

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-507943

(P2017-507943A)

(43) 公表日 平成29年3月23日(2017.3.23)

(51) Int.Cl.

**A61K 35/74** (2015.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 37/04** (2006.01)  
**A61K 39/39** (2006.01)  
**A61K 39/07** (2006.01)

F 1

A 61 K 35/74  
A 61 P 35/00  
A 61 P 37/04  
A 61 K 39/39  
A 61 K 39/07

A  
A 61 K  
A 61 P  
A 61 K  
A 61 K

テーマコード(参考)

4 B 065  
4 C 085  
4 C 087  
4 H 045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 98 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-553897 (P2016-553897)  
(86) (22) 出願日 平成27年2月25日 (2015. 2. 25)  
(85) 翻訳文提出日 平成28年8月24日 (2016. 8. 24)  
(86) 國際出願番号 PCT/US2015/017559  
(87) 國際公開番号 WO2015/130810  
(87) 國際公開日 平成27年9月3日 (2015. 9. 3)  
(31) 優先権主張番号 14/189,008  
(32) 優先日 平成26年2月25日 (2014. 2. 25)  
(33) 優先権主張国 米国(US)  
(31) 優先権主張番号 14/268,436  
(32) 優先日 平成26年5月2日 (2014. 5. 2)  
(33) 優先権主張国 米国(US)  
(31) 優先権主張番号 62/076,411  
(32) 優先日 平成26年11月6日 (2014. 11. 6)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 514231424  
アドバクシス、 インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国 ニュージャージー 08  
540, プリンストン, カレッジ ロ  
ード イースト 305  
(71) 出願人 500429103  
ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバー  
シティ オブ ペンシルバニア  
アメリカ合衆国 ペンシルバニア 191  
04-6283, フィラデルフィア,  
チエスナット ストリート 3160,  
スイート 200  
(74) 代理人 100078282  
弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HER2/neu過剰発現腫瘍の治療のための組成物および方法

## (57) 【要約】

本発明は、 HER2/neu抗原を発現する腫瘍に対して治療およびワクチン接種をし、これに対する免疫応答を被験者の中に誘発するための組成物および方法を提供する。一態様では、本明細書に提供される発明は、融合ポリペプチドを含む免疫原性組成物に関し、前記融合ポリペプチドは追加的なポリペプチドに融合したHER2/neuキメラ抗原を含み、かつHER2/neuを発現する腫瘍を有する被験者に融合タンパク質を投与することは腫瘍による変異回避を避ける。

【選択図】図14

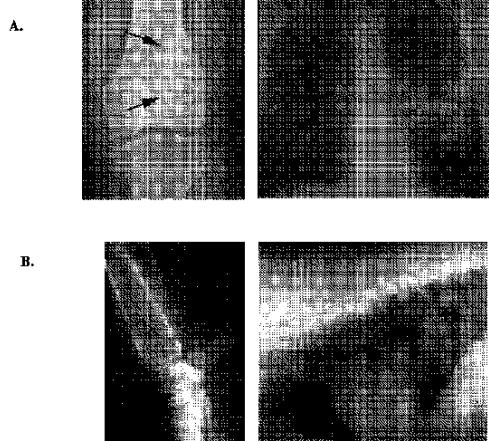


Figure 14

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

被験者内のHER2/neuを発現する腫瘍増殖またはガンを治療する方法であって、前記方法が組み換え型ポリペプチドをコードする核酸を含む組み換え型弱毒化リストリアを含む組成物を投与する工程を含み、前記組み換え型ポリペプチドが追加的なポリペプチドに融合したHER2/neuキメラ抗原を含み、前記核酸分子が前記組み換え型ポリペプチドをコードする第1のオープンリーディングフレームを含み、前記核酸分子が代謝酵素をコードする第2のオープンリーディングフレームをさらに含み、かつ前記代謝酵素が前記組み換え型リストリア株の前記染色体内の突然変異した内因性遺伝子を相補する、方法。

10

**【請求項 2】**

前記組成物がリストリア約 $3.3 \times 10^9$ 個のリストリア投与量を含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記被験者がヒトまたはイヌの被験者である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記ヒトの被験者が子ども、青年、または大人である、請求項3に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記融合ポリペプチドを前記被験者に投与することが前記腫瘍の中のエスケープ変異を防止する、請求項1に記載の方法。

20

**【請求項 6】**

前記HER2/neuキメラ抗原が前記マッピングしたヒトMHCクラスIエピトープのうちの少なくとも5、9、13、14、または17を含むヒトキメラ型HER2/neuである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記キメラ型HER2/neuがキメラ型イヌHER2/neuである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記核酸分子が前記リストリアゲノムに組み込まれる、請求項1に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記核酸分子が前記組み換え型リストリアワクチン株の中のプラスミドの中にあり、かつ抗生物質選択がないとき、前記プラスミドは前記組み換え型リストリアワクチン株の中に安定して維持される、請求項1に記載の方法。

30

**【請求項 10】**

前記組み換え型リストリアが前記actA病毒性遺伝子内に突然変異を含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記追加的なポリペプチドが、a) 非溶血性LLOタンパク質もしくはN末端断片、b) PEST配列、またはc) ActA断片からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

40

**【請求項 12】**

前記第2のオープンリーディングフレームによってコードされた前記代謝酵素がアラニン・ラセマーゼ酵素またはD-アミノ酸トランスフェラーゼ酵素である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 13】**

独立したアジュvantをさらに含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記アジュvantが、顆粒球性/マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)タンパク質、GM-CSFタンパク質をコードするヌクレオチド分子、サポニンQS21、モノホスホリルリピドA、またはメチル化されていないCpG含有オリゴヌクレオチドを

50

含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記腫瘍が H E R 2 / n e u 陽性腫瘍であり、かつ前記ガンが H E R 2 / n e u を発現するガンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記ガンが骨肉腫、卵巣ガン、胃ガン、中枢神経系（C N S）のガン、またはユーユーイング肉腫（E S）である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記骨肉腫ガンがイヌの骨肉腫である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記骨肉腫が小児骨肉腫である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

被験者内の H E R 2 / n e u を発現する腫瘍増殖またはガンに対する強化した免疫応答を引き出す方法であって、前記方法が組み換え型ポリペプチドをコードする核酸を含む組み換え型弱毒化リストリア株を含む組成物を投与する工程を含み、前記融合ポリペプチドが追加的なポリペプチドに融合した H E R 2 / n e u キメラ抗原を含み、前記核酸分子が前記組み換え型ポリペプチドをコードする第 1 のオープンリーディングフレームを含み、前記核酸分子が代謝酵素をコードする第 2 のオープンリーディングフレームをさらに含み、かつ前記代謝酵素が前記組み換え型リストリア株の前記染色体内の突然変異した内因性遺伝子を相補する、方法。

10

20

【請求項 2 0】

前記組成物がリストリア約  $3 . 3 \times 10^9$  個のリストリア投与量を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記被験者がヒトまたはイヌの被験者である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記ヒトの被験者が子ども、青年、または大人である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記融合ポリペプチドを H E R 2 / n e u を発現する腫瘍を有する前記被験者に投与することが前記腫瘍の中のエスケープ変異を防止する、請求項 1 9 に記載の方法。

30

【請求項 2 4】

前記 H E R 2 / n e u キメラ抗原が前記マッピングしたヒト M H C クラス I エピトープのうちの少なくとも 5、9、13、14、または 17 を含むヒトキメラ型 H E R 2 / n e u である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記キメラ型 H E R 2 / n e u がキメラ型イヌ H E R 2 / n e u である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記核酸分子が前記リストリアゲノムに組み込まれる、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 7】

核酸分子が、前記組み換え型リストリアワクチン株の中のプラスミド内にある、請求項 1 9 に記載の方法。

40

【請求項 2 8】

抗生素質選択が無いときに前記プラスミドが前記組み換え型リストリアワクチン株内で安定して維持される、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記組み換え型リストリアが前記 a c t A 病毒性遺伝子内に突然変異を含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記追加的なポリペプチドが、a ) 非溶血性 L L O タンパク質もしくは N 末端断片、b

50

) P E S T 配列、または c ) A c t A 断片からなる群から選択される、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記第 2 のオープンリーディングフレームによってコードされた前記代謝酵素がアラニン・ラセマーゼ酵素または D - アミノ酸トランスフェラーゼ酵素である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 3 2】

独立したアジュバントをさらに含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記アジュバントが、顆粒球性 / マクロファージコロニー刺激因子 ( G M - C S F ) タンパク質、 G M - C S F タンパク質をコードするヌクレオチド分子、サポニン Q S 2 1 、モノホスホリルリピド A 、またはメチル化されていない CpG 含有オリゴヌクレオチドを含む、請求項 3 2 に記載の方法。 10

【請求項 3 4】

前記腫瘍が H E R 2 / n e u 陽性腫瘍であり、かつ前記ガンが H E R 2 / n e u を発現するガンである、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記ガンが骨肉腫、卵巣ガン、胃ガン、中枢神経系 ( C N S ) のガン、またはユーユーイング肉腫 ( E S ) である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記骨肉腫ガンがイヌの骨肉腫である、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記骨肉腫が小児骨肉腫である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記 H E R 2 / n e u を発現する腫瘍またはガンに対する前記免疫応答が、前記 H E R 2 / n e u タンパク質の準優占エピトープへの免疫応答を含む、請求項 1 9 に記載の方法。

。 【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は H E R 2 / n e u 抗原を発現する腫瘍に対して免疫応答を誘発するための、ならびにヒトおよびイヌの被験者において、これを治療し、またこれに対してワクチン接種するための、組成物および方法を提供する。別の実施形態では、ヒトの被験者は、子どもまたは青年である。 30

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

リストリア・モノサイトゲネスは、主として抗原提示細胞に感染し、またこれらの細胞の細胞質内に死ぬまで適合する細胞内病原体である。マクロファージなどの宿主細胞は、 L . モノサイトゲネスを活発に貪食し、その大半の細菌がファゴソーム内で分解される。一部の細菌は、溶血素、リストリオリシン O ( L L O ) の活動を通してファゴソーム膜に穿孔することによって宿主サイトゾルの中へとエスケープする。一旦サイトゾルに入ると、 L . モノサイトゲネスは宿主アクチンを重合して、細胞間を直接通り抜けて、宿主の免疫系をさらに逃れることができ、結果として L . モノサイトゲネスに対する抗体応答がごくわずかになる。 40

【 0 0 0 3 】

H E R 2 / n e u ( 本明細書では「 H e r - 2 」とも称する ) は、チロシンキナーゼの上皮成長因子受容体 ( E G F R ) ファミリーのメンバーである 185 k D a の糖タンパク質であり、かつ細胞外領域、膜貫通領域、および細胞内シグナル伝達に関与することが知られている細胞内領域からなる。ヒトでは、 H e r 2 抗原はすべての乳ガンの 25 ~ 40 % で過剰発現され、また骨 ( 骨肉腫 - O S A ) 、卵巣、肺、脾臓、脳、および消化管と 50

といった数多くのガンで過剰発現される。H e r - 2 の過剰発現は制御されていない細胞増殖およびシグナル伝達と関連付けられ、その両方が腫瘍の発生に寄与する。H e r - 2 を過剰発現するガンを有する患者は、H e r - 2 に対して向けられた検出可能な体液性のC D 8<sup>+</sup> T 細胞、およびC D 4<sup>+</sup> T 細胞応答にさえも耐性を示す。

#### 【0004】

大型の飼育犬は、組織学的不均質性、侵攻性局所疾病、および早期の転移を含む小児科のO S A の数多くの態様を反復するO S A を自発的に発生する。イヌでは、O S A はいかなる骨にも生じる可能性があるが、影響を受けたすべての骨の75%～85%を体肢が占めており、これは「四肢骨肉腫」と呼ばれている。残りのO S A は、上顎骨、下顎骨、脊椎、頭蓋、肋骨、鼻腔、副鼻腔、および骨盤を含む中軸骨格に影響を与える。診断では、微小転移性病態を有するイヌの95%は、切断術および化学療法を受けたにもかかわらず、進行性転移性疾患のためにほとんどのイヌは安樂死させられるので、生存期間中央値は10か月である。肺の転移性疾患は両方の種で罹患率および死亡率の主たる原因である。

10

#### 【0005】

小児科ないし若年成人母集団での原発性悪性骨腫瘍は比較的珍しく、20歳未満の者のすべてのガンの約6%を数え、また、15～29歳の年齢範囲内の青年および若年成人（A Y A）ではすべてのガンの3%である。骨肉腫は、米国では毎年約400人の子どもおよび10代を襲っていて、数十年にわたって治癒的な改善があまり見られなかった小さい必要性の高い領域を示している。骨肉腫（O S）は稀な悪性腫瘍であるが、小児科の年齢群でのガン関連死の主要な原因の中でも上位になっている。最近の多剤併用用量強化化学療法を外科手術と併せて用いることで、極端に局所的な非転移性疾患で60～70%の5年間のイベントフリー生存率を達成した。しかしながら、まだ解決されていない主要な問題は、転移の再燃または再発に対する、また中軸疾患を有する患者に対する予後の不良である。さらに、米国では骨肉腫に対して認可された製品が無く、この疾患に対処する新規の療法の高い必要性を提示している。

20

#### 【0006】

本発明は、L m d d A ワクチンベクターを使用して生成した組み換え型リステリア・H E R 2 / n e u ワクチン株を提供することによってこの必要性を満たすものであり、これは良好に画定された弱毒化機構を有し、かつ抗生物質選択マーカーを欠いており、これはイヌの骨肉腫を治療するうえで効果的であることが見出されている。

30

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0007】

一態様では、本明細書に提供される発明は、融合ポリペプチドを含む免疫原性組成物に関し、前記融合ポリペプチドは追加的なポリペプチドに融合したH E R 2 / n e u キメラ抗原を含み、かつH E R 2 / n e u を発現する腫瘍を有する被験者に融合タンパク質を投与することは腫瘍による変異回避を避ける。別の実施形態では、変異回避を避けることはエピトープ拡大に起因する。さらに別の実施形態では、変異回避を避けることは抗原のキメラ的な性質に起因する。

40

#### 【0008】

別の実施形態では、本明細書に提供される発明は核酸分子を含む組み換え型リステリアワクチン株に関し、この実施形態および別の実施形態では、核酸分子はポリペプチドをコードする第1のオープンリーディングフレームを含み、ポリペプチドはH E R 2 / n e u キメラ抗原を含み、核酸分子は代謝酵素をコードする第2のオープンリーディングフレームをさらに含み、また代謝酵素は組み換え型リステリア株の染色体内の突然変異した内因性遺伝子を相補する。

#### 【0009】

一実施形態では、本明細書に提供される発明は被験者内のH E R 2 / n e u を発現する腫瘍増殖またはガンを治療する方法に関し、この方法は融合ポリペプチドをコードする核酸を含む組み換え型弱毒化リステリアを投与する工程を含み、前記融合ポリペプチドが追

50

加的なポリペプチドに融合したH E R 2 / n e u キメラ抗原を含み、前記核酸分子が前記融合ポリペプチドをコードする第1のオープンリーディングフレームを含み、前記核酸分子が代謝酵素をコードする第2のオープンリーディングフレームをさらに含み、かつ前記代謝酵素が前記組み換え型リストリアワクチン株の染色体内の突然変異した内因性遺伝子を相補する。別の実施形態では、被験者はヒトである。別の実施形態では、ヒトの被験者は大人であってもよく、または子どもであってもよい。別の実施形態では、被験者はイヌである。別の実施形態では、キメラのH E R 2 はイヌのキメラのH E R 2 である。別の実施形態では、キメラのH E R 2 はヒトのキメラのH E R 2 である。別の実施形態では、前記融合ポリペプチドを前記被験者に投与することは前記腫瘍内のエスケープ変異を防止する。別の実施形態では、前記ヒトのH E R 2 / n e u キメラ抗原はマッピングしたヒトのM H C クラスIエピトープのうちの少なくとも5、9、13、14、または17を含む。

10

#### 【0010】

別の実施形態では、本明細書に提供される発明はH E R 2 / n e u を発現する腫瘍増殖またはガンを防止する方法に関する。

#### 【0011】

一実施形態では、H E R 2 / n e u を発現する腫瘍増殖またはガンを治療する方法は、結果として前記被験者の全生存の増加をもたらす。別の実施形態では、H E R 2 / n e u を発現する腫瘍増殖またはガンを治療する方法は結果として被験者内の転移性疾患の遅延をもたらす。別の実施形態では、治療は結果としてH E R 2 / n e u に特異的なT細胞応答の増加をもたらす。

20

#### 【0012】

一実施形態では、本発明は被験者内のH E R 2 / n e u を発現する腫瘍増殖またはガンに対する強化した免疫応答を引き出す方法を提供し、この方法は融合ポリペプチドをコードする核酸を含む組み換え型弱毒化リストリアを投与する工程を含み、前記融合ポリペプチドが追加的なポリペプチドに融合したH E R 2 / n e u キメラ抗原を含み、前記核酸分子が前記融合ポリペプチドをコードする第1のオープンリーディングフレームを含み、前記核酸分子が代謝酵素をコードする第2のオープンリーディングフレームをさらに含み、かつ前記代謝酵素が前記組み換え型リストリアワクチン株の染色体内で欠いている内因性遺伝子を相補する。別の実施形態では、前記強化した免疫応答を引き出す方法は結果として前記被験者の全生存の増加をもたらす。別の実施形態では、前記強化した免疫応答を引き出す方法は結果として被験者内の転移性疾患の遅延をもたらす。別の実施形態では、前記強化免疫応答を引き出す方法は結果としてH E R 2 / n e u に特異的なT細胞応答の増加をもたらす。

30

#### 【0013】

一実施形態では、本発明はH E R 2 / n e u を発現する腫瘍増殖またはガンを患う被験者の生存を延長させる方法を提供し、この方法は融合ポリペプチドをコードする核酸を含む組み換え型弱毒化リストリアを投与する工程を含み、前記融合ポリペプチドが追加的なポリペプチドに融合したH E R 2 / n e u キメラ抗原を含み、前記核酸分子が前記融合ポリペプチドをコードする第1のオープンリーディングフレームを含み、前記核酸分子が代謝酵素をコードする第2のオープンリーディングフレームをさらに含み、かつ前記代謝酵素が前記組み換え型リストリアワクチン株の染色体内で欠いている内因性遺伝子を相補する。別の実施形態では、被験者はヒトである。別の実施形態では、ヒトの被験者は大人であってもよく、または子どもであってもよい。別の実施形態では、被験者はイヌである。一実施形態では、前記方法は前記被験者での再燃または転移に続いて前記組み換え型弱毒化リストリアを投与することをさらに含む。

40

#### 【0014】

一実施形態では、本明細書に提供される発明はH E R 2 / n e u を発現する腫瘍増殖またはガンを患う被験者内の転移性疾患を遅延する方法に関する、この方法は融合ポリペプチドをコードする核酸を含む組み換え型弱毒化リストリアを投与する工程を含み、前記融合ポリペプチドが追加的なポリペプチドに融合したH E R 2 / n e u キメラ抗原を含み、前

50

記核酸分子が前記融合ポリペプチドをコードする第1のオープンリーディングフレームを含み、前記核酸分子が代謝酵素をコードする第2のオープンリーディングフレームをさらに含み、かつ前記代謝酵素が前記組み換え型リストリアワクチン株の染色体内で欠いている内因性遺伝子を相補する。別の実施形態では、被験者はヒトである。別の実施形態では、ヒトの被験者は大人であってもよく、または子どもであってもよい。別の実施形態では、被験者はイヌである。

【図面の簡単な説明】

【0015】

本発明に関する主題は、本明細書の結論部分に特定的に指摘され、かつ明瞭に主張されている。しかしながら、本発明の構成および運用方法の両方については、その目的、特徴、および利点とともに、添付図面とともに読んだとき、以下の発明を実施するための形態を参照することによって最も良好に理解され得る。

10

【0016】

【図1】ADX31-164の構築。(A)構造性のリストリアp60プロモーターの制御下で、LmddA株内の染色体のdal-dat欠失の相補のために、バシラスサチリスdal遺伝子を寄生するpAdv164のプラスミドマップ。これは、HER2/neuの3つの断片：EC1(aa 40-170)、EC2(aa 359-518)およびIC1(aa 679-808)の直接融合によって構造化された、切断LLO(1-441)のキメラ型ヒトHER2/neu遺伝子への融合も含有する。右側のベクターの概略図は、切断LLOに融合したヒトHER2/neuの2つの細胞外領域および1つの細胞内領域から構成されるキメラ型HER2/neu融合タンパク質を発現するpAdv164の詳細を示す。プラスミドはdal遺伝子の栄養要求性相補によって組み換え型dal/dat/actA-リストリア株(LmddA)内に維持される(実施例参照)。(B)抗LLO抗体でプロットしたTCA沈殿した細胞培養上清のウエスタンプロット解析によって、Lm-LLO-ChHer2(Lm-LLO-138)およびLmddA-LLO-ChHer2(ADX31-164)内でtLLO-ChHer2の発現および分泌が検出された。~104 KDの差を示す帯はtLLO-ChHer2に対応する。内因性のLLOは、58 KD帯として検出される。リストリア対照はChHer2発現を欠いている。

20

【図2】ADX31-164の免疫原性特性(A)NT-2細胞を刺激薬として使用し、かつ3T3/neu細胞を標的として使用して、免疫化マウスからの脾細胞内でHER2/neuリストリアベースのワクチンによって引き出された細胞毒性T細胞応答を試験した。Lm-対照は、すべてのやり方で同一であるが、無関連の抗原(HPV16-E7)が発現される、LmddAバックグラウンドに基づく。(B)脾細胞によって免疫化FVB/Nマウスから細胞培地の中へと分泌されたIFN- $\gamma$ が、NT-2細胞によって治療されたマイトイシンCを用いたインビトロの刺激の24時間後、ELISAによって測定された。(C)インビトロでのタンパク質の異なる領域からのペプチドを用いたインキュベーションに応答する、キメラワクチンを用いて免疫化したHLA-A2トランスジェニックマウスからの脾細胞によるIFN- $\gamma$ 分泌。図の凡例にリスト表示したように、組み換え型ChHer2タンパク質が正の対照として使用され、無関連ペプチドまたはペプチドを含まない群が負の対照を構成要素とした。コインキュベーションの72時間後に採取した細胞培養上清を使用するELISAアッセイによって、IFN- $\gamma$ 分泌が検出された。各々のデータ点は、3倍のデータ+/-標準誤差の平均であった。 $*P$ 値<0.01。

30

40

【図3】リストリア-ChHER2/neuワクチンのための腫瘍防止研究HER2/neuトランスジェニックマウスに各々組み換え型リストリア-ChHer2または対照リストリアワクチンを6回注射した。生後6週で免疫化を開始し、21週目まで3週ごとに継続した。腫瘍の外観を毎週観察して、腫瘍を有しないマウスのパーセンテージで表現した。 $*p$ <0.05、グループ当たりN=9。

【図4】脾臓中のTregの%で示したADX31-164を用いた免疫化の効果。F

50

V B / N マウスに  $1 \times 10^6$  NT - 2 細胞を用いて皮下で接種し、各々のワクチンを用いて一週間間隔で 3 回免疫化した。第 2 の免疫化の 7 日後、脾臓を採取した。免疫細胞の分離後、T reg の検出のためにこれらを抗 CD 3、CD 4、CD 25、および FoxP3 抗体によって染色した。代表的な実験からの T reg のドットプロットは、異なる治療群の間での全 CD 3<sup>+</sup> または CD 3<sup>+</sup> CD 4<sup>+</sup> T 細胞に対するパーセンテージとして表される CD 25<sup>+</sup> / FoxP3<sup>+</sup> T 細胞の頻度を示す。

【図 5】NT - 2 腫瘍内の腫瘍浸潤 T reg の % で示した ADXS31 - 164 を用いた免疫化の効果。FVB / N マウスに  $1 \times 10^6$  NT - 2 細胞を用いて皮下で接種し、各々のワクチンを用いて一週間間隔で 3 回免疫化した。第 2 の免疫化の 7 日後に腫瘍を採取した。免疫細胞の分離後、T reg の検出のために、抗 CD 3、CD 4、CD 25、および FoxP3 抗体によってこれらを染色した。(A) 代表的な実験からの T reg のドットプロット。(B) 異なる投与群にわたって全 CD 3<sup>+</sup> または CD 3<sup>+</sup> CD 4<sup>+</sup> T 細胞 ( 左のパネル ) 、および腫瘍内の CD 8 / T reg 比 ( 右のパネル ) に対するパーセンテージとして表される、CD 25<sup>+</sup> / FoxP3<sup>+</sup> T 細胞の頻度。データは、2 つの独立した実験から得られた平均  $\pm$  SEM として示される。10

【図 6】ADXS31 - 164 を用いたワクチン接種は乳ガン細胞株の脳内での増殖を遅延することができる。Balb / c マウスに ADXS31 - 164 または対照リストリアワクチンを用いて 3 回免疫化した。EMT6 - Luc 細胞 ( 5,000 ) を麻酔をかけたマウスの頭蓋内に注射した。(A) 示された日に Xenogen X - 100 CCD カメラを使用してマウスのエクスピボ撮像を遂行した。(B) ピクセルの輝度は、1 秒当たり表面積 1 平方 cm 当たりの光子数としてグラフ表示され、平均放射輝度として提示される。(C) ウエスタンプロットによって、抗 HER2 / neu 抗体を使用して、EMT6 - Luc 細胞、4T1 - Luc、および NT - 2 細胞株による HER2 / neu の発現が検出された。J774 . A2 細胞、マウスのマクロファージ様細胞株を負の対照として使用した。20

【図 7】ADXS31 - 164 を用いてワクチン接種した最初の 18 人の患者を示す。

【図 8】ADXS31 - 164 の投与が早期または遅発の心臓障害を生じないことを示す。A) 正常に見える心臓を示す心臓の心エコー図。B) レベルが正常であることを示す、研究期間全体にわたって評価された連続的な心筋トロポニン I レベル ( 図 26D も参照のこと )。30

【図 9】ADXS31 - 164 に関連する、A) 体温および、B) 収縮期血圧の変化を示す。ベースラインおよび ADXS31 - 164 投与後 2 時間ごとの体温および収縮期血圧を記録した。各々のイヌに対する各々のワクチン接種でのパラメータが表示される。水平のバーは各々の時点における各々の投与群でのすべてのイヌの中央値を示す。 \* p < 0.05, \*\* p < 0.005

【図 10】原発性疾患における ADXS31 - 164 と緩和的放射線療法 ( RT ) との組み合わせの治療スケジュールを示す。

【図 11】上腕骨近位端骨折後のイヌで転移性疾患の証拠がないことを示す放射線写真であり、また骨折の治癒を示す骨カルスの存在も示す。

【図 12】四肢骨肉腫を有するイヌで治療的に効果的な抗腫瘍免疫性を引き出すために ADXS31 - 164 を発現する L. モノサイトゲネス組み換え型の安全性および有効性を評価するための試験段階 I 臨床試験のタイムライン。40

【図 13】ADXS31 - 164 投与に続く、治療に関連する有害事象および生存曲線。A) 治療に関連する有害事象。B) 試験に登録した時点で転移性疾患を有していないすべてのイヌ。四肢の切断術を受け、それに続いてカルボプラチニン単独またはカルボプラチニンに加えてアドリアマイシンを受けた対照群のイヌ。2 匹のイヌは関係のない原因で死んだため ( 1 匹のイヌは誤嚥性肺炎で死に、もう一匹は腎芽細胞腫で死んだ ) 、ワクチン群から打ち切りにされた。ワクチン接種した群 赤い線、対照群 黒い線。

【図 14】ヒト ( A ) およびイヌ ( B ) の患者での原発性および転移性骨肉腫 ( OSA ) の放射線写真的画像。両方の種で、原発病巣は骨幹端でのマーキングした増殖および溶解

10

20

30

40

50

の区域（Aの中の矢印）によって特徴付けられる。

【図15】フェーズIの、HER2+骨肉腫(OSA)を有するイヌでのADX31-164の安全性および有効性を評価するための3+3臨床試験の概略図である。自発性HER2+四肢OSAを有する個人所有のイヌが標準的である治療切断、およびフォローアップのカルボプラチニ化学療法を受けた。最後のカルボプラチニ投与の3週間後、 $2 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、または $3 \times 10^9$ CFUのいずれかのADX31-164を用いてイヌに静脈内でワクチン接種した（3週間おきに3回のワクチン接種）。転移性疾患を防止するうえでのワクチンの有効性を決定するために、死ぬまで2か月ごとにイヌを再ステージングした。

【図16】イヌの原発性骨肉腫におけるHER2/neu発現。（A）悪性骨芽細胞および類骨沈着の病巣を示すイヌからの原発性OSAのH&E染色。（B）イヌの原発性OSAの免疫組織化学的評価は悪性骨芽細胞内のHER2/neu発現を示す。（C）HER2/neuの発現のばらつきを示す、5匹の個人所有のイヌからの原発性OSAサンプルのウエスタンプロット。正の対照は：ヒトの乳ガン細胞株MCF-7、およびイヌの乳ガン細胞株CAMAC2。

【図17】ベースラインおよびADX31-164投与後24時間の時点での血液学的数値。各々の投与群内のすべてのイヌからの各々のワクチン接種前および後の値を平均した。 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.005$ 。白血球および好中球の計数（A～B）では、ADX31-164投与の24時間後に生じた一時的だが統計的に有意な増加を示し、また血小板およびリンパ球の一時的な減少が付随して起きた（C～D）。

【図18】ADX31-164は、生存と関連する白血球（WBC）、好中球、および単球の計数の増加を誘発した。WBC、好中球、および単球の数をベースラインおよびワクチン接種の24時間後に測定した。各々のワクチン接種に引き続いてパーセント増加を計算し、各々のイヌについて平均した。（A）生存（死または生）によって結果を表示した。（B）受容したADX31-164投与量によって結果を表示した。水平のバーは群の中央値を表す。

【図19】ADX31-164によって誘発されるHer-2に特異的なT細胞応答のIFN-ELISPOTによる評価の結果を示す。

【図20】Her-2に特異的な免疫性を刺激する繰返し「ブースター」ワクチン接種を示す。（A）患者289-003に対する結果を示す。（B）患者289-004に対する結果を示す。EC1、EC2、およびIC1はHER2/neuポリペプチドのペプチド断片を表す。

【図21】（A）転移までの時間（TTM）および（B）OSA特異的な生存についてのカプラン・マイヤー推定値。

【図22】ADX31-164が転移性疾患の発生を防止することを示す。（AおよびB）カルボプラチニ療法の3週間後（A）、および第3のADX31-164ワクチンの3週間後（B）に撮った胸部放射線写真。右肺中葉内の前から存在する転移性結節のサイズの増加を示すが、残りの肺葉内ではさらなる転移性疾患の発生を欠いている。（CおよびD）ICGの投与に引き続いて近赤外光の下で蛍光を発する、胸腔鏡検査で識別される肺結節（C）。近赤外光の下で蛍光を示す転移巣切除のときに取り出した大幅な正常な外見の肺組織（差し込み図）（D）。（EおよびF）H&E染色した肺結節（E）および蛍光を発する正常な肺組織（F）の病理組織。封入された肺結節（E）および大幅に正常な外見の肺組織内の炎症の巣状地域（F）の著しい出血および壊死を示す。（GおよびH）組織内の最小限のCD3+T細胞で肺結節を取り囲むCD3+T細胞を示す低倍率（G）および高倍率（H）の肺結節の免疫組織化学。（IおよびJ）CD3+T細胞の巣状滞留を示す、正常な外見の肺組織の低倍率（G）および高倍率（H）の免疫組織化学。（K）リンパ球によって包囲された有糸分裂像を有する大きい異常細胞を示す巣状肺炎の高倍率のH&E染色。（L）単核細胞によって取り囲まれた有糸分裂像を有する大きい細胞を示す肺炎の領域のビメンチン染色。

【図23】ADX31-164は転移性疾患を遅延／防止し、自発性HER2+骨肉腫

10

20

30

40

50

を有するイヌの全生存を長持ちさせる。ワクチン接種したイヌのカプラン - マイヤー生存率曲線を歴史的な対照群と比較して示す。対照群は、切断術を用いて治療され、フォローアップ化学療法を受けたがADX31-164を受けていない、HER2+四肢OSAを有するイヌから成る。P < 0.0001。ワクチン接種した群 赤い線、対照群 黒い線。

【図24】ADX31-164がHER2/neuに対する耐性を破壊することを示す。第3のワクチンの3週間後(9週目)および2か月後(17週目)にPBMCをベースライン収集し、IFN-ELISpotによってHER2/neuの高度に保存されたIC1領域に対する応答について解析した。結果は、応答の早いもの、応答の遅いもの、および明らかな応答の無いものにイヌを分けて示した。適用外はこれらのイヌに対する17週目のサンプルがまだ評価されていないことを示す。10

【図25A】ADX31-164が心臓の機能に有害な影響を及ぼすことが無いことを示す。心臓のパラメータLVID(拡張期)(図25A)、LVID(収縮期)(図25B)、および短縮率(図25C)を各々のイヌについてベースライン、ワクチン接種時、およびその後2か月ごとに評価した。心筋トロポニンIレベルと同じ時点で評価した(図25D)。

【図25B】ADX31-164が心臓の機能に有害な影響を及ぼすことが無いことを示す。心臓のパラメータLVID(拡張期)(図25A)、LVID(収縮期)(図25B)、および短縮率(図25C)を各々のイヌについてベースライン、ワクチン接種時、およびその後2か月ごとに評価した。心筋トロポニンIレベルと同じ時点で評価した(図25D)。20

【図25C】ADX31-164が心臓の機能に有害な影響を及ぼすことが無いことを示す。心臓のパラメータLVID(拡張期)(図25A)、LVID(収縮期)(図25B)、および短縮率(図25C)を各々のイヌについてベースライン、ワクチン接種時、およびその後2か月ごとに評価した。心筋トロポニンIレベルと同じ時点で評価した(図25D)。

【図25D】ADX31-164が心臓の機能に有害な影響を及ぼすことが無いことを示す。心臓のパラメータLVID(拡張期)(図25A)、LVID(収縮期)(図25B)、および短縮率(図25C)を各々のイヌについてベースライン、ワクチン接種時、およびその後2か月ごとに評価した。心筋トロポニンIレベルと同じ時点で評価した(図25D)。30

【図26】ADX31-164がHER2/neuの高度に保存された細胞内領域への免疫寛容を破壊することを示す。

#### 【0017】

図示の単純化および明瞭化のために図に示される要素は必ずしも実寸に比例していないことを理解されたい。例えば、一部の要素の寸法は、明瞭化のために他の要素に対して相対的に誇張されている場合がある。さらに、適切と考えられる場合には、参照番号は対応するかまたは類似する要素を示す図の間で繰り返される場合がある。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0018】

以下の発明を実施するための形態では、本発明の完全な理解を提供するために多数の具体的な詳細が示される。しかしながら、本発明はこれらの具体的な詳細を含まざずに実施されてもよいことが当業者によって理解されるであろう。他の事例では、本発明を不明瞭にしないために周知の方法、手順、および構成成分は詳細には記述されていない。40

#### 【0019】

一実施形態では、Her2-neu抗原を発現する腫瘍に対して防止、治療、およびワクチン接種し、かつHer2-neu抗原の準優占エピトープに対する免疫応答を誘発し、一方で変異回避を避けるための組成物および方法が本明細書に提供される。別の実施形態では、変異回避を避けることはエピトープ拡大に起因する。さらに別の実施形態では、変異回避を避けることは抗原のキメラ的な性質に起因する。50

**【 0 0 2 0 】**

別の実施形態では、融合ポリペプチドを含む免疫原性組成物が本明細書に提供され、前記融合ポリペプチドは追加的なポリペプチドに融合したHER2/neuキメラ抗原を含み、またHER2/neuを発現する腫瘍を有する被験者に融合タンパク質を投与することは前記腫瘍内のエスケープ変異を防止する。別の実施形態では、免疫原性組成物を含む組み換え型リストリアワクチン株が本明細書に提供される。

**【 0 0 2 1 】**

一実施形態では、被験者はヒトの被験者である。別の実施形態では、ヒトの被験者は大人または子どもである。別の実施形態では、ヒトの被験者は子どもである。別の実施形態では、被験者はイヌの被験者である。別の実施形態では、イヌは犬である。

10

**【 0 0 2 2 】**

一実施形態では、被験者内のHER2/neuを発現する腫瘍増殖またはガンに対する強化した免疫応答を引き出す方法が本明細書に提供され、この方法は融合ポリペプチドをコードする核酸を含む組み換え型リストリアを投与する工程を含み、前記融合ポリペプチドは追加的なポリペプチドに融合したHER2/neuキメラ抗原を含む。

**【 0 0 2 3 】**

一実施形態では、被験者内のHER2/neuを発現する腫瘍増殖またはガンを防止する方法が本明細書に提供され、この方法は融合ポリペプチドをコードする核酸を含む組み換え型リストリアを投与する工程を含み、前記融合ポリペプチドは追加的なポリペプチドに融合したHER2/neuキメラ抗原を含む。

20

**【 0 0 2 4 】**

別の実施形態では、被験者内のHER2/neuを発現する腫瘍増殖またはガンを治療する方法が本明細書に提供され、この方法は融合ポリペプチドをコードする核酸を含む組み換え型リストリアを投与する工程を含み、前記融合ポリペプチドは追加的なポリペプチドに融合したHER2/neuキメラ抗原を含む。

**【 0 0 2 5 】**

一実施形態では、HER2/neuを発現する腫瘍増殖またはガンを有する被験者の生存を長持ちさせる方法が本明細書に提供され、この方法は融合ポリペプチドをコードする核酸を含む組み換え型リストリアを投与する工程を含み、前記融合ポリペプチドは追加的なポリペプチドに融合したHER2/neuキメラ抗原を含む。一実施形態では、被験者はヒトである。別の実施形態では、被験者はイヌである。

30

**【 0 0 2 6 】**

一実施形態では、HER2/neuを発現する腫瘍増殖またはガンを有する被験者内の転移性疾患を遅延する方法が本明細書に提供され、この方法は融合ポリペプチドをコードする核酸を含む組み換え型リストリアを投与する工程を含み、前記融合ポリペプチドは追加的なポリペプチドに融合したHER2/neuキメラ抗原を含む。一実施形態では、被験者はヒトである。別の実施形態では、被験者はイヌである。

**【 0 0 2 7 】**

一実施形態では、被験者内のHER2/neuを発現する腫瘍増殖またはガンを治療する方法が本明細書に提供され、この方法は融合ポリペプチドをコードする核酸を含む組み換え型弱毒化リストリアを投与する工程を含み、前記融合ポリペプチドは追加的なポリペプチドに融合したHER2/neuキメラ抗原を含み、前記核酸分子は前記融合ポリペプチドをコードする第1のオープンンリー・ディングフレームを含み、前記核酸分子は代謝酵素をコードする第2のオープンンリー・ディングフレームをさらに含み、かつ前記代謝酵素は前記組み換え型リストリアワクチン株の染色体内で突然変異した内因性遺伝子を相補する。別の実施形態では被験者はヒトである。別の実施形態では、ヒトの被験者は大人であってもよく、または子どもであってもよい。別の実施形態では、被験者はイヌである。別の実施形態では、キメラのHER2はイヌのキメラのHER2である。別の実施形態では、キメラのHER2はヒトのキメラのHER2である。別の実施形態では、前記融合ポリペプチドを前記被験者に投与することは前記腫瘍内のエスケープ変異を防止する。別の実施形

40

50

態では、前記ヒトの H E R 2 / n e u キメラ抗原はマッピングしたヒトの M H C クラス I エピトープのうちの少なくとも 5、9、13、14、または 17 を含む。

#### 【 0 0 2 8 】

一実施形態では、核酸分子を含む組み換え型リステリアワクチン株が本明細書に提供され、核酸分子はポリペプチドをコードする第 1 のオープンリーディングフレームを含み、ポリペプチドは H E R 2 / n e u キメラ抗原を含み、核酸分子は代謝酵素をコードする第 2 のオープンリーディングフレームをさらに含み、代謝酵素は組み換え型リステリア株の染色体内で欠いている内因性遺伝子を相補する。別の実施形態では、組み換え型リステリアワクチン株は、代謝酵素をコードする第 3 のオープンリーディングフレームを含む核酸分子をさらに含み、代謝酵素は組み換え型リステリア株の染色体内で欠いている内因性遺伝子を相補する。

10

#### 【 0 0 2 9 】

一実施形態では、核酸分子はリステリアゲノムの中へと組み込まれる。別の実施形態では、核酸分子は組み換え型リステリアワクチン株内のプラスミドの中にある。さらに別の実施形態では、抗生物質選択が無いときにプラスミドは組み換え型リステリアワクチン株内で安定して維持される。別の実施形態では、プラスミドは組み換え型リステリア上に抗生物質抵抗性を与えない。別の実施形態では、組み換え型リステリア株は、弱毒化されている。別の実施形態では、組み換え型リステリアは、弱毒化栄養要求性株である。別の実施形態では、外来抗原の発現が本発明のうちの 1 つなどの細菌上に行使する高い代謝負担も、弱毒化の重要な機構である。

20

#### 【 0 0 3 0 】

一実施形態では、弱毒化株は L m d d A である。別の実施形態では、この株は、リステリアベースのワクチンの先天的特性である強いアジュvant効果を発揮する。このアジュvant効果の 1 つの兆候は、キメラ型 H E R 2 / n e u 以外の抗原を発現するリステリア、または A D X S - 3 1 - 1 6 4 (キメラ型 H E R 2 / n e u を発現する) ワクチンのいずれかによって生じた腫瘍内の T r e g の数の 5 分の 1 への減少である(本明細書内の図 5 参照)。別の実施形態では、恐らく免疫性応答の結果と同様に、異なる抗原( H P V 1 6 E 7 )を発現する L m d d A ベクターは腫瘍内の T r e g の頻度の著しい減少とも関連付けられる。

30

#### 【 0 0 3 1 】

一実施形態では、本明細書に提供される弱毒化した栄養要求性リステリアワクチン株は A D X S - 3 1 - 1 6 4 株である。A D X S - 3 1 - 1 6 4 は、リステリアワクチンベクターに基づき、これは病毒性遺伝子 A c t A の欠失に起因して弱毒化され、かつインビボおよびインビトロでの H E R 2 / n e u 発現のために d a 1 遺伝子の相補によってプラスミドを保持する。一実施形態では、A D X S 3 1 - 1 6 4 はリステリオリシン O ( L L O ) の最初の 4 4 1 のアミノ酸を融合したキメラ型 H E R 2 / n e u タンパク質を発現および分泌し、別の実施形態では、これは切断 L L O および非溶血性 L L O である。別の実施形態では、A D X S 3 1 - 1 6 4 は、耐性を破壊する能力を有する強くかつ抗原特異的な抗腫瘍応答をトランスジェニック動物内の H E R 2 / n e u に対して行使する(図 2 4 の実施例参照)。別の実施形態では、免疫化したマウスの脾臓からより迅速に除去されるので、A D X S 3 1 - 1 6 4 株は高度に弱毒化され、以前のリステリアワクチン世代より良好な安全性プロファイルを有する。別の実施形態では、トランスジェニック動物で、このワクチンの抗生素耐性でかつより病毒性のバージョンである L m - L L O - C h H e r 2 よりも長い腫瘍発症の遅延を、A D X S 3 1 - 1 6 4 はもたらす(図 3 参照)。別の実施形態では、A D X S 3 1 - 1 6 4 株は高度に免疫原性であり、H E R 2 / n e u トランスジェニック動物内で H E R 2 / n e u 自己抗原に対する耐性を破壊し、腫瘍形成を防止することができる。別の実施形態では、A D X S 3 1 - 1 6 4 は、腫瘍内の調節性 T 細胞( T r e g )の著しい減少を生じる。別の実施形態では、L m d d A ワクチンで処理した腫瘍内の T r e g のより低い頻度は、腫瘍内の C D 8 / T r e g 比の増加をもたらし、L m d d A ワクチンを用いた免疫化後により好ましい腫瘍の微小環境を得ることができること

40

50

を示唆する。別の実施形態では、このキメラ抗原の使用は、腫瘍が突然変異してこの新規な抗原を用いた治療に対する治療的に有効な応答から離れることを示すエスケープ変異をもたさない(実施例6参照)。別の実施形態では、ADX31-164を用いた末梢の免疫化は脳内の転移性乳ガン細胞株の増殖を遅延する(実施例7参照)。別の実施形態では、骨肉腫を患い、かつ切断術、化学療法、およびADX31-164を用いたワクチン接種を含む治療を提供されたイヌの被験者は、ADX31-164を用いたワクチン接種を受けていない対照被験者と比較して生存を延長させた。(実施例9および10参照)。別の実施形態では、骨肉腫を患い、かつ切断術、化学療法、およびADX31-164を用いたワクチン接種を含む治療を提供されたイヌの被験者は、ADX31-164を用いたワクチン接種を受けていない対照被験者と比較して転移の減少を示した。(実施例10参照)。別の実施形態では、骨肉腫を患い、かつ切断術、化学療法、およびADX31-164を用いたワクチン接種を含む治療を提供されたイヌの被験者は、ADX31-164を用いたワクチン接種を受けていない対照被験者と比較して誘発された特異的なT細胞応答の増加を示した。(実施例10参照)。

10

#### 【0032】

一実施形態では、Lm-LLO-ChHer2株は、Lm-LLO-138であり、抗生物質抵抗性遺伝子およびプラスミドから発現されるprfA遺伝子を含む。

#### 【0033】

一実施形態では、本明細書に例示したように、組み換え型の弱毒化した、抗生物質を含まないリストリアを発現するキメラ抗原はガンまたは固形腫瘍を防止および治療するため有用である。別の実施形態では、腫瘍はHER2/neu陽性腫瘍である。別の実施形態では、このガンはHER2を発現するガンである。別の実施形態では、このガンは乳ガン、中枢神経系(CNS)のガン、頭頸部ガン、骨肉腫(OSA)、イヌの骨肉腫、ユーリング肉腫(ES)、または当該技術分野で既知のいずれかのHER2/neuを発現するガンである。別の実施形態では、イヌの骨肉腫は四肢骨肉腫である。別の実施形態では、腫瘍は骨肉腫腫瘍、乳房腫瘍、頭頸部腫瘍、または当該技術分野で既知の任意の他の抗原を発現する腫瘍である。別の実施形態では、本明細書に記述されるガンまたは固形腫瘍は、再燃または転移性疾患の結果である。

20

#### 【0034】

別の一実施形態では、キメラ型HER2/neuを発現する組み換え型リストリアはHER2/neuを過剰発現する固形腫瘍に対する治療のための治療ワクチンとして有用である。別の実施形態では、本明細書に提供されるHER2/neuキメラ抗原は、HER2/neuを発現する腫瘍を治療するため、およびそのエスケープ変異を防止するに有用である。別の実施形態では、「エスケープ変異」という用語は、治療に対する治療的に有効な応答から変異して離れる腫瘍を指す。

30

#### 【0035】

一実施形態では、本明細書に提供される組み換え型ポリペプチドをコードする第1のオープンリーディングフレームを含む核酸分子を本明細書に提供し、核分子は組み換え型リストリアワクチン株の中に常在する。別の実施形態では、本明細書に提供される核酸分子は組み換え型リストリアに到達するために、リストリアを形質転換するように使用される。別の実施形態では本明細書に提供される核酸は病毒性遺伝子を欠いている。別の実施形態では、リストリアゲノムの中へと組み込まれた核酸分子は非機能性病毒性遺伝子を担持する。別の実施形態では、病毒性遺伝子は組み換え型リストリアのゲノム内で突然変異する。さらに別の実施形態では、核酸分子はリストリアゲノム内に存在する内因性の遺伝子を不活性化するために使用される。さらに別の実施形態では、病毒性遺伝子はactA遺伝子。別の実施形態では、病毒性遺伝子はprfA遺伝子である。当業者であれば理解するとおり、病毒性遺伝子は、組み換え型リストリア内で病毒性と関連付けられる、当該技術分野で既知の任意の遺伝子とすることができます。

40

#### 【0036】

一実施形態では、本明細書に提供される代謝遺伝子、病毒性遺伝子などはリストリア株

50

の染色体内で欠いている。別の実施形態では、本明細書に提供される代謝遺伝子、病毒性遺伝子などはリステリア株の染色体内でおよびいずれかのエピソーム性の遺伝要素中で欠いている。「エピソーム」、「エピソーム性の」などの用語が、本明細書に提供されるリステリアの染色体の中に組み込まれないプラスミドベクターまたはその使用を指すことを当業者は理解するであろう。別の実施形態では、この用語は本明細書に提供されるリステリアの染色体の中に組み込まれるプラスミドベクターを指す。別の実施形態では、代謝遺伝子、病毒性遺伝子などは、病毒性株のゲノムを欠いている。一実施形態では、病毒性遺伝子は、染色体内で突然変異する。別の実施形態では、病毒性遺伝子は染色体から欠失される。

## 【0037】

10

別の実施形態では、本明細書に提供される核酸およびプラスミドは、本明細書に提供される組み換え型リステリアに抗生物質抵抗性を与えない。

## 【0038】

20

一実施形態では、本明細書に提供される核酸分子はプラスミドを含む。別の実施形態では、本明細書に提供される核酸分子はプラスミドである。別の実施形態では、本明細書に提供されるプラスミドは組込み型ベクターである。別の実施形態では、プラスミドは非組込み型ベクターである。別の実施形態では、プラスミドは組込み型ベクターを含む。別の実施形態では、組込み型ベクターは部位特異的な組込み型ベクターである。別の実施形態では、本発明の方法および組成物の核酸分子は、当該技術分野で既知の任意のタイプのスクレオチドで成り立っている。

## 【0039】

20

「代謝酵素」という用語が宿主細菌によって要求される栄養素の合成に関する酵素を包含する場合があることを当業者は理解するであろう。別の実施形態では、この用語は宿主細菌によって要求される栄養素の合成のために要求される酵素を指す。別の実施形態では、この用語は宿主細菌によって利用される栄養素の合成に関する酵素を指す。別の実施形態では、この用語は宿主細菌の増殖の保持のために要求される栄養素の合成に関する酵素を指す。別の実施形態では、この酵素は栄養素の合成のために要求される。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

## 【0040】

30

「安定して維持される」という用語が、10世代の間検出可能な損失無しで、選択（例えば、抗生物質選択）が無い場合に宿主細胞または細菌内の核酸分子またはプラスミドの維持を包含する場合があることを当業者は理解するであろう。別の実施形態では、期間は15世代である。別の実施形態では、期間は20世代である。別の実施形態では、期間は25世代である。別の実施形態では、期間は30世代である。別の実施形態では、期間は40世代である。別の実施形態では、期間は50世代である。別の実施形態では、期間は60世代である。別の実施形態では、期間は80世代である。別の実施形態では、期間は100世代である。別の実施形態では、期間は150世代である。別の実施形態では、期間は200世代である。別の実施形態では、期間は300世代である。別の実施形態では、期間は500世代である。別の実施形態では、期間は世代を超えるものである。別の実施形態では、核酸分子またはプラスミドは、インビトロで（例えば、培養液内で）安定して維持される。別の実施形態では、核酸分子またはプラスミドは、インビボで安定して維持される。別の実施形態では、核酸分子またはプラスミドは、インビトロおよびインビトロの両方で安定して維持される。

40

## 【0041】

一実施形態では、本発明は抗原を発現する組み換え型リステリア株を提供する。本発明は、HER2キメラタンパク質またはその断片に融合したリステリオリシン（LL0）タンパク質断片を含む組み換え型ポリペプチド、ワクチンおよびこれを含む免疫原性組成物、ならびに抗HER2免疫応答を誘発する方法およびこれを含むHER2を発現する腫瘍に対して治療およびワクチン接種する方法も提供する。

## 【0042】

50

別の実施形態では、本発明の組み換え型リストリア株は動物宿主を通して継代されている。別の実施形態では、継代は株のワクチンベクターとしての有効性を最大化する。別の実施形態では、継代はリストリア株の免疫原性を安定化する。別の実施形態では、継代はリストリア株の病毒性を安定化する。別の実施形態では、継代はリストリア株の免疫原性を増加する。別の実施形態では、継代はリストリア株の病毒性を増加する。別の実施形態では、継代はリストリア株の不安定な亜系を除去する。別の実施形態では、継代はリストリア株の不安定な亜系の有病率を減少する。別の実施形態では、リストリア株は抗原含有組み換え型ペプチドをコードする遺伝子のゲノム挿入を含有する。別の実施形態では、リストリア株は抗原含有組み換え型ペプチドをコードする遺伝子を含むプラスミドを担持する。別の実施形態では、当該技術分野で既知の任意の他の方法によって継代を遂行する。

10

## 【0043】

一実施形態では、本明細書に提供される組み換え型ポリペプチドは本明細書に提供される融合タンパク質を含む。別の実施形態では、組み換え型ポリペプチドは融合タンパク質である。別の実施形態では、本明細書に提供される融合タンパク質はキメラ型HER2抗原、ならびにa)非溶血性LL0タンパク質もしくはN末端断片、b)PEST配列、またはc)ActA断片から成る群から選択される追加的なポリペプチドを含み、さらに前記追加的なポリペプチドはHER2/neuキメラ抗原に融合している。別の実施形態では、追加的なポリペプチドは機能性である。別の実施形態では、追加的なポリペプチドの断片は免疫原性である。別の実施形態では、追加的なポリペプチドは免疫原性である。

20

## 【0044】

別の実施形態では、本明細書に提供される融合タンパク質は非溶血性LL0タンパク質または本明細書に提供されるHER2/neuキメラ抗原に融合したN末端断片を含む。別の実施形態では、本発明の方法および組成物の融合タンパク質はリストリア生物体からのActA配列を含む。ActAタンパク質およびその断片は抗原発現および免疫性をLL0と類似の様式で増強する。

20

## 【0045】

別の実施形態では、本発明の方法および組成物の融合タンパク質はリストリア生物体からの切断ActA配列を含む。別の実施形態では、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許シリアル番号第7,655,238号に記述されるように、切断ActAは野生型ActAタンパク質の最初の390のアミノ酸から成る。別の実施形態では、米国特許公開番号第2014/0186387号に記述されるように、切断ActAは、ActA-N100またはその修正版(ActA-N100\*と称される)であり、この中でPESTモチーフを欠失しており、非保存的なQDNKR置換を含有する。ActAタンパク質およびその断片は抗原発現および免疫性をLL0と類似の様式で増強する。

30

## 【0046】

本発明の方法および組成物の別の実施形態では、本明細書に提供される融合タンパク質はHER2/neu抗原および追加的なポリペプチドを含む。一実施形態では、追加的なポリペプチドは非溶血性LL0タンパク質またはその断片である(実施例が本明細書に含まれる)。別の実施形態では、追加的なポリペプチドはPEST配列である。別の実施形態では、追加的なポリペプチドはActAタンパク質またはその断片である。ActAタンパク質およびその断片は抗原発現および免疫性をLL0と類似の様式で増強する。

40

## 【0047】

本発明の方法および組成物の追加的なポリペプチドは、別の実施形態ではリストリオシン(LL0)ペプチドである。別の実施形態では、追加的なポリペプチドはActAペプチドである。別の実施形態では、追加的なポリペプチドはPEST配列ペプチドである。別の実施形態では、追加的なポリペプチドは抗原ペプチドの免疫原性を強化する能力を有する任意の他のペプチドである。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

## 【0048】

HER2/neuキメラ抗原を含む融合タンパク質を、例えば、クローニングおよび適切な配列の制限、または以下に考察する方法による直接的な化学合成を含む任意の好適な

50

方法で調製してもよい。あるいは、部分配列をクローニングし、適切な部分配列を適切な制限酵素を使用して分割してもよい。次いで断片を連結し、望ましいDNA配列を生産してもよい。一実施形態では、本明細書に提供される抗原コードするDNAは、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）などのDNA増幅法を使用して生産することができる。まず、未変性のDNAのいずれかの側の新しい末端の区分を別個に増幅する。1つの増幅した配列の5'端はペプチドリンカーをコードし、一方でもう1つの増幅した配列の3'端もペプチドリンカーをコードする。第1の断片の5'端は第2の断片の3'端の相補なので、2つの断片を（例えば、LMPアガロース上で部分的な精製後）第3のPCR反応での重複テンプレートとして使用することができる。増幅した配列は、コドン、開放部位のカルボキシ側上の区分（ここではアミノ配列を形成している）、リンカー、および開放部位のアミノ側上の配列（ここではカルボキシル配列を形成している）を含有することになる。別の実施形態では、抗原はプラスミドの中へと連結される。各々の方法は本発明の別個の実施形態を表す。

10

## 【0049】

本発明の結果は、本発明の組成物の投与が腫瘍細胞を識別しあつ殺す抗原特異的なT細胞（例えば、細胞毒性T細胞）の形成を誘発するために有用性を有することを実証する（実施例が本明細書に含まれる）。

20

## 【0050】

一実施形態では、本発明は、HER2キメラタンパク質に融合したまたはその断片に融合したLLOタンパク質のN末端断片を含む組み換え型ポリペプチドを提供する。一実施形態では、本発明は、HER2キメラタンパク質に融合したまたはその断片に融合したLLOタンパク質のN末端断片から構成される組み換え型ポリペプチドを提供する。

20

## 【0051】

別の実施形態では、本発明の方法および組成物のHER2キメラタンパク質はヒトHER2キメラタンパク質である。別の実施形態では、HER2キメラタンパク質はマウスのHER2キメラタンパク質である。別の実施形態では、HER2キメラタンパク質はラットのHER2キメラタンパク質である。別の実施形態では、HER2キメラタンパク質は靈長類のHER2キメラタンパク質である。別の実施形態では、HER2キメラタンパク質はイヌのHER2キメラタンパク質である。別の実施形態では、Her-2タンパク質は当該技術分野で既知のヒトもしくは任意の他の動物種のHER2キメラタンパク質またはその組み合わせである。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

30

## 【0052】

別の実施形態では、Her-2タンパク質は、「HER2/neu」、「Erbb2」、「v-erb-b2」、「c-erb-b2」、「neu」、または「cNeu」と称されるタンパク質である。別の実施形態では、本明細書では、HER2/neuは、「Her-2」、「Her-2タンパク質」、「HER2タンパク質」、「HER2」）とも称される。

30

## 【0053】

一実施形態では、本明細書に提供されるHer-2-neuキメラタンパク質は、ガン遺伝子のMHCクラスIエピトープのクラスターを示すHER2/neu抗原の2つの細胞外および1つの細胞内の断片を寄生し、一方別の実施形態では、キメラタンパク質は、HER2/neu抗原の3つのH2Dqおよび少なくとも17のマッピングしたヒトMHCクラスIエピトープ（断片EC1、EC2、およびIC1）を寄生する（図1A参照）。別の実施形態では、キメラタンパク質は少なくとも13のマッピングしたヒトMHCクラスIエピトープ（断片EC2およびIC1）を寄生する。別の実施形態では、キメラタンパク質は少なくとも14のマッピングしたヒトMHCクラスIエピトープ（断片EC1およびIC1）を寄生する。別の実施形態では、キメラタンパク質は少なくとも9のマッピングしたヒトMHCクラスIエピトープ（断片EC1およびIC2）を寄生する。別の実施形態では、Her-2-neuキメラタンパク質は非溶血性リステリオリシンO（LLO）に融合する。別の実施形態では、Her-2-neuキメラタンパク質は切断リステリオ

40

50

リシンO( t L L O )に融合する。別の実施形態では、H e r 2 - n e u キメラタンパク質はリストリア・モノサイトゲネスリストリオリシンO( L L O )タンパク質の最初の441のアミノ酸に融合し、リストリア・モノサイトゲネス弱毒化栄養要求性株L m d d Aによって発現および分泌される。別の実施形態では、キメラ型H E R 2 / n e u 抗原/ L L O融合タンパク質を発現する本明細書に提供される弱毒化栄養要求性株からの融合タンパク質t L L O - C h H e r 2 の発現および分泌は、インビトロで8時間増殖した後T C A沈殿させた細胞培養上清内のL m - L L O - C h H e r 2 のものと同等である(図1B参照)。

#### 【0054】

一実施形態では、無処置の動物、または無関連のリストリアワクチンを注射したマウスではC T L活性は検出されなかった(図2A)。一方で別の実施形態では、本明細書に提供される弱毒化栄養要求性株( A D X S 3 1 - 1 6 4 )は、野生型F V B / N マウスからの脾細胞によるI F N - の分泌を刺激することができる(図2B)。

10

#### 【0055】

別の実施形態では、本明細書に提供される方法および組成物の代謝酵素はアミノ酸代謝酵素であり、一方で別の実施形態では、代謝酵素はアラニン・ラセマーゼ酵素である。別の実施形態では、代謝酵素はD-アミノ酸トランスクレオチド酵素である。別の実施形態では、代謝酵素は組み換え型リストリア株内で細胞壁合成のために使用されるアミノ酸の形成に触媒作用を及ぼし、一方で別の実施形態では、代謝酵素はアラニン・ラセマーゼ酵素である。

20

#### 【0056】

別の実施形態では、代謝酵素をコードする遺伝子は、リストリアp 6 0 プロモーターの制御下で発現する。別の実施形態では、i n l A(インターナリンをコードする)プロモーターが使用される。別の実施形態では、h 1 y プロモーターが使用される。別の実施形態では、a c t A プロモーターが使用される。別の実施形態では、インテグラーゼ遺伝子は任意の他のグラム陽性プロモーターの制御下で発現される。別の実施形態では、代謝酵素をコードする遺伝子は、リストリア内で機能する任意の他のプロモーターの制御下で発現する。遺伝子の発現を駆動するために他のプロモーターまたはポリシストロニック発現力セットが使用されてもよいことを当業者は理解するであろう。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

30

#### 【0057】

別の実施形態では、H E R 2 / n e u キメラタンパク質は、配列番号：1に示される以下の核酸配列によってコードされる。

```

g a g a c c c a c c t g g a c a t g c t c c g c c a c c t c a c c a g g g c t
g c c a g g t g g t g c a g g g a a a c c t g g a a c t c a c c t a c c t g c c
c a c c a a t g c c a g c c t g t c c t t c c t g c a g g a t a t c c a g g a g
g t g c a g g g c t a c g t g c t c a t c g c t c a c a a c c a a g t g a g g c
a g g t c c c a c t g c a g a g g c t g c g g a t t g t g c g a g g c a c c a
g c t c t t g a g g a c a a c t a t g c c c t g g c c g t g c t a g a c a a t
g g a g a c c c g c t g a a c a a t a c c a c c c c t g t c a c a g g g g c c t
c c c c a g g a g g c c t g c g g g a g c t g c a g c t t c g a a g c c t c a c
a g a g a t c t t g a a a g g a g g g g g t c t t g a t c c a g c g g a a c c c c
c a g c t c t g c t a c c a g g a c a c g a t t t g t g g a a g a a t a t c c
a g g a g t t t g c t g g c t g c a a g a a g a t c t t g g g a g c c t g g c
a t t t c t g c c g g a g a g c t t t g a t g g g g a c c c a g c c t c c a a c
a c t g c c c c g c t c c a g c c a g a g c a g c t c c a a g t g t t g a g a
c t c t g g a a g a g a t c a c a g g t t a c c t a t a c a t c t c a g c a t g
g c c g g a c a g c c t g c c t g a c c t c a g c g t c t t c c a g a a c c t g
c a a g t a a t c c g g g g a c g a a t t c t g c a c a a t g g c g c c t a c t
c g c t g a c c c t g c a a g g g c t g g g c a t c a g c t g g g c t g g g g c t

```

40

50

g c g c t c a c t g a g g g a a c t g g g c a g t g g a c t g g c c c t c a c a c c a t a a c a c c c a c c t c t g c t t c g t g c a c a c g g t g c c c t g g g a c c a g c t c t t t c g g a a c c c g c a c c a a g c t c t g c t c c a c a c t g c c a a c c g g c c a g a g g a c g a g t g t g t g g g c g a g g g c c t g g c c t g c c a c c a g c t g t g c g c c c g a g g g c a g c a g a a g a t c c c g g a a g t a c a c g a t g c g g a g a c t g c a g g a a a c g g a g c t g g g t g g a g g c c g c t g a c a c c t a g c g g a g c g a t g c c c a a c a g g c g c a g a t g c g g a t c c t g a a a a g a g a c g g g a g c t g a g g a a g g t g a a g g t g c t t g g a t c t g g c g c t t t g g c a c a g t c t a c a a g g g c a t c t g g a t c c c t g a t g g g g a g a a t g t g a a a a t t c c a g t g g c c a t c a a a g t g t t g a g g g a a a a c a c a t c c c c a a a g c c a a c a a a g a a a t c t t a g a c g a a g c a t a c g t g a t g g c t g g t g c a c a c a g c t t a t g c c t g a c a t c c a c g g t g c a g c t g g t g a c a c a g c t t a t g c c t a t g g c t g c c t c t t a g a c t a a (配列番号: 1)。

10

【 0 0 5 8 】

別の実施形態では、HER2/neuキメラタンパク質は配列番号：2に示される配列を含む。

20

30

40

50

## 【0059】

以下の表1は、ヒトとイヌとのそれぞれHer-2 ECおよびIC断片アミノ酸配列の間の同一性パーセント(%)を示す。

## 【表1-1】

ヒト	SLSFLQDQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRRLRIVRGTLQLFEDNYALAVLDNGDPLNNNTTPV 60		
イヌ	SLSFLQDQEVQGYVLIAHNQVRQIPLQRRLRIVRGTLQLFEDNYALAVLDNGDPLEGGIPA 60 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		
ヒト	TGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPOLCYQDTILWKDIPHKNQNQLALTLLIDTNRS 120		
イヌ	PGAAPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRSPQLCHQDTILWKDVFHKNQNQLALTLLIDTNRS 120 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		
ヒト	RACHPCSPMCK 131 配列番号:69	89%同一	EC1
イヌ	RACPPCSPACK 131 配列番号:70 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		
ヒト	TAPLOPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPDLSVFPQLQVIRGRILHNGAYSLTLQGL 60		
イヌ	TAPLOPEQLRVFEALEEITGYLYISAWPDSLPNLSVFPQLR VIRGRVLHDGAYSLTLQGL 60 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		
ヒト	GISWLGLRSLRELGs 配列番号:71		
イヌ	GISWLGLRSLRELGs 配列番号:72 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:	93%同一	EC2
ヒト	NQAQMRLKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGWIWPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEI 60		
イヌ	NQAQMRLKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGWIWPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEI 60 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		
ヒト	LDEAYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTVQLTQLMPYGCCLLDHVRENHRGLGSQDLLNWCN 120		
イヌ	LDEAYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTVQLTQLMPYGCCLLDHVREHRGLGSQDLLNWCN 120 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		
ヒト	QIAKGMSTLED 131 配列番号:73		
イヌ	QIAKGMSTLED 131 配列番号:74 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:	98%同一	IC1

## 【0060】

別の実施形態では、ヒトHER2/EC1断片をコードするアミノ酸配列は(配列番号:69)で示される: SLSFLQDQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRRLRIVRGTLQLFEDNYALAVLDNGDPLNNNTTPV рт GА S P G G L R E L Q L R S L T E I L K G G V L I Q R N P Q L C Y Q D T I L W K D I F H K N N Q L A L T L I D T N R S R A C H P C S P M C K (配列番号:69)。

## 【0061】

別の実施形態では、イヌのher2/neu EC1断片をコードするアミノ酸配列が(配列番号:70)で示される:

## 【0062】

SLSFLQDQEVQGYVLIAHSQVRQIPLQRRLRIVRGTLQLFEDNYALAVLDNGDPLEGGIPA (配列番号:70)。

## 【0063】

別の実施形態では、ヒトher2/neu EC2断片をコードするアミノ酸配列が(配列番号:71)で示される:

## 【0064】

TAPLOPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPDLSVFPQLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLG (配列番号:71)。

## 【0065】

別の実施形態では、イヌのher2/neu EC2断片をコードするアミノ酸配列が(配列番号:72)で示される:

## 【0066】

TAPLOPEQLR V F E A L E E I T G Y L Y I S A W P D S L P N L S V F Q N (配列番号:72)。

10

20

30

40

50

L R V I R G R V L H D G A Y S L T L Q G L G I S W L G L R S L R E L G S (配列番号：72)。

【0067】

別の実施形態では、ヒトher2/neu IC1断片をコードするアミノ酸配列が(配列番号：73)で示される：

【0068】

N Q A Q M R I L K E T E L R K V K V L G S G A F G T V Y K G I W I P D G E N V  
K I P V A I K V L R E N T S P K A N K E I L D E A Y V M A G V G S P Y V S R L L  
G I C L T S T V Q L V T Q L M P Y G C L L D H V R E N R G R L G S Q D L L N W C  
M Q I A K G M S Y L E D (配列番号：73)。 10

【0069】

別の実施形態では、イヌのher2/neu IC1断片をコードするアミノ酸配列が(配列番号：74)で示される：

【0070】

N Q A Q M R I L K E T E L R K V K V L G S G A F G T V Y K G I W I P D G E N V  
K I P V A I K V L R E N T S P K A N K E I L D E A Y V M A G V G S P Y V S R L L  
G I C L T S T V Q L V T Q L M P Y G C L L D H V R E N R G R L G S Q D L L N W C  
M Q I A K G M S Y L E D (配列番号：74)。一実施形態では、ヒトのHER2 EC1断片のアミノ酸配列(配列番号：69)はイヌのHER2 EC1断片のアミノ酸配列(配列番号：70)と89%の同一性を有する。別の実施形態では、ヒトのHER2 EC2断片のアミノ酸配列(配列番号：71)はイヌのHER2 EC2断片のアミノ酸配列(配列番号：72)と93%の同一性を有する。別の実施形態では、ヒトのHER2 IC1断片のアミノ酸配列(配列番号：73)はイヌのHER2 IC1断片のアミノ酸配列(配列番号：74)と98%の同一性を有する。 20

【0071】

一実施形態では、本明細書に提供される方法および組成物のHER2キメラタンパク質またはその断片はそのシグナル配列を含まない。別の実施形態では、シグナル配列の高い疎水性により、シグナル配列の削除はHER2断片がリストリア内で順調に発現できるようとする。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

【0072】

別の実施形態では、本発明の方法および組成物のHER2キメラタンパク質の断片はその膜貫通領域(TM)を含まない。一実施形態では、TMの高い疎水性により、TMの削除はHER2断片がリストリア内で順調に発現できるようにする。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。 30

【0073】

一実施形態では、ラットのher2/neu遺伝子をコードする核酸配列は配列番号：45を含む： C C G G A A T C G C G G G C A C C C A A G T G T G T A C C G G C A  
C A G A C A T G A A G T T G C G G C T C C C T G C C A G T C C T G A G A C C C A  
C C T G G A C A T G C T C C G C C A C C T G T A C C A G G G C T G T C A G G T A  
G T G C A G G G C A A C T T G G A G G C T T A C C T A C G T G C C T G C C A A T G  
C C A G G C C T C A T T C C T G C A G G A C A T C C A G G A A G T T C A G G G  
T T A C A T G C T C A T C G C T C A C A A C C A G G T G A A G C G C G T C C C A  
C T G C A A A G G C T G C G C A T C G T G A G A G G G A C C C A G C T C T T G  
A G G A C A A G T A T G C C C T G G C T G T G C T A G A C A A C C G A G A T C C  
T C A G G A C A A T G T C G C C G C C T C C A C C C C A G G C A G A A C C C C A  
G A G G G G C T G C G G G A G G C T G C A G C T T C G A A G T C T C A C A G A G A  
T C C T G A A G G G A G G G A G T T T G A T C C G T G G G A A C C C T C A G C T  
C T G C T A C C A G G A C A T G G T T T G T G G A A G G A C G T C T T C C G C  
A A G A A T A A C C A A C T G G C T C C T G T C G A T A T A G A C A C C A A T C  
G T T C C C G G G C C T G T C C A C C T T G T G C C C C C G C C T G C A A A G A 40

CAATCACTGTTGGGTGAGAGTCCGGAAGACTGTCAGATC  
TTGACTGGCACCATCTGTACCACTGAGCTGCCATTCTGACTGCCTGGCC  
AGGGCCGGCTGCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGC  
CGCAGGGCTGCACGGGCCCCAAGCATTCTGACTGCCTGGCC  
TGCCCTCCACTTCAATCATAGTGGTATCTGTGAGCTGCAC  
GCCAGCCCTCGTCACCTACAACACAGACACCTTGAGTC  
CATGCACAACCCCTGAGGGTGCCTACACCTTGGTGCAGC  
TGCAGTACGGGACCTGCCCTACAACACTACCTGTCTACGGAAAG  
TGGGATCCTGCACCTCTGGTGTGTCCTCCCGAATAACCAAGA  
GGTCACAGCTGAGGGACGGAACACAGCGTTGTGAGAAATGC 10  
AGCAAGCCCTGTGCTCGAGTGTGCTATGGTCTGGCATGG  
AGCACCTTCGAGGGCGAGGGCCATCACCAAGTGAACATGT  
CCAGGAGTTGATGGCTGCAAGAAGATCTTGGGAGCCTG  
GCATTTTGGCAGAGCTTGTGATGGGACCCCTCCCTCG  
GCATTGCTCCGCTGAGGCCCTGAGCAGCTCCAAGTGTTCGA  
AACCCCTGGAGGGAGATCACAGGTTACCTGTACATCTCAGCA  
TGGCCAGACAGTCTCCGTGACCTCAGTGTCTTCCAGAAC  
TTCGAACATCATTGGGACGGATTCTCCACGATGGCGCGTA  
CTCATTGACACTGCAAGGCCCTGGGATCCACTCGCTGGGG  
CTGCGCTCACTGCGGGAGCTGGCAGTGGATTGGCTCTGA  
TTCACCGCAACGCCATCTCTGCTTTGTACACACTGTACC  
TTGGGACCAAGCTCTCCGGAACCCACATCAGGCCCTGCTC  
CACAGTGGAACCGGCCGGAAAGAGGATTGTGGTCTCGAGG  
GCTTGGTCTGTAACACTGACTGTGTGCCCACGGGCACTGCTG  
GGGCCAGGGCCCACCCAGTGTGTCAACTGCAGTCATTTC  
CTTCGGGGCCAGGAGTGTGTGGAGGGAGTGCCAGTATGGA  
AGGGGCTCCCCGGGAGTATGTGAGTGAACAAGCGCTGTCT  
GCCGTGTCACCCCGAGTGTCAAGCCTCAAAACAGCTCAGAG  
ACCTGCTTGGATCGGAGGGCTGATCAGTGTGCAAGCCTGCG  
CCCACTACAAGGACTCGTCCCTCTGTGTGGCTCGCTGCC 20  
CAGTGGTGTGAAACCGGACCTCTCTACATGCCATCTGG  
AAGTACCCGGATGAGGGAGGGCATATGCCAGCCGTGCCCA  
TCAACTGCACCCACTCCTGTGTGGATCTGGATGAACGAGG  
CTGCCAGCAGAGCAGAGAGGCCAGGCCGGTGAACATTCA  
ATTGCAAATGTAGTGGCGTCCCTGCTGTTCTGATCTTAG  
TGGTGGTCGTTGGAATCTTAATCAAACGAAGGAGACAGAA  
GATCCGGAAAGTATACGATGCGTAGGGCTGCTGCAGGAAACT  
GAGTTAGTGGAGGCCGCTGACGCCAGCAGGGAGCAATGCCA  
ACCAGGGCTCAGATGCGGATCCTAAAAGAGACGGAGCTAAG  
GAAGGTGAAGGTGCTTGGATCAGGAGCTTTGGCACTGTC 30  
TACAAGGGCATCTGGATCCCAGATGGGGAGAATGTGAAAAA  
TCCCCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAACACATCTCC  
TAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGTATGTGATG  
GCTGGTGTGGTTCTCGTATGTGTCCCGCCTCCTGGCA  
TCTGCCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGAACACAGCTTAT  
GCCCTACGGCTGCCCTCTGGACCATGTCAGAGAACACCGA  
GGTCGCCTAGGGCTCCAGGACCTGCTCAACTGGTGTGTT  
AGATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGGACGTGCGGCT  
TGTACACAGGGACCTGGCTGCCCGGAATGTGCTAGTCAAG  
AGTCCCCAACCAACGTCAAGATTACAGATTTCGGGCTGGCTC 40  
50

GGCTGCTGGACATTGATGAGACAGAGTACCATGCAGATGG  
 GGGCAAGGTGCCCATCAAATGGATGGCATTGGAATCTATT  
 CT CAGACGCCGGTTCACCCATCAGAGT GAT GT GTGGAGCT  
 ATGGAGTGACTGTGTGGAGCTGATGACTTTTGGGGCCAA  
 ACCTTACGATGGAATCCCAGCCCCGGGAGATCCCTGATTG  
 CTGGAGAAGGGAGAACGCCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCA  
 CCATTGATGTCATGATTATGGTCAAATGTTGGATGAT  
 TGACTCTGAATGTCGCCCGAGATTCCGGGAGTTGGTGTCA  
 GAATTTCACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTTTGTGG  
 TCATCCAGAACGAGGACTTGGGCCATCCAGCCCCATGGA  
 CAGTACCTTCTACCGTTCACTGCTGGAAAGATGATGACATG  
 GGTGACCTGGTAGACGCTGAAGAGTATCTGGTGCCTCAGC  
 AGGGATTCTCTCCCCGGACCCCTACCCAGGCACGGAG  
 CACAGCCCATAAGAAGGCACCGCAGCTCGTCCACCAGGAGT  
 GGAGGTGGTGAGCTGACACTGGGCTGGAGGCCCTCGGAAG  
 AAGGGCCCCCAGATCTCCACTGGCTCCCTCGGAAGGGGC  
 TGGCTCCGATGTTGATGGTGACCTGGCAATGGGGGTA  
 ACCAAAGGGCTGCAGAGCCTCTCCACATGACCTCAGCC  
 CTCTACAGCGGTACAGCGAGGACCCCCACATTACCTCTGCC  
 CCCCCGAGACTGATGGCTATGTTGCTCCCCCTGGCCTGCAGC  
 CCCCCAGCCCCGAGTATGTGAACCAATCAGAGGTTCAAGCCTC  
 AGCCTCCTTTAACCCAGAGGGTCTGCTCCCTGTCCTGCG  
 GCCTGCTGGTCTACTCTAGAAAGACCCAAGACTCTCTCT  
 CCTGGGAAGAATGGGGTTGTCAAAGACGTTTTGCCCTTCG  
 GGGGTGCTGTGGAGAACCCCTGAATACTTAGTACCGAGAGA  
 AGGCACTGCCTCTCCGCCACCCCTTCTGCCCTCAGC  
 CCAGCCTTGTGACAACCTCTATTACTGGGACCAAGACTCAT  
 CGGAGCAGGGGCCCTCCACCAAGTAACCTTGAAGGGACCCC  
 CACTGCAGAGAACCCCTGAGTACCTAGGCCCTGGATGTACCT  
 GTA (配列番号 : 45)。

## 【0074】

一実施形態では、ラットのHER2/neu EC1断片をコードする核酸配列は配列番号：46を含む： CCCAGGCAGAACCCCCAGAGGGGCTGCAGGG  
 GCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCTGAAAGGGAGGA  
 GTTTTGATCCGTGGAAACCCCTCAGCTCTGCTACCAAGGACA  
 TGGTTTGTGGAAAGGACGTCCTCCGCAAGAAATAACCAACT  
 GGCTCCTGTCGATATAGACACCAATCGTTCCCGGGCTGT  
 CCACCTTGTGCCCTGGCTGCAAAGACAAATCACTGTTGGG  
 GTGAGAGTCCGGAAAGACTGTCAGATCTTGACTGGCACCAT  
 CTGTACCAAGTGGTTGTGCCCGGTGCAAGGGCCGGCTGCC  
 ACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCCGCAGGCTGCACGG  
 GCCCAAGCA (配列番号：46)。

## 【0075】

別の実施形態では、ラットのHER2/neu EC2断片をコードする核酸配列は配列番号：47を含む： GGTCAACAGCTGAGGGACGGAACACAGCGTT  
 GTGAGAAATGCAGCAAGGCCCTGTCGCTCGAGTGTGCTATGG  
 TCTGGGCATGGAGGCACCTTCGAGGGGGCGAGGGCCATCACCC  
 AGTGACAATGTCAGGAGTTGATGGCTGCAAGAAGATCT  
 TTGGGAGGCCCTGGCATTTTGCCGGAGAGGCTTTGATGGGG  
 CCCCCCTCCTCCGGCATTGCTCCGCTGAGGCCCTGAGCAGCTC

10

20

30

40

50

C A A G T G T T C G A A A C C C T G G A G G A G A T C A C A G G T T A C C T G T  
 A C A T C T C A G C A T G G C C A G A C A G T C T C C G T G A C C T C A G T G T  
 C T T C C A G A A C C T T C G A A T C A T T C G G G G A C G G A T T C T C C A C  
 G A T G G C G C G T A C T C A T T G A C A C T G C A A G G C C T G G G G A T C C  
 A C T C G C T G G G G C T G C G C T C A C T G C G G G A G C T G G G C A G T G G  
 A T T G G C T C T G A T T C A C C G C A A C G C C C A T C T C T G C T T T G T A  
 C A C A C T G T A C C T T G G G A C C A G C T C T T C C G G A A C C C A C A T C  
 A G G C C C T G C T C C A C A G T G G G A A C C G G C C G G A A G A G G A T T G  
 T G G T C T C G A G G G C T T G G T C T G T A A C T C A C T G T G T G C C C A C  
 G G G C A C T G C T G G G G C C A G G G C C C A C C C A (配列番号：47)。 10

## 【0076】

別の実施形態では、ラットのHER2/neu IIC1断片をコードする核酸配列は配列番号：48を含む：

## 【0077】

C G C C C A G C G G A G C A A T G C C C A A C C A G G C T C A G A T G C G G A  
 T C C T A A A A G A G A C G G A G C T A A G G A A G G T G A A G G T G C T T G G  
 A T C A G G A G C T T T G G C A C T G T C T A C A A G G G C A T C T G G A T C  
 C C A G A T G G G G A G A A T G T G A A A A T C C C C G T G G C T A T C A A G G  
 T G T T G A G A G A A A A C A C A T C T C C T A A A G C C A A C A A A G A A A T  
 T C T A G A T G A A G C G T A T G T G A T G G C T G G T G T G G G T T C T C C G  
 T A T G T G T C C C G C C T C C T G G G C A T C T G C C T G A C A T C C A C A G  
 T A C A G C T G G T G A C A C A G C T T A T G C C C T A C G G C T G C C T T C T  
 G G A C C A T G T C C G A G A A C A C C G A G G G T C G C C T A G G C T C C C A G  
 G A C C T G C T C A A C T G G T G T G T C A G A T T G C C A A G G G G A T G A  
 G C T A C C T G G A G G A C G T G C G G C T T G T A C A C A G G G A C C T G G C  
 T G C C C G G A A T G T G C T A G T C A A G A G T C C C A A C C A C G T C A A G  
 A T T A C A G A T T T C G G G C T G G C T C G G C T G C T G G A C A T T G A T G  
 A G A C A G A G T A C C A T G C A G A T G G G G C A A G G T G C C C A T C A A  
 A T G G A T G G C A T T G G A A T C T A T T C T C A G A C G C C G G T T C A C C  
 C A T C A G A G T G A T G T G T G G A G C T A T G G A G T G A C T G T G T G G G  
 A G C T G A T G A C T T T G G G G C C A A A C C T T A C G A T G G A A T C C C 30  
 A G C C C G G G A G A T C C C T G A T T T G C T G G A G A A G G G A G A A C G C  
 C T A C C T C A G C C T C C A A T C T G C A C C A T T G A T G T C T A C A T G A  
 T T A T G G T C A A A T G T T G G A T G A T T G A C T C T G A A T G T C G C C C  
 G A G A T T C C G G G A G T T G G T G T C A G A A T T T T C A C G T A T G G C G  
 A G G G A C C C C A G C G T T T T G T G G T C A T C C A G A A C G A G G G A C T  
 T G G G C C C A T C C A G C C C C A T G G A C A G T A C C T T C T A C C G T T C  
 A C T G C T G G A A (配列番号：48)。

## 【0078】

一実施形態では、ヒトのHER2/neu遺伝子の核酸配列は配列番号：49を含む：

A T G G A G C T G G C G G C C T T G T G C C G C T G G G G G C T C C C T C C T G  
 C C C T C T T G C C C C C G G A G C C G C G A G C A C C C A A G T G T G C A C  
 C G G C A C A G A C A T G A A G C T G C G G C T C C C T G C C A G T C C C G A G  
 A C C C A C C T G G A C A T G C T C C G C C A C C T C T A C C A G G G C T G C C  
 A G G T G G T G C A G G G A A A C C T G G A A C T C A C C T A C C T G C C C A C  
 C A A T G C C A G C C T G T C C T T C C T G C A G G A T A T C C A G G A G G T G  
 C A G G G C T A C G T G C T C A T C G C T C A C A A C C A A G T G A G G G C A G G  
 T C C C A C T G C A G A G G C T G C G G A T T G T G C G A G G G C A C C C A G C T  
 C T T T G A G G G A C A A C T A T G C C C T G G C C G T G C T A G A C A A T G G A  
 G A C C C G C T G A A C A A T A C C A C C C C T G T C A C A G G G G C T C C C 50

CAGGAGGGCTGCAGGGAGCTGCAGCTTCGAAGCCTCACAGA  
 GATCTTGAAGGAGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCCAG  
 CTCTGCTACCAAGGACACGATTGTGGAAAGGACATCTTCC  
 ACAAGAACAAACCAGCTGGCTCTCACACTGATAGACACCAA  
 CGCTCTCGGGCTGCCACCCCTGTTCTCCGATGTGTAAG  
 GGCTCCCGCTGCTGGGAGAGAGTTCTGAGGATTGTCAGA  
 GCCTGACGCGCACTGTCGTCGCCCCGTGGCTGTGCCCCGCTG  
 CAAGGGGCCACTGCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGT  
 GCTGCCGGCTGCACGGCCCCAAGCAGCTCTGACTGCCCTGG  
 CCTGCCCTCACTCAACCAAGTGGCATCTGTGAGCTGCA  
 CTGCCAGCCCTGGTCACCTACAACACAGACACGTTTGAG  
 TCCATGCCCAATCCCAGGGCCGGTATAACATTGCGGCCA  
 GCTGTGTGACTGCCTGTCCTACAACACTACCTTCTACGGA  
 CGTGGGATCCTGCACCCCTCGTCTGCCCTGCAACAACCAA  
 GAGGTGACAGCAGAGGATGGAACACAGCGGTGTGAGAAGT  
 GCAGCAAGCCCTGTGCCCGAGTGTGCTATGGTCTGGCAT  
 GGAGCACTTGCAGAGGTGAGGGCAGTTACCAAGTGC  
 ATATCCAGGAGTTGCTGGCTGCAAGAAGATCTTGGGAGCC  
 TGGCATTCTGCCGGAGACTTGTGATGGGACCCAGCCTC  
 CAACACTGCCCGCTCCAGCCAGAGCAGCTCCAAGTGT  
 GAGACTCTGGAAGAGATCACAGGTTACCTATAACATCTCAG  
 CATGGCCGGACAGCCTGCTGACCTCAGCGTCTTCCAGAA  
 CCTGCAAGTAATCCGGGGACGAATTCTGCACAATGGCGCC  
 TACTCGCTGACCCCTGCAAGGGCTGGCATCAGCTGGCTGG  
 GGCTGCGCTCACTGAGGGAACTGGGCAGTGGACTGGCC  
 CATCCACCAATAACACCCACCTCTGCTTGTGCAACACGGT  
 CCCTGGGACCAAGCTCTTCTGGAACCCGCACCAAGCTCTGC  
 TCCACACTGCCAACCGGCCAGAGGACAGAGTGTG  
 GGGCCTGGCCTGCCACCAAGCTGTGCGGCCGGAGGGCACTGC  
 TGGGGTCCAGGGCCACCCAGTGTGTC  
 ACTGCAAGCCAGT  
 TCCTTCGGGGCCAGGAGTGC  
 GTGGAGGAATGCCGAGTACT  
 GCAGGGGCTCCCCAGGGAGTATGTGAATGCCAGGGCACTGT  
 TTGCCGTGCCACCCCTGAGTGTGTCAGCCCCAGAAATGGCTCAG  
 TGACCTGTTTGGACCGGGAGGGCTGACCAAGTGTG  
 TGCCCACTATAAGGACCCCTCCCTCTGCGTGGGCCGCTGC  
 CCCAGCGGTGTGAAACCTGACCTCTCCTACATGCCCATCT  
 GGAAGTTCCAGATGAGGAGGGCGCATGCCAGCCTGCC  
 CATCAACTGCACCCACTCCTGTGTTGGACCTGGATGACAAG  
 GGCTGCCCGCCGAGCAGAGAGCCAGCCTCTGACGTCCA  
 TCGTCTCTCGGGTGGTGGCATTCTGCTGGTC  
 GTGGTCTT  
 GGGGGTGGTCTTGGATCCTCATCAAGCGACGGCAGCAG  
 AAGATCCGGAAGTACACGATGCGGAGACTGCTG  
 CAGGAAAGGAAAGTACACGATGCGGAGACTGCTG  
 CAGGAAAGGTGAAGGTGCTTGGATCTGGCGCTTTGGC  
 ACAG  
 TCTACAAAGGGC  
 ATCTGGATCCCTGATGGGGAGAATGTGAA  
 AATTCCAGTGGCCATCAAAGTGTGAGGGAAAACACATCC  
 CCCAAAGCCAACAAAGAAATCTTAGACGAAGC  
 ATACGTGA  
 TGGCTGGTGTGGCTCCCCATATGTCT  
 CCCGCCCTCTGGG  
 CATCTGCCCTGACATCCACGGTGCAGCTGGT  
 GACACAGCTT

10

20

30

40

50

A T G C C C T A T G G C T G C C T C T T A G A C C A T G T C C G G G A A A A C C  
 G C G G A C G C C T G G G C T C C C A G G A C C T G C T G A A C T G G T G T A T  
 G C A G A T T G C C A A G G G G A T G A G C T A C C T G G A G G A T G T G C G G  
 C T C G T A C A C A G G G A C T T G G C C G C T C G G A A C G T G C T G G T C A  
 A G A G T C C C A A C C A T G T C A A A A T T A C A G A C T T C G G G C T G G C  
 T C G G C T G C T G G A C A T T G A C G A G A C A G A G T A C C A T G C A G A T  
 G G G G G C A A G G T G C C C A T C A A G T G G A T G G C G C T G G A G T C C A  
 T T C T C C G C C G G C G G T T C A C C C A C C A G A G T G A T G T G T G G A G  
 T T A T G G T G T G A C T G T G T G G G A G C T G A T G A C T T T G G G G C C  
 A A A C C T T A C G A T G G G A T C C C A G C C C G G G A G A T C C C T G A C C  
 T G C T G G A A A A G G G G G G A G C G G G C T G C C C C A G C C C C C A T C T G  
 C A C C A T T G A T G T C T A C A T G A T C A T G G T C A A A T G T T G G A T G  
 A T T G A C T C T G A A T G T C G G C C A A G A T T C C G G G A G T T G G T G T  
 C T G A A T T C T C C C G C A T G G C C A G G G A C C C C C A G C G C T T T G T  
 G G T C A T C C A G A A T G A G G A C T T G G G C C C A G C C A G T C C C T T G  
 G A C A G C A C C T T C T A C C G C T C A C T G C T G G A G G A C G A T G A C A  
 T G G G G G A C C T G G T G G A T G C T G A G G G A G T A T C T G G T A C C C C A  
 G C A G G G G C T T C T G T C C A G A C C C T G C C C C G G G C G C T G G G  
 G G C A T G G T C C A C C A C A G G C A C C G C A G C T C A T C T A C C A G G A  
 G T G G C G G T G G G G A C C T G A C A C T A G G G G C T G G A G G C C C T C T G A  
 A G A G G A G G C C C C C A G G T C T C C A C T G G C A C C C T C C G A A G G G  
 G C T G G C T C C G A T G T A T T T G A T G G T G A C C T G G G A A T G G G G G  
 C A G C C A A G G G G C T G C A A A G C C T C C C C A C A C A T G A C C C C A G  
 C C C T C T A C A G C G G T A C A G T G A G G A C C C C A C A G T A C C C C T G  
 C C C T C T G A G A C T G A T G G C T A C G T T G C C C C C C T G A C C T G C A  
 G C C C C C A G C C T G A A T A T G T G A A C C A G C C A G A T G T T C G G C C  
 C C A G C C C C C T T C G C C C C G A G A G G G G C C C T C T G C C T G C T G C C  
 C G A C C T G C T G G T G C C A C T C T G G A A A G G G C C A A G A C T C T C T  
 C C C C A G G G A A G A A T G G G G T C G T C A A A G A C G T T T T G C C T T  
 T G G G G G T G C C G T G G A G A A C C C C G A G T A C T T G A C A C C C C A G  
 G G A G G A G G C T G C C C C T C A G C C C C A C C C T C C T C C T G C C T T C A  
 G C C C A G C C C T T C G A C A A C C T C T A T T A C T G G G A C C A G G A C C C  
 A C C A G A G G C G G G G G C T C C A C C C A G C A C C T T C A A A G G G A C A  
 C C T A C G G G C A G A G A A C C C A G A G T A C C T G G G T C T G G A C G T G C  
 C A G T G T G A A C C A G A A A G G C C A A G T C C G C A G A A G G C C C T G A (配列番号：49)。

## 【0079】

別の実施形態では、ヒトHER2/neu EC1断片をコードする核酸配列は、ヒトのEC1領域の120～510bpにわたるキメラの中へと実装され、以下の配列番号：50を含む：

G A G A C C C A C C T G G A C A T G C T C C G C C A C C T C T A C C A G G G C T  
 G C C A G G T G G T G C A G G G A A A C C T G G A A C T C A C C T A C C T G C C  
 C A C C A A T G C C A G C C T G T C C T T C C T G C A G G A T A T C C A G G A G  
 G T G C A G G G C T A C G T G C T C A T C G C T C A C A A C C A A G T G A G G G C  
 A G G T C C C A C T G C A G A G G C T G C G G A T T G T G C G A G G C A C C C A  
 G C T C T T T G A G G G A C A A C T A T G C C C T G G C C G T G C T A G A C A A T  
 G G A G A C C C G C T G A A C A A T A C C A C C C C T G T C A C A G G G G C C T  
 C C C C A G G G A G G C C T G C G G G A G G C T G C A G C T T C G A A G G C C T C A C  
 A G A G A T C T T G A A A G G G A G G G G T C T T G A T C C A G C G G A A C C C C  
 C A G C T C T G C T A C C A G G A C A C G A T T T T G T G G A A G (配列番号：50)

0 )。

**【 0 0 8 0 】**

一実施形態では、完全な E C 1 ヒト H E R 2 / n e u 断片は(ヒトの H E R 2 / n e u 遺伝子の 5 8 ~ 9 7 9 b p )にわたり、以下の配列番号：5 4 を含む核酸配列によってコードされる：

G C C G G C G A G C A C C C A A G T G T G C A C C G G C A C A G A C A T G A A G C  
T G C G G C T C C C T G C C A G T C C C G A G A C C C A C C T G G A C A T G C T  
C C G C C A C C T C T A C C A G G G C T G C C A G G T G G T G C A G G G A A A C  
C T G G A A C T C A C C T A C C T G C C C A C C A A T G C C A G C C T G T C C T  
T C C T G C A G G A T A T C C A G G A G G T G C A G G G C T A C G T G C T C A T 10  
C G C T C A C A A C C A A G T G A G G G C A G G T C C C A C T G C A G A G G G C T G  
C G G A T T G T G C G A G G G C A C C C A G G C T C T T G A G G G A C A A C T A T G  
C C C T G G C C G T G C T A G A C A A T G G A G A C C C G C T G A A C A A T A C  
C A C C C C T G T C A C A G G G G C T C C C C A G G A G G G C T G C G G G A G  
C T G C A G C T T C G A A G C C T C A C A G A G A T C T T G A A A G G A G G G G  
T C T T G A T C C A G C G G A A C C C C C A G C T C T G C T A C C A G G A C A C  
G A T T T T G T G G A A G G A C A T C T T C A C A A G A A C A A C C A G C T G  
G C T C T C A C A C T G A T A G A C A C C A A C C G C T C T C G G G C C T G C C  
A C C C C T G T T C T C C G A T G T G T A A G G G C T C C C G C T G C T G G G G  
A G A G A G T T C T G A G G A T T G T C A G A G C C T G A C G C G C A C T G T C 20  
T G T G C C G G T G G C T G T G C C C G C T G C A A G G G G C C A C T G C C C A  
C T G A C T G C T G C C A T G A G C A G T G T G C T G C C G G C T G C A C G G G  
C C C C A A G C A C T C T G A C T G C C T G G C C T G C C T C C A C T T C A A C  
C A C A G T G G C A T C T G T G A G G C T G C A C T G C C C A G C C C T G G T C A  
C C T A C A A C A C A G A C A C G T T T G A G T C C A T G C C C A A T C C C G A  
G G G C C G G T A T A C A T T C G G C G C C A G C T G T G A C T G C C T G T  
C C C T A C A A C T A C C T T T C T A C G G A C G T G G G A T C C T G C A C C C  
T C G T C T G C C C C C T G C A C A A C C A A G A G G G T G A C A G C A G A G G A  
T (配列番号：5 4)。

**【 0 0 8 1 】**

別の実施形態では、ヒトの H E R 2 / n e u E C 2 断片をコードする核酸配列は、ヒトの H E R 2 / n e u E C 2 断片の 1 0 7 7 ~ 1 5 5 4 b p にわたるキメラの中へと実装されかつ 5 0 b p の延長部を含み、以下の配列番号：5 1 を含む：

A A T A T C C A G G A G T T T G C T G G C T G C A A G A A G A T C T T T G G G A  
G C C T G G C A T T T C T G C C G G A G A G C T T T G A T G G G G A C C C A G C  
C T C C A A C A C T G C C C C G C T C C A G C C A G A G C A G C T C C A A G T G  
T T T G A G A C T C T G G A A G A G A T C A C A G G T T A C C T A T A C A T C T  
C A G C A T G G C C G G A C A G C C T G C C T G A C C T C A G C G T C T T C C A  
G A A C C T G C A A G T A A T C C G G G A C G A A T T C T G C A C A A T G G C  
G C C T A C T C G C T G A C C C T G C A A G G G C T G G G C A T C A G C T G G C  
T G G G G C T G C G C T C A C T G A G G G A A C T G G G C A G T G G A C T G G C 40  
C C T C A T C C A C C A T A A C A C C C A C C T C T G C T T C G T G C A C A C G  
G T G C C C T G G G A C C A G C T C T T C G G A A C C C G C A C C A A G C T C  
T G C T C C A C A C T G C C A A C C G G C C A G A G G A C G A G T G T G T G G G  
C G A G G G C C T G G C C T G C C A C C A G C T G T G C G C C C G A G G G (配列  
番号：5 1)。

**【 0 0 8 2 】**

一実施形態では、ヒトの H E R 2 / n e u 遺伝子の 9 0 7 ~ 1 5 0 4 b p にわたる完全な E C 2 ヒト H E R 2 / n e u 断片は、以下の配列番号：5 5 を含む核酸配列によってコードされる)：

10

20

30

40

50

T A C C T T T C T A C G G A C G T G G G A T C C T G C A C C C T C G T C T G C C  
 C C C T G C A C A A C C A A G A G G G T G A C A G C A G A G G A T G G A A C A C A  
 G C G G T G T G A G A A G T G C A G C A A G C C C T G T G C C C G A G T G T G C  
 T A T G G T C T G G G C A T G G A G C A C T T G C G A G A G G G T G A G G G C A G  
 T T A C C A G T G C C A A T A T C C A G G A G T T T G C T G G C T G C A A G A A  
 G A T C T T T G G G A G C C T G G C A T T T C T G C C G G A G A G C T T T G A T  
 G G G G A C C C A G C C T C C A A C A C T G C C C C G C T C C A G C C A G A G C  
 A G C T C C A A G T G T T G A G A C T C T G G A A G A G A T C A C A G G T T A  
 C C T A T A C A T C T C A G C A T G G C C G G A C A G C C T G C C T G A C C T C  
 A G C G T C T T C C A G A A C C T G C A A G T A A T C C G G G G A C G A A T T C  
 T G C A C A A T G G C G C C T A C T C G C T G A C C C T G C A A G G G G C T G G G  
 C A T C A G C T G G C T G G G G C T G C G C T C A C T G A G G G A A C T G G G C  
 A G T G G A C T G G C C C T C A T C C A C C A T A A C A C C C A C C T C T G C T  
 T C G T G C A C A C G G T G C C C T G G G A C C A G C T C T T C G G A A C C C  
 G C A C C A A G C T C T G C T C C A C A C T G C C A A C C G G C C A G A G (配列番号 : 55)。

10

## 【0083】

別の実施形態では、ヒトのHER2/neu IC1断片をコードする核酸配列は以下の配列番号：52を含むキメラの中へと実装される：

C A G C A G A A G A T C C G G A A G T A C A C G A T G C G G A G A C T G C T G C  
 A G G A A A C G G A G G C T G G T G G A G G C C G C T G A C A C C T A G C G G A G C  
 G A T G C C C A A C C A G G G C G C A G A T G C G G A T C C T G A A A G A G A C G  
 G A G C T G A G G A A G G T G A A G G T G C T T G G A T C T G G C G C T T T G  
 G C A C A G T C T A C A A G G G C A T C T G G A T C C C T G A T G G G G A G A A  
 T G T G A A A A T T C C A G T G G C C A T C A A A G T G T T G A G G G A A A A C  
 A C A T C C C C C A A A G C C A A C A A A G A A A T C T T A G A C G A A G C A T  
 A C G T G A T G G C T G G T G T G G G C T C C C C A T A T G T C T C C C G C C T  
 T C T G G G C A T C T G C C T G A C A T C C A C G G T G C A G C T G G T G A C A  
 C A G C T T A T G C C C T A T G G C T G C C T C T T A G A C T (配列番号：52)

20

。

30

## 【0084】

別の実施形態では、完全なヒトのHER2/neu IC1断片をコードする核酸配列はヒトのHER2/neu遺伝子の2034～3243にわたり、配列番号：56を含む)：

C A G C A G A A G A T C C G G A A G T A C A C G A T G C G G A G A C T G C T G C  
 A G G A A A C G G A G G C T G G T G G A G G C C G C T G A C A C C T A G C G G A G C  
 G A T G C C C A A C C A G G G C G C A G A T G C G G A T C C T G A A A G A G A C G  
 G A G C T G A G G A A G G T G A A G G T G C T T G G A T C T G G C G C T T T G  
 G C A C A G T C T A C A A G G G C A T C T G G A T C C C T G A T G G G G A G A A  
 T G T G A A A A T T C C A G T G G C C A T C A A A G T G T T G A G G G A A A A C  
 A C A T C C C C C A A A G C C A A C A A A G A A A T C T T A G A C G A A G C A T  
 A C G T G A T G G C T G G T G T G G G C T C C C C A T A T G T C T C C C G C C T  
 T C T G G G C A T C T G C C T G A C A T C C A C G G T G C A G C T G G T G A C A  
 C A G C T T A T G C C C T A T G G C T G C C T C T T A G A C C A T G T C C C G G G  
 A A A A C C G C G G A C G C C T G G G C T C C C A G G A C C T G C T G A A C T G  
 G T G T A T G C A G A T T G C C A A G G G G A T G A G G C T A C C T G G A G G A T  
 G T G C G G C T C G T A C A C A G G G A C T T G G C C G C T C G G A A C G T G C  
 T G G T C A A G A G T C C C A A C C A T G T C A A A A T T A C A G A C T T C G G  
 G C T G G C T C G G C T G C T G G A C A T T G A C G A G A C A G A G T A C C A T  
 G C A G A T G G G G G C A A G G T G C C C A T C A A G T G G A T G G C G C T G G  
 50

A G T C C A T T C T C C G C C G G C G G T T C A C C C A C C A G A G T G A T G T  
 G T G G A G T T A T G G T G T G A C T G T G T G G G A G C T G A T G A C T T T T  
 G G G G C C A A A C C T T A C G A T G G G A T C C C A G C C C G G G A G A T C C  
 C T G A C C T G C T G G A A A A G G G G G A G C G G C T G C C C C A G C C C C C  
 C A T C T G C A C C A T T G A T G T C T A C A T G A T C A T G G T C A A A T G T  
 T G G A T G A T T G A C T C T G A A T G T C G G C C A A G A T T C C G G G A G T  
 T G G T G T C T G A A T T C T C C C G C A T G G C C A G G G A C C C C A G C G  
 C T T T G T G G T C A T C C A G A A T G A G G A C T T G G G C C C A G C C A G T  
 C C C T T G G A C A G C A C C T T C T A C C G C T C A C T G C T G G A G G A C G  
 A T G A C A T G G G G G A C C T G G T G G A T G C T G A G G A G T A T C T G G T  
 A C C C C A G C A G G G C T T C T T C T G T C C A G A C C C T G C C C C G G G C  
 G C T G G G G G C A T G G T C C A C C A C A G G C A C C G C A G C T C A T C T A  
 C C A G G A G T G G C G G T G G G A C C T G A C A C T A G G G C T G G A G C C  
 C T C T G A A G A G G A G G G C C C C A G G T C T C C A C T G G C A C C C T C C  
 G A A G G G G C T (配列番号：56)。

10

## 【0085】

一実施形態では、本明細書に提供される方法および組成物で利用されるLLOはリステリアLLOである。一実施形態では、LLOが由来するリステリアはリステリア・モノサイトゲネス(LM)である。別の実施形態では、リステリアはリステリア・イバノビである。別の実施形態では、リステリアはリステリア・ウェルシメリである。別の実施形態では、リステリアはリステリア・シーリゲリである。別の実施形態では、LLOタンパク質は、非リステリア系LLOタンパク質である。別の実施形態では、LLOタンパク質は、合成LLOタンパク質である。別の実施形態では、これは組み換え型LLOタンパク質である。

20

## 【0086】

一実施形態では、LLOタンパク質は、以下の配列番号：3を含む核酸配列によってコードされる：

a t g a a a a a a a a t a a t g c t a g t t t t a t t a c a c t t a t a t a g  
 t t a g t c t a c c a a t t g c g c a a c a a a c t g a a g c a a a g g a t g c  
 a t c t g c a t t c a a t a a a g a a a a a t t c a a t t c a t c c a t g g c a  
 c c a c c a g c a t c t c c g c c t g c a a g t c c t a a g a c g c c a a t c g  
 a a a a g a a a a c a c g c g g a t g a a a a t c g a t a a g t a t a c a a g g  
 a t t g g a t t a c a a t a a a a a c a a t g t a t t a g t a t a c c a c g g a  
 g a t g c a g t g a c a a a t g t g c c g c c a a g a a a a g g t t a c a a a g  
 a t g g a a a t g a a a t a t a t t g t t g t g g a g a a a a a g a a g a a a t c  
 c a t c a a t c a a a a a t a a t g c a g a c a t t c a a g t t g t g a a t g c a  
 a t t t c g a g c c t a a c c t a t c c a g g t g c t c t c g t a a a a g c g a  
 a t t c g g a a t t a g t g a a a a t c a a c c a g a t g t t c t c c c t g t  
 a a a a c g t g a t t c a t t a a c a c t c a g c a t t g a t t t g c c a g g t  
 a t g a c t a a t c a a g a c a a t a a a a t a g t t g t a a a a a a t g c c a  
 c t a a a t c a a a c g t t a a c a a c g c a g t a a a a t a c a t t a g t g g a  
 a a g a t g g a a t g a a a a a a t a t g c t c a a g c t t a t c c a a a t g t a  
 a g t g c a a a a a a t t g a t t g a t g a c g a a a t g g c t t a c a g t g  
 a a t c a c a a t t a a t t g c g a a a a t t t g g t a c a g c a t t a a a g c  
 t g t a a a a t a a t a g c t t g a a t g t a a a a c t t c g g c g c a a t c a g t  
 g a a g g g a a a a t g c a a g a a g a a g t c a t t a g t t t t a a a c a a a a  
 t t t a c t a a a c g t g a a t g t t a a t g a a c c t a c a a g a c c t t c  
 c a g a t t t t c g g c a a a g c t g t t a c t a a a g a g c a g t t g c a a a  
 g c g c t t g g a g t g a a t g c a g a a a a t c c t c c t g c a t a t a t c  
 c a a g t g t g g c g t a t g g c c g t c a a g t t t a t t g a a a t t a t c  
 50

a a c t a a t t c c c a t a g t a c t a a a g t a a a a g c t g c t t t g a t  
 g c t g c c g t a a g c g g a a a a t c t g t c t c a g g t g a t g t a g a a c  
 t a a c a a a t a t c a t c a a a a a t t c t c c t t c a a a g c c g t a a t  
 t t a c g g a g g t t c c g c a a a a g a t g a a g t t c a a a t c a t c g a c  
 g g c a a c c t c g g a g a c t t a c g c g a t a t t g a a a a a a g g c g  
 c t a c t t t a a t c g a g a a a c a c c a g g a g t t c c c a t t g c t t a  
 t a c a a c a a a c t t c c t a a a a g a c a a t g a a t t a g c t g t t a t t  
 a a a a a c a a a c t c a g a a t a t a t g a a a c a a c t t c a a a a g c t t  
 a t a c a g a t g g a a a a a t t a a c a t c g a t c a c t c t g g a g g a t a  
 c g t t g c t c a a t t c a a c a t t c t t g g g a t g a a g t a a a t t a t  
 g a t (配列番号：3)。 10

## 【0087】

別の実施形態では、LL0タンパク質は配列番号：4の配列を含む：

M	K	K	I	M	L	V	F	I	T	L	I	L	V
S	L	P	I	A	Q	Q	T	E	A	K	D	A	
S	A	F	N	K	E	N	S	I	S	S	M	A	
P	P	A	S	P	P	A	S	P	K	T	P	I	E
K	K	H	A	D	E	I	D	K	Y	I	Q	G	
L	D	Y	N	K	N	N	V	L	V	Y	H	G	
D	A	V	T	N	V	P	P	R	K	G	Y	K	D
G	N	E	Y	I	V	V	E	K	K	K	K	S	
I	N	Q	N	N	A	D	I	Q	V	V	N	A	
I	S	S	L	T	Y	P	G	A	L	V	K	A	N
S	E	L	V	E	N	Q	P	D	V	L	P	V	
K	R	D	S	L	T	L	S	I	D	L	P	G	
M	T	N	Q	D	N	K	I	V	V	K	N	A	T
K	S	N	V	N	N	A	V	N	T	L	V	E	
R	W	N	E	K	Y	A	Q	A	Y	P	N	V	
S	A	K	I	D	Y	D	D	E	M	A	Y	S	E
S	Q	L	I	A	K	F	G	T	A	F	K	A	
V	N	N	S	L	N	V	N	F	G	A	I	S	
E	G	K	M	Q	E	E	V	I	S	F	K	Q	I
Y	Y	N	V	N	V	N	E	P	T	R	P	S	
R	F	F	G	K	A	V	T	K	E	Q	L	Q	
A	L	G	V	N	A	E	N	P	P	A	Y	I	S
S	V	A	Y	G	R	Q	V	Y	L	K	L	S	
T	N	S	H	S	T	K	V	K	A	A	F	D	
A	A	V	S	G	K	S	V	S	G	D	V	E	L
T	N	I	I	K	N	S	S	F	K	A	V	I	
Y	G	G	S	A	K	D	E	V	Q	I	I	D	
G	N	L	G	D	L	R	D	I	L	K	K	G	A
T	F	N	R	E	T	P	G	V	P	I	A	Y	
T	T	N	F	L	K	D	N	E	L	A	V	I	
K	N	N	S	E	Y	I	E	T	T	S	K	A	Y
T	D	G	K	I	N	I	D	H	S	G	G	Y	
V	A	Q	F	N	I	S	W	D	E	V	N	Y	

D (配列番号：4) 40

## 【0088】

この配列に対応するタンパク質の最初の25個のアミノ酸はシグナル配列であり、また細菌によって分泌されるときにLL0から分割される。したがって、この実施形態では、

全長の活性 LLO タンパク質は 504 残基長である。別の実施形態では、LLO タンパク質は、遺伝子銀行受入番号 DQ054588、DQ054589、AY878649、U25452、または U25452 で示される配列を有する。別の実施形態では、LLO タンパク質は、LLO タンパク質の変異体である。別の実施形態では、LLO タンパク質は、LLO タンパク質の相同体である。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

#### 【0089】

別の実施形態では、「切断 LLO」または「tLLO」は PEST ドメインを含む LLO の断片を指す。別の実施形態では、この用語はアミノ末端において活性化ドメインを含有せず、シスチン 484 を含まない LLO 断片を指す。別の実施形態では、LLO 断片は PEST 配列から構成される。別の実施形態では、LLO 断片は PEST 配列を含む。別の実施形態では、LLO 断片は 529 アミノ酸全長 LLO タンパク質のおよそ最初の 400 ~ 441 アミノ酸から構成される。別の実施形態では、LLO 断片は LLO タンパク質の非溶血性の形態である。

10

#### 【0090】

本発明の方法および組成物の別の実施形態では、本発明の方法および組成物の核酸配列によってコードされた組み換え型ポリペプチドは、キメラ型 HER2/neu 抗原および追加的なポリペプチドを含む融合タンパク質であり、一方で別の実施形態では、融合タンパク質は、とりわけ一実施形態では LM 非溶血性 LLO タンパク質であり、または別の実施形態では切断 LLO である LLO 断片を含む（実施例が本明細書に含まれる）。

20

#### 【0091】

一実施形態では、LLO 断片はおよそ残基 1 ~ 25 から構成される。別の実施形態では、LLO 断片はおよそ残基 1 ~ 50 から構成される。別の実施形態では、LLO 断片はおよそ残基 1 ~ 75 から構成される。別の実施形態では、LLO 断片はおよそ残基 1 ~ 100 から構成される。別の実施形態では、LLO 断片はおよそ残基 1 ~ 125 から構成される。別の実施形態では、LLO 断片はおよそ残基 1 ~ 150 から構成される。別の実施形態では、LLO 断片はおよそ残基 1 ~ 175 から構成される。別の実施形態では、LLO 断片はおよそ残基 1 ~ 200 から構成される。別の実施形態では、LLO 断片はおよそ残基 1 ~ 225 から構成される。別の実施形態では、LLO 断片はおよそ残基 1 ~ 250 から構成される。別の実施形態では、LLO 断片はおよそ残基 1 ~ 275 から構成される。別の実施形態では、LLO 断片はおよそ残基 1 ~ 300 から構成される。別の実施形態では、LLO 断片はおよそ残基 1 ~ 325 から構成される。別の実施形態では、LLO 断片はおよそ残基 1 ~ 350 から構成される。別の実施形態では、LLO 断片はおよそ残基 1 ~ 375 から構成される。別の実施形態では、LLO 断片はおよそ残基 1 ~ 400 から構成される。別の実施形態では、LLO 断片はおよそ残基 1 ~ 425 から構成される。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

30

#### 【0092】

別の実施形態では、本発明の方法および組成物の融合タンパク質は、LLO タンパク質由来または別の生物体（例えば、原核生物生命体など）由来のいずれかの、PEST 配列を含む。

40

#### 【0093】

別の実施形態では、PEST アミノ酸（AA）配列は配列番号：5 ~ 9 から選択される配列を含む。別の実施形態では、PEST 配列はリストリア・モノサイトゲネス（Lm）ActA タンパク質由来の PEST 配列である。別の実施形態では、PEST 配列は、KT EEE QP S E V N T G P R（配列番号：5）、K A S V T D T S E G D L D S S M Q S A D E S T P Q P L K（配列番号：6）、K N E E V N A S D F P P P P T D E E L R（配列番号：7）、または R G G I P T S E E F S S L N S G D F T D D E N S E T T E E E I D R（配列番号：8）を含む。別の実施形態では、PEST 配列は、ストレプトコッカス種のストレプトリジン O タンパク質由来である。別の実施形態では、PEST 配列は、ストレプトコッカス・ピオゲネスストレプトリジン O、例えば、AA 35 ~ 51 において K Q N T A S T E T T T N E Q P K（配列番号：9）由来である。別の実施形態で

50

は、P E S T配列は、ストレプトコッカス・エクイシミリスストレプトリジンO、例えば、A A 3 8 ~ 5 4においてK Q N T A N T E T T T T N E Q P K（配列番号：10）由来である。別の実施形態では、P E S T様配列は、原核生物に由来する別のP E S T A配列である。別の実施形態では、P E S T配列は、当該技術分野で既知の任意の他のP E S T配列である。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

#### 【0094】

L mのP E S T配列への抗原の融合は媒介した細胞および抗原の抗腫瘍免疫性を強化した。したがって、他の原核生物に由来する他のP E S T配列への抗原の融合は、抗原の免疫原性も強化する。他の原核生物のP E S T配列を、例えば、L MについてRechsteinerおよびRogers(1996, Trends Biochem. Sci. 21: 267 - 271)に記述されているものなどの方法に従って同定することができる。あるいは、この方法に基づいて原核生物由来のP E S T A A配列を同定することもできる。P E S T A A配列が期待されることになる他の原核生物には、他のリステリア種が含まれるが限定されない。別の実施形態では、P E S T配列は抗原タンパク質の中に埋め込まれる。したがって、別の実施形態では、「融合」は、抗原の一方の端部にリンクしているかまたは抗原の中に埋め込まれるかのどちらかで、抗原とP E S Tアミノ酸配列との両方を含む抗原タンパク質を指す。

#### 【0095】

別の実施形態では、本発明の組み換え型ポリペプチドを含むワクチンが本明細書に提供される。別の実施形態では、本発明の組み換え型ポリペプチドを含む組成物が本明細書に提供される。別の実施形態では、本発明の組み換え型ポリペプチドから構成されるワクチンが本明細書に提供される。別の実施形態では、本発明の組み換え型ポリペプチドから構成される組成物が本明細書に提供される。別の実施形態では、組成物は免疫原性組成物である。

#### 【0096】

別の実施形態では、本発明の組み換え型ポリペプチドをコードするヌクレオチド分子が本明細書に提供される。別の実施形態では、ヌクレオチド分子を含むワクチンが本明細書に提供される。別の実施形態では、ヌクレオチド分子を含む組成物が本明細書に提供される。

#### 【0097】

別の実施形態では、本発明の組み換え型ポリペプチドをコードするヌクレオチド分子が本明細書に提供される。

#### 【0098】

別の実施形態では、本発明のヌクレオチド分子によってコードされる組み換え型ポリペプチドが本明細書に提供される。

#### 【0099】

別の実施形態では、本発明のヌクレオチド分子または組み換え型ポリペプチドを含むワクチンが本明細書に提供される。

#### 【0100】

別の実施形態では、本発明のヌクレオチド分子または組み換え型ポリペプチドを含む免疫原性組成物が本明細書に提供される。

#### 【0101】

別の実施形態では、本発明のヌクレオチド分子または組み換え型ポリペプチドを含むベクターが本明細書に提供される。

#### 【0102】

別の実施形態では、本発明のヌクレオチド分子を含むリステリアの組み換え型形態が本明細書に提供される。

#### 【0103】

別の実施形態では、本発明のリステリアの組み換え型の形態を含むワクチンが本明細書に提供される。

10

20

30

40

50

**【 0 1 0 4 】**

別の実施形態では、本発明のリストリアの組み換え型を含む免疫原性組成物が本明細書に提供される。

**【 0 1 0 5 】**

別の実施形態では、本発明のリストリアの組み換え型形態のカルチャーが本明細書に提供される。

**【 0 1 0 6 】**

一実施形態では、本発明の方法で使用するためのワクチンまたは組成物は組み換え型リストリア・モノサイトゲネスを、本明細書に記述されるような任意の形態または実施形態で含む。一実施形態では、本発明で使用するためのワクチンまたは組成物は本発明の組み換え型リストリア・モノサイトゲネスから、本明細書に記述されるような任意の形態または実施形態で構成される。別の実施形態では、本発明の方法で使用するためのワクチンまたは組成物は本発明の組み換え型リストリア・モノサイトゲネスから、本明細書に記述されるような任意の形態または実施形態で本質的に構成される。

10

**【 0 1 0 7 】**

一実施形態では、「含む」という用語は組み換え型リストリア・モノサイトゲネスをワクチンまたは組成物の中に含むこと、ならびに当該技術分野で既知である場合がある他のワクチン、組成物、または処置を含むことを指す。別の実施形態では、「本質的に含む」という用語は、機能的な構成成分は組み換え型リストリア・モノサイトゲネスであるが、しかしながらワクチンまたは組成物の他の構成成分が含まれる場合があるワクチンを指し、他の構成成分はワクチンの治療的な効果に直接的に関与せず、例えば、組み換え型リストリア・モノサイトゲネスの効果を促進する（例えば、安定する、保存する、等々）構成成分を指す場合がある。別の実施形態では、「含む」という用語は、組み換え型リストリア・モノサイトゲネスを含有するワクチンを指す。

20

**【 0 1 0 8 】**

別の実施形態では、本発明の方法は組み換え型リストリア・モノサイトゲネスを本明細書に記述されるような任意の形態または実施形態で投与する工程を含む。一実施形態では、本発明の方法は本発明の組み換え型リストリア・モノサイトゲネスを本明細書に記述されるような任意の形態または実施形態で投与する工程を含む。別の実施形態では、本発明の方法は本発明の組み換え型リストリア・モノサイトゲネスを本明細書に記述されるような任意の形態または実施形態で投与する工程を本質的に含む。一実施形態では、「含む」という用語は方法の中に組み換え型リストリア・モノサイトゲネスを投与する工程を含むこと、ならびに当該技術分野で既知である場合がある他の方法または処置を含むことを指す。別の実施形態では、「本質的に～からなる」という用語は、その機能的な構成要素が組み換え型リストリア・モノサイトゲネスを投与することであるが、しかしながらこの方法の他の工程を含んでもよく、その工程は、方法の治療的な効果に直接的に関与せず、例えば、組み換え型リストリア・モノサイトゲネスの投与の効果を促進する工程を指す場合がある、方法を指す。一実施形態では、「～からなる」という用語は、追加的な工程を含まずに組み換え型リストリア・モノサイトゲネスを投与する方法を指す。

30

**【 0 1 0 9 】**

別の実施形態では、本発明の方法および組成物のリストリアはリストリア・モノサイトゲネスである。別の実施形態では、リストリアはリストリア・イバノビである。別の実施形態では、リストリアはリストリア・ウェルシメリである。別の実施形態では、リストリアはリストリア・シーリゲリである。各々のタイプのリストリアは本発明の別個の実施形態を表す。

40

**【 0 1 1 0 】**

一実施形態では、本発明の方法および組成物のリストリア株はADX31-164株である。別の実施形態では、ADX31-164は、野生型FVB/Nマウスからの脾細胞によってIFN- $\gamma$ の分泌を刺激する。さらに、本明細書に提示されたデータは、ADX31-164が抗HER2/neuに特異的な免疫応答を標的化した抗原の異なる

50

ドメインに位置するヒトエピトープへと引き出すことができる事を示す。

【0111】

別の実施形態では、本発明は H E R 2 キメラタンパク質またはその断片をコードする又クレオチド分子を含むリストリアの組み換え型形態を提供する。

【0112】

一実施形態では、本発明は被験者内に抗 H E R 2 免疫応答を誘発する方法であって、H E R 2 キメラタンパク質に融合したまたはその断片に融合した L L O タンパク質の N 末端断片を含む組み換え型ポリペプチドを被験者に投与することを含む方法を提供し、これによつて抗 H E R 2 免疫応答を被験者内に誘発する。

【0113】

一実施形態では、融合タンパク質の 2 つの分子 (L L O、A c t A 断片、または P E S T 配列、および抗原) は直接的に結合する。別の実施形態では、2 つの分子は 1 つ以上のアミノ酸から構成される短いスペーサーペプチドによって結合される。一実施形態では、スペーサーは、タンパク質を結合すること、またはこれらの間の何らかの最低限の距離もしくは他の空間的関係を保持すること以外には特異的な生物活性を有しない。別の実施形態では、スペーサーの構成アミノ酸は、フォールディング、正味荷電、または疎水性などの分子のいくつかの特性に影響を与えるように選択される。別の実施形態では、タンパク質の 2 つの分子 (L L O 断片および抗原) は別個に合成される、または非融合される。別の実施形態では、タンパク質の 2 つの分子は同じ核酸から別個に合成される。さらに別の実施形態では、2 つの分子は別個の核酸から個別に合成される。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

10

【0114】

一実施形態では、本明細書に提供される組み換え型ポリペプチドをコードする核酸は、シグナルペプチドまたは配列もコードする。別の実施形態では、本発明の方法および組成物の融合タンパク質は L L O からの L L O シグナル配列を含む。一実施形態では、異種抗原は、リストルアシグナル配列 (例えば、溶血素シグナル配列または A c t A シグナル配列) などのシグナル配列の使用を通して発現される場合がある。代替的には、例えば、融合タンパク質を作り出すことなく外来遺伝子を L . モノサイトゲネスプロモーターから下流で発現することができる。別の実施形態では、シグナルペプチドは、細菌性 (リストリア性または非リストリア性) である。一実施形態では、シグナルペプチドは、細菌に対してネイティブである。別の実施形態では、シグナルペプチドは、細菌に対して外来である。別の実施形態では、シグナルペプチドは、s e c A 1 シグナルペプチドなどのリストリア・モノサイトゲネスからのシグナルペプチドである。別の実施形態では、シグナルペプチドは、ラクトコッカス・ラクティスからの U s p 4 5 シグナルペプチド、またはバチルス・アントラシスからの保護抗原シグナルペプチドである。別の実施形態では、シグナルペプチドは、p 6 0 シグナルペプチドなどの、リストリア・モノサイトゲネスからの s e c A 2 シグナルペプチドである。さらに、組み換え型核酸分子は、任意選択的に p 6 0 またはその断片をコードする第 3 のポリヌクレオチド配列を含む。別の実施形態では、シグナルペプチドは、バシラスサチリス T a t シグナルペプチドなどの T a t シグナルペプチド (例えば、P h o D ) である。一実施形態では、シグナルペプチドは、組み換え型ポリペプチドをコードする同一の翻訳リーディングフレームである。

20

30

40

【0115】

別の実施形態では、被験者内に抗 H E R 2 免疫応答を誘発する方法であつて、H E R 2 キメラタンパク質に融合したまたはその断片に融合した L L O タンパク質の N 末端断片を含む組み換え型ポリペプチドをコードする組み換え型ヌクレオチドを被験者に投与することを含む方法が本明細書に提供され、これによつて抗 H E R 2 免疫応答を被験者内に誘発する。

【0116】

一実施形態では、被験者内の H E R 2 / n e u を発現する腫瘍に強化した免疫応答を引き出す方法が本明細書に提供され、一方で別の実施形態では、この方法は本明細書に提供

50

される組み換え型リステリアワクチン株を含む組成物を被験者に投与することを含む。別の実施形態では、HER2を発現する腫瘍に対する免疫応答はHER2タンパク質に対する準優占エピトープに対する免疫応答を含む。別の実施形態では、HER2を発現する腫瘍に対する免疫応答はHER2タンパク質のいくつかの準優占エピトープに対する免疫応答を含む。別の実施形態では、HER2を発現する腫瘍に対する免疫応答はHER2タンパク質の少なくとも1~5個の準優占エピトープに対する免疫応答を含む。別の実施形態では、HER2を発現する腫瘍に対する免疫応答はHER2タンパク質の少なくとも1~10個の準優占エピトープに対する免疫応答を含む。別の実施形態では、HER2を発現する腫瘍に対する免疫応答はHER2タンパク質の少なくとも1~17個の準優占エピトープに対する免疫応答を含む。別の実施形態では、HER2を発現する腫瘍に対する免疫応答はHER2タンパク質の少なくとも17個の準優占エピトープに対する免疫応答を含む。

10

#### 【0117】

小さい断片リステリアベースのワクチンまたはトラスツズマブ(HER2/neu抗原の細胞外領域に位置するエピトープに対するモノクローナル抗体)によってこれらの腫瘍が標的化されたとき、ガン遺伝子タンパク質HER2/neu内の点突然変異またはアミノ酸欠失が耐性腫瘍細胞の処置を媒介することが報告されている。ガン遺伝子のMHCクラスIエピトープのクラスターを示すHER2/neu抗原の2つの細胞外断片および1つの細胞内断片を寄生するキメラ型HER2/neuベースの組成物が本明細書に記述される。HER2/neu抗原の3個のH2Dqおよび少なくとも17個のマッピングしたヒトのMHCクラスIエピトープを寄生する、このキメラタンパク質は、リステリア・モノサイトゲネスリスティオリシンOタンパク質の最初の441のアミノ酸に融合し、リステリア・モノサイトゲネス弱毒化株LmddAによって発現および分泌した。

20

#### 【0118】

以前の報告は、HER2/neuトランスジェニックマウスにHER2/neu抗原の小さい断片(その各々がHER2/neuガン遺伝子の1つのH2Dqエピトープのみを寄生する)を発現し、分離して分泌するリステリアベースのワクチンを用いて免疫化したとき、HER2/neu過剰発現腫瘍は各々のワクチンによって標的化されたHER2/neu抗原のこれらのエピトープでの突然変異に起因してエスケープする可能性があることを示している(Singh R, Paterson Y. Immunoediting sculpts tumor epitopes during immunotherapy. Cancer Res 2007; 67: 1887-92参照)。キメラ型ワクチン内にHER2/neuタンパク質の3つ以上のエピトープが組み込まれたとき、これらの腫瘍の選択を除去し、エスケープ変異によってエスケープすることができるという予期しない結果が本明細書で実証された。新規のHER2/neuキメラ型リステリアワクチンを用いた免疫化は、点突然変異またはアミノ酸欠失と関連付けられる可能性があるいかなるエスケープ変異もHER2/neu抗原内にもたらさない(本明細書の実施例4参照)。

30

#### 【0119】

一実施形態では、HER2キメラタンパク質またはキメラタンパク質を発現する組み換え型ポリペプチドを発現するためにリステリアワクチン株を改変する方法が本明細書に提供され、この方法は核酸分子を用いたリステリア株の形質転換を含む。別の実施形態では、核酸分子はポリペプチドをコードする第1のオープンリーディングフレームを含み、ポリペプチドはHER2/neuキメラ抗原を含む。別の実施形態では、核酸分子は代謝酵素をコードする第2のオープンリーディングフレームをさらに含み、前記代謝酵素は組み換え型リステリア株の染色体内で欠いている内因性遺伝子を相補し、それによってHER2キメラタンパク質を発現するためにリステリアワクチン株を改変する。

40

#### 【0120】

一実施形態では、本明細書に提供される方法および組成物はさらにアジュバントを含み、一方で別の実施形態では、アジュバントは、顆粒球性/マクロファージコロニー刺激因

50

子( G M - C S F )タンパク質、 G M - C S F タンパク質をコードするヌクレオチド分子、サポニン Q S 2 1 、モノホスホリルリピド A 、メチル化されていない C p G 含有オリゴヌクレオチド、または当該技術分野で既知の任意のアジュバントを含む。

#### 【 0 1 2 1 】

一実施形態では、本発明では、 L M d e l t a - a c t A m u t a n t ( B r u n d a g e e t a l , 1 9 9 3 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , U S A 、 9 0 : 1 1 8 9 0 - 1 1 8 9 4 ) 、 L . モノサイトゲネス d e l t a - p l c A ( C a m i l l i e t a l , 1 9 9 1 , J . E x p . M e d . , 1 7 3 : 7 5 1 - 7 5 4 ) 、または d e l t a - A c t A 、 d e l t a I N L - b ( B r o c k s t e d t e t 5 a l , 2 0 0 4 , P N A S , 1 0 1 : 1 3 8 3 2 - 1 3 8 3 7 ) などの弱毒化リステリア株が使用される。別の実施形態では、弱毒化リステリア株は、本明細書の開示を装備するとき当業者であれば理解するとおり、1つ以上の弱毒化突然変異を導入することによって構築される。かかる株の例としては、芳香族アミノ酸に対する栄養要求性のリステリア株( Alexander e t a l , 1 9 9 3 , I n f e c t i o n a n d I m m u n i t y 1 0 6 1 : 2 2 4 5 - 2 2 4 8 ) およびリポタイコ酸の形成のための突然変異体( Ab a c h i n e t a l , 2 0 0 2 , M o l . M i c r o b i o l . 4 3 : 1 - 1 4 ) 、および病毒性遺伝子を欠くことによって弱毒化されるもの( 本明細書に含まれる実施例を参照 ) が挙げられるが、これに限定されない。

10

#### 【 0 1 2 2 】

別の実施形態では、本発明の方法および組成物の核酸分子は、プロモーター / 調節配列に動作可能にリンクする。別の実施形態では、本発明の方法および組成物の第1のオーブンリーディングフレームは、プロモーター / 調節配列に動作可能にリンクする。別の実施形態では、核酸分子は、プロモーター / 調節配列に動作可能にリンクする第2のオーブンリーディングフレームを含む。別の実施形態では、オーブンリーディングフレームの各々はプロモーター / 調節配列に動作可能にリンクする。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

20

#### 【 0 1 2 3 】

本開示および本明細書に提供される方法が装備されたとき、異なる転写プロモーター、停止剤、キャリアベクター、または特異的な遺伝子配列( 例えば、市販のクローニングベクター内のもの ) を本発明の方法および組成物内で順調に使用できることを当業者は容易に理解するであろう。本発明で意図されるように、これらの機能性は、例えば、 p U C シリーズとして知られる市販のベクターで提供される。別の実施形態では、非必須 D N A 配列( 例えば、抗生物質抵抗性遺伝子 ) は除去される。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。別の実施形態では、本発明で市販のプラスミドが使用される。かかるプラスミドは、例えば、 I n v i t r o g e n ( 米国カリフォルニア州 L a J o l l a ) 、 S t r a t a g e n e ( カリフォルニア州 L a J o l l a ) 、 C l o n t e c h ( カリフォルニア州 P a l o A l t o ) などの様々な供給元から入手可能であり、または当該技術分野で周知の方法を使用して構築することができる。

30

#### 【 0 1 2 4 】

別の実施形態は、 p C R 2 . 1 ( I n v i t r o g e n 、米国カリフォルニア州 L a J o l l a ) などのプラスミドであり、これは原核生物の複製起点および原核生物内での発現を容易にするプロモーター / 調節要素を有する原核生物発現ベクターである。別の実施形態では、外来ヌクレオチド配列は、プラスミドのサイズを減少しつつその中に定置することができるカセットのサイズを増加するために除去される。

40

#### 【 0 1 2 5 】

かかる方法は当該技術分野で周知であり、また例えば、 S a m b r o o k e t a l . ( 1 9 8 9 , M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l 、 C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s 、 N e w Y o r k ) および A u s u b e i e t a l . ( 1 9 9 7 , C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , G r e e n &

50

Wiley, New York)に記述されている。

【0126】

抗生素質抵抗性遺伝子は、分子生物学およびワクチン調製で一般的に採用される従来の選択およびクローニングプロセスで使用される。本発明で企図される抗生素質抵抗性遺伝子としては、アンピシリン、ペニシリン、メチシリン、ストレプトマイシン、エリスロマイシン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール(CAT)、ネオマイシン、ハイグロマイシン、ゲンタマイシンおよび当該技術分野で周知の他のものに抵抗を与える遺伝子産物が挙げられるがこれらに限定されない。各々の遺伝子は本発明の別個の実施形態を表す。

【0127】

細菌を形質転換するための方法は当該技術分野で周知であり、またこの方法としては塩化カルシウム適格細胞ベースの方法、電気穿孔法、バクテリオファージ媒介性形質導入、化学的および物理的形質転換技法が挙げられる(de Boer et al., 1989, Cell 56:641-649; Miller et al., 1995, FASEB J., 9:190-199; Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Ausubel et al., 1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Gerhardt et al., eds., 1994, Methods for General and Molecular Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, DC; Miller, 1992, A Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)。別の実施形態では、本発明のリストリアワクチン株は電気穿孔によって形質転換される。各々の方法は本発明の別個の実施形態を表す。

【0128】

別の実施形態では、遺伝物質および/またはプラスミドを細菌の中へと導入するために結合が使用される。結合のための方法は当該技術分野で周知であり、また例えば、Nikodinovic J et al. (A second generation snp-derived Escherichia coli-Streptomyces shuttle expression vector that is generally transferable by conjugation. Plasmid. 2006 Nov; 56(3):223-7)およびAuchtung JM et al (Regulation of a Bacillus subtilis mobile genetic element by intercellular signaling and the global DNA damage response. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Aug 30; 102(35):12554-9)に記述される。各々の方法は本発明の別個の実施形態を表す。

【0129】

一実施形態では「形質転換」という用語は「形質移入」いう用語と同じ意味で使用され、プラスミドまたは他の異種DNA分子を取り上げるために細菌細胞を改変することを指す。別の実施形態では、「形質転換」は、プラスミドまたは他の異種DNA分子の遺伝子を発現するために細菌細胞を改変することを指す。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

【0130】

本発明で有用なプラスミドおよび他の発現ベクターは、本明細書のいずれかに記述され、プロモーター/調節配列、グラム陰性およびグラム陽性細菌に対する複製の起点、融合

10

20

30

40

50

タンパク質をコードする孤立核酸、および分離されたアミノ酸代謝遺伝子をコードする核酸などの特徴を含むことができる。さらに、融合タンパク質およびアミノ酸代謝遺伝子をコードする孤立核酸は、かかる孤立核酸の発現を駆動するのに好適なプロモーターを有する。細菌系で発現を駆動するために有用であるプロモーターは当該技術分野で周知であり、またバクテリオファージ、p B R 3 2 2 のラクタマーゼ遺伝子の b l a プロモーター、および p B R 3 2 5 のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子の C A T プロモーターを含む。原核生物プロモーターのさらなる実施例としては、5つのバクテリオファージのメジャーライトおよびレフトプロモーター(PLおよびPR)と、大腸菌の t r p 、 r e c A 、 l a c Z 、 l a d 、および g a l プロモーター、アミラーゼ(Ulmanen et al. 1985. J. Bacteriol. 162: 176-182)およびS 2 8 特異的な枯草菌のプロモーター(Gilman et al. 1984 Gene 32: 11-20)と、桿菌のバクテリオファージのプロモーター(Gryczan, 1982, In: The Molecular Biology of the Baciili, Academic Press, Inc., New York)と、ストレプトマイシンプロモーター(Ward et al. 1986, Mol. Genet. 203: 468-478)と、が挙げられる。本発明で企図される追加的な原核生物のプロモーターは、例えば、Glick(1987, J. Ind. Microbiol. 1: 277-282)、Cenatiempo(1986, Biochimie, 68: 505-516)、およびGottesman(1984, Ann. Rev. Genet. 18: 415-442)で検討される。本発明で企図されるプロモーター/調節要素のさらなる実施例としては、リストリアの p r f A プロモーター、リストリアの h l y プロモーター、リストリアの p 6 0 プロモーター、およびリストリアの a c t A プロモーター(遺伝子銀行受入番号NC\_003210)、またはその断片が挙げられるがこれらに限定されない。  
10  
20

### 【0131】

別の実施形態では、本発明の方法および組成物のプラスミドは融合タンパク質をコードする遺伝子を含む。別の実施形態では、部分配列はクローニングされ、また適切な部分配列は適切な制限酵素を使用して分割される。別の実施形態では、次いで断片は連結され、望ましいDNA配列が生産される。別の実施形態では、抗原をコードするDNAは、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)などのDNA增幅法を使用して生産される。まず、未変性のDNAのいずれかの側の新しい末端の区分を別個に増幅する。1つの増幅した配列の5'端はペプチドリンカーをコードし、一方でもう1つの増幅した配列の3'端もペプチドリンカーをコードする。第1の断片の5'端は第2の断片の3'端の相補なので、2つの断片を(例えば、LMPアガロース上での部分的な精製後)第3のPCR反応での重複テンプレートとして使用することができる。増幅した配列は、コドン、開放部位のカルボキシ側上の区分(ここではアミノ配列を形成している)、リンカー、および開放部位のアミノ側上の配列(ここではカルボキシル配列を形成している)を含有することになる。抗原はプラスミドへと連結される。各々の方法は本発明の別個の実施形態を表す。  
30

### 【0132】

別の実施形態では、本発明は臨床用途のためのファージベースの染色体組込系をさらに含む。d-アラニンラセマーゼ(しかしこれに限定されない)を含む必須酵素のための栄養要求性宿主株は、例えば L m d a 1 (-) d a t (-) を使用されることになる。別の実施形態では、「ファージ治癒工程」を避けるためにPSAベースのファージ組込系を使用した(Lauer, et al., 2002 J Bacteriol. 184: 4177-4186)。別の実施形態では、これは組込まれた遺伝子を維持するための抗生物質による継続的な選択を要求する。したがって、別の実施形態では、本発明は、抗生物質を用いた選択を要求しないファージベースの染色体組込系の確立を可能にする。別の方で、栄養要求性宿主株を相補することになる。  
40

### 【0133】

別の実施形態では、組み換え型DNA法を使用して本発明の組み換え型タンパク質を合  
50

成した。一実施形態では、これは、融合タンパク質をコードするDNA配列を作り出すことと、特定のプロモーター／調節要素の制御下で本発明のプラスミドなどの発現カセット内にDNAを定置することと、タンパク質を発現することと、に関与する。別の実施形態では、本発明の融合タンパク質（例えば、非溶血性LLO／抗原）をコードするDNAは、任意の好適な方法によって調製され、この方法としては、例えば、適切な配列のクローニングおよび制限、またはNarangらのホスホトリエステル法（1979、Meth. Enzymol. 68: 90-99）、Brownらのホスホジエステル法（1979、Meth. Enzymol. 68: 109-151）、Beaucageらのジエチルホスホラミダイト法（1981、Tetra. Lett., 22: 15 1859-1862）、および米国特許第4,458,066号の固定法などの方法による直接化学合成が挙げられる。

10

#### 【0134】

別の実施形態では、一本鎖のオリゴヌクレオチドを生産するために化学合成が使用される。様々な実施形態では、一本鎖をテンプレートとして使用して、相補的な配列を用いたハイブリダイゼーションによって、またはDNAポリメラーゼを用いた重合によって、この一本鎖のオリゴヌクレオチドを二本鎖のDNAへと変換する。DNAの化学合成が約100個の塩基の配列に限られ一方で、より短い配列の連結によってより長い配列を得ることができることを当業者は認識するであろう。別の実施形態では、部分配列はクローニングされ、また適切な部分配列は適切な制限酵素を使用して分割される。次いで断片は連結され、望ましいDNA配列が生産される。

20

#### 【0135】

別の実施形態では、本発明の融合タンパク質または組み換え型タンパク質をコードするDNAは、ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）などのDNA增幅法を使用してクローニングされる。したがって、非溶血性LLOに対する遺伝子は、クローニングを容易にするために、好適な制限部位を含むセンスプライマーと、例えば、同一でない制限部位などの別の制限部位を含むアンチセンスプライマーとを使用して増幅されたPCRである。抗原をコードする孤立核酸に対しても同じことを繰り返す。非溶血性LLOおよび抗原配列の連結、ならびにプラスミドまたはベクターの中への挿入は抗原の末端に結合する非溶血性LLOをコードするベクターを生産する。2つの分子は、直接的か、または制限部位によって導入された短いスペーサーによってかのいずれかで結合する。

30

#### 【0136】

別の実施形態では、分子は1つ以上のアミノ酸から構成されるペプチドスペーサーによって分離され、一般的にスペーサーはタンパク質を結合することまたはこれらの間のなんらかの最少距離もしくは他の空間関係を保持すること以外には特定の生物活性を有しない。別の実施形態では、スペーサーの構成AAは、フォールディング、正味荷電、または疎水性などの分子のいくつかの特性に影響を与えるように選択される。別の実施形態では、融合タンパク質または組み換え型タンパク質をコードする核酸配列は、大腸菌、リステリアなどの他の細菌宿主、酵母、および様々なより高度な真核生物細胞（COS、CHOおよびHeLa細胞株、ならびに骨髄腫細胞株などの）を含む様々な宿主細胞へと形質転換される組み換え型融合タンパク質遺伝子は、各々の宿主に対して適切な発現対照配列に動作可能にリンクする。プロモーター／調節配列は、本明細書のいずれかに詳細に記述される。別の実施形態では、プラスミドは、追加的なプロモーター調節要素、ならびにリボソーム結合部位および転写終結シグナルをさらに含む。真核生物細胞については、対照配列は、例えば、免疫グロブリン遺伝子、SV40、サイトメガロウイルス、等々に由来するプロモーターおよびエンハンサー、およびポリアデニレーション配列を含む。別の実施形態では、配列はスプライスドナーおよびアクセプター配列を含む。

40

#### 【0137】

一実施形態では、「動作可能にリンクする」という用語は並置を指し、そのように記述される構成成分はそれらの意図される様式で機能することができるようになる関係にある。コード配列に「動作可能にリンクする」対照配列は、コード配列の発現が対照配列に対

50

応する条件の下で達成されるようなやり方で連結される。

【0138】

別の実施形態では、プラスミドを含む栄養要求性細菌を選択するために、形質転換した栄養要求性細菌をアミノ酸代謝遺伝子の発現を選択する培地上で増殖する。別の実施形態では、D-グルタミン酸合成のための栄養要求性の細菌は、D-グルタミン酸合成のための遺伝子を含むプラスミドを用いて形質転換され、また栄養要求性細菌はD-グルタミン酸無しで増殖することになり、一方でD-グルタミン酸合成のためにプラスミドを用いて形質転換されていない栄養要求性細菌、またはタンパク質をコードするプラスミドを発現していない栄養要求性細菌は、増殖しないことになる。別の実施形態では、D-アラニン合成のための栄養要求性の細菌は、プラスミドがD-アラニン合成のためのアミノ酸代謝酵素をコードする孤立核酸を含む場合、本発明のプラスミドを形質転換し、かつ発現するときD-アラニン無しで増殖することになる。必要な増殖因子、サプリメント、アミノ酸、ビタミン、抗生物質、およびこれに類するものを含んでいる、または欠いている適切な培地を作成するためのかかる方法は当該技術分野で既知であり、また市販されている(Becton-Dickinson、米国ニュージャージー州Franklin Lakes)。各自の方法は本発明の別個の実施形態を表す。

10

【0139】

別の実施形態では、本発明のプラスミドを含む栄養要求性細菌が一旦選択されると、この細菌は適切な培地上で選択的な圧力の存在の中で繁殖する。かかる繁殖は、栄養要求性因子を有しない培地内での細菌の増殖を含む。栄養要求性細菌内でのアミノ酸代謝酵素を発現するプラスミドの存在は、細菌とともにプラスミドの複製を確保し、したがって継続的にプラスミドが規制する細菌を選択する。本開示および本明細書の方法を備えるとき、プラスミドを含む栄養要求性細菌が増殖する培地の体積を調節することによって、当業者は、リストリアワクチンベクターの生産を容易にスケールアップすることができる。

20

【0140】

別の実施形態では、他の栄養要求性株および相補系が本発明の使用に適合されることを当業者は理解するであろう。

【0141】

一実施形態では、被験者内のHER2/neuを発現する腫瘍の増殖を妨げる方法が本明細書に提供され、また別の実施形態では、この方法は本明細書に記述される組み換え型リストリアワクチン株を含む組成物を被験者に投与する工程を含む。

30

【0142】

一実施形態では、被験者内のHER2/neuを発現する腫瘍からの転移性疾患の起因を妨げるまたは遅延する方法が本明細書に提供され、また別の実施形態では、この方法は本明細書に記述される組み換え型リストリアワクチン株を含む組成物を被験者に投与する工程を含む。

【0143】

別の実施形態では、被験者内のHER2/neuを発現する腫瘍に強化した免疫応答を引き出す方法が本明細書に提供され、また別の実施形態では、この方法は本明細書に記述される組み換え型リストリアワクチン株を含む組成物を被験者に投与する工程を含む。さらに別の実施形態では、HER2/neuを発現する腫瘍に対する免疫応答はHER2/neuタンパク質の少なくとも1つの準優占エピトープへの免疫応答を含む。

40

【0144】

一実施形態では、被験者内のHER2/neuを発現する腫瘍の治療でのエスケープ変異を防止する方法が本明細書に提供され、また別の実施形態では、この方法は本明細書に提供される組み換え型リストリアワクチン株を含む組成物を前記被験者に投与する工程を含む。

【0145】

別の実施形態では、被験者内のHER2/neu抗原を発現する腫瘍の発症を防止する方法が本明細書に提供され、また別の実施形態では、この方法は本明細書に提供される組

50

み換え型リストリアワクチン株を含む組成物を被験者に投与する工程を含む。

【0146】

一実施形態では、腫瘍内の調節性T細胞の頻度を減少する方法が本明細書に提供され、また別の実施形態では、この方法は本明細書に提供される組み換え型リストリアワクチン株を含む組成物を被験者に投与する工程を含む。

【0147】

別の実施形態では、腫瘍内の調節性T細胞の頻度を減少する方法が本明細書に提供され、また別の実施形態では、この方法は本明細書に提供される組み換え型リストリアワクチン株を含む組成物を被験者に投与する工程を含む。

【0148】

一実施形態では、腫瘍内の骨髄系由来抑制細胞の頻度を減少する方法が本明細書に提供され、また別の実施形態では、この方法は本明細書に提供される組み換え型リストリアワクチン株を含む組成物を被験者に投与する工程を含む。

10

【0149】

別の実施形態では、骨髄系由来抑制細胞の頻度を減少する方法が本明細書に提供され、また別の実施形態では、この方法は本明細書に提供される組み換え型リストリアワクチン株を含む組成物を被験者に投与する工程を含む。

【0150】

一実施形態では、被験者内のHER2/neuを発現する腫瘍の形成を防止する方法が本明細書に提供され、また別の実施形態では、この方法は本明細書に提供される組み換え型リストリアワクチン株を含む組成物を被験者に投与する工程を含む。別の実施形態では、被験者内のHER2/neuを発現する腫瘍から起因する転移性疾患の形成を防止する方法が本明細書に提供され、また別の実施形態では、この方法は本明細書に提供される組み換え型リストリアワクチン株を含む組成物を被験者に投与する工程を含む。一実施形態では、被験者内のHER2/neuを発現する腫瘍を治療する方法が本明細書に提供され、また別の実施形態では、この方法は本明細書に提供される組み換え型リストリアワクチン株を含む組成物を被験者に投与する工程を含む。別の実施形態では、被験者内のHER2/neuを発現する腫瘍から来る転移性疾患を治療する方法が本明細書に提供され、また別の実施形態では、この方法は本明細書に提供される組み換え型リストリアワクチン株を含む組成物を被験者に投与する工程を含む。一実施形態では、本発明の組成物を投与する方法が本明細書に提供される。別の実施形態では、本発明のワクチンを投与する方法が本明細書に提供される。別の実施形態では、本発明の組み換え型ポリペプチドまたは組み換え型ヌクレオチドを投与する方法が本明細書に提供される。別の実施形態では、本発明の組成物、ワクチン、組み換え型ポリペプチド、または組み換え型ヌクレオチドを投与する工程を、弱毒化組み換え型形態のリストリアを含む組成物、ワクチン、組み換え型ヌクレオチド、またはこれを発現する組み換え型ポリペプチドを用いて、各々その独自の個別の実施形態の中で遂行する。別の実施形態では、異なる弱毒化細菌ベクターを用いて投与を遂行する。別の実施形態では、DNAワクチン（例えば、ネイキッドDNAワクチン）を用いて投与を遂行する。別の実施形態では、本発明の組み換え型ポリペプチドの投与は、タンパク質を遺伝子組み換えによって生産し、次いで組み換え型タンパク質を被験者に投与することによって遂行される。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

20

30

40

【0151】

一実施形態では、腫瘍退行を達成するために、第1の処置の過程にすぐ引き続いて、または数日、数週間、または数か月の間隔の後、本発明の組成物の繰返し投与（ブースター投与量）を行ってもよい。別の実施形態では、腫瘍増殖の抑制を達成するために、第1の処置の過程にすぐ引き続いて、または数日、数週間、または数か月の間隔の後、繰返し投与を行ってもよい。撮像技法、血清腫瘍マーカーの解析、生検、または腫瘍に伴う症状の存在、不在、または寛解などの診断方法を含む当該技術分野で既知の任意の技法によって評価を決定してもよい。

【0152】

50

別の実施形態では、本発明の方法および組成物によって引き出される免疫応答は C D 8<sup>+</sup> T 細胞媒介性応答を含む。別の実施形態では、免疫応答は主として C D 8<sup>+</sup> T 細胞媒介性応答から構成される。別の実施形態では、免疫応答の唯一検出可能な構成成分は、 C D 8<sup>+</sup> T 細胞媒介性応答である。

#### 【 0 1 5 3 】

別の実施形態では、本明細書に提供される方法および組成物によって引き出される免疫応答は C D 4<sup>+</sup> T 細胞媒介性応答を含む。別の実施形態では、免疫応答は主として C D 4<sup>+</sup> T 細胞媒介性応答から構成される。別の実施形態では、免疫応答の唯一検出可能な構成成分は、 C D 4<sup>+</sup> T 細胞媒介性応答である。別の実施形態では、 C D 4<sup>+</sup> T 細胞媒介性応答は抗原に対する測定可能な抗体応答に付随して起こる。別の実施形態では、 C D 4<sup>+</sup> T 細胞媒介性応答は抗原に対する測定可能な抗体応答に付随しない。

10

#### 【 0 1 5 4 】

別の実施形態では、本発明は被験者内に抗原の準優占 C D 8<sup>+</sup> T 細胞エピトープに対して C D 8<sup>+</sup> T 細胞媒介性免疫応答を誘発する方法を提供し、この方法は ( a ) H e r 2 - n e u キメラ抗原またはその断片をコードするヌクレオチド分子を L L O タンパク質の N 末端断片をコードするヌクレオチド分子に融合してこれによって L L O - 抗原融合タンパク質をコードする組み換え型ヌクレオチドを生成する工程と、 ( b ) 組み換え型ヌクレオチドまたは L L O - 抗原融合を被験者に投与する工程とを含み、これによって C D 8<sup>+</sup> T 細胞媒介性免疫応答を抗原の準優占 C D 8<sup>+</sup> T 細胞エピトープに対して誘発する。

#### 【 0 1 5 5 】

一実施形態では、腫瘍内の C D 8<sup>+</sup> / 調節性 T 細胞の比を増加する方法が本明細書に提供され、また別の実施形態では、この方法は本発明の組み換え型ポリペプチド、組み換え型リストリア、または組み換え型ベクターを含む組成物を被験者に投与する工程を含む。

20

#### 【 0 1 5 6 】

一実施形態では、腫瘍内の C D 8<sup>+</sup> / 調節性 T 細胞の比を増加する方法が本明細書に提供され、また別の実施形態では、この方法は本発明の組み換え型ポリペプチド、組み換え型リストリア、または組み換え型ベクターを含む組成物を被験者に投与する工程を含む。

#### 【 0 1 5 7 】

別の実施形態では、本明細書に提供される方法および組成物によって引き出された免疫応答は少なくとも 1 つの抗原の準優占エピトープへの免疫応答を含む。別の実施形態では、免疫応答は準優占エピトープへの免疫応答を含まない。別の実施形態では、免疫応答は少なくとも 1 つの準優占エピトープへの免疫応答から構成される。別の実施形態では、ただ 1 つの測定可能な免疫応答の構成成分は少なくとも 1 つの準優占エピトープへの免疫応答である。各々のタイプの免疫応答は本発明の別個の実施形態を表す。

30

#### 【 0 1 5 8 】

一実施形態では、本発明の方法は被験者内の H E R 2 / 発現腫瘍またはガンに対する前記被験者内の耐性を破壊し、また別の実施形態では、この方法は本明細書に記述される組み換え型リストリアワクチン株を含む組成物を被験者に投与する工程を含む。

#### 【 0 1 5 9 】

免疫応答を測定する方法は当該技術分野で周知であり、例えば、腫瘍増殖の抑制の測定、フローサイトメトリー、標的細胞溶解アッセイ（例えば、クロム遊離アッセイ）、四量体の使用、および他のものが挙げられる。各々の方法は本発明の別個の実施形態を表す。

40

#### 【 0 1 6 0 】

別の実施形態では、本発明は被験者内で H e r - 2 を発現する腫瘍から発する転移性疾患を遅延または阻害する方法を提供し、また別の実施形態では、方法は被験者に H E R 2 キメラタンパク質もしくはその断片に融合した L L O タンパク質の N 末端断片を含む組み換え型ポリペプチド、または組み換え型ポリペプチドをコードする組み換え型ヌクレオチドを投与することを含み、被験者は H E R 2 を発現する腫瘍に対する免疫応答を搭載し、これによって被験者内で H E R 2 を発現する腫瘍から発する転移性疾患を遅延または阻害する。

50

## 【0161】

別の実施形態では、本発明はHER2キメラタンパク質抗原性を改善する方法を提供し、また別の実施形態では、方法はLLOタンパク質のN末端断片をHer-2タンパク質またはその断片をコードするスクレオチドにコードするスクレオチドを融合して組み換え型ポリペプチドを作り出す工程を含み、これによってHER2キメラタンパク質の抗原性を改善する。

## 【0162】

別の実施形態では、HER2キメラタンパク質の抗原性を改善する方法が本明細書に提供され、また別の実施形態では、方法は組み換え型スクレオチドを発現するためにリストリア株を改変することを含む。別の実施形態では、組み換え型スクレオチドを発現するために異なる細菌ベクターが使用される。別の実施形態では、細菌ベクターは弱毒化される。別の実施形態では、DNAワクチン（例えば、ネイキッドDNAワクチン）は組み換え型スクレオチドを発現するために使用される。別の実施形態では、スクレオチドによってコードされたLLO-HER2キメラ融合ペプチドの投与は、タンパク質を遺伝子組み換えによって生産し、次いで組み換え型タンパク質を被験者に投与することによって遂行される。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

10

## 【0163】

一実施形態では、本発明は腫瘍の「エピトープ拡大」のための方法を提供する。別の実施形態では、本明細書に提供される組成物および方法を使用する免疫化は、本発明のワクチン内で搬送される抗原以外の抗原を持つ他の腫瘍の上へのエピトープ拡大を誘発する。

20

## 【0164】

別の実施形態では、優占エピトープまたは準優占エピトープは、治療される被験者内とそれぞれ優占または準優占である。別の実施形態では、優占エピトープまたは準優占エピトープは、治療される母集団内でそれぞれ優占または準優占である。

## 【0165】

一実施形態では、エピトープ拡大によって被験者内のガンまたは腫瘍増殖を治療する、抑制する、または阻害する方法が本明細書に提供され、また別の実施形態では、前記ガンは本発明の組成物内に含まれる抗原またはその断片の発現と関連付けられる。別の実施形態では、方法は前記被験者に本発明の組み換え型ポリペプチド、組み換え型リストリア、または組み換え型ベクターを含む組成物を投与することを含む。さらに別の実施形態では、被験者は抗原を発現するガンまたは抗原を発現する腫瘍に対する免疫応答を搭載し、これによって被験者内のガンまたは腫瘍増殖を治療、抑制、または阻害する。

30

## 【0166】

一実施形態では、「優占CD8<sup>+</sup>T細胞エピトープ」は、ワクチン接種、タンパク質もしくは病原体による感染または悪性増殖、またはタンパク質を含有するガン細胞によって引き出される、30%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、これによって引き出される35%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、40%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、45%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、45%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、50%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、55%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、60%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、65%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、70%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、75%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、80%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語

40

50

は、85%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、90%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、95%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、96%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、97%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、98%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。

#### 【0167】

一実施形態では、「準優占CD8<sup>+</sup>T細胞エピトープ」は、ワクチン接種、タンパク質もしくは病原体による感染または悪性増殖、またはタンパク質を含有するガン細胞によって引き出される、30%より少ない抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、28%より少ない抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、26%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、24%より少ない抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、22%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、20%より少ない抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、18%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、16%より少ない抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、14%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、12%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、10%より少ない抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、8%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、6%より少ない抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、5%より少ない抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、4%を超える抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、3%より少ない抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、2%より少ない抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、1%より少ない抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。別の実施形態では、この用語は、0.5%より少ない抗原特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞によって識別されるエピトープを指す。

#### 【0168】

各々のタイプの優占エピトープおよび準優占エピトープは、本発明の別個の実施形態を表す。

#### 【0169】

一実施形態では、本発明の方法および組成物での抗原は被験者の非腫瘍細胞上で検出可能なレベルで発現される。別の実施形態では、抗原は被験者の非腫瘍細胞の少なくともある特定のパーセンテージ(例えば、0.01%、0.03%、0.1%、0.3%、1%、2%、3%、または5%)の検出可能なレベルで発現される。一実施形態では、「非腫瘍細胞」は腫瘍の本体の外側の細胞を指す。別の実施形態では、「非腫瘍細胞」は非悪性細胞を指す。別の実施形態では、「非腫瘍細胞」は形質転換されていない細胞を指す。別の実施形態では、非腫瘍細胞は体細胞である。別の実施形態では、非腫瘍細胞は生殖細胞である。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

#### 【0170】

10

20

30

40

50

一実施形態では、「検出可能なレベル」は標準的なアッセイを使用するときに検出可能なレベルを指す。一実施形態では、アッセイは免疫学的アッセイである。一実施形態では、アッセイは酵素結合免疫測定法（E L I S A）である。別の実施形態では、アッセイはウエスタンプロットである。別の実施形態では、アッセイはF A C Sである。当該技術分野において利用可能である任意の他のアッセイを本明細書に提供される方法において使用することができる事が当業者によって理解されるべきである。別の実施形態では、検出可能なレベルは特定のアッセイのバックグラウンドレベルに対して決定される。これらの技法の各々を遂行するための方法は当業者に周知であり、各々の技法は本発明の別個の実施形態を表す。

#### 【0171】

一実施形態では、組み換え型の抗原を発現するL Mを用いたワクチン接種はエピトープ拡大を誘発する。別の実施形態では、L L O - 抗原融合を用いたワクチン接種は、H e r 2の状況の外側でさえも、エピトープ拡大を同様に誘発する。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

#### 【0172】

別の実施形態では、本発明は被験者内でH E R 2を発現する腫瘍の増殖を妨げる方法を提供し、被験者にH E R 2キメラ抗原に融合したL L Oタンパク質のN末端断片を含む組み換え型ポリペプチドを投与することを含み、抗原は1つ以上の準優占C D 8<sup>+</sup>T細胞エピトープを有し、被験者は抗原を発現する腫瘍に対する免疫応答を搭載し、これによって被験者内でH E R 2を発現する腫瘍の増殖を妨げる。別の実施形態では、抗原は優占D 8<sup>+</sup>T細胞エピトープのうちのいずれも含有しない。別の実施形態では、被験者内のH E R 2を発現する腫瘍の増殖を妨げる方法が本明細書に提供され、この方法は本明細書に提供される組み換え型ポリペプチドをコードする組み換え型ヌクレオチドを含むリストリアの組み換え型形態を被験者に投与することを含む。

#### 【0173】

別の実施形態では、本発明はガンを有する宿主内に細胞毒性T細胞の形成を誘発するための方法を提供し、この方法は宿主に本発明の組成物を投与することを含み、これによってガンを有する宿主内の細胞毒性T細胞の形成を誘発する。

#### 【0174】

別の実施形態では、本発明は、ガンの発生率を減少する方法を提供し、この方法は本発明の組成物を投与することを含む。別の実施形態では、本発明は、ガンを軽快する方法を提供し、この方法は本発明の組成物を投与することを含む。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

#### 【0175】

一実施形態では、組成物を被験者の細胞にエクスピボで投与し、別の実施形態では、組成物をドナーの細胞にエクスピボで投与し、別の実施形態では、組成物をドナーの細胞にインビボで投与し、次いで被験者に移入した。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

#### 【0176】

一実施形態では、本発明の方法で治療されるガンは乳ガンである。別の実施形態では、このガンはH e r 2を含有するガンである。別の実施形態では、このガンはメラノーマである。別の実施形態では、このガンは膵臓ガンである。別の実施形態では、このガンは卵巣ガンである。別の実施形態では、このガンは胃ガンである。別の実施形態では、このガンは膵臓のガンの病巣である。別の実施形態では、このガンは肺腺ガンである。別の実施形態では、このガンは結腸直腸腺ガンである。別の実施形態では、このガンは肺扁平上皮腺ガンである。別の実施形態では、このガンは胃腺ガンである。別の実施形態では、このガンは卵巣表面の上皮性新生物（例えば、その良性の、増殖性の、または悪性の変種）である。別の実施形態では、このガンは口腔扁平上皮ガンである。別の実施形態では、このガンはC N Sガンである。別の実施形態では、このガンは非小細胞性肺ガンである。別の実施形態では、このガンは子宮内膜ガンである。別の実施形態では、このガンは膀胱ガン

10

20

30

40

50

である。別の実施形態では、このガンは中皮腫である。別の実施形態では、このガンは悪性中皮腫（M M）である。別の実施形態では、このガンは頭頸部ガンである。別の実施形態では、このガンは前立腺ガンである。別の実施形態では、このガンは骨肉腫である。別の実施形態では、このガンはH E R 2 / n e uを発現する骨肉腫である。別の実施形態では、この骨肉腫はイヌの骨肉腫である。別の実施形態では、この骨肉腫は限局性骨肉腫である。別の実施形態では、この骨肉腫は転移性骨肉腫である。別の実施形態では、この骨肉腫は高悪性度骨肉腫である。別の実施形態では、この骨肉腫はイヌの四肢骨肉腫である。

#### 【 0 1 7 7 】

本発明の方法の別の実施形態では、被験者は抗原を発現する腫瘍または標的抗原に対して免疫応答を搭載し、これによって抗腫瘍効果を媒介する。

10

#### 【 0 1 7 8 】

別の実施形態では、本発明はガンを治療するために免疫原性組成物を提供し、この組成物はH E R 2 キメラタンパク質への切断L L Oの融合を含む。別の実施形態では、免疫原性組成物は融合を発現するリステリア株をさらに含む。

#### 【 0 1 7 9 】

別の実施形態では、本発明はガンを治療するために免疫原性組成物を提供し、この組成物はH E R 2 キメラタンパク質を発現するリステリア株を含む。

#### 【 0 1 8 0 】

一実施形態では、本発明の治療プロトコルは治療的である。別の実施形態では、プロトコルは予防的である。別の実施形態では、当業者であれば理解するとおり、本発明のワクチンまたは組成物は、家族性の遺伝子または人々がこれらのタイプの病気にかかりやすくする他の状況の原因で、乳ガンまたは他のタイプのH E R 2含有腫瘍などのガンのリスクがある人々を保護するために使用される。別の実施形態では、ワクチンは、外科手術による腫瘍増殖の減量術、従来の化学療法、または放射線治療の後のガン免疫療法として使用される。かかる治療に続いて、本発明のワクチンを投与し、これによってワクチンの腫瘍抗原に対するC T L応答が残りの転移を破壊し、ガンからの寛解を長持ちさせる。別の実施形態では、ワクチンは、外科手術、従来の化学療法、または放射線治療と組み合わせてガン免疫療法として使用される。別の実施形態では、切断術を受けることができない被験者にかかる併用療法が使用される。別の実施形態では、切断術を受けることができない原発性骨肉腫を有する被験者にかかる併用療法が使用される。別の実施形態では、本発明のワクチンは、それまでに定着した腫瘍の増殖に効果を持ち、既存の腫瘍細胞を死滅するために使用される。

20

30

#### 【 0 1 8 1 】

一実施形態では、「腫瘍抗原またはその断片」、「腫瘍関連抗原またはその断片」、「異種抗原またはその断片」、または「抗原ペプチドまたはその断片」は本明細書では交換可能に使用され、腫瘍抗原、血管形成抗原、または感染性疾患抗原を含む当該技術分野で既知の任意の抗原を含む。別の実施形態では、抗原は自己抗原である。

#### 【 0 1 8 2 】

一実施形態では、本明細書に提供される抗原は腫瘍関連抗原に由来し、一実施形態では、これは以下の腫瘍抗原、サバイシン、M A G E（メラノーマ関連抗原E）タンパク質、例えば、M A G E 1、M A G E 2、M A G E 3、M A G E 4、チロシナーゼ；突然変異r a sタンパク質；突然変異p 5 3タンパク質；進行ガンと関連付けられたp 9 7メラノーマ抗原、r a sペプチドもしくはp 5 3ペプチド；子宮頸ガンと関連付けられたH P V 1 6 / 1 8抗原、乳ガンと関連付けられたK L H抗原、結腸直腸ガンと関連付けられたC E A（ガン胎児抗原）、g p 1 0 0、メラノーマと関連付けられたM A R T 1抗原、または前立腺ガンと関連付けられたP S A抗原のうちの1つである。別の実施形態では、本明細書に提供される組成物および方法のための抗原はメラノーマ-関連抗原であり、これは、一実施形態では、T R P - 2、M A G E - 1、M A G E - 3、g p - 1 0 0、チロシナーゼ、H S P - 7 0、- H C G、またはこれらの組合せである。当該技術分野

40

50

で既知の他の腫瘍関連抗原は本発明でも企図される。

**【0183】**

別の実施形態では、抗原またはその断片は、HPV-E7 (HPV16またはHPV18株のいずれかから)、HPV-E6 (HPV16またはHPV18株のいずれかから)、Her-2/neu、NY-ESO-1、テロメラーゼ (TERT、SCCE、CEA、LMP-1、p53、炭酸脱水酵素IX (CAIX)、PSMA、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、HMW-MAA、WT-1、HIV-1 Gag、プロティナーゼ3、チロシナーゼ関連タンパク質2、PSA (前立腺に特異的な抗原)、EGFR-III、サバイビン、アボトーシスのバキュロウイルス阻害剤繰返し含有5 (baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5) (BIRC5)、LMP-1、p53、PSMA、PSCA、Muc1、PSA (前立腺に特異的な抗原)、またはこれらの組合せから選択される抗原に由来する。  
10

**【0184】**

別の実施形態では、本発明の組成物および方法は腫瘍またはガンに対してワクチン接種するために使用される。

**【0185】**

一実施形態では、本発明の治療プロトコルは治療的である。別の実施形態では、プロトコルは予防的である。別の実施形態では、当業者であれば理解するとおり、本発明のワクチンまたは組成物は、家族性の遺伝子または人々がこれらのタイプの病気にかかりやすくする他の状況の原因で、乳ガンまたは他のタイプのHER2含有腫瘍などのガンのリスクがある人々を保護するために使用される。別の実施形態では、ワクチンは、外科手術による腫瘍増殖の減量術、従来の化学療法、または放射線治療の後のガン免疫療法として使用される。かかる治療に続いて、本発明のワクチンを投与し、これによってワクチンの腫瘍抗原に対するCTL応答が残りの転移を破壊し、ガンからの寛解を長持ちさせる。別の実施形態では、外科手術または従来の化学療法と組み合わせてガン免疫療法としてワクチンが使用される。別の実施形態では、切断術を受けることができない被験者にかかる併用療法が使用される。別の実施形態では、切断術を受けることができない原発性骨肉腫を有する被験者にかかる併用療法が使用される。別の実施形態では、本発明のワクチンは、それまでに定着した腫瘍の増殖に効果を持ち、既存の腫瘍細胞を死滅するために使用される。  
20

**【0186】**

別の実施形態では、上述の方法のいずれかで利用されるワクチンおよび免疫原性組成物は、本発明のワクチンおよび免疫原性組成物の特徴のいずれかを有する。各々の特徴は本発明の別個の実施形態を表す。

**【0187】**

本発明によって投与範囲の様々な実施形態が企図される。一実施形態では、ワクチンベクターの場合は、投与量は0.4LD<sub>50</sub>/回の範囲である。別の実施形態では、投与量は約0.4~4.9LD<sub>50</sub>/回である。別の実施形態では、投与量は約0.5~0.59LD<sub>50</sub>/回である。別の実施形態では、投与量は約0.6~0.69LD<sub>50</sub>/回である。別の実施形態では、投与量は約0.7~0.79LD<sub>50</sub>/回である。別の実施形態では、投与量は約0.8LD<sub>50</sub>/回である。別の実施形態では、投与量は0.4LD<sub>50</sub>/回~0.8のLD<sub>50</sub>/回である。  
40

**【0188】**

別の実施形態では、投与量は細菌数10<sup>7</sup>個/回である。別の実施形態では、投与量は細菌数1.5×10<sup>7</sup>個/回である。別の実施形態では、投与量は細菌数2×10<sup>7</sup>個/回である。別の実施形態では、投与量は細菌数3×10<sup>7</sup>個/回である。別の実施形態では、投与量は細菌数4×10<sup>7</sup>個/回である。別の実施形態では、投与量は細菌数6×10<sup>7</sup>個/回である。別の実施形態では、投与量は細菌数8×10<sup>7</sup>個/回である。別の実施形態では、投与量は細菌数1×10<sup>8</sup>個/回である。別の実施形態では、投与量は細菌数1.5×10<sup>8</sup>個/回である。別の実施形態では、投与量は細菌数2×10<sup>8</sup>個/回で  
50

ある。別の実施形態では、投与量は細菌数  $3 \times 10^8$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $4 \times 10^8$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $6 \times 10^8$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $8 \times 10^8$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $1 \times 10^9$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $1.5 \times 10^9$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $2 \times 10^9$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $3 \times 10^9$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $5 \times 10^9$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $6 \times 10^9$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $8 \times 10^9$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $1 \times 10^{10}$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $1.5 \times 10^{10}$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $2 \times 10^{10}$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $3 \times 10^{10}$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $5 \times 10^{10}$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $6 \times 10^{10}$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $8 \times 10^{10}$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $1 \times 10^{11}$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $1.5 \times 10^{11}$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $2 \times 10^{11}$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $3 \times 10^{11}$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $5 \times 10^{11}$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $6 \times 10^{11}$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $8 \times 10^{11}$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $5.0 \times 10^8$  個／回である。別の実施形態では、投与量は細菌数  $3.3 \times 10^9$  個／回である。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

【 0 1 8 9 】

一実施形態では、本発明のワクチンまたは免疫原性組成物を被験者に単独で投与する。別の実施形態では、別のガン療法と一緒にワクチンまたは免疫原性組成物を投与する。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

【 0 1 9 0 】

一実施形態では、本発明の方法および組成物の組み換え型リストリアは、HER2キメラ抗原またはLLL-HER2キメラ抗原融合をコードする構築体を用いて安定して形質転換される。一実施形態では、構築体はさらなるサブクローニングを容易にするためにポリリンカーを含有する。組み換え型リストリアを生産するためのいくつかの技法が既知である。

【 0 1 9 1 】

一実施形態では、構築体または核酸分子は相同的組み換えを使用してリストリアの染色体の中へと組込まれる。相同的組み換えのための技法は周知であり、また例えば以下の文献に記述されている。Baloglu S, Boyle SM, et al. (Immune responses of mice to vaccinia virus recombinants expressing either Listeria monocytogenes partial listeriolysin or Brucella abortus ribosomal L7/L12 protein. Vet Microbiol 2005; 109(1-2): 11-7)、およびJiang LL, Song HH, et al., (Characterization of a mutant Listeria monocytogenes strain expressing green fluorescent protein. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2005; 37(1): 19-24)。別の実施形態では、相同的組み換えを米国特許第6,855,320号に記述されるように実施した。この場合、E7を発現する組み換え型Lm株は、hlyプロモーターの制御下で、また遺伝子生成物の分泌を確保するためにhlyシグナル配列を含むことによって、E7遺伝子の染色体組込によって作成され、Lm-AZ/E

7と称される組み換え型を得る。別の実施形態では、温度感受性プラスミドは、組み換え型を選択するために使用される。各々の技法は本発明の別個の実施形態を表す。

#### 【0192】

別の実施形態では、構築体または核酸分子はトランスポゾン挿入を使用してリステリア染色体の中へと組込まれる。トランスポゾン挿入の技法は当該技術分野で周知であり、とりわけ以下のSunらの文献( Infection and Immunity 1990, 58: 3770 - 3778)にDP-L967の構築について記述されている。トランスポゾン突然変異生成は、別の実施形態では、安定したゲノム挿入変異体を形成することができるという有利点を有するが、外来性遺伝子が挿入されるゲノム内の位置が未知であるという不利点を有する。

10

#### 【0193】

別の実施形態では、構築体または核酸分子は、ファージ組み込み部位を使用してリステリアの染色体の中へと組込まれる( Lauer P, Chow MY et al, Construction, characterization, and use of two Listeria monocytogenes site-specific phage integration vectors. J Bacteriol 2002; 184 (15): 4177 - 86 )。この方法のある特定の実施形態では、異種遺伝子を、ゲノム内の任意の適切な部位であってもよい、対応する付着部位( 例えは、comKまたはarg tRNA遺伝子のc端 )の中へとインサートするために、バクテリオファージ( 例えは、U153またはPSAリステリオファージ )のインテグラーゼ遺伝子および付着部位が使用される。別の実施形態では、内因性のプロファージは構築体または異種遺伝子組込の前に利用された付着部位から回復した。別の実施形態では、この方法は結果として單一コピー組み込み体をもたらす。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

20

#### 【0194】

別の実施形態では、様々なプロモーターのうちの1つが、これを含有する抗原または融合タンパク質を発現するために使用される。一実施形態では、Lmプロモーターが使用され、例えは、プロモーターはリステリアのタンパク質溶血素、actA、ホスホチジルイノシトールに特異的なホスホリパーゼ、ホスホリパーゼC、およびメタロプロテアーゼそれぞれをコードするための遺伝子hly、actA、plcA、plcB、およびmp1のためのプロモーターである。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

30

#### 【0195】

本発明の別の実施形態では、本発明の方法および組成物は、本発明のHER2キメラタンパク質またはLL0配列の相同体を利用する。別の実施形態では、本発明の方法および組成物はヒト以外の哺乳類のHER2キメラタンパク質を利用する。「相同性」、「相同的」等々という用語は、いずれかのタンパク質またはペプチドに関するとき、一実施形態では、最大パーセントの相同性を達成するため、配列同一性の部分としていかなる保存的置換も考慮せずに、必要に応じて配列をアラインしギャップを導入した後の対応する未変性ポリペプチドの残基と同一の候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージを指す。アライメントのための方法およびコンピュータープログラムは当該技術分野で周知である。

40

#### 【0196】

別の実施形態では、「相同性」という用語は、いずれかの核酸配列を参照するとき、対応する未変性核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセンテージを同様に示す。

#### 【0197】

別の実施形態では、本発明のシグナルペプチドもしくは組み換え型ポリペプチドまたは融合タンパク質をコードする孤立核酸を本発明は提供する。一実施形態では、孤立核酸は少なくとも65%の相同性を本発明のシグナルペプチドもしくは組み換え型ポリペプチドまたは融合タンパク質をコードする核酸と共有する配列を含む。別の実施形態では、孤立核酸は少なくとも75%の相同性を本発明のシグナルペプチドもしくは組み換え型ポリペ

50

10 プチドまたは融合タンパク質をコードする核酸と共有する配列を含む。別の実施形態では、孤立核酸は少なくとも 85% の相同性を本発明のシグナルペプチドもしくは組み換え型ポリペプチドまたは融合タンパク質をコードする核酸と共有する配列を含む。別の実施形態では、孤立核酸は少なくとも 90% の相同性を本発明のシグナルペプチドもしくは組み換え型ポリペプチドまたは融合タンパク質をコードする核酸と共有する配列を含む。別の実施形態では、孤立核酸は少なくとも 95% の相同性を本発明のシグナルペプチドもしくは組み換え型ポリペプチドまたは融合タンパク質をコードする核酸と共有する配列を含む。別の実施形態では、孤立核酸は少なくとも 97% の相同性を本発明のシグナルペプチドもしくは組み換え型ポリペプチドまたは融合タンパク質をコードする核酸と共有する配列を含む。別の実施形態では、孤立核酸は少なくとも 99% の相同性を本発明のシグナルペプチドもしくは組み換え型ポリペプチドまたは融合タンパク質をコードする核酸と共有する配列を含む。

#### 【0198】

一実施形態では、当該技術分野において適切に記述される方法によって、相同性は配列アライメントに対してコンピューターアルゴリズムによって決定される。例えば、核酸配列相同性のコンピューターアルゴリズム解析は、例えば、BLAST、DOMAIN、BEAUTY (BLAST強化アラインメントユーティリティ)、GENPEPT、およびTREMBLパッケージなどの利用可能な任意の数のソフトウェアパッケージの利用を含む場合がある。

#### 【0199】

別の実施形態では、「相同性」は本明細書に提供される配列（核酸またはアミノ酸配列）から選択された配列との同一性が 65% より大きいことを指す。別の実施形態では、「相同性」は本明細書に提供される配列から選択された配列との同一性が 70% より大きいことを指す。別の実施形態では、同一性は 75% より大きい。別の実施形態では、同一性は 78% より大きい。別の実施形態では、同一性は 80% より大きい。別の実施形態では、同一性は 82% より大きい。別の実施形態では、同一性は 83% より大きい。別の実施形態では、同一性は 85% より大きい。別の実施形態では、同一性は 87% より大きい。別の実施形態では、同一性は 88% より大きい。別の実施形態では、同一性は 90% より大きい。別の実施形態では、同一性は 92% より大きい。別の実施形態では、同一性は 93% より大きい。別の実施形態では、同一性は 95% より大きい。別の実施形態では、同一性は 96% より大きい。別の実施形態では、同一性は 97% より大きい。別の実施形態では、同一性は 98% より大きい。別の実施形態では、同一性は 99% より大きい。別の実施形態では、同一性は 100% である。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

#### 【0200】

別の実施形態では、相同性は候補配列ハイブリダイゼーションの決定を介して決定され、その方法は当該技術分野において適切に記述される（例えば、“Nucleic Acid Hybridization” Hames, B. D., and Higgins S. J., Eds. (1985)、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.、およびAusubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y を参照のこと）。例えば、ハイブリダイゼーションの方法は、未変性カスパーゼペプチドをコードするDNAの補体に対して中程度からストリンジエントな条件下で実行される場合がある。例えば、ハイブリダイゼーション条件は、10 ~ 20% のホルムアミド、5 × SSC (150 mM の NaCl、15 mM のクエン酸三ナトリウム)、50 mM のリン酸ナトリウム (pH 7.6)、5 × デンhardt 液、10% の硫酸デキストラン、および 20 µg / mL の変性断片化サケ精子DNAを含む溶液中 42 ℃ にて一晩のインキュベーションである。

10

20

30

40

50

## 【0201】

本発明の一実施形態では、「核酸」は少なくとも2つの塩基-糖-リン酸塩の組合せのストリングを指す。一実施形態では、この用語はDNAおよびRNAを含む。一実施形態では、「ヌクレオチド」は核酸高分子の単量体単位を指す。一実施形態では、RNAは、tRNA(転移RNA)、snRNA(核内低分子RNA)、rRNA(リボソームRNA)、mRNA(メッセンジャーRNA)、アンチセンスRNA、阻害的低分子RNA(siRNA)、マイクロRNA(miRNA)、およびリボザイムの形態をとる。siRNAおよびmiRNAの使用が記述される(Caudy AA et al, Genes & Development 16: 2491-96およびその中で引用される参考文献)。

DNAは、プラスミドDNA、ウイルスDNA、線状DNA、もしくは染色体DNAの形態、またはこれらの群の誘導体であってもよい。さらに、DNAおよびRNAのこれらの形態は、1本鎖、2本鎖、3本鎖、または4本鎖であってもよい。別の実施形態では、この用語は他の種類のバックボーンであるが同一の塩基を含有する人工核酸も含む。一実施形態では、この人工核酸はPNA(ペプチド核酸)である。PNAはペプチドバックボーンおよびヌクレオチド塩基を含有し、一実施形態では、DNAおよびRNA分子に結合することができる。別の実施形態では、このヌクレオチドはオキセタン修飾される。別の実施形態では、ヌクレオチドは1つ以上のホスホジエステル結合をホスホロチオエート結合で置き換えることによって修飾される。別の実施形態では、人工核酸は当該技術分野で既知の未変性の核酸のリン酸バックボーンの任意の他の変異体を含有する。ホスホロチオエート核酸およびPNAの使用は、当業者に既知であり、また例えば、Neilsen PE, Current Opinion Structural Biology 9: 353-57、およびRaz NK et al Biochem Biophys Res Commun. 297: 1075-84に記述される。核酸の生産および使用は、当業者には既知であり、また例えば、Molecular Cloning, (2001), Sambrook and Russell, eds. およびMethods in Enzymology: Methods for molecular cloning in eukaryotic cells (2003) Purchio and G. C. Fareedに記述される。各々の核酸誘導体は、本発明の別個の実施形態を表す。

## 【0202】

本明細書に列挙された任意のアミノ酸配列に対するタンパク質および/またはペプチド相同性は、一実施形態では、免疫プロット解析を含む当該技術分野において適切に記述される方法によって、または確立された方法を介して利用可能な任意の数のソフトウェアパッケージを利用したアミノ酸配列のコンピューターアルゴリズム解析を介して決定される。これらのパッケージのうちのいくつかはFASTA、BLAST、MPSEARCH、またはScansパッケージを含んでもよく、また例えば、スミス-ウォーターマンアルゴリズムの使用、および/または解析のための広範囲/局所的もしくはBLOCKSアラインメントを採用してもよい。各々の相同性を決定する方法は、本発明の別個の実施形態を表す。

## 【0203】

別の実施形態では、本発明は、本発明の方法を遂行するうえで利用される試薬を含むキットを提供する。別の実施形態では、本発明は、本発明の組成物、ツール、または器具を含むキットを提供する。

## 【0204】

一実施形態では、「接触する」または「投与する」という用語は本発明の組成物を用いてガン細胞または腫瘍に直接的に接触することを指す。別の実施形態では、この用語は、本発明の組成物を用いてガン細胞または腫瘍に間接的に接触することを指す。別の実施形態では、本発明の方法は、これによって化合物が体内を循環する当該技術分野で既知の拡散または任意の他の能動輸送もしくは受動輸送プロセスによって、被験者に本発明の組成物を接触し、その後組成物がガン細胞または腫瘍と接触する方法を含む。別の実施形態では、本発明の方法は本発明の組成物の少なくとも単一の投与を含んでもよく、別の実施形

10

20

20

30

40

50

態では、本発明の方法は本発明の組成物の複数の投与を含んでもよい。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

#### 【0205】

別の実施形態では、「遺伝子」および「組み換え型遺伝子」という用語は、本発明のポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを含む核酸分子を指す。かかる自然の対立遺伝子変異は、典型的には所与の遺伝子のヌクレオチド配列中に1～5%の変異を生じる。数多くの異なる個体または生物体の中の対象となる遺伝子を配列決定することによって、代替的な対立遺伝子を同定することができる。これはハイブリダイゼーションプロープを使用して、様々な個体または生物体中の同一の遺伝子座を識別するために、容易に実行することができる。自然の対立遺伝子変異の結果であり、また機能活性を変更しない、ありとあらゆるかかるヌクレオチドの変種および結果として得られるアミノ酸多型もしくは変種が本発明の範囲内であることが意図される。

10

#### 【0206】

##### 医薬組成物

別の実施形態では、非経口的に、癌近傍に、経粘膜的に、経皮的に、筋肉内に、静脈内に、皮内に、皮下に、腹腔内に、脳室内に、頭蓋内に、腔内に、または腫瘍内などの当業者に既知の任意の方法によって、本発明のワクチンおよび組成物を含有する医薬組成物を被験者に投与する。

#### 【0207】

本明細書に提供される方法および組成物の別の実施形態では、ワクチンまたは組成物は経口で投与され、したがってこれは経口投与に好適な形態、すなわち固体調製物または液状調製物で処方される。好適な固体の経口剤形としては、錠剤、カプセル、丸薬、顆粒、ペレット、およびこれに類するものが挙げられる。好適な液状の経口剤形としては、溶液、懸濁液、分散剤、エマルション、オイル、およびこれに類するものが挙げられる。本発明の別の実施形態では、活性成分はカプセルで処方される。この実施形態によると、本発明の組成物は活性化合物および不活性担体または希釈剤に加えて、硬いゼラチンカプセルを含む。

20

#### 【0208】

別の実施形態では、ワクチンまたは組成物は、液状調製物の静脈内、動脈内、または筋肉内注射によって投与される。好適な液体剤形としては、溶液、懸濁液、分散剤、エマルション、オイルおよびこれに類するものが挙げられる。一実施形態では、医薬組成物は静脈内に投与され、したがって静脈内投与に好適な形態で処方される。別の実施形態では、医薬組成物は動脈内に投与され、したがって動脈内投与に好適な形態で処方される。別の実施形態では、医薬組成物は筋肉内に投与され、したがって筋肉内投与に好適な形態で処方される。

30

#### 【0209】

一実施形態では、「治療する」という用語は疾患を治癒することを指す。別の実施形態では、「治療する」とは疾患を防止することを指す。別の実施形態では、「治療する」とは疾患の発生率を減少することを指す。別の実施形態では、「治療する」とは疾患の症状を軽快することを指す。別の実施形態では、「治療する」とは患者のパフォーマンスのない生存率または全体的な生存率が増加することを指す。別の実施形態では、「治療する」とは疾患の進行を安定させることを指す。別の実施形態では、「治療する」とは寛解を誘発することを指す。別の実施形態では、「治療する」とは疾患の進行を減速することを指す。別の実施形態では、「減少する」、「抑制する」、および「阻害する」という用語は、より少なくすることまたは減らすことを指す。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

40

#### 【0210】

本明細書で使用される時、「約」という用語は定量的な用語プラスもしくはマイナス5%を意味し、または別の実施形態では、プラスもしくはマイナス10%を意味し、または別の実施形態では、プラスもしくはマイナス15%を意味し、または別の実施形態では、

50

プラスもしくはマイナス 20 % を意味する。

【0211】

「被験者」という用語は、症状もしくはその後遺症に対するまたはその症状になりやすいことに対する療法を必要とする、成人のヒト、またはヒトの子ども、ティーンエージャー、もしくは青年を含むことができ、これはイヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ラット、およびマウスなどのヒト以外の哺乳類を包含してもよいことを当業者は理解するべきである。この用語が家畜を包含してもよいことも理解されるであろう。「被験者」という用語はあらゆる点で正常な個体を除外しない。

【0212】

一実施形態では、「被験者」という用語は切断術を行うことができない愛玩用のイヌおよびネコも包含する。別の実施形態では、「被験者」という用語は外科手術を行うことができないヒトも包含する。別の実施形態では、「被験者」という用語は切断術を行うことができないヒトも包含する。別の実施形態では、「被験者」という用語はヒトの子どもも包含する。

10

【0213】

治療の目的については、[ 哺乳類 ] という用語は哺乳類と分類されたあらゆる動物を指し、ヒト、飼育動物および家畜物、ならびに動物園の動物、スポーツ用の動物、または愛玩用動物（犬を含むイヌ科の動物、およびウマ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ等々など）を含むがこれに限定されないことを当業者は理解するであろう。

20

【0214】

腫瘍の治療に関して「治療的に有効な量」とは、以下の効果のうちの 1 つ以上を引き起こす能力を有する量を指す。（1）増殖の減速および完全な増殖停止を含むある程度の腫瘍増殖の阻害、（2）腫瘍細胞の数の減少、（3）腫瘍サイズの減少、（4）周辺器官への腫瘍細胞の浸潤の阻害（すなわち、減少、減速、または完全な停止）、（5）転移の阻害（すなわち、減少、減速、または完全な停止）、（6）腫瘍の退行もしくは拒絶をもたらす場合があるが、必ずしもそうでなくてもよい、抗腫瘍免疫応答の強化、および／または（7）障害に関連した 1 つ以上の症状のある程度の軽減。腫瘍の治療の目的については、本明細書に提供されるワクチンの「治療的に有効な量」は、経験的におよび習慣的な様式で決定される場合がある。

30

【0215】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態をより完全に例示するために提示される。しかしながら、これらは本発明の幅広い範囲を制限するものとはけっして理解するべきでない。

【実施例】

【0216】

材料および方法

オリゴヌクレオチドは *In vitro* (*Invitrogen* (米国カリフォルニア州 *Carlsbad*)) によって合成され、また DNA 配列決定は *Genewiz Inc* (米国ニュージャージー州 *South Plainfield*) によって行われた。フローサイトメトリー試薬は *Becton Dickinson Biosciences* (BD、米国カリフォルニア州 *San Diego*) から購入した。細胞培養培地、補助剤および他のすべての試薬は、示されない限り *Sigma* (米国ミズーリ州 *St. Louise*) から入手した。HER2/neu HLA-A2ペプチドは *EZ biolabs* (米国インディアナ州 *Westfield*) によって合成された。完全な RPMI 1640 (C-RPMI) 培地は、2 mM グルタミン、0.1 mM 非必須アミノ酸、および 1 mM のピルビン酸ナトリウム、10% ウシ胎児血清、ペニシリン／ストレプトマイシン、Hepes (25 mM) を含有した。多クローニ性の抗 LLO 抗体が以前に記述され、抗 HER2/neu 抗体は *Sigma* から購入した。

40

【0217】

マウスおよび細胞株

50

すべての動物実験は、University of PennsylvaniaまたはRutgers UniversityにおいてIACUCによって認可されたプロトコルに従って実施した。FVB/NマウスはJackson laboratories(米国メイン州Bar Harbor)から購入した。ラットHER2/neu腫瘍性タンパク質を過剰発現するFVB/N HER2/neuトランスジェニックマウスは、University of Pennsylvaniaの実験動物コア施設で収容および飼育された。NT-2腫瘍細胞株は高いレベルのラットHER2/neuタンパク質を発現し、これはこれらのマウスの自然発生的な乳腺腫瘍に由来し、以前記述したように増殖した。DHFR-G8(3T3/neu)細胞はATCCから得られ、ATCCの推奨に従って増殖した。EMT6-Luc細胞株は、John Ohlfest博士(University of Minnesota、米国ミネソタ州)からの寛大な供与物であり、また完全なC-RPMI培地で増殖した。生物発光の作業は、University of Pennsylvania(米国ペンシルバニア州Philadelphia)のSmall Animal Imaging Facility(SAIF)によるガイドンスに従って実行された。

10

## 【0218】

## リストリア構築体および抗原発現

HER2/neu-pGEM7Zは、親切にもUniversity of PennsylvaniaのMark Greene博士によって提供され、これはpGEM7Zプラスミド(Promega、米国ウィスコンシン州Madison)へとクローニングされた全長のヒトHER2/neu(hHer2)遺伝子を含んでいた。このプラスミドは、PCRによってpfxf DNAポリメラーゼ(Invitrogen)および表1に示されるオリゴを使用して、hHER2/neuの3つの区分、すなわちEC1、EC2、およびIC1を増幅するためのテンプレートとして使用された。

20

## 【表1-2】

【表1-2】ヒトHER2-キメラのクローニングのためのプライマー

	DNA配列	塩基対領域	アミノ酸領域または接合部
HER2-キメラ(F)	TGAT <u>CTCGAG</u> ACCCACCTGGACATG CTC(配列番号:57)	120-510	40-170
Her EC1-EC2 F (結合)	CTACCAGGACACGATTGTGGAAAG -AATATCCA GGAGTTGCTGGCTGC(配列番号:58)	510/1077	170/359
Her EC1-EC2 R (結合)	GCAGCCAGCAAACCTCCTGGATATT- CTTCCACAA AATCGTGTCCTGGTAG(配列番号:59)		
Her EC2-IC1 F (結合)	CTGCCACCAGCTGTGCGCCCGAGGG -CAGCAGAAGATCCGGAAAGTACACG A(配列番号:60)	1554/2034	518/679
Her EC2-IC1 R (結合)	TCGTGTACTTCCGGATCTTCTGCTG CCCTCGGGC GCACAGCTGGTGGCA G(配列番号:61)		
HER2-キメラ(R)	GTGG <u>CCCCGGG</u> TCTAGATTAGTCTAA GAGGCAGCCATAGG(配列番号:62)	2034-2424	679-808

30

## 【0219】

HER2/neuキメラ構築体はSOEing PCR法およびテンプレートとしての各々の別個のhHER2/neu区分による直接融合によって生成された。プライマーを

40

50

表2に示す。

**【0220】**

異なる区分のヒトHer2領域の増幅のためのプライマーの配列

**【表1A】**

	DNA配列	塩基対領域	アミノ酸領域
HER2-EC1 (F)	CCGC <u>CTCGAG</u> GGCCGCGAGCACC CAAGTG (配列番号: 63)	58-979	20-326
HER2-EC1 (R)	CGCG <u>ACTAGTTAATCCTCTGC</u> TGTACACCTC (配列番号: 64)		
HER2-EC2 (F)	CCGC <u>CTCGAGTACCTTTCTACG</u> GACGTG (配列番号: 65)	907-1504	303-501
Her-2-EC2 (R)	CGCG <u>ACTAGTTACTCTGGCCG</u> GTTGGCAG (配列番号: 66)		
HER2-HER2 -IC1 (F)	CCGC <u>CTCGAGCAGCAGAAGATC</u> CGGAAGTAC (配列番号: 67)	2034-3243	679-1081
HER2-IC1 (R)	CGCG <u>ACTAGTTAAGCCCCCTTC</u> GGAGGGTG (配列番号: 68)		

10

20

30

40

50

**【0221】**

ChHer2遺伝子は、XbaIおよびSphI制限酵素を使用してpAdv138から切り離され、Lmddシャトルベクター、pAdv134で、LLOの切断非溶血性断片を用いてインフレームでクローニングされた。インサート、LLO、およびhlyプロモーターの配列はDNAシークエンシング解析によって確認された。このプラスミドは電子コンピテントActA、dal、dat突然変異体リステリア・モノサイトゲネス株、LmddAへと電気穿孔され、ストレプトマイシン(250 μg/mL)を含有するブレインハートインフージョン(BHI)寒天培養基プレート上で陽性クローンが選択された。いくつかの実験では、hHER2/neu(Lm-hHER2)断片を発現する類似のリステリア株が比較の目的で使用された。これらは以前に記述した。すべての研究で、無関連リステリア構築体(Lm対照)が、免疫系でリステリアの抗原と無関係な効果を説明するために含まれる。Lm対照は、ADXS31-164と同一のリステリアプラットフォームに基づくが、HPV16-E7またはNY-ESO-1などの異なる抗原を発現した。融合タンパク質のリステリアからの発現および分泌が試験された。各々の構築体はインビオで2回継代された。

**【0222】**

細胞毒性アッセイ

3~5匹のFVB/Nマウスの群が、1×10<sup>8</sup>コロニー形成単位(CFU)のLm-LLO-ChHer2、ADXS31-164、Lm-hHer2-IC1、またはLm対照(無関連抗原を発現する)を用いて一週間間隔で3回免疫化されるか、または無処置のままとされた。NT-2細胞をインビトロで増殖させ、トリプシンで取り出し、マイトイシンC(血清を含まないC-RPMI媒体中250 μg/mL)で37にて45分間処置した。5回洗浄した後、これらを免疫化した動物または無処置の動物から採取した脾細胞を用いて1:5の比(刺激薬:レスポンダー)で5日間、37にて、5%CO<sub>2</sub>で共インキュベートした。標的として3T3/neu(DHFR-G8)細胞のラベルが付いているユーロピウムを使用して、前述した方法により、標準的な細胞毒性アッセイを実施した。4時間のインキュベーションの後、分光光度計(Perkin Elmer、Victor<sup>2</sup>)を590 nmにて使用して、死滅した標的細胞から放出されたユーロピウムを測定した。特異的な溶解のパーセントが(実験群での溶解-自然発生的溶解)/(

最大溶解 - 自然発生的溶解)として定義された。

【0223】

免疫化マウスからの脾細胞によるインターフェロン - 分泌  
 3 ~ 5 匹の F V B / N または H L A - A 2 トランスジェニックマウスの群が、 $1 \times 10^8$  C F U の A D X S 3 1 - 1 6 4 、陰性リストリア対照(無関連抗原を発現する)を用いて一週間間隔で 3 回免疫化されるか、または無処置のままとされた。最後の免疫化の一週間後、F V B / N マウスからの脾細胞が分離され、 $5 \times 10^6$  細胞 / ウェルにて 2 4 ウェルプレートでマイトイシン C で処置した N T - 2 細胞の存在下で C - R P M I 培地中で共培養された。H L A - A 2 トランスジェニックマウスからの脾細胞は、1 μM の H L A - A 2 に特異的なペプチドまたは 1 μg / mL の組み換え型 H i s タグ付き C h H e r 2 タンパク質(大腸菌内で生産され、ニッケルベースのアフィニティークロマトグラフィー・システムによって精製された)の存在下でインキュベートされた。上清からのサンプルが 2 4 時間または 7 2 時間後に得られ、インターフェロン - (I F N - ) の存在について、製造業者の推奨に従ってマウス I F N - 酵素にリンクした免疫吸着剤アッセイ(E L I S A)キットを使用して試験した。  
10

【0224】

I N F - E L I S p o t アッセイ  
 各々の表示された時点での凍結保存した P B M C を解凍し、3 7 で一晩置き、次いで計数した。キメラ型ワクチン、および組み換え型ヒト I L - 2 (I n v i t r o g e n 、米国メリーランド州 F r e d r i c k ) の中に存在する H E R 2 / N e u の E C 1 、 E C 2 、および I C 1 ドメインを代表する重複ヒト H E R 2 / N e u ペプチド(5 アミノ酸によって 1 1 m e r が重複する)の 2 . 5 μM のプールを用いて細胞を 5 日間の間刺激した。細胞を採取し、1 × の P B S 中で 2 回洗浄し、計数した。製造業者のプロトコルに従って市販のイヌの I F N - E L I S p o t アッセイキット(R & D S y s t e m s 、米国ミネソタ州 M i n n e a p o l i s ) を使用して、I F N - E L I S p o t アッセイを遂行した。簡潔に述べると、0 . 8 - 2 × 1 0 5 の刺激された細胞を 2 . 5 μM の E C 1 、 E C 2 、または I C 1 ペプチドプールプラス I L - 2 を用いて、または I L - 2 を単独で用いてインキュベートした(バックグラウンド計数を決定するため)。すべてのアッセイを 2 回ずつ遂行した。製造業者の取扱い説明書に従ってプレートを発色させた。C T L - I m m u n o s p o t アナライザー(C . T . L 、米国オハイオ州 S h a k e r H e i g h t s ) を使用してスポットを計数した。刺激していないウェルで計数したスポットの数を 2 回差し引くことによってスポットの数を正規化した。  
20  
30

【0225】

H e r 2 トランスジェニック動物での腫瘍研究  
 生後 6 週間の F V B / N ラット H E R 2 / n e u トランスジェニックマウス(9 ~ 1 4 / 群)に  $5 \times 10^8$  C F U の L m - L L O - C h H e r 2 、 A D X S 3 1 - 1 6 4 、または L m 対照を 6 回免疫化した。これらを、自然発生的な乳腺腫瘍の出現について週に 2 回観察し、これらは最高 5 2 週間まで電子カリパスを使用して測定された。平均直径が 1 c m<sup>2</sup> のサイズに達したとき、エスケープした腫瘍を切り離し、R N A l a t e r 内で - 2 0 ° にて保存した。これらの腫瘍のエスケープ上の H E R 2 / n e u タンパク質内の突然変異の効果を決定するために、ゲノム D N A 分離キットを使用してゲノム D N A を抽出し、配列決定した。  
40

【0226】

脾臓および腫瘍内の調節性 T 細胞への A D X S 3 1 - 1 6 4 の効果  
 マウスに  $1 \times 10^6$  N T - 2 細胞を皮下(s . c . )で移植した。7 日目、1 4 日目、および 2 1 日目に、これらに  $1 \times 10^8$  C F U の A D X S 3 1 - 1 6 4 、 L m d d A 対照で免疫化、または無処置のままにした。2 8 日目に腫瘍および脾臓を抽出し、F A C S 解析によって C D 3<sup>+</sup> / C D 4<sup>+</sup> / F o x P 3<sup>+</sup> T r e g の存在について試験した。簡潔に述べると、C - R P M I 培地中で 2 枚のガラススライドの間で脾臓を均質化することによって脾細胞を分離した。滅菌したカミソリの刃を使用して腫瘍を細かく刻み、P B S 中に  
50

D N a s e ( 1 2 U / m L ) およびコラゲナーゼ ( 2 m g / m L ) を含有するバッファーを用いて消化した。室温にて攪拌しながら 6 0 分間インキュベーションした後で、細胞を激しいピペッティングによって分離した。赤血球を R B C 溶解バッファーによって溶解し、続いて 1 0 % F B S を含有する完全な R P M I - 1 6 4 0 培地を用いて数回洗浄した。ナイロンメッシュを通した濾過の後、腫瘍細胞および脾細胞を F A C S バッファー ( 2 % F B S / P B S ) 中で再懸濁し、抗 C D 3 - P e r C P - C y 5 . 5 、 C D 4 - F I T C 、 C D 2 5 - A P C 抗体を用いて染色し、続いて抗 F o x p 3 - P E を用いて透過処理および染色した。4 色 F A C S キャリバー ( B D ) を使用してフローサイトメトリー解析を実施し、 c e l l q u e s t ソフトウェア ( B D ) を使用してデータを解析した。

## 【 0 2 2 7 】

10

## 統計的解析

生存データに対して対数順位二乗検定を使用し、 C T L および E L I S A アッセイに対してスチューデントの t 検定を使用し、これらを 3 回行った。これらの解析では、 0 . 0 5 未満 (\*印をつけた) の p 値は統計的に有意であると考えられる。 P r i s m ソフトウェア、 V . 4 . 0 a ( 2 0 0 6 ) または S P S S ソフトウェア、 V . 1 5 . 0 ( 2 0 0 6 ) のいずれかを用いてすべての統計的な解析が行われた。別段の記載がない限り、すべての F V B / N ラット H E R 2 / n e u トランスジェニック研究のために、群あたり 8 ~ 1 4 匹のマウスを使用し、すべての野生型 F V B / N 研究のために、群あたり少なくとも 8 匹のマウスを使用した。 H E R 2 / n e u トランスジェニックマウスマルクの長期腫瘍研究を除いて、すべての研究を少なくとも 1 回は繰り返した。

20

## ( 実施例 1 )

## 【 0 2 2 8 】

H e r - 2 断片に融合された L L O 断片を分泌する L . モノサイトゲネス株の発生 : A D X S 3 1 - 1 6 4 の構築。

## 【 0 2 2 9 】

30

キメラ H E R 2 / n e u 遺伝子 ( C h H e r 2 ) の構築については前述した。簡潔に述べると、 C h H e r 2 遺伝子は、 S O E i n g P C R 法によって、 H E R 2 / n e u タンパク質の 2 つの細胞外断片 ( a a 4 0 ~ 1 7 0 および a a 3 5 9 ~ 4 3 3 ) と 1 つの細胞内断片 ( a a 6 7 8 ~ 8 0 8 ) との直接融合によって生成された。キメラタンパク質は、タンパク質の既知のヒト M H C クラス I エピトープのほとんどを有する。 C h H e r 2 遺伝子は、プラスミド、 p A d v 1 3 8 ( これは構築体 L m - L L O - C h H e r 2 に使用される ) から切り離され、 L m d d A シャトルプラスミドへとクローニングされ、結果としてプラスミド p A d v 1 6 4 が得られる ( 図 1 A ) 。これらの 2 つのプラスミドバックボーンの間には 2 つの大きい違いがある。 1 ) 組み換え型細菌のインビトロでの選択のために p A d v 1 3 8 はクロラムフェニコール耐性マーカー ( c a t ) を使用しているが、 p A d v 1 6 4 はバシラスサチリスからの D - アラニン・ラセマーゼ遺伝子 ( d a l ) を寄生し、これは d a l - d a t 遺伝子を欠いている L m d d A 株内でインビトロでの選択のためおよびインビオでのプラスミド保持のために代謝相補経路を使用する。このワクチンプラットフォームは、 F D A による改変リストリアワクチン株の抗生物質抵抗性についての憂慮に対処するために設計および開発された。 2 ) p A d v 1 3 8 とは異なり、これはインビオでの L m d d 株の相補に必要ないので、プラスミド ( 以下の配列および図 1 A を参照 ) 中で p A d v 1 6 4 は p r f A 遺伝子のコピーを寄生しない。 L m d d A ワクチン株も、 a c t A 遺伝子 ( リストリア細胞内移動、および細胞から細胞への拡散を担当する ) を欠いているので、このバックボーンに由来する組み換え型ワクチン株は、その親株である L m d d に由来するものより毒性が 1 0 0 倍少ない。 L m d d A ベースのワクチンは、免疫化マウスの脾臓からの L m d d ベースのワクチンよりもずっと速く ( 4 8 時間未満の間に ) 除去される。この株からの融合タンパク質 t L L O - C h H e r 2 の発現および分泌は、インビトロで 8 時間増殖した T C A 沈殿した細胞培養上清の中の L m - L L O - C h H e r 2 のもの ( 図 1 B ) と同等であり、ウエスタンプロット解析を使用して約 1 0 4 K D の帯域として抗 L L O 抗体によって検出される。負の対照として t L

40

50

L.O.のみを発現するリステリアバックボーン株が使用される。

【 0 2 3 0 】

p A d v 1 6 4 配列 ( 7 0 7 5 塩基対 ) ( 図 1 参照 ) :

cggagtgatactggcttactatgttgtgcactgtgaggcactgtgagg  
tgtcagtgaaagtgccttcatgtggcaggaaaaaggctgc  
cacccggtgtcgctcagcagaatatgtgatacaggatattc  
cgcttcctcgctcactgactcgctacgctcggtcgatcg  
ctgcggcgagcggaaatggcttacgaacggggcggagat  
tccctggaaagatgccaggaaagataacttaacaggaaagtgag  
aggcccggcaaaaggccgttttccataggctccggcccc  
ctgacaaggcatcacgaaaatctgacgcctcaaatcagtggt  
gcgaaaacctgacaggactataaagataaccaggcggttcc  
ccctggcggtctccctcggtgcgtctccgtttccctgcctt  
ggtttacccggtgtcattccgcgtgttatggccggcggttgc  
tcattccacgcctgacactcagttccgggttaggcagttcg  
ctccaaggctggactgtatgcacgaacccccccgttcagtc  
gaccgctgcgccttataccggtaactatcgctttagtccaa  
acccggaaagacatgcaaaaaggcaccactggcagcagccac  
tggtaattgatttagaggagtttagtcttgaagtcatgcgc  
cggttaaggctaactgaaaaggacaagtttggtgactgc  
gctccctccaaggccagttaccctcggttcaaaaggatggtag  
ctcagagaacccttcgaaaaaccggccctgcacggcggttt  
ttcggtttcagagcaagagatatacgccgcagacaaaacg  
tctcaagaagatcatcttattatcagataaaaatattct  
agccctccattgttagtatttcattatcttataagttact  
ttatgtggaggcattaacatattgttaatgacgtcaaaaag  
gatagcaagactagaataaagctataaaggcaagcatataa  
attgcgtttcatctttagaaggcgaatttcgcacatatt  
taattatcaaaaagagagggttggcaaacggtagttggcat  
tattaggtaaaaaatgttagaaggagatgtggaaacccatg  
aaaaaaaataatgcgtattttattacacttatatttagtt  
tctaccatattgcgcacaaaactgaaagcaaggatgcatt  
gcattcaataaagaaaaattcaatttcatccatggcaccac  
cagcatctccggctgcaagtcctaaagacgcacatcgaaa  
gaaacacgcggatgaaaatcgataagttatatacaaggat  
gattacaataaaaaacaatgtttagtataaccacggagat  
cagtgacaaaatgtggccgcacaaaagggttacaaagatgg  
aaatgaatatattgttggagaaaaaagaagaaatccatc  
aatcaaaaataatgcagacattcaagttgtgaatgcatt  
cgagccataaccatccaggtgcctcgttaaaaaggcgaatt  
ggaaatttagtagaaaatcaaccagatgttctccctgttaaaa  
cgtgattcattaacactcagcattgatttgcggcaggatg  
ctaatcaagacaataaaaatgttggtaaaaaatgcccacta  
atcaaaaacgttaacaacgcagtaaaaatacattatgtggaaag  
tggaaatgaaaaatatgtcaagcttataccaaaatgttaagtg  
aaaaatgtgattatgtgacgaaaatggcttacagtgaaatc  
acaattatgcgaaatttggtagcatttgcggcgaatcagtgaa  
ataatagcttgaatgttaacttcggcgcgaatcagtgaaatc  
ggaaaatgcaagaagaagtcattatgtttaaacaaaattt  
ctataacgtgaatgttaatgaaacctacaagacccattccag

10

20

30

40

50

t t t t c g g c a a a g c t g t t a c t a a a g a g c a g t t g c a a g c g c  
 t t g g a g t g a a t g c a g a a a a t c c t c c t g c a t a t a t c t c a a g  
 t g t g g c g t a t g g c c g t c a a g t t a t t g a a a t t a t c a a c t  
 a a t t c c c a t a g t a c t a a a g t a a a a g c t g c t t t g a t g c t g  
 c c g t a a g c g g a a a a t c t g t c t c a g g t g a t g t a g a a c t a a c  
 a a a t a t c a t c a a a a a t t c t t c c t t c a a a g c c g t a a t t a c  
 g g a g g t t c c g c a a a a g a g t g a a g t t c a a a t c a t c g a c g g c a  
 a c c t c g g a g a c t t a c g c g a t a t t g a a a a a a g g c g c t a c  
 t t t a a t c g a g a a a c a c c a g g a g t t c c c a t t g c t t a t a c a  
 a c a a a c t t c c t a a a a g a c a a t g a a t t a g c t g t t a t t a a a a  
 a c a a c t c a g a a t a t a t g a a a c a a c t t c a a a a g c t t a t a c  
 a g a t g g a a a a a t t a a c a t c g a t c a c t c t g g a g g g a t a c g t t  
 g c t c a a t t c a a c a t t c t t g g g a t g a a g t a a a t t a t g a t c  
 t c g a g a c c c a c c t g g a c a t g c t c c g c c a c c t c t a c c a g g g  
 c t g c c a g g t g g t g c a g g g a a a c c t g g a a c t c a c c t a c c t g  
 c c c a c c a a t g c c a g c c t g t c c t t c c t g c a g g a t a t c c a g g  
 a g g t g c a g g g c t a c g t g c t c a t c g c t c a c a a c c a a g t g a g  
 g c a g g t c c c a c t g c a g a g g c t g c g g a t t g t g c g a g g c a c c  
 c a g c t c t t g a g g a c a a c t a t g c c c t g g c c g t g c t a g a c a  
 a t g g a g a c c c g c t g a a c a a t a c c a c c c c t g t c a c a g g g g c  
 c t c c c c a g g a g g c c t g c g g g a g c t g c a g c t t c g a a g c c t c  
 a c a g a g a t c t t g a a a g g a g g g g t c t t g a t c c a g c g g a a c c  
 c c c a g c t c t g c t a c c a g g a c a c g a t t t g t g g a a g a a t a t  
 c c a g g a g t t t g c t g g c t g c a a g a a g a t c t t g g g a g c c t g  
 g c a t t t c t g c c g g a g a g c t t t g a t g g g g a c c c a g c c t c c a  
 a c a c t g c c c c g c t c c a g c c a g a g c a g c t c c a a g t g t t g a  
 g a c t c t g g a a g a g a t c a c a g g t t a c c t a t a c a t c t c a g c a  
 t g g c c g g a c a g c c t g c c t g a c c t c a g c g t c t t c c a g a a c c  
 t g c a a g t a a t c c g g g g a c g a t t t c t g c a c a a t g g c g c c t a  
 c t c g c t g a c c c t g c a a g g g c t g g g c a t c a g c t g g c t g g g g  
 c t g c g c t c a c t g a g g g a a c t g g g c a g t g g a c t g g c c c t c a  
 t c c a c c a t a a c a c c c a c c t c t g c t t c g t g c a c a c g g t g c c  
 c t g g g a c c a g c t c t t c g g a a c c c g c a c c a a g c t c t g c t c  
 c a c a c t g c c a a c c g g c c a g a g g a c g a g g a g t g t g g g c g a g g  
 g c c t g g c c t g c c a c c a g c t g t g c g c c c g a g g g g c a g c a g a a  
 g a t c c g g a a g t a c a c g a t g c g g a g a c t g c a g g a a a c g  
 g a g c t g g t g g a g g c c g c t g a c a c c t a g c g g a g c g a t g c c c a  
 a c c a g g c g c a g a t g c g g a t c c t g a a a a g a g a c g g g a g c t g a g  
 g a a g g t g a a g g t g c t t g g a t c t g g c g c t t t g g c a c a g t c  
 t a c a a g g g c a t c t g g a t c c c t g a t g g g g a g a a t g t g a a a a a  
 t t c c a g t g g c c a t c a a a g t g t g a g g g a a a a c a c a t c c c c  
 c a a a g c c a a c a a a a g a a a a t c t t a g a c g a a g c a t a c g t g a t g  
 g c t g g t g t g g g c t c c c c a t a t g t c t c c c g c c t t c t g g g c a  
 t c t g c c t g a c a t c c a c g g t g c a g c t g g t g a c a c a g c t t a t  
 g c c c t a t g g c t g c c t t a g a c t a a t c t a g a c c c c g g g c c a  
 c t a a c t c a a c g c t a g t g g a t t t a a t c c c a a a t g a g g c c  
 a a c a g a a c c a g a a c c a g a a a c a g a a c a g t a a c a t t g g a g  
 t t a g a a a t g g a a g a a a a a a g c a a t g a t t t c g t g t g a a a  
 t a a t g c a c g a a a a t c a t t g c t t a t t t t a a a a a g c g a t a  
 t a c t a g a t a a c g a a a a c a a c g a a c t g a a t a a a a g a a a t a c a  
 10  
 20  
 30  
 40  
 50

a a a a a a g a g g c c a c g a c c a g t t a a a g g c c t g a g a a a c t t t a a  
 c t g c g a g c c t t a a t t g a t t a c c a c c a a t c a a t t a a a g a a g  
 t c g a g a c c c a a a a a t t t g g t a a a g t a t t a a t t a c t t t a t t  
 a a t c a g a t a c t t a a a t a t c t g t a a a c c c a t t a t a t c g g g t  
 t t t g a g g g g a t t t c a a g t c t t a a g a a g a g a t a c c a g g c a a  
 t c a a t t a a g a a a a a c t t a g t c t t g c c t t t t g t t g t g  
 a t t c a a c t t t g a t c g t a g c t t c t a a c t a a t t a a t t t t c g t  
 a a g a a a a g g a g a a c a g c t g a a t g a a t a t c c c t t t g t t g t a  
 g a a a c t g t g c t t c a t g a c g g c t t g t t a a g t a c a a a t t t a  
 a a a a t a g t a a a a t t c g c t c a a t c a c t a c c a a g c c a g g t a a  
 a a g t a a a g g g g c t a t t t t g c g t a t c g c t c a a a a a a a a g c  
 a t g a t t g g c g g a c g t g g c g t t g t t c t g a c t t c c g a a g a a g  
 c g a t t c a c g a a a a a t c a a g a t a c a t t a c g c a t t g g a c a c c  
 a a a c g t t a t c g t a t g g t a c g t a t g c a g a c g a a a a c c g t  
 t c a t a c a c t a a a g g a c a t t c t g a a a a c a a t t a a g a c a a a a  
 t c a a t a c c t t c t t a t t g a t t t g a t a t t c a c a c g g a a a a  
 a g a a a c t a t t c a g c a a g c g a t a t t t a a c a a c a g c t a t t  
 g a t t t a g g t t t a t g c c t a c g t t a a t t a a t c a a a t c t g a t a  
 a a g g t t a t c a a g c a t a t t t g t t t a g a a a c g c c a g t c t a  
 t g t g a c t t c a a a a t c a g a a t t t a a a t c t g t c a a a a g c a g c c  
 a a a a t a a t c t c g c a a a a a t t c c g a g a a t a t t t g g a a a g t  
 c t t t g c c a g t t g a t c t a a c g t g c a a t c a t t t g g g a t t g c  
 t c g t a t a c c a a g a a c g g a c a a t g t a g a a t t t t g a t c c c  
 a a t t a c c g t t a t t c t t c a a a g a a t g g c a a g a t t g g t c t t  
 t c a a a c a a a c a g a t a a a g g g c t t t a c t c g t t c a a g t c t  
 a a c g g t t t a a g c g g t a c a g a a g g c a a a a a a c a a g t a g a t  
 g a a c c c t g g t t a a t c t c t t a t t g c a c g a a a c g a a a t t t  
 c a g g a a a a a g g g t t t a g t a g g g c g c a a t a g c g t t a t g t t  
 t a c c c t c t t t a g c c t a c t t a g t t c a g g c t a t t c a a t c  
 g a a a c g t g c g a a t a a t a t g t t g a g t t t a a t a a t c g a t  
 t a g a t c a a c c t t a g a a g a a a a a g a a g t a a t c a a a a t t g t  
 t a g a a g t g c c t a t t c a g a a a a a c t a t c a a g g g g c t a a t a g g  
 g a a t a c a t a c c a t t c t t g c a a a g c t t g g g t a t c a a g t g  
 a t t a a c c a g t a a a g a t t t a t t g t c c g t c a a g g g t g g t t  
 t a a a t t c a a g a a a a a a a g a a g c g a a c g t c a a c g t g t t c a t  
 t t g t c a g a a t t g g a a a g a a g a t t a a t g g c t t a t a t t a g c g  
 a a a a a a a g c g a t g t a t a c a a g c c t t a t t a g c g a c g a c c a a  
 a a a a g a g a t t a g a a g a g t g c t a g g c a t t c c t g a a c g g g a c a  
 t t a g a t a a a t t g c t g a a g g t a c t g a a g g c g a a t c a g g a a a  
 t t t c t t a a g a t t a a a c c a g g a a g a a a t g g t g g c a t t c a  
 a c t t g c t a g t g t t a a t c a t t g t g c t a t c g a t c a t t a a a  
 t t a a a a a a a g a a g a a a c g g a a g c t a t a t a a a g g g c g c t g a  
 c a g c t t c g t t a a t t a g a a a c g g t a c a t t a t t c a a g a a a c  
 t c t a a a c a a a t t g g c a g a a c g c c c a a a a c g g a c c c a c a a  
 c t c g a t t g t t a g c t a c g a t a c a g g c t g a a a a a t a a a a c c  
 c g c a c t a t g c c a t t a c a t t a t a t c t a t g a t a c g t g t t g  
 t t t t c t t t g c t g g c t a g c t t a a t t g c t t a t t a c c t g  
 c a a t a a a g g a t t t c t a c t t c c a t t a t a c t c c c a t t t c c  
 a a a a a c a t a c g g g g a a c a c g g g a a c t t a t t g t a c a g g c c a  
 c c t c a t a g t t a a t g g t t t c g a g c c t t c c t g c a a t c t c a t c  
10  
20  
30  
40  
50

c a t g g a a a t a t a t c a t c c c c c t g c c g g c c t a t t a a t g t g  
 a c t t t t g t g c c c g g c g g a t a t t c c t g a t c c a g c t c c a c c a  
 t a a a t t g g t c c a t g c a a a t t c g g c c g g c a a t t t c a g g c g  
 t t t c c c t t c a c a a g g a t g t c g g t c c c t t c a a t t t c g g  
 a g c c a g c c g t c c g c a t a g c c t a c a g g c a c c g t c c c g a t c c  
 a t g t g t c t t t c c g c t g t g t a c t c g g c t c c g t a g c t g a c  
 g c t c t c g c c t t t c t g a t c a g t t g a c a t g t g a c a g t g t c  
 g a a t g c a g g g t a a a t g c c g g a c g c a g c t g a a a c g g t a t c t  
 c g t c c g a c a t g t c a g c a g a c g g g c g a a g g c c a t a c a t g c c  
 g a t g c c g a a t c t g a c t g c a t t a a a a a g c c t t t t c a g c  
 c g g a g t c c a g c g g c g c t g t t c g c g c a g t g g a c c a t t a g  
 t c t t t a a c g g c a g c g g a g c a a t c a g c t c t t a a a g c g c t c  
 a a a c t g c a t t a a g a a a a t a g c c t c t t c t t t c a t c c g c t  
 g t c g c a a a a t g g g t a a a t a c c c c t t t g c a c t t t a a a c g a g  
 g g t t g c g g t c a a g a a t t g c c a t c a c g t t c t g a a c t t c t t c  
 c t c t g t t t t a c a c c a a g t c t g t t c a t c c c c g t a t c g a c c  
 t t c a g a t g a a a a t g a a g a g a a c c t t t t c g t g t g g c g g g  
 c t g c c t c c t g a a g c c a t t c a a c a g a a t a a c c t g t t a a g g t  
 c a c g t c a t a c t c a g c a g c g a t t g c c a c a t a c t c c g g g g g  
 a a c c g c g c c a a g c a c c a a t a t a g g c g c c t t c a a t c c c t t t  
 t g c g c a g t g a a a a t c g c t t c a t c c a a a a t g g c c a c g g c c a a  
 g c a t g a a g c a c c t g c g t c a a g a g c a g c c t t t g c t g t t c t  
 g c a t c a c c a t g c c c g t a g g c g t t g c t t c a c a a c t g c c a  
 t c a a g t g g a c a t g t t c a c c g a t a t g t t t t c a t a t t g c t  
 g a c a t t t c c t t t a t c g c g g a c a a g t c a a t t t c c g c c c a c  
 g t a t c t c t g t a a a a a g g t t t g t g c t c a t g g a a a a c t c c t  
 c t c t t t t t c a g a a a a t c c c a g t a c g t a a t t a a g t a t t g  
 a g a a t t a a t t t a t t g a t t a a t a c t a a g t t t a c c c a g t  
 t t t c a c c t a a a a a c a a a a t g a t g a g a t a a t a g c t c c a a a g  
 g c t a a a a g a g g a c t a c c a a c t a t t g t t a a t t a a ( S E D  
 I D 番号 : 5 3 )  
 ( 実施例 2 )  
 【 0 2 3 1 】  
A D X S 3 1 - 1 6 4 は、 L M - L L O - C h H E R 2 と同じく免疫原性である。

## 【 0 2 3 2 】

抗 H E R 2 / n e u に特異的な細胞毒性 T 細胞を発生するうえでの A D X S 3 1 - 1 6 4 の免疫原性の特性が、標準的な C T L アッセイで L m - L L O - C h H e r 2 ワクチンのものと比較された。両方のワクチンは、 3 T 3 / n e u 標的細胞によって発現される H E R 2 / n e u 抗原に対して強いが同等の細胞毒性 T 細胞応答を引き出す。したがって、 L L O に対して H e r 2 に融合された細胞内断片のみを発現するリストリアを用いて免疫化されたマウスは、より多くの M H C クラス I エピトープを含有するキメラより低い溶解活性を示す。無処置の動物、または無関連リストリアワクチンを注射したマウスでは C T L 活性は検出されなかった(図 2 A)。A D X S 3 1 - 1 6 4 は、野生型 F V B / N マウスからの脾細胞によって I F N - α の分泌を刺激することもできる(図 2 B)。これはマイトイシン C で処理された N T - 2 細胞と共に培養されたこれらの細胞のカルチャーパンクリエーションの中で検出され、これらは高いレベルの H E R 2 / n e u 抗原(図 5 C)を発現する。

## 【 0 2 3 3 】

ヒト M H C クラス I エピトープの A D X S 3 1 - 1 6 4 を用いた免疫化後の適切な処置および提示は、 H L A - A 2 マウスで試験された。免疫化した H L A - A 2 トランジェニックからの脾細胞は、マッピングした H L A - A 2 で制限されたエピトープに対応する

10

20

30

40

50

ペプチドと72時間の間、共インキュベートされ、このペプチドはHER2/neu分子の細胞外(HLYQGCQVV配列番号:11もしくはKIFGSLAFL配列番号:12)、または細胞内(RLLQETELV配列番号:13)領域に位置する(図2C)。組み換え型ChHerr2タンパク質は、正の対照、および無関連ペプチド、または負の対照としてペプチドなしで使用された。この実験からのデータは、ADXS31-164が抗HER2/neuに特異的な免疫応答を標的化した抗原の異なるドメインに位置するヒトエピトープへと引き出すことができることを示す。

(実施例3)

【0234】

ADXS31-164は、自然発生的な乳腺腫瘍の発症の防止には、Lm-LLO-C  
hHER2より有効である。

10

【0235】

ADXS31-164の抗腫瘍効果が、Lm-LLO-ChHerr2とHER2/neuトランスジェニック動物において比較され、この動物は生後20~25週間で増殖の遅い自然発生的な乳腺腫瘍を発生した。無関連リストリア対照ワクチンを用いて免疫化されたすべての動物は、21~25週の間に乳房の腫瘍を発生し、33週の前に犠牲にされた。対照的に、リストリア-HER2/neu組み換え型ワクチンは、乳腺腫瘍の形成の著しい遅延を生じた。45週には、50%を超えるADXS31-164をワクチン接種したマウス(9匹のうち5匹)は、まだ腫瘍がなく、これはLm-LLO-ChHerr2を用いて免疫化したマウスの25%と比較される。52週には、ADXS31-164を用いて免疫化した8匹のうち2匹のマウスは、まだ腫瘍を有しないままであったが、一方で他の実験的な群からのマウスはすべて、すでにこれらの疾患に屈服していた(図3)。これらの結果は、ADXS31-164はより弱毒化しているにもかかわらず、HER2/neuトランスジェニック動物の自然発生的な乳腺腫瘍の発症の防止ではLm-LLO-ChHerr2より有効であることを示す。

20

(実施例4)

【0236】

ADXS31-164を用いた免疫化の際のHER2/NEU遺伝子での突然変異。

【0237】

HER2/neuのMHCクラスIエピトープ内の突然変異は、小さい分量のワクチンまたはトラスツズマブ(ハーセプチン)(HER2/neuの細胞外領域でエピトープを標的化するモノクローナル抗体)を用いた免疫化の際にエスケープした腫瘍を担当すると考えられてきた。これを評価するために、トランスジェニック動物内のエスケープした腫瘍からゲノム材料が抽出され、キメラワクチンまたは対照ワクチンを用いて免疫化した腫瘍内のneu遺伝子の対応する断片を配列決定した。いかなるワクチン接種した腫瘍サンプルのHER2/neu遺伝子の中にも突然変異が観察されなかったことは、代替的なエスケープ機構を示唆する(データ示さず)。

30

(実施例5)

【0238】

ADXS31-164は、腫瘍内の調節性T細胞の著しい減少を生じる。

40

【0239】

脾臓および腫瘍内の調節性T細胞の頻度に対するADXS31-164の効果を解明するために、マウスにNT-2腫瘍細胞を移植した。3回の免疫化の後、脾細胞および腫瘍内のリンパ球が分離され、Tregのために染色した。これらは、CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>細胞と定義されたが、別個に解析したとき、FoxP3マーカーまたはCD25マーカーのいずれかを用いて同等の結果が得られた。この結果は、無関連リストリアワクチンまたは無処置の動物と比較して、ADXS31-164を用いた免疫化は、脾臓内のTregの頻度については効果を有しないことを示した(図4参照)。対照的に、リストリアワクチンを用いた免疫化は、腫瘍内のTregの存在に少なからぬ影響を生じた(図5A)。処理されていない腫瘍ではすべてのCD3<sup>+</sup>T細胞の平均で

50

19.0%がTregであったが、この頻度は無関連ワクチンについては4.2%に減少し、ADX31-164については3.4%と腫瘍内のTregの頻度が5分の1に減少した(図5B)。いずれかのLmddAワクチンで処置したマウスでの腫瘍内のTregの頻度の減少は、腫瘍のサイズの差異には貢献しなかった。代表的実験では、ADX31-164を用いて免疫化したマウスからの腫瘍(平均直径(mm)±SD:6.71±0.43、n=5)は、未処置マウス(8.69±0.98、n=5、p<0.01)、または無関連ワクチン(8.41±1.47、n=5、p=0.04)で処置されたマウスからの腫瘍より著しくより小さかったが、一方で後者のこれら2つの群の比較は腫瘍サイズでは統計的な有意さを示さなかった(p=0.73)。LmddAワクチンで処置した腫瘍内のTregのより低い頻度は、腫瘍内のCD8/Treg比の増加をもたらし、LmddAワクチンを用いた免疫化後により好ましい腫瘍の微小環境を得ることができる事を示唆する。しかしながら、標的抗原HER2/neu(ADX31-164)を発現するワクチンのみが腫瘍増殖を減少することができ、Tregの減少は腫瘍内で抗原特異的な応答が存在するときのみ効果を有することを示す。

(実施例6)

【0240】

HER-2キメラを発現するリステリアワクチンによってエスケープ変異が導入されない

【0241】

Lm-LLO-138、LmddA164、および無関連ワクチンLm-LLO-NYなどの異なるワクチンを用いて免疫化したマウスの腫瘍サンプルを採取した。これらのサンプルからDNAを精製し、HER2/neu領域に対応するDNA断片、IC1、EC1、およびEC2を增幅し、何らかの免疫エスケープ変異があるかどうかを決定するために配列決定した。CLUSTALWを使用して各々のDNAからの配列のアラインメントを遂行した。解析の結果腫瘍から採取したDNA配列内には突然変異がないことを示した。これらの配列の詳細な解析を以下に示す。

EC2のアラインメント(975-1029bpのHER2/neu)

【0242】

参照 GGTCACAGCTGAGGGACGGAACACACAGCGTTGTGAGAA  
AATGCAGCAAGCCCTGTGCT (配列番号:14)  
Lm-LLO-138-2 GGTCACAGCTGAGGGACGGAACACACAGCG  
TTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT  
Lm-LLO-138-3 GGTCACAGCTGAGGGACGGAACACACAGCG  
TTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT  
Lm-ddA-164-1 GGTCACAGCTGAGGGACGGAACACACAGCG  
TTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT  
LmddA164-2 GGTCACAGCTGAGGGACGGAACACACAGCGT  
TGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT  
Lm-ddA-164-3 GGTCACAGCTGAGGGACGGAACACACAGCG  
TTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT  
LmddA164-4 GGTCACAGCTGAGGGACGGAACACACAGCGT  
TGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT  
Lm-ddA-164-5 GGTCACAGCTGAGGGACGGAACACACAGCG  
TTGTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT  
LmddA-164-6 GGTCACAGCTGAGGGACGGAACACACAGCG  
TTCTGAGAAATGCAGCAAGCCCTGTGCT

【0243】

参照 CGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACCCTTCGA  
GGGGCGAGGGGCCATCACCAAGTGAC (配列番号:15)

Lm-LLO-138-2 CGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAG

10

20

30

40

50

C A C C T T C G A G G G G C G A G G G C C A T C A C C A G T G A C  
Lm - LLO - 138 - 3 CG A G T G T G C T A T G G T C T G G G C A T G G A G  
C A C C T T C G A G G G G C G A G G G C C A T C A C C A G T G A C  
Lm - d d A - 164 - 1 CG A G T G T G C T A T G G T C T G G G C A T G G A G  
C A C C T T C G A G G G G C G A G G G C C A T C A C C A G T G A C  
Lm d d A 164 - 2 CG A G T G T G C T A T G G T C T G G G C A T G G A G  
A C C T T C G A G G G G C G A G G G C C A T C A C C A G T G A C  
Lm - d d A - 164 - 3 CG A G T G T G C T A T G G T C T G G G C A T G G A G  
C A C C T T C G A G G G G C G A G G G C C A T C A C C A G T G A C  
Lm d d A 164 - 4 CG A G T G T G C T A T G G T C T G G G C A T G G A G C 10  
A C C T T C G A G G G G C G A G G G C C A T C A C C A G T G A C  
Lm - d d A - 164 - 5 CG A G T G T G C T A T G G T C T G G G C A T G G A G  
C A C C T T C G A G G G G C G A G G G C C A T C A C C A G T G A C  
Lm d d A - 164 - 6 CG A G T G T G C T A T G G T C T G G G C A T G G A G  
C A C C T T C G A G G G G C G A G G G C C A T C A C C A G T G A C  
【0244】

参照 A A T G T C C A G G A G T T T G A T G G C T G C A A G A A G A T C T T T  
G G G A G C C T G G C A T T T T G C C G G A G (配列番号 : 16) 20  
Lm - LLO - 138 - 2 A A T G T C C A G G A G T T T G A T G G C T G C A A G  
A A G A T C T T T G G G A G C C T G G C A T T T T G C C G G A G  
Lm - LLO - 138 - 3 A A T G T C C A G G A G T T T G A T G G C T G C A A G  
A A G A T C T T T G G G A G C C T G G C A T T T T G C C G G A G  
Lm - d d A - 164 - 1 A A T G T C C A G G A G T T T G A T G G C T G C A A G  
A A G A T C T T T G G G A G C C T G G C A T T T T G C C G G A G  
Lm d d A 164 - 2 A A T G T C C A G G A G T T T G A T G G C T G C A A G A  
A G A T C T T T G G G A G C C T G G C A T T T T G C C G G A G  
Lm - d d A - 164 - 3 A A T G T C C A G G A G T T T G A T G G C T G C A A G  
A A G A T C T T T G G G A G C C T G G C A T T T T G C C G G A G  
Lm d d A 164 - 4 A A T G T C C A G G A G T T T G A T G G C T G C A A G A 30  
A G A T C T T T G G G A G C C T G G C A T T T T G C C G G A G  
Lm - d d A - 164 - 5 A A T G T C C A G G A G T T T G A T G G C T G C A A G  
A A G A T C T T T G G G A G C C T G G C A T T T T G C C G G A G  
Lm d d A - 164 - 6 A A T G T C C A G G A G T T T G A T G G C T G C A A G  
A A G A T C T T T G G G A G C C T G G C A T T T T G C C G G A G  
【0245】

参照 A G C T T T G A T G G G G A C C C C T C C C T C C G G C A T T G C T C C G  
C T G A G G C C T G A G C A G C T C C A A G T G (配列番号 : 17) 40  
Lm - LLO - 138 - 2 A G C T T T G A T G G G G A C C C C T C C C T C C G G C  
A T T G C T C C G C T G A G G C C T G A G C A G C T C C A A G T G  
t Lm - LLO - 138 - 3 A G C T T T G A T G G G G A C C C C T C C C T C C G G  
C A T T G C T C C G C T G A G G C C T G A G C A G C T C C A A G T G  
Lm - d d A - 164 - 1 A G C T T T G A T G G G G A C C C C T C C C T C C G G C  
A T T G C T C C G C T G A G G C C T G A G C A G C T C C A A G T G  
Lm d d A 164 - 2 A G C T T T G A T G G G G A C C C C T C C C T C C G G C A  
T T G C T C C G C T G A G G C C T G A G C A G C T C C A A G T G  
Lm - d d A - 164 - 3 A G C T T T G A T G G G G A C C C C T C C C T C C G G C  
A T T G C T C C G C T G A G G C C T G A G C A G C T C C A A G T G  
Lm d d A 164 - 4 A G C T T T G A T G G G G A C C C C T C C C T C C G G C A  
T T G C T C C G C T G A G G C C T G A G C A G C T C C A A G T G  
Lm - d d A - 164 - 5 A G C T T T G A T G G G G A C C C C T C C C T C C G G C C 50

A T T G C T C C G C T G A G G C C T G A G C A G C T C C A A G T G  
 L m d d A - 1 6 4 - 6      A G C T T T G A T G G G G A C C C C T C C T C C G G C  
 A T T G C T C C G C T G A G G C C T G A G C A G C T C C A A G T G  
 【 0 2 4 6 】

参照    T T C G A A A C C C T G G A G G A G A T C A C A G G T T A C C T G T A C  
 A T C T C A G C A T G G C C A G A C A G T C T C ( 配列番号 : 1 8 )

L m - L L O - 1 3 8 - 2    T T C G A A A C C C T G G A G G A G A T C A C A G G T  
 T A C C T G T A C A T C T C A G C A T G G C C A G A C A G T C T C

L m - L L O - 1 3 8 - 3    T T C G A A A C C C T G G A G G A G A T C A C A G G T  
 T A C C T G T A C A T C T C A G C A T G G C C A G A C A G T C T C

10

L m - d d A - 1 6 4 - 1    T T C G A A A C C C T G G A G G A G A T C A C A G G T  
 T A C C T G T A C A T C T C A G C A T G G C C A G A C A G T C T C

L m d d A 1 6 4 - 2    T T C G A A A C C C T G G A G G A G A T C A C A G G T  
 A C C T G T A C A T C T C A G C A T G G C C A G A C A G T C T C

L m - d d A - 1 6 4 - 3    T T C G A A A C C C T G G A G G A G A T C A C A G G T  
 T A C C T G T A C A T C T C A G C A T G G C C A G A C A G T C T C

L m d d A 1 6 4 - 4    T T C G A A A C C C T G G A G G A G A T C A C A G G T  
 A C C T G T A C A T C T C A G C A T G G C C A G A C A G T C T C

L m - d d A - 1 6 4 - 5    T T C G A A A C C C T G G A G G A G A T C A C A G G T  
 T A C C T G T A C A T C T C A G C A T G G C C A G A C A G T C T C

20

L m d d A - 1 6 4 - 6    T T C G A A A C C C T G G A G G A G A T C A C A G G T  
 T A C C T G T A C A T C T C A G C A T G G C C A G A C A G T C T C

【 0 2 4 7 】

参照    C G T G A C C T C A G T G T C T T C C A G A A C C T T C G A A T C A T T  
 C G G G G A C G G A T T C T C C A C G A T G G C ( 配列番号 : 1 9 )

L m - L L O - 1 3 8 - 2    C G T G A C C T C A G T G T C T T C C A G A A C C T T  
 C G A A T C A T T C G G G G A C G G A T T C T C C A C G A T G G C

L m - L L O - 1 3 8 - 3    C G T G A C C T C A G T G T C T T C C A G A A C C T T  
 C G A A T C A T T C G G G G A C G G A T T C T C C A C G A T G G C

L m - d d A - 1 6 4 - 1    C G T G A C C T C A G T G T C T T C C A G A A C C T T  
 C G A A T C A T T C G G G G A C G G A T T C T C C A C G A T G G C

30

L m d d A 1 6 4 - 2    C G T G A C C T C A G T G T C T T C C A G A A C C T T C  
 G A A T C A T T C G G G G A C G G A T T C T C C A C G A T G G C

L m - d d A - 1 6 4 - 3    C G T G A C C T C A G T G T C T T C C A G A A C C T T  
 C G A A T C A T T C G G G G A C G G A T T C T C C A C G A T G G C

L m d d A 1 6 4 - 4    C G T G A C C T C A G T G T C T T C C A A A A C C T T C  
 G A A T C A T T C G G G G A C G G A T T C T C C A C G A T G G C

L m - d d A - 1 6 4 - 5    C G T G A C C T C A G T G T C T T C C A A A A C C T T  
 C G A A T C A T T C G G G G A C G G A T T C T C C A C G A T G G C

L m d d A - 1 6 4 - 6    C G T G A C C T C A G T G T C T T C C A A A A C C T T  
 C G A A T C A T T C G G G G A C G G A T T C T C C A C G A T G G C

40

【 0 2 4 8 】

参照    G C G T A C T C A T T G A C A C T G C A A G G C C T G G G G A T C C A C  
 T C G C T G G G G C T G C G C T C A C T G C G G ( 配列番号 : 2 0 )

L m - L L O - 1 3 8 - 2    G C G T A C T C A T T G A C A C T G C A A G G C C T G  
 G G G A T C C A C T C G C T G G G G C T G C G C T C A C T G C G G

L m - L L O - 1 3 8 - 3    G C G T A C T C A T T G A C A C T G C A A G G C C T G  
 G G G A T C C A C T C G C T G G G G C T G C G C T C A C T G C G G

L m - d d A - 1 6 4 - 1    G C G T A C T C A T T G A C A C T G C A A G G C C T G  
 G G G A T C C A C T C G C T G G G G C T G C G C T C A C T G C G G

50

L m d d A 1 6 4 - 3     G C G T A C T C A T T G A C A C T G C A A G G C C T G G  
 G G A T C C A C T C G C T G G G G C T G C G C T C A C T G C G G  
 L m - d d A - 1 6 4 - 5     G C G T A C T C A T T G A C A C T G C A A G G C C T G  
 G G G A T C C A C T C G C T G G G G C T G C G C T C A C T G C G G  
 L m - d d A - 1 6 4 - 6     G C G T A C T C A T T G A C A C T G C A A G G C C T G  
 G G G A T C C A C T C G C T G G G G C T G C G C T C A C T G C G G

【 0 2 4 9 】

参照     G A G C T G G G C A G T G G A T T G G C T C T G A T T C A C C G C A A C  
 G C C C A T C T C T G C T T G T A C A C A C T ( 配列番号 : 2 1 )

L m - L L O - 1 3 8 - 2     G A G C T G G G C A G T G G A T T G G C T C T G A T T    10  
 C A C C G C A A C G C C C A T C T C T G C T T G T A C A C A C T

L m - L L O - 1 3 8 - 3     G A G C T G G G C A G T G G A T T G G C T C T G A T T  
 C A C C G C A A C G C C C A T C T C T G C T T G T A C A C A C T

L m - d d A - 1 6 4 - 1     G A G C T G G G C A G T G G A T T G G C T C T G A T T  
 C A C C G C A A C G C C C A T C T C T G C T T G T A C A C A C T

L m d d A 1 6 4 - 3     G A G C T G G G C A G T G G A T T G G C T C T G A T T C  
 A C C G C A A C G C C C A T C T C T G C T T G T A C A C A C T

L m - d d A - 1 6 4 - 5     G A G C T G G G C A G T G G A T T G G C T C T G A T T  
 C A C C G C A A C G C C C A T C T C T G C T T G T A C A C A C T

L m - d d A - 1 6 4 - 6     G A G C T G G G C A G T G G A T T G G C T C T G A T T  
 C A C C G C A A C G C C C A T C T C T G C T T G T A C A C A C T    20

【 0 2 5 0 】

参照     G T A C C T T G G G A C C A G C T C T T C C G G A A C C C A C A T C A G  
 G C C C T G C T C C A C A G T G G G A A C C G G ( 配列番号 : 2 2 )

L m - L L O - 1 3 8 - 2     G T A C C T T G G G A C C A G C T C T T C C G G A A C  
 C C A C A T C A G G C C C T G C T C C A C A G T G G G A A C C G G

L m - L L O - 1 3 8 - 3     G T A C C T T G G G A C C A G C T C T T C C G G A A C  
 C C A C A T C A G G C C C T G C T C C A C A G T G G G A A C C G G

L m - d d A - 1 6 4 - 1     G T A C C T T G G G A C C A G C T C T T C C G G A A C  
 C C A C A T C A G G C C C T G C T C C A C A G T G G G A A C C G G    30

L m d d A 1 6 4 - 3     G T A C C T T G G G A C C A G C T C T T C C G G A A C C  
 C A C A T C A G G C C C T G C T C C A C A G T G G G A A C C G G

L m - d d A - 1 6 4 - 5     G T A C C T T G G G A C C A N C T C T T C C G G A A C  
 C C A C A T C A G G C C C T G C T C C A C A G T G G G A A C C G G

L m - d d A - 1 6 4 - 6     G T A C C T T G G G A C C A G C T C T T C C G G A A C  
 C C A C A T C A G G C C C T G C T C C A C A G T G G G A A C C G G

【 0 2 5 1 】

参照     C C G G A A G A G G A T T G T G G T C T C G A G G G C T T G G T C T G T  
 A A C T C A C T G T G T G C C C A C G G G C A C ( 配列番号 : 2 3 )

L m - L L O - 1 3 8 - 2     C C G G A A G A G G A T T G T G G T C T C G A G G G C  
 T T G G T C T G T A A C T C A C T G T G T G C C C A C G G G C A C    40

L m - L L O - 1 3 8 - 3     C C G G A A G A G G A T T G T G G T C T C G A G G G C  
 T T G G T C T G T A A C T C A C T G T G T G C C C A C G G G C A C

L m - d d A - 1 6 4 - 1     C C G G A A G A G G A T T G T G G T C T C G A G G G C  
 T T G G T C T G T A A C T C A C T G T G T G C C C A C G G G C A C

L m d d A 1 6 4 - 3     C C G G A A G A G G A T T G T G G T C T C G A G G G C T  
 T G G T C T G T A A C T C A C T G T G T G C C C A C G G G C A C

L m - d d A - 1 6 4 - 6     C C G G A A G A G G A T T G T G G T C T C G A G G G C  
 T T G G T C T G T A A C T C A C T G T G T G C C C A C G G G C A C

【 0 2 5 2 】

50



GAGCTTTGGC ACT GTCTACAAGGGCATCTGGA  
 Lm-ddA164-6 TAAGGAAAGGTGAAGG TGCTTGGATCAG  
 GAGCTTTGGC ACT GTCTACAAGGGCATCTGGA  
 【0255】

参照 TCCCAGATGGGGAGAACATGTGAAAATCCCCGTGGCTA  
 TCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT (配列番号: 27)

Lm-LLO-NY-1 TCCCAGATGGGGAGAACATGTGAAAATCC  
 CCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

Lm-LLO-NY-2 TCCCAGATGGGGAGAACATGTGAAAATCC  
 CCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT 10

Lm-LLO-138-1 TCCCAGATGGGGAGAACATGTGAAAATCC  
 CCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

Lm-LLO-138-2 TCCCAGATGGGGAGAACATGTGAAAATCC  
 CCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

Lm-LLO-138-3 TCCCAGATGGGGAGAACATGTGAAAATCC  
 CCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

Lm-LLO-138-4 TCCCAGATGGGGAGAACATGTGAAAATCC  
 CCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

Lm-ddA-164-1 TCCCAGATGGGGAGAACATGTGAAAATCC  
 CCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT 20

Lm-ddA-164-2 TCCCAGATGGGGAGAACATGTGAAAATCC  
 CCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

Lm-ddA-164-3 TCCCAGATGGGGAGAACATGTGAAAATCC  
 CCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

Lm-ddA-164-4 TCCCAGATGGGGAGAACATGTGAAAATCC  
 CCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

Lm-ddA-164-5 TCCCAGATGGGGAGAACATGTGAAAATCC  
 CCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT

Lm-ddA164-6 TCCCAGATGGGGAGAACATGTGAAAATCC  
 CCGTGGCTATCAAGGTGTTGAGAGAAAACACAT 30

【0256】

参照 CTCCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAGATGAAGCGT  
 ATGTGATGGCTGGTGTTCTC (配列番号: 28)

Lm-LLO-NY-1 CTCCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAG  
 ATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTTCTC

Lm-LLO-NY-2 CTCCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAG  
 ATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTTCTC

Lm-LLO-138-1 CTCCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAG  
 ATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTTCTC

Lm-LLO-138-2 CTCCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAG  
 ATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTTCTC 40

Lm-LLO-138-3 CTCCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAG  
 ATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTTCTC

Lm-LLO-138-4 CTCCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAG  
 ATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTTCTC

Lm-ddA-164-1 CTCCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAG  
 ATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTTCTC

Lm-ddA-164-2 CTCCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAG  
 ATGAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTTCTC

Lm-ddA-164-3 CTCCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAG 50

ATGAAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC  
 Lm-ddA-164-4 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAG  
 ATGAAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC  
 Lm-ddA-164-5 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAG  
 ATGAAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC  
 Lm-ddA-164-6 CTCCTAAAGCCAACAAAGAAATTCTAG  
 ATGAAAGCGTATGTGATGGCTGGTGTGGGTTCTC

【0257】

参照 CGTATGTGTCCTGCCTGGCATCTGCCCTGACAT  
 CCACAGTACAGCTGGTGACACAGC (配列番号: 29) 10

Lm-LLO-NY-1 CGTATGTGTCCTGCCTGGCATCT  
 GCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

Lm-LLO-NY-2 CGTATGTGTCCTGCCTGGCATCT  
 GCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

Lm-LLO-138-1 CGTATGTGTCCTGCCTGGCATCT  
 GCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

Lm-LLO-138-2 CGTATGTGTCCTGCCTGGCATCT  
 GCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

Lm-LLO-138-3 CGTATGTGTCCTGCCTGGCATCT  
 GCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC 20

Lm-LLO-138-4 CGTATGTGTCCTGCCTGGCATCT  
 GCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

Lm-ddA-164-1 CGTATGTGTCCTGCCTGGCATCT  
 GCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

Lm-ddA-164-2 CGTATGTGTCCTGCCTGGCATCT  
 GCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

Lm-ddA-164-3 CGTATGTGTCCTGCCTGGCATCT  
 GCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

Lm-ddA-164-4 CGTATGTGTCCTGCCTGGCATCT  
 GCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC 30

Lm-ddA-164-5 CGTATGTGTCCTGCCTGGCATCT  
 GCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

Lm-ddA-164-6 CGTATGTGTCCTGCCTGGCATCT  
 GCCTGACATCCACAGTACAGCTGGTGACACAGC

【0258】

参照 TTATGCCCTACGGCTGCCCTTCTGGACCATGTCCTGAG  
 AACACCGAGGTCGCCCTAGGCTCCC (配列番号: 30)

Lm-LLO-NY-1 TTATGCCCTACGGCTGCCCTTCTGGACC  
 ATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCCTAGGCTCCC

Lm-LLO-NY-2 TTATGCCCTACGGCTGCCCTTCTGGACC  
 ATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCCTAGGCTCCC 40

Lm-LLO-138-1 TTATGCCCTACGGCTGCCCTTCTGGACC  
 ATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCCTAGGCTCCC

Lm-LLO-138-2 TTATGCCCTACGGCTGCCCTTCTGGACC  
 ATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCCTAGGCTCCC

Lm-LLO-138-3 TTATGCCCTACGGCTGCCCTTCTGGACC  
 ATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCCTAGGCTCCC

Lm-LLO-138-4 TTATGCCCTACGGCTGCCCTTCTGGACC  
 ATGTCCGAGAACACCGAGGTCGCCCTAGGCTCCC

Lm-ddA-164-1 TTATGCCCTACGGCTGCCCTTCTGGACC 50

A T G T C C G A G A A C A C C G A G G T C G C C T A G G C T C C C  
 L m - d d A - 1 6 4 - 2 T T A T G C C C T A C G G C T G C C T T C T G G A C C  
 A T G T C C G A G A A C A C C G A G G T C G C C T A G G C T C C C  
 L m - d d A - 1 6 4 - 3 T T A T G C C C T A C G G C T G C C T T C T G G A C C  
 A T G T C C G A G A A C A C C G A G G T C G C C T A G G C T C C C  
 L m - d d A - 1 6 4 - 4 T T A T G C C C T A C G G C T G C C T T C T G G A C C  
 A T G T C C G A G A A C A C C G A G G T C G C C T A G G C T C C C  
 L m - d d A - 1 6 4 - 5 T T A T G C C C T A C G G C T G C C T T C T G G A C C  
 A T G T C C G A G A A C A C C G A G G T C G C C T A G G C T C C C  
 L m - d d A - 1 6 4 - 6 T T A T G C C C T A C G G C T G C C T T C T G G A C C 10  
 A T G T C C G A G A A C A C C G A G G T C G C C T A G G C T C C C  
**【0259】**  
 参照 A G G A C C T G C T C A A C T G G T G T G T T C A G A T T G C C A A G G  
 G G A T G A G C T A C C T G G A G G A C G T G C (配列番号: 31)  
 L m - L L O - N Y - 1 A G G A C C T G C T C A A C T G G T G T G T T C A G A  
 T T G C C A A G G G G A T G A G C T A C C T G G A G G A C G T G C  
 L m - L L O - N Y - 2 A G G A C C T G C T C A A C T G G T G T G T T C A G A  
 T T G C C A A G G G G A T G A G C T A C C T G G A G G A C G T G C  
 L m - L L O - 1 3 8 - 1 A G G A C C T G C T C A A C T G G T G T G T T C A G A  
 T T G C C A A G G G G A T G A G C T A C C T G G A G G A C G T G C 20  
 L m - L L O - 1 3 8 - 2 A G G A C C T G C T C A A C T G G T G T G T T C A G A  
 T T G C C A A G G G G A T G A G C T A C C T G G A G G A C G T G C  
 L m - L L O - 1 3 8 - 3 A G G A C C T G C T C A A C T G G T G T G T T C A G A  
 T T G C C A A G G G G A T G A G C T A C C T G G A G G A C G T G C  
 L m - L L O - 1 3 8 - 4 A G G A C C T G C T C A A C T G G T G T G T T C A G A  
 T T G C C A A G G G G A T G A G C T A C C T G G A G G A C G T G C  
 L m - d d A - 1 6 4 - 1 A G G A C C T G C T C A A C T G G T G T G T T C A G A  
 T T G C C A A G G G G A T G A G C T A C C T G G A G G A C G T G C  
 L m - d d A - 1 6 4 - 2 A G G A C C T G C T C A A C T G G T G T G T T C A G A  
 T T G C C A A G G G G A T G A G C T A C C T G G A G G A C G T G C 30  
 L m - d d A - 1 6 4 - 3 A G G A C C T G C T C A A C T G G T G T G T T C A G A  
 T T G C C A A G G G G A T G A G C T A C C T G G A G G A C G T G C  
 L m - d d A - 1 6 4 - 4 A G G A C C T G C T C A A C T G G T G T G T T C A G A  
 T T G C C A A G G G G A T G A G C T A C C T G G A G G A C G T G C  
 L m - d d A - 1 6 4 - 5 A G G A C C T G C T C A A C T G G T G T G T T C A G A  
 T T G C C A A G G G G A T G A G C T A C C T G G A G G A C G T G C  
 L m - d d A - 1 6 4 - 6 A G G A C C T G C T C A A C T G G T G T G T T C A G A  
 T T G C C A A G G G G A T G A G C T A C C T G G A G G A C G T G C  
**【0260】**  
 参照 G G C T T G T A C A C A G G G A C C T G G C T G C C C G G A A T G T G C  
 T A G T C A A G A G T C C C A A C C A C G T C A (配列番号: 32) 40  
 L m - L L O - N Y - 1 G G C T T G T A C A C A G G G A C C T G G C T G C C C  
 G G A A T G T G C T A G T C A A G A G T C C C A A C C A C G T C A  
 L m - L L O - N Y - 2 G G C T T G T A C A C A G G G A C C T G G C T G C C C  
 G G A A T G T G C T A G T C A A G A G T C C C A A C C A C G T C A  
 L m - L L O - 1 3 8 - 1 G G C T T G T A C A C A G G G A C C T G G C T G C C C  
 G G A A T G T G C T A G T C A A G A G T C C C A A C C A C G T C A  
 L m - L L O - 1 3 8 - 2 G G C T T G T A C A C A G G G A C C T G G C T G C C C  
 G G A A T G T G C T A G T C A A G A G T C C C A A C C A C G T C A  
 L m - L L O - 1 3 8 - 3 G G C T T G T A C A C A G G G A C C T G G C T G C C C 50

G G A A T G T G C T A G T C A A G A G T C C C A A C C A C G T C A  
 L m - L L O - 1 3 8 - 4    G G C T T G T A C A C A G G G A C C T G G C T G C C C  
 G G A A T G T G C T A G T C A A G A G T C C C A A C C A C G T C A  
 L m - d d A - 1 6 4 - 1    G G C T T G T A C A C A G G G A C C T G G C T G C C C  
 G G A A T G T G C T A G T C A A G A G T C C C A A C C A C G T C A  
 L m - d d A - 1 6 4 - 2    G G C T T G T A C A C A G G G A C C T G G C T G C C C  
 G G A A T G T G C T A G T C A A G A G T C C C A A C C A C G T C A  
 L m - d d A - 1 6 4 - 3    G G C T T G T A C A C A G G G A C C T G G C T G C C C    10  
 G G A A T G T G C T A G T C A A G A G T C C C A A C C A C G T C A  
 L m - d d A - 1 6 4 - 5    G G C T T G T A C A C A G G G A C C T G G C T G C C C  
 G G A A T G T G C T A G T C A A G A G T C C C A A C C A C G T C A  
 L m - d d A 1 6 4 - 6    G G C T T G T A C A C A G G G A C C T G G C T G C C C  
 G G A A T G T G C T A G T C A A G A G T C C C A A C C A C G T C A  
**【 0 2 6 1 】**  
 参照    A G A T T A C A G A T T T C G G G C T G G C T C G G C T G C T G G A C A  
 T T G A T G A G A C A G A G T A C C A T G C A G (配列番号 : 3 3 )  
 L m - L L O - N Y - 1    A G A T T A C A G A T T T C G G G C T G G C T C G G C  
 T G C T G G A C A T T G A T G A G A C A G A G T A C C A T G C A G    20  
 L m - L L O - N Y - 2    A G A T T A C A G A T T T C G G G C T G G C T C G G C  
 T G C T G G A C A T T G A T G A G A C A G A G T A C C A T G C A G  
 L m - L L O - 1 3 8 - 1    A G A T T A C A G A T T T C G G G C T G G C T C G G C  
 T G C T G G A C A T T G A T G A G A C A G A G T A C C A T G C A G  
 L m - L L O - 1 3 8 - 2    A G A T T A C A G A T T T C G G G C T G G C T C G G C  
 T G C T G G A C A T T G A T G A G A C A G A G T A C C A T G C A G  
 L m - L L O - 1 3 8 - 3    A G A T T A C A G A T T T C G G G C T G G C T C G G C  
 T G C T G G A C A T T G A T G A G A C A G A G T A C C A T G C A G  
 L m - L L O - 1 3 8 - 4    A G A T T A C A G A T T T C G G G C T G G C T C G G C  
 T G C T G G A C A T T G A T G A G A C A G A G T A C C A T G C A G    30  
 L m - d d A - 1 6 4 - 1    A G A T T A C A G A T T T C G G G C T G G C T C G G C  
 T G C T G G A C A T T G A T G A G A C A G A G T A C C A T G C A G  
 L m - d d A - 1 6 4 - 2    A G A T T A C A G A T T T C G G G C T G G C T C G G C  
 T G C T G G A C A T T G A T G A G A C A G A G T A C C A T G C A G  
 L m - d d A - 1 6 4 - 3    A G A T T A C A G A T T T C G G G C T G G C T C G G C  
 T G C T G G A C A T T G A T G A G A C A G A G T A C C A T G C A G  
 L m - d d A - 1 6 4 - 4    A G A T T A C A G A T T T C G G G C T G G C T C G G C  
 T G C T G G A C A T T G A T G A G A C A G A G T A C C A T G C A G  
 L m - d d A - 1 6 4 - 5    A G A T T A C A G A T T T C G G G C T G G C T C G G C  
 T G C T G G A C A T T G A T G A G A C A G A G T A C C A T G C A G    40  
 L m - d d A 1 6 4 - 6    A G A T T A C A G A T T T C G G G C T G G C T C G G C  
 T G C T G G A C A T T G A T G A G A C A G A G T A C C A T G C A G  
**【 0 2 6 2 】**  
 参照    A T G G G G G C A A G G T G C C C A T C A A A T G G A T G G C A T T G G  
 A A T C T A T T C T C A G A C G C C G G T T C A (配列番号 : 3 4 )  
 L m - L L O - N Y - 1    A T G G G G G C A A G G T G C C C A T C A A A T G G A  
 T G G C A T T G G A A T C T A T T C T C A G A C G C C G G T T C A  
 L m - L L O - N Y - 2    A T G G G G G C A A G G T G C C C A T C A A A T G G A  
 T G G C A T T G G A A T C T A T T C T C A G A C G C C G G T T C A  
 L m - L L O - 1 3 8 - 1    A T G G G G G C A A G G T G C C C A T C A A A T G G A    50

T G G C A T T G G A A T C T A T T C T C A G A C G C C G G T T C A  
 Lm - LLO - 138 - 2 ATGGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGA  
 T G G C A T T G G A A T C T A T T C T C A G A C G C C G G T T C A  
 Lm - LLO - 138 - 3 ATGGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGA  
 T G G C A T T G G A A T C T A T T C T C A G A C G C C G G T T C A  
 Lm - LLO - 138 - 4 ATGGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGA  
 T G G C A T T G G A A T C T A T T C T C A G A C G C C G G T T C A  
 Lm - dda - 164 - 1 ATGGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGA  
 T G G C A T T G G A A T C T A T T C T C A G A C G C C G G T T C A  
 Lm - dda - 164 - 2 ATGGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGA 10  
 T G G C A T T G G A A T C T A T T C T C A G A C G C C G G T T C A  
 Lm - dda - 164 - 3 ATGGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGA  
 T G G C A T T G G A A T C T A T T C T C A G A C G C C G G T T C A  
 Lm - dda - 164 - 4 ATGGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGA  
 T G G C A T T G G A A T C T A T T C T C A G A C G C C G G T T C A  
 Lm - dda - 164 - 5 ATGGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGA  
 T G G C A T T G G A A T C T A T T C T C A G A C G C C G G T T C A  
 Lm - dda - 164 - 6 ATGGGGGCAAGGTGCCATCAAATGGA  
 T G G C A T T G G A A T C T A T T C T C A G A C G C C G G T T C A  
 【0263】 20

参照 CCCATCAGAGT GAT GT GT G G A G C T A T G G A G T G A C T G  
 T G T G G G A G C T G A T G A C T T T G G G G (配列番号 : 35 )

Lm - LLO - NY - 1 CCCATCAGAGT GAT GT GT G G A G C T A T G  
 G A G T G A C T G T G T G G G A G C T G A T G A C T T T G G G G  

Lm - LLO - NY - 2 CCCATCAGAGT GAT GT GT G G A G C T A T G  
 G A G T G A C T G T G T G G G A G C T G A T G A C T T T G G G G  

Lm - LLO - 138 - 1 CCCATCAGAGT GAT GT GT G G A G C T A T G  
 G A G T G A C T G T G T G G G A G C T G A T G A C T T T G G G G  

Lm - LLO - 138 - 2 CCCATCAGAGT GAT GT GT G G A G C T A T G  
 G A G T G A C T G T G T G G G A G C T G A T G A C T T T G G G G 30  

Lm - LLO - 138 - 3 CCCATCAGAGT GAT GT GT G G A G C T A T G  
 G A G T G A C T G T G T G G G A G C T G A T G A C T T T G G G G  

Lm - LLO - 138 - 4 CCCATCAGAGT GAT GT GT G G A G C T A T G  
 G A G T G A C T G T G T G G G A G C T G A T G A C T T T G G G G  

Lm - dda - 164 - 1 CCCATCAGAGT GAT GT GT G G A G C T A T G  
 G A G T G A C T G T G T G G G A G C T G A T G A C T T T G G G G  

Lm - dda - 164 - 2 CCCATCAGAGT GAT GT GT G G A G C T A T G  
 G A G T G A C T G T G T G G G A G C T G A T G A C T T T G G G G  

Lm - dda - 164 - 3 CCCATCAGAGT GAT GT GT G G A G C T A T G  
 G A G T G A C T G T G T G G G A G C T G A T G A C T T T G G G G  

Lm - dda - 164 - 4 CCCATCAGAGT GAT GT GT G G A G C T A T G  
 G A G T G A C T G T G T G G G A G C T G A T G A C T T T G G G G 40  

Lm - dda - 164 - 5 CCCATCAGAGT GAT GT GT G G A G C T A T G  
 G A G T G A C T G T G T G G G A G C T G A T G A C T T T G G G G  

Lm - dda - 164 - 6 CCCATCAGAGT GAT GT GT G G A G C T A T G  
 G A G T G A C T G T G T G G G A G C T G A T G A C T T T G G G G  
 【0264】  

参照 C C A A A C C T T A C G A T G G A A T C C C A G C C C G G G A G A T C C  
 C T G A T T G C T G G A G A A G G G A G A A (配列番号 : 36 )

Lm - LLO - NY - 1 C C A A A C C T T A C G A T G G A A T C C C A G C C C 50

GGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA  
 Lm - LLO - NY - 2 CCAACCTTACGATGGAATCCCAGCCC  
 GGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA  
 Lm - LLO - 138 - 1 CCAACCTTACGATGGAATCCCAGCCC  
 GGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA  
 Lm - LLO - 138 - 3 CCAACCTTACGATGGAATCCCAGCCC  
 GGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA  
 Lm - LLO - 138 - 4 CCAACCTTACGATGNAATCCCAGCCC  
 GGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA  
 Lm - dda164 - 6 CCAACCTTACGATGGAATCCCAGCCC  
 GGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA  
 Lm - dda - 164 - 2 CCAACCTTACGATGGAATCCCAGCCC  
 GGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA  
 Lm - LLO - 138 - 2 CCAACCTTACGATGGAATCCCAGCCC  
 GGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA  
 Lm - dda - 164 - 3 CCAACCTTACGATGGAATCCCAGCCC  
 GGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA  
 Lm - dda - 164 - 5 CCAACCTTACGATGGAATCCCAGCCC  
 GGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA  
 Lm - dda - 164 - 1 CCAACCTTACGATGGAATCCCAGCCC  
 GGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA  
 Lm - dda - 164 - 4 CCAACCTTACGATGGAATCCCAGCCC  
 GGGAGATCCCTGATTTGCTGGAGAAGGGAGAA  
**【0265】**  
 参照 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACCATTTGATGTC  
 TACATGATTATGGTCAAATGTT (配列番号 : 37)  
 Lm - LLO - NY - 1 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACC  
 ATTGATGTCACATGATTATGGTCAAATGTT  
 Lm - LLO - NY - 2 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACC  
 ATTGATGTCACATGATTATGGTCAAATGTT  
 Lm - dda - 164 - 1 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACC  
 ATTGATGTCACATGATTATGGTCAAATGTT  
 Lm - LLO - 138 - 1 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACC  
 ATTGATGTCACATGATTATGGTCAAATGTT  
 Lm - LLO - 138 - 2 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACC  
 ATTGATGTCACATGATTATGGTCAAATGTT  
 Lm - LLO - 138 - 3 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACC  
 ATTGATGTCACATGATTATGGTCAAATGTT  
 Lm - LLO - 138 - 4 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACC  
 ATTGATGTCACATGATTATGGTCAAATGTT  
 Lm - dda - 164 - 1 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACC  
 ATTGATGTCACATGATTATGGTCAAATGTT  
 Lm - dda - 164 - 2 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACC  
 ATTGATGTCACATGATTATGGTCAAATGTT  
 Lm - dda - 164 - 3 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACC  
 ATTGATGTCACATGATTATGGTCAAATGTT  
 Lm - dda - 164 - 4 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACC  
 ATTGATGTCACATGATTATGGTCAAATGTT  
 Lm - dda - 164 - 5 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACC  
 ATTGATGTCACATGATTATGGTCAAATGTT  
 Lm - dda - 164 - 6 CGCCTACCTCAGCCTCCAATCTGCACC  
 ATTGATGTCACATGATTATGGTCAAATGTT

## 【0266】

参照 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCGAGATTCGGGG  
 AGTTGGTGTCAAGAATT (配列番号 : 38 )  
 Lm - LLO - NY - 1 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCGA  
 GATTCCGGAGTTGGTGTCAAGAATT  
 Lm - LLO - NY - 2 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCGA  
 GATTCCGGAGTTGGTGTCAAGAATT  
 Lm - LLO - 138 - 2 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCGA  
 GATTCCGGAGTTGGTGTCAAAATT  
 Lm - LLO - 138 - 3 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCGA  
 GATTCCGGAGTTGGTGTCAAGAATT 10  
 Lm - LLO - 138 - 4 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCGA  
 GATTCCGGAGTTGGTGTCAAGAATT  
 Lm - d d A - 164 - 1 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCGA  
 GATTCCGGAGTTGGTGTCAAGAATT  
 Lm - d d A - 164 - 2 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCGA  
 GATTCCGGAGTTGGTGTCAAGAATT  
 Lm - d d A - 164 - 3 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCGA  
 GATTCCGGAGTTGGTGTCAAGAATT  
 Lm - d d A - 164 - 5 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCGA  
 GATTCCGGAGTTGGTGTCAAGAATT 20  
 Lm - d d A - 164 - 4 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCGA  
 GATTCCGGAGTTGGTGTCAAGAATT  
 Lm - d d A 164 - 6 GGATGATTGACTCTGAATGTCGCCCGA  
 GATTCCGGAGTTGGTGTCAAGAATT  
 【0267】

参照 CACGTATGGCGAGGGACCCCCCAGCGTTTGTGGTCA  
 TCCAGAACGAGGACTT (配列番号 : 39 )  
 Lm - LLO - NY - 1 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTT  
 TTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT 30  
 Lm - LLO - NY - 2 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTT  
 TTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT  
 Lm - LLO - 138 - 2 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTT  
 TTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT  
 Lm - LLO - 138 - 3 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTT  
 TTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT  
 Lm - LLO - 138 - 4 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTT  
 TTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT  
 Lm - d d A - 164 - 1 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTT  
 TTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT  
 Lm - d d A - 164 - 2 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTT  
 TTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT  
 Lm - d d A - 164 - 3 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTT  
 TTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT  
 Lm - d d A - 164 - 5 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTT  
 TTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT  
 Lm - d d A - 164 - 6 CACGTATGGCGAGGGACCCCCAGCGTT  
 TTGTGGTCATCCAGAACGAGGACTT  
 EC1のアラインメント (399 - 758 bp のHER2/neu )

## 【0268】

参照 CCCAGGCAGAACCCCCAGAGGGGCTGCGGGAGCTGCA  
GCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCT (配列番号 : 40 )

Lm - LLO - 138 - 1 CCCAGGCAGAACCCCCAGAGGGGCTGCG  
GGAGCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCT

Lm - LLO - 138 - 2 CCCAGGCAGAACCCCCAGAGGGGCTGCG  
GGAGCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCT

Lm - dda - 164 - 1 CCCAGGCAGAACCCCCAGAGGGGCTGCG  
GGAGCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCT

Lm dda - 164 - 2 CCCAGGCAGAACCCCCAGAGGGGCTGCG  
GGAGCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCT

Lm dda - 164 - 3 CCCAGGCAGAACCCCCAGAGGGGCTGCG  
GGAGCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCT

Lm dda - 164 - 4 CCCAGGCAGAACCCCCAGAGGGGCTGCG  
GAGCTGCAGCTTCGAAGTCTCACAGAGATCCT

【0269】

参照 GAAGGGAGGGAGTTTGATCCGTGGAAACCCCTCAGCT  
CTGCTACCAGGACATGGTTTGTG (配列番号 : 41 )

Lm - LLO - 138 - 1 GAAGGGAGGGAGTTTGATCCGTGGAA  
CCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTGTG

Lm - LLO - 138 - 2 GAAGGGAGGGAGTTTGATCCGTGGAA  
CCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTGTG

Lm - dda - 164 - 1 GAAGGGAGGGAGTTTGATCCGTGGAA  
CCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTGTG

Lm dda - 164 - 2 GAAGGGAGGGAGTTTGATCCGTGGAA  
CCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTGTG

Lm dda - 164 - 3 GAAGGGAGGGAGTTTGATCCGTGGAA  
CCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTGTG

Lm dda - 164 - 4 GAAGGGAGGGAGTTTGATCCGTGGAA  
CCCTCAGCTCTGCTACCAGGACATGGTTTGTG

【0270】

参照 CGGGGCCCTGTCACCTTGTGCCCCCGCCCTGCAAAGA  
CAATCACTGTTGGGGTGAAGAGTCC (配列番号 : 42 )

Lm - LLO - 138 - 1 CGGGGCCCTGTCACCTTGTGCCCCCGC  
CTGCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAAGAGTCC

Lm - LLO - 138 - 2 CGGGGCCCTGTCACCTTGTGCCCCCGC  
CTGCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAAGAGTCC

Lm - dda - 164 - 1 CGGGGCCCTGTCACCTTGTGCCCCCGC  
CTGCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAAGAGTCC

Lm - dda - 164 - 2 CGGGGCCCTGTCACCTTGTGCCCCCGC  
CTGCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAAGAGTCC

Lm - dda - 164 - 3 CGGGGCCCTGTCACCTTGTGCCCCCGC  
CTGCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAAGAGTCC

Lm - dda - 164 - 4 CGGGGCCCTGTCACCTTGTGCCCCCGC  
CTGCAAAGACAATCACTGTTGGGGTGAAGAGTCC

【0271】

参照 GGAAGACTGTCAGATCTTGACTGGCACCATCTGTAC  
CAGTGGTTGTGCCCCGGTGAAGGG (配列番号 : 43 )

Lm - LLO - 138 - 1 GGAAGACTGTCAGATCTTGACTGGCAC  
CATCTGTACCACTGGTTGTGCCCCGGTGAAGGG

Lm - LLO - 138 - 2 GGAAGACTGTCAGATCTTGACTGGCAC

10

20

30

40

50

C A T C T G T A C C A G T G G T T G T G C C C G G T G C A A G G G  
 L m - d d A - 1 6 4 - 1 G G A A G A C T G T C A G A T C T T G A C T G G C A C  
 C A T C T G T A C C A G T G G T T G T G C C C G G T G C A A G G G  
 L m d d A - 1 6 4 - 2 G G A A G A C T G T C A G A T C T T G A C T G G C A C  
 C A T C T G T A C C A G T G G T T G T G C C C G G T G C A A G G G  
 L m d d A - 1 6 4 - 3 G G A A G A C T G T C A G A T C T T G A C T G G C A C  
 C A T C T G T A C C A G T G G T T G T G C C C G G T G C A A G G G  
 L m d d A 1 6 4 - 4 G G A A G A C T G T C A G A T C T T G A C T G G C A C C  
 A T C T G T A C C A G T G G T T G T G C C C G G T G C A A G G G

## 【0272】

10

参照 C C G G C T G C C C A C T G A C T G C T G C C A T G A G C A G T G T G C  
 C G C A G G C T G C A C G G G C C C A A G C A (配列番号: 44)

L m - L L O - 1 3 8 - 1 C C G G C T G C C C A C T G A C T G C T G C C A T G A

G C A G T G T G C C G C A G G C T G C A C G G G C C C A A G C A

L m - L L O - 1 3 8 - 2 C C G G C T G C C C A C T G A C T G C T G C C A T G A  
 G C A G T G T G C C G C A G G C T G C A C G G G C C C A A G C A

L m - d d A - 1 6 4 - 1 C C G G C T G C C C A C T G A C T G C T G C C A T G A  
 G C A G T G T G C C G C A G G C T G C A C G G G C C C A A G C A

L m d d A - 1 6 4 - 2 C C G G C T G C C C A C T G A C T G C T G C C A T G A  
 G C A G T G T G C C G C A G G C T G C A C G G G C C C A A G C A

L m - d d A - 1 6 4 - 3 C C G G C T G C C C A C T G A C T G C T G C C A T G A  
 G C A G T G T G C C G C A G G C T G C A C G G G C C C A A G C A

L m d d A - 1 6 4 - 4 C C G G C T G C C C A C T G A C T G C T G C C A T G A  
 G A G T G T G C C G C A G G C T G C A C G G G C C C A A G T A

(実施例7)  
 【0273】

20

A D X S 3 1 - 1 6 4 を用いた末梢の免疫化は転移性乳ガン細胞株の脳内での増殖を遅延することができる

## 【0274】

30

A D X S 3 1 - 1 6 4 または無関連 L m 対照ワクチンを用いてマウスに腹腔内で免疫化し、次いでルシフェラーゼおよび低いレベルの H E R 2 / n e u を発現する E M T 6 - L u c 脳癌細胞を 5 , 0 0 0 頭蓋内に移植した(図 6 C)。麻酔をかけたマウスのエクスピボでの撮像によって接種後の異なる時点での腫瘍をモニターした。腫瘍接種後 8 日目に、すべての対照動物で腫瘍が検出されたが、A D X S 3 1 - 1 6 4 群のマウスではいかなる検出可能な腫瘍を示すものもなかった(図 6 A および図 6 B)。A D X S 3 1 - 1 6 4 はこれらの腫瘍の発症を明らかに遅延することができ、腫瘍接種後 1 1 日目には負の対照群のマウスはすべてその腫瘍によって死んだが、A D X S 3 1 - 1 6 4 群のマウスはすべてまだ生存しており、腫瘍増殖の小さい兆候を示すのみであった。これらの結果は、A D X S 3 1 - 1 6 4 の末梢投与を用いて得られた免疫応答が中枢神経系に到達することができる可能性があり、かつ L m d d A ベースのワクチンが C N S 脳癌の治療のための使用の可能性を有する場合があることを強く示唆する。

40

(実施例8)

## 【0275】

A D X S 3 1 - 1 6 4 を用いた免疫化によるイヌの骨肉腫の治療。

## 【0276】

50

イヌの骨肉腫は長骨(下肢骨)のガンであり、10歳を超える大型犬の主要な死亡原因である。標準的な治療は診断直後の切断術と、後に続く化学療法である。しかしながら、常にガンは肺に転移する。化学療法を用いて、イヌは約18か月生存し、治療しない場合の6~12か月と比較される。骨肉腫の最高50%までではH E R 2 抗原が存在すると考えられる。A D X S 3 1 - 1 6 4 はこの抗原を発現する細胞を攻撃する免疫を作り出し、

ヒトの乳ガンを治療するために開発されてきた。

【0277】

骨肉腫の組織学的な診断、および悪性細胞によるHER2/neu発現の証拠を有するイヌは、登録する資格がある。

【0278】

イヌの骨肉腫の試験

第1のレジメンでは、四肢を切断し、化学療法治療のラウンドがその後に続いた。3投与のHer-2ワクチンをこれに続いて投与し、6か月間隔でブースターする、またはブースターなしとした。

【0279】

すべてのイヌは4週間のカルボプラチニ療法を受けた。最後のカルボプラチニ投与の4週間後、イヌはADX-S-HER2を3週間に1回、合計3回の投与を受けた。群1(3匹のイヌ)は投与当たり $1 \times 10^8$  CFUを受け、群2(3匹のイヌ)は各々投与当たり $5 \times 10^8$  CFUを受け、群3(3匹のイヌ)は投与当たり $1 \times 10^9$  CFUを受けた。潜在的用量制限毒性の場合、さらに多くのデータを収集するために追加的なイヌが群に追加される。したがって初期の研究では9~18匹のイヌが治療される場合がある。

【0280】

第2のレジメンでは、化学療法の前(1か月前)にワクチンを1投与しかせず合計4投与であることを除いて、第1のレジメンと同様のものを繰り返した。

【0281】

さらに、両方のレジメンで、化学療法の1か月後に1投与のみを投与した。

(実施例9)

【0282】

HER2/NEUを過剰発現するイヌの骨肉腫を有する愛玩犬でのADX-S-cHER2の安全性を評価するフェーズ1投与量エスカレーション研究

【0283】

骨肉腫を有するイヌで腫瘍特異的な免疫性を安全かつ効果的に刺激することができる、ヒトHER2/neu組み換え型ワクチンを発現するL.モノサイトゲネス投与を決定するために試験段階I投与量エスカレーション研究を遂行した。OSAの疑いまたは確認されたOSAに起因する四肢の切断術のためにPennVetに提示されたすべてのイヌの腫瘍を、定期的に採取し、OSAの診断を確認するために病理組織的に評価した。加えて、すべてのイヌからの腫瘍の断面を、腫瘍がHER2/neuを発現するかどうかを決定するためにIHICおよびウエスタンプロット解析によって評価した。OSAの組織学的な診断、および悪性細胞によるHER2/neu発現の証拠を有するイヌのみが登録する資格がある。外科手術で取った腫瘍組織の単一細胞懸濁液を凍結保存し、抗腫瘍免疫性を決定するためにクロム遊離アッセイで自己腫瘍標的として使用した。

【0284】

四肢OSAを有し、かつHer2-neuの発現を確認した最高18匹の個人所有のイヌが登録された(図7)。登録時(最後のカルボプラチニ処置後3週間)に、すべてのイヌは全血算定(CBC)、化学スクリーニング(CS)、および尿検査(UA)を含む基本的な臨床検査、ならびに心エコー図および心臓に特異的なトロポニンI(cTnI)レベルの測定による心臓機能のベースライン評価を受けた。胸部放射線写真を取って、肺の転移が存在するかどうかを決定した。肺の転移の兆候が見られないイヌのみにこの研究に含まれる資格がある。登録時に、抗腫瘍免疫性のベースラインレベルを評価するために末梢血单核細胞(PBMC)を収集した(抗腫瘍免疫性の評価を参照)。さらに、これらがすでにカルボプラチニによって免疫抑制されていないことを確認する目的で、ベースライン免疫機能性を評価するために血液を取った。機能的に無傷な免疫系を有するイヌのみにリストアワクチンを受ける資格がある。

【0285】

Lm組み換え型投与およびデータ取得

10

20

30

40

50

すべてのイヌに単一の A D X S 3 1 - 1 6 4 A D X S 3 1 - 1 6 4 組み換え型ワクチンを使用してワクチン接種した。第 1 の L m - h u H e r 2 - n e u ワクチンを最後のカルボプラチニン投与の 3 週間後に与え、この後 3 週間に 1 度、合計 3 投与だけ与えた（図 7）。

#### 【 0 2 8 6 】

群 1 ( 3 匹のイヌ ) は A D X S 3 1 - 1 6 4 ( L m - ヒトキメラ H E R 2 / n e u ) ワクチンを投与当たり  $1 \times 1 0^8$  C F U で受け、群 2 ( 3 匹のイヌ ) は各々投与当たり  $5 \times 1 0^8$  C F U で受け、群 3 ( 3 匹のイヌ ) は投与当たり  $1 \times 1 0^9$  C F U で受け、投与当たり  $3 . 3 \times 1 0^9$  C F U で受けた ( 1 匹のイヌ ) 。組み換え型 L m は 30 分間にわたる遅い静脈内点滴で投与された。群 1 のために選択された投与量は、マウスでキメラ型 A D X S 3 1 - 1 6 4 組み換え型に対して確立された安全な投与量である。ヒトでは L o v a x i n C に対する非毒性投与量はマウスで確率されたものより 1 ログ高いだけであり、この投与量はこのパイロット試験の群 3 で評価された投与量である。10

#### 【 0 2 8 7 】

L m 投与の時点で、全身的な悪影響の兆候についてイヌをモニターした。点滴の間の、E C G によって心拍数および心リズムをモニターし、呼吸数を記録した。さらに、超音波の使用およびトロポニン I レベルの測定によって心臓障害をモニターした（図 8）。点滴の後 48 時間の間、イヌを注意深くモニターした。M i n i M i t t e r R e s p i r o n i c s の V i t a l S e n s e 連続体温監視システム（発明者らの獣医臨床試験センター（V e t e r i n a r y C l i n i c a l T r i a l s C e n t e r ）、V C I C で日常的に使用される）を使用して中核体温を点滴後 12 時間未満の間連続的にモニターした。脈拍の数、リズム、および質、ならびに呼吸数および呼吸努力をモニターし、最初の 6 時間の間は 1 時間ごとに記録し、次いでそれ以後は 4 時間ごとに記録し、血圧および体温も同様にした（図 9）。免疫刺激と一致したすべての症状に留意され、必要に応じて激しい反応を制御するために液体、鎮痛薬、制吐薬、および抗ヒスタミン薬を使用した。すべてのイヌを 1 日に 6 回観察し、不快症状、昏睡、吐き気、嘔吐、および下痢を含む組み換え型剤の毒性的な影響のあらゆる兆候を記録した。全身的投与後の L m の除去を評価する培養のために、最初の A D X S 3 1 - 1 6 4 ワクチンの 24 、 48 、および 72 時間後に血液サンプルを取った。20

#### 【 0 2 8 8 】

##### 抗腫瘍免疫性の評価

最後のカルボプラチニン投与に続く 3 週間、イヌは定期的な臨床検査ならびに C B C 、 C S 、 U A 、および c T n I レベルを含むベースライン血液検査を受けた。抗腫瘍免疫性のベースライン評価のためにこの時点で P B M C を取った。各々のワクチン接種の時点および最後のワクチン接種の 3 週間後に繰返し免疫評価を遂行した。以下に概要を示すように、C F S E 増殖、サイトカイン産生（ E L I S p o t および q R T - P C R ）、および C T L アッセイによって、 H E R 2 / n e u に特異的な T 細胞応答について P B M C を自己腫瘍標的に対して解析した（図 12）。

#### 【 0 2 8 9 】

##### 結果

今日までに、発明者らは 16 匹のイヌで合計 41 件の A D X S 3 1 - 1 6 4 の点滴を遂行した。40

【表1B】

イヌの数	点滴回数	論理的根拠
1	5	転移性疾患を治療するために初期の一連の後2回の追加的な点滴
4	4	腫瘍のない状態を維持するために初期の一連の後1回の追加的な点滴
4	3	予定した初期の一連を完了した
1	2	初期の過程の終了前に転移性疾患のために死んだ
2	1	初期の過程の終了前に転移性疾患のために死んだ
4	1	ワクチン接種の初期過程中

10

## 【0290】

ADX S 31 - 164 投与量は、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、および $3.3 \times 10^9$  CFU からの範囲であった。

【表1C】

受容した投与量	投与した投与量の合計数	イヌの数	報告された副作用
$1 \times 10^8$	9	3	発熱、吐き気、嘔吐、肝臓酵素の増加
$5 \times 10^8$	9	3	発熱、吐き気、嘔吐、肝臓酵素の増加
$1 \times 10^9$	17	10	発熱、吐き気、嘔吐、肝臓酵素の増加、血小板減少
$3.3 \times 10^9$	1	1	吐き気、嘔吐、

20

## 【0291】

## ワクチン投与のための標準作業手順

ADX S 31 - 164 の投与のための標準作業手順を開発した。ワクチン接種の1時間前に患者は筋肉内注射を介しての $2 \text{ mg} / \text{kg}$  のジフェンヒドラミンと、ゆっくりとした静注として $0.2 \text{ mg} / \text{kg}$  のオンドアンセトロンとを受けた。ワクチンを - 80 に保持し、患者の傍で解凍した。これを $200 \text{ mL}$  の $0.9\% \text{ NaCl}$  中で30分間にわたって投与した。次いで点滴ラインを $30 \text{ mL}$  のプラズマライト (Plasmalyte) でフラッシングした。アモキシシリソの3日間の過程（ワクチン接種後72時間に開始）、および細胞の増殖および修復を助ける肝臓補助剤 (S-アデノシル-メチオニン) の7日間の過程付きでイヌを家庭に帰した。

30

## 【0292】

研究の一次的な終了点は、ADX S 31 - 164 の最大許容投与量を決定することであった。

## 【0293】

最大 $3.3 \times 10^9$ までの投与量は体重が $25 \text{ kg} \sim 67 \text{ kg}$ の範囲のイヌでは良好に許容された。報告されたすべての副作用は、グレードIの毒性で、最大耐量にはまだ達していなかった。副作用はワクチン投与の2~4時間以内に常套的に生じた。高熱は等張液を維持速度 ( $4 \text{ mL} / \text{kg} / \text{時間}$ ) で2~4時間の間静脈内に送達することによって通常解消された。体温が $104.7^\circ\text{F}$ 以上に達した2つの事例では、カルプロフェンの単一の皮下注射が1~2時間の間に正常体温を誘発した。吐き気および嘔吐は通常自己限定期であったが、場合によってはいくつかのエピソードが記載され、 $1 \text{ mg} / \text{kg}$  のセレニアを投与し、これはさらなる吐き気および嘔吐の防止に大変効果的であった。合計5匹のイヌがワクチン投与の48時間以内に中程度の肝臓酵素のグレードI上昇を発生し、これはワクチン接種の1週間後までに解消された。

40

## 【0294】

## リストリアの除去

ワクチン接種した16匹のイヌすべてに対して血液培養を遂行した後、今日までワクチン接種後24時間の時点でいずれのイヌの末梢循環内でも検出可能なリストリアは無かった。ワクチン接種したイヌの尿および排泄物内へのリストリアの排出は評価しなかった。

## 【0295】

50

研究の二次的な終了点は、無増悪生存および全生存である。四肢の切断術およびカルボプラチニンの4投与後ADX31-164を投与したとき、骨肉腫を有するイヌでの統計的に有意な全生存優位性が観察された。所有者が試験に参加しないが生存について追跡することを選択した6匹のイヌと比較すると、第1の2回投与群（6匹のイヌ）からの早期の結果はADX31-164を受けたイヌにおける有意な生存優位性を示す（ $p = 0.003$ ）（図13）。ワクチン接種していないイヌの平均生存時間は239.5日である。ワクチン接種したイヌに対する平均生存時間にはまだ達していない。治療を意図する群の中のすべてのイヌが解析に含まれる場合、これは真実となる。

#### 【0296】

結論として、心臓血管系、造血系、肝臓系、または腎臓系で有意な短期または長期の副作用の証拠はない。さらに、最小限の残余疾患の存在下でのADX31-164の投与は転移性疾患を遅延／防止することができ、HER2/neuが陽性の骨肉腫を有するイヌの全生存を長くすることができます。

#### （実施例10）

#### 【0297】

自然発生的なイヌの骨肉腫（OSA）のモデルでADX31-164を評価するフェーズ1臨床試験

#### 材料および方法

#### 【0298】

##### ワクチン製造業者

ADX31-164の設計および生成。簡潔に述べると、リステリア・モノサイトゲネス（Lm）のdal dat actA突然変異体株を、キメラ型ヒトHER2/neu構築体を担持するpADVプラスミドを用いて形質移入する。この構築体はヒトHER2/neu分子の2つの細胞外領域（EC1およびEC2）と1つの細胞内領域（IC1）とを含有し、この分子はHLA-A2で制限された免疫優性エピトープの大部分を含有し、切断リステリオリシンO構築体と融合した。伝達プラスミドは、桿菌p60dal遺伝子およびも含有し、これは栄養要求性相補を介して突然変異体Lmの中に維持される。細菌耐性カセットはない。ワクチンはVibalogics GmbH（ドイツ、Cuxhaven）によって製造され、使用前は-80で保存された。

#### 【0299】

##### 病理組織学、病期分類、および免疫組織化学

すべての原発性四肢骨肉腫腫瘍の病理組織学的評価が有資格獣医病理学者（J.E.）によって遂行された。腫瘍は組織学的な特徴に基づいて、骨芽細胞性、軟骨芽細胞性、線維芽細胞性、および毛細血管拡張性として記述された。原発性腫瘍は、有糸分裂指数、核多形性、ならびにマトリクスおよび壊死が存在する量に基づいてスコアリングされた。組織学的スコアはグレード（I、II、またはIII）へと変換された。

#### 【0300】

HER2/neu染色については、ホルマリン固定し、脱灰し、パラフィン包埋した組織の5マイクロメートルの厚さの連続切片を負電荷を帯びたガラススライド上に搭載した。切片を20分間80で加熱し、Pro Par（透明剤）内に浸し、エタノール中で再水和した。切片のクエン酸ナトリウムバッファー（pHが9.0付近）内での煮沸によって抗原の回収を遂行した。3%の過酸化水素を使用して内因性ペルオキシダーゼを閉鎖した。ウサギの抗ヒトHER2/neu抗体（Neu（c-18）：sc-284、Santa Cruz Biotechnology）またはウサギのIgGアイソタイプを用いて染色を遂行した（ユニバーサル負の対照血清、NC498、Biocare Medical）。Universal Streptavidin-Biotin System（DAKO/LSAB2、HRP）を使用して結合抗体を検出した。組織を3,3'-ジアミノベンジジン溶液（DAKO）を用いて染色し、ヘマトキシリントリコントラスト染色した。Nikon E600無限遠補正立顕微鏡を使用してスライドを見た。画像解析のためにNikon Digital Sight DS-Fi1カラーカメラおよ

10

20

30

40

50

びN I S - E l e m e n t B R 3 を使用して明るい視野画像が得られた。有資格獣医病理学者( J . E . )によって、H E R 2 / n e u を染色している新生細胞のパーセンテージ( < 1 0 % = 1 、 1 0 % ~ 5 0 % = 2 、 > 5 0 % = 3 )およびH E R 2 / n e u 染色の強度( 弱 = 1 、 中 = 2 、 強 = 3 )に基づいて組織切片を評価し、H E R 2 / n e u 正陽性のためにスコアリングした。スコアは各々の組織切片に対して 1 0 h p f 以内で解析された細胞に基づいた。組み合わせられたH E R 2 / n e u スコアは、H E R 2 / n e u 染色およびH E R 2 / n e u 染色強度に対して陽性の腫瘍細胞のパーセンテージに対して与えられた 2 つの別個のスコアを掛け算することによって得られる。その腫瘍細胞の 1 0 % より多くがH E R 2 / n e u に対して陽性に染色するイヌのみに試験の登録資格がある。

## 【 0 3 0 1 】

10

## 資格の基準および臨床試験設計

H E R 2 / n e u 陽性O S A の病理組織学的および免疫組織化学的診断を有し、四肢の切斷術または四肢の温存のいずれかの手術によって原発性腫瘍の除去を受けたイヌで、アジュバント化学療法として 3 週間毎に 1 度( または骨髄抑制が生じた場合は 4 週間毎に 1 度 ) の 3 0 0 m g / m <sup>2</sup> のカルボプラチニンの 4 回の投与を受けたイヌはスクリーニングのために資格を有する。最後のカルボプラチニン治療の 3 週間後イヌをスクリーニングした。詳細な身体検査、全血算定( C B C )、化学スクリーニング( C S )、および尿検査( U A )を遂行して、全体的な健康状態を決定した。フローサイトメトリーの好中球酸化バーストアッセイおよびマイトイジエン誘発性のリンパ球増殖アッセイをそれぞれ使用して、基本的に先天的および適応性の免疫機能を試験した。ベースラインの心臓の状態を心電図記録法、心エコー図、および血清心筋トロポニン I レベルによって評価した。肺の転移性疾患の存在を決定するために胸部放射線写真を遂行した( 図 1 4 B 参照 )。先天的および適応性免疫が無傷であり、心臓の疾患を受けている兆候のない、かつ肺の転移性疾患の兆候のない、全身的に健康であることが見いだされたイヌのみが、登録の資格を有する。研究の過程の間に死んだイヌは検視を受けた。転移性疾患の存在および場所を記録し、転移性病巣内でのH E R 2 / n e u 発現を評価するために病理組織的および免疫組織化学的検査を遂行した。

20

## 【 0 3 0 2 】

## 免疫解析

30

好中球酸化バーストアッセイ。ナトリウムヘパリン抗凝固剤処置血液中の赤血球を 0 . 8 3 % N H <sub>4</sub> C l を使用して溶解し、残った白血球を 1 × P B S 中で 2 回洗浄した。 1 5 μ g / m L のジヒドロローダミン 1 2 3 ( D H R - 1 2 3 、 M o l e c u l a r P r o b e s , 米国ニューヨーク州 G r a n d I s l a n d ) を用いて血球を標識し、 3 n M の 1 3 - 酢酸 1 2 - ミリスチン酸ホルボール( P M A 、 S i g m a 、 米国ミズーリ州 S t . L o u i s ) を用いて 3 7 ℃ にて 3 0 分間活性化した。フローサイトメトリー解析の前に、血球を氷上に 1 5 分間定置した。血球を F A C S C a n t o 血球計算器( B D B i o s c i e n c e s 、 米国カリフォルニア州 S a n J o s e ) の上に取得し、 F l o J o ソフトウェア( T r e e s t a r 、 米国カリフォルニア州 S a n C a r l o s ) を使用して解析した。

40

## 【 0 3 0 3 】

リンパ球増殖アッセイ。密度遠心分離によって末梢血単核細胞( P B M C )をナトリウムヘパリン抗凝固剤処置全血から分離した。P B M C を、 1 × P B S 中で 2 回洗浄され、計数した。血球を 5 μ M の C F S E を用いて標識し、 1 . 2 5 μ M のコンカナバリン A を用いて 3 7 ℃ にて 5 日間刺激した。細胞を採取し、 F A C S バッファー内で 2 回洗浄し、 A P C 結合ラット抗イヌ C D 4 および P E 結合ラット抗イヌ C D 8 抗体( S e r o t e c 、 米国ノースカロライナ州 R a l e i g h ) を用いて標識し、フローサイトメトリーによって解析した。免疫機能の解析のために、正の対照として健康なコロニー犬( I A C U C # 8 0 4 1 9 7 )から取った末梢血液を使用した。

## 【 0 3 0 4 】

50

T 細胞サブセット解析。各々のワクチン接種の前にベースラインにおいて、再ステージ

ングにおいて、およびその後2か月毎に取ったPBM CをCD4およびCD8 T細胞サブセットについて解析した。簡潔に述べると、凍結保存した細胞を解凍し、FACSバッファー(1×PBS、0.2%のBSA fraction V、および4mMのアジ化ナトリウム)内で2回洗浄し、その後マウス抗イヌCD3、PE標識したラット抗イヌCD8、またはAlexa標識した抗イヌCD4(Serotec、米国ノースカロライナ州Raleigh)を用いて表面染色した。フローサイトメトリーの取得の直前に細胞を生体染色色素7-ADDとともにインキュベートした。CD4<sup>+</sup>T細胞数およびCD8<sup>+</sup>T細胞数の合計をフローサイトメトリーのパーセンテージから計算し、Cell Dyn 3700CS血液分析器を使用してリンパ球計数の合計を決定した。

## 【0305】

10

## ワクチン投与

ワクチン接種の前に、イヌは5HT3拮抗薬オンダンセトロン(0.2mg/kg)を静脈内で、H1受容体遮断薬、ジフェンヒドラミン(2mg/kg)を筋肉内で受容して、吐き気およびアナフィラキシーをそれぞれ防止する。標準的な3+3臨床試験設計が採用された。ADX S31-164を以下の投与で投与した。群1(2×10<sup>8</sup>CFU)、群2(5×10<sup>8</sup>CFU)、群3(1×10<sup>9</sup>CFU)および群4(3.3×10<sup>9</sup>CFU)。ADX S31-164を100mLの0.9%のNaCl(群1および群2)、ならびに200mLの0.9%のNaCl(群3および群4)内に希釈し、30分にわたり静脈内で投与した。点滴後一時間ごとに体温、脈拍、呼吸数、心拍数および心リズム(EKGによる)ならびに血圧をモニターした。体温が103°Fを超えた場合、イヌに静脈内でプラズマライトを4mL/kg/時間で体温が103°Fより低くなるまで与えた。イヌを1時間ごとに昏睡、吐き気、または嘔吐の兆候についてモニターした。血液学的パラメータまたは生化学的パラメータに何らかの変化がないかを評価するためにワクチン接種の24時間後および1週間後に血液サンプルを抜き出し、ワクチン接種の24時間後に血液培養を遂行して血流中の生細菌の持続性を決定した。すべてのイヌはワクチン接種後72時間にアモキシシリソルおよびS-アデノシルメチオニン(SAME)の短い過程を受け、残っているリストリアをすべて殺し、肝臓に抗酸化剤酸サポートを提供した。

20

## 【0306】

30

初期の一連で最後にワクチンを受けた後少なくとも5か月転移性疾患を有しないイヌの所有者は1×10<sup>9</sup>CFUの標準的な投与量でブースターワクチンを受けるオプションの提案を受けた。ブースターワクチンを記述されているように投与し、点滴後イヌを上述のようにモニターした。

## 【0307】

30

## 毒性

毒性を、獣医がん臨床研究グループの有害事象に対する共通分類用語(Veterinary Co-operative Oncology Group - Common Terminology Criteria for Adverse Events)(VCOG-CTCAE)に従ってグレード付けした。各々のワクチン接種のとき、最後のワクチン接種後3週間、およびその後死ぬまで2か月毎に、連続心電図、心エコー図、およびベースラインにおける血清心筋トロポニンIレベルを通して心毒性の評価を遂行した。評価したパラメータとしては左室内径短縮率(LVFS)、ならびに左室拡張末期径(LVIDd)および左室収縮末期径(LVIDs)が挙げられる。イヌの間でからだの大きさの範囲が幅広いことを考慮してLVIDdおよびLVIDsを体重で正規化した。

40

## 【0308】

## ELISPOT解析

各々の表示された時点での凍結保存したPBM Cを解凍し、37で一晩置き、次いで計数した。キメラ型ワクチン、および組み換え型ヒトIL-2(Invitrogen、米国メリーランド州Frederick)の中に存在するHER2/NeuのEC1、EC2、およびIC1ドメインを代表する重複ヒトHER2/Neuペプチド(5アミノ酸に

50

よって 11 m e r が重複する) の 2 . 5  $\mu$  M のプールを用いて細胞を 5 日間の間刺激した。細胞を採取し、1 × の P B S 中で 2 回洗浄し、計数した。製造業者のプロトコルに従つて市販のイヌの I F N - E L I S p o t アッセイキット (R & D S y s t e m s、米国ミネソタ州 M i n n e a p o l i s ) を使用して、I F N - E L I S p o t アッセイを遂行した。簡潔に述べると、0 . 8 - 2 × 10<sup>5</sup> の刺激された細胞を 2 . 5  $\mu$  M の E C 1、E C 2、または I C 1 ペプチドプールプラス I L - 2 を用いて、または I L - 2 を単独で用いてインキュベートした(バックグラウンド計数を決定するため)。すべてのアッセイを 2 回ずつ遂行した。製造業者の取扱い説明書に従つてプレートを発色させた。C T L - I mm u n o s p o t アナライザー (C . T . L、米国オハイオ州 S h a k e r H e i g h t s ) を使用してスポットを計数した。

10

#### 【 0 3 0 9 】

##### 一次および二次転帰の測定

転移の時期 (T T M) は切断術と転移性疾患発生との間の時間として計算される。切断術と死との間の時間として O S A に特異的な生存を計算した。無関係な原因で死んだ患者は、その死の時点で打ち切った。

#### 【 0 3 1 0 】

##### 結果

資格種特異の基準を満たした 18 匹のイヌをこのフェーズ I 臨床試験に登録した。年齢、品種、性別、腫瘍の場所、サブタイプ、グレード、および H E R 2 / n e u の状態を記録した(表 4)。標準的な 3 + 3 臨床試験設計が採用された。A D X S 3 1 - 1 6 4 を以下投与量で投与した。群 1 : 2 × 10<sup>8</sup> C F U (n = 3)、群 2 : 5 × 10<sup>8</sup> C F U (n = 3)、群 3 : 1 × 10<sup>9</sup> C F U (n = 9)、および群 4 : 3 × 10<sup>9</sup> C F U (n = 3)。スクリーニングの時点で識別された既存の肺の転移性疾患を有する 5 匹の追加的なイヌも、思いやりのあるケアとして A D X S 3 1 - 1 6 4 を受容した(表 4)。これらのイヌのうち 4 匹はその原発性腫瘍からの新生細胞の > 50 % で強い H E R 2 / n e u 染色を有した。スクリーニングの際にこれらのイヌのうち 3 匹は複数の肺の転移性結節を有し、2 匹のイヌは単一の転移性結節を有した。複数の肺結節を有するイヌは、疾患の進行の前に各々 1 つのワクチンを受容し、代替的な治療のために研究から離脱した。単一の結節を有する 2 匹のイヌは、各々 3 つのワクチンの全過程を受容した。既存の転移性疾患を有するイヌは 1 × 10<sup>9</sup> C F U (n = 3) または 3 × 10<sup>9</sup> C F U (n = 2) のいずれかの A D X S 3 1 - 1 6 4 を受容した(表 5)。

20

#### 【 0 3 1 1 】

図 15 はフェーズ 1 臨床試験のタイムラインの概略図を示し、切断およびフォローアップの化学療法に続いて 3 つのワクチン接種を投与した。

30

【表4】

【表4】登録したイヌの表徴および腫瘍特徴

年齢	品種	性別	腫瘍の場所	サブタイプ	グレード	HER 2 スコア	投与量	全生存(日)
<b>群1</b>								
12.5	アメリカンピットブル	F S	上腕骨近位端	骨芽細胞性	I I	2	2×10 <sup>-8</sup>	738
11.5	雄種	F S	桡骨遠位部	骨芽細胞性	I	5	2×10 <sup>-8</sup>	267
9	ラブラドール	MC	上腕骨近位端	線維芽細胞性	I I	7.5	2×10 <sup>-8</sup>	977+
<b>群2</b>								
6	雄種	F S	脛骨遠位部	骨芽細胞性	I	4.5	5×10 <sup>-8</sup>	943+
7	ロットワイラー	MC	尺骨遠位部	骨芽細胞性	I I I	2.25	5×10 <sup>-8</sup>	925
4.5	イングリッシュブルドッグ	MC	上腕骨近位端	骨芽細胞性	I	4	5×10 <sup>-8</sup>	346
<b>群3</b>								
6	OES	MC	大腿遠位部	骨芽細胞性	I I	1.5	1×10 <sup>-9</sup>	744+
9	グレイハウンド	MC	上腕骨近位端	骨芽細胞性	I I	5	1×10 <sup>-9</sup>	444
8	ゴールデン・レトリバー	MC	尺骨遠位部	線維芽細胞性	I	3	1×10 <sup>-9</sup>	488+
2	ラブラドール	F S	脛骨近位部	線維芽細胞性	I	4.5	1×10 <sup>-9</sup>	438+
7.5	キャバリア・キング・チャーチルズ	F S	脛骨近位部	骨芽細胞性	I I	7.5	1×10 <sup>-9</sup>	439+
6.5	ゴールデン・レトリバー	F S	桡骨遠位部	骨芽細胞性	I	4.5	1×10 <sup>-9</sup>	430+
10	グレイハウンド	MC	大腿遠位部	骨芽細胞性	I I	2	1×10 <sup>-9</sup>	276
5.5	ラブラドール	MC	大腿遠位部	骨芽細胞性	I	9	1×10 <sup>-9</sup>	312+
9	ゴールデン・レトリバー	F S	大腿遠位部	骨芽細胞性	I	6	1×10 <sup>-9</sup>	336+
<b>群4</b>								
6.6	グレート・デーン	MC	桡骨遠位部	骨芽細胞性	I I	7.5	3×10 <sup>-9</sup>	259
7	雄種	MC	上腕骨近位端	骨芽細胞性	I I	9	3×10 <sup>-9</sup>	345+
6.5	ロットワイラー	F S	上腕骨近位端	骨芽細胞性	I I	6	3×10 <sup>-9</sup>	332+

【表5】

【表5】思いやりのあるケアとして処置された既存の転移性疾患を有するイヌの表徴および腫瘍特徴

年齢	品種	性別	腫瘍の場所	サブタイプ	グレード	HER 2 スコア	投与量	全生存(日)
<b>転移性疾患を有するワクチン群</b>								
5	ナポリタン・マスティフ	MC	桡骨遠位部	線維芽細胞性	I	7.50	1×10 <sup>-9</sup>	233
6.5	グレート・デーン	F S	桡骨遠位部			6	1×10 <sup>-9</sup>	256
2	ラブラドール	F	腓骨近位部	骨芽細胞性	I I I	7.5	1×10 <sup>-9</sup>	153
6.5	バニーズ・マウンテン・ドッグ	F S	尺骨遠位部	骨芽細胞性	I I I	8.25	3×10 <sup>-9</sup>	336
7	ロットワイラー	MC	桡骨遠位部	骨芽細胞性	I I	4.00	3×10 <sup>-9</sup>	231

## 結果

## 【0312】

安全性および毒性 = 23匹のワクチン接種したイヌすべてに対して安全性が評価された。すべてのイヌはADX31-164投与に対して十分な耐性があり、ワクチン接種の日に一時的な低グレードの毒性のみが観察された（表6）。投与量に関わらずすべての群で、ADX31-164の投与の4時間後に体温の統計的に有意な増加が生じた（図9A）。低血圧はいかなる時点でもまたはいずれの投与量でも観察されなかった（図9B）。8匹/18匹のイヌ（既存の転移性疾患のない）、および3匹/5匹のイヌ（既存の転移性疾患を有する）は、ワクチン接種の4時間以内に  $> 103^{\circ}\text{F}$  の熱を発生し、その時点で静脈内に液体を与えられた。3匹のイヌは体温を下げるために単一投与の非ステロイド抗炎症薬を受容した。すべての事例で、さらなる介入なしに発熱は解消した。投与量に関わらず、ワクチン接種の4時間以内に、治療的な介入を必要としない一時的な昏睡、吐き気、ならびに嘔吐が発生した。2匹のイヌでは、ワクチン接種のすぐ後で一時的な單一のまたは二段の心室性期外収縮が識別された。既存の転移性疾患を有する1匹のイヌは、ワクチン接種の2時間以内に心室頻拍を発生した。リドカイン、プロカインアミド、ソタロール、および副腎皮質ステロイドを用いた治療はあまり効果が無かったが、しかしながら不整脈は72時間以内に解消された。ADX31-164の24時間後に、一時的ではあったが、白血球および好中球の計数の統計的に有意な増加が生じ、血小板およびリンパ球の一時的減少が付随して起きた（図17）。ADX31-164投与量と血液学的变化の程度との間に相関はなかったが、生存したイヌと死亡したイヌとの白血球、好中球、および单球の程度の応答の間には有意な差があった（図18A～図18F）。肝臓酵素の血清濃度の中程度の一時的な増加がおよそ半分のイヌで、肝臓指向性リストリアによって発生した中程度の炎症と一致して生じた（表6）。末梢血液で識別されたすべての変化

10

20

30

40

50

は無症候性であり、一週間以内の A D X S 3 1 - 1 6 4 投与で解消された。いずれのイヌでも腎臓の機能では有意な変更は記載されなかった。19匹 / 23匹のイヌは A D X S 3 1 - 1 6 4 投与の 24 時間後に血液培養を遂行し、高度に弱毒化した L m d d A 株の急速な除去と一致してすべて陰性であった。

【 0 3 1 3 】

H E R 2 / n e u を標的化したモノクローナル抗体が心臓毒性を生じると仮定して、心筋トロポニン I、短縮率(%)、ベースラインにおける L V I D d および L V I D s を含む、心臓障害のバイオマーカーおよび機能障害の心エコー測定を、各々のワクチン接種の前およびその後 2か月ごとに評価した。いずれかのワクチン接種したイヌで、心筋トロポニン I、短縮率、L V I D d または L V I D s の有意でない、持続的な変化が識別された(図 26 A ~ 図 26 D)。群 3 の中の 1 匹のイヌは各々のワクチン接種の時点で血清心筋トロポニン I の段階的な増加を示したが、これは心エコーの機能障害の兆候に付随して起きたものではなかった。値は最後のワクチン接種に続いてベースラインに戻り、繰り返し評価では上昇しなかった。

【 0 3 1 4 】

図 25 (A ~ D) に示すように、臨床試験を通して、短縮率、左室収縮末期径(L V I D s)、および拡張期の L V I D (L V I D d) とともに心筋トロポニン I のレベルを測定し、A D X S 3 1 - 1 6 4 の投与に続く長期または短期の心臓毒性の兆候はなかった。

【 0 3 1 5 】

最低限の治療に関連する有害事象を示すデータを提供する下記の表 6 が臨床試験の間に報告された。

10

20

## 【表6】

【表6】ADX S 31-164ワクチン接種の48時間以内に生じた処置に関連する有害事象。

処置に関連する有害事象を有したイヌの数						
ADX S 31-164投与量		2×10 <sup>8</sup>	5×10 <sup>8</sup>	1×10 <sup>9</sup>	3×10 <sup>9</sup>	合計
採用したイヌの数		3	3	11	6	23
一般的な障害						
Pyrexia (T>103)	グレード1	2	1	5	5	13
疲労	グレード1	1	0	7	2	10
吐き気	グレード1	1	2	10	2	15
	グレード2	1	0	0	0	1
嘔吐	グレード1	1	2	9	3	15
	グレード2	2	0	0	3	5
心臓血管異常						
不整脈	グレード1	0	1	0	0	1
	グレード2	0	0	0	1	1
頻脈	グレード1	0	0	2	1	3
	グレード2	0	0	0	1	1
低血圧		0	0	0	0	0
高血圧	グレード1	2	3	8	5	18
血液学的パラメータ						
血小板減少	グレード1	2	2	6	3	13
	グレード2	0	0	2	1	3
生化学的パラメータ(増加)						
γ-GT	グレード1	0	2	1	0	3
ALKP	グレード1	0	1	6	1	8
	グレード2	0	0	0	1	1
	グレード3	1	0	0	0	1
ALT	グレード1	1	1	3	0	5
	グレード2	0	0	0	1	1
	グレード3	1	0	0	0	1
AST	グレード1	1	1	4	2	8
	グレード2	0	0	2	0	2
	グレード3	0	0	1	0	1
BUN		0	0	0	0	0
CREA		0	0	0	0	0
心筋トロポニンI	グレード1	0	0	1	1	2

## 【0316】

結論：ADX S 31-164の毒性のグレードは低く、かつ一時的であった。

## 【0317】

## ADX S 31-164への免疫応答

図18に提示する結果は、イヌの生存が予測されるワクチンを受容したイヌでのADX S 31-164への早期の免疫応答を実証する。図18は、ADX S 31-164が生存と相關するWBC、好中球、および単球の計数の増加を誘発したことを見し、これは血小板およびリンパ球の一時的な減少に付随して起こる（図17）。

## 【0318】

ADX S 31-164の免疫応答を誘発および維持する能力、および特にHER2/Neuに特異的なT細胞免疫性を誘発する能力を臨床試験の間に評価した。免疫応答を評価し、ADX S 31-164によってHER2/Neuに特異的なT細胞応答が誘発される

10

20

30

40

50

かどうかを決定するために、HER2/neuに特異的なT細胞数をIFN-ELISAによって評価した。ベースライン（カルボプラチニンの3週間後）において、各ワクチン接種ごと、およびその後2か月に一度サンプルを取った。図19はELISPOTアッセイの結果を示す。

### 【0319】

HER2/neuに特異的な免疫応答。HER2/neuのヒトEC1、EC2、およびIC1ドメインに対する免疫学的応答（それぞれ89%、93%、および98%の同一性をイヌのHER2/neuと共有する）をそれぞれ4/18、6/18、および1/18のイヌでベースラインにおいて検出した。1つ以上のHER2/neuドメインに対する誘発されたIFN-応答が7匹のイヌで第3のADX31-164ワクチン接種の3週間後に検出された（表7）。これらのイヌのうちの5匹は高度に保存されたIC1ドメインに対して免疫応答を発生した。5匹の追加的なイヌは2か月後IC1ドメインに対してIFN-応答を発生した。3匹の追加的なイヌは、再燃の時点でEC2単独、EC2およびIC1、またはEC1、EC2、およびEC3の何れかに対してIFN-応答を発生した（イヌ001、002、および017）。初期のワクチン接種の一連の間にHER2/neuに対して免疫学的応答を発生した3匹のイヌは、15~17か月にわたってIFN-ELISPOTによって評価された。HER2/neuに特異的なIFN-応答は維持されなかつたが、イヌはこの期間の間、転移性疾患がないままだった。10匹のイヌが追加的なブースターワクチン接種を受け、6匹の評価可能なもののうち、2匹のイヌは、ブースターワクチン接種の2か月後、HER2/neuに特異的なIFN-応答の検出可能な増加を有した。再発した8匹のイヌのうち、5匹はADX31-164後3週間、HER2/neuに特異的なIFN-応答の増加がなかった。

### 【表7】

イヌ	ADX31-16												再燃の時	全生存		
	ベースライン			4の3週間後			2か月の再点検			4か月の再点検						
	EC 1	EC 2	IC 1	EC 1	EC 2	IC 1	EC 1	EC 2	IC 1	EC 1	EC 2	IC 1				
1	2	1	1	2	1	1	1	2	1	1	2	1				
<b>群1</b>																
001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-R	+R	-R	350 <sup>B</sup>	738		
002	-	+	-	-	-	-	-R	+R	+R	死亡	185 <sup>L</sup>	267				
003	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+		1000+		
<b>群2</b>																
004	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-		966+		
007	+	+	-	+	-	-	+	+	+	ND	ND	ND	869 <sup>B</sup>	948+		
008	-	-	-	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	318 <sup>B*</sup>	346		
<b>群3</b>																
013	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+		767+		
017	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+R	+R	+R	322 <sup>B</sup>	444		
024	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+		511+		
025	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-		461+		
026	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+		462+		
027	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-		453+		
036	-	-	-	+R	-R	+R	死亡						251 <sup>L</sup>	276		
038	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND	ND	ND		335+		
039	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-R	-R	+R	315 <sup>L</sup>	359+		
<b>群4</b>																
030	+	+	+	-	+	+	ND	ND	ND	死亡			226 <sup>L*</sup>	259		
037	-	-	-	+R	+R	+R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	190 <sup>L</sup>	368+		
040	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND		355+		

10

20

30

40

50

## 【0320】

ブースターワクチン接種。登録時に転移性疾患を有しない18匹のイヌのうちの10匹に、初期の一連のワクチンの後5～10か月の間に単一のブースターワクチンを投与した。これらのイヌのうちの4匹は、第1のブースターワクチンの後4～15か月の間に与えられる追加的なブースターワクチンを受容した。初期の一連のワクチン接種と類似のグレードの低い一時的な副作用がブースターワクチン接種の時点で留意された。

## 【0321】

図20(AおよびB)は、繰返しブースターワクチン接種もHER2に特異的な免疫を刺激することを示している。動物289-003に対しては6か月および10か月に、動物289-004に対しては8か月に繰返しブースターワクチン接種を投与した。臨床的転帰。ワクチン接種した群の中の8匹/18匹のイヌが再発し、4匹は肺の転移性疾患有し、4匹は骨転移を有した。骨転移を有する2匹のイヌは肺の転移へと進行した。仙骨に骨病巣を有する1匹のイヌは、誤嚥性肺炎で死に、孤立性肺結節を有する1匹のイヌは腎芽細胞腫で死んだが、骨および肺の病巣からのそれぞれの検視標本を転移性骨肉腫の病理組織学的な確認のために利用することができなかった。これらの2匹のイヌはOSAに特異的な生存解析から打ち切られた。再発したイヌは主任臨床医の自由裁量で異なる救援化学療法および放射線療法を受けた。骨転移を有する4匹のイヌは鎮痛薬のみを用いて(1匹のイヌ)、緩和放射線単独で(1匹のイヌ)、または化学療法と組み合わせて(2匹のイヌ)処置された。2匹のイヌはアドリアマイシンを受容し、1匹のイヌは肺の転移性疾患の治療のためにパラディアを受容した。ワクチン接種したイヌに対するOSAに特異的な平均生存期間にはまだ到達していない。TTMおよびOSAに特異的な生存に対するカプラン-マイヤー生存率曲線を図21に示す。ワクチン接種したイヌに対する1年および2年の全生存率は、それぞれ71.4%および57%である。ワクチン接種の2か月以内にHER2/neuに特異的なIFN-応答を発生した12匹のイヌのうち、9匹がまだ生存している(3匹のイヌ>900日、1匹のイヌ>700日、3匹のイヌ>400日、および2匹のイヌ>300日、7匹は今日まで腫瘍が無いままである(表7))。図24に提示される結果は、ADX31-164がHER2/Neuへの耐性を破壊することを実証する。これはOSAの治療ならびに他のHER2/Neu腫瘍および/またはガンに対して有意である場合がある。

10

20

30

## 【0322】

剖検所見。6匹/18匹のイヌは研究期間の間に死に、これらのイヌのうち4匹で剖検を遂行した。3匹のイヌは、肺(3匹のイヌ)、骨(2匹のイヌ)、縦隔(1匹のイヌ)、および腎臓(1匹のイヌ)が関与するグレードIIおよびグレードIIIの多巣性転移性骨肉腫を有することが見出された。大きい進行性の腎腫瘍のために安楽死させた1匹のイヌは、腎芽細胞腫を有することが見出された。このイヌは単一の肺結節も有したが、これは残念ながら病理組織検査による評価はされなかった。

40

## 【0323】

ADX31-164の投与に続く生存、生存の延長、腫瘍進行

スクリーニング時に複数の転移性肺結節を有し、思いやりのあるケアとして治療された3匹のイヌは、疾患の進行の前に各々1つのワクチンを受容し、研究から除外された。スクリーニング時に孤立性転移性肺結節を提示した2匹のイヌは3つのワクチンすべてを受容した(表徵および腫瘍特徴については表5を参照)。ワクチン接種にもかかわらずこれらのイヌのうちの1匹で進行性の肺転移性疾患が発生した。既存の肺結節の大きさが3週間ごとに倍になっていたのにもかかわらず、第2のイヌではいかなる追加的な肺の病巣も発生しなかった(図22Aおよび図22B)。最後のワクチン接種の1週間後、CTスキャンは追加的な転移性病巣が無いことを確認し、そのイヌは転移巣切除術を受けた。外科手術の前に、腫瘍境界および炎症の区域を検出するために使用される染料であるインドシアニングリーン(ICG)を静脈内投与し、外科手術では近赤外光の下で肺結節および孤立性結節の近くの健康に見える肺実質のいくつかの他の区域で蛍光が見られた(図22Cおよび図22D)。肺結節の病理組織検査では、出血および壞死の大きい区域を有し、厚

50

い線維性被膜によって取り囲まれた転移性OSAを明らかにした(図22E)。IHCは、結節自体の中にごくわずかなT細胞を有する線維性被膜の周りのCD3<sup>+</sup>T細胞の蓄積を示した(図22Gおよび図22H)。近赤外光蛍光によって識別される他の区域はT細胞浸潤の焦点地域を示す(図22F、図22I、および図22J)。T細胞は、異常に大きいビメンチン陽性細胞を包囲して目立つ有糸分裂像を用いて示される(図22Kおよび図22L)。これらの所見は単一の転移性肉腫細胞が肺の中の腫瘍に特異的なT細胞によって効果的に標的化される場合があり、ADX31-164がこれによって肺の転移性疾患を防止する、可能な機構を提供する場合があることを示唆する。このイヌは外科手術から良好に回復し、広い範囲に及ぶ侵攻性のHER2/neu+転移性疾患が皮下組織(骨芽細胞性、グレードIIおよび軟骨芽細胞性、グレードIII)、縦隔(骨芽細胞、グレードII)、および横隔膜(骨芽細胞、グレードIII)に発生する前5か月間の間肺の転移性疾患が無いままであった。結果は、HER2/neuに特異的なT細胞応答の誘導にもかかわらず、腫瘍外での副作用が識別されず、したがってHER2/neuに特異的なT細胞の誘導はHER2/neu陽性の転移性細胞の除去および疾患の再発からの長期の保護を担当することを示す。これはHER2/Neuに特異的なT細胞増幅のタイミングによってサポートされ、これは数多くのイヌが転移性疾患を発生するとき、また巣状T細胞の病理組織学的所見によってワクチン接種および転移巣切除術に続いて1匹のイヌの肺実質の中で応答するとき、5匹のイヌでは診断のおよそ8か月後に発生した。

10

#### 【0324】

図22および図23に提示される結果は、ADX31-164の投与が自然発生的なHER2+骨肉腫を有するイヌの転移性疾患を遅延および/または防止し、かつ全生存を長くすることを実証する。両方の図で見ることができるように、ワクチンを受容しているイヌは、有意に延長された生存時間有し、一方でこれらのワクチンを受容しているイヌに対する平均生存期間にはまだ達していない。

20

#### 【0325】

発明者らの研究は転移性疾患を防止するうえでのこのアプローチの有効性を実証するが、ADX31-164を用いたワクチン接種は、思いやりのあるケアに基づき治療を受けた5匹のイヌでは既存の大きい肺の転移性疾患の退行を誘発することができなかった。1匹のイヌでは、これはT細胞が転移性病巣を包囲する線維性被膜に浸透することができないこと、またはこれらの細胞が定着した腫瘍微小環境内で生存することと関連付けられると思われた(図22C)。しかしながら、この同じイヌで、周囲の大きい活動的に分割している間葉細胞を浸潤し、転移性OSA細胞となると言われているT細胞の焦点地域は大幅に正常な肺実質内で識別され、また予想に反してこのイヌの転移巣切除術の後はさらなる肺の転移性疾患は発生しなかった。これらを考え合わせると、これらのデータは、転移性OSA細胞をFAS/FASL媒介アポトーシスに敏感にする場合があるその有能な先天的な免疫応答、および微小転移性肺疾患を除去するHER2/Neuに特異的なT細胞の形態の適応性免疫応答を誘発する能力を通してADX31-164が肺の転移性疾患を防止していることを示唆する。

30

#### 【0326】

##### 結論：

この適用を登録した時点では、12匹/18匹のイヌは肺の転移性疾患を発生しておらず、最低限の残留疾患の設定で投与するときADX31-164が自然発生HER2+骨肉腫を患う被験者内の転移性疾患を防止することを実証していた。ワクチン接種したイヌは、履歴的なHER2/Neu+対照群と比較して、全生存の統計的に有意な増加を示した。HER2/Neu+対照のイヌ(n=11)での平均生存期間は、316日(p=0.032)であり、ADX31-164治療されたイヌでの平均生存期間はまだ達していない。さらに、結果はADX31-164がHER2/Neuの高度に保存されたIC1ドメインに対する末梢耐性を破壊することを示している(図26)。ADX31-164投与の24時間以内の白血球の増加の程度は(図18)は、生存と相関し、ワクチンに応答するため転帰がイヌの免疫系の能力に部分的に依存することを示唆する。重要

40

50

なことに、この研究は自発性OSAを有するイヌに最高 $3 \times 10^9$  CFUまでのADX31-164の投与が安全であり、投与時に単に一時的な低いグレードの副作用のみを発生することを示している。さらに、肺の転移性疾患の防止は、部分的にCD3+T細胞が媒介する肺内の顕微鏡的な転移性疾患の除去と関連付けられる場合がある。この研究は小児科のOSAおよびHER2/neuを発現する他のヒトのガンのために重要な意味合いを有する。

### 【0327】

さらに、ここで発明者らはイヌでの最高 $3 \times 10^9$  CFUまでの投与量でのADX31-164の投与が安全であること、HER2/neuに特異的な免疫性を誘発するにもかかわらず、短期または長期の心毒性につながらないことを示した。標的上で、心毒性を含む腫瘍外での副作用は、多数のHER2/neuに特異的なT細胞の投与と、またはトラスツズマブがアントラサイクリンとの同時使用時とに関連付けられてきた。発明者らは、あらゆる潜在的な心毒性のリスクを減少するためにドキソルビシンを用いない標準的な化学療法プロトコルを採用した。

### 【0328】

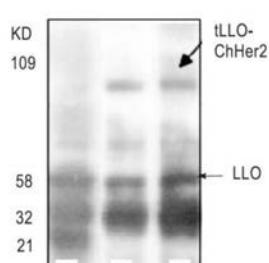
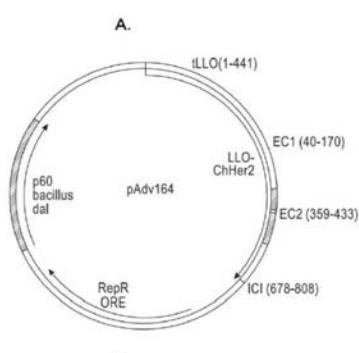
発明者らの研究は、OSAを有するイヌでADX31-164が肺の転移性疾患を防止することができることを実証した。これらの結果は安全性およびかつてないほどの生存時間をOSAを有するイヌで実証し、小児骨肉腫および乳ガンを含むHER2/neuを発現する腫瘍を有する患者内の転移性疾患を防止する、ADX31-164の能力を調査する道筋を固めるものである。

### 【0329】

本発明のある特定の特徴が本明細書に例示され記述してきたが、今では当業者には多くの修正、置換、変更、および均等物が生じるであろう。したがって、添付の特許請求の範囲が、本発明の真の趣旨に含まれるかかるすべての修正および変更を網羅することを意図していることが理解されるべきである。

【図1】

【図1】



1—負のLm-対照  
2—Lm-tLLO-ChHer2  
3—ADX31-164

図1

【図2】

【図2】

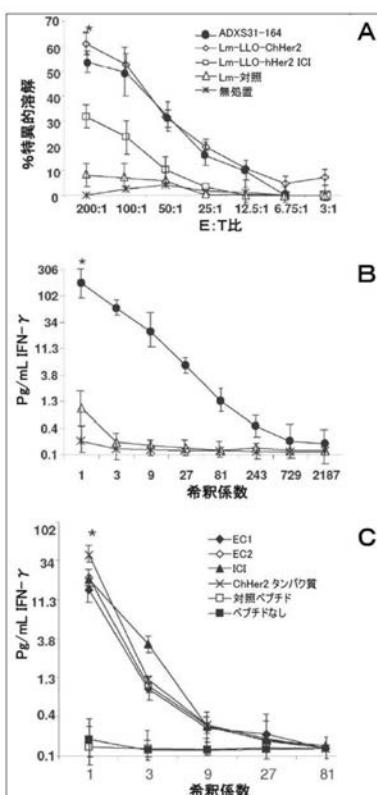


図2

## 【図3】

【図3】

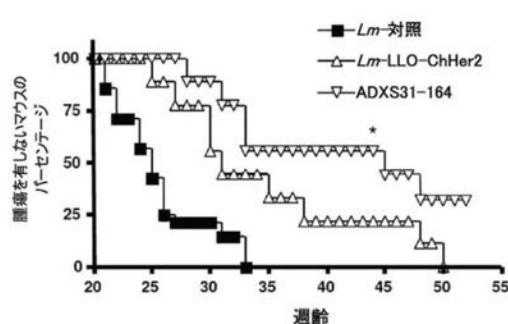


図3

## 【図4】

【図4】

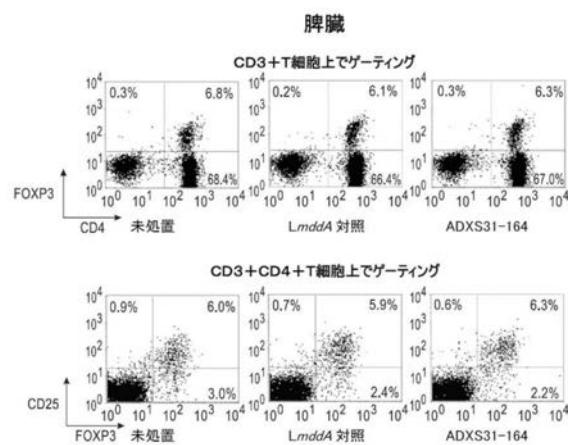
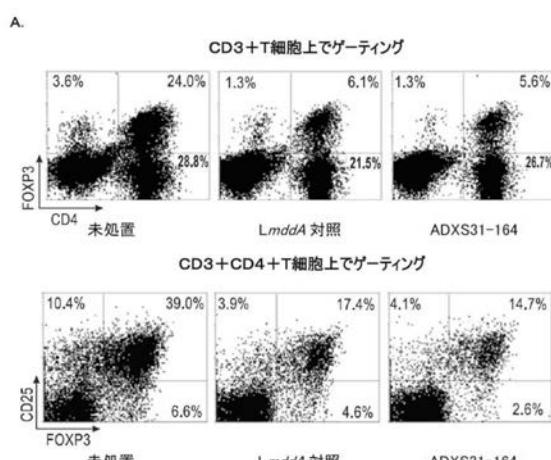


図4

## 【図5】

【図5】



B.

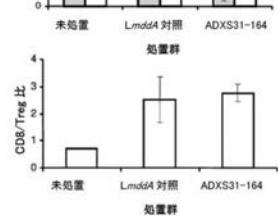
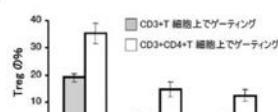
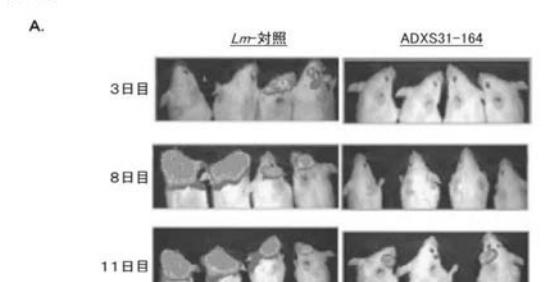


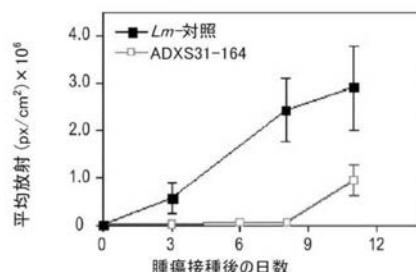
図5

## 【図6】

【図6】



B.



C.

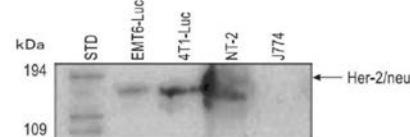
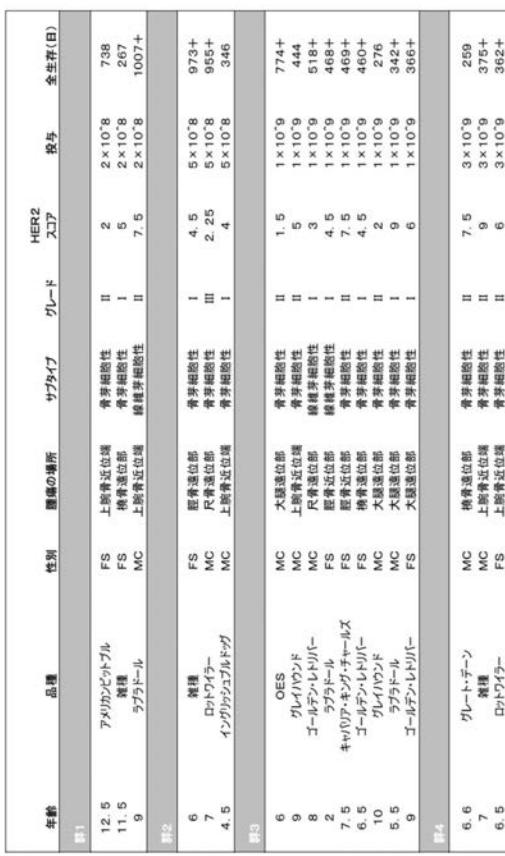


図6

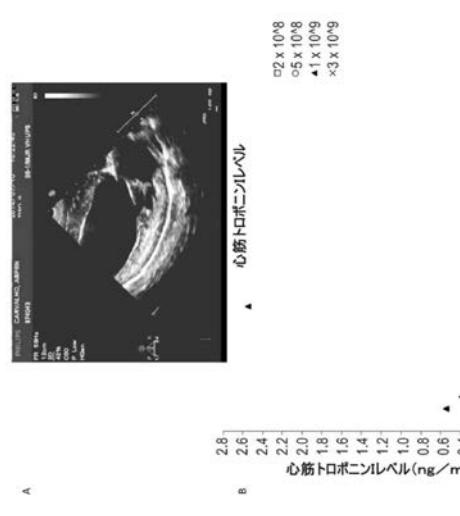
【 図 7 】

【図7】



【 四 8 】

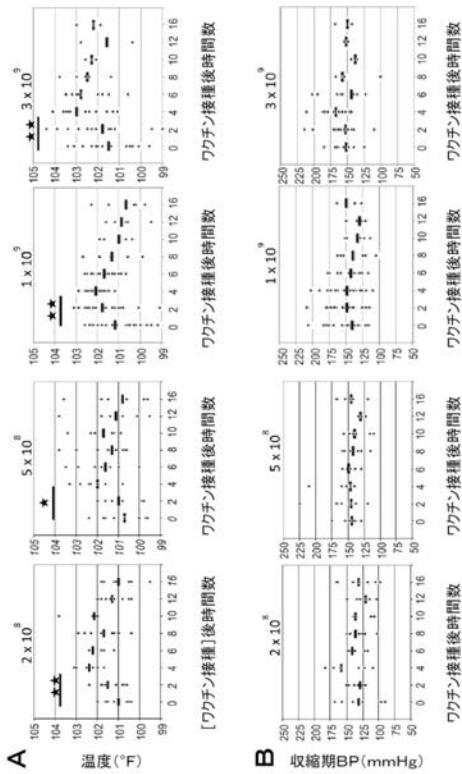
[図 8]



8

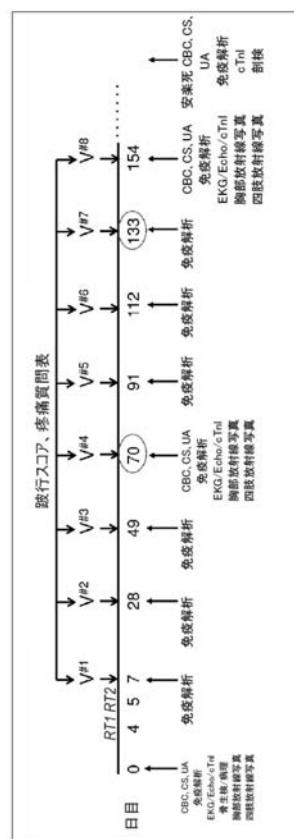
【 四 9 】

【図9】



【 図 1 0 】

【図10】



10

## 【図11】

【図11】

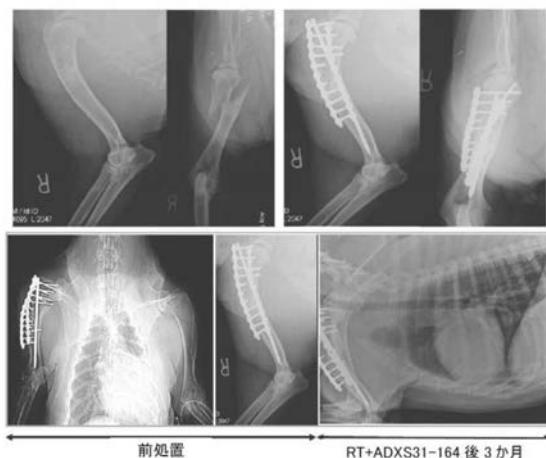


図11

## 【図12】

【図12】

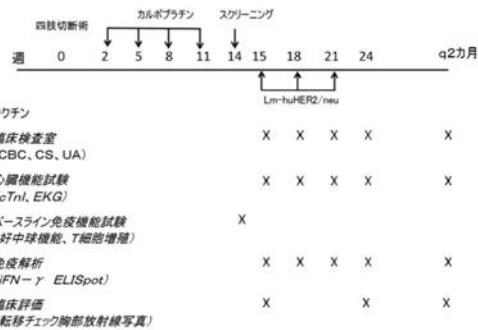


図12

## 【図13】

【図13】

A.

ADXS31-164投与量		$2 \times 10^8$	$5 \times 10^8$	$1 \times 10^9$	$3 \times 10^9$	合計
採用したイヌの数		3	3	12	5	23
<b>一般的な理査</b>						
Pyrexia( $T > 103$ )		2	1	4	4	11
疲労		1	0	7	2	10
吐き気	グレード1	1	2	10	2	15
	グレード2	1	0	0	0	1
嘔吐	グレード1	1	2	9	3	15
	グレード2	2	0	0	0	2
<b>心臓血管異常</b>						
不整脈	グレード1	0	1	0	0	1
	グレード2	0	0	1	1	2
頻脈	グレード1	0	0	2	1	3
	グレード2	0	0	0	1	1
低血圧		0	0	0	0	0
高血圧	グレード1	2	3	8	5	18
<b>血液学的/ワニール</b>						
血小板減少	グレード1	2	2	6	3	13
	グレード2	0	0	2	1	3
<b>生化学的/パラメータ(増加)</b>						
$\gamma$ -GT		0	2	1	0	3
	グレード1	0	1	6	1	8
ALKP	グレード2	0	0	0	1	1
	グレード3	1	0	0	0	1
ALT	グレード1	1	1	3	0	5
	グレード2	0	0	0	1	1
	グレード3	1	0	0	0	1
AST	グレード1	1	1	4	2	8
	グレード2	0	0	2	0	2
	グレード3	0	0	1	0	1
BUN		0	0	0	0	0
CREA		0	0	0	0	0
心筋トロポニンI( $> 0.2$ )		0	0	1	0	1

B.

最初のワクチン接種の時点ではすべてのイヌは全般的な転移性疾患を有しなかつた。

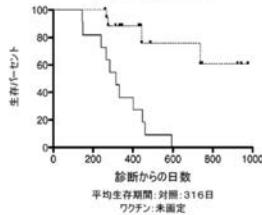


図13

## 【図14】

【図14】

A.



B.

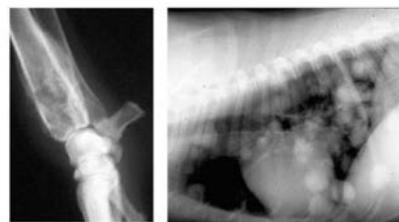


図14

## 【図15】

【図15】

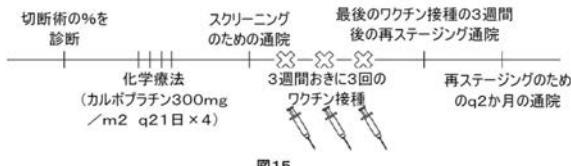


図15

【図 16】

【図16】

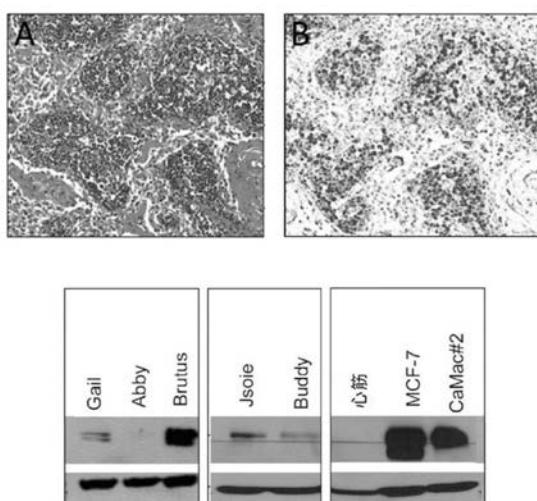


図16

【図 17】

【図17】

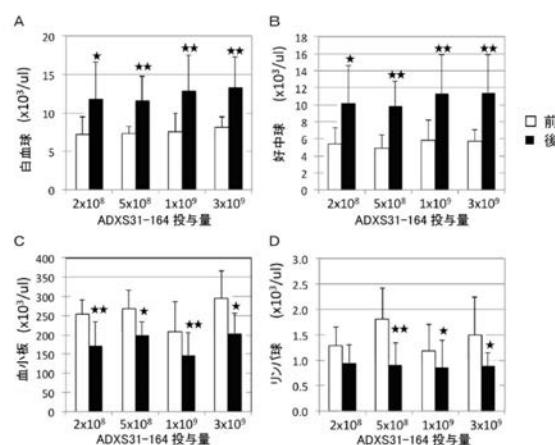


図17

【図 18】

【図18】

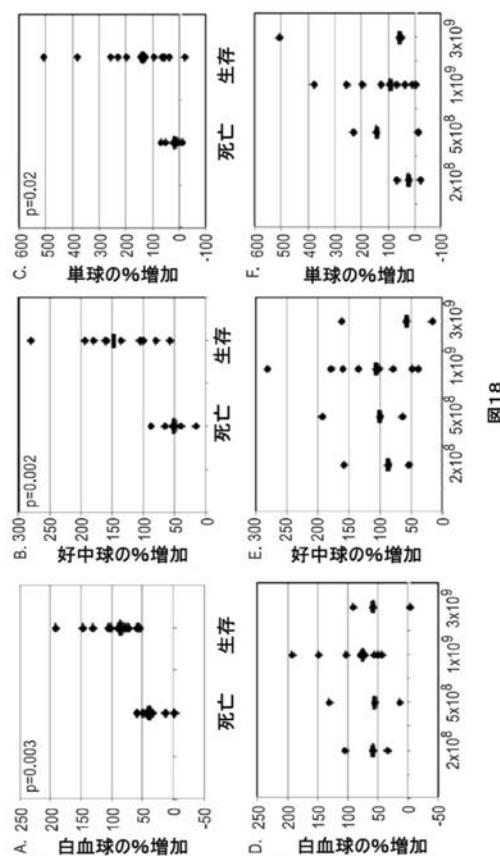


図18

【図 19】

【図19】

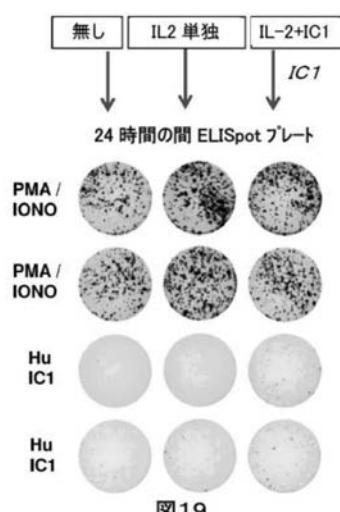


図19

【図 2 0】

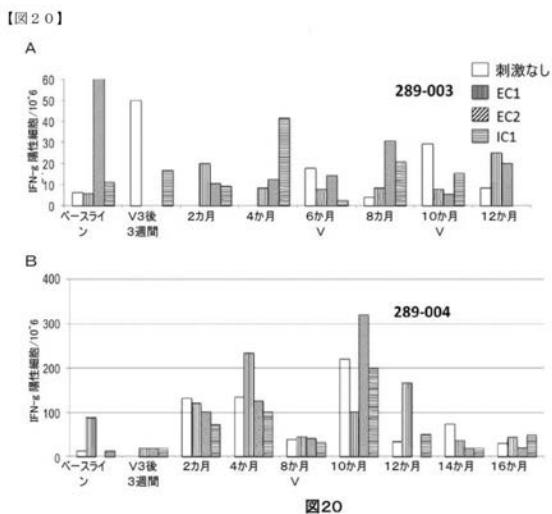


図20

【図 2 1】

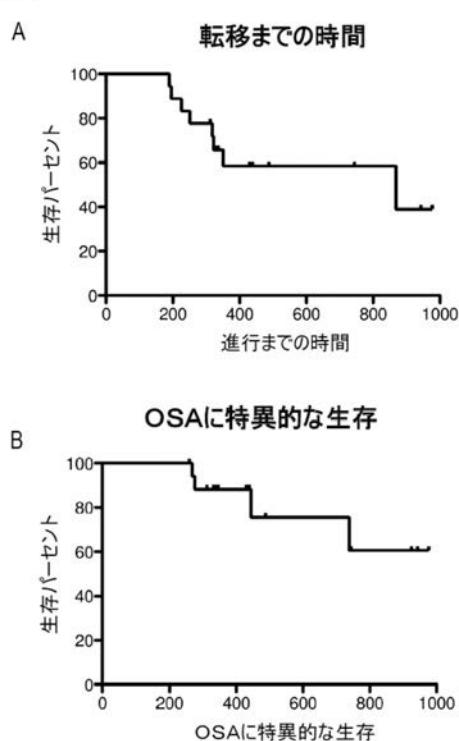


図21

【図 2 2】

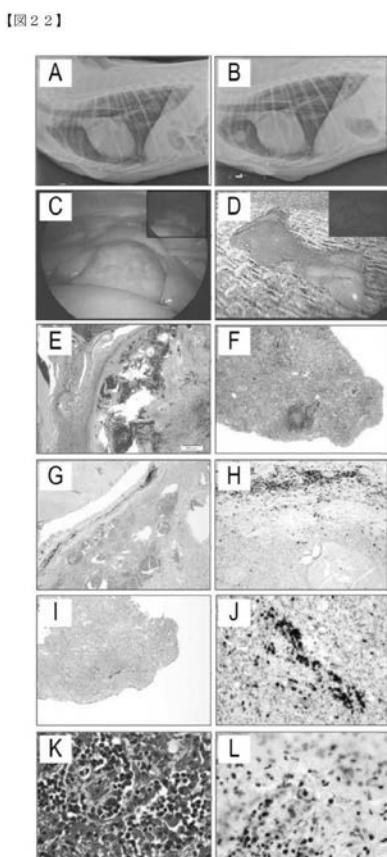


図22

【図 2 3】

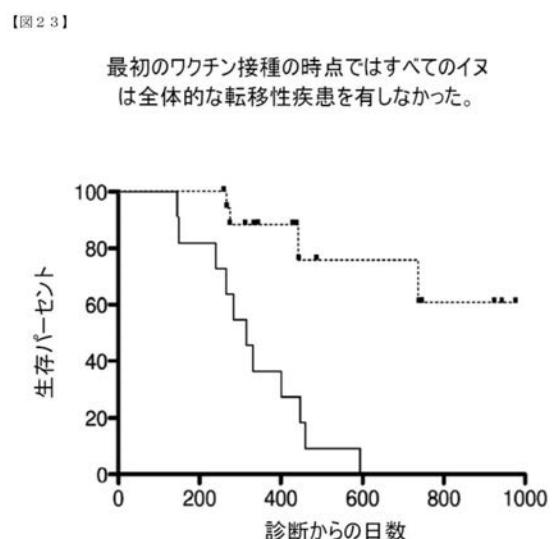
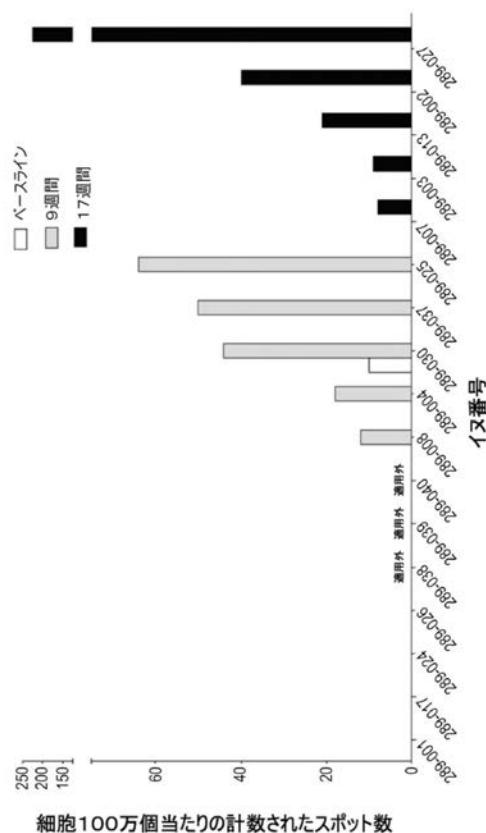


図23

【図 2 4】

【図 2 4】



【図 2 5 A】

【図 2 5 A】

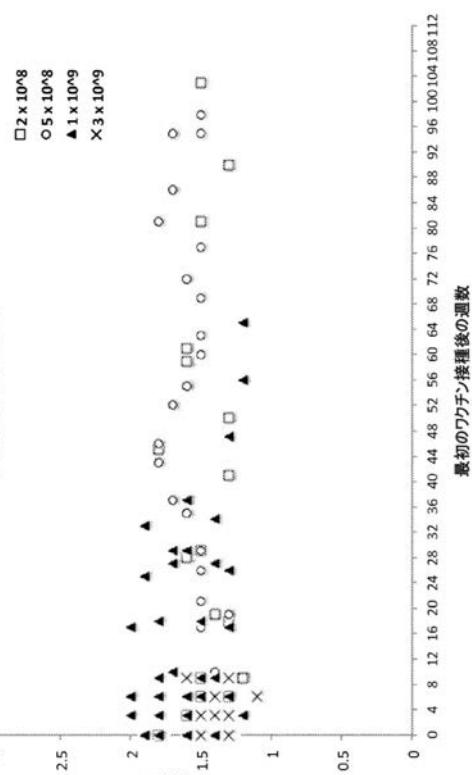
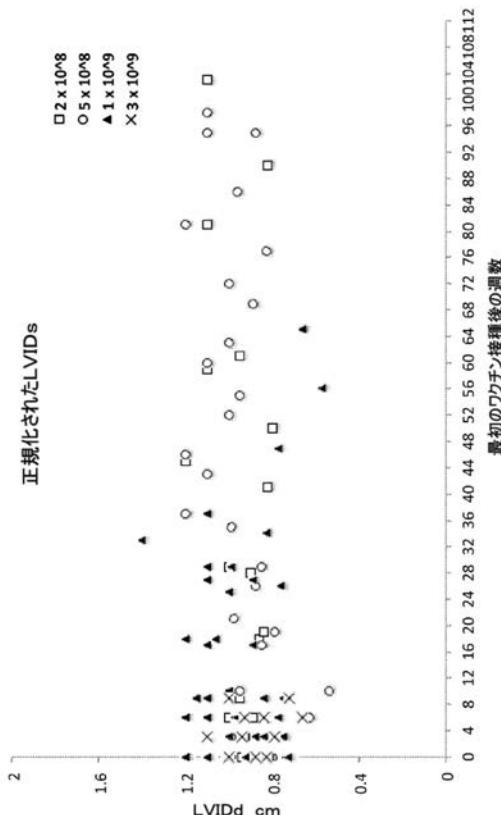


図25A

【図 2 5 B】

【図 2 5 B】



【図 2 5 C】

【図 2 5 C】

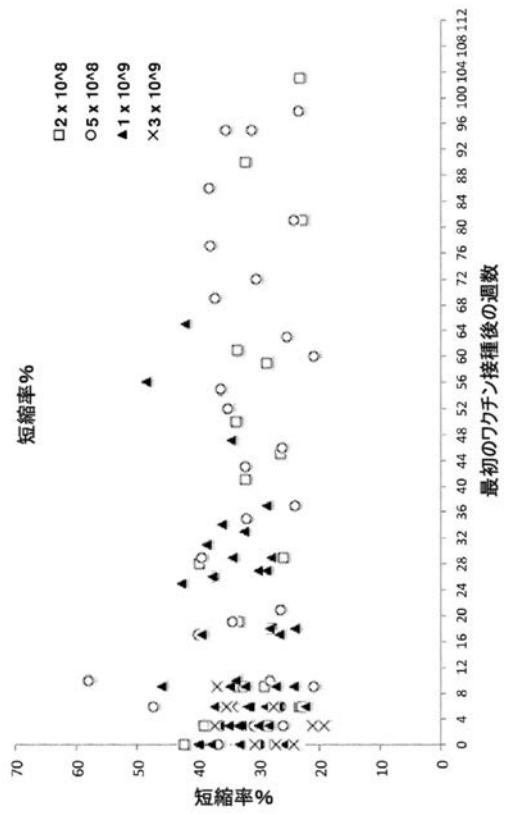
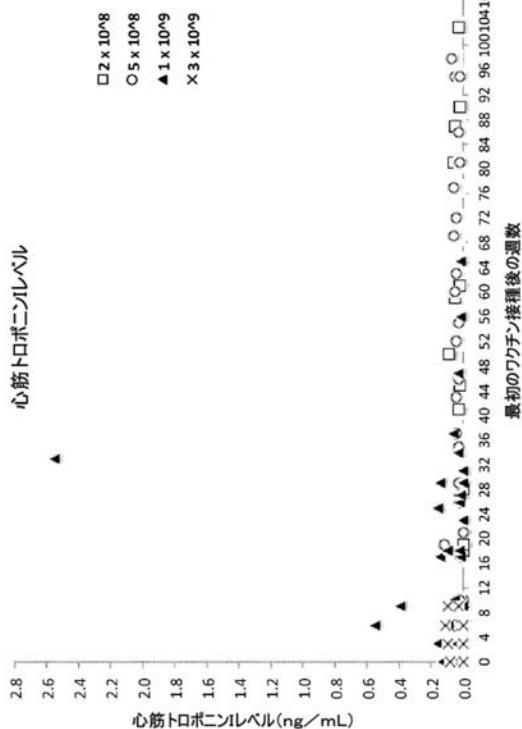


図25C

【図 2 5 D】

【図 25D】



【図 2 6】

【図 26】

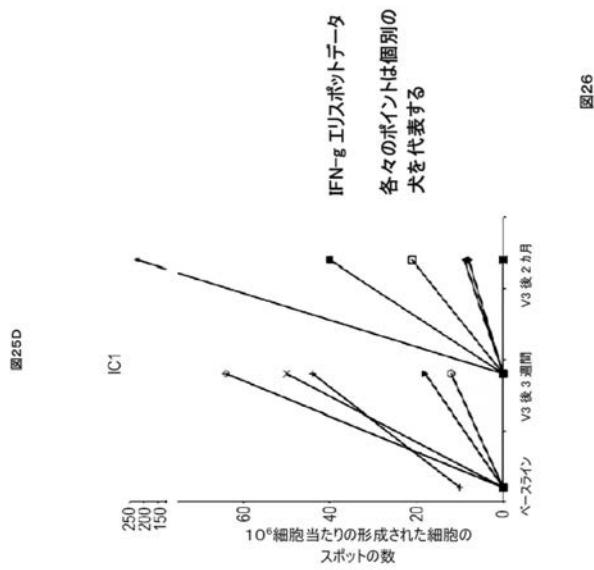


図26

【配列表】

2017507943000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/17559
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12N 1/12, C12N 1/20 (2015.01) CPC - C12R 1/01, A61K 38/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> <small>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</small> IPC(8) - C12N 1/12, C12N 1/20 (2015.01) CPC - C12R 1/01, A61K 38/00		
<small>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</small> USPC - 435/252.1, 435/252.3		
<small>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</small> pubWEST, PatBase, Google Scholar <small>search terms - her2, neu, antigen, MHC, attenuat*, lsteria, recombi*</small>		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012/0014984 A1 (SHAHABI) 19 January 2012 (19.01.2012) para [0006]; [0009]-[0010]; [0020]; [0023]-[0030]; [0040]; [0049]; [0051]; [0101]; [0158]; [0164]; [0186]; claim 23, 24, 73.	1-38
A	US 2002/025323 A1 (PATERSON et al.) 28 February 2002 (28.02.2002) abstract; para [0010]-[0020].	1-38
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
<small>* Special categories of cited documents:</small> <small>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</small> <small>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</small> <small>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</small> <small>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</small> <small>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</small>		
<small>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</small> <small>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</small> <small>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</small> <small>"&amp;" document member of the same patent family</small>		
Date of the actual completion of the international search 05 May 2015 (05.05.2015)	Date of mailing of the international search report <b>05 JUN 2015</b>	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: <b>Lee W. Young</b> <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>	

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 0 7 K 14/195 (2006.01)	C 0 7 K 14/195	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,C1,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 シャハビ, バファ

アメリカ合衆国 ペンシルバニア 19481, パレー フォージ, ジャグ ホロー ロード  
200

(72)発明者 ワレチャ, アヌ

アメリカ合衆国 ペンシルバニア 19067, ヤードリー, ウィルドフラワー サークル  
201

(72)発明者 マシアグ, パウロ シー.

アメリカ合衆国 イリノイ 60047, ロング グローブ, オークウッド サークル 56  
42

(72)発明者 パターソン, イボンヌ

アメリカ合衆国 ペンシルバニア 19102, フィラデルフィア, ローカスト ストリート  
1425, ユニット 11シー

(72)発明者 メイソン, ニコラ

アメリカ合衆国 ペンシルバニア 19107, フィラデルフィア, サウス デリ ストリート  
225

(72)発明者 シーベイ, マシュー

アメリカ合衆国 ペンシルバニア 19018, セケイン, クインス レーン 887

F ターム(参考) 4B065 AA01X AA01Y AA99Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA45

4C085 AA03 AA38 BA08 BB07 BB23 CC07 DD62 EE03 EE06 FF12

FF13

4C087 AA01 AA02 BC76 CA09 NA14 ZB09 ZB26

4H045 AA30 BA10 BA41 CA11 CA41 DA86 EA22 EA28 EA31 FA74