

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-535855
(P2024-535855A)

(43)公表日 令和6年10月2日(2024.10.2)

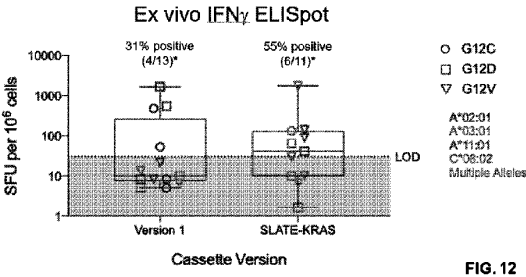
(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z Z N A 4 C 0 8 5
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/861 (2006.01)	C 1 2 N	15/861	Z 4 H 0 4 5
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705	
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全208頁) 最終頁に続く		
(21)出願番号	特願2024-516894(P2024-516894)	(71)出願人	518213307	
(86)(22)出願日	令和4年9月19日(2022.9.19)		グリットストーン バイオ インコーポレ	
(85)翻訳文提出日	令和6年4月11日(2024.4.11)		イテッド	
(86)国際出願番号	PCT/US2022/076680		アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォル	
(87)国際公開番号	WO2023/044493		ニア州 エメリービル ホートン ストリ	
(87)国際公開日	令和5年3月23日(2023.3.23)		ート 5 9 5 9 スイート 3 0 0	
(31)優先権主張番号	63/245,703	(74)代理人	100102978	
(32)優先日	令和3年9月17日(2021.9.17)		弁理士 清水 初志	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100205707	
(31)優先権主張番号	63/281,029		弁理士 小寺 秀紀	
(32)優先日	令和3年11月18日(2021.11.18)	(74)代理人	100160923	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 山口 裕孝	
(31)優先権主張番号	63/321,587	(74)代理人	100119507	
			弁理士 刑部 俊	
		(74)代理人	100142929	
最終頁に続く		最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 K R A S ネオ抗原療法

(57)【要約】

本明細書では、K R A S ネオエピトープコード配列の複数の繰り返しを有しかつ／または免疫優性なエピトープを欠く抗原コード核酸配列を含む組成物を開示する。(1) K R A S 関連MHCクラスIネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2) 結腸直腸癌 (C R C)、(3) 非小細胞肺癌 (N S C L C)、及び／または(4) 膵管腺癌 (P D A) を含むがんを有する対象などにおける、ワクチンとしてのそれらの使用を含む、当該組成物と関連するヌクレオチド、細胞、及び方法もまた開示する。

【選択図】 図 1 2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

疾患を有する対象を治療するための方法であって、前記疾患が、（１）K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを発現する固形腫瘍、（２）結腸直腸癌（C R C）、（３）非小細胞肺癌（N S C L C）、及び／または（４）膵管腺癌（P D A）を含むがんであり、前記方法が、前記対象に、抗原ベースワクチンを前記対象に投与することを含み、前記抗原ベースワクチンが、抗原コードカセット、または前記カセットによってコードされたポリペプチド配列を含み、前記抗原コードカセットが、5' から 3' 方向に、次式によって記述される少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列を含む、前記方法：

$$(E_x - (E^N_n)_y)_z$$

〔式中、

E は、異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

n は、別個の異なるエピトープコード核酸配列の数を表しかつ、0 を含む任意の整数であり、

E^N は、それぞれの対応する n で前記別個の異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

z の各繰り返しについて：各 n について $x = 0$ または 1、 $y = 0$ または 1 であり、x または y の少なくとも一方は 1 であり、

$z = 2$ 以上であり、前記抗原コード核酸配列は、E、所与の E^N 、またはこれらの組み合わせの少なくとも 1 つの 2 回の繰り返しを含み、

前記少なくとも 2 回の繰り返しを含む前記異なるエピトープコード核酸配列のうちの少なくとも 1 つは、前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする〕。

【請求項 2】

疾患を有する対象を治療するための方法であって、前記疾患が、（１）K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを発現する固形腫瘍、（２）結腸直腸癌（C R C）、（３）非小細胞肺癌（N S C L C）、及び／または（４）膵管腺癌（P D A）を含むがんであり、前記方法が、前記対象に、抗原ベースワクチンを前記対象に投与することを含み、前記抗原ベースワクチンが抗原発現系を含み、前記抗原発現系が 1 つ以上のベクターを含み、前記 1 つ以上のベクターが、

（a）ベクター骨格であって、

（i）少なくとも 1 つのプロモーターヌクレオチド配列と、

（i i）任意で、少なくとも 1 つのポリアデニル化（ポリ（A））配列と

を含む、前記ベクター骨格と、

（b）カセットであって、

（i）少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列であって、

（I）前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードするエピトープコード核酸配列

を含み、前記エピトープコード核酸配列のそれぞれが、

（A）任意で、5' リンカー配列と、

（B）任意で、3' リンカー配列と

を含む、前記少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列と、

（i i）任意で、前記抗原コード核酸配列に機能的に連結された第 2 のプロモーターヌクレオチド配列と、

（i i i）任意で、少なくとも 1 つの M H C クラス I I エピトープコード核酸配列と

、

（i v）任意で、G P G P G アミノ酸リンカー配列（配列番号 5 6）をコードする少なくとも 1 つの核酸配列と、

（v）任意で、天然のポリ（A）配列または前記ベクター骨格に対して外因性のポリ

（A）配列である少なくとも 1 つの第 2 のポリ（A）配列と

を含む、前記カセットと

を含み、

前記第2のプロモーターヌクレオチド配列が存在しない場合、前記抗原コード核酸配列が前記少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列と機能的に連結され、
前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列が、前記KRAS関連MHCクラスIネオエピトープをコードする前記エピトープコード核酸配列の少なくとも2回の繰り返しを含む、
前記治療方法。

【請求項3】

前記エピトープコード核酸配列が、がんを有する前記対象の腫瘍、または、感染した前記対象の細胞もしくは試料に由来する、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項4】

前記エピトープコード核酸配列が、がんを有する前記対象の腫瘍、ならびに、感染した前記対象の細胞および試料に由来しない、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

がんを有する対象における免疫応答を刺激するための方法であって、前記がんが、(1) KRAS関連MHCクラスIネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2) 結腸直腸癌(CRC)、(3) 非小細胞肺癌(NSCLC)、及び／または(4) 膵管腺癌(PDA)を含み、前記方法が、前記対象に、抗原ベースワクチンを前記対象に投与することを含み、前記抗原ベースワクチンが、抗原コードカセット、または前記カセットによってコードされたポリペプチド配列を含み、前記抗原コードカセットが、5'から3'方向に、次式によって記述される少なくとも1つの抗原コード核酸配列を含む、前記方法：

$$(E_x - (E^N_n)_y)z$$

【式中、

Eは、異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

nは、別個の異なるエピトープコード核酸配列の数を表しかつ、0を含む任意の整数であり、

E^N は、それぞれの対応するnで前記別個の異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

zの各繰り返しについて：各nについて $x = 0$ または 1 、 $y = 0$ または 1 であり、xまたはyの少なくとも一方は1であり、

$z = 2$ 以上であり、前記抗原コード核酸配列は、E、所与の E^N 、またはこれらの組み合わせの少なくとも1つの2回の繰り返しを含み、

前記少なくとも2回の繰り返しを含む前記異なるエピトープコード核酸配列のうちの少なくとも1つは、前記KRAS関連MHCクラスIネオエピトープをコードする】。

【請求項6】

がんを有する対象における免疫応答を刺激するための方法であって、前記がんが、(1) KRAS関連MHCクラスIネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2) 結腸直腸癌(CRC)、(3) 非小細胞肺癌(NSCLC)、及び／または(4) 膵管腺癌(PDA)を含み、前記方法が、前記対象に、抗原ベースワクチンを前記対象に投与することを含み、前記抗原ベースワクチンが抗原発現系を含み、前記抗原発現系が1つ以上のベクターを含み、

前記1つ以上のベクターが、

(a) ベクター骨格であって、

(i) 少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列と、

(ii) 任意で、少なくとも1つのポリアデニル化(ポリ(A))配列と

を含む、前記ベクター骨格と、

(b) カセットであって、

(i) 少なくとも1つの抗原コード核酸配列であって、

(I) 前記KRAS関連MHCクラスIネオエピトープをコードするエピトープコード核酸配列

を含み、前記エピトープコード核酸配列のそれぞれが、

10

20

30

40

50

(A) 任意で、5'リンカー配列と、

(B) 任意で、3'リンカー配列と

を含む、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列と、

(i i) 任意で、前記抗原コード核酸配列に機能的に連結された第2のプロモーターヌクレオチド配列と、

(i i i) 任意で、少なくとも1つのMHCクラスI IEピトープコード核酸配列と

(i v) 任意で、G P G P G アミノ酸リンカー配列 (配列番号 5 6) をコードする少なくとも1つの核酸配列と、

(v) 任意で、天然のポリ (A) 配列または前記ベクター骨格に対して外因性のポリ

10

(A) 配列である少なくとも1つの第2のポリ (A) 配列と

を含む、前記カセットと

を含み、

前記第2のプロモーターヌクレオチド配列が存在しない場合、前記抗原コード核酸配列が前記少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列と機能的に連結され、

前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列が、前記K R A S 関連MHCクラスI ネオエピトープをコードする前記エピトープコード核酸配列の少なくとも2回の繰り返しを含む、前記方法。

【請求項7】

前記対象が、前記少なくとも1つのエピトープ配列を提示すると予想されるかまたは提示することが知られている少なくとも1つのH L A アレルを発現し、任意で、提示されると予想されるかまたは提示されることが知られている前記少なくとも1つのエピトープ配列が、前記K R A S 関連MHCクラスI ネオエピトープを含む、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項8】

前記対象が、前記少なくとも1つのエピトープ配列を提示すると予想されるかまたは提示することが知られている少なくとも1つのH L A アレルを発現し、前記少なくとも1つのエピトープ配列が、細胞の表面においてMHCクラスI により提示されることが知られているかまたは疑われるエピトープを含み、任意で、提示されると予想されるかまたは提示されることが知られている前記少なくとも1つのエピトープ配列が、前記K R A S 関連MHCクラスI ネオエピトープを含む、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項9】

前記細胞の表面が腫瘍細胞表面である、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

がんを有する対象において免疫応答を誘導するための方法であって、前記がんが、(1) K R A S 関連MHCクラスI ネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2) 結腸直腸癌 (C R C)、(3) 非小細胞肺癌 (N S C L C)、及び／または(4) 膵管腺癌 (P D A) を含み、前記方法が、前記対象に、抗原ベースワクチンを前記対象に投与することを含み、前記抗原ベースワクチンが、抗原コードカセット、または前記カセットによってコードされたポリペプチド配列を含み、前記抗原コードカセットが、5'から3'方向に、次式に 40 によって記述される少なくとも1つの抗原コード核酸配列を含む、前記方法：

$(E_x - (E^N n)_y) z$

【式中、

E は、異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

n は、別個の異なるエピトープコード核酸配列の数を表しかつ、0を含む任意の整数であり、

E^N は、それぞれの対応する n で前記別個の異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

z の各繰り返しについて：各 n について $x = 0$ または 1、 $y = 0$ または 1 であり、x または y の少なくとも一方は 1 であり、

50

z = 2 以上であり、前記抗原コード核酸配列は、E、所与の E^N、またはこれらの組み合わせの少なくとも 1 つの 2 回の繰り返しを含み、
前記少なくとも 2 回の繰り返しを含む前記異なるエピトープコード核酸配列のうちの少なくとも 1 つは、前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする】。

【請求項 1 1】

がんを有する対象における免疫応答を誘導するための方法であって、前記がんが、(1) K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2) 結腸直腸癌 (C R C)、(3) 非小細胞肺癌 (N S C L C)、及び／または (4) 膵管腺癌 (P D A) を含み、前記方法が、前記対象に、抗原ベースワクチンを前記対象に投与することを含み、前記抗原ベースワクチンが抗原発現系を含み、前記抗原発現系が 1 つ以上のベクターを含み、

10

前記 1 つ以上のベクターが、

(a) ベクター骨格であって、

(i) 少なくとも 1 つのプロモーターヌクレオチド配列と、

(i i) 任意で、少なくとも 1 つのポリアデニル化 (ポリ (A)) 配列と

を含む、前記ベクター骨格と、

(b) カセットであって、

(i) 少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列であって、

(I) 前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードするエピトープコード核酸配列

20

を含み、前記エピトープコード核酸配列のそれぞれが、

(A) 任意で、5' リンカー配列と、

(B) 任意で、3' リンカー配列と

を含む、前記少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列と、

(i i) 任意で、前記抗原コード核酸配列に機能的に連結された第 2 のプロモーターヌクレオチド配列と、

(i i i) 任意で、少なくとも 1 つの M H C クラス I I エピトープコード核酸配列と

、

(i v) 任意で、G P G P G アミノ酸リンカー配列 (配列番号 5 6) をコードする少なくとも 1 つの核酸配列と、

30

(v) 任意で、天然のポリ (A) 配列または前記ベクター骨格に対して外因性のポリ

(A) 配列である少なくとも 1 つの第 2 のポリ (A) 配列と

を含む、前記カセットと

を含み、

前記第 2 のプロモーターヌクレオチド配列が存在しない場合、前記抗原コード核酸配列が前記少なくとも 1 つのプロモーターヌクレオチド配列と機能的に連結され、

前記少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列が、前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする前記エピトープコード核酸配列の少なくとも 2 回の繰り返しを含み、前記対象が、前記少なくとも 1 つの K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを提示すると予想されるかまたは提示することが知られている少なくとも 1 つの H L A アレルを発現する、前記方法。

40

【請求項 1 2】

前記抗原ベースワクチンが、プライミング用量として投与される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記抗原ベースワクチンが、1 回以上のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記ブースター用量が、前記プライミング用量と異なる、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

50

a) 前記プライミング用量が、チンパンジーアデノウイルスベクターを含み、前記ブースター用量が、アルファウイルスベクターを含む；または

b) 前記プライミング用量が、アルファウイルスベクターを含み、前記ブースター用量が、チンパンジーアデノウイルスベクターを含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記ブースター用量が、前記プライミング用量と同じである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 1 回以上のブースター用量の注射部位が、前記プライミング用量の注射部位に可能な限り近い、請求項 13～16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記対象の HLA ハプロタイプを測定することまたは測定していたことをさらに含む、前記方法の請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記抗原ベースワクチンが、筋肉内 (IM)、皮内 (ID)、皮下 (SC)、または静脈内 (IV) 投与される、前記方法の請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

前記抗原ベースワクチンが、筋肉内 (IM) 投与される、前記方法の請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

前記 IM 投与が、別々の注射部位に施される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記別々の注射部位が対向する三角筋内である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記別々の注射部位が両側の殿筋または大腿直筋部位内である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記 KRAS 関連 MHC クラス I ネオエピトープまたは前記 KRAS 変異が、KRAS G12C 変異、KRAS G12V 変異、KRAS G12D 変異、または、KRAS Q61H 変異を含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

前記 KRAS 関連 MHC クラス I ネオエピトープまたは前記 KRAS 変異が、配列番号 75～82 に示されるアミノ酸配列のいずれか 1 つを含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

前記抗原コードカセットが、配列番号 75～82 に示されるそれぞれのアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

前記抗原コードカセットが、配列番号 75～82 に示されるそれぞれのアミノ酸配列の 2 回以上の繰り返しを含み、任意で、配列番号 75～82 に示されるそれぞれのアミノ酸配列の 4 回の繰り返しを含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法または組成物。

【請求項 28】

前記 KRAS 関連 MHC クラス I ネオエピトープまたは前記 KRAS 変異が、配列番号 57、配列番号 58、配列番号 59、または配列番号 60 に示されるアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

前記エピトープコード核酸配列が、異なる KRAS 関連 MHC クラス I ネオエピトープまたは異なる KRAS 変異を独立してコードする 2 個以上の異なるエピトープコード核酸配列を含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

10

20

30

40

50

前記エピトープコード核酸配列のそれぞれが、異なるKRAS関連MHCクラスIネオエピトープまたは異なるKRAS変異を独立してコードする、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項31】

前記エピトープコード核酸配列が、KRAS G12C変異、KRAS G12V変異、KRAS G12D変異、またはKRAS Q61H変異を独立してコードする2個以上の異なるエピトープコード核酸配列を含む、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項32】

前記エピトープコード核酸配列が、KRAS G12C変異、KRAS G12V変異、及びKRAS G12D変異、及び任意でKRAS Q61H変異のそれぞれを独立してコードする、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項33】

前記抗原コード核酸配列が、配列番号64または配列番号65に示されるアミノ酸配列を含むペプチドをコードする、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項34】

前記カセットが、

(1) 前記カセット内でコードされ対象にて免疫応答を刺激することができる別のMHCクラスIエピトープと比較して、ワクチン組成物中で前記対象に投与されたときに5倍以上の免疫応答を刺激し、かつ／または

(2) 免疫優性のMHCクラスIエピトープの非存在下で他のMHCクラスIエピトープが投与された際の免疫応答と比較して、ワクチン組成物中で対象に投与されたときに、前記カセット内でコードされる別のMHCクラスIエピトープに対する免疫応答を低減し、任意で、前記免疫応答が、検出限界を下回って低減され、かつ／もしくは、前記免疫応答が、治療的に有効な応答ではない

前記免疫優性MHCクラスIエピトープ

をコードしない、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項35】

前記がんが、KRAS関連及び／またはNRAS関連MHCクラスIネオエピトープを発現する固形腫瘍を含む、前記方法の請求項のいずれか1項。

【請求項36】

前記KRAS関連及び／またはNRAS関連MHCクラスIネオエピトープが、KRAS__G12C、NRAS__G12C、KRAS__G12D、NRAS__G12D、KRAS__G12V、NRAS__G12V、KRAS__Q61H、及びNRAS__Q61Hからなる群から選択される変異を含む、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

前記がんが、結腸直腸癌(CRC)を含む、前記方法の請求項のいずれか1項。

【請求項38】

前記がんが、非小細胞肺癌(NSCLC)を含む、前記方法の請求項のいずれか1項。

【請求項39】

前記がんが、膵管腺癌(PDA)を含む、前記方法の請求項のいずれか1項。

【請求項40】

前記抗原ベースワクチン、または前記1回以上のブースター用量が、4週毎(Q4W)に投与される、前記方法の請求項のいずれか1項。

【請求項41】

前記抗原ベースワクチン、または前記1回以上のブースター用量が、8週毎(Q8W)に投与される、前記方法の請求項のいずれか1項。

【請求項42】

前記抗原ベースワクチン、または前記1回以上のブースター用量が、1ヶ月毎に投与される、前記方法の請求項のいずれか1項。

【請求項43】

10

20

30

40

50

前記抗原ベースワクチン、または前記 1 回以上のブースター用量が、2 ヶ月毎に投与される、前記方法の請求項のいずれか 1 項。

【請求項 4 4】

前記方法が、

前記対象に、自己複製アルファウイルスベースの発現系を送達するための組成物を投与することと、

前記対象に、チンパンジーアデノウイルス（C h A d V）ベースの発現系を送達するための組成物を投与することと

を含み、

前記 C h A d V ベースの発現系を送達するための前記組成物がプライミング用量として投与され、前記自己複製アルファウイルスベースの発現系を送達するための前記組成物が、1 回以上のブースター用量として投与される、前記方法の請求項のいずれか 1 項。

10

【請求項 4 5】

2 回以上のブースター用量が投与される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 6】

1、2、3、4、5、6、7、または 8 回のブースター用量が投与される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記 C h A d V ベースの発現系が、ブースター用量としてさらに投与される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 4 8】

前記 C h A d V ベースのブースター用量が、単回ブースター用量として投与されるのみである、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記 C h A d V ベースの発現系が、前記 C h A d V ベースの発現系の前記プライミング用量の 1 4 0 日後、または約 1 4 0 日後に、前記ブースター用量として投与される、請求項 4 7 または 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記 C h A d V ベースの発現系が、前記 C h A d V ベースの発現系の前記プライミング用量の 2 0 週後、または約 2 0 週後に、前記ブースター用量として投与される、請求項 4 7 または 4 8 に記載の方法。

30

【請求項 5 1】

前記 C h A d V ベースの発現系が、前記 C h A d V ベースの発現系の前記プライミング用量の 5 ヶ月後、または約 5 ヶ月後に、前記ブースター用量として投与される、請求項 4 7 または 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記 C h A d V ベースの発現系が、前記 C h A d V ベースの発現系の前記プライミング用量の 1 4 0 日後、または 1 4 0 日よりも後に、前記ブースター用量として投与される、請求項 4 7 または 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記 C h A d V ベースの発現系が、前記 C h A d V ベースの発現系の前記プライミング用量の 2 0 週後、または 2 0 週よりも後に、前記ブースター用量として投与される、請求項 4 7 または 4 8 に記載の方法。

40

【請求項 5 4】

前記 C h A d V ベースの発現系が、前記 C h A d V ベースの発現系の前記プライミング用量の 5 ヶ月後、または 5 ヶ月よりも後に、前記ブースター用量として投与される、請求項 4 7 または 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記自己複製アルファウイルスベースの発現系が、少なくとも 2 回のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 56】

前記自己複製アルファウイルススペースの発現系が、少なくとも28日の間隔を空けて、少なくとも2回以上のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 57】

前記自己複製アルファウイルススペースの発現系が、少なくとも4週（Q4W）の間隔を空けて、少なくとも2回以上のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 58】

前記自己複製アルファウイルススペースの発現系が、少なくとも1ヶ月の間隔を空けて、少なくとも2回以上のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項 59】

前記自己複製アルファウイルススペースの発現系が、少なくとも56日の間隔を空けて、少なくとも2回以上のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 60】

前記自己複製アルファウイルススペースの発現系が、少なくとも8週（Q8W）の間隔を空けて、少なくとも2回以上のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 61】

前記自己複製アルファウイルススペースの発現系が、少なくとも2ヶ月の間隔を空けて、少なくとも2回以上のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 62】

前記自己複製アルファウイルススペースの発現系が、前記ChAdVベースの発現系の前記プライミング用量の28及び84日後、または約28及び84日後に、少なくとも2回のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 63】

前記自己複製アルファウイルススペースの発現系が、前記ChAdVベースの発現系の前記プライミング用量の4及び12週後、または約4及び12週後に、少なくとも2回のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 64】

前記自己複製アルファウイルススペースの発現系が、前記ChAdVベースの発現系の前記プライミング用量の1及び3ヶ月後、または約1及び3ヶ月後に、少なくとも2回のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 65】

前記自己複製アルファウイルススペースの発現系が、少なくとも4回のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 66】

前記自己複製アルファウイルススペースの発現系が、前記ChAdVベースの発現系の前記プライミング用量と比較して、28、84、196、及び252日後に、または、約28、84、196、及び252日後に投与される、請求項65に記載の方法。

40

【請求項 67】

前記自己複製アルファウイルススペースの発現系が、前記ChAdVベースの発現系の前記プライミング用量と比較して、4、12、28、及び40週後に、または、約4、12、28、及び40週後に投与される、請求項65に記載の方法。

【請求項 68】

前記自己複製アルファウイルススペースの発現系が、前記ChAdVベースの発現系の前記プライミング用量と比較して、1、3、7、及び10ヶ月後に、または、約1、3、7

50

、及び10ヶ月後に投与される、請求項65に記載の方法。

【請求項69】

1種以上の免疫調節剤の投与をさらに含み、任意で、前記免疫調節剤が、前記組成物または医薬組成物の投与前、投与と同時に、または投与後に投与される、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項70】

前記1種以上の免疫調節剤が、抗CTLA4抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗PD-1抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗PD-L1抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗4-1BB抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または、抗OX-40抗体もしくはその抗原結合フラグメントからなる群から選択される、請求項55に記載の方法。

10

【請求項71】

前記免疫調節剤が、静脈内（IV）、筋肉内（IM）、皮内（ID）、または皮下（SC）投与される、請求項56または57に記載の方法。

【請求項72】

前記皮下投与が、前記組成物もしくは医薬組成物の投与部位付近である、または、1種以上のベクターもしくは組成物流入領域リンパ節に極めて近接している、請求項58に記載の方法。

【請求項73】

前記プライミング用量及び第1のブースター用量だけを伴う、抗CTLA-4抗体またはその抗原結合フラグメントの投与を含む、請求項56～59のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項74】

前記抗CTLA-4抗体がイピリムマブを含む、請求項60に記載の方法。

【請求項75】

前記イピリムマブが、30mgの用量で皮下投与される、請求項61に記載の方法。

【請求項76】

任意で含む、抗PD-L1抗体またはその抗原結合フラグメントの4週毎（Q4W）の投与を含む、請求項56～62のいずれか1項に記載の方法。

【請求項77】

抗PD-L1抗体が、アテゾリズマブまたはニボルマブを含む、請求項63に記載の方法。

30

【請求項78】

前記アテゾリズマブが、1680mgの用量で静脈内投与され、または、前記ニボルマブが、480mgの用量で静脈内投与される、請求項64に記載の方法。

【請求項79】

1種以上の前記免疫調節剤の、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13回の投与を含む、請求項56～65のいずれか1項に記載の方法。

【請求項80】

前記方法が、抗PD-L1抗体の少なくとも13回の投与を含む、請求項56～65のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項81】

前記1種以上の免疫調節剤が、アテゾリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、及びイピリムマブからなる群から選択される、請求項56～67のいずれか1項に記載の方法。

【請求項82】

— KRAS G12C変異を含む前記KRAS関連MHCクラスIネオエピトープが、VVVGACGVGK（配列番号75）、KLVVVGACGV（配列番号76）、及びGACGVGKSALからなる群から選択され、

— KRAS G12D変異を含む前記KRAS関連MHCクラスIネオエピトープが、VVGADGVGK（配列番号77）、VVVGADGVGK（配列番号78）、KL

50

V V V G A D G V、及び G A D G V G K S A L からなる群から選択され、

— K R A S G 1 2 V 変異を含む前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープが、V V G A V G V G K (配列番号 7 9)、V V V G A V G V G K (配列番号 8 1)、A V G V G K S A L (配列番号 8 0)、及び G A V G V G K S A L からなる群から選択される、

前記方法または組成物の請求項のいずれか 1 項。

【請求項 8 3】

K R A S G 1 2 C 変異を含む前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープが、V V G A C G V G K (配列番号 7 5)、K L V V V G A C G V (配列番号 7 6)、及び G A C G V G K S A L からなる群から選択される、前記方法または組成物の請求項のいずれか 1 項。

10

【請求項 8 4】

K R A S G 1 2 D 変異を含む前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープが、V V G A D G V G K (配列番号 7 7)、V V V G A D G V G K (配列番号 7 8)、K L V V V G A D G V、及び G A D G V G K S A L からなる群から選択される、前記方法または組成物の請求項のいずれか 1 項。

【請求項 8 5】

K R A S G 1 2 V 変異を含む前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープが、V V G A V G V G K (配列番号 7 9)、V V V G A V G V G K (配列番号 8 1)、A V G V G K S A L (配列番号 8 0)、及び G A V G V G K S A L からなる群から選択される、前記方法または組成物の請求項のいずれか 1 項。

20

【請求項 8 6】

前記免疫応答を前記刺激することが、分子応答を刺激することを含む、前記方法または組成物の請求項のいずれか 1 項。

【請求項 8 7】

前記分子応答が、c t D N A の減少を含む、請求項 7 3 に記載の方法または組成物。

【請求項 8 8】

前記 c t D N A の減少が、c t D N A の、少なくとも 2 0 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 4 0 %、または少なくとも 5 0 % の減少である、請求項 7 4 に記載の方法または組成物。

30

【請求項 8 9】

前記 c t D N A の減少が、c t D N A の、少なくとも 3 0 % の減少である、請求項 7 4 に記載の方法または組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、あらゆる目的でその全容を参照によって本明細書に援用する 2 0 2 1 年 9 月 1 7 日出願の米国特許仮出願第 6 3 / 2 4 5 , 7 0 3 号、2 0 2 1 年 1 1 月 1 8 日出願の同第 6 3 / 2 8 1 , 0 2 9 号、2 0 2 2 年 3 月 1 8 日出願の同第 6 3 / 3 2 1 , 5 8 7 号、及び、2 0 2 2 年 9 月 7 日出願の同第 6 3 / 3 7 4 , 8 8 8 号の利益を主張するものである。

40

【0 0 0 2】

配列表

本出願は、A S C I I フォーマットで電子的に提出され、その全容を参照によって本明細書に援用する配列表を含む。前記 A S C I I コピーは、2 0 X X 年 X X X に作成され、X X X の名前が付けられており、そのサイズは X X X バイトである。

【背景技術】

【0 0 0 3】

腫瘍特異的抗原に基づく治療用ワクチンは、次世代の個別化がん免疫療法として極めて

50

有望である。^{1~3}例えば、非小細胞肺癌（NSCLC）及び黒色腫などの高い変異負荷を有するがんは、比較的ネオ抗原を生成しやすいことからこうした療法に特に適した標的となる。^{4, 5}初期のエビデンスは、ネオ抗原ベースのワクチン接種がT細胞応答を誘導し⁶、ネオ抗原を標的とした細胞療法が選択された患者における特定の状況下で腫瘍退縮を引き起こし得ることを示している。⁷

【0004】

がん及び感染症の両方の状況での抗原ワクチン設計における疑問の1つは、存在する多くのコーディング変異のうちのどれが、「最良の」治療抗原、例えば、免疫を誘導することができる抗原を生じるかというものである。

【0005】

現行の抗原予測法の課題に加えて、多くがヒト由来のものである、ヒトにおける抗原送達に使用することができる既存のベクター系にもやはり特定の課題が存在する。例えば、多くのヒトは、過去の自然曝露の結果としてヒトウイルスに対する既存の免疫を有しており、この免疫が、がん治療または感染症に対するワクチン接種などでのワクチン接種計画において抗原を送達するための組換えヒトウイルスの使用にとって大きな障害となりうる。上記の課題に対処してワクチン接種計画における一定の進歩があったものの、改善されたワクチン効力及び有効性など、特に臨床用途において依然として改善が求められている。

【発明の概要】

【0006】

本明細書では、疾患を有する対象を治療するための方法であって、前記疾患が、（1）KRAS関連MHCクラスIネオエピトープを発現する固形腫瘍、（2）結腸直腸癌（CRC）、（3）非小細胞肺癌（NSCLC）、及び／または（4）膵管腺癌（PDA）を含むがんであり、前記方法が、前記対象に抗原ベースワクチンを投与することを含み、前記抗原ベースワクチンが、抗原コードカセット、または前記カセットによってコードされたポリペプチド配列を含み、前記抗原コードカセットが、5'から3'方向に、次式によって記述される少なくとも1つの抗原コード核酸配列を含む、前記方法を開示する：

$(E_x - (E^N)_n)_y)_z$

【式中、

Eは、異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

nは、別個の異なるエピトープコード核酸配列の数を表しかつ、0を含む任意の整数であり、

E^N は、それぞれの対応するnで前記別個の異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

zの各繰り返しについて：各nについてx=0または1、y=0または1であり、xまたはyの少なくとも一方は1であり、

z=2以上であり、前記抗原コード核酸配列は、E、所与の E^N 、またはこれらの組み合わせの少なくとも2回の繰り返しを含み、

前記少なくとも2回の繰り返しを含む前記異なるエピトープコード核酸配列の少なくとも1つはKRAS関連MHCクラスIネオエピトープをコードする】。

【0007】

本明細書では、疾患を有する対象を治療するための方法であって、前記疾患が、（1）KRAS関連MHCクラスIネオエピトープを発現する固形腫瘍、（2）結腸直腸癌（CRC）、（3）非小細胞肺癌（NSCLC）、及び／または（4）膵管腺癌（PDA）を含むがんであり、前記方法が、前記対象に抗原ベースワクチンを投与することを含み、前記抗原ベースワクチンが抗原発現系を含み、前記抗原発現系が1つ以上のベクターを含み、前記1つ以上のベクターが、

（a）ベクター骨格であって、

（i）少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列と、

（ii）任意で、少なくとも1つのポリアデニル化（ポリ（A））配列と

を含む、前記ベクター骨格と、

(b) カセットであって、

(i) 少なくとも1つの抗原コード核酸配列であって、

(I) K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードするエピトープコード核酸配列

を含み、前記エピトープコード核酸配列のそれぞれが、

(A) 任意で、5'リンカー配列と、

(B) 任意で、3'リンカー配列と

を含む、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列と、

(ii) 任意で、前記抗原コード核酸配列に機能的に連結された第2のプロモーターヌクレオチド配列と、 10

(iii) 任意で、少なくとも1つの M H C クラス I エピトープコード核酸配列と

(iv) 任意で、G P G P G アミノ酸リンカー配列 (配列番号 56) をコードする少なくとも1つの核酸配列と、

(v) 任意で、天然のポリ (A) 配列または前記ベクター骨格に外因性のポリ (A) 配列である少なくとも1つの第2のポリ (A) 配列と

を含む、前記カセットと

を含み、前記第2のプロモーターヌクレオチド配列が存在しない場合、前記抗原コード核酸配列が前記少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列と機能的に連結され、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列が、K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする前記エピトープコード核酸配列の少なくとも2回の繰り返しを含む、前記方法もまた開示する。 20

【0008】

いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列は、がんを有する対象の腫瘍、または、感染した対象の細胞もしくは試料に由来する。いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列は、がんを有する対象の腫瘍、ならびに、感染した対象の細胞および試料に由来しない。

【0009】

本明細書では、がんを有する対象における免疫応答を刺激するための方法であって、前記がんが、(1) K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2) 結腸直腸癌 (C R C)、(3) 非小細胞肺癌 (N S C L C)、及び／または (4) 膵管腺癌 (P D A) を含み、前記方法が、前記対象に抗原ベースワクチンを投与することを含み、前記抗原ベースワクチンが抗原コードカセット、または前記カセットによってコードされたポリペプチド配列を含み、前記抗原コードカセットが、5'から3'方向に、次式によって記述される少なくとも1つの抗原コード核酸配列を含む、前記方法もまた開示する： 30

$$(E_x - (E^N)_y)_z$$

[式中、

E は、異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、 40

n は、別個の異なるエピトープコード核酸配列の数を表しかつ、0を含む任意の整数であり、

E^N は、それぞれの対応する n で前記別個の異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

z の各繰り返しについて：各 n について $x = 0$ または 1、 $y = 0$ または 1 であり、x または y の少なくとも一方は 1 であり、

$z = 2$ 以上であり、前記抗原コード核酸配列は、E、所与の E^N 、またはこれらの組み合わせの少なくとも2回の繰り返しを含み、

前記少なくとも2回の繰り返しを含む前記異なるエピトープコード核酸配列の少なくとも1つは K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする]。 50

【0010】

本明細書では、がんを有する対象における免疫応答を刺激するための方法であって、前記がんが、(1) K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2) 結腸直腸癌 (C R C)、(3) 非小細胞肺癌 (N S C L C)、及び／または (4) 膵管腺癌 (P D A) を含み、前記方法が、前記対象に抗原ベースワクチンを投与することを含み、前記抗原ベースワクチンが抗原発現系を含み、前記抗原発現系が1つ以上のベクターを含み、前記1つ以上のベクターが、

(a) ベクター骨格であって、

(i) 少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列と、

(i i) 任意で、少なくとも1つのポリアデニル化 (ポリ (A)) 配列と

を含む、前記ベクター骨格と、

(b) カセットであって、

(i) 少なくとも1つの抗原コード核酸配列であって、

(I) K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードするエピトープコード核酸配列

を含み、前記エピトープコード核酸配列のそれぞれが、

(A) 任意で、5'リンカー配列と、

(B) 任意で、3'リンカー配列と

を含む、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列と、

(i i) 任意で、前記抗原コード核酸配列に機能的に連結された第2のプロモーターヌクレオチド配列と、

(i i i) 任意で、少なくとも1つの M H C クラス I I エピトープコード核酸配列と

、
(i v) 任意で、G P G P G アミノ酸リンカー配列 (配列番号 5 6) をコードする少なくとも1つの核酸配列と、

(v) 任意で、天然のポリ (A) 配列または前記ベクター骨格に外因性のポリ (A) 配列である少なくとも1つの第2のポリ (A) 配列と

を含む、前記カセットと

を含み、前記第2のプロモーターヌクレオチド配列が存在しない場合、前記抗原コード核酸配列が前記少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列と機能的に連結され、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列が、K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする前記エピトープコード核酸配列の少なくとも2回の繰り返しを含む、前記方法もまた開示する。

【0011】

いくつかの態様では、対象は、少なくとも1つのエピトープ配列を提示すると予想されるかまたは提示することが知られている少なくとも1つの H L A アレルを発現し、任意で、提示されると予想されるかまたは提示されることが知られている少なくとも1つのエピトープ配列は、K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを含む。いくつかの態様では、対象は、少なくとも1つのエピトープ配列を提示すると予想されるかまたは提示することが知られている少なくとも1つの H L A アレルを発現し、少なくとも1つのエピトープ配列は、細胞の表面において M H C クラス I により提示されることが知られているかまたは疑われるエピトープを含み、任意で、提示されると予想されるかまたは提示されることが知られている少なくとも1つのエピトープ配列は、K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを含む。いくつかの態様では、細胞の表面は腫瘍細胞表面である。

【0012】

本明細書では、がんを有する対象における免疫応答を誘導するための方法であって、前記がんが、(1) K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2) 結腸直腸癌 (C R C)、(3) 非小細胞肺癌 (N S C L C)、及び／または (4) 膵管腺癌 (P D A) を含み、前記方法が、前記対象に抗原ベースワクチンを投与することを含み、前記抗原ベースワクチンが抗原コードカセット、または前記カセットによってコード

10

20

30

40

50

されたポリペプチド配列を含み、前記抗原コードカセットが、5'から3'方向に、次式によって記述される少なくとも1つの抗原コード核酸配列を含む、前記方法もまた開示する：

$$(E_x - (E^N)_n)_y)_z$$

〔式中、

Eは、異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

nは、別個の異なるエピトープコード核酸配列の数を表しかつ、0を含む任意の整数であり、

E^N は、それぞれの対応するnで前記別個の異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

zの各繰り返しについて：各nについて $x = 0$ または1、 $y = 0$ または1であり、xまたはyの少なくとも一方は1であり、

$z = 2$ 以上であり、前記抗原コード核酸配列は、E、所与の E^N 、またはこれらの組み合わせの少なくとも2回の繰り返しを含み、

前記少なくとも2回の繰り返しを含む前記異なるエピトープコード核酸配列の少なくとも1つはKRAS関連MHCクラスIネオエピトープをコードする〕。

〔0013〕

本明細書では、がんを有する対象における免疫応答を誘導するための方法であって、前記がんは、(1)KRAS関連MHCクラスIネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2)結腸直腸癌(CRC)、(3)非小細胞肺癌(NSCLC)、及び／または(4)膵管腺癌(PDA)を含み、前記方法は、前記対象に、抗原ベースワクチンを前記対象に投与することを含み、前記抗原ベースワクチンは、抗原発現系であって、前記抗原発現系を含む、前記抗原発現系を含み、前記抗原発現系は、1つ以上のベクターを含み、前記1つ以上のベクターは、(a)ベクター主鎖であって、前記主鎖は、(i)少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列、及び、(ii)任意で、少なくとも1つのポリアデニル化(ポリ(A))配列を含む、前記ベクター主鎖；ならびに、(b)カセットであって、前記カセットは、(i)少なくとも1つの抗原コード核酸配列であって、(I)前記KRAS関連MHCクラスIネオエピトープをコードするエピトープコード核酸配列を含み、前記エピトープコード核酸配列のそれぞれは、(A)任意で、5'リンカー配列、及び、(B)任意で、3'リンカー配列を含む、前記核酸配列と、(ii)任意で、前記抗原コード核酸配列に機能的に連結された第2のプロモーターヌクレオチド配列と、(iii)任意で、少なくとも1つのMHCクラスIエピトープコード核酸配列と、(iv)任意で、GPGPGアミノ酸リンカー配列(配列番号56)をコードする少なくとも1つの核酸配列と、(v)任意で、少なくとも1つの第2のポリ(A)配列と、を含む、前記カセットを含み、前記第2のポリ(A)配列は、自然のポリ(A)配列、または、ベクター主鎖に対して外来性のポリ(A)配列であり、前記第2のプロモーターヌクレオチド配列が存在しない場合、前記抗原コード核酸配列が前記少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列に機能的に連結されており、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列は、前記KRAS関連MHCクラスIネオエピトープをコードする前記エピトープコード核酸配列の、少なくとも2回の繰り返しを含み、前記対象は、前記少なくとも1つのKRAS関連MHCクラスIネオエピトープを提示すると予想されるかまたは提示することが知られている少なくとも1つのHLAアレルを発現する、前記方法もまた開示する。

〔0014〕

いくつかの態様では、抗原ベースワクチンは、プライミング用量として投与される。いくつかの態様では、抗原ベースワクチンは、1回以上のブースター用量として投与される。いくつかの態様では、ブースター用量は、プライミング用量とは異なる。いくつかの態様では、a)プライミング用量は、チンパンジーアデノウイルスベクターを含み、ブースター用量は、アルファウイルスベクターを含む；または、b)プライミング用量は、アルファウイルスベクターを含み、ブースター用量は、チンパンジーアデノウイルスベクターを含む。いくつかの態様では、ブースター用量は、プライミング用量と同じである。いく

10

20

30

40

50

つかの態様では、1回以上のブースター用量の注射部位は、プライミング用量の注射部位に可能な限り近い。

【0015】

いくつかの態様では、方法は、対象のHLAハプロタイプを測定することまたは測定していたことをさらに含む。

【0016】

いくつかの態様において、抗原ベースワクチンは、筋肉内（IM）、皮内（ID）、皮下（SC）、または静脈内（IV）投与される。いくつかの態様では、抗原ベースワクチンは筋肉内（IM）投与される。いくつかの態様では、筋肉内（IM）投与は、別々の注射部位に施される。いくつかの態様では、別々の注射部位は対向する三角筋内である。いくつかの態様では、別々の注射部位は両側の殿筋または大腿直筋部位内である。

【0017】

いくつかの態様では、KRAS関連MHCクラスIネオエピトープまたはKRAS変異は、KRAS G12C変異、KRAS G12V変異、KRAS G12D変異、またはKRAS Q61H変異を含む。いくつかの態様では、KRAS関連MHCクラスIネオエピトープまたはKRAS変異は、配列番号75～82に示されるアミノ酸配列のいずれか1つを含む。いくつかの態様では、抗原コードカセットは、配列番号75～82に示されるそれぞれのアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、抗原コードカセットは、配列番号75～82に示されるそれぞれのアミノ酸配列の2回以上の繰り返しを含み、任意で、配列番号75～82に示されるそれぞれのアミノ酸配列の4回の繰り返しを含む。いくつかの態様では、KRAS関連MHCクラスIネオエピトープまたはKRAS変異は、配列番号57、配列番号58、配列番号59、または配列番号60に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列は、異なるKRAS関連MHCクラスIネオエピトープまたは異なるKRAS変異を独立してコードする2個以上の異なるエピトープコード核酸配列を含む。いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列のそれぞれは、異なるKRAS関連MHCクラスIネオエピトープまたは異なるKRAS変異を独立してコードする。いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列は、KRAS G12C変異、KRAS G12V変異、KRAS G12D変異、またはKRAS Q61H変異を独立してコードする2個以上の異なるエピトープコード核酸配列を含む。いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列は、KRAS G12C変異、KRAS G12V変異、及びKRAS G12D変異、及び任意でKRAS Q61H変異のそれぞれを独立してコードする。いくつかの態様では、抗原コード核酸配列は、配列番号64または配列番号65に示されるアミノ酸配列を含むペプチドをコードする。

【0018】

いくつかの態様では、カセットは、

（1）カセット内でコードされ対象にて免疫応答を刺激することができる別のMHCクラスIエピトープと比較して、ワクチン組成物中で対象に投与されたときに5倍以上の免疫応答を刺激し、かつ／または

（2）免疫優性のMHCクラスIエピトープの非存在下で他のMHCクラスIエピトープが投与された際の免疫応答と比較して、ワクチン組成物中で対象に投与されたときに、カセット内でコードされる別のMHCクラスIエピトープに対する免疫応答を低減し、任意で、免疫応答が、検出限界を下回って低減され、かつ／もしくは、免疫応答が、治療的に有効な応答ではない

免疫優性のMHCクラスIエピトープをコードしない。

【0019】

いくつかの態様では、がんは、KRAS関連及び／またはNRAS関連MHCクラスIネオエピトープを発現する固形腫瘍を含む。いくつかの態様では、KRAS関連及び／またはNRAS関連MHCクラスIネオエピトープは、KRAS__G12C、NRAS__G12C、KRAS__G12D、NRAS__G12D、KRAS__G12V、NRAS__G

12V、KRAS__Q61H、及びNRAS__Q61Hからなる群から選択される変異を含む。

【0020】

いくつかの態様では、がんは、結腸直腸癌（CRC）を含む。いくつかの態様では、がんは、非小細胞肺癌（NSCLC）を含む。いくつかの態様では、がんは、膵管腺癌（PDA）を含む。

【0021】

いくつかの態様では、抗原ベースワクチン、または1回以上のブースター用量は、4週毎（Q4W）に投与される。いくつかの態様では、抗原ベースワクチン、または1回以上のブースター用量は、8週毎（Q8W）に投与される。いくつかの態様では、抗原ベースワクチン、または1回以上のブースター用量は、1ヶ月毎に投与される。いくつかの態様では、抗原ベースワクチン、または1回以上のブースター用量は、2ヶ月毎に投与される。

10

【0022】

いくつかの態様では、方法は、対象に、自己複製アルファウイルスベースの発現系を送達するための組成物を投与することと、対象に、チンパンジーアデノウイルス（ChAdV）ベースの発現系を送達するための組成物を投与することと、を含み、ChAdVベースの発現系を送達するための組成物はプライミング用量として投与され、自己複製アルファウイルスベースの発現系を送達するための組成物は、1回以上のブースター用量として投与される。

20

【0023】

いくつかの態様では、2回以上のブースター用量が投与される。いくつかの態様では、1、2、3、4、5、6、7、または8回のブースター用量が投与される。

【0024】

いくつかの態様では、ChAdVベースの発現系は、ブースター用量としてさらに投与される。いくつかの態様では、ChAdVベースのブースター用量は、単回ブースター用量として投与されるのみである。いくつかの態様では、ChAdVベースの発現系は、ChAdVベースの発現系のプライミング用量の140日後、または約140日後に、ブースター用量として投与される。いくつかの態様では、ChAdVベースの発現系は、ChAdVベースの発現系のプライミング用量の20日後、または約20日後に、ブースター用量として投与される。いくつかの態様では、ChAdVベースの発現系は、ChAdVベースの発現系のプライミング用量の5ヶ月後、または約5ヶ月後に、ブースター用量として投与される。いくつかの態様では、ChAdVベースの発現系は、ChAdVベースの発現系のプライミング用量の140日後、または140日より後に、ブースター用量として投与される。いくつかの態様では、ChAdVベースの発現系は、ChAdVベースの発現系のプライミング用量の20日後、または20日より後に、ブースター用量として投与される。いくつかの態様では、ChAdVベースの発現系は、ChAdVベースの発現系のプライミング用量の5ヶ月後、または5ヶ月より後に、ブースター用量として投与される。

30

【0025】

いくつかの態様では、自己複製アルファウイルスベースの発現系は、少なくとも2回のブースター用量として投与される。いくつかの態様では、自己複製アルファウイルスベースの発現系は、少なくとも28日の間隔を空けて、少なくとも2回以上のブースター用量として投与される。いくつかの態様では、自己複製アルファウイルスベースの発現系は、少なくとも4週（Q4W）の間隔を空けて、少なくとも2回以上のブースター用量として投与される。いくつかの態様では、自己複製アルファウイルスベースの発現系は、少なくとも1ヶ月の間隔を空けて、少なくとも2回以上のブースター用量として投与される。いくつかの態様では、自己複製アルファウイルスベースの発現系は、少なくとも56日の間隔を空けて、少なくとも2回以上のブースター用量として投与される。いくつかの態様では、自己複製アルファウイルスベースの発現系は、少なくとも8週（Q8W）の間隔を空

40

50

けて、少なくとも2回以上のブースター用量として投与される。いくつかの態様では、自己複製アルファウイルススペースの発現系は、少なくとも2ヶ月の間隔を空けて、少なくとも2回以上のブースター用量として投与される。いくつかの態様では、自己複製アルファウイルススペースの発現系は、C h A d Vベースの発現系のプライミング用量の28及び84日後、または約28及び84日後に、少なくとも2回のブースター用量として投与される。いくつかの態様では、自己複製アルファウイルススペースの発現系は、C h A d Vベースの発現系のプライミング用量の4及び12週後、または約4及び12週後に、少なくとも2回のブースター用量として投与される。いくつかの態様では、自己複製アルファウイルススペースの発現系は、C h A d Vベースの発現系のプライミング用量の1及び3ヶ月後、または約1及び3ヶ月後に、少なくとも2回のブースター用量として投与される。

10

【0026】

いくつかの態様では、自己複製アルファウイルススペースの発現系は、少なくとも4回のブースター用量として投与される。いくつかの態様では、自己複製アルファウイルススペースの発現系は、C h A d Vベースの発現系のプライミング用量と比較して、28、84、196、及び252日後に、または、約28、84、196、及び252日後に投与される。いくつかの態様では、自己複製アルファウイルススペースの発現系は、C h A d Vベースの発現系のプライミング用量と比較して、4、12、28、及び40週後に、または、約4、12、28、及び40週後に投与される。いくつかの態様では、自己複製アルファウイルススペースの発現系は、C h A d Vベースの発現系のプライミング用量と比較して、1、3、7、及び10ヶ月後に、または、約1、3、7、及び10ヶ月後に投与される。

20

【0027】

いくつかの態様では、方法は、1種以上の免疫調節剤の投与をさらに含み、任意で、免疫調節剤は、組成物または医薬組成物の投与前、投与と同時、または、投与後に投与される。いくつかの態様では、1種以上の免疫調節剤は、抗C T L A 4抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗P D - 1抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗P D - L 1抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗4 - 1 B B抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または、抗O X - 4 0抗体もしくはその抗原結合フラグメントからなる群から選択される。いくつかの態様では、免疫調節剤は、静脈内（I V）、筋肉内（I M）、皮内（I D）、または皮下（S C）投与される。いくつかの態様では、皮下投与は、組成物もしくは医薬組成物の投与部位付近である、または、1種以上のベクターもしくは組成物流入領域リンパ節に極めて近接している。いくつかの態様では、方法は、プライミング用量及び第1のブースター用量だけを伴う、抗C T L A - 4抗体またはその抗原結合フラグメントの投与を含む。いくつかの態様では、抗C T L A - 4抗体はイピリムマブを含む。いくつかの態様では、イピリムマブは、30mgの用量で皮下投与される。いくつかの態様では、方法は、任意で、含む、抗P D - L 1抗体またはその抗原結合フラグメントを4週毎（Q 4 W）の投与を含む。いくつかの態様では、抗P D - L 1抗体は、アテゾリズマブまたはニボルマブを含む。いくつかの態様では、アテゾリズマブは、1680mgの用量で静脈内投与され、または、ニボルマブは、480mgの用量で静脈内投与される。

30

【0028】

いくつかの態様では、方法は、1種以上の免疫調節剤の、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13回の投与を含む。いくつかの態様では、方法は、抗P D - L 1抗体の少なくとも13回の投与を含む。いくつかの態様では、1種以上の免疫調節剤は、アテゾリズマブ、ニボルマブ、センプリマブ、及びイピリムマブからなる群から選択される。いくつかの態様では、K R A S G 1 2 C変異を含むK R A S 関連M H CクラスIネオエピトープは、V V V G A C G V G K（配列番号75）、K L V V V G A C G V（配列番号76）、及びG A C G V G K S A Lからなる群から選択され、K R A S G 1 2 D変異を含むK R A S 関連M H CクラスIネオエピトープは、V V G A D G V G K（配列番号77）、V V V G A D G V G K（配列番号78）、K L V V V G A D G V、及びG A D G V G K S A Lからなる群から選択され、K R A S G 1 2 V変異を含むK R A S 関連M H CクラスIネオエピトープは、V V G A V G V G K（配列番号79

40

50

）、V V V G A V G V G K（配列番号 81）、A V G V G K S A L（配列番号 80）、及び G A V G V G K S A L からなる群から選択される。いくつかの態様では、K R A S G 1 2 C 変異を含む K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープは、V V V G A C G V G K（配列番号 75）、K L V V V G A C G V（配列番号 76）、及び G A C G V G K S A L からなる群から選択される。いくつかの態様では、K R A S G 1 2 D 変異を含む K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープは、V V G A D G V G K（配列番号 77）、V V V G A D G V G K（配列番号 78）、K L V V V G A D G V、及び G A D G V G K S A L からなる群から選択される。いくつかの態様では、K R A S G 1 2 V 変異を含む K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープは、V V G A V G V G K（配列番号 79）、V V V G A V G V G K（配列番号 81）、A V G V G K S A L（配列番号 80）、及び G A V G V G K S A L からなる群から選択される。

10

【0029】

いくつかの態様では、免疫応答を刺激することは、分子応答を刺激することを含む。いくつかの態様では、分子応答は、c t D N A の減少を含む。いくつかの態様では、c t D N A の減少は、c t D N A の、少なくとも 20 %、少なくとも 30 %、少なくとも 40 %、または少なくとも 50 % の減少である。いくつかの態様では、c t D N A の減少は、c t D N A の、少なくとも 30 % の減少である。

【0030】

いくつかの態様では、抗原コードカセット、または、前記カセットによってコードされたポリペプチド配列は、5' から 3' 方向に、次式によって記述される少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列を含む：

20

$$(E_x - (E^N)_n)_y)_z$$

〔式中、

E は、異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

n は、別個の異なるエピトープコード核酸配列の数を表しかつ、0 を含む任意の整数であり、

E^N は、それぞれの対応する n で前記別個の異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

z の各繰り返しについて：各 n について $x = 0$ または 1、 $y = 0$ または 1 であり、x または y の少なくとも一方は 1 であり、

30

z = 2 以上であり、前記抗原コード核酸配列は、E、所与の E^N 、またはこれらの組み合わせの少なくとも 2 回の繰り返しを含み、

前記少なくとも 2 回の繰り返しを含む前記異なるエピトープコード核酸配列の少なくとも 1 つは K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする〕。

【0031】

いくつかの態様では、抗原コードカセットは、アミノ酸配列 V V V G A C G V G K（配列番号 75）、V V V G A D G V G K（配列番号 78）、V V G A V G V G K（配列番号 79）、及び I L D T A G H E E Y（配列番号 82）のそれぞれの少なくとも 4 回の繰り返しをコードする。いくつかの態様では、K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープまたは K R A S 変異は、K R A S G 1 2 C 変異、K R A S G 1 2 V 変異、K R A S G 1 2 D 変異、または K R A S Q 6 1 H 変異を含む。いくつかの態様では、K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープまたは K R A S 変異は、配列番号 75～82 に示されるアミノ酸配列のいずれか 1 つを含む。いくつかの態様では、抗原コードカセットは、配列番号 75～82 に示されるそれぞれのアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、抗原コードカセットは、配列番号 75～82 に示されるそれぞれのアミノ酸配列の 2 回以上の繰り返しを含む。いくつかの態様では、抗原コードカセットは、配列番号 75～82 に示されるそれぞれのアミノ酸配列の 4 回の繰り返しを含む。いくつかの態様では、K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープまたは K R A S 変異は、配列番号 57、配列番号 58、配列番号 59、または配列番号 60 に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列は、異なる K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープまたは

40

50

異なる K R A S 変異を独立してコードする 2 個以上の異なるエピトープコード核酸配列を含む。いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列のそれぞれは、異なる K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープまたは異なる K R A S 変異を独立してコードする。いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列は、K R A S G 1 2 C 変異、K R A S G 1 2 V 変異、K R A S G 1 2 D 変異、または K R A S Q 6 1 H 変異を独立してコードする 2 個以上の異なるエピトープコード核酸配列を含む。いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列は、K R A S G 1 2 C 変異、K R A S G 1 2 V 変異、及び K R A S G 1 2 D 変異、及び任意で K R A S Q 6 1 H 変異のそれぞれを独立してコードする。いくつかの態様では、抗原コード核酸配列は、配列番号 6 4 または配列番号 6 5 に示されるアミノ酸配列を含むペプチドをコードする。いくつかの態様では、抗原コード核酸配列は、配列番号 6 5 に示されるアミノ酸配列を含むペプチドをコードする。

10

【0032】

いくつかの態様では、少なくとも 2 回の繰り返しを含む異なるエピトープコード核酸配列のうちの少なくとも 2 個は、異なる K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする。いくつかの態様では、少なくとも 2 回の繰り返しを含む異なるエピトープコード核酸配列のうちの少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、または少なくとも 8 個が、異なる K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする。いくつかの態様では、少なくとも 2 回の繰り返しを含む異なるエピトープコード核酸配列のそれぞれは、異なる K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする。いくつかの態様では、K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする核酸配列のうちの 1 つ以上が、少なくとも 2 回、少なくとも 3 回、少なくとも 4 回、少なくとも 5 回、少なくとも 6 回、少なくとも 7 回、または少なくとも 8 回の繰り返しを含む。いくつかの態様では、K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする核酸配列のそれぞれが、少なくとも 2 回、少なくとも 3 回、少なくとも 4 回、少なくとも 5 回、少なくとも 6 回、少なくとも 7 回、または少なくとも 8 回の繰り返しを含む。いくつかの態様では、異なる K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする核酸配列のうちの 1 つ以上が、少なくとも 4 回の繰り返しを含む。いくつかの態様では、異なる K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする核酸配列のそれぞれが、少なくとも 4 回の繰り返しを含む。いくつかの態様では、異なる K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープのうちの 1 つ以上が、独立して、K R A S G 1 2 C 変異、K R A S G 1 2 V 変異、K R A S G 1 2 D 変異、または K R A S Q 6 1 H 変異を含む。

20

30

【0033】

いくつかの態様では、各 E または E^N は、5' から 3' 方向に、式 (L_{b5}-N_c-L_{3d}) によって記述されるヌクレオチド配列を独立して含み、式中、N は、各 E または E^N に関連付けられた異なるエピトープコード核酸配列を含み、ただし c = 1 であり、L₅ は 5' リンカー配列を含み、ただし b = 0 または 1 であり、L₃ は 3' リンカー配列を含み、ただし d = 0 または 1 である。いくつかの態様では、各 N は、アミノ酸 7 ~ 15 個の長さのエピトープをコードし、L₅ は、前記エピトープの天然の N 末端アミノ酸配列をコードする天然の 5' リンカー配列であり、前記 5' リンカー配列は、少なくともアミノ酸 2 個の長さのペプチドをコードし、L₃ は、前記エピトープの天然の C 末端アミノ酸配列をコードする天然の 3' リンカー配列であり、前記 3' リンカー配列は、少なくともアミノ酸 32 個の長さのペプチドをコードする。いくつかの態様では、5' 及び／または 3' リンカー配列は、少なくともアミノ酸 3 個の長さのペプチドをコードする。いくつかの態様では、5' 及び／または 3' リンカー配列は、少なくともアミノ酸 4 個の長さのペプチドをコードする。いくつかの態様では、5' 及び／または 3' リンカー配列は、少なくともアミノ酸 5 個の長さのペプチドをコードする。いくつかの態様では、5' 及び／または 3' リンカー配列は、少なくともアミノ酸 8 個の長さのペプチドをコードする。いくつかの態様では、5' 及び／または 3' リンカー配列は、少なくともアミノ酸 2 ~ 8 個の長さのペプチドをコードする。いくつかの態様では、5' 及び／または 3' リンカー配列は、少なくともアミノ酸 2 ~ 10 個の長さのペプチドをコードする。

40

50

【0034】

いくつかの態様において、各 E 及び E^N は、少なくともアミノ酸 7 個の長さのエピトープをコードする。いくつかの態様において、各 E 及び E^N は、アミノ酸 7～15 個の長さのエピトープをコードする。いくつかの態様において、各 E 及び E^N は、少なくともヌクレオチド 21 個の長さのヌクレオチド配列である。いくつかの態様において、各 E 及び E^N は、ヌクレオチド 75 個の長さのヌクレオチド配列である。

【0035】

いくつかの態様では、抗原発現系は 1 つ以上のベクターであって、前記 1 つ以上のベクターが、(a) ベクター骨格であって、(i) 少なくとも 1 つのプロモーターヌクレオチド配列と、(ii) 任意で、少なくとも 1 つのポリアデニル化 (ポリ (A)) 配列と、を含む、前記ベクター骨格と、(b) カセットであって、(i) 少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列であって、(I) K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードするエピトープコード核酸配列を含み、前記エピトープコード核酸配列のそれぞれが、(A) 任意で、5' リンカー配列と、(B) 任意で、3' リンカー配列と、を含む、前記少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列と、(ii) 任意で、前記抗原コード核酸配列に機能的に連結された第 2 のプロモーターヌクレオチド配列と、(iii) 任意で、少なくとも 1 つの M H C クラス I エピトープコード核酸配列と、(iv) 任意で、G P G P G アミノ酸リンカー配列 (配列番号 56) をコードする少なくとも 1 つの核酸配列と、(v) 任意で、天然のポリ (A) 配列または前記ベクター骨格に外因性のポリ (A) 配列である少なくとも 1 つの第 2 のポリ (A) 配列と、を含む、前記カセットと、を含み、前記第 2 のプロモーターヌクレオチド配列が存在しない場合、前記抗原コード核酸配列が前記少なくとも 1 つのプロモーターヌクレオチド配列と機能的に連結され、前記少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列が、前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする前記エピトープコード核酸配列の少なくとも 2 回の繰り返しを含む、前記 1 つ以上のベクターを含む。

【0036】

いくつかの態様では、抗原発現系は、1 つ以上のベクターであって、前記 1 つ以上のベクターが、(a) ベクター骨格であって、(i) 少なくとも 1 つのプロモーターヌクレオチド配列と、(ii) 少なくとも 1 つのポリアデニル化 (ポリ (A)) 配列と、を含む、前記ベクター骨格と、(b) カセットであって、(i) 少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列であって、(I) 互いに直鎖状に連結された少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個の異なるエピトープコード核酸配列であって、そのうちの少なくとも 1 つが K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする、前記少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個の異なるエピトープコード核酸配列を含み、前記エピトープコード核酸配列のそれぞれが、(A) 任意で、5' リンカー配列と、(B) 任意で、3' リンカー配列と、を含む、前記少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列と、(ii) 任意で、前記抗原コード核酸配列に機能的に連結された第 2 のプロモーターヌクレオチド配列と、(iii) 任意で、少なくとも 1 つの M H C クラス I エピトープコード核酸配列と、(iv) 任意で、G P G P G アミノ酸リンカー配列 (配列番号 56) をコードする少なくとも 1 つの核酸配列と、(v) 任意で、天然のポリ (A) 配列または前記ベクター骨格に外因性のポリ (A) 配列である少なくとも 1 つの第 2 のポリ (A) 配列と、を含む、前記カセットと、を含み、前記第 2 のプロモーターヌクレオチド配列が存在しない場合、前記抗原コード核酸配列が前記少なくとも 1 つのプロモーターヌクレオチド配列と機能的に連結され、前記少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列が、K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする前記異なるエピトープコード核酸配列のうちの少なくとも 1 つの少なくとも 2 回の繰り返しを含む、前記 1 つ以上のベクターを含む。

【0037】

いくつかの態様において、前記少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列は、少なくとも 3 個の異なるエピトープコード核酸配列を含む。

【0038】

いくつかの態様では、抗原発現系は、1 つ以上のベクターであって、前記 1 つ以上のベ

10

20

30

40

50

クターが、(a) 任意で C h A d V 6 8 ベクターであるチンパンジーアデノウイルスベクター、または任意でベネズエラウマ脳炎ウイルスベクターであるアルファウイルスベクターを含む、ベクター骨格と、(b) カセットであって、前記カセットは、任意で前記ベクター骨格に天然に存在する天然プロモーターヌクレオチド配列とポリ(A)配列との間に組み込まれ、任意で前記ポリ(A)配列は前記ベクター骨格に天然に存在し、前記カセットは、(i) 少なくとも1つの抗原コード核酸配列であって、(I) K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードするエピトープコード核酸配列であって、任意で、互いに直鎖状に連結された少なくとも2個の異なるエピトープコード核酸配列を含み、任意で各エピトープコード核酸配列が、(A) アミノ酸 7 ~ 15 個の長さの M H C クラス I エピトープをコードする、M H C クラス I エピトープコード核酸配列と、(B) 前記 M H C クラス I エピトープの天然の N 末端アミノ酸配列をコードし、少なくともアミノ酸 2 個の長さであるペプチドをコードする、5'リンカー配列と、(C) 前記 M H C クラス I エピトープの天然の C 末端酸配列をコードし、少なくともアミノ酸 2 個の長さであるペプチドをコードする、3'リンカー配列と、を含み、前記カセットが前記天然プロモーターヌクレオチド配列と機能的に連結され、前記エピトープコード核酸配列のそれぞれが、アミノ酸 13 ~ 25 個の長さのポリペプチドをコードし、各エピトープコード核酸配列の各 3'末端が、前記カセット内の最後のエピトープコード核酸配列を除いて、それに続くエピトープコード核酸配列の 5'末端に連結された、前記エピトープコード核酸配列を含む、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列と、(i i) 少なくとも2個の M H C クラス I I エピトープコード核酸配列であって、(I) P A D R E M H C クラス I I 配列(配列番号 48)と、(I I) 破傷風トキソイド M H C クラス I I 配列(配列番号 46)と、(I I I) 前記 P A D R E M H C クラス I I 配列と前記破傷風トキソイド M H C クラス I I 配列とを連結する G P G P G アミノ酸リンカー配列(配列番号 56)をコードする第1の核酸配列と、(I V) 前記少なくとも2個の M H C クラス I I エピトープコード核酸配列の 5'末端と、前記エピトープコード核酸配列とを連結する G P G P G アミノ酸リンカー配列(配列番号 56)をコードする第2の核酸配列と、(V) 任意で、前記少なくとも2個の M H C クラス I I エピトープコード核酸配列の 3'末端の G P G P G アミノ酸リンカー配列(配列番号 56)をコードする第3の核酸配列と、を含む、前記少なくとも2個の M H C クラス I I エピトープコード核酸配列と、(i i i) 任意で、前記抗原コード核酸配列に機能的に連結された第2のプロモーターヌクレオチド配列と、を含む、前記カセットと、を含み、前記第2のプロモーターヌクレオチド配列が存在しない場合、前記抗原コード核酸配列が前記天然プロモーターヌクレオチド配列と機能的に連結され、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列が、前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする前記エピトープコード核酸配列の少なくとも2回の繰り返しを含む、前記1つ以上のベクターを含む。

10

20

30

【0039】

いくつかの態様において、前記カセットの各要素の順序付けられた配列は、5'から3'方向に、

$P_a - (L5_b - N_c - L3_d)X - (G5_e - U_f)Y - G3_g$

を含む式〔式中、Pは、前記第2のプロモーターヌクレオチド配列を含み、ただし、a = 0 または 1 であり、Nは、前記異なるエピトープコード核酸配列のうちの1つを含み、ただし c = 1 であり、L5は、5'リンカー配列を含み、ただし b = 0 または 1 であり、L3は、3'リンカー配列を含み、ただし d = 0 または 1 であり、G5は、G P G P G アミノ酸リンカー(配列番号 56)をコードする前記少なくとも1つの核酸配列のうちの1つを含み、ただし e = 0 または 1 であり、G3は、G P G P G アミノ酸リンカー(配列番号 56)をコードする前記少なくとも1つの核酸配列のうちの1つを含み、ただし g = 0 または 1 であり、Uは、前記少なくとも1つの M H C クラス I I エピトープコード核酸配列のうちの1つを含み、ただし f = 1 であり、X = 1 ~ 400 であり、ただし各 X について、対応する N_cは、エピトープコード核酸配列であり、Y = 0、1、または 2 であり、ただし各 Y について、対応する U_fは、M H C クラス I I エピトープコード核酸配列である

40

50

」で記述される。

【0040】

いくつかの態様では、各Xについて、対応するN_cは、前記異なるエピトープコード核酸配列の前記少なくとも2回の繰り返しに対応するN_cを除いて、異なるエピトープコード核酸配列である。いくつかの態様では、各Yについて、対応するU_fは、異なるMHCクラスIIエピトープコード核酸配列である。いくつかの態様では、a=0、b=1、d=1、e=1、g=1、h=1、X=16、Y=2であり、前記少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列は、前記ベクター骨格に天然に存在する単一の天然プロモーターヌクレオチド配列であり、前記少なくとも1つのポリアデニル化ポリ(A)配列は、前記ベクターウイルス骨格によって与えられる少なくとも80個の連続したAヌクレオチドのポリ(A)配列であり、各Nは、アミノ酸7～15個の長さのエピトープをコードし、L5は、前記エピトープの天然のN末端アミノ酸配列をコードする天然の5'リンカー配列であり、前記5'リンカー配列は、少なくともアミノ酸2個の長さのペプチドをコードし、L3は、前記エピトープの天然のC末端アミノ酸配列をコードする天然の3'リンカー配列であり、前記3'リンカー配列は、少なくともアミノ酸2個の長さのペプチドをコードし、Uは、PADREクラスII配列及び破傷風トキソイドMHCクラスII配列のそれぞれであり、前記ベクター骨格は、任意でChAdV68ベクターであるチンパンジーアデノウイルスベクター、または任意でベネズエラウマ脳炎ウイルスベクターであるアルファウイルスベクターを含み、前記ベクター骨格がアルファウイルスベクターを含む場合には、任意で前記天然プロモーターヌクレオチド配列はサブゲノム（例えば、26S）プロモーターであり、前記MHCクラスIIエピトープコード核酸配列のそれぞれは、アミノ酸13個～25個の長さのポリペプチドをコードする。

10

20

【0041】

いくつかの態様では、抗原コードカセットは、アミノ酸配列VVVGACGVGK（配列番号75）、VVVGADGVGK（配列番号78）、VVGAVGVGK（配列番号79）、及びILDTAGHEEY（配列番号82）のそれぞれの少なくとも4回の繰り返しをコードする。いくつかの態様では、KRAS関連MHCクラスIネオエピトープまたはKRAS変異は、KRAS G12C変異、KRAS G12V変異、KRAS G12D変異、またはKRAS Q61H変異を含む。いくつかの態様では、KRAS関連MHCクラスIネオエピトープまたはKRAS変異は、配列番号75～82に示されるアミノ酸配列のいずれか1つを含む。いくつかの態様では、抗原コードカセットは、配列番号75～82に示されるそれぞれのアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、抗原コードカセットは、配列番号75～82に示されるそれぞれのアミノ酸配列の2回以上の繰り返しを含む。いくつかの態様では、抗原コードカセットは、配列番号75～82に示されるそれぞれのアミノ酸配列の4回の繰り返しを含む。いくつかの態様では、KRAS関連MHCクラスIネオエピトープまたはKRAS変異は、配列番号57、配列番号58、配列番号59、または配列番号60に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列は、異なるKRAS関連MHCクラスIネオエピトープまたは異なるKRAS変異を独立してコードする2個以上の異なるエピトープコード核酸配列を含む。いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列のそれぞれは、異なるKRAS関連MHCクラスIネオエピトープまたは異なるKRAS変異を独立してコードする。いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列は、KRAS G12C変異、KRAS G12V変異、KRAS G12D変異、またはKRAS Q61H変異を独立してコードする2個以上の異なるエピトープコード核酸配列を含む。いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列は、KRAS G12C変異、KRAS G12V変異、及びKRAS G12D変異、及び任意でKRAS Q61H変異のそれぞれを独立してコードする。いくつかの態様では、抗原コード核酸配列は、配列番号64または配列番号65に示されるアミノ酸配列を含むペプチドをコードする。いくつかの態様では、抗原コード核酸配列は、配列番号65に示されるアミノ酸配列を含むペプチドをコードする。

30

40

【0042】

50

いくつかの態様では、少なくとも2回の繰り返しは、少なくとも3回、少なくとも4回、少なくとも5回、少なくとも6回、少なくとも7回、または少なくとも8回の繰り返しである。いくつかの態様では、少なくとも2回の繰り返しは、少なくとも8回の繰り返しである。いくつかの態様では、少なくとも2回の繰り返しは、少なくとも8回、少なくとも9回、少なくとも10回、少なくとも11回、少なくとも12回、少なくとも13回、1少なくとも4回、少なくとも15回、少なくとも16回、少なくとも17回、少なくとも18回、少なくとも19回、または少なくとも20回の繰り返しである。いくつかの態様では、少なくとも2回の繰り返しは、2～3回、2～4回、2～5回、2～6回、2～7回、または2～8回の繰り返しである。いくつかの態様では、少なくとも2回の繰り返しは、7回以下の繰り返し、6回以下の繰り返し、5回以下の繰り返し、4回以下の繰り返し、または3回以下の繰り返しである。

10

【0043】

いくつかの態様では、少なくとも1つの抗原コード核酸配列は、少なくとも2個の異なるエピトープコード核酸配列の少なくとも2回の繰り返しを含む。いくつかの態様では、少なくとも1つの抗原コード核酸配列は、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、または少なくとも10個の異なるエピトープコード核酸配列の少なくとも2回の繰り返しを含む。いくつかの態様では、少なくとも2回の繰り返しは、少なくとも1つの別個の異なるエピトープコード核酸配列によって分離されている。いくつかの態様では、少なくとも2回の繰り返しは、少なくとも2個の別個の異なるエピトープコード核酸配列によって分離されている。いくつかの態様では、任意の5'リンカー配列及び／または任意の3'リンカー配列を含む少なくとも2回の繰り返しは、少なくとも75個のヌクレオチドによって分離されている。いくつかの態様では、場合により存在してよい5'リンカー配列及び／または場合により存在してよい3'リンカー配列を含む少なくとも2回の繰り返しは、少なくとも150個のヌクレオチド、少なくとも300個のヌクレオチド、または少なくとも675個のヌクレオチドによって分離されている。いくつかの態様では、場合により存在してよい5'リンカー配列及び／または場合により存在してよい3'リンカー配列を含む少なくとも2回の繰り返しは、少なくとも50個のヌクレオチド、少なくとも100個のヌクレオチド、少なくとも200個のヌクレオチド、少なくとも250個のヌクレオチド、少なくとも350個のヌクレオチド、少なくとも400個のヌクレオチド、少なくとも450個のヌクレオチド、少なくとも500個のヌクレオチド、少なくとも700個のヌクレオチド、少なくとも800個のヌクレオチド、少なくとも900個のヌクレオチド、または少なくとも1000個のヌクレオチドによって分離されている。いくつかの態様では、場合により存在してよい5'リンカー配列及び／または場合により存在してよい3'リンカー配列を含む少なくとも2回の繰り返しは、少なくとも10個のヌクレオチド、少なくとも15個のヌクレオチド、少なくとも20個のヌクレオチド、少なくとも25個のヌクレオチド、少なくとも30個のヌクレオチド、少なくとも35個のヌクレオチド、少なくとも40個のヌクレオチド、少なくとも45個のヌクレオチド、少なくとも50個のヌクレオチド、少なくとも55個のヌクレオチド、少なくとも60個のヌクレオチド、少なくとも65個のヌクレオチド、または少なくとも70個のヌクレオチドによって分離されている。

20

30

40

【0044】

いくつかの態様において、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列は、5'から3'方向に、次式によって記述される：

$$(E_x - (E^N_n)_y)_z$$

〔式中、

Eは、前記異なるエピトープコード核酸配列のうちの少なくとも1つを含むヌクレオチド配列を表し、

nは、別個の異なるエピトープコード核酸配列の数を表しかつ、0を含む任意の整数であり、

50

E^N は、それぞれの対応する n で前記別個の異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

z の各繰り返しについて：各 n について $x = 0$ または 1 、 $y = 0$ または 1 であり、 x または y の少なくとも一方は 1 であり、

$z = 2$ 以上であり、前記抗原コード核酸配列は、 E 、所与の E^N 、またはこれらの組み合わせの少なくとも 2 回の繰り返しを含む】。

【0045】

いくつかの態様では、抗原コードカセットは、アミノ酸配列 $V V V G A C G V G K$ （配列番号 75）、 $V V V G A D G V G K$ （配列番号 78）、 $V V G A V G V G K$ （配列番号 79）、及び $I L D T A G H E E Y$ （配列番号 82）のそれぞれの少なくとも 4 回の繰り返しをコードする。

【0046】

いくつかの態様では、異なるエピトープコード核酸配列は、異なる $K R A S$ 関連 $M H C$ クラス I ネオエピトープをそれぞれがコードする少なくとも 2 個の異なるエピトープコード核酸配列を含む。いくつかの態様では、異なるエピトープコード核酸配列は、異なる $K R A S$ 関連 $M H C$ クラス I ネオエピトープをそれぞれがコードする少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、または少なくとも 8 個の異なるエピトープコード核酸配列を含む。いくつかの態様では、少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列のエピトープコード核酸配列のそれぞれは、異なる $K R A S$ 関連 $M H C$ クラス I ネオエピトープをコードする。いくつかの態様では、異なる $K R A S$ 関連 $M H C$ クラス I ネオエピトープをコードする核酸配列のうちの 1 つ以上は、少なくとも 2 回、少なくとも 3 回、少なくとも 4 回、少なくとも 5 回、少なくとも 6 回、少なくとも 7 回、または少なくとも 8 回の繰り返しを含む。いくつかの態様では、異なる $K R A S$ 関連 $M H C$ クラス I ネオエピトープをコードする核酸配列のそれぞれが、少なくとも 2 回、少なくとも 3 回、少なくとも 4 回、少なくとも 5 回、少なくとも 6 回、少なくとも 7 回、または少なくとも 8 回の繰り返しを含む。いくつかの態様では、異なる $K R A S$ 関連 $M H C$ クラス I ネオエピトープをコードする核酸配列のうちの 1 つ以上が、少なくとも 4 回の繰り返しを含む。いくつかの態様では、異なる $K R A S$ 関連 $M H C$ クラス I ネオエピトープをコードする核酸配列のそれぞれが、少なくとも 4 回の繰り返しを含む。いくつかの態様では、異なる $K R A S$ 関連 $M H C$ クラス I ネオエピトープのうちの 1 つ以上が、独立して、 $K R A S$ $G 1 2 C$ 変異、 $K R A S$ $G 1 2 V$ 変異、 $K R A S$ $G 1 2 D$ 変異、または $K R A S$ $Q 6 1 H$ 変異を含む。

【0047】

いくつかの態様では、少なくとも 2 回の繰り返しは、エピトープコード核酸配列の単一の繰り返しを含む抗原コード核酸配列と比較してより高い免疫応答を刺激するのに十分な数の繰り返しを含むか、または z がそのような十分な数を含む。いくつかの態様では、少なくとも 2 回の繰り返しは、免疫応答を刺激するのに十分な数の繰り返しを含むか、または z がそのような十分な数を含み、前記エピトープコード核酸配列の単一の繰り返しは、前記免疫応答を刺激するのに不十分であるかもしくは検出可能な免疫応答を刺激するのに不十分である。いくつかの態様において、前記免疫応答は、前記抗原発現系を送達するための前記組成物によるインビボ免疫後のエピトープ特異的 T 細胞の増殖である。いくつかの態様では、前記免疫応答は、前記抗原発現系を送達するための前記組成物によるインビボ免疫後のエピトープ特異的 T 細胞の活性化の増加及び／またはエピトープ特異的 T 細胞によるエピトープ特異的殺滅の増加である。

【0048】

本明細書ではまた、抗原発現系を送達するための組成物であって、1 つ以上のベクターを含む前記抗原発現系を含み、前記 1 つ以上のベクターが、(a) ベクター骨格であって、(i) 少なくとも 1 つのプロモーターヌクレオチド配列と、(ii) 任意で、少なくとも 1 つのポリアデニル化（ポリ（A））配列と、を含む、前記ベクター骨格と、(b) カセットであって、(i) 少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列であって、(I) 少なくと

10

20

30

40

50

も2個の異なるエピトープコード核酸配列であって、任意で、(1)前記コードされたエピトープ配列を、野生型核酸配列によってコードされた対応するペプチド配列とは異なるものとする少なくとも1つの変化であって、任意でKRAS変異である、前記少なくとも1つの変化、または(2)病原体由来ペプチド、ウイルス由来ペプチド、細菌由来ペプチド、真菌由来ペプチド、及び寄生虫由来ペプチドからなる群から選択される感染症生物ペプチドをコードする核酸配列を含み、前記エピトープコード核酸配列のそれぞれが、(A)任意で、5'リンカー配列と、(B)任意で、3'リンカー配列と、を含む、前記少なくとも2個の異なるエピトープコード核酸配列を含む、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列と、(ii)任意で、前記抗原コード核酸配列に機能的に連結された第2のプロモーターヌクレオチド配列と、(iii)任意で、少なくとも1つのMHCクラスIIエピトープコード核酸配列と、(iv)任意で、GPGPGアミノ酸リンカー配列(配列番号56)をコードする少なくとも1つの核酸配列と、(v)任意で、天然のポリ(A)配列または前記ベクター骨格に外因性のポリ(A)配列である少なくとも1つの第2のポリ(A)配列と、を含む、前記カセットと、を含み、前記第2のプロモーターヌクレオチド配列が存在しない場合、前記抗原コード核酸配列が前記少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列と機能的に連結され、前記カセットが、免疫優性なMHCクラスIIエピトープをコードせず、前記免疫優性なMHCクラスIIエピトープが、(1)ワクチン組成物中で対象に投与された場合に前記カセット内にコードされた別のMHCクラスIIエピトープと比較して5倍以上の免疫応答を刺激し、前記対象の免疫応答を刺激することができるか、及び／または(2)前記免疫優性なMHCクラスIIエピトープの非存在下で他のMHCクラスIIエピトープが投与された場合の免疫応答と比較してワクチン組成物中で対象に投与された場合に前記カセット内にコードされた別のMHCクラスIIエピトープに対する免疫応答を減少させ、任意で、前記免疫応答が検出限界未満に減少させられるか、及び／または前記免疫応答が治療的に有効な応答ではないものである、前記組成物も提供される。

10

20

30

40

50

【0049】

本明細書ではまた、抗原発現系を送達するための組成物であって、1つ以上のベクターを含む前記抗原発現系を含み、前記1つ以上のベクターが、(a)ベクター骨格であって、(i)少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列と、(ii)任意で、少なくとも1つのポリアデニル化(ポリ(A))配列と、を含む、前記ベクター骨格と、(b)カセットであって、(i)少なくとも1つの抗原コード核酸配列であって、(I)互いに直鎖状に連結された少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の異なるエピトープコード核酸配列であって、任意で、(1)前記コードされたエピトープ配列を、野生型核酸配列によってコードされた対応するペプチド配列とは異なるものとする少なくとも1つの変化であって、任意でKRAS変異である、前記少なくとも1つの変化、または(2)病原体由来ペプチド、ウイルス由来ペプチド、細菌由来ペプチド、真菌由来ペプチド、及び寄生虫由来ペプチドからなる群から選択される感染症生物ペプチドをコードする核酸配列を含み、前記エピトープコード核酸配列のそれぞれが、(A)任意で、5'リンカー配列と、(B)任意で、3'リンカー配列と、を含む、前記異なるエピトープコード核酸配列を含む、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列と、(ii)任意で、前記抗原コード核酸配列に機能的に連結された第2のプロモーターヌクレオチド配列と、(iii)任意で、少なくとも1つのMHCクラスIIエピトープコード核酸配列と、(iv)任意で、GPGPGアミノ酸リンカー配列(配列番号56)をコードする少なくとも1つの核酸配列と、(v)任意で、天然のポリ(A)配列または前記ベクター骨格に外因性のポリ(A)配列である少なくとも1つの第2のポリ(A)配列と、を含む、前記カセットと、を含み、前記第2のプロモーターヌクレオチド配列が存在しない場合、前記抗原コード核酸配列が前記少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列と機能的に連結され、前記カセットが、免疫優性なMHCクラスIIエピトープをコードせず、前記免疫優性なMHCクラスIIエピトープが、(1)ワクチン組成物中で対象に投与された場合に前記カセット内にコードされた別のMHCクラスIIエピトープと比較して5倍以上の免疫応答を刺激し、前記対象の免疫応答を刺激することができるか、及び／または(2)前記免疫優

性なMHCクラスIエピトープの非存在下で他のMHCクラスIエピトープが投与された場合の免疫応答と比較してワクチン組成物中で対象に投与された場合に前記カセット内にコードされた別のMHCクラスIエピトープに対する免疫応答を減少させ、任意で、前記免疫応答が検出限界未満に減少させられるか、及び／または前記免疫応答が治療的に有効な応答ではないものである、前記組成物も提供される。

【0050】

いくつかの態様では、異なるエピトープコード核酸配列のうちの少なくとも1つは、KRAS関連MHCクラスIネオエピトープをコードする。

【0051】

本明細書ではまた、抗原発現系を送達するための組成物であって、1つ以上のベクターを含む前記抗原発現系を含み、前記1つ以上のベクターが、(a)任意でChAdV68ベクターであるチンパンジーアデノウイルスベクター、または任意でベネズエラウマ脳炎ウイルスベクターであるアルファウイルスベクターを含む、ベクター骨格と、(b)カセットであって、前記カセットは、任意で前記ベクター骨格に天然に存在する天然プロモーターヌクレオチド配列とポリ(A)配列との間に組み込まれ、任意で前記ポリ(A)配列は前記ベクター骨格に天然に存在し、前記カセットは、(i)少なくとも1つの抗原コード核酸配列であって、(I)少なくとも1つのエピトープコード核酸配列であって、任意で、互いに直鎖状に連結された少なくとも2個の異なるエピトープコード核酸配列を含み、各エピトープコード核酸配列が任意で、(A)アミノ酸7～15個の長さのMHCクラスIエピトープをコードする、MHCクラスIエピトープコード核酸配列と、(B)前記MHCクラスIエピトープの天然のN末端アミノ酸配列をコードし、少なくともアミノ酸2個の長さであるペプチドをコードする、5'リンカー配列と、(C)前記MHCクラスIエピトープの天然のC末端酸配列をコードし、少なくともアミノ酸2個の長さであるペプチドをコードする、3'リンカー配列と、を含み、前記カセットが前記天然プロモーターヌクレオチド配列と機能的に連結され、前記エピトープコード核酸配列のそれぞれが、アミノ酸13～25個の長さのポリペプチドをコードし、各エピトープコード核酸配列の各3'末端が、前記カセット内の最後のエピトープコード核酸配列を除いて、それに続くエピトープコード核酸配列の5'末端に連結された、前記エピトープコード核酸配列を含む、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列と、(ii)少なくとも2個のMHCクラスIIエピトープコード核酸配列であって、(I)PADRE MHCクラスII配列(配列番号48)と、(II)破傷風トキソイドMHCクラスII配列(配列番号46)と、(III)前記PADRE MHCクラスII配列と前記破傷風トキソイドMHCクラスII配列とを連結するGPGPGアミノ酸リンカー配列(配列番号56)をコードする第1の核酸配列と、(IV)前記少なくとも2個のMHCクラスIIエピトープコード核酸配列の5'末端と、前記エピトープコード核酸配列とを連結するGPGPGアミノ酸リンカー配列(配列番号56)をコードする第2の核酸配列と、(V)任意で、前記少なくとも2個のMHCクラスIIエピトープコード核酸配列の3'末端のGPGPGアミノ酸リンカー配列(配列番号56)をコードする第3の核酸配列と、を含む、前記少なくとも2個のMHCクラスIIエピトープコード核酸配列と、(iii)任意で、前記抗原コード核酸配列に機能的に連結された第2のプロモーターヌクレオチド配列と、を含む、前記カセットと、を含み、前記第2のプロモーターヌクレオチド配列が存在しない場合、前記抗原コード核酸配列が前記天然プロモーターヌクレオチド配列と機能的に連結され、前記カセットが、免疫優性なMHCクラスIエピトープをコードせず、前記免疫優性なMHCクラスIエピトープが、(1)ワクチン組成物中で対象に投与された場合に前記カセット内にコードされた別のMHCクラスIエピトープと比較して5倍以上の免疫応答を刺激し、前記対象の免疫応答を刺激することができるか、及び／または(2)前記免疫優性なMHCクラスIエピトープの非存在下で他のMHCクラスIエピトープが投与された場合の免疫応答と比較してワクチン組成物中で対象に投与された場合に前記カセット内にコードされた別のMHCクラスIエピトープに対する免疫応答を減少させ、任意で、前記免疫応答が検出限界未満に減少させられるか、及び／または前記免疫応答が治療的に有効な応答

10

20

30

40

50

ではないものである、前記組成物も提供される。

【0052】

いくつかの態様では、前記免疫優性なMHCクラスIエピトープは、ワクチン組成物中で対象に投与された場合に、カセット内にコードされた別のMHCクラスIエピトープと比較して10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、または10,000倍またはそれ以上の免疫応答を刺激し、前記対象の免疫応答を刺激することができる。いくつかの態様では、前記免疫優性なMHCクラスIエピトープは、前記他のMHCクラスIエピトープの免疫応答を検出限界未満に減少させるか、及び／または治療的に有効な応答を刺激しない。いくつかの態様では、対象は、カセット内にコードされた前記免疫優性なMHCクラスIエピトープ及び前記他のMHCクラスIエピトープの両方を提示することが分かっているかまたは予測されている少なくとも1つのHLAアレルを発現する。

10

【0053】

いくつかの態様では、前記エピトープコード核酸配列のうちの1つ以上が、腫瘍に由来する。いくつかの態様では、前記エピトープコード核酸配列のそれぞれが、対象の腫瘍、感染または感染細胞に由来する。いくつかの態様では、前記エピトープコード核酸配列のうちの1つ以上は、対象の腫瘍、感染および感染細胞に由来しない。いくつかの態様では、前記エピトープコード核酸配列のそれぞれは、対象の腫瘍、感染および感染細胞に由来しない。

20

【0054】

いくつかの態様では、前記エピトープコード核酸配列は、細胞の表面上のMHCクラスIによって提示されることが分かっているかまたは疑われるエピトープをコードしており、任意で、前記細胞の表面は腫瘍細胞表面または感染細胞表面であり、任意で、前記細胞は対象の細胞である。いくつかの態様では、細胞は、肺癌、メラノーマ、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、腎臓癌、胃癌、結腸癌、精巣癌、頭頸部癌、脾臓癌、脳癌、B細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、T細胞リンパ球性白血病、非小細胞肺癌、及び小細胞肺癌からなる群から選択される腫瘍細胞であるか、または細胞は、病原体感染細胞、ウイルス感染細胞、細菌感染細胞、真菌感染細胞、及び寄生虫感染細胞からなる群から選択される感染細胞である。いくつかの態様では、ウイルス感染細胞は、HIV感染細胞、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス(SARS)感染細胞、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス2(SARS-CoV-2)感染細胞、エボラ感染細胞、B型肝炎ウイルス(HBV)感染細胞、インフルエンザ感染細胞、オルトミクソウイルス科ウイルス感染細胞、ヒトパピローマウイルス(HPV)感染細胞、サイトメガロウイルス(CMV)感染細胞、チクングニアウイルス感染細胞、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)感染細胞、デングウイルス感染細胞、及びC型肝炎ウイルス(HCV)感染細胞からなる群から選択される。

30

【0055】

いくつかの態様では、組成物は、ナノ粒子状の送達ビヒクルをさらに含む。いくつかの態様では、ナノ粒子状の送達ビヒクルは、脂質ナノ粒子(LNP)である。いくつかの態様では、LNPは、イオン化可能なアミノ脂質を含む。いくつかの態様では、イオン化可能なアミノ脂質は、MC3様(ジリノレイルメチル-4-ジメチルアミノブチレート)分子を含む。いくつかの態様では、ナノ粒子送達ビヒクルは抗原発現系を封入する。

40

【0056】

いくつかの態様では、カセットは、少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列と少なくとも1つのポリ(A)配列との間に組み込まれる。いくつかの態様では、第2のプロモーターは存在せず、前記少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列は、前記抗原コード核酸配列と機能的に連結されている。

【0057】

いくつかの態様では、1つ以上のベクターは、1つ以上の+鎖RNAベクターを含む。

50

いくつかの態様では、1つ以上の+鎖RNAベクターは、5'7-メチルグアノシン(m7g)キャップを有する。いくつかの態様では、1つ以上の+鎖RNAベクターは、インビトロ転写によって生成される。いくつかの態様では、1つ以上のベクターは、哺乳動物細胞内で自己複製する。いくつかの態様では、骨格は、アウラウイルス、フォートモルガンウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、ロスリバーウイルス、セムリキ森林ウイルス、シンドビスウイルス、またはマヤロウイルスの少なくとも1つのヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、骨格は、ベネズエラウマ脳炎ウイルスの少なくとも1つのヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、骨格は、少なくとも、アウラウイルス、フォートモルガンウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、ロスリバーウイルス、セムリキ森林ウイルス、シンドビスウイルス、またはマヤロウイルスのヌクレオチド配列によってコードされた、非構造タンパク質媒介増幅のための配列、26Sプロモーター配列、ポリ(A)配列、非構造タンパク質1(nsP1)遺伝子、nsP2遺伝子、nsP3遺伝子、及びnsP4遺伝子を含む。いくつかの態様では、骨格は、少なくとも、アウラウイルス、フォートモルガンウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、ロスリバーウイルス、セムリキ森林ウイルス、シンドビスウイルス、またはマヤロウイルスのヌクレオチド配列によってコードされた、非構造タンパク質媒介増幅のための配列、26Sプロモーター配列、及びポリ(A)配列を含む。いくつかの態様では、非構造タンパク質媒介増幅のための配列は、アルファウイルス5'UTR、51ntのCSE、24ntのCSE、26Sサブゲノミックプロモーター配列、19ntのCSE、アルファウイルス3'UTR、またはこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの態様では、骨格は、構造ビリオンタンパク質カプシドE2及びE1をコードしていない。いくつかの態様では、カセットは、アウラウイルス、フォートモルガンウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、ロスリバーウイルス、セムリキ森林ウイルス、シンドビスウイルス、またはマヤロウイルスのヌクレオチド配列内の構造ビリオンタンパク質の代わりに挿入される。

10

20

30

40

50

【0058】

いくつかの態様では、ベネズエラウマ脳炎ウイルスは、配列番号3または配列番号5の配列を含む。いくつかの態様では、ベネズエラウマ脳炎ウイルスは、さらに塩基対7544と11175との間の欠失を有する配列番号3または配列番号5の配列を含む。いくつかの態様では、骨格は、配列番号6または配列番号7に記載の配列を含む。いくつかの態様では、カセットは、配列番号3または配列番号5の配列に記載される塩基対7544と11175との間の欠失を置換するように7544位に挿入されている。

【0059】

いくつかの態様では、前記カセットの挿入は、前記nsP1~4遺伝子及び前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列を含むポリシストロニックRNAの転写をもたらし、前記nsP1~4遺伝子及び前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列は別々のオープンリーディングフレーム内にある。

【0060】

いくつかの態様では、骨格は、チンパンジーアデノウイルスベクターの少なくとも1つのヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、チンパンジーアデノウイルスベクターは、ChAdV68ベクターである。いくつかの態様では、ChAdV68骨格は、配列番号1に記載の配列を含むChAdV68ベクター骨格を含む。いくつかの態様では、ChAdV68ベクターは、配列番号1に記載の配列のチンパンジーアデノウイルスE1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4、L1、L2、L3、L4、及びL5遺伝子からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子が配列から完全に欠失されているかまたは機能的に欠失されている点を除いて、配列番号1に記載の配列を含むChAdV68ベクター骨格を含み、任意で、前記配列は、配列番号1に記載の配列の(1)E1A及びE1B、(2)E1A、E1B、及びE3、または(3)E1A、E1B、E3、及びE4が完全に欠失されているかまたは機能的に欠失されている。いくつかの態様では、ChAdV68ベクターは、配列番号1の配列から得られる遺伝子または調節配列を含むChAdV68ベクター骨格を含み、任意で、前記遺伝子は、配列番号1に記載の配列のチンパン

ジーアデノウイルスの末端逆位繰り返し配列 (ITR)、E1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4、L1、L2、L3、L4、及びL5遺伝子からなる群から選択される。いくつかの態様では、ChAdV68ベクターは、欠失または部分欠失E4orf2領域及び欠失または部分欠失E4orf3領域、及び任意で、欠失または部分欠失E4orf4領域を含む部分欠失E4遺伝子を含むChAdV68ベクター骨格を含む。いくつかの態様では、ChAdV68ベクターは、ChAdV68ベクター骨格であって、配列番号1に記載の配列の少なくともヌクレオチド277~3403のE1欠失、(2)配列番号1に示される配列の少なくともヌクレオチド27, 125~31, 825のE3欠失、(3)配列番号1に示される配列の少なくともヌクレオチド34, 916~35, 642のE4欠失を含む、ChAdV68ベクター骨格を含み、任意で前記抗原カセットが、前記E1欠失内に挿入されている。いくつかの態様では、ChAdV68ベクターは、配列番号68に記載の配列を含むChAdV68ベクター骨格を含み、任意で、抗原カセットは、E1欠失内に挿入されている。いくつかの態様では、ChAdV68ベクターは、配列番号1に記載の配列の塩基対番号577~3403の間、または塩基対456~3014の間に1つ以上の欠失を有するChAdV68ベクター骨格を含み、任意で、ベクターは、塩基対27, 125~31, 825の間、または塩基対27, 816~31, 333の間に1つ以上の欠失をさらに有する。いくつかの態様では、ChAdV68ベクターは、配列番号1に記載の配列の塩基対番号3957~10346、塩基対番号21787~23370、及び塩基対番号33486~36193の間に1つ以上の欠失を有するChAdV68ベクター骨格を含む。いくつかの態様では、カセットは、E1領域、E3領域、及び／または、カセットの組み込みが可能な任意の欠失されたAdV領域においてChAdVベクター骨格に挿入される。

10

20

30

40

50

【0061】

いくつかの態様では、少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列は、骨格によってコードされた天然の26Sプロモーターヌクレオチド配列である。いくつかの態様では、少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列は、外因性のRNAプロモーターである。いくつかの態様では、第2のプロモーターヌクレオチド配列は、26Sプロモーターヌクレオチド配列である。いくつかの態様では、第2のプロモーターヌクレオチド配列は、複数の26Sプロモーターヌクレオチド配列を含み、各26Sプロモーターヌクレオチド配列が、別々のオープンリーディングフレームのうちの1つ以上の転写をもたらす。

【0062】

いくつかの態様では、1つ以上のベクターは、それぞれ少なくとも300ntのサイズである。いくつかの態様では、1つ以上のベクターは、それぞれ少なくとも1kbのサイズである。いくつかの態様では、1つ以上のベクターは、それぞれ2kbのサイズである。いくつかの態様では、1つ以上のベクターは、それぞれ5kb未満のサイズである。

【0063】

いくつかの態様では、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列のうちの少なくとも1つは、細胞表面、任意で腫瘍細胞表面または感染細胞上のMHCクラスIによって提示されるポリペプチド配列またはその一部をコードする。

【0064】

いくつかの態様では、各エピトープコード核酸配列が互いに直接連結されている。いくつかの態様では、前記抗原コード核酸配列のうちの少なくとも1つは、リンカーをコードする核酸配列によって異なるエピトープコード核酸配列と連結されている。いくつかの態様では、リンカーは、2個のMHCクラスI配列または1個のMHCクラスI配列を1個のMHCクラスII配列と連結する。いくつかの態様では、リンカーは、(1)少なくとも残基2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の長さの連続したグリシン残基、(2)少なくとも残基2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の長さの連続したアラニン残基、(3)2個のアルギニン残基(RR)、(4)アラニン、アラニン、チロシン(AAY)、(5)哺乳動物プロテアーゼによって効率的にプロセッシングされる、少

なくともアミノ酸残基 2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個の長さのコンセンサス配列、及び (6) 同種由来タンパク質に由来する抗原に隣接し、少なくともアミノ酸残基 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または 2～20 個の長さの 1 つ以上の天然配列からなる群から選択される。いくつかの態様では、リンカーは、2 個の MHC クラス II 配列または 1 個の MHC クラス II 配列を 1 個の MHC クラス I 配列と連結する。いくつかの態様では、リンカーは、配列 G P G P G (配列番号 56) を含む。いくつかの態様では、前記エピトープコード核酸配列のうちの少なくとも 1 つの配列は、それによりコードされるエピトープのエピトープコード核酸配列の発現、安定性、細胞トラフィッキング、プロセッシング及び提示、及び／または免疫原性を高める、分離した、または連続した配列に機能的または直接的に連結されている。いくつかの態様において、分離した、または連続した配列は、ユビキチン配列、プロテアソームターゲティング性を高めるように改変されたユビキチン配列 (例えば、76 位に G l y または A l a 置換を有するユビキチン配列)、免疫グロブリンシグナル配列 (例えば I g K)、主要組織適合性クラス I 配列、リソソーム関連膜タンパク質 (L A M P) - 1、ヒト樹状細胞リソソーム関連膜タンパク質、及び主要組織適合性クラス II 配列のうちの少なくとも 1 つを含み、任意でプロテアソームターゲティング性を高めるように改変された前記ユビキチン配列が A 76 である。

10

【0065】

いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列のうちの少なくとも 1 つは、翻訳後の対応する野生型核酸配列に対して、その対応する MHC アレルに対する結合親和性が増大したポリペプチド配列またはその一部をコードする。いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列のうちの少なくとも 1 つは、翻訳後の対応する野生型核酸配列に対して、その対応する MHC アレルに対する結合安定性が増大したポリペプチド配列またはその一部をコードする。いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列のうちの少なくとも 1 つは、翻訳後の対応する野生型の核酸配列に対して、その対応する MHC アレル上への提示の尤度が増大したポリペプチド配列またはその一部をコードする。いくつかの態様では、前記少なくとも 1 つの変化は、点変異、フレームシフト変異、非フレームシフト変異、欠失変異、挿入変異、スプライスバリエーション、ゲノム再編成、またはプロテアソームにより生成されたスプライス抗原を含む。

20

【0066】

いくつかの態様では、腫瘍は、肺癌、メラノーマ、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、腎臓癌、胃癌、結腸癌、精巣癌、頭頸部癌、膵臓癌、膀胱癌、脳癌、B 細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、成人急性リンパ芽球性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、T 細胞リンパ球性白血病、非小細胞肺癌、及び小細胞肺癌からなる群から選択されるか、または、感染症生物は、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス (S A R S)、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス 2 (S A R S - C o V - 2)、エボラ、H I V、B 型肝炎ウイルス (H B V)、インフルエンザ、C 型肝炎ウイルス (H C V)、ヒトパピローマウイルス (H P V)、サイトメガロウイルス (C M V)、チクングニアウイルス、呼吸器多核体ウイルス (R S V)、デングウイルス、オルトミクソウイルス科ウイルス、及び結核からなる群から選択される。

30

40

【0067】

いくつかの態様では、前記少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列は、少なくとも 2～10 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、または 10 個のエピトープコード核酸配列を含む。いくつかの態様では、前記少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列は、少なくとも 11～20 個、15～20 個、11～100 個、11～200 個、11～300 個、11～400 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、20 個、または最大で 400 個のエピトープコード核酸配列を含む。いくつかの態様では、前記少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列は少なくとも 2～400 個のエピトープコード核酸配列を含み、前記エピトープコード核酸配列のうちの少なくとも 2 個は、細胞表面、任意で腫瘍細胞表面または感染細胞表面上の MHC クラス I によって

50

提示されるポリペプチド配列またはその一部をコードする。いくつかの態様では、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列は、少なくとも2～10個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個の抗原コード核酸配列を含む。いくつかの態様では、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列は、少なくとも11～20個、15～20個、11～100個、11～200個、11～300個、11～400個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、または最大で400個の抗原コード核酸配列を含む。いくつかの態様では、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列は少なくとも2～400個の抗原コード核酸配列を含み、前記抗原コード核酸配列のうちの少なくとも2個は、細胞表面、任意で腫瘍細胞表面または感染細胞表面上のMHCクラスIによって提示されるポリペプチド配列またはその一部をコードする。いくつかの態様では、前記エピトープコード核酸配列のうちの少なくとも2つが、細胞表面、任意で腫瘍細胞表面または感染細胞表面上のMHCクラスIによって提示されるポリペプチド配列またはその一部をコードする。

10

【0068】

いくつかの態様では、対象に投与されて翻訳された場合、前記エピトープコード核酸配列によってコードされた前記エピトープのうちの少なくとも1つが抗原提示細胞上に提示され、前記腫瘍細胞表面または感染細胞表面上の前記抗原の少なくとも1つを標的とする免疫応答をもたらす。いくつかの態様では、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列は、前記対象に投与されて翻訳された場合、前記MHCクラスIまたはクラスIIエピトープのうちの少なくとも1つが抗原提示細胞上に提示され、腫瘍細胞表面または前記感染細胞表面上の前記エピトープのうちの少なくとも1つを標的とする免疫応答をもたらす、任意で、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列のそれぞれの発現は、前記少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列によって誘導される。

20

【0069】

いくつかの態様では、各エピトープコード核酸配列は、アミノ酸8～35個の長さ、任意で、アミノ酸9～17個、9～25個、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34または35個の長さのポリペプチド配列をコードする。

【0070】

いくつかの態様では、少なくとも1つのMHCクラスIIエピトープコード核酸配列は存在する。いくつかの態様では、少なくとも1つのMHCクラスIIエピトープコード核酸配列は存在し、コードされたペプチド配列を、野生型核酸配列によってコードされる対応するペプチド配列とは異なるものとする少なくとも1つの変化を有する少なくとも1つのMHCクラスIIエピトープコード核酸配列を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのMHCクラスIIエピトープコード核酸配列は、アミノ酸12～20個、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または20～40個の長さである。いくつかの態様では、前記少なくとも1つのMHCクラスIIエピトープコード核酸配列は存在し、少なくとも1つのユニバーサルMHCクラスII抗原コード核酸配列を含み、任意で、前記少なくとも1つのユニバーサル配列は、破傷風トキソイド及びPADREの少なくとも一方を含む。

30

40

【0071】

いくつかの態様では、少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列または第2のプロモーターヌクレオチド配列は、誘導性である。いくつかの態様では、少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列または第2のプロモーターヌクレオチド配列は、非誘導性である。

【0072】

いくつかの態様では、少なくとも1つのポリ(A)配列は、前記骨格に天然に存在するポリ(A)配列を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのポリ(A)配列は、前記骨格に外因性のポリ(A)配列を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのポリ(A)

50

）配列は、少なくとも1つの抗原コード核酸配列のうちの少なくとも1つと機能的に連結される。いくつかの態様では、少なくとも1つのポリ（A）配列は、少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、少なくとも90個、または少なくとも100個の連続したAヌクレオチドである。いくつかの態様では、少なくとも1つのポリ（A）配列は、少なくとも80個の連続したAヌクレオチドである。

【0073】

いくつかの態様では、カセットは、イントロン配列、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節因子（WPRE）配列、内部リボソーム進入配列（IRES）配列、2A自己切断ペプチド配列をコードするヌクレオチド配列、フーリン切断部位をコードするヌクレオチド配列、または、少なくとも1つの抗原コード核酸配列のうちの少なくとも1つに機能的に連結された、mRNAの核輸送、安定性、または翻訳効率を向上させることが知られている5'または3'末端の非コード領域内の配列のうちの少なくとも1つをさらに含む。いくつかの態様では、カセットは、緑色蛍光タンパク質（GFP）、GFPバリエーション、分泌型アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、ルシフェラーゼバリエーション、または検出可能なペプチドもしくはエピトープを含むがこれらに限定されないレポーター遺伝子をさらに含む。いくつかの態様では、検出可能なペプチドまたはエピトープは、HAタグ、FLAGタグ、Hisタグ、またはV5タグからなる群から選択される。

【0074】

いくつかの態様では、1つ以上のベクターは、少なくとも1つの免疫調節剤をコードする1つ以上の核酸配列をさらに含む。いくつかの態様では、免疫調節剤は、抗CTLA4抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗PD-1抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗PD-L1抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗4-1BB抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または抗OX-40抗体もしくはその抗原結合フラグメントである。いくつかの態様では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、一本鎖Fv（scFv）、単一特異性抗体もしくは互いに連結された多重特異性抗体としての単ドメイン抗体（sdAb）（例えば、ラクダ科動物の抗体ドメイン）、または完全長の一本鎖抗体（例えば、柔軟なリンカーによって重鎖と軽鎖が連結された完全長IgG）である。いくつかの態様では、抗体の前記重鎖配列と前記軽鎖配列とは、2AまたはIRESのような自己切断配列によって分離された連続的配列であるか、または抗体の重鎖配列と軽鎖配列とは連続したグリシン残基のような柔軟性リンカーによって連結される。いくつかの態様では、免疫調節剤はサイトカインである。いくつかの態様では、サイトカインは、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、もしくはIL-21、またはそれぞれのそのバリエーションである。

【0075】

いくつかの態様において、少なくとも1つのエピトープコード核酸配列は、（a）腫瘍、感染細胞、または感染症生物からエクソーム、トランスクリプトーム、または全ゲノムヌクレオチドシーケンシングデータのうちの少なくとも1つを取得する工程であって、前記ヌクレオチドシーケンシングデータが、抗原のセットのそれぞれのペプチド配列を表すデータを取得するために用いられる、前記工程と、（b）各抗原の前記ペプチド配列を提示モデルに入力することにより、前記抗原のそれぞれが細胞表面、任意で腫瘍細胞表面または感染細胞上のMHCアレルのうちの1つ以上によって提示される数値的尤度のセットを生成する工程であって、前記数値的尤度のセットが、受け取られた質量分析データに少なくとも基づいて特定されたものである、前記工程と、（c）前記抗原のセットのサブセットを前記数値的尤度のセットに基づいて選択することにより、前記エピトープコード核酸配列を生成するために用いられる選択された抗原のセットを生成する工程と、を実施することによって選択される。

【0076】

いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列のそれぞれは、（a）腫瘍、感染細胞、または感染症生物からエクソーム、トランスクリプトーム、または全ゲノムヌクレオチ

ドシークエンシングデータのうちの少なくとも1つを取得する工程であって、前記ヌクレオチドシークエンシングデータが、抗原のセットのそれぞれのペプチド配列を表すデータを取得するために用いられる、前記工程と、(b)各抗原の前記ペプチド配列を提示モデルに入力することにより、前記抗原のそれぞれが細胞表面、任意で腫瘍細胞表面または感染細胞上のMHCアレルのうちの1つ以上によって提示される数値的尤度のセットを生成する工程であって、前記数値的尤度のセットが、受け取られた質量分析データに少なくとも基づいて特定されたものである、前記工程と、(c)前記抗原のセットのサブセットを前記数値的尤度のセットに基づいて選択することにより、前記少なくとも20個のエピトープコード核酸配列を生成するために用いられる選択された抗原のセットを生成する工程と、を実施することによって選択される。いくつかの態様では、選択された抗原のセットの数は、2~20である。いくつかの態様では、提示モデルは、(a)前記MHCアレルのうちの特定の1つとペプチド配列の特定の位置の特定のアミノ酸とのペアの存在と、(b)前記ペアの前記MHCアレルのうちの前記特定の1つによる、前記特定の位置に前記特定のアミノ酸を含むそのようなペプチド配列の細胞表面上、任意で腫瘍細胞表面または感染細胞表面上での提示の尤度との間の依存性を表す。いくつかの態様では、前記選択された抗原のセットを選択することは、前記提示モデルに基づいて選択されない抗原に対して前記細胞表面上に提示される尤度が増大している抗原を選択することを含み、任意で、前記選択された抗原は、1つ以上の特異的HLAアレルによって提示されているものとして検証されている。いくつかの態様では、前記選択された抗原のセットを選択することは、前記提示モデルに基づいて選択されない抗原に対して前記対象の腫瘍特異的または感染症特異的な免疫応答を誘導することができる尤度が増大している抗原を選択することを含む。いくつかの態様では、前記選択された抗原のセットを選択することは、提示モデルに基づいて選択されない抗原に対してプロフェッショナル抗原提示細胞(APC)によってナイーブT細胞に対して提示される尤度が増大している抗原を選択することを含み、任意で、APCは樹状細胞(DC)である。いくつかの態様では、前記選択された抗原のセットを選択することは、提示モデルに基づいて選択されない抗原に対して中枢性寛容または末梢性寛容によって阻害される尤度が減少している抗原を選択することを含む。いくつかの態様では、前記選択された抗原のセットを選択することは、提示モデルに基づいて選択されない抗原に対して対象に正常組織に対する自己免疫応答を誘導することができる尤度が減少している抗原を選択することを含む。いくつかの態様では、エクソームまたはトランスクリプトームのヌクレオチドシークエンシングデータが、腫瘍細胞または組織、感染細胞、または感染症生物でシークエンシングを行うことによって取得される。いくつかの態様では、シークエンシングは、次世代シークエンシング(NGS)または任意の大規模並列処理シークエンシングアプローチである。

10

20

30

40

50

【0077】

いくつかの態様では、カセットは、抗原カセット内の隣接配列によって形成されたジャンクションエピトープ配列を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つの、または各ジャンクションエピトープ配列は、MHCに対して500nMよりも高い親和性を有する。いくつかの態様では、各ジャンクションエピトープ配列は、非自己である。

【0078】

いくつかの態様では、MHCクラスIエピトープのそれぞれは、集団の少なくとも5%に存在する少なくとも1つのHLAアレルによって提示が可能であることが予測または検証されている。いくつかの態様では、MHCクラスIエピトープのそれぞれは、少なくとも1つのHLAアレルによって提示が可能であることが予測または検証されており、各抗原/HLAペアは、集団において少なくとも0.01%の抗原/HLA頻度を有する。いくつかの態様では、MHCクラスIエピトープのそれぞれは、少なくとも1つのHLAアレルによって提示が可能であることが予測または検証されており、各抗原/HLAペアが、集団において少なくとも0.1%の抗原/HLA頻度を有する。

【0079】

いくつかの態様では、カセットは、翻訳後の野生型核酸配列を含む非治療的MHCクラ

スⅠまたはクラスⅠⅠエピトープ核酸配列をコードしておらず、非治療的エピトープが対象のMHCアレル上に提示されると予測される。いくつかの態様では、非治療的な予測されたMHCクラスⅠまたはクラスⅠⅠエピトープ配列は、カセット内の隣接配列によって形成されたジャンクションエピトープ配列である。

【0080】

いくつかの態様では、予測は、前記非治療的エピトープの配列を提示モデルに入力することによって生成される提示尤度に基づいたものである。

【0081】

いくつかの態様では、カセット内における少なくとも1つの抗原コード核酸配列の順序は、(a) 前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列の異なる順序に対応した候補カセット配列のセットを生成する工程と、(b) 前記各候補カセット配列について、候補カセット配列内の非治療的エピトープの提示に基づいた提示スコアを決定する工程と、(c) 所定の閾値を下回る提示スコアに関連する候補カセット配列を、抗原ワクチン用のカセット配列として選択する工程と、を含む一連の工程によって決定される。

【0082】

また、本明細書では、本明細書に記載される組成物のいずれかと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物も提供される。いくつかの態様において、組成物は、アジュバントをさらに含む。いくつかの態様では、組成物は、免疫調節剤をさらに含む。いくつかの態様では、免疫調節剤は、抗CTL A4抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗PD-1抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗PD-L1抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗4-1BB抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または抗OX-40抗体もしくはその抗原結合フラグメントである。

【0083】

本明細書ではまた、本明細書に記載される組成物のいずれかのカセットと、配列番号3または配列番号5の配列から得られる1つ以上の要素と、を含む単離ヌクレオチド配列または単離ヌクレオチド配列のセットであって、任意で、前記1つ以上の要素が、非構造タンパク質媒介増幅に必要な配列、26Sプロモーターヌクレオチド配列、ポリ(A)配列、及び配列番号3または配列番号5に記載の配列のnsP1~4遺伝子からなる群から選択され、任意で、前記ヌクレオチド配列がcDNAである、前記単離ヌクレオチド配列または単離ヌクレオチド配列のセットも提供される。いくつかの態様では、前記単離ヌクレオチド配列または配列のセットは、配列番号6または配列番号7に記載の配列の7544位に挿入された先行の組成物の請求項のいずれかに記載のカセットを含む。いくつかの態様では、組成物はさらに、a) 配列番号3または配列番号5の配列から得られた前記1つ以上の要素の5'側に位置するT7またはSP6 RNAポリメラーゼプロモーターのヌクレオチド配列と、b) 任意で、前記ポリ(A)配列の3'側に位置する1つ以上の制限部位と、を含む。いくつかの態様では、先行の組成物の請求項のいずれかに記載のカセットは、配列番号8または配列番号9の7563位に挿入される。

【0084】

本明細書ではまた、本明細書に記載のヌクレオチド配列のいずれかを含むベクターまたはベクターのセットも提供される。

【0085】

本明細書ではまた、本明細書に記載のヌクレオチド配列または単離ヌクレオチド配列のセットを含む単離細胞であって、任意で、前記細胞が、BHK-21、CHO、HEK293もしくはそのバリエーション、911、HeLa、A549、LP-293、PER.C6、またはAE1-2a細胞である、前記単離細胞も提供される。

【0086】

本明細書ではまた、本明細書に記載の組成物のいずれかと、使用説明書と、を含むキットも提供される。

【0087】

いくつかの態様では、上記の組成物のいずれかは、ナノ粒子状の送達ビヒクルをさらに

10

20

30

40

50

含む。いくつかの態様では、ナノ粒子状の送達ビヒクルは、脂質ナノ粒子（LNP）であってよい。いくつかの態様では、LNPは、イオン化可能なアミノ脂質を含むいくつかの態様では、イオン化可能なアミノ脂質は、MC3様（ジリノレイルメチル-4-ジメチルアミノブチレート）分子を含む。いくつかの態様では、ナノ粒子送達ビヒクルは抗原発現系を封入する。

【0088】

いくつかの態様では、上記の組成物のいずれかは、複数のLNPをさらに含み、LNPは、抗原発現系、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、及び、LNPの凝集を阻害する複合脂質とを含み、前記複数のLNPのうち、少なくとも約95%のLNPは、非層状の形態を有するか、または高電子密度であるかのいずれかである。

【0089】

いくつかの態様では、非カチオン性脂質は、（1）リン脂質、及び（2）コレステロールまたはコレステロール誘導体の混合物である。

【0090】

いくつかの態様では、LNPの凝集を阻害する複合脂質は、ポリエチレングリコール（PEG）-脂質複合体である。いくつかの態様では、PEG-脂質複合体は、PEG-ジアシルグリセロール（PEG-DAG）複合体、PEG-ジアルキルオキシプロピル（PEG-DAA）複合体、PEG-リン脂質複合体、PEG-セラミド（PEG-Cer）複合体、及びこれらの混合物からなる群から選択される。いくつかの態様では、PEG-DAA複合体は、PEG-ジデシルオキシプロピル（C₁₀）複合体、PEG-ジラウリルオキシプロピル（C₁₂）複合体、PEG-ジミリスチルオキシプロピル（C₁₄）複合体、PEG-ジパルミチルオキシプロピル（C₁₆）複合体、PEG-ジステアリルオキシプロピル（C₁₈）複合体、及びこれらの混合物からなる群から選択される構成員である。

【0091】

いくつかの態様では、抗原発現系は、LNP中に完全に封入される。

【0092】

いくつかの態様では、LNPの非層状の形態は、逆六方晶（H_{II}）または立方晶相構造を含む。

【0093】

いくつかの態様では、カチオン性脂質は、LNP中に存在する全脂質の約10mol%～約50mol%に含まれる。いくつかの態様では、カチオン性脂質は、LNP中に存在する全脂質の約20mol%～約50mol%に含まれる。いくつかの態様では、カチオン性脂質は、LNP中に存在する全脂質の約20mol%～約40mol%に含まれる。

【0094】

いくつかの態様では、非カチオン性脂質は、LNP中に存在する全脂質の約10mol%～約60mol%に含まれる。いくつかの態様では、非カチオン性脂質は、LNP中に存在する全脂質の約20mol%～約55mol%に含まれる。いくつかの態様では、非カチオン性脂質は、LNP中に存在する全脂質の約25mol%～約50mol%に含まれる。

【0095】

いくつかの態様では、複合脂質は、LNP中に存在する全脂質の約0.5mol%～約20mol%に含まれる。いくつかの態様では、複合脂質は、LNP中に存在する全脂質の約2mol%～約20mol%に含まれる。いくつかの態様では、複合脂質は、LNP中に存在する全脂質の約1.5mol%～約18mol%に含まれる。

【0096】

いくつかの態様では、LNPの95%超は、非層状の形態を有する。いくつかの態様では、LNPの95%超は、高電子密度である。

【0097】

いくつかの態様では、上記の組成物のいずれかは、複数のLNPをさらに含み、LNP

10

20

30

40

50

は、LNP中に存在する全脂質の50mol%～85mol%に含まれるカチオン性脂質と、LNP中に存在する全脂質の0.5mol%～2mol%に含まれる、LNPの凝集を阻害する複合脂質と、非カチオン性脂質であって、リン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物であって、前記リン脂質が前記LNP中に存在する全脂質の4mol%～10mol%に含まれ、前記コレステロールまたはその誘導体が前記LNP中に存在する全脂質の30mol%～40mol%に含まれる、前記混合物、リン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物であって、前記リン脂質が前記LNP中に存在する全脂質の3mol%～15mol%に含まれ、前記コレステロールまたはその誘導体が前記LNP中に存在する全脂質の30mol%～40mol%に含まれる、前記混合物、または、LNP中に存在する全脂質の49.5mol%以下であり、リン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物を含み、前記コレステロールまたはその誘導体が前記LNP中に存在する全脂質の30mol%から40mol%に含まれる前記混合物、のいずれかを含む、前記非カチオン性脂質と、を含む。

10

【0098】

いくつかの態様では、上記の組成物のいずれかは複数のLNPをさらに含み、LNPは、LNP中に存在する全脂質の50mol%～65mol%に含まれるカチオン性脂質と、LNP中に存在する全脂質の0.5mol%～2mol%に含まれる、LNPの凝集を阻害する複合脂質と、LNP中に存在する全脂質の13mol%～49.5mol%に含まれる非カチオン性脂質と、を含む。

20

【0099】

いくつかの態様では、リン脂質は、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、またはこれらの混合物を含む。

【0100】

いくつかの態様では、複合脂質は、ポリエチレングリコール(PEG)-脂質複合体を含む。いくつかの態様では、PEG-脂質複合体は、PEG-ジアシルグリセロール(PEG-DAG)複合体、PEG-ジアルキルオキシプロピル(PEG-DAA)複合体、またはこれらの混合物を含む。いくつかの態様では、PEG-DAA複合体は、PEG-ジミリスチルオキシプロピル(PEG-DMA)複合体、PEG-ジステアロイルオキシプロピル(PEG-DSA)複合体、またはこれらの混合物を含む。いくつかの態様では、複合体のPEG部分は、約2000ダルトンの平均分子量を有する。

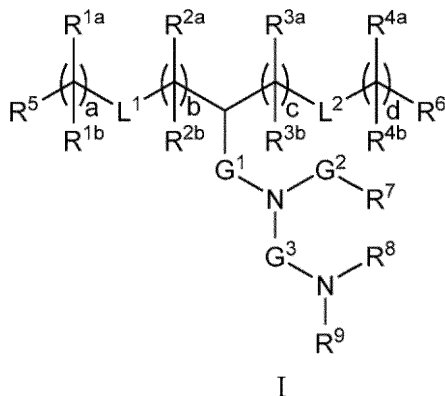
30

【0101】

いくつかの態様では、複合脂質は、LNP中に存在する全脂質の1mol%～2mol%に含まれる。

【0102】

いくつかの態様では、LNPは、式Iの構造：



40

【式中、 L^1 及び L^2 は、それぞれ独立して、 $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)_x-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-R^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)R^a-$ 、 $-R^aC(=O)R^a-$ 、 $-OC(=$

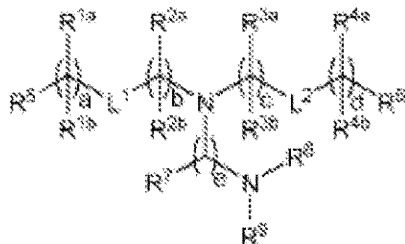
50

0) R^a- 、 $-R^aC(=O)O-$ 、または直接的結合であり、 G_1 は、 $C_i \sim C_2$ アルキレン、 $-(C=O)-$ 、 $-O(C=O)-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-R^aC(=O)-$ 、または直接的結合であり、 $-C(=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-C(=O)R^a-$ 、または直接的結合であり、 G は、 $C_i \sim C_6$ アルキレンであり、 R^a は、 H または $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであり、 R^{1a} 及び R^{1b} は、それぞれの出現について、独立して (a) H または $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであるか、または (b) R^{1a} は、 H または $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであり、 R^{1b} はそれが結合する炭素原子と共に、隣り合った R^{1b} 及びそれが結合する炭素原子と共に炭素-炭素二重結合を形成し、 R^{2a} 及び R^{2b} は、それぞれの出現について、独立して、(a) H または $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであるか、または (b) R^{2a} は、 H または $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであり、 R^{2b} はそれが結合する炭素原子と共に、隣り合った R^{2b} 及びそれが結合する炭素原子と共に炭素-炭素二重結合を形成し、 R^{3a} 及び R^{3b} は、それぞれの出現について、独立して、(a) H または $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであるか、または (b) R^{3a} は、 H または $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであり、 R^{3b} はそれが結合する炭素原子と共に、隣り合った R 及びそれが結合する炭素原子と共に炭素-炭素二重結合を形成し、 R^{4a} 及び R^{4b} は、それぞれの出現について、独立して、(a) H または $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであるか、または (b) R^{4a} は、 H または $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであり、 R^{4b} はそれが結合する炭素原子と共に、隣り合った R^{4b} 及びそれが結合する炭素原子と共に炭素-炭素二重結合を形成し、 R^5 及び R^6 は、それぞれ独立して H またはメチルであり、 R^7 は、 $C_4 \sim C_{20}$ アルキルであり、 R^8 及び R^9 は、それぞれ独立して $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであるか、または R^8 と R^9 とは、それらが結合した窒素原子とともに、5、6、または7員の複素環を形成し、 a 、 b 、 c 、及び d は、それぞれ独立して1~24の整数であり、 x は0、1、または2である]を有する化合物、または、その薬学的に許容される塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体を含む。

10

20

【0103】

いくつかの態様では、 LNP は、式IIの構造：

30

II

[式中、 L^1 及び L^2 は、それぞれ独立して $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)O-$ 、または炭素-炭素二重結合であり、 R^{1a} 及び R^{1b} は、それぞれの出現について、独立して、(a) H または $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであるか、または (b) R^{1a} は、 H または $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであり、 R^{1b} はそれが結合する炭素原子と共に、隣り合った R^{1b} 及びそれが結合する炭素原子と共に炭素-炭素二重結合を形成し、 R^{2a} 及び R^{2b} は、それぞれの出現について、独立して、(a) H または $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであるか、または (b) R^{2a} は、 H または $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであり、 R^{2b} はそれが結合する炭素原子と共に、隣り合った R^{2b} 及びそれが結合する炭素原子と共に炭素-炭素二重結合を形成し、 R^{3a} 及び R^{3b} は、それぞれの出現について、独立して、(a) H または $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであるか、または (b) R^{3a} は、 H または $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであり、 R^{3b} はそれが結合する炭素原子と共に、隣り合った R^{3b} 及びそれが結合する炭素原子と共に炭素-炭素二重結合を形成し、 R^{4a} 及び R^{4b} は、それぞれの出現について、独立して、(a) H または $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであるか、または (b) R^{4a} は、 H または $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであり、 R^{4b} はそれが結合する炭素原子と共に、隣り合っ

40

50

た R^4 及びそれが結合する炭素原子と共に炭素－炭素二重結合を形成し、 R^5 及び R^6 は、それぞれ独立してメチルまたはシクロアルキルであり、 R^7 は、それぞれの出現について、独立して H または $C_{1\sim 12}$ アルキルであり、 R^8 及び R^9 は、それぞれ独立して、非置換の $C_{1\sim 12}$ アルキルであるか、または R^8 と R^9 とは、それらが結合した窒素原子とともに、1 個の窒素原子を含む 5、6、または 7 員の複素環を形成し、 a 及び d は、それぞれ独立して 0～24 の整数であり、 b 及び c はそれぞれ独立して 1～24 の整数であり、 e は 1 または 2 であり、ただし、 R^{1a} 、 R^{2a} 、 R^{3a} 、または R^{4a} のうちの少なくとも 1 つが、 $C_{1\sim 12}$ アルキルであるか、または L^1 または L^2 の少なくとも一方が、 $-O$ ($C=O$) $-$ または $-(C=O)O-$ であり、 R^{1a} 及び R^{1b} は、 a が 6 である場合にはイソプロピルでなく、 a が 8 である場合には n -ブチルでない] を有する化合物、または、その薬学的に許容される塩、互変異性体、プロドラッグもしくは立体異性体を含む。

10

【0104】

いくつかの態様では、上記の組成物のいずれかは、中性脂質、ステロイド、及びポリマー結合脂質を含む 1 つ以上の賦形剤をさらに含む。いくつかの態様では、中性脂質は、1，2-ジステアロイル- $s n$ -グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC)、1，2-ジパルミトイル- $s n$ -グリセロ-3-ホスホコリン (DPPC)、1，2-ジミリストイル- $s n$ -グリセロ-3-ホスホコリン (DMPC)、1-パルミトイル-2-オレオイル- $s n$ -グリセロ-3-ホスホコリン (POPC)、1，2-ジオレオイル- $s n$ -グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC)、及び 1，2-ジオレオイル- $s n$ -グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE) のうちの少なくとも 1 つを含む。いくつかの態様では、中性脂質は DSPC である。

20

【0105】

いくつかの態様では、化合物と中性脂質とのモル比は、約 2 : 1～約 8 : 1 の範囲である。

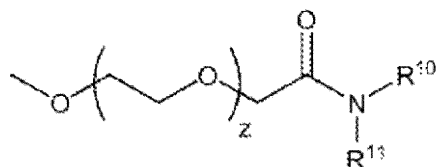
【0106】

いくつかの態様では、ステロイドはコレステロールである。いくつかの態様では、化合物とコレステロールとのモル比は、約 2 : 1～1 : 1 の範囲である。

【0107】

いくつかの態様では、ポリマー結合脂質は PEG 化脂質である。いくつかの態様では、化合物と PEG 化脂質とのモル比は、約 100 : 1～約 25 : 1 の範囲である。いくつかの態様では、PEG 化脂質は、PEG-DAG、PEG ポリエチレン (PEG-PE)、PEG-スクシノイル-ジアシルグリセロール (PEG-S-DAG)、PEG-*cer*、または PEG ジアルキルオキシプロピルカルバメートである。いくつかの態様では、PEG 化脂質は、下記構造 III :

30



III

40

[式中、 R^{10} 及び R^{11} は、それぞれ独立して、10～30 個の炭素原子を有する、直鎖または分枝鎖、飽和または不飽和のアルキル鎖であり、前記アルキル鎖は任意で 1 つ以上のエステル結合によって中断され、 z は、30～60 の範囲の平均値を有する] を有するか、または、その薬学的に許容される塩、互変異性体、もしくは立体異性体である。いくつかの態様では、 R^{10} 及び R^{11} は、それぞれ独立して、12～16 個の炭素原子を有する直鎖の飽和アルキル鎖である。いくつかの態様では、 z の平均は、約 45 である。

【0108】

いくつかの態様では、LNP は、ポリアニオン性の核酸と混合される際に非二重層構造

50

に自己組織化する。いくつかの態様では、非二重層構造は、60 nm～120 nmの直径を有する。いくつかの態様では、非二重層構造は、約70 nm、約80 nm、約90 nm、または約100 nmの直径を有する。いくつかの態様では、ナノ粒子状の送達ビヒクルは、約100 nmの直径を有する。

【0109】

本明細書では、がんを有する対象を治療するための方法であって、前記がんは、(1) K R A S 関連M H CクラスIネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2) 結腸直腸癌(C R C)、(3) 非小細胞肺癌(N S C L C)、及び／または(4) 膵管腺癌(P D A)を含み、前記方法は、前記対象に、本明細書に記載の組成物のいずれか、または本明細書に記載の医薬組成物のいずれかを投与することを含む、前記方法も提供される。いくつかの態様では、前記エピトープコード核酸配列は、がんを有する前記対象の腫瘍に由来するかまたは前記感染した対象の細胞または試料に由来する。いくつかの態様では、前記エピトープコード核酸配列は、がんを有する前記対象の腫瘍にも、前記感染した対象の細胞または試料にも由来しない。

10

【0110】

本明細書では、がんを有する対象において免疫応答を刺激する方法であって、前記がんは、(1) K R A S 関連M H CクラスIネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2) 結腸直腸癌(C R C)、(3) 非小細胞肺癌(N S C L C)、及び／または(4) 膵管腺癌(P D A)を含み、前記方法は、前記対象に、本明細書に記載の組成物のいずれか、または本明細書に記載の医薬組成物のいずれかを投与することを含む、前記方法も提供される。

20

【0111】

いくつかの態様では、対象は、M H CクラスIエピトープを提示することが予測または知られている少なくとも1つのH L Aアレルを発現する。いくつかの態様では、M H CクラスIエピトープを提示することが予測されるかまたは知られているH L Aアレルは、A * 0 3 : 0 1、A * 1 1 : 0 1、A * 0 2 : 0 1、A * 6 8 : 0 1、B * 0 7 : 0 2、C * 0 1 : 0 2、C * 0 3 : 0 4、C * 0 8 : 0 2、及び／またはA * 0 1 : 0 1である。いくつかの態様では、M H CクラスIエピトープを提示することが予測されるかまたは知られているH L Aアレルは、A * 0 3 : 0 1である。いくつかの態様では、M H CクラスIエピトープを提示することが予測されるかまたは知られているH L Aアレルは、A * 1 1 : 0 1である。いくつかの態様では、M H CクラスIエピトープを提示することが予測されるかまたは知られているH L Aアレルは、A * 0 2 : 0 1である。いくつかの態様では、M H CクラスIエピトープを提示することが予測されるかまたは知られているH L Aアレルは、C * 0 1 : 0 2である。いくつかの態様では、M H CクラスIエピトープを提示することが予測されるかまたは知られているH L Aアレルは、A * 6 8 : 0 1である。いくつかの態様では、M H CクラスIエピトープを提示することが予測されるかまたは知られているH L Aアレルは、B * 0 7 : 0 2である。いくつかの態様では、M H CクラスIエピトープを提示することが予測されるかまたは知られているH L Aアレルは、C * 0 3 : 0 4である。いくつかの態様では、M H CクラスIエピトープを提示することが予測されるかまたは知られているH L Aアレルは、C * 0 8 : 0 2である。いくつかの態様では、M H CクラスIエピトープを提示することが予測されるかまたは知られているH L Aアレルは、A * 0 1 : 0 1である。

30

40

【0112】

いくつかの態様では、組成物は、筋肉内(I M)、皮内(I D)、皮下(S C)、または静脈内(I V)投与される。いくつかの態様では、組成物は筋肉内投与される。いくつかの態様では、方法は、1種以上の免疫調節剤の投与をさらに含み、任意で、免疫調節剤は、組成物または医薬組成物の投与前、投与と同時、または投与後に投与される。いくつかの態様では、1種以上の免疫調節剤は、抗C T L A 4抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗P D - 1抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗P D - L 1抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗4 - 1 B B抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または、抗O X - 4 0抗体もしくはその抗原結合フラグメントからなる群から選択される。い

50

くつかの態様では、免疫調節剤は、静脈内（IV）、筋肉内（IM）、皮内（ID）、または皮下（SC）投与される。いくつかの態様では、皮下投与は、組成物もしくは医薬組成物の投与部位付近である、または、1種以上のベクターもしくは組成物流入領域リンパ節に極めて近接している。いくつかの態様では、1種以上の免疫調節剤は、ニボルマブ、センプリマブ、及びイピリムマブからなる群から選択される。いくつかの態様では、1種以上の免疫調節剤は、ニボルマブを含む。いくつかの態様では、1種以上の免疫調節剤は、センプリマブを含む。いくつかの態様では、1種以上の免疫調節剤は、イピリムマブを含む。

【0113】

いくつかの態様では、方法は、対象に第2のワクチン組成物を投与することをさらに含む。いくつかの態様では、第2のワクチン組成物は、本明細書に記載の組成物または医薬組成物のいずれかの投与の前に投与される。いくつかの態様では、第2のワクチン組成物は、本明細書に記載の組成物または医薬組成物のいずれかの投与の後に投与される。いくつかの態様では、第2のワクチン組成物は、本明細書に記載の組成物または医薬組成物のいずれかと同じである。いくつかの態様では、第2のワクチン組成物は、本明細書に記載の組成物または医薬組成物のいずれとも異なる。いくつかの態様では、第2のワクチン組成物は、少なくとも1つの抗原コード核酸配列をコードするチンパンジーアデノウイルスベクターを含む。いくつかの態様では、チンパンジーアデノウイルスベクターによってコードされる少なくとも1つの抗原コード核酸配列は、先行の組成物の請求項のいずれかに記載の少なくとも1つの抗原コード核酸配列と同じである。

【0114】

本明細書ではまた、先行の組成物の請求項のいずれかに記載の1つ以上のベクターを製造する方法であって、（a）骨格及びカセットを含む直鎖化DNA配列を得ることと、（b）直鎖化DNA配列を、直鎖化DNA配列をRNAに転写するために必要なすべての成分を含んだインビトロ転写反応液に加えることにより、直鎖化DNA配列をインビトロ転写することであって、任意で、得られたRNAにm7gキャップをインビトロで付加することを含む、直鎖化DNA配列をインビトロ転写することと、（c）インビトロ転写反応液から1つ以上のベクターを単離することと、を含む、方法も提供される。いくつかの態様では、直鎖化DNA配列は、DNAプラスミド配列を直鎖化することにより、またはPCRを用いた増幅により生成される。いくつかの態様では、DNAプラスミド配列は、細菌組換えまたは全ゲノムDNA合成または細菌細胞内で合成されたDNAの増幅を行う全ゲノムDNA合成のうちの1つを用いて生成される。いくつかの態様では、1つ以上のベクターを前記インビトロ転写反応液から単離することは、フェノールクロロホルム抽出、シリカカラムを用いた精製、または同様のRNA精製法のうちの1つ以上を含む。

【0115】

本明細書ではまた、前記抗原発現系を送達するための先行の組成物の請求項のいずれかに記載の組成物を製造する方法であって、（a）ナノ粒子状の送達ビヒクルの成分を与えることと、（b）抗原発現系を与えることと、（c）ナノ粒子状の送達ビヒクル及び抗原発現系が、抗原発現系を送達するための組成物を生成するのに十分な条件を与えることと、を含む方法も提供される。いくつかの態様では、かかる条件は、マイクロ流体混合によって与えられる。

【0116】

本明細書では、疾患を有する対象を治療するための方法であって、前記疾患はがんであり、前記がんは、（1）KRAS関連MHCクラスIネオエピトープを発現する固形腫瘍、（2）結腸直腸癌（CRC）、（3）非小細胞肺癌（NSCLC）、及び／または（4）膵管腺癌（PDA）を含むがんであり、前記方法は、前記対象に、抗原ベースワクチンを前記対象に投与することを含み、前記抗原ベースワクチンは、抗原コードカセット、または前記カセットによってコードされたポリペプチド配列を含み、前記抗原コードカセットは、5'から3'方向に、次式によって記述される少なくとも1つの抗原コード核酸配列を含む、前記方法も提供される：

10

20

30

40

50

$(E_x - (E^N_n) y) z$

〔式中、

E は、異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

n は、別個の異なるエピトープコード核酸配列の数を表しかつ、0 を含む任意の整数であり、

E^N は、それぞれの対応する n で前記別個の異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

z の各繰り返しについて：各 n について $x = 0$ または 1、 $y = 0$ または 1 であり、x または y の少なくとも一方は 1 であり、

z = 2 以上であり、前記抗原コード核酸配列は、E、所与の E^N 、またはこれらの組み合わせの少なくとも 2 回の繰り返しを含み、

前記少なくとも 2 回の繰り返しを含む前記異なるエピトープコード核酸配列の少なくとも 1 つは K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする〕。

〔0117〕

本明細書では、疾患を有する対象を治療するための方法であって、前記疾患ががんであり、前記がんが、(1) K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2) 結腸直腸癌 (C R C)、(3) 非小細胞肺癌 (N S C L C)、及び／または (4) 膵管腺癌 (P D A) を含み、前記方法が、前記対象に抗原ベースワクチンを投与することを含み、前記抗原ベースワクチンが抗原発現系を含み、前記抗原発現系が 1 つ以上のベクターを含み、前記 1 つ以上のベクターが、

(a) ベクター骨格であって、

(i) 少なくとも 1 つのプロモーターヌクレオチド配列と、

(i i) 任意で、少なくとも 1 つのポリアデニル化 (ポリ (A)) 配列とを含む、前記ベクター骨格と、

(b) カセットであって、

(i) 少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列であって、

(I) K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードするエピトープコード核酸配列を含み、前記エピトープコード核酸配列のそれぞれが、

(A) 任意で、5' リンカー配列と、

(B) 任意で、3' リンカー配列と

を含む、前記少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列と、

(i i) 任意で、前記抗原コード核酸配列に機能的に連結された第 2 のプロモーターヌクレオチド配列と、

(i i i) 任意で、少なくとも 1 つの M H C クラス I I エピトープコード核酸配列と、

(i v) 任意で、G P G P G アミノ酸リンカー配列 (配列番号 56) をコードする少なくとも 1 つの核酸配列と、

(v) 任意で、天然のポリ (A) 配列または前記ベクター骨格に対して外因性のポリ (A) 配列である少なくとも 1 つの第 2 のポリ (A) 配列と

を含む、前記カセットと

を含み、前記第 2 のプロモーターヌクレオチド配列が存在しない場合、前記抗原コード核酸配列が前記少なくとも 1 つのプロモーターヌクレオチド配列と機能的に連結され、前記少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列が、K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする前記エピトープコード核酸配列の少なくとも 2 回の繰り返しを含む、方法も提供される。

〔0118〕

いくつかの態様では、抗原コードカセットは、アミノ酸配列 V V V G A C G V G K (配列番号 75)、V V V G A D G V G K (配列番号 78)、V V G A V G V G K (配列番号 79)、及び I L D T A G H E E Y (配列番号 82) のそれぞれの少なくとも 4 回の繰り返しをコードする。

【0119】

いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列は、がんを有する対象の腫瘍、または、感染した対象の細胞もしくは試料に由来する。いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列は、がんを有する対象の腫瘍、ならびに、感染した対象の細胞および試料に由来しない。

【0120】

本明細書では、がんを有する対象における免疫応答を刺激するための方法であって、前記がんは、(1) K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2) 結腸直腸癌 (C R C)、(3) 非小細胞肺癌 (N S C L C)、及び／または (4) 膵管腺癌 (P D A) を含み、前記方法は、前記対象に、抗原ベースワクチンを前記対象に投与することを含み、前記抗原ベースワクチンは、抗原コードカセット、または前記カセットによってコードされたポリペプチド配列を含み、前記抗原コードカセットは、5' から 3' 方向に、次式によって記述される少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列を含む、前記方法もまた提供される：

$$(E_x - (E^N_n)_y)_z$$

[式中、

E は、異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

n は、別個の異なるエピトープコード核酸配列の数を表しかつ、0 を含む任意の整数であり、

E^N は、それぞれの対応する n で前記別個の異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

z の各繰り返しについて：各 n について $x = 0$ または 1、 $y = 0$ または 1 であり、x または y の少なくとも一方は 1 であり、

z = 2 以上であり、前記抗原コード核酸配列は、E、所与の E^N 、またはこれらの組み合わせの少なくとも 2 回の繰り返しを含み、

前記少なくとも 2 回の繰り返しを含む前記異なるエピトープコード核酸配列の少なくとも 1 つは K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする]。

【0121】

本明細書では、がんを有する対象において免疫応答を刺激するための方法であって、前記がんが、(1) K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2) 結腸直腸癌 (C R C)、(3) 非小細胞肺癌 (N S C L C)、及び／または (4) 膵管腺癌 (P D A) を含み、前記方法が、前記対象に抗原ベースワクチンを投与することを含み、前記抗原ベースワクチンが抗原発現系を含み、前記抗原発現系が 1 つ以上のベクターを含み、前記 1 つ以上のベクターが、

(a) ベクター骨格であって、

(i) 少なくとも 1 つのプロモーターヌクレオチド配列と、

(i i) 任意で、少なくとも 1 つのポリアデニル化 (ポリ (A)) 配列とを含む、前記ベクター骨格と、

(b) カセットであって、

(i) 少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列であって、

(I) K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードするエピトープコード核酸配列を含み、前記エピトープコード核酸配列のそれぞれが、

(A) 任意で、5' リンカー配列と、

(B) 任意で、3' リンカー配列と

を含む、前記少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列と、

(i i) 任意で、前記抗原コード核酸配列に機能的に連結された第 2 のプロモーターヌクレオチド配列と、

(i i i) 任意で、少なくとも 1 つの M H C クラス I I エピトープコード核酸配列と、

(i v) 任意で、G P G P G アミノ酸リンカー配列 (配列番号 56) をコードする少

なくとも1つの核酸配列と、

(v) 任意で、天然のポリ(A)配列または前記ベクター骨格に対して外因性のポリ(A)配列である少なくとも1つの第2のポリ(A)配列とを含む、前記カセットと

を含み、前記第2のプロモーターヌクレオチド配列が存在しない場合、前記抗原コード核酸配列が前記少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列と機能的に連結され、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列が、KRAS関連MHCクラスIエペトープをコードする前記エペトープコード核酸配列のうちの少なくとも1つの少なくとも2回の繰り返しを含む、前記方法も提供される。

【0122】

本明細書では、疾患を有する対象を治療するための方法であって、前記疾患ががんであり、前記がんが、(1) KRAS関連MHCクラスIエペトープを発現する固形腫瘍、(2) 結腸直腸癌(CRC)、(3) 非小細胞肺癌(NSCLC)、及び／または(4) 膵管腺癌(PDA)を含み、前記方法が、前記対象に抗原ベースワクチンを投与することを含み、前記抗原ベースワクチンが抗原発現系を含み、前記抗原発現系が1つ以上のベクターを含み、前記1つ以上のベクターが、

(a) ベクター骨格であって、

(i) 少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列と、

(ii) 任意で、少なくとも1つのポリアデニル化(ポリ(A))配列とを含む、前記ベクター骨格と、

(b) カセットであって、

(i) 少なくとも1つの抗原コード核酸配列であって、

(I) 少なくとも2個の異なるエペトープコード核酸配列であって、任意で、

(1) 前記コードされたエペトープ配列を、野生型核酸配列によってコードされた対応するペプチド配列とは異なるものとする少なくとも1つの変化であって、任意でKRAS変異である、前記少なくとも1つの変化、または

(2) 病原体由来ペプチド、ウイルス由来ペプチド、細菌由来ペプチド、真菌由来ペプチド、及び寄生虫由来ペプチドからなる群から選択される感染症生物ペプチドをコードする核酸配列

を含み、前記エペトープコード核酸配列のそれぞれが、

(A) 任意で、5'リンカー配列と、

(B) 任意で、3'リンカー配列と

を含む、前記少なくとも2個の異なるエペトープコード核酸配列

を含む、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列と、

(iii) 任意で、前記抗原コード核酸配列に機能的に連結された第2のプロモーターヌクレオチド配列と、

(iii) 任意で、少なくとも1つのMHCクラスIエペトープコード核酸配列と、

(iv) 任意で、GPGPGアミノ酸リンカー配列(配列番号56)をコードする少なくとも1つの核酸配列と、

(v) 任意で、天然のポリ(A)配列または前記ベクター骨格に対して外因性のポリ(A)配列である少なくとも1つの第2のポリ(A)配列とを含む、前記カセットと

を含み、前記第2のプロモーターヌクレオチド配列が存在しない場合、前記抗原コード核酸配列が前記少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列と機能的に連結され、前記カセットが、免疫優性なMHCクラスIエペトープをコードせず、前記免疫優性なMHCクラスIエペトープが、(1) ワクチン組成物中で対象に投与された場合に前記カセット内にコードされた別のMHCクラスIエペトープと比較して5倍以上の免疫応答を刺激し、前記対象の免疫応答を刺激することができるか、及び／または(2) 前記免疫優性なMHCクラスIエペトープの非存在下で他のMHCクラスIエペトープが投与された場合の

10

20

30

40

50

免疫応答と比較してワクチン組成物中で対象に投与された場合に前記カセット内にコードされた別のMHCクラスIエピトープに対する免疫応答を減少させ、任意で、前記免疫応答が検出限界未満に減少させられるか、及び／または前記免疫応答が治療的に有効な応答ではないものである、前記方法も提供される。

【0123】

いくつかの態様では、抗原コードカセットは、アミノ酸配列VVVGACGVGK（配列番号75）、VVVGADGVGK（配列番号78）、VVGAVGVGK（配列番号79）、及びILDTAGHEEY（配列番号82）のそれぞれの少なくとも4回の繰り返しをコードする。

【0124】

いくつかの態様では、対象は、前記少なくとも1つのエピトープ配列を提示することが予測されるかまたは知られている少なくとも1つのHLAアレルを発現し、任意で、提示されることが予測されているかまたは知られている前記少なくとも1つのエピトープ配列が、前記カセット内にコードされた（1）KRAS関連MHCクラスIネオエピトープ、及び／または（2）前記免疫優性なMHCクラスIエピトープ及び他のMHCクラスIエピトープを含む。いくつかの態様では、対象は、前記少なくとも1つのエピトープ配列を提示することが予測されるかまたは知られている少なくとも1つのHLAアレルを発現し、前記少なくとも1つのエピトープ配列が、細胞の表面上にMHCクラスIによって提示されることが知られているかまたは疑われるエピトープを含み、任意で、提示されることが予測されているかまたは知られている前記少なくとも1つのエピトープ配列が、前記カセット内にコードされた（1）KRAS関連MHCクラスIネオエピトープ、及び／または（2）前記免疫優性なMHCクラスIエピトープ及び他のMHCクラスIエピトープを含む。いくつかの態様では、細胞の表面は、腫瘍細胞表面である。いくつかの態様では、細胞は、肺癌、メラノーマ、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、腎臓癌、胃癌、結腸癌、精巣癌、頭頸部癌、膵臓癌、脳癌、B細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、T細胞リンパ球性白血病、非小細胞肺癌、及び小細胞肺癌からなる群から選択される腫瘍細胞である。いくつかの態様では、細胞の表面は、感染細胞表面である。いくつかの態様では、細胞は、病原体感染細胞、ウイルス感染細胞、細菌感染細胞、真菌感染細胞、及び寄生虫感染細胞からなる群から選択される感染細胞である。いくつかの態様では、ウイルス感染細胞は、HIV感染細胞、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス（SARS）感染細胞、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス2（SARS-CoV-2）感染細胞、エボラ感染細胞、B型肝炎ウイルス（HBV）感染細胞、インフルエンザ感染細胞、オルトミクソウイルス科ウイルス感染細胞、ヒトパピローマウイルス（HPV）感染細胞、サイトメガロウイルス（CMV）感染細胞、チクングニアウイルス感染細胞、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）感染細胞、デングウイルス感染細胞、及びC型肝炎ウイルス（HCV）感染細胞からなる群から選択される。

【0125】

本明細書では、がんを有する対象において免疫応答を誘導するための方法であって、前記がんが、（1）KRAS関連MHCクラスIネオエピトープを発現する固形腫瘍、（2）結腸直腸癌（CRC）、（3）非小細胞肺癌（NSCLC）、及び／または（4）膵管腺癌（PDA）を含み、前記方法が、前記対象に抗原ベースワクチンを投与することを含み、前記抗原ベースワクチンが抗原コードカセット、または前記カセットによってコードされたポリペプチド配列を含み、前記抗原コードカセットが、5'から3'方向に、次式によって記述される少なくとも1つの抗原コード核酸配列を含む、前記方法も提供される：

$$(E_x - (E^N_n)_y)_z$$

【式中、

Eは、異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

nは、別個の異なるエピトープコード核酸配列の数を表しかつ、0を含む任意の整数であり、

E^Nは、それぞれの対応するnで前記別個の異なるエピトープコード核酸配列を含むヌク

レオチド配列を表し、

z の各繰り返しについて；各 n について $x = 0$ または 1、 $y = 0$ または 1 であり、 x または y の少なくとも一方は 1 であり、

$z = 2$ 以上であり、前記抗原コード核酸配列は、E、所与の E^N 、またはこれらの組み合わせの少なくとも 2 回の繰り返しを含み、

前記少なくとも 2 回の繰り返しを含む前記異なるエピトープコード核酸配列の少なくとも 1 つは K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする】。

【0126】

本明細書では、がんを有する対象における免疫応答を誘導するための方法であって、前記がんは、(1) K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2) 結腸直腸癌 (C R C)、(3) 非小細胞肺癌 (N S C L C)、及び／または (4) 膵管腺癌 (P D A) を含み、前記方法は、前記対象に、抗原ベースワクチンを前記対象に投与することを含み、前記抗原ベースワクチンは、抗原発現系であって、前記抗原発現系を含む、前記抗原発現系を含む、前記抗原発現系は、1 つ以上のベクターを含み、前記 1 つ以上のベクターは、(a) ベクター主鎖であって、前記主鎖は、(i) 少なくとも 1 つのプロモーターヌクレオチド配列、及び、(i i) 任意で、少なくとも 1 つのポリアデニル化 (ポリ (A)) 配列を含む、前記ベクター主鎖；ならびに、(b) カセットであって、前記カセットは、(i) 少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列であって、(I) 前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードするエピトープコード核酸配列を含み、前記エピトープコード核酸配列のそれぞれは、(A) 任意で、5' リンカー配列、及び、(B) 任意で、3' リンカー配列を含む、前記核酸配列と、(i i) 任意で、前記抗原コード核酸配列に機能的に連結された第 2 のプロモーターヌクレオチド配列と、(i i i) 任意で、少なくとも 1 つの M H C クラス I I エピトープコード核酸配列と、(i v) 任意で、G P G P G アミノ酸リンカー配列 (配列番号 56) をコードする少なくとも 1 つの核酸配列と、(v) 任意で、少なくとも 1 つの第 2 のポリ (A) 配列と、を含む、前記カセットを含み、前記第 2 のポリ (A) 配列は、自然のポリ (A) 配列、または、ベクター主鎖に対して外来性のポリ (A) 配列であり、前記第 2 のプロモーターヌクレオチド配列が存在しない場合、前記抗原コード核酸配列が前記少なくとも 1 つのプロモーターヌクレオチド配列に機能的に連結されており、前記少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列は、前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする前記エピトープコード核酸配列の、少なくとも 2 回の繰り返しを含み、前記対象は、前記少なくとも 1 つの K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを提示すると予想されるかまたは提示することが知られている少なくとも 1 つの H L A アレルを発現する、前記方法もまた提供する。

【0127】

本明細書では、がんを有する対象において免疫応答を誘導するための方法であって、前記がんが、(1) K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2) 結腸直腸癌 (C R C)、(3) 非小細胞肺癌 (N S C L C)、及び／または (4) 膵管腺癌 (P D A) を含み、前記抗原ベースワクチンが抗原発現系を含み、前記抗原発現系が 1 つ以上のベクターを含み、前記 1 つ以上のベクターが、

(a) ベクター骨格であって、

(i) 少なくとも 1 つのプロモーターヌクレオチド配列と、

(i i) 任意で、少なくとも 1 つのポリアデニル化 (ポリ (A)) 配列とを含む、前記ベクター骨格と、

(b) カセットであって、

(i) 少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列であって、

(I) 少なくとも 2 個のエピトープコード核酸配列であって、任意で、

(1) 前記コードされたエピトープ配列を、野生型核酸配列によってコードされた対応するペプチド配列とは異なるものとする少なくとも 1 つの変化であって、任意で K R A S 変異である、前記少なくとも 1 つの変化、または

(2) 病原体由来ペプチド、ウイルス由来ペプチド、細菌由来ペプチド、真菌由

来ペプチド、及び寄生虫由来ペプチドからなる群から選択される感染症生物ペプチドをコードする核酸配列

を含み、任意で前記エピトープコード核酸配列がMHCクラスIエピトープをコードし、前記エピトープコード核酸配列のそれぞれが、

(A) 任意で、5'リンカー配列と、

(B) 任意で、3'リンカー配列と

を含む、前記少なくとも2個の異なるエピトープコード核酸配列

を含む、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列と、

(i i) 任意で、前記抗原コード核酸配列に機能的に連結された第2のプロモーターヌクレオチド配列と、

(i i i) 任意で、少なくとも1つのMHCクラスIエピトープコード核酸配列と、

(i v) 任意で、G P G P G アミノ酸リンカー配列（配列番号56）をコードする少なくとも1つの核酸配列と、

(v) 任意で、天然のポリ（A）配列または前記ベクター骨格に対して外因性のポリ

（A）配列である少なくとも1つの第2のポリ（A）配列と

を含む、前記カセットと

を含み、前記第2のプロモーターヌクレオチド配列が存在しない場合、前記抗原コード核酸配列が前記少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列と機能的に連結され、前記カセットが、免疫優性なMHCクラスIエピトープをコードせず、前記免疫優性なMHCクラスIエピトープが、（1）ワクチン組成物中で対象に投与された場合に前記カセット内にコードされた別のMHCクラスIエピトープと比較して5倍以上の免疫応答を刺激し、前記対象の免疫応答を刺激することができるか、及び／または（2）前記免疫優性なMHCクラスIエピトープの非存在下で他のMHCクラスIエピトープが投与された場合の免疫応答と比較してワクチン組成物中で対象に投与された場合に前記カセット内にコードされた別のMHCクラスIエピトープに対する免疫応答を減少させ、任意で、前記免疫応答が検出限界未満に減少させられるか、及び／または前記免疫応答が治療的に有効な応答ではないものであり、前記対象が、前記カセット内にコードされた前記免疫優性なMHCクラスIエピトープ及び前記他のMHCクラスIエピトープの両方を提示することが予測されているかまたは知られている少なくとも1つのHLAアレルを発現する、前記方法も提供される。

【0128】

いくつかの態様では、抗原コードカセットは、アミノ酸配列V V V G A C G V G K（配列番号75）、V V V G A D G V G K（配列番号78）、V V G A V G V G K（配列番号79）、及びI L D T A G H E E Y（配列番号82）のそれぞれの少なくとも4回の繰り返しをコードする。いくつかの態様では、KRAS関連MHCクラスIネオエピトープまたはKRAS変異は、KRAS G12C変異、KRAS G12V変異、KRAS G12D変異、またはKRAS Q61H変異を含む。いくつかの態様では、KRAS関連MHCクラスIネオエピトープまたはKRAS変異は、配列番号75～82に示されるアミノ酸配列のいずれか1つを含む。いくつかの態様では、抗原コードカセットは、配列番号75～82に示されるそれぞれのアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、抗原コードカセットは、配列番号75～82に示されるそれぞれのアミノ酸配列の2回以上の繰り返しを含む。いくつかの態様では、抗原コードカセットは、配列番号75～82に示されるそれぞれのアミノ酸配列の4回の繰り返しを含む。いくつかの態様では、KRAS関連MHCクラスIネオエピトープまたはKRAS変異は、配列番号57、配列番号58、配列番号59、または配列番号60に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列は、異なるKRAS関連MHCクラスIネオエピトープまたは異なるKRAS変異を独立してコードする2個以上の異なるエピトープコード核酸配列を含む。いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列のそれぞれは、異なるKRAS関連MHCクラスIネオエピトープまたは異なるKRAS変異を独立してコードする。いく

10

20

30

40

50

つかの態様では、エピトープコード核酸配列は、K R A S G 1 2 C 変異、K R A S G 1 2 V 変異、K R A S G 1 2 D 変異、または K R A S Q 6 1 H 変異を独立してコードする 2 個以上の異なるエピトープコード核酸配列を含む。いくつかの態様では、エピトープコード核酸配列は、K R A S G 1 2 C 変異、K R A S G 1 2 V 変異、及び K R A S G 1 2 D 変異、及び任意で K R A S Q 6 1 H 変異のそれぞれを独立してコードする。いくつかの態様では、抗原コード核酸配列は、配列番号 6 4 または配列番号 6 5 に示されるアミノ酸配列を含むペプチドをコードする。いくつかの態様では、抗原コード核酸配列は、配列番号 6 5 に示されるアミノ酸配列を含むペプチドをコードする。

【0129】

いくつかの態様では、K R A S G 1 2 C 変異を含む K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープは、V V V G A C G V G K (配列番号 7 5)、K L V V V G A C G V (配列番号 7 6)、及び G A C G V G K S A L からなる群から選択される。いくつかの態様では、K R A S G 1 2 D 変異を含む K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープは、V V G A D G V G K (配列番号 7 7)、V V V G A D G V G K (配列番号 7 8)、K L V V V G A D G V、及び G A D G V G K S A L からなる群から選択される。いくつかの態様では、K R A S G 1 2 V 変異を含む K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープは、V V G A V G V G K (配列番号 7 9)、V V V G A V G V G K (配列番号 8 1)、A V G V G K S A L (配列番号 8 0)、及び G A V G V G K S A L からなる群から選択される。

【0130】

いくつかの態様では、カセットは、

(1) カセット内でコードされ対象にて免疫応答を刺激することができる別の M H C クラス I エピトープと比較して、ワクチン組成物中で対象に投与されたときに 5 倍以上の免疫応答を刺激し、かつ／または

(2) 免疫優性の M H C クラス I エピトープの非存在下で他の M H C クラス I エピトープが投与された際の免疫応答と比較して、ワクチン組成物中で対象に投与されたときに、カセット内でコードされる別の M H C クラス I エピトープに対する免疫応答を低減し、任意で、免疫応答が、検出限界を下回って低減され、かつ／もしくは、免疫応答が、治療的に有効な応答ではない

免疫優性の M H C クラス I エピトープ

をコードしない。いくつかの態様では、前記カセットは、ワクチン組成物中で対象に投与された場合に、前記カセット内にコードされ、前記対象の免疫応答を刺激することができる K R A S 関連ネオエピトープと比較して 5 倍以上の免疫応答を刺激する免疫優性な M H C クラス I エピトープをコードしていない。いくつかの態様では、前記カセットは、免疫優性な M H C クラス I エピトープの非存在下で他の M H C クラス I エピトープが投与された場合の免疫応答と比較して、ワクチン組成物中で対象に投与された場合に前記カセット内にコードされた別の M H C クラス I エピトープに対する免疫応答を低下させる免疫優性な M H C クラス I エピトープをコードしていない。いくつかの態様では、前記カセットは、免疫優性な M H C クラス I エピトープの非存在下で他の M H C クラス I エピトープが投与された場合の免疫応答と比較して、ワクチン組成物中で対象に投与された場合に前記カセット内にコードされた別の M H C クラス I エピトープに対する免疫応答を検出限界未満にまで低下させる免疫優性な M H C クラス I エピトープをコードしていない。いくつかの態様では、前記カセットは、免疫優性な M H C クラス I エピトープの非存在下で他の M H C クラス I エピトープが投与された場合の免疫応答と比較して、ワクチン組成物中で対象に投与された場合に前記カセット内にコードされた別の M H C クラス I エピトープに対する免疫応答を低下させる免疫優性な M H C クラス I エピトープをコードしておらず、前記他の M H C クラス I エピトープに対する前記免疫応答が治療的に有効な応答ではない。

【0131】

いくつかの態様では、免疫優性なエピトープは T P 5 3 関連 M H C クラス I ネオエピトープであり、任意で、T P 5 3 関連 M H C クラス I ネオエピトープは S 1 2 7 Y 変異を含む。

【0132】

いくつかの態様では、抗原発現系は、本明細書に記載される抗原発現系のいずれか1つを含む。いくつかの態様では、抗原ベースワクチンは、本明細書に記載される医薬組成物のいずれか1つを含む。

【0133】

いくつかの態様では、抗原ベースワクチンは、プライミング用量として投与される。いくつかの態様では、抗原ベースワクチンは、1つ以上のブースター用量として投与される。いくつかの態様では、ブースター用量は、プライミング用量と異なる。いくつかの態様では、a) プライミング用量がチンパンジーアデノウイルスベクターを含み、ブースター用量がアルファウイルスベクターを含むか、またはb) プライミング用量がアルファウイルスベクターを含み、ブースター用量がチンパンジーアデノウイルスベクターを含む。いくつかの態様では、ブースター用量は、プライミング用量と同じである。いくつかの態様では、1回以上のブースター用量の注射部位は、プライミング用量の注射部位に可能な限り近い。

10

【0134】

いくつかの態様では、方法は、対象のHLAハプロタイプを測定することまたは測定していたことをさらに含む。

【0135】

いくつかの態様において、抗原ベースワクチンは、筋肉内(IM)、皮内(ID)、皮下(SC)、または静脈内(IV)投与される。いくつかの態様では、抗原ベースワクチンは筋肉内(IM)投与される。いくつかの態様では、筋肉内(IM)投与は、別々の注射部位に施される。いくつかの態様では、別々の注射部位は対向する三角筋内である。いくつかの態様では、別々の注射部位は両側の殿筋または大腿直筋部位内である。

20

【0136】

本明細書ではまた、本明細書に開示される組成物のいずれか(本明細書に開示されるアルファウイルスに基づく、またはChAdに基づくベクターなど)と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物も開示される。いくつかの態様では、医薬組成物は、アジュバントをさらに含む。いくつかの態様では、医薬組成物は、免疫調節剤をさらに含む。いくつかの態様では、免疫調節剤は、抗CTLA4抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗PD-1抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗PD-L1抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗4-1BB抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または抗OX-40抗体もしくはその抗原結合フラグメントである。

30

【0137】

本明細書ではまた、本明細書に開示される単離ヌクレオチド配列を含むベクターも開示される。

【0138】

本明細書ではまた、本明細書に開示されるベクターまたは組成物と、使用説明書と、を含むキットも開示される。

【0139】

本明細書では、がんを有する対象を治療するための方法であって、前記がんは、(1) KRAS関連MHCクラスIネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2) 結腸直腸癌(CRC)、(3) 非小細胞肺癌(NSCLC)、及び／または(4) 膵管腺癌(PDA)を含み、前記方法は、前記本明細書に開示されるベクター、または本明細書に開示される医薬組成物を投与することを含む方法もまた開示される。本明細書では、がんを有する対象において免疫応答を誘導するための方法であって、前記がんは、(1) KRAS関連MHCクラスIネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2) 結腸直腸癌(CRC)、(3) 非小細胞肺癌(NSCLC)、及び／または(4) 膵管腺癌(PDA)を含み、前記方法は、前記対象に、本明細書に記載される組成物、ベクター、または医薬組成物のいずれかを投与することを含む方法もまた開示される。

40

【0140】

50

いくつかの態様では、対象は、MHCクラスIエピトープを提示することが予測または知られている少なくとも1つのHLAアレルを発現する。いくつかの態様では、MHCクラスIエピトープを提示することが予測されるかまたは知られているHLAアレルは、A*03:01、A*11:01、A*02:01、A*68:01、B*07:02、C*01:02、C*03:04、C*08:02、及び／またはA*01:01である。いくつかの態様では、MHCクラスIエピトープを提示することが予測されるかまたは知られているHLAアレルは、A*03:01である。いくつかの態様では、MHCクラスIエピトープを提示することが予測されるかまたは知られているHLAアレルは、A*11:01である。いくつかの態様では、MHCクラスIエピトープを提示することが予測されるかまたは知られているHLAアレルは、A*02:01である。いくつかの態様では、MHCクラスIエピトープを提示することが予測されるかまたは知られているHLAアレルは、C*01:02である。いくつかの態様では、MHCクラスIエピトープを提示することが予測されるかまたは知られているHLAアレルは、A*68:01である。いくつかの態様では、MHCクラスIエピトープを提示することが予測されるかまたは知られているHLAアレルは、B*07:02である。いくつかの態様では、MHCクラスIエピトープを提示することが予測されるかまたは知られているHLAアレルは、C*03:04である。いくつかの態様では、MHCクラスIエピトープを提示することが予測されるかまたは知られているHLAアレルは、C*08:02である。いくつかの態様では、MHCクラスIエピトープを提示することが予測されるかまたは知られているHLAアレルは、A*01:01である。

10

20

【0141】

いくつかの態様では、ベクターまたは組成物は、筋肉内（IM）、皮内（ID）、皮下（SC）、または静脈内（IV）投与される。

【0142】

いくつかの態様では、がんは、KRAS関連及び／またはNRAS関連MHCクラスIネオエピトープを発現する固形腫瘍を含む。いくつかの態様では、KRAS関連及び／またはNRAS関連MHCクラスIネオエピトープは、KRAS__G12C、NRAS__G12C、KRAS__G12D、NRAS__G12D、KRAS__G12V、NRAS__G12V、KRAS__Q61H、及びNRAS__Q61Hからなる群から選択される変異を含む。

30

【0143】

いくつかの態様では、がんは、結腸直腸癌（CRC）を含む。いくつかの態様では、がんは、非小細胞肺癌（NSCLC）を含む。いくつかの態様では、がんは、膵管腺癌（PDA）を含む。

【0144】

いくつかの態様では、本明細書に記載する組成物、医薬組成物、抗原ベースワクチン、または、1回以上のブースター用量のいずれか1つは、4週毎（Q4W）に投与される。いくつかの態様では、本明細書に記載する組成物、医薬組成物、抗原ベースワクチン、または、1回以上のブースター用量のいずれか1つは、8週毎（Q8W）に投与される。いくつかの態様では、本明細書に記載する組成物、医薬組成物、抗原ベースワクチン、または、1回以上のブースター用量のいずれか1つは、1ヶ月毎に投与される。いくつかの態様では、本明細書に記載する組成物、医薬組成物、抗原ベースワクチン、または、1回以上のブースター用量のいずれか1つは、2ヶ月毎に投与される。

40

【0145】

いくつかの態様では、免疫応答を刺激することは、分子応答を刺激することを含む。いくつかの態様では、分子応答は、c t DNAの減少を含む。いくつかの態様では、c t DNAの減少は、c t DNAの、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、または少なくとも50%の減少である。いくつかの態様では、c t DNAの減少は、c t DNAの、少なくとも30%の減少である。

【0146】

50

本明細書では、上記の組成物のいずれかの1つ以上のベクターを製造する方法であって、骨格及び抗原カセットを含む直鎖化DNA配列を得ることと、直鎖化DNA配列を、直鎖化DNA配列をRNAに転写するために必要なすべての成分を含んだインビトロ転写反応液に加えることにより、直鎖化DNA配列をインビトロ転写することであって、任意で、得られたRNAにm7gキャップをインビトロで付加することを含む、直鎖化DNA配列をインビトロ転写することと、インビトロ転写反応液から1つ以上のベクターを単離することと、を含む、方法も提供される。いくつかの態様では、直鎖化DNA配列は、DNAプラスミド配列を直鎖化することにより、またはPCRを用いた増幅により生成される。いくつかの態様では、DNAプラスミド配列は、細菌組換えまたは全ゲノムDNA合成または細菌細胞内で合成されたDNAの増幅を行う全ゲノムDNA合成のうちの1つを用いて生成される。いくつかの態様では、1つ以上のベクターを前記インビトロ転写反応液から単離することは、フェノールクロロホルム抽出、シリカカラムを用いた精製、または同様のRNA精製法のうちの1つ以上を含む。

10

【0147】

本明細書ではまた、本明細書に開示される組成物のいずれかを製造する方法であって、ナノ粒子状の送達ビヒクルの成分を与えることと、抗原発現系を与えることと、ナノ粒子状の送達ビヒクル及び抗原発現系が、抗原発現系を送達するための組成物を生成するのに十分な条件を与えることと、を含む方法も提供される。いくつかの態様では、かかる条件は、マイクロ流体混合によって与えられる。

【0148】

20

本明細書ではまた、本明細書に開示されるアデノウイルスベクターを製造する方法であって、少なくとも1つのプロモーター配列と抗原カセットとを含むプラスミド配列を得ることと、プラスミド配列を1つ以上の宿主細胞にトランスフェクトすることと、1つ以上の宿主細胞からアデノウイルスベクターを単離することと、を含む方法も開示される。

【0149】

いくつかの態様では、単離することは、宿主細胞を溶解してアデノウイルスベクターを含む細胞ライセートを得ることと、細胞ライセートからアデノウイルスベクターを精製することと、を含む。

【0150】

いくつかの態様では、プラスミド配列は、細菌組換えまたは全ゲノムDNA合成または細菌細胞内で合成されたDNAの増幅を行う全ゲノムDNA合成のうちの1つを用いて生成される。いくつかの態様では、前記1つ以上の宿主細胞は、CHO、HEK293もしくはその変異体、911、HeLa、A549、LP-293、PER.C6、及びAE1-2a細胞のうちの少なくとも1つである。いくつかの態様では、細胞ライセートからアデノウイルスベクターを精製することは、クロマトグラフィー分離、遠心分離、ウイルス沈殿、及び濾過のうちの1つ以上を行う。

30

【図面の簡単な説明】

【0151】

本発明のこれらの、ならびに他の特徴、態様、及び利点は、以下の説明文、及び添付図面を参照することでより深い理解がなされるであろう。

40

【0152】

【図1A】KRASネオエピトープG12C、G12V、G12D、及びQ61Hの単一のコピー（「KRAS 1X（20×1）」、カセット＝配列番号63）、KRAS G12C、G12V、G12D、及びQ61Hネオエピトープの2回の反復とさらなるKRASネオエピトープの2回の反復（「KRAS 2X（8×2）」、カセット＝配列番号64）、または各KRASネオエピトープの4回の反復（「KRAS 4X（4×4）」、カセット＝配列番号65）のいずれかを有するカセットの図を示す。数値識別子は、各カセットに対するエピトープ「スロット」をそれぞれ基準としたものであり、カセット設計全体にわたったものではない（例えば、20×1カセットのスロット「3」のエピトープは、8×2カセットのスロット3のエピトープと同じではない）。

50

【0153】

【図1B】反復するエピトープがワクチンにより誘導される抗原特異的T細胞応答を増加させることを示す。反復ネオエピトープKRAS G12CのELISpotの結果を示す。ヒトHLA-A11:01を発現するように操作したマウスを、示されるChAdV68送達ベクターを使用して 8×10^{10} 個のVPで免疫し、免疫14日後に脾細胞を単離した。VVVGACGVGK（配列番号75）で一晩刺激した後、抗原特異的T細胞の数をIFNg ELISpotにより測定した。データは、各動物について脾細胞 1×10^6 個当たりのスポット形成コロニー（SFC）として示す。バーは中央値を示す。

【0154】

【図1C】反復するエピトープが、ワクチンで誘導される抗原特異的T細胞応答を増加させることを示す。反復ネオエピトープKRAS G12VのELISpotの結果を示す。ヒトHLA-A11:01を発現するように操作したマウスを、示されるChAdV68送達ベクターを使用して 8×10^{10} 個のVPで免疫し、免疫14日後に脾細胞を単離した。VVVGAVGVGK（配列番号81）で一晩刺激した後、抗原特異的T細胞の数をIFNg ELISpotにより測定した。データは、各動物について脾細胞 1×10^6 個当たりのスポット形成コロニー（SFC）として示す。バーは中央値を示す。破線は、測定不能多数（TNTC）試料を表す。

【0155】

【図1D】反復するエピトープが、ワクチンで誘導される抗原特異的T細胞応答を増加させることを示す。反復ネオエピトープKRAS G12DのELISpotの結果を示す。ヒトHLA-A11:01を発現するように操作したマウスを、示されるChAdV68送達ベクターを使用して 8×10^{10} 個のVPで免疫し、免疫14日後に脾細胞を単離した。VVVGADGVGK（配列番号78）で一晩刺激した後、抗原特異的T細胞の数をIFNg ELISpotにより測定した。データは、各動物について脾細胞 1×10^6 個当たりのスポット形成コロニー（SFC）として示す。バーは中央値を示す。

【0156】

【図2A】TP53エピトープの免疫優性を評価するために設計されたChAdV68送達ベクター、具体的には、KRASネオエピトープG12C、G12V、G12D、及びQ61Hのみ（「KRAS 4x1」、カセット＝配列番号66）、各KRASネオエピトープとTP53 R213Lネオエピトープとの組み合わせ（「KRAS 4x1+R213L」、カセット＝配列番号67）、及び各KRASネオエピトープとTP53 S127Yネオエピトープとの組み合わせ（「KRAS 4x1+S127Y」、カセット＝配列番号68）を含むベクターの図を示す。

【0157】

【図2B】免疫優性エピトープの除去が、ワクチンで誘導されるKRASネオエピトープに対する抗原特異的T細胞応答を増加させることを示す。ネオエピトープKRAS G12CのELISpotの結果を示す。ヒトHLA-A11:01を発現するように操作したマウスを、示されるChAdV68送達ベクターを使用して 5×10^{10} 個のVPで免疫し、免疫14日後に脾細胞を単離した。VVVGACGVGK（配列番号75）で一晩刺激した後、抗原特異的T細胞の数をIFNg ELISpotにより測定した。データは、各動物について脾細胞 1×10^6 個当たりのスポット形成コロニー（SFC）として示す。バーは中央値を示す。

【0158】

【図2C】免疫優性エピトープの除去が、ワクチンで誘導されるKRASネオエピトープに対する抗原特異的T細胞応答を増加させることを示す。ネオエピトープKRAS G12DのELISpotの結果を示す。ヒトHLA-A11:01を発現するように操作したマウスを、示されるChAdV68送達ベクターを使用して 5×10^{10} 個のVPで免疫し、免疫14日後に脾細胞を単離した。VVVGADGVGK（配列番号78）で一晩刺激した後、抗原特異的T細胞の数をIFNg ELISpotにより測定した。データは、各動物について脾細胞 1×10^6 個当たりのスポット形成コロニー（SFC）として

示す。バーは中央値を示す。

【0159】

【図2D】免疫優性エピトープの除去が、ワクチンで誘導されるKRASネオエピトープに対する抗原特異的T細胞応答を増加させることを示す。ネオエピトープKRAS G12VのELISpotの結果を示す。ヒトHLA-A11:01を発現するように操作したマウスを、示されるChAdV68送達ベクターを使用して 5×10^{10} 個のVPで免疫し、免疫14日後に脾細胞を単離した。VVVGAVGVGK（配列番号81）で一晩刺激した後、抗原特異的T細胞の数をIFN γ ELISpotにより測定した。データは、各動物について脾細胞 1×10^6 個当たりのスポット形成コロニー（SFC）として示す。バーは中央値を示す。

10

【0160】

【図2E】免疫優性エピトープ及び関連するコントロールエピトープの免疫応答を示す。R213L及びS127YネオエピトープのTP53ネオエピトーププールについてELISpotの結果を示す。ヒトHLA-A11:01を発現するように操作したマウスを、示されるChAdV68送達ベクターを使用して 5×10^{10} 個のVPで免疫し、免疫14日後に脾細胞を単離した。一晩刺激した後、抗原特異的T細胞の数をIFN γ ELISpotにより測定した。データは、各動物について脾細胞 1×10^6 個当たりのスポット形成コロニー（SFC）として示す。バーは中央値を示す。破線は、測定不能多数（TNTC）試料を表す。

20

【0161】

【図3】反復するエピトープが、ワクチンで誘導される抗原特異的T細胞応答を増加させることを示す。反復ネオエピトープKRAS G12V（左のパネル）またはKRAS G12D（右のパネル）のELISpotの結果を示す。ヒトHLA-A11:01を発現するように操作したマウスを、示されるChAdV68送達ベクターを使用して 5×10^{10} 個のVPで免疫し、免疫14日後に脾細胞を単離した。VVVGAVGVGK（配列番号81）またはVVVGADGVGK（配列番号78）でそれぞれ一晩刺激した後、抗原特異的T細胞の数をIFN γ ELISpotにより測定した。データは、各動物について脾細胞 1×10^6 個当たりのスポット形成コロニー（SFC）として示す。バーは中央値を示す。

30

【0162】

【図4】反復するエピトープが、ワクチンで誘導される抗原特異的T細胞応答を増加させることを示す。反復ネオエピトープKRAS G12V（左のパネル）またはKRAS G12D（右のパネル）のELISpotの結果を示す。ヒトHLA-A11:01を発現するように操作したマウスを、示されるChAdV68送達ベクターを使用して 7×10^{10} 個のVPで免疫し、免疫14日後に脾細胞を単離した。VVVGAVGVGK（配列番号81）またはVVVGADGVGK（配列番号78）でそれぞれ一晩刺激した後、抗原特異的T細胞の数をIFN γ ELISpotにより測定した。データは、各動物について脾細胞 1×10^6 個当たりのスポット形成コロニー（SFC）として示す。バーは中央値を示す。

40

【0163】

【図5】反復するエピトープが、ワクチンで誘導されるKRAS Q61Hに対する抗原特異的T細胞応答を増加させることを示す。示される各カセットフォーマットについて反復ネオエピトープKRAS Q61HのELISpotの結果を示す。ヒトHLA-A01:01を発現するように操作したマウスを、示されるChAdV68送達ベクターを使用して 5×10^{10} 個のVPで免疫し、免疫12日後に脾細胞を単離した。ILDTAGHEEY（配列番号82）で一晩刺激した後、抗原特異的T細胞の数をIFN γ ELISpotにより測定した。データは、各動物について脾細胞 1×10^6 個当たりのスポット形成コロニー（SFC）として示す。バーは中央値を示す。破線は、測定不能多数（TNTC）試料を表す。

50

【0164】

【図6】反復するエピトープが、ワクチンで誘導されるChAdV68及びSAMベクターフォーマットの両方に対する抗原特異的T細胞応答を増加させることを示す。反復ネオエピトープKRAS G12V（左のパネル）またはKRAS G12D（右のパネル）のELISpotの結果を示す。ヒトHLA-A11:01を発現するように操作したマウスを、示されるChAdV68送達ベクターを使用して 5×10^{10} 個のVP、または示される10 μ gのSAMベクターで免疫し、免疫14日後に脾細胞を単離した。25マーカーにわたったすべての可能な38種の最小エピトープを含む各ペプチドプールで一晩刺激した後、抗原特異的T細胞の数をIFN γ ELISpotにより測定した。データは、各動物について脾細胞 1×10^6 個当たりのスポット形成コロニー（SFC）として示す。バーは中央値を示す。柱は左から右に、ChAdV68 20x1、SAM 20x1、ChAdV68 4x4、及びSAM 4x4である。

10

【0165】

【図7】反復するエピトープが、ワクチンで誘導されるChAdV68及びSAMベクターフォーマットの両方に対する抗原特異的T細胞応答を増加させることを示す。反復ネオエピトープKRAS G12V（左のパネル）またはKRAS G12D（右のパネル）のELISpotの結果を示す。ヒトHLA-A11:01を発現するように操作したマウスを、示されるChAdV68送達ベクターを使用して 5×10^{10} 個のVP、または示される10 μ gのSAMベクターで免疫し、免疫14日後に脾細胞を単離した。VVGVGVGK（配列番号79）またはVVVGADGVGK（配列番号78）で一晩刺激した後、抗原特異的T細胞の数をIFN γ ELISpotにより測定した。データは、各動物について脾細胞 1×10^6 個当たりのスポット形成コロニー（SFC）として示す。バーは中央値を示す。柱は左から右に、ChAdV68 20x1、SAM 20x1、ChAdV68 4x4、及びSAM 4x4である。

20

【0166】

【図8】進行癌を有する患者において、免疫チェックポイント遮断薬と組み合わせて投与した、本明細書に記載する反復KRASネオエピトープカセット（「SLATE v2」）をコードする癌ワクチンの、用量、安全性及び忍容性、免疫原性、ならびに、初期臨床活性を調査するための設計された第1/2相研究を示す。

【0167】

【図9】SLATE「バージョン1」（v1）カセットを投与されたSLATE患者S21、及び、反復KRASネオエピトープを含む最適化SLATE「バージョン2」（v2）カセットを投与された患者S31に対する、ELISpotのCD8+T細胞応答を示す。38個の最小エピトープを含有するペプチドプールとの、一晩の刺激を示す。2回目のSAM投与後に、時間点を収集した。

30

【0168】

【図10】反復KRASネオエピトープを含むSLATE v2カセットを投与された患者S31に対する臨床応答を示す。上図：腫瘍部位の放射線医学CTスキャン。左下図：放射線医学CTスキャンの定量化。右下図：ネオ抗原ctDNAを監視することによる応答評価。

【0169】

【図11】進行癌を有する患者において、免疫チェックポイント遮断薬と組み合わせて投与した、本明細書に記載する反復KRASネオエピトープカセット（「SLATE v2」）をコードする癌ワクチンの、用量、安全性及び忍容性、免疫原性、ならびに、初期臨床活性を調査するための設計された第1/2相研究を示す。

40

【0170】

【図12】示される様々なG12変異、アレル、及びカセットに対するIFN γ ELISpotにより調査されるT細胞応答の一覧を示す。

【0171】

【図13】ネオ抗原ctDNA（左上図）、ならびに、標準血清腫瘍マーカーCEA及びCA 19-9（左下図）、加えて、腫瘍部位の放射線医学CTスキャン（右図）を監視

50

することにより調査される分子応答を示す。

【0172】

【図14】分子応答があった、及びなかった対象の、全体的な生存確率を示す（c t D N Aの減少 $\geq$ 30%）。

【0173】

【図15】NSCLCを有する患者に対する臨床的結果の一覧を示す。

【0174】

【図16】後期CRCを有する患者に対する臨床的結果の一覧を示す。

【0175】

【図17】第2相試験の、2ヶ月治療スケジュールを示す。

【発明を実施するための形態】

【0176】

詳細な説明

I. 定義

一般に、特許請求の範囲及び明細書において使用される用語は、当業者により理解される通常の意味を有するものとして解釈されるものとする。特定の用語を、さらなる明確性を与えるために下記に定義する。通常の意味と与えられる定義との間に矛盾が存在する場合、与えられる定義が用いられるものとする。

【0177】

本明細書で使用するところの「抗原」という用語は、免疫反応を刺激する物質のことである。抗原は、ネオ抗原であってよい。抗原は、特定の集団、例えば、がん患者の特定の集団間にみられる抗原である「共通抗原」であってよい。

【0178】

本明細書で使用するところの「ネオ抗原」なる用語は、例えば、腫瘍細胞の変異、または腫瘍細胞に特異的な翻訳後修飾によって、抗原を対応する野生型抗原とは異なるものとする少なくとも1つの変化を有する抗原のことである。ネオ抗原は、ポリペプチド配列またはヌクレオチド配列を含んでよい。変異は、フレームシフトもしくは非フレームシフトインデル、ミスセンスもしくはナンセンス置換、スプライス部位変化、ゲノム再編成もしくは遺伝子融合、または、ネオORFを生じる任意のゲノム変化もしくは発現変化を含むことができる。変異はまた、スプライスバリエーションも含むことができる。腫瘍細胞に特異的な翻訳後修飾は、異常リン酸化を含むことができる。腫瘍細胞に特異的な翻訳後修飾はまた、プロテアソームによって生成されるスプライス抗原も含むことができる。Liep et al., A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides; Science. 2016 Oct 21; 354 (6310): 354-358を参照されたい。投与を行うための対象は、様々な診断方法、例えば、下記でさらに述べる患者選択方法の使用により特定することができる。

【0179】

本明細書で使用するところの「腫瘍抗原」という用語は、対象の腫瘍細胞もしくは組織中に存在するが、対象の対応する正常細胞もしくは組織中には存在しない抗原、または正常細胞もしくは組織と比較して腫瘍細胞もしくはがん性組織中で発現が変化していることが知られているかまたは見出されているポリペプチドに由来する抗原である。

【0180】

本明細書において使用するところの「抗原ベースワクチン」という用語は、1つ以上の抗原、例えば複数の抗原に基づいたワクチン組成物のことである。ワクチンは、ヌクレオチドベース（例えば、ウイルスベース、RNAベース、またはDNAベース）、タンパク質ベース（例えば、ペプチドベース）、またはこれらの組み合わせであってよい。

【0181】

本明細書において使用するところの「候補抗原」という用語は、抗原を表しうる配列を生じる変異または他の異常のことである。

10

20

30

40

50

【0182】

本明細書において使用するところの「コード領域」という用語は、タンパク質をコードする遺伝子の部分（複数可）のことである。

【0183】

本明細書において使用するところの「コード変異」という用語は、コード領域で生じる変異のことである。

【0184】

本明細書において使用するところの「ORF」という用語は、オープンリーディングフレームを意味する。

【0185】

本明細書において使用するところの「ネオORF」なる用語は、変異またはスプライシングなどの他の異常により生じる腫瘍特異的なORFのことである。

【0186】

本明細書において使用するところの「ミスセンス変異」という用語は、1つのアミノ酸から別のアミノ酸への置換を引き起こす変異である。

【0187】

本明細書において使用される場合、「ナンセンス変異」という用語は、アミノ酸から終止コドンへの置換を引き起こすか、またはカノニカル開始コドンの除去を引き起こす変異である。

【0188】

本明細書において使用される場合、「フレームシフト変異」という用語は、タンパク質のフレームに変更を引き起こす変異である。

【0189】

本明細書において使用される場合、「インデル」という用語は、1つ以上の核酸の挿入または欠失である。

【0190】

本明細書において使用される場合、2つ以上の核酸またはポリペプチドの配列との関連での「同一率」(%)という用語は、下記の配列比較アルゴリズム（例えば、BLASTP及びBLASTN、または当業者が利用可能な他のアルゴリズム）のうちの1つを用いて、または目視検査により測定される、最大の一致について比較し、整列させた場合に、ヌクレオチドまたはアミノ酸残基の特定の比率(%)が同じである2つ以上の配列または部分配列のことを指す。用途に応じて、「同一率」(%)は、比較される配列の領域にわたって、例えば、機能ドメインにわたって存在するか、あるいは、比較される2つの配列の完全長にわたって存在することができる。

【0191】

配列比較では、一般的に、1つの配列が、試験配列が比較される参照配列として機能する。配列比較アルゴリズムを用いる場合、試験配列及び参照配列をコンピュータに入力し、必要な場合には部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムのパラメータを指定する。次いで、配列比較アルゴリズムが、指定されたプログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列の配列同一率(%)を算出する。あるいは、配列の類似性または相違性は、選択された配列位置（例えば、配列モチーフ）における特定のヌクレオチドの、または翻訳後の配列ではアミノ酸の有無の組み合わせによって確立することもできる。

【0192】

比較を行うための配列の最適なアラインメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)の局所相同性アルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)の類似性の探索法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ処理による実

10

20

30

40

50

行 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis. における GAP、BESTFIT、FASTA、及び TFASTA) によって、または目視検査によって実施することができる (一般的には、下記の Ausubel et al. を参照)。

【0193】

配列同一率 (%) 及び配列類似率 (%) を決定するのに適したアルゴリズムの 1 つの例として、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990) に記載される BLAST アルゴリズムがある。BLAST 解析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information を通して公に入手可能である。

10

【0194】

本明細書において使用される場合、「ノンストップまたはリードスルー」という用語は、天然の終止コドンの除去を引き起こす変異のことである。

【0195】

本明細書において使用される場合、「エピトープ」という用語は、抗体または T 細胞受容体が一般的に結合する、抗原の特異的な部分のことである。

【0196】

本明細書において使用される場合、「免疫原性」という用語は、例えば、T 細胞、B 細胞、またはその両方を介して免疫応答を刺激する能力のことである。

20

【0197】

本明細書において使用される場合、「HLA 結合親和性」、「MHC 結合親和性」という用語は、特異的な抗原と特異的な HLA または MHC アレルとの結合の親和性を意味する。

【0198】

本明細書において使用される場合、「ベイト」という用語は、DNA または RNA の特定の配列を試料から濃縮するために使用される核酸プローブのことである。

【0199】

本明細書において使用される場合、「変異」という用語は、対象の核酸と、対照として使用される参照ヒトゲノムとの差である。

30

【0200】

本明細書において使用される場合、「変異コール」という用語は、典型的にはシーケンシングからの、変異の存在のアルゴリズム的決定である。

【0201】

本明細書において使用される場合、「多型」という用語は、生殖細胞系列変異、すなわち、個体のすべての DNA 保有細胞において見出される変異である。

【0202】

本明細書において使用される場合、「体細胞変異」という用語は、個体の非生殖系列細胞において生じる変異である。

【0203】

40

本明細書において使用される場合、「アレル」という用語は、遺伝子の 1 つのバージョンまたは遺伝子配列の 1 つのバージョンまたはタンパク質の 1 つのバージョンのことである。

【0204】

本明細書において使用される場合、「HLA 型」という用語は、HLA 遺伝子アレルの相補体のことである。

【0205】

本明細書において使用される場合、「ナンセンス変異依存分解機構」または「NMD」という用語は、未成熟な終止コドンに起因する細胞による mRNA の分解のことである。

【0206】

50

本明細書において使用される場合、「トランカル変異 (truncal mutation)」という用語は、腫瘍の発生の初期に生じ、腫瘍の細胞の大部分に存在する変異である。

【0207】

本明細書において使用される場合、「サブクローナル変異」という用語は、腫瘍の発生において後期に生じ、腫瘍の細胞の一部のみに存在する変異である。

【0208】

本明細書において使用される場合、「エクソーム」という用語は、タンパク質をコードするゲノムのサブセットである。エクソームは、ゲノムの集合的なエクソンでありうる。

【0209】

本明細書において使用される場合、「ロジスティック回帰」という用語は、従属変数が1に等しい確率のロジットが従属変数の線形関数としてモデル化される、統計からのバイナリデータ用の回帰モデルである。

【0210】

本明細書において使用される場合、「ニューラルネットワーク」という用語は、多層の線形変換に続いて一般的に確率的勾配降下法及び逆伝搬により訓練された要素ごとの非線形変換を行うことからなる分類または回帰のための機械学習モデルである。

【0211】

本明細書において使用される場合、「プロテオーム」という用語は、細胞、細胞の群、または個体によって発現される、及び／または翻訳されるすべてのタンパク質のセットのことである。

【0212】

本明細書において使用される場合、「ペプチドーム」という用語は、細胞表面上のMHC-IまたはMHC-IIによって提示されるすべてのペプチドのセットのことである。ペプチドームは、細胞または細胞の集合の性質を指す場合もある（例えば、腫瘍ペプチドームは、腫瘍に含まれるすべての細胞ペプチドームの集合を意味する）。

【0213】

本明細書において使用される場合、「ELISPOT」という用語は、ヒト及び動物において免疫応答を観察するための一般的な方法である、酵素結合免疫吸着スポットアッセイを意味する。

【0214】

本明細書において使用される場合、「デキストラマー」という用語は、フローサイトメトリーにおいて抗原特異的T細胞染色に使用される、デキストランベースのペプチド-MHCマルチマーである。

【0215】

本明細書において使用される場合、「寛容または免疫寛容」という用語は、1つ以上の抗原、例えば、自己抗原に対する免疫不応答の状態のことである。

【0216】

本明細書において使用される場合、「中枢性寛容」という用語は、自己反応性T細胞クローンを欠失させること、または自己反応性T細胞クローンの免疫抑制性制御性T細胞 (Treg) への分化を促進することのいずれかにより、胸腺において与えられる寛容である。

【0217】

本明細書において使用される場合、「末梢性寛容」という用語は、中枢性寛容を生き延びた自己反応性T細胞を下方制御もしくはアネルギー化すること、またはこれらのT細胞のTregへの分化を促進することにより、末梢系において与えられる寛容である。

【0218】

「試料」という用語は、静脈穿刺、排泄、射精、マッサージ、生検、針吸引、洗浄試料、擦過、外科的切開、もしくは介入、または当技術分野において公知の他の手段を含む手段によって対象から採取された、単一細胞、または複数の細胞、または細胞の断片、また

10

20

30

40

50

は体液のアリコートを含むことができる。

【0219】

「対象」という用語は、インビボ、エクスピボ、またはインビトロ、雄または雌のいずれかの、細胞、組織、または生物体、ヒトまたは非ヒトを包含する。対象という用語は、ヒトを含む哺乳動物を含める。

【0220】

「哺乳動物」という用語は、ヒト及び非ヒトの両方を包含し、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、マウス、ウシ、ウマ、及びブタを含むが、それらに限定されない。

【0221】

「臨床的因子」という用語は、対象の状態、例えば、疾患の活性または重症度の測定を指す。「臨床的因子」は、非試料マーカーを含む、対象の健康状態のすべてのマーカー、ならびに／または、非限定的に年齢及び性別などの、対象の他の特徴を包含する。臨床的因子は、対象または所定の条件下の対象由来の試料（または試料の集団）の評定から取得され得るスコア、値、または値のセットであることができる。臨床的因子はまた、マーカー、及び／または遺伝子発現代替物などの他のパラメータによっても予測することができる。臨床的因子は、腫瘍のタイプ、腫瘍のサブタイプ、及び喫煙歴を含むことができる。

10

【0222】

「腫瘍由来の抗原コード核酸配列」とは、例えばRT-PCRによって腫瘍から得られた核酸配列、または、腫瘍をシーケンシングした後、例えば当該技術分野では周知の様々な合成法もしくはPCRに基づく方法によりシーケンシングデータを利用して核酸配列を合成することによって得られた配列データのことを指す。得られる配列は、腫瘍から得られた対応する天然の核酸配列と同じポリペプチド配列をコードする、配列最適化された核酸配列バリエーション（例えば、コドン最適化及び／または他の形で発現が最適化された）などの核酸配列バリエーションを含み得る。

20

【0223】

「アルファウイルス」という用語は、トガウイルス科のメンバーのことを指し、一本鎖プラス鎖RNAウイルスである。アルファウイルスは、一般的に、シンドビス、ロスリバー、マヤロ、チクングニア、及びセムリキ森林ウイルスなどの旧世界型、または、東部ウマ脳炎ウイルス、アウラ、フォートモルガン、もしくはベネズエラウマ脳炎ウイルス及びその誘導株TC-83などの新世界型に分類される。アルファウイルスは一般的には自己複製RNAウイルスである。

30

【0224】

「アルファウイルス骨格」という用語は、ウイルスゲノムの自己複製を可能とするアルファウイルスの最小配列（複数可）のことを指す。最小配列としては、非構造タンパク質媒介増幅用の保存配列、非構造タンパク質1（nsP1）遺伝子、nsP2遺伝子、nsP3遺伝子、nsP4遺伝子、及びポリA配列、ならびに、サブゲノミック（例えば、26S）プロモーター因子をはじめとするサブゲノミックウイルスRNAの発現用の配列を挙げることができる。

【0225】

「非構造タンパク質媒介増幅用の保存配列」という用語には、当該技術分野では周知のアルファウイルス保存配列因子（CSE）が含まれる。CSEとしては、これらに限定されるものではないが、アルファウイルス5'UTR、51-nt CSE、24-nt CSE、サブゲノミックプロモーター配列（例えば、26Sサブゲノミックプロモーター配列）、19-nt CSE、及びアルファウイルス3'UTRが挙げられる。

40

【0226】

「RNAポリメラーゼ」という用語には、DNA鋳型からのRNAポリヌクレオチドの生成を触媒するポリメラーゼが含まれる。RNAポリメラーゼとしては、これらに限定されるものではないが、T3、T7、及びSP6を含むバクテリオファージ由来ポリメラーゼが挙げられる。

【0227】

50

「脂質」という用語には、疎水性及び／または両親媒性分子が含まれる。脂質は、カチオン性、アニオン性、または中性であってよい。脂質は、合成または天然由来のものであってよく、特定の例では生分解性であってよい。脂質は、コレステロール、リン脂質、ポリエチレングリコール（PEG）複合体（PEG化脂質）を含む（ただしこれに限定されない）脂質複合体、ワックス、油類、グリセリド、脂肪、及び脂溶性ビタミンを含みうる。脂質には、ジリノレイルメチル-4-ジメチルアミノブチレート（MC3）及びMC3様分子も含まれうる。

【0228】

「脂質ナノ粒子」または「LNP」という用語には、リポソームとも呼ばれる、水性の内部を包囲する脂質含有膜を用いて形成された小胞様構造が含まれる。脂質ナノ粒子は、界面活性剤により安定化された固体脂質コアを有する脂質ベースの組成物を含む。コア脂質は、脂肪酸、アシルグリセロール、ワックス、及びこれらの界面活性剤の混合物であってよい。リン脂質、スフィンゴミエリン、胆汁酸（タウロコール酸）、及びステロール類（コレステロール）のような生体膜脂質を安定化剤として用いることができる。脂質ナノ粒子は、1種類以上のカチオン性、アニオン性、または中性脂質の規定の比率を含む（ただし、これに限定されない）、規定の比率の異なる脂質分子を用いて形成することができる。脂質ナノ粒子は、外膜シェル内に分子を封入することができ、その後、標的細胞と接触させて封入分子を宿主細胞のサイトゾルに送達することができる。脂質ナノ粒子は、それらの表面などを非脂質分子で修飾または官能化することができる。脂質ナノ粒子は、単一層（単層）または多層（複層）とすることができる。脂質ナノ粒子は、核酸と複合体化することができる。単層脂質ナノ粒子を核酸と複合体化することができ、その場合、核酸は水性の内部となる。複層脂質ナノ粒子を核酸と複合体化することができ、その場合、核酸は水性の内部となるか、またはその間を形成するかまたはその間に挟まれる。

【0229】

略語：MHC：主要組織適合性複合体；HLA：ヒト白血球抗原、またはヒトMHC遺伝子座；NGS：次世代シーケンシング；PPV：陽性適中率；TSNA：腫瘍特異的ネオ抗原；FFPE：ホルマリン固定パラフィン包埋；NMD：ナンセンス変異依存分解機構；NSCLC：非小細胞肺癌；DC：樹状細胞。

【0230】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈によってそうでない旨が明示されない限り、複数の指示物を含む点に留意されたい。

【0231】

特に断らない限り、または文脈から明らかでない限り、本明細書において使用される「約」という用語は、例えば、平均から標準偏差2つ分以内など、当該技術分野における公称公差の範囲内にあるものとして理解される。「約」は、記載される値の10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、または0.01%以内として理解することができる。文脈から明らかでない限り、本明細書に示される全ての数値は「約」という語によって修飾されている。

【0232】

本明細書において直接定義されていない用語は、本発明の技術分野の範囲内で理解されるような、一般的にそれらに付随する意味を有するものとして理解されるべきである。本発明の態様の組成物、装置、方法など、ならびにそれらの製造または使用法を説明するうえで実施者にさらなる手引きを与える目的で特定の用語が本明細書で検討される。同じものについて複数の言い方がなされうる点は認識されるであろう。したがって、代替的な語及び同義語が、本明細書で検討される用語の任意の1つ以上について用いられる場合がある。本明細書においてある用語が詳述または検討されているか否かに重きが置かれるべきではない。いくつかの同義語または代用可能な方法、材料などが提供される。1つまたは数個の同義語または均等物の記載は、明確に述べられない限り、他の同義語または均等物の使用を除外しない。用語の例を含む例の使用は、あくまで説明を目的としたものにすぎ

ず、本明細書における発明の態様の範囲及び意味を限定しない。

【0233】

本明細書の本文において引用されるすべての参照文献、発行特許、及び特許出願は、あらゆる目的でそれらの全容を参照により本明細書に援用するものである。

【0234】

II. 抗原の特定

腫瘍の及び正常なエクソーム及びトランスクリプトームのNGS解析の研究モデルについては、これまでに記載されており、抗原特定空間で適用される。6, 14, 15 臨床状況における抗原特定の感度及び特異性を高めるための特定の最適化を考慮することができる。これらの最適化は、実験室プロセスに関連するものと、NGSデータ解析に関連するものの2つの領域に分類することができる。記載される研究法は、感染症生物、対象の感染症、または対象の感染細胞からの特定など、他の状況での抗原の特定にも適用することができる。最適化の例は当業者には周知のものであり、例えば、そのような方法が、あらゆる目的で本明細書に参照によりその全容をそれぞれ援用する米国特許第10,055,540号、米国特許出願公開第US20200010849A1号、米国特許出願第16/606,577号、及び国際特許出願公開第WO2020181240A1号、同第WO/2018/195357号及び同第WO2018/208856号により詳細に記載されている。

【0235】

共通抗原（例えば、ネオ抗原）を特定するための方法は、樹状細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞を含む、腫瘍もしくは免疫細胞の上面に提示される可能性が高い、及び／または、免疫原性である可能性が高い、対象の腫瘍に由来する抗原を特定することを含む。例として、かかる方法の1つは、対象の腫瘍細胞からエクソーム、トランスクリプトーム、または全ゲノムの腫瘍ヌクレオチドシーケンシング及び／または発現データのうちの少なくとも1つを取得する工程であって、前記腫瘍ヌクレオチドシーケンシングデータ及び／または発現データを用いて抗原（例えば、各ネオ抗原のペプチド配列が、対応する野生型ペプチド配列と異なるものにする少なくとも1つの変異を含むネオ抗原の場合、または、ペプチドが、通常の細胞もしくは組織と比較して、腫瘍細胞もしくはがん性組織において、変化した発現を有することが知られている、もしくは有することが発見されている任意のポリペプチドに由来する変異を有しない、共通抗原の場合）のセットのそれぞれのペプチド配列を表すデータが得られる、前記工程と、各抗原のペプチド配列を1つ以上の提示モデルに入力して抗原のそれぞれが、対象の腫瘍細胞または腫瘍に存在する細胞の腫瘍細胞表面の1つ以上のMHCアレルによって提示される数値的尤度のセットを生成する工程であって、前記数値的尤度のセットが、受け取られた質量分析データに少なくとも基づいて特定されたものである、前記工程と、前記数値的尤度のセットに基づいて抗原のセットのサブセットを選択して、選択された抗原のセットを生成する工程と、を含むことができる。

【0236】

III. ネオ抗原の腫瘍特異的変異の特定

本明細書では、特定の変異（例えば、がん細胞に存在するバリエーションまたはアレル）を特定するための方法も開示する。詳細には、これらの変異は、がんを有する対象のがん細胞のゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、またはエクソーム内に存在し得るが、対象からの正常組織には存在しない。腫瘍に特異的な共通ネオ抗原を含むネオ抗原を特定するための具体的な方法は当業者には周知のものであり、これらの方法は例えば、あらゆる目的で本明細書に参照によりそれらの全容をそれぞれ援用する米国特許第10,055,540号、米国特許出願公開第US20200010849A1号、ならびに国際特許出願公開第WO/2018/195357号、及び同第WO/2018/208856号により詳細に記載されている。腫瘍に特異的な共通ネオ抗原の例は、あらゆる目的で本明細書にその全容を援用するところの国際特許出願公開第WO2019226941A1号により詳細に記載されている。共通ネオ抗原としては、これらに限定されるものではない

いが、K R A S 関連変異（例えば、K R A S G 1 2 C、K R A S G 1 2 V、K R A S G 1 2 D、及び／またはK R A S Q 6 1 H 変異）が挙げられる。例えば、K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープは、以下の例示的なアミノ酸配列：M T E Y K L V V V G A G G V G K S A L T I Q L I Q N H F V D E Y D P T I E D S Y R K Q V V I D G E T C L L D I L D T A G Q E E Y S A M R D Q Y M R T G E G F L C V F A I N N T K S F E D I H H Y R E Q I K R V K D S E D V P M V L V G N K C D L P S R T V D T K Q A Q D L A R S Y G I P F I E T S A K T R Q R V E D A F Y T L V R E I R Q Y R L K K I S K E E K T P G C V K I K K C I I M（配列番号 84）を基準としてなど、野生型（W T）ヒト K R A S を基準としてこれらの変異を含むことができる。

【0237】

腫瘍の遺伝子変異は、こうした変異が、腫瘍においてのみタンパク質のアミノ酸配列の変化をもたらす場合に腫瘍の免疫学的ターゲティングに有用と考えられる。有用な変異としては、（1）タンパク質内に異なるアミノ酸を生じる非同義変異、（2）C 末端に新規な腫瘍特異的配列を有するより長いタンパク質の翻訳を生じる、終止コドンが改変または欠失されたリードスルー変異、（3）成熟 mRNA へのイントロンの導入、それによる固有の腫瘍特異的タンパク質配列を生じるスプライス部位変異、（4）2 個のタンパク質の接合部に腫瘍特異的配列を有するキメラタンパク質を生じる染色体再編成（すなわち、遺伝子融合）、（5）新規な腫瘍特異的タンパク質配列を有する新たなオープンリーディングフレームを生じるフレームシフト変異または欠失が挙げられる。変異には、非フレームシフトインデル、ミスセンスまたはナンセンス置換、スプライス部位変化、ゲノム再編成もしくは遺伝子融合、またはネオ O R F を生じる任意のゲノムもしくは発現変化のうちの 1 つ以上も含まれる。

【0238】

例えば、腫瘍細胞のスプライス部位、フレームシフト、リードスルー、または遺伝子融合変異から生じる変異を有するペプチドまたは変異ポリペプチドは、正常細胞に対して腫瘍の DNA、RNA、またはタンパク質をシーケンシングすることにより特定することができる。

【0239】

また、変異は、以前に特定されている腫瘍特異的変異も含み得る。既知の腫瘍変異は、C O S M I C（C a t a l o g u e o f S o m a t i c M u t a t i o n s i n C a n c e r）データベースで見つけることができる。

【0240】

個人の DNA または RNA の特定の変異またはアレルの存在を検出するための各種の方法が利用可能である。この分野での進歩により、正確で容易な、かつ低費用の大規模 S N P 遺伝子型判定が可能となっている。例えば、動的アレル特異的ハイブリダイゼーション（D A S H）、マイクロプレートアレイダイアゴナルゲル電気泳動（M A D G E）、パイロシーケンシング、オリゴヌクレオチド特異的ライゲーション、T a q M a n システム、ならびに A f f y m e t r i x の S N P チップのような様々な DNA「チップ」技術を含むいくつかの手法がこれまでに記載されている。これらの方法は、一般的には P C R による標的遺伝子領域の増幅を利用したものである。侵襲的切断による小さなシグナル分子の生成に続き、質量分析または固定化したパッドロックプローブ及びローリングサークル増幅を行うことに基づくさらに他の方法もある。特定の変異を検出するための、当該技術分野では周知の方法のいくつかを下記に要約する。

【0241】

P C R ベースの検出手段は、複数のマーカーの同時の多重増幅を含むことができる。例えば、サイズがオーバーラップせず、同時に解析することができる P C R 産物を生成するように P C R プライマーを選択することは、当該技術分野では周知である。あるいは、差次的に標識され、したがって、それぞれを差次的に検出することができるプライマーで異なるマーカーを増幅することも可能である。ハイブリダイゼーションベースの検出手段によれば、試料中の複数の P C R 産物の差次的な検出が可能になる点は言うまでもない。複

10

20

30

40

50

数のマーカーの多重分析を可能とする他の手法も当該技術分野で知られている。

【0242】

ゲノムDNAまたは細胞RNAの単一ヌクレオチド多型の分析を容易にするためのいくつかの方法が開発されている。例えば、一塩基多型は、例えば、Mundy, C. R. (米国特許第4,656,127号)において開示されるような、特殊なエキソヌクレアーゼ抵抗性ヌクレオチドを用いることによって検出することができる。この方法によれば、多型部位のすぐ3'側のアレル配列と相補的なプライマーを、特定の動物またはヒトから得られた標的分子にハイブリダイズさせる。標的分子上の多型部位が、存在する特定のエキソヌクレアーゼ抵抗性ヌクレオチド誘導体と相補的であるヌクレオチドを含んでいる場合、その誘導体は、ハイブリダイズしたプライマーの末端に組み込まれる。このような組み込みにより、プライマーはエキソヌクレアーゼに対して抵抗性となるため、その検出が可能となる。試料のエキソヌクレアーゼ抵抗性誘導体の性質は分かっているため、プライマーがエキソヌクレアーゼに対して抵抗性になったという事実によって、標的分子の多型部位に存在するヌクレオチド(複数可)が、反応に用いられたヌクレオチド誘導体のヌクレオチドと相補的であることが示される。この方法は、大量の外来性配列データの決定を必要としないという利点を有する。

10

【0243】

多型部位のヌクレオチドの種類を決定するために、溶液ベースの方法を使用することができる(Cohen, D. et al. (フランス国特許第2,650,840号;PCT出願第WO91/02087号)。米国特許第4,656,127号のMundyの方法におけるように、多型部位のすぐ3'側のアレル配列に対して相補的であるプライマーが使用される。この方法は、多型部位のヌクレオチドに対して相補的である場合にプライマーの末端に組み込まれる標識されたジデオキシヌクレオチド誘導体を使用してその部位のヌクレオチドの性質を決定するものである。

20

【0244】

遺伝子ビット分析(Genetic Bit Analysis)またはGBAとして知られる代替的な方法が、Goellet, P. et al. (PCT出願第92/15712号)により記載されている。Goellet, P. et al.の方法では、標識ターミネーターと、多型部位の3'側の配列に対して相補的であるプライマーとの混合物を使用する。したがって、組み込まれた標識ターミネーターは、評価される標的分子の多型部位に存在するヌクレオチドによって決定され、これらのヌクレオチドと相補的である。Cohen et al. (フランス国特許第2,650,840号;PCT出願第WO91/02087号)の方法に対して、Goellet, P. et al.の方法は、プライマーまたは標的分子が固相に固定化される、不均一相アッセイとすることができる。

30

【0245】

DNA内の多型部位をアッセイするためのいくつかのプライマーガイドヌクレオチド取り込み法がこれまでに記載されている(Komher, J. S. et al., Nucl. Acids. Res. 17:7779-7784(1989); Sokolov, B. P., Nucl. Acids Res. 18:3671(1990); Syvanen, A.-C., et al., Genomics 8:684-692(1990); Kuppuswamy, M. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1143-1147(1991); Prezant, T. R. et al., Hum. Mutat. 1:159-164(1992); Ugozzoli, L. et al., GATA 9:107-112(1992); Nyren, P. et al., Anal. Biochem. 208:171-175(1993))。これらの方法は、多型部位の塩基間で区別するために標識デオキシヌクレオチドの組み込みを用いている点でGBAとは異なる。かかるフォーマットでは、シグナルが組み込まれたデオキシヌクレオチドの数に比例するため、同じヌクレオチドの複数のランに生じる多型は、ランの長さに比例したシグナルを生じ得る(Syvanen, A.-C., et al., Amer. J. Hum. Genet. 52:46-59(1993))。

40

50

【0246】

多くの手法が、DNAまたはRNAの数百万の個別の分子から並行して直接配列情報を得ている。逐次合成によるリアルタイムな単一分子シーケンシング (Real-time single molecule sequencing-by-synthesis) 技術は、シーケンシングされる鑄型に相補的なDNAの新生鎖に蛍光ヌクレオチドが取り込まれることから蛍光ヌクレオチドの検出に基づいている。1つの方法では、30～50塩基の長さのオリゴヌクレオチドの5'末端がカバーガラスに共有結合によって固定される。これらの固定された鎖は2つの機能を果たす。第1に、これらの固定された鎖は、鑄型鎖が、表面に結合されたオリゴヌクレオチドに相補的な捕捉テールを有するように構成されている場合に標的鑄型鎖の捕捉鎖として機能する。これらは、配列読取りの基礎をなす鑄型誘導プライマー伸長のプライマーとしても機能する。捕捉プライマーは、色素リンカーの合成、検出、及び色素を除去するための化学的切断の複数のサイクルを用いた配列決定における固定位置部位として機能する。各サイクルは、ポリメラーゼ／標識ヌクレオチド混合物の添加、洗浄、イメージング、及び色素の切断を含む。別の方法では、ポリメラーゼを蛍光ドナー分子で修飾してカバーガラス上に固定する一方で、各ヌクレオチドを、 γ 位リン酸に結合されたアクセプター蛍光部分で色コード化する。このシステムは、蛍光標識されたポリメラーゼと蛍光修飾されたヌクレオチドとの相互作用を、ヌクレオチドが新生鎖に取り込まれる際に検出する。他の逐次合成によるシーケンシング技術も存在する。

10

【0247】

20

任意の適当な逐次合成によるシーケンシングプラットフォームを用いて変異を特定することができる。上記に述べたように、Roche／454 Life Sciencesより提供されるGenome Sequencer、Illumina／Solexaより提供される1G Analyzer、Applied Biosystemsより提供されるSOLiDシステム、及びHelicos Biosciencesより提供されるHeliscopeシステムの4つの主要な逐次合成によるシーケンシングプラットフォームが現在、利用可能である。逐次合成によるシーケンシングのプラットフォームは、Pacific Biosciences及びVisiGen Biotechnologiesによっても記載されている。いくつかの実施形態では、シーケンシングする複数の核酸分子を支持体（固体支持体）に結合させる。核酸を支持体上に固定するため、捕捉配列／ユニバーサルプライミング部位を鑄型の3'及び／または5'末端に付加することができる。核酸は、支持体に共有結合により結合させた相補的配列に捕捉配列をハイブリダイズさせることによって支持体に結合させることができる。捕捉配列（ユニバーサル捕捉配列とも呼ばれる）は、ユニバーサルプライマーとして二重に機能することができる、支持体に結合された配列に相補的な核酸配列である。

30

【0248】

捕捉配列に代わるものとして、カップリングペア（例えば、米国特許出願第2006／0252077号に記載されるような、抗体／抗原、受容体／リガンド、またはアビジン／ビオチンのペア）のメンバーを、そのカップリングペアの対応する第2のメンバーでコーティングした表面上に捕捉させようとする各フラグメントと結合させることができる。

40

【0249】

捕捉後、配列を例えば、鑄型依存型の逐次合成によるシーケンシングを含む、実施例及び／または米国特許第7,283,337号に記載されるような単一分子検出／シーケンシングによって分析することができる。逐次合成によるシーケンシングでは、表面に結合させた分子を、ポリメラーゼの存在下で複数の標識ヌクレオチド三リン酸に曝露する。鑄型の配列は、成長する鎖の3'末端に取り込まれた標識ヌクレオチドの順序によって決定される。これは、リアルタイムで行うことができ、また、ステップ・アンド・リピートモードで行うことができる。リアルタイム分析では、各ヌクレオチドに対する異なる光学標識を取り込ませ、複数のレーザーを取り込まれたヌクレオチドの刺激に用いることができる。

50

【0250】

シーケンシングは、他の大規模並行シーケンシングまたは次世代シーケンシング（NGS）技術及びプラットフォームを含んでもよい。大規模並行シーケンシング技術及びプラットフォームのさらなる例としては、Illumina HiSeqまたはMiSeq、Thermo PGMまたはProton、PacBio RS IIまたはSequel、QiagenのGene Reader、及びOxford Nanopore MinIONがある。さらなる同様の現在の大規模並行シーケンシング技術、ならびにこれらの技術の将来的世代のものを用いることができる。

【0251】

任意の細胞タイプまたは組織を用いて本明細書に記載される方法で使用するための核酸試料を得ることができる。例えば、DNAまたはRNA試料は、腫瘍または既知の方法（例えば、静脈穿刺）によって得られた血液もしくは唾液などの体液から得ることができる。あるいは、乾燥試料（例えば、毛髪または皮膚）で核酸試験を行ってもよい。さらに、シーケンシング用の試料を腫瘍から得ることができ、その腫瘍と同じ組織タイプの正常組織から別の試料をシーケンシング用に得ることもできる。シーケンシング用の試料を腫瘍から得ることができ、その腫瘍とは異なる組織タイプの正常組織から別の試料をシーケンシング用に得ることもできる。

【0252】

腫瘍は、肺癌、メラノーマ、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、腎臓癌、胃癌、結腸癌、精巣癌、頭頸部癌、膵臓癌、脳癌、B細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、及びT細胞リンパ球性白血病、非小細胞肺癌、及び小細胞肺癌のうちの1つ以上のものを含むことができる。

【0253】

あるいは、タンパク質質量分析を用いて、腫瘍細胞上のMHCタンパク質に結合した変異ペプチドの存在を特定または検証することもできる。ペプチドは、腫瘍細胞から、または腫瘍から免疫沈降したHLA分子から酸溶出し、その後、質量分析を用いて特定することができる。

【0254】

I V . 抗原

抗原は、ヌクレオチドまたはポリペプチドを含みうる。例えば、抗原は、ポリペプチド配列をコードするRNA配列であってよい。したがって、ワクチンにおいて有用な抗原には、ヌクレオチド配列またはポリペプチド配列が含まれる。

【0255】

本明細書では、本明細書に開示される方法によって特定された腫瘍特異的変異を含む単離されたペプチド、既知の腫瘍特異的変異を含むペプチド、及び本明細書に開示される方法によって特定された変異体ポリペプチドまたはそのフラグメントが開示される。ネオ抗原ペプチドはそれらのコード配列に関して記述することができ、ネオ抗原は関連するポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列（例えば、DNAまたはRNA）を含む。

【0256】

具体的には、本明細書では、KRAS関連MHCクラスIネオエピトープの繰り返しを含むカセットが開示される。KRAS関連MHCクラスIネオエピトープとしては、これらに限定されるものではないが、KRAS G12変異及び／またはKRAS Q61変異を有するネオエピトープが挙げられる。カセットは、KRAS G12変異を有するKRAS関連MHCクラスIネオエピトープの繰り返しを含むことができる。カセットは、KRAS Q61変異を有するKRAS関連MHCクラスIネオエピトープの繰り返しを含むことができる。カセットは、KRAS G12C、KRAS G12V、KRAS G12D、及び／またはKRAS Q61H変異を有するKRAS関連MHCクラスIネオエピトープの繰り返しを含むことができる。カセットは、KRAS G12C変異を有するKRAS関連MHCクラスIネオエピトープの繰り返しを含むことができる。カセットは、KRAS G12V変異を有するKRAS関連MHCクラスIネオエピトープの繰

10

20

30

40

50

り返しを含むことができる。カセットは、K R A S G 1 2 D 変異を有する K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープの繰り返しを含むことができる。カセットは、K R A S Q 6 1 H 変異を有する K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープの繰り返しを含むことができる。カセットは、K R A S G 1 2 C、K R A S G 1 2 V、K R A S G 1 2 D、及び K R A S Q 6 1 H 変異を有する K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープのそれぞれの繰り返しを含むことができる。カセットは、K R A S G 1 2 C、K R A S G 1 2 V、K R A S G 1 2 D、及び／または K R A S Q 6 1 H 変異からなる群から選択される少なくとも 2 個の異なる K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープの繰り返しを含むことができる。カセットは、K R A S G 1 2 C、K R A S G 1 2 V、K R A S G 1 2 D、及び／または K R A S Q 6 1 H 変異からなる群から選択される少なくとも 3 個の異なる K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープの繰り返しを含むことができる。カセットは、単一の異なる K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープのみの繰り返しを含むことができる。カセットは、K R A S G 1 2 C 変異を有する単一の異なる K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープのみの繰り返しを含むことができる。カセットは、K R A S G 1 2 D 変異を有する単一の異なる K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープのみの繰り返しを含むことができる。カセットは、K R A S G 1 2 V 変異を有する単一の異なる K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープのみの繰り返しを含むことができる。カセットは、K R A S Q 6 1 H 変異を有する単一の異なる K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープのみの繰り返しを含むことができる。

10

20

【0257】

K R A S G 1 2 C 変異を有する K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープには、V V V G A C G V G K（配列番号 75）、K L V V V G A C G V（配列番号 76）、または G A C G V G K S A L が含まれる。K R A S G 1 2 D 変異を有する K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープには、V V G A D G V G K（配列番号 77）、V V V G A D G V G K（配列番号 78）、K L V V V G A D G、または G A D G V G K S A L が含まれる。K R A S G 1 2 V 変異を有する K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープには、V V G A V G V G K（配列番号 79）、V V V G A V G V G K（配列番号 81）、A V G V G K S A L（配列番号 80）、または G A V G V G K S A L が含まれる。

30

40

【0258】

カセットは、アミノ酸配列 V V V G A C G V G K（配列番号 75）、V V V G A D G V G K（配列番号 78）、V V G A V G V G K（配列番号 79）、及び I L D T A G H E E Y（配列番号 82）を有する K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープのそれぞれの繰り返しを含むことができる。カセットは、アミノ酸配列 V V V G A C G V G K（配列番号 75）、V V V G A D G V G K（配列番号 78）、V V G A V G V G K（配列番号 79）、及び I L D T A G H E E Y（配列番号 82）から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも 2 個の異なる K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープの繰り返しを含むことができる。カセットは、アミノ酸配列 V V V G A C G V G K（配列番号 75）、V V V G A D G V G K（配列番号 78）、V V G A V G V G K（配列番号 79）、及び I L D T A G H E E Y（配列番号 82）から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも 3 個の異なる K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープの繰り返しを含むことができる。カセットは、アミノ酸配列 V V V G A C G V G K（配列番号 75）、V V V G A D G V G K（配列番号 78）、V V G A V G V G K（配列番号 79）、及び I L D T A G H E E Y（配列番号 82）を有する K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープのうちの少なくとも 1 つの繰り返しを含むことができる。

50

【0259】

K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープは、天然 K R A S タンパク質との関連で治療用ワクチンエピトープの天然の N 及び／または C 末端フランキング配列を含むことができる。K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープの例示的な非限定的な例としては、K R A S G 1 2 C では 25 マー M T E Y K L V V V G A C G V G K S A L T I Q L I Q（配列番号 57）、K R A S G 1 2 D では M T E Y K L V V V G A D G V G K S A L T I

50

Q L I Q（配列番号58）、K R A S G 1 2 VではM T E Y K L V V V G A V G V G K S A L T I Q L I Q（配列番号59）、及びK R A S Q 6 1 HではE T C L L D I L D T A G H E E Y S A M R D Q Y M R（配列番号60）がある。天然のフランキング配列を含むK R A S関連M H CクラスIネオエピトープは、それらのそれぞれの天然のフランキング配列を含む他のネオエピトープ（例えば、他のK R A S関連M H CクラスIネオエピトープ）を含む、カセット内にコードされた他のネオエピトープと連結（鎖状に連結）することができる。天然のフランキング配列により連結され、変異K R A S G 1 2 C、K R A S G 1 2 D、K R A S G 1 2 V、及びK R A S Q 6 1 Hを有するK R A Sネオエピトープのそれぞれの4回の繰り返しを含む連結されたK R A S関連M H CクラスIネオエピトープの例示的な非限定的カセットは、配列番号65に示されるアミノ酸配列で表される。

10

【0260】

天然のN及び／またはC末端フランキング配列を含むものなど、K R A S関連M H CクラスIネオエピトープをコードするエピトープコード核酸配列は、複数の既知及び／または予測されたK R A S関連M H CクラスIネオエピトープをコードすることができる。例示的な例として、K R A S G 1 2 Vの25マーM T E Y K L V V V G A V G V G K S A L T I Q L I Q（配列番号59）は、既知及び／または予測されたK R A S関連M H CクラスIネオエピトープV V G A V G V G K（配列番号79）、V V V G A V G V G K（配列番号81）、及びA V G V G K S A L（配列番号80）のそれぞれをコードしている。

20

【0261】

K R A S関連M H CクラスIネオエピトープをコードするものを含むエピトープコード核酸配列は、カセット内で任意の順序とすることができる。K R A S関連M H CクラスIネオエピトープをコードするものを含むエピトープコード核酸配列は、本明細書でさらに記載されるように、ジャンクションエピトープが最小となるような順序とすることができる。例示的な非限定例として、ジャンクションエピトープが最小となるように互いに連結された連結K R A S関連M H CクラスIネオエピトープは、配列番号65に示されるアミノ酸配列で表され、G 1 2 C G 1 2 D Q 6 1 H G 1 2 D G 1 2 V G 1 2 C Q 6 1 H G 1 2 D G 1 2 V G 1 2 C Q 6 1 H G 1 2 D G 1 2 V Q 6 1 H G 1 2 V G 1 2 Cの順序を有する。

30

【0262】

本明細書はまた、正常細胞または組織と比較して腫瘍細胞またはがん性組織中で発現が変化していることが知られているかまたは見出されている任意のポリペプチド、例えば、正常細胞または組織と比較して腫瘍細胞またはがん性組織中で異常に発現することが知られているかまたは見出されている任意のポリペプチドに由来するペプチドも開示する。抗原性ペプチドが由来する適当なポリペプチドは、例えば、C O S M I Cデータベースに見出すことができる。C O S M I Cは、ヒトのがんにおける体細胞変異に関する包括的な情報をキュレートしたものである。ペプチドは、腫瘍特異的変異を含む。腫瘍抗原（例えば、共通腫瘍抗原及び腫瘍ネオ抗原）としては、これらに限定されるものではないが、あらゆる目的で本明細書に参照により援用する米国特許出願第17／058,128号に記載されるものが挙げられる。抗原ペプチドはそれらのコード配列に関して記述することができ、抗原は関連するポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列（例えば、D N AまたはR N A）を含む。

40

【0263】

腫瘍細胞、または樹状細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞を含む免疫細胞などの細胞の細胞表面上に提示されることが予測される抗原を選択することができる。免疫原性を有することが予測される抗原を選択することができる。

【0264】

抗原ヌクレオチド配列によってコードされる1つ以上のポリペプチドは、以下のうちの少なくとも1つを含むことができる：1000nM未満のI C 50値でのM H Cとの結合親和性、M H CクラスIペプチドについてはアミノ酸8～15個、8、9、10、11、

50

12、13、14、または15個の長さ、プロテアソーム切断を促進するペプチド内またはその近くの配列モチーフの存在、及び、TAP輸送を促進する配列モチーフの存在、MHCクラスIIのポリペプチドについてはアミノ酸6〜30個、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30個の長さ、細胞外もしくはリソソームプロテアーゼ（例えば、カテプシン）によるペプチド促進切断部位またはHLA-DMにより触媒されるHLA結合部位内またはその近くの配列モチーフの存在。

【0265】

1つ以上の抗原は、腫瘍の表面上に存在することができる。

【0266】

1つ以上の抗原が、腫瘍を有する対象で免疫原性でありうる（例えば、対象のT細胞応答及び／またはB細胞応答を刺激することができる）。1つ以上の抗原が、1つ以上の抗原を認識する抗体（例えば、腫瘍を認識する抗体）の産生などのB細胞応答を刺激することが可能な場合がある。抗体は、直鎖状ポリペプチド配列を認識するか、または二次及び三次構造を認識することができる。したがって、B細胞の抗原としては、これらに限定されるものではないが、完全長タンパク質、タンパク質サブユニット、タンパク質ドメイン、または二次及び三次構造を有することが知られているかもしくは予測される任意のポリペプチドを含む直鎖状ポリペプチド配列または二次及び三次構造を有するポリペプチドを挙げることができる。腫瘍に対するB細胞応答を刺激することができる抗原は、腫瘍細胞の表面に見出される抗原でありうる。腫瘍に対するB細胞応答を誘導することができる抗原は、腫瘍で発現される細胞内ネオ抗原でありうる。

【0267】

1つ以上の抗原は、T細胞応答を刺激することができる抗原（例えば、予測されるT細胞エピトープ配列を含むペプチド）と、B細胞応答を刺激することができる異なる抗原（例えば、完全長タンパク質、タンパク質サブユニット、タンパク質ドメイン）との組み合わせを含むことができる。

【0268】

対象において自己免疫応答を刺激する1つ以上の抗原は、対象のためのワクチン生成との関連において考察から除外することができる。

【0269】

少なくとも1つの抗原性ペプチド分子（例えば、エピトープ配列）のサイズは、約5個、約6個、約7個、約8個、約9個、約10個、約11個、約12個、約13個、約14個、約15個、約16個、約17個、約18個、約19個、約20個、約21個、約22個、約23個、約24個、約25個、約26個、約27個、約28個、約29個、約30個、約31個、約32個、約33個、約34個、約35個、約36個、約37個、約38個、約39個、約40個、約41個、約42個、約43個、約44個、約45個、約46個、約47個、約48個、約49個、約50個、約60個、約70個、約80個、約90個、約100個、約110個、約120個、またはそれよりも多いアミノ分子残基、及びこれらの範囲から導出される任意の範囲を含むことができるが、それらに限定されない。具体的な実施形態において、抗原性ペプチド分子は、アミノ酸50個以下である。

【0270】

抗原性ペプチド及びポリペプチドは、MHCクラスIについては長さが15残基以下で、通常約8〜約11残基の間からなり、特に9または10残基であることができ；MHCクラスIIについては、6〜30残基であることができる。

【0271】

望ましい場合、より長いペプチドを、いくつかのやり方において設計することができる。1つの例において、HLAアレル上のペプチドの提示尤度が予測されるかまたは公知である場合、より長いペプチドは、（1）各々の対応する遺伝子産物のN末端及びC末端に向かって2〜5アミノ酸の伸長を有する個々の提示されるペプチド；（2）各々について伸長した配列を有する、提示されるペプチドのいくつかまたはすべての連鎖のいずれか

10

20

30

40

50

らなることができる。別の場合では、シーケンシングによって腫瘍内の長い（10個よりも多い残基）ネオエピトープ配列の存在が判明した場合（例えば、新規なペプチド配列をもたらすフレームシフト、リードスルー、またはイントロン導入による）、より長いペプチドは、（3）新規な腫瘍特異的アミノ酸のストレッチ全体からなる（これにより、最も強くHLA提示されるより短いペプチドを計算またはインビトロ試験選択に基づいて選択する必要がない）。いずれの場合も、より長いペプチドは、患者細胞による内因性プロセッシングを可能とし、より効果的な抗原提示及びT細胞応答の刺激をもたらす。より長いペプチドは、腫瘍で発現されるものなど、ペプチドの完全長タンパク質、タンパク質サブユニット、タンパク質ドメイン、及びそれらの組み合わせを含んでもよい。B細胞応答を刺激するためにより長いペプチド（例えば、完全長タンパク質、タンパク質サブユニット、またはタンパク質ドメイン）及びそれらの組み合わせが含まれてもよい。

10

【0272】

抗原性ペプチド及びポリペプチドは、HLAタンパク質上に提示されることができる。いくつかの態様において、抗原性ペプチドまたはポリペプチドは、野生型ペプチドよりも高い親和性でHLAタンパク質上に提示される。いくつかの態様において、抗原性ペプチドまたはポリペプチドは、少なくとも5000nM未満、少なくとも1000nM未満、少なくとも500nM未満、少なくとも250nM未満、少なくとも200nM未満、少なくとも150nM未満、少なくとも100nM未満、少なくとも50nM未満、またはそれよりも小さいIC50を有することができる。

【0273】

いくつかの態様において、抗原性ペプチド及びポリペプチドは、対象に投与された場合に、自己免疫応答を刺激せず、及び／または免疫寛容を引き起こさない。

20

【0274】

少なくとも2つ以上の抗原性ペプチドを含む組成物も提供される。いくつかの実施形態では、組成物は少なくとも2つの異なるペプチドを含む。少なくとも2つの異なるペプチドは同じポリペプチドに由来するものであってよい。異なるペプチドとは、ペプチドが、長さ、アミノ酸配列、またはその両方において異なることを意味する。ペプチドは、腫瘍特異的変異を含み得る。腫瘍特異的ペプチドは、正常細胞または組織と比較して腫瘍細胞またはがん性組織中で発現が変化していることが知られているかまたは見出されている任意のポリペプチド、例えば、正常細胞または組織と比較して腫瘍細胞またはがん性組織中で異常に発現することが知られているかまたは見出されている任意のポリペプチドに由来する腫瘍特異的変異またはペプチドを含むことが知られているかまたは見出されている任意のポリペプチドに由来するものとする。ペプチドは、感染症生物に関連することが知られているかもしくは疑われる任意のポリペプチドに由来するものとするか、またはペプチドは、正常細胞または組織と比較して感染細胞で発現が変化していることが知られているかもしくは見出されている任意のポリペプチド（例えば、宿主細胞に発現が制限されている感染症ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを含む感染症ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）に由来するものとする。抗原性ペプチドが由来する適当なポリペプチドは、例えば、COSMICデータベースまたはAACR GENIE (Genomics Evidence Neoplasia Information Exchange) データベースに見出すことができる。COSMICは、ヒトのがんにおける体細胞変異に関する包括的な情報をキュレートしたものである。AACR GENIEは、数万人のがん患者からの臨床成績を用いた臨床グレードのがんゲノムデータを集約及びリンクしたものである。いくつかの態様では、腫瘍特異的変異は、特定のがんのタイプのドライバー変異である。ペプチドは、KRAS変異（例えば、KRAS G12C、KRAS G12V、KRAS G12D、及び／またはKRAS Q61H変異）を含むことができる。

30

40

【0275】

望ましい活性または性質を有する抗原性ペプチド及びポリペプチドは、望ましいMHC分子に結合して適切なT細胞を活性化する非改変ペプチドの生物学的活性を増大させるか

50

または実質的にそのすべてを少なくとも保持しつつ、特定の望ましい属性、例えば、改善された薬理学的特徴を与えるように改変することができる。例として、抗原性ペプチド及びポリペプチドを、保存的または非保存的のいずれかの置換などの、種々の改変にさらに供することができ、そのような改変は、改善されたMHC結合、安定性、または提示などの、それらの使用におけるある特定の利点を提供し得る。保存的置換とは、アミノ酸残基を、生物学的及び／または化学的に類似している別のもので、例えば、1つの疎水性残基を別の疎水性残基、または1つの極性残基を別の極性残基で置き換えることを意味する。置換は、Gly、Ala；Val、Ile、Leu、Met；Asp、Glu；Asn、Gln；Ser、Thr；Lys、Arg；及びPhe、Tyrなどの組み合わせを含む。単一アミノ酸置換の効果はまた、D-アミノ酸を用いて探査してもよい。そのような改変は、例えば、Merrifield, Science 232:341-347 (1986), Barany & Merrifield, The Peptides, Gross & Meienhofer, eds. (N.Y., Academic Press), pp. 1-284 (1979)；及びStewart & Young, Solid Phase Peptide Synthesis, (Rockford, Ill., Pierce), 2d Ed. (1984)に記載されているように、周知のペプチド合成手順を用いて行うことができる。

10

【0276】

種々のアミノ酸模倣物または非天然アミノ酸でのペプチド及びポリペプチドの改変は、インビボでのペプチド及びポリペプチドの安定性の増大に特に有用である場合がある。安定性は多くの方法でアッセイすることができる。例として、ペプチダーゼ、ならびに、ヒト血漿及び血清などの種々の生物学的媒質が、安定性を試験するために使用されている。例えば、Verhoeft et al., Eur. J. Drug Metab Pharmacokin. 11:291-302 (1986)を参照されたい。ペプチドの半減期は、25%ヒト血清(v/v)アッセイを用いて好都合に決定することができる。プロトコルは、概して以下のようなものである。プールしたヒト血清(タイプAB、非熱不活性化)を、使用前に遠心分離によって脱脂する。次いで、血清を、RPMI組織培養培地で25%に希釈し、ペプチド安定性を試験するために使用する。あらかじめ決定された時間間隔で、少量の反応溶液を取り出して、6%水性トリクロロ酢酸またはエタノールのいずれかに添加する。濁った反応試料を15分間冷却(4℃)し、次いで、スピンドして沈降血清タンパク質を沈殿させる。次いで、ペプチドの存在を、安定性特異的クロマトグラフィー条件を用いた逆相HPLCによって決定する。

20

30

【0277】

ペプチド及びポリペプチドを、改善された血清半減期以外の望ましい属性を提供するために修飾することができる。例として、CTL活性を刺激するペプチドの能力を、Tヘルパー細胞応答を刺激することができる少なくとも1つのエピトープを含有する配列への連結によって増強することができる。免疫原性ペプチド/Tヘルパーコンジュゲートは、スペーサー分子によって連結することができる。スペーサーは、典型的には、生理学的条件下で実質的に無電荷である、アミノ酸またはアミノ酸模倣物などの相対的に小さな中性分子から構成される。スペーサーは、典型的には、例えば、Ala、Gly、または、非極性アミノ酸もしくは中性極性アミノ酸の他の中性スペーサーから選択される。任意で存在するスペーサーは、同じ残基から構成される必要はなく、したがって、ヘテロオリゴマーまたはホモオリゴマーであり得ることが、理解されるであろう。存在する場合、スペーサーは、通常、少なくとも1または2残基、より通常は、3~6残基であろう。あるいは、ペプチドを、スペーサーなしでTヘルパーペプチドに連結することができる。

40

【0278】

抗原性ペプチドは、ペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかで、直接またはスペーサーを介してのいずれかでTヘルパーペプチドに連結することができる。抗原性ペプチドまたはTヘルパーペプチドのいずれかのアミノ末端を、アシル化することができる。例示的なTヘルパーペプチドは、破傷風トキソイドの830~843、インフルエ

50

ンザの307～319、マラリアスポロゾイトの周囲382～398及び378～389を含む。

【0279】

タンパク質またはペプチドは、標準的な分子生物学的技法を通したタンパク質、ポリペプチド、もしくはペプチドの発現、天然由来源からのタンパク質もしくはペプチドの単離、またはタンパク質もしくはペプチドの化学合成を含む、当業者に公知の任意の技法によって作製することができる。種々の遺伝子に対応する、ヌクレオチドならびにタンパク質、ポリペプチド及びペプチドの配列は、以前に開示されており、当業者に公知のコンピュータ処理されたデータベースで見出すことができる。1つのそのようなデータベースは、National Institutes of Healthのウェブサイト¹⁰に位置する、National Center for Biotechnology InformationのGenbank及びGenPeptデータベースである。公知の遺伝子のコード領域は、本明細書に開示する技法を用いて、または当業者に公知であるように、増幅及び／または発現させることができる。あるいは、タンパク質、ポリペプチド、及びペプチドの種々の商業的調製物が、当業者に公知である。

【0280】

さらなる態様において、抗原は、抗原性ペプチドまたはその一部をコードする核酸（例えば、ポリヌクレオチド）を含む。ポリヌクレオチドは、例えば、DNA、cDNA、PNA、CNA、RNA（例えば、mRNA）、例えば、ホスホロチオアートバックボーン²⁰を有するポリヌクレオチドなどの、ポリヌクレオチドの一本鎖及び／もしくは二本鎖、または天然形態もしくは安定化形態のいずれか、または、それらの組み合わせであることができ、イントロンを含有してもよく、または含有しなくてもよい。抗原をコードするポリヌクレオチド配列は、転写、翻訳、転写後プロセッシング、及び／またはRNA安定性を改善することなどにより、発現を改善するために配列最適化することができる。例えば、抗原をコードするポリヌクレオチド配列はコドン最適化することができる。本明細書では「コドン最適化」とは、所与の生物のコドンバイアスに関して、低頻度で用いられるコドンを高頻度で用いられる同義コドンに置換することを指す。ポリヌクレオチド配列は、転写後プロセッシングを改善するために最適化することができ、例えば、好ましいスプライシング事象にバイアスするように、スプライシングモチーフ（例えば、カノニカル及び／またはクリプティック／非カノニカルスプライスドナー、ブランチ、及び／またはアクセプター³⁰配列）の除去、及び／または外因性スプライシングモチーフ（スプライスドナー、ブランチ、及び／またはアクセプター配列）の導入などにより、意図しないスプライシングを減少させるように最適化することができる。外因性イントロン配列としては、これらに限定されるものではないが、SV40に由来するもの（例えば、SV40ミニイントロン）及び／または免疫グロブリンに由来するもの（例えば、ヒトβ-グロブリン遺伝子）が挙げられる。外因性イントロン配列は、プロモーター／エンハンサー配列と抗原（複数可）配列との間に組み込むことができる。発現ベクターで使用するための外因性イントロン配列は、あらゆる目的で本明細書に参照によりその全容をそれぞれ援用するCallendret et al. (Virology, 2007 Jul 5; 363 (2): 288-302)⁴⁰により詳細に記載されている。ポリヌクレオチド配列は、例えば、RNA安定性モチーフ（例えば、AUリッチエレメント及び／または3' UTRモチーフ）及び／または反復ヌクレオチド配列の除去により転写物安定性を改善するように最適化することができる。ポリヌクレオチド配列は、例えば、クリプティックな転写イニシエーター及び／またはターミネーターの除去によって正確な転写を改善するように最適化することができる。ポリヌクレオチド配列は、例えば、クリプティックなAUG開始コドン、未成熟ポリA配列、及び／または二次構造モチーフの除去によって翻訳及び翻訳精度を改善するように最適化することができる。ポリヌクレオチド配列は、構成的輸送エレメント（CTE）、RNA輸送エレメント（RTE）、またはウッドチャック転写後調節エレメント（WPRE）の付加などによって、転写物の核外輸送を改善するように最適化することができる。発現ベクターで使用するための核外輸送シグナルは、あらゆる目的で本明細書に参⁵⁰

照によりその全容をそれぞれ援用する Callendret et al. (Virology, 2007 Jul 5; 363 (2): 288-302) により詳細に記載されている。ポリヌクレオチド配列は、例えば、所与の生物の平均 GC 含量を反映するように、GC 含量に関して最適化することができる。配列最適化によって、転写、翻訳、転写後プロセッシング、及び／または RNA 安定性などの 1 つ以上の配列特性のバランスをとることができる。配列最適化によって、転写、翻訳、転写後プロセッシング、及び RNA 安定性のそれぞれのバランスをとる最適配列を生成することができる。配列最適化アルゴリズムは、GeneArt (Thermo Fisher)、Codon Optimization Tool (IDT)、Cool Tool (University of Singapore)、SGI-DNA (La Jolla California) などの当業者には周知のものである。抗原コードタンパク質の 1 つ以上の領域を別々に配列最適化することができる。

10

【0281】

またさらなる態様は、ポリペプチドまたはその一部を発現することができる発現ベクターを提供する。様々な細胞タイプ用の発現ベクターが、当技術分野において周知であり、過度の実験なしで選択することができる。概して、DNA を、プラスミドなどの発現ベクター中に、発現のための適正な方向及び正確なリーディングフレームで挿入する。必要な場合は、DNA を、望ましい宿主によって認識される適切な転写及び翻訳調節性制御ヌクレオチド配列に連結することができるが、そのような制御は、概して発現ベクターにおいて利用可能である。次いで、ベクターを、標準的な技法を通して宿主中に導入する。手引

20

【0282】

V. ワクチン組成物

また、特異的な免疫応答、例えば、腫瘍特異的な免疫応答を生じることができる免疫原性組成物、例えば、ワクチン組成物も、本明細書に開示する。ワクチン組成物は、典型的に、本明細書に記載される方法を用いて選択された 1 つまたは複数の抗原を含む。ワクチン組成物はワクチンと呼ぶこともできる。

30

【0283】

ワクチンは、1~30 個のペプチド、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、もしくは 30 個の異なるペプチド、6、7、8、9、10、11、12、13、もしくは 14 個の異なるペプチド、または 12、13、もしくは 14 個の異なるペプチドを含むことができる。ペプチドは、翻訳後修飾を有してもよい。ワクチンは、1~100 個以上のヌクレオチド配列、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100 個、もしくはそれよりも多くの異なるヌクレオチド配列、6、7、8、9、10、11、12、13、もしくは 14 個の異なる抗原コード核酸配列、または 12、13、もしくは 14 個の異なる抗原コード核酸配列を含むことができる。ワクチンは、1~30 個の抗原配列、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46

40

50

、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100個、もしくはそれよりも多くの異なる抗原配列、6、7、8、9、10 11、12、13、もしくは14個の異なる抗原配列、または12、13もしくは14個の異なる抗原配列を含むことができる。

【0284】

ワクチンは、1～30個の抗原コード核酸配列、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100個、もしくはそれよりも多くの異なる抗原コード核酸配列、6、7、8、9、10 11、12、13、もしくは14個の異なる抗原コード核酸配列、または12、13もしくは14個の異なる抗原コード核酸配列を含むことができる。抗原コード核酸配列は、「抗原カセット」の抗原コード部分を指す場合もある。抗原カセットの特性について本明細書でより詳細に説明する。抗原コード核酸配列は、1つ以上のエピトープコード核酸配列（例えば、連結されたT細胞エピトープをコードした抗原コード核酸配列）を含むことができる。

10

20

【0285】

ワクチンは、1～30個の異なるエピトープコード核酸配列、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100個、もしくはそれよりも多くの異なるエピトープコード核酸配列、6、7、8、9、10 11、12、13、もしくは14個の異なるエピトープコード核酸配列、または12、13もしくは14個の異なるエピトープコード核酸配列を含むことができる。エピトープコード核酸配列とは、連結されたT細胞エピトープコード核酸配列をコードする抗原コード核酸配列中のT細胞エピトープのそれぞれなど、個別のエピトープ配列の配列を指す場合もある。

30

【0286】

ワクチンは、エピトープコード核酸配列の少なくとも2回の繰り返しを含むことができる。本明細書で使用される「繰り返し」（または互換的に「反復」）とは、抗原コード核酸配列内の2個以上の同じ核酸エピトープコード核酸配列（本明細書に記載される任意の5'リンカー配列及び／または任意の3'リンカー配列を含む）を指す。1つの例では、カセットの抗原コード核酸配列部分は、エピトープコード核酸配列の少なくとも2回の繰り返しをコードする。さらなる非限定的な例では、カセットの抗原コード核酸配列部分は複数の異なるエピトープをコードし、異なるエピトープのうちの少なくとも1つは、異なるエピトープをコードした核酸配列の少なくとも2回の繰り返し（すなわち、少なくとも2個の異なるエピトープコード核酸配列）によってコードされる。例示的な非限定例では、抗原コード核酸配列は、エピトープコード核酸配列A（E_A）、エピトープコード配列B（E_B）、及びエピトープコード配列C（E_C）によってコードされるエピトープA、B、及びCをコードし、異なるエピトープのうちの少なくとも1つの繰り返しを有する例示

40

50

的な抗原コード核酸配列は、これらに限定されるものではないが、次式によって示される。

－ 1つの異なるエピトープの繰り返し（エピトープ A の繰り返し）：

$E_A - E_B - E_C - E_A$ 、または

$E_A - E_A - E_B - E_C$

－ 複数の異なるエピトープの繰り返し（エピトープ A、B、及び C の繰り返し）：

$E_A - E_B - E_C - E_A - E_B - E_C$ 、または

$E_A - E_A - E_B - E_B - E_C - E_C$

－ 複数の異なるエピトープの複数の繰り返し（エピトープ A、B、及び C の繰り返し）：

$E_A - E_B - E_C - E_A - E_B - E_C - E_A - E_B - E_C$ 、または

$E_A - E_A - E_A - E_B - E_B - E_B - E_C - E_C - E_C$

【0287】

上記の例は限定的なものではなく、異なるエピトープのうちの少なくとも1つの繰り返しを有する抗原コード核酸配列は、異なるエピトープのそれぞれを任意の順序または頻度でコードすることができる。例えば、順序及び頻度は、例えば式 $E_A - E_B - E_C - E_C - E_A - E_B - E_A - E_C - E_A - E_C - E_C - E_B$ によるエピトープ A、B、及び C を有する例におけるように、異なるエピトープのランダムな配置とすることができる。

【0288】

本明細書では、5' から 3' 方向に次式によって記述される少なくとも1つの抗原コード核酸配列を有する抗原コードカセットが提供される。

$(E_x - (E^N_n)_y)_z$

式中、

E は、異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

n は、別個の異なるエピトープコード核酸配列の数を表しかつ、0 を含む任意の整数であり、

E^N は、それぞれの対応する n で前記別個の異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

z の各繰り返しについて：各 n について $x = 0$ または 1、 $y = 0$ または 1 であり、x または y の少なくとも一方は 1 であり、

z = 2 以上であり、抗原コード核酸配列は、E、所与の E^N 、またはこれらの組み合わせの少なくとも1つの2回の繰り返しを含む。いくつかの態様では、少なくとも2回の繰り返しを含む異なるエピトープコード核酸配列のうちの少なくとも1つは、KRAS 関連 MHC クラス I ネオエピトープをコードする。

【0289】

各 E または E^N は、本明細書に記載されるエピトープコード核酸配列（例えば、感染症 T 細胞エピトープ及び／またはネオ抗原エピトープをコードするペプチド）を独立して含むことができる。例えば、各 E または E^N は、5' から 3' 方向に、式 $(L_5 - N_c - L_3)_d$ によって記述されるヌクレオチド配列を独立して含むことができ、式中、N は、各 E または E^N に関連付けられた異なるエピトープコード核酸配列を含み、ただし $c = 1$ であり、 L_5 は 5' リンカー配列を含み、ただし $b = 0$ または 1 であり、 L_3 は 3' リンカー配列を含み、ただし $d = 0$ または 1 である。使用することができるエピトープ及びリンカーについては本明細書でさらに述べる。

【0290】

エピトープコード核酸配列（任意の 5' リンカー配列及び／または任意の 3' リンカー配列を含む）の繰り返しは互いに直接連結されてもよい（例えば、上記に示したように、 $E_A - E_A - \dots$ ）。エピトープコード核酸配列の繰り返しは、1つ以上のさらなるヌクレオチド配列によって分離されてもよい。一般的に、エピトープコード核酸配列の繰り返しは、本明細書に記載される組成物に適用可能な任意のサイズのヌクレオチド配列によって分離される。1つの例では、エピトープコード核酸配列の繰り返しは、別個の異なるエピトープコード核酸配列によって分離される（例えば、上記に示したように、 $E_A - E_B$

10

20

30

40

50

－E_C－E_A…）。繰り返しが単一の別個の異なるエピトープコード核酸配列によって分離されており、各エピトープコード核酸配列（任意の5'リンカー配列及び／または任意の3'リンカー配列を含む）がアミノ酸25個の長さのペプチドをコードする例では、繰り返しは、例えばE_A－E_B－E_A…（E_Aは75個のヌクレオチドによって分離されている）により表される抗原コード核酸におけるように75個のヌクレオチドによって分離されうる。例示的な1つの例では、25マーの抗原Trp1（VTNTEMFVTAPDNLGYMYEVQWPGQ）〔配列番号86〕及びTrp2（TQPQIANCSVYDFFVWLHYYSVRDT）〔配列番号87〕の繰り返しをコードした配列VTNTEMFVTAPDNLGYMYEVQWPGQTQPQIANCSVYDFFVWLHYYSVRDTVTNTEMFVTAPDNLGYMYEVQWPGQTQPQIANCSVYDFFVWLHYYSVRDT（配列番号85）を有する抗原コード核酸であり、Trp1の繰り返しが25マーのTrp2によって分離されており、したがって、Trp1エピトープコード核酸配列の繰り返しは、ヌクレオチド75個のTrp2エピトープコード核酸配列によって分離される。繰り返しが2、3、4、5、6、7、8、または9個の別個の異なるエピトープコード核酸配列によって分離されており、各エピトープコード核酸配列（任意の5'リンカー配列及び／または任意の3'リンカー配列を含む）がアミノ酸25個の長さのペプチドをコードする例では、繰り返しは、それぞれ、150、225、300、375、450、525、600、または675個のヌクレオチドによって分離されうる。

10

20

30

40

50

【0291】

一実施形態では、異なるペプチド及び／もしくはポリペプチド、またはそれらをコードするヌクレオチド配列は、ペプチド及び／またはポリペプチドが、異なるMHCクラスI分子及び／または異なるMHCクラスII分子などの異なるMHC分子と結合することができるように選択される。いくつかの態様において、1つのワクチン組成物は、最も頻繁に存在するMHCクラスI分子及び／または異なるMHCクラスII分子と結合することができるペプチド及び／またはポリペプチドのコード配列を含む。したがって、ワクチン組成物は、少なくとも2種類の好ましい、少なくとも3種類の好ましい、または少なくとも4種類の好ましいMHCクラスI分子及び／または異なるMHCクラスII分子と結合することができる異なる断片を含むことができる。

【0292】

ワクチン組成物は、特異的な細胞傷害性T細胞応答、及び／または特異的なヘルパーT細胞応答を刺激することができる。ワクチン組成物は、特異的な細胞傷害性T細胞応答、及び特異的なヘルパーT細胞応答を刺激することができる。

【0293】

ワクチン組成物は、特異的B細胞応答（例えば、抗体応答）を刺激することができる。

【0294】

ワクチン組成物は、特異的細胞傷害性T細胞応答、特異的ヘルパーT細胞応答、及び／または特異的B細胞応答（例えば、抗体応答）を刺激することができる。ワクチン組成物は、特異的細胞傷害性T細胞応答及び特異的B細胞応答を刺激することができる。ワクチン組成物は、特異的ヘルパーT細胞応答及び特異的B細胞応答を刺激することができる。ワクチン組成物は、特異的細胞傷害性T細胞応答、特異的ヘルパーT細胞応答、及び特異的B細胞応答を刺激することができる。

【0295】

ワクチン組成物は、アジュバント及び／または担体をさらに含むことができる。有用なアジュバント及び担体の例を本明細書で以下に示す。組成物は、例えば、タンパク質、またはペプチドをT細胞に提示することができる樹状細胞（DC）などの抗原提示細胞などの担体を伴ってもよい。

【0296】

アジュバントは、ワクチン組成物に混合することで抗原に対する免疫応答を増大または他の形で改変する任意の物質である。担体は、抗原が会合することができる、例えばポリ

ペプチドまたは多糖類などのスカフォールド構造であってよい。任意で、アジュバントは共有結合または非共有結合により結合される。

【0297】

アジュバントが抗原に対する免疫応答を増大させる能力は、免疫介在反応の有意なもしくは大幅な増大、または疾患症状の低減として一般的に現れる。例えば、体液性免疫の増大は、抗原に対して生成された抗体の力価の有意な増大として一般的に現れ、T細胞活性の増大は細胞増殖、または細胞傷害性、またはサイトカイン分泌の増大として一般的に現れる。アジュバントはまた、例えば、主として体液性またはTh応答を主として細胞性またはTh応答に変化させることにより、免疫応答も変化させることができる。

【0298】

適当なアジュバントとしては、これらに限定されるものではないが、1018 ISS、ミョウバン、アルミニウム塩、Amplivax、AS15、BCG、CP-870、893、CpG7909、CyaA、dSLIM、GM-CSF、IC30、IC31、イミキモド、ImuFact IMP321、IS Patch、ISS、ISCOMATRIX、JuvImmune、LipoVac、MF59、モノホスホリル脂質A、Montanide IMS 1312、Montanide ISA206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、PepTelベクターシステム、PLG微小粒子、レシキモド、SRL172、ピロソーム及び他のウイルス様粒子、YF-17D、VEGFトラップ、R848、 β -グルカン、Pam3Cys、サポニンから誘導されるAquila's QS21ステイミュロン（Aquila Biotech, Worcester, Mass., USA）、マイコバクテリウム抽出物及び合成細菌壁模倣体、ならびにRibi's Detox. QuilまたはSuperfosなどの他の特許取得アジュバントが挙げられる。不完全フロイントまたはGM-CSFなどのアジュバントが有用である。樹状細胞に対して特異的ないくつかの免疫学的アジュバント（例えば、MF59）及びそれらの製剤がこれまでに記載されている（Dupuis M, et al., Cell Immunol. 1998; 186 (1): 18-27; Allison AC; Dev Biol Stand. 1998; 92: 3-11）。サイトカインを用いることもできる。いくつかのサイトカインが、リンパ組織への樹状細胞の遊走に影響を及ぼし（例えば、TNF- α ）、Tリンパ球に対する効率的な抗原提示細胞への樹状細胞の成熟を加速させ（例えば、GM-CSF、IL-1及びIL-4）（参照によって本明細書にその全容を具体的に援用する米国特許第5,849,589号）、免疫アジュバントとして作用する（例えば、IL-12）（Gabrilovich DI, et al., J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1996 (6): 414-418）ことに直接的な関連が示されている。

【0299】

CpG免疫刺激オリゴヌクレオチドも、ワクチン環境におけるアジュバントの効果を高めることが報告されている。RNA結合TLR 7、TLR 8及び／またはTLR 9のような他のTLR結合分子を使用することもできる。

【0300】

有用なアジュバントの他の例としては、これらに限定されるものではないが、化学修飾CpG（例えば、CpR、Idera）、Poly（I:C）（例えば、poly i:C I2U）、非CpG細菌性DNAまたはRNA、ならびに、治療作用を有し、かつ／またはアジュバントとして作用しうる、シクロフォスファミド、スニチニブ、ベバシズマブ、セブレックス、NCX-4016、シルデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、ソラフィニブ、XL-999、CP-547632、パゾパニブ、ZD2171、AZD2171、イピリムマブ、トレメリムマブ、及びSC58175などの免疫活性小分子及び抗体が挙げられる。アジュバント及び添加剤の量ならびに濃度は、当業者によれば不要な実験を行うことなく容易に決定することが可能である。さらなるアジュバントとしては

、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF、サルグラモスティム）などのコロニー刺激因子が挙げられる。

【0301】

ワクチン組成物は、複数の異なるアジュバントを含むことができる。さらに、治療組成物は、上記のいずれかまたはそれらの組み合わせを含む、任意のアジュバント物質を含むことができる。ワクチンとアジュバントは、一緒に投与してもよく、または任意の適当な順序で別々に投与することもできる。

【0302】

担体（または賦形剤）がアジュバントとは独立して存在してもよい。担体の機能は、例えば特定の変異体の分子量を増やすことによって、活性もしくは免疫原性を高める、安定性を付与する、生物活性を高める、または血清半減期を延ばすことであってよい。さらに、担体は、T細胞へのペプチドの提示を助けることができる。担体は、例えば、タンパク質または抗原提示細胞などの当業者には周知の任意の適当な担体であってよい。担体タンパク質は、これらに限定されるものではないが、キーホールリンペットヘモシアニン；トランスフェリン、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、チログロブリンまたはオボアルブミンなどの血清タンパク質、免疫グロブリン；インスリンまたはパルミチン酸などのホルモンであってよい。ヒトの免疫化においては、担体は一般的に、ヒトに許容される、安全な生理学的に許容される担体である。しかしながら、破傷風トキソイド及び／またはジフテリアトキソイドは適当な担体である。あるいは、担体は、デキストラン、例えばセファロースであってよい。

【0303】

細胞傷害性T細胞（CTL）は、インタクトな外来抗原自体ではなく、MHC分子に結合したペプチドの形の抗原を認識する。MHC分子自体は、抗原提示細胞の細胞表面に位置している。したがって、CTLの活性化は、ペプチド抗原、MHC分子及びAPCの三量体複合体が存在する場合に可能となる。これに対応して、CTLは、ペプチドのみがCTLの活性化に用いられる場合でなく、対応するMHC分子を有するAPCがさらに加えられる場合に免疫応答を増強することができる。したがって、特定の実施形態では、ワクチン組成物は少なくとも1つの抗原提示細胞をさらに含む。

【0304】

抗原はまた、ワクシニア、鶏痘、自己複製アルファウイルス、マラバウイルス、アデノウイルス（例えば、Tatsis et al., *Adenoviruses, Molecular Therapy* (2004) 10, 616-629を参照されたい）、または、第2、第3、もしくはハイブリッド第2／第3世代のレンチウイルス、及び特異的な細胞タイプもしくは受容体を標的とするように設計された任意の世代の組換えレンチウイルスを含むがそれらに限定されないレンチウイルス（例えば、Hu et al., *Immunization Delivered by Lentiviral Vectors for Cancer and Infectious Diseases, Immunol Rev.* (2011) 239 (1): 45-61、Sakuma et al., *Lentiviral vectors: basic to translational, Biochem J.* (2012) 443 (3): 603-18、Cooper et al., *Rescue of splicing-mediated intron loss maximizes expression in lentiviral vectors containing the human ubiquitin C promoter, Nucl. Acids Res.* (2015) 43 (1): 682-690、Zufferey et al., *Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery, J. Virol.* (1998) 72 (12): 9873-9880を参照されたい）などの、ウイルスベクターベースのワクチンプラットフォームに含めることもできる。上述のウイルスベクターベースのワクチンプラットフォームのパッケージング能力に依存して、このアプローチは、1つ以上の抗原ペプ

チドをコードする1つ以上のヌクレオチド配列を送達することができる。配列は、非変異配列が隣接していてもよく、リンカーによって分離されていてもよく、または、細胞内区画を標的とする1つもしくは複数の配列が先行していてもよい（例えば、Gros et al., Prospective identification of antigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients, Nat Med. (2016) 22 (4) : 433-8、Stronen et al., Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires, Science. (2016) 352 (6291) : 1337-41、Lu et al., Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions, Clin Cancer Res. (2014) 20 (13) : 3401-10を参照されたい）。宿主中への導入時に、感染した細胞は、抗原を発現し、それにより、ペプチドに対する宿主免疫（例えば、CTL）応答を刺激する。免疫化プロトコールにおいて有用なワクシニアベクター及び方法は、例えば、米国特許第4,722,848号に記載されている。別のベクターは、BCG（カルメット・ゲラン桿菌）である。BCGベクターは、Stover et al. (Nature 351 : 456-460 (1991)) に記載されている。抗原の治療的投与または免疫化に有用な、多種多様の他のワクチンベクター、例えば、チフス菌（Salmonella typhi）ベクターなどが、本明細書における記載から当業者に明らかであろう。

10

20

【0305】

V. A. 抗原カセット

1つ以上の抗原の選択に用いられる方法、「抗原カセット」のクローニング及び構築、ならびにウイルスベクターへのその挿入は本明細書に与えられる教示を考慮すれば当該技術分野の範囲内である。「抗原カセット」または「カセット」とは、選択された抗原または複数の抗原（例えば、抗原コード核酸配列）と、この抗原（複数可）を転写し、転写産物を発現するために必要とされる他の調節エレメントとの組み合わせを意味する。選択された抗原または複数の抗原とは、異なるエピトープ配列を指す場合がある（例えば、カセット内の抗原コード核酸配列は、エピトープが転写されて発現されるようにエピトープコード核酸配列（または複数のエピトープコード核酸配列）をコードすることができる）。抗原または複数の抗原は、転写を可能とするような形で調節要素と機能的に連結することができる。かかる要素としては、ウイルスベクターをトランスフェクトした細胞内で抗原（複数可）の発現を誘導することができる従来の調節エレメントが挙げられる。したがって、抗原カセットは、抗原（複数可）に連結され、組換えベクターの選択されたウイルス配列内に他の任意選択的な調節エレメントとともに配置された選択されたプロモーターも含むことができる。カセットは、1つ以上の抗原（例えば、配列番号75～82に示されるKRAS関連ネオエピトープのいずれかなどの、ワクチン組成物中の、1つ以上のKRAS関連ネオエピトープ）を含むことができる。カセットは、それぞれが独立して別個のプロモーターに機能的に連結されるか、及び／または、2Aリボソームスキッピング配列エレメント（例えば、E2A、P2A、F2A、またはT2A配列）または内部リボソーム進入部位（IRES）配列エレメントなどの他のマルチシストロニックシステムを用いて互いに連結された複数の抗原コード核酸配列を含むカセットなどの1つ以上の抗原コード核酸配列を有することができる。リンカーは、TEVまたはフーリン切断部位のような切断部位を有することもできる。切断部位を有するリンカーを、マルチシストロニックシステム内のエレメントなど、他のエレメントと組み合わせることもできる。非限定的な例示的な例では、フリンプロテアーゼ切断部位を2Aリボソームスキッピング配列エレメントと組み合わせて使用して、翻訳後の2A配列の除去を促進するようにフリンプロテアーゼ切断部位を構成することができる。複数の抗原コード核酸配列を含むカセットにおいて

30

40

50

、各抗原コード核酸配列は、1つ以上のエピトープコード核酸配列（例えば、連結されたT細胞エピトープをコードした抗原コード核酸配列）を含むことができる。

【0306】

有用なプロモーターは、構成性プロモーター、または発現させる抗原（複数可）の量を制御することが可能な調節された（誘導性）プロモーターであってよい。例えば、望ましいプロモーターとして、サイトメガロウイルス最初期プロモーター／エンハンサーのものがある〔例えば、Boshart et al., Cell, 41:521-530 (1985)を参照〕。別の望ましいプロモーターとしては、ラウス肉腫ウイルスLTRプロモーター／エンハンサーが挙げられる。さらに別のプロモーター／エンハンサー配列は、ニワトリβアクチンプロモーターである〔T. A. Kost et al., Nucl. Acids Res., 11(23):8287 (1983)〕。当業者であれば、他の適当な、または望ましいプロモーターも選択することができる。

【0307】

本明細書では、TET-OnシステムまたはTET-OffシステムのようなTETプロモーターシステムである調節可能なプロモーターに機能的に連結された少なくとも1つのペイロード配列を有するカセットを含むウイルスベクターも開示する。理論に束縛されることを望まずに言えば、TETプロモーターシステムを用いることで、ウイルス生産時における、ワクチンカセットにコードされた抗原などのカセットにコードされたペイロード核酸の転写を最小限に抑えることができる。TETプロモーターシステムは、あらゆる目的で本明細書にその全容を援用するところの国際特許出願公開第WO2020/243719号により詳細に記載されている。

【0308】

TETプロモーターシステムは、テトラサイクリン（TET）リプレッサータンパク質（TET_r）により制御されるプロモーターを含むことができる。したがって、本明細書では、テトラサイクリン（TET）リプレッサータンパク質（TET_r）により制御されるプロモーターに機能的に連結された少なくとも1つのペイロード配列を有するカセットを含むウイルスベクターも開示される。TET_r制御プロモーターは、19bpのTETオペレーター（TET_o）配列TCCCTATCAGTGATAGAGA（配列番号83）を含むことができる。TET_r制御プロモーターは、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個以上のTET_o核酸配列を含むことができる。2個以上のTET_o核酸配列を有するTET_r制御プロモーターでは、TET_o配列同士は互いに連結されてもよい。2個以上のTET_o核酸配列を有するTET_r制御プロモーターでは、TET_o配列同士は互いに直接連結されてもよい。2個以上のTET_o核酸配列を有するTET_r制御プロモーターでは、TET_o配列同士は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個以上のヌクレオチドを有するリンカー配列などのリンカー配列によって互いに連結されてもよい。一般的に、TET_r制御プロモーターは、SV40、EF-1、RSV、PGK、HSA、MCKまたはEBVプロモーター配列などの任意の望ましいプロモーター配列を用いることができる。TET_r制御プロモーターはCMVプロモーター配列を用いることができる。TET_r制御プロモーターは最小CMVプロモーター配列を用いることができる。TET_o配列は、RNAポリメラーゼが結合するプロモーター配列領域の上流（5'）にあってよい。例示的な1つの例では、7個のTET_o配列が、プロモーター配列の上流（5'）にある。TET_o配列がプロモーター配列領域の上流にある、少なくとも1つのペイロード核酸配列に機能的に連結されたTET_r制御プロモーターは、5'から3'の方向に、次式によって記述される順序付けられた配列を有することができる。すなわち、

$$(T-L)_Y-X-P-N$$

式中、Nは、ペイロード核酸配列であり、Pは、ペイロード核酸配列に機能的に連結されたプロモーター配列のRNAポリメラーゼ結合配列であり、Tは、配列番号66に示されるヌクレオチド配列を含むTET_o核酸配列であり、Lは、リンカー配列であり、ただし、各XについてY=0または1であり、X=1、2、3、4、5、6、7、8、9、10

、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20である。例示的な1つの例では、各Xについて $X=7$ かつ $Y=1$ とは、7個のTET α 配列がプロモーター配列の上流(5')にあり、各TET α 配列がリンカーによって分離されている場合を記述している。

【0309】

TET α 配列は、RNAポリメラーゼが結合するプロモーター配列領域の下流(3')にあってもよい。別の例示的な例では、2個のTET α 配列が、プロモーター配列の下流(3')にある。TET α 配列がプロモーター配列領域の下流にある、少なくとも1つのペイロード核酸配列に機能的に連結されたTET α 制御プロモーターは、5'から3'の方向に、次式によって記述される順序付けられた配列を有することができる。すなわち、

$$P-(T-L)_Y X-N$$

式中、Nは、ペイロード核酸配列であり、Pは、ペイロード核酸配列に機能的に連結されたプロモーター配列のRNAポリメラーゼ結合配列であり、Tは、配列番号66に示されるヌクレオチド配列を含むTET α 核酸配列であり、Lは、リンカー配列であり、ただし、各Xについて $Y=0$ または1であり、 $X=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19$ 、または20である。例示的な1つの例では、各Xについて $X=2$ かつ $Y=1$ とは、2個のTET α 配列がプロモーター配列の下流(3')にあり、各TET α 配列がリンカーによって分離されている場合を記述している。

【0310】

TET α 制御プロモーターを有するベクターのウイルス生産では、TET α 配列(tTS)を発現するように操作された293細胞株またはその誘導株(例えば、293F細胞株)など、tTSを発現するように操作されたあらゆるウイルス産生細胞株を使用することができる。tTS発現細胞内でのTET α 制御プロモーターを有するベクターのウイルス生産により、ウイルス生産を改善することができる。tTS発現細胞内でのTET α 制御プロモーターを有するベクターのウイルス生産により、感染単位(IU)当たりのウイルス粒子(VP)として定義されるウイルス感染性を改善することができる。tTS発現細胞内でのTET α 制御プロモーターを有するベクターのウイルス生産により、非tTS発現細胞内での生産と比較してウイルス生産及び／またはウイルス感染性を少なくとも1.5、少なくとも2、少なくとも2.5、少なくとも3、少なくとも3.5、少なくとも4、少なくとも4.5、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、または少なくとも10倍改善することができる。tTS発現細胞内でのTET α 制御プロモーターを有するベクターのウイルス生産により、非tTS発現細胞内での生産と比較してウイルス生産及び／またはウイルス感染性を少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、または少なくとも100倍改善することができる。tTS発現細胞内でのTET α 制御プロモーターを有するベクターのウイルス生産により、TET α 制御プロモーターを有さないベクターの生産と比較してウイルス生産及び／またはウイルス感染性を少なくとも1.5、少なくとも2、少なくとも2.5、少なくとも3、少なくとも3.5、少なくとも4、少なくとも4.5、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、または少なくとも10倍改善することができる。tTS発現細胞内でのTET α 制御プロモーターを有するベクターのウイルス生産により、TET α 制御プロモーターを有さないベクターの生産と比較してウイルス生産及び／またはウイルス感染性を少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、または少なくとも100倍改善することができる。

【0311】

抗原カセットは、転写産物の効率的なポリアダニル化(ポリ(A)、ポリAまたはpA)のためのシグナルを与える配列ならびに機能的スプライスドナー及びアクセプター部位

を含むイントロンを含む、ウイルスベクター配列に対して異種の核酸配列も含みうる。本明細書の例示的なベクターに用いられる一般的なポリ A 配列は、パポバウイルス SV-40 由来のものである。ポリ A 配列は、抗原ベースの配列の後で、ウイルスベクター配列の前にカセットに挿入することができる。一般的なイントロン配列もまた SV-40 由来のものでよく、SV-40 T イントロン配列と呼ばれる。抗原カセットは、プロモーター／エンハンサー配列と抗原（複数可）との間に位置するイントロンを含んでもよい。これら及び他の一般的なベクターエレメントの選択は従来のものであり [例えば、Sambrook et al, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual.", 2d edit., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989) 及び本明細書に引用される参考文献を参照]、多くのかかる配列が商業的及び産業的供給元、ならびに Genbank より入手可能である。

10

【0312】

抗原カセットは1つ以上の抗原を有することができる。例えば、所与のカセットは、1～10個、1～20個、1～30個、10～20個、15～25個、15～20個、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、またはそれよりも多くの抗原を含むことができる。抗原は互いに直接連結されてもよい。抗原はリンカーによって互いに連結されてもよい。抗原は、NからCまたはCからNを含む、互いに対して任意の方向とすることができる。

20

【0313】

本明細書の他の箇所で述べたように、抗原カセットは、選択することができるものの中でもとりわけ、例えば、VEE 骨格の欠失した構造タンパク質または ChAd-ベースベクターの E1 遺伝子領域の欠失または E3 遺伝子領域の欠失の部位などのウイルスベクター内の任意の選択された欠失部位内に配置することができる。

【0314】

抗原カセットは、5' から 3' 方向に各要素の順序付けられた配列を記述する下式を用いて記述することができる。すなわち、

$$(P_a - (L_{5b} - N_c - L_{3d})_X)_Z - (P_{2h} - (G_{5e} - U_f)_Y)_W - G_{3g}$$

[式中、P 及び P2 は、プロモーターヌクレオチド配列を含み、N は、MHC クラス I エピトープコード核酸配列を含み、L5 は、5' リンカー配列を含み、L3 は、3' リンカー配列を含み、G5 は、アミノ酸リンカーをコードする核酸配列を含み、G3 は、アミノ酸リンカーをコードする少なくとも1つの核酸配列のうちの1つを含み、U は、MHC クラス II 抗原コード核酸配列を含み、ただし、各 X について、対応する Nc は、エピトープコード核酸配列であり、各 Y について、対応する Uf は、MHC クラス I II エピトープコード核酸配列（例えば、ユニバーサルな MHC クラス I II エピトープコード核酸配列）である。ユニバーサル配列は、破傷風トキソイド及び PADRE の少なくとも一方を含むことができる。ユニバーサル配列は、破傷風トキソイドペプチドを含むことができる。ユニバーサル配列は、PADRE ペプチドを含むことができる。ユニバーサル配列は、破傷風トキソイド及び PADRE ペプチドを含むことができる。]。組成物及び順序付けられた配列は、存在する要素の数を選択することによってさらに定義することができ、例えば、a = 0 または 1 である場合、b = 0 または 1 である場合、c = 1 である場合、d = 0 または 1 である場合、e = 0 または 1 である場合、f = 1 である場合、g = 0 または 1 である場合、h = 0 または 1 である場合、X = 1～400 であり、Y = 0、1、2、3、4 または 5 であり、Z = 1～400 であり、かつ W = 0、1、2、3、4 または 5 である。

30

40

【0315】

1つの例では、存在する要素は、a = 0、b = 1、d = 1、e = 1、g = 1、h = 0、X = 10、Y = 2、Z = 1、かつ W = 1 であり、さらなるプロモーターが存在しない場合が記述される場合（例えば、RNA アルファウイルス骨格などのベクター骨格によって与えられるプロモーターヌクレオチド配列のみが存在する）、10個の MHC クラス I エピ

50

トープが存在し、各 N について 5' リンカーが存在し、各 N について 3' リンカーが存在し、2 個の MHC クラス II エピトープが存在し、2 個の MHC クラス II エピトープを連結するリンカーが存在し、2 個の MHC クラス II エピトープの 5' 末端を最後の MHC クラス II エピトープの 3' リンカーに連結するリンカーが存在し、2 個の MHC クラス II エピトープの 3' 末端をベクター骨格（例えば、RNA アルファウイルス骨格）に連結するリンカーが存在する。抗原カセットの 3' 末端の、ベクター骨格（例えば、RNA アルファウイルス骨格）との連結の例としては、3' の 19 nt の CSE のような、ベクター骨格によって与えられる 3' UTR 要素に直接連結することが挙げられる。抗原カセットの 5' 末端の、ベクター骨格（例えば、RNA アルファウイルス骨格）との連結の例としては、サブゲノミックプロモーター配列（例えば、26S サブゲノミックプロモーター配列）、アルファウイルスの 5' UTR、51 nt の CSE、または 24 nt の CSE などのベクター骨格のプロモーターまたは 5' UTR エlement に直接連結することが挙げられる。

10

【0316】

他の例としては、 $a = 1$ であり、ベクター骨格（例えば、RNA アルファウイルス骨格）によって与えられるプロモーターヌクレオチド配列以外のプロモーターが存在する場合が記述される場合； $a = 1$ かつ Z が 1 よりも大きく、それぞれが 1 つ以上の異なる MHC クラス II エピトープコード核酸配列の発現をもたらす、ベクター骨格によって与えられるプロモーターヌクレオチド配列以外の複数のプロモーターが存在する場合； $h = 1$ であり、MHC クラス II エピトープコード核酸配列の発現をもたらす別のプロモーターが存在することが記述される場合；及び、 $g = 0$ であり、MHC クラス II エピトープコード核酸配列（存在する場合）がベクター骨格（例えば、RNA アルファウイルス骨格）に直接連結される場合などが挙げられる。

20

【0317】

他の例としては、存在する各 MHC クラス II エピトープが、5' リンカーを有する、3' リンカーを有する、どちらも有さない、または両方を有する場合が挙げられる。複数の MHC クラス II エピトープが同じ抗原カセット内に存在する例では、一部の MHC クラス II エピトープが 5' リンカー及び 3' リンカーの両方を有してよく、他の MHC クラス II エピトープが、5' リンカーまたは 3' リンカーを有するか、またはどちらも有さなくてもよい。複数の MHC クラス II エピトープが同じ抗原カセット内に存在するその他の例では、一部の MHC クラス II エピトープが 5' リンカーまたは 3' リンカーのどちらかを有してよく、他の MHC クラス II エピトープが 5' リンカーまたは 3' リンカーを有するか、またはどちらも有さなくてもよい。

30

【0318】

複数の MHC クラス II エピトープが同じ抗原カセット内に存在する例では、一部の MHC クラス II エピトープが 5' リンカー及び 3' リンカーの両方を有してよく、他の MHC クラス II エピトープが 5' リンカーまたは 3' リンカーを有するか、またはどちらも有さなくてもよい。複数の MHC クラス II エピトープが同じ抗原カセット内に存在するその他の例では、一部の MHC クラス II エピトープが 5' リンカーまたは 3' リンカーのどちらかを有してよく、他の MHC クラス II エピトープが 5' リンカーまたは 3' リンカーを有するか、またはどちらも有さなくてもよい。

40

【0319】

他の例としては、存在する各抗原が、5' リンカーを有する、3' リンカーを有する、どちらも有さない、または両方を有する場合が挙げられる。複数の抗原が同じ抗原カセット内に存在する例では、一部の抗原が 5' リンカー及び 3' リンカーの両方を有してよく、他の抗原が、5' リンカーまたは 3' リンカーを有するか、またはどちらも有さなくてもよい。複数の抗原が同じ抗原カセット内に存在するその他の例では、一部の抗原が 5' リンカーまたは 3' リンカーのどちらかを有してよく、他の抗原が 5' リンカーまたは 3' リンカーを有するか、またはどちらも有さなくてもよい。

【0320】

50

プロモーターヌクレオチド配列 P 及び／または P 2 は、RNA アルファウイルス骨格などのベクター骨格によって与えられるプロモーターヌクレオチド配列と同じであってよい。例えば、ベクター骨格によって与えられるプロモーター配列である P n 及び P 2 が、それぞれサブゲノミックプロモーター配列（例えば、26S サブゲノミックプロモーター配列）または CMV プロモーターを含むことができる。プロモーターヌクレオチド配列 P 及び／または P 2 は、ベクター骨格（例えば、RNA アルファウイルス骨格）によって与えられるプロモーターヌクレオチド配列と異なってもよく、また、互いと異なってもよい。

【0321】

5' リンカー L 5 は、天然配列または非天然配列であってよい。非天然配列としては、これらに限定されるものではないが、AA Y、RR、及び D P P が挙げられる。3' リンカー L 3 もまた、天然配列または非天然配列であってよい。さらに、L 5 及び L 3 は、いずれも天然配列であってよく、いずれも非天然配列であってよく、または一方が天然で他方が非天然であってよい。各 X について、アミノ酸リンカーは、アミノ酸 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、20 個、21 個、22 個、23 個、24 個、25 個、26 個、27 個、28 個、29 個、30 個、31 個、32 個、33 個、34 個、35 個、36 個、37 個、38 個、39 個、40 個、41 個、42 個、43 個、44 個、45 個、46 個、47 個、48 個、49 個、50 個、51 個、52 個、53 個、54 個、55 個、56 個、57 個、58 個、59 個、60 個、61 個、62 個、63 個、64 個、65 個、66 個、67 個、68 個、69 個、70 個、71 個、72 個、73 個、74 個、75 個、76 個、77 個、78 個、79 個、80 個、81 個、82 個、83 個、84 個、85 個、86 個、87 個、88 個、89 個、90 個、91 個、92 個、93 個、94 個、95 個、96 個、97 個、98 個、99 個、100 個、またはそれ以上の長さであってよい。各 X について、アミノ酸リンカーはまた、アミノ酸が少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、少なくとも 10 個、少なくとも 11 個、少なくとも 12 個、少なくとも 13 個、少なくとも 14 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、少なくとも 20 個、少なくとも 21 個、少なくとも 22 個、少なくとも 23 個、少なくとも 24 個、少なくとも 25 個、少なくとも 26 個、少なくとも 27 個、少なくとも 28 個、少なくとも 29 個、または少なくとも 30 個の長さであってよい。

【0322】

各 Y について、アミノ酸リンカー G 5 は、アミノ酸 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、20 個、21 個、22 個、23 個、24 個、25 個、26 個、27 個、28 個、29 個、30 個、31 個、32 個、33 個、34 個、35 個、36 個、37 個、38 個、39 個、40 個、41 個、42 個、43 個、44 個、45 個、46 個、47 個、48 個、49 個、50 個、51 個、52 個、53 個、54 個、55 個、56 個、57 個、58 個、59 個、60 個、61 個、62 個、63 個、64 個、65 個、66 個、67 個、68 個、69 個、70 個、71 個、72 個、73 個、74 個、75 個、76 個、77 個、78 個、79 個、80 個、81 個、82 個、83 個、84 個、85 個、86 個、87 個、88 個、89 個、90 個、91 個、92 個、93 個、94 個、95 個、96 個、97 個、98 個、99 個、100 個、またはそれ以上の長さであってよい。各 Y について、アミノ酸リンカーはまた、アミノ酸が少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、少なくとも 10 個、少なくとも 11 個、少なくとも 12 個、少なくとも 13 個、少なくとも 14 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、少なくとも 20 個、少なくとも 21 個、少なくとも 22 個、少なくとも 23 個、少なくとも 24 個、少なくとも 25 個、少なくとも 26 個、少なくとも 27 個、少なくとも 28 個

、少なくとも 29 個、または少なくとも 30 個の長さであってもよい。

【0323】

アミノ酸リンカー G3 は、アミノ酸 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、20 個、21 個、22 個、23 個、24 個、25 個、26 個、27 個、28 個、29 個、30 個、31 個、32 個、33 個、34 個、35 個、36 個、37 個、38 個、39 個、40 個、41 個、42 個、43 個、44 個、45 個、46 個、47 個、48 個、49 個、50 個、51 個、52 個、53 個、54 個、55 個、56 個、57 個、58 個、59 個、60 個、61 個、62 個、63 個、64 個、65 個、66 個、67 個、68 個、69 個、70 個、71 個、72 個、73 個、74 個、75 個、76 個、77 個、78 個、79 個、80 個、81 個、82 個、83 個、84 個、85 個、86 個、87 個、88 個、89 個、90 個、91 個、92 個、93 個、94 個、95 個、96 個、97 個、98 個、99 個、100 個、またはそれ以上の長さであってもよい。G3 はまた、アミノ酸が少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、少なくとも 10 個、少なくとも 11 個、少なくとも 12 個、少なくとも 13 個、少なくとも 14 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、少なくとも 20 個、少なくとも 21 個、少なくとも 22 個、少なくとも 23 個、少なくとも 24 個、少なくとも 25 個、少なくとも 26 個、少なくとも 27 個、少なくとも 28 個、少なくとも 29 個、または少なくとも 30 個の長さであってもよい。

【0324】

各 X について、各 N は、MHC クラス I エピトープ、MHC クラス II エピトープ、B 細胞応答を刺激することができるエピトープ／抗原、またはこれらの組み合わせをコードすることができる。各 X について、各 N は、MHC クラス I エピトープ、MHC クラス II エピトープ、及び B 細胞応答を刺激することができるエピトープ／抗原の組み合わせをコードすることができる。各 X について、各 N は、MHC クラス I エピトープと MHC クラス II エピトープとの組み合わせをコードすることができる。各 X について、各 N は、MHC クラス I エピトープと B 細胞応答を刺激することができるエピトープ／抗原との組み合わせをコードすることができる。各 X について、各 N は、MHC クラス II エピトープと B 細胞応答を刺激することができるエピトープ／抗原との組み合わせをコードすることができる。各 X について、各 N は、B 細胞応答を刺激することができるエピトープ／抗原をコードすることができる。各 X について、各 N は、アミノ酸 7～15 個の長さの MHC クラス I エピトープをコードすることができる。各 X について、各 N は、アミノ酸 5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、20 個、21 個、22 個、23 個、24 個、25 個、26 個、27 個、28 個、29 個、または 30 個の長さの MHC クラス I エピトープをコードしてもよい。各 X について、各 N はまた、アミノ酸が少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、少なくとも 10 個、少なくとも 11 個、少なくとも 12 個、少なくとも 13 個、少なくとも 14 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、少なくとも 20 個、少なくとも 21 個、少なくとも 22 個、少なくとも 23 個、少なくとも 24 個、少なくとも 25 個、少なくとも 26 個、少なくとも 27 個、少なくとも 28 個、少なくとも 29 個、または少なくとも 30 個の長さの MHC クラス I エピトープをコードしてもよい。

【0325】

1 つ以上の抗原をコードするカセットは、700 ヌクレオチド以下であってもよい。1 つ以上の抗原をコードするカセットは、700 ヌクレオチド以下であってもよく、2 個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる（例えば、免疫原性ポリペプチドをコードする 2 個の異なる感染症または腫瘍由来核酸配列をコードする）。1 つ以上の抗

原をコードするカセットは、700ヌクレオチド以下であってよく、少なくとも2個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。1つ以上の抗原をコードするカセットは、700ヌクレオチド以下であってよく、3個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。1つ以上の抗原をコードするカセットは、700ヌクレオチド以下であってよく、少なくとも3個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。1つ以上の抗原をコードするカセットは、700ヌクレオチド以下であってよく、1～10個、1～5個、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれよりも多い抗原を含むことができる。

【0326】

1つ以上の抗原をコードするカセットは、375～700ヌクレオチドの長さであってよい。1つ以上の抗原をコードするカセットは、375～700ヌクレオチドの長さであってよく、2個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる（例えば、免疫原性ポリペプチドをコードする2個の異なる感染症または腫瘍由来の核酸配列をコードする）。1つ以上の抗原をコードするカセットは、375～700ヌクレオチドの長さであってよく、少なくとも2個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。1つ以上の抗原をコードするカセットは、375～700ヌクレオチドの長さであってよく、3個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。1つ以上の抗原をコードするカセットは、375～700ヌクレオチドの長さであってよく、少なくとも3個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。1つ以上の抗原をコードするカセットは、375～700ヌクレオチドの長さであってよく、1～10個、1～5個、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれよりも多い抗原を含むことができる。

【0327】

1つ以上の抗原をコードするカセットは、600、500、400、300、200、または100ヌクレオチド以下の長さであってよい。1つ以上の抗原をコードするカセットは、600、500、400、300、200、または100ヌクレオチド以下の長さであってよく、2個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。1つ以上の抗原をコードするカセットは、600、500、400、300、200、または100ヌクレオチド以下の長さであってよく、少なくとも2個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。1つ以上の抗原をコードするカセットは、600、500、400、300、200、または100ヌクレオチド以下の長さであってよく、3個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。1つ以上の抗原をコードするカセットは、600、500、400、300、200、または100ヌクレオチド以下の長さであってよく、少なくとも3個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。1つ以上の抗原をコードするカセットは、600、500、400、300、200、または100ヌクレオチド以下の長さであってよく、1～10個、1～5個、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれよりも多い抗原を含むことができる。

【0328】

1つ以上の抗原をコードするカセットは、375～600、375～500、または375～400ヌクレオチドの長さであってよい。1つ以上の抗原をコードするカセットは、375～600、375～500、または375～400ヌクレオチドの長さであってよく、2個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。1つ以上の抗原をコードするカセットは、375～600、375～500、または375～400ヌクレオチドの長さであってよく、少なくとも2個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。1つ以上の抗原をコードするカセットは、375～600、375～500、または375～400ヌクレオチドの長さであってよく、3個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。1つ以上の抗原をコードするカセットは、375～600、375～500、または375～400ヌクレオチドの長さであってよく、少なくとも3個の異なるエピトープコード核酸配列をコードすることができる。

1つ以上の抗原をコードするカセットは、375～600、375～500、または375～400ヌクレオチドの長さであってよく、1～10個、1～5個、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれよりも多い抗原を含むことができる。

【0329】

場合によって、さらなる抗原及び／またはエピトープをコードするカセット内の抗原またはエピトープは、コードされた他のエピトープに対して免疫優性なエピトープであってよい。一般的に、免疫優性とは、1個または数個のみの特定の免疫原性ペプチドに対する免疫応答の偏りである。免疫優性は、免疫モニタリングのプロトコールの一環として評価することができる。例えば、免疫優性は、コードされた抗原に対するT細胞及び／またはB細胞応答を評価することにより評価することができる。

10

【0330】

免疫優性は、免疫優性抗原の存在が、1つ以上の他の抗原に対する免疫応答に与える影響として評価することができる。例えば、免疫優性抗原及びその対応する免疫応答（例えば、免疫優性MHCクラスIエピトープ）は、別の抗原の免疫応答を、免疫優性抗原の非存在下での免疫応答と比較して減少させ得る。この減少は、免疫優性抗原の存在下での免疫応答が治療的に有効な応答とみなされないようなものでありうる。例えば、MHCクラスIエピトープは、他の抗原に対するT細胞応答が、免疫優性なMHCクラスIエピトープの非存在下で誘導される応答と比較して治療的に有効な応答とはみなされなくなった場合に一般的に免疫優性とみなされる。免疫応答は、免疫優性抗原の非存在下での応答と比較して検出限界未満または検出限界近くまで減少されてもよい。例えば、MHCクラスIエピトープは、他の抗原に対するT細胞応答が、免疫優性なMHCクラスIエピトープの非存在下で誘導される応答と比較して検出限界以下である場合に一般的に免疫優性とみなされる。一般的に、免疫優性の評価は、それぞれ各エピトープを提示することが分かっているかまたは予測されている同種MHCアレルを保有する対象に投与されるワクチン組成物中の、どちらも免疫応答を刺激することができる2つの抗原間、例えば、2つのT細胞エピトープ間で行われる。免疫優性は、疑われる免疫優性抗原の存在下及び非存在下での他の抗原に対する相対免疫優性により評価することができる。

20

【0331】

免疫優性は、2つ以上の抗原間の免疫応答の相対差として評価することができる。免疫優性は、同じカセット内にコードされた別の抗原に対して、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、または50倍の特定の抗原の免疫応答を指し得る。免疫優性は、同じカセット内にコードされた別の抗原に対して、100倍、200倍、300倍、400倍、または500倍の特定の抗原の免疫応答を指し得る。免疫優性は、同じカセット内にコードされた別の抗原に対して、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、または5000倍の特定の抗原の免疫応答を指し得る。免疫優性は、同じカセット内にコードされた別の抗原に対して、10,000倍の特定の抗原の免疫応答を指し得る。

30

【0332】

場合によっては、免疫優性なエピトープを含むワクチン組成物は避けることが望ましい場合もある。例えば、免疫優性なエピトープをコードしたワクチンカセットの設計は避けることが望ましい場合もある。理論に束縛されることを望むものではないが、免疫優性なエピトープをさらなるエピトープと一緒に投与及び／またはコードすると、さらなるエピトープに対する免疫応答が低下する場合があります。さらなるエピトープに対するワクチン有効性が最終的に低下する可能性がある。例示的な非限定例として、TP53関連ネオエピトープを含むワクチン組成物は、ワクチン組成物中の他の抗原またはエピトープ（例えば、配列番号75～82に示されるKRAS関連MHCクラスIネオエピトープのいずれかなどのワクチン組成物中の1つ以上のKRAS関連ネオエピトープ）に負の影響を及ぼすようにTP53関連ネオエピトープの方向に偏った（例えば、免疫応答が治療的に有効な応答でなくなるところまで、及び／または検出限界未満まで免疫応答を低下させる）免疫応答、例えばT細胞応答を有し得る。したがって、ワクチン組成物を、免疫優性なエピトープをコードしないワクチンカセット（例えば、（ネオ）抗原コードカセット）を設計す

40

50

るなど、免疫優性なエピトープを含まないように設計することができる。例えば、カセットは、免疫優性なMHCクラスIエピトープの非存在下で他のエピトープが投与された場合の免疫応答と比較して、ワクチン組成物中で対象に投与された場合にカセット内にコードされた別のエピトープに対する免疫応答を低下させるエピトープをコードしない。別の例では、カセットは、免疫優性なMHCクラスIエピトープの非存在下で他のエピトープが投与された場合の免疫応答と比較して、ワクチン組成物中で対象に投与された場合にカセット内にコードされた別のエピトープに対する免疫応答を検出限界未満まで低下させるエピトープをコードしない。別の例では、カセットは、各抗原が対象の免疫応答を刺激することができる場合にワクチン組成物中で対象に投与される同じカセット内にコードされた別のエピトープに対して5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、または50倍、またはそれ以上高い免疫応答を刺激するエピトープをコードしない。別の例では、カセットは、各抗原が対象の免疫応答を刺激することができる場合にワクチン組成物中で対象に投与される同じカセット内にコードされた別のエピトープに対して100倍、200倍、300倍、400倍、または500倍、またはそれ以上高い免疫応答を刺激するエピトープをコードしない。別の例では、カセットは、各抗原が対象の免疫応答を刺激することができる場合にワクチン組成物中で対象に投与される同じカセット内にコードされた別のエピトープに対して1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、または5000倍、またはそれ以上高い免疫応答を刺激するエピトープをコードしない。別の例では、カセットは、各抗原が対象の免疫応答を刺激することができる場合にワクチン組成物中で対象に投与される同じカセット内にコードされた別のエピトープに対して10,000倍、またはそれ以上高い免疫応答をもたらすエピトープをコードしない。

10

20

30

40

50

【0333】

V. B. 免疫調節因子

本明細書に記載されるベクター、例えば本明細書に記載されるC68ベクター、または本明細書に記載されるアルファウイルスベクターは少なくとも1つの抗原をコードする核酸を含むことができ、また、同じまたは別のベクターが、少なくとも1つの免疫調節因子をコードする核酸を含むことができる。免疫調節因子は、免疫チェックポイント分子に結合してその活性を遮断する結合分子（例えばscFvなどの抗体）を含むことができる。免疫調節因子は、IL-2、IL-7、IL-12（IL-12 p35、p40、p70、及び／またはp70融合コンストラクトを含む）、IL-15、またはIL-21などのサイトカインを含むことができる。免疫調節因子は、修飾サイトカイン（例えば、pegIL-2）を含むことができる。ベクターは、抗原カセットと、免疫調節因子をコードする1つ以上の核酸分子とを含むことができる。

【0334】

遮断または阻害するための標的となりうる例示的な免疫チェックポイント分子としては、これらに限定されるものではないが、CTLA-4、4-1BB（CD137）、4-1BBL（CD137L）、PD-L1、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、TIM3、B7H3、B7H4、VISTA、KIR、2B4（CD2ファミリーの分子に属し、すべてのNK（ $\gamma\delta$ ）及びメモリーCD8+（ $\alpha\beta$ ）T細胞で発現する）、CD160（BY55とも呼ばれる）、及びCGEN-15049が挙げられる。免疫チェックポイント阻害剤には、CTLA-4、PD-L1、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、TIM3、B7H3、B7H4、VISTA、KIR、2B4、CD160、及びCGEN-15049の1つ以上に結合してその活性を遮断または阻害する抗体、またはその抗原結合フラグメント、または他の結合タンパク質が挙げられる。例示的な免疫チェックポイント阻害剤としては、トレメリムマブ（CTLA-4

遮断抗体)、抗OX40、PD-L1モノクローナル抗体(抗B7-H1; MEDI4736)、イピリムマブ、MK-3475 (PD-1 blocker)、ニボルマブ(抗PD1抗体)、セミブリマブ(抗PD1抗体)、CT-011(抗PD1抗体)、BY55モノクローナル抗体、AMP224(抗PDL1抗体)、BMS-936559(抗PDL1抗体)、MPLDL3280A/アテゾリズマブ(抗PDL1抗体)、MSB0010718C(抗PDL1抗体)、及びヤーボイ/イピリムマブ(抗CTLA-4チェックポイント阻害剤)が挙げられる。抗体をコードする配列は、当該技術分野における通常の技能を用いてベクターに操作により組み込むことができる。例示的な方法の1つが、あらゆる目的で参照により本明細書に援用する、Fang et al., Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. Nat Biotechnol. 2005 May; 23(5): 584-90. Epub 2005 Apr 17に記載されている。

10

【0335】

V. C. ワクチン設計及び製造のさらなる考慮事項

V. C. 1. すべての腫瘍サブクローンのカバーするペプチドのセットの決定

すべてまたは大部分の腫瘍サブクローンによって提示されるペプチドを意味する躯幹ペプチド(truncal peptide)を、ワクチンに含めるために優先順位付けることができる。任意で、高確率で提示され、免疫原性であると予測される躯幹ペプチドが存在しない場合、または高確率で提示され、免疫原性であると予測される躯幹ペプチドの数が、さらなる非躯幹ペプチドをワクチンに含めることができるだけ十分に小さい場合、ワクチンによって包含される腫瘍サブクローンの数が最大となるように腫瘍サブクローンの数及び種類を推定し、ペプチドを選択することによってさらなるペプチドを順位付けることができる。

20

【0336】

V. C. 2. 抗原の優先順位決定

上記の抗原フィルターのすべてが適用された後、ワクチン技術が対応できるよりも多くの候補抗原が、ワクチン包含になおも利用可能である可能性がある。追加的に、抗原解析の種々の態様についての不確定度が残っている可能性があり、候補ワクチン抗原の様々な性状の間にトレードオフが存在する可能性がある。したがって、選択プロセスの各段階でのあらかじめ決定されたフィルターの代わりに、少なくとも以下の軸を有する空間に候補抗原を置き、積分アプローチを用いて選択を最適化する、積分多次元モデルを考えることができる。

30

1. 自己免疫または寛容のリスク(生殖細胞系列のリスク)(より低い自己免疫のリスクが、典型的に好ましい)

2. シークエンシングアーチファクトの確率(より低いアーチファクトの確率が、典型的に好ましい)

3. 免疫原性の確率(より高い免疫原性の確率が、典型的に好ましい)

4. 提示の確率(より高い提示の確率が、典型的に好ましい)

5. 遺伝子発現(より高い発現が、典型的に好ましい)

40

6. HLA遺伝子のカバレッジ(抗原のセットの提示に関与する、より多い数のHLA分子は、腫瘍が、HLA分子の下方制御または変異を介して免疫攻撃を回避するであろう確率を低くする可能性がある)

7. HLAクラスのカバレッジ(HLA-I及びHLA-IIの両方をカバーすることで、治療応答の確率が高まり、腫瘍の回避の確率が低くなる可能性がある)

【0337】

さらに、場合によっては、抗原が、患者の腫瘍のすべてまたは一部において喪失するかまたは不活性化されたHLAアレルによって提示されることが予想される場合には、抗原のワクチン接種における優先順位を下げる(例えば除外)することができる。HLAアレルの喪失は、体細胞変異、ヘテロ接合性の喪失、または遺伝子座のホモ接合欠失のいずれ

50

かによって生じうる。HLAアレルの体細胞変異の検出方法は当該技術分野では周知のものである（例えば、Shukla et al., 2015）。体細胞LOH及びホモ接合欠失（HLA遺伝子座を含む）の検出方法についても同様に述べられている（Carter et al., 2012; McGranahan et al., 2017; Van Loo et al., 2010）。抗原は、質量分析データが、予測された抗原が予測されたHLAアレルによって提示されないことを示す場合には優先順位付けを外してもよい。

【0338】

V. D. アルファウイルス

V. D. 1. アルファウイルスの生物学

アルファウイルスは、トガウイルス科のメンバーであり、一本鎖プラス鎖RNAウイルスである。メンバーは、一般的に、シンドビス、ロスリバー、マヤロ、チクングニア、及びセムリキ森林ウイルスなどの旧世界型、または、東部ウマ脳炎ウイルス、アウラ、フォートモルガン、もしくはベネズエラウマ脳炎ウイルス及びその誘導株TC-83などの新世界型に分類される（Strauss Microbial Review 1994）。天然のアルファウイルスゲノムは、通常、長さ約12 kbであり、その最初の2/3は、ウイルスゲノムを自己複製するためのRNA複製複合体を形成する非構造タンパク質（nsP）をコードする遺伝子を含んでおり、最後の1/3は、ビリオンを産生するための構造タンパク質をコードするサブゲノム発現カセットを含んでいる（Frollov RNA 2001）。

【0339】

アルファウイルスのモデル生活環は、複数の異なるステップを含む（Strauss Microbial Review 1994, Jose Future Microbiol 2009）。宿主細胞にウイルスが吸着した後、ビリオンが細胞内区画内の膜と融合し、最終的にゲノムRNAをサイトゾル中に放出する。プラス鎖の向きを有し、5'末端のメチルグアニル酸キャップ及び3'末端のポリAテールを有するゲノムRNAは、翻訳されて非構造タンパク質nsP1-4を生成し、これが複製複合体を形成する。感染初期には、プラス鎖はこの複合体によってマイナス鎖の鋳型に複製される。現在のモデルでは、複製複合体は感染が進行するにつれてさらにプロセッシングされ、生じたプロセス後の複合体はマイナス鎖の完全長プラス鎖ゲノムRNA及び構造遺伝子を含む26Sのサブゲノムプラス鎖RNAへの転写に切り替わる。アルファウイルスのいくつかの保存配列エレメント（CSE）が、マイナス鎖鋳型からのプラス鎖RNAの複製における5'UTRの相補体、ゲノム鋳型からのマイナス鎖合成の複製における51 ntのCSE、マイナス鎖からのサブゲノムRNAの転写におけるnsPと26S RNAとのジャンクション領域内の24 ntのCSE、及び、プラス鎖鋳型からのマイナス鎖合成における3'末端の19 ntのCSEを含む様々なRNA合成ステップにおいて潜在的に一定の役割を担っているものとして同定されている。

【0340】

ウイルスの自然の生活環では、異なるRNA種の複製後、ウイルス粒子が通常、アセンブルされる。26S RNAは翻訳され、生じたタンパク質はさらにプロセッシングされて、カプシドタンパク質、糖タンパク質E1及びE2、ならびに2種類の小ポリペプチドE3及び6Kを含む構造タンパク質を生成する（Strauss 1994）。ウイルス粒子のカプシド形成が生じ、通常はゲノムRNAのみに特異的なカプシドタンパク質がパッケージングされた後、ビリオンがアセンブルされ、膜表面に出芽する。

【0341】

V. D. 2. 送達ベクターとしてのアルファウイルス

アルファウイルス（アルファウイルス配列、特徴、及び、他の要素）を使用してアルファウイルスベースの送達ベクター（アルファウイルスベクター、アルファウイルスウイルスベクター、アルファウイルスワクチンベクター、自己複製RNA（srRNA）ベクター、または自己増幅mRNA（SAM）ベクターもしくはsamRNAベクターとも称さ

れる)を作製することができる。アルファウイルスは、発現ベクター系として使用するために従来、遺伝子操作がなされている(Pushko 1997, Rheme 2004)。アルファウイルスは、異種抗原の発現が望ましい場合があるワクチン設定においていくつかの長所を有する。アルファウイルスは、宿主のサイトソル中で自己複製するその能力のため、細胞内の発現カセットの高いコピー数を一般的に得ることができることから、高いレベルの異種抗原の産生を実現することができる。さらに、ベクターは一般的に一過性であるため、バイオセーフティーが高く、ベクターに対する免疫寛容の誘導は低い。また、一般公衆は、一般的にヒトアデノウイルスのような他の標準的ウイルスベクターと比較してアルファウイルスに対する既存の免疫を有していない。アルファウイルスに基づくベクターはまた、感染細胞に対する細胞傷害性反応を一般的に生じる。細胞傷害性は、発現された異種抗原に対する免疫応答を適性に刺激するためにワクチン設定においてある程度の重要性を有しうる。しかしながら、所望の細胞傷害性の程度はバランスの問題であり、そのため、VEEのTC-83株をはじめとするいくつかの弱毒化されたアルファウイルスが開発されている。したがって、本明細書に記載される抗原発現ベクターの一例では、高いレベルの抗原発現を可能とし、抗原に対する強い免疫応答を刺激し、ベクター自体に対する免疫応答は刺激せず、安全に使用することができるアルファウイルス骨格を用いることができる。さらに、抗原発現カセットは、ベクターが、VEEまたはその弱毒化誘導株TC-83に由来する配列を含む(ただしこれらに限定されない)どのアルファウイルス配列を用いるかを最適化することを通じて異なるレベルの免疫応答を刺激するように設計することができる。

10

20

【0342】

アルファウイルス配列を用いたいくつかの発現ベクターの設計戦略が開発されている(Pushko 1997)。1つの戦略では、アルファウイルスベクターの設計は、構造タンパク質遺伝子の下流に26Sプロモーター配列因子の第2のコピーを挿入した後、異種遺伝子を挿入することを含む(Frollov 1993)。これにより、天然の非構造及び構造タンパク質以外に、さらなる異種タンパク質を発現するサブゲノムRNAが産生される。このシステムでは、感染性ビリオンを産生するためのすべての因子が存在し、したがって、非感染細胞において発現ベクターの繰り返しの感染のラウンドが行われうる。

【0343】

別の発現ベクターの設計では、ヘルパーウイルスシステムを利用する(Pushko 1997)。この戦略では、構造タンパク質は異種遺伝子によって置換される。したがって、依然としてインタクトな非構造遺伝子によって媒介されるウイルスRNAの自己複製の後、26SサブゲノムRNAが異種タンパク質の発現をもたらす。従来、構造タンパク質を発現するさらなるベクターが、例えば、細胞株の同時トランスフェクションなどによってイン・トランスで与えられることで感染性ウイルスを生じる。1つのシステムが米国特許第8,093,021号に記載されており、当該特許の全容をあらゆる目的で参照によって本明細書に援用する。ヘルパーベクターシステムは、感染性粒子を形成する可能性を制限するという長所をもたらし、したがってバイオセーフティーを改善する。さらに、ヘルパーベクターシステムは、全ベクター長を短縮し、複製及び発現の効率を改善する可能性がある。したがって、本明細書に記載される抗原発現ベクターの一例では、構造タンパク質が抗原カセットで置換されたアルファウイルス骨格を用いることができ、得られるベクターはバイオセーフティーの問題が低減されるのと同時に全体的な発現ベクターのサイズの減少により、効率的な発現を促進する。

30

40

【0344】

V. D. 3. インビトロでのアルファウイルスの生成

アルファウイルス送達ベクターは一般的に、プラスセンスRNAポリヌクレオチドである。RNA生成のための当該技術分野では周知の従来する方法として、インビトロ翻訳(IVT)がある。この方法では、所望のベクターのDNA鋳型が、クローニング、制限消化、ライゲーション、遺伝子合成(例えば、化学的及び/または酵素的合成)、及びポリメラーゼ連鎖反応(PCR)などの標準的な分子生物学的方法を含む当該技術分野では周知

50

の方法によって最初に生成される。このDNA鋳型は、RNAに転写されることが望ましい配列の5'末端にRNAポリメラーゼのプロモーターを有している。プロモーターとしては、これらに限定されるものではないが、T3、T7、またはSP6などのバクテリオファージポリメラーゼのプロモーターが挙げられる。次に、DNA鋳型は、適当なRNAポリメラーゼ酵素、バッファー剤、及びヌクレオチド（NTP）とインキュベートされる。得られたRNAポリヌクレオチドは、7-メチルグアノシンまたは関連する構造などの5'キャップ構造の付加、及び任意でポリアデニル化（ポリA）テールを有するように3'末端を改変することを含む（ただしこれらに限定されない）方法によって、任意でさらに改変することができる。次に、RNAをフェノールクロロホルム抽出またはカラム精製（例えば、クロマトグラフィーベースの精製）などの当該技術分野では周知の方法を用いて精製することができる。

10

【0345】

V. D. 4. 脂質ナノ粒子による送達

ワクチンベクターの設計において考慮すべき重要な側面の1つとして、ベクター自体に対する免疫がある（Riley 2017）。これは、例えば特定のヒトアデノウイルス系などのベクター自体に対する既存の免疫の形である場合もあり、またはワクチンの投与後に生じるベクターに対する免疫の形である場合もある。後者は、例えば別々のプライミング及びブースター投与のように同じワクチンの複数回の投与が行われる場合、または異なる抗原カセットを送達するために同じワクチンベクターシステムが用いられるような場合に重要な考慮事項となる。

20

【0346】

アルファウイルスベクターの場合では、標準的な送達方法は、カプシド、E1、及びE2タンパク質をイン・トランスで与えることによって感染性のウイルス粒子を生じる上記に述べたヘルパーウイルスシステムである。しかしながら、E1及びE2タンパク質は、しばしば中和抗体の主要な標的である点に留意することが重要である（Strauss 1994）。したがって、対象とする抗原を標的細胞に送達するためにアルファウイルスベクターを使用することの有効性は、感染性粒子が中和抗体の標的とされる場合に低下する可能性がある。

【0347】

ウイルス粒子を媒介とした遺伝子送達の代替的手法として、ナノ粒子を用いた発現ベクターの送達がある（Riley 2017）。重要な点として、ナノ材料担体は、非免疫原性材料で形成することができ、送達ベクター自体に対する免疫の誘導を一般的に回避することができる。これらの材料としては、これらに限定されるものではないが、脂質、無機ナノ材料、及び他のポリマー材料を挙げることができる。脂質は、カチオン性、アニオン性、または中性であってよい。かかる材料は、合成または天然由来のものであってよく、特定の例では生分解性であってよい。脂質は、脂肪、コレステロール、リン脂質、ポリエチレングリコール（PEG）複合体（PEG化脂質）を含む（ただしこれに限定されない）脂質複合体、ワックス、油類、グリセリド、及び脂溶性ビタミンを含みうる。

30

【0348】

脂質ナノ粒子（LNP）は、膜及び小胞状構造の形成を可能とする脂質の両親媒性の性質のために魅力的な送達システムである（Riley 2017）。一般的にこれらの小胞は、標的細胞の膜内に吸収され、サイトゾル中に核酸を放出することによって発現ベクターを送達する。さらに、LNPは特定の細胞種のターゲティングを促すようにさらに改変または官能化することができる。LNPの設計における別の考慮事項は、ターゲティングの効率と細胞傷害性との間のバランスである。脂質の組成は一般的に、カチオン性、中性、アニオン性、及び両親媒性脂質の規定の混合物を含む。いくつかの例では、LNPの凝集を防止するか、脂質の酸化を防止するか、またはさらなる部分の付着を促す化学官能基を与えるために特定の脂質が含まれる。脂質の組成は、全体のLNPのサイズ及び安定性に影響しうる。1つの例では、脂質の組成は、ジリノレイルメチルー4-ジメチルアミノブチレート（MC3）またはMC3様分子を含む。MC3及びMC3様脂質の組成物は

40

50

、例えばPEGまたはPEG複合化脂質、ステロール、または中性脂質などの1種類以上の他の脂質を含むように製剤化することができる。

【0349】

血清に直接曝露された発現ベクターなどの核酸ベクターは、血清中のヌクレアーゼによる核酸の分解、または遊離核酸による免疫系のオフターゲットの刺激を含むいくつかの望ましくない影響を有しうる。したがって、アルファウイルスベクターの封入を利用して分解を防止する一方で、潜在的なオフターゲット効果も防止することができる。特定の例では、アルファウイルスベクターは、LNPの水性の内部など、送達担体内に完全に封入される。LNP内へのアルファウイルスベクターの封入は、微小流体液滴生成装置で行われる微小流体混合及び液滴生成などの当該技術分野では周知の方法によって実施することができる。かかる装置としては、これらに限定されるものではないが、標準的なTジャンクション装置またはフローフォーカシング装置が挙げられる。1つの例では、MC3またはMC3様分子含有組成物などの所望の脂質製剤を、アルファウイルス送達ベクター及び他の所望の物質と並行して液滴生成装置に供給することで、送達ベクター及び所望の物質がMC3またはMC3様分子ベースのLNPの内部に完全に封入される。1つの例では、液滴生成装置は、生成されたLNPの粒径範囲及び粒度分布を制御することができる。例えば、LNPは、直径1〜1000nmの範囲の粒径、例えば、1、10、50、100、500、または1000nmの粒径を有することができる。液滴生成の後、発現ベクターを封入した送達ベクターを、投与に備えてさらに処理または改変することができる。

10

【0350】

20

V. E. チンパンジーアデノウイルス (ChAd)

V. E. 1. チンパンジーアデノウイルスによるウイルス送達

1つ以上の抗原を送達するためのワクチン組成物（例えば、抗原カセットによる、及び、配列番号75〜82に示されるKRAS関連ネオエピトープのいずれかなどの、1つ以上のKRAS関連ネオエピトープを含む）は、チンパンジー由来のアデノウイルスヌクレオチド配列、各種の新規ベクター、及びチンパンジーアデノウイルス遺伝子を発現する細胞株を与えることにより作出することができる。チンパンジーC68アデノウイルス（本明細書ではChAdV68とも呼ぶ）のヌクレオチド配列を、抗原を送達するためのワクチン組成物中に使用することができる（配列番号1を参照）。C68アデノウイルス由来ベクターの使用については米国特許第6,083,716号にさらに詳細に記載されており、当該特許の全容をあらゆる目的で参照によって本明細書に援用する。ChAdV68ベースのベクター及び送達システムは、あらゆる目的で本明細書に参照によりそれぞれ援用するところの米国特許出願公開第US20200197500A1号及び国際特許出願公開第WO2020243719A1に詳細に記載されている。

30

【0351】

さらなる態様において、本明細書では、C68などのチンパンジーアデノウイルスのDNA配列と、発現を誘導する調節配列に機能的に連結された抗原カセットとを含む組換えアデノウイルスが提供される。この組換えウイルスは、哺乳動物、好ましくはヒトの細胞に感染させることが可能であり、細胞内で抗原カセットの産物を発現することが可能である。このベクターでは、天然のチンパンジーE1遺伝子、及び／またはE3遺伝子、及び／またはE4遺伝子を欠失させることができる。抗原カセットを、これらの遺伝子欠失部位のいずれに挿入することもできる。抗原カセットは、それに対するプライミングされた免疫応答が望ましい抗原を含むことができる。

40

【0352】

別の態様において、本明細書では、C68などのチンパンジーアデノウイルスを感染させた哺乳動物細胞が提供される。

【0353】

さらなる別の態様では、チンパンジーアデノウイルス遺伝子（例えばC68由来の）またはその機能的フラグメントを発現する新規な哺乳動物細胞株が提供される。

【0354】

50

いっそうさらなる態様において、本明細書では、哺乳動物細胞内に抗原カセットを送達するための方法であって、細胞内に、抗原カセットを発現するように操作された、有効量の C 6 8 などのチンパンジーアデノウイルスを導入する工程を含む方法が提供される。

【0355】

さらなる別の態様は、がんを治療するために哺乳動物宿主に免疫応答を刺激する方法を提供する。この方法は、免疫応答が標的とする腫瘍に由来する 1 種類以上の抗原をコードする抗原カセットを含む、有効量の C 6 8 などの組換えチンパンジーアデノウイルスを宿主に投与する工程を含むことができる。

【0356】

さらなる別の態様は、哺乳動物宿主に免疫応答を刺激して、がんなどの対象の疾患を治療または予防するための方法を提供する。この方法は、免疫応答が標的とするがん／腫瘍に由来する抗原などの 1 つ以上の抗原をコードする抗原カセットを含む、有効量の C 6 8 などの組換えチンパンジーアデノウイルスを宿主に投与する工程を含むことができる。

【0357】

さらに、配列番号 1 の配列から得られるチンパンジーアデノウイルス遺伝子が発現する非サル哺乳動物細胞も開示される。この遺伝子は、配列番号 1 のアデノウイルス E 1 A、E 1 B、E 2 A、E 2 B、E 3、E 4、L 1、L 2、L 3、L 4 及び L 5 からなる群から選択することができる。

【0358】

さらに、配列番号 1 の配列から得られる遺伝子を含むチンパンジーアデノウイルスの DNA 配列を含む核酸分子も開示される。この遺伝子は、配列番号 1 の前記チンパンジーアデノウイルス E 1 A、E 1 B、E 2 A、E 2 B、E 3、E 4、L 1、L 2、L 3、L 4 及び L 5 遺伝子からなる群から選択することができる。いくつかの態様において、核酸分子は、配列番号 1 を含む。いくつかの態様において、核酸分子は、配列番号 1 の E 1 A、E 1 B、E 2 A、E 2 B、E 3、E 4、L 1、L 2、L 3、L 4 及び L 5 遺伝子からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子が欠失した、配列番号 1 の配列を含む。

【0359】

さらに、配列番号 1 から得られるチンパンジーアデノウイルス DNA 配列と、異種宿主細胞内でカセットの発現を誘導する 1 つ以上の調節配列に機能的に連結された抗原カセットとを含むベクターであって、任意で、チンパンジーアデノウイルス DNA 配列が、複製及びカプシド形成に必要とされる少なくともシスエレメントを含み、シスエレメントが抗原カセット及び調節配列に隣接している、ベクターも開示される。いくつかの態様において、チンパンジーアデノウイルス DNA 配列は、配列番号 1 の E 1 A、E 1 B、E 2 A、E 2 B、E 3、E 4、L 1、L 2、L 3、L 4 及び L 5 遺伝子配列から選択される遺伝子を含む。いくつかの態様において、ベクターは、E 1 A 及び／または E 1 B 遺伝子を欠失していてもよい。

【0360】

本明細書では、欠失または部分欠失 E 4 o r f 2 領域及び欠失または部分欠失 E 4 o r f 3 領域、及び任意で、欠失または部分欠失 E 4 o r f 4 領域を含む部分欠失 E 4 遺伝子を含むアデノウイルスベクターも開示される。部分欠失 E 4 は、配列番号 1 に示される配列の少なくともヌクレオチド 3 4, 9 1 6 ~ 3 5, 6 4 2 の E 4 欠失を含むことができ、ベクターは、配列番号 1 に記載される配列の少なくともヌクレオチド 2 ~ 3 6, 5 1 8 を含む。部分欠失 E 4 は、配列番号 1 に示される配列のヌクレオチド 3 4, 9 1 6 ~ 3 4, 9 4 2 の少なくとも部分欠失、配列番号 1 に示される配列のヌクレオチド 3 4, 9 5 2 ~ 3 5, 3 0 5 の少なくとも部分欠失、及び配列番号 1 に示される配列のヌクレオチド 3 5, 3 0 2 ~ 3 5, 6 4 2 の少なくとも部分欠失の E 4 欠失を含むことができ、ベクターは、配列番号 1 に記載される配列の少なくともヌクレオチド 2 ~ 3 6, 5 1 8 を含む。部分欠失 E 4 は、配列番号 1 に示される配列の少なくともヌクレオチド 3 4, 9 8 0 ~ 3 6, 5 1 6 の E 4 欠失を含むことができ、ベクターは、配列番号 1 に記載される配列の少なくともヌクレオチド 2 ~ 3 6, 5 1 8 を含む。部分欠失 E 4 は、配列番号 1 に示される配列

の少なくともヌクレオチド 34, 979~35, 642 の E4 欠失を含むことができ、ベクターは、配列番号 1 に記載される配列の少なくともヌクレオチド 2~36, 518 を含む。部分欠失 E4 は、E4 Orf 2 の少なくとも部分欠失、完全欠失した E4 Orf 3、及び E4 Orf 4 の少なくとも部分欠失の E4 欠失を含むことができる。部分欠失 E4 は、E4 Orf 2 の少なくとも部分欠失、E4 Orf 3 の少なくとも部分欠失、及び E4 Orf 4 の少なくとも部分欠失の E4 欠失を含むことができる。部分欠失 E4 は、E4 Orf 1 の少なくとも部分欠失、完全欠失した E4 Orf 2、及び E4 Orf 3 の少なくとも部分欠失の E4 欠失を含むことができる。部分欠失 E4 は、E4 Orf 2 の少なくとも部分欠失及び E4 Orf 3 の少なくとも部分欠失の E4 欠失を含むことができる。部分欠失 E4 は、E4 Orf 1 の開始部位から E4 Orf 5 の開始部位までの E4 欠失を含むことができる。部分欠失 E4 は、E4 Orf 1 の開始部位に隣接した E4 欠失であってよい。部分欠失 E4 は、E4 Orf 2 の開始部位に隣接した E4 欠失であってよい。部分欠失 E4 は、E4 Orf 3 の開始部位に隣接した E4 欠失であってよい。部分欠失 E4 は、E4 Orf 4 の開始部位に隣接した E4 欠失であってよい。E4 欠失は、少なくとも 50、少なくとも 100、少なくとも 200、少なくとも 300、少なくとも 400、少なくとも 500、少なくとも 600、少なくとも 700、少なくとも 800、少なくとも 900、少なくとも 1000、少なくとも 1100、少なくとも 1200、少なくとも 1300、少なくとも 1400、少なくとも 1500、少なくとも 1600、少なくとも 1700、少なくとも 1800、少なくとも 1900、または少なくとも 2000 ヌクレオチドであってよい。E4 欠失は、少なくとも 700 ヌクレオチドであってよい。E4 欠失は、少なくとも 1500 ヌクレオチドであってよい。E4 欠失は、50 以下、100 以下、200 以下、300 以下、400 以下、500 以下、600 以下、700 以下、800 以下、900 以下、1000 以下、1100 以下、1200 以下、1300 以下、1400 以下、1500 以下、1600 以下、1700 以下、1800 以下、1900 以下、または 2000 ヌクレオチド以下であってよい。E4 欠失は、750 ヌクレオチド以下であってよい。E4 欠失は、少なくとも 1550 ヌクレオチドまたはそれ以下であってよい。

10

20

30

40

50

【0361】

部分欠失 E4 遺伝子は、配列番号 1 に示される配列の少なくともヌクレオチド 34, 916~35, 642 を欠く、配列番号 1 に示される E4 遺伝子配列であってよい。部分欠失 E4 遺伝子は、配列番号 1 に示される E4 遺伝子配列を欠き、かつ、配列番号 1 に示される配列の少なくともヌクレオチド 34, 916~34, 942、ヌクレオチド 34, 952~35, 305、及び配列番号 1 に示される配列のヌクレオチド 35, 302~35, 642 を欠く、配列番号 1 に示される E4 遺伝子配列であってよい。部分欠失 E4 遺伝子は、配列番号 1 に示される配列の少なくともヌクレオチド 34, 980~36, 516 を欠く、配列番号 1 に示される E4 遺伝子配列であってよい。部分欠失 E4 遺伝子は、配列番号 1 に示される配列の少なくともヌクレオチド 34, 979~35, 642 を欠く、配列番号 1 に示される E4 遺伝子配列であってよい。部分欠失 E4 遺伝子を有するアデノウイルスベクターは、カセットを含むことができ、カセットは少なくとも 1 つのペイロード核酸配列を含み、さらにカセットは、少なくとも 1 つのペイロード核酸配列に機能的に連結された少なくとも 1 つのプロモーター配列を含む。部分欠失 E4 遺伝子を有するアデノウイルスベクターは、配列番号 1 に示される ChAdV68 配列の 1 つ以上の遺伝子または調節配列を有することができ、任意で、1 つ以上の遺伝子または調節配列は、配列番号 1 に示される配列のチンパンジーアデノウイルス末端逆位反復配列 (ITR)、E1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4、L1、L2、L3、L4、及び L5 遺伝子のうちの少なくとも 1 つを含む。部分欠失 E4 遺伝子を有するアデノウイルスベクターは配列番号 1 に示される配列のヌクレオチド 2~34, 915 を有することができ、部分欠失 E4 遺伝子は、ヌクレオチド 2~34, 915 の 3' 末端であり、任意で、ヌクレオチド 2~34, 915 は、E1 欠失に相当する、配列番号 1 に示される配列のヌクレオチド 577~3403 をさらに欠き、及び／または E3 欠失に相当する、配列番号 1 に示される配列のヌクレオチド 27, 125~31, 825 を欠く。部分欠失 E4 遺伝子を有するアデ

ノウイルスベクターは、配列番号 1 に示されるヌクレオチド 35, 643~36, 518 を有することができ、部分欠失 E 4 遺伝子はヌクレオチド 35, 643~36, 518 の 5' 末端である。部分欠失 E 4 遺伝子を有するアデノウイルスベクターは配列番号 1 に示される配列のヌクレオチド 2~34, 915 を有することができ、部分欠失 E 4 遺伝子は、ヌクレオチド 2~34, 915 の 3' 末端であり、ヌクレオチド 2~34, 915 は、E 1 欠失に相当する、配列番号 1 に示される配列のヌクレオチド 577~3403 をさらに欠き、かつ E 3 欠失に相当する、配列番号 1 に示される配列のヌクレオチド 27, 125~31, 825 を欠く。部分欠失 E 4 遺伝子を有するアデノウイルスベクターは配列番号 1 に示される配列のヌクレオチド 2~34, 915 を有することができ、部分欠失 E 4 遺伝子は、ヌクレオチド 2~34, 916 の 3' 末端であり、ヌクレオチド 2~34, 915 は、E 1 欠失に相当する、配列番号 1 に示される配列のヌクレオチド 577~3403 をさらに欠き、かつ E 3 欠失に相当する、配列番号 1 に示される配列のヌクレオチド 27, 125~31, 825 を欠き、かつ配列番号 1 に示される配列のヌクレオチド 35, 643~36, 518 を有し、部分欠失 E 4 遺伝子は、ヌクレオチド 35, 643~36, 518 の 5' 末端である。

10

【0362】

部分欠失 E 4 遺伝子を有するアデノウイルスベクターは、配列番号 1 に示される配列の少なくともヌクレオチド 34, 916~35, 642、配列番号 1 に示される配列のヌクレオチド 2~34, 915 を欠く、配列番号 1 に示される E 4 遺伝子配列であってよく、部分欠失 E 4 遺伝子は、ヌクレオチド 2~34, 915 の 3' 末端であり、ヌクレオチド 2~34, 915 は、E 1 欠失に相当する、配列番号 1 に示される配列のヌクレオチド 577~3403 をさらに欠き、かつ E 3 欠失に相当する、配列番号 1 に示される配列のヌクレオチド 27, 125~31, 825 を欠き、かつ配列番号 1 に示される配列のヌクレオチド 35, 643~36, 518 を有し、部分欠失 E 4 遺伝子は、ヌクレオチド 35, 643~36, 518 の 5' 末端である。

20

【0363】

さらに、抗原カセットを発現するように操作された C 68 ベクターなどの本明細書に開示されるベクターをトランスフェクトした宿主細胞も開示される。さらに、細胞内に本明細書に開示されるベクターを導入することによって細胞内に導入された選択された遺伝子が発現するヒト細胞も開示される。

30

【0364】

さらに、哺乳動物細胞に抗原カセットを送達するための方法であって、前記細胞内に、抗原カセットを発現するように操作された有効量の ChAd ベクターまたは自己複製 RNA ベクターなどの本明細書に開示されるベクターを導入することを含む方法も提供される。

【0365】

さらに、哺乳動物細胞内に本明細書に開示されるベクターを導入することと、適当な条件下で細胞を培養することと、抗原を産生することと、を含む、抗原を産生するための方法も開示される。

【0366】

40

V. E. 2. E 1 を発現する相補性細胞株

本明細書に記載される遺伝子のいずれかにおいて欠失を有する組換えチンパンジーアデノウイルス (Ad) を作製するため、欠失させた遺伝子領域の機能 (ウイルスの複製及び感染性に不可欠である場合) をヘルパーウイルスまたは細胞株 (すなわち、相補性またはパッケージング細胞株) によって組換えウイルスに供給することができる。例えば、複製欠損チンパンジーアデノウイルスベクターを作製するには、ヒトまたはチンパンジーアデノウイルスの E 1 遺伝子産物を発現する細胞株を使用することができ、そのような細胞株には HEK 293 またはそのバリエーションが含まれる。チンパンジー E 1 遺伝子が発現する細胞株の作製のプロトコール (米国特許第 6, 083, 716 号の実施例 3 及び 4) にしたがって任意の選択されたチンパンジーアデノウイルス遺伝子が発現する細胞株を作製

50

することができる。

【0367】

A A V 強化アッセイを用いてチンパンジーアデノウイルス E 1 発現細胞株を同定することができる。このアッセイは、他の特性評価されていないアデノウイルス（例えば他の種由来）の E 1 遺伝子を使用して作製された細胞株において E 1 の機能を同定するうえで有用である。このアッセイは米国特許第 6, 083, 716 号の実施例 4 B に記載されている。

【0368】

選択されたチンパンジーアデノウイルス遺伝子（例えば E 1）は、選択された親細胞株で発現するためのプロモーターの転写制御下にある可能性がある。この目的で誘導性または構成性プロモーターを用いることができる。誘導性プロモーターには、亜鉛によって誘導されるヒツジメタロチオニンプロモーター、または糖質コルチコイド、特にデキサメタゾンによって誘導されるマウス哺乳動物腫瘍ウイルス（MMTV）がある。本明細書に参照により援用するところの国際出願第 WO 95 / 13392 号において特定されるものなどの他の誘導性プロモーターもパッケージング細胞株の作製に使用することができる。チンパンジーアデノウイルス遺伝子の発現を制御する構成性プロモーターも用いることができる。

【0369】

任意の所望の C 6 8 遺伝子を発現する新規な細胞株を作製するために親細胞を選択することができる。限定されることなく、かかる親細胞株は、HeLa [ATCC 寄託番号 CCL2]、A549 [ATCC 寄託番号 CCL185]、KB [CCL17]、Detroit [例えば Detroit 510、CCL72]、及び WI-38 [CCL75] 細胞であってよい。他の適当な親細胞株を他の供給元から入手することができる。親細胞株としては、CHO、HEK293 またはそのバリエーション、911、HeLa、A549、LP-293、PER.C6、または AE1-2a を挙げることができる。

【0370】

E 1 発現細胞株は、組換えチンパンジーアデノウイルス E 1 欠失ベクターの作製において有用となりうる。1 つ以上の他のチンパンジーアデノウイルス遺伝子産物を発現する基本的に同じ手順を用いて構築された細胞株は、これらの産物をコードする遺伝子に欠失を有する組換えチンパンジーアデノウイルスベクターの作製において有用である。さらに、他のヒト Ad E 1 遺伝子産物を発現する細胞株も、チンパンジー組換え Ad を作製するうえで有用である。

【0371】

V. E. 3. ベクターとしての組換えウイルス粒子

本明細書に開示される組成物は、少なくとも 1 種類の抗原を細胞に送達するウイルスベクターを含むことができる。かかるベクターは、C 6 8 のようなチンパンジーアデノウイルス DNA 配列と、カセットを直接発現するための調節配列に機能的に連結された抗原カセットとを含む。C 6 8 ベクターは、感染した哺乳動物細胞内でカセットを発現することが可能である。C 6 8 ベクターは 1 つ以上のウイルス遺伝子に機能的欠失を有することができる。抗原カセットは、プロモーターなどの 1 つ以上の調節配列の制御下にある少なくとも 1 つの抗原を含む。任意選択的なヘルパーウイルス及び／またはパッケージング細胞株によって、チンパンジーウイルスベクターに、欠失させたアデノウイルス遺伝子の任意の必要な産物を供給することができる。

【0372】

「機能的に欠失された」という用語は、その遺伝子領域の十分な量が除去または例えば変異もしくは改変により他の形で変化させられていることにより、その遺伝子領域が遺伝子発現の 1 つ以上の機能的産物を産生できなくなっていることを意味する。機能的欠失につながりうる変異または改変としては、これらに限定されるものではないが、未成熟終止コドンの導入及び基準及び非基準開始コドンの除去のようなナンセンス変異、mRNA スプライシングまたは他の転写プロセッシングを変化させる変異、またはこれらの組み合わせ

が挙げられる。必要な場合、遺伝子領域全体を除去することができる。

【0373】

配列の欠失、挿入、及び他の変異を含む、本明細書に開示されるベクターを形成する核酸配列の改変は、標準的な分子生物学的手法を用いて生成することができるものであり、本明細書の範囲内である。

【0374】

V. E. 4. ウイルスプラスミドベクターの構築

本発明で有用なチンパンジーアデノウイルスC68ベクターには、組換え欠損アデノウイルス、すなわち、E1aまたはE1b遺伝子に機能的欠失を有し、任意で例えば温度感受性変異または他の遺伝子における欠失などの他の変異を有するチンパンジーアデノウイルス配列が含まれる。これらのチンパンジー配列は、他のアデノウイルス及び／またはアデノ随伴ウイルス配列からハイブリッドベクターを形成するうえでも有用であると予想される。ヒトアデノウイルスから調製された同種アデノウイルスベクターについては、刊行文献に記載されている〔例えば、上記に引用のKozarsky I及びII、ならびに同文献に引用された参考文献、米国特許第5,240,846号を参照〕。

【0375】

抗原カセットをヒト（または他の哺乳動物）細胞に送達するための有用なチンパンジーアデノウイルスC68ベクターの構築において、広範囲のアデノウイルス核酸配列をベクターに用いることができる。最小のチンパンジーC68アデノウイルス配列を含むベクターをヘルパーウイルスとともに使用して感染性の組換えウイルス粒子を作製することができる。ヘルパーウイルスは、最小のチンパンジーアデノウイルスベクターのウイルス感染性及び増殖に必要な基本的な遺伝子産物を提供する。チンパンジーアデノウイルス遺伝子の1つ以上の選択された欠失のみが、欠失がなければ機能性のウイルスベクターに導入される場合、欠失された遺伝子産物は、欠失された遺伝子機能をイン・トランスで与えるウイルスを選択されたパッケージング細胞株内で増殖させることによるウイルスベクター作製プロセスで供給することができる。

【0376】

V. E. 5. 組換え最小アデノウイルス

最小チンパンジーAd C68ウイルスとしては、複製及びビリオンのカプシド形成に必要なアデノウイルスのシスエレメントのみを含むウイルス粒子がある。すなわち、このベクターは、アデノウイルスのシス作用性の5'及び3'の末端逆位繰返し配列（ITR）（複製起点として機能する）と、天然の5'パッケージング／エンハンサードメイン（直鎖状のAdのゲノム及びE1プロモーターのエンハンサーエレメントをパッケージングするために必要な配列を含む）とを含む。例えば、国際出願第WO96/13597号において「最小」ヒトAdベクターの調製について述べられ、本明細書に参照によって援用する方法を参照されたい。

【0377】

V. E. 6. 他の欠損アデノウイルス

組換え複製不全アデノウイルスは、最小チンパンジーアデノウイルス配列以上のものを含んでもよい。これらの他のAdベクターは、ウイルスの遺伝子領域の異なる部分の欠失、ならびに、必要に応じたヘルパーウイルス及び／またはパッケージング細胞株の使用によって形成される感染性ウイルス粒子によって特徴づけることができる。

【0378】

1つの例として、適当なベクターは、C68アデノウイルスの最初期遺伝子E1a及び後初期遺伝子E1bの全体または十分な部分を欠失させることにより、それらの正常な生物学的機能を失わせることによって形成することができる。複製不全E1欠失ウイルスは、対応する遺伝子産物をイン・トランスで与える機能的アデノウイルスE1a及びE1b遺伝子を含むチンパンジーのアデノウイルス形質転換相補性細胞株で増殖させた場合に感染性のウイルスを複製及び生成することが可能である。既知のアデノウイルス配列に対する相同性に基けば、得られる組換えチンパンジーアデノウイルスは、当該技術分野のヒ

ト組換え E 1 欠失アデノウイルスでそうであるように多くの細胞種に感染することが可能であり、抗原（複数可）を発現することができるが、チンパンジー E 1 領域 DNA を有していない多くの細胞では、細胞が極めて高い感染多重度で感染していないかぎりでは複製できないものと予想される。

【0379】

別の例として、C 6 8 アデノウイルス後初期遺伝子 E 3 の全体または一部を、組換えウイルスの一部を形成するチンパンジーアデノウイルス配列から除去することができる。

【0380】

チンパンジーアデノウイルス C 6 8 ベクターは、E 4 遺伝子の欠失を有するように構築することもできる。さらに別のベクターは、後初期遺伝子 E 2 a に欠失を有することができる。

10

【0381】

欠失は、チンパンジー C 6 8 アデノウイルスゲノムの後期遺伝子 L 1 ~ L 5 のいずれに導入することもできる。同様に、中期遺伝子 I X 及び I V a 2 内の欠失も特定の目的では有用となりうる。他の欠失を他の構造または非構造アデノウイルス遺伝子に導入することもできる。

【0382】

上記に述べた欠失は、個々に用いることもできる。すなわち、アデノウイルス配列は E 1 のみの欠失を有してもよい。また、それらの生物学的活性を破壊または低減するうえで効果的な遺伝子全体またはその一部を任意の組み合わせで用いることもできる。例えば、1 つの例示的なベクターでは、アデノウイルス C 6 8 配列は、E 1 遺伝子及び E 4 遺伝子、または E 1、E 2 a、及び E 3 遺伝子、または E 1 及び E 3 遺伝子、または、E 3 の欠失をとまなうかまたはとまなわない、E 1、E 2 a、及び E 4 遺伝子の欠失を有することができる。上記に述べたように、かかる欠失は、所望の結果を得るために温度感受性変異などの他の変異と組み合わせることもできる。

20

【0383】

抗原（複数可）を含むカセットを任意でチンパンジー C 6 8 A d ウイルスの任意の欠失領域に挿入する。また、必要に応じて既存の遺伝子領域内にカセットを挿入することでその領域の機能を破壊することもできる。

【0384】

30

V. E. 7. ヘルパーウイルス

抗原カセットを送達するために用いられるウイルスベクターのチンパンジーアデノウイルス遺伝子の含量に応じて、ヘルパーアデノウイルスまたは非複製ウイルスフラグメントを用いて、カセットを含む感染性の組換えウイルス粒子を生成するのに十分なチンパンジーアデノウイルス遺伝子配列を与えることができる。

【0385】

有用なヘルパーウイルスは、アデノウイルスベクターコンストラクト中に存在しない、及び／またはベクターをトランスフェクトしたパッケージング細胞株によって発現されない選択されたアデノウイルス遺伝子配列を含む。ヘルパーウイルスは複製不全であってよく、上記に述べた配列以外の様々なアデノウイルス遺伝子を含むことができる。ヘルパーウイルスは、本明細書に記載される E 1 発現細胞株と組み合わせることもできる。

40

【0386】

C 6 8 では、「ヘルパー」ウイルスは、C 6 8 ゲノムの C 末端を、ウイルスの左端から約 1300 bp を除去する S s p I によって短縮することによって形成されるフラグメントとすることができる。次に、この短縮されたウイルスをプラスミド DNA とともに E 1 発現細胞株内に同時トランスフェクトすることにより、プラスミド内の C 6 8 配列との相同組換えによって組換えウイルスを形成する。

【0387】

ヘルパーウイルスは、Wu et al., J. Biol. Chem., 264:16985-16987 (1989); K. J. Fisher and J. M. Wilso

50

n, Biochem. J., 299:49 (Apr. 1, 1994)に記載されるようなポリカチオン複合体として形成することもできる。ヘルパーウイルスは、任意でレポーター遺伝子を含んでもよい。多くのかかるレポーター遺伝子が当該技術分野で知られている。アデノウイルスベクター上の抗原カセットとは異なるヘルパーウイルス上のレポーター遺伝子の存在によって、Adベクターとヘルパーウイルスを独立して観察することが可能となる。この第2のレポーター遺伝子を用いることで、精製時に得られた組換えウイルスとヘルパーウイルスとを分離することが可能である。

【0388】

V. E. 8. ウイルス粒子のアセンブリと細胞株の感染

アデノウイルス、抗原カセット、及び他のベクター因子の選択されたDNA配列の様々な中間プラスミド及びシャトルベクターへのアセンブリ、ならびに組換えウイルス粒子を作製するためのプラスミド及びシャトルベクターの使用は、従来手法を用いてすべて実現することができる。かかる手法としては、従来のcDNAのクローニング法、インビトロ組換え法（例えば、ギブソンアセンブリ）、アデノウイルスゲノムの重複するオリゴヌクレオチド配列の使用、ポリメラーゼ連鎖反応、及び所望のヌクレオチド配列を与える任意の適当な方法が挙げられる。標準的なトランスフェクション及び同時トランスフェクションの手法、例えば、CaPO4沈殿法またはリポフェクタミンなどのリポソーム媒介トランスフェクション法が用いられる。用いられる他の従来方法としては、ウイルスゲノムの相同組み換え、アガーオーバーレイ中でのウイルスのプラーク形成、シグナル発生測定の方法などが挙げられる。

【0389】

例えば、所望の抗原を含むウイルスベクターの構築及びアセンブリの後、ベクターをインビトロでヘルパーウイルスの存在下でパッケージング細胞株にトランスフェクトすることができる。ヘルパーとベクター配列との間で相同組み換えが起こり、これによりベクター内のアデノウイルス-抗原配列が複製されてビリオンカプシド内にパッケージングされ、組換えウイルスベクター粒子が得られる。

【0390】

得られた組換えチンパンジーC68アデノウイルスは、抗原カセットを選択された細胞に導入するうえで有用である。パッケージング細胞株内で増殖させた組換えウイルスを用いたインビボ実験において、E1欠失組換えチンパンジーアデノウイルスが、カセットを非チンパンジー細胞、好ましくはヒト細胞に導入するうえで実用性を有することが実証されている。

【0391】

V. E. 9. 組換えウイルスベクターの使用

したがって、抗原カセットを含む得られた組換えチンパンジーC68アデノウイルス（上記に述べたようなアデノウイルスベクターとヘルパーウイルス、またはアデノウイルスベクターとパッケージング細胞株の組み込みにより作製される）は、抗原（複数可）をインビボまたはエキスピボで対象に送達することができる効率的な遺伝子導入担体を与えるものである。

【0392】

上記に述べた組換えベクターは、遺伝子治療について公開されている方法にしたがってヒトに投与される。抗原カセットを有するチンパンジーウイルスベクターは、好ましくは生体適合性溶液または薬学的に許容される送達溶媒中に懸濁させて患者に投与することができる。適当な溶媒としては滅菌生理食塩水が挙げられる。薬学的に許容される担体として知られ、当業者には周知のものである他の水性及び非水性等張滅菌注射溶液、ならびに水性及び非水性滅菌懸濁液をこの目的で使用することもできる。

【0393】

チンパンジーアデノウイルスベクターは、ヒト細胞を形質転換し、医療分野の当業者によって判定することが可能な有害作用をとまなわずに、または医学的に許容される生理学的作用をとまなう、治療効果を与えるうえで十分なレベルの抗原の導入及び発現をもた

らすのに十分な量で投与される。従来の薬学的に許容される投与経路としては、これらに限定されるものではないが、肝臓、鼻腔内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、経口、及び他の非経口の投与経路が挙げられる。投与経路は必要に応じて組み合わせることができる。

【0394】

ウイルスベクターの用量は、治療される状態、患者の年齢、体重、及び健康状態などの因子に主として依存し、したがって患者間で異なりうる。用量は、あらゆる副作用に対して治療効果のバランスが取れるように調節され、かかる用量は、組換えベクターが用いられる治療用途に応じて異なりうる。抗原（複数可）の発現レベルを観察することにより、投与頻度を決定することができる。

【0395】

組換え複製不全アデノウイルスは、「薬学的有効量」、すなわち、所望の細胞をトランスフェクトし、ワクチン効果、すなわち一定の測定可能なレベルの防御免疫をもたらすような選択された遺伝子の十分な発現レベルを与えるのにある投与経路で有効な組換えアデノウイルスの量で投与することができる。抗原を含むC68ベクターは、アジュバントと同時投与することができる。アジュバントは、ベクターとは別のモノマーの出てくてもよく（例えばミョウバン）または特にアジュバントがタンパク質である場合にはベクター内にコードされてもよい。アジュバントは当該技術分野では周知のものである。

【0396】

従来の薬学的に許容される投与経路としては、これらに限定されるものではないが、鼻腔内、筋肉内、気管内、皮下、皮内、直腸内、経口、及び他の非経口の投与経路が挙げられる。投与経路は必要に応じて組み合わせるか、または免疫原もしくは疾患に応じて調節することができる。例えば、狂犬病の予防では、皮下、気管内、及び鼻腔内経路が好ましい。投与経路は、主として治療される疾患の性質によって決められる。

【0397】

抗原（複数可）の発現レベルを観察することにより、ブースターの必要性（ある場合）を決定することができる。例えば、血清中の抗体力価の評価の後、必要に応じてブースター免疫が望ましい場合がある。

【0398】

VI. 治療及び製造方法

本明細書に開示する方法を用いて特定された複数の抗原などの1つ以上の抗原を対象に投与することにより、対象の腫瘍特異的な免疫応答を刺激し、腫瘍に対するワクチン接種を行い、対象のがんを治療及び／またはその症状を緩和する方法も提供される。

【0399】

いくつかの実施形態では、対象は、がんと診断されているかまたはがんを発症するリスクを有する。対象は、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、または腫瘍特異的な免疫応答が望ましい任意の動物とすることができる。腫瘍は、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、肺癌、腎臓癌、胃癌、結腸癌、精巣癌、頭頸部腫瘍、膵臓癌、脳腫瘍、黒色腫、及び他の組織臓器の腫瘍などの任意の固形腫瘍、ならびに、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、T細胞リンパ球性白血病、及びB細胞リンパ腫を含むリンパ腫及び白血病などの血液腫瘍でありうる。

【0400】

抗原は、CTL応答を刺激するのに十分な量で投与することができる。抗原は、T細胞応答を刺激するのに十分な量で投与することができる。抗原は、B細胞応答を刺激するのに十分な量で投与することができる。抗原は、T細胞応答及びB細胞応答の両方を刺激するのに十分な量で投与することができる。

【0401】

抗原は、単独で、または他の治療薬と併用して投与することができる。治療薬は、抗ウイルス剤または抗生剤などの感染症生物を標的とするものを含む。

【0402】

さらに、対象に、チェックポイント阻害剤などの抗免疫抑制／免疫刺激剤をさらに投与

10

20

30

40

50

することができる。例えば、対象に、抗CTLA抗体または抗PD-1または抗PD-L1をさらに投与することができる。CTLA4またはPD-L1の遮断は、患者のがん性細胞に対する免疫応答を高めることができる。詳細には、CTLA4の遮断は、ワクチン接種プロトコルに従った場合に効果的であることが示されている。

【0403】

ワクチン組成物中に含まれる各抗原の最適用量及び最適な投与レジメンを決定することができる。例えば、抗原またはそのバリエーションは、静脈内(i.v.)注射、皮下(s.c.)注射、皮内(i.d.)注射、腹腔内(i.p.)注射、筋肉内(i.m.)注射用に製剤化することができる。注射の方法としては、皮下(s.c.)、皮内(i.d.)、腹腔内(i.p.)、筋肉内(i.m.)、及び静脈内(i.v.)が挙げられる。DNAまたはRNAの注射方法としては、皮内(i.d.)、筋肉内(i.m.)、皮下(s.c.)、腹腔内(i.p.)及び静脈内(i.v.)が挙げられる。ワクチン組成物の他の投与方法は、当業者には周知のものである。

10

【0404】

ワクチンは、組成物中に存在する抗原の選択、数、及び／または量が、組織、がん、感染症、及び／または患者に特異的であるように適合することができる。例えば、ペプチドの正確な選択は、所与の組織における親タンパク質の発現パターンによって導くか、または患者の変異もしくは疾患状態によって導くことができる。この選択は、特定のがんのタイプ、疾患の状態、ワクチン接種の目的(例えば、予防的かまたは進行中の疾患を標的としているか)、初期の治療レジメン、患者の免疫状態、及び、言うまでもなく、患者のHLAハロタイプに依存する。さらに、ワクチンは、特定の患者の個人的ニーズにしたがって、個別化された成分を含むことができる。例としては、特定の患者における抗原の発現にしたがって抗原の選択を変えること、または治療の第1ラウンドもしくはスキーム後の二次的治療を調整することが挙げられる。

20

【0405】

抗原ワクチンの投与を行うための患者は、様々な診断方法、例えば、下記でさらに述べる患者選択方法の使用により特定することができる。患者選択では、1つ以上の遺伝子の変異または発現パターンを特定することを行うことができる。任意で、患者選択では、患者のハプロタイプを特定することを行う。様々な患者選択方法を並行して行うことができる。例えば、シーケンシング診断によって患者の変異及びハプロタイプの両方を特定することができる。様々な患者選択方法を順次行うこともでき、例えば、1つの診断検査で変異を特定し、別の診断検査で患者のハプロタイプを特定し、その場合、各検査は、同じ(例えば、両方ともハイスループットシーケンシング)か、または異なる(例えば、一方がハイスループットシーケンシングで他方がサンガーシーケンシング)診断方法であってよい。

30

【0406】

組成物のがんまたは感染症のワクチンとして使用されるためには、正常組織で高量で発現される類似の正常な自己ペプチドを含む抗原が、本明細書に記載される組成物中で避けられるかまたは低量で存在してもよい。これに対して、患者の腫瘍または感染細胞が特定の抗原を高量で発現していることが分かっている場合、このがんまたは感染の治療用のそれぞれの医薬組成物を高量で存在させることができ、及び／またはこの特定の抗原またはこの抗原の経路に対して特異的な複数の抗原が含まれてもよい。

40

【0407】

抗原を含む組成物を、既になんかに罹患している個人に投与することができる。治療用途では、組成物は、腫瘍抗原に対する効果的なCTLを刺激するなど、免疫応答を刺激し、症状及び／または合併症を治癒または少なくとも部分的に阻止するうえで十分な量で対象に投与される。免疫応答は、腫瘍サイズまたは体積の低減を含むことができる。腫瘍サイズまたは体積の低減は、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少

50

なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の低減を含むことができる。腫瘍サイズまたは体積の低減は、少なくとも15%の低減を含むことができる。腫瘍サイズまたは体積の低減は、少なくとも20%の低減を含むことができる。免疫応答は、腫瘍サイズまたは体積の安定化を含むことができる。免疫応答は、（例えば、臨床研究で説明される基準により調査されるように）完全奏功（CR）、部分奏功（PR）、または、安定した疾患（SD）などの、対象の疾患の回復をもたらすことができる。これを実現するのに適した量は、「治療有効用量」として定義される。この目的で有効な量は、例えば、組成物、投与形態、治療される疾患のステージ及び重症度、患者の体重及び一般的状態、ならびに処方医師の判断によって決められる。組成物は、特に、がんが転移している場合に、重篤な病状、すなわち命に関わる、または潜在的に命に関わる状況で一般的に用いることができることに留意すべきである。そのような場合、外来物質及び抗原の相対的非毒性特性の最小化を考慮すると、治療にあたる医師によってこれらの組成物の大幅な過剰量を投与することが可能であり、望ましいと感じられるものと考えられる。

10

【0408】

治療用途では、投与は、腫瘍の検出もしくは外科的除去時に開始することができる。これに続いて、少なくとも症状が実質的に消失し、その後の所定の期間、または免疫が得られたとみなされる（例えば、メモリーB細胞もしくはT細胞集団、または抗原特異的B細胞もしくは抗体が産生される）まで、ブースター用量を投与することができる。

20

【0409】

抗原を含む組成物を、化学療法、免疫チェックポイント阻害剤療法、放射線療法、またはこれらの組み合わせと組み合わせて投与されるなどの、追加療法との併用療法としての、アジュバント療法または維持療法として投与することができる。併用療法は、フルオロピリミジン、ペバシズマブ、及び／または、免疫チェックポイント阻害剤療法を含むことができる。併用療法は、フルオロピリミジン及びペバシズマブを含むことができる。併用療法は、フルオロピリミジン、ペバシズマブ、及び免疫チェックポイント阻害剤療法（例えば、抗PD-1または抗PD-L1抗体）を含むことができる。

【0410】

免疫チェックポイント阻害剤としては、（1）抗PD-1抗体もしくはその抗原結合フラグメント、（2）抗PD-L1抗体もしくはその抗原結合フラグメント、及び／または、（3）抗CTLA-4抗体もしくはその抗原結合フラグメントを挙げることができる。免疫チェックポイント阻害剤療法は、プライミング用量及び第1のブースター用量だけを伴う、抗CTLA-4抗体またはその抗原結合フラグメントの投与を含むことができる。免疫チェックポイント阻害剤療法は、抗CTLA-4抗体のイピリムマブを含むことができる。免疫チェックポイント阻害剤療法は、30mgの用量で皮下投与されるイピリムマブを含むことができる。免疫チェックポイント阻害剤療法は、4週毎（Q4W）に、抗PD-L1抗体またはその抗原結合フラグメントを投与することを含むことができる。免疫チェックポイント阻害剤療法は、抗PD-L1抗体のアテゾリズマブまたはニボルマブを含むことができる。アテゾリズマブは、1680mgの用量で静脈内投与することができる。ニボルマブは、480mgの用量で静脈内投与することができる。

30

40

【0411】

免疫チェックポイント阻害剤療法は、少なくとも2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、11回、12回、または13回の個別投与、例えば、28日毎、もしくは約28日毎（または、4週毎及び／または1ヶ月毎）の、少なくとも2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、11回、12回、または13回の個別投与を含むことができる。免疫チェックポイント阻害剤療法は、例えば、28日毎、もしくは約28日毎（または、4週毎及び／または1ヶ月毎）の、少なくとも2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、11回、12回、または13回の投与を含む、抗PD-L1抗体またはその抗原結合フラグメントの投与を含むことができる。免疫チェックポイント阻害剤療法は、例えば、28日毎、もしくは約28日毎（または、4週

50

毎及び／または1ヶ月毎)の、少なくとも13回の個別投与を含むことができる。いくつかの態様では、抗PD-L1抗体またはその抗原結合フラグメントの投与は、例えば、28日毎、もしくは約28日毎(または、4週毎及び／または1ヶ月毎)の、少なくとも13回の投与を含む。

【0412】

ChAdVベースの発現系は、ChAdVベースの発現系のプライミング用量の140日後、または約140日後に、ブースター用量として投与することができる。ChAdVベースの発現系は、ChAdVベースの発現系のプライミング用量の20週後、または約20週後に、ブースター用量として投与することができる。ChAdVベースの発現系は、ChAdVベースの発現系のプライミング用量の5ヶ月後、または約5ヶ月後に、ブースター用量として投与することができる。ChAdVベースの発現系は、ChAdVベースの発現系のプライミング用量の140日後、または140日より後に、ブースター用量として投与することができる。ChAdVベースの発現系は、ChAdVベースの発現系のプライミング用量の20週後、または20週より後に、ブースター用量として投与することができる。ChAdVベースの発現系は、ChAdVベースの発現系のプライミング用量の5ヶ月後、または5ヶ月より後に、ブースター用量として投与することができる。

10

【0413】

自己複製アルファウイルスベースの発現系は、少なくとも2回のブースター用量として投与することができる。自己複製アルファウイルスベースの発現系は、少なくとも28日の間隔を空けて、少なくとも2回以上のブースター用量として投与することができる。自己複製アルファウイルスベースの発現系は、少なくとも4週(Q4W)の間隔を空けて、少なくとも2回以上のブースター用量として投与することができる。自己複製アルファウイルスベースの発現系は、少なくとも1ヶ月の間隔を空けて、少なくとも2回以上のブースター用量として投与することができる。自己複製アルファウイルスベースの発現系は、少なくとも56日の間隔を空けて、少なくとも2回以上のブースター用量として投与することができる。自己複製アルファウイルスベースの発現系は、少なくとも8週(Q8W)の間隔を空けて、少なくとも2回以上のブースター用量として投与することができる。自己複製アルファウイルスベースの発現系は、少なくとも2ヶ月の間隔を空けて、少なくとも2回以上のブースター用量として投与することができる。

20

【0414】

自己複製アルファウイルスベースの発現系は、ChAdVベースの発現系のプライミング用量の28及び84日後、または約28及び84日後に、少なくとも2回のブースター用量として投与することができる。自己複製アルファウイルスベースの発現系は、ChAdVベースの発現系のプライミング用量の4及び12週後、または約4及び12週後に、少なくとも2回のブースター用量として投与することができる。自己複製アルファウイルスベースの発現系は、ChAdVベースの発現系のプライミング用量の1及び3ヶ月後、または約1及び3ヶ月後に、少なくとも2回のブースター用量として投与することができる。

30

【0415】

自己複製アルファウイルスベースの発現系は、少なくとも4回のブースター用量として投与することができる。自己複製アルファウイルスベースの発現系は、ChAdVベースの発現系のプライミング用量と比較して、28、84、196、及び252日後に、または、約28、84、196、及び252日後に投与することができる。自己複製アルファウイルスベースの発現系は、ChAdVベースの発現系のプライミング用量と比較して、4、12、28、及び40週後に、または、約4、12、28、及び40週後に投与することができる。自己複製アルファウイルスベースの発現系は、ChAdVベースの発現系のプライミング用量と比較して、1、3、7、及び10ヶ月後に、または、約1、3、7、及び10ヶ月後に投与することができる。

40

【0416】

ChAdVベースの発現系は、ChAdVベースの発現系のプライミング用量の140

50

製アルファウイルスベースの発現系は、C h A d V ベースの発現系のプライミング用量と比較して、28、84、196、及び252日後に、または、約28、84、196、及び252日後に投与することができる。C h A d V ベースの発現系は、C h A d V ベースの発現系のプライミング用量の140日後、もしくは約140日後（または、20週及び／または5ヶ月後）に、ブースター用量として投与することができ、自己複製アルファウイルスベースの発現系は、C h A d V ベースの発現系のプライミング用量と比較して、4、12、28、及び40週後に、または、約4、12、28、及び40週後に投与することができる。C h A d V ベースの発現系は、C h A d V ベースの発現系のプライミング用量の140日後、もしくは約140日後（または、20週及び／または5ヶ月後）に、ブースター用量として投与することができ、自己複製アルファウイルスベースの発現系は、C h A d V ベースの発現系のプライミング用量と比較して、1、3、7、及び10ヶ月後に、または、約1、3、7、及び10ヶ月後に投与することができる。

10

【0419】

治療処置用の医薬組成物（例えば、ワクチン組成物）は、非経口、局所（t o p i c a l）、経鼻、経口、局所（l o c a l）投与を意図している。医薬組成物は、非経口的に、例えば、静脈内、皮下、皮内、または筋肉内投与することができる。組成物は、腫瘍に対する局所的免疫応答を刺激するために外科的切除の部位に投与することができる。組成物は、対象の特定の組織、臓器、及び／または細胞を標的として投与することができる。本明細書では、抗原の溶液を含む非経口投与用の組成物を開示し、ワクチン組成物は許容される担体、例えば水性担体中に溶解または懸濁される。例えば、水、緩衝された水、0.9%生理食潜水、0.3%グリシン、ヒアルロン酸などの様々な水性担体を使用することができる。これらの組成物は従来の周知の滅菌法によって滅菌するか、または滅菌濾過することができる。得られた水溶液はそのまま使用されるようにパッケージングされてもよく、または凍結乾燥し、凍結乾燥した製剤を投与に先立って滅菌溶液と加え合わせることができる。組成物は、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、モノラウリン酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミンなどのpH調整剤及び緩衝剤、浸透圧調整剤、湿潤剤など、生理学的条件に近づけるために必要とされる薬学的に許容される補助物質を含むことができる。

20

【0420】

抗原は、リンパ系組織などの特定の細胞組織に抗原をターゲティングするリポソームによって投与することもできる。リポソームは、半減期を増大させるうえでも有用である。リポソームとしては、エマルジョン、フォーム、ミセル、不溶性単分子膜、液晶、リン脂質分散液、ラメラ層などが挙げられる。これらの製剤中では、送達させようとする抗原を、単独で、または例えばCD45抗原に結合するモノクローナル抗体などのリンパ系細胞に多くみられる受容体に結合する分子、または他の治療用もしくは免疫原性組成物と共にリポソームの一部として取り込ませる。したがって、所望の抗原で充填されたリポソームをリンパ系細胞の部位に誘導することができ、そこでリポソームは選択された治療用／免疫原性組成物を送達する。リポソームは、一般的に中性及び負に帯電したリン脂質とコレステロールのようなステロールとを含む標準的な小胞形成脂質から形成することができる。脂質の選択は、例えば、リポソームのサイズ、酸不安定性、及び血流中でのリポソームの安定性を考慮して一般的に導かれる。例えば、S z o k a e t a l. , A n n . R e v . B i o p h y s . B i o e n g . 9 ; 4 6 7 (1 9 8 0)、米国特許第4,235,871号、同第4,501,728号、同第4,501,728号、同第4,837,028号、及び同第5,019,369号に記載されるようなリポソームを調製するための様々な方法がある。

30

40

【0421】

免疫細胞にターゲティングするため、リポソームに組み込むリガンドは、例えば、所望の免疫系細胞の細胞表面決定因子に特異的な抗体またはそのフラグメントを含むことができる。リポソーム懸濁液を、とりわけ、投与方法、送達されるペプチド、及び治療される疾患のステージに応じて異なる用量で静脈内、局所的（l o c a l l y）、局所的（t o

50

p i c a l l y) といった要領で投与することができる。

【0422】

治療または免疫化の目的では、ペプチド及び任意で本明細書に記載されるペプチドの1つ以上をコードする核酸患者に投与してもよい。核酸を患者に投与するための多くの方法が便宜よく用いられる。例えば、核酸は「ネイキッドDNA」として直接投与することができる。このアプローチは、例えば、W o l f f e t a l . , S c i e n c e 247:1465-1468 (1990)、ならびに米国特許第5,580,859号及び同第5,589,466号に記載されている。核酸は、例えば、米国特許第5,204,253号に記載されるような弾道送達を用いて投与することもできる。DNAのみで構成された粒子を投与することもできる。あるいは、DNAを金粒子のような粒子に付着させてもよい。核酸配列を送達するためのアプローチとしては、エレクトロポレーションを伴う、または伴わないウイルスベクター、mRNAベクター、及びDNAベクターが挙げられる。

10

【0423】

核酸は、カチオン性脂質などのカチオン性化合物と複合体化して送達させることもできる。脂質により媒介される遺伝子送達法は、例えば、9618372WOAWO 96/18372、9324640WOAWO 93/24640、Mannino & Gould-Fogerite, BioTechniques 6(7):682-691 (1988)、米国特許第5,279,833号Rose米国特許第5,279,833号、9106309WOAWO 91/06309、及びFelgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7414 (1987)に記載されている。

20

【0424】

抗原は、ワクシニア、鶏痘、自己複製アルファウイルス、マラバウイルス、アデノウイルス(例えば、Tatsis et al., Adenoviruses, Molecular Therapy (2004) 10, 616-629を参照)、または、第2、第3、またはハイブリッド第2/第3世代レンチウイルス及び特定の細胞タイプまたは受容体をターゲティングするように設計された任意の世代の組換えレンチウイルス(例えば、Hu et al., Immunization Delivered by Lentiviral Vectors for Cancer and Infectious Diseases, Immunol Rev. (2011) 239(1):45-61, Sakuma et al., Lentiviral vectors: basic to translational, Biochem J. (2012) 443(3):603-18, Cooper et al., Rescue of splicing-mediated intron loss maximizes expression in lentiviral vectors containing the human ubiquitin C promoter, Nucl. Acids Res. (2015) 43(1):682-690, Zufferey et al., Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery, J. Virol. (1998) 72(12):9873-9880を参照)などのウイルスベクターに基づいたワクチンプラットフォームに含まれるようにしてもよい。上記に述べたウイルスベクターに基づくワクチンプラットフォームのパッケージングキャパシティーに応じて、この手法は1つ以上の抗原ペプチドをコードする1つ以上のヌクレオチド配列を送達することができる。配列は、変異が導入されていない配列を隣接させてもよく、リンカーによって分離されてもよく、または細胞内区画をターゲティングする1つ以上の配列がその前に配置されてもよい(例えば、Gros et al., Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients, Nat Med. (2016) 22(4):433-8

30

40

50

, Stronen et al., Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires, Science. (2016) 352 (6291) : 1337-41, Lu et al., Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions, Clin Cancer Res. (2014) 20 (13) : 3401-10を参照)。宿主に導入されると、感染細胞は抗原を発現し、それによりペプチド（複数可）に対する宿主の免疫（例えば、CTL）応答を刺激する。免疫化プロトコールにおいて有用なワクシニアベクター及び方法は、例えば、米国特許第4,722,848号に記載されている。別のベクターとしてBCG (Bacille Calmette Guérin、カルメット・ゲラン桿菌)がある。BCGベクターは、Stover et al. (Nature 351: 456-460 (1991))に記載されている。例えば、チフス菌 (Salmonella typhi) ベクターなどの治療薬の投与または抗原の免疫化において有用な広範な他のワクチンベクターが、本明細書の記載から当業者には明らかとなろう。

10

20

30

40

50

【0425】

核酸を投与する手段の1つは、1つまたは複数のエピトープコード核酸配列をコードしたミニジーンコンストラクトを使用することである。ヒト細胞で発現させるための選択されたCTLエピトープをコードしたDNA配列（ミニジーン）を作製するには、エピトープのアミノ酸配列を逆翻訳する。ヒトのコドン使用表を用いて各アミノ酸のコドン選択の手引きとする。これらのエピトープコードDNA配列を直接連結して、連続したポリペプチド配列を作製する。発現及び／または免疫原性を最適化するため、さらなるエレメントをミニジーン的设计に組み込むことができる。逆翻訳してミニジーン配列に組み込むことができるアミノ酸配列の例としては、ヘルパーTリンパ球、エピトープ、リーダー（シグナル）配列、及び小胞体保留シグナルが挙げられる。さらに、CTLエピトープのMHCによる提示は、合成（例えば、ポリアラニン）または天然のランキング配列をCTLエピトープに隣接して組み込むことによって向上させることができる。ミニジーン配列は、ミニジーンのと鎖とー鎖をコードしたオリゴヌクレオチドをアセンブルすることによりDNAに変換される。重複するオリゴヌクレオチド（30～100塩基の長さ）を周知の方法を用いて合成、リン酸化、精製し、適当な条件下でアニールする。オリゴヌクレオチドの末端同士を、T4 DNAリガーゼを用いてつなげる。次いで、CTLエピトープポリペプチドをコードしたこの合成ミニジーンを所望の発現ベクターにクローニングする。

【0426】

精製したプラスミドDNAは、様々な製剤を用いて注射用に調製することができる。これらのうちで最も簡単なものは、凍結乾燥したDNAを無菌リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で戻すことである。様々な方法がこれまでに記載されており、新たな技術も利用可能となる可能性がある。上記に述べたように、核酸はカチオン性脂質と便宜よく配合される。さらに、糖脂質、膜融合性リボソーム、ペプチド及びPINC (protective, interactive, non-condensing、保護的、相互作用性、非凝縮性)と総称される化合物を、精製したプラスミドDNAと複合体化することで安定性、筋肉内の分散性、または特定の臓器もしくは細胞タイプへのトラフィックキングなどの変数に影響を及ぼすこともできる。

【0427】

本明細書に開示される方法の各工程を実行することと、複数の抗原または複数の抗原のサブセットを含むワクチンを生産することとを含む、ワクチンを製造する方法も開示される。

【0428】

本明細書に開示される抗原は、当該技術分野における周知の方法を用いて製造することができる。例えば、本明細書に開示される抗原またはベクター（例えば、1つ以上の抗原

をコードする少なくとも1つの配列を含むベクター)の製造方法は、抗原またはベクターをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、抗原またはベクターを発現するのに適した条件下で培養することと、抗原またはベクターを精製することと、を含むことができる。標準的な精製方法としては、クロマトグラフィー法、電気泳動法、免疫学的方法、沈殿、透析、濾過、濃縮、及びクロマト分画法が挙げられる。

【0429】

宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、NSO細胞、酵母、またはHEK293細胞を含みうる。宿主細胞は、本明細書に開示される抗原またはベクターをコードする少なくとも1つの核酸配列を含む1つ以上のポリヌクレオチドで形質転換することができ、任意で、単離されたポリヌクレオチドは、抗原またはベクターをコードする少なくとも1つの核酸配列に機能的に連結されたプロモーター配列を含む。特定の実施形態では、単離されたポリペプチドはcDNAであってよい。

【0430】

VII. 抗原の使用及び投与

ワクチン接種プロトコルを用いて対象に1つ以上の抗原を投与することができる。プライミングワクチン及びブースターワクチンを用いて対象への投与を行うことができる。使用することが可能なワクチン接種法、プロトコル、及びスケジュールとしては、これらに限定されるものではないが、あらゆる目的で本明細書に参照によりその全容をそれぞれ援用するところの国際出願公開第WO2021092095号に記載されるものが挙げられる。

【0431】

プライミングワクチンは、C68 (例えば、配列番号1または2に示される配列) またはSamRNA (例えば、配列番号3または4に示される配列) に基づいたものとすることができる。ブースターワクチンも、C68 (例えば、配列番号1または2に示される配列) またはSamRNA (例えば、配列番号3または4に示される配列) に基づいたものとすることができる。

【0432】

プライミング／ブースター計画における各ベクターは、通常、抗原を含むカセットを含んでいる。カセットは、各抗原を通常取り囲む天然の配列、またはAAVなどの他の非天然のスペーサー配列などのスペーサーによって分離された約1〜50個の抗原を含むことができる。カセットは、破傷風トキソイド抗原などのMHCII抗原、及び普遍的なクラスII抗原とみなされるPADRE抗原を含んでもよい。カセットは、ユビキチンターゲティング配列などのターゲティング配列を含んでもよい。さらに、各ワクチン用量は、免疫調節因子と組み合わせて (例えば、同時、その前、またはその後で) 対象に投与することができる。各ワクチン用量は、チェックポイント阻害剤 (CPI) と組み合わせて (例えば、同時、その前、またはその後で) 対象に投与することができる。CPIは、抗体またはその抗原結合部分など、CTLA4、PD1、及び／またはPDL1を阻害するものを含むことができる。かかる抗体としては、アテゾリズマブ、イピリムマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、トレメリムマブまたはデュルバルマブを挙げることができる。各ワクチン用量は、IL-2、IL-7、IL-12 (IL-12 p35、p40、p70、及び／またはp70融合コンストラクトを含む)、IL-15、またはIL-21などのサイトカインと組み合わせて (例えば、同時、その前、またはその後で) 対象に投与することができる。各ワクチン用量は、修飾サイトカイン (例えば、pegIL-2) と組み合わせて (例えば、同時、その前、またはその後で) 対象に投与することができる。

【0433】

プライミングワクチンは、対象に注射 (例えば筋肉内に) することができる。用量ごとに両側性注射を用いることができる。例えば、ChAdV68 (C68) の1回以上の注射を用いることができ (例えば、総用量 1×10^{12} 個のウイルス粒子)、0.001〜1 µgのRNAの範囲から選択される低ワクチン用量、詳細には0.1もしくは1 µgのSAMベクターの1回以上の注射を用いることができ、または、1〜100 µgのRNA

の範囲から選択される高ワクチン用量、詳細には10もしくは100ugのSAMベクターの1回以上の注射を用いることができる。

【0434】

プライムワクチン接種後に、ワクチンブースト（ブースターワクチン）を注射（例えば筋肉内に）することができる。ブースターワクチンは、プライム後の約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10週間ごと、例えば、4週間ごと、及び／または8週間ごとに投与することができる。用量ごとに両側性注射を用いることができる。例えば、ChAdV68（C68）の1回以上の注射を用いることができ（例えば、総用量 1×10^{12} 個のウイルス粒子）、0.001~1ugのRNAの範囲から選択される低ワクチン用量、詳細には0.1もしくは1ugのSAMベクターの1回以上の注射を用いることができ、または、1~100ugのRNAの範囲から選択される高ワクチン用量、詳細には10もしくは100ugのSAMベクターの1回以上の注射を用いることができる。

10

【0435】

抗CTLA-4（例えばトレメリムマブ）を対象に投与することもできる。例えば、抗CTLA-4を筋肉内ワクチン注射（ChAdV68プライムまたはSamRNA低用量）の部位の近くに皮下投与することで同じリンパ節内に確実に送り込むことができる。トレメリムマブは、CTLA-4の選択的ヒトIgG2mAb阻害剤である。標的抗CTLA-4（トレメリムマブ）皮下用量は、通常、70~75mg（詳細には75mg）であり、例えば、1~100mgまたは5~420mgの用量範囲である。

【0436】

特定の場合では、デュルバルマブ（MEDI4736）などの抗PD-L1抗体を使用することができる。デュルバルマブは、PD-1及びCD80へのPD-L1の結合を阻害する選択的な高親和性のヒトIgG1 mAbである。デュルバルマブは一般的に4週間ごとに20mg/kgが静脈内投与される。

20

【0437】

免疫モニタリングを、ワクチン投与の前、その間、及び／またはその後に行うことができる。かかるモニタリングは、他のパラメータの中でもとりわけ、安全性及び有効性についての情報を与えることができる。

【0438】

免疫モニタリングを行うには、PBMCが一般的に用いられる。PBMCは、プライムワクチン接種の前、及びプライムワクチン接種の後（例えば、4週間及び8週間）に単離することができる。PBMCは、ブーストワクチン接種の直前、及び各ブーストワクチン接種の後（例えば、4週間及び8週間）に採取することができる。

30

【0439】

T細胞応答及びB細胞応答などの免疫応答を、免疫モニタリングプロトコールの一環として評価することができる。例えば、本明細書に記載されるワクチン組成物が免疫応答を刺激する能力を監視及び／または評価することができる。本明細書で使用する「免疫応答を刺激する」とは、免疫応答を開始させること（例えば、ナイーブな対象において免疫応答の開始を刺激するプライミングワクチン）、または免疫応答の増強（例えば、プライミングワクチンにより開始された既存の免疫応答などの抗原に対する既存の免疫応答を有する対象における免疫応答の増強を刺激するブースターワクチン）などの免疫応答のあらゆる増加を指す。T細胞応答は、ELISpot、細胞内サイトカイン染色、サイトカイン分泌、及び細胞表面捕捉、T細胞増殖、MHCマルチマー染色、または細胞傷害性アッセイなどの当業者には周知の1つ以上の方法を用いて測定することができる。ワクチンにコードされたエピトープに対するT細胞応答は、ELISpotアッセイを用いて、IFN- γ などのサイトカインの誘導を測定することによりPBMCから監視することができる。ワクチンにコードされたエピトープに対する特異的なCD4またはCD8 T細胞応答は、フローサイトメトリーを用いて、IFN- γ などの細胞内または細胞外で捕捉されたサイトカインの誘導を測定することによりPBMCから監視することができる。ワクチンにコードされたエピトープに対する特異的なCD4またはCD8 T細胞応答は、MHC

40

50

マルチマー染色を用い、エピトープ／MHCクラスⅠ複合体に対して特異的なT細胞受容体を発現するT細胞集団を測定することによりPBMCから監視することができる。ワクチンにコードされたエピトープに対する特異的なCD4またはCD8 T細胞応答は、3Hチミジン、プロモデオキシウリジン、及びカルボキシフルオロセインジアセテートスクシンイミジルエステル（CFSE）の取り込み後に、T細胞集団のエクスピボ増殖を測定することによりPBMCから監視することができる。ワクチンにコードされたエピトープに特異的なPBMC由来T細胞の抗原認識能及び溶解活性は、クロム放出アッセイまたは代替的な比色細胞傷害性アッセイにより機能的に評価することができる。

【0440】

B細胞応答は、B細胞の分化（例えば、形質細胞への分化）、B細胞または形質細胞の増殖、B細胞または形質細胞の活性化（例えば、CD80またはCD86などの共刺激マーカーの増加）、抗体のクラススイッチ、及び／または抗体産生（例えば、ELISA）を判定するために用いられるアッセイなど、当該技術分野では周知の1つ以上の方法を用いて測定することができる。抗体は中和能力について評価するなど、機能について評価することもできる。

【0441】

対象の病状を、本明細書に記載されるワクチン組成物のいずれかの投与後にモニタリングすることができる。例えば、病状は、対象から単離された無細胞DNA（cfDNA）（環状腫瘍DNA「ctDNA」ともまた呼ばれる）を使用してモニタリングすることができる。さらに、ワクチン療法の有効性を、対象から単離されたcfDNAを使用してモニタリングすることができる。cfDNAモニタリングは、a. 対象からcfDNAを単離するかまたは既に単離している工程と、b. 単離されたcfDNAをシーケンシングするかまたは既にシーケンシングしている工程と、c. 対象の野生型生殖系列核酸配列に対するcfDNAの1つ以上の変異の頻度を決定するかまたは既に決定している工程と、d. 工程（c）から対象の疾患の状態を評価するかまたは既に評価している工程と、を含むことができる。方法は、上記工程（c）に続いて、d. 所与の対象について工程（a）～（c）を複数回繰り返して行い、複数回の繰り返しで決定された1つ以上の変異の頻度を比較する工程と、f. 対象の疾患の状態を工程（d）から評価するかまたは既に評価されている工程を含んでもよい。複数回の繰り返しは、ワクチン組成物の投与の前に行われる工程（a）～（c）の1回目の繰り返し、及びワクチン組成物の投与の後に行われる工程（a）～（c）の2回目の繰り返しなどの異なる時点で行うことができる。工程（c）は、複数回の繰り返しで決定された1つ以上の変異の頻度を比較するか、または1回目の繰り返しで決定された1つ以上の変異の頻度を、2回目の繰り返しで決定された1つ以上の変異の頻度と比較することを含むことができる。後続の繰り返しまたは2回目の繰り返しで決定された1つ以上の変異の頻度の増加は、疾患の進行として評価することができる。後続の繰り返しまたは2回目の繰り返しで決定された1つ以上の変異の頻度の減少は、奏功として評価することができる。いくつかの態様では、応答は、完全奏功（CR）または部分奏功（PR）である。療方は、cfDNAの1つ以上の変異の頻度の評価が、対象が疾患を有していることを示す場合など、評価工程の後で対象に投与することができる。cfDNAの単離工程では、遠心分離を用いて細胞及び細胞破片からcfDNAを分離することができる。cfDNAは、血漿層、 Buffyコート、赤血を分離することなどにより、全血から単離することができる。cfDNAのシーケンシングでは、次世代シーケンシング（NGS）、サンガーシーケンシング、デュプレックスシーケンシング、全エクソームシーケンシング、全ゲノムシーケンシング、デノボ・シーケンシング、フェーズド・シーケンシング、標的化アンプリコンシーケンシング、ショットガンシーケンシング、またはこれらの組み合わせを使用することができ、シーケンシングに先立ってcfDNAを1つ以上の目的のポリヌクレオチド領域（例えば、1つ以上の変異をコードすることが知られているかまたは疑われるポリヌクレオチド、コード領域、及び／または腫瘍エクソームのポリヌクレオチド）について濃縮することができる。cfDNAの濃縮は、修飾する（例えば、ビオチン化する）ことができる1つ以上のポリヌク

10

20

30

40

50

レオチドプローブを、1つ以上の目的のポリヌクレオチド領域にハイブリダイズさせることを含み得る。一般的に、任意の数の変異を同時に、または並行してモニタリングすることができる。

【0442】

治療への応答（即ち、治療応答）は、例えば、例えば、Zhang et al. Cancer Discov. 2020; 10: 1842-1853, Parikh et al. Clin Cancer Res. 2020; 26: 1877-1885, and Vega et al. JCO Precision Oncology 2022; 6: e2100372に記載されているように、ネオ抗原ctDNA（例えば、バリエーション頻度「VAF」）、または、例えば、Palmer et al. Nat. Med. 2022; 28: 1619-1629 and Chabon et al. Nature 2020; 580 (7802): 245-251に記載されている、ネオ抗原変異半数体ゲノム等価物（変異hGE）を監視することによる、放射線医学調査及び／または分子応答により、測定することができる。分子応答は、基準ctDNAに対するctDNAの減少、例えば、基準ctDNAに対する、ctDNAの、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、または95%以上の減少として定義することができる。いくつかの実施形態では、分子応答は、基準ctDNAに対する、ctDNAの30%以上の減少として定義される。いくつかの実施形態では、分子応答は、基準ctDNAに対する、ctDNAの30%以上の減少として定義され、ctDNAの減少は、治療から24ヶ月までに、18ヶ月までに、12ヶ月までに、または、6ヶ月までに生じる。いくつかの実施形態では、分子応答は、基準ctDNAに対する、ctDNAの30%以上の減少として定義され、ctDNAの減少は、治療から12週、8週、4週、または2週までに生じる。他の実施形態では、基準ctDNAに対する、ctDNAの50%以上の減少として定義され、ctDNAの減少は、治療から24ヶ月までに、18ヶ月までに、12ヶ月までに、または、6ヶ月までに生じる。他の実施形態では、基準ctDNAに対する、ctDNAの50%以上の減少として定義される。いくつかの実施形態では、分子応答は、基準ctDNAに対する、ctDNAの50%以上の減少として定義され、ctDNAの減少は、治療から12週、8週、4週、または2週までに生じる。分子応答は、初期治療中の放射線医学的に安定した疾患（SD）の間に、及び／または、放射線医学的に進行性の疾患（PD）を有する患者において、観察することができる。

【0443】

VIII. 抗原の特定

VIII. A 抗原候補の特定

腫瘍の及び正常なエクソーム及びトランスクリプトームのNGS解析の研究モデルについては、これまでに記載されており、抗原特定空間で適用される。6, 14, 15 臨床状況における抗原特定の感度及び特異性を高めるための特定の最適化を考慮することができる。これらの最適化は、実験室プロセスに関連するものと、NGSデータ解析に関連するものの2つの領域に分類することができる。最適化の例は当業者には周知のものであり、例えば、そのような方法が、あらゆる目的で本明細書に参照によりその全容をそれぞれ援用する国際特許出願公開第WO/2017/106638号、同第WO/2018/195357号及び同第WO2018/208856号により詳細に記載されている。

【0444】

VIII. B HLAペプチドの単離及び検出

HLAペプチド分子の単離を、組織試料の溶解及び可溶化後に古典的な免疫沈降（IP）法を用いて行った（55～58）。清澄化したライセートをHLA特異的IPに使用した。

【0445】

免疫沈降を、抗体がHLA分子に特異的である、ビーズにカップリングした抗体を用いて行った。汎クラスI HLA免疫沈降のためには、汎クラスI CR抗体を使用し、ク

ラスII HLA-DRのためには、HLA-DR抗体を使用する。抗体を、一晚インキュベーション中に、NHS-セファロースビーズに共有結合で付着させる。共有結合性の付着後、ビーズを洗浄して、IPのために等分した(59, 60)。免疫沈降は、ビーズに共有結合されていない抗体を用いて行うこともできる。一般的に、これは、抗体をカラムに保持するためにProtein A及び／またはProtein Gでコーティングしたセファロース114または磁気ビーズを使用して行われる。MHC／ペプチド複合体を選択的に濃縮するために使用することができるいくつかの抗体を下記に示す。

抗体名	特異性
W6/32	クラスI HLA-A, B, C
L243	クラスII-HLA-DR
Tu36	クラスII-HLA-DR
LN3	クラスII-HLA-DR
Tu39	クラスII-HLA-DR, DP, DQ
SPVL3	クラスII-HLA-DQ
B7/21	クラスII-HLA-DP

10

【0446】

清澄化した組織溶解物を、免疫沈降のために抗体ビーズに添加する。免疫沈降後、ビーズを溶解物から除去し、追加的なIPを含む追加的な実験のために、溶解物を保存する。標準的な技法を用いて、IPビーズを洗浄して非特異的結合を除去し、HLA／ペプチド複合体をビーズから溶出する。分子量スピンカラムまたはC18分画を用いて、タンパク質構成要素をペプチドから除去する。結果として生じたペプチドを、Speed Vac蒸発によって乾燥させ、いくつかの場合には、MS解析の前に-20℃で保存する。HLA IPもまた、フィルター底を含有するプレートを用いて、96ウェルプレート内で行うことができる。プレートを用いることで、複数のIPをタンデムに実施することができることとなる。

20

【0447】

乾燥したペプチドを、逆相クロマトグラフィーに適しているHPLC緩衝液において再構成し、Fusion Lumos質量分析計(Thermo)における勾配溶出のために、C-18マイクロキャピラリーHPLCカラム上にロードする。ペプチド質量／電荷(m/z)のMS1スペクトルを、Orbitrap検出器において高解像度で収集し、その後、MS2低解像度スキャンを、選択イオンのHCDフラグメンテーション後にイオントラップ検出器において収集した。追加的に、MS2スペクトルは、CIDもしくはETDフラグメンテーション法、または、ペプチドのより大きなアミノ酸カバレッジを獲得するための3つの技法の任意の組み合わせのいずれかを用いて、取得することができる。MS2スペクトルはまた、並行反応モニタリング(parallel reaction monitoring; PRM)として知られる標的化方法により、Orbitrap検出器において高解像度質量精度で測定することもできる。標的化PRMでは、特定のペプチド前駆体イオンがOrbitrap検出器内で単離され、得られたすべてのHCDフラグメンテーションイオンがペプチドピークの溶出全体にわたってスキャンされる。これにより、同時に注入される安定な同位体標識されたペプチド標準の存在下で、内因性ペプチドのペプチド同定及び定量化の両方が可能となる。

30

40

【0448】

各解析由来のMS2スペクトルを、Comet(61, 62)を用いてタンパク質データベースに対して検索し、ペプチド同定を、Percolator(63~65)を用いてスコア化する。PEAKS studio(Bioinformatics Solutions Inc.)及び他のサーチエンジンを用いてさらなるシーケンシングを行うか、またはスペクトルマッチング及びデノボシーケンシング(97)を含むシーケ

50

ンシング法を用いることができる。標的化 M S 1 及び M S 2 スペクトルは S k y l i n e (1 0 4) により処理することができる。

【 0 4 4 9 】

V I I I . B . 1 . 包括的 H L A ペプチドシーケンシングを支持する M S 検出限界試験ペプチド Y V Y V A D V A A K (配列番号 8 8) を使用し、L C カラムにロードした異なる量のペプチドを用いて検出限界を決定した。試験したペプチドの量は、1 p m o l 、1 0 0 f m o l 、1 0 f m o l 、1 f m o l 、及び 1 0 0 a m o l とした。(表 1) これらの結果は、最低検出限界 (L o D) がアtomol^{1 2 2} 範囲 (1 0 ^{-1 8}) 内にあること、ダイナミックレンジは 5 桁にわたること、及び信号対雑音比が低フェムtomol^{1 2 2} 範囲 (1 0 ^{-1 5}) でのシーケンシングに充分と考えられることを示している。

10

【 0 4 5 0 】

(表 1)

ペプチド m/z	カラムへのロード量	1e9細胞中のコピー数／細胞
566.830	1 pmol	600
562.823	100 fmol	60
559.816	10 fmol	6
556.810	1 fmol	0.6
553.802	100 amol	0.06

20

【 0 4 5 1 】

I X . 提示モデル

提示モデルを用いて、患者におけるペプチド提示の尤度を特定することができる。異なる提示モデルは当業者には周知のものであり、例えば、そのような提示モデルは、あらゆる目的で本明細書に参照によりその全容をそれぞれ援用する米国特許第 1 0 , 0 5 5 , 5 4 0 号、米国特許出願公開第 U S 2 0 2 0 0 0 1 0 8 4 9 A 1 号及び同第 U S 2 0 1 1 0 2 9 3 6 3 7 、ならびに国際特許出願公開第 W O / 2 0 1 8 / 1 9 5 3 5 7 号、同第 W O / 2 0 1 8 / 2 0 8 8 5 6 号、及び同第 W O 2 0 1 6 1 8 7 5 0 8 号により詳細に記載されている。

30

【 0 4 5 2 】

X . 訓練モジュール

訓練モジュールを用いて、ペプチド配列がそのペプチド配列に関連した M H C アレルによって提示される尤度を生成する 1 つ以上の提示モデルを訓練データセットに基づいて構築することができる。様々な訓練モジュールが当業者には周知であり、例えば、そのような提示モデルは、あらゆる目的で本明細書に参照によりその全容をそれぞれ援用する米国特許第 1 0 , 0 5 5 , 5 4 0 号、米国特許出願公開第 U S 2 0 2 0 0 0 1 0 8 4 9 A 1 、ならびに国際特許出願公開第 W O / 2 0 1 8 / 1 9 5 3 5 7 号、及び同第 W O / 2 0 1 8 / 2 0 8 8 5 6 号により詳細に記載されている。訓練モジュールは、アレル毎ベースでペプチドの提示尤度を予測するための予測モデルを構築することができる。訓練モジュールは、2 つ以上の M H C アレルが存在する複数アレル場面においてペプチドの提示尤度を予測するための提示モデルも構築することができる。

40

【 0 4 5 3 】

X I . 予測モジュール

予測モジュールを用いて配列データを受け取り、提示モデルを用いて配列データ中の候

50

補抗原を選択することができる。具体的には、配列データは、患者の腫瘍組織細胞から抽出されたDNA配列、RNA配列、及び／またはタンパク質配列であってよい。予測モジュールは、患者の正常組織の細胞から抽出された配列データを、患者の腫瘍組織細胞から抽出された配列データと比較して1つ以上の変異を含む部分を特定することにより、変異したペプチド配列である候補ネオ抗原を特定することができる。予測モジュールは、患者の正常組織の細胞から抽出された配列データを、患者の腫瘍組織の細胞から抽出された配列データと比較して不適切に発現されている候補抗原を特定することにより、正常細胞または組織と比較して腫瘍細胞またはがん組織で発現が変化している候補抗原を特定することができる。

【0454】

10

提示モジュールは、1つ以上の提示モデルを処理されたペプチド配列に適用してペプチド配列の提示尤度を推定することができる。具体的には、予測モジュールは、提示モデルを候補抗原に適用することによって、腫瘍のHLA分子上に提示される可能性が高い1つ以上の候補抗原ペプチド配列を選択することができる。一実現形態では、提示モジュールは、あらかじめ決定された閾値を上回る推定提示尤度を有する候補抗原配列を選択する。別の実現形態では、提示モデルは、最も高い推定提示尤度を有するN個の候補抗原配列を選択する（Nは、一般的に、ワクチン中で送達することができるエピトープの最大数である）。所与の患者について選択された候補抗原を含むワクチンを対象に注射して免疫応答を刺激することができる。

【0455】

20

XI. B. カセット設計モジュール

XI. B. 1 概要

カセット設計モジュールを用いて、患者に注射するために選択された候補ペプチドに基づいてワクチンカセット配列を生成することができる。様々なカセット設計モジュールが当業者には周知であり、例えば、そのようなカセット設計訓練モジュールが、あらゆる目的で本明細書に参照によりそれらの全容をそれぞれ援用する米国特許第10,055,540号、米国特許出願公開第US20200010849A1号、ならびに国際特許出願公開第WO/2018/195357号、及び同第WO/2018/208856号により詳細に記載されている。

【0456】

30

治療エピトープのセットは、所定の閾値を上回る提示尤度（提示尤度は、提示モデルにより決定される）に関連付けられた予測モジュールによって決定された選択されたペプチドに基づいて生成することができる。しかしながら、他の実施形態では、治療エピトープのセットは、多くの方法の任意の1つ以上（単独または組み合わせ）に基づいて、例えば、患者のHLAクラスIまたはクラスIIアレルに対する結合親和性もしくは予測される結合親和性、患者のHLAクラスIまたはクラスIIアレルに対する結合安定性もしくは予測される結合安定性、ランダムサンプリングなどに基づいて、生成することができる。

【0457】

治療エピトープはそれ自体が選択されたペプチドに相当してもよい。治療エピトープは、選択されたペプチド以外にC及び／またはN末端フランキング配列を含むこともできる。N及びC末端フランキング配列は、その由来源タンパク質との関連において治療ワクチンエピトープの天然のN及びC末端フランキング配列であってよい。治療エピトープは固定長のエピトープを表してもよい。治療エピトープは、可変長のエピトープを表してもよく、エピトープの長さは例えばCまたはN末端フランキング配列の長さによって異なりうる。例えば、C末端フランキング配列及びN末端フランキング配列は、それぞれ2～5残基の異なる長さを有してよく、これによりエピトープの16種類の可能な選択肢が与えられる。

40

【0458】

カセット設計モジュールは、カセット内の2個の治療エピトープ間の連結部にまたがるジャンクションエピトープの提示を考慮することによってカセット配列を生成することも

50

できる。ジャンクションエピトープは、カセット内で治療エピトープ及びリンカー配列を連結するプロセスによってカセット内に生じる新規な非自己であるが無関係なエピトープ配列である。ジャンクションエピトープの新規な配列は、カセットの治療エピトープ自体とは異なる。

【0459】

カセット設計モジュールは、ジャンクションエピトープがその患者において提示される尤度を低下させるカセット配列を生成することができる。具体的には、カセットが患者に注射される際、ジャンクションエピトープは、患者のHLAクラスIまたはHLAクラスIIアレルによって提示される可能性を有し、それぞれCD8またはCD4 T細胞応答を刺激する。かかる応答は、ジャンクションエピトープに対する反応性を有するT細胞は治療効果を有さないことから望ましくなく、抗原競合によりカセット内の選択された治療エピトープに対する免疫応答を消失させる可能性がある⁷⁶。

10

【0460】

カセット設計モジュールは、1つ以上の候補カセットについて繰り返し処理を行って、そのカセット配列に関連付けられたジャンクションエピトープの提示スコアが数値閾値を下回るカセット配列を決定することができる。ジャンクションエピトープ提示スコアは、カセット内のジャンクションエピトープの提示尤度に関連付けられた量であり、ジャンクションエピトープ提示スコアの値が高いほど、カセットのジャンクションエピトープがHLAクラスIまたはHLAクラスIIまたはその両方によって提示されやすいことを示す。

20

【0461】

一実施形態では、カセット設計モジュールは、候補カセット配列間で最も低いジャンクションエピトープ提示スコアに関連付けられたカセット配列を決定することができる。

【0462】

カセット設計モジュールは、1つ以上の候補カセット配列について繰り返し処理を行い、各候補カセットのジャンクションエピトープ提示スコアを決定し、閾値を下回るジャンクションエピトープ提示スコアに関連付けられた最適なカセット配列を特定することができる。

【0463】

カセット設計モジュールは、候補カセット配列内のジャンクションエピトープのいずれかが、ワクチンを設計しようとする所与の患者の自己エピトープであるかどうかを識別するために1つ以上の候補カセット配列をさらに確認することができる。これを行うには、カセット設計モジュールは、BLASTなどの既知のデータベースに対してジャンクションエピトープを確認する。一実施形態では、カセット設計モジュールは、ジャンクション自己エピトープを防止するカセットを設計するように構成することができる。

30

【0464】

カセット設計モジュールは、ブルートフォースアプローチを実行して、すべての、または大部分の可能な候補カセット配列について繰り返し処理を行うことで最小のジャンクションエピトープ提示スコアを有する配列を選択することができる。しかしながら、かかる候補カセットの数は、ワクチンの容量が大きくなるにしたがって途方もなく大きくなりうる。例えば、20個のエピトープのワクチン容量では、カセット設計モジュールは、最小のエピトープ提示スコアを有するカセットを決定するために約 10^{18} 個の可能な候補カセットについて繰り返し処理を行わなければならない。この決定は、カセット設計モジュールが妥当な長さの時間内で患者に対するワクチンを生成するには計算の負荷（必要とされる計算処理リソースの点で）が大きくなり、時として処理不能となりうる。さらに、各候補カセットについて可能なジャンクションエピトープを処理することはよりいっそうの負荷となりうる。したがって、カセット設計モジュールは、ブルートフォースアプローチにおける候補カセット配列の数よりも大幅に小さい候補カセット配列の数について繰り返し処理を行う方法に基づいてカセット配列を選択することができる。

40

【0465】

50

カセット設計モジュールは、ランダムに、または少なくとも疑似ランダムに生成された候補カセットを生成し、所定の閾値を下回るジャンクションエピトープ提示スコアに関連付けられた候補カセットをカセット配列として選択することができる。さらに、カセット設計モジュールは、最小のジャンクションエピトープ提示スコアを有するサブセットからの候補カセットをカセット配列として選択することができる。例えば、カセット設計モジュールは、20個の選択されたエピトープのセットについて約100万の候補カセットのサブセットを生成し、最小のジャンクションエピトープ提示スコアを有する候補カセットを選択することができる。ランダムカセット配列のサブセットを生成し、このサブセットからジャンクションエピトープ提示スコアの低いカセット配列を選択することはブルートフォースアプローチと比べて最適とはいえないが、これは、必要な計算リソースが大幅に少なく、そのため、その実施が技術的に可能である。さらに、このより効率的な手法に対してブルートフォース法を行うことは、ジャンクションエピトープ提示スコアのわずかな、またはさらには無視される程度の改善しかもたらされない可能性があるため、リソースの配分の観点からはあまり価値がない。カセット設計モジュールは、カセットのエピトープ配列を非対称巡回セールスマン問題（TSP）として定式化することにより、改善されたカセット構成を決定することができる。ノードのリスト、及び各ノードのペア間の距離が与えられた場合、TSPは、各ノードをちょうど1回ずつ訪問して元のノードに戻るための最小の総距離に関連付けられたノードの配列を決定する。例えば、互いの間の距離が既知である都市A、B、及びCが与えられた場合、TSPの解は、可能な巡回路のうちで各都市をちょうど1回ずつ訪問するのに移動する総距離が最小となるような都市の閉じた配列を生成する。TSPの非対称バージョンは、ノードのペア間の距離が非対象である場合の最適なノードの配列を決定する。例えば、ノードAからノードBに移動するための「距離」は、ノードBからノードAに移動するための「距離」と異なる場合がある。非対称TSPを用いて改善された最適カセットについて解くことにより、カセット設計モジュールは、カセットの各エピトープ間のジャンクションにわたって低い提示スコアを与えるカセット配列を見つけることができる。非対称TSPの解は、カセットの各ジャンクションにわたったジャンクションエピトープ提示スコアを最小とするために各エピトープが連結されなければならない順序に対応した治療エピトープの配列を示す。このアプローチによって決定されたカセット配列は、ジャンクションエピトープの提示が大幅に低い配列を与える一方で、特に生成される候補カセット配列の数が大きい場合に、必要とされる計算リソースがランダムサンプリングアプローチよりも大幅に少なくなる可能性がある。異なる計算手法及び最適化カセット設計の比較の例示的な例が、あらゆる目的で本明細書に参照によりその全容をそれぞれ援用する米国特許第10,055,540号、米国特許出願公開第US20200010849A1、ならびに国際特許出願公開第WO/2018/195357号、及び同第WO/2018/208856号により詳細に記載されている。

【0466】

天然のランキング配列によって連結され、変異KRAS G12C、KRAS G12D、KRAS G12V、及びKRAS Q61Hを有するKRASネオエピトープのそれぞれの4回の繰り返しを含み、潜在的なジャンクションエピトープを最小とするような順序で配列された、連結されたKRAS関連MHCクラスIネオエピトープの例示的な非限定的カセットは、配列番号65に示され、G12C G12D Q61H G12D G12V G12C Q61H G12D G12V G12C Q61H G12D G12V Q61H G12V G12CのKRAS関連ネオエピトープの順序を有するアミノ酸配列によって表される。

【0467】

共通抗原ワクチンに含めるための共通（ネオ）抗原の配列及びかかるワクチンによる治療に適当な患者は、例えば、あらゆる目的で本明細書に参照により援用する米国特許出願第17/058,128号に記載されるように当業者が選択することができる。候補共通（ネオ）抗原の質量分析（MS）による検証を、選択プロセスの一環として行うことができる。

【0468】

XIII. 例示的なコンピュータ

本明細書に記載される計算方法のいずれにおいてもコンピュータを使用することができる。当業者には、コンピュータは異なるアーキテクチャを有し得る点が認識されよう。当業者には周知のコンピュータの例は、例えば、あらゆる目的で本明細書に参照によりその全容をそれぞれ援用する、米国特許第10,055,540号、米国特許出願公開第US20200010849A1号、ならびに国際特許出願公開第WO/2017/106638号、同第WO/2018/195357号、及び同第WO/2018/208856号により詳細に記載されている。

【実施例】

【0469】

XIV. 実施例

以下は、本明細書を実施するための具体的な実施形態の例である。これらの例はあくまで例示の目的で示されるものにすぎず、本発明の範囲をいかなる意味においても限定しようとするものではない。用いられる数値（例えば、量、温度など）に関して精度を確実にするべく努力に努めてはいるが、ある程度の実験的誤差及び偏差は無論のこと、許容されなければならない。

【0470】

本発明の実施では、特に断らない限りは、当該技術分野の技術の範囲内で、タンパク質化学、生化学、組換えDNA技術、及び薬理学の従来の方法を用いている。かかる技術は文献に完全に説明されている（例えば、T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W. H. Freeman and Company, 1993); A. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 3rd Ed. (Plenum Press) Vols A and B (1992) を参照されたい)。

【0471】

XIV. A. 反復ネオエピトープを含むカセット及び／または免疫優性ネオエピトープの除去の評価の概要

ワクチン接種によって、対応する免疫応答（複数可）を刺激する複数のクラスI MHC制限ネオ抗原を送達することができる。複数のネオエピトープ、具体的には複数の異なるKRAS関連ネオエピトープを単一の遺伝子産物としてコードするいくつかのワクチンカセットが遺伝子操作によって得られており、これらのエピトープはその天然の周囲のペプチド配列内に埋め込まれている。様々なカセット設計が、1つ以上のネオエピトープの複数のコピー（すなわち、繰り返し）を有している。様々なカセット設計が、免疫優性ネオエピトープの除去も採り入れている。

【0472】

XIV. B. 反復ネオエピトープ及び／または免疫優性ネオエピトープの除去の評価の材料及び方法
抗原

以下の実施例で使用した、エピトープを含む25マーのアミノ酸配列（すなわち、天然のN及びC末端アミノ酸リンカーで挟まれたエピトープ）を表2Aに示し、下記に記載するようにして用いた。異なるコンストラクトのカセットの抗原コード配列を、以下の実施

10

20

30

40

50

例に記載される順序及び数（例えば、図 1 A、2 A、3 A、及び 4 Aを参照）で、各 2 5 マー配列を互いに直接連結する（すなわち、連続した 2 5 マー配列間にさらなるアミノ酸が存在しないように）ことによって構築した。互いに連結された複数の異なるエピトープ、ならびにユニバーサルな M H C クラス I I 抗原である破傷風トキソイド及び P A D R E（太字の配列）を含む完全長の抗原コード配列を含むカセットを表 2 B に示す。ベクターへの完全な外因性ヌクレオチドインサートは、5' から 3' の方向に、コザック配列（G C C A C C）、3つのアミノ酸 M A G をコードするヌクレオチド（A T G G C C G G G）、表 2 B のカセット配列のうちの 1 つ、及び 2 個の終止コドン（T A A T G A）を含む。個別の K R A S 変異 G 1 2 V、G 1 2 C、及び G 1 2 D の 4 つの繰り返しを含むさらなるカセットを作製した（すなわち、配列 5 7、5 8、または 5 9 の別々のコンカテマー）。 10

【 0 4 7 3 】

（表 2 A）2 5 マーネオエピトープを含む配列

抗原名	2 5 マー配列	配列番号
KRAS G12C	MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQ	57
KRAS G12D	MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ	58
KRAS G12V	MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQ	59
KRAS Q61H	ETCLLDILDTAGHEEYSAMRDQYMR	60
TP53 R213L	LRVEYLDDRNTFLHSVVVPYEPPEV	61
TP53 S127Y	HSGTAKSVTCTYYPALNKMFCQLAK	62

 20

【 0 4 7 4 】

（表 2 B）カセット内の完全長のマルチネオエピトープ配列

30

40

50

1X (20x1)カセット(配列番号63)	
MTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQETCLLDILDTAGKEEYSAMRDQYMRMCNSSCMGGMN RMPILTIITLEDSSSGIHSGATTTAPPLSGKGNPEEEDVSGIHSGATTTAPFLSGKGNPEEEDVEIL DEAYVMAYVMAGVGSPLYVSRLLMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQETCLLDILDTAGREE YSAMRDQYMRSYLDSGIHSGATATAPSLSGKGNPEKSVTCTYSPALNNMFCQLAKTCPVQMT EYKLVVVGAGAGVGKSALTIQLIQETCLLDILDTAGLEEYSAMRDQYMRRLRVEYLDDRNTFLHS VVVPYEPPEVDGQITVVGQRIGSVSFGTVYKKGKWHGMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQETC LLDILDTAGHEEYSAMRDQYMRWQQSYLDSGIHFAGTTTAPSLSGKHSHTAKSVTCTYYPAL NKMFCQLAKKSVTCTYSPALNEMFCQLAKTCPVQMTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQGPG PGAKFVAAWTLKAAAGPGPGQYIKANSKFIGITELGPGPG	10
KRAS 2X (8x2)カセット(配列番号64)	
MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQETCLLDILDTAGHEEYSAMRDQYMRMTEYKLVVVGAG DVGKSALTIQLIQETCLLDILDTAGREEYSAMRDQYMRMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ ETCLLDILDTAGLEEYSAMRDQYMRMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQETCLLDILDTAGK EEYSAMRDQYMRMTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQETCLLDILDTAGKEEYSAMRDQYMR MTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQETCLLDILDTAGHEEYSAMRDQYMRMTEYKLVVVGAG VGVGKSALTIQLIQETCLLDILDTAGREEYSAMRDQYMRMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLI QETCLLDILDTAGLEEYSAMRDQYMRGPGPGAKFVAAWTLKAAAGPGPGQYIKANSKFIGI TELGPGPG	20
KRAS 4X (4x4)カセット(配列番号65)	
MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQETCLLDILDTAGH EEYSAMRDQYMRMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQ MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQETCLLDILDTAGHEEYSAMRDQYMRMTEYKLVVVGAD GVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQ ETCLLDILDTAGHEEYSAMRDQYMRMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAG VGVGKSALTIQLIQETCLLDILDTAGHEEYSAMRDQYMRMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLI QMTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQGPGPGAKFVAAWTLKAAAGPGPGQYIKANSKFIGI TELGPGPG	30
KRAS 4x1 カセット (配列番号66)	
MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQETCLLDILDTAGH EEYSAMRDQYMRMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQGPGPGAKFVAAWTLKAAAGPGPG QYIKANSKFIGITELGPGPG	40
KRAS 4x1 + R213L カセット(配列番号67)	
MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQETCLLDILDTAGH EEYSAMRDQYMRMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQLRVEYLDDRNTFLHSVVVPYEPPEV GPGPGAKFVAAWTLKAAAGPGPGQYIKANSKFIGITELGPGPG	
KRAS 4x1 + S127Y カセット(配列番号68)	
MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQETCLLDILDTAGH EEYSAMRDQYMRMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQHSGTAKSVTCTYYPALNKMFCQLA KGPGPGAKFVAAWTLKAAAGPGPGQYIKANSKFIGITELGPGPG	

【 0 4 7 5 】

アデノウイルスベクター

抗原発現系用の改変 ChAdV68 ベクターを、E1 (nt 577~3403) 及び E3 (nt 27, 125~31, 825) 配列を欠失させ、対応する ATCC VR-594 (独立してシーケンシングした完全長の VR-594 C68、配列番号10) ヌクレオチドを5つの位置で置換した AC_000011.1 に基づいて作製した。対応する ATCC VR-594 ヌクレオチドが5つの位置で置換された完全長の ChAdV68 AC_000011.1 配列は、「ChAdV68.5WTnt」(配列番号1) と呼ばれる。CMVプロモーター／エンハンサー配列の制御下にある抗原カセットを、欠

失させた E 1 配列の代わりに挿入した。抗原カセットに 20 個のモデル抗原を含む代表的な ChAdV68 ベクターは、「ChAdV68.5WTnt.MAG25マー」（配列番号 2）である。MAG25 マーカセットを有する後述する抗原カセットを有するベクターを、上記の（例えば、表 2 B の）抗原カセットに置き換えることができる。

【0476】

293F 細胞でのアデノウイルス生産

ChAdV68 ウイルス生産を、8% CO₂ のインキュベーター内で 293FreeStyle（商標）（ThermoFisher）培地中で増殖させた 293F 細胞で行った。感染させた日に細胞を生存率 98% で 10⁶ 細胞/mL に希釈し、1 L の振盪フラスコ（Corning）中の生産ラン 1 回当たり 400 mL を使用した。感染 1 回当たり、4 mL の目標 MOI が 3.3 よりも高い 3 次ウイルスストックを用いた。トリパンブルーによって測定される生存率が 70% を下回るまで 48~72 時間にわたって細胞をインキュベートした。次いで、感染細胞を最大速度のベンチトップ遠心分離器による遠心分離により回収し、1×PBS 中で洗浄し、再遠心した後、20 mL の 10 mM Tris、pH 7.4 中に再懸濁した。細胞ペレットを凍結融解を 3 回繰り返して溶解し、4300×g で 5 分間遠心して清澄化した。

10

【0477】

CsCl 遠心分離によるアデノウイルスの精製

CsCl 遠心分離によってウイルス DNA を精製した。2 回の不連続の勾配ラン操作を行った。1 回目は、細胞成分からウイルスを精製するためのものであり、2 回目は、細胞成分からの分離物をさらに精製して感染性粒子から欠陥粒子を分離するためのものである。

20

【0478】

10 mL の 1.2 (92 mL の 10 mM Tris、pH 8.0 に 26.8 g の CsCl を溶解したもの) CsCl をポリアロマーチューブに加えた。次いで、8 mL の 1.4 CsCl (87 mL の 10 mM Tris、pH 8.0 に 53 g の CsCl を溶解したもの) を、ピペットを使用してチューブの底に入れることで慎重に加えた。清澄化したウイルスをこの 1.2 の層の上に層をなすように慎重に加えた。必要に応じてさらなる 10 mM Tris を加えてチューブのバランスを取った。次いで、各チューブを SW-32 Ti ローターに入れ、10℃ で 2 時間 30 分、遠心した。次いで、チューブを取り出して層流キャビネットに移し、18 ゲージの針と 10 mL シリンジを用いてウイルスバンドを吸引した。混入する宿主細胞の DNA 及びタンパク質を除去しないように注意を払った。次いで、バンドを 10 mM Tris、pH 8.0 で少なくとも 2 倍に希釈し、上記に述べた不連続勾配上に上記のように層をなすように置いた。今回の操作は終夜行った点以外は、上記と同様にして操作を行った。翌日、欠陥粒子のバンドを吸引しないように注意しながらバンドを吸引した。次いで、ARM バッファー (20 mM Tris、pH 8.0、25 mM NaCl、2.5% グリセロール) に対して Slide-a-Lyzer（商標）カセット（Pierce）を使用してウイルスを透析した。これをバッファーを 1 回交換するごとに 1 時間、3 回行った。次いで、ウイルスを等分量に分けて -80℃ で保存した。

30

40

【0479】

アデノウイルスアッセイ

OD_{260nm} での吸光度値 1 に相当する 1.1 × 10¹² 個のウイルス粒子 (VP) の消光係数に基づいて OD₂₆₀ アッセイを用いて VP 濃縮化を行った。アデノウイルスの 2 つの希釈液 (1:5 と 1:10) を、ウイルス溶解バッファー (0.1% SDS、10 mM Tris、pH 7.4、1 mM EDTA) 中で調製した。両方の希釈液で OD を 2 重に測定し、OD₂₆₀ 値 × 希釈倍率 × 1.1 × 10¹² VP を乗じることにより、VP 濃度/mL を測定した。

【0480】

ウイルスストックの限界希釈アッセイによって感染単位 (IU) 力価を計算した。最初

50

にウイルスをDMEM／5％NS／1×PBS中で100倍に希釈した後、10倍希釈率を用いて 1×10^{-7} にまで希釈した。次いで、 $100 \mu\text{L}$ のこれらの希釈液を、少なくとも1時間前に24ウェルプレートに 3×10^5 細胞／ウェルで播種した293A細胞に加えた。これを二重で行った。各プレートを、 37°C の CO_2 (5％) インキュベーターで48時間、インキュベートした。次いで、細胞を1×PBSで洗浄した後、100％冷メタノール (-20°C) で固定した。次いで、各プレートを -20°C で最低20分間インキュベートした。ウェルを1×PBSで洗浄した後、1×PBS／0.1％BSA中、室温で1時間ブロッキングした。ウサギ抗Ad抗体 (Abcam, Cambridge, MA) をブロッキングバッファー (ウェル当たり 0.25 mL) 中に1:8000の希釈率で加え、室温で1時間インキュベートした。各ウェルをウェル当たり 0.5 mL のPBSで4回洗浄した。1000倍に希釈したHRP結合ヤギ抗ウサギ抗体 (Bethyl Labs, Montgomery Texas) をウェルごとに加え、1時間インキュベートした後、最終ラウンドの洗浄を行った。5回のPBS洗浄を行い、各プレートを、Tris緩衝生理食塩水に加えたDAB (ジアミノベンジジン四塩酸塩) 基質 (50 mM Tris、 $\text{pH} 7.5$ 中、 0.67 mg/mL のDAB、 150 mM NaCl) を0.01％ H_2O_2 とともに使用して発色させる。各ウェルを、カウントに先立って5分間、発色させた。細胞を、視野当たり4～40個の染色細胞となるような希釈率を用いて10倍対物レンズ下でカウントした。使用した視野は、24ウェルプレート上の視野当たり625個に相当する 0.32 mm^2 の格子であった。 1 mL 当たりの感染性ウイルスの数は、格子1個当たりの染色細胞の数に、視野1つ当たりの格子の数を掛け、希釈倍率10を掛けることによって求めることができる。同様に、GFP発現細胞を扱う場合、カプシド染色の代わりに蛍光を用いて 1 mL 当たりのGFP発現ビリオンの数を求めることができる。

10

20

30

40

50

【0481】

SAMベクター

自己複製型のベネズエラウマ脳炎 (VEE) ウイルス (Kinney, 1986, Virology 152:400-413) から、26Sサブゲノムプロモーターの3'側に位置するVEEの構造タンパク質を欠失させることによって、抗原発現系のRNAアルファウイルス骨格を作製した (7544～11, 175を欠失させたVEE配列; 番号付けはKinney et al. 1986に基づく。配列番号6)。自己複製型mRNA (「SAM」) ベクターを作製するには、欠失させた配列を抗原配列に置き換える。20個のモデル抗原を含む代表的なSAMベクターは、「VEE-MAG25マー」 (配列番号4) である。MAG25マーカセットを有する記載される抗原カセットを有するベクターを、本明細書に記載のSARS-CoV-2カセット及び／または完全長タンパク質に置き換えることができる。

【0482】

SAMを作製するためのインビトロ転写

インビトロ試験を行うには：SAMベクターを「AU-SAM」ベクターとして作製した。カノニカルな3'末端のジヌクレオチドGGを欠いた改変T7 RNAポリメラーゼプロモーター (TAATACGACTCACTATA [配列番号89]) を、SAMベクターの5'末端に付加してインビトロ転写用の鋳型DNA (配列番号6に記載の配列; 挿入された抗原カセットを有さない、7544～11, 175を欠失させたSAM) を作製した。反応条件を以下に記載する。

— $1 \times$ T7 RNAポリメラーゼミックス (E2040S)、 0.025 mg/mL のDNA転写用鋳型 (制限酵素による消化によって直鎖化したもの)、 8 mM のCleanCap試薬AU (カタログ番号N-7114) 及び各 10 mM のATP、シチジン三リン酸 (CTP)、GTP、及びウリジン三リン酸 (UTP) の最終濃度を用いた、 $1 \times$ 転写バッファー (40 mM Tris-HCl [$\text{pH} 7.9$]、 10 mM ジチオトレイトール、 2 mM スベルミジン、 0.002% Triton X-100、及び 27 mM 塩化マグネシウム)

— 転写反応を 37°C で2時間インキュベートし、Daseバッファー中、 0.001

mgのDNA転写鋳型当たり最終濃度2UのDNase I (AM2239)で1時間、37℃で処理した。

— SAMをRNeasy Maxi (QIAGEN, 75162)により精製した。
【0483】

5'キャップ構造の同時転写による付加の代わりに、7-メチルグアノシンまたは関連する5'キャップ構造を、mRNA 2'-O-メチルトランスフェラーゼ及びS-アデノシルメチオニンを含むワクシニアキャッピングシステム (NEBカタログ番号M2080)を用いて転写後に酵素的に付加することもできる。

【0484】

免疫化

ChAdV68ワクチンでは、キメラHLA-A11:01 (Taconicモデル番号9660-[CB6F1-Tg (HLA-A*1101/H2-Kb) A11.01])を発現するトランスジェニックマウスに、示されるように、100μL体積中、 8×10^{10} 個のウイルス粒子 (VP) または 5×10^{10} 個のVPを両側性筋肉内注射 (片脚当たり50μL)により注入した。

【0485】

SAMワクチンでは、100μL体積中、10μgのRNA-LNP複合体を両側性筋肉内注射 (片脚当たり50μL)として投与した。

【0486】

脾細胞の解離

脾細胞を免疫14日後に単離した。各マウスの脾臓を、3mLの完全RPMI (RPMI、10% FBS、ペニシリン/ストレプトマイシン)中にプールした。gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec)を製造者のプロトコールにしたがって使用して機械的解離を行った。解離した細胞を、40ミクロンのフィルターに通して濾過し、赤血球をACK溶解バッファー (150mM NH₄Cl、10mM KHCO₃、0.1mM Na₂EDTA)で溶解した。細胞を30ミクロンのフィルターに通して再び濾過した後、完全RPMI中に再懸濁した。細胞を、死細胞及びアポトーシス細胞を除外するためのヨウ化プロピジウム染色を用いてCytoflex LX (Beckman Coulter)でカウントした。次いで、後の分析用に細胞を適当な生細胞濃度に調整した。

【0487】

エクスピボ酵素結合イムノスポット (ELISpot) 分析

マウスIFNg ELISpotPLUSキット (MABTECH)を用い、ELISPOTハーモナイゼーションガイドライン {DOI:10.1038/nprot.2015.068}にしたがってELISPOT分析を行った。 1×10^5 個の脾細胞を、96ウェルIFNg抗体コーティングプレート中で、10μMの示したペプチドと16時間インキュベートした。アルカリホスファターゼを用いてスポットを発色させた。反応時間を10分計り、水道水をプレートに流して反応を停止させた。AID vSpot Reader Spectrumを用いてスポットをカウントした。ELISPOT分析では、飽和度が50%よりも高いウェルを「測定不能多数」として記録した。複製ウェルの偏差が10%よりも大きい試料は分析から除外した。次いで、スポットのカウントを式: $\text{スポットカウント} + 2 \times (\text{スポットカウント} \times \text{コンフルエンス}(\%) / [100\% - \text{コンフルエンス}(\%)])$ を用いてウェルのコンフルエンスについて補正した。ネガティブペプチド刺激ウェルのスポットカウントを抗原刺激ウェルから差し引くことによりネガティブバックグラウンドを補正した。最後に、測定不能多数として標識されたウェルを、最高の観察補正值に設定し、10の位で四捨五入して100の位までの概数とした。

【0488】

XIV. C. 反復エピトープの評価結果

反復 (すなわち、繰り返しの) ネオエピトープを有するカセットによるワクチン有効性を、所与のネオエピトープの単一のコピーのみを有するカセットに対して比較した。ヒト

10

20

30

40

50

H L A - A 1 1 : 0 1 を発現するように操作したマウスを、後述する C h A d V 6 8 送達ベクターを使用して 8×10^{10} 個の V P で免疫し、I F N γ E L I S p o t により有効性を評価した。

【0489】

図1Aに示されるように、K R A S ネオエピトープ G 1 2 C、G 1 2 V、G 1 2 D、及び Q 6 1 H の単一のコピー（「K R A S 1 X (2 0 × 1) 」、カセット＝配列番号 6 3）、K R A S G 1 2 C、G 1 2 V、G 1 2 D、及び Q 6 1 H ネオエピトープの2回の反復とさらなる K R A S ネオエピトープの2回の反復（「K R A S 2 X (8 × 2) 」、カセット＝配列番号 6 4）、または各 K R A S ネオエピトープの4回の反復（「K R A S 4 X (4 × 4) 」、カセット＝配列番号 6 5）のいずれかを有するカセットの有効性を評価するための一連の C h A d V 6 8 送達ベクターを設計した。H L A - A 1 1 : 0 1 は、K R A S G 1 2 C、G 1 2 V、及び G 1 2 D ネオエピトープを提示することがあらかじめ予測された（データは示さず）。

【0490】

図1Bに示され、また表3に示されるように、ネオエピトープの複数の反復を有するベクターによるワクチン接種は、スポット形成コロニー（S F C）の増加を示し、カセット内のエピトープコード配列の反復が、K R A S ネオエピトープ G 1 2 C に対する抗原特異的免疫応答の増加につながることを示した。しかしながら、G 1 2 V 1 × 4 カセット（G 1 2 V のみを発現する）で G 1 2 C ペプチドに対する応答がみられたが G 1 2 C 1 × 4 カセット（G 1 2 C のみを発現する）で応答がみられなかったというさらなる観察に基づけば、4 × 4 カセットで G 1 2 C ペプチドに対して観察された応答は、G 1 2 V エピトープにより誘導されたものである可能性が高かった。質量分析によって、G 1 2 C ペプチドに G 1 2 V ペプチドが混入していたことが確認された。

【0491】

図1C及び図1Dに示され、表3Aに示されるように、ネオエピトープの複数の反復を有するベクターによるワクチン接種は、スポット形成コロニー（S F C）の増加を示し、カセット内のエピトープコード配列の反復が、C h A d V 6 8 送達システムを用いた K R A S ネオエピトープ、具体的には G 1 2 V 及び G 1 2 D ネオエピトープに対する抗原特異的免疫応答の増加につながることを示した。

【0492】

（表3）K R A S ネオエピトープ G 1 2 C、G 1 2 V、及び G 1 2 D ± 反復についての E L I S p o t データ

抗原カセット	G12C		G12V		G12D	
	平均	+/- SE	平均	+/- SE	平均	+/- SE
20x1	17	7	3	2	5	3
4x4	2277 ⁺	580	6169*	31	970	864
8x2	66	31	1563	293	97	45

* 6 つの試料のうち、5 つが測定不能多数であった（最大値 6 2 0 0 ）

+ G 1 2 V の混入によると考えられる

【0493】

X I V . D . 免疫優性エピトープ除去の評価の結果

免疫応答を刺激することができる、潜在的に免疫優性である T P 5 3 ネオエピトープを有するカセットによるワクチン有効性を、免疫応答を刺激することができる T P 5 3 ネオエピトープを含まないカセットに対して比較した。ヒト H L A - A 1 1 : 0 1 を発現するように操作したマウスを、後述する C h A d V 6 8 送達ベクターを使用して 5×10^{10} 個の V P で免疫し、E L I S p o t により有効性を評価した。H L A - A 1 1 : 0 1 は、K R A S G 1 2 C、G 1 2 V、G 1 2 D、及び T P 5 3 S 1 2 7 Y ネオエピトープを

提示することがあらかじめ予測された（データは示さず）。

【0494】

図2Aに示されるように、TP53エピトープの免疫優性を評価するために一連のChAdV68送達ベクターを設計した。KRASネオエピトープG12C、G12V、G12D及びQ61Hのみ（「KRAS 4×1」、カセット=配列番号66）、KRASネオエピトープと、ヒトHLA-A02:01によって提示されるがHLA-A11:01によっては提示されないことが予測されたことからHLA-A11:01マウスモデルでは免疫応答を刺激できないと考えられるTP53 R213Lとの組み合わせ（「KRAS 4×1+R213L」、カセット=配列番号67）、または、KRASネオエピトープと、HLA-A11:01によって提示されると予測されたTP53 S127Yネオ

10

【0495】

図2Bに示され、表4に示されるように、免疫原性のTP53 S127Yエピトープを含むベクターによるワクチン接種は、TP53ネオエピトープを含まない（「4×1」）、または非免疫原性のTP53を含む（「4×1+R213L」）ベクターと比較して、KRASエピトープG12Cに対するスポット形成コロニー（SCF）の減少を示し、ワクチンカセット内のTP53 S127Yネオエピトープの存在がKRAS特異的T細胞応答を減少させる免疫優性ネオエピトープとして作用することを示している。しかしながら、G12V 1×4カセット（G12Vのみを発現する）でG12Cペプチドに対する

20

【0496】

図2C～Eに示され、表4に示されるように、免疫原性のTP53 S127Yエピトープを含むベクターによるワクチン接種は、TP53ネオエピトープを含まない（「4×1」）、または非免疫原性のTP53を含む（「4×1+R213L」）ベクターと比較して、KRASエピトープG12V及びG12Dに対するスポット形成コロニー（SCF）の減少を示し、ワクチンカセット内のTP53 S127Yネオエピトープの存在がKRAS特異的T細胞応答を減少させる免疫優性ネオエピトープとして作用することを示している。

30

【0497】

（表4）KRAS及びTP53ネオエピトープのELISpotデータ

抗原 カセット	G12C		G12D		G12V		R213L		S127Y	
	平均	+/-SE	平均	+/-SE	平均	+/-SE	平均	+/-SE	平均	+/-SE
4x1	92	41	32	21	1570	833	ND	ND	ND	ND
4x1+R213L	86	74	62	46	773	378	5	3	ND	ND
4x1+S127Y	2	1	7	5	0	0	ND	ND	6118*	264

40

ND = 測定される。* 6つの試料のうち、3つが測定不能多数であった（最大値6200）

【0498】

XIV. E. 質量分析によるKRASネオエピトープの提示の評価

候補KRASエピトープの質量分析（MS）による検証を、標的化質量分析法を用いて行った。ドナー腫瘍切除物（複数アレル；アレル指定はEDGE予測より）または示されるマルチエピトープカセット（表2B）、もしくは、表2Aに示されるネオエピトープ含

50

有 2 5 マー配列を発現するように操作した単一アレル K 5 6 2 株を評価した。質量分析法は、あらゆる目的で本明細書にその全容を援用するところの G i l l e t e e t a l . (N a t M e t h o d s . 2 0 1 3 J a n ; 1 0 (1) : 2 8 - 3 4) により詳細に記載されている。K 5 6 2 単一アレルインビトロシステムを使用する標的化質量分析は、あらゆる目的で本明細書に参照により援用する国際出願公開第 W O 2 0 2 1 0 9 2 0 9 5 号に記載されている。表 5 に示される結果は、異なる K R A S ネオエピトープによる H L A 特異的提示が確認されたことを示す。

【 0 4 9 9 】

(表 5) K R A S ネオエピトープ質量分析

変異	HLA	配列	腫瘍	20x1 K562 細胞株	4x4 K562 細胞株	8x2 K562 細胞株	配列番号 57または 59 25マー
G12C	A*02:01	KLVVVGACGV	なし	なし	なし	なし	あり
G12C	A*03:01	VVVGACGVGK	なし	あり	NA	NA	NA
G12C	A*11:01	VVVGACGVGK	なし	あり	あり	なし	NA
G12C	A*68:01	VVVGACGVGK	なし	あり	NA	NA	NA
G12C	B*07:02	GACGVGKSAL	なし	あり	NA	NA	NA
G12C	C*03:04	GACGVGKSAL	なし	あり	NA	NA	NA
G12D	A*02:01	KLVVVGADGV	なし	なし	あり	なし	NA
G12D	A*03:01	VVGADGVGK	なし	あり	NA	NA	NA
G12D	A*03:01	VVVGADGVGK	なし	あり	NA	NA	NA
G12D	A*11:01	VVGADGVGK	あり	あり	あり	なし	NA
G12D	A*11:01	VVVGADGVGK	あり	あり	あり	あり	NA
G12D	A*68:01	VVVGADGVGK	なし	あり	NA	NA	NA
G12D	B*07:02	GADGVGKSAL	なし	あり	NA	NA	NA
G12D	C*03:04	GADGVGKSAL	なし	あり	NA	NA	NA
G12V	A*02:01	KLVVVGAVGV	なし	なし	あり	なし	あり
G12V	A*03:01	VVGAVGVGK	なし	あり	NA	NA	NA
G12V	A*03:01	VVVGAVGVGK	あり	あり	NA	NA	NA
G12V	A*11:01	VVGAVGVGK	あり	あり	あり	あり	あり
G12V	A*11:01	VVVGAVGVGK	あり	あり	あり	あり	あり
G12V	A*68:01	VVVGAVGVGK	なし	あり	NA	NA	NA
G12V	B*07:02	AVGVGKSAL	なし	あり	NA	NA	NA
G12V	C*01:02	AVGVGKSAL	あり	NA	NA	NA	NA
G12V	C*03:04	GAVGVGKSAL	なし	あり	NA	NA	NA
Q61H	A*01:01	ILDTAGHEEY	NA	あり	あり	あり	NA

N A = 適用なし (試験するための腫瘍または細胞株がなかった / 作製されなかった)

【 0 5 0 0 】

X I V . F . 繰り返しの K R A S ネオエピトープカセットの評価の結果

反復（すなわち繰り返しの）ネオエピトープまたは所与のネオエピトープの単一のコピーを有する異なるカセットによるワクチン有効性を評価した。K R A S G 1 2 変異に対してヒト H L A - A 1 1 : 0 1 または K R A S Q 6 1 H に対してヒト H L A - A 0 1 : 0 1 を発現するように操作したマウスを、後述する C h A d V 6 8 送達ベクターを使用して 5×10^{10} 個の V P で免疫し、I F N γ E L I S p o t により有効性を評価した。

【0501】

K R A S ネオエピトープ G 1 2 C、G 1 2 V、G 1 2 D、及び Q 6 1 H の単一のコピー（「K R A S 4 $\times$ 1」）、カセット＝配列番号 6 6）、K R A S ネオエピトープ G 1 2 C、G 1 2 V、G 1 2 D、及び Q 6 1 H のそれぞれの 4 回の繰り返し（「K R A S 4 $\times$ 4」）、カセット＝配列番号 6 5）、または K R A S ネオエピトープ G 1 2 C、G 1 2 V、G 1 2 D、及び Q 6 1 H のうちの 1 つのみの 4 回の繰り返し（「K R A S 1 $\times$ 4」）のいずれかを有するカセットの有効性を評価するための一連の C h A d V 6 8 送達ベクターを設計した。

10

【0502】

K R A S ネオエピトープの単一のコピー（「4 $\times$ 1」）または K R A S ネオエピトープのそれぞれの 4 回の繰り返し（「4 $\times$ 4」）のいずれかを有するカセット同士を比較した。図 3 に示され、表 6 に定量化されるように、ネオエピトープの複数の繰り返しの有するベクターによるワクチン接種は、スポット形成コロニー（S F C）の増加を示し、カセット内のエピトープコード配列の反復が、C h A d V 6 8 送達システムを用いた K R A S ネオエピトープ、具体的には G 1 2 V 及び G 1 2 D ネオエピトープに対する抗原特異的免疫応答の増加につながることを示した。

20

【0503】

K R A S ネオエピトープのそれぞれの 4 回の繰り返し（「4 $\times$ 4」）または K R A S のうちの 1 つのみの 4 回の繰り返し（「1 $\times$ 4」）のいずれかを有するカセット同士を比較した。図 4 に示され、表 7 に定量化されるように、ネオエピトープの複数の繰り返しの有するベクターによるワクチン接種は、スポット形成コロニー（S F C）による免疫応答を生じ、各フォーマットで同等であったが、このことは、カセット内のエピトープコード配列の繰り返しが、C h A d V 6 8 送達システムを用いた K R A S ネオエピトープ、具体的には G 1 2 V 及び G 1 2 D ネオエピトープに対する抗原特異的免疫応答の増加につながることを示した。

30

【0504】

K R A S Q 6 1 H の単一のコピーと 1 9 個の他の異なるネオエピトープ（「2 0 $\times$ 1」）、K R A S Q 6 1 H の 2 回の繰り返し（「8 $\times$ 2」）、K R A S Q 6 1 H の単一のコピーと各 K R A S G 1 2 エピトープの単一のコピー（「4 $\times$ 1」）、K R A S Q 6 1 H の 4 回の繰り返しと各 K R A S G 1 2 ネオエピトープの繰り返し（「4 $\times$ 4」）、または K R A S Q 6 1 H のみの 4 回の繰り返し（「1 $\times$ 4」）を有するカセットを含む、K R A S Q 6 1 H のカセットフォーマットに対する免疫応答を比較した。図 5 に示され、表 8 に定量化されるように、K R A S Q 6 1 H の単一のコピーと各 K R A S G 1 2 ネオエピトープの単一のコピーを有するベクターによるワクチン接種がより大きなカセットと比較してわずかな改善を示した（1 0 $\times$ 1 または 8 $\times$ 2 に対する 4 $\times$ 1）だけなのに対して、4 $\times$ 4 または 1 $\times$ 4 のフォーマット内にネオエピトープの複数の繰り返しの有するベクターによるワクチン接種はスポット形成コロニー（S F C）による免疫応答を生じ、1 $\times$ 4 フォーマットが最も強い応答を示したが、このことは、カセット内のエピトープコード配列の繰り返しならびにより短いフォーマット及び／またはさらなる異なるネオエピトープの除去が、C h A d V 6 8 送達システムを用いた K R A S ネオエピトープ Q 6 1 H に対する抗原特異的免疫応答の増加をもたらしたことを示している。

40

【0505】

C h A d V 6 8 送達システムまたは S A M 送達システムによる免疫後の応答を比較した。K R A S ネオエピトープの単一のコピーと他のネオエピトープ（「2 0 $\times$ 1」）または

50

K R A S ネオエピトープのそれぞれの4回の繰り返し（「4×4」）のいずれかを有するカセットを評価した。図6及び図7に示され、表9に定量化されるように、ネオエピトープの複数の反復を有するベクターによるワクチン接種は、C h A d V 6 8 及び S A M フォーマットの両方でスポット形成コロニー（S F C）の増加を示し、カセット内のエピトープコード配列の反復が、C h A d V 6 8 または S A M 送達システムを用いた K R A S ネオエピトープ、具体的には G 1 2 V 及び G 1 2 D ネオエピトープに対する抗原特異的免疫応答の増加をもたらしたことを示し、ネオエピトープの繰り返しを有するカセットによる改善された応答が、使用されるベクタープラットフォームに依存しないことを示唆するものである。

【0506】

10

（表6）K R A S ネオエピトープ G 1 2 V 及び G 1 2 D ± 反復についての E L I S p o t データ

抗原カセット	G12V (VVVGAVGGK) (配列番号91)		G12D (VVVGADGVGK) (配列番号78)	
	平均	+/- SE	平均	+/- SE
4x4	5632	237.9	1069	361.4
4x1	1570	833.2	32	20.6

【0507】

20

（表7）K R A S ネオエピトープ G 1 2 V 及び G 1 2 D ± 反復についての E L I S p o t データ

抗原カセット	G12V (VVVGAVGGK) (配列番号91)		G12D (VVVGADGVGK)* (配列番号78)	
	平均	+/- SE	平均	+/- SE
4x4	3700	404.9	536	316.1
1x4	3358	310.8	1726	784.7

*フォーマット間で結果に有意差はなかった（ $p = 0.1896$ ）。

30

【0508】

（表8）K R A S ネオエピトープ Q 6 1 H ± 反復についての E L I S p o t データ

抗原カセット	Q61H (ILDTAGHEEY) (配列番号82)	
	平均	+/- SE
20x1	3	1.3
4x4	554	225
8x2	20	10.8
4x1	262	112.2
1x4	1289	451.7
ナイーブ	1	0.6

40

【0509】

（表9）C h a d / S A M フォーマットにおける K R A S G 1 2 V 及び G 1 2 D ± 反復についての E L I S p o t

50

	ChAdV68 20x1			SAM 20x1			ChAdV68 4x4			SAM 4x4		
	平均	SEM	N	平均	SEM	N	平均	SEM	N	平均	SEM	N
G12Vプール	13	6	6	33	6	6	4483	767	6	6939	1149	6
G12Dプール	5	2	6	6	3	6	297	227	6	560	163	6
G12V (VVGAVGVGK) (配列番号79)	4	2	6	12	3	6	3167	846	6	6878	1216	6
G12D (VVVGADGVGK) (配列番号78)	4	3	6	8	3	6	356	288	6	564	148	6

10

【0510】

X I V . G . ネオ抗原ワクチンの臨床評価

オープンラベル多重中心多用量第1／2相研究を行い、異種プライム／ブーストワクチン接種方法の用量、安全性及び忍容性、免疫原性、ならびに初期臨床活性を評価する。本明細書に記載する、反復K R A S ネオエピトープカセットを発見するワクチンプログラムを評価する。

20

【0511】

本研究の目的は、進行性または転移性非小細胞肺癌、マイクロサテライト安定結腸直腸癌、膵癌、及び共通ネオ抗原陽性腫瘍を有する患者における、免疫チェックポイント遮断薬と組み合わせた、ネオ抗原ベースの治療用がんワクチンであるChAdVベクター（G R T - C 9 0 3）及びs a m R N Aベクター（G R T - R 9 0 4）の用量、安全性、免疫原性、及び初期臨床活性を評価することである。非同義デオキシリボ核酸（DNA）変異を有する腫瘍は、腫瘍細胞表面上に、H L Aの文脈で、自己抗原としてこれらの変異を含有するペプチドを提示することができる。変異したペプチドの画分は、排他的に腫瘍細胞を標的にする、T細胞応答を生成可能なネオ抗原をもたらす。これらの腫瘍特異的ネオ抗原のいくつかは、患者のサブセットにまたがって共通であることが知られているかまたは共通であると予想されており、共通ネオ抗原と呼ばれる。本研究は、免疫応答を刺激するためのチェックポイント遮断薬と組み合わせて、異種プライム／ブースト治療用ワクチンアプローチ（まずG R T - C 9 0 3、続いて、G R T - R 9 0 4）を用い、共通ネオ抗原を標的にする。本研究は、治療用ワクチンに含有される共通ネオ抗原に対して特異的なT細胞応答の誘導における、本ネオ抗原ベース免疫療法の安全性、及び初期臨床活性を発見する。第1相試験は、複数回用量、及び、チェックポイント遮断薬との併用について試験し、第2相試験は、第1相のデータに基づきワクチンレジメンを使用し、臨床活性の初期の徴候を試験する。

30

【0512】

本明細書に記載する反復K R A S ネオエピトープカセット（「S L A T E v 2」または「S L A T E - K R A S」）をコードするがんワクチンを、進行癌を有する患者において、免疫チェックポイント遮断薬と組み合わせて投与する。S L A T E異種プライム／ブーストワクチンレジメンは、（1）プライムワクチン接種として使用されるChAdV、及び、（2）ChAdVベクターの後にワクチン接種をブーストするために用いられる、L N P中で製剤化されるs a m R N Aを伴う。ChAdV及びs a m R N Aベクターは共に同一の反復K R A S ネオエピトープカセットをコードし、これはまた、2つのユニバーサルC D 4 T細胞エピトープ（P A D R E及び破傷風トキソイド）もコードする。対象を含めるために、腫瘍を、全エクソーム及びトランスクリプトームシーケンシングに用いて体細胞突然変異を検出し、血液を、H L Aタイピングに用いる。

40

【0513】

ChAdVベクターは、サブグループEのアデノウイルスである、チンパンジーアデノ

50

ウイルス68 (C68、68/SAdV-25、元々、Pan9として示されていた) に基づく、複製欠損型E1、E3、E4オープンリーディングフレーム2-4 (ORF2-4) 欠失アデノウイルスベクターである [ChAdV68-Empty-E4deleted; E1欠失 (577~3403)、E3欠失 (27, 125~31, 825)、及び部分的E4欠失スパニングORF2-4 (34, 916~35, 642) を有する配列番号1を表す、配列番号83を参照されたい]。ChAdVベクターは、 5×10^{11} vp/mLで溶液中にて製剤化され、1.0 mLを、それぞれ、対向する三角筋内における2つの両側ワクチン注射部位にてIM注射する (三角筋が好ましく、臀筋 [背面もしくは腹面]、またはそれぞれの側の大腿直筋を使用してよい)。

【0514】

samRNAベクターはアルファウイルスに由来する。samRNAベクターは、ウイルス性タンパク質、ならびに、RNA増幅に必要な5'及び3' RNA配列をコードするが、構造タンパク質はコードしなかった。samRNAベクターを、4種類の脂質：イオン性アミノ脂質、ホスファチジルコリン、コレステロール、及び、PEGベースのコート脂質で構成されるLNP中で製剤化し、samRNAを封入させて、samRNA-LNPを形成する。samRNAベクターは、ChAdVベクターで用いるのと同じネオ抗原発現カセットを含有する。samRNAベクターは、1 mg/mLで溶液中にて製剤化され、それぞれ、対向する三角筋内における2つの両側ワクチン注射部位にてIM注射する (三角筋が好ましく、臀筋 [背面もしくは腹面]、またはそれぞれの側の大腿直筋を使用してよい)。ブーストワクチン接種部位は、できる限りプライムワクチン接種部位に近づく。注射量は、投与される用量に基づく。用量レベル量とは、samRNAベクターの量を明示的に指す、即ち、LNPなどの他の構成成分を指すものではない。LNP:samRNAの比率は、およそ24:1である。したがって、LNPの用量は720 µgであり、samRNAベクターの用量レベルは30 µgである。

【0515】

イピリムマブは、細胞毒性Tリンパ球関連抗原4 (CTLA-4) に結合する、ヒトモノクローナルIgG1抗体である。イピリムマブは、5 mg/mLで溶液中にて製剤化され、両側のワクチン接種部位のそれぞれに、SCに近接して (約2 cm以内) 注射される。イピリムマブのSC経路は、認可されたIV投与経路とは異なる。イピリムマブは、以下に示す2つの方法のうちの一方で、30 mgの用量にて投与される：

1. 両側のワクチン接種部位のそれぞれにおいて、ワクチン排出LNに近い、4回の1.5 mL (7.5 mg) の注射 (即ち、各三角筋、腰部の腹側臀筋、臀部の背側臀筋、または大腿直筋内の、それぞれの両側の、ワクチン接種部位の下に1.5 mL、及び、ワクチン接種部位の上に1.5 mL [三角筋が好ましいが、臨床部位及び患者の好みに依存する])。

2. 両側のワクチン接種部位のそれぞれにおいて、ワクチン排出LNに近い、6回の1 mL (5 mg) の注射 (即ち、各三角筋、腰部の腹側臀筋、臀部の背側臀筋、または大腿直筋内の、それぞれの両側の、ワクチン接種部位の下に1 mL、ワクチン接種部位の横に1 mL、及び、ワクチン接種部位の下に1.5 mL、及び、ワクチン接種部位の上に1.5 mL [三角筋が好ましいが、臨床部位及び患者の好みに依存する])。

【0516】

ニボルマブは、PD-1と、そのリガンドであるPD-L1及びPD-L2との相互作用を遮断する、ヒトモノクローナルIgG4抗体である。ニボルマブは、10 mg/mLで溶液中で製剤化され、0.2ミクロン~1.2ミクロンの孔径、低タンパク結合のインラインフィルターを通して、プロトコールにより規定される用量で、IV輸液として投与される。これは、IVプッシュまたはボラス注射としては投与されない。用量が固定される (例えば、240 mgの平坦用量) とし、ニボルマブ注射は未希釈のまま、または希釈されて輸液され、合計の輸液体積が160 mLを超えないようにする。ニボルマブ輸液の後、直ちに希釈液を一流しし、ラインをきれいにする。ニボルマブは、同日中にイピリムマブと共に、または、イピリムマブなしで、各ワクチン接種 (即ち、samRNAまた

10

20

30

40

50

はC h A d Vワクチンのそれぞれ)の後に投与される。ニボルマブの用量及び経路は、食品医薬品局が認可した用量及び経路に基づく。ニボルマブの用量は、参加者がどれだけ十分に治療に耐えるかに応じて、中断する、遅らせる、または、中止することができる。投与訪問は飛ばされず、遅らせるのみである。研究員及びスポンサーが、ニボルマブなしでs a m R N Aベクターを用いて治療することが、患者にとって最も関心あることと考えない限り、ワクチン接種は、ニボルマブなしでは行われない。例えば、メーカーの指示、及び／または、当業者により認識されている、測定された適切な用量に従い、セミプリマブを、ニボルマブの代わりに投与することができる。他のP D 1及び／またはP D - L 1チェックポイント阻害剤を、代わりに用いてよい。

【0517】

第1相試験では、C h A d Vベクター、続いて、複数用量レベルのs a m R N Aベクターによるプライムワクチン接種を調査し、患者は全員、V Iニボルマブを受けた。適格な患者は、進行性、または転移性の(1)K R A S関連M H CクラスIネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2)マイクロサテライト安定性C R C (M S S - C R C)を含む結腸直腸癌(C R C)、(3)非小細胞肺癌(N S C L C)、及び／または(4)膵管腺癌(P D A)を有する患者を含んだ。用量レベル1(30 µg)での、安全性及び忍容性の初期立証の後、患者を、用量レベル1(30 µg)と同じ用量のs a m R N Aベクターにより、S C イピリムマブ(30 mg)を組み込んだ用量レベル2で治療した。S A Mベクターの用量を、用量レベル3(100 µg)、続けて用量レベル4(300 µg)まで増加させ、患者は全員、S C イピリムマブ(30 mg)を受け続けた。第2相は、腫瘍特異的増殖コホートを伴い、腫瘍タイプの外の、変異陽性腫瘍のコホートは既に、他の増殖コホートにより示されている。コホート1及び4では、日常的な治療法までの疾患の進行を経験していない患者が登録され、コホート2、3、5、及び6は、日常的な治療法での、またはこれを超えた疾患を経験した患者が登録される。第2相の患者は、第1相で十分認容されると測定された用量で、S C イピリムマブを受ける。患者は、第1相及び第2相を通して、480 mg・Q4WでニボルマブをI Vで受ける。第1/2相試験の詳細を、図8及び図11に示す。第2群は、1ヶ月毎の治療スケジュール、または、2ヶ月毎の治療スケジュールの両方を含む。図17は、2ヶ月の治療スケジュールを示す。

【0518】

包含基準としては、具体的に、以下が挙げられる：

1. 以下に示す進行性または転移性固形腫瘍を有する患者：
 - a. 現在、V E G FまたはE G F R標的治療法を含み得る、フルオロピリミジン、オキサリプラチン、及びイリノテカンによる治療の後に、疾患の進行を経験した、転移性疾患O Rに対する1 L治療法としての、V E G FまたはE G F R標的治療法を挙げることができる、フルオロピリミジン及びオキサリプラチン及び／またはイリノテカンの全身治療を受けており、かつ、転移性設定において、一連の全身療法を受けていない、マイクロサテライト安定性結腸直腸癌(M S S - C R C)。
 - b. 細胞毒性白金ベースの化学療法と組み合わせた、抗P D - (L) 1抗体(または、患者が、白金ベースの化学療法を拒絶する場合に、抗P D - (L) 1のみ)による治療の後に、疾患の進行を経験し、かつ、転移性設定において、一連の全身療法を受けていない、細胞毒性白金ベースの化学療法O Rと組み合わせた、抗P D - (L) 1抗体による全身治療を現在受けている、非小細胞肺癌(N S C L C)。
 - c. 1 L全身細胞毒性化学療法において疾患の進行を経験し、かつ、転移性設定において、以前に一連の治療法を2回以上受けていない、転移性疾患O Rに対する1 L治療法として現在全身性細胞毒性化学療法を受けている、膵管腺癌(P D A)。
 - d. 患者が、臨床効果を付与することが知られている、利用可能なあらゆる治療法を用いても、疾患の進行を経験している、任意の固形腫瘍組織学；及び／または
2. 患者の腫瘍が、以下に列挙する変異のうちの1つを有し、特定された腫瘍変異(表10)の抗原提示に対して、H L Aアレルを発現することが測定されている：K R A S _ G 1 2 CまたはN R A S _ G 1 2 C；K R A S _ G 1 2 DまたはN R A S _ G 1 2 D；K R

A S _ G 1 2 V または N R A S _ G 1 2 V ; K R A S _ Q 6 1 H または N R A S _ Q 6 1 H。

【 0 5 1 9 】

(表 1 0) ネオ抗原及び H L A アレルのペア

KRAS_G12C	A0201, A0301, A1101, A6801, B0702, C0304
KRAS_G12D	A0201, A0301, A1101, A6801, B0702, C0304, C0802
KRAS_G12V	A0201, A0301, A1101, A6801, B0702, C0102, C0304
KRAS_Q61H	A0101

10

【 0 5 2 0 】

包含基準は、E C O G 性能状態 0 または 1 ; R E C I S T v 1 . 1 に従い測定可能な疾患 ; 実験室用の値で測定すると十分な臓器機能もまた含む。

【 0 5 2 1 】

除外基準は、以下もまた含む : 以下のとおりの遺伝特性を有する腫瘍 : (a) N S C L C に関しては、E G F R、A L K、R O S 1、R E T、または T R K における既知の遺伝ドライバー変化を有する患者 ; (b) 機関の基準に基づく既知の M S I - 高疾患 ; チンパンジーアデノウイルスへの既知の曝露、または、ワクチン接種に対する反応におけるアナフィラキシーの何らかの履歴 ; 出血性疾患 (例えば、因子欠損症、凝固障害)、または、I M 注射もしくは輸血後の、顕著な紫斑もしくは出血歴 ; 同種異系 / 固形臓器移植の履歴 ; 活性で既知の、または、疑いのある自己免疫疾患 ; 活性の結核もしくは最近 (2 週間以内) の、臨床的に有意な感染症、または、活性 B 型肝炎もしくは C 型肝炎の証拠 ; ヒト免疫不全 (H I V) または既知の後天性免疫不全症候群 (A I D S) に対する陽性試験の既知の履歴を有する患者

20

【 0 5 2 2 】

第 1 / 2 相試験で評価した患者の、全体的な個体群頭頸を、表 1 1 で以下に示す。

【 0 5 2 3 】

(表 1 1) 対象の個体群統計

30

40

50

個体群統計及び腫瘍のタイプ	バージョ ン1 N=26	SLATE-KRAS N=12	全体 N= 38
年齢：平均年（最小、最大）	60 (33, 83)	59 (36, 86)	60 (33,86)
性別（男性／女性）	10/16	4/8	14/24
腫瘍のタイプ			
非小細胞肺癌（NSCLC）	13	5	18
以前の治療法の回数（中央、範囲）	1 (1-4)	2 (1-3)	1.5 (1-4)
以前の抗PD-（L）1療法	13	5	18
マイクロサテライト安定性（MSS）結腸直腸癌	6	7	13
以前の治療法の回数（中央、範囲）	1.5 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-2)
以前のオキサリプラチン／イリノテカンの回数	6	6	12
膵管腺癌（PDA）	5	0	5
以前の治療法の回数（中央、範囲）	1 (1-3)	0	1 (1-3)
その他	2	0	2
以前の治療法の回数（中央、範囲）	3 (3)	0	3 (3)

【0524】

異種プライムブーストネオ抗原により指示されるV1及びSLATE-KRASに対する有害事象の一覧は、表1に示すに示すように、進行性固形癌患者において、十分認容された。

【0525】

（表12）有害事象の一覧

10

20

30

40

50

	V1 (n=26)		KRAS-SLATE (n=12)		全体 (n=38)
好ましい用語 ; n(%)	等級1/2	等級3以上	等級1/2	等級3以上	全等級
発熱	14(53.8)	0.0	3(25.0)	0.0	17(44.7)
疲労	8(30.8)	1(3.8)	2(16.7)	0.0	11(28.9)
悪心	6(23.1)	0.0	3(25.0)	0.0	9(23.7)
嘔吐	7(26.9)	0.0	1(8.3)	0.0	8(21.1)
悪寒	3(11.5)	0.0	4(33.3)	0.0	7(18.4)
下痢	5(19.2)	0.0	1(8.3)	0.0	6(15.8)
筋肉痛	2(7.7)	0.0	3(25.0)	0.0	5(13.2)
食欲減退	2(7.7)	0.0	2(16.7)	0.0	4(10.5)
注射部位での痛み	2(7.7)	0.0	2(16.7)	0.0	4(10.5)
注射部位での反応	4(15.4)	0.0	0.00	0.0	4(10.5)

治療関連の3 / 4 等級のAEは、頻度が10 %未満：

- － V 1 では、患者 1 名が、アラニンアミノトランスフェラーゼ及びアスパルテートアミノトランスフェラーゼの、一過性の3 等級の増加を経験した
- － V 1 では、患者 1 名が、発熱と関連する3 等級の混乱状態に陥った

【0526】

最適化されたSLATE v2 反復KRASネオエピトープカセットをコードするがんワクチンを、KRAS G12V変異を有すると特定され、A*03：01としてハロタイプされた転移性NSCLCを有する、41歳男性のSLATE患者（S31）に投与した。S31は、進行性疾患で16ヶ月、ペムブロリズマブ、カルボプラチン、及びペメトレキセドによる治療を以前受けていた。S31は、プライムワクチン接種として、SCイピリムマブ（30mg）及びIVニボルマブ（480mg）と組み合わせた用量1-ChAdVベクターを受け、続けて、以下のとおりに、4週毎に投与訪問をした：

- ・用量2－ブーストワクチン接種としての、SCイピリムマブ（30mg）及びIVニボルマブ（480mg）と組み合わせたsamRNAベクター（30µg）
- ・用量3－ニボルマブ（480mg）単剤療法
- ・用量4－ブーストワクチン接種としての、SCイピリムマブ（30mg）及びIVニボルマブ（480mg）と組み合わせたSAMベクター
- ・用量5－ニボルマブ（480mg）単剤療法
- ・S31は、6ヶ月間研究治療で維持した。

【0527】

T細胞応答を評価し、反復KRASネオエピトープを含む最適化SLATE v2カセットを投与された患者S31と、以前のSLATE「バージョン1」（v1）カセットを投与されたSLATE患者（S21）との間で比較した。図9に示すように、SLATE v2カセットを受ける患者S31は、特に、KRAS G12Vペプチドに対して、SLATE v1カセットを受ける患者と比較して、応答の増大（約100倍）を示した。したがって、反復KRASネオエピトープを特徴とするカセットは、改善された免疫応答刺激能力を示した。さらに、図10に示すように、患者S31は、8週目において、腫瘍サイズの37%の低下（図10の上及び左下の図）、及び、18週目において、28%の低下（図10の左下図）、加えて、ネオ抗原ctDNAを監視することにより評価される、分子応答（図10の右図）を示し、ここで評価した時点における、潜在的な臨床的有効性を示している。

【0528】

最適化されたSLATE v2反復KRASネオエピトープカセットをコードするがんワクチンを、KRAS G12V変異を有すると特定され、A*11:01としてハロタイプされた転移性NSCLCを有する、64歳女性のSLATE患者(S37)に投与した。S37は、進行性疾患を有する23ヶ月の間、FOLFOX/FOLFIR/ペバシズマブによる以前の治療を受けた。S37は、プライムワクチン接種として、SCイピリムマブ(30mg)及びIVニボルマブ(480mg)と組み合わせた用量1-ChAdVベクターを受け、続けて、以下のとおりに、4週毎(Q4W)に投与訪問をした(例えば、図17に示すように)：

- ・用量2－ブーストワクチン接種としての、SCイピリムマブ(30mg)及びIVニボルマブ(480mg)と組み合わせたsamRNAベクター(30µg)
- ・用量3－ニボルマブ(480mg)単剤療法
- ・用量4－ブーストワクチン接種としての、SCイピリムマブ(30mg)及びIVニボルマブ(480mg)と組み合わせたsamRNAベクター(30µg)
- ・用量5－ニボルマブ(480mg)単剤療法
- ・用量6－SCイピリムマブ(30mg)及びIVニボルマブ(480mg)と組み合わせたChAdVベクター(プライムと同じ用量)
- ・用量7－ニボルマブ(480mg)単剤療法
- ・用量8－ブーストワクチン接種としての、SCイピリムマブ(30mg)及びIVニボルマブ(480mg)と組み合わせたsamRNAベクター(30µg)
- ・用量9－ニボルマブ(480mg)単剤療法
- ・用量10－ブーストワクチン接種としての、SCイピリムマブ(30mg)及びIVニボルマブ(480mg)と組み合わせたsamRNAベクター(30µg)
- ・S37は、研究治療で維持した。

10

20

【0529】

T細胞応答を評価し、反復KRASネオエピトープを含む最適化SLATE v2カセットを投与された患者S37と、以前のSLATE「バージョン1」(v1)カセットを投与されたSLATE患者(S21)との間で比較した。図9に示すように、SLATE v2カセットを受ける患者S31は、特に、KRAS G12Vペプチドに対して、SLATE v1カセットを受ける患者と比較して、応答の増大(約100倍)を示した。図12に示される、様々なG12変異、アレル、及びカセットに対するIFNγ ELISpotにより調査されるT細胞応答の一覧。したがって、反復KRASネオエピトープを特徴とするカセットは、改善された免疫応答刺激能力を示した。

30

【0530】

さらに、図13に示すように、患者S37は、24週目において、腫瘍サイズの23%の低下(図13の右図；24週)、加えて、ネオ抗原ctDNA(図13の左上図)、ならびに、標準的な血清腫瘍マーカーCEA及びCA 19-9(図13の左下図)を監視することにより評価される分子応答を示し、潜在的な臨床的有効度を示している。

【0531】

臨床的有効度を、NSCLCを有する患者において評価した。分子応答(ctDNAでの低下が30%以上)、及び、生存確率を図14に示し、分子応答を有する、NSCLC患者において、これを有しない患者よりも、全生存期間が改善される傾向を示している。NSCLCを有する患者に対する臨床結果の一覧を図15に示し、免疫チェックポイント遮断(抗PD-(L)1療法)後の、NSCLC対象における耐久性及び分子応答の各シグナルを示している。

40

【0532】

臨床的有効度を、後期CRCを有する患者で評価した。後期CRCを有する患者に対する臨床的結果の一覧を図16に示し、後期CRCにおける耐久性及び分子応答の初期シグナルを示している。

【0533】

50

概して、分子応答（c t DNAの減少）は、以前の2回の治療法を進めた、K R A S G 1 2 V 変異体 C R C を有する患者における、分子及び臨床効果を含む、C R C 及び N S C L C の先行臨床効果を有する患者の31.8%で観察された。さらに、c t DNAによる分子応答を評価することで、本免疫療法による R E C I S T 放射線医学と比較して、有益な改善されたバイオマーカーがもたらされ得る。

【0534】

特定の配列

本明細書で参照されるベクター、カセット、及び抗体を以下に記載し、配列番号で参照する。

トレメリムマブVL (配列番号16)	10
トレメリムマブVH (配列番号17)	
トレメリムマブVH CDR1 (配列番号18)	
トレメリムマブVH CDR2 (配列番号19)	
トレメリムマブVH CDR3 (配列番号20)	
トレメリムマブVL CDR1 (配列番号21)	
トレメリムマブVL CDR2 (配列番号22)	
トレメリムマブVL CDR3 (配列番号23)	
デュルバルマブ(MEDI4736) VL (配列番号24)	20
MEDI4736 VH (配列番号25)	
MEDI4736 VH CDR1 (配列番号26)	
MEDI4736 VH CDR2 (配列番号27)	
MEDI4736 VH CDR3 (配列番号28)	
MEDI4736 VL CDR1 (配列番号29)	
MEDI4736 VL CDR2 (配列番号30)	
MEDI4736 VL CDR3 (配列番号31)	
UbA76-25マーPDTTヌクレオチド(配列番号32)	
UbA76-25マーPDTTポリペプチド(配列番号33)	30
MAG-25マーPDTTヌクレオチド(配列番号34)	
MAG-25マーPDTTポリペプチド(配列番号35)	
Ub7625マーPDTT_NoSFLヌクレオチド(配列番号36)	
Ub7625マーPDTT_NoSFLポリペプチド(配列番号37)	
ChAdV68.5Wtnt.MAG25マー (配列番号2) ; AC_000011.1のE1 (nt 577~3403)及びE3 (nt 27, 125~31,825)配列を欠失させたもの;対応するATCC VR-594ヌクレオチドは5つの位置で置換;モデル新生抗原カセットは、欠失させたE1の代わりに挿入されたCMVプロモーター／エンハンサーの制御下にある;カセットの3'側にSV40ポリA	
ベネズエラウマ脳炎ウイルス [VEE](配列番号3) GenBank: L01442.2	40
VEE-MAG25マー(配列番号4) ; MAG-25マーPDTTヌクレオチドを含む (塩基30~1755)	
ベネズエラウマ脳炎ウイルス株TC-83 [TC-83](配列番号5) GenBank: L01443.1	
ATAGGCGGCGCATGAGAGAAGCCAGACCAATTACCTACCCAAAATGGAGAAAGTTCA CGTTGACATCGAGGAAGACAGCCCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAG TTTGAGGTAGAAGCCAAGCAGGTCACCTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTT CGCATCTGGCTTCAAACTGATCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGA CATTGGAAGTGCGCCCGCCCGCAGAATGTATTCTAAGCACAAGTATCATTGTATCTGTC CGATGAGATGTGCGGAAGATCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGAA	

AAACTGTAAGGAAATAACTGATAAGGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTCGCCGC
CGTCATGAGCGACCCTGACCTGGAAACTGAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGTCG
TGTCGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGTTTACCAGGATGTATACGCGGTTGACGGACCGA
CAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGGGAGTTAGAGTCGCCTACTGGATAGGCTTTGA
CACCACCCCTTTTATGTTTAAAGAACTTGGCTGGAGCATATCCATCATACTCTACCAACT
GGGCCGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATAGGCCTATGCAGCTCTGACGTTAT
GGAGCGGTCACGTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAGAAGTATTTGAAACCATCCAAC
AATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGGACTTACTGAGGAG
CTGGCACCTGCCGTCTGTATTTCACTTACGTGGCAAGCAAAATTACACATGTCGGTGTG
AGACTATAGTTAGTTGCGACGGGTACGTCGTTAAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCCT
GTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTCTTGTGCTGCA
AAGTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCC
AGCTACATTGTGTGACCAAATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTCAGTGC GGACGAC
GCGCAAAAACCTGCTGGTTGGGCTCAACCAGCGTATAGTCGTCAACGGTCGCACCCAGA
GAAACACCAATACCATGAAAAATTACCTTTTGCCCGTAGTGGCCCAGGCATTTGCTAGG
TGGGCAAAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGAT
AGACAGTTAGTCATGGGGTGTGTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGATAACATCTATTTA
TAAGCGCCCGGATACCCAAACCATCATCAAAGTGAACAGCGATTTCCTCATTCGTGC
TGCCCAGGATAGGCAGTAACACATTGGAGATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAA
TGTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACCTCTCATTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGC
TAAGTGCGCAGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAAGCCGAGGAGTTGCGCGCAGCT
CTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCTGGAAGCCGATGTCGACTTGAT
GTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAAAGGTTACC
AGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCGCAGGCTGTACT
CAAGAGTGAAAAATTATCTTGCATCCACCCTCTCGCTGAACAAGTCATAGTGATAACAC
ACTCTGGCCGAAAAGGGCGTTATGCCGTGGAACCATAACCATGGTAAAGTAGTGGTGCC
AGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGGACTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATT
GTGTACAACGAACGTGAGTTCGTAAACAGGTACCTGCACCATATTGCCACACATGGAG
GAGCGCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAACCTGTCAAGCCCAGCGAGCACGACGG
CGAATACCTGTACGACATCGACAGGAAACAGTGCGTCAAGAAAGAACTAGTCACTGGG
CTAGGGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTCGCCTACGAGAGTCT
GAGAACACGACCAGCCGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCA
GGATCAGGCAAGTCTGGCATCATTAAGAGCGCAGTCACCAAAAAAGATCTAGTGGTGA
GCGCCAAGAAAGAAAACCTGTGCAGAAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGAAAGGGC
TGGACGTCAATGCCAGAACTGTGGACTCAGTGCTCTTGAATGGATGCAAACACCCCGT
AGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCTTGTTCATGCAGGTACTCTCAGAGCGCTCA
TAGCCATTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGCGGGGATCCCAAACAGTGCGGTTT
TTTAAACATGATGTGCCTGAAAGTGCATTTTAACCACGAGATTTGCACACAAGTCTTCC

10

20

30

40

50

ACAAAAGCATCTCTCGCCGTTGCACTAAATCTGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTTGTTTT
ACGACAAAAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACTAAGATTGTGATTGACACTA
CCGGCAGTACCAAACCTAAGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTTCAGAGGGTGGGTG
AAGCAGTTGCAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCTCTCAAG
GGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTCCGGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTGTA
CGCACCCACCTCAGAACATGTGAACGTCCTACTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTG
TGGAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAAACACTGACTGCCAAGTACCCTGGGA
ATTTCACTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCACAT
CTTGAGAGACCGGACCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAAACGTGTGTTGGGCC
AAGGCTTTAGTGCCGGTGCTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACCACTGAACAATGGA
ACACTGTGGATTATTTTGAACGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCA
ACTATGCGTGAGGTTCTTTGGACTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACTGT
TCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGGGATAACTCCCCGTCGCTAACATGTACGGGC
TGAATAAAGAAGTGGTCCGTCAGCTCTCTCGCAGGTACCCACAACCTGCCTCGGGCAGTT
GCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACACTGCGCAATTATGATCCGCGCA
TAAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGACTGCCTCATGCTTTAGTCCTCCACCATAATGAA
CACCCACAGAGTGACTTTTCTTCATTCGTGACAAATTGAAGGGCAGAACTGTCCTGGT
GGTCGGGGAAAAGTTGTCCGTCCCAGGCAAAATGGTTGACTGGTTGTGACACCGGCCT
GAGGCTACCTTCAGAGCTCGGCTGGATTTAGGCATCCCAGGTGATGTGCCCAAATATG
ACATAATATTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAATACCATCACTATCAGCAGTGTGAA
GACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCATCTGAATCCCGG
CGGAACCTGTGTCAGCATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCATCATT
GGTGCTATAGCGCGGCAGTTCAAGTTTTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTGA
AGAGACGGAAGTTCTGTTTGTATTTCATTGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATC
CTTACAAGCTTTCATCAACCTTGACCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCC
GGATGTGCACCCTCATATCATGTGGTGCGAGGGGATATTGCCACGGCCACCGAAGGAG
TGATTATAAATGCTGCTAACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTGTGCGGAGCGCT
GTATAAGAAATTCCTGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCGA
CTGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCATTTCATGCCGTAGGACCAAACCTTCAACAAAG
TTTCGGAGGTTGAAGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGAT
TGTCAACGATAACAATTACAAGTCAGTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGGCATCTTTT
CCGGGAACAAAGATCGACTAACCCAATCATTGAACCATTTGCTGACAGCTTTAGACAC
CACTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGGACAAGAAATGGGAAATGACTCTCAAG
GAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAGGAGATATGCATATCCGACGACTCTTCAG
TGACAGAACCTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAGTTCTTTGGCTGGAAG
GAAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAAACTTTCTCATATTTGGAAGGGACCAAGTTT
CACCAGGCGGCCAAGGATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCCCGTTGCAACGGAGG
CCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGCATGAGCAGTATTAGGTGCAA
ATGCCCCGTCGAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTTGCTTGTCGA

10

20

30

40

50

TCCATGCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAAT
TACTGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCC
AATGCTCCCAGCCTATATTGTTCTCACCGAAAGTGCCTGCGTATATTCATCCAAGGAAG
TATCTCGTGGAACACCACCGGTAGACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAAT
CCACAGAGGGGACACCTGAACAACCACCACCTTATAACCGAGGATGAGACCAGGACTA
GAACGCCTGAGCCGATCATCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGCTGTC
AGATGGCCCGACCCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGGGCCGCCCTCT
GTATCTAGCTCATCCTGGTCCATTCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTTATCC
ATACTTGACACCCTGGAGGGAGCTAGCGTGACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGACTA
ACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTCTGGCGCGACCGGTGCCTGCGCCTCGAACA
GTATTCAGGAACCCTCCACATCCCGCTCCGCGCACAAGAACACCGTCACTTGCACCCAG
CAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAATAGGGTGATC
ACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACGCACTCCTAGCAGGTGCGTCTCGA
GAACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATTACAAGAGAGGAGTT
TGAGGCGTTTCGTAGCACAACAACAATGACGGTTTGATGCGGGTGCATACATCTTTTCCT
CCGACACCGGTCAAGGGCATTTACAACAAAAATCAGTAAGGCAAACGGTGCTATCCGA
AGTGGTGTGGAGAGGACCGAATTGGAGATTTTCGTATGCCCCGCGCCTCGACCAAGAA
AAAGAAGAATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAATCCCACACCTGCTAACAGAAGCA
GATACCAGTCCAGGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCA
AGGCCTAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGAACCCCTGCAT
CCTGTTCTTTGTATTCTAGTGTGAACCGTGCTTTTCAAGCCCCAAGGTCGCAGTG
GAAGCCTGTAACGCCATGTTGAAAGAGAACTTTCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTAT
TCCAGAGTACGATGCCTATTTGGACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTGCTTAGACACTG
CCAGTTTTTTGCCCTGCAAAGCTGCGCAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTATTTGGAACCC
ACAATACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCAGAACACGCTCCAGAACGTCCTGGCAG
CTGCCACAAAAAGAAATTGCAATGTCACGCAAATGAGAGAATTGCCCGTATTGGATTC
GGCGGCCTTTAATGTGGAATGCTTCAAGAAATATGCGTGTAATAATGAATATTGGGAA
ACGTTTAAAGAAAACCCCATCAGGCTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCA
AATTAAGGACCAAAAGCTGCTGCTCTTTTTGCGAAGACACATAATTTGAATATGTTG
CAGGACATACCAATGGACAGGTTTGTAATGGACTTAAAGAGAGACGTGAAAGTGACTC
CAGGAACAAAACATACTGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGTGATCCAGGCTGCCGATCC
GCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCACCGAGAGCTGGTTAGGAGATTAAATGCG
GTCCTGCTTCCGAACATTCATACACTGTTTGATATGTGCGGCTGAAGACTTTGACGCTATT
ATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTCTGGAACTGACATCGCGTCGTTTGA
TAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCGTTAATGATTCTGGAAGACTTAGGT
GTGGACGCAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGAAATTCATCAATAC
ATTTGCCCACTAAACTAAATTTAAATTCGGAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTCCCTC
ACACTGTTTGTGAACACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTTGAGAGAAC
GGCTAACCGGATCACCATGTGCAGCATTCATTGGAGATGACAATATCGTGAAAGGAGT

10

20

30

40

50

CAAATCGGACAAATTAATGGCAGACAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTCAAG
ATTATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCCTTATTTCTGTGGAGGGTTTATTTTGTG
TGA CTCCGTGACCGGCACAGCGTGCCGTGTGGCAGACCCCCTAAAAAGGCTGTTTAAG
CTTG GCAAACCTCTGGCAGCAGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGC
ATGAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAGTGGGTATTCTTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGT
AGAATCAAGGTATGAAACCGTAGGAACTTCCATCATAGTTATGGCCATGACTACTCTA
GCTAGCAGTGTTAAATCATT CAGCTACCTGAGAGGGGGCCCCTATAACTCTCTACGGCTA
ACCTGAATGGACTACGACATAGTCTAGTCCGCCAAGATGTTCCCGTTCCAGCCAATGTA
TCCGATGCAGCCAATGCCCTATCGCAACCCGTTTCGCGGGCCCCGCGCAGGCCCTGGTTCC
CCAGAACCGACCCTTTTCTGGCGATGCAGGTGCAGGAATTAACCCGCTCGATGGCTAA
CCTGACGTTCAAGCAACGCCGGGACGCGCCACCTGAGGGGCCATCCGCTAAGAAACCG
AAGAAGGAGGCCTCGCAAAAACAGAAAGGGGGAGGCCAAGGGAAGAAGAAGAAGAA
CCAAGGGAAGAAGAAGGCTAAGACAGGGCCGCCTAATCCGAAGGCACAGAATGGAAA
CAAGAAGAAGACCAACAAGAAACCAGGCAAGAGACAGCGCATGGTCATGAAATTGGA
ATCTGACAAGACGTTCCCAATCATGTTGGAAGGGAAGATAAACGGCTACGCTTGTGTG
GTCGGAGGGAAGTTATTCAGGCCGATGCATGTGGAAGGCAAGATCGACAACGACGTTT
TGGCCGCGCTTAAGACGAAGAAAGCATCCAAATACGATCTTGAGTATGCAGATGTGCC
ACAGAACATGCGGGCCGATACATTCAAATACACCCATGAGAAACCCCAAGGCTATTAC
AGCTGGCATCATGGAGCAGTCCAATATGAAAATGGGCGTTTTCACGGTGCCGAAAGGAG
TTGGGGCCAAGGGAGACAGCGGACGACCCATTCTGGATAACCAGGGACGGGTGGTCGC
TATTGTGCTGGGAGGTGTGAATGAAGGATCTAGGACAGCCCTTTCAGTCGTCATGTGGA
ACGAGAAGGGAGTTACCGTGAAGTATACTCCGGAGAACTGCGAGCAATGGTCACTAGT
GACCACCATGTGTCTGCTCGCCAATGTGACGTTCCCATGTGCTCAACCACCAATTTGCT
ACGACAGAAAACCAGCAGAGACTTTGGCCATGCTCAGCGTTAACGTTGACAACCCGGG
CTACGATGAGCTGCTGGAAGCAGCTGTTAAGTGCCCCGGAAGGAAAAGGAGATCCACC
GAGGAGCTGTTTAATGAGTATAAGCTAACGCGCCCTTACATGGCCAGATGCATCAGAT
GTGCAGTTGGGAGCTGCCATAGTCCAATAGCAATCGAGGCAGTAAAGAGCGACGGGCA
CGACGGTTATGTTAGACTTCAGACTTCCTCGCAGTATGGCCTGGATTCTCCTCCGGCAACT
TAAAGGGCAGGACCATGCGGTATGACATGCACGGGACCATTAAAGAGATACCACTACA
TCAAGTGTCACTCTATACATCTCGCCCCTGTACATTGTGGATGGGCACGGTTATTTCT
GCTTGCCAGGTGCCCCGGCAGGGGACTCCATCACCATGGAATTTAAGAAAGATTCCGTC
AGACACTCCTGCTCGGTGCCGTATGAAGTGAAATTTAATCCTGTAGGCAGAGAACTCTA
TACTCATCCCCCAGAACACGGAGTAGAGCAAGCGTGCCAAGTCTACGCACATGATGCA
CAGAACAGAGGAGCTTATGTCGAGATGCACCTCCCGGGCTCAGAAGTGGACAGCAGTT
TGGTTTCCTTGAGCGGCAGTTCAGTCACCGTGACACCTCCTGATGGGACTAGCGCCCTG
GTGGAATGCGAGTGTGGCGGCACAAAGATCTCCGAGACCATCAACAAGACAAAACAG
TTCAGCCAGTGCACAAAGAAGGAGCAGTGCAGAGCATATCGGCTGCAGAACGATAAGT
GGGTGTATAATTCTGACAAACTGCCCAAAGCAGCGGGAGCCACCTTAAAAGGAAAAC
GCATGTCCCATTTCTGCTGGCAGACGGCAAATGCACCGTGCCTCTAGCACCAGAACCTA

10

20

30

40

50

TGATAACCTTCGGTTTCAGATCAGTGTCACTGAAACTGCACCCTAAGAATCCCACATAT
CTAATCACCCGCCAACTTGCTGATGAGCCTCACTACACGCACGAGCTCATATCTGAACC
AGCTGTTAGGAATTTTACCGTCACCGAAAAAGGGTGGGAGTTTGTATGGGGAAACCAC
CCGCCGAAAAGGTTTTGGGCACAGGAAACAGCACCCGGAATCCACATGGGCTACCGC
ACGAGGTGATAACTCATTATTACCACAGATACCCTATGTCCACCATCCTGGGTTTGTCA
ATTTGTGCCGCCATTGCAACCGTTTCCGTTGCAGCGTCTACCTGGCTGTTTTGCAGATCT
AGAGTTGCGTGCCTAACTCCTTACCGGCTAACACCTAACGCTAGGATAACATTTTGTCT
GGCTGTGCTTTGCTGCGCCCGCACTGCCCCGGGCGGAGACCACCTGGGAGTCCTTGGATC
ACCTATGGAACAATAACCAACAGATGTTCTGGATTCAATTGCTGATCCCTCTGGCCGCC
TTGATCGTAGTGACTCGCCTGCTCAGGTGCGTGTGCTGTGTCGTGCCTTTTTTAGTCATG
GCCGGCGCCGCAGGCGCCGGCGCCTACGAGCACGCGACCACGATGCCGAGCCAAGCG
GGAATCTCGTATAAACTATAGTCAACAGAGCAGGCTACGCACCACTCCCTATCAGCA
TAACACCAACAAAGATCAAGCTGATACCTACAGTGAACCTTGGAGTACGTCACCTGCCA
CTACAAAACAGGAATGGATTCACCAGCCATCAAATGCTGCGGATCTCAGGAATGCACT
CCAACCTTACAGGCCTGATGAACAGTGCAAAGTCTTACAGGGGTTTACCCGTTTCATGTG
GGGTGGTGCATATTGCTTTTGCGACACTGAGAACACCCAAGTCAGCAAGGCCTACGTA
ATGAAATCTGACGACTGCCTTGCGGATCATGCTGAAGCATATAAAGCGCACACAGCCT
CAGTGCAGGCGTTTCTCAACATCACAGTGGGAGAACACTCTATTGTGACTACCGTGTAT
GTGAATGGAGAACTCCTGTGAATTTCAATGGGGTCAAAATAACTGCAGGTCCGCTTTC
CACAGCTTGGACACCCTTTGATCGCAAAATCGTGCAGTATGCCGGGGAGATCTATAATT
ATGATTTTCTGAGTATGGGGCAGGACAACCAGGAGCATTGGAGATATACAATCCAG
AACAGTCTCAAGCTCTGATCTGTATGCCAATACCAACCTAGTGCTGCAGAGACCCAAA
GCAGGAGCGATCCACGTGCCATACACTCAGGCACCTTCGGGTTTTGAGCAATGGAAGA
AAGATAAAGCTCCATCATTGAAATTTACCGCCCCCTTTCGGATGCGAAATATATACAAAC
CCCATTTCGCGCCGAAAACCTGTGCTGTAGGGTCAATTCCATTAGCCTTTGACATTCCCGA
CGCCTTGTTTACCAGGGTGTGAGAAACACCGACACTTTCAGCGGCCGAATGCACTCTTA
ACGAGTGCGTGTATTCTTCCGACTTTGGTGGGATCGCCACGGTCAAGTACTCGGCCAGC
AAGTCAGGCAAGTGCGCAGTCCATGTGCCATCAGGGACTGCTACCCTAAAAGAAGCAG
CAGTCGAGCTAACCGAGCAAGGGTCGGCGACTATCCATTTCTCGACCGCAAATATCCA
CCCGGAGTTCAGGCTCCAAATATGCACATCATATGTTACGTGCAAAGGTGATTGTCACC
CCCCGAAAGACCATATTGTGACACACCCTCAGTATCACGCCCAAACATTTACAGCCGC
GGTGTCAAAAACCGCGTGGACGTGGTTAACATCCCTGCTGGGAGGATCAGCCGTAATT
ATTATAATTGGCTTGGTGCTGGCTACTATTGTGGCCATGTACGTGCTGACCAACCAGAA
ACATAATTGAATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTACATAGAAGCTCGCGGCGATTGG
CATGCCGCCTTAAAATTTTTATTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTT
AATATTTT

10

20

30

40

50

VEE 送達ベクター(配列番号6) ; VEEゲノムのヌクレオチド7544~11175を欠失させたもの
[アルファウイルス構造タンパク質を除去]

ATGggcggcgatgagagaagcccagaccaattacctacccaaaATGGagaaagttcacgttgacatcgaggaagacagccattcct
cagagctttgcagcggagcttcccgcagtttgaggtagaagccaagcaggtcactgataatgacctgctaagccagagcgttttcgcatctgg
cttcaaaactgatcgaacggaggtggaccatccgacacgatcttgacattggaagtgcgccccgccgcagaatgtattctaagcacaagta
tcattgtatctgtccgatgagatgtgcggaagatccggacagattgtataagtatgcaactaagctgaagaaaaactgtaaggaaataactgataa
ggaattggacaagaaaaatgaaggagctcgcgcgcatgagcgacctgacctggaactgagactatgtgcctccacgacgacgagtcgt
gtcgtctacgaagggcaagtcgctgtttaccaggatgtatacgcggttgacggaccgacaagtctctatcaccaagccaataagggagtagagt
cgctactggataggctttgacaccaccccttttatgtttaagaactggctggagcatatccatcatactctaccaactggcgccgacgaaaccgtg
ttaacggctcgtaacataggcctatgcagctctgacgttatggagcggtcacgtagagggtatgccattcttagaaagaagtattgaaaccatcc
aacaatgttctattctgttggctcgaccatctaccagagaagagggacttactgaggagctggcacctgccgtctgtatttcacttacgtggca
agcaaaattacacatgtcgggtgtgagactatagttatgtgcgacgggtacgtcgtaaaaagaatagctatcagtcaggcctgtatgggaagcctt
caggctatgtgctacgatgcaccgcgagggtattctgtctgcaaaagtacagacacattgaacggggagaggggtctctttcccggtgtgcacg
tatgtgccagctacattgtgtgaccaaagtactggcactatggcaacagatgtcagtgccgacgacgcgcaaaaactgtcggttgggctcaacc
agcgtatagtcgtcaacggctgcacccagagaaacaccaatacatgaaaattaccttttgcctagtgggccaggcatttgctaggtgggca
aaggaatataaggaagatcaagaagatgaaaggccactaggactacgagatagacagttagtcaggggtgtgttgggcttttagaaggcaca
agataacatctatttataagcgccccgatacccaaacatcatcaaaagtgaacagcgatttccactattctgtgctgccaggataggcagtaaca
cattggagatcgggctgagaacaagaatcaggaaaatgttagaggagcacaaggagccgtcacctctcattaccgccgaggacgtacaagaa
gctaagtgcgcagccgatgaggctaaggaggtgcgtgaagccgaggagttgcgcgagctctaccacctttggcagctgatgttgaggagcc
cactctggaagccgatgtcacttgatgttacaagaggctggggccggtcagtgagacacctcgtggcttgataaagggtaccagctacgct
ggcgaggacaagatcggtcttacgtgtgtttctccgcaggtgtactcaagagtgaaaaattatcttgcatccacctctcgtgaacaagtc
atagtataacacactctggccgaaaaggcggttatgccgtggaaccataccatggtaaagtagtggtgccagagggacatgcaataccgtcc
aggactttcaagctctgagtgaagtgccaccattgtgtacaacgaacgtgagttcgtaaacaggtacctgcaccatattgccacacatggagga
gcgctgaacactgatgaagaatattacaaaactgtcaagcccagcgagcacgacggcgaataacctgtacgacatcgacaggaaacagtgcgt
caagaaagaactagtcactgggctagggtcacaggcgagctggtggatcctccttccatgaattcgctacgagagctctgagaacacgacc
agccgctccttaccagtaaccaacatagggtgtatggcgtgccaggatcaggcaagtctggcatcattaaaagcgagtcacaaaaaagat
ctagtgtgagcgccaagaaagaaaactgtgcagaaattataaggagcgtcaagaaaatgaaagggtggacgtcaatgccagaactgtgga
ctcagtgtcttgaatggtgcaaacaccccgtagagacctgtatattgacgaagcttttgcctgcatgcaggtactctcagagcgctcatagcc
attataagacctaaaaaggcagtgctctgcggggatccaaacagtgcggttttttaacatgatgtgcctgaaagtgcattttaaccacgagattg
cacacaagtcttccaaaaagcatctctcgcggttgactaaatctgtgacttcggctgtctcaacctgttttacgacaaaaaaatgagaacgacg
aatccgaaagagactaagattgtgattgacactaccggcagtlaccaaacctaagcaggacgatctcattctcactgttttcagagggtgggtgaa
gcagttgcaaatagattacaaaggcaacgaaataatgacggcagctgcctctcaagggtgacctcgtaaagggtgtgtatgccgttcggtacaag
gtgaatgaaaatcctctgtacgcaccacctcagaacatgtgaacgtctactgacctgcagggagaccgcatcgtgtgaaaacactagcc
ggcgaccatggataaaaacactgactgccaagtaccctgggaatttactgccacgatagaggagtggaagcagagcatgatgccatcatg
aggcacatcttgagagaccggacctaccgacgtcttcagaataaggcaaacgtgtgttggccaaggcttttagtccgggtgtgaagacc
gctggcatagacatgaccactgaacaatggaacactgtggatttttgaacggcacaagctcactcagcagagatagattgaaccaactatg
cgtgaggttcttggactcgtactcggtctattttctgaccactgttccgttatccattaggaataatcactgggataactccccgtcgcc
taacatgtacgggctgaataaagaagtgtccgtcagctctctcgaggtaccacaactgcctcgggcagttgccactggaagagtctatgac

10

20

30

40

50

atgaacactggtactgcgcaattatgatccgcgcataaacctagctgtaaacagaagactgcctcatgctttagctcctccaccataatgaac
accacagagtacttttctcattcgtcagcaaatgaagggcagaactgtcctggtggtcggggaaaagtgtccgtccaggcaaaatggtg
actggtgtcagaccggcctgaggctaccttcagagctcggctggatttaggcacccagggtgatgtgcccaaatatgacataatattgttaatgt
gaggaccccatataataaccatcactatcagcagtgtaagaccatgccattaagcttagcatgttgaccaagaaagcttgtctcatctgaatcc
cggcggaacctgtgtcagcataggttatggttacgtgacagggccagcgaaagcatcattggtgctatagcgcggcagttcaagtttccggg
gtatgcaaaccgaaatcctcacttgaagagacggaagtctgtttgtattcattgggtacgatcgcaaggccgtacgcacaatcctacaagcttt
catcaaccttgaccaacatttatacaggttcagactccacgaagccggatgtgcacccatatacatgtggtgaggggatattgccacggcc
accgaaggagtattataatgtctgaacagcaaaggacaacctggcgagggggtgtgcggagcgtgtataagaaattcccgaaagcttc
gatttacagccgatcgaaagtaggaaaagcgcgactggtcaaaagtgacgttaaaccatattcatgccgtaggaccaaaactcaacaaagtctt
ggaggttgaagtgacaacagttggcagaggcttatgagtcacgctaagattgtcaacgataacaattacaagtcagtagcgattccactgtt
gtccaccggcatctttccgggaacaaagatcgactaaccaatcattgaaccatttgcagacgtttagacaccactgatgcagatgtagccat
atactgcagggacaagaatgggaaatgactctcaagggaagcagtggttaggagagaagcagtgaggagatatgcataccgacgactctt
cagtgacagaacctgatgcagagctggtgaggggtcatccgaaggttcttggctggaaggagggtctacagcacaagcgtggcaaaactt
tctcatatttgaagggaccaagtctcaccaggcgccaaggtatagcagaataatgccatgtggccgttgcaacggaggccaatgagca
ggatgtcatgtatatcctcgagaaaagcatgagcagattaggtcgaaatgcccgtcgaaagtcggaagcctccacaccacctagcacgctg
cctgtctgtcatccatgccatgactccagaaaagtagacagcgctaaagcctcacgtccagaacaaattactgtgtgctcatcctttcattgc
cgaagtataaatcactggtgtgcagaagatccaatgtcccagcctatattgtctcaccgaaagtgcctgcgtatattcatccaaggagtattct
cgtggaaacaccaccggtgacgagactccggagccatcgagagaaccaatccacagaggggacacctgaacaaccaccacttataacc
gaggatgagaccaggactagaacgcctgagccgatcatcatgaagagggaagagatagcataagtttgcgtgcagatgccccgaccca
ccaggtgtcgcaagtcaggcgacattcacggcgccctctgtatctagctcatcctggtccattcctcatgcacccgactttgatgtggacag
tttatccatacttgacacctggaggggagctagcgtgaccagcggggcaacgtcagccgagactaactcttacttcgaaagagtatggagtttct
ggcgcgaccgggtgcctgcgctcgaacagtattcaggaacctccacatcccgtccgcgcacaagaacaccgtcacttgcaccagcaggg
cctgtctcgagaaccgctagtctccaccccgccaggcgtgaatagggtgatcactagagaggagctcaggcgcttaccctgcacgcactc
ctagcaggtcggtctcgagaaccagcctggtctccaaccgcccaggcgtaaatagggtgattacaagagaggagttagggcgctcgtagcac
aacaacatgacggttgatgcgggtgcatacatctttcctccgacaccggtcaagggcatttacaacaaaatcagtaaggcaaacggtgctat
ccgaagtgtgttgagaggaccgaattggagatttctgtatccccgcgcctcgaccaagaaaaagaagaattactacgcaagaaattacgtt
aatcccacacctgtaacagaagcagataccagtcagggaaggtggagaacatgaaagccataacagctagacgtattctgcaaggcctagg
gcattatttgaaggcagaaggaaaaagtgagtgctaccgaacctgcatcgttcttcttattcatctagtgtgaacctgccttttcaagcccca
aggctcgagtggaagcctgtaacgccatgttgaagagaacttccgactgtggcttcttactgtattattccagtagcagatgcctatttggacatg
gttgacggagcttcatgtcttgacactgccagttttgcctgcaaaagctgcgcagcttccaaagaaacactcctatttgaaccacaatac
gatcggcagtgcttcagcagatccagaacacgtccagaacgtctggcagctgcccacaaaagaaattgcaatgtcacgcaaatgagagaat
tgcccgtattggattcggcgccctttaatgtggaatgctcaagaaatgctgtaataatgaatattgggaacgtttaaagaaaaccccatcag
gcttactgaagaaaacgtggtaaattacattacaaattaaaaggacaaaaagctgctgctcttttgcgaagacacataatttgaatatgttgagg
acataccaatggacaggttgaatggactaaaagagagacgtgaaagtactccagggaacaaaacatactgaagaacggcccaagggtacagg
tgatccaggctgccgatccgtagcaacagcgtatctgtcgggaatccaccgagagctggttaggagattaaatcggtcctgcttccgaacatt
catacactgtttgatatgtcggctgaagactttgacgtattatagccgagcactccagcctggggattgtgttctggaacctgacatcgctcgtt
gataaaagtgaggacgacgccatggctctgaccgcgttaattgattctggaagacttaggtgtggacgcagagctgttgacgtgattgaggcgg
cttccggcgaaatttcatcaatacatttcccactaaaactaaatttaattcggagccatgatgaaatctggaatgttctcactgtttgtgaacac

10

20

30

40

50

agtcattaacattgtaatcgcaagcagagtgttgagagaacggctaaccggatcacccatgtgcagcattcattggagatgacaatatcgtgaaag
gagtcaaacgagacaaattaatggcagacaggtgcgccacctggtgaatatggaagtcaagattatagatgctgtggtggcgagaaaagcgc
cttatttctgtggagggtttattttgtgtgactccgtgaccggcacagcgtgccgtgtggcagacccccctaaaaaggctgtttaagcttggcaaacct
ctggcagcagacgatgaacatgatgatgacaggagaaggcattgcatgaagagtcaacacgctggaaccgagtgggtattcttcagagctg
tgcaaggcagtagaatacaggtatgaaaccgtaggaactccatcatagttatggccatgactactctagctagcagtgttaaacattcagctacc
tgagagggggcccctataactctctacggcTAAcctgaatggactacgacgtatcacgccaaacatttacagccgcgggtgtcaaaaaccgcg
tggacgtggtaacatccctgctgggaggatcagccgtaattattataattggcttggctgctgactattgtggccatgtacgtgctgaccaacca
gaaacataattgaatacagcagcaattggcaagctgcttacatagaactcgccggcgattggcatgccgccttaaaattttttttttttttttttt
ccgaatcggttttttttaattttcAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

10

TC-83送達ベクター(配列番号7) ; TC-83ゲノムのヌクレオチド7544~11175を欠失させたもの[アルファウイルス構造タンパク質を除去]

ATAGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAAATGGAGAAAGTTCA
CGTTGACATCGAGGAAGACAGCCCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAG
TTTGAGGTAGAAGCCAAGCAGGTCACTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTT
CGCATCTGGCTTCAAACTGATCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGA
CATTGGAAGTGCGCCCGCCCGCAGAATGTATTCTAAGCACAAGTATCATTGTATCTGTC
CGATGAGATGTGCGGAAGATCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGAA
AAACTGTAAGGAAATAACTGATAAGGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTCGCCGC
CGTCATGAGCGACCCTGACCTGGAACTGAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGTCG
TGTCGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGTTTACCAGGATGTATACGCGGTTGACGGACCGA
CAAGTCTCTATACCAAGCCAATAAGGGAGTTAGAGTCGCCTACTGGATAGGCTTTGA
CACCACCCCTTTTATGTTTAAGAACTTGGCTGGAGCATATCCATCATACTCTACCAACT
GGGCCGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATAGGCCTATGCAGCTCTGACGTTAT
GGAGCGGTCACGTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAGAAGTATTTGAAACCATCCAAC
AATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTTACTGAGGAG
CTGGCACCTGCCGTCTGTATTTCACTTACGTGGCAAGCAAAATTACACATGTCGGTGTG
AGACTATAGTTAGTTGCGACGGGTACGTCGTTAAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCCT
GTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTCTTGTGCTGCA
AAGTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCC
AGCTACATTGTGTGACCAAATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTCAGTGC GGACGAC
GCGCAAAAACCTGCTGGTTGGGCTCAACCAGCGTATAGTCGTCAACGGTCGCACCCAGA
GAAACACCAATAACCATGAAAAATTACCTTTTGCCCGTAGTGGCCCAGGCATTTGCTAGG
TGGGCAAAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGAT
AGACAGTTAGTCATGGGGTGTGTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGATAACATCTATTTA
TAAGCGCCCGGATACCCAAACCATCATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCATTCGTGC
TGCCCAGGATAGGCAGTAACACATTGGAGATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAA
TGTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACCTCTCATTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGC

20

30

40

TAAGTGCGCAGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAAGCCGAGGAGTTGCGCGCAGCT
CTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCACTCTGGAAGCCGATGTGCGACTTGAT
GTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAAAGGTTACC
AGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCGCAGGCTGTACT
CAAGAGTGAAAAATTATCTTGCATCCACCCTCTCGCTGAACAAGTCATAGTGATAACAC
ACTCTGGCCGAAAAGGGCGTTATGCCGTGGAACCATAACCATGGTAAAGTAGTGGTGCC
AGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGGACTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATT
GTGTACAACGAACGTGAGTTCGTAAACAGGTACCTGCACCATAATTGCCACACATGGAG
GAGCGCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAAGTGTCAAGCCCAGCGAGCACGACGG
CGAATACCTGTACGACATCGACAGGAAACAGTGCGTCAAGAAAGAACTAGTCACTGGG
CTAGGGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTCGCCTACGAGAGTCT
GAGAACACGACCAGCCGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCA
GGATCAGGCAAGTCTGGCATCATTAAAAGCGCAGTCACCAAAAAAGATCTAGTGGTGA
GCGCCAAGAAAGAAAAGTGTGCAGAAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGAAAGGGC
TGGACGTCAATGCCAGAACTGTGGACTCAGTGCTCTTGAATGGATGCAAACACCCCGT
AGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCTTGTGCATGCAGGTACTCTCAGAGCGCTCA
TAGCCATTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGCGGGGATCCCAAACAGTGCGGTTT
TTTTAACATGATGTGCCTGAAAGTGCATTTTAACCACGAGATTTGCACACAAGTCTTCC
ACAAAAGCATCTCTCGCCGTTGCACTAAATCTGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTTGTTTT
ACGACAAAAAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACTAAGATTGTGATTGACACTA
CCGGCAGTACCAAACCTAAGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTTCAGAGGGTGGGTG
AAGCAGTTGCAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCTCTCAAG
GGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTCCGGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTGTA
CGCACCCACCTCAGAACATGTGAACGTCTACTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTG
TGGAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAAACACTGACTGCCAAGTACCCTGGGA
ATTTCACTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCACAT
CTTGAGAGACCGGACCCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAAACGTGTGTTGGGCC
AAGGCTTTAGTGCCGGTGCTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACCACTGAACAATGGA
ACACTGTGGATTATTTTGAACGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCA
ACTATGCGTGAGGTTCTTTGGACTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACTGT
TCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGGGATAACTCCCCGTCGCCTAACATGTACGGGC
TGAATAAAGAAGTGGTCCGTCAGTCTCTCGCAGGTACCCACAACCTGCCTCGGGCAGTT
GCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACACTGCGCAATTATGATCCGCGCA
TAAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGACTGCCTCATGCTTTAGTCCTCCACCATAATGAA
CACCCACAGAGTGACTTTTCTTCATTCGTCAGCAAATTGAAGGGCAGAACTGTCTGGT
GGTCGGGGAAAAGTTGTCCGTCCCAGGCAAAATGGTTGACTGGTTGTCAGACCGGCCT
GAGGCTACCTTCAGAGCTCGGCTGGATTTAGGCATCCCAGGTGATGTGCCCAAATATG
ACATAATATTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAATACCATCACTATCAGCAGTGTGAA

10

20

30

40

50

GACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCATCTGAATCCCGG
CGGAACCTGTGTGCAGCATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCATCATT
GGTGCTATAGCGCGGCAGTTCAAGTTTTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTGA
AGAGACGGAAGTTCTGTTTGTATTTCATTGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATC
CTTACAAGCTTTCATCAACCTTGACCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCC
GGATGTGCACCCTCATATCATGTGGTGCGAGGGGATATTGCCACGGCCACCGAAGGAG
TGATTATAAATGCTGCTAACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTGTGCGGAGCGCT
GTATAAGAAATTCCCGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCGA
CTGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCATTTCATGCCGTAGGACCAAACCTTCAACAAAG
TTTCGGAGGTTGAAGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGAT
TGTCAACGATAACAATTACAAGTCAGTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGGCATCTTTT
CCGGGAACAAAGATCGACTAACCCAATCATTGAACCATTGCTGACAGCTTTAGACAC
CACTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGGACAAGAAATGGGAAATGACTCTCAAG
GAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAGGAGATATGCATATCCGACGACTCTTCAG
TGACAGAACCTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAGTTCTTTGGCTGGAAG
GAAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAAACTTTCTCATATTTGGAAGGGACCAAGTTT
CACCAGGCGGCCAAGGATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCCCGTTGCAACGGAGG
CCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGCATGAGCAGTATTAGGTGCGAA
ATGCCCGTTCGAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTTGCTTGTGCA
TCCATGCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAT
TACTGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCC
AATGCTCCCAGCCTATATTGTTCTCACCGAAAGTGCCTGCGTATATTCATCCAAGGAAG
TATCTCGTGGAACACCACCGGTAGACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAAT
CCACAGAGGGGACACCTGAACAACCACCACTTATAACCGAGGATGAGACCAGGACTA
GAACGCCTGAGCCGATCATCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGCTGTC
AGATGGCCCGACCCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGGGCCGCCCTCT
GTATCTAGCTCATCCTGGTCCATTCCCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTTATCC
ATACTTGACACCCTGGAGGGAGCTAGCGTGACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGACTA
ACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTCTGGCGCGACCGGTGCCTGCGCCTCGAACA
GTATTCAGGAACCCTCCACATCCCGCTCCGCGCACAAAGAACCCGTCACTTGCACCCAG
CAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAATAGGGTGATC
ACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACGCACTCCTAGCAGGTGCGTCTCGA
GAACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATTACAAGAGAGGAGTT
TGAGGCGTTCGTAGCACAACAACAATGACGGTTTGATGCGGGTGCATACATCTTTTCCT
CCGACACCGGTCAAGGGCATTTACAACAAAAATCAGTAAGGCAAACGGTGCTATCCGA
AGTGGTGTTGGAGAGGACCGAATTGGAGATTTTCGTATGCCCCGCGCCTCGACCAAGAA
AAAGAAGAATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAATCCCACACCTGCTAACAGAAGCA
GATACCAGTCCAGGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCA

10

20

30

40

50

AGGCCTAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGAACCCCTGCAT
CCTGTTCCCTTTGTATTTCATCTAGTGTGAACCGTGCCTTTTCAAGCCCCAAGGTCGCAGTG
GAAGCCTGTAACGCCATGTTGAAAGAGAACTTTCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTAT
TCCAGAGTACGATGCCTATTTGGACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTGCTTAGACACTG
CCAGTTTTTTGCCCTGCAAAGCTGCGCAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTATTTGGAACCC
ACAATACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCAGAACACGCTCCAGAACGTCCTGGCAG
CTGCCACAAAAAGAAATTGCAATGTCACGCAAATGAGAGAATTGCCCGTATTGGATTG
GGCGGCCTTTAATGTGGAATGCTTCAAGAAATATGCGTGTAATAATGAATATTGGGAA
ACGTTTAAAGAAAACCCCATCAGGCTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCA
AATTAAGGACCAAAAGCTGCTGCTCTTTTTGCGAAGACACATAATTTGAATATGTTG
CAGGACATACCAATGGACAGGTTTGTAATGGACTTAAAGAGAGACGTGAAAGTGACTC
CAGGAACAAAACATACTGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGTGATCCAGGCTGCCGATCC
GCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCACCGAGAGCTGGTTAGGAGATTAAATGCG
GTCCTGCTTCCGAACATTCATACACTGTTTGATATGTCGGCTGAAGACTTTGACGCTATT
ATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTCTGGAACTGACATCGCGTCGTTTGA
TAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCGTTAATGATTCTGGAAGACTTAGGT
GTGGACGCAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGAAATTTTCATCAATAC
ATTTGCCCACTAAACTAAATTTAAATTCGGAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTCCCTC
ACACTGTTTGTGAACACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTTGAGAGAAC
GGCTAACCGGATCACCATGTGCAGCATTCATTGGAGATGACAATATCGTGAAAGGAGT
CAAATCGGACAAATTAATGGCAGACAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTCAAG
ATTATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCCTTATTTCTGTGGAGGGTTTATTTTGTG
TGACTCCGTGACCGGCACAGCGTGCCGTGTGGCAGACCCCCTAAAAAGGCTGTTTAAG
CTTGGCAAACCTCTGGCAGCAGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGC
ATGAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAGTGCGGTATTCTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGT
AGAATCAAGGTATGAAACCGTAGGAACTTCCATCATAGTTATGGCCATGACTACTCTA
GCTAGCAGTGTTAAATCATTACGCTACCTGAGAGGGGGCCCCTATACTCTCTACGGCTA
ACCTGAATGGACTACGACATAGTCTAGTCCGCCAAGATGTTCCCGTTCCAGCCAATGTA
TCCGATGCAGCCAATGCCCTATCGCAACCCGTTTCGCGGCCCCGCGCAGGCCCTGGTTCC
CCAGAACCGACCCTTTTCTGGCGATGCAGGTGCAGGAATTAACCCGCTCGATGGCTAA
CCTGACGTTCAAGCAACGCCGGGACGCGCCACCTGAGGGGGCCATCCGCTAAGAAACCG
AAGAAGGAGGCCTCGCAAAAACAGAAAGGGGGAGGCCAAGGGAAGAAGAAGAAGAA
CCAAGGGAAGAAGAAGGCTAAGACAGGGCCGCCTAATCCGAAGGCACAGAATGGAAA
CAAGAAGAAGACCAACAAGAAACCAGGCAAGAGACAGCGCATGGTCATGAAATTGGA
ATCTGACAAGACGTTCCCAATCATGTTGGAAGGGAAGATAAACGGCTACGCTTGTGTG
GTCGGAGGGAAGTTATTCAGGCCGATGCATGTGGAAGGCAAGATCGACAACGACGTTT
TGGCCGCGCTTAAGACGAAGAAAGCATCCAAATACGATCTTGAGTATGCAGATGTGCC
ACAGAACATGCGGGCCGATACATTCAAATACACCCATGAGAAACCCCAAGGCTATTAC
AGCTGGCATCATGGAGCAGTCCAATATGAAAATGGGCGTTTCACGGTGCCGAAAGGAG

10

20

30

40

50

TTGGGGCCAAGGGAGACAGCGGACGACCCATTCTGGATAACCAGGGACGGGTGGTCGC
TATTGTGCTGGGAGGTGTGAATGAAGGATCTAGGACAGCCCTTTCAGTCGTCATGTGGA
ACGAGAAGGGAGTTACCGTGAAGTATACTCCGGAGAAGTGCAGCAATGGTCACTAGT
GACCACCATGTGTCTGCTCGCCAATGTGACGTTCCCATGTGCTCAACCACCAATTTGCT
ACGACAGAAAACCAGCAGAGACTTTGGCCATGCTCAGCGTTAACGTTGACAACCCGGG
CTACGATGAGCTGCTGGAAGCAGCTGTAAAGTGCCCCGGAAGGAAAAGGAGATCCACC
GAGGAGCTGTTTAATGAGTATAAGCTAACGCGCCCTTACATGGCCAGATGCATCAGAT
GTGCAGTTGGGAGCTGCCATAGTCCAATAGCAATCGAGGCAGTAAAGAGCGACGGGCA
CGACGGTTATGTTAGACTTCAGACTTCCTCGCAGTATGGCCTGGATTTCCTCCGGCAACT
TAAAGGGCAGGACCATGCGGTATGACATGCACGGGACCATTAAAGAGATAACCACTACA
TCAAGTGTCACTCTATACATCTCGCCCGTGTACATTGTGGATGGGCACGGTTATTTCT
GCTTGCCAGGTGCCCCGGCAGGGGACTCCATCACCATGGAATTTAAGAAAGATTCCGTC
AGACACTCCTGCTCGGTGCCGTATGAAGTGAAATTTAATCCTGTAGGCAGAGAAGTCTA
TACTCATCCCCCAGAACACGGAGTAGAGCAAGCGTGCCAAGTCTACGCACATGATGCA
CAGAACAGAGGAGCTTATGTCGAGATGCACCTCCCGGGCTCAGAAGTGGACAGCAGTT
TGGTTTCCTTGAGCGGCAGTTCAGTCACCGTGACACCTCCTGATGGGACTAGCGCCCTG
GTGGAATGCGAGTGTGGCGGCACAAAGATCTCCGAGACCATCAACAAGACAAAACAG
TTCAGCCAGTGCACAAAGAAGGAGCAGTGCAGAGCATATCGGCTGCAGAACGATAAGT
GGGTGTATAATTCTGACAACTGCCCAAAGCAGCGGGAGCCACCTTAAAAGGAAAAGT
GCATGTCCCATTCTTGCTGGCAGACGGCAAATGCACCGTGCCTCTAGCACCAGAACCTA
TGATAACCTTCGGTTTCAGATCAGTGTCACTGAACTGCACCCTAAGAATCCCACATAT
CTAATCACCCGCCAACTTGCTGATGAGCCTCACTACACGCACGAGCTCATATCTGAACC
AGCTGTTAGGAATTTTACCGTCACCGAAAAAGGGTGGGAGTTTGTATGGGGAAACCAC
CCGCCGAAAAGGTTTTGGGCACAGGAAACAGCACCCGGAATCCACATGGGCTACCGC
ACGAGGTGATAACTCATTATTACCACAGATACCCTATGTCCACCATCCTGGGTTTGTCA
ATTTGTGCCGCCATTGCAACCGTTTCCGTTGCAGCGTCTACCTGGCTGTTTTGCAGATCT
AGAGTTGCGTGCCCTAACTCCTTACCGGCTAACACCTAACGCTAGGATACCATTTTGTCT
GGCTGTGCTTTGCTGCGCCCGCACTGCCCCGGGCCGAGACCACCTGGGAGTCCTTGGATC
ACCTATGGAACAATAACCAACAGATGTTCTGGATTCAATTGCTGATCCCTCTGGCCGCC
TTGATCGTAGTGACTCGCCTGCTCAGGTGCGTGTGCTGTGTCGTGCCTTTTTAGTCATG
GCCGGCGCCGCAGGCGCCGGCGCCTACGAGCACGCGACCACGATGCCGAGCCAAGCG
GGAATCTCGTATAAACTATAGTCAACAGAGCAGGCTACGCACCACTCCCTATCAGCA
TAACACCAACAAAGATCAAGCTGATACCTACAGTGAAGTTGGAGTACGTCACCTGCCA
CTACAAAACAGGAATGGATTACACAGCCATCAAATGCTGCGGATCTCAGGAATGCACT
CCAACTTACAGGCCTGATGAACAGTGCAAAGTCTTACAGGGGTTTACCCGTTTCATGTG
GGGTGGTGATATTGCTTTTGCACACTGAGAACACCCAAGTCAGCAAGGCCTACGTA
ATGAAATCTGACGACTGCCTTGCGGATCATGCTGAAGCATATAAAGCGCACACAGCCT
CAGTGCAGGCGTTCCTCAACATCACAGTGGGAGAACACTCTATTGTGACTACCGTGTAT

10

20

30

40

50

GTGAATGGAGAACTCCTGTGAATTTCAATGGGGTCAAAATAACTGCAGGTCCGCTTTC
CACAGCTTGGACACCCTTTGATCGCAAAATCGTGCAGTATGCCGGGGAGATCTATAATT
ATGATTTTCTGAGTATGGGGCAGGACAACCAGGAGCATTGAGATATACAATCCAG
AACAGTCTCAAGCTCTGATCTGTATGCCAATACCAACCTAGTGCTGCAGAGACCCAAA
GCAGGAGCGATCCACGTGCCATACACTCAGGCACCTTCGGGTTTTGAGCAATGGAAGA
AAGATAAAGCTCCATCATTGAAATTTACCGCCCCTTTCGGATGCGAAATATATACAAAC
CCCATTGCGCGCCGAAAACCTGTGCTGTAGGGTCAATTCATTAGCCTTTGACATTCCCGA
CGCCTTGTTTACCAGGGTGTGAGAAACACCGACACTTTCAGCGGCCGAATGCACTCTTA
ACGAGTGCCTGTATTCTTCCGACTTTGGTGGGATCGCCACGGTCAAGTACTCGGCCAGC
AAGTCAGGCAAGTGCGCAGTCCATGTGCCATCAGGGACTGCTACCCTAAAAGAAGCAG
CAGTCGAGCTAACCGAGCAAGGGTTCGGCGACTATCCATTTCTCGACCGCAAATATCCA
CCCGGAGTTTCAGGCTCCAAATATGCACATCATATGTTACGTGCAAAGGTGATTGTCACC
CCCCGAAAGACCATATTGTGACACACCCTCAGTATCACGCCCAAACATTTACAGCCGC
GGTGTCAAAAACCGCGTGGACGTGGTTAACATCCCTGCTGGGAGGATCAGCCGTAATT
ATTATAATTGGCTTGGTGCTGGCTACTATTGTGGCCATGTACGTGCTGACCAACCAGAA
ACATAATTGAATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTACATAGAACTCGCGGCGATTGG
CATGCCGCCTTAAATTTTTATTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTT
AATATTTT

10

VEE産生ベクター(配列番号8) ; VEE ゲノムのヌクレオチド7544~11175を欠失させ、5'
T7-プロモーターを加え、3'制限部位を加えたもの

20

TAATACGACTCACTATAGGATGggcggcgcgatgagagaagcccagaccaattacctacccaaaATGgagaaagtca
cgttgacatcgaggaagacagcccattcctcagagctttgcagcggagcttcccgagttgaggtagaagccaagcaggtcactgataatgac
catgctaattgccagagcgttttcgcatctggttcaaaactgatcgaaacggaggtggacccatccgacacgacatccttgacattggaagtgcgc
cgcccgagaatgtattctaagcacaagtatcattgtatctgtccgatgagatgtgcggaagatccggacagattgtataagtatgcaactaagct
gaagaaaaactgtaaggaaataactgataaggaattggacaagaaaatgaaggagctcgccgctcatgagcgaccctgacctggaactg
agactatgtgcctccacgacgacgagtcgtgtcgtacgaaggcgaagtcgctgtttaccaggatgtatacgcggttgacggaccgacaagtct
ctatcaccaagccaataagggaggttagatgcctactggataggcttgacaccaccctttatgtttaagaacttggtggagcatatccatcat
actctaccaactgggcccagaaaccgtgttaacggctcgtaacataggcctatgcagctctgacgttatggagcggtcacgtagagggatgc
cattcttagaagaagtatttgaaccatccaacaatgttctattctctgttggctcgaccatctaccacgagaagagggacttactgaggagctgg
cacctgccgtctgtatttcacttacgtggcaagcaaaattacacatgtcgggtgtgagactatagttagttgcgacgggtacgtcgttaaaagaatag
ctatcagtcaggcctgtatgggaagccttcaggctatgtgtacgatgcaccgaggggattctgtgtgctgcaagtgcagacacattgaac
ggggagagggtctctttccgtgtgcagctatgtccagctacattgtgtgaccaaactgactggcactactggcaacagatgtcagtcgagcga
cgcgcaaaaactgctggttgggtcaaccagcgtatagtcgtcaacggtcgcaccagagaaaacccaataccatgaaaaattaccttttccc
gtagtggcccaggcatttctaggtgggcaaaggaatataaggaagatcaagaagatgaaggccactaggactacgagatagacagttagtc
atggggtgttgggcttttagaaggcacaagataacatctatttataagcgcccgatacccaaaccatcatcaaagtgaacagcgatttccact
cattcgtgctgccaggataggcagtaacacattggagatcgggctgagaacaagaatcaggaaaatgttagaggagcacaaggagccgtca
cctctcattaccgcccaggacgtacaagaagctaagtgcgcagccgatagggtgaaggaggtgcgtgaagccgaggagttgcgcgcagctct

30

40

50

accaccttggcagctgatgttgaggagcccactctggaagccgatgtcacttgatgttacaagaggctggggccggctcagtgagacacct
cgtggcttgataaaggttaccagctacgtggcgaggacaagatcggctcttacctgtgttctccgcaggctgtactcaagagtgaataa
tcttgcatccaccctctcgtgaacaagtcatagtgataacacactctggccgaaaaggcggtatgccgtggaaccataccatgtaagtagtg
gtgccagaggacatgcaatacccgctcaggactttcaagctctgagtgaagtgccaccattgtgtacaacgaacgtgagttcgtaaacaggt
acctgcacatattgccacacatggaggagcgtgaacactgatgaagaatattacaaaactgtcaagcccagcgagcacgacggcgaatacc
tgtacgacatcgacaggaaacagtgctcaagaaagaactagtcactgggctagggtcacaggcgagctgggtgatccctcccttccatgaatt
cgcctacgagagtctgagaacacgaccagccgctccttaccagtaaccaaccataggggtgtatggcggtgccaggatcaggcaagctggcat
cattaaaagcgagtcaccaaaaaagatctagtggtagcgccaagaaagaaaactgtgcagaaattataaggagcgtcaagaaaatgaaag
ggctggagctcaatgccagaactgtggactcagtgctcttgatggatgcaaacacccgtagagaccctgtatattgacgaagcttttctgtc
atgcaggtagtctcagagcgctcatagccattataagacctaaaaaggcagtgctctgcggggtcccaaacagtcgggttttttaacatgatgt
gcctgaaagtgcatttaaccagagatttgcacacaagctctccacaaaagcatctctgccgttgactaaatctgtgacttcggtcgtctcaacc
ttgttttacgacaaaaaatgagaacgacgaatccgaaagagactaagattgtgattgacactaccggcagtaccaaacctaaagcaggacgatct
cattctcattgtttcagaggggtgggtgaagcagttgcaaatagattacaaaggcaacgaataatgacggcagctgcctctcaagggtgacc
gtaaaagggtgtgatgccgttcggtgacaaggtgaatgaaaatcctctgtacgcacccacctcagaacatgtgaacgtcctactgacccgcacggag
gaccgcatcgtgtgaaaacactagccggcgacccatggataaaaacactgactgccaagtagcctgggaattcactgccacgataagggag
tggaagcagagcatgatgccatcatgaggcacatcttgagagaccggacccatccgacgtctccagaataaggcaaacgtgtgttggcc
aaggctttagtgccggtgctgaagaccgctggcatagacatgaccactgaacaatggaacactgtggatttttgaacggacaaagctcactc
agcagagatagattgaaccaactatcgtgaggtcttggactcagtcgactccggtctatttctgcacccactgttccgttatccattagga
taactactgggataactccccgtcgcctaacatgtacgggtgaataaagaagtggtccgtcagctctctcgcaggtaccacaactgcctcggg
cagttgccactggaagagtctatgacatgaacactggtacactgcgcaattatgatccgcataaacctagtacctgtaaacagaagactgcct
catgcttttagtctccaccataatgaacaccacagagtgcattttcttctcagcaaatgaagggcagaactgtcctggtggctggggaaa
agttgtccgtcccaggcaaatggttgactggtgtcagaccggcctgaggctacctcagagctcggctggatttaggcatcccagggtgatgtg
cccaaatatgacataatattgttaatgtgaggacccatataataaccatcactatcagcagtgtaagaccatgccattaaagcttagcatgtgac
caagaaagcttgtctgcatctgaatccggcggaacctgtgtcagcataggttatggttacgtgacagggccagcgaaagcatcattggtgcta
tagcggcgagttcaagtttccgggtatgcaaaccgaaatcctcactgaagagacggaagttctgttgtattcattgggtacgacgcgaaggc
ccgtacgcacaatccttacaagctttcatcaaccttgaccaacatttatacaggttccagactccacgaagccggatgtgcacccatcatatgtg
gtgcgaggggatattgccacggccaccgaaggagtattataaatgctgctaacgcaaaaggacaacctggcgagggggtgtgcggagcgc
tgtataagaaattccggaaagcttcgatttacgccgatcgaagtaggaaaagcgcgactggtcaaagggtgcagctaaacatatcattcatgcc
gtaggaccaaactcaacaaagtctcggaggtgaagggtgacaaacagttggcagaggcttatgagccatcgctaagattgtcaacgataacaa
ttacaagtcagtagcattccactgtgtccaccggcatctttccgggaacaaagatcgactaaccaatcattgaaccatttgcagagctttag
acaccactgatgcagatgtagccatatactgcagggacaagaaatgggaatgactctcaagggaagcagtggttaggagagaagcagtgagg
gagatatgcataatccgacgactctcagtgacagaacctgatgcagagctggtaggggtgcatccgaagagttcttggctggaaggaaagggt
acagcacaagcgatggcaaaacttctcatatttgaaggggaccaagtttcaccaggcggccaaggatatagcagaaattaatgccatgtggcc
cgttgcaacggaggccaatgagcaggtatgcatgtatatcctcggagaagcatgagcagtaggtcgaatgccccgtcgaagagtcgga
agcctccacaccacatagcagctgccttgccttgcatccatgccatgactccagaaaagtagacagcgctaaaagcctcacgtccagaacaa
attactgtgtgctcatccttccattgccgaagtatagaactcagtggtgtgcagaagatccaatgctccagcctatattgttctaccgaaagtgcct
gcgtatattcatcaaggaaagtatctcgtgaaacaccaccggtagacgagactccggagccatcggcagagaaccaatccacagaggggac
acctgaacaaccaccacttataaccgaggtgagaccaggactagaacgcctgagccgatcatcatcgaagaggaagaaggatagcataa

10

20

30

40

50

gtttgctgtcagatggcccgaccaccaggtgctgcaagtcgaggcagacattcacggccgacctgtatctagctcatcctgtccattcctc
atgcatccgactttgatgtggacagtttatccatacttgacacctggaggagctagcgtgaccagcggggcaacgtcagccgagactaactct
tacttcgaaaagagtatggagtttctggcgcgaccgggtgctgcgctcgaacagtattcaggaacctccacatcccgtccgcgcacaagaa
cacgctcacttgacccagcaggcctgctcgagaaccagcctagtttccaccccgccaggcgtgaatagggatgactagagaggagctc
gaggcgcttaccctgcacgcactcctagcaggtcggctcgcagaaccagcctggctccaacccgccaggcgtaaataggggtgattacaaga
gaggagtttgaggcgttcgtagcacaacaacaatgacggttgatgcgggtgcatacatctttctccgacaccggtaagggcatttacaacaa
aatcagtaaggcaaacgggtgctatccgaagtgggtggagaggaccgaattggagatttcgtatgccccgcgctcgaccaagaaaaagaa
gaattactacgcaagaaattacagttaaatcccacacctgtaacagaagcagataccagtcaggaagggtggagaacatgaaagccataaca
gctagacgtattctgcaaggcctagggcattattgaaggcagaaggaaaaagtgagggtgctaccgaacctgcatcctgttctttgtattcatcta
gtgtgaaccgtgccttttaagcccaaggctgcagtggaagcctgtaacgccatgttgaaagagaactttccgactgtggcttcttactgtattatt
ccagagtacgatgcttatttggacatggtgacggagcttcatgctgcttagacactgccagttttgacctgcaaagctgcgcagctttcaaaga
aacactcctatttgaacccacaatcagatcggcagtgcttgcagatccagaacacgctccagaacgctcctggcagctgccacaaaaagaa
attgcaatgtcacgcaaatgagagaattgccgtattggattcggcggcctttaatgtggaatgctcaagaaatatgctgtaataatgaattgg
gaaacgtttaagaaaaaccccatcaggcttactgaagaaaacgtgtaattacattaccaaatfaaaaggaccaaaaagctgctgctcttttgcga
agacacataatttgaatatgttcaggacataccaatggacaggtttgtaatggacttaagagagacgtgaaagtactccaggaacaaaacat
actgaagaacggcccaaggtagcaggtgatccaggtgccgatccgctagcaacagcgtatctgtgcggaatccaccgagagctggttaggag
attaaatgcggctcctgcttccgaacattcatacactgtttgatatgtcggctgaagactttgacgctattatagccgagcacttccagcctggggatt
gtgttctggaaactgacatcgctcgtttgataaaagtgaggacgacgccatggctctgaccgcgttaatgattctggaagacttaggtgtggacg
cagagctgttgacgctgattgagcggttctcgcgaaatttcatcaatacatttgcctactaaaactaaattfaattcggagccatgatgaaatct
ggaatgttctcacactgtttgtaacacagtcattaacattgtaatcgcaagcagagtgttgagagaacggctaaccggatcaccatgtgcagca
ttcattggagatgacaatatcgtgaaaggagtcaaatcgacaaatgaatggcagacaggtgcgccacctggtgaaatggaagtcaagattata
gatgtgtgtggggcagaaaagcgccctatttctgtggagggtttatttgtgtgactccgtgaccggcacagcgtgccgtgtggcagacccccta
aaaaggctgtttaagcttggcaaacctctggcagcagcagatgaacatgatgatgacaggagaagggcattgcatgaagagtcaacacgctgg
aacgagtggttattctttcagagctgtgcaaggcagtagaatcaaggtagaacttccatcatagttatggccatgactactcta
gctagcagtgtaaatcattcagctacctgagagggggcccctataactctctacggcTAAcctgaatggactacgacgtatcacgcccacat
ttacagccgcggtgtcaaaaaccgcgtggacgtggttaacatccctgctgggaggatcagccgtaattattataattggcttggctgctgctactat
tgtggccatgtacgtgctgaccaaccagaaacataattgaatacagcagcaattggcaagctgcttacaagaactcgcggcgattggcatgccg
cctfaaaatttttttttttttttttttttttccgaatcgattttgttttaattttcAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

10

20

30

TC-83産生ベクター(配列番号9) ; TC-83ゲノムのヌクレオチド7544~11175を欠失させ、5'
T7-プロモーターを加え、3'制限部位を加えたもの

ATAGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAAATGGAGAAAGTTCA
CGTTGACATCGAGGAAGACAGCCCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAG
TTTGAGGTAGAAGCCAAGCAGGTCACCTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTT
CGCATCTGGCTTCAAACTGATCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGA
CATTGGAAGTGCGCCCGCCCGCAGAATGTATTCTAAGCACAAGTATCATTGTATCTGTC
CGATGAGATGTGCGGAAGATCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGAA

40

50

AAACTGTAAGGAAATAACTGATAAGGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTCGCCGC
CGTCATGAGCGACCCTGACCTGGAAACTGAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGTCG
TGTCGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGTTTACCAGGATGTATACGCGGTTGACGGACCGA
CAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGGGAGTTAGAGTCGCCTACTGGATAGGCTTTGA
CACCACCCCTTTTATGTTTAAAGAACTTGGCTGGAGCATATCCATCATACTCTACCAACT
GGGCCGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATAGGCCTATGCAGCTCTGACGTTAT
GGAGCGGTCACGTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAGAAGTATTTGAAACCATCCAAC
AATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGGACTTACTGAGGAG
CTGGCACCTGCCGTCTGTATTTCACTTACGTGGCAAGCAAAATTACACATGTCGGTGTG
AGACTATAGTTAGTTGCGACGGGTACGTCGTTAAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCCT
GTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTCTTGTGCTGCA
AAGTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCC
AGCTACATTGTGTGACCAAATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTCAGTGC GGACGAC
GCGCAAAAACCTGCTGGTTGGGCTCAACCAGCGTATAGTCGTCAACGGTCGCACCCAGA
GAAACACCAATACCATGAAAAATTACCTTTTGCCCGTAGTGGCCCAGGCATTTGCTAGG
TGGGCAAAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGAT
AGACAGTTAGTCATGGGGTGTGTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGATAACATCTATTTA
TAAGCGCCCGGATACCCAAACCATCATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCATTCGTGC
TGCCCAGGATAGGCAGTAACACATTGGAGATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAA
TGTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACCTCTCATTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGC
TAAGTGCGCAGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAAGCCGAGGAGTTGCGCGCAGCT
CTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCTGGAAGCCGATGTCGACTTGAT
GTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAAAGGTTACC
AGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCGCAGGCTGTACT
CAAGAGTGAAAAATTATCTTGCATCCACCCTCTCGCTGAACAAGTCATAGTGATAACAC
ACTCTGGCCGAAAAGGGCGTTATGCCGTGGAACCATAACCATGGTAAAGTAGTGGTGCC
AGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGGACTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATT
GTGTACAACGAACGTGAGTTCGTAAACAGGTACCTGCACCATATTGCCACACATGGAG
GAGCGCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAACCTGTCAAGCCCAGCGAGCACGACGG
CGAATACCTGTACGACATCGACAGGAAACAGTGCGTCAAGAAAGAACTAGTCACTGGG
CTAGGGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTCGCCTACGAGAGTCT
GAGAACACGACCAGCCGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCA
GGATCAGGCAAGTCTGGCATCATTAAGAGCGCAGTCACCAAAAAAGATCTAGTGGTGA
GCGCCAAGAAAGAAAACCTGTGCAGAAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGAAAGGGC
TGGACGTCAATGCCAGAACTGTGGACTCAGTGCTCTTGAATGGATGCAAACACCCCGT
AGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCTTGTTCATGCAGGTACTCTCAGAGCGCTCA
TAGCCATTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGCGGGGATCCCAAACAGTGCGGTTT
TTTAAACATGATGTGCCTGAAAGTGCATTTTAACCACGAGATTTGCACACAAGTCTTCC

10

20

30

40

50

ACAAAAGCATCTCTCGCCGTTGCACTAAATCTGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTTGTTTT
ACGACAAAAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACTAAGATTGTGATTGACACTA
CCGGCAGTACCAAACCTAAGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTTCAGAGGGTGGGTG
AAGCAGTTGCAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCTCTCAAG
GGCTGACCCGTAAGGTGTGTATGCCGTTTCGGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTGTA
CGCACCCACCTCAGAACATGTGAACGTCCTACTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTG
TGGAACAACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAAAACTGACTGCCAAGTACCCTGGGA
ATTTCACTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCACAT
CTTGAGAGACCGGACCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAAACGTGTGTTGGGCC
AAGGCTTTAGTGCCGGTGCTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACCACTGAACAATGGA
ACACTGTGGATTATTTTGAAACGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCA
ACTATGCGTGAGGTTCTTTGGACTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACTGT
TCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGGGATAACTCCCCGTCGCCTAACATGTACGGGC
TGAATAAAGAAGTGGTCCGTCAGCTCTCTCGCAGGTACCCACAACCTGCCTCGGGCAGTT
GCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACACTGCGCAATTATGATCCGCGCA
TAAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGACTGCCTCATGCTTTAGTCCTCCACCATAATGAA
CACCCACAGAGTGACTTTTCTTCATTTCGTCAGCAAATTGAAGGGCAGAAGTGTCTGGT
GGTCGGGGAAAAGTTGTCCGTCCCAGGCAAATGGTTGACTGGTTGTCAGACCGGCCT
GAGGCTACCTTCAGAGCTCGGCTGGATTTAGGCATCCCAGGTGATGTGCCCAAATATG
ACATAATATTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAATACCATCACTATCAGCAGTGTGAA
GACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCATCTGAATCCCGG
CGGAACCTGTGTTCAGCATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCATCATT
GGTGCTATAGCGCGGCAGTTCAAGTTTTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTGA
AGAGACGGAAGTTCTGTTTGTATTTCATTGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATC
CTTACAAGCTTTCATCAACCTTGACCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCC
GGATGTGCACCCTCATATCATGTGGTGCGAGGGGATATTGCCACGGCCACCGAAGGAG
TGATTATAAATGCTGCTAACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTGTGCGGAGCGCT
GTATAAGAAATTCCTGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCGA
CTGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCATTTCATGCCGTAGGACCAAACCTTCAACAAAG
TTTCGGAGGTTGAAGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGAT
TGTC AACGATAACAATTACAAGTCAGTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGGCATCTTTT
CCGGGAACAAAGATCGACTAACCCAATCATTGAACCATTTGCTGACAGCTTTAGACAC
CACTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGGACAAGAAATGGGAAATGACTCTCAAG
GAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAGGAGATATGCATATCCGACGACTCTTCAG
TGACAGAACCTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAGTTCTTTGGCTGGAAG
GAAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAAACTTTCTCATATTTGGAAGGGACCAAGTTT
CACCAGGCGGCCAAGGATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCCCGTTGCAACGGAGG
CCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGCATGAGCAGTATTAGGTGCAA

10

20

30

40

50

ATGCCCCGTCGAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTTGCTTGTGCA
TCCATGCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAT
TACTGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCC
AATGCTCCCAGCCTATATTGTTCTCACCAGAAAGTGCCTGCGTATATTCATCCAAGGAAG
TATCTCGTGGAACACCACCGGTAGACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAAT
CCACAGAGGGGACACCTGAACAACCACCACTTATAACCGAGGATGAGACCAGGACTA
GAACGCCTGAGCCGATCATCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGCTGTC
AGATGGCCCCGACCCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGGGCCGCCCTCT
GTATCTAGCTCATCCTGGTCCATTCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTTATCC
ATACTTGACACCCTGGAGGGAGCTAGCGTGACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGACTA
ACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTCTGGCGCGACCGGTGCCTGCGCCTCGAACA
GTATTCAGGAACCCTCCACATCCCGCTCCGCGCACAAGAACACCGTCACTTGCACCCAG
CAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAATAGGGTGATC
ACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACGCACTCCTAGCAGGTGCGTCTCGA
GAACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATTACAAGAGAGGAGTT
TGAGGCGTTTCGTAGCACAAACAATGACGGTTTGATGCGGGTGATACATCTTTTCT
CCGACACCGGTCAAGGGCATTTACAACAAAATCAGTAAGGCCAAACGGTGCTATCCGA
AGTGGTGTGGAGAGGACCGAATTGGAGATTTTCGTATGCCCCGCGCCTCGACCAAGAA
AAAGAAGAATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAATCCCACACCTGCTAACAGAAGCA
GATACCAGTCCAGGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCA
AGGCCTAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGAACCCCTGCAT
CCTGTTCTTTGTATTCTAGTGTGAACCGTGCCTTTTCAAGCCCCAAGGTGCGCAGTG
GAAGCCTGTAACGCCATGTTGAAAGAGAACTTTCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTAT
TCCAGAGTACGATGCCTATTTGGACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTGCTTAGACACTG
CCAGTTTTTGGCCTGCAAAGCTGCGCAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTATTTGGAACCC
ACAATACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCAGAACACGCTCCAGAACGTCTGGCAG
CTGCCACAAAAAGAAATTGCAATGTCACGCAAATGAGAGAATTGCCCCGATTGGATTC
GGCGGCCTTTAATGTGGAATGCTTCAAGAAATATGCGTGTAATAATGAATATTGGGAA
ACGTTTAAAGAAAACCCCATCAGGCTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCA
AATTAAGGACCAAAAGCTGCTGCTCTTTTGCAGAACACATAATTTGAATATGTTG
CAGGACATACCAATGGACAGGTTTGTAATGGACTTAAAGAGAGACGTGAAAGTGA
CAGGAACAAAACATACTGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGTGATCCAGGCTGCCGATCC
GCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCACCGAGAGCTGGTTAGGAGATTAAATGCG
GTCCTGCTTCCGAACATTCATACACTGTTTGATATGTCGGCTGAAGACTTTGACGCTATT
ATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTCTGGAACTGACATCGCGTCGTTTGA
TAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCGTTAATGATTCTGGAAGACTTAGGT
GTGGACGCAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGAAATTCATCAATAC
ATTTGCCCACTAAACTAAATTTAAATTCGGAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTCTC

10

20

30

40

50

ACACTGTTTGTGAACACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTTGAGAGAAC GGCTAACCGGATCACCATGTGCAGCATTGAGATGACAATATCGTGAAAGGAGT CAAATCGGACAAATTAATGGCAGACAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTCAAG ATTATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCCTTATTTCTGTGGAGGGTTTATTTTGTG TGA TCCGTGACCGGCACAGCGTGCCGTGTGGCAGACCCCCTAAAAAGGCTGTTTAAG CTTGGCAAACCTCTGGCAGCAGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGC ATGAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAGTGGGTATTCTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGT AGAATCAAGGTATGAAACCGTAGGAACCTCCATCATAGTTATGGCCATGACTACTCTA GCTAGCAGTGTTAAATCATTACGCTACCTGAGAGGGGCCCCCTATACTCTCTACGGCTA ACCTGAATGGACTACGACGTATCACGCCCAAACATTTACAGCCGCGGTGTCAAAAACC GCGTGGACGTGGTTAACATCCCTGCTGGGAGGATCAGCCGTAATTATTATAATTGGCTT GGTGCTGGCTACTATTGTGGCCATGTACGTGCTGACCAACCAGAAACATAATTGAATAC AGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTACATAGA ACTCGCGGCGATTGGCATGCCGCCTTAAA ATTTTTATTTTATTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTAAATTTTCAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	10
VEE-UbAAY (配列番号14) ; VEE送達ベクターにMHCクラスIマウス腫瘍エピトープ SIINFEKL (配列番号92)及びAH1-A5を挿入したもの	20
VEE-ルシフェラーゼ (配列番号15) ; VEE送達ベクターの7545にルシフェラーゼ遺伝子を挿 入したもの	20
ユビキチン(配列番号38)>UbG76 0~228	
ユビキチン A76 (配列番号39)>UbA76 0~228	
HLA-A2 (MHC クラスI)シグナルペプチド(配列番号40)>MHCシグナルペプチド0~78	
HLA-A2 (MHC クラスI) 膜貫通ドメイン(配列番号41)>HLA A2 TMドメイン0~201	
IgK リーダー配列(配列番号42)>IgK リーダー配列0~60	
ヒトDC-Lamp (配列番号43)>ヒトDCLAMP 0~3178	
マウスLAMP1 (配列番号44)>マウスLamp1 0~1858	30
ヒトLamp1 cDNA (配列番号45)>ヒトLamp1 0~2339	
破傷風トキソイド核酸配列(配列番号46)	
破傷風トキソイドアミノ酸配列(配列番号47)	
PADREヌクレオチド配列(配列番号48)	
PADREアミノ酸配列(配列番号49)	
WPRE (配列番号50)>WPRE 0~593	
IRES (配列番号51)>eGFP_IRES_SEAP_インサート1746~2335	
GFP (配列番号52)	40

50

KRAS 2X (8x2) カセットヌクレオチド配列(配列番号70)

ATGGCTGGCATGACTGAATACAAATTAGTTGTCGTCGGTGCATGCGGGGTAGGCAAGT
CGGCCTTAACGATACAACTTATTCAAGAGACATGTCTACTGGATATCCTTGACACTGCC
GGTCACGAAGAATATAGTGCAATGAGGGACCAGTACATGCGTATGACGGAATATAAGT
TAGTAGTAGTTGGCGCAGGCGACGTAGGGAAATCCGCTCTAACTATCCAATAATTCA
AGAAACGTGCCTACTAGATATATTAGACACAGCGGGACGTGAGGAGTATAGCGCCATG
CGTGACCAGTATATGCGGATGACCGAGTATAAGCTAGTCGTAGTCGGCGCGGATGGGG
TTGGTAAGAGCGCCTTGACCATCCAGCTCATACAAGAACTTGCCTTCTGGACATCCTA
GACACCGCGGGTCTCGAAGAGTACAGTGCGATGAGAGATCAGTACATGAGGATGACA
GAATACAAGCTCGTTGTTGTTGGTGCGGTGCGTGTTGGAAAGAGTGCGCTAACCATTCA
GCTTATCCAGGAAACCTGTCTGTTAGACATCTTAGATACCGCAGGTAAAGAGGAATATT
CGGCCATGAGGGATCAATATATGCGAATGACAGAGTATAAATTGGTAGTGGTAGGGGC
TTGCGGAGTGGGGAAAAGCGCATTGACTATACAATTGATTCAGGAAACATGCCTATTG
GACATACTCGACACGGCCGGGAAAGAAGAGTATTCCGCGATGCGAGATCAATACATGC
GCATGACCGAATATAAACTTGTCGTTGTCGGAGCGGGTGATGTAGGTAAATCGGCGCT
CACAATCCAATTAATCCAAGAGACGTGCTTGCTAGACATTCTGGATACAGCTGGGCAC
GAGGAGTACTCAGCTATGCGCGATCAGTATATGAGGATGACTGAGTACAAGTTGGTCG
TCGTAGGAGCGGTTGGTGTCGGAAAATCTGCGTTGACAATTCAACTGATACAAGAGAC
TTGTTTGTAGATATTCTCGATACTGCGGGTCGGGAAGAATACTCGGCTATGAGAGACC
AATATATGAGAATGACGGAGTACAACTCGTAGTTGTAGGTGCGGACGGTGTAGGAAA
GTCTGCGCTTACGATTCAGTTGATACAGGAGACCTGTTTGCTCGATATCTTGGATACGG
CGGGTTTGGAGGAATACAGCGCAATGCGGGACCAATACATGAGAGGACCCGGACCAG
GCGCCAAATTTGTTGCTGCTTGGACACTGAAAGCTGCTGCTGGGCCCCGACAGGCCA
GTACATCAAGGCCAACTCTAAGTTTATCGGCATCACCGAATTGGGACCTGGACCCGGCT
AG

KRAS 4X (4x4) カセットヌクレオチド配列(配列番号71)

ATGGCTGGCATGACCGAGTATAAACTAGTAGTTGTGGGAGCGTGTGGTGTAGGCAAGT
CGGCACTTACAATTCAGTTGATACAAATGACGGAATATAAGCTCGTAGTAGTCGGAGC
AGACGGCGTGGGGAAATCAGCGTTGACTATCCAGTTAATACAGGAACTTGCCTATTA
GACATCTTGGATACGGCAGGTCATGAGGAATATTCCGCTATGAGAGATCAGTATATGC
GCATGACGGAGTATAAGCTTGTGGTTGTCGGGGCCGACGGGGTAGGTAAGTCAGCGCT
CACGATACAATTAATTCAAATGACCGAATACAAGTTGGTCGTGGTGGGGGCAGTTGGG
GTCGGTAAATCCGCGTTAACGATCCAATTATCCAAATGACAGAATATAAACTCGTTGT
TGTAGGTGCATGTGGCGTAGGAAAAAGCGCATTGACCATCCAGCTAATTCAGGAGACG
TGTCTCCTTGATATCCTAGACACGGCGGGGCACGAAGAATACTCGGCTATGCGCGACC
AGTACATGAGAATGACGGAATACAACTTGTGTCGTGGGTGCGGATGGAGTAGGGAA
AAGTGCTCTAACAAATACTCATTTCAGATGACAGAGTACAAATTGGTAGTCGTGCGT

10

20

30

40

50

GCGGTAGGAGTTGGGAAGTCTGCACTAACTATTCAGCTCATACAGATGACCGAGTACA
AGCTGGTGGTGGTAGGCGCTTGCGGTGTGGTAAGAGTGCATTAACCATACAGCTTAT
ACAAGAGACATGTCTGCTAGATATATTAGATACCGCCGGGCATGAAGAGTACTCTGCC
ATGCGAGACCAATACATGCGTATGACAGAGTATAAATTAGTAGTGTTGGGGCGGACG
GTGTTGGCAAGAGCGCCTTAACCTATACAGTTGATCCAGATGACGGAGTACAACTGGT
CGTCGTTGGTGCAGTGGGAGTGGGAAAATCTGCGCTGACGATTCAACTAATCCAAGAA
ACATGTTTACTTGACATCCTCGACACTGCGGGTCACGAGGAGTATTCGGCGATGCGTGA
TCAATATATGAGGATGACTGAGTATAAGTTAGTCGTAGTTGGAGCGGTTCGGTGTCCGA
AAGTCCGCGCTAACCATTCAATTGATTCAAATGACTGAATACAAGCTAGTGGTAGTAG
GAGCATGCGGCGTCGGCAAATCGGCTTTAACAATCCAACCTGATACAGGGACCCGGACC
AGGCGCCAAATTTGTTGCTGCTTGGACACTGAAAGCTGCTGCTGGGCCCCGACCAGGC
CAGTACATCAAGGCCAACTCTAAGTTTATCGGCATCACCGAATTGGGACCTGGACCCG
GCTAG

10

KRAS 4x1 カセットヌクレオチド配列(配列番号72)

ATGGCTGGCATGACCGAGTATAAACTAGTAGTTGTGGGAGCGTGTGGTGTAGGCAAGT
CGGCACTTACAATTCAGTTGATACAAATGACGGAATATAAGCTCGTAGTAGTCGGAGC
AGACGGCGTGGGGAAATCAGCGTTGACTATCCAGTTAATACAGGAACTTGCCTATTA
GACATCTTGGATACGGCAGGTCATGAGGAATATTCGCTATGAGAGATCAGTATATGC
GCATGACCGAATACAAGTTGGTCGTGGTGGGGGCAGTTGGGGTCGGTAAATCCGCGTT
AACGATCCAACCTTATCCAAGGACCCGGACCAGGCGCCAAATTTGTTGCTGCTTGGACA
CTGAAAGCTGCTGCTGGGCCCCGACCAGGCCAGTACATCAAGGCCAACTCTAAGTTTA
TCGGCATCACCGAATTGGGACCTGGACCCGGCTAG

20

KRAS 4x1 + R213L カセットヌクレオチド配列(配列番号73)

ATGGCTGGCATGACCGAGTATAAACTAGTAGTTGTGGGAGCGTGTGGTGTAGGCAAGT
CGGCACTTACAATTCAGTTGATACAAATGACGGAATATAAGCTCGTAGTAGTCGGAGC
AGACGGCGTGGGGAAATCAGCGTTGACTATCCAGTTAATACAGGAACTTGCCTATTA
GACATCTTGGATACGGCAGGTCATGAGGAATATTCGCTATGAGAGATCAGTATATGC
GCATGACCGAATACAAGTTGGTCGTGGTGGGGGCAGTTGGGGTCGGTAAATCCGCGTT
AACGATCCAACCTTATCCAACCTGCGCGTGGAGTATCTGGATGACAGGAACACCTTCCTGC
ATTCTGTTGTGGTGGCCCTATGAGCCCCCGGAGGTGGGACCCGGACCAGGCGCCAAATTT
GTTGCTGCTTGGACACTGAAAGCTGCTGCTGGGCCCCGACCAGGCCAGTACATCAAGG
CCAACCTCTAAGTTTATCGGCATCACCGAATTGGGACCTGGACCCGGCTAG

30

KRAS 4x1 + S127Y カセットヌクレオチド配列(配列番号74)

ATGGCTGGCATGACCGAGTATAAACTAGTAGTTGTGGGAGCGTGTGGTGTAGGCAAGT
CGGCACTTACAATTCAGTTGATACAAATGACGGAATATAAGCTCGTAGTAGTCGGAGC
AGACGGCGTGGGGAAATCAGCGTTGACTATCCAGTTAATACAGGAACTTGCCTATTA
GACATCTTGGATACGGCAGGTCATGAGGAATATTCGCTATGAGAGATCAGTATATGC

40

GCATGACCGAATACAAGTTGGTCGTGGTGGGGGCAGTTGGGGTCGGTAAATCCGCGTT AACGATCCAACCTTATCCAACACAGCGGCACCGCCAAATCTGTCACGTGTACTTACTACC CAGCCTTGAACAAGATGTTCTGTCAATTAGCAAAGGGACCCGGACCAGGCGCCAAATT TGTTGCTGCTTGGACACTGAAAGCTGCTGCTGGGCCCCGGACCAGGCCAGTACATCAAG GCCAACTCTAAGTTTATCGGCATCACCGAATTGGGACCTGGACCCGGCTAG	
KRAS G12C ネオエピトープ (配列番号75)	
VVVGACGVGK	
KRAS G12C ネオエピトープ (配列番号76)	10
KLVVVGACGV	
KRAS G12D ネオエピトープ (配列番号77)	
VVGADGVGK	
KRAS G12D ネオエピトープ (配列番号78)	
VVVGADGVGK	
KRAS G12V ネオエピトープ (配列番号79)	
VVGAVGVGK	
KRAS G12V ネオエピトープ (配列番号80)	20
AVGVGKSAL	
KRAS G12V ネオエピトープ (配列番号81)	
VVVGAVGVGK	
KRAS Q61H ネオエピトープ (配列番号82)	
ILDTAGHEEY	
ChAdV68-Empty-E4deleted (配列番号83)	
CATCTTCAATAATATACCTCAAACCTTTTGTGCGCGTTAATATGCAAATGAGGCGTTTG AATTTGGGGAGGAAGGGCGGTGATTGGTCGAGGGATGAGCGACCGTTAGGGGCGGGG CGAGTGACGTTTTGATGACGTGGTTGCGAGGAGGAGCCAGTTTGCAAGTTCTCGTGGG AAAAGTGACGTCAAACGAGGTGTGGTTTGAACACGGAAATACTCAATTTCCCGCGCT CTCTGACAGGAAATGAGGTGTTTCTGGGCGGATGCAAGTGAAAACGGGCCATTTTCGC GCGAAAACCTGAATGAGGAAGTGAAAATCTGAGTAATTTTCGCGTTTATGGCAGGGAGGA GTATTTGCCGAGGGCCGAGTAGACTTTGACCGATTACGTGGGGGTTTCGATTACCGTGT TTTTACCTAAATTTCCCGCTACGGTGTCAAAGTCCGGTGTTTTTACGTAGGTGTCAGCT GATCGCCAGGGTATTTAAACCTGCGCTCTCCAGTCAAGAGGCCACTCTTGAGTGCCAGC GAGAAGAGTTTTCTCCTCCGCGCCGCGAGTCAGATCTACACTTTGAAAGTAGGGGataaGG TAGCGAGTGAGTAGTGTTCTGGGGCGGGGAGGACCTGCATGAGGGCCAGAATAACTG AAATCTGTGCTTTTCTGTGTGTTGCAGCAGCATGAGCGGAAGCGGCTCCTTTGAGGGAG GGGTATTACGCCCTTATCTGACGGGGCGTCTCCCCTCCTGGGCGGGAGTGCGTCAGAAT GTGATGGGATCCACGGTGGACGGCCGGCCCGTGCAGCCCGGAACTCTTCAACCCTGA	30
	40

CCTATGCAACCCTGAGCTCTTCGTCGTTGGACGCAGCTGCCGCCGACGCTGCTGCATCT
GCCGCCAGCGCCGTGCGCGGAATGGCCATGGGCGCCGGCTACTACGGCACTCTGGTGG
CCAACTCGAGTTCCACCAATAATCCCGCCAGCCTGAACGAGGAGAAGCTGTTGCTGCT
GATGGCCCAGCTCGAGGCCTTGACCCAGCGCCTGGGCGAGCTGACCCAGCAGGTGGCT
CAGCTGCAGGAGCAGACGCGGGCCGCGGTTGCCACGGTGAAATCCAAATAAAAAATG
AATCAATAAATAAACGGAGACGGTTGTTGATTTTAACACAGAGTCTGAATCTTTATTTG
ATTTTTCGCGCGCGGTAGGCCCTGGACCACCGGTCTCGATCATTGAGCACCCGGTGGAT
CTTTTCCAGGACCCGGTAGAGGTGGGCTTGATGTTGAGGTACATGGGCATGAGCCCCG
TCCCGGGGGTGGAGGTAGCTCCATTGCAGGGCCTCGTGCTCGGGGGTGGTGTGTAA
TCACCCAGTCATAGCAGGGGCGCAGGGCATGGTGTGACAATATCTTTGAGGAGGAG
ACTGATGGCCACGGGCAGCCCTTTGGTGTAGGTGTTTACAAATCTGTTGAGCTGGGAGG
GATGCATGCGGGGGGAGATGAGGTGCATCTTGGCCTGGATCTTGAGATTGGCGATGTT
ACCGCCCAGATCCCGCCTGGGGTTCATGTTGTGACAGGACCACCAGCACGGTGTATCCG
GTGCACTTGGGGAATTTATCATGCAACTTGGAAGGGAAGGCGTGAAAGAATTTGGCGA
CGCCTTTGTGCCCCGCCAGGTTTTCCATGCACTCATCCATGATGATGGCGATGGGCCCCG
TGGGCGGCGGCCTGGGCAAAGACGTTTCGGGGGTGCGACACATCATAGTTGTGGTCCT
GGGTGAGGTCATCATAGGCCATTTTAATGAATTTGGGGCGGAGGGTGCCGGACTGGGG
GACAAAGGTACCCTCGATCCCGGGGGCGTAGTTCCCCTCACAGATCTGCATCTCCAGG
CTTTGAGCTCGGAGGGGGGGATCATGTCCACCTGCGGGGCGATAAAGAACACGGTTTC
CGGGGCGGGGGAGATGAGCTGGGCCGAAAGCAAGTTCCGGAGCAGCTGGGACTTGCC
GCAGCCGGTGGGGCCGTAGATGACCCCGATGACCGGCTGCAGGTGGTAGTTGAGGGAG
AGACAGCTGCCGTCCTCCCGGAGGAGGGGGGCCACCTCGTTCATCATCTCGCGCACGT
GCATGTTCTCGCGCACCAGTTCCGCCAGGAGGCGCTCTCCCCCAGGGATAGGAGCTCC
TGGAGCGAGGCGAAGTTTTTCAGCGGCTTGAGTCCGTCGGCCATGGGCATTTTGGAGA
GGGTTTGTGCAAGAGTTCCAGGCGGTCCCAGAGCTCGGTGATGTGCTCTACGGCATCT
CGATCCAGCAGACCTCCTCGTTTCGCGGGTTGGGACGGCTGCGGGAGTAGGGCACCAG
ACGATGGGCGTCCAGCGCAGCCAGGGTCCGGTCCTTCCAGGGTTCGAGCGTCCGCGTC
AGGGTGGTCTCCGTCACGGTGAAGGGGTGCGCGCCGGGCTGGGCGCTTGCGAGGGTGC
GCTTCAGGCTCATCCGGCTGGTCGAAAACCGCTCCCGATCGGCGCCCTGCGCGTCGGCC
AGGTAGCAATTGACCATGAGTTCGTAGTTGAGCGCCTCGGCCGCGTGGCCTTTGGCGCG
GAGCTTACCTTTGGAAGTCTGCCCCGAGGCGGGACAGAGGAGGGACTTGAGGGCGTAG
AGCTTGGGGGCGAGGAAGACGGACTCGGGGGCGTAGGCGTCCGCGCCGACGTGGGCG
CAGACGGTCTCGCACTCCACGAGCCAGGTGAGGTGCGGGCTGGTCGGGGTCAAAAACCA
GTTTCCCGCCGTTCTTTTTGATGCGTTTCTTACCTTTGGTCTCCATGAGCTCGTGTCCCCG
CTGGGTGACAAAGAGGCTGTCCGTGTCCCGTAGACCGACTTTATGGGCCGGTCCCTCGA
GCGGTGTGCCGCGGTCCTCCTCGTAGAGGAACCCCGCCCACTCCGAGACGAAAGCCCG
GGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCCACGTGGGACGGGTAGCGGTCGTTGTCCACCAGC
GGGTCCACCTTTTCCAGGGTATGCAAACACATGTCCCCCTCGTCCACATCCAGGAAGGT

10

20

30

40

50

GATTGGCTTGTAAGTGTAGGCCACGTGACCGGGGGTCCCGGCCGGGGGGGTATAAAAG
GGTGCGGGTCCCTGCTCGTCTCACTGTCTTCCGGATCGCTGTCCAGGAGCGCCAGCTG
TTGGGGTAGGTATTCCCTCTCGAAGGCGGGCATGACCTCGGCACTCAGGTTGTCAGTTT
CTAGAAACGAGGAGGATTTGATATTGACGGTGCCGGCGGAGATGCCTTTCAAGAGCCC
CTCGTCCATCTGGTCAGAAAAGACGATCTTTTTTGTGTCGAGCTTGGTGGCGAAGGAGC
CGTAGAGGGCGTTGGAGAGGAGCTTGGCGATGGAGCGCATGGTCTGGTTTTTTTCCTTG
TCGGCGCGCTCCTTGGCGGCGATGTTGAGCTGCACGTACTCGCGCGCCACGCACTTCCA
TTCGGGGAAGACGGTGGTCAGCTCGTCGGGCACGATTCTGACCTGCCAGCCCCGATTAT
GCAGGGTGATGAGGTCCACACTGGTGGCCACCTCGCCGCGCAGGGGGTCCATTAGTCCA
GCAGAGGCGTCCGCCCTTGCGCGAGCAGAAGGGGGGCGAGGGGGTCCAGCATGACCTC
GTCGGGGGGGTGCGCATCGATGGTGAAGATGCCGGGCAGGAGGTGCGGGTCAAAGTA
GCTGATGGAAGTGGCCAGATCGTCCAGGGCAGCTTGCCATTCGCGCACGGCCAGCGCG
CGCTCGTAGGGACTGAGGGGCGTGCCCCAGGGCATGGGATGGGTAAGCGCGGAGGCG
TACATGCCGCAGATGTCGTAGACGTAGAGGGGGTCTCTCGAGGATGCCGATGTAGGTGG
GGTAGCAGCGCCCCCGCGGATGCTGGCGCGCACGTAGTCATACAGCTCGTGCGAGGG
GGCGAGGAGCCCCGGGCCAGGTTGGTGCGACTGGGCTTTTCGGCGCGGTAGACGATC
TGGCGGAAAATGGCATGCGAGTTGGAGGAGATGGTGGGCCTTTGGAAGATGTTGAAGT
GGGCGTGGGGCAGTCCGACCGAGTCGCGGATGAAGTGGGCGTAGGAGTCTTGCAGCTT
GGCGACGAGCTCGGCGGTGACTAGGACGTCCAGAGCGCAGTAGTCGAGGGTCTCCTGG
ATGATGTCATACTTGAGCTGTCCCTTTTGTTCACAGCTCGCGGTTGAGAAGGAACTC
TTCGCGGTCTTCCAGTACTCTTCGAGGGGGAACCCGTCTGATCTGCACGGTAAGAGC
CTAGCATGTAGAACTGGTTGACGGCCTTGTAGGCGCAGCAGCCCTTCTCCACGGGGAG
GGCGTAGGCCTGGGCGGCCTTGCGCAGGGAGGTGTGCGTGAGGGCGAAAGTGTCCCTG
ACCATGACCTTGAGGAACTGGTGCTTGAAGTCGATATCGTCGCAGCCCCCTGCTCCCA
GAGCTGGAAGTCCGTGCGCTTCTTGTAGGCGGGGTGGGCAAAGCGAAAGTAACATCG
TTGAAGAGGATCTTGCCCGCGCGGGGCATAAAGTTGCGAGTGATGCGGAAAGGTTGGG
GCACCTCGGCCCCGTTGTTGATGACCTGGGCGGCGAGCACGATCTCGTCGAAGCCGTT
GATGTTGTGGCCACGATGTAGAGTTCCACGAATCGCGGACGGCCCTTGACGTGGGGC
AGTTTCTTGAGCTCCTCGTAGGTGAGCTCGTCGGGGTTCGCTGAGCCCGTGCTGCTCGAG
CGCCCAGTCGGCGAGATGGGGGTTGGCGCGGAGGAAGGAAGTCCAGAGATCCACGGC
CAGGGCGGTTTGCAGACGGTCCCGGTACTGACGGAAGTCTGCCCCGACGGCCATTTTTT
CGGGGGTGACGCAGTAGAAGGTGCGGGGGTCCCCGTGCCAGCGATCCCATTTGAGCTG
GAGGGCGAGATCGAGGGCGAGCTCGACGAGCCGGTCGTCCCCGAGAGTTTCATGACC
AGCATGAAGGGGACGAGCTGCTTGCCGAAGGACCCCATCCAGGTGTAGGTTTCCACAT
CGTAGGTGAGGAAGAGCCTTTCGGTGCAGGATGCGAGCCGATGGGGAAGAACTGGA
TCTCCTGCCACCAATTGGAGGAATGGCTGTTGATGTGATGGAAGTAGAAATGCCGACG
GCGCGCCGAACACTCGTGCTTGTGTTTATACAAGCGGCCACAGTGCTCGCAACGCTGCA
CGGGATGCACGTGCTGCACGAGCTGTACCTGAGTTCCTTTGACGAGGAATTCAGTGGG

10

20

30

40

50

AAGTGGAGTCGTGGCGCCTGCATCTCGTGCTGTACTACGTTCGTGGTGGTTCGGCCTGGCC
CTCTTCTGCCTCGATGGTGGTCATGCTGACGAGCCCGCGCGGGAGGCAGGTCCAGACCT
CGGCGCGAGCGGGTTCGAGAGCGAGGACGAGGGCGCGCAGGCCGGAGCTGTCCAGGG
TCCTGAGACGCTGCGGAGTCAGGTCACTGGGCAGCGGCGGCGCGCGGTTGACTTGACG
GAGTTTTTCCAGGGCGCGCGGGAGGTCCAGATGGTACTTGATCTCCACCGCGCCATTGG
TGGCGACGTCGATGGCTTGACAGGGTCCCGTGCCCTGGGGTGTGACCACCGTCCCCCGT
TTCTTCTTGGGCGGCTGGGGCGACGGGGGCGGTGCCTCTTCCATGGTTAGAAGCGGCG
GCGAGGACGCGCGCCGGGCGGCAGGGGCGGCTCGGGGCCCCGGAGGCAGGGGCGGCAG
GGGCACGTCGGCGCCGCGCGCGGGTAGGTTCTGGTACTGCGCCCGGAGAAGACTGGCG
TGAGCGACGACGCGACGGTTGACGTCCTGGATCTGACGCCTCTGGGTGAAGGCCACGG
GACCCGTGAGTTTGAACCTGAAAGAGAGTTCGACAGAATCAATCTCGGTATCGTTGAC
GGCGGCCTGCCGAGGATCTCTTGACGTCGCCCCGAGTTGTCTGGTAGGCGATCTCGG
TCATGAACTGCTCGATCTCCTCCTCTTGAAGGTCTCCGCGGCCGGCGCGCTCCACGGTG
GCCGCGAGGTTCGTTGGAGATGCGGCCCATGAGCTGCGAGAAGGCGTTCATGCCCGCCT
CGTTCCAGACGCGGCTGTAGACCACGACGCCCTCGGGATCGCgGGCGCGCATGACCAC
CTGGGCGAGGTTGAGCTCCACGTGGCGCGTGAAGACCGCGTAGTTGCAGAGGCGCTGG
TAGAGGTAGTTGAGCGTGGTGGCGATGTGCTCGGTGACGAAGAAATACATGATCCAGC
GGCGGAGCGGCATCTCGCTGACGTCGCCCAGCGCCTCCAAACGTTCCATGGCCTCGTA
AAAGTCCACGGCGAAGTTGAAAACTGGGAGTTGCGCGCCGAGACGGTCAACTCCTCC
TCCAGAAGACGGATGAGCTCGGCGATGGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAGGCCCCCG
GGAGTTCTTCCACTTCTTCTTCTCCTCCTCCACTAACATCTTCTACTTCTCCTCAGG
CGGCAGTGGTGGCGGGGGAGGGGGCCTGCGTCGCCGGCGGGCGCACGGGCAGACGGTC
GATGAAGCGCTCGATGGTCTCGCCGCGCCGGCGTCGCATGGTCTCGGTGACGGCGCGC
CCGTCTCGCGGGGCCGACGCGTGAAGACGCCGCCGCGCATCTCCAGGTGGCCGGGGG
GGTCCCCGTTGGGCAGGGAGAGGGCGCTGACGATGCATCTTATCAATTGCCCCGTAGG
GACTCCGCGCAAGGACCTGAGCGTCTCGAGATCCACGGGATCTGAAAACCGCTGAACG
AAGGCTTCGAGCCAGTCGCAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACGGTTTTCTTCTGGCGGGT
CATGTTGGTTGGGAGCGGGGCGGGCGATGCTGCTGGTGATGAAGTTGAAATAGGCGGT
TCTGAGACGGCGGATGGTGGCGAGGAGCACCAAGTCTTTGGGCCCGGCTTGCTGGATG
CGCAGACGGTCGGCCATGCCCCAGGCGTGGTCCTGACACCTGGCCAGGTCCTTGAGT
AGTCCTGCATGAGCCGCTCCACGGGCACCTCCTCCTCGCCCGCGCGGCCGTGCATGCGC
GTGAGCCCGAAGCCGCGCTGGGGCTGGACGAGCGCCAGGTGCGCGACGACGCGCTCG
GCGAGGATGGCTTGCTGGATCTGGGTGAGGGTGGTCTGGAAGTCATCAAAGTCGACGA
AGCGGTGGTAGGCTCCGGTGTTGATGGTGTAGGAGCAGTTGGCCATGACGGACCAGTT
GACGGTCTGGTGGCCCGGACGCACGAGCTCGTGGTACTTGAGGCGCGAGTAGGCGCGC
GTGTCGAAGATGTAGTCGTTGACGGTGCGCACCAAGTACTGGTAGCCGATGAGGAAGT
GCGGCGGCGGCTGGCGGTAGAGCGGCCATCGCTCGGTGGCGGGGGCGCCGGGCGCGA
GGTCCTCGAGCATGGTGCGGTGGTAGCCGTAGATGTACCTGGACATCCAGGTGATGCC

10

20

30

40

50

GGCGGCGGTGGTGGAGGCGCGCGGGAACCTCGCGGACGCGGTTCCAGATGTTGCGCAGC
GGCAGGAAGTAGTTCATGGTGGGCACGGTCTGGCCCGTGAGGCGCGCGCAGTCGTGGA
TGCTCTATACGGGCAAAAACGAAAGCGGTTCAGCGGCTCGACTCCGTGGCCTGGAGGCT
AAGCGAACGGGTTGGGCTGCGCGTGTACCCCGGTTTGAATCTCGAATCAGGCTGGAGC
CGCAGCTAACGTGGTATTGGCACTCCCGTCTCGACCCAAGCCTGCACCAACCCTCCAGG
ATACGGAGGCGGGTCGTTTTGCAACTTTTTTTTGGAGGCCGGATGAGACTAGTAAGCGC
GGAAAGCGGCCGACCGCGATGGCTCGCTGCCGTAGTCTGGAGAAGAATCGCCAGGGTT
GCGTTGCGGTGTGCCCCGGTTCGAGGCCGGCCGGATTCCGCGGCTAACGAGGGCGTGG
CTGCCCCGTCGTTTCCAAGACCCCATAGCCAGCCGACTTCTCCAGTTACGGAGCGAGCC
CCTCTTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGCCAGATGCATCCCGTACTGCGGCAGATGCGCCCCA
CCACCCTCCACCGCAACAACAGCCCCCTCCACAGCCGGCGCTTCTGCCCCCGCCCCAGC
AGCAACTTCCAGCCACGACCGCCGCGGCCGCGGTGAGCGGGGCTGGACAGAGTTATGA
TCACCAGCTGGCCTTGGAAGAGGGCGAGGGGCTGGCGCGCCTGGGGGCGTCGTCGCCG
GAGCGGCACCCGCGCGTGCAGATGAAAAGGGACGCTCGCGAGGCCTACGTGCCCAAG
CAGAACCTGTTTCAGAGACAGGAGCGGCGAGGAGCCCCGAGGAGATGCGCGCGGCCCGG
TTCCACGCGGGGCGGGAGCTGCGGCGCGGCCTGGACCGAAAGAGGGTGCTGAGGGAC
GAGGATTTTCGAGGCGGACGAGCTGACGGGGATCAGCCCCGCGCGCGCGCACGTGGCCG
CGGCCAACCTGGTCACGGCGTACGAGCAGACCGTGAAGGAGGAGAGCAACTTCCAAA
AATCCTTCAACAACCACGTGCGCACCTGATCGCGCGGAGGAGGTGACCCTGGGCCT
GATGCACCTGTGGGACCTGCTGGAGGCCATCGTGCAGAACCCACAGCAAGCCGCTG
ACGGCGCAGCTGTTCTGGTGGTGCAGCATAGTCGGGACAACGAAGCGTTCAGGGAGG
CGCTGCTGAATATCACCGAGCCCGAGGGCCGCTGGCTCCTGGACCTGGTGAACATTCTG
CAGAGCATCGTGGTGCAGGAGCGCGGGCTGCCGCTGTCCGAGAAGCTGGCGGCCATCA
ACTTCTCGGTGCTGAGTTTGGGCAAGTACTACGCTAGGAAGATCTACAAGACCCCGTAC
GTGCCCATAGACAAGGAGGTGAAGATCGACGGGTTTTACATGCGCATGACCCTGAAAG
TGCTGACCCTGAGCGACGATCTGGGGGTGTACCGCAACGACAGGATGCACCGTGCAGG
GAGCGCCAGCAGGCGGCGGAGCTGAGCGACCAGGAGCTGATGCATAGTCTGCAGCG
GGCCCTGACCGGGGCGGGACCGAGGGGGAGAGCTACTTTGACATGGGCGCGGACCTG
CACTGGCAGCCCAGCCGCCGGGCCTTGGAGGCGGCGGACGAGGACCCTACGTAGAAGAG
GTGGACGATGAGGTGGACGAGGAGGGCGAGTACCTGGAAGACTGATGGCGCGACCGT
ATTTTTGCTAGATGCAACAACAACAGCCACCTCCTGATCCCGCGATGCGGGCGGCGCTG
CAGAGCCAGCCGTCCGGCATTAACTCCTCGGACGATTGGACCCAGGCCATGCAACGCA
TCATGGCGCTGACGACCCGCAACCCCGAAGCCTTTAGACAGCAGCCCCAGGCCAACCG
GCTCTCGGCCATCCTGGAGGCCGTGGTGGCCTCGCGCTCCAACCCACGCACGAGAAG
GTCTGGCCATCGTGAACGCGCTGGTGGAGAACAAAGGCCATCCGCGGCGACGAGGCCG
GCCTGGTGTACAACGCGCTGCTGGAGCGCGTGGCCCGCTACAACAGCACCAACGTGCA
GACCAACCTGGACCGCATGGTGACCGACGTGCGCGAGGCCGTGGCCCAGCGCGAGCGG
TTCCACCGCGAGTCCAACCTGGGATCCATGGTGGCGCTGAACGCCTTCTCAGCACCCA

10

20

30

40

50

GCCCCCAACGTGCCCCGGGGCCAGGAGGACTACACCAACTTCATCAGCGCCCTGCGC
CTGATGGTGACCGAGGTGCCCCAGAGCGAGGTGTACCAAGTCCGGGGCCGGACTIONTCT
TCCAGACCAGTCGCCAGGGCTTGACAGACCGTGAACCTGAGCCAGGCTTTCAAGAACTT
GCAGGGCCTGTGGGGCGTGCAGGCCCGGTGCGGGACCGCGCGACGGTGTTCGAGCCTG
CTGACGCCGAACCTCGCGCCTGCTGCTGCTGCTGGTGGCCCCCTTCACGGACAGCGGCAG
CATCAACCGCAACTCGTACCTGGGCTACCTGATTAACCTGTACCGCGAGGCCATCGGCC
AGGCGCACGTGGACGAGCAGACCTACCAGGAGATCACCCACGTGAGCCGCGCCCTGGG
CCAGGACGACCCGGGCAACCTGGAAGCCACCCTGAACCTTTTGTGACCAACCGGTCTG
CAGAAGATCCCGCCCCAGTACGCGCTCAGCACCGAGGAGGAGCGCATCCTGCGTTACG
TGCAGCAGAGCGTGGGCCTGTTCTGATGCAGGAGGGGGCCACCCCCAGCGCCGCGCT
CGACATGACCGCGCGCAACATGGAGCCCAGCATGTACGCCAGCAACCGCCCGTTTCATC
AATAAACTGATGGACTACTTGCATCGGGCGGCCGCCATGAACTCTGACTATTTACCAA
CGCCATCCTGAATCCCCACTGGCTCCCGCCGCCGGGGTTCTACACGGGCGAGTACGAC
ATGCCCCGACCCAATGACGGGTTCTGTGGGACGATGTGGACAGCAGCGTGTCTCCCC
CCGACCGGGTGCTAACGAGCGCCCCCTGTGGAAGAAGGAAGGCAGCGACCGACGCC
GTCCTCGGCGCTGTCCGGCCGCGAGGGTGTGCGCGCGGTGCCCCAGGCCGCCAGT
CCTTTCCCGAGCTTGCCCTTCTCGCTGAACAGTATCCGCAGCAGCGAGCTGGGCAGGAT
CACGCGCCCCGCGCTTGCTGGGCGAAGAGGAGTACTTGAATGACTCGCTGTTGAGACCC
GAGCGGGAGAAGAAGTTCCTCCCAATAACGGGATAGAAAGCCTGGTGGACAAGATGAGC
CGCTGGAAGACGTATGCGCAGGAGCACAGGGACGATCCCCGGGCGTCGCAGGGGGCC
ACGAGCCGGGGCAGCGCCGCCCGTAAACGCCGGTGGCACGACAGGCAGCGGGGACAG
ATGTGGGACGATGAGGACTCCGCCGACGACAGCAGCGTGTGGACTTGGGTGGGAGTG
GTAACCCGTTTCGCTCACCTGCGCCCCCGTATCGGGCGCATGATGTAAGAGAAACCGAA
AATAAATGATACTACCAAGGCCATGGCGACCAGCGTGCGTTTCGTTTCTTCTGTGT
TGTTGTATCTAGTATGATGAGGCGTGCGTACCCGGAGGGTCCTCCTCCCTCGTACGAGA
GCGTGATGCAGCAGGCGATGGCGGCGGCGGCGATGCAGCCCCCGCTGGAGGCTCCTTA
CGTGCCCCCGCGGTACCTGGCGCCTACGGAGGGGCGGAACAGCATTTCGTTACTCGGAG
CTGGCACCCCTTGACGATACCACCCGGTTGTACCTGGTGGACAACAAGTCGGCGGACA
TCGCCTCGCTGAACTACCAGAACGACCACAGCAACTTCCTGACCACCGTGGTGCAGAA
CAATGACTTCACCCCCACGGAGGCCAGCACCCAGACCATCAACTTTGACGAGCGCTCG
CGGTGGGGCGGCCAGCTGAAAACCATCATGCACACCAACATGCCCAACGTGAACGAGT
TCATGTACAGCAACAAGTTCAAGGCGCGGGTGTGGTCTCCCGCAAGACCCCCAATGG
GGTGACAGTGACAGAGGATTATGATGGTAGTCAGGATGAGCTGAAGTATGAATGGGTG
GAATTTGAGCTGCCCAGGCAACTTCTCGGTGACCATGACCATCGACCTGATGAACA
ACGCCATCATCGACAATTACTTGGCGGTGGGGCGGCAGAACGGGGTGCTGGAGAGCGA
CATCGGCGTGAAGTTCGACACTAGGAACTTCAGGCTGGGCTGGGACCCCGTGACCGAG
CTGGTCATGCCCGGGGTGTACACCAACGAGGCTTCCATCCCGATATTGTCTTGCTGCC

10

20

30

40

50

CGGCTGCGGGGTGGACTTCACCGAGAGCCGCCTCAGCAACCTGCTGGGCATTTCGCAAG
AGGCAGCCCTTCCAGGAAGGCTTCCAGATCATGTACGAGGATCTGGAGGGGGGCAACA
TCCCCGCGCTCCTGGATGTCGACGCCTATGAGAAAAGCAAGGAGGATGCAGCAGCTGA
AGCAACTGCAGCCGTAGCTACCGCCTCTACCGAGGTCAGGGGCGATAATTTTGCAAGC
GCCGCAGCAGTGGCAGCGGCCGAGGCGGGCTGAAACCGAAAGTAAGATAGTCATTTCAG
CCGGTGGAGAAGGATAGCAAGAACAGGAGCTACAACGTACTACCGGACAAGATAAAC
ACCGCCTACCGCAGCTGGTACCTAGCCTACAACCTATGGCGACCCCGAGAAGGGCGTGC
GCTCCTGGACGCTGCTCACCACCTCGGACGTCACCTGCGGCGTGGAGCAAGTCTACTGG
TCGCTGCCCGACATGATGCAAGACCCGGTCACCTTCCGCTCCACGCGTCAAGTTAGCAA
CTACCCGGTGGTGGGCGCCGAGCTCCTGCCCGTCTACTCCAAGAGCTTCTTCAACGAGC
AGGCCGTCTACTCGCAGCAGCTGCGCGCCTTACCTCGCTTACGCACGTCTTCAACCGC
TCCCCGAGAACCAGATCCTCGTCCGCCCCGCCGCGCCACCATTACCACCGTCAGTGA
AAACGTTTCTGCTCTCACAGATCACGGGACCCTGCCGCTGCGCAGCAGTATCCGGGGA
GTCCAGCGCGTGACCGTTACTGACGCCAGACGCCGCACCTGCCCTACGTCTACAAGG
CCCTGGGCATAGTCGCGCCGCGCGTCTCTCGAGCCGCACCTTCTAAATGTCCATTCTC
ATCTCGCCAGTAATAACACCGGTTGGGGCCTGCGCGCGCCAGCAAGATGTACGGAG
GCGCTCGCCAACGCTCCACGCAACACCCCGTGCGCGTGCGCGGGCACTTCCGCGCTCCC
TGGGGCGCCCTCAAGGGCCGCGTGCGGTGCGCACCAACCGTCGACGACGTGATCGACC
AGGTGGTGGCCGACGCGCGCAACTACCCCCGCGCCGCGCGCCCGTCTCCACCGTGGA
CGCCGTCATCGACAGCGTGGTGGCAGACGCGCGCCGGTACGCCCCGCGCCAAGAGCCGG
CGGCGGCGCATCGCCGCGCGCACCGGAGCACCCCCGCCATGCGCGCGGCGCGAGCCT
TGCTGCGCAGGGCCAGGCGCACGGGACGCAAGGGCCATGCTCAGGGCGGCCAGACGCG
CGGCTTCAGGCGCCAGCGCCGGCAGGACCCGGAGACGCGCGGCCACGGCGGCGGCAG
CGGCCATCGCCAGCATGTCCCGCCCCGCGGCGAGGGAACGTGTACTGGGTGCGCGACGC
CGCCACCGGTGTGCGCGTGCCCGTGCGCACCCGCCCCCCTCGCACTTGAAGATGTTTAC
TTCGCGATGTTGATGTGTCCCAGCGGCGAGGAGGATGTCCAAGCGCAAATTCAAGGAA
GAGATGCTCCAGGTCATCGCGCCTGAGATCTACGGCCCTGCGGTGGTGAAGGAGGAAA
GAAAGCCCCGCAAAATCAAGCGGGTCAAAAAGGACAAAAGGAAGAAGAAAGTGATG
TGGACGGATTGGTGGAGTTTGTGCGGAGTTCGCCCCCGGGCGGCGCGTGCAGTGGCG
CGGGCGGAAGGTGCAACCGGTGCTGAGACCCGGCACCAACCGTGGTCTTCACGCCCGGC
GAGCGCTCCGGCACCGCTTCCAAGCGTCTCTACGACGAGGTGTACGGGGATGATGATA
TTCTGGAGCAGGCGGCCGAGCGCCTGGGCGAGTTTGTCTACGGCAAGCGCAGCCGTTT
CGCACCGAAGGAAGAGGCGGTGTCCATCCCGCTGGACCACGGCAACCCACGCCGAGC
CTCAAGCCCGTGACCTTGCAGCAGGTGCTGCCGACCGCGGCGCCGCGCCGGGGGTTCA
AGCGCGAGGGCGAGGATCTGTACCCACCATGCAGCTGATGGTGCCCAAGCGCCAGAA
GCTGGAAGACGTGCTGGAGACCATGAAGGTGGACCCGGACGTGCAGCCCGAGGTCAA
GGTGCGGCCCATCAAGCAGGTGGCCCCGGGCCTGGGCGTGAGACCGTGGACATCAAG
ATTCCACGAGCCCATGGAAACGAGACCGAGCCCATGATCAAGCCAGCACCAGCA

10

20

30

40

50

CCATGGAGGTGCAGACGGATCCCTGGATGCCATCGGCTCCTAGTCGAAGACCCCGGCG
CAAGTACGGCGCGGCCAGCCTGCTGATGCCAACTACGCGCTGCATCCTTCCATCATCC
CCACGCCGGGCTACCGCGGCACGCGCTTCTACCGCGGTCATACCAGCAGCCGCCGCCG
CAAGACCACCACTCGCCGCCGCCGTCGCCGCACCGCCGCTGCAACCACCCCTGCCGCC
CTGGTGC GGAGAGTGTACCGCCGCGGCCGCGCACCTCTGACCCTGCCGCGCGCGCT
ACCACCCGAGCATCGCCATTTAAACTTTTCGCCtGCTTTGCAGATCAATGGCCCTCACATG
CCGCCTTCGCGTTCCCATTAACGGGCTACCGAGGAAGAAAACCGCGCCGCTAGAAGGCTG
GCGGGGAACGGGATGCGTCGCCACCACCACCGGCGGCGGCGGCCATCAGCAAGCGG
TTGGGGGGAGGCTTCCTGCCCGCGCTGATCCCCATCATCGCCGCGGCGATCGGGGCGA
TCCCCGGCATTGCTTCCGTGGCGGTGCAGGCCTCTCAGCGCCACTGAGACACACTTGGA
AACATCTTGTAATAAACCaATGGACTCTGACGCTCCTGGTCCTGTGATGTGTTTTCTGTA
ACAGATGGAAGACATCAATTTTTCTGTCCTGGCTCCGCGACACGGCACGCGGCCGTTCA
TGGGCACCTGGAGCGACATCGGCACCAGCCAACTGAACGGGGGGCGCCTTCAATTGGAG
CAGTCTCTGGAGCGGGCTTAAGAATTTTCGGGTCCACGCTTAAAACCTATGGCAGCAAG
GCGTGGAACAGCACACAGGGCAGGCGCTGAGGGATAAGCTGAAAGAGCAGAACTTC
CAGCAGAAGGTGGTCGATGGGCTCGCCTCGGGCATCAACGGGGTGGTGGACCTGGCCA
ACCAGGCCGTGCAGCGGCAGATCAACAGCCGCCTGGACCCGGTGCCGCCCGCCGGCTC
CGTGAGATGCCGCAGGTGGAGGAGGAGCTGCCTCCCCTGGACAAGCGGGGCGAGAA
GCGACCCCGCCCCGATGCGGAGGAGACGCTGCTGACGCACACGGACGAGCCGCCCCCG
TACGAGGAGGCGGTGAAACTGGGTCTGCCACCACGCGGCCCATCGCGCCCCTGGCCA
CCGGGGTGCTGAAACCCGAAAAGCCCGCGACCCTGGACTTGCCTCCTCCCCAGCCTTCC
CGCCCCTCTACAGTGGCTAAGCCCCTGCCGCCGGTGGCCGTGGCCCGCGCGGACCCG
GGGGCACCGCCCGCCCTCATGCGAACTGGCAGAGCACTCTGAACAGCATCGTGGGTCT
GGGAGTGCAGAGTGTGAAGCGCCGCCGCTGCTATTAAACCTACCGTAGCGCTTAACTT
GCTTGTCTGTGTGTGTATGTATTATGTCGCCGCCGCCGCTGTCCACCAGAAGGAGGAGT
GAAGAGGCGCGTCGCCGAGTTGCAAGATGGCCACCCCATCGATGCTGCCCCAGTGGGC
GTACATGCACATCGCCGGACAGGACGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGTCTGGTGCAG
TTTGCCCGCGCCACAGACACCTACTTCAGTCTGGGGAACAAGTTTAGGAACCCACGGT
GGCGCCACGCACGATGTGACCACCGACCGCAGCCAGCGGCTGACGCTGCGCTTCGTG
CCCGTGGACCGCGAGGACAACACCTACTCGTACAAAGTGCGCTACACGCTGGCCGTGG
GCGACAACCGCGTGCTGGACATGGCCAGCACCTACTTTGACATCCGCGGCGTGCTGGA
TCGGGGCCCTAGCTTCAAACCCTACTCCGGCACCGCCTACAACAGTCTGGCCCCCAAGG
GAGCACCCAACACTTGTCAGTGGACATATAAAGCCGATGGTGAAACTGCCACAGAAAA
AACCTATACATATGGAAATGCACCCGTGCAGGGCATTAAACATCACAAAAGATGGTATT
CAACTTGGAAGTACACCGATGATCAGCCAATCTACGCAGATAAAACCTATCAGCCTG
AACCTCAAGTGGGTGATGCTGAATGGCATGACATCACTGGTACTGATGAAAAGTATGG
AGGCAGAGCTCTTAAGCCTGATACCAAAATGAAGCCTTGTTATGGTTCTTTTGCCAAGC
CTACTAATAAAGAAGGAGGTCAGGCAAATGTGAAAACAGGAACAGGCACTACTAAAG

10

20

30

40

50

AATATGACATAGACATGGCTTTCTTTGACAACAGAAGTGCGGCTGCTGCTGGCCTAGCT
CCAGAAATTGTTTTGTATACTGAAAATGTGGATTTGGAAACTCCAGATACCCATATTGT
ATACAAAGCAGGCACAGATGACAGCAGCTCTTCTATTAATTTGGGTCAGCAAGCCATG
CCCAACAGACCTAACTACATTGGTTTCAGAGACAACCTTTATCGGGCTCATGTACTACAA
CAGCACTGGCAATATGGGGGTGCTGGCCGGTCAGGCTTCTCAGCTGAATGCTGTGGTTG
ACTTGCAAGACAGAAACACCGAGCTGTCCTACCAGCTCTTGCTTGACTCTCTGGGTGAC
AGAACCCGGTATTTTCAGTATGTGGAATCAGGCGGTGGACAGCTATGATCCTGATGTGC
GCATTATTGAAAATCATGGTGTGGAGGATGAACTTCCCAACTATTGTTTCCCTCTGGAT
GCTGTTGGCAGAACAGATACTTATCAGGGAATTAAGGCTAATGGAAGTATCAAACCA
CATGGACCAAAGATGACAGTGTCAATGATGCTAATGAGATAGGCAAGGGTAATCCATT
CGCCATGGAAATCAACATCCAAGCCAACCTGTGGAGGAACTTCCTCTACGCCAACGTG
GCCCTGTACCTGCCCCGACTCTTACAAGTACACGCCGGCCAATGTTACCCTGCCACCAA
CACCAACACCTACGATTACATGAACGGCCGGGTGGTGGCGCCCTCGCTGGTGGACTCC
TACATCAACATCGGGGCGCGCTGGTCGCTGGATCCCATGGACAACGTGAACCCCTTCA
ACCACCACCGCAATGCGGGGCTGCGCTACCGCTCCATGCTCCTGGGCAACGGGCGCTA
CGTGCCCTTCCACATCCAGGTGCCCCAGAAATTTTTCGCCATCAAGAGCCTCCTGCTCC
TGCCCCGGTCTACACCTACGAGTGGAACCTCCGCAAGGACGTCAACATGATCCTGCA
GAGCTCCCTCGGCAACGACCTGCGCACGGACGGGGCCTCCATCTCCTTACCAGCATCA
ACCTCTACGCCACCTTCTTCCCCATGGCGCACAACACGGCCTCCACGCTCGAGGCCATG
CTGCGCAACGACACCAACGACCAGTCCTTCAACGACTACCTCTCGGCGGCCAACATGC
TCTACCCCATCCCGGCCAACGCCACCAACGTGCCCATCTCCATCCCCTCGCGCAACTGG
GCCGCTTCCGCGGCTGGTCCTTACGCGTCTCAAGACCAAGGAGACGCCCTCGCTGGG
CTCCGGGTTCGACCCCTACTTCGTCTACTCGGGCTCCATCCCCTACCTCGACGGCACCTT
CTACCTCAACCACACCTTCAAGAAGGTCTCCATCACCTTCGACTCCTCCGTCAGCTGGC
CCGGCAACGACCGGCTCCTGACGCCCAACGAGTTCGAAATCAAGCGCACCGTCGACGG
CGAGGGCTACAACGTGGCCCAGTGCAACATGACCAAGGACTGGTTCTTGGTCCAGATG
CTGGCCCACTACAACATCGGCTACCAGGGCTTCTACGTGCCCAGGGGCTACAAGGACC
GCATGTACTCCTTCTTCCGCAACTTCCAGCCCATGAGCCGCCAGGTGGTGGACGAGGTC
AACTACAAGGACTACCAGGCCGTACCCCTGGCCTACCAGCACAACAACCTCGGGCTTCG
TCGGCTACCTCGCGCCACCATGCGCCAGGGCCAGCCCTACCCGCCAACTACCCCTAC
CCGCTCATCGGCAAGAGCGCCGTCACCAGCGTCACCCAGAAAAAGTTCCTCTGCGACA
GGGTCATGTGGCGCATCCCCTTCTCCAGCAACTTCATGTCCATGGGCGCGCTCACCGAC
CTCGGCCAGAACATGCTCTATGCCAACTCCGCCCACGCGCTAGACATGAATTTTGAAGT
CGACCCCATGGATGAGTCCACCCTTCTCTATGTTGTCTTCGAAGTCTTCGACGTCGTCCG
AGTGCACCAGCCCCACCGCGGCGTCATCGAGGCCGTCTACCTGCGCACCCCCTTCTCGG
CCGGTAACGCCACCACCTAAGCTCTTGCTTCTTGCAAGCCATGGCCGCGGGCTCCGGCG
AGCAGGAGCTCAGGGCCATCATCCGCGACCTGGGCTGCGGGCCCTACTTCCTGGGCAC
CTTCGATAAGCGCTTCCCGGGATTTCATGGCCCCGCACAAGCTGGCCTGCGCCATCGTCA

10

20

30

40

50

ACACGGCCGGCCGCGAGACCGGGGGCGAGCACTGGCTGGCCTTCGCCTGGAACCCGCG
CTCGAACACCTGCTACCTCTTCGACCCCTTCGGGTTCTCGGACGAGCGCCTCAAGCAGA
TCTACCAGTTCGAGTACGAGGGCCTGCTGCGCCGCGAGCGCCCTGGCCACCGAGGACCG
CTGCGTCAACCTGGAAAAGTCCACCCAGACCGTGCAGGGTCCGCGCTCGGCCGCTGC
GGGCTCTTCTGCTGCATGTTCTGCACGCCTTCGTGCACTGGCCCGACCGCCCCATGGA
CAAGAACCCACCATGAACTTGCTGACGGGGGTGCCAACGGCATGCTCCAGTCGCCC
CAGGTGGAACCCACCCTGCGCCGCAACCAGGAGGCGCTCTACCGCTTCCTCAACTCCC
ACTCCGCTACTTTCGCTCCACCGCGCGCGCATCGAGAAGGCCACCGCCTTCGACCGC
ATGAATCAAGACATGTAAACCGTGTGTGTATGTTAAATGTCTTTAATAAACAGCACTTT
CATGTTACACATGCATCTGAGATGATTTATTTAGAAATCGAAAGGGTTCTGCCGGGTCT
CGGCATGGCCCGCGGGCAGGGACACGTTGCGGAACTGGTACTTGGCCAGCCACTTGAA
CTCGGGGATCAGCAGTTTGGGCAGCGGGGTGTCGGGGAAGGAGTCGGTCCACAGCTTC
CGCGTCAGTTGCAGGGCGCCAGCAGGTGCGGCGCGGAGATCTTGAAATCGCAGTTGG
GACCCGCGTTCTGCGCGCGGGAGTTGCGGTACACGGGGTTGCAGCACTGGAACACCAT
CAGGGCCGGGTGCTTCACGCTCGCCAGCACCGTCGCGTCGGTGATGCTCTCCACGTCGA
GGTCTCGGCGTTGGCCATCCCGAAGGGGGTTCATCTTGCAAGTCTGCCTTCCCATGGTG
GGCACGCACCCGGGCTTGTGGTTGCAATCGCAGTGCAGGGGGATCAGCATCATCTGGG
CCTGGTCGGCGTTCATCCCCGGGTACATGGCCTTCATGAAAGCCTCCAATTGCCTGAAC
GCCTGCTGGGCCTTGGCTCCCTCGGTGAAGAAGACCCCGCAGGACTTGCTAGAGAACT
GGTTGGTGGCGCACCCGGCGTCGTGCACGCAGCAGCGCGCGTCGTTGTTGGCCAGCTG
CACCACGCTGCGCCCCAGCGGTTCTGGGTGATCTTGGCCCGGTCGGGGTTCTCCTTCA
GCGCGCGCTGCCCGTTCTCGCTCGCCACATCCATCTCGATCATGTGCTCCTTCTGGATCA
TGGTGGTCCCGTGCAGGCACCGCAGCTTGCCCTCGGCCTCGGTGCACCCGTGCAGCCAC
AGCGCGCACCCGGTGCACCTCCAGTTCTTGTGGGCGATCTGGGAATGCGCGTGCACGA
AGCCCTGCAGGAAGCGGCCCATCATGGTGGTCAGGGTCTTGTGCTAGTGAAGGTCAG
CGGAATGCCGCGGTGCTCCTCGTTGATGTACAGGTGGCAGATGCGGCGGTACACCTCG
CCCTGCTCGGGCATCAGCTGGAAGTTGGCTTTCAGGTGCGTCTCCACGCGGTAGCGGTC
CATCAGCATAGTCATGATTTCCATACCCTTCTCCCAGGCCGAGACGATGGGCAGGCTCA
TAGGGTTCTTCACCATCATCTTAGCGCTAGCAGCCGCGGCCAGGGGGTTCGCTCTCGTCC
AGGGTCTCAAAGCTCCGCTGCCGTCTTCTCGGTGATCCGCACCGGGGGGTAGCTGAA
GCCCACGGCCGCCAGCTCCTCCTCGGCCTGTCTTTCGTCCTCGCTGTCCTGGCTGACGTC
CTGCAGGACCACATGCTTGGTCTTGCGGGGTTTCTTCTTGGGCGGCAGCGGCGGCGGAG
ATGTTGGAGATGGCGAGGGGGAGCGCGAGTTCTCGCTCACCCTACTATCTCTTCTCT
TCTTGGTCCGAGGCCACGCGGCGGTAGGTATGTCTCTTCGGGGGCAGAGGCGGAGGCG
ACGGGCTCTCGCCGCCGCGACTTGGCGGATGGCTGGCAGAGCCCCTTCCGCGTTCGGG
GGTGCCTCCCGGCGGCGCTCTGACTGACTTCCCTCCGCGGCGGCCATTGTGTTCTCCT
AGGGAGGAACAACAAGCATGGAGACTCAGCCATCGCCAACCTCGCCATCTGCCCCAC
CGCCGACGAGAAGCAGCAGCAGCAGAATGAAAGCTTAACCGCCCCGCCGCCAGCCCC

10

20

30

40

50

GCCACCTCCGACGCGGCCGTCCCAGACATGCAAGAGATGGAGGAATCCATCGAGATTG
ACCTGGGCTATGTGACGCCCCGCGGAGCACGAGGAGGAGCTGGCAGTGCGCTTTTCACA
AGAAGAGATACACCAAGAACAGCCAGAGCAGGAAGCAGAGAATGAGCAGAGTCAGGC
TGGGCTCGAGCATGACGGCGACTACCTCCACCTGAGCGGGGGGGAGGACGCGCTCATC
AAGCATCTGGCCCCGGCAGGCCACCATCGTCAAGGATGCGCTGCTCGACCGCACCGAGG
TGCCCCTCAGCGTGGAGGAGCTCAGCCGCGCCTACGAGTTGAACCTCTTCTCGCCGCGC
GTGCCCCCAAGCGCCAGCCCAATGGCACCTGCGAGCCCAACCCGCGCCTCAACTTCT
ACCCGGTCTTTCGCGGTGCCCGAGGGCCCTGGCCACCTACCACATCTTTTTCAAGAACCAA
AAGATCCCCGTCTCCTGCCGCGCCAACCGCACCCGCGCCGACGCCCTTTTCAACCTGGG
TCCCGGCGCCCGCCTACCTGATATCGCCTCCTTGGAAGAGGTTCCCAAGATCTTCGAGG
GTCTGGGACAGCGACGAGACTCGGGCCGCGAACGCTCTGCAAGGAGAAGGAGGAGAGC
ATGAGCACCACAGCGCCCTGGTCGAGTTGGAAGGCGACAACGCGCGGCTGGCGGTGCT
CAAACGCACGGTCGAGCTGACCCATTTTCGCTACCCGGCTCTGAACCTGCCCCCAAAG
TCATGAGCGCGGTTCATGGACCAGGTGCTCATCAAGCGCGCGTCGCCCATCTCCGAGGA
CGAGGGCATGCAAGACTCCGAGGAGGGCAAGCCCGTGGTCAGCGACGAGCAGCTGGC
CCGGTGGCTGGGTCTAATGCTAGTCCCCAGAGTTTGGAAGAGCGGCGCAAACCTCATG
ATGGCCGTGGTCCTGGTGACCGTGGAGCTGGAGTGCCCTGCGCCGCTTCTTCGCCGACGC
GGAGACCCTGCGCAAGGTCGAGGAGAACCTGCACTACCTCTTCAGGCACGGGTTTCGTG
CGCCAGGCCTGCAAGATCTCCAACGTGGAGCTGACCAACCTGGTCTCCTACATGGGCA
TCTTGACGAGAACCGCCTGGGGCAGAACGTGCTGCACACCACCCTGCGCGGGGAGGC
CCGGCGCGACTACATCCGCGACTGCGTCTACCTCTACCTCTGCCACACCTGGCAGACGG
GCATGGGCGTGTGGCAGCAGTGTCTGGAGGAGCAGAACCTGAAAGAGCTCTGCAAGCT
CCTGCAGAAGAACCTCAAGGGTCTGTGGACCGGGTTCGACGAGCGCACCAACCGCCTCG
GACCTGGCCGACCTCATTTTCCCCGAGCGCCTCAGGCTGACGCTGCGCAACGGCCTGCC
CGACTTTATGAGCCAAAGCATGTTGCAAAACTTTTCGCTCTTTCATCCTCGAACGCTCCG
GAATCCTGCCCCGCCACCTGCTCCGCGCTGCCCTCGGACTTCGTGCCGCTGACCTTCCGC
GAGTGCCCCCGCCGCTGTGGAGCCACTGCTACCTGCTGCGCCTGGCCAACTACCTGGC
CTACCACTCGGACGTGATCGAGGACGTCAGCGGCGAGGGCCTGCTCGAGTGCCACTGC
CGCTGCAACCTCTGCACGCCGCACCGCTCCCTGGCCTGCAACCCCCAGCTGCTGAGCGA
GACCCAGATCATCGGCACCTTCGAGTTGCAAGGGCCAGCGAAGGCGAGGGTTCAGCC
GCCAAGGGGGGTCTGAAACTCACCCCGGGGCTGTGGACCTCGGCCTACTTGCGCAAGT
TCGTGCCCCGAGGACTACCATCCCTTCGAGATCAGGTTCTACGAGGACCAATCCCATCCG
CCCAAGGCCGAGCTGTGCGCCTGCGTCATCACCCAGGGGGCGATCCTGGCCCAATTGC
AAGCCATCCAGAAATCCCGCCAAGAATTCTTGCTGAAAAAGGGCCGCGGGGTCTACCT
CGACCCCCAGACCGGTGAGGAGCTCAACCCCGGCTTCCCCCAGGATGCCCCGAGGAAA
CAAGAAGCTGAAAGTGAGGCTGCCGCCCCGTGGAGGATTTGGAGGAAGACTGGGAGAA
CAGCAGTCAGGCAGAGGAGGAGGAGATGGAGGAAGACTGGGACAGCACTCAGGCAGA
GGAGGACAGCCTGCAAGACAGTCTGGAGGAAGACGAGGAGGAGGCAGAGGAGGAGG

10

20

30

40

50

TGGAAGAAGCAGCCGCCGACCGTCGTCCTCGGCGGGGGAGAAAGCAAGCAGCA
CGGATACCATCTCCGCTCCGGGTCCGGGTCCCGCTCGACCACACAGTAGATGGGACGA
GACCGGACGATTCCCGAACCCACCACCCAGACCGGTAAGAAGGAGCGGCAGGGATA
CAAGTCCTGGCGGGGGCACAAAAACGCCATCGTCTCCTGCTTGCAGGCCTGCGGGGGC
AACATCTCCTTCACCCGGCGCTACCTGCTCTTCCACCGCGGGGTGAACTTTCCCCGCAA
CATCTTGCATTACTACCGTCACCTCCACAGCCCCTACTACTTCCAAGAAGAGGCAGCAG
CAGCAGAAAAAGACCAGCAGAAAAACCAGCAGCTAGAAAATCCACAGCGGCGGCAGCA
GGTGGACTGAGGATCGCGGCGAACGAGCCGGCGCAAACCCGGGAGCTGAGGAACCGG
ATCTTTCCACCCCTCTATGCCATCTTCCAGCAGAGTCGGGGGGCAGGAGCAGGAACTGA
AAGTCAAGAACCGTTCTCTGCGCTCGCTCACCCGCAGTTGTCTGTATCACAAGAGCGAA
GACCAACTTCAGCGCACTCTCGAGGACGCCGAGGCTCTCTTCAACAAGTACTGCGCGCT
CACTCTTAAAGAGTAGCCCGCGCCCCGCCAGTCGCAGAAAAAGGCGGGAATTACGTCA
CCTGTGCCCTTCGCCCTAGCCGCCTCCACCCATCATCATGAGCAAAGAGATTCCACGC
CTTACATGTGGAGCTACCAGCCCCAGATGGGCCTGGCCGCCGGTGCCGCCAGGACTA
CTCCACCCGCATGAATTGGCTCAGCGCCGGGCCCCGCGATGATCTCACGGGTGAATGAC
ATCCGCGCCCAACGAAACCAGATACTCCTAGAACAGTCAGCGCTCACCGCCACGCCCC
GCAATCACCTCAATCCGCGTAATTGGCCCCGCCGCCCTGGTGTACCAGGAAATTCCCCAG
CCCACGACCGTACTACTTCCGCGAGACGCCAGGCCGAAGTCCAGCTGACTAACTCAG
GTGTCCAGCTGGCGGGCGGCGCCACCCTGTGTGCTCACCGCCCCGCTCAGGGTATAAA
GCGGCTGGTGATCCGGGGCAGAGGCACACAGCTCAACGACGAGGTGGTGAGCTCTTCG
CTGGGTCTGCGACCTGACGGAGTCTTCCAACCTCGCCGGATCGGGGAGATCTTCCTTCAC
GCCTCGTCAGGCCGTCCTGACTTTGGAGAGTTCGTCTCCTCGCAGCCCCGCTCGGGTGGA
TCGGCACTCTCCAGTTCGTGGAGGAGTTCCTCCCTCGGTCTACTTCAACCCCTTCTCCG
GCTCCCCCGGCCACTACCCGGACGAGTTCATCCCGAACTTCGACGCCATCAGCGAGTCG
GTGGACGGCTACGATTGAAACTAATCACCCCCTTATCCAGTGAAATAAAGATCATATTG
ATGATGATTTTACAGAAATAAAAAATAATCATTTGATTTGAAATAAAGATACAATCAT
ATTGATGATTTGAGTTTAACAAAAAAATAAAGAATCACTTACTTGAAATCTGATACCAG
GTCTCTGTCCATGTTTTCTGCCAACACCACTTCACTCCCCTCTTCCCAGCTCTGGTACTG
CAGGCCCGGCGGGCTGCAAACCTCCTCCACACGCTGAAGGGGATGTCAAATTCCTCCT
GTCCCTCAATCTTCATTTTATCTTCTATCAGATGTCCAAAAAGCGCGTCCGGGTGGATG
ATGACTTCGACCCCGTCTACCCCTACGATGCAGACAACGCACCGACCGTGCCCTTCATC
AACCCCCCTTCGTCTCTTCAGATGGATTCCAAGAGAAGCCCCTGGGGGTGTTGTCCCT
GCGACTGGCCGACCCCGTCACCACCAAGAACGGGGAAATCACCTCAAGCTGGGAGAG
GGGGTGGACCTCGATTCTCGGGAAAACATCTCCAACACGGCCACCAAGGCCGCCG
CCCCTCTCAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCCTTAACATGGATCACCCCTTTTACACTA
AAGATGGAAAATTATCCTTACAAGTTTCTCCACCATTAATATACTGAGAACAAGCATT
CTAAACACACTAGCTTTAGGTTTTGGATCAGGTTTAGGACTCCGTGGCTCTGCCTTGGC
AGTACAGTTAGTCTCTCCACTTACATTTGATACTGATGGAAACATAAAGCTTACCTTAG

10

20

30

40

50

ACAGAGGTTTGCATGTTACAACAGGAGATGCAATTGAAAGCAACATAAGCTGGGCTAA
AGGTTTAAAATTTGAAGATGGAGCCATAGCAACCAACATTGGAAATGGGTTAGAGTTT
GGAAGCAGTAGTACAGAAACAGGTGTTGATGATGCTTACCCAATCCAAGTTAACTTG
GATCTGGCCTTAGCTTTGACAGTACAGGAGCCATAATGGCTGGTAACAAAGAAGACGA
TAAACTCACTTTGTGGACAACACCTGATCCATCACCAACTGTCAAATACTCGCAGAAA
ATGATGCAAACTAACACTTTGCTTGACTAAATGTGGTAGTCAAATACTGGCCACTGTG
TCAGTCTTAGTTGTAGGAAGTGGAACCTAAACCCCATTAAGTGGCACCGTAAGCAGTG
CTCAGGTGTTTCTACGTTTTGATGCAAACGGTGTTCTTTTAACAGAACATTCTACACTAA
AAAAATACTGGGGGTATAGGCAGGGAGATAGCATAGATGGCACTCCATATACCAATGC
TG TAGGATTCATGCCCAATTTAAAAGCTTATCCAAAGTCACAAAGTTCTACTACTAAA
ATAATATAGTAGGGCAAGTATACATGAATGGAGATGTTTCAAACCTATGCTTCTCACT
ATAACCCTCAATGGTACTGATGACAGCAACAGTACATATTCAATGTCATTTTCATACAC
CTGGACTAATGGAAGCTATGTTGGAGCAACATTTGGGGCTAACTCTTATACCTTCTCAT
ACATCGCCCAAGAATGAACACTGTATCCACCCCTGCATGCCAACCCTTCCCACCCCACT
CTGTGGAACAACTCTGAAACACAAAATAAAATAAAGTTCAAGTGTTTTATTGATTCA
ACAGTTTTTACAGGATTCGAGCAGTTATTTTTCTCCACCCTCCCAGGACATGGAATACA
CCACCCTCTCCCCCGCACAGCCTTGAACATCTGAATGCCATTGGTGATGGACATGCTT
TTGGTCTCCACGTTCCACACAGTTTCAGAGCGAGCCAGTCTCGGGTCGGTCAGGGAGAT
GAAACCCTCCGGGCACTCCCGCATCTGCACCTCACAGCTCAACAGCTGAGGATTGTCTT
CGGTGGTCGGGATCACGGTTATCTGGAAGAAGCAGAAGAGCGGCGGTGGGAATCATA
GTCCGCGAACGGGATCGGCCGGTGGTGTCGCATCAGGCCCGCGCAGCAGCGCATGCGGATC
CGCCGCTCCGTCAAGCTGCTGCTCAGGGGGTCCGGGTCCAGGGACTCCCTCAGCATGAT
GCCACGGCCCTCAGCATCAGTCGTCTGGTGCGGCGGGCGCAGCAGCGCATGCGGATC
TCGCTCAGGTGCTGTCAGTACGTGCAACACAGAACCACCAGGTGTTCAACAGTCCAT
AGTTCAACACGCTCCAGCCGAACTCATCGCGGGAAGGATGCTACCCACGTGGCCGTC
GTACCAGATCCTCAGGTAAATCAAGTGGTGCCCCCTCCAGAACACGCTGCCACGTAC
ATGATCTCCTTGGGCATGTGGCGGTTACACACCTCCCGGTACCACATCACCTCTGGTT
GAACATGCAGCCCCGGATGATCCTGCGGAACCACAGGGCCAGCACCGCCCCGCCGCC
ATGCAGCGAAGAGACCCCGGTCCCGGCAATGGCAATGGAGGACCCACCGCTCGTACC
CGTGGATCATCTGGGAGCTGAACAAGTCTATGTTGGCACAGCACAGGCATATGCTCAT
GCATCTCTTCAGCACTCTCAACTCCTCGGGGGTCAAACCATATCCCAGGGCACGGGG
AACTCTTGACAGGACAGCGAACCCCGCAGAACAGGGCAATCCTCGCACAGAACTTACAT
TGTGCATGGACAGGGTATCGCAATCAGGCAGCACCGGGTGATCCTCCACCAGAGAAGC
GCGGGTCTCGGTCTCCTCACAGCGTGGTAAGGGGGCCGGCCGATACGGGTGATGGCGG
GACGCGGCTGATCGTGTTGCGGACCGTGTCATGATGCAGTTGCTTTCGGACATTTTCGT
ACTTGCTGTAGCAGAACCTGGTCCGGGCGCTGCACACCGATCGCCGGCGGCGGTCTCG
GCGCTTGGAACGCTCGGTGTTGAAATTGTAACAGCCACTCTCTCAGACCGTGCAGC
AGATCTAGGGCCTCAGGAGTGATGAAGATCCCATCATGCCTGATGGCTCTGATCACATC

10

20

30

40

50

GACCACCGTGGAATGGGCCAGACCCAGCCAGATGATGCAATTTTGTGGGTTTCGGTG
ACGGCGAGCCTCGGGAACAACGATGAAGTAAATGCAAGCGGTGCGTTCCAGCATGGTT
AGTTAGCTGATCTGTAGAAAAAACAATAATGAACATTAAACCATGCTAGCCTGGCGAA
CAGGTGGGTAAATCGTTCTCTCCAGCACCAGGCAGGCCACGGGGTCTCCGGCGCGACC
CTCGTAAAAATTGTCGCTATGATTGAAAACCATCACAGAGAGACGTTCCCGGTGGCCG
GCGTGAATGATTCGACAAGATGAATACACCCCGGAACATTGGCGTCCGCGAGTGAAA
AAAAGCGCCCGAGGAAGCAATAAGGCACTACAATGCTCAGTCTCAAGTCCAGCAAAGC
GATGCCATGCGGATGAAGCACAAAATTCTCAGGTGCGTACAAAATGTAATTACTCCCC
TCCTGCACAGGCAGCAAAGCCCCGATCCCTCCAGGTACACATACAAAGCCTCAGCGT
CCATAGCTTACCGAGCAGCAGCACACAACAGGCGCAAGAGTCAGAGAAAGGCTGAGC
TCTAACCTGTCCACCCGCTCTCTGCTCAATATATAGCCCAGATCTACACTGACGTAAAG
GCCAAAGTCTAAAAATACCCGCCAAATAATCACACACGCCCAGCACACGCCCAGAAAC
CGGTGACACACTCAAAAAAATACGCGCACTTCTCAAACGCCCAAAACTGCCGTCATT
TCCGGGTTCCACGCTACGTCATCAAAACACGACTTTCAAATTCCGTGACCGTTAAAA
ACGTCACCCGCCCGCCCTAACGGTCGCCGTCTCTCAGCCAATCAGCGCCCCGCATC
CCCAAATTCAAACACCTCATTTGCATATTAACGCGCACAAAAAGTTTGAGGTATATTAT
TGATGATG

10

20

30

40

50

【0535】**参考文献**

1. Desrichard, A., Snyder, A. & Chan, T. A. Cancer Neoantigens and Applications for Immunotherapy. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. (2015). doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-3175
2. Schumacher, T. N. & Schreiber, R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy. Science 348, 69-74 (2015).
3. Gubin, M. M., Artyomov, M. N., Mardis, E. R. & Schreiber, R. D. Tumor neoantigen s: building a framework for personalized cancer immunotherapy. J. Clin. Invest. 125, 3413-3421 (2015).
4. Rizvi, N. A. et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. Science 348, 124-128 (2015).
5. Snyder, A. et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. N. Engl. J. Med. 371, 2189-2199 (2014).
6. Carreno, B. M. et al. Cancer immunotherapy. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells. Science 348, 803-808 (2015).
7. Tran, E. et al. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. Science

e 344, 641-645 (2014).

8. Hachohen, N. & Wu, C. J. -Y. United States Patent Application: 20110293637 - COMPOSITIONS AND METHODS OF IDENTIFYING TUMOR SPECIFIC NEOANTIGENS. (A1). at <<http://appft1.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=20110293637>>. PGNR. >

9. Lundegaard, C., Hoof, I., Lund, O. & Nielsen, M. State of the art and challenges in sequence based T-cell epitope prediction. Immunome Res. 6 Suppl 2, S3 (2010). 10

10. Yadav, M. et al. Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. Nature 515, 572-576 (2014).

11. Bassani-Sternberg, M., Pletscher-Frankild, S., Jensen, L. J. & Mann, M. Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation. Mol. Cell. Proteomics MCP 14, 658-673 (2015). 20

12. Van Allen, E. M. et al. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. Science 350, 207-211 (2015).

13. Yoshida, K. & Ogawa, S. Splicing factor mutations and cancer. Wiley Interdiscip. Rev. RNA 5, 445-459 (2014). 30

14. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. Nature 511, 543-550 (2014).

15. Rajasagi, M. et al. Systematic identification of personal tumor-specific neoantigens in chronic lymphocytic leukemia. Blood 124, 453-462 (2014).

16. Downing, S. R. et al. United States Patent Application: 0120208706 - OPTIMIZATION OF MULTIGENE ANALYSIS OF TUMOR SAMPLES. (A1). at <<http://appft1.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=20120208706>>. PGNR. > 40

17. Target Capture for NextGen Sequencing - IDT. at <<http://www.idtdna.com/pages/products/nextgen/target-capture>>

18. Shukla, S. A. et al. Comprehensive an 50

- alysis of cancer-associated somatic mutations in class I HLA genes. *Nat. Biotechnol.* 33, 1152–1158 (2015).
19. Cieslik, M. et al. The use of exome capture RNA-seq for highly degraded RNA with application to clinical cancer sequencing. *Genome Res.* 25, 1372–1381 (2015).
20. Bodini, M. et al. The hidden genomic landscape of acute myeloid leukemia: subclonal structure revealed by undetected mutations. *Blood* 125, 600–605 (2015). 10
21. Saunders, C. T. et al. Strelka: accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 28, 1811–1817 (2012).
22. Cibulskis, K. et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat. Biotechnol.* 31, 213–219 (2013).
23. Wilkerson, M. D. et al. Integrated RNA and DNA sequencing improves mutation detection in low purity tumors. *Nucleic Acids Res.* 42, e107 (2014). 20
24. Mose, L. E., Wilkerson, M. D., Hayes, D. N., Perou, C. M. & Parker, J. S. ABRA: improved coding indel detection via assembly-based realignment. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 30, 2813–2815 (2014).
25. Ye, K., Schulz, M. H., Long, Q., Apweiler, R. & Ning, Z. Pindel: a pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium sized insertions from paired-end short reads. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 25, 2865–2871 (2009). 30
26. Lam, H. Y. K. et al. Nucleotide-resolution analysis of structural variants using BreakSeq and a breakpoint library. *Nat. Biotechnol.* 28, 47–55 (2010).
27. Frampton, G. M. et al. Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* 31, 1023–1031 (2013). 40
28. Boegel, S. et al. HLA typing from RNA-Seq sequence reads. *Genome Med.* 4, 102 (2012).
29. Liu, C. et al. ATHLATES: accurate typing of human leukocyte antigen through exome sequencing. *Nucleic Acids Res.* 41, e142 (2013). 50

30. Mayor, N. P. et al. HLA Typing for the Next Generation. *PloS One* 10, e0127153 (2015).
31. Roy, C. K., Olson, S., Graveley, B. R., Zamore, P. D. & Moore, M. J. Assessing long-distance RNA sequence connectivity via RNA-templated DNA-DNA ligation. *eLife* 4, (2015).
32. Song, L. & Florea, L. CLASS: constrained transcript assembly of RNA-seq reads. *BMC Bioinformatics* 14 Suppl 5, S14 (2013). 10
33. Maretty, L., Sibbesen, J. A. & Krogh, A. Bayesian transcriptome assembly. *Genome Biol.* 15, 501 (2014).
34. Pertea, M. et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat. Biotechnol.* 33, 290-295 (2015).
35. Roberts, A., Pimentel, H., Trapnell, C. & Pachter, L. Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA-Seq. *Bioinforma. Oxf. Engl.* (2011). doi:10.1093/bioinformatics/btr355 20
36. Vitting-Seerup, K., Porse, B. T., Sandelin, A. & Waage, J. splicerR: an R package for classification of alternative splicing and prediction of coding potential from RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* 15, 81 (2014).
37. Rivas, M. A. et al. Human genomics. Effect of predicted protein-truncating genetic variants on the human transcriptome. *Science* 348, 666-669 (2015). 30
38. Skelly, D. A., Johansson, M., Madeoy, J., Wakefield, J. & Akey, J. M. A powerful and flexible statistical framework for testing hypotheses of allele-specific gene expression from RNA-seq data. *Genome Res.* 21, 1728-1737 (2011).
39. Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 31, 166-169 (2015). 40
40. Furney, S. J. et al. SF3B1 mutations are associated with alternative splicing in uveal melanoma. *Cancer Discov.* (2013). doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0330
41. Zhou, Q. et al. A chemical genetics approach for the functional assessment of novel cancer genes. *Cancer Res.* (2015). 50

doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2930

42. Maguire, S. L. et al. SF3B1 mutations constitute a novel therapeutic target in breast cancer. *J. Pathol.* 235, 571-580 (2015).

43. Carithers, L. J. et al. A Novel Approach to High-Quality Postmortem Tissue Procurement: The GTEx Project. *Biopreservation Biobanking* 13, 311-319 (2015).

44. Xu, G. et al. RNA CoMPASS: a dual approach for pathogen and host transcriptome analysis of RNA-seq datasets. *PloS One* 9, e89445 (2014). 10

45. Andreatta, M. & Nielsen, M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. *Bioinforma. Oxf. Engl.* (2015). doi:10.1093/bioinformatics/btv639

46. Jorgensen, K. W., Rasmussen, M., Buus, S. & Nielsen, M. NetMHCstab - predicting stability of peptide-MHC-I complexes; impacts for cytotoxic T lymphocyte epitope discovery. *Immunology* 141, 18-26 (2014). 20

47. Larsen, M. V. et al. An integrative approach to CTL epitope prediction: a combined algorithm integrating MHC class I binding, TAP transport efficiency, and proteasomal cleavage predictions. *Eur. J. Immunol.* 35, 2295-2303 (2005).

48. Nielsen, M., Lundegaard, C., Lund, O. & Kesmir, C. The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage. *Immunogenetics* 57, 33-41 (2005). 30

49. Boisvert, F.-M. et al. A Quantitative Spatial Proteomics Analysis of Proteome Turnover in Human Cells. *Mol. Cell. Proteomics* 11, M111.011429-M111.011429 (2012).

50. Duan, F. et al. Genomic and bioinformatic profiling of mutational neoepitopes reveals new rules to predict anticancer immunogenicity. *J. Exp. Med.* 211, 2231-2248 (2014). 40

51. Janeway's Immunobiology: 9780815345312: Medicine & Health Science Books @ Amazon.com. at <<http://www.amazon.com/Janeways-Immunobiology-Kenneth-Murphy/dp/0815345313>>

52. Calis, J. J. A. et al. Properties of M 50

- HC Class I Presented Peptides That Enhance Immunogenicity. *PLoS Comput. Biol.* 9, e1003266 (2013).
53. Zhang, J. et al. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science* 346, 256–259 (2014)
54. Walter, M. J. et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 366, 1090–1098 (2012). 10
55. Hunt DF, Henderson RA, Shabanowitz J, Sakaguchi K, Michel H, Sevilir N, Cox AL, Appella E, Engelhard VH. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 1992. 255: 1261–1263.
56. Zarling AL, Polefrone JM, Evans AM, Mikesch LM, Shabanowitz J, Lewis ST, Engelhard VH, Hunt DF. Identification of class I MHC-associated phosphopeptides as targets for cancer immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Oct 3;103(40):14889–94. 20
57. Bassani-Sternberg M, Pletscher-Frankild S, Jensen LJ, Mann M. Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation. *Mol Cell Proteomics.* 2015 Mar; 14(3):658–73. doi: 10.1074/mcp.M114.042812. 30
58. Abelin JG, Trantham PD, Penny SA, Patterson AM, Ward ST, Hildebrand WH, Cobbold M, Bai DL, Shabanowitz J, Hunt DF. Complementary IMAC enrichment methods for HLA-associated phosphopeptide identification by mass spectrometry. *Nat Protoc.* 2015 Sep; 10(9):1308–18. doi: 10.1038/nprot.2015.086. Epub 2015 Aug 6
59. Barnstable CJ, Bodmer WF, Brown G, Galfre G, Milstein C, Williams AF, Ziegler A. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens—new tools for genetic analysis. *Cell.* 1978 May;14(1):9–20. 40
60. Goldman JM, Hibbin J, Kearney L, Orchard K, Th'ng KH. HLA-DR monoclonal antibodies inhibit the proliferation of normal and chronic granulocytic leukaemia myeloid progenitor cells. *Br J Haematol.* 1982 50

Nov ; 52 (3) : 411-20.

61. Eng JK, Jahan TA, Hoopmann MR. Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool. *Proteomics*. 2013 Jan; 13 (1) : 22-4. doi: 10.1002/pmic.201200439. Epub 2012 Dec 4.

62. Eng JK, Hoopmann MR, Jahan TA, Egertson JD, Noble WS, MacCoss MJ. A deeper look into Comet—implementation and features. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2015 Nov; 26 (11) : 1865-74. doi: 10.1007/s13361-015-1179-x. Epub 2015 Jun 27.

63. Lukas Kall, Jesse Canterbury, Jason Weston, William Stafford Noble and Michael J. MacCoss. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nature Methods* 4:923 - 925, November 2007

64. Lukas Kall, John D. Storey, Michael J. MacCoss and William Stafford Noble. Assigning confidence measures to peptides identified by tandem mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 7 (1) : 29-34, January 2008

65. Lukas Kall, John D. Storey and William Stafford Noble. Nonparametric estimation of posterior error probabilities associated with peptides identified by tandem mass spectrometry. *Bioinformatics*, 24 (16) : i42-i48, August 2008

66. Kinney RM, BJ Johnson, VL Brown, DW Trent. Nucleotide Sequence of the 26 S mRNA of the Virulent Trinidad Donkey Strain of Venezuelan Equine Encephalitis Virus and Deduced Sequence of the Encoded Structural Proteins. *Virology* 152 (2), 400-413. 1986 Jul 30.

67. Jill E Slansky, Frederique M Rattis, Lisa F Boyd, Tarek Fahmy, Elizabeth M Jaffee, Jonathan P Schneck, David H Margulies, Drew M Pardoll. Enhanced Antigen-Specific Antitumor Immunity with Altered Peptide Ligands that Stabilize the MHC-Peptide-TCR Complex. *Immunity*, Volume 13, Issue 4, 1 October 2000, Pages 529-538.

68. A Y Huang, P H Gulden, A S Woods, M C Thomas, C D Tong, W Wang, V H Engelhard, G Pasternack, R Cotter, D Hunt, D M Pardoll, and E M Jaffee. The immunodominant major histocompatibility complex class I-r

10

20

30

40

50

restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 93 (18): 9730–9735, 1996 Sep 3.

69. JOHNSON, BARBARA J. B., RICHARD M. KINNEY, CRYSTLE L. KOST AND DENNIS W. TRENT. Molecular Determinants of Alphavirus Neurovirulence: Nucleotide and Deduced Protein Sequence Changes during Attenuation of Venezuelan Equine Encephalitis Virus. *J Gen Virol* 67:1951–1960, 1986.

10

70. Aarnoudse, C.A., Kruse, M., Konopitzky, R., Brouwenstijn, N., and Schrier, P.I. (2002). TCR reconstitution in Jurkat reporter cells facilitates the identification of novel tumor antigens by cDNA expression cloning. *Int J Cancer* 99, 7–13.

71. Alexander, J., Sidney, J., Southwood, S., Ruppert, J., Oseroff, C., Maewal, A., Snoke, K., Serra, H.M., Kubo, R.T., and Sette, A. (1994). Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. *Immunity* 1, 751–761.

20

72. Banu, N., Chia, A., Ho, Z.Z., Garcia, A.T., Paravasivam, K., Grotenbreg, G.M., Bertoletti, A., and Gehring, A.J. (2014). Building and optimizing a virus-specific T cell receptor library for targeted immunotherapy in viral infections. *Scientific Reports* 4, 4166.

30

73. Cornet, S., Miconnet, I., Menez, J., Lemonnier, F., and Kosmatopoulos, K. (2006). Optimal organization of a polypeptide-based candidate cancer vaccine composed of cryptic tumor peptides with enhanced immunogenicity. *Vaccine* 24, 2102–2109.

74. Depla, E., van der Aa, A., Livingston, B.D., Crimi, C., Allosery, K., de Brabandere, V., Krakover, J., Murthy, S., Huang, M., Power, S., et al. (2008). Rational design of a multiepitope vaccine encoding T-lymphocyte epitopes for treatment of chronic hepatitis B virus infections. *Journal of Virology* 82, 435–450.

40

75. Ishioka, G.Y., Fikes, J., Hermanson, G., Livingston, B., Crimi, C., Qin, M., del Guercio, M.F., Oseroff, C., Dahlberg, C., Alexander, J., et al. (1999). Utilization of MHC class I transgenic mice for

50

- development of minigene DNA vaccines encoding multiple HLA-restricted CTL epitopes. *J Immunol* 162, 3915-3925.
76. Janetzki, S., Price, L., Schroeder, H., Britten, C.M., Welters, M.J.P., and Hoos, A. (2015). Guidelines for the automated evaluation of Elispot assays. *Nat Protoc* 10, 1098-1115.
77. Lyons, G.E., Moore, T., Brasic, N., Li, M., Roszkowski, J.J., and Nishimura, M.I. (2006). Influence of human CD8 on antigen recognition by T-cell receptor-transduced cells. *Cancer Res* 66, 11455-11461. 10
78. Nagai, K., Ochi, T., Fujiwara, H., An, J., Shirakata, T., Mineno, J., Kuzushima, K., Shiku, H., Melenhorst, J.J., Gostick, E., et al. (2012). Aurora kinase A-specific T-cell receptor gene transfer re-directs T lymphocytes to display effective antileukemia reactivity. *Blood* 119, 368-376. 20
79. Panina-Bordignon, P., Tan, A., Termijtelen, A., Demotz, S., Corradin, G., and Lanzavecchia, A. (1989). Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur J Immunol* 19, 2237-2242.
80. Vitiello, A., Marchesini, D., Furze, J., Sherman, L.A., and Chesnut, R.W. (1991). Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex. *J Exp Med* 173, 1007-1015. 30
81. Yachi, P.P., Ampudia, J., Zal, T., and Gascoigne, N.R.J. (2006). Altered peptide ligands induce delayed CD8-T cell receptor interaction—a role for CD8 in distinguishing antigen quality. *Immunity* 25, 203-211. 40
82. Pushko P, Parker M, Ludwig GV, Davis NL, Johnston RE, Smith JF. Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens in vivo. *Virology*. 1997 Dec 22;239(2):389-401.
83. Strauss, JH and E G Strauss. The alph 50

- aviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev.* 1994 Sep; 58 (3) : 491–562.
84. Rheme C, Ehrengreber MU, Grandgirard D. Alphaviral cytotoxicity and its implication in vector development. *Exp Physiol.* 2005 Jan; 90 (1) : 45–52. Epub 2004 Nov 12.
85. Riley, Michael K. II, and Wilfred Vermerris. Recent Advances in Nanomaterials for Gene Delivery— A Review. *Nanomaterials* 2017, 7 (5), 94. 10
86. Frolov I, Hardy R, Rice CM. Cis-acting RNA elements at the 5' end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis. *RNA.* 2001 Nov; 7 (11) : 1638–51.
87. Jose J, Snyder JE, Kuhn RJ. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol.* 2009 Sep; 4 (7) : 837–56. 20
88. Bo Li and C. olin N. Dewey. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12:323, August 2011
89. Hillary Pearson, Tariq Daouda, Diana Paola Granados, Chantal Durette, Eric Bonneil, Mathieu Courcelles, Anja Rodenbrock, Jean-Philippe Laverdure, Caroline Cote, Sylvie Mader, Sebastien Lemieux, Pierre Thibault, and Claude Perreault. MHC class I-associated peptides derive from selective regions of the human genome. *The Journal of Clinical Investigation*, 2016, 90.
90. Juliane Liepe, Fabio Marino, John Sidney, Anita Jeko, Daniel E. Bunting, Alessandro Sette, Peter M. Kloetzel, Michael P. H. Stumpf, Albert J. R. Heck, Michele Mishto. A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides. *Science*, 21, October 2016. 30
91. Mommen GP., Marino, F., Meiring HD., Poelen, MC., van Gaans-van den Brink, JA., Mohammed S., Heck AJ., and van Els CA. Sampling From the Proteome to the Human Leukocyte Antigen-DR (HLA-DR) Ligandome Proceeds Via High Specificity. *Mol Cell Proteomics* 15 (4) : 1412–1423, April 2016. 40
92. Sebastian Kreiter, Mathias Vormehr, Niels van de Roemer, Mustafa Diken, Marti 50

- n Lower, Jan Diekmann, Sebastian Boegel, Barbara Schrors, Fulvia Vascotto, John C. Castle, Arbel D. Tadmor, Stephen P. Schoenberger, Christoph Huber, Ozlem Tureci, and Ugur Sahin. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* 520, 692–696, April 2015.
93. Tran E., Turcotte S., Gros A., Robbins P. F., Lu Y. C., Dudley M. E., Wunderlich J. R., Somerville R. P., Hogan K., Hinrichs C. S., Parkhurst M. R., Yang J. C., Rosenberg S. A. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4⁺ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science* 344 (6184) 641–645, May 2014. 10
94. Andreatta M., Karosiene E., Rasmussen M., Stryhn A., Buus S., Nielsen M. Accurate pan-specific prediction of peptide-MHC class II binding affinity with improved binding core identification. *Immunogenetics* 67 (11–12) 641–650, November 2015. 20
95. Nielsen, M., Lund, O. NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. *BMC Bioinformatics* 10:296, September 2009.
96. Nielsen, M., Lundegaard, C., Lund, O. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. *BMC Bioinformatics* 8:238, July 2007. 30
97. Zhang, J., et al. PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. *Molecular & Cellular Proteomics*. 11 (4):1–8. 1/2/2012.
98. Jensen, Kamilla Kjaergaard, et al. “Improved Methods for Predicting Peptide Binding Affinity to MHC Class II Molecules.” *Immunology*, 2018, doi:10.1111/imm.12889. 40
99. Carter, S. L., Cibulskis, K., Helman, E., McKenna, A., Shen, H., Zack, T., Laird, P. W., Onofrio, R. C., Winckler, W., Weir, B. A., et al. (2012). Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. *Nat. Biotechnol.* 30, 413–421
100. McGranahan, N., Rosenthal, R., Hiley, C. T., Rowan, A. J., Watkins, T. B. K., Wilson, G. A., Birkbak, N. J., Veeriah, S., 50

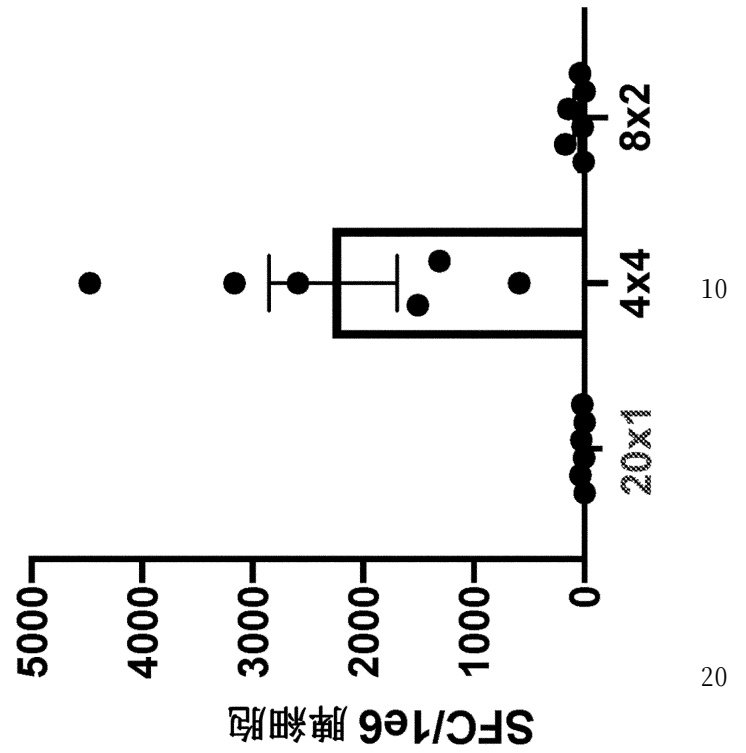
- Van Loo, P., Herrero, J., et al. (2017). Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution. *Cell* 171, 1259–1271. e11.
101. Shukla, S. A., Rooney, M. S., Rajasagi, M., Tiao, G., Dixon, P. M., Lawrence, M. S., Stevens, J., Lane, W. J., Dellagatta, J. L., Steelman, S., et al. (2015). Comprehensive analysis of cancer-associated somatic mutations in class I HLA genes. *Nat. Biotechnol.* 33, 1152–1158. 10
102. Van Loo, P., Nordgard, S. H., Lingjaerde, O. C., Russnes, H. G., Rye, I. H., Sun, W., Weigman, V. J., Marynen, P., Zetterberg, A., Naume, B., et al. (2010). Allele-specific copy number analysis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16910–16915.
103. Van Loo, P., Nordgard, S. H., Lingjaerde, O. C., Russnes, H. G., Rye, I. H., Sun, W., Weigman, V. J., Marynen, P., Zetterberg, A., Naume, B., et al. (2010). Allele-specific copy number analysis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16910–16915. 20
104. MacLean, B., Tomazela, D. M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G. L., Frewen, B., Kern, R., Tabb, D. L., Liebler, D. C., MacCoss, M. J., (2010). Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* 26 (7), 966–8. 30

【図面】

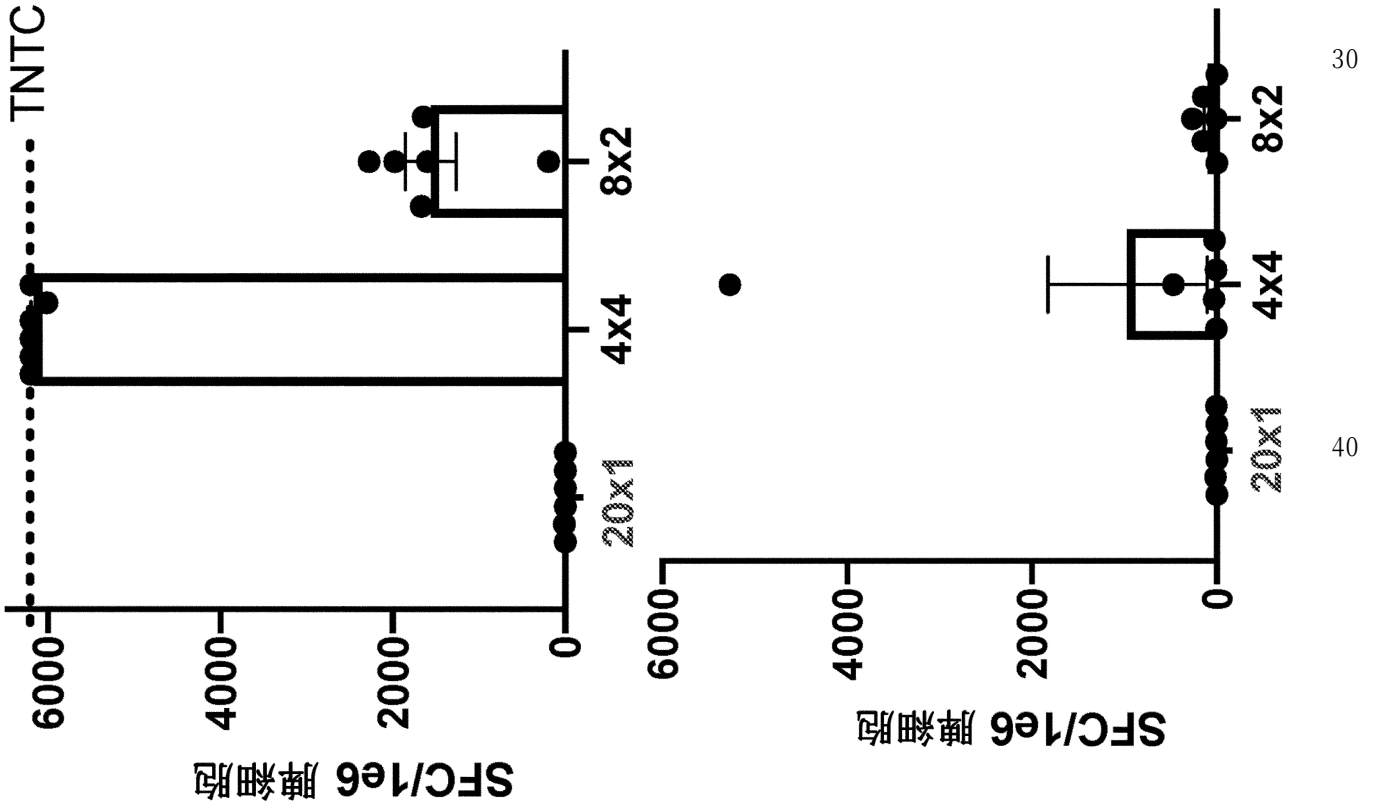
【図 1 A】

KRAS 1x (20x1):	1	2	3	4	5	6	G12D	8	9	10	11	12	G12V	G36H	17	G12V	19	G12D
KRAS 2x (8x2):	G12D	G36H	3	4	G12D	6	G12V	8	G12V	8	3	G36H	G12D	4	G12D	6		
KRAS 4x (4x4):	G12D	G12D	G36H	G12D	G12V	G12D	G12D	G36H	G12D	G12D	G36H	G12D	G12V	G36H	G12V	G12V	G12D	G12D

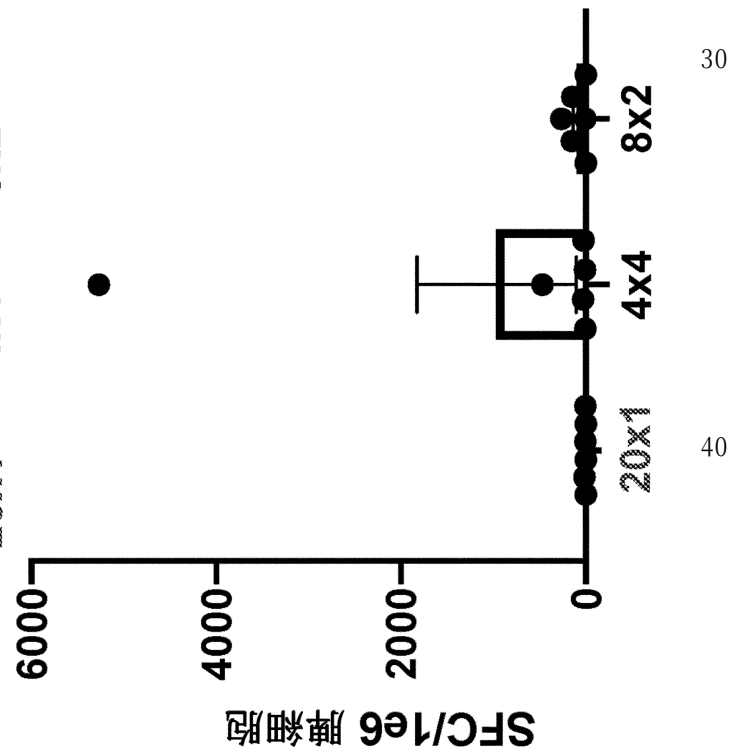
【図 1 B】



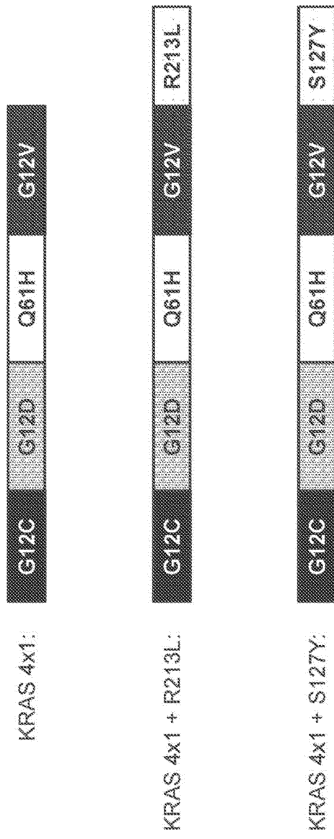
【図 1 C】



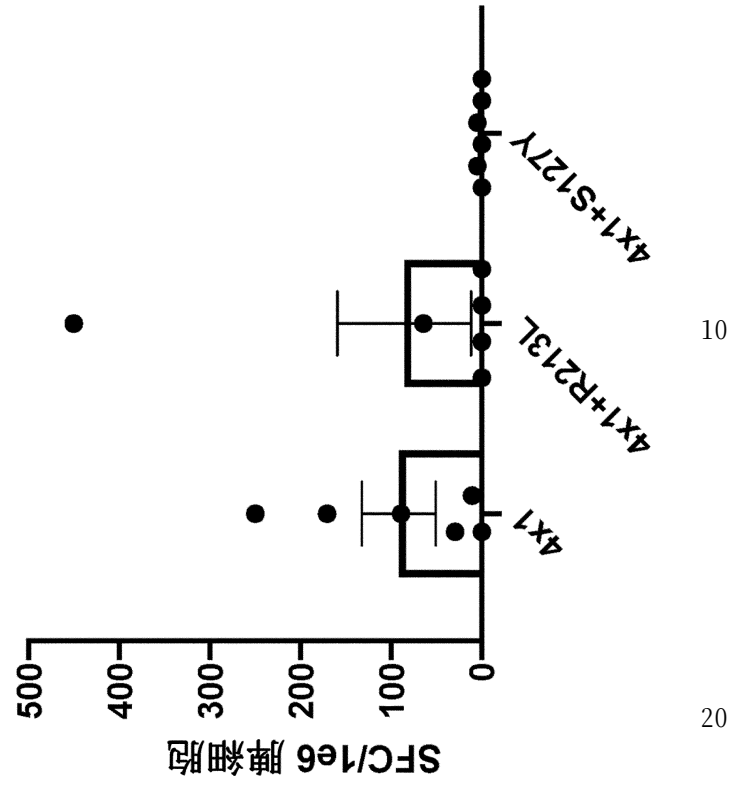
【図 1 D】



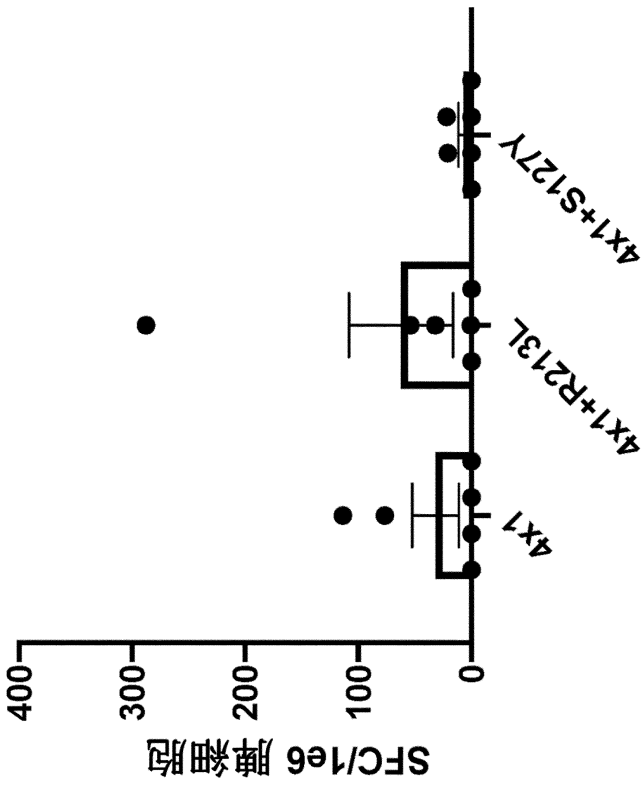
【図 2 A】



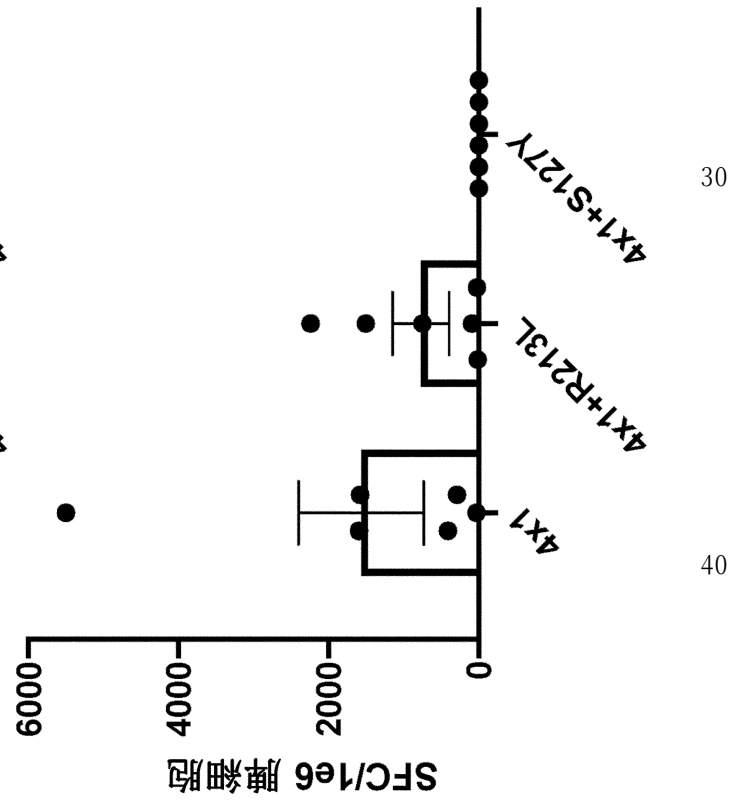
【図 2 B】



【図 2 C】



【図 2 D】



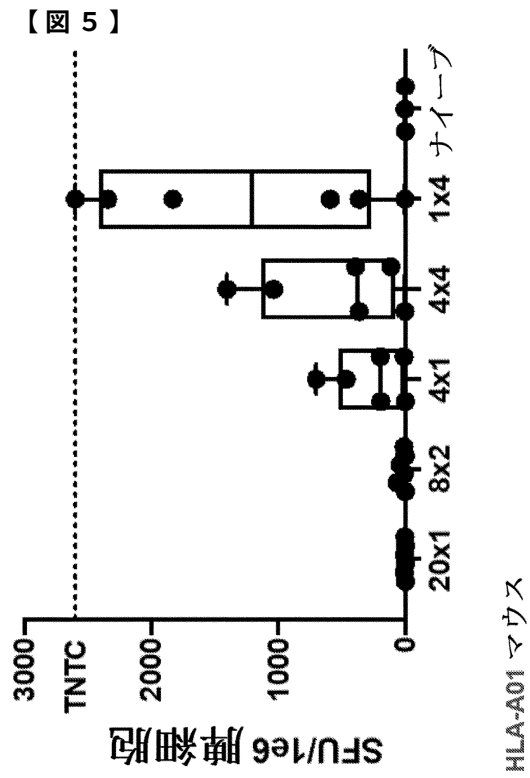
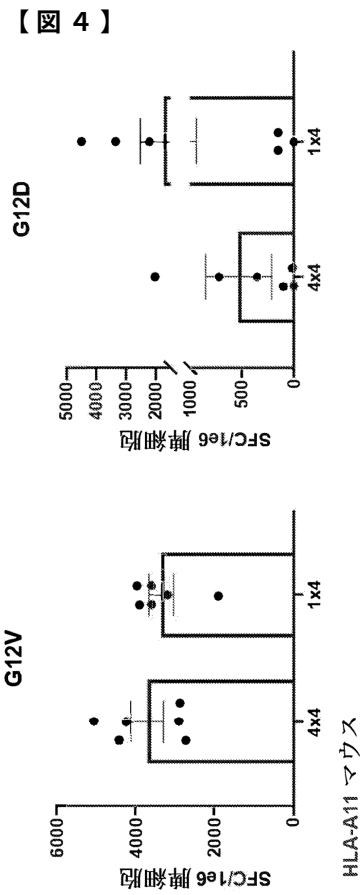
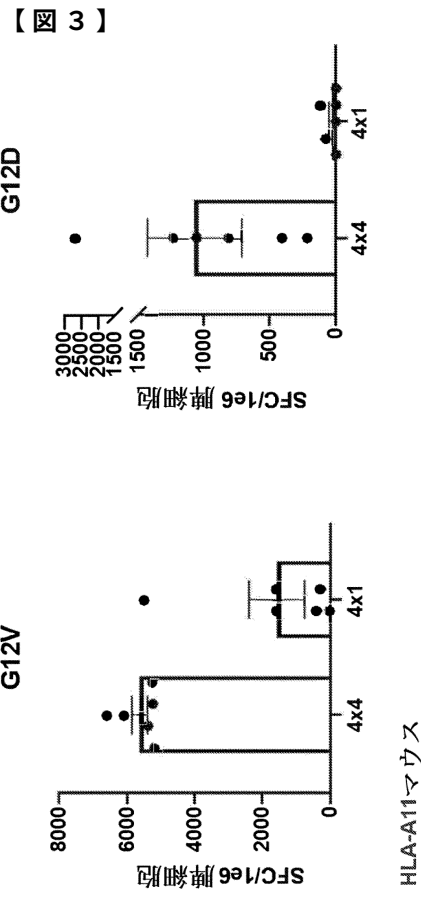
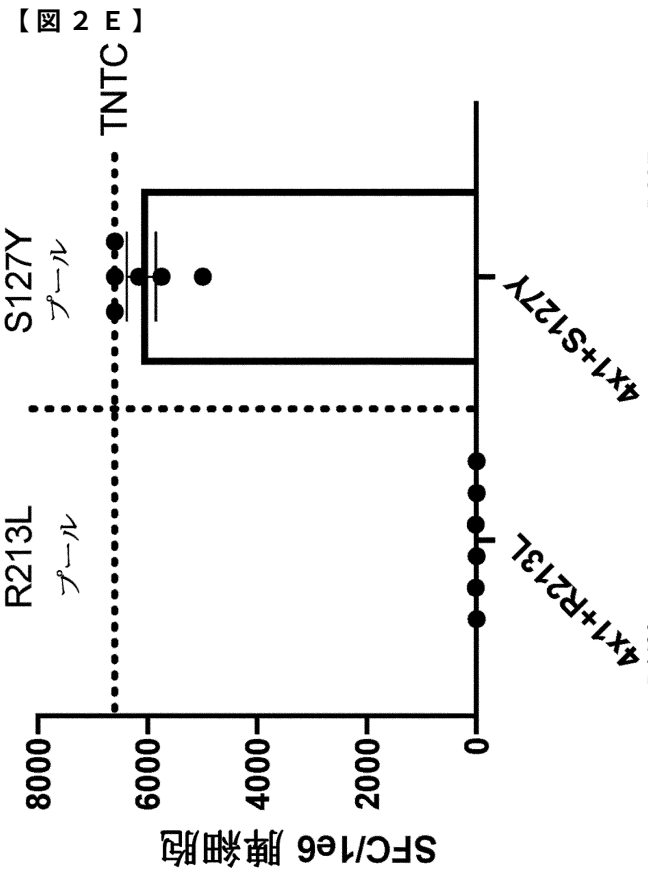
10

20

30

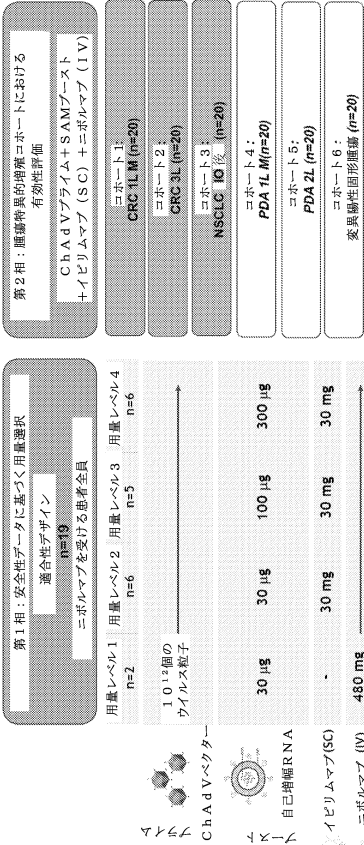
40

50

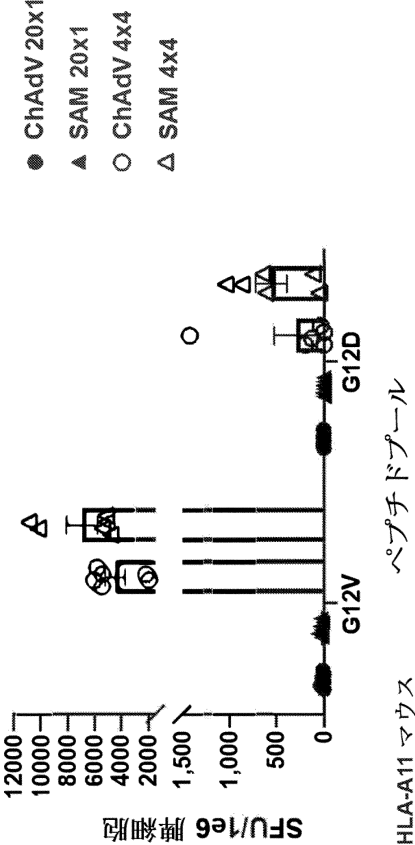


S L A T E : さ ら な る 調 査 の 可 能 性 が あ る 第 2 相 コ ホ ー ト で
現 在 調 査 さ れ て い る バ ー ジ ョ ン 2

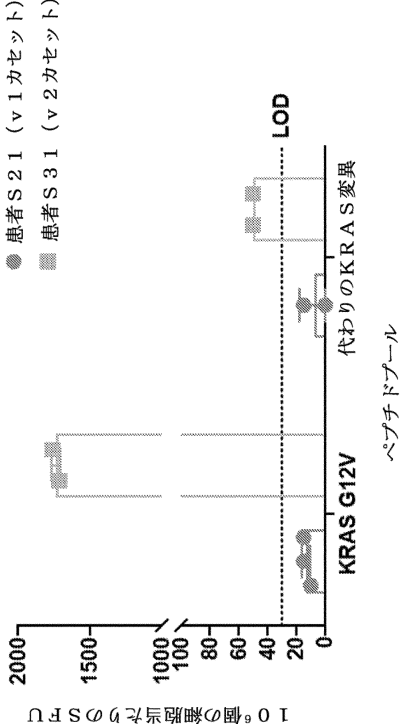
【 図 8 】



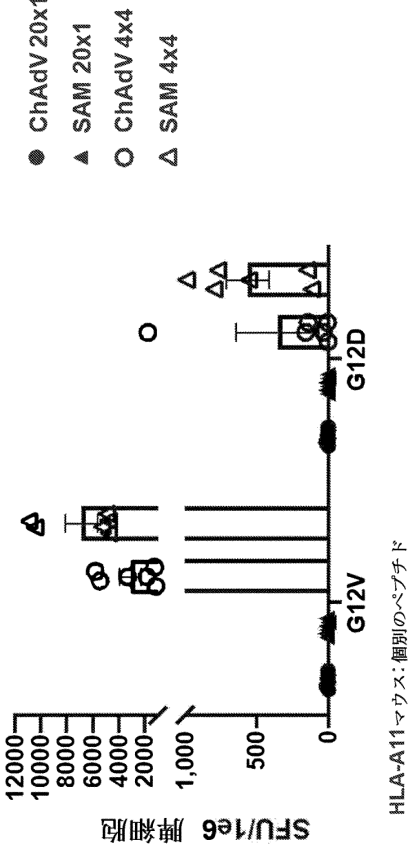
【 図 6 】



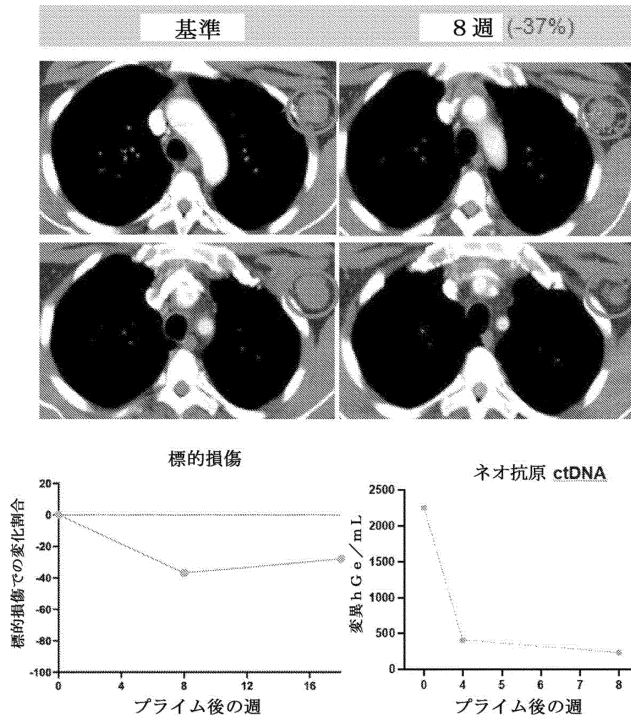
【 図 9 】



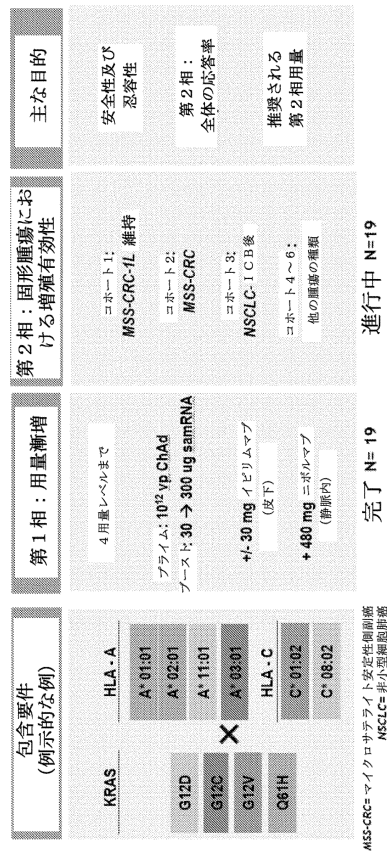
【 図 7 】



【図 10】



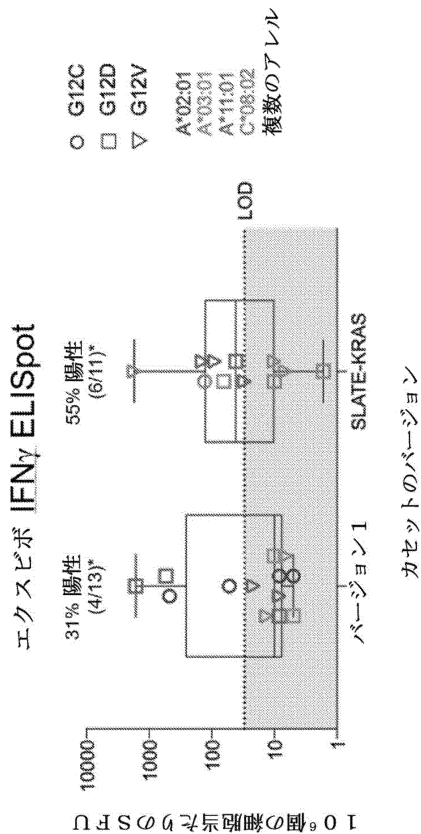
【図 11】



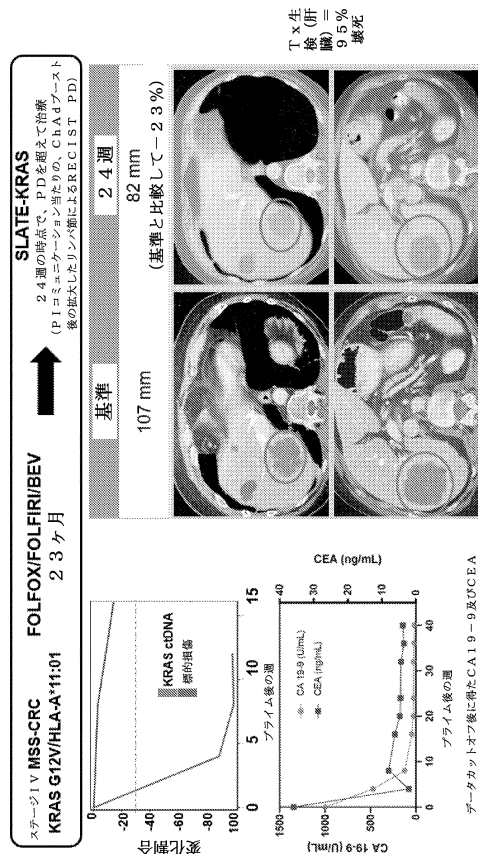
10

20

【図 12】



【図 13】

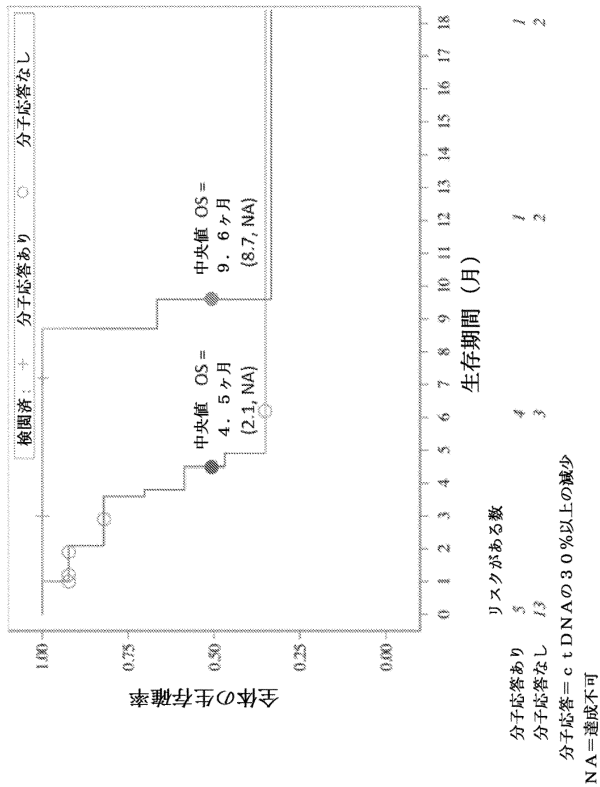


30

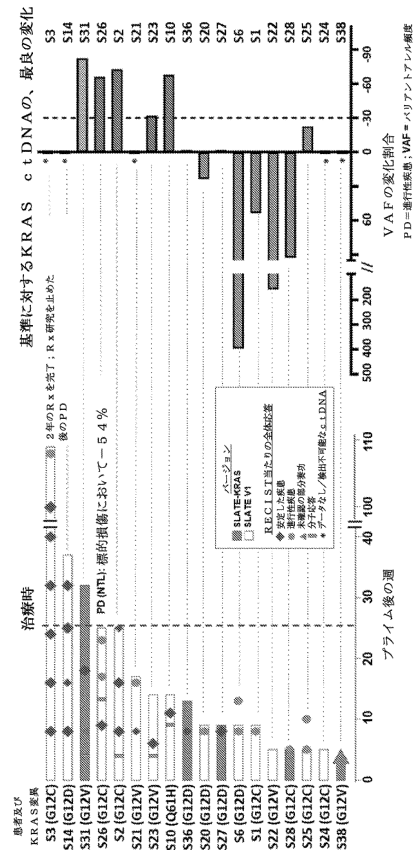
40

50

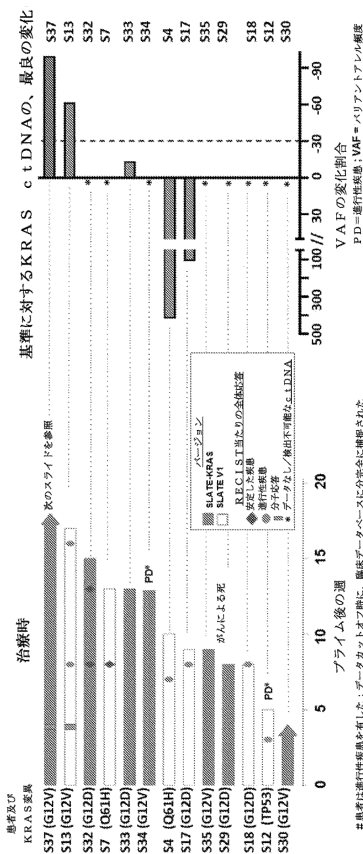
【図 14】



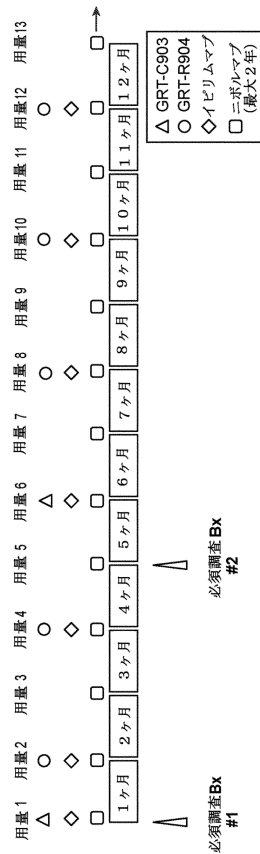
【図 15】



【図 16】



【圖 17】



【手続補正書】

【提出日】令和6年8月5日(2024.8.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

疾患を有する対象を治療するための方法であって、前記疾患が、(1)KRAS関連MHCクラスIネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2)結腸直腸癌(CRC)、(3)非小細胞肺癌(NSCLC)、及び／または(4)膵管腺癌(PDA)を含むがんであり、前記方法が、前記対象に、抗原ベースワクチンを前記対象に投与することを含み、前記抗原ベースワクチンが、抗原コードカセット、または前記カセットによってコードされたポリペプチド配列を含み、前記抗原コードカセットが、5'から3'方向に、次式によって記述される少なくとも1つの抗原コード核酸配列を含む、前記方法：

$(E_x - (E^N)_n)_y)_z$

〔式中、

Eは、異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、
nは、別個の異なるエピトープコード核酸配列の数を表しかつ、0を含む任意の整数であり、

E^N は、それぞれの対応するnで前記別個の異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

zの各繰り返しについて：各nについて $x = 0$ または 1 、 $y = 0$ または 1 であり、xまたはyの少なくとも一方は1であり、

$z = 2$ 以上であり、前記抗原コード核酸配列は、E、所与の E^N 、またはこれらの組み合わせの少なくとも1つの2回の繰り返しを含み、

前記少なくとも2回の繰り返しを含む前記異なるエピトープコード核酸配列のうちの少なくとも1つは、前記KRAS関連MHCクラスIネオエピトープをコードする〕。

【請求項2】

疾患を有する対象を治療するための方法であって、前記疾患が、(1)KRAS関連MHCクラスIネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2)結腸直腸癌(CRC)、(3)非小細胞肺癌(NSCLC)、及び／または(4)膵管腺癌(PDA)を含むがんであり、前記方法が、前記対象に、抗原ベースワクチンを前記対象に投与することを含み、前記抗原ベースワクチンが抗原発現系を含み、前記抗原発現系が1つ以上のベクターを含み、前記1つ以上のベクターが、

(a)ベクター骨格であって、

(i)少なくとも1つのプロモーターヌクレオチド配列と、

(ii)任意で、少なくとも1つのポリアデニル化(ポリ(A))配列と

を含む、前記ベクター骨格と、

(b)カセットであって、

(i)少なくとも1つの抗原コード核酸配列であって、

(I)前記KRAS関連MHCクラスIネオエピトープをコードするエピトープコード核酸配列

を含み、前記エピトープコード核酸配列のそれぞれが、

(A)任意で、5'リンカー配列と、

(B)任意で、3'リンカー配列と

を含む、前記少なくとも1つの抗原コード核酸配列と、

(ii)任意で、前記抗原コード核酸配列に機能的に連結された第2のプロモーターヌクレオチド配列と、

10

20

30

40

50

(i i i) 任意で、少なくとも 1 つの M H C クラス I I エピトープコード核酸配列と

、
(i v) 任意で、G P G P G アミノ酸リンカー配列（配列番号 5 6）をコードする少なくとも 1 つの核酸配列と、

(v) 任意で、天然のポリ（A）配列または前記ベクター骨格に対して外因性のポリ（A）配列である少なくとも 1 つの第 2 のポリ（A）配列と

を含む、前記カセットと

を含み、

前記第 2 のプロモーターヌクレオチド配列が存在しない場合、前記抗原コード核酸配列が前記少なくとも 1 つのプロモーターヌクレオチド配列と機能的に連結され、

前記少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列が、前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする前記エピトープコード核酸配列の少なくとも 2 回の繰り返しを含む、前記治療方法。

【請求項 3】

前記エピトープコード核酸配列が、がんを有する前記対象の腫瘍、または、感染した前記対象の細胞もしくは試料に由来する、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4】

前記エピトープコード核酸配列が、がんを有する前記対象の腫瘍、ならびに、感染した前記対象の細胞および試料に由来しない、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

がんを有する対象における免疫応答を刺激するための方法であって、前記がんが、（1）K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを発現する固形腫瘍、（2）結腸直腸癌（C R C）、（3）非小細胞肺癌（N S C L C）、及び／または（4）膵管腺癌（P D A）を含み、前記方法が、前記対象に、抗原ベースワクチンを前記対象に投与することを含み、前記抗原ベースワクチンが、抗原コードカセット、または前記カセットによってコードされたポリペプチド配列を含み、前記抗原コードカセットが、5' から 3' 方向に、次式によって記述される少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列を含む、前記方法：

$(E_x - (E^N)_n)_y)_z$

【式中、

E は、異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

n は、別個の異なるエピトープコード核酸配列の数を表しかつ、0 を含む任意の整数であり、

E^N は、それぞれの対応する n で前記別個の異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、

z の各繰り返しについて：各 n について $x = 0$ または 1、 $y = 0$ または 1 であり、x または y の少なくとも一方は 1 であり、

$z = 2$ 以上であり、前記抗原コード核酸配列は、E、所与の E^N 、またはこれらの組み合わせの少なくとも 1 つの 2 回の繰り返しを含み、

前記少なくとも 2 回の繰り返しを含む前記異なるエピトープコード核酸配列のうちの少なくとも 1 つは、前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする】。

【請求項 6】

がんを有する対象における免疫応答を刺激するための方法であって、前記がんが、（1）K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを発現する固形腫瘍、（2）結腸直腸癌（C R C）、（3）非小細胞肺癌（N S C L C）、及び／または（4）膵管腺癌（P D A）を含み、前記方法が、前記対象に、抗原ベースワクチンを前記対象に投与することを含み、前記抗原ベースワクチンが抗原発現系を含み、前記抗原発現系が 1 つ以上のベクターを含み、

前記 1 つ以上のベクターが、

（a）ベクター骨格であって、

（i）少なくとも 1 つのプロモーターヌクレオチド配列と、

(i i) 任意で、少なくとも 1 つのポリアデニル化 (ポリ (A)) 配列とを含む、前記ベクター骨格と、

(b) カセットであって、

(i) 少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列であって、

(I) 前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードするエピトープコード核酸配列

を含み、前記エピトープコード核酸配列のそれぞれが、

(A) 任意で、5'リンカー配列と、

(B) 任意で、3'リンカー配列と

を含む、前記少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列と、

10

(i i) 任意で、前記抗原コード核酸配列に機能的に連結された第 2 のプロモーターヌクレオチド配列と、

(i i i) 任意で、少なくとも 1 つの M H C クラス I I エピトープコード核酸配列と

(i v) 任意で、G P G P G アミノ酸リンカー配列 (配列番号 5 6) をコードする少なくとも 1 つの核酸配列と、

(v) 任意で、天然のポリ (A) 配列または前記ベクター骨格に対して外因性のポリ

(A) 配列である少なくとも 1 つの第 2 のポリ (A) 配列と

を含む、前記カセットと

20

を含み、

前記第 2 のプロモーターヌクレオチド配列が存在しない場合、前記抗原コード核酸配列が前記少なくとも 1 つのプロモーターヌクレオチド配列と機能的に連結され、

前記少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列が、前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする前記エピトープコード核酸配列の少なくとも 2 回の繰り返しを含む、前記方法。

【請求項 7】

前記対象が、前記少なくとも 1 つのエピトープ配列を提示すると予想されるかまたは提示することが知られている少なくとも 1 つの H L A アレルを発現し、任意で、提示されると予想されるかまたは提示されることが知られている前記少なくとも 1 つのエピトープ配列が、前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを含む、前記請求項のいずれか 1

30

【請求項 8】

前記対象が、前記少なくとも 1 つのエピトープ配列を提示すると予想されるかまたは提示することが知られている少なくとも 1 つの H L A アレルを発現し、前記少なくとも 1 つのエピトープ配列が、細胞の表面において M H C クラス I により提示されることが知られているかまたは疑われるエピトープを含み、任意で、提示されると予想されるかまたは提示されることが知られている前記少なくとも 1 つのエピトープ配列が、前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記細胞の表面が腫瘍細胞表面である、請求項 8 に記載の方法。

40

【請求項 10】

がんを有する対象において免疫応答を誘導するための方法であって、前記がんが、(1) K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2) 結腸直腸癌 (C R C)、(3) 非小細胞肺癌 (N S C L C)、及び／または (4) 膵管腺癌 (P D A) を含み、前記方法が、前記対象に、抗原ベースワクチンを前記対象に投与することを含み、前記抗原ベースワクチンが、抗原コードカセット、または前記カセットによってコードされたポリペプチド配列を含み、前記抗原コードカセットが、5'から3'方向に、次式によって記述される少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列を含む、前記方法：

(E_x - (E^N_n)_y)_z

【式中、

50

E は、異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、
 n は、別個の異なるエピトープコード核酸配列の数を表しかつ、0 を含む任意の整数であり、
 E^N は、それぞれの対応する n で前記別個の異なるエピトープコード核酸配列を含むヌクレオチド配列を表し、
 z の各繰り返しについて：各 n について $x = 0$ または 1、 $y = 0$ または 1 であり、x または y の少なくとも一方は 1 であり、
 $z = 2$ 以上であり、前記抗原コード核酸配列は、E、所与の E^N 、またはこれらの組み合わせの少なくとも 1 つの 2 回の繰り返しを含み、
 前記少なくとも 2 回の繰り返しを含む前記異なるエピトープコード核酸配列のうちの少なくとも 1 つは、前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする]。

10

【請求項 1 1】

がんを有する対象における免疫応答を誘導するための方法であって、前記がんが、(1) K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを発現する固形腫瘍、(2) 結腸直腸癌 (C R C)、(3) 非小細胞肺癌 (N S C L C)、及び／または (4) 膵管腺癌 (P D A) を含み、前記方法が、前記対象に、抗原ベースワクチンを前記対象に投与することを含み、前記抗原ベースワクチンが抗原発現系を含み、前記抗原発現系が 1 つ以上のベクターを含み、

前記 1 つ以上のベクターが、

20

(a) ベクター骨格であって、

(i) 少なくとも 1 つのプロモーターヌクレオチド配列と、

(i i) 任意で、少なくとも 1 つのポリアデニル化 (ポリ (A)) 配列とを含む、前記ベクター骨格と、

(b) カセットであって、

(i) 少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列であって、

(I) 前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードするエピトープコード核酸配列

を含み、前記エピトープコード核酸配列のそれぞれが、

(A) 任意で、5' リンカー配列と、

(B) 任意で、3' リンカー配列と

30

を含む、前記少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列と、

(i i) 任意で、前記抗原コード核酸配列に機能的に連結された第 2 のプロモーターヌクレオチド配列と、

(i i i) 任意で、少なくとも 1 つの M H C クラス I I エピトープコード核酸配列と、

、

(i v) 任意で、G P G P G アミノ酸リンカー配列 (配列番号 5 6) をコードする少なくとも 1 つの核酸配列と、

(v) 任意で、天然のポリ (A) 配列または前記ベクター骨格に対して外因性のポリ

(A) 配列である少なくとも 1 つの第 2 のポリ (A) 配列と

を含む、前記カセットと

40

を含み、

前記第 2 のプロモーターヌクレオチド配列が存在しない場合、前記抗原コード核酸配列が前記少なくとも 1 つのプロモーターヌクレオチド配列と機能的に連結され、

前記少なくとも 1 つの抗原コード核酸配列が、前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープをコードする前記エピトープコード核酸配列の少なくとも 2 回の繰り返しを含み、前記対象が、前記少なくとも 1 つの K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープを提示すると予想されるかまたは提示することが知られている少なくとも 1 つの H L A アレルを発現する、前記方法。

【請求項 1 2】

前記抗原ベースワクチンが、プライミング用量として投与される、前記請求項のいずれ

50

か 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記抗原ベースワクチンが、1 回以上のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記ブースター用量が、前記プライミング用量と異なる、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

a) 前記プライミング用量が、チンパンジーアデノウイルスベクターを含み、前記ブースター用量が、アルファウイルスベクターを含む；または

b) 前記プライミング用量が、アルファウイルスベクターを含み、前記ブースター用量が、チンパンジーアデノウイルスベクターを含む、請求項 14 に記載の方法。

10

【請求項 16】

前記ブースター用量が、前記プライミング用量と同じである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 1 回以上のブースター用量の注射部位が、前記プライミング用量の注射部位に可能な限り近い、請求項 13～16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記対象の HLA ハプロタイプを測定することまたは測定していたことをさらに含む、前記方法の請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 19】

前記抗原ベースワクチンが、筋肉内 (IM)、皮内 (ID)、皮下 (SC)、または静脈内 (IV) 投与される、前記方法の請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

前記抗原ベースワクチンが、筋肉内 (IM) 投与される、前記方法の請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

前記 IM 投与が、別々の注射部位に施される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記別々の注射部位が対向する三角筋内である、請求項 21 に記載の方法。

30

【請求項 23】

前記別々の注射部位が両側の殿筋または大腿直筋部位内である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記 KRAS 関連 MHC クラス I ネオエピトープまたは前記 KRAS 変異が、KRAS G12C 変異、KRAS G12V 変異、KRAS G12D 変異、または、KRAS Q61H 変異を含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

前記 KRAS 関連 MHC クラス I ネオエピトープまたは前記 KRAS 変異が、配列番号 75～82 に示されるアミノ酸配列のいずれか 1 つを含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 26】

前記抗原コードカセットが、配列番号 75～82 に示されるそれぞれのアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

前記抗原コードカセットが、配列番号 75～82 に示されるそれぞれのアミノ酸配列の 2 回以上の繰り返しを含み、任意で、配列番号 75～82 に示されるそれぞれのアミノ酸配列の 4 回の繰り返しを含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法または組成物。

【請求項 28】

前記 KRAS 関連 MHC クラス I ネオエピトープまたは前記 KRAS 変異が、配列番号

50

57、配列番号58、配列番号59、または配列番号60に示されるアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項29】

前記エピトープコード核酸配列が、異なるKRAS関連MHCクラスIネオエピトープまたは異なるKRAS変異を独立してコードする2個以上の異なるエピトープコード核酸配列を含む、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】

前記エピトープコード核酸配列のそれぞれが、異なるKRAS関連MHCクラスIネオエピトープまたは異なるKRAS変異を独立してコードする、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項31】

前記エピトープコード核酸配列が、KRAS G12C変異、KRAS G12V変異、KRAS G12D変異、またはKRAS Q61H変異を独立してコードする2個以上の異なるエピトープコード核酸配列を含む、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項32】

前記エピトープコード核酸配列が、KRAS G12C変異、KRAS G12V変異、及びKRAS G12D変異、及び任意でKRAS Q61H変異のそれぞれを独立してコードする、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項33】

前記抗原コード核酸配列が、配列番号64または配列番号65に示されるアミノ酸配列を含むペプチドをコードする、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項34】

前記カセットが、

(1) 前記カセット内でコードされ対象にて免疫応答を刺激することができる別のMHCクラスIエピトープと比較して、ワクチン組成物中で前記対象に投与されたときに5倍以上の免疫応答を刺激し、かつ／または

(2) 免疫優性のMHCクラスIエピトープの非存在下で他のMHCクラスIエピトープが投与された際の免疫応答と比較して、ワクチン組成物中で対象に投与されたときに、前記カセット内でコードされる別のMHCクラスIエピトープに対する免疫応答を低減し、任意で、前記免疫応答が、検出限界を下回って低減され、かつ／もしくは、前記免疫応答が、治療的に有効な応答ではない

前記免疫優性MHCクラスIエピトープ

をコードしない、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項35】

前記がんが、KRAS関連及び／またはNRAS関連MHCクラスIネオエピトープを発現する固形腫瘍を含む、前記方法の請求項のいずれか1項。

【請求項36】

前記KRAS関連及び／またはNRAS関連MHCクラスIネオエピトープが、KRAS__G12C、NRAS__G12C、KRAS__G12D、NRAS__G12D、KRAS__G12V、NRAS__G12V、KRAS__Q61H、及びNRAS__Q61Hからなる群から選択される変異を含む、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

前記がんが、結腸直腸癌(CRC)を含む、前記方法の請求項のいずれか1項。

【請求項38】

前記がんが、非小細胞肺癌(NSCLC)を含む、前記方法の請求項のいずれか1項。

【請求項39】

前記がんが、膵管腺癌(PDA)を含む、前記方法の請求項のいずれか1項。

【請求項40】

前記抗原ベースワクチン、または前記1回以上のブースター用量が、4週毎(Q4W)に投与される、前記方法の請求項のいずれか1項。

10

20

30

40

50

【請求項 4 1】

前記抗原ベースワクチン、または前記 1 回以上のブースター用量が、8 週毎（Q 8 W）に投与される、前記方法の請求項のいずれか 1 項。

【請求項 4 2】

前記抗原ベースワクチン、または前記 1 回以上のブースター用量が、1 ヶ月毎に投与される、前記方法の請求項のいずれか 1 項。

【請求項 4 3】

前記抗原ベースワクチン、または前記 1 回以上のブースター用量が、2 ヶ月毎に投与される、前記方法の請求項のいずれか 1 項。

【請求項 4 4】

前記方法が、
前記対象に、自己複製アルファウイルスベースの発現系を送達するための組成物を投与することと、
前記対象に、チンパンジーアデノウイルス（C h A d V）ベースの発現系を送達するための組成物を投与することと
を含み、

前記 C h A d V ベースの発現系を送達するための前記組成物がプライミング用量として投与され、前記自己複製アルファウイルスベースの発現系を送達するための前記組成物が、1 回以上のブースター用量として投与される、前記方法の請求項のいずれか 1 項。

【請求項 4 5】

2 回以上のブースター用量が投与される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 6】

1、2、3、4、5、6、7、または 8 回のブースター用量が投与される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記 C h A d V ベースの発現系が、ブースター用量としてさらに投与される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記 C h A d V ベースのブースター用量が、単回ブースター用量として投与されるのみである、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記 C h A d V ベースの発現系が、前記 C h A d V ベースの発現系の前記プライミング用量の 1 4 0 日後、または約 1 4 0 日後に、前記ブースター用量として投与される、請求項 4 7 または 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記 C h A d V ベースの発現系が、前記 C h A d V ベースの発現系の前記プライミング用量の 2 0 週後、または約 2 0 週後に、前記ブースター用量として投与される、請求項 4 7 または 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記 C h A d V ベースの発現系が、前記 C h A d V ベースの発現系の前記プライミング用量の 5 ヶ月後、または約 5 ヶ月後に、前記ブースター用量として投与される、請求項 4 7 または 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記 C h A d V ベースの発現系が、前記 C h A d V ベースの発現系の前記プライミング用量の 1 4 0 日後、または 1 4 0 日よりも後に、前記ブースター用量として投与される、請求項 4 7 または 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記 C h A d V ベースの発現系が、前記 C h A d V ベースの発現系の前記プライミング用量の 2 0 週後、または 2 0 週よりも後に、前記ブースター用量として投与される、請求項 4 7 または 4 8 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 4】

前記 C h A d V ベースの発現系が、前記 C h A d V ベースの発現系の前記プライミング用量の 5 ヶ月後、または 5 ヶ月よりも後に、前記ブースター用量として投与される、請求項 4 7 または 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記自己複製アルファウイルスベースの発現系が、少なくとも 2 回のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記自己複製アルファウイルスベースの発現系が、少なくとも 2 8 日の間隔を空けて、少なくとも 2 回以上のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 5 7】

前記自己複製アルファウイルスベースの発現系が、少なくとも 4 週（Q 4 W）の間隔を空けて、少なくとも 2 回以上のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記自己複製アルファウイルスベースの発現系が、少なくとも 1 ヶ月の間隔を空けて、少なくとも 2 回以上のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記自己複製アルファウイルスベースの発現系が、少なくとも 5 6 日の間隔を空けて、少なくとも 2 回以上のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 6 0】

前記自己複製アルファウイルスベースの発現系が、少なくとも 8 週（Q 8 W）の間隔を空けて、少なくとも 2 回以上のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記自己複製アルファウイルスベースの発現系が、少なくとも 2 ヶ月の間隔を空けて、少なくとも 2 回以上のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 6 2】

前記自己複製アルファウイルスベースの発現系が、前記 C h A d V ベースの発現系の前記プライミング用量の 2 8 及び 8 4 日後、または約 2 8 及び 8 4 日後に、少なくとも 2 回のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記自己複製アルファウイルスベースの発現系が、前記 C h A d V ベースの発現系の前記プライミング用量の 4 及び 1 2 週後、または約 4 及び 1 2 週後に、少なくとも 2 回のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記自己複製アルファウイルスベースの発現系が、前記 C h A d V ベースの発現系の前記プライミング用量の 1 及び 3 ヶ月後、または約 1 及び 3 ヶ月後に、少なくとも 2 回のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 6 5】

前記自己複製アルファウイルスベースの発現系が、少なくとも 4 回のブースター用量として投与される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記自己複製アルファウイルスベースの発現系が、前記 C h A d V ベースの発現系の前記プライミング用量と比較して、2 8、8 4、1 9 6、及び 2 5 2 日後に、または、約 2 8、8 4、1 9 6、及び 2 5 2 日後に投与される、請求項 6 5 に記載の方法。

50

【請求項 67】

前記自己複製アルファウイルスベースの発現系が、前記 C h A d V ベースの発現系の前記プライミング用量と比較して、4、12、28、及び40週後に、または、約4、12、28、及び40週後に投与される、請求項65に記載の方法。

【請求項 68】

前記自己複製アルファウイルスベースの発現系が、前記 C h A d V ベースの発現系の前記プライミング用量と比較して、1、3、7、及び10ヶ月後に、または、約1、3、7、及び10ヶ月後に投与される、請求項65に記載の方法。

【請求項 69】

1種以上の免疫調節剤の投与をさらに含み、任意で、前記免疫調節剤が、前記組成物または医薬組成物の投与前、投与と同時、または投与後に投与される、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項 70】

前記1種以上の免疫調節剤が、抗CTLA4抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗PD-1抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗PD-L1抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗4-1BB抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または、抗OX-40抗体もしくはその抗原結合フラグメントからなる群から選択される、請求項55に記載の方法。

【請求項 71】

前記免疫調節剤が、静脈内（IV）、筋肉内（IM）、皮内（ID）、または皮下（SC）投与される、請求項56または57に記載の方法。

20

【請求項 72】

前記皮下投与が、前記組成物もしくは医薬組成物の投与部位付近である、または、1種以上のベクターもしくは組成物流入領域リンパ節に極めて近接している、請求項58に記載の方法。

【請求項 73】

前記プライミング用量及び第1のブースター用量だけを伴う、抗CTLA-4抗体またはその抗原結合フラグメントの投与を含む、請求項56～59のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 74】

前記抗CTLA-4抗体がイピリムマブを含む、請求項60に記載の方法。

30

【請求項 75】

前記イピリムマブが、30mgの用量で皮下投与される、請求項61に記載の方法。

【請求項 76】

任意で含む、抗PD-L1抗体またはその抗原結合フラグメントの4週毎（Q4W）の投与を含む、請求項56～62のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 77】

抗PD-L1抗体が、アテゾリズマブまたはニボルマブを含む、請求項63に記載の方法。

【請求項 78】

前記アテゾリズマブが、1680mgの用量で静脈内投与され、または、前記ニボルマブが、480mgの用量で静脈内投与される、請求項64に記載の方法。

40

【請求項 79】

1種以上の前記免疫調節剤の、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13回の投与を含む、請求項56～65のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 80】

前記方法が、抗PD-L1抗体の少なくとも13回の投与を含む、請求項56～65のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 81】

前記1種以上の免疫調節剤が、アテゾリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、及びイピ

50

リムマブからなる群から選択される、請求項 56～67 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 82】

－ K R A S G 1 2 C 変異を含む前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープが、V V V G A C G V G K (配列番号 75)、K L V V V G A C G V (配列番号 76)、及び G A C G V G K S A L (配列番号 93) からなる群から選択され、

－ K R A S G 1 2 D 変異を含む前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープが、V V G A D G V G K (配列番号 77)、V V V G A D G V G K (配列番号 78)、K L V V V G A D G V (配列番号 94)、及び G A D G V G K S A L (配列番号 95) からなる群から選択され、

－ K R A S G 1 2 V 変異を含む前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープが、V V G A V G V G K (配列番号 79)、V V V G A V G V G K (配列番号 81)、A V G V G K S A L (配列番号 80)、及び G A V G V G K S A L (配列番号 96) からなる群から選択される、

前記方法または組成物の請求項のいずれか 1 項。

【請求項 83】

K R A S G 1 2 C 変異を含む前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープが、V V V G A C G V G K (配列番号 75)、K L V V V G A C G V (配列番号 76)、及び G A C G V G K S A L (配列番号 93) からなる群から選択される、前記方法または組成物の請求項のいずれか 1 項。

【請求項 84】

K R A S G 1 2 D 変異を含む前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープが、V V G A D G V G K (配列番号 77)、V V V G A D G V G K (配列番号 78)、K L V V V G A D G V (配列番号 94)、及び G A D G V G K S A L (配列番号 95) からなる群から選択される、前記方法または組成物の請求項のいずれか 1 項。

【請求項 85】

K R A S G 1 2 V 変異を含む前記 K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープが、V V G A V G V G K (配列番号 79)、V V V G A V G V G K (配列番号 81)、A V G V G K S A L (配列番号 80)、及び G A V G V G K S A L (配列番号 96) からなる群から選択される、前記方法または組成物の請求項のいずれか 1 項。

【請求項 86】

前記免疫応答を前記刺激することが、分子応答を刺激することを含む、前記方法または組成物の請求項のいずれか 1 項。

【請求項 87】

前記分子応答が、c t D N A の減少を含む、請求項 73 に記載の方法または組成物。

【請求項 88】

前記 c t D N A の減少が、c t D N A の、少なくとも 20 %、少なくとも 30 %、少なくとも 40 %、または少なくとも 50 % の減少である、請求項 74 に記載の方法または組成物。

【請求項 89】

前記 c t D N A の減少が、c t D N A の、少なくとも 30 % の減少である、請求項 74 に記載の方法または組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0028】

いくつかの態様では、方法は、1 種以上の免疫調節剤の、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または 13 回の投与を含む。いくつかの態様では、方法は、抗 P D - L 1 抗体の少なくとも 13 回の投与を含む。いくつかの態様では、1 種

10

20

30

40

50

以上の免疫調節剤は、アテゾリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、及びイピリムマブからなる群から選択される。いくつかの態様では、K R A S G 1 2 C 変異を含む K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープは、V V V G A C G V G K (配列番号 7 5)、K L V V V G A C G V (配列番号 7 6)、及び G A C G V G K S A L (配列番号 9 3) からなる群から選択され、K R A S G 1 2 D 変異を含む K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープは、V V G A D G V G K (配列番号 7 7)、V V V G A D G V G K (配列番号 7 8)、K L V V V G A D G V (配列番号 9 4)、及び G A D G V G K S A L (配列番号 9 5) からなる群から選択され、K R A S G 1 2 V 変異を含む K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープは、V V G A V G V G K (配列番号 7 9)、V V V G A V G V G K (配列番号 8 1)、A V G V G K S A L (配列番号 8 0)、及び G A V G V G K S A L (配列番号 9 6) からなる群から選択される。いくつかの態様では、K R A S G 1 2 C 変異を含む K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープは、V V V G A C G V G K (配列番号 7 5)、K L V V V G A C G V (配列番号 7 6)、及び G A C G V G K S A L (配列番号 9 3) からなる群から選択される。いくつかの態様では、K R A S G 1 2 D 変異を含む K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープは、V V G A D G V G K (配列番号 7 7)、V V V G A D G V G K (配列番号 7 8)、K L V V V G A D G V (配列番号 9 4)、及び G A D G V G K S A L (配列番号 9 5) からなる群から選択される。いくつかの態様では、K R A S G 1 2 V 変異を含む K R A S 関連 M H C クラス I ネオエピトープは、V V G A V G V G K (配列番号 7 9)、V V V G A V G V G K (配列番号 8 1)、A V G V G K S A L (配列番号 8 0)、及び G A V G V G K S A L (配列番号 9 6) からなる群から選択される。

10

20

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0064

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0064】

いくつかの態様では、各エピトープコード核酸配列が互いに直接連結されている。いくつかの態様では、前記抗原コード核酸配列のうちの少なくとも1つは、リンカーをコードする核酸配列によって異なるエピトープコード核酸配列と連結されている。いくつかの態様では、リンカーは、2個のMHCクラスI配列または1個のMHCクラスI配列を1個のMHCクラスII配列と連結する。いくつかの態様では、リンカーは、(1) 少なくとも残基2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の長さの連続したグリシン残基 (配列番号 9 9)、(2) 少なくとも残基2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の長さの連続したアラニン残基 (配列番号 1 0 0)、(3) 2個のアルギニン残基 (R R)、(4) アラニン、アラニン、チロシン (A A Y)、(5) 哺乳動物プロテアーゼによって効率的にプロセッシングされる、少なくともアミノ酸残基2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の長さのコンセンサス配列、及び(6) 同種由来タンパク質に由来する抗原に隣接し、少なくともアミノ酸残基2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または2~20個の長さの1つ以上の天然配列からなる群から選択される。いくつかの態様では、リンカーは、2個のMHCクラスII配列または1個のMHCクラスII配列を1個のMHCクラスI配列と連結する。いくつかの態様では、リンカーは、配列 G P G P G (配列番号 5 6) を含む。いくつかの態様では、前記エピトープコード核酸配列のうちの少なくとも1つの配列は、それによりコードされるエピトープのエピトープコード核酸配列の発現、安定性、細胞トラフィッキング、プロセッシング及び提示、及び／または免疫原性を高める、分離した、または連続した配列に機能的または直接的に連結されている。いくつかの態様において、分離した、または連続した配列は、ユビキチン配列、プロテアソームターゲティング性を高めるように改変されたユビキチン配列 (例えば、76位にG l y またはA l a 置換を有するユビキチン配列)、免疫グロブリンシグナル配列 (例えばI g K)、主要組織適合性

30

40

50

クラスⅠ配列、リソソーム関連膜タンパク質（LAMP）－1、ヒト樹状細胞リソソーム関連膜タンパク質、及び主要組織適合性クラスⅠⅠ配列のうちの少なくとも1つを含み、任意でプロテアソームターゲティング性を高めるように改変された前記ユビキチン配列がA76である。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0072

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0072】

いくつかの態様では、少なくとも1つのポリ（A）配列は、前記骨格に天然に存在するポリ（A）配列を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのポリ（A）配列は、前記骨格に外因性のポリ（A）配列を含む。いくつかの態様では、少なくとも1つのポリ（A）配列は、少なくとも1つの抗原コード核酸配列のうちの少なくとも1つと機能的に連結される。いくつかの態様では、少なくとも1つのポリ（A）配列は、少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、少なくとも90個、または少なくとも100個の連続したAヌクレオチド（配列番号98）である。いくつかの態様では、少なくとも1つのポリ（A）配列は、少なくとも80個の連続したAヌクレオチドである。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0129

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0129】

いくつかの態様では、KRAS G12C変異を含むKRAS関連MHCクラスⅠネオエピトープは、VVVGACGVGK（配列番号75）、KLVVVGACGV（配列番号76）、及びGACGVGKSAL（配列番号93）からなる群から選択される。いくつかの態様では、KRAS G12D変異を含むKRAS関連MHCクラスⅠネオエピトープは、VVGADGVGK（配列番号77）、VVVGADGVGK（配列番号78）、KLVVVGADGV（配列番号94）、及びGADGVGKSAL（配列番号95）からなる群から選択される。いくつかの態様では、KRAS G12V変異を含むKRAS関連MHCクラスⅠネオエピトープは、VVGAVGVGK（配列番号79）、VVVGAVGVGK（配列番号81）、AVGVGKSAL（配列番号80）、及びGAVGVGKSAL（配列番号96）からなる群から選択される。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0257

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0257】

KRAS G12C変異を有するKRAS関連MHCクラスⅠネオエピトープには、VVVGACGVGK（配列番号75）、KLVVVGACGV（配列番号76）、またはGACGVGKSAL（配列番号93）が含まれる。KRAS G12D変異を有するKRAS関連MHCクラスⅠネオエピトープには、VVGADGVGK（配列番号77）、VVVGADGVGK（配列番号78）、KLVVVGADGV（配列番号94）、またはGADGVGKSAL（配列番号95）が含まれる。KRAS G12V変異を有するKRAS関連MHCクラスⅠネオエピトープには、VVGAVGVGK（配列番号79）、VVVGAVGVGK（配列番号81）、AVGVGKSAL（配列番号80）、またはGAVGVGKSAL（配列番号96）が含まれる。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0308

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0308】

TETプロモーターシステムは、テトラサイクリン（TET）リプレッサータンパク質（TET_r）により制御されるプロモーターを含むことができる。したがって、本明細書では、テトラサイクリン（TET）リプレッサータンパク質（TET_r）により制御されるプロモーターに機能的に連結された少なくとも1つのペイロード配列を有するカセットを含むウイルスベクターも開示される。TET_r制御プロモーターは、19bpのTETオペレーター（TET_o）配列TCCCTATCAGTGATAGAGA（配列番号92）を含むことができる。TET_r制御プロモーターは、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個以上のTET_o核酸配列を含むことができる。2個以上のTET_o核酸配列を有するTET_r制御プロモーターでは、TET_o配列同士は互いに連結されてもよい。2個以上のTET_o核酸配列を有するTET_r制御プロモーターでは、TET_o配列同士は互いに直接連結されてもよい。2個以上のTET_o核酸配列を有するTET_r制御プロモーターでは、TET_o配列同士は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個以上のヌクレオチドを有するリンカー配列などのリンカー配列によって互いに連結されてもよい。一般的に、TET_r制御プロモーターは、SV40、EF-1、RSV、PGK、HSA、MCKまたはEBVプロモーター配列などの任意の望ましいプロモーター配列を用いることができる。TET_r制御プロモーターはCMVプロモーター配列を用いることができる。TET_r制御プロモーターは最小CMVプロモーター配列を用いることができる。TET_o配列は、RNAポリメラーゼが結合するプロモーター配列領域の上流（5'）にあってよい。例示的な1つの例では、7個のTET_o配列が、プロモーター配列の上流（5'）にある。TET_o配列がプロモーター配列領域の上流にある、少なくとも1つのペイロード核酸配列に機能的に連結されたTET_r制御プロモーターは、5'から3'の方向に、次式によって記述される順序付けられた配列を有することができる。すなわち、

$$(T-L)_X-P-N$$

式中、Nは、ペイロード核酸配列であり、Pは、ペイロード核酸配列に機能的に連結されたプロモーター配列のRNAポリメラーゼ結合配列であり、Tは、配列番号66に示されるヌクレオチド配列を含むTET_o核酸配列であり、Lは、リンカー配列であり、ただし、各XについてY=0または1であり、X=1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20である。例示的な1つの例では、各XについてX=7かつY=1とは、7個のTET_o配列がプロモーター配列の上流（5'）にあり、各TET_o配列がリンカーによって分離されている場合を記述している。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0499

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0499】

(表5) KRASネオエピトープ質量分析

10

20

30

40

50

変異	HLA	配列	腫瘍	20x1 K562 細胞株	4x4 K562 細胞株	8x2 K562 細胞株	配列番号 57または 59 25マー
G12C	A*02:01	KLVVVGACGV (配列番号76)	なし	なし	なし	なし	あり
G12C	A*03:01	VVVGACGVGK (配列番号75)	なし	あり	NA	NA	NA
G12C	A*11:01	VVVGACGVGK (配列番号75)	なし	あり	あり	なし	NA
G12C	A*68:01	VVVGACGVGK (配列番号75)	なし	あり	NA	NA	NA
G12C	B*07:02	GACGVGKSAL (配列番号93)	なし	あり	NA	NA	NA
G12C	C*03:04	GACGVGKSAL (配列番号93)	なし	あり	NA	NA	NA
G12D	A*02:01	KLVVVGADGV (配列番号94)	なし	なし	あり	なし	NA
G12D	A*03:01	VVGADGVGK (配列番号77)	なし	あり	NA	NA	NA
G12D	A*03:01	VVVGADGVGK (配列番号78)	なし	あり	NA	NA	NA
G12D	A*11:01	VVGADGVGK (配列番号77)	あり	あり	あり	なし	NA
G12D	A*11:01	VVVGADGVGK (配列番号78)	あり	あり	あり	あり	NA
G12D	A*68:01	VVVGADGVGK (配列番号78)	なし	あり	NA	NA	NA
G12D	B*07:02	GADGVGKSAL (配列番号95)	なし	あり	NA	NA	NA

10

20

30

40

50

G12D	C*03:04	GADGVGKSAL (配列番号95)	なし	あり	NA	NA	NA
G12V	A*02:01	KLVVVGAVGV (配列番号97)	なし	なし	あり	なし	あり
G12V	A*03:01	VVGAVGVGK (配列番号79)	なし	あり	NA	NA	NA
G12V	A*03:01	VVVGAVGVGK (配列番号81)	あり	あり	NA	NA	NA
G12V	A*11:01	VVGAVGVGK (配列番号79)	あり	あり	あり	あり	あり
G12V	A*11:01	VVVGAVGVGK (配列番号81)	あり	あり	あり	あり	あり
G12V	A*68:01	VVVGAVGVGK (配列番号81)	なし	あり	NA	NA	NA
G12V	B*07:02	AVGVGKSAL (配列番号80)	なし	あり	NA	NA	NA
G12V	C*01:02	AVGVGKSAL (配列番号80)	あり	NA	NA	NA	NA
G12V	C*03:04	GAVGVGKSAL (配列番号96)	なし	あり	NA	NA	NA
Q61H	A*01:01	ILDTAGHEEY (配列番号82)	NA	あり	あり	あり	NA

NA = 適用なし（試験するための腫瘍または細胞株がなかった／作製されなかった）

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2024535855000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/076680

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - INV. - A61K 39/00; C12N 15/62; C12N 15/85 (2023.01)

ADD.

CPC - INV. - A61K 39/0011; C12N 15/62; C12N 15/85 (2023.02)

ADD. - A61K 2039/53; A61K 2039/82; A61K 2039/852; A61K 2039/86 (2023.02)

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)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/092095 A1 (GRITSTONE ONCOLOGY INC.) 14 May 2021 (14.05.2021) entire document	1-3, 5, 6, 10, 11
A	WO 2021/092094 A1 (GRITSTONE ONCOLOGY INC.) 14 May 2021 (14.05.2021) entire document	1-3, 5, 6, 10, 11
A	WO 2021/097365 A2 (GRITSTONE ONCOLOGY INC.) 20 May 2021 (20.05.2021) entire document	1-3, 5, 6, 10, 11
P, X	US 2022/0265797 A1 (GRITSTONE BIO INC.) 25 August 2022 (25.08.2022) entire document	1-3, 5, 6, 10, 11

☐ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"I" 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 March 2023

Date of mailing of the international search report

MAR 24 2023

Name and mailing address of the ISA/

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1460, Alexandria, VA 22313-1460

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Taina Matos

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/076680

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☐ forming part of the international application as filed.

b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/076680

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.: 4, 7-9, 12-89
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	1/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/00	
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	1/18 (2006.01)	A 6 1 P	1/18	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17	
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	Z
A 6 1 K	35/761 (2015.01)	A 6 1 K	35/761	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	U
		A 6 1 K	39/395	T
		A 6 1 K	39/395	G
		A 6 1 K	39/395	E
		A 6 1 K	39/395	N
		A 6 1 K	39/395	D

(32)優先日 令和4年3月18日(2022.3.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/374,888

(32)優先日 令和4年9月7日(2022.9.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ルソー ラファエル
 アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル ホートン ストリート 5 9 5 9 ス
 イート 3 0 0 グリットストーン バイオ インコーポレイテッド内

(72)発明者 ヨース カリン
 アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル ホートン ストリート 5 9 5 9 ス
 イート 3 0 0 グリットストーン バイオ インコーポレイテッド内

(72)発明者 パーマー クリスティーヌ デニス
 アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル ホートン ストリート 5 9 5 9 ス
 イート 3 0 0 グリットストーン バイオ インコーポレイテッド内

(72)発明者 ラッパポート エイミー レイチェル
 アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル ホートン ストリート 5 9 5 9 ス
 イート 3 0 0 グリットストーン バイオ インコーポレイテッド内

F ターム (参考) 4C084 AA02 AA13 AA19 BA01 BA03 BA08 BA22 BA23 CA53 DC50
 MA02 MA16 MA66 NA14 ZA59 ZA66 ZB09 ZB26 ZC75

 4C085 AA03 AA13 AA14 BA01 BB01 BB31 CC22 CC23 DD62 EE01
 EE03 GG02 GG03 GG04 GG05

 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA02 MA66 NA14 ZA59 ZA66 ZB09
 ZB26 ZC75

 4H045 AA11 AA20 AA30 BA15 CA40 DA50 DA86 EA31 FA74