

(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2018-512165

(P2018-512165A)

(43) 公表日 平成30年5月17日(2018.5.17)

(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	4 B 0 5 0
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 140 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-554394 (P2017-554394)	(71) 出願人	517355992
(86) (22) 出願日	平成28年4月12日 (2016. 4. 12)		アデュロ バイオテック, インコーポレイ
(85) 翻訳文提出日	平成29年12月1日 (2017. 12. 1)		テッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/027167		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 7
(87) 国際公開番号	W02016/168214		1 0 - 2 2 2 4 バークレー, 3 シー, バ
(87) 国際公開日	平成28年10月20日 (2016. 10. 20)		ンクロフト ウェイ 6 2 6
(31) 優先権主張番号	62/146, 654	(71) 出願人	398076227
(32) 優先日	平成27年4月13日 (2015. 4. 13)		ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシテ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ィー
(31) 優先権主張番号	62/146, 626		アメリカ合衆国、メリーランド州 2 1 2
(32) 優先日	平成27年4月13日 (2015. 4. 13)		1 8、ボルチモア、ノース・チャールズ・
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ストリート 3 4 0 0
(31) 優先権主張番号	62/263, 174	(74) 代理人	100095832
(32) 優先日	平成27年12月4日 (2015. 12. 4)		弁理士 細田 芳徳
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 癌の治療のための免疫原性融合タンパク質

(57) 【要約】

本明細書では、対象において免疫応答を誘発するための組成物及び方法が提供される。特に、本開示は、免疫原性融合タンパク質と、前記融合タンパク質をコードする核酸分子を含む宿主細胞を用いて免疫応答を誘発する方法とに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a. 配列番号 3 に示される E G F R v I I I x 5 - S S X 2 と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一であるヌクレオチド配列；

b. 配列番号 11 に示される E G F R v I I I x 5 - P A P_{33 ~ 386} と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一であるヌクレオチド配列；及び

c. 配列番号 15 に示される E G F R v I I I x 5 - N K X 3. 1 (R 4 1 G)_{11 ~ 234} - P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一であるヌクレオチド配列

を含む宿主細胞。

【請求項 2】

a. 配列番号 3 に示される E G F R v I I I x 5 - S S X 2 と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一であるヌクレオチド配列；

b. 配列番号 11 に示される E G F R v I I I x 5 - P A P_{33 ~ 386} と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一であるヌクレオチド配列；及び

c. 配列番号 22 に示される E G F R v I I I x 5 - N K X 3. 1_{11 ~ 234} - P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一であるヌクレオチド配列

を含む宿主細胞。

【請求項 3】

1 つ又は複数の核酸分子を含む宿主細胞であって、前記核酸分子が、

a. 配列番号 6 と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリペプチド、及び配列番号 10 に示される S S X 2 と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一のアミノ酸配列を含む S S X 2 ポリペプチドを含む、E G F R v I I I - S S X 2 融合タンパク質；

b. 配列番号 6 と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリペプチド、及び配列番号 14 に示される P A P_{33 ~ 386} と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一のアミノ酸配列を含む P A P ポリペプチドを含む、E G F R v I I I - P A P_{33 ~ 386} 融合タンパク質；

c. 配列番号 6 と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリペプチド、配列番号 25 に示される N K X 3. 1_{11 ~ 234} と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一のアミノ酸配列を含む N K X 3. 1 ポリペプチド、及び配列番号 20 に示される P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一のアミノ酸配列を含む P S M A ポリペプチドを含む、E G F R v I I I - N K X 3. 1_{11 ~ 234} - P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} 融合タンパク質；

d. 配列番号 6 と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリペプチド、配列番号 18 に示される N K X 3. 1 (R 4 1 G)_{11 ~ 234} と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一のアミノ酸配列を含む N K X 3. 1 ポリペプチド、及び配列番号 20 に示される P S M A_{1 ~ 2}

10

20

30

40

50

0, 44~138, 169~750 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P S M A ポリペプチドを含む、E G F R v I I I - N K X 3. 1 (R 4 1 G) 1 1 ~ 2 3 4 - P S M A 1 ~ 2 0, 44~138, 169~750 融合タンパク質；

e. 配列番号 29 に示される N K X 3. 1 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む N K X 3. 1 ポリペプチド、及び配列番号 14 に示される P A P 3 3 ~ 3 8 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P A P ポリペプチドを含む、N K X 3. 1 - P A P 3 3 ~ 3 8 6 融合タンパク質；

f. 配列番号 2 として示される A c t A N 1 0 0 * と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む A c t A N 1 0 0 * ポリペプチド、及び配列番号 10 に示される S S X 2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む S S X 2 ポリペプチドを含む、A c t A N 1 0 0 * - S S X 2 融合タンパク質；又は

g. 配列番号 33 のアミノ酸残基 1~100 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む A c t A N 1 0 0 ポリペプチド、及び配列番号 33 のアミノ酸残基 103~459 に示される P A P 3 0 ~ 3 8 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P A P ポリペプチドを含む、A c t A N 1 0 0 - P A P 3 0 ~ 3 8 6 融合タンパク質；

h. これらの任意の組み合わせ

をコードする核酸配列を含む、宿主細胞。

【請求項 4】

前記核酸分子が、

a. 配列番号 3 に示される E G F R v I I I x 5 - S S X 2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；

b. 配列番号 11 に示される E G F R v I I I x 5 - P A P 3 3 ~ 3 8 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；

c. 配列番号 22 に示される E G F R v I I I x 5 - N K X 3. 1 1 1 ~ 2 3 4 - P S M A 1 ~ 2 0, 44~138, 169~750 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；

d. 配列番号 15 に示される E G F R v I I I x 5 - N K X 3. 1 (R 4 1 G) 1 1 ~ 2 3 4 - P S M A 1 ~ 2 0, 44~138, 169~750 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；

e. 配列番号 26 に示される N K X 3. 1 - P A P 3 3 ~ 3 8 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；

f. 配列番号 30 に示される A c t A N 1 0 0 * - S S X 2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；

g. 配列番号 32 に示される A c t A N 1 0 0 * - P A P 3 3 ~ 3 8 6 - S L 8 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一である核酸配列；

h. 配列番号 34 に示される E G F R v I I I x 1 - P A P 3 3 ~ 3 8 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；

10

20

30

40

50

i. 配列番号 36 に示される EGFRvIIIX2-PAP_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；

j. 配列番号 38 に示される EGFRvIIIX3-PAP_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；

k. 配列番号 40 に示される EGFRvIIIX4-PAP_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；又は

l. これらの任意の組合せを含む、請求項 3 に記載の宿主細胞。

10

【請求項 5】

a. 配列番号 3 に示される EGFRvIIIX5-SSX2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；

b. 配列番号 11 に示される EGFRvIIIX5-PAP_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；及び

c. 配列番号 15 に示される EGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列

20

を含む、請求項 3 又は 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 6】

a. 配列番号 3 に示される EGFRvIIIX5-SSX2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；

b. 配列番号 11 に示される EGFRvIIIX5-PAP_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；及び

30

c. 配列番号 22 に示される EGFRvIIIX5-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列

を含む、請求項 3 又は 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 7】

前記核酸分子が、

a. 配列番号 4 のアミノ酸残基 89~475 に示される EGFRvIIIX5-SSX2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるアミノ酸配列；

b. 配列番号 12 のアミノ酸残基 89~606 に示される EGFRvIIIX5-PAP_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるアミノ酸配列；

40

c. 配列番号 23 のアミノ酸残基 89~1177 に示される EGFRvIIIX5-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるアミノ酸配列；

d. 配列番号 16 のアミノ酸残基 89~1177 に示される EGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるアミノ酸配列；

50

e. 配列番号 27 のアミノ酸残基 89～678 に示される NKX3.1-PAP_{33～386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるアミノ酸配列；

f. 配列番号 31 に示される ActAN100*-SSX2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるアミノ酸配列；

g. 配列番号 33 のアミノ酸残基 1～459 に示される ActAN100*-PAP_{30～386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるアミノ酸配列；

h. 配列番号 35 のアミノ酸残基 89～476 に示される EGFRvIIIX1-PAP_{33～386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるアミノ酸配列；

i. 配列番号 37 のアミノ酸残基 89～509 に示される EGFRvIIIX2-PAP_{33～386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるアミノ酸配列；

j. 配列番号 39 のアミノ酸残基 89～541 に示される EGFRvIIIX3-PAP_{33～386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるアミノ酸配列；

k. 配列番号 41 のアミノ酸残基 89～573 に示される EGFRvIIIX4-PAP_{33～386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるアミノ酸配列；又は

l. これらの任意の組合せ

をコードする核酸配列を含む、請求項 3～6 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 8】

対象において免疫応答を誘発する方法であって、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の宿主細胞を含む組成物を前記対象に投与するステップを含む方法。

【請求項 9】

前記核酸分子が、配列番号 3 に示される EGFRvIIIX5-SSX2、配列番号 11 に示される EGFRvIIIX5-PAP_{33～386}、及び配列番号 15 に示される EGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11～234}-PSMA_{1～20,44～138,169～750} を含む、請求項 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 10】

前記核酸分子が、配列番号 3 に示される EGFRvIIIX5-SSX2、配列番号 11 に示される EGFRvIIIX5-PAP_{33～386}、及び配列番号 15 に示される EGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11～234}-PSMA_{1～20,44～138,169～750} からなる、請求項 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 11】

上皮増殖因子受容体変異型 III (EGFRvIII) ポリペプチドと、滑膜肉腫、X ブレークポイント 2 (SSX2) ポリペプチドとを含む融合タンパク質。

【請求項 12】

前記 EGFRvIII ポリペプチドが、配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 11 に記載の融合タンパク質。

【請求項 13】

複数の EGFRvIII ポリペプチドを含む、請求項 11 又は 12 に記載の融合タンパク質。

【請求項 14】

前記 SSX2 ポリペプチドが、配列番号 10 に示される SSX2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 11～13 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 15】

配列番号4のアミノ酸残基89～475に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含む、請求項11～14のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 16】

請求項11～15のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする核酸分子。

【請求項 17】

請求項16に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 18】

請求項16に記載の核酸分子を含む宿主細胞。

【請求項 19】

請求項18に記載の宿主細胞と、薬学的に許容される賦形剤とを含むワクチン。

【請求項 20】

EGFRvIIIPポリペプチドと、前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)ポリペプチドとを含む融合タンパク質。

【請求項 21】

前記EGFRvIIIPポリペプチドが、配列番号6と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含む、請求項20に記載の融合タンパク質。

【請求項 22】

前記PAPポリペプチドが、配列番号14に示されるPAP_{33～386}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含む、請求項20又は21に記載の融合タンパク質。

【請求項 23】

請求項20～22のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする核酸分子。

【請求項 24】

請求項23に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 25】

請求項23に記載の核酸分子を含む宿主細胞。

【請求項 26】

請求項25に記載の宿主細胞と、薬学的に許容される賦形剤とを含むワクチン。

【請求項 27】

EGFRvIIIPポリペプチド、NK3ホメオボックス1(NKX3.1)ポリペプチド、及び前立腺特異的膜抗原(PSMA)ポリペプチドを含む融合タンパク質。

【請求項 28】

前記EGFRvIIIPポリペプチドが、配列番号6と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含む、請求項27に記載の融合タンパク質。

【請求項 29】

前記PSMAポリペプチドが、配列番号20に示されるPSMA_{1～20, 44～138, 169～750}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含む、請求項27又は28に記載の融合タンパク質。

【請求項 30】

前記NKX3.1ポリペプチドが、配列番号25に示されるNKX3.1_{111～234}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含む、請求項27～29のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 31】

前記NKX3.1ポリペプチドが、配列番号18に示されるNKX3.1_{111~234}(R41G)と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含む、請求項27~29のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項32】

請求項27~31のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする核酸分子。

【請求項33】

請求項32に記載の核酸分子を含む宿主細胞。

【請求項34】

請求項33に記載の宿主細胞と、薬学的に許容される賦形剤とを含むワクチン。

10

【請求項35】

NK3ホメオボックス1(NKX3.1)ポリペプチドと、PAPポリペプチドとを含む融合タンパク質。

【請求項36】

請求項35に記載の融合タンパク質をコードする核酸分子。

【請求項37】

請求項36に記載の核酸分子を含む宿主細胞。

【請求項38】

請求項37に記載の宿主細胞と、薬学的に許容される賦形剤とを含むワクチン。

【請求項39】

対象において免疫応答を誘発する方法であって、宿主細胞を含む組成物を前記対象に投与するステップを含み、前記宿主細胞が、

a. 配列番号6と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIPポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、EGFRvIIIP-SSX2融合タンパク質；

b. 配列番号6と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIPポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、EGFRvIIIP-PAP_{33~386}融合タンパク質；

30

c. 配列番号6と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIPポリペプチド、配列番号25に示されるNKX3.1_{111~234}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20,44~138,169~750}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRvIIIP-NKX3.1_{111~234}-PSMA_{1~20,44~138,169~750}融合タンパク質；

40

d. 配列番号6と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIPポリペプチド、配列番号18に示されるNKX3.1(R41G)_{111~234}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20,44~138,169~750}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRvIIIP-NKX3.1(R41G)_{111~234}-PSMA_{1~20,44~138,169~750}融合タンパク質；

50

e. 配列番号 29 に示される NKX3. 1 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む NKX3. 1 ポリペプチド、及び配列番号 14 に示される PAP_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む PAP ポリペプチドを含む、NKX3. 1-PAP_{33~386} 融合タンパク質；

f. 配列番号 2 として示される ActAN100* と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む ActAN100* ポリペプチド、及び配列番号 10 に示される SSX2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む SSX2 ポリペプチドを含む、ActAN100*-SSX2 融合タンパク質；

g. 配列番号 2 として示される ActAN100* と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む ActAN*100 ポリペプチド、及び配列番号 33 のアミノ酸残基 103~459 に示される PAP_{30~386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む PAP ポリペプチドを含む、ActAN100*-PAP_{30~386} 融合タンパク質；又は

h. これらの任意の組み合わせ

を含む 1 つ又は複数の融合タンパク質を発現する、方法。

【請求項 40】

抗原ポリペプチドの発現を増大させる方法であって、宿主細胞において核酸分子を発現させるステップを含み、前記核酸分子が、

a. 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の EGFRvIII ポリペプチド、及び配列番号 10 に示される SSX2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む SSX2 ポリペプチドを含む、EGFRvIII-SSX2 融合タンパク質；

b. 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の EGFRvIII ポリペプチド、及び配列番号 14 に示される PAP_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む PAP ポリペプチドを含む、EGFRvIII-PAP_{33~386} 融合タンパク質；

c. 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の EGFRvIII ポリペプチド、配列番号 25 に示される NKX3. 1_{11~234} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む NKX3. 1 ポリペプチド、及び配列番号 20 に示される PSMA_{1~20, 44~138, 169~750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む PSMA ポリペプチドを含む、EGFRvIII-NKX3. 1_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750} 融合タンパク質；

d. 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の EGFRvIII ポリペプチド、配列番号 18 に示される NKX3. 1 (R41G)_{11~234} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む NKX3. 1 ポリペプチド、及び配列番号 20 に示される PSMA_{1~20, 44~138, 169~750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む PSMA ポリペプチドを含む、EGFRvIII-NKX3. 1 (R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750} 融合タンパク質；

10

20

30

40

50

e. 配列番号 29 に示される NKX3. 1 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む NKX3. 1 ポリペプチド、及び配列番号 14 に示される PAP_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む PAP ポリペプチドを含む、NKX3. 1-PAP_{33~386} 融合タンパク質；

f. 配列番号 2 として示される ActAN100* と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む ActAN100* ポリペプチド、及び配列番号 10 に示される SSX2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む SSX2 ポリペプチドを含む、ActAN100*-SSX2 融合タンパク質；

g. 配列番号 2 として示される ActAN100* と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む ActAN*100 ポリペプチド、及び配列番号 33 のアミノ酸残基 103~459 に示される PAP_{30~386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む PAP ポリペプチドを含む、ActAN100*-PAP_{30~386} 融合タンパク質；又は

h. これらの任意の組み合わせをコードする核酸配列を含む、方法。

【請求項 41】

前記 1 つ又は複数の核酸分子が、

a. 配列番号 3 に示される EGFRvIIIX5-SSX2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；

b. 配列番号 11 に示される EGFRvIIIX5-PAP_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；及び

c. 配列番号 15 に示される EGFRvIIIX5-NKX3. 1 (R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列

を含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 42】

前記 1 つ又は複数の核酸分子が、配列番号 3 に示される EGFRvIIIX5-SSX2、配列番号 11 に示される EGFRvIIIX5-PAP_{33~386}、及び配列番号 15 に示される EGFRvIIIX5-NKX3. 1 (R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750} からなる、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

癌の治療を、それを必要とする対象において行う方法であって、治療有効量の、宿主細胞を含む組成物を前記対象に投与するステップを含み、前記宿主細胞が、

a. 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の EGFRvIIIX5 ポリペプチド、及び配列番号 10 に示される SSX2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む SSX2 ポリペプチドを含む、EGFRvIIIX5-SSX2 融合タンパク質；

b. 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の EGFRvIIIX5 ポリペプチド、及び配列番号 14 に示される PAP_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む PAP ポリペプチドを含む、EGFRvIIIX5-PAP_{33~386} 融合タンパク質；

10

20

30

40

50

c. 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、配列番号25に示されるNKX3. 1₁₁~2₃₄と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3. 1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA₁~2₀, 4₄~1₃₈, 1₆₉~7₅₀と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRvIII-NKX3. 1₁₁~2₃₄-PSMA₁~2₀, 4₄~1₃₈, 1₆₉~7₅₀融合タンパク質；

d. 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、配列番号18に示されるNKX3. 1(R41G)₁₁~2₃₄と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3. 1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA₁~2₀, 4₄~1₃₈, 1₆₉~7₅₀と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRvIII-NKX3. 1(R41G)₁₁~2₃₄-PSMA₁~2₀, 4₄~1₃₈, 1₆₉~7₅₀融合タンパク質；

e. 配列番号29に示されるNKX3. 1と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3. 1ポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP₃₃~3₈₆と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、NKX3. 1-PAP₃₃~3₈₆融合タンパク質；

f. 配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100*ポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、ActAN100*-SSX2融合タンパク質；若しくは

g. 配列番号33のアミノ酸残基1~100と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100ポリペプチド、及び配列番号33のアミノ酸残基103~459に示されるPAP₃₀~3₈₆と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、ActAN100-PAP₃₀~3₈₆融合タンパク質；又は

h. これらの任意の組み合わせを含む1つ又は複数の融合タンパク質を発現する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2015年4月13日に出願された米国仮特許出願第62/146, 626号明細書、及び2015年4月13日に出願された米国仮特許出願第62/146, 654号明細書、及び2015年12月4日に出願された米国仮特許出願第62/263, 174号明細書の利益を主張する。上記出願の教示全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

政府支援

本発明は、米軍医学研究調達機関協力協定(U. S. Army Medical Research Acquisition Activity)(USAMRAA)からの

10

20

30

40

50

契約W 8 1 X W H - 1 2 - 1 - 0 4 3 9による政府支援を得て実施された。政府は本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

皮膚癌に加えて、前立腺癌は、米国男性の間で最も一般的な癌である。米国癌協会（American Cancer Society）によれば、米国のみで推定220, 800人の新たな前立腺癌患者及び27, 540件の前立腺癌による死亡が2015年に発生するであろう。7人のうち約1人がその生涯で前立腺癌と診断されるであろう。過去10年間の癌診断及び治療の進歩により治療の選択肢は増加したが、転移性前立腺癌患者のための治癒的治療は提供されていない。こうした患者のためにさらなる療法が求められている。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本明細書では、上皮増殖因子受容体変異型 I I I（EGFRv I I I）ポリペプチド、及び滑膜肉腫、Xブレークポイント2（SSX2）ポリペプチドを含む融合タンパク質が開示される。一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号6と少なくともi）90%同一、ii）95%同一、iii）99%同一、又はiv）100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRv I I Iポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi）90%同一、ii）95%同一、iii）99%同一、又はiv）100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含み得る。他の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号4のアミノ酸残基89～475に示されるEGFRv I I I x 5 - SSX2と少なくともi）90%同一、ii）95%同一、iii）99%同一、又はiv）100%同一のアミノ酸配列を含み得る。

20

【0005】

また、EGFRv I I I - SSX2融合タンパク質をコードする核酸分子も提供される。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号5に示されるEGFRv I I Iポリヌクレオチドと少なくともi）90%同一、ii）95%同一、iii）99%同一、又はiv）100%同一である1つ又は複数のEGFRv I I Iポリヌクレオチド、及び配列番号9に示されるSSX2ポリヌクレオチドと少なくともi）90%同一、ii）95%同一、iii）99%同一、又はiv）100%同一であるポリヌクレオチドを含み得る。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

30

【0006】

本明細書では、EGFRv I I Iポリペプチドと、前立腺酸性ホスファターゼ（PAP）ポリペプチドとを含む融合タンパク質が開示される。一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号12のアミノ酸残基89～606に示されるEGFRv I I I x 5 - PAP_{33~386}と少なくともi）90%同一、ii）95%同一、若しくはiii）99%同一、又はiv）100%同一のアミノ酸配列を含み得る。他の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号6と少なくともi）90%同一、ii）95%同一、iii）99%同一、又はiv）100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRv I I Iポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi）90%同一、ii）95%同一、iii）99%同一、又はiv）100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含み得る。

40

【0007】

また、EGFRv I I I - PAP融合タンパク質をコードする核酸分子も提供される。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号5に示されるEGFRv I I Iポリヌクレオチドと少なくともi）90%同一、ii）95%同一、iii）99%同一、又はiv）100%同一である1つ又は複数のEGFRv I I Iポリヌクレオチド、及び配列番号13に示されるPAP_{33~386}ポリヌクレオチドと少なくともi）90%同一、ii）95%同一、iii）99%同一、又はiv）100%同一であるポリヌクレオチドを含

50

み得る。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0008】

本明細書では、EGFRvIIIポリペプチド、NK3ホメオボックス1（NKX3.1）ポリペプチド、及び前立腺癌特異的膜抗原（PSMA）ポリペプチドを含む融合タンパク質が開示される。一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、配列番号25に示されるNKX3.1_{111~234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含み得る。他の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号23のアミノ酸残基89~1177に示されるEGFRvIIIx5-NKX3.1_{111~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、配列番号18に示されるNKX3.1（R41G）_{111~234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含み得る。他の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号16のアミノ酸残基89~1177に示されるEGFRvIIIx5-NKX3.1（R41G）_{111~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む得る。

【0009】

また、EGFRvIII-NKX3.1-PSMA融合タンパク質をコードする核酸分子が提供される。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号5に示されるEGFRvIIIポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一である1つ又は複数のEGFRvIIIポリヌクレオチド、配列番号24に示されるNKX3.1_{111~234}ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号19に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドを含み得る。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。他の実施形態では、核酸分子は、配列番号5に示されるEGFRvIIIポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一である1つ又は複数のEGFRvIIIポリヌクレオチド、配列番号17に示されるNKX3.1（R41G）_{111~234}ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号19に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドを含み得る。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0010】

本明細書では、NKX3.1ポリペプチドとPAPポリペプチドを含む融合タンパク質が開示される。一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号27のアミノ酸残基89~678に示されるNKX3.1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、

i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含み得る。一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号29に示されるNKX3.1と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含み得る。

【0011】

また、NKX3.1-PAP融合タンパク質をコードする核酸分子も提供される。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号28に示されるNKX3.1ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号13に示されるPAP_{33~386}ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一であるポリヌクレオチドを含み得る。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0012】

本明細書では、開示される核酸分子の1つ又は複数を含む宿主細胞が開示される。一部の実施形態では、宿主細胞は、

a) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIPポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、EGFRvIIIP-SSX2融合タンパク質；

b) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIPポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、EGFRvIIIP-PAP_{33~386}融合タンパク質；

c) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIPポリペプチド、配列番号25に示されるNKX3.1_{11~234}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRvIIIP-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質；

d) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIPポリペプチド、配列番号18に示されるNKX3.1(R41G)_{11~234}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRvIIIP-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質；

e) 配列番号29に示されるNKX3.1と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、NKX3.1-PAP_{33~386}融合タンパク質；

10

20

30

40

50

f) 配列番号2として示されるA c t A N 1 0 0 *と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むA c t A N 1 0 0 *ポリペプチド、及び配列番号10に示されるS S X 2と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むS S X 2ポリペプチドを含む、A c t A N 1 0 0 *-S S X 2融合タンパク質；若しくは

g) 配列番号33のアミノ酸残基1~100と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むA c t A N 1 0 0ポリペプチド、及び配列番号33のアミノ酸残基103~459に示されるP A P_{30~386}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むP A Pポリペプチドを含む、A c t A N 1 0 0-P A P_{30~386}融合タンパク質；又は

h) これらの任意の組み合わせ
をコードする核酸配列を含む1つ又は複数の核酸分子を含み得る。

【0013】

一部の態様では、a)~h)に列記した1つ又は複数の核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0014】

また、対象において免疫応答を誘発する方法も提供される。一部の実施形態では、本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、前記宿主細胞は、1つ又は複数の核酸分子を含み、前記核酸分子は、

a) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のE G F R v I I Iポリペプチド、及び配列番号10に示されるS S X 2と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むS S X 2ポリペプチドを含む、E G F R v I I I-S S X 2融合タンパク質；

b) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のE G F R v I I Iポリペプチド、及び配列番号14に示されるP A P_{33~386}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むP A Pポリペプチドを含む、E G F R v I I I-P A P_{33~386}融合タンパク質；

c) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のE G F R v I I Iポリペプチド、配列番号25に示されるN K X 3. 1_{11~234}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むN K X 3. 1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるP S M A_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むP S M Aポリペプチドを含む、E G F R v I I I-N K X 3. 1_{11~234}-P S M A_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質；

d) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のE G F R v I I Iポリペプチド、配列番号18に示されるN K X 3. 1 (R 4 1 G)_{11~234}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むN K X 3. 1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるP S M A_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むP S M Aポリペプチドを含む、E G F R v I I I-N K X 3. 1 (R 4 1 G)_{11~234}-P S M A_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質；

e) 配列番号29に示されるN K X 3. 1と少なくともi) 90%同一、i i) 95%

10

20

30

40

50

同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3. 1ポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、NKX3. 1-PAP_{33~386}融合タンパク質；

f) 配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100*ポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、ActAN100*-SSX2融合タンパク質；

g) 配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100*ポリペプチド、及び配列番号33のアミノ酸残基103~459に示されるPAP_{30~386}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、ActAN100*-PAP_{30~386}融合タンパク質；又は

h) これらの任意の組み合わせをコードする核酸配列を含む。

【0015】

一部の態様では、a) ~ h) に列記した1つ又は複数の核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0016】

対象において免疫応答を誘発する方法が提供され、これは、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含み、宿主細胞は、

a) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRv I I Iポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、EGFRv I I I-SSX2融合タンパク質；

b) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRv I I Iポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、EGFRv I I I-PAP_{33~386}融合タンパク質；

c) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRv I I Iポリペプチド、配列番号25に示されるNKX3. 1_{11~234}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3. 1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRv I I I-NKX3. 1_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質；

d) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRv I I Iポリペプチド、配列番号18に示されるNKX3. 1 (R41G)_{11~234}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3. 1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチド

10

20

30

40

50

を含む、EGFR ν IIII-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20},_{44~138},_{169~750}融合タンパク質；

e) 配列番号29に示されるNKX3.1と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、NKX3.1-PAP_{33~386}融合タンパク質；

f) 配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100*ポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、ActAN100*-SSX2融合タンパク質；

g) 配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100*ポリペプチド、及び配列番号33のアミノ酸残基103~459に示されるPAP_{30~386}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、ActAN100*-PAP_{30~386}融合タンパク質；又は

h) これらの任意の組み合わせを含む1つ又は複数の融合タンパク質を発現する。

【0017】

さらに、抗原ポリペプチドの発現を増大させる方法も提供される。一部の実施形態では、本方法は、宿主細胞において核酸分子を発現させるステップを含んでよく、前記核酸分子は、

a) 配列番号6と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFR ν IIIIポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、EGFR ν IIII-SSX2融合タンパク質；

b) 配列番号6と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFR ν IIIIポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、EGFR ν IIII-PAP_{33~386}融合タンパク質；

c) 配列番号6と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFR ν IIIIポリペプチド、配列番号25に示されるNKX3.1_{11~234}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20},_{44~138},_{169~750}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFR ν IIII-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20},_{44~138},_{169~750}融合タンパク質；

d) 配列番号6と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFR ν IIIIポリペプチド、配列番号18に示されるNKX3.1(R41G)_{11~234}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20},_{44~138},_{169~750}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFR ν IIII-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20},_{44~138},_{169~750}融合タンパク質；

e) 配列番号29に示されるNKX3.1と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、NKX3.1-PAP_{33~386}融合タンパク質；

f) 配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100*ポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、ActAN100*-SSX2融合タンパク質；

g) 配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100*ポリペプチド、及び配列番号33のアミノ酸残基103~459に示されるPAP_{30~386}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、ActAN100*-PAP_{30~386}融合タンパク質；又は

h) これらの任意の組み合わせを含む1つ又は複数の融合タンパク質を発現する。

i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むP S M Aポリペプチドを含む、E G F R v I I I - N K X 3. 1 (R 4 1 G) _{1 1 ~ 2 3 4} - P S M A _{1 ~ 2 0}, _{4 4 ~ 1 3 8}, _{1 6 9 ~ 7 5 0} 融合タンパク質；

e) 配列番号29に示されるN K X 3. 1と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むN K X 3. 1ポリペプチド、及び配列番号14に示されるP A P _{3 3 ~ 3 8 6}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むP A Pポリペプチドを含む、N K X 3. 1 - P A P _{3 3 ~ 3 8 6} 融合タンパク質；

f) 配列番号2として示されるA c t A N 1 0 0 *と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むA c t A N 1 0 0 *ポリペプチド、及び配列番号10に示されるS S X 2と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むS S X 2ポリペプチドを含む、A c t A N 1 0 0 * - S S X 2 融合タンパク質；

g) 配列番号2として示されるA c t A N 1 0 0 *と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むA c t A N 1 0 0 *ポリペプチド、及び配列番号33のアミノ酸残基103~459に示されるP A P _{3 0 ~ 3 8 6}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むP A Pポリペプチドを含む、A c t A N 1 0 0 * - P A P _{3 0 ~ 3 8 6} 融合タンパク質；又は

h) これらの任意の組み合わせをコードする核酸配列を含む。

【0018】

一部の態様では、a) ~ h) に列記した1つ又は複数の核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0019】

癌の治療を、それを必要とする対象において行う方法が本明細書に提供され、前記方法は、治療有効量の、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含み、宿主細胞は、1つ又は複数の開示された核酸分子を含む。一部の実施形態では、本方法は、治療有効量の、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、

a) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のE G F R v I I I ポリペプチド、及び配列番号10に示されるS S X 2と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むS S X 2ポリペプチドを含む、E G F R v I I I - S S X 2 融合タンパク質；

b) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のE G F R v I I I ポリペプチド、及び配列番号14に示されるP A P _{3 3 ~ 3 8 6}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むP A Pポリペプチドを含む、E G F R v I I I - P A P _{3 3 ~ 3 8 6} 融合タンパク質；

c) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のE G F R v I I I ポリペプチド、配列番号25に示されるN K X 3. 1 _{1 1 ~ 2 3 4}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むP S M Aポリペプチドを含む、E G F R v I I I - N K X 3. 1 _{1 1 ~ 2 3 4} - P S M A _{1 ~ 2 0}, _{4 4 ~ 1 3 8}, _{1 6 9 ~ 7 5 0} 融合タンパク質；

d) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一

、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリペプチド、配列番号 18 に示される N K X 3. 1 (R 4 1 G) _{1 1 ~ 2 3 4} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む N K X 3. 1 ポリペプチド、及び配列番号 20 に示される P S M A _{1 ~ 2 0, 4 4 ~ 1 3 8, 1 6 9 ~ 7 5 0} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P S M A ポリペプチドを含む、E G F R v I I I - N K X 3. 1 (R 4 1 G) _{1 1 ~ 2 3 4} - P S M A _{1 ~ 2 0, 4 4 ~ 1 3 8, 1 6 9 ~ 7 5 0} 融合タンパク質；

e) 配列番号 29 に示される N K X 3. 1 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む N K X 3. 1 ポリペプチド、及び配列番号 14 に示される P A P _{3 3 ~ 3 8 6} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P A P ポリペプチドを含む、N K X 3. 1 - P A P _{3 3 ~ 3 8 6} 融合タンパク質；

f) 配列番号 2 として示される A c t A N 1 0 0 * と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む A c t A N 1 0 0 * ポリペプチド、及び配列番号 10 に示される S S X 2 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む S S X 2 ポリペプチドを含む、A c t A N 1 0 0 * - S S X 2 融合タンパク質；

g) 配列番号 33 のアミノ酸残基 1 ~ 100 に示される A c t A N 1 0 0 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む A c t A N 1 0 0 ポリペプチド、及び配列番号 33 のアミノ酸残基 103 ~ 459 に示される P A P _{3 0 ~ 3 8 6} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P A P ポリペプチドを含む、A c t A N 1 0 0 - P A P _{3 0 ~ 3 8 6} 融合タンパク質；又は

h) これらの任意の組み合わせ

をコードする核酸配列を含む 1 つ又は複数の核酸分子を含む。

【0020】

一部の実施形態では、a) ~ h) に列記した 1 つ又は複数の核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0021】

癌の治療を、それを必要とする対象において行う方法が提供され、前記方法は、治療有効量の、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含み、宿主細胞は、

a) 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリペプチド、及び配列番号 10 に示される S S X 2 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む S S X 2 ポリペプチドを含む、E G F R v I I I - S S X 2 融合タンパク質；

b) 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリペプチド、及び配列番号 14 に示される P A P _{3 3 ~ 3 8 6} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P A P ポリペプチドを含む、E G F R v I I I - P A P _{3 3 ~ 3 8 6} 融合タンパク質；

c) 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリペプチド、配列番号 25 に示される N K X 3. 1 _{1 1 ~ 2 3 4} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む N K X 3. 1 ポリペプチド、及び配列番号 20 に示される P S M A _{1 ~ 2 0, 4 4 ~ 1 3 8, 1 6 9 ~ 7 5 0} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P S M A ポリペプチドを含む、E G

10

20

30

40

50

FRvIII-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質；

d) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、配列番号18に示されるNKX3.1(R41G)_{11~234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRvIII-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質；

e) 配列番号29に示されるNKX3.1と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、NKX3.1-PAP_{33~386}融合タンパク質；

f) 配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100*ポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、ActAN100*-SSX2融合タンパク質；

g) 配列番号33のアミノ酸残基1~100に示されるActAN100と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100ポリペプチド、及び配列番号33のアミノ酸残基103~459に示されるPAP_{30~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、ActAN100-PAP_{30~386}融合タンパク質；又は

h) これらの任意の組み合わせを含む1つ又は複数の融合タンパク質を発現する。

【0022】

概要及び以下の詳細な説明は、添付の図面と一緒に読まれる場合にさらによく理解されるであろう。開示される組成物及び方法を例証する目的で、組成物及び方法の例示的实施形態の図面が提供されるが、組成物及び方法は、開示される具体的な実施形態に限定されない。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】3つの個別の免疫原性融合タンパク質として発現された5つの癌抗原を含む、BH5290株の例示的な概略図を示す。

【図2】NKX3.1(R41G)変異を含む免疫原性融合物の発現を示す。

【図3A-B】NKX3.1(R41G)変異を含む例示的な免疫原性融合タンパク質の免疫原性を示す。(図3A)SSX2特異的免疫；(図3B)PAP特異的免疫；(図3C)NKX3.1特異的免疫；(図3D)PSMA特異的免疫；及び(図3E)EGFRvIII特異的免疫。

【図3C-D】NKX3.1(R41G)変異を含む例示的な免疫原性融合タンパク質の免疫原性を示す。(図3A)SSX2特異的免疫；(図3B)PAP特異的免疫；(図3C)NKX3.1特異的免疫；(図3D)PSMA特異的免疫；及び(図3E)EGFRvIII特異的免疫。

【図3E】NKX3.1(R41G)変異を含む例示的な免疫原性融合タンパク質の免疫原性を示す。(図3A)SSX2特異的免疫；(図3B)PAP特異的免疫；(図3C)

NKX3. 1 特異的免疫；（図3D）PSMA特異的免疫；及び（図3E）EGFRvIII特異的免疫。

【図4】野生型リステリア（*Listeria*）攻撃に対するBH5290によるワクチン接種の防御免疫を示す。

【図5A】EGFRvIIIに融合された際のSSX2の発現を示す。（A）EGFRvIIIの存在下でのSSX2発現を調べるために用いた例示的な菌株。抗原発現に対するEGFRvIIIx5の含有の影響を評価するため、EGFRvIIIx5の存在のみが異なる対応SSX2発現カセットを、*inlB*遺伝子座から $ActAN100^*$ -NKX3.1-PAP_{33~386}融合タンパク質を発現した同じLmバックグラウンドのtRNA^{Arg}遺伝子座に導入した。BH4598は、第1カセット- $ActAN100^*$ -SSX2を含有し、BH4602は、第2カセット- $ActAN100^*$ -EGFRvIIIx5-SSX2を含有した（図5A）。全ての発現カセットが $actA$ プロモータを使用した。（図5B）細胞内ウエスタンブロット結果。レーン1：Lm11（負の対照）、レーン2：BH4598（ $ActAN100^*$ -SSX2）、レーン3：BH4602（ $ActAN100^*$ -EGFRvIIIx5-SSX2）。

【図5B】EGFRvIIIに融合された際のSSX2の発現を示す。（A）EGFRvIIIの存在下でのSSX2発現を調べるために用いた例示的な菌株。抗原発現に対するEGFRvIIIx5の含有の影響を評価するため、EGFRvIIIx5の存在のみが異なる対応SSX2発現カセットを、*inlB*遺伝子座から $ActAN100^*$ -NKX3.1-PAP_{33~386}融合タンパク質を発現した同じLmバックグラウンドのtRNA^{Arg}遺伝子座に導入した。BH4598は、第1カセット- $ActAN100^*$ -SSX2を含有し、BH4602は、第2カセット- $ActAN100^*$ -EGFRvIIIx5-SSX2を含有した（図5A）。全ての発現カセットが $actA$ プロモータを使用した。（図5B）細胞内ウエスタンブロット結果。レーン1：Lm11（負の対照）、レーン2：BH4598（ $ActAN100^*$ -SSX2）、レーン3：BH4602（ $ActAN100^*$ -EGFRvIIIx5-SSX2）。

【図6】EGFRvIIIx5が免疫原性融合タンパク質の一部である場合のSSX2免疫応答を示す。

【図7A】EGFRvIIIの複数のコピーに融合された際のPAP発現を示す。（A）構築物に含まれるEGFRvIII反復配列のコピー数が異なる6つのPAP発現カセットを構築した。全ての構築物をLm11のtRNA^{Arg}遺伝子座に組み込むことにより、6つのLmワクチン株：BH2868、PL1631、PL1629、PL1627、PL1625、及びPL1623を得た。（B）細胞内ウエスタンにより発現を評価した。レーン1：Lm11（発現カセットなし）；レーン2：BH2868は、 $ActAN100$ -PAP_{33~386}を発現し；レーン3：PL1631は、 $ActAN100^*$ -EGFRvIIIx1-PAP_{33~386}を発現し；レーン4：PL1629は、 $ActAN100^*$ -EGFRvIIIx2-PAP_{33~386}を発現し；レーン5：PL1627は、 $ActAN100^*$ -EGFRvIIIx3-PAP_{33~386}を発現し；レーン6：PL1625は、 $ActAN100^*$ -EGFRvIIIx4-PAP_{33~386}を発現し；レーン7：PL1623は、 $ActAN100^*$ -EGFRvIIIx5-PAP_{33~386}を発現する。

【図7B】EGFRvIIIの複数のコピーに融合された際のPAP発現を示す。（A）構築物に含まれるEGFRvIII反復配列のコピー数が異なる6つのPAP発現カセットを構築した。全ての構築物をLm11のtRNA^{Arg}遺伝子座に組み込むことにより、6つのLmワクチン株：BH2868、PL1631、PL1629、PL1627、PL1625、及びPL1623を得た。（B）細胞内ウエスタンにより発現を評価した。レーン1：Lm11（発現カセットなし）；レーン2：BH2868は、 $ActAN100$ -PAP_{33~386}を発現し；レーン3：PL1631は、 $ActAN100^*$ -EGFRvIIIx1-PAP_{33~386}を発現し；レーン4：PL1629は、 $ActAN100^*$ -EGFRvIIIx2-PAP_{33~386}を発現し；レーン5：PL

1627は、ActAN100*－EGFRvIIIx3－PAP₃₃～₃₈₆を発現し；レーン6：PL1625は、ActAN100*－EGFRvIIIx4－PAP₃₃～₃₈₆を発現し；レーン7：PL1623は、ActAN100*－EGFRvIIIx5－PAP₃₃～₃₈₆を発現する。

【図8】EGFRvIIIの複数のコピーと融合された際のPAP特異的免疫原性を示す。EGFRvIIIコピー数が異なる6つのPAP発現Lm株（BH2868、PL1631、PL1629、PL1627、PL1625、及びPL1623）をT細胞応答の誘導について試験した。

【発明を実施するための形態】

【0024】

10

本発明の例示的な実施形態の説明を以下に行う。

【0025】

開示される組成物及び方法は、本開示の一部を成す添付の図面に関連して行われる以下の詳細な説明を参照することによってより容易に理解されるであろう。開示される組成物及び方法が本明細書に記載及び／又は示される具体的な組成物及び方法に限定されないことと、本明細書で使用される専門用語があくまで例として具体的な実施形態を説明することを目的とし、特許請求される組成物及び方法の限定を意図するものではないことを理解すべきである。

【0026】

特に別途記載のない限り、考えられる作用機構若しくは作用モード又は改善の理由は、例示を意図するに過ぎず、開示される組成物及び方法が、このような提案される作用機構若しくは作用モード又は改善の理由の正確さ又は不正確さによって束縛されるわけではない。

20

【0027】

本文全体を通して、これらの説明は、組成物及び前記組成物を使用する方法に関連する。本開示が、組成物に関連する特徴又は実施形態を説明又は特許請求する場合、こうした特徴又は実施形態は、前記組成物を使用する方法にも等しく適用可能である。同様に、開示内容は、組成物を使用する方法に関連する特徴又は実施形態を説明又は特許請求する場合、こうした特徴又は実施形態は、組成物にも等しく適用可能である。

【0028】

30

明瞭化のために個別の実施形態に関して本明細書に記載される開示の組成物及び方法のいくつかの特徴は、単一の実施形態において組み合わせ提供してもよいことを理解すべきである。反対に、簡略化のために単一の実施形態に関して記載される開示の組成物及び方法の様々な特徴は、個別に又は任意の部分組合せで提供してもよい。

【0029】

本明細書で使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」は、複数形を含む。

【0030】

以下の略語は、本開示全体を通して使用される：EGFRvIII（上皮増殖因子受容体変異型IIIネオアンチゲン結合領域）；EGFRvIIIx5（EGFRvIIIの5つのコピー）；SSX2（滑膜肉腫、Xブレークポイント2）（アクセッション番号Q16385）；NKX3.1（NK3ホメオボックス1ポリペプチド）（アクセッション番号Q99801）；PSMA（前立腺特異的膜抗原）（アクセッション番号Q04609）；PAP（前立腺酸性ホスファターゼ）（アクセッション番号P15309）；Lm（リステリア・モノサイトゲネス（*Listeria monocytogenes*））；LADD（二重欠失リステリア・モノサイトゲネス（*Listeria monocytogenes*））。

40

【0031】

デルタ記号（Δ又は「. DELTA.」）は、欠失を指す。例えば、「ΔactA」（又は「. DELTA. actA」）は、actA遺伝子の全部又は一部が欠失しているこ

50

とを意味する。

【0032】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、ヒト又は非ヒト生物を指す。従って、本明細書に記載する方法及び組成物は、ヒト及び脊椎動物の両方に適用可能である。いくつかの実施形態では、対象は、「患者」、すなわち疾患又は病状のための医療を受けている生きたヒトである。これは、確定されていない疾病を有し、疾病の兆候につき検査中の人を含む。EGFRvIII、SSX2、NKX3.1、PMSA、及びPAPの1つ又は複数、好ましくはこれらの各々を発現する悪性腫瘍を有する対象が好ましい。いくつかの実施形態では、対象は、前立腺癌、好ましくは転移性前立腺癌に罹患している。

【0033】

本明細書で使用される場合、「同一パーセント」、「配列同一性」、及び「同一性パーセント」という用語は、2つ以上のポリペプチド間で同じ（すなわち、同一の）アミノ酸のパーセントを指す。2つ以上のポリペプチド間の配列同一性は、ポリペプチドのアミノ酸配列をアラインメントし、同じアミノ酸残基を含有するアラインメントされたポリペプチド中の位置の数をスコアリングして、これをアラインメントされたポリペプチド中の異なる位置の数と比較することにより決定することができる。ポリペプチドは、例えば、異なるアミノ酸を含有すること（すなわち、置換若しくは突然変異）により、又はアミノ酸が欠失すること（すなわち、ポリペプチドの1つ又は両方へのアミノ酸挿入若しくはアミノ酸欠失）により異なり得る。配列同一性は、同じアミノ酸残基を含有する位置の数をポリペプチド中のアミノ酸残基の総数で割ることによって計算することができる。例えば、同一性パーセントは、同じアミノ酸残基を含有する位置の数をポリペプチド中のアミノ酸残基の総数で割り、100を掛けることによって計算することができる。

【0034】

「その免疫原性断片」は、対象において免疫原性応答を誘発することができる融合タンパク質の部分を含む。一部の態様では、免疫原性断片は、融合タンパク質を含むか、これからなるか、又はこれから実質的になる。他の態様では、免疫原性断片は、シグナル配列－融合タンパク質を含むか、これからなるか、又はこれから実質的になる。

【0035】

本明細書で使用される場合、「融合タンパク質」は、2つ以上のポリペプチドの結合から作製されるタンパク質を指す。融合タンパク質は、ポリペプチドを化学的に共役させることによって作製することができる。好ましくは、融合タンパク質は、遺伝子融合によって作製され、この場合、核酸分子の転写及び翻訳により、個々のポリペプチドを含む単一のタンパク質が産生されるように、個々のポリペプチドをコードする核酸分子をフレーム内結合する。開示される融合タンパク質は、ポリペプチド間に1つ又は複数のリンカー残基を有してよい。

【0036】

本明細書で使用される場合、「シグナル配列」は、融合タンパク質の分泌を駆動するために機能するポリペプチド配列、及びこれをコードするヌクレオチド配列を指す。シグナル配列は、融合タンパク質を含むポリペプチドに作動可能に連結されており、融合タンパク質を含むポリペプチドと共に翻訳リーディングフレーム内にある。「シグナル配列」はまた、「分泌シグナル配列」と呼ぶこともできる。

【0037】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」は、成分の正常な機能が維持される様式におけるプロモータリボソーム結合部位などの制御配列の並置を指す。「制御配列」は、典型的に、宿主生物における作動可能に連結されたコード配列の発現のために必要なDNA配列を指す。制御配列は、プロモータ、リボソーム結合部位、及び任意選択でShine/Dalgarno配列を含んでよい。このように、コードされたシグナル配列に「作動可能に連結された」コード配列は、シグナルペプチドが宿主細胞によってプロセシングされて、プロセシングされたタンパク質が分泌されるように、コード配列がシグナル配列に結合されている立体配置を指す。プロモータに作動可能に連結されたシグナル

配列は、分泌シグナル配列の転写及び翻訳がプロモータ、リボソーム結合部位、及び必要に応じて Shine/Dalgarno 配列によって制御されるようにプロモータに結合されている。

【0038】

本明細書で使用される場合、「i) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一」は、参照項目（例えば、生物学的配列）と少なくとも90%同一、91%同一、92%同一、93%同一、94%同一、95%同一、96%同一、97%同一、98%同一、99%同一、又は100%同一を包含する。

【0039】

EGFRvIIIポリペプチド及びこれを含む免疫原性融合タンパク質の場合、本明細書に記載するいずれかの配列変異性は、配列番号6のアミノ酸残基7～14（EEKKGNVYV）の外部で起こらなければならない。換言すれば、配列変異性は、配列番号6のアミノ酸残基1～6（PASRAL）若しくはこれを含む免疫原性融合タンパク質、及び／又は配列番号6のアミノ酸残基15～21（VTDHGSC）若しくはこれを含む免疫原性融合タンパク質に起こり得る。例えば、配列番号6と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むEGFRvIIIポリペプチドは、配列番号6と少なくとも90%同一、91%同一、92%同一、93%同一、94%同一、95%同一、96%同一、97%同一、98%同一、99%同一、又は100%同一であるアミノ酸配列を包含し、配列番号6のアミノ酸残基1～6又は15～21に変異性が起こる。従って、各EGFRvIIIポリペプチド及びこれを含む免疫原性融合タンパク質は、配列番号6のアミノ酸残基7～14（EEKKGNVYV）を含有し得る。

【0040】

EGFRvIIIポリヌクレオチドは、配列番号6の短い部分を含むように長さを調節することができる。例えば、一部の実施形態では、EGFRvIIIポリペプチドは、配列番号6のアミノ酸残基6～18と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むか、これからなるか、又はこれから実質的になり得る。一部の実施形態では、EGFRvIIIポリペプチドの1つ又は複数のコピーは、配列番号6のアミノ酸残基6～14と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むか、これからなるか、又はこれから実質的になり得る。前述したように、これらの短いポリペプチドの変異性は、配列番号6のアミノ酸残基1～6又は15～21で起こることになる。従って、配列番号6のアミノ酸残基6～18と少なくとも90%同一のアミノ酸配列の場合、変異性は、配列番号6のアミノ酸残基6又は15～18で起こり得る。配列番号6のアミノ酸残基6～14のアミノ酸残基と少なくとも90%同一のアミノ酸配列の場合、変異性はアミノ酸残基6で起こり得る。

【0041】

本開示全体を通して、1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチドを含む免疫原性融合タンパク質、及びその融合タンパク質をコードする核酸が記載される。EGFRvIIIポリペプチドは、表1に記載するEGFRvIIIヌクレオチド配列のいずれか1つによってコードされ得る。従って、本開示全体を通して、EGFRvIIIポリヌクレオチドが「配列番号5（表1の共通配列）と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一」であるというとき、配列番号42と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一；配列番号43と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一；配列番号44と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一；配列番号45と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一；及び／又は配列番号46と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一を含むことが意図される。同様に、様々な免疫原性融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、配列番号42～46のいずれか1つを含むことができる。そのため、本明細書に提供される各EGFRvIII含有免疫原性融合タンパク質は、核酸分子によってコードすることができ、核酸分子は、配列番号42と少なくともi)

90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一；配列番号43と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一；配列番号44と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一；配列番号45と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一；配列番号46及び／又は少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一である1つ又は複数のポリヌクレオチドを含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0042】

【表1】

10

表1

EGFRvIII スクレオチド配列	
反復配列 1 (配列番号42)	1 (1) <u>CCAGCTAGTCGTCATTAGAGGAGAAAAAGGGGAATTACGTGGTGACGGATCATGGATCGTGT</u> 63
反復配列 2 (配列番号43)	(1) <u>CCTGCATCACGAGCACTTGAAGAGAAAAAGGAAACTATGTTGTGACCGATCATGGTAGCTGC</u>
反復配列 3 (配列番号44)	(1) <u>CCAGCATCTAGAGCTTTAGAGGAAAGAAGGGTAACTATGTCGTAACAGATCATGGAAGTTGT</u>
反復配列 4 (配列番号45)	(1) <u>CCAGCTTCTCGCGCATTAGAAGAAAAAGGCAATTATGTTGTAACAGACCATGGTAGTTGT</u>
反復配列 5 (配列番号46)	(1) <u>CCGGCTTCTCGTGCCTAGAAGAGAAGAAAGGAAATTACGTAGTTACAGACCACGGCTCTTGC</u>
Consensus (配列番号5)	(1) CCdGCwwswmGhGCdyTwGARGARAArAAGGnAAyTAyGTnGTdACvGAYCAyGGhwsbTGy

20

30

【0043】

免疫原性融合タンパク質

本明細書では、免疫原性融合タンパク質及び前記融合タンパク質をコードする核酸分子が開示される。例示的免疫原性融合タンパク質は、表2及び3に記載されている。表1は、融合タンパク質によって発現される抗原の例示的な組合せを提供する。表3は、様々な融合タンパク質の例示的な発現カセット、細菌株、及びアミノ酸範囲を記載する。

【0044】

【表 2】

表 2

例示的な抗原の組合せ		
EGFRvIII	SSX2 ₁₋₂₃₄	
EGFRvIII	SSX2 ₂₋₂₃₄	
EGFRvIII	PAP ₃₃₋₃₈₆	
EGFRvIII	NKX3.1 ₁₁₋₂₃₄	PSMA _{1-20, 44-138, 169-750}
EGFRvIII	NKX3.1(R41G) ₁₁₋₂₃₄	PSMA _{1-20, 44-138, 169-750}
NKX3.1	PAP ₃₃₋₃₈₆	

10

【0045】

免疫原性融合タンパク質は、抗原（すなわち、EGFRvIII、SSX2、NKX3.1、PAP、PSMA）の上記組合せのいずれも含むことができる。本明細書に記載する抗原は、完全長タンパク質配列からのMHCクラスIエピトープ又はMHCクラスIIエピトープである配列を含んでもよい。

【0046】

EGFRは、細胞増殖及び生存に重要な受容体チロシンキナーゼである。EGFR遺伝子は、頭部及び頸部、結腸、膵臓、乳房、卵巣、腎臓癌、並びに悪性神経膠腫などのヒト癌に過剰発現又は突然変異することが多い。EGFR受容体変異型III（EGFRvIII）は、エキソン2～7の267アミノ酸欠失及びエキソン1とエキソン8との融合によって生じ、結合部に新たなグリシンを有する腫瘍特異的ペプチドを産生する。EGFRvIIIは、構成的リガンド非依存性シグナル伝達を呈示する。一実施形態では、記載されたEGFRvIIIポリヌクレオチドは、少なくとも1つのMHCクラスIエピトープ又は少なくとも1つのMHCクラスIIエピトープをコードする配列を含む。同様に、本明細書に記載するEGFRvIIIポリペプチドは、少なくとも1つのMHCクラスIエピトープ又は少なくとも1つのMHCクラスIIエピトープを含む。EGFRvIII突然変異のN末端10残基の配列は、配列番号61に示される通り、LEEKKGN Y V V

20

30

【0047】

SSX2は、高度に相同性の滑膜肉腫（SSX）ブレークポイントタンパク質のファミリーに属する。これらのタンパク質は、転写レプレッサとして機能し得る。SSX2遺伝子、並びにSSX1及びSSX4ファミリーメンバーも、全ての滑膜肉腫に特徴的に見出されるt(X;18)(p11.2;q11.2)転座に関与していた。この転座により、染色体18上の滑膜肉腫転座遺伝子と染色体X上のSSX遺伝子の1つとの融合が起こる。コードされたハイブリッドタンパク質が恐らく形質転換活性の原因となる。この遺伝子の選択的スプライシングにより、複数の転写変異体が生じる。一実施形態では、記載されるSSX2ポリヌクレオチドは、少なくとも1つのMHCクラスIエピトープ又は少なくとも1つのMHCクラスIIエピトープを含む。同様に、本明細書に記載されるSSX2ポリヌクレオチドは、少なくとも1つのMHCクラスIエピトープ又は少なくとも1つのMHCクラスIIエピトープを含む。SSX2配列（Swiss Prot エントリー Q16385）は、配列番号62として示される。

40

【化 1】

10	20	30	40	50
MNGDDAFARR	PTVGAQIPEK	IQKAFDDIAK	YFSKEEWEKM	KASEKIFYVY
60	70	80	90	100
MKRKYEAMTK	LGFKATLPPF	MCNKRAEDFQ	GNDLDNDPNR	GNQVERPQMT
110	120	130	140	150
FGRLQGISPK	IMPKKPAEEG	NDSEEVPEAS	GPQNDGKELC	PPGKPTTSEK
160	170	180		
IHERSGPKRG	EHAWTHRLRE	RKQLVIYEEI	SDPEEDDE	

10

【0048】

NKX3. 1 (NK3 ホメオボックス1 ポリペプチド) (アクセッション番号Q99801) は、転写因子であり、これは、共通配列 5' - T A A G T [A G] - 3' と優先的に結合して、転写レプレッサとして振る舞うことができる。NKX3. 1 は、腺上皮の増殖を調節して、正常な前立腺発生に、さらには前立腺中の管の形成に重要な役割を果たす。一実施形態では、記載される NKX3. 1 ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの MHC クラス I エピトープ又は少なくとも1つの MHC クラス II エピトープをコードする配列を含む。同様に、本明細書に記載する NKX3. 1 ポリペプチドは、少なくとも1つの MHC クラス I エピトープ又は少なくとも1つの MHC クラス II エピトープを含む。NKX3. 1 のヒト規定配列 (Swiss Prot エントリーQ99801) は、配列番号29として示される。

20

【化 2】

10	20	30	40	50
MLRVPEPRPG	EAKAEGAAPP	TPSKPLTSFL	IQDILRDGAQ	RQGGRITSSQR
60	70	80	90	100
QRDPEPEPEP	EPEGGRSRAG	AQNDQLSTGP	RAAPEEAETL	AETEPERHLG
110	120	130	140	150
SYLLDSENTS	GALPRLPQTP	KQPQKRSRAA	FSHTQVIELE	RKFSHQKYLS
160	170	180	190	200
APER AHLAKN	LKLTETQVKI	WFQNRRYKTK	RKQLSSELGD	LEKHSSLPAL
210	220	230		
KEEAFSRASL	VSVYNSYPYY	PYLYCVGSWS	PAFW	

30

40

【0049】

PSMA (前立腺特異的膜抗原) (アクセッション番号Q04609) は、葉酸ヒドロラーゼ及びN-アセチル化 α -結合酸性ジペプチダーゼ (NAALADase) 活性の両方を有する。PSMA は、トリ- α -グルタミン酸ペプチドを選択する。腸において、PSMA は、葉酸塩の取り込みのために必要であり；脳において、PSMA は、神経ペプチド、N-アセチルアスパルチルグルタミン酸 (NAAG) の加水分解、これによるグルタミン酸塩の放出によって興奮性神経伝達を調節する。PSMA も前立腺腫瘍進行に関与している。一実施形態では、記載される PSMA ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの MHC クラス I エピトープ又は少なくとも1つの MHC クラス II エピトープをコードする

50

配列を含む。同様に、本明細書に記載する P S M A ポリペプチドは、少なくとも 1 つの M H C クラス I エピトープ又は少なくとも 1 つの M H C クラス I I エピトープを含む。P S M A のヒト規定配列 (S w i s s P r o t エントリー Q 0 4 6 0 9) は、配列番号 6 3 として示される。

【化 3】

10	20	30	40	50	
MWNLLHETDS	AVATARRPRW	LCAGALVLAG	GFFLLGFLFG	WFIKSSNEAT	
60	70	80	90	100	10
NITPKHNMKA	FLDELKAENI	KKFLYNFTQI	PHLAGTEQNF	QLAKQIQSQW	
110	120	130	140	150	
KEFGLDSVEL	AHYDVLLSYP	NKTHPNYISI	INEDGNEIFN	TSLFEPPPPG	
160	170	180	190	200	
YENVSDIVPP	FSAFSPQGMP	EGDLVYVNYA	RTEDFFKLER	DMKINCSGKI	
210	220	230	240	250	
VIARYGKVFR	GNKVKNAQLA	GAKGVILYSD	PADYFAPGVK	SYPDGWNLPG	20
260	270	280	290	300	
GGVQQRGNILN	LNGAGDPLTP	GYPANNEYAYR	RGIAEAVGLP	SIPVHPIGYY	
310	320	330	340	350	
DAQKLLEKMG	GSAPPDSSWR	GSLKVPYNVG	PGFTGNFSTQ	KVKMHIHSTN	
360	370	380	390	400	
EVTRIYNVIG	TLRGAVEPDR	YVILGGHRDS	WVFGGIDPQS	GAAVVHEIVR	
410	420	430	440	450	
SFGTLKKEGW	RPRRTILFAS	WDAEEFGLLG	STEWAEENSR	LLQERGVAYI	30
460	470	480	490	500	
NADSSIEGNY	TLRVDCTPLM	YSLVHNLTK	LKSPDEGFEG	KSLYESWTKK	
510	520	530	540	550	
SPSPEFSGMP	RISKLGSGND	FEVFFQRLGI	ASGRARYTKN	WETNKFSGYP	
560	570	580	590	600	
LYHSVYETYE	LVEKFYDPMF	KYHLTVAQVR	GGMVFELANS	IVLPFDICRDY	
610	620	630	640	650	40
AVVLRKYADK	IYSISMKHPQ	EMKTYSVSFD	SLFSAVKNFT	EIASKFSERL	
660	670	680	690	700	
QDFDKSNPIV	LRMMNDQLMF	LERAFIDPLG	LPDRPFYRHV	IYAPSSHNKY	
710	720	730	740	750	
AGESFPGIYD	ALFDIESKVD	PSKAWGEVKR	QIYVAAFTVQ	AAAETLSEVA	

【0050】

P A P (前立腺ホスファターゼ) (アクセション番号 P 1 5 3 0 9) は、酸性条件 (50

pH 4～6) 下でアルキル、アリール、及びアシルオルトリン酸モノエステル並びにリン酸化タンパク質などの様々な数の基質を脱リン酸化する非特異的チロシンホスファターゼである。PAPは、脂質ホスファターゼ活性を有し、精漿中のリゾホスファチジン酸を不活性化する。一実施形態では、記載されるPAPポリヌクレオチドは、少なくとも1つのMHCクラスIエピトープ又は少なくとも1つのMHCクラスIIエピトープをコードする配列を含む。同様に、本明細書に記載するPAPポリペプチドは、少なくとも1つのMHCクラスIエピトープ又は少なくとも1つのMHCクラスIIエピトープを含む。PAPのヒト規定配列(Swiss ProtエントリーP15309)は、配列番号64として示される。

【化4】

10

10	20	30	40	50
MRAAPLLLLAR	AASLSLGFLF	LLFFWLDRSV	LAKELKFVTL	VFRHGDRSPI
60	70	80	90	100
DTFPTDPIKE	SSWPQGFQQL	TQLGMEQHYE	LGEYIRKRYR	KFLNESYKHE
110	120	130	140	150
QVYIRSTDVD	RTLMSAMTNL	AALFPPEGVS	IWNPILLWQP	IPVHTVPLSE
160	170	180	190	200
DQLLYLPFRN	CPRFQELESE	TLKSEEFQKR	LHPYKDFIAT	LGKLSGLHGQ
210	220	230	240	250
DLFGIWSKVY	DPLYCESVHN	FTLPSWATED	TMTKLRELSE	LSLLSLYGIH
260	270	280	290	300
KQKEKSRLQG	GVLVNEILNH	MKRATQIPSY	KKLIMYSAHD	TTVSGLQMAL
310	320	330	340	350
DVYNGLLPPY	ASCHLTELYF	EKGEYFVEMY	YRNETQHEPY	PLMLPGCSPS
360	370	380		
CPLERFAELV	GPVIPQDWST	ECMTTNSHQG	TEDSTD	

20

30

【0051】

予測アルゴリズム「BIMAS」は、ペプチド/HLA複合体の予測半減期解離に従って潜在的HLA結合エピトープを等級付けする。「SYFPEITHI」アルゴリズムは、一次及び二次HLA結合アンカー残基の存在を明らかにするスコアに従ってペプチドを等級付けする。いずれのコンピュータ化アルゴリズムも、以前公開されたHLA結合エピトープと類似する結合モチーフを有する所与のタンパク質内のアミノ酸配列に基づいて候補エピトープをスコアリングする。また、他のアルゴリズムを用いて別の生物学的試験のための候補を見出すこともできる。

40

【0052】

【表 3】

表 3

発現カセット	株	融合タンパク質中のアミノ酸の総数	融合タンパク質の抗原領域	アミノ酸
ActAN100*-EGFRvIII-SSX2	BH5290, BH5258	475	EGFRvIIIx5-SSX2	89-475
ActAN100*-EGFRvIII-PAP ₃₃₋₃₈₆	BH5290, BH5258	606	EGFRvIIIx5-PAP ₃₃₋₃₈₆	89-606
ActAN100*-EGFRvIII-NKX3.1(R41G) ₁₁₋₂₃₄ -PSMA _{1-20, 44-138, 169-750}	BH5290	1177	EGFRvIII-NKX3.1(R41G) ₁₁₋₂₃₄ -PSMA _{1-20, 44-138, 169-750}	89-1177
ActAN100*-EGFRvIII-NKX3.1 ₁₁₋₂₃₄ -PSMA _{1-20, 44-138, 169-750}	BH5258	1177	EGFRvIII-NKX3.1 ₁₁₋₂₃₄ -PSMA _{1-20, 44-138, 169-750}	89-1177
ActAN100*-SSX2 ₂₋₂₃₄	BH4598	310	SSX2 ₂₋₂₃₄	89-310
ActAN100*-EGFRvIII-SSX2 ₂₋₂₃₄	BH4602	474	EGFRvIII-SSX2 ₂₋₂₃₄	89-474
ActAN100*-NKX3.1-PAP ₃₃₋₃₈₆	BH4598, BH4602	678	NKX3.1-PAP ₃₃₋₃₈₆	89-678
ActAN100-PAP ₃₀₋₃₈₆	BH2868	491	PAP ₃₀₋₃₈₆	103-459
ActAN100*-EGFRvIIIx1-PAP ₃₃₋₃₈₆	PL1631	476	EGFRvIIIx1-PAP ₃₃₋₃₈₆	89-476
ActAN100*-EGFRvIIIx2-PAP ₃₃₋₃₈₆	PL1629	509	EGFRvIIIx2-PAP ₃₃₋₃₈₆	89-509
ActAN100*-EGFRvIIIx3-PAP ₃₃₋₃₈₆	PL1627	541	EGFRvIIIx3-PAP ₃₃₋₃₈₆	89-541
ActAN100*-EGFRvIIIx4-PAP ₃₃₋₃₈₆	PL1625	573	EGFRvIIIx4-PAP ₃₃₋₃₈₆	89-573
ActAN100*-EGFRvIIIx5-PAP ₃₃₋₃₈₆	PL1623	606	EGFRvIIIx5-PAP ₃₃₋₃₈₆	89-606

【0053】

EGFRvIII-SSX2 融合タンパク質

本明細書では、上皮増殖因子受容体変異型 III (EGFRvIII) ポリペプチドと、滑膜肉腫、X ブレークポイント 2 (SSX2) ポリペプチドとを含む融合タンパク質が開示される。

【0054】

融合タンパク質は、EGFRvIII ポリペプチドの 1 つ又は複数のコピーを含み得る。一部の実施形態では、融合タンパク質は、1 つの EGFRvIII ポリペプチドを含み得る。他の実施形態では、融合タンパク質は、複数の EGFRvIII ポリペプチドを含み得る。EGFRvIII ポリペプチドの好適なコピー数として、限定はしないが、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、又はそれを超えるコピーが挙げられる。一部の実施形態では、例えば、融合タンパク質は、1 つの EGFRvIII ポリペプチド (EGFRvIIIx1 と称する) を含み得る。このように、一部の態様では、融合タンパク質は、EGFRvIII

I x 1 - S S X 2 融合タンパク質を含み得る。一部の実施形態では、例えば、融合タンパク質は、E G F R v I I I ポリペプチドの2つのコピー（E G F R v I I I x 2 と称する）を含み得る。このように、一部の態様では、融合タンパク質は、E G F R v I I I x 2 - S S X 2 融合タンパク質を含み得る。一部の実施形態では、例えば、融合タンパク質は、E G F R v I I I ポリペプチドの3つのコピー（E G F R v I I I x 3 と称する）を含み得る。このように、一部の態様では、融合タンパク質は、E G F R v I I I x 3 - S S X 2 融合タンパク質を含み得る。一部の実施形態では、例えば、融合タンパク質は、E G F R v I I I ポリペプチドの4つのコピー（E G F R v I I I x 4 と称する）を含み得る。このように、一部の態様では、融合タンパク質は、E G F R v I I I x 4 - S S X 2 融合タンパク質を含み得る。一部の実施形態では、例えば、融合タンパク質は、E G F R v I I I ポリペプチドの5つのコピー（E G F R v I I I x 5 と称する）を含み得る。このように、一部の態様では、融合タンパク質は、E G F R v I I I x 5 - S S X 2 融合タンパク質を含み得る。

10

【0055】

E G F R v I I I ポリペプチドの1つ又は複数のコピーの各々は、配列番号6と少なくとも90%同一、91%同一、92%同一、93%同一、94%同一、95%同一、96%同一、97%同一、98%同一、99%同一、又は100%同一であるアミノ酸配列を含み得る。一部の態様では、例えば、E G F R v I I I ポリペプチドは、配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含み得る。他の実施形態では、E G F R v I I I ポリペプチドは、E G F R v I I I ポリペプチドの2つ、3つ、4つ、5つ、又はそれを超えるコピーを含んでよく、各コピーは、配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、E G F R v I I I ポリペプチドは、配列番号6である。E G F R v I I I x 5 の例示的なアミノ酸配列は、配列番号8に示されている。

20

【0056】

一部の態様では、E G F R v I I I ポリペプチドの1つ又は複数のコピーの各々は、配列番号6と少なくとも90%同一、91%同一、92%同一、93%同一、94%同一、95%同一、96%同一、97%同一、98%同一、99%同一、又は100%同一であるアミノ酸配列からなり得る。一部の実施形態では、E G F R v I I I ポリペプチドの1つ又は複数のコピーの各々は、配列番号6と少なくとも90%同一、91%同一、92%同一、93%同一、94%同一、95%同一、96%同一、97%同一、98%同一、99%同一、又は100%同一であるアミノ酸配列から実質的になり得る。

30

【0057】

E G F R v I I I ポリペプチドの1つ又は複数のコピーは、配列番号6のアミノ酸残基6~18と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むか、これからなるか、又はこれから実質的になり得る。一部の実施形態では、E G F R v I I I ポリペプチドの1つ又は複数のコピーは、配列番号6のアミノ酸残基6~14と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むか、これからなるか、又はこれから実質的になり得る。

【0058】

E G F R v I I I ポリペプチドは、E G F R v I I I ポリペプチドのN末端、C末端、又はN末端及びC末端の両方で1つ又は複数の切断配列によってフランキングされ得る。切断配列は、対象に存在するプロテアーゼによってプロセッシングされるように立体配置されている。E G F R v I I I ポリペプチドがE G F R v I I I ポリペプチドの2つ以上のコピーを含む場合、切断配列は、E G F R v I I I ポリペプチドの個々のコピー間に存在してよい。例えば、限定はしないが、配列番号8は、E G F R v I I I ポリペプチドの5つのコピー（配列番号6に示されるE G F R v I I I ポリペプチドの各コピー）と、切断配列（A S K V L / A D G S V K T S（配列番号54）、A S K V A / G D G S I K（配列番号55）、L S K V L / A D G S V K（配列番号56）、A S K V A / G D G S I K（配列番号57）、及びL S K V L / A D G S V K（配列番号58）；ここで、「/」は

40

50

、EGFRvIIIポリペプチドを表す)とを含む。これらの切断配列は、本来、例示的なものに過ぎない。好適な切断配列は、米国特許出願第13/988,076号明細書(米国特許出願公開第2014/037662号明細書); Toes, et al., J. Exp. Med. (2001) 194:1-12; Lauer et al., Infect. Immun. (2008) 76:3742-53; 及び Sinnathamby et al., J. Immunother. (2009) 32:856-69に記載されており、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0059】

EGFRvIIIポリペプチドは、SSX2ポリペプチドのN末端又はC末端と融合させることができる。好ましくは、EGFRvIIIポリペプチドは、SSX2ポリペプチドのN末端と融合させることができる。

【0060】

好適なSSX2ポリペプチドとしては、SSX2のアミノ酸1~234(「SSX2」又は「SSX2_{1~234}」)及びSSX2のアミノ酸2~234(「SSX2_{2~234}」)がある。一部の実施形態では、SSX2ポリペプチドは、配列番号10に示されるSSX2と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むか、同アミノ酸配列からなるか、又は同アミノ酸配列から実質的になり得る。一部の態様では、SSX2ポリペプチドは、配列番号10である。一部の実施形態では、SSX2ポリペプチドは、配列番号10のアミノ酸残基2~234に示されるSSX2_{2~234}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むか、これからなるか、又はこれから実質的になり得る。

【0061】

融合タンパク質は、1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド(EGFRvIIIポリペプチドは、配列番号6と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含む)、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含み得る。一部の実施形態では、融合タンパク質は、1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド(EGFRvIIIポリペプチドは、配列番号6と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含む)、及び配列番号10のアミノ酸残基2~234に示されるSSX2_{2~234}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含み得る。

【0062】

融合タンパク質は、配列番号4のアミノ酸残基89~475として示されるEGFRvIIIx5-SSX2と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含み得る。

【0063】

開示される融合タンパク質は、シグナル配列をさらに含んでもよく、シグナル配列は、EGFRvIIIポリペプチド及びSSX2ポリペプチドと共に翻訳リーディングフレーム内にある。好適なシグナル配列として、例えば、ActAN100(配列番号60に示される)、ActAN100* (配列番号2に示される)、LLO441(配列番号49に示される)、LLO441ΔPEST(配列番号51に示される)、及びLLO441Δ26(配列番号53に示される)が挙げられる。一部の実施形態では、シグナル配列は、配列番号60に示されるActAN100と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含み得る。一部の実施形態では、シグナル配列は、配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含み得る。従って、一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号

4に示されるA c t A N 1 0 0 * - E G F R v I I I x 5 - S S X 2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含み得る。

【0064】

開示される融合タンパク質は、本明細書の他の箇所に開示する通り、いくつかの好適な宿主細胞に発現させることができる。一部の実施形態では、例えば、融合タンパク質は、細菌、例えば、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) 又はその遺伝子修飾形態に発現させることができる。

【0065】

また、E G F R v I I I - S S X 2 融合タンパク質をコードする核酸分子も開示される。開示される核酸分子は、本明細書に開示するE G F R v I I I - S S X 2 融合タンパク質のいずれかをコードすることができる。

【0066】

核酸分子は、1つ又は複数のE G F R v I I I ポリペプチドを含むE G F R v I I I - S S X 2 融合タンパク質をコードすることができる。一部の実施形態では、核酸分子は、1つのE G F R v I I I ポリペプチドを含むE G F R v I I I - S S X 2 融合タンパク質をコードすることができる。他の実施形態では、核酸分子は、複数のE G F R v I I I ポリペプチドを含むE G F R v I I I - S S X 2 融合タンパク質をコードすることができる。開示される核酸分子によってコードされるE G F R v I I I ポリペプチドの好適な数は、限定はしないが、2つ、3つ、4つ、5つ、又はそれを超えるコピーが挙げられる。一部の実施形態では、核酸分子は、E G F R v I I I ポリペプチドの5つのコピー (E G F R v I I I x 5) を含むE G F R v I I I - S S X 2 融合タンパク質をコードすることができる。各E G F R v I I I ポリペプチドは、配列番号5と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を有するE G F R v I I I ポリヌクレオチドによってコードすることができる。E G F R v I I I x 5 ポリヌクレオチドの例示的な核酸配列は、配列番号7に示される。従って、開示される核酸分子は、1つ又は複数のE G F R v I I I ポリペプチドを含み、E G F R v I I I ポリペプチドは、配列番号5に示されるE G F R v I I I ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドによってコードされる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。例えば、核酸分子は、E G F R v I I I - S S X 2 融合タンパク質をコードすることができ、E G F R v I I I ポリペプチドは、配列番号7に示されるE G F R v I I I x 5 ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドによってコードされる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0067】

開示される核酸分子は、E G F R v I I I - S S X 2 融合タンパク質をコードすることができ、S S X 2 ポリペプチドは、配列番号9に示されるS S X 2 ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドによってコードされる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0068】

一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号5に示されるE G F R v I I I ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一の1つ又は複数のポリヌクレオチド、及び配列番号9に示されるS S X 2 ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0069】

核酸分子は、EGFRvIII-SSX2融合タンパク質をコードすることができる。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号7に示されるEGFRvIIIx5ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号9に示されるSSX2ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0070】

核酸分子は、プロモータ、シグナル配列、又はその両方をさらに含んでもよく、プロモータ、シグナル配列、又はその両方は、EGFRvIIIポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、及びSSX2ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結されている。好適なプロモータとして、例えば、actA（配列番号21に示される）又はhly（配列番号47に示される）が挙げられる。プロモータは、例えば、配列番号21に示されるactAプロモータと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を含んでもよい。好適なシグナル配列として、例えば、ActAN100（配列番号59に示される）、ActAN100*（配列番号1に示される）、LLO441（配列番号48に示される）、LLO441ΔPEST（配列番号50に示される）、及びLLO441Δ26（配列番号52に示される）が挙げられる。シグナル配列は、例えば、配列番号1に示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を含んでもよい。従って、一部の実施形態では、EGFRvIII-SSX2融合タンパク質をコードする核酸分子は、配列番号3に示されるactA-ActAN100*-EGFRvIIIx5-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドを含むか、同ポリヌクレオチドからなるか、又は同ポリヌクレオチドから実質的になる。

【0071】

核酸分子は、限定はしないが、制限エンドヌクレアーゼ切断部位（クローニングリナー）をはじめとする別の核酸配列をさらに含んでもよい。いくつかの好適な制限エンドヌクレアーゼを用いて核酸分子を生成することができ、この場合、最終核酸分子中にエンドヌクレアーゼ切断部位が残留してもよい。

【0072】

核酸分子に含まれ得る別の核酸配列は、個別のEGFRvIIIポリヌクレオチドとランキングする「切断配列」（他の箇所で定義する通り）を含む。

【0073】

核酸分子は発現カセットの一部であってよい。発現カセットは、プロモータ、開示の核酸分子を含むオープンリーディングフレーム、及び3'非翻訳領域を含んでよい。宿主細胞の機構に指令して開示の融合タンパク質を産生させるために発現カセットを使用することができる。

【0074】

さらに、開示の核酸分子を含むベクターも提供される。好適なベクターとして、例えば、細菌ベクター、ウイルスベクター、ネイキッドDNAベクター、及びネイキッドRNAベクターが挙げられる。

【0075】

EGFRvIII-PAP融合タンパク質

本明細書では、EGFRvIIIポリペプチドと、前立腺酸性ホスファターゼ（PAP）ポリペプチドとを含む融合タンパク質が開示される。

【0076】

融合タンパク質は、EGFRvIIIポリペプチドの1つ又は複数のコピーを含み得る。一部の実施形態では、融合タンパク質は、1つのEGFRvIIIポリペプチドを含み

10

20

30

40

50

得る。他の実施形態では、融合タンパク質は、複数のEGFRvIIIポリペプチドを含み得る。EGFRvIIIポリペプチドの好適なコピー数として、限定はしないが、2つ、3つ、4つ、5つ、又はそれを超えるコピーが挙げられる。一部の実施形態では、例えば、融合タンパク質は、1つのEGFRvIIIポリペプチド（EGFRvIIIx1と称する）を含んでよい。このように、一部の態様では、融合タンパク質は、EGFRvIIIx1-PAP融合タンパク質を含んでよい。一部の態様では、例えば、融合タンパク質は、EGFRvIIIポリペプチドの2つのコピー（EGFRvIIIx2と称する）を含んでよい。このように、一部の態様では、融合タンパク質は、EGFRvIIIx2-PAP融合タンパク質を含んでよい。一部の実施形態では、例えば、融合タンパク質は、EGFRvIIIポリペプチドの3つのコピー（EGFRvIIIx3と称する）を含んでよい。このように、一部の態様では、融合タンパク質は、EGFRvIIIx3-PAP融合タンパク質を含んでよい。一部の実施形態では、例えば、融合タンパク質は、EGFRvIIIポリペプチドの4つのコピー（EGFRvIIIx4と称する）を含んでよい。このように、一部の態様では、融合タンパク質は、EGFRvIIIx4-PAP融合タンパク質を含んでよい。一部の実施形態では、例えば、融合タンパク質は、EGFRvIIIポリペプチドの5つのコピー（EGFRvIIIx5と称する）を含んでよい。このように、一部の態様では、融合タンパク質は、EGFRvIIIx5-PAP融合タンパク質を含んでよい。

10

【0077】

EGFRvIIIポリペプチドの1つ又は複数のコピーの各々は、配列番号6と少なくとも90%同一、91%同一、92%同一、93%同一、94%同一、95%同一、96%同一、97%同一、98%同一、99%同一、又は100%同一であるアミノ酸配列を含み得る。一部の実施形態では、例えば、EGFRvIIIポリペプチドは、配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含み得る。他の実施形態では、EGFRvIIIポリペプチドは、EGFRvIIIポリペプチドの2つ、3つ、4つ、5つ、又はそれを超えるコピーを含んでよく、各コピーは、配列番号6と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有する。EGFRvIIIx5の例示的なアミノ酸配列は、配列番号8に示されている。

20

【0078】

一部の態様では、EGFRvIIIポリペプチドの1つ又は複数のコピーの各々は、配列番号6と少なくとも90%同一、91%同一、92%同一、93%同一、94%同一、95%同一、96%同一、97%同一、98%同一、99%同一、又は100%同一であるアミノ酸配列からなり得る。一部の態様では、EGFRvIIIポリペプチドの1つ又は複数のコピーの各々は、配列番号6と少なくとも90%同一、91%同一、92%同一、93%同一、94%同一、95%同一、96%同一、97%同一、98%同一、99%同一、又は100%同一であるアミノ酸配列から実質的になり得る。

30

【0079】

一部の態様では、EGFRvIIIポリペプチドの1つ又は複数のコピーは、配列番号6のアミノ酸残基6~18と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むか、同アミノ酸配列からなるか、又は同アミノ酸配列から実質的になり得る。一部の実施形態では、EGFRvIIIポリペプチドの1つ又は複数のコピーは、配列番号6のアミノ酸残基6~14と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むか、同アミノ酸配列からなるか、又は同アミノ酸配列から実質的になり得る。

40

【0080】

EGFRvIIIポリペプチドは、EGFRvIIIポリペプチドのN末端、C末端、又はN末端及びC末端の両方で1つ又は複数の切断配列によってフランキングされていてもよい。切断配列は、対象に存在するプロテアーゼによってプロセッシングされるように立体配置されている。EGFRvIIIポリペプチドがEGFRvIIIポリペプチドの2

50

つ以上のコピーを含む場合、切断配列は、EGFRvIIIポリペプチドの個々のコピー間に存在してよい。例えば、限定はしないが、配列番号8は、EGFRvIIIポリペプチドの5つのコピー（配列番号6に示されるEGFRvIIIポリペプチドの各コピー）と、切断配列（ASKVL/ADGSVKTS（配列番号54）、ASKVA/GDGSIK（配列番号55）、LSKVL/ADGSVK（配列番号56）、ASKVA/GDGSIK（配列番号57）、及びLSKVL/ADGSVK（配列番号58）；ここで、「/」は、EGFRvIIIポリペプチドを表す）とを含む。これらの切断配列は、本来、例示的なものに過ぎない。好適な切断配列は、米国特許出願第13/988,076号明細書（米国特許出願公開第2014/037662号明細書）；Toes, et al., J. Exp. Med. (2001) 194:1-12；Lauer et al., Infect. Immun. (2008) 76:3742-53；及びSinnathamby et al., J. Immunother. (2009) 32:856-69に記載されており、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0081】

EGFRvIIIポリペプチドは、PAPポリペプチドのN末端又はC末端と融合させることができる。好ましくは、EGFRvIIIポリペプチドは、PAPポリペプチドのN末端と融合させることができる。

【0082】

好適なPAPポリペプチドは、PAPのアミノ酸33～386（「PAP_{33～386}」）を含む。このように、一部の実施形態では、PAPポリペプチドは、配列番号14に示されるPAP_{33～386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含み得る。一部の実施形態では、PAPポリペプチドは、配列番号14に示されるPAP_{33～386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列からなり得る。一部の実施形態では、PAPポリペプチドは、配列番号14に示されるPAP_{33～386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列から実質的になり得る。

20

【0083】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号6に示されるEGFRvIIIポリペプチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33～386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリペプチドを含んでよい。例えば、融合タンパク質は、配列番号35のアミノ酸残基89～476に示されるEGFRvIII-PAP_{33～386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含んでよい。一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号6に示されるEGFRvIIIポリペプチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一である2つのポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33～386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリペプチドを含んでよい。例えば、融合タンパク質は、配列番号37のアミノ酸残基89～509に示されるEGFRvIIIx2-PAP_{33～386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含んでよい。一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号6に示されるEGFRvIIIポリペプチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一である3つのポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33～386}ポリペプチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリペプチドを含んでよい。例えば、融合タンパク質は、配列番号39のアミノ酸残基89～541に示されるEGFRvIIIx3-PAP_{33～386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一の

30

40

50

アミノ酸配列を含んでよい。一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号6に示されるEGFRvIIIPolipeptidと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一である4つのポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}ポリペプチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリペプチドを含んでよい。例えば、融合タンパク質は、配列番号41のアミノ酸残基89~573に示されるEGFRvIIIX4-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含んでよい。一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号6に示されるEGFRvIIIPolipeptidと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一である5つのポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}ポリペプチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリペプチドを含んでよい。例えば、融合タンパク質は、配列番号12のアミノ酸残基89~606に示されるEGFRvIIIX5-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含んでよい。

10

【0084】

開示される融合タンパク質は、シグナル配列をさらに含み、シグナル配列は、EGFRvIIIPolipeptid及びPAPポリペプチドと共に翻訳リーディングフレーム内にある。好適なシグナル配列として、例えば、ActAN100(配列番号60に示される)、ActAN100* (配列番号2に示される)、LLO441(配列番号49に示される)、LLO441ΔPEST(配列番号51に示される)、及びLLO441Δ26(配列番号53に示される)が挙げられる。一部の実施形態では、シグナル配列は、配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含んでよい。一部の実施形態では、シグナル配列は、配列番号60に示されるActAN100と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含んでよい。従って、一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号35に示されるActAN100*-EGFRvIIIX1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含んでよい。一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号37に示されるActAN100*-EGFRvIIIX2-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含んでよい。一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号39に示されるActAN100*-EGFRvIIIX3-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含んでよい。一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号41に示されるActAN100*-EGFRvIIIX4-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含んでよい。一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号12に示されるActAN100*-EGFRvIIIX5-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含んでよい。

20

30

40

【0085】

開示される融合タンパク質は、本明細書の他の箇所に開示する通り、いくつかの好適な宿主細胞に発現させることができる。一部の実施形態では、例えば、融合タンパク質は、細菌、例えば、リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*)又はその遺伝子修飾形態に発現させることができる。

【0086】

また、EGFRvIIIPolipeptid融合タンパク質をコードする核酸分子も開示される。

50

開示される核酸分子は、本明細書に開示する E G F R v I I I - P A P 融合タンパク質のいずれかをコードすることができる。

【0087】

核酸分子は、1つ又は複数の E G F R v I I I ポリペプチドを含む E G F R v I I I - P A P 融合タンパク質をコードすることができる。一部の実施形態では、核酸分子は、1つの E G F R v I I I ポリペプチドを含む E G F R v I I I - P A P 融合タンパク質をコードすることができる。他の実施形態では、核酸分子は、複数の E G F R v I I I ポリペプチドを含む E G F R v I I I - P A P 融合タンパク質をコードすることができる。開示の核酸分子によってコードされる E G F R v I I I ポリペプチドの好適な数として、限定はしないが、2つ、3つ、4つ、5つ、又はそれを超えるコピーが挙げられる。一部の実施形態では、核酸分子は、E G F R v I I I ポリペプチドの1つのコピー (E G F R v I I I x 1)、E G F R v I I I ポリペプチドの2つのコピー (E G F R v I I I x 2)、E G F R v I I I ポリペプチドの3つのコピー (E G F R v I I I x 3)、E G F R v I I I ポリペプチドの4つのコピー (E G F R v I I I x 4)、又はE G F R v I I I ポリペプチドの5つのコピー (E G F R v I I I x 5) を含む E G F R v I I I - P A P 融合タンパク質をコードすることができる。E G F R v I I I ポリヌクレオチドの例示的な核酸配列は、配列番号5に示され、また、E G F R v I I I x 5 ポリヌクレオチドの例示的な核酸配列は、配列番号7に示される。従って、開示される核酸分子は、E G F R v I I I - P A P 融合タンパク質をコードすることができ、融合タンパク質は、配列番号5に示される E G F R v I I I ポリヌクレオチドと少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるポリヌクレオチドによってコードされる E G F R v I I I ポリペプチドの1、2、3、4、又は5つのコピーを含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の態様では、開示の核酸分子は、E G F R v I I I - P A P 融合タンパク質をコードすることができ、E G F R v I I I ポリペプチドは、配列番号7に示される E G F R v I I I x 5 ポリヌクレオチドと少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるポリヌクレオチドによってコードされる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0088】

開示される核酸分子は、E G F R v I I I - P A P 融合タンパク質をコードすることができ、P A P ポリペプチドは、配列番号13に示される P A P_{33~386} ポリヌクレオチドと少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるポリヌクレオチドによってコードされる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0089】

一部の実施形態では、核酸分子は、各々が配列番号5に示される E G F R v I I I ポリヌクレオチドと少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一である、1つ又は複数の E G F R v I I I ポリヌクレオチド、及び配列番号13に示される P A P_{33~386} ポリヌクレオチドと少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるポリヌクレオチドを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号7に示される E G F R v I I I x 5 ポリヌクレオチドと少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号13に示される P A P_{33~386} ポリヌクレオチドと少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるポリヌクレオチドを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0090】

核酸分子は、プロモータ、シグナル配列、又はその両方をさらにもよく、プロモータ、シグナル配列、又はその両方は、E G F R v I I I ポリペプチドをコードするヌク

レオチド配列、及びPAPポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結されている。好適なプロモータとして、例えば、a c t A（配列番号21に示される）又はh l y（配列番号47に示される）が挙げられる。プロモータは、例えば、配列番号21に示されるa c t Aプロモータと少なくともi）90%同一、i i）95%同一、i i i）99%同一、又はi v）100%同一であるヌクレオチド配列を含んでもよい。好適なシグナル配列として、例えば、A c t A N 1 0 0（配列番号59に示される）、A c t A N 1 0 0 *（配列番号1に示される）、L L O 4 4 1（配列番号48に示される）、L L O 4 4 1 Δ P E S T（配列番号50に示される）、及びL L O 4 4 1 Δ 2 6（配列番号52に示される）が挙げられる。シグナル配列は、例えば、配列番号1に示されるA c t A N 1 0 0 *と少なくともi）90%同一、i i）95%同一、i i i）99%同一、又はi v）100%同一であるヌクレオチド配列を含んでもよい。従って、一部の実施形態では、E G F R v I I I - P A P融合タンパク質をコードする核酸分子は、配列番号34に示されるa c t A - A c t A N 1 0 0 * - E G F R v I I I x 1 - P A P_{33~386}と少なくともi）90%同一、i i）95%同一、i i i）99%同一、又はi v）100%同一であるポリヌクレオチドを含むか、これからなるか、又はこれから実質的になり得る。一部の実施形態では、E G F R v I I I - P A P融合タンパク質をコードする核酸分子は、配列番号36に示されるa c t A - A c t A N 1 0 0 * - E G F R v I I I x 2 - P A P_{33~386}と少なくともi）90%同一、i i）95%同一、i i i）99%同一、又はi v）100%同一であるポリヌクレオチドを含むか、これからなるか、又はこれから実質的になり得る。一部の実施形態では、E G F R v I I I - P A P融合タンパク質をコードする核酸分子は、配列番号38に示されるa c t A - A c t A N 1 0 0 * - E G F R v I I I x 3 - P A P_{33~386}と少なくともi）90%同一、i i）95%同一、i i i）99%同一、又はi v）100%同一であるポリヌクレオチドを含むか、これからなるか、又はこれから実質的になり得る。一部の実施形態では、E G F R v I I I - P A P融合タンパク質をコードする核酸分子は、配列番号40に示されるa c t A - A c t A N 1 0 0 * - E G F R v I I I x 4 - P A P_{33~386}と少なくともi）90%同一、i i）95%同一、i i i）99%同一、又はi v）100%同一であるポリヌクレオチドを含むか、これからなるか、又はこれから実質的になり得る。一部の実施形態では、E G F R v I I I - P A P融合タンパク質をコードする核酸分子は、配列番号11に示されるa c t A - A c t A N 1 0 0 * - E G F R v I I I x 5 - P A P_{33~386}と少なくともi）90%同一、i i）95%同一、i i i）99%同一、又はi v）100%同一であるポリヌクレオチドを含むか、これからなるか、又はこれから実質的になり得る。

【0091】

核酸分子は、限定はしないが、制限エンドヌクレアーゼ切断部位（クローニングリナー）及び「切断配列」（他の箇所では定義する通り）をはじめとする別の核酸配列を含んでもよい。

【0092】

核酸分子は発現カセットの一部であってよい。発現カセットは、プロモータ、開示の核酸分子を含むオープンリーディングフレーム、及び3'非翻訳領域を含んでよい。宿主細胞の機構に指令して開示の融合タンパク質を産生させるために発現カセットを使用することができる。

【0093】

さらに、開示の核酸分子を含むベクターも提供される。好適なベクターとして、例えば、細菌ベクター、ウイルスベクター、ネイキッドDNAベクター、及びネイキッドRNAベクターが挙げられる。

【0094】

E G F R v I I I - N K X 3 . 1 - P S M A融合タンパク質

本明細書では、E G F R v I I Iポリペプチド、NK3ホメオボックス1（NKX3.1）ポリペプチド、及び前立腺特異的膜抗原（PSMA）ポリペプチドを含む融合タンパ

ク質が開示される。

【0095】

融合タンパク質は、EGFRvIIIポリペプチドの1つ又は複数のコピーを含み得る。一部の実施形態では、融合タンパク質は、1つのEGFRvIIIポリペプチドを含み得る。他の実施形態では、融合タンパク質は、複数のEGFRvIIIポリペプチドを含み得る。EGFRvIIIポリペプチドの好適なコピー数として、限定はしないが、2つ、3つ、4つ、5つ、又はそれを超えるコピーが挙げられる。一部の実施形態では、例えば、融合タンパク質は、1つのEGFRvIIIポリペプチド（EGFRvIIIx1と称する）を含んでよい。一部の実施形態では、例えば、融合タンパク質は、EGFRvIIIポリペプチドの2つのコピー（EGFRvIIIx2と称する）を含んでよい。一部の実施形態では、例えば、融合タンパク質は、EGFRvIIIポリペプチドの3つのコピー（EGFRvIIIx3と称する）を含んでよい。一部の実施形態では、例えば、融合タンパク質は、EGFRvIIIポリペプチドの4つのコピー（EGFRvIIIx4と称する）を含んでよい。一部の実施形態では、例えば、融合タンパク質は、EGFRvIIIポリペプチドの5つのコピー（EGFRvIIIx5と称する）を含んでよい。

10

【0096】

EGFRvIIIポリペプチドの1つ又は複数のコピーの各々は、配列番号6と少なくとも90%同一、91%同一、92%同一、93%同一、94%同一、95%同一、96%同一、97%同一、98%同一、99%同一、又は100%同一であるアミノ酸配列を含んでよい。一部の実施形態では、例えば、EGFRvIIIポリペプチドは、配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含んでよい。他の実施形態では、EGFRvIIIポリペプチドは、EGFRvIIIポリペプチドの2つ、3つ、4つ、5つ、又はそれを超えるコピーを含んでよく、各コピーは、配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を有する。EGFRvIIIx5の例示的なアミノ酸配列は、配列番号8に示されている。

20

【0097】

一部の態様では、EGFRvIIIポリペプチドの1つ又は複数のコピーの各々は、配列番号6と少なくとも90%同一、91%同一、92%同一、93%同一、94%同一、95%同一、96%同一、97%同一、98%同一、99%同一、又は100%同一であるアミノ酸配列からなり得る。一部の実施形態では、EGFRvIIIポリペプチドの1つ又は複数のコピーの各々は、配列番号6と少なくとも90%同一、91%同一、92%同一、93%同一、94%同一、95%同一、96%同一、97%同一、98%同一、99%同一、又は100%同一であるアミノ酸配列から実質的になり得る。

30

【0098】

一部の態様では、EGFRvIIIポリペプチドの1つ又は複数のコピーは、配列番号6のアミノ酸残基6～18と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むか、これからなるか、又はこれから実質的になり得る。一部の実施形態では、EGFRvIIIポリペプチドの1つ又は複数のコピーは、配列番号6のアミノ酸残基6～14と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むか、同アミノ酸配列からなるか、又は同アミノ酸配列から実質的になり得る。

40

【0099】

EGFRvIIIポリペプチドは、EGFRvIIIポリペプチドのN末端、C末端、又はN末端及びC末端の両方で1つ又は複数の切断配列によってフランキングされ得る。切断配列は、対象に存在するプロテアーゼによってプロセッシングされるように立体配置されている。EGFRvIIIポリペプチドが、EGFRvIIIポリペプチドの2つ以上のコピーを含む場合、切断配列は、EGFRvIIIポリペプチドの個々のコピー間に存在してよい。例えば、限定はしないが、配列番号8は、EGFRvIIIポリペプチドの5つのコピー（配列番号6に示されるEGFRvIIIポリペプチドの各コピー）と、切

50

断配列 (ASKVL/ADGSVKTS (配列番号54)、ASKVA/GDGSIK (配列番号55)、LSKVL/ADGSVK (配列番号56)、ASKVA/GDGSIK (配列番号57)、及びLSKVL/ADGSVK (配列番号58)) ; ここで、「/」は、EGFRvIIIポリペプチドを表す) とを含む。これらの切断配列は、本来、例示的なものに過ぎない。好適な切断配列は、米国特許出願第13/988,076号明細書 (米国特許出願公開第2014/037662号明細書) ; Toes, et al., J. Exp. Med. (2001) 194:1-12; Lauer et al., Infect. Immun. (2008) 76:3742-53; 及び Sinnathamby et al., J. Immunother. (2009) 32:856-69に記載されており、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0100】

好ましくは、融合タンパク質は、NKX3.1ポリペプチドのN末端と融合したEGFRvIIIポリペプチドと、PSMAポリペプチドのN末端と融合したNKX3.1ポリペプチドとを含んでもよい。EGFRvIIIポリペプチド、NKX3.1ポリペプチド、及びPSMAポリペプチドの他の順序も好適である。例えば、EGFRvIII-PSMA-NKX1; PSMA-NKX-EGFRvIII; PSMA-EGFRvIII-NKX1; 及びNKX1-PSMA-EGFRvIII融合タンパク質が好適である。

【0101】

好適なNKX3.1ポリペプチドは、NKX3.1のアミノ酸11~234 (「NKX3.1_{11~234}」) を含む。一部の実施形態では、NKX3.1ポリペプチドは、配列番号25に示されるNKX3.1_{11~234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含み得る。一部の実施形態では、NKX3.1ポリペプチドは、配列番号25に示されるNKX3.1_{11~234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列からなり得る。一部の実施形態では、NKX3.1ポリペプチドは、配列番号25に示されるNKX3.1_{11~234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列から実質的になり得る。

20

【0102】

NKX3.1_{11~234}ポリペプチドは、アルギニン (R) からグリシン (G) への突然変異をアミノ酸41に有してもよい (「NKX3.1 (R41G)」)。一部の実施形態では、NKX3.1ポリペプチドは、配列番号18に示されるNKX3.1 (R41G)_{11~234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含み得る。一部の実施形態では、NKX3.1ポリペプチドは、配列番号18に示されるNKX3.1 (R41G)_{11~234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列からなり得る。一部の実施形態では、NKX3.1ポリペプチドは、配列番号18に示されるNKX3.1 (R41G)_{11~234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列から実質的になり得る。

30

40

【0103】

好適なPSMAポリペプチドは、PSMAのアミノ酸1~20及び44~750 (PSMA_{1~20, 44~750}) 又はPSMAのアミノ酸1~20、44~138、及び169~750 (PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}) を含む。好ましくは、PSMAポリペプチドは、配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含み得る。一部の実施形態では、PSMAポリペプチドは、配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列からなり得る。一部の実施形態では、PSMAポリペプチドは、

50

配列番号 20 に示される P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列から実質的になり得る。

【0104】

E G F R v I I I - N K X 3 . 1_{11 ~ 234} - P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} 融合タンパク質は、

a) 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリペプチド、配列番号 25 に示される N K X 3 . 1_{11 ~ 234} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む N K X 3 . 1 ポリペプチド、及び配列番号 20 に示される P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P S M A ポリペプチド；

b) 配列番号 8 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む E G F R v I I I x 5 ポリペプチド、配列番号 25 に示される N K X 3 . 1_{11 ~ 234} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む N K X 3 . 1 ポリペプチド、及び配列番号 20 に示される P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P S M A ポリペプチド；又は

c) 配列番号 23 のアミノ酸残基 89 ~ 1177 に示される E G F R v I I I x 5 - N K X 3 . 1_{11 ~ 234} - P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含み得る。

【0105】

E G F R v I I I - N K X 3 . 1 (R 4 1 G)_{11 ~ 234} - P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} 融合タンパク質は、

a) 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を有する 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリペプチド、配列番号 18 に示される N K X 3 . 1 (R 4 1 G)_{11 ~ 234} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む N K X 3 . 1 ポリペプチド、及び配列番号 20 に示される P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P S M A ポリペプチド；

b) 配列番号 8 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を有する E G F R v I I I x 5 ポリペプチド、配列番号 18 に示される N K X 3 . 1 (R 4 1 G)_{11 ~ 234} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む N K X 3 . 1 ポリペプチド、及び配列番号 20 に示される P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P S M A ポリペプチド；又は

c) 配列番号 16 のアミノ酸残基 89 ~ 1177 に示される E G F R v I I I x 5 - N K X 3 . 1 (R 4 1 G)_{11 ~ 234} - P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含み得る。

【0106】

開示される融合タンパク質は、シグナル配列をさらに含んでもよい。一部の実施形態で

は、融合タンパク質は、シグナル配列をさらに含んでもよく、シグナル配列は、EGFRvIIIポリペプチド、NKX3.1ポリペプチド、及びPSMAポリペプチドと共に翻訳リーディングフレーム内にある。好適なシグナル配列として、例えば、ActAN100（配列番号60に示される）、ActAN100*（配列番号2に示される）、LLO441（配列番号49に示される）、LLO441ΔPEST（配列番号51に示される）、及びLLO441Δ26（配列番号53に示される）が挙げられる。一部の実施形態では、シグナル配列は、配列番号60に示されるActAN100と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含んでよい。一部の実施形態では、シグナル配列は、配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含んでよい。従って、一部の実施形態では、EGFRvIII-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20,44~138,169~750}融合タンパク質は、配列番号23に示されるActAN100*-EGFRvIIIx5-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20,44~138,169~750}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むか、これからなるか、又はこれから実質的になり得る。一部の実施形態では、EGFRvIII-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20,44~138,169~750}融合タンパク質は、配列番号16に示されるActAN100*-EGFRvIIIx5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20,44~138,169~750}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列を含むか、これからなるか、又はこれから実質的になり得る。

【0107】

開示される融合タンパク質は、本明細書の他の箇所に開示する通り、いくつかの好適な宿主細胞に発現させることができる。一部の実施形態では、例えば、融合タンパク質は、細菌、例えば、リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*)又はその遺伝子修飾形態に発現させることができる。

【0108】

また、EGFRvIII-NKX3.1-PSMA融合タンパク質をコードする核酸分子も開示される。開示される核酸分子は、本明細書に開示するEGFRvIII-NKX3.1-PSMA融合タンパク質のいずれかをコードすることができる。

【0109】

核酸分子は、1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチドを含むEGFRvIII-NKX3.1-PSMA融合タンパク質をコードすることができる。一部の実施形態では、核酸分子は、1つのEGFRvIIIポリペプチドを含むEGFRvIII-NKX3.1-PSMA融合タンパク質をコードすることができる。他の実施形態では、核酸分子は、複数のEGFRvIIIポリペプチドを含むEGFRvIII-NKX3.1-PSMA融合タンパク質をコードすることができる。開示の核酸分子によってコードされるEGFRvIIIポリペプチドの好適な数として、限定はしないが、2つ、3つ、4つ、5つ、又はそれを超えるコピーが挙げられる。一部の実施形態では、核酸分子は、EGFRvIIIポリペプチドの5つのコピー(EGFRvIIIx5)を含むEGFRvIII-NKX3.1-PSMA融合タンパク質をコードすることができる。EGFRvIIIポリヌクレオチドの例示的な核酸配列は、配列番号5に示されており、EGFRvIIIx5ポリヌクレオチドの例示的な核酸配列は、配列番号7に示される。従って、開示される核酸分子は、EGFRvIII-NKX3.1-PSMA融合タンパク質をコードすることができ、融合タンパク質は、各々が配列番号5に示されるEGFRvIIIx5ポリヌクレオチドと少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるポリヌクレオチドによってコードされる、複数のEGFRvIIIポリペプチドを含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。開示される核酸分子は、EGFRvIII-NKX3.1-PSMA融合タ

ンパク質をコードすることができ、EGFRvIIIポリペプチドは、配列番号7に示されるEGFRvIIIx5ポリヌクレオチドと少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるポリヌクレオチドによってコードされる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0110】

開示される核酸分子は、EGFRvIII-NKX3.1-PSMA融合タンパク質をコードすることができ、NKX3.1ポリペプチドは、配列番号24に示されるNKX3.1_{11~234}ポリヌクレオチドと少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるポリヌクレオチドによってコードされる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。或いは、開示される核酸分子は、EGFRvIII-NKX3.1-PSMA融合タンパク質をコードすることができ、NKX3.1ポリペプチドは、配列番号17に示されるNKX3.1(R41G)_{11~234}ポリヌクレオチドと少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるポリヌクレオチドによってコードされる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0111】

開示される核酸分子は、EGFRvIII-NKX3.1-PSMA融合タンパク質をコードすることができ、PSMAポリペプチドは、配列番号19に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるポリヌクレオチドによってコードされる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0112】

EGFRvIII-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質をコードする核酸分子は、

a) 配列番号5に示されるEGFRvIIIポリヌクレオチドと少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一である1つ又は複数のEGFRvIIIポリヌクレオチド、配列番号24に示されるNKX3.1_{11~234}ポリヌクレオチドと少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号19に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるポリヌクレオチド；又は

b) 配列番号7に示されるEGFRvIIIx5ポリヌクレオチドと少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるポリヌクレオチド、配列番号24に示されるNKX3.1_{11~234}ポリヌクレオチドと少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号19に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるポリヌクレオチド

を含むか、これらからなるか、又はこれらから実質的になり得る。

【0113】

一部の態様では、上に列記した核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0114】

EGFRvIII-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質をコードする核酸分子は、

a) 配列番号5に示されるEGFRvIIIポリヌクレオチドと少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一である1つ又は複数のEGFRvIIIポリヌクレオチド、配列番号17に示されるNKX3.1(R41G)_{11~234}ポリヌクレオチドと少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号1

9に示されるP S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチド；又は

b) 配列番号7に示されるE G F R v I I I x 5ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチド、配列番号17に示されるN K X 3. 1 (R 4 1 G)_{11 ~ 234}ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号19に示されるP S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドを含むか、これらからなるか、又はこれらから実質的になり得る。

10

【0115】

一部の態様では、上に列記した核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0116】

核酸分子は、プロモータ、シグナル配列、又はその両方をさらにもよく、プロモータ、シグナル配列、又はその両方は、E G F R v I I I ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、N K X 3. 1 ポリペプチド、及びP S M A ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結されている。好適なプロモータとして、例えば、a c t A (配列番号21に示される)又はh l y (配列番号47に示される)が挙げられる。プロモータは、例えば、配列番号21に示されるa c t A プロモータと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を含んでもよい。好適なシグナル配列として、例えば、A c t A N 1 0 0 (配列番号59に示される)、A c t A N 1 0 0 * (配列番号1に示される)、L L O 4 4 1 (配列番号48に示される)、L L O 4 4 1 Δ P E S T (配列番号50に示される)、及びL L O 4 4 1 Δ 2 6 (配列番号52に示される)が挙げられる。シグナル配列は、例えば、配列番号1に示されるA c t A N 1 0 0 * と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を含んでもよい。従って、一部の実施形態では、E G F R v I I I - N K X 3. 1 - P S M A 融合タンパク質をコードする核酸分子は、配列番号22として示されるa c t A - A c t A N 1 0 0 * - E G F R v I I I x 5 - N K X 3. 1_{11 ~ 234} - P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドを含むか、これらからなるか、又はこれらから実質的になり得る。他の実施形態では、E G F R v I I I - N K X 3. 1 - P S M A 融合タンパク質をコードする核酸分子は、配列番号15として示されるa c t A - A c t A N 1 0 0 * - E G F R v I I I x 5 - N K X 3. 1 (R 4 1 G)_{11 ~ 234} - P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドを含むか、これらからなるか、又はこれらから実質的になり得る。

20

30

【0117】

核酸分子は、限定はしないが、制限エンドヌクレアーゼ切断部位（クローニングリンカー）及び「切断配列」（他の箇所では定義する通り）をはじめとする別の核酸配列をさらにも含む。

40

【0118】

核酸分子は発現カセットの一部であってよい。発現カセットは、プロモータ、開示の核酸分子を含むオープンリーディングフレーム、及び3'非翻訳領域を含んでよい。宿主細胞の機構に指令して開示の融合タンパク質を産生させるために発現カセットを使用することができる。

【0119】

さらに、開示の核酸分子を含むベクターも提供される。好適なベクターとして、例えば、細菌ベクター、ウイルスベクター、ネイキッドDNAベクター、及びネイキッドRNA

50

ベクターが挙げられる。

【0120】

NKX3.1-PAP融合タンパク質

本明細書では、NK3ホメオボックス1 (NKX3.1) ポリペプチドと、PAPポリペプチドとを含む融合タンパク質が開示される。

【0121】

好適なNKX3.1ポリペプチドとしては、完全長NKX3.1 (NKX3.1のアミノ酸残基1~234、「NKX3.1」) がある。一部の実施形態では、NKX3.1ポリペプチドは、配列番号29に示されるNKX3.1と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含み得る。一部の実施形態では、NKX3.1ポリペプチドは、配列番号29に示されるNKX3.1と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列からなり得る。一部の実施形態では、NKX3.1ポリペプチドは、配列番号29に示されるNKX3.1と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列から実質的になり得る。

【0122】

好適なPAPポリペプチドとしては、PAPのアミノ酸33~386 (「PAP_{33~386}」) がある。このように、一部の実施形態では、PAPポリペプチドは、配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸を含み得る。一部の実施形態では、PAPポリペプチドは、配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列からなり得る。一部の実施形態では、PAPポリペプチドは、配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列から実質的になり得る。

【0123】

NKX3.1ポリペプチドは、PAPポリペプチドのN末端又はC末端に融合させることができる。好ましくは、NKX3.1ポリペプチドは、PAPポリペプチドのN末端に融合させることができる。

【0124】

融合タンパク質は、配列番号29に示されるNKX3.1と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含むか、これらからなるか、又はこれらから実質的になり得る。

【0125】

融合タンパク質は、配列番号27のアミノ酸残基89~678に示されるNKX3.1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むか、これらからなるか、又はこれらから実質的になり得る。

【0126】

開示される融合タンパク質は、シグナル配列をさらに含んでもよい。一部の実施形態では、融合タンパク質は、シグナル配列をさらに含んでもよく、シグナル配列は、NKX3.1ポリペプチド及びPAPポリペプチドと共に翻訳リーディングフレーム内にある。好適なシグナル配列として、例えば、ActAN100 (配列番号60に示される)、ActAN100* (配列番号2に示される)、LLO441 (配列番号49に示される)、LLO441ΔPEST (配列番号51に示される)、及びLLO441Δ26 (配列番号53に示される) が挙げられる。一部の実施形態では、シグナル配列は、配列番号60

に示される A c t A N 1 0 0 と少なくとも i) 9 0 % 同一、i i) 9 5 % 同一、i i i) 9 9 % 同一、又は i v) 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含んでよい。一部の実施形態では、シグナル配列は、配列番号 2 として示される A c t A N 1 0 0 * と少なくとも i) 9 0 % 同一、i i) 9 5 % 同一、i i i) 9 9 % 同一、又は i v) 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含んでよい。従って、一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 2 7 に示される A c t A N 1 0 0 * - N K X 3 . 1 - P A P _{33 ~ 386} と少なくとも i) 9 0 % 同一、i i) 9 5 % 同一、i i i) 9 9 % 同一、又は i v) 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含んでよい。

【0127】

開示される融合タンパク質は、本明細書の他の箇所に開示する通り、いくつかの好適な宿主細胞に発現させることができる。一部の実施形態では、例えば、融合タンパク質は、細菌、例えば、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) 又はその遺伝子修飾形態に発現させることができる。

【0128】

また、N K X 3 . 1 - P A P 融合タンパク質をコードする核酸分子も開示される。開示される核酸分子は、本明細書に開示する N K X 3 . 1 - P A P 融合タンパク質のいずれかをコードすることができる。

【0129】

開示される核酸分子は、N K X 3 . 1 - P A P 融合タンパク質をコードすることができ、N K X 3 . 1 ポリペプチドは、配列番号 2 8 に示される N K X 3 . 1 ポリヌクレオチドと少なくとも i) 9 0 % 同一、i i) 9 5 % 同一、i i i) 9 9 % 同一、又は i v) 1 0 0 % 同一であるポリヌクレオチドによってコードされる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0130】

開示される核酸分子は、N K X 3 . 1 - P A P 融合タンパク質をコードすることができ、P A P ポリペプチドは、配列番号 1 3 に示される P A P _{33 ~ 386} ポリヌクレオチドと少なくとも i) 9 0 % 同一、i i) 9 5 % 同一、i i i) 9 9 % 同一、又は i v) 1 0 0 % 同一であるポリヌクレオチドによってコードされる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0131】

核酸分子は、N K X 3 . 1 - P A P _{33 ~ 386} 融合タンパク質をコードすることができる。一部の実施形態では、例えば、核酸分子は、配列番号 2 8 に示される N K X 3 . 1 ポリヌクレオチドと少なくとも i) 9 0 % 同一、i i) 9 5 % 同一、i i i) 9 9 % 同一、又は i v) 1 0 0 % 同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号 1 3 に示される P A P _{33 ~ 386} ポリヌクレオチドと少なくとも i) 9 0 % 同一、i i) 9 5 % 同一、i i i) 9 9 % 同一、又は i v) 1 0 0 % 同一であるポリヌクレオチドを含み得る。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0132】

核酸分子は、プロモータ、シグナル配列、又はその両方をさらにもよく、プロモータ、シグナル配列、又はその両方は、N K X 3 . 1 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、及び P A P ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結されている。好適なプロモータとして、例えば、a c t A (配列番号 2 1 に示される) 又は h l y (配列番号 4 7 に示される) が挙げられる。プロモータは、例えば、配列番号 2 1 に示される a c t A プロモータと少なくとも i) 9 0 % 同一、i i) 9 5 % 同一、i i i) 9 9 % 同一、又は i v) 1 0 0 % 同一であるヌクレオチド配列を含んでもよい。好適なシグナル配列として、例えば、A c t A N 1 0 0 (配列番号 5 9 に示される)、A c t A N 1 0 0 * (配列番号 1 に示される)、L L O 4 4 1 (配列番号 4 8 に示される)、L L O 4 4 1 Δ P E S T (配列番号 5 0 に示される)、及び L L O 4 4 1 Δ 2 6 (配列番号 5 2 に示される) が挙げられる。シグナル配列は、例えば、配列番号 1 に示される A c t A N 1 0 0 * と少なくとも i) 9 0 % 同一、i i) 9 5 % 同一、i i i) 9 9 % 同一、又は i

v) 100%同一であるヌクレオチド配列を含んでもよい。従って、一部の実施形態では、NKX3. 1-PAP融合タンパク質をコードする核酸分子は、配列番号26に示される actA-actAN100*-NKX3. 1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドを含むか、これからなるか、又はこれから実質的になり得る。

【0133】

核酸分子は、限定はしないが、制限エンドヌクレアーゼ切断部位（クローニングリンカー）をはじめとする別の核酸配列をさらに含んでもよい。

【0134】

核酸分子は発現カセットの一部であってよい。発現カセットは、プロモータ、開示の核酸分子を含むオープンリーディングフレーム、及び3'非翻訳領域を含んでよい。宿主細胞の機構に指令して開示の融合タンパク質を産生させるために発現カセットを使用することができる。

10

【0135】

さらに、開示の核酸分子を含むベクターも提供される。好適なベクターとして、例えば、細菌ベクター、ウイルスベクター、ネイキッドDNAベクター、及びネイキッドRNAベクターが挙げられる。

【0136】

actAN100*-SSX2融合タンパク質

本明細書では、actAN100*ポリペプチドとSSX2ポリペプチドを含む融合タンパク質が開示される。

20

【0137】

好適なSSX2ポリペプチドとしては、SSX2のアミノ酸1~234（「SSX2」又は「SSX2_{1~234}」）及びSSX2のアミノ酸2~234（「SSX2_{2~234}」）がある。一部の実施形態では、SSX2ポリペプチドは、配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含み得る。一部の実施形態では、SSX2ポリペプチドは、配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列からなり得る。一部の実施形態では、SSX2ポリペプチドは、配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列から実質的になり得る。

30

【0138】

actAN100*ポリペプチドは、配列番号2として示されるactAN100*と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含み得る。

【0139】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号2として示されるactAN100*と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むactAN100*ポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含み得る。一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号31に示されるactAN100*-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含み得る。

40

【0140】

他の好適なシグナル配列として、例えば、actAN100（配列番号60に示される）、LLO441（配列番号49に示される）、LLO441ΔPEST（配列番号51に示される）、及びLLO441Δ26（配列番号53に示される）が挙げられる。

【0141】

50

開示される融合タンパク質は、本明細書の他の箇所に開示する通り、いくつかの好適な宿主細胞に発現させることができる。一部の実施形態では、例えば、融合タンパク質は、細菌、例えば、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) 又はその遺伝子修飾形態に発現させることができる。

【0142】

また、ActAN100*–SSX2 融合タンパク質をコードする核酸分子も開示される。一部の実施形態では、ActAN100*–SSX2 融合タンパク質をコードする核酸分子は、配列番号1に示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のActAN100*ポリヌクレオチド、及び配列番号9に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のSSX2ポリヌクレオチドを含むか、これらからなるか、又はこれらから実質的になり得る。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、ActAN100*–SSX2 融合タンパク質をコードする核酸分子は、配列番号30に示されるactA–ActAN100*–SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドを含むか、これらからなるか、又はこれらから実質的になり得る。

10

【0143】

他の好適なシグナル配列として、例えば、ActAN100 (配列番号59に示される)、LLO441 (配列番号48に示される)、LLO441ΔPEST (配列番号50に示される)、及びLLO441Δ26 (配列番号52に示される) が挙げられる。

20

【0144】

核酸分子は、限定はしないが、制限エンドヌクレアーゼ切断部位 (クローニングリナー) をはじめとする別の核酸配列をさらに含んでもよい。核酸分子は、いくつかの好適な制限エンドヌクレアーゼを用いて生成することができ、エンドヌクレアーゼ切断部位が最終核酸分子内に残ってもよい。

【0145】

核酸分子は発現カセットの一部であってよい。発現カセットは、プロモータ、開示の核酸分子を含むオープンリーディングフレーム、及び3' 非翻訳領域を含んでよい。宿主細胞の機構に指令して開示の融合タンパク質を産生させるために発現カセットを使用することができる。

30

【0146】

さらに、開示の核酸分子を含むベクターも提供される。好適なベクターとして、例えば、細菌ベクター、ウイルスベクター、ネイキッドDNAベクター、及びネイキッドRNAベクターが挙げられる。

【0147】

ActAN100–PAP融合タンパク質

本明細書では、ActAN100ポリペプチドとPAPポリペプチドを含む融合タンパク質が開示される。

【0148】

好適なPAPポリペプチドとしては、PAPのアミノ酸30~386 (「PAP_{30~386}」) がある。一部の実施形態では、PAPポリペプチドは、配列番号33のアミノ酸残基103~459に示されるPAP_{30~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含み得る。一部の実施形態では、PAPポリペプチドは、配列番号33のアミノ酸残基103~459に示されるPAP_{30~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列からなり得る。一部の実施形態では、PAPポリペプチドは、配列番号33のアミノ酸残基103~459に示されるPAP_{30~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列から実質的になり得る。

40

50

【0149】

好適なシグナル配列として、例えば、A c t A N 1 0 0（配列番号60に示される）、A c t A N 1 0 0 *（配列番号2に示される）、L L O 4 4 1（配列番号49に示される）、L L O 4 4 1 Δ P E S T（配列番号51に示される）、及びL L O 4 4 1 Δ 2 6（配列番号53に示される）が挙げられる。一部の実施形態では、A c t A N 1 0 0ポリペプチドは、配列番号33のアミノ酸残基1～100と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含んでよい。他の実施形態では、A c t A N 1 0 0 *ポリペプチドは、配列番号2として示されるA c t A N 1 0 0 *と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含んでよい。

10

【0150】

A c t A N 1 0 0 - P A P融合タンパク質は、S L 8ポリペプチドをさらに含んでもよい。S L 8ポリペプチドは、T細胞エピトープタグ（ニワトリオボアルブミン（O V A 2 5 7 - 2 6 4）由来の「S I I N F E K L」）であり、これを用いて、例えば、ウエスタンブロットによる結合抗原の検出に役立てることができる。S L 8は、C 5 7 / B L 6マウスに関連するクラスI M H C分子、H - 2 K bによって提示されるクラスI（K b）制限ペプチドエピトープである。

【0151】

一部の実施形態では、A c t A N 1 0 0 - P A P融合タンパク質は、配列番号33のアミノ酸残基1～100と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むA c t A N 1 0 0ポリペプチド、及び配列番号33のアミノ酸残基103～459に示されるP A P_{30～386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むP A Pポリペプチドを含むか、これらからなるか、又はこれらから実質的になり得る。一部の実施形態では、A c t A N 1 0 0 - P A P融合タンパク質は、配列番号2として示されるA c t A N 1 0 0 *と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むA c t A N 1 0 0 *ポリペプチド、及び配列番号33のアミノ酸残基103～459に示されるP A P_{30～386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むP A Pポリペプチドを含むか、これらからなるか、又はこれらから実質的になり得る。一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号33のアミノ酸残基1～459に示されるA c t A N 1 0 0 - P A P_{30～386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むか、これからなるか、又はこれから実質的になり得る。一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号33に示されるA c t A N 1 0 0 - P A P_{30～386} - S L 8と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むか、これらからなるか、又はこれから実質的になり得る。

20

30

【0152】

開示される融合タンパク質は、本明細書の他の箇所に開示する通り、いくつかの好適な宿主細胞に発現させることができる。一部の実施形態では、例えば、融合タンパク質は、細菌、例えば、リステリア・モノサイトゲネス（L i s t e r i a m o n o c y t o g e n e s）又はその遺伝子修飾形態に発現させることができる。

40

【0153】

また、A c t A N 1 0 0 - P A P融合タンパク質をコードする核酸分子も開示される。一部の実施形態では、A c t A N 1 0 0 - P A P融合タンパク質をコードする核酸分子は、配列番号32に示されるa c t A - A c t A N 1 0 0 - P A P_{30～386} - S L 8と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドを含むか、これからなるか、又はこれから実質的になり得る。一部の実施形態では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

50

【0154】

好適なシグナル配列として、例えば、A c t A N 1 0 0（配列番号59に示される）、L L O 4 4 1（配列番号48に示される）、L L O 4 4 1 Δ P E S T（配列番号50に示される）、及びL L O 4 4 1 Δ 2 6（配列番号52に示される）が挙げられる。

【0155】

核酸分子は、限定はしないが、制限エンドヌクレアーゼ切断部位（クローニングリンカー）をはじめとする別の核酸配列をさらに含んでもよい。核酸分子は、いくつかの好適な制限エンドヌクレアーゼを用いて生成することができ、エンドヌクレアーゼ切断部位は、最終核酸分子内に残ってもよい。

【0156】

核酸分子は発現カセットの一部であってよい。発現カセットは、プロモータ、開示の核酸分子を含むオープンリーディングフレーム、及び3'非翻訳領域を含んでよい。宿主細胞の機構に指令して開示の融合タンパク質を産生させるために発現カセットを使用することができる。

【0157】

さらに、開示の核酸分子を含むベクターも提供される。好適なベクターとして、例えば、細菌ベクター、ウイルスベクター、ネイキッドDNAベクター、及びネイキッドRNAベクターが挙げられる。

【0158】

免疫原性ポリペプチドをコードする核酸分子を含む宿主細胞

開示される核酸分子のいずれかを含む宿主細胞も提供される。さらに、開示の核酸分子のいずれかによってコードされる融合タンパク質を発現する宿主細胞も開示される。

【0159】

好適な宿主細胞として、例えば、細菌が挙げられる。宿主細胞は、弱毒化、片利共生、及び／又は死滅しているが、代謝的に活性であってよい。例示的な実施形態では、宿主細胞は、弱毒化、片利共生、及び／又は死滅しているが、代謝的に活性の細菌であってよい。好適な細菌として、限定はしないが、リステリア・モノサイトゲネス（*Listeria monocytogenes*）、フレキシナ赤痢菌（*Shigella flexneri*）、大腸菌（*Escherichia coli*）、エルシニア・エンテロコリチカ（*Yersinia enterocolitica*）、ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）、腸チフス菌（*Salmonella typhi*）若しくはマイコバクテリウム属（*Mycobacterium*）種、又はこれらの修飾形態が挙げられる。一部の実施形態では、例えば、宿主細胞は、リステリア・モノサイトゲネス（*Listeria monocytogenes*）又はその修飾形態であってよい。修飾としては、突然変異、改変、及びその他の遺伝子変化／変異、並びに熱処理又は化学修飾が挙げられ、これらにより対象に対する宿主細胞の毒性を軽減する。例えば、対象における細胞との結合を低減するか、1細胞から別の細胞への広がりを低減するか、対象における細胞外増殖を低減するか、又は対象における細胞内増殖を低減するために細菌を修飾することができる。

【0160】

宿主細胞として好適な細菌株は、米国特許出願第13／988,076号明細書（米国特許出願公開第2014／037662号明細書）に記載されているものがあり、この文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。例えば、宿主細胞は、a c t A及び／又はi n l Bに弱毒変異、並びに好ましくはa c t A及びi n l Bの全部又は一部の欠失（本明細書では「L m Δ a c t A／Δ i n l B」と称する）を含むように遺伝子修飾され、且つ免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含有する、リステリア・モノサイトゲネス（*L. monocytogenes*）の弱毒生株であってよい。一部の実施形態では、リステリア・モノサイトゲネス（*Listeria monocytogenes*）は、a c t A欠失（Δ a c t A）突然変異体、a c t A挿入突然変異体、i n l B欠失（Δ i n l B）突然変異体、i n l B挿入突然変異体、又はこれらの組み合わせで

10

20

30

40

50

あってよい。例えば、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) は、 $\Delta actA / \Delta inlB$ 突然変異体であってよい。

【0161】

宿主細胞は、開示される核酸分子の1つ又は複数を含むことができる。1つ又は複数の核酸分子を宿主細胞に組み込むことができる。このような宿主細胞は、宿主細胞発現配列の制御下にあるため、真核生物の転写又は翻訳エレメントを必要としない核酸を含有することができる。核酸分子は、*actA* 遺伝子座、*inlB* 遺伝子座又は *tRNA^{Arg}* 遺伝子座に組み込むことができる。一部の実施形態では、核酸分子は、*actA* 遺伝子座に組み込むことができる。一部の実施形態では、核酸分子は、*inlB* 遺伝子座に組み込むことができる。一部の実施形態では、核酸分子は、*tRNA^{Arg}* 遺伝子座に組み込むことができる。表4は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含む宿主細胞の例示的なリストを示し、ここで、核酸分子は、宿主細胞ゲノムに組み込まれている。以下のリストは、例示を意図するに過ぎない。

【0162】

【表4】

表4

株	バックグラウンド	遺伝子座	抗原発現カセット
Lm11	Lm $\Delta actA \Delta inlB$	-	-
DP-L4027	Lm Δhly	-	-
BH5258	Lm $\Delta actA \Delta inlB$	<i>actA</i>	ActAN100*-EGFRvIIIx5-SSX2
		<i>inlB</i>	ActAN100*-EGFRvIIIx5-PAP ₃₃₋₃₈₆
		<i>tRNA^{Arg}</i>	ActAN100*-EGFRvIIIx5-NKX3.1 ₁₁₋₂₃₄ -PSMA _{1-20, 44-138, 169-750}
BH5290	Lm $\Delta actA \Delta inlB$	<i>actA</i>	ActAN100*-EGFRvIIIx5-SSX2
		<i>inlB</i>	ActAN100*-EGFRvIIIx5-PAP ₃₃₋₃₈₆
		<i>tRNA^{Arg}</i>	ActAN100*-EGFRvIIIx5-NKX3.1(R41G) ₁₁₋₂₃₄ -PSMA _{1-20, 44-138, 169-750}
BH4598	Lm $\Delta actA \Delta inlB$	<i>inlB</i>	ActAN100*-NKX3.1-PAP ₃₃₋₃₈₆
		<i>tRNA^{Arg}</i>	ActAN100*-SSX2
BH4602	Lm $\Delta actA \Delta inlB$	<i>inlB</i>	ActAN100*-NKX3.1-PAP ₃₃₋₃₈₆
		<i>tRNA^{Arg}</i>	ActAN100*-EGFRvIIIx5-SSX2
BH2868	Lm $\Delta actA \Delta inlB$	<i>tRNA^{Arg}</i>	ActAN100*-PAP ₃₃₋₃₈₆
PL1631	Lm $\Delta actA \Delta inlB$	<i>tRNA^{Arg}</i>	ActAN100*-EGFRvIIIx1-PAP ₃₃₋₃₈₆
PL1629	Lm $\Delta actA \Delta inlB$	<i>tRNA^{Arg}</i>	ActAN100*-EGFRvIIIx2-PAP ₃₃₋₃₈₆
PL1627	Lm $\Delta actA \Delta inlB$	<i>tRNA^{Arg}</i>	ActAN100*-EGFRvIIIx3-PAP ₃₃₋₃₈₆
PL1625	Lm $\Delta actA \Delta inlB$	<i>tRNA^{Arg}</i>	ActAN100*-EGFRvIIIx4-PAP ₃₃₋₃₈₆
PL1623	Lm $\Delta actA \Delta inlB$	<i>tRNA^{Arg}</i>	ActAN100*-EGFRvIIIx5-PAP ₃₃₋₃₈₆

【0163】

反対に、宿主細胞は、核酸分子が宿主細胞内において染色体外にある免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含んでもよい。例えば、免疫原性融合タンパク質をコードする開示の核酸分子の1つ又は複数を含む宿主細胞内のエピソームプラスミド上の発現カセットに挿入することができる。

【0164】

一部の実施形態では、宿主細胞は、開示される核酸分子の1つ又は複数を含んでよく、核酸分子は、

a) 配列番号5に示されるEGFRvIIIPポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドの1つ又は複数のコピー、及び配列番号9に示されるSSX2ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチド；

b) 配列番号5に示されるEGFRvIIIPポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドの1つ又は複数のコピー、及び配列番号13に示されるPAP_{33~386}ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチド；

c) 配列番号5に示されるEGFRvIIIPポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドの1つ又は複数のコピー、配列番号24に示されるNKX3.1_{11~234}ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号19に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチド；

d) 配列番号5に示されるEGFRvIIIPポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドの1つ又は複数のコピー、配列番号17に示されるNKX3.1(R41G)_{11~234}ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号19に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチド；

e) 配列番号28に示されるNKX3.1ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号13に示されるPAP_{33~386}ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチド；

f) 配列番号1に示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるActAN100*ポリヌクレオチド、及び配列番号9に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるSSX2ポリヌクレオチド；

g) 配列番号32に示されるActAN100-PAP_{33~386}-SL8と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチド；又は

h) これらの任意の組合せを含み、

i) 核酸分子は、actA遺伝子座、inlB遺伝子座若しくはtRNA^{Arg}遺伝子座に組み込まれるか、又は核酸分子は、宿主細胞内のエピソードプラスミド上の発現カセットに挿入される。

【0165】

一部の態様では、a)~h)に列記した1つ又は複数の核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0166】

本明細書の他の箇所に開示されている通り、開示される免疫原性融合タンパク質及びこ

10

20

30

40

50

れをコードする核酸分子は、1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチドを含むことができる。このように、「配列番号5に示されるEGFRvIIIポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドの1つ又は複数のコピー」には、限定はしないが、EGFRvIIIポリペプチドの2つ、3つ、4つ、5つ、又はそれを超えるコピーを含む免疫原性融合タンパク質、及びこれをコードする核酸分子が含まれる。

【0167】

一部の実施形態では、宿主細胞は、1つ又は複数の核酸分子を含んでよく、前記核酸分子は、

a) 配列番号3に示されるEGFRvIIIx5-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

b) 配列番号11に示されるEGFRvIIIx5-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

c) 配列番号22に示されるEGFRvIIIx5-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

d) 配列番号15に示されるEGFRvIIIx5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

e) 配列番号26に示されるNKX3.1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

f) 配列番号30に示されるActAN100*-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

g) 配列番号32に示されるActAN100-PAP_{33~386}-SL8と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一である核酸配列；

h) 配列番号34に示されるEGFRvIIIx1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

i) 配列番号36に示されるEGFRvIIIx2-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

j) 配列番号38に示されるEGFRvIIIx3-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

k) 配列番号40に示されるEGFRvIIIx4-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

l) これらの任意の組合せを含み、

m) 核酸分子は、actA遺伝子座、inlB遺伝子座若しくはtRNA^{Arg}遺伝子座に組み込まれるか、又は核酸分子は、宿主細胞内のエピソードプラスミド上の発現カセットに挿入される。

【0168】

一部の態様では、a)~l)に列記した1つ又は複数の核酸分子は、プロモータに作動

10

20

30

40

50

可能に連結されている。

【0169】

宿主細胞は、(a) 配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；(b) 配列番号11に示されるEGFRvIIIX5-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；(c) 配列番号22に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を含んでよい。一部の態様では、核酸分子はプロモータに作動可能に連結されている。一部の態様では、配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列は、actA遺伝子座に組み込むことができ；配列番号11に示されるEGFRvIIIX5-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列は、inlB遺伝子座に組み込むことができ；配列番号22に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列は、tRNA^{Arg}遺伝子座に組み込むことができる。一部の態様では、核酸分子はプロモータに作動可能に連結されている。

【0170】

宿主細胞は、(a) 配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；(b) 配列番号11に示されるEGFRvIIIX5-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；(c) 配列番号15に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を含んでよい。一部の態様では、核酸分子はプロモータに作動可能に連結されている。一部の態様では、配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列は、actA遺伝子座に組み込むことができ；配列番号11に示されるEGFRvIIIX5-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列は、inlB遺伝子座に組み込むことができ；配列番号15に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列は、tRNA^{Arg}遺伝子座に組み込むことができる。一部の態様では、核酸分子はプロモータに作動可能に連結されている。

【0171】

宿主細胞は、(a) 配列番号26に示されるNKX3.1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；及び(b) 配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を含んでよい。一部の態様では、核酸分子はプロモータに作動可能に連結されている。一部の態様では、配列番号26に示されるNKX3.1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列は、inlB

遺伝子座に組み込むことができ；配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列は、tRNA^{Arg}遺伝子座に組み込むことができる。一部の態様では、核酸分子はプロモータに作動可能に連結されている。

【0172】

宿主細胞は、(a) 配列番号26に示されるNKX3.1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；及び(b) 配列番号30に示されるActAN100*-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を含んでよい。一部の態様では、核酸分子はプロモータに作動可能に連結されている。一部の態様では、配列番号26に示されるNKX3.1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列は、inlB遺伝子座に組み込むことができ；配列番号30に示されるActAN100*-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列は、tRNA^{Arg}遺伝子座に組み込むことができる。一部の態様では、核酸分子はプロモータに作動可能に連結されている。

【0173】

宿主細胞は、

a) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIPolipeptid、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、EGFRvIIIX-SSX2融合タンパク質；

b) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIPolipeptid、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、EGFRvIIIX-PAP_{33~386}融合タンパク質；

c) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIPolipeptid、配列番号25に示されるNKX3.1_{11~234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRvIIIX-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質；

d) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIPolipeptid、配列番号18に示されるNKX3.1(R41G)_{11~234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRvIIIX-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質；

e) 配列番号29に示されるNKX3.1と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%

同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、NKX3. 1-PAP_{33~386}融合タンパク質；

f) 配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100*ポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、ActAN100*-SSX2融合タンパク質；又は

g) 配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100*ポリペプチド、及び配列番号33のアミノ酸残基103~459に示されるPAP_{30~386}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、ActAN100-PAP_{30~386}融合タンパク質

をコードする核酸配列を含む1つ又は複数の核酸分子を含んでよく、

核酸分子は、actA遺伝子座、inlB遺伝子座若しくはtRNA^{Arg}遺伝子座に組み込まれるか、又は核酸分子は、宿主細胞内のエピソードプラスミド上の発現カセットに挿入される。

【0174】

一部の態様では、a) ~ g) に列記した1つ又は複数の核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0175】

宿主細胞は、

配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、EGFRvIII-SSX2融合タンパク質；

配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、EGFRvIII-PAP_{33~386}融合タンパク質；

配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、配列番号25に示されるNKX3. 1_{11~234}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3. 1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRvIII-NKX3. 1_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質；

配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、配列番号18に示されるNKX3. 1(R41G)_{11~234}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3. 1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRvIII-NKX3. 1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質；

10

20

30

40

50

4 ~ 138, 169 ~ 750 融合タンパク質；

配列番号29に示されるNKX3.1と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、NKX3.1-PAP_{33~386}融合タンパク質；

配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100*ポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、ActAN100*-SSX2融合タンパク質；又は

配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100*ポリペプチド、及び配列番号33のアミノ酸残基103~459に示されるPAP_{30~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、ActAN100-PAP_{30~386}融合タンパク質

を含む1つ又は複数の融合タンパク質を発現することができる。

【0176】

宿主細胞は、

a) 配列番号4のアミノ酸残基89~475に示されるEGFRvIIIX5-SSX2又はその免疫原性断片と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；

b) 配列番号12のアミノ酸残基89~606に示されるEGFRvIIIX5-PAP_{33~386}又はその免疫原性断片と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；

c) 配列番号23のアミノ酸残基89~1177に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20}, 44~138, 169~750又はその免疫原性断片と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；

d) 配列番号16のアミノ酸残基89~1177に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20}, 44~138, 169~750又はその免疫原性断片と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；

e) 配列番号27のアミノ酸残基89~678に示されるNKX3.1-PAP_{33~386}又はその免疫原性断片と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；

f) 配列番号31に示されるActAN100*-SSX2又はその免疫原性断片と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；

g) 配列番号33のアミノ酸残基1~459に示されるActAN100-PAP_{30~386}又はその免疫原性断片と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；

h) 配列番号35のアミノ酸残基89~476に示されるEGFRvIIIX1-PAP_{33~386}又はその免疫原性断片と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；

i) 配列番号37のアミノ酸残基89~509に示されるEGFRvIIIX2-PAP_{33~386}又はその免疫原性断片と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；

j) 配列番号 39 のアミノ酸残基 89～541 に示される EGFRv I I I x 3 - P A P₃₃～₃₈₆ 又はその免疫原性断片と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるアミノ酸配列；

k) 配列番号 41 のアミノ酸残基 89～573 に示される EGFRv I I I x 4 - P A P₃₃～₃₈₆ 又はその免疫原性断片と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるアミノ酸配列；又は

l) これらの任意の組合せ

をコードする核酸配列を含む 1 つ又は複数の核酸分子を含んでよく、

m) 核酸分子は、a c t A 遺伝子座、i n l B 遺伝子座若しくは t R N A^{A r g} 遺伝子座に組み込まれるか、又は核酸分子は、宿主細胞内のエピソードプラスミド上の発現カセットに挿入される。

10

【0177】

一部の態様では、a) ～ l) に列記した 1 つ又は複数の核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0178】

宿主細胞は、

a) 配列番号 4 のアミノ酸残基 89～475 に示される EGFRv I I I x 5 - S S X 2 又はその免疫原性断片と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるアミノ酸配列；

b) 配列番号 12 のアミノ酸残基 89～606 に示される EGFRv I I I x 5 - P A P₃₃～₃₈₆ 又はその免疫原性断片と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるアミノ酸配列；

20

c) 配列番号 23 のアミノ酸残基 89～1177 に示される EGFRv I I I x 5 - N K X 3. 1₁₁～₂₃₄ - P S M A₁～₂₀, ₄₄～₁₃₈, ₁₆₉～₇₅₀ 又はその免疫原性断片と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるアミノ酸配列；

d) 配列番号 16 のアミノ酸残基 89～1177 に示される EGFRv I I I x 5 - N K X 3. 1 (R 4 1 G)₁₁～₂₃₄ - P S M A₁～₂₀, ₄₄～₁₃₈, ₁₆₉～₇₅₀ 又はその免疫原性断片と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるアミノ酸配列；

30

e) 配列番号 27 のアミノ酸残基 89～678 に示される N K X 3. 1 - P A P₃₃～₃₈₆ 又はその免疫原性断片と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるアミノ酸配列；

f) 配列番号 31 に示される A c t A N 1 0 0 * - S S X 2 又はその免疫原性断片と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるアミノ酸配列；

g) 配列番号 33 のアミノ酸残基 1～459 に示される A c t A N 1 0 0 - P A P₃₀～₃₈₆ 又はその免疫原性断片と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるアミノ酸配列；

h) 配列番号 35 のアミノ酸残基 89～476 に示される EGFRv I I I x 1 - P A P₃₃～₃₈₆ 又はその免疫原性断片と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるアミノ酸配列；

40

i) 配列番号 37 のアミノ酸残基 89～509 に示される EGFRv I I I x 2 - P A P₃₃～₃₈₆ 又はその免疫原性断片と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるアミノ酸配列；

j) 配列番号 39 のアミノ酸残基 89～541 に示される EGFRv I I I x 3 - P A P₃₃～₃₈₆ 又はその免疫原性断片と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるアミノ酸配列；

k) 配列番号 41 のアミノ酸残基 89～573 に示される EGFRv I I I x 4 - P A P₃₃～₃₈₆ 又はその免疫原性断片と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、

50

i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一であるアミノ酸配列；又は

1) これらの任意の組合せ

を含む1つ又は複数の融合タンパク質を発現することができる。

【0179】

開示される核酸分子のいずれかを含有するように修飾された組換えリステリア (*Listeria*) 属細菌が提供される。この核酸分子は、リステリア (*Listeria*) 属に染色体外で存在してよく、又は細菌ゲノムに組み込んでもよい。一部の実施形態では、例えば、宿主細胞は、*actA* 遺伝子座、*inlB* 遺伝子座、又は *tRNA^{Arg}* 遺伝子座に組み込まれた免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を有するリステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) $\Delta actA/\Delta inlB$ 突然変異体であってよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。リステリア (*Listeria*) 属は、宿主細胞と異種である開示の融合タンパク質を発現するための発現プラットフォームとして使用することができる。このような発現により、例えば、宿主細胞を含有する対象において異種融合タンパク質に対する免疫応答をもたらすことができる。

【0180】

免疫原性融合タンパク質の発現は、*Lm actA* プロモータから駆動され、これは、*Lm* が宿主細胞に感染すると、高度に誘導される。*actA* 遺伝子は、*PrfA* レギュロンに存在するが、これは、一連の *Lm* 病原性遺伝子であり、その発現は、*PrfA*、すなわち、感染宿主細胞に関連して誘導される転写活性化タンパク質によって制御及び誘導される。開示される核酸分子中の発現カセットは、*Lm* 転写、翻訳及び分泌機構のみを使用し、哺乳動物発現エレメント（例えば、哺乳動物発現系に特有のプロモータ又はターミネータ領域）を一切含まない。そのため、目的の指定遺伝子が発現するために哺乳動物宿主細胞機構を使用しなければならず、且つ定義により、遺伝子移入が遺伝子発現の前提であるプラスミドDNA—又はウイルスベースのベクターと異なり、*Lm* は、「自己完結型」自由生活性有機体である。ワクチン接種した宿主の感染細胞では、開示される宿主細胞の原生動物発現機構のみが使用されて宿主細胞内で融合タンパク質を合成し、続いて、このタンパク質は、抗原プロセッシング及び提示のために対象の感染細胞の細胞質中に分泌される。

【0181】

一部の態様では、宿主細胞は、1つ又は複数の核酸分子を含んでよく、1つ又は複数の核酸分子は、配列番号3に示される *EGFRvIIIX5-SSX2*、配列番号11に示される *EGFRvIIIX5-PAP_{33~386}*、及び配列番号15に示される *EGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20,44~138,169~750}* を含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0182】

一部の態様では、宿主細胞は、1つ又は複数の核酸分子を含んでよく、1つ又は複数の核酸分子は、配列番号3に示される *EGFRvIIIX5-SSX2*、配列番号11に示される *EGFRvIIIX5-PAP_{33~386}*、及び配列番号15に示される *EGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20,44~138,169~750}* からなる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0183】

宿主細胞は、薬学的に許容される賦形剤と組み合わせることができる。

【0184】

また、本明細書では、開示される宿主細胞と、薬学的に許容される賦形剤を含むワクチンが提供される。ワクチンは、本明細書に開示される適切な免疫応答を誘発するのに十分な量で対象に投与することができる。

【0185】

免疫応答を誘発する方法

また、対象において免疫応答を誘発する方法も提供され、これは、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含み、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含む。一部の実施形態では、本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含み、宿主細胞は、本明細書に開示される融合タンパク質の1つ又は複数を発現する。

【0186】

本明細書において、「宿主細胞」は、1つ又は複数の宿主細胞を含み、各宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする1つ又は複数の核酸分子を含み得る。一部の実施形態では、宿主細胞は、1つの免疫原性融合タンパク質をコードする同じ核酸分子を含んでよい。例えば、限定はしないが、本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、EGFRvIII-SSX2をコードする核酸分子を含む。一部の実施形態では、宿主細胞は、異なる免疫原性融合タンパク質をコードする様々な核酸分子を含んでよい。

【0187】

本方法は、本明細書に開示される宿主細胞のいずれかを用いて実施することができ、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含む。

【0188】

対象において免疫応答を誘発する方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、前記宿主細胞は、1つ又は複数の核酸分子を含み、前記核酸分子は、

a) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、EGFRvIII-SSX2融合タンパク質；

b) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、EGFRvIII-PAP_{33~386}融合タンパク質；

c) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、配列番号25に示されるNKX3.1_{11~234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRvIII-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質；

d) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、配列番号18に示されるNKX3.1(R41G)_{11~234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRvIII-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質；

e) 配列番号29に示されるNKX3.1と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1

10

20

30

40

50

ポリペプチド、及び配列番号 14 に示される P A P_{33 ~ 386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P A P ポリペプチドを含む、N K X 3. 1 - P A P_{33 ~ 386} 融合タンパク質；

f) 配列番号 2 として示される A c t A N 1 0 0 * と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む A c t A N 1 0 0 * ポリペプチド、及び配列番号 10 に示される S S X 2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む S S X 2 ポリペプチドを含む、A c t A N 1 0 0 * - S S X 2 融合タンパク質；

g) 配列番号 2 として示される A c t A N 1 0 0 * と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む A c t A N 1 0 0 * ポリペプチド、及び配列番号 33 のアミノ酸残基 103 ~ 459 に示される P A P_{30 ~ 386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P A P ポリペプチドを含む、A c t A N 1 0 0 * - P A P_{30 ~ 386} 融合タンパク質；又は

h) これらの任意の組合せをコードする核酸配列を含む。

【0189】

一部の実施形態では、a) ~ h) に列記した 1 つ又は複数の核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0190】

本明細書では、対象において免疫応答を誘発する方法が開示され、これは、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含み、宿主細胞は、

a) 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリペプチド、及び配列番号 10 に示される S S X 2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む S S X 2 ポリペプチドを含む、E G F R v I I I - S S X 2 融合タンパク質；

b) 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリペプチド、及び配列番号 14 に示される P A P_{33 ~ 386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P A P ポリペプチドを含む、E G F R v I I I - P A P_{33 ~ 386} 融合タンパク質；

c) 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリペプチド、配列番号 25 に示される N K X 3. 1_{11 ~ 234} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む N K X 3. 1 ポリペプチド、及び配列番号 20 に示される P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P S M A ポリペプチドを含む、E G F R v I I I - N K X 3. 1_{11 ~ 234} - P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} 融合タンパク質；

d) 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリペプチド、配列番号 18 に示される N K X 3. 1 (R 4 1 G)_{11 ~ 234} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む N K X 3. 1 ポリペプチド、及び配列番号 20 に示される P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P S M A ポリペプチドを含む、E G F R v I I I - N K X 3. 1 (R 4 1 G)_{11 ~ 234} - P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} 融合タンパク質；

10

20

30

40

50

, 44 ~ 138, 169 ~ 750 融合タンパク質;

e) 配列番号29に示されるNKX3.1と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、NKX3.1-PAP_{33~386}融合タンパク質;

f) 配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100*ポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、ActAN100*-SSX2融合タンパク質;

g) 配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100*ポリペプチド、及び配列番号33のアミノ酸残基103~459に示されるPAP_{30~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、ActAN100*-PAP_{30~386}融合タンパク質;又は

h) これらの任意の組合せ

を含む1つ又は複数の融合タンパク質を発現する。

【0191】

一部の実施形態では、本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、配列番号5に示されるEGFR₁₁₁ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドの1つ又は複数のコピー、及び配列番号9に示されるSSX2ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドを含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる免疫原性融合タンパク質を発現する。

【0192】

一部の実施形態では、本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、配列番号5に示されるEGFR₁₁₁ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドの1つ又は複数のコピー、及び配列番号13に示されるPAP_{33~386}ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドを含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる免疫原性融合タンパク質を発現する。

【0193】

一部の実施形態では、本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、配列番号5に示されるEGFR₁₁₁ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドの1つ又は複数のコピー、配列番号24に示されるNKX3.1_{11~234}ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号19に示されるPSMA_{1~20,44~138,169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドを含む。一部の

態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる免疫原性融合タンパク質を発現する。

【0194】

一部の実施形態では、本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、配列番号5に示されるE G F R v I I I ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドの1つ又は複数のコピー、配列番号17に示されるN K X 3. 1 (R 4 1 G) _{1 1} ~ _{2 3 4} ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号19に示されるP S M A _{1 ~ 2 0}, _{4 4 ~ 1 3 8}, _{1 6 9 ~ 7 5 0} と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドを含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる免疫原性融合タンパク質を発現する。

10

【0195】

一部の実施形態では、本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、配列番号28に示されるN K X 3. 1 ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号13に示されるP A P _{3 3 ~ 3 8 6} ポリヌクレオチドと少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドを含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる免疫原性融合タンパク質を発現する。

20

【0196】

一部の実施形態では、本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、配列番号1に示されるA c t A N 1 0 0 * と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるA c t A N 1 0 0 * ポリヌクレオチド、及び配列番号9に示されるS S X 2 と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるS S X 2 ポリヌクレオチドを含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる免疫原性融合タンパク質を発現する。

30

【0197】

一部の実施形態では、本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、配列番号32に示されるA c t A N 1 0 0 - P A P _{3 0 ~ 3 8 6} - S L 8 と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるポリヌクレオチドを含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる免疫原性融合タンパク質を発現する。

40

【0198】

一部の実施形態では、本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、上記核酸分子の任意の組合せを含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる免疫原性融合タンパク質を発現する。

【0199】

50

宿主細胞は、開示される核酸分子の1つ又は複数を含んでよく、核酸分子は、

a) 配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

b) 配列番号11に示されるEGFRvIIIX5-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

c) 配列番号22に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

d) 配列番号15に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

e) 配列番号26に示されるNKX3.1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

f) 配列番号30に示されるActAN100*-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

g) 配列番号32に示されるActAN100-PAP_{30~386}-SL8と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一である核酸配列；

h) 配列番号34に示されるEGFRvIIIX1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

i) 配列番号36に示されるEGFRvIIIX2-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

j) 配列番号38に示されるEGFRvIIIX3-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

k) 配列番号40に示されるEGFRvIIIX4-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；又は

l) これらの任意の組合せを含む核酸分子から発現される。

【0200】

一部の態様では、a)~l)に列記した1つ又は複数の核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0201】

一部の実施形態では、宿主細胞は、1つ又は複数の融合タンパク質を発現し、1つ又は複数の融合タンパク質は、

a) 配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

b) 配列番号11に示されるEGFRvIIIX5-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

c) 配列番号22に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1_{11~234}-PS

10

20

30

40

50

MA₁ ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；

d) 配列番号 15 に示される EGFRvIIIX5-NKX3.1 (R41G)₁₁ ~ 234-PSMA₁ ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；

e) 配列番号 26 に示される NKX3.1-PAP₃₃ ~ 386 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；

f) 配列番号 30 に示される ActAN100*-SSX2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；

g) 配列番号 32 に示される ActAN100-PAP₃₀ ~ 386-SL8 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一である核酸配列；

h) 配列番号 34 に示される EGFRvIIIX1-PAP₃₃ ~ 386 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；

i) 配列番号 36 に示される EGFRvIIIX2-PAP₃₃ ~ 386 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；

j) 配列番号 38 に示される EGFRvIIIX3-PAP₃₃ ~ 386 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；

k) 配列番号 40 に示される EGFRvIIIX4-PAP₃₃ ~ 386 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；又は

l) これらの任意の組合せを含む核酸分子から発現される。

【0202】

一部の態様では、a) ~ l) に列記した 1 つ又は複数の核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0203】

本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、配列番号 3 に示される EGFRvIIIX5-SSX2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

【0204】

本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、配列番号 11 に示される EGFRvIIIX5-PAP₃₃ ~ 386 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

【0205】

本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、配列番号 22 に示される EGFRvIIIX5-NKX3.1₁₁ ~ 234-PSMA₁ ~ 20, 44 ~ 1

10

20

30

40

50

38, 169~750と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

【0206】

本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、配列番号15に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

10

【0207】

本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、配列番号26に示されるNKX3.1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

【0208】

本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、配列番号30に示されるActAN100*-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

20

【0209】

本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、配列番号32に示されるActAN100-PAP_{30~386}-SL8と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一である核酸配列を含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

30

【0210】

本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、配列番号34に示されるEGFRvIIIX1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

40

【0211】

本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、配列番号36に示されるEGFRvIIIX2-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

【0212】

本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、配列番号38に示

50

されるEGFRvIIIx3-PAP_{33~386}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

【0213】

本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、配列番号40に示されるEGFRvIIIx4-PAP_{33~386}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

10

【0214】

本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、配列番号11に示されるEGFRvIIIx5-PAP_{33~386}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

【0215】

本明細書に既述したように、核酸分子は、actA遺伝子座、inlB遺伝子座若しくはtRNA^{Arg}遺伝子座に組み込んでもよく、又は宿主細胞内のエピソードプラスミド上の発現カセットに挿入してもよい。

20

【0216】

一部の実施形態では、本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする1つ又は複数の核酸分子を含む。1つ又は複数の核酸分子を含む本明細書に記載の宿主細胞のいずれを本方法に使用することもできる。

【0217】

本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、(a)配列番号3に示されるEGFRvIIIx5-SSX2と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列；(b)配列番号11に示されるEGFRvIIIx5-PAP_{33~386}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列；及び(c)配列番号22に示されるEGFRvIIIx5-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20,44~138,169~750}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の態様では、配列番号3に示されるEGFRvIIIx5-SSX2と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列をactA遺伝子座に組み込むことができ；配列番号11に示されるEGFRvIIIx5-PAP_{33~386}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列をinlB遺伝子座に組み込むことができ；配列番号22に示されるEGFRvIIIx5-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20,44~138,169~750}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列をtRNA^{Arg}遺伝子座に組み込むことができる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によりコードされる融合タンパク質を発現する。

30

40

【0218】

50

本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、(a) 配列番号 3 に示される EGFRvIIIX5-SSX2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；(b) 配列番号 11 に示される EGFRvIIIX5-PAP_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；及び (c) 配列番号 15 に示される EGFRvIIIX5-NKX3.1 (R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の態様では、配列番号 3 に示される EGFRvIIIX5-SSX2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列を actA 遺伝子座に組み込むことができ；配列番号 11 に示される EGFRvIIIX5-PAP_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列を inlB 遺伝子座に組み込むことができ；配列番号 15 に示される EGFRvIIIX5-NKX3.1 (R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列を tRNA^{Arg} 遺伝子座に組み込むことができる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によりコードされる融合タンパク質を発現する。

【0219】

本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、1つ又は複数の融合タンパク質を発現し、融合タンパク質は、

a) 配列番号 3 に示される EGFRvIIIX5-SSX2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；

b) 配列番号 11 に示される EGFRvIIIX5-PAP_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；及び

c) 配列番号 15 に示される EGFRvIIIX5-NKX3.1 (R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列

を含む核酸分子から発現される。

【0220】

一部の態様では、a) ~ c) に列記した 1つ又は複数の核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0221】

一部の実施形態では、1つ又は複数の核酸分子は、配列番号 3 に示される EGFRvIIIX5-SSX2、配列番号 11 に示される EGFRvIIIX5-PAP_{33~386}、及び配列番号 15 に示される EGFRvIIIX5-NKX3.1 (R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750} からなる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0222】

本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、(a) 配列番号 26 に示される NKX3.1-PAP_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；及び (b) 配列番号 3 に示される EGFRvIIIX5-SSX2 と少なくとも i) 90% 同

一、*i i*) 95%同一、*i i i*) 99%同一、又は*i v*) 100%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の態様では、配列番号26に示されるNKX3. 1-PAP_{33~386}と少なくとも*i*) 90%同一、*i i*) 95%同一、*i i i*) 99%同一、又は*i v*) 100%同一であるヌクレオチド配列は、*inl B*遺伝子座に組み込むことができ、配列番号3に示されるEGFR*v l l l x 5-SSX2*と少なくとも*i*) 90%同一、*i i*) 95%同一、*i i i*) 99%同一、又は*i v*) 100%同一であるヌクレオチド配列は、*tRNA^{Arg}*遺伝子座に組み込むことができる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によりコードされる融合タンパク質を発現する。

10

【0223】

本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、(a) 配列番号26に示されるNKX3. 1-PAP_{33~386}と少なくとも*i*) 90%同一、*i i*) 95%同一、*i i i*) 99%同一、又は*i v*) 100%同一であるヌクレオチド配列；及び(b) 配列番号30に示されるActAN100*-SSX2と少なくとも*i*) 90%同一、*i i*) 95%同一、*i i i*) 99%同一、又は*i v*) 100%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の態様では、配列番号26に示されるNKX3. 1-PAP_{33~386}と少なくとも*i*) 90%同一、*i i*) 95%同一、*i i i*) 99%同一、又は*i v*) 100%同一であるヌクレオチド配列は、*inl B*遺伝子座に組み込むことができ、配列番号30に示されるActAN100*-SSX2と少なくとも*i*) 90%同一、*i i*) 95%同一、*i i i*) 99%同一、又は*i v*) 100%同一であるヌクレオチド配列は、*tRNA^{Arg}*遺伝子座に組み込むことができる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によりコードされる融合タンパク質を発現する。

20

【0224】

本明細書に開示される宿主細胞のいずれも、開示される方法での使用に好適である。例えば、宿主細胞は、*act A*及び／又は*inl B*に弱毒変異、並びに好ましくは*act A*及び*inl B*の全部又は一部の欠失（本明細書では「*Lm Δact A / Δinl B*」と称する）を含むように遺伝子修飾され、且つ免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含有する、リステリア・モノサイトゲネス（*Listeria monocytogenes*）の弱毒生株であってよい。一部の実施形態では、リステリア・モノサイトゲネス（*Listeria monocytogenes*）は、*act A*欠失突然変異体、*act A*挿入突然変異体、*inl B*欠失突然変異体、*inl B*挿入突然変異体、又はこれらの組み合わせであってよい。例えば、リステリア・モノサイトゲネス（*Listeria monocytogenes*）は、*Δact A / Δinl B*突然変異体であってよい。

30

【0225】

組成物を対象に投与する好適な態様として、限定はしないが、静脈内、経口、皮下、皮内、筋内、腹腔内、経粘膜、鼻内投与、又はこれらの任意の組合せが挙げられる。一部の実施形態では、投与ステップは静脈内で実施され得る。

40

【0226】

宿主細胞は、開示の免疫原性融合タンパク質を対象内に発現させ、これによって宿主細胞を含有する対象において異種融合タンパク質に対する免疫応答を誘発するための発現プラットフォームとして使用することができる。例えば、対象内の感染細胞の細胞質中に融合タンパク質を宿主細胞から発現及び分泌させることができる。感染細胞は、宿主細胞を取り込むことができる対象内の任意の細胞を含む。一部の実施形態では、感染細胞は抗原提示細胞であってよい。抗原提示細胞（APC）は、T細胞に対して抗原を提示するために用いられる免疫系の細胞である。APCとしては、樹状細胞、単球、マクロファージ、辺縁帯クッパー細胞、小膠細胞、ランゲルハンス細胞、T細胞、及びB細胞が挙げられる

50

。一部の実施形態では、融合タンパク質は、対象の1つ又は複数の細胞に発現させることができる。

【0227】

一部の実施形態では、本方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、

a) 配列番号4のアミノ酸残基89～475に示されるEGFRvIIIX5-SSX2又はその免疫原性断片と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；

b) 配列番号12のアミノ酸残基89～606に示されるEGFRvIIIX5-PAP_{33～386}又はその免疫原性断片と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；

c) 配列番号23のアミノ酸残基89～1177に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1_{11～234}-PSMA_{1～20, 44～138, 169～750}又はその免疫原性断片と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；

d) 配列番号16のアミノ酸残基89～1177に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11～234}-PSMA_{1～20, 44～138, 169～750}又はその免疫原性断片と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；

e) 配列番号27のアミノ酸残基89～678に示されるNKX3.1-PAP_{33～386}又はその免疫原性断片と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；

f) 配列番号35のアミノ酸残基89～476に示されるEGFRvIIIX1-PAP_{33～386}又はその免疫原性断片と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；

g) 配列番号37のアミノ酸残基89～509に示されるEGFRvIIIX2-PAP_{33～386}又はその免疫原性断片と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；

h) 配列番号39のアミノ酸残基89～541に示されるEGFRvIIIX3-PAP_{33～386}又はその免疫原性断片と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；

i) 配列番号41のアミノ酸残基89～573に示されるEGFRvIIIX4-PAP_{33～386}又はその免疫原性断片と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；又は

j) これらの任意の組合せ

を含む融合タンパク質をコードする核酸分子を含む。

【0228】

一部の態様では、a)～j)に列記した1つ又は複数の核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0229】

開示される方法は、EGFRvIIIX免疫応答、SSX2免疫応答、PAP免疫応答、NKX3.1免疫応答、PSMA免疫応答、リステリア(Listeria)属に対する免疫、又はこれらの任意の組合せを誘発するために使用することができる。従って、対象においてEGFRvIIIX免疫応答を誘発する方法が提供され、この方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含み、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含む。また、対象においてSSX2免疫応答を誘発する方法も提供され、この方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含み、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含む。さらに、対象においてPAP免疫応答を誘発する方法も提供され、この方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含み、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含む。また

、対象においてNKX3.1免疫応答を誘発する方法も提供され、この方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含み、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含む。さらにまた、対象においてPSMA免疫応答を誘発する方法も提供され、この方法は、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含み、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含む。さらには、対象においてリステリア (*Listeria*) 属に対する免疫を誘発する方法が提供され、この方法は、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) を含む組成物を対象に投与するステップを含み、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含む。

【0230】

抗原ペプチドの発現を増大させる方法

抗原ペプチドの発現を増大させる方法も本明細書に開示され、これは、開示される核酸分子の1つ又は複数を宿主細胞において発現させるステップを含む。

【0231】

抗原ポリペプチドの発現を増大させる方法は、宿主細胞において核酸分子を発現させるステップを含み、前記核酸分子は、

a) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、EGFRvIII-SSX2融合タンパク質；

b) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、EGFRvIII-PAP_{33~386}融合タンパク質；

c) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、配列番号25に示されるNKX3.1_{11~234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRvIII-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質；

d) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、配列番号18に示されるNKX3.1(R41G)_{11~234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRvIII-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質；

e) 配列番号29に示されるNKX3.1と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、NKX3.1-PAP_{33~386}融合タンパク質；

f) 配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、ii

10

20

30

40

50

） 95%同一、*iii*） 99%同一、又は *iv*） 100%同一のアミノ酸配列を含む *ActAN100**ポリペプチド、及び配列番号10に示される *SSX2*と少なくとも *i*） 90%同一、*ii*） 95%同一、*iii*） 99%同一、又は *iv*） 100%同一のアミノ酸配列を含む *SSX2*ポリペプチドを含む、*ActAN100*-SSX2*融合タンパク質；

g) 配列番号2として示される *ActAN100**と少なくとも *i*） 90%同一、*ii*） 95%同一、*iii*） 99%同一、又は *iv*） 100%同一のアミノ酸配列を含む *ActAN100**ポリペプチド、及び配列番号33のアミノ酸残基103～459に示される *PAP_{30~386}*と少なくとも *i*） 90%同一、*ii*） 95%同一、*iii*） 99%同一、又は *iv*） 100%同一のアミノ酸配列を含む *PAP*ポリペプチドを含む、*ActAN100*-PAP_{30~386}*融合タンパク質；又は

h) これらの任意の組合せをコードする核酸配列を含む。

【0232】

一部の態様では、a)～h)に列記した1つ又は複数の核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0233】

本方法は、本明細書に開示される核酸分子のいずれを用いて実施することもできる。一部の実施形態では、本方法は、配列番号5に示される *EGFRvIII*ポリヌクレオチドと少なくとも *i*） 90%同一、*ii*） 95%同一、*iii*） 99%同一、又は *iv*） 100%同一であるポリヌクレオチドの1つ又は複数のコピー、及び配列番号9に示される *SSX2*ポリヌクレオチドと少なくとも *i*） 90%同一、*ii*） 95%同一、*iii*） 99%同一、又は *iv*） 100%同一であるポリヌクレオチドを含む核酸分子を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、本方法は、配列番号5に示される *EGFRvIII*ポリヌクレオチドと少なくとも *i*） 90%同一、*ii*） 95%同一、*iii*） 99%同一、又は *iv*） 100%同一であるポリヌクレオチドの1つ又は複数のコピー、及び配列番号13に示される *PAP_{33~386}*ポリヌクレオチドと少なくとも *i*） 90%同一、*ii*） 95%同一、*iii*） 99%同一、又は *iv*） 100%同一であるポリヌクレオチドを含む核酸分子を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、本方法は、配列番号5に示される *EGFRvIII*ポリヌクレオチドと少なくとも *i*） 90%同一、*ii*） 95%同一、*iii*） 99%同一、又は *iv*） 100%同一であるポリヌクレオチドの1つ又は複数のコピー、配列番号24に示される *NKX3.1_{11~234}*ポリヌクレオチドと少なくとも *i*） 90%同一、*ii*） 95%同一、*iii*） 99%同一、又は *iv*） 100%同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号19に示される *PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}*と少なくとも *i*） 90%同一、*ii*） 95%同一、*iii*） 99%同一、又は *iv*） 100%同一であるポリヌクレオチドを含む核酸分子を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、本方法は、配列番号5に示される *EGFRvIII*ポリヌクレオチドと少なくとも *i*） 90%同一、*ii*） 95%同一、*iii*） 99%同一、又は *iv*） 100%同一であるポリヌクレオチドの1つ又は複数のコピー、配列番号17に示される *NKX3.1(R41G)_{11~234}*ポリヌクレオチドと少なくとも *i*） 90%同一、*ii*） 95%同一、*iii*） 99%同一、又は *iv*） 100%同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号19に示される *PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}*と少なくとも *i*） 90%同一、*ii*） 95%同一、*iii*） 99%同一、又は *iv*） 100%同一であるポリヌクレオチドを含む核酸分子を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、本方法は、配列番号28に示される *NKX3.1*ポリヌクレオチドと少なくとも *i*） 90%同一、*ii*） 95%同一、

i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号13に示されるPAP_{33~386}ポリヌクレオチドと少なくとも90%同一であるポリヌクレオチドを含む核酸分子を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0234】

一部の実施形態では、本方法は、配列番号1に示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号9に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一であるポリヌクレオチドを含む核酸分子を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

10

【0235】

一部の実施形態では、本方法は、配列番号32に示されるActAN100-PAP_{30~386}-SL8と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一であるポリヌクレオチドを含む核酸分子を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0236】

一部の実施形態では、本方法は、上記核酸分子の任意の組合せを宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。

20

【0237】

宿主細胞は、以下の核酸分子：

a) 配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一であるヌクレオチド配列；

b) 配列番号11に示されるEGFRvIIIX5-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一であるヌクレオチド配列；

c) 配列番号22に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20,44~138,169~750}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一であるヌクレオチド配列；

30

d) 配列番号15に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20,44~138,169~750}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一であるヌクレオチド配列；

e) 配列番号26に示されるNKX3.1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一であるヌクレオチド配列；

f) 配列番号30に示されるActAN100*-SSX2と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一であるヌクレオチド配列；

40

g) 配列番号32に示されるActAN100-PAP_{30~386}-SL8と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一である核酸配列；

h) 配列番号34に示されるEGFRvIIIX1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一であるヌクレオチド配列；

i) 配列番号36に示されるEGFRvIIIX2-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一であるヌクレオチド配列；

50

j) 配列番号 38 に示される E G F R v I I I x 3 - P A P_{33 ~ 386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；

k) 配列番号 40 に示される E G F R v I I I x 4 - P A P_{33 ~ 386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列；又は

l) これらの任意の組合せ
 のうちの 1 つ又は複数を含んでよい。

【0238】

一部の態様では、a) ~ l) に列記した 1 つ又は複数の核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

10

【0239】

一部の実施形態では、本方法は、配列番号 3 に示される E G F R v I I I x 5 - S S X 2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0240】

一部の実施形態では、本方法は、配列番号 11 に示される E G F R v I I I x 5 - P A P_{33 ~ 386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

20

【0241】

一部の実施形態では、本方法は、配列番号 22 に示される E G F R v I I I x 5 - N K X 3 . 1_{11 ~ 234} - P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0242】

一部の実施形態では、本方法は、配列番号 15 に示される E G F R v I I I x 5 - N K X 3 . 1 (R 4 1 G)_{11 ~ 234} - P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

30

【0243】

一部の実施形態では、本方法は、配列番号 26 に示される N K X 3 . 1 - P A P_{33 ~ 386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

40

【0244】

一部の実施形態では、本方法は、配列番号 34 に示される E G F R v I I I x 1 - P A P_{33 ~ 386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0245】

一部の実施形態では、本方法は、配列番号 36 に示される E G F R v I I I x 2 - P A P_{33 ~ 386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、

50

又は i v) 100% 同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0246】

一部の実施形態では、本方法は、配列番号 38 に示される EGFRv I I I x 3 - P A P_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0247】

一部の実施形態では、本方法は、配列番号 40 に示される EGFRv I I I x 4 - P A P_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0248】

一部の実施形態では、本方法は、配列番号 11 に示される EGFRv I I I x 5 - P A P_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0249】

本明細書に既述したように、核酸分子は、a c t A 遺伝子座、i n l B 遺伝子座若しくは t R N A^{A r g} 遺伝子座に組み込んでもよく、又は宿主細胞内のエピソードプラスミド上の発現カセットに挿入してもよい。

【0250】

一部の実施形態では、本方法は、上記核酸分子の 1 つ又は複数を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。

【0251】

本方法は、(a) 配列番号 3 に示される EGFRv I I I x 5 - S S X 2 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるヌクレオチド配列；(b) 配列番号 11 に示される EGFRv I I I x 5 - P A P_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるヌクレオチド配列；及び (c) 配列番号 22 に示される EGFRv I I I x 5 - N K X 3. 1_{11~234} - P S M A_{1~20, 44~138, 169~750} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の態様では、配列番号 3 に示される EGFRv I I I x 5 - S S X 2 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるヌクレオチド配列は、a c t A 遺伝子座に組み込むことができ；配列番号 11 に示される EGFRv I I I x 5 - P A P_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるヌクレオチド配列は、i n l B 遺伝子座に組み込むことができ；配列番号 22 に示される EGFRv I I I x 5 - N K X 3. 1_{11~234} - P S M A_{1~20, 44~138, 169~750} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるヌクレオチド配列は、t R N A^{A r g} 遺伝子座に組み込むことができる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0252】

本方法は、(a) 配列番号 3 に示される EGFRv I I I x 5 - S S X 2 と少なくとも

i) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；(b) 配列番号11に示されるEGFRvIIIX5-PAP₃₃~₃₈₆と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；及び(c) 配列番号15に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の態様では、配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列は、actA遺伝子座に組み込むことができ；配列番号11に示されるEGFRvIIIX5-PAP₃₃~₃₈₆と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列は、inlB遺伝子座に組み込むことができ；配列番号15に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列は、tRNA^{Arg}遺伝子座に組み込むことができる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

10

【0253】

20

本方法は、(a) 配列番号26に示されるNKX3.1-PAP₃₃~₃₈₆と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；及び(b) 配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の態様では、配列番号26に示されるNKX3.1-PAP₃₃~₃₈₆と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列は、inlB遺伝子座に組み込むことができ、配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列は、tRNA^{Arg}遺伝子座に組み込むことができる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

30

【0254】

本方法は、(a) 配列番号26に示されるNKX3.1-PAP₃₃~₃₈₆と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；及び(b) 配列番号30に示されるActAN100*-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を宿主細胞において発現させるステップを含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の態様では、配列番号26に示されるNKX3.1-PAP₃₃~₃₈₆と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列は、inlB遺伝子座に組み込むことができ、配列番号30に示されるActAN100*-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列は、tRNA^{Arg}遺伝子座に組み込むことができる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

40

【0255】

開示される方法は、開示の核酸分子の転写、並びに限定はしないが、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、昆虫細胞、及び哺乳動物細胞をはじめとする抗原ポリペプチドの発現

50

を支持するか、又は支持するように設計され得る任意の宿主細胞において実施することができる。発現ステップは、核酸分子を宿主細胞に導入し、宿主細胞機構が抗原ポリペプチドを産生するのを可能にすることによって実施することができる。例えば、宿主細胞は、*actA* 及び／又は *inlB* に弱毒変異、並びに好ましくは *actA* 及び *inlB* の全部又は一部の欠失（本明細書では「*Lm ΔactA/ΔinlB*」と称する）を含むように遺伝子修飾され、且つ免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含有する、リステリア・モノサイトゲネス（*Listeria monocytogenes*）の弱毒生株であってよい。一部の態様では、リステリア・モノサイトゲネス（*Listeria monocytogenes*）は、*actA* 欠失突然変異体、*actA* 挿入突然変異体、*inlB* 欠失突然変異体、*inlB* 挿入突然変異体、又はこれらの組み合わせであってよい。例えば、リステリア・モノサイトゲネス（*Listeria monocytogenes*）は、*ΔactA/ΔinlB* 突然変異体であってよい。

10

【0256】

或いは、発現ステップは、目的の細胞に宿主細胞を投与することによって実施することができ、抗原ポリペプチドは、前記目的の細胞内に産生される。一部の実施形態では、発現ステップは、目的の細胞を宿主細胞に感染させることによって実施することができ、抗原ポリペプチドは、目的の細胞内に産生される。一部の実施形態では、発現ステップは、宿主細胞を対象に投与することによって実施することができ、抗原ポリペプチドは、対象において産生される。

【0257】

20

本方法は、宿主細胞において、

a) 配列番号4のアミノ酸残基89～475に示されるEGFRvIIIX5-SSX2又はその免疫原性断片と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるアミノ酸配列；

b) 配列番号12のアミノ酸残基89～606に示されるEGFRvIIIX5-PAP_{33~386}又はその免疫原性断片と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるアミノ酸配列；

c) 配列番号23のアミノ酸残基89～1177に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20,44~138,169~750}又はその免疫原性断片と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるアミノ酸配列；

30

d) 配列番号16のアミノ酸残基89～1177に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20,44~138,169~750}又はその免疫原性断片と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるアミノ酸配列；

e) 配列番号27のアミノ酸残基89～678に示されるNKX3.1-PAP_{33~386}又はその免疫原性断片と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるアミノ酸配列；

f) 配列番号35のアミノ酸残基89～476に示されるEGFRvIIIX1-PAP_{33~386}又はその免疫原性断片と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるアミノ酸配列；

40

g) 配列番号37のアミノ酸残基89～509に示されるEGFRvIIIX2-PAP_{33~386}又はその免疫原性断片と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるアミノ酸配列；

h) 配列番号39のアミノ酸残基89～541に示されるEGFRvIIIX3-PAP_{33~386}又はその免疫原性断片と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるアミノ酸配列；

i) 配列番号41のアミノ酸残基89～573に示されるEGFRvIIIX4-PAP_{33~386}又はその免疫原性断片と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるアミノ酸配列；又は

50

j) これらの任意の組合せを含む融合タンパク質をコードする核酸分子を発現させるステップを含む。

【0258】

一部の態様では、a) ~ j) に列記した1つ又は複数の核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0259】

癌を治療する方法

本明細書では、癌の治療を、それを必要とする対象において行う方法が開示され、前記方法は、治療有効量の、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含み、宿主細胞は、本明細書に開示の核酸分子の1つ又は複数を含む。一部の実施形態では、宿主細胞は、1つ又は複数の核酸分子によってコードされる1つ又は複数の融合タンパク質を発現する。例えば、宿主細胞は、

a) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIPolipeptid、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2Polipeptidを含む、EGFRvIIIPolipeptid-SSX2融合タンパク質；

b) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIPolipeptid、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPPolipeptidを含む、EGFRvIIIPolipeptid-PAP_{33~386}融合タンパク質；

c) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIPolipeptid、配列番号25に示されるNKX3.1_{111~234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1Polipeptid、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAPolipeptidを含む、EGFRvIIIPolipeptid-NKX3.1_{111~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質；

d) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIPolipeptid、配列番号18に示されるNKX3.1(R41G)_{11~234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1Polipeptid、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAPolipeptidを含む、EGFRvIIIPolipeptid-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質；

e) 配列番号29に示されるNKX3.1と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1Polipeptid、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPPolipeptidを含む、NKX3.1-PAP_{33~386}融合タンパク質；

f) 配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100*Polipeptid、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2Polipeptidを含む、ActAN100*-SSX2融合タンパク質

；若しくは

g) 配列番号33のアミノ酸残基1～100に示されるAc t AN100と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むAc t AN100ポリペプチド、及び配列番号33のアミノ酸残基103～459に示されるPAP_{30～386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、Ac t AN100-PAP_{30～386}融合タンパク質；又は

h) これらの任意の組合せ

をコードする核酸配列を含む1つ又は複数の核酸分子を含んでよい。

【0260】

一部の態様では、a)～h)に列記した1つ又は複数の核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0261】

また、癌の治療を、それを必要とする対象において行う方法が開示され、前記方法は、治療有効量の、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含み、宿主細胞は、

a) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、EGFRvIII-SSX2融合タンパク質；

b) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33～386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、EGFRvIII-PAP_{33～386}融合タンパク質；

c) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、配列番号25に示されるNKX3.1_{111～234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1～20, 44～138, 169～750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRvIII-NKX3.1_{111～234}-PSMA_{1～20, 44～138, 169～750}融合タンパク質；

d) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、配列番号18に示されるNKX3.1(R41G)_{111～234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1～20, 44～138, 169～750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRvIII-NKX3.1(R41G)_{111～234}-PSMA_{1～20, 44～138, 169～750}融合タンパク質；

e) 配列番号29に示されるNKX3.1と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33～386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、NKX3.1-PAP_{33～386}融合タンパク質；

f) 配列番号2として示されるAc t AN100*と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むAc

10

20

30

40

50

t A N 1 0 0 * ポリペプチド、及び配列番号 1 0 に示される S S X 2 と少なくとも i) 9 0 % 同一、 i i) 9 5 % 同一、 i i i) 9 9 % 同一、又は i v) 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む S S X 2 ポリペプチドを含む、 A c t A N 1 0 0 * - S S X 2 融合タンパク質；若しくは

g) 配列番号 3 3 のアミノ酸残基 1 ~ 1 0 0 に示される A c t A N 1 0 0 と少なくとも i) 9 0 % 同一、 i i) 9 5 % 同一、 i i i) 9 9 % 同一、又は i v) 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む A c t A N 1 0 0 ポリペプチド、及び配列番号 3 3 のアミノ酸残基 1 0 3 ~ 4 5 9 に示される P A P _{3 0 ~ 3 8 6} と少なくとも i) 9 0 % 同一、 i i) 9 5 % 同一、 i i i) 9 9 % 同一、又は i v) 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む P A P ポリペプチドを含む、 A c t A N 1 0 0 - P A P _{3 0 ~ 3 8 6} 融合タンパク質；又は

h) これらの任意の組合せを含む 1 つ又は複数の融合タンパク質を発現する。

【0262】

一部の実施形態では、宿主細胞は、(a)、(b) 及び (d) を発現する。

【0263】

いくつかの実施形態では、1 つ又は複数の核酸分子は、配列番号 3 に示される E G F R v I I I x 5 - S S X 2 と少なくとも i) 9 0 % 同一、 i i) 9 5 % 同一、 i i i) 9 9 % 同一、又は i v) 1 0 0 % 同一であるヌクレオチド配列を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、1 つ又は複数の核酸分子は、配列番号 3 4 に示される E G F R v I I I x 1 - P A P _{3 3 ~ 3 8 6} と少なくとも i) 9 0 % 同一、 i i) 9 5 % 同一、 i i i) 9 9 % 同一、又は i v) 1 0 0 % 同一であるヌクレオチド配列を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、1 つ又は複数の核酸分子は、配列番号 3 6 に示される E G F R v I I I x 2 - P A P _{3 3 ~ 3 8 6} と少なくとも i) 9 0 % 同一、 i i) 9 5 % 同一、 i i i) 9 9 % 同一、又は i v) 1 0 0 % 同一であるヌクレオチド配列を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、1 つ又は複数の核酸分子は、配列番号 3 8 に示される E G F R v I I I x 3 - P A P _{3 3 ~ 3 8 6} と少なくとも i) 9 0 % 同一、 i i) 9 5 % 同一、 i i i) 9 9 % 同一、又は i v) 1 0 0 % 同一であるヌクレオチド配列を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、1 つ又は複数の核酸分子は、配列番号 4 0 に示される E G F R v I I I x 4 - P A P _{3 3 ~ 3 8 6} と少なくとも i) 9 0 % 同一、 i i) 9 5 % 同一、 i i i) 9 9 % 同一、又は i v) 1 0 0 % 同一であるヌクレオチド配列を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、1 つ又は複数の核酸分子は、配列番号 1 1 に示される E G F R v I I I x 5 - P A P _{3 3 ~ 3 8 6} と少なくとも i) 9 0 % 同一、 i i) 9 5 % 同一、 i i i) 9 9 % 同一、又は i v) 1 0 0 % 同一であるヌクレオチド配列を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、1 つ又は複数の核酸分子は、配列番号 2 2 に示される E G F R v I I I x 5 - N K X 3 . 1 _{1 1 1 ~ 2 3 4} - P S M A _{1 ~ 2 0 , 4 4 ~ 1 3 8 , 1 6 9 ~ 7 5 0} と少なくとも i) 9 0 % 同一、 i i) 9 5 % 同一、 i i i) 9 9 % 同一、又は i v) 1 0 0 % 同一であるヌクレオチド配列を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、1 つ又は複数の核酸分子は、配列番号 1 5 に示される E G F R v I I I x 5 - N K X 3 . 1 (R 4 1 G) _{1 1 ~ 2 3 4} - P S M A _{1 ~ 2 0 , 4 4 ~ 1 3 8 , 1 6 9 ~ 7 5 0} と少なくとも i) 9 0 % 同一、 i i) 9 5 % 同一、 i i i) 9 9 % 同一、又は i v) 1 0 0 % 同一であるヌクレオチド配列を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、1 つ又は複数の核酸分子は、配列番号 2 6 に示される N K X 3 . 1 - P A P _{3 3 ~ 3 8 6} と少なくとも i) 9 0 % 同一、 i i) 9 5 % 同一、 i i i) 9 9 % 同一、又は i v) 1 0 0 % 同一であるヌクレオチド配列を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形

10

20

30

40

50

態では、1つ又は複数の核酸分子は、配列番号30に示されるA c t A N 1 0 0 * - S S X 2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、1つ又は複数の核酸分子は、配列番号32に示されるA c t A N 1 0 0 - P A P_{30~386} - S L 8と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、1つ又は複数の核酸分子は、上記の任意の組合せを含んでもよい。宿主細胞は、上記核酸分子のいずれかによってコードされる融合タンパク質を発現することができる。

10

【0264】

一部の態様では、本方法は、治療有効量の、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含み、宿主細胞は、1つ又は複数の融合タンパク質を発現し、融合タンパク質は、

a) 配列番号3に示されるE G F R v I I I x 5 - S S X 2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

b) 配列番号11に示されるE G F R v I I I x 5 - P A P_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；及び

20

c) 配列番号15に示されるE G F R v I I I x 5 - N K X 3. 1 (R 4 1 G)_{11~234} - P S M A_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列

を含む核酸分子から発現される。

【0265】

一部の態様では、a) ~ c) に列記した1つ又は複数の核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0266】

一部の実施形態では、ヌクレオチド配列は、A c t A プロモータに作動可能に連結することができる。A c t A プロモータは、配列番号21に示される配列を有してよい。

30

【0267】

一部の態様では、融合タンパク質は、

a) 配列番号3に示されるE G F R v I I I x 5 - S S X 2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；

b) 配列番号11に示されるE G F R v I I I x 5 - P A P_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；及び

40

c) 配列番号15に示されるE G F R v I I I x 5 - N K X 3. 1 (R 4 1 G)_{11~234} - P S M A_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列

からなる核酸分子から発現される。

【0268】

一部の態様では、a) ~ c) に列記した1つ又は複数の核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0269】

一部の実施形態では、ヌクレオチド配列は、A c t A プロモータに作動可能に連結することができる。A c t A プロモータは、配列番号21に示される配列を有してよい。

50

【0270】

一部の態様では、融合タンパク質は、配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2、配列番号11に示されるEGFRvIIIX5-PAP_{33~386}、及び配列番号15に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}からなる核酸分子から発現される。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0271】

宿主細胞は、宿主細胞ゲノムに組み込まれた核酸分子を含んでよい。このような宿主細胞は、宿主細胞発現配列の制御下にあるため、真核生物転写又は翻訳エレメントを必要としない核酸を含有する。核酸分子は、actA遺伝子座、inlB遺伝子座又はtRNA^{Arg}遺伝子座に組み込むことができる。一部の実施形態では、核酸分子は、actA遺伝子座に組み込むことができる。一部の実施形態では、核酸分子は、inlB遺伝子座に組み込むことができる。一部の実施形態では、核酸分子は、tRNA^{Arg}遺伝子座に組み込むことができる。宿主細胞は、融合タンパク質をコードする核酸分子を含み、核酸分子は、宿主細胞内において染色体外に存在する。例えば、免疫原性融合タンパク質をコードする開示の核酸分子の1つ又は複数を、宿主細胞内のエピソームプラスミド上の発現カセットに挿入することができる。

【0272】

本方法は、治療有効量の、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含み、宿主細胞は、(a)配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列；(b)配列番号11に示されるEGFRvIIIX5-PAP_{33~386}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列；及び(c)配列番号22に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列を含む1つ又は複数の核酸分子を含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の態様では、配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列は、actA遺伝子座に組み込むことができ；配列番号11に示されるEGFRvIIIX5-PAP_{33~386}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列は、inlB遺伝子座に組み込むことができ；配列番号22に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列は、tRNA^{Arg}遺伝子座に組み込むことができる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0273】

本方法は、治療有効量の、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含み、宿主細胞は、(a)配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列；(b)配列番号11に示されるEGFRvIIIX5-PAP_{33~386}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列；及び(c)配列番号15に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列を含む1つ又は複数の核酸分子を含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の態様では、配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi)90%同一

10

20

30

40

50

、*i i*) 95%同一、*i i i*) 99%同一、又は*i v*) 100%同一であるヌクレオチド配列は、*act A*遺伝子座に組み込むことができ；配列番号11に示されるEGFRv11ix5-PAP_{33~386}と少なくとも*i*) 90%同一、*i i*) 95%同一、*i i i*) 99%同一、又は*i v*) 100%同一であるヌクレオチド配列は、*inl B*遺伝子座に組み込むことができ；配列番号15に示されるEGFRv11ix5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくとも*i*) 90%同一、*i i*) 95%同一、*i i i*) 99%同一、又は*i v*) 100%同一であるヌクレオチド配列は、*tRNA^{Arg}*遺伝子座に組み込むことができる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0274】

本方法は、治療有効量の、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含み、宿主細胞は、(a)配列番号26に示されるNKX3.1-PAP_{33~386}と少なくとも*i*) 90%同一、*i i*) 95%同一、*i i i*) 99%同一、又は*i v*) 100%同一であるヌクレオチド配列；及び(b)配列番号3に示されるEGFRv11ix5-SSX2と少なくとも*i*) 90%同一、*i i*) 95%同一、*i i i*) 99%同一、又は*i v*) 100%同一であるヌクレオチド配列を含む1つ又は複数の核酸分子を含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の態様では、配列番号26に示されるNKX3.1-PAP_{33~386}と少なくとも*i*) 90%同一、*i i*) 95%同一、*i i i*) 99%同一、又は*i v*) 100%同一であるヌクレオチド配列は、*inl B*遺伝子座に組み込むことができ、配列番号3に示されるEGFRv11ix5-SSX2と少なくとも*i*) 90%同一、*i i*) 95%同一、*i i i*) 99%同一、又は*i v*) 100%同一であるヌクレオチド配列は、*tRNA^{Arg}*遺伝子座に組み込むことができる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0275】

本方法は、治療有効量の、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、(a)配列番号26に示されるNKX3.1-PAP_{33~386}と少なくとも*i*) 90%同一、*i i*) 95%同一、*i i i*) 99%同一、又は*i v*) 100%同一であるヌクレオチド配列；及び(b)配列番号30に示されるSSX2と少なくとも*i*) 90%同一、*i i*) 95%同一、*i i i*) 99%同一、又は*i v*) 100%同一であるヌクレオチド配列を含む1つ又は複数の核酸分子を含む。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の態様では、配列番号26に示されるNKX3.1-PAP_{33~386}と少なくとも*i*) 90%同一、*i i*) 95%同一、*i i i*) 99%同一、又は*i v*) 100%同一であるヌクレオチド配列は、*inl B*遺伝子座に組み込むことができ、配列番号30に示されるSSX2と少なくとも*i*) 90%同一、*i i*) 95%同一、*i i i*) 99%同一、又は*i v*) 100%同一であるヌクレオチド配列は、*tRNA^{Arg}*遺伝子座に組み込むことができる。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0276】

PAPは、良性及び悪性両方の前立腺円柱上皮細胞によって分泌される主要タンパク質の1つである。免疫療法における薬剤としてのPAPの有効性は、進行前立腺癌の治療薬として、PAPをターゲティングするオートロガス細胞免疫療法である、シプリーセル-T(*sipuleucel-T*)(*Provenge*(登録商標))の2010FDA承認において確認された。

【0277】

PSMAは、葉酸ヒドロラーゼ及びニューロカルボキシペプチダーゼ活性を有する100kDAのII型膜貫通糖タンパク質である。非分泌型、細胞表面膜内在性タンパク質であるPSMAは、ほぼ全ての前立腺癌で発現され、より高度の悪性腫瘍、転移性疾患及び去勢抵抗性前立腺癌において発現を次第に増大させていく。前立腺癌におけるPSMAの役割はわかっていないが、PSMAの発現は疾患の進行と相関しており、これは、PSMAが前立腺癌の進行において機能的な役割を有することを示唆する。PSMAは固形腫瘍

10

20

30

40

50

の新生血管にも発現されるが、正常な血管には発現されない。新生血管における役割はわかっていないものの、PSMAの葉酸ヒドロラーゼ活性は、上皮組織における脈管形成を促進する上で重要である可能性がある。

【0278】

SSXタンパク質は、高度に相同性のCTAのスーパーファミリーを代表する癌-精巣抗原（CTA）であり、HLAクラスI欠損精巣又は卵巣生殖細胞における核局在化、制限発現、及び様々な組織を起源とする腫瘍、特に進行癌における頻繁な過剰発現を有する。SSXタンパク質の発現は、幹細胞遊走に関連するが、これは、転移性表現型について重要な生物学的役割を果たすことを示唆している。生殖細胞は、クラスI MHC分子を発現しないため、これらは傍観者型自己免疫から保護されている。癌細胞におけるSSX 2の過剰発現及び正常HLAクラスI発現細胞におけるその限定的発現により、SSX 2は、T細胞を用いた戦略のための特に魅力的な免疫療法となる。CTAは、通常、精巣の生殖細胞のみに発現され、癌患者において自発的に免疫原性であることが明らかにされている。癌組織におけるCTAの異所性発現により、これらのタンパク質は理想的な免疫療法標的となる。重要なことに、SSX-2に特異的なIgG応答及びCD8⁺T細胞を前立腺癌患者において検出することができ、且つ発現が進行前立腺癌で証明されたことから、SSX 2が前立腺癌の免疫標的として選択された。

【0279】

NKX3.1は、ホメオボックスタンパク質であり、ヒト染色体hp21の最小領域に位置付けられる。NKX3.1は、正常な前立腺発生に必要であり、胚性前立腺発生、新生児期の分化、及び成体機能のあらゆる局面と関連している。これは、最も早期にわかった前立腺形成のマーカーであり、前立腺分化のあらゆる段階及び成人期で発現され続ける。組織特異的調節遺伝子であるNKX3.1は、前立腺の正常な形態形成及び機能に必須であるが、これが不活性化すると、前腫瘍状態のモデルとなる前立腺上皮過形成及び異形成を招く。NKX3.1は、アンドロゲンアブレーション後、前立腺中に持続する幹様特性を有する管腔細胞の集団の目印となる。重要なことに、NKX3.1発現細胞が欠失すると、前立腺腫瘍は、アンドロゲンアブレーション及びテストステロン欠失後に進行することができなくなったことから、これらの去勢抵抗性NKX3.1発現細胞（CARN）は、前立腺癌の起源細胞として作用することが判明した。CARNでのNKX3.1特有の過剰発現は、この抗原に対するワクチン接種により前立腺CSCの直接前駆体をターゲティングする可能性を開いた。加えて、近年、ヒトNKX3.1は、ゲノムワイド関連スクリーンによって7つの前立腺癌感受性遺伝子座のうちの1つとして同定されたため、これは、前立腺癌の免疫療法の極めて魅力的な新規の抗原標的となった。近年の分析は、検査したほぼ全ての前立腺癌及び転移で低レベルのNKX3.1を立証できることを示す。このように、癌の進行全体を通してNKX3.1の減少（しかし、消失ではない）の選択が明らかである。

【0280】

EGFRは、細胞増殖及び生存に重要な受容体チロシンキナーゼである。EGFR遺伝子は、頭部及び頸部、結腸、膵臓、乳房、卵巣、腎臓、及び悪性グリオーマなどのヒト癌で過剰発現又は突然変異することが多い。EGFRvIIIは、267アミノ酸欠失及びエキソン1とエキソン8との融合によって生じ、結合部に新たなグリシンを有する腫瘍特異的ペプチドをもたらす。EGFRvIII発現乳癌を有する患者は、このペプチドに対して検出可能な体液性及び細胞性免疫応答を有し、これが免疫原性ネオアンチゲンとして機能することを示唆している。EGFRvIII反復配列は、それが融合タンパク質（PAP、PSMA、SSX2、及びNKX3.1）の高度発現及び前立腺癌関連抗原に対する高度抗原特異的免疫応答と相関するため、開示の免疫原性融合タンパク質に含有されていた。ネイティブEGFRは、正常機能細胞集団におけるシグナル伝達に必要であるため、開示される免疫原性融合タンパク質は、腫瘍細胞中のエキソン2～7の欠失によって発現されるEGFRvIIIネオアンチゲン領域の21アミノ酸セグメントのみを含有することに留意することが重要である。

【0281】

従って、開示される方法で治療することができる好適な癌として、EGFRvIII発現癌、SSX2発現癌、PAP発現癌、NKX3.1発現癌、PSMA発現癌、又はこれらの任意の組合せが挙げられる。好ましくは、癌は前立腺癌である。

【0282】

本明細書に開示される宿主細胞のいずれも、開示される方法での使用に好適である。例えば、宿主細胞は、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) であってよい。好ましい態様では、宿主細胞は、actA及び／又はinlBに弱毒変異、並びに好ましくはactA及びinlBの全部又は一部の欠失（本明細書では「Lm ΔactA／ΔinlB」と称する）を含むように遺伝子修飾され、且つ開示される免疫原性融合タンパク質の1つ又は複数をコードする核酸分子を含有する、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) の弱毒生株であってよい。一部の実施形態では、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) は、actA欠失 (ΔactA) 突然変異体、actA挿入突然変異体、inlB欠失 (ΔinlB) 突然変異体、inlB挿入突然変異体、又はこれらの組み合わせであってよい。例えば、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) は、ΔactA／ΔinlB突然変異体であってよい。

【0283】

宿主細胞は、対象内で核酸分子によりコードされる免疫原性融合タンパク質を発現し、これによりEGFRvIII発現腫瘍細胞、SSX2発現腫瘍細胞、PAP発現腫瘍細胞、NKX3.1発現腫瘍細胞、及び／又はPSMA発現腫瘍細胞に対して抗腫瘍応答を誘発するための発現プラットフォームとして使用することができる。融合タンパク質は、対象内の感染細胞の細胞質中に宿主細胞から発現及び分泌させることができる。感染細胞は、宿主細胞を取り込むことができる、対象内の任意の細胞を含む。一部の実施形態では、感染細胞は抗原提示細胞であってよい。

【0284】

宿主細胞は、配列番号4のアミノ酸残基89～475に示されるEGFRvIIIx5-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む1つ又は複数の核酸分子を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

【0285】

宿主細胞は、配列番号12のアミノ酸残基89～606に示されるEGFRvIIIx5-PAP_{33～386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む1つ又は複数の核酸分子を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

【0286】

宿主細胞は、配列番号23のアミノ酸残基89～1177に示されるEGFRvIIIx5-NKX3.1_{11～234}-PSMA_{1～20, 44～138, 169～750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む1つ又は複数の核酸分子を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

【0287】

宿主細胞は、配列番号16のアミノ酸残基89～1177に示されるEGFRvIIIx5-NKX3.1(R41G)_{11～234}-PSMA_{1～20, 44～138, 16}

9 ~ 7 5 0 と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む1つ又は複数の核酸分子を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

【0288】

宿主細胞は、配列番号27のアミノ酸残基89~678に示されるNKX3. 1-PAP_{33~386}と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む1つ又は複数の核酸分子を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

10

【0289】

宿主細胞は、配列番号31に示されるActAN100*-SSX2と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む1つ又は複数の核酸分子を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

【0290】

宿主細胞は、配列番号33のアミノ酸残基1~459に示されるActAN100-PA_{30~386}と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一であるアミノ酸配列のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む1つ又は複数の核酸分子を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

20

【0291】

宿主細胞は、配列番号35のアミノ酸残基89~476に示されるActAN100*-EGFRvIIIX1-PAP_{33~386}と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む1つ又は複数の核酸分子を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

30

【0292】

宿主細胞は、配列番号37のアミノ酸残基89~509に示されるActAN100*-EGFRvIIIX2-PAP_{33~386}と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む1つ又は複数の核酸分子を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

【0293】

宿主細胞は、配列番号39のアミノ酸残基89~541に示されるActAN100*-EGFRvIIIX3-PAP_{33~386}と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む1つ又は複数の核酸分子を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

40

【0294】

宿主細胞は、配列番号41のアミノ酸残基89~573に示されるActAN100*-EGFRvIIIX4-PAP_{33~386}と少なくとも i) 90 % 同一、i i) 95 % 同一、i i i) 99 % 同一、又は i v) 100 % 同一のアミノ酸配列をコードする核酸

50

配列を含む1つ又は複数の核酸分子を含んでよい。一部の態様では、核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸分子によってコードされる融合タンパク質を発現する。

【0295】

宿主細胞は、上記アミノ酸配列の任意の組合せをコードする核酸配列を含む1つ又は複数の核酸分子を含んでよい。一部の実施形態では、宿主細胞は、1つ又は複数の核酸分子によってコードされる融合タンパク質の組合せを発現する。例えば、宿主細胞は、

a) 配列番号4のアミノ酸残基89～475に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列；

b) 配列番号12のアミノ酸残基89～606に示されるEGFRvIIIX5-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列；及び

c) 配列番号16のアミノ酸残基89～1177に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列

を含む1つ又は複数の融合タンパク質を発現することができる。

【0296】

一部の態様では、a)～c)に列記した1つ又は複数の核酸分子は、プロモータに作動可能に連結されている。

【0297】

宿主細胞は、

a) 配列番号4のアミノ酸残基89～475に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列；

b) 配列番号12のアミノ酸残基89～606に示されるEGFRvIIIX5-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列；及び

c) 配列番号16のアミノ酸残基89～1177に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列

からなる1つ又は複数の融合タンパク質を発現することができる。

【0298】

宿主細胞は、配列番号4のアミノ酸残基89～475に示されるEGFRvIIIX5-SSX2、配列番号12のアミノ酸残基89～606に示されるEGFRvIIIX5-PAP_{33~386}、及び配列番号16のアミノ酸残基89～1177に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}からなる1つ又は複数の融合タンパク質を発現することができる。

【0299】

開示される方法は、組成物を投与する前に対象からの生体サンプル中でEGFRvIII、SSX2、PAP、NKX3.1、PSMA、又はこれらの任意の組合せの発現を測定するステップをさらに含んでもよい。対象からの生体サンプル中でEGFRvIII、SSX2、PAP、NKX3.1、PSMA、又はこれらの任意の組合せの発現レベルを測定する方法として、限定はしないが、免疫組織化学(IHC)、ウエスタンブロッティング、顕微鏡法、免疫沈降、BCAアッセイ、分光測光法、in vivoイメージング、又はこれらの任意の組合せが挙げられる。EGFRvIII、SSX2、PAP、NKX3.1、及び／又はPSMAは、限定はしないが、血液、リンパ液、骨髓、固形腫瘍サ

10

20

30

40

50

ンプル、又はこれらの任意の組合せをはじめとする生体サンプル中で検出することができる。

【0300】

本組成物は、薬学的に許容される賦形剤をさらに含んでもよい。例えば、限定はしないが、リン酸緩衝食塩水（PBS）、及びグリセロールをはじめとする任意の好適な緩衝液と宿主細胞を組み合わせることができる。例示的な実施形態では、組成物をダルベッコリン酸緩衝食塩水（PBS）及びグリセロール中で製剤化した後、投与まで凍結保存（ -60°C 以下で）し、好適な時間にわたり、塩化ナトリウムを用いた静脈内注入により投与することができる。当業者であれば、組成物を投与する時間が部分的に癌の種類、癌の重症度、及び対象の年齢、体重などに応じて変動することは理解するであろう。好ましくは、組成物は、数時間かけて投与することができる。例えば、組成物は、1～2時間かけて投与することができる。他の実施形態では、1～2時間未満で組成物を投与することができる。また別の実施形態では、1～2時間超かけて組成物を投与することができる。

10

【0301】

治療は、単回用量の組成物又は複数回用量の組成物を含んでよい。このように、開示される方法は、宿主細胞を含む組成物の1回又は複数回用量を対象に投与するステップを含んでよく、宿主細胞は、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含む。用量数を決定することができる要因として、例えば、癌の進行、癌症状の重症度、癌症状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せが挙げられる。限定はしないが、用量数は、進行、又は癌の進行を抑制できないこと、癌症状の重症度の増悪若しくは重症度の無変化、癌症状の頻度の増大若しくは頻度の無変化、腫瘍サイズの増加若しくは腫瘍サイズの無変化、又はこれらの任意の組み合わせに基づいて増加させることができる。例えば、1～100回用量以上の組成物を対象に投与することができる。

20

【0302】

宿主細胞の用量を決定することができる要因として、例えば、癌の進行、癌症状の重症度、癌症状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せが挙げられる。一部の実施形態では、組成物は、約 1×10^8 ～約 1×10^9 コロニー形成単位（CFU）の宿主細胞を含んでよい。一部の態様では、組成物は、約 1×10^8 CFUの宿主細胞を含んでよい。一部の態様では、組成物は、約 1×10^9 CFUの宿主細胞を含んでよい。

【0303】

組成物は、約7日毎に1回、約14日毎に1回、約21日毎に1回、約28日毎に1回、約35日毎に1回、約42日毎に1回、約49日毎に1回、約56日毎に1回、約63日毎に1回、約70日毎に1回、約77日毎に1回、約84日毎に1回、又は約91日毎に1回投与することができる。

30

【0304】

以上に基づき、当業者は、本明細書に記載される組成物のいずれか1つの上記用量を投与する（投与は、記載される通り、一定の間隔で繰り返される）ことにより、癌の進行、癌症状の重症度、癌症状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せについて対象を治療し得ることを理解するであろう。従って、一実施形態では、癌の進行、癌症状の重症度、癌症状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せを治療するため、約 1×10^8 ～約 1×10^9 CFUの用量で組成物を対象に投与してよく、投与は、約7日毎に1回繰り返される。さらに、本明細書に記載の組成物は、この方法で投与しようとするそのような用量に適した医薬製剤として調製することができる。一実施形態では、組成物は、癌の進行、癌症状の重症度、癌症状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せを治療するため、約 1×10^8 ～約 1×10^9 CFUの用量で組成物を対象に投与してよく、投与は、約14日毎に1回繰り返される。さらに、本明細書に記載の組成物は、この方法で投与しようとするそのような用量に適した医薬製剤として調製することができる。一実施形態では、癌の進行、癌症状の重症度、癌症状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せを治療するため、約 1×10^8 ～約 1×10^9 CFUの用量で組成物を対象に投与してよく、投与は、約21日毎に1回繰り返される。さらに、本明細書に記載の組成物は

40

50

、この方法で投与しようとするそのような用量に適した医薬製剤として調製することができる。一実施形態では、癌の進行、癌症状の重症度、癌症状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せを治療するため、約 1×10^8 ～約 1×10^9 CFU の用量で組成物を対象に投与してよく、投与は、約 35 日毎に 1 回繰り返される。さらに、本明細書に記載の組成物は、この方法で投与しようとするそのような用量に適した医薬製剤として調製することができる。一実施形態では、癌の進行、癌症状の重症度、癌症状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せを治療するため、約 1×10^8 ～約 1×10^9 CFU の用量で組成物を対象に投与してよく、投与は、約 45 日毎に 1 回繰り返される。さらに、本明細書に記載の組成物は、この方法で投与しようとするそのような用量に適した医薬製剤として調製することができる。一実施形態では、癌の進行、癌症状の重症度、癌症状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せを治療するため、約 1×10^8 ～約 1×10^9 CFU の用量で組成物を対象に投与してよく、投与は、約 60 日毎に 1 回繰り返される。さらに、本明細書に記載の組成物は、この方法で投与しようとするそのような用量に適した医薬製剤として調製することができる。一実施形態では、癌の進行、癌症状の重症度、癌症状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せを治療するため、約 1×10^8 CFU の用量で組成物を対象に投与してよく、投与は、約 7 日毎に 1 回繰り返される。さらに、本明細書に記載の組成物は、この方法で投与しようとするそのような用量に適した医薬製剤として調製することができる。一実施形態では、癌の進行、癌症状の重症度、癌症状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せを治療するため、約 1×10^8 CFU の用量で組成物を対象に投与してよく、投与は、約 14 日毎に 1 回繰り返される。さらに、本明細書に記載の組成物は、この方法で投与しようとするそのような用量に適した医薬製剤として調製することができる。一実施形態では、癌の進行、癌症状の重症度、癌症状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せを治療するために約 1×10^8 CFU の用量で組成物を対象に投与してよく、投与は、約 35 日毎に 1 回繰り返される。さらに、本明細書に記載の組成物は、この方法で投与しようとするそのような用量に適した医薬製剤として調製することができる。一実施形態では、癌の進行、癌症状の重症度、癌症状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せを治療するため、約 1×10^8 CFU の用量で組成物を対象に投与してよく、投与は、約 45 日毎に 1 回繰り返される。さらに、本明細書に記載の組成物は、この方法で投与しようとするそのような用量に適した医薬製剤として調製することができる。一実施形態では、癌の進行、癌症状の重症度、癌症状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せを治療するため、約 1×10^8 CFU の用量で組成物を対象に投与してよく、投与は、約 60 日毎に 1 回繰り返される。さらに、本明細書に記載の組成物は、この方法で投与しようとするそのような用量に適した医薬製剤として調製することができる。一実施形態では、癌の進行、癌症状の重症度、癌症状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せを治療するため、約 1×10^9 CFU の用量で組成物を対象に投与してよく、投与は、約 7 日毎に 1 回繰り返される。さらに、本明細書に記載の組成物は、この方法で投与しようとするそのような用量に適した医薬製剤として調製することができる。一実施形態では、癌の進行、癌症状の重症度、癌

状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せを治療するため、約 1×10^9 CFU の用量で組成物を対象に投与してよく、投与は、約 14 日毎に 1 回繰り返される。さらに、本明細書に記載の組成物は、この方法で投与しようとするそのような用量に適した医薬製剤として調製することができる。一実施形態では、癌の進行、癌症状の重症度、癌症状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せを治療するため、約 1×10^9 CFU の用量で組成物を対象に投与してよく、投与は、約 21 日毎に 1 回繰り返される。さらに、本明細書に記載の組成物は、この方法で投与しようとするそのような用量に適した医薬製剤として調製することができる。一実施形態では、癌の進行、癌症状の重症度、癌症状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せを治療するため、約 1×10^9 CFU の用量で、組成物を対象に投与してよく、投与は、約 35 日毎に 1 回繰り返される。さらに、本明細書に記載の組成物は、この方法で投与しようとするそのような用量に適した医薬製剤として調製することができる。一実施形態では、癌の進行、癌症状の重症度、癌症状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せを治療するため、約 1×10^9 CFU の用量で組成物を対象に投与してよく、投与は、約 45 日毎に 1 回繰り返される。さらに、本明細書に記載の組成物は、この方法で投与しようとするそのような用量に適した医薬製剤として調製することができる。一実施形態では、癌の進行、癌症状の重症度、癌症状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せを治療するため、約 1×10^9 CFU の用量で組成物を対象に投与してよく、投与は、約 60 日毎に 1 回繰り返される。さらに、本明細書に記載の組成物は、この方法で投与しようとするそのような用量に適した医薬製剤として調製することができる。一実施形態では、癌の進行、癌症状の重症度、癌症状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せを治療するため、約 1×10^9 CFU の用量で組成物を対象に投与してよく、投与は、約 90 日毎に 1 回繰り返される。さらに、本明細書に記載の組成物は、この方法で投与しようとするそのような用量に適した医薬製剤として調製することができる。

10

20

【0305】

好ましくは、治療は、投与間において、組成物を対象に投与しない期間を含んでよい。例えば、本方法は、宿主細胞を含む組成物の第 1 用量を対象に投与するステップであって、宿主細胞が、免疫原性融合タンパク質をコードする核酸分子を含む、ステップ、第 1 用量の有効性をモニターするステップ、及び第 1 用量が有効でない場合、組成物の 1 又は複数回用量を対象に投与するステップを含んでよい。組成物の有効性を決定することができる要因として、例えば、癌の進行、癌症状の重症度、癌症状の頻度、腫瘍サイズ、又はこれらの任意の組合せが挙げられる。限定はしないが、進行、又は癌の進行を抑制できないこと、癌症状の重症度の増悪若しくは重症度の無変化、癌症状の頻度の増大若しくは頻度の無変化、腫瘍サイズの増加若しくは腫瘍サイズの無変化、又はこれらの任意の組み合わせは、組成物の第 1 用量が有効でなかった指標となり得る。投与間の好適な期間としては、数日、数週間、又は数ヶ月が挙げられる。一部の実施形態では、投与間の期間は、約 1 日～約 90 日、約 5 日～約 80 日、約 10 日～約 70 日、約 15 日～約 60 日、約 20 日～約 50 日、又は約 25 日～約 40 日であってよい。例えば、投与間の期間は、約 1 日、約 2 日、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、約 7 日、約 14 日、約 21 日、約 28 日、約 35 日、約 42 日、約 49 日、約 56 日、約 60 日、約 65 日、約 70 日、約 80 日、約 85 日、又は約 90 日であってよい。

30

40

【0306】

組成物を対象に投与する好適な態様として、限定はしないが、静脈内、経口、皮下、皮内、筋肉内、腹腔内、経粘膜、鼻内投与、又はこれらの任意の組合せが挙げられる。一部の実施形態では、投与ステップは、静脈内経路で実施することができる。

【0307】

治療は、組成物の投与後、抗生物質を対象に投与するステップをさらに含んでもよい。例えば、組成物の最終用量を患者に投与してから好適な時間を置いた後、患者に抗生物質を投与することができる。このように、好ましい態様では、組成物の最終用量後に抗生物質を投与する。好適な抗生物質として、限定はしないが、アモキシシリン、又はペニシリ

50

ンに対してアレルギー性の対象にはトリメトプリム／スルファメトキサゾールがある。当業者は、抗生物質を対象に投与するための十分な投与量及び投与スケジュールを決定することができるであろう。

【0308】

以下の実施例は、本明細書に開示される実施形態のいくつかをさらに詳細に説明するために記載する。これらの実施例は、開示される実施形態を例示することを意図し、これらを限定するものではない。

【実施例】

【0309】

方法

10

ワクチン株の分子構造

ワクチン株は、全て Brockstedt, D. G., et al., *Listeria* a-based cancer vaccines that segregate immunogenicity from toxicity. PNAS (2004) 101 (38): 13832-13837 (その全体が参照により本明細書に組み込まれる) に記載されているように、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) $\Delta actA \Delta inlB$ 株バックグラウンドで構築した。EGFRvIII、SSX2、PAP、NKX3.1、及びPSMAオープンリーディングフレームを、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) バイアスを用いてコドン最適化した後、表1に記載する断片をPCR増幅した後、国際公開第2014/106123号パンフレット；米国特許出願公開第2014/186387号明細書（参照により本明細書に組み込まれる）に開示されているように、*actA* プロモータの制御下でクローニングし、修飾 *ActAN100** 配列と作動可能に連結した。Camilli, A. et al., Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Molecular Microbiology* (1993) 8 (1): 143-157 (その全体が参照により本明細書に組み込まれる) に記載されているように、対立遺伝子交換によって抗原発現カセットを *actA* 又は *inlB* 遺伝子座に挿入した。欠失 *actA* 又は *inlB* の両側から約1キロベースのDNA配列をpKSV7の誘導体にクローニングすることにより、対立遺伝子交換ベクターをアセンブリングした。pKSV7ベクターの *a* 30

【0310】

単一の発現カセットが、*actA* プロモータ、*ActAN100** コード配列、21アミノ酸EGFRvIII結合領域の5つのコピー、及びコドン最適化完全長SSX2配列からなる *actA* 対立遺伝子交換ベクターにクローニングされ、且つ株BH5258及びBH5290を構築するために用いられた。同様に、2つの発現カセットを *inlB* 対立遺伝子交換ベクターにクローニングし、ここで、第1の発現カセットは、*actA* プロモータ、*ActAN100** コード配列、21アミノ酸EGFRvIII結合領域の5つのコピー、及びアミノ酸33～386をコードするコドン最適化PAPを含み（BH5258及びBH5290を構築するために用いられる）；第2の発現カセットは、*actA* 30

40

【0311】

tRNA^{Arg} 遺伝子座に挿入された抗原発現カセットの場合、部位特異的組換えを用いてLm染色体上に構築物を安定に組み込んだ。抗原発現カセットは、Lauer et 50

50

a l . , I n f e c t . I m m u n . (2 0 0 8) 7 6 : 3 7 4 2 - 5 3 (その全体が参照により本明細書に組み込まれる) に記載されているように、p P L 2 組込みベクターの誘導体にクローニングしたが、このベクターは、国際公開第 2 0 0 7 / 1 0 3 2 2 5 号パンフレット ; 米国出願第 P C T / U S 2 0 0 7 / 0 0 5 4 5 7 号明細書 (参照により本明細書に組み込まれる) に記載されている通り、全ての抗生物質耐性マーカを含む外来ベクター配列の除去を可能にするように修飾しておいた。a c t A プロモータ、A c t A N 1 0 0 * コード配列、E G F R v I I I 結合領域の 5 つのコピー、アミノ酸 1 1 ~ 2 4 3 にわたる N K X 3 . 1 のコドン最適化配列、並びにアミノ酸 1 ~ 2 0 、4 4 ~ 1 3 8 、及び 1 6 9 ~ 7 5 0 にわたる P S M A を含む発現カセットをクローニングし、t R N A ^{A r g} 遺伝子座に組み込んだ。2 つの変異株は、N K X 3 . 1 コード配列のアミノ酸 4 1 でコードされる 1 アミノ酸が異なる。すなわち、B H 5 2 5 8 は、アミノ酸 4 1 でアルギニンをコードし ; B H 5 2 9 0 は、アミノ酸 4 1 でグリシンをコードする。プラスミド骨格及び抗生物質耐性マーカの除去のため、温度感受性プラスミドからの一過性 F L P リコンビナーゼ発現を使用した。全ての最終抗原発現カセットを D N A 配列決定により確認した。

【0312】

細胞内ウエスタンブロット

マウス樹状細胞株 D C 2 . 4 に多重感染度 (M O I) 1 0 でリステリア・モノサイトゲネス (*L i s t e r i a m o n o c y t o g e n e s*) 株を 1 時間かけて接種し、P B S 及び 5 0 μ g / m L ゲンタマイシンを補充した D M E M 培地で細胞を 3 回洗浄した。細胞を感染から 7 時間後、回収した。S D S サンプルバッファーで細胞を溶解させ、回収し、4 ~ 1 2 % ポリアクリルアミドゲル上で泳動させた後、ウエスタンブロット分析のためにニトロセルロース膜に移した。抗原検出を視覚化し、A c t A タンパク質の成熟 N 末端に対するポリクローナル抗体を用いた L i c o r O d y s s e y I R 検出システムで定量した後、抗 p 6 0 モノクローナル抗体を用いた p 6 0 発現 (非関連 L m タンパク質) に対して正規化した。p 6 0 レベルは、実験における細菌の数と直接相関する。

【0313】

ワクチン接種マウスにおける抗原特異的免疫応答

6 週齢の B a l b / c マウス (n = 5) に 5 $\times$ 1 0 ⁶ c f u で静脈内 (I V) ワクチン接種した。7 日後、脾臓を採取し、S S X 2 、P A P 、N K X 3 . 1 、又は P S M A (1 1 アミノ酸による 1 5 量体ペプチドオーバーラップ) のオーバーラップペプチドライブラリー又は非刺激培地対照を用いた I F N γ E L I s p o t アッセイにより、免疫応答を測定した。E G F R v I I I 特異的免疫原性について、6 週齢の C 3 H / H e N マウス (n = 5) に 5 $\times$ 1 0 ⁶ c f u で I V ワクチン接種した。7 日後、脾臓を採取して、E G F R v I I I _{2 6 ~ 3 3} (K ^k 結合ペプチド E E K K G N Y V) を用いた I F N γ E L I s p o t アッセイにより、免疫応答を測定した。非刺激応答と一緒に、又はバックグラウンド (非刺激) 除去データとして、各株 / 抗原についてのデータをプロットした。独立 t 検定を用いて統計的有意性を決定した。

【0314】

野生型リステリア (*L i s t e r i a*) 攻撃に対する防御免疫

2 $\times$ 1 0 ⁶ c f u の各 L m 株 I V で B a l b / c マウスに 1 回ワクチン接種した。4 0 日後、L a u e r , 2 0 0 2 に記載されているように、5 $\times$ 1 0 ⁴ c f u (2 $\times$ L D _{5 0} 用量) の W T L m 株 D P - L 4 0 5 6 でマウスを I V 攻撃した。3 日後、脾臓を採取し、ホモジナイズした。2 0 0 μ g / m L のストレプトマイシンを含有する B H I プレート上で希釈液を平板培養して、c f u / 臓器を決定した。このアッセイの検出限界 (L O D) は、5 0 C F U であった。

【0315】

癌の治療

転移性去勢抵抗性前立腺癌を有する対象に投与した際の安全性を特性決定し、第 2 相用量 (R P 2 D) を決定し、予備臨床有効性を評価し、単剤 A D U - 7 4 1 (株 B H 5 2 9 0 と呼ばれる) の免疫応答を決定するため、ファーストインヒューマン (F I H) 、第

10

20

30

40

50

I 相、オープンラベル、多施設、2 部試験を実施した。対象は、ホルモン療法にตอบสนองせず、且つスクリーニングで進行中の疾患を有すると共に、少なくとも 2 種の未承認療法を受けたことがある者でなければならない。約 42 人の対象がこの試験に参加することになるであろう。

【0316】

第 1 部（用量漸増）：安全性及び薬力学的評価に基づいて R P 2 D を決定するために設計される。2 用量の A D U-741（用量コホート 1 A： 1×10^8 CFU 及び用量コホート 1 B： 1×10^9 CFU）を順次投与する。参加する対象の総数は、用量制限毒性が観察されたとき及び／又はこれが観察されるか否かに応じて変動し得る。

【0317】

第 2 部（用量拡大）：A D U-741 についての R P 2 D を決定した後の 2 つの拡大コホート（コホート 2 A 及び 2 B）を評価するために設計される。拡大コホートの目標は、A D U-741 の安全性をさらに評価すること（コホート 2 A）と、腫瘍部位での免疫応答について治療前及び治療後の生検を評価することとである（コホート 2 B）。

【0318】

対象が試験に適格であると決定されたら、オープンラベル治療期間中、21 日毎に A D U-741 を静脈内投与する。A D U-741 は、末梢静脈カテーテルを介して投与する。試験薬物は、1 時間かけて投与するが、必要に応じて注入時間を延長する選択肢もある。対象は、有害事象、検査所見の異常、並びに臨床及び免疫学的応答について詳細にモニターされる。治療薬は、放射線写真による疾患進行の確認、許容できない毒性、同意の撤回、治験責任医師による治療停止の決定、後の抗癌療法の開始、又はスポンサーによる試験の終了まで投与される。安全性及び有効性を評価する。

【0319】

試験集団 — 去勢抵抗性転移性疾患と共に前立腺の組織学的に確認された腺癌を有する 18 歳超であり、少なくとも 2 種の未承認療法を受けたことがあり、且つ疾患進行についての下記基準：（1）各決定間に > 1 週間の間隔をあげ、最小 3 つの上昇レベルを含む、前立腺特異的抗原（P S A）の上昇（最後の決定は、参加前の 2 週間以内に得られた値 $\geq 2 \text{ ng/mL}$ でなければならない）；（2）コンピュータ断層撮影（C T）又は磁気共鳴画像法（M R I）スキャンにより、新規若しくは進行性軟組織疾患と定義される測定可能な疾患；（3）前立腺癌臨床試験ワーキンググループ（P r o s t a t e C a n c e r C l i n i c a l T r i a l s W o r k i n g G r o u p）（P C W G 2）基準によって決定される、少なくとも 2 つの新たな骨病変を伴う、放射性核種スキャン又は 18 F フッ化ナトリウムポジトロンエミッショントモグラフィー／コンピュータ断層撮影（N a F P E T / C T）結果の少なくとも 1 つを有する対象が本試験に適格であり；且つ対象は、少なくとも 2 種の未承認療法を受けたことがなければならない。対象は、0 又は 1 の米国東海岸癌臨床試験グループ（E a s t e r n C o o p e r a t i v e O n c o l o g y G r o u p）（E C O G）性能状態スコアを有していなければならない。

【0320】

有効性評価 — 有効性評価は、P C W G 2 基準、固形癌の治療効果判定のための新ガイドライン（R e s p o n s e E v a l u a t i o n C r i t e r i a i n S o l i d T u m o r s (V1.1)）（R E C I S T）基準、及び免疫関連反応評価基準（I m m u n e - R e l a t e d R e s p o n s e C r i t e r i a）（i r R C）に従って治験責任医師により評価される。疾患応答は、胸部、腹部及び骨盤の I V コントラストと共に C T スキャンを用いて評価する。I V C T コントラスト剤に不耐性の対象は、経口造影剤を用いて実施される C T スキャンを使用する。磁気共鳴画像法（M R I）を用いて、C T により適切に画像表示できない疾患の部位を評価することができる。軟組織疾患（すなわち、放射線で検出可能な腫瘍）は、C T 及び／又は M R I によって評価する。放射性核種骨スキャン又は 18 F-N a F P E T / C T を実施して骨疾患の部位を評価する。これらの評価は、ベースラインで疾患を評価するのに用いたのと同じ評価方法を使用して、試験全体を通し各時点で実施する。また、次の抗癌療法について、及び治療後

の追跡期間中の全生存期間についてもデータを収集する。

【0321】

結果

全てのコードされた抗原の高度発現におけるNKX3.1 (R41G) 結果

2つの多価ワクチン株BH5258 (「野生型」NKX3.1を含有する) 及びBH5290 (NKX3.1 R41G変異を含む) は、NKX3.1の41位の単一アミノ酸が異なる。記載のように、Lmゲノムにおいて3つの遺伝子座から5つのコードされた抗原を発現する株を構築した (図1)。これらの株を用いてマウス樹状細胞株DC2.4を感染させ、半定量ウエスタンブロットを用いて発現を測定した。融合タンパク質の各々は、ほぼ予測サイズで検出された。驚くべきことに、コードされた融合タンパク質抗原 (P
SMA、PAP、NKX3.1、SSX2、及びEGFRvIII) の各々について、発現は、NKX3.1 (R41G) 変異を含有する株で2.1×〜3.2×の範囲で高かったが、これは、NKX3.1における単一アミノ酸の変化が全てのコードされた抗原の発現を増大させることを示す。特に、NKX3.1及びPMAは、BH5290で2.7倍高く、PAPは、BH5290で3.2倍高く、SSX2は、BH5290で2.1倍高く、EGFRvIIIは、BH5290で3.2倍高かった。

10

【0322】

NKX3.1 (R41G) は、より高い抗原特異的免疫原性をもたらす

2つの多価ワクチン株BH5258及びBH5290をマウスにおけるT細胞免疫原性について比較した (図3)。SSX2、PAP、NKX3.1、及びPMAに対する免疫応答をBalb/cマウスにおいて測定した。EGFRvIIIは、C3H/HeNマウスにおいて測定した。5つのコードされた抗原のうちの4つに対する応答は、BH5290において高かったが、これは、NKX3.1コード配列中の単一のアミノ酸が異なる (NKX3.1 (R41G))。PAPに対する応答は、BH5258と比較してBH5290において統計的に高かった。PMA応答は、両方の株でほぼ均等であった。BH5290とBH5258との間の単一のアミノ酸の違いが、コードされた抗原の大部分に対してより高い応答をもたらしたが、これは、それがより強力な前立腺癌ワクチンであることを示す。

20

【0323】

BH5290は、WT Lmで攻撃されると十分に機能性且つ防御的な免疫を誘導する

図4に示すように、BH5290による1回のワクチン接種は、WTリステリア (Listeria) 攻撃に対して十分に防御的な長期免疫を誘導した。BH5290によるワクチン接種は、WT-Lm攻撃後、脾臓中のCFUの5-log減少をもたらした。機能免疫は、抗原特異的免疫応答の大きさと、免疫応答が将来の攻撃から防御する能力との組合せである。この場合、機能性は、十分に毒性の野生型リステリア (Listeria) 攻撃を用いて試験した。HBS S又はLm株DP-L4027 (hly-) によるワクチン接種は、負の対照として実験に加えた。

30

【0324】

融合タンパク質の一部としてEGFRvIIIx5が含まれる場合、SSX2発現が増大する

抗原発現に対するEGFRvIIIx5の含有の影響を評価するため、EGFRvIIIx5の存在のみが異なる対応SSX2発現カセットを、inlB遺伝子座からActAN100*-NKX3.1-PAP_{33~38}融合タンパク質を発現した同じLmバックグラウンドのtRNA^{Arg}遺伝子座に導入した。BH4598は、第1カセット-ActAN100*-SSX2を含み、BH4602は、第2カセット-ActAN100*-EGFRvIIIx5-SSX2を含んだ (図5A)。いずれの発現カセットもactAプロモータを使用した。次に、これらのカセットの発現を細胞内ウエスタンブロットにより評価した (図5B)。レーン1: Lm11 (負の対照)、レーン2: BH4598 (ActAN100*-SSX2)、レーン3: BH4602 (ActAN100*-EGFRvIIIx5-SSX2)。融合タンパク質各々の全長サイズのコートを右側に示

40

50

す。発現レベルを定量し、データを構成的リステリア (L i s t e r i a) P 6 0 タンパク質に対して正規化した。定発現カセット (N K X 3 . 1 - P A P 融合) の相対発現レベルは、2つの株 (B H 4 5 9 8では0.43、B H 4 6 0 2では0.33) 同士で同様であった。しかし、S S X 2 融合タンパク質の発現は、融合物の一部としてE G F R v I I I x 5を含有する株の方が200倍超高かった (B H 4 5 9 8では1、B H 4 6 0 2では224)。このデータは、E G F R v I I I x 5がS S X 2の発現を増大させることを明確に証明する。

【0325】

S S X 2 免疫応答は、E G F R v I I I x 5が免疫原性融合タンパク質の一部であるとき、有意に高い

10

B H 4 5 9 8 及び B H 4 6 0 2 によって誘導される一次免疫応答を比較した。B H 4 6 0 2 は、B H 4 5 9 8 より有意に高い S S X 2 特異的免疫応答を誘導した ($p = 0.0024$)。これは、E G F R v I I I - S S X 2 融合タンパク質からのより高度な発現が免疫原性のマウスモデルにおいてより高い免疫応答に変換されたことを証明する。

【0326】

P A P 発現は、E G F R v I I I の複数のコピーに融合された場合に高くなる

図7に示すように、追加E G F R v I I I 反復単位の各々がより高いP A P の発現をもたらした。レーン2~7で測定された相対発現：それぞれ1×、2.4×、19.6×、127×、156×、及び213×。さらに、E G F R v I I I x 5とS S X 2 及びP A P とのいずれの融合の場合にも、発現の増加は両抗原について200×超の発現増加をもたらした。

20

【0327】

P A P 応答は、E G F R v I I I の複数のコピーと融合するとより高く、E G F R v I I I の5つのコピーと融合すると有意に高い

E G F R v I I I コピー数が異なる6つのP A P 発現L m 株 (B H 2 8 6 8、P L 1 6 3 1、P L 1 6 2 9、P L 1 6 2 7、P L 1 6 2 5、及びP L 1 6 2 3) をT細胞応答の誘導について試験した。B H 2 8 6 8 (E G F R v I I I のゼロコピー) は、低いが発現可能なP A P 特異的応答を誘導した。P A P 融合物の一部としてE G F R v I I I の少なくとも1つのコピーを含む全ての株は、より高いP A P 特異的応答を誘導し、発現レベルの増加を反映する免疫応答には、ある傾向があった (E G F R v I I I のコピーが多いほど高い免疫応答をもたらした)。最も高い免疫応答は、P L 1 6 2 3 (E G F R v I I I の5つのコピー) から観察され、この応答は、E G F R v I I I を全く含まないか、又はE G F R v I I I 反復の1コピーを含む株より統計的に高かった。同様に、反復の2つのコピーを含むP L 1 6 2 9は、E G F R v I I I のゼロコピーの株より有意に高いP A P 応答を誘導した。

30

【0328】

当業者は、本発明の好ましい実施形態に対する多くの変更形態及び改変形態がなされ得ることと、こうした変更形態及び改変形態が本発明の趣旨から逸脱することなくなされ得ることとを理解するであろう。従って、添付の特許請求の範囲は、こうした均等な変形形態の全てを本発明の真の趣旨及び範囲に含まれるものとして包含することが意図される。

40

【0329】

本明細書に引用又は記載される各特許、特許出願、及び刊行物の開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0330】

【表5】

表5

<i>ActAN100</i> * スクレオチド配列 (配列番号1)	
gtgggattaaatagatttatgcgtgcgatgtagttagtttcttactgccaactgcattacgattaaccccgacataatattgcagcgacag atagcgaagattccagtctaaacacagatgaatgggaagaagaatacgaaactgcacgtgaagtaagttcacgtgatattgaggaacta gaaaaatcgataaagtgaataacgaacaaagcagaccaagataataaacgtaaagcaaaagcagagaaaggt	
<i>ActAN100</i> * アミノ酸配列 (配列番号2)	
(BamHI リンカー -gs = 下線部)	
MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEEEYETAREVSSRDIE ELEKSNKVKNTNKADQDNKRKAKAEKGS	
<i>actAp-ActAN100</i> *-EGFRvIIIx5-SSX2 スクレオチド配列 (配列番号3)	
gggaagcagttggggttaactgattaacaaatgtagagaaaaattaattctccaagtgaatttcttaaaaataattcatgaatatttttcttatat tagctaattaagaagataattaactgctaatacatttttaacggaataaattagtgaaatgaaggccgaattttccttggtctaaaaagggtg tattagcgtatcacgaggaggaggtataagtgggattaaatagatttatgcgtgcgatgtagttagtttcttactgccaactgcattacga ttaaccccgacataatatttgcagcgacagatagcgaagattccagtctaaacacagatgaatgggaagaagaatacgaaactgcacgt gaagtaagttcacgtgatattgaggaactagaaaaatcgataaagtgaataacgaacaaagcagaccaagataataaacgtaaagc aaaagcagagaaaggtggatccgcaagcaaagtattccagctagtcgtgcattagaggagaaaaagggaattacgtggtgacgga tcatggatcgtgtgccgatggctcagtaagactagtcgagcaaaagtggccctgcatcacgagcactgaagagaaaaaaggaaac tatgttgtagccgatcatgtagctgcggagatgggtcaattaaattatcaaaagtcttaccagcatctagagcttagaggaaaagaagg taactatgtcgaacagatcatggaagtgtgtgacggaagtgttaaagcgtcgaaagttagctccagcttctcgcgcattagaagaaaag aaaggcaattatgttgaacagaccatgtagttagtggtgatggctcgaatgtcaaaagtctaccggcttctcgtgcgctagaaga gaagaaaggaaattacgtagttacagaccacggctccttgcgcggtatggttcggttaacaattgatgaatggtgatgacgcttccgacg ccgtcctaccgtaggagcacaattccagaaaagattcaaaaagcatttgatgacatcgctaaatacttttctaaagaagaatgggagaaa atgaaagcgagcgagaaaaatctttatgtctatatgaaacggaatatgaagcaatgacaaaattgggtttcaagcaacattaccaccatt tatgtcaataaacgtgcggaagatttcaagggaatgatttagacaatgatcctaatcgaggcaaccaagtggaaagaccgcaaatgac tttcggacgtttacaagggtttctccaagataatgccgaaaaagccagccgaagaaggtaatgatagtgaagaagtacctgaagcga gtggtccacaaaatgatggttaaagaactttgtcctccaggcaaaaccgacaacgtctgagaagattcatgaacggtccggttaaccgtgaa gtcaagagaaagaagaacgacgtggaactgctcacagatggagttcacagaatacacataacattggccgctttagcctatcaacaag catgggggctgttcatggaactccaaaacgatcacgcataacagagatccaaaaggcggaacatgccgggtccaacagattgtgtt agagaaaattcgtggttaa	
<i>ActAN100</i> *-EGFRvIIIx5-SSX2 アミノ酸配列 (配列番号4)	
(ActAN100* = 標準字体; BamHI リンカー -gs = 下線部; EGFRvIIIx5 = 二重下線部; MfeI リンカー -gl = 太字下線部; SSX2 = 太字)	
MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEEEYETAREVSSRDIE ELEKSNKVKNTNKADQDNKRKAKAEKGSASKVLPASRALEEKKGNYVVTDHGSC ADGSVKTSASKVAPASRALEEKKGNYVVTDHGSCGDGSIKLSKVLPAASRALEEKKGNYVVTDHGSCADGSVKASKVAPASRALEEKKGNYVVTDHGSCGDGSIKLSKVLPAASRALEEKKGNYVVTDHGSCADGSVK ^{gl} MNGDDAFARRPTVGAQIPEKIQAFFDDIAKY FSKEEWEKMKASEKIFYVYMKRKYEAMTKLGFKATLPPFMCNKRAEDFQGNL DNDPNRGNQVERPQMTFGRLQGISPMPKPAEEGNDSEEVPEASGPQNDGKE LCPPGKPTTSEKIHESGNREAQEKEERRGTAHRWSSQNTNIGRFSLSSTMGAV HGTPKTITHNRDPKGGNMPGPTDCVRENSW	
<i>EGFRvIII</i> スクレオチド配列 (配列番号5)	
CCdGCwwswmGhGCdyTwGArGArAArAArGGnAAyTAyGTnGTdACvGAyCAyGGhwsbT Gy	
<i>EGFRvIII</i> アミノ酸配列 (配列番号6)	
PASRALEEKKGNYVVTDHGSC	
<i>EGFRvIIIx5</i> スクレオチド配列 (配列番号7)	
gcaagcaaagtattccagctagtcgtgcattagaggagaaaaagggaattacgtggtgacggatcatggatcgtgtgccgatggctc	

【表 6】

agtaaagactagtgcgagcaaagtggccctgcatcacgagcacttgaagagaaaaaggaaactatgttgtagccgatcatggttagctg cgagagatggttcaattaaattatcaaaagtctaccagcatctagagcttttagaggaaaagaagggttaactatgtcgtaacagatcatgg aagtgtgctgacggaagtgttaaagcgtcgaaagtagctccagcttctcgcgcattagaagaaaagaaggcaattatgttgtaacaga ccatggtagtgtggtgatggctcgatcaaattgtcaaaagtctaccggcttctcgcgctagaagagaagaaggaaattacgtagtta cagaccacggctcttgcgcgatggttccgttaa	
EGFR ^{IIIx5} アミノ酸配列 (配列番号8) (個別のEGFR ^{III} 下線部)	
<u>ASKVLPASRALEEKKGNYVVT</u> <u>DHGSCADGSVK</u> <u>TSASKVAPASRALEEKKGNYVVT</u> <u>D</u> <u>HGSCGDGSIKLSKVL</u> <u>PASRALEEKKGNYVVT</u> <u>DHGSCADGSVK</u> <u>ASKVAPASRALEEK</u> <u>KGNYVVT</u> <u>DHGSCGDGSIKLSKVL</u> <u>PASRALEEKKGNYVVT</u> <u>DHGSCADGSVK</u>	10
SSX2 スクレオチド配列 (配列番号9)	
atgaatggtgatgacgcttctgcacgcccgtctaccgtaggagcacaaattccagaaaagattcaaaaagcatttgatgacatcgcta acttttctaaagaagaatgggagaaaaatgaaagcagcgagagaaaatctttatgtctatatgaaacggaaatgaagcaatgacaaa gggtttcaagcaacattaccaccatttatgtgcaataaacgtgcggaagattttcaagggaatgatttagacaatgatccta accaagtggaaaagaccgcaaatgactttcggacgtttcaagggtttctccaagataatgccgaaaaagccagccgaagaagga gatagtgaagaagtacgtgaagcgagtgggtccacaaaatgatggttaagaactttgtcctccaggcaaaccgacaacgtctgaga tcatgaacgggtccgtaaccgtgaagctcaagagaaagaagaacgacgtggaactgctcacagatggagttcacagaatacacata attggccgctttagcctatcaacaagcatgggggctgttcatggaactccaaaacgatcacgcataacagagatccaaaaggcggaa catgccgggtccaacagattgtgttagagaaaattcgtgg	20
SSX2 アミノ酸配列 (配列番号10)	
MNGDDAFARRPTVGAQIPEKIQKAFDDIAKYFSKEEWEKMKASEKIFYVYMKRK YEAMTKLGFKATLPPFMCNKRAEDFQGNLDNDPNRGNQVERPQMTFGR LQGI SPKIMPKKPAEEGNDSEEVPEASGPQNDGKELCPPGKPTTSEKIHRSNREAQE KEERRGTAHRWSSQNTNIGRFSLS TSMGAVHGTPTKTITHNRDPKGGNMPGPTD CVRENSW	
actAp-ActAN100 ⁺ -EGFR ^{IIIx5} -PAP ₃₃₋₃₈₆ スクレオチド配列 (配列番号11)	
gggaagcagttggggttaactgattaacaaatgttagagaaaaattaattctccaagtgatattcttaaaataattcatgaatatttttcttat tagctaattaagaagataattaactgctaattttaaacggaataaattagtgaataagaggccgaattttctgttctaaaagggtg tattagcgtatcacgaggaggaggtataagtgggattaatagatttatgctgcatgatgtagttttcattactccaactgcattacga ttaaccccgacataatatttcagcgcagatagcgaagattccagcttaaacacagatgaatgggaagaagaatacgaactgcacgt gaagtaagttcacgtgatattgaggaactagaaaaatcgaataaagtgaataacgaacaaagcagaccaagataataaacgtaaaagc aaaagcagagaaaggtgatctgcaagcaaagtattgccagctagtcgtgcattagaggagaaaaaggggaattacgtggtgacggat catggatcgtgtgccgatggctcagtaaaagactagtgcgagcaaagtggccctgcatcacgagcacttgaagagaaaaaggaaact atgttgtagccgatcatggttagctgcggagatggttcaattaaattatcaaaagtctaccagcatctagagcttttagaggaaaagaagggt aactatgtcgtaacagatcatggaagtgtgctgacggaagtgttaaagcgtcgaaagtagctccagcttctcgcgcattagaagaaaag aaaggcaattatgttgaacagaccatggttagttgtggtgatggctcgatcaaattgtcaaaagtctaccggcttctcgcgctagaaga gaagaaaggaaattacgttagttacagaccacggcttgcgcggtggttccgttaaaggatccaaagaactaaagtgttaacgttagtc tttagacatggtgatcgtagtcctattgataccttctacagatccaatcaagagagttagttggccacaaggcttcggacaacttacaca attaggaatggaacaacattatgaattaggtaatacattcgaaacgttatcgaaattcctaataatgaatctacaaacgaacaagtgt atatccgttccactgacgttgatagaactaatgtcagctatgacaaatctagctgcattagtgccaccagaaggcgttagcatttggaat cctatcttactttggcagccaataacgtgtacatacgggttccgttatctgaagatcaattactttatcttccatttcgcaactgccacgattcaa gaattagaatccgaacattgaaaagcgaagaatttcagaaaagattacatacaaaagactttatcgcaaccttaggcaaatgtcag ggttacacggacaggatctatttggaatttggtcgaaagtttatgatcctttgactgtgaatctgtacataactttacattacctagtcgcgcc acggaagatactatgacgaaactacgtgaactttccgaacttttactatcgttgatggtattcataacaaaaagaaaagagcagattg caagggtggtgttttagtaaatgaaatctaaaccatagaaaagagctacacaaattccgtcttacaagaattgattatgtatagtcctatg atcacgagtagtctgggcttcaaatggcggttagatgtctataacggcttactccaccgtatgcgtcatgtcaccttacggaactttacttga	30
	40

【表 7】

gaaaggtgagtactttgttgagatgtactatcgcaatgaaacccaacatgaaccatatccgttgatgttaccaggttgtagtccatcttggcc gttagaacgatttgcggaattagtggtccagtgtataccacaagactgggtctactgagtgtatgactactaatagccaccaagggactgaa gattcaacagattaa	
ActAN100*-EGFRvIIIx5-PAP ³³⁻³⁸⁶ (配列番号12)	
(ActAN100* = 標準字体, BamHI リンカー gs = 下線部, EGFRvIIIx5 = 二重下線部, PAP ³³⁻³⁸⁶ = 太字)	
MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEYETAREVSSRDIE ELEKSNKVKNTNKADQDNKRKAKAEK <u>GG</u> <u>S</u> ASKVLPASRALEEKKGNYVVTDHGSC <u>ADGSVKTSASKVAPASRALEEKKGNYVVTDHGSCGDGSIKLSKVLPASRALEEKKG</u> <u>NYVVTDHGSCADGSVKASKVAPASRALEEKKGNYVVTDHGSCGDGSIKLSKVLPASR</u> <u>ALEEKKGNYVVTDHGSCADGSVK</u> <u>gs</u> KELKFVTLVFRHGDSPIDTFPTDPIKESSWP QGFGQLTQLGMEQHYELGEYIRKRYRKFLNESYKHEQVYIRSTDVRTLMSAM TNLAALVPPEGVSIWNPILLWQIPVHTVPLSEDQLLYLPFRNCPRFQELESETLK SEEFQKRLHPYKDFIATLGKLSGLHGQDLFGIWSKVYDPLYCESVHNFTLPSRAT EDTMTKLRELSELSLLSLYGIHKQKEKSRLQGGVLVNEILNHMKRATQIPSYKKL IMYSAHDTTVSGLQMALDVYNGLLPPYASCHLTELYFEKGEYFVEMYRNETQH EPYPLMLPGCSPSCPLERFAELVGPVIPQDWSTECMTTNSHQGTEDSTD	10
PAP ³³⁻³⁸⁶ スクレオチド配列 (配列番号13)	
aaagaactaaagtttgaacgtagtcttagacatggtgatcgtatgtagtctattgataccttctacagatccaatcaaagagagtagttggc cacaaggcttcggacaacttacacaattaggaatggaacaacattatgaattaggtgaatacattcgcaaacgttatcgcaaatcctaat gaatcgtacaaacacgaacaagtgtatatccgttccactgacgttgatagaacactaatgtcagctatgacaaatctagctgcattagtgcc accagaaggcgttagcatttggaatcctatcttactttggcagccaatacctgtacatacgggtccgttatctgaagatcaattactttatctc catttcgcaactgcccacgattccaagaattagaatccgaaacattgaaaagcgaagaatttcagaaaagattacatccatacaagacttt atcgcaaccttaggcaaattgtcagggttacacggacaggatctatttggaaatttggtcgaagtttatgatctttgtactgtgaatctgtac ataactttacattacctagtcgcgccacggaagatactatgacgaaactacgtgaactttccgaactttcttactatcgttgtagtggtattcat aaacaaaaagaaaagagcagattgcaagtggtgttttagtaaatgaaatctaaaccatatgaaaagagctacacaaattccgtcttaca agaaattgattatgtatagtgtcatgatacgacagtatctgggcttcaaatggcgttagatgtctataacggcttacttccaccgtatgcgtc atgtcaccttacggaactttactttgagaaagtgagtactttgttgagatgtactatcgcaatgaaacccaacatgaaccatatccgttgat gttaccaggttgtagtccatcttggcgttagaacgatttgcggaattagtggtccagtgtataccacaagactgggtctactgagtgtatga ctactaatagccaccaagggactgaagattcaacagat	20
PAP ³³⁻³⁸⁶ アミノ酸配列 (配列番号14)	
KELKFVTLVFRHGDSPIDTFPTDPIKESSWPQGFGQLTQLGMEQHYELGEYIRK RYRKFLNESYKHEQVYIRSTDVRTLMSAMTNLAALVPPEGVSIWNPILLWQIP VHTVPLSEDQLLYLPFRNCPRFQELESETLKSEEFQKRLHPYKDFIATLGKLSGL HGQDLFGIWSKVYDPLYCESVHNFTLPSRATEDTMTKLRELSELSLLSLYGIHKQ KEKSRLQGGVLVNEILNHMKRATQIPSYKKLIMYSAHDTTVSGLQMALDVYNGLL PPYASCHLTELYFEKGEYFVEMYRNETQHEPYPLMLPGCSPSCPLERFAELVG PVIPQDWSTECMTTNSHQGTEDSTD	30
actAp-ActAN100*-EGFRvIIIx5-NKX3.1(R41G) ¹¹⁻²³⁴ -PSMA ^{1-20, 44-138, 169-750} スクレオチド 配列 (配列番号15)	
gggaagcagttggggttaactgattaacaaatgtagagaaaaattaattctccaagtgtattcttaaataattcatgaatatttttcttatat tagctaattaagaagataattaactgctaattcaatttttaacggaataaattagtgaaaatgaaggccgaattttctgttctaaaagggttg tattagcgtatcacgaggaggaggtataagtgggattaatagatttatgcgtgcgatgatgtagtttcttactgccaactgcattacga ttaaccccgacataatatttgcagcgcagatagcgaagattccagtctaaacacagatgaatgggaagaagaatacgaactgcacgt gaagtaagttcacgtgatattgaggaactagaaaaatcgaataaagtgaataacgaacaaagcagaccaagataataaacgtaaagc aaaagcagagaaaggtgatctgcaagcaaagtattgccagctagctgctgcattagaggagaaaaaggggaattacgtggtgacggat	40

【表 8】

catggatcgtgtgccgatggctcagtaaagactagcgcgagcaaaagtgccctgcatcacgagcactgaagagaaaaaggaac
tatgttgtagccgatcatggttagctgcggagatggttaattaaattatcaaaagtctaccagcatctagagctttagaggaaaagagg
taactatgtcgtaacagatcatggaagtgtgctgacggaagtgttaaaagcgtcgaaagtagctccagctctcgcgcattagaagaaaag
aaaggcaattatgttgaacagaccatggttagttgtggtgatggctcgatcaaatgtcaaaagttctaccggcttctcgtgcgctagaaga
gaagaaaggaaattacgtagttagacagaccacggctcttgcgcggtggttccgttaaggatccgaagcaaaagctgaaggcgcagcg
ccaccgactcctagtaaaccactaacaagtttctaatccaagatattctcgtgacgggtgcacaaggacaaggcggacgaacttctcac
aacgtcaacgagatcctgagccagaaccggagcctgaaccggaagggggacgctcccagctggagcacaacacgatcagttatct
actggtccaagagctgcccctgaagaagcagagacactagccgaaacggaaccagaaagacatttgggttcatacttacttgactcaga
aaacacaagcggggctttaccgagattaccacaaacacaaaacagcctcaaaaacgtagtctgctgcattttcgcacacgcaagtc
tagagttagaacgcaaatcagccatcaaaagtatttgcgcgaccagaacgtgctcatcttgcgaagaatttgaacttacagaaaccca
agtaaagatttgggttcaaaatcgccgctataagacgaaacgtaaacacttcttgaactaggtgatttagaaaacattcaagccttcc
ggcgttaaaaggaagaagcatttagtctgctgagcttagtttctgtttacaatagttatccatactatccatactatctgtgtaggctcgtggt
cgccagcttttggactagtagtggaacttattacacgaaacagactcagcagtagcaacagccagacgcccctggtgaaatcaagca
acgaagctaccaatatcaccggaaacacaatatgaaagcattcctagacgaactaaaagcagaaaacataaaaaatttctttacaattt
cacacagattccacatttagctggtagcggagcaaaactttcaattagcaaaacaaattcaatctcaatggaaagaatttgggttagacagtg
agaattggctcattacgatgtcctttatcttaccgaataaaacgcacccaaattacatttcaattattaatgaagatggaaatgaaatacaatt
gatgcctgagggcgatttagtgtagttaaactatgcgcgcacagaggatttctttaaactgaacgggatatgaaaatcaactgttctggttaa
aatcgtcattgctcgttatggcaagatttctggtgcaacaaagtaagaatgcacaattagcgggtgcgaaggcgctatattatactccg
atccagcagattacttgcacctggagtaaaatcctatccagatggctggaatttgcaggtgggggtgtacagcgtggcaatatttcta
cttaattggggctggtgacctttaactcctggttatccagctaataatagcgttatcgtcgtggaatgcagaagccgtgggactaccctc
aattcctgtacatccaatcggtactatgatgctcaaaaattattagaaaagatgggggggtccgctccaccagattcgagctggcggtgga
agtctcaaagttccatacaatgtaggcccgggtttactggcaactttcaacacaaaaagtgaagaatgcacattcattccagcaatgaagt
gactcgaatatacaatgtcattggaactctccgtggtgcggttagccagacagatatgtaatccttggcgacaccgagatagttgggta
tttgagggtattgatccacaaagtggagcagcgggtgtcatgaaattgttagaagtttcggtacacttaagaaagaagggtggcgaccac
gccgtacgattttgttgcctcgtgggatgccgaagagttcgacttttgggatctacagaatgggcagaagagaacagccgtttattgcaa
gaacgcggggtagcttataatgctgtagtagtattgaaggttaactatacataagagtggtgactgtacgccgttaattgtattcgtagtc
cataaccttacaagaacttaaaagccagatgaagggtcgaagggaatcgctttatgaatcatggacaaagaatctccatcacca
gagttctctggaatgcctcgtatcagtaaattgggttagcggaaacgactttgaagtttcttcaacgtctaggcattgctcggggagagc
gcggtacacaaaaactgggaaccaataagtttagcggctatccactctatcattctgtgtatgaaacatacagagctttagaaaaatttta
tgatccgatgtttaatatcatcttacagttgctcaggtccgggtggaatggttttaggttggttaattccattgtacttccatttgactgccg
cgattacgctgtggtgctaagaaaatcgctgataaaatctatccattcaatgaaacaccacagaagaatgaaacttatagcgtgagttt
tgatagtttattcagtgccgtaaaagaactttactgaaatcgccagcaagtttctgaaagattacaagatttcgataaattcaatcctatagatt
aagaatgatgaatgatcaactaatgttttagaacgagcgttcattgatccgttaggttaccggatcgacctttctatcgtcacgttatctacg
ctccagtagccataacaaatgcaggcgaatctttccaggaatctatgacgccctattcgatatagaaagtaagttgatccgagtaaa
gcatgggggtgaagttaaacgacaaatctatgtcgcggcattcactgttcaagcagcggctgaaactttatcagaagttgcttaa

ActAN100*-EGFRvIIIx5-NKX3.1(R41G)₁₁₋₂₃₄-PSMA_{1-20, 44-138, 169-750} アミノ酸配列
(配列番号16)

(ActAN100* = 標準字体; BamHI リンカー (gs) = 下線部; EGFRvIIIx5 = 二重
下線部; NKX3.1(R41G)₁₁₋₂₃₄ = 太字; SpeI リンカー (ts) = 太字下線部) PSMA_{1-20, 44-138, 169-750}
= 斜体; MfeI リンカー (gl) = 点線下線部)

MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEYETAREVSSRDIE
ELEKSNKVKNTNKADQDNKRKAKAEKGGSASKVLPASRALEEKKGNYVVTDHGSC
ADGSVKTSASKVAPASRALEEKKGNYVVTDHGSCGDGSIKLSKVLPASRALEEKKG
YVVTDHGSCADGSVKASKVAPASRALEEKKGNYVVTDHGSCGDGSIKLSKVLPASR
ALEEKKGNYVVTDHGSCADGSVK_{gs}EAKAEGAAPPTPSKPLTSFLIQDILRDGAQG
QGGRITSSQRQRDPEPEPEPEPEGGRSRAGAQNQLSTGPRAAPEEAETLAETEPE
RHLGSYLLDSENTSGALPRLPQTPKQPQKRSRAAFSHTQVIELERKFHQKYL
PERAHLAKNLKLTETQVKIWFQNRKYKTKRKQLSSELGDLEKHSSLPALKEEAF

【表 9】

SRASLSVSYNSYPYYPYLYCVGSWSWPAFW_{ts}MWNLLHETDSAVATARPRWKSSNEAT NITPKHNMAFLDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAQIQSQWKEFGLDSVELA HYDVLLSYPNKTHPNYISIINEDGNEI_qLMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVIA RYGKVFRGNKVNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQQRGNILNLNG AGDPLTPGYPANAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYDDAQKLEKMGGSAPPDSSWRGSLKV PYNVGPFGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRIYVILGGHRDSWVFGGI DQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLQERGV AYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSEFSGM PRISKLGSNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFK YHLTVAQVRGGMVFELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYSVSFDSLF SAVKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPS SHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKROIYVAAFTVQAAAETLSEVA	10
NKX3.1(R41G)₁₁₋₂₃₄ スクレオチド配列 (配列番号17)	
gaagcaaaagctgaaggcgcagcgcaccgactcctagtaaaccactaacaagtttctaataccaagatattctctgacggtgcacaa ggacaaggcggacgaacttctcacacgtcaacgagatcctgagccagaaccggagcctgaaccggaagggggacgctcccgag ctggagcacaaaacgatcagttatctactggtccaagagctgccctgaagaagcagagacactagccgaaacggaaccagaaagac atttgggttcatacttacttgactcagaaaacacaagcggggtttaccgagattaccacaaacacacaaacagcctcaaaaacgtagtc gtgctgcattttcgacacgcaagtcataagagttagaacgcaaatcagccatcaaaagtattgtccgcaccagaacgtgctcatcttgcg aagaatttgaaacttacagaaacccaagtaaaagatttggttcaaatcgccgtataagacgaaacgtaaacatttcttctgaactagg tgatttagaaaaacattcaagccttcggcggttaaaggaagaagcatttagctgctgcgagcttagttctgtttacaatagttatccatactatc catactatactgtgtaggctcgtgctgccagcttttgg	20
NKX3.1(R41G)₁₁₋₂₃₄ アミノ酸配列 (配列番号18)	
EAKAEGAAPPTPSKPLTSFLIQDILRDGAQGGGRTSSQRQRDPEPEPEPEPEGGR SRAGAQNQLSTGPRAAPEEAETLAETEPERHLGSYLLDSENTSGALPRLPQTPK QPQKRSRAAFSHTQVIELERKFHQKYLAPERAHLAKNLKLTETQVKIWFQNR RYKTKRKQLSSELGDLEKHSSLPALKEEAFSRASLSVSYNSYPYYPYLYCVGSWS PAFW	
PSMA_{1-20, 44-138, 169-750} スクレオチド配列 (配列番号19)	
(MfeI リンカー 点線下線部)	30
atgtggaacttattacacgaaacagactcagcagtagcaacagccagacgacctcgttggaatcaagcaacgaagctaccaatcac cccgaacacaatatgaaagcattcctagacgaactaaaagcagaaaacataaaaaatttcttacaatttcacacagattccacatttag ctggtagggagcaaaacttcaattagcaaaacaaattcaatctcaatggaaagaatttggttagacagtgtagaattggctcattacgatg tccttttatcttatccgaataaaacgcatccaaattacatttcaattattaatgaagatggaaatgaaatacaattgatgacctgagggcgattta gtgtatgtaactatgcgcgcacagaggatttcttaaaactgaacgggatatgaaaatcaactgttctggtaaaatcgtcattgctcgttatg gcaaagtatttcgtggcaacaaagtaagaatgcacaattagcgggtgcgaaaggcgtcatattatactccgatccagcagattactttgc acctggagtaaaatcctatccagatggctggaatttgccaggtgggggtgtacagcgtggcaatattcttaattctaatggggctggtgac cctttaactcctggttatccagctaataacgcttatcgtcgtggaatcgagagccgctgggactaccctcaattcctgtacatccaatc ggatactatgatgctcaaaaattattagaaaagatgggggggtccgctccaccagattcgagctggcgtggaagtctcaaaagtccatac aatgtaggcccggttttactggcaactttcaacacaaaaagtgaatgcacattcattccacgaatgaagtgactcgaatatacaatgt cattggaaactcctcgtggtgagccagacagatatgtaactccttggcggacaccgagatagttgggtatttggaggtattgatcca caaagtggagcagcgggtgtcatgaaattgttagaagttcgttacacttaagaaagaagggtggcgaccacgccgtacgattttgttg cttcgtgggatgccgaagagttcggacttttgggtatcagaatgggcagagaagacagccgttattgcaagaacgcggggtagct tatattaatgctgatagtattgaagtaactatacattaagagtggtgactgtacgccgttaattgtattcgtatccataaccttataaaag aacttaaaagcccagatgaagggttcgaagggaatcgcttatgaatcatggacaaagaatctccatcaccagagttctctggaatgc ctcgtatcagtaaattgggtagcggaaacgactttgaagtttcttcaacgtctaggcattgcgtcggggagagcgcggttacacaaaaa ctgggaaaccaataagttagcggctatccactctatcattctgtgtatgaacatacagcgttgtagaaaaattttatgatccgatgtttaa atcatcttacagtgctcaggtccgggtggaatggtttttagttggctaattccattgtacttccatttgactgccgcgattacgctgtggtg ctaagaaaatacgtgataaaatctattccattcaatgaacacccacaagaaatgaaaacttatagcgtgagttttagatgttttattcagtg	40

【表 10】

ccgtaaagaacttactgaaatcgccagcaagttttctgaagattacaagatttcgataaatctaactctatagattataagaatgatgaatga tcaactaatgttttagaacgagcgttcattgatccgttaggtttaccggatcgacctttctatcgctacgttatctacgctcccagtagccata acaatatgcaggcgaatctttccaggaatctatgacgccctattcgatatagaaagtaaagttgatccgagtaaagcatggggtgaagtt aaacgacaaatctatgtcgcgccattcactgttcaagcagcgggtgaaactttatcagaagttgct	
PSMA _{1-20, 44-138, 169-750} アミノ酸配列 (配列番号20)	
(MfeI リンカー gl = 点線下線部)	
MWNLLHETDSAVATARRPRWKSSNEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQI PHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISIINEDGNEIql MPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINC SGKIVIRYGVFRGNKVKNAQLAGAKG VILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPAN EYAYRR GIAEAVGLPSIPVHPIGYDAQKLEKMGGSAPPDSSWRGSLKVPYNVGPFGFTGNFST QKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVH EIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLQERGVA YINADS SIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRIS KLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMF KYHLTVAQVRGGMVFELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYSV SFDSLFSAVKNFTEIASKF SERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPF YRHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKRQIYVAAFTVQAAAE TLSEVA	10
actA プロモータスクレオチド配列 (配列番号21)	
gggaagcagttggggttaactgattaacaaatgtagagaaaaattaattctccaagtgatattctaaaataattcatgaatatttttcttatat tagctaattaagaagataattaactgctaataccaatttttaacggaataaattagtgaaaaaagaaggccgaattttccttggtctaaaaaggttg tattagcgtatcacgaggaggaggtataa	
actAp-ActAN100'-EGFRvIIIx5-NKX3.1 ₁₁₋₂₃₄ -PSMA _{1-20, 44-138, 169-750} スクレオチド配列 (配列 番号22)	
gggaagcagttggggttaactgattaacaaatgtagagaaaaattaattctccaagtgatattctaaaataattcatgaatatttttcttatat tagctaattaagaagataattaactgctaataccaatttttaacggaataaattagtgaaaaaagaaggccgaattttccttggtctaaaaaggttg tattagcgtatcacgaggaggaggtataagtggttaaatagattatgcgtgcgatgatggttagtttcttactgccaactgcattacga ttaaccccgacataatatttcagcgacagatagcgaagattccagctctaaacacagatgaatgggaagaagaatacgaactgcacgt gaagtaagttcacgtgatattgaggaactagaaaaatcgaataaagtgaataaacgaacaaagcagaccaagataataaacgtaaagc aaaagcagagaaaggtggatctgcaagcaaagtattgccagctagtcgtgcattagaggagaaaaagggaattcagtggtgacggat catggatcgtgtgccgatggctcagtaagactagcgcgagcaaagtggccctgcacacgagcactgaagagaaaaaggaac tatgttgtagccgatcatggttagctgcggagatggttcaattaaattatcaaaagtcttaccagcatctagagcttttagaggaaaagaaggg taactatgtcgtaacagatcatggaagttgtgctgacggaagtgttaaagcgtcgaaagtagctccagcttctcgcgattagaagaaaag aaaggcaattatgtgtaacagaccatggttagttgtggtgatggctcgatcaaatgtcaaaagttctaccggcttctcgctgctagaaga gaagaaggaaattacgttagttacagaccaggtcttgcgcggtatggttcgttaaaggatccgaagcaaaagctgaaggcgcagcg ccaccgactcctagtaaacactaacaagtttctaatccaagatattcttgcgtgacgggtgcacaaagacaaggcggacgaacttctcac aacgtcaacgagatcctgagccagaaccggagcctgaaccggaagggggacgctcccagctggagcacaaaacgatcagttatct actggtccaagagctgcccctgaagaagcagagacactagccgaacggaaccagaagacatttggttcatactacttgactcaga aaacacaagcggggctttaccgagattaccacaaacacccaaacagcctcaaaaacgtagtcgtgctgcattttcgcacacgcaagtca tagagttagaacgcaaattcagccatcaaaagtattgtccgcaccagaacgtgctcatcttgcgaagaatttgaaacttacagaaacca agtaaagatttggttcaaaatcgccgtataagacgaaacgtaaacaacttcttctgaactaggtgatttagaaaaacattcaagcctcc ggcgtaaaggaaagcatttagtcgtgcgagcttagtttctgtttacaatagttatccatactatccatattctatctgtgtaggctcgtggt cgccagcttttggactagtagtggaacttattacagaaacagactcagcagtagcaacagccagacgcctcgttggaatcaagca acgaagctaccaatatcacccgaaacacaatatgaagcattcctagacgaactaaaagcagaaaaacataaaaaatttctttacaattt cacacagattccacatttagctggtacggagcaaaacttcaattagcaaaacaattcaatctcaatggaaagaatttggttagacagtg agaattggctcattacgatgtcttttatcttatccgaataaaacgcacatccaaattacatttcaattattaatgaagatggaaatgaatacaatt gatgcctgagggcgatttagtgtagttaaactatgcgcgcacagaggatttctttaaactgaacgggatatgaaaatcaactgttctggttaa	30
	40

【表 1 1】

aatcgctattgctcgttatggcaaagtatttcgtggcaacaaagtaaagaatgcacaattagcgggtgcgaaaggcgtcatattatactccg atccagcagattactttgcacctggagtaaaatctatccagatggctggaatttgcaggtgggggtgtacagcgtggcaattattctta cttaattggggctggtgacctttaactcctggttatccagctaataatgaatacgttatcgtcgtggaatcgagaagccgtgggactaccctc aattctgtacatccaatcgatactatgatgctcaaaaattattagaaaaagatgggggggtccgctccaccagattcgagctggcggtgga agtctcaaagttccatacaatgtaggccgggttttactggcaactttcaacacaaaaagtgaatgcacattcattccaggaatgaagt gactcgaatatacaatgtcattggaactctccgtggtgctggtgagccagacagatatgtaatccttggcggacaccgagatagttgggta tttgagggtattgatccacaaagtggagcagcgggtgtcatgaaattgttagaagtttcggtacacttaagaagaagggtggcgaccac gccgtacgattttgttgcctcgtgggatgccgaagagttcggacttttgggatctacagaatgggcagaagagaacagccgtttattgcaa gaacgcggggtagcttataatgtctgatagtagtattgaaggtaactatacattaagagtggactgtacgccgttaattgtattcgtagtc cataaccttacaagaacttaaaagccagatgaaggggtcgaagggaaatcgctttatgaatcatggacaaagaatctccatcacca gagttctctggaatgcctcgtatcagtaaatgggtagcggaaacgactttgaagttttttcaacgtctaggcattgcgtcggggagagc gcggtacacaaaaactgggaaccaataagtttagcggctatccactctatcattctgtgtatgaaacatacagactgtagaaaaattta tgatccgatgtttaaatacatcttacagttgctcaggtcgggggtggaatggtttttagttggctaattccattgtacttccatttgactccg cgattacgctgtggtgctaagaaaatacgtctgataaaatctattccattcaatgaaacaccacagaagaatgaaaacttatagcgtgagttt tgatagtttattcagtgccgtaaaagaactttactgaaatgccagcaagtttctgaaagattacaagatttcgataaatctaactctatagatt aagaatgatgaatgaactaatgtttttagaacgagcgttcattgatccgttaggtttaccggatcgaccttctatcgtcacgttatctacg ctcccagtagccataacaaatgcagggcaatctttccaggaatctatgacccctattcgatatagaaagtaaagttgatccgagtaaa gcatgggggtgaagttaaacgcacaaatctatgtcgcggcattcactgttcaagcagcggctgaaactttatcagaagttgcttaa	10
ActAN100*-EGFRvIIIx5-NKX3.1₁₁₋₂₃₄-PSMA_{1-20, 44-138, 169-750} アミノ酸配列 (配列 番号23) (ActAN100* = 標準字体, BamHI リンカー (gs) = 下線部, EGFRvIIIx5 = 二重下線部, NKX3.1₁₁₋₂₃₄ = 太字, SpeI リンカー (ts) = 太字下線部, PSMA_{1-20, 44-138, 169-750} = 斜体, MfeI リンカー (gl) = 点線下線部)	20
MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEYETAREVSSRDIE ELEKSNKVKNTNKADQDNKRKAKAEK<u>GS</u>ASKVLPASRALEEKKGNYVVTDHGSC <u>ADGSVKTSASKVAPASRALEEKKGNYVVTDHGSCGDGSIKLSKVLPASRALEEKKGNY</u> <u>YVVTDHGSCADGSVKASKVAPASRALEEKKGNYVVTDHGSCGDGSIKLSKVLPASR</u> <u>ALEEKKGNYVVTDHGSCADGSVK</u><u>gsEAKAEGAAPPTPSKPLTSFLIQDILRDGAQR</u> <u>QGGRTSSQRQRDPEPEPEPEPEGGRSRAGAQN</u><u>QDQLSTGPRAAPEEAETLAETEPE</u> <u>RHLGSYLLDSENTSGALPRLPQTPKQPQKRSRAAFSHTQVIELERKF</u><u>FSHQKYL</u><u>SA</u> <u>PERAHLAKNLKLTETQVKIWFQNR</u><u>RYKTKRKQLSSELGDLEKHSSLPALKEEAF</u> <u>SRASLVS</u><u>VNSYPYPYLYCVGSWSPAFW</u><u>tsMWNLLHETDSAVATARPRWKSSNEAT</u> <u>NITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQ</u><u>LAKQIQSQWKEFGLDSVELA</u> <u>HYDVLLSYPNKTHPNYISIINEDGNEI</u><u>qlMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINC</u><u>SGKIVIA</u> <u>RYGKVFRGNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQ</u><u>RGNILNLNG</u> <u>AGDPLTPGYPAN</u><u>EYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLEKMGGSAPPDSSWRGSLKV</u> <u>PYNVGPGFTGNFSTQKV</u><u>KMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPD</u><u>RYVILGGHRDSWVFGGI</u> <u>DPQSGAAV</u><u>VHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRL</u><u>LQERGV</u> <u>AYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLT</u><u>KELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGM</u> <u>PRISKL</u><u>SGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKN</u><u>WETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFK</u> <u>YHLTVAQVRGGMVFELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISM</u><u>KHPQEMKTYSVSFDSL</u><u>F</u> <u>SAVKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQ</u><u>LMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVITYAPS</u> <u>SHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKA</u><u>WGEVKROIYVAAFTVQAAAETLSEVA</u>	30
NKX3.1₁₁₋₂₃₄ スクレオチド配列 (配列番号24)	40
gaagcaaaagctgaaggcgcagcgcaccgactcctagtaaacactaacaagtttctaatccaagatattctcgtgacggtgcacaa agacaaggcggacgaacttctcacacgtcaacgagatcctgagccagaaccggagcctgaaccggaagggggacgctcccag ctggagcacaaaacgatcagttatctactggtccaagagctgccctgaagaagcagagacactagccgaaacggaaccagaaagac atttgggttcatacttactgactcagaaaaacacagcggggctttaccgagattaccacaaacacacaaaacagcctcaaaaacgtagtc	50

【表 1 2】

gtgctgcattttgcacacgcaagtcataagtagtaaacgcaaattcagccatcaaaagtattgtccgcaccagaacgtgctcatcttgcg aagaatttgaaacttacagaaccaagtaaagatttggtttcaaaatcgccgctataagacgaaacgtaaacaactttcttgaactagg tgatttagaaaaacattcaagccttcggcgtaaaaggaagaagcatttagtgcgagcttagttctgtttacaatagttatccatactac catatctatactgtgtaggctcgtggtcgccagcttttgg	
NKX3.1 ₁₁₋₂₃₄ アミノ酸配列 (配列番号25)	
EAKAEGAAPPTPSKPLTSFLIQDILRDGAQRQGGRTSSQRQRDPEPEPEPEPEGGR SRAGAQNQLSTGPRAAPEEAETLAETEPERHLGSYLLDSENTSGALPRLPQTPK QPQKRSRAAFSHTQVIELERKFHQKYL SAPERAHLAKNLKLTETQVKIWFQNR RYKTKRKQLSSELGDLK HSSLPALKEEAFSRASLVSVYNSYPYPYLYCVGSWS PAFW	
actA-ActANI100*-NKX3.1-PAP ₁₃₋₃₈₆ スクレオチド配列 (配列番号26)	
gggaagcagttggggttaactgattaacaaatgtagagaaaaattaattctccaagtgaattcttaaaataattcatgaatatttttcttat tagctaattaagaagataattaactgctaatacatttttaacggaataaattagtgaaaaatgaaggccgaattttctgttctaaaaaggttg tattagcgtatcacgaggaggagataagtggtgattaaatagattatgctgctgatgtagtttcttactgccaactgcattacga ttaaccccgacataatatttcgacgcagatagcgaagattccagtctaaacacagatgaatgggaagaagaatacgaactgcacgt gaagtaagttcacgtgatattgaggaactagaaaaatcgaataaagtgaaaaaatcgaacaaagcagaccaagataataaacgtaaagc aaaagcagagaaaaggtgatccatgtaagagtgctgaaccaagaccaggagaagcaaaagctgaaggcgacgcccaccgactc ctagtaaacactaacaagtttctaatcaagatattcttctgacgggtgcacaaagacaaggcgacgaacttcttcaaacgtcaacg agatcctgagccagaaccggagcctgaaccggaagggggacgctcccagctggagcacaaaacgatcagttatctactggtccaag agctgcccctgaagaagcagagacactagccgaaacggaaccagaaagacatttgggttcatacttactgactcagaaaacacaagc ggggctttaccgagattaccacaaacacaaaacagcctcaaaaacgtagtcgtgctgcattttcgacacgcaagtcataagtagtaa cgcaattcagccatcaaaagtattgtccgcaccagaacgtgctcatcttgcgaagaattgaaacttacagaaacccaagtaaagatttg gtttcaaaatcgccgtataagacgaaacgtaaacaactttcttctgaactagggtgatttagaaaaacattcaagccttcggcgtaaaag aagaagcatttagtgcgagcttagttctgtttacaatagttatccatactatccatactatctactgtgtaggctcgtggtcgccagctttt ggactaggaaaactaaagtgttaacgttagcttttagacatggtgatcgtatgcttattgatacttctctacagatccaatcaaagaga gtagttggccacaaggcttcggacaacttacacaattaggaatggaacaacattatgaattaggtgaatacattcgcaaacgttatcgcaa attccttaatgaatcgtacaaacacgaacaagtgtatatccgttccactgacgttgatagaacactaatgtcagctatgacaaatctagctgc attagtgcaccagaaggcggttagcatttggaaatcctatcttactttggcagccaatacctgtacatacgggtccgttatctgaagatcaatta ctttatcttccatttcgcaactgcccacgattccaagaattagaatccgaaacattgaaaagcgaagaatttcagaaaagattacatccatac aaagactttatcgcaaccttaggcaaatgtcagggttacacggacaggatctatttggaaattggtcgaaaagttatgatcctttgtactgtg aatctgtacataactttacattacctagtcgcgccacggaagatactatgacgaaactacgtgaactttccgaactttcttactatcgttgat ggtattcataacaaaaagaaaagagcagattgcaagtggtgttttagtaaatgaaatctaaaccatatgaaaagagctacacaaattc cgtcttacaagaaattgattatgtatgtctcatgatacgacagatctgggcttcaaatggcggttagatgtctataacggcttacttccacc gtatgcgtcatgtcaccttacggaactttactttgaaaaggtgagtactttgtgagatgtactatcgcaatgaaacccaacatgaaccata tccgttgatgttaccaggtttagtccatcttgcgggttagaacgatttgcggaattagtggtccagtgataccacaagactggtctactga gtgtatgactactaatagccaccaagggactgaagattcaacagattaa	
ActANI100*-NKX3.1-PAP ₁₃₋₃₈₆ アミノ酸配列 (配列番号27)	
(ActANI100* = 標準字体; BamHI リンカー (gs) = 下線部; NKX3.1 = 太字; リンカー (tr) = 太字 下線部; PAP ₁₃₋₃₈₆ = 斜体)	
MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEYETAREVSSRDIE ELEKSNKVKNNTNKADQDNKRKAKAEKG <u>S</u> MLRVPEPRPGEAKAEGAAPPTPSKPL TSFLIQDILRDGAQRQGGRTSSQRQRDPEPEPEPEPEGGRSRAGAQNQLSTGPR AAPEEAETLAETEPERHLGSYLLDSENTSGALPRLPQTPKQPQKRSRAAFSHTQVI ELERKFHQKYL SAPERAHLAKNLKLTETQVKIWFQNR RRYKTKRKQLSSELGDL EKHSSLPALKEEAFSRASLVSVYNSYPYPYLYCVGSWS PAFW <u>tr</u> KELKFVTLVFRH GDRSPIDTFPTDPIKESSWPQGFQLTQLGMEQHYELGEYIRKRYRKFLNESYKHEQVYIRS TDVDRTLMSAMTNLAALVPPEGVSIWNPILLWQPIPVHTVPLSEDQLLYLPFRNCPRFQELE SETLKSEEFQKRLHPYKDFIATLGKLSGLHGQDLFGIWSKVYDPLYCESVHNFTLPSRATED	

【表 1 3】

<i>TMTKLRELSELSLLSLYGIHKQKEKSRLQGGVLVNEILNHMKRATQIPSYKKLIMYSAHDTTV</i> <i>SGLQMALDVYNGLPPYASCHLTELFEKGEYFVEMYRNETQHEPYPLMLPGCSPSCPLE</i> <i>RFAELVGPVIPQDWSTECMTTNSHQGTEDSTD</i>	
NKX3.1 スクレオチド配列 (配列番号28)	
atgttaagagtgccctgaaccaagaccaggagaagcaaaagctgaaggcgagcgccaccgactcctagtaaaccactaacaagtttct taatccaagatattcttctgtgacgggtgcacaaagacaaggcggagcaacttcttcacaacgtcaacgagatcctgagccagaaccggag cctgaaccggaaggggggacgctcccagctggagcacaaaacgatcagttatctactggtccaagagctgccctgaagaagcagag acactagccgaaacggaaccagaaagacatttgggttcatacttactgactcagaaaacacaagcggggctttaccgagattaccaca aacacaaaacagcctcaaaaacgtagtctgtcgtcattttgcacacgcaagtcataagtagaacgcaaattcagccatcaaaagta tttgcgcaccagaacgtgctcatcttgcgaagaatttgaacttacagaaacccaagtaaagatttggtttcaaaatcgccgctataaga cgaaacgtaaacaactttcttgaactaggtgatttagaaaaacattcaagccttcggcggttaaaggaagaagcatttagtcgtgcgag cttagtttctgtttacaatagttatccatactatccatactatctgtaggctcgtggtcgccagcttttgg	10
NKX3.1 アミノ酸配列 (配列番号29)	
MLRVPEPRPGEAKAEGAAPPTPSKPLTSFLIQDILRDGAQRQGGRTSSQRQRDPE PEPEPEPEGGRSRAGAQNQDQLSTGPRAAPEEAETLAETEPERHLGSYLLDSENTS GALPRLPQTPKQPQKRSRAAFSHTQVIELERKFESHQKYLAPERAHLAKNLKLTE TQVKIWFQNRKYKTRKQLSSELGDLEKHSSLPALKEEAFSRASLVSVYNSYPYY PYLYCVGSWSPAFW	20
actA プロモータ-ActAN100'-SSX2 スクレオチド配列 (配列番号30)	
gggaagcagttgggggttaactgattaacaaatgtagagaaaaattaattctccaagtgatattcttaaaataattcatgaatatttttcttatat tagctaattaagaagataaactgctaataatcttaacggaataaattagtgaaaaatgaaggccgaattttccttgttctaaaaaggttg tattagcgtatcacgaggaggagtagtaagtgggattaaatagatttatgctgcatgatgtagtttcttactgccaactgcattacga ttaaccccgacataatatttgcagcgacagatagcgaagattccagtctaaacacagatgaatgggaagaagaatacgaactgcacgt gaagtaagttcacgtgatattgaggaactagaaaaatcgaataaagtgaaaaaatacgaacaagcagaccaagataataaacgtaaagc aaaagcagagaaaggtgatccaatgggtgatgacgttttcgcacgcccgtctaccgtaggagcacaattccagaaaagattcaaaaa gcatttgatgacatcgctaaatactttttaaagaagaatgggagaaaatgaaagcgagcgagaaaatctttatgtctatatgaaacggaa atatgaagcaatgacaaaattgggtttcaaagcaacattaccaccatttatgtgcaataaacgtgcggaagattttcaagggaatgatttag acaatgatcctaatecgaggcaaccaagtggaaagaccgcaaatgactttcgagcgtttacaagggtttctcaaagataatgccgaaaa agccagccgaagaaggtaatgatagtaagaagtacgtgaagcgagtgtccacaaaatgatgtaagaactttgtcctccaggcaa accgacaacgtctgagaagattcatgaacggtccggttaacgtgaagctcaagagaaagaacgacgtggaactgctcacagatg gagttcacagaatacacataacattggccgcttttagcctatcaacaagcatggggggtgttcatggaactccaaaacgatcacgcataa cagagatccaaaaggcggaacatgccgggtccaacagattgtgttagagaaaattcgtggttaa	30
ActAN100'-SSX2 アミノ酸配列 (配列番号31)	
(BamHI リンカー (gs) = 下線部; SSX2 = 太字)	
MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEYETAREVSSRDIE ELEKSNKVKNNTNKADQDNKRKAKAEKGGSNGDDAFARRPTVGAQIPEKIQKAFDD IAKYFSKEEWEKMKASEKIFYVYMKRKYEAMTKLGFKATLPPFMCNKRAEDFQ GNDLDNDPNRGNQVERPQMTFGRLQGISPKIMPKKPAEEGNDSEEVPEASGPQN DGKELCPPGKPTTSEKIHRSNGNREAQEKEERRGTAHRWSSQNTNIGRFSLS MGAVHGTPTKTITHNRDPKGGNMPGPTDCVRENSW	40
actAp-ActAN100-PAP ₃₀₋₃₈₆ -SL8 スクレオチド配列 (配列番号32)	
(actAp = 小文字斜体, ActAN100 = 大文字; PAP ₃₀₋₃₈₆ = 太字)	
gggaagcagttgggggttaactgattaacaaatgtagagaaaaattaattctccaagtgatattcttaaaataattcatgaatatttttct ttatattagctaattaagaagataaactgctaataatcttaacggaataaattagtgaaaaatgaaggccgaattttccttgttcta aaaaggttgatttagcgtatcacgaggaggagtagtaaaGTGGGATTAAATAGATTTATGCGTGCGATGA TGGTAGTTTTCTATTACTGCCAACTGCATTACGATTAAACCCCGACATAATATTTGCA	

【表 1 4】

GCGACAGATAGCGAAGATTCCAGTCTAAACACAGATGAATGGGAAGAAGAAAA ACAGAAGAGCAGCCAAGCGAGGTAAATACGGGACCAAGATACGAAACTGCACGT GAAGTAAGTTCACGTGATATTGAGGAACTAGAAAAATCGAATAAAGTGAAAAAT ACGAACAAAGCAGACCTAATAGCAATGTTGAAAGCAAAAGCAGAGAAAGGT^{ggatc} ^cGTATTGGCAAAAGAACTAAAGTTTGTAAACGTTAGTCTTTAGACATGGTGATC GTAGTCCTATTGATACCTTTCTACAGATCCAATCAAAGAGAGTAGTTGGCCA CAAGGCTTCGGACAACCTTACACAATTAGGAATGGAACAACATTATGAATTAG GTGAATACATTTCGCAAACGTTATCGCAAATTCCTTAATGAATCGTACAAACAC GAACAAGTGTATATCCGTTCCACTGACGTTGATAGAACACTAATGTCAGCTAT GACAAATCTAGCTGCATTAGTGCCACCAGAAGGCGTTAGCATTGGAATCCT ATCTTACTTTGGCAGCCAATACCTGTACATACGGTTCGTTATCTGAAGATCA ATTACTTTATCTTCCATTTTCGCAACTGCCACGATTCCAAGAATTAGAATCCG AAACATTGAAAAGCGAAGAATTTTCAGAAAAGATTACATCCATACAAAGACTTT ATCGCAACCTTAGGCAAATTGTCAGGGTTACACGGACAGGATCTATTTGGAA TTTGGTCGAAAGTTTATGATCCTTTGTACTGTGAATCTGTACATAACTTTACA TTACCTAGTCGCGCCACGGAAGATACTATGACGAAACTACGTGAACTTTCCG AACTTTCTTTACTATCGTTGTATGGTATTCATAAAACAAAAAGAAAAGAGCAGA TTGCAAGGTGGTGTTTTAGTAAATGAAATCTTAAACCATATGAAAAGAGCTAC ACAAATTCGCTCTTACAAGAAATTGATTATGTATAGTGCTCATGATACGACAG TATCTGGGCTTCAAATGGCGTTAGATGTCTATAACGGCTTACTTCCACCGTAT GCGTCATGTCACCTTACGGAACCTTACTTTGAGAAAGGTGAGTACTTTGTTGA GATGTACTATCGCAATGAAACCCAACATGAACCATATCCGTTGATGTTACCAG GTTGTAGTCCATCTTGCCCGTTAGAACGATTTGCGGAATTAGTGGGTCCAGT GATACCACAAGACTGGTCTACTGAGTGTATGACTACTAATAGCCACCAAGGG ACTGAAGATTCAACAGAT^{tactagtcaattgggtgacggtagattaaacttagcaaagtattacaattagaaagtattatt} aattttgaaaaattagctgatggttcagttaaataa	10
ActAN100-PAP₃₀₋₃₈₆-SL8 アミノ酸配列 (配列番号33) (PAP₃₀₋₃₈₆ = 太字)	20
MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEKTEEQPSEVNTGP RYETAREVSSRDIEELEKSNKVKNTNKADLIAMLKAKAEKGGS^VLAKELKFVTLVF RHGDRSPIDTFPTDPIKESSWPQGFQQLTQLGMEQHYELGEYIRKRYRKFLNESY KHEQVYIRSTVDVDRTLMSAMTNLAALVPPEGVSIWNPILLWQPIPVHTVPLSEDQ LLYLPRNCPRFQELESETLKSEEFQKRLHPYKDFIATLGKLSGLHGQDLFGIWS KVYDPLYCESVHNFTLPSRATEDTMTKLRELSELSLLSLYGIHKQKEKSRLQGGV LVNEILNHMKRATQIPSYKKLIMYSAHDTTVSGLQMALDVYNGLLPPYASCHLT ELYFEKGEYFVEMYRNETQHEPYPLMLPGCSPSCPLERFAELVGPVIPQDWSTE CMTTNSHQGTEDSTDTSQLGDGSIKLSKVLQLESINFEKLADGSVK	30
actAp-ActAN100'-EGFRvIIIxI-PAP₃₁₋₃₈₆ スクレオチド配列 (配列番号34) gggaagcagttggggttaactgattaacaaatgtagagaaaaattaatttccaagtgatattcttaaaataattcatgaatatttttcttatat tagctaattaagaagataaactgtaaatccaatttttaacggaataaattagtgaaaatgaaggccgaattttccttggtctaaaaagggtg tattagcgtatcacgaggaggaggtataaGTGGGATTAAATAGATTTATGCGTGCGATGATGGTAGT TTTCATTACTGCCAACTGCATTACGATTAACCCCGACATAATATTTGCAGCGACAG ATAGCGAAGATTCCAGTCTAAACACAGATGAATGGGAAGAAGAATACGAAACTG CACGTGAAGTAAGTTCACGTGATATTGAGGAACTAGAAAAATCGAATAAAGTGAA AAATACGAACAAAGCAGACCAAGATAATAAACGTAAAGCAAAAGCAGAGAAAG GT^{ggatct}GCAAGCAAAGTATTGCCAGCTAGTCGTGCATTAGAGGAGAAAAAGGGGAATTA CGTGGTGACGGATCATGGATCGTGTGCCGATGGCTCAGTAAAG^{ggatcc}AAAGAACTAA AGTTTGTAACGTTAGTCTTTAGACATGGTGATCGTAGTCCTATTGATACCTTT	40

【表 15】

CCTACAGATCCAATCAAAGAGAGTAGTTGGCCACAAGGCTTCGGACAACCTTA CACAATTAGGAATGGAACAACATTATGAATTAGGTGAATACATTTCGCAAACG TTATCGCAAATTCCTTAATGAATCGTACAAACACGAACAAGTGTATATCCGTT CCACTGACGTTGATAGAACACTAATGTCAGCTATGACAAATCTAGCTGCATTA GTGCCACCAGAAGGCGTTAGCATTGGAATCCTATCTTACTTTGGCAGCCAA TACCTGTACATACGGTTCCGTTATCTGAAGATCAATTACTTTATCTTCCATTT CGCAACTGCCCACGATTCCAAGAATTAGAATCCGAAACATTGAAAAGCGAAG AATTCAGAAAAGATTACATCCATACAAAGACTTTATCGCAACCTTAGGCAAA TTGTCAGGGTTACACGGACAGGATCTATTTGGAATTTGGTTCGAAAGTTTATG ATCCTTTGTACTGTGAATCTGTACATAACTTTACATTACCTAGTCGCGCCACG GAAGATACTATGACGAAACTACGTGAACCTTCCGAACTTTCTTTACTATCGTT GTATGGTATTCATAAACAAGAAAGAGAGCAGATTGCAAGGTGGTGTTTTA GTAATGAAATCTTAAACCATATGAAAAGAGCTACACAAATTCGCTCTTACAA GAAATTGATTATGTATAGTGCTCATGATACGACAGTATCTGGGCTTCAAATGG CGTTAGATGTCTATAACGGCTTACTTCCACCGTATGCGTCATGTCACCTTACG GAACCTTACTTTGAGAAAGGTGAGTACTTTGTTGAGATGTACTATCGCAATGA AACCAACATGAACCATATCCGTTGATGTTACCAGGTTGTAGTCCATCTTGCC CGTTAGAACGATTTGCGGAATTAGTGGGTCCAGTGATACCACAAGACTGGTC TACTGAGTGTATGACTACTAATAGCCACCAAGGGACTGAAGATTCAACAGATt aa	10
ActAN100³³⁻³⁸⁶-EGFRvIIIx1-PAP アミノ酸配列 (配列番号35)	20
MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEYETAREVSSRDIE ELEKSNKVKNNTKADQDNKRKAKAEKGG³³⁻³⁸⁶ASKVLPASRALEEKKGNYVVT³³⁻³⁸⁶DHGSCAD GSVK³³⁻³⁸⁶GSKELKFVTLVFRHGD³³⁻³⁸⁶RSPIDTFPTDPIKESSWPQGFQ³³⁻³⁸⁶LTLQ³³⁻³⁸⁶LGMEQH³³⁻³⁸⁶YEL GEYIRKRYRKFLNESYKHEQVYIRSTD³³⁻³⁸⁶VDRTLMSAMTNLAALVPPEGVSIWN³³⁻³⁸⁶PIL LWQPIPVHTVPLSEDQLLYLPFRNCPRFQELESETLKSEEFQKRLHPYKDFIATLG KLSGLHGQDLFGIWSKVYDPLYCESVHNFTLPSRATEDTMTKLRELSELSLLSLY GIHKQKEKSRLQGGVLVNEILNHMKRATQIPSYKKLIMYSAHDTTVSGLQMALD VYNGLLPYASCHLTELYFEKGEYFVEMYRNETQHEPYPLMLPGCSPSCPLERF AELVGPVIPQDWSTECMTTNSHQGTEDSTD	30
actAp-ActAN100³³⁻³⁸⁶-EGFRvIIIx2-PAP スクレオチド配列 (配列番号36)	40
gggaagcagttggggttaactgattaacaaatgtagagaaaaattaattctccaagtatattctaaaataattcatgaatatttttcttatat tagctaattaagaagataattaactgctaataccaattttaacggaataaattagtgaaaatgaaggccgaattttcttgtctaaaaagggtg tattagcgtatcacgaggaggaggtataaGTGGGATTAAATAGATTTATGCGTGCGATGATGGTAGT TTTCATTACTGCCAACTGCATTACGATTAACCCCGACATAATATTTGCAGCGACAG ATAGCGAAGATTCCAGTCTAAACACAGATGAATGGGAAGAAGAATACGAAACTG CACGTGAAGTAAGTTCACGTGATATTGAGGAACTAGAAAAATCGAATAAAGTGAA AAATACGAACAAAGCAGACCAAGATAATAAACGTAAAGCAAAAGCAGAGAAAG GTGGATCTGCAAGCAAAGTATTGCCAGCTAGTCGTGCATTAGAGGAGAAAAAGGGGAA TTACGTGGTGACGGATCATGGATCGTGTGCCGATGGCTCAGTAAAGACTAGCGCGAGC AAAGTGGCCCCCTGCATCACGAGCACTTGAAGAGAAAAAAGGAAACTATGTTGTGACCGA TCATGGTAGCTGCGGAGATGGTTCAAAGGATCCAAAGAACTAAAGTTTGTAAACGT TAGTCTTTAGACATGGTGATCGTAGTCCTATTGATACCTTTCCTACAGATCCA ATCAAAGAGAGTAGTTGGCCACAAGGCTTCGGACAACCTTACACAATTAGGAA TGGAACAACATTATGAATTAGGTGAATACATTTCGCAAACGTTATCGCAAATTC CTTAATGAATCGTACAAACACGAACAAGTGTATATCCGTTCCACTGACGTTGA TAGAACACTAATGTCAGCTATGACAAATCTAGCTGCATTAGTGCCACCAGAA GGCGTTAGCATTGGAATCCTATCTTACTTTGGCAGCCAATACCTGTACATAC GGTTCGTTATCTGAAGATCAATTACTTTATCTTCCATTTTCGCAACTGCCCAC	50

【表 16】

GATTCCAAGAATTAGAATCCGAAACATTGAAAAGCGAAGAATTTTCAGAAAAG ATTACATCCATACAAAGACTTTATCGCAACCTTAGGCAAATTTGTCAGGGTTAC ACGGACAGGATCTATTTGGAATTTGGTTCGAAAGTTTATGATCCTTTGTACTGT GAATCTGTACATAACTTTACATTACCTAGTCGCGCCACGGAAGATACTATGAC GAACTACGTGAACTTTCCGAACTTTCTTTACTATCGTTGTATGGTATTTCATA AACAAAAAGAAAAGAGCAGATTGCAAGGTGGTGTTTTAGTAAATGAAATCTT AAACCATATGAAAAGAGCTACACAAATTCCGTCTTACAAGAAATTGATTATGT ATAGTGCTCATGATACGACAGTATCTGGGCTTCAAATGGCGTTAGATGTCTAT AACGGCTTACTTCCACCGTATGCGTCATGTCACCTTACGGAACCTTACTTTGA GAAAGGTGAGTACTTTGTTGAGATGTACTATCGCAATGAAACCCAACATGAA CCATATCCGTTGATGTTACCAGGTTGTAGTCCATCTTGCCCGTTAGAACGATT TGCGGAATTAGTGGGTCCAGTGATACCACAAGACTGGTCTACTGAGTGTATG ACTACTAATAGCCACCAAGGGACTGAAGATTCAACAGATTAA	10
ActAN100'-EGFRvIIIx2-PAP ₃₃₋₃₈₆ アミノ酸配列 (配列番号37)	
MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEYETAREVSSRDIE ELEKSNKVKNTNKADQDNKRKAKAEKGG ³⁵ ASKVLPASRALEEKKGNYVVTDHGSCAD GSVKTSASKVAPASRALEEKKGNYVVTDHGSCGDGSKG ³⁶ SKELKFVTLVFRHGDRSPIDT FPTDPIKESSWPQGFQQLTQLGMEQHYELGEYIRKRYRKFLNESYKHEQVYIRST DVDRTLMSAMTNLAALVPPEGVSIWNPIILLWQPIPVHTVPLSEDQLLYLPFRNCP RFQELESETLKSEEFQKRLHPYKDFIATLGKLSGLHGQDLFGIWSKVYDPLYCES VHNFTLPSRATEDTMTKLRELSELSLLSLYGIHKQKEKSRLQGGVLVNEILNHM KRATQIPSYKKLIMYSAHDTTVSGLQMALDVYNGLLPPYASCHLTELYFEKGEY FVEMYRNETQHEPYPLMLPGCSPSCPLERFAELVGPVIPQDWSTECMTTNSHQ GTEDSTD	20
actAp-ActAN100'-EGFRvIIIx3-PAP ₃₃₋₃₈₆ スクレオチド配列 (配列番号38)	
gggaagcagttggggttaactgattaacaaatgtagagaaaaattaattctccaagtatattcttaaaataattcatgaatatttttcttatat tagctaattaagaagataattaactgctaataccaatttttaacggaataaattagtgaaaaatgaaggccgaattttctgttctaaaaaggttg tattagcgtatcacgaggaggaggtataaGTGGGATTAAATAGATTTATGCGTGCGATGATGGTAGT TTTCATTACTGCCAACTGCATTACGATTAACCCCGACATAATATTTGCAGCGACAG ATAGCGAAGATTCCAGTCTAAACACAGATGAATGGGAAGAAGAATACGAAACTG CACGTGAAGTAAGTTCACGTGATATTGAGGAACTAGAAAAATCGAATAAAGTGAA AAATACGAACAAAGCAGACCAAGATAATAAACGTAAAGCAAAAGCAGAGAAAG GT ³⁷ ggatctGCAAGCAAAGTATTGCCAGCTAGTCGTGCATTAGAGGAGAAAAAGGGGAATTA CGTGGTGACGGATCATGGATCGTGTGCCGATGGCTCAGTAAAGACTAGCGCGAGCAAA GTGGCCCCCTGCATCACGAGCACTTGAAGAGAAAAAAGGAAACTATGTTGTGACCGATCA TGGTAGCTGCGGAGATGGTTCAATTAAATTATCAAAAGTCTTACCAGCATCTAGAGCTTT AGAGGAAAAGAAGGGTAACTATGTCGTAACAGATCATGGAAGTTGTGCTGACGGAAGTG TT ³⁸ ggatccAAAGAACTAAAGTTTGTAAACGTTAGTCTTTAGACATGGTGATCGTAG TCCTATTGATACCTTTCCTACAGATCCAATCAAAGAGAGTAGTTGGCCACAAG GCTTCGGACAACTTACACAATTAGGAATGGAACAACATTATGAATTAGGTGA ATACATTGCAAAACGTTATCGCAAATTCCTTAATGAATCGTACAAACACGAAC AAGTGTATATCCGTTCCACTGACGTTGATAGAACACTAATGTCAGCTATGACA AATCTAGCTGCATTAGTGCCACCAGAAGGCGTTAGCATTGGAATCCTATCTT ACTTTGGCAGCCAATACCTGTACATACGGTTCCGTTATCTGAAGATCAATTAC TTTATCTTCCATTTTCGCAACTGCCCACGATTCCAAGAATTAGAATCCGAAACA TTGAAAAGCGAAGAATTTAGAAAAGATTACATCCATACAAAGACTTTATCGC AACCTTAGGCAAATTTGTCAGGGTTACACGGACAGGATCTATTTGGAATTTGG TCGAAAGTTTATGATCCTTTGTACTGTGAATCTGTACATAACTTTACATTACC TAGTCGCGCCACGGAAGATACTATGACGAAACTACGTGAACTTTCCGAACTT	30
	40

【表 17】

TCTTTACTATCGTTGTATGGTATTCATAAACAAAAAGAAAAGAGCAGATTGCA AGGTGGTGTTTTAGTAAATGAAATCTTAAACCATATGAAAAGAGCTACACAAA TTCCGTCTTACAAGAAATTGATTATGTATAGTGCTCATGATACGACAGTATCT GGGCTTCAAATGGCGTTAGATGTCTATAACGGCTTACTTCCACCGTATGCGT CATGTCACCTTACGGAACCTTTACTTTGAGAAAGGTGAGTACTTTGTTGAGATG TACTATCGCAATGAAACCCAACATGAACCATATCCGTTGATGTTACCAGGTTG TAGTCCATCTTGCCCGTTAGAACGATTTGCGGAATTAGTGGGTCCAGTGATA CCACAAGACTGGTCTACTGAGTGTATGACTACTAATAGCCACCAAGGGACTG AAGATTCAACAGAT _{taa}	
ActAN100 ⁺ -EGFRvIIIx3-PAP ₃₃₋₃₈₆ アミノ酸配列 (配列番号39)	
MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEYETAREVSSRDIE ELEKSNKVKNNTNKADQDNKRKAKAEKGSASKVLPASRALEEKKGNYVVTDHGSCAD GSVKTSASKVAPASRALEEKKGNYVVTDHGSCGDGSIKLSKVLPASRALEEKKGNYVVTDH GSCADGSVGS ³³ KELKFVTLVFRHGDRSPIDTFPTDPIKESSWPQGFQQLTQLGMEQ HYELGEYIRKRYRKFLNESYKHEQVYIRSTDVDRTLMSAMTNLAALVPPEGVSI WNPILLWQPIPVHTVPLSEDQLLYLPFRNCPRFQELESETLKSEEFQKRLHPYKD FIATLGKLSGLHGQDLFGIWSKVYDPLYCESVHNFTLPSRATEDMTKLRELSL SLLSLYGIHKQKEKSRLQGGVLVNEILNHMKRATQIPSYKKLIMYSAHDTTVSGL QMALDVYNGLLPPYASCHLTelyFEKGEYFVEMYRNETQHEPYPLMLPGCSPS CPLERFAELVGPVIPQDWSTECMTTNSHQGTEDSTD	
actAp-ActAN100 ⁺ -EGFRvIIIx4-PAP ₃₃₋₃₈₆ スクレオチド配列 (配列番号40)	
gggaagcagttgggggtaactgattaacaaatgtagagaaaaattaattctccaagtgatattcttaaaataattcatgaatatttttcttatat tagctaattaagaagataattaactgctaatacgaataaattagtgaaaatgaaggccgaattttcttgttctaaaaaggttg tattagcgtatcacgaggaggagataaGTGGGATTAAATAGATTTATGCGTGCGATGATGGTAGT TTTCATTACTGCCAACTGCATTACGATTAACCCCGACATAATATTTGCAGCGACAG ATAGCGAAGATTCCAGTCTAAACACAGATGAATGGGAAGAAGAATACGAAACTG CACGTGAAGTAAGTTCACGTGATATTGAGGAAGTAGAAAAATCGAATAAAGTGAA AAATACGAACAAAGCAGACCAAGATAATAAACGTAAAGCAAAAGCAGAGAAAG GTGGATCTGCAAGCAAAGTATTGCCAGCTAGTCGTGCATTAGAGGAGAAAAAGGGGAA TTACGTGGTGACGGATCATGGATCGTGTGCCGATGGCTCAGTAAAGACTAGCGCGAGC AAAGTGGCCCCCTGCATCACGAGCACTTGAAGAGAAAAAAGGAAACTATGTTGTGACCGA TCATGGTAGCTGCGGAGATGGTTCAATTAATTAATCAAAAAGTCTTACCAGCATCTAGAGC TTTAGAGGAAAAAGAGGGTAAGTATGTCTGTAACAGATCATGGAAGTTGTGCTGACGGAA GTGTTAAAGCGTCGAAAGTAGCTCCAGCTTCTCGCGCATTAGAAGAAAAAGAAAGGCAAT TATGTTGTAAACAGACCATGGTAGTTGTGGTGATGGCTCGAAAGGATCCAAAGAAGTAA AGTTTGTAACGTTAGTCTTTAGACATGGTGATCGTAGTCCTATTGATACCTTT CCTACAGATCCAATCAAAGAGAGTAGTTGGCCACAAGGCTTCGGACAACCTTA CACAATTAGGAATGGAACAACATTATGAATTAGGTGAATACATTTCGCAAACG TTATCGCAAATTCCTTAATGAATCGTACAAACACGAACAAGTGTATATCCGTT CCACTGACGTTGATAGAACACTAATGTCAGCTATGACAAATCTAGCTGCATTA GTGCCACCAGAAGGCGTTAGCATTTGGAATCCTATCTTACTTTGGCAGCCAA TACCTGTACATACGGTTCCGTTATCTGAAGATCAATTACTTTATCTTCCATTT CGCAACTGCCCACGATTCCAAGAATTAGAATCCGAAACATTGAAAAGCGAAG AATTTTCAGAAAAGATTACATCCATACAAAGACTTTATCGCAACCTTAGGCAAA TTGTCAGGGTTACACGGACAGGATCTATTTGGAATTTGGTCGAAAGTTTATG ATCCTTTGTACTGTGAATCTGTACATAACTTTACATTACCTAGTCGCGCCACG GAAGATACTATGACGAAACTACGTGAACCTTTCCGAACCTTTCTTTACTATCGTT GTATGGTATTCATAAACAAAAAGAAAAGAGCAGATTGCAAGGTGGTGTTTTA GTAAATGAAATCTTAAACCATATGAAAAGAGCTACACAAATTCGCTCTTACAA	

【表 18】

GAAATTGATTATGTATAGTGCTCATGATACGACAGTATCTGGGCTTCAAATGG CGTTAGATGTCTATAACGGCTTACTTCCACCGTATGCGTCATGTCACCTTACG GAACTTTACTTTGAGAAAGGTGAGTACTTTGTTGAGATGTACTATCGCAATGA AACCCAACATGAACCATATCCGTTGATGTTACCAGGTTGTAGTCCATCTTGCC CGTTAGAACGATTTGCGGAATTAGTGGGTCCAGTGATACCACAAGACTGGTC TACTGAGTGTATGACTACTAATAGCCACCAAGGGACTGAAGATTCAACAGAT TAA	
ActAN100 ⁺ -EGFRvIIIx4-PAP ₃₄₋₃₈₆	アミノ酸配列 (配列番号41)
MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEYETAREVSSRDIE ELEKSNKVKNTNKADQDNKRKAKAEKGSASKVLPASRALEEKKGNYVVTDHGSCAD GSVKTSASKVAPASRALEEKKGNYVVTDHGSCGDGSIKLSKVLPASRALEEKKGNYVVTDH GSCADGSVKASKVAPASRALEEKKGNYVVTDHGSCGDGSKGSKELKFVTLVFRHGD RSPIDTFPTDPIKESSWPQGFQQLTQLGMEQHYELGEYIRKRYRKFLNESYKHEQVY IRSTDVEDRTLMSAMTNLAALVPPEGVSIWNPIILLWQPIPVHTVPLSEDQLLYLPFR NCPRFQELESETLKSEEFQKRLHPYKDFIATLGKLSGLHGQDLFGIWSKVYDPLY CESVHNFTLPSRATEDTMTKLRELSELSLLSLYGIHKQKEKSRLQGGVLVNEILN HMKRATQIPSYKKLIMYSAHDTTVSGLQMALDVYNGLLPPYASCHLTelyFEKG EYFVEMYRNETQHEPYPLMLPGCSPSCPLERFAELVGPVIPQDWSTECMTTNS HQGTEDSTD	
EGFRvIII スクレオチド配列 1 (配列番号42)	
CCAGCTAGTCGTGCATTAGAGGAGAAAAAGGGGAATTACGTGGTGACGGATCATG GATCGTGT	
EGFRvIII スクレオチド配列 2 (配列番号43)	
CCTGCATCACGAGCACTTGAAGAGAAAAAGGAACTATGTTGTGACCGATCATG GTAGCTGC	
EGFRvIII スクレオチド配列 3 (配列番号44)	
CCAGCATCTAGAGCTTTAGAGGAAAAAGAAGGGTAACATATGTCGTAACAGATCATG GAAGTTGT	
EGFRvIII スクレオチド配列 4 (配列番号45)	
CCAGCTTCTCGCGCATTAGAAGAAAAAGAAAGGCAATTATGTTGTAACAGACCATG GTAGTTGT	
EGFRvIII スクレオチド配列 5 (配列番号46)	
CCGGCTTCTCGTGCGCTAGAAGAGAAGAAAGGAAATTACGTAGTTACAGACCACG GCTCTTGC	
hly プロモータスクレオチド配列 (配列番号47)	
tcctttgattagtatattcctatcttaaagttacttttatgtggaggcattaacatttgtaatgacgtcaaaaggatagcaagactagaataaag ctataaagcaagcatataatattgcgtttcatcttagaagcgaatttcgccaattataattatcaaaagagaggggtggcaaacggtattt ggcattattaggttaaaaaatgtagaaggagagtgaaccc	
LLO441 スクレオチド配列 (配列番号48)	
ATGAAAAAATAATGCTAGTTTTATTACACTTATATTAGTTAGTCTACCAATTGC GCAACAACTGAAGCAAAGGATGCATCTGCATTCAATAAAGAAAATTCAATTTCA TCCATGGCACCACCAGCATCTCCGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCAATCGAAAAGA AACACGCGGATGAAATCGATAAGTATATACAAGGATTGGATTACAATAAAAAACA ATGTATTAGTATACCACGGAGATGCAGTGACAAATGTGCCGCCAAGAAAAGGTTA CAAAGATGGAAATGAATATATTGTTGTGGAGAAAAAGAAGAAATCCATCAATCA AAATAATGCAGACATTCAAGTTGTGAATGCAATTTTCGAGCCTAACCTATCCAGGT	

10

20

30

40

10

20

30

40

50

ATGAAAAAATAATGCTAGTTTTTTATTACACTTATATTAGTTAGTCTACCAATTGC
GCAACAACTGAAGCAAAGGATGCATCTGCATTCAATACGCCAATCGAAAAGAA
ACACGCGGATGAAATCGATAAGTATATACAAGGATTGGATTACAATAAAAACAAT
GTATTAGTATACCACGGAGATGCAGTGACAAATGTGCCGCCAAGAAAAGGTTACA
AAGATGGAAATGAATATATTGTTGTGGAGAAAAAGAAGAAATCCATCAATCAA
ATAATGCAGACATTCAAGTTGTGAATGCAATTCGAGCCTAACCTATCCAGGTGCT
CTCGTAAAAGCGAATTCGGAATTAGTAGAAAATCAACCAGATGTTCTCCCTGTAA
AACGTGATTCATTAACACTCAGCATTGATTTGCCAGGTATGACTAATCAAGACAAT
AAAATAGTTGTAAAAAATGCCACTAAATCAAACGTTAACAACGCAGTAAATACAT
TAGTGGAAGATGGAATGAAAAATATGCTCAAGCTTATCCAAATGTAAGTGCAA
AATTGATTATGATGACGAAATGGCTTACAGTGAATCACAATTAATTGCGAAATTT
GGTACAGCATTTAAAGCTGTAAATAATAGCTTGAATGTAAACTTCGGCGCAATCA
GTGAAGGGAAAATGCAAGAAGAAGTCATTAGTTTTTAAACAAATTTACTATAACGT
GAATGTTAATGAACCTACAAGACCTTCCAGATTTTTTCGGCAAAGCTGTTACTAAAG
AGCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAATGCAGAAAATCCTCCTGCATATATCTCAAG
TGTGGCGTATGGCCGTCAAGTTTTATTTGAAATTATCAACTAATTCCCATAGTACTA
AAGTAAAAGCTGCTTTTTGATGCTGCCGTAAGCGGAAAATCTGTCTCAGGTGATGT
AGAACTAACAAATATCATCAAAAATTCTTCCTTCAAAGCCGTAATTTACGGAGGTT

10

20

30

40

【表 2 1】

ActANI100 スクレオチド配列 (配列番号59)
GTGGGATTAAATAGATTTATGCGTGCGATGATGGTAGTTTTTCATTACTGCCAACTG CATTACGATTAACCCCGACATAATATTTGCAGCGACAGATAGCGAAGATTCCAGT CTAAACACAGATGAATGGGAAGAAGAAAAACAGAAGAGCAGCCAAGCGAGGT AAATACGGGACCAAGATACGAACTGCACGTGAAGTAAGTTCACGTGATATTGAG GAACTAGAAAAATCGAATAAAGTGAAAAATACGAACAAAGCAGACCTAATAGCA ATGTTGAAAGCAAAAGCAGAGAAAGGT
ActANI100 アミノ酸配列 (配列番号60)
MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEETEEQPSEVNTGP RYETAREVSSRDIEELEKSNKVKNTNKADLIAMLKAKAEKG

10

【0347】

一部の実施形態では、本発明は、上皮増殖因子受容体変異型 I I I (E G F R v I I I) ポリペプチドと、滑膜肉腫、Xブレークポイント 2 (S S X 2) ポリペプチドとを含む融合タンパク質に関する。一部の実施形態では、前記 E G F R v I I I ポリペプチドは、配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、前記融合タンパク質は、複数の E G F R v I I I ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、前記融合タンパク質は、E G F R v I I I ポリペプチドの 5 つのコピーを含む。いくつかの実施形態では、前記 E G F R v I I I ポリペプチドは、1 つ又は複数の切断配列によってフランキングされている。いくつかの実施形態では、E G F R v I I I ポリペプチドは、S S X 2 ポリペプチドの N 末端と融合されている。いくつかの実施形態では、S S X 2 ポリペプチドは、配列番号 10 に示される S S X 2 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む。

20

【0348】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリペプチド、及び配列番号 10 に示される S S X 2 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む S S X 2 ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 4 のアミノ酸残基 89~475 に示される E G F R v I I I x 5 - S S X 2 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む。

30

【0349】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、シグナル配列を含み、シグナル配列は、E G F R v I I I ポリペプチド及び S S X 2 ポリペプチドと共に翻訳リーディングフレーム内にある。いくつかの実施形態では、シグナル配列は、配列番号 2 として示される A c t A N 100 * と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一である。

40

【0350】

いくつかの実施形態では、前記融合タンパク質は細菌に発現される。一実施形態では、細菌は、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) である。

【0351】

様々な実施形態では、本発明はまた、前述の実施形態のいずれかの融合タンパク質をコードする核酸分子も提供する。

【0352】

いくつかの実施形態では、前記核酸分子は、配列番号 5 に示される E G F R v I I I ポリヌクレオチドと少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、

50

又は i v) 100% 同一である 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリヌクレオチド、及び配列番号 9 に示される S S X 2 ポリヌクレオチドと少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるポリヌクレオチドを含む。

【0353】

一部の実施形態では、核酸分子は、プロモータ、シグナル配列、又はその両方をさらに含んでもよく、プロモータ、シグナル配列、又はその両方は、E G F R v I I I ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、及び S S X 2 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、プロモータは、配列番号 21 に示される a c t A プロモータと少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一である。様々な実施形態において、シグナル配列は、配列番号 1 に示される A c t A N 100* と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一である。一部の実施形態では、核酸分子は発現カセットの一部である。

【0354】

一部の実施形態では、本発明は、前述の実施形態のいずれかの核酸分子を含むベクターを提供する。

【0355】

一部の実施形態では、本発明は、前述の実施形態のいずれかの核酸分子を含む宿主細胞も提供する。いくつかの実施形態では、前記宿主細胞は細菌である。一実施形態では、細菌は、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) である。一部の実施形態では、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) は、a c t A 欠失突然変異体、a c t A 挿入突然変異体、i n l B 欠失突然変異体、i n l B 挿入突然変異体、又はこれらの組合せである。一実施形態では、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) は、 Δ a c t A / Δ i n l B 突然変異体である。いくつかの実施形態では、核酸分子は、宿主細胞ゲノムに組み込まれる。いくつかの実施形態では、核酸分子は、a c t A 遺伝子座、i n l B 遺伝子座又は t R N A ^{A r g} 遺伝子座に組み込まれる。

【0356】

様々な実施形態において、前述の実施形態のいずれかの宿主細胞は、薬学的に許容される賦形剤と組み合わせられる。

【0357】

一部の実施形態では、本発明は、前述の実施形態のいずれかの宿主細胞と、薬学的に許容される賦形剤とを含むワクチンを提供する。

【0358】

いくつかの実施形態では、本発明は、E G F R v I I I ポリペプチドと、前立腺酸性ホスファターゼ (P A P) ポリペプチドとを含む融合タンパク質を提供する。一部の実施形態では、前記 E G F R v I I I ポリペプチドは、配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、前記融合タンパク質は、複数の E G F R v I I I ポリペプチドを含む。一実施形態では、前記融合タンパク質は、E G F R v I I I ポリペプチドの 5 つのコピーを含む。

【0359】

いくつかの実施形態では、前記 E G F R v I I I ポリペプチドは、1 つ又は複数の切断配列によってフランキングされている。一部の実施形態では、E G F R v I I I ポリペプチドは、P A P ポリペプチドの N 末端と融合されている。

【0360】

一部の実施形態では、P A P ポリペプチドは、配列番号 14 に示される P A P _{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列

10

20

30

40

50

番号 12 のアミノ酸残基 89～606 に示される EGFR_v IIII_{x5}-PAP_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む。

【0361】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の EGFR_v IIII ポリペプチド、及び配列番号 14 に示される PAP_{33~386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む PAP ポリペプチドを含む。

【0362】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、シグナル配列を含み、シグナル配列は、EGFR_v IIII ポリペプチド及び PAP ポリペプチドと共に翻訳リーディングフレーム内にある。いくつかの実施形態では、シグナル配列は、配列番号 2 に示される ActAN100* と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一である。

【0363】

様々な実施形態では、融合タンパク質は細菌に発現される。一部の実施形態では、細菌は、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) である。

【0364】

いくつかの実施形態では、本発明は、前述の実施形態のいずれかの融合タンパク質をコードする核酸分子を提供する。一部の実施形態では、前記核酸分子は、配列番号 5 に示される EGFR_v IIII ポリヌクレオチドと少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一である 1 つ又は複数の EGFR_v IIII ポリヌクレオチド、及び配列番号 13 に示される PAP_{33~386} ポリヌクレオチドと少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一であるポリヌクレオチドを含む。

【0365】

一部の実施形態では、核酸は、プロモータ、シグナル配列、又はその両方をさらに含んでもよく、プロモータ、シグナル配列、又はその両方は、EGFR_v IIII ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、及び PAP ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と共に翻訳フレーム内にある。いくつかの実施形態では、プロモータは、配列番号 21 に示される actA プロモータと少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一である。一部の実施形態において、シグナル配列は、配列番号 1 に示される ActAN100* と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一である。

【0366】

一実施形態では、前記核酸分子は発現カセットの一部である。

【0367】

いくつかの実施形態では、本発明は、前述の実施形態のいずれかの核酸分子を含むベクターを提供する。

【0368】

一部の実施形態では、本発明は、前述の実施形態のいずれかの核酸分子を含む宿主細胞も提供する。いくつかの実施形態では、前記宿主細胞は細菌である。一実施形態では、細菌は、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) である。様々な実施形態では、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) は、actA 欠失突然変異体、actA 挿入突然変異体、inlB 欠失突然変異体、inlB 挿入突然変異体、又はこれらの組合せである。一実施形態では、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) は、ΔactA/ΔinlB 突然変異体である。

10

20

30

40

50

【0369】

一部の実施形態では、核酸分子は、宿主細胞ゲノムに組み込まれる。いくつかの実施形態では、核酸分子は、a c t A遺伝子座、i n l B遺伝子座又はt R N A^{A r g}遺伝子座に組み込まれる。

【0370】

いくつかの実施形態において、宿主細胞は、薬学的に許容される賦形剤と組み合わせられる。

【0371】

一部の実施形態では、本発明は、前述の実施形態のいずれかの宿主細胞と、薬学的に許容される賦形剤とを含むワクチンを提供する。

10

【0372】

いくつかの実施形態では、本発明は、E G F R v I I Iポリペプチド、N K 3ホメオボックス1 (N K X 3. 1)ポリペプチド、及び前立腺特異的膜抗原 (P S M A)ポリペプチドを含む融合タンパク質を提供する。一部の実施形態では、前記E G F R v I I Iポリペプチドは、配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、融合タンパク質は、複数のE G F R v I I Iポリペプチドを含む。一実施形態では、融合タンパク質は、E G F R v I I Iポリペプチドの5つのコピーを含む。

【0373】

一部の実施形態では、前記E G F R v I I Iポリペプチドは、1つ又は複数の切断配列によってフランキングされている。

20

【0374】

いくつかの実施形態では、E G F R v I I Iポリペプチドは、N K X 3. 1ポリペプチドのN末端と融合されており、N K X 3. 1ポリペプチドは、P S M AポリペプチドのN末端と融合されている。

【0375】

一部の実施形態では、P S M Aポリペプチドは、配列番号20に示されるP S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む。

【0376】

いくつかの実施形態では、N K X 3. 1ポリペプチドは、配列番号25に示されるN K X 3. 1_{11 ~ 234}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む。

30

【0377】

いくつかの実施形態では、N K X 3. 1ポリペプチドは、配列番号18に示されるN K X 3. 1_{11 ~ 234} (R 41 G)と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む。

【0378】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号6と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のE G F R v I I Iポリペプチド、配列番号25に示されるN K X 3. 1_{11 ~ 234}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むN K X 3. 1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるP S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列を含むP S M Aポリペプチドを含む。

40

【0379】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号23のアミノ酸残基89~1177に示されるE G F R v I I I x 5-N K X 3. 1_{11 ~ 234}-P S M A_{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%

50

同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む。

【0380】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリペプチド、配列番号 18 に示される N K X 3. 1 (R 4 1 G) _{1 1 ~ 2 3 4} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む N K X 3. 1 ポリペプチド、及び配列番号 20 に示される P S M A _{1 ~ 2 0, 4 4 ~ 1 3 8, 1 6 9 ~ 7 5 0} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P S M A ポリペプチドを含む。

10

【0381】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 16 のアミノ酸残基 89 ~ 1177 に示される E G F R v I I I x 5 - N K X 3. 1 (R 4 1 G) _{1 1 ~ 2 3 4} - P S M A _{1 ~ 2 0, 4 4 ~ 1 3 8, 1 6 9 ~ 7 5 0} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む。

【0382】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、シグナル配列を含み、シグナル配列は、E G F R v I I I ポリペプチド、N K X 3. 1 ポリペプチド、及び P S M A ポリペプチドと共に翻訳リーディングフレーム内にある。一部の実施形態では、シグナル配列は、配列番号 2 に示される A c t A N 100* と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一である。

20

【0383】

様々な実施形態において、融合タンパク質は細菌に発現される。一実施形態では、細菌は、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) である。

【0384】

一部の実施形態では、本発明は、前述の実施形態のいずれかの融合タンパク質をコードする核酸分子を提供する。いくつかの実施形態では、前記核酸分子は、配列番号 5 に示される E G F R v I I I ポリヌクレオチドと少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一である 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリヌクレオチド、配列番号 24 に示される N K X 3. 1 _{1 1 ~ 2 3 4} ポリヌクレオチドと少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号 19 に示される P S M A _{1 ~ 2 0, 4 4 ~ 1 3 8, 1 6 9 ~ 7 5 0} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるポリヌクレオチドを含む。

30

【0385】

一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号 5 に示される E G F R v I I I ポリヌクレオチドと少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一である 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリヌクレオチド、配列番号 17 に示される N K X 3. 1 (R 4 1 G) _{1 1 ~ 2 3 4} ポリヌクレオチドと少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号 19 に示される P S M A _{1 ~ 2 0, 4 4 ~ 1 3 8, 1 6 9 ~ 7 5 0} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるポリヌクレオチドを含む。

40

【0386】

一部の実施形態では、核酸は、プロモータ、シグナル配列、又はその両方をさらに含んでもよく、プロモータ、シグナル配列、又はその両方は、E G F R v I I I ポリペプチド、N K X 3. 1 ポリペプチド、及び P S M A ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と共に翻訳フレーム内にある。一部の実施形態では、プロモータは、配列番号 21 に示される a c t A プロモータと少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99

50

%同一、又は i v) 100%同一である。一部の実施形態において、シグナル配列は、配列番号 1 に示される A c t A N 100*と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又は i v) 100%同一である。

【0387】

一部の実施形態では、前述の実施形態のいずれかの核酸分子は発現カセットの一部である。

【0388】

一部の実施形態では、本発明は、前述の実施形態のいずれかの核酸分子を含むベクターを提供する。

【0389】

一部の実施形態では、本発明は、前述の実施形態のいずれかの核酸分子を含む宿主細胞を提供する。一部の実施形態では、宿主細胞は細菌である。一実施形態では、細菌は、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) である。一部の実施形態では、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) は、a c t A 欠失突然変異体、a c t A 挿入突然変異体、i n l B 欠失突然変異体、i n l B 挿入突然変異体、又はこれらの組合せである。一部の実施形態では、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) は、 Δ a c t A / Δ i n l B 突然変異体である。

【0390】

一部の実施形態では、核酸分子は、宿主細胞ゲノムに組み込まれる。一部の実施形態では、核酸分子は、a c t A 遺伝子座、i n l B 遺伝子座又は t R N A ^{A r g} 遺伝子座に組み込まれる。

【0391】

一部の実施形態では、前述の実施形態のいずれかの宿主細胞は、薬学的に許容される賦形剤と組み合わせられる。

【0392】

様々な実施形態において、本発明は、前述の実施形態のいずれかの宿主細胞及び薬学的に許容される賦形剤を含むワクチンを提供する。

【0393】

一部の実施形態では、本発明は、N K 3 ホメオボックス 1 (N K X 3. 1) ポリペプチドと、P A P ポリペプチドとを含む融合タンパク質を提供する。一部の実施形態では、N K X 3. 1 ポリペプチドは、配列番号 29 に示される N K X 3. 1 と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又は i v) 100%同一のアミノ酸配列を含む。

【0394】

一部の実施形態では、N K X 3. 1 ポリペプチドは、P A P ポリペプチドの N 末端と融合されている。

【0395】

一部の実施形態では、P A P ポリペプチドは、配列番号 14 に示される P A P _{33 ~ 386} と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又は i v) 100%同一のアミノ酸配列を含む。

【0396】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 27 のアミノ酸残基 89 ~ 678 に示される N K X 3. 1 - P A P _{33 ~ 386} と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又は i v) 100%同一のアミノ酸配列を含む。

【0397】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 29 に示される N K X 3. 1 と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又は i v) 100%同一のアミノ酸配列を含む N K X 3. 1 ポリペプチド、及び配列番号 14 に示される P A P _{33 ~ 386} と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又

10

20

30

40

50

は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P A P ポリペプチドを含む。

【0398】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、シグナル配列をさらに含み、シグナル配列は、N K X 3. 1 ポリペプチド及び P A P ポリペプチドと共に翻訳リーディングフレーム内にある。一部の実施形態では、シグナル配列は、配列番号 2 に示される A c t A N 1 0 0 * と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一である。

【0399】

一部の実施形態では、前記融合タンパク質は細菌に発現される。一実施形態では、細菌は、リステリア・モノサイトゲネス (*L i s t e r i a m o n o c y t o g e n e s*) である。

10

【0400】

一部の実施形態では、本発明は、前述の実施形態のいずれかの融合タンパク質をコードする核酸分子を提供する。一部の実施形態では、前記核酸分子は、配列番号 28 に示される N K X 3. 1 ポリヌクレオチドと少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるポリヌクレオチド、及び配列番号 13 に示される P A P_{33 ~ 386} ポリヌクレオチドと少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるポリヌクレオチドを含む。

【0401】

一部の実施形態では、核酸は、プロモータ、シグナル配列、又はその両方をさらに含み、プロモータ、シグナル配列、又はその両方は、N K X 3. 1 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、及び P A P ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と共に翻訳フレーム内にある。一部の実施形態では、プロモータは、配列番号 21 に示される a c t A プロモータと少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一である。一部の実施形態において、シグナル配列は、配列番号 1 に示される A c t A N 1 0 0 * と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一である。

20

【0402】

一部の実施形態では前記核酸分子は発現カセットの一部である。

【0403】

一部の実施形態では、本発明は、前述の実施形態のいずれかの核酸分子を含むベクターを提供する。

30

【0404】

一部の実施形態では、本発明は、前述のいずれかの核酸分子を含む宿主細胞を提供する。一実施形態では、前記宿主細胞は細菌である。一部の実施形態では、細菌は、リステリア・モノサイトゲネス (*L i s t e r i a m o n o c y t o g e n e s*) である。一部の実施形態では、リステリア・モノサイトゲネス (*L i s t e r i a m o n o c y t o g e n e s*) は、a c t A 欠失突然変異体、a c t A 挿入突然変異体、i n l B 欠失突然変異体、i n l B 挿入突然変異体、又はこれらの組合せである。いくつかの実施形態では、リステリア・モノサイトゲネス (*L i s t e r i a m o n o c y t o g e n e s*) は、 Δ a c t A / Δ i n l B 突然変異体である。一部の実施形態では、核酸分子は、宿主細胞ゲノムに組み込まれる。様々な実施形態では、核酸分子は、a c t A 遺伝子座、i n l B 遺伝子座又は t R N A^{A r g} 遺伝子座に組み込まれる。

40

【0405】

一部の実施形態では、前述の実施形態のいずれかの宿主細胞は、薬学的に許容される賦形剤と組み合わせられる。

【0406】

一部の実施形態では、本発明は、前述の実施形態のいずれかの宿主細胞と、薬学的に許容される賦形剤とを含むワクチンを提供する。

【0407】

50

一部の実施形態では、本発明は、1つ又は複数の核酸分子を含む宿主細胞を提供し、前記核酸分子は、a) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、EGFRvIII-SSX2融合タンパク質；b) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、EGFRvIII-PAP_{33~386}融合タンパク質；c) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、配列番号25に示されるNKX3.1_{11~234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRvIII-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質；d) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、配列番号18に示されるNKX3.1(R41G)_{11~234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRvIII-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質；e) 配列番号29に示されるNKX3.1と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、NKX3.1-PAP_{33~386}融合タンパク質；f) 配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100*ポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、ActAN100*-SSX2融合タンパク質；g) 配列番号33のアミノ酸残基1~100と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100ポリペプチド、及び配列番号33のアミノ酸残基103~459に示されるPAP_{30~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、ActAN100-PAP_{30~386}融合タンパク質；又はh) これらの任意の組み合わせをコードする核酸配列を含む。

【0408】

一部の実施形態では、宿主細胞の核酸分子は、a) 配列番号3に示されるEGFRvIIIx5-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；b) 配列番号11に示されるEGFRvIIIx5-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；c) 配列番号

22に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1₁₁~2₃₄-PSMA₁~2₀, 4₄~1₃₈, 1₆₉~7₅₀と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列；d)配列番号15に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)₁₁~2₃₄-PSMA₁~2₀, 4₄~1₃₈, 1₆₉~7₅₀と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列；e)配列番号26に示されるNKX3.1-PAP₃₃~3₈₆と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列；f)配列番号30に示されるActAN100*-SSX2と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列；g)配列番号32に示されるActAN100*-PAP₃₀~3₈₆-SL8と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一である核酸配列；h)配列番号34に示されるEGFRvIIIX1-PAP₃₃~3₈₆と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列；i)配列番号36に示されるEGFRvIIIX2-PAP₃₃~3₈₆と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列；j)配列番号38に示されるEGFRvIIIX3-PAP₃₃~3₈₆と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列；k)配列番号40に示されるEGFRvIIIX4-PAP₃₃~3₈₆と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列；又はl)これらの任意の組合せを含む。

【0409】

一部の実施形態では、宿主細胞は細菌である。一実施形態では、細菌は、リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*)である。一部の実施形態では、リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*)は、 $\Delta actA/\Delta inlB$ 突然変異体である。

【0410】

一部の実施形態では、前述の実施形態のいずれかの宿主細胞は、a)配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列；b)配列番号11に示されるEGFRvIIIX5-PAP₃₃~3₈₆と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列；及びc)配列番号22に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1₁₁~2₃₄-PSMA₁~2₀, 4₄~1₃₈, 1₆₉~7₅₀と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、(a)は、actA遺伝子座に組み込まれ、(b)は、inlB遺伝子座に組み込まれ、(c)は、tRNA^{Arg}遺伝子座に組み込まれる。

【0411】

一部の実施形態では、前述の実施形態のいずれかの宿主細胞は、a)配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列；b)配列番号11に示されるEGFRvIIIX5-PAP₃₃~3₈₆と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列；及びc)配列番号15に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)₁₁~2₃₄-PSMA₁~2₀, 4₄~1₃₈, 1₆₉~7₅₀と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、(a)は、actA遺伝子座に組み込まれ、(b)は、inlB遺伝子座に組み込まれ、(c)は、tRNA^{Arg}遺伝子座に組み込まれる。

【0412】

一部の実施形態では、前述の実施形態のいずれかの宿主細胞は、a) 配列番号26に示されるNKX3.1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；及びb) 配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、(a)は、inlB遺伝子座に組み込まれ、(b)は、tRNA^{Arg}遺伝子座に組み込まれる。

【0413】

一部の実施形態では、前述の実施形態のいずれかの宿主細胞は、a) 配列番号26に示されるNKX3.1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；及びb) 配列番号30に示されるActAN100*-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、(a)は、inlB遺伝子座に組み込まれ、(b)は、tRNA^{Arg}遺伝子座に組み込まれる。

【0414】

一部の実施形態では、前述の実施形態のいずれかの宿主細胞の核酸分子は、a) 配列番号4のアミノ酸残基89~475に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；b) 配列番号12のアミノ酸残基89~606に示されるEGFRvIIIX5-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；c) 配列番号23のアミノ酸残基89~1177に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；d) 配列番号16のアミノ酸残基89~1177に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；e) 配列番号27のアミノ酸残基89~678に示されるNKX3.1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；f) 配列番号31に示されるActAN100*-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；g) 配列番号33のアミノ酸残基1~459に示されるActAN100*-PAP_{30~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；h) 配列番号35のアミノ酸残基89~476に示されるEGFRvIIIX1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；i) 配列番号37のアミノ酸残基89~509に示されるEGFRvIIIX2-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；j) 配列番号39のアミノ酸残基89~541に示されるEGFRvIIIX3-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；k) 配列番号41のアミノ酸残基89~573に示されるEGFRvIIIX4-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるアミノ酸配列；又はl) これらの任意の組合せをコードする核酸配列を含む。

【0415】

一部の実施形態では、本発明は、対象において免疫応答を誘発する方法を提供し、これは、前述の実施形態のいずれかの宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含む

10

20

30

40

50

。

【0416】

一部の実施形態では、本発明は、対象において免疫応答を誘発する方法を提供し、これは、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含み、宿主細胞は、a) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、EGFRvIII-SSX2融合タンパク質；b) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、EGFRvIII-PAP_{33~386}融合タンパク質；c) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、配列番号25に示されるNKX3.1_{11~234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRvIII-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質；d) 配列番号6と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含む1つ又は複数のEGFRvIIIポリペプチド、配列番号18に示されるNKX3.1(R41G)_{11~234}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号20に示されるPSMA_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPSMAポリペプチドを含む、EGFRvIII-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20, 44~138, 169~750}融合タンパク質；e) 配列番号29に示されるNKX3.1と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むNKX3.1ポリペプチド、及び配列番号14に示されるPAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、NKX3.1-PAP_{33~386}融合タンパク質；f) 配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100*ポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、ActAN100*-SSX2融合タンパク質；g) 配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100*ポリペプチド、及び配列番号33のアミノ酸残基103~459に示されるPAP_{30~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、ActAN100*-PAP_{30~386}融合タンパク質；又はh) これらの任意の組み合わせを含む1つ又は複数の融合タンパク質を発現する。

【0417】

一部の実施形態では、1つ又は複数の融合タンパク質は、a) 配列番号3に示されるEGFRvIIIx5-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii)

) 99%同一、又は i v) 100%同一であるヌクレオチド配列；b) 配列番号 11 に示される E G F R v I I I x 5 - P A P _{33 ~ 386} と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又は i v) 100%同一であるヌクレオチド配列；c) 配列番号 22 に示される E G F R v I I I x 5 - N K X 3. 1 _{11 ~ 234} - P S M A _{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又は i v) 100%同一であるヌクレオチド配列；d) 配列番号 15 に示される E G F R v I I I x 5 - N K X 3. 1 (R 4 1 G) _{11 ~ 234} - P S M A _{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又は i v) 100%同一であるヌクレオチド配列；e) 配列番号 26 に示される N K X 3. 1 - P A P _{33 ~ 386} と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又は i v) 100%同一であるヌクレオチド配列；f) 配列番号 30 に示される A c t A N 1 0 0 * - S S X 2 と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又は i v) 100%同一であるヌクレオチド配列；g) 配列番号 32 に示される A c t A N 1 0 0 - P A P _{30 ~ 386} - S L 8 と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又は i v) 100%同一である核酸配列；h) 配列番号 34 に示される E G F R v I I I x 1 - P A P _{3 ~ 386} と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又は i v) 100%同一であるヌクレオチド配列；i) 配列番号 36 に示される E G F R v I I I x 2 - P A P _{33 ~ 386} と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又は i v) 100%同一であるヌクレオチド配列；j) 配列番号 38 に示される E G F R v I I I x 3 - P A P _{33 ~ 386} と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又は i v) 100%同一であるヌクレオチド配列；k) 配列番号 40 に示される E G F R v I I I x 4 - P A P _{33 ~ 386} と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又は i v) 100%同一であるヌクレオチド配列；又は l) これらの任意の組合せを含む核酸分子から発現される。一部の実施形態では、(a) は、a c t A 遺伝子座に組み込まれ、(b) は、i n l B 遺伝子座に組み込まれ、(c) は、t R N A ^{A r g} 遺伝子座に組み込まれる。いくつかの実施形態では、(a) は、a c t A 遺伝子座に組み込まれ、(b) は、i n l B 遺伝子座に組み込まれ、(d) は、t R N A ^{A r g} 遺伝子座に組み込まれる。一部の実施形態では、(e) は、i n l B 遺伝子座に組み込まれ、(f) は、t R N A ^{A r g} 遺伝子座に組み込まれる。様々な実施形態において、(e) は、i n l B 遺伝子座に組み込まれ、(a) は、t R N A ^{A r g} 遺伝子座に組み込まれる。

【0418】

一部の実施形態では、1つ又は複数の融合タンパク質は、a) 配列番号 4 のアミノ酸残基 89~475 に示される E G F R v I I I x 5 - S S X 2 と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又は i v) 100%同一のアミノ酸配列；b) 配列番号 12 のアミノ酸残基 89~606 に示される E G F R v I I I x 5 - P A P _{33 ~ 386} と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又は i v) 100%同一のアミノ酸配列；c) 配列番号 23 のアミノ酸残基 89~1177 に示される E G F R v I I I x 5 - N K X 3. 1 _{11 ~ 234} - P S M A _{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又は i v) 100%同一のアミノ酸配列；d) 配列番号 16 のアミノ酸残基 89~1177 に示される E G F R v I I I x 5 - N K X 3. 1 (R 4 1 G) _{11 ~ 234} - P S M A _{1 ~ 20, 44 ~ 138, 169 ~ 750} と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又は i v) 100%同一のアミノ酸配列；e) 配列番号 27 のアミノ酸残基 89~678 に示される N K X 3. 1 - P A P _{33 ~ 386} と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又は i v) 100%同一のアミノ酸配列；f) 配列番号 35 のアミノ酸残基 89~476 に示される E G F R v I I I x 1 - P A P _{33 ~ 386} と少なくとも i) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又は i v) 100%同一のアミノ酸配列；g) 配列番号 37 のアミノ酸

残基 89～509 に示される EGFRv I I I x 2 - PAP_{33～386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列；h) 配列番号 39 のアミノ酸残基 89～541 に示される EGFRv I I I x 3 - PAP_{33～386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列；i) 配列番号 41 のアミノ酸残基 89～573 に示される EGFRv I I I x 4 - PAP_{33～386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列；又は j) これらの任意の組合せを含む。

【0419】

前述の方法のいずれかの一部の実施形態では、前記宿主細胞は細菌である。一実施形態では、細菌は、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) である。いくつかの実施形態では、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) は、 $\Delta actA/\Delta inlB$ 突然変異体である。様々な実施形態において、投与ステップは、静脈内経路で実施される。一部の実施形態では、1つ又は複数の融合タンパク質は、対象内の感染細胞の細胞質中に宿主細胞から発現及び分泌される。一部の実施形態では、感染細胞は抗原提示細胞である。

【0420】

一部の実施形態では、本発明は、抗原ポリペプチドの発現を増大させる方法を提供し、前記方法は、宿主細胞において核酸分子を発現するステップを含み、前記核酸分子は、a) 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1つ又は複数の EGFRv I I I ポリペプチド、及び配列番号 10 に示される SSX2 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む SSX2 ポリペプチドを含む、EGFRv I I I - SSX2 融合タンパク質；b) 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1つ又は複数の EGFRv I I I ポリペプチド、及び配列番号 14 に示される PAP_{33～386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む PAP ポリペプチドを含む、EGFRv I I I - PAP_{33～386} 融合タンパク質；c) 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1つ又は複数の EGFRv I I I ポリペプチド、配列番号 25 に示される NKX3. 1_{11～234} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む NKX3. 1 ポリペプチド、及び配列番号 20 に示される PSMA_{1～20, 44～138, 169～750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む PSMA ポリペプチドを含む、EGFRv I I I - NKX3. 1_{11～234} - PSMA_{1～20, 44～138, 169～750} 融合タンパク質；d) 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1つ又は複数の EGFRv I I I ポリペプチド、配列番号 18 に示される NKX3. 1 (R41G)_{11～234} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む NKX3. 1 ポリペプチド、及び配列番号 20 に示される PSMA_{1～20, 44～138, 169～750} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む PSMA ポリペプチドを含む、EGFRv I I I - NKX3. 1 (R41G)_{11～234} - PSMA_{1～20, 44～138, 169～750} 融合タンパク質；e) 配列番号 29 に示される NKX3. 1 と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む NKX3. 1 ポリペプチド、及び配列番号 14 に示される PAP_{33～386} と少なくとも i) 90% 同一、ii) 95% 同一、iii) 99% 同一、又は iv) 100% 同一のアミノ酸配列を含む PAP ポリペプチドを含む、NKX3. 1 -

10

20

30

40

50

PAP_{33~386} 融合タンパク質；f) 配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100*ポリペプチド、及び配列番号10に示されるSSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むSSX2ポリペプチドを含む、ActAN100*-SSX2 融合タンパク質；g) 配列番号2として示されるActAN100*と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むActAN100*ポリペプチド、及び配列番号33のアミノ酸残基103~459に示されるPAP_{30~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一のアミノ酸配列を含むPAPポリペプチドを含む、ActAN100*-PAP_{30~386} 融合タンパク質；又はh) これらの任意の組み合わせをコードする核酸配列を含む。

【0421】

いくつかの実施形態では、1つ又は複数の核酸分子は、a) 配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；b) 配列番号11に示されるEGFRvIIIX5-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；c) 配列番号22に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1_{11~234}-PSMA_{1~20,44~138,169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；d) 配列番号15に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)_{11~234}-PSMA_{1~20,44~138,169~750}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；e) 配列番号26に示されるNKX3.1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；f) 配列番号30に示されるActAN100*-SSX2と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；g) 配列番号32に示されるActAN100*-PAP_{30~386}-SL8と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一である核酸配列；h) 配列番号34に示されるEGFRvIIIX1-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；i) 配列番号36に示されるEGFRvIIIX2-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；j) 配列番号38に示されるEGFRvIIIX3-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；k) 配列番号40に示されるEGFRvIIIX4-PAP_{33~386}と少なくともi) 90%同一、ii) 95%同一、iii) 99%同一、又はiv) 100%同一であるヌクレオチド配列；又はl) これらの任意の組合せを含む。一部の実施形態では、(a)は、actA遺伝子座に組み込まれ、(b)は、inlB遺伝子座に組み込まれ、(c)は、tRNA^{Arg}遺伝子座に組み込まれる。一部の実施形態では、(a)は、actA遺伝子座に組み込まれ、(b)は、inlB遺伝子座に組み込まれ、(d)は、tRNA^{Arg}遺伝子座に組み込まれる。一部の実施形態では、(e)は、inlB遺伝子座に組み込まれ、(f)は、tRNA^{Arg}遺伝子座に組み込まれる。一部の実施形態において、(e)は、inlB遺伝子座に組み込まれ、(a)は、tRNA^{Arg}遺伝子座に組み込まれる。

【0422】

前述の方法のいずれかの一部の実施形態では、核酸分子は、a) 配列番号4のアミノ酸残基89~475に示されるEGFRvIIIX-SSX2と少なくともi) 90%同一、

i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列；b) 配列番号12のアミノ酸残基89～606に示されるEGFRv I I I - P A P_{33~386}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列；c) 配列番号23のアミノ酸残基89～1177に示されるEGFRv I I I - N K X 3. 1_{11~234} - P S M A_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列；d) 配列番号16のアミノ酸残基89～1177に示されるEGFRv I I I - N K X 3. 1 (R 4 1 G)_{11~234} - P S M A_{1~20, 44~138, 169~750}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列；e) 配列番号27のアミノ酸残基89～678に示されるN K X 3. 1 - P A P_{33~386}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列；f) 配列番号35のアミノ酸残基89～476に示されるEGFRv I I I x 1 - P A P_{33~386}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列；g) 配列番号37のアミノ酸残基89～509に示されるEGFRv I I I x 2 - P A P_{33~386}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列；h) 配列番号39のアミノ酸残基89～541に示されるEGFRv I I I x 3 - P A P_{33~386}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列；i) 配列番号41のアミノ酸残基89～573に示されるEGFRv I I I x 4 - P A P_{33~386}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列；又はj) これらの任意の組合せを含む融合タンパク質をコードする。

【0423】

前述の方法のいずれかの一部の実施形態では、前記宿主細胞は細菌である。いくつかの実施形態では、細菌は、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) である。

【0424】

前述の方法のいずれかの一部の実施形態では、発現ステップは、目的の細胞を宿主細胞に感染させるステップを含む。一部の実施形態では、前記発現ステップは、宿主細胞を対象に投与するステップを含む。

【0425】

一部の実施形態では、前述の宿主細胞のいずれかの核酸分子は、宿主細胞内のエピソームプラスミド上の発現カセットに挿入される。

【0426】

一部の実施形態では、前述の宿主細胞のいずれかの核酸分子は、配列番号3に示されるEGFRv I I I x 5 - S S X 2；配列番号11に示されるEGFRv I I I x 5 - P A P_{33~386}；配列番号15に示されるEGFRv I I I x 5 - N K X 3. 1 (R 4 1 G)_{11~234} - P S M A_{1~20, 44~138, 169~750}を含む。

【0427】

一部の実施形態では、前述の宿主細胞のいずれかの核酸分子は、配列番号3に示されるEGFRv I I I x 5 - S S X 2；配列番号11に示されるEGFRv I I I x 5 - P A P_{33~386}；配列番号15に示されるEGFRv I I I x 5 - N K X 3. 1 (R 4 1 G)_{11~234} - P S M A_{1~20, 44~138, 169~750}からなる。

【0428】

前述の方法のいずれかの一部の実施形態では、1つ又は複数の核酸分子は、a) 配列番号3に示されるEGFRv I I I x 5 - S S X 2と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一であるヌクレオチド配列；b) 配列番号11に示されるEGFRv I I I x 5 - P A P_{33~386}と少なくともi) 90%同一、i i) 95%同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一であるヌク

レオチド配列；及び c) 配列番号 15 に示される E G F R v I I I x 5 - N K X 3 . 1 (R 4 1 G) _{1 1 ~ 2 3 4} - P S M A _{1 ~ 2 0 , 4 4 ~ 1 3 8 , 1 6 9 ~ 7 5 0} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるヌクレオチド配列を含む。

【0429】

前述の方法のいずれかの一部の実施形態では、1つ又は複数の核酸分子は、配列番号 3 に示される E G F R v I I I x 5 - S S X 2 ；配列番号 11 に示される E G F R v I I I x 5 - P A P _{3 3 ~ 3 8 6} ；配列番号 15 に示される E G F R v I I I x 5 - N K X 3 . 1 (R 4 1 G) _{1 1 ~ 2 3 4} - P S M A _{1 ~ 2 0 , 4 4 ~ 1 3 8 , 1 6 9 ~ 7 5 0} からなる。

【0430】

一部の実施形態では、本発明は、癌の治療を、それを必要とする対象において行う方法を提供し、前記方法は、治療有効量の、宿主細胞を含む組成物を対象に投与するステップを含み、宿主細胞は、a) 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリペプチド、及び配列番号 10 に示される S S X 2 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む S S X 2 ポリペプチドを含む、E G F R v I I I - S S X 2 融合タンパク質；b) 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリペプチド、及び配列番号 14 に示される P A P _{3 3 ~ 3 8 6} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P A P ポリペプチドを含む、E G F R v I I I - P A P _{3 3 ~ 3 8 6} 融合タンパク質；c) 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリペプチド、配列番号 25 に示される N K X 3 . 1 _{1 1 ~ 2 3 4} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む N K X 3 . 1 ポリペプチド、及び配列番号 20 に示される P S M A _{1 ~ 2 0 , 4 4 ~ 1 3 8 , 1 6 9 ~ 7 5 0} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P S M A ポリペプチドを含む、E G F R v I I I - N K X 3 . 1 _{1 1 ~ 2 3 4} - P S M A _{1 ~ 2 0 , 4 4 ~ 1 3 8 , 1 6 9 ~ 7 5 0} 融合タンパク質；d) 配列番号 6 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む 1 つ又は複数の E G F R v I I I ポリペプチド、配列番号 18 に示される N K X 3 . 1 (R 4 1 G) _{1 1 ~ 2 3 4} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む N K X 3 . 1 ポリペプチド、及び配列番号 20 に示される P S M A _{1 ~ 2 0 , 4 4 ~ 1 3 8 , 1 6 9 ~ 7 5 0} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P S M A ポリペプチドを含む、E G F R v I I I - N K X 3 . 1 (R 4 1 G) _{1 1 ~ 2 3 4} - P S M A _{1 ~ 2 0 , 4 4 ~ 1 3 8 , 1 6 9 ~ 7 5 0} 融合タンパク質；e) 配列番号 29 に示される N K X 3 . 1 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む N K X 3 . 1 ポリペプチド、及び配列番号 14 に示される P A P _{3 3 ~ 3 8 6} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P A P ポリペプチドを含む、N K X 3 . 1 - P A P _{3 3 ~ 3 8 6} 融合タンパク質；f) 配列番号 2 として示される A c t A N 1 0 0 * と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む A c t A N 1 0 0 * ポリペプチド、及び配列番号 10 に示される S S X 2 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む S S X 2 ポリペプチドを含む、A c t A N 1 0 0 * - S S X 2 融合タンパク質；g) 配列番号 33 のアミノ

10

20

30

40

50

酸残基 1～100 に示される A c t A N 1 0 0 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む A c t A N 1 0 0 ポリペプチド、及び配列番号 33 のアミノ酸残基 103～459 に示される P A P_{30～386} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一のアミノ酸配列を含む P A P ポリペプチドを含む、A c t A N 1 0 0 - P A P_{30～386} 融合タンパク質；又は h) これらの任意の組み合わせを含む 1 つ又は複数の融合タンパク質を発現する。一部の実施形態では、宿主細胞は、(a)、(b) 及び (d) を発現する。

【0431】

一部の実施形態では、1 つ又は複数の融合タンパク質は、a) 配列番号 3 に示される E G F R v I I I x 5 - S S X 2 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるヌクレオチド配列；b) 配列番号 11 に示される E G F R v I I I x 5 - P A P_{33～386} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるヌクレオチド配列；c) 配列番号 22 に示される E G F R v I I I x 5 - N K X 3. 1_{11～234} - P S M A_{1～20, 44～138, 169～750} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるヌクレオチド配列；d) 配列番号 15 に示される E G F R v I I I x 5 - N K X 3. 1 (R 4 1 G)_{11～234} - P S M A_{1～20, 44～138, 169～750} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるヌクレオチド配列；e) 配列番号 26 に示される N K X 3. 1 - P A P_{33～386} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるヌクレオチド配列；f) 配列番号 30 に示される A c t A N 1 0 0 * - S S X 2 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるヌクレオチド配列；g) 配列番号 32 に示される A c t A N 1 0 0 - P A P_{30～386} - S L 8 と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一である核酸配列；h) 配列番号 34 に示される E G F R v I I I x 1 - P A P_{33～386} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるヌクレオチド配列；i) 配列番号 36 に示される E G F R v I I I x 2 - P A P_{33～386} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるヌクレオチド配列；j) 配列番号 38 に示される E G F R v I I I x 3 - P A P_{33～386} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるヌクレオチド配列；k) 配列番号 40 に示される E G F R v I I I x 4 - P A P_{33～386} と少なくとも i) 90% 同一、i i) 95% 同一、i i i) 99% 同一、又は i v) 100% 同一であるヌクレオチド配列；又は l) これらの任意の組合せを含む核酸分子から発現される。

【0432】

一部の実施形態では、1 つ又は複数の融合タンパク質は、(a)、(b)、及び (d) を含む核酸分子から発現される。一部の実施形態では、1 つ又は複数の融合タンパク質は、(a)、(b)、及び (d) からなる核酸分子から発現される。一部の実施形態では、(a)、(b)、及び (d) は、A c t A プロモータと作動可能に連結されている。一部の実施形態では、A c t A プロモータは、配列番号 21 に示される。一部の実施形態では、(a) は、a c t A 遺伝子座に組み込まれ、(b) は、i n l B 遺伝子座に組み込まれ、(c) は、t R N A^{A r g} 遺伝子座に組み込まれる。いくつかの実施形態では、(a) は、a c t A 遺伝子座に組み込まれ、(b) は、i n l B 遺伝子座に組み込まれ、(d) は、t R N A^{A r g} 遺伝子座に組み込まれる。一部の実施形態では、(e) は、i n l B 遺伝子座に組み込まれ、(f) は、t R N A^{A r g} 遺伝子座に組み込まれる。いくつかの実施形態では、(e) は、i n l B 遺伝子座に組み込まれ、(a) は、t R N A^{A r g} 遺伝子座に組み込まれる。

【0433】

一部の実施形態では、1つ又は複数の融合タンパク質は、配列番号3に示されるEGFRvIIIX5-SSX2、配列番号11に示されるEGFRvIIIX5-PAP₃₃~₃₈₆、及び配列番号15に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)₁₁~₂₃₄-PSMA₁~₂₀,₄₄~₁₃₈,₁₆₉~₇₅₀からなる核酸分子から発現される。

【0434】

いくつかの実施形態では、癌は、EGFRvIIIX5発現癌、SSX2発現癌、PAP発現癌、NKX3.1発現癌、PSMA発現癌、又はこれらの任意の組合せである。一実施形態では、癌は前立腺癌である。

【0435】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*)である。様々な実施形態において、リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*)は、actA欠失(Δ actA)突然変異体、actA挿入突然変異体、inlB欠失(Δ inlB)突然変異体、inlB挿入突然変異体、又はこれらの組合せである。一実施形態では、リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*)は、 Δ actA/ Δ inlB突然変異体である。

【0436】

癌を治療する前述の方法のいずれかの一部の実施形態では、融合タンパク質は、対象における感染細胞の細胞質中に宿主細胞から発現及び分泌される。いくつかの実施形態では、感染細胞は抗原提示細胞である。

【0437】

癌を治療する前述の方法のいずれかの一部の実施形態では、1つ又は複数の融合タンパク質は、a)配列番号4のアミノ酸残基89~475に示されるEGFRvIIIX5-SSX2と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列；b)配列番号12のアミノ酸残基89~606に示されるEGFRvIIIX5-PAP₃₃~₃₈₆と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列；c)配列番号23のアミノ酸残基89~1177に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1₁₁~₂₃₄-PSMA₁~₂₀,₄₄~₁₃₈,₁₆₉~₇₅₀と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列；d)配列番号16のアミノ酸残基89~1177に示されるEGFRvIIIX5-NKX3.1(R41G)₁₁~₂₃₄-PSMA₁~₂₀,₄₄~₁₃₈,₁₆₉~₇₅₀と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列；e)配列番号27のアミノ酸残基89~678に示されるNKX3.1-PAP₃₃~₃₈₆と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列；f)配列番号31に示されるActAN100*-SSX2と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列；g)配列番号33のアミノ酸残基1~459に示されるActAN100-PAP₃₀~₃₈₆と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列；h)配列番号35のアミノ酸残基89~476に示されるEGFRvIIIX1-PAP₃₃~₃₈₆と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列；i)配列番号37のアミノ酸残基89~509に示されるEGFRvIIIX2-PAP₃₃~₃₈₆と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列；j)配列番号39のアミノ酸残基89~541に示されるEGFRvIIIX3-PAP₃₃~₃₈₆と少なくともi)90%同一、ii)95%同一、iii)99%同一、又はiv)100%同一のアミノ酸配列；k)配列番号41のアミノ酸残基89~573に示されるEGFRvIIIX4-PAP₃₃~₃₈₆と少なくともi)90%同一、ii)95%

10

20

30

40

50

同一、i i i) 99%同一、又はi v) 100%同一のアミノ酸配列；又はこれらの任意の組合せを含む。

【0438】

癌を治療する前述の方法のいずれかの一部の実施形態では、1つ又は複数の融合タンパク質は、(a)、(b)及び(d)を含む。

【0439】

癌を治療する前述の方法のいずれかの一部の実施形態では、1つ又は複数の融合タンパク質は、(a)、(b)及び(d)からなる。

【0440】

癌を治療する前述の方法のいずれかの一部の実施形態では、1つ又は複数の融合タンパク質は、配列番号4のアミノ酸残基89～475に示されるEGFRv I I I x 5 - S S X 2、配列番号12のアミノ酸残基89～606に示されるEGFRv I I I x 5 - P A P_{33～386}、及び配列番号16のアミノ酸残基89～1177に示されるEGFRv I I I x 5 - N K X 3. 1 (R 4 1 G)_{11～234} - P S M A_{1～20, 44～138, 169～750}からなる。

10

【0441】

一部の実施形態では、本方法は、組成物を投与する前に対象からの生体サンプルにおいてEGFRv I I I、S S X 2、P A P、N K X 3. 1、P S M A、又はこれらの任意の組合せの発現を測定するステップをさらに含む。

【0442】

癌を治療する前述の方法のいずれかの一部の実施形態では、組成物は、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む。いくつかの実施形態では、投与ステップは、静脈内経路で実施する。

20

【0443】

一部の実施形態では、癌を治療する方法は、組成物を投与した後、抗生物質を対象に投与するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、組成物の最終用量後に抗生物質を投与する。関連する実施形態では、抗生物質は、アモキシシリン又はトリメトプリム／スルファメトキサゾールである。

【0444】

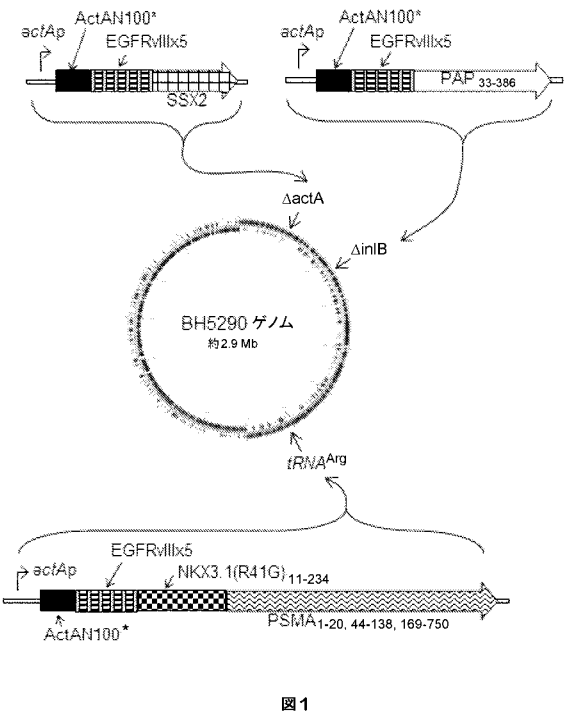
本明細書に引用されるあらゆる特許、公開出願、及び参照文献の教示は、その全体が参照により組み込まれる。

30

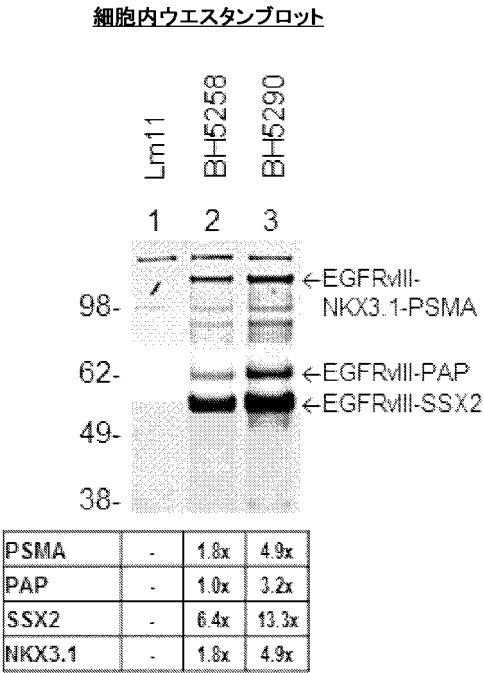
【0445】

本発明をその例示的な実施形態に関して具体的に示し、説明してきたが、当業者は、特許請求の範囲に包含される本発明の範囲から逸脱することなく、形態及び詳細に対する様々な変更形態がなされ得ることを理解するであろう。

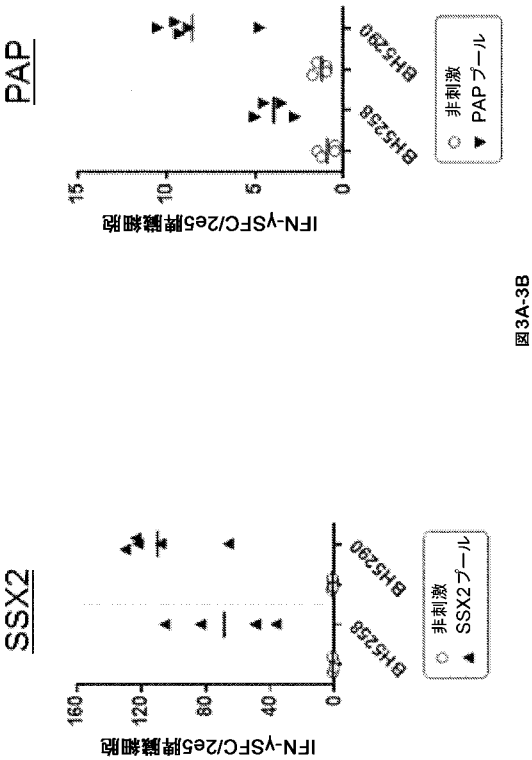
【 図 1 】



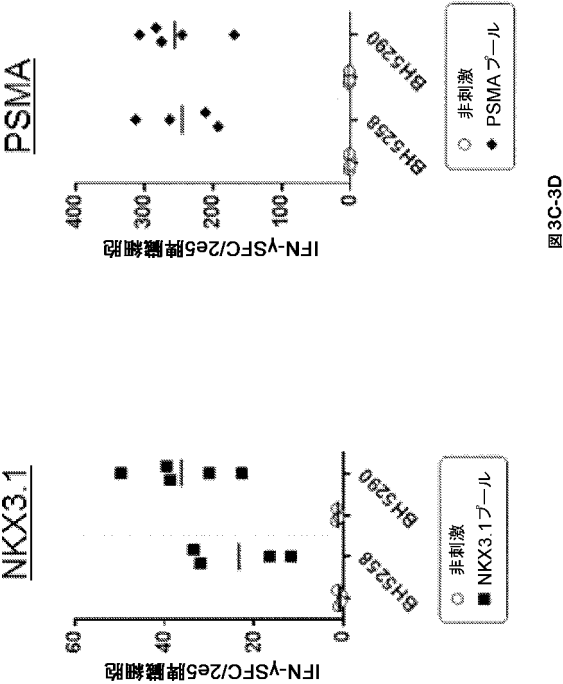
【 図 2 】



【 図 3 A - B 】



【 図 3 C - D 】



【 図 3 E 】

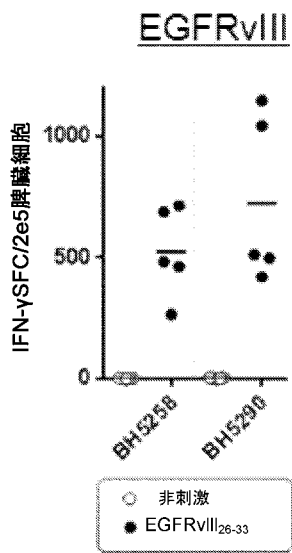


図3E

【 図 4 】

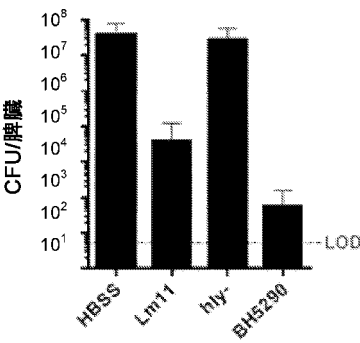


図 4

【 図 5 A 】

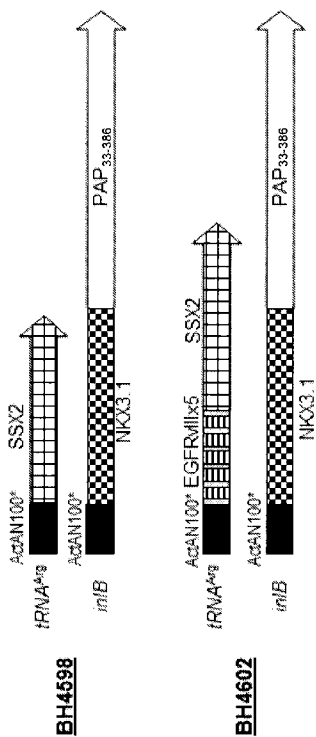
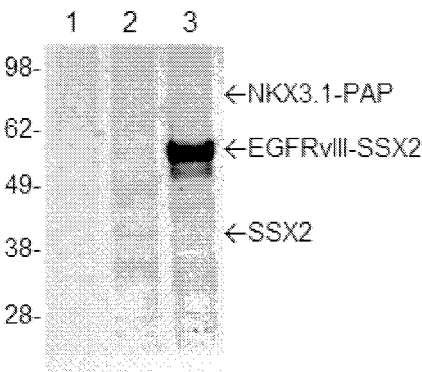


FIG. 5A

【 図 5 B 】

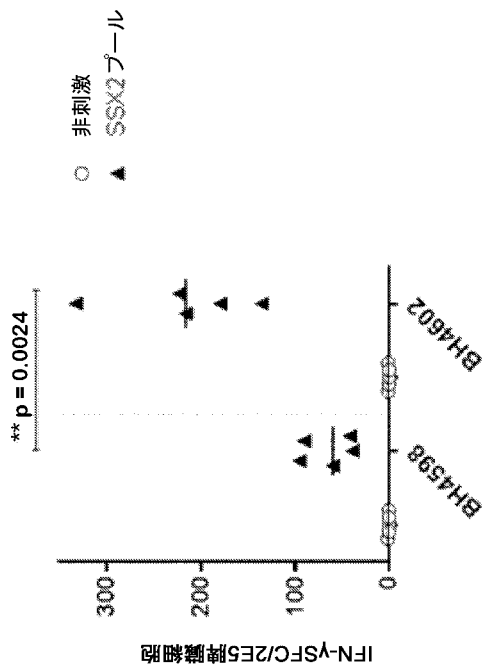
細胞内ウエスタンブロット



レーン	株	遺伝子座	相対発現
1	Lm11		0
2	BH4598	<i>hRNA^{Arg}</i> ActAN100*-SSX2	1
		<i>iniB</i> ActAN100*-NKX3.1-PAP	0.43
3	BH4602	<i>hRNA^{Arg}</i> ActAN100*-EGFRvIII-SSX2	224
		<i>iniB</i> ActAN100*-NKX3.1-PAP	0.33

図5B

【 図 6 】



【 図 7 A 】

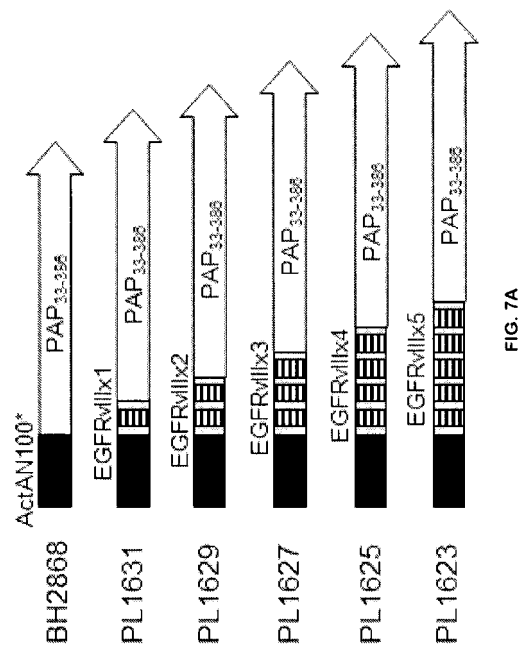
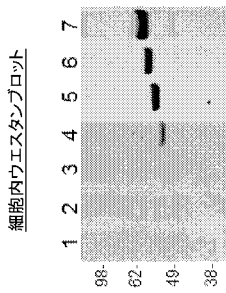


FIG. 7A

図 6

【 図 7 B 】



レーン	株	構築物	相対発現
1	Lm11	負の対照	-
2	BH2868	ActIN100-hPAP ₃₃₋₃₈₆	1x
3	PL1631	ActIN100*-EGFRvIIIx1-PAP ₃₃₋₃₈₆	2.4x
4	PL1629	ActIN100*-EGFRvIIIx2-PAP ₃₃₋₃₈₆	19.6x
5	PL1627	ActIN100*-EGFRvIIIx3-PAP ₃₃₋₃₈₆	127x
6	PL1625	ActIN100*-EGFRvIIIx4-PAP ₃₃₋₃₈₆	157x
7	PL1623	ActIN100*-EGFRvIIIx5-PAP ₃₃₋₃₈₆	213x

【 図 8 】

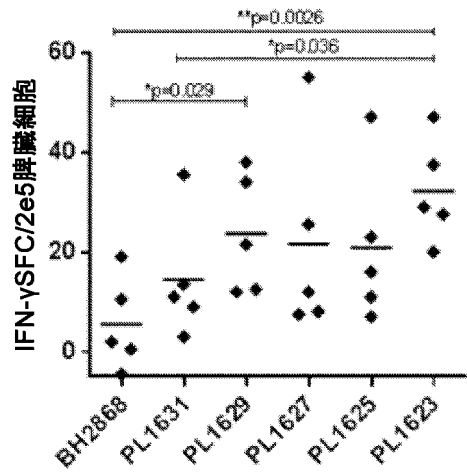


図 8

図 7B

【配列表】

2018512165000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2016/027167

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/068360 A1 (ADURO BIOTECH [US]; PROVIDENCE HEALTH & SERVICES OREGON D B A PROVIDEN) 24 May 2012 (2012-05-24) Par.7, Par.102-103, Par.105 -----	1-19, 39-43
A	KEI FUJIO ET AL: "A vaccine strategy with multiple prostatic acid phosphatase-fused cytokines for prostate cancer treatment", ONCOLOGY REPORTS, 29 January 2015 (2015-01-29), XP055292019, GR ISSN: 1021-335X, DOI: 10.3892/or.2015.3770 p.1585 col.2 par.1 - p.1586 col.1 par.2, p.1591 col.2 par.2 ----- -/--	1-19, 39-43

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 October 2016

Date of mailing of the international search report

20/10/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bonello, Steve

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/027167

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MAHA AYYOUB ET AL: "Cancer Immunity 3:13 (2003) -ARTICLE LATEST PAPERS SEARCH for PAPERS Printer-friendly PDF Comment(s) SSX antigens as tumor vaccine targets in human sarcoma", CANCER IMMUNITY, vol. 3, 9 October 2003 (2003-10-09), page 13, XP055292562, p.2 par.2, p.5 par.2,3. -----	1-19, 39-43
Y	HEATH A. SMITH ET AL: "The SSX Family of Cancer-Testis Antigens as Target Proteins for Tumor Therapy", CLINICAL & DEVELOPMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 156, no. 6, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 2205-18, XP055292586, US ISSN: 1740-2522, DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(199906)179:3<251::AID-JCP2>3.0.CO;2-P p.2 col.1 par.3, col.2 par.2, p.2 col.2 par.3, p.9 col.2 par.2,p.13 col.2 par.2 -----	1-19, 39-43
A	US 2014/186387 A1 (LAUER PETER M [US] ET AL) 3 July 2014 (2014-07-03) Par.6, 7,11,13,14, 31, 34, 91, 95-97,138,139,140 pages 9,10; table 1 figures 9,10 -----	1-19, 39-43
A	S CECCO ET AL: "Cancer Vaccines in Phase II/III Clinical Trials: State of the Art and Future Perspectives", CURRENT CANCER DRUG TARGETS, vol. 1100, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 85-102, XP055292707, p.87 col.1 par.1, p.90 Tbl.1, p.93 col.1, 2, p.94 col.1, p.96 col.2 par.3- p.97 col.1 par.1 -----	1-19, 39-43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2016/027167**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
11-19(completely); 1-10, 39-43(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2016/ 027167

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 11-19(completely); 1-10, 39-43(partially)

Directed towards host cells, uses and methods related to a fusion protein comprising EGFRvIII and a synovial sarcoma, X breakpoint 2 (SSX2) polypeptide.

2. claims: 20-26(completely); 1-10, 39-43(partially)

Directed towards host cells, uses and methods related to a fusion protein comprising EGFRvIII and a prostatic acid phosphatase (PAP) polypeptide.

3. claims: 27-34(completely); 1-10, 39-43(partially)

Directed towards host cells, uses and methods related to a fusion protein comprising EGFRvIII, NK3 homeobox 1 (NKX3.1) polypeptide and a prostate-specific membrane antigen (PSMA) polypeptide.

4. claims: 35-38(completely); 1-10, 39-43(partially)

Directed towards host cells, uses and methods related to a fusion protein comprising NKX3.1 polypeptide and a PAP polypeptide.

5. claims: 1-4, 7, 8, 39, 40, 43(all partially)

Directed towards host cells, uses and methods related to a fusion protein comprising an ActAN100* and a SSX2 polypeptide.

6. claims: 1-4, 7, 8, 39, 40, 43(all partially)

Directed towards host cells, uses and methods related to a fusion protein comprising an ActAN100* and a PAP30-386 polypeptide.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/027167

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012068360 A1	24-05-2012	CA 2818353 A1	24-05-2012
		CN 103415620 A	27-11-2013
		EP 2640842 A1	25-09-2013
		JP 5998370 B2	28-09-2016
		JP 2014504851 A	27-02-2014
		US 2014037662 A1	06-02-2014
		US 2016074491 A1	17-03-2016
		WO 2012068360 A1	24-05-2012

US 2014186387 A1	03-07-2014	AU 2013370210 A1	18-06-2015
		CA 2888727 A1	03-07-2014
		CN 104955835 A	30-09-2015
		EA 201590397 A1	29-02-2016
		EP 2938627 A1	04-11-2015
		HK 1215260 A1	19-08-2016
		JP 2016503655 A	08-02-2016
		KR 20150099738 A	01-09-2015
		SG 11201502792T A	28-05-2015
		US 2014186387 A1	03-07-2014
		WO 2014106123 A1	03-07-2014

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K 39/07 (2006.01)	A 6 1 K	39/07	
C 1 2 N 9/16 (2006.01)	C 1 2 N	9/16	B

(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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, 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

(72)発明者 ブロックシュテット, ダーク, ジー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 8 0 4 リッチモンド, ビーチ ヘッド ウェイ 2 5 2 8

(72)発明者 ラウア, ピーター, エム.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 7 0 6 アルバニー, ソラノ アベニュー 1 0 0 3

(72)発明者 ハンソン, ウィリアム, ジー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 9 6 ウォルナット クリーク, カムローズ プレース 1 0 1

(72)発明者 レオン, メレディス, ライ リン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 1 1 オークランド, サロニ ドライブ 6 6 1 5

(72)発明者 ファッソ, マルセラ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 8 0 4 リッチモンド, サウスウィンド サークル 5 7

(72)発明者 レイ, クリストファー, スティーブン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 8 0 5 リッチモンド, カールストン ストリート 4 4 5

(72)発明者 ドレーク, チャールズ, ジー.
アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 1 2 ボルチモア, ハザーライ ロード 8 0 0

F ターム(参考) 4B050 CC05 DD01 LL01

4B065 AA01X AA57X AA72X AA88X AA90X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
CA45

4C085 AA03 BA08 BB01 CC07 DD62 EE01

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA89 EA20 EA31

FA74