg/ml)からバックグラウンド(PBS対照)レベルを差し引いた値として示す。

【0144】

統計分析

生存率曲線でPeto-Peto-Wilcoxon Testを使用した以外は、本実施例の全統計分析はMann-Whitney Rank Testを使用して実施した。いずれの場合も、p値が0.05の場合に結果が有意であるとみなした。

【0145】

実施例Iの結果

EC D^{H E R 2} ワクチン接種と抗腫瘍活性

BALB/cマウスに0週目と5週目に(上記のように)PBS、EC D^{H E R 2} 単独、EC D^{H E R 2} + IgG3、EC D^{H E R 2} + IgG3 - (GMCSF)、EC D^{H E R 2} + IgG3 - (IL-2)又はEC D^{H E R 2} + IgG3 - (IL-12)を皮下ワクチン接種した。ワクチン接種期間を通して明白な副作用は観察されなかった。初回ワクチン接種から8週間後にTUBO細胞10⁶個をワクチン接種マウスの左脇腹に皮下注射した。攻撃から7日後に、PBS、EC D^{H E R 2} 単独及びEC D^{H E R 2} + IgG3をワクチン接種した全マウスに測定可能な腫瘍が存在したが、EC D^{H E R 2} + IgG3 - (GMCSF)又はEC D^{H E R 2} + IgG3 - (IL-12)ワクチン接種マウス群の8頭のうちの2頭とEC D^{H E R 2} + IgG3 - (IL-2)ワクチン接種マウスの7頭のうちの5頭は腫瘍を示さなかった。図3a参照。腫瘍は全PBS投与マウスで均等に進行的に増殖したが、EC D^{H E R 2} 単独及びEC D^{H E R 2} + IgG3をワクチン接種したマウスは腫瘍サイズのばらつきを示した。EC D^{H E R 2} + 抗体-免疫刺激剤融合蛋白質をワクチン接種したマウスの腫瘍は指定日内では小さいままであるか又は存在しなかった。図3a参照。

【0146】

図3はTUBOで攻撃したワクチン接種マウスにおける腫瘍増殖を示す。上述のように、雌性BALB/cマウス8頭からなる群に-56日目と-21日目にPBS(図3の参照)、EC D^{H E R 2} 蛋白質単独(図3の参照)、EC D^{H E R 2} + IgG3(図3の参照)、EC D^{H E R 2} + IgG3 - (GMCSF)(図3の参照)、EC D^{H E R 2} + IgG3 - (IL-2)(図3の黒四角参照)又はEC D^{H E R 2} + IgG3 - (IL-12)(図3の参照)を皮下ワクチン接種した。この場合も、上述のように、0日目にTUBO細胞10⁶個をマウスの左脇腹に皮下注射した。7日目から19日目まで3日毎に個体(図3A)又は平均(図3B)の平均腫瘍サイズを測定した。図3Cはマウスの生存率曲線を示す。検査時に直径が1.5cmを越える腫瘍をもつマウスを安楽死させ、攻撃に耐えなかったとみなした。110日目に腫瘍をもたないマウスを(*)により示す。

【0147】

19日目にEC D^{H E R 2} 単独及びEC D^{H E R 2} + IgG3ワクチン接種マウスはPBS対照に比較して腫瘍の縮小(p<0.02)が明白であった。図3b参照。EC D^{H E R 2} + IgG3 - (GMCSF)をワクチン接種したマウス又はEC D^{H E R 2} + IgG3 - (IL-2)をワクチン接種したマウスでは全指定日内で腫瘍サイズが有意に小さかった(PBS、EC D^{H E R 2} 単独又はEC D^{H E R 2} + IgG3をワクチン接種したマウスに比較してp=0.05)。図3B参照。EC D^{H E R 2} + IgG3 - (IL-1

10

20

30

40

50

2) をワクチン接種したマウスの平均腫瘍サイズはPBS、ECD^{H E R 2} 単独、又はECD^{H E R 2} + IgG3をワクチン接種したマウスよりも小さかったが、有意に小さい腫瘍が観察されたのは13、16及び19日目のみであった ($p < 0.05$)。図3B参照。

【0148】

この場合も、検査時に直径が1.5cmを越える腫瘍をもつマウスを安楽死させ、TUBO攻撃に耐えなかったとみなした。これを考慮した生存率曲線から明らかなように、ECD^{H E R 2} を抗体-免疫刺激剤融合蛋白質と併用したワクチン接種レジメンのほうが優れている (ECD^{H E R 2} 単独又はECD^{H E R 2} + IgG3をワクチン接種したマウスに比較して $p < 0.05$)。図3C参照。ECD^{H E R 2} + IgG3とECD^{H E R 2} 単独をワクチン接種したマウスの間に有意差は観察されなかった ($p = 0.20$)。攻撃後110日目に、ECD^{H E R 2} + IgG3 - (GMCSF) 又はECD^{H E R 2} + IgG3 - (IL-2) をワクチン接種したマウス8頭のうちの1頭とECD^{H E R 2} + IgG3 - (IL-12) をワクチン接種したマウス8頭のうちの2頭は腫瘍発生を示さなかった。図3c参照 (星印で示す)。

10

【0149】

マウス抗ECD^{H E R 2} による *in vitro* 腫瘍増殖阻害に対する (TUBO細胞でなく) SK-BR-3細胞の感受性

抗ECD^{H E R 2} 抗体による腫瘍増殖阻害に対するTUBO細胞とSK-BR-3細胞の感受性を調べるために *in vitro* 増殖アッセイを実施した。TUBO細胞をワクチン接種マウスの免疫血清と共にインキュベーションした場合には細胞増殖阻害は検出されなかった。図4a参照。SK-BR-3細胞の場合には、免疫血清は有意抗増殖活性を示した (図4b参照)。図5から明らかなように、細胞増殖阻害レベルは抗ECD^{H E R 2} IgGレベルに相関した。ECD^{H E R 2} + IgG3 - (GMCSF) 及びECD^{H E R 2} + IgG3 - (IL2) をワクチン接種したマウスからの免疫血清は高い増殖阻害を示し、ECD^{H E R 2} + IgG3 - (IL-12) をワクチン接種したマウスからの免疫血清は弱い阻害しか誘発しなかったが、低い血清希釈倍率でECD^{H E R 2} + IgG3 及びECD^{H E R 2} 単独をワクチン接種したマウスの阻害よりもまだ高かった。

20

【0150】

図4はTUBO細胞とSK-BR-3細胞の *in vitro* 増殖に及ぼす血清の影響を示す。TUBO又はSK-BR-3細胞をTUBO細胞攻撃の2日前にワクチン接種マウスから採取した補体不活化プール免疫血清と共にインキュベーションした。インキュベーション終了の12時間前にウェルに³H-チミジンをパルスした。図4Aのデータは100倍希釈免疫血清と共に48時間インキュベーション後にTUBO細胞に取込まれた³H-チミジン (CPM) を示し、図4Bのデータは100倍及び300倍 (図4c) 希釈免疫血清と共にインキュベーションした場合にSK-BR-3細胞に取込まれた³H-チミジンレベル (CPM) を示す。誤差線は得られた数値の範囲を示す。

30

【0151】

図5はマウス抗ECD^{H E R 2} 抗体応答を示す。TUBO細胞攻撃の2日前に採取したワクチン接種マウスからの血液試料を集め、血清をプールした。プール血清の抗ECD^{H E R 2} IgGレベルをELISAにより試験した。PBS対照ウェルの抗ECD^{H E R 2} IgGレベルは検出不能であったので、ブランクとして使用した。図5の数値は指定血清希釈倍率におけるウェル2個のOD_{410nm}の平均強度を示す。誤差線は2個の数値の範囲を示す。

40

【0152】

免疫血清の受動的移行

抗ECD抗体がTUBO細胞の増殖を *in vitro* 阻害できないことから、TUBO細胞に対して有効な抗腫瘍応答を誘発するには恐らく *in vivo* 環境が必要であるのではないかと考えられた。この可能性を試験するために、ナイーブマウスにプール免疫血清を静脈内注射した後、翌日にTUBO細胞10⁶個を皮下攻撃投与した。腫瘍増殖を

50

モニターし、攻撃後7日目から21日目まで3日毎にキャリパーで測定した。PBS、ECD^{H E R 2}単独及びECD^{H E R 2}+IgG3をワクチン接種したマウスからの血清を注射したマウスは実験期間を通して明白な抗腫瘍活性を示さなかった。下表I参照。未処置マウスと比較してECD^{H E R 2}+抗体融合蛋白質をワクチン接種したマウスは指定日に観察された平均腫瘍サイズが小さかった。他方、ECD^{H E R 2}+IgG3-(GMCSF)をワクチン接種したマウスからの血清を注射したマウスでは13日目のみに有意に小さい腫瘍が観察された(未処置マウスと比較してp=0.03)。ECD^{H E R 2}+IgG3-(IL-2)をワクチン接種したマウスからの血清を注射したマウスは16日目と19日目に有意に小さい腫瘍を示した(未処置マウスと比較して夫々p=0.03及びp=0.05)。ECD^{H E R 2}+IgG3-(IL-12)をワクチン接種したマウスからの血清を注射したマウスは13、16、19及び21日目に有意に小さい腫瘍を示した(未処置マウスと比較してp=0.05)。表I参照。

10

【0153】

【表1】

表1. 受動的免疫移行*

群	平均腫瘍サイズ(mm ³)					
	7日	10日	13日	16日	19日	21日
対照	51	219	439	771	1045	1581
PBS	50	184	452	589	983	1468
ECD	93	160	451	595	932	1681
IgG3	54	316	432	699	1242	1604
IgG3-(GM-CSF)	52	140	233	510	897	1077
IgG3-(IL-2)	39	150	261	381	605	977
IgG3-(IL-12)	19	135	161	382	482	804

*雌性BALB/cマウス6頭の各群にプール免疫血清175μlをiv注射した。翌日、0日目にTUBO細胞10⁶個を右脇腹にs.c注射した。腫瘍増殖を試験し、7日目から21日まで3日毎に測定した。下線太字で示す数値は未処置マウスの平均腫瘍サイズと比較してp値が≤0.05である各群のマウスの平均腫瘍サイズを示す。

20

【0154】

移行免疫血清の抗ECD^{H E R 2}抗体の特性決定

移行免疫血清の抗ECD^{H E R 2}IgG1、IgG2a及びIgG3レベルを分析した。ECD^{H E R 2}+IgG3-(GMCSF)とECD^{H E R 2}+IgG3-(IL-2)をワクチン接種したマウスのプール血清はECD^{H E R 2}+IgG3-(IL-12)、ECD^{H E R 2}+IgG3又はECD^{H E R 2}単独をワクチン接種したマウスのプール血清と比較して高レベルの抗ECD^{H E R 2}IgG1を示した。図6a参照。これに対して、抗ECD^{H E R 2}IgG2a応答はECD+IgG3-(IL-12)をワクチン接種したマウスのプール血清が著しく高く、ECD^{H E R 2}+IgG3-(IL-2)をワクチン接種したマウスの応答は低く、ECD^{H E R 2}+IgG3-(GMCSF)では更に低レベルであった。図6b参照。ECD^{H E R 2}単独をワクチン接種したマウスのプール血清ではECD^{H E R 2}+IgG3-(IL-2)をワクチン接種したマウスと比較して実質的な抗ECD^{H E R 2}IgG2aレベルが検出されたが、ECD^{H E R 2}+IgG3をワクチン接種したマウスでは抗ECD^{H E R 2}IgG2aは殆ど又は全く検出されなかった。各マウスの血清を分析した結果、(ECD^{H E R 2}単独をワクチン接種したマウス8頭のうちで)過剰反応マウス1頭が検出可能な抗ECD^{H E R 2}IgG2a応答を示した。他の7頭のマウスでは検出可能な抗ECD^{H E R 2}IgG2a応答は殆ど又は全く検出されなかった。表II参照。抗ECD^{H E R 2}IgG3レベルは抗ECD^{H E R 2}IgG2aレベルと同様であったが、ECD^{H E R 2}単独をワクチン接種したマウスのプール血清ではECD^{H E R 2}+IgG3をワクチン接種したマウスのプール血清と比較して高レベルの抗ECD^{H E R 2}IgG3は観察されなかった。図6c参照。

30

40

【0155】

【表 2】

表II.マウス抗ECD^{HER2}IgG2a 力価*

マウス番号	PBS	ECD	IgG3	IgG3- (GMCSF)	IgG3- (IL-2)	IgG3- (IL-12)
1	0 ^b	0 ^b	0 ^b	200	200	800
2	0 ^b	8100	0 ^b	100	0 ^b	800
3	0 ^b	0 ^b	0 ^b	200	3200	800
4	0 ^b	0 ^b	0 ^b	200	100	6400
5	0 ^b	0 ^b	0 ^b	100	100	6400
6	0 ^b	0 ^b	0 ^b	100	100	1600
7	0 ^b	0 ^b	0 ^b	100	800	800
8	0 ^b	0 ^b	0 ^b	100	200	800
平均値	0	1013	0	175	586	2300

* 雌性BALB/cマウス8頭の各群の右脇腹にPBS、ECD^{HER2}単独、ECD^{HER2}+IgG3、ECD^{HER2}+IgG3-(GM-CSF)、ECD^{HER2}+IgG3-(IL-2)、又はECD^{HER2}+IgG3-(IL-12)を0週目と5週目にs.c.注射した。8週目に血液試料を採取し、各マウスからの血清の抗ECD^{HER2}IgG2a力価をELISAにより試験した。数値は時間インキュベーション後に吸光度OD_{410nm}≥0.05とするために必要な血清希釈倍率の2回の平均値を表す。

^b 50倍の初期血清希釈倍率でOD_{410nm}<0.05の吸光度。

10

【0156】

上記に説明したように、図6は移行免疫血清の抗ECD^{HER2}IgGの特性決定を示す。ワクチン接種マウスからの移行プール血清の抗ECD^{HER2}IgG1(図6a参照)、IgG2a(図6b参照)、及びIgG3(図6c参照)レベルをELISAにより試験した。数値は夫々1000倍、50倍、及び50倍血清希釈倍率の2個のウェルのOD_{410nm}の平均強度を表す。PBS対照をブランクとして使用した。誤差線は2個の数値の範囲を示す。

【0157】

ECD^{HER2}蛋白質によるワクチン接種マウスからの脾細胞の*in vitro*刺激
ワクチン接種マウスで誘発される細胞性免疫応答を測定するために、可溶性ECD^{HER2}蛋白質と共にインキュベーション後に脾細胞が*in vitro*増殖する能力を評価した。DNAへの³H-チミジン取込みにより増殖を測定した。48時間インキュベーション後に、ECD^{HER2}+IgG3-(GMCSF)をワクチン接種したマウスからの脾細胞には有意増殖が検出され、ECD^{HER2}+IgG3-(IL-2)をワクチン接種したマウスからの脾細胞ではそれよりも弱い増殖が検出された。脾細胞がECD^{HER2}+IgG3-(IL-12)、ECD^{HER2}単独又はECD^{HER2}+IgG3をワクチン接種したマウスに由来する場合には非常に弱い刺激しか観察されなかった。図7a参照。可溶性ECD^{HER2}蛋白質と共に96時間インキュベーション後にも同様の結果が観察された。図7b参照。

20

30

【0158】

図7はECD^{HER2}蛋白質による脾細胞増殖の*in vitro*刺激を示す。ワクチン接種マウスからのプール脾細胞を24ウェル組織培養プレートで可溶性ECD^{HER2}と共にインキュベーションし、インキュベーション時間(即ち図7aに示すように48時間又は図7bに示すように96時間)の終了の12時間前に³H-チミジンをパルスした。24ウェル組織培養プレートの単一ウェルからの細胞を96ウェル丸底組織培養プレートのウェル4個ずつに移し、セルハーベスターで回収した。シンチレーションカウンターを使用して³H-チミジン取込み(CPM)を測定した。図7のデータは(上記に定義したような)刺激指数(SI)として表す。誤差線は4回の測定から得られた数値の範囲を表す。

40

【0159】

刺激脾細胞のIFN- 産生

可溶性ECD^{HER2}蛋白質と共にインキュベーションした脾細胞の上清のT_H1又はT_H2サイトカイン、IFN- 及びIL-4のレベルを試験した。例えばArai, K. I.ら, 1990 "Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses" Annu Rev Biochem 59: 783+参照。36時間の刺激時間後に、ワクチン接種マウスからの脾細胞の上清にはPBS対照に比較してIFN- 産生の増加が検出され、レベルはECD^{HER2}+IgG3-(GMCSF)>ECD^{HER2}+IgG3-(IL-2)>

50

$EC D^{HER2} + IgG3 - (IL - 12) > EC D^{HER2} + IgG3 > EC D^{HER2}$
 2 単独の順であった。図 8 a 参照。PBS を投与したマウスからの脾細胞を使用した場合には IFN - γ を検出することができなかった。84 時間刺激後に、 $EC D^{HER2} + IgG3 - (GMCSF)$ をワクチン接種したマウスからの脾細胞の上清には更に IFN - γ 産生の増加が検出された。産生ピークは約 1,500 pg/ml であった。図 8 b 参照。 $EC D^{HER2} + IgG3 - (IL - 2)$ をワクチン接種したマウスの上清では多少の IFN - γ 増加が観察されたが、 $EC D^{HER2} + IgG3 - (IL - 12)$ 、 $EC D^{HER2}$ 単独又は $EC D^{HER2} + IgG3$ をワクチン接種したマウスからの脾細胞の上清では増加は殆ど又は全く認められなかった。図 6 b 参照。36 時間後に全上清中の IL - 4 レベルはアッセイ感度を下回った (< 30 pg/ml, データは示さず)。しかし、84 時間後には $EC D^{HER2} + IgG3 - (GMCSF)$ をワクチン接種したマウスからの脾細胞の上清のみで低い IL - 4 レベルを観察することができた (36 pg/ml)。

10

【0160】

図 8 はワクチン接種マウスからの脾細胞 (刺激後) による *in vitro* IFN - γ 産生を示す。可溶性 $EC D^{HER2}$ と共に 36 時間 (図 8 a) 又は 84 時間 (図 8 b) インキュベーション後にワクチン接種マウスの脾細胞からの上清を回収し、サンドイッチ ELISA を使用して IFN - γ 分泌レベルを定量した。各プレートで標準曲線を作成し、IFN - γ 濃度 (pg/ml) からバックグラウンド (PBS 対照) レベルを差し引いた数値として表した。誤差線は 2 個の数値の範囲を表す。

【0161】

実施例 II : 黄色ブドウ球菌ビルレンス因子プロテイン A に対する免疫応答を増強するための抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質の使用

プロテイン A と抗体 - 免疫刺激剤融合蛋白質

上記に要約したように、ヒト腫瘍関連抗原 HER2/neu の細胞外ドメイン ($EC D^{HER2}$) に特異的な抗体 - 免疫刺激剤 (例えばサイトカイン) 融合蛋白質を構築し、その作用を特性決定した。このような融合蛋白質は (トラスツズマブ (ハーセプチン, Genentech, San Francisco, CA) の可変領域を含む) ヒト IgG3 を免疫刺激性サイトカインであるインターロイキン - 2 (IL - 2)、インターロイキン - 12 (IL - 12)、又は顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子 (GMCSF) と遺伝子工学的に融合することにより構成した。Penichet, M. L. and Morrison, S. L. 2001, "Antibody - cytokine fusion proteins for the therapy of cancer" *J Immunol Methods* 248: 91 - 101; Peng, L. S. ら, 1999, "A single - chain IL - 12 IgG3 antibody fusion protein retains antibody specificity and IL - 12 bioactivity and demonstrates antitumor activity" *J Immunol* 163: 250 - 8; 及び Dela Cruz, J. S. ら, 2000, "Recombinant anti - human HER2/neu IgG3 - (GMCSF) fusion protein retains antigen specificity, cytokine function and demonstrates anti - tumor activity" *J Immunol* 165: 5112 - 21 参照。

30

40

【0162】

抗 HER2/neu 融合蛋白質の特性決定 (即ち上記参照) を行う過程で、ハーセプチンの可変領域を含む抗体はプロテイン A と結合することが判明した。他のアイソタイプとは異なり、ヒト IgG3 はプロテイン A と結合しないのでこの知見は意外であった。このような結合は抗体の可変領域を介して生じることが判明した (Penichet ら, 未発表結果)。この知見はハーセプチン可変領域が $V_H 3$ 遺伝子ファミリーによりコードされるという最近の報告と一致した (Meininger, D. P. ら, 2000 "Characterization of the binding interface be

50

tween the E-domain of Staphylococcal protein A and an antibody Fv-fragment" *Biochemistry* 39:26-36 参照)。

【0163】

上述のように、 V_H 3領域をもつ抗体はその可変領域の「フレームワーク」を介してプロテインAと結合する。しかし、プロテインA結合部位は古典的なFc部位とは異なることに留意しなければならない(Tashiro M.ら, 1995, "Structures of bacterial immunoglobulin-binding domains and their complexes with immunoglobulins" *Curr Opin Struct Biol* 4:471-81; Vidal M.A.ら, 1985 "Alternative mechanism of protein A-immunoglobulin interaction the V_H -associated reactivity of a monoclonal human IgM" *J Immunol* 135:1232-8; Graille M.ら, 2000, "Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity" *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5399-404 参照)。従って、開発された抗HER2/neu融合蛋白質(例えば実施例Iに例証するもの)は「抗プロテインA」融合蛋白質の1類としても作用する。

【0164】

抗体融合蛋白質の2種(即ち実施例Iで使用したように抗HER2/neu IgG3-(IL-2)と抗HER2/neu IgG3-(GMCSF))を使用することにより可溶性プロテインAと結合できることを利用し、このような抗体-免疫刺激剤融合蛋白質がプロテインA細菌抗原の免疫原性を増強できるか否かを調べた。

【0165】

材料と方法

マウス

雌性BALB/cマウス(6~8週齢)をTaconic Farms (German town, NY)から購入した。1群のマウスに抗体又は抗体-免疫刺激剤融合蛋白質の存在下又は不在下に可溶性プロテインAを皮下注射した。別の群のマウスには対照としてPBS単独を注射した。各群のマウスは合計8頭/群とした。

【0166】

可溶性プロテインAによるワクチン接種

可溶性プロテインA(P4931, Sigma, St. Louis, MO) 5 μ gを1XPBS(リン酸緩衝食塩水)中にてIgG3=20 μ gに等価の抗体モル比で抗HER2/neu IgG3(免疫刺激剤と融合せずに抗体単独)、抗HER2/neu IgG3-(GMCSF)又は抗HER2/neu IgG3-(IL-2)20 μ gと共に一晩4 $^{\circ}$ Cでインキュベーションした。翌日、混合物のサンプルをマウスの右脇腹に皮下注射した。各マウスの同一脇腹に5週間ブースター注射した。

【0167】

酵素免疫法(ELISA)アッセイ用血清の作製

免疫後、マウスから8週間毎週採血した。血液を集めて4 $^{\circ}$ Cで一晩保存した。翌日、血清を集めて-20 $^{\circ}$ Cで保存した。各群の全マウスの血清をプールし、血清試験用として150倍に希釈した。

【0168】

ELISAを使用した血清試験

ELISAを使用してマウスで発生した可溶性プロテインAとCowan I(不溶性

表面蛋白質プロテイン A を発現する黄色ブドウ球菌の標準株) に対する抗体応答のレベルを試験した。

【0169】

10% m/v ホルマリンで殺菌した Cowan I (P7155, Sigma) の溶液を炭酸緩衝液で希釈し(約235倍)、 $OD_{650nm} = 0.1$ とした。これを96ウェルプレート(Immulon-2, Dynatex Technologies, Chantilly, VA)に50 μ l/ウェルで加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベーションした。プロテイン A (P3838, Sigma, St. Louis, MO) を炭酸緩衝液で希釈し、最終濃度1 μ g/mlとした。希釈したプロテイン A を96ウェルプレートに50 μ l/ウェルで加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベーションした。3%ウサギ血清のPBS溶液を希釈剤及びブロッキング溶液として使用し、マウス抗体が抗体のFc又はFab領域を介してプロテイン A と結合しないようにした。PBS中3%ウサギ血清と共にインキュベーションすると、マウス抗体がFc又はFab領域を介してプロテイン A と結合するのを阻止するのに極めて有効であることは既に分かっている(Penichetら, 未発表結果)。ブロッキングにより、本実施例で検出される抗体結合はプロテイン A の各種エピトープに特異的である。集めたマウス血清をPBS中1%BSA(ウシ血清アルブミン)で450倍に希釈し、各ウェルに容量50 μ lを加えた後、2倍系列希釈した。Cowan I に固相化した不溶性プロテイン A と可溶性プロテイン A に対して高い抗体力価を示すプール抗血清をPBS中1%BSAで1350倍に希釈し、陽性対照として使用した。20,000倍に希釈したアルカリホスファターゼ(AP)標識ヤギ抗マウスIgGを使用して結合マウスIgGを検出した。96ウェルプレートをPBSで4回洗浄し、(ジエタノールアミン緩衝液に溶かした)AP-基質を容量50 μ l/ウェルでプレートに加えた。PBS単独をワクチン接種したマウスの血清を対照とし、ブランクとして使用し、410nmの吸光度を測定した。

10

20

【0170】

結果

可溶性プロテイン A をコートしたプレートを使用した抗体免疫応答の検出

図9に示すように、PBS中可溶性プロテイン A (SPA) 又はIgG3、IgG3-(GMCSF)及びIgG3-(IL-2)をワクチン接種したマウスからの血清を免疫後8週間毎週採取し、プールした。可溶性プロテイン A をコートしたプレートを使用して試料の抗プロテイン A 応答をELISAにより(2個ずつ)アッセイした。PBS単独を投与したマウスから構成される陰性対照群をブランクとして使用した。図9のデータは2個のウェルの平均 OD_{410} として示す。ブースター(初回ワクチン接種から5週間後に投与)を矢印で示す。

30

【0171】

図9から明らかのように、IgG3及びIgG3-(IL-2)群はいずれもブースター前はPBS群と比較してプロテイン A に対して高い抗体応答を示さなかった。他方、IgG3-(GMCSF)群は高い抗プロテイン A 応答を示した。ブースター投与後、IgG3、IgG3-(GMCSF)、及びIgG3-(IL-2)群はPBS群に比較して高い抗プロテイン A 応答を示すことができた。更に、ブースター投与後には、IgG3-(GMCSF)群はIgG3及びIgG3-(IL-2)群の両者に比較して最高の抗プロテイン A 応答を示した。

40

【0172】

プロテイン A を発現するCowan Iをコートしたプレートを使用した抗体免疫後応答の検出

PBS中可溶性プロテイン A (SPA) 又はIgG3、IgG3-(GMCSF)及びIgG3-(IL-2)をワクチン接種したマウスからの血清を免疫後8週間毎週採取し、プールした。Cowan Iをコートしたプレートを使用して試料の抗プロテイン A 応答の徴候をELISAにより2個ずつアッセイした(Cowan Iの表面にプロテイン A を結合)。PBS単独を投与したマウスから構成される陰性対照群をブランクとして使

50

用した。図10のデータは2個のウェルの平均OD₄₁₀として示す。初回ワクチン接種から5週間後にブースター投与した(矢印で示す)。図10に示すように、ブースター前の数週間に高い抗プロテインA応答を発生したのはIgG3-(IL-2)群のみであった(Cowan Iの表面にプロテインAを結合)。ブースター後の数週間に後期応答の著変は認められなかった。ブースター投与後、IgG3、IgG3-(GMCSF)及びIgG3-(IL-2)群はPBS群に比較して応答を示した。更に、IgG3-(GMCSF)群はブースター後にIgG3及びIgG3-(IL-2)群の両者に比較して最高の応答を発生した。

【0173】

以上、明確に理解できるように本発明を詳細に説明したが、本発明の真の範囲を逸脱することなく形態や細部に種々の変更が可能であることは以上の開示から当業者に自明である。例えば、上記全技術及び装置は種々に組合せて使用することができる。本明細書に引用した全刊行物、特許、特許出願、又は他の文献はその開示内容全体を全目的で参考資料として組み込み、各刊行物、特許、特許出願、又は他の文献を全目的で参考資料として組み込むと個々に記載しているものとして扱う。

10

【図面の簡単な説明】

【0174】

【図1】本発明により使用される典型的抗体-免疫刺激剤融合蛋白質の模式図である。

【図2】本発明により使用される抗体融合蛋白質と可溶性抗原の免疫複合体の作製と抗原提示細胞への前記複合体の提示を示す模式図である。

20

【図3A】TUBOで攻撃したワクチン接種マウスにおける本発明の典型的融合蛋白質/抗原ワクチン接種処置の抗腫瘍活性を示す。

【図3B】TUBOで攻撃したワクチン接種マウスにおける本発明の典型的融合蛋白質/抗原ワクチン接種処置の抗腫瘍活性を示す。

【図3C】TUBOで攻撃したワクチン接種マウスにおける本発明の典型的融合蛋白質/抗原ワクチン接種処置の抗腫瘍活性を示す。

【図4】パネルA~CはTUBO及びSK-BR-3細胞の*in vitro*増殖に及ぼす血清の影響を示す。

【図5】ワクチン接種マウスにおけるマウス抗ECD^{HER2}抗体応答を示す。

【図6】パネルA~Cはワクチン接種マウスの転移免疫血清の抗ECD^{HER2}IgGの特性決定を示す。

30

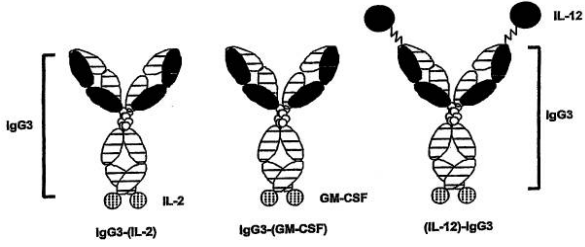
【図7】パネルA~BはECD^{HER2}蛋白質によるワクチン接種マウスの脾細胞の増殖の*in vitro*刺激を示す。

【図8】パネルA~Bはワクチン接種マウスからの脾細胞(刺激後)による*in vitro*IFN-産生を示す。

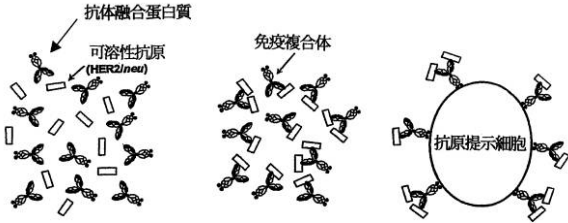
【図9】ワクチン接種マウスにおけるマウス抗プロテインA抗体応答を示す。

【図10】ワクチン接種マウスにおけるマウス抗プロテインA(Cowan Iに結合)抗体応答を示す。

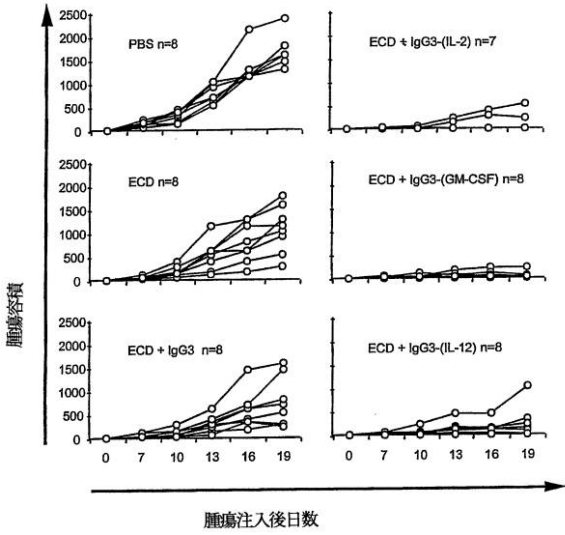
【 図 1 】



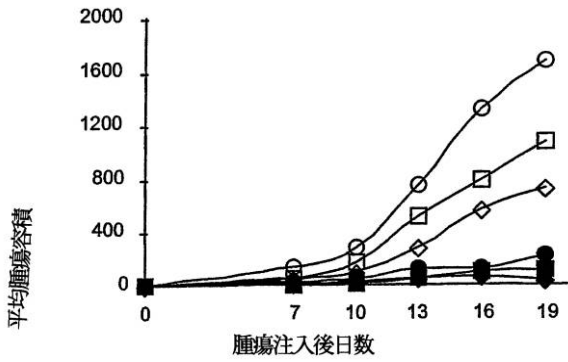
【 図 2 】



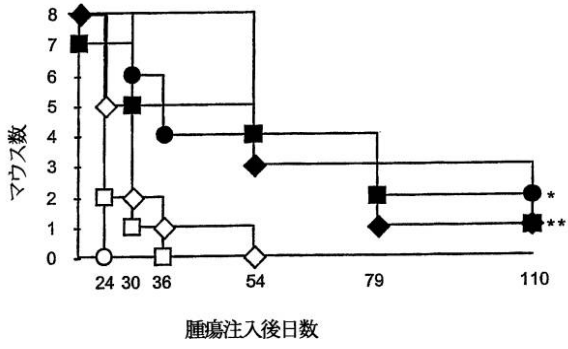
【 図 3 A 】



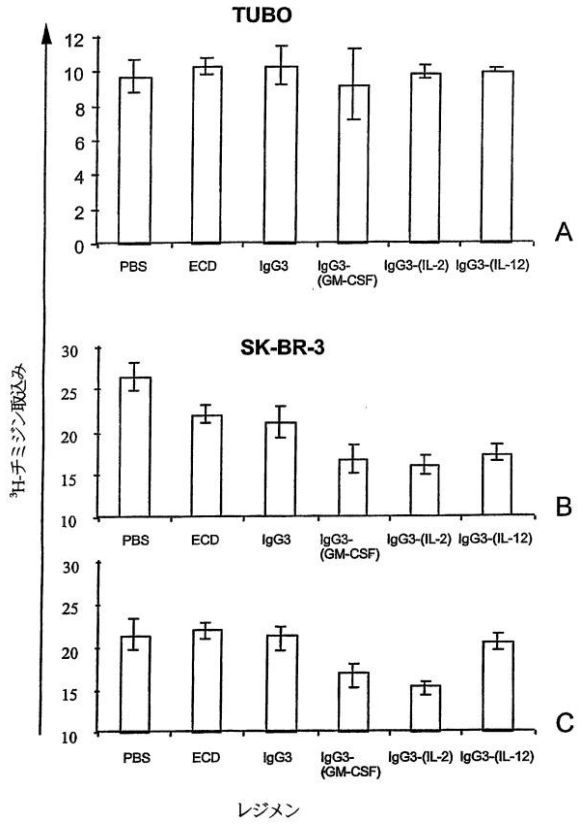
【 図 3 B 】



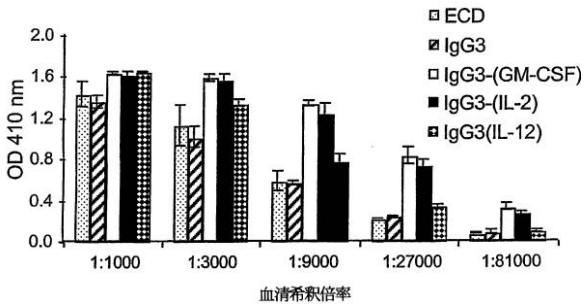
【 図 3 C 】



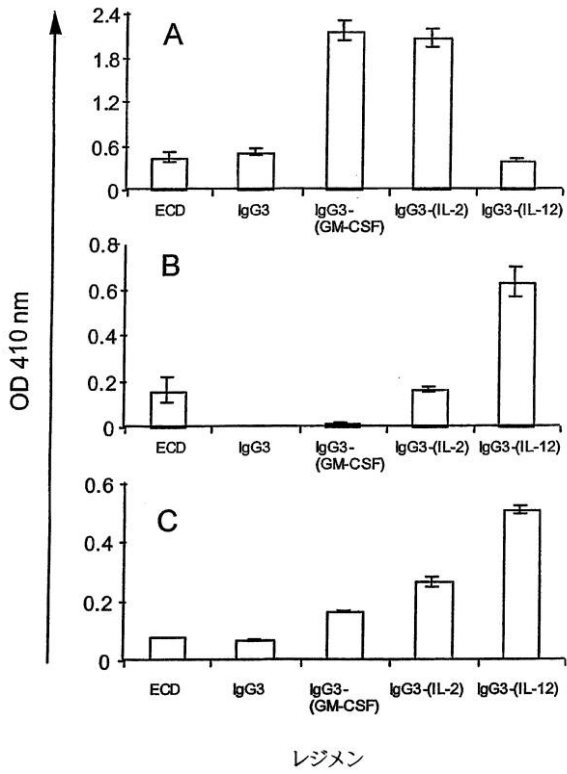
【 図 4 】



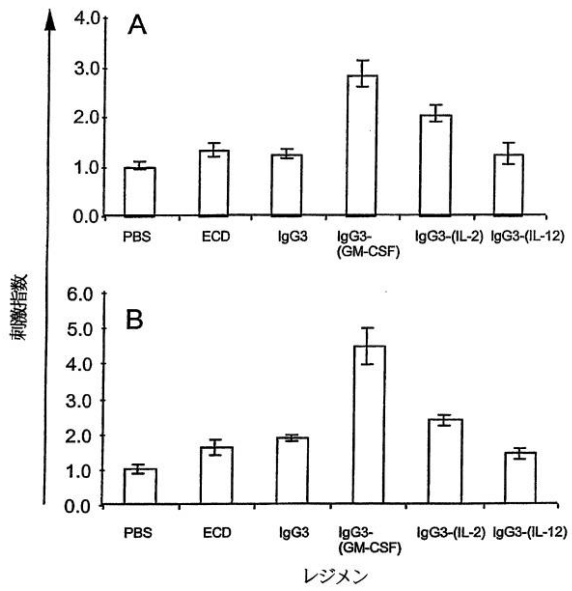
【 図 5 】



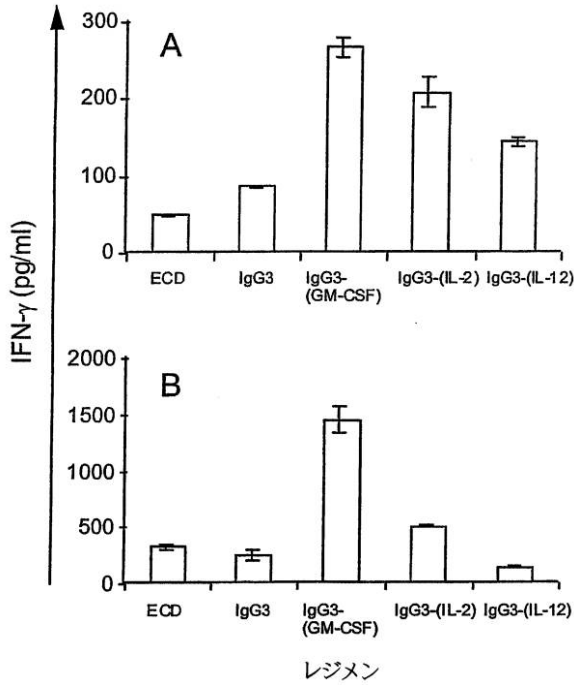
【 図 6 】



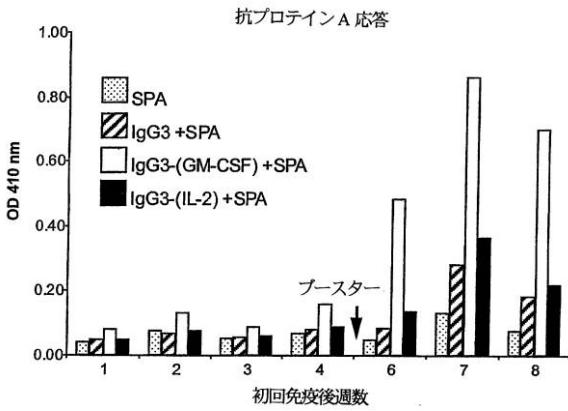
【 図 7 】



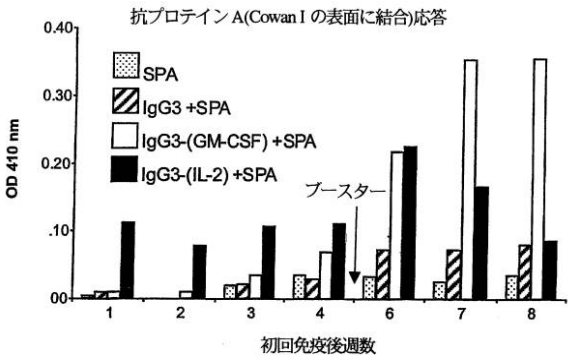
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/09136
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A61K 38/19, 39/00, 39/395; C07K 14/52, 16/28, 16/30		
US CL : 530/351, 387.3, 388.1, 388.33, 388.3; 424/85.1, 134.1, 141.1, 143.1, 152.1, 172.1, 174.1, 192.1		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/351, 387.3, 388.1, 388.33, 388.3; 424/85.1, 134.1, 141.1, 143.1, 152.1, 172.1, 174.1, 192.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HARVILL et al. In Vivo Properties of an IgG3-IL-2 Fusion Protein. J. Immunol. 1996, Vol 157, pages 3165-3170, see entire document.	1-54
Y	PENG et al. A Single-Chain IL-12 IgG3 Antibody Fusion Protein Retains Antibody Specificity and IL-12 Bioactivity and Demonstrates Antitumor Activity. J. Immunol. 1999, Vol 163, pages 250-258, see entire document.	1-54
Y	DELA CRUZ et al. Recombinant Anti-Human HER2/neu IgG3-(GM-CSF) Fusion Protein Retains Antigen Specificity and Cytokine Function and Demonstrates Antitumor Activity. J. Immunol. 2000, Vol 165, pages 5112-5121, see entire document.	1-54
Y	PENICHERET et al. A recombinant IgG3-(IL-2) fusion protein for the treatment of human HER2/neu expressing tumors. Human Antibodies. 2001, Vol 10, pages 43-49, see entire document.	1-54
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "&" document member of the same patent family		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 18 June 2003 (18.06.2003)		Date of mailing of the international search report 31 JUL 2003
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Jessica H. Roark</i> Jessica H. Roark Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/09136

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST, MEDLINE

search terms: Inventor's names, immunofusion, immunoadhesin, tumor, antibody-cytokine, chemokine

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/12	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 39/39	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	C
A 6 1 P 31/00	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 31/10	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 P 31/12	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 33/00	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 37/04	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 P 37/00	
	A 6 1 P 37/04	
	A 6 1 P 43/00	1 1 1
	A 6 1 P 43/00	1 2 1
	A 6 1 K 37/66	F

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 シェリー・エル・モリソン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 0 0 4 9 ロス アンゼルス デンスロー アヴェニュー
 2 5 8

(72) 発明者 リザン・ペング
 アメリカ合衆国 アリゾナ州 8 5 7 1 9 ツスコン イースト ハンプトン ストリート 2 2
 2 5

(72) 発明者 クルーズ・ジャイ・デラ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 0 3 0 1 イングルウッド イースト ナインティナイン
 ス ストリート 6 2 6 アpartment イー

F ターム(参考) 4C084 AA01 AA02 AA06 AA27 BA41 BA44 CA18 DA01 DA12 DA21
 DA22 DA24 DA25 DA39 MA02 MA05 NA05 NA13 NA14 ZB021
 ZB071 ZB091 ZB092 ZB211 ZB261 ZB321 ZB331 ZB351 ZB371 ZC411
 ZC511 ZC751
 4C085 AA02 AA03 AA13 AA14 AA15 AA21 AA34 AA37 AA38 BA01
 BA07 BA48 BA49 BA51 BB01 BB31 CC02 DD86 EE01 EE03
 EE06