(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-533204
(P2023-533204A)
(43)公表日　令和5年8月2日(2023.8.2)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ　39/00　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	39/00	Ｈ	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ　48/00　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	48/00	ＺＮＡ	４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	４Ｃ０８７
Ａ６１Ｐ　37/04　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	37/04		
Ａ６１Ｋ　35/76　(2015.01)		Ａ６１Ｋ	35/76		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全33頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-580102(P2022-580102)
(86)(22)出願日　令和3年6月25日(2021.6.25)
(85)翻訳文提出日　令和5年2月14日(2023.2.14)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/039046
(87)国際公開番号　WO2021/263081
(87)国際公開日　令和3年12月30日(2021.12.30)
(31)優先権主張番号　63/044,675
(32)優先日　令和2年6月26日(2020.6.26)
(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,
最終頁に続く

(71)出願人　522497674
ナショナル ブレスト キャンサー コアリション
ＮＡＴＩＯＮＡＬ ＢＲＥＡＳＴ ＣＡＮＣＥＲ ＣＯＡＬＩＴＩＯＮ
アメリカ合衆国， ディストリクト オブ コロンビア， ワシントン， エル ストリート ２００１， ノースウェスト， スイート ５００ ピーエムビーナンバー ５０１１１
(74)代理人　100107456
弁理士　池田 成人
(74)代理人　100162352
弁理士　酒巻 順一郎
(74)代理人　100123995
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　乳がんワクチン

(57)【要約】
本発明は、乳がん療法のためのワクチンに関する。本発明はまた、乳がんワクチンを使用して、乳がんを予防及び治療する方法に関する。
【選択図】　図１

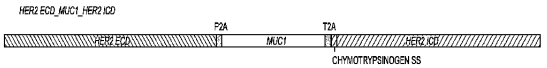


FIG. 1A

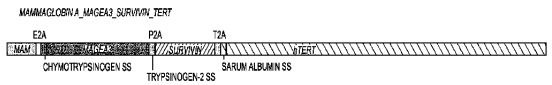


FIG. 1B

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡからなる群から選択される遺伝子によってコードされる少なくとも３種の抗原に由来する少なくとも１つのエピトープをコードするベクターと、少なくとも１種の薬学的に許容される賦形剤とを含む免疫原性組成物。
【請求項２】
ベクターが、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡからなる群から選択される遺伝子によってコードされる少なくとも４種の抗原をコードする、請求項１に記載の免疫原性組成物。
【請求項３】
ベクターが、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡからなる群から選択される遺伝子によってコードされる少なくとも５種の抗原をコードする、請求項１に記載の免疫原性組成物。
【請求項４】
ベクターが、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡからなる群から選択される遺伝子によってコードされる少なくとも６種の抗原をコードする、請求項１に記載の免疫原性組成物。
【請求項５】
ＭＵＣ１遺伝子によってコードされる少なくとも１つのエピトープが、ＭＵＣ１遺伝子によってコードされる全長タンパク質を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。
【請求項６】
ＨＥＲ２遺伝子によってコードされる少なくとも１つのエピトープが、ＨＥＲ２遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸１～６５２を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。
【請求項７】
ＨＥＲ２遺伝子によってコードされる少なくとも１つのエピトープが、ＨＥＲ２遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸６７６～１２５４を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。
【請求項８】
ｈＴＥＲＴ遺伝子によってコードされる少なくとも１つのエピトープが、ｈＴＥＲＴ遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸１５～１１３２を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。
【請求項９】
ＭＡＧＥＡ３遺伝子によってコードされる少なくとも１つのエピトープが、ＭＡＧＥＡ３遺伝子によってコードされる全長タンパク質を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。
【請求項１０】
サバイビン遺伝子によってコードされる少なくとも１つのエピトープが、サバイビン遺伝子によってコードされる全長タンパク質を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。
【請求項１１】
各エピトープが、切断可能なスペーサー配列で分離されている、請求項１～１０のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。
【請求項１２】
ベクターがＤＮＡベクターである、請求項１～１１のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。
【請求項１３】
ベクターが改変ワクシニアアンカラ（ＭＶＡ）ウイルスである、請求項１～１２のいず

れか一項に記載の免疫原性組成物。
【請求項１４】
ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡからなる群から選択される１種又は複数の抗原に対するヒト対象における抗原媒介性又はＴ細胞媒介性免疫応答を誘導する方法であって、請求項１～１３のいずれか一項に記載の免疫原性組成物をヒト対象に投与するステップを含む方法。
【請求項１５】
請求項１２に記載の免疫原性組成物をヒト対象に投与するステップを含む、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
請求項１２に記載の免疫原性組成物の投与後に請求項１３に記載の免疫原性組成物をヒト対象に投与するステップを更に含む、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
請求項１２に記載の免疫原性組成物の投与の少なくとも１５日後に請求項１３に記載の免疫原性組成物をヒト対象に投与する、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
請求項１２に記載の免疫原性組成物の投与の少なくとも３０日後に請求項１３に記載の免疫原性組成物をヒト対象に投与する、請求項１６に記載の方法。
【請求項１９】
ヒト対象が乳がんに罹患していない、請求項１４～１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
ヒト対象が原発性乳がんに罹患している、請求項１４～１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１】
ヒト対象が転移性乳がんに罹患している、請求項１４～１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
ヒト対象がステージ０、Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩ又はＩＶの乳がんに罹患している、請求項１４～１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
ヒト対象が化学療法を受けていない、請求項１４～２２のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【背景技術】
【０００１】
乳がんは、毎年約４５９，０００人の死亡につながっていることから、乳がんは世界的に非常に大きな負担を生じている。スウェーデンの研究によると、いかなる病状であっても、そのコストは、次の３つのカテゴリの１つに分類される：直接コスト（治療、検出、予防又はケアに直接関連するコスト）；間接コスト（生産性の低下及び早期死亡）；及び無形コスト（生活の質の低下）。したがって、米国における乳がん治療の平均年間総コストは、年当たり約１，７００億ドルと推定される可能性があり；これは、米国の国内総生産の約１％である。発生率は先進国ではほぼ不変であるが、発展途上国では生殖因子、ライフスタイル及び平均余命の変化に起因して急増している。その結果、特に我々がより新しい早期検出及び新規な費用のかかる治療戦略を実施し続けるために、経済的コストは急激に増大し；そのため、限られた世界的資源に桁外れの負担がかかっている。これに応じて、我々は方向転換を図り、一次予防のための有望で、妥当な価格の、安全な戦略を進展させることに真摯な関心を持たなければならない。
【０００２】
がん関連の罹患率及び死亡率の抑制並びに治療の経済的負担の軽減の両方を目的として、がん予防のための戦略が策定されている。化学的予防治療（合成薬剤、天然薬剤又は生物学的薬剤の慢性投与を含む）は、乳がんのサブタイプについて成功している（Ａｄｖａ

ｎｉ及びＭｏｒｅｎｏ－Ａｓｐｉｔｉａ（２０１４年）Ｂｒｅａｓｔ　Ｃａｎｃｅｒ．６巻：５９～７１頁）。例えば、乳がんリスクの高い女性では、選択的エストロゲン受容体調節薬による治療が、発症リスクを大幅に低減している（Ａｄｖａｎｉ及びＭｏｒｅｎｏ－Ａｓｐｉｔｉａ、２０１４年）。しかし、予防薬剤の長期投与を含むそのようなアプローチは、深刻な副作用を伴う。これらには、他のタイプのがん及び心血管疾患を発生するリスクの増加が含まれる（Ａｄｖａｎｉ及びＭｏｒｅｎｏ－Ａｓｐｉｔｉａ、２０１４年）。これに関連して、乳がんワクチン等の代替アプローチの創出にかなりの関心が寄せられている。感染性疾患及び（より最近では）がん（例えば、子宮頸がん）を予防するために、ワクチンは傑出した有効性及び安全性プロファイルの両方を有する。したがって、ワクチン戦略は、従来の化学的予防に関連する課題を回避することができる。ワクチン接種によるがん予防は、多くの動物モデルにおいて成功している（Ｄｉｓｉｓら（２０１３年）Ｃａｎｃｅｒ　Ｐｒｅｖ．Ｒｅｓ．６巻：１２７３～８２頁；Ｌｏｌｌｉｎｉら（２００６年）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｃａｎｃｅｒ、６巻：２０４～１６頁；Ｎａｖａ－Ｐａｒａｄａら（２００７年）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．６７巻：１３２６～３４頁）。それにもかかわらず、臨床への移行時には、ワクチン技術の大部分は、主に進行性疾患を有する患者に、治療法として適用されている。それらは、抑止ではなく、病気の排除のために採用されている。動物モデルと臨床試験の両方における、治療的ながんワクチン接種はある程度の成功を収めている。一例は、ＦＤＡに承認された最初の前立腺がん治療ワクチン、シプロイセル（ｓｉｐｕｌｅｕｃｅｌ）－Ｔである。

【０００３】

それにもかかわらず、病気の排除を目標とした治療用ワクチン接種に関連していくつかの課題がある：（１）腫瘍増殖動態は、免疫系の除去の可能性を上回ることがある；（２）腫瘍は、免疫応答を抑制するための戦略をすでに画策している；及び（３）腫瘍は、免疫介在性破壊に対する感受性を低減するメカニズムを発現している可能性がある。回避戦略には、抗原発現の低減又はＨＬＡ発現の低減が含まれる。回避戦略には、免疫細胞毒性メカニズムの抑制も含まれる。これらの問題に関連する疾患に取り組む場合、がんを成功裏に根絶し及び治癒をもたらすワクチン誘導性免疫応答が結果として得られる可能性は低い。

【０００４】

腫瘍の出現前に投与される乳がん予防ワクチンは、治療的使用と関連する多くの課題を付随的に回避する。したがって、予防ワクチン接種は、治療アプローチの成功を築き上げることとそれを強化することの両方が可能である。これを達成するためには、予防ワクチンは、乳がんの種々のサブタイプを横断して広範に発現されている抗原を標的としなければならない。抗原は疾患特異的でなければならない。このための１つのアプローチ：正常な自己タンパク質の活用が、かなりの熱意を集めている。種々のタイプのがん及びがん前駆体において、これらの自己タンパク質は過剰発現されている。自己タンパク質のこの異常な過剰発現は、サブドミナントな腫瘍特異的エピトープ：予防ワクチンのプライム標的の提示につながっている（Ｄｉｓｉｓら、２００２年；Ｍｏｕｄｇｉｌ（１９９９年）Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｌｅｔｔ．６８巻：２５１～６頁；Ｒｅｙｎｏｌｄｓら（１９９６年）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８４巻：１８５７～７０頁）。

【発明の概要】

【０００５】

本発明は、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡからなる群から選択される遺伝子によってコードされる少なくとも３種の抗原に由来する少なくとも１つのエピトープをコードするベクターと、少なくとも１種の薬学的に許容される賦形剤とを含む免疫原性組成物に関する。一部の実施形態において、ベクターは、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡからなる群から選択される遺伝子によってコードされる少なくとも４種の抗原をコードする。一部の実施形態において、ベクターは、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡからなる群から選択される遺伝子によってコー

ドされる少なくとも５種の抗原をコードする。一部の実施形態において、ベクターは、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡからなる群から選択される遺伝子によってコードされる少なくとも６種の抗原をコードする。

【０００６】

一部の実施形態において、ＭＵＣ１遺伝子によってコードされる少なくとも１つのエピトープは、ＭＵＣ１遺伝子によってコードされる全長タンパク質を含む。一部の実施形態において、ＨＥＲ２遺伝子によってコードされる少なくとも１つのエピトープは、ＨＥＲ２遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸１～６５２を含む。一部の実施形態において、ＨＥＲ２遺伝子によってコードされる少なくとも１つのエピトープは、ＨＥＲ２遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸６７６～１２５４を含む。一部の実施形態において、ｈＴＥＲＴ遺伝子によってコードされる少なくとも１つのエピトープは、ｈＴＥＲＴ遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸１５～１１３２を含む。一部の実施形態において、ＭＡＧＥＡ３遺伝子によってコードされる少なくとも１つのエピトープは、ＭＡＧＥＡ３遺伝子によってコードされる全長タンパク質を含む。一部の実施形態において、サバイビン遺伝子によってコードされる少なくとも１つのエピトープは、サバイビン遺伝子によってコードされる全長タンパク質を含む。一部の実施形態において、各エピトープは、切断可能なスペーサー配列で分離されている。一部の実施形態において、ベクターはＤＮＡベクターである。一部の実施形態において、ベクターは改変ワクシニアアンカラ（Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｖａｃｃｉｎｉａ　Ａｎｋａｒａ）（ＭＶＡ）ウイルスである。

【０００７】

本発明はまた、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡからなる群から選択される１種又は複数の抗原に対するヒト対象における抗原媒介性又はＴ細胞媒介性免疫応答を誘導する方法であって、本明細書中に記載した免疫原性組成物をヒト対象に投与するステップを含む方法に関する。一部の実施形態において、この方法は、免疫原性組成物をヒト対象に投与するステップを含む。一部の実施形態において、プラスミドベクターを含有する免疫原性組成物の投与後に、ワクシニアベクターを含有する免疫原性組成物をヒト対象に投与する。一部の実施形態において、ワクシニアベクターは、プラスミドベクターの投与の少なくとも１５日後にヒト対象に投与する。一部の実施形態において、ワクシニアベクターは、少なくとも３０日後にヒト対象に投与する。一部の実施形態において、ヒト対象は乳がんに罹患していない、一部の実施形態において、ヒト対象は原発性乳がんに罹患している。一部の実施形態において、ヒト対象は転移性乳がんに罹患している。一部の実施形態において、ヒト対象はステージ０、Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩ又はＩＶの乳がんに罹患している。一部の実施形態において、ヒト対象は化学療法を受けていない。

【図面の簡単な説明】

【０００８】

【図１】図１Ａは、アルテミス（Ａｒｔｅｍｉｓ）１．Ｐ１及びアルテミス１．Ｖ１に関して、プラスミドがＨＥＲ２細胞外ドメイン（ＥＣＤ）、ＭＵＣ１及びＨＥＲ２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）を含むことを示す図である。図１Ｂは、アルテミス１．Ｐ２及びアルテミス１．Ｖ２に関して、プラスミドがマンモグロビンＡ、ＭＡＧＥＡ３、サバイビン及びｈＴＥＲＴを含むことを示す図である。

【図２】ｐＵＭＶＣ４ａプラスミドを示す図である。プラスミドワクチン接種では、ｐＮＧＶＬ－３ベクターの派生物であるｐＵＭＶＣ４ａプラスミドが、臨床試験で使用されており、これは、免疫刺激配列（ＩＳＳ）及び転写安定性を強化するためのイントロンを含む、ワクチン接種に適したいくつかの独特の特徴を有する。

【図３】ｐＭＶＡｐ１１ｅＧＦＰ－ｍＨ５導入プラスミドを示す図である。このプラスミドは、ＥＧＦＰ下での一過性選択を、ｍＨ５初期／後期プロモーター下での組換え発現を、及びＭＶＡゲノムのＩ８ＲＬ／Ｇ１Ｌ部位への挿入を可能にする。

【図４】組換えＭＶＡの品質管理を示す図である。ｍｖａＢＣ．１及びｍｖａＢＣ．２陽

性対照からのＤＮＡを使用して、ＰＣＲを行った。増幅産物は妥当なサイズであり、それらの元のプラスミドとの配列同一性（配列決定による）が１００％であった。
【図５】ｐＢＣ．１プラスミド（図５Ａ）及びｐＢＣ．２プラスミド（図５Ｂ）をトランスフェクトしたＨＥＫ２９３細胞からの細胞画分及び分泌（上清）画分のウエスタンブロット解析を示す図である。
【図６】ｍｖａＢＣ．１（図６Ａ）及びｍｖａＢＣ．２（図６Ｂ）を感染させたＤＦ－１細胞からの細胞画分及び分泌（上清）画分のウエスタンブロット解析を示す図である。
【図７】ｐＢＣ．１（ｐＵＭＶＣ４ａ－ＨＥＲ２ＥＣＤ＿ムチン１＿ＨＥＲ２ＩＣＤ）プラスミドのベクターマップを示す図である。（コード配列及びアミノ酸配列については配列番号１及び２を参照のこと）
【図８】ｍｖａＢＣ．１（ｐＭＶａ－ｍＨ５＿ＨＥＲ２ＥＣＤ＿ムチン１＿ＨＥＲ２ＩＣＤ）ベクターのベクターマップを示す図である。（コード配列及びアミノ酸配列については、配列番号３及び４を参照のこと）
【図９】ｐＵＭＶＣ４ａ－Ｍａｍｍａ＿Ｍａｇｅａ３＿サバイビン＿Ｔｅｒｔプラスミドのベクターマップを示す図である。（コード配列及びアミノ酸配列については、配列番号５及び６を参照のこと）
【図１０】ｐＭＶａ－ｍＨ５＿Ｍａｍｍａ＿Ｍａｇｅａ３＿サバイビン＿Ｔｅｒｔベクターのベクターマップを示す図である。（コード配列及びアミノ酸配列については、配列番号７及び８を参照のこと）
【発明を実施するための形態】
【０００９】
本発明の明細書及び特許請求の範囲において、以下の用語を以下に示す定義に従って使用する。
【００１０】
本明細書中で使用する「免疫原性組成物」又は「ワクチン」は、細胞性（Ｔ細胞）若しくは体液性（Ｂ細胞）又はそれらの組合せであり得る、適応（特異的）免疫応答をプライミング、増強、活性化、誘発、刺激、増強、ブースト、増大又は強化することができる任意の１種又は複数の化合物又は薬剤又は免疫原を指す。好ましくは、適応免疫応答は防御免疫応答である。免疫原の代表的な例は、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡ抗原に由来する。本明細書において、あらゆる濃度範囲、百分率範囲、比率範囲又は整数範囲は、特に断らない限り、挙げられた範囲内のあらゆる整数の値、及び適切な場合は、その分数（例えば、整数の１０分の１及び１００分の１等）を含むと理解される。
【００１１】
「免疫原性」という用語は、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡタンパク質のいずれかに向けられた免疫応答を誘起する、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡ抗原の能力を意味する。調製物が免疫原性であるかどうかは、例えば、ＤＴＨアッセイ又は実験動物モデルにおけるインビボアッセイによって試験することができる。
【００１２】
本明細書中で使用する「ベクター」という用語は、複製開始点を含む核酸配列を意味し得る。ベクターは、プラスミド、ウイルス、バクテリオファージ、細菌人工染色体又は酵母人工染色体であり得る。ベクターはＤＮＡ又はＲＮＡベクターであり得る。ベクターは、自己複製染色体外ベクター又は宿主ゲノムに組み込まれるベクターのいずれかであり得る。
【００１３】
本明細書中で使用する「薬学的に許容される担体」という用語は、標準的な医薬担体、例えば、リン酸緩衝生理食塩溶液、水、油／水又は水／油エマルジョン等のエマルジョン、及び種々のタイプの湿潤剤をいずれも含む。この用語はまた、米国連邦政府の規制機関によって承認された又は米国薬局方に掲載された、ヒトを含む動物に使用するための薬剤

をいずれも包含する。
【００１４】
本明細書中で使用する「治療する」という用語は、特定の障害若しくは状態の予防、又は特定の障害若しくは状態に関連する症状の軽減、並びに／又は前記症状の予防若しくは排除を含む。
【００１５】
本明細書中で使用する、医薬品の「有効」量又は「治療有効量」は、無毒性であるが所望の効果をもたらすのに十分な、医薬品の量を指す。例えば、所望の効果の１つは、乳がんの予防又は治療である。「有効」である量は、個体の年齢及び全身状態、投与方法等に応じて、対象によって異なる。したがって、正確な「有効量」を特定することができるとは限らない。しかし、任意の個々の場合に適切な「有効」量は、当業者がルーチン実験を使用して決定することができる。
【００１６】
本明細書中で使用する「リンカー」は、２つの別個の実在物を互いに結合する結合、分子又は分子の群である。リンカーは、２つの実在物の最適な間隔を提供するか、又は２つの実在物を互いに分離させる不安定な連結を更に供給することができる。不安定な連結は、酵素によって切断可能な基を含む。
【００１７】
更なる指定を伴わない「患者」という用語は、ヒトを包含することを意図する。
【００１８】
本明細書で使用する「約」又は「～から本質的にからなる」は、±１０％を意味する。本明細書で使用する場合、「ａ」又は「ａｎ」等の不定冠詞の使用は、名詞又は名詞句の単数形及び複数形を指すと理解すべきである（すなわち、列挙された要素又は成分の「１つ（種）又は複数」又は「少なくとも１つ（種）」を意味する）。選択肢（例えば、「又は」）の使用は、選択肢のうちのいずれか１つ、２つ又はそれらの任意の組合せを意味することを理解すべきである。本明細書中で範囲を使用して、例えば、物理的又は化学的性質、例えば、分子量又は化学式を記載する場合、範囲及びその中の特定の実施形態の全ての組合せ及び下位組合せが含まれることを意図する。数値又は数値範囲に言及する場合の「約」という用語の使用は、言及される数値又は数値範囲が実験的変動性内（又は統計的実験誤差内）の近似値を意味し、したがって、数値又は数値範囲は変動し得る。変動は、示された数値又は数値範囲の典型的には０％～１５％、好ましくは０％～１０％、より好ましくは０％～５％である。「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という用語（及び関連用語、例えば、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」若しくは「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」又は「有する（ｈａｖｉｎｇ）」又は「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」）は、これらの実施形態、例えば、記載された特徴「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔ　ｏｆ）」又は「から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」任意の物質組成、方法又はプロセスの実施形態を含む。
【００１９】
免疫原性組成物
一実施形態によれば、患者において免疫応答を誘導するための多価抗原性（すなわち、免疫原性）組成物が提供される。一実施形態において、多価抗原性組成物は、乳がんを予防するために予防的に投与する。例示的な一態様において、組成物は、乳がん発症リスクのある、授乳中でない女性に投与する。あるいは、一実施形態において、組成物は、任意選択で、乳がんを治療するための他の公知の抗がん療法と共に、投与する。一部の実施形態によれば、多価抗原性組成物は、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡから選択される遺伝子のいずれかによってコードされるタンパク質のうちの３種以上、４種以上、５種以上若しくは６種のタンパク質又はその抗原性断片をコードするベクターである。
【００２０】
乳がんの治療及び／又は予防に有用な、本明細書中に記載した免疫原性組成物又はワク

チンは、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡから選択される遺伝子、その断片及びバリアントをコードする１種又は複数のベクター、２種以上のベクターを含む。ある特定の実施形態において、ベクターは、防御免疫応答を誘発する（例えば、中和抗体の産生を誘発し、及び／又は細胞媒介性免疫応答を刺激する）ことができるエピトープを有するこれらのタンパク質の任意の部分をコードすることができる。プラスミドには、本明細書に記載したこれらの抗原又はその断片が直線状に配列され、組み合わされ又は融合されていてもよく、各免疫原は反復していても反復していなくてもよく、反復は、１回又は複数回起こっていてもよく、抗原のＮ末端に、Ｃ末端に又は直鎖配列の内部に位置し得る。加えて、複数の異なる抗原ポリペプチドを選択するか又は１種若しくは複数のベクターへと組み合わせて、有害な又はそうでなければ望まない関連免疫応答若しくは副作用を伴わない、防御免疫応答の誘発に使用するための多価ワクチンを提供することができる。

【００２１】

一実施形態において、多価ヒト乳がんワクチンは、６種の免疫原性ポリペプチド又はその断片をコードするベクターを含む。一実施形態において、免疫原性ポリペプチドのうちの１種は、ヒトムチン－１（ＭＵＣ１）を含む。ＭＵＣ１遺伝子（例示的な実施形態については配列番号１及び３を参照のこと）は、様々な上皮細胞の頂端膜側で発現される大きい膜貫通ムチン糖タンパク質（例示的な実施形態については配列番号２及び４を参照のこと）をコードする。他のムチンと同様に、ムチン－１は上皮細胞表面の潤滑及び水分補給、並びに微生物及び分解酵素からの防御に関与する。分子量は、非グリコシル化形態では、細胞外ドメインの反復モチーフの対立遺伝子のバリエーションのため、１２５～２２５キロダルトンである。典型的には、このタンパク質は重度にグリコシル化されて、分子量が２２５～５００キロダルトンの範囲のタンパク質を生成する。ＭＵＣ１は、乳がんを含む多くのヒトのがんにおいて過剰発現され、異常にグリコシル化されている。

【００２２】

一実施形態において、多価ヒト乳がんワクチンは、６種の免疫原性ポリペプチド又はその断片をコードするベクターを含む。一実施形態において、免疫原性ポリペプチドのうちの１種は、ヒト上皮増殖因子受容体２（ＨＥＲ２）又はその抗原性断片を含む（例示的な実施形態については配列番号２及び４を参照のこと）。一部の実施形態において、ベクターは、ＨＥＲ２の１種又は複数の抗原性断片をコードする（例示的な実施形態については配列番号１及び３を参照のこと）。一実施形態において、ベクターは、ＨＥＲ２の異なる抗原性断片をコードする。一実施形態において、ベクターは、ＨＥＲ２の細胞外ドメイン中のアミノ酸を含むか又はそれらからなる１種の抗原性断片をコードする。一実施形態において、ベクターは、ＨＥＲ２のアミノ酸１～６５２を含むか又はそれらからなる１種の抗原性断片をコードする（図１参照）。一実施形態において、ベクターは、ＨＥＲ２の細胞内ドメイン中のアミノ酸を含むか又はそれらからなる１種の抗原性断片をコードする。一実施形態において、ベクターは、ＨＥＲ２のアミノ酸６７６～１２５４を含むか又はそれらからなる１種の抗原性断片をコードする（図１参照）。一実施形態において、ベクターは、本明細書中で開示される別の抗原又はその断片をコードする遺伝子によって分離されている、ＨＥＲ２の２種の別個の異なる抗原性断片をコードする。一部の実施形態において、別の抗原は、ＭＵＣ１又はその断片である。ＨＥＲ２癌原遺伝子は、上皮増殖因子受容体と広範な相同性を有する、変異していない１８５ｋＤの膜貫通糖タンパク質受容体をコードする。ＨＥＲ２タンパク質は、おそらくリガンド結合において機能する大きいシステインに富む細胞外ドメイン（ＥＣＤ）、短い膜貫通ドメイン、及びチロシンキナーゼ活性を有する小さい細胞質ドメイン（ＩＣＤ）からなる。正常な成体組織細胞では、ＨＥＲ２遺伝子は単一のコピーとして存在する。転写後メカニズムによる遺伝子の増幅又は過剰発現は、関連タンパク質の過剰発現につながり、したがって、がん細胞の制御されない増殖に寄与することによって悪性形質転換に関与する。ＨＥＲ２の過剰発現は、乳腺、卵巣、腎細胞、前立腺、膵臓、結腸、非小細胞肺、胃、唾液腺、膀胱及び口腔扁平上皮癌を含む様々な腫瘍型で記載されている。ＨＥＲ２の過剰発現は、リンパ節陽性及び陰性の両

方の乳がん患者の予後不良因子と考えられている。加えて、ＨＥＲ２過剰発現は、一部の化学療法薬に対する耐性の予測因子と思われる。ネオアジュバント、アジュバント及び転移の設定では、ＨＥＲ２は、トラスツズマブ、ペルツズマブ及びラパチニブを含む種々の標的薬剤で成功裏に標的化されている。

【００２３】

一実施形態において、多価ヒト乳がんワクチンは、６種の免疫原性ポリペプチド又はその断片をコードするベクターを含む。一実施形態において、免疫原性ポリペプチドのうちの１種は、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素（ｈＴＥＲＴ）を含む。一実施形態において、ベクター（例示的な実施形態については配列番号５及び７を参照のこと）は、ｈＴＥＲＴタンパク質のアミノ酸１５～１１３２を含む又はそれらからなるｈＴＥＲＴの抗原性断片（例示的な実施形態については配列番号６及び８を参照のこと）をコードする。ｈＴＥＲＴは、染色体上のテロメアを維持する及びテロメアが異常にくっつく又は崩壊（分解）するのを防御する酵素であるテロメラーゼの主要なタンパク質成分である。ｈＴＥＲＴは、分子量が約１２６キロダルトンの大きなタンパク質である。このタンパク質は、通常の非分裂細胞には概して存在しないが、乳がんを含むがん細胞の９０％超で高発現されたままである。

【００２４】

一実施形態において、多価ヒト乳がんワクチンは、６種の免疫原性ポリペプチド又はその断片をコードするベクターを含む。一実施形態において、免疫原性ポリペプチドのうちの１種は、ヒトサバイビンを含む（例示的な実施形態については配列番号６及び８を参照のこと）。サバイビンは、ヒトにおいてＢＩＲＣ５遺伝子によってコードされる１６キロダルトンの抗アポトーシスタンパク質である（例示的な実施形態については配列番号５及び７を参照のこと）。サバイビンは、バキュロウイルスＩＡＰリピート含有タンパク質５（ｂａｃｕｌｏｖｉｒａｌ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ｏｆ ａｐｏｐｔｏｓｉｓ ｒｅｐｅａｔ－ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ５）又はＢＩＲＣ５とも称される。サバイビンは、Ｂａｘ及びＦａｓ誘導アポトーシス経路の両方を阻害することが示されている。このタンパク質の発現は、胚胎児発生中に遍在的に見られるが、正常な分化成熟細胞では見られない。この遺伝子は乳がんの９０％超で発現される。

【００２５】

一実施形態において、多価ヒト乳がんワクチンは、６種の免疫原性ポリペプチド又はその断片をコードするベクターを含む。一実施形態において、免疫原性ポリペプチドのうちの１種は、ヒトメラノーマ関連抗原Ａ３（ＭＡＧＥＡ３）を含む。ＭＡＧＥＡ３は、ＭＡＧＥ－Ａ３遺伝子（例示的な実施形態については配列番号７及び９を参照のこと）によってコードされる３４キロダルトンの細胞内タンパク質（例示的な実施形態については配列番号８及び１０を参照のこと）である。ＭＡＧＥＡ３の発現は、胎盤栄養膜細胞及び精巣の生殖細胞に限定される。全乳がんの半数以上を含む多くのがんが、ＭＡＧＥ３を過剰発現する。ＭＡＧＥＡ３の正常な生理機能は不明である。

【００２６】

一実施形態において、多価ヒト乳がんワクチンは、６種の免疫原性ポリペプチド又はその断片をコードするベクターを含む。一実施形態において、免疫原性ポリペプチドのうちの１種は、ヒトマンマグロビンＡを含む（例示的な実施形態については配列番号６及び８を参照のこと）。セクレトグロビンファミリー２Ａのメンバー２としても知られるマンマグロビンＡは、ヒトにおいてＳＣＧＢ２Ａ２遺伝子（例示的な実施形態については配列番号５及び７を参照のこと）によってコードされるタンパク質である。マンマグロビンＡは、もっぱら原発性及び転移性乳がんの４０～８０％で発現される１０キロダルトンの分泌タンパク質２６である。マンマグロビンＡの発現は、正常な健常組織では非常に限られているようであり、乳がんでの発現は正常細胞よりも１０倍高いと推定されている。しかし、マンマグロビンＡの正常な生理機能は不明である。

【００２７】

本発明の一実施形態によれば、多価抗原性組成物は、上記で言及した抗原性ポリペプチ

ド又はその断片のうちの３種、４種、５種又は６種をコードするベクターである。一部の実施形態において。一実施形態において、ベクターは、各抗原又はその抗原性断片をコードする遺伝子のそれぞれの間のスペーサー配列をコードする。一部の実施形態において、スペーサー配列は、切断可能なアミノ酸配列である。一部の実施形態において、ベクターは、切断及び同時発現を可能にするＧＳＧスペーサーからなるインフレーム切断可能なアミノ酸配列をコードする。

【００２８】

一実施形態において、多価抗原性組成物は、本明細書中に開示した正常なアミノ酸配列に対して単一のアミノ酸修飾によって異なる、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡポリペプチドのいずれかをコードするベクターを含み、アミノ酸修飾は、アミノ酸の置換、欠失若しくは挿入又はアミノ酸の翻訳後修飾である。一実施形態において、単一のアミノ酸修飾は、保存的アミノ酸置換である。

【００２９】

一実施形態において、多価抗原性組成物は、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡタンパク質のいずれかの１５アミノ酸断片を含む、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡ抗原性断片のいずれかをコードするベクターを含む。一実施形態において、多価抗原性組成物は、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡタンパク質のいずれかの２０アミノ酸断片を含む、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡ抗原性断片のいずれかをコードするベクターを含む。一実施形態において、多価抗原性組成物は、得られるアミノ酸配列が野生型アミノ酸配列と少なくとも９５、９６、９７、９８又は９９％の配列同一性を有するようにアミノ酸配列がアミノ酸の置換、欠失又は挿入によって修飾されている、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡタンパク質のいずれかをコードするベクターを含む。

【００３０】

一実施形態において、抗原性組成物のポリペプチドは、連結部分によって互いに連結されている。一実施形態において、ポリペプチドは、ヘッドトゥーテール式に連結されている（すなわち、１つのポリペプチドのアミノ末端が第２のポリペプチドのカルボキシ末端に連結されている）。更なる一実施形態において、ポリペプチドはアミノ酸リンカーによって連結されており、一実施形態において、リンカーはジペプチド又はトリペプチドである。典型的には、連結アミノ酸はグリシン及びアラニンから選択され、一実施形態において、ポリペプチドはＧ－Ｇ又はＡ－Ａ－Ａリンカーで連結されている。抗原性タンパク質は、投与後に発現されたら、インビボでプロテアーゼによってプロセシングされてより小さいペプチド断片になり、それが抗原提示細胞上のＭＨＣクラスＩ及び／又はＭＨＣクラスＩＩ分子に結合できると理解されている。続いて、Ｔ細胞受容体が、ペプチドが結合しているＭＨＣ分子を認識してそれに結合し、免疫応答を開始する一次シグナルを形成する。

【００３１】

一実施形態において、ワクチンは、アジュバント及び薬学的に許容される担体を更に含む。本明細書中で使用する「アジュバント」という用語は、免疫系を刺激し及びワクチンに対する応答を増加させる薬剤を指す。ワクチンアジュバントは、当業者に周知である。例示的には、ＧＰＩ－０１００は、ワクチンの好適なアジュバントである。本明細書中で使用する「担体」という用語は、製剤中の活性成分（複数可）以外の成分を指す。担体の選択は、特定の投与方法又は適用方法、溶解性及び安定性に対する担体の効果、並びに剤形の性質等の要因に大きく依存する。ポリペプチド抗原のための薬学的に許容される担体は、当技術分野において公知である。一実施形態において、ワクチンは、乳がんを予防するために予防的に投与する。例示的な一態様において、ワクチンは、乳がん発症リスクのある、授乳中でない女性に投与する。

【００３２】

一実施形態において、免疫原性組成物は、腫瘍細胞増殖を阻害するために投与する。免疫原性組成物は、ヒト患者における乳腺腫瘍細胞の検出の前又は後に投与し得る。腫瘍細胞増殖の阻害は、腫瘍細胞の増殖の予防、停止、減速又は腫瘍細胞の死滅を指すと理解される。例示的な一態様において、ヒト免疫系のＴ細胞は、ベクターをベースとする免疫原性組成物の投与並びにその後の、ヒトＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡタンパク質の発現後に活性化される。活性化Ｔ細胞は、ＣＤ４＋及び／又はＣＤ８＋細胞であり得る。一実施形態において、免疫原性組成物の投与及びその後の抗原性タンパク質の発現後、免疫細胞とＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡタンパク質とのその後の遭遇によって、炎症誘発性応答が誘導される。炎症誘発性応答は、炎症誘発性サイトカイン及び／又はケモカイン、例えば、インターフェロンガンマ（ＩＦＮγ）及び／又はインターロイキン２（ＩＬ－２）の産生を含む。炎症誘発性サイトカイン及びケモカインは、当技術分野において周知である。

【００３３】

乳房組織がヒトＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡタンパク質を認識できる量で活発に産生していない患者に乳がんワクチンを投与した場合、これらの抗原性タンパク質による免疫化は、乳房組織において、実質的な炎症性免疫応答を誘発しない（すなわち、乳房組織不全を引き起こす可能性がある）ことを理解すべきである。これらの抗原性タンパク質、例えば、発生中の腫瘍の細胞によって発現されるものとのその後の遭遇は、免疫系によるリコール応答を誘発する。リコール応答としては、これらに限定されるものではないが、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡタンパク質発現細胞に対するロバストな免疫系攻撃を促進する炎症誘発性サイトカイン、例えば、ＩＦＮγ及びＩＬ－２の産生の増加が挙げられる。

【００３４】

一実施形態において、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡタンパク質に対してヒト患者を免疫化する方法が開示される。この方法は、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡタンパク質から選択される３種以上、４種以上、５種以上又は６種のポリペプチドをコードするベクターを含む免疫原性組成物を患者に投与するステップを含む。一態様において、免疫原性組成物は、６種の抗原性ポリペプチド全て又はそれらの１種若しくは複数の抗原性断片をコードするベクターを含む。

【００３５】

一実施形態において、免疫原性組成物は、乳がんを予防又は治療するためのワクチンである。ワクチンは、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡタンパク質又はそれらの１つ若しくは複数の抗原性断片をコードするベクターを含む免疫原性ポリペプチドを含む。

【００３６】

一実施形態において、ヒト患者において乳がんを治療する方法が、開示される。この方法は、ヒトＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡタンパク質から選択される３種以上、４種以上、５種以上又は６種のポリペプチドをコードするベクターと薬学的に許容される担体とを含む免疫原性組成物を、ヒト患者において乳房組織特異的な炎症応答を誘発するのに有効な量で患者に投与するステップを含む。

【００３７】

乳がんの治療又は予防に関する種々の実施形態によれば、免疫原性組成物の１つ又は複数のブースター注射が投与される。Ｔ細胞は、典型的には免疫系のマクロファージ及び樹状細胞上で発現される抗原提示分子の文脈で提示されるタンパク質抗原の個別のペプチドを認識する。ペプチド認識は典型的には、抗原提示細胞による抗原の貪食プロセシング及び主要組織適合複合体（ＭＨＣ）クラスＩ及び／又はクラスＩＩ分子への小ペプチド断片

のロード後に行われる。ＣＤ４＋Ｔ細胞は、ＭＨＣクラスＩＩ分子上で提示されたペプチドを認識した後、急速に増殖し、他の免疫エフェクター細胞を活性化し得るエフェクターＴ細胞となる。

【００３８】

多価免疫原性組成物は、連続的に又は乳がんの治療に使用される他の治療薬と組み合わせて投与することができる。これらの治療薬としては、ＩＦＮ－アルファ、ＩＦＮ－ベータ、インターロイキン－１、インターロイキン－２、腫瘍壊死因子、マクロファージコロニー刺激因子、マクロファージ活性化因子、リンホトキシン、線維芽細胞増殖因子が挙げられる。あるいは、多価ワクチンは、連続的に又は従来の化学療法薬、例えば、５－フルオロウラシル；パクリタキセル；エトポシド；カルボプラチン；シスプラチン；トポテカン、メタトレキサート（ｍｅｔｈａｔｒｏｘａｔｅ）及び／若しくは放射線療法と組み合わせて投与することができる。このような併用療法は有利には、通常投与量未満のそれらの薬剤を利用するか又はより少ないラジカルレジメン（ｒａｄｉｃａｌ　ｒｅｇｉｍｅｎ）を含み、したがってそれらの治療法に関連する潜在的な毒性又はリスクを回避することができる。

【００３９】

本発明の一実施形態によれば、抗原性ポリペプチドは、これらの抗原性ポリペプチド又はその断片をコードするベクターの投与後に、融合ペプチドとして一緒に連結されたポリペプチドのいくつかを発現することを含めて、組換えで発現されることができる。一実施形態において、多価ワクチンは、任意の薬学的に許容される形態で、腫瘍内、腫瘍周囲、病巣内、静脈内、筋肉内又は皮下投与することができる。

【００４０】

本発明の抗原性ポリペプチド断片は、長さが少なくとも５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００アミノ酸又はそれ以上の小ささのものであり得る。例えば、本発明の抗原性ポリペプチド断片は、１種又は複数の抗体によって認識されるエピトープを生成するのに必要な最小長さであり得る。本明細書中で使用する「エピトープ」は、抗体が結合する抗原性ポリペプチドのその領域を指す。

【００４１】

プラスミドベクター

ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡから選択される抗原遺伝子を、ヒトにおいて免疫応答を誘発するのに有効な量でヒトの細胞中において発現することができるベクターが本明細書中で提供される。ベクターはプラスミドであり得る。プラスミドは、これらの抗原遺伝子をコードする核酸を細胞にトランスフェクトするのに有用であり得、形質転換された宿主細胞は、マラリア抗原の発現が起こる条件下で培養及び維持する。

【００４２】

プラスミドは、本明細書中で開示されるＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡから選択される抗原遺伝子をコードする１つ又は複数のコード配列を含むＤＮＡ構築物を含み得る。本明細書中に開示されるこれらの遺伝子をコードするコード配列は好ましくは、調節エレメントに操作可能に連結されている。一部の実施形態において、プラスミドは、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡから選択される３種以上、４種以上、５種以上又は６種の抗原遺伝子のコード配列を含むＤＮＡ構築物を有する。一部の実施形態において、プラスミドは、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡから選択される多重抗原遺伝子のコード配列を含むＤＮＡ構築物を有する。ＤＮＡ構築物を有するプラスミドにおいて、これらは、多重抗原遺伝子のコード配列を含むことができ、構築物は、各抗原遺伝子が調節エレメントの別個のセットを含む別個の発現カセットであってもよいし、又は２つ以上のコード配列が、コード配列がＩＲＳ配列によって分離される単一発現カセットに組み込まれていてもよい。

【００４３】
プラスミドは、コード配列の上流にあり得る開始コドン、及びコード配列の下流にあり得る終止コドンを含み得る。開始及び終止コドンは、コード配列と共にフレーム内にあり得る。プラスミドはまた、コード配列と操作可能に連結しているプロモーターを含み得る。コード配列と操作可能に連結しているプロモーターは、サルウイルス４０（ＳＶ４０）由来のプロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス（ＭＭＴＶ）プロモーター、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）プロモーター、例えば、ウシ免疫不全ウイルス（ＢＩＶ）長末端反復（ＬＴＲ）プロモーター、モロニー（Ｍｏｌｏｎｅｙ）ウイルスプロモーター、トリ白血病ウイルス（ＡＬＶ）プロモーター、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、例えば、ＣＭＶ前初期プロモーター、エプスタインバン（Ｅｐｓｔｅｉｎ　Ｂａｎ）ウイルス（ＥＢＶ）プロモーター、又はラウス（Ｒｏｕｓ）肉腫ウイルス（ＲＳＶ）プロモーターであることができる。プロモーターはまた、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン又はヒト筋肉クレアチン等のヒト遺伝子由来のプロモーターであり得る。プロモーターはまた、天然又は合成の、組織特異的プロモーター、例えば、筋肉又は皮膚特異的プロモーターであり得る。このようなプロモーターの例は、米国特許出願公開第２００４０１７５７２７号に記載されており、その内容はその全体が本明細書中に組み込まれる。

【００４４】
プラスミドはまた、コード配列の下流にあり得るポリアデニル化シグナルを含み得る。ポリアデニル化シグナルは、ＳＶ４０ポリアデニル化シグナル、ＬＴＲポリアデニル化シグナル、ウシ成長ホルモン（ｂＧＨ）ポリアデニル化シグナル、ヒト成長ホルモン（ｈＧＨ）ポリアデニル化シグナル又はヒトβ－グロビンポリアデニル化シグナルであり得る。ＳＶ４０ポリアデニル化シグナルは、ｐＣＥＰ４プラスミド（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）由来のポリアデニル化シグナルであり得る。プラスミドはまた、コード配列の上流にエンハンサーを含み得る。エンハンサーは、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチン又はウイルスエンハンサー、例えば、ＣＭＶ、ＦＭＤＶ、ＲＳＶ若しくはＥＢＶに由来するものであり得る。

【００４５】
プラスミドはまた、プラスミドを染色体外に維持し及び細胞内でプラスミドの複数のコピーを産生するために、哺乳動物の複製開始点を含み得る。プラスミドは、組み込みなしで高コピーエピソーム複製を生じ得る、エプスタイン・バー（Ｅｐｓｔｅｉｎ　Ｂａｒｒ）ウイルス複製起点及び核抗原ＥＢＮＡ－１コード領域を含み得るｐＶＡＸ１、ｐＣＥＰ４又はｐＲＥＰ４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）であることがある。プラスミドの骨格はｐＡＶ０２４２であり得る。プラスミドは、複製欠損アデノウイルス５型（Ａｄ５）プラスミドであり得る。プラスミドはまた、プラスミドが投与される細胞における遺伝子発現に十分に適し得る調節配列を含み得る。任意の抗原のコード配列は、宿主細胞におけるコード配列のより効率的な転写を可能にし得るコドンを含み得る。したがって、コード配列は、より効率的な翻訳のためにコドン最適化され得る。

【００４６】
コード配列はまた、Ｉｇリーダー配列を含み得る。リーダー配列は、コード配列の５’であり得る。この配列によってコードされるコンセンサス抗原は、コンセンサス抗原タンパク質がその後に続くＮ末端Ｉｇリーダーを含み得る。Ｎ末端ＩｇリーダーはＩｇＥ又はＩｇＧであり得る。プラスミドはｐＳＥ４２０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）であってもよく、これは、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ；Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）におけるタンパク質産生に使用され得る。プラスミドはまた、ｐＹＥＳ２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）であってもよく、これは、酵母のサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株におけるタンパク質産生に使用され得る。プラスミドはまた、ＭＡＸＢＡＣ（商標）コンプリートバキュロウイルス発現系（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）であってもよく、これは、昆虫細胞におけるタンパク質産生に使用され得る。プラスミドはまた、ｐｃＤＮＡＩ又はｐｃＤＮＡ３（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）であってもよく、これは、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞等の哺乳動物細胞におけるタンパク質産生

に使用され得る。

【００４７】

プラスミドを含む免疫原性又はワクチン組成物が提供される。免疫原性組成物は、単一核酸分子、例えば、単一プラスミドの複数のコピー、２種以上の異なる核酸分子、例えば、２種以上の異なるプラスミドの複数のコピーを含み得る。例えば、免疫原性組成物は、複数の、１種、２種、３種、４種、５種、６種、７種、８種、９種若しくは１０種又はそれ以上の異なる核酸分子を含み得る。このような組成物は、複数の、１種、２種、３種、４種、５種、６種、７種、８種、９種若しくは１０種又はそれ以上の異なるプラスミドを含み得る。組成物は、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡから選択される抗原遺伝子又はその抗原性断片をコードする１つ又は複数のコード配列のうちの１つ又は複数のコード配列を含み得る。免疫原性組成物は、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡから選択される単一の抗原遺伝子若しくはその抗原性断片のコード配列、これらの抗原遺伝子のうちの２つのコード配列、これらの抗原遺伝子のうちの３つのコード配列、これらの抗原遺伝子のうちの４つのコード配列、これらの遺伝子の５つの抗原のコード配列又はこれらの抗原遺伝子のうちの６つのコード配列を集合的に含む、核酸分子、例えば、プラスミドを含み得る。

【００４８】

ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡから選択される抗原遺伝子又はその抗原性断片のコード配列を含む組成物は、単一核酸分子、例えば、単一プラスミドであってもよいし、又は一方の核酸分子が１つの抗原遺伝子のコード配列を含み及び他方の核酸分子が異なる抗原遺伝子のコード配列を含む、２種の異なる核酸分子、例えば、２種の異なるプラスミドを含んでいてもよい。同様に、これらの抗原遺伝子のうちの３種のコード配列を含む組成物は、単一核酸分子、例えば、単一プラスミド、２種の異なる核酸分子又は３種の異なる核酸分子を含み得る。同様に、これらの抗原遺伝子のうちの４種のコード配列を含む組成物は、単一核酸分子、例えば、単一プラスミド、２種の異なる核酸分子、３種の異なる核酸分子又は４種の異なる核酸分子を含み得る。これらの抗原遺伝子のうちの５種のコード配列を含む組成物は、単一核酸分子、例えば、単一プラスミド、２種の異なる核酸分子、３種の異なる核酸分子、４種の異なる核酸分子又は５種の異なる核酸分子を含み得る。

【００４９】

一部の実施形態において、組成物は、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡから選択される抗原遺伝子又はその抗原性断片をコードする複数の単一核酸分子を含む。一部の実施形態において、組成物は、これらの抗原遺伝子又はその抗原性断片のうちの２種をコードする、複数の単一核酸分子、例えば、単一プラスミドを含む。一部の実施形態において、組成物は、これらの抗原遺伝子又はその抗原性断片のうちの３種をコードする、複数の単一核酸分子、例えば、単一プラスミドを含む。一部の実施形態において、組成物は、これらの抗原遺伝子又はその抗原性断片のうちの４種をコードする、複数の単一核酸分子、例えば、単一プラスミドを含む。一部の実施形態において、組成物は、これらの抗原遺伝子又はその抗原性断片のうちの５種をコードする、複数の単一核酸分子、例えば、単一プラスミドを含む。一部の実施形態において、組成物は、これらの抗原遺伝子又はその抗原性断片のうちの６種をコードする、複数の単一核酸分子、例えば、単一プラスミドを含む。

【００５０】

一部の実施形態において、組成物は複数の２種の異なる核酸分子、例えば、２種のプラスミドを含み、各異なる核酸分子はＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡから選択される異なる抗原遺伝子又はその抗原性断片の単一の異なるコード配列を含む。集合的に、２種の異なるプラスミドは、２種の異なる抗原遺伝子又はその抗原性断片をコードする。一部の実施形態において、組成物は、３種の異なる抗原遺伝子のコード配列を集合的に含む、複数の２種の異なる核酸分子、例えば、２

種のプラスミドを含む。集合的に、２種の異なるプラスミドは、３種の異なる抗原遺伝子又はその抗原性断片をコードする。

【００５１】

一部の実施形態において、組成物は、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡから選択される４種の異なる抗原遺伝子又はその抗原性断片のコード配列を集合的に含む、複数の２種の異なる核酸分子、例えば、２種のプラスミドを含む。一部の実施形態において、１つの核酸分子はこれらの抗原遺伝子又はその抗原性断片のうちの１種をコードし、第２の核酸分子は３種の異なる抗原遺伝子又はその抗原性断片をコードする。集合的に、２種の異なるプラスミドは、４種の異なる抗原遺伝子又はその抗原性断片をコードする。

【００５２】

一部の実施形態において、組成物は、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡから選択される５種の異なる抗原遺伝子又はその抗原性断片のコード配列を集合的に含む、複数の２種の異なる核酸分子、例えば、２種のプラスミドを含む。一部の実施形態において、１つの核酸分子は２種の抗原遺伝子又はその抗原性断片をコードし、第２の核酸分子は３種の抗原遺伝子又はその抗原性断片をコードする。集合的に、２種の異なるプラスミドは、５種の異なる抗原遺伝子又はその断片をコードする。

【００５３】

一部の実施形態において、組成物は、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡから選択される６種の異なる抗原遺伝子又はその抗原性断片のコード配列を集合的に含む、複数の２種の異なる核酸分子、例えば、２種のプラスミドを含む。一部の実施形態において、１つの核酸分子は３種の抗原遺伝子又はその抗原性断片をコードし、第２の核酸分子は３種の異なる抗原遺伝子又はその抗原性断片をコードする。集合的に、２種の異なるプラスミドは、６種の異なる抗原遺伝子又はその抗原性断片をコードする。

【００５４】

改変ワクシニアアンカラウイルスベクター

一実施形態において、本開示は、乳がん免疫化のための組換え改変ワクシニアアンカラ（ＭＶＡ）ウイルスの使用を包含する。組換えＭＶＡは、ＭＶＡウイルスへの異種配列の挿入によって作製する。本発明の実施において有用なＭＶＡウイルス株の例は、ＭＶＡ株（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第５１８５１４６号に記載されている；Ａｌｔｅｎｂｕｒｇ（２０１４年）Ｖｉｒｕｓｅｓ６巻、２７３５～２７６１頁も参照のこと）であり、ＭＶＡ－５７２、ＭＶＡ－５７５、ＭＶＡ－ＢＮ及びその派生物が、追加の例示的な株である。ＭＶＡのコード配列は、ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｎｕｃｃｏｒｅ／Ｕ９４８４８．１で見出すことができる。ＭＶＡは、安全性がより高い（複製成分がより少ない）ために好ましいが、いずれのＭＶＡも本発明に好適である。

【００５５】

ある特定の実施形態において、ＭＶＡは、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡから選択される抗原性タンパク質又はその抗原性断片をコードする３種以上、４種以上、５種以上又は６種の遺伝子を含む。更なる実施形態において、抗原は全長形態で発現されるのではなく、２つ以上の断片として発現されるように改変されている。

【００５６】

このような乳がん免疫原性作用物質は、本明細書において非限定的な例として記載されており、本明細書を通じて「ｍｖａＢＣ．１」及び「ｍｖａＢＣ．２」と称する。ｍｖａＢＣ．１及びｍｖａＢＣ．２を含むがこれらに限定されるものではない、本明細書中で記載するこのような免疫原性作用物質は、乳がんの予防的免疫化及び治療に有用である。本発明は、乳がんリスクがあるが乳がんに罹患していない患者及び全段階の乳がんに罹患し

ている患者を含むヒトの初回及びブーストワクチン接種レジメンにおけるこのような薬剤の使用を可能にする。一実施形態において、ＭＶＡは、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡから選択される抗原性タンパク質又はその抗原性断片をコードする３種以上、４種以上、５種以上又は６種の遺伝子をコードするプラスミドＤＮＡベクターによる初回免疫化後のブースト免疫化である。

【００５７】

ある特定の実施形態において、ＭＶＡはＭＶＡ－ＢＮであり、米国特許第６７６１８９３号及び第６１９３７５２号に記載されている。ある特定の実施形態において、組換えＭＶＡはＭＶＡの派生物である。このような「派生物」は、ＭＶＡと本質的に同じ複製特性を示すがそのゲノムの１つ又は複数の部分において差異を示すウイルスを含む。ＭＶＡと本質的に同じ複製特性を有するウイルスは、例えばトランスジェニックマウスモデルＡＧＲ１２９で決定した場合、ＣＥＦ細胞並びにＨｅＬａ、ＨａＣａｔ及び１４３Ｂ細胞株においてＭＶＡと同様な増幅倍率で複製し、同様なインビボ複製特性を示すウイルスである。一部の実施形態において、ＭＶＡ派生物はＭＶＡのコドン最適化された変種である。

【００５８】

ある特定の実施形態において、ＭＶＡは、ワクシニアウイルスにとって異種である追加のヌクレオチド配列を含む組換えワクシニアウイルスである。前記実施形態のいくつかにおいて、異種配列は、免疫系によって応答を誘導するエピトープをコードする。したがって、ある特定の実施形態において、組換えＭＶＡは、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡのいずれかに由来するエピトープを含むタンパク質又は薬剤に対してワクチン接種するために使用する。

【００５９】

ある特定の実施形態において、異種核酸配列はウイルスゲノムの非必須領域に挿入される。それらの実施形態のいくつかにおいて、異種核酸配列は、ＭＶＡゲノムの天然に存在する欠失部位に挿入される。異種配列をＭＶＡゲノムに挿入する方法は、当業者に公知である。

【００６０】

ワクチン調製のために、ＭＶＡは、生理学的に許容される形態に変換することができる。ある特定の実施形態において、このような調製は、種痘に使用されるポックスウイルスワクチンの調製での経験に基づく。

【００６１】

調製のために、精製ウイルスを－８０℃で保存し、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、１４０ｍＭＮａＣｌ（ｐＨ７．４）で製剤化して、$ＴＣＩＤ_{50}$が１ｍｌ当たり５×１０^{8}の力価を有する。ワクチン用量調製のために、例えば、バイアル、好ましくはガラスバイアル中、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中、２％ペプトン及び１％ヒトアルブミンの存在下で１０^{2}～１０^{8}個のウイルス粒子を凍結乾燥することができる。あるいは、ワクチン用量は、製剤中のウイルスの凍結乾燥によって段階的に調製することができる。ある特定の実施形態において、製剤は、追加の添加剤、例えば、マンニトール、デキストラン、糖、グリシン、ラクトース、ポリビニルピロリドン、又はインビボ投与に好適な酸化防止剤若しくは不活性ガス、安定剤若しくは組換えタンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン）を含むがこれらに限定されない他の添加剤を含有する。次いで、バイアルを密封する。これは、好適な温度、例えば、４℃～室温で数カ月保存することができる。しかし、必要がない限り、バイアルは好ましくは－２０℃未満の温度で保存する。

【００６２】

ワクチン接種又は治療法を含む一部の実施形態において、凍結乾燥物を、０．１～０．５ｍｌの水溶液、好ましくは生理食塩水又はＴｒｉｓ緩衝液に溶解させ、全身的又は局所的に投与する、すなわち、非経口、皮下、静脈内、筋肉内、鼻腔内、皮内又は当業者に公知の任意の他の投与経路でする。投与方法、用量及び投与回数の最適化は、当業者の技術及び知識の範囲内である。

【００６３】

免疫化方法

乳がんを治療及び／又は予防するための方法であって、それを必要とする対象に、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡ又はその抗原性断片をコードする少なくとも１種のベクターであり、免疫原が、体液性免疫応答（例えば、粘膜性ＩｇＡ、全身性ＩｇＡ、ＩｇＧ、ＩｇＭ応答を含む）及び／又は細胞媒介性免疫応答である防御免疫応答を誘発するエピトープを有する、ベクターと、薬学的に許容される担体、希釈剤又は賦形剤とを含む組成物を投与するステップを含む方法も、本明細書中に記載される。免疫原組成物は、投与されるベクター及びそのバリアントに特異的な免疫応答を誘発するのに十分な用量で投与する。

【００６４】

本明細書中に記載した免疫原性組成物による治療に好適なヒト対象又は宿主は、乳がん発症リスクの十分に確立された指標によって又は存在する疾患の十分に確立されたホールマークによって特定することができる。本発明の１種又は複数のベクターを含有する免疫原性組成物は、ヒト対象への組成物の投与を可能にする任意の形態であり得る。例えば、ベクター組成物は、液体の溶液として調製及び投与しもよいし、又は固体形態で投与できる若しくは投与に伴って溶液中に再懸濁できる固体形態（例えば、凍結乾燥された形態）として調製してもよい。ハイブリッドポリペプチド組成物は、組成物内に含有される活性成分が対象若しくは患者への組成物の投与時に生物学的に利用可能となるように又は遅延放出によって生物学的に利用可能になるように、調製又は製剤化する。対象又は患者に投与される組成物は、１つ又は複数の投与量単位の形態を取り；例えば、錠剤は単一投与量単位であることができ、エアロゾルの形態の本発明の１種又は複数の化合物の容器は、複数の投与量単位を収納することができる。ある特定の好ましい実施形態において、本発明のベクターを含む前記免疫原性組成物又はワクチンはいずれも、容器、好ましくは滅菌容器中に入っている。

【００６５】

一実施形態において、免疫原性組成物又はワクチンは、皮内又は皮下を含む非経口手段によって投与する。本明細書中で使用する「非経口」という用語は、皮内、筋肉内、鼻腔内、眼内、腹腔内、静脈内、皮下、粘膜下及び膣内注射又は注入技術を含む、胃腸管を迂回する投与経路を示す。本明細書中で使用する「皮下／粘膜下」という用語は、局所的投与を含む、皮膚を通して又は皮膚を経由して免疫原性組成物を投与する投与の経路である。「経鼻」又は「吸入」という用語は、肺内又は経肺投与を含む、免疫原性組成物を呼吸樹に導入する投与の技術を包含する。一実施形態において、本発明の組成物は、経鼻的に投与する。

【００６６】

一部の実施形態において、免疫原性組成物又はワクチンは、１用量当たり約１００μｇ～約１０００μｇの量のプラスミドベクターを含有する。一部の実施形態において、投与される１用量当たりのベクターの量は、約５００μｇ～約７００μｇである。一部の実施形態において、投与される１用量当たりのベクターの量は、約５００μｇ、５５０μｇ、６００μｇ、６５０μｇ、７００μｇ又はそれ以上である。一部の実施形態において、プラスミドベクターの量は、投薬スケジュールによって異なる。例えば、初回用量は、ブースター免疫化用量を含むその後のあらゆる免疫化用量と同じであっても、それより低くても、又はそれより高くてもよい。任意のヒト対象に投与される１用量当たりのプラスミドの量は、ヒト対象の年齢、体重及び体調に従って調整することができる。

【００６７】

一部の実施形態において、免疫原性組成物又はワクチンは、１用量当たり、約10^3～10^9プラーク形成単位（ｐｆｕ）の量のＭＶＡベクターを含有する。一部の実施形態において、投与される１用量当たりのベクターの量は約10^5～10^7ｐｆｕである。一部の実施形態において、投与される１用量当たりのベクターの量は約10^5ｐｆｕ、10^6ｐｆｕ、10^7ｐｆｕ又はそれ以上である。一部の実施形態において、ＭＶＡベクターの量は、投薬スケジュールによって異なる。例えば、初回用量は、ブースター免疫化用量を

含むその後のあらゆる免疫化用量と同じであっても、それより低くても、又はそれより高くてもよい。任意のヒト対象に投与される１用量当たりのプラスミドの量は、ヒト対象の年齢、体重及び体調に従って調整することができる。

【００６８】

アジュバント

一部の実施形態において、本発明は、１種又は複数のＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡ遺伝子をコードするベクターと、ワクチンアジュバントとを含む免疫原性組成物又はワクチンを提供する。一実施形態において、乳がんを治療及び／又は予防するための免疫原性組成物として有用な組成物は、免疫応答を誘発することができる、本明細書中に記載したＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡ抗原（免疫原）をコードする少なくとも１種のベクターと、組換えヒトＧＭ－ＣＳＦ（サルグラモスチムとしても知られる）とを含有する。サルグラモスチムは、酵母（Ｓ．セレビシエ）発現系において組換えＤＮＡ技術によって生成された組換えヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ｒｈｕ　ＧＭ－ＣＳＦ）である。ＧＭ－ＣＳＦは、造血前駆細胞の増殖及び分化を刺激する造血成長因子である。サルグラモスチムは、１９，５００、１６，８００及び１５，５００ダルトンの分子質量を有する３つの主要な分子種を特徴とする１２７アミノ酸の糖タンパク質である。サルグラモスチムのアミノ酸配列は、天然のヒトＧＭ－ＣＳＦとは２３位のロイシンの置換によって異なり、炭水化物部分が天然のタンパク質とは異なり得る。液体サルグラモスチムは、バイアル中の保存剤添加（１．１％ベンジルアルコール）滅菌注射剤（５００ｍｃｇ／ｍＬ）として製剤化する。凍結乾燥サルグラモスチムは、保存剤を含まない滅菌白色粉末（２５０ｍｃｇ）であって、１ｍＬの滅菌注射用水（ＵＳＰ）又は１ｍＬの注射用静細菌水（ＵＳＰ）での復元を必要とする。液体サルグラモスチムは６．７～７．７のｐＨ範囲を有し、凍結乾燥サルグラモスチムは７．１～７．７のｐＨ範囲を有する。液体サルグラモスチム及び復元された凍結乾燥サルグラモスチムは、皮下注射（ＳＣ）又は静脈内注入（ＩＶ）に好適な無色透明の液体である。

【００６９】

一部の実施形態において、アジュバントは、プロトリン（Ｐｒｏｔｏｌｌｉｎ）又はプロテオソーム（ｐｒｏｔｅｏｓｏｍｅ）アジュバントである（例えば、米国特許第５，７２６，２９２号を参照のこと）。当技術分野で理解されるように、アジュバントは免疫原の免疫原性を強化又は改善することができ（すなわち、免疫刺激剤として作用する）、多くの抗原は、アジュバントと組み合わせるか又は混ぜるか若しくは混合しなければ、免疫原性が低い。様々な供給源、例えば、抗原をコードする生ＭＶＡ、抗原をコードするプラスミド、スプリット抗原調製物、サブユニット抗原、組換え抗原及びそれらの組合せを、抗原の供給源として使用できる。ベクターをベースとするワクチンの有効性を最大化するために、ベクターは、強力な免疫刺激剤又はアジュバントと組み合わせることができる。他の例示的なアジュバントとしては、ミョウバン（水酸化アルミニウム、ＲＥＨＹＤＲＡＧＥＬ）；リン酸アルミニウム；ビロソーム；リピドＡを含む及び含まないリポソーム；又は他の水中油型エマルジョン型のアジュバント、例えば、ＭＦ－５９（ノバルティス社）、また、例えば、ナノエマルジョン（例えば、米国特許第５，７１６，６３７号を参照のこと）若しくはサブミクロンエマルジョン（例えば、米国特許第５，９６１，９７０号を参照のこと）；並びにフロイント完全及び不完全アジュバントが挙げられる。

【００７０】

プロテオソームをベースとするアジュバント（すなわち、プロトリン又はプロテオソーム）は、本明細書中に記載した、様々なＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡ抗原のうちの任意の１種又は複数を含み得るワクチン組成物又は製剤に使用することができる。プロテオソームは、典型的にナイセリア属（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ）種の外膜タンパク質（ＯＭＰ）から構成されるが、他のグラム陰性細菌にも由来し得る（例えば、米国特許第５，７２６，２９２号を参照のこと）。プロテオソームは、２０～８００ｎｍの小胞又は小胞様ＯＭＰクラスターに自己集合し、タンパク

質抗原、特に疎水性部分を有する抗原を非共有結合的に組み込み、配位させ、会合させ又は他の方法でそれらと協力する能力を有する。プロテオソームは疎水性であり、ヒトの使用に安全であり、サイズがある特定のウイルスに匹敵する。背景として、理論に拘束されることを望むものではないが、プロテオソームを抗原、例えば、タンパク質抗原と混合すると、抗原とプロテオソームとの間の非共有結合的な会合又は配位を含む組成物が得られる。この会合又は配位は、可溶化界面活性剤（ｄｅｔｅｒｇｅｎｔ）を、例えばダイアリシスによって、選択的に除去するか又は濃度低下させる場合に形成される。

【００７１】

１種又は複数のＯＭＰのモルテングロビュール様ＯＭＰ組成物を含む、小胞又は小胞様形態の外膜タンパク質成分を提供する任意の調製方法は、プロテオソームの範囲内に含める。一実施形態において、プロテオソームは、ナイセリア属種及びナイセリア・メニンギティディス（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）に由来する。ある特定の他の実施形態において、プロテオソームはアジュバント及び抗原送達組成物であり得る。一実施形態において、免疫原性組成物は、乳がん抗原をコードする１種又は複数のベクターとアジュバントとを含み、アジュバントは、プロジュバント（ＰｒｏＪｕｖａｎｔ）又はプロトリンを含む。ある特定の実施形態において、免疫原性組成物は、第２の免疫刺激剤、例えば、リポ糖を更に含む。すなわち、アジュバントは、追加の免疫刺激剤を含むように調製してもよい。例えば、プロジュバントをリポ糖と混合して、ＯＭＰ－ＬＰＳアジュバントを提供してもよい。したがって、ＯＭＰ－ＬＰＳ（プロトリン）アジュバントは、２つの成分から構成され得る。第１の成分は、グラム陰性細菌、例えば、ナイセリア・メニンギティディスから調製されたプロテオソームの外膜タンパク質調製物（すなわち、プロジュバント）を含み、第２の成分はリポ糖の調製物を含む。第２の成分は、脂質、糖脂質、糖タンパク質、小分子等、及びそれらの組合せを含み得ることも企図される。本明細書に記載されるように、ＯＭＰ－ＬＰＳアジュバントの２つの成分は、成分間の相互作用を最適化するために特定の初期比で組み合わせて（混合又は製剤化して）、免疫原性組成物の調製に使用するための成分の安定した会合及び製剤化をもたらすことができる。このプロセスは、一般に、選択された界面活性剤溶液中で成分（例えば、エンピゲン（Ｅｍｐｉｇｅｎ）ＢＢ、トリトン（Ｔｒｉｔｏｎ）ｘ－１００、メガ－１０（Ｍｅｇａ－１０））を混合し、次いで、ダイアリシス又はダイアフィルトレーション／限外濾過法によって界面活性剤の量を所定の好ましい濃度まで低減しながら、ＯＭＰ及びＬＰＳ成分の複合体形成を行うことを含む。２つの成分の混合、共沈又は凍結乾燥はまた、適切で安定した会合、組成又は製剤化をもたらすために使用できる。一実施形態において、免疫原性組成物は、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡ抗原をコードする１種又は複数のベクターとアジュバントとを含み、アジュバントはプロジュバント（すなわちプロテオソーム）及びリポ糖を含む。

【００７２】

一実施形態において、総プロテオソームタンパク質の百分率としての最終リポサッカリド含有量は重量で、約１％～約５００％の範囲、また、約１０％～約２００％の範囲、又は約３０％～約１５０％の範囲であり得る。別の実施形態は、プロテオソームがナイセリア・メニンギティディスから調製され、リポ糖がシゲラ・フレックスネリ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｆｌｅｘｎｅｒｉ）又はプレシオモナス・シゲロイデス（Ｐｌｅｓｉｏｍｏｎａｓ ｓｈｉｇｅｌｌｏｉｄｅｓ）から調製され及び最終リポ糖含有量が重量で総プロテオソームタンパク質の５０％～１５０％である、アジュバントを含む。別の実施形態において、プロテオソームは、総ＯＭＰの約０．５％～約５％の範囲の内因性リポオリゴ糖（ＬＯＳ）含有量で調製される。別の実施形態において、プロテオソームは約１２％～約２５％の範囲の内因性リポサッカライドを有し、更に別の実施形態において、内因性リポ糖は総ＯＭＰの約１５％～約２０％である。本開示はまた、プロテオソームの供給源である同じグラム陰性細菌種に由来するか又は異なる細菌種に由来し得る、任意のグラム陰性細菌種に由来するリポ糖を含有する免疫原性組成物を提供する。ある特定の実施形態において、免疫原性組成物中のプロテオソーム又はプロトリン対ベクターの比は、１：１より大きい、

２：１より大きい、３：１より大きい又は４：１より大きい。他の実施形態において、免疫原性組成物中のプロテオソーム又はプロトリン対ベクターの比は、約１：１、２：１、３：１又は４：１である。この比は８：１以上であってもよい。他の実施形態において、免疫原性組成物中のプロテオソーム又はプロトリン対ベクターの比は、約１：１～約１：５００の範囲であり、少なくとも１：５、少なくとも１：１０、少なくとも１：２０、少なくとも１：５０、又は少なくとも１：１００、又は少なくとも１：２００である。

【００７３】

他の実施形態において、免疫原性組成物は、（プロジュバント又はプロトリン）を含んでもよく、又はワクチン接種者の１種若しくは複数の宿主細胞によって産生されるある特定の受容体（例えば、Ｔｏｌｌ様受容体又は「ＴＬＲ」）と相互作用することによって宿主免疫応答を刺激することができる成分（例えば、受容体リガンド）を更に含んでいてもよい。一実施形態によれば、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡタンパク質の免疫原性エピトープを含む組成物は、Ｔｏｌｌ様受容体と相互作用することができるポリペプチドエピトープを含有し、それによって自然免疫応答を促進することができ、それはその後の適応免疫応答を誘起する場合も誘起しない場合もある。

【００７４】

自然免疫応答は、特異的な抗原依存性又は抗体依存性の応答ではない（すなわち、Ｔ細胞及び／又はＢ細胞のクローン増殖を伴わない）非特異的な防御免疫応答である。自然免疫応答は、本明細書中に記載した多数の乳がん抗原又は免疫原のいずれかによって誘発され得る。本明細書中に記載した免疫刺激組成物は、プロテオソーム及びリポ糖（プロトリン）を含み、そのいずれか一方が又は両方が非特異的防御反応を誘発し得る。理論に拘束されることを望むものではないが、本明細書中に開示したワクチン組成物又は製剤の１つ又は複数の成分は、ワクチン接種者の自然免疫応答又は適合免疫応答と関連するＴｏｌｌ様受容体と相互作用する可能性がある。ＴＬＲ８及びＴＬＲ１０を除くある特定のＴＬＲと相互作用し、その後に活性化する１種又は複数のリガンドが、特定されている。ナイセリア・メニンギティディスのある特定の外膜タンパク質、例えば、ＯＭＰ２（ＰｒｏＢとも称する）はＴＬＲ２と相互作用するが、全てではないがほとんどのグラム陰性細菌のＬＰＳはＴＬＲ４と相互作用する。したがって、生物学的効果に寄与し得る、本明細書中に記載したワクチン組成物又は製剤の１つの活性は、ＴＬＲ２及びＴＬＲ４の一方又は両方の活性化を含む。他のＴＬＲ（ＴＬＲ２及びＴＬＲ４以外の）の活性化は、同様な機能を担うか、又は発現されるサイトカインの質的若しくは量的プロファイルを更に強化させる可能性があり、宿主Ｔｈｌ／Ｔｈ２免疫応答と関連し得る。ＬＰＳ及びＰｏｒＢ以外のＴＬＲリガンドを単独で又は組み合わせて使用して、ＴＬＲ２又はＴＬＲ４を活性化し得ることも企図される。１種又は複数のＴＬＲの質的又は量的活性化は、体液性抗体応答が付随しても又はしなくても、Ｔｈ１又はＴｈ２免疫応答の相対的な刺激（均衡のとれた又は均衡のとれていない）を誘発するか、もたらすか又はそれに影響を与えることが期待される。ＴＬＲ２及びＴＬＲ４以外のＴＬＲと相互作用するリガンドもまた、本明細書に記載したワクチン組成物に使用できる。このようなワクチン成分を単独で又は組み合わせて使用して、本明細書に記載したような、ウイルス感染を治療するか又はウイルス感染から防御するのに十分な宿主免疫応答の発生に影響を与えることができる。

【００７５】

当技術分野で公知の他の成分を、本明細書中に記載した組成物中に使用してもよい。免疫原の一部の実施形態は、アジュバント、例えば、バチルス・カルメット・ゲラン（ＢＣＧ；Ｂａｃｉｌｌｕｓ　Ｃａｌｍｅｔｔｅ－Ｇｕｅｒｉｎ）、サイトカイン（非限定的な例として、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ））、アルミニウムゲル若しくはアルミニウム塩、又は非特異的に免疫応答を刺激し及びワクチンに対する免疫応答の有効性を強化する、当技術分野で公知の他のアジュバントを更に含み得る。少なくとも１つの好ましい実施形態において、アジュバントはＢＣＧ　Ｔｉｃｅである。

【００７６】

免疫原性組成物又はワクチンは、ホルムアルデヒド、抗生物質、グルタミン酸一ナトリウム、２－フェノキシエタノール、フェノール及び塩化ベンゼトニウムを含むがこれらに限定されない、当技術分野で公知の保存剤を更に含み得る。免疫原性組成物又はワクチンは、注射用滅菌水、注射剤用平衡塩類溶液を更に含み得る。

【００７７】

本発明の一部の実施形態を本明細書中に示し、説明したが、このような実施形態は、一例として提供するにすぎず、本発明の範囲を他の方法で限定することを意図するものではない。本発明の記載された実施形態の種々の代替形態を、本発明の実施に用いることができる。したがって、添付した特許請求の範囲の趣旨及び範囲は、本明細書に含まれる好ましい変形形態の記載に限定されるべきではない。

【００７８】

読み手の注意は、本明細書と同時に提出され及び本明細書と共に公衆の閲覧に付される全ての論文及び文献並びに参照により本明細書に組み込まれる全てのそのような論文及び文献の内容に向けられる。明細書（あらゆる添付の特許請求の範囲、要約書及び図面を含む）において開示する全ての特徴は、特に明記しない限り、同一の、均等な又は同様な目的にかなう代替的な特徴に置き換えることができる。したがって、特に明記しない限り、開示した各特徴は、包括的な一連の均等な又は同様な特徴の一例にすぎない。

【実施例】

【００７９】

実施例１：ワクチンの調製

２Ａペプチド技術を使用して２種の構築物の産物として６種の抗原を同時発現するワクチンを設計及び製造した（図１）。ＨＥＲ２を、全長タンパク質と関連する発癌活性を予防するために分割した。加えて、既知の細胞下発現を有する抗原（ＨＥＲ２　ＩＣＤ、ｈＴＥＲＴ、ＭＡＧＥＡ３及びサバイビン）のＮ末端に異なるシグナル配列（ＳＳ）を付加して、細胞外分泌を促進する。マルチ抗原遺伝子カセットをｐＵＭＶＣ４ａワクチンプラスミド（図２）に挿入して、ｐＢＣ．１及びｐＢＣ．２を作製し、それらの発現をＨＥＫ２９３細胞における一過性トランスフェクションによって検証した。全ての抗原は、分泌されるだけであったマンマグロビンＡを除いて、細胞画分及び分泌画分において発現される（図２）。組換えＭＶＡを作製するために、２つのマルチ抗原遺伝子カセット（図１）をワクシニアウイルスのためにコドン最適化し、ｐＭＶＡｐ１１ｅＧＦＰ－ｍＨ５導入用ベクター（図２）に挿入して、ｍｖａＢＣ．１及びｍｖａＢＣ．２を作製した。ＭＶＡウイルスの作製及び増幅は、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｉｏｗａ　Ｖｉｒａｌ　Ｖｅｃｔｏｒ　Ｃｏｒｅ　Ｆａｃｉｌｉｔｙによって行った。ＰＣＲ／配列決定による最終ＱＣ（補足データ４）を行った後、ｍｖａＢＣ．１及びｍｖａＢＣ．２からの標的抗原の組換え発現を、ＤＦ－１細胞の感染によって評価した。細胞内及び細胞外で発現されている個々の抗原の発現パターンは、プラスミドをベースとする発現（図２）と一致していた（図３）。全てのプラスミドを、次世代配列決定及びＭＶＡによって標的配列決定を介して検証した。

【００８０】

実施例２：プラスミドワクチンからの標的抗原のインビトロ発現

ＨＥＫ２９３細胞にプラスミドｐＢＣ．１及びｐＢＣ．２をトランスフェクトした。無血清培地中で２４時間インキュベーション後、細胞培養上清をアセトンで沈殿させ、細胞可溶化物を調製した。２０μｇの細胞可溶化物及び２０μｌの上清（１００μｌのうち）を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥウエスタンブロットによって抗原特異的抗体を使用して解析した。図５は、ｐＢＣ．１及びｐＢＣ．２プラスミドをトランスフェクトしたＨＥＫ２９３細胞からの細胞画分及び分泌（上清）画分のウエスタンブロット解析を示す。膜は、Ｈｅｒ２ＥＣＤ（細胞外ドメイン）、Ｈｅｒ２ＩＣＤ（細胞内ドメイン）、Ｍａｇｅａ３、サバイビン及びβ－アクチンに対する１：１０００希釈の抗体でプローブした。Ｍｕｃｉｎ－１及びｈＴｅｒｔに対する抗体は、それぞれ１：５０及び１：５００希釈で使用した。適切なＩＲＤｙｅ抗体（１：５０００希釈）を使用して検出を行い、ＬｉｃｏＲ　Ｏｄｙｓ

ｓｅｙ　ＣＬｘを使用して検出した。

【００８１】

実施例３：組換えＭＶＡからの標的抗原のインビトロ発現

ＤＦ－１細胞にｍｖａＢＣ．１及びｍｖａＢＣ．２を、の感染多重度（ＭＯＩ）５で２時間感染させた。次いで、細胞を一晩回復させ、次いで無血清培地中で２４時間インキュベートした。細胞培養上清をアセトンで沈殿させ、細胞可溶化物を調製した。２０μｇの細胞可溶化物及び２０μｌの上清（１００μｌのうち）を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥウエスタンブロットによって抗原特異的抗体を使用して解析した。図６は、ｍｖａＢＣ．１及びｍｖａＢＣ．２を感染させたＤＦ－１細胞からの細胞画分及び分泌（上清）画分のウエスタンブロット解析を示す。膜は、Ｈｅｒ２ＥＣＤ（細胞外ドメイン）、Ｈｅｒ２ＩＣＤ（細胞内ドメイン）、Ｍａｇｅａ３、サバイビン及びβ－アクチンに対する１：１０００希釈の抗体でプローブした。Ｍｕｃｉｎ－１及びｈＴｅｒｔに対する抗体は、それぞれ１：５０及び１：５００希釈で使用した。適切なＩＲＤｙｅ抗体（１：５０００希釈）を使用して検出を行い、ＬｉｃｏＲ　Ｏｄｙｓｓｅｙ　ＣＬｘを使用して検出した。

【００８２】

実施例４：臨床研究

本臨床プロトコルは、接種者が乳がんに対する内部免疫防御をブーストできるようにするワクチン戦略を試験することを提示する。しかし、感染症ワクチンとは異なり、提示するワクチンは、正常な健常組織では発現レベルが低いが腫瘍では発現レベルが高い自己抗原を標的とする。このワクチンは、一般的に上方調節される６種の抗原、ＭＵＣ１、ＨＥＲ２、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、ＭＡＧＥＡ３及びマンマグロビンＡを標的とする。最近の前臨床及び臨床サポートデータの広範な背景に基づいて発見された本ワクチンは、乳がんの３つの主要なサブセット、ＥＲ＋、ＨＥＲ２＋及び三種陰性乳がんの発生を予防する目的で、生物学的に関連する免疫を安全に生じさせるように設計するものである。ワクチン接種プロセスは、乳がん発症リスクのある健常人への２回の介入、６種のプラスミドの等モル混合物による初期プライミング介入、続いて、プライミングの３０日後における、それぞれが抗原の１つを発現する６種の改変ワクシニアアンカラウイルス構築物の等モル混合物でのブーストからなる。投与の安全性及びこのアプローチの免疫原性は、試験登録後３カ月にわたって検査するものとする。最終目標は、全ての形態の乳がんに対する安全な予防ワクチンを確立することである。

【００８３】

本臨床プロトコルは、新規のマルチ抗原プラスミドＤＮＡプライムＭＶＡブーストワクチンを用いる。この特定のワクチンは、２種のマルチ抗原プラスミドＤＮＡワクチンから構成され、それに続いて、最初のワクチン接種から３０±３日後に、同様なマルチ抗原プラスミドＤＮＡを含む改変ワクシニアウイルスアンカラ（ＭＶＡ）によるブーストを行う。この特定のＤＮＡプライムＭＶＡブースト戦略は、安全であり、より強力な細胞性免疫応答を誘導できることが示されている。ＨＩＶワクチンの開発においては、異種ＤＮＡプライムＭＶＡブーストレジメンが、ＤＮＡ又はＭＶＡワクチンのいずれか単独による同種ワクチン接種と比較して、著しい改善されたＴ細胞応答を生じさせることが示されている（ｖａｎ　Ｄｉｅｐｅｎら（２０１９年）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．９３巻：ｅ０２１５５～１８）。最初の２つのマルチ抗原プラスミドＤＮＡワクチンとしては、アルテミス１．Ｐ１及びアルテミス１．Ｐ２が挙げられる。プラスミド構築物は、図１に示す通りである。

【００８４】

プラスミドＤＮＡ用量（合計４ｍｇ／各構築物２ｍｇ）を投与する。改変ワクシニアウイルスアンカラ（ＭＶＡ）は、ニワトリ胚線維芽細胞の連続継代によるコリオアラントイス・ワクシニア（Ｃｈｏｒｉｏａｌｌａｎｔｏｉｓ　Ｖａｃｃｉｎｉａ）ウイルスアンカラに由来する（Ａｌｔｅｎｂｕｒｇら（２０１４年）Ｖｉｒｕｓｅｓ６巻、２７３５～２７６１頁）。抗原に関係なく、1×10^{8}プラーク形成単位が免疫原性で安全な用量であることが確立されている（Ｂｕｃｈｂｉｎｄｅｒら（２０１７年）ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ　１２、ｅ０１７９５９７）。本研究では、組換えヒトＧＭ－ＣＳＦ（ｒｈｕＧＭ－ＣＳＦ）

を総注射用量１２５ｍｃｇで使用し、これを注射前にペプチドと混合し、免疫化時に皮内注射するものとする。この用量のＧＭ－ＣＳＦでは、注射部位での局所効果は期待されない。ｒｈｕＧＭ－ＣＳＦは、５０～５００ｍｃｇ／ｍ^2／日の範囲の用量で静脈内又は皮下投与された場合には一般に忍容性が良好である。

【００８５】

主要目標は、転移性乳がん患者において、マルチ抗原プラスミドＤＮＡプライムＭＶＡブーストワクチン、アルテミス１の安全性及び忍容性を決定することである。アルテミス１が測定される免疫応答を誘発する能力はまた、ＨＥＲ２、ＭＵＣ１、マンモグロビンＡ、サバイビン、ｈＴＥＲＴ及びＭＡＧＥＡ３に対する高親和性抗体によって決定する。副次的目標は、２用量のワクチン後の客観的奏効率（ＯＲＲ）及び臨床的有用率（ＣＢＲ）の評価、並びにワクチン接種後の後続療法におけるＯＲＲ及びＣＢＲの評価を含む。発現されたＨＥＲ－２／ｎｅｕペプチド８８５が、ＨＥＲ－２／ｎｅｕに特異的であるか又はＥＧＦＲタンパク質と交差反応性であるＴ細胞応答を生じさせる能力を、決定する。ＨＬＡクラスＩ埋め込みエピトープを含むＨＬＡ－ＤＲエピトープの存在も評価する。

【００８６】

選択基準。女性　年齢１８才超。切除不能な局所進行性又は転移性疾患を伴う乳腺癌の組織学的確認。以下の全てを有する：研究者の裁量による低疾患負荷。ワクチン接種、及び化学療法（注：タモキシフェン、卵巣機能抑制薬、アロマターゼ阻害薬（アナストロゾール、レトロゾール及びエキセメスタン）を含む内分泌療法；ワクチン接種中はフルベストラントが許可される））のない６０日間の経過観察に適合。６カ月超の平均余命。標準的な根治療法の選択肢なし。

【００８７】

治療スケジュール。研究治療は、以下の表に概説されているようにして施す。患者は、３０±３日の間隔で合計２回のワクチン接種を受ける。ワクチン接種の完了後、患者を、ワクチン接種後３０日間にわたって追跡する（注：試験中、内分泌治療薬、例えば、アロマターゼ阻害薬（レトロゾール、アナストロゾール及びエキセメスタン）、フルベストラント、卵巣機能抑制薬又はタモキシフェンの同時使用は許可される）。アルテミス１ワクチンを皮内注射する。安全性導入期（ｓａｆｅｔｙ　ｌｅａｄ－ｉｎ）の最初の６人の患者は、最初のワクチン接種中にＧＭ－ＣＳＦを含むアルテミス１．Ｐ１で、続いて最初の注射の３０±３日後にアルテミス１．Ｖ１で治療する。

【００８８】

ｉ．安全導入期の研究におけるワクチン接種

【表１】

薬剤	用量レベル	経路	治療日
アルテミス1.P1 ＋ アジュバント (GM-CSF)	600μgを125μgの GM-CSFと混合	皮内注射	1日目
アルテミス1.V1	10^8プラーク形成 単位(pfu)	皮内注射	30(±3)日目

【００８９】

最初の６人の患者で有意なＤＬＴが観察されない場合、追加の１９人の患者が、最初のワクチン接種中にアルテミス１．Ｐ１＋アルテミス１．Ｐ２をＧＭ－ＣＳＦと共に受け、続いて最初注射の３０±３日間後にアルテミス１．Ｖ１＋アルテミス１．Ｖ２を受ける。

【００９０】

ｉｉ．研究におけるワクチン接種

【表２】

薬剤	用量レベル	経路	治療日
アルテミス1.P1 + アルテミス1.P2 + アジュバント (GM-CSF)	それぞれ600μgを125μgのGM-CSFと混合	皮内注射	1日目
アルテミス1.V1 + アルテミス1.V2	それぞれ10^8pfu	皮内注射	30(±3)日目

【００９１】
治療評価及び効果の測定。改訂されたＲｅｓｐｏｎｓｅ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ Ｃｒｉｔｅｒｉａ ｉｎ Ｓｏｌｉｄ Ｔｕｍｏｒｓ（ＲＥＣＩＳＴ）ガイドライン（第１．１版）及びＥＳＭＯ ２０１４ Ａｄａｐｔａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｉｍｍｕｎｅ－Ｒｅｌａｔｅｄ Ｒｅｓｐｏｎｓｅ Ｃｒｉｔｅｒｉａ：ｉｒＲＥＣＩＳＴ（Ｓｅｙｍｏｕｒら（２０１７年）Ｌａｎｃｅｔ．Ｏｎｃｏｌ．１８巻、ｅ１４３－ｅ１５２）によって提案された新しい国際基準を使用して、この研究において応答及び増悪を評価する。ＲＥＣＩＳＴ第１．１版は、主要評価項目の腫瘍応答の評価に使用する。
【００９２】
ＲＥＣＩＳＴ１．１及びｉｒＲＥＣＩＳＴガイドラインでは、腫瘍病変の最大直径（一次元測定値）及びリンパ節の場合には短軸測定値の変化が使用される。ＲＥＣＩＳＴ１．１では、新しい病変の出現が自動的に進行性疾患（ＰＤ）を意味するのに対し、ｉｒＲＥＣＩＳＴでは新しい測定可能な病変が総腫瘍量に算入される。詳細は以下に示す。
【００９３】
評価のスケジュール。本研究のために、患者は６週間毎に再評価すべきである。ベースラインスキャンに加えて、客観的反応の最初の記録から４週間後に確認スキャンも取得するべきである。
【００９４】
測定可能な疾患。非結節性病変は、その最長直径が胸部Ｘ線撮影で２．０ｃｍ超又はＣＴスキャン若しくはＭＲＩで２’１．０ｃｍと正確に測定できるならば、測定可能と考える。表在性非結節性病変は、ノギス（例えば、皮膚結節）又は画像診断を使用して評価した場合に最長直径が直径２’１．０ｃｍであるならば、測定可能である。皮膚病変の場合、病変のサイズを概算するための定規を含むカラー写真による記録が推奨される。悪性リンパ節は、ＣＴスキャンによって評価した場合にその短軸が１．５ｃｍ超であるならば、測定可能と考える（ＣＴスキャンスライスの厚さは５ｍｍ以下であることが推奨される）。
【００９５】
測定不可能な疾患。他の全ての病変（又は疾患の部位）は、病理学的結節（短軸が２’１．０ｃｍ～１．５ｃｍ未満のもの）を含めて、測定不可能な疾患と考える。骨病変、軟髄膜疾患、腹水、胸水／心嚢液貯留、皮膚／肺リンパ管炎、炎症性乳腺疾患及び腹部腫瘤（ＣＴ又はＭＲＩによって追跡されない）も同様に測定不可能と考える。
【００９６】
投与。アルテミス１．Ｐ１及びアルテミス１．Ｐ２：調製、ラベリング及び用量確認後できるだけ早く、プラスミドワクチンを患者に投与する。バイオジェクター（Ｂｉｏｊｅｃｔｏｒ）（登録商標）２０００を、プラスミドワクチンの送達のために使用する。注射は、上肢のいずれかの三角筋に、筋肉内（Ｉ．Ｍ．）に行うべきである。しかし、以前の腋窩リンパ節郭清のない上肢が好ましい側である。アルテミス１．Ｖ１及びアルテミス１．Ｖ２：調製、ラベリング及び用量確認後できるだけ早く、ＭＶＡワクチンを患者に投与

する。ＭＶＡワクチンは、上肢のいずれかの三角筋の１つの部位に筋肉内注射（Ｉ．Ｍ．）する。しかし、以前の腋窩リンパ節郭清のない上肢が好ましい側である。ＧＭ－ＣＳＦは、プラスミドワクチン、アルテミス１．Ｐ１及びアルテミス１．Ｐ２と混合して、同時に投与する。

【図面】

【図１】



FIG. 1A

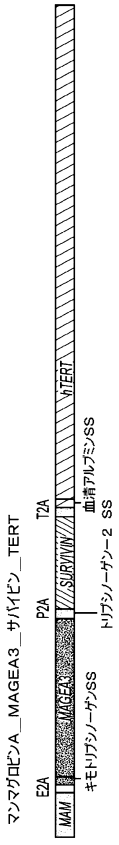


FIG. 1B

【図２】

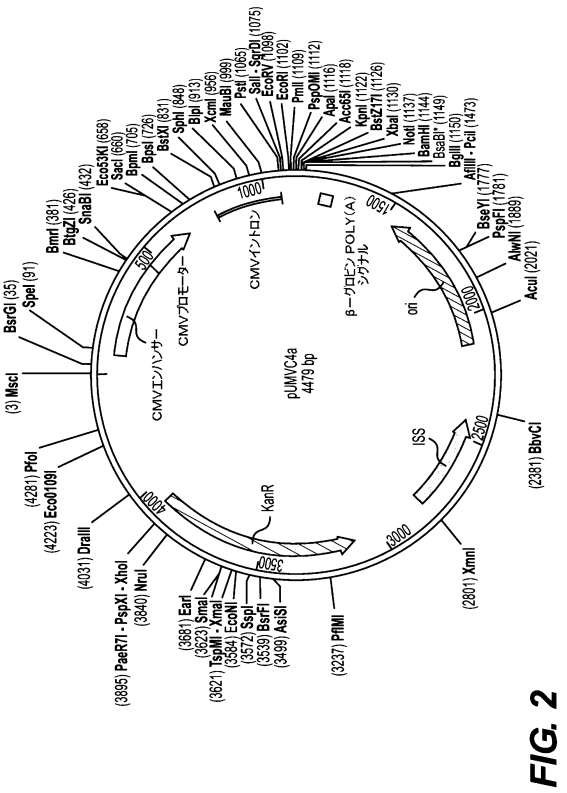


FIG. 2

【図３】

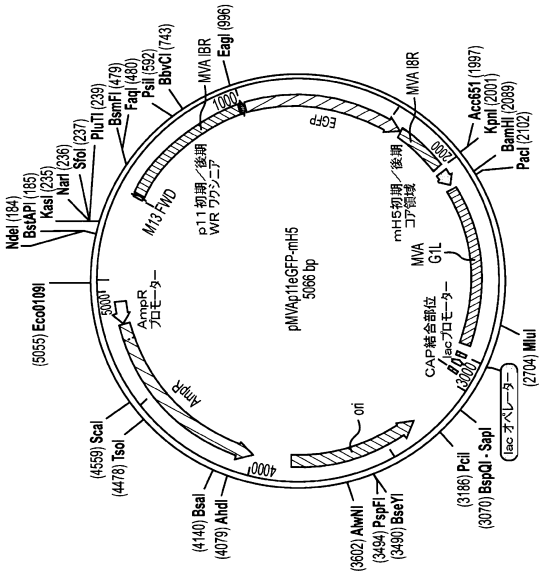


FIG. 3

【図４】

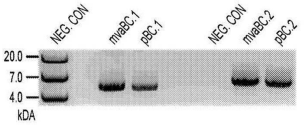


FIG. 4

【図５】

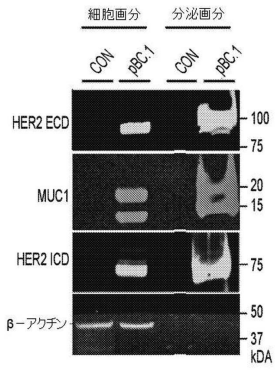


FIG. 5A

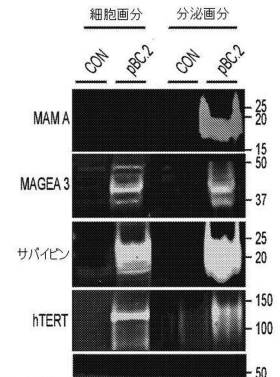


FIG. 5B

【図６】

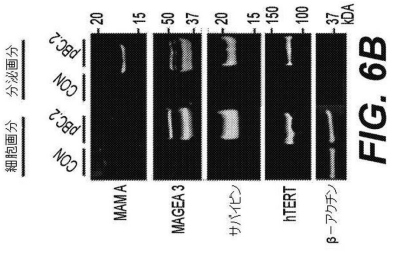


FIG. 6B

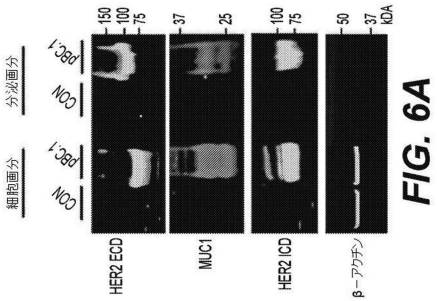


FIG. 6A

【図７】

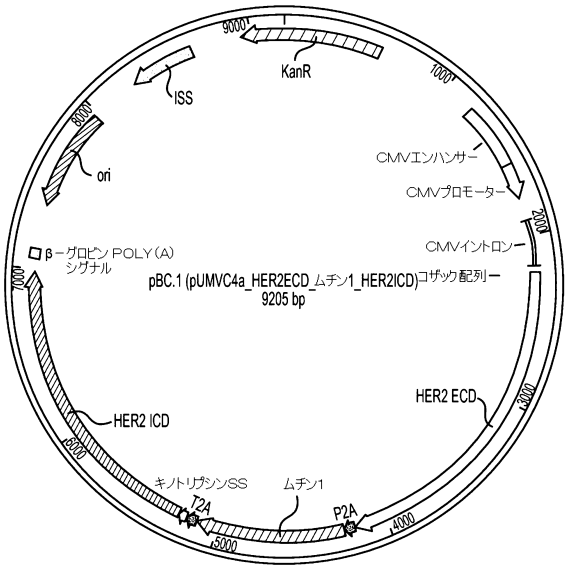


FIG. 7

【図８】

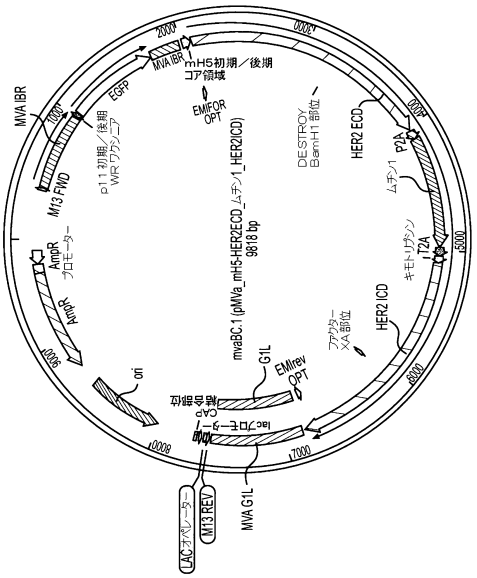


FIG. 8

【図９】

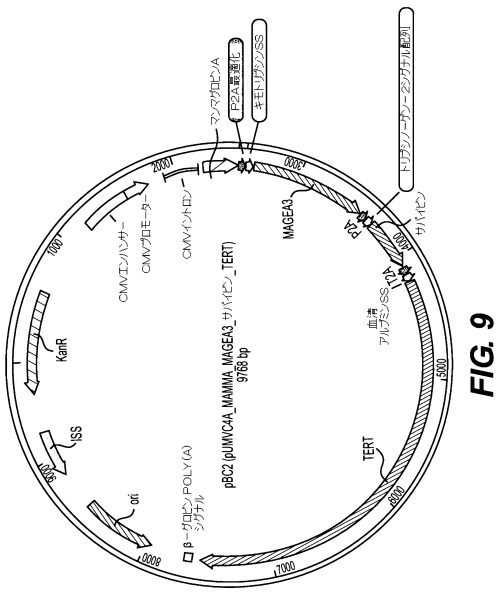


FIG. 9

【図１０】

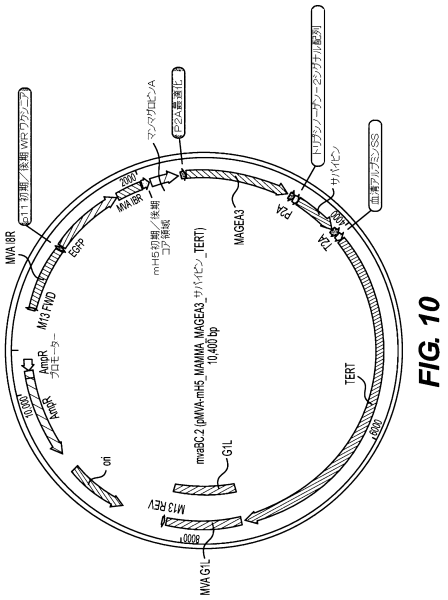


FIG. 10

【配列表】
20235332040000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US21/39046

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - A61K 39/00; C07K 16/30; A61K 38/17 (2021.01)
CPC - A61K 39/001106; A61K 39/001157; A61K 39/00117; C07K 16/3015; A61K 38/177; C07K 14/4727; A61P 35/00

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 data base consulted during the international search (name of data base 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 --- Y	US 2018/0133295 A1 (AMAL THERAPEUTICS SA) 17 May 2018; abstract; paragraphs [0026], [0027], [0029], [0032], [0121], [0124], [0142], [0173], [0182], [0183], [0185], [0186], [0252], [0253], [0634], [0635], [0707], [0716]	1, 5, 8 --- 6, 7
Y	WO 2020/025013 A1 (CHEN, et al.) 6 February 2020; page 17, 2nd paragraph; page 18, 1st paragraph	6
Y	WO 2016/184862 A1 (ONCOOR ML GMBH) 24 November 2016; page 4, line 6; page 7, lines 30-31; page 8, line 1; page 20, lines 1-4; page 30, lines 5-9	7
A	US 2019/0000946 A1 (INVECTYS) 3 January 2019; abstract; paragraph [0176]	8
A	WO 2018/165631 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 13 September 2018; abstract; paragraph [0033]	8
A	WO 2007/014740 A2 WO 2007/014740 A2 (INSTITUT PASTEUR, et al.) 8 February 2007; abstract; paragraphs [037], [073]	8
A	(ALLAHVERDIYEV, A et al.) Current Approaches in Development of Immunotherapeutic Vaccines for Breast Cancer. Journal of Breast Cancer. December 2018, Epub 29 October 2018, Vol. 21, No. 4; pages 343-353; entire document; DOI: 10.4048/jbc.2018.21.e47	1, 5-8

☐ 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
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 November 2021 (08.11.2021)	DEC 15 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US21/39046

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:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US21/39046

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.: 11-23
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:
-***-Please See Supplemental Page-***-

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.:
Groups I+, Claims 1-10, Muc1 (antigen), HER2 (antigen) and hTERT (antigen)

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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US21/39046

-***-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-10, Muc1 (antigen), HER2 (antigen) and hTERT (antigen) are directed toward immunogenic compositions.

The immunogenic compositions will be searched to the extent they encompass Muc1 (first exemplary antigen), HER2 (second exemplary antigen) and hTERT (third exemplary antigen). Applicant is invited to elect additional antigen(s), where available as an option in at least one searchable claim, to be searched. Additional antigen(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1 (in-part), and 5-8 (each in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass Muc1 (antigen), HER2 (antigen) and hTERT (antigen). Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected antigen(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be Survivin (antigen).

No technical features are shared between the antigens of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: an immunogenic composition comprising a vector encoding at least one epitope from at least three antigens, and at least one pharmaceutically acceptable excipient; these shared technical features are previously disclosed by the article 'Protective anti-tumor immunity induced by vaccination with recombinant adenoviruses encoding multiple tumor-associated cytotoxic T lymphocyte epitopes in a string-of-beads fashion' by Toes, et al. (hereinafter 'Toes'), in view of US 2020/0123571 A1 to GlaxoSmithKline Biologicals S.A. (hereinafter 'GlaxoSmithKline').

Toes discloses an immunogenic composition comprising a vector encoding at least one epitope from at least three antigens (infection of cells with recombinant adenovirus encoding a plurality of epitopes (an immunogenic composition comprising a vector encoding at least one epitope from at least three antigens); abstract, Figure 1; page 14662, first column, third paragraph).

Toes does not disclose at least one pharmaceutically acceptable excipient.

GlaxoSmithKline discloses an immunogenic composition comprising an adenovirus vector and a pharmaceutically acceptable excipient (an immunogenic composition comprising an adenovirus vector and a pharmaceutically acceptable excipient; paragraph [0502]).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time the invention was made to have modified the disclosure of Toes to have used a pharmaceutical composition comprising an acceptable excipient, as disclosed by GlaxoSmithKline, in order to provide a formulation useful for administration to a subject, such as a human, for producing an effective immune response to any of the antigens encoded by the vector.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Toes and GlaxoSmithKline references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*35/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/04		
Ｃ１２Ｎ	*15/12 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12		
Ｃ１２Ｎ	*15/863 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/863	Ｚ	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,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．ＴＲＩＴＯＮ

弁理士　野田 雅一

(72)発明者　ヌトソン， キース エル．

アメリカ合衆国， フロリダ州， ジャクソンビル， サン パブロ ロード サウス ４５００ ２５１ビー， グリフィン ビルディング， ケアオブ メイヨー クリニック

Ｆターム（参考）　4C084　AA13 MA02 NA05 ZB091 ZB092 ZB261 ZB262 ZC751

4C085　AA03 BB01 EE03 GG02 GG04

4C087　AA01 AA02 BC83 CA09 CA12 MA02 NA05 ZB09 ZB26 ZC75