

(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2009-522372

(P2009-522372A)

(43) 公表日 平成21年6月11日(2009.6.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/00 H	4 B 0 2 4
<b>C 1 2 N 5/06 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 E	4 B 0 6 5
<b>A 6 1 P 31/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/00	4 C 0 7 6
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 47/34 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/34	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-549617 (P2008-549617)  
 (86) (22) 出願日 平成19年1月9日 (2007.1.9)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年8月27日 (2008.8.27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/000616  
 (87) 国際公開番号 W02007/120368  
 (87) 国際公開日 平成19年10月25日 (2007.10.25)  
 (31) 優先権主張番号 60/757, 314  
 (32) 優先日 平成18年1月9日 (2006.1.9)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 592130699  
 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  
 The Regents of The  
 University of Calif  
 ornia  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 946  
 07-5200, オークランド, フラ  
 ンクリン ストリート 1111, 5テ  
 ィーエイチ フロアー  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ワクチンおよび腫瘍免疫療法のための TNFRSF、TLR、NLR、RHR、プリン受容体、およびサイトカイン受容体アゴニストの組み合わせ免疫刺激剤

## (57) 【要約】

本発明は、送達法と共に、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー (TNFRSF) アゴニスト、Toll様受容体 (TLR) アゴニスト、「NAIP、CIITA、HET-E、TP-1中に存在するドメイン (NACT)-ロイシンリッチ反復配列 (LRR)」すなわち「NLR」アゴニスト、RIG-I様ヘリカーゼすなわち「RLH」アゴニスト、プリン受容体アゴニスト、およびサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニストの組み合わせ免疫刺激剤を開示する。病変部位で単独で使用した場合、この組み合わせ剤は、病原体または新生物を除去するための宿主の液性免疫応答および細胞性免疫応答を誘導する免疫刺激を提供する。または、所定の抗原と共に使用した場合、これらの組み合わせ剤は、感染症に対する予防的および/または寛解的な治療様式、ならびに腫瘍性疾患の治療として有用な、集中的な液性および細胞性の免疫応答を誘導し得る。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下を含むワクチン：

(a) 腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー(TNFRSF)アゴニストをコードする1つまたは複数の核酸；ならびに

(b) Toll様受容体(TLR)アゴニスト、NAIP、CIITA、HET-E、TP-1中に存在するドメイン(NACHT)-ロイシンリッチ反復配列(LRR)すなわちNLRアゴニスト、RIG様ヘリカーゼ(RLH)アゴニスト、サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト、プリン受容体アゴニスト、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される1つまたは複数のアゴニスト。

## 【請求項 2】

10

以下を含む、請求項1記載のワクチン：

(a) TNFRSFアゴニストをコードする1つまたは複数の核酸；

(b) 1つまたは複数のNLRアゴニスト；および

(c) 1つまたは複数のサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト。

## 【請求項 3】

以下を含む、請求項1記載のワクチン：

(a) TNFRSFアゴニストをコードする1つまたは複数の核酸；

(b) 1つまたは複数のTLRアゴニスト；および

(c) 1つまたは複数のNLRアゴニスト。

## 【請求項 4】

20

以下を含む、請求項1記載のワクチン：

(a) TNFRSFアゴニストをコードする1つまたは複数の核酸；

(b) 1つまたは複数のTLRアゴニスト；および

(c) 1つまたは複数のRLHアゴニスト。

## 【請求項 5】

以下を含む、請求項1記載のワクチン：

(a) TNFRSFアゴニストをコードする1つまたは複数の核酸；

(b) 1つまたは複数のTLRアゴニスト；

(c) 1つまたは複数のNLRアゴニスト；および

(d) 1つまたは複数のサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト。

30

## 【請求項 6】

以下を含む、請求項1記載のワクチン：

(a) TNFRSFアゴニストをコードする1つまたは複数の核酸；

(b) 1つまたは複数のTLRアゴニスト；

(c) 1つまたは複数のRLHアゴニスト；および

(d) 1つまたは複数のサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト。

## 【請求項 7】

TNFRSFアゴニストが、LTA(リンホトキシンA)、LTB(リンホトキシンB)、TNFSF4(OX-40L)、TNFSF5(CD40L)、TNFSF6(FasL)、TNFSF7(CD27LまたはCD70またはCD27L/CD70)、TNFSF8(CD30L)、TNFSF9(4-1BBL)、TNFSF10(TRAAIL)、TNFSF11(RANKL)、TNFSF12(TWEAK)、TNFSF13A(APRIL)、TNFSF13B(BAFF)、TNFSF14(LIGHT)、TNFSF15(VEG1)、TNFSF18(GITRL)、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項1~6のいずれか一項記載のワクチン。

40

## 【請求項 8】

TLRアゴニストが、TLR1~TLR11のアゴニストまたはこれらの組み合わせである、請求項1、3、4、5、および6のいずれか一項記載のワクチン。

## 【請求項 9】

NLRアゴニストが原核生物の細胞壁に由来する、請求項1~3および5のいずれか一項記載のワクチン。

## 【請求項 10】

50

RLHアゴニストが二本鎖RNAである、請求項1、4、および6のいずれか一項記載のワクチン。

【請求項11】

サイトカイン/ケモカインアゴニストが、インターロイキン、インターフェロン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、CXCLケモカイン、CXCケモカイン、Cケモカイン、CX3Cケモカイン、CCケモカイン、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項1、2、5、および6のいずれか一項記載のワクチン。

【請求項12】

プリン受容体アゴニストが細胞外ATP(ATPe)である、請求項1記載のワクチン。

【請求項13】

以下を含む組成物：

(a) 請求項1～12のいずれか一項記載のワクチン；

(b) TNFRSFアゴニスト、TLRアゴニスト、RLHアゴニスト、プリン受容体アゴニスト、およびサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニストからなる群より選択される1つもしくは複数のポリペプチドアゴニスト；ならびに/または

(c) 二本鎖RNA、 $\alpha$ -D-Glu-メソ-ジアミノピメリン酸(DAP)もしくはその誘導体、およびムラミルジペプチド(MDP)もしくはその誘導体からなる群より選択される1つもしくは複数のNLRアゴニスト。

【請求項14】

ポリエチレンイミン、カチオン性脂質、カチオン性ポリマー、 dendリマーポリマー、ポロキサミン、乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)微粒子、ポリ(アミノエステル)(PBAE)ポリマー、PLGA/PBAEエステル微粒子、ポリ[ $\alpha$ -(4-アミノブチル)- $\omega$ -グリコール酸]、ポリ(プロピレンイミン)dendリマー、ポリ乳酸、ポリエチレングリコール(PEG)化ポリ(乳酸)、乳酸-グリコール酸共重合体、ポリ(オルトエステル)、PEG化ポリ(オルトエステル)、ポリ(カプロラクトン)、PEG化ポリ(カプロラクトン)、ポリリジン、PEG化ポリリジン、ポリ(エチレンイミン)、PEG化ポリ(エチレンイミン)、ポリ(アクリル酸)、PEG化ポリ(アクリル酸)、ポリ(ウレタン)、PEG化ポリ(ウレタン)、ポリマー脂質-タンパク質-糖微粒子、細胞エンドソームの内部で加水分解性であるポリマー、自己会合粒子、およびこれらの誘導体からなる群より選択されるポリマーをさらに含む、請求項13記載の組成物。

【請求項15】

感染症または腫瘍性疾患に対する免疫治療応答を誘発する際に用いるための使用であって、それによって、対象へのアゴニストの組み合わせ剤の投与が、感染症または腫瘍性疾患に対する液性免疫応答および/または細胞性応答を誘発する、請求項1～12のいずれか一項記載のワクチンの使用。

【請求項16】

感染症または腫瘍性疾患に対する免疫治療応答を誘発する際に用いるための医薬を製造するための使用であって、それによって、対象へのアゴニストの組み合わせ剤の投与が、感染症または腫瘍性疾患に対する液性免疫応答および/または細胞性応答を誘発する、請求項1～12のいずれか一項記載のワクチンの使用。

【請求項17】

感染症または腫瘍性疾患に対する免疫治療応答を誘発する際に用いるための使用であって、それによって、対象へのアゴニストの組み合わせ剤の投与が、感染症または腫瘍性疾患に対する液性免疫応答および/または細胞性応答を誘発する、請求項13または14記載の組成物の使用。

【請求項18】

感染症または腫瘍性疾患に対する免疫治療応答を誘発する際に用いるための医薬を製造するための使用であって、それによって、対象へのアゴニストの組み合わせ剤の投与が、感染症または腫瘍性疾患に対する液性免疫応答および/または細胞性応答を誘発する、請求項13または14記載の組成物の使用。

【請求項19】

10

20

30

40

50

請求項1～12のいずれか一項記載のワクチンの治療有効量をそれを必要とする対象に投与する段階により、感染症または腫瘍性疾患を治療する方法。

【請求項20】

請求項13または14記載の組成物の治療有効量をそれを必要とする対象に投与する段階により、感染症または腫瘍性疾患を治療する方法。

【請求項21】

ワクチンまたは組成物の投与がエレクトロポレーション、微粒子銃、注射、またはこれらの組み合わせを含む、請求項19または20記載の方法。

【請求項22】

感染症または腫瘍性疾患に関連した抗原を投与する段階をさらに含む、請求項19～21のいずれか一項記載の方法。

【請求項23】

抗原が、ウイルス抗原、細菌抗原、寄生虫抗原、原虫抗原、異常な宿主タンパク質、および腫瘍抗原からなる群より選択される、請求項22記載の方法。

【請求項24】

免疫治療応答が予防的である、請求項22記載の方法。

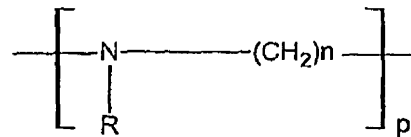
【請求項25】

以下を含む組成物：

- a) 1つまたは複数の腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー(TNFRSF)アゴニスト；
- b) 少なくとも2つのTLRアゴニスト；および
- c) カチオン性ポリマー。

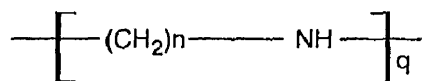
【請求項26】

ポリマーが一般式(1)のものである、請求項25記載の組成物：



(1)

式中、Rは水素原子または式



の基であり、

R基は(CH<sub>2</sub>)末端において主式中のN原子に結合し、

nは2～10の整数であり、かつ

pおよびqは整数であり、

ただしn + p + qは、ポリマーの平均分子量が100～10,000,000となるような値である。

【請求項27】

TNFRSFアゴニストが、LTA(リンホトキシンA)、LTB(リンホトキシンB)、TNFSF4(OX-40L)、TNFSF5(CD40L)、TNFSF6(FasL)、TNFSF7(CD27LまたはCD70)、TNFSF8(CD30L)、TNFSF9(4-1BBL)、TNFSF10(TRAIL)、TNFSF11(RANKL)、TNFSF12(TWEAK)、TNFSF13A(APRIL)、TNFSF13B(BAFF)、TNFSF14(LIGHT)、TNFSF15(VEG1)、およびTNFSF18(GITRL)からなる群より選択される、請求項25記載の組成物。

【請求項28】

TNFRSFアゴニストがCD40Lである、請求項27記載の組成物。

【請求項29】

TNFRSFアゴニストがGITRLである、請求項27記載の組成物。

【請求項30】

TLRアゴニストの1つまたは複数がTLR9アゴニストである、請求項25記載の組成物。

【請求項31】

10

20

30

40

50

TLR9アゴニストがCpGを含むオリゴヌクレオチドである、請求項30記載の組成物。

【請求項32】

多量体化ポリペプチドがC1qファミリーまたはコレクチンファミリーのメンバーである、請求項25記載の組成物。

【請求項33】

ポリペプチドがAcrp30またはサーファクタントタンパク質D(SP-D)である、請求項32記載の組成物。

【請求項34】

MAGE-1、MAGE-2、MUC-1、チロシナーゼ、表面Ig、サイクリン依存性キナーゼ4、カテニン、カスパーゼ8、HPV16型、E6およびE7タンパク質、CD5、CAMPATH-1、CEA、EGFR、FAP、テネイシン、メタロプロテイナーゼ、HIV-1 gag、HIV-1 nef、HIV-1 env、HIV-1 gp 41-1、HIV-1 p24、HIV-1 gp 120、HIV-2 env、HIV-2 gp 36、HCVコア、HCV NS4、HCV NS3、HCV p22ヌクレオカプシド、HCV NS5、A型インフルエンザ、B型インフルエンザ、SARS関連スパイクモザイクS(N)、SARS関連スパイクモザイクS(M)、およびSARS関連コロナウイルスヌクレオカプシドからなる群より選択される抗原をさらに含む、請求項13、14、および25のいずれか一項記載の組成物。

【請求項35】

以下を含む組成物と対象の細胞を接触させる段階を含む、対象においてエフェクターT細胞を含む細胞集団の増殖を誘導する方法：

- a) 1つまたは複数の腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー(TNFSF)アゴニスト；
- b) 少なくとも2つのTLRアゴニスト；および
- c) カチオン性ポリマー。

【請求項36】

細胞をエキスピボで接触させ、その後対象に投与する、請求項35記載の方法。

【請求項37】

組成物を対象に投与することにより細胞を接触させる、請求項35記載の方法。

【請求項38】

対象の呈する腫瘍中に直接または腫瘍の周囲に組成物を投与する段階をさらに含む、請求項37記載の方法。

【請求項39】

以下を含む薬学的に許容される組成物の治療有効量を投与する段階を含む、細胞増殖性疾患を治療する方法：

- a) 1つまたは複数の腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー(TNFSF)アゴニスト；
- b) 少なくとも2つのTLRアゴニスト；
- c) カチオン性ポリマー；および
- d) 薬学的に許容される担体。

【請求項40】

細胞増殖性疾患が癌である、請求項19～24および35～39のいずれか一項記載の方法。

【請求項41】

以下の段階をさらに含む、請求項19～24および35～39のいずれか一項記載の方法：

- e) 免疫細胞を含む細胞を対象から抽出する段階；
- f) エキシピボで細胞を組成物と混合する段階；および
- g) 混合物を対象に投与する段階。

【請求項42】

組成物を腫瘍中に直接または腫瘍の周囲に投与する、請求項19～24および35～39のいずれか一項記載の方法。

【請求項43】

薬学的に許容される担体と以下を含む組成物とを含む、薬学的組成物：

- a) 1つまたは複数の腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー(TNFRSF)アゴニスト；
- b) 少なくとも2つのTLRアゴニスト；および



全長膜CD40Lをコードするプラスミドは通常、DNAワクチンに対する免疫応答を増強しない。そのため、いくつかの研究では、可溶性1-三量体型のCD40L(sCD40LT、当初はImmunexによって作製された)を使用している。しかし、完全なCD40L刺激には、多量体型のCD40Lによってのみ達成され得る膜面での受容体のクラスター形成が必要であり、このことは、対応する細胞型を完全に刺激するためにTNFSFは概して単一の三量体レベルを上回る多量体化を必要とするという知見を裏付けるものである。

#### 【0007】

上記で示唆されるように、DCを刺激するにはいくつかの方法が存在する：すなわち、CD40受容体を刺激するか、または、Toll様受容体(TLR)アゴニストの受容体を刺激することによる。重要なTLRアゴニストには、CpGリッチオリゴヌクレオチドおよび二本鎖RNA模倣体、ポリイノシン酸:ポリシチジル酸(ポリI:C)が含まれる。CpGはMyD88経路を用いてDCにシグナル伝達し、ポリI:CはTRIF経路を使用する。最近の報告から、CD40刺激と単一のTLRアゴニストを併用することで、強力な免疫応答が促進されることが示されている。同様に、他の報告から、2つのTLRアゴニストを共に併用することで(例えば、CpG + ポリI:C)、著しく大きな応答が生じることが示されている。

10

#### 【0008】

いくつかの感染性病原体(例えば、HIV)に関する知見と同様に、アジュバント/DNAワクチン接種様式でマウスにおけるモデル腫瘍を治療することは非常に困難であった。これは、B16-F10腫瘍を呈するマウスにおいて特に当てはまる。現在、確立されたB16-F10腫瘍は、免疫細胞枯渇、トランスジェニック抗腫瘍CD8+ T細胞の注入、黒色腫抗原を発現するワクシニアによるワクチン接種、およびIL-2の併用によりマウスで治療され得る。しかし、上記の段階を行わない場合には、腫瘍治療用のDNAワクチンに対する免疫応答を増強するアジュバントをコードするプラスミドを使用しても、成功は限られている。

20

#### 【0009】

免疫刺激剤は、共刺激分子を上方制御し、支持サイトカインを誘導し、かつ免疫記憶を支持することによって、ワクチンの有効性に寄与する。理想的には、ワクチンは、安全であり、防御性が強く、かつ頻繁なワクチン再接種の必要性を軽減するよう永続的であるべきである。

#### 【0010】

1世紀以上にわたり、癌の免疫療法は、正常組織にほとんど損傷を与えないことのない、腫瘍および転移の治療見込みを提供してきた。このような見込みを実現する上での度重なる失敗の記録にもかかわらず、特定の腫瘍抗原、サイトカインを発現するように改変された腫瘍細胞、または腫瘍抗原を提示する樹状細胞を患者にワクチン接種することを含め、癌免疫療法に新たな関心が寄せられている。

30

#### 【0011】

ワクチン接種なしで免疫系が腫瘍細胞を認識できるならば、欠如している唯一の要素は、抗腫瘍応答を増強するための強力なアジュバントである。いくつかの研究路線から、これが事実であるという証拠が提供されている：(1) 未処置の癌患者において、MUC-1、HER-2/neu、gp 100、およびテロメラーゼのような抗原に対するCD8+ T細胞が測定され得る；(2) ワクチン接種していない患者の腫瘍浸潤リンパ球(TIL)をエクスピボで拡大し、患者に再注入すると、転移性疾患においてさえも劇的な応答が起こり得る場合がある；(3) CTLA-4遮断薬のような非特異的免疫刺激剤によって、有効な抗腫瘍応答が誘発され得る；および(4) 治療によって免疫応答を誘導した場合、治療に用いたものと異なる特異性を有する多数のCD8+ T細胞の産生、いわゆる「エピトープ拡散」によって患者が応答する場合が多い。

40

#### 【0012】

腫瘍細胞は、免疫応答を不活化する種々の物質を産生する。これらの物質には、IL-10、TGF- $\beta$ 、PGE2、およびさらには血管新生因子、VEGFが含まれる。しかし、抗腫瘍CD8+ T細胞は、腫瘍およびその流入領域リンパ節内で見出され得る。これらの細胞はエフェクター機能を獲得するために成熟樹状細胞(DC)からの刺激を必要とし、かつ、腫瘍関連DCが腫

50

瘍抗原を提示するという証拠が存在する。しかし、上記のIL-10、TGF- $\beta$ 、PGE2、およびVEGFを含む腫瘍によって産生される抑制物質のために、癌内部のDCは典型的に成熟していない。そのような未成熟DCによって、免疫抑制性調節性T細胞(すなわち、Treg)によって媒介される免疫寛容が生じ得る。Tregは効果的なCD8+ T細胞応答を抑制する。Tregを除去するかまたは不活化することで、抗腫瘍免疫は増大する。または、CD40を介したDCの刺激によって例証される成熟DCに対する刺激により、効率的な抗腫瘍免疫が生じ得る。

【0013】

抗腫瘍療法を増強するために、免疫刺激剤を利用する多くのアプローチが用いられている。例えば、IL-12の「裸の」プラスミドDNAを腫瘍周囲に繰り返し注射すると、マウスにおいて腫瘍増殖が調節され得る。しかしながら、DNAワクチンが抗体応答を誘発する能力は様々である。

【発明の開示】

【0014】

発明の概要

本発明は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー(TNFRSF)アゴニスト、Toll様受容体(TLR)アゴニスト、「NAIP、CIITA、HET-E、TP-1中に存在するドメイン(NACHT)-ロイシブリッチ反復配列(LRR)」すなわち「NLR」アゴニスト、RHRアゴニスト、プリン受容体アゴニスト、プリン受容体、およびサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニストの組み合わせ免疫刺激剤に関する。病変部位で単独で使用した場合、これらの組み合わせ剤は、病原体または新生物を除去するための宿主免疫応答を誘導する免疫刺激を提供する。明確な抗原と共に使用した場合、これらの組み合わせ剤は、ワクチンとして、および腫瘍性疾患の治療に有用な集中的な応答を引き起こし得る。

【0015】

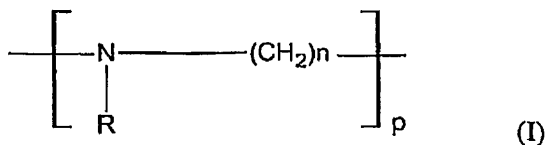
1つの態様において、TNFRSF受容体の刺激は、DNAワクチンの有用な分子アジュバントとして、可溶性多量体腫瘍壊死因子スーパーファミリー(TNFSF)リガンド(例えば、CD40Lおよびグルココルチコイド誘導性TNFR関連遺伝子リガンド(GITRL))を含む組成物を介して達成される。

【0016】

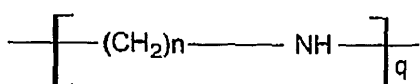
関連局面において、可溶性腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー(TNFRSF)リガンドおよび多量体化ポリペプチドを含む融合タンパク質をコードする核酸、少なくとも2つのTLRアゴニスト、ならびにカチオン性ポリマーを含む組成物を開示する。さらに、そのような多量体化ポリペプチドには、例えば、Acrp30またはサーファクタントタンパク質D(SP-D)などのC1qおよびコレクチンファミリーのメンバーが含まれる。

【0017】

関連局面において、そのような組成物は、一般式(1)のポリマーを含み得る：



式中、Rは水素原子または式



の基であり、

R基は(CH<sub>2</sub>)末端において主式中のN原子に結合し、nは2~10の整数であり、かつpおよびqは整数であり、ただし和p + qは、ポリマーの平均分子量が100~10<sup>7</sup>となるような値である。

【0018】

別の関連局面において、TNFRSFリガンドには、これらに限定されないが、CD40L、グルココルチコイド誘導性TNFR関連遺伝子リガンド(GITRL)、NGF、CD137L/4-1BBL、TNF、CD

10

20

30

40

50



143L/OX40L、CD27L/CD70、FasL、CD30L、TNF /LT 、LT 、RANKL、LIGHT、およびTRAILが含まれる。

【 0 0 1 9 】

関連局面において、そのような組成物は、これらに限定されないが、MAGE-1、MAGE-2、MUC-1、チロシナーゼ、表面Ig、サイクリン依存性キナーゼ4、 カテニン、カスパーゼ8、HPV16型、E6およびE7タンパク質、CD5、CAMPATH-1、CEA、EGFR、FAP- 、テネイシン、メタロプロテイナーゼ、HIV-1 gag、HIV-1 nef、HIV-1 env、HIV-1 gp41-1、HIV-1 p24、HIV-1 gp 120、HIV-2 env、HIV-2 gp 36、HBsAg、HCVコア、HCV NS4、HCV NS3、HCV p22ヌクレオカプシド、HCV NS5、A型インフルエンザ、B型インフルエンザ、SARS関連スパイクモザイクS(N)、SARS関連スパイクモザイクS(M)、およびSARS関連コロナウイルスヌクレオカプシドなどの抗原を含み得る。

10

【 0 0 2 0 】

別の態様においては、可溶性腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー(TNFRSF)リガンドおよび多量体化ポリペプチドを含む融合タンパク質をコードする核酸、少なくとも2つのTLRアゴニスト、ならびにカチオン性ポリマーを含む組成物と対象の細胞を接触させる段階を含む、対象においてエフェクターT細胞を含む細胞集団の増殖を誘導する方法を開示する。

【 0 0 2 1 】

関連局面において、細胞をエキスピボで接触させて、その後対象に投与するか、または組成物を対象に投与することにより細胞を接触させる。さらに、本方法は、対象の呈する腫瘍中に直接または腫瘍の周囲に組成物を投与する段階を含み得る。

20

【 0 0 2 2 】

別の態様においては、薬学的に許容される担体中に、少なくとも2つのTLRアゴニスト、カチオン性ポリマーと組み合わせて、可溶性腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー(TNFRSF)リガンドと多量体化ポリペプチドとを含む融合タンパク質をコードする核酸と混合されたカチオン性ポリマーを含む薬学的に許容される組成物の治療有効量を投与する段階を含む、細胞増殖性疾患を治療する方法を開示する。

【 0 0 2 3 】

関連局面において、細胞増殖性疾患は癌であり、対象からTリンパ球(T細胞)を含む細胞を抽出する段階、エキスピボで細胞を組成物と混合する段階、および混合物を対象に投与する段階を含み得る。または、組成物を、腫瘍中に直接または腫瘍の周囲に投与する。

30

【 0 0 2 4 】

別の態様においては、薬学的に許容される担体、ならびに可溶性腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー(TNFRSF)リガンドおよび多量体化ポリペプチドを含む融合タンパク質をコードする核酸、少なくとも2つのTLRアゴニスト、およびカチオン性ポリマーを含む組成物を含む薬学的組成物を開示する。

【 0 0 2 5 】

別の態様においては、可溶性腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー(TNFRSF)リガンドおよび多量体化ポリペプチドを含む融合タンパク質をコードする核酸、少なくとも2つのTLRアゴニスト、カチオン性ポリマー、MAGE-1、MAGE-2、MUC-1、チロシナーゼ、表面Ig、サイクリン依存性キナーゼ4、 カテニン、カスパーゼ8、HPV16型、E6およびE7タンパク質、CD5、CAMPATH-1、CEA、EGFR、FAP- 、テネイシン、メタロプロテイナーゼ、HIV-1 gag、HIV-1 nef、HIV-1 env、HIV-1 gp41-1、HIV-1 p24、HIV-1 gp 120、HIV-2 env、HIV-2 gp 36、HCVコア、HCV NS4、HCV NS3、HCV p22ヌクレオカプシド、HCV NS5、A型インフルエンザ、B型インフルエンザ、SARS関連スパイクモザイクS(N)、SARS関連スパイクモザイクS(M)、およびSARS関連コロナウイルスヌクレオカプシドを非限定的に含む抗原、ならびに薬学的に許容される担体を含むワクチンを開示する。

40

【 0 0 2 6 】

関連局面において、対象は感染症または腫瘍性疾患を呈し、投与は予防的または寛解性である。

50

## 【0027】

1つの態様において、1つまたは複数の核酸の組み合わせを含むDNAワクチンを開示するが、該核酸は、1つまたは複数の腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー (TNFRSF) アゴニスト、ならびにToll様受容体 (TLR) アゴニスト、NAIP、CIITA、HET-E、TP-1中に存在するドメイン (NACHT)-ロイシンリッチ反復配列 (LRR) すなわちNLRアゴニスト、RIG様ヘリカーゼすなわちRHRアゴニスト、プリン受容体アゴニスト、サイトカイン/ケモカイン受容体アンタゴニスト、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される1つまたは複数のアゴニストをコードする。

## 【0028】

関連局面において、1つまたは複数の核酸は、1つまたは複数のTNFRSFアゴニスト、1つまたは複数のTLRアゴニスト、1つまたは複数のNLRアゴニスト、1つまたは複数のRHRアゴニスト、1つまたは複数のプリン受容体アゴニスト、および1つまたは複数のサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニストをコードする。別の局面において、1つまたは複数の核酸は、1つまたは複数のTNFRSFアゴニスト、1つまたは複数のTLRアゴニスト、および1つまたは複数のNLRアゴニストをコードする。別の局面において、1つまたは複数の核酸は、1つまたは複数のTNFRSFアゴニスト、1つまたは複数のTLRアゴニスト、1つまたは複数のNLRアゴニスト、および1つまたは複数のサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニストをコードする。

10

## 【0029】

別の態様において、DNAワクチン、TNFRSFアゴニスト、TLRアゴニスト、RIG様ヘリカーゼすなわちRHRアゴニスト、プリン受容体アゴニスト、およびサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニストを非限定的に含む1つもしくは複数のポリペプチドアゴニスト、ならびに/または、二本鎖RNA、 $\alpha$ -D-Glu-メソ-ジアミノピメリン酸 (DAP) もしくはその誘導体、ムラミルジペプチド (MDP) もしくはその誘導体、細菌DNA、および細胞外ATP (ATPe) を非限定的に含む1つもしくは複数のNLRアゴニストを含む組成物を開示する。

20

## 【0030】

1つの局面において、DNAワクチンまたは組成物は、感染症または腫瘍性疾患に対する免疫治療応答を誘発するために用いられ、脊椎動物細胞におけるアゴニストの組み合わせ剤の発現が、感染症または腫瘍性疾患に対する液性免疫応答および/または細胞性応答を誘発する。

30

## 【0031】

別の局面において、DNAワクチンまたは組成物は、感染症または腫瘍性疾患に対する免疫治療応答を誘発する際に使用する医薬の製造に用いられ、ここで脊椎動物細胞におけるアゴニストの組み合わせ剤の発現が、感染症または腫瘍性疾患に対する液性免疫応答および/または細胞性応答を誘発する。

## 【0032】

1つの態様において、DNAワクチンまたは組成物の治療有効量をそれを必要とする対象に投与する段階を含む、感染症または腫瘍性疾患を治療する方法を開示する。関連局面において、本方法は、感染症または腫瘍性疾患に関連した抗原を投与する段階を含む。

## 【0033】

本発明による例示的な方法および組成物を、以下にさらに詳述する。

40

## 【0034】

発明の詳細な説明

本組成物、方法、および治療法について記載する前に、本発明が記載の特定の組成物、方法、および実験条件に限定されず、したがって組成物、方法、および条件が変更可能であることが理解されるべきである。本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、本明細書で使用する専門用語は特定の態様を説明する目的のためのものなのであって、限定を意図するものではないこともまた理解されるべきである。

## 【0035】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用する単数形「1つの」、「ある」、および

50

「本」とは、特記する場合を除き、その対象物の複数形も含む。したがって、例えば「本方法」への言及は、本開示を読めば当業者に明らかとなるであろう本明細書に記載する種類などの1つまたは複数の方法および/または段階を含む。

#### 【0036】

特記しない限り、本明細書で使用する専門用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を有する。本発明の実施または試験において、本明細書に記載のものと類似のまたは同等の任意の方法および材料を用いることができるが、好ましい方法および材料は以下に記載するものである。

#### 【0037】

本発明の実施は、特にそうでないことが示されていない限り、ウイルス学、免疫学、微生物学、分子生物学、および当技術分野の技術の範囲内である組換えDNA技術の従来法を使用し、そのいくつかについては説明目的で後述する。このような技法は、文献で完全に説明されている。例えば、Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); Maniatis et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984)を参照されたい。

#### 【0038】

「アゴニスト」という用語は、細胞受容体と相互作用して細胞で刺激シグナルを生じるタンパク質、核酸、脂質、糖質、および/または化学物質を指す。特に好ましいアゴニストは、免疫細胞を刺激するアゴニストである。

#### 【0039】

「抗原」という用語は、それに対して特異的な免疫応答が起こり得る微生物(細菌、真菌、原虫、またはウイルス)由来の物質または内因性物質を指す。微生物抗原の例には、HIV(Gag, Env, Nef)、インフルエンザ(HA, N)、マラリア原虫(CSP-1, MSP-1)、B型肝炎、C型肝炎、パピロウイルス、ヘルペスウイルス、オルソボックスウイルス(痘瘡の病原体である天然痘など)由来のタンパク質が含まれる。連鎖球菌、髄膜炎菌、マイコバクテリウム属、マイコプラズマ属、クラミジア属、フランシセラ属、パストレラ属、レジオネラ属、およびバチルス属種(炭疽菌(*B. anthracis*)を含む)由来の糖質などの糖質もまた抗原となり得る。糖脂質などの脂質も抗原となり得る。核酸もまた抗原となり得る。さらに、タンパク質、糖質、脂質、および/または核酸から構成される複合物質も抗原となり得る。内因性抗原としては、腫瘍に特異的な抗原が好ましい。他の内因性抗原には、プリオン、またはアルツハイマー病のプラークで認められるような凝集タンパク質などの異常なタンパク質が含まれる。

#### 【0040】

抗原は、本出願における免疫刺激剤のいずれかに直接結合させることもできる。結合は、共有結合または非共有結合相互作用(CpG ODNと正荷電ペプチド抗原との間の静電的相互作用など)によるものであってよい。例として、タンパク質抗原を、CpG含有免疫刺激オリゴデオキシヌクレオチド(ISS-ODN)または他のTLRアゴニストに共有結合させることができる。適切な方法によりワクチン接種すると、これらの抗原-免疫刺激剤化合物により、2つの成分を結合せずに共に使用した場合に起こる免疫応答よりも大きな免疫応答が起こり得る。例えば、タンパク質をISS-ODNに結合させて、より強いワクチン応答を引き起こすことができる。同様に、タンパク質抗原をTLRアゴニストに共有結合させて、より強いワクチン応答をもたらすことができる。

#### 【0041】

抗原をワクチン中で使用して、疾患を治療または予防することができる。抗原はまた、診断検査またはキットで使用され得る抗体などの特異的免疫物質を産生させるために用いることができる。抗原含有ワクチンの対象は典型的に、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、

より好ましくはヒトである。

【0042】

この説明の目的のため、抗原は、免疫応答が所望される任意のタンパク質、糖質、脂質、核酸、またはこれらの混合物、またはこれらの複数と定義される。抗原が分子用語として見なされることが必ずしも必要でないことに留意することが重要である。例えば、免疫応答がどの分子に対するものなのかを事前にまたは事後に知ることなく、腫瘍に対する免疫応答を引き起こすことができる。このような場合、抗原という用語は、特異的免疫応答が対象とする既知または未知の1つまたは複数の物質を指す。免疫応答の特異性は、1つの腫瘍型に対して生じた免疫がその腫瘍型に特異的であって別の腫瘍型には特異的ではないというような、抗原の機能上の定義を提供する。

10

【0043】

「相乗作用」という用語は、個々に投与した場合のタンパク質、脂質、核酸、糖質、または化合物の相加的活性よりも高い、タンパク質、脂質、核酸、糖質、または化合物の組み合わせ投与の活性を指す。

【0044】

「併用投与」という用語は、単独で投与されたタンパク質、脂質、核酸、糖質、または化合物の治療効果よりも組み合わせの治療または予防効果が高くなり得るように投与される、組み合わせによる2つのまたはそれ以上のタンパク質、脂質、核酸、糖質、または化合物を指す。2つまたはそれ以上のタンパク質、脂質、核酸、糖質、または化合物は、同時にまたは連続して投与することができる。同時に併用投与するタンパク質、脂質、核酸、糖質、または化合物は、薬学的に許容される1つまたは複数の組成物中に提供され得る。連続的な併用投与には、各タンパク質、脂質、核酸、糖質、または化合物が同時に治療部位に存在し得るように、タンパク質、脂質、核酸、糖質、または化合物が投与される場合が非限定的に含まれる。

20

【0045】

「アジュバント」という用語は、抗原に対する免疫応答を増強する化合物または混合物を指す。アジュバントは、抗原をゆっくりと放出する組織貯蔵所として、および免疫応答を非特異的に増強するリンパ系活性化剤としてはたらき得る(Hood et al., Immunology, Second Ed., 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, Calif., p. 384)。多くの場合、アジュバント非存在下での抗原単独による一次刺激は、液性免疫応答も細胞性免疫応答も誘発することができない。アジュバントには、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、サポニン、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチンなどの界面活性剤、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油または炭化水素乳濁液、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、ならびにBCG(カルメット・ゲラン桿菌)およびコリネバクテリウム・パルブム(*Corynebacterium parvum*)などの潜在的に有用なヒトアジュバントが非限定的に含まれる。アジュバントは薬学的に許容されることが好ましい。

30

【0046】

関連局面において、「分子アジュバント」という用語は、それに対して樹状細胞(DC)、マクロファージ、B細胞、T細胞、および/またはNK細胞が公知の受容体を有し、その受容体の占有により、一連の確立した細胞内シグナル伝達、およびその後の免疫応答の量または質の改善をもたらす表現形の変化が生じるタンパク質、脂質、核酸、糖質、または化合物と定義される。関連局面において、上記の細胞はまとめて「免疫細胞」と称される。

40

【0047】

「抗原提示細胞」または「APC」という用語は、抗原を処理し、そのペプチド断片をリンパ球活性化に必要な分子と共に細胞表面上に提示する、高度に特殊化した細胞を指す。T細胞に対する主な抗原提示細胞はDC、マクロファージ、およびB細胞であり、B細胞に対する主な抗原提示細胞は濾胞樹状細胞である。

【0048】

「樹状細胞」または「DC」という用語は、リンパ組織のT細胞領域において認められるA

50

PCと定義される。(Banchereau et al., Nature 392:245-251, 1998)。DCは、抗原の取り込み、輸送、処理、およびT細胞への提示に特殊化した、骨髄由来白血球のまばらに分布した遊走群である。非リンパ組織もまたDCを含むが、これらは活性化されてリンパ組織に移動するまでT細胞応答を刺激しない。一般に、樹状細胞は、典型的な形状(インサイチューで星状、インピトロで可視化可能な顕著な細胞質突起、樹状突起を有する)；高率で抗原を取り込み、処理し、かつ提示する能力；およびナイーブT細胞応答を活性化する能力に基づいて同定され得る。マウスおよびヒト樹状細胞の一般的総説に関しては、Shortman et al., Nat. Rev. Immunol. 2(3):151-61, 2002を参照されたい。

#### 【0049】

「免疫原性」という用語は、体液または細胞媒介性の免疫応答を誘発する抗原の能力を指す。本明細書で使用する「免疫原性有効量」とは、当業者に公知である標準的なアッセイ法によって測定される、免疫応答、細胞性(T細胞)または液性(B細胞または抗体)応答を誘発するのに十分な抗原の量を指す。免疫源としての抗原の有効性は、増殖アッセイ法により、特定の標的細胞を溶解するT細胞の能力を測定するクロム放出アッセイ法などの細胞溶解アッセイ法により、または抗原に特異的な血清中の循環抗体のレベルを測定して、もしくは脾臓中の抗体スポット形成細胞の数を測定してB細胞活性のレベルを測定することにより測定することができる。さらに、免疫化した宿主を、注射した抗原を含む複製ウイルスまたは細胞で刺激することにより、免疫応答の防御レベルを測定することも可能である。例えば、免疫応答が所望される抗原がウイルスまたは腫瘍細胞である場合、「免疫原性有効量」の抗原によって誘導された防御レベルは、動物のウイルスまたは腫瘍細胞刺激後に生存レベルを検出することにより測定される。あるいは、防御はまた、動物刺激後のウイルス複製または腫瘍増殖の減少として測定することもできる。

#### 【0050】

本明細書で使用するサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニストという用語は、これらの免疫刺激タンパク質のいずれかを指す。IL-1(この分子ファミリーのすべてのメンバー、特にIL-1)、IL-2、IL-4、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18、CCL13、CCL20、IFN、IFN、IFN、IFN 1、IFN 2、IFN 3、およびGM-CSFが好ましい。

#### 【0051】

サイトカインおよびケモカインは、免疫細胞の機能に影響を及ぼすタンパク質である。サイトカインの概要は、The Cytokine Referenceデータベース(Academic Press、米国、マサチューセッツ州、パーリントン主催)においてOppenheimerらにより提供されている。サイトカインの他のリストには以下のものがある：Cytokines and Cells Online Pathfinder Encyclopedia(COPE)(Horst Ibelgaufits, Institute of Biochemistry, MPI of Biochemistry、ドイツ、ミュンヘン・マルティンスリート主催)；The Cytokines Web(PSINIX Information Systems Ltd、中国主催)；およびThe Cytokine Handbook, Vol. 1 and 2, 4th Ed., 2003, (Thompson and Lotze, eds.), Academic Press、カリフォルニア州、サンディエゴ。いくつかのサイトカインはインターロイキン(IL)と命名され、IL-1~IL-33のように数字で表示される。他のサイトカインはインターフェロン(IFN)と命名され、ギリシャ文字を用いて表示される。他のサイトカインは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子すなわちGM-CSFのように、その特性により命名されている。ケモカインとは一般に、特定の細胞型の化学誘因をもたらすタンパク質である。ケモカインは、タンパク質内のシステインの数および配置に基づいて4つのファミリー：CXC、C、CX3C、およびCCに分類される。ケモカインには、CXCL1~CXCL16、XCL1~XCL2、CX3CL1、およびCCL1~CCL28が含まれる。CCL3、CCL4、CCL5、CCL13、およびCCL20が特に好ましい。CCL3はマクロファージ炎症性タンパク質1とも称され、T細胞のような、CCケモカイン受容体1(CCR1)およびCCR5を有する細胞の化学誘因物質である。CCL4はマクロファージ炎症性タンパク質1とも称され、T細胞のようなCCR5を有する細胞の化学誘因物質である。CCL5はRANTESとも称され、T細胞のようなCCR5を有する細胞の化学誘因物質である。CCL3、CCL4、およびCCL5はまた、ヒト免疫不全ウイルスの多くの株がCD4+ T細胞およびマクロファージに侵入するのを阻止することができる。CCL13はマクロファージ走化性タンパク質4とも称され、血中単球

10

20

30

40

50

または樹状細胞前駆体のような、CCR2およびCCR3を有する細胞の化学誘因物質である。CCL20はマクロファージ炎症性タンパク質3とも称され、未成熟樹状細胞のようなCCR6を有する細胞の化学誘因物質である。CCL20および同じくCCL13は、抗腫瘍応答を増強することが示されている。ポリマー送達剤を使用することで、これらのサイトカインまたはケモカインをコードする核酸の注射の抗腫瘍用途を増強することができる。

#### 【0052】

本明細書で使用する「ワクチン」とは、予防的または既存状態の治療のいずれのために投与されるとしても、抗原に対する免疫応答を誘発するように設計された免疫刺激治療と定義される。

#### 【0053】

関連局面において、「遺伝子ワクチン」とは、免疫剤として使用する関心対象のタンパク質をコードする遺伝物質(例えば、核酸配列)の使用を指す。この用語には、これらに限定されないが、ウイルスもしくはウイルスベクター(例えば、改良型のアデノウイルス、ポックスウイルス、ラブドウイルス、アルファウイルス、ヘルペスウイルス、インフルエンザウイルス、レトロウイルス、またはレンチウイルス)、または細菌(例えば、改良型のサルモネラ属種、リステリア属種、またはマイコバクテリウム属種)内で宿主細胞に輸送される核酸が含まれる。この用語にはまた、これらに限定されないが、「DNAワクチン」と称される、プラスミドDNAのような直接投与する核酸が含まれる。関心対象のタンパク質をコードするDNAはまた、最小発現構築物としての直鎖状の二本鎖分子として非プラスミド型で投与することもできる。関心対象のタンパク質をコードするメッセンジャーRNA(mRNA)もまた、直接投与することができる。1つの局面において、関心対象のタンパク質をコードする核酸は、プラスミドを含むDNAワクチンとして投与する。

#### 【0054】

1つの局面において、本発明は、タンパク質に対する免疫応答を誘発し得る外因性タンパク質をコードする外因性または外来DNA分子の、個体の組織または細胞への導入に関する。外因性核酸配列は、単独でも、または、その配列がコードタンパク質の発現を調節し得るプロモーターおよび/もしくはエンハンサーに機能的に連結されている、発現ベクターの状況でも導入することができる。外因性核酸配列の導入は、核酸配列の細胞内への取り込みまたは組み込みを増強し得る細胞刺激剤の存在下で行うことができる。そのような外因性核酸配列は、生物学的適合性を有するまたは薬学的に許容される担体を含む、組成物中に投与することができる。外因性核酸配列は、本明細書に記載する、および当技術分野で周知の種々の手段によって投与することができる。DNAは、個体の細胞における発現に必要な調節因子に連結される。調節因子には、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルが含まれる。当業者に公知である他の因子を、適用に応じて本発明の遺伝子構築物に含めることもできる。以下の参考文献は、生存している動物に核酸配列を直接導入するための方法に関する：Nabel et al., (1990) Science 249:1285-1288；Wolfe et al., (1990) Science 247:1465-1468；Acsadi et al. (1991) Nature 352:815-818；Wolfe et al. (1991) BioTechniques 11(4):474-485、およびFelgner and Rhodes, (1991) Nature 349:351-352。このような方法は、個体が病原体に感染する危険を伴わずに、病原体に対する免疫を誘発するために用いることができる。本発明は、一段階手順で個体の細胞にポリヌクレオチドを直接注射することにより病原体感染に対して個体を免疫化する方法を提示しているPCT国際出願第PCT/US90/01515号、および米国特許第6,635,624号；第6,586,409号；第6,413,942号；第6,406,705号；第6,383,496号に記載されている手順など、当技術分野で公知の手順を用いて実施することができる。

#### 【0055】

「効果の増強」とは、ワクチンに対する免疫応答の増加、または抗腫瘍応答の増加を指す。これには、有効性のわずかな増加、成分免疫促進剤のすべての合計である完全な相加的増加、または成分すべての合計よりも大きな相乗的増加が含まれる。

#### 【0056】

NLRタンパク質は大きなファミリーを形成する。これは、CATERPILLERファミリー(この

10

20

30

40

50

用語は、CARD、転写エンハンサー、R(プリン)結合、ピリン、多数のロイシン反復配列の頭字語である)のタンパク質と称されることもある。この分子ファミリー内のタンパク質の多くは、NACHTドメイン(この用語は、NAIP、CIITA、HET-E、TP-1中に存在するドメインの頭字語である)を含む。また、この分子ファミリー内のタンパク質の多くはLRRドメイン(この用語は、ロイシンリッチ反復配列の頭字語である)を含み、いくつかはピリンドメインを含む。このファミリーのいくつかのメンバーの別称は、NOD-LRRタンパク質(NODは、ヌクレオチド結合オリゴマー化ドメインの頭字語である)である。このファミリーのいくつかのメンバーの別称は、NALP(NACHT-LRR-PYD含有タンパク質の頭字語である)である。

【 0 0 5 7 】

NLR刺激の重要な特徴は、インターロイキン1 変換酵素(ICE)としても知られるカスパーゼ1の活性化を引き起こし得ることである。樹状細胞およびマクロファージの多くの刺激はプロインターロイキン1 の合成をもたらす得るが、この不活性前駆体を切断して完全に成熟したインターロイキン1 型(IL-1 )にするにはICEが必要である。例えば、CD40L単独では、樹状細胞は相当量のIL-1 を放出するように誘導されない。同様に、ICEは、プロIL-18を活性IL-18に変換するのに必要である。IL-1 およびIL-18はいくつかの免疫細胞型を活性化する上で重要であり、よってNLRアゴニストはワクチンおよび免疫刺激剤の有用な成分である。例えば、IL-1 はCD40Lと相乗的に作用して、IL-12を作製するようにヒト単球由来樹状細胞を誘導する。

【 0 0 5 8 】

TNFRSFアゴニストは、TNF受容体スーパーファミリー(TNFRSF)メンバーと相互作用して細胞活性化応答を引き起こす任意の物質と定義される。典型的に、これは、TNFスーパーファミリー(TNFSF)リガンドのような、TNFRSF受容体の同族リガンドの形態である(例えば、CD40受容体のTNFRSFリガンドは典型的に、CD40リガンドまたはCD40Lである)。例示的なTNFSFリガンドの遺伝子記号および一般名は、TNF、LTA(リンホトキシンA)、LTB(リンホトキシンB)、TNFSF4(OX-40L)、TNFSF5(CD40L)、TNFSF6(FasL)、TNFSF7(CD27LもしくはCD70またはCD27L/CD70)、TNFSF8(CD30L)、TNFSF9(4-1BBL)、TNFSF10(TRAIL)、TNFSF11(RANKL)、TNFSF12(TWEAK)、TNFSF13A(APRIL)、TNFSF13B(BAFF)、TNFSF14(LIGHT)、TNFSF15(VEG1)、TNFSF18(GITRL)などである。TNFSFリガンドの最新リストは、National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine、米国、メリーランド州、ベテスダにより維持されている。

【 0 0 5 9 】

本出願では、TNFRSFアゴニストの定義をTNFSF分子自体に制限するのではなく、TNFRSF受容体と相互作用して細胞活性化応答を引き起こす任意の物質を表すより一般的な用語として「TNFRSFアゴニスト」を使用する。TNFRSF受容体のオンラインデータベースは、Human Genome Nomenclature Committeeにより維持されている。コレクチンまたはC1qファミリーメンバーの主部とTNFSFの細胞外ドメインとの間の誘導タンパク質を構築することによって形成されるような、多量体可溶性のTNFRSFアゴニストが好ましい。これらの多量体可溶性TNFSFの構築は、当技術分野において認識されている。しかし、本出願の目的のためには、TNFRSF受容体と相互作用して細胞応答を誘導する任意の他の物質もまた、TNFRSFアゴニストという用語によって示される。そのような物質には以下のものが含まれ、多量体可溶性、または応答細胞型においてTNFRSF受容体を効率的にクラスター化する形態でこれらのTNFRSFアゴニストを送達する方法が好ましい。(1) Hsp70などの熱ショックタンパク質(Hsp)またはHsp70由来のペプチドは、CD40と相互作用して細胞を活性化することが報告されている。そのため、TNFRSF受容体と相互作用し得るHspは、Antigenics, Inc.により抗腫瘍剤として、およびHsp70の誘導體としてワクチン内で試験されている。(2) C4BPまたはそれに由来するペプチドは、CD40と相互作用して細胞を活性化することが報告されている。(3) 特定の抗受容体抗体はTNFRSF受容体を活性化することができ、この場合これらは「アゴニスト抗体」と称される。マウスCD40に関して、そのようなアゴニスト抗体には、モノクローナル抗体IC10、FGK4.5、およびそれらの誘導體が含まれる。ヒトCD40に関して、そのようなアゴニスト抗体には、B-B20(Diaclone、フランス、ブザンソン)、Mab89(1

10

20

30

40

50

mmunotech)、G28-5(American Type Culture Collection、バージニア州、マナッサス)、クローン64(Tanox Pharma、オランダ、アムステルダム)、CP-870,893(Pfizer Inc.、ニューヨーク州、ニューヨーク)、およびそれらの誘導体が含まれる。抗体分子の他の部分を含むか含まないかにかかわらず、そのようなアゴニスト抗体の相補性決定領域(CDR)またはこれらのCDRの変種を含む誘導体が特に好ましい。(4) 別の抗受容体抗体型は、TNFSFリガンドとそれらのTNFRSF受容体との準最適レベルの相互作用を増強し得る。例として、CD40LとCD40受容体との相互作用を安定化するように作用し、それによってCD40Lに対する細胞応答を増強するS2C6(SGN-40、Seattle Genetics, Inc.)がある。(5) アゴニスト化合物はまた、ランダム突然変異誘発法と、それに続くTNFRSF受容体への結合および活性化に関する選択によって作製され得る。そのようなランダム突然変異誘発法には、ファージディスプレイ、ペプチドライブラリー、およびRNAまたはDNAアプタマー技法が含まれる。(6) TNFRSFアゴニスト(C4BP、抗受容体抗体、および受容体結合ペプチドまたはアプタマーなどの上記のものを含む)はまた、多量体化足場に結合させることができる。

10

## 【0060】

そのような足場の例には：(1) 「結合価基盤」；(2) 「多量体バイオポリマー」；(3) 「分子足場」；(4) 多量体化技法；(5) ポリエチレンオキシドに基づく多量体化足場；(6) 油体に基づく多量体；(7) 相補的な表面を有する単位から構成される多量体化足場；(8) ヘテロオリゴマー足場；(9) 多量体化成分と別の成分との間の遺伝子融合物；(10) 繫留リガンド；および(11) CD40LのCD40への結合のための3つの「ホットスポット」残基を含むC3対称ペプチド足場の構築(Lys-GlyTyr-Tyr)(配列番号:8)が含まれる。

20

## 【0061】

細胞内に導入されたCD40、Fas、または他のTNFRSF受容体の細胞内部分を使用すると、これらの分子は選択的に多量体化されてシグナルを送達し得る。例えば、CD40の細胞内シグナル伝達部分を樹状細胞に導入して、これが多量体化されると、樹状細胞が活性化されて腫瘍抗原を提示し、腫瘍を根絶する。TNFRSF受容体を刺激するためのこれらの多くのアプローチを考慮すると、TNFRSFアゴニストという用語は本明細書において、TNFRSF受容体のこれらの活性化剤、およびそれらの機能的な等価物または誘導体の全てを包含すると定義される。

## 【0062】

TLRに結合しこれを活性化する物質はTLRリガンド、または同等にTLRアゴニストと称される。どのTLRが所与のアゴニストによって活性化されるかに関して、ヒトとマウスの間に差があることに留意することが重要であり、使用する種に応じてこのことを考慮すべきである。この記載を任意の特定の態様に限定するわけではないが、以下のTLRアゴニストは、本明細書に記載する組み合わせ免疫刺激剤に関する適切な例である：TLR2/1アゴニストおよびTLR2/6アゴニスト。TLR2は典型的に、TLR1またはTLR6と組み合わせて認められるヘテロマー受容体である。細菌リポペプチドは、TLR2含有受容体の主要なアゴニストである。これらのアゴニストには、マイコプラズマのマクロファージ活性化リポタンパク質2；トリパルミトイル-システニル-セリル-(リジル)3-リジン(P3CSK4)、ジパルミトイル-CSK4(P2-CSK4)、およびモノパルミトイル-CSK4(PCSK4)；ライム病スピロヘータボレリア・ブルグドルフェリ(*Borrelia burgdorferi*)由来のOspAを含む、トリパルミトイル-S-グリセリル-システイン(Pam(3)Cys)修飾リポタンパク質；リポアラビノマンナンが濃縮されたマイコバクテリア細胞壁画分、ミコリルアラビノガラクトン-ペプチドグリカン複合体、または結核菌(*M. tuberculosis*)総脂質が含まれる。

30

40

## 【0063】

TLR3アゴニストは、TRIF経路を介してシグナルを伝達して、サイトカインを生成させる。dsRNAを生じるウイルスゲノムまたは部分的ゲノムの投与は、これらの系を活性化する別の手段である。場合によっては、内因性メッセンジャーRNA(mRNA)でさえTLR3を刺激することができ、細菌RNAは樹状細胞にとって特に刺激性であり得る。RNAがヌクレオチド受容体を介して樹状細胞を刺激することもまた示唆されている。

## 【0064】

50



ウイルス二本鎖RNA(dsRNA)を用いてTLR3を刺激することができるが、最も試験が行われているTLR3アゴニストは、合成型のdsRNAであるポリリボイノシン酸-ポリリボシチジル酸すなわちポリ(1:C)である。ポリ(1:C)は、腹腔内または静脈内に100 ug用量でマウスにおいて抗腫瘍効果を有し、癌を有するヒトにおいて広く試験が行われている。ポリ(1:C)は、マウスにおいて単純ヘルペス角結膜炎を寛解させること、およびマウス細胞においてリーシュマニアの増殖を減少させることが示された。ペプチドワクチン接種に関して、ポリ(1:C)は皮下に50 ug用量で使用された。単純ヘルペス感染および癌を有するヒトにおいて、ポリ(1:C)は3~12 mg/kg用量で用いられている。Ampligen(ポリ1:ポリC12U)は、同様に試験が行われているミスマッチ型のdsRNAである。

【0065】

TLR4は、MyD88およびTRIF経路の両方を介して細胞にシグナルを伝達し得る。ヒト樹状細胞の活性化におけるその特殊な有用性は、当技術分野で認識されている。TLR4の古典的アゴニストは細菌リポ多糖(LPS)であり、LPSとはリポDおよびその同類物を含む物質のファミリーを指す。LPSの例示的形態は、大腸菌(*E. coli*) B:O111(Sigma Chemicals)である。しかし、より毒性の低い形態のTLR4アゴニストを作製する試みにおいて、モノホスホリルリポD(MPL)化合物が作製され、いくつかはヒトにおいて活性を有する。合成アジュバントであるASO2(GlaxoSmithKline、英国)は、成分としてMPLを含む。

【0066】

TLR5の主要なアゴニストは細菌のフラジェリンである。

【0067】

TLR7アゴニストには、一本鎖RNA；レジキモドおよびイミキモドなどのイミダゾキノリン化合物；ロキソリピン(7-アリル-7,8-ジヒドロ-8-オキソ-グアノシン)および関連化合物；7-チア-8-オキソグアノシン、7-デアザグアノシン、および関連グアノシン類似体；ANA975(Anadys Pharmaceuticals)および関連化合物；SM-360320(Sumimoto)；3M-01および3M-03(3M Pharmaceuticals)；ならびにUC-1V150(Jin et al., Bioorganic Medicinal Chem Lett (2006) 16:4559-4563、化合物4)などのアデノシン類似体が無限定的に含まれる。TLR7アゴニストはIFN $\alpha$ を作製するように形質細胞様樹状細胞を直接活性化するのに対して、TLR8アゴニストは、TNF、IL-12、およびMIP-1などの炎症促進性サイトカインおよびケモカインを作製するように骨髄樹状細胞、単球、および単球由来樹状細胞を直接活性化することが認められている。それにもかかわらず、多くの化合物はTLR7およびTLR8の両方のアゴニストである。

【0068】

上記のように、TLR7を活性化する化合物の多くはTLR8もまた活性化する。3M-03はTLR7およびTLR8の両方を活性化するが、3M-02はTLR8に対してより特異的である。繰り返すが、多くの化合物はTLR7およびTLR8の両方のアゴニストである。ホスホロチオエート結合で結合されたグアノシンヌクレオチドを10個含むポリG(ポリG10)もまた、調節性CD4+CD25+ T細胞の免疫抑制機能を遮断する物質として特に有用であり得るTLR8アゴニストである。

【0069】

CpG含有オリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)などの免疫刺激オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、TLR9の原型アゴニストである。より一般的には、多くの免疫刺激オリゴヌクレオチド(ODN)はCpGモチーフを含まないため、これらはオリゴデオキシヌクレオチドの免疫刺激配列(ISS-ODN)と称される。典型的に、ODNは合成チオリン酸化結合化合物である。しかし、細菌DNA、リボソーム脊椎動物DNA、昆虫DNA、クラミジアポリヌクレオチドなどを含む、DNAおよびRNAの多くの型がTLR9を活性化し得る。

【0070】

別のクラスのTLR9アゴニストは、免疫調節性オリゴヌクレオチド(IMO)(Hybridon, Inc.)と称される、合成シトシン-リン酸-2'-デオキシ-7-デアザグアノシンジヌクレオチド(CpR)を含むヌクレオチド配列である。TLR9のアゴニストであるダンベル様共有結合構造もまた、当技術分野で認識されている(dSLIM-30L1)。ポリGオリゴデオキシヌクレオチドもまた、免疫刺激性であり得る。死滅していく細胞から放出されるような二本鎖DNAでさえ、

10

20

30

40

50

免疫応答を増加させ得る。プラスミドDNAは特に免疫刺激性であり得る。これはCpGモチーフに起因すると考えられるが、これが常にそのTLR9のアゴニスト活性によるのかは不明である。それにもかかわらず、プラスミドがTNFRSFアゴニスト、TLRアゴニスト(Hsp60のような)、またはサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(インターフェロンのような)をコードする場合、プラスミドDNAのこの特性は組み合わせ免疫刺激剤の有効性に付加され得る。

【0071】

TLR10のリガンドは現在のところ不明である。

【0072】

TLR11の1つのアゴニストは、寄生原虫トキソプラズマ原虫(*Toxoplasma gondii*)由来のプロフィリン様分子(PFTG)である。

10

【0073】

NLRアゴニストには、微生物産物およびその合成誘導体が含まれる。最も特徴づけられているアゴニストは、NOD1、NOD2、NALP-3、RIG-I、およびMDA5のアゴニストである。

【0074】

NOD1はCARD-4とも称され、細菌細胞壁中のペプチドグリカンの分解産物である、GM-TriDAPとも称されるGlcNac-MurNac-L-Ala-D-Glu-メソ-ジアミノピメリン酸を含む化合物によって活性化される。別のNOD1活性化剤は、M-TriDAPとも称されるMurNac-L-Ala-D-Glu-メソ-ジアミノピメリン酸である。NOD1活性化の最小モチーフは、露出したDAP基部を有する、iE-DAPとも称される-D-Glu-メソ-DAPである。他のNOD1活性化剤は、FK156(D-ラクチル-L-アラニル-D-グルタミル(L)-メソ-ジアミノピメリル(L)-グリシン)およびFK565(ヘプタノイル-D-グルタミル(L)-メソ-ジアミノピメリル(D)-アラニン)である。FK565は、0.01、0.1、および1 mg/kgの静脈内および皮下用量を投与した場合、または1 mg/kg用量を経口投与した場合に、マウスを単純ヘルペスウイルスから防御した。FK565はまた、15 mg/kgの皮下用量で投与した場合に、マウスをサイトメガロウイルス感染から防御し、0.001~1 mg/kgの静脈内、皮下、および経口用量で、インフルエンザウイルスに対して防御的であった。

20

【0075】

NOD2はCARD-15とも称され、ムラミルジペプチド(MDP)、GM-Diとも称されるMurNac-L-Ala-D-イソGlnによって活性化される。別のNOD2活性化剤は、MtriLYSとも称されるMurNac-L-Ala-D-Glu-L-Lysである。MDPは、ホスファチジルセリンおよびホスファチジルコリン(3:7)比から構成され、MDP 2.5 ugを含むリポソーム中に製剤化されている。静脈内投与した場合、この形態のMDPは、B16-BL6黒色腫瘍を有するマウスにおいて転移を顕著に減少させる。骨肉腫を有するイヌおよびヒトにおける臨床試験では、リポソーム型のムラミルトリペプチド(MTP)ホスファチジルエタノールアミン(MTP-PE)を使用し、これを1~2 mg/mm<sup>2</sup>で静脈内投与する。MTP-PEリポソームの同様の試験により、イヌの黒色腫に対する軽度の陽性効果が示された。

30

【0076】

PYPAF1とも称されるNALP-3はいくつかのスプライス変種を有し、そのうちの1つはクリオピリンと称される。MDPはNalp3と相互作用して、インターロイキン1(IL-13)およびインターロイキン18(IL-18)のタンパク質分解プロセッシングを促進し、これは、細菌RNA、およびプリンP2X<sub>7</sub>受容体に作用する細胞外ATP(ATPe)によって活性化され得る。1つの局面において、ATP Sおよびベンゾイル-安息香酸ATPはP2X<sub>7</sub>アゴニストである。関連局面において、ATPeには、これらに限定されないが、ベンゾイルベンゾイルATP、またはP1、P2X、およびP2Y受容体ファミリーの任意のアゴニストが含まれる。

40

【0077】

NLRタンパク質の多くはCARDドメインを含む。最近記載されたCARD含有タンパク質は、IPS-1、MAVS、VISA、およびCardifと様々に称されるが、ヘリカーゼドメインもまた含むレチノイン酸誘導性遺伝子1(RIG-I)および黒色腫分化関連遺伝子5(MDA5)からの活性化シグナルの伝達に關与するアダプタータンパク質である。

50

## 【 0 0 7 8 】

「RHL受容体」は、RIG様ヘリカーゼタンパク質のクラスと定義される。関連局面において、RHL受容体には、これらに限定されないが、RIG-I(GenBankアクセッション番号AF038963)および黒色腫分化関連遺伝子5(MDA5)(GenBankアクセッション番号AF095844)が含まれる。RIG-Iは5'-三リン酸RNAを認識し、ポリ(I:C)などのdsRNAはMDA5のリガンドである。さらに、特定のウイルスの複製中に生成されることの多い三リン酸を含むdsRNAは、MDA5と相互作用して、細胞における抗ウイルス防御のプログラムおよびI型インターフェロンの産生を開始する転写因子であるインターフェロン調節因子3(IRF3)を活性化する。

## 【 0 0 7 9 】

異なるNLRアゴニストは異なる応答を誘導する。例えば、MDPはNalp3と相互作用して、インターロイキン1(IL-1)およびインターロイキン18(IL-18)のタンパク質分解プロセッシングを促進する。二本鎖RNA(dsRNA)はMDA5と相互作用して、細胞における抗ウイルス防御のプログラムおよびI型インターフェロンの産生を開始する転写因子であるインターフェロン調節因子3(IRF3)を活性化する。上記の通り、天然dsRNAの模倣体としてポリ(I:C)が通常用いられ、細胞外ポリ(I:C)はTLR3と相互作用して細胞を刺激することが示されている。しかし、その細胞表面上にTLR3がない細胞、またはTLRシグナル伝達が遮断されている細胞もなお、推定上の細胞RNAヘリカーゼであるレチノイン酸誘導性遺伝子1(RIG-I)の発現を必要とするTLR3非依存的細胞内経路を介して、細胞内センダイウイルス感染によるdsRNAに応答し得る。dsRNAに関してこのアゴニストは、細胞型に応じてTLR3もしくはRIG-Iのいずれかまたはその両方を用いてシグナルを伝達し得る。例えば、骨髄由来樹状細胞はTLR3を用いてdsRNAに応答し、形質細胞様樹状細胞はRIG-Iを用いてdsRNAに応答する。MDA5は、RIG-Iと同様に細胞内dsRNAを感知し、シグナルを伝達する別のRNAヘリカーゼである。

## 【 0 0 8 0 】

要約すると、これまでに同定されたNLRおよびRLHアゴニストには、NOD1の最小活性化剤である-D-Glu-メソ-DAP; NOD2およびNALP-3の活性化剤であるMurNAc-L-Ala-D-イソGlnすなわちムラミルジペプチド(MDP); 同様にNOD2およびNALP-3を活性化する可能性の高いMT-PEリポソーム; ならびにRIG-IおよびMDA5の活性化剤であるポリ(I:C)などのdsRNA、細菌DNA、およびATPe(クリオピリン/NALP3を介して作用する)が含まれる。

## 【 0 0 8 1 】

「プリン受容体」は、1つまたは複数のプリンに結合する細胞膜受容体と定義される。これらの受容体は当初、その主要なリガンドとしてアデノシンを有するP1受容体と、その主要なリガンドとしてATPおよびADPを有するP2受容体に分類された。後にP2受容体は、イオンチャネル型P2Xサブタイプと代謝型P2YサブタイプP1プリン受容体に分類された(V. Ralevic and G. Burnstock, Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol. Rev. 50:413-492, 1998)。P1受容体には、A1、A2A、A2B、およびA3が含まれる。P1受容体のオンラインデータベースは、The Neuromuscular Disease Center, Washington University、ミズーリ州、セントルイスによって主催されている。P2受容体は、The Human Genome Organization Gene Nomenclature Committee, Department of Biology, University College London、英国により主催されているオンラインデータベースに記載されている。P2X受容体には、ホモマーP2X1、P2X2、P2X3、P2X4、P2X5、P2X7、およびP2XL1チャネル、ならびにヘテロマーP2X2/3およびP2X1/5チャネルが含まれる。P2X受容体は、The Neuromuscular Disease Center, Washington University、ミズーリ州、セントルイスによって主催されるオンラインデータベースに記載されている。P2Y受容体には、P2Y1、P2Y2、P2Y4、P2Y6、P2Y11、P2Y12、P2Y13、およびP2Y14が含まれる。P2Y受容体のオンラインリストは、The International Union of Basic and Clinical Pharmacology(IUPHAR)、University of Kansas Medical Center、カンザス州、カンザスシティにより維持されている。1つの局面において、受容体はP2X7である。P2X7の刺激は、多くの腫瘍細胞型を誘導して、アポトーシス細胞死を引き起こし得る(N. White and G. Burnstock, P2 receptors and cancer, Trends Pharmacol. Sci. 27:211-217, 2006)。ATPによるP2X7の刺激はカスパーゼ1を活性

10

20

30

40

50

化し、カスパーゼ1は次に、プロインターロイキン1およびプロインターロイキン18のタンパク質分解活性化を起こして、それぞれ活性インターロイキン1および活性インターロイキン18に変換する(D. Ferrari et al, The P2X7 Receptor: A Key Player in IL-1 Processing and Release, J. Immunol. 176:3877-83, 2006)。

#### 【0082】

「プリン受容体アゴニスト」は、プリン受容体を活性化する物質と定義される。P2X受容体のアゴニストが特に好ましく、P2X7のアゴニストが最も好ましい。P2X7のアゴニストには、アデノシン5'-三リン酸(ATP)、ATP<sub>S</sub>(非加水分解型のATP)、2'-および3'-O-(4-ベンゾイル-ベンゾイル)ATP(BzATP)が非限定的に含まれ、ATP<sub>S</sub>が好ましい。ATPを細胞表面においてプリン受容体に作用するように投与した場合、ATPは「細胞外ATP」すなわち「ATPe」と称される。P2X7の別のアゴニストは、ヒトカテリシジン由来ペプチドLL37/nCAP-18(GenBankアクセッション番号NM\_004345)である。ATP<sub>S</sub>は、マウス皮膚において免疫介在性遅延型過敏反応を増加させることが示されている。ATPは、1分当たり50 ug/kgの最大耐量で、非小細胞肺癌を有するヒトに静脈内注入される。

10

#### 【0083】

「エクトヌクレオチダーゼ」は、細胞外ATPを分解する酵素と定義される。これは場合により、「エクトATPアーゼ」と称される。以下を含むいくつかの酵素ファミリーが、エクトヌクレオチダーゼ活性を有する：NTPDアーゼ1、2、3、および8が細胞外性であるエクトヌクレオシド三リン酸ジホスホヒドロラーゼ(E-NTPDアーゼ)；3つの型のエクトヌクレオチドピロホスファターゼ(E-NPP)、E-NPP-1、E-NPP-2/オートタキシン、およびE-NPP-3；アルカリホスファターゼ；エクト-5'-ヌクレオチダーゼ；ならびにエクトヌクレオシドジホスホキナーゼ(E-NDPK)。これらの分解酵素は、ATPおよびATP類似体を分解することができ、それによってこれらのプリンアゴニストの効果を制限する点で重要である。逆に、これらのエクトヌクレオチダーゼを阻害する薬剤は、プリンアゴニストの有効性を延長および増強し得る。

20

#### 【0084】

サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニストは、免疫刺激剤として単独で使用され得る。例えば、IL-2(10 ug)およびIFN $\gamma$ (10 ug)は、ヒトにおいて10 ug用量でらい腫らい病変に注射され、良好な治療効果が得られている。イヌでのGM-CSFの有効用量は、9週間にわたる毎日の皮下注射による15 ug/kgであり、これは、インビトロにおいて単球が腫瘍細胞増殖を制御する能力を増強した。同様に、サイトカインも、免疫応答を増強するためにDNAワクチンに含められている。

30

#### 【0085】

IL-2は、2200万単位/バイアルの調製物でProleukin(Chiron Corp.)として市販されている。投与の典型的スケジュールは、600,000単位を15分かけて、8時間ごとに最大で14用量を静脈内注射するというものである。IFN $\gamma$  1bは、3000万単位/mlの調製物でActimmune(InterMune, Inc.)として市販されている。投与の典型的スケジュールは、100万単位/平方メートルを週に3回皮下注射するというものである。GM-CSFは、500 ug/mlの調製物でLeukine(Berlex, Inc.)として市販されている。投与の典型的スケジュールは、250 ug/平方メートルを4時間かけて静脈内注射するというものである。

40

#### 【0086】

いずれのサイトカインも、それをコードする核酸として投与することもできる。プラスミドDNAが好ましいが、その理由は、その投与によってワクチン接種部位または腫瘍免疫治療部位においてタンパク質が持続的に放出され、これらの潜在的毒物への全身の曝露を最小限に抑えつつ、流入領域リンパ節での高濃度が達成されるためである。

#### 【0087】

多くの免疫刺激剤の組み合わせが使用可能性を有し、例えばTLRアゴニストを、DC活性化の阻害剤を遮断する薬剤と併用することができる。さらに、腫瘍をCpG ODNおよびIL-10に対する中和抗体と共に注射することができる。他の組み合わせも当技術分野で公知である。以下の組み合わせを含む、相乗的な免疫刺激剤の組み合わせが好ましい。

50

## 【 0 0 8 8 】

インビトロで樹状細胞成熟化を誘導するためのTLRアゴニストの組み合わせの使用を含む、イミダゾキノリンTLR7および/またはTLR8アゴニストとISS-ODNの併用が記載されている。

## 【 0 0 8 9 】

CD40Lはそれ自体では、樹状細胞によるIL-12産生の弱い刺激因子である。CD40LはdsRNAと併用すると、形質細胞様DCを活性化して、インターロイキン12(IL-12)およびI型インターフェロンを産生させ、これが次に1型ヘルパーT細胞応答を活性化する。CD40LおよびCpG ODN(TLR9アゴニスト)は、樹状細胞を相乗的に活性化してIL-12を作製させる。アゴニスト抗CD40抗体 + ポリ(I:C)は、マウスにおいて相乗的抗腫瘍効果を有する。IL-1、TNF、およびIFN と共に培養した樹状細胞にポリ(I:C)を加えることは、IL-12の産生に関して特に促進的であり、1型ヘルパーT細胞の生成が示されている。

10

## 【 0 0 9 0 】

NOD1活性化剤であるGM-TriDAPは、ヒト末梢血単核細胞によるサイトカイン産生に関して、TLR1/2アゴニスト(Pam3CysLys4)、TLR2/6アゴニスト(MALP2)、TLR4アゴニスト(LPS)、TLR7/8アゴニスト(レジキモド)と相乗的に作用することが認められた。ヒト単球および樹状細胞において、NOD1活性化剤(M-triDAP)は、サイトカイン産生に関してTLR4アゴニスト(精製LPS)と相乗的に作用することが認められた。

## 【 0 0 9 1 】

NOD2活性化剤であるMDPは、マウスマクロファージにおけるサイトカイン産生に関して、TLR2アゴニスト(Pam3CysまたはMALP2のいずれか)、TLR3アゴニスト(ポリ(I:C))、またはTLR4アゴニスト(LPS)と相乗的に作用することが認められた。別の研究から、ヒト末梢血単核細胞によるサイトカイン産生に関して、TLR9アゴニストであるISS-ODNと相乗的に作用するNOD2のMDP活性化が認められた。ヒトTHP-1細胞株において、MDPはIL-8産生に関して、TLR1/2アゴニスト(Pam3CysLys4)、TLR4アゴニスト(リポドA)、またはTLR9アゴニスト(ISS-ODN)と相乗的に作用した。ヒト単球および樹状細胞において、NOD2活性化剤(MDPまたはM-triLYSのいずれか)は、サイトカイン産生に関してTLR4アゴニスト(精製LPS)と相乗的に作用することが認められた。マウスにおいて、MDPはTLR2、TLR4、またはTLR9のアゴニストと相乗的に作用する。

20

## 【 0 0 9 2 】

培養したヒト単球由来樹状細胞では、Pam3CSSNAではなくリポドA、ポリ(I:C)、およびCpG DNAと併用したMDP(NOD2アゴニスト)およびFK565(NOD1アゴニスト)による刺激が、培養上清中のインターロイキン12(IL-12) p70およびインターフェロン(IFN)を相乗的に誘導したが、IL-18は誘導せず、また細胞表面上のIL-15を誘導した。

30

## 【 0 0 9 3 】

イヌ由来の単核血液細胞がインビトロで腫瘍細胞の増殖を制御する能力は、リポ多糖(LPS)とMDPの併用によって相乗的に増加した。

## 【 0 0 9 4 】

IFN ならびに同じくIL-3およびGM-CSFは、ヒト単球上のCD40受容体を上方制御し、これらの細胞においてCD40LがIL-6、IL-8、TNFを誘導する能力を劇的に増強する。重要なことには、IFN は、樹状細胞においてCD40LがIL-12産生を誘導する能力を大幅に増強する。一方、IL-4、IL-13、およびGM-CSFなどの付加的なサイトカインもまた、樹状細胞によるIL-12産生に関して、CD40Lと相乗的に作用し得る。IL-4およびTNFもまた、腫瘍の治療に関して相乗的に作用し得る。

40

## 【 0 0 9 5 】

LPS刺激後に、IFN はマウスマクロファージを刺激してIL-12を産生させる。カチオン性脂質製剤中でポリ(I:C)と併用した、IFN をコードするプラスミドDNAは、マウスの結腸癌モデルにおいて転移を減少させた。ISS-ODNと、IL-2、IL-12、およびIFN、IFN、IFN、またはこれらの組み合わせなどのサイトカインとの併用が実証されている。

## 【 0 0 9 6 】

50

インビトロにおいて、IL-2とFK565の併用により、腫瘍細胞を死滅させ得るリンホカイン活性化キラー(LAK)細胞の相乗的活性化が起こった。IFN およびムラミルジペプチド(MDP)リポソームは、インビトロでヒト単球の腫瘍細胞死滅活性を相乗的に誘導した。GM-CSFおよびムラミルトリペプチドリポソーム(L-MTP-PE)は、イヌの肺胞マクロファージによる抗腫瘍死滅(anti-tumor killing)の誘導において相乗的であり、この場合、L-MTP-PEは1~2 mg/mm<sup>2</sup>で静脈内投与された。

【0097】

DC送達を増強してそれに対する免疫応答を調節するための抗原の選択は、免疫応答の増強が所望されるかまたは抗原に対する免疫系の寛容が所望される任意の抗原であってよい。関心対象の特定の抗原に対する免疫応答の増強が所望される場合、そのような抗原には、防御免疫応答が誘発され得る感染症抗原が非限定的に含まれる。例えば、検討中のHIV由来の抗原は、gag、env、pol、tat、rev、nef、逆転写酵素、および他のHIV成分である。ヒトパピローウイルス由来のE6およびE7タンパク質もまた検討中である。さらに、単純ヘルペスウイルス由来のEBNA1抗原もまた検討中である。検討対象となる他のウイルス抗原は、肝炎ウイルス抗原、例えば、B型肝炎ウイルスのS、M、およびLタンパク質、B型肝炎ウイルスのプレS抗原、ならびにC型肝炎ウイルスRNAなどの他の肝炎(例えばA型、B型、およびC型肝炎)ウイルス成分など；インフルエンザウイルス抗原、例えば、赤血球凝集素、ノイラミニダーゼ、核タンパク質、M2、および他のインフルエンザウイルス成分など；麻疹ウイルス抗原、例えば、麻疹ウイルス融合タンパク質および他の麻疹ウイルス成分など；風疹ウイルス抗原、例えば、タンパク質E1およびE2ならびに他の風疹ウイルス成分など；ロタウイルス抗原、例えば、VP7scおよび他のロタウイルス成分など；サイトメガロウイルス抗原、例えば、エンベロープ糖タンパク質Bおよび他のサイトメガロウイルス抗原成分など；呼吸器合胞体ウイルス抗原、例えば、RSV融合タンパク質、M2タンパク質、および他の呼吸器合胞体ウイルス抗原成分など；単純ヘルペスウイルス抗原、例えば、前初期タンパク質、糖タンパク質D、および他の単純ヘルペスウイルス抗原成分など；水痘帯状疱疹ウイルス抗原、例えば、gpI、gpII、および他の水痘帯状疱疹ウイルス抗原成分など；日本脳炎ウイルス抗原、例えば、タンパク質E、M-E、M-E-NS 1、NS 1、NS 1-NS2 A、80% E、および他の日本脳炎ウイルス抗原成分など；狂犬病ウイルス抗原、例えば、狂犬病糖タンパク質、狂犬病核タンパク質、および他の狂犬病ウイルス抗原成分など；ウエストナイルウイルスprMおよびEタンパク質；ならびにエボラエンベロープタンパク質である。ウイルス抗原のさらなる例に関しては、Fundamental Virology, Second Edition, eds. Knipe, D.M. and, Howley P.M. (Lippincott Williams & Wilkins, New York, 2001)を参照されたい。加えて、細菌抗原もまた開示する。本発明の組成物および方法において使用され得る細菌抗原には、これらに限定されないが、百日咳細菌抗原、例えば、百日咳毒素、線維状赤血球凝集素、パータクチン、FIM2、FIM3、アデニル酸シクラーゼ、および他の百日咳細菌抗原成分など；ジフテリア細菌抗原、例えば、ジフテリア毒素またはトキシソイドおよび他のジフテリア細菌抗原成分など；破傷風細菌抗原、例えば、破傷風毒素またはトキシソイドおよび他の破傷風細菌抗原成分など；連鎖球菌細菌抗原、例えば、Mタンパク質および他の連鎖球菌細菌抗原成分など；ブドウ球菌細菌抗原、例えば、IsdA、IsdB、SdrD、およびSdrEなど；グラム陰性桿菌細菌抗原、例えば、リポ多糖、フラジェリン、および他のグラム陰性細菌抗原成分など；結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)細菌抗原、例えば、ミコール酸、熱ショックタンパク質65(HSP65)、30 kDa主要分泌タンパク質、抗原85A、ESAT-6、および他のマイコバクテリア抗原成分など；ピロリ菌(*Helicobacter pylori*)細菌抗原成分；肺炎球菌細菌抗原、例えば、ニューモリシン、肺炎球菌莢膜多糖、および他の肺炎球菌細菌抗原成分など；インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)細菌抗原、例えば、莢膜多糖および他のインフルエンザ菌細菌抗原成分など；炭疽菌細菌抗原、例えば、炭疽菌防御抗原、炭疽菌致死因子、および他の炭疽菌細菌抗原成分など；ペスト菌(*Yersinia pestis*)由来のF1およびVタンパク質；リケッチア細菌抗原、例えば、ro mpおよび他のリケッチア細菌抗原成分などが含まれる。任意の他の細菌抗原、マイコバクテリア、マイコプラズマ、リケッチア、またはクラミジア抗原もまた、本明細書に記載の

10

20

30

40

50

細菌抗原と共に含まれる。原虫および他の寄生虫抗原の例には、これらに限定されないが、熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)抗原、例えば、メロゾイト表面抗原、スポロゾイト表面抗原、スポロゾイト周囲抗原、生殖母細胞/配偶子表面抗原、血液期抗原pf 1 55/RESA、および他のマラリア原虫抗原成分など；トキソプラズマ抗原、例えば、SAG-1、p30、および他のトキソプラズマ抗原成分；住血吸虫抗原、例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、パラミオシン、および他の住血吸虫抗原成分など；森林型熱帯リーシュマニア(*Leishmania major*)および他のリーシュマニア抗原、例えば、gp63、リポホスホグリカンおよびその関連タンパク質、ならびに他のリーシュマニア抗原成分など；ならびにクルーズトリパノソーマ(*Trypanosoma cruzi*)抗原、例えば、75~77 kDa抗原、56 kDa抗原、および他のトリパノソーマ抗原成分などが含まれる。真菌抗原の例には、これらに限定されないが、カンジダ属種、アスペルギルス属種、プラストミセス属種、ヒストプラズマ属種、コクシジオイデス属種、癩菌(*Malassezia furfur*)および他のマラセジヤ属種、エクソフィアラ・ウェルネッキイ(*Exophiala werneckii*)および他のエクソフィアラ属種、ピエドライア・ホルタイ(*Piedraia hortai*)および他のピエドライア属種、トリコスポルム・ベイゲリイ(*Trichosporum beigeli*)および他のトリコスポルム属種、ミクロスポルム属種、白癬菌属種、エピデルモフィトン属種、スポロトリクス・シェンキイ(*Sporothrix schenckii*)および他のスポロトリクス属種、フォンセカエア・ペドロソイ(*Fonsecaea pedrosoi*)および他のフォンセカエア属種、ワングエラ・デルマチチジス(*Wangiella dermatitidis*)および他のワングエラ属種、シュードアレシエリア・ボイディイ(*Pseudallescheria boydii*)および他のシュードアレシエリア属種、マツレラ・グリセア(*Madurella grisea*)および他のマツレラ属種、リゾプス属種、ユミケカビ属種、ならびにケカビ属種由来の抗原が含まれる。プリオン病抗原の例には、PrP、アミロイド、および他のプリオン関連タンパク質が含まれる。

10

20

30

40

50

#### 【0098】

上記の感染性および寄生性の病原体に加えて、非感染性病原体に対する免疫原性の増強が所望されるもう一つの分野とは、癌を非限定的に含む悪性増殖性疾患の分野であり、ここでは、癌抗原を発現する細胞が体内から排除されることが望ましい。本発明の組成物および方法において使用され得る腫瘍抗原には、これらに限定されないが、前立腺特異抗原(PSA)、乳房、卵巣、精巣、黒色腫、テロメラーゼ；P糖タンパク質などの多剤耐性タンパク；MAGE-1、フェトプロテイン、癌胎児抗原、変異p53、パピローマウイルス抗原、ガングリオシド、または黒色腫もしくは他の腫瘍細胞の他の糖質含有成分が含まれる。本明細書に記載の組成物および方法において任意の腫瘍細胞型由来の抗原を使用できることが、本発明により意図される。抗原は、癌細胞、または膜タンパク質のような癌細胞から単離された免疫原性物質であってよい。サバイピンおよびテロメラーゼ共通抗原、ならびにMAGEファミリーの癌精巣抗原が含まれる。自己免疫に関与することが示されており、寛容を誘導するために本発明の方法において使用され得る抗原には、これらに限定されないが、ミエリン塩基性タンパク質、多発性硬化症のミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質およびプロテオリピドタンパク質、ならびに関節リウマチのCIIコラーゲンタンパク質が含まれる。

#### 【0099】

抗原は、非限定的な例として、強力なT細胞媒介免疫(樹状細胞による)を動員するワクチンを必要とするHZV-1、EBV、HBV、インフルエンザウイルス、SARSウイルス、ポックスウイルス、マラリア、またはHSVなどの感染性病原体の一部であってよい。

#### 【0100】

「腫瘍」という用語は、内因性組織の(多少脱抑制された)組織新生物の形態、特に自発的、自律的、かつ不可逆的な過剰増殖の形態の、少なくとも1つの細胞または細胞塊を表し、その増殖は一般に、特定の細胞および組織機能の多少の明白な喪失を伴う。この細胞または細胞塊は、例えば黒色腫または癌腫などのように、その増殖に関して、それ自体によっても宿主生物の調節機構によっても効率的に阻害されない。腫瘍抗原には、悪性細胞自体の内部またはその表面上に存在する抗原ばかりでなく、内皮細胞および他の血管成

分を含む腫瘍の間質支持組織に存在する抗原も含まれる。

【0101】

関連局面において、新生物とは異常な新規増殖物を指し、したがって腫瘍と同じ意味を表し、良性または悪性であり得る。さらに、そのような新生物には細胞増殖性疾患が含まれる。

【0102】

本明細書で使用する「ポリペプチド」という用語は、その従来の意味で、すなわちアミノ酸の配列として用いられる。ポリペプチドは特定の長さの産物に限定されず；したがって、ペプチド、オリゴペプチド、およびタンパク質はポリペプチドの定義に含まれ、このような用語は、特記しない限り本明細書で互換的に用いられ得る。本用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾、例えばグリコシル化、アセチル化、リン酸化など、ならびに当技術分野で公知の天然および非天然の他の修飾を指すわけではないが、除外するわけでもない。ポリペプチドはタンパク質全体であってもよいし、またはそのサブ配列であってもよい。本発明の状況において関心対象となる特定のポリペプチドは、エピトープ、すなわち、ポリペプチドの免疫原特性に実質的に関与し、免疫応答を誘発し得る抗原決定基を含むアミノ酸サブ配列である。

10

【0103】

1つの態様において、関心対象のポリペプチドには、これらに限定されないが、CD40L(GenBankアクセッション番号P63305、P63304、Q918D8、Q9BDN3、Q9BDM7)；グルココルチコイド誘導性TNFR関連遺伝子リガンド(GIRTL)(GenBankアクセッション番号Q9Y5U5)；NGF(GenBankアクセッション番号AAA40599、AAA30666、AAA72805、CAA37703、AAB58676)；CD137L/4-1BBL(GenBankアクセッション番号NP\_033430、P41274)；TNF (GenBankアクセッション番号NP\_001003244、NP\_038721、AAB06492、AAB01775)；CD143L/OX40L(GenBankアクセッション番号P23510、AAX43997、NP\_003317)；CD27L/CD70(GenBankアクセッション番号P32970、O55237)；FasL(GenBankアクセッション番号P63308、P63307、P63308)；CD30L(GenBankアクセッション番号NP\_001235、AAH93630、P32971)；TNF /LT (GenBankアクセッション番号AAA18593、NP\_034865)；LT (GenBankアクセッション番号Q5TM22、Q9TSV8)；TRAIL(GenBankアクセッション番号AAC52345、AAC50332)；BAFF(GenBankアクセッション番号Q9Y275)；LIGHT(GenBankアクセッション番号AAQ89171、AAC39563)、RANKL(GenBankアクセッション番号AAB86811、NP\_003692)；Acrp30(GenBankアクセッション番号AAZ81421、AAH92565、AAK13417、AA80543)；およびサーファクタントタンパク質D(SP-D)(Genbankアクセッション番号NP\_033186、AAB25038、AAB25037、AAH03705)が含まれる。

20

30

【0104】

1つの態様において、ポリペプチドは構造ドメインにより定義される。例えば、受容体結合時の伝達に関連し、細胞の細胞質区画に見出されるシグナル伝達ドメインは、機能に基づいて区切られるタンパク質分子の領域と定義され、受容体の細胞質基質と関連している。そのようなシグナル伝達ドメインには、例えば、TNFSFRのCD40の細胞質ドメインが含まれる。

【0105】

別の局面において、本発明は、本明細書に記載するポリペプチド組成物の変種を提供する。本発明によって一般的に包含されるポリペプチド変種は典型的に、本明細書に記載のポリペプチド配列に対し、その長さに沿って、(後述のように決定される)少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%もしくはそれ以上の同一性を示す。

40

【0106】

他の例示的な態様において、ポリペプチドは、本明細書に記載の複数のポリペプチドを含むか、または本明細書に記載の少なくとも1つのポリペプチド、および公知の細菌タンパク質などの非関連配列を含む融合ポリペプチドであってよい。融合パートナーは例えば、Tヘルパーエピトープ、特にヒトによって認識されるTヘルパーエピトープを提供する上で役立つか(免疫学的融合パートナー)、または天然組換えタンパク質よりも高い収率

50



でタンパク質を発現させる上で役立つ(発現エンハンサー)。特定の融合パートナーは、多量体の形成を増強する。関連局面において、「多量体化」し、関心対象のタンパク質を凝集させるための融合パートナーとして役立つポリペプチドには、コレクチン(コラーゲン性レクチン)およびフィコリン(例えば、Ohashi and Erikson, J Biol Chem (2004) 279(8):6534-6539を参照されたい)、Acrp30などのC1qファミリータンパク質が含まれる。

#### 【0107】

1つの態様において、CD40Lは可溶性多量体分子として発現させている。関連局面においては、CD40Lの2-および4-三量体多量体をコードするDNAワクチンアプローチを開示する。例えば、TNFSFリガンドの細胞外ドメイン(ECD)を、典型的にC1qおよびコレクチンファミリーメンバーから得られた多量体化ドメインと組み合わせることによって、そのような融合タンパク質を生成することができ、この場合、C1q/コレクチンファミリーメンバーの糖鎖認識ドメイン(CRD)をTNFSFリガンドのECDにより置換する。別の態様では、関心対象の抗原、腫瘍壊死因子スーパーファミリー受容体(TNFSFR)またはトール様受容体(TLR)のシグナル伝達ドメイン、およびクラスター化ペプチドを含む融合タンパク質が想定される。関連局面において、本発明に開示する融合タンパク質は、翻訳エンハンサー因子(TEE)を含み得る。本明細書で使用する「翻訳エンハンサー因子(TEE)」とは、その文法上の変化形も含めて、単位mRNA当たりの誘導されるタンパク質量を増加させるシス作動性配列を意味する。関連局面において、TEEには、Gtx配列(例えば、Gtx9-nt、Gtx8-nt、Gtx7-nt)を非限定的に含む、HCV-IRES、IRES、およびIRES因子が含まれる。別の関連局面において、TEEには、シストロンに機能的に連結させた場合に単位mRNA当たりの誘導されるタンパク質量を増加させる、N-18ランダムヌクレオチドが含まれ得る。

#### 【0108】

別の関連局面において、そのような因子の配列には、これらに限定されないが、GenBankアクセッション番号AX205123およびAX205116(Gtx IRES因子)、D 17763(HCV-IRES、5'非翻訳領域)が含まれる。

#### 【0109】

いくつかの他のTNFSFリガンドもまた、候補分子アジュバント/融合パートナーである。1つの態様では、GITR(グルココルチコイド誘導性TNF受容体関連)がCD4+ CD25+調節性T細胞(Treg)上に発現されることから、GITRのリガンドが想定される。TregのGITR刺激はその免疫抑制効果を消失させ、免疫応答を増強する。関連局面において、4-三量体可溶性多量体型のGITRLもまた、CD8+ T細胞の強力な分子アジュバントである。

#### 【0110】

融合ポリペプチドは一般に、化学的結合を含む標準的技法を用いて調製され得る。融合ポリペプチドを組換えポリペプチドとして発現させることが好ましく、これによって発現系において、非融合ポリペプチドと比較して高いレベルの産生が可能になる。簡潔に説明すると、ポリペプチド成分をコードするDNA配列を個別に構築し、適切な発現ベクターに連結する。1つのポリペプチド成分をコードするDNA配列の3'末端を、配列の読み枠が一致するように、ペプチドリンカーを伴いまたは伴わずに、第2ポリペプチド成分をコードするDNA配列の5'末端に連結する。これによって、両方の成分ポリペプチドの生物学的活性を保持する単一の融合タンパク質への翻訳が可能になる。

#### 【0111】

ペプチドリンカー配列を使用して、第1および第2ポリペプチド成分を、各ポリペプチドが確実にその二次構造および三次構造に折りたたまれるのに十分な距離で分離することができる。このようなペプチドリンカー配列は、当技術分野で周知の標準的な技法を使用して融合ポリペプチドに組み込まれる。適切なペプチドリンカー配列は、以下の要因に基づいて選択することができる：(1) 可動性のある伸長した高次構造をとる能力；(2) 第1および第2ポリペプチド上の機能的エピトープと相互作用し得る二次構造をとれないこと；ならびに(3) ポリペプチドの機能的エピトープと反応し得る疎水性残基または荷電残基の欠如。好ましいペプチドリンカー配列は、Gly、Asn、およびSer残基を含む。ThrおよびAl

10

20

30

40

50

aなどのほぼ中性の他のアミノ酸もまた、リンカー配列に使用することができる。リンカーとして有用に使用され得るアミノ酸配列には、Maratea et al., Gene 40:39-46, 1985 ; Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262, 1986 ; 米国特許第4,935,223号および米国特許第4,751,180号に開示されているアミノ酸配列が含まれる。リンカー配列は一般に、1~約50アミノ酸長であってよい。第1および第2ポリペプチドが、機能的ドメインを分離しかつ立体的干渉を妨げるために用いられ得る非必須N末端アミノ酸領域を有する場合には、リンカー配列は必要ではない。

#### 【0112】

連結されたDNA配列を、適切な転写または翻訳調節因子に機能的に連結させる。DNAの発現に關与する調節因子は、第1ポリペプチドをコードする配列の5'側にのみ位置する。同様に、翻訳の終了に必要な終止コドンおよび転写終結シグナルは、第2、第3、または第4などのポリペプチドをコードするDNA配列の3'側にのみ存在する(すなわち、終止コドンは、キメラタンパク質分子を構成する異なるポリペプチドの数に応じて、最終ポリペプチド上に存在することになる)。

10

#### 【0113】

本発明は他の局面において、ポリヌクレオチド組成物を提供する。「DNA」および「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書において本質的に互換的に用いられ、特定種的全ゲノムDNAを含まない単離されたDNA分子を指す。本明細書で使用する「単離された」とは、ポリヌクレオチドが他のコード配列から実質的に分離されていること、およびDNA分子が、大きな染色体断片または他の機能的遺伝子もしくはポリペプチドコード領域などの、非関連コードDNAの大部分を含まないことを意味する。当然のことながら、これは元々単離されているDNA分子を指し、後に人工的にその部分に付加された遺伝子またはコード領域を除外するものではない。

20

#### 【0114】

当業者に理解されるように、本発明のポリヌクレオチド組成物は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチドなどを発現するか、または発現するように適合化され得るゲノム配列、ゲノム外配列およびプラスミドコード配列、ならびにより小さな改変遺伝子部分を含み得る。このような部分は、天然で単離され得るか、または人工的に合成により改変され得る。

#### 【0115】

同様に当業者によって認識されるように、本発明のポリヌクレオチドは一本鎖でも二本鎖であってもよく、かつDNA分子(ゲノム、cDNA、または合成)でもRNA分子でもよい。RNA分子には、イントロンを含みかつ1対1の様式でDNA分子に対応するHnRNA分子、および、イントロンを含まないmRNA分子が含まれ得る。その必要はないものの、さらなるコード配列または非コード配列が本発明のポリヌクレオチド内に存在してもよく、その必要はないものの、ポリヌクレオチドは他の分子および/または支持材に連結されてもよい。

30

#### 【0116】

ポリヌクレオチドは、天然配列(すなわち、本発明のポリペプチド/タンパク質またはその一部をコードする内因性配列)を含み得るか、またはこのような配列の免疫原性変種または誘導体を含む変種または誘導体をコードする配列を含み得る。

40

#### 【0117】

比較のためのポリペプチドまたは核酸配列の最適アライメントは、バイオインフォマティクスソフトウェアのLasergeneスイート(DNASTAR, Inc.、ウィスコンシン州、マディソン)におけるMegalignプログラムを使用して、初期設定パラメータを用いて行うことができる。このプログラムは、以下の参考文献に記載されているいくつかのアライメント図式を具体化している: Dayhoff, M. O. (1978) A model of evolutionary change in proteins-Matrices for detecting distant relationships., Dayhoff, M. O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington D.C. Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358 ; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press,

50

Inc., San Diego, Calif.; Higgins, D. G. and Sharp, P. M. (1989) CABIOS 5:151-153; Myers, E. W. and Muller W. (1988) CABIOS 4:11-17; Robinson, E. D. (1971) Comb. Theor 11:105; Saitou, N. Nei, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. (1973) Numerical Taxonomy--the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, Calif.; Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

【0118】

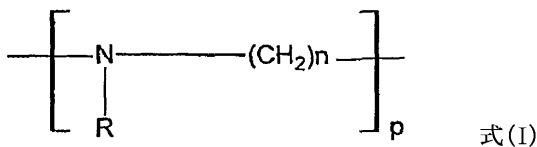
または、比較のための配列の最適アライメントは、Smith and Waterman (1981) Adv. Math 2:482の局所的同一性アルゴリズムにより、Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443の同一性アラインメントアルゴリズムにより、Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444の類似性検索法により、これらのアルゴリズムのコンピューターによる実行(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis.のGAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、およびTFASTA)により、または目視により行うことができる。

【0119】

パーセント配列同一性および配列類似性を決定するのに適したアルゴリズムの一例は、Altschul et al. (1977) Nucl. Acids Res. 25:3389-3402、およびAltschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410にそれぞれ記載されているBLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムである。BLASTおよびBLAST 2.0は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドについてパーセント配列同一性を決定するために、例えば本明細書中に記載のパラメータを用いて使用することができる。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationを通して公的に利用可能である。アミノ酸配列に関しては、スコアリング行列を使用して累積スコアを算出することができる。各方向へのワードヒットの伸長は、以下の場合に中断される：累積アライメントスコアが、最大達成値からX量減少した場合；1つまたは複数の負のスコア残基アラインメントの累積に起因して、累積スコアがゼロ以下になった場合；またはどちらか一方の配列の末端に到達した場合。BLASTアルゴリズムパラメータ、W、T、およびXによって、アラインメントの感度および速度が決まる。

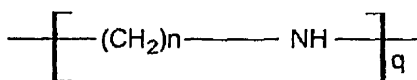
【0120】

本発明はまた、開示した核酸組成物と併用できる、例えば式(I)のカチオン性ポリマーの使用に関する。



【0121】

1つの態様において、式(I)中、Rは水素原子または式



の基であり、

R基は(CH<sub>2</sub>)末端において主式中のN原子に結合し、nは2~10の整数であり、かつpおよびqは整数であり、ただし和p + qは、ポリマーの平均分子量が100~10<sup>7</sup>となるような値である。非限定的な例として、そのようなポリマーの有用なR基には、D.G. Anderson et al., A Polymer library approach to suicide gene therapy for cancer, Proc Natl Acad Sci USA, 101:16028-16033, 2004によって提供されるものが含まれる。1つの局面において、ポリ(アミノエステル)のライブラリーに由来するアミノアルコールはR基を含む。1つの局面において、2-(ピリジルジチオ)-エチルアミン(PDA)はR基を含む。別の局面において、チオール反応性側鎖を有するポリ(アミノエステル)はR基を含む。そのような成分R

基は当技術分野において公知である。

【0122】

1つの局面において、ポリエチレンイミン(PEI)およびポリプロピレンイミン(PPI)ポリマーは有利な特性を有する。

【0123】

関連局面において、本発明を実行するためのポリマーは、分子量が $10^3 \sim 5 \times 10^6$ のポリマーである。一例として、これには、平均分子量50,000 Daのポリエチレンイミン(PEI50K)または平均分子量800,000 Daのポリエチレンイミン(PEI800K)が含まれる。

【0124】

本発明の状況において用いられるポリマーは、種々の方法で得ることができる。ポリマーは、まず初めの段階で、アニオン重合条件下で対応する単量体から(例えば、エチレンイミンの重合)、または、二酸とジアミンとの重縮合によって得られたポリアミドの還元によって、もしくは代替的に、ジアルデヒドとジアミンとの重縮合によって得られたイミンの還元によって、化学的に合成することができる。さらに、これらのポリマーのいくつか、特にPEI50KまたはPEI800Kなどは市販されている。

【0125】

本発明の組成物において、核酸はデオキシリボ核酸またはリボ核酸であってよい。問題の配列は天然または人工起源のもの、特にゲノムDNA、cDNA、mRNA、tRNA、rRNA、ハイブリッド配列、または合成もしくは半合成配列であってよい。さらに核酸は、オリゴヌクレオチドから染色体までの非常に様々な大きさであってよい。これらの核酸は、ヒト、動物、植物、細菌、ウイルスなどに由来してよい。これらは、当業者に公知の任意の技法によって、特にライブラリーのスクリーニングによって、化学合成によって、または代替的に、ライブラリーのスクリーニングにより得られた配列の化学的もしくは酵素的修飾を含む混合法によって得ることができる。これらはさらに、プラスミドベクターなどのベクター中に組み込んでもよい。所望のポリペプチドを発現させるには、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列またはその機能的等価物を、適切な発現ベクター、すなわち挿入されたコード配列の転写および翻訳に必要な因子を含むベクターに挿入し得る。当業者に周知の方法を用いて、関心対象のポリペプチドをコードする配列、ならびに適切な転写および翻訳制御因子を含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、インビトロ組換えDNA技法、合成技法、およびインビボ遺伝子組換えが含まれる。このような技法は、例えば、Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y., および Ausubel, F. M. et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.に記載されている。

【0126】

ポリヌクレオチド配列を含めてこれを発現させるために、種々の発現ベクター/宿主系を使用することができる。これには、組換えバクテリオファージ、プラスミド、もしくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌などの微生物；酵母発現ベクターで形質転換された酵母；ウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)を感染させた昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV)もしくは細菌発現ベクター(例えば、TiまたはpBR322プラスミド)で形質転換された植物細胞系；または動物細胞系が含まれるが、これらに限定されない。

【0127】

発現ベクター中に存在する「制御因子」または「調節配列」は、ベクターの非翻訳領域--エンハンサー、プロモーター、5'および3'非翻訳領域--であり、これらは宿主細胞タンパク質と相互作用して転写および翻訳を行う。このような因子は、長さおよび特異性が異なり得る。使用するベクター系および宿主に応じて、構成的プロモーターおよび誘導性プロモーターを含む、任意数の適切な転写および翻訳因子を使用することができる。例えば、細菌系でクローニングする場合、pBLUESCRIPTファージミド(Stratagene、カリフォルニア州、ラホーヤ)またはpSPORT1プラスミド(Gibco BRL、メリーランド州、ゲイサーズバー

10

20

30

40

50

グ)などのハイブリッドlacZプロモーターのような誘導性プロモーターを使用することができる。哺乳動物細胞系では、哺乳動物遺伝子または哺乳動物ウイルス由来のプロモーターが一般に好ましい。非限定的な例として、プロモーターには、CMV、アクチン、EF2、RSV LTR、HIV LTR、HTLV-1 LTR由来のプロモーター、および複合プロモーター(D.H. Barouch et al, A human T-cell leukemia virus type 1 regulatory element enhances the immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 DNA vaccines in mice and nonhuman primates, J. Virol. 79: 8828-8834, 2005)が含まれる。1つの局面において、プロモーターは、CMVプロモーター、またはニワトリアクチンプロモーターの一部を含むプロモーター(H. Niwa et al, Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector, Gene 108:193-199, 1991)である。ポリペプチドをコードする配列の複数コピーを含む細胞株を作製する必要がある場合には、SV40またはEBVに基づくベクターを、適切な選択マーカーと共に有利に使用することができる。

10

#### 【0128】

細菌系では、発現させるポリペプチドの意図される用途に応じて、いくつかの発現ベクターのうちのいずれかを選択することができる。例えば抗体の誘導用など大量に必要な場合には、例えば、容易に精製される融合タンパク質の高レベル発現を導くベクターが使用され得る。このようなベクターには、関心対象のポリペプチドをコードする配列が、ハイブリッドタンパク質が産生されるように、 $\lambda$ -ガラクトシダーゼのアミノ末端Metおよび次の7残基の配列と共にインフレームでベクターに連結され得るpBLUESCRIPT(Stratagene)などの、多機能性大腸菌クローニングおよび発現ベクターや、pINベクター(Van Heeke, G. and S. M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509)などが非限定的に含まれる。pGEXベクター(Promega、ウィスコンシン州、マディソン)もまた、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させるために用いられ得る。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン-アガロースビーズへの吸着、およびそれに続く遊離グルタチオンの存在下での溶出によって、溶解細胞から容易に精製することができる。このような系で作製されるタンパク質は、関心対象のクローニングされたポリペプチドがGST成分から自由に放出され得るように、ヘパリン、トロンピン、またはXA因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計することができる。

20

#### 【0129】

酵母すなわちサッカロミセス・セレビスエ(Saccharomyces cerevisiae)では、因子、アルコールオキシダーゼ、およびPGHなどの構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むいくつかのベクターを使用することができる。総説については、Ausubel et al. (前記)、およびGrant et al. (1987) Method Enzymol. 153:516-544を参照されたい。

30

#### 【0130】

昆虫系もまた、関心対象のポリペプチドを発現させるために使用することができる。例えば、1つのこのような系では、オートグラフィア・カリフォルニカ(Autographa californica)核多角体病ウイルス(AcNPV)が、ヨトウガ(Spodoptera frugiperda)細胞またはトリコプルシア・ラーバエ(Trichoplusia larvae)で外来遺伝子を発現させるためのベクターとして用いられる。ポリペプチドをコードする配列をポリヘドリン遺伝子などのウイルスの非必須領域にクローニングして、ポリヘドリンプロモーターの制御下に置くことができる。ポリペプチドコード配列の挿入の成功によりポリヘドリン遺伝子は不活化され、コートタンパク質を欠く組換えウイルスが産生される。次いでこの組換えウイルスを用いて、例えばヨトウガ細胞またはトリコプルシア・ラーバエを感染させることができ、そこで関心対象のポリペプチドが発現され得る(Engelhard, E. K. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91:3224-3227)。

40

#### 【0131】

哺乳動物宿主細胞では、ウイルスに基づくいくつかの発現系が一般に利用可能である。例えば、アデノウイルスを発現ベクターとして使用する場合には、後期プロモーターおよび3連リーダー配列からなるアデノウイルス転写/翻訳複合体に、関心対象のポリペプチドをコードする配列を連結できる。ウイルスゲノムの非必須のE1またはE3領域における挿入

50

により、感染宿主細胞においてポリペプチドを発現し得る生存ウイルスを得ることができ  
る(Logan, J. and Shenk, T. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3655-3659)。さらに、  
哺乳動物宿主細胞における発現を増加させるために、ラウス肉腫ウイルス(RSV)エンハン  
サーなどの転写エンハンサーを使用することもできる。

#### 【0132】

関心対象のポリペプチドをコードする配列のより効率的な翻訳を達成するために、特定  
の開始シグナルを使用することもできる。このようなシグナルには、ATG開始コドンおよ  
び隣接配列が含まれる。ポリペプチドをコードする配列、その開始コドン、および上流配  
列を適切な発現ベクターに挿入した場合、さらなる転写および翻訳制御シグナルは必要で  
ないと考えられる。しかし、コード配列またはその一部のみを挿入した場合には、ATG開  
始コドンを含む外因性翻訳制御シグナルが提供されるべきである。さらに、挿入物全体の  
翻訳を確実にするには、開始コドンは正確な読み枠内にあるべきである。外因性翻訳因子  
および開始コドンは、天然および合成の種々の起源のものであってよい。発現効率は、文  
献に記載されているような(Scharf, D. et al. (1994) Results Probl. Cell Differ. 20  
:125-162)、使用する特定の細胞系に適したエンハンサーを含めることによって増強する  
ことができる。

10

#### 【0133】

さらに、挿入配列の発現を調節する能力、または所望の様式で発現タンパク質を処理す  
る能力に関して、宿主細胞株を選択することができる。ポリペプチドのこのような修飾に  
は、これらに限定されないが、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、  
脂質付加、およびアシル化が含まれる。タンパク質の「プレプロ」型を切断する翻訳後  
プロセッシングを用いて、正確な挿入、折りたたみ、および/または機能を促進することも可  
能である。外来タンパク質の正確な修飾およびプロセッシングを確実にするために、このよ  
うな翻訳後活性に関して特定の細胞機構および特徴的な機構を有するCHO、COS、HeLa、MD  
CK、HEK293、およびWI38などの種々の宿主細胞を選択することができる。

20

#### 【0134】

通常はウイルスによる微生物送達に依存しない、一般的クラスの遺伝子または核酸送達  
は、「非ウイルス性遺伝子送達」と称される。別称は、遺伝子送達用の「合成ベクター」  
または「人工的ベクター」である。これらは典型的に、DNAプラスミドまたは他の核酸と  
共に複合体、ナノ粒子(直径1ミクロン未満と定義される)、またはさらには微粒子(直径1  
ミクロン以上と定義される)を形成するポリマーを含む。細胞において核酸がコードする  
遺伝子の発現を増強する多くの種類のポリマーが記載されている。

30

#### 【0135】

1つの局面においては、ポリエチレンジアミン(PEI)を送達剤として使用できる。ポリエチ  
レンジアミン(PEI)は、DNA送達用に最も確立されたポリマーの1つである。PEIは正に荷電し  
ており、負に荷電したDNAと複合体を形成することが可能である。そのマンノシル型は、  
プラスミドDNAを静止マクロファージおよび樹状細胞に指向し、これらの細胞はそのマン  
ノース受容体を使用してこれをエンドサイトーシスにより取り込む(QBioGene, Inc.によ  
りMan jetPEIとして販売されている)。PEIはそのアミン基のために、エンドソーム小胞中  
で通常酸性であるpHを効率的に緩衝し、それによって、DNA積載物に対する酸損傷を防ぐ  
「プロトンスポンジ」として役立つ。PEIの多くの変化形が記載されている。

40

#### 【0136】

別の局面では、カチオン性脂質を核酸の送達剤として使用できる。カチオン性脂質およ  
び関連化合物は、ワクチンの有効性、および細胞において核酸がコードする遺伝子の発現  
を増強するために使用されている。DNAまたはRNAはまた、アミノアルキルグルコサミニド  
4-リン酸(AGP)からなるマイクロスフェアに封入され得る。場合によっては、脂質-DNA複合  
体(「リポプレックス」)は、免疫刺激性であり、プラスミドDNAの抗腫瘍効果を増強する  
直接的な炎症活性を有する。

#### 【0137】

ポリ-L-リジン、ポリ-L-グルタミン酸、またはブロック共重合体などのカチオン性ポリ

50

マーもまた、核酸の送達剤となり得る。一例として、ポリ-L-アルギニンは、免疫応答の増強および延長に関して、CpGモチーフを含むオリゴデオキシヌクレオチド(CpG-ODN)と相乗的に作用することが認められ、炎症促進性サイトカインのCpG-ODN誘導性全身放出を妨げた。抗原、CpGモチーフを含む免疫原性オリゴデオキシヌクレオチド(CpG-ODN)、およびポリカチオン性ポリマーを含む薬学的組成物が、当技術分野において公知である。

【0138】

関連局面において、CpG-ODNとは、ホスホロチオエート結合を用いて生成された、非メチル化シトシン-グアノシンモチーフを含む一本鎖オリゴデオキシヌクレオチドを指す。

【0139】

1つの局面において、デンドリマーポリマー送達剤には、Starburstポリマー(Dow Chemical)が含まれる。別の局面では、ポロキサマーおよびポロキサミン組成物を両方含むポロキサミン送達剤が使用され得る。

【0140】

乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)は、縫合糸を作製するために用いられる。これはまた、ワクチン成分を送達するために製剤化され得る。例えば、HIVタンパク質をコードするプラスミドDNAは、臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)と共にPLGAで製剤化され、得られたPLG-CTAB-DNA微粒子は、改善された免疫応答を誘発することが判明した。PLGAはまた、DNA送達用のマイクロスフェアを作製するために、ポリエチレンイミン(PEI)と併用され得る。DNAおよびTLRアゴニストを取り込む、PLGAおよび他の材料から作製された微粒子が、Chironによって開発された。ポリマー成分は、(1) ポリ(a-ヒドロキシ酸)、ポリヒドロキシ酪酸、ポリカプロラクトン、ポリオルトエステル、ポリ酸無水物、およびポリシアノアクリル酸からなる群、ならびに(2) 界面活性剤から選択され、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、免疫調節剤、抗原、およびアジュバントを送達するために使用された。

【0141】

別の種類の遺伝子送達ポリマーは、 $\alpha$ -アミノエステルから形成される。C32、U28、およびJJ28などのこの系列の薬剤は、コンビナトリアルライブラリーアプローチを用いて同定された。C32は、腫瘍におけるプラスミドDNA遺伝子発現を4倍増加させることが示されたため、腫瘍免疫療法に特に有用であると考えられる。プラスミドDNAをC32、U28、またはJJ28と複合体形成させるには、ポリマーを最初にDMSOに溶解する(100 mg/ml)。次いで、DNA(50  $\mu$ g)を25 mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0) 25  $\mu$ lに懸濁し、同じく25 mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0) 25  $\mu$ lに希釈したポリマー溶液(1,500  $\mu$ gまたは25  $\mu$ g)と混合する。ポリマー/DNA混合物を室温で5分間インキュベートした後、PBS中の30%グルコース10  $\mu$ lをポリマー/DNA混合物50-  $\mu$ lに添加する。DNA 50  $\mu$ gをポリマー1,500  $\mu$ gと共に使用する場合、これは1:30比と見なされる。DNA 50  $\mu$ gをポリマー25  $\mu$ gと共に使用する場合、これは2:1比と見なされる。以前の研究では、腫瘍内注射には1:30比が良好に作用し、筋肉内DNAワクチン接種には2:1比が最良に作用した。

【0142】

DNAワクチン接種に関して、DNAをDCに標的化する1つのアプローチは、DNAをカチオン性乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)粒子に吸着させることであり、これによってDNAは食作用性APCに標的化され、CD8+ T細胞応答および抗体価はそれぞれ100倍および1,000倍増強される。この利点にもかかわらず、低分子量のPLGA系でさえ、インビトロにおいてDC取り込み後に封入DNAを完全に放出するのに最長で13日要する。大部分のDCは、活性化および流入領域リンパ節への遊走後7日以内に死滅するため、この期間は長すぎる。さらにPLGA微粒子は、水性環境においてわずか3日後に、極めて低いpH環境(pH < 3.5)を生じ得る。この酸性レベルは、プラスミドDNAの活性を大幅に減少させることが示されている。PLGA微粒子はまたファゴリソソーム小胞に局限して残り、そのため移入されたDCにおける遺伝子発現が制限される。したがって、微粒子が細胞内pH変化後にその積載物を即座に放出できるように、PLGAと組み合わせて生分解性pH感受性ポリアミノエステル(PBAE)を含めることができる。これらのハイブリッドPLGA/PBAE微粒子内にDNAワクチンを封入することで、

10

20

30

40

50

CD8+ T細胞応答は強く増強され、またDCは刺激されてCD40を上方制御した。PBAEおよびPLGAでマイクロカプセル化されたプラスミドDNAを調製するには、プラスミドDNA 1 mgを1 mM EDTAおよび300 nM D(+)-ラクトースの水溶液に添加し、次いで超音波処理器にてCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中のPBAE/PLGA混合物 200 mgで乳化する。得られた乳濁液を次に50%ポリ(ビニルアルコール)および0.2 M NaClの溶液に添加し、次いでポリ(ビニルアルコール)の第2溶液に添加して3時間置き、遠心分離を繰り返して洗浄した後、凍結乾燥して-20 で保存する。2種類のPBAE/PLGA混合物が好ましい：15% PBAE/85% PLGAおよび25% PBAE/75% PLGA。25% PBAE混合物がインビトロでDCに対して有意により刺激性であったが、皮内DNAワクチン接種に使用した場合、15% PBAE混合物および25% PBAE混合物はほぼ同等であった。いずれの場合にも、最終的な凍結乾燥微粒子調製物は、使用のため10 μg/50 μlの濃度でPBSに再懸濁するが、ここで10 μgは微粒子中のDNA量を指す。

10

## 【0143】

IL-12の「裸の」プラスミドDNAを腫瘍周囲に注射することが、マウスの抗腫瘍治療に用いられている。さらに、IL-12プラスミドDNAを腫瘍保有マウスに送達するためのポリ[(4-アミノブチル)-L-グリコール酸](PAGA)の使用が、当技術分野で公知である。さらに、分枝ポリエチレンイミンおよびクロロギ酸コレステリルを用いた、IL-12遺伝子の送達を増強するための、水溶性リポポリマー(WSLP)およびインターロイキン12(IL-12)発現プラスミドの使用もまた記載されている。送達剤としてのポリ(プロピレンイミン)デンドリマーの使用を含む、プラスミドDNA発現ベクターを送達するための別法としての、ポリエチレンイミンに基づく小胞-ポリマーハイブリッド遺伝子送達。また、プラスミドDNAおよび他の核酸の制御放出に用いられ得る様々な種類のポリマーを含む、ポリエチレングリコール(PEG)共重合体が、プラスミドDNA送達を改善することが認められた。そのような分子には、ポリ(乳酸)およびその誘導体、PEG化ポリ(乳酸)、乳酸-グリコール酸共重合体およびその誘導体、ポリ(オルトエステル)およびその誘導体、PEG化ポリ(オルトエステル)、ポリ(カプロラクトン)およびその誘導体、PEG化ポリ(カプロラクトン)、ポリリジンおよびその誘導体、PEG化ポリリジン、ポリ(エチレンイミン)およびその誘導体、PEG化ポリ(エチレンイミン)、ポリ(アクリル酸)およびその誘導体、PEG化ポリ(アクリル酸)、ポリ(ウレタン)およびその誘導体、PEG化ポリ(ウレタン)、ならびにこれらのすべての組み合わせが含まれる。本発明の1つの目的は、核酸の送達にポリマー-脂質-タンパク質-糖微粒子を使用することである。さらなる目的は、核酸積載物が細胞内環境において適切に放出されるように、細胞エンドソームの内部で加水分解性であるポリマーを使用することである。核酸を送達するために生分解性粒子を使用する一般的有用性は、当技術分野において公知である。

20

30

## 【0144】

自己会合粒子送達系は多くの場合、核酸と、マンノース-ポリエチレングリコール(PEG)-PAMAM-G3.0、-G4.0、または-G5.0から構成されるハイブリッドポリマーとの間のポリプレックスとして作製され得る自己会合粒子を含む複合物質である。PAMAMはポリ(アミドアミン)の分枝デンドリマーを指し、Gは分枝数を示す。このような線状-樹状ハイブリッドポリマーの溶液とプラスミドDNAを併用することで、中心にDNAがあり外側にマンノース残基がある直径約200 nmの自己会合粒子が得られた。この場合にはナノ粒子の外殻を形成するためにマンノースが用いられるが、その理由は、未成熟DCおよびマクロファージが、そのマンノース受容体(これはDC成熟に際して下方制御される)およびおそらくはDS-SIGNなどの他のマンノース結合受容体を用いてマンノシル化物質を活発に取り込むためである。P388D1マクロファージ細胞株を使用したところ、ルシフェラーゼプラスミドとMan-PEG-PAMAM-G5.0または-G6.0から得られたポリプレックスにより、市販のJetPEI(QBioGene, Inc.)と複合化したプラスミドよりも4倍多い遺伝子発現が起こり、G4.0ポリマーはJetPEIと同等であった。-G6.0ポリマーはこれらの細胞に対する毒性が軽度であったが、G5.0ポリマーは、JetPEIの毒性用量よりも100倍高い濃度において本質的に非毒性であった。

40

## 【0145】

ポリマー送達系の免疫刺激特性。ポリマー-遺伝子送達系は、生物学的に不活性である必

50



要はない。実際に、送達系はそれ自体で免疫刺激性である場合にさらにより効果的となり得、このような場合、この送達系はワクチン接種および腫瘍免疫療法に好ましいと考えられる。例えば、ポリマーは固有の抗癌効果を有し得る。ポリプロピレンイミン(PPI) dendrimerは、TNFプラスミドDNAの抗癌効果を増強することが認められている。興味深いことに、PPI dendrimerは、トランスフェクション細胞において遺伝子発現を誘導するという、免疫刺激または抗癌活性に有用であり得る特性も含めて、線状ポリエチレンイミン(PEI)およびポリアミドアミン dendrimerと同様に、単独でいくらかの抗癌効果を有した。異なるポリマーを使用して、プラスミドDNAを乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)/ポリアミノエステル(PBAE)混合物中にマイクロカプセル化すると、樹状細胞の直接的活性化が起こる。

10

## 【0146】

1つの局面において、核酸はエレクトロポレーションによって送達される。エレクトロポレーションは電気パルスを使用して、タンパク質、核酸、脂質、糖質、またはこれらの混合物を宿主に導入し、効果をもたらす。エレクトロポレーションの典型的な使用とは、核酸によってコードされるタンパク質が効率的に産生されるように核酸を宿主に導入することである。

## 【0147】

別の局面において、核酸は微粒子銃により送達される。Powderject(Norvartis Pharmaceutical Corporation)は、金粒子を核酸および他の物質で被覆し、次いで微粒子銃によってその粒子を宿主に強制的に導入する方法を開発した。抗原をコードする核酸に関しては、この方法によって、抗原に対する免疫応答が改善された。

20

## 【0148】

本発明の1つの目的は、ISS-ODNと改善された送達剤とを併用することである。例えば、CpG-ODNをポリカチオン性ポリマーと併用することで、ワクチン接種に対する応答が改善された。または、CpG-ODNを水中油型乳剤中に混合して、その免疫刺激能を改善する小胞を形成することができる。CpG-ODNはまた、大きさ10ミクロン未満の微小担体複合体中に取り込むことができる。乳酸-グリコール酸共重合体微粒子にCpG-ODNを吸着させると、炭疽菌ワクチンに対する免疫応答が改善された。本発明の1つの目的は、PLGAおよび他の材料から、DNAおよびCpG-ODNなどのTLRアゴニストを取り込む送達剤を形成することである。

30

## 【0149】

いくつかの態様において、組み合わせ免疫刺激剤は抗原をさらに含み得る。組み合わせ免疫刺激剤中に存在する場合、抗原は、組み合わせ剤の他の成分と併用して抗原に対する免疫応答を生じるのに有効な量で投与され得る。例えば、抗原は約100 ng/kg ~ 約100 mg/kgの量で投与され得る。いくつかの態様において、抗原は約10 µg/kg ~ 約10 mg/kgの量で投与され得る。いくつかの態様において、抗原は約1 mg/kg ~ 約5 mg/kgの量で投与され得る。しかし、免疫応答を生じるのに効果的な量を構成する抗原の特定量は、例えば投与する抗原の特徴；投与するアゴニストの特徴およびその量；投与するアゴニストの特徴およびその量；免疫系の状態；アゴニストおよび抗原の投与の方法およびその順序；製剤を投与する種；ならびに所望の治療結果などの特定の要因にある程度依存する。したがって、抗原の有効量を構成する量を一般的に記載することは実際的ではない。しかし、当業者であれば、そのような要因を十分に考慮して適量を容易に決定することができる。

40

## 【0150】

抗原は、Th1免疫応答を起し得る任意の物質であってよく、そのような応答には、例えばCD8+ T細胞応答、NK T細胞応答、 / T細胞応答、またはTh1抗体応答の1つまたは複数が含まれ得る。適切な抗原には、これらに限定されないが、ペプチド；ポリペプチド；脂質；糖脂質；多糖；糖質；ポリヌクレオチド；プリオン；生存または不活化細菌、ウイルス、または真菌；および細菌、ウイルス、真菌、原虫、腫瘍由来、または生物由来の抗原、毒素、またはトキシドが含まれる。

## 【0151】

50

さらに、現在の実験に基づくある種の抗原、特に強力な免疫応答を引き起こさない組換えタンパク質、糖タンパク質、およびペプチドなどの物質を、本発明のアジュバント組み合わせ剤と共に使用することができる。例示的な実験的サブユニット抗原には、アデノウイルス、AIDS、水痘、サイトメガロウイルス、デング熱、ネコ白血病、家禽ペスト、A型肝炎、B型肝炎、HSV-1、HSV-2、ブタコレラ、A型インフルエンザ、B型インフルエンザ、日本脳炎、麻疹、パラインフルエンザ、狂犬病、呼吸器合胞体ウイルス、ロタウイルス、疣贅、および黄熱病などのウイルス性疾患に関連した抗原が含まれる。

#### 【0152】

1つの態様において、抗原は癌抗原または腫瘍抗原であってよい。癌抗原および腫瘍抗原という用語は互換的に用いられ、癌細胞によって差次的に発現される抗原を指す。したがって、癌抗原は、癌細胞に対する免疫応答を差次的に標的化するために利用することができる。したがって癌抗原は、腫瘍特異的免疫応答を潜在的に刺激し得る。ある種の癌抗原は、必ずしも発現されないが、正常細胞によってコードされる。これらの抗原のいくつかは、正常細胞では通常はサイレントである(すなわち、発現されない)、分化の特定段階でのみ発現される、および時間的に発現される(例えば、胚および胎児抗原)と特徴づけられ得る。他の癌抗原は、例えば癌遺伝子(例えば、活性化ras癌遺伝子)、抑制遺伝子(例えば、変異p53)などの変異細胞遺伝子によってコードされ得るか、または内部欠失もしくは染色体転座に起因する融合タンパク質であってよい。さらなる他の癌抗原は、RNAおよびDNA腫瘍ウイルスによって運ばれるようなウイルス遺伝子によってコードされ得る。

10

#### 【0153】

腫瘍抗原の例には、MAGE、MART-1/Melan-A、gp100、ジペプチジルペプチダーゼIV(DPPV)、アデノシンデアミナーゼ結合タンパク質(ADAbp)、シクロフィリンb、結腸直腸関連抗原(CRC)-C017-1A/GA733、癌胎児抗原(CEA)ならびにその抗原エピトープCAP-1およびCAP-2、etv6、aml1、前立腺特異抗原(PSA)ならびにその抗原エピトープPSA-1、PSA-2、およびPSA-3、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、T細胞受容体/CD3 鎖、MAGEファミリーの腫瘍抗原(例えば、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2(MAGE-B2)、MAGE-Xp3(MAGE-B3)、MAGE-Xp4(MAGE-B4)、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5)、GAGEファミリーの腫瘍抗原(例えば、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9)、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、チロシナーゼ、p53、MUCファミリー、HER2/neu、p21ras、RCAS1、フェトプロテイン、Eカドヘリン、カテニン、カテニン、カテニン、p120ctn、gp100<sup>Pme1117</sup>、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、大腸腺腫症タンパク質(APC)、フォドリン、コネキシン37、Ig-イディオタイプ、p15、gp75、GM2およびGD2ガングリオシド、ヒトパピローマウイルスタンパク質などのウイルス産物、Smadファミリーの腫瘍抗原、Imp-1、P1A、EBVコード核抗原(EBNA)-1、脳グリコーゲンホスホリラーゼ、SSX-1、SSX-2(HOM-MEL-40)、SSX-3、SSX-4、SSX-5、SCP-1、およびCT-7、ならびにc-erbB-2が含まれる。

20

30

#### 【0154】

癌または腫瘍、およびそのような腫瘍に関連した(しかし排他的ではない)特定の腫瘍抗原には、急性リンパ性白血病(etv6、aml1、シクロフィリンb)、B細胞リンパ腫(Ig-イディオタイプ)、神経膠腫(Eカドヘリン、カテニン、カテニン、カテニン、p120ctn)、膀胱癌(p21ras)、胆道癌(p21ras)、乳癌(MUCファミリー、HER2/neu、c-erbB-2)、子宮頸癌(p53、p21ras)、結腸癌(p21ras、HER2/neu、c-erbB-2、MUCファミリー)、結腸直腸癌(結腸直腸関連抗原(CRC)-C017-1A/GA733、APC)、絨毛癌(CEA)、上皮細胞癌(シクロフィリンb)、胃癌(HER2/neu、c-erbB-2、ga733糖タンパク質)、肝細胞癌(フェトプロテイン)、ホジキンリンパ腫(Imp-1、EBNA-1)、肺癌(CEA、MAGE-3、NY-ESO-1)、リンパ球由来白血病(シクロフィリンb)、黒色腫(p53タンパク質、gp75、癌胎児抗原、GM2およびGD2ガングリオシド、Melan-A/MART-1、cdc27、MAGE-3、p21ras、gp100<sup>Pme1117</sup>)、骨髄腫(MUCファミリー、p21ras)、非小細胞肺癌(HER2/neu、c-erbB-2)、鼻咽頭癌(Imp-1、EBNA-1)、卵巣癌(MUCファミリー、HER2/neu、c-erbB-2)、前立腺癌(前立腺特異抗原(PSA)ならびにその抗原

40

50

エピトープPSA-1、PSA-2、およびPSA-3、PSMA、HER2/neu、c-erbB-2、ga733糖タンパク質)、腎癌(HER2/neu、c-erbB-2)、頸部および食道の扁平上皮癌(ヒトパピローマウイルス産物などのウイルス産物)、精巣癌(NY-ESO-1)、およびT細胞白血病(HTLV-1エピトープ)が含まれる。

【0155】

抗原を含む本発明の組み合わせ免疫刺激剤は、ワクチンを形成し得る。そのようなワクチンは、当業者に周知の付加的な薬学的に許容される成分、賦形剤、担体などを含み得る。

【0156】

本発明の組み合わせ免疫刺激剤は、当業者に周知の従来法に従って(例えば、経口、皮下、経鼻、局所)、動物、例えば哺乳動物(ヒトおよび非ヒト)、家禽などに投与することができる。

10

【0157】

本発明はまた、本発明の組み合わせ免疫刺激剤を対象に投与する段階を含む治療および/または予防法を提供する。

【0158】

特定の投与順序が提供されていない限り、組み合わせ免疫刺激剤の成分は、抗原と同時に(混合物中で一緒にまたは別々に、例えば経口または別々の注射によって)、または組み合わせ免疫刺激剤の1つもしくは複数の他の成分の投与後に投与することができる。

【0159】

治療的組み合わせ剤は、1つまたは複数の薬学的に許容される担体とのさらなる組み合わせで提供することができる。開示の組み合わせ剤および抗原(組み合わせ剤中に存在する場合)は、異なる部位におよび/または異なる経路により連続して併用投与することができるため、治療的組み合わせ剤は2つまたはそれ以上の製剤として提供することができる。2つまたはそれ以上の製剤として提供する場合、各製剤は、その他の製剤中に含まれる1つまたは複数の担体と同様のまたは異なる担体を含み得る。または、開示の組み合わせ剤および抗原(組み合わせ剤中に存在する場合)は、単一の担体または担体の組み合わせを含み得る単一の製剤として提供することもできる。

20

【0160】

各成分または成分の混合物は、例えば錠剤、トローチ剤、非経口製剤、シロップ、クリーム、軟膏、エアロゾル製剤、経皮パッチ、経粘膜パッチなどの任意の適切な従来の剤形で投与することができる。

30

【0161】

治療的組み合わせ免疫刺激剤は、治療計画において単一の治療薬として投与することができる。または、本発明の治療的組み合わせ免疫刺激剤は、本発明の別の治療的組み合わせ剤と、1つもしくは複数の薬学的組成物と、または抗ウイルス剤、抗生物質などの他の活性薬剤と併用して投与することができる。

【0162】

本発明はまた、本発明の組み合わせ免疫刺激剤の治療有効量を動物に投与する段階を含む、動物におけるウイルス感染症を治療する方法、および動物における腫瘍性疾患を治療する方法を提供する。ウイルス感染症を治療または阻害するための治療有効量とは、ウイルス性病変、ウイルス量、ウイルス産生速度、および死亡率のようなウイルス感染症の症状発現の1つまたは複数、未処置対照動物と比較して減少させる量である。腫瘍性疾患を治療するための組み合わせ剤の治療有効量とは、未処置動物と比較して、例えば腫瘍の大きさの減少、腫瘍病巣数の減少、または腫瘍増殖の遅延をもたらす量である。

40

【0163】

本発明による治療は、1回または2回以上の免疫化を含み得る。2回以上の免疫化を含む場合、治療は、任意の適切な頻度で投与される任意の適切な回数、免疫化を含み得る。治療計画における免疫化の回数および頻度は、治療する状態およびその病期、患者の免疫系の状態、投与するアゴニストの特徴およびその量、ならびに投与する抗原(存在する場合)

50

の特徴およびその量を非限定的に含む1つまたは複数の要因に少なくとも一部依存する。

【0164】

「薬学的に許容される」という語句は、ヒトに投与した際に、生理学的に許容されかつアレルギー反応も同等の有害反応(胃の不調、めまいなど)も通常生じない、分子実体および組成物を指す。1つの態様において、本明細書で使用する「薬学的に許容される」という用語は、米国政府もしくは州政府の管理機関によって承認されていること、または動物、より詳細にはヒトにおける使用のために米国薬局方もしくは他の一般的に認識されている薬局方に収載されていることを意味する。「担体」という用語は、化合物と共に投与する希釈剤、補助剤、賦形剤、または溶媒を指す。このような薬学的担体は無菌液体、例えば水および油であってよく、これには石油、動物、植物、または合成起源の油、例えば落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油などが含まれる。水または生理食塩水溶液ならびにデキストロース水溶液およびグリセロール水溶液が、特に注射液の担体として使用されることが好ましい。適切な薬学的担体は、E. W. Martinにより「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。

10

【0165】

さらなる態様において、本発明は、単独でまたは1つもしくは複数の他の治療様式と共に細胞または動物に投与するための薬学的に許容される担体と組み合わせた、本明細書に開示のポリヌクレオチド、TLRアゴニスト、および/またはカチオン性ポリマー組成物のうち1つまたは複数の製剤に関する。

【0166】

別の態様において、ワクチンは、融合タンパク質をコードするDNAを生物学的作用物質に組み入れることにより送達し得る。本明細書で使用する「生物学的作用物質」とは、原核細胞、真核細胞、またはウイルスを指す。そのような作用物質には腫瘍細胞もまた含まれる。本明細書に開示するそのような作用物質は、単独でまたは1つもしくは複数の他の治療様式と共に細胞または動物に投与するための薬学的に許容される担体と組み合わせることができる。他の態様において、そのような融合タンパク質をコードするDNAワクチンは、単独でまたは1つもしくは複数の他の治療様式と共に細胞または動物に投与するための薬学的に許容される担体と共に製剤化することができる。

20

【0167】

関連局面において、そのような薬学的組成物を、予防または寛解様式で対象に投与することができる。本明細書で使用する「寛解」とは、疾患に伴う症状について対象を改善または緩和することを指し、これにはそのような疾患の治療も含まれる。例えば、本発明に開示するワクチンは、感染症の発症前、または対象が感染した後に対象に投与することができる。

30

【0168】

必要に応じて、本明細書に開示の組成物は、例えば他のタンパク質もしくはポリペプチドまたは種々の薬学的活性薬剤などの他の薬剤と併用して投与できることが理解されよう。実際に、付加的な薬剤が標的細胞または宿主組織との接触に際して顕著な副作用を起こさない限り、含めることのできる他の成分に実質的に制限はない。したがって組成物は、特定の場合に必要な種々の他の薬剤と共に送達することができる。このような組成物は宿主細胞または他の生物学的供給源から精製することができ、または本明細書に記載のように化学合成することができる。同様に、このような組成物は、置換または誘導体化されたRNAまたはDNA組成物をさらに含み得る。

40

【0169】

したがって、本発明の別の局面では、薬学的に許容される担体と組み合わせた、本明細書に記載のポリヌクレオチド、TLRアゴニスト、および/またはカチオン性ポリマー組成物の1つまたは複数を含む薬学的組成物を提供する。特定の好ましい態様において、本発明の薬学的組成物は、予防および治療的ワクチン用途において使用するための、本発明の免疫原性ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド組成物を含む。ワクチン調製物は一般に、例えば、M. F. Powell and M. J. Newman, eds., 「Vaccine Design (the subunit

50

and Adjuvant approach)」、Plenum Press (NY, 1995)に記載されている。一般に、そのような組成物は、1つまたは複数の免疫刺激剤と組み合わせて、本発明の1つまたは複数のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド組成物を含む。

【0170】

本明細書に記載の全ての薬学的組成物が、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの薬学的に許容される塩を含み得ることは明白である。そのような塩は、例えば、有機塩基(例えば、一級、二級、および三級アミンならびに塩基性アミノ酸の塩)および無機塩基(例えば、ナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、カルシウム、およびマグネシウム塩)を含む薬学的に許容される非毒性塩基から調製され得る。

【0171】

別の態様において、本発明の例示的な免疫原性組成物、例えばワクチン組成物は、ポリペプチドがインサイチュで生成されるように上記のポリペプチドの1つまたは複数を含み得るDNAを含む。上記の通り、ポリヌクレオチドは、当業者に公知の種々の送達系のいずれかにおいて投与することができる。実際に、Rolland, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15:143-198, 1998により記載されているような多くの遺伝子送達技法が当技術分野で周知である。当然のことながら、適切なポリヌクレオチド発現系は、患者における発現に必要な調節性DNA調節配列(適切なプロモーターおよび終結シグナルなど)を含む。または、生物学的送達系は、その細胞表面上にポリペプチドの免疫原性部分を発現するかまたはそのようなエピトープを分泌する感染性病原体または新生物細胞もしくは組織の投与を含み得る。

【0172】

特定の態様では、本明細書に記載の免疫原性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ウイルスに基づくいくつかの公知の系のいずれかを用いて、発現に適した哺乳動物宿主細胞に導入する。1つの態様において、レトロウイルスまたはレンチウイルスは、遺伝子送達系の簡便かつ効率的な基盤を提供する。当技術分野で公知の技法を用いて、本発明のポリペプチドをコードする選択されたヌクレオチド配列をベクターに挿入し、レトロウイルスまたはレンチウイルス粒子中にパッケージングすることができる。次いで組換えウイルスを単離し、対象に送達することができる。いくつかの例示的なレトロウイルス系が記載されている(例えば、米国特許第5,219,740号; Miller and Rosman (1989) BioTechniques 7:980-990; Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14; Scarpa et al. (1991) Virology 180:849-852; Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037; および Boris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109)。例示的なレンチウイルス系は、L. Naldini et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11382-11388, 1996により記載されている。

【0173】

加えて、アデノウイルスに基づくいくつかの例示的な系もまた記載されている。宿主ゲノム中に組み込まれるレトロウイルスとは異なり、アデノウイルスは染色体外に持続し、したがって挿入による変異誘発と関連した危険性が最小限に抑えられる(Haj-Ahmad and Graham (1986) J. Virol. 57:267-274; Bett et al. (1993) J. Virol. 67:5911-5921; Mittereder et al. (1994) Human Gene Therapy 5:717-729; Seth et al. (1994) J. Virol. 68:933-940; Barr et al. (1994) Gene Therapy 1:51-58; Berkner, K. L. (1988) BioTechniques 6:616-629; および Rich et al. (1993) Human Gene Therapy 4:461-476)。

【0174】

種々のアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター系もまた、ポリヌクレオチド送達に関して開発されている。AAVベクターは、当技術分野で周知の技法を用いて容易に構築することができる。例えば、米国特許第5,173,414号および第5,139,941号; WO 92/01070およびWO 93/03769; Lebkowski et al. (1988) Molec. Cell. Biol. 8:3988-3996; Vincent et al. (1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. (1992) Current Opinion in Biotechnology 3:533-539; Muzyczka, N. (1992) Current Topics in Microbiol. and Immunol. 158:97-129; Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy 5:793

10

20

30

40

50

-801 ; Shelling and Smith (1994) Gene Therapy 1:165-169 ; ならびに Zhou et al. (1994) J. Exp. Med. 179:1867-1875を参照されたい。

【 0 1 7 5 】

遺伝子導入により本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを送達するのに有用な追加のウイルスベクターには、ワクシニアウイルスおよびトリボックスウイルスなどのポックスファミリーのウイルスに由来するものが含まれる。例として、新規分子を発現するワクシニアウイルス組換え体は、以下のように構築することができる。最初に、ポリペプチドをコードするDNAを、ワクシニアプロモーターおよび隣接ワクシニアDNA配列、例えばチミジンキナーゼ(TK)をコードする配列に隣接するように、適切なベクターに挿入する。次にこのベクターを使用して、ワクシニアを同時に感染させる細胞にトランスフェクションする。相同組換えにより、ワクシニアプロモーターおよび関心対象のポリペプチドをコードする遺伝子がウイルスゲノムに挿入される。5-プロモデオキシウリジンの存在下で細胞を培養し、それに耐性であるウイルスプラークを採取することにより、生じたTK<sup>(-)</sup>組換え体を選択することができる。

10

【 0 1 7 6 】

ワクシニアに基づく感染/トランスフェクション系は、生物の宿主細胞における、本明細書に記載する1つまたは複数のポリペプチドの誘導可能な一過性発現または同時発現を提供するために、都合よく使用することができる。この特定の系では、まず最初に細胞に、バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼをコードするワクシニアウイルス組換え体をインビトロで感染させる。このポリメラーゼは、T7プロモーターを有する鋳型のみを転写する点で、優れた特異性を示す。感染後、T7プロモーターによって駆動される関心対象の1つまたは複数のポリヌクレオチドを細胞にトランスフェクションする。ワクシニアウイルス組換え体から細胞質中で発現されたポリメラーゼは、トランスフェクションされたDNAをRNAに転写し、このRNAは次いで宿主翻訳機構によってポリペプチドに翻訳される。この方法は、大量のRNAおよびその翻訳産物の高レベルかつ一過性の細胞質産生を提供する。例えば、Elroy-Stein and Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:6743-6747 ; Fuerst et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:8122-8126を参照されたい。

20

【 0 1 7 7 】

代替的に、鶏痘ウイルスおよびカナリア痘ウイルスなどのアビポックスウイルスもまた、関心対象のコード配列を送達するために使用することができる。哺乳動物病原体由来の免疫原を発現する組換えアビポックスウイルスは、非鳥類種に投与された場合に、防御免疫を付与することが知られている。アビポックス属のメンバーは、感受性の鳥類種においてのみ増殖複製することができ、そのため哺乳動物細胞では感染性ではないことから、アビポックスベクターの使用はヒトおよび他の哺乳動物種において特に望ましい。組換えアビポックスウイルスを作製する方法は当技術分野で公知であり、ワクシニアウイルスの作製に関して上記した遺伝子組換えを使用する。例えば、WO 91/12882 ; WO 89/03429 ; およびWO 92/03545を参照されたい。

30

【 0 1 7 8 】

米国特許第5,843,723号 ; 第6,015,686号 ; 第6,008,035号、および第6,015,694号に記載されるベクターのようないくつかのアルファウイルスベクターのいずれかを、本発明のポリヌクレオチド組成物を送達するために使用することもできる。ベネズエラウマ脳炎(VEE)に基づく特定のベクターもまた使用することができ、その具体例は、米国特許第5,505,947号および第5,643,576号に見出され得る。

40

【 0 1 7 9 】

さらに、Michael et al. J. Biol. Chem. (1993) 268:6866-6869、およびWagner et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:6099-6103に記載されるアデノウイルスキメラベクターなどの分子複合体ベクターもまた、本発明における遺伝子送達に使用することができる。

【 0 1 8 0 】

ウイルスに基づくこれらおよび他の公知の送達系に関するさらなる例示的な情報は、例

50

えば、Fisher-Hoch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:317-321, 1989 ; Flexner et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 569:86-103, 1989 ; Flexner et al., Vaccine 8:17-21, 1990 ; 米国特許第4,603,112号、第4,769,330号、および第5,017,487号 ; WO 89/01973 ; 米国特許第4,777,127号 ; GB 2,200,651 ; EP 0,345,242 ; WO 91/02805 ; Berkner, Biotechniques 6:616-627, 1988 ; Rosenfeld et al., Science 252:431-434, 1991 ; Kolls et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219, 1994 ; Kass-Eisler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11498-11502, 1993 ; Guzman et al., Circulation 88:2838-2848, 1993 ; ならびにGuzman et al., Cir. Res. 73:1202-1207, 1993に見出すことができる。

#### 【0181】

特定の態様において、ポリヌクレオチドは標的細胞のゲノムに組み込まれ得る。この組み込みは、相同組換えを介して特定の位置および方向であってよく(遺伝子置換)、または無作為な非特異的位置に組み込まれてもよい(遺伝子増大)。なおさらなる態様では、ポリヌクレオチドは、DNAの別のエピソーム部分として細胞内で安定に維持され得る。このようなポリヌクレオチド部分すなわち「エピソーム」は、宿主細胞周期とは独立してまたはこれと同調して維持および複製を可能にするのに十分な配列をコードする。発現構築物を細胞に送達し、その細胞中にポリヌクレオチドが残存する様式は、使用する発現構築物の種類に依存する。

#### 【0182】

本発明の別の態様では、例えば、Ulmer et al., Science 259:1745-1749, 1993に記載され、Cohen, Science 259: 1691-1692, 1993によって概説されるように、ポリヌクレオチドを「裸の」DNAとして投与/送達する。裸のDNAの取り込みは、細胞へと効率的に輸送される生分解性ビーズ上にDNAを被覆することによって増加させることができる。

#### 【0183】

さらに別の態様において、本発明の組成物は、微粒子銃アプローチによって送達され得り、その多くが記載されている。1つの具体例においては、いずれも現在はNovartisのChiron部門の一部であるPowderject Pharmaceuticals PLC(英国、オックスフォード)およびPowderject Vaccines Inc.(ウィスコンシン州、マディソン)によって製造されたような装置を使用して、ガス駆動粒子加速が達成され得る。そのいくつかの例は、米国特許第5,846,796号 ; 第6,010,478号 ; 第5,865,796号 ; 第5,584,807号 ; および欧州特許第0500 799号に記載されている。このアプローチは無針送達アプローチを提供し、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド粒子などの微細粒子の乾燥粉末製剤は、手持ち式装置によって生成されたヘリウムガス噴射内で高速に加速され、粒子は関心対象の標的組織内へ推進される。

#### 【0184】

関連態様において、本発明の組成物のガス駆動無針注射に有用であり得る他の装置および方法には、Bioject, Inc.(オレゴン州、ポートランド)によって提供されるものが含まれ、そのいくつかの例は、米国特許第4,790,824号 ; 第5,064,413号 ; 第5,312,335号 ; 第5,383,851号 ; 第5,399,163号 ; 第5,520,639号 ; および第5,993,412号に記載されている。

#### 【0185】

典型的に、これらの製剤は少なくとも約0.1%またはそれ以上の活性化合物を含むが、活性成分の割合は当然のことながら変化してよく、適宜、全製剤の重量または体積の約1%または約2%~約60%または約70%もしくはそれ以上であってよい。当然ながら、治療上有用な各組成物中の活性化合物の量は、適切な投与量が化合物の任意の所定の単位用量として得られるような様式で調製され得る。溶解度、生物学的利用能、生物学的半減期、投与経路、産物の有効期間のような要因、および他の薬理学的考慮事項が、このような薬学的製剤を調製する技術分野の当業者によって考慮され、したがって種々の投与量および処置計画が所望され得る。

#### 【0186】

経口投与に関して、本発明の組成物は代替的に、口腔洗浄剤、歯磨剤、舌下錠、経口スプレー、または舌下経口投与製剤の形態の1つまたは複数の賦形剤と共に組み込まれてもよい。または、活性成分は、ホウ酸ナトリウム、グリセリン、および炭酸水素カリウムを

10

20

30

40

50

含む溶液などの経口溶液中に組み込まれ得るか、または歯磨剤中に分散され得るか、または水、結合剤、研磨剤、香味料、起泡剤、および湿潤剤を含み得る組成物に治療有効量で添加され得る。または組成物は、舌下に置かれ得るかまたはさもなければ口腔内で溶解され得る、錠剤または溶液形態に成形され得る。ワクチン製剤はまた、経鼻粘膜へ送達すること、吸入送達用にエアロゾル化すること、または女性および男性の生殖系もしくは直腸の粘膜表面に送達することができる。ワクチン製剤はまた、経皮送達用に製剤化することもできる。

#### 【0187】

特定の状況では、本明細書に開示する薬学的組成物を、非経口送達、静脈内送達、筋肉内送達、またはさらに腹腔内送達することが望ましい。このようなアプローチは当業者に周知であり、そのうちのいくつかは、例えば米国特許第5,543,158号；米国特許第5,641,515号、および米国特許第5,399,363号にさらに記載されている。特定の態様において、遊離塩基または薬学的に許容される塩としての活性化化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合された水中で調製され得る。分散液もまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物中で、ならびに油中で調製され得る。保存および使用の通常条件下で、これらの調製物は一般に、微生物の増殖を防止するために保存剤を含む。

10

#### 【0188】

注射用途に適した例示的な薬学的形態には、滅菌水溶液または分散液、および滅菌注射用溶液または分散液を即時調製するための滅菌粉末が含まれる(例えば、米国特許第5,466,468号を参照されたい)。いずれの場合にも、その形態は滅菌でなければならず、容易に注射することができる程度に流動性でなければならない。それは製造および保存条件下において安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の汚染作用を受けないよう保存されねばならない。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)、それらの適切な混合物、および/または植物油を含む溶媒または分散媒であってよい。例えば、レシチンなどの被覆剤を使用することによって、分散液の場合には必要な粒径を維持することによって、および/または界面活性剤を使用することによって、適切な流動性を維持することができる。微生物作用の予防は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによって促進され得る。多くの場合、等張剤、例えば糖類または塩化ナトリウムを含めることが好ましい。注射用組成物の持続的吸収は、吸収遅延剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物中に使用することによってもたらされ得る。

20

30

#### 【0189】

1つの態様において、水溶液中での非経口投与に関しては、溶液は必要に応じて適切に緩衝化されるべきであり、液体希釈液は十分な生理食塩水またはグルコースを用いて最初に等張化されるべきである。このような特定の水溶液は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、および腹腔内投与に特に適している。これに関連して、使用できる滅菌水性媒体は、本開示の観点から当業者に明らかになるであろう。例えば、単回投与量を等張NaCl溶液1 mlに溶解し、皮下注入液1000 mlに添加するか、または注入の予定部位に注射することができる(例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580を参照されたい)。治療する対象の状態に応じて、投与量のいくらかの変動は必然的に生じることになる。さらに、ヒト投与に関しては、調製物は当然のことながら、FDA Office of Biologics基準によって義務づけられている無菌性、発熱性、ならびに一般的安全性および純度基準を満たすことが好ましい。

40

#### 【0190】

本発明の別の態様において、本明細書に開示する組成物は、中性形態または塩形態で製剤化され得る。例示的な薬学的に許容される塩には、無機酸(例えば、塩酸またはリン酸など)または有機酸(酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸など)によって形成される酸付加塩(タンパク質の遊離アミノ基によって形成される)が含まれる。遊離カルボキシル基に

50



よって形成される塩はまた、無機塩基(例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化第二鉄など)および有機塩基(イソプロピルアミン、トリエチルアミン、ヒスチジン、プロカインなど)に由来し得る。製剤化により、溶液は、投薬製剤と適合する様式で、かつ治療上有効であるような量で投与される。

#### 【0191】

担体とは、全ての溶媒、分散媒、媒体、被覆剤、希釈剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、緩衝液、担体溶液、懸濁液、コロイドなどをさらに含み得る。薬学的活性物質へのこのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野において周知である。任意の従来の媒体または薬剤が活性成分と不適合である場合を除き、治療組成物におけるその使用が意図される。補助的な活性成分もまた組成物中に取り込まれ得る。「薬学的に許容される」という語句は、ヒトに投与した際に、アレルギー反応も同様の有害反応も生じない分子実体および組成物を指す。

10

#### 【0192】

特定の態様において、薬学的組成物は、鼻腔内スプレー、吸入、および/または他のエアロゾル送達媒体によって送達され得る。遺伝子、核酸、およびペプチド組成物を経鼻エアロゾルスプレーにより肺に直線送達する方法は、例えば米国特許第5,756,353号および米国特許第5,804,212号に記載されている。同様に、鼻腔内微粒子樹脂(Takenaga et al., *J Controlled Release* (1998) 52(1-2):81-7)およびリゾホスファチジルグリセロール化合物(米国特許第5,725,871号)を使用する薬物の送達もまた、薬学分野において周知である。同様に、ポリテトラフルオロエチレン支持マトリックスの形態での例示的な経粘膜薬物送達が、米国特許第5,780,045号に記載されている。

20

#### 【0193】

特定の態様においては、適切な宿主細胞/生物に本発明の組成物を導入するために、リポソーム、ナノカプセル、微粒子、脂質粒子、小胞などを使用する。特に、本発明の組成物は、脂質粒子、リポソーム、小胞、ナノスフェア、またはナノ粒子などのいずれかに封入して送達するために製剤化され得る。または、本発明の組成物は、このような担体媒体の表面に、共有結合または非共有結合させることができる。

#### 【0194】

潜在的な薬物担体としてのリポソームおよびリポソーム様調製物の形成および使用は一般に、当業者に公知である(例えば、Lasic, *Trends Biotechnol* (1998) 16(7):307-21; Takakura, *Nippon Rinsho* (1998) 56(3):691-5; Chandran et al., *Indian J Exp Biol* (1997) 35(8):801-9; Margalit, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* (1995) 12(2-3):233-61; 米国特許第5,567,434号; 米国特許第5,552,157号; 米国特許第5,565,213号; 米国特許第5,738,868号、および米国特許第5,795,587号を参照されたい)。

30

#### 【0195】

リポソームは、T細胞懸濁液、初代肝細胞培養物、およびPC12細胞を含む、他の手順によるトランスフェクションが通常困難であるいくつかの細胞型との使用が成功している(Renneisen et al., *J Biol. Chem* (1990) 265(27):16337-42; Muller et al., *DNA Cell Biol* (1990) 9(3):221-9)。さらに、リポソームは、ウイルスに基づく送達系に典型的なDNA長の制限がない。リポソームは、遺伝子、種々の薬物、放射線治療薬、酵素、ウイルス、転写因子、アロステリックエフェクターなどを種々の培養細胞株および動物に導入するために効果的に使用されている。さらに、リポソームの使用は、全身送達後の自己免疫応答にも、許容されない毒性にも関連しないようである。

40

#### 【0196】

特定の態様において、リポソームは、水性媒体中に分散されたリン脂質から形成され、多層同心性二重層小胞(多層小胞(MLV)とも称される)を自発的に形成する。

#### 【0197】

または他の態様において、本発明は、本発明の組成物の薬学的に許容されるナノカプセル製剤を提供する。ナノカプセルは一般に、化合物を安定かつ再現可能な様式で捕捉し得

50

る(例えば、Quintanar-Guerrero et al., Drug Dev India Pharm (1998) 24(12):1113-28を参照されたい)。細胞内ポリマー過負荷に起因する副作用を回避するために、このような超微粒子(約0.1 $\mu$ mの大きさ)は、インピボで分解され得るポリマーを使用して設計され得る。このような粒子は、例えば、Couvreur et al., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1988; 5(1):1-20; zur Muhlen et al., Eur J Pharm Biopharm (1998) 45(2):149-55; Zambaux et al., J Controlled Release (1998) 50(1-3):31-40; および米国特許第5,145,684号に記載されるように作製することができる。

【0198】

以下の実施例は本発明を説明することを目的とするものであって、限定を意図するものではない。

【0199】

## 実施例

### 方法

CD40Lの細胞外ドメインを2つのタンパク質、肺サーファクタントタンパク質D(SP-D、4つの三量体)またはACRP 30(2つの三量体)の主部に融合することにより、可溶性多量体型のCD40Lを作製した。マウスにおいて、HIV抗原をコードするプラスミドによるDNAワクチン接種は、pSP-D-CD40L、pACRP-30-CD40L、pSP-D-GITRLを同時注射することにより有意に増強されたが、単一三量体pTrCD40Lおよび全長基盤CD40Lでは増強されなかった。抗腫瘍活性を試験するため、DNA 50 mgをB16-F10黒色腫またはA20リンパ腫に注射した。B16-F10の増殖は、pSP-D-CD40Lの腫瘍周囲注射によって有意に遅延された。A20腫瘍ではより劇的な効果が認められた。TNFスーパーファミリー(TNFSF)の可溶性多量体メンバーを作製するためのこの方法によって、確立された腫瘍の効果的な治療法としてCD40L、GITRL、および他のTNFSFリガンドを使用することの実現可能性が強化される。

【0200】

腫瘍が腫瘍抗原を提示する樹状細胞を既に含んでいることが知られているので、抗原なしで本構築物を腫瘍周囲に直接注射することの効果の本発明は認めた。しかし、これらのDCは局所的な腫瘍環境によって抑制されているため、CD8+抗腫瘍免疫を活性化するためには何らかの形の免疫刺激を必要とする。

【0201】

可溶性多量体CD40Lの抗腫瘍効果を増強するため、アジュバントプラスミドをいくつかのTLRアゴニストと共に腫瘍に注射した。結果から、TLR 9またはTLR 3の刺激が、インピボにおいてCD40刺激と相乗的に作用して顕著な抗腫瘍効果を生じ得ることが示される。

【0202】

### 実施例1. プラスミドの構築

プラスミドは、pcDNA3.1発現ベクター(Invitrogen、カリフォルニア州、カールズバッド)で構築した。マウスCD40Lの全長天然型である膜CD40L(p-Mem-CD40L)を、抗CD3/抗CD26刺激マウス脾臓細胞からRT-PCRによりクローニングした。

【0203】

1-三量体可溶性CD40L(pTr-CD40L)は、マウスCD40Lの細胞外ドメイン(柄を含む)に融合されたイソロイシンジッパーを生じるPCRを用いて構築した。次いで、構築物をpcDNA3.1発現ベクターにクローニングした(図1)。

【0204】

2-三量体可溶性CD40L(pAcrp30-CD40L)に関しては、マウスAcrp30の主部をマウスCD40Lの細胞外ドメインに融合した。Acrp30は、2つの三量体TNFSF細胞外ドメインを提示し得る2つの三量体アームを有するV型分子である(図1)。

【0205】

4-三量体可溶性CD40LおよびGITRL(pSP-D-CD40LおよびpSP-D-GITRL)に関しては、マウスサーファクタントタンパク質D(SP-D)の主部をマウスCD40LまたはGITRLの細胞外ドメイン(柄を含む)に融合した。SP-Dは、4つの三量体TNFSF細胞外ドメインを提示し得る4つの三量体アームを有するプラス記号型分子である(図1)。

10

20

30

40

50

## 【0206】

また、プラスミド、特にマウスSP-D-CD40LまたはSP-D-GITRLを発現するプラスミドについては、pVAX1発現ベクター(Invitrogen)を用いて構築した。

## 【0207】

さらに、pVAX1発現ベクターを用いて、マカクSP-D-CD40L、ACRP30-CD40L、またはSP-D-GITRLを発現するプラスミドを構築した。

## 【0208】

pcDNA3.1ベクターにおける先のpSP-D-CD40Lプラスミドの改良として、挿入物をpCAGEN(AddGene, Inc., マサチューセッツ州、ケンブリッジ)に移した。pCAGENは、種々の組織において発現を増加させることが判明しているニワトリ アクチンプロモーターの因子を含むpCAGGSの派生物である(H. Niwa et al, Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector, Gene 108:193-199, 1991)。さらなる改変として、シグナル配列を、サーファクタントタンパク質D(SP-D)のものからヒト組織プラスミノゲンアクチベーター(GenBankアクセッション番号P00750およびNP\_127509)のものに変更した。加えて、CD40Lはその細胞外柄領域においてプロテイナーゼにより切断されることが示されている(Pietravalle, F. et al, Eur. J. Immunol. 26:725-728, 1996)。この切断を回避するために、マウスCD40Lの柄領域を欠失させた。最終版をpSP-D-CD40L-NSTと称する(NSTとは、柄なし/tPAシグナル配列を指す)。このプラスミドをインビトロで293T細胞にトランスフェクションしたところ、上記のpSP-D-CD40L構築物よりも約8倍多いCD40Lタンパク質がELISAにより検出された。

10

20

## 【0209】

毒性

マウスは、ワクチン接種実験を通して正常に見えた。pcDNA3.1ベクター中のpSP-D-CD40Lによるワクチン接種の48時間後の筋肉内注射部位の組織像では炎症が示されず、また実験終了時に肺の組織像は正常であった。他のアジュバントとは異なり、脾臓の大きさおよび細胞数はpSP-D-CD40Lによって増加しなかった。さらに、pScGag抗原プラスミドおよびpSP-D-CD40Lアジュバントプラスミドを混合せずに代わりに反対側の四頭筋に別々に注射した場合、ワクチン応答は認められず、このことは、pSP-D-CD40Lが(TLRアゴニストと異なり)全身免疫活性化を誘導しないことを示す。腫瘍注射の後、マウスは正常に見え、色素の喪失を含む自己免疫応答の徴候を示さなかった。

30

## 【0210】

HIV-1 Gagワクチン法ワクチンプラスミド

分泌性のコドン最適化HIV GAGのプラスミド(pScGag)を試験抗原として使用した。HIVエンベローププラスミドおよびプラスモディウム・ヨエリ(Plasmodium yoelii)のMSP-1タンパク質のプラスミドを用いても、同様の結果が得られた。

## 【0211】

マウスのワクチン接種

全DNA濃度 1 ug/ulでリン酸緩衝生理食塩水に懸濁したpScGag(80 μg)およびCD40Lプラスミドまたは空対照ベクター(20 μg)の組み合わせ剤を1週間おきに3回、BALB/cマウスの両四頭筋に筋肉内注射した。28Gインスリンシリンジを用いて、50 μlを各四頭筋に注射した。マウスは、短時間の注射中に動かないようにするために、イソフルオランガス麻酔で鎮静させた。

40

## 【0212】

免疫測定

最後のワクチン接種の2週間後に、マウスを安楽死させた。脾細胞CD8+ T細胞活性を、ペプチドパルスP815細胞を使用してCTL活性により測定した。脾臓CTLは5日間にわたり再刺激した後に測定し、H-2Kd免疫優性ペプチド、AMQMLKETI(配列番号:6)でパルスしたP815標的の死滅に関して試験した。

## 【0213】

50

実施例2. DNAワクチンアジュバントとしての可溶性多量体CD40LおよびGITRL

4-三量体可溶性CD40Lは、DNAワクチンに対する細胞傷害性CD8+ T細胞応答を劇的に増強した(図2)。他の研究者らによって認められているように、全長膜CD40Lのプラスミド(pMemCD40L)を添加しても増強効果はなかった。一方、4-三量体可溶性CD40Lのプラスミド(pSP-D-CD40L)は、2-三量体型および1-三量体型と比較してGagに対するCTL応答を劇的に増加させた。

【0214】

4-三量体可溶性GITRLをDNAワクチン接種に加えると、CTLは有意に増加した(図3)。しかし、これらのCD8+ T細胞応答は、4-三量体CD40Lを分子アジュバントとして使用して生じた応答ほど強くはなかった。

【0215】

実施例3. 腫瘍免疫治療法

BALB/cマウスに $1 \times 10^6$ 個のA20腫瘍細胞を皮下注射し、C57B5/6マウスに $1 \times 10^6$ 個のB16-F10腫瘍細胞を皮下注射した。明白な腫瘍が出現した後(> 4 mm)、50  $\mu$ l PBSまたはプラスミドDNA(50  $\mu$ g)をTLRアゴニスト分子と共にまたはこれを伴わずに、腫瘍中および腫瘍周囲に1日おきに5回注射した。1日おきに腫瘍を計測した。マウスがストレスの徴候を示すか、または腫瘍が1.5 cm  $\times$  1.5 cmよりも大きくなった場合に、マウスを屠殺した。

【0216】

腫瘍周囲へのプラスミド注射による確立されたA20リンパ腫腫瘍の治癒

A20リンパ腫腫瘍に対して、非分泌性膜CD40L(pMemCD40L)、2-三量体可溶性CD40L(pAcrp30-CD40L)、4-三量体可溶性CD40L(pSP-D-CD40L)、および4-三量体可溶性GITRL(pSP-D-GITRL)のプラスミドを注射した。これらのプラスミドはいずれもpcDNA3.1ベクターを使用した。3種の可溶性多量体TNFSFプラスミドはいずれも抗腫瘍活性を有し、4/5の症例で、マウスの局所腫瘍を治癒させることができた(図4)。膜CD40Lのプラスミド(pMemCD40L)は不活性であった(図4)。

【0217】

A20リンパ腫に対する多量体TNFSFリガンドの延命効果

pAcrp30-CD40LおよびpSP-D-CD40Lはいずれも、マウスの80%を治癒させることができた( $p < 0.05$ )。pSP-D-GITRLもマウスの80%を治癒させることができた(図5)。治癒は、治療の90日後における腫瘍非存在下における生存と定義した。

【0218】

確立されたB16-F10腫瘍に対してCD40Lと相乗作用するTLR 3刺激(ポリI:C)

ポリ(I:C)とpSP-D-CD40Lを併用することで、対照プラスミドまたはpSP-D-CD40L単独と比較して有意な抗腫瘍効果をもたらされた( $p < 0.05$ )(図6)。この例では、pSP-D-CD40L(PBS 50  $\mu$ l中50  $\mu$ g)を0、2、4、6、および8日目に腫瘍周囲に注射し、ポリ(I:C)(PBS 50  $\mu$ l中25  $\mu$ g)を1、3、5、7、および9日目に注射した。

【0219】

強力な抗腫瘍免疫を誘導する2-三量体pAcrp30-CD40L

A20リンパ腫においてpAcrp30-CD-40Lの強力な抗腫瘍効果が認められたため、B16-F10腫瘍に対するその効果について調べた。局所腫瘍の大きさの有意な減少は認められたが( $p < 0.05$ )(図7)、延命は有意に増大されなかった。

【0220】

確立されたB16-F10腫瘍に対してCD40Lと相乗作用するTLR 9刺激(CpG)

pSP-D-CD40Lプラスミドは、腫瘍進行を有意に変更することができなかつた(図8)。しかし、CpGとpSP-D-CD40Lの併用は有意な抗腫瘍活性を有した( $p < 0.05$ )。この例では、pSP-D-CD40L(PBS 50  $\mu$ l中50  $\mu$ g)を0、2、4、6、および8日目に注射し、CpG-ODN 1018(PBS 50  $\mu$ l中25  $\mu$ g)を1、3、5、7、および9日目に腫瘍周囲に注射した。

【0221】

確立されたB16-F10腫瘍に対してTLR 9と相乗作用するCD40刺激

CpG単独および空プラスミドを伴うCpGの効果を制御するために、第2の実験を行った。

10

20

30

40

50

やはり、pSP-D-CD40LとCpGの併用は、CpG単独およびCpGと併用したpcDNA3.1の両方と比較して有意な抗腫瘍活性を有した( $p>0.05$ )(図9)。

【0222】

#### CD40Lアジュバントと相乗作用するTLRアゴニスト

TLR 3およびTLR 9のみが、確立されたB16-F10腫瘍に対する抗腫瘍効果に関してCD40L刺激と相乗的に作用する(表1)。

【0223】

(表1) CD40刺激とのTLRアゴニスト効果

TLR	TLRアゴニスト	効果
TLR 1/2	Pam3CSK4	-
TLR 2/6	FSL1	-
TLR 2/6	MALP2	-
TLR 3	ポリI:C	+
TLR 4	MPL	-
TLR 7/8	イミキモド	-
TLR 9	CpG 1018	+++

10

【0224】

#### 実施例4. カチオン性ポリマーと併用して可溶性多量体CD40LおよびTLRアゴニストを使用する腫瘍免疫治療法

C57B5/6マウスに、 $1 \times 10^6$ 個のB16-F10腫瘍細胞を皮下注射した。触知可能な腫瘍が出現した後(> 4 mm)、50  $\mu$ l PBSまたはプラスミドDNA(50  $\mu$ g)をTLRアゴニストと共にまたはこれを伴わずに、カチオン性ポリマー(JetPEI(商標) Qbiogene、カリフォルニア州、アーバイン)分子の存在下または非存在下において、腫瘍中および腫瘍周囲に1日おきに5回注射した。1日おきに腫瘍を計測した。マウスがストレスの徴候を示すか、または腫瘍が1.5 cm  $\times$  1.5 cmよりも大きくなった場合に、マウスを屠殺した。

20

【0225】

#### カチオン性ポリマーと併用したTNFSFプラスミド/TLRアゴニストの抗腫瘍効果

予想通り、TLRアゴニストと併用した可溶性多量体TNFSFプラスミドは、抗腫瘍活性を有した(図10)。しかし、カチオン性ポリマーをTNFSFプラスミド/TLRアゴニスト組み合わせ剤に追加すると、活性の著しい増大が示された(図10)。

30

【0226】

#### B16-F10腫瘍に対するTNFSFプラスミド/TLRアゴニスト-ポリマー組み合わせ剤の延命効果

pSP-D-CD40L + CpG + ポリI:C + ポリマーの組み合わせ剤は、マウスの80%を治癒させることができた( $p<0.05$ )(図11)。治癒とは、治療の90日後における腫瘍非存在下における生存と定義した。

【0227】

#### 実施例5: サーフアクトタンパク質Dとの融合タンパク質として産生され得る可溶性多量体CD40L

受容体保有細胞を刺激するためには、CD40Lを、多くのTNFSFリガンドと同様に、多量体(多くの三量体)として提示させなくてはならない。単一三量体型のCD40Lを作製するために、イソロイシンジッパーを使用して細胞外ドメインと遺伝子融合させた。TNFSFリガンドの細胞外ドメインを、それぞれコレクチンおよびC1qファミリーの2つの天然多量体タンパク質であるサーファクトタンパク質D(SP-D)またはAcrp30(アディポネクチン)の主に遺伝子融合して、多量体可溶性TNFSFリガンドを作製した(図12)。

40

【0228】

#### 実施例6: DNAワクチンにおけるアジュバント活性と直接関連するCD40L三量体の結合価

図12に示すように3つの形態の可溶性CD40Lを作製した: イソロイシンジッパーを含む1-三量体CD40L(pTr-CD40L); Acrp30の主要部との融合タンパク質として作製された2-三量体CD40L(pAcrp30-CD40L); サーフアクトタンパク質Dの主要部との融合タンパク質として作製された4-三量体CD40L(pSP-D-CD40L)。

50

## 【0229】

## 方法：

プラスミドは、大腸菌株XL1ブルーまたはTOP10で増殖させた。陰イオン交換クロマトグラフィー樹脂(EndoFree Plasmid MaxiKit、QIAGEN, Inc、カリフォルニア州、バレンシア)により、スーパーコイルプラスミドDNAを単離した。本方法によって単離した対照ベクターが、緩衝液単独と比較してなお免疫刺激活性を保持することが最初の実験から示された後、その後のプラスミド単離物をTriton X-114抽出によりさらに精製した。簡潔に説明すると、10倍量のTE緩衝液を添加し、4℃で6時間インキュベートし、37℃で一晩インキュベートすることによりTriton X-114(Sigma)を予め平衡化し、次いで上(水)層および界面の混濁物を除去した。この手順を繰り返して合計3回抽出を行い、この界面活性剤を4℃で保存した。EndoFreeキット精製手順を完了した後、プラスミドDNAを0.8 mg/mlの濃度でTE緩衝液に懸濁した。酢酸ナトリウム、pH 5.2を最終濃度0.3 Mになるように添加した。合計0.03量の予め平衡化したTriton X-114を添加して、試料を十分にボルテックスした。氷上で15分間インキュベートした後、試料を37℃で10分間加熱して2層を分離させ、その後室温またはそれ以上の温度で400×gで2分間遠心分離した。次いで水性上層を新しいチューブに移し、追加量のTriton X-114を添加して、全3回の抽出を行った。0.7量の室温イソプロパノールを添加し、最大速度で10分間遠心分離して、プラスミドDNAを回収した。ペレットを冷70%エタノール(エンドトキシン不含)で洗浄した後乾燥させ、エンドトキシン不含10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA、pH 7.5 TE緩衝液に5~7 mg/ml濃度で再懸濁した。使用前に、DNAをリン酸緩衝生理食塩水で希釈した。分泌型のHIV-1 Gag(pScGag)を抗原プラスミドとして使用した。各免疫化は、抗原プラスミドpScGag 80 µg、およびCD40LまたはGITRLプラスミドのうちの1つ20 µgを含む、リン酸緩衝生理食塩水100 µlからなつた。対照として、数匹のマウスは免疫化しないか(「無処置」)、またはアジュバントプラスミドの無い抗原プラスミド80 µgで免疫化した(この場合、増量DNAとして、空の発現ベクター-pcDNA3.1 20 µgで置き換えた)。6~9週齢の雌BALB/cByJマウス(The Jackson Laboratory、メイン州、バーハーバー)を5匹の群として試験した。28ゲージ針を備えたインスリンシリンジを用いて各後肢の四頭筋にプラスミドDNA溶液50 µlを注射することで(合計100 µg DNA)、3回の免疫化をイソフルオラン麻酔下において2週間間隔で行つた。最終免疫化の2週間後に、マウスをペントバルビタールで安楽死させ、脾臓細胞を回収した。GagペプチドでパルスしたP815細胞に対する細胞傷害活性に関するアッセイ、およびインターフェロンの産生に関する一晩のELISPOTアッセイを、記載の標準的な方法により行つた。

## 【0230】

## 結果：

抗原プラスミドであるpScGagと併用した場合、CD40Lのアジュバント活性は図13に示すように、三量体の数に直接関連した(4 > 2 > 1)。このことから、4-三量体型および2-三量体型のTNFRSFリガンド、特にSP-Dとの融合タンパク質として産生される4-三量体型が好ましい。

## 【0231】

実施例7：マラリア用のDNAワクチンにおけるTNFRSFアゴニストとTLRアゴニストの併用

## 方法：

pcDNA3.1(空プラスミド)、pSP-D-CD40L、pSP-D-GITRL(4-三量体型の可溶性GITRリガンド)、およびpMSP-1(プラスモディウム・ヨエリに由来する分泌性でコドン最適化型のメロゾイト表面タンパク質1)のいずれかを用いて、上記の通りにプラスミドDNAを調製した。BALB/cByJマウスにpMSP-1抗原プラスミド80 µgおよびpcDNA3.1またはpSP-D-GITRLのいずれか20 µgの全量を、以前の通りに2週間ごとに3回、筋肉内よりワクチン接種した。さらに、プラスミドDNAおよびISS-ODNの両方が同じ注射剤中に存在するように、一部の群ではISS-ODN 25 µgを注射剤と混合した。使用した特定のISS-ODNは、ODN 1018、BクラスISS-ODNとも称される、ホスホチオエート型の5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3'(配列番号:5)であった。最終ワクチン接種の2週間後に、 $2 \times 10^4$ 個のP. ヨエリ17XL寄生赤血球を腹腔内注射してマウスを刺激した。マウスは毎日追跡し、瀕死に見えた時点で安楽死させた。生存をカ

プラン・マイヤーグラフとしてプロットした。

【0232】

結果：

図14に示すように、pSP-D-GITRLとISS-ODN(CpGと表示)の併用により、100%のマウスがマラリアによる死亡から防御された。

【0233】

実施例8：中皮腫腫瘍を治療するためのTNFRSFアゴニストと2つのTLRアゴニストの併用

方法：

AB1マウス中皮腫細胞を、10%ウシ胎仔血清を添加したRPMI 1640中で培養した。トリプシン-EDTAで細胞を剥離し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で洗浄した。次いで、PBS 100 ul中の $10^4$ 個細胞を、6~9週齢の雌BALB/cByJマウス(Jackson Laboratories)の腹部に皮下注射した。直径 4 mmの腫瘍が形成された時点で、腫瘍に、28G針を備えたインスリンシリンジを用いて、ポリ(1:C) 25 ugおよび/またはCpG ODN 1018 25 ugと共にまたはこれを伴わずに、pSP-D-CD40L 50 ugを含むリン酸緩衝生理食塩水50 ulを1日おきに5回注射した。

10

【0234】

結果：

図15に示すように、1つのTNFRSFアゴニスト(すなわち、pSP-D-CD40L)と2つのTLRアゴニスト(すなわち、CpGすなわちISS-ODN + ポリ(1:C))の併用は、この腫瘍に対してそれ自体では効果をもたないpSP-D-CD40L単独と比較して、優れた抗腫瘍効果を有した。

20

【0235】

実施例9：黒色腫腫瘍を治療するためのTNFRSFアゴニストと2つのTLRアゴニストの併用

方法：

B16-F10黒色腫細胞を、10%ウシ胎仔血清を添加したRPMI 1640中で培養した。トリプシン-EDTAで細胞を剥離し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で洗浄した。次いで、PBS 100 ul中の $10^5$ 個細胞を、6~9週齢の雌C57BL/6雌マウス(Jackson Laboratories)の腹部に皮下注射した。直径 4 mmの腫瘍が形成された時点で、腫瘍に、28G針を備えたインスリンシリンジを用いて、ポリ(1:C) 25 ugおよび/またはCpG ODN 1018 25 ugと共にまたはこれを伴わずに、pSP-D-CD40L 50 ugを含むリン酸緩衝生理食塩水50 ulを1日おきに5回注射した。

30

【0236】

結果：

図16に示すように、1つのTNFRSFアゴニスト(すなわち、pSP-D-CD40L)と2つのTLRアゴニスト(すなわち、CpGすなわちISS-ODN + ポリ(1:C))の併用は、この腫瘍に対してそれ自体では効果をもたないpSP-D-CD40L単独と比較して、優れた抗腫瘍効果を有した。

【0237】

実施例10：黒色腫腫瘍を治療するためのTNFRSFアゴニスト、2つのTLRアゴニスト、およびポリマー送達の併用

方法：

B16-F10黒色腫細胞を、10%ウシ胎仔血清を添加したRPMI 1640中で培養した。トリプシン-EDTAで細胞を剥離し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で洗浄した。次いで、PBS 100 ul中の $10^5$ 個B16-F10細胞を、6~9週齢の雌C57BL/6雌マウス(Jackson Laboratories)の腹部に皮下注射した。直径 4 mmの腫瘍が形成された時点で、腫瘍に、ポリエチレンイミン(JetPEI, QBioGene, Inc.)と共にまたはこれを伴わずに、pcDNA3.1またはpSP-D-CD40L 50 ugを注射した。DNA/PEI混合物を作製するため、プラスミドDNA 50 ugを5%グルコースで希釈して50 ul量とした。別のチューブで、jetPEI 10 ulを5%グルコースと混合して50 ul量とした。各チューブをボルテックスした後、2本のチューブを混合して、室温で15分間インキュベートした。マウスの腫瘍周囲に、PBS 50 ul中の単独のpcDNA3.1またはpSP-D-CD40L 50 ugを1日おきに5回注射し(0、2、3、6、および8日目)、数匹のマウスにはDNA/JetPEI混合物を注射した。CpG ODNはDNA/JetPEI混合物中で沈殿するため、PBS 50 ul中のCpG ODN 1018および/またはポリ(1:C)各25 ugの溶液は、DNA ± JetPEI注射の間の日(1、3、5、7

40

50

、および9日目)に腫瘍周囲に注射した。

【0238】

結果：

図17に示すように、JetPEIによるポリマー送達を用いた、1つのTNFRSFアゴニスト(すなわち、pSP-D-CD40L)と2つのTLRアゴニスト(すなわち、CpGすなわちISS-ODN + ポリ(1:C))の併用は、優れた抗腫瘍効果を有した。

【0239】

実施例11：黒色腫瘍を治療するためのTNFRSFアゴニストおよびサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニストの併用

方法：

実施例10と同様に、B16-F10黒色腫瘍をC57BL/6マウスで確立した。直径 4 mmの腫瘍が形成された時点で、腫瘍に、PBS単独50  $\mu$ l、または、pcDNA3.1 50  $\mu$ g、pSP-CD40L-NST 50  $\mu$ g、もしくはマウスMIP3 (CCL20、pMIP3 ; GenBankアクセッション番号AF099052)のプラスミド25  $\mu$ gと組み合わせたpSP-D-CD40L-NST 50  $\mu$ gを含むPBS 50  $\mu$ lを、0、2、4、6、および8日目に注射した。選択したマウスにはまた、ISS-ODN(CpG 1018) 25  $\mu$ gおよびポリ(1:C) 25  $\mu$ gを含むPBS 50  $\mu$ lを、1、3、5、7、および9日目に注射した。

【0240】

結果：

MIP3 が腫瘍およびその流入領域リンパ節の部位へと樹状細胞を誘引すること、ならびに、pSP-D-CD40Lがこれらの樹状細胞を刺激することが予測された。図18のカプラン・マ  
 イヤープロットに示されるように、pMIP3 なしでの同じ処置と比較して、pSP-D CD40L-N  
 ST/pMIO-3 + CpG/ポリ(1:C)組み合わせ剤の延命効果が認められた。

【0241】

実施例12：マウスにおけるEnvに対する組み合わせDNAワクチン

DNAワクチンは抗体応答を誘発する能力が異なり、例えば、HBsAg DNAワクチンは、十分な液性応答を誘発するために強力なCTLエピトープを含むことが必要であることが知られている。CTLはDNAワクチンに対する抗体応答を1,000倍増強し得ることが以前に認められた。特定の条件下において、CTLおよびAbは、両抗原が同一ワクチン接種中に存在する限り、別々のタンパク質に向けられ得る。理論によって縛られることはないが、Agが流入リンパ節領域中のB細胞へと移動し得るように、ワクチン部位において細胞に結合したAgをC  
 TLが遊離させるように作用すると仮定された(図19を参照されたい)。

【0242】

やはり理論によって縛られることはないが、反復Agにより、不規則なAgよりも高い抗体価が生じると考えられる。さらにデータから、高密度Agがより多くのB細胞受容体と複合化し、低密度Agよりも強力な活性化シグナルを生じることが示唆される。このことから、高密度Env発現トランスフェクション筋細胞に由来する、CTLにより生成された膜断片は、EnvをB細胞に送達する方法となり得ることが示唆される。1つの局面においては、Envプラスミド(pEnv、すなわち、DC5シグナル配列を用いてpcDNA3.1中のコドン最適化型のサブタイプC株96ZM651由来gp160タンパク質p96ZM651gp160-CD5-optをコードするプラスミド)をトランスフェクションした細胞を用いて、正確に折りたたまれたEnv免疫原を生成し、中  
 和抗体応答を誘発する。

【0243】

CTLがHIVワクチンに対するAb応答を増強するかどうかを判定するため、BALB/cマウスに最初に、分泌性Gag(pScGag) + 4-三量体可溶性CD40L(pSP-D-CD40L)のプラスミドを用いてGagに対してワクチン接種した。2週間ごと3回のpScGag + pSP-D-CD40L筋肉内注射(i.m.)によるワクチン接種により、Gagに対する強力なCTL応答が生じる。他のマウスは、抗Gag CTLなしの対照とするために、ワクチン接種をしないでおいた。

【0244】

結果：

最後のGagワクチン接種の2週間後に、非分泌性Gagのプラスミド(p96ZM651gag-opt、pGa

10

20

30

40

50



gまたはサブタイプCと省略するが、BALB/cマウスにおいて免疫優性MHC-IエピトープであるAMQMLKETI配列(配列番号:6)を含むように変異させてある)と共にまたはこれを伴わずに、Envのプラスミド(上記のpEnv)をマウスに一度ワクチン接種した。また、pEnv ± pGag DNAによるいくつかのワクチン接種には、4-三量体可溶性GITRL(pSP-D-GITRL)またはBAFF(pSP-D-BAFF)を含めた。この単回Envプラスミドワクチン接種の1週間後に、静脈血を採血し、抗Env IgGをELISAにより測定した。グラフは、マウス5匹/群の平均力価を示す(図20)。

#### 【0245】

実施例13：組み合わせ免疫刺激剤の成分としての細胞外ATP(ATPe)

非加水分解型のATPであるATP Sを種々のアゴニストに添加し(pSP-D-CD40L + CpG + ポリ(1:C) + ATPe)、確立したB16F10黒色腫を呈するマウスにこの組み合わせ剤を筋肉内注射した。腫瘍は、以前のようにC57BL/6マウスにB16F10腫瘍細胞を皮下注射することにより形成した。腫瘍の平均直径が 4 mmであると認められた時点で、腫瘍に、ATP Sと併用したまたは併用しない種々のアゴニスト(上記)を0、2、4、6、および8日目に注射した。処置は、腫瘍内または腫瘍周囲への1日おきの5回の注射に限定した。1日おきに腫瘍の大きさを測定し、2つの直行する直径(すなわち、「腫瘍面積」)の産物としてプロットした。腫瘍が消失した場合、44日間の観察中に腫瘍が再発もせず、マウスが遠位腫瘍により死亡もしない限り、腫瘍なしと見なした。

#### 【0246】

結果：

図21に、確立された腫瘍に対する種々の組み合わせ免疫刺激剤の効果を実証する9つの実験治療群を示す。上段パネル：四重組み合わせ剤(すなわち、pSP-D-CD40L-NST + CpG + ポリ(1:C) + ATPe)による処置は、20日目までに腫瘍の大きさの減少を示したが、他の処置治療群ではいずれも腫瘍は増殖した。中段パネル：四重組み合わせ剤が他の実験条件を上回る顕著な延命効果を示したことを示す Kaplan-Meier 生存プロット。ロジック検定によると、pSP-D-CD40L-NSTを含む四重組み合わせ剤は、この組み合わせ剤において pSP-D-CD40L-NST を pcDNA3.1 に置換すること以外は同じ組み合わせ剤よりも有意に優れていた、 $p=0.03$ 。下段パネル：腫瘍のないマウスの割合は、pSP-D-CD40L-NST および ATP S(ATPe) を両方含む四重組み合わせ剤群においてのみ増加した。

#### 【0247】

その他の組み合わせ免疫刺激剤

これらの実施例の範囲を越えて、以下にその他の組み合わせ免疫刺激剤を挙げる。

#### 【0248】

条件#1：1つの TNFRSF アゴニスト

CD40 アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L)

GITR アゴニスト(例えば、pSP-D-GITRL)

RANKL アゴニスト(例えば、pSP-D-RANKL)

CD27 アゴニスト(例えば、pSP-D-CD70)

OX40 アゴニスト(例えば、pSP-D-OX40L)

4-1BB アゴニスト(例えば、pSP-D-4-1BBL)

HVEM アゴニスト(例えば、pSP-D-LIGHT)

#### 【0249】

条件#2：2つの TNFRSF アゴニスト

CD40 アゴニスト + GITR アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-GITRL)

CD40 アゴニスト + RANKL アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-RANKL)

CD40 アゴニスト + CD27 アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-CD70)

CD40 アゴニスト + OX40 アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-OX40L)

CD40 アゴニスト + 4-1BB アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-4-1BBL)

CD40 アゴニスト + HVEM アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-LIGHT)

#### 【0250】

条件#3：1つの TNFRSF アゴニスト + 1つの TLR アゴニスト

CD40 アゴニスト (例えば、pSP-D-CD40L) + TLR3 アゴニスト (例えば、ポリ(1:C))  
 CD40 アゴニスト (例えば、pSP-D-CD40L) + TLR4 アゴニスト (例えば、MPL)  
 CD40 アゴニスト (例えば、pSP-D-CD40L) + TLR7 アゴニスト (例えば、イサトリピン)  
 CD40 アゴニスト (例えば、pSP-D-CD40L) + TLR8 アゴニスト (例えば、レジキモド)

)  
 CD40 アゴニスト (例えば、pSP-D-CD40L) + TLR9 アゴニスト (例えば、ISS-ODN)  
 GITR アゴニスト (例えば、pSP-D-GITRL) + TLR3 アゴニスト (例えば、ポリ(1:C))  
 GITR アゴニスト (例えば、pSP-D-GITRL) + TLR4 アゴニスト (例えば、MPL)  
 GITR アゴニスト (例えば、pSP-D-GITRL) + TLR7 アゴニスト (例えば、イサトリピン)  
 GITR アゴニスト (例えば、pSP-D-GITRL) + TLR8 アゴニスト (例えば、レジキモド)

10

)  
 GITR アゴニスト (例えば、pSP-D-GITRL) + TLR9 アゴニスト (例えば、ISS-ODN)  
 RANK アゴニスト (例えば、pSP-D-RANKL) + TLR3 アゴニスト (例えば、ポリ(1:C))  
 RANK アゴニスト (例えば、pSP-D-RANKL) + TLR4 アゴニスト (例えば、MPL)  
 RANK アゴニスト (例えば、pSP-D-RANKL) + TLR7 アゴニスト (例えば、イサトリピン)  
 RANK アゴニスト (例えば、pSP-D-RANKL) + TLR8 アゴニスト (例えば、レジキモド)

)  
 RANK アゴニスト (例えば、pSP-D-RANKL) + TLR9 アゴニスト (例えば、ISS-ODN)  
 OX40 アゴニスト (例えば、pSP-D-OX40L) + TLR3 アゴニスト (例えば、ポリ(1:C))  
 OX40 アゴニスト (例えば、pSP-D-OX40L) + TLR4 アゴニスト (例えば、MPL)  
 OX40 アゴニスト (例えば、pSP-D-OX40L) + TLR7 アゴニスト (例えば、イサトリピン)  
 OX40 アゴニスト (例えば、pSP-D-OX40L) + TLR8 アゴニスト (例えば、レジキモド)  
 OX40 アゴニスト (例えば、pSP-D-OX40L) + TLR9 アゴニスト (例えば、ISS-ODN)

20

4-1BB アゴニスト (例えば、pSP-D-4-1BBL) + TLR3 アゴニスト (例えば、ポリ(1:C))  
 4-1BB アゴニスト (例えば、pSP-D-4-1BBL) + TLR4 アゴニスト (例えば、MPL)  
 4-1BB アゴニスト (例えば、pSP-D-4-1BBL) + TLR7 アゴニスト (例えば、イサトリピン)  
 4-1BB アゴニスト (例えば、pSP-D-4-1BBL) + TLR8 アゴニスト (例えば、レジキモド)  
 4-1BB アゴニスト (例えば、pSP-D-4-1BBL) + TLR9 アゴニスト (例えば、ISS-ODN)

CD27 アゴニスト (例えば、pSP-D-CD70) + TLR3 アゴニスト (例えば、ポリ(1:C))  
 CD27 アゴニスト (例えば、pSP-D-CD70) + TLR4 アゴニスト (例えば、MPL)  
 CD27 アゴニスト (例えば、pSP-D-CD70) + TLR7 アゴニスト (例えば、イサトリピン)  
 CD27 アゴニスト (例えば、pSP-D-CD70) + TLR8 アゴニスト (例えば、レジキモド)  
 CD27 アゴニスト (例えば、pSP-D-CD70) + TLR9 アゴニスト (例えば、ISS-ODN)

30

HVEM アゴニスト (例えば、pSP-D-LIGHT) + TLR3 アゴニスト (例えば、ポリ(1:C))  
 HVEM アゴニスト (例えば、pSP-D-LIGHT) + TLR4 アゴニスト (例えば、MPL)  
 HVEM アゴニスト (例えば、pSP-D-LIGHT) + TLR7 アゴニスト (例えば、イサトリピン)  
 HVEM アゴニスト (例えば、pSP-D-LIGHT) + TLR8 アゴニスト (例えば、レジキモド)  
 HVEM アゴニスト (例えば、pSP-D-LIGHT) + TLR9 アゴニスト (例えば、ISS-ODN)

【 0 2 5 1 】

条件#4 : 1つのTNFRSFアゴニスト + 2つのTLRアゴニスト

40

CD40 アゴニスト (例えば、pSP-D-CD40L) + TLR3 アゴニスト (例えば、ポリ(1:C)) + TLR4 アゴニスト (例えば、MPL)  
 CD40 アゴニスト (例えば、pSP-D-CD40L) + TLR3 アゴニスト (例えば、ポリ(1:C)) + TLR7 アゴニスト (例えば、イサトリピン)  
 CD40 アゴニスト (例えば、pSP-D-CD40L) + TLR3 アゴニスト (例えば、ポリ(1:C)) + TLR8 アゴニスト (例えば、レジキモド)  
 CD40 アゴニスト (例えば、pSP-D-CD40L) + TLR3 アゴニスト (例えば、ポリ(1:C)) + TLR9 アゴニスト (例えば、ISS-ODN)  
 CD40 アゴニスト (例えば、pSP-D-CD40L) + TLR4 アゴニスト (例えば、MPL) + TLR7 アゴニスト (例えば、イサトリピン)

50

CD40アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL) + TLR8アゴニスト(例えば、レジキモード)

CD40アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL) + TLR9アゴニスト(例えば、ISS-ODN)

GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-GITRL) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL)

GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-GITRL) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR7アゴニスト(例えば、イサトリピン)

GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-GITRL) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR8アゴニスト(例えば、レジキモード) 10

GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-GITRL) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR9アゴニスト(例えば、ISS-ODN)

GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-GITRL) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL) + TLR7アゴニスト(例えば、イサトリピン)

GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-GITRL) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL) + TLR8アゴニスト(例えば、レジキモード)

GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-GITRL) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL) + TLR9アゴニスト(例えば、ISS-ODN)

RANKアゴニスト(例えば、pSP-D-RANKL) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL) 20

RANKアゴニスト(例えば、pSP-D-RANKL) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR7アゴニスト(例えば、イサトリピン)

RANKアゴニスト(例えば、pSP-D-RANKL) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR8アゴニスト(例えば、レジキモード)

RANKアゴニスト(例えば、pSP-D-RANKL) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR9アゴニスト(例えば、ISS-ODN)

RANKアゴニスト(例えば、pSP-D-RANKL) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL) + TLR7アゴニスト(例えば、イサトリピン)

RANKアゴニスト(例えば、pSP-D-RANKL) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL) + TLR8アゴニスト(例えば、レジキモード) 30

RANKアゴニスト(例えば、pSP-D-RANKL) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL) + TLR9アゴニスト(例えば、ISS-ODN)

OX40Lアゴニスト(例えば、pSP-D-OX40L) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL)

OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-OX40L) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR7アゴニスト(例えば、イサトリピン)

OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-OX40L) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR8アゴニスト(例えば、レジキモード)

OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-OX40L) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR9アゴニスト(例えば、ISS-ODN) 40

OX40Lアゴニスト(例えば、pSP-D-OX40L) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL) + TLR7アゴニスト(例えば、イサトリピン)

OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-OX40L) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL) + TLR8アゴニスト(例えば、レジキモード)

OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-OX40L) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL) + TLR9アゴニスト(例えば、ISS-ODN)

4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-4-1BBL) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL)

4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-4-1BBL) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR7アゴニスト(例えば、イサトリピン) 50

4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-4-1BBL) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR8アゴニスト(例えば、レジキモード)

4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-4-1BBL) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR9アゴニスト(例えば、ISS-ODN)

4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-4-1BBL) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL) + TLR7アゴニスト(例えば、イサトリピン)

4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-4-1BBL) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL) + TLR8アゴニスト(例えば、レジキモード)

4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-4-1BBL) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL) + TLR9アゴニスト(例えば、ISS-ODN)

CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD70) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL)

CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD70) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR7アゴニスト(例えば、イサトリピン)

CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD70) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR8アゴニスト(例えば、レジキモード)

CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD70) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR9アゴニスト(例えば、ISS-ODN)

CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD70) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL) + TLR7アゴニスト(例えば、イサトリピン)

CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD70) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL) + TLR8アゴニスト(例えば、レジキモード)

CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD70) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL) + TLR9アゴニスト(例えば、ISS-ODN)

HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-LIGHT) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL)

HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-LIGHT) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR7アゴニスト(例えば、イサトリピン)

HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-LIGHT) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR8アゴニスト(例えば、レジキモード)

HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-LIGHT) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C)) + TLR9アゴニスト(例えば、ISS-ODN)

HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-LIGHT) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL) + TLR7アゴニスト(例えば、イサトリピン)

HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-LIGHT) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL) + TLR8アゴニスト(例えば、レジキモード)

HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-LIGHT) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL) + TLR9アゴニスト(例えば、ISS-ODN)

10

20

30

40

50

## 【 0 2 5 2 】

条件#5 : 2つのTNFRSFアゴニスト + 1つのTLRアゴニスト

CD40アゴニスト + GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-GITRL) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C))

CD40アゴニスト + GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-GITRL) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL)

CD40アゴニスト + GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-GITRL) + TLR7アゴニスト(例えば、イサトリピン)

CD40アゴニスト + GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-GITRL) + TLR8アゴニスト(例えば、レジキモード)

CD40アゴニスト + GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-GITRL) + TLR9アゴニスト(例えば、ISS-ODN)

CD40アゴニスト + RANKL(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-RANKL) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C))

CD40アゴニスト + RANKL(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-RANKL) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL)

CD40アゴニスト + RANKL(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-RANKL) + TLR7アゴニスト(例えば、イサトリピン)

CD40アゴニスト + RANKL(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-RANKL) + TLR8アゴニスト(例えば、レジキモド)

CD40アゴニスト + RANKL(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-RANKL) + TLR9アゴニスト(例えば、ISS-ODN)

CD40アゴニスト + CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-CD70) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C))

CD40アゴニスト + CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-CD70) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL)

CD40アゴニスト + CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-CD70) + TLR7アゴニスト(例えば、イサトリピン)

CD40アゴニスト + CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-CD70) + TLR8アゴニスト(例えば、レジキモド)

CD40アゴニスト + CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-CD70) + TLR9アゴニスト(例えば、ISS-ODN)

CD40アゴニスト + OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-OX40L) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C))

CD40アゴニスト + OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-OX40L) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL)

CD40アゴニスト + OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-OX40L) + TLR7アゴニスト(例えば、イサトリピン)

CD40アゴニスト + OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-OX40L) + TLR8アゴニスト(例えば、レジキモド)

CD40アゴニスト + OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-OX40L) + TLR9アゴニスト(例えば、ISS-ODN)

CD40アゴニスト + 4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-4-1BBL) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C))

CD40アゴニスト + 4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-4-1BBL) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL)

CD40アゴニスト + 4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-4-1BBL) + TLR7アゴニスト(例えば、イサトリピン)

CD40アゴニスト + 4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-4-1BBL) + TLR8アゴニスト(例えば、レジキモド)

CD40アゴニスト + 4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-4-1BBL) + TLR9アゴニスト(例えば、ISS-ODN)

CD40アゴニスト + HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-LIGHT) + TLR3アゴニスト(例えば、ポリ(1:C))

CD40アゴニスト + HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-LIGHT) + TLR4アゴニスト(例えば、MPL)

CD40アゴニスト + HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-LIGHT) + TLR7アゴニスト(例えば、イサトリピン)

CD40アゴニスト + HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-LIGHT) + TLR8アゴニスト(例えば、レジキモド)

CD40アゴニスト + HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-LIGHT) + TLR9アゴニスト(例えば、ISS-ODN)

10

20

30

40

50



CD40アゴニスト + 4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-4-1BBL) + TLR3アゴニスト+ TLR7アゴニスト(例えば、ポリ(1:C) + イサトリピン)

CD40アゴニスト + 4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-4-1BBL) + TLR3アゴニスト+ TLR8アゴニスト(例えば、ポリ(1:C) + レジキモド)

CD40アゴニスト + 4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-4-1BBL) + TLR3アゴニスト+ TLR9アゴニスト(例えば、ポリ(1:C) + ISS-ODN)

CD40アゴニスト + 4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-4-1BBL) + TLR4アゴニスト+ TLR7アゴニスト(例えば、MPL + イサトリピン)

CD40アゴニスト + 4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-4-1BBL) + TLR4アゴニスト+ TLR8アゴニスト(例えば、MPL + レジキモド)

10

CD40アゴニスト + 4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-4-1BBL) + TLR4アゴニスト+ TLR9アゴニスト(例えば、MPL + ISS-ODN)

CD40アゴニスト + HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-LIGHT) + TLR3アゴニスト+ TLR7アゴニスト(例えば、ポリ(1:C) + イサトリピン)

CD40アゴニスト + HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-LIGHT) + TLR3アゴニスト+ TLR8アゴニスト(例えば、ポリ(1:C) + レジキモド)

CD40アゴニスト + HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-LIGHT) + TLR3アゴニスト+ TLR9アゴニスト(例えば、ポリ(1:C) + ISS-ODN)

CD40アゴニスト + HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-LIGHT) + TLR4アゴニスト+ TLR7アゴニスト(例えば、MPL + イサトリピン)

20

CD40アゴニスト + HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-LIGHT) + TLR4アゴニスト+ TLR8アゴニスト(例えば、MPL + レジキモド)

CD40アゴニスト + HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-LIGHT) + TLR4アゴニスト+ TLR9アゴニスト(例えば、MPL + ISS-ODN)

【 0 2 5 4 】

条件#7 : 1つのTNFRSFアゴニスト + 1つのNLRまたはRLHアゴニスト

CD40アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L) + NOD1アゴニスト(例えば、M-TriDAP)

CD40アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L) + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriLys)

CD40アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L) + MDA5アゴニスト(例えば、dsRNA)

GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-GITRL) + NOD1アゴニスト(例えば、TriDAP)

30

GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-GITRL) + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriLys)

GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-GITRL) + MDA5アゴニスト(例えば、dsRNA)

RANKアゴニスト(例えば、pSP-D-RANKL) + NOD1アゴニスト(例えば、TriDAP)

RANKアゴニスト(例えば、pSP-D-RANKL) + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriLys)

RANKアゴニスト(例えば、pSP-D-RANKL) + MDA5アゴニスト(例えば、dsRNA)

OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-OX40L) + NOD1アゴニスト(例えば、TriDAP)

OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-OX40L) + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriLys)

OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-OX40L) + MDA5アゴニスト(例えば、dsRNA)

4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-4-1BBL) + NOD1アゴニスト(例えば、TriDAP)

4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-4-1BBL) + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriLys)

40

4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-4-1BBL) + MDA5アゴニスト(例えば、dsRNA)

CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD70) + NOD1アゴニスト(例えば、TriDAP)

CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD70) + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriLys)

CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD70) + MDA5アゴニスト(例えば、dsRNA)

HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-LIGHT) + NOD1アゴニスト(例えば、TriDAP)

HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-LIGHT) + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriLys)

HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-LIGHT) + MDA5アゴニスト(例えば、dsRNA)

【 0 2 5 5 】

条件#8 : 1つのTNFRSFアゴニスト + 2つのNLRまたはRLHアゴニスト

CD40アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L) + NOD1 + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriDAP + M

50

-TriLys)

- CD40アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L) + NOD1 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriDAP + dsRNA)
- CD40アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L) + NOD2 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriLys + dsRNA)
- GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-GITRL) + NOD1 + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriDAP + M-TriLys)
- GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-GITRL) + NOD1 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriDAP + dsRNA)
- GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-GITRL) + NOD2 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriLys + dsRNA) 10
- RANKアゴニスト(例えば、pSP-D-RANKL) + NOD1 + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriDAP + M-TriLys)
- RANKアゴニスト(例えば、pSP-D-RANKL) + NOD1 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriDAP + dsRNA)
- RANKアゴニスト(例えば、pSP-D-RANKL) + NOD2 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriLys + dsRNA)
- OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-OX40L) + NOD1 + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriDAP + M-TriLys)
- OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-OX40L) + NOD1 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriDAP + dsRNA) 20
- OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-OX40L) + NOD2 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriLys + dsRNA)
- 4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-4-1BBL) + NOD1 + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriDAP + M-TriLys)
- 4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-4-1BBL) + NOD1 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriDAP + dsRNA)
- 4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-4-1BBL) + NOD2 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriLys + dsRNA)
- CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD70) + NOD1 + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriDAP + M-TriLys) 30
- CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD70) + NOD1 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriDAP + dsRNA)
- CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD70) + NOD2 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriLys + dsRNA)
- HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-LIGHT) + NOD1 + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriDAP + M-TriLys)
- HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-LIGHT) + NOD1 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriDAP + dsRNA)
- HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-LIGHT) + NOD2 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriLys + dsRNA) 40

【 0 2 5 6 】

条件#9：2つのTNFRSFアゴニスト + 1つのNLRまたはRLHアゴニスト

- CD40アゴニスト + GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-GITRL) + NOD1アゴニスト(例えば、M-TriDAP)
- CD40アゴニスト + GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-GITRL) + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriLys)
- CD40アゴニスト + GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-GITRL) + MDA5アゴニスト(例えば、dsRNA)
- CD40アゴニスト + RANKL(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-RANKL) + NOD1アゴニスト(例え 50



ば、M-TriDAP)

CD40アゴニスト + RANKL(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-RANKL) + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriLys)

CD40アゴニスト + RANKL(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-RANKL) + MDA5アゴニスト(例えば、dsRNA)

CD40アゴニスト + CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-CD70) + NOD1アゴニスト(例えば、M-TriDAP)

CD40アゴニスト + CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-CD70) + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriLys)

CD40アゴニスト + CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-CD70) + MDA5アゴニスト(例えば、dsRNA)

CD40アゴニスト + OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-OX40L) + NOD1アゴニスト(例えば、M-TriDAP)

CD40アゴニスト + OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-OX40L) + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriLys)

CD40アゴニスト + OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-OX40L) + MDA5アゴニスト(例えば、dsRNA)

CD40アゴニスト + 4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-4-1BBL) + NOD1アゴニスト(例えば、M-TriDAP)

CD40アゴニスト + 4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-4-1BBL) + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriLys)

CD40アゴニスト + 4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-4-1BBL) + MDA5アゴニスト(例えば、dsRNA)

CD40アゴニスト + HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-LIGHT) + NOD1アゴニスト(例えば、M-TriDAP)

CD40アゴニスト + HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-LIGHT) + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriLys)

CD40アゴニスト + HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-LIGHT) + MDA5アゴニスト(例えば、dsRNA)

【 0 2 5 7 】

条件#10：2つのTNFRSFアゴニスト + 2つのNLRまたはRLHアゴニスト

CD40アゴニスト + GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-GITRL) + NOD1 + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriDAP + M-TriLys)

CD40アゴニスト + GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-GITRL) + NOD1 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriDAP + dsRNA)

CD40アゴニスト + GITRアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-GITRL) + NOD2 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriLys + dsRNA)

CD40アゴニスト + RANKL(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-RANKL) + NOD1 + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriDAP + M-TriLys)

CD40アゴニスト + RANKL(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-RANKL) + NOD1 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriDAP + dsRNA)

CD40アゴニスト + RANKL(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-RANKL) + NOD2 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriLys + dsRNA)

CD40アゴニスト + CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-CD70) + NOD1 + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriDAP + M-TriLys)

CD40アゴニスト + CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-CD70) + NOD1 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriDAP + dsRNA)

CD40アゴニスト + CD27アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-CD70) + NOD2 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriLys + dsRNA)

CD40アゴニスト + OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-OX40L) + NOD1 + NOD2

10

20

30

40

50

アゴニスト(例えば、M-TriDAP + M-TriLys)  
 CD40アゴニスト + OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-OX40L) + NOD1 + MDA5  
 アゴニスト(例えば、M-TriDAP + dsRNA)  
 CD40アゴニスト + OX40アゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-OX40L) + NOD2 + MDA5  
 アゴニスト(例えば、M-TriLys + dsRNA)  
 CD40アゴニスト + 4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-4-1BBL) + NOD1 + NO  
 D2アゴニスト(例えば、M-TriDAP + M-TriLys)  
 CD40アゴニスト + 4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-4-1BBL) + NOD1 + MD  
 A5アゴニスト(例えば、M-TriDAP + dsRNA)  
 CD40アゴニスト + 4-1BBアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-4-1BBL) + NOD2 + MD  
 A5アゴニスト(例えば、M-TriLys + dsRNA)  
 CD40アゴニスト + HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-LIGHT) + NOD1 + NOD2  
 アゴニスト(例えば、M-TriDAP + M-TriLys)  
 CD40アゴニスト + HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-LIGHT) + NOD1 + MDA5  
 アゴニスト(例えば、M-TriDAP + dsRNA)  
 CD40アゴニスト + HVEMアゴニスト(例えば、pSP-D-CD40L + pSP-D-LIGHT) + NOD2 + MDA5  
 アゴニスト(例えば、M-TriLys + dsRNA)

【 0 2 5 8 】

条件#11：1つのTNFRSFアゴニスト + 1つのサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト  
 条件#1の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、IFN )  
 条件#1の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、CCL20)

【 0 2 5 9 】

条件#12：2つのTNFRSFアゴニスト + 1つのサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト  
 条件#2の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、IFN )  
 条件#2の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、CCL20)

【 0 2 6 0 】

条件#13：1つのTNFRSFアゴニスト + 1つのTLRアゴニスト + 1つのサイトカイン/ケモカイン  
 受容体アゴニスト

条件#3の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、IFN )  
 条件#3の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、CCL20)

【 0 2 6 1 】

条件#14：1つのTNFRSFアゴニスト + 2つのTLRアゴニスト + 1つのサイトカイン/ケモカイン  
 受容体アゴニスト

条件#4の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、IFN )  
 条件#4の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、CCL20)

【 0 2 6 2 】

条件#15：2つのTNFRSFアゴニスト + 1つのTLRアゴニスト + 1つのサイトカイン/ケモカイン  
 受容体アゴニスト

条件#5の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、IFN )  
 条件#5の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、CCL20)

【 0 2 6 3 】

条件#16：2つのTNFRSFアゴニスト + 2つのTLRアゴニスト + 1つのサイトカイン/ケモカイン  
 受容体アゴニスト

条件#6の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、IFN )  
 条件#6の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、CCL20)

【 0 2 6 4 】

条件#17：1つのTNFRSFアゴニスト + 1つのNLRまたはRLHアゴニスト + 1つのサイトカイン  
 /ケモカイン受容体アゴニスト

条件#7の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、IFN )  
 条件#7の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、CCL20)

50

20

30

40

## 【 0 2 6 5 】

条件#18：1つのTNFRSFアゴニスト + 2つのTLR + 1つのサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト

条件#8の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、IFN )

条件#8の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、CCL20)

## 【 0 2 6 6 】

条件#19：2つのTNFRSFアゴニスト + 1つのNLRまたはRLHアゴニスト + 1つのサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト

条件#9の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、IFN )

条件#9の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、CCL20)

10

## 【 0 2 6 7 】

条件#20：2つのTNFRSFアゴニスト + 1つのNLRまたはRLHアゴニスト + 1つのサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト

条件#10の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、IFN )

条件#10の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、CCL20)

## 【 0 2 6 8 】

条件#21：1つのTNFRSFアゴニスト + 1つのTLRアゴニスト + 1つのNLRまたはRLHアゴニスト

条件#3の組み合わせ剤 + NOD1アゴニスト(例えば、M-TriDAP)

条件#3の組み合わせ剤 + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriLys)

条件#3の組み合わせ剤 + MDA5アゴニスト(例えば、dsRNA)

20

## 【 0 2 6 9 】

条件#22：1つのTNFRSFアゴニスト + 1つのTLRアゴニスト + 2つのNLRまたはRLHアゴニスト

条件#3の組み合わせ剤 + NOD1 + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriDAP + M-TriLys)

条件#3の組み合わせ剤 + NOD1 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriDAP + dsRNA)

条件#3の組み合わせ剤 + NOD2 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriLys + dsRNA)

## 【 0 2 7 0 】

条件#23：1つのTNFRSFアゴニスト + 2つのTLRアゴニスト + 1つのNLRまたはRLHアゴニスト

30

条件#4の組み合わせ剤 + NOD1アゴニスト(例えば、M-TriDAP)

条件#4の組み合わせ剤 + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriLys)

条件#4の組み合わせ剤 + MDA5アゴニスト(例えば、dsRNA)

## 【 0 2 7 1 】

条件#24：1つのTNFRSFアゴニスト + 2つのTLRアゴニスト + 2つのNLRまたはRLHアゴニスト

条件#4の組み合わせ剤 + NOD1 + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriDAP + M-TriLys)

条件#4の組み合わせ剤 + NOD1 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriDAP + dsRNA)

条件#4の組み合わせ剤 + NOD2 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriLys + dsRNA)

40

## 【 0 2 7 2 】

条件#25：2つのTNFRSFアゴニスト + 1つのTLRアゴニスト + 1つのNLRまたはRLHアゴニスト

条件#5の組み合わせ剤 + NOD1アゴニスト(例えば、M-TriDAP)

条件#5の組み合わせ剤 + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriLys)

条件#5の組み合わせ剤 + MDA5アゴニスト(例えば、dsRNA)

## 【 0 2 7 3 】

条件#26：2つのTNFRSFアゴニスト + 1つのTLRアゴニスト + 2つのNLRまたはRLHアゴニスト

条件#5の組み合わせ剤 + NOD1 + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriDAP + M-TriLys)

条件#5の組み合わせ剤 + NOD1 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriDAP + dsRNA)

50

- 条件#5の組み合わせ剤 + NOD2 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriLys + dsRNA)  
 【 0 2 7 4 】
- 条件#27：2つのTNFRSFアゴニスト + 2つのTLRアゴニスト + 1つのNLRアゴニスト
- 条件#6の組み合わせ剤 + NOD1アゴニスト(例えば、M-TriDAP)
- 条件#6の組み合わせ剤 + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriLys)
- 条件#6の組み合わせ剤 + RIG-Iアゴニスト(例えば、dsRNA)  
 【 0 2 7 5 】
- 条件#28：2つのTNFRSFアゴニスト + 2つのTLRアゴニスト + 2つのNLRまたはRLHアゴニスト
- 条件#6の組み合わせ剤 + NOD1 + NOD2アゴニスト(例えば、M-TriDAP + M-TriLys) 10
- 条件#6の組み合わせ剤 + NOD1 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriDAP + dsRNA)
- 条件#6の組み合わせ剤 + NOD2 + MDA5アゴニスト(例えば、M-TriLys + dsRNA)  
 【 0 2 7 6 】
- 条件#29：1つのTNFRSFアゴニスト + 1つのTLRアゴニスト + 1つのNLRまたはRLHアゴニスト + 1つのサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト
- 条件#21の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、IFN )
- 条件#21の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、CCL20)  
 【 0 2 7 7 】
- 条件#30：1つのTNFRSFアゴニスト + 1つのTLRアゴニスト + 2つのNLRまたはRLHアゴニスト + 1つのサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト 20
- 条件#22の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、IFN )
- 条件#22の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、CCL20)  
 【 0 2 7 8 】
- 条件#31：1つのTNFRSFアゴニスト + 2つのTLRアゴニスト + 1つのNLRまたはRLHアゴニスト + 1つのサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト
- 条件#23の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、IFN )
- 条件#23の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、CCL20)  
 【 0 2 7 9 】
- 条件#32：1つのTNFRSFアゴニスト + 2つのTLRアゴニスト + 2つのNLRまたはRLHアゴニスト + 1つのサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト 30
- 条件#24の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、IFN )
- 条件#24の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、CCL20)  
 【 0 2 8 0 】
- 条件#33：2つのTNFRSFアゴニスト + 1つのTLRアゴニスト + 1つのNLRまたはRLHアゴニスト + 1つのサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト
- 条件#25の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、IFN )
- 条件#25の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、CCL20)  
 【 0 2 8 1 】
- 条件#34：2つのTNFRSFアゴニスト + 1つのTLRアゴニスト + 2つのNLRまたはRLHアゴニスト + 1つのサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト 40
- 条件#26の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、IFN )
- 条件#26の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、CCL20)  
 【 0 2 8 2 】
- 条件#35：2つのTNFRSFアゴニスト + 2つのTLRアゴニスト + 1つのNLRまたはRLHアゴニスト + 1つのサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト
- 条件#27の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、IFN )
- 条件#27の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、CCL20)  
 【 0 2 8 3 】
- 条件#36：2つのTNFRSFアゴニスト + 2つのTLRアゴニスト + 2つのNLRまたはRLHアゴニスト + 1つのサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト 50

条件#28の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、IFN )

条件#28の組み合わせ剤 + サイトカイン/ケモカイン受容体アゴニスト(例えば、CCL20)

【0284】

条件#37：1つのTNFRSFアゴニスト + 1つのプリンアゴニスト

条件#1の組み合わせ剤 + プリンアゴニスト(例えば、ATP S)

【0285】

条件#38：2つのTNFRSFアゴニスト + 1つのプリンアゴニスト

条件#2の組み合わせ剤 + プリンアゴニスト(例えば、ATP S)

【0286】

条件#39：1つのTNFRSFアゴニスト + 1つのTLRアゴニスト + 1つのプリンアゴニスト

条件#3の組み合わせ剤 + プリンアゴニスト(例えば、ATP S)

【0287】

条件#40：1つのTNFRSFアゴニスト + 2つのTLRアゴニスト + 1つのプリンアゴニスト

条件#4の組み合わせ剤 + プリンアゴニスト(例えば、ATP S)

【0288】

条件#41：2つのTNFRSFアゴニスト + 1つのTLRアゴニスト + 1つのプリンアゴニスト

条件#5の組み合わせ剤 + プリンアゴニスト(例えば、ATP S)

【0289】

条件#42：2つのTNFRSFアゴニスト + 2つのTLRアゴニスト + 1つのプリンアゴニスト

条件#6の組み合わせ剤 + プリンアゴニスト(例えば、ATP S)

【0290】

同様に、条件#43～#72は、条件#7～#36 + 1つのプリンアゴニスト(例えば、ATP S)である。

【0291】

さらに、条件#73～#102は、条件#43～#72(すなわち、プリンアゴニストを添加したもの)に、プリンアゴニストの有効性を延長するためにエクトヌクレオチダーゼの阻害剤を添加したものである。

【0292】

上記の実施例を参照して本発明を説明したが、修正および変更が本発明の趣旨および範囲に包含されることが理解されよう。したがって、本発明は添付の特許請求の範囲によってのみ制限される。

【図面の簡単な説明】

【0293】

【図1】可溶性多量体CD40L融合タンパク質を示す。

【図2】HIV-1 Gag DNAワクチンにおいて、可溶性多量体CD40Lが単一三量体よりも活性が高いことを実証する(1 < 2 < 4-三量体)。

【図3】CD40Lに加えて、多量体GITRLもHIV GagワクチンのCTL活性を増加させることを実証する。

【図4】確立されたA20リンパ腫腫瘍が腫瘍周囲プラスミド注射により治癒され得ることを実証する。

【図5】A20リンパ腫に対する多量体TNFSFリガンドの延命効果を示す。

【図6】確立されたB16-F10腫瘍に対して、TLR 3刺激(ポリI:C)がCD40Lと相乗的に作用することを実証する。

【図7】確立されたB16-F10腫瘍に対する、PBS、対照プラスミド、および2 CD40L三量体を含むプラスミドの効果を比較する。

【図8】確立されたB16-F10腫瘍に対して、TLR 9刺激(CpG)がCD40Lと相乗的に作用することを実証する。

【図9】確立されたB16-F10腫瘍に対して、CD40刺激がTLR 9と相乗的に作用することを実証する。

【図10】JetPEIと併用したCD40L、TLR 3、およびTLR 9刺激が、確立されたB16-F10腫瘍

10

20

30

40

50

に対して効果的であることを実証する。

【図 1 1】B16-F10腫瘍に対するCD40L、TLR 3/TLR 9アゴニスト、JetPEI組み合わせ剤の延命効果を示す。

【図 1 2】TNFRSFアゴニストであるCD40Lの1-、2-、および4-三量体可溶型を示す。マウスCD40Lの細胞外ドメイン(ECD)をイソロイシンジッパーに融合させて、1-三量体可溶性CD40Lを作製した。マウスCD40LのECDをマウスAcrp30(アディポネクチン)の主に融合させて、2-三量体可溶性CD40Lを作製した。マウスCD40LのECDをマウスサーファクタントタンパク質D(SP-D)の主に融合させて、4-三量体可溶性CD40Lを作製した。各プラスミドDNAは、pTr-CD40L、pAcrp30-CD40L、およびpSP-D-CD40Lと称する。GITRL(pSP-D-GITRL)、RANKL(pSP-D-RANKL)、4-1BBL(pSP-D-4-1BBL)、OX40L(pSP-D-OX40L)、CD27L/CD70(pSP-D-CD27L/CD70)、BAFF(pSP-D-BAFF)、およびLIGHT(pSP-D-LIGHT)についても、同様の4-三量体構築物を作製した。

10

【図 1 3】ワクチンにおける可溶性CD40Lのアジュバント活性が三量体の結合価に関連することを実証する。1-、2-、および4-三量体型の可溶性CD40Lのプラスミドを分泌性HIV-1 Gagの抗原プラスミド(pScGag)と併用して、5匹のマウス群を免疫化した。

【図 1 4】マラリア用のワクチンにおけるTNFRSFアゴニストとTLRアゴニストの相乗作用を示す。マウスに、コドン最適化した分泌型のメロゾイト表面タンパク質1をコードするDNAワクチン(pMSP-1)または空ベクター-pcDNA3.1をワクチン接種した。アジュバントとして、4-三量体GITRL(TNFSF18)のプラスミドDNA、pSP-D-GITRLをまた、CpG-ODNを付加してまたは付加せずに使用した。次いで、プラスモディウム・ヨエリ寄生赤血球を注射して、マウスを刺激した。

20

【図 1 5】中皮腫に対する腫瘍免疫治療手順におけるTNFRSFアゴニストと2つのTLRアゴニストの相乗作用を示す。マウスに中皮腫細胞を注射し、腫瘍を形成させた。腫瘍が直径4 mmに到達したら、腫瘍に、空プラスミド(pcDNA3.1)、4-三量体CD40L(pSP-D-CD40L)、またはpSP-D-40Lを50 µg含むリン酸緩衝液50 µlを0、2、4、6、および8日目に注射し(パネルAにおける矢印)、ポリ(1:C) 25 µgと共にまたはこれを伴わずに、CpG-ODN 1018(すなわち、配列5'-TGAAGTGTGAACGTTTCGAGATTGA-3'(配列番号:7)を有するホスホロチオエート結合オリゴヌクレオチド) 25 µgを含むリン酸緩衝生理食塩水50 µlを1、3、5、7、および9日目に注射した。

【図 1 6】黒色腫に対する腫瘍免疫治療手順におけるTNFRSFアゴニストと2つのTLRアゴニストの相乗作用を示す。マウスにB16-F10黒色腫細胞を注射し、腫瘍を形成させた。腫瘍が直径4 mmに到達したら、腫瘍に、空プラスミド(pcDNA3.1)、4-三量体CD40L(pSP-D-CD40L)、またはpSP-D-40Lを50 µg含むリン酸緩衝生理食塩水50 µlを0、2、4、6、および8日目に注射し(パネルAにおける矢印)、ポリ(1:C) 25 µgと共にまたはこれを伴わずに、CpG-ODN 1018 25 µgを含むリン酸緩衝生理食塩水50 µlを1、3、5、7、および9日目に注射した。

30

【図 1 7】0、2、4、6、および8日目に投与したTNFRSFアゴニストのプラスミドの有効性に対するポリエチレンイミンの有益な効果を実証するが、この場合、黒色腫に対する腫瘍免疫治療手順には2つのTLRアゴニストが存在した。マウスには、図16に記載した通りにB16-F10腫瘍を注射した。

40

【図 1 8】黒色腫に対する腫瘍免疫治療手順におけるTNFRSFアゴニストとサイトカイン/ケモカイン受容体アゴニストの相乗作用を示す。マウスにB16-F10黒色腫細胞を注射し、腫瘍を形成させた。腫瘍が直径4 mmに到達したら、腫瘍に、空プラスミド(pcDNA3.1)、4-三量体CD40L(pSP-D-CD40L)、および/またはMIP3 (CCL20とも称される)のプラスミド、pMIP3 を50 µg含むリン酸緩衝生理食塩水50 µlを0、2、4、6、および8日目に注射した(パネルAにおける矢印)。

【図 1 9】筋肉のトランスフェクションおよび正確に折りたたまれたEnvの高密度発現を示すが、ここで、細胞溶解後に、筋細胞断片は流入領域リンパ節に移動する。

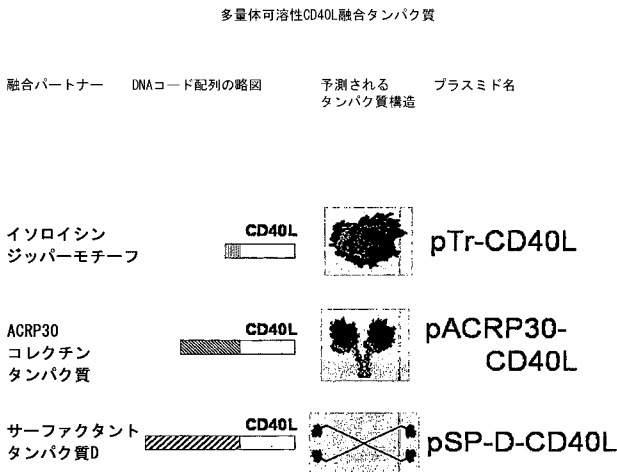
【図 2 0】pEnvワクチン接種したマウスに由来する抗Env IgGの相対力価を図示する。

【図 2 1】分子アジュバントおよびプリン受容体アゴニストである細胞外ATP(ATPe)の相

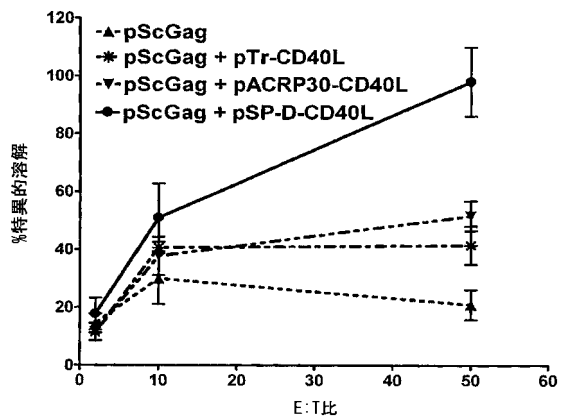
50

乗効果を図示する。マウスにB16-F10黒色腫細胞を注射し、腫瘍を形成させた。腫瘍が直径 4 mmに到達したら、腫瘍に、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)単独50 uI、または空プラスミド (pcDNA3.1)もしくは4-三量体CD40Lをコードするプラスミド (pSP-D-CD40L-NST)のいずれかを50 ug含むPBS 50 uIを、0、2、4、6、および8日目に注射した。また表示のように、いくつかの実験治療群には、100 uM ATP Sと共にまたはこれを伴わずに、ポリ(1:C) 25 ugと共にまたはこれを伴わずに、CpG-ODN 1018 25 ugを含むリン酸緩衝生理食塩水50 uIを、1、3、5、7、および9日目に投与した。パネルBは生存に対するこれら処置の効果を示すが、腫瘍の平均直径が15 mmよりも大きくなる、腫瘍が潰瘍化する、またはマウスが瀕死となった場合にマウスを安楽死させた。パネルCは、局所腫瘍に対するこれら処置の効果を示す。全マウスが最初から腫瘍を有したため、処置の0日目における腫瘍なしは0%であった。Y軸は、各条件で処置した後に腫瘍なしとなったマウスの%を示す。

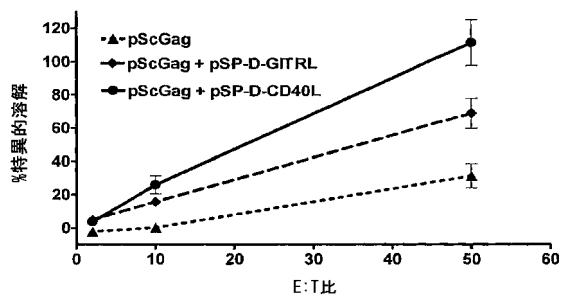
【 図 1 】



【 図 2 】

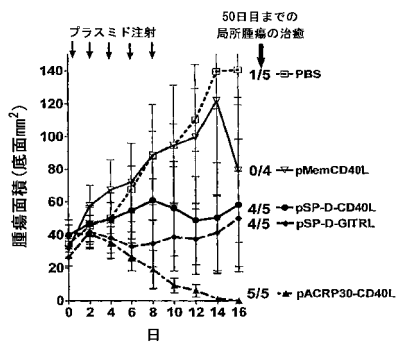


【 図 3 】



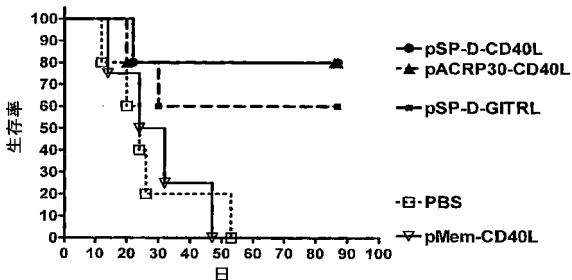
【 図 4 】

BALB/cマウスにおける確立されたA20リンパ腫に及ぼす多量体CD40LおよびGITRLの効果



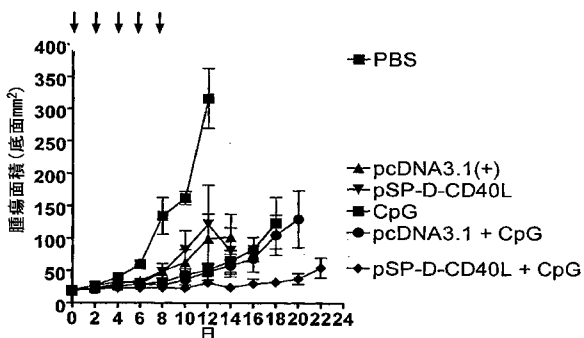
【 図 5 】

BALB/cマウスにおけるA20リンパ腫に対する多量体TNFSFリガンドの延命効果



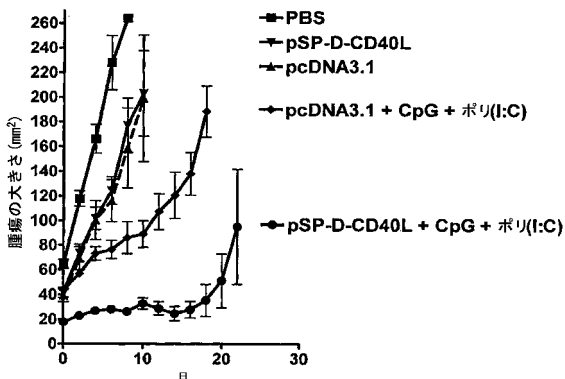
【 図 8 】

マウスにおける確立されたB16-F10黒色腫に及ぼすTLR9刺激とCD40刺激の併用の効果



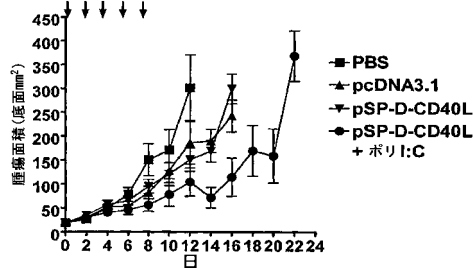
【 図 9 】

B16-F10黒色腫に及ぼすTLR刺激を伴うCD40刺激の効果



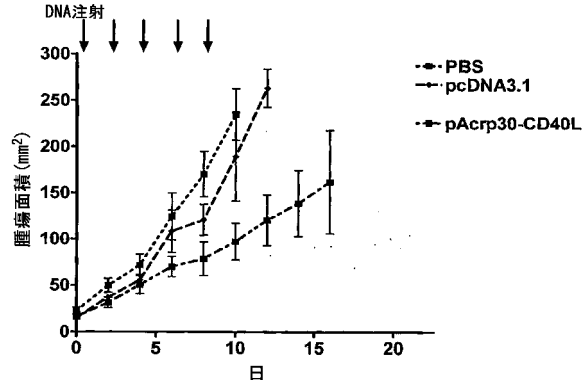
【 図 6 】

マウスにおける確立されたB16-F10黒色腫瘍のpSP-D-CD40L治療に及ぼすポリ(I:C)の効果



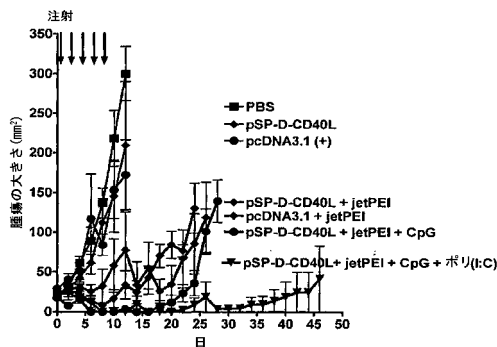
【 図 7 】

B16-F10黒色腫瘍増殖に及ぼす2-三量体CD40Lの効果



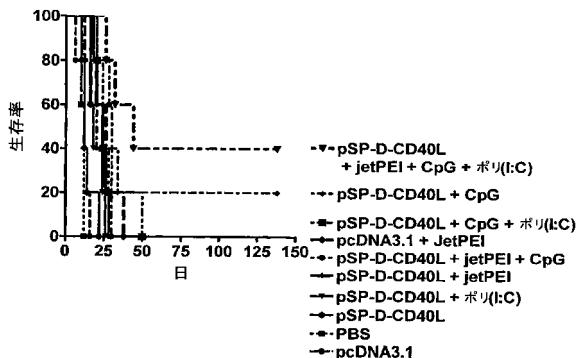
【 図 10 】

確立されたB16-F10黒色腫に及ぼすポリエチレンイミン(JetPEI)ポリマーの効果



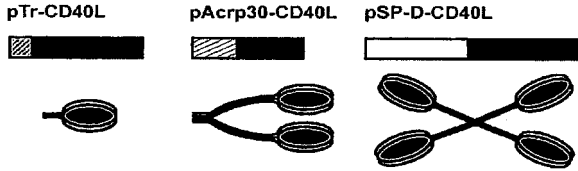
【 図 11 】

B16-F10黒色腫生存に及ぼすポリエチレンイミン(JetPEI)ポリマーの効果

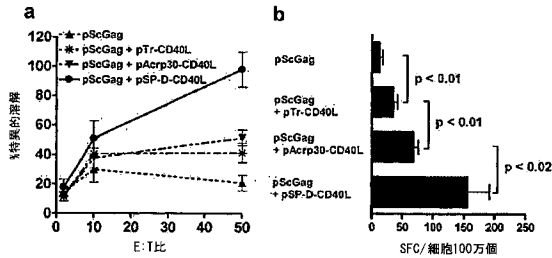




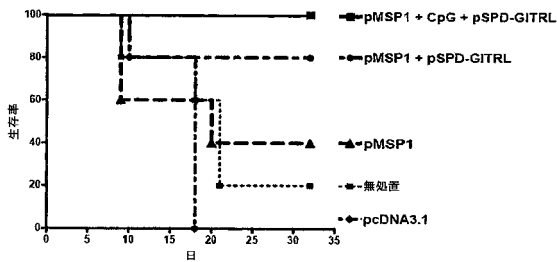
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】

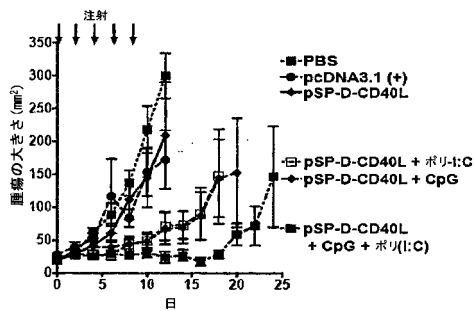


【 図 1 4 】



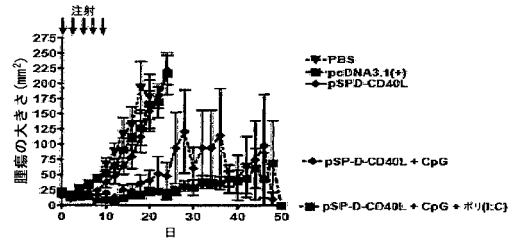
【 図 1 6 】

C. B16-F10黒色腫の増殖を阻害するCD40刺激とTLR刺激の併用

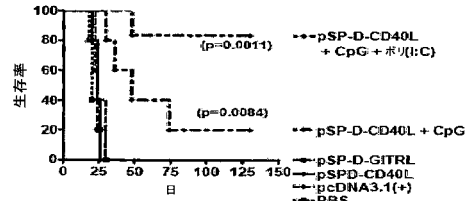


【 図 1 5 】

A. AB1中皮腫の増殖を阻害するCD40刺激とTLR刺激の併用

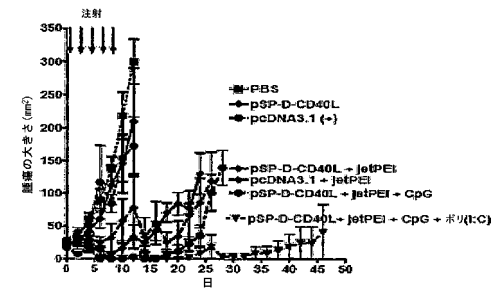


B. AB1中皮腫による生存を延長するCD40刺激とTLR刺激の併用

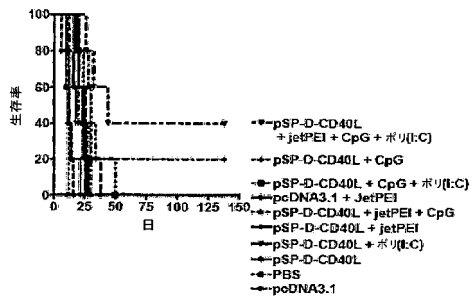


【 図 1 7 】

A. B16-F10黒色腫増殖に及ぼすjetPEIポリマーの効果



B. B16-F10黒色腫生存に及ぼすjetPEIポリマーの効果

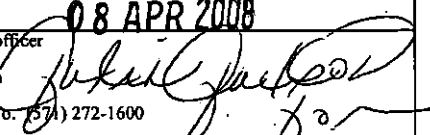




【配列表】

2009522372000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/00616
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8): C12P 21/02( 2006.01);C07H 21/04( 2006.01);C07K 14/525( 2006.01);C12N 1/21( 2006.01)  USPC: 435/69.5;435/253.3;435/320.1;530/351 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/69.5; 435/253.3; 435/320.1; 530/351;  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) DIALOG, EAST		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2004/0141950 A1 (NOELLE et al) 22 July 2004 (22.07.2004), see entire document	1-12, 25-33, 35-39, 43-44
Y	Santhakumaran et al. Nucleic Acids Research, April 2004, Vol 32, No. 7, pages 2102-2112	1-12, 25-33, 35-39, 43-44
<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:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"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 25 March 2008 (25.03.2008)		Date of mailing of the international search report 08 APR 2008
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. (571) 273-3201		Authorized officer Sharon Wen  Telephone No. (571) 272-1600

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US07/00616

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 15-18  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
claims 15-18 are non-statutory "use" claims under 35 USC 101.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such  
an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.: 13-24, 34 and 40-42  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
  3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K	9/10	
A 6 1 K 9/50 (2006.01)	A 6 1 K	9/50	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 0 7 K 14/52 (2006.01)	C 0 7 K	14/52	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74) 代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(72) 発明者 コーンブルース リチャード シド

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ラ ホーヤ タフト アベニュー 5 4 1 5

(72) 発明者 ストーン ジェフリー ウィリアム

カナダ国 オンタリオ州 トロント ジェラルド ストリート イースト 2 0 1 1 - 4 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA21 BA31 CA02 DA02 EA04 FA02 GA18 HA01 HA20

4B065 AA90 AC12 AC20 BB19 CA44 CA45

4C076 AA16 AA95 BB11 CC06 CC47 EE24 EE25 EE48 FF43 FF63

4C085 AA04 BB11 BB23 EE03 GG01

4H045 AA11 AA30 CA40 DA01 DA14 DA86 EA22 EA31 FA74