

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7222915号
(P7222915)

(45)発行日 令和5年2月15日(2023.2.15)

(24)登録日 令和5年2月7日(2023.2.7)

(51)国際特許分類

A 6 1 K	39/00 (2006.01)	F I	A 6 1 K	39/00	H Z N A
A 6 1 K	47/62 (2017.01)		A 6 1 K	47/62	
A 6 1 K	47/65 (2017.01)		A 6 1 K	47/65	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)		A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)		A 6 1 P	35/00	

請求項の数 29 (全115頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-560156(P2019-560156)
(86)(22)出願日	平成30年5月2日(2018.5.2)
(65)公表番号	特表2020-518613(P2020-518613)
	A)
(43)公表日	令和2年6月25日(2020.6.25)
(86)国際出願番号	PCT/US2018/030725
(87)国際公開番号	WO2018/204534
(87)国際公開日	平成30年11月8日(2018.11.8)
審査請求日	令和3年4月15日(2021.4.15)
(31)優先権主張番号	62/500,053
(32)優先日	平成29年5月2日(2017.5.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)
(31)優先権主張番号	62/561,760
(32)優先日	平成29年9月22日(2017.9.22)
	最終頁に続く

(73)特許権者	516384081 イミュノミック セラピューティックス, インコーポレイテッド IMMUNOMIC THERAPEUTICS, INC. アメリカ合衆国 メリーランド州 20850 ロックビル, ブロスクハート ロード 15010, スイート 250
(74)代理人	100189131 弁理士 佐伯 拓郎
(74)代理人	100182486 弁理士 中村 正展
(74)代理人	100158872 牛山 直子
(74)代理人	100147289

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 癌抗原を含む改善されたLAMP構築物

(57)【特許請求の範囲】**【請求項1】**

リソソーム関連膜タンパク質(LAMP)のルーメンドメインの2つの相同ドメイン、および抗原性ドメインを含むLAMP構築物であって、前記抗原性ドメインが前記2つの相同ドメインの間に配置され、前記抗原性ドメインがpp65の少なくとも1つのエピトープ、gBの少なくとも1つのエピトープ、及びE1の少なくとも1つのエピトープを含む、LAMP構築物。

【請求項2】

前記LAMPタンパク質が、LAMP-1、LAMP-2、LAMP-3、LIMP-2、Macrosailin、Endolyn、LAMP-5またはLIMBICから選択される、請求項1に記載のLAMP構築物。

【請求項3】

前記LAMPタンパク質のアミノ酸配列が配列番号1～113のいずれか1つから選択される、請求項1または2に記載のLAMP構築物。

【請求項4】

前記LAMPタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号1～113のいずれか1つと少なくとも約90%、少なくとも約95%、96%、97%、98%または99%同一である、請求項1または2に記載のLAMP構築物。

【請求項5】

前記LAMPタンパク質がLAMP-1である、請求項1に記載のLAMP構築物。

【請求項 6】

前記 2 つの相同ドメインが LAMP - 1 相同ドメイン 1 及び LAMP - 1 相同ドメイン 2 を含む、請求項 1 に記載の LAMP 構築物。

【請求項 7】

前記 LAMP - 1 相同ドメイン 1 が配列番号 1 の残基 29 - 194 を含み、および / または、前記 LAMP - 1 相同ドメイン 2 が配列番号 1 の残基 228 - 381 を含む、請求項 6 に記載の LAMP 構築物。

【請求項 8】

前記 LAMP 構築物が、LAMP タンパク質の膜貫通ドメインおよび細胞質尾部をさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の LAMP 構築物。

10

【請求項 9】

前記膜貫通ドメインが配列番号 1 の残基 383 - 405 を含み、および / または、前記細胞質尾部が配列番号 1 の残基 406 - 417 を含む、請求項 8 に記載の LAMP 構築物。

【請求項 10】

前記 LAMP 構築物がシグナル配列をさらに含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の LAMP 構築物。

【請求項 11】

前記シグナル配列が LAMP タンパク質に由来する、請求項 10 に記載の LAMP 構築物。

【請求項 12】

前記抗原性ドメインの前記エピトープがリンカーによって分離されている、請求項 1 ~ 11 に記載の LAMP 構築物。

20

【請求項 13】

前記リンカーがアミノ酸配列 GPGPG または PMGLP から選択される、請求項 12 に記載の LAMP 構築物。

【請求項 14】

前記少なくとも 1 つの p p 65 エピトープが配列番号 114 のアミノ酸配列を含むか、または、配列番号 114 と少なくとも約 95%、96%、97%、98%、もしくは 99% 同一であるアミノ酸配列を含み；および / または、前記少なくとも 1 つの g B エピトープが配列番号 117 のアミノ酸配列を含むか、または、配列番号 117 と少なくとも約 95%、96%、97%、98% もしくは 99% 同一であるアミノ酸配列を含み；および / または、前記少なくとも 1 つの I_E 1 エピトープが配列番号 121 のアミノ酸配列を含むか、または、配列番号 121 と少なくとも約 95%、96%、97%、98% もしくは 99% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の LAMP 構築物。

30

【請求項 15】

前記少なくとも 1 つの p p 65 エピトープが、LLQTGIGHVRVSQL、ALPLKMLNIPSIINVH、DQYVKVYLESFCEDV、IIKPGKISHIMLDVAFTSH、PQYSSEHPTFTSQYRIQGKL、PPWQAGILARNLVPMV、もしくは KYQEFFFWDANDIYRIFA で表されるアミノ酸配列のうち 1 つまたは複数を含み、および / または

40

前記少なくとも 1 つの g B エピトープが、TTSAQTRSVYSQHVT、QLIPDDYSNTHSTRYV、VSVFETSGGLVVFWQ、もしくは NSAYEYVDYLFKRMIDL で表されるアミノ酸配列のうち 1 つまたは複数を含み；および / または

前記少なくとも 1 つの I_E 1 エピトープが、VLAEELVKQIKVVRVDMVRHRIKEHMLKKYTQ、IVPEDKREMWMACIKE LH、KDELRRKMMYMCYRNIEFFT KNSAFPKTT、SVMKRRIEEICMKVFAQYI、AIAEESDEEEAIVAY、もしくは VKSEPVSEIEEVAPEEEEDG で表されるアミノ酸配列のうち 1 つまたは複数を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項

50

に記載の LAMP 構築物。

【請求項 16】

前記抗原性ドメインが配列番号 115、116、119、120、122、もしくは 123 のうち 1 つまたは複数含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の LAMP 構築物。

【請求項 17】

前記抗原性ドメインが配列番号 114、配列番号 117、および配列番号 121 を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の LAMP 構築物。

【請求項 18】

LAMP タンパク質のルーメンドメインの 2 つの相同ドメイン、および抗原性ドメインを含む LAMP 構築物であって、前記抗原性ドメインが前記 2 つの相同ドメインの間に配置され、前記抗原性ドメインが、配列番号 124 ~ 197 と少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、96%、97%、98% または 99% 同一である、LAMP 構築物。

10

【請求項 19】

請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の LAMP 構築物をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 20】

請求項 19 に記載のポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の LAMP 構築物、請求項 19 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 20 に記載の宿主細胞を含む医薬組成物。

20

【請求項 22】

前記組成物を、疾患または障害を軽減または治療するのに十分な量でそれを必要とする対象に投与される、疾患または障害を軽減または治療するための請求項 21 に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

前記組成物を、多形性膠芽腫を治療するのに十分な量でそれを必要とする対象に投与される、多形性膠芽腫を治療するための請求項 21 に記載の医薬組成物。

【請求項 24】

前記組成物が、プライミングステップおよび / または少なくとも 1 回のブースティングステップで使用される、請求項 22 または 23 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 25】

前記組成物が、プライミングステップで使用される、請求項 24 に記載の医薬組成物。

【請求項 26】

前記組成物がブースティングステップで使用される、請求項 24 に記載の医薬組成物。

【請求項 27】

プライミングに使用される抗原が、ブースティングに使用される抗原と同じである、請求項 22 ~ 26 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 28】

プライミングに使用される抗原が、ブースティングに使用される第 2 の抗原と同じタンパク質に由来する、請求項 22 ~ 27 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

40

【請求項 29】

プライミングおよび / またはブースティングに 2 つ以上の抗原が使用される、請求項 22 ~ 28 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌抗原を含む改善された LAMP 構築物、および過剰増殖性障害および / または癌に罹患している対象の治療におけるその使用に関する。本明細書に記載の改善された LAMP 構築物を利用するプライムブーストプロトコルも記載されている。

【背景技術】

【0002】

50

以下の説明では、背景および前置きの目的で特定の物品と方法を記載する。ここに含まれるものは、先行技術の「承認」と解釈されるべきではない。出願人は、必要に応じて、ここで参照されている物品および方法が、適用される法定条項の下で先行技術を構成しないことを実証する権利を明示的に留保する。

【0003】

DNAワクチンは、予防ワクチンと治療ワクチンの両方を開発するための新しい有望な候補である。DNAワクチンは安全であることが証明されており、臨床的利益を達成するためにワクチン接種の反復サイクルが必要である場合、ベクター骨格に対する免疫応答の欠如が決定的な利点になり得る。しかし、従来のDNAワクチンに認められる欠点の1つは、ヒトでの免疫原性が低いことである。エピトープベースのDNAワクチンの免疫原性における重要な制限的ステップは、T細胞へのMHCII提示経路に対するエピトープのアクセスであり得、これは標的技術を含まないワクチンの場合には確率過程である可能性が高い。

10

【0004】

米国特許第5,633,234号には、改変されたインフルエンザ血球凝集素(HA)の抗原性ドメインと、抗原をその区画に効果的に標的化する細胞質エンドソーム/リソソーム標的化シグナルとを含むキメラタンパク質が記載されている。抗原性ドメインが処理され、それからのペプチドが主要組織適合性(MHC)クラスII分子と関連して細胞表面に提示された。LAMP-1の細胞質尾部を使用して、キメラタンパク質のエンドソーム/リソソーム標的化ドメインを形成した。

20

【0005】

米国特許第8,318,173号は、これらの最初の観察を展開して、LAMP-1の全ルーメンドメインと膜貫通ドメインとの間に挿入されたHIV-1 Gagタンパク質を含むキメラタンパク質(およびこれらのタンパク質をコードする対応するDNA)を説明した。この構築物は樹状細胞に導入され、MHC II経路を標的とすることが報告された。

20

【0006】

このアプローチは、いくつかのウイルス抗原、ヒトパピローマウイルスE7、デングウイルス膜タンパク質、HIV-1 gp160膜タンパク質、HIV-1 p55 Gag、西ナイル膜タンパク質、C型肝炎ウイルスNS3タンパク質およびサイトメガロウイルスpp65に対する細胞応答および体液性応答の増加に有用であることが証明されている(例えば、Bonini, et al., J. Immunol. 166: 5250-5257, 2001を参照)。強化された免疫応答は、LAMPおよびMHC IIの共局在化、ならびに抗原ペプチドのより効率的なプロセシングおよび送達に起因する可能性がある。さらに、LAMP標的化は免疫原性エピトープの増加した数を示す結果となり、したがって、非標的抗原と比較して質的に拡大した免疫応答を誘導することが報告されている。例えばFernandes et al., 2000, Eur. J. Immunol. 30(8): 2333-43では、ワクシニアベクターにコードされたLAMP輸送OVA抗原の提示されたペプチドの数の増加が実証された。外因的に供給されたOVAから生成された12個のペプチドのうち、9個がOVA/LAMPキメラによって提示されたのに対し、LAMPを含まない構築物では2個のみが提示された。

30

40

【0007】

LAMPの細胞質ドメインが(シグナル配列および膜貫通ドメインと共に)必要であることは確定しているが、すべての抗原のエンドソーム/リソソーム輸送に対して必ずしも十分ではない。それどころか、リソソーム小胞経路へのタンパク質の輸送にはLAMPの全ルーメンドメインも必要であることが示されている。

【0008】

しかし、LAMPの完全なルーメンドメインと完全な膜貫通/細胞質尾部(「完全なLAMP構築物」)が存在する場合でも、特定の抗原が免疫応答を産生する効果は、これらの構造物で使用される特定の配列に高度に依存することがますます発見されている。実際

50

、完全なLAMP構築物に挿入した場合、同じタンパク質の異なる抗原断片は同じ免疫応答を誘発しないことがわかっている。抗原断片が免疫応答を生じる場合と、そうでない場合がある。これらの観察から、完全なLAMP構築物で目的のタンパク質のどの特定の抗原配列が免疫応答を產生するかを事前に予測することは難しくなる。

【0009】

さらに、完全なLAMP構築物の生成において、抗原を適切に発現および処理するには全ルーメンドメインが必要であることが繰り返し観察されている。例えば、Godinho et al., PLoS ONE 9(6): e99887. doi: 10.1371/journal.pone.0099887で著者らは、完全かつ無傷のルーメンドメインが、抗原をリソソームに標的化するために必要な最小限の領域であり、ルーメンドメインの断片は機能しないことを報告した。6ページのidを参照。

10

【0010】

具体的には、Godinhoらは、第1の管腔ドメインおよびいくつかの第2の管腔ドメインを完全に除去することにより（すなわち、T1-Lum/gag構築物）、タンパク質発現と抗体応答の両方が減少することを示した。同様に、第1の管腔ドメインの25%を除去するが無傷の第2の管腔ドメインを有する場合（すなわち、T2-Lum/gag）、タンパク質発現と抗体応答の両方は比較的増加したが、完全なLAMP構築物で得られた結果に比べると依然として少なかった。

【0011】

さらに、著者らは、免疫応答を产生する能力が、特定の抗原およびこれらの完全なLAMP構築物で使用されるエピトープに依存することを確認した。例えば、9ページの2列目で、著者らは「したがって、先の研究では、VLPとして、または可溶性の形態で分泌されるGagを生成するDNAワクチンが、異なるレベルのT細胞およびB細胞活性化を誘導することが実証され、これは細胞質のGagが誘導する反応とも異なる」と述べている。さらに、文献に記載されているようにLAMPの全ルーメンドメインとLAMPの全膜貫通/細胞質ドメインとの間に抗原配列を挿入すると、非常に大きなポリヌクレオチド配列になり得、商業レベルで生産するにはコストがかかりすぎるか、科学的な観点からは非現実的になり得る。

20

【0012】

したがって、例えば、過剰増殖性障害および/または癌を効果的に治療するためのワクチンとして使用できる、新しく改善されたLAMP構築物を設計する必要がある。さらに、一旦改善されると、これらの新しいLAMP構築物を使用して抗体を生成できる。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【文献】米国特許第5,633,234号

米国特許第8,318,173号

【非特許文献】

【0014】

【文献】Bonini, et al., J. Immunol. 166: 5250-525

7, 2001

40

Fernandes et al., 2000, Eur. J. Immunol. 30(8): 2333-43

Godinho et al., PLoS ONE 9(6): e99887. doi: 10.1371/journal.pone.0099887

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

この概要は、以下の発明を実施するための形態でさらに説明される概念をいくつか選んで簡略化した形式で紹介するために提供されている。この概要は、特許請求される主題の

50

重要なまたは本質的な特徴を特定することを意図しておらず、特許請求される主題の範囲を制限するために使用されることも意図していない。特許請求される主題の他の特徴、詳細、有用性、および利点は、添付の図面に例示され、かつ添付の特許請求の範囲に定義される態様を含む以下の発明を実施するための形態から明らかになる。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明の目的は、増強された免疫応答を生じるために本明細書で特定される癌抗原を免疫系に効果的に提示するLAMPドメインの特定の断片および/または変異体を含む新規構築物（「改善されたLAMP構築物」）を提供することである。これらの改善されたLAMP構築物は、ヘルパーT細胞が優先的に刺激される、および/または抗体が生成されるように、抗原をリソソーム/エンドソーム区画に効果的に導き、そこで処理されて主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスI分子に提示される。

10

【0017】

本明細書に記載される改善されたLAMP構築物および方法は、対象において免疫応答を誘発し得る。免疫応答は、改善されたLAMP構築物（例えば、ワクチン）中の抗原のエピトープに対する免疫応答であり得る。ワクチンは、免疫系が対象におけるワクチンの抗原を含む免疫系を検出および破壊できるように、対象の免疫系を準備させる。本明細書に記載の改善されたLAMP構築物および方法は、対象においてTh1免疫応答を誘発し得る。Th1免疫応答には、免疫細胞のサブセット（例えば、抗原特異的T細胞）による炎症性サイトカイン（例えば、IFN、TNF）の分泌が含まれ得る。場合によっては、炎症性サイトカインは、対象の抗原を含む免疫細胞を破壊する可能性のある免疫細胞の別のサブタイプ（例えば、細胞毒性T細胞）を活性化する。

20

【0018】

場合によっては、本明細書に記載の改善されたLAMP構築物および方法で使用されるエピトープおよび/または抗原は、対象の免疫系によって認識されてTh1免疫応答を誘発し、I型サイトカインを放出することができる。Th1応答は、エピトープとT細胞、より具体的にはT細胞により発現される主要組織適合遺伝子複合体（MHC）との間の相互作用により開始され得る。例えば、エピトープのMHC受容体への高親和性結合は、Th1応答を刺激する可能性がある。MHC受容体は、複数のタイプのMHC受容体のうちの少なくとも1つであり得る。T細胞に関するMHC受容体は、集団内の個人によって異なる可能性がある。

30

【0019】

場合によっては、免疫応答はタイプ1の免疫応答である。場合によっては、免疫応答は、I型サイトカイン産生とII型サイトカイン産生との比が1を超えることを特徴とする。場合によっては、免疫応答は、I型サイトカイン産生とII型サイトカイン産生との比が1未満であることを特徴とする。場合によっては、免疫応答は、IFN産生とIL-10産生との比が1を超えることを特徴とする。場合によっては、免疫応答は、IFN産生とIL-10産生との比が1未満であることを特徴とする。

【0020】

プライムブーストプロトコルも考えられる。例えば、本発明は、本明細書に記載の癌抗原を含む改善されたLAMP構築物で対象をプライミングし、続いて抗原または関連抗原（例えば、同じまたは非常に類似したタンパク質配列に由来する第2の抗原）で対象を少なくとも1回ブースティングすることを含む、癌抗原に対して対象内に免疫応答を生じさせる方法をさらに提供する。抗原の混合物は、プライミングおよびブースティング工程のいずれかまたは両方で使用できる。プライミング工程およびそれに続く抗原のブースティング工程のための改善されたLAMP構築物の使用は、より高い力値を有意に生成することが示されており、これは増強された抗体応答におけるLAMPの力を表している。

40

【0021】

本発明のさらに別の目的は、ヘルパーT細胞の刺激によって抗腫瘍免疫応答を誘発することにより、癌および/または過剰増殖性障害の改善された治療方法を提供することであ

50

る。

【 0 0 2 2 】

本発明はさらに、本明細書に記載の癌抗原を含む改善されたLAMP構築物のいずれかをコードする核酸分子を提供する。本発明はまた、抗体を生成するための抗原を含む改善されたLAMP構築物を提供する。改善されたLAMP構築物は、核酸分子が発現制御配列に作動可能に連結されている核酸を含むことができる。好ましい一態様では、改善されたLAMP構築物は、患者にワクチン接種するのに適したワクチンベクターである。別の態様では、本発明は、抗原をコードする核酸分子を細胞に導入しやすくするための改善されたLAMP構築物を含む送達媒体を提供する。送達媒体は、脂質ベース（例えば、リポソーム製剤）、ウイルスベース（例えば、核酸分子をカプセル化するウイルスタンパク質を含む）、または細胞ベースであり得る。10

【 0 0 2 3 】

好ましい実施形態では、本発明は、哺乳動物において癌抗原に対する免疫応答（例えば、抗体の生成）を誘発するための目的の癌抗原を含む改善されたLAMP構築物を含む注射可能な組成物を提供する。好ましい実施形態では、このワクチンは、Th2応答に対して優先的なTh1応答を生じる。改善されたLAMP構築物は、本明細書に記載の癌抗原の少なくとも1つのエピトープを含む。

【 0 0 2 4 】

本発明はまた、本明細書に記載の改善されたLAMP構築物のいずれかを含む細胞を提供する。一態様では、細胞は抗原提示細胞である。抗原提示細胞は、プロフェッショナル抗原提示細胞（例えば、樹状細胞、マクロファージ、B細胞など）または操作された抗原提示細胞（例えば、MHCクラスII分子など、抗原提示に必要な分子を発現するよう操作された非プロフェッショナル抗原提示細胞）であってもよい。抗原提示に必要な分子は、他の細胞、例えば、天然発生の細胞に由来し得るか、またはそれ自体が操作されたもの（例えば、抗原性エピトープに対する親和性が高いまたは低いなど、所望の特性を発現するように変異または修飾されたもの）であり得る。一態様では、抗原提示細胞は共刺激シグナルを一切発現せず、抗原は自己抗原である。20

【 0 0 2 5 】

本発明はさらに、本明細書に記載の改善されたLAMP構築物のいずれかを含む複数の細胞を含むキットを提供する。少なくとも2つの細胞が異なるMHCクラスII分子を発現し、各細胞は同じLAMP構築物を含む。一態様では、改善されたLAMP構築物とベクターを受け取るための細胞とを含むキットが提供される。30

【 0 0 2 6 】

本発明はまた、本明細書に記載の少なくとも1つの細胞および/または少なくとも1つの改善されたLAMP構築物を含むトランスジェニック動物を提供する。本発明はまた、本明細書に記載の細胞の少なくとも1つを含むトランスジェニック動物を提供する。

【 0 0 2 7 】

本発明はさらに、動物（例えば、ヒトまたは非ヒト脊椎動物）において抗原に対する免疫応答を生じさせる方法を提供し、この方法は、上記の細胞を動物に投与することを含み、ここで細胞は、動物中に改善されたLAMP構築物を発現するか、または動物における改善されたLAMP構築物の発現を誘導することができる。一態様では、動物がMHCクラスII分子に対する免疫応答を生成しないように、細胞は、動物のMHCタンパク質と適合するMHCクラスII分子を含む。好ましい一態様では、動物はヒトである。40

【 0 0 2 8 】

さらなる態様において、本発明は、ヒトまたは非ヒト脊椎動物などの動物に、本明細書に記載の改善されたLAMP構築物のいずれかを投与することを含む、癌抗原に対する免疫応答を誘発する方法を提供する。好ましくは、改善されたLAMP構築物は動物の細胞に対して感染性である。例えば、改善されたLAMP構築物は、ワクシニア改善型LAMP構築物などのウイルスベクターであり得る。

【 0 0 2 9 】

10

20

30

40

50

例えば、本発明はさらに、本明細書に記載の抗原を含む改善されたLAMP構築物で動物をプライミングし、続いて動物を少なくとも1回ブースティングすることを含む、癌抗原に対して動物中に免疫応答を生じさせる方法を提供する。プライミング工程およびそれに続く抗原のブースティング工程のための改善されたLAMP構築物の使用は、より高い力価を有意に生成することが示されており、これは増強された抗体応答におけるLAMPの力を表している。

【0030】

さらなる態様において、細胞は患者から得られ、本明細書に記載の改善されたLAMP構築物が細胞に導入され、細胞または細胞の子孫が患者内に再導入される。一態様では、細胞は、抗原提示細胞に分化することができる幹細胞である。ヒト患者の治療および獣医学的使用が特に考えられる。10

【0031】

本発明はまた、非ヒト脊椎動物中に抗体を生じさせる方法を含み、ここで、非ヒト脊椎動物には、本明細書に記載の目的の抗原を含む改善されたLAMP構築物が注入される。次に、目的の癌抗原は、非ヒト脊椎動物のLAMPの助けを借りて免疫系に効率的に提示され、抗原に対する抗体を産生する。

【0032】

具体的には、目的の抗原の提示をLAMPと組み合わせることにより、抗原を細胞質エンドソーム／リソソーム区画に効率的に輸送し、そこで抗原を処理し、そこからのペプチドを主要組織適合性(MHC)クラスII分子に関連して細胞表面に提示することができる。20

【0033】

これらの生成された抗体は、脊椎動物の血液から(ポリクローナルとして)単離し、標準的な技術を使用してモノクローナル抗体を生成するためにさらに単離することができる。

【0034】

好ましい実施形態では、非ヒト脊椎動物のゲノムは、導入された部分的ヒト免疫グロブリン領域を含み、この導入された領域は、ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子座コード配列と非ヒト脊椎動物の内因性免疫グロブリン可変領域遺伝子座に基づく非コード配列とを含む。好ましくは、非ヒト脊椎動物のゲノムは、内因性免疫グロブリン領域の少なくとも一部またはすべてが除去されている。30

【0035】

さらに好ましい実施形態では、非ヒト脊椎動物におけるヒトモノクローナル抗体の産生には、宿主が、ヒト重鎖免疫グロブリンタンパク質を発現する少なくとも1つの遺伝子座と、ヒト軽鎖免疫グロブリンタンパク質を発現する1つの遺伝子座とを有する必要がある。

【0036】

いくつかの態様では、部分的ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子座は、ヒトV_Hコード配列と非ヒト脊椎動物の内因性V_H領域に基づく非コードV_H配列とを含む。これらの態様では、部分的ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子座はさらに、ヒトDおよびJ遺伝子コード配列と非ヒト脊椎動物宿主の内因性ゲノムに基づく非コードDおよびJ遺伝子配列とを含む。40

【0037】

他の態様において、免疫グロブリン領域は、ヒトV_Lコード配列と非ヒト脊椎動物の内因性V_L領域に基づく非コードV_L配列とを含む導入された領域を含む。より好ましくは、ヒトV_Lコード配列を含む導入された部分的ヒト免疫グロブリン領域は、ヒトJ遺伝子コード配列と非ヒト脊椎動物宿主の内因性ゲノムに基づく非コードJ遺伝子配列とをさらに含む。

【0038】

特定の態様では、脊椎動物は哺乳動物であり、好ましくは、哺乳動物はげっ歯類、例えばマウスまたはラットである。他の態様では、脊椎動物は鳥類、例えばニワトリである。その他の非ヒト脊椎動物には、ウサギ、ラマ、ラクダ、ウシ、モルモット、ハムスター、

10

20

30

40

50

イヌ、ネコ、ウマ、非ヒト霊長類、類人猿（例えば、サルまたはエイプ）、サル（例えば、マーモセット、ヒヒ、アカゲザル）、またはエイプ（例えば、ゴリラ、チンパンジー、オランウータン、テナガザル）が含まれる。

【0039】

さらなる実施形態では、部分的ヒト免疫グロブリン領域は、ヒトV_H遺伝子コード領域を含み、さらに、i₁)ヒトDおよびJ遺伝子コード配列と、i₂i₃)非ヒト脊椎動物宿主の内因性ゲノムに基づく非コードDおよびJ遺伝子ならびにp r e - D J配列とを含む。他の態様では、V_H遺伝子コード領域は他の供給源に（少なくとも部分的に）由来し、例えば、合理的またはそうでなければ設計された配列、ヒトと他の設計された配列との組み合わせである配列、あるいは非ヒト霊長類など他の種からの配列であり得る。

10

【0040】

さらに別の特定の態様において、部分的ヒト免疫グロブリン領域は、ヒトV_L遺伝子コード領域を含み、さらに、i₁)ヒトJ遺伝子コード配列およびi₂i₃)非ヒト脊椎動物宿主の内因性ゲノムに基づく非コードJ遺伝子配列を含む。特定の態様において、部分的ヒト免疫グロブリン領域は、ヒトV_Hコード領域と、ヒトDおよびJ遺伝子コード配列と、非ヒト脊椎動物宿主の内因性ゲノムに基づく非コードDおよびJ遺伝子ならびにp r e - D J配列とを含む。

【0041】

本明細書に記載の方法は、診断および治療用途のための、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体を含む抗体の产生および／または最適化に使用することができる。そのような抗体を產生するハイブリドーマも本発明のさらなる目的である。

20

【0042】

これらおよびその他の態様、目的、特徴について以下でさらに詳しく説明する。

【0043】

本発明の目的および特徴は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照してよりよく理解することができる。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】本明細書で説明するように使用できる様々な種類の改善されたL A M P構築物（ILC-1、ILC-2、ILC-3、ILC-4、ILC-5、およびILC-6として識別される）の一般的な図式を示す図である。

30

【0045】

【図2】図2Bは本明細書で定義されるL A M Pタンパク質のドメインを示し、図2AはヒトL A M P - 1（配列番号1）、ヒトL A M P - 2（配列番号2）、ヒトL A M P - 3（配列番号3）、ヒトL I M P - 2（配列番号4）、ヒトE n d o l y n（配列番号5）、ヒトM a c r o s a i l i n（配列番号80）、ヒトL A M P - 5（配列番号93）およびヒトL I M B I C（配列番号67）についてこれらのドメインの特定のアミノ酸境界を定義する図である。本明細書に記載されるように、改善されたL A M P構築物ILC-1、ILC-2、ILC-3、ILC-4、ILC-5およびILC-6を生成するために、L A M Pルーメンドメイン、相同ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞質尾部およびシグナル配列を使用することができる。

40

【0046】

【図3】ヒトL A M P - 1（配列番号1）と比較して他の種に見られるL A M P - 1タンパク質のアラインメントを示す図である。これらの他の種の同等のドメインは、本明細書に記載の改善されたL A M P構築物を生成するために使用でき、図2および図3でヒトL A M P - 1について特定されたドメインを図3に示すアラインメントと比較することによって容易に識別できる。

【0047】

【図4】ヒトL A M P - 2（配列番号2）と比較して他の種に見られるL A M P - 2タンパク質のアラインメントを示す図である。これらの他の種の同等のドメインは、本明細書

50

に記載の改善された LAMP 構築物を生成するために使用でき、図 2 および図 4 でヒト LAMP - 2 について特定されたドメインを図 4 に示すアラインメントと比較することによって容易に識別できる。

【0048】

【図 5】ヒト LAMP - 3 (配列番号 3) と比較して他の種に見られる LAMP - 3 タンパク質のアラインメントを示す図である。これらの他の種の同等のドメインは、本明細書に記載の改善された LAMP 構築物を生成するために使用でき、図 2 および図 5 でヒト LAMP - 3 について特定されたドメインを図 5 に示すアラインメントと比較することによって容易に識別できる。

【0049】

【図 6】ヒト LIMP - 2 (配列番号 4) と比較して他の種に見られる LIMP - 2 タンパク質のアラインメントを示す図である。これらの他の種の同等のドメインは、本明細書に記載の改善された LAMP 構築物を生成するために使用でき、図 2 および図 6 でヒト LIMP - 2 について特定されたドメインを図 6 に示すアラインメントと比較することによって容易に識別できる。

10

【0050】

【図 7】ヒト LIMBIC (配列番号 67) と比較して他の種に見られる LIMBIC タンパク質のアラインメントを示す図である。これらの他の種の同等のドメインは、本明細書に記載の改善された LAMP 構築物を生成するために使用でき、図 2 および図 7 でヒト LIMBIC について特定されたドメインを図 7 に示すアラインメントと比較することによって容易に識別できる。

20

【0051】

【図 8】ヒト Endolin (配列番号 5) と比較して他の種に見られる Endolin タンパク質のアラインメントを示す図である。これらの他の種の同等のドメインは、本明細書に記載の改善された LAMP 構築物を生成するために使用でき、図 2 および図 8 でヒト Endolin について特定されたドメインを図 8 に示すアラインメントと比較することによって容易に識別できる。

【0052】

【図 9】ヒト Macrosailin (配列番号 80) と比較して他の種に見られる Macrosailin タンパク質のアラインメントを示す図である。これらの他の種の同等のドメインは、本明細書に記載の改善された LAMP 構築物を生成するために使用でき、図 2 および図 9 でヒト Macrosailin について特定されたドメインを図 9 に示すアラインメントと比較することによって容易に識別できる。

30

【0053】

【図 10】ヒト LAMP - 5 (配列番号 93) と比較して他の種に見られる LAMP - 5 タンパク質のアラインメントを示す図である。これらの他の種の同等のドメインは、本明細書に記載の改善された LAMP 構築物を生成するために使用でき、図 2 および図 10 でヒト LAMP - 5 について特定されたドメインを図 10 に示すアラインメントと比較することによって容易に識別できる。

【0054】

【図 11】マウスを 0、7、および 14 日目に HVEMLAMP、HVEML、または LAMP で免疫したときに得られた結果を示す図である。28 日目に、マウスから採血し、血清試料を単離した。HVEML 特異的 IgG を ELISA で調べた。データは、抗体力値の幾何平均 ± 幾何 SD、n = 6、** p 値 < 0.01 を表す。

40

【0055】

【図 12】マウスを 0、7、14 日目に HVEMLAMP、HVEML、または LAMP で免疫したときに得られた結果を示す図である。35 日目に、ミョウバンアジュバントの存在下、5 μg の HVEML タンパク質でマウスをブーストした。49 日目にマウスから採血し、血清試料を単離した。HVEML 特異的 IgG を ELISA で調べた。データは、抗体力値の幾何平均 ± 幾何 SD、n = 6、*** p 値 < 0.001、**** p 値 < 0.0

50

001を表す。

【0056】

【図13】LAMPがHREMのCRD3/4でエピトープの結合親和性を変化させることを示す図である。

【0057】

【図14】試験した改善されたLAMP構築物のタンパク質発現を確認する図である。図14～図28の各々において、「完全なLAMP構築物」、ILC-1、ILC-2、ILC-3およびILC-4のラベルは図1に示した構築物に対応している。

【0058】

【図15】改善されたLAMP構築物が、INF γ を産生するTh1エフェクターT細胞を誘導することを示す図である。

10

【0059】

【図16】特定の改善されたLAMP構築物（例えば、図1に示すILC-4）がすべてのサバイビンペプチドプールに対して有意に高いT細胞応答を誘発したことを示す図である。

【0060】

【図17】CD4 $+$ T細胞がIFN γ 産生細胞の主要な供給源であり、改善されたLAMP構築物が完全なLAMP構築物よりもCD4エフェクター記憶細胞集団の増加を実証することを示す図である。

20

【0061】

【図18】改善されたLAMP構築物がBALB/cマウスでより強いサバイビン特異的総IgG応答を生じたことを示す図である。

【0062】

【図19】本明細書および図1～図10に記載のLAMP構築物に、単独でまたは表1および段落【0169】に記載の組み合わせでクローニングできる癌抗原のアミノ酸配列を示す図である。さらに、図19は、実施例で試験したサバイビン-LAMP構築物のアミノ酸配列を提供する。各構築物のシグナル配列は、小文字と下線付きの文字で表され、サバイビン配列は大文字の白い文字で、黒い影を付けて表され、管腔ドメインは斜体の大文字で表され、膜貫通/細胞質ドメインは大文字で、灰色の影を付けて表され、ILC-4では、第2の相同ドメインが太字になっている。追加のアミノ酸（LEおよびEF）がクローニングリンカーの一部として含まれ得る。

30

【0063】

【図21】IGFBP2(39-328)-ILC-1構築物が、10ug IM/EP免疫化の用量で有意に高いIFN γ 産生エフェクターT細胞を誘導したことを示す図である。

【0064】

【図22】IGFBP2(39-328)-ILC-1構築物が、10ug IM/EP免疫化の用量でCD4 $+$ およびCD8 $+$ エフェクター記憶T細胞を産生するIFN γ および/またはTNF α を誘導したことを示す図である。

40

【0065】

【図23】IM/EP免疫化によりIGFBP2(39-328)-ILC-1構築物で免疫したC57BL/6アルビノマウスにおけるIGFBP-2特異的IgG産生を示す図である。

【0066】

【図24】pp65ペプチドとgBペプチドの両方によるIFN γ 誘導を示す図である。

【0067】

【図25】CMVトランスフェクト細胞ライセートに対する免疫マウスの血清中の総IgG（左）およびIgG2a（右）抗体力値を示す図である。

【0068】

【図26】PSMA-ILC-1 LAMP構築物が、20ug ID/EP免疫化の用量

50

で有意に高いIFN産生エフェクターT細胞を誘導したことを示す図である。

【0069】

【図27】PSMA-ILC-1LAMP構築物が、20ug ID/EP免疫化の用量でIFN産生CD4+およびCD8+エフェクター記憶T細胞を誘導したことを示す図である。

【0070】

【図28】ID/EPを介した免疫化によりPSMA-ILC-1LAMP構築物で免疫したC57BL/6マウスにおけるIgGおよびIgG2Aの総産生量を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0071】

本発明は、ワクチンを生成するために、および/または抗体を産生するために使用することができる改善されたLAMP構築物を提供する。改善されたLAMP構築物を使用して免疫応答を調節または強化することができる。好ましい一態様では、本発明は、本明細書に記載するような1つ以上の癌抗原を含む改善されたLAMP構築物を提供することにより、癌または過剰増殖性障害の患者を治療する方法を提供する。改善されたLAMP構築物を使用して、非ヒト脊椎動物、および好ましくは非ヒト哺乳動物中に抗体を産生することができる。

【0072】

定義

以下の定義は、以下の説明で使用する特定の用語について提供される。

10

【0073】

明細書および請求項で使用される場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈がそうでないことを明確に示さない限り、複数の参照を含む。例えば、「細胞」という用語は、その混合物を含む複数の細胞を含む。「核酸分子」という用語は、複数の核酸分子を含む。

【0074】

本明細書で使用する「含む」という用語は、改善されたLAMP構築物および方法が列挙された要素を含むが、他の要素を除外しないことを意味することを意図している。「本質的に～からなる」は、改善されたLAMP構築物および方法を定義するために使用する場合、組み合わせにとって本質的に重要な他の要素を除外することを意味するものとする。したがって、本明細書で定義される要素から本質的になる改善されたLAMP構築物は、単離および精製方法からの微量汚染物質、ならびにリン酸緩衝生理食塩水、防腐剤などの薬学的に許容される担体を除外しない。「からなる」とは、本発明の改善されたLAMP構築物を投与するための他の成分の微量要素および実質的な方法ステップを除外することを意味するものとする。これらの移行用語の各々によって定義される実施形態は、本発明の範囲内にある。

30

【0075】

「約」または「およそ」という用語は、当業者によって決定される特定の値の許容範囲内であることを意味し、これは、値の測定方法または決定方法、例えば測定システムの限界に一部依存する。例えば、「約」は、所与の値の最大20%、好ましくは最大10%、より好ましくは最大5%、さらにより好ましくは最大1%の範囲を意味し得る。あるいは、特に生物学的システムまたはプロセスに関して、この用語は、値の1桁以内、好ましくは5倍以内、より好ましくは2倍以内を意味し得る。特に明記しない限り、「約」という用語は、特定の値の許容誤差範囲内、例えば±1~20%、好ましくは±1~10%、より好ましくは±1~5%を意味する。

40

【0076】

値の範囲が提供される場合、その範囲の上限と下限との間の各介在値と、その記載された範囲内の任意の他の記載値または介在値が本発明に含まれることが理解される。これらのより小さな範囲の上限および下限は、より小さな範囲に独立して含まれてもよく、また、記載された範囲内の任意の具体的に除外された制限を条件として本発明に含まれる。記

50

載された範囲が限界の一方または両方を含む場合、それらの含まれる両方の限界のいずれかを除外した範囲も本発明に含まれる。

【0077】

本明細書で使用する「リソソーム／エンドソーム区画」とは、膜にLAMP分子を含む膜結合酸性液胞、抗原プロセシングで機能する加水分解酵素、ならびに抗原認識および提示のためのMHCクラスII分子を指す。この区画は、エンドサイトーシス、ファゴサイトーシス、およびピノサイトーシスを含む様々なメカニズムのいずれかによって細胞表面から内在化した異物、および特殊な自己分解現象によってこの区画に送達される細胞内物質の分解部位として機能する(de Duve, Eur. J. Biochem. 137: 391, 1983)。本明細書および特許請求の範囲で使用される「エンドソーム」という用語は、リソソームを包含する。10

【0078】

本明細書で使用する「リソソーム関連オルガネラ」は、リソソームを含む任意のオルガネラを指し、MIC、CIV、メラノソーム、分泌顆粒、溶解顆粒、血小板高密度顆粒、好塩基球顆粒、ビルベック顆粒、ファゴリソソーム、分泌リソソームなどを含むがこれらに限定されない。好ましくは、そのようなオルガネラは、マンノース6-リン酸受容体を欠き、LAMPを含むが、MHCクラスII分子を含んでも含まなくてもよい。レビューについては、例えば、Blott and Griffiths, Nature Reviews, Molecular Cell Biology, 2002; Dell'Angelicaら、The FASEB Journal 14:1265-1278, 2000を参照。20

【0079】

本明細書で使用する「ポリヌクレオチド」および「核酸分子」という用語は、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指すために互換的に使用される。ポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、および／またはそれらの類似体を含み得る。ヌクレオチドは、任意の3次元構造を有することができ、既知または未知の任意の機能を実行できる。「ポリヌクレオチド」という用語は、例えば、一本鎖、二本鎖および三重らせん分子、遺伝子または遺伝子断片、エクソン、イントロン、mRNA、tRNA、rRNA、リボザイム、アンチセンス分子、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、アプタマー、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ、およびプライマーを含む。核酸分子はまた、修飾された核酸分子（例えば、修飾された塩基、糖、および／またはヌクレオチド間リンクを含む）を含み得る。30

【0080】

本明細書で使用する「ペプチド」という用語は、2つ以上のサブユニットアミノ酸、アミノ酸類似体、またはペプチド模倣物の化合物を指す。サブユニットは、ペプチド結合または他の結合（例えば、エステル、エーテルなど）によって連結されていることがある。

【0081】

本明細書で使用する「アミノ酸」という用語は、グリシンおよびDまたはL光学異性体の両方、ならびにアミノ酸類似体およびペプチド模倣体を含む、天然および／または非天然または合成アミノ酸を指す。3つ以上のアミノ酸のペプチドは、ペプチド鎖が短い場合、一般にオリゴペプチドと呼ばれる。ペプチド鎖が長い場合（例えば、約10個より多いアミノ酸）、ペプチドは一般にポリペプチドまたはタンパク質と呼ばれる。「タンパク質」という用語は「ポリペプチド」という用語を包含するが、「ポリペプチド」は完全長未満のタンパク質であり得る。40

【0082】

本明細書で使用する「LAMPポリペプチド」は、本明細書に記載するような哺乳動物のリソソーム関連膜タンパク質であるヒトLAMP-1、ヒトLAMP-2、ヒトLAMP-3、ヒトLIMP-2、ヒトEndolyn、ヒトLIMBIC、ヒトLAMP-5、またはヒトMacrosailin、ならびにオルソログ（例えば、図3～図10に示

10

20

30

40

50

す LAMP タンパク質など)、および対立遺伝子変異体を指す。

【 0 0 8 3 】

本明細書で使用する「発現」とは、ポリヌクレオチドが mRNA に転写される、および / またはペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。ポリヌクレオチドがゲノム DNA に由来する場合、発現には、ゲノム DNA から転写された mRNA のスプライシングが含まれる場合がある。

【 0 0 8 4 】

本明細書で使用する「転写制御下」または「作動可能に連結された」とは、発現制御要素とコード配列の適切な並置によって制御されるポリヌクレオチド配列の発現(例えば、転写または翻訳)を指す。一態様では、発現制御配列がその DNA 配列の転写を制御および調節する場合、DNA 配列は発現制御配列に「作動可能に連結されている」。

10

【 0 0 8 5 】

本明細書で使用する「コード配列」は、適切な発現制御配列の制御下に置かれたときに転写されてポリペプチドに翻訳される配列である。コード配列の境界は、5' (アミノ) 末端の開始コドンと 3' (カルボキシル) 末端の翻訳停止コドンによって決定される。コード配列は、原核生物配列、真核生物 mRNA からの cDNA、真核生物(例えば、哺乳動物) DNA からのゲノム DNA 配列、および合成 DNA 配列でさえ含むことができるが、これらに限定されない。ポリアデニル化シグナルと転写終結配列は通常、コード配列の 3' に位置する。

【 0 0 8 6 】

20

本明細書で使用する場合、配列またはそれらの相補配列が同じアミノ酸配列をコードする場合には 2 つのコード配列は互いに「対応する」。

【 0 0 8 7 】

本明細書で使用する「シグナル配列」は、小胞体転座配列を示す。この配列はシグナルペプチドをコードし、シグナルペプチドは、細胞に連絡して、小胞体の小胞区画に(例えば化学結合を介して)結合しているポリペプチドがエキソサイトーシス / エンドサイトーシスのオルガネラに入り、細胞小胞区画、細胞表面に送達されるか、またはポリペプチドを分泌するように指示する。このシグナル配列は、タンパク質の成熟時に細胞によって切り取られることがある。原核生物および真核生物に固有の様々なタンパク質に関連するシグナル配列を見つけることができる。

30

【 0 0 8 8 】

本明細書で使用する「輸送」とは、粗面小胞体から抗原プロセシングおよび MHC I への結合が発生するエンドソーム / リソソーム区画または関連オルガネラまでの経路における、細胞オルガネラまたは区画を通して改善された LAMP 構築物によってコードされるポリペプチドの移動または進行を意味する。

【 0 0 8 9 】

本明細書で使用する場合、「改善された LAMP 構築物」および「抗原を含む改善された LAMP 構築物」および「目的の抗原を含む改善された LAMP 構築物」は互換的に使用される。改善された LAMP 構築物の様々な配置は、図 1 に ILC1 - ILC6 として示す。さらに、「改善された LAMP 構築物」の使用は、改善された LAMP 構築物のポリヌクレオチド配列、および改善された LAMP 構築物のポリヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質の両方を包含する。

40

【 0 0 9 0 】

本明細書で使用する「改善された LAMP 構築物送達媒体」は、改善された LAMP 構築物を宿主細胞(例えば、遺伝子または遺伝子断片、アンチセンス分子、リボザイム、アブタマーなど)に運ぶことができ、それが本明細書に記載の改善された LAMP 構築物と関連して生じる任意の分子または分子群または高分子として定義される。

【 0 0 9 1 】

本明細書で使用する「改善された LAMP 構築物送達」または「改善された LAMP 構築物移入」は、導入に使用される方法に関係なく、改善された LAMP 構築物を宿主細胞

50

に導入することを指す。導入された改善された LAMP 構築物は、宿主細胞内で安定的または一時的に維持され得る。通常、安定した維持には、導入された改善された LAMP 構築物に、宿主細胞と互換性のある複製起点が含まれているか、染色体外レプリコン（プラスミドなど）や核またはミトコンドリア染色体などの宿主細胞のレプリコンに組み込まれることが必要である。

【 0 0 9 2 】

本明細書で使用する「ウイルス改善型 LAMP 構築物」とは、インビボ、エクスピボまたはインビトロのいずれかで宿主細胞に送達される改善された LAMP 構築物を含むウイルスまたはウイルス粒子を指す。ウイルス改善型 LAMP 構築物の例には、アデノウイルスベクター、アデノ隨伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが含まれるが、これらに限定されない。遺伝子移入がアデノウイルスベクターによって媒介される態様では、改善された LAMP 構築物は、アデノウイルスゲノムまたはその一部、およびアデノウイルスキャプシドタンパク質に関連する選択された非アデノウイルス遺伝子を含む。

10

【 0 0 9 3 】

本明細書で使用する「アデノウイルス媒介遺伝子移入」または「アデノウイルス形質導入」とは、アデノウイルスが細胞に入ることにより、改善された LAMP 構築物が宿主細胞に移入されるプロセスを指す。好ましくは、改善された LAMP 構築物は、細胞内で複製および／または統合および転写され得る。

【 0 0 9 4 】

本明細書で使用する「アデノウイルス粒子」は、外部キャプシドおよび改善された LAMP 構築物を含む個々のアデノウイルスピリオンであり、キャプシドはアデノウイルスエンベロープタンパク質をさらに含む。アデノウイルスエンベロープタンパク質は、例えば、アデノウイルス粒子を特定の細胞および／または組織型に標的化するために、ウイルスタンパク質に共有結合したポリペプチドリガンドを含む融合ポリペプチドを含むように修飾されてもよい。

20

【 0 0 9 5 】

本明細書で使用する場合、改善された LAMP 構築物の「投与」または「免疫化」または「注入」という用語は、改善された LAMP 構築物で細胞を形質導入、トランスフェクション、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、または発射することを指す。いくつかの態様において、改善された LAMP 構築物は、標的細胞を送達細胞と接触させることにより（例えば、細胞融合により、または送達細胞が標的細胞に近接している場合には送達細胞を溶解することにより）標的細胞内に導入される。

30

【 0 0 9 6 】

本明細書で使用する「プライムブースト」という語句は、T 細胞応答をプライミングするために使用される本明細書に記載の改善された LAMP 構築物の使用、それに続く応答を高めるための抗原、抗原を含む DNA ワクチンまたは組換え抗原を含む第 2 の改善された LAMP 構築物の使用（またはその逆）を表す。これらの異種プライムブースト免疫化は、同じベクターでプライミングおよびブースティングすることで達成できるよりも高度かつ長期に免疫応答を誘発する。抗原を含む改善された LAMP 構築物によるプライミングは記憶細胞を起動させ、ブースティング工程は記憶応答を拡張する。好ましくは、互いに対する応答を産生しない、したがって互いの活動に干渉しない 2 つの異なる薬剤が使用される。抗原の混合物は、プライミングおよび／またはブースティング工程で特に考えられる。ブースティングは 1 回または複数回発生する可能性がある。

40

【 0 0 9 7 】

本明細書で使用する「ハイブリダイゼーション」とは、1 または複数のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合を介して安定化された複合体を形成する反応を指す。水素結合は、Watson-Crick 型塩基対、Hoogsteen 結合、またはその他の配列固有の方法で発生する。複合体は、二重鎖構造を形成する 2 本の鎖、多重鎖複合体を形成する 3 本以上の鎖、単一の自己ハイブリッド形成鎖、またはこれらの任意の組み合わせを含み得る。ハイブリダイゼーション反応は、PCR 反応の開始

50

、またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的切断などのより広範なプロセスの工程を構成し得る。

【 0 0 9 8 】

本明細書で使用する場合、別の配列に対して特定の割合（例えば、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 99%）の「配列同一性」を有するポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド領域とは、当該技術分野で日常的なソフトウェアプログラムを使用して最大限に整列した場合に、その塩基（またはアミノ酸）の割合が 2 つの配列を比較して同じであることを意味する。

【 0 0 9 9 】

ヌクレオチドの少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、好ましくは少なくとも約 80%、そして最も好ましくは少なくとも約 90 または 95% が、DNA 配列の定義された長さにわたって一致するとき、2 つの配列は「実質的に相同」または「実質的に類似」である。同様に、ポリペプチドのアミノ酸残基の少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 66%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、好ましくは少なくとも約 80%、そして最も好ましくは少なくとも約 90 または 95% が、ポリペプチド配列の定義された長さにわたって一致するとき、2 つのポリペプチド配列は「実質的に相同」または「実質的に類似」である。実質的に相同的な配列は、配列データバンクで利用可能な標準ソフトウェアを使用して配列を比較することにより識別できる。実質的に相同的な核酸配列も、例えば、その特定のシステムに対して定義されたストリンジエントな条件下でのサザンハイブリダイゼーション実験で識別できる。適切なハイブリダイゼーション条件を定義することは、当技術分野の範囲内である。例えば、ストリンジエントな条件は、42 °C で 5 × SSC および 50% ホルムアミドでのハイブリダイゼーション、および 60 °C で 0.1 × SSC および 0.1% ドデシル硫酸ナトリウムでの洗浄であり得る。ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件のさらなる例には、約 25 ~ 約 37 のインキュベーション温度、約 6 × SSC ~ 約 10 × SSC のハイブリダイゼーション緩衝液濃度、約 0% ~ 約 25% のホルムアミド濃度、および約 6 × SSC の洗浄溶液が含まれる。中程度のハイブリダイゼーション条件の例には、約 40 ~ 約 50 のインキュベーション温度、約 9 × SSC ~ 約 2 × SSC の緩衝液濃度、約 30% ~ 約 50% のホルムアミド濃度、および約 5 × SSC ~ 約 2 × SSC の洗浄溶液が含まれる。高ストリンジエンシー条件の例には、約 55 ~ 約 68 のインキュベーション温度、約 1 × SSC ~ 約 0.1 × SSC の緩衝液濃度、約 55% ~ 約 75% のホルムアミド濃度、および約 1 × SSC、0.1 × SSC、または脱イオン水の洗浄溶液が含まれる。一般に、ハイブリダイゼーションのインキュベーション時間は 5 分 ~ 24 時間で、1 工程、2 工程またはそれ以上の洗浄工程があり、洗浄インキュベーション時間は約 1、2、または 15 分である。SSC は 0.15 M NaCl と 15 mM クエン酸の緩衝液である。他の緩衝系を使用する SSC の同等物を使用できることが理解される。類似性は配列決定により検証できるが、好ましくはまた、または代わりに、問題の特定のドメインに適したアッセイを使用して、機能（例えば、エンドゾーム区画への輸送能力など）により検証される。

【 0 1 0 0 】

「パーセント (%) 配列類似性」、「パーセント (%) 配列同一性」などの用語は一般に、核酸分子の異なるヌクレオチド配列またはポリペプチドのアミノ酸配列間の同一性または一致の程度を指し、これらは共通の進化的起源を共有する場合としない場合がある（前出の Reecck らを参照）。配列の同一性は、BLAST、FASTA、DNA Strider、GCG (Genetics Computer Group)、GCG パッケージのプログラムマニュアル、バージョン 7、ウィスコンシン州マディソン）など、公開されている多数の配列比較アルゴリズムのいずれかを使用して決定できる。

【 0 1 0 1 】

2 つのアミノ酸配列または 2 つの核酸分子間の同一性パーセントを決定するために、最

10

20

30

40

50

適な比較目的で配列を並べる。2つの配列間の同一性パーセントは、配列が共有する同一位置の数の関数である（すなわち、同一性パーセント = 同一位置の数 / 位置の総数（例えば、重複する位置）× 100）。一実施形態では、2つの配列は同じ長さであるか、またはほぼ同じ長さである。2つの配列間の同一性パーセントは、ギャップを許可するかどうかにかかわらず、以下で説明する手法に類似の手法を使用して決定できる。パーセント配列同一性の計算では、通常、完全一致がカウントされる。

【0102】

2つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを使用して実現できる。2つの配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの非限定的な例は、KarlinsおよびAltschulのアルゴリズム、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87: 2264、修正版Karlins and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90: 5873 - 5877である。このようなアルゴリズムは、Altschulら、J. Mol. Biol. 1990; 215: 403のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれている。BLASTヌクレオチド検索は、NBLASTプログラム、スコア = 100、ワード長 = 12で実施して、本発明の配列に相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索は、XBLASTプログラム、スコア = 50、ワード長 = 3で実施して、本発明のタンパク質配列に相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較の目的でギャップのあるアラインメントを取得するには、Altschulら、Nucleic Acids Res. 1997, 25: 3389に記載されているように、Gapped BLASTを利用できる。あるいは、PSI-Blastを使用して、分子間の遠い関係を検出する反復検索を実行できる。前出のAltschulら(1997)を参照。BLAST、Gapped BLAST、およびPSI-Blastプログラムを利用する場合、それぞれのプログラムのデフォルトのパラメーター(XBLASTおよびNBLASTなど)を使用できる。WorldWideWebのncbi.nlm.nih.gov/BLAST/を参照。

10

20

30

【0103】

配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの別の非限定的な例は、MyersおよびMillerのアルゴリズム、CABIOS 1988; 4: 11 - 17である。このようなアルゴリズムは、GC配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれている。アミノ酸配列を比較するためにALIGNプログラムを利用する場合、PAM120重み残基表、ギャップ長さペナルティ12、およびギャップペナルティ4を使用できる。

40

【0104】

好ましい実施形態では、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、Blossum 62マトリックスまたはPAM250マトリックス、ギャップ重み16、14、12、10、8、6または4、および長さ重み1、2、3、4、5または6のいずれかを用いて、GC配列アラインメントソフトウェアパッケージ(マサチューセッツ州バーリントンのアクセリス、WorldWideWebのaccelrys.comで入手可能)のGAPプログラムに組み込まれているNeedlemanおよびWunschのアルゴリズム(J. Mol. Biol. 1970, 48: 444 - 453)を使用して決定される。さらに別の好ましい実施形態では、2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、NWGapDNA.CMPマトリックス、ギャップ重み40、50、60、70、または80、長さ重み1、2、3、4、5、または6を使用するGC配列アラインメントソフトウェアパッケージのGAPプログラムを使用して決定される。特に好ましいパラメーターのセット(および分子が本発明の配列同一性または相同性の制限であるかどうかを決定するためにどのパラメーターを適用すべきかについて実施者が不明である場合に使用できるもの)は、ギャップオープンペナルティ12、ギャップ拡張ペナルティ4、フレームシフトギャップペナルティ5でBlossum 62スコアリングマトリックスを使用する。

40

【0105】

50

同一性パーセントを決定できる方法の別の非限定的な例は、Current Protocols In Molecular Biology (F. M. Ausubelら編、1987) Supplement 30、セクション7.7.18、表7.7.1に記載されているようなソフトウェアプログラムを使用することである。好ましくはアラインメントにデフォルトのパラメーターを使用する。推奨されるアラインメントプログラムは、デフォルトパラメーターを使用したBLASTである。特に、好ましいプログラムはBLASTNおよびBLASTPであり、filter = none; strand = both; cutoff = 60; expect = 10; Matrix = BLOSUM62; Descriptions = 50 sequences; sort by = HIGH SCORE; Databases = non-redundant、GenBank + EMBL + DD BJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProt ein + SP update + PIRのデフォルトパラメーターを使用する。これらのプログラムの詳細は、次のインターネットアドレスhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLASTで確認できる。

【0106】

本明細書に記載される特性の統計分析は、標準的な試験、例えば、t検定、ANOVA、またはカイ二乗検定によって実行され得る。通常、統計的有意性はp = 0.05(5%)、より好ましくはp = 0.01、p = 0.001、p = 0.0001、p = 0.00001のレベルまで測定される。

【0107】

ドメイン配列の「保存的に修飾された変異体」も提供され得る。特定の核酸配列について、保存的に修飾された変異体とは、同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸、または核酸がアミノ酸配列をコードしない場合、本質的に同一の配列を指す。具体的には、縮重コドン置換は、1または複数の選択された（またはすべての）コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を生成することによって実現できる(Batzerら、1991、Nucleic Acid Res. 19: 5081; 大塚ら、1985、J. Biol. Chem. 260: 2605-2608; Rossoliniら、1994、Mol. Cell. Probes 8: 91-98)。

【0108】

野生型タンパク質の「生物学的に活性な断片」、「生物学的に活性な形態」、「生物学的に活性な同等物」および「機能的誘導体」という用語は、活性の検出に適したアッセイを使用して測定された野生型タンパク質の生物活性に少なくとも実質的に等しい（例えば、有意に異なる）生物学的活性を有する。

【0109】

本明細書で使用する「インビボ」核酸送達、核酸移入、核酸療法」などは、改善されたLAMP構築物をヒトまたは非ヒト哺乳動物などの生物の体内に直接導入することを指し、これにより、改善されたLAMP構築物がそのような生物の細胞にインビボで導入される。

【0110】

本明細書で使用する「インサイチュ」という用語は、改善されたLAMP構築物が標的細胞に近接するタイプのインビボ核酸送達を指す（例えば、核酸は全身投与されない）。例えば、インサイチュ送達法は、限定ではないが、改善されたLAMP構築物がある部位（例えば、腫瘍または心筋などの組織）に直接注入するか、開いた手術野を通して改善されたLAMP構築物を細胞または組織に接触させるか、またはカテーテルなどの医療用アクセスデバイスを使用して改善されたLAMP構築物がある部位に送達することを含む。

【0111】

本明細書で使用する「単離された」または「精製された」という用語は、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、またはそれらの断片が、通常自然界で関連する細胞およびその他の構成要素から分離（または実質的に遊離）することを意味

10

20

30

40

50

する。例えば、改善された LAMP 構築物に関して、単離されたポリヌクレオチドは、それが通常染色体に関連する 5' および 3' 配列から分離されたものである。当業者には明らかなように、非天然発生のポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、またはそれらの断片は、その天然発生の対応物と区別するために「単離」を必要としない。実質的に遊離または実質的に精製されたとは、集団の少なくとも 50%、好ましくは少なくとも 70%、より好ましくは少なくとも 80%、さらにより好ましくは少なくとも 90% が、それらが自然界で関連する成分を含まないことを意味する。

【0112】

本明細書で使用する「標的細胞」または「レシピエント細胞」は、本明細書に記載の改善された LAMP 構築物のレシピエントであることが望まれる、またはレシピエントであった個々の細胞または細胞を指す。この用語は、単一細胞の子孫を含むことも意図しており、子孫は、自然、偶発的、または意図的な突然変異のために（形態またはゲノムまたは全 DNA 相補体において）元の親細胞と必ずしも完全に同一ではない場合がある。標的細胞は、他の細胞と接触している場合があるか（例えば、組織内のように）、または生物の体内で循環していることが見出される場合もある。

10

【0113】

本明細書で使用する「対象」は、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。哺乳動物には、ネズミ、類人猿、ヒト、家畜、スポーツ動物、ペットが含まれるが、これらに限定されない。他の好ましい実施形態では、「対象」はげっ歯類（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ラマ、ラクダ、ウシ、モルモット、ハムスター、イヌ、ネコ、ウマ、非ヒト霊長類、類人猿（例えば、サルまたはエイプ）、サル（例えば、マーモセット、ヒヒ、アカゲザル）、またはエイプ（例えば、ゴリラ、チンパンジー、オランウータン、テナガザル）である。他の実施形態では、非ヒト哺乳動物、特にヒトの治療効果を実証するためのモデルとして従来使用されている哺乳動物（例えば、ネズミ科動物、霊長類、ブタ、イヌ科動物、またはウサギ動物）が使用される場合がある。

20

【0114】

「癌」、「新生物」および「腫瘍」という用語は互換的に使用され、単数形または複数形のいずれかで、宿主生物の病因となる悪性形質転換を受けた細胞を指す。原発性癌細胞の形質転換により、それらは宿主生物の病因になる。原発性癌細胞（すなわち、悪性形質転換部位の近くから得られた細胞）は、十分に確立された技術、特に組織学的検査により、非癌性細胞と容易に区別することができる。本明細書で使用する癌細胞の定義には、原発性癌細胞だけでなく、癌細胞祖先に由来する任意の細胞が含まれる。これには、転移した癌細胞、および癌細胞に由来するインビトロ培養物および細胞株が含まれる。通常固形腫瘍として現れるタイプの癌に言及する場合、「臨床的に検出可能な」腫瘍は、例えば、CAT スキャン、MRイメージング、X 線、超音波または触診などの手順により腫瘍塊に基づいて検出可能であるもの、および / または患者から得られる試料中の 1 または複数の癌特異的抗原の発現により検出可能であるものである。

30

【0115】

好ましい実施形態では、癌（過形成を含む進行のすべてのステージを含む）は、腺癌、肉腫、皮膚癌、黒色腫、膀胱癌、脳癌（多形性膠芽腫を含む）、乳癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、肺癌（NSCLC、SCLC、扁平上皮癌を含むがこれらに限定されない）、結腸直腸癌、肛門癌、直腸癌、子宮頸癌、肝臓癌、頭頸部癌、口腔癌、唾液腺癌、食道癌、膵臓癌、膵管腺癌（PDA）、腎癌、胃癌、腎臓癌、多発性骨髄腫または脳の癌である。また、本明細書に記載の LAMP 構築物で治療される好ましい疾患には、サイトメガロウイルス（CMV）によって引き起こされる過剰増殖性障害または癌が含まれる。

40

【0116】

本明細書で使用する「薬学的に許容される担体」という用語は標準的な医薬担体、例えばリン酸緩衝生理食塩水、水、および油 / 水または水 / 油乳濁液などの乳濁液、ならびに様々な種類の湿潤剤などを包含する。改善された LAMP 構築物を含む組成物は、安定剤および防腐剤も含むことができる。担体、安定剤、アジュバントの例については、Mar

50

tin Remington's Pharm. Sci、第15版(Mack Publ. Co.、Easton(1975))を参照。

【0117】

そのような核酸が細胞内に導入された場合、改善されたLAMP構築物によって細胞は「形質転換」、「形質導入」または「トランスフェクト」されている。形質転換DNAは、細胞のゲノムを構成する染色体DNAと統合(共有結合)する場合としない場合がある。例えば、原核生物、酵母、および哺乳動物細胞では、改善されたLAMP構築物は、プラスミドなどのエピソーム要素上で維持され得る。真核細胞では、安定に形質転換された細胞とは、改善されたLAMP構築物が染色体に組み込まれ、染色体複製を通じて娘細胞に継承される細胞である。この安定性は、改善されたLAMP構築物を含む娘細胞の集団から構成される細胞株またはクローンを確立する真核細胞の能力によって実証される。「クローン」とは、単一の細胞または有糸分裂による共通の祖先に由来する細胞の集団である。「細胞株」とは、多くの世代(例えば、少なくとも約10世代)にわたってインビトロで安定した増殖が可能な初代細胞のクローンである。

10

【0118】

本明細書で使用する「有効量」とは、有益なまたは所望の結果に影響を与えるのに十分な量、例えば、改善されたLAMP構築物の移入および/または発現、および/または所望の治療エンドポイントの達成の有効量などである。有効量は、1回以上の投与、適用または投与量で投与することができる。一態様では、改善されたLAMP構築物の有効量は、少なくとも2つの細胞を含む細胞集団内の少なくとも1つの細胞を形質転換/形質導入/トランスフェクトするのに十分な量である。

20

【0119】

本明細書で使用する「治療有効量」は、異常な生理学的反応を予防、修正、および/または正常化するのに十分な量を意味するために本明細書で使用する。一態様では、「治療有効量」は、例えば、腫瘍塊のサイズ、抗体産生、サイトカイン産生、発熱または白血球数など病理学的臨床的に重要な特徴を少なくとも約30%、より好ましくは少なくとも50%、最も好ましくは少なくとも90%減少させるのに十分な量である。

【0120】

「抗体」は、特定の抗原に結合する抗体およびその断片を含む任意の免疫グロブリンである。この用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、およびキメラ抗体(例えば、二重特異性抗体)を包含する。「抗体結合部位」は、抗原に特異的に結合する重鎖および軽鎖の可変および超可変領域から構成される抗体分子の構造部分である。例示的な抗体分子は、無傷の免疫グロブリン分子、実質的に無傷の免疫グロブリン分子、およびFab、Fab'、F(ab')₂およびF(v)部分を含むパラトープを含有する免疫グロブリン分子の部分であり、これらの部分は本明細書に記載の治療方法で使用するのに好ましい。したがって、抗体という用語は、抗体分子全体だけでなく、抗体断片、ならびに抗体および抗体断片の変異体(融合タンパク質などの誘導体を含む)も包含する。本出願において「抗体」という用語によって説明される分子の例には、限定ではないが単鎖Fv(scFv)、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂、ジスルフィド結合Fv(sdfv)、Fv、およびVLまたは VHドメインのいずれかを含むかまたはそれらからなる断片が含まれる。本明細書で使用する「単鎖Fv」または「scFv」という用語は、抗体のVHドメインに連結された抗体のVLドメインを含むポリペプチドを指す。Carter(2006)Nature Rev. Immunol. 6: 243を参照。

30

【0121】

さらに、本発明の抗体は、限定ではないが、モノクローナル、多重特異性、二重特異性、ヒト、ヒト化、マウス、またはキメラ抗体、単鎖抗体、ラクダ科抗体、Fab断片、F(ab')断片、抗イディオタイプ(抗Id)抗体(例えば、本発明の抗体に対する抗Id抗体を含む)、ドメイン抗体および上記のいずれかのエピトープ結合断片を含む。本発明の免疫グロブリン分子は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、Ig

40

50

G3、IgG4、IgA1およびIgA2)またはサブクラスのものであり得る。

【0122】

最も好ましくは、抗体はヒト抗体である。本明細書で使用する「ヒト」抗体には、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体が含まれ、ヒト免疫グロブリンライブラリ、およびヒト抗体を産生するように遺伝子操作されたゼノマウス(xenomice)または他の生物から単離された抗体が含まれる。本明細書に記載の改善されたLAMP構築物は、例示のプロトコルに記載されるようにヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を生成するための既知の技術と組み合わせて使用することができる。例えば、PCT公開WO98/24893、WO92/01047、WO96/34096、WO96/33735、欧州特許第0598877号、米国特許第5,413,923号、第5,625,126号、第5,633,425号、第5,569,825号、第5,661,016号、第5,545,806号、第5,814,318号、第5,885,793号、第5,916,771号、および第5,939,598号、ならびにLonberg and Huszar、Int. Rev. Immunol. 13:65-93(1995)を参照。

【0123】

ヒト抗体または「ヒト化」キメラモノクローナル抗体は、改善されたLAMP構築物を本明細書に記載のあるいは当技術分野で公知の技術と組み合わせて使用して産生することができる。例えば、キメラ抗体を産生するための標準的な方法は当技術分野で知られている。レビューについては、参考文献Morrison、Science 229:1202(1985); Oiら、Biotechniques 4:214(1986); Cabillyら、米国特許第4,816,567号;谷口ら、欧州特許第171496号; Morrisonら、欧州特許第173494号; Neubergerら、WO8601533; Robinsonら、WO8702671; Boulianneら、Nature 312:643(1984); Neubergerら、Nature 314:268(1985)を参照。

【0124】

本発明の抗体は、一価、二価、三価または多価であり得る。例えば、一価のscFvは、化学的に、または別のタンパク質または物質と関連付けることにより多量体化することができる。ヘキサヒスチジンタグまたはFlagタグに融合したscFvは、Ni-NTAアガロース(Qiagen)または抗Flag抗体(Stratagene, Inc.)を使用して多量体化することができる。さらに、改善されたLAMP構築物を使用して、改善されたLAMP構築物に含まれるコードされた抗原に対して单一特異性、二重特異性、三重特異性、またはより大きな多重特異性を生成することができる。例えば、PCT公開WO93/17715、WO92/08802、WO91/00360、WO92/05793、Tuttら、J. Immunol. 147:60-69(1991)、米国特許第4,474,893号、第4,714,681号、第4,925,648号、第5,573,920号、第5,601,819号、Kostelnikら、J. Immunol. 148:1547-1553(1992)を参照。

【0125】

「エピトープ」は、通常、短いペプチド配列またはオリゴ糖で構成される構造であり、免疫系の成分によって特異的に認識または特異的に結合される。T細胞エピトープは、一般に線状オリゴペプチドであることが示されている。同じ抗体が特異的に結合できる場合、2つのエピトープは互いに対応する。両方が同じB細胞受容体または同じT細胞受容体に結合できる場合、2つのエピトープは互いに対応し、1つの抗体がそのエピトープに結合すると、他のエピトープによる結合が実質的に妨げられる(例えば、約30%未満、好ましくは約20%未満、より好ましくは約10%、5%、1%、または約0.1%未満の他のエピトープが結合する)。本発明では、複数のエピトープが1つの抗原を構成することができる。

【0126】

本明細書で使用する「抗原」または「目的の抗原」という用語は、表1に示すように自

10

20

30

40

50

然免疫応答または適応免疫応答を誘発するために使用される改善された LAMP 構築物にクローニングされたポリヌクレオチド配列によってコードされる任意のポリペプチド配列を包含する。「抗原」は、改善された LAMP 構築物にクローニングされた単一の抗原と複数の抗原配列（同じまたは異なるタンパク質に由来する）の両方を包含する。

【 0 1 2 7 】

本明細書で使用する「抗原提示細胞」という用語は、主要組織適合遺伝子複合体分子、またはその一部、または 1 もしくは複数の非古典的 MHC 分子、またはその一部に関連する抗原をその表面に提示する任意の細胞を含む。適切な APC の例は以下で詳細に説明し、マクロファージ、樹状細胞、B 細胞、ハイブリッド APC、および仮親抗原提示細胞などの細胞全体を含むが、これらに限定されない。

10

【 0 1 2 8 】

本明細書で使用する場合、「操作された抗原提示細胞」とは、その表面に非天然分子部分を有する抗原提示細胞を指す。例えば、そのような細胞は、その表面に共刺激物質を自然に持たないか、その表面に自然の共刺激物質に加えて追加の人工共刺激物質を含むか、その表面に非天然のクラス II 分子を発現することがある。好ましい実施形態では、操作された抗原提示細胞は、その表面上に改善された LAMP 構築物から発現した抗原を有する。

20

【 0 1 2 9 】

本明細書で使用する「免疫エフェクター細胞」とは、抗原に結合することができ、免疫応答を媒介する細胞を指す。これらの細胞には、T 細胞、B 細胞、单球、マクロファージ、NK 細胞および細胞傷害性 T リンパ球 (CTL)、例えば CTL 株、CTL クローン、および腫瘍、炎症性、または他の浸潤からの CTL が含まれるが、これらに限定されない。

20

【 0 1 3 0 】

本明細書で使用する場合、「部分的にヒト」とは、ヒトおよび非ヒト脊椎動物の両方からの配列を有する核酸を指す。部分的ヒト配列の文脈において、部分的ヒト核酸は、ヒト免疫グロブリンコード領域の配列、および非ヒト脊椎動物の内因性免疫グロブリン領域の非コード配列に基づく配列を有する。非ヒト脊椎動物由来の内因性非コード配列に関して使用される場合、「に基づく」という用語は、非コード配列に対応し、かつ宿主脊椎動物（例えば、ES 細胞が由来する非ヒト脊椎動物）の内因性遺伝子座の非コード配列と比較的高度の相同性を共有する配列を指す。好ましくは、非コード配列は、非コード配列を含む部分的にヒトの分子が導入された非ヒト脊椎動物宿主細胞の内因性遺伝子座に見出される対応する非コード配列と少なくとも 80%、より好ましくは 90% の相同性を共有する。

30

【 0 1 3 1 】

本明細書で使用する「免疫グロブリン可変領域」という用語は、抗体分子の可変領域のすべてまたは一部、または抗体分子の発現を制御する調節ヌクレオチド配列のすべてまたは一部をコードするヌクレオチド配列を指す。重鎖の免疫グロブリン領域には、V、D、J、およびイントロンを含むスイッチ領域のすべてまたは一部が含まれるが、これらに限定されない。軽鎖の免疫グロブリン領域には、軽鎖定常領域遺伝子に関連または隣接する V および J 領域、それらの上流フランкиング配列、イントロンが含まれるが、これらに限定されない。

40

【 0 1 3 2 】

「トランスジェニック動物」とは、その細胞の一部に染色体外要素として存在するか、またはその生殖系列 DNA（すなわち、その細胞のほとんどまたはすべてのゲノム配列）に安定的に組み込まれた外因性核酸配列を有する非ヒト動物、通常哺乳類を意味する。ヒト配列を含むトランスジェニック動物の作製において、部分的にヒトの核酸は、当技術分野で周知の方法に従って、例えば宿主動物の胚または胚性幹細胞の遺伝子操作により、そのようなトランスジェニック動物の生殖系列に導入される。

40

【 0 1 3 3 】

「ベクター」には、プラスミドおよびウイルス、ならびに自己複製するかどうかに關係なく、細胞の形質転換またはトランスフェクションに使用できる任意の DNA または RNA

50

A分子が含まれる。

【0134】

「単離された」または「精製された」細胞の集団は、自然界で関連する細胞および物質を実質的に含まない。実質的に遊離または実質的に精製されたA P Cとは、集団の少なくとも50%がA P Cであり、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%が、それらが自然界で関連する非A P C細胞を含まないことを意味する。

【0135】

本明細書で使用する「遺伝子改変」とは、細胞の正常なヌクレオチドへの任意の付加、欠失、または破壊を指す。A P Cの遺伝的改変を達成できる方法は、本発明の精神および範囲内にある。当該分野で認められている方法には、ウイルス媒介遺伝子移入、リポソーム媒介移入、形質転換、トランスフェクションおよび形質導入、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスおよびヘルペスウイルス、ならびにレトロウイルスベースのベクターなどのDNAウイルスに基づく改善されたL A M P構築物の使用などのウイルス媒介遺伝子移入が含まれる。

10

【0136】

本発明の実施は、別に明記しない限り、当技術分野の範囲内の従来の分子生物学、微生物学、および組換えDNA技術を使用する。そのような技術は、文献で完全に説明されている。例えば、Maniatis、Fritsch & Sambrook、In Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982) ; DNA Cloning: A Practical Approach, Volume I and II (D. N. Glover編、1985) ; Nucleic Acid Hybridization (M. J. Gait編、1984) ; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins編、1985) ; Transcription and Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins編、1984) ; Animal Cell Culture (R. I. Freshney編、1986) ; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press、1986) ; B. Perbal、A Practical Guide to Molecular Cloning (1984) を参照。

20

【0137】

別に定義されない限り、本明細書で使用するすべての技術用語および科学用語は、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のと同じ意味を有する。本明細書で言及するすべての刊行物は、本明細書に記載される発明に関連して使用され得るデバイス、製剤、および方法論を説明および開示する目的で参考により組み込まれる。

30

【0138】

L A M P構築物

L A M P - 1は、cDNAクローンから推論されるように (Chenら、J. Biol. Chem. 263: 8754、1988) 大きな(346残基)アミノ末端ルーメンドメインおよびそれに続く24残基の疎水性膜貫通領域ならびに短い(12残基)カルボキシル末端細胞質尾部を有する約382個のアミノ酸のポリペプチドコアからなる。図2Aおよび図2Bを参照。ルーメンドメインは高度にグリコシル化され、約20のアスパラギン結合複合型オリゴ糖で置換され、プロリン/セリンに富むヒンジ領域によって分離された2つの約160残基の「相同ドメイン」からなる。これらの「相同ドメイン」はそれぞれ、4つの均一に間隔を空けたシステイン残基を含み、ジスルフィド結合して、ルーメンドメインの2等分内に対称的に配置された4つの36~38残基ループを形成する (Arterburnら、J. Biol. Chem. 265: 7419、1990; また、Chenら、J. Biol. Chem. 25: 263 (18): 8754-8、1988も参照)。図2Aは、L A M P - 1、L A M P - 2、L A M P - 3、Endolyn、L I M B I C、L A M P 5、またはMacrosailin間の保存されたドメインを模式的に示す。

40

50

【0139】

以前に報告された LAMP 構築物は、この特定の配置で (a) LAMP - 1 タンパク質の全ルーメンドメイン、抗原、次に LAMP - 1 タンパク質の全膜貫通 / 細胞質尾部、または (b) LAMP - 1 タンパク質の抗原および全膜貫通 / 細胞質尾部の要素を含む。例 (a) では、抗原配列は、LAMP - 1 タンパク質の全ルーメンドメインと LAMP - 1 全膜貫通ドメイン / 細胞質尾部との間に挿入される。両方の構築物は、抗原配列をリソソーム / エンドソームにうまく標的化することが示されており、本明細書に記載の改善された LAMP 構築物 ILC1 - ILC6 と比較して、図 1 に示すように「完全な LAMP 構築物」と呼ばれる。本明細書に記載の改善された LAMP 構築物は、先行技術に記載された完全な LAMP 構築物を含まない。

10

【0140】

文献では、LAMP - 1 の全ルーメンドメインよりも小さい断片は、強い免疫応答を生成するのに効果的ではないことが広く報告されている（例えば Goodinhol を参照）。対照的に、本発明者らは、特定の配置において、特定の断片が実際に免疫系に抗原を効果的に提示し、多くの場合、抗体の異なるレパートリーの生成を含むより強力な免疫応答を生成することを予期せずに発見した。例えば、本発明者らは、強い免疫応答を生成するのに有効な最小 LAMP ルーメンドメイン断片は、（文献で広く報告されているように）全ルーメンドメインではなく、むしろ LAMP タンパク質のルーメンドメインの単一の相同ドメインであることを特定した。

20

【0141】

例えば、構築物は、全ルーメンドメインではなく、LAMP タンパク質のルーメンドメインの単一の相同ドメインを含むことができる。本明細書で使用する場合、「相同ドメイン」は、図 3 ~ 図 10 に示す少なくとも 4 つの均一に間隔を空けたシステイン残基を含む。これらのシステインの存在は、図 3 ~ 図 10 に示すように、各相同ドメインで 1、2、3、および 4 とラベル付けされ（LIMP - 2 および Macroasailin では 5 つのシステインが識別され、LIMBIC では 6 つのシステインが識別され、Endolyn では 8 つのシステインが識別される）、本明細書では「システイン保存断片」と定義される。追加のアミノ酸をシステイン保存断片の N 末端および / または C 末端のいずれかに含めて、LAMP タンパク質の全相同ドメインまでを生成することができる。これらの追加の追加アミノ酸は、システイン保存断片が由来する相同ドメインまたは他の LAMP タンパク質相同ドメインに由来することができる。したがって、本明細書で使用する場合、LAMP 相同ドメインは、1 つのシステイン保存断片を含む、および / またはそれからなる。少なくとも 2 つの LAMP 相同ドメインは、LAMP - 1、LAMP - 2、LAMP - 3、または Endolyn のルーメンドメインを構成する。

30

【0142】

具体的には、好ましい実施形態において、改善された LAMP 構築物は、表 1 に記載の少なくとも 1 つの癌抗原（好ましくは表 1 の列 4 に記載の配列 / 断片 / エピトープ）および / または段落 [0169] に記載の組み合わせを LAMP タンパク質のルーメンドメインの N 末端、LAMP タンパク質の少なくとも 1 つの相同ドメイン、または LAMP タンパク質の少なくとも 1 つのシステイン保存断片に融合したものを含む。例えば、図 1 の ILC - 2 および ILC - 6 を参照。好ましい実施形態では、これらの構築物は、LAMP タンパク質の膜貫通ドメイン、および / または LAMP タンパク質のサイトゾル尾部も含む。他の好ましい実施形態では、抗原が膜貫通ドメインを含む場合、LAMP タンパク質の膜貫通ドメインおよび / または LAMP タンパク質のサイトゾル尾部は不要である。好ましい実施形態では、2 つの相同ドメインが改善された LAMP 構築物に含まれる（例えば、図 1 の ILC - 1）。さらに好ましい実施形態では、2 つの相同ドメインは、LAMP - 1、LAMP - 2、LAMP - 3、または Endolyn タンパク質に由来する。あるいは、2 つの相同ドメインは異なる LAMP タンパク質に由来する。2 つの相同ドメインを含むこれらの構築物には、LAMP ヒンジドメインも含まれ得る。抗原は全 LAMP - 1 ルーメンドメインと全 LAMP - 1 膜貫通 / 細胞質尾部との間に常に配置され、ル

40

50

ーメンドメインの断片は強い免疫応答の生成に効果的ではないと報告されているため、この段落で説明した改善された LAMP 構築物は先行技術の観点からは予想外である。

【 0 1 4 3 】

別の好ましい実施形態では、改善された LAMP 構築物は、表 1 に記載の少なくとも 1 つの癌抗原（好ましくは表 1 の列 4 に記載の配列 / 断片 / エピトープ）および / または段落 [0 1 6 9] に記載の組み合わせを LAMP タンパク質の単一の相同ドメインの C 末端または LAMP タンパク質の単一のシステイン保存断片に融合したもの（例えば、図 1 の ILC - 5 ）を含む。好ましい実施形態では、これらの構築物は、LAMP タンパク質の膜貫通ドメイン、および / または LAMP タンパク質のサイトゾル尾部（例えば、図 1 の ILC - 3 ）も含む。他の好ましい実施形態では、抗原が膜貫通ドメインを含む場合、LAMP タンパク質の膜貫通ドメインおよび / または LAMP タンパク質のサイトゾル尾部は不要である。表 1 に記載されている癌抗原は、図 1 に示すように、完全な LAMP 構築物に挿入することもできる。あるいは、2 つの異なる LAMP タンパク質からの 2 つの相同ドメインを使用してもよい。抗原は全 LAMP - 1 ルーメンドメインと全 LAMP - 1 膜貫通 / 細胞質尾部との間に常に配置され、ルーメンドメインの断片は強い免疫応答の生成に効果的ではないと報告されているため、この段落で説明した改善された LAMP 構築物は先行技術の観点からは予想外である。

【 0 1 4 4 】

したがって、改善された LAMP 構築物は、表 1 に記載の少なくとも 1 つの癌抗原（好ましくは表 1 の列 4 に記載の配列 / 断片 / エピトープ）および / または段落 [0 1 6 9] に記載の組み合わせを LAMP タンパク質の単一の相同ドメインの C 末端または LAMP タンパク質の単一のシステイン保存断片に融合したものを含む。例えば、図 1 の ILC - 3 および ILC - 5 を参照。好ましい実施形態では、これらの構築物は、LAMP タンパク質の膜貫通ドメイン、および / または LAMP タンパク質のサイトゾル尾部も含む。他の好ましい実施形態では、抗原が膜貫通ドメインを含む場合、LAMP タンパク質の膜貫通ドメインおよび / または LAMP タンパク質のサイトゾル尾部は不要である。この段落で説明されている改善された LAMP 構築物は、上記のように先行技術の観点から予想外である。

【 0 1 4 5 】

別の好ましい実施形態では、改善された LAMP 構築物は、LAMP タンパク質の第 1 の相同ドメインと LAMP タンパク質の第 2 の相同ドメインとの間（または少なくとも 2 つのシステイン保存断片の間）に融合した少なくとも 1 つの対象抗原を含む。例えば、図 1 の ILC - 4 を参照。好ましい実施形態では、2 つの相同ドメインは、LAMP - 1、LAMP - 2、LAMP - 3、または Endolyt タンパク質に由来する。これらの構築物において、抗原は LAMP ヒンジ領域に配置され得る。あるいは、2 つの異なる LAMP タンパク質からの 2 つの相同ドメインを使用してもよい。表 1 に記載されている少なくとも 1 つの癌抗原（好ましくは表 1 の列 4 に記載されている配列 / 断片 / エピトープ）および / または段落 [0 1 6 9] に記載の組み合わせを 2 つの LAMP 相同ドメイン（システイン保存断片を含む）の間に融合したものは、上記のように先行技術の観点からは予想外である。

【 0 1 4 6 】

上記で定義した改善された LAMP 構築物の各々は、図で定義したドメインを使用して生成できる。例えば、図 1 に例示される改善された LAMP 構築物に含まれるドメインは、例えば、オーソロガス配列に由来する配列から起こり得ることが特に企図される。例について図 3 ~ 図 10 を参照。図 2A および図 2B で定義される同等のドメインを使用して、オーソロガス配列について図 1 に例示した改善された LAMP 構築物を生成することが明確に考えられる。さらに、図 3 ~ 図 10 に示すオーソロガス配列は、ドメインの生成に使用できる配列を表している。他のオーソロガス配列および / またはアイソタイプを特定し、それらを図 3 ~ 図 10 に示すアラインメントと比較することは、十分に当技術分野の技術の範囲内である。したがって、図 3 ~ 図 10 に示すアラインメントを有するヒト L

10

20

30

40

50

A M P タンパク質について、図 2 A および図 2 B に定義される対応する境界を識別することにより、図 1 に例示の改善された L A M P 構築物を生成できる。

【 0 1 4 7 】

当業者によって十分に理解されるように、各ドメインの境界は近似値であり、クローニングの考慮事項および制限酵素の配置に基づいて少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個のアミノ酸を調整することができる。したがって、特定のドメイン（例えば、L A M P 相同ドメイン）が改善された L A M P 構築物に含まれる場合、ドメインの開始と終了のアミノ酸は、図 2 A で定義されている境界のとおりに少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個のアミノ酸で調整され得る。

【 0 1 4 8 】

上記の改善された L A M P 構築物の各々は、当技術分野で周知のように、クローニング目的のために各ドメイン間にシグナル配列および / または追加のアミノ酸をさらに含み得る。さらに、L A M P 相同ドメイン、L A M P ルーメンドメイン、L A M P 膜貫通ドメイン、および / または L A M P サイトゾル尾部ドメインは、同じ L A M P タンパク質（例えば、ヒト L A M P - 1 ）または異なる L A M P タンパク質（例えば、ヒト L A M P - 1 からのルーメンドメインおよびヒト L A M P - 2 からの膜貫通ドメイン、および / または同じ遺伝子ファミリー（例えば、L A M P - 1 ）または異なる遺伝子ファミリー（L A M P - 1 および L A M P - 2 ）のオーソロガスドメインの混合に由来し得る。

【 0 1 4 9 】

記載された L A M P 構築物のポリペプチド変異体が考えられる。例えば、本明細書に記載の改善された L A M P 構築物のいずれかに対して少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、96%、97%、98% または 99% 同一のポリペプチドならびにこれらの変異体をコードするポリヌクレオチドが考えられる。改善された L A M P 構築物の変異体は、抗原配列をリソソームに標的化することによって機能する能力を保持する。例えば、改変されたルーメン配列は、元のドメイン配列と比較して少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、または少なくとも約 100% の有効性、すなわち、免疫応答を開始するためのキメラ配列を含む細胞による十分な抗原提示をもたらす有効性で、膜および非膜抗原物質の両方をエンドソーム区画に輸送する能力を保持しなければならない。一態様では、適切な輸送シグナルを含む配列は、オボアルブミンの十分に特徴づけられた抗原性ドメイン、膜貫通ドメイン、および推定されるリソソーム / エンドソーム標的化シグナルを含むタンパク質の細胞質ドメインを含む改変された L A M P 構築物を構築することにより特定され得る。標的化の効率は、改変された L A M P 構築物を発現する抗原提示細胞が H A エピトープ特異的 M H C クラス I I 拘束性 T 細胞を刺激する能力を測定することにより測定できる（例えば、米国特許第 5,633,234 号の実施例 5 を参照）。

【 0 1 5 0 】

記載されている改変された L A M P 構築物のいずれかをコードするポリヌクレオチドは、本明細書に記載の改変された L A M P 構築物ポリヌクレオチドのいずれかに対して少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、96%、97%、98% または 99% 同一であるポリヌクレオチドと共に、本発明の好ましい実施形態である。改変された L A M P 構築物の変異体は、抗原配列をリソソームに標的化することによって機能する能力を保持する。例えば、改変されたルーメン配列は、元のドメイン配列と比較して少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、または少なくとも約 100% の有効性、すなわち、免疫応答を開始するためのキメラ配列を含む細胞による十分な抗原提示をもたらす有効性で、膜および非膜抗原物質の両方をエンドソーム区画に輸送する能力を保持しなければならない。一態様では、適切な輸送シグナルを含む配列は、オボアルブミンの十分に特徴づけられた抗原性ドメイン、膜貫通ドメイン、および推定されるリソソーム / エンドソーム標的化シグナルを

10

20

30

40

50

含むタンパク質の細胞質ドメインを含む改善された LAMP 構築物を構築することにより特定され得る。標的化の効率は、改善された LAMP 構築物を発現する抗原提示細胞が H A エピトープ特異的 MHC クラス I I 拘束性 T 細胞を刺激する能力を測定することにより測定できる（例えば、米国特許第 5,633,234 号の実施例 5 を参照）。

【 0 1 5 1 】

癌抗原

表 1 に示す以下の抗原は、当業者に周知の技術を使用して、本明細書に記載される各 LAMP 構築物にクローニングされ得る。第 4 列に記載されている配列 / 断片 / エピトープは、本明細書に記載の改善された LAMP 構築物にクローニングすることもできる。さらに、表 1 に列挙した癌抗原のいずれか 1 つを表 1 に列挙した他の抗原（第 4 列に記載されている配列 / 断片 / エピトープを含む）と組み合わせて、本明細書に記載の改善された LAMP 構築物に挿入できることが特に考えられる。10

【 0 1 5 2 】

20

20

30

40

50

【表 1 - 1】

	各抗原のタンパク質名	取扱／由来	本明細書に記載のLAMP構築物にクローニングできる好ましいエビトープ／断片は少なくとも以下を含む。
1 1 4	P P 6 5	A B Q 2 3 5 9 3	図20に強調して示すエビトープであり、LLQTTGIVHV RVSQPSLおよび／またはDQYVKVYLESFCEDVおよび／またはPQYSSEHPTFTSQYR1QGKLおよび／またはPFWQAGILARNLVPMVおよび／またはKYQEFFFWANDIYR1IFAを含み、各エビトープは、任意の順序および／または任意の組み合わせで組み合わせることができ、各エビトープは、例えばGPGPGまたはPMGLPなどの構築物イソサートを配列番号1 1 5および配列番号1 1 6として示す。
1 1 7 および 1 1 8		P 0 6 4 7 3 g B	図20に強調して示すエビトープであり、TTSAQTTRS VYSQHVTおよび／またはVSVFETSGGLVVFWQおよび／またはNSAYEVVDYLFKRMIDLSSを含み、各エビトープは、任意の順序および／または任意の組み合わせで組み合わせて本明細書に記載のLAMP構築物にクローニングすることができ、各エビトープは、例えばGPGPGまたはPMGLPなどのリンクカーネイティックリソースを配列番号1 1 9および配列番号1 2 0として示す。
1 2 1		I E 1 P 1 3 2 0 2	図20に強調して示すエビトープであり、VLAELVKQ IKVRVDMVRHR1KEHMLKKYTQおよび／またはIVPEDKREMMWMACTKELHおよび／またはDELRKMMYMCYRNIEFFTCKNSAFPKTおよび／またはSVMKRR1EEICMKVFAQYIおよび／またはAIAEESDEEAIVAYおよび／またはVKSEPVSEIEVAPEEEEDGを含み、各エビトープは、任意の順序および／または任意の組み合わせて組み合わせて本明細書に記載のLAMP構築物にクローニングすることができ、各エビトープは、例えばGPGPGまたはPMGLPなどのリンクカーネイティックリソースを配列番号1 2 1および配列番号1 2 2および配列番号1 2 3として示す。
1 2 4 1 2 6	形態変換領域III ([MTRII]) U S 2 8	AAA6 6 5 4 3 AMJ 5 3 5 2 4	配列番号1 2 5 配列番号1 2 7

【0 1 5 3】

【表 1 - 2】

1 2 8	I G F B P 2 N P - 0 0 0 5 8 8	(a) 配列番号 1 2 8 のアミノ酸 3 9 ~ 3 2 8 について、 (b) 配列番号 1 2 8 のアミノ酸 4 0 ~ 3 2 8 について、 (c) 配列番号 1 2 8 のアミノ酸 4 3 ~ 1 3 5 について、 (d) 配列番号 1 2 8 のアミノ酸 1 ~ 1 6 3 について、 (e) 配列番号 1 2 8 のアミノ酸 2 ~ 1 6 3 について、 (f) 配列番号 1 2 8 のアミノ酸 3 9 ~ 1 6 3 について、 (g) 配列番号 1 2 8 のアミノ酸 4 0 ~ 1 6 3 について、 (h) 配列番号 1 2 8 のアミノ酸 2 2 9 ~ 3 0 9 について、 (i) 配列番号 1 2 8 のアミノ酸 2 ~ 3 2 8 および／または (j) 配列番号 1 2 8 のアミノ酸 1 ~ 3 2 8 について。									
		H C M V A ウイルスインターロイキ 1 2 9 ((I L 1 0)) P 1 7 1 5 0	配列番号 1 3 0								
1 3 1	H C M V M 膜糖タンパク質 U L 1 4 4 ((U L 1 4 4)) F 5 H A M O	配列番号 1 3 2									
1 3 3	H C M V M タンパク質 U L 1 4 1 ((U L 1 4 1)) Q 6 R J Q 3	配列番号 1 3 4									
1 3 5	H C M V A 独自の短い U S 1 1 糖 タンパク質 ((U S 1 1)) P 0 9 7 2 7	配列番号 1 3 6									
1 3 7 および 1 3 8	H C M V エンベロープ糖タンパク質 H O S ((H O S)) A O A O G 2 T M 8 1	図 20 に強調して示すエビトープであり、T Y N S S L R N S T V V R E N A I S F N F Q S Y N Q Y Y V F H M P R および／または D L T E T L E R Y Q Q R L N T Y A L V S K D L A S Y R S F S および／または S H T T S G L H R P H F N Q T C I L F D および／または Q L N R H S Y L K D P D F L D A A L D F を含み、各エビトープは、任意の順序 および／または任意の組み合わせで組み合わせて本明細書に 記載の L A M P 構築物にクローニングすることができます、各エ ビトープは、例えば G P G P G または P M G L P などの構築 物イントサートを配列番号 1 3 9 および配列番号 1 4 0 として 示す。									
1 4 1	H C M V T ウイルス転写因子 1 E 2 ((I E 2)) Q 6 S W P 7	図 20 に強調して示すエビトープで R R G R V K I D E V S R M F R および／または G I Q I I Y T R N H E V K S E お よび／または L S T P F L M E H T M P V T H P P E V A を 含む。各エビトープは、任意の順序および／または任意の組 み合わせで組み合わせて本明細書に記載の L A M P 構築物に クローニングすることができます、各エビトープは、例えば G P G P または P M G L P などの構築物イントサートを配列番号 1 4 2 および配列番号 1 4 3 として示す。									

【 0 1 5 4 】

【表 1 - 3】

1 4 4	T E R T A I Y I S P F O R E M 1 (T E R T J)	N P _ 9 3 7 9 8 . 2	配列番号 1 4 5 配列番号 1 4 6
1 4 7	サバイビン	N P _ 0 0 1 1 2 5 7 2 7	配列番号 1 4 7 ; 代表的な構築物には配列番号 1 9 3 ~ 1 9 7 が含まれる。
1 4 8	破傷風		図 20 に強調して示すエビトープであり、P G I N G K A I H L V N N E S S E および／または F N N F T V S F W L R V P K V S A S H H L E Q Y G T および／または Y V S I D K F R I F C K A L N P R E I E K L Y T S Y L S および／または I L R V G Y N A P G I P L Y K M E A V K L R D L K を含み、各エビトープは、任意の順序および／または任意の組み合せで本明細書に記載の L A M P 構築物を含むことができる。各エビトープは、例えば G P G P または P M G L P などのリンクカーネットによって分離されていることが好ましい。代表的な構築物インサートを配列番号 1 4 9 および配列番号 1 5 0 として示す。
1 5 1	滋賀県琵琶湖 N Y - E S O - 1 ((N Y E S O - 1))	N P - 0 0 1 3 1 8 . 1 (配列番号 1 5 1)	配列番号 1 5 1 のアミノ酸 1 - 1 5 - 5 配列番号 1 5 1 のアミノ酸 8 0 - 1 5 5
1 5 2	H E R 2	A A A 7 5 4 9 3 . 1 (配列番号 1 5 2)	配列番号 1 5 2 のアミノ酸 2 3 ~ 6 5 2 および／または 6 9 0 ~ 1 2 5 の少なくとも 1 つを含む構築物であり、各エビトープは、任意の順序および／または任意の組み合せで組み合わせて本明細書に記載の L A M P 構築物にクローニング PMG L P などのリンクカーネットによって分離していることが好ましい。代表的な構築物インサートを配列番号 1 5 3 および配列番号 1 5 4 として示す。
1 5 5	H E R 3	N P _ 0 0 1 9 7 3 . 2 (配列番号 1 5 5)	配列番号 1 5 5 のアミノ酸 2 0 ~ 6 4 3 、 6 6 5 ~ 1 2 0 1 、 および／または 1 2 0 9 ~ 1 3 4 2 の少なくとも 1 つを含む構築物であり、各エビトープは、任意の順序および／または任意の組み合せで組み合わせて本明細書に記載の L A M P 構築物にクローニング PMG L P または P M G L P などのリンクカーネットによって分離されていることが好ましい。代表的な構築物インサートを配列番号 1 5 6 および配列番号 1 5 7 として示す。
1 5 8	H V E M	N P _ 0 0 3 8 1 1 . 2 (配列番号 1 5 8)	アミノ酸 3 9 - 2 0 2 (配列番号 1 5 9)
1 6 0 ~ 1 6 3	H P V 構築物		構築物の作成に使用される配列：(a) H P V 1 6 E 6 (配列番号 1 6 0) ; (b) H P V 1 8 E 6 (配列番号 1 6 1) ; (c) H P V 1 6 E 7 (配列番号 1 6 2) ; (d) H P V 1 8 E 7 (配列番号 1 6 3)

【 0 1 5 5 】

【表 1 - 4】

		代表的な構築物 : 配列番号 1 6 4 (代表的な H P V 1 6 E 6 - E 7 構築物) 配列番号 1 6 5 (代表的な H P V 1 8 E 6 - E 7 構築物) 配列番号 1 6 6 (H P V 1 6 E 6 - リンカーンカーペット H P V 1 8 E 6 - リンカーンカーペット H P V 1 8 E 7 - リンカーンカーペット H P V 1 8 E 7)
1 6 9 ~ 1 7 2	E B V 構築物	以下の配列のいずれかを任意の組み合わせで使用して構築物を作成できる : (a) E B V E B N A 1 (配列番号 1 6 9); (b) E B V ドラッグカード E B N A - 1 (配列番号 1 7 0); (c) E B V g p 3 5 0 (配列番号 1 7 1); (d) E B V L M P 2 (配列番号 1 7 2)。例えば、代表的な構築物は、ドラッグカード E B N A - 1 および L M P 2 を含み得る。
1 7 4 ~ 1 7 5	H B V 構築物	次の配列のいずれかを使用して(どちらの方向でも)構築物を作成できる : H B V ミドル S タンパク質 (配列番号 1 7 4) および H B V X タンパク質 (配列番号 1 7 5) 例えば、代表的な構築物は、ミドル S タンパク質 - X タンパク質を含み得る。
1 7 6	T I G I T	配列番号 1 7 6
1 7 7	T E M 8	配列番号 1 7 7
1 7 8	T E M 1	配列番号 1 7 8
1 7 9	H E R 2 E C D + T M	配列番号 1 7 9
1 8 0	C E A	配列番号 1 8 0
1 8 1	T A R P	配列番号 1 8 1
1 8 2	P R O S T E I N	配列番号 1 8 2
1 8 3	P S M A	配列番号 1 8 3
1 8 4	B I R C 4	配列番号 1 8 4
1 8 5	ムチシ - 1 アイソフオーム	配列番号 1 8 5
1 8 6	C D 4 0 リガンド	配列番号 1 8 6
1 8 7	W T - 1	配列番号 1 8 7
1 8 8	W T - 1 ドラッグカード	配列番号 1 8 8
1 8 9	WT - 1 ドラッグカード	配列番号 1 8 9
1 9 0	P R A M E	配列番号 1 9 0
1 9 1	L A G E - 1	配列番号 1 9 1
1 9 2	M A G E A 3	配列番号 1 9 2
1 9 8	1 A 0 1 H L A - A ∕ m	配列番号 1 9 8
1 9 9	1 A 0 2 U n i P r o t K B : P 3 0 4 4 3 U n i P r o t K B : P 0 1 8 9 2	配列番号 1 9 9

【0 1 5 6】

【表 1 - 5】

2 0 0		5 T 4	U n i P r o t K B : Q 1 3 6 4 1	配列番号 2 0 0
2 0 1	A C R B P	U n i P r o t K B : Q 8 N E B 7	配列番号 2 0 1	
2 0 2	A F P	U n i P r o t K B : P 0 2 7 7 1	配列番号 2 0 2	
2 0 3	A K A P 4	U n i P r o t K B : Q 5 J Q C 9	配列番号 2 0 3	
2 0 4	α アクチニン-4/ m	U n i P r o t K B : B 4 D S X 0	配列番号 2 0 4	
2 0 5	α アクチニン-4/ m	U n i P r o t K B : B 4 E 3 3 7	配列番号 2 0 5	
2 0 6	α アクチニン-4/ m	U n i P r o t K B : O 4 3 7 0 7	配列番号 2 0 6	
2 0 7	α -メチルアシル-コエノザイム- β	U n i P r o t K B : A 0 A 0 2 4 R E 1 6	配列番号 2 0 7	
2 0 8	α -メチルアシル-コエノザイム- β	U n i P r o t K B : A 8 K A C 3	配列番号 2 0 8	
2 0 9	A N D R	U n i P r o t K B : P 1 0 2 7 5	配列番号 2 0 9	
2 1 0	A R T - 4	U n i P r o t K B : Q 9 U L X 3	配列番号 2 1 0	
2 1 1	A R T C 1/ m	U n i P r o t K B : P 5 2 9 6 1	配列番号 2 1 1	
2 1 2	A U R K B	U n i P r o t K B : Q 9 6 G D 4	配列番号 2 1 2	
2 1 3	B 2 M G	U n i P r o t K B : P 6 1 7 6 9	配列番号 2 1 3	
2 1 4	B 3 G N 5	U n i P r o t K B : Q 9 B Y G 0	配列番号 2 1 4	
2 1 5	B 4 G N 1	U n i P r o t K B : Q 0 0 9 7 3	配列番号 2 1 5	
2 1 6	B 7 H 4	U n i P r o t K B : Q 7 Z 7 D 3	配列番号 2 1 6	
2 1 7	B A G E - 1	U n i P r o t K B : Q 1 3 0 7 2	配列番号 2 1 7	
2 1 8	B A S I	U n i P r o t K B : P 3 5 6 1 3	配列番号 2 1 8	
2 1 9	B C L - 2	U n i P r o t K B : A 9 Q X G 9	配列番号 2 1 9	
2 2 0	b c r // a b 1	U n i P r o t K B : A 9 U E Z 4	配列番号 2 2 0	
2 2 1	b c r // a b 1	U n i P r o t K B : A 9 U E Z 7	配列番号 2 2 1	
2 2 2	b c r // a b 1	U n i P r o t K B : A 9 U E Z 8	配列番号 2 2 2	
2 2 3	b c r // a b 1	U n i P r o t K B : A 9 U E Z 9	配列番号 2 2 3	
2 2 4	b c r // a b 1	U n i P r o t K B : A 9 U F 0 0	配列番号 2 2 4	
2 2 5	b c r // a b 1	U n i P r o t K B : A 9 U F 0 1	配列番号 2 2 5	
2 2 6	b c r // a b 1	U n i P r o t K B : A 9 U F 0 3	配列番号 2 2 6	
2 2 7	b c r // a b 1	U n i P r o t K B : A 9 U F 0 4	配列番号 2 2 7	
2 2 8	b c r // a b 1	U n i P r o t K B : A 9 U F 0 5	配列番号 2 2 8	
2 2 9	b c r // a b 1	U n i P r o t K B : A 9 U F 0 6	配列番号 2 2 9	
2 3 0	b c r // a b 1	U n i P r o t K B : A 9 U F 0 8	配列番号 2 3 0	
2 3 1	β カテニン/ m	U n i P r o t K B : P 3 5 2 2 2	配列番号 2 3 1	
2 3 2	β カテニン/ m	U n i P r o t K B : Q 8 W Y A 6	配列番号 2 3 2	
2 3 3	B I N G - 4	U n i P r o t K B : O 1 5 2 1 3	配列番号 2 3 3	
2 3 4	B I R C 7	U n i P r o t K B : Q 9 6 C A 5	配列番号 2 3 4	
2 3 5	B R C A 1/ m	U n i P r o t K B : A 0 A 0 2 4 R 1 V 0	配列番号 2 3 5	
2 3 6	B R C A 1/ m	U n i P r o t K B : A 0 A 0 2 4 R 1 V 7	配列番号 2 3 6	

【0 1 5 7】

【表 1 - 6】

2 3 7	B R C A 1 / m	U n i P r o t K B : A O A O 2 4 R 1 Z 8	配列番号 2 3 7
2 3 8	B R C A 1 / m	U n i P r o t K B : A O A O 6 8 B F X 7	配列番号 2 3 8
2 3 9	B R C A 1 / m	U n i P r o t K B : C 6 Y B 4 5	配列番号 2 3 9
2 4 0	B R C A 1 / m	U n i P r o t K B : C 6 Y B 4 7	配列番号 2 4 0
2 4 1	B R C A 1 / m	U n i P r o t K B : G 3 X A C 3	配列番号 2 4 1
2 4 2	B Y 5 5	U n i P r o t K B : O 5 9 7 1	配列番号 2 4 2
2 4 3	C A M E L	U n i P r o t K B : O 9 5 9 8 7	配列番号 2 4 3
2 4 4	C A S P A	U n i P r o t K B : Q 9 2 8 5 1 - 4	配列番号 2 4 4
2 4 5	c a t h e p s i n _ B	U n i P r o t K B : A O A O 2 4 R 3 7 4	配列番号 2 4 5
2 4 6	c a t h e p s i n _ B	U n i P r o t K B : P 0 7 8 5 8	配列番号 2 4 6
2 4 7	カテブシシ L	U n i P r o t K B : A O A O 2 4 R 2 7 6	配列番号 2 4 7
2 4 8	カテブシシ L	U n i P r o t K B : P 0 7 7 1 1	配列番号 2 4 8
2 4 9	カテブシシ L	U n i P r o t K B : Q 9 H B Q 7	配列番号 2 4 9
2 5 0	C D 1 A	U n i P r o t K B : P 0 6 1 2 6	配列番号 2 5 0
2 5 1	C D 1 B	U n i P r o t K B : P 2 9 0 1 6	配列番号 2 5 1
2 5 2	C D 1 C	U n i P r o t K B : P 2 9 0 1 7	配列番号 2 5 2
2 5 3	C D 1 D	U n i P r o t K B : P 1 5 8 1 3	配列番号 2 5 3
2 5 4	C D 1 E	U n i P r o t K B : P 1 5 8 1 2	配列番号 2 5 4
2 5 5	C D 2 0	U n i P r o t K B : P 1 1 8 3 6	配列番号 2 5 5
2 5 6	C D 2 2	U n i P r o t K B : O 6 0 9 2 6	配列番号 2 5 6
2 5 7	C D 2 2	U n i P r o t K B : P 2 0 2 7 3	配列番号 2 5 7
2 5 8	C D 2 2	U n i P r o t K B : Q 0 E A F 5	配列番号 2 5 8
2 5 9	C D 2 7 6	U n i P r o t K B : Q 5 Z P R 3	配列番号 2 5 9
2 6 0	C D 3 3	U n i P r o t K B : B 4 D F 5 1	配列番号 2 6 0
2 6 1	C D 3 3	U n i P r o t K B : P 2 0 1 3 8	配列番号 2 6 1
2 6 2	C D 3 3	U n i P r o t K B : Q 5 4 6 G 0	配列番号 2 6 2
2 6 3	C D 3 E	U n i P r o t K B : P 0 7 6 6	配列番号 2 6 3
2 6 4	C D 3 Z	U n i P r o t K B : P 2 0 9 6 3	配列番号 2 6 4
2 6 5	C D 4 4 - ジソフオーム - 1	U n i P r o t K B : P 1 6 0 7 0	配列番号 2 6 5
2 6 6	C D 4 4 _ ジソフオーム - 6	U n i P r o t K B : P 1 6 0 7 0 - 6	配列番号 2 6 6
2 6 7	C D 4	U n i P r o t K B : P 0 1 7 3 0	配列番号 2 6 7
2 6 8	C D 5 2	U n i P r o t K B : P 3 1 3 5 8	配列番号 2 6 8
2 6 9	C D 5 2	U n i P r o t K B : Q 6 1 B D 0	配列番号 2 6 9
2 7 0	C D 5 2	U n i P r o t K B : V 9 H W N 9	配列番号 2 7 0
2 7 1	C D 5 5	U n i P r o t K B : B 1 A P 1 5	配列番号 2 7 1
2 7 2	C D 5 5	U n i P r o t K B : D 3 D T 8 5	配列番号 2 7 2
2 7 3	C D 5 5	U n i P r o t K B : D 3 D T 8 6	配列番号 2 7 3
2 7 4	C D 5 5	U n i P r o t K B : P 0 8 1 7 4	配列番号 2 7 4
2 7 5	C D 5 6	U n i P r o t K B : P 1 3 5 9 1	配列番号 2 7 5

【0 1 5 8】

【表 1 - 7】

276	C D 8 0	Uni ProtKB : A O N O P 2	配列番号 2 7 6
277	C D 8 0	Uni ProtKB : P 3 3 6 8 1	配列番号 2 7 7
278	C D 8 6	Uni ProtKB : P 4 2 0 8 1	配列番号 2 7 8
279	C D 8 A	Uni ProtKB : P 0 1 7 3 2	配列番号 2 7 9
280	C D C 2 7 / m	Uni ProtKB : G 5 E A 3 6	配列番号 2 8 0
281	C D C 2 7 / m	Uni ProtKB : P 3 0 2 6 0	配列番号 2 8 1
282	C D E 3 0	Uni ProtKB : P 2 8 9 0 8	配列番号 2 8 2
283	C D K 4 / m	Uni ProtKB : A O A O 0 2 4 R B B 6	配列番号 2 8 3
284	C D K 4 / m	Uni ProtKB : P 1 1 8 0 2	配列番号 2 8 4
285	C D K 4 / m	Uni ProtKB : Q 6 L C 8 3	配列番号 2 8 5
286	C D K 4 / m	Uni ProtKB : Q 9 6 B E 9	配列番号 2 8 6
287	C D K N 2 A / m	Uni ProtKB : D 1 L Y X 3	配列番号 2 8 7
288	C D K N 2 A / m	Uni ProtKB : G 3 X A G 3	配列番号 2 8 8
289	C D K N 2 A / m	Uni ProtKB : K 7 P M L 8	配列番号 2 8 9
290	C D K N 2 A / m	Uni ProtKB : L 8 E 9 4 1	配列番号 2 9 0
291	C D K N 2 A / m	Uni ProtKB : Q 8 N 7 2 6	配列番号 2 9 1
292	C E A	Ref Seq : N P _ 0 0 4 3 5 4	配列番号 2 9 2
293	C E A M 6	Uni ProtKB : P 4 0 1 9 9	配列番号 2 9 3
294	C H 3 L 2	Uni ProtKB : Q 1 5 7 8 2	配列番号 2 9 4
295	C L C A 2	Uni ProtKB : Q 9 U Q C 9	配列番号 2 9 5
296	C M L 2 8	Uni ProtKB : Q 9 N Q T 4	配列番号 2 9 6
297	C M L 6 6	Uni ProtKB : Q 9 6 R S 6	配列番号 2 9 7
298	C O A - 1 / m	Uni ProtKB : Q 5 T 1 2 4	配列番号 2 9 8
299	ヨアクトシン様タンパク質	Uni ProtKB : Q 1 4 0 1 9	配列番号 2 9 9
300	ヨラーデン_XXI_I	Uni ProtKB : L 8 E A S 4	配列番号 3 0 0
301	ヨラーデン_XXI_I	Uni ProtKB : Q 8 6 Y 2 2	配列番号 3 0 1
302	C O X - 2	Uni ProtKB : Q 6 Z Y K 7	配列番号 3 0 2
303	C P 1 B 1	Uni ProtKB : Q 1 6 6 7 8	配列番号 3 0 3
304	C S A G 2	Uni ProtKB : Q 9 Y 5 P 2 - 2	配列番号 3 0 4
305	C S A G 2	Uni ProtKB : Q 9 Y 5 P 2	配列番号 3 0 5
306	C T 4 5 A 1	Uni ProtKB : Q 5 H Y N 5	配列番号 3 0 6
307	C T 5 5	Uni ProtKB : Q 8 W U E 5	配列番号 3 0 7
308	C T - 9 / B R D 6	Uni ProtKB : Q 5 S F 2 1	配列番号 3 0 8
309	C T A G 2 _ ヤイソフオーラ_L A	Uni ProtKB : O 7 5 6 3 8 - 2	配列番号 3 0 9
310	C T A G 2 _ ヤイソフオーラ_L A	Uni ProtKB : O 7 5 6 3 8	配列番号 3 1 0
311	C T C F L	Uni ProtKB : Q 8 N I 5 1	配列番号 3 1 1
312	C t e n	Uni ProtKB : Q 8 I Z W 8	配列番号 3 1 2

【 0 1 5 9 】

【表 1 - 8】

3 1 3	c y c l i n _ B 1	U n i P r o t K B : P 1 4 6 3 5	配列番号 3 1 3
3 1 4	c y c l i n _ D 1	U n i P r o t K B : P 2 4 3 8 5	配列番号 3 1 4
3 1 5	c y p - B	U n i P r o t K B : P 2 3 2 8 4	配列番号 3 1 5
3 1 6	D A M - 1 0	U n i P r o t K B : P 4 3 3 6 6	配列番号 3 1 6
3 1 7	D E P 1 A	U n i P r o t K B : Q 5 T B 3 0	配列番号 3 1 7
3 1 8	E 7	U n i P r o t K B : P 0 3 1 2 9	配列番号 3 1 8
3 1 9	E 7	U n i P r o t K B : P 0 6 7 8 8	配列番号 3 1 9
3 2 0	E 7	U n i P r o t K B : P 1 7 3 8 7	配列番号 3 2 0
3 2 1	E 7	U n i P r o t K B : P 0 6 4 2 9	配列番号 3 2 1
3 2 2	E 7	U n i P r o t K B : P 2 7 2 3 0	配列番号 3 2 2
3 2 3	E 7	U n i P r o t K B : P 2 4 8 3 7	配列番号 3 2 3
3 2 4	E 7	U n i P r o t K B : P 2 1 3 6	配列番号 3 2 4
3 2 5	E 7	U n i P r o t K B : P 2 6 5 5 8	配列番号 3 2 5
3 2 6	E 7	U n i P r o t K B : P 3 6 8 3 1	配列番号 3 2 6
3 2 7	E 7	U n i P r o t K B : P 3 6 8 3 3	配列番号 3 2 7
3 2 8	E 7	U n i P r o t K B : Q 9 Q C Z 1	配列番号 3 2 8
3 2 9	E 7	U n i P r o t K B : Q 8 1 9 6 5	配列番号 3 2 9
3 3 0	E 7	U n i P r o t K B : Q 8 0 9 5 6	配列番号 3 3 0
3 3 1	E F 1 A 2	U n i P r o t K B : Q 0 5 6 3 9	配列番号 3 3 1
3 3 2	E F T U D 2 / m	U n i P r o t K B : Q 1 5 0 2 9	配列番号 3 3 2
3 3 3	E G F R	U n i P r o t K B : A O A O B 4 J 1 Y 5	配列番号 3 3 3
3 3 4	E G F R	U n i P r o t K B : E 7 B S V O	配列番号 3 3 4
3 3 5	E G F R	U n i P r o t K B : L O R 6 G 1	配列番号 3 3 5
3 3 6	E G F R	U n i P r o t K B : P 0 O 5 3 3 - 2	配列番号 3 3 6
3 3 7	E G F R	U n i P r o t K B : P 0 O 5 3 3	配列番号 3 3 7
3 3 8	E G F R	U n i P r o t K B : Q 1 4 7 T 7	配列番号 3 3 8
3 3 9	E G F R	U n i P r o t K B : Q 5 0 4 U 8	配列番号 3 3 9
3 4 0	E G F R	U n i P r o t K B : Q 8 N D U 8	配列番号 3 4 0
3 4 1	E G L N 3	U n i P r o t K B : Q 9 H 6 Z 9	配列番号 3 4 1
3 4 2	E L F 2 / m	U n i P r o t K B : B 7 Z 7 2 0	配列番号 3 4 2
3 4 3	E M M P R I N	U n i P r o t K B : Q 5 4 A 5 1	配列番号 3 4 3
3 4 4	E p C a m	U n i P r o t K B : P 1 6 4 2 2	配列番号 3 4 4
3 4 5	E p h A 2	U n i P r o t K B : P 2 9 3 1 7	配列番号 3 4 5
3 4 6	E p h A 3	U n i P r o t K B : P 2 9 3 2 0	配列番号 3 4 6
3 4 7	E p h A 3	U n i P r o t K B : Q 6 P 4 R 6	配列番号 3 4 7
3 4 8	E r b B 3	U n i P r o t K B : B 3 K W G 5	配列番号 3 4 8
3 4 9	E r b B 3	U n i P r o t K B : B 4 D G Q 7	配列番号 3 4 9
3 5 0	E R B B 4	U n i P r o t K B : Q 1 5 3 0 3	配列番号 3 5 0
3 5 1	E R G	U n i P r o t K B : P 1 1 3 0 8	配列番号 3 5 1

【0 1 6 0】

【表 1 - 9】

3 5 2	E T V 6	U n i P r o t K B : P 4 1 2 1 2	配列番号 3 5 2
3 5 3	E W S	U n i P r o t K B : Q 0 1 8 4 4	配列番号 3 5 3
3 5 4	E Z H 2	U n i P r o t K B : F 2 Y M M 1	配列番号 3 5 4
3 5 5	E Z H 2	U n i P r o t K B : G 3 X A L 2	配列番号 3 5 5
3 5 6	E Z H 2	U n i P r o t K B : L O R 8 5 5	配列番号 3 5 6
3 5 7	E Z H 2	U n i P r o t K B : Q 1 5 9 1 0	配列番号 3 5 7
3 5 8	E Z H 2	U n i P r o t K B : S 4 S 3 R 8	配列番号 3 5 8
3 5 9	F A B P 7	U n i P r o t K B : O 1 5 5 4 0	配列番号 3 5 9
3 6 0	F C G R 3 A _ V e r s i o n = 1	U n i P r o t K B : P 0 8 6 3 7	配列番号 3 6 0
3 6 1	F C G R 3 A _ V e r s i o n = 2	C C D S : C C D S 1 2 3 2 . 1	配列番号 3 6 1
3 6 2	F G F 5	U n i P r o t K B : P 1 2 0 3 4	配列番号 3 6 2
3 6 3	F G F 5	U n i P r o t K B : Q 6 0 5 1 8	配列番号 3 6 3
3 6 4	F G F R 2	U n i P r o t K B : P 2 1 8 0 2	配列番号 3 6 4
3 6 5	フイプロネクチン	U n i P r o t K B : A 0 A 0 2 4 R 5 1 6	配列番号 3 6 5
3 6 6	フイプロネクチン	U n i P r o t K B : A 0 A 0 2 4 R B 0 1	配列番号 3 6 6
3 6 7	フイプロネクチン	U n i P r o t K B : A 0 A 0 2 4 R D T 9	配列番号 3 6 7
3 6 8	フイプロネクチン	U n i P r o t K B : A 0 A 0 2 4 R D V 5	配列番号 3 6 8
3 6 9	フイプロネクチン	U n i P r o t K B : A 6 N H 4 4	配列番号 3 6 9
3 7 0	フイプロネクチン	U n i P r o t K B : A 8 K 6 A 5	配列番号 3 7 0
3 7 1	フイプロネクチン	U n i P r o t K B : B 2 R 6 2 7	配列番号 3 7 1
3 7 2	フイプロネクチン	U n i P r o t K B : B 3 K X M 5	配列番号 3 7 2
3 7 3	フイプロネクチン	U n i P r o t K B : B 4 D I C 5	配列番号 3 7 3
3 7 4	フイプロネクチン	U n i P r o t K B : B 4 D N 2 1	配列番号 3 7 4
3 7 5	フイプロネクチン	U n i P r o t K B : B 4 D S 9 8	配列番号 3 7 5
3 7 6	フイプロネクチン	U n i P r o t K B : B 4 D T H 2	配列番号 3 7 6
3 7 7	フイプロネクチン	U n i P r o t K B : B 4 D T K 1	配列番号 3 7 7
3 7 8	フイプロネクチン	U n i P r o t K B : B 4 D U 1 6	配列番号 3 7 8
3 7 9	フイプロネクチン	U n i P r o t K B : B 7 Z 3 W 5	配列番号 3 7 9
3 8 0	フイプロネクチン	U n i P r o t K B : B 7 Z 9 3 9	配列番号 3 8 0
3 8 1	フイプロネクチン	U n i P r o t K B : G 5 E 9 X 3	配列番号 3 8 1
3 8 2	フイプロネクチン	U n i P r o t K B : Q 9 H 3 8 2	配列番号 3 8 2
3 8 3	F O S	U n i P r o t K B : P 0 1 1 0 0	配列番号 3 8 3
3 8 4	F O X P 3	U n i P r o t K B : Q 9 B Z S 1	配列番号 3 8 4
3 8 5	F U T 1	U n i P r o t K B : P 1 9 5 2 6	配列番号 3 8 5
3 8 6	G 2 5 0	U n i P r o t K B : Q 1 6 7 9 0	配列番号 3 8 6
3 8 7	G A G E - 1	G e n b a n k : A A A 8 2 7 4 4	配列番号 3 8 7
3 8 8	G A G E - 2	U n i P r o t K B : Q 6 N T 4 6	配列番号 3 8 8
3 8 9	G A G E - 3	U n i P r o t K B : Q 1 3 0 6 7	配列番号 3 8 9
3 9 0	G A G E - 4	U n i P r o t K B : Q 1 3 0 6 8	配列番号 3 9 0

【 0 1 6 1 】

【表 1 - 10】

3 9 1	G A G E - 5	U n i P r o t K B : Q 1 3 0 6 9	配列番号 3 9 1
3 9 2	G A G E - 6	U n i P r o t K B : Q 1 3 0 7 0	配列番号 3 9 2
3 9 3	G A G E 7 b	U n i P r o t K B : O 7 6 0 8 7	配列番号 3 9 3
3 9 4	G A G E - 8 (G A G E - 2 D)	U n i P r o t K B : Q 9 U E U 5	配列番号 3 9 4
3 9 5	G A S R	U n i P r o t K B : P 3 2 2 3 9	配列番号 3 9 5
3 9 6	G n T - V	U n i P r o t K B : Q 0 9 3 2 8	配列番号 3 9 6
3 9 7	G P C 3	U n i P r o t K B : I 6 Q J G 3	配列番号 3 9 7
3 9 8	G P C 3	U n i P r o t K B : P 5 1 6 5 4	配列番号 3 9 8
3 9 9	G P C 3	U n i P r o t K B : Q 8 1 Y G 2	配列番号 3 9 9
4 0 0	G P N M B / m	U n i P r o t K B : A O A O 2 4 R A 5 5	配列番号 4 0 0
4 0 1	G P N M B / m	U n i P r o t K B : Q 1 4 9 5 6	配列番号 4 0 1
4 0 2	G P N M B / m	U n i P r o t K B : Q 8 1 X J 5	配列番号 4 0 2
4 0 3	G P N M B / m	U n i P r o t K B : Q 9 6 F 5 8	配列番号 4 0 3
4 0 4	G R M 3	U n i P r o t K B : Q 1 4 8 3 2	配列番号 4 0 4
4 0 5	H A G E	U n i P r o t K B : Q 9 N X Z 2	配列番号 4 0 5
4 0 6	ヘブシソ	U n i P r o t K B : B 2 Z D Q 2	配列番号 4 0 6
4 0 7	ヘブシソ	U n i P r o t K B : P 0 5 9 8 1	配列番号 4 0 7
4 0 8	H e r 2 / n e u	U n i P r o t K B : B 4 D T R 1	配列番号 4 0 8
4 0 9	H e r 2 / n e u	U n i P r o t K B : L 8 E 8 G 2	配列番号 4 0 9
4 1 0	H e r 2 / n e u	U n i P r o t K B : P 0 4 6 2 6	配列番号 4 1 0
4 1 1	H e r 2 / n e u	U n i P r o t K B : Q 9 U K 7 9	配列番号 4 1 1
4 1 2	H L A - A 2 / m	U n i P r o t K B : Q 9 5 3 8 7	配列番号 4 1 2
4 1 3	H L A - A 2 / m	U n i P r o t K B : Q 9 M Y F 8	配列番号 4 1 3
4 1 4	h o m e o b o x _ N K X 3 . 1	U n i P r o t K B : Q 9 9 8 0 1	配列番号 4 1 4
4 1 5	H O M - T E S - 8 5	U n i P r o t K B : B 2 R B Q 6	配列番号 4 1 5
4 1 6	H O M - T E S - 8 5	U n i P r o t K B : Q 9 P 1 2 7	配列番号 4 1 6
4 1 7	H P G 1	P u b m e d : 1 2 5 4 3 7 8 4	配列番号 4 1 7
4 1 8	H S 7 1 A	U n i P r o t K B : P 0 D M V 8	配列番号 4 1 8
4 1 9	H S 7 1 B	U n i P r o t K B : P 0 D M V 9	配列番号 4 1 9
4 2 0	H S T - 2	U n i P r o t K B : P 1 0 7 6 7	配列番号 4 2 0
4 2 1	h T E R T	U n i P r o t K B : O 9 4 8 0 7	配列番号 4 2 1
4 2 2	i C E	U n i P r o t K B : O 0 0 7 4 8	配列番号 4 2 2
4 2 3	I F 2 B 3	U n i P r o t K B : O 0 0 4 2 5	配列番号 4 2 3
4 2 4	I L - 1 3 R a 2	U n i P r o t K B : Q 1 4 6 2 7	配列番号 4 2 4
4 2 5	I L 2 - R A	U n i P r o t K B : P 0 1 5 8 9	配列番号 4 2 5
4 2 6	I L 2 - R B	U n i P r o t K B : P 1 4 7 8 4	配列番号 4 2 6
4 2 7	I L 2 - R G	U n i P r o t K B : P 3 1 7 8 5	配列番号 4 2 7
4 2 8	I M P 3	U n i P r o t K B : Q 9 N V 3 1	配列番号 4 2 8
4 2 9	I T A 5	U n i P r o t K B : P 0 8 6 4 8	配列番号 4 2 9

【0 1 6 2】

【表 1 - 11】

4 3 0	I T B 1	Uni i P r o t K B : P 0 5 5 5 6	配列番号 4 3 0
4 3 1	I T B 6	Uni i P r o t K B : P 1 8 5 6 4	配列番号 4 3 1
4 3 2	カリクレイシ-2	Uni i P r o t K B : A 0 A 0 2 4 R 4 J 4	配列番号 4 3 2
4 3 3	カリクレイシ-2	Uni i P r o t K B : A 0 A 0 2 4 R 4 N 3	配列番号 4 3 3
4 3 4	カリクレイシ-2	Uni i P r o t K B : B 0 A Z U 9	配列番号 4 3 4
4 3 5	カリクレイシ-2	Uni i P r o t K B : B 4 D 7 7	配列番号 4 3 5
4 3 6	カリクレイシ-2	Uni i P r o t K B : P 2 0 1 5 1	配列番号 4 3 6
4 3 7	カリクレイシ-2	Uni i P r o t K B : Q 6 T 7 7 4	配列番号 4 3 7
4 3 8	カリクレイシ-2	Uni i P r o t K B : Q 6 T 7 7 5	配列番号 4 3 8
4 3 9	カリクレイシ-4	Uni i P r o t K B : A 0 A 0 C 4 D F Q 5	配列番号 4 3 9
4 4 0	カリクレイシ-4	Uni i P r o t K B : Q 5 B Q A 0	配列番号 4 4 0
4 4 1	カリクレイシ-4	Uni i P r o t K B : Q 9 6 P T 0	配列番号 4 4 1
4 4 2	カリクレイシ-4	Uni i P r o t K B : Q 9 6 P T 1	配列番号 4 4 2
4 4 3	カリクレイシ-4	Uni i P r o t K B : Q 9 Y 5 K 2	配列番号 4 4 3
4 4 4	K 1 2 0 A	Uni i P r o t K B : O 9 5 2 3 5	配列番号 4 4 4
4 4 5	K I A A 0 2 0 5	Uni i P r o t K B : Q 9 2 6 0 4	配列番号 4 4 5
4 4 6	K I F 2 C	Uni i P r o t K B : Q 9 9 6 6 1	配列番号 4 4 6
4 4 7	KK-LC-1	Uni i P r o t K B : Q 5 H 9 4 3	配列番号 4 4 7
4 4 8	L D L R	Uni i P r o t K B : P 0 1 1 3 0	配列番号 4 4 8
4 4 9	L G M N	Uni i P r o t K B : Q 9 9 5 3 8	配列番号 4 4 9
4 5 0	L I R B 2	Uni i P r o t K B : Q 8 N 4 2 3	配列番号 4 5 0
4 5 1	L Y 6 K	Uni i P r o t K B : Q 1 7 R Y 6	配列番号 4 5 1
4 5 2	MAG A 5	Uni i P r o t K B : P 4 3 3 5 9	配列番号 4 5 2
4 5 3	MAG A 8	Uni i P r o t K B : P 4 3 3 6 1	配列番号 4 5 3
4 5 4	MAG AB	Uni i P r o t K B : P 4 3 3 6 4	配列番号 4 5 4
4 5 5	MAG E-A 1 0	Uni i P r o t K B : A 0 A 0 2 4 R C 1 4	配列番号 4 5 5
4 5 6	MAG E-A 1 2	Uni i P r o t K B : P 4 3 3 6 5	配列番号 4 5 6
4 5 7	MAG E-A 1	Uni i P r o t K B : P 4 3 3 5 5	配列番号 4 5 7
4 5 8	MAG E-A 2	Uni i P r o t K B : P 4 3 3 5 6	配列番号 4 5 8
4 5 9	MAG E-A 3	Uni i P r o t K B : P 4 3 3 5 7	配列番号 4 5 9
4 6 0	MAG E-A 4	Uni i P r o t K B : A 0 A 0 2 4 R C 1 2	配列番号 4 6 0
4 6 1	MAG E-A 4	Uni i P r o t K B : P 4 3 3 5 8	配列番号 4 6 1
4 6 2	MAG E-A 4	Uni i P r o t K B : Q 1 R N 3 3	配列番号 4 6 2
4 6 3	MAG E-A 6	Uni i P r o t K B : A 8 K 0 7 2	配列番号 4 6 3
4 6 4	MAG E-A 6	Uni i P r o t K B : P 4 3 3 6 0	配列番号 4 6 4
4 6 5	MAG E-A 6	Uni i P r o t K B : Q 6 F H 1 5	配列番号 4 6 5
4 6 6	MAG E-A 9	Uni i P r o t K B : P 4 3 3 6 2	配列番号 4 6 6
4 6 7	MAG E-B 1 0	Uni i P r o t K B : Q 9 6 L Z 2	配列番号 4 6 7
4 6 8	MAG E-B 1 6	Uni i P r o t K B : A 2 A 3 6 8	配列番号 4 6 8

【0 1 6 3】

【表 1 - 12】

4 6 9	M A G E - B 1 7	U n i P r o t K B : A 8 M X T 2	配列番号 4 6 9
4 7 0	M A G E - B 1	U n i P r o t K B : Q 9 6 T G 1	配列番号 4 7 0
4 7 1	M A G E - B 2	U n i P r o t K B : O 1 5 4 7 9	配列番号 4 7 1
4 7 2	M A G E - B 3	U n i P r o t K B : O 1 5 4 8 0	配列番号 4 7 2
4 7 3	M A G E - B 4	U n i P r o t K B : O 1 5 4 8 1	配列番号 4 7 3
4 7 4	M A G E - B 5	U n i P r o t K B : Q 9 B 7 Z 8 1	配列番号 4 7 4
4 7 5	M A G E - B 6	U n i P r o t K B : Q 8 N 7 X 4	配列番号 4 7 5
4 7 6	M A G E - C 1	U n i P r o t K B : O 6 0 7 3 2	配列番号 4 7 6
4 7 7	M A G E - C 2	U n i P r o t K B : Q 9 U B F 1	配列番号 4 7 7
4 7 8	M A G E - C 3	U n i P r o t K B : Q 8 T D 9 1	配列番号 4 7 8
4 7 9	M A G E - D 1	U n i P r o t K B : Q 9 Y 5 V 3	配列番号 4 7 9
4 8 0	M A G E - D 2	U n i P r o t K B : Q 9 U N F 1	配列番号 4 8 0
4 8 1	M A G E - D 4	U n i P r o t K B : Q 9 6 J G 8	配列番号 4 8 1
4 8 2	M A G E - E 1	U n i P r o t K B : Q 6 I A I 7	配列番号 4 8 2
4 8 3	M A G E - E 1 - (M A G E 1)	U n i P r o t K B : Q 9 H C I 5	配列番号 4 8 3
4 8 4	M A G E - E 2	U n i P r o t K B : Q 8 T D 9 0	配列番号 4 8 4
4 8 5	M A G E - F 1	U n i P r o t K B : Q 9 H A Y 2	配列番号 4 8 5
4 8 6	M A G E - H 1	U n i P r o t K B : Q 9 H 2 1 3	配列番号 4 8 6
4 8 7	M A G E L 2	U n i P r o t K B : Q 9 U J 5 5	配列番号 4 8 7
4 8 8	→シマダロボシ→A	U n i P r o t K B : Q 9 U 2 9 6	配列番号 4 8 8
4 8 9	マントマダロボシ→A	U n i P r o t K B : Q 6 N X 7 0	配列番号 4 8 9
4 9 0	M A R T - 1 / m e l a n - A	U n i P r o t K B : Q 1 6 6 5 5	配列番号 4 9 0
4 9 1	M A R T - 2	U n i P r o t K B : Q 5 V T Y 9	配列番号 4 9 1
4 9 2	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : Q 0 1 7 2 6	配列番号 4 9 2
4 9 3	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : Q 1 J U L 4	配列番号 4 9 3
4 9 4	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : Q 1 J U L 6	配列番号 4 9 4
4 9 5	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : Q 1 J U L 8	配列番号 4 9 5
4 9 6	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : Q 1 J U L 9	配列番号 4 9 6
4 9 7	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : Q 1 J U M 0	配列番号 4 9 7
4 9 8	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : Q 1 J U M 2	配列番号 4 9 8
4 9 9	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : Q 1 J U M 3	配列番号 4 9 9
5 0 0	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : Q 1 J U M 4	配列番号 5 0 0
5 0 1	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : Q 1 J U M 5	配列番号 5 0 1
5 0 2	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : Q 6 U R 9 2	配列番号 5 0 2
5 0 3	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : Q 6 U R 9 4	配列番号 5 0 3
5 0 4	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : Q 6 U R 9 5	配列番号 5 0 4
5 0 5	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : Q 6 U R 9 6	配列番号 5 0 5
5 0 6	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : Q 6 U R 9 7	配列番号 5 0 6
5 0 7	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : Q 6 U R 9 8	配列番号 5 0 7

【0 1 6 4】

【表 1 - 13】

5 0 8	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : Q 6 U R 9 9	配列番号 5 0 8
5 0 9	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : Q 6 U R A 0	配列番号 5 0 9
5 1 0	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : Q 8 6 Y W 1	配列番号 5 1 0
5 1 1	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : V 9 Q 5 S 2	配列番号 5 1 1
5 1 2	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : V 9 Q 6 7 1	配列番号 5 1 2
5 1 3	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : V 9 Q 7 8 3	配列番号 5 1 3
5 1 4	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : V 9 Q 7 F 1	配列番号 5 1 4
5 1 5	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : V 9 Q 8 N 1	配列番号 5 1 5
5 1 6	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : V 9 Q 9 7 7	配列番号 5 1 6
5 1 7	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : V 9 Q 9 P 5	配列番号 5 1 7
5 1 8	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : V 9 Q 9 R 8	配列番号 5 1 8
5 1 9	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : V 9 Q A E 0	配列番号 5 1 9
5 2 0	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : V 9 Q A R 2	配列番号 5 2 0
5 2 1	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : V 9 Q A W 3	配列番号 5 2 1
5 2 2	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : V 9 Q B O 2	配列番号 5 2 2
5 2 3	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : V 9 Q B 5 8	配列番号 5 2 3
5 2 4	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : V 9 Q B Y 6	配列番号 5 2 4
5 2 5	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : V 9 Q C 1 7	配列番号 5 2 5
5 2 6	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : V 9 Q C 6 6	配列番号 5 2 6
5 2 7	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : V 9 Q C Q 4	配列番号 5 2 7
5 2 8	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : V 9 Q D F 4	配列番号 5 2 8
5 2 9	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : V 9 Q D N 7	配列番号 5 2 9
5 3 0	M C 1 _ R	U n i P r o t K B : V 9 Q D Q 6	配列番号 5 3 0
5 3 1	メソセリゾ	U n i P r o t K B : Q 1 3 4 2 1	配列番号 5 3 1
5 3 2	M I T F	U n i P r o t K B : O 7 5 0 3 0 - 8	配列番号 5 3 2
5 3 3	M I T F	U n i P r o t K B : O 7 5 0 3 0 - 9	配列番号 5 3 3
5 3 4	M I T F	U n i P r o t K B : O 7 5 0 3 0	配列番号 5 3 4
5 3 5	M M P 1 _ 1	U n i P r o t K B : B 3 K Q S 8	配列番号 5 3 5
5 3 6	M M P 7	U n i P r o t K B : P 0 9 2 3 7	配列番号 5 3 6
5 3 7	M U C - 1	G e n b a n k : A A A 6 0 0 1 9	配列番号 5 3 7
5 3 8	M U M - 1 ∕ m	R e f S e q : N P _ 1 1 6 2 4 2	配列番号 5 3 8
5 3 9	M U M - 2 ∕ m	U n i P r o t K B : Q 9 Y 5 R 8	配列番号 5 3 9
5 4 0	M Y O 1 A	U n i P r o t K B : Q 9 U B C 5	配列番号 5 4 0
5 4 1	M Y O 1 B	U n i P r o t K B : O 4 3 7 9 5	配列番号 5 4 1
5 4 2	M Y O 1 C	U n i P r o t K B : O 0 0 1 5 9	配列番号 5 4 2
5 4 3	M Y O 1 D	U n i P r o t K B : O 9 4 8 3 2	配列番号 5 4 3
5 4 4	M Y O 1 E	U n i P r o t K B : Q 1 2 9 6 5	配列番号 5 4 4
5 4 5	M Y O 1 F	U n i P r o t K B : O 0 0 1 6 0	配列番号 5 4 5
5 4 6	M Y O 1 G	U n i P r o t K B : B 0 1 1 T 2	配列番号 5 4 6

【0 1 6 5】

【表 1 - 14】

5 4 7	MYO1H	RefSeq : NP_001094891	配列番号 5 4 7
5 4 8	NA17	UniProtKB : Q3V5L5	配列番号 5 4 8
5 4 9	NA88-A	Pumbed : I0790436	配列番号 5 4 9
5 5 0	Neo-PAP	UniProtKB : Q9BWT3	配列番号 5 5 0
5 5 1	NFYC/m	UniProtKB : Q13952	配列番号 5 5 1
5 5 2	NGEP	UniProtKB : Q61WH7	配列番号 5 5 2
5 5 3	NPM	UniProtKB : P06748	配列番号 5 5 3
5 5 4	NRCAM	UniProtKB : Q92823	配列番号 5 5 4
5 5 5	NSE	UniProtKB : P09104	配列番号 5 5 5
5 5 6	NUF2	UniProtKB : Q9BZD4	配列番号 5 5 6
5 5 7	NY-ESO-1	UniProtKB : P78358	配列番号 5 5 7
5 5 8	OAI1	UniProtKB : P51810	配列番号 5 5 8
5 5 9	OGT	UniProtKB : O15294	配列番号 5 5 9
5 6 0	OS-9	UniProtKB : B4DH11	配列番号 5 6 0
5 6 1	OS-9	UniProtKB : B4E321	配列番号 5 6 1
5 6 2	OS-9	UniProtKB : B7Z8E7	配列番号 5 6 2
5 6 3	OS-9	UniProtKB : Q13438	配列番号 5 6 3
5 6 4	オスティカルシン	UniProtKB : P02818	配列番号 5 6 4
5 6 5	オスティオボンチン	UniProtKB : A0AO24RDE2	配列番号 5 6 5
5 6 6	オスティオボンチン	UniProtKB : A0AO24RDE6	配列番号 5 6 6
5 6 7	オスティオボンチン	UniProtKB : A0AO24RDJ0	配列番号 5 6 7
5 6 8	オスティオボンチン	UniProtKB : B7Z351	配列番号 5 6 8
5 6 9	オスティオボンチン	UniProtKB : F2YQ21	配列番号 5 6 9
5 7 0	オスティオボンチン	UniProtKB : P10451	配列番号 5 7 0
5 7 1	P53	UniProtKB : P04637	配列番号 5 7 1
5 7 2	PAGE-4	UniProtKB : O60829	配列番号 5 7 2
5 7 3	PAI-1	UniProtKB : P05121	配列番号 5 7 3
5 7 4	PAI-2	UniProtKB : P05120	配列番号 5 7 4
5 7 5	PAP	UniProtKB : Q06141	配列番号 5 7 5
5 7 6	PAP	UniProtKB : Q53S56	配列番号 5 7 6
5 7 7	PATE	UniProtKB : Q8WXA2	配列番号 5 7 7
5 7 8	PAX3	UniProtKB : P23760	配列番号 5 7 8
5 7 9	PAX5	UniProtKB : Q02548	配列番号 5 7 9
5 8 0	PDI-L1	UniProtKB : Q9NZQ7	配列番号 5 8 0
5 8 1	PDCD1	UniProtKB : Q15116	配列番号 5 8 1
5 8 2	PDEF	UniProtKB : O95238	配列番号 5 8 2
5 8 3	PECAN	UniProtKB : P16284	配列番号 5 8 3
5 8 4	PGCB	UniProtKB : Q96GW7	配列番号 5 8 4
5 8 5	PGFRB	UniProtKB : P09619	配列番号 5 8 5

【0 1 6 6】

【表 1 - 15】

5.8.6	P i m - 1 _ - キナ - シ	Uni ProtKB : A O A O 2 4 R D 2 5	配列番号 5.8.6
5.8.7	P i n - 1	Uni ProtKB : O 1 5 4 2 8	配列番号 5.8.7
5.8.8	P i n - 1	Uni ProtKB : Q 1 3 5 2 6	配列番号 5.8.8
5.8.9	P i n - 1	Uni ProtKB : Q 4 9 A R 7	配列番号 5.8.9
5.9.0	P L A C 1	Uni ProtKB : Q 9 H B J O	配列番号 5.9.0
5.9.1	P M E L	Uni ProtKB : P 4 0 9 6 7	配列番号 5.9.1
5.9.2	P M L	Uni ProtKB : P 2 9 5 9 0	配列番号 5.9.2
5.9.3	P O T E F	Uni ProtKB : A 5 A 3 E 0	配列番号 5.9.3
5.9.4	P O T E	Uni ProtKB : Q 8 6 Y R 6	配列番号 5.9.4
5.9.5	P R A M E	Uni ProtKB : A O A O 2 4 R 1 E 6	配列番号 5.9.5
5.9.6	P R A M E	Uni ProtKB : P 7 8 3 9 5	配列番号 5.9.6
5.9.7	P R D X 5 / m	Uni ProtKB : P 3 0 0 4 4	配列番号 5.9.7
5.9.8	P R M 2	Uni ProtKB : P 0 4 5 5 4	配列番号 5.9.8
5.9.9	p r o s t e i n	Uni ProtKB : Q 9 6 J T 2	配列番号 5.9.9
6.0.0	プロテイナ - シ - 3	Uni ProtKB : D 6 C H E 9	配列番号 6.0.0
6.0.1	プロテイナ - シ - 3	Uni ProtKB : P 2 4 1 5 8	配列番号 6.0.1
6.0.2	P S A	Uni ProtKB : P 5 5 7 8 6	配列番号 6.0.2
6.0.3	P S B 9	Uni ProtKB : P 2 8 0 6 5	配列番号 6.0.3
6.0.4	P S C A	Uni ProtKB : D 3 D W I 6	配列番号 6.0.4
6.0.5	P S C A	Uni ProtKB : O 4 3 6 5 3	配列番号 6.0.5
6.0.6	P S G R	Uni ProtKB : Q 9 H 2 5 5	配列番号 6.0.6
6.0.7	P S M	Uni ProtKB : Q 0 4 6 0 9	配列番号 6.0.7
6.0.8	P T P R C	R e f S e q : N P _ 0 0 2 8 2 9	配列番号 6.0.8
6.0.9	R A B 8 A	Uni ProtKB : P 6 1 0 0 6	配列番号 6.0.9
6.1.0	R A G E - 1	Uni ProtKB : Q 9 U Q 0 7	配列番号 6.1.0
6.1.1	R A R A	Uni ProtKB : P 1 0 2 7 6	配列番号 6.1.1
6.1.2	R A S H	Uni ProtKB : P 0 1 1 1 2	配列番号 6.1.2
6.1.3	R A S K	Uni ProtKB : P 0 1 1 1 6	配列番号 6.1.3
6.1.4	R A S N	Uni ProtKB : P 0 1 1 1 1	配列番号 6.1.4
6.1.5	R G S 5	Uni ProtKB : O 1 5 5 3 9	配列番号 6.1.5
6.1.6	R H A M M / C D 1 6 8	Uni ProtKB : O 7 5 3 3 0	配列番号 6.1.6
6.1.7	R H O C	Uni ProtKB : P 0 8 1 3 4	配列番号 6.1.7
6.1.8	R S S A	Uni ProtKB : P 0 8 6 5	配列番号 6.1.8
6.1.9	R U 1	Uni ProtKB : Q 9 U H J 3	配列番号 6.1.9
6.2.0	R U 2	Uni ProtKB : Q 9 U H G 0	配列番号 6.2.0
6.2.1	R U N X 1	Uni ProtKB : Q 0 1 1 9 6	配列番号 6.2.1
6.2.2	S - 1 0 0	Uni ProtKB : V 9 H W 3 9	配列番号 6.2.2
6.2.3	S A G E	Uni ProtKB : Q 9 N X Z 1	配列番号 6.2.3
6.2.4	S A R T - 1	Uni ProtKB : O 4 3 2 9 0	配列番号 6.2.4

【0 1 6 7】

【表 1 - 16】

6 2 5	S A R T - 2	U n i P r o t K B : Q 9 U U L 0 1	配列番号 6 2 5
6 2 6	S A R T - 3	U n i P r o t K B : Q 1 5 0 2 0	配列番号 6 2 6
6 2 7	S E P R	U n i P r o t K B : Q 1 2 8 8 4	配列番号 6 2 7
6 2 8	S I A 7 F	U n i P r o t K B : Q 9 6 9 X 2	配列番号 6 2 8
6 2 9	S I A 8 A	U n i P r o t K B : Q 9 2 1 8 5	配列番号 6 2 9
6 3 0	S I A T 9	U n i P r o t K B : Q 9 U N P 4	配列番号 6 3 0
6 3 1	S I R T 2 / m	U n i P r o t K B : A O A O 2 4 R O G 8	配列番号 6 3 1
6 3 2	S I R T 2 / m	U n i P r o t K B : Q 8 1 X J 6	配列番号 6 3 2
6 3 3	S O X 1 0	U n i P r o t K B : P 5 6 6 9 3	配列番号 6 3 3
6 3 4	S P 1 7	U n i P r o t K B : Q 1 5 5 0 6	配列番号 6 3 4
6 3 5	S P N X A	U n i P r o t K B : Q 9 N S 2 6	配列番号 6 3 5
6 3 6	S P X N 3	U n i P r o t K B : Q 5 M J 0 9	配列番号 6 3 6
6 3 7	S S X - 1	U n i P r o t K B : Q 1 6 3 8 4	配列番号 6 3 7
6 3 8	S S X - 2	U n i P r o t K B : Q 1 6 3 8 5	配列番号 6 3 8
6 3 9	S S X 3	U n i P r o t K B : Q 9 9 9 0 9	配列番号 6 3 9
6 4 0	S S X - 4	U n i P r o t K B : O 6 0 2 2 4	配列番号 6 4 0
6 4 1	S T 1 A 1	U n i P r o t K B : P 5 0 2 2 5	配列番号 6 4 1
6 4 2	S T A G 2	U n i P r o t K B : Q 8 N 3 U 4 - 2	配列番号 6 4 2
6 4 3	S T E A P - 1	U n i P r o t K B : Q 8 N F T 2	配列番号 6 4 3
6 4 4	S T E A P - 1	U n i P r o t K B : A O A O 2 4 R A 6 3	配列番号 6 4 4
6 4 5	S T E A P - 1	U n i P r o t K B : Q 9 U H E 8	配列番号 6 4 5
6 4 6	サバイビン - 2 B	U n i P r o t K B : O 1 5 3 9 2 - 2	配列番号 6 4 6
6 4 7	サバイビン	U n i P r o t K B : O 1 5 3 9 2	配列番号 6 4 7
6 4 8	S Y C P 1	U n i P r o t K B : A O A O 2 4 R O 1 2	配列番号 6 4 8
6 4 9	S Y C P 1	U n i P r o t K B : B 7 Z L S 9	配列番号 6 4 9
6 5 0	S Y C P 1	U n i P r o t K B : Q 1 5 4 3 1	配列番号 6 5 0
6 5 1	S Y C P 1	U n i P r o t K B : Q 3 M H C 4	配列番号 6 5 1
6 5 2	S Y T - S S X - 1	U n i P r o t K B : A 4 P I V 7	配列番号 6 5 2
6 5 3	S Y T - S S X - 1	U n i P r o t K B : A 4 P I V 8	配列番号 6 5 3
6 5 4	S Y T - S S X - 2	U n i P r o t K B : A 4 P I V 9	配列番号 6 5 4
6 5 5	S Y T - S S X - 2	U n i P r o t K B : A 4 P I W 0	配列番号 6 5 5
6 5 6	T A R P	U n i P r o t K B : Q O V G M 3	配列番号 6 5 6
6 5 7	T C R g	U n i P r o t K B : A 2 J G V 3	配列番号 6 5 7
6 5 8	T F 2 A A	U n i P r o t K B : P 5 2 6 5 5	配列番号 6 5 8
6 5 9	T G F R 2	U n i P r o t K B : P 3 7 1 7 3	配列番号 6 5 9
6 6 0	T G M - 4	U n i P r o t K B : B 2 R 7 D 1	配列番号 6 6 0
6 6 1	T I E 2	U n i P r o t K B : Q 0 2 7 6 3	配列番号 6 6 1
6 6 2	T K T L 1	U n i P r o t K B : P 5 1 8 5 4	配列番号 6 6 2
6 6 3	T P I / m	U n i P r o t K B : P 6 0 1 7 4	配列番号 6 6 3

【0 1 6 8】

【表 1 - 17】

6 6 4	T R G V 1 1	U n i P r o t K B : Q 9 9 6 0 1	配列番号 6 6 4
6 6 5	T R G V 9	U n i P r o t K B : A 4 D 1 X 2	配列番号 6 6 5
6 6 6	T R G V 9	U n i P r o t K B : Q 9 9 6 0 3	配列番号 6 6 6
6 6 7	T R G V 9	U n i P r o t K B : Q 9 9 6 0 4	配列番号 6 6 7
6 6 8	T R P C 1	U n i P r o t K B : P 4 8 9 9 5	配列番号 6 6 8
6 6 9	T R P - p 8	U n i P r o t K B : Q 7 Z 2 W 7	配列番号 6 6 9
6 7 0	T S G 1 0	U n i P r o t K B : Q 9 B Z W 7	配列番号 6 7 0
6 7 1	T S P Y 1	U n i P r o t K B : Q 0 1 5 3 4	配列番号 6 7 1
6 7 2	T V C = (T R G V 3)	G e n b a n k : M 1 3 2 3 1 . 1	配列番号 6 7 2
6 7 3	T X 1 0 1	U n i P r o t K B : Q 9 B Y 1 4 - 2	配列番号 6 7 3
6 7 4	チロシナーゼ	U n i P r o t K B : A 0 A 0 2 4 D B G 7	配列番号 6 7 4
6 7 5	チロシナーゼ	U n i P r o t K B : L 8 B 0 8 2	配列番号 6 7 5
6 7 6	チロシナーゼ	U n i P r o t K B : L 8 B 0 8 6	配列番号 6 7 6
6 7 7	チロシナーゼ	U n i P r o t K B : L 8 B 0 B 9	配列番号 6 7 7
6 7 8	チロシナーゼ	U n i P r o t K B : O 7 5 7 6 7	配列番号 6 7 8
6 7 9	チロシナーゼ	U n i P r o t K B : P 1 4 6 7 9	配列番号 6 7 9
6 8 0	チロシナーゼ	U n i P r o t K B : U 3 M 8 N 0	配列番号 6 8 0
6 8 1	チロシナーゼ	U n i P r o t K B : U 3 M 9 D 5	配列番号 6 8 1
6 8 2	チロシナーゼ	U n i P r o t K B : U 3 M 9 J 2	配列番号 6 8 2
6 8 3	T Y R P 1	U n i P r o t K B : P 1 7 6 4 3	配列番号 6 8 3
6 8 4	T Y R P 2	U n i P r o t K B : P 4 0 1 2 6	配列番号 6 8 4
6 8 5	U P A	U n i P r o t K B : Q 9 6 N Z 9	配列番号 6 8 5
6 8 6	V E G F R 1	U n i P r o t K B : B 5 A 9 2 4	配列番号 6 8 6
6 8 7	W T 1	U n i P r o t K B : A 0 A 0 H 5 A U Y 0	配列番号 6 8 7
6 8 8	W T 1	U n i P r o t K B : P 1 9 5 4 4	配列番号 6 8 8
6 8 9	W T 1	U n i P r o t K B : Q 0 6 2 5 0	配列番号 6 8 9
6 9 0	X A G E 1	U n i P r o t K B : Q 9 H D 6 4	配列番号 6 9 0
6 9 1	I L - 1 0	U n i P r o t K B : P 2 2 3 0 1	配列番号 6 9 1
6 9 2	I L - 5	U n i P r o t K B : P 0 5 1 1 3	配列番号 6 9 2
6 9 3	M - C S F	U n i P r o t K B : P 0 9 6 0 3	配列番号 6 9 3
6 9 4	T G F b e t a 1	U n i P r o t K B : P 0 1 1 3 7	配列番号 6 9 4
6 9 5	カスペーゼ-8	U n i P r o t K B : Q 1 4 7 9 0	配列番号 6 9 5
6 9 6	S E R P I N B 5	U n i P r o t K B : P 3 6 9 5 2	配列番号 6 9 6
6 9 7	カルレディキョリソ	U n i P r o t K B : B 4 D H R 1	配列番号 6 9 7
6 9 8	カルレディキョリソ	U n i P r o t K B : B 4 E 2 Y 9	配列番号 6 9 8
6 9 9	カルレディキョリソ	U n i P r o t K B : P 2 7 7 9 7	配列番号 6 9 9
7 0 0	カルレディキョリソ	U n i P r o t K B : Q 9 6 L 1 2	配列番号 7 0 0
7 0 1	N - m y c	U n i P r o t K B : P 0 4 1 9 8	配列番号 7 0 1

【0 1 6 9】

さらに、表 1 に記載されている抗原（列 4 に示す配列 / 断片 / エピトープを含む）は、個別に、または互いに組み合わせて、本明細書に記載の L A M P 構築物にクローニングできる。例えば、名称 p p 6 5 、 g B 、 I E 1 、 M T R I I 、 U S 2 8 、 I G F B P 2 、 I L 1 0 、 U L 1 4 4 、 U L 1 4 1 、 U S 1 1 、 H O S 、 I E 2 、 T E R T 、 サバイビン、破傷風、N Y - E S O - 1 、 H E R 2 、 H E R 3 、 H V E M 、 H P V 1 6 E 6 、 H P V 1 8 E 6 、 H P V 1 6 E 7 、 H P V 1 8 E 7 、 E B N A 1 、 E B N A _ t r u n c 、 g p 3 5 0 、 L M P 2 、 G C P 3 、 ミドル S 、 X タンパク質、T I G I T 、 T E M 8 、 T E M 1 、 H E R 2 E C D + T M 、 C E A 、 T A R P 、 P R O S T E I N 、 P S M A 、 B I R C

4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3は表1に記載されているタンパク質を指し、一般的に、表1の列1に示す完全長配列を指すだけでなく、好ましくは図19および図20ならびに表1の第4列に記載されている配列/断片/エピトープも指すことを明確に意図している。したがって、表1の列4に記載されているエピトープ/断片を含む、表1の列1に示す各配列を使用して、LAMP構築物を生成できる。考えられる様々な組み合わせを説明するために、決して本開示を限定するものではないが、抗原の組み合わせ（表1の列1に示す配列および/または表1の列4に記載の配列/断片/エピトープを含む）を以下のようにLAMP構築物にクローニングすることができる：(a) p p 65、および次のうち少なくとも1つ：gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(b) gB、および次のうち少なくとも1つ：pp65、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(c) IE1、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1 ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(d) MTRII、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1 ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(e) US28、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1 ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(f) IGFBP2、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IL10、UL144、

10

20

30

40

50

UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(g) IL10、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(h) UL144、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(i) UL141、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(j) US11、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(k) IE2、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(l) TERT、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA 10 20 30 40 50

1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(m)サバイビン、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(n)破傷風、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(o)NY-ESO-1、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(p)HER2、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(q)HER3、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(r)HVEM、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、

10

20

30

40

50

PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(s) HOS、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(t) HPV16E6、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(u) HPV18E6、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TER、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(v) HPV16E7、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(w) HPV18E7、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(x) EBNA1、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、お

10

20

30

40

50

11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、
 HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E
 7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、
 Xタンパク質、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PR
 OSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L
 、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE
 A3；(af) TEM8、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、M
 TRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、H
 OS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3
 、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EB
 NA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパ
 ク質、TIGIT、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROST
 EIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT
 -1、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3
 ；(ag) TEM1、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTR
 II、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS
 、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、H
 VEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA
 1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質
 、TIGIT、TEM8、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN
 N、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1
 、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(ah)
 HER2 ECD+TM、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE
 1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US1
 1、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、H
 ER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7
 、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、X
 タンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、CEA、TARP、PROSTEIN、
 PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、W
 T-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(ai)
 CEA、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US
 28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、
 TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、H
 PV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBN
 A trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGI
 T、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、TARP、PROSTEIN、PS
 MA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1
 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(aj) TA
 RP、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US28
 、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TE
 RT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV
 16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA
 trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、
 TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、PROSTEIN、PSMA、
 BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 tr
 unc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(ak) PROS
 TEIN、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US
 28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、
 TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、H
 PV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBN
 10
 20
 30
 40
 50

A trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGI
 T、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PSMA、BIR
 C4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、
 PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(a1) PSMA、お
 よび次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGF
 BP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サ
 バイбин、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6
 、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc
 、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8
 、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、BIRC
 4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、
 PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(am) BIRC4、お
 よび次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFB
 P2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバ
 イбин、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、
 HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc
 、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、
 TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、
 ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PR
 AME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(an)
)ムチン-1、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、
 US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE
 2、TERT、サバイбин、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM
 、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、E
 BNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TI
 GIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROST
 EIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1
 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(ao)ムチ
 ソン-1 iso、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII
 、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、I
 E2、TERT、サバイбин、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HV
 EM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、
 EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、T
 IGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROS
 TEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、CD40-L、WT-1、WT-1 t
 runc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(ap) CD4
 0-L、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US2
 8、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、T
 ERT、サバイбин、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HP
 V16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA
 trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、
 TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、
 PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、WT-1、WT-1 trunc、
 PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(aq) WT-1、お
 よび次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGF
 BP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サ
 バイбин、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6
 、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc
 、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8
 、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA

10

20

30

40

50

、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1 trunc、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(ar)WT-1 trunc、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV18E7、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、PRAME、LAGE-1、および/またはMAGE A3；(as)PRAME、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、および/またはMAGE A3；および/または(at)LAGE-1、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV18E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、および/またはMAGE A3；および/または(au)MAGE A3、および次のうち少なくとも1つ：pp65、gB、IE1、MTRII、US28、IGFBP2、IL10、UL144、UL141、US11、HOS、IE2、TERT、サバイビン、破傷風、NY-ESO-1、HER2、HER3、HVEM、HPV16E6、HPV18E6、HPV16E7、HPV18E7、EBNA1、EBNA trunc、gp350、LMP2、GCP3、ミドルS、Xタンパク質、TIGIT、TEM8、TEM1、HER2 ECD+TM、CEA、TARP、PROSTEIN、PSMA、BIRC4、ムチン-1、ムチン-1 iso、CD40-L、WT-1、WT-1 trunc、PRAME、および/またはLAGE-1。このリストはLAMP構築物が含むものを説明し、必ずしも特定の構築物内の抗原の配置を説明するわけではないため、特定のLAMP構築物における上記の抗原の組み合わせの順序は変わり得る。さらに、これらの抗原は単一のLAMP構築物内で組み合わせができるか、または複数のLAMP構築物を含む1つの組成物で送達できることが特に想定される。

【0170】

改善されたLAMP構築物をコードする配列のアセンブリ

目的の抗原を含む改善されたLAMP構築物を構築する手順は、当技術分野で周知である（例えば、Williamsら、J. Cell Biol. 111: 955, 1990を参照）。目的のセグメントをコードするDNA配列は、容易に入手可能な組換えDNA材料から得ることができ、例えば、American Type Culture Collection（米国メリーランド州20852、ロックビル、Parklawn Drive 12301）、または所望のDNAを含むDNAライブラリから入手可能な材料が挙げられる。

【0171】

例えば、所望のドメイン配列に対応するDNAセグメントは、組換えDNA方法論の通常の手順を使用して適切な制御およびシグナル配列で組み立てることができる。例えば、

10

20

30

40

50

米国特許第4,593,002号、およびLangfordら、Molec. Cell. Biol. 6: 3191, 1986に記載されている。

【0172】

タンパク質またはポリペプチドをコードするDNA配列は、化学的に合成するか、いくつかのアプローチのうちの1つによって単離できる。合成されるDNA配列は、所望のアミノ酸配列に適したコドンを使用して設計できる。一般に、配列が発現に使用される予定の宿主に好ましいコドンを選択する。完全な配列は、標準的な方法で調製された重複オリゴヌクレオチドから組み立てられ、完全なコード配列に組み立てられてもよい。例えば、Edge、Nature 292: 756, 1981; Nambairら、Science 223: 1299, 1984; Jayら、J. Biol. Chem. 259: 6311, 1984を参照。

10

【0173】

一様では、改善されたLAMP構築物のドメイン配列をコードする1または複数の核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応を使用して個別に単離される(M. A. Innissら、In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications、Academic Press、1990)。ドメインは、それらを含むことが知られている公的に入手可能なクローンから単離されが好ましいが、ゲノムDNAまたはcDNAライブラリから単離されてもよい。好ましくは、単離された断片は、適合する制限エンドヌクレアーゼ部位に隣接し、それにより、癌抗原配列をコードする改善されたLAMP構築物が構築される。この技術は当業者に周知である。ドメイン配列は、互いに直接融合するか(例えば、介在配列なし)、互いに挿入するか(例えば、ドメイン配列が不連続である場合)、または介在配列により分離することができる(例えば、リンカー配列など)。

20

【0174】

オリゴヌクレオチドプライマー、プローブおよびDNAライブラリを調製するための基本戦略、ならびに核酸ハイブリダイゼーションによるそれらのスクリーニングは当業者に周知である。例えば、前出のSambrookら、1989; 前出のPerbal、1984を参照。適切なゲノムDNAまたはcDNAライブラリの構築は、当技術分野の範囲内である。例えば、前出のPerbal、1984を参照。あるいは、適切なDNAライブラリまたは公的に入手可能なクローンは、ClonetechやStratageneなどの生物学的研究材料の供給者、およびAmerican Type Culture Collectionなどの公的な寄託機関から入手できる。

30

【0175】

選択は、DNAの発現ライブラリから配列を発現させ、発現したペプチドを免疫学的に検出することによって達成することができる。MHC II分子および所望の抗体/T細胞受容体に結合するペプチドを発現するクローンが選択される。これらの選択手順は当業者に周知である(例えば、前出のSambrookら、1989を参照)。

【0176】

希望のポリペプチド配列のコード配列を含むクローンが調製または単離されたら、配列を任意の適切なベクターにクローニングすることができ、好ましくは宿主細胞で配列を維持するための複製起点を含む。

40

【0177】

核酸送達媒体

一様では、改善されたLAMP構築物を含むワクチン組成物が細胞に導入される。細胞は、核酸を複製するため、または改善されたLAMP構築物を発現するための宿主細胞であり得る。好ましくは、改善されたLAMP構築物を発現するための宿主細胞は抗原提示細胞である(以下でさらに説明する)。

【0178】

好ましい実施形態では、改善されたLAMP構築物は、標的細胞へ挿入するためのポリヌクレオチド配列と、細胞におけるポリヌクレオチド配列の発現(例えば、転写および/

50

または翻訳)を制御するためにそれに機能的に連結された発現制御配列とをさらに含む。例には、プラスミド、ファージ、自律複製配列(ARS)、動原体、およびインビトロまたは宿主細胞(細菌、酵母、昆虫細胞など)および/または標的細胞(例えば、哺乳動物細胞、好ましくは抗原提示細胞など)で複製できるかまたは複製され得る、および/または改善されたLAMP構築物をコードする配列を標的細胞内の所望の位置に運ぶための他の配列が含まれる。

【0179】

組換え発現ベクターは、ヒト、ウマ、ウシ、ブタ、ラマ、キリン、イヌ、ネコ、またはニワトリを含む動物に容易に感染する微生物に由来する場合がある。好ましいベクターには、ワクシニアなどの生ワクチンとしてすでに使用されているものが含まれる。これらの組換え体は宿主に直接接種することができ、微生物ベクターだけでなく外来抗原を発現する免疫も付与する。本明細書で生組換えワクチンとして企図される好ましいベクターには、例えば、Flexner、Adv. Pharmacol. 21: 51、1990に教示されているように、RNAウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、ワクシニアおよび他のポックスウイルスが含まれる。

10

【0180】

発現制御配列には、RNAポリメラーゼに結合するプロモーター配列、転写アクチベーターとリプレッサーにそれぞれ結合するエンハンサー配列または負の調節エレメント、および/またはリボソーム結合の翻訳開始配列が含まれるが、これらに限定されない。例えば、細菌発現ベクターは、lacプロモーターなどのプロモーターを含むことができ、転写開始のために、シャイン-ダルガルノ配列および開始コドンAUGを含むことができる(前出のSambrookら、1989)。同様に、真核生物発現ベクターは、好ましくは、RNAポリメラーゼIIの異種、相同、またはキメラプロモーター、下流のポリアデニル化シグナル、開始コドンAUG、およびリボソームの分離のための終止コドンを含む。

20

【0181】

発現制御配列は、天然発生の遺伝子から取得しても、設計してもよい。設計された発現制御配列には、突然変異および/またはキメラ発現制御配列または合成またはクローニングされたコンセンサス配列が含まれるが、これらに限定されない。プロモーターと、ポリヌクレオチドを作動可能に連結できるクローニング部位との両方を含むベクターは、当技術分野で周知である。そのようなベクターは、インビトロまたはインビボでRNAを転写することができ、Stratagene(カリフォルニア州ラホーヤ)およびPromega Biotech(ウィスコンシン州マディソン)などの供給元から市販されている。

30

【0182】

発現および/または転写を最適化するために、ベクターの5'および/または3'非翻訳部分を除去、追加または変更して、転写または翻訳のいずれかのレベルで発現に干渉するかまたは発現を減少させる可能性のある余分なまたは代替の翻訳開始コドンまたは他の配列を排除することが必要な場合がある。あるいは、コンセンサスリボソーム結合部位を、発現を増強するために開始コドンの5'に直接挿入することができる。多種多様な発現制御配列(それに機能的に連結されたDNA配列の発現を制御する配列)をこれらのベクターで使用して、本発明のDNA配列を発現させることができる。そのような有用な発現制御配列には、例えば、SV40、CMV、ワクシニア、ポリオーマ、アデノウイルス、ヘルペスウイルスの初期または後期プロモーター、および哺乳動物細胞の遺伝子の発現を制御することが知られている他の配列、およびそれらの様々な組み合わせが含まれる。

40

【0183】

一態様では、改善されたLAMP構築物は、ベクターを複製するための複製起点を含む。好ましくは、起点は、標的細胞への送達に使用するのに十分な数の配列のコピーを生成するために使用できる少なくとも1種類の宿主細胞で機能する。したがって、適切な起点には、細菌細胞(例えば、エシェリヒア属、サルモネラ属、プロテウス属、クロストリジウム属、クレブシエラ属、バチルス属、ストレプトマイセス属、およびシュードモナス種)、酵母(例えば、サッカラマイセス種またはピキア種など)、昆虫細胞、および哺乳動

50

物細胞で機能するものが含まれるが、これらに限定されない。好ましい一態様では、核酸送達媒体が導入される標的細胞（例えば、ヒト細胞などの哺乳動物細胞）で機能する複製起点が提供される。別の態様では、少なくとも2つの複製起点が提供され、1つは宿主細胞で機能し、もう1つは標的細胞で機能する。

【0184】

改善されたLAMP構築物は、代替的または追加的に、核酸送達ベクターの少なくとも一部を標的細胞染色体に組み込みしやすくする配列を含み得る。例えば、改善されたLAMP構築物は、標的細胞染色体DNAと相同な領域を含み得る。一態様では、送達ベクターは、改善されたLAMP構築物をコードする核酸配列に隣接する2つ以上の組換え部位を含む。

10

【0185】

ベクターが標的細胞にうまく導入される、および／または標的細胞によって発現され得ることを確認するために、ベクターは、検出可能および／または選択可能なマーカーをさらに含んでもよい。これらのマーカーは、RNA、ペプチド、またはタンパク質の産生などの活性をコードすることができるか、またはRNA、ペプチド、タンパク質、無機および有機化合物または組成物などの結合部位を提供することができる。

【0186】

検出可能／選択可能なマーカー遺伝子の例には、毒性化合物に対する耐性を提供する生成物（例えば抗生物質）をコードするDNAセグメント；レシピエント細胞に欠けている生成物（例えば、tRNA遺伝子、栄養要求性マーカー）をコードするDNAセグメント；遺伝子産物の活性を抑制する生成物をコードするDNAセグメント；容易に識別できる生成物（例えば、-ガラクトシダーゼなどの表現型マーカー、蛍光タンパク質（GFP、CFP、YFP、BFP、RFP、EGFP、EYFP、EBFP、dsRed、それらの変異型、修飾型、または強化型など）、および細胞表面タンパク質）をコードするDNAセグメント；細胞の生存および／または機能に有害である生成物を結合するDNAセグメント；他の核酸セグメントの活性を阻害するDNAセグメント（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）；基質を修飾する生成物（例えば、制限エンドヌクレアーゼ）を結合するDNAセグメント；所望の分子を単離または識別するために使用できるDNAセグメント（例えば、特定のタンパク質結合部位をコードするセグメント）；プライマー配列；存在しない場合、特定の化合物に対する抵抗性または感受性を直接的または間接的に付与するDNAセグメント；および／またはレシピエント細胞に毒性のある生成物をコードするDNAセグメントが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0187】

マーカー遺伝子は、成功した遺伝子移入の立体構造のマーカーとして、および／または移入された遺伝子を発現する細胞を単離するため、および／または移入された遺伝子を細胞から回収するために使用できる。例えば、一態様では、マーカー遺伝子を使用して、改善されたLAMP構築物を発現する抗原提示細胞を単離および精製する。

30

【0188】

実質的に類似の遺伝子、例えば、既知の遺伝子と約50%超、約70%超、80%超、約90%超上、好ましくは約95%超の同一性を有する遺伝子を提供することができる。実質的に類似のドメイン配列は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で目的のドメイン配列に特異的にハイブリダイズする配列を選択することにより最初に特定することができる。相同、変異、または修飾されたドメイン配列の適合性を決定するためのアッセイの実行は、適切な活性を発現する配列のスクリーニングの問題に過ぎない。そのようなスクリーニングは、当技術分野では日常的である。

40

【0189】

改善されたLAMP構築物は、裸の核酸として、または細胞への核酸の進入を促進するための1つ以上の分子に関連する送達媒体で提供され得る。適切な送達媒体には、リポソーム製剤、ポリペプチド、多糖、リポ多糖、ウイルス製剤（例えば、ウイルス、ウイルス粒子、人工ウイルスエンベロープなどを含む）、細胞送達媒体などが含まれるが、これら

50

に限定されない。

【0190】

脂質ベースの製剤

改善されたLAMP構築物の細胞内送達を促進するように設計された送達媒体は、（例えば、原形質膜、組織液、細胞内の区画など）非極性環境と極性環境の両方と相互作用する必要がある。したがって、好ましくは、送達媒体は、極性および非極性ドメインの両方、または改善されたLAMP構築物を細胞に移行させるための移行配列を含むように設計されている。

【0191】

極性ドメインと非極性ドメインを有する化合物は両親媒性物質と呼ばれる。カチオン性両親媒性物質は、DNAなどの負に帯電したポリヌクレオチドと相互作用するために、生理学的pHまたはその付近で正に帯電できる極性基を有する。

10

【0192】

本明細書に記載の改善されたLAMP構築物は、細胞膜を横切るベクターの移動を促進するために脂質単層または二重層を含む製剤で提供することができる。リポソームまたは任意の形態の脂質膜、例えば平面脂質膜または無傷の細胞、例えば赤血球の細胞膜を使用することができる。リポソーム製剤は、静脈内または経口投与を含む任意の手段によって投与することができる。

【0193】

リポソームおよびリポソーム製剤は、標準的な方法に従って調製することができ、当技術分野で周知である。例えば、Remington's; Akimaru, 1995, Cytokines Mol. Ther. 1: 197 - 210; Alvining, 1995, Immunol. Rev. 145: 5 - 31; Szoka, 1980, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467; 米国特許第4,235,871号; 第4,501,728号; および第4,837,028号を参照。一態様では、リポソームは、リポソーム、すなわち改善されたLAMP構築物複合体を特定の細胞型に標的化するための標的分子を含む。特に好ましい態様において、標的分子は、血管または標的組織に見られる細胞の表面上の生体分子（例えば、受容体またはリガンド）に対する結合パートナー（例えば、リガンドまたは受容体）を含む。

20

【0194】

リポソームの電荷は血液からのリポソームのクリアランスにおける重要な決定因子であり、負に帯電したリポソームは細網内皮系によってより迅速に取り込まれ（Julian o, 1975, Biochem. Biophys. Res. Commun. 63: 651）、したがって血流の半減期が短くなる。ホスファチジルエタノールアミン誘導体を組み込むと、リポソームの凝集が防止され、循環時間が延長される。例えば、N-（-カルボキシ）アシルアミドホスファチジルエタノールアミンをL-（-ジステアロイルホスファチジルコリンの大きな単ラメラ小胞に組み込むと、インビボのリポソーム循環寿命が劇的に増加する（例えば、Ahl, 1997, Biochim. Biophys. Acta 1329: 370 - 382を参照）。循環半減期が長いリポソームは、通常、治療および診断用途に望ましい。薬物動態の一般的な議論については、例えば、Remington's, Chapters 37 - 39, Leesら, In Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach (Technomic Publishing AG, Basel, Switzerland 1996) を参照。

30

40

【0195】

典型的には、リポソームは、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリンまたはホスファチジルイノシトールなど、約5～15モル%の負に帯電したリン脂質で調製される。また、ホスファチジルグリセロールなどの負に帯電したリン脂質を追加すると、自発的なリポソーム凝集を防ぐ働きをするため、リポソーム凝集体が過小形成されるリスクを最小限に抑える。膜剛性化剤、例えば、少なくとも約50モル%の濃度のスフィンゴミエリンまたは飽和中性リン脂質、および5～15モル%のモノシリアルガングリオシドも

50

、剛性などの望ましいリポソーム特性を付与することができる（例えば、米国特許第4,837,028号を参照）。

【0196】

さらに、リポソーム懸濁液は、保存時のフリーラジカルおよび脂質過酸化損傷から脂質を保護する脂質保護剤を含むことができる。-トコフェロールなどの親油性フリーラジカルクエンチャー、およびフェリオキシアニンなどの水溶性鉄特異的キレート剤が好ましい。

【0197】

本発明の改善されたLAMP構築物は、不均一なサイズの多重ラメラ小胞を含むことができる。例えば、小胞形成脂質を適切な有機溶媒または溶媒系に溶解し、真空または不活性ガス下で乾燥させて、薄い脂質膜を形成することができる。必要に応じて、膜を第三級ブタノールなどの適切な溶媒に再溶解し、次に凍結乾燥して、より容易に水和される粉末状のより均質な脂質混合物を形成することができる。この膜は、ペプチドまたはポリペプチド複合体の水溶液で覆われ、典型的には攪拌しながら15～60分かけて水和することができる。結果として得られる多重ラメラ小胞のサイズ分布は、より激しい攪拌条件下で脂質を水和させるか、デオキシコール酸などの可溶化界面活性剤を加えることによって、より小さなサイズに変えることができる。水和媒体は、好ましくは、最終リポソーム懸濁液中のリポソームの内部容積で望ましい濃度の核酸を含む。

10

【0198】

リポソーム調製後、リポソームは、所望のサイズ範囲およびリポソームサイズの比較的狭い分布を達成するようにサイズ調整することができる。1つの好ましいサイズ範囲は約0.2～0.4ミクロンであり、これにより、従来のフィルター、典型的には0.22ミクロンフィルターを介した濾過によりリポソーム懸濁液を滅菌することができる。リポソームのサイズが約0.2～0.4ミクロンまで小さくなっている場合、フィルター滅菌はハイスループットで実行できる。リポソームを所望のサイズにサイジングするためのいくつかの技術が利用可能である（例えば、米国特許第4,737,323号を参照）。

20

【0199】

適切な脂質は、限定されるものではないが、DOTMA (Felgnerら、1987、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417)、DGGSまたはTransfectain (商標) (Behrら、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6982-6986)、DNERIEまたはDORIE (Felgnerら、Methods 5:67-75)、DC-CHOL (Gao and Huang、1991、BBRC 179:280-285)、DOTAP (商標) (McLachlanら、1995、Gene Therapy 2:674-622)、Lipofectamine (商標) およびグリセロ脂質化合物（例えば、EP 901463およびWO 98/37916を参照）を含む。

30

【0200】

改善されたLAMP構築物との複合化に適した他の分子には、カチオン分子、例えば、ポリアミドアミン (Haensler and Szoka、1993、Biocongigate Chem. 4:372-379)、樹枝状ポリシン (WO 95/24221)、ポリエチレンイリニンまたはポリプロピレンh-ナイン (WO 96/02655)、ポリリジン (米国特許第5,595,897号；フランス特許FR 2 719 316)、キトサン (米国特許第5,744,166号)、DNA-ゼラチンコアセルベート（例えば、米国特許第6,207,195号；第6,025,337号；第5,972,707号を参照）またはDEAEデキストラン (Lopataら、1984、Nucleic Acid Res. 12:5707-5717) が含まれる。

40

【0201】

ウイルスベースの遺伝子送達媒体

一態様では、改善されたLAMP構築物送達媒体は、ウイルスまたはウイルス粒子を含む。この態様において、好ましくは、改善されたLAMP構築物はウイルスベクターを含

50

む。レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスなどのウイルスベクターは、多くの場合、2つの成分、すなわち修飾されたウイルスゲノムとそれを囲むコート構造で構成されているが（例えば、Smithら、1995、Ann. Rev. Microbiol. 49: 807 - 838を参照）、ウイルスベクターは裸の形で導入されたり、ウイルスタンパク質以外のタンパク質でコーティングされたりすることがある。現在のほとんどのベクターは、野生型ウイルスに似たコート構造を有する。この構造は、ウイルス核酸をパッケージングして保護し、標的細胞に結合して侵入する手段を提供する。

【0202】

好ましくは、本明細書に記載の改善されたLAMP構築物を含むウイルスベクターは、野生型ウイルスゲノムから改変されて、標的細胞でのウイルスの増殖を無効し、感染性粒子の調製に使用される宿主細胞（例えば、パッケージング細胞またはヘルパー細胞など）でのウイルスの増殖を可能にする。ベクター核酸は一般に、ヘルパー株での複製およびパッケージングのためのシス作用性ウイルス配列、および標的細胞に送達されるポリヌクレオチドの発現を調節するための発現制御配列に不可欠である。他のウイルス機能は、当技術分野で知られているように、特定のパッケージングまたはヘルパー細胞株にトランスで発現される。

【0203】

好ましい改善されたLAMP構築物は、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、泡沫状ウイルス、レンチウイルス、セムリキフォレストウイルス、AAV（アデノ随伴ウイルス）、ポックスウイルス、アデノウイルスおよびレトロウイルスからなる群から選択されるウイルスに由来するウイルスベクターである。そのようなウイルスベクターは当技術分野で周知である。

【0204】

好ましい一態様では、使用されるウイルスベクターはアデノウイルスベクターである。アデノウイルスゲノムは、ウイルス複製サイクルを完了するために必要な約30を超える遺伝子を運ぶ約36kbの線形二本鎖DNA分子で構成されている。初期の遺伝子は、抗ウイルス宿主免疫応答を調節すると考えられているE3領域を除いて、ウイルス複製に不可欠な4つの領域（E1～E4）に分けられる。E1領域（E1AおよびE1B）は、ウイルスゲノムの転写調節に関与するタンパク質をコードする。E2領域遺伝子（E2AおよびE2B）の発現は、ウイルス複製に必要なポリペプチドの合成をもたらす。E3領域によってコードされるタンパク質は、細胞傷害性T細胞および腫瘍壊死因子による細胞溶解を防ぐ（Wold and Gooding、1991、Virology 184: 1 - 8）。E4領域によってコードされるタンパク質は、DNA複製、後期遺伝子発現、スプライシング、および宿主細胞の遮断に関与している（Halbertら、1985、J. Virology 56: 250 - 257）。後期遺伝子は一般に、ウイルスキープシドに寄与する構造タンパク質をコードする。さらに、アデノウイルスゲノムは、シス作用性5'および3'ITR（逆方向末端反復）およびDNA複製に不可欠なパッケージング配列を運ぶ。ITRにはDNA複製の起点があるが、感染粒子へのアデノウイルスDNAのパッケージングにはキャプシド形成領域が必要である。

【0205】

Heise and Kim(2000、J. Clin. Invest. 105: 847 - 851)に記載されているように、特定の細胞（例えば増殖細胞など）で選択的に複製するために、アデノウイルスベクターを条件付きで複製するように操作できる（CRAdベクター）。別の態様において、アデノウイルスベクターは、E1機能の複製欠損である（例えば、E1の全体的または部分的な欠失または突然変異誘発による）。ベクターのアデノウイルス骨格は、追加の修飾（1または複数のウイルス遺伝子の削除、挿入または突然変異）を含み得る。E2修飾の例は、DBP(DNA Binding Protein)コード遺伝子に局在する温度感受性突然変異によって示されている（ensingrら、1972、J. Virology 10: 328 - 339）。アデノウイルス配列は、E

10

20

30

40

50

4領域の全部または一部を削除することもできる（例えば、欧洲特許第974 668号；Christら、2000、Human Gene Ther. 11: 415-427；Luskyら、1999、J. Virol. 73: 8308-8319）。非必須E3領域内の追加の欠失により、送達されるポリヌクレオチドのサイズを増加させることができる場合がある（Yehら、1997、FASEB Journal 11: 615 623）。しかし、ウイルスが免疫系（Goodingら、1990、Critical Review of Immunology 10: 53-71）または炎症反応（欧洲特許第00440267.3号）から逃れることを可能にするポリペプチド（例えば、gp19kなど）をコードするE3配列の全部または一部を保持することは有利かもしれない。

【0206】

ITRおよびパッケージング配列を保持し、ウイルス抗原の残留合成を無効にする実質的な遺伝子修飾を含む第2世代のベクターも、形質導入細胞における発現遺伝子の長期発現を改善するために使用できる（例えば、WO 94/28152；Luskyら、1998、J. Virol. 72: 2022-2032を参照）。

【0207】

細胞に導入される改善されたLAMP構築物は、シス作用性配列を除いて、ウイルスゲノムの任意の場所に挿入され得る。好ましくは、改善されたLAMP構築物は、削除された領域（E1、E3および／またはE4）の置換、好ましくは削除されたE1領域内に挿入される。

【0208】

アデノウイルスは、任意のヒトまたは動物源、特にイヌ科動物（例えばCAV-1またはCAV-2、それぞれGenbank ref. CAVIGENOMおよびCAV77 082）、鳥類（Genbank ref. AAVEDSDNA）、ウシ科動物（例えばBAV3；Reddyら、1998、J. Virol. 72: 1394 1402）、ネズミ科動物（Genbank ref. ADRMUSMAVI）、ヒツジ、ネコ科動物、ブタまたは類人猿の供給源、あるいはハイブリッドウイルスの可能性がある。任意の血清型を使用できる。しかし、Cサブグループのヒトアデノウイルス、特にアデノウイルス2（Ad2）および5（Ad5）が好ましい。このようなウイルスは、例えばATCCから入手できる。

【0209】

アデノウイルス粒子または空のアデノウイルスキャプシドもまた、米国特許第5,928,944号に記載されているように、ウイルス媒介共内在化プロセスによって改善されたLAMP構築物を移入するために使用できる。このプロセスは、1または複数の脂質層を含むポリカルベンまたは脂質小胞などのカチオン剤の存在下で達成することができる。

【0210】

アデノウイルス粒子は、ウイルス複製に必要な欠損ウイルス遺伝子をトランスで供給する相補細胞株またはヘルパーウイルスを使用して、当技術分野の任意の従来技術（例えば、WO 96/17070）に従って調製および増殖させることができる。細胞株293（Grahamら、1977、J. Gen. Virol. 36: 59-72）およびPER C6（Fallauxら、1998、Human Gene Therapy 9: 1909-1917）はE1欠失を補完するために一般的に使用されている。他の細胞株は欠陥ベクターを補完するように操作されている（Yehら、1996、J. Virol. 70: 559-565；Krougħak and Graham、1995、Human Gene Ther. 6: 1575-1586；Wangら、1995、Gene Ther. 2: 775-783；Luskyら、1998、J. Virol. 72: 2022-203；欧洲特許第919627号およびWO 97/04119）。アデノウイルス粒子は、培養上清からも溶解後の細胞からも回収することができ、場合により標準的な技術（例えば、WO 96/27677、WO 98/00524、WO 98/26048およびWO 00/50573に記載されているようなクロマトグラフィー、超遠心分離）に従ってさらに精製することができる。

10

20

30

40

50

【0211】

細胞型特異的標的化は、ウイルス表面タンパク質の修飾により、広範な宿主範囲を有するアデノウイルスに由来するベクターで達成され得る。例えば、アデノウイルスの感染の特異性は、許容細胞の表面に存在する細胞受容体への付着によって決定される。これに関して、アデノウイルスキャプシドの表面に存在する纖維およびペントンは、細胞付着において重要な役割を果たす(Deferら、1990、J. Virol. 64: 3661-3673)。したがって、アデノウイルスの細胞標的化は、纖維および/またはペントンをコードするウイルス遺伝子の遺伝的修飾によって実行され、独自の細胞表面受容体との特異的相互作用が可能な修飾纖維および/またはペントンを生成できる。そのような修飾の例は、Wickarnら、1997、J. Virol. 71: 8221-8229; Arribergら、1997、Virol. Chem. 268: 6866-6869; Rouxら、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9079-9083; Miller and Ville、1995、FASEB J. 9: 190-199; WO93/09221、WO95/28494に記載されている。

10

【0212】

特に好ましい態様では、アデノ随伴ウイルス配列がベクターとして使用される。ヒトパルボウイルスAAV-2(アデノ随伴ウイルス2型)に由来するベクターは、現在開発されている最も有望な遺伝子送達媒体の1つである。一本鎖DNAをパッケージングするためのこのシステムのいくつかの特徴は、送達用の裸のDNAの可能な代替物としてそれを示唆している。主要な魅力的な特徴は、ワクシニアまたはアデノウイルスなどの他のウイルスベクターとは対照的に、AAVベクターがウイルス遺伝子をまったく発現しないことである。ワクチン構築物に含まれる唯一のウイルスDNA配列は、145 bp逆方向末端反復配列(ITR)である。したがって、裸のDNAによる免疫化の場合と同様に、発現される遺伝子は抗原または抗原キメラの遺伝子のみである。さらに、AAVベクターは、ヒト末梢血単球由来樹状細胞などの分裂細胞と非分裂細胞の両方に、導入遺伝子の持続的な発現を導入し、また粘膜免疫の生成のための経口および鼻腔内送達の可能性を導入することが知られている。さらに、必要なDNAの量は数桁分も少ないよう見え、裸のDNA用量50ugまたは約10¹⁵コピーとは対照的に、DNA用量10¹⁰~10¹¹粒子またはコピーで最大の応答が得られる。

20

【0213】

30

一態様において、AAVベクターは、適切な細胞株(例えば、ヒト293細胞)を、構築物をコードするAAV_ITRキメラタンパク質に含まれるDNA、

およびITRのないAAVコード領域(AAV_re pおよびc a p遺伝子)を含むAAVヘルパープラスミドACG2と同時にトランスフェクトすることによってパッケージングされる。その後、細胞をアデノウイルスAd5に感染させる。ベクターは、当技術分野で知られている方法(例えば、塩化セシウム密度勾配超遠心分離など)を使用して細胞ライセートから精製し、検出可能な複製競合AAVまたはアデノウイルスがないことを確認するために検証することができる(例えば、細胞変性効果バイオアッセイによる)。AAV力価は、プロテイナーゼKによる消化後に調製されたウイルスDNA試料を用いた定量的PCRによって決定され得る。好ましくは、そのような方法によって生成されるベクター力価は、mlあたり約5×10¹²~1×10¹³DNa se耐性粒子である。

40

【0214】

他の態様では、レトロウイルスベクターが使用される。レトロウイルスは統合型ウイルスの一種であり、ウイルスにコードされた逆転写酵素を使用して複製し、ウイルスRNAゲノムを感染細胞(例えば、標的細胞)の染色体DNAに組み込まれる二本鎖DNAに複製する。そのようなベクターには、マウス白血病ウイルス、特にモロニー(Gilboaら、1988、Adv. Exp. Med. Biol. 241: 29)またはフレンドのFB29株(WO95/01447)に由来するものが含まれる。一般に、レトロウイルスベクターは、ウイルス遺伝子gag、polおよびenvのすべてまたは一部が削除され、5'および3'LTRおよびキャプシド形成配列を保持する。これらの要素を改変して、

50

レトロウイルスベクターの発現レベルまたは安定性を高めることができる。そのような改変には、V L 3 0などのレトロトランスポゾンの1つによるレトロウイルスキャプシド形成配列の置換が含まれる（例えば、米国特許第5,747,323号を参照）。好ましくは、改善されたL A M P構築物は、キャプシド形成配列の下流に、好ましくはレトロウイルスゲノムに対して反対方向に挿入される。細胞特異的標的化は、当技術分野で知られているように、レトロウイルスエンベロープタンパク質への抗体または抗体断片のコンジュゲーションによって達成され得る。

【0215】

レトロウイルス粒子は、ヘルパーウイルスの存在下、またはレトロウイルスベクターが欠損しているレトロウイルス遺伝子（例：gag/polおよびenv）をゲノムに組み込んだ適切な相補性（パッケージング）細胞株で調製される。そのような細胞株は、先行技術に記載されている（Miller and Rosman, 1989, Biotechniques 7:980; Danos and Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460; Markowitzら、1988、Virology 167:400）。env遺伝子の産物は、標的細胞の表面に存在するウイルス受容体へのウイルス粒子の結合を担い、したがってレトロウイルス粒子の宿主範囲を決定する。本発明の文脈において、ヒトおよび他の種の標的細胞の感染を可能にするために、両指向性エンベロープタンパク質を含むPA317細胞（ATCC CRL 9078）または293EI6（WO97/35996）などのパッケージング細胞株を使用することが有利である。レトロウイルス粒子は、培養上清から回収されが好ましく、標準的な技術（例えば、クロマトグラフィー、超遠心分離）に従ってさらに精製されてもよい。

【0216】

他の適切なウイルスには、ポックスウイルスが含まれる。ポックスウイルス科のいくつかのメンバーのゲノムがマッピングされ、配列決定されている。ポックスウイルスベクターは、ポックスウイルス科の任意のメンバー、特にカナリア痘ウイルス、鶏痘ウイルスおよびワクシニアウイルスから得ることができる。適切なワクシニアウイルスには、コペンハーゲン株（Goebelら、1990、Virology 179:247-266；Johnsonら、1993、Virology 196:381-401）、ワイエス株および改変アンカラ（MVA）株（Antoineら、1998、Virology 244:365-396）が含まれるが、これらに限定されない。ワクシニアウイルスベクターを構築するための一般的な条件は、当技術分野で知られている（例えば、欧州特許第83 286号および第206 920号；Mayrら、1975、Infection 3:6-14；Sutter and Moss、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10847-10851を参照）。好ましくは、目的のポリヌクレオチドは、非コード遺伝子間領域または不活性または欠失がウイルスの成長および複製を著しく損なわない任意の遺伝子など、非必須遺伝子座内に挿入される。

【0217】

ポックスウイルス粒子は、当技術分野で記載されているように調製される（Piccioli他、1987、Methods of Enzymology 153:545-563；米国特許第4,769,330号；第4,772,848号；第4,603,112号；第5,100,587号および第5,179,993号）。一般に、ドナープラスマドを構築し、大腸菌での増殖により増幅し、従来の手順により単離する。次に、それをポックスウイルスゲノムと共に適切な細胞培養物（例えば、ニワトリ胚線維芽細胞）に導入し、相同組換えによりポックスウイルス粒子を生成する。これらは、溶解ステップ（例えば、化学的溶解、凍結/解凍、浸透圧ショック、超音波処理など）の後に培養上清または培養細胞から回収できる。連続したブラーク精製を使用して、汚染している野生型ウイルスを除去できる。次に、当技術分野で知られている技術（例えば、クロマトグラフィー法または塩化セシウムまたはスクロース勾配での超遠心分離）を使用してウイルス粒子を精製することができる。

10

20

30

40

50

【0218】

天然痘を根絶するための世界的なキャンペーンで生ウイルスワクチンとしてワクシニアを使用したことにより、ワクシニアは、生組換えワクチンベクターとして開発用の明白な選択肢になった。100種近くの異なる外来タンパク質を発現する生組換えワクシニアウイルスが報告されており、これらの多くは効果的な実験用ワクチンである(Moss and Flexner, 1987によるレビュー)。ワクシニアは、その大きなゲノムサイズ、少なくとも25,000塩基対の外来DNAを受け入れる能力、および昆虫細胞を含むほとんどの真核細胞タイプに感染する能力(同上)のため、発現ベクターとして特に用途が広い。他のDNAウイルスとは異なり、ポックスウイルスは感染細胞の細胞質でのみ複製し、組換えウイルスDNAと宿主染色体との遺伝的交換の可能性を減らす。組換えワクシニアベクターは、ヒト、他の哺乳動物、寄生虫、RNAおよびDNAウイルス、バクテリアおよびバクテリオファージを含む様々な供給源からのタンパク質を適切に処理および発現することが示されている。

【0219】

外来タンパク質をコードするDNAの発現は、上流のプロモーター配列や、必要に応じてRNAプロセシングシグナルなど、宿主ウイルスの調節エレメントによって制御される。ワクシニアウイルスゲノムの非必須領域への外来DNAの挿入は、相同組換えによって行われている(Panicaliら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 79: 4927, 1982; Mackettら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 79: 7415, 1982)。

【0220】

改善されたLAMP構築物による癌抗原の発現は、挿入部位またはその近くの転写調節エレメントによって、またはより正確な遺伝子工学によって発生する可能性がある。外来遺伝子の挿入および発現を大幅に促進するプラスミドベクターが構築されている(Mackettら、J. Virol. 49: 857, 1982)。これらのベクターは、ワクシニア転写プロモーターと、ワクシニアゲノムの非必須領域からDNAが隣接する外来コード配列を挿入するための1つ以上の独自の制限エンドヌクレアーゼ部位とで構成される発現部位を含む。プロモーターの選択は発現の時間(例えば、早期または後期)と発現レベルの両方を決定し、ランキングDNA配列は相同組換えの部位を決定する。

【0221】

この手順で生成されたウイルス粒子のうち、組換え体であるのは約1000分の1に過ぎない。組換えウイルスのブラークはDNAハイブリダイゼーションによって特定できるが、効率的な選択手順が開発されている。非必須ワクシニアウイルスチミジンキナーゼ(TK)遺伝子のセグメントをランディング配列として使用することにより、外来遺伝子はTK遺伝子座に組み換えられ、挿入によりTK遺伝子が不活性化される。TKウイルスの選択は、5'-プロモデオキシリジンの存在下でTK細胞でウイルスブラークアッセイを実施することにより達成される。スクレオシド類似体のリン酸化とウイルスDNAへの致命的な取り込みは、TK+親ウイルスに感染した細胞でのみ起こる。トランスフェクションと組換えの効率に応じて、最大80個のブラークが望ましい組換え体であり、残りは自発的なTK変異体である。

【0222】

大腸菌の-L-ガラクトシダーゼ遺伝子と2番目の遺伝子の発現部位とを含むプラスミドベクターは、親ウイルスと組換え体を区別する別の方法を可能にする(Chakrabarti、Mol. Cell. Biol. 5: 3403, 1985)。そのような組換え体によって形成されたブラークは、適切な指標を追加すると形成される青色によって明確に識別できる。TK選択と-L-ガラクトシダーゼ発現の両方を組み合わせることにより、組換えウイルスを容易かつ迅速に単離する。次に、組換え体を適切な細胞株での増殖によって増幅し、挿入された遺伝子の発現を適切な酵素学的、免疫学的または物理的手順によって確認する。

【0223】

10

20

30

40

50

ワクシニアウイルスゲノムに追加できる遺伝情報の量の上限はまだわかっていない。しかし、外来DNAのほぼ25,000塩基対を追加しても、ウイルス収量に明らかな悪影響はなかった(Smithら、Gene、25:21、1983)。必要な場合、ワクシニアウイルスゲノムの大きなセグメントを削除して、追加の容量を提供できる(Mossら、J. Virol. 40:387、1981)。

【0224】

ウイルスキャプシド分子は、細胞への標的化および/または進入を促進する標的化部分を含んでもよい。適切な標的分子には、化学的コンジュゲート、脂質、糖脂質、ホルモン、糖、ポリマー(例えば、PEG、ポリリジン、PEIなど)、ペプチド、ポリペプチド(例えば、WO94/40958を参照)、ビタミン、抗原、レクチン、抗体およびその断片が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、そのような標的分子は、細胞特異的マーカー、組織特異的マーカー、細胞受容体、ウイルス抗原、抗原性エピトープまたは腫瘍関連マーカーを認識して結合する。

10

【0225】

ウイルス粒子に基づく改善されたLAMP構築物を含む組成物は、 $10 \sim 10^{14}$ i.u(感染単位)、好ましくは $10 \sim 10^{11}$ i.uの用量の形態で製剤化され得る。力価は、従来の技術により決定され得る。LAMP構築物の用量は、好ましくは0.01~1.0mg/kg、より具体的には0.1~2mg/kgで構成される。

20

【0226】

自己複製RNA

本明細書に記載の改善されたLAMP構築物を使用して自己複製RNAウイルスペクター構築することもできる。例えば、アルファウイルス、フラビウイルス、麻疹ウイルスおよびラブドウイルスを使用して、自己複製RNAウイルスワクチンを生成することができる。自己複製RNAウイルスの好ましい株には、狂犬病ウイルス(RABV)、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、西ナイルウイルス、クンジンウイルス、セムリキ森林ウイルス(SFV)、シンドビスウイルス(SIN)および/またはベネズエラ馬脳炎ウイルス(VEE)が含まれるが、これらに限定されない。

【0227】

自己複製RNAウイルスは、組織への送達時にネイティブ抗原を発現するため、病原性への復帰のリスクを伴わずに弱毒生ワクチンを模倣する。また、自然免疫系を刺激し、反応を強化する。例えば、Ljungberg、K、「自己複製アルファウイルスRNAワクチン(Self-replicating alphavirus RNA vaccines)」、Expert Rev Vaccines(2):177-94(2015); Lundstrom、K、「癌免疫療法における腫瘍溶解性アルファウイルス(Oncolytic Alphaviruses in Cancer Immunotherapy)」、Vaccines 5:9(2017); Lundstrom、K、「ワクチンとしてのレプリコンRNAウイルスペクター(Replikon RNA Viral Vectors as Vaccines)」、Vaccines 4:39(2016)を参照(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。本明細書に記載の改善されたLAMP構築物を含む自己複製ワクチンの使用は、プライムブーストプロトコルでも使用することができる。

30

【0228】

さらに、本明細書に記載のように、リポソームによって自己複製RNAウイルスをカプセル化して、送達および標的化を改善することもできる。本明細書に記載の改善されたLAMP構築物を含む自己複製RNAウイルスによる免疫化は、抗原のより高い一時的発現レベルをもたらし、安全な条件下での中和抗体応答の生成と致死的チャレンジに対する保護をもたらす。

40

【0229】

細胞ベースの送達媒体

本発明による改善されたLAMP構築物は、構築物を含む他の細胞(「送達細胞」)に

50

よって標的細胞に送達することができる。構築物を細胞に導入する方法は当技術分野で知られており、細胞の核へのDNAのマイクロインジェクション(Capechiら、1980、Cell 22:479-488)、Cap04によるトランスフェクション(Chen and Okayama、1987、Mol. Cell Biol. 7:2745-2752)、エレクトロポレーション(Chuら、1987、Nucleic Acid Res. 15:1311-1326)、リポフェクション/リポソーム融合(Feignerら、1987、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417)および粒子衝撃(Yangら、1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9568-9572)が含まれる。適切な細胞には、自己細胞および非自己細胞が含まれ、異種細胞が含まれてもよい。送達細胞は、細胞の死を誘導することにより(例えば、細胞に誘導性自殺遺伝子を提供することにより)、標的細胞にその内容物を送達するように誘導され得る。

【0230】

アクセサリー分子

本発明による改善されたLAMP構築物を含む組成物は、細胞への改善されたLAMP構築物の導入を促進し、および/または特定の治療効果を高め、および/または抗体産生を高めるための1つ以上のアクセサリー分子を含み得る。

【0231】

さらに、本発明による改善されたLAMP構築物を含む組成物は、動物/人体内の分解を阻害するため、および/またはベクターの標的細胞へのトランスフェクション/感染を改善するために1つ以上の安定化物質、例えば脂質、ヌクレアーゼ阻害剤、ヒドロゲル、ヒアルロニダーゼ(WO 98/53853)、コラゲナーゼ、ポリマー、キレート剤(欧洲特許第890362号)を含んでもよい。そのような物質は、単独でまたは組み合わせて使用されてもよい(例えば、カチオン性脂質と中性脂質)。

【0232】

また、アデノウイルスタンパク質は、エンドソームを不安定化し、DNAの細胞への取り込みを促進できることが示されている。脂質複合体DNAベクターを含む溶液へのアデノウイルスの混合、またはタンパク質架橋剤を使用したアデノウイルスに共有結合したポリリジンへのDNAの結合は、改善されたLAMP構築物の取り込みと発現を大幅に改善する可能性がある(例えば、Curie1ら、1992、Am. J. Respir. Crit. Care Med. 11:247-252を参照)。

【0233】

宿主細胞

本発明による改善されたLAMP構築物は、限定ではないが原核細胞(例えば、大腸菌、ブドウ球菌種、バチルス種)、酵母細胞(例えば、サッカロマイセス属)、昆虫細胞、線虫細胞、植物細胞、両生類細胞(例えば、アフリカツメガエル)、鳥類細胞および哺乳動物細胞(例えば、ヒト細胞、マウス細胞、哺乳動物細胞株、解剖組織などからの初代培養哺乳動物細胞)を含む様々な宿主細胞で発現され得る。

【0234】

分子は、生物から単離された宿主細胞、生物の一部である宿主細胞、または生物に導入される宿主細胞で発現させることができる。一態様では、改善されたLAMP構築物は、インビトロで、例えば培養中の宿主細胞で発現する。別の態様では、改善されたLAMP構築物は、改善されたLAMP構築物をコードする核酸を含む体細胞および/または生殖系列細胞を含むトランスジェニック生物(例えば、トランスジェニックマウス、ラット、ウサギ、ブタ、靈長類など)で発現する。トランスジェニック動物を構築する方法は当技術分野で周知であり、日常的である。

【0235】

改善されたLAMP構築物は、インビトロで細胞に導入することもでき、その細胞(例えば、幹細胞、造血細胞、リンパ球など)を宿主生物に導入することができる。細胞は、宿主生物に関して異種または自己であってもよい。例えば、細胞は宿主生物から得られ、

改善された LAMP 構築物がインビトロで細胞に導入され、その後宿主生物に再導入される。

【0236】

抗原提示細胞

本発明の好ましい態様では、本明細書に記載の改善された LAMP 構築物は、天然または操作された抗原提示細胞に導入される。

【0237】

本明細書で使用する「抗原提示細胞」(APC)という用語は、主要組織適合遺伝子複合体分子、好ましくはクラスII分子、またはその一部に関連してその表面に抗原を提示する任意の細胞を意図する。適切な APC の例は以下で詳細に説明し、マクロファージ、樹状細胞、B 細胞、ハイブリッド APC、および仮親抗原提示細胞などの細胞全体を含むが、これらに限定されない。ハイブリッド APC を作製する方法は記述されており、当技術分野で知られている。10

【0238】

樹状細胞 (DC) は、強力な抗原提示細胞である。DC は T 細胞の活性化と増殖に必要なすべてのシグナルを提供することが示されている。これらのシグナルは 2 つのタイプに分類できる。第 1 のタイプは免疫応答に特異性を与え、T 細胞受容体 / CD3 ('TCR / CD3') 複合体と APC 表面の主要組織適合遺伝子複合体 (前に定義した 'MHC') クラス I または II タンパク質によって提示される抗原ペプチドとの相互作用によって媒介される。この相互作用は、T 細胞の活性化が起こるために必要であるが、十分ではない。実際、第 2 のタイプのシグナルがなければ、第 1 のタイプのシグナルは T 細胞アネルギーを引き起こす可能性がある。第 2 のタイプのシグナルは共刺激シグナルと呼ばれ、抗原特異的でも MHC 拘束性でもないため、第 1 のタイプのシグナルの存在下で T 細胞の全増殖反応と T 細胞エフェクター機能の誘導をもたらすことができる。20

【0239】

いくつかの分子が共刺激活性を高めていることが示されている。これらの分子には、熱安定抗原 (HSA)、コンドロイチン硫酸修飾 MHC 不変鎖 (Ii-CS)、細胞内接着分子 I (ICAM-1)、および APC 表面の B7 共刺激分子ならびに T 細胞上のそのカウンター受容体 CD28 または CTLA-4 が含まれるが限定されない。

【0240】

他の重要な共刺激分子は CD40、CD54、CD80、CD86 である。本明細書で使用する「共刺激分子」という用語は、T 細胞の表面上の TCR により結合されるペプチド / MHC 複合体と一緒に作用すると、ペプチドに結合する T 細胞の活性化を達成する共刺激効果を提供する、任意の単一分子または分子の組み合わせを包含する。したがって、この用語は、B7、または APC 上の他の共刺激分子、その断片 (単独、別の分子と複合化した、または融合タンパク質の一部) を包含し、これらは、ペプチド / MHC 複合体と共に認識リガンドに結合し、T 細胞表面の TCR がペプチドに特異的に結合すると T 細胞の活性化をもたらす。共刺激分子は、例えば Beckman Coulter を含む様々な供給元から市販されている。30

【0241】

本発明の一態様では、Romaniら、J. Immunol. Methods 196 : 135 - 151、1996、および Benderら、J. Immunol. Methods 196 : 121 - 135、1996 に記載されている方法を使用して、ネズミ科動物、類人猿またはヒトなどの哺乳動物の末梢血单核細胞 (PBMC) から未成熟および成熟樹状細胞を生成する。簡単に言えば、単離された PBMC を前処理し、免疫磁気技術によって T 細胞および B 細胞を枯渇させる。次に、リンパ球が枯渇した PBMC を、ヒト血漿 (好ましくは自己血漿) および GM-CSF / IL-4 を補充した RPMI 培地 9 で培養して (例えば、約 7 日間)、樹状細胞を生成する。樹状細胞は、单球前駆細胞と比較すると非接着性である。したがって、およそ 7 日目に、非接着細胞をさらに処理するために収集する。40

【 0 2 4 2 】

G M - C S F および I L - 4 の存在下で P B M C に由来する樹状細胞は未成熟であり、サイトカイン刺激が培養物から除去されると、非接着性を失い、マクロファージ細胞の運命に戻る可能性がある。未成熟状態の樹状細胞は、M H C クラス I I 拘束性経路の天然タンパク質抗原のプロセシングに非常に効果的である (R o m a n i ら、J . E x p . M e d . 1 6 9 : 1 1 6 9 , 1 9 8 9)。培養樹状細胞のさらなる成熟は、必要な成熟因子を含むマクロファージ馴化培地 (C M) で 3 日間培養することにより達成される。成熟樹状細胞は、提示のために新しいタンパク質を捕捉する能力は低いが、休止 T 細胞 (C D 4 と C D 8 の両方) を刺激して成長および分化させることについてははるかに優れている。

【 0 2 4 3 】

成熟樹状細胞は、形態の変化 (より運動性の細胞質プロセスの形成など) によって、非接着性によって、C D 8 3 、 C D 6 8 、 H L A - D R または C D 8 6 のマーカーの少なくとも 1 つの存在によって、または C D 1 1 5 などの F c 受容体の喪失によって特定できる (S t e i n m a n 、 A n n u . R e v . I m m u n o l . 9 : 2 7 1 , 1 9 9 1 でレビュー)。成熟樹状細胞は、F A C S c a n やF A C S t a r などの典型的な細胞蛍光検査法および細胞選別技術およびデバイスを使用して収集および分析できる。フローサイトメトリーに使用される一次抗体は、成熟樹状細胞の細胞表面抗原に特異的なものであり、市販されている。二次抗体は、ビオチン化 I g 、続いて F I T C または P E 結合ストレプトアビジンであり得る。

【 0 2 4 4 】

あるいは、樹状細胞を上方制御 (活性化) し、単球を活性化された樹状細胞表現型に変換する方法が報告されている。この方法では、培養培地にカルシウムイオノフォアを追加して、単球を活性化された樹状細胞に変換する。例えば、培養期間 2 4 ~ 4 8 時間の開始時にカルシウム 2 1 イオノフォア A 2 3 1 8 7 を追加すると、「単球 + D C 」画分プールの均一な活性化と樹状細胞表現型変換が起こり、特徴的には、活性化された集団は均一に C D 1 4 (L e u M 3) 隆陰性になり、H L A - D R 、 H L A - D Q 、 I C A M - 1 、 1 3 7 . 1 、および 1 3 7 . 2 が上方制御された。さらに、この活性化されたバルク集団は、さらに精製されると少数ベースでも機能する。サイトカインの特定の組み合わせは、カルシウムイオノフォアで達成される活性化 / 変換を増幅 (または部分的に置換) するために成功裏に使用されており、これらのサイトカインは G - C S F 、 G M - C S F 、 I L - 2 、および I L - 4 を含むが、これらに限定されない。単独で投与した場合、各サイトカインは最適な上方制御には不十分である。

【 0 2 4 5 】

A P C を単離するための第 2 のアプローチは、血液中にすでに循環している比較的多数の事前にコミットした A P C を収集することである。コミットした A P C をヒト末梢血から単離するための以前の技術は、メトリザミド勾配と付着 / 非付着ステップ (F r e u d e n t h a l ら、P N A S 8 7 : 7 6 9 8 - 7 7 0 2 , 1 9 9 0) ; パーコール勾配分離 (M e h t a - D a m a n i ら、J . I m m u n o l . 1 5 3 : 9 9 6 - 1 0 0 3 , 1 9 9 4) ; および蛍光活性化細胞選別技術 (T h o m a s ら、J . I m m u n o l . 1 5 1 : 6 8 4 0 - 5 2 , 1 9 9 3) などの物理的手順の組み合わせを含んでいた。

【 0 2 4 6 】

プロフェッショナル抗原提示細胞 (またはその前駆体) を単離するための当技術分野で日常的な他の多くの方法があり、そのような方法および開発され得る他の方法は限定されず、本発明の範囲内に含まれる。

【 0 2 4 7 】

一実施形態では、A P C 、したがって 1 または複数の抗原を提示する細胞は自己由来である。別の実施形態では、抗原を提示する A P C は同種異系であり、すなわち異なる対象に由来する。

【 0 2 4 8 】

本明細書で論じるように、改善された L A M P 構築物は、上記の方法または当技術分野

10

20

30

40

50

で知られている他の方法（限定ではないがトランスフェクション、エレクトロポレーション、融合、マイクロインジェクション、ウイルスベースの送達、または細胞ベースの送達を含む）を使用してA P Cに導入することができる。Arthurら、Cancer Gene Therapy 4(1) : 17 - 25、1997には、ヒト樹状細胞における遺伝子導入法の比較が報告されている。

【0249】

コンセンサス配列を含むヒトMHC、アミノ酸およびヌクレオチド配列の遺伝子名称である既知の部分的および推定ヒト白血球抗原（HLA）は公開されており（例えば、Zemmouri and Parham, Immunogenetics 33 : 310 - 320、1991を参照）、HLA変異体を発現する細胞株は既知かつ一般に利用可能でもあり、多くはAmerican Type Culture Collection（「ATCC」）から入手できる。したがって、MHCクラスIIをコードするヌクレオチド配列は、PCRを使用して本発明の発現ベクターに容易に作動可能に連結され、その後、発現のために適切な細胞を形質転換するために使用される。

10

【0250】

マクロファージ、B細胞、単球、樹状細胞およびランゲルハンス細胞などのプロフェッショナルA P Cを使用できる。これらは、標準的な手順を使用して1)自己ドナー、2)治療対象の宿主と異なるHLA特異性を有する異種ドナー、または3)異なる種の異種ドナーからの血液または組織から収集される（Colliganら、Current Protocols in Immunology, section 3 and 14、1994）。細胞は、正常な宿主または感染症、癌、自己免疫疾患、またはアレルギーを有する患者から単離されてもよい。

20

【0251】

プロフェッショナルA P Cは、白血球除去および「FICOLL / HYPAQUE」密度勾配遠心分離（フィコールおよび不連続パーコール密度勾配による段階的遠心分離）を使用して、末梢血から取得できる。A P Cによって内在化され得る抗原へのA P Cの曝露を回避する手順を利用して、目的の抗原に特異的ではないT細胞の活性化をもたらす。

30

【0252】

本来は抗原提示ではない細胞は、適切な分子をコードする配列を導入することにより、抗原提示になるように操作することができる。例えば、MHCクラスII分子、アクセサリー分子、共刺激分子および抗原プロセシング補助分子をコードする核酸配列は、そのような遺伝子を含む細胞からのDNAの直接合成、クローニング、精製などの後に導入することができる。本明細書に記載の改善されたLAMP構築物および方法で使用される分子をコードする遺伝子を得るために1つの適切な手段は、選択されたオリゴヌクレオチドプライマー対を有する選択された核酸テンプレートのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅による。例えば、上皮細胞、内皮細胞、腫瘍細胞、線維芽細胞、活性化T細胞、好酸球、ケラチノサイト、アストロサイト、ミクログリア細胞、胸腺皮質上皮細胞、シュワン細胞、網膜色素上皮細胞、筋芽細胞、血管平滑筋細胞、軟骨細胞、腸細胞、甲状腺細胞および腎尿細管細胞を使用できる。これらは、宿主から最近外植された初代細胞で、確立された細胞株を形成するために細胞培養で広範囲に継代されていないか、確立された細胞株であるが比較的均質で何世代にもわたり無期限に増殖できる細胞株であり得る。

40

【0253】

プロフェッショナルA P Cではない細胞は、自己ドナー、異種（heterologous）ドナーまたは異種（xenogenic）ドナーの組織から単離され、単離は様々な既知の分離方法が使用して行われる（Darling, Animal Cells: Culture and Media. J. Wiley, New York, 1994; Freshney, Culture of Animal Cells. Alan R. Liss, Inc., New York, 1987）。非自己細胞、例えば異種（heterologous）または異種（xenogenic）細胞をエクスピボで操作して、既知のヒトHLA特異性に一致するHLAクラスIおよびクラスII分子を発現させること

50

ができる。次に、これらの細胞を、操作された細胞の HLA 特異性に一致するヒト対象に導入することができる。細胞を、本発明による 1 または複数の LAMP 構築物を発現するようにエクスピボでさらに操作する。

【0254】

操作した細胞は、標準的な細胞培養法によって細胞培養内で維持する (Darling, Animal Cells: Culture and Media". J. Wiley, New York, 1994; Freshney, Culture of Animal Cells". Alan R. Liss, Inc., New York, 1987)。本発明で使用するための細胞株は、様々な供給源から得るか(例えば、ATCC Catalogue of Cell Lines & Hybridomas, American Type Culture Collection, 第8版、1995)、または標準的な方法を用いて產生される(Freshney, Culture of Immortalized Cells, Wiley-Liss, New York, 1996)。非形質転換細胞株は、ヒト対象での使用に好ましい。10

【0255】

一態様では、GM-CSF の影響下で樹状細胞に分化する CD34+ 前駆体は、対象の身体から得られ、本発明による LAMP 構築物をコードする核酸が細胞に導入され、その後、その細胞が対象に注入される。本明細書に記載の改善された LAMP 構築物を利用すると、特定の抗原に由来するペプチドと形質導入された抗原提示細胞上の MHC クラス I 分子との結合が強化され、結果として有意により強力な全身性 T 細胞依存性免疫応答および / または抗体産生がもたらされる。この戦略でトランスフェクトされた抗原提示細胞は好ましくは自己細胞であるが、宿主内で抗原を効果的に提示する任意の MHC クラス I 細胞を上記のように使用してもよい。20

【0256】

ペプチドワクチン

改善された LAMP 構築物によってコードされるペプチドワクチンも本発明の範囲内である。好ましくは、抗原は区画 / オルガネラ (またはそれが送達される後続の区画 / オルガネラ) 内で処理され、免疫応答を調節することができる MHC クラス II 分子に結合したエピトープを生成する。

【0257】

改善された LAMP 構築物によりコードされるペプチドワクチンはまた、膜構造に結合されて、生物の身体への投与を促進することができる。例えば、改善された LAMP 構築物によりコードされたペプチドワクチンは、米国特許第 4,448,765 号に記載されているように、リポソームに組み込まれてもよい。30

【0258】

タンパク質またはポリペプチドを免疫原として使用する場合、本明細書に記載の改善された LAMP 構築物のいずれか 1 つまたは複数を組換え細胞で発現させることにより生成するか、化学合成により調製することができる。例えば、メリフィールド法 (Journal of American Chemical Society, vol. 85, pp. 2149 - 2154, 1968) を使用できる。40

【0259】

LAMP 構築物を使用して抗体を產生する方法

ポリヌクレオチドとしての改善された LAMP 構築物、改善された LAMP 構築物のコード化タンパク質、および / または細胞 (本明細書に記載の改善された LAMP 構築物を発現する抗原提示細胞など) は、例えば当技術分野で説明されている方法など、当業者に周知の方法により抗体を生成するために使用できる。例えば、前出の Sutcliffe ら ; 前出の Wilson ら ; Chow ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 910 - 914 (1985) ; および Bittle ら、J. Gen. Virol. 66 : 2347 - 2354 (1985) を参照。インビボ免疫化を使用する場合、改善された LAMP 構築物によってコードされたタンパク質および / または本明細書に記載

10

20

30

40

50

したような抗原を含む改善された LAMP 構築物を含むポリヌクレオチドで動物を免疫化してもよい。本発明の好ましい一実施形態は、ポリヌクレオチドとしての改善された LAMP 構築物でのプライミング、改善された LAMP 構築物のコード化タンパク質、および / または細胞（本明細書に記載の改善された LAMP 構築物を発現する抗原提示細胞など）に続く抗原でのブースティングである。さらなる好ましい実施形態では、特に抗体レパートリーの多様性および力価を考慮すると、本明細書に記載の改善された LAMP 構築物でのプライミングとそれに続く抗原でのブースティングが特に考えられ、さらに強い免疫応答を生み出すために使用できる。

【 0 2 6 0 】

抗原を含む改善された LAMP 構築物は、抗体を産生するために非ヒト脊椎動物に注入してもよい。非ヒト脊椎動物への LAMP 構築物の調製および注入は、当業者に周知の動物の免疫化の原理に従って達成され得る。

10

【 0 2 6 1 】

改善された LAMP 構築物を使用して抗原を効果的に提示することは、一態様では、エンドサイトーシス、およびエンドソームとリソソームとの融合後に抗原提示細胞で LAMP によって抗原を処理することを含む。次に、エンドソームは、クラス II MHC 分子を含むゴルジ体からのエキソサイトーシス小胞と結合し、結果として生じるペプチドがそれに結合する。次に、MHC - ペプチド複合体は原形質膜に輸送され、ここで抗原を CD_{4⁺}T 細胞への表示に利用できる。

【 0 2 6 2 】

ウサギ、ラット、マウス、ラマ、ラクダ、および / またはウシなどの動物は、抗原および / または抗原を含む改善された LAMP 構築物をコードするポリヌクレオチドを含む改善された LAMP 構築物で免疫化することができる。免疫化に適した追加の動物には、非ヒト哺乳動物、例えはげっ歯類（例えはモルモット、ハムスター、ラット、マウス）、ネズミ科動物（例えはマウス）、イヌ科動物（例えはイヌ）、ネコ科動物（例えはネコ）、ウマ科動物（例えはウマ）、靈長類、類人猿（例えはサルまたはエイプ）、サル（例えはマーモセット、ヒヒ、アカゲザル）、エイプ（例えはゴリラ、チンパンジー、オランウータン、テナガザル）が含まれる。

20

【 0 2 6 3 】

例えは、抗原または担体タンパク質およびフロイントアジュバントまたは免疫応答を刺激することが知られている任意の他のアジュバントを含む約 100 マイクログラムの改善された LAMP 構築物を含む乳濁液の腹腔内および / または皮内注射を使用してもよい。例えは E L I S A アッセイで、直接または間接的に（例えは、ビオチン化 A v i T a g を介して）固体表面に吸着した遊離抗原を使用して検出することができる抗抗原抗体の有用な力価を得るために、例えは約 2 週間の間隔で、何度かのブースター注射（組換え抗原タンパク質など）が必要になる場合がある。免疫動物の血清中の抗抗原抗体の力価は、抗抗体の選択によって、例えは、固体支持体上の抗原への吸着および当技術分野で周知の方法による選択された抗体の溶出によって増加し得る。

30

【 0 2 6 4 】

あるいは、抗原を含む改善された LAMP 構築物をコードするポリヌクレオチドを動物に直接導入することもできる。例えは、米国特許第 5,676,954 号；第 6,875,748 号；第 5,661,133 号；Sahin ら、Nat Rev Drug Discov、2014 Oct；13(10)：759-80；Kariiko ら、Mol Ther、2008 Nov；16(11)：1833-40；Kariiko ら、Nucleic Acid Res、2011、Nov；39(21)：e142；米国特許第 6,511,832 号を参照。一例では、抗原を含む改善された LAMP 構築物は、非ヒト脊椎動物に直接注射される。動物への注射は、筋肉内、皮内、鼻腔内、皮下、静脈内、気管内、およびくも膜下腔内の送達を介して行うことができる。組換え抗原による後続のブースティングも、抗体の生成に含めることができる。

40

【 0 2 6 5 】

50

さらに、開示の方法によって生成された抗体は、例えばファージディスプレイ、酵母ディスプレイまたはリボソームディスプレイなどのディスプレイ技術を使用して親和性成熟させることができる。一例では、ファージ粒子の表面に表示される単鎖抗体分子（「scFv」）をスクリーニングして、抗原および／または出発タンパク質に免疫特異的に結合するscFvを特定する。本発明は、抗原および／または出発タンパク質に免疫特異的に結合することが特定されたscFvおよびその部分の両方を包含する。そのようなscFvは、例えば、scFvのVHおよび／またはVLドメインをコードするヌクレオチド配列を、定常ドメイン配列を含む発現ベクターに挿入し、免疫グロブリン分子の発現を指示するように操作することにより、免疫グロブリン分子に日常的に「変換」することができる。

10

【0266】

抗原を含む改善されたLAMP構築物および／または本発明の抗原を含む改善されたLAMP構築物をコードするポリヌクレオチドを使用する、產生された抗体（scFv、および抗体断片またはその変異体を含むかそれらからなる他の分子を含む（例えば、本発明の抗体の重鎖または軽鎖、またはその一部、または本発明の単鎖抗体））の組換え発現には、抗体またはその断片または変異体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの構築が必要である。本発明の抗体分子（例えば、抗体全体、抗体の重鎖または軽鎖、またはその変異体または部分（重鎖または軽鎖可変ドメインを含むことが好ましいが必ずしもそうではない））をコードするポリヌクレオチドが得られた後、抗体分子を產生するためのベクターは、当技術分野で周知の技術を使用する組換えDNA技術により生成され得る。このように、ヌクレオチド配列をコードする抗体を含むポリヌクレオチドを発現させることにより抗体を調製する方法が本明細書に記載されている。当業者に周知の方法を使用して、抗体コード配列と適切な転写および翻訳制御シグナルとを含む発現ベクターを構築することができる。これら的方法には、例えば、インピトロ組換えDNA技術、合成技術、およびインビオ遺伝子組換えが含まれ、本明細書に記載されている。したがって、本発明は、プロモーターに作動可能に連結されている本明細書に記載されるように得られ単離された抗抗原抗体（例えば、抗体全体、抗体の重鎖または軽鎖、抗体の重鎖または軽鎖可変ドメイン、またはその一部、または重鎖もしくは軽鎖のCDR、単鎖Fv、またはその断片もしくは変異体）をコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターを提供する。そのようなベクターは、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含み（例えば、PCT公開WO 86/05807；PCT公開WO 89/01036；および米国特許第5,122,464号を参照）、抗体の可変ドメインは、重鎖全体、軽鎖全体、または重鎖および軽鎖両方の全体の発現のためにそのようなベクターにクローニングされる。

20

【0267】

発現ベクターは従来の技術によって宿主細胞に移入することができ、その後、トランスフェクトされた細胞は従来の技術によって培養されていずれかの抗抗原抗体を产生する。したがって、本発明は、異種プロモーターに機能的に連結された抗抗原抗体（例えば、抗体全体、その重鎖または軽鎖、またはその一部、または本発明の一本鎖抗体、またはその断片もしくは変異体）をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を含む。好ましい実施形態では、抗体分子全体の発現のために、以下に詳述するように、免疫グロブリン分子全体の発現のために、重鎖と軽鎖の両方をコードするベクターを宿主細胞で共発現させることができる。

30

【0268】

様々な宿主発現ベクター系を利用して、抗抗原抗体を発現させることができる。そのような宿主発現系には、目的のコード配列を产生することができ、かつその後精製することができる媒体が挙げられるが、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換またはトランスフェクトすると抗抗原抗体を発現する細胞も挙げられる。これらには、限定ではないが、組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、または配列を含むコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌（例えば、大腸菌、枯草菌）などの微生物；コード配

40

50

列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、サッカロミセス、ピキア属）；コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系；組換え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、C a M V；タバコモザイクウイルス、T M V）に感染しているか、またはコード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター（例えば、T i プラスミド）で形質転換された植物細胞系；または哺乳動物細胞のゲノム（例えば、メタロチオネインプロモーター）もしくは哺乳動物ウイルス（例えば、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）に由来するプロモーターを含む組換え発現構築物を有する哺乳動物細胞系（例えば、C O S、C H O、B H K、293、3 T 3細胞）が含まれる。好ましくは大腸菌などの細菌細胞、より好ましくは真核細胞が、抗抗原抗体の発現に使用される。例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（C H O）などの哺乳動物細胞は、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要な中間初期遺伝子プロモーター要素などのベクターと組み合わせると有効な発現システムである（F o e c k i n g ら、G e n e 45：101（1986）；C o c k e t t ら、B i o / T e c h n o l o g y 8：2（1990））。

【0269】

細菌系では、意図する用途に応じて多くの発現ベクターを有利に選択することができる。例えば、（抗体産生または改善されたL A M P構築物のコード化ポリペプチドのいずれかで）大量のタンパク質を生成する場合、容易に精製される高レベルの融合タンパク質生成物の発現を指示するベクターが望ましい場合がある。そのようなベクターには、限定ではないが、大腸菌発現ベクターp U R 278（R u t h e r ら、E M B O 1.2：1791（1983））、コード配列は、融合タンパク質が生成されるようにl a c Zコード領域を含むフレーム内のベクターに個別に連結される；p I Nベクター（I n o u y e & I n o u y e、N u c l e i c A c i d s R e s . 13：3101-3109（1985）；V a n H e e k e & S c h u s t e r、J . B i o l . C h e m . 24：5503-5509（1989））などが含まれる。p G E Xベクターは、外来ポリペプチドをグルタチオン5-トランスフェラーゼ（G S T）との融合タンパク質として発現させるためにも使用できる。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、マトリックスグルタチオンアガロースビーズへの吸着および結合とそれに続く遊離グルタチオンの存在下での溶出により、溶解細胞から容易に精製することができる。p G E Xベクターは、クローニングされた標的遺伝子産物がG S T部分から放出されるように、トロンビンまたはX a 因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計されている。

【0270】

昆虫系では、オウトグラファカリフォルニア（A u t o g r a p h a c a l i f o r n i c a）核多汗症ウイルス（A c N P V）をベクターとして使用して、抗抗原抗体または改善されたL A M P構築物のコード化ポリペプチドを発現させることができる。ウイルスはス Podoptera・フルギベルダ（S podoptera frugiperda）細胞で増殖する。コード配列は、ウイルスの非必須領域（例えば、ポリヘドリン遺伝子）に個別にクローニングし、A c N P Vプロモーター（例えば、ポリヘドリンプロモーター）の制御下に置く。

【0271】

哺乳動物宿主細胞では、多くのウイルスベースの発現系を利用して、抗抗原抗体または改善されたL A M P構築物のコード化ポリペプチドを発現させることができる。発現ベクターとしてアデノウイルスを使用する場合、目的のコード配列は、アデノウイルス転写/翻訳制御複合体、例えば、後期プロモーターおよび三者間リーダー配列に連結することができる。次に、このキメラ遺伝子を、インビトロまたはインビボ組換えによりアデノウイルスゲノムに挿入してもよい。

【0272】

ウイルスゲノムの非必須領域（例えば領域E 1またはE 3）に挿入すると、感染宿主で抗抗原抗体または改善されたL A M P構築物のコード化ポリペプチドを発現できる、生存能力のある組換えウイルスが得られる（例えば、L o g a n & S h e n k、P r o c . N

10

20

30

40

50

a t l . A c a d . S c i . U S A 8 1 : 3 5 5 - 3 5 9 (1 9 8 4) を参照)。

【 0 2 7 3 】

挿入されたコード配列の効率的な翻訳には、特定の開始シグナルも必要になる場合がある。これらのシグナルには、A T G 開始コドンと隣接配列が含まれる。さらに、開始コドンは、インサート全体の翻訳を確実にするために、所望のコード配列のリーディングフレームと同相でなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然および合成の両方の様々な起源のものであり得る。発現の効率は、適切な転写エンハンサー要素、転写ターミネーターなどを含めることにより高めることができる(例えばBittnerら、Methods in Enzymol. 153: 51-544 (1987) を参照)。

10

【 0 2 7 4 】

加えて、挿入された配列の発現を調節するか、または遺伝子産物を所望の特定の様式で修飾および処理する宿主細胞株を選択することができる。タンパク質産物のそのような修飾(例えば、グリコシル化)およびプロセシング(例えば、切断)は、タンパク質の機能にとって重要であり得る。様々な宿主細胞には、タンパク質および遺伝子産物の翻訳後プロセシングおよび修飾のための特徴的かつ特定のメカニズムがある。発現した外来タンパク質の正しい修飾とプロセシングを確実に行うために適切な細胞株または宿主系を選択することができ、このために、一次転写産物、グリコシル化、遺伝子産物のリン酸化の適切なプロセシングのための細胞機構を有する真核宿主細胞を使用してもよい。そのような哺乳動物宿主細胞には、限定ではないがCHO、VERY、BHK、HeLa、COS、NSO、MDCK、293、3T3、W138、および特に乳癌細胞株、例えばBT483、Hs578T、HTB2、BT20およびT47D、ならびに通常の乳腺細胞株、例えばCRL7030およびHs578Bstなどが含まれる。

20

【 0 2 7 5 】

組換えタンパク質の長期にわたる高収量の産生には、安定した発現が好ましい。例えば、抗抗原抗体の発現または改善されたLAMP構築物のコード化ポリペプチドを安定して発現する細胞株は、操作することができる。ウイルスの複製起点を含む発現ベクターを使用するのではなく、適切な発現制御要素(プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など)および選択可能なマーカーによって制御されるポリヌクレオチドで宿主細胞を形質転換することができる。外来ポリヌクレオチドの導入に続いて、操作された細胞を濃縮培地で1~2日間増殖させることができ、その後、選択培地に切り替える。組換えプラスミドの選択マーカーは、選択に対する耐性を付与し、細胞がプラスミドを染色体に安定して組み込み、増殖して病巣を形成することを可能にし、それをクローニングして細胞株内に拡大させることができる。この方法は、抗抗原抗体または改善されたLAMP構築物のコード化ポリペプチドを発現する細胞株を操作するために有利に使用され得る。

30

【 0 2 7 6 】

多くの選択系を使用することができ、限定ではないが単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wiglerら、Cell 11: 223 (1977))、ヒポキサンチングアミニホスホリボシリルトランスフェラーゼ(Szybalska & Szybalski、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 202 (1992))、およびアデニンホスホリボシリルトランスフェラーゼ(Lowyら、Cell 22: 817 (1980))遺伝子を含み、これらはそれぞれtk-、hprt-、またはprt-細胞で使用できる。また、代謝拮抗薬耐性は、以下の遺伝子、すなわち、メトトレキサートに対する耐性を付与するdhfr(Wiglerら、Natl. Acad. Sci. USA 77: 357 (1980); O'Hareら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527 (1981));

40

ミコフェノール酸に対する耐性を付与するgpt(Mulligan & Berg、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072 (1981));アミノグリコシドG-418に対する耐性を付与するneo(Goldspielら、Clini

50

cal Pharmacy、12:488-505(1993); Wu and Wu、Biotherapy 3:87-95(1991); Tolstoshev、Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596(1993); Mulligan、Science 260:926-932(1993); およびMorgan and Anderson、Ann. Rev. Biochem. 62:191-217(1993); TIB TECH 11(5):155-215(May; 1993)) ; およびハイグロマイシンに対する耐性を付与するhygro(Santerreら、Gene 30:147(1984))の選択の基礎として使用できる。組換えDNA技術の分野で一般的に知られている方法は、所望の組換えクローニングを選択するために日常的に適用することができ、そのような方法は、例えばAusubelら(編)、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、NY(1993); Kriegler、Gene Transfer and Expression、A Laboratory Manual、Stockton Press、NY(1990); Dracopoliら(編)、Current Protocols in Human Genetics、第12章および第13章、John Wiley & Sons、NY(1994); Colberre-Garapinら、J. Mol. Biol. 150:1(1981)に記載されている。
10

【0277】

抗抗原抗体または改善されたLAMP構築物のコード化ポリペプチドの発現レベルは、ベクター増幅によって増加させることができる(レビューについては、Bebbington and Hentschel、The Use of Vectors Based on Gene Amplification For The Cloned Genes In Mammalian Cells In DNA Cloning、Vol. 3(Academic Press、New York、1987)を参照)。抗抗原抗体または改善されたLAMP構築物のコード化ポリペプチドを発現するベクター系のマーカーが増幅可能である場合、宿主細胞培養に存在する阻害剤のレベルの増加はマーカー遺伝子のコピー数を増加させる。増幅された領域はコード配列に関連付けられているため、抗抗原抗体発現または改善されたLAMP構築物のコード化ポリペプチドの産生も増加する(Crouseら、Mol. Cell. Biol. 3:257(1983))。

【0278】

ベクター配列に含めることができる他の要素には、異種シグナルペプチド(分泌シグナル)、膜固定配列、インtron、代替スプライス部位、翻訳開始および停止シグナル、インテイン、ビオチン化部位、および翻訳後修飾を促進する他の部位、精製タグ、他のタンパク質またはペプチドへの融合をコードする配列、内部リボソーム再入部位により分離された別個のコード領域、例えば選択性(例えば、抗生物質耐性)または選別性(例えば、蛍光)、修飾ヌクレオチドを付与する「マーカー」タンパク質をコードする配列、およびこれらの例に限定されない他の既知のポリヌクレオチドシス作用特徴が含まれる。
30

【0279】

宿主細胞は、本発明の2つの発現ベクター、例えば、重鎖由来ポリペプチドをコードする第1のベクターおよび軽鎖由来ポリペプチドをコードする第2のベクターで同時にトランسفェクトされ得る。2つのベクターは、重鎖および軽鎖ポリペプチドの同等の発現を可能にする同一の選択可能マーカーを含んでもよい。あるいは、重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方をコードし、発現できる単一のベクターを使用してもよい。このような状況では、重鎖の前に軽鎖を配置して、毒性のない過剰な重鎖を避けることが好ましい(Proudfoot、Nature 322:52(1986); Kohler、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197(1980))。重鎖および軽鎖のコード配列は、cDNAまたはゲノムDNAまたは合成DNA配列を含んでもよい。

【0280】

抗抗原抗体または改善されたLAMP構築物のコード化ポリペプチドを組換え発現によって生成した後、タンパク質の精製のための当技術分野で公知の任意の方法、例えばクロ

マトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性（特にプロテインAの親和性と特定の抗原に対する免疫親和性による）、およびサイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度の違い、またはタンパク質精製のためのその他の標準技術によって精製してもよい。さらに、抗抗原抗体または改善されたLAMP構築物のコード化ポリペプチドを、本明細書に記載のまたは当技術分野で知られている異種ポリペプチド配列に融合して、精製を促進してもよい。

【0281】

一例では、抗抗原抗体または改善されたLAMP構築物のコード化ポリペプチドを、免疫グロブリンの定常ドメイン（IgA、IgE、IgG、IgM）またはその一部（CH1、CH2、CH3、またはこれらの任意の組み合わせまたはこれらの一部）、またはアルブミン（組換えヒトアルブミンまたはその断片または変異体を含むが、これらに限定されない）と融合して、キメラポリペプチドを得てもよい（例えば、1999年3月2日発行の米国特許第5,876,969号、欧州特許第0413622号、および1998年6月16日発行の米国特許第5,766,883を参照）。そのような融合タンパク質は、精製を促進し、インビオでの半減期を延長し得る。これは、ヒトCD4-ポリペプチドの最初の2つのドメインと哺乳動物免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の様々なドメインからなるキメラタンパク質で示されている。例えば、欧州特許第394,827号、Trauneckerら、Nature、331:84-86（1988）を参照。免疫系への上皮バリアを通過する抗原の増強された送達は、IgGまたはFc断片などのFcRn結合パートナーに結合した抗原（例えば、インスリン）について実証されている（例えば、PCT公報WO96/22024およびWO99/04813を参照）。IgG部分のジスルフィド結合によるジスルフィド結合二量体構造を有するIgG融合タンパク質は、単量体ポリペプチドまたはその断片単独よりも他の分子の結合および中和においてより効率的であることがわかっている。例えば、Fountoulakisら、J. Biochem. 270:3958-3964（1995）を参照。本明細書に記載の抗抗原抗体または改善されたLAMP構築物のコード化ポリペプチドをコードする核酸を、エピトープタグ（例えば、血球凝集素（「HA」）タグまたはフラグタグ）としての目的の遺伝子と組換えて、発現したポリペプチドの検出および精製を補助することもできる。例えば、Janknechtらによって説明されたシステムによりヒト細胞株で発現した非変性融合タンパク質の容易な精製が可能になる（Janknechtら、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-8977）。このシステムでは、遺伝子のオープンリーディングフレームが6つのヒスチジン残基からなるアミノ末端タグに翻訳融合されるように、目的の遺伝子をワクシニア組換えプラスミドにサブクローニングする。タグは、融合タンパク質のマトリックス結合ドメインとして機能する。組換えワクシニアウイルスに感染した細胞からの抽出物をNi²⁺ニトリロ酢酸-アガロースカラムにロードし、ヒスチジンタグ付きタンパク質をイミダゾール含有緩衝液で選択的に溶出することができる。

【0282】

投与

本発明によるワクチン材料は、本明細書に記載の免疫刺激性が改善されたLAMP構築物を含んでもよく、または組換え微生物、または免疫刺激性が改善されたLAMP構築物を発現する抗原提示細胞であってもよい。本発明によるワクチン材料を含む改善されたLAMP構築物の調製および個体の免疫化のためのそのような改善されたLAMP構築物の投与は、当業者に周知の免疫化の原理に従って達成される。

【0283】

本明細書に記載の改善されたLAMP構築物を発現するレプリコンを含む組換え細胞または形質転換細胞を培養することにより、これらの材料を大量に得ることができる。培養方法は、当業者に周知であり、上記で引用した1または複数の文書で教示されている。改善されたLAMP構築物ワクチンは一般に、組換え細胞または形質転換細胞の培養によって生成され、通常生理学的に適合性のある水溶液である薬理学的に許容される溶液または

10

20

30

40

50

懸濁液、または例えば参照により本明細書に組み込まれる米国特許第4,446,128号に記載されるようなコーティング錠、錠剤、カプセル、坐剤またはアンプルに製剤化される。投与は、経口、直腸、鼻腔内または注射による任意の適切な経路であり得、注射は、例えば経皮、皮下、筋肉内または静脈内であり得る。

【0284】

改善されたLAMP構築物は、哺乳動物に免疫応答を誘発するのに十分な量で哺乳動物に投与される。投与のための最小の好ましい量は、投与前に存在した濃度の少なくとも4倍の濃度まで抗体形成を誘発するのに必要な量である。投与の一般的な初期用量は、静脈内、筋肉内または皮下投与の場合 $10 \sim 5000$ マイクログラム、または組換えベクターの $10^5 \sim 10^{11}$ ブラーク形成単位であるが、この量はワクチンや免疫応答を誘発する他の薬剤の投与で一般的に行われるよう、投与を行う臨床医によって調整される場合がある。通常、免疫を誘発するには単回投与で十分であり得るが、反応を確実にしたりブースティングしたりするために、複数回投与を行う場合がある。

【0285】

改善されたLAMP構築物ワクチンは、最初に非ヒト哺乳動物（例えば、マウスまたは靈長類）で試験することがある。例えば、接種したマウスの免疫応答のアッセイを使用して、野生型抗原に対するよりも改善されたLAMP構築物に対するより強い抗体、T細胞増殖、および細胞傷害性T細胞応答を実証することができる。改善されたLAMP構築物をアカゲザルで評価して、マウスで非常に効果的なワクチン製剤が適切なサルの免疫応答を誘発するかどうかを判断できる。一態様において、各サルに、免疫化ごとに合計5mgのDNAを投与し、筋肉内送達し、2施設に分け、0日目および4、8、および20週目に免疫化し、追加の用量は任意とする。抗体反応、ADCC、CD4+およびCD8+T細胞サイトカイン産生、CD4+およびCD8+T細胞抗原特異的サイトカイン染色を測定して、ワクチンに対する免疫応答をモニターすることができる。

【0286】

本発明による製剤化および投与の適切な方法のさらなる説明は、米国特許第4,454,116号（構築物）、米国特許第4,681,762号（組換え細菌）、および米国特許第4,592,002号および第4,920,209号（組換えウイルス）に見出すことができる。

【0287】

癌免疫療法：予防と治療のための候補

表1に記載の少なくとも1つの癌抗原を含む本明細書に記載の改善されたLAMP構築物を使用して、癌および/または過剰増殖性障害を有する患者を治療することができる。例には、エピスタン - バーウイルス関連リンパ腫が記録されている患者、HPV関連子宮頸癌患者、慢性HCV患者、または癌遺伝子もしくは腫瘍抑制遺伝子に明確な再配列もしくは変異がある患者が含まれる。さらに好ましい実施形態は、CMV感染に起因する癌を含む過剰増殖性障害を有する患者を含む。

【0288】

好ましい実施形態では、本明細書に記載の改善されたLAMP構築物を使用して治療できる癌には、腺癌、肉腫、皮膚癌、黒色腫、膀胱癌、脳癌（多形性膠芽腫を含む）、乳癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、肺癌（NSCLC、SCLC、扁平上皮癌を含むがこれらに限定されない）、結腸直腸癌、肛門癌、直腸癌、子宮頸癌、肝臓癌、頭頸部癌、口腔癌、唾液腺癌、食道癌、肺臓癌、肺管腺癌（PDA）、腎癌、胃癌、腎臓癌、多発性骨髄腫または脳癌の過形成を含む進行のすべてのステージが含まれるが、これらに限定されない。

【0289】

改善されたLAMP構築物を含むワクチン組成物の場合など、改善されたLAMP構築物による治療は、癌が特定されると、個人の癌の経過中の任意の期間で利用できると想定される。リスクの高い患者では、その後の癌の発生を防ぐためのワクチン接種も可能である。タンパク質ベースのLAMP構築物ワクチンおよび細胞療法（例えば、LAMP構築物を含む樹状細胞療法）も想定される。

10

20

30

40

50

【0290】**治療の手順**

一実施形態では、改善されたLAMP構築物は、悪性腫瘍の経過中の任意の適切な時間に患者に注入され得る。例えば、表1に記載の少なくとも1つの癌抗原を含む改善されたLAMP構築物は、腫瘍負荷が低い段階で注入されるであろう。改善されたLAMP構築物が個体の抗原提示細胞（例えば、樹状細胞など）に導入される代替実施形態では、抗原提示細胞または成熟抗原提示細胞の前駆体は、個体の骨髄または末梢血から静脈穿刺によって採取される。これらの細胞は培養で確立され、続いて改善されたLAMP構築物で形質導入される。形質導入が行われた後、これらの抗原提示細胞は患者に注入される。

【0291】

10

特に好ましい実施形態では、本発明は、疾患の初期、新生物腫瘍の切除後、または腫瘍細胞の負荷が減少しているときなど、腫瘍負荷が低い癌患者の治療方法を提供する。この方法では、MHCクラスII分子を発現する抗原提示細胞に分化することができる自己幹細胞を含む細胞集団が患者から得られる。これらの細胞は、改善されたLAMP構築物を導入することにより培養および形質転換され、癌抗原を区画／オルガネラ内または抗原が送達される別の区画／オルガネラ内のMHCクラスII分子に結合して送達される。

【0292】

次に、トランスフェクトされた幹細胞集団を患者に再導入し、そこで幹細胞は抗原提示細胞に分化し、抗原からのThエピトープと複合体化したMHCクラスII分子を発現する。抗原に対する免疫応答は、ヘルパーT細胞集団の刺激を強化することにより強化される。

20

【0293】

より一般的には、一実施形態において、本発明は、抗原に対する哺乳動物の免疫応答を調節する（すなわち、そのような応答を刺激、増強、または低減する）ための改善されたLAMP構築物を含むワクチン組成物を提供する。

【0294】**キット**

本発明はさらに、本明細書に記載された方法の実施を促進するキットを含む。一態様では、キットは、本明細書に記載の改善されたLAMP構築物と、改善されたLAMP構築物を受け取るための細胞とを含む。キットは、細胞をプロフェッショナルAPC内に設計するための1または複数の核酸をさらに含み得る。ただし、一態様では細胞はプロフェッショナルAPCである。細胞は共刺激分子を発現してもしなくてもよい。好ましい態様では、細胞が共刺激分子を発現しない場合、改善されたLAMP構築物によりコードされる抗原は自己抗原である。別の態様では、異なるMHC分子（例えば、ヒトで発現されることが知られている）を発現する細胞のパネルが提供される。さらなる態様では、キットは、細胞（例えば、脂質ベースの製剤、ウイルスパッケージング材料、細胞など）への改善されたLAMP構築物の進入を促進する試薬を含む。なおさらなる態様では、改善されたLAMP構築物によってコードされる抗原に特異的な1つ以上のT細胞株が提供され、改善されたLAMP構築物が免疫応答を誘発、調節または増強する能力を検証する。

30

【0295】

40

実施例

ここで、以下の実施例を参照して本発明をさらに説明する。以下の実施例は単なる例に過ぎず、本発明の範囲内にある限り詳細を変更することができることを理解されたい。

【実施例1】**【0296】****LAMP構築物の構築**

図1に示す改善されたLAMP構築物は、当業者に周知の標準的な分子生物学技術を使用して構築することができる。例えば、ポリヌクレオチドを含むプラスミドは、図1に示すILC-1～ILC-6の異なる構造を生じるように設計できる。図1に示すLAMPドメインは、図3～図10に示すアミノ酸配列に由来することができる。好ましくは、L

50

LAMPドメインは、図3～図10に示すヒトLAMPタンパク質に由来する。各ドメインの境界は、図2Aおよび図2Bから導出できる。ヒト配列と比較した場合に同等のドメインを識別することにより、対応するドメインはオーソロガス配列からもクローニングできることが想定される。癌抗原は、表1に記載されているように、個別に、または組み合わせて、記載されているLAMP構築物にクローニングできる。

【実施例2】

【0297】

LAMP構築物に対するマウスの免疫応答評価

免疫応答を調節する能力について、実施例1に記載の改善されたLAMP構築物の能力を試験することができる。例えば、雌のBALB/cマウスを0、14、28日目にナノパスを使用して、PBS100ul中の改善されたLAMP構築物50ugおよびGMC-SF5ugの投与量で免疫化することができる。実験は、最後の投与の4週間後に終了する。

10

【0298】

脾細胞(3×105/ウェル)をT細胞培地(10%熱不活性化FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、1X2-MEを含むRPMI)の抗原タンパク質(10ug/ml)で刺激し、72時間後に上清を収集する。上清を希釈し(上清400ul+T細胞培地200ul)、サイトカインをELISAで評価する。IL-10またはIL-4の産生をELISPOTアッセイで測定できる。

20

【実施例3】

【0299】

LAMP構築物を使用した抗原提示の改善

サバイビンは、タンパク質のアポトーシス阻害剤(IAP)ファミリーの最小メンバーであり、アポトーシスの阻害と細胞周期の調節に関与する。これらの機能的属性により、サバイビンは、多様な機能、すなわち細胞増殖と細胞死の調節を示す独自のタンパク質になる。腫瘍におけるサバイビンの発現は、アポトーシスの阻害および細胞死の減少率と相關するだけでなく、化学療法への抵抗性および腫瘍の攻撃性とも相関する[1-6]。したがって、サバイビンは癌ワクチンおよび治療薬の重要な標的である[7-9]。サバイビンは、ヒトおよび胚性幹細胞と多くの体性幹細胞タイプの両方で顕著に発現されることもわかっており、幹細胞の発生と維持における未だ未解明の役割を示している。

30

【0300】

癌は、他の身体部分に侵入する可能性のある異常な細胞増殖が正常な恒常性を制御し、適時かつ適切に治療されなければ致命的になる異種の疾患群である。免疫療法は特に腫瘍細胞を標的とし、それにより非腫瘍細胞への付随的損傷を回避し、抗腫瘍応答を誘導する。この抗腫瘍応答は、外科的切除では不可能な場合がある体内の遠隔部位で腫瘍を根絶する可能性もある。腫瘍細胞は複数の回避戦略を使用し、免疫細胞による検出または排除を避けるため、抗腫瘍免疫応答の誘導または強化は、癌にとって手ごわい挑戦である。

【0301】

このプロジェクトの目的は、BALB/cマウスに皮内投与で注入されるすべての新世代のLAMP構築物のインビボ免疫応答を評価することである。具体的には、図1の凡例に定義されている試験構築物50μgで皮内注射によりマウスを免疫化した。この実験ではアジュバントは添加しなかった。各群6匹のマウスにワクチンを7日ごとに投与し、1か月に合計3回投与した。免疫応答は、最後の免疫化の14日後にモニターした。

40

【0302】

試験したLAMP構築物は、本明細書に記載したように生成し、試験した各構築物の配列は図19に示されている。サバイビンタンパク質は、My Biosource(カリフオルニア州サンディエゴ)から購入した。サバイビンペプチドはGenScript(ニュージャージー州ピスカタウェイ)から入手した。抗サバイビンおよびm-IgGk-BP-HRPはSanta Cruz Biotechnology(テキサス州ダラス)から購入し、マウスモノクローナル抗LAMP-1/CD107aはOrigene Te

50

ch n o l o g i e s (メリーランド州ロックビル) から購入した。IFN の E L I S P O T 抗体ペアは Bi o l e g e n d から入手した。蛍光結合 C D 3、C D 4、C D 8、C D 4 4、C D 6 2 L、IFN 、TNF 、グランザイム B、C D 6 9 モノクローナル抗体および Z o m b i e aqua f i x a b l e v i a b i l i t y k i t は Bi o L e g e n d (カリフォルニア州サンディエゴ) から購入した。ヤギ抗マウス Ig G 2 a - H R P およびヤギ抗マウス Ig G - H R P は、S ou t h e r n B i o t e c h n o l o g i e s (アラバマ州バーミンガム) から購入した。ストレプトアビシン - H R P は、T hermo F i s h e r (マサチューセッツ州ウォルサム) から購入した。S u r e B l u e T M B マイクロウェルペルオキシダーゼ基質および T M B 停止液は、K P L (メリーランド州ゲーサーズバーグ) から購入した。

10

【0303】

P h a r m a j e t で各構築物 5 0 μ g を 1 0 0 u l / マウス / 用量の総量で使用した。0、7、14 日目に皮内送達によりマウスをワクチンで免疫化した。28 日目に血清収集のためマウスから採血した。血清を採取し、- 3 0 で保存した。28 日目の実験終了時に脾臓を収集し、E L I S P O T および F A C S で処理して、サバイビン特異的 T 細胞応答を評価した。

【0304】

E L I S A による血漿サバイビン特異的総 Ig G の測定。サバイビンに対するマウス抗体反応は、間接 E L I S A によって評価した。E L I S A プレート (M a x i S o r p) を炭酸水素塩 - 重炭酸塩緩衝液中の 2 μ g / m l サバイビン (1 - 1 4 2) タンパク質で一晩コーティングし、その後、P B S 中の 2 % B S A でブロックした。血漿試料をプロッキング緩衝液で 1 : 1 0 0 に希釈した。試料をヤギ抗マウス Ig G - H R P (S ou t h e r n B i o t e c h 、アラバマ州バーミンガム) で検出した。反応は S u r e B l u e T M B S u b s t r a t e で発生させ、K P L (メリーランド州ゲーサーズバーグ) の T M B S t o p S o l u t i o n で停止させた。E p o c h E L I S A リーダー (B i o T e k 、バーモント州ウィヌースキー) を使用して、プレートを読み取った (O D 4 5 0)。

20

【0305】

抗原特異的 T 細胞応答の評価 ワクチン接種マウスの抗原特異的 T 細胞応答を評価するために、ワクチン接種マウスの脾細胞を、酵素結合免疫スポット (E L I S P O T) による抗原特異的 IFN 産生について評価した。E L I S P O T アッセイの場合、9 6 ウェルニトロセルロースプレート (M i l l i p o r e) を、P B S 中の 1 0 0 μ l / ウェルの捕捉モノクローナル抗体で 4 で一晩コーティングした。プレートを 2 0 0 μ l / ウェルの P B S で 3 回洗浄し、2 0 0 μ l / ウェルの T 細胞培地で室温で少なくとも 2 時間ブロックした。脾細胞を 3 × 1 0 ⁵ 細胞 / ウェルで播種し、3 × 1 0 ⁵ 細胞 / ウェル、総量 2 0 0 μ l / ウェルの T 細胞培地 (L - グルタミンおよび H E P E S 含有 R P M I - 1 6 4 0 (A T C C) 、1 % ペニシリン、1 % ストレプトマイシン、および 5 × 1 0 ^{- 5} M - M E) 中、サバイビンのペプチドプール 2 μ g / m l (表 2) またはコンカバリン A (0 . 1 2 5 μ g / m l) または培地のみを 5 % C O ₂ 、3 7 ° C で 4 8 時間共培養した。プレートを 2 0 0 μ l / ウェルの P B S で 2 回、2 0 0 μ l / ウェルの P B S - T (0 . 0 5 % T w e e n / P B S) で 2 回洗浄した。希釈した検出抗体 (P B S - T / 0 . 5 % B S A 中 5 0 μ l / ウェル) を添加し、室温で振とうしながらプレートを 2 時間インキュベートした。プレートを P B S で 4 回洗浄した。P B S で希釈したストレプトアビシン - アルカリホスファターゼ (5 0 μ l / ウェル) を添加し、2 時間インキュベートした。プレートを P B S で 4 回洗浄し、5 0 μ l / ウェルの 3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール (A E C 、B D B i o s c i e n c e) 基質で 1 0 分間発色させた。水道水の流水で洗浄することにより発色を停止させた。暗所で室温で 7 2 時間乾燥させた後、A I D E L I S P O T 高解像度リーダーシステムおよび A I D E L I S P O T ソフトウェアバージョン 3 . 5 (A u t o i m m u n D i a g n o s t i k a G m b H) を使用して、着色スポットをカウントした。

30

40

50

【0306】

表2 Genscriptから入手したペプチドプール

【0307】

【表2】

プールP1	Sur1-15、Sur11-25、Sur21-35、Sur31-45、sur41-55
プールP2	Sur51-65、sur61-75、sur71-85、sur81-95
プールP3	Sur91-105、sur101-115、sur111-125、sur121-135、sur131-142
プールP4	Sur31-45、sur41-55、sur51-65

10

【0308】

ウェスタンプロット リポフェクタミン2000試薬(Invitrogen)を使用して、試験した構築物を293T細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞をPBSで洗浄し、停止プロテイナーゼ阻害剤(Thermo Scientific、マサチューセッツ州ウォルサム)を含む200μlのRIPA溶解緩衝液に懸濁した。ライセートを遠心分離機にかけ(700gを4°Cで15分間)、続いてPierce BCAタンパク質アッセイキット(Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ州ウォルサム)を使用して、清澄化された上清のタンパク質濃度を測定した。10μgのタンパク質をプレキャスト(4-20%)SDS-PAGEゲル(BioRad、カリリフォルニア州ハーキュリーズ)で電気泳動し、ニトロセルロース膜(BioRad)に移入し、mAbでhLAMPに免疫プロットした。膜をDetection(商標)ブロック緩衝液(KPL)でブロックし、ウサギ抗ヒトLAMP(Sino Biological Inc.、中国、北京)または抗サバイビン抗体とヤギ抗ウサギHRP抗体でプローブし、TMB(KPL)で発色させた。

20

【0309】

フローサイトメトリー 最初に細胞をPBS中のZombie aqua fixable viability染料(1:500希釈)で標識し、続いて染色緩衝液中の表面抗体(1:100希釈)(PBS中4%FBS、2%ラット血清、2%マウス血清)で標識した。細胞内染色の場合、細胞をZombie aquaで染色した後、表面染色し、4%パラホルムアルデヒドで固定し、透過処理緩衝液(1%FCS、0.1%サポニンを含むPBS)中の細胞内抗体で染色した。試料をCytoflowフローサイトメーター(Beckman Coulter)で分析し、Kaluzaソフトウェア(Beckman Coulter)を使用して分析した。

30

【0310】

統計 統計的有意性を評価するために、GraphPad Prism 6.0ソフトウェアまたはRファイルを使用して、2因子ANOVA試験を実施した。各マウスのRPMI結果を抗原活性化の結果から差し引いた。

【0311】

ワクチンおよび免疫化 コントロール、サバイビン+完全なLAMP、サバイビン-I LC-1構築物、サバイビン-I LC-2、サバイビン-I LC-3、およびサバイビン-I LC-4構築物ワクチンを25μl/マウス/用量の総量で使用した。0、7、および14日目に皮内送達によりマウスをワクチンで免疫化した。13、28日目に血清採取のためマウスから採血した。血清を採取し、-30で保存した。28日目に脾臓を採取し、ELISPOT/ELISAアッセイ用に処理した。

40

【0312】

図14：プラスミドの検証：293T細胞にプラスミドを3日間トランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を溶解し、次にプレキャストSDS-PAGEゲルで電気泳動した。タンパク質をニトロセルロース膜に移入し、ヒトLAMP(Origene、

50

T A 3 3 7 1 0 8) またはサバイビン (S a n t a C r u z # 1 7 7 7 9) に対する m A b で免疫プロットした。 L A M P の分子量 = 1 0 0 K D 、サバイビン = 1 6 K D 。 図 1 3 は、試験したすべての L A M P 構築物が適切なサイズのタンパク質を產生したことを示す。

【 0 3 1 3 】

図 1 5 および図 1 6 : 試験した L A M P 構築物は、 I F N を產生する T h 1 エフェクター T 細胞を誘導する。雌の B A L B / c マウスを、 0 、 7 、および 1 4 日目に P h a r m a j e t デバイスを介して P B S 1 0 0 μ l 中の示された構築物 5 0 μ g の皮内投与で免疫化した。実験は、最後の投与の 1 4 日後に終了した。脾細胞 (3 \times 1 0 ⁵ / ウエル) を、 T 細胞培地 (1 0 % 熱不活性化 F B S 、 1 % ペニシリン / ストレプトマイシン、 1 X - M E を含む R P M I) のサバイビンペプチド (4 μ g / m l) で 4 8 時間刺激した。 A . スポットによる I F N の產生 B . すべてのペプチドペールによって誘導された I F N の產生 (A の棒グラフ) 。 n = 6 / 群。統計分析には、 2 因子 A N O V A (R ファイル) を使用した。図 1 4 は、 I F N 產生によって示されるように、試験したすべての L A M P 構築物が強い T 細胞応答を誘導したことを示す。

【 0 3 1 4 】

本発明者らは意外にも、改善された L A M P 構築物 3 回 (1 週間間隔) の後、試験した L A M P 構築物、特にヒンジ配列がサバイビン遺伝子で置き換えられた I L C - 4 によって、 T h 1 タイプの強い反応が誘発されることを見出した。さらに興味深いことに、改善された L A M P 構築物 I L C - 4 は、 N 末端から C 末端までのサバイビンエピトープを認識し、マウスと 1 0 0 % 同一のヒトサバイビンペプチド配列に対する T 細胞応答を誘導するように見える。また、サバイビンペプチドによる凍結融解脾細胞のより長い (7 2 時間) 刺激を見出し、 I L C - 4 は、第 1 世代の L A M P - サバイビンよりも有意に高い I F N 產生を示した (図 1 9 を参照) 。具体的には、図 1 6 は、試験したすべての改善された L A M P 構築物が I L C - 4 でより高い T 細胞応答を示し、この構築物はすべてのサバイビンペプチドペールに対して有意に高い T 細胞応答を誘発したため最高の活性を有することを示している。さらに、当技術分野で知られていることは反対に、管腔ドメインの 2 番目の相同ドメインの除去は、完全な L A M P 構築物と比較してより強い免疫応答を誘発する改善された L A M P 構築物を作り出した (I L C - 2 および I L C - 3 の結果を参考) 。凍結脾細胞 (4 \times 1 0 5 / ウエル) を、 T 細胞培地 (1 0 % 熱不活性化 F B S 、 1 % ペニシリン / ストレプトマイシン、 1 X - M E を含む R P M I) のペプチドペール 4 (4 μ g / m l) で 4 8 時間刺激した (n = 6 / 群) 。統計分析には 2 因子 A N O V A を使用した。 * p < 0 . 0 5 、 ** p < 0 . 0 1 、 *** p < 0 . 0 0 5 、 **** p < 0 . 0 0 0 1 。

【 0 3 1 5 】

図 1 7 : C D 4 T 細胞は I F N 產生細胞の主要な供給源である。雌の B A L B / c マウスを、 0 、 7 、および 1 4 日目に P h a r m a j e t デバイスを介して P B S 1 0 0 μ l 中の示されたワクチン 5 0 μ g の皮内投与で免疫化した。実験は、最後の投与の 1 4 日後に終了した。脾細胞 (1 \times 1 0 ⁶ / ウエル) を、 T 細胞培地 (1 0 % 熱不活性化 F B S 、 1 % ペニシリン / ストレプトマイシン、 1 X - M E を含む R P M I) のペプチドペール 1 (4 μ g / m l) で一晩刺激し、続いてモネシンおよびブレフェルディン A を添加し、さらに 5 時間培養した。細胞を採取し、 I T I 染色プロトコルに従って Z o m b i e 、表面マーカー、および細胞内染色で染色した。細胞は、記憶 C D 4 T 細胞 (C D 4 + C D 4 4 + C D 6 2 L -) または C D 8 T 細胞 (C D 8 + C D 4 4 + C D 6 2 L -) でゲート制御する。データは、各グループ 1 匹のマウスを代表する。様々な構築物を接種したワクチン接種マウスで C D 8 エフェクター記憶細胞が増加しているが、 C D 4 T 細胞集団では I F N の產生がより顕著である。

【 0 3 1 6 】

図 1 8 : 改善された L A M P 構築物は、 B A L B / c マウスでより強いサバイビン特異的総 I g G 応答を生じた。雌の B A L B / c マウスを、 0 、 7 、および 1 4 日目に P h a

10

20

30

40

50

r m a j e t デバイスを介して PBS 100 μl 中の示されたワクチン 50 μg の皮内投与で免疫化した。実験は、最後の投与の 14 日後に終了した。28 日目にマウスから採血した。血清を分離し、-30°で保存した。ELISA で血清中の総 IgG および IgG2a を測定した。簡単に説明すると、ELISA プレートを 2 μg/ml サバイビン (1 - 142aa) でコーティングし、PBS / 2% BSA でロックし、血清（ブロッキング緩衝液で 1:100 希釈）を HRP 標識ヤギ抗マウス IgG (1:6000) および IgG2a (1:11000) で評価した。n = マウス 6 匹 / 群。** p < 0.01, *** p < 0.005, **** p < 0.0001。重要なことに、また当技術分野で知られていることとは反対に、図 18 は、管腔ドメインの断片が完全な管腔ドメインを使用した場合よりもうまく機能したことを示す（すなわち、完全な LAMP 構築物を構築物 ILC-2 および IL-3 と比較する）。意外にも、管腔ドメインの 2 つの相同ドメイン間に抗原を挿入すると、最も強い抗体反応が生じた（ILC-4 を参照）。

【0317】

このセクションが依拠する参照

1. Kami K, Doi R, Koizumi M, Toyoda E, Mori T, Ito Dら. Survivin expression is a prognostic marker in pancreatic cancer patients. *Surgery*. 2004; 136(2): 443-8. doi: 10.1016/j.surg.2004.05.023. PubMed PMID: 15300213.
2. Zhang SQ, Qiang SY, Yang WB, Jiang JT, Jiz ZZ, [Expression of survivin in different stages of carcinogenesis and progression of breast cancer], *Ai Zheng*. 2004; 23(6): 697-700. PubMed PMID: 15191674.
3. Zhang X, Zhong L, Hu K, Li Q, [Expression of survivin and its correlation with apoptosis in non-small cell lung cancer], *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2004; 7(2): 138-41. doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2004.02.14. PubMed PMID: 21215009.
4. Kishi H, Igawa M, Kikuno N, Yoshino T, Uramaki S, Shiina H. Expression of the survivin gene in prostate cancer: correlation with clinicopathological characteristics, proliferative activity and apoptosis. *J Urol*. 2004; 171(5): 1855-60. doi: 10.1097/01.ju.0000120317.88372.03. PubMed PMID: 15076293.
5. Asanuma K, Tsuji N, Endoh T, Yagihashi A, Watanabe N. Survivin enhances Fas ligand expression via up-regulation of specificity protein 1-mediated gene transcription in colon cancer cells. *J Immunol*. 2004; 172(6): 3922-9. PubMed PMID: 15004200.
6. Miyachi K, Sasaki K, Onodera S, Taguchi T, Nagamachi M, Kaneko H, et al. Correlation between survivin mRNA expression and lymph node metastasis in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2003; 6(4): 217-24. doi: 10.1007/s10120-003-0255-2. PubMed PMID: 14716515.
7. Badana AK, Chintala M, Gavara MM, Naik S,

10

20

30

40

50

Kumari S, Kappala VRら、Lipid rafts disruption induces apoptosis by attenuating expression of LRP6 and survivin in triple negative breast cancer. *Biomed Pharmacother.* 2017; 97: 359 - 68. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.045. PubMed PMID: 29091885.

8. Cai JP、Wang YD、Zhang X、Xue HZ、[Expression of P16 and survivin in liver cancer and their clinical significance]、*Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2017; 25(10): 778 - 80. doi: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2017.10.013. PubMed PMID: 29108210。 10

9. Cho HJ、Kim HR、Park YS、Kim YH、Kim DK、Park SI、Prognostic value of survivin expression in stage III non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based therapy. *Surg Oncol.* 2015; 24(4): 329 - 34. doi: 10.1016/j.suronc.2015.09.001. PubMed PMID: 26690822。

10. Godinho RM、Matassoli FL、Lucas CG、Rigato PO、Goncalves JL、Sato MNら、Regulation of HIV-Gag expression and targeting to the endolysosomal/secretory pathway by the luminal domain of lysosomal-associated membrane protein (LAMP-1) enhance Gag-specific immune response. *PLoS One.* 2014; 9(6): e99887. doi: 10.1371/journal.pone.0099887. PubMed PMID: 24932692; PubMed Central PMCID: PMC4059647。 20

【実施例4】

【0318】

LAMP構築物の治療的処置

0日目に、雌のBALB/cマウスに同系の7000 4T1乳癌細胞を皮下接種することができる。腫瘍が触知可能になったら、ナノパスを使用して、PBS 100ul中のワクチン50ugおよびGM-CSF 5ugを皮内投与する。原発腫瘍をノギスで測定し、腫瘍体積を式 $p/6$ （長さ×幅） $3/2$ を使用して計算する。腫瘍接種後の日数の関数としての平均腫瘍体積を測定できる。Kaplan-Meierプロットを使用して、終了時点での全生存率を表示できる。

【実施例5】

【0319】

プライム/ブーストプロトコル

腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリーメンバー14(TNFRSF14)またはCD270としても知られるヘルペスウイルス侵入メディエーター(HVEM)は、TNF受容体スーパーファミリーのヒト細胞表面受容体である。近年、HVEMは、造血細胞、様々な実質細胞(乳癌、黒色腫、結腸直腸、卵巣癌細胞など)、および腸上皮に高度に発現していることが見出されている。HVEMは、BTLAまたはLIGHT(TNFSF14)への結合を介して、T細胞を阻害または刺激する双方向タンパク質である。

【0320】

本発明者らはHVEM-LAMPをコードするDNAワクチンを生成して、腫瘍治療用途でHVEMの阻害機能をブロックできる抗体を生成した。本発明者らは、LAMPがH 50

H V E M 特異的抗体の親和性を高める、および / または H V E M タンパク質の B 細胞エピトープのレパートリーを拡大することにより、抗体応答を促進するという仮説を立てた。この研究では、H V E M をコードするプラスミドの免疫原性を、L A M P (配列番号 1 5 8 および配列番号 1 5 9) の有無で比較した。H V E M - L A M P および H V E M および組換え H V E M タンパク質をコードするプラスミドは、本明細書に記載されるように設計した。

【 0 3 2 1 】

ヤギ抗マウス I g G - H R P は、S outhern Biotechnologies (アラバマ州バーミングガム) から購入した。S ureBlue T M B マイクロウェルペルオキシダーゼ基質および T M B 停止液は、K P L (メリーランド州ゲーサーズバーグ) から購入した。E LIS P O T プレートは、E MD Millipore (マサチューセツ州ビレリカ、カタログ番号 M A I P S 4 5 1 0) に注文した。E LIS P O T で使用したI FN - 抗体ペアはB i o L e g e n d (カリフォルニア州サンディエゴ) から購入し、クローンA N 1 8 およびR 4 6 A 2 はそれぞれコーティングおよび検出に使用した。ストレプトアビシン - H R P およびA E C 基質はB D B i o s c i e n c e s (カリフォルニア州サンホゼ) から購入した。

10

【 0 3 2 2 】

6 ~ 8 週齢の雌のBal b / c マウスをH arlan L aboratories (マサチューセツ州フレデリック) から購入し、I mmunomic T herapeutic s, I nc . (マサチューセツ州ロックビル) の動物施設で飼育した。0、7、および1 4 日目に、エレクトロポレーションによる筋肉内送達により 1 0 μ g / 用量のH V E M - L A M P 、H V E M 、またはL A M P ベクターコントロールでマウス (n = 6) を処置した。3 5 日目に、ミョウバンの存在下、5 μ g のH V E M タンパク質の腹腔内注射でマウスをブーストした。2 8 日目と4 9 日目に、マウスから採血し、抗体検出のために血清を単離した。5 6 日目にマウスを殺し、I FN - 産生についてE LIS P O T で脾細胞を試験した。

20

【 0 3 2 3 】

E LIS A 手順はS uら、J of I mmunol R es ; (1 0) : 1 - 1 5 (2 0 1 6) に従った。プレートを5 μ g / m l のH V E M タンパク質でコーティングした。データはM icrosoft E xcel およびP r i s m 6 ソフトウェアを使用して分析した。

30

【 0 3 2 4 】

この研究の主な目的は、H V E M - L A M P とH V E M の抗体プロファイルを比較することであった。2 8 日目に、H V E M - L A M P ワクチン接種マウスは、H V E M 群よりも有意に高いレベルのH V E M 特異的 I g G 抗体を産生した (図 1 1)。タンパク質ブースト後、H V E M 特異的抗体はH V E M 免疫マウスで約 1 0 0 0 倍増加し、平均力価は 1 0 0 から 1 0 8 0 0 0 に変化した。この結果は、H V E M D NA プラスミドによって免疫記憶が誘導されたことを示す。H V E M D NA 単独では最小限の抗体反応しか誘発しなかったが、タンパク質ブーストは免疫記憶を急速に呼び戻した。一方、H V E M - L A M P 群はH V E M 群およびL A M P 群よりも有意に高い力価を再び示し、平均力価はH V E M 群の 5 倍であり、L A M P が抗体応答を高める力を示している (図 1 2)。

40

【 0 3 2 5 】

さらに、H V E M + L A M P またはH V E M 単独免疫 / H V E M タンパク質ブーストマウスからの血清試料 (4 9 日目) をプールし、ペプチドマッピングについて試験した。1 2 個のペプチドが血清プールに結合していることがわかり (マウス I g G 反応) 、1 2 個のペプチドのうち 7 個が強い結合親和性を示した。H V E M + L A M P は、図 1 3 に示すように、H V E M 単独と比較して、ペプチド 1 7 、2 4 、2 5 、2 8 の結合親和性を変化させる。これらの変化は、腫瘍の成長を保護する生理学的効果をもたらす可能性がある。

【 0 3 2 6 】

結論として、この研究のデータは、2 つの構築物がインビボで発現され、L A M P が液

50

性免疫応答を大幅に改善したことを示唆する。

【実施例 6】

【0327】

ポリペプチドからの抗体産生

抗抗原抗体は、動物への注射を用いて抗体を産生する様々な標準的な方法で調製できる。 (Current Protocols, Chapter 2 を参照。) 例えば、本明細書に記載の癌抗原を含む改善された LAMP 構築物を発現する細胞を非ヒト脊椎動物に投与して、ポリクローナル抗体を含む血清の産生を誘導する。好ましい方法では、LAMP / 抗原タンパク質の調製物を調製および精製して、天然汚染物質を実質的に含まないよう 10 にする。次に、そのような調製物を非ヒト脊椎動物に導入して、より高い比活性のポリクローナル抗血清を産生する。

【0328】

最も好ましい方法では、本発明の抗抗原抗体はモノクローナル抗体（またはそのタンパク質結合断片）である。そのようなモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術を使用して調製することができる (Kohlerら、Nature 256 : 495 (1975) ; Kohlerら、Eur. J. Immunol. 6 : 511 (1976) ; Kohlerら、Eur. J. Immunol. 6 : 292 (1976) ; Hammerlingら、in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas、Elsevier、NY、pp. 563 - 681 (1981))。一般に、そのような手順は、抗原を含む改善された LAMP 構築物、抗原を含む改善された LAMP 構築物のコード化ポリペプチド、またはより好ましくは、改善された LAMP 構築物発現細胞と共に、非ヒト脊椎動物（好ましくはウサギ、マウス、ウシ、ラクダ、ラマ）を免 20 免疫化することを含む。そのような細胞は、任意の適切な組織培養培地で培養され得るが、好ましくは、10% ウシ胎児血清（約 56°C で不活性化）を追加し、約 10 g / l の非必須アミノ酸、約 1,000 U / ml のペニシリン、および約 100 ug / ml のストレプトマイシンを追加した Earle の改变イーグル培地で細胞を培養する。

【0329】

そのような非ヒト脊椎動物宿主（例えば、マウス）の脾細胞を抽出し、適切な骨髄腫細胞株と融合する。本発明に従って、任意の適切な骨髄腫細胞株を使用することができるが、好ましくは、ATCC（商標）から入手可能な親骨髄腫細胞株（SP20）を使用する。融合後、得られたハイブリドーマ細胞を HAT 培地で選択的に維持し、その後、Wandsら (Gastroenterology 80 : 225 - 232 (1981)) に記載されるように限界希釈によってクローニングする。次に、そのような選択により得られたハイブリドーマ細胞をアッセイして、抗原に結合できる抗体を分泌するクローンを特定する。 30

【0330】

Fab および Fab' 2 および抗抗原抗体の他の断片が、本明細書に開示される方法に従って使用され得ることが理解されるであろう。そのような断片は、典型的には、ペプシン（Fab 断片を生成する）またはペプシン（Fab' 2 断片を生成する）などの酵素を使用して、タンパク質分解開裂により生成される。あるいは、分泌されたタンパク質結合断片は、組換え DNA 技術の適用または合成化学により生成され得る。 40

【0331】

ヒトにおける抗体のインビオ使用のために、「ヒト化」キメラモノクローナル抗体を使用することが好ましい場合がある。そのような抗体は、上記のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞に由来する遺伝子構築物を使用して産生され得る。キメラ抗体を産生する方法は、当技術分野で知られている。（レビューについては、Morrison、Science 229 : 1202 (1985) ; Oiら、Biotechniques 4 : 214 (1986) ; Cabillyら、米国特許第 4,816,567 号；谷口ら、欧州特許第 171496 号；Morrisonら、欧州特許第 173494 号；Neubergerら、WO 8601533；Robinsonら、WO 8702671；Bo 50

uliianneら、Nature 312:643(1984)；Neubergersら、Nature 314:268(1985)を参照。)

【実施例7】

【0332】

ポリヌクレオチドの使用によるポリクローナルおよびモノクローナル抗体の生成

動物にポリヌクレオチドを直接注入する方法は、当技術分野で十分に説明されている。例えば、米国特許第5,676,954号；第6,875,748号；第5,661,133号を参照。例えば、抗原を含む改善されたLAMP構築物をコードするポリヌクレオチドを、拘束された覚醒マウス（雌の6-12週齢BALB/cまたはヌード、nu/nu、Harlan Sprague Dawley（インディアナ州インディアナポリス）から入手）の四頭筋に注射することができる。一実施形態では、50μl溶液中の50μgのポリヌクレオチドを、使い捨ての滅菌プラスチックインスリン注射器およびマイクロピペット先端部から切り取ったプラスチックカラーを備えた28G 1/2針（ニュージャージー州フランクリンレイクスのBecton-Dickinson、Cat. No. 329430）を使用して、Hartikka、Jら、Hum. Gene Ther. 7:1205-1217(1996)に記載されているようにマウスに注射することができる。

10

【0333】

または、6週齢の雌のSprague Dawleyマウス（体重20~25グラム）に、注射の24時間前から飲料水中5000ppmのZnOSO₄を与えることができる。この量の亜鉛は、メタロチオネインプロモーターを活性化できることが示されている。次に、各マウスに、リポソーム150μg（Lipofection TM）と複合体を形成した抗原を含む改善されたLAMP構築物をコードするポリヌクレオチド30μgを総量30μlで25ゲージ針を用いて尾静脈穿刺により静脈内注射する。動物の世話は研究を通して維持されるべきであり、「実験動物の使用と管理に関する指針（Guide for the Use and Care of Laboratory Animals）、Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, National Academy Pressに従って実施すべきである。

20

【0334】

抗原を含む改善されたLAMP構築物をコードするポリヌクレオチドが注入され動物の細胞に送達された後、抗原はエンドソーム/リソソームに送達され、処理され、免疫系に提示される。次に、抗原を含む改善されたLAMP構築物は、抗原に特異的な抗体の産生を刺激することができる。これらの抗体は、単離してポリクローナル混合物として使用することも、單一種またはモノクローナルにさらに単離することもできる。免疫応答のプロセスおよびインビボでの外来抗原に対する抗体の産生は、当技術分野で周知である。

30

【0335】

第3の動物モデルでは、Balb/c 3T3 A31細胞に、抗原を含む改善されたLAMP構築物をコードするポリヌクレオチドをエレクトロポレーションによりトランスフェクトする。抗原を含むLAMP構築物を発現するG418耐性クローンは、ヒトRBCに結合する能力により特定される。ポリクローナル抗体を生成するために、Balb/cマウスを14日間の間隔で2回腹腔内に免疫し、10⁷個の細胞が抗原を含む改善されたLAMP構築物を含むようにする。最後のブーストの後、免疫血清を収集し、IgGをプロテインGセファロースで精製し、臭化シアンで活性化したセファロースCL-4Bに精製抗原1.0mgをカップリングして調製した抗原カラムに通す。結合したIgGは、0.1Mグリシン緩衝液pH2.5で溶出し、0.1容量の0.1M Tris pH8.0で中和することができる。モノクローナル抗体(mAb)を生成するには、Balb/cマウスを抗原を含むLAMP構築物で免疫化し、標準的な方法に従ってSP2骨髄腫と免疫脾細胞を融合することによりハイブリドーマを生成する(28)。抗原と特異的に反応

40

50

する陽性ウェルは、当技術分野で説明されている酵素結合免疫吸着検定法によって特定できる。ハイブリドーマを限界希釈により3回クローニングして抗体を生成する。

【実施例8】

【0336】

抗原を含む改善されたLAMP構築物の免疫化

哺乳動物で抗体を產生する方法は、当技術分野で周知である。一例では、抗原を含むLAMP構築物に対するポリクローナル抗血清は、抗原を含む合計 $500\mu g$ の改善されたLAMP構築物で病原体を含まないウサギを免疫化することによって2か月間にわたって產生される。例えば、抗原を含む改善されたLAMP構築物をPBSに溶解し、等量のフロイントアジュvantで乳化することができる。最後のブースターの後、ウサギの血清を分離して、ポリクローナル抗血清の力値を決定することができる。

【0337】

追加の動物モデルでは、ミョウバンに乳化した抗原を含む内毒素を含まないLAMP構築物 $5\mu g$ で、各群5匹のマウス(C57BL/6J; Jackson Labs)を皮下免疫することができる。3週間後、マウスから採血し、ELISAで血清を滴定することによって抗原特異的抗体の存在を確認することができる(ウェル上に直接または間接的に(ビオチン化タグおよびストレプトアビジンを介して)コーティングした野生型BPTIまたはAPP-KIに血清中の抗体を直接結合させる)。

【0338】

モノクローナル抗体を得るには、4~6週齢のBalb/cマウスを、抗原を含む改善されたLAMP構築物で免疫することができる(例えば、 $10~100\mu g$ /注射を最初の注射ではフロイントの完全なアジュvantに溶解し、その後の免疫化ではフロイントの不完全なアジュvantに溶解し、2週間間隔で4回)。脾細胞を単離し、Sp2/0骨髄腫細胞などの融合細胞株と融合させた後、限界希釈を行う。成長中のクローンは、例えば酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を使用してスクリーニングする。96細胞プレートを、抗原またはコントロールタンパク質を含む改善されたLAMP構築物でコーティングする。培養上清を加えた後、洗浄し、検出用の標識抗マウス抗体を加える。限界希釈後、安定したハイブリドーマを產生する抗原抗体のクローニングが得られる。各細胞から上清を回収し、プロテインAセファロースカラムを使用したアフィニティーコロマトグラフィーによりモノクローナル抗体を精製できる。

【実施例9】

【0339】

IGFBP-2を使用したLAMP構築物

癌ワクチンの開発は40年以上にわたって追求してきた。しかし、様々な癌ワクチン製剤の多数の臨床研究にもかかわらず、治療用癌ワクチン接種の全体的な臨床的利益は約20%である^{1, 2, 3, 4, 5}。有効性を改善するための障害には、a)癌関連抗原である自己タンパク質の免疫原性の低さ、b)制御性T細胞の誘導⁶、およびc)ワクチン接種により得られる低い免疫応答が含まれる。最近の報告は、多くの腫瘍における臨床反応の改善と腫瘍微小環境におけるワクチン誘発性Th1免疫浸潤との相関を示唆している^{7, 8, 9, 10, 11}。

【0340】

インスリン様成長因子結合タンパク質2(IGFBP-2)は、多くのヒト腫瘍の進行中に上昇する自己タンパク質である。IGFBP-2の過剰発現は、予後不良の高悪性度神経膠腫と相關しており^{1, 2}、乳癌患者の悪性腫瘍の独立した指標である^{1, 3}。IGFBP-2は、肺癌患者の転移と生存率低下に関連している^{1, 4}。IGFBP-2の過剰発現は、副腎癌^{1, 5}、膀胱癌^{1, 6}、胃癌^{1, 7}、卵巣癌^{1, 8, 1, 9}、および前立腺癌^{2, 0, 2, 1}の進行疾患とも相關している。

【0341】

材料および方法

マウス 6~8週齢の雌のC57BL/6アルビノマウスをEnvigoから購入し、

10

20

30

40

50

Immunomic Therapeutics, Inc. (マサチューセッツ州ロックビル) の動物施設で飼育した。

【0342】

試薬および抗体 コントロールベクター対照、IGFBP2 (1 - 328) - LAMPなし、およびIGFBP2 (39 - 328) - ILC - 1構築物を、標準プロトコルを使用して本明細書に記載のように作製した。抗マウスウサギIGFBP2 PoAbはMy Biosource (カリフォルニア州サンディエゴ) から、ヤギ抗ウサギIgG - FITCはe - biosciences (カリフォルニア州サンディエゴ) から、ウサギ抗ヒトLAMPはSino Biological (中国、北京) から入手した。ヤギ抗ウサギHRP、ヤギ抗マウスIgG1 - HRPおよびヤギ抗マウスIgG2a - HRPは、Southern Biotechnologies (アラバマ州バーミンガム) から購入した。ストレプトアビジン - HRPは、Thermo Fisher (マサチューセッツ州ウォルサム) から購入した。SureBlue TMBマイクロウェルペルオキシダーゼ基質およびTMB停止液は、KPL (メリーランド州ゲーサーズバーグ) から購入した。IFN のELISPOT抗体ペアとIL - 10はBioLegendから入手した。サイトカインELISAキットはR & Dシステムから入手した。

10

【0343】

ワクチンおよび免疫化 コントロール、IGFBP2 (39 - 328) - ILC - 1構築物、およびIGFBP2 (1 - 328) - LAMPなしワクチンを20 μl / マウス / 用量の総量で使用した。0、7、および14日目にエレクトロポレーションを介した筋肉内送達によりマウスをワクチンで免疫化した。13、28日目に血清採取のためマウスから採血した。血清を採取し、-30 °Cで保存した。28日目に脾臓を採取し、ELISPOT / ELISAアッセイ用に処理した。

20

【0344】

ELISAによる血清IGFBP - 2特異的IgGの測定。IGFBP - 2に対するマウス抗体反応は、間接ELISAによって評価した。ELISAプレート (Maxisorp) を炭酸重炭酸塩緩衝液中の5 ug / mlのIGFBP2 (39 - 328) タンパク質で一晩コーティングし、次にPBS中の2% BSAでブロックした。血清試料をPBS - Tで希釈した (1 : 100、1 : 300、1 : 900、1 : 2700、1 : 8100、1 : 24300、1 : 72900、1 : 218700)。試料を1 : 6000 ヤギ抗マウスIgG - HRP (Southern Biotech、アラバマ州バーミンガム) で検出し、続いてストレプトアビジン - HRP (Thermo Fisher Scientific、イリノイ州ロックフォード) で検出した。反応はSureBlue TMB Substrateで発生させ、KPL (メリーランド州ゲーサーズバーグ) のTMB Stop Solutionで停止させた。Epoch ELISAリーダー (Bitek、バーモント州ウィヌースキー) を使用して、プレートを読み取った (OD 450)。平均バックグラウンド (PBSのみ) を計算し、平均バックグラウンド2*を超えるOD 450値を有する試料を陽性と見なした。そのような試料の希釈を終点力値として測定する。

30

【0345】

抗原特異的T細胞応答の評価 ワクチン接種マウスの抗原特異的T細胞応答を評価するために、ワクチン接種マウスの脾細胞の抗原特異的IFN およびIL - 10を酵素結合免疫スポット (ELISPOT) により評価した。

40

【0346】

脾細胞からRBCを除去し、平底96ウェルプレートで、200 μl / ウェルのT細胞培地 (L - グルタミンおよびHEPES含有 RPMI - 1640 (ATCC)、1%ペニシリノグリコシド、1%ストレプトマイシン、および 5×10^{-5} M 2-ME) 4×10^5 細胞 / ウェル、および10 μg / ml IGFBP2 (39 - 328) タンパク質またはコンカバリンA (0.25 μg / ml) または培地のみを37%、5% CO₂で72時間共培養した。プレートを1600 rpmで6分間遠心分離し、上清を収集して-30 °Cで保存した。

50

【0347】

E L I S P O T アッセイについては、本明細書に記載のとおりに実施した。簡単に説明すると、96ウェルニトロセルロースプレート (M i l l i p o r e) を30 u l の35%エタノールで1分間活性化し、P B Sで2回洗浄し、P B S中のキャプチャーモノクローナル抗体50 μ l / ウェルで4℃で一晩コーティングした。プレートを200 μ l / ウェルのP B Sで3回洗浄し、200 μ l / ウェルのT細胞培地で室温で少なくとも2時間ブロックした。脾細胞を4×10⁵細胞 / ウェルで播種し、総量200 μ l / ウェルのT細胞培地中、10 μ g / m l I G F B P 2 (39 - 328) タンパク質または10 u g / m l ペプチドプールまたはコンカバリンA (0.25 μ g / m l) または培地のみを5%CO₂、37℃で48時間共培養した。プレートを洗浄し、希釈した検出抗体 (50 μ l / ウェル) を加え、プレートをシェーカー上で室温で2時間インキュベートした。プレートをP B Sで4回洗浄した。P B Sで希釈したストレプトアビジン - H R P (50 μ l / ウェル) を添加し、1時間インキュベートした。プレートをP B Sで洗浄し、50 μ l / ウェルのA E C 発色液で最大30分間発色させた。水道水の流水で洗浄することにより発色を停止させた。暗所の室温で24~72時間乾燥させた後、A I D E L I S P O T 高解像度リーダーシステムおよびA I D E L I S P O Tソフトウェアバージョン3.5 (Autoimmun Diagnostika GmbH) を使用して、着色スポットをカウントした。

【0348】

細胞内サイトカインの評価 サイトカインの産生に関与する細胞を決定するために、細胞内染色を実施した。R B C を除去した脾臓細胞を冷蔵庫に24時間保管した。翌日、脾細胞を、平底96ウェルプレートで200 u l / ウェルのT細胞培地 (L - グルタミンおよびH E P E S 含有R P M I - 1 6 4 0 (ATCC)、1%ペニシリン、1%ストレプトマイシン、および5×10 - 5 M 2 - M E) 3×10⁶ 細胞 / ウェル、および20 u g / m l I G F B P 2 (39 - 328) タンパク質またはペプチドプールまたは培地のみを共培養した。1時間後にプラフェルジンAとモネンシン (X 1 0 0 0) の混合物を各ウェルに20 u l の容量で加えた (20 u l の容量に対して各ウェル0.22 u l、すべてのウェルについてストックを準備)。P M A / イオノマイシン活性化カクテルをB F A およびモネンシンと共に陽性対照ウェルに加えた (2つのウェルを設定し、1つはI g G コントロール用、もう1つはサイトカイン染色用であった)。細胞を5%CO₂、37℃で合計6時間インキュベートした。

【0349】

細胞を200 μ l のP B Sで洗浄した。細胞を50 u l の希釈したz o m b i e a q u a 色素 (z o m b i e aquaをP B Sで1:500希釈) で染色し、遮光し室温で20分間インキュベートした。細胞をP B S中の2%血清で1回洗浄した。20 u l の精製抗マウスC D 1 6 / 3 2 m A b (クローン2.4G2; 1 u g / 20 u l) を細胞に加え、細胞を4℃で10分間インキュベートした。細胞を遠心分離し (2 0 0 0 r p m、6分)、上清をデカントし、2%血清を添加したP B Sに細胞外抗体を加えた。抗体は各0.3 u l / ウェルであった。A b s を50 μ l / ウェルの量で加え、4℃で30分間インキュベートした (C D 3 クローン17A2はT細胞を活性化できるため、4℃の温度が重要である)。

【0350】

細胞をP B S + タンパク質 (2%F C S) で洗浄し、100 μ l のC y t o F i x / C y t o P e r m 溶液で4℃で30分間固定し、透過処理した (固定緩衝液を加えるときにマルチチャネルと完全に混合し、凝集体とダブルットの形成を減らした)。細胞を200 μ l のP e r m / W a s h 緩衝液 (1 X) で2回 (2 0 0 0 r p m、6分) 洗浄した。細胞をP e r m 緩衝液中0.5 μ l A b / ウェルの細胞内染色A bで染色した。P M A / イオノマイシンウェルの1つをアイソタイプコントロールで染色した。1時間 (または一晩) インキュベーション後、細胞をP e r m 緩衝液で2回洗浄し、フローサイトメーターで細胞を取得した。取得中のイベント / 秒は8 0 0 0 未満であった。試料あたり10⁶ 個

10

20

30

40

50

を超える細胞を取得した。取得したデータは、Kaluza分析ソフトウェアを使用して分析した。死細胞とダブレットはゲートアウトした。

【0351】

統計 統計分析は、Prism 6ソフトウェア(GraphPad Software、カリフォルニア州ラホーヤ)を使用して実行した。データは、1因子ANOVAの後、多重比較のためテューキー検定で分析した。0.05未満の値が統計的に有意な差を示すと見なした。

【0352】

結果図21：IGFBP2(39-328)-ILC-1構築物は、10ug IM/EP免疫化の用量で有意に高いIFN産生エフェクターT細胞を誘導した。ペプチドプール1は、IGFBP-2全長タンパク質と同様のIFN応答を誘導し、ペプチドプール1の優性エピトープを示している。脾細胞(4×10^5 /ウェル)を、T細胞培地(10%熱不活性化FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、および1X2-MEを含むRPMI)中のIGFBP-2タンパク質(10ug/ml)またはペプチドプール(10ug/ml)で48時間刺激した。ドットプロットの値は実験的なもので、各マウスの培地である。N=マウス7匹/群。図21A：IGFBP2全長(10ug/ml)でのリコールを示すドットプロットである。図21B：ペプチドプール1(10ug/ml)でのリコールを示すドットプロットである。*は $p < 0.05$ を示す。

10

【0353】

図22：IGFBP2(39-328)-ILC-1構築物は、10ug IM/EP免疫化の用量で、CD4+およびCD8+エフェクター記憶T細胞を産生するIFNおよび/またはTNFを誘導した。脾細胞(4×10^5 /ウェル)を、T細胞培地(10%熱不活性化FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、および1X2-MEを含むRPMI)中のIGFBP-2タンパク質(10ug/ml)またはペプチドプール1(5ug/ml)で6時間刺激した。細胞を、説明したように細胞内サイトカインについて染色し、以下に示すように分析した。各グループの代表的なデータを示す。

20

【0354】

図23：IM/EPによるIGFBP2(39-328)-ILC-1構築物で免疫化したC57BL/6アルビノマウスにおけるIGFBP-2特異的IgG産生。0、7、および14日目に、雌のC57BL/6アルビノマウスをPBS20μl中の示されたワクチン10ugでIM/EPで免疫化した。6、28日目にマウスから採血した。血清を分離し、-30で保存した。IgGは、血漿中のELISAによって測定した。簡単に説明すると、ELISAプレートを炭酸重炭酸塩緩衝液中の5μg/ml IGFBP-2(39-328)でコーティングし、2%BSAでブロックし、血清(PBS-Tで1:100希釈)をHRP標識ヤギ抗マウスIgGで評価した(1:6000)。平均バックグラウンド(PBSのみ)を計算し、平均バックグラウンド2*を超えるOD450値を有する試料を陽性と見なした。そのような試料の希釈を終点力値として測定する。

30

【0355】

この実施例が依拠する参照。

1. Melero, Iら、Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. Nat Rev Clin Oncol 11、509-524 (2014)。

40

2. Obeid, J.、Hu, Y. & Slingluff, C. L.、Jr. Vaccines, Adjuvants, and Dendritic Cell Activators - Current Status and Future Challenges. Semin Oncol 42、549-561 (2015)。

3. Pol, Jら、Trial Watch: Peptide-based anticancer vaccines. Oncoimmunology 4、e974411 (2015)。

4. Speiser, D. E. & Romero, P. Molecularly def

50

ined vaccines for cancer immunotherapy, and protective T cell immunity. *Semin Immunol* 22, 144 - 154 (2010).

5. Thomas, A. & Giaccone, G. Why has active immunotherapy not worked in lung cancer? *Ann Oncol* 26, 2213 - 2220 (2015).

6. Ebert, L. M., A cancer vaccine induces expansion of NY-ESO-1-specific regulatory T cells in patients with advanced melanoma. *PLoS One* 7, e48424 (2012). 10

7. Galon, J., Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960 - 1964 (2006).

8. Fridman, W. H., Pages, F., Sautes-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 12, 298 - 306 (2012).

9. Kenter, G. G., Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med* 361, 1838 - 1847 (2009). 20

10. Madan, R. A., Bilusic, M., Heery, C., Schlozman, J. & Gulley, J. L. Clinical evaluation of TRICOM vector therapeutic cancer vaccines. *Semin Oncol* 39, 296 - 304 (2012).

11. Disis, M. L., Concurrent trastuzumab and HER2/neu-specific vaccination in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 27, 4685 - 4692 (2009).

12. Moore, L. M., IGFBP2 is a candidate biomarker for Ink4a-Arf status and a therapeutic target for high-grade gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16675 - 16679 (2009). 30

13. Busund, L. T., Significant expression of IGFBP2 in breast cancer compared with benign lesions. *J Clin Pathol* 58, 361 - 366 (2005).

14. Hu, Q., Is insulin-like growth factor binding protein 2 associated with metastasis in lung cancer? *Clin Exp Metastasis* 31, 535 - 541 (2014). 40

15. Bouille, N., Logie, A., Gicquel, C., Perin, L. & Le Bouc, Y. Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 1713 - 1720 (1998).

16. Miyake, H., Hara, I., Yamanaka, K., Muramaki, M. & Eto, H. Prognostic significance of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 to IGF-binding protein-3 ratio in p 50

patients undergoing radical cystectomy for invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *BJU Int* 95, 987-991 (2005).

17. Shi, L. H., Zhu, X. Q., Zhao, G. H., Xia, Y. B. & Zhang, Y. S. Expression of insulin-like growth factor binding protein-2 in gastric carcinoma and its relationship with cell proliferation. *World J Gastroenterol* 12, 6285-6289 (2006).

18. Lee, E. J. et al. Insulin-like growth factor binding protein 2 promotes ovarian cancer cell invasion. *Mol Cancer* 4, 7 (2005). 10

19. Lukanova, A. et al. Risk of ovarian cancer in relation to prediagnostic levels of C-peptide, insulin-like growth factor binding proteins-1 and -2 (USA, Sweden, Italy). *Cancer Causes Control* 14, 285-292 (2003).

20. Degraff, D. J., Aguiar, A. A. & Sikkes, R. A. Disease evidence for IGFBP-2 as a key player in prostate cancer progression and development of osteosclerotic lesions. *Am J Transl Res* 1, 115-130 (2009). 20

21. Shariat, S. F. et al. Association of preoperative plasma levels of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding proteins-2 and -3 with prostate cancer invasion, progression, and metastasis. *J Clin Oncol* 20, 833-841 (2002).

【実施例 10】

【0356】

CMV pp65 および gB を含む LAMP 構築物

多形性膠芽腫 (GBM) 脳癌は、5年生存率が10%未満の攻撃的なヒト脳癌である (SchueSSLer Aら、2014)。現在の治療には腫瘍の外科的切除と放射線療法が含まれるが、治療の成功で延長される生存期間中央値は約15か月に過ぎない。現在、GBMについて免疫療法を含むいくつかの臨床試験が評価されている。興味深いことに、GBM腫瘍は抗原pp65を含むCMV抗原を発現することが最近発見された。CMVは発癌性ウイルスではないため、GBMでのCMVの役割は不明であるが、治療の観点から、CMV抗原の存在は、免疫ベースのGBM治療に既存の抗ウイルス免疫を活用する独自の機会を提供する。最近の報告では、独自のプロトコルでLAMP-pp65 mRNAをトランスフェクトしたDCを使用した自己免疫療法により、GBM患者の生存率が大幅に改善されることが示された。具体的には、フロリダ大学のDr. Duane A. Mritchellは、エクスピリオで自己DCを生成し、LAMP-pp65 mRNAでパルスし、GBM患者に注射して、GBM患者の生存率を大幅に改善したことを示した。pp65をトランスフェクトしたDCのプロトコルでは、DC注射の24時間前に破傷風/ジフテリアワクチンを注射して注射部位を事前調整する必要もあった (Mritchell DAら、2015)。

【0357】

ここでは、PharmaJetとID/EPを使用して、pp65+ILC-1 LAMP構築物とgB+ILC-1 LAMPワクチンを比較する。

【0358】

10

20

30

40

50

材料および方法

【0359】

試薬 プラスミド構築物コントロール、pp65+ILC-1 LAMP構築物、およびgB+ILC-1 LAMPは本明細書に記載するように構築した。ELISPOTのpp65およびgBペプチドはJPTから購入した（純度70%）。RBC溶解緩衝液はTonbo Bioから購入し、0.22 μmフィルターで濾過した。ConA (Sigma)を2.5 ug / mlで使用した。IFN ELISPOTの抗体は、e BioscienceまたはBiologendから購入した。IL-10 ELISPOT試薬、SA-ALPおよびBCIP/NBT plusはMabTechから購入した。Ab抗体価は、Southern BiotechのHRP抗マウス抗体を使用して評価した。CMVに感染した細胞のライセートはVirussysから購入した。ライセートは製造会社により非感染性であることが確認された。

【0360】

免疫化および血漿採取 6~8週齢の雄のBALB/CマウスをImmunomic Therapeutics, Inc.の動物施設で繁殖させ飼育した。0、7、および14日目に、ID (Pharmajet) またはエレクトロポレーションを介した皮内投与によりマウスをワクチンで免疫化した。26日目にマウスを殺した。

【0361】

ELISPOT。ELISPOTは、細胞数を除いて、本明細書に記載するように実行した：細胞はウェルあたり 2×10^5 個の脾細胞を播種した。殺したマウスの脾臓を培地で洗い流し、赤血球を溶解し、セルメーターを使用して細胞をカウントした。ELISPOTのウェルごとに 2×10^5 個の脾細胞を播種し、培地 (HEPES + 10% HI同量のFetal + NaP + ME + P/Sを含む RPMI)、PP65およびgBペプチド（各ペプチド1 μg / ml）またはConA (2.5 ug / ml) の複製でインキュベートした。結果は、各マウスの複製を平均化し、RPMIからの値を適切に減らした後に表示されている。

【0362】

抗体価 CMVに感染した細胞のライセートを使用して抗体価を評価した。総 IgG および IgG2a を評価した。結果は総 IgG についてのみ計算し、1:100 OD の結果のみを比較した。

【0363】

結果 図24は、IFN が pp65 および gB ペプチドの両方で誘導されたことを示す。さらに、最後の採血から血清 Ab を試験した。CMV トランスフェクト細胞のライセートを使用した場合、両方の免疫化で同様の IgG 力価が見られる。具体的には、図25は、CMV トランスフェクト細胞ライセートに対する免疫マウスの血清中の総 IgG (左) および IgG2a (右) 抗体の力価を示す。統計分析は、Mann Whitney の検定を使用して、GraphPad ブリズムで行った。IgG2a CMV ライセート Ag - P = 0.041

【実施例11】

【0364】

PSMAを含むLAMP構築物

前立腺癌は、男性で最も頻繁に診断される癌であり、米国では男性の癌による死亡の2番目に多い原因である¹。局在性疾患の場合、手術と放射線療法は治癒的な治療法であり続けるが、尿路症状や性機能障害などの悪影響があり、生活の質に悪影響を及ぼす可能性がある。転移性疾患の場合、初期治療としての化学療法は現在、アンドロゲン除去療法単独 (ADT)²と比較して生存期間を延長するように見える。ADTは、a) 骨ミネラル密度の減少と骨粗鬆症による脆弱性骨折のリスク増加、b) 去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) の発生に関連する。免疫系を利用して前立腺癌細胞を認識し殺す方法が開発されている。そのような試みの1つは、無症候性または最小症候性の転移性CRPC (mCRPC)³の治療のために前立腺酸性ホスファターゼ (PAP) を標的とする FDA 承認の自己

10

20

30

40

50

細胞免疫療法である S i p u l e u c e l - T につながっている。前立腺癌に対するさらなる免疫療法は、多くのワクチン候補、および標的モノクローナル抗体を使用するアプローチを含めて開発中である^{4, 5}。

【0365】

T 細胞または抗体ベースの免疫療法の有望な標的を表すいくつかの腫瘍関連抗原 (T A A) が特定されている。正常および悪性の前立腺組織で優先的に発現される分子群は、前立腺特異的膜抗原 (P S M A) 、 P R O S T E I N 、前立腺特異的抗原 (P S A) 、前立腺酸性ホスファターゼ (P A P) 、前立腺幹細胞抗原 (P S C A) 、 T 細胞受容体 代替リーディングフレームタンパク質 (T A R P) 、一過性受容体電位 (t r p) - p 8 および前立腺 1 の 6 回膜貫通上皮抗原 (S T E A P 1) を含む。

10

【0366】

葉酸ヒドロラーゼ I (F O L H 1) としても知られるヒト前立腺特異的膜抗原 (P S M A) は、750 アミノ酸の I I 型膜糖タンパク質であり、主に正常なヒト前立腺上皮で発現し、転移性疾患を含む前立腺癌で上方制御される。P S M A のマウス相同体 (F o l h 1) は、マウスの前立腺では発現しないが、主に脳と腎臓で発現する。マウス F o l h 1 は、ヒト P S M A のアミノ酸配列と 86 % の同一性と 91 % の類似性を有する 752 アミノ酸のタンパク質をコードする⁶。P S M A は、前立腺細胞で他の組織の細胞よりもはるかに多く発現するため、前立腺の重要な臨床バイオマーカーと考えられている^{7, 8, 9}。P S M A 発現の増加と前立腺癌の進行との間に強い相関関係が示されている¹⁰。P S M A 発現の上昇は、腎臓癌および膀胱癌を含む他の悪性腫瘍とも関連している¹¹。P S M A 発現の上昇は腫瘍の新生血管で観察されているが、正常な血管では観察されず血管新生における P S M A の役割を示唆している¹²。膜タンパク質である P M S A は、診断および治療目的でそれに対する抗体を開発するための魅力的な標的である¹³。いくつかの治療用抗 P S M A m A b が開発されており、これらの多くは細胞傷害性放射性ヌクレオチド、特に P S M A 発現細胞を標的とする放射免疫療法に使用されている¹⁴。いくつかの抗 P S M A m A b s は、前立腺癌細胞を殺す抗体依存性細胞傷害 (A D C C) 効果を促進することにより、治療効果を媒介することが実証されている^{4, 14, 15}

20

【0367】

材料および方法

【0368】

マウス 6 ~ 8 週齢の雌の C 5 7 B L / 6 アルビノマウスを E n v i g o から購入し、I mm u n o m i c T h e r a p e u t i c s , I n c . (マサチューセッツ州ロックビル) の動物施設で飼育した。

30

【0369】

試薬および抗体 コントロールおよび P S M A - I L C - 1 L A M P 構築物は、本明細書に記載するように作製した。ヒト P S M A P e p M i x (185 ペプチド、11aa オーバーラップを有する 15 マー) は J P T (マサチューセッツ州アクトン) から入手した。マウス抗ヒト P S M A A l e x a F l o u r 488 、ヤギ (F a b) 2 抗マウス I g G - F c P E は a b c a m (マサチューセッツ州ケンブリッジ) から、ウサギ抗ヒト L A M P は S i n o B i o l o g i c a l (中国、北京) から入手した。ヤギ抗ウサギ H R P 、ヤギ抗マウス I g G 1 - H R P およびヤギ抗マウス I g G 2 a - H R P は、S ou t h e r n B i o t e c h n o l o g i e s (アラバマ州バーミンガム) から購入した。ストレプトアビシン - H R P は、T h e r m o F i s h e r (マサチューセッツ州ウォルサム) から購入した。S u r e B l u e T M B マイクロウェルペルオキシダーゼ基質および T M B 停止液は、K P L (メリーランド州ゲーサーズバーグ) から購入した。I F N g の E L I S P O T 抗体ペアは B i o L e g e n d から入手した。

40

【0370】

ワクチンおよび免疫化 コントロールベクターである P S M A - I L C - 1 L A M P 構築物は、20 μl / マウス / 用量の総量で使用した。0 日目および 21 日目にエレクトロポレーションを介した皮内投与によりマウスをワクチンで免疫化した。血清を採取し、-

50

30°Cで保存した。34日目にELISPOT/ELISAアッセイのために脾臓を採取した。

【0371】

抗原特異的T細胞応答の評価 ワクチン接種マウスの抗原特異的T細胞応答を評価するために、ワクチン接種マウスの脾細胞を酵素結合免疫スポット(ELISPOT)により抗原特異的IFNおよびIL-10について評価した。脾細胞からRBCを除去し、平底96ウェルプレートで200μl/ウェルのT細胞培地(L-グルタミンおよびHEPES含有RPMI-1640(ATCC)、1%ペニシリン、1%ストレプトマイシン、および5×10-5M 2-ME)4×10⁵細胞/ウェル、および10μg/ml IgFBP2(39-328)タンパク質またはコンカバリンA(0.25μg/ml)、または培地のみを37°C%、5%CO₂で72時間共培養した。プレートを1600 rpmで6分間遠心分離し、上清を収集して-30°Cで保存した。
10

【0372】

ELISPOTアッセイについては、本明細書に記載のとおりに実施した。簡単に説明すると、96ウェルニトロセルロースプレート(Millipore)を30ulの35%エタノールで1分間活性化し、PBSで2回洗浄し、PBS中のキャプチャーモノクローナル抗体50μl/ウェルで4°Cで一晩コーティングした。プレートを200μl/ウェルのPBSで3回洗浄し、200μl/ウェルのT細胞培地で室温で少なくとも2時間ブロックした。脾細胞を3×10⁵細胞/ウェルで播種し、総量200μl/ウェルのT細胞培地中、PSMA用の10、5、2、1、0.1、0.01μg/ml PSMA JPTペプチド混合物またはコンカバリンA(0.25μg/ml)または培地単独で5%CO₂、37°Cで48時間共培養した。プレートを洗浄し、希釈した検出抗体(50μl/ウェル)を加え、プレートをシェーカー上で室温で2時間インキュベートした。プレートをPBSで4回洗浄した。PBSで希釈したストレプトアビジン-HRP(50μl/ウェル)を添加し、1時間インキュベートした。プレートをPBSで洗浄し、50μl/ウェルのAEC発色液で最大30分間発色させた。水道水の流水で洗浄することにより発色を停止させた。暗所の室温で24~72時間乾燥させた後、AID ELISPOT高解像度リーダーシステムおよびAID ELISPOTソフトウェアバージョン3.5(Autoimmun Diagnostika GmbH)を使用して、着色スポットをカウントした。
20
30

【0373】

ELISAによる血清PSMA特異的IgG/IgG2aおよびProtein特異的IgG/IgG2aの測定。PSMAに対するマウス抗体応答を間接ELISAによって評価した。ELISAプレート(MaxiSorp)を炭酸重炭酸塩緩衝液中の5ug/mlのPSMAタンパク質で一晩コーティングし、次にPBS中の2%BSAでブロックした。血清試料をPBS-Tで希釈した(1:100、1:300、1:900、1:2700、1:8100、1:24300、1:72900、1:218700)。試料を1:6000ヤギ抗マウスIgG-HRPまたは1:11000ヤギ抗マウスIgG2a-HRP(Southern Biotech、アラバマ州バーミンガム)で検出し、続いてストレプトアビジン-HRP(Thermo Fisher Scientific、イリノイ州ロックフォード)で検出した。反応はSureBlue TMB Substrateで発生させ、KPL(メリーランド州ゲーサーズバーグ)のTMB Stop Solutionで停止させた。Epoch ELISAリーダー(BioTek、バーモント州ウィヌースキー)を使用して、プレートを読み取った(OD450)。平均バックグラウンド(PBSのみ)を計算し、平均バックグラウンド2*を超えるOD450値を有する試料を陽性と見なした。そのような試料の希釈を終点力値として測定する。
40

【0374】

細胞内サイトカインの評価 サイトカインの産生に関与する細胞を決定するために、細胞内染色を実施した。RBCを除去した脾臓細胞を冷蔵庫に24時間保管した。翌日、脾細胞を平底96ウェルプレートで、200ul/ウェルのT細胞培地(L-グルタミンお

10

20

30

40

50

およびHEPES含有RPMI-1640(ATCC)、1%ペニシリン、1%ストレプトマイシン、および5×10-5M 2-ME)3×10⁶細胞/ウェル、および2ug/ml PSMA(JPTペプチドミックス)、または培地のみを共培養した。1時間後にプラフェルジンAとモネンシン(X1000)の混合物を各ウェルに20ulの容量で加えた(20ulの容量に対して各ウェル0.22ul、すべてのウェルについてストックを準備)。PMA/イオノマイシン活性化カクテルをBFAおよびモネンシンと共に陽性対照ウェルに加えた(2つのウェルを設定し、1つはIGGコントロール用、もう1つはサイトカイン染色用であった)。細胞を5%CO₂で37°Cで合計6時間インキュベートした。

【0375】

Live/Dead染色(このステップではタンパク質なし)：細胞を200μlのPBSで洗浄した(この洗浄にはタンパク質なし)。細胞を50ulの希釈したzombie aqua染料(zombie aquaをPBSで1:500希釈)で染色し、遮光し室温で20分間インキュベートした(このステップではタンパク質なし)。細胞をPBS中の2%血清で1回洗浄した。

【0376】

Fcブロック：20ulの精製抗マウスCD16/32mAb(クローン2.4G2; 1ug/20ul)を細胞に加え、細胞を4°Cで10分間インキュベートした。

【0377】

表面染色：細胞を遠心分離し(2000rpm、6分)、上清をデカントし、2%血清を添加したPBSに細胞外抗体を加えた。抗体は各0.3ul/ウェルであった。Absを50μl/ウェルの量で加え、4°Cで30分間インキュベートした(CD3クローン17A2はT細胞を活性化できるため、4°Cの温度が重要である)。

【0378】

固定および透過処理：細胞をPBS+タンパク質(2%FCS)で洗浄し、100μlのCytoFix/Cytoperm溶液で4°Cで30分間固定および透過処理した(固定緩衝液を加えるときにマルチチャネルと完全に混合し、凝集体とダブルットの形成を減らした)。細胞を200μlのPerm/Wash緩衝液(1X)で2回洗浄した(2000rpm、6分)。

【0379】

細胞内染色：細胞をPerm緩衝液中0.5μl Ab/ウェルの細胞内染色Abで染色した。PMA/イオノマイシンウェルの1つをアイソタイプコントロールで染色した。1時間(または一晩)インキュベーション後、細胞をPerm緩衝液で2回洗浄し、フローサイトメーターで細胞を取得した。取得中のイベント/秒は8000未満であった。試料あたり10⁶個を超える細胞を取得した。

【0380】

取得したデータは、Kalluza分析ソフトウェアを使用して分析した。死細胞とダブルットはゲートアウトした。

【0381】

統計 統計分析は、Prism 6ソフトウェア(GraphPad Software、カリフォルニア州ラホーヤ)を使用して実行した。データは、1因子ANOVAの後、多重比較のためチューキー検定で分析した。0.05未満の値が統計的に有意な差を示すと見なした。

【0382】

図26は、PSMA-ILC-1 LAMP構築物が、20μg ID/EP免疫化の用量で有意に高いIFN産生エフェクターT細胞を誘導したことを示す。脾細胞(3×10⁵/ウェル)を、T細胞培地(10%熱不活性化FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、および1X2-MEを含むRPMI)中のJPT製PSMAペプチドミックス(2、1、0.1、0.01、0.001ug/ml)で48時間刺激した。ドットプロットの値は実験的なもので、各マウスの培地である。N=マウス7匹/群。ドットプロッ

10

20

30

40

50

トはPSMAでのリコールを示す。

【0383】

図27は、PSMA-ILC-1 LAMP構築物が、20ug ID/EPI免疫化の用量でCD4+およびCD8+エフェクター記憶T細胞を産生するIFN γ を誘導したことを示す。脾細胞(3×10⁵/ウェル)を、T細胞培地(10%熱不活性化FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、および1X2-MEを含む RPMI)中のPSMAペプチド(JPT、2ug/ml)で6時間刺激した。細胞を、説明したように細胞内サイトカインについて染色し、以下に示すように分析した。個々のマウスからのデータを示す。

【0384】

図28は、ID/EPIを介した免疫化によりPSMA-ILC-1 LAMP構築物で免疫したC57BL/6マウスの総IgGおよびIgG2A産生を示す。IgGは、血漿中のELISAによって測定した。簡単に説明すると、ELISAプレートを炭酸重炭酸塩緩衝液中の5 μ g/mlのPSMAでコーティングし、2%BSAでブロックし、HRP結合ヤギ抗マウスIgG(1:6000)で血清(PBS-Tで1:100希釈)を評価した。

10

【0385】

本明細書に記載されているものの変形、修正、および他の実装は、本発明および特許請求の範囲の趣旨および範囲から逸脱することなく、当業者に思い浮かぶであろう。特定されたすべての特許、特許出願、国際出願、および参考文献は、参照によりその全体が本明細書に明示的に組み込まれる。

20

本発明は以下の実施形態を含む。

[1] a. LAMPタンパク質のシステイン保存断片と、

b. 少なくとも1つの癌抗原と

を含む改善されたLAMP構築物。

[2] a. 前記抗原が前記システイン保存断片のN末端に配置されているか、

b. 前記抗原が単一のシステイン保存断片のC末端に配置されているか、または

c. 前記抗原が2つのシステイン保存断片の間に配置されている、

[1]に記載の改善されたLAMP構築物。

[3] 前記改善されたLAMP構築物が表1の列1または列4に記載された少なくとも1

つの断片/エピトープを含み、好ましくはILC-1、ILC-2、ILC-3、ILC

-4、ILC-5またはILC-6に示すように構築されている、[1]または[2]に

記載の改善されたLAMP構築物。

30

[4] 各抗原がリンカーによって分離されている、[3]に記載の改善されたLAMP構築物。

[5] 前記リンカーがアミノ酸配列GPGPGまたはPMGLPから選択される、[4]に記載の改善されたLAMP構築物。

[6] 前記改善されたLAMP構築物が2つ以上のシステイン保存断片を含む、[1]～[5]のいずれか一項に記載の改善されたLAMP構築物。

[7] 前記システイン保存断片がLAMPタンパク質の相同ドメインを含む、[1]～[6]のいずれか一項に記載の改善されたLAMP構築物。

[8] 前記改善されたLAMP構築物が、LAMPタンパク質の膜貫通ドメインをさらに含む、[1]～[7]のいずれか一項に記載の改善されたLAMP構築物。

[9] 前記改善されたLAMP構築物がシグナル配列をさらに含む、[1]～[8]のいずれか一項に記載の改善されたLAMP構築物。

[10] 前記シグナル配列がLAMPタンパク質に由来する、[9]に記載の改善されたLAMP構築物。

[11] 前記LAMPタンパク質が、LAMP-1、LAMP2、LAMP-3、LIMP2、Macrosailin、Endolyn、LAMP5またはLIMBICから選択される、[1]～[10]のいずれか一項に記載の改善されたLAMP構築物。

[12] 前記LAMPタンパク質が配列番号1～113のいずれか1つから選択される、

40

50

および／または前記癌抗原が配列番号 114～197のいずれか1つから選択される、〔11〕に記載の改善されたLAMP構築物。

〔13〕前記LAMPタンパク質が、配列番号1～113と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、96%、97%、98%または99%同一である、および／または前記癌抗原が、配列番号114～197と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、96%、97%、98%または99%同一である、〔12〕に記載の改善されたLAMP構築物。

〔14〕〔1〕～〔13〕のいずれか一項に記載の改善されたLAMP構築物をコードするポリヌクレオチド。

〔15〕〔14〕に記載のポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

〔16〕〔1〕～〔13〕のいずれか一項に記載の改善されたLAMP構築物、〔14〕に記載のポリヌクレオチド、または〔15〕に記載の宿主細胞を含む組成物。

〔17〕疾患または障害を有する対象を治療する方法であって、それを必要とする対象に、〔1〕～〔13〕のいずれか一項に記載の改善されたLAMP構築物、〔14〕に記載のポリヌクレオチド、〔15〕に記載の宿主細胞、または〔16〕に記載の組成物を、疾患または障害を軽減または治療するのに十分な量で投与することを含む、方法。

〔18〕前記方法が、プライミングステップと少なくとも1回のブースティングステップとを含む、〔17〕に記載の方法。

〔19〕〔1〕～〔13〕のいずれか一項に記載の改善されたLAMP構築物、〔14〕に記載のポリヌクレオチド、〔15〕に記載の宿主細胞または〔16〕に記載の組成物がプライミングステップで使用される、〔18〕に記載の方法。

〔20〕前記ブースティングステップが、抗原、改善されたLAMP構築物、改善されたLAMP構築物によりコードされるポリペプチド、または改善されたLAMP構築物を含む細胞の投与を含む、〔18〕または〔19〕に記載の方法。

〔21〕プライミングに使用される抗原がブースティングに使用される抗原と同じである、〔17〕～〔20〕のいずれか一項に記載の方法。

〔22〕プライミングに使用される抗原が、ブースティングに使用される第2の抗原と同じタンパク質に由来する、〔17〕～〔21〕のいずれか一項に記載の方法。

〔23〕プライミングおよび／またはブースティングに2つ以上の抗原が使用される、〔17〕～〔22〕のいずれか一項に記載の方法。

10

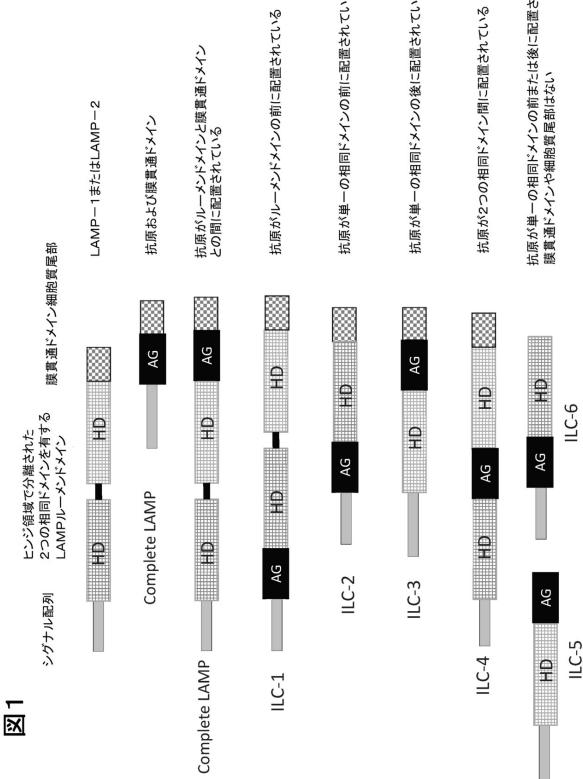
20

30

40

50

【図1】
【図1】



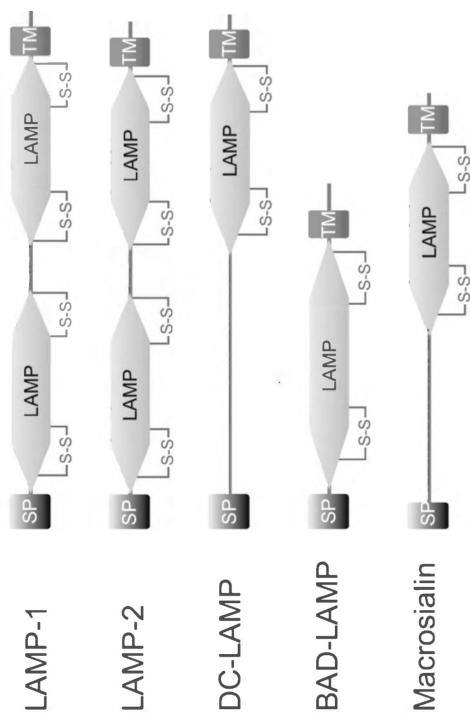
【図2A - 1】

遺伝子名 取得番号	代替名	配列番号	オーロガス シグナル 配列	第1の 相同ドメイン	ルームドメイン		細胞質尾部
					SEQ ID: 1-28	SEQ ID: 1-28	
h_LAMP-1 NP_005523	CD107a; LAMP1; LG120	1	AMRF-EPMA; LG85; CD36L2; HLCP5; LMP1; SR-BI;	29-194	195-227	228 to 381 or 382	382 or 333 to 405
h_LAMP-2 NP_002951	CD107b; LAMPB; LGP10	2	SCAR2	29-192	193-228	229-375	376-399
h_LAMP-3 NP_055213.2	CD206; DC LAMP; DC- LAMP; DC1AMP; TSG403	3	AMRF-EPMA; LG85; CD36L2; HLCP5; LMP1; SR-BI;	28-219	220-234	235-381	382-402
LAMP-2 Q14108		4	SCAR2	5-27 膜貫通 * 非切断	28-433	434-459	460-478
h_Endolyn NP_0060072	Sialomucin CD164 MUC24	5	SCAR2	1-23	24-162	163-183	184-197
Macrosatin NP_0071242.2	CD68	80	SCAR2	81-92	22-319	320-344	345-354

【図 2 A - 2】

LAMP5 NP_038393	BD-LAMP 93	SEQ ID NO: 94-101	1-29	30-235	236-256	257-280
h LIMBIC NP_0023292	LAMP1 IGLON3 67	SEQ ID NO: 68-72 and 102-113	1-28	29-315	316-338	尾部なし

【図 2 B】



10

20

図 2B

【図 3 - 1】

図3 オーソロガス配列を含むヒトLAMP-1アラインメント

シグナル配列		LAMP相同ドメイン1	
SEQIDNO:1	MAPGSAARPLLLLLLLLGLIMH-CASAAMFVVKGN--GTACIMANFSAAFSVNYYDTKS	58	
SEQIDNO:6	MAPGAR-RPLLU--ILLLAGLAH--GASALFEVK--NN-GTCIMANFSAAFSFLTYETAN	52	
SEQIDNO:7	-----MARAGC-VCTLILMGCVFA-AHATVFEVTDGN--STCIGEINASFSISYNTN	50	
SEQIDNO:8	-MSWRQVMPVVWNAVMUILLGVQQ-VATAVQFEVKDGTKNITCLILADSINFVSYNVSS	58	
SEQIDNO:9	MAPGSARRPLLLLILLGLVH-CASAAMFVVKGN--GTACIMANFSAAFSVNYYDTKS	58	
SEQIDNO:10	MAPGSARRSPLL-LLLLGLITH-CASAAMFVVKGN--GTACIMANFSAAFSVNYYDTKS	57	
SEQIDNO:11	MAPAAGGARPRPLI--LLLNLGLVH--GASAVFVKDGN--GTACIMANFSAAFSFLAYETRS	55	
SEQIDNO:12	MAPAAGGARPLLI--LLLNLGLVH--GASAVFVKDGN--GTACIMANFSAAFSFLVYESKS	54	
SEQIDNO:13	MAPAAGGARPLLI--LLLNLGLVH--SAPALFEVKDGN--GTACIMANFSAAFSFLTYSYDTR	55	
SEQIDNO:14	MAPAAGGARPLLI--LLLNLGLVH--SAPALFEVKDGN--GTACIMANFSAAFSFLTYSYDAGH	53	
SEQIDNO:15	-----MOGNA--RFLLGFT--QASSTFVRDNTK-GKICLILANPFRPTVYDSTKA	48	
SEQIDNO:16	MAPAAGGARPLLLL-LLLLGLIAR--GASAVFVKDGN--GTACIMANFSAAFSFLTYSYDSE	53	
SEQIDNO:17	MAPAAGGARPLLLL-LLLLGLIAR--GASAVFVKDGN--GTACIMANFSAAFSFLTYSYDSE	53	
SEQIDNO:18	MAPAAGGARPLLLL-LLLLGLIAR--QASSTFVRDNTK-GKICLILANPFRPTVYDSTKA	48	
SEQIDNO:19	-----MOGNA--RFLLGFT--QASSTFVRDNTK-GKICLILANPFRPTVYDSTKA	48	
SEQIDNO:20	MWSSSSCPRGOLL--ARVLLGFI--QASSTFVRDNTK-GKICLILANPFRPTVYDSTKA	54	
SEQIDNO:21	MKSFSFVVALFT--VCSSVLLADT--QAVTFLVKEGN--STCIKAFSBAVFSITNTN	53	
SEQIDNO:22	MKRSHALVVL-I-IAWFSLISGC--IQAVSVLEVKEGN--STCIKANLSAFYFSITNTS	52	
SEQIDNO:23	MTRCFEVFG-I-AC-FAILGCVTVVQSQVTLVEVGN--STCIKABLSAFYDVTAN	55	
SEQIDNO:24		0	

LAMP相同ドメイン1

2

SEQIDNO:1	GPKNMTFLLFEDSATDVNLNSSSCGKENTSDPSLIVIAFGRGH--TILTINFTRNAVTRYSVQLM	116
SEQIDNO:6	GSQLVNISSLPAAEVLVKGSSCGKENVSDPSLITFTGRGY--LLTINFTKNTTRYSVQHM	110
SEQIDNO:7	GTGSVSEALVKGSSCGKENVSDPSLITFTGRGY--LLTINFTKNTTRYSVQHM	108
SEQIDNO:8	KMELATFVLFSEAVTNNIKNSCCGKENTSDPSLIVIAFGRGH--TILTINFTRNAVTRYVEAEL	116
SEQIDNO:9	GPKNMTFLLFEDSATDVNLNSSSCGKENTSDPSLIVIAFGRGH--TILTINFTRNAVTRYSVQLM	116
SEQIDNO:10	GPKNMTFLLFEDSATDVNLNSSSCGKENTSDPSLIVIAFGRGH--TILTINFTRNAVTRYSVQLM	115
SEQIDNO:11	GPKNMTFLLFEDSATDVNLNSSSCGKENTSDPSLIVIAFGRGH--GLTINFTRNAVTRYSVQLM	112
SEQIDNO:12	GYKNAFELPFATA-EVNNTSSCGKENTSDPSLIVIAFGRGH--VIANLFTRNAVTRYSVQLM	111
SEQIDNO:13	GPQNKSFELPFAGA-EVNNTSSCGKENTSDPSLIVIAFGRGH--VIANLFTRNAVTRYSVQLM	112
SEQIDNO:14	VSKVSNMLTPAASEVLVKGSSCGKENVSDPSLIVIAFGRGH--LLTILFTKNTTRYSVQHM	111
SEQIDNO:15	QKQFHFPLPQNTSQ-SHSSCCGEKTSHPIILAFSGAGH--LISLNFSTKLKYQVEEL	103
SEQIDNO:16	GNKTTTFSLPAAS-QVLNSSSSCGKENTSDPSLIVIAFGRGH--TILTINFTRNAVTRYSVQLM	113
SEQIDNO:17	GLESSTTFRLPQNA-SVMNNSSSCGKENTSDPSLIVIAFGRGH--TILTINFTSTGTSQYQVEEL	112
SEQIDNO:18	QKQFHFPLPQNTSQ-SHSSCCGEKTSHPIILAFSGAGH--LLSINFSKTLKYQVEEL	104
SEQIDNO:19	QKQFHFPLPQNTSQ-SHSSCCGDASHPIILDFGGHH--SLSINFSKESADKYQVEEL	105
SEQIDNO:20	KVERKTFQLESSAHINKESSSSCGEKEKETSQVILVEFGFGH--SLTFEFKSNDFYHVSNL	112
SEQIDNO:21	DITRTSVFVLNSTTVDVASANSSCGS-NGSTPGMIAKPGFPGH--YGMNMFSTGNSLYSVDTL	110
SEQIDNO:22	STRTAGFILFEDSATVPDOSSTCGG-NGSSFWLVAVFGAGH--ALLGOFSTGNSFYSVANL	109
SEQIDNO:23	GTRTVVHPLFQGSVVG-ASSCGG-DGRSFWLVALFGDGH--ALLGOFSTGNSFYSVANL	111
SEQIDNO:24		0

【図 3 - 2】

LAMP相同ドメイン1

SEQIDNO:1	SEFYNLSDTHLFPNASSK-EIKT--VESITDIRADIDKKYRCSGTOVHRMN--VTVTLHDA	173
SEQIDNO:6	YFTYNLSDTHEFPNAAISK-EIYT--MDSTTDDIKADINKAYRCVSDIRYVMMN--VTVTLRDA	167
SEQIDNO:7	SLOYNLSDGDIFFQSSAGVGSVMSVSELSMARLNSTYCVSSSSISLSSAAVNLTLSGV	168
SEQIDNO:8	VMSYNLSDKIIFFPNASGEGTKT--STNKTAVIAENDVYKYNPNHLIRMDA-ANATFHDI	174
SEQIDNO:9	SEFYNLSDTHLFPNASSK-EIKT--VEITDTRADIDKKYRCVGSGTOVHRN--VTVTLHDA	173
SEQIDNO:10	SEFYNLSDTHLFPNASSK-EIKT--VEATDTRADIDKKYRCVGSGTOVHRN--VTVTLHDA	172
SEQIDNO:11	SEFYNLSDTHLFPNASSK-EIKT--VEATDTRADIDKKYRCVGSGTOVHRN--VTVTLHDA	169
SEQIDNO:12	SEFYNLSDTHLFPNASSK-EIKT--VEATDTRADIDKKYRCVGSGTOVHRN--VTVTLHDA	168
SEQIDNO:13	SEFYNLSDTHLFPNASSK-EIKT--VEATDTRADIDKKYRCVGSGTOVHRN--VTVTLHDA	169
SEQIDNO:14	SEFYNLSDTHLFPNASSK-EIKT--VEATDTRADIDKKYRCVGSGTOVHRN--VTVTLHDA	168
SEQIDNO:15	SEFYNLSDTHLFPNASSK-EIKT--VEATDTRADIDKKYRCVGSGTOVHRN--VTVTLHDA	169
SEQIDNO:16	SEFYNLSDTHLFPNASSK-EIKT--VEATDTRADIDKKYRCVGSGTOVHRN--VTVTLHDA	168
SEQIDNO:17	SEFYNLSDTHLFPNASSK-EIKT--VEATDTRADIDKKYRCVGSGTOVHRN--VTVTLHDA	169
SEQIDNO:18	SEFYNLSDTHLFPNASSK-EIKT--VEATDTRADIDKKYRCVGSGTOVHRN--VTVTLHDA	168
SEQIDNO:19	SEFYNLSDTHLFPNASSK-EIKT--VEATDTRADIDKKYRCVGSGTOVHRN--VTVTLHDA	169
SEQIDNO:20	SEFYNLSDTHLFPNASSK-EIKT--VEATDTRADIDKKYRCVGSGTOVHRN--VTVTLHDA	168
SEQIDNO:21	SEFYNLSDTHLFPNASSK-EIKT--VEATDTRADIDKKYRCVGSGTOVHRN--VTVTLHDA	169
SEQIDNO:22	SEFYNLSDTHLFPNASSK-EIKT--VEATDTRADIDKKYRCVGSGTOVHRN--VTVTLHDA	167
SEQIDNO:23	SEFYNLSDTHLFPNASSK-EIKT--VEATDTRADIDKKYRCVGSGTOVHRN--VTVTLHDA	169
SEQIDNO:24		0

LAMP相同ドメイン1

SEQIDNO:1	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	218
SEQIDNO:7	QMEAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	213
SEQIDNO:8	RLEAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	219
SEQIDNO:9	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	218
SEQIDNO:10	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	217
SEQIDNO:11	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	214
SEQIDNO:12	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	219
SEQIDNO:13	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	219
SEQIDNO:14	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	210
SEQIDNO:15	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	210
SEQIDNO:16	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	215
SEQIDNO:17	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	214
SEQIDNO:18	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	224
SEQIDNO:19	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	216
SEQIDNO:20	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	216
SEQIDNO:21	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	220
SEQIDNO:22	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	218
SEQIDNO:23	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	221
SEQIDNO:24		0

40

SEQIDNO:1	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	218
SEQIDNO:7	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	213
SEQIDNO:8	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	219
SEQIDNO:9	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	218
SEQIDNO:10	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	217
SEQIDNO:11	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	214
SEQIDNO:12	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	224
SEQIDNO:13	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	216
SEQIDNO:14	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	216
SEQIDNO:15	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	218
SEQIDNO:16	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	219
SEQIDNO:17	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	219
SEQIDNO:18	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	221
SEQIDNO:19	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	219
SEQIDNO:20	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	219
SEQIDNO:21	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	219
SEQIDNO:22	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	219
SEQIDNO:23	TIGAYLSSGNISNFTGEEETRCQDQSPFESTTAPFAP-----PSP-SP---SFVFKSPS	219
SEQIDNO:24		0

50

【図3-3】

SEQIDNO:	ビンジ	LAMP相同ドメイン2
1	VDKYVNNSG-CNT-CLASLMSGQLNITYE-RKDNTTVTRLLINP VSKYVNNTGNGNT--CLASLMSGQLNITYL-KKNDTWTTRAFNLINP RGNYNTG-DGNTVGLCILALMGQLNITYNTHT-TQNTQSVELLNMLOP VUQVYNNVRSEP--CLAKVQLNQNTTYT-TKDGQGSYVNFNLP VDKYNNSGTNGT--CLASLMSGQLNITYE-RKDNTTVTRLLINP VDKYNNSGTNGT--CLASLMSGQLNITYE-RKDNTTVTRLLINP VHKYNNSGANGT--CLASLMSGQLNITYK-RKDNTTVTRVKNVNP VSKYNNSGANGT--CLASLMSGQLNITYR-RKDNTTVTRVKNVNP VFRYNNSGANGT--CLASLMSGQLNITYR-RKDNTTVTRVKNVNP VSKYNNVTGANGT--CLASLMSGQLNITYTM-RKDNTTVTRAPINP EGVKYNNVTGANGT--CLASLMSGQLNITYV-TKDGKEHGLDNNLP VSRYNNSGANGT--CLASLMSGQLNITYVTR-RKDNTTVTRVKNVNP IFKVNNSGTANGT--CLASLMSGQLNITYA-KXKNDSSARLWNP VGKVNNTGANGT--CLASLMSGQLNITYL-KDGTGKGLDNNLP VSQYNNVTGPNGT--CLAYLMGQLNQNTYQ-QDNERGLDDLNVP IGRNYNTGLHGT--CLATMLGQVNTNTS-YNTNTKSCELLNLP VSKYVNNSKGASCTVCMARKGQVNLNSYFSQSNKTQVCELLNLP RTGYSVNNHDNTTLLAQMQLNQNTSYFSRNSQNTKQVSLNLP QGGSYVNNNSGNTVCLLARMLQDLSQFNSQASQNTKQVSLNLP RGYNTNHNTGTLVQVYNTNTSYNSTSQRQVWVNMQNP	
2	SEQIDNO: 1 SEQIDNO: 6 SEQIDNO: 7 SEQIDNO: 8 SEQIDNO: 9 SEQIDNO: 10 SEQIDNO: 11 SEQIDNO: 12 SEQIDNO: 13 SEQIDNO: 14 SEQIDNO: 15 SEQIDNO: 16 SEQIDNO: 17 SEQIDNO: 18 SEQIDNO: 19 SEQIDNO: 20 SEQIDNO: 21 SEQIDNO: 22 SEQIDNO: 23 SEQIDNO: 24	

【図3-4】

LAMP相同ドメイン2	4	膜貫通ドメイン
3	4	
SYCKNAEHEVIRWTFKAFSNTFKWVQAKFVGEGGFSVEECLLDENMLIPAVGAGAL		394
SYCKNTEEHIVRVSNLMSLNVSQVQAKFVFDSDRFGVEECVQDGNLNSMLIPAVGAGAL		383
SYVCSAQAMLSVFTPSINTFRFLQLQPNITANRFTSAEVEQDNMLIPAVGAGAL		383
SFCNSKNSQQLTIDPFTVNTQVQYQLOQVAFNSDNTFASAVECSLENDMLIPAVGAGAL		394
SYCKNAEHEVIRWTFKAFSNTFKWVQAKFVGEGGFSVEECLLDENMLIPAVGAGAL		394
SYCKNGAEEHVTRVPTVSVNIVQWVQAFRVEGGQFGEVCELDENMLIPAVGAGAL		393
SYCKNGAEEHVTRVPTVSVNIVQWVQAFRVEGGQFGEVCELDENMLIPAVGAGAL		390
SYCKNSEEHEVIRWTFPSLFSI1FKWVQAKFVGEGGFSVEECLLDENMLIPAVGAGAL		395
SYCKNSEEHEVIRLVTSSFLMPEWLFQAFRVEGGQFGEVCELDENMLIPAVGAGAL		386
SYCKNSEEHEVIFPVKALLAHENFSVQVQAKFVFDSDRFGVEECVQDGNLNSMLIPAVGAGAL		384
SYCKSACEAEVNTFQDVALVNQVQAKFVFDSDRFGVEECVQDGNLNSMLIPAVGAGAL		391
SYCKRSEQRQLETVTEAFALNFVQVRAFKVFDSDRFGVEECVQDGNLNSMLIPAVGAGAL		390
SYCKNAEHEVHTDFGSVNFVRQVRAFKVFDSDRFGVEECVQDGNLNSMLIPAVGAGAL		399
SYCKSACEAEVNTQDVALVNQVQVQAKFVFDSDRFGVEECVQDGNLNSMLIPAVGAGAL		392
SYCKSCESEEVNTQDVALVNQVQVQAKFVFDSDRFGVEECVQDGNLNSMLIPAVGAGAL		392
SYCKIAESIESIW3GAAVHNNTFLQJQAKFPGDKGAEVCECDDENMLIPAVGAGAL		395
SYCMNAECLTVVSTFSIMFELQVQPGFTVQTQFASAEVQICDQDMPLIPAVGAGAL		395
SYMCNAECLQVATVFTSFLNTFLQVQPGFTVQTQFASAEVQICDQDMPLIPAVGAGAL		397
STMCISECEVTLQVQNTSFLNTFLQVQPGFTVQTQFAGGAECQDQDMPLIPAVGAGAL		396
SIFCRDEQTLNVAQNLSINTFLQVQPGFTVQFAGKDGFAAEBQCLEDDMMLIPAVGAGAL		224
* * * * *	* * * * *	* * * * *

LAMP相同ドメイン2

SEQIDNO: 1 ELHS-EGSTVLLFQFMGNASSRQLQJLNP-TLARDPAFKANGSNSLRAJATGVN
 SEQIDNO: 6 KVEN-K-NRALEQFLGMNASSRQLQJLNP-TLARDPAFKANGSNSLRAJATGVN
 SEQIDNO: 7 RLSDS-E-ETTLHNFSTFTMNTQKYYLQLSVASLWPM-IIMS-VWEFAAGNTCSQCSR
 SEQIDNO: 8 SLTS-G-DLDFRNFTLNSLLEVLYFGLDVS-LTGLPADANDTFEANSLNMYQTMNVN
 SEQIDNO: 9 ELHS-EGSTVLLFQFMGNASSRQLQJLNP-TLARDPAFKANGSNSLRAJATGVN
 SEQIDNO: 10 ELHS-EGSTVLLFQFMGNASSRQLQJLNP-TLARDPAFKANGSNSLRAJATGVN
 SEQIDNO: 11 ELRS-E-STVLLFQFMGNASSRQLQJLNP-TLARDPTFKAGNSNSLRAJATGVN
 SEQIDNO: 12 ELQS-E-RSTVLLFQFMGNASSRQLQJLNP-TLARDPAFSNSNSLRAJATGVN
 SEQIDNO: 13 ELHS-ENLILLALQFQVMNNESSRFVQLQJLNP-TLADKEGSFTATNSSLRAJATGVN
 SEQIDNO: 14 VKGN-K-SRFLVLFQFMGNASSRQLQJLNP-TLADKEGSFTATNSSLRAJATGVN
 SEQIDNO: 15 ELHS-ENLILLALQFQVMNNESSRFVQLQJLNP-TLADKEGSFTATNSSLRAJATGVN
 SEQIDNO: 16 ELQCS-ESLILARALQFQVMNNESSRFVQLQJLNP-TLADKEGSFTATNSSLRAJATGVN
 SEQIDNO: 17 ELQTS-BN-STLAFS-QMNNTTQKFLR1R1R1HFKFP
 SEQIDNO: 18 NLAP-ER-K-TT1KTVHJLNP-QMNNTTQKFLR1R1HFKFP
 SEQIDNO: 19 NLUP-EK-TRTPVFLNPLAETKQFLQJLNP-VSTTLPSEAKMPEASNDMSMSELRATGVN
 SEQIDNO: 20 NUTS-ES-TS1QLFQFLPSQNTSTKQFLYQJLNP-TLADKEGSFTATNSSLRAJATGVN
 SEQIDNO: 21 VLAQ-E-ETTVLISFLSFVNTNSTHLSYHGTIQLQJNMMT-DMM-SFESPSLTDYLSRSLHG
 SEQIDNO: 22 ILTQ-Q-TTILHFLSTLNSTSHYHTLGLSLSQWANNS-IMA-AFFPSASNLASLRLSTFGH
 SEQIDNO: 23 TLVY-ANATHLFLSTLNSTSHYHTLGLSLSQWAWAS-IMA-AFFPNTNSLSDYQGSGLR
 SEQIDNO: 24 NLTVDAVKTNLHFVFTMNSTSHYHLSVEVTVAASWP-EMK-EPVHSNNSLSDYLRGTGVY

細胞質尾部

LVLVILVILYLIGRKRRSHQYQSI	406
LVLVILVILYLIGRKRRSHQYQTI	411
LVLVILVILYLIGRKRRSHQYQI	417
LVLVILVILYLIGRKRRSHQYQTI	417
LVLVILVILYLIGRKRRSHQYQI	415
LVLVILVILYLIGRKRRSHQYQTI	413
LVLVILVILYLIGRKRRSHQYQI	417
LVLVILVILYLIGRKRRSHQYQTI	409
LVLVILVILYLIGRKRRSHQYQI	407
LVLVILVILYLIGRKRRSHQYQTI	414
LVLVILVILYLIGRKRRSHQYQI	413
LVLVILVILYLIGRKRRSHQYQTI	422
LVLVILVILYLIGRKRRSHQYQI	415
LVLVILVILYLIGRKRRSHQYQTI	415
LVLVILVILYLIGRKRRSHQYQI	418
LVLVILVILYLIGRKRRSHQYQTI	418
LVLVILVILYLIGRKRSHHQYQSI	420
LVLVILVILYLIGRKRSHHQYQTI	419
LVLVILVILYLIGRKRSHHQYQSI	247

(図 3 - 5)

LAMP-1					
取得番号	種	配列番号	取得番号	種	配列番号
NP_005552.3	<i>H. sapiens</i>	1	NP_990614.1	<i>G. gallus</i>	15
NP_034814.2	<i>M. musculus</i>	6	NP_001011507.1	<i>S. scrofa</i>	16
NP_955996.1	<i>D. rerio</i>	7	XP_001374132.1	<i>M. domestica</i>	17
NP_001087042.1	<i>X. laevis</i>	8	XP_003203252.1	<i>M. gallo-pavo</i>	18
NP_001233491.1	<i>P. troglodytes</i>	9	XP_002191607.2	<i>T. guttata</i>	19
XP_001087801.1	<i>M. mulatta</i>	10	XP_003218797.1	<i>A. carolinensis</i>	20
XP_534193.2	<i>C. lupus familiaris</i>	11	XP_004067118.1	<i>O. latipes</i>	21
XP_002723509.1	<i>O. cuniculus</i>	12	XP_003699411.1	<i>T. rubripes</i>	22
NP_001068592.1	<i>B. taurus</i>	13	NP_001158846.1	<i>S. solar</i>	23
NP_036989.1	<i>R. novegicus</i>	14	XP_003452974.1	<i>O. niloticus</i>	24

【 图 4 - 1 】

図4 オーソロガス配列を含むヒトLAMP-2アラインメント

SEQININO:0	2	0
SEQININO:0	25	0
SEQININO:0	26	0
SEQININO:0	27	0
SEQININO:0	28	0
SEQININO:0	29	0
SEQININO:0	30	0
SEQININO:0	31	0
SEQININO:0	32	0
SEQININO:0	33	0
SEQININO:0	34	0
SEQININO:0	35	0
SEQININO:0	36	0
SEQININO:0	37	0
SEQININO:0	38	0
SEQININO:0	39	0
SEQININO:0	40	0
SEQININO:0	41	0
SEQININO:0	42	0
SEQININO:0	43	0
MMIGNPTLQQERDTSVALIIRITYVRAFLKVTYVTPKPQRCHNQW	—	QSLINIEGIEIEI
SEQININO:0	37	57
SEQININO:0	38	0
SEQININO:0	39	0
SEQININO:0	40	0
SEQININO:0	41	0
SEQININO:0	42	0
SEQININO:0	43	0
—	MECREGEVITRCKQJQNLFSGIN-	DDISGAKQ
SEQININO:0	39	30

SEQIDNO:2		0
SEQIDNO:25		0
SEQIDNO:26		0
SEQIDNO:27		0
SEQIDNO:28		0
SEQIDNO:29		0
SEQIDNO:30		0
SEQIDNO:31		0
SEQIDNO:32		0
SEQIDNO:33		0
SEQIDNO:34		0
SEQIDNO:35		0
SEQIDNO:36		0
SEQIDNO:37	VKGSKWR - SALETIITIQVKRK - SQUQKYHPPSLHSHRCQNTNQ	99
SEQIDNO:38		0
SEQIDNO:39	AKQROQCTPQKPPKGUTLPLIQLRPPRGICPGPAPNIVJUWJADRITPSGHQTRPFEEJAR	99
SEQIDNO:40		0
SEQIDNO:41		0
SEQIDNO:42		0
SEQIDNO:43		0

【図4-2】

```

SEQIDNO:2      -----M 1
SEQIDNO:25     -----MGT 4
SEQIDNO:26     -----MGT 4
SEQIDNO:27     -----MVCF 4
SEQIDNO:28     -----MVCF 4
SEQIDNO:29     -----MVCF 4
SEQIDNO:30     -----MVCF 4
SEQIDNO:31     -----MVCF 4
SEQIDNO:32     -----MVCF 4
SEQIDNO:33     -----MVCF 4
SEQIDNO:34     -----MVCF 4
SEQIDNO:35     -----MVCF 4
SEQIDNO:36     -----MVCF 4
SEQIDNO:37     G---TOGVATVIADECLNPSIPSTLQKVNLGSCAEFSIIGYSVFLAFYLKPNLDF 156
SEQIDNO:38     -----MVCF 4
SEQIDNO:39     DFRPDRPRNRRAAPSGHWRAGGFQRHR-----HHR-----HRRHGPPLRR 133
SEQIDNO:40     -----MVCF 4
SEQIDNO:41     -----MVCF 4
SEQIDNO:42     -----MVCF 4
SEQIDNO:43     -----MVCF 4

```

【図4-3】

```

LAMP相同ドメイン1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
809
810
811
812
813
814
815
816
817
817
818
819
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
889
890
891
892
893
894
895
896
897
897
898
899
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
909
910
911
912
913
914
915
916
917
917
918
919
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
999
1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1019
1020
1021
1022
1023
1024
1025
1026
1027
1028
1029
1029
1030
1031
1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039
1039
1040
1041
1042
1043
1044
1045
1046
1047
1048
1049
1049
1050
1051
1052
1053
1054
1055
1056
1057
1058
1059
1059
1060
1061
1062
1063
1064
1065
1066
1067
1068
1069
1069
1070
1071
1072
1073
1074
1075
1076
1077
1078
1079
1079
1080
1081
1082
1083
1084
1085
1086
1087
1088
1089
1089
1090
1091
1092
1093
1094
1095
1096
1097
1098
1099
1099
1100
1101
1102
1103
1104
1105
1106
1107
1108
1109
1109
1110
1111
1112
1113
1114
1115
1116
1117
1118
1119
1119
1120
1121
1122
1123
1124
1125
1126
1127
1128
1129
1129
1130
1131
1132
1133
1134
1135
1136
1137
1138
1139
1139
1140
1141
1142
1143
1144
1145
1146
1147
1148
1149
1149
1150
1151
1152
1153
1154
1155
1156
1157
1158
1159
1159
1160
1161
1162
1163
1164
1165
1166
1167
1168
1169
1169
1170
1171
1172
1173
1174
1175
1176
1177
1178
1179
1179
1180
1181
1182
1183
1184
1185
1186
1187
1188
1189
1189
1190
1191
1192
1193
1194
1195
1196
1197
1198
1199
1199
1200
1201
1202
1203
1204
1205
1206
1207
1208
1209
1209
1210
1211
1212
1213
1214
1215
1216
1217
1218
1219
1219
1220
1221
1222
1223
1224
1225
1226
1227
1228
1229
1229
1230
1231
1232
1233
1234
1235
1236
1237
1238
1239
1239
1240
1241
1242
1243
1244
1245
1246
1247
1248
1249
1249
1250
1251
1252
1253
1254
1255
1256
1257
1258
1259
1259
1260
1261
1262
1263
1264
1265
1266
1267
1268
1269
1269
1270
1271
1272
1273
1274
1275
1276
1277
1278
1279
1279
1280
1281
1282
1283
1284
1285
1286
1287
1288
1289
1289
1290
1291
1292
1293
1294
1295
1296
1297
1298
1299
1299
1300
1301
1302
1303
1304
1305
1306
1307
1308
1309
1309
1310
1311
1312
1313
1314
1315
1316
1317
1318
1319
1319
1320
1321
1322
1323
1324
1325
1326
1327
1328
1329
1329
1330
1331
1332
1333
1334
1335
1336
1337
1338
1339
1339
1340
1341
1342
1343
1344
1345
1346
1347
1348
1349
1349
1350
1351
1352
1353
1354
1355
1356
1357
1358
1359
1359
1360
1361
1362
1363
1364
1365
1366
1367
1368
1369
1369
1370
1371
1372
1373
1374
1375
1376
1377
1378
1379
1379
1380
1381
1382
1383
1384
1385
1386
1387
1388
1389
1389
1390
1391
1392
1393
1394
1395
1396
1397
1398
1398
1399
1399
1400
1401
1402
1403
1404
1405
1406
1407
1408
1409
1409
1410
1411
1412
1413
1414
1415
1416
1417
1418
1419
1419
1420
1421
1422
1423
1424
1425
1426
1427
1428
1429
1429
1430
1431
1432
1433
1434
1435
1436
1437
1438
1439
1439
1440
1441
1442
1443
1444
1445
1446
1447
1448
1449
1449
1450
1451
1452
1453
1454
1455
1456
1457
1458
1459
1459
1460
1461
1462
1463
1464
1465
1466
1467
1468
1469
1469
1470
1471
1472
1473
1474
1475
1476
1477
1478
1479
1479
1480
1481
1482
1483
1484
1485
1486
1487
1488
1489
1489
1490
1491
1492
1493
1494
1495
1496
1497
1498
1498
1499
1499
1500
1501
1502
1503
1504
1505
1506
1507
1508
1509
1509
1510
1511
1512
1513
1514
1515
1516
1517
1518
1519
1519
1520
1521
1522
1523
1524
1525
1526
1527
1528
1529
1529
1530
1531
1532
1533
1534
1535
1536
1537
1538
1539
1539
1540
1541
1542
1543
1544
1545
1546
1547
1548
1549
1549
1550
1551
1552
1553
1554
1555
1556
1557
1558
1559
1559
1560
1561
1562
1563
1564
1565
1566
1567
1568
1569
1569
1570
1571
1572
1573
1574
1575
1576
1577
1578
1579
1579
1580
1581
1582
1583
1584
1585
1586
1587
1588
1589
1589
1590
1591
1592
1593
1594
1595
1596
1597
1598
1598
1599
1599
1600
1601
1602
1603
1604
1605
1606
1607
1608
1609
1609
1610
1611
1612
1613
1614
1615
1616
1617
1618
1619
1619
1620
1621
1622
1623
1624
1625
1626
1627
1628
1629
1629
1630
1631
1632
1633
1634
1635
1636
1637
1638
1639
1639
1640
1641
1642
1643
1644
1645
1646
1647
1648
1649
1649
1650
1651
1652
1653
1654
1655
1656
1657
1658
1659
1659
1660
1661
1662
1663
1664
1665
1666
1667
1668
1669
1669
1670
1671
1672
1673
1674
1675
1676
1677
1678
1679
1679
1680
1681
1682
1683
1684
1685
1686
1687
1688
1689
1689
1690
1691
1692
1693
1694
1695
1696
1697
1698
1698
1699
1699
1700
1701
1702
1703
1704
1705
1706
1707
1708
1709
1709
1710
1711
1712
1713
1714
1715
1716
1717
1718
1719
1719
1720
1721
1722
1723
1724
1725
1726
1727
1728
1729
1729
1730
1731
1732
1733
1734
1735
1736
1737
1738
1739
1739
1740
1741
1742
1743
1744
1745
1746
1747
1748
1749
1749
1750
1751
1752
1753
1754
1755
1756
1757
1758
1759
1759
1760
1761
1762
1763
1764
1765
1766
1767
1768
1769
1769
1770
1771
1772
1773
1774
1775
1776
1777
1778
1779
1779
1780
1781
1782
1783
1784
1785
1786
1787
1788
1789
1789
1790
1791
1792
1793
1794
1795
1796
1797
1797
1798
1799
1799
1800
1801
1802
1803
1804
1805
1806
1807
1808
1809
1809
1810
1811
1812
1813
1814
1815
1816
1817
1818
1819
1819
1820
1821
1822
1823
1824
1825
1826
1827
1828
1829
1829
1830
1831
1832
1833
1834
1835
1836
1837
1838
1839
1839
1840
1841
1842
1843
1844
1845
1846
1847
1848
1849
1849
1850
1851
1852
1853
1854
1855
1856
1857
1858
1859
1859
1860
1861
1862
1863
1864
1865
1866
1867
1868
1869
1869
1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1897
1898
1899
1899
1900
1901
1902
1903
1904
1905
1906
1907
1908
1909
1909
1910
1911
1912
1913
1914
1915
1916
1917
1918
1919
1919
1920
1921
1922
1923
1924
1925
1926
1927
1928
1929
1929
1930
1931
1932
1933
1934
1935
1936
1937
1938
1939
1939
1940
1941
1942
1943
1944
1945
1946
1947
1948
1949
1949
1950
1951
1952
1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978
1979
1979
1980
1981
1982
1983
1984
1985
1986
1987
1988
1989
1989
1990
1991
1992
1993
1994
1995
1996
1997
1997
1998
1999
1999
2000
2001
2002
2003
2004
2005
2006
2007
2008
2009
2009
2010
2011
2012
2013
2014
2015
2016
2017
2018
2019
2019
2020
2021
2022
2023
2024
2025
2026
2027
2028
2029
2029
2030
2031
2032
2033
2034
2035
2036
2037
2038
2039
2039
2040
2041
2042
2043
2044
2045
2046
2047
2048
2049
2049
2050
2051
2052
2053
2054
2055
2056
2057
2058
2059
2059
2060
2061
2062
2063
2064
2065
2066
2067
2068
2069
2069
2070
2071
2072
2073
2074
2075
2076
2077
2078
2079
2079
2080
2081
2082
2083
2084
2085
2086
2087
2088
2089
2089
2090
2091
2092
2093
2094
2095
2096
2097
2097
2098
2099
2099
2100
2101
2102
2103
2104
2105
2106
2107
2108
2109
2109
2110
2111
2112
2113
2114
2115
2116
2117
2118
2119
2119
2120
2121
2122
2123
2124
2125
2126
2127
2128
2129
2129
2130
2131
2132
2133
2134
2135
2136
2137
2138
2139
2139
2140
2141
2142
2143
2144
2145
2146
2147
2148
2149
2149
2150
2151
2152
2153
2154
2155
2156
2157
2158
2159
2159
2160
2161
2162
2163
2164
2165
2166
2167
2168
2169
2169
2170
2171
2172
2173
2174
2175
2176
2177
2178
2179
2179
2180
2181
2182
2183
2184
2185
2
```

【図4-6】

細胞質尾部

SEQIDNO:	SEQUENCE	COMMENT
SEQIDNO: 2	AGAGLVLIVIYLAYIIGRKRRH--AQYQFL	410
SEQIDNO: 5	AGAGLVLIVIYLAYIIGRKRRHSSSSGEGEMN	410
SEQIDNO: 6	AGAGLVLIVIYLAYIIGRKRRHSSSSGEGEMN	355
SEQIDNO: 7	AGAGLVLIVIYLAYIIGRKRRH--VGQYLT	355
SEQIDNO: 28	AGAGLVLIVIYLAYIISGMGRKRKR--TQYCVS	411
SEQIDNO: 29	AGAGLVLIVIYLAYIIGRKRRH--AQYEFQ	364
SEQIDNO: 30	AGAGLVLIVIYLAYIISGMGRKRKR--TQYCVS	364
SEQIDNO: 31	GLGSLGLLIVIYLAYIIGRKRRH--AQYQFL	411
SEQIDNO: 32	AGAGLVLIVIYLAYIIGRKRRH--AQYGEFQ	411
SEQIDNO: 33	GLGSLGLLIVIYLAYIIGRKRRH--AQYQFL	407
SEQIDNO: 34	AGAGLVLIVIYLAYIIGRKRRH--AQYGEFQ	411
SEQIDNO: 35	AGAGLVLIVIYLAYIIGRKRRH--TQYCVS	408
SEQIDNO: 36	AGAGLVLIVIYLAYIIGRKRRH--TQYCVS	511
SEQIDNO: 37	AGAGLVLIVIYLAYIIGRKRRH--TQYCVS	425
SEQIDNO: 38	AGAGLVLIVIYLAYIISGMGRKRKR--TQYCVS	425
SEQIDNO: 39	AGAGLVLIVIYLAYIISGMGRKRKR--TQYCVS	556
SEQIDNO: 40	AGAGLVLIVIYLAYIIGRKRRH--SCQYCL	408
SEQIDNO: 41	AGAGLVLIVIYLAYIIGRKRRH--VGQYLT	404
SEQIDNO: 42	AGAGLVLIVIYLAYIIGRKRRH--AQYQFL	410
SEQIDNO: 43	AALAAVLVILAYIISGMGRKRKR--AQYQFL	249

【図 5 - 1】

図5 オーソロガス配列を含むヒトLAMP-3アラインメント

シグナル配列

LAMP相同ドメイン1

LAMP-2					
取得番号	種	配列番号	取得番号	種	配列番号
NP_0022851.5	<i>H. sapiens</i>	2	NP_001231184.1	<i>S. scrofa</i>	34
NP_034815.2	<i>M. musculus</i>	25	XP_004022401.1	<i>A. aries</i>	35
NP_001087881.1	<i>X. laevis</i>	26	NP_058764.2	<i>R. norvegicus</i>	36
NP_001013551.1	<i>D. rerio</i>	27	XP_001510101.2	<i>O. anatinus</i>	37
XP_003918270.1	<i>P. Anubis</i>	28	NP_001001749.1	<i>G. gallus</i>	38
XP_001084005.2	<i>M. mulatta</i>	29	XP_002191619.2	<i>T. guttata</i>	39
XP_003317709.1	<i>P. troglodytes</i>	30	NP_001116192.2	<i>X. tropicalis</i>	40
XP_005641822.1	<i>C. lupus familiaris</i>	31	NP_001133282.1	<i>S. salar</i>	41
XP_001493687.3	<i>E. caballus</i>	32	XP_03445830.1	<i>O. niloticus</i>	42
NP_001029742.1	<i>B. Taurus</i>	33	XP_03961835.1	<i>T. rubripes</i>	43

SEQIDNO:3	AQKQPHQTLARIMDGQHTTFTQATVTKTP--	TTTPTAKTNTTATSPITY	102
SEQIDNO:44	AQKQPHQTLARIMDGQHTTFTQATVTKTP--	TTTPTAKTNTTATSPITY	102
SEQIDNO:45	ANQAQPHQTLARIMDGHTTFQDAAITKTP--	TTTPVTNNKFPTSPILY	102
SEQIDNO:46	ANQAQPHQTLARIMDGHTTFQDAAITKTP--	TTTPVTNNKFPTSPILY	102
SEQIDNO:47	TNQVPSQTLLARSMGHLASRAAQTSSSEPPTHHFTTVKWLTSIVLWANTRFESSSSLY	TTTPTVNTTGTSPILY	114
SEQIDNO:48	TNHTPKHTLAKSSTGHTVTSQIATTFTDSELPTEHTTITLTLANTSLSLTTSPSTPHTH	TTTPTVNTTGTSPILY	116
SEQIDNO:49			0
SEQIDNO:50	TNQVPHKTLLATRSMDGGVTSQTAATTNTPEPVTHTTIKTAATTSIVLTNSTLSTSPITH	TTTPTVNTTGTSPILY	116
SEQIDNO:51	TNYVPHKTAARRSTGDHGTVTSQTAATTSSETLTNTTDLVLATLTSPTVHSKTLSTPPTTH	TTTPTVNTTGTSPILY	117
SEQIDNO:52	TNHVPCNTAAKAATSDHGTVTSQTAATTSSETLTNTTIEVLATLTSPTVHSKTLSTPPTTH	TTTPTVNTTGTSPILY	113
SEQIDNO:53	TNTQSHSATLARSKKDDYVTAQAEATS--TFF--DTAHATMTCATLPTVTKSLSPLPSTSYY	TTTPTVNTTGTSPILY	107
SEQIDNO:54	INQRSHHTLARSFKDDYVTAQAEATS--AIE--NTAHATMTCATLPTVTKSLSPLPSTSYY	TTTPTVNTTGTSPILY	108
SEQIDNO:55		MDRVSLLSLSTILLY	14

【図 5 - 2】

【図5-3】

LAMP相同ドメイン2	
	4
GC1KHAWVNEVTPUAVGHSFKVCSEQSLQSLAHLQTKTNTVOLQDFEDDDFHGEVNCDESS3U	379
GC1KHAWVNEVTPUAVGHSFKVCSEQSLQSLAHLQTKTNTVOLQDFEDDDFHGEVNCDESS3U	379
QGMKHAWVNEVTPUAVGHSFKVCSEQSLQSLAHLQTKTNTVOLQDFEDDDFHGEVNCDESS3U	391
QGMKNAWVNEVTPUAVGHSFKVCSEQSLQSLPQLQNTMVLQDFEDDDFHGEVNCDESS3U	393
VGLVNDNEFLKKAQNLGSFKFCSEMLTTLADYFLRVLPLQFADFLWAVAKGEVKEWABD	220
QGMKSWMPTFVTVGHFSFKVCSEQSLELSLTQHLQTKTNTVOLQDFEDDDNFGEVNCDESS3U	395
QGLKHAWMMPFETVTVGHFSFKVCSEQSLELSLTQHLQTKTNTVOLQDFEDDDNFGEVNCDESS3U	394
QGLKHAWMMPFETVTVGHFSFKVCSEQSLELSLTQHLQTKTNTVOLQDFEDDDNFGEVNCDESS3U	390
QGLKHAWMMPFETVTVGHFSFKVCSEQSLELSLTQHLQTKTNTVOLQDFEDDDNFGEVNCDESS3U	390
QGKHNWLMFETVTVGHFSFKVCSEQSLELSLTQHLQTKTNTVOLQDFEDDDNFGEVNCDESS3U	374
QNNTLKLKTCNNPCKVXCMPTKOLCPTKUNMPLKVNLCNPKFNSCPYKTCPPKCD	277

SEQIDNO:3	ヒンジ	LAMP相同ドメイン2
SEQIDNO:4	TVPGEPLIAPOSSPSKTYIQVQLN-GSPRLCKIAEMGILQVQDKESVSPFRYFNIL	1
SEQIDNO:45	TVPGEPLIAPOSSPSKTYIQVQLN-GSRLCIKAEMGILQVQDKESVSPFRYFNIL	
SEQIDNO:46	TVPGEPLIAPOSSPSKTYIQVQLN-GSRLCIKAEMGILQVQDKESVSPFRYFNIL	
SEQIDNO:47	TVPGEPLIAPOSSPSKTYIQVQLN-GSRLCIKAEMGILQVQDKESVSPFRYFNIL	
SEQIDNO:48	PASPGPLIAPOSSPSKTYIQVQLN-GSRLCIKAEMGILQVQDKESVSPFRYFNIL	
SEQIDNO:49	IAPGTLPLIAPOSSPSKTYIQVQLN-GSRLCIKAEMGILQVQDKESVSPFRYFNIL	
SEQIDNO:50	VFQMPGLPLQKETPAATTIYTIIPLNFGQKVGRXFSRVEFVYREN---KSCGYV	
SEQIDNO:51	TATGTLPLIAPOSSPSKTYIQVQLN-GSRLCIKAEMGILQVQDKESVSPFRYFNIL	
SEQIDNO:52	IAPRPLPLIAPOSSPSKTYIQVQLN-GSRLCIKAEMGILQVQDKESVSPFRYFNIL	
SEQIDNO:53	IAPRPLPLIAPOSSPSKTYIQVQLN-GSRLCIKAEMGILQVQDKESVSPFRYFNIL	
SEQIDNO:54	LVRPRTLTVTWSPSAKPTGIVEVLN-GSRLCIKAEMGILQVQDKESVSPFRYFNIL	
SEQIDNO:55	LVRPRTLTVTWSPSAKPTGIVEVLN-GSRLCIKAEMGILQVQDKESVSPFRYFNIL	

LAMP相同じドメイン2	
SEQIDNO: 3	QASGNGCTRK-----SNLLNPFQGGFWNLTFKEDEESYYISEVGAYLTWS-----DPETIY 319
SEQIDNO: 44	SLSGCGLCARNEHS-----FLFLFEGPGPSVTDDEESEYYISEVGAYLTWS-----DPETIY 319
SEQIDNO: 45	QASGNGCTR-----SNLLNPFQGGFWNLTFKEDEESYYISEVGACLTWS-----DPETIY 319
SEQIDNO: 46	QASGNCQGTRN-----SNLLNPFQGGFWNLTFKEDEESYYISEVGACLTWS-----DPETIY 319
SEQIDNO: 47	QTSGNGCSQK-----SNLLNPFQGGFWNLTFKEDEESYYISEVGALVWS-----NPKEVY 331
SEQIDNO: 48	QASGNGCSRK-----SNLLNPFQGGFWNLTFKEDEESYYISEVGAYLTWS-----NPKEVY 333
SEQIDNO: 49	TFLVLSRATP-----PTFLTKGQGSYVTKWNGRLAAPPCKNCNSPKL-----NPARYV 333
SEQIDNO: 50	QVSIGCGKQR-----SNLLNWFQGGFWNLTFKEDEESYYISEVGAYLTWS-----NPETRY 335
SEQIDNO: 51	QASGNGCSQ-----SNLLNPFQGGFWNLTFKEDEESYYISEVGAYLTWS-----NPARYV 334
SEQIDNO: 52	QASGNCQGTR-----SNLLNPFQGGFWNLTFKEDEESYYISEVGAYLTWS-----NPARYV 334
SEQIDNO: 53	HAWSGKGCSQN-----SNMLPFGGSNTWTFKEDEESYYISEVGALLTWS-----NPTERY 312
SEQIDNO: 54	SNLLNPFQGGFWNLTFKEDEESYYILEVGALLTWS-----NPTERY 312

LAMP-3					
取得番号	種	配列番号	取得番号	種	配列番号
NP_055213.2	<i>H. sapiens</i>	3	XP_001496333.1	<i>E. caballus</i>	50
XP_001155195.3	<i>P. troglodytes</i>	44	NP_001095605.1	<i>B. Taurus</i>	51
XP_003894825.1	<i>P. Anubis</i>	45	XP_004003158.1	<i>O. aries</i>	52
NP_001028044.1	<i>M. mulatta</i>	46	NP_001012015.1	<i>R. norvegicus</i>	53
XP_848889.2	<i>C. lupus familiaris</i>	47	NP_796330.2	<i>M. musculus</i>	54
XP_003558746.1	<i>S. scrofa</i>	48	XP_002936919.2	<i>X. tropicalis</i>	55
XP_001326588.2	<i>O. oris</i>	49			

〔 図 6 - 1 〕

図6 オーソロガス配列を含むヒトLIMP-2アラインメント

シグナル配列	
SEQIDNO:4	-MGRCCCFYTAGTGLS 13
SEQIDNO:56	-MGRCCCFYTAGTGLS 13
SEQIDNO:57	-MGRCCCFYTAGTGLS 13
SEQIDNO:58	-MGRCCCFYTAGTGLS 13
SEQIDNO:59	-MGRCCCFYTAGTGLS 13
SEQIDNO:60	-MGRCCCFYFAVGTGLS 12
SEQIDNO:61	-MTRSCCFYTAGTGLS 13
SEQIDNO:62	-MARCCCFYTAGTGLS 13
SEQIDNO:63	-MSRLCFYTAGTGLS 13
SEQIDNO:64	-MVKWFVAFGTGLS 13
SEQIDNO:65	MQLDDILHINNCKADCSSLSTTPNPKHTFKTLSTVNMNGPKHKGKFTKLSTVNLR6WQ1ITVVA 58
SEQIDNO:66	-MYGRSNRLCALKLSSLAFLVTVGFLVIA- FA 27

LAMP相同ドメイン

LAMP相同ドメイン

SEQIDNO:4 EILRGE--PDRVYVPPWVTPTRRLRNKALQIPEGCNGT1LSAVSNKAYVPEGNSQGPDKD13
 SEQIDNO:56 EILRGE--PTPRVBVNGPYTTRRLRNKALQIPEGCNGT1LSAVSNKAYVPEGNSQGPDKD13
 SEQIDNO:57 EILRGE--PTPRVBVNGPYTTRRLRNKALQIPEGCNGT1LSAVSNKAYVPEGNSQGPDKD13
 SEQIDNO:58 EILRGE--PLLEEVGGPYTTRRLRNKALQIPEGCNGT1LSAVSNKAYVPEGNSQGPDKD13
 SEQIDNO:59 EILRGE--PLLEEVGGPYTTRRLRNKALQIPEGCNGT1LSAVSNKAYVPEGNSQGPDKD13
 SEQIDNO:60 EILRGE--PLLEEVGGPYTTRRLRNKALQIPEGCNGT1LSAVSNKAYVPEGNSQGPDKD13
 SEQIDNO:61 EILRGE--PLLEEVGGPYTTRRLRNKALQIPEGCNGT1LSAVSNKAYVPEGNSQGPDKD13
 SEQIDNO:62 EILRGE--PLLEEVGGPYTTRRLRNKALQIPEGCNGT1LSAVSNKAYVPEGNSQGPDKD13
 SEQIDNO:63 EILRGE--PLLEEVGGPYTTRRLRNKALQIPEGCNGT1LSAVSNKAYVPEGNSQGPDKD13
 SEQIDNO:64 EILRGE--PLLEEVGGPYTTRRLRNKALQIPEGCNGT1LSAVSNKAYVPEGNSQGPDKD13
 SEQIDNO:65 EILRGE--PLLEEVGGPYTTRRLRNKALQIPEGCNGT1LSAVSNKAYVPEGNSQGPDKD13
 SEQIDNO:66 EILRGE--PLLEEVGGPYTTRRLRNKALQIPEGCNGT1LSAVSNKAYVPEGNSQGPDKD13

【 図 6 - 3 】

LAMP相同ドメイン

	3	4	5	
SEQUIDNO: 4	--SDNAGFCGPCE	-GNCGLGSQGVLN1SCKNGAP1I	MSSFPFHYPQADERFVSALEIGKHP	-NCG
SEQUIDNO: 56	--SDNAGFCGPCE	-GNCGLGSQGVLN1SCKNGAP1I	MSSFPFHYPQADERFVSALEIGKHP	-NCG
SEQUIDNO: 57	--SDNAGFCGPCE	-GNCGLGSQGVLN1SCKNGAP1I	MSSFPFHYPQADERFVSALEIGKHP	-NCG
SEQUIDNO: 58	--SDNAGFCGPCE	-GNCGLGSQGVLN1SCKNGAP1I	MSSFPFHYPQADERFVSALEIGKHP	-NCG
SEQUIDNO: 59	--SDNAGFCGPCE	-GNCGLGSQGVLN1SCKNGAP1I	MSSFPFHYPQADERFVSALEIGKHP	-NCG
SEQUIDNO: 60	--SDNAGFCGPCE	-GNCGLGSQGVLN1SCKNGAP1I	MSSFPFHYPQADERFVSALEIGKHP	-NCG
SEQUIDNO: 61	DENPANAGFCGPVA	-DGLDKLGKLVKCRSVQ	GIAFQ1IVSFWPHYQADERFVYIAINAEQ	-NCG
SEQUIDNO: 62	--SENAFGCGPCE	-GNMDGAVLQNS1SCKNGAP1I	MSSFPFHYPQADERFVSALEIGKHP	-NCG
SEQUIDNO: 63	T7VNPNQKGFCPVCP	-GNCPLGSSLVNS1CKQAF1FLSAPHY1I	QADQJFVSDIEGKHP	-TK
SEQUIDNO: 64	T7VNPNQKGFCPVCP	-GNCPLGSSLVNS1CKQAF1FLSAPHY1I	QADQJFVSDIEGKHP	-TK
SEQUIDNO: 65	DSHPFLNNCFCKAGKSC	-PGCKHNSLQYDQF1MSLSFPFHYP	YLADES1LTQVGKIPSPM	14
SEQUIDNO: 66	T7VNPNQKGFCPVCP	-PGCKHNSLQYDQF1MSLSFPFHYP	YLADES1LTQVGKIPSPM	14

LAMP相向トメイン

SEQIDNO:	氨基酸	アミノ酸
4	TASRLKSMINTLITLVTNI	-PYIMALGVGFGLVETWLACKGGSMEGTDEADRAPLI
56	TASRLKSMINTLITLVTNI	-PYIMALGVGFGLVFTWLACKGGSMEGTDEADRAPLI
57	TASRLKSVINTLITLVTNI	-PYIMALGVGFGLVFTWLACKGGSMEGTDEADRAPLI
58	TASRLKSVINTLITLVTNI	-PYIMALGVGFGLIFTWLACRGCGSMEGTDEADRAPLI
59	TASRLKSVINTLITLVTNI	-PYIMALGVGFGLIFTWLACRGCGSMEGTDEADRAPLI
60	TANQLKSVINTLITLVTNI	-PYIMALGVGFGLIFTWLACRGCGSMEGTDEADRAPLI
61	SAAQMRMLVLTIVVVNNN	-PVIIALGVVLLWLVLFICRVRNKRNEVRKIDTFE
62	SAAQMRMLVLTIVVVNNN	-PVIIALGVVLLWLVLFICRVRNKRNEVRKIDTFE
63	SPANKLASHLLEAVVNNN	-PFVIMGLIQLVAFESVLMCRGRBEEESTPERRGP
64	SNGLRSLLILFGGVVNNN	-PFVIMGLIQLVAFESVLMCRGRBEEESTPERRGP
65	EIVTL--MFAPEVPPKVRAFLTIVLVALGCLGGLEWVAVI	-CLIRNSRHOSTHLEGSN 5 30 80
66	EILDL--MVAVINPPIVRAFLTIVLVALGCLGGLEWVAVI	-CLIRNSRHOSTHLEGSN 5 30 80

【图 6 - 2】

LAMP相同ドメイン

```

SEQUINO: 4          IRTINTLPIVLTIVIWEQSQ-V-HFLIRELEI1TEAM1KAYQQC1FVTH1TDELLNGKDE1LS1H19
SEQUINO: 56         IRTINTLPIVLTIVIWEQSQ-V-HFLIRELEI1TEAM1KAYQQC1FVTH1TDELLNGKDE1LS1H19
SEQUINO: 57         IRTINTLPIVLTIVIWEQSQ-V-HFLIRELEI1TEAM1KAYQQC1FVTH1TDELLNGKDE1LS1H19
SEQUINO: 58         IRTINTLPIVLTIVIWEQSQ-V-HFLIRELEI1TEAM1KAYQQC1FVTH1TDELLNGKDE1LS1H19
SEQUINO: 59         IRTINTLPIVLTIVIWEQSQ-V-HFLIRELEI1TEAM1KAYQQC1FVTH1TDELLNGKDE1LS1H19
SEQUINO: 60         IRTINTLPIVLTIVIWEQSQ-V-HFLIRELEI1TEAM1KAYQQC1FVTH1TDELLNGKDE1LS1H19
SEQUINO: 61         IRTINTLPIVLTIVIWEQSQ-V-HFLIRELEI1TEAM1KAYQQC1FVTH1TDELLNGKDE1LS1H19
SEQUINO: 62         IRTINTLPIVLTIVIWEQSQ-V-HFLIRELEI1TEAM1KAYQQC1FVTH1TDELLNGKDE1LS1H19
SEQUINO: 63         IRTINTLPIVLTIVIWEQSQ-V-HFLIRELEI1TEAM1KAYQQC1FVTH1TDELLNGKDE1LS1H19
SEQUINO: 64         IRTINTLPIVLTIVIWEQSQ-V-HFLIRELEI1TEAM1KAYQQC1FVTH1TDELLNGKDE1LS1H19
SEQUINO: 65         IRTINTVNPMLSAT5QSQHSKAAR1FLMAS1IMDL1KIPKFVPSVQSVQLLNGYEDPPL1KL2K123
SEQUINO: 66         IRTINTVNPMLSAT5QSQHSKAAR1FLMAS1IMDL1KIPKFVPSVQSVQLLNGYEDPPL1KL2K123

```

LAMP相同ドメイン

LAMP相同ドメイン

【 図 6 - 4 】

RY-----

LIMP-2					
取得番号	種	配列番号	取得番号	種	配列番号
NP_005497.1	<i>H. sapiens</i>	4	NP_775366.1	<i>D. rerio</i>	61
XP_517214.2	<i>P. troglodytes</i>	56	NP_446453.1	<i>R. norvegicus</i>	62
XP_001096458.1	<i>M. mulatta</i>	57	XP_420593.1	<i>G. gallus</i>	63
XP_005639134.1	<i>C. lupus familiaris</i>	58	NP_001016557.1	<i>X. tropicalis</i>	64
NP_001095623.1	<i>B. Taurus</i>	59	NP_726504.2	<i>D. Melanogaster</i>	65

40

10

20

30

50

【圖 7 - 1】

【 図 7 - 2 】

図7 オーソロガス配列を含むヒトLIMBIC／SLAMPアラインメント

```

シグナル配列 LAMP相同ドメイン 1
SEQIDNO: 67 -MVRVQ/PDKRLQLPV--LLELLCLL--LPTGLR--PVSVDNFNRGTDNTVTRQ/GDTA/LRCVVED
SEQIDNO: 68 -MVMVRQ/PDKRLQLPV--LLELLCLL--LPTGLPVRSSVDFNRGTDNTVTRQ/GDTA/LRCVVED
SEQIDNO: 69 -MAGVRQ/PDKRLQLPV--LLELLCLL--LPTGLPVRSSVDFNRGTDNTVTRQ/GDTA/LRCVVED
SEQIDNO: 70 -MVMVRQ/PDKRLQLPV--LLELLCLL--LPTGLPVRSSVDFNRGTDNTVTRQ/GDTA/LRCVVED
SEQIDNO: 71 -MVRGSQSDNRLNLP--LLELLCLL--LPTGLPVRSSVDFNRGTDNTVTRQ/GDTA/LRCVVED
SEQIDNO: 72 -MCLSMILHWSIYFPE--LLELLCLL--LPTGLPVRSSVDFNRGTDNTVTRQ/GDTA/LRCVVED
SEQIDNO: 102 -MVMVRQ/PDKRLQLPV--LLELLCLL--LPTGLPVRSSVDFNRGTDNTVTRQ/GDTA/LRCVVED
SEQIDNO: 103 -MVMVRQ/PDKRLQLPV--LLELLCLL--LPTGLPVRSSVDFNRGTDNTVTRQ/GDTA/LRCVVED
SEQIDNO: 104 -MVMVRQ/PDKRLQLPV--LLELLCLL--LPTGLPVRSSVDFNRGTDNTVTRQ/GDTA/LRCVVED
SEQIDNO: 105 -MVMVRQ/PDKRLQLPV--LLELLCLL--LPTGLPVRSSVDFNRGTDNTVTRQ/GDTA/LRCVVED
SEQIDNO: 106 -MSFGFAEE--SCQILNLAEPLS/SEARKEAFPA/GDGTIT/LRCVVED
SEQIDNO: 107 -MPCRLLHSIWMVGLFLCLL--LGLPFRSDFGNRSTNDNTVTRQ/GDTA/LRCVVED
SEQIDNO: 108 -MLGARLPPRSPLQLPV--LLELLCLL--LPTGLPVRSSVDFNRGTDNTVTRQ/GDTA/LRCVVED
SEQIDNO: 109 -MVMVRQ/HDFKQLPV--LLELLCLL--LPTGLPVRSSVDFNRGTDNTVTRQ/GDTA/LRCVVED
SEQIDNO: 110 -MVMVRQ/HDFKQLPV--LLELLCLL--LPTGLPVRSSVDFNRGTDNTVTRQ/GDTA/LRCVVED
SEQIDNO: 111 -MRTYI_LHSLWVII--LRLCLL--LPTGLPVRSSVDFNRGTDNTVTRQ/GDTA/LRCVVED
SEQIDNO: 112 -MPCRLLHSIWMVGLFLCLL--LGLPFRSDFGNRSTNDNTVTRQ/GDTA/LRCVVED
SEQIDNO: 113 -MGRVNSKWLQ--LQAS_FFLRLCL--LPTGPFRS/DVW/MQATRNTT/IRQ/GDTA/LRCVVED

```

LAMP相同ドメイン

【図 7 - 3】

【 図 7 - 4 】

LAMP相同ドメイン

膜貫通ドメイン

SEQIDNO: 67	VAANGLTGVNAILFPGSVRGINGSILVAPVIMLIAASLFLCLL--SIC-	33
SEQIDNO: 68	VAANGLTGVNAILFPGSVRGINGSILVAPVIMLIAASLFLCLL--SIC-	33
SEQIDNO: 69	VAANGLTGVNAILFPGSVRGINGSILVAPVIMLIAASLFLCLL--SIC-	33
SEQIDNO: 70	VAANGLTGVNAILFESKYAKTEPDMQVTE-HFLIDKIS1TRPHL-KVNPIQK-	33
SEQIDNO: 71	VATRNLGTVNAILFSLY--GPPTD1PATSLAS1MLM1AN1LLCFLC-CTC-	33
SEQIDNO: 72	VATRNLGTVNAILFHNSAFLYKPGMGRDHSNACCC1LW1MLM1LLCVSAL-LQC-	33
SEQIDNO: 102	VAANGLTGVNAILFPGSVRGINGSILVAPVIMLIAASLFLCLL--SIC-	33
SEQIDNO: 103	VAANGLTGVNAILFPGSVRGINGSILVAPVIMLIAASLFLCLL--SIC-	33
SEQIDNO: 104	VAANGLTGVNAILFPGSVRGINGSILVAPVIMLIAASLFLCLL--SIC-	33
SEQIDNO: 105	VAANGLTGVNAILFPGSVRGINGSILVAPVIMLIAASLFLCLL--SIC-	33
SEQIDNO: 106	IAQNGLKTNTTSV1LFRPGSVRGINGSILVAPVIMLIAASLFLCLL--SIC-	33
SEQIDNO: 107	VAANGLTGVNAILFPGSVDATSLAS1MLM1AN1LLCFLC-YRQ-	33
SEQIDNO: 108	VAANGLTGVNAILFPGSVRGINGSILVAPVIMLIAASLFLCLL--SIC-	33
SEQIDNO: 109	VAANGLTGVNAILFSLY--GPPTD1PATSLAS1MLM1AN1LLCFLC-CTC-	33
SEQIDNO: 110	VAANGLTGVNAILFSLY--PTGTGRVNGDSLSVAPVIMLIAASLFLCLL--SIC-	33
SEQIDNO: 111	VAANGLTGVNAILFSLY--PTGTGRVNGDSLSVAPVIMLIAASLFLCLL--SIC-	33
SEQIDNO: 112	VAANGLTGVNAILFSLY--GPPTD1PATSLAS1MLM1AN1LLCFLC-CTC-	33
SEQIDNO: 113	VASNRVLQVQNSL1YLRYPGTGRDINGASCVSQS1WL1LIAF1LKC- *: *.*. . * . : * .	33

LAMP相同ドメイン

LAMP相同ドメイン

SEQIDNO:	4	
67	GREFGEQEYILELGITREQSGKYECKAANEVASSVQKVQKVTVNYNPTITESKS	230
68	GREFGEQEYILELGITREQSGKYECKAANEVASSVQKVQKVTVNYNPTITESKS-NEAT	230
69	GREFGEQEYILELGITREQSGKYECKAANEVASSVQKVQKVTVNYNPTITESKS	230
70	GREFGEQEYILELGITREQSGKYECKAANEVASSVQKVQKVTVNYNPTITESKS-NEAT	230
71	ARDFGEQEYILELGITREQSGKYECKAANEVASSVQKVQKVTVNYNPTITESNS	230
72	ALAEVL-GEYLETGSVRSQGTYRECKAANSVDPDVKYVNVNNPYPKDVRKTS-SETA	225
102	GREFGEQEYILELGITREQSGKYECKAANEVASSVQKVQKVTVNYNPTITESKS-NEAT	230
103	GREFGEQEYILELGITREQSGKYECKAANEVASSVQKVQKVTVNYNPTITESKS-NEAT	230
104	GREFGEQEYILELGITREQSGKYECKAANEVASSVQKVQKVTVNYNPTITESKS-NEAT	230
105	GREFGEQEYILELGITREQSGKYECKAANEVASSVQKVQKVTVNYNPTITESKS-NEAT	230
106	GREFGEQEYILELGITREQSGKYECKAANEVASSVQKVQKVTVNYNPTITESKS-NEAT	230
107	GREFGEQEYILELGITREQSGKYECKAANEVASSVQKVQKVTVNYNPTITESKS-NEAT	230
108	GREFGEQEYILELGITREQSGKYECKAANEVASSVQKVQKVTVNYNPTITESKS-NEAT	230
109	GREFGEQEYILELGITREQSGKYECKAANEVASSVQKVQKVTVNYNPTITESKS-NEAT	230
110	GKFGEQEYILELGITREQSGKYECKAANEVASSVQKVQKVTVNYNPTITESKS-NEAA	230
111	GREFGEQEYILELGITREQSGKYECKAANEVASSVQKVQKVTVNYNPTITESKS-NEAR	227
112	ARDFGEQEYILELGITREQSGKYECKAANEVASSVQKVQKVTVNYNPTITESKS-NEAT	227
113	AFPLDG-EYELDILIGIMRTOQAGRYECKAANSVDPDVKYVNVNNPYPKTITQGS-SETP	229

10

20

【 図 7 - 4 】

SEQUINO:67		338
SEQUINO:68		338
SEQUINO:69		338
SEQUINO:70		341
SEQUINO:71		331
SEQUINO:72		333
SEQUINO:102		338
SEQUINO:103		338
SEQUINO:104		338
SEQUINO:105		338
SEQUINO:106	MTTFSIGLQLPLQTWRDIVLPATFYSHHTYGMGSYLLRGLPFDQQYEARVQSRSNRYGWSD	391
SEQUINO:107		334
SEQUINO:108		338
SEQUINO:109		338
SEQUINO:110		338
SEQUINO:111		335
SEQUINO:112		334
SEQUINO:113		337

30

LIMBIC/LSAMP

取得番号	種	配列番号	取得番号	種	配列番号
NP_002329.2	<i>H. sapiens</i>	67	NP_001192297.1	<i>B. Taurus</i>	105
XP_516662.2	<i>P. troglodytes</i>	68	XP_312298.5	<i>A.gambiae</i>	106
XP_002716722.1	<i>O. cuniculus</i>	69	NP_001096385.1	<i>X.tropicalis</i>	107
NP_780757.1	<i>M. musculus</i>	70	XP_003434117.1	<i>C. lupus familiaris</i>	108
NP_001086181.1	<i>X. laevis</i>	71	XP_0031362972.1	<i>M. domestica</i>	109
NP_001034921.1	<i>D. rerio</i>	72	NP_990205.1	<i>G. gallus</i>	110
NP_058938.1	<i>R. norvegicus</i>	102	XP_002190582.1	<i>T. guttata</i>	111
XP_001502710.1	<i>E. caballus</i>	103	NP_001096385.1	<i>X. tropicalis</i>	112
NP_001213162.1	<i>S. scrofa</i>	104	XP_003449349.1	<i>O. niloticus</i>	113

40

50

【 図 8 - 1 】

図8 オーソロガス配列を含むヒトENDOLYNアラインメント

```

シグナル配列                                         LAMP相同ドメイン

SEQIDNO: 5
MSRLSRLSLILWAATCAGLVLCLS-----DKNTTTH-ENVTTLAPLISNVTSAP-----V-TSLPLV53
SEQIDNO: 73
MSGSSRLSLLWAATCAGLVLCLSQAOPNITTLAARNTEVEPT-----VTPWPTTOM500
SEQIDNO: 74
MSRLSRLSLLWAATCAGLVLCLSSEAEPNTT-----TNTVSLLTAPTSNTISAP-----V-TSLPLV53
SEQIDNO: 75
MLGLSRLSLLWAATCAGLVLCLSAAALCWLTAANNSTL-----PFSPTTTFWPLSPPTTT-----T-ASPAPKL77
SEQIDNO: 76
MSGLSRLSLLWAATCAGLVLCLSAAATGAGT-----ENVTTASS-----PFNTTPTTVPSFTLPLTPV58
SEQIDNO: 77
MSGLSRLSLLWAATCAGLVLCLSAAATGAGT-----ENVTTASS-----PFNTTPTTVPSFTLPLTPV58
SEQIDNO: 78
MSGLSRLSLLWAATCAGLVLCLSAAATGAGT-----ENVTTASS-----PFNTTPTTVPSFTLPLTPV58
SEQIDNO: 79
MSGASRLSLLWAATCAGLVLCLSAAQNS-----SANSVNIDT-----TT-----SKVWPPTT149

```

```

LAMP相同ドメイン

SEQIDNO:5 V$T-ATPVFTANSKAPTPVQPSPTT-SKTTTSGTNTNTVPTSQVRKSTTF-AASIFG 168
SEQIDNO:73 V1PT-ATPVFTANSKAPTPVQPSPTT-SKTTTSGTNTNTVPTSQVRKSTTF-AASIFG 168
SEQIDNO:74 V$T-ATPVFTANSKAPTPVQPSPTT-SKTTTSGTNTNTVPTSQVRKSTTF-AASIFG 168
SEQIDNO:75 GPT-ATVLPT-NSTAKTTLPEFSSA-STTATSGTNTNTVPTSQVRKSTTF-AASIFG 168
SEQIDNO:76 VPT-ATTPPT-NSTAKTTLPEFSSA-STTATSGTNTNTVPTSQVRKSTTF-AASIFG 168
SEQIDNO:77 VPT-ATTPPT-NSTAKTTLPEFSSA-STTATSGTNTNTVPTSQVRKSTTF-AASIFG 168
SEQIDNO:78 APE-ATPMPT-NSTAKTTLPEFSSA-STTATSGTNTNTVPTSQVRKSTTF-AASIFG 168
SEQIDNO:79 V1PT-ATPVFTANSKAPTPVQPSPTT-SKTTTSGTNTNTVPTSQVRKSTTF-AASIFG 168

```

膜貫通トロマイ	細胞質尾部
SEQIDNO: 5	GIVILVLGVQAVIFFLYFKCKSKERNYHTL 19
SEQIDNO: 73	GIVILVLGVQAVIFFLYFKCKSKERNYHTL 19
SEQIDNO: 74	GIVILVLGVQAVIFFLYFKCKSKERNYHTL 19
SEQIDNO: 75	GIVILVLGVQAVIFFLYFKCKSKERNYHTL 19
SEQIDNO: 76	GIVILVLGVQAVIFFLYFKCKSKERNYHTL 19
SEQIDNO: 77	GIVILVLGVQAVIFFLYFKCKSKERNYHTL 19
SEQIDNO: 78	GIVILVLGVQAVIFFLYFKCKSKERNYHTL 19
SEQIDNO: 79	GIVILVLGVQAVIFFLYFKCKSKERNYHTL 19
*****	*****

【図 9 - 1】

図9 オーソロガス配列を含むヒトMACROSAILINアラインメント

シグナル配列		LAMP相同ドメイン1
	1	
SEQIDNO:80	MRLAVLFSGALLGL-LAAGTGNCDPHKKSSATLLPSFTVTPTEST-	-GTTSHRTTK 55
SEQIDNO:81	MRLAVLFSGALLGL-	-GTTSHRTTK 55
SEQIDNO:82	MRLAVFSGSGALLGL-LAAGTGTGCDPHKKSSATLLPSFTVTPTESTPS-	-PGTSHTRTK 58
SEQIDNO:83	MRLAVFSGSGALLGL-LAAGTGTGCDPHKKSSATLLPSFTVTPTESTPS-FTTSHRTTK 58	
SEQIDNO:84	MRLAVFSGSGALLGL-LAAGTGTGCDPHKKSSATLLPSFTVTPTESTPS-PTTSHRTTK 58	
SEQIDNO:85	MRLAVFSGSGALLGL-LAAGTGTGCDPHKKSSATLLPSFTVTPTESTPS-PHTTSHRTTK 58	
SEQIDNO:86	MRLAVFSGSGALLGL-LAAGTGTGCDPHKKSSATLLPSFTVTPTESTPS-BHTTSHRTTK 58	
SEQIDNO:87	MRLAVLFSGALLGL-LAAGTGTGCDPHKKSSATLLPSFTVTPTESTPS-PTGTSHTQTQ 56	
SEQIDNO:88	MRLVLFSGALLGL-LAAGTGTGCDPHKKSSATLLPSFTVTPTESTPS-S-SGTSHTRTK 27	
SEQIDNO:89	MRLAVLFSGALLGL-LAESTTSH-	22
SEQIDNO:90	MRLAVLFSGALLGL-	-GTTSHRTTK 55
SEQIDNO:91	MRLLSLLSGSGALLGL-LAEGAGGCDPKEKSLLVLPSTTITATERST-SPPTTSSGS 58	
SEQIDNO:92	-MGLTLPAGGQSQRANCRRPHKKSSATLLPSFTVTPTESTSG--PTTAAHHTQT 49	

LAMP相同ドメイン	
SEQIDNO:80	SHKTTTTHRRTT--TGTTSHOPTATHTNITTSHGNVTWHTPSNSTSTATSQGPSTAT 100
SEQIDNO:81	SHKTTTTHRRTT--TGTAOSHGPPTATHTNITTSHGNVTWHTPSNSTSTATSQGPSTAT 100
SEQIDNO:82	SHRTTTHRLSTTTHTNTTGTTSSESPHTNSPA-- 92
SEQIDNO:83	SHGNVTWTH--T-SGGSPVTWHNPA-- 77
SEQIDNO:84	SHKTTTTHRRTT--TGTTSHOPTATHTNITTSHGNVTWHTPSNSTSTATSQGPSTAT 100
SEQIDNO:85	SHRPTTTS--HRPTTSHOPTTSHRPT-- TTS 85
SEQIDNO:86	SHRTTTHRRTT--TGTTSHOPTATHTNITTSHGNVTWHTPSNSTSTATSQGPSTAT 100
SEQIDNO:87	SHRTTTHRRTT--GTTSMDPHTTSHRNPE-- 79
SEQIDNO:88	HSHTTTHRRTT--SHSTATPTGTSHTSHRPTAT 50
SEQIDNO:89	-RTTTPR--TTTGTSHOPTATHTNITTSHGNVTWHTPSNSTSTATSQGPSTAT 100
SEQIDNO:90	SHKTTTTHRRTT--TGTTSHOPTATHTNITTSHGNVTWHTPSNSTSTATSQGPSTAT 100
SEQIDNO:91	-TATTYTR--TAATFTSHOPTATHTNITTSHGNVTWHTPSNSTSTATSQGPSTAT 100
SEQIDNO:92	DHGGTTSHETTTSQGTTSHGTSTPHTTGGHT-TGHQN--TSH-- 80
	----- 91

LAMP相同ドメイン1	
SEQIDNO:80	HSPATTSHGNATVHPT--SNSTATSPG-----F-T--SSAHPPEPPPEPSPGPSPGSTK 154
SEQIDNO:81	HSPATTSHGNATVHPT--SNSTATSPG-----F-T--SSAHPPEPPPEPSPGPSPGSTK 154
SEQIDNO:82	--TTTSHQNTVHTH--SNITATSPG-----EST--RSPHPEP--PEPSPGPSPGSTK 135
SEQIDNO:83	--TTTSHQNTIISATVSPPT-----NG-TATSPRSR-----VHPGPGPGPSPGPSPGSTK 134
SEQIDNO:84	HRPATTSHGNAVTVHPT--SNSTATSPG-----L-T--SSAHPGPPEPPPEPSPGPSPGSTK 154
SEQIDNO:85	HRFTTTSHGNAVTVHPT-----SP-----TTNSPGFST-----VHPGPGPPEPPPEPSPGSTK 128
SEQIDNO:86	AFTTTSHGNAVTVHPT-----TGTTGKGHTT-----S-S-----SSAHPGPPEPPPEPSPGSTK 154
SEQIDNO:87	TTTSHQNTVHTH--SNITATSPG-----S-S-----SSAHPGPPEPPPEPSPGSTK 135
SEQIDNO:88	TTTCHQNTVHTH----SNITATSPG-----EST--RSPHPEP--PEPSPGPSPGSTK 134
SEQIDNO:89	HRPATTSHGNAVTVHPT--SNSTATSPG-----EST--RPHPEPPEPPPEPSPGPSPGSTK 154
SEQIDNO:90	HRPATTSHGNAVTVHPT--SNSTATSPG-----L-T--SSAHPGPPEPPPEPSPGPSPGSTK 154
SEQIDNO:91	--YTTSECTAVHTH----SPN-----TSTT-----STSQSGPSPGPSPQTSPTSPK 123
SEQIDNO:92	--STTSHQNTSHPKHTTH----TRTHSHGTGHTWARTPRTIGPPEPPPEP-----SPC 145

【 図 8 - 2 】

Endolyn					
取得番号	種	配列番号	取得番号	種	配列番号
NP_006007.2	<i>H. sapiens</i>	5	NP_001395061.1	<i>B. taurus</i>	76
NP_058941.1	<i>M. musculus</i>	73	XP_004011265.1	<i>O. aries</i>	77
XP_001091286.1	<i>M. mulatta</i>	74	XP_532256.2	<i>C. lupus familiaris</i>	78
XP_001924661.2	<i>S. scrofa</i>	75	NP_114000.1	<i>R. norvegicus</i>	79

10

20

30

【図9-2】

LAMP相同ドメイン

LAMP相同ドメイン

SEQUIDNO: 80	GSCGEAHPHLLLSF	-----PYGHLISFGFMQDLQQ-----KVVYLSSYMAVEYNVSFPHAAQWTFS	258
SEQUIDNO: 81	GSCGEAHPHLLLSF	-----PYGHLISFGFMQDLQQ-----KVVYLSSYMAVEYNVSFPHAAQWTFS	258
SEQUIDNO: 82	GCGCETHGHLLLSLF	-----PSQGLLSPFGFKQDPLQQ-----SAVVLYNMYAVEYNVSFPQAFQWTFS	258
SEQUIDNO: 83	GCGCETHGHLLLSLF	-----PYGGTQITFGPKFDLHQSPKFVTPVLYNMYAVEYNVSFPQAFQWTFS	239
SEQUIDNO: 84	GCGEAHGPFLLLSF	-----PYGHLISFGFMQDLQQ-----RUVVLYNMYAVEYNVSFPHAAQWTFS	258
SEQUIDNO: 85	GCGDSAPHLILLSF	-----PYGGTQITFGPKFDLHQSPKFVTPVLYNMYAVEYNVSFPQAFQWTFS	234
SEQUIDNO: 86	GDGCDGAPHLILLSF	-----PFGQLLSPFGTQEPCQ-----SUVVLYNMYAVEYNVSFPQAFQWTFS	258
SEQUIDNO: 87	GCGCA-PRHPLLSF	-----PYGGTQITFGPKFDLHQSPKFVTPVLYNMYAVEYNVSFPQAFQWTFS	226
SEQUIDNO: 88	GCGECPHPLILLSF	-----PQGGQLLSPFGKQDFPQFQ-----STVVLNYNMYAVEYNVSFPQAFQWTFS	258
SEQUIDNO: 89	GCGCEAHPHVRWLIL	-----PYGGTQITFGPKFDLHQSPKFVTPVLYNMYAVEYNVSFPQAFQWTFS	258
SEQUIDNO: 90	GCGEAEHGHLLLSLF	-----PYGHLISFGFMQDLQQ-----RUVVLYNMYAVEYNVSFPHAAQWTFS	258
SEQUIDNO: 91	GNCNEAHPHLLLSLF	-----PNGLKLSPFGKQDFPQFQ-----KIVVYLSSLHATEFNVSFPSATWIFTS	227
SEQUIDNO: 92	GEDGIDERSRVTIVASANTVTEGGGSRAAPWTF	-----KIVVYLSSLHATEFNVSFPSATWIFTS	228

40

LAMP相同比

	4	5
SEQIDNO: 80	AQNSAISRLDLQLAPLGQSFCNSNIIISLPAVHLDLLSLRLQQAQLPHTGVFGQGSCSPSDR	318
SEQIDNO: 81	AQNSAISRLDLQLAPLGRSFCNSNIIISLPAVHLDLLSLRLQQAQLPHTGVFGQGSCSPSDR	318
SEQIDNO: 82	AQNSAISRLDLQLAPLGQSFCNSNIIISLPAVHLDLLSLRLQQAQLPHTGVFGQGSCSPSDR	318
SEQIDNO: 83	AQNSAISRLDLQLAPLGQSFCNSNIIISLPAVHLDLLSLRLQQAQLPHTGVFGQGSCSPSDR	318
SEQIDNO: 84	AQNSAISRLDLQLAPLGQSFCNSNIIISLPAVHLDLLSLRLQQAQLPHTGVFGQGSCSPSDR	318
SEQIDNO: 85	AQNSAISRLDLQLAPLGQSFCNSNIIISLPAVHLDLLSLRLQQAQLPHTGVFGQGSCSPSDR	318
SEQIDNO: 86	GONSAISRALQLAPLGQSFCNSNIIISLPAVHLDLLSLRLQQAQLPHTGVFGQGSCSPSDR	318
SEQIDNO: 87	VONSLRDLQLAPLGQRFSCRNNSIALS PAFLHDLLSLRLQQAQLPHTGVFGQGSCSPSDR	318
SEQIDNO: 88	AQNSAISRLDLQLAPLGQSFCNSNIIISLPAVHLDLLSLRLQQAQLPHTGVFGQGSCSPSDR	318
SEQIDNO: 89	VONSLRDLQLTFRGRYSFCNSNIIISLPAVHLDLLSLRLQQAQLPHTGVFGQGSCSPSDR	318
SEQIDNO: 90	AQNSAISRLDLQLAPLGQSFCNSNIIISLPAVHLDLLSLRLQQAQLPHTGVFGQGSCSPSDR	318
SEQIDNO: 91	VENSLRDLQLTFLPGRYFCNSNIIISLPAVHLDLLSLRLQQAQLPHTGVFGQGSCSPSDR	318
SEQIDNO: 92	—LAEVRSRAPSRLGRAGKTRL—RIHQPVVVIQ—HTVVY—	263

(四 9 - 3)

膜貫通ドメイン		細胞質尾部			
取得番号	種	配列番号	取得番号	種	配列番号
SEQIDNO: 80	-SILLPLIIGVILGLLGLLAWVIVLTFCCIRRRPSSAYQAL	354			
SEQIDNO: 81	-SILLPLIIGVILGLLGLLAWVIVLTFCCIRRRPSSAYQAL	354			
SEQIDNO: 82	-SILLPLIIGVILGLLGLLAWVIVLTFCCIRRRPSSAYQAL	355			
SEQIDNO: 83	-SILLPLIIGVILGLLGLLAWVIVLTFCCIRRRPSSAYQAL	355			
SEQIDNO: 84	-SILLPLIIGVILGLLGLLAWVIVLTFCCIRRRPSSAYQAL	354			
SEQIDNO: 85	-SILLPLIIGVILGLLGLLAWVIVLTFCCIRRRPSSAYQAL	354			
SEQIDNO: 86	-FNLLPLIIGVIVGVLISGLGLLALALWVIVLTFCCIRRRPSSAYQPL	329			
SEQIDNO: 87	-SILLPLIIGVILGLLGLLGFALFWVLTTCVIRRPPYQPL	322			
SEQIDNO: 88	PSIIVPLIIGVILGLLGLLAWVIVLAFCCIRRRPSSAYQPL	291			
SEQIDNO: 89	-TILLPLIIGVILGLLGLLAWVIVLTFCCIRRRPSSAYQPL	291			
SEQIDNO: 90	-SILLPLIIGVILGLLGLLAWVIVLAFCCIVRRPSSAYQAL	354			
SEQIDNO: 91	-NIVLPLIVVVGLLVLTLTLLIVLSAFCISRRRPPAYQPL	323			
SEQIDNO: 92					263

【 义 1 0 - 1 】

図10 オーソロガス配列を含むヒトLAMP5アラインメント

シグナル配列 LAMP相同ドメイン

LAMP相同ドメイン

1

SEQUINOID:	MDLGRQFVPSIDLRLRVLMLHEHTMRQIMP	EQEVENLNLGLSLTPKEKDIDTVRNRGTTCLMA	1
SEQUINOID: 93	MDLGRQFVPSIDLRLRVLMLHEHTMRQIMP	EQEVENLNLGLSLTPKEKDIDTVRNRGTTCLMA	60
SEQUINOID: 94	MDLGRQFVPSIDLRLRVLMLHEHTMRQIMP	EQEVENLNLGLSLTPKEKDIDTVRNRGTTCLMA	60
SEQUINOID: 95	MDLGRQFVPSIDLRLRVLMLHEHTMRQIMP	EQEVENLNLGLSLTPKEKDIDTVRNRGTTCLMA	60
SEQUINOID: 96	MDLGRQFVPSIDLRLRVLMLHEHTMRQIMP	EQEVENLNLGLSLTPKEKDIDTVRNRGTTCLMA	60
SEQUINOID: 97	MDLRLRALLGGVDLGLRVLMLHEHTMRQIMP	EQEVENLNLGLSLTPKEKDIDTVRNRGTTCLMA	60
SEQUINOID: 98	MDLVRVTLGGDRLLMFLMMFHVMQTVTAQEV	EQEVENLNLGLSLTPKEKDIDTVRNRGTTCLMA	60
SEQUINOID: 99	MDLGRQFVPSIDLRLRVLMLHEHTMRQIMP	EQEVENLNLGLSLTPKEKDIDTVRNRGTTCLMA	60
SEQUINOID: 100	-----NAAGRLGLLVLILHARLAEQCEVENLNLGLSLTPKEKDIDTVRNRGTTCLMA	52	
SEQUINOID: 101	-MDYRACTSALMVLMLTFCNLEQCEVENLNLGLSLTPKEKDIDTVRNRGTTCLMA	52	

LAMP相同ドメイン

```

SEQUIN#93 : EFAAKFVYDWWASNYSDVLDLQEALTRAEVGKCHGHSQELWFVWDYRAILML 120
SEQUIN#94 : EFAAKFVYDWWASNYSDVLDLQEALTRAEVGKCHGHSQELWFVWDYRAILML 120
SEQUIN#95 : EFAAKFVYDWWASNYSDVLDLQEALTRAEVGKCHGHSQELWFVWDYRAILML 120
SEQUIN#96 : EFAAKFVYDWWASNYSDVLDLQEALTRAEVGKCHGHSQELWFVWDYRAILML 120
SEQUIN#97 : EFAAKFVYDWWASNYSDVLDLQEALTRAEVGKCHGHSQELWFVWDYRAILML 120
SEQUIN#98 : EFAAKFVYDWWASNYSDVLDLQEALTRAEVGKCHGHSQELWFVWDYRAILML 120
SEQUIN#99 : EFAAKFVYDWWASNYSDVLDLQEALTRAEVGKCHGHSQELWFVWDYRAILML 120
SEQUIN#100: EFAAKFVYDWWASNYSDVLDLQEALTRAEVGKCHGHSQELWFVWDYRAILML 120
SEQUIN#101: EFSARILVWYVEPSSNSWVDLSEASLQLPROTEIRGKCNNESELHSLWLDKAYTLLF 118

```

I AMP相同ドメイン

SEQIDNO:	FVK	E-BH-KGKPEAATL-GLQVFDSSKTHF	153
SEQIDNO: 94	FVK	ESB-NKGKPEAATL-GLQVFDSSKTHF	153
SEQIDNO: 95	FVK	ESB-NKGKPEAATL-GLQVFDSSKTHF	153
SEQIDNO: 96	FVK	ESB-NKGKPEAATL-GLQVFDSSKTHF	153
SEQIDNO: 97	FLK	ESB-NKGKPEAATL-GLQVFDSSKTHF	153
SEQIDNO: 98	FVK	ESB-NKGKPEAATL-GLQVFDSSKTHF	153
SEQIDNO: 99	FVK	ESB-NKGKPEAATL-GLQVFDSSKTHF	153
SEQIDNO: 100	FVK	FLV/RGCBPRLGRCAAALRGDQPCPPQHETRSGREBAEFLVLSRQVFDSSKTHF	152
SEQIDNO: 101	FSK	ESQDA---SKRSWMSKQVFDSSKTHF	149
	*	*****	

10

20

【 図 1 0 - 2 】

【図 1 1】

LAMP相同ドメイン

SEQUINO:	SEQUINO:	SEQUINO:	SEQUINO:	SEQUINO:	SEQUINO:	SEQUINO:	SEQUINO:	SEQUINO:	SEQUINO:	SEQUINO:	SEQUINO:	SEQUINO:	SEQUINO:	SEQUINO:	SEQUINO:	SEQUINO:	SEQUINO:	SEQUINO:	SEQUINO:
93	KDVAASAGKHTANSHHSLALVTPAGKGSYECQACQQTISLASSDLPQTCTMVLSAHVHQPFDDI	213																	
SEQUINO: 94	KDVAASAGKHTANSHHSLALVTPAGKGSYECQACQQTISLASSDLPQTCTMVLSAHVHQPFDDI	213																	
SEQUINO: 95	KDVAASAGKHTANSHHSLALVTPAGKGSYECQACQQTISLASSDLPQTCTMVLSAHVHQPFDDI	213																	
SEQUINO: 96	KDVAASAGKHTANSHHSLALVTPAGKGSYECQACQQTISLASSDLPQTCTMVLSAHVHQPFDDI	213																	
SEQUINO: 97	KDVAASAGKHTANSHHSLALVTPAGKGSYECQACQQTISLASSDLPQTCTMVLSAHVHQPFDDI	213																	
SEQUINO: 98	KDVAASAGKHTANSHHSLALVTPAGKGSYECQACQQTISLASSDLPQTCTMVLSAHVHQPFDDI	213																	
SEQUINO: 99	KDVAASAGKHTANSHHSLALVTPAGKGSYECQACQQTISLASSDLPQTCTMVLSAHVHQPFDDI	213																	
SEQUINO: 100	KDVAASAGKHTANSHHSLALVTPAGKGSYECQACQQTISLASSDLPQTCTMVLSAHVHQPFDDI	213																	
SEQUINO: 101	KSGPAPGRHTANSHHSLALVTPAGKGSYECQACQQTISLASSDLPQTCTMVLSAHVHQPFDDI	209																	

脾言通ドメイン

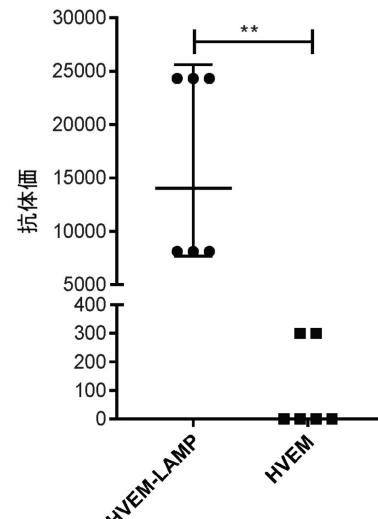
細胞質尾部

4

SEQIDNO: 93	ISDFVFSEHHCKPVDERQLEETLLILGLLGLLGVITNLTLATYVHHHMKTANQVQIPRDR	273
SEQIDNO: 94	ISDFVFSEHHCKPVDERQLEETLLILGLLGLLGVITNLTLATYVHHHMKTANQVQIPRDR	273
SEQIDNO: 95	ISDFVFSEHHCKPVDERQLEETLLILGLLGLLGVITNLTLATYVHHHMKTANQVQIPRDR	273
SEQIDNO: 96	ISDFVFSEHHCKPVDERQLEETLLILGLLGLLGVITNLTLATYVHHHMKTANQVQIPRDR	273
SEQIDNO: 97	ISDFVFSEHHCKPVDERQLEETLLILGLLGLLGVITNLTLATYVHHHMKTANQVQIPRDR	273
SEQIDNO: 98	ISDFVFSEHHCKPVDERQLEETLLILGLLGLLGVITNLTLATYVHHHMKTANQVQIPRDR	273
SEQIDNO: 99	ISDFVFSEHHCKPVDERQLEETLLILGLLGLLGVITNLTLATYVHHHMKTANQVQIPRDR	273
SEQIDNO: 100	TADFVFSEHHCKPVDERQLEETLLILGLLGLLGVITNLTLATYVHHHMKTANQVQIPRDR	269
SEQIDNO: 101	KSDFVYSEHHCKPVDERQLEETLLILGLLGLLGVITNLTLATYVHHHMKTANQVQIPRDR	269
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:	
SEQIDNO: 93	SQYKIMG	280
SEQIDNO: 94	SQYKIMG	280
SEQIDNO: 95	SQYKIMG	280
SEQIDNO: 96	SQYKIMG	280
SEQIDNO: 97	SQYKIMG	280
SEQIDNO: 98	SQYKIMG	280
SEQIDNO: 99	SQYKIMG	280

LAMP5					
取得番号	種	配列番号	取得番号	種	配列番号
NP_0036393.1	<i>H. sapiens</i>	93	NP_001076887.1	<i>B. taurus</i>	97
XP_514512.3	<i>P. troglodytes</i>	94	NP_083806.2	<i>M. musculus</i>	98
NP_001181627.1	<i>M. mulatta</i>	95	NP_001014205.1	<i>R. norvegicus</i>	99
XP_850634.1	<i>C. lupus familiaris</i>	96	XP_004935300.1	<i>G. gallus</i>	100
			NP_001090781.1	<i>X. tropicalis</i>	101

17-ONC-039 D28



30

40

図11 HVEM特異的IgG抗体(28日目)

【図 1 2】

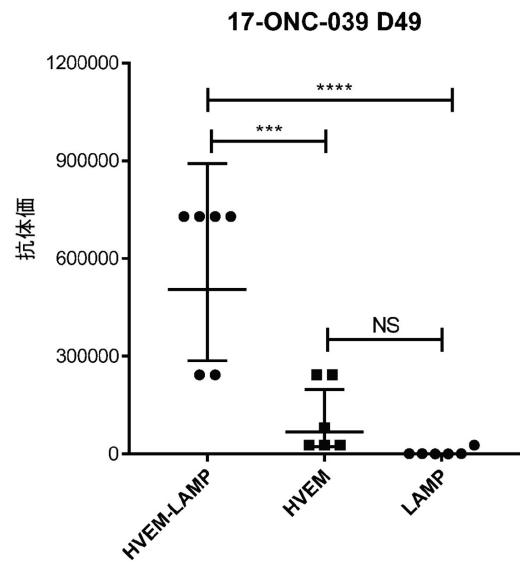


図12 HVEM特異的IgG抗体(49日目)

【図 1 3】

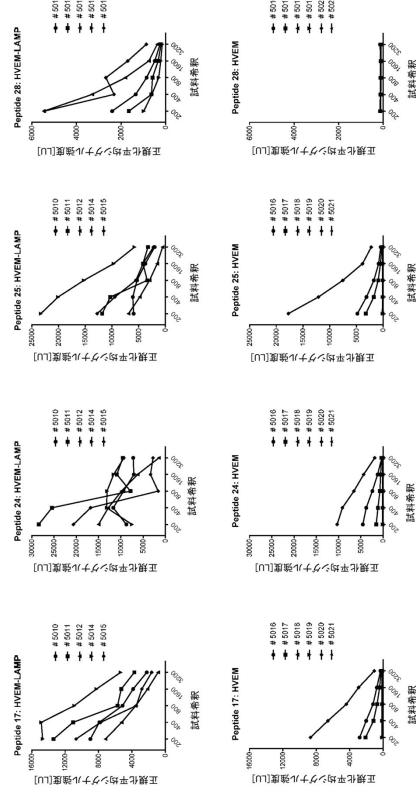


図13

【図 1 4】

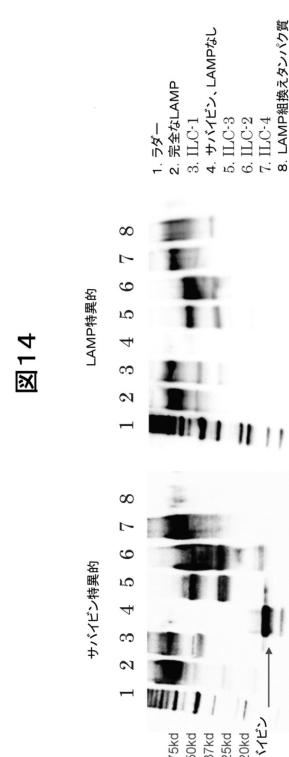


図14

【図 1 5】

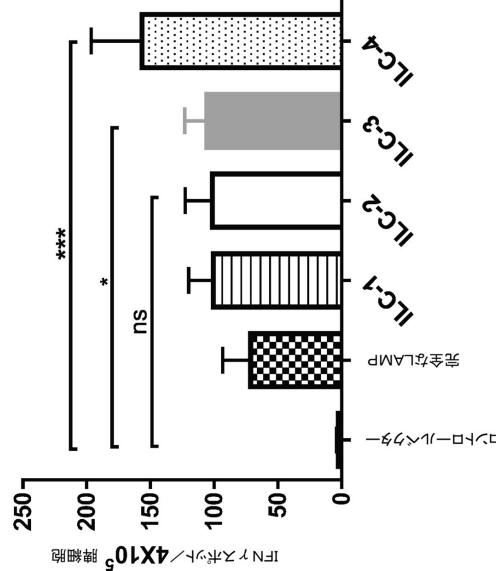


図15

10

20

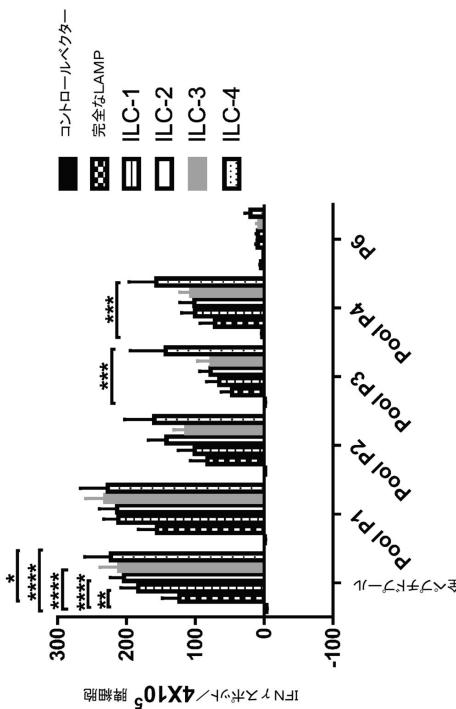
30

40

50

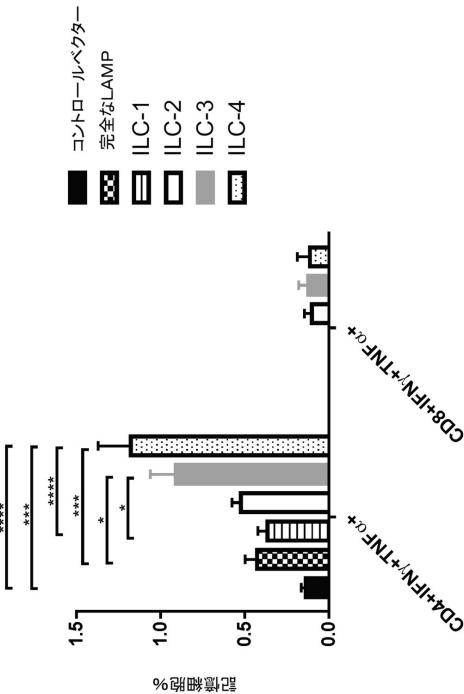
【図 16】

図16



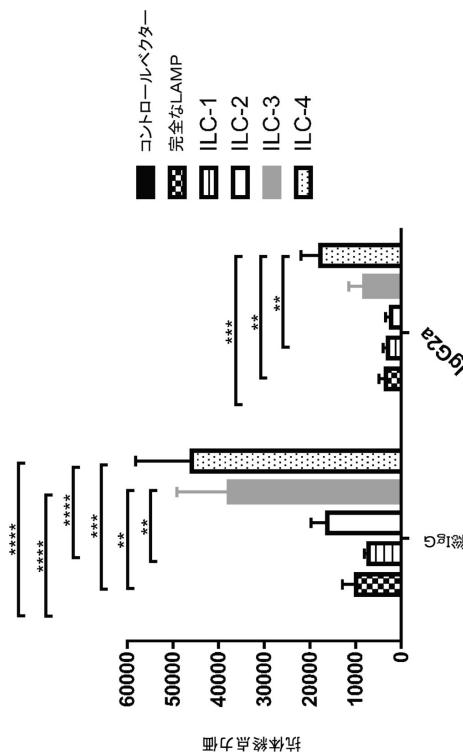
【図 17】

図17



【図 18】

図18



【図 19】

図19

サバイビン - 完全なLAMP構築物の例(配列番号193)

```
maprsarrpllllllglmbcasaaMFMVKNNGTACIMANFAASFVNYDTKSGPKNMTLIDPSDATVVLNRSSCGKENTSDP
SLVIAFGRGHTLTNFTRNATRYSVQLMSFYVNLDTHLFPNASSEKEIKTVESTIDRADIKKYRCVSGTQVHMNNVTVLH
DATIQAYLSNSSSFSRGETRECEQDRSPPTTAPAPPSPSPSPVPKSPSVDXYIVNSGTGTCCLASMGLQLNLTYERKDNTTVLH
LLNNPDKTSAGSGCGAHLVTELEISEGTFLVQFGMNAASSSRFLOGIQLNTILDARDPAFKAAANGSLRALQATVGNNSYK
CNAEEHVRVTKAFSVNIFKVWVQAFKVEGGQFGSVEECLLDENS15MGAPTLPPAWQPFKLDRISTFKNWPFLLEGCAO
TPERMAEGFIHCPTENEPDLAQCCFCFKELEGWEPDDPIEEKKHSSGCAFLSVKKQFEELTGEFLKLDREAKNIKAEETNNKK
KKEFEETAKVRRRAIEQLAA
```

30

サバイビン - ILC - 1構築物の例(配列番号194)

```
maprsarrpllllllglmbcasaaMGAPTLPPAWQPFKLDRISTFKNWPFLLEGACTPERMAEGFIHCPTENEPDLAQCCFC
FKELEGWEPDDPIEEKKHSSGCAFLSVKKQFEELTGEFLKLDREAKNIKAEETNNKKKEFEETAKVRRRAIEQLAA
DMFMVKNNGTACIMANFAASFVNYDTKSGPKNMTLIDPSDATVVLNRSSCGKENTSDPVLIAFGRGHTLTNFTRN
ATRYSVQLMSFYVNLDTHLFPNASSEKEIKTVESTIDRADIKKYRCVSGTQVHMNNVTVLHDTIQAYLSNSSSFSRGETR
CEQDRSPPTTAPAPPSPSPVPKSPSVDXYIVNSGTGTCCLASMGLQLNLTYERKDNTTVTRLLNINPNTKSAASGSCAH
LVTELEISEGTFLVQFGMNAASSSRFLOGIQLNTILDARDPAFKAAANGSLRALQATVGNNSYKCNAAEHVRVTKAFSVNIF
KVWVQAFKVEGGQFGSVEECLLDENS15MGAPTLPPAWQPFKLDRISTFKNWPFLLEGCAO
QOLIPIAVGGALAGLVLIVLIAVYLVGRKRSHAGYQT
```

30

サバイビン - ILC - 2構築物の例(配列番号195)

```
maprsarrpllllllglmbcasaaMGAPTLPPAWQPFKLDRISTFKNWPFLLEGACTPERMAEGFIHCPTENEPDLAQCCFC
KELEGWEPDDPIEEKKHSSGCAFLSVKKQFEELTGEFLKLDREAKNIKAEETNNKKKEFEETAKVRRRAIEQLAA
MFMVKNNGTACIMANFAASFVNYDTKSGPKNMTLIDPSDATVVLNRSSCGKENTSDPVLIAFGRGHTLTNFTRN
RYSVQLMSFYVNLDTHLFPNASSEKEIKTVESTIDRADIKKYRCVSGTQVHMNNVTVLHDTIQAYLSNSSSFSRGETR
QOLIPIAVGGAAGLVLIVLIAVYLVGRKRSHAGYQT
```

40

サバイビン - ILC - 3構築物の例(配列番号196)

```
maprsarrpllllllglmbcasaaMFMVKNNGTACIMANFAASFVNYDTKSGPKNMTLIDPSDATVVLNRSSCGKENTSDP
SLVIAFGRGHTLTNFTRNATRYSVQLMSFYVNLDTHLFPNASSEKEIKTVESTIDRADIKKYRCVSGTQVHMNNVTVLH
DATIQAYLSNSSSFSRGETRECEQDRSPPTTAPAPPSPSPVPKSPSVDXYIVNSGTGTCCLASMGLQLNLTYERKDNTTVLH
CFCFCFKELEGWEPDDPIEEKKHSSGCAFLSVKKQFEELTGEFLKLDREAKNIKAEETNNKKKEFEETAKVRRRAIEQLAA
MDFTCLASMGLQLNLTYERKDNTTVTRLLNINPNTKSAASGSCAHVTELEISEGTFLVQFGMNAASSSRFLOG
IQLNTILDARDPAFKAAANGSLRALQATVGNNSYKCNAAEHVRVTKAFSVNIFKVWVQAFKVEGGQFGSVEECLLDENS
QOLIPIAVGGAAGLVLIVLIAVYLVGRKRSHAGYQT
```

サバイビン - ILC - 4構築物の例(配列番号197)

```
maprsarrpllllllglmbcasaaMFMVKNNGTACIMANFAASFVNYDTKSGPKNMTLIDPSDATVVLNRSSCGKENTSDP
SLVIAFGRGHTLTNFTRNATRYSVQLMSFYVNLDTHLFPNASSEKEIKTVESTIDRADIKKYRCVSGTQVHMNNVTVLH
DATIQAYLSNSSSFSRGETRECEQDRSPPTTAPAPPSPSPVPKSPSVDXYIVNSGTGTCCLASMGLQLNLTYERKDNTTVLH
QOLIPATLPPAWQPFKLDRISTFKNWPFLLEGACTPERMAEGFIHCPTENEPDLAQCCFCFKELEGWEPDDPIEEKKHSSG
CAFLSVKKQFEELTGEFLKLDREAKNIKAEETNNKKKEFEETAKVRRRAIEQLAA
MDFTCLASMGLQLNLTYERKDNTTVTRLLNINPNTKSAASGSCAHVTELEISEGTFLVQFGMNAASSSRFLOG
IQLNTILDARDPAFKAAANGSLRALQATVGNNSYKCNAAEHVRVTKAFSVNIFKVWVQAFKVEGGQFGSVEECLLDENS
QOLIPIAVGGAAGLVLIVLIAVYLVGRKRSHAGYQT
```

50

【図20-5】

LPFTIPSMHQVLDEAIKACKTMQVNNKCIQIYLTRNHEVKSEFDVAVRCLRLGTMCNLALSTPFLMBEHTMPVTBPEY
AQRTADACNEGVKAASLKLHQLCPLRSSDYNRMIIHAATPVDLRLGALNLCLPLMQKFPKQVVMRIFSTNQQGG
MLPYTETAAKAYVGQFQEPTPTPELDLTLSEIAAIIQDLRNKRQ

>配列番号1442、GPGPGリンクで分離されたIE2エピトープ（上記で強調）を含む代表的なワイルス転写因子IE2LAMP構築イノンサート

>配列番号143、PMGLPリンカーで分離されたIE2エピトープ（上記で強調）を含む代表的なウイルス転写因子IE2 LAM構成物イノンサート
RRGRVKIDEVSRNPRFMPGLPGIQIIVYTRNHEVKSPEMGLPLSTPFLMEHTMPVTHPPVEVA

→配列リスト14・5、明細書に記載の改善された完全なLAMP構築案に拘束できるテロメラーゼ活性化
写短知片1 1-8-11-32アミノ
YQCVGCPPLYLQAGAATQARPWPHASGCRRLGCEARANHVSREAVGLPAGAPGRGGASRSLPLPKRPRP
PERPEPTVCGQSWHAPRHTGRPSDRGFVCVSPARAEATTSLEGLSAGLSTHRHSFSGVRHQHAGPSTSFRPVPWD
PPCPVVAETEKKHFLYSSGKDQLCPLSPSLSPSLRSPSLTGLARVEPRLRSPWRPMGTPRRLPLPQRYWMQRPLF
LHNQAGCAVPGVLUKLTHCPLRAVPAACVKEPQGSVAEEEDDTDPRRVLQCLRSHQFSWPVGVFCRACLR
LVPVGPLWSRNRHNTKFLS1KGLHAKLQLSLPQKRSVWRCALRSPGVCVPAEEHLRREELIKAFLP
LMSSVYVLLERNSRFYVTETTFTQKRNLPYFRRKSVMQTLWSMRSVWRCALRSPGVCVPAEEHLRREELIKAFLP
IKPDKGRLPVRINVMWVUGARTFREKRERLTSVRLKALSVNLYRARERPLRGGLGVALDLDIHRARWTFVLR
ODGPPELYFWFKVVDVGYADTIPDORTLEVIASII1KPNPTQCYVRVYAAVQOKKAHGHVRAKPKHSTVLDLQYQCM
FVHALHQTSPSLRDLADDV1QSESSLNSAEGGLPFDVPLRFMCHHAR1VIGSKVSCQCG1PQGSLS1TLLCSLGQYGDME
LKFAGI1RDGLRLLBLDPPDFLVTPLFHHTLAKTFLTRLVPGVEYGVCNLK1VTRVNPFDEEALGTTAFTVQMPVAM
LFLCLLSDMDDLTTRLEQSDSYSSARTFSLRNLTFNGRKAGNMRRLKGFLVPLRKHCSLFLDQLQNSLQTVCNTIY
1ILLQAXRHFQAVLQLPWFQVWKNPQHTSFRLV1SDTALS1CYSL1KNAKMGNSLGAKGAGPLPSEAWQVLCHQAF
LKLTHRRTVYVPLLGSRLTQAQTLCKLPGTT1LAEEAANPLPSDFKT1LD

*配列番号146、本明細書に記載の改善された完全なLAMP構築物内に挿入できるテロメラーゼ遮断写真片2
MPRPARCRAVSSLRSHYREVPLATFVRFLRGQGWLRLQRGDPAFFRALVAQACLVCLCPVWDPARDPPAAPSFRQV
LKLVELVARVLQLCREGAKNVLAFGPFALLGRAGPPEAFFTSVRSLYPTNTDRLRGSGAWLLRLRRVGDGGPLV

【図 20 - 6】

OLGAATOPRAPPHSASPRRRLGRCERAAHSVRAEGPLGLPAGPARRGRRSARSLPLPKRPRGRRAPEAPERPTPVG
QCSWAHDTRGPDSRFGCWCSPRAEAEETLSAGLSTRHSPVSRGHQHPGSPRSPWDTCPVCPVVA
KHFYSSNDGKBLPDRSPFLSRLRSPLSTGARLVEITFLFGSPWMPGTPLRPLPQRQWMPLEPLFLLNHQAOP
VLYKLTHCKPLCRAAATPAAGWCARKEPCQPSVAAPEBEDDTPRVLRLNQHRSPPQVWYFVACRLRLLPVGCLG
RHNERRFLRNTKKFISLGKHAKLSSLQELTWMGSVRDCAMLRSSPGVGVCPAAEHLRREEI1AKFLHWLMSVTVVEL
LRSFVWYDTEITFCQKNUFLPYRQVWSMGSKLSIGTROHKLVRMVEAEVQFHARPALSLRSLRIPKFDGLRP
INFVMDYVQAFTRREBARTLRSKUFLSVLYEDRPLRPLGCGASGLDDIHRAWTFTVFLRVAQDGPPEFLY
VRVATAVGYDITPQDLTVEIASIKPNTQVYCRVAVQKUAGHVKVFRKAQSHVSHTDQLQPMYQFUVHALQJETS
PRLDAVVIQCSLNEASASGLDFWLFRPFLCMCHAVIRGQSYVQEONKLFAIGIRDGLLRLLWDFTFLVTHLTTHA
FRLTFLRVGPVEBYCQVNCNLRKVTFVNPFVEDEALTRFLVSDQSYYARTSISRASLTFRNGFKRGAQNMRLKFCFGVLR
LKHSLSHDQLQNSVTCPTCNVYI1KLLQYARQHFLAVCLPQFHVWKNPFTFLRFLVISDASTLCYS1KUAKNAGMS
LGAAGKAAGPLPSEAQVWLCHQAFLLKLTRHRVTVYVPLLGSLSRTAQTSRSLRKPGLTTLTEALEAANPALSDFTIL
D

[配列番号14 47 サバビン、取得番号NP_001125727]のアミノ酸1～142、パキュロウイルス1Aプロテイン含有タンパク質

>配列番号 148 1AF9—A鎖人、破傷風神経毒C断片
 MNLNDKCVWNEEDDILVLLKSTTLNLDINDIISDFGSNSVTPYDPQLV
 D1EYNDM₁PFNTFVWSRPLRVKVSASHA₂LEYGQTNEYISSSMMKHSIGSWSVLSKGNLNLITWLDSAGEGVQRTT
 FRLDL₃DFCKNFANLAYKVN₄TTTNDRLSANSALYNGVLMGSAT1GLA₅REDNTNTLKLDRCCNNNN₆YVS1DPM₇
 FCFLAKNP₈K1EYLTYS₉LTFLPDRFWNP₁₀LRTDYTEY₁₁VIA₁₂PASSD₁₃QVLDKLN₁₄TIDYML₁₅TNPAS₁₆TYGKLN₁₇Y₁₈
 RLYNGL₁₉K1F1K₂₀TYPR₂₁PNED₂₂FSVKS₂₃F1KLYVSN₂₄NHEH₂₅YVPGKD₂₆NNL₂₇LR₂₈LYGYN₂₉GA₃₀PL₃₁YKMEAV₃₂
 RLDR₃₃KY₃₄WV₃₅VLKYL₃₆DQKNSAL₃₇GVLTHG₃₈NH₃₉GNDP₄₀DL₄₁A₄₂SY₄₃WGNH₄₄FL₄₅KLGCD₄₆WV₄₇FP₄₈WTGDNT₄₉
 >代表的な破傷風神経毒C LAMP構築物、GPGPGリンカーで分離された破傷風神経毒Cエピ
 トープ（上記で強調）
 (配列番号 149)

PGINGKAIHLNNSSEGPFGNNFTTFSWLRVPKVSASHLEQYGTGPGPYVSIDKFRIPKCALNPKEIEKLTT
SLSPGCGPILRVRGNAGPAIPLYKHMVEAKVLRLDK

>代表的な破傷風神経毒C LAMP構築物、PMGLPリンカーで分離された破傷風神経毒Cエビ
トープ（上記で強調）
(配列番号 15 0)
PGINGKAIHLNNSSEGPMLGPNNFTTFSWLRVPKVSASHLEQYGTGPGPYVSIDKFRIPKCALNPKEIEKLTT
SLSPGCGPILRVRGNAGPAIPLYKHMVEAKVLRLDK

>NP_001318.1癌/果糖抗原1【ホモサビエンス】(配列番号151)
MQAEGRRGTGGSDADGPGGPIDPGGGNAGGPGEAGATGGRGPRGAGAARASGPGGGAPRGPHGGAASGLNGCC
RGRGARGPSSLRFLEYLAMTFAPEMEAIIARKRSIQLADQPLPVPGVLLKEFTVSGNLITIRLTAADHRQLQLSISCC
LQLQSLIMWITQCPFLPVFLAQPPSPQRG

【図20-7】

N Y-E S O-1 配列番号151の80~155 (配列番号168)

ARGPESRLLFYLAMPATPMEEALARRSLAQDAPPLPVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHQLQLSISSCLQ
QRR

配列番号152のアミノ酸23～652および690～1255を含む代表的なHER2構築物（配列番号153）

配列番号152のアミノ酸23～632を含む第2の代表的なHER2構築物(配列番号154)

TQVCTGTDMLRLPASPETHLDMLRHLYQCQCVQQGNLELTLYLPTNASLSFLQDQEVCQGYVLI
AHNQVRQVLQLRIRVGTLQFEDNYALAVLDNGDPLNNTPVTGASPQGLRELQLRSLTEILKG
GGVLIQRNPQLCYQDTIWLKDIFT

【 図 2 0 - 1 3 】

MNLLHETDOSAVATRPRWLCKSNEATNTPKHNMKPLDELKAENIKKFLYNTQPIHLAGTEQNQLAKIQI
SQNKWVYDLSHADHAYVLLSVEYNKTHNYSIISNEDGNEFLNTSFPPPGYENVSIDTPVFPFSAFQSG
LUVNVYARTEDPFLERDMLKCSKGKIVIAJRYGVFKRGNVKNAQLAGAKVGYLWYIISDADPFAVGPVSYDPG
GGVQGRNLININGLADDPLTFPGVANEYARGIIEAAGVLSPVPHIYDGQAKLLEKGSQGAPDSWSS
PYNPVGDFGTNSKVKUHMHNTHEVNTRVYIINGLTLGARVEDPFEYVILGHGRDSFWVGGIIPDQSAGAHIVEH
FTGLKLPSBEGDFEGKBLSEYASNDAEFBGGLSTEWANESNRLRQGRVAYNADSSIGEYNTLVRDCTPLMSLVN
TBLKLPSBEGDFEGKBLSEYASNDAEFBGGLSTEWANESNRLRQGRVAYNADSSIGEYNTLVRDCTPLMSLVN
SVETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGMGWFELANSIVLPFCDRDYAVLRYKADYKISI5SMKHPEMKTYZVSF
DLSLSPASVKNFTESIASPKSERLQDFPKDNPIVLRMNDMLQPLERFIDPLGLPDRPFYRVHIVYAPSSHNYCABES
PYIJDALYDFIDESVKDPSKAWGEKBRQVYIATVQAATLSVEVA

BIR C4 サバイシン β [ホモサビエンス] (配列番号184)
MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLLEGCACTPERMAEAGFIHCPTEE
GTVAYACNTSTLGGRRGRTTREHKKHSSGCCFLSVKKOFFELTLGEEEL

GTVAYACNTSTLGGRRGGRITREEKKHSSGCAFLSVKKQFEELTGFKLDRERAKNIAKETNNKKKEFEETAK
KVRRAIEQLAAMD

ムチン-1 ムチン [ホモサピエンス] (配列番号 185)

ムチーン一アイソフォーム ムチーン一アイソフォーム11前軸体【ホモサビエンス】 (配列番号18
6)
TGGSHASSTPGEKETSATQRSSVPSSTEKNALSTGVSFPEFLPHN.SLQNFNSLSDPTSDYQQLRDIQDLSQD
IYQKGGLFLGLSNIKRPGGSVVLQTLAFREKNTLHVNDHWTQFNQTYEAAARSLNTLSDVSPWSDVPSFASQSGAGA
WPVGWJALLVLWVCLVALAVALIYALACVQCCRKNYQQLDIFPARTDYTHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSTDRSPEYK
WSAGNGSLLSYTTPVAATSAKL

C D 4 0 リ ガ ンド [ホモサビエンス] (配列番号 1 8 7)
MKI KUHNGTQD TQWIMGSALFAYVLRDKI BFTWFMKTI QRONTGERSLSSLNCEEIKS QFEGFWK
DMLNKEETKT KFENS PMSX QKGDSI PIAAHV ISEASS KTISVL QWAEGKYYTMNSNL VTL ENGLQJTVK RQGLYYIY
DMLNKEETKT KFENS PMSX QKGDSI PIAAHV ISEASS KTISVL QWAEGKYYTMNSNL VTL ENGLQJTVK RQGLYYIY
HGTGFTSPGLL

WT-1. ウィルムス腫瘍タンパク質アソイフォームD [ホモジニエン] (別表番号188)
MGSDVDRDLNALLPAVPSLGGGGCALKPGASQAVPLWDFAFPGSAAGSGLGGPAPPAPPPPPPPPKFQKEP
SWGGAEPHEEQLSCLATWPSQFTGATGACRYGPQGPPPPSQCASSQGMPNPNAFLPSCLSEQPAIRNQGYST
TDFGTPTSYGHNTTAAQCFKNSHVAEPMCGQCSQVSPVPPVGCHPTDSTSGLSQQALRRTPYSSNDLY
MTSLQCECTWMQNMLGATLKAQGSSSVKWTQEGLNSQHSTQESYHCTEWSDDNTHPTLICAJQYIHTWHGRVFRGIDQVRVE

【图 20 - 14】

GVAPTLVRSASETSEKRPFCMAYPGCNKRYFKLHSQMHRSRKHTGKPYQCDFKDCERRFSRSQDLKRHKQRHRTGV
KPFQCKTCQRKFSDRSLKLKHTTRHTGKTSEKPFSCRWPSCQKKFARSDELVRHHNMHQNRNMTKLQLAL

W1-1トランクード ウィルムス酒場タバコ販賣機オムロ [ホリヒヒエ] (配列番号1
89)
MSGDSDRLNALLPAVPLSGLGGGCGALPSSQGAQWAFLDPAPPAGASYGLSGPAPPPAPPPPPPHF1KQEP
SWGSAHPBEEQCLSPTVHTFGSQTGTAGACRYPGPFMPSQSQQASQARMFNPNAVPLSYCLESQPAIRNGQSY
TFDGTSPSYGHTPSHHAQFPNHSKPHEDPMGQQQSGLQEQQYSVPVVYVGCHTPDSTSCTGSQALLRTPYSSDNLYQ
MTSQCLETMCWNTMNLGATLKVAQGASSSSVWKTEQSNHSTGYESDNHHTPILCQAQYRINTHGUVPRGIQDVRRVP
GAVPLTRVSASETSEKRP

P R A M E 黒色腫で優先的に発現される抗原 [ホモサビエンス] (配列番号 190)
MEPPDPNGGCGTGGVYI GMSVTTGGRPLVLLVAGCGGLKRELLMAMMELLDEEFEPPLFMAEEDG

MERRRNLGSISQYI1MSWPSVPLRLAELQSSLLDEALIAEALLPFLRPLPMLFAA9DRGHSQTLKAMQW
PTCPCLPGLWMLQGHHLETFPKVALDQLVLAQEVRPRRKLWLKDRLRNKSNDPFTWVSNCRASLYSPPEA
QPMTKRNRVGDLSLSEAQPPIFVEVLIFDLKKEGACDLSFLSYLVEKVRKNNVLRLLCKKLKLFPMQDQIIMKILK
MQLDSIELEDTCTVLTPLKPLAKFSYPLQYMLNIRRLLHSHIASYIPEKEQYIQAFTQSFLSCLQLQAVD
SLPFLRGRDLDQQLRRHVMNPLETLSITNCRLSEGDVWHLQSQPSVSQLSVLSLGSVMLTDVSPSPQGALLERASATL
QDLVFBEDCHGTRDQLLALLSPHLSQCHS1QNSIS1SALQSLQHLLG1SLSNLTHVLYPFLESYDIEDHTGL
LERLAYLHDHLLRELLCELGRPSWBLWSANSPCPCHGDRTPFDIP1LCPCFM

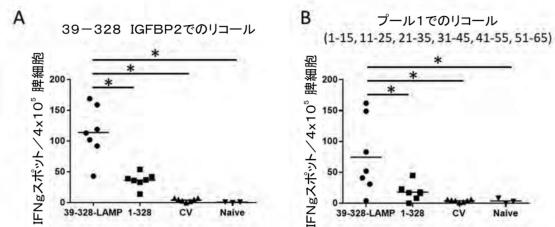
LAGE-1 痘/精巢抗原2、アイソフォームCRA_a [ホモサビエンス] (配列番号191)
MQEAGQGTGGSTGDAGDPGPGPI_DPGGGNAGGPGEAGATGGRGGAGAASRGGPRGGPGRPHGGAAASAQDGR
CPCGARRDRSLLQLHITMPSPMSMEAELVRLRSLDRADPLPREGVALKDFTVGGNLNPMSVRSVDQDREGAGRMRVVG
WGLGSASPEGQKARDLRTPKHKVSEQRPGTPGPPPPPEGAQGDCRGCRGVAFNVMFSAPI

MAGE_A3 黒色腫関連抗原3【ボサビエンス】(配列番号 1-92)
MPLERQRSQHKCPKEEGLEARGEAALGVQAQAPATEEQEEQAAASSSTLVEVTLGEVPVAAESPDPQSPQGASSLPTTMN
YPLWQSQYEDDSNQEEGGPFTPDLESEFQALSRKVAELVHFLLKYRAERPVTKAEMLGSVGNWQYFPVIFS

RASSSLQWFGIELMEVDPFGHFTTFATCGLS1DGLGILQGQ1MPKAGLLE1VIA1TAREGUCAPER1WEELSVL
HEWFRGIDES1LGDPPKKL1TQHFQENYLEYRQVPGSDPACYEFLWGPRALVETSYVVKLHHMVK1SSGGPHISYPPL
HEWLREGE

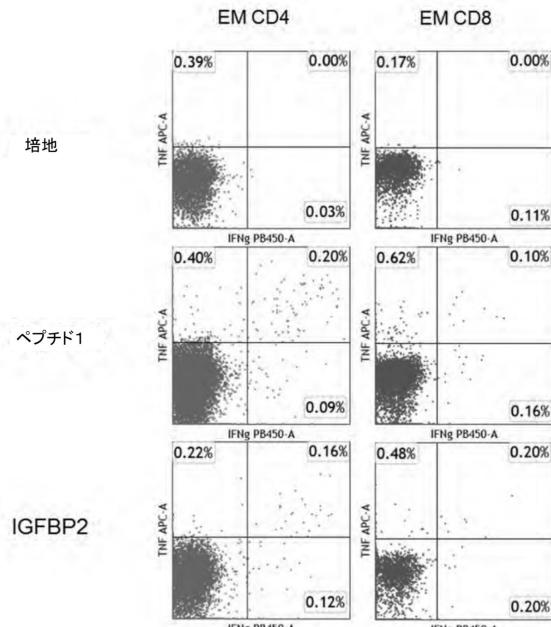
【 図 2 1 】

图21



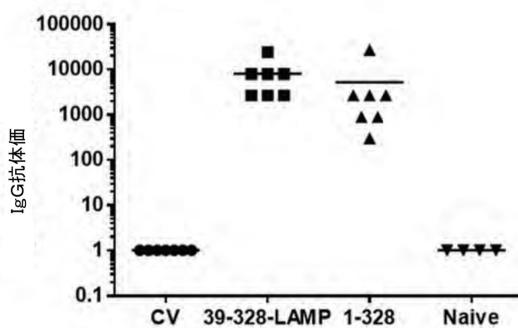
【 図 2 2 】

图 22



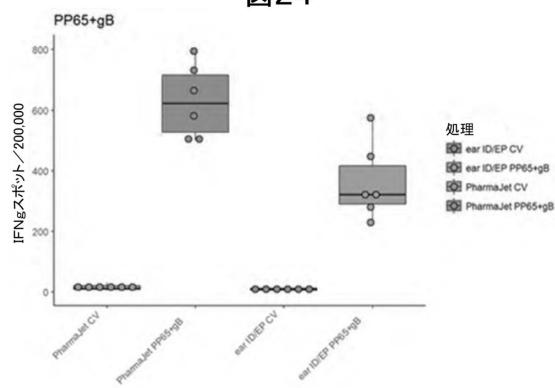
【図23】

図23



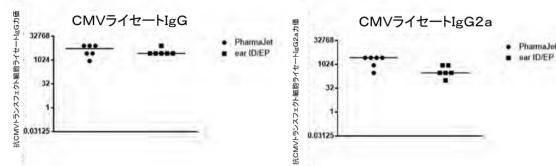
【図24】

図24



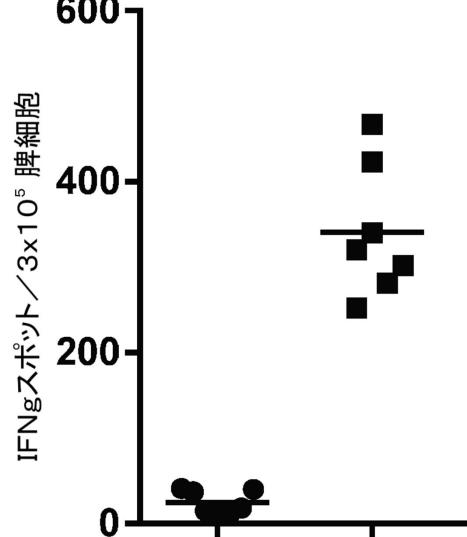
【図25】

図25



【図26】

図26



10

20

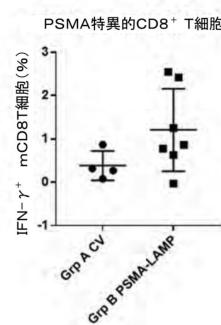
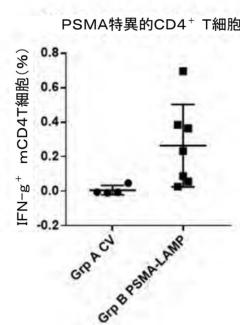
30

40

50

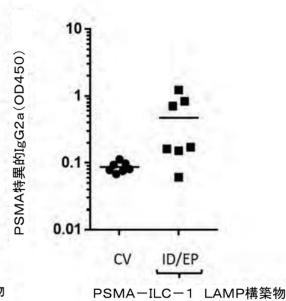
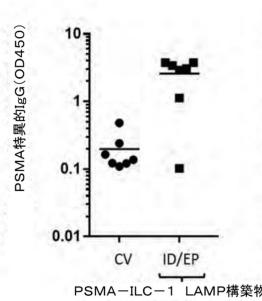
【図 2 7】

図27



【図 2 8】

図28



10

【配列表】

0007222915000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00
C 0 7 K	14/82 (2006.01)	C 0 7 K 14/82
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 佐伯 裕子

(72)発明者 ハイラント, テリー

アメリカ合衆国 メリーランド州 21774 ニューマーケット, ソーヤー ロード 6241

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献 特表2004-537285 (JP, A)

米国特許出願公開第2012/0294879 (US, A1)

特表2012-500829 (JP, A)

特表2013-503159 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 9 / 0 0

A 6 1 K 4 7 / 0 0

C 0 7 K 1 9 / 0 0

C 0 7 K 1 4 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0

C 1 2 N 1 / 0 0

C 1 2 N 5 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q