

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-521194

(P2023-521194A)

(43)公表日 令和5年5月23日(2023.5.23)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	Z 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	Z N A 4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/861 (2006.01)	C 1 2 N 15/861	Z 4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/863 (2006.01)	C 1 2 N 15/863	Z 4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全85頁) 最終頁に続く

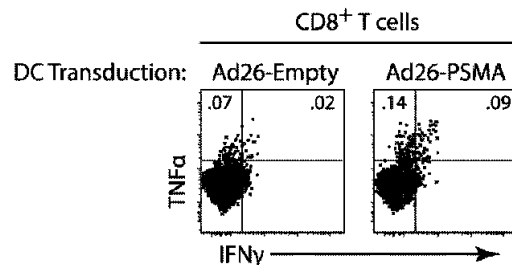
(21)出願番号	特願2022-562250(P2022-562250)	(71)出願人	509087759
(86)(22)出願日	令和3年4月13日(2021.4.13)		ヤンセン バイオテック, インコーポレ
(85)翻訳文提出日	令和4年11月30日(2022.11.30)		ーテッド
(86)国際出願番号	PCT/IB2021/053041		アメリカ合衆国ペンシルベニア州190
(87)国際公開番号	WO2021/209897		44ホーシャム・リτζジビユードライブ
(87)国際公開日	令和3年10月21日(2021.10.21)		800/850
(31)優先権主張番号	63/008,848	(74)代理人	100092783
(32)優先日	令和2年4月13日(2020.4.13)		弁理士 小林 浩
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100095360
			弁理士 片山 英二
(31)優先権主張番号	63/158,601	(74)代理人	100093676
(32)優先日	令和3年3月9日(2021.3.9)		弁理士 小林 純子
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA)	(74)代理人	100149010
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 P S M A 及び S T E A P 1 ワクチン並びにそれらの使用

(57)【要約】

本明細書では、P S M A 及び / 又は S T E A P 1 ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、ウイルス、ワクチン、及びワクチン組み合わせ、並びにそれらの使用が開示される。

FIG. 1A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ワクチン組み合わせであって、

- a) P S M A をコードする第 1 のポリヌクレオチドと、
- b) S T E A P 1 をコードする第 2 のポリヌクレオチドと、
- c) P S M A 及び S T E A P 1 をコードする第 3 のポリヌクレオチドと、を含む、ワクチン組み合わせ。

【請求項 2】

組換えアデノウイルス (r A d)、大型類人猿アデノウイルス 2 0 (G A d 2 0)、改変ワクシニアアンカラ (r M V A)、又は自己複製 R N A が、前記第 1 のポリヌクレオチド、前記第 2 のポリヌクレオチド、又は前記第 3 のポリヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載のワクチン組み合わせ。

10

【請求項 3】

前記 r A d が、組換えアデノウイルス血清型 2 6 (r A d 2 6) である、請求項 1 又は 2 に記載のワクチン組み合わせ。

【請求項 4】

a) r A d 2 6 が、前記第 1 のポリヌクレオチドを含み、
 b) r A d 2 6 が、前記第 2 のポリヌクレオチドを含み、
 c) r M V A が、前記第 3 のポリヌクレオチドを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のワクチン組み合わせ。

20

【請求項 5】

a) P S M A をコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号 1 5 のポリペプチドをコードし、かつ / 又は
 b) P S M A をコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号 1 4 のポリヌクレオチドを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のワクチン組み合わせ。

【請求項 6】

前記第 1 のポリヌクレオチドが、
 a) 配列番号 1 5 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び / 又は
 b) 配列番号 1 6 のポリヌクレオチド、を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のワクチン組み合わせ。

30

【請求項 7】

a) S T E A P 1 をコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号 1 8 のポリペプチドをコードし、かつ / 又は
 b) S T E A P 1 をコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号 1 7 のポリヌクレオチドを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のワクチン組み合わせ。

【請求項 8】

前記第 2 のポリヌクレオチドが、
 a) 配列番号 1 8 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び / 又は
 b) 配列番号 1 9 のポリヌクレオチド、を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のワクチン組み合わせ。

40

【請求項 9】

前記第 3 のポリヌクレオチドにおいて、
 a) P S M A をコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号 8 のポリペプチドをコードし、
 b) P S M A をコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号 3 のポリヌクレオチドを含み、
 c) S T E A P 1 をコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号 1 0 のポリペプチドをコードし、かつ / 又は
 d) S T E A P 1 をコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号 6 のポリヌクレオチドを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のワクチン組み合わせ。

50

【請求項 10】

前記第3のポリヌクレオチドにおいて、

- a) P S M A をコードするポリヌクレオチドが、S T E A P 1 をコードする前記ポリヌクレオチドの5'に位置し、
- b) ボックスウイルスプロモーターが、P S M A をコードする前記ポリヌクレオチドの5'に位置し、
- c) 第1のT C E をコードするポリヌクレオチドが、P S M A をコードする前記ポリヌクレオチドの5'に位置し、
- d) 第2のT C E をコードするポリヌクレオチドが、P S M A をコードする前記ポリヌクレオチドの3'に位置し、かつ/又は
- e) 2 A 自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドが、P S M A をコードする前記ポリヌクレオチドの3'と、第2のT C E をコードするポリヌクレオチドの5'とに位置する、請求項1～9のいずれか一項に記載のワクチン組み合わせ。

10

【請求項 11】

前記第3のポリヌクレオチドが、

- a) 配列番号12のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び/又は
- b) 配列番号11のポリヌクレオチド、を含む、請求項1～10のいずれか一項に記載のワクチン組み合わせ。

【請求項 12】

前記 r M V A が、M V A - 4 7 6 M G / 1 4 / 7 8、M V A - 5 7 2、M V A - 5 7 4 若しくは M V A - 5 7 5 又は M V A - B N に由来する、請求項1～11のいずれか一項に記載のワクチン組み合わせ。

20

【請求項 13】

P S M A をコードするポリヌクレオチドであって、

- a) 前記ポリヌクレオチドが、配列番号15のポリペプチドをコードし、かつ/又は
- b) 前記ポリヌクレオチドが、配列番号14のポリヌクレオチドを含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 14】

- a) 前記ポリヌクレオチドが、配列番号15のポリペプチドをコードし、かつ/又は
- b) 前記ポリヌクレオチドが、配列番号16の配列を含む、請求項13に記載のポリヌクレオチド。

30

【請求項 15】

請求項13又は14に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 16】

前記ベクターが、組換えアデノウイルス (r A d)、大型類人猿アデノウイルス 2 0 (G A d 2 0)、改変ワクシニアアンカラ (r M V A)、又は自己複製 R N A を含む、請求項15に記載のベクター。

【請求項 17】

前記ベクターが、ヒトアデノウイルス血清型 2 6 (A d 2 6) に由来する組換えアデノウイルスを含む、請求項16に記載のベクター。

40

【請求項 18】

請求項16又は17に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項 19】

S T E A P 1 をコードするポリヌクレオチドであって、

- a) 前記ポリヌクレオチドが、配列番号18のポリペプチドをコードし、かつ/又は
- b) 前記ポリヌクレオチドが、配列番号17のポリヌクレオチドを含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 20】

- a) 前記ポリヌクレオチドが、配列番号18のポリペプチドをコードし、かつ/又は
- b) 前記ポリヌクレオチドが、配列番号19の配列を含む、請求項19に記載のポリヌ

50

クレオチド。

【請求項 21】

請求項 19 又は 20 に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 22】

前記ベクターが、組換えアデノウイルス (rAd)、大型類人猿アデノウイルス 20 (GAd20)、改変ワクシニアアンカラ (rMVA)、又は自己複製 RNA を含む、請求項 21 に記載のベクター。

【請求項 23】

前記ベクターが、ヒトアデノウイルス血清型 26 (Ad26) に由来する組換えアデノウイルスを含む、請求項 22 に記載のベクター。

【請求項 24】

請求項 22 又は 23 に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項 25】

P S M A 及び S T E A P 1 をコードするポリヌクレオチドであって、

a) P S M A をコードする前記ポリヌクレオチドの一部が、配列番号 8 のポリペプチドをコードし、

b) P S M A をコードする前記ポリヌクレオチドの一部が、配列番号 3 のポリヌクレオチドを含み、

c) S T E A P 1 をコードする前記ポリヌクレオチドの一部が、配列番号 10 のポリペプチドをコードし、かつ/又は

d) S T E A P 1 をコードする前記ポリヌクレオチドの一部が、配列番号 6 のポリヌクレオチドを含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 26】

a) P S M A をコードする前記ポリヌクレオチドの一部が、S T E A P 1 をコードする前記ポリヌクレオチドの一部の 5' に位置し、

b) ポックスウイルスプロモーターが、P S M A をコードする前記ポリヌクレオチドの一部の 5' に位置し、

c) 第 1 の T C E をコードするポリヌクレオチドが、P S M A をコードする前記ポリヌクレオチドの一部の 5' に位置し、

d) 第 2 の T C E をコードするポリヌクレオチドが、P S M A をコードする前記ポリヌクレオチドの一部の 3' に位置し、かつ/又は

e) 2 A 自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドが、P S M A をコードする前記ポリヌクレオチドの一部の 3' と、第 2 の T C E をコードするポリヌクレオチドの 5' とに位置する、請求項 25 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 27】

a) 前記ポリヌクレオチドが、配列番号 12 のポリペプチドをコードし、かつ/又は

b) 前記ポリヌクレオチドが、配列番号 11 の配列を含む、請求項 25 又は 26 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 28】

請求項 25 ~ 27 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 29】

前記ベクターが、組換えアデノウイルス (rAd)、大型類人猿アデノウイルス 20 (GAd20)、改変ワクシニアアンカラ (rMVA)、又は自己複製 RNA を含む、請求項 28 に記載のベクター。

【請求項 30】

前記ベクターが、組換え改変ワクシニアアンカラ (rMVA) を含む、請求項 29 に記載のベクター。

【請求項 31】

請求項 29 又は 30 に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項 32】

10

20

30

40

50

前立腺がん罹患している対象において前記前立腺がんに対する免疫応答を強化する方法であって、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、ベクター、細胞、又はワクチン組み合わせを前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項 3 3】

前立腺がんに対する免疫応答の強化を必要とする対象においてそれを行う方法であって、

a) 免疫応答を初回免疫するための P S M A をコードする第 1 のポリヌクレオチドを含む、免疫学的有効量の第 1 の組換えアデノウイルス血清型 2 6 (A d 2 6) ウイルスと、

b) 免疫応答を初回免疫するための S T E A P 1 をコードする第 2 のポリヌクレオチドを含む、免疫学的有効量の第 2 の組換え A d 2 6 ウイルスと、

c) 免疫応答を追加免疫するための P S M A 及び S T E A P 1 をコードする第 3 のポリヌクレオチドを含む、免疫学的有効量の組換え改変ワクシニアアンカラ (M V A) ウイルスと、を前記対象に投与することを含む、方法。

10

【請求項 3 4】

前立腺がん罹患している対象を治療する方法であって、

a) 免疫応答を初回免疫するための P S M A をコードする第 1 のポリヌクレオチドを含む、免疫学的有効量の第 1 の組換えアデノウイルス血清型 2 6 (A d 2 6) ウイルスと、

b) 免疫応答を初回免疫するための S T E A P 1 をコードする第 2 のポリヌクレオチドを含む、免疫学的有効量の第 2 の組換え A d 2 6 ウイルスと、

c) 免疫応答を追加免疫するための P S M A 及び S T E A P 1 をコードする第 3 のポリヌクレオチドを含む、免疫学的有効量の組換え改変ワクシニアアンカラ (M V A) ウイルスと、を前記対象に投与することを含む、方法。

20

【請求項 3 5】

1 つ又は 2 つ以上の追加のがん治療を投与することを更に含む、請求項 3 2 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記 1 つ又は 2 つ以上の追加のがん治療が、手術、化学療法、アンドロゲン除去療法、放射線療法、標的療法、若しくはチェックポイント阻害剤、又はそれらの任意の組み合わせである、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記チェックポイント阻害剤が、C T L A - 4 の阻害剤、P D - 1 の阻害剤、又は P D - L 1 の阻害剤である、請求項 3 6 に記載の方法。

30

【請求項 3 8】

請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、細胞、又はワクチン組み合わせを含む、医薬組成物。

【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、2020年4月13日に提出された米国特許仮出願第 6 3 / 0 0 8 , 8 4 8 号及び2021年3月9日に提出された米国特許仮出願第 6 3 / 1 5 8 , 6 0 1 号の優先権を主張するものであり、これら各々の開示は、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。

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済みである、その全体が参照により本明細書に組み込まれる配列表を含む。A S C I I コピーは、2021年3月30日に作成され、名称は 1 0 3 6 9 3 . 0 0 2 4 8 1 _ S L . t x t であり、サイズは 6 4 , 3 4 3 バイトである。

【0 0 0 3】

50

(発明の分野)

本明細書では、P S M A 及び / 又は S T E A P 1 ポリペプチド、ポリペプチドをコードするコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含むベクター、ポリヌクレオチドを含むウイルス、ワクチン、及びそれらの使用が提供される。

【背景技術】

【 0 0 0 4 】

前立腺がんは、男性における最も一般的な非皮膚悪性腫瘍であり、西欧諸国における男性のがん死因の第 2 位となっている。前立腺がんは、前立腺の異常細胞の制御されない増殖により生じる。前立腺がんの腫瘍が発生すると、テストステロンなどのアンドロゲンが前立腺がんの増殖を促進する。その初期段階において、局在性の前立腺がんは、例えば、前立腺の外科的除去及び放射線治療を含む局所的療法によって治療可能であることが多い。しかしながら、男性の 1 / 3 でそうであるように、局所的療法により前立腺がんが治癒できない場合、疾患は治癒不能な転移性疾患（すなわち、身体の 1 つの部分から他の部分にがんが転移する疾患）に進行してしまう。

10

【 0 0 0 5 】

長年にわたって、悪性去勢抵抗性前立腺がん（malignant castration-resistant prostate cancer、m C R P C）を有する男性用の確立された標準的なケアは、ドセタキセル化学療法であった。より最近では、プレドニゾンと組み合わせた酢酸アピラテロン（Z Y T I G A（登録商標））が、転移性去勢抵抗性前立腺がんを治療するために承認されてきた。アンドロゲン受容体（androgen receptor、A R）標的化剤、例えばエンザルタミド（X T A N D I（登録商標））もまた、転移性去勢抵抗性前立腺がんを治療するために市場に参入している。白金を用いた化学療法は、限定された結果及び有意な毒性を有する、分子的に選択されていない前立腺がん患者における多数の臨床研究で試験されている。しかしながら、これらの治療に対して初期に応答しないか又は不応性（又は抵抗性）である患者の小集団が残される。このような患者に対して利用可能である、承認された治療選択肢はない。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 6 】

本明細書では、P S M A、S T E A P 1、又は P S M A と S T E A P 1 との組み合わせをコードするポリヌクレオチドが提供される。ポリヌクレオチドを含む導入遺伝子もまた提供される。

30

【 0 0 0 7 】

P S M A、S T E A P 1、又は P S M A と S T E A P 1 との組み合わせをコードするポリヌクレオチドを含むベクター、及び開示されたベクターを含む細胞を含むベクターもまた開示される。

【 0 0 0 8 】

開示されたポリヌクレオチドを含むウイルスもまた提供される。

【 0 0 0 9 】

本明細書ではワクチンが更に開示される。いくつかの実施形態では、ワクチンは、P S M A、S T E A P 1、又は P S M A と S T E A P 1 との組み合わせをコードする、開示されたポリヌクレオチドのうちいずれかを含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、P S M A をコードするポリヌクレオチド、S T E A P 1 をコードするポリヌクレオチド、並びに P S M A をコードするポリヌクレオチド及び S T E A P 1 をコードするポリヌクレオチドを含むワクチン組み合わせを含む。

40

【 0 0 1 0 】

本開示はまた、対象における前立腺がんに対する免疫応答を強化する方法、及び前立腺がん罹患している対象を治療する方法であって、対象に、開示されたポリヌクレオチド、導入遺伝子、ポリペプチド、ベクター、細胞、ウイルス、又はワクチンのうちのいずれかを投与することを含む、方法を提供する。

50

【 0 0 1 1 】

前立腺がんに対する免疫応答を、それを必要とする対象において強化する方法は、免疫学的有効量の免疫応答を初回免疫するための P S M A をコードするポリヌクレオチド、免疫学的有効量の免疫応答を初回免疫するための S T E A P 1 をコードするポリヌクレオチド、並びに免疫学的有効量の免疫応答を追加免疫するための P S M A 及び S T E A P 1 をコードするポリヌクレオチドを、対象に投与することを含み得る。

【 0 0 1 2 】

前立腺がん罹患している対象を治療する方法は、免疫学的有効量の免疫応答を初回免疫するための P S M A をコードするポリヌクレオチド、免疫学的有効量の免疫応答を初回免疫するための S T E A P 1 をコードするポリヌクレオチド、並びに免疫学的有効量の免疫応答を追加免疫するための P S M A 及び S T E A P 1 をコードするポリヌクレオチドを、対象に投与することを含み得る。

10

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 3 】

【 図 1 A 】 A d 2 6 . h P S M A (図中の A d 2 6 - P S M A) で形質導入された A P C による抗原初回免疫から 1 2 日間後の抗原特異的 C D 8 ⁺ 及び C D 4 ⁺ T 細胞リコール応答を示す、単一ドナーからの細胞内サイトカイン染色 (intracellular cytokine staining、I C S) (T N F 、 I F N 、 及び I L - 2) の代表的なフローサイトメトリプロットを示す。ゲート中の数字は、それぞれのサイトカインについて陽性に染色する総 C D 8 ⁺ (図 1 A) 又は C D 4 ⁺ (図 1 B) T 細胞の割合を示す。表示されたデータに適用可能な統計分析は実施されなかった。A d 2 6 - 空 : 空ベクター。

20

【 図 1 B 】 A d 2 6 . h P S M A (図中の A d 2 6 - P S M A) で形質導入された A P C による抗原初回免疫から 1 2 日間後の抗原特異的 C D 8 ⁺ 及び C D 4 ⁺ T 細胞リコール応答を示す、単一ドナーからの細胞内サイトカイン染色 (intracellular cytokine staining、I C S) (T N F 、 I F N 、 及び I L - 2) の代表的なフローサイトメトリプロットを示す。ゲート中の数字は、それぞれのサイトカインについて陽性に染色する総 C D 8 ⁺ (図 1 A) 又は C D 4 ⁺ (図 1 B) T 細胞の割合を示す。表示されたデータに適用可能な統計分析は実施されなかった。A d 2 6 - 空 : 空ベクター。

【 図 2 A 】 A d 2 6 . h S T E A P 1 (図中の A d 2 6 - S T E A P 1) で形質導入された A P C による抗原初回免疫から 1 2 日後の抗原特異的 C D 8 ⁺ (図 2 A) 及び C D 4 ⁺ (図 2 B) T 細胞リコール応答を示す、単一ドナーからの I C S (T N F 、 I F N 、 及び I L - 2) の代表的なフローサイトメトリプロットを示す。ゲート中の数字は、それぞれのサイトカインについて陽性に染色する総 C D 8 ⁺ 又は C D 4 ⁺ T 細胞の割合を示す。表示されたデータに適用可能な統計分析は実施されなかった。A d 2 6 - 空 : 空ベクター。

30

【 図 2 B 】 A d 2 6 . h S T E A P 1 (図中の A d 2 6 - S T E A P 1) で形質導入された A P C による抗原初回免疫から 1 2 日後の抗原特異的 C D 8 ⁺ (図 2 A) 及び C D 4 ⁺ (図 2 B) T 細胞リコール応答を示す、単一ドナーからの I C S (T N F 、 I F N 、 及び I L - 2) の代表的なフローサイトメトリプロットを示す。ゲート中の数字は、それぞれのサイトカインについて陽性に染色する総 C D 8 ⁺ 又は C D 4 ⁺ T 細胞の割合を示す。表示されたデータに適用可能な統計分析は実施されなかった。A d 2 6 - 空 : 空ベクター。

40

【 図 3 】 h P S M A ペプチドプールで一晩刺激した後、示されたように、A d 2 6 . h P S M A 、 A d . 2 6 . S T E A P 1 、 又は空ベクター (A d 2 6 - 空) の 1 0 ⁹ 個又は 1 0 ^{1 0} 個のウイルス粒子 (virus particle、v p) で免疫化したマウスから単離した脾細胞 1 0 ⁶ 個当たりの、I F N スポット形成単位 (spot forming unit、S F U) の数の log 1 0 を示す。群当たりの幾何平均応答を、横線で示す。点線は、非刺激脾細胞で観察された S F U の 9 5 % パーセンタイルとして定義される、アッセイのバックグラウンドを示す。I F N は E L I S p o t を用いて測定した。統計分析のために、ボンフェローニ補正を伴うウィルコクソン順位和検定を使用した。

50

【図4】hSTEAP1ペプチドプールで一晩刺激した後、示されたように、Ad26・hPSMA、Ad26・STEAP1、又は空ベクター(Ad26-空)の 10^9 個又は 10^{10} 個のウイルス粒子(vp)で免疫化したマウスから単離した脾細胞からの 10^6 個の脾細胞当たりの、IFN スポット形成単位(SFU)の数の対数を示す。群当たりの幾何平均応答を、横線で示す。点線は、非刺激脾細胞で観察されたSFUの95%パーセントイルとして定義される、アッセイのバックグラウンドを示す。IFN はELISpotを用いて測定した。統計分析のために、ボンフェローニ補正を伴うウィルコクソン順位和検定を使用した。

【図5】hPSMAペプチドプールで一晩刺激した後、示されたように、Ad26・hPSMA又は空ベクター(Ad26-空)の 10^9 個又は 10^{10} 個のウイルス粒子(vp)で免疫化したマウスから単離したIFN (CD3⁺CD8⁺IFN⁺細胞)を生成するCD8⁺脾細胞の割合(%)を示す。群当たりの幾何平均応答を、横線で示す。点線はバックグラウンド染色の平均+3×標準偏差として定義されるアッセイのバックグラウンドを示し、この値を下回る値をこのカットオフに設定した。IFN は細胞内サイトカイン染色(ICSt)を用いて測定した。

【図6】hSTEAP1ペプチドプールで一晩刺激した後、示されたように、Ad26・hSTEAP1又は空ベクター(Ad26-空)の 10^9 個又は 10^{10} 個のウイルス粒子(vp)で免疫化したマウスから単離したIFN (CD3⁺CD8⁺IFN⁺細胞)を生成するCD8⁺脾細胞の割合(%)を示す。群当たりの幾何平均応答を、横線で示す。点線はバックグラウンド染色の平均+3×標準偏差として定義されるアッセイのバックグラウンドを示し、この値を下回る値をこのカットオフに設定した。IFN は細胞内サイトカイン染色(ICSt)を用いて測定した。

【図7】Ad26・hPSMAの 10^8 個又は 10^9 個ウイルス粒子(vp)、Ad26・STEAP1の 10^{10} vp、Ad26・hPSMAの 10^9 vpとAd26・STEAP1の 10^{10} vpの同時投与(別の脚に各々注射される; 図中の「同時投与」)、又は注射前に混合され片脚に注射された(図中の「ベッドサイド混合」)Ad26・hPSMAの 10^9 vpとAd26・STEAP1の 10^{10} vpのいずれかにより免疫化されたマウスより単離した脾細胞からの、 10^6 個の脾細胞当たりのIFN スポット形成単位(SFU)の数の \log_{10} を示している。hPSMAペプチドプールで一晩刺激した後のIFN- 応答を示す。群当たりの幾何平均応答を、横線で示す。点線は、非刺激脾細胞で観察されたSFUの95%パーセントイルとして定義される、アッセイのバックグラウンドを示す。IFN はELISpotを用いて測定した。同時投与群とベッドサイド混合群(ANOVA、Tobitモデル)との間に統計的に有意な差は観察されなかった。

【図8】同時投与及びベッドサイド混合で誘導されたPSMA特異的免疫応答の大きさが、Ad26・PSMAよりも劣っていないことを実証する、非劣性分析を示す。

【図9】Ad26・hPSMAの 10^8 個又は 10^9 個ウイルス粒子(vp)、Ad26・STEAP1の 10^{10} vp、Ad26・hPSMAの 10^9 vpとAd26・STEAP1の 10^{10} vpの同時投与(別の脚に各々注射される; 「同時投与」)、又は注射前に混合され片脚に注射された(「ベッドサイド混合」)Ad26・hPSMAの 10^9 vpとAd26・STEAP1の 10^{10} vpのいずれかにより免疫化されたマウスからの、 10^6 個の脾細胞当たりのIFN スポット形成単位(SFU)の数の \log_{10} を示している。hSTEAP1ペプチドプールで一晩刺激した後のIFN- 応答を示す。群当たりの幾何平均応答を、横線で示す。点線は、非刺激脾細胞で観察されたSFUの95%パーセントイルとして定義される、アッセイのバックグラウンドを示す。IFN はELISpotを用いて測定した。同時投与群とベッドサイド混合群(ANOVA、Tobitモデル)との間に統計的に有意な差は観察されなかった。

【図10】同時投与で誘導されたSTEAP1特異的免疫応答の大きさがAd26・STEAP1よりも劣っていないことを実証する非劣性分析を示すが、一方で、Ad26・STEAP1と比較してベッドサイド混合については非劣性を実証することができなかった

10

20

30

40

50

。

【図11】hPSMA発現を欠くCT26親細胞（黒色）と比較した、hPSMAをコードするレンチウイルス粒子で形質導入したCT26腫瘍細胞（灰色）（図中、CT26-hPSMA低）からのクローン増殖における、hPSMA発現を測定するフローサイトメトリを示す。

【図12】腫瘍移植後の経時的な腫瘍サイズ（ mm^3 ）によって測定した場合の親CT26又はCT26-hPSMA低細胞の腫瘍増殖速度論を示す。

【図13】 10^{10} vpのAd26・空ベクター（灰色、塗りつぶしの円）、5mg/kgの抗CTLA-4抗体と組み合わせた 10^{10} vpのAd26・からベクター（灰色、白抜きの正方形）、 10^{10} vpのAd26・hPSMA（灰色、白抜きの三角形）、又は5mg/kgの抗CTLA-4抗体と組み合わせた 10^{10} vpのAd26・hPSMA（黒色、塗りつぶしの円）のいずれかにより処置した、CT26-hPSMA腫瘍を保有するマウスにおける腫瘍移植後の経時的な腫瘍サイズ（ mm^3 ）を示す（ n = マウス5匹/群）。

【図14】 10^{10} vpのAd26・空ベクター（灰色、塗りつぶしの円）、5mg/kgの抗CTLA-4抗体と組み合わせた 10^{10} vpのAd26・からベクター（灰色、白抜きの正方形）、 10^{10} vpのAd26・hPSMA（灰色、白抜きの三角形）、又は5mg/kgの抗CTLA-4抗体と組み合わせた 10^{10} のAd26・hPSMA（黒色、塗りつぶしの円）のいずれかにより処置したマウスからの、hPSMAタンパク質全体をカバーする重複ペプチドプールで再刺激した後にICSを用いて評価した、血液単離CD8⁺T細胞のIFN⁺CD8⁺T細胞の割合（%）を示す（ n = マウス10匹/群）。群当たりの幾何平均応答を、横線で示す。*** p < 0.0004 スチューデントt検定。

【図15】Ad26・hPSMA、Ad26・hSTEAP1、及びMVA・hPSMA・hSTEAP1を利用するマウスのプライム-ブーストワクチン接種研究の例示的な研究設計を示す。

【図16】初回としてのMVA・hPSMA・hSTEAP1（群1；Gr1）、初回としてのAd26・hPSMA+Ad26・hSTEAP1（群3、Gr3）、初回としてのAd26・hPSMA+Ad26・hSTEAP1及び追加としてのMVA・hPSMA・hSTEAP1（群4、Gr4）、又は空Ad26ベクター（Ad26・空、群10、Gr10）によりで免疫し、PSMAペプチドプールで一晩刺激したマウスから単離した脾細胞からの、 10^6 個の脾細胞当たりのIFN スポット形成単位（SFU）の数の対数を示す。群4のプライム-ブーストレジメンは、IFN 生成の増加によって測定される免疫応答を有意に増強した。

【図17】初回としてのMVA・hPSMA・hSTEAP1（群1；Gr1）、初回としてのAd26・hPSMA+Ad26・hSTEAP1（群3、Gr3）、初回としてのAd26・hPSMA+Ad26・hSTEAP1及び追加としてのMVA・hPSMA・hSTEAP1（群4、Gr4）、又は空Ad26ベクター（Ad26・空、群10、Gr10）によりで免疫し、PSMAペプチドプールで一晩刺激したマウスから単離した脾細胞からの、 10^6 個の脾細胞当たりのIFN スポット形成単位（SFU）の数の対数を示す。群4のプライム-ブーストレジメンは、IFN 生成の増加によって測定される免疫応答を有意に増強した。

【図18】例示的な非ヒト霊長類プライム-ブースト研究設計を示す。

【図19】hPSMA及びhSTEAP1ペプチドプールで一晩刺激した、Ad26・hPSMA及びAd26・hSTEAP1で初回免疫し、かつMVA・hPSMA・hSTEAP1で4週及び8週に追加免疫した（群1、Gr1）、Ad26・hPSMA及びAd26・hSTEAP1で初回免疫し、追加免疫を受けなかった（群2、Gr2）、Ad26・hPSMA及びAd26・hSTEAP1で初回免疫し、かつMVA・hPSMA・hSTEAP1で4週及び8週に追加免疫し、かつ4週及び8週の両方においてイピリムマブIVを投与した（群3、Gr3）、並びにAd26・hPSMA及びAd26・h

10

20

30

40

50

STEP 1で初回免疫し、かつMVA、hPSMA、hSTEP 1で4週及び8週に追加免疫し、かつ4週及び8週の両方においてイピリムマブSCを投与した(群4、Gr4)、カニクイザル(cynomolgous macaque)から、図に示すように経時的に単離した脾細胞 10^6 個当たりのIFNスポット形成単位(SFU)の数の対数を示す図である。下側の点線は $100\text{ SFU} / 10^6$ 細胞のカットオフ値に対応し、上側の点線は定量上限(upper limit of quantification、ULOQ)に対応する。エラーバーは標準偏差を示す。矢印は免疫化の時間を指す。潜在的打ち切り値を調整したANOVA Tobitモデルを、説明因子として群を \log_{10} 変換した総SFU応答に適用した。統計分析は、示された時点における、群1対群2(一次分析、有意性は*で示され、 $p < 0.005$ に対応)を比較するか、又は群1対群3若しくは群4(二次分析、有意性は群1対群3について#で示され、 $p = 0.032$ に対応)を比較し、全応答にわたって時点ごとに行った。

【図20】 ウイルスレプリコン由来の例示的な自己複製RNA分子(レプリコン)の概略図を示し、ウイルス構造遺伝子は、サブゲノムプロモーター(subgenomic promoter、SGP)の転写制御下において目的の遺伝子に置き換えられる。5'及び3'末端の保存配列エレメント(conserved sequence element、CSE)は、マイナス鎖及びプラス鎖RNA転写のためのプロモーターとして作用する。レプリコンが細胞内に送達された後、非構造ポリタンパク質前駆体(nsP1234)は、インビトロでの転写されたレプリコンから翻訳される。nsP1234は、初期段階で自動タンパク質分解的に処理されて断片nsP123及びnsP4になり、レプリコンのマイナス鎖コピーを転写する。その後、nsP123は完全に1つのタンパク質に処理され、(+)鎖レプリカーゼに組み合わさって、新しいプラス鎖ゲノムコピーと、目的の遺伝子をコードする(+)鎖サブゲノム転写産物と、を転写する。サブゲノムRNA及び新しいゲノムRNAは、キャップされ、ポリアデニル化される。不活性プロモーターは、点線の矢印であり、活性プロモーターは、実線の矢印である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本明細書に引用される、特許及び特許出願を含むがそれらに限定されない全ての刊行物は、完全に記載されているかのように、参照により本明細書に組み込まれる。

【0015】

本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明するためのみに使用され、限定することを意図するものではないと理解すべきである。特に断らない限り、本明細書において使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。

【0016】

本明細書に記載されているものと同様又は同等の任意の方法及び材料を、本発明の試験を実施するために使用することができるが、例示となる材料及び方法を本明細書に記載する。本発明を説明及び特許請求する上で以下の用語が使用される。

【0017】

リストが提示される場合、特に指定しない限り、そのリストの各個々の要素及びそのリストの全ての組み合わせは別個の実施形態であることを、理解されたい。例えば、「A、B、又はC」として提示される実施形態のリストは、実施形態「A」、「B」、「C」、「A又はB」、「A又はC」、「B又はC」、又は「A、B、又はC」を含むと解釈されるべきである。

【0018】

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、「a」、「an」、及び「the」という単数形は、その内容について別途明確に指示されない限り、複数の指示対象を包含する。したがって、例えば、「細胞(a cell)」という言葉及には、2つ又は3つ以上の細胞の組み合わせなどが含まれる。

【0019】

複数の列挙された要素間の「及び／又は」という接続句は、個々の及び組み合わせられた選択肢の両方を包含するものとして理解される。例えば、2つの要素が「及び／又は」によって接続される場合、第1の選択肢は、第2の要素なしに第1の要素が適用可能であることを指す。第2の選択肢は、第1の要素なしに第2の要素が適用可能であることを指す。第3の選択肢は、第1及び第2の要素と一緒に適用可能であることを指す。これらの選択肢のうちのいずれか1つは、意味に含まれ、したがって、本明細書で使用するとき、「及び／又は」という用語の要件を満たすことが理解される。選択肢のうちの2つ以上の同時適用性もまた、意味に含まれ、したがって、「及び／又は」という用語の要件を満たすことが理解される。

【0020】

移行句「備える／含む (comprising)」、「から本質的になる (consisting essentially of)」、及び「からなる (consisting of)」は、特許用語において一般的に受け入れられている意味を含意することを意図しており、すなわち、(i)「備える／含む (comprising)」は、「含む」、「含有する」、又は「特徴とする」と同義であり、包括的又は非制限的なものであり、その他の列挙されていない要素又は方法工程を除外するものではなく、(ii)「からなる (consisting of)」は、特許請求の範囲において特定されていない、あらゆる要素、工程、又は成分を除外し、並びに(iii)「から本質的になる」は、特定される材料又は工程、並びに、特許請求される発明の「基本的かつ新しい特徴に実質的に影響しないもの」に、特許請求の範囲の範囲を制限する。語句「備える／含む (comprising)」（又はその同等語）を伴って記載される実施形態はまた、

【0021】

「組み合わせ」とは、2つ又は3つ以上の異なる組換えウイルスなどの2つ以上の別個の構成成分を指す。

【0022】

「組換え体」とは、組換え手段によって調製、発現、作製、又は単離されたポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、ウイルス、及び他の巨大分子を指す。

【0023】

「導入遺伝子」とは、ベクター又はウイルスゲノム中に天然に存在しない異種核酸を指し、ベクター又はウイルスゲノムへと挿入されて、組換えウイルスを生成することができる。

【0024】

「PSMA」又は「hPSMA」とは、ヒト葉酸ヒドロラーゼ (FOL1) を指し、GenBank 受託番号 NP__001014986.1、NP__001180400.1、NP__001180401.1、NP__001180402.1、NP__001338165.1、及び NP__004467.1 に見出されるアミノ酸配列を有するアイソフォームなどの、全てのアイソフォーム及びバリエーションを包含する。「PSMA」とは、天然に存在するヒトPSMA及び組換え発現ヒトPSMAの両方を指す。組換え発現される場合、開始メチオニンは、PSMAに存在しなくてもよい。「PSMA」はまた、開始メチオニンを含まないPSMAも包含する。

【0025】

「STEAP1」又は「hSTEAP1」とは、ヒトSTEAP1メタロレダクターゼを指し、GenBank 受託番号 NP__036581.1 に見出されるアミノ酸配列を有するSTEAP1などの、全てのアイソフォーム及びバリエーションを包含する。「STEAP1」は、天然に存在するヒトSTEAP1及び組換え発現ヒトSTEAP1の両方を指す。組換え発現される場合、開始メチオニンは、STEAP1に存在しなくてもよい。「STEAP1」は、また開始メチオニンを含まないSTEAP1も包含する。

【0026】

本明細書で使用される場合、目的の遺伝子 (gene of interest、GOI) とは、PS

10

20

30

40

50

M A、S T E A P 1、又はP S M A及びS T E A P 1を指す。

【0027】

「5に位置 (Located 5)」とは、第2のポリヌクレオチドエレメントに対する、第1のポリヌクレオチドエレメントのより5'の配向を指す。

【0028】

「3に位置 (Located 3)」とは、第2のポリヌクレオチドエレメントに対する、第1のポリヌクレオチドエレメントのより3'の配向を指す。

【0029】

「オペレーター含有プロモーター」とは、T e t O又はC u Oなどの転写リプレッサー (例えば、リプレッサー) オペレーター配列に操作可能に結合されたプロモーターを指す。

10

【0030】

「操作可能に連結している」とは、このように記載されている構成成分が通常の機能を実行するようになっていいる要素の配置を指す。核酸は、別の核酸配列と機能的関係に置かれる場合、「操作可能に連結されて」いる。例えば、プロモーターは、1つ又は2つ以上の導入遺伝子の転写に影響を与える場合、1つ又は2つ以上の導入遺伝子に操作可能に連結される。更に、コード配列に操作可能に連結された制御エレメントは、コード配列の発現をもたらすことができる。制御エレメントは、その発現を導くように機能する限り、コード配列に隣接している必要はない。

【0031】

「CMVプロモーター」とは、CMVエンハンサー、プロモーター、エクソン1、及び/又はイントロン1配列を包含し得る、ヒト又はマウスCMVプロモーターを指す。例示的なCMVプロモーターは、5'エンハンサー領域の少なくとも一部及びエクソン1の少なくとも一部を包含するヒトIE1 CMVプロモーターであり、任意選択的には、第1のイントロンの少なくとも一部を含み得る。配列番号24は例示的なCMVプロモーター配列を提供する。

20

【0032】

「ワクシニアウイルスプロモーターp7.5」とは、配列番号1のポリヌクレオチド配列を含むワクシニアウイルス早期-後期p7.5プロモーターを指す。

【0033】

「T細胞エンハンサー」(T cell enhancer、TCE)とは、下流ポリペプチド配列 (例えば、PSMA及び/又はSTEAP1) に融合した場合、ワクチン接種の文脈における下流ポリペプチド配列に対するT細胞の誘導を増加させる、ポリペプチド配列を指す。T細胞エンハンサーの例は、インバリエント鎖配列若しくはその断片、任意選択的には6つの追加の下流アミノ酸残基を含む、組織型プラスミノゲン活性化因子リーダー配列、PEST配列、サイクリン破壊ボックス、ユビキチン化シグナル、又はSUMO化シグナルである。

30

【0034】

「2A自己切断ペプチド」とは、真核細胞における翻訳中のポリペプチドの切断を媒介する、2Aウイルス自己切断ペプチドを指す。

40

【0035】

「単離された」とは、組換え細胞などの分子が生成される系の他の構成成分から離して実質的に分離及び/又は精製された分子の均質な集団 (例えば、合成ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、又はウイルス) に加えて、少なくとも1つの精製又は単離工程に供されたタンパク質を指す。「単離された」とは、他の細胞材料及び/又は化学物質を実質的に含まない分子を指し、より高い純度、例えば80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の純度まで単離された分子を包含する。

【0036】

50

がんなどの疾患若しくは障害を「治療する」、「治療すること」、又は「治療」とは、以下、障害の重篤度及び/若しくは期間を低減すること、障害に特徴的な症状の悪化を阻害すること、以前に障害を有していた対象における障害の再発を制限若しくは予防すること、又は障害について以前に症候性であった対象における症状の再発を制限若しくは予防すること、のうちの1つ又は2つ以上を達成することを指す。

【0037】

「前立腺がん」は、組織病理学的な種類又は悪性度の段階に関係なく、前立腺内の全ての種類のがん性増殖又は発がんプロセス、転移組織又は悪性腫瘍形質転換細胞、組織、又は器官を含むことを意味する。

【0038】

疾患若しくは障害を「予防する」、「予防すること」、「予防 (prevention)」、又は「予防 (prophylaxis)」とは、対象における障害の発生を予防することを意味する。

【0039】

「治療に有効な量」とは、必要な用量及び期間で所望の治療結果を得るための有効量を指す。治療有効量は、個体の病態、年齢、性別、及び体重などの要因、並びに個体において所望の応答を誘発する治療又は治療の組み合わせの能力によって変動し得る。有効な治療、又は治療の組み合わせの例示的な指標としては、例えば、患者の改善された健康が挙げられる。

【0040】

「再発性」とは、治療薬による前治療後の改善期間後に疾患又は疾患の徴候及び症状が再開することを指す。

【0041】

「難治性」とは、治療に応答しない疾患を指す。難治性疾患は、治療前若しくは治療開始時に治療に抵抗性であり得るか、又は難治性疾患は、治療中に抵抗性疾患となり得る。

【0042】

「対象」は、任意のヒト又は非ヒト動物を含む。「非ヒト動物」としては、全ての脊椎動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などの哺乳類及び非哺乳類が挙げられる。「対象」及び「患者」という用語は、本明細書において互換的に使用され得る。

【0043】

「と組み合わせる」は、2つ又は3つ以上の治療剤を、混合物の状態と一緒に、単剤として同時に、又は単剤として任意の順序で順次、対象に投与することを意味する。

【0044】

「強化する」又は「誘導する」とは、免疫応答に関する場合、免疫応答のスケール及び/若しくは効率を増大させること、又は免疫応答の持続時間を延長することを指す。これらの用語は「増強する」と互換的に使用される。

【0045】

「免疫応答」とは、脊椎動物対象の免疫系による、ワクチン(ウイルスなど)に対する任意の応答を指す。例示的な免疫応答としては、局所及び全身の細胞性及び体液性免疫、例えば、CD8⁺細胞傷害性Tリンパ球(cytotoxic T lymphocyte、CTL)の抗原特異的誘導を含むCTL応答、T細胞増殖応答及びサイトカイン生成(IL-2、IFN、及びTNFの生成など)を含むヘルパーT細胞応答、並びに抗体応答を含むB細胞応答が挙げられる。

【0046】

「免疫学的有効量」又は「免疫学的有効用量」とは、検出可能な免疫応答を誘導するのに十分なウイルスの量を指す。

【0047】

「バリエーション」、「変異体」又は「変化した」とは、1つ又は2つ以上の改変、例えば、1つ又は2つ以上の置換、挿入、又は欠失によって参照ポリペプチド又は参照ポリヌクレオチドとは異なる、ポリペプチド又はポリヌクレオチドを指す。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 8 】

「約」は、当業者によって決定される特定の値について許容される誤差範囲内であることを意味し、これは、その値がどのように測定又は決定されるのか、すなわち、測定システムの制限に部分的に依存する。特定のアッセイ、結果、又は実施形態の文脈において、実施例又は明細書の他の箇所に別途明示的に記載されない限り、「約」は、技術分野の実施につき1つの標準偏差、又は5%までの範囲のうちのいずれか大きい方の範囲内であることを意味する。

【 0 0 4 9 】

「プライム - ブースト」とは、第1のワクチンでT細胞応答を初回免疫し、続いて、第2のワクチンで免疫応答を追加免疫することを含む、対象を治療する方法を指す。これらのプライム - ブースト免疫は、同じワクチンで初回免疫及び追加免疫することによって達成され得るよりも大きくかつ広範な免疫応答を誘発する。初回免疫工程は、メモリ細胞を開始させ、追加免疫工程は、メモリ応答を拡大する。追加免疫は、1回又は複数回行われ得る。

10

【 0 0 5 0 】

本開示は、前立腺がん罹患している対象を治療するために使用することができる、ワクチン、ワクチン組み合わせ、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、及びベクターを提供する。本開示は、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチド、並びにワクチン及びワクチン組み合わせを作製するために使用され得るベクターを更に提供し、これは、治療目的と研究使用とで使用され得る。ワクチン及びワクチン組み合わせは、マウス及び非ヒト霊長類などの動物モデルにおけるインビボでのワクチン免疫応答及び抗原提示に関連した科学的問題に対処するために使用され得る。ポリヌクレオチドを使用して、ポリペプチドを発現させ、それらを細胞に導入した後にインビトロで細胞に対するそれらの効果を研究することができる。ポリペプチドは、それらに対する抗体を作製するために使用され得る。

20

【 0 0 5 1 】

ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、細胞

本明細書では、PSMAをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号16の配列に対して、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号16の配列を含む。いくつかの実施形態では、PSMAをコードするポリヌクレオチドは、配列番号15の配列に対して、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、又は少なくとも99%の配列同一性を有するポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、PSMAをコードするポリヌクレオチドは、配列番号15を含むポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、PSMAをコードするポリヌクレオチドは、配列番号14の配列に対して、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号14の配列を含む。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、配列番号15のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、配列番号16のポリヌクレオチドを含む。

30

40

【 0 0 5 2 】

本明細書では、STEAP1をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号19の配列に対して、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号19の配列を含む。いくつかの実施形態では、STEAP1をコードするポリヌクレオチドは、配列番号18の配列に対して、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、又は少なくとも99%の配列同一性を有するポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、STEAP1をコードするポリヌクレオチドは、配列番号18の配列を含むポ

50

リペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、STEP 1をコードするポリヌクレオチドは、配列番号17の配列に対して、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号17の配列を含む。

【0053】

本明細書ではまた、PSMA及びSTEP 1をコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号12の配列に対して、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、又は少なくとも99%の配列同一性を有するポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、PSMA及びSTEP 1をコードするポリヌクレオチドは、配列番号12の配列を含むポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号11の配列に対して、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号11の配列を含む。

10

【0054】

本明細書では、開示されたポリヌクレオチドのうちのいずれかを含むベクターが開示される。開示されたベクターのうちのいずれかを含む細胞もまた提供される。

【0055】

ポリヌクレオチドはRNAの形態又はDNAの形態であり得る。RNA又はDNAはクローニング又は合成的に生成され得る。DNAは、二本鎖又は一本鎖であり得る。ポリヌクレオチドを作製する方法は、技術分野において既知であり、化学合成、酵素合成（例えば、インビトロ転写）、より長い前駆体の酵素的又は化学的開裂、ポリヌクレオチドのより小さな断片を化学合成した後に断片をライゲーションすること、又は既知のPCR方法が挙げられる。合成されるポリヌクレオチド配列は、所望のアミノ酸配列に適切なコドンを用いて設計され得る。一般に、好ましいコドンは、その配列が発現のために使用される、意図する宿主のために選択され得る。

20

【0056】

本明細書ではPSMAポリペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、PSMAは、配列番号15の配列に対して、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、PSMAは、配列番号15の配列を含む。

30

【0057】

本明細書ではSTEP 1ポリペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、STEP 1は、配列番号18の配列に対して、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、STEP 1は、配列番号18の配列を含む。

【0058】

本明細書ではまた、PSMA及びSTEP 1ポリペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、PSMA及びSTEP 1は、配列番号12の配列に対して、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、PSMA及びSTEP 1は、配列番号12の配列を含む。

40

【0059】

ポリペプチドを作製する方法は、技術分野において既知であり、ポリペプチドのクローニング及び発現、並びにポリペプチドの化学合成のための標準的な分子生物学的技術が挙げられる。

【0060】

本明細書では、開示されたポリヌクレオチドのうちのいずれかを含むベクターが開示される。ベクターは既知の技術を用いて作製することができる。いくつかの実施形態では、ベクターは、発現ベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターは、ウイルスベクター

50

ーである。ベクターは、組換えウイルスを作製するために、又は本明細書に開示されるポリペプチドのうちのいずれかを発現するために利用され得る。

【0061】

ベクターは、細菌、酵母、又は哺乳類などの任意の宿主におけるポリヌクレオチドの発現を意図するベクターであってもよい。好適な発現ベクターは、典型的には、エピソードとして、又は宿主染色体DNAの不可欠な部分として、宿主生物において複製可能である。通常、発現ベクターは、所望のDNA配列で形質転換された細胞の検出を可能にするため、アンピシリン耐性、ヒグロマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、カナマイシン耐性、又はネオマイシン耐性などの選択マーカを含有する。例示的なベクターは、プラスミド、コスミド、ファージ、ウイルスベクター、又は人工染色体である。

10

【0062】

好適なベクターは、当業者に既知である。多くが、組換え構築物を生成するために市販されている。例えば以下のベクターが提供されている。細菌系：pBs、phagescript、PsiX174、pBluescriptSK、pBsKS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a (Stratagene、La Jolla、Calif.、USA)；pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、及びpRIT5 (Pharmacia、Uppsala、Sweden)。真核細胞系：pWLineo、pSV2cat、pOG44、PXR1、pSG (Stratagene) pSVK3、pBPV、pMSG、及びpSVL (Pharmacia)。

20

【0063】

いくつかの実施形態では、ベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus、AAV) ベクター (例えば、AAV5型及び2型)、ウイルスベクター (例えば、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (Venezuelan equine encephalitis virus、VEE)、シンドビスウイルス (Sindbis virus、SIN)、セムリキ森林ウイルス (Semliki forest virus、SFV)、及びVEE-SINキメラ)、ヘルペスウイルスベクター (例えば、アカゲザルサイトメガロウイルス (rhesus cytomegalovirus、RhCMV) のようなサイトメガロウイルスに由来するベクター)、アレナウイルスベクター (例えば、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (lymphocytic choriomeningitis virus、LCMV) ベクター)、麻疹ウイルスベクター、ポックスウイルスベクター (例えば、ワクシニアウイルス、改変ワクシニアウイルスアンカラ (modified vaccinia virus Ankara、MVA)、NYVAC (ワクシニアのコペンハーゲン株に由来)、及びトリポックスベクター：カナリアポックス (ALVAC) 及び鶏痘 (fowlpox、FPV) ベクター)、水疱性口内炎ウイルスベクター、レトロウイルス、レンチウイルス、ウイルス様粒子、及び細菌胞子を含むウイルスベクターであるが、これらに限定されない。

30

【0064】

本開示はまた、開示されたポリヌクレオチドのうちの1つ又は2つ以上を含む細胞 (例えば、宿主細胞) を提供する。本開示はまた、開示されたベクターのうちの1つ又は2つ以上を含む細胞 (例えば、宿主細胞) を提供する。本開示はまた、開示されたポリペプチドのうちの1つ又は2つ以上を生成する細胞 (例えば、宿主細胞) を提供する。本開示はまた、本開示の1つ又は2つ以上のrMVAを生成する細胞 (例えば、宿主細胞) を提供する。本開示はまた、本開示の1つ又は2つ以上のrAdを生成する細胞 (例えば、宿主細胞) を提供する。本開示はまた、本開示の1つ又は2つ以上の自己複製RNAを生成する細胞 (例えば、宿主細胞) を提供する。「宿主細胞」とは、ポリヌクレオチド、ベクター、rMVA、又はrAdが導入される細胞を指す。宿主細胞という用語は、特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の後代、特定の対象細胞から生成された安定な細胞株を指すことを意図すると理解される。変異又は環境の影響のいずれかに起因して、後続世代においてある特定の修飾が生じ得るので、そのような後代は親細胞に同一ではない場合があるが、本明細書で使用される「宿主細胞」という用語の範囲内に依然含まれる。そのよ

40

50

うな宿主細胞は、真核細胞、原核細胞、植物細胞、又は古細菌細胞であってもよい。Escherichia coli、Bacillus subtilisなどの桿菌、並びにSalmonella、Serratia及び種々のPseudomonas種などの他の腸内細菌が、原核宿主細胞の例である。酵母などの他の微生物も発現に有用である。好適な酵母宿主細胞の例は、Saccharomyces（例えば、S.cerevisiae）及びPichiaである。例示的な真核細胞は、哺乳類、昆虫、鳥類、又は他の動物由来のものであってもよい。哺乳動物真核細胞としては、SP2/0（米国型培養コレクション（American Type Culture Collection、ATCC）、Manassas、VA、CRL-1581）、NS0（ヨーロッパ細胞培養コレクション（ECACC）、Salisbury、Wiltshire、UK、ECACC No. 85110503）、FO（ATCC CRL-1646）及びAg653（ATCC CRL-1580）マウス細胞株などといった、ハイブリドーマ又は骨髄腫の細胞株などの不死化細胞株が挙げられる。例示的なヒト骨髄腫細胞株は、U266（ATCC CRL-TIB-196）である。他の有用な細胞株としては、CHO-K1SV（Lonza Biologics、Walkersville、MD）、CHO-K1（ATCC CRL-61）、DG44、BHK-21、MDCK、VERO、又は293細胞などのチャイニーズハムスター卵巣（Chinese Hamster Ovary、CHO）細胞に由来するものが挙げられる。使用され得る他の宿主細胞は、PER.C6、PER.C6 TetR細胞、E1形質転換A549細胞、ニワトリ胚線維芽細胞（chicken embryonic fibroblast、CEF）などの鳥類細胞、又はAGE1.CR.pIX（登録商標）細胞（例えば、米国特許第8,940,534号を参照されたい）などのAGE-1細胞である。

【0065】

ウイルス

アデノウイルス

本明細書では、開示されたポリヌクレオチド又は導入遺伝子のうちいずれかを含む、組換えアデノウイルス（recombinant adenovirus、rAd）が提供される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、PSMAをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、STEAP1をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、PSMAをコードするポリヌクレオチドと、STEAP1をコードするポリヌクレオチドと、を含む。

【0066】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、PSMAをコードするポリヌクレオチドに操作可能に連結されたオペレーター含有プロモーター、STEAP1をコードするポリヌクレオチド、又はPSMAをコードするポリヌクレオチド及びSTEAP1をコードするポリヌクレオチドを更に含む。

【0067】

いくつかの実施形態では、オペレーター含有プロモーターは、CMVプロモーター及びテトラサイクリンオペロンオペレーター（tetracyclin operon operator、TetO）を含む。いくつかの実施形態では、TetOは、配列番号22のポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、オペレーター含有プロモーターは、配列番号20のポリヌクレオチドを含む。

【0068】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、SV40pAシグナルを更に含む。いくつかの実施形態では、SV40pAは、配列番号21のポリヌクレオチドを含む。

【0069】

rAdはPSMAをコードするポリヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、rAdは、配列番号14のポリヌクレオチドを含むPSMAをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0070】

いくつかの実施形態では、rAdは、配列番号15のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、rAdは、配列番号16のポリヌクレオチドを含む、導入遺伝子を含む。

【0071】

配列番号15のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むrAdもまた提供される。配列番号16のポリヌクレオチドを含むrAdが提供される。

【0072】

rAdはSTEAP1をコードするポリヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、rAdは、配列番号17のポリヌクレオチドを含むSTEAP1をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、rAdは、配列番号18のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、rAdは、配列番号19のポリヌクレオチドを含む。

10

【0073】

アデノウイルスは、ヒトアデノウイルス(human adenovirus、Ad)由来だけでなく、ウシアデノウイルス(例えば、ウシアデノウイルス3、BAdV3)、イヌアデノウイルス(例えばCA DV2)、ブタアデノウイルス(例えば、PA DV3又は5)、又はチンパンジー(Pan)、ゴリラ(Gorilla)、オランウータン(Pongo)、ボノボ(Pan paniscus)、及びチンパンジー(common chimpanzee)(Pan troglodytes)などの大型類人猿などの他の種に感染するアデノウイルス由来であり得る。典型的には、天然に存在する大型類人猿アデノウイルスは、それぞれの大型類人猿の糞便試料から単離される。

20

【0074】

ヒトアデノウイルスは、例えば、ヒトアデノウイルス血清型hAd5、hAd7、hAd11、hAd26、hAd34、hAd35、hAd48、hAd49、又はhAd50(血清型は、Ad5、Ad7、Ad11、Ad26、Ad34、Ad35、Ad48、Ad49、又はAd50とも称される)からのものを含む、様々なアデノウイルス血清型に由来し得る。

【0075】

大型類人猿アデノウイルス(Great ape adenovirus、GA D)は、様々なアデノウイルス血清型、例えば、大型類人猿アデノウイルス血清型GA D20、GA D19、GA D21、GA D25、GA D26、GA D27、GA D28、GA D29、GA D30、GA D31、ChAd3、ChAd4、ChAd5、ChAd6、ChAd7、ChAd8、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19、ChAd20、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd55、ChAd63、ChAd73、ChAd82、ChAd83、ChAd146、ChAd147、PanAd1、PanAd2、又はPanAd3に由来し得る。

30

【0076】

アデノウイルスは技術分野において既知である。ヒト及び非ヒトアデノウイルスの大部分の配列は既知であり、その他については、常法を用いて得ることができる。Ad26の例示的なゲノム配列は、GenBank受託番号EF153474及び国際公開第2007/104792号の配列番号1に見出される。Ad35の例示的なゲノム配列は、国際公開第2000/70071号の図6に見出される。Ad26ウイルスは、例えば、国際公開第2007/104792号に記載される。Ad35ウイルスは、例えば、米国特許第7,270,811号及び国際公開第2000/70071号に記載されている。ChAd3、ChAd4、ChAd5、ChAd6、ChAd7、ChAd8、ChAd9、ChAd10、ChAd11、ChAd16、ChAd17、ChAd19、ChAd20、ChAd22、ChAd24、ChAd26、ChAd30、ChAd31、ChAd37、ChAd38、ChAd44、ChAd63、及びChAd82ウイルスは、国

40

50

際公開第2005/071093号に記載されている。PanAd1、PanAd2、PanAd3、ChAd55、ChAd73、ChAd83、ChAd146、及びChAd147ウイルスは、国際公開第2010/086189号に記載されている。

【0077】

いくつかの実施形態では、アデノウイルスは、ヒトアデノウイルス(Ad)である。いくつかの実施形態では、Adは、Ad5に由来する。いくつかの実施形態では、Adは、Ad11に由来する。いくつかの実施形態では、Adは、Ad7に由来する。いくつかの実施形態では、Adは、Ad26に由来する。いくつかの実施形態では、Adは、Ad34に由来する。いくつかの実施形態では、Adは、Ad35に由来する。いくつかの実施形態では、Adは、Ad48に由来する。いくつかの実施形態では、Adは、Ad49に由来する。いくつかの実施形態では、Adは、Ad50に由来する。

10

【0078】

いくつかの実施形態では、アデノウイルスは、大型類人猿アデノウイルス(GAd)である。いくつかの実施形態では、GAdは、GAd20に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、GAd19に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、GAd21に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、GAd25に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、GAd26に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、GAd27に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、GAd28に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、GAd29に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、GAd30に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、GAd31に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd3に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd4に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd5に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd6に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd7に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd8に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd9に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd9に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd10に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd11に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd16に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd17に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd19に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd20に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd22に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd24に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd26に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd30に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd31に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd32に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd31に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd33に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd37に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd38に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd44に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd55に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd63に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd68に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd73に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd82に由来する。いくつかの実施形態では、GAdは、ChAd83に由来する。GAd19-21及びGAd25-31は、国際公開第2019/008111号に記載されており、一般的なヒト集団において高い免疫原性を有し、既存の免疫は有しない株を表す。GAd20ゲノムのポリヌクレオチド配列は、国際公開第2019/008111号に開示されている。

20

30

40

【0079】

組換えアデノウイルスは、例えば、ヒトアデノウイルス血清型5(hAd5)、hAd7、hAd11、hAd26、hAd34、hAd35、hAd48、hAd49、又はhAd50からの、様々なヒトアデノウイルス血清型に由来し得る。「Ad26」とは、

50

ヒトアデノウイルス血清型 26 を指す。「rAd26」とは、組換えアデノウイルス血清型 26 を指す。これに応じて他のアデノウイルス及び組換えアデノウイルスを命名する。

【0080】

本開示の組換えアデノウイルスは天然に存在するアデノウイルスに由来し、典型的には、複製不全、例えば非複製性であるように改変される。本開示の組換えアデノウイルスは、アデノウイルス領域 E1、E2、及び E4 のうちの 1 つ又は 2 つ以上などのウイルス複製に必須である遺伝子産物の少なくとも 1 つが機能的に欠失するか又は完全に除去され、それによって、アデノウイルスが複製不能なよう遺伝子操作される。E1 領域の欠失は、E1A、E1B 55K、若しくは E1B 21K の欠失、又はこれらの任意の組み合わせを含み得る。複製欠損組換えアデノウイルスは、ヘルパープラスミドを利用して欠失領域にコードされているタンパク質を生成細胞によりトランスに提供することによって、又は生成細胞を遺伝子操作して必要なタンパク質を発現させることによって増殖する。組換えアデノウイルスはまた、複製に不要である E3 領域に欠失を有していてもよく、したがって、このような欠失は、相補される必要はない。E3 欠失は、組換えアデノウイルスへのより大きな導入遺伝子の挿入を容易にするために行われ得る。

10

【0081】

いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルスは、E1 領域及び E3 領域の少なくとも一部が機能的に欠失しているか又は完全に除去されていてもよい。いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルスは、E1 領域 (E1 欠失) の完全な除去、及び E3 領域の少なくとも一部の欠失を含む。

20

【0082】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、E1 欠失部位へと挿入される。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、E3 欠失部位へと挿入される。

【0083】

組換えアデノウイルスは、更に、E4 領域及び / 又は E2 領域が機能的に欠失しているか又は完全に除去されていてもよい。

【0084】

組換えアデノウイルスは、少なくとも 1 つのカプシドタンパク質が Ad26 に由来する限り、Ad26、又は 1 つ又は 2 つ以上の Ad26 カプシドタンパク質 (繊維、ペントン及びヘキソン) が異なる血清型に由来し得るキメラ Ad26 に由来し得る。場合によっては、Ad26 の E4-orf6 コード配列は、Ad5 などのサブグループ C のアデノウイルスの E4-orf6 で置き換えられ得る。これにより、得られたキメラアデノウイルスを、Ad5 の E1 遺伝子を発現する周知の相補性細胞株、例えば、293 細胞及び PER.C6 細胞などにおいて増殖させることが容易になる (例えば、Havenga, et al., 2006, J Gen Virol 87: 2135-43 [61]; 国際公開第 03/104467 号を参照されたい)。しかしながら、そのようなアデノウイルスは、Ad5 の E1 遺伝子を発現しない非相補性細胞で複製することができない。

30

【0085】

組換えアデノウイルスは、ウイルス複製に必要な欠損ウイルス遺伝子をトランスで供給する、相補性細胞株又はヘルパーウイルスを用いて、当分野における任意の従来技術 (例えば、国際公開第 1996/17070 号) に従って調製及び増殖することができる。細胞株 293 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36: 59-72)、PER.C6 (例えば、米国特許第 5,994,128 号)、及び E1-形質転換 A549 細胞 (国際公開第 1998/39411 号、米国特許第 5,891,690 号) は、E1 欠失を補完するために一般的に使用されている。他の細胞株は、欠陥ベクターを相補するように遺伝子操作されている (Yeh, et al., 1996, J. Virol. 70: 559-565、Kroughak and Graham, 1995, Human Gene Ther. 6: 1575-1586、Wang, et al., 1995, Gene Ther. 2: 775-783、Lusky, et al., 1998, J. Virol. 72: 2022-203、欧州特許第 919627 号及び国

40

50

際公開第1997/04119号)。組換えアデノウイルスは、培養上清から回収され得るが、溶解後に細胞からもまた回収され、任意選択的に、標準的な技術に従って更に精製され得る(例えば、国際公開第1996/27677号、国際公開第1998/00524号、国際公開第1998/26048号、国際公開第2000/50573号に記載のクロマトグラフィー、超遠心分離法)。アデノウイルスの構築及び増殖方法は、例えば、米国特許第5,559,099号、同第5,837,511号、同第5,846,782号、同第5,851,806号、同第5,994,106号、同第5,994,128号、同第5,965,541号、同第5,981,225号、同第6,040,174号、同第6,020,191号及び同第6,113,913号に記載されている。

【0086】

リプレッサー系を用いて、組換えアデノウイルスの生産性(改善されたウイルスレスキュー及び改善された収率など)、及び遺伝的安定性(欠陥のある導入遺伝子を有するウイルス変異体の増殖の減少)を改善することができる(例えば、米国特許第10,071,151号を参照されたい)。強力な構成的プロモーターの制御下において発現される組換えアデノウイルスに挿入された導入遺伝子は、導入遺伝子による発現タンパク質の特性に応じて、組換えアデノウイルスの産生に悪影響を及ぼし得る(Yoshida and Yamada, 1997, Biochem. Biophys. Res. Commun. 230:426-30、Rubinchik et al., 2000, Gene Ther. 7:875-85、Matthews et al., 1999, J. Gen. Virol. 80:345-53、Edholm et al., 2001, J. Virol. 75:9579-84、Gall et al., 2007, Mol. Biotechnol. 35:263-73)。使用され得る例示的なリプレッサー系は、TetR/TetO (Yao and Eriksson, 1999, Hum. Gene Ther. 10:419-22、欧州特許第0990041B1号)及びCymR/CuO (Mullick et al., 2006, BMC Biotechnol. 6:43)である。したがって、導入遺伝子はリプレッサー配列のうちの1つを組み込んでよく、目的の遺伝子は、CMVプロモーターなどの強力なプロモーターを含有するTetO又はCuOの制御下において発現されてもよい。使用され得る例示的な配列は、配列番号22のTetO及び配列番号23のCuOである。TetO及びCuO配列は、それぞれ、プロモーターの位置-20及び7のすぐ下流に挿入され得る。

【0087】

配列番号22(2xTetO含有配列)

GAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGATCTCCCTATCAGTGA
ATAGAGATCGTCGAC

配列番号23(CuO含有配列)

AACAACAAGACAATCTGGTCTGTTTGTA

【0088】

導入遺伝子発現の抑制は、例えば組換えアデノウイルスを生成するために使用される細胞株において、リプレッサータンパク質TetR又はCymRをトランスで提供することを必要とする。TetR又はCyRのいずれかを発現する細胞株は、例えば、プラスミドpcDNA(商標)6/TR(Life Technologies、V1025-20)、又はTetRコード配列をコドンに最適化されたCymRコード配列に置換したpcDNA(商標)6/TRの誘導体を用いて、Per.C6細胞の安定したトランスフェクションによって作られ得る。TetR又はCyRを発現する安定した細胞株は、既知の方法を用いて作製され得、ウイルス複製中に導入遺伝子発現を再抑制する能力は、リプレッサー-CMVプロモーター下における蛍光タンパク質などの検出可能なマーカを発現するアデノウイルスベクターを用いて評価され得る。

【0089】

導入遺伝子は、導入遺伝子が得られた組換えアデノウイルスの生存率に影響を与えないような様式で、組換えアデノウイルス内のE1欠失部位及び/又はE3欠失部位へと挿入

10

20

30

40

50

され得る。導入遺伝子は、欠失した E 1 領域若しくは部分的に欠失した E 3 領域に平行に（5' から 3' に転写される）、又は逆平行（ベクター主鎖に対して 3' から 5' 方向に転写される）の配向で挿入され得る。加えて、使用のためにベクターが調製される哺乳類宿主細胞において導入遺伝子によりコードされるポリペプチドの発現を指示することができる適切な転写調節エレメントは、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに操作可能に連結され得る。操作可能に連結された配列は、それらの配列が調節する核酸配列に隣接する発現制御配列と、トランスに作用するか又は調節される核酸配列を制御するための距離にある調節配列とを両方含む。

【0090】

改変ワクシニアアンカラ (MVA)

また、開示されたポリヌクレオチド又は導入遺伝子のうちのいずれかを含む、組換え改変ワクシニアアンカラ (recombinant modified vaccinia Ankara, rMVA) ウイルスも提供される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、PSMA をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、STEAP1 をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、PSMA をコードするポリヌクレオチドと、STEAP1 をコードするポリヌクレオチドと、を含む。

【0091】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、PSMA をコードするポリヌクレオチド及び / 又は STEAP1 をコードするポリヌクレオチドに操作可能に連結された、ボックスウイルスプロモーターを更に含む。好適なボックスウイルスプロモーターとしては、例えば、ワクシニア p7.5 プロモーター、ハイブリッド初期 / 後期プロモーター、PrS プロモーター、PrS5E プロモーター、合成若しくは天然の初期若しくは後期プロモーター、又は牛痘ウイルス ATI プロモーターが挙げられる。いくつかの実施形態では、ボックスウイルスプロモーターは、配列番号 1 のポリヌクレオチドを含むワクシニアウイルスプロモーター p7.5 を含む。

【0092】

ポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、第 1 の T 細胞エンハンサー (TCE) をコードするポリヌクレオチドと、第 2 の TCE をコードするポリヌクレオチドと、を更に含み得る。いくつかの実施形態では、第 1 の TCE 及び第 2 の TCE は、配列番号 25 のヒトインバリアント鎖又はその断片を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の TCE 及び第 2 の TCE は、配列番号 26 のマウスインバリアント鎖又はその断片を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の TCE 及び第 2 の TCE は、配列番号 27 のマンダリンフィッシュインバリアント鎖又はその断片を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の TCE をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 13 のポリペプチドをコードし、第 2 の TCE をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 7 のポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、第 1 の TCE をコードするポリヌクレオチド及び第 2 の TCE をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 29 のポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、第 1 の TCE をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 2 のポリヌクレオチドを含み、及び / 又は第 2 の TCE をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 5 のポリヌクレオチドを含む。

【0093】

ポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、2A 自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドを更に含み得る。いくつかの実施形態では、2A 自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号 9 のポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、2A 自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号 4 のポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、2A 自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号 30 のポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、2A 自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号 31 のポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、2A 自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番

10

20

30

40

50

号 3 2 のポリペプチドをコードする。

【 0 0 9 4 】

いくつかの実施形態では、

P S M A をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 8 のポリペプチドをコードする、
P S M A をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 3 のポリヌクレオチドを含む、
S T E A P 1 をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 1 0 のポリペプチドをコード
し、かつ / 又は

S T E A P 1 をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 6 のポリヌクレオチドを含む
。

【 0 0 9 5 】

いくつかの実施形態では、

P S M A をコードするポリヌクレオチドが、S T E A P 1 をコードするポリヌクレオチ
ドの 5 ' に位置する、

ボックスウイルスプロモーターが、P S M A をコードするポリヌクレオチドの 5 ' に位
置する、

第 1 の T C E をコードするポリヌクレオチドが、P S M A をコードするポリヌクレオチ
ドの 5 ' に位置する、

第 2 の T C E をコードするポリヌクレオチドが、P S M A をコードするポリヌクレオチ
ドの 3 ' に位置し、かつ / 又は

2 A 自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドが、P S M A をコードするポリヌ
クレオチドの 3 ' と、第 2 の T C E をコードするポリヌクレオチドの 5 ' とに位置する。

【 0 0 9 6 】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、配列番号 1 2 のポリペプチドをコードするポ
リヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、配列番号 1 1 のポリヌ
クレオチドを含む。

【 0 0 9 7 】

r M V A は、M V A - 4 7 6 M G / 1 4 / 7 8、M V A - 5 7 2、M V A - 5 7 4、
M V A - 5 7 5、又は M V A - B N に由来し得る。いくつかの実施形態では、r M V A は
、M V A - 4 7 6 M G / 1 4 / 7 8 に由来する。いくつかの実施形態では、r M V A は
、M V A - 5 7 2 に由来する。いくつかの実施形態では、r M V A は、M V A - 5 7 4 に
由来する。いくつかの実施形態では、r M V A は、M V A - 5 7 5 に由来する。いくつか
の実施形態では、r M V A は、M V A - B N に由来する。

【 0 0 9 8 】

導入遺伝子は、M V A 欠失部位 I、I I、I I I、I V、V、又は V I へと挿入するこ
とができる。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、M V A 欠失部位 I I I へと挿入さ
れる。

【 0 0 9 9 】

ボックスウイルス（ボックスウイルス科）は、天然痘ウイルス（痘瘡）、ワクシニアウ
イルス、牛痘ウイルス、又はサル痘ウイルスに由来し得る。例示的なワクシニアウイルス
としては、コペンハーゲンワクシニアウイルス（W）、ニューヨーク弱毒化ワクシニアウ
イルス（New York Attenuated Vaccinia Virus、N Y V A C）、A L V A C、T R
O V A C、及び改変ワクシニアアンカラ（Modified Vaccinia Ankara、M V A）が
挙げられる。

【 0 1 0 0 】

組換え M V A（r M V A）ウイルスは改変ワクシニアアンカラウイルスに由来する弱毒
化ウイルスであり、これは、ヒト細胞株において再現性よく複製する能力の喪失を特徴と
する。組換え M V A は、開示された P S M A、S T E A P 1、若しくは P S M A 及び S T
E A P 1 ポリヌクレオチド、導入遺伝子、又はこれらを含むベクターのうちのいずれかを
発現することができる。

【 0 1 0 1 】

10

20

30

40

50

MVAは、Vaccination Institute (Ankara, Turkey)において長年維持され、ヒトのワクチン接種の基礎として使用されてきた皮膚ワクシニア株アンカラ(アンカラ絨毛尿膜ワクシニア(Chorioallantois vaccinia Ankara, CVA)ウイルス)を起源とする。しかしながら、ワクシニアウイルス(vaccinia virus、VACV)に関連する重度のワクチン後合併症が多いことから、より弱毒化された、より安全な天然痘ワクチンを生成するいくつかの試みが行われた。

【0102】

MVAは、CVAウイルスのニワトリ胚線維芽細胞を516回連続継代することによって生成されている(Meyer et al., J. Gen. Virol., 72:1031-1038 (1991)及び米国特許第10,035,832号を参照されたい)。これらの長期継代のために、得られたMVAウイルスは、そのゲノム配列の約31キロベースが欠失しており、したがって、高度に鳥類細胞に限定された宿主細胞として記載されていた(Meyer, H. et al., Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038, 1991; Meisinger-Henschel et al., Genomic sequence of chorioallantois vaccinia virus Ankara, the ancestor of modified vaccinia virus Ankara, J. Gen. Virol. 88:3249-3259, 2007)。MVAゲノムをその親CVAと比較すると、合計31,000塩基対のゲノムDNAの6つの主要な欠失(欠失I、II、III、IV、V、及びVI)が明らかになった。(Meyer et al., J. Gen. Virol. 72:1031-8 (1991))。得られたMVAは著しく弱毒性であることが、様々な動物モデルで示された(Mayr, A. & Danner, K. Vaccination against pox diseases under immunosuppressive conditions, Dev. Biol. Stand. 41:225-34, 1978)。MVAを弱毒化させるために多くの継代が使用されたので、CEF細胞の継代数に応じて、いくつかの異なる株又は単離株が存在する。例示的なMVA株は、MVA-572(1994年1月27日、寄託番号ECACC V94012707の下で英国(「UK」)ソールズベリーSP4 0JGポートダウンの健康保護庁の欧州動物細胞培養保存機関(European Collection of Animal Cell Culture、「ECACC」)に寄託)、MVA-575(2000年12月7日に寄託番号ECACC V00120707の下でECACCに寄託)、MVA-Bavarian Nordic(「MVA-BN」)(2000年8月30日に寄託V00080038の下でECACCに寄託)、VR-1508(米国バージニア州マナッサスの米国型培養コレクション(ATCC)に寄託)、及びMVA 476 MG/14/78などのCEF細胞におけるワクシニアウイルスの571継代目から得られたウイルスシードバッチ460MGに由来するMVA(例えば、国際公開第2014/41176号)である。

【0103】

導入遺伝子は、得られる組換えウイルスのウイルス生存能力に影響を及ぼさないMVAゲノム内の部位又は領域(挿入領域)に挿入することができる。このような領域は、組換えウイルスのウイルス生存能力に深刻な影響を及ぼすことなく組換え体形成を可能にする領域について、ウイルスDNAのセグメントを試験することによって容易に同定することができる。チミジンキナーゼ(thymidine kinase、TK)遺伝子は、使用することができる挿入領域であり、例えば、全ての調べられたボックスウイルスゲノム中など、多くのウイルスに存在する。更に、MVAは、6つの天然欠失部位を含有し、これらは各々、挿入部位として使用され得る(例えば、欠失I、II、III、IV、V、及びVI;例えば、米国特許第5,185,146号及び米国特許第6,440,442号を参照されたい)。更に、MVAの1つ又は2つ以上の遺伝子間領域(intergenic region: IG

R)、例えば、IGR IGR 07 / 08、IGR 44 / 45、IGR 64 / 65、IGR 88 / 89、IGR 136 / 137、及びIGR 148 / 149を挿入部位として使用してもよい(例えば、米国特許出願公開第2018 / 0064803号を参照されたい)。追加の好適な挿入部位は、国際公開第2005 / 048957号に記載されている。

【0104】

組換えMVAは、標準的な分子生物学クローニング技術を用いて技術分野で記載されるように調整される(Piccini, et al., 1987, Methods of Enzymology 153: 545-563、米国特許第4,769,330号、米国特許第4,772,848号、米国特許第4,603,112号、米国特許第5,100,587号、及び米国特許第5,179,993号を参照されたい)。例示的な方法では、ウイルスに挿入されるDNA配列(例えば、導入遺伝子)を、MVAのDNAの一部に対して相同なDNAが挿入されているE. coliプラスミド構築物に入れることができる。別々に、挿入されるDNA配列をプロモーターにライゲーションすることができる。プロモーター遺伝子連結は、非必須遺伝子座を含有するMVA DNA領域に隣接するDNA配列に相同なDNAに両末端が隣接するように、プラスミド構築物内に位置している。得られたプラスミド構築物は、E. coli細菌内で増殖することによって増幅され、単離され得る。挿入されるDNA遺伝子配列を含有する単離プラスミドを、例えばニワトリ胚線維芽細胞(chicken embryo fibroblast、CEF)の細胞培養物にトランスフェクトしてよく、同時に培養物にMVAを感染させる。それぞれプラスミド及びウイルスゲノムにおける相同MVA DNA間の組換えによって、外来DNA配列の存在によって改変されたMVAを生成することができる。rMVA粒子は、溶解工程(例えば、化学溶解、凍結/解凍、浸透性ショック、及び超音波処理など)後に培養上清又は培養細胞から回収することができる。溶菌斑の連続精製ラウンドを使用して、夾雑野生型ウイルスを除去することができる。次いで、当該技術分野において既知の技術(例えば、クロマトグラフィー法、又は塩化セシウム若しくはスクロース勾配における超遠心分離)を使用して、ウイルス粒子を精製することができる。

【0105】

任意選択的に、E. coliプラスミドベクターはまた、ボックスウイルスプロモーターに操作可能に連結されたマーカ及び/又は選択遺伝子を含むカセットを含有し得る。好適なマーカ又は選択遺伝子は、例えば、緑色蛍光タンパク質、 β -ガラクトシダーゼ、ネオマイシン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ、又は他のマーカをコードする遺伝子である。選択又はマーカカセットの使用は、作製された組換えMVAの同定及び単離を簡素化する。あるいは、組換えMVAはPCR技術によって同定することができる。

【0106】

自己複製RNA分子

本開示はまた、PSMA、STEAP1、又はPSMA及びSTEAP1をコードする自己複製RNAを提供する。いくつかの実施形態では、自己複製RNAは、PSMAをコードする。いくつかの実施形態では、自己複製RNAは、STEAP1をコードする。いくつかの実施形態では、自己複製RNAは、PSMA及びSTEAP1をコードする。

【0107】

自己複製RNAは、ウイルスに由来し得る。ウイルスは、VEEV/EEEV群、又はSF群、又はSIN群に属し得る。SF群 ウイルスの非限定的な例としては、セムリキ森林ウイルス、オニオンニオンウイルス、ロスリバーウイルス、ミドルバーグウイルス、チクングニアウイルス、パーマ森林ウイルス、ゲタウイルス、マヤロウイルス、サギヤマウイルス、ベバルウイルス、及びウナウイルスが挙げられる。SIN群 ウイルスの非限定的な例としては、シンドビスウイルス、ガードウッドS.A.ウイルス、南アフリカアルボウイルスNo. 86、オケルボウイルス、アウラウイルス、パバンキウイルス、ワタロアウイルス、及びキジラガウイルスが挙げられる。VEEV/EEEV群 ウイルスの非限定的な例としては、東部ウマ脳炎ウイルス(Eastern equine encephalitis

virus、EEEV)、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (Venezuelan equine encephalitis virus、VEEV)、エバークレーズウイルス (Everglades virus、EVEV)、ムカンボウイルス (Mucambo virus、MUCV)、ピクスナウイルス (Pixuna virus、PIXV)、ミドルバーグウイルス (Middleburg virus、MIDV)、チクングニアウイルス (Chikungunya virus、CHIKV)、オニョンニョンウイルス (O'Nyong-Nyong virus、ONNV)、ロスリバーウイルス (Ross River virus、RRV)、バーマ森林ウイルス (Barmah Forest virus、BF)、ゲタウイルス (Getah virus、GET)、サギヤマウイルス (Sagiyama virus、SAGV)、ベバルウイルス (Bebaru virus、BE BV)、マヤロウイルス (Mayaro virus、MAYV)、及びウナウイルス (Una virus、UNAV) が挙げられる。

10

【0108】

自己複製RNA分子は、ウイルスゲノムに由来し得、これは、それらがウイルスゲノムの構造的特徴のいくつかを有するか、又はそれらと同様であることを意味する。自己複製RNA分子は、改変ウイルスゲノムに由来し得る。

【0109】

自己複製RNA分子は、東部ウマ脳炎ウイルス (EEEV)、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV)、エバークレーズウイルス (EVEV)、ムカンボウイルス (MUCV)、セムリキ森林ウイルス (SFV)、ピクスナウイルス (PIXV)、ミドルバーグウイルス (MIDV)、チクングニアウイルス (CHIKV)、オニョンニョンウイルス (ONNV)、ロスリバーウイルス (RRV)、バーマ森林ウイルス (BF)、ゲタウイルス (GET)、サギヤマウイルス (SAGV)、ベバルウイルス (BE BV)、マヤロウイルス (MAYV)、ウナウイルス (UNAV)、シンドビスウイルス (Sindbis virus、SINV)、アウラウイルス (Aura virus、AURAV)、ワタロアウイルス (Whataroa virus、WHAV)、パバンキウイルス (Babanki virus、BABV)、キジラガウイルス (Kyzylagach virus、KYZV)、西部ウマ脳炎ウイルス (Western equine encephalitis virus、WEEV)、ハイランドJウイルス (Highland J virus、HJV)、フォートモーガンウイルス (Fort Morgan virus、FMV)、ヌドウムウイルス (Ndumu、NDUV)、及びバギークリークウイルスに由来し得る。病原性及び非病原性ウイルス株は、両方とも好適である。いくつかの実施形態では、ウイルスRNAレプリコンは、シンドビスウイルス (SIN)、セムリキ森林ウイルス (SFV)、ロスリバーウイルス (RRV)、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV)、又は東部ウマ脳炎ウイルス (EEEV) のものである。

20

30

【0110】

いくつかの実施形態では、ウイルス由来の自己複製RNA分子は、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) である。

【0111】

自己複製RNA分子は、野生型新世界型又は旧世界型ウイルスゲノム (又は、それによってコードされるアミノ酸配列) からのRNA配列を含有することができる。本明細書に開示される自己複製RNA分子のいずれかは、野生型ウイルスゲノム配列に「由来する」又は「基づく」RNA配列を含むことができ、これは、それが、新世界型又は旧世界型ウイルスゲノムであり得る、野生型RNAウイルスゲノム由来のRNA配列 (対応するRNA配列であり得る) と、少なくとも60%、若しくは少なくとも65%、若しくは少なくとも68%、若しくは少なくとも70%、若しくは少なくとも80%、若しくは少なくとも85%、若しくは少なくとも90%、若しくは少なくとも95%、若しくは少なくとも97%、若しくは少なくとも98%、若しくは少なくとも99%、若しくは100%、又は80~99%、若しくは90~100%、若しくは95~99%、若しくは95~100%、若しくは97~99%、若しくは98~99% 同一の配列を有することを意味する。

40

【0112】

自己複製RNA分子は、許容細胞内でそれら自身の増幅又は自己複製を指示するために

50

必要な全ての遺伝情報を含む。それら自身の複製を指示するために、自己複製RNA分子は、ポリメラーゼ、レプリカーゼ、又はRNA増幅プロセスを触媒するためにウイルス若しくは宿主細胞に由来するタンパク質、核酸、若しくはリボ核タンパク質と相互作用し得る他のタンパク質をコードし、レプリコンをコードするRNAの複製及び転写に必要なシス作用性RNA配列を含む。したがって、RNA複製は、複数の娘RNAの生成につながる。これらの娘RNA、及び同一線上のサブゲノム転写物は、目的の遺伝子の*in situ*発現を提供するように翻訳され得るか、又は目的の遺伝子の*in situ*発現を提供するように翻訳される、送達されたRNAと同じセンスの転写物を更に提供するように転写され得る。この転写の配列の全体的な結果として、導入されたレプリコンRNAの数が大きく増幅されるため、目的のコード化遺伝子は、細胞の主要なポリペプチド産物になる。 10

【0113】

ウイルス、非構造(non-structural、*ns*)及び構造遺伝子のゲノムには、2つのオープンリーディングフレーム(open reading frame、ORF)がある。*nsORF*は、ウイルスRNAの転写及び複製に必要なタンパク質(*nsP1 - nsP4*)をコードし、ポリタンパク質として生成され、ウイルス複製機構である。構造ORFは、コアヌクレオカプシドタンパク質C、並びにヘテロ二量体として会合するエンベロープタンパク質P62及びE1の3つの構造タンパク質をコードする。ウイルス膜アンカー表面糖タンパク質は、受容体認識を担い、膜融合によって標的細胞内に入る。4つの*ns*タンパク質遺伝子は、ゲノムの5'2/3の遺伝子によってコードされ、3つの構造タンパク質は、ゲノムの3'1/3で同一線上のサブゲノムmRNAから翻訳される。ウイルスゲノムの例示的な描写を図20に示す。 20

【0114】

自己複製RNA分子は、構造遺伝子をコードしているウイルス配列を置換することにより、又は構造遺伝子をコードする配列の5'若しくは3'に外来配列を挿入することによって、宿主細胞への外来配列の導入への基礎として使用することができる。それらは、サブゲノムプロモーターの制御下にあるレプリカーゼの下流にあるウイルス構造遺伝子を目的の遺伝子(GOI)によって置き換えるように操作され得る。トランスフェクションにより、直ちに翻訳されたレプリカーゼは、ゲノムRNAの5'及び3'末端と相互作用し、相補的ゲノムRNAコピーを合成する。これらは、新規のプラス鎖キャップ化かつポリアデニル化ゲノムコピー、及びサブゲノム転写物の合成のためのテンプレートとして機能する(図20)。増幅は最終的に、細胞当たり最大 2×10^5 個のコピーの非常に多いRNAコピー数をもたらす。その結果、ワクチンの有効性又は治療の治療的影響に影響を及ぼし得る、GOIの均一なかつ/又は増強された発現が生じる。したがって、自己複製RNA分子に基づくワクチンは、従来のウイルスベクターと比較して、生成されたRNAの非常に多いコピーに起因して、非常に低いレベルで投与され得る。本明細書に開示される組成物及び方法の重要な価値のうちの1つは、免疫活性化の慢性又は急性状態である個体において、ワクチン効果を高めることができることである。 30

【0115】

PSMA、STEAP1、又はPSMA及びSTEAP1ポリペプチドをコードするRNAを含む自己複製RNA分子は、本明細書に記載のウイルスベクター又は他の送達技術を含む、様々な技術を用いて対象にそれらを送達することによって、治療として利用され得る。 40

【0116】

自己複製RNA分子は、許容細胞内でそれら自身の増幅又は自己複製を指示するために必要な全ての遺伝情報を含むし得る。

【0117】

本開示はまた、構造遺伝子をコードするウイルス配列を置き換えることによって、宿主細胞に外来配列(例えば、PSMA、STEAP1、又はPSMA及びSTEAP1ポリペプチド)を導入することの基礎として使用することができる、自己複製RNA分子を提 50

供する。

【0118】

本明細書では、本開示のポリヌクレオチドのうちのいずれかに由来するRNA配列を含む自己複製RNA分子が提供される。

【0119】

自己複製RNAはPSMAをコードすることができる。いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、配列番号16の、又は配列番号16と少なくとも90%の配列同一性、若しくは少なくとも95%の配列同一性、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する、ポリヌクレオチドに由来するRNA配列を含む。いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、配列番号14の、又は配列番号14と少なくとも90%の配列同一性、若しくは少なくとも95%の配列同一性、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する、ポリヌクレオチドに由来するRNA配列を含む。

10

【0120】

自己複製RNAはSTEAP1をコードすることができる。いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、配列番号19の、又は配列番号19と少なくとも90%の配列同一性、若しくは少なくとも95%の配列同一性、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する、ポリヌクレオチドに由来するRNA配列を含む。いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、配列番号17の、又は配列番号17と少なくとも90%の配列同一性、若しくは少なくとも95%の配列同一性、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する、ポリヌクレオチドに由来するRNA配列を含む。

20

【0121】

自己複製RNAはPSMA及びSTEAP1をコードすることができる。いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、配列番号11の、又は配列番号11と少なくとも90%の配列同一性、若しくは少なくとも95%の配列同一性、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する、アミノ酸配列をコードするRNA配列を含む。

【0122】

上記の自己複製RNA分子のうちのいずれかは、

- ・1つ又は2つ以上の非構造遺伝子、nsP1、nsP2、nsP3、及びnsP4、
- ・DLPモチーフ、5'UTR、3'UTR、及びポリAのうちの少なくとも1つ、並び

に

- ・サブゲノムプロモーター、

のうちの1つ又は2つ以上を更に含み得る。

30

【0123】

いくつかの実施形態では、例えば、自己複製RNA分子は、

- ・1つ又は2つ以上の非構造遺伝子、nsP1、nsP2、nsP3、及びnsP4、
- ・DLPモチーフ、5'UTR、3'UTR、及びポリAのうちの少なくとも1つ、並び

に

- ・サブゲノムプロモーター、並びに

・配列番号8又は配列番号10のアミノ酸をコードし、サブゲノムプロモーターに操作可能に連結された、RNA、

40

のうちの1つ又は2つ以上を更に含み得る。

【0124】

いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、タンパク質又はペプチドをコードするRNA配列、5'及び3' ウイルス非翻訳領域、新世界型 ウイルスVEEV非構造タンパク質nsP1、nsP2、nsP3、及びnsP4に由来するアミノ酸配列をコードするRNA配列、タンパク質をコードするRNA配列に操作可能に連結され、その翻訳を調節するサブゲノムプロモーター、5'キャップ及び3'ポリA尾部、プラス鎖一本鎖RNA、非構造タンパク質1 (non-structural protein 1、nsP1)の上流のシンドビスウイルスからのDLP、2Aリボソームスキッピングエレメント、並びに5'-UTRの下流及びDLPの上流でのnsp1ヌクレオチド反復を含む。

50

【0125】

いくつかの実施形態で、自己複製RNA分子は、少なくとも1 kb、若しくは少なくとも2 kb、若しくは少なくとも3 kb、若しくは少なくとも4 kb、若しくは少なくとも5 kb、若しくは少なくとも6 kb、若しくは少なくとも7 kb、若しくは少なくとも8 kb、若しくは少なくとも10 kb、若しくは少なくとも12 kb、若しくは少なくとも15 kb、若しくは少なくとも17 kb、若しくは少なくとも19 kb、若しくは少なくとも20 kbのサイズであり得るか、又は100 bp ~ 8 kb、若しくは500 bp ~ 8 kb、若しくは500 bp ~ 7 kb、若しくは1 ~ 7 kb、若しくは1 ~ 8 kb、若しくは2 ~ 15 kb、若しくは2 ~ 20 kb、若しくは5 ~ 15 kb、若しくは5 ~ 20 kb、若しくは7 ~ 15 kb、若しくは7 ~ 18 kb、若しくは7 ~ 20 kbのサイズであり得る。

【0126】

上で開示した自己複製RNA分子のうちのいずれかは、自己プロテアーゼペプチド（例えば、自己触媒的自己切断ペプチド）のコード配列を更に含むことができ、自己プロテアーゼのコード配列は、任意選択的にGOIをコードする核酸配列の上流に操作可能に連結される。

【0127】

一般に、当該技術分野で既知の任意のタンパク質分解切断部位は、本開示の核酸分子内に組み込まれることができ、例えば、プロテアーゼによる生産後に切断される、タンパク質分解切断配列であり得る。更に好適なタンパク質分解切断部位には、外部プロテアーゼの添加後に切断され得る、タンパク質分解切断配列も含まれる。本明細書で使用する場合、「自己プロテアーゼ」という用語は、自己タンパク質分解活性を有し、それ自身をより大きなポリペプチド部分から切断することができる「自己切断」ペプチドを指す。口蹄疫ウイルス（foot-and-mouth disease virus、FMDV）で初めて同定され、ピコルナウイルス群のメンバーであるウマ鼻炎Aウイルス（E2A）、ブタテッシュウウイルス（porcine teschovirus）- 1（P2A）、Thosea signaウイルス（T2A）からの「2A様」ペプチドのようないくつかの自己プロテアーゼがその後同定され、タンパク質分解切断でのそれらの活性は、様々なエクスピトロ及びインピボ真核生物系にて示されている。したがって、多くの天然に存在する自己プロテアーゼ系が同定されているので、自己プロテアーゼの概念は、当業者に利用可能である。十分に研究された自己プロテアーゼ系は、例えば、ウイルスプロテアーゼ、発生タンパク質（例えば、HetR、ヘッジホッグタンパク質）、RumA自己プロテアーゼドメイン、UmuDなど）である。本開示の組成物及び方法に好適な自己プロテアーゼペプチドの非限定的な例としては、ブタテッシュウウイルス- 1 2A（P2A）、口蹄疫ウイルス（FMDV）2A（F2A）、ウマ鼻炎Aウイルス（Equine Rhinitis A Virus、ERAV）2A（E2A）、Thosea signaウイルス2A（T2A）、細胞質多角体病ウイルス2A（BmCPV2A）、軟化病ウイルス2A（BmIFV2A）、又はこれらの組み合わせからのペプチド配列が挙げられる。

【0128】

いくつかの実施形態では、自己プロテアーゼペプチドのコード配列は、DLPモチーフの下流、並びにGOIの上流に操作可能に連結される。

【0129】

いくつかの実施形態では、自己プロテアーゼペプチドは、ブタテッシュウウイルス- 1 2A（P2A）、口蹄疫ウイルス（FMDV）2A（F2A）、ウマ鼻炎Aウイルス（ERAV）2A（E2A）、Thosea signaウイルス2A（T2A）、細胞質多角体病ウイルス2A（BmCPV2A）、軟化病ウイルス2A（BmIFV2A）、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、ペプチド配列を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、自己プロテアーゼペプチドは、ブタテッシュウウイルス- 1 2A（P2A）のペプチド配列を含む。

【0130】

いくつかの実施形態では、自己プロテアーゼペプチドは、ブタテッシュウウイルス - 1 2 A (P 2 A)、口蹄疫ウイルス (F M D V) 2 A (F 2 A)、ウマ鼻炎 A ウイルス (E R A V) 2 A (E 2 A)、Those a s i g n a ウイルス 2 A (T 2 A)、細胞質多角体病ウイルス 2 A (B m C P V 2 A)、軟化病ウイルス 2 A (B m I F V 2 A)、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。

【 0 1 3 1 】

いくつかの実施形態では、自己プロテアーゼペプチドは、ブタテッシュウウイルス - 1 2 A (P 2 A) である。

【 0 1 3 2 】

10 変更ウイルス RNA レプリコンへの P 2 A ペプチドの組み込みは、カプシド - G O I 融合物からの G O I によってコードされるタンパク質の放出を可能にする。

【 0 1 3 3 】

ブタテッシュウウイルス - 1 2 A (P 2 A) ペプチド配列は、D L P 配列の直後にインフレームで操作され、全ての G O I のすぐ上流にインフレームで操作され得る。

【 0 1 3 4 】

上に開示される自己複製 RNA 分子のうちのいずれかは、コード配列下流ループ (d o w n s t r e a m L o o p 、 D L P) モチーフを更に含み得る。

【 0 1 3 5 】

20 いくつかのウイルスは、カプシド遺伝子発現を調節する、例えば増加させる、1つ又は2つ以上のステムループ構造を形成することができる、配列を有する。本明細書で使用されるウイルスカプシド増強剤は、そのようなステムループ構造を形成することができる配列を含む、調節エレメントを指す。いくつかの例では、ステムループ構造は、カプシドタンパク質のコード配列内の配列によって形成され、下流ループ (D L P) 配列と呼ばれる。本明細書に開示されるように、これらのステムループ構造又はそのバリエーションは、例えば、目的の遺伝子の発現レベルを調節する、例えば増加させる、ために使用することができる。例えば、これらのステムループ構造又はバリエーションは、その下流に操作可能に連結されたコード配列の転写及び/又は翻訳を増強するために、組換えベクター (例えば、異種ウイルスゲノム中) で使用することができる。

【 0 1 3 6 】

30 宿主細胞での ウイルス複製は、二本鎖 RNA 依存性タンパク質キナーゼ (P K R) を誘導することが知られている。P K R は、真核生物翻訳開始因子 2 (e u k a r y o t i c t r a n s l a t i o n i n i t i a t i o n f a c t o r 2 、 e I F 2) をリン酸化する。e I F 2 のリン酸化は、m R N A の翻訳開始を阻害し、そうすることで、ウイルスが生産的複製サイクルを完了できないようにする。シンドビスウイルスによる細胞の感染は、e I F 2 のリン酸化をもたらす P K R を誘導するが、ウイルスサブゲノム m R N A は効率的に翻訳され、他の全ての細胞 m R N A の翻訳は制限される。シンドビスウイルスにおけるウイルスサブゲノム m R N A の効率的な翻訳は、ウイルスカプシドタンパク質の野生型 A U G 開始コドン (例えば、カプシドエンハンサー) の下流にある安定な RNA ヘアピンループ (又は D L P モチーフ) の存在によって可能となる。D L P 構造は、野生型 A U G 上でリボソームを停止させることができ、これは、機能的 e I F 2 を必要とせずに、サブゲノム m R N A の翻訳をサポートすることが報告されている。したがって、シンドビスウイルス (S I N V) 及び他の ウイルスのサブゲノム m R N A は、e I F 2 の完全なリン酸化をもたらす、高活性 P K R を有する細胞でも効率的に翻訳される。

【 0 1 3 7 】

40 D L P 構造は、最初にシンドビスウイルス (S I N V) 2 6 S m R N A で特徴付けられ、セムリキ森林ウイルス (S F V) でも検出された。同様の D L P 構造は、新世界 (例えば、M A Y V 、 U N A V 、 E E E V (N A) 、 E E E V (S A) 、 A U R A V) 及び旧世界 (S V 、 S F V 、 B E B V 、 R R V 、 S A G 、 G E T V 、 M I D V 、 C H I K V 及び O N N V) メンバーを含む、 ウイルス属の少なくとも 1 4 個の他のメンバーに存在することが報告されている。これらの ウイルス 2 6 S m R N A の予測構造は、S H A P E (50

選択的 2'-ヒドロキシルアシル化及びプライマー伸長)データに基づいて構築された (Toribio et al., *Nucleic Acids Res.* May 19; 44(9): 4368-80, (2016); その内容を参照により本明細書に組み込む)。安定的ステムループ構造は、CHIKV及びONNVを除く、全ての場合で検出されたが、MAYV及びEEEVは、より低い安定性のDLPを示した(上述のToribio et al., 2016)。最高のDLP活性は、最も安定したDLP構造を含有するウイルスについて報告された。

【0138】

一例として、ウイルス属のメンバーは、ウイルス26S転写物内に存在する下流ループ(DLP)による抗ウイルスRNA活性化タンパク質キナーゼ(PKR)の活性化に抵抗し得、これにより、これらのmRNAのeIF2非依存性翻訳開始が可能になる。下流ループ(DLP)は、SINV26SmRNA及びウイルス属の他のメンバーにて、AUGの下流に位置する。

10

【0139】

いくつかの実施形態では、開示されたポリヌクレオチドは、DLPモチーフに操作可能に連結されたGOIのコード配列、及び/又はDLPモチーフのコード配列を含み得る。

【0140】

いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、下流ループ(DLP)を含む。いくつかの実施形態では、下流ループ(DLP)は、少なくとも1つのRNA-ステムループを含む。

20

【0141】

場合によっては、DLP活性は、DLPモチーフと開始コドンAUG(AUGi)との間の距離に依存する。ウイルス26SmRNAのAUG-DLP間隔は、DLPによって停止した40SサブユニットのP部位にAUGiを配置し、eIF2の関与なしにMet-tRNAの組み込みを可能にする方法で、リボソーム18SrRNAのES6S領域のトポロジーに調整される。シンドビスウイルスの場合、DLPモチーフは、シンドビスサブゲノムRNAの最初のおよそ150ntに見られる。ヘアピンは、シンドビスカプシドAUG開始コドンの下流に位置し(シンドビスサブゲノムRNAのnt50にあるAUG)、その結果、正しいカプシド遺伝子AUGを使用して翻訳を開始するように、リボソームを停止させる。配列比較及び構造RNA分析の以前の研究は、SINVでのDLPの進化的保存を明らかにし、ウイルス属の多くのメンバーでの同等のDLP構造の存在を予測した(例えば、Ventoso, *J. Virol.* 9484-9494, Vol. 86, September 2012を参照されたい)。

30

【0142】

いかなる特定の理論にも束縛されるものではないが、任意のGOIのコード配列の上流にDLPモチーフを配置すると、通常、ヘアピン領域でコードされるN末端キャプシドアミノ酸とGOIコード化タンパク質との融合タンパク質が生成されると考えられており、なぜなら、開始は、GOI AUGではなく、カプシドAUGで起こるからである。

【0143】

いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、非構造タンパク質1(nsP1)の上流に配置された、下流ループを含む。いくつかの実施形態では、下流ループは、非構造タンパク質1(nsP1)の上流に配置され、ブタテッシュウウイルス-1 2A(P2A)リボソームスキッピングエレメントによってnsP1に結合される。

40

【0144】

DLP含有自己複製RNAは、対象における自然免疫系に対する耐性を付与するのに有用であり得る。非改変RNAレプリコンは、それらが導入される、細胞の初期自然免疫系状態に感受性である。細胞/個体が高度に活性化自然免疫系状態にある場合、RNAレプリコンの性能(例えば、GOIの複製及び発現)が悪影響を受ける可能性がある。DLPを操作して、特に非構造タンパク質のタンパク質翻訳の開始を制御することによって、自然免疫系の既存の活性化状態が、効率的なRNAレプリコン複製に及ぼす影響を除去又は

50

軽減させる。その結果、ワクチンの有効性又は治療の治療的影響に影響を及ぼし得る、G O I のより均一なかつ / 又は増強された発現が生じる。

【 0 1 4 5 】

自己複製RNAのDLPモチーフは、細胞mRNA翻訳が阻害される細胞環境において、効率的なmRNA翻訳を付与することができる。DLPがレプリコンベクターの非構造タンパク質遺伝子の翻訳と連結している場合、レプリカーゼ及び転写酵素タンパク質は、PKR活性化細胞環境で機能的複製を開始することができる。DLPがサブゲノムmRNAの翻訳と連結している場合、自然免疫活性化により細胞内mRNAが制限されても、強固なGOI発現が可能である。したがって、非構造タンパク質遺伝子及びサブゲノムmRNAの両方の翻訳を駆動するのを助けるためにDLP構造を含有する、自己複製RNAを操作することは、自然免疫活性化を克服する強力な方法を提供する。

10

【 0 1 4 6 】

DLPモチーフを含む自己複製RNA分子の例は、米国特許出願公開第2018/0171340号及び国際公開第2018/106615号に記載されており、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 1 4 7 】

上に開示した自己複製RNA分子のうちのいずれかは、非構造遺伝子nsP1、nsP2、nsP3、及び / 又はnsP4を更に含み得る。いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、機能的ウイルス構造タンパク質をコードしない。

【 0 1 4 8 】

ウイルスゲノムは、非構造タンパク質nsP1、nsP2、nsP3及びnsP4をコードし、これは、P1234（又はnsP1-4若しくはnsP1234）と呼ばれることもある、単一のポリタンパク質前駆体として生成され、タンパク質分解処理によって成熟タンパク質に開裂される（図20）。nsP1は約60kDaの大きさで、メチルトランスフェラーゼ活性を持ち得、ウイルスのキャッピング反応に関与し得る。nsP2は約90kDaの大きさで、ヘリカーゼ及びプロテアーゼ活性を有し得、nsP3は約60kDaで、マクロドメイン、中心（又はウイルス固有）ドメイン、及び超可変ドメイン（hypervariable domain、HVD）の3つのドメインを含有する。nsP4は約70kDaの大きさで、コアRNA依存性RNAポリメラーゼ（RNA-dependent RNA polymerase、RdRp）触媒ドメインを含有する。感染後、ウイルスゲノムRNAを翻訳して、P1234ポリタンパク質を得る。これは、個々のタンパク質に切断される。

20

30

【 0 1 4 9 】

ウイルスゲノムはまた、コアヌクレオカプシドタンパク質C、並びにヘテロ二量体として会合するエンベロープタンパク質P62及びE1の3つの構造タンパク質をコードする。構造タンパク質は、サブゲノムプロモーターの制御下にあり、GIOによって置き換えることができる。

【 0 1 5 0 】

いくつかの実施形態では、自己複製RNAは、構造ウイルスタンパク質（例えば、ヌクレオカプシドタンパク質C、エンベロープタンパク質P62、6K、及びE1）のうち少なくとも1つ（又は、全て）の配列を欠く（又は、含有しない）ことができる。これらの実施形態では、1つ又は2つ以上の構造遺伝子をコードする配列は、例えば、少なくとも1つのタンパク質又はペプチド（例えば、開示されたPSMA、STEAP1、又はPSMA及びSTEAP1ポリペプチドのうちのいずれか）のコード配列、又は他の目的のポリペプチドなどの1つ又は2つ以上の配列で置換され得る。

40

【 0 1 5 1 】

いくつかの実施形態では、自己複製RNAは、ウイルス構造タンパク質をコードする、配列を欠くか、又はウイルス（又は、任意選択的に任意の他の）構造タンパク質をコードしない。いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、1つ又は2つ以上のウイルス構造タンパク質の一部又は全コード領域を更に欠く。例えば、ウイルス発現系は、ウイルスカプシドタンパク質C、E1糖タンパク質、E2糖タンパク質、E3タンパク質

50

、及び6Kタンパク質のうちの1つ又は2つ以上のコード配列の一部、又は全体を欠いていてもよい。

【0152】

いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、構造ウイルスタンパク質のうちの少なくとも1つのコード配列を含有しない。これらの例では、構造遺伝子をコードする配列は、例えば、開示されたPSMA、STEAP1、又はPSMA及びSTEAP1ポリヌクレオチドのうちのいずれかのコード配列など、1つ又は2つ以上の配列で置換され得る。

【0153】

本開示はまた、非構造遺伝子nsP1、nsP2、nsP3、及びnsP4を含む自己複製RNA分子を提供し、自己複製RNA分子は、機能的ウイルス構造タンパク質をコードしない。

10

【0154】

自己複製RNA分子は、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、又は少なくとも4つの非構造ウイルスタンパク質（例えば、nsP1、nsP2、nsP3、nsP4）のコード配列を含み得る。レプリコンによってコードされるnsP1、nsP2、nsP3及びnsP4タンパク質は、機能的又は生物学的活性タンパク質である。いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、少なくとも1つの非構造ウイルスタンパク質の一部のコード配列を含む。例えば、自己複製RNA分子は、少なくとも1つの非構造ウイルスタンパク質のコード配列の約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、又はこれらの値のうちのいずれか2つの間の範囲を含み得る。いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、少なくとも1つの非構造ウイルスタンパク質の実質的な部分のコード配列を含むことができる。本明細書で使用する場合、非構造ウイルスタンパク質をコードする核酸配列の「実質的な部分」とは、当業者による配列の手動評価、又はBLASTなどのアルゴリズムを用いたコンピュータによる自動配列比較及び同定のいずれかによって、そのタンパク質の推定上の識別を可能にするのに十分な非構造ウイルスタンパク質をコードする核酸配列を含む（例えば、"Basic Local Alignment Search Tool"; Altschul S F et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1993を参照されたい）。

20

30

【0155】

いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、少なくとも1つの非構造タンパク質のコード配列全体を含み得る。いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、天然のウイルス非構造タンパク質の実質的に全てのコード配列を含む。特定の実施形態では、1つ又は2つ以上の非構造ウイルスタンパク質は、同じウイルスに由来する。

【0156】

いくつかの実施形態では、非構造タンパク質1（nsP1）の上流に配置された自己複製RNA分子の下流ループDLPは、シンドビスウイルスに由来する。

【0157】

いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEEV）由来のnsP1、nsP2、nsP3及びnsP4配列、並びにシンドビスウイルス（SIN）由来のDLPモチーフを含む。

40

【0158】

自己複製RNA分子はまた、ウイルスnsP3マクロドメインに由来するアミノ酸配列をコードするRNAサブ配列、及びウイルスnsP3中央ドメインに由来するアミノ酸配列をコードするRNAサブ配列を有し得る。自己複製RNA分子はまた、旧世界型アルファウイルスnsP3超可変ドメインから完全に由来するアミノ酸配列をコードするRNAサブ配列を有することができ、又は、新世界型ウイルスnsP3超可変ドメインに由来する部分と、旧世界型ウイルスnsP3超可変ドメインに由来する部分と、を有するアミノ酸配列を有することができ、すなわち、超可変ドメイン（HVD）は、ハイブリ

50

ッド又はキメラ新世界型/旧世界型配列であり得る。

【0159】

いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、野生型新世界型 ウイルスnsP1、nsP2、nsP3、及びnsP4タンパク質配列に由来するアミノ酸配列をコードする、RNA配列を有することができる。他の実施形態では、1つ又は2つ以上の非構造タンパク質は、異なるウイルスに由来する。

【0160】

いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、野生型 ウイルスnsP3に由来するnsP3マクロドメインと、野生型 ウイルスnsP3に由来するnsP3中央ドメインと、をコードするRNA配列を有し得る。様々な実施形態では、マクロドメイン及び中央ドメインは、両方とも新世界型野生型 ウイルスnsP3に由来し得るか、又は両方とも旧世界型野生型 ウイルスnsP3タンパク質に由来し得る。他の実施形態では、マクロドメインは、新世界型野生型 ウイルスマクロドメインに由来し得、中央ドメインは、旧世界型野生型 ウイルス中央ドメインに由来し得るか、又はその逆であり得る。様々なドメインは、本明細書に記載の任意の配列のものであり得る。

10

【0161】

いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、非VEEV非構造タンパク質nsP1、nsP2、nsP3、及びnsP4を含有する。

【0162】

蓄積された実験的証拠により、VEEV及び他の ウイルスゲノムの複製/増幅が示され、それらの欠陥干渉(defective interfering、DI)RNAは、3つのプロモーターエレメント、(i)保存3'末端配列エレメント(conserved 3'-terminal sequence element、3' CSE)及びそれに続くポリ(A)尾部と、(ii)マイナス鎖及びプラス鎖両方のRNA合成のための重要なプロモーターエレメントとして機能する5'UTRと、(iii)nsP1コード配列に存在し、 ウイルスゲノム複製のエンハンサーとして機能する、51-nt保存配列エレメント(51-nt CSE)とによって決定される(Kim et al., PNAS, 2014, 111: 10708-10713、及びその中の参考文献)。

20

【0163】

上に開示した自己複製RNA分子のうちのいずれかは、非改変5'非翻訳領域(5' untranslated region、5' UTR)を更に含み得る。

【0164】

これまでの研究で、VEEV及びシンドビスウイルス感染時には、ウイルスの非構造タンパク質(nonstructural protein、nsP)のごく一部だけがdsRNA複製中間体に共在化することが明らかにされている。したがって、nsPの大部分はRNA複製に関与していない(Gorchakov R, et al. (2008) A new role for ns polyprotein cleavage in Sindbis virus replication. J Virol 82(13): 6218-6231)。これは、通常、サブゲノムプロモーターから転写され、更に増幅されない、目的のタンパク質をコードするサブゲノムRNAの増幅に十分に使用されていないnsタンパク質を利用する機会を提供する。

40

【0165】

いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子のnsP1の断片は、5'-UTRの下流及びDLPの上流に複製される。いくつかの実施形態では、nsP1の最初の193個のヌクレオチドは、5'UTRの下流及びDLPの上流に複製される。

【0166】

いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、改変5'非翻訳領域(5'-UTR)を含む。例えば、改変5'-UTRは、1位、2位、4位、又はそれらの組み合わせで1つ又は2つ以上のヌクレオチド置換を含み得る。好ましくは、改変5'-UTRは、2位にヌクレオチド置換を含み、より好ましくは、改変5'-UTRは、2位にU->G置換

50

を有する。そのような自己複製RNA分子の例は、米国特許出願公開第2018/0104359号及び国際公開第2018/075235号に記載されており、その内容の各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0167】

いくつかの実施形態では、UTRは、野生型新世界型又は旧世界型 ウイルスUTR配列、又はそれらのうちのいずれかに由来する配列であり得る。5'UTRは、約60nt、又は50~70nt、又は40~80ntなどの任意の好適な長さであり得る。いくつかの実施形態では、5'UTRはまた、保存された一次又は二次構造（例えば、1つ又は2つ以上のステムループ）を有し得、 ウイルス又はレプリコンRNAの複製に関与し得る。3'UTRは、最大数百個のヌクレオチドであり得、例えば、50~900、又は1000~900、又は50~800、又は100~700、又は200~700ntであり得る。3'UTRはまた、二次構造、例えばステップループを有することができ、その後

10

【0168】

5'及び3'非翻訳領域は、レプリコンによってコードされる他の配列のうちのいずれかに操作可能に連結され得る。UTRは、他のコード化配列の認識及び転写に必要な配列及び間隔を提供することによって、タンパク質若しくはペプチドをコードする、プロモーター及び/又は配列に操作可能に連結され得る。

【0169】

GOI（例えば、PSMA、STEAP1、又はPSMA及びSTEAP1ポリヌクレオチド）は、サブゲノムプロモーターの制御下において発現され得る。特定の実施形態では、天然サブゲノムプロモーターの代わりに、サブゲノムRNAは、脳性心筋炎ウイルス（encephalomyocarditis virus、EMCV）、ウシウイルス性下痢症ウイルス（Bovine Viral Diarrhea Virus、BVDV）、ポリオウイルス、口蹄疫ウイルス（Foot-and-mouth disease virus、FMD）、エンテロウイルス71、又はC型肝炎ウイルスに由来する配列内リボソーム進入部位（internal ribosome entry site、IRES）の制御下に置かれ得る。サブゲノムプロモーターは、24ヌクレオチド（シンドビスウイルス）から100ヌクレオチド超（ビート壊疽性葉脈黄化ウイルス）の範囲であり、通常、転写開始の上流に見られる。

20

【0170】

自己複製RNA分子は、3'ポリA尾部を有することができ、自己複製RNA分子はまた、その3'末端にポリAポリメラーゼ認識配列（例えば、AAUAAA）を含むことができる。

30

【0171】

自己複製RNA分子が組換え ウイルス粒子内にパッケージングされる場合、それは、粒子形成につながる ウイルス構造タンパク質との相互作用を開始する役割を果たす、いわゆるパッケージングシグナルと呼ばれる、1つ又は2つ以上の配列を含有し得る。いくつかの実施形態では、 ウイルス粒子は、1つ又は2つ以上の ウイルスに由来するRNA、及び当該構造タンパク質のうちの少なくとも1つが2つ又は3つ以上の ウイルスに由来する、構造タンパク質を含む。

40

【0172】

いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、構造ウイルスタンパク質（例えば、ヌクレオカプシドタンパク質C、及びエンベロープタンパク質P62、6K、及びE1）が除去され、本開示のPSMA、STEAP1、又はPSMA及びSTEAP1ポリペプチドのコード配列によって置き換えられる、VEEVを含む。

【0173】

調節エレメント

開示されたポリペプチド、導入遺伝子、及びベクターは、ポリペプチドに操作可能に連結された1つ又は2つ以上の調節エレメントを含有し得る。調節エレメントは、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、及びリプレッサーなどを含み得る。

50

【 0 1 7 4 】

ベクター中の一般的に使用されるエンハンサー及びプロモーター配列のいくつかは、例えば、hCMV、CAG、SV40、mCMV、EF-1、及びhPGKプロモーターである。hCMVプロモーターは、hCMV1 IE1エンハンサー、プロモーター、及びエクソン1若しくはエクソン1の部分を含み得る。hCMVプロモーターの例示的な配列は、配列番号24として提供される。その高い効力及び約0.8kBの中程度の大きさに起因して、hCMVプロモーターは一般的に使用されている。hPGKプロモーターは、小さなサイズ(約0.4kB)を特徴とするが、hCMVプロモーターよりも効力が低い。他方、サイトメガロウイルス初期エンハンサーエレメント、プロモーター、ニワトリベータ-アクチン遺伝子の第1エクソン及びイントロン、並びにウサギベータグロビン遺伝子のスプライス受容体からなるCAGプロモーターは、hCMVプロモーターに匹敵する非常に強力な遺伝子発現を指示することができるが、サイズが大きいことから、例えば、アデノウイルス(AdV)、アデノ随伴ウイルス(AAV)、又はレンチウイルス(LV)において、空間的制約が重大な懸念となり得るウイルスにはあまり適していない。

10

【 0 1 7 5 】

配列番号24

```

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

```

20

30

【 0 1 7 6 】

使用することができる追加のプロモーターは、国際公開第2018146205(A1)号に記載されているヨザル(Aotine)ヘルペスウイルス1主要最初期プロモーター(AoHV-1プロモーター)である。

40

【 0 1 7 7 】

使用され得る他のプロモーターは、1つ又は2つ以上のボックスウイルスプロモーターである。例示的なボックスウイルスプロモーターは、ワクシニアp7.5プロモーター、ハイブリッド初期/後期プロモーター、又はPrSプロモーター、PrS5Eプロモーター、合成若しくは天然の初期若しくは後期プロモーター、又は牛痘ウイルスATIプロモーターである。ボックスウイルスプロモーターを使用して、組換えMVAの導入遺伝子発現を駆動し得る。

【 0 1 7 8 】

プロモーターは、リプレッサータンパク質の存在下でプロモーターの発現を抑制するた

50

めに、リプレッサータンパク質が結合することができるリプレッサーオペレーター配列に操作可能に連結され得る。

【0179】

いくつかの実施形態では、リプレッサーオペレーター配列は、T e t O配列又はC u O配列であり（例えば、米国特許第9790256号を参照されたい）、かつ本明細書に記載の通りである。

【0180】

特定の場合では、同じベクターから少なくとも2つの別個のポリペプチドを発現させることが望ましい場合がある。この場合、各ポリヌクレオチドは、同じ又は異なるプロモーター及び/若しくはエンハンサー配列に操作可能に連結されてもよく、又は例えば脳性心筋炎ウイルスからの配列内リボソーム進入部位（I R E S）を利用することによって周知のバイシストロニックな発現系を使用してもよい。あるいは、h C M V - r h C M Vプロモーター及び国際公開第2017220499（A1）号に記載の他のプロモーターなどの双方向合成プロモーターを使用してもよい。

10

【0181】

ポリアデニル化シグナルは、S V 4 0又はウシ成長ホルモン（bovine growth hormone、B G H）に由来し得る。

【0182】

開示されたポリヌクレオチド及び導入遺伝子はまた、1つ又は2つ以上のT細胞エンハンサー（T C E）をコードする1つ又は2つ以上のポリヌクレオチドを含有し得る。T C Eは、それらが融合しているタンパク質、例えばP S M A及び/又はS T E A P 1などの免疫原性を強化するポリペプチド配列である。T C Eはタンパク質のN末端又はC末端に融合され得る。例示的なT細胞エンハンサーは、ヒト（配列番号25）、マウス（配列番号26）、又はマンダリンフィッシュ（配列番号27）のインバリアント鎖配列若しくはその断片；配列番号7若しくは配列番号28のアミノ酸配列を有するマンダリンフィッシュインバリアント鎖の断片、又は場合により6つの追加の下流アミノ酸残基（配列番号29）を含む組織型プラスミノゲン活性化因子リーダー配列などの、インバリアント鎖の断片である。他の例示的なT C Eとしては、P E S T配列；サイクリン破壊ボックス；ユビキチン化シグナル又はS U 2 9 M O化シグナルが挙げられる。

20

【0183】

ヒトインバリアント鎖（配列番号25）

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

30

マウスインバリアント鎖（配列番号26）

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

40

マンダリンフィッシュインバリアント鎖（配列番号27）

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

50

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

配列番号7 (マンダリンフィッシュインバリエント鎖の断片)

G Q K E Q I H T L Q K N S E R M S K Q L T R S S Q A V

配列番号13 (マンダリンフィッシュインバリエント鎖の断片)

M G Q K E Q I H T L Q K N S E R M S K Q L T R S S Q A V

配列番号28 (マンダリンフィッシュインバリエント鎖の断片)

Q I H T L Q K N S E R M S K Q L

配列番号29 T P A

M D A M K R G L C C V L L L C G A V F V S P S Q E I H A R

10

【0184】

ポリヌクレオチド又は導入遺伝子はまた、1つ又は2つ以上の2A自己切断ペプチドをコードする1つ又は2つ以上のポリヌクレオチドを含有し得る。2A自己切断ペプチドは、翻訳中のポリペプチドの切断を媒介するウイルス性又は合成の短いペプチドである。2Aペプチドは、例えば、口蹄疫ウイルス(F2)、ウマ鼻炎Aウイルス(E2A)、ブタテシオウイルス(porcine teschevirus) - 1(P2A)、及びThosea asignaウイルス2A(T2A)から同定されている。2A媒介性自己切断のメカニズムは、最近、リボソームスキッピングであることが発見され、C末端に異なる2Aによって共有される高度に保存された配列GDVEXNPGP(配列番号33)が自己切断に不可欠であることが見出された。任意の2A自己切断配列は、PSMAをコードするポリヌクレオチドとSTEAP1をコードするポリヌクレオチドとの間のポリヌクレオチド又は導入遺伝子へと導入され得る。例示的な2A自己切断ペプチドのアミノ酸配列は、P2A(配列番号30)、T2A(配列番号31)、E2A(配列番号32)、及びF2A(配列番号9)である。

20

【0185】

P2A(配列番号30)

G S G A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P

T2A(配列番号31)

G S G E G R G S L L T C G D V E E N P G P

E2A(配列番号32)

G S G Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P

F2A(配列番号9)

A P V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P

30

【0186】

ワクチン及びワクチン組み合わせ

本明細書では、PSMAをコードするポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含むワクチンが提供される。本明細書ではまた、STEAP1をコードするポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含むワクチンも提供される。本明細書では、PSMAをコードするポリヌクレオチド又は導入遺伝子と、STEAP1をコードするポリヌクレオチドと、を含むワクチンが更に提供される。

40

【0187】

開示されたワクチンのうち2つ又は3つ以上を含むワクチン組み合わせもまた提供される。いくつかの実施形態では、ワクチン組み合わせは、

PSMAをコードする第1のポリヌクレオチド又は導入遺伝子と、

STEAP1をコードする第2のポリヌクレオチド又は導入遺伝子と、

PSMA及びSTEAP1をコードする第3のポリヌクレオチド又は導入遺伝子と、を含む。

【0188】

いくつかの実施形態では、組換えAd26ウイルスは、第1及び第2のポリヌクレオチ

50

ド又は導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、MVAウイルスは、第1及び第2のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、自己複製RNAは、第1及び第2のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む。

【0189】

いくつかの実施形態では、組換えAd26ウイルスは、第3のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、MVAウイルスは、第3のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、自己複製RNAは、第3のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む。

【0190】

本明細書ではまた、
 PSMAをコードする第1のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む第1の組換えAd26ウイルスと、
 STEP1をコードする第2のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む、第2の組換えAd26ウイルスと、
 STEP1をコードする第3のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む、組換えMVAウイルスと、
 を含む、ワクチン組み合わせが開示される。

10

【0191】

本明細書ではまた、
 PSMAをコードする第1のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む第1の組換えAd26ウイルスと、
 STEP1をコードする第2のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む、第2の組換えAd26ウイルスと、
 PSMA及びSTEP1をコードする第3のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む、自己複製RNAと、
 を含む、ワクチン組み合わせが開示される。

20

【0192】

本明細書ではまた、
 PSMAをコードする第1のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む第1の組換えMVAウイルスと、
 STEP1をコードする第2のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む、第2の組換えMVAウイルスと、
 PSMA及びSTEP1をコードする第3のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む、組換えAd26ウイルスと、
 を含む、ワクチン組み合わせが提供される。

30

【0193】

本明細書では、
 PSMAをコードする第1のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む第1の組換えMVAウイルスと、
 STEP1をコードする第2のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む、第2の組換えMVAウイルスと、
 PSMA及びSTEP1をコードする第3のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む、自己複製RNAと、
 を含む、ワクチン組み合わせが開示される。

40

【0194】

本明細書では、
 PSMAをコードする第1のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む、自己複製RNAと、
 STEP1をコードする第2のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む、自己複製RNAと、

50

P S M A 及び S T E A P 1 をコードする第 3 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む、組換え A d 2 6 ウイルスト、
を含む、ワクチン組み合わせが開示される。

【 0 1 9 5 】

本明細書ではまた、
P S M A をコードする第 1 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む、自己複製 R N A と、
S T E A P 1 をコードする第 2 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む、自己複製 R N A と、
P S M A 及び S T E A P 1 をコードする第 3 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む、組換え M V A ウイルスト、
を含む、ワクチン組み合わせが提供される。

10

【 0 1 9 6 】

いくつかの実施形態では、第 1 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子及び第 2 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、P S M A ポリヌクレオチド配列及び S T E A P 1 ポリヌクレオチド配列へと操作可能に連結されたオペレーター含有プロモーターを更に含む。いくつかの実施形態では、オペレーター含有プロモーターは、C M V プロモーター及びテトラサイクリンオペロンオペレーター (T e t O) を含む。いくつかの実施形態では、オペレーター含有プロモーターは、配列番号 2 0 のポリヌクレオチドを含む。

【 0 1 9 7 】

いくつかの実施形態では、第 1 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子及び第 2 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、S V 4 0 ポリアデニル化シグナル (S V 4 0 polyadenylation signal, S V 4 0 p A) を更に含む。

20

【 0 1 9 8 】

いくつかの実施形態では、P S M A をコードする第 1 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、配列番号 1 5 のポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、P S M A をコードする第 1 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、配列番号 1 4 のポリヌクレオチド配列を含む。

【 0 1 9 9 】

いくつかの実施形態では、第 1 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、配列番号 1 5 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、第 1 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、配列番号 1 6 のポリヌクレオチドを含む。

30

【 0 2 0 0 】

いくつかの実施形態では、第 2 のポリヌクレオチドにおいて、又は S T E A P 1 をコードする導入遺伝子は、配列番号 1 8 のポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、S T E A P 1 をコードする第 2 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、配列番号 1 7 のポリヌクレオチドを含む。

【 0 2 0 1 】

いくつかの実施形態では、第 2 のポリヌクレオチドにおいて、又は導入遺伝子は、配列番号 1 8 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、第 1 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、配列番号 1 9 のポリヌクレオチドを含む。

40

【 0 2 0 2 】

いくつかの実施形態では、第 1 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子において、及び第 2 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、r A d 2 6 E 1 欠失部位へと挿入される。

【 0 2 0 3 】

いくつかの実施形態では、第 3 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、P S M A をコードするポリヌクレオチド及び S T E A P 1 をコードするポリヌクレオチドに操作可能に連結された、ボックスウイルスプロモーターを更に含む。いくつかの実施形態では、ボックスウイルスプロモーターは、配列番号 1 のワクシニアウイルスプロモーター p 7 . 5 を含む。

50

【 0 2 0 4 】

いくつかの実施形態では、第3のポリヌクレオチドにおいて、又は導入遺伝子は、第1のT細胞エンハンサー(TCE)をコードするポリヌクレオチドと、第2のTCEをコードするポリヌクレオチドと、を更に含む。いくつかの実施形態では、第1のTCE及び第2のTCEは、配列番号25のヒトインバリアント鎖又はその断片を含む。いくつかの実施形態では、第1のTCE及び第2のTCEは、配列番号26のマウスインバリアント鎖又はその断片を含む。いくつかの実施形態では、第1のTCE及び第2のTCEは、配列番号27のマンダリンフィッシュインバリアント鎖又はその断片を含む。いくつかの実施形態では、第1のTCEをコードするポリヌクレオチドは、配列番号13のポリペプチドをコードし、第2のTCEをコードするポリヌクレオチドは、配列番号7のポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、第1のTCEをコードするポリヌクレオチド及び第2のTCEをコードするポリヌクレオチドは、配列番号29のポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、第1のTCEをコードするポリヌクレオチドは、配列番号2のポリヌクレオチドを含み、及び/又は第2のTCEをコードするポリヌクレオチドは、配列番号5のポリヌクレオチドを含む。

10

【 0 2 0 5 】

いくつかの実施形態では、第3のポリヌクレオチドにおいて、又は導入遺伝子は、2A自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドを更に含む。いくつかの実施形態では、第3のポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、2A自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドを更に含む。いくつかの実施形態では、2A自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号9のポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、2A自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号4のポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、2A自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号30のポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、2A自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号31のポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、2A自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号32のポリペプチドをコードする。

20

【 0 2 0 6 】

いくつかの実施形態では、第3のポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、配列番号8のポリペプチドをコードする、PSMAをコードするポリヌクレオチド、配列番号3のポリヌクレオチドを含む、PSMAをコードするポリヌクレオチド、配列番号10のポリペプチドをコードする、STEAP1をコードするポリヌクレオチド、及び/又は配列番号6のポリヌクレオチドを含む、STEAP1をコードするポリヌクレオチド、を含む。

30

【 0 2 0 7 】

いくつかの実施形態では、第3のポリヌクレオチドにおいて、又は導入遺伝子は：STEAP1をコードするポリヌクレオチドに対して5'に位置するPSMAをコードするポリヌクレオチド、ボックスウイルスプロモーターが、PSMAをコードするポリヌクレオチドに対して5'に位置する、第1のTCEをコードするポリヌクレオチドが、PSMAをコードするポリヌクレオチドに対して5'に位置する、第2のTCEをコードするポリヌクレオチドが、PSMAをコードするポリヌクレオチドに対して3'に位置し、かつ/又は2A自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドが、PSMAをコードするポリヌクレオチドに対して3'に位置し、かつ第2のTCEをコードするポリヌクレオチドに対して5'に位置する。

40

【 0 2 0 8 】

いくつかの実施形態では、第3のポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、配列番号12のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、第3のポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、配列番号11のポリヌクレオチドを含む。

【 0 2 0 9 】

50

いくつかの実施形態では、rMVAは、ウイルスシードMVA-476 MG/14/78、MVA-572、MVA-574若しくはMVA-575又はMVA-BNに由来する。いくつかの実施形態では、第3のポリヌクレオチド又は導入遺伝子は、rMVA欠失部位IIIへと挿入される。

【0210】

医薬組成物

開示されたワクチン又はワクチン組み合わせは、ワクチン及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物を含んでいてもよく、又は医薬組成物に製剤化されてもよい。「薬学的に許容される」とは、使用される投与量及び濃度で、投与される対象において望ましくない効果も有害な効果も引き起こさず、担体、緩衝剤、安定剤、又は当業者に周知の他の材料を含む賦形剤を指す。担体又は他の材料の厳密な性質は、投与経路、例えば、筋肉内、皮下、経口、静脈内、皮膚、粘膜内（例えば、腸内）、鼻腔内、又は腹腔内経路に依存し得る。水、石油、動物油又は植物油、鉱油又は合成油などの液体担体が含まれていてもよい。生理食塩水、デキストロース若しくは他の糖液、又はエチレングリコール、プロピレングリコール若しくはポリエチレングリコールなどのグリコールが含まれていてもよい。例示的なウイルス処方は、アデノウイルス世界標準（Hoganson et al, 2002）：20mM Tris pH8、25mM NaCl、2.5%グリセロール；又は20mM Tris、2mM MgCl₂、25mM NaCl、スクロース10% w/v、ポリソルベート-80 0.02% w/v、又は10~25mMクエン酸バッファpH5.9~6.2、4~6%（w/w）ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン（hydroxypropyl-beta-cyclodextrin、HBCD）、70~100mM NaCl、0.018~0.035%（w/w）ポリソルベート-80、及び任意選択的に0.3~0.45%（w/w）エタノールである。別の例示的なウイルス処方は、7.7のpHで10mM Tris、140mM NaClである。他の緩衝剤を使用することができ、精製された医薬製剤の保管及び医薬投与のための好適な処方の例が知られている。

【0211】

ワクチンは、1つ又は2つ以上のアジュバントを含んでいてもよい。好適なアジュバントとしては、QS-21、Detox-PC、MPL-SE、MoGM-CSF、TiterMax-G、CRL-1005、GERBU、TERamide、PSC97B、Adjumer、PG-026、GSK-I、GcMAF、B-アレチン、MPC-026、Adjuvax、CpG ODN、ベータフェクチン、アラム、及びMF59が挙げられる。使用することができる他のアジュバントとしては、レクチン、成長因子、サイトカイン及びリンホカイン、例えば、インターフェロン、インターフェロン、血小板由来成長因子（platelet derived growth factor、PDGF）、顆粒球コロニー刺激因子（granulocyte-colony stimulating factor、G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（granulocyte macrophage colony stimulating factor、GM-CSF）、腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor、TNF）、上皮成長因子（epidermal growth factor、EGF）、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、又はTLRアゴニストが挙げられる。

【0212】

「アジュバント」及び「免疫刺激剤」という用語は、本明細書において互換的に使用され、免疫系の刺激を引き起こす1つ又は2つ以上の物質として定義される。この文脈において、アジュバントは、本明細書に記載のウイルスベクターに対する免疫応答を強化するために使用される。

【0213】

医薬組成物は、特定の実施形態では、ワクチンであり得る。

【0214】

キット

本開示はまた、本開示のワクチン又はワクチン組み合わせを含むキットを提供する。

【0215】

本開示はまた、rMVAを含むキットを提供する。本開示はまた、rAd26を含むキットを提供する。キットは、本明細書に記載の方法の実施を容易にするために使用することができる。いくつかの実施形態では、キットは、脂質ベースの製剤又はウイルスパッケージング材料などの、ワクチンの細胞への進入を容易にするための試薬を更に含む。

【0216】

治療、使用、及び投与の方法

ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、ウイルス、ワクチン、及びワクチン組み合わせは、前立腺がんの治療などの研究ツール及び治療目的として使用され得る。

【0217】

本明細書では、対象における前立腺がんを予防又は治療する方法であって、開示されたポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、ウイルス、ワクチン、及びワクチン組み合わせのうちいずれか1つの治療有効量を対象に投与することを含む、方法が提供される。

10

【0218】

また、前立腺がん罹患している対象における前立腺がんに対する免疫応答を強化する方法であって、本開示のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、ウイルス、ワクチン、及びワクチン組み合わせのうちいずれか1つを対象に投与することを含む、方法も提供される。

【0219】

本明細書では、対象における前立腺がんを予防又は治療するための医薬品の調製における、開示されたポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、ウイルス、ワクチン、及びワクチン組み合わせの使用であって、開示されたポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、ウイルス、ワクチン、及びワクチン組み合わせのいずれか1つの治療有効量を対象に投与することを含む、使用が提供される。

20

【0220】

また、前立腺がん罹患している対象における前立腺がんに対する免疫応答を強化するための医薬品の調製における、開示されたポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、ウイルス、ワクチン、及びワクチン組み合わせの使用であって、本開示のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、ウイルス、ワクチン、及びワクチン組み合わせのうちいずれか1つを対象に投与することを含む、使用も提供される。

【0221】

いくつかの実施形態では、前立腺がんに対する免疫応答の強化を必要とする対象においてそれを行う方法は、

30

免疫応答を初回免疫するための、PSMAをコードする免疫学的有効量の第1のポリヌクレオチド又は導入遺伝子と、

免疫応答を更に初回免疫するための、STEAP1をコードする免疫学的有効量の第2のポリヌクレオチド又は導入遺伝子と、

免疫応答を追加免疫するための、PSMA及びSTEAP1をコードする免疫学的有効量の第3のポリヌクレオチド又は導入遺伝子と、を対象に投与することを含む。

【0222】

いくつかの実施形態では、前立腺がん罹患している対象を治療する方法は、

40

免疫応答を初回免疫するための、PSMAをコードする免疫学的有効量の第1のポリヌクレオチド又は導入遺伝子と、

免疫応答を更に初回免疫するための、STEAP1をコードする免疫学的有効量の第2のポリヌクレオチド又は導入遺伝子と、

免疫応答を追加免疫するための、PSMA及びSTEAP1をコードする免疫学的有効量の第3のポリヌクレオチド又は導入遺伝子と、を対象に投与することを含む。

【0223】

開示された方法のいくつかの実施形態では、

第1の組換えAd26ウイルスは、PSMAをコードする第1のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含み、

50

第 2 の組換え A d 2 6 ウイルスは、S T E A P 1 をコードする第 2 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含み、

組換え M V A ウイルスは、P S M A 及び S T E A P 1 をコードする第 3 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む。

【 0 2 2 4 】

開示された方法のいくつかの実施形態では、

第 1 の組換え A d 2 6 ウイルスは、P S M A をコードする第 1 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含み、

第 2 の組換え A d 2 6 ウイルスは、S T E A P 1 をコードする第 2 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含み、

自己複製 R N A は、P S M A 及び S T E A P 1 をコードする第 3 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む。

【 0 2 2 5 】

開示された方法のいくつかの実施形態では、

第 1 の組換え M V A ウイルスは、P S M A をコードする第 1 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含み、

第 2 の組換え M V A ウイルスは、S T E A P 1 をコードする第 2 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含み、

組換え A d 2 6 ウイルスは、P S M A 及び S T E A P 1 をコードする第 3 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む。

【 0 2 2 6 】

開示された方法のいくつかの実施形態では、

第 1 の組換え M V A ウイルスは、P S M A をコードする第 1 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含み、

第 2 の組換え M V A ウイルスは、S T E A P 1 をコードする第 2 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含み、

自己複製 R N A は、P S M A 及び S T E A P 1 をコードする第 3 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む。

【 0 2 2 7 】

開示された方法のいくつかの実施形態では、

自己複製 R N A は、P S M A をコードする第 1 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含み、

自己複製 R N A は、S T E A P 1 をコードする第 2 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含み、

組換え A d 2 6 ウイルスは、P S M A 及び S T E A P 1 をコードする第 3 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む。

【 0 2 2 8 】

開示された方法のいくつかの実施形態では、

自己複製 R N A は、P S M A をコードする第 1 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含み、

自己複製 R N A は、S T E A P 1 をコードする第 2 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含み、

組換え M V A ウイルスは、P S M A 及び S T E A P 1 をコードする第 3 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子を含む。

【 0 2 2 9 】

いくつかの実施形態では、A d 2 6、M V A、及び / 又は自己複製 R N A は、医薬組成物中に製剤化される。

【 0 2 3 0 】

いくつかの実施形態では、免疫応答は、C D 8 + T 細胞応答又は C D 4 + T 細胞応答である。

10

20

30

40

50

【 0 2 3 1 】

いくつかの実施形態では、第1の組換えAd26ウイルスはrAd26・PSMAを含み、第2の組換えAd26ウイルスはrAD26・STEAP1を含み、組換えMVAウイルスはrMVA・PSMA・STEAP1を含む。

【 0 2 3 2 】

いくつかの実施形態では、がんは腺がんである。いくつかの実施形態では、がんは転移性前立腺がんである。いくつかの実施形態では、前立腺がんは、直腸、リンパ節、若しくは骨、又はそれらの任意の組み合わせに転移している。

【 0 2 3 3 】

いくつかの実施形態では、前立腺がんは、再発性又は難治性前立腺がんである。いくつかの実施形態では、前立腺がんは去勢抵抗性前立腺がんである。いくつかの実施形態では、前立腺がんは、アンドロゲン除去療法に対して感受性である。いくつかの実施形態では、前立腺がんは、アンドロゲン除去療法に対して非感受性である。アンドロゲン除去療法としては、アピラテロン、ケトコナゾール、エンザルタミド、ガレテロン、ARN-509、及びオルテロネル(TAK-700)が挙げられる。

10

【 0 2 3 4 】

ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、ウイルス、ワクチン、及びワクチン組み合わせは、筋肉内又は皮下注射によって投与され得る。しかしながら、静脈内、皮膚、皮内、又は鼻腔などの他の投与様式も同様に想定され得る。ワクチンの筋肉内投与は、針を使用することによって達成することができる。代替案は、組成物を投与するための無針注射装置(例えば、Biojector(商標)の使用)又はワクチンを含有する凍結乾燥粉末の使用である。

20

【 0 2 3 5 】

静脈内、皮膚若しくは皮下注射、又は罹患部位への注射では、ベクターは、パイロジェンフリーであり、好適なpH、等張性、及び安定性を有する非経口的に許容される水溶液の形態であり得る。当業者は、例えば、塩化ナトリウム注射剤、リンゲル注射剤、乳酸リンゲル注射剤などの等張性ビヒクルを使用して好適な溶液を調製することが可能である。必要に応じて、防腐剤、安定剤、緩衝剤、酸化防止剤、及び/又は他の添加剤を含めることができる。徐放性製剤を使用することもできる。

【 0 2 3 6 】

典型的には、投与は、前立腺がんの症状の発症前に前立腺ネオ抗原(すなわち、PSMA及び/又はSTEAP1)に対する免疫応答を生じさせる予防的目的を有する。

30

【 0 2 3 7 】

ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、ウイルス、ワクチン、及びワクチン組み合わせを対象に投与し、対象に免疫応答を生じさせる。ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、ウイルス、ワクチン、及びワクチン組み合わせは、体液性及び細胞媒介性免疫応答を誘導し得る。典型的な実施形態では、免疫応答は、保護免疫応答である。

【 0 2 3 8 】

実際の投与量、並びに投与速度及び時間経過は、治療されている状態の性質及び重篤度によって決まる。治療の処方、例えば、投与量などの決定は、一般開業医及び他の医師の責任の範囲内であり、典型的には、治療される障害、個々の患者の状態、送達部位、投与の方法、及び開業医に既知の他の要因を考慮する。

40

【 0 2 3 9 】

例示的なレジメンでは、組換えAd26・PSMAウイルス及び組換えAd26・STEAP1ウイルスを、約 10^4 ~ 10^{12} ウイルス粒子/mlの濃度を含む約100 μ L~約10mlの範囲にわたる体積で投与する(例えば、筋肉内)。rAd26・PSMA及びrAd26・STEAP1は、0.5mlの体積などの0.25~1.0mlの範囲にわたる体積で投与され得る。

【 0 2 4 0 】

組換えアデノウイルスは、1回の投与中に約 10^9 ~約 10^{12} 個のウイルス粒子(v

50

p) の量で、より典型的には約 10^{10} ~ 約 10^{12} v p の量でヒト対象に投与され得る。

【0241】

組換え MVA ウイルスは、約 1×10^7 TCID₅₀ ~ 1×10^9 TCID₅₀ (50% 組織培養感染量) 又は Inf. U (感染単位) の用量を含有する、約 $100 \mu\text{l}$ ~ 約 10 ml の範囲の体積の生理食塩水で (例えば、筋肉内に) 投与され得る。rMVA は、 0.25 ~ 1.0 ml の範囲の体積で投与してよい。

【0242】

組換え GAd20 ウイルスは、用量当たり約 10^8 IFU の量で投与され得る。いくつかの実施形態では、GAd20 ウイルスを含む組成物は、用量当たり約 1×10^{10} IFU で投与される。いくつかの実施形態では、GAd20 ウイルスを含む組成物は、用量当たり約 1×10^{10} VP で投与される。いくつかの実施形態では、GAd20 ウイルスを含む組成物は、用量当たり約 1×10^{11} VP で投与される。

10

【0243】

自己複製 RNA 分子を含む組成物は、約 1 マイクログラム ~ 約 100 マイクログラム、約 1 マイクログラム ~ 約 90 マイクログラム、約 1 マイクログラム ~ 約 80 マイクログラム、約 1 マイクログラム ~ 約 70 マイクログラム、約 1 マイクログラム ~ 約 60 マイクログラム、約 1 マイクログラム ~ 約 50 マイクログラム、約 1 マイクログラム ~ 約 40 マイクログラム、約 1 マイクログラム ~ 約 30 マイクログラム、約 1 マイクログラム ~ 約 20 マイクログラム、約 1 マイクログラム ~ 約 10 マイクログラム、又は約 1 マイクログラム ~ 約 5 マイクログラムの自己複製 RNA 分子の用量で投与されてもよい。

20

【0244】

追加免疫組成物は、初回免疫組成物の投与の数週間又は数ヶ月後、例えば、初回免疫組成物の投与の約 1 又は 2 週間、又は 3 週間、又は 4 週間、又は 6 週間、又は 8 週間、又は 12 週間、又は 16 週間、又は 20 週間、又は 24 週間、又は 28 週間、又は 32 週間、又は 1 ~ 2 年間後に 2 回又は 3 回以上投与してよい。更なる追加免疫組成物を、最初の追加免疫接種の 6 週間 ~ 5 年間後、例えば、最初の追加免疫接種の 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、若しくは 25 週間、又は 7、8、9、10、11、若しくは 12 ヶ月、又は 2、3、4、若しくは 5 年後に投与してもよい。任意選択で、更なる追加免疫を必要に応じて 1 回又は 2 回以上繰り返してもよい。

30

【0245】

併用療法

ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、ウイルス、ワクチン、及びワクチン組み合わせは、前立腺を治療するための 1 つ又は 2 つ以上の追加のがん治療と組み合わせて使用され得る。

【0246】

いくつかの実施形態では、前立腺がんに対する免疫応答の強化を必要とする対象において対象においてそれを行う方法は、対象に、

免疫応答を初回免疫するための、PSMA をコードする免疫学的有効量の第 1 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子と、

40

免疫応答を更に初回免疫するための、STEAP1 をコードする免疫学的有効量の第 2 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子と、

免疫応答を追加免疫するための、PSMA 及び STEAP1 をコードする免疫学的有効量の第 3 のポリヌクレオチド又は導入遺伝子と、

1 つ又は 2 つ以上の追加のがん治療と、
を投与することを含み得る。

【0247】

前立腺がん罹患している対象を治療する方法は、対象に、

免疫応答を初回免疫するための、PSMA をコードする免疫学的有効量の第 1 のポリヌ

50

クレオチド又は導入遺伝子と、

免疫応答を更に初回免疫するための、STEP 1をコードする免疫学的有効量の第2のポリヌクレオチド又は導入遺伝子と、

免疫応答を追加免疫するための、PSMA及びSTEP 1をコードする免疫学的有効量の第3のポリヌクレオチド又は導入遺伝子と、

1つ又は2つ以上の追加のがん治療と、

を投与することを含み得る。

【0248】

追加のがん治療剤は、手術、化学療法、アンドロゲン除去療法、放射線療法、標的治療、若しくはチェックポイント阻害剤、又はこれらの任意の組み合わせであってよい。いくつかの実施形態では、1つ又は2つ以上の追加のがん治療は、手術である。いくつかの実施形態では、1つ又は2つ以上の追加のがん治療は、アンドロゲン除去療法である。いくつかの実施形態では、1つ又は2つ以上の追加のがん治療は、放射線療法である。いくつかの実施形態では、1つ又は2つ以上の追加のがん治療は、標的療法である。いくつかの実施形態では、1つ又は2つ以上の追加のがん治療は、チェックポイント阻害剤である。

【0249】

いくつかの実施形態では、1つ又は2つ以上の追加の抗がん治療は、抗CTLA-4抗体である。例示的な抗CTLA-4抗体は、イピリムマブ(YERVOY(登録商標))である。

【0250】

いくつかの実施形態では、1つ又は2つ以上の追加のがん治療は、抗PD-1抗体である。例示的な抗PD-1抗体は、ニボルマブ(OPDIVO(登録商標))、ペンブロリズマブ(KEYTRUDA(登録商標))、シンチリマブ、セミプリマブ(LIBTAYO(登録商標))、トリポリバマブ、チスレリズマブ、スパルタリズマブ、カンレリズマブ、ドストラリマブ、ゲノリムズマブ、又はセトレマブである。承認された抗PD-1抗体は、認可された販売業者又は薬局を介して購入することができる。抗PD-1抗体のアミノ酸配列は、一般に、企業によるUSAN及び/又はINN提出から見出すことができる。

【0251】

いくつかの実施形態では、1つ又は2つ以上の追加のがん治療は、抗PD-L1抗体である。例示的な抗PD-L1抗体は、エンパフォリマブ、アテゾリズマブ(TECENTRIQ(登録商標))、デュルバルマブ(IMFINZI(登録商標))、及びアベルマブ(BAVENCIO(登録商標))である。

【0252】

任意の抗体(例えば、抗CTLA-4抗体など)を、天然又はトランスジェニックのマウス、ラット、ニワトリ、ウサギ、ラマにおいて、公知の方法を使用して作製し、得られた抗体を、CTLA-4に結合し、CTLA-4によって媒介されるT細胞の抑制を逆転させる能力について、例えばIL-2の産生又は増殖を誘出しとして使用してアッセイすることができる。

【0253】

例示的な化学療法剤は、アルキル化剤；ニトロソウレア；代謝拮抗薬；抗腫瘍性抗生物質；植物アルカロイド；タキサン；ホルモン剤；並びに種々の剤、例えば、ブスルファン、カルボプラチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、ダカルバジン、イホスファミド、塩酸メクロレタミン、メルファラン、プロカルバジン、チオテパ、ウラシルマスタード、5-フルオロウラシル、6-メルカプトプリン、カプシタビン、シトシンアラビノシド、フロクスウリジン、フルダラビン、ゲムシタビン、メトトレキサート、チオグアニン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、イダルビシン、マイトマイシンC、及びミトキサントロン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピンデシン、ピノレルピン、バクリタキセル、ドセタキセルである。

【0254】

10

20

30

40

50

例示的なアンドロゲン除去療法としては、酢酸アピラテロン、ケトコナゾール、エンザルタミド、ガレテロン、ARN-509及びオルテロネル(TAK-700)、並びに精巣の外科切除が挙げられる。

【0255】

放射線療法は、外部照射療法、内部放射線療法、インプラント放射線、定位放射線手術、全身放射線療法、放射線療法、及び永久的又は一時的な間質近接照射療法を含む、様々な方法を使用して投与され得る。外部照射療法は、照射野が設計されている三次元原体照射療法、局所放射線(例えば、予め選択された標的又は器官を対象とする放射線)、又は集束放射線を含む。集束放射線は、定位放射線手術、分割定位放射線手術、又は強度変調放射線療法から選択され得る。集束放射線は、放射線源として、粒子ビーム(プロトン)、コバルト-60(光子)直線加速器(X線)を有し得る(例えば、国際公開第2012/177624号を参照されたい)。「近接照射療法」は、腫瘍又は他の増殖性組織疾患部位又はその付近で体内に挿入された空間的に閉じ込められた放射性材料によって送達される放射線療法を指し、放射性同位体(例えば、At-211、I-131、I-125、Y-90、Re-186、Re-188、Sm-153、Bi-212、P-32、及びLu放射性同位体)への曝露を含む。細胞コンディショナとして使用するのに好適な放射線源は、固体と液体との両方を含む。放射線源は、固体源としてのI-125、I-131、Yb-169、Ir-192、固体源としてのI-125などの放射性核種、又は光子、ベータ粒子、ガンマ線、若しくは他の治療用光線を放出する他の放射性核種であり得る。放射性材料はまた、放射性核種の任意の溶液、例えばI-125若しくはI-131の溶液から作製された流体であってもよく、又はAu-198、Y-90などの固体放射性核種の小粒子を含有する好適な流体のスラリーを使用して、放射性流体を生成することができる。放射性核種は、ゲル又は放射性マイクロスフィア中で具現化されてもよい。

【0256】

標的療法としては、抗アンドロゲン療法、ペバシズマブなどの血管新生阻害剤、抗PSA若しくは抗PSMA抗体、又はPSA若しくはPSMAに対する免疫応答を強化するワクチンが挙げられる。

【0257】

例示的なチェックポイント阻害剤は、PD-1、PD-L1、PD-L2、VISTA、BTNL2、B7-H3、B7-H4、HVEM、HHLA2、CTLA-4、LAG-3、TIM-3、BTLA、CD160、CEACAM-1、LAIR1、TIGIT、NKG2A、CD112、CD47、SIRPA、又はCD244のアンタゴニストである。「アンタゴニスト」とは、細胞タンパク質に結合したとき、タンパク質の天然のリガンドによって誘導される少なくとも1つの反応又は活性を抑制する分子を指す。分子は、少なくとも1つの反応若しくは活性が、アンタゴニストの非存在下(例えば、陰性対照)で抑制される少なくとも1つの反応若しくは活性よりも少なくとも約30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、若しくは100%多く抑制されるとき、又はアンタゴニストの非存在下における抑制と比較して抑制が統計的に有意であるとき、アンタゴニストである。アンタゴニストは、抗体、可溶性リガンド、低分子、DNA、又はsiRNAなどのRNAであり得る。チェックポイント阻害剤の例示的なアンタゴニストは、米国特許出願公開第2017/0121409号に記載されている。

【実施例】

【0258】

本明細書にて開示した実施形態のいくつかを更に説明するために、以下の実施例を提供する。これらの実施例は、例示を目的とするものであり、本開示の実施形態を制限するものではない。

【0259】

実施例1 組換えMVA-hPSMA-hSTEAP1の構築

10

20

30

40

50

MVA-hPSMA-hSTEAP1導入遺伝子は、自己切断2Aペプチドによって分離された、2つのヒトタンパク質PSMA及びSTEAP1をコードするように設計された。T細胞エンハンサー(TcE)配列を2つのタンパク質の各々のN末端で融合させた。導入遺伝子ヌクレオチド配列を以下のように設計した：ヒトPSMA及びSTEAP1コード配列(それぞれ、genBank NM_004476.2及びNM_012449.2から)を使用した。いくつかのヌクレオチドを変更して、MVA(「n」は任意のヌクレオチドを表す)、ポリTストレッチ、及び導入遺伝子合成を妨げた可能性がある高すぎる又は低すぎるGC含有量を有する領域において、転写終結シグナルとして作用し得る5TnTモチーフを除去した。導入遺伝子への反復配列の挿入を回避するために、同じタンパク質配列をコードするがコドン使用頻度が異なる、2つのバージョンのTcE配列(TcE-v1及びTcE-v2)を使用した。TcE-v1及びTcE-v2(ATGなし)を、それぞれ、PSMA及びSTEAP1配列にN末端融合させた。停止コドン

10

【0260】

得られた配列を合成し、BamH1-Asc1制限部位を介してシャトルプラスミドにサブクローニングした。得られたプラスミドをH433と命名し、BamH1及びAsc1制限酵素による制御消化に供した。

【0261】

20

H433プラスミドは以下を含有した：

「Z」と命名された2つの反復領域に隣接するポキソウイルスプロモーター(poxoviral promoter)P7.5の制御下におけるhPSMA-hSTEAP1導入遺伝子、合成Spプロモーターの制御下におけるeGFP導入遺伝子、欠失III遺伝子座のMVA配列に相同な隣接III領域、アンピシリン耐性。H433中の導入遺伝子をサンガー配列決定によって配列決定した。

【0262】

MVA-hPSMA-hSTEAP1を、CEF細胞においてインビボで生じる2つの相同組換え工程によって作製した。第1の組換え工程では、新鮮なCEF細胞を親MVA-RED 476 MGに感染させ、H433プラスミドでトランスフェクトした。MVA-RED 476 MGは、欠失III遺伝子座にHcRed 1-1赤色蛍光タンパク質の発現カセットを保有する。H433プラスミドは、欠失III遺伝子座に相同な配列が隣接する2つの発現カセット(ポキソウイルスP7.5プロモーター下におけるPSMA-STEAP1導入遺伝子、及び合成Spプロモーター下におけるeGFP導入遺伝子)を有していた。eGFP導入遺伝子カセットはまた、「Z」として示される短い反復配列(215bp)に隣接していた。相同組換えは隣接III領域間で発生し、導入遺伝子及びeGFPカセット(MVA-Green-PSMA-STEAP1)の両方を保有した中間組換えMVAの作製をもたらした。感染/トランスフェクト細胞の翌日、赤色蛍光及び緑色蛍光の両方が示され、MVA-RED 476 MG及びMVA-Green-PSMA-STEAP1ベクターの両方の存在が示された。細胞を、収集し、溶解した

30

40

【0263】

MVA-Green-PSMA-STEAP1ゲノムに存在する反復Z領域を伴う第2の組換え工程は、このベクターに感染した細胞で起こる自発的事象である。したがって、

50

最終的なMVA・PSMA・STEAP1を得るために、新鮮なCEF細胞をクローン#B1からの溶解物に感染させた。MW96ウェル中の非蛍光細胞のFACS選別を行って、最終組換えMVA・PSMA・STEAP1ベクターに感染した細胞を単離した。

【0264】

4日後、細胞変性効果を示し、蛍光を示さなかった感染ウェルを収集し、溶解し、PCR同一性及び純度対照に供した。2つのクローン(#B1・B1及び#B1・C2)を選択し、限界希釈工程に供した。限界希釈からのいくつかのクローンを収集し、再びPCR同一性及び純度対照に供し、実施した全てのPCR対照から正しい結果が得られたクローン#B1・C2・16を、最終的にその後の増幅工程のために選択した。

【0265】

P7.5プロモーター配列番号1

GATCACTAATTCCAAACCCACCCGCTTTTATAAGTAAGT
TTTTTCACCCATAAATAATAAATACAATAATTAAATTTCTCG
TAAAAGTAGAAAATATAATTCTAATTTATTGCACGGTAAGG
AAGTAGAATCATAAAGAACAG

TcE-v1配列番号2

ATGGGCCAGAAAGGAACAGATTTCATACGCTTTCAGAAAAAT
TCTGAACGAATGTCAAAGCAATTGACACGAAGTTCTCAGG
CAGTA

hPSMA DNA配列番号3

【0266】

10

20

30

40

50

【表 1】

TGGAATCTCCTTCACGAAACCGACTCGGCTGTGGCTACCGCACGCAGACCTAGGTGGCTGTGTGC
TGGAGCTCTGGTCTGGCGGGTGGCTTCTTTCTCCTCGGCTTCTCTTCGGGTGGTTATAAAAT
CCTCCAATGAAGCTACTAACATTACTCCAAAGCATAATATGAAAGCATTTTTGGATGAATTGAAA
GCTGAGAACATCAAGAAGTTCTTATATAATTTTACACAGATACCACATTTAGCAGGAACAGAACA
AACTTTTCAGCTTGCAAAGCAAATTCATCCCAGTGGAAAGAATTTGGCCTGGATTCTGTTGAGC
TAGCACATTATGATGTCTGTGTCTACCCAAATAAGACTCATCCCAACTACATCTCAATAATT
AATGAAGATGGAAATGAGATTTTCAACACATCATTATTTGAACCACCTCCTCCAGGATATGAAAA
TGTTTCGGATATTGTACCACCTTTCAGTGCTTTCTCTCCTCAAGGAATGCCAGAGGGCGATCTAG 10
TGTATGTTAACTATGCACGAACTGAAGACTTCTTTAAATTGGAACGGGACATGAAAATCAATTGC
TCTGGGAAAATTGTAATTGCCAGATATGGGAAAGTTTTCAGAGGAAATAAGGTTAAAAATGCCCA
GCTGGCAGGGGCCAAAGGAGTCATTCTCTACTCCGACCCTGCTGACTACTTTGCTCCTGGGGTGA
AGTCCTATCCAGATGGTTGGAATCTTCTGGAGGTGGTGTCCAGCGTGGAAATATCCTAAATCTG
AATGGTGCAGGAGACCTCTCACACCAGGTTACCAGCAAATGAATATGCTTATAGGCGTGGAAAT
TGCAGAGGCTGTTGGTCTTCCAAGTATTCCTGTTCATCCAATTGGATACTATGATGCACAGAAGC
TCCTAGAAAAAATGGGTGGCTCAGCACCACCAGATAGCAGCTGGAGAGGAAGTCTCAAAGTGCCC
TACAATGTTGGACCTGGCTTTACTGGAACTTTTCTACACAAAAAGTCAAGATGCACATCCACTC
TACCAATGAAGTGACAAGAATTTACAATGTGATAGGTACTCTCAGAGGAGCAGTGGAAACCAGACA 20
GATATGTCATTCTGGGAGGTCAACGGGACTCATGGGTGTTTGGTGGTATTGACCCCTCAGAGTGGG
GCAGCTGTTGTTTCATGAAATTGTGAGGAGCTTTGGAACACTGAAAAAGGAAGGTGGAGACCTAG
AAGAACAATTTTGTGTTGCAAGCTGGGATGCAGAAGAATTTGGTCTTCTTGGTCTACTGAGTGGG
CAGAGGAGAATTCAGACTCCTTCAAGAGCGTGGCGTGGCTTATATTAATGCTGACTCATCTATA
GAAGGAACTACACTCTGAGAGTTGATTGTACACCGCTGATGTACAGCTTGGTACACAACCTAAC
AAAAGAGCTGAAAAGCCCTGATGAAGGCTTTGAAGGCAAATCTCTTTATGAAAGTTGGACTAAAA
AAAGTCCTTCCCCAGAGTTCAGTGGCATGCCAGGATAAGCAAATTTGGGATCTGGAAATGATTTT
GAGGTGTTCTTCCAACGACTTGGAAATGCTTCAGGCAGAGCACGGTATACTAAAAATTTGGGAAAC
AAACAAATTCAGCGGCTATCCACTGTATCACAGTGTCTATGAAACATATGAGTTGGTGGAAAAGT 30
TTTATGATCCAATGTTTAAATATCACCTCACTGTGGCCAGGTTCCAGGAGGGATGGTGTGTTGAG
CTAGCCAATTCATAGTGTCTCCCTTTTGATTGTGAGATTATGCTGTAGTTTTAAGAAAAGTATGC
TGACAAAATCTACAGTATTTCTATGAAACATCCACAGGAAATGAAGACATACAGTGTATCATTTG
ATTCACTCTTCTCTGCAGTAAAGAATTTTACAGAAATTGCTTCCAAGTTCAGTGAGAGACTCCAG
GACTTTGACAAAAGCAACCCAATAGTATTAAGAATGATGAATGATCAACTCATGTTTCTGGAAAG
AGCATTTATTGATCCATTAGGGTTACCAGACAGGCCATTCTATAGGCATGTCATCTATGCTCCAA
GCAGCCACAACAAGTATGCAGGGGAGTCATCCCAGGAATTTATGATGCTCTGTTTGATATTGAA
AGCAAAGTGGACCCTTCCAAGGCCTGGGGAGAAGTGAAGAGACAGATTTATGTTGCAGCCTTAC
AGTGCAGGCAGCTGCAGAGACTTTGAGTGAAGTAGCC 40

2 A 配列番号 4

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

T c E - v 2 配列番号 5

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

h S T E A P 1 DNA 配列番号 6

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

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

10

20

T c E - v 1 タンパク質配列番号 1 3

M G Q K E Q I H T L Q K N S E R M S K Q L T R S S Q A V

T c E - v 2 タンパク質配列番号 7

G Q K E Q I H T L Q K N S E R M S K Q L T R S S Q A V

h P S M A タンパク質配列番号 8

30

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

40

2 A タンパク質配列番号 9 (F 2 A)

50

A P V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P

h S T E A P 1 タンパク質配列番号 1 0

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

10

完全挿入配列番号 1 1 (配列から除外されたプロモーター)

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

20

30

40

50

A G C T G A A A A G C C C T G A T G A A G G C T T T G A A G G C A A A T C T C T
 T T A T G A A A G T T G G A C T A A A A A A G T C C T T C C C C A G A G T T C
 A G T G G C A T G C C C A G G A T A A G C A A A T T G G G A T C T G G A A A T G
 A T T T T G A G G T G T T C T T C C A A C G A C T T G G A A T T G C T T C A G G
 C A G A G C A C G G T A T A C T A A A A A T T G G G A A A C A A A C A A A T T C
 A G C G G C T A T C C A C T G T A T C A C A G T G T C T A T G A A A C A T A T G
 A G T T G G T G G A A A A G T T T T A T G A T C C A A T G T T T A A A T A T C A
 C C T C A C T G T G G C C C A G G T T C G A G G A G G G A T G G T G T T T G A G
 C T A G C C A A T T C C A T A G T G C T C C C T T T T G A T T G T C G A G A T T
 A T G C T G T A G T T T T A A G A A A G T A T G C T G A C A A A A T C T A C A G 10
 T A T T T C T A T G A A A C A T C C A C A G G A A A T G A A G A C A T A C A G T
 G T A T C A T T T T G A T T C A C T C T T C T C T G C A G T A A A G A A T T T T A
 C A G A A A T T G C T T C C A A G T T C A G T G A G A G A C T C C A G G A C T T
 T G A C A A A A G C A A C C C A A T A G T A T T A A G A A T G A T G A A T G A T
 C A A C T C A T G T T T C T G G A A A G A G C A T T T A T T G A T C C A T T A G
 G G T T A C C A G A C A G G C C A T T C T A T A G G C A T G T C A T C T A T G C
 T C C A A G C A G C C A C A A C A A G T A T G C A G G G G A G T C A T T C C C A
 G G A A T T T A T G A T G C T C T G T T T G A T A T T G A A A G C A A A G T G G
 A C C C T T C C A A G G C C T G G G G A G A A G T G A A G A G A C A G A T T T A
 T G T T G C A G C C T T C A C A G T G C A G G C A G C T G C A G A G A C T T T G 20
 A G T G A A G T A G C C G c g c c a g t a a a g c a g a c a t t a a a c t t t g
 a t t t g c t g a a a c t t g c a g g t g a t g t a g a g t c a a a t c c a g g
 t c c a G G A C A G A A A G A G C A A A T C C A C A C A C T G C A G A A G A A C
 A G C G A G A G G A T G A G C A A A C A G C T T A C C A G G T C A T C C C A A G
 C T G T T G A A A G C A G A A A A G A C A T C A C A A A C C A A G A A G A A C T
 T T G G A A A A T G A A G C C T A G G A G A A A T T T A G A A G A A G A C G A T
 T A T T T G C A T A A G G A C A C G G G A G A G A C C A G C A T G C T A A A A A
 G A C C T G T G C T T T T G C A T T T G C A C C A A A C A G C C C A T G C T G A
 T G A A T T T G A C T G C C C T T C A G A A C T T C A G C A C A C A C A G G A A
 C T C T T T C C A C A G T G G C A C T T G C C A A T T A A A A T A G C T G C T A 30
 T T A T A G C A T C T C T G A C T T T T C T T T A C A C T C T T C T G A G G G A
 A G T A A T T C A C C C T T T A G C A A C T T C C C A T C A G C A A T A C T T C
 T A T A A G A T T C C A A T C C T G G T C A T C A A C A A A G T C T T G C C A A
 T G G T T T C C A T C A C T C T C T T G G C A T T G G T T T A C C T G C C A G G
 T G T G A T A G C A G C A A T T G T C C A A C T T C A T A A T G G A A C C A A G
 T A T A A G A A G T T T C C A C A T T G G T T G G A T A A G T G G A T G T T A A
 C A A G A A A G C A G T T T G G G C T T C T C A G T T T C T T C T T T G C T G T
 A C T G C A T G C A A T T T A T A G T C T G T C T T A C C C A A T G A G G C G A
 T C C T A C A G A T A C A A G T T G C T A A A C T G G G C A T A T C A A C A G G
 T C C A A C A A A A T A A A G A A G A T G C C T G G A T T G A G C A T G A T G T 40
 T T G G A G A A T G G A G A T T T A T G T G T C T C T G G G A A T T G T G G G A
 T T G G C A A T A C T G G C T C T G T T G G C T G T G A C A T C T A T T C C A T
 C T G T G A G T G A C T C T T T G A C A T G G A G A G A A T T T C A C T A T A T
 T C A G A G C A A G C T A G G A A T T G T T T C C C T T C T A C T G G G C A C A
 A T A C A C G C A T T G A T T T T T G C C T G G A A T A A G T G G A T A G A T A
 T A A A C A A T T T G T A T G G T A T A C A C C T C C A A C T T T T A T G A T
 A G C T G T T T T C C T T C C A A T T G T T G T C C T G A T A T T T A A A A G C
 A T A C T A T T C C T G C C A T G C T T G A G G A A G A A G A T A C T G A A G A
 T T A G A C A T G G T T G G G A A G A C G T C A C C A A A A T T A A C A A A A C
 T G A G A T A T G T T C C C A G T T G T A G T A A A

10

20

30

40

50

完全挿入タンパク質配列番号 1 2

(T c E - v 1 - P S M A - 2 A - T c E - v 2 - S T E A P 1)

M G Q K E Q I H T L Q K N S E R M S K Q L T R S S Q A V W N L L H E T D S A V
 A T A R R P R W L C A G A L V L A G G F F L L G F L F G W F I K S S N E A T N I
 T P K H N M K A F L D E L K A E N I K K F L Y N F T Q I P H L A G T E Q N F Q L
 A K Q I Q S Q W K E F G L D S V E L A H Y D V L L S Y P N K T H P N Y I S I I N
 E D G N E I F N T S L F E P P P P G Y E N V S D I V P P F S A F S P Q G M P E G
 D L V Y V N Y A R T E D F F K L E R D M K I N C S G K I V I A R Y G K V F R G N
 K V K N A Q L A G A K G V I L Y S D P A D Y F A P G V K S Y P D G W N L P G G G
 V Q R G N I L N L N G A G D P L T P G Y P A N E Y A Y R R G I A E A V G L P S I 10
 P V H P I G Y Y D A Q K L L E K M G G S A P P D S S W R G S L K V P Y N V G P G
 F T G N F S T Q K V K M H I H S T N E V T R I Y N V I G T L R G A V E P D R Y V
 I L G G H R D S W V F G G I D P Q S G A A V V H E I V R S F G T L K K E G W R P
 R R T I L F A S W D A E E F G L L G S T E W A E E N S R L L Q E R G V A Y I N A
 D S S I E G N Y T L R V D C T P L M Y S L V H N L T K E L K S P D E G F E G K S
 L Y E S W T K K S P S P E F S G M P R I S K L G S G N D F E V F F Q R L G I A S
 G R A R Y T K N W E T N K F S G Y P L Y H S V Y E T Y E L V E K F Y D P M F K Y
 H L T V A Q V R G G M V F E L A N S I V L P F D C R D Y A V V L R K Y A D K I Y
 S I S M K H P Q E M K T Y S V S F D S L F S A V K N F T E I A S K F S E R L Q D
 F D K S N P I V L R M M N D Q L M F L E R A F I D P L G L P D R P F Y R H V I Y 20
 A P S S H N K Y A G E S F P G I Y D A L F D I E S K V D P S K A W G E V K R Q I
 Y V A A F T V Q A A A E T L S E V A A P V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P
 G P G Q K E Q I H T L Q K N S E R M S K Q L T R S S Q A V E S R K D I T N Q E E
 L W K M K P R R N L E E D D Y L H K D T G E T S M L K R P V L L H L H Q T A H A
 D E F D C P S E L Q H T Q E L F P Q W H L P I K I A A I I A S L T F L Y T L L R
 E V I H P L A T S H Q Q Y F Y K I P I L V I N K V L P M V S I T L L A L V Y L P
 G V I A A I V Q L H N G T K Y K K F P H W L D K W M L T R K Q F G L L S F F F A
 V L H A I Y S L S Y P M R R S Y R Y K L L N W A Y Q Q V Q Q N K E D A W I E H D
 V W R M E I Y V S L G I V G L A I L A L L A V T S I P S V S D S L T W R E F H Y
 I Q S K L G I V S L L L G T I H A L I F A W N K W I D I K Q F V W Y T P P T F M 30
 I A V F L P I V V L I F K S I L F L P C L R K K I L K I R H G W E D V T K I N K
 T E I C S Q L

【 0 2 6 7 】

実施例 2 組換え A d 2 6 . h P S M A 及び A d 2 6 . h S T E A P 1 の構築

C M V . T e t O プロモーターの制御下において h P S M A 又は h S T E A P 1 をコードする DNA を、 E 1 が欠失した複製不全 A d 2 6 ベクター (E 1 A / E 1 B) へと個別に挿入した。 E 3 領域の一部もまたベクター (E 3) から除去して、導入遺伝子の挿入のための十分なスペースをウイルスゲノムに作成した。ベクター中の T e t O オペロンは、2つの 19 b p テトラサイクリンオペレーター (T e t O) 配列を含有する 54 b p 配列を含む。 C M V . T e t O は、ウイルス増殖中に導入遺伝子発現を阻害するために、
 テトラサイクリンリプレッサー (tetracycline repressor、 T e t R) タンパク質によって抑制可能である。ベクターはまた、 S V 4 0 ポリ A 部位を含有する。 40

【 0 2 6 8 】

A d 2 6 . h P S M A (配列番号 1 4) における h P S M A のポリヌクレオチド配列は、配列番号 1 5 の h P S M A をコードする。

【 0 2 6 9 】

配列番号 1 4

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

C T G G T T T A T C A A G A G C A G C A A C G A G G C C A C C A A T A T C A C A
 C C T A A G C A C A A T A T G A A G G C C T T C C T G G A c G A G C T G A A G G
 C C G A G A A T A T C A A G A A G T T C C T G T A C A A C T T T A C C C A G A T
 C C C A C A C C T G G C C G G C A C A G A G C A G A A C T T T C A G C T G G C C
 A A G C A G A T C C A G A G C C A G T G G A A G G A G T T C G G C C T G G A C T
 C C G T G G A G C T G G C C C A C T A C G A c G T G C T G C T G T C T T A T C C
 A A A T A A G A C C C A C C C C A A C T A T A T C A G C A T C A T C A A C G A G
 G A C G G C A A c G A G A T T T T C A A C A C A T C T C T G T T T G A G C C C C
 C T C C A C C C G G C T A C G A G A A c G T G A G C G A C A T C G T G C C T C C
 A T T C T C T G C C T T T A G C C C A C A G G G A A T G C C T G A G G G C G A T 10
 C T G G T G T A C G T G A A T T A c G C C A G G A C C G A G G A C T T C T T T A
 A G C T G G A G C G C G A T A T G A A G A T C A A C T G T A G C G G C A A G A T
 C G T G A T C G C C C G G T A C G G C A A G G T G T T T A G A G G C A A T A A G
 G T G A A G A A C G C A C A G C T G G C A G G A G C A A A G G G C G T G A T C C
 T G T A C A G C G A C C C C G C C G A T T A T T T C G C C C C T G G C G T G A A
 G T C C T A T C C A G A C G G C T G G A A T C T G C C A G G A G G A G G A G T G
 C A G A G G G G A A A C A T C C T G A A C C T G A A c G G A G C A G G C G A T C
 C T C T G A C C C C A G G C T A C C C C G C C A A C G A G T A C G C C T A T A G
 G A G G G G A A T C G C A G A G G C A G T G G G C C T G C C T T C C A T C C C A
 G T G C A C C C C A T C G G C T A C T A c G A C G C C C A G A A G C T G C T G G 20
 A G A A G A T G G G A G G C T C T G C C C C A C C T G A T T C T A G C T G G A G
 A G G C A G C C T G A A G G T G C C T T A C A A c G T G G G C C C A G G C T T C
 A C C G G C A A C T T T T C C A C A C A G A A G G T G A A G A T G C A C A T C C
 A C T C T A C C A A c G A G G T G A C A A G G A T C T A T A A C G T G A T C G G
 C A C C C T G A G G G G A G C A G T G G A G C C T G A C A G A T A C G T G A T C
 C T G G G A G G A C A C A G G G A C A G C T G G G T G T T T G G A G G A A T C G
 A T C C A C A G T C C G G A G C C G C C G T G G T G C A C G A G A T C G T G C G
 G T C C T T C G G C A C C C T G A A G A A G G A G G G g T G G C G G C C C C G G
 A G A A C A A T C C T G T T T G C C T C T T G G G A c G C C G A G G A G T T C G
 G C C T G C T G G G C T C C A C A G A G T G G G C A G A G G A G A A C A G C C G 30
 G C T G C T C C A G G A G A G G G G A G T G G C C T A C A T C A A c G C C G A C
 T C C T C T A T C G A G G G C A A C T A T A C C C T G C G G G T G G A T T G C A
 C A C C C C T G A T G T A C T C C C T G G T G C A C A A C C T G A C C A A G G A
 G C T G A A G T C T C C T G A C G A G G G C T T C G A G G G C A A G T C T C T G
 T A c G A G A G C T G G A C A A A G A A G T C T C C A A G C C C C G A G T T T A
 G C G G C A T G C C T C G G A T C T C C A A G C T G G G C T C T G G C A A c G A
 T T T C G A G G T G T T C T T T C A G A G A C T G G G A A T C G C A T C C G G C
 A G G G C C C G C T A C A C C A A G A A T T G G G A G A C A A A C A A G T T C T
 C T G G C T A C C C A C T G T A T C A C A G C G T G T A C G A G A C A T A C G A
 G C T G G T G G A G A A G T T C T A C G A C C C C A T G T T T A A G T A T C A C 40
 C T G A C A G T G G C A C A G G T G A G G G G A G G A A T G G T G T T T G A G C
 T G G C C A A T A G C A T C G T G C T G C C A T T C G A C T G T C G G G A T T A
 c G C C G T G G T G C T G A G A A A G T A C G C C G A C A A A A T C T A C T C C
 A T C T C T A T G A A G C A C C C C C A G G A G A T G A A G A C C T A C A G C G
 T G T C C T T C G A T T C C C T G T T T T C T G C C G T G A A G A A C T T C A C
 A G A G A T C G C C A G C A A G T T T T C C G A G C G G C T C C A G G A C T T C
 G A T A A G T C C A A T C C C A T C G T G C T G A G G A T G A T G A A C G A C C
 A G C T G A T G T T C C T G G A G C G C G C C T T T A T C G A C C C T C T G G G
 C C T G C C T G A T C G G C C C T T C T A C A G A C A C G T G A T C T A c G C C
 C C T A G C T C C C A C A A C A A G T A C G C C G G C G A G T C T T T T C C A G 50

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

配列番号 15 (Ad 26 . h P S M A)

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

10
20

【 0 2 7 0 】

Ad 26 . h P S M A における導入遺伝子発現カセットのポリヌクレオチド配列は、配列番号 16 のポリペプチドをコードする配列番号 14 のポリヌクレオチドを含む。

配列番号 16 (完全導入遺伝子発現カセット Ad 26 . h P S M A)

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

30
40
50

T G G A T C T A G A G C C A C C A T G T G G A A C C T G C T G C A C G A G A C A
 G A C A G C G C C G T G G C C A C A G C C C G G C G G C C C A G g T G G C T G T
 G C G C A G G C G C C C T G G T G C T G G C A G G A G G C T T C T T T C T G C T
 G G G C T T C C T G T T T G G C T G G T T T A T C A A G A G C A G C A A C G A G
 G C C A C C A A T A T C A C A C C T A A G C A C A A T A T G A A G G C C T T C C
 T G G A c G A G C T G A A G G C C G A G A A T A T C A A G A A G T T C C T G T A
 C A A C T T T A C C C A G A T C C C A C A C C T G G C C G G C A C A G A G C A G
 A A C T T T C A G C T G G C C A A G C A G A T C C A G A G C C A G T G G A A G G
 A G T T C G G C C T G G A C T C C G T G G A G C T G G C C C A C T A C G A c G T
 G C T G C T G T C T T A T C C A A A T A A G A C C C A C C C C A A C T A T A T C 10
 A G C A T C A T C A A C G A G G A C G G C A A c G A G A T T T T C A A C A C A T
 C T C T G T T T G A G C C C C C T C C A C C C G G C T A C G A G A A c G T G A G
 C G A C A T C G T G C C T C C A T T C T C T G C C T T T A G C C C A C A G G G A
 A T G C C T G A G G G C G A T C T G G T G T A C G T G A A T T A c G C C A G G A
 C C G A G G A C T T C T T T A A G C T G G A G C G C G A T A T G A A G A T C A A
 C T G T A G C G G C A A G A T C G T G A T C G C C C G G T A C G G C A A G G T G
 T T T A G A G G C A A T A A G G T G A A G A A C G C A C A G C T G G C A G G A G
 C A A A G G G C G T G A T C C T G T A C A G C G A C C C C G C C G A T T A T T T
 C G C C C C T G G C G T G A A G T C C T A T C C A G A C G G C T G G A A T C T G
 C C A G G A G G A G G A G T G C A G A G G G G A A A C A T C C T G A A C C T G A 20
 A c G G A G C A G G C G A T C C T C T G A C C C C A G G C T A C C C C G C C A A
 C G A G T A C G C C T A T A G G A G G G G A A T C G C A G A G G C A G T G G G C
 C T G C C T T C C A T C C C A G T G C A C C C C A T C G G C T A C T A c G A C G
 C C C A G A A G C T G C T G G A G A A G A T G G G A G G C T C T G C C C C A C C
 T G A T T C T A G C T G G A G A G G C A G C C T G A A G G T G C C T T A C A A c
 G T G G G C C C A G G C T T C A C C G G C A A C T T T T C C A C A C A G A A G G
 T G A A G A T G C A C A T C C A C T C T A C C A A c G A G G T G A C A A G G A T
 C T A T A A C G T G A T C G G C A C C C T G A G G G G A G C A G T G G A G C C T
 G A C A G A T A C G T G A T C C T G G G A G G A C A C A G G G A C A G C T G G G
 T G T T T G G A G G A A T C G A T C C A C A G T C C G G A G C C G C C G T G G T 30
 G C A C G A G A T C G T G C G G T C C T T C G G C A C C C T G A A G A A G G A G
 G G g T G G C G G C C C C G G A G A A C A A T C C T G T T T G C C T C T T G G G
 A c G C C G A G G A G T T C G G C C T G C T G G G C T C C A C A G A G T G G G C
 A G A G G A G A A C A G C C G G C T G C T C C A G G A G A G G G G A G T G G C C
 T A C A T C A A c G C C G A C T C C T C T A T C G A G G G C A A C T A T A C C C
 T G C G G G T G G A T T G C A C A C C C C T G A T G T A C T C C C T G G T G C A
 C A A C C T G A C C A A G G A G C T G A A G T C T C C T G A C G A G G G C T T C
 G A G G G C A A G T C T C T G T A c G A G A G C T G G A C A A A G A A G T C T C
 C A A G C C C C G A G T T T A G C G G C A T G C C T C G G A T C T C C A A G C T
 G G G C T C T G G C A A c G A T T T C G A G G T G T T C T T T C A G A G A C T G 40
 G G A A T C G C A T C C G G C A G G G C C C G C T A C A C C A A G A A T T G G G
 A G A C A A A C A A G T T C T C T G G C T A C C C A C T G T A T C A C A G C G T
 G T A C G A G A C A T A C G A G C T G G T G G A G A A G T T C T A C G A C C C C
 A T G T T T A A G T A T C A C C T G A C A G T G G C A C A G G T G A G G G G A G
 G A A T G G T G T T T G A G C T G G C C A A T A G C A T C G T G C T G C C A T T
 C G A C T G T C G G G A T T A c G C C G T G G T G C T G A G A A A G T A C G C C
 G A C A A A A T C T A C T C C A T C T C T A T G A A G C A C C C C C A G G A G A
 T G A A G A C C T A C A G C G T G T C C T T C G A T T C C C T G T T T T C T G C
 C G T G A A G A A C T T C A C A G A G A T C G C C A G C A A G T T T T C C G A G
 C G G C T C C A G G A C T T C G A T A A G T C C A A T C C C A T C G T G C T G A 50

GGATGATGAACGACCAGCTGATGTTCTCTGGAGCGCGCCTT
TATCGACCCTCTGGGCCCTGCCTGATCGGCCCTTCTACAGA
CACGTGATCTA cGCCCTAGCTCCCACAACAAGTACGCCG
GCGAGTCTTTTCCAGGCATCTA cGACGCCCTGTTTCGATA
CGAGAGCAAGGTGGACCCTCCAAGGCCCTGGGGAGAGGTG
AAGAGACA AATCTACGTGGCAGCCTTCAACCGTGCAGGCTG
CAGCCGAGACA CTGTCCGAGGTGGCC t g a T A A G G T A C C A T
CCGA ACTTGT T T A T T G C A G C T T A T A A T G G T T A C A A A T A A A
GCAATAGCATCACA A A T T T C A C A A A T A A A G C A T T T T T T T C
ACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTA 10
TCTTATCATGTCT

【0271】

Ad26 . hSTEAP1 (配列番号17)におけるhSTEAP1のポリヌクレオチド配列は配列番号18のhSTEAP1をコードする

Ad26 . hSTEAP1における配列番号17 hSTEAP1

ATGGAGTCTCGGAAGGACATCAACCAACCAGGAGGAGGAGCTG
TGGAAAGATGAAGCCACGGAGAAATCTGGAGGAGGACGATT
ACCTGCACAAGGATACCGGCGAGACATCCATGCTGAAGCG
GCCCGTGTGTGTGCACCTGTGCAC CAGACC G C A C A C A G G A G C
GAGTTTGATTGCCCTCTGTAGCTGCAACACACACAGGAGC 20
TGTTC C C A C A G T G G C A C C T G C C C A T C A A G A T C G C C G C C A T
CATCGCCAGCCTGACCTTTCTGTATACACTGCTGAGAGAA
GTGATCCACCCTCTGGCCACCCTCCCACCAGCAGTACTTCT
ATAAGATCCCTATCCTGGTCA T C A A C A A G G T G C T G C C A A T
GGTGAGCATCACACTGTGTGGCCCTGGTGTACCTGCTGGC
GTGATCGCCGCCATCGTGTGAGCTGCACA A c G G C A C C A A G T
ATAAGAAGTTTCCACACTGGCTGGACAAGTGGATGCTGAC
ACGCAAGCAGTTCCGGCCCTGTGTCTTTCTTTTTCGCCCGTG
CTGCACGCCATCTACAGCCTGTCTTATCCCATGAGGCGCA
GCTACAGGTATAAGCTGTGAACTGGGCCCTACCAGCAGGT 30
GACAGCAATAAAGGAGGACGCCCTGGATCGAGCACGACGTG
TGGCGCATGGA A A T C T A C G T G A G C C T G G G A A T C G T G G G C C
TGGCAATCCTGGCCCTGTGTGGCAGTGACCCTCTATCCCTTC
TGTGAGCGACTCCCTGAC c T G G C G G G A G T T T C A C T A C A T C
CAGTCTAAGCTGGGCATCGTGTGAGCCTGCTGCTGGGCACCA
TCCACGCCCTGATCTTTGCTGTGGAACAAGTGGATCGATAT
CAAGCAGTTCGTGTGGTATA C C C C C C C A C C T T C A T G A T C
GCCGTGTTCTGTGCCATCGTGGTGTGATCTTTAAGAGCA
TCCTGTTCTGTCTTGTCTGTGGAGG A c G T G A C C A A G A T C A A T A A G A C A
GAGATTTGCAGCCAATTG 40

配列番号18 (開始Metが存在)

MESRKDITNQEE L W K M K P R R N L E E D D Y L H K D T G E T S M L K
RPVLLHLHQTAHADEFDCPSELQHTQELFPQWHLPIKIAA
IIASLTFLYTLREVIHPLATSHQQYFYKIPILVINKVLP
MVSITLLALVYLPVIAAIVQLHNGTKYKKFPHWLDKWML
TRKQFGLLSFFFAVLHAIYSLSYPMRRSYRYKLLNWAYQQ
VQQNKEDAWIEHDVWRMEIYVSLGIVGLAILALLAVTSIP
SVSDSLTWREFHYIQSKLGI V S L L L G T I H A L I F A W N K W I D
IKQFVWYTPPTFMIAVFLPIVVLI F K S I L F L P C L R K K I L K 50

IRHGWEDVTKINKTEICSQL

【0272】

Ad26.hSTEAP1における導入遺伝子発現カセットのポリヌクレオチド配列は、配列番号18のポリペプチドをコードする配列番号19のポリヌクレオチドを含む。

配列番号19

TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTATTTCATTGGTTATAAT
AGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTTG
TATCCATATCATAAATATGTACATTTATAATTGGCTCATGTTC
CAACATTACCGCCATGTTGACATTTGATTAATTGACTAGTTTA
TTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTTCATAGCCCA 10
TATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTA AATGGCC
CGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTC
AATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACT
TTCATTGACGTC AATGGGTGGAGTATTTACGGTA AACTG
CCCACCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTAC
GCCCCCTATTGACGTC AATGACGGTA AATGGCCCGCCTGG
CATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTT
GGCAGTACATCTACGTATTAGTTCATCGCTATTACCATGGT
GATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGG
TTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACG 20
TCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCA AATCAACGGGACTT
TCCA A AATGTCGTAACA ACTCCGCCCATTTGACGCA AATG
GGCGGTAGGC GTGTACGGTGGGAGGTCTATAAAGCAGAG
CTCTCCCTATCAGTGTATAGAGATCTCCCTATCAGTGTATAG
AGATCGTCGACGAGCTCGTTTTAGTGAACC GTTCAGATCGCC
TGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGAC
ACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGC CGGGAACGGTGCAT
TGGAGGATCCGCCACCATGGAGTCTCGGAAGGACATCACCC
AACCAAGGAGGAGGCTGTGGAAGATGAAGCCACGGAGAAATC
TGGAGGAGGACGATTA CCTGCACAAGGATACC GGCGAGAC 30
ATCCATGCTGAAGCGGCCCGTGTGCTGCTGCACCTGCACCAAG
ACCGCACACGCCGACGAGTTTTGATTTGCCCTCTGAGCTGC
AACACACACAGGAGCTGTTCCACAGTGGCACCTGCCCCAT
CAAGATCGCCGCCATCATCGCCAGCCTGACCTTTCTGTAT
ACACTGCTGAGAGAAAGTGTATCCACCCTCTGGCCACCCTCCC
ACCAGCAGTACTTCTATAAGATCCCTATCTCTGGTCAATCAA
CAAGGTGCTGCCAATGGTGTAGCATCACACTGCTGGCCCTG
GTGTACCTG CCTGGCGTGTATCGCCGCCATCGTGCAGCTGC
ACAAAGGACCAAGTATAAGAAAGTTTTCCACACTGGCTGGA
CAAGTGGATGCTGACACGCAAGCAGTTCCGGCCTGCTGTCT 40
TTCTTTTTTCGCCGTGTGCTGCACGCCATCTACAGCCTGTCTT
ATCCCATGAGGCGCAGCTACAGGTATAAGCTGTGTGA ACTG
GGCCTACCAAGCAGGTGCAGCAGAAATAAGGAGGACGCCCTGG
ATCGAGCACGACGTGTGGCGCATGGAAATCTACGTGAGCC
TGGGAATCGTGGGCCTGGCAATCTGGCCCTGCTGGCAGT
GACCTCTATCCCTTCTGTGAGCGACTCCCTGACCTGGCGG
GAGTTTTCACTACATCCAGTCTAAGCTGGGCATCGTGTAGCC
TGCTGCTGGGCACCATCCACGCCCTGATCTTTGCTGTGAA
CAAGTGGATCGATATCAAGCAGTTCTGTGTGGTATACCCCC
CCCACCTTCAATGATCGCCGTGTCTCTGCCCATCGTGGTGC 50

10
20
30
40
50

T G A T C T T T A A G A G C A T C C T G T T C C T G C C T T G C C T G C G G A A
 G A A G A T C C T G A A G A T C A G A C A C G G C T G G G A G G A c G T G A C C
 A A G A T C A A T A A G A C A G A G A T T T G C A G C C A A T T G t g a T A A C
 T C G A G A T C C G A A C T T G T T T A T T G C A G C T T A T A A T G G T T A C
 A A A T A A A G C A A T A G C A T C A C A A A T T T C A C A A A T A A A G C A T
 T T T T T T C A C T G C A T T C T A G T T G T G G T T T G T C C A A A C T C A T
 C A A T G T A T C T T A T C A T G T C T

配列番号 20 (CMV TetOプロモーター)

T C A A T A T T G G C C A T T A G C C A T A T T A T T C A T T G G T T A T A T
 A G C A T A A A T C A A T A T T G G C T A T T G G C C A T T G C A T A C G T T G 10
 T A T C C A T A T C A T A A T A T G T A C A T T T A T A T T G G C T C A T G T C
 C A A C A T T A C C G C C A T G T T G A C A T T G A T T A T T G A C T A G T T A
 T T A A T A G T A A T C A A T T A C G G G G T C A T T A G T T C A T A G C C C A
 T A T A T G G A G T T C C G C G T T A C A T A A C T T A C G G T A A A T G G C C
 C G C C T G G C T G A C C G C C C A A C G A C C C C G C C C A T T G A C G T C
 A A T A A T G A C G T A T G T T C C C A T A G T A A C G C C A A T A G G G A C T
 T T C C A T T G A C G T C A A T G G G T G G A G T A T T T A C G G T A A A C T G
 C C C A C T T G G C A G T A C A T C A A G T G T A T C A T A T G C C A A G T A C
 G C C C C C T A T T G A C G T C A A T G A C G G T A A A T G G C C C G C C T G G
 C A T T A T G C C C A G T A C A T G A C C T T A T G G G A C T T T C C T A C T T 20
 G G C A G T A C A T C T A C G T A T T A G T C A T C G C T A T T A C C A T G G T
 G A T G C G G T T T T G G C A G T A C A T C A A T G G G C G T G G A T A G C G G
 T T T G A C T C A C G G G G A T T T C C A A G T C T C C A C C C C A T T G A C G
 T C A A T G G G A G T T T G T T T T G G C A C C A A A A T C A A C G G G A C T T
 T C C A A A A T G T C G T A A C A A C T C C G C C C C A T T G A C G C A A A T G
 G G C G G T A G G C G T G T A C G G T G G G A G G T C T A T A T A A G C A G A G
 C T C T C C C T A T C A G T G A T A G A G A T C T C C C T A T C A G T G A T A G
 A G A T C G T C G A C G A G C T C G T T T A G T G A A C C G T C A G A T C G C C
 T G G A G A C G C C A T C C A C G C T G T T T T G A C C T C C A T A G A A G A C
 A C C G G G A C C G A T C C A G C C T C C G C G G C C G G G A A C G G T G C A T 30
 T G G A

配列番号 21 SV40pA

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

【0273】

Ad26.PSMA及びAd26.STEAP1ベクターを、標準的な操作手順を用い
 て懸濁PER.C6 TetR(sPER.C6 TetR)細胞上で作製した。ヨザル
 ヘルペスウイルス1主要前初期プロモーター(AoHV-1プロモーター)の制御下にお
 いてTetRを発現するPER.C6 TetR細胞を、国際公開第2018/1462
 05号に記載されているように、プラスミドpC_AoHV_TetRによるPER.C
 6細胞の安定なトランスフェクションによって作製した。preMV生成のために、製造
 業者(Life Technologies)によって提供された説明書に従ってLip
 ofectamineを用いて、PER.C6 TetR細胞をpAd26.PSMA又
 はpAd26.STEAP1単一ゲノムプラスミドでトランスフェクトした。2回の溶菌
 斑精製及び増幅ラウンドを実施し、溶菌斑を単離し、選択し、sPER.C6 TetR
 細胞に感染させるために使用した。2回目の溶菌斑精製及び増幅ラウンドの後、ウイルス
 ストックを生成のために増殖させた。2段階塩化セシウム遠心分離精製法を用いてウイル
 スを精製した。最後に、ウイルスを-85でアリコートに保存した。

10

20

30

40

50

【0274】

実施例3 Ad26・hPSMA及びAd26・hSTEAP1はインビトロでT細胞応答を誘導する

材料及び方法

ドナーCD1c+樹状細胞(Dendritic Cell、DC)を解凍し、完全培地(5%ブールヒト血清及び1%Pen/Strepを含有するIMDM; Invitrogen)+GM-CSF(80ng/mL; Peprotech)及びIL-4(80ng/mL; Peprotech)に再懸濁し、次いで、1ウェル当たり 5×10^4 細胞で播種した。37°Cで一晩静置した後、DCに、Ad26・PSMA又はAd26・STEAP1のいずれかの75,000個のウイルス粒子を、更に24時間37°Cで形質導入した。細胞を培地で洗浄し、次いで、 5×10^5 個の自己ドナーT細胞を、IL-2(100u/mL; R&D systems)及びIL-15(10ng/mL; Peprotech)を含有する培地中のDCに加えた。培地交換を13日目まで2日ごとに行った。13日目に、T細胞を、タンパク質輸送阻害剤カクテル(ebioscience)を含有する $1 \mu\text{g/mL}$ のhSTEAP1又はhPSMAペプチドプール(JPT Peptide Technologies)で16時間再刺激した。細胞を洗浄し、CD3、CD4、CD8、CD137、TNF、IFN、及びIL-2(Biolegend)を含有する表現型及び細胞内サイトカインパネルを用いた細胞内サイトカイン染色(ICSS)分析のために染色した。染色した細胞をLSR Fortessa II(BD Biosciences)で分析した。

10

20

【0275】

結果

Ad26・hPSMA及びAd26・hSTEAP1がそれらの挿入(hPSMA及びhSTEAP1)に対するT細胞応答を誘導する能力を、インビトロで評価した。正常ヒトドナーCD1c+樹状細胞にAd26・hPSMA又はAd26・hSTEAP1のいずれかを形質導入し、ベクター由来抗原を提示して、自己ドナーCD8⁺及びCD4⁺T細胞を初回免疫する能力を評価した。形質導入された樹状細胞を自己T細胞と12日間組み合わせた後、hPSMA又はhSTEAP1の重複ペプチドプールを用いて抗原特異的T細胞応答をアッセイした。抗原特異的T細胞応答は、エフェクターサイトカインTNF、IFN、及びIL-2の細胞内サイトカイン生成によって評価された。陽性T細胞リコール応答は、二重陽性サイトカイン生成ゲートに少なくとも0.05%の細胞があり、かつ平均空ベクター対照よりも少なくとも3倍増加しているものであると決定された。12人のスクリーニングされた正常な男性ドナーのうち10人が、hPSMA又はhSTEAP1のいずれかに対する陽性T細胞応答を生じた。図1及び図2は、Ad26・hSTEAP1(図1)又はAd26・hSTEAP1(図2)のいずれかで形質導入されたAPCによる抗原初回免疫から12日後の抗原特異的CD8⁺及びCD4⁺T細胞リコール応答を示す、単一ドナーからのICSS(TNF、IFN、及びIL-2)の代表的なフローサイトメトリプロットを示す。ゲート中の数字は、それぞれのサイトカインについて陽性に染色する総CD8⁺又はCD4⁺T細胞の割合を示す。表示されたデータに適用可能な統計分析は実施されなかった。表1は、12人の正常な男性ドナーの各々について、hSTEAP1又はhPSMAに特異的なCD8⁺及びCD4⁺T細胞応答を示す。陽性応答については、平均空ベクター対照の倍数が示される。重要なことに、これらのアッセイは、Ad26・hPSMA及びAd26・hSTEAP1ワクチンベクターによってhPSMA及びhSTEAP1に対して初回免疫され得る前駆体T細胞を、ヒトドナーが含有することを実証した。

30

40

【0276】

50

【表 2】

表 1.

ドナー	STEAP1		PSMA	
	CD8	CD4	CD8	CD4
1	29.5x	7.2x	4.6x	30.3x
2	3.8x	21.1x	—	1886x
3	3.2x	—	4.7x	—
4	694x	—	24.4x	24.5x
5	5.7x	—	—	—
6	42.4x	—	—	—
7	—	23x	—	—
8	—	8.8x	—	—
9	—	—	17.9x	22.3x
10	—	—	154.6x	—
11	—	—	—	—
12	—	—	—	—

「—」は陽性応答なしを示す

10

【0277】

実施例 4. Ad26.hPSMA 及び Ad26.hSTEAP1 はマウスにおける免疫応答を誘導する

材料及び方法

免疫化スケジュール。0日目に、6匹のマウスの群を 10^9 又は 10^{10} vp の Ad26.hPSMA 又は Ad26.STEAP1 で免疫化した。10匹のマウスの対照群には、導入遺伝子を発現しない Ad26ベクター（「空」）を与えた。免疫化から2週間後、動物を殺し、IFN ELISpot 又は ICS による hPSMA 又は hSTEAP-1 特異的サイトカイン生成細胞の誘導について、脾細胞を分析した。脾細胞を hPSMA 特異的又は hSTEAP-1 特異的ペプチドプールで一晩刺激した。ELISpot アッセイのために、 10^6 個の脾細胞当たりの IFN スポット形成単位 (SFU) の数を決定した。群当たりの幾何平均応答を、横線で示す。点線は、非刺激脾細胞で観察された SFU の 95% パーセンタイルとして定義される、アッセイのバックグラウンドを示す。ボンフェローニ補正によるウィルコクソン順位和検定を用いた統計分析のために、 18.5 SFU / 10^6 細胞未満の値をこのカットオフに設定した。サイトカイン分泌細胞を、ICS 及び FACS 分析によって CD4 又は CD8⁺ ゲート CD3⁺ 細胞において測定した；点線は、非刺激脾細胞における平均応答 + 3 × 標準偏差として定義されるアッセイのバックグラウンドを示し、各サイトカイン生成細胞集団について計算され、この値未満の値をこのカットオフに設定した。

20

30

【0278】

結果

筋肉内免疫化後の C57BL/6 マウスにおいてベクターコード抗原に対する細胞性免疫応答を誘導する、実施例 2 で作製した Ad26.hPSMA 又は Ad26.hSTEAP1 の能力を評価した。Ad26.hPSMA 及び Ad26.hSTEAP1 を、 10^9 個のウイルス粒子 (vp) 又は 10^{10} 個の vp の 2 つの用量で試験し、対照マウスは、導入遺伝子を封入しない 10^{10} 個の Ad26ベクター (Ad26-空) を受けた。それぞれの抗原に対する免疫応答を、酵素結合免疫スポットアッセイ (enzyme-linked immunospot assay、ELISpot) 又は細胞内サイトカイン染色 (ICS) などの公知の免疫学的アッセイを用いて測定した。

40

【0279】

免疫化の2週間後に動物を殺し、脾細胞を単離した。以下に記載されるように、異なる免疫パラメータを評価した。

【0280】

ベクターにコードされた抗原に対する細胞性免疫応答を、hPSMA 又は hSTEAP

50

- 1 特異的 I F N E L I S P O T アッセイ又は I C S によって評価した。この目的のために、脾細胞を、h P S M A 又は h S T E A P 1 野生型抗原にまたがる 1 5 m e r の重複ペプチドで一晩刺激した。I F N 分泌細胞の相対数を測定することにより、抗原特異的免疫応答を決定した。I F N E L I S p o t 結果は、A d 6 . h P S M A によって誘導された細胞性免疫応答が、試験した両方の投与量で A d 2 6 - 空によって誘導されたものよりも有意に高かったことを示した。同様に、h S T E A P 1 応答は、試験した両方の投与量で A d 2 6 - 空ベクターによって誘導されたものよりも高かった。A d 2 6 . h S T E A P 1 では明確な用量応答が見られたが (図 4)、 10^9 v p 又は 10^{10} v p の A d 2 6 . h P S M A によって誘導される応答の大きさにはわずかな差があった (図 4)。予想通り、これらの抗原を欠くアデノベクターに対して h P S M A 又は h S T E A P 1 特異的応答は検出されなかった。I C S の結果は、主に I F N 生成 C D 8 + T 細胞が誘導されたが、T N F のレベルは全体的に低く、サイトカインを生成する C D 4 + 特異的細胞の検出可能な誘導はなかったことを示した。図 3 は、h P S M A ペプチドプールで一晩刺激した後、示されたように、A d 2 6 . h P S M A 1、A d . 2 6 . S T E A P 1、又は空ベクター (A d 2 6 - 空) の 10^9 個又は 10^{10} 個のウイルス粒子 (v p) で免疫化したマウスから単離した脾細胞からの 10^6 個の脾細胞当たりの、I F N スポット形成単位 (S F U) の数の対数を示す。群当たりの幾何平均応答を、横線で示す。点線は、非刺激脾細胞で観察された S F U の 9 5 % パーセントイルとして定義される、アッセイのバックグラウンドを示す。I F N は E L I S p o t を用いて測定した。図 4 は、h S T E A P 1 ペプチドプールで一晩刺激した後、示されたように、A d 2 6 . h P S M A 1、A d . 2 6 . S T E A P 1、又は空ベクター (A d 2 6 - 空) の 10^9 個又は 10^{10} 個のウイルス粒子 (v p) で免疫化したマウスから単離した脾細胞からの 10^6 個の脾細胞当たりの、I F N スポット形成単位 (S F U) の数の対数を示す。群当たりの幾何平均応答を、横線で示す。点線は、非刺激脾細胞で観察された S F U の 9 5 % パーセントイルとして定義される、アッセイのバックグラウンドを示す。I F N は E L I S p o t を用いて測定した。図 5 は、h P S M A ペプチドプールで一晩刺激した後、示されたように、A d 2 6 . h P S M A 又は空ベクター (A d 2 6 - 空) の 10^9 個又は 10^{10} 個のウイルス粒子 (v p) で免疫化したマウスから単離した I F N (C D 3 + C D 8 + I F N + 細胞) を生成する C D 8 + 脾細胞の割合 (%) を示す。群当たりの幾何平均応答を、横線で示す。点線はバックグラウンド染色の平均 + 3 x 標準偏差として定義されるアッセイのバックグラウンドを示し、この値を下回る値をこのカットオフに設定した。I F N は細胞内サイトカイン染色 (I C S) を用いて測定した。図 6 は、h S T E A P 1 ペプチドプールで一晩刺激した後、示されたように、A d 2 6 . h S T E A P 1 又は空ベクター (A d 2 6 - 空) の 10^9 個又は 10^{10} 個のウイルス粒子 (v p) で免疫化したマウスから単離した I F N (C D 3 + C D 8 + I F N + 細胞) を生成する C D 8 + 脾細胞の割合 (%) を示す。群当たりの幾何平均応答を、横線で示す。点線はバックグラウンド染色の平均 + 3 x 標準偏差として定義されるアッセイのバックグラウンドを示し、この値を下回る値をこのカットオフに設定した。I F N は細胞内サイトカイン染色 (I C S) を用いて測定した。

【 0 2 8 1 】

全体として、A d 2 6 . h P S M A 及び A d 2 6 . h S T E A P 1 によって誘導される細胞免疫応答は、マウスにおけるこれらの構築物の強力な免疫原性を明確に示した。

【 0 2 8 2 】

実施例 5 . A d 2 6 . h P S M A 又は A d 2 6 . h S T E A P 1 の同時注射は、単一注射ワクチンと比較して、細胞性免疫応答の大きさにわずかな影響を及ぼす

材料及び方法

0 日目に、マウス (群当たり $n = 9$) を、 10^8 若しくは 10^9 v p の A d 2 6 . h P S M A 単独、又は 10^{10} v p の A d 2 6 . h S T E A P 1 と組み合わせて免疫化した。免疫化から 2 週間後、動物を殺し、I F N E L I S p o t による h P S M A 又は h S T E A P 1 特異的サイトカイン生成細胞の誘導について、脾細胞を分析した。

【0283】

脾細胞をhPSMA特異的又はhSTEAP1特異的ペプチドプールで一晩刺激した。10⁶個の脾細胞当たりのIFN γ SFUの数を、ELISPOTで決定した。群ごとの幾何平均応答を測定した。アッセイのバックグラウンドは、非刺激脾細胞で観察されたSFUの95%パーセンタイルとして定義された。17.9 SFU / 10⁶細胞未満の値をこのカットオフに設定した。同時注射（同時投与）対ベッドサイド混合の間の差異を試験するために、ANOVA分析を行った。事前に指定された0.5 log₁₀のマージンを用いて、単一注射ベクター（10⁹ VP Ad26 . hPSMA又は10¹⁰ Ad26 . hSTEAP1）対同時投与又はベッドサイド混合を比較して、非劣性分析を行った。

10

【0284】

結果

Ad26 . hPSMA及びAd26 . hSTEAP1をマウスへ同時注射して、ワクチン誘導免疫原性に対するそれらの同時影響を評価した。この実験では、ベクターを、筋肉内免疫化後のマウスにおいてベクターにコードされた抗原に対する、細胞性免疫応答を誘導する能力について評価した。Ad26 . hPSMAベクターを10⁸ vp又は10⁹ vpの2つの用量で試験し、一方でAd26 . hSTEAP1を10¹⁰ vpで試験した。それぞれの抗原に対する免疫応答を、酵素結合免疫スポットアッセイ（ELISPOT）を用いて測定した。

【0285】

同時投与については、マウスに一方の脚にAd26 . hPSMA（10⁹ vp）及び他方の脚にAd26 . hSTEAP1（10¹⁰ vp）を投与し、ベッドサイド混合では、Ad26 . hPSMA（10⁹ vp）及びAd26 . hSTEAP1（10¹⁰ vp）を注射前に混合し、一方の脚に注射した（ベッドサイド混合）。免疫化の2週間後に動物を殺し、脾細胞を単離した。

20

【0286】

脾細胞を、hPSMA又はhSTEAP1野生型抗原にまたがる15merの重複ペプチドで一晩刺激した。IFN γ 分泌細胞の相対数を測定することにより、抗原特異的免疫応答を決定した。IFN γ ELISPOT結果は、同時投与又はベッドサイド混合のいずれかとしてAd26 . hPSMA及びAd26 . hSTEAP1の両方を注射することによって誘導されたhPSMA特異的細胞性免疫応答が、Ad26 . PSMAのみによって誘導された応答よりも劣っていないことを示した。更に、同時投与又はベッドサイド混合によって誘導された応答の大きさに有意差はなかった。同様に、hSTEAP1応答については、同時投与とベッドサイド混合とを比較した場合、誘導された免疫応答の大きさに有意差はなかった。同時投与によって誘導されたhSTEAP1免疫応答は、Ad26 . hSTEAP1単独によって誘導されたものよりも劣っていなかったが、対照的に、Ad26 . hSTEAP1単独によって誘導された免疫応答と比較して、ベッドサイドでの混合については非劣性を示すことができなかった。

30

【0287】

図7は、hPSMAペプチドプールで一晩刺激された後、示されたように、Ad26 . hPSMA1、Ad . 26 . STEAP1、別々の脚に各々注射されたAd26 . hPSMA1及びAd . 26 . STEAP1、（同時投与）又は注射前に混合されたAd26 . hPSMA1及びAd . 26 . STEAP1により免疫化され、一方の脚に注射された（ベッドサイド混合）マウスから単離された脾細胞からの、10⁶個の脾細胞当たりのIFN γ スポット形成単位（SFU）の数の対数を示す。群当たりの幾何平均応答を、横線で示す。点線は、非刺激脾細胞で観察されたSFUの95%パーセンタイルとして定義される、アッセイのバックグラウンドを示す。IFN γ はELISPOTを用いて測定した。同時投与群とベッドサイド混合群との間に統計的に有意な差は観察されなかった。図8は、ベッドサイド混合及び同時投与によって誘導されたhPSMA特異的免疫応答が、Ad26 . hPSMAによって誘導されたものよりも劣っていなかったことを実証する非劣性

40

50

分析を示す。図9は、hSTEAP1ペプチドプールで一晩刺激された後、示されたように、Ad26.hPSMA1、Ad.26.STEAP1、別々の脚に各々注射されたAd26.hPSMA1及びAd.26.STEAP1、(同時投与)又は注射前に混合されたAd26.hPSMA1及びAd.26.STEAP1により免疫化され、一方の脚に注射された(ベッドサイド混合)マウスから単離された脾細胞からの、 10^6 個の脾細胞当たりのIFNスポット形成単位(SFU)の数の対数を示す。群当たりの幾何平均応答を、横線で示す。点線は、非刺激脾細胞で観察されたSFUの95パーセントイルとして定義される、アッセイのバックグラウンドを示す。IFNはELISpotを用いて測定した。同時投与群とベッドサイド混合群との間に統計的に有意な差は観察されなかった。図10は、ベッドサイド混合によるhSTEAP1特異的免疫応答がAd26.hSTEAP1によって誘導される免疫応答より劣っていなかったことを実証する非劣性分析を示すが、一方で非劣性は、Ad26.hSTEAP1と比較したベッドサイド混合については示されなかった。

10

【0288】

全体として、Ad26.hPSMA及びAd26.hSTEAP-1の同時注射によって誘導された細胞性免疫応答は、応答の全体的な大きさにわずかな影響を及ぼした。

【0289】

実施例6. Ad26.hPSMAはインビボでCT26-PSMA腫瘍の腫瘍増殖を遅延させる

材料及び方法

hPSMAを発現するマウスCT26結腸直腸がん細胞株(CT26-PSMA細胞)を、EF1aプロモーター(Genecopoeia)によって駆動される完全長hPSMA配列(GenBank:M99487.1)をコードするレンチウイルスにより、CT26細胞を形質導入することによって作製した。形質導入された細胞を単一細胞クローン化し、クローン集団を、CT26親細胞株と比較した、hPSMA(Biolegend)を検出する抗体を用いるフローサイトメトリによってスクリーニングした。低レベルのhPSMAを発現する細胞のクローン集団を選択し、Balb/cマウスに 5×10^5 個の細胞を移植し、腫瘍増殖を経時的に追跡することによって、増殖速度論をCT26親細胞株と比較した。

20

【0290】

腫瘍増殖を制御することができた効果的なT細胞応答の誘導におけるAd26.hPSMA構築物の有効性を試験するために、マウスの側腹部に 5×10^5 個のCT26-PSMA細胞を皮下移植し、次いで、移植後14日目に、 10^{10} vp Ad26-空ベクター、 10^{10} vp Ad26-空ベクター+抗CTLA-4抗体(5mg/kg)、 10^{10} vp Ad26.hPSMA、及び 10^{10} vp Ad26.hPSMA+抗CTLA-4抗体(5mg/kg)のいずれかで処置し、次いで、腫瘍増殖を経時的に測定した。処置後10日目に、PBMCを単離し、抗原特異的リコール応答を、重複するペプチドプールを有する細胞をhPSMA(JPT Peptide Technologies)に対して5時間刺激し、次いで、IFN細胞内サイトカイン産生をフローサイトメトリによって評価することによって評価した。

30

40

【0291】

結果

Ad26.hPSMAによって作製される免疫応答の質を評価するために、ワクチン標的PSMAを発現する同系マウス腫瘍モデルを設計した。CT26同系腫瘍モデルは、免疫腫瘍剤を研究するために一般的に採用される、容易に測定される皮下腫瘍であるので使用した。CT26細胞に、hPSMAをコードするレンチウイルスを形質導入し、均一なhPSMA発現を確実にするために単一細胞クローンを単離した。図11は、hPSMAを形質導入された選択されたクローン増殖CT26腫瘍細胞上のhPSMA発現を測定するフローサイトメトリを示す。インビボでのCT26-PSMA細胞の腫瘍増殖速度論を親CT26細胞と比較して、hPSMAの添加が腫瘍増殖を変化させなかったことを確認

50

した（図12）。

【0292】

CT26 - PSM A腫瘍モデルを用いて、Ad26 . hPSMA処置によって作製されたT細胞応答が腫瘍増殖の制御を助ける能力を、単剤として、又は免疫チェックポイント遮断抗CTLA - 4抗体と組み合わせて評価した。図13に示すように、Ad26 . 空ベクター対照又はAd26 . 空ベクターを抗CTLA - 4抗体と組み合わせた治療と比較して、Ad26 . hPSMAで治療したマウスは腫瘍増殖の遅延を示し、Ad26 . hPSMAと抗CTLA - 4抗体との組み合わせは腫瘍制御を更に強化した。抗原特異的CD8⁺T細胞応答もまた、hPSMAに対する重複ペプチドプールを用いたペプチド再刺激によって、薬剤の各々により処置したマウスの血液中で評価した。再刺激応答は、Ad26 . hPSMAで処置したマウスにおいてhPSMA特異的T細胞が首尾よく検出されたことを示し、Ad26 . hPSMAと抗CTLA - 4抗体との組み合わせは、いずれかの単剤単独よりも有意に高かった最高レベルの抗原特異的CD8⁺T細胞を示した。図14は、示された処置後の全CD8⁺T細胞のIFN γ + CD8⁺T細胞の割合（%）を示す。

【0293】

実施例7 . Ad26 . hPSMA、Ad26 . hSTEAP1、及びMVA . hPSMA . hSTEAP1のプライム - ブーストレジメンは、Ad26 . hPSMA及びAd26 . hSTEAP1で初回免疫したマウスにおいて免疫応答を強化する

材料及び方法

動物を以下のように免疫化した：群1（n = 5）を、第3週にMVA . hPSMA . hSTEAP1（ 10^7 IU）で初回免疫した；群3（n = 10）及び群4（n = 10）は、筋肉内でAd26 . hPSMA（ 10^8 vp） + Ad26 . hSTEAP - 1（ 10^9 vp）の混合物により0週目に初回免疫し、続いてMVA . hPSMA . hSTEAP（ 10^7 IU）により3週目に追加免疫した；アッセイ陰性対照群（n = 3）としての役割を果たした群10は、筋肉内でAd26 . 空により 10^{10} vpで0週目に初回免疫化した。全ての動物を、MVA免疫化の4週目、例えば7日後に殺した。

【0294】

脾細胞を、IFN γ ELISpotによるhPSMA又はhSTEAP1特異的サイトカイン生成細胞の誘導について分析した。 10^6 個の脾細胞当たりのIFN γ SFUの数を、ELISpotで決定した。群当たりの幾何平均応答を決定し、アッセイのバックグラウンドは、非刺激脾細胞で観察されたSFUの95%パーセンタイルとして定義した。Ad26 . hPSMA + Ad26 . hSTEAP1初回のみと、Ad26 . hPSMA + Ad26 . hSTEAP1初回免疫化及びMVA . hPSMA . hSTEAP1による追加免疫とを比較する識別試験では、 \log_{10} 変換したELISpotデータに対してANOVAを実施した。 22 SFU / 10^6 細胞を下回る値を、カットオフとして設定した（ $1.342 \log_{10}$ に対応）。

【0295】

結果

初回免疫化として、マウスを、Ad26 . hPSMA（ 10^8 vp）及びAd26 . hSTEAP1（ 10^9 vp）での筋肉内注射によって、又は導入遺伝子（E）をコードしないアデノウイルスベクターでの対照として（空アデノウイルス）、ワクチン接種した。初回免疫化の3週間後、初回免疫化中と同じ抗原を発現するMVA（ 1×10^7 IU / マウスの用量でのMVA . hPSMA . hSTEAP - 1）で動物を追加免疫化したが、別の群のマウスは追加免疫しなかった。対照動物を第3週にMVA . hPSMA . hSTEAP - 1（ 1×10^7 IU / マウスの用量）で免疫化した。初回免疫化から4週後に免疫応答を測定した。細胞を、hPSMA又はhSTEAP - 1野生型抗原にまたがる15merの重複ペプチドにまたがるペプチドプールで一晩刺激した。IFN γ 分泌細胞の相対数を測定することにより、抗原特異的免疫応答を決定した。データは、Ad26 . hPSMA及びAd26 . hSTEAP1単独、又はAd26 . hPSMA、Ad26 . hSTEAP1、及びMVA . hPSMA . hSTEAP1のいずれかによるマウスの免疫化が

、両方のタンパク質に対する細胞性免疫応答をもたらしたことを示した。対照的に、MVA・hPSMA・hSTEAP-1による初回免疫化後の誘導された免疫応答は、陰性ワクチン対照Ad26・Eで見られたものと同じレベルであった。全体的応答はMVA・hPSMA・hSTEAP1で追加免疫化した動物で最も高かった。図15は、Ad26・hPSMA、Ad26・hSTEAP1、及びMVA・hPSMA・hSTEAP1によるマウスのプライム-ブーストワクチン接種を利用するマウスの研究設計を示す。図16は、初回としてのMVA・hPSMA・hSTEAP1(群1; Gr1)、初回としてのAd26・hPSMA、Ad26・hSTEAP1(群3、Gr3)、初回としてのAd26・hPSMA、Ad26・hSTEAP1及び追加としてのMVA・hPSMA・hSTEAP1(群4、Gr4)、又は空Ad26ベクター(Ad26・空、群10、Gr10)により免疫化し、PSMAペプチドプールにより一晩刺激し、又はマウスから単離した脾細胞からの、 10^6 個の脾細胞当たりのIFN スポット形成単位(SFU)の数の対数を示す。群5のプライム-ブーストレジメンは、IFN 生成の増加によって測定される免疫応答を有意に増強した。図17は、初回としてのMVA・hPSMA・hSTEAP1(群1; Gr1)、初回としてのAd26・hPSMA、Ad26・hSTEAP1(群3、Gr3)、初回としてのAd26・hPSMA、Ad26・hSTEAP1及び追加としてのMVA・hPSMA・hSTEAP1(群4、Gr4)、又は空Ad26ベクター(Ad26・空、群10、Gr10)により免疫化し、STEAP1ペプチドプールにより一晩刺激した、マウスから単離した脾細胞からの、 10^6 個の脾細胞当たりのIFN スポット形成単位(SFU)の数の対数を示す。

【0296】

実施例8・抗CTLA4抗体と組み合わせた、Ad26・hPSMA、Ad26・hSTEAP1、及びMVA・hPSMA・hSTEAP1のプライム-ブーストレジメンは、非ヒト霊長類において免疫応答を強化する

T細胞応答対初回免疫のみの大きさと期間を増強する、任意選択的にチェックポイント阻害薬と併用したプライム-ブーストレジメンの能力を、非ヒト霊長類モデルで評価した。

【0297】

材料及び方法

動物を、0週目にAd26・hPSMA及びAd26・hSTEAP-1によりアデノベクター当たり 5×10^{10} vpを用いて初回免疫化した。ワクチンを、筋肉内注射を介して、四頭筋(一方の脚)へ、単独で、又は(1)10 mg/kgのIpi IV若しくは(2)3 mg/kgのIpi SCと組み合わせて投与した。4週間後及び8週間後、 1×10^8 個のTCID50/動物(片脚内)を、単独で、又は(1)10 mg/kgのIpi IV若しくは(2)3 mg/kgのIpi SCと組み合わせて用いて、MVA・hPSMA・hASTEAP-1により四頭筋内へ、動物を筋肉内で追加免疫化した。研究の群サイズは、動物6匹、動物8匹、又は動物9匹であった。

【0298】

10^6 個のPBMC当たりの全(hPSMA+hSTEAP1)特異的T細胞応答の誘導を経時的に測定した。総応答を以下のように動物ごとに計算した:(PSMA応答-媒介応答)+(STEAP1応答-媒介応答)。 100 SFU/ 10^6 細胞未満の値を 100 SFU/ 10^6 細胞に調整した。潜在的打ち切り値を調整したANOVA Tobitモデルを、説明因子として群を \log_{10} 変換した総SFU応答に適用した。統計分析は、示された時点における、群1対群2(一次分析、有意性は*で示され、 $p < 0.005$ に対応)を比較するか、又は群1対群3若しくは群4(二次分析、有意性は群1対群3について#で示され、 $p = 0.032$ に対応)を比較し、全応答にわたって時点ごとに行った。

【0299】

結果

カニクイザルを、各ベクターの 5×10^{10} VPの用量のAd26・hPSMAとAd

26. hSTEAP1との組み合わせにより、単独で、又はイピリムマブ（図ではIpiと略す）と組み合わせ、IMで免疫化した（10mg/kg静脈内[IV]又は3mg/kgSC）。4週間後、動物に、MVA・hPSMA・hSTEAP1（ 10^8 IU）による追加免疫化を、単独で、又は10mg/kgIV若しくは3mg/kgSCのイピリムマブの組み合わせにより行った。8週目に、動物は、4週目に与えられたのと同じ材料で2回目の追加免疫を受けた。対照動物はAd26・hPSMA及びAd26・hSTEAP1で初回免疫したが、一切の追加免疫化又はイピリムマブも受けなかった。hPSMA又はhSTEAP1に対する免疫応答の誘導は、末梢血単核細胞（PBMC；血液）にて、研究中の様々な時点において、IFN- γ ・Elispotによって評価された。

10

【0300】

Ad26・hPSMA及びAd26・hSTEAP1初回免疫化は、第2週及び第4週に細胞性免疫応答を誘導した。イピリムマブの静脈内注射（群3）は、統計的に有意ではなかったが、Ad26・hPSMA及びAd26・hSTEAP1のみ（群1及び群2）によって誘発された反応と比較して、総応答の大きさを1.7~2.4倍増加させた。皮下注射されたイピリムマブではわずかな効果が見られた。

【0301】

4週目及び8週目のMVA・hPSMA・hSTEAP1による追加免疫は、Ad26による単一初回免疫化によって誘導されるものと比較して、総細胞免疫応答を2~6~3.9倍強化した（Tobit LRT、Bonferroni、第6週：p=0.005；第8週：p=0.004；第10週：p<0.001）。

20

【0302】

イピリムマブAを投与しなかった動物（群1）では、第6週と比較して、第8週に免疫応答の減少が見られた。対照的に、イピリムマブの静脈内注射（群2）は、6週目に見られる応答の大きさを維持し、これは第8週の2回目の追加免疫後に更に増加した。

【0303】

図18は、非ヒト霊長類プライム-ブースト研究の投薬量を示す。図19は、hPSMA及びhSTEAP1ペプチドプールで一晩刺激した、Ad26・hPSMA及びAd26・hSTEAP1で初回免疫し、かつMVA・hPSMA・hSTEAP1で4週及び8週に追加免疫した（群1、Gr1）、Ad26・hPSMA及びAd26・hSTEAP1で初回免疫し、追加免疫を受けなかった（群2、Gr2）、Ad26・hPSMA及びAd26・hSTEAP1で初回免疫し、かつMVA・hPSMA・hSTEAP1で4週及び8週に追加免疫し、かつ4週及び8週の両方においてイピリムマブIVを投与した（群3、Gr3）、並びにAd26・hPSMA及びAd26・hSTEAP1で初回免疫し、かつMVA・hPSMA・hSTEAP1で4週及び8週に追加免疫し、かつ4週及び8週の両方においてイピリムマブSCを投与した（群4、Gr4）、カニクイザル（cynomolgous macaque）から、図に示すように経時的に単離した脾細胞 10^6 個当たりのIFN- γ スポット形成単位（SFU）の数の対数を示す図である。下側の点線は100SFU/ 10^6 細胞のカットオフ値に対応し、上側の点線は定量上限（ULOQ）に対応する。エラーバーは標準偏差を示す。矢印は免疫化の時間を指す。潜在的打ち切り値を調整したANOVA Tobitモデルを、説明因子として群を \log_{10} 変換した総SFU応答に適用した。統計分析は、示された時点における、群1対群2（一次分析、有意性は*で示され、p<0.005に対応）を比較するか、又は群1対群3若しくは群4（二次分析、有意性は群1対群3について#で示され、p=0.032に対応）を比較し、全応答にわたって時点ごとに行った。

30

40

【0304】

当業者であれば、本発明の好ましい実施形態に対して、多数の変更及び修正を加えることができ、このような変更及び修正を、本発明の趣旨を逸脱しない範囲内で行うことができることを理解するであろう。したがって、添付の特許請求の範囲は、本発明の真の趣旨及び範囲に収まる、このような同等の変化を全て網羅することが意図されている。

50

【0305】

本明細書に引用又は記載されている各特許、特許出願、及び刊行物の開示は、その全体が本明細書に参照として組み込まれる。

【0306】

実施形態

以下の実施形態のリストは、前述の説明を置き換え又は取って代わるものではなく、補完することを意図している。

【0307】

実施形態1．ワクチン組み合わせであって、

- a) P S M A をコードする第1のポリヌクレオチドと、
 - b) S T E A P 1 をコードする第2のポリヌクレオチドと、
 - c) P S M A 及び S T E A P 1 をコードする第3のポリヌクレオチドと、
- を含む、ワクチン組み合わせ。

10

【0308】

実施形態2．組換えアデノウイルス (r A d)、大型類人猿アデノウイルス 20 (G A d 20)、改変ワクシニアアンカラ (r M V A)、又は自己複製 R N A が、第1のポリヌクレオチド、第2のポリヌクレオチド、又は第3のポリヌクレオチドを含む、実施形態1に記載のワクチン組み合わせ。

【0309】

実施形態3．r A d が、組換えアデノウイルス血清型 26 (r A d 26) である、実施形態1又は2に記載のワクチン組み合わせ。

20

【0310】

実施形態4．

- a) r A d 26 が、第1のポリヌクレオチドを含み、
 - b) r A d 26 が、第2のポリヌクレオチドを含み、
 - c) r M V A が、第3のポリヌクレオチドを含む、
- 実施形態1～3のいずれか1つに記載のワクチン組み合わせ。

【0311】

実施形態5．第1のポリヌクレオチド及び第2のポリヌクレオチドが、ポリヌクレオチドへ操作可能に連結されたオペレーター含有プロモーターを更に含む、実施形態1～4のいずれか1つに記載のワクチン組み合わせ。

30

【0312】

実施形態6．オペレーター含有プロモーターが、C M V プロモーター及びテトラサイクリンオペロンオペレーター (T e t O) を含む、実施形態5に記載のワクチン組み合わせ。

【0313】

実施形態7．オペレーター含有プロモーターが、配列番号20のポリヌクレオチドを含む、実施形態5又は6に記載のワクチン組み合わせ。

【0314】

実施形態8．第1のポリヌクレオチド及び第2のポリヌクレオチドが、S V 40 ポリアデニル化シグナル (S V 40 p A) を更に含む、実施形態1～7のいずれか1つに記載のワクチン組み合わせ。

40

【0315】

実施形態9．S V 40 p A が、配列番号21のポリヌクレオチドを含む、実施形態8に記載のワクチン組み合わせ。

【0316】

実施形態10．a) P S M A をコードするポリヌクレオチドが、配列番号15のポリペプチドをコードし、かつ/又は

b) P S M A をコードするポリヌクレオチドが、配列番号14のポリヌクレオチドを含む、

50

実施形態 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載のワクチン組み合わせ。

【 0 3 1 7 】

実施形態 1 1 . 第 1 のポリヌクレオチドが、

- a) 配列番号 1 5 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び / 又は
- b) 配列番号 1 6 のポリヌクレオチド、

を含む、実施形態 1 ~ 1 0 のいずれか 1 つに記載のワクチン組み合わせ。

【 0 3 1 8 】

実施形態 1 2 .

a) S T E A P 1 をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 1 8 のポリペプチドをコードし、かつ / 又は

b) S T E A P 1 をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 1 7 のポリヌクレオチドを含む、

実施形態 1 ~ 1 1 のいずれか 1 つに記載のワクチン組み合わせ。

【 0 3 1 9 】

実施形態 1 3 . 第 2 のポリヌクレオチドが、

- a) 配列番号 1 8 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び / 又は
- b) 配列番号 1 9 のポリヌクレオチド、

を含む、実施形態 1 ~ 1 2 のいずれか 1 つに記載のワクチン組み合わせ。

【 0 3 2 0 】

実施形態 1 4 . 第 1 のポリヌクレオチド及び第 2 のポリヌクレオチドが、 r A d 2 6 E 1 欠失部位へと挿入される、実施形態 1 ~ 1 3 のいずれか 1 つに記載のワクチン組み合わせ。

【 0 3 2 1 】

実施形態 1 5 . 第 3 のポリヌクレオチドが、ポリヌクレオチドへ操作可能に連結されたボックスウイルスプロモーターを更に含む、実施形態 1 ~ 1 4 のいずれか 1 つに記載のワクチン組み合わせ。

【 0 3 2 2 】

実施形態 1 6 . ボックスウイルスプロモーターが、配列番号 1 のワクシニアウイルスプロモーター p 7 . 5 を含む、実施形態 1 5 に記載のワクチン組み合わせ。

【 0 3 2 3 】

実施形態 1 7 . 第 3 のポリヌクレオチドが、第 1 の T 細胞エンハンサー (T C E) をコードするポリヌクレオチドと、第 2 の T C E をコードするポリヌクレオチドと、を更に含む、実施形態 1 ~ 1 6 のいずれか 1 つに記載のワクチン組み合わせ。

【 0 3 2 4 】

実施形態 1 8 . 第 1 の T C E をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 1 3 のポリペプチドをコードし、第 2 の T C E をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 7 のポリペプチドをコードする、実施形態 1 7 に記載のワクチン組み合わせ。

【 0 3 2 5 】

実施形態 1 9 . 第 1 の T C E をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 2 のポリヌクレオチドを含み、及び / 又は第 2 の T C E をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 5 のポリヌクレオチドを含む、実施形態 1 8 に記載のワクチン組み合わせ。

【 0 3 2 6 】

実施形態 2 0 . 第 3 のポリヌクレオチドが、2 A 自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドを更に含む、実施形態 1 ~ 1 9 のいずれか 1 つに記載のワクチン組み合わせ。

【 0 3 2 7 】

実施形態 2 1 . 2 A 自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドが、配列番号 9 のポリペプチドをコードする、実施形態 2 0 に記載のワクチン組み合わせ。

【 0 3 2 8 】

実施形態 2 2 . 2 A 自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドが、配列番号 4 のポリヌクレオチドを含む、実施形態 2 1 に記載のワクチン組み合わせ。

10

20

30

40

50

【0329】

実施形態23．第3のポリヌクレオチドにおいて、

- a) P S M A をコードするポリヌクレオチドが、配列番号8のポリペプチドをコードする、
- b) P S M A をコードするポリヌクレオチドが、配列番号3のポリヌクレオチドを含む、
- c) S T E A P 1 をコードするポリヌクレオチドが、配列番号10のポリペプチドをコードし、かつ/又は
- d) S T E A P 1 をコードするポリヌクレオチドが、配列番号6のポリヌクレオチドを含む、

実施形態1～22のいずれか1つに記載のワクチン組み合わせ。

【0330】

実施形態24．第3のポリヌクレオチドにおいて、

- a) P S M A をコードするポリヌクレオチドが、S T E A P 1 をコードするポリヌクレオチドの5'に位置し、
- b) ポックスウイルスプロモーターが、P S M A をコードするポリヌクレオチドの5'に位置し、
- c) 第1のT C E をコードするポリヌクレオチドが、P S M A をコードするポリヌクレオチドの5'に位置し、
- d) 第2のT C E をコードするポリヌクレオチドが、P S M A をコードするポリヌクレオチドの3'に位置し、かつ/又は
- e) 2 A 自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドが、P S M A をコードするポリヌクレオチドの3'と、第2のT C E をコードするポリヌクレオチドの5'とに位置する、

実施形態1～23のいずれか1つに記載のワクチン組み合わせ。

【0331】

実施形態25．第3のポリヌクレオチドが、

- (a) 配列番号12のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び/又は
 - (b) 配列番号11のポリヌクレオチド、
- を含む、実施形態1～24のいずれか1つに記載のワクチン組み合わせ。

【0332】

実施形態26．r M V A が、M V A - 4 7 6 M G / 1 4 / 7 8、M V A - 5 7 2、M V A - 5 7 4 若しくはM V A - 5 7 5 又はM V A - B N に由来する、実施形態1～25のいずれか1つに記載のワクチン組み合わせ。

【0333】

実施形態27．第3のポリヌクレオチドが、r M V A 欠失部位I I I へと挿入される、実施形態1～26のいずれか1つに記載のワクチン組み合わせ。

【0334】

実施形態28．P S M A をコードするポリヌクレオチドを含む、組換えアデノウイルス。

【0335】

実施形態29．ポリヌクレオチドが、P S M A をコードするポリヌクレオチドに操作可能に連結されたオペレーター含有プロモーターを更に含む、実施形態28に記載の組換えアデノウイルス。

【0336】

実施形態30．オペレーター含有プロモーターが、C M V プロモーター及びテトラサイクリンオペロンオペレーター(T e t O) を含む、実施形態29に記載の組換えアデノウイルス。

【0337】

実施形態31．オペレーター含有プロモーターが、配列番号20のポリヌクレオチドを

10

20

30

40

50

含む、実施形態 30 に記載の組換えアデノウイルス。

【0338】

実施形態 32 . ポリヌクレオチドが、SV40pA シグナルを更に含む、実施形態 28 ~ 31 のいずれか 1 つに記載の組換えアデノウイルス。

【0339】

実施形態 33 . SV40pA が、配列番号 21 のポリヌクレオチドを含む、実施形態 32 に記載の組換えアデノウイルス。

【0340】

実施形態 34 . a) PSMA をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 15 のポリペプチドをコードし、かつ / 又は

b) PSMA をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 14 のポリヌクレオチドを含む、

実施形態 28 ~ 33 のいずれか 1 つに記載の組換えアデノウイルス。

【0341】

実施形態 35 .

a) ポリヌクレオチドが、配列番号 15 のポリペプチドをコードし、かつ / 又は

b) ポリヌクレオチドが、配列番号 16 の配列を含む、

実施形態 28 ~ 34 のいずれか 1 つに記載の組換えアデノウイルス。

【0342】

実施形態 36 . 組換えアデノウイルスが、ヒトアデノウイルス血清型 26 (Ad26) に由来する、実施形態 28 ~ 35 のいずれか 1 つに記載の組換えアデノウイルス。

【0343】

実施形態 37 . ポリヌクレオチドが、E1 欠失部位又は E3 欠失部位へと挿入される、実施形態 28 ~ 36 のいずれか 1 つに記載の組換えアデノウイルス。

【0344】

実施形態 38 . 配列番号 16 の配列を含む、ポリヌクレオチド。

【0345】

実施形態 39 . 実施形態 38 に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【0346】

実施形態 40 . 実施形態 39 に記載のベクターを含む、細胞。

【0347】

実施形態 41 . 実施形態 28 ~ 37 のいずれか 1 つに記載の組換えアデノウイルスを含む、細胞。

【0348】

実施形態 42 . STEAP1 をコードするポリヌクレオチドを含む、組換えアデノウイルス (rAd) 。

【0349】

実施形態 43 . ポリヌクレオチドが、ポリヌクレオチドに操作可能に連結されたオペレーター含有プロモーターを更に含む、実施形態 42 に記載の組換えアデノウイルス。

【0350】

実施形態 44 . オペレーター含有プロモーターが、CMV プロモーター及びテトラサイクリンオペロンオペレーター (TetO) を含む、実施形態 43 に記載の組換えアデノウイルス。

【0351】

実施形態 45 . オペレーター含有プロモーターが、配列番号 20 のポリヌクレオチドを含む、実施形態 44 に記載の組換えアデノウイルス。

【0352】

実施形態 46 . ポリヌクレオチドが、SV40pA シグナルを更に含む、実施形態 42 ~ 45 のいずれか 1 つに記載の組換えアデノウイルス。

【0353】

10

20

30

40

50

実施形態 47 . S V 4 0 p A が、配列番号 2 1 のポリヌクレオチドを含む、実施形態 4 6 に記載の組換えアデノウイルス。

【 0 3 5 4 】

実施形態 4 8 .

a) S T E A P 1 をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 1 8 のポリペプチドをコードし、かつ / 又は

b) S T E A P 1 をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 1 7 のポリヌクレオチドを含む、

実施形態 4 2 ~ 4 7 のいずれか 1 つに記載の組換えアデノウイルス。

【 0 3 5 5 】

実施形態 4 9 .

a) ポリヌクレオチドが、配列番号 1 8 のポリペプチドをコードし、かつ / 又は

b) ポリヌクレオチドが、配列番号 1 9 の配列を含む、

請求項 4 2 ~ 4 8 のいずれか 1 つに記載の組換えアデノウイルス。

【 0 3 5 6 】

実施形態 5 0 . 組換えアデノウイルスが、ヒトアデノウイルス血清型 2 6 (A d 2 6) に由来する、実施形態 4 2 ~ 4 9 のいずれか 1 つに記載の組換えアデノウイルス。

【 0 3 5 7 】

実施形態 5 1 . ポリヌクレオチドが、E 1 欠失部位又は E 3 欠失部位へと挿入される、実施形態 4 2 ~ 5 0 のいずれか 1 つに記載の組換えアデノウイルス。

【 0 3 5 8 】

実施形態 5 2 . 配列番号 1 9 の配列を含む、ポリヌクレオチド。

【 0 3 5 9 】

実施形態 5 3 . 実施形態 5 2 に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【 0 3 6 0 】

実施形態 5 4 . 実施形態 5 3 に記載のベクターを含む、細胞。

【 0 3 6 1 】

実施形態 5 5 . 実施形態 4 2 ~ 5 1 のいずれか 1 つに記載の組換えアデノウイルスを含む、細胞。

【 0 3 6 2 】

実施形態 5 6 . P S M A 及び S T E A P 1 をコードするポリヌクレオチドを含む、組換え改変ワクシニアアンカラ (r M V A) ウイルス。

【 0 3 6 3 】

実施形態 5 7 . ポリヌクレオチドが、ポリヌクレオチドに操作可能に連結されたボックスウイルスプロモーターを更に含む、実施形態 5 6 に記載の組換え改変ワクシニアアンカラウイルス。

【 0 3 6 4 】

実施形態 5 8 . ボックスウイルスプロモーターが、配列番号 1 のポリヌクレオチドを含むワクシニアウイルスプロモーター p 7 . 5 である、実施形態 5 7 に記載の組換え改変ワクシニアアンカラウイルス。

【 0 3 6 5 】

実施形態 5 9 . ポリヌクレオチドが、第 1 の T 細胞エンハンサー (T C E) をコードするポリヌクレオチドと、第 2 の T C E をコードするポリヌクレオチドと、を更に含む、実施形態 5 6 ~ 5 8 のいずれか 1 つに記載の組換え改変ワクシニアアンカラウイルス。

【 0 3 6 6 】

実施形態 6 0 . 第 1 の T C E をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 1 3 のポリペプチドをコードし、第 2 の T C E をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 7 のポリペプチドをコードする、実施形態 5 9 に記載の組換え改変ワクシニアアンカラウイルス。

【 0 3 6 7 】

実施形態 6 1 . 第 1 の T C E をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 2 のポリヌク

10

20

30

40

50

レオチドを含み、及び/又は第2のTCEをコードするポリヌクレオチドが、配列番号5のポリヌクレオチドを含む、実施形態60に記載の組換え改変ワクシニアアンカラウイルス。

【0368】

実施形態62. ポリヌクレオチドが、2A自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドを更に含む、実施形態56~61のいずれか1つに記載の組換え改変ワクシニアアンカラウイルス。

【0369】

実施形態63. 2A自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドが、配列番号9のポリペプチドをコードする、実施形態62に記載の組換え改変ワクシニアアンカラウイルス。

10

【0370】

実施形態64. 2A自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドが、配列番号4のポリヌクレオチドを含む、実施形態63に記載の組換え改変ワクシニアアンカラウイルス。

【0371】

実施形態65.

a) PSMAをコードするポリヌクレオチドが、配列番号8のポリペプチドをコードし、

、

b) PSMAをコードするポリヌクレオチドが、配列番号3のポリヌクレオチドを含み

、

c) STEAP1をコードするポリヌクレオチドが、配列番号10のポリペプチドをコードし、かつ/又は

d) STEAP1をコードするポリヌクレオチドが、配列番号6のポリヌクレオチドを含む、

実施形態56~64のいずれか1つに記載の組換え改変ワクシニアアンカラウイルス。

20

【0372】

実施形態66.

a) PSMAをコードするポリヌクレオチドが、STEAP1をコードするポリヌクレオチドの5'に位置し、

b) ポックスウイルスプロモーターが、PSMAをコードするポリヌクレオチドの5'に位置し、

c) 第1のTCEをコードするポリヌクレオチドが、PSMAをコードするポリヌクレオチドの5'に位置し、

d) 第2のTCEをコードするポリヌクレオチドが、PSMAをコードするポリヌクレオチドの3'に位置し、かつ/又は

e) 2A自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドが、PSMAをコードするポリヌクレオチドの3'と、第2のTCEをコードするポリヌクレオチドの5'とに位置する

、

実施形態56~65のいずれか1つに記載の組換え改変ワクシニアアンカラウイルス。

40

【0373】

実施形態67.

a) ポリヌクレオチドが、配列番号12のポリペプチドをコードし、かつ/又は

b) ポリヌクレオチドが、配列番号11の配列を含む、

実施形態56~66のいずれか1つに記載の組換え改変ワクシニアアンカラウイルス。

【0374】

実施形態68. 組換え改変ワクシニアアンカラウイルスが、MVA-476 MG/14/78、MVA-572、MVA-574若しくはMVA-575又はMVA-BNに由来する、実施形態56~67のいずれか1つに記載の組換え改変ワクシニアアンカラウイルス。

50

【 0 3 7 5 】

実施形態 6 9 . ポリヌクレオチドが、欠失部位 I I I へと挿入される、実施形態 5 6 ~ 6 8 のいずれか 1 つに記載の組換え改変ワクシニアアンカラウイルス。

【 0 3 7 6 】

実施形態 7 0 . 配列番号 1 2 の配列を含む、ポリヌクレオチド。

【 0 3 7 7 】

実施形態 7 1 . 配列番号 1 1 の配列を含む、ポリヌクレオチド。

【 0 3 7 8 】

実施形態 7 2 . 実施形態 7 0 又は 7 1 に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【 0 3 7 9 】

実施形態 7 3 . 実施形態 7 2 に記載のベクターを含む、細胞。

10

【 0 3 8 0 】

実施形態 7 4 . 実施形態 5 6 ~ 6 9 のいずれか 1 つに記載の組換え M V A を含む、細胞。

【 0 3 8 1 】

実施形態 7 5 . 前立腺がん罹患している対象において前立腺がんに対する免疫応答を強化する方法であって、実施形態 1 ~ 2 7 のいずれか 1 つに記載のワクチン組み合わせを対象に投与することを含む、方法。

【 0 3 8 2 】

実施形態 7 6 . 前立腺がんに対する免疫応答の強化を必要とする対象において対象においてそれを行う方法であって、

20

a) 免疫応答を初回免疫するための P S M A をコードする第 1 のポリヌクレオチドを含む、免疫学的有効量の第 1 の組換えアデノウイルス血清型 2 6 (A d 2 6) ウイルスト、

b) 免疫応答を初回免疫するための S T E A P 1 をコードする第 2 のポリヌクレオチドを含む、免疫学的有効量の第 2 の組換え A d 2 6 ウイルスト、

c) 免疫応答を追加免疫するための P S M A 及び S T E A P 1 をコードする第 3 のポリヌクレオチドを含む、免疫学的有効量の組換え改変ワクシニアアンカラ (M V A) ウイルスト、を対象に投与することを含む、方法。

【 0 3 8 3 】

実施形態 7 7 . 前立腺がん罹患している対象を治療する方法であって、

30

a) 免疫応答を初回免疫するための P S M A をコードする第 1 のポリヌクレオチドを含む、免疫学的有効量の第 1 の組換えアデノウイルス血清型 2 6 (A d 2 6) ウイルスト、

b) 免疫応答を初回免疫するための S T E A P 1 をコードする第 2 のポリヌクレオチドを含む、免疫学的有効量の第 2 の組換え A d 2 6 ウイルスト、

c) 免疫応答を追加免疫するための P S M A 及び S T E A P 1 をコードする第 3 のポリヌクレオチドを含む、免疫学的有効量の組換え改変ワクシニアアンカラ (M V A) ウイルスト、を対象に投与することを含む、方法。

【 0 3 8 4 】

実施形態 7 8 . 第 1 の組換え A d 2 6 、第 2 の組換え A d 2 6 、及び組換え M V A が、医薬組成物中に製剤化される、実施形態 7 5 ~ 7 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【 0 3 8 5 】

実施形態 7 9 . 免疫応答が、C D 8 + T 細胞応答又は C D 4 + T 細胞応答である、実施形態 7 5 ~ 7 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 8 6 】

実施形態 8 0 . 第 1 の組換え A d 2 6 が A d 2 6 . P S M A を含み、第 2 の組換え A d 2 6 が A d 2 6 . S T E A P 1 を含み、組換え M V A が M V A . P S M A . S T E A P 1 を含む、実施形態 7 5 ~ 7 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 8 7 】

実施形態 8 1 . 1 つ又は 2 つ以上の追加のがん治療を投与すること更に含む、実施形態 7 5 ~ 8 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

50

【 0 3 8 8 】

実施形態 8 2 . 1 つ又は 2 つ以上の追加のがん治療が、手術、化学療法、アンドロゲン除去療法、放射線療法、標的療法、若しくはチェックポイント阻害剤、又はそれらの任意の組み合わせである、実施形態 8 1 に記載の方法。

【 0 3 8 9 】

実施形態 8 3 . チェックポイント阻害剤が、C T L A - 4 の阻害剤、P D - 1 の阻害剤、又は P D - L 1 の阻害剤である、実施形態 8 2 に記載の方法。

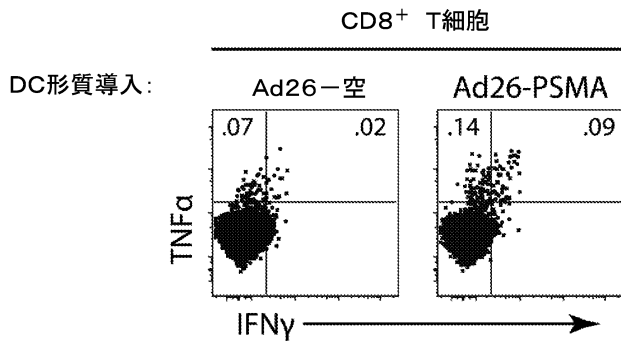
【 0 3 9 0 】

実施形態 8 4 . 実施形態 1 ~ 7 4 のいずれか 1 つに記載の r A d、r M V A、ワクチン組み合わせ、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、又は細胞を含む、医薬組成物

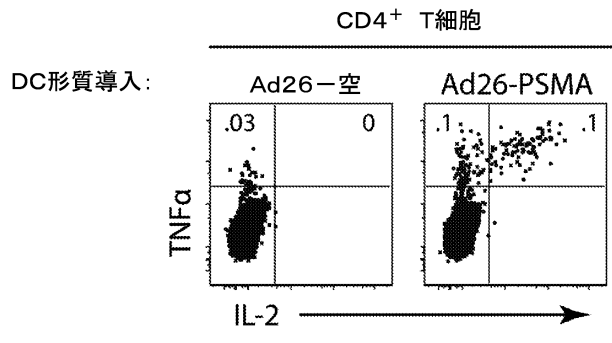
10

【 図 面 】

【 図 1 A 】

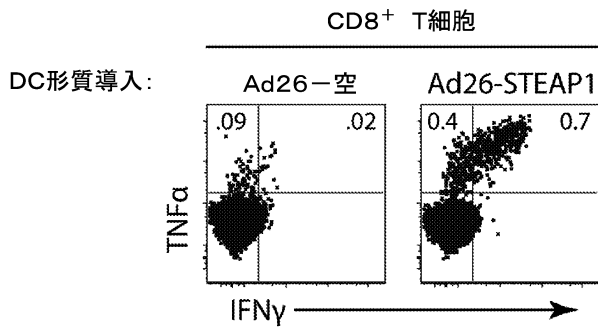


【 図 1 B 】

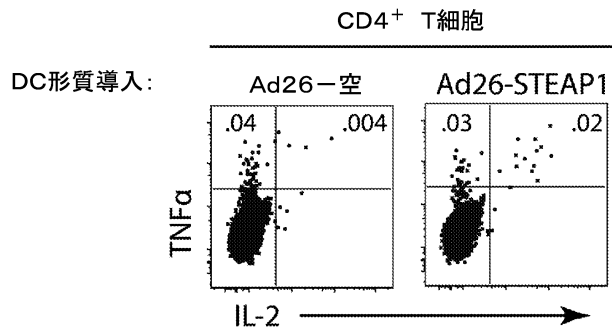


20

【 図 2 A 】



【 図 2 B 】

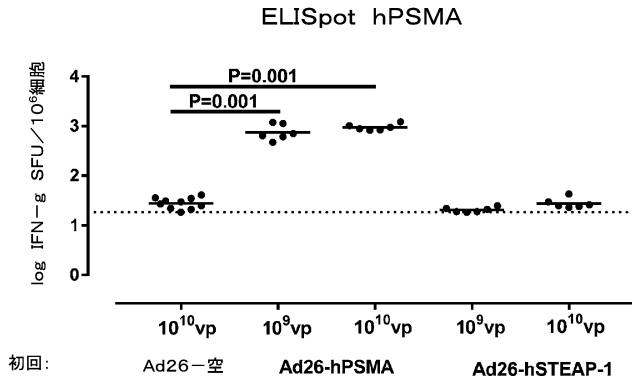


30

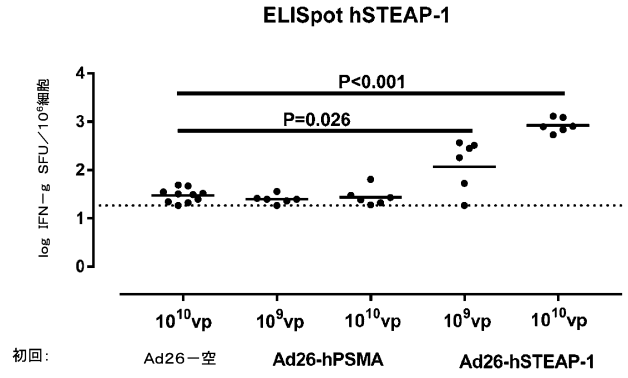
40

50

【 図 3 】

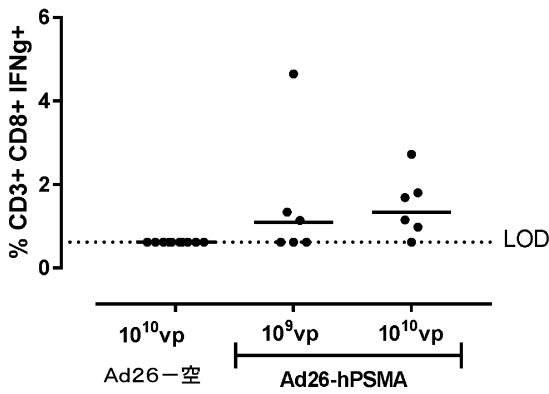


【 図 4 】

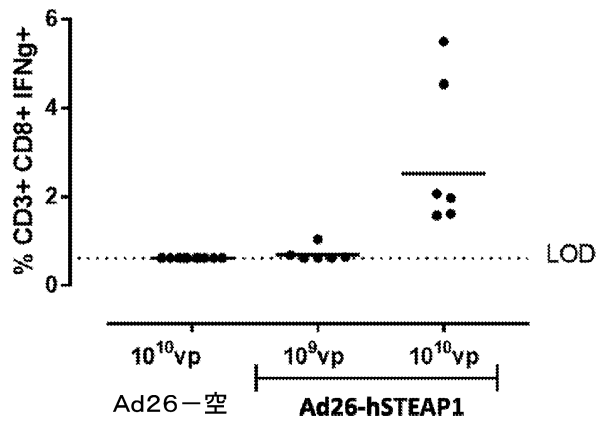


10

【 図 5 】

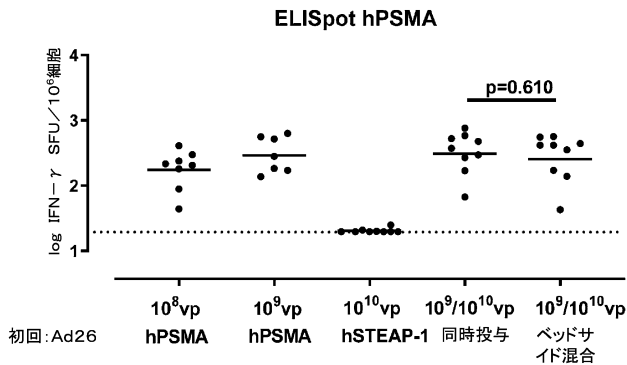


【 図 6 】

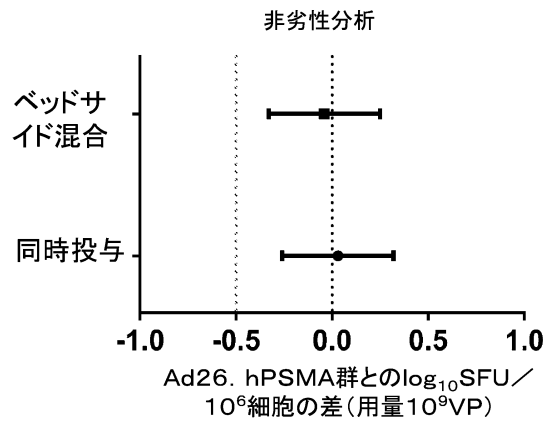


20

【 図 7 】



【 図 8 】

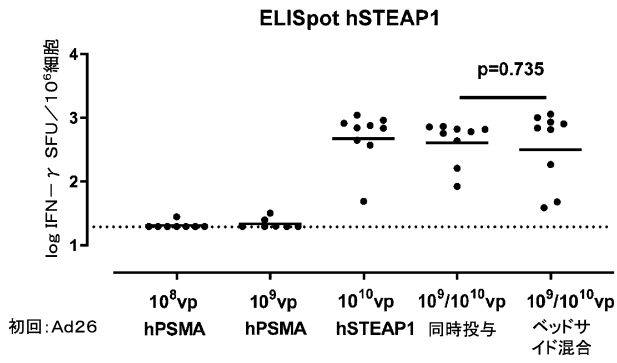


30

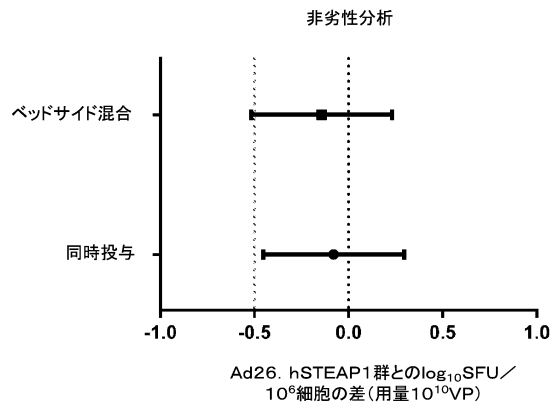
40

50

【 図 9 】



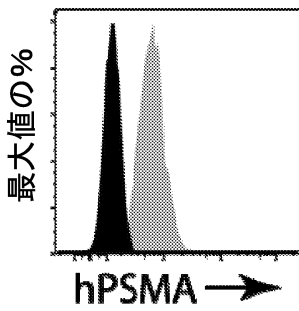
【 図 10 】



10

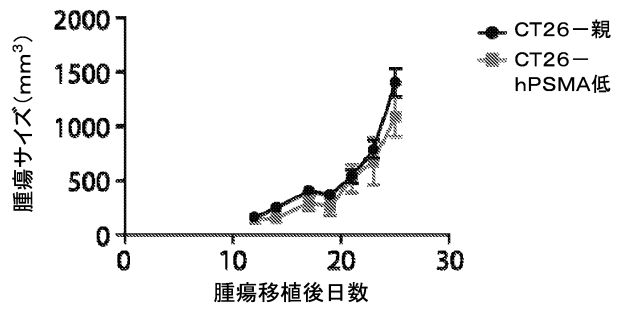
【 図 11 】

CT26 hPSMAクローン



- CT26-親
- ▨ CT26-hPSMA低

【 図 12 】



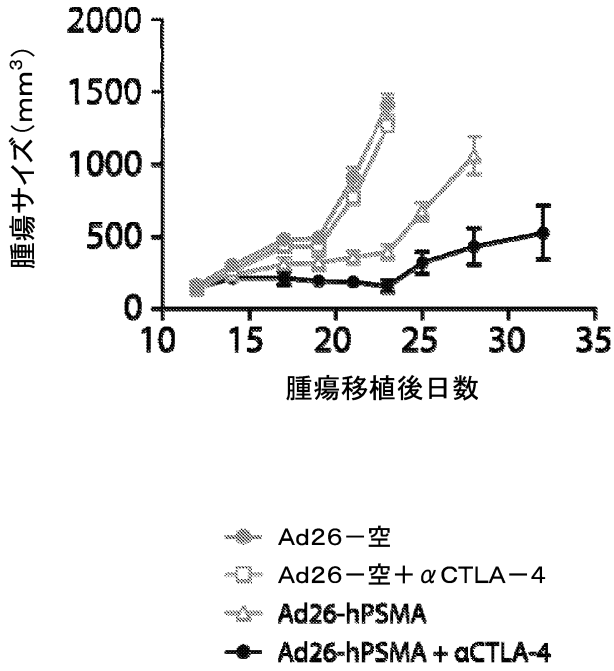
20

30

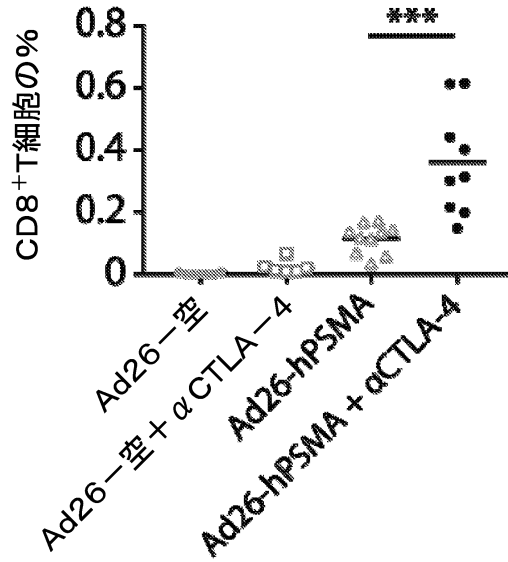
40

50

【 図 1 3 】



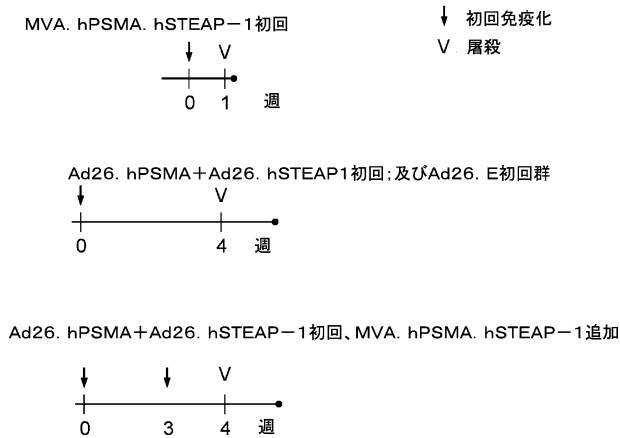
【 図 1 4 】



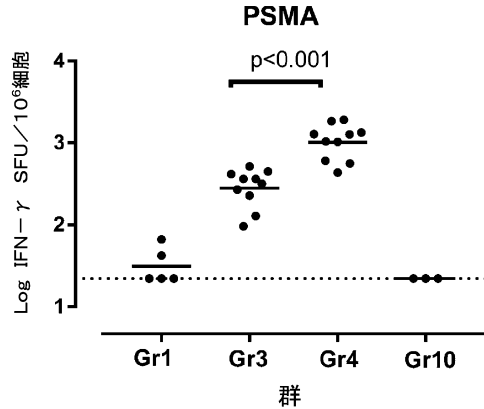
10

20

【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



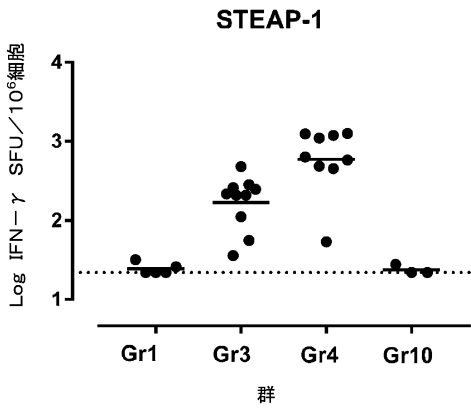
30

Gr1: MVA, hPSMA, hSTEAP-1(初回)
 Gr3: Ad26, hPSMA+Ad26, hSTEAP-1(初回)
 Gr4: Ad26, hPSMA+Ad26, hSTEAP-1(初回)+MVA, hPSMA, hSTEAP-1(追加)
 Gr10: Ad26, 空

40

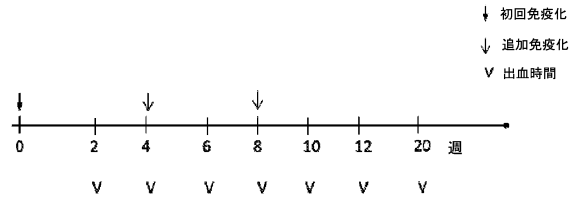
50

【 図 1 7 】



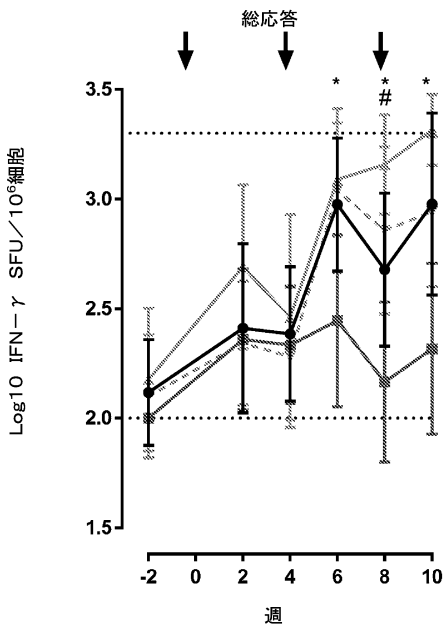
Gr1: MVA. hPSMA. hSTEAP-1 (初回)
 Gr3: Ad26. hPSMA+Ad26. hSTEAP-1 (初回)
 Gr4: Ad26. hPSMA+Ad26. hSTEAP-1 (初回)+MVA. hPSMA. hSTEAP-1 (追加)
 Gr10: Ad26. 空

【 図 1 8 】



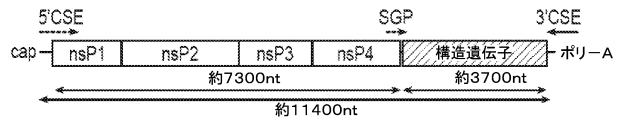
10

【 図 1 9 】



● Gr1: Ad-MVA-MVA
 ▨ Gr2: Ad
 ▩ Gr3 Ad-MVA-MVA + Ipi (IV)
 ▧ Gr4 Ad-MVA-MVA + Ipi (SC)

【 図 2 0 】



20

30

40

【 配列表 】

2023521194000001.app

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/IB2021/053041
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/00 A61P35/00 ADD. C12N15/861 C12N15/863		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM S ET AL: "Vaccination with recombinant adenoviruses and dendritic cells expressing prostate-specific antigens is effective in eliciting CTL and suppresses tumor growth in the experimental prostate cancer", THE PROSTATE, vol. 69, no. 9, 15 June 2009 (2009-06-15), pages 938-948, XP055828535, ISSN: 0270-4137, DOI: 10.1002/pros.20942 the whole document	13-24, 32,38
A	----- -/--	1-12, 25-31, 33-37
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
30 July 2021		10/08/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Teysnier, Bertrand

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2021/053041

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KÜBLER H ET AL: "Self-adjuvanted mRNA vaccination in advanced prostate cancer patients: a first-in-man phase I/IIa study", JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER, vol. 3, 26, 16 June 2015 (2015-06-16), XP055286117, DOI: 10.1186/s40425-015-0068-y the whole document -----	13-24, 32,38
X	WO 2015/024664 A1 (CUREVAC GMBH [DE]) 26 February 2015 (2015-02-26) claims; examples -----	13-24, 32,38
X A	WO 2017/210562 A1 (ETUBICS CORP [US]) 7 December 2017 (2017-12-07) claims; figure 10a -----	13-24, 32,38 25-31
A	WO 2009/052328 A1 (BN IMMUNOTHERAPEUTICS INC [US]; DELCAYRE ALAIN [US] ET AL.) 23 April 2009 (2009-04-23) -----	1-38

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2021/053041

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015024664 A1	26-02-2015	AU 2014310930 A1	21-01-2016
		BR 112016000889 A2	12-12-2017
		CA 2915904 A1	26-02-2015
		CN 105517566 A	20-04-2016
		JP 2016532451 A	20-10-2016
		JP 2018184422 A	22-11-2018
		KR 20160043103 A	20-04-2016
		RU 2016109938 A	26-09-2017
		SG 10201801433X A	27-04-2018
		SG 11201510751Y A	30-03-2016
		US 2016166668 A1	16-06-2016
		WO 2015024664 A1	26-02-2015
		WO 2017210562 A1	07-12-2017
CA 3026342 A1	07-12-2017		
CN 110114086 A	09-08-2019		
EP 3463450 A1	10-04-2019		
JP 2019517521 A	24-06-2019		
KR 20190034503 A	02-04-2019		
SG 11201810631S A	28-12-2018		
TW 201805012 A	16-02-2018		
US 2019125852 A1	02-05-2019		
WO 2017210562 A1	07-12-2017		
WO 2009052328 A1	23-04-2009	AU 2008312444 A1	23-04-2009
		CA 2702586 A1	23-04-2009
		CN 101888853 A	17-11-2010
		DK 2207564 T3	16-01-2017
		EP 2207564 A1	21-07-2010
		ES 2608604 T3	12-04-2017
		HK 1149709 A1	14-10-2011
		IL 204541 A	26-02-2015
		JP 5669581 B2	12-02-2015
		JP 2011500718 A	06-01-2011
		KR 20100109545 A	08-10-2010
		KR 20160065985 A	09-06-2016
		NZ 584042 A	28-09-2012
		NZ 601827 A	31-01-2014
		RU 2010115220 A	27-11-2011
		US 2009104225 A1	23-04-2009
		US 2011008386 A1	13-01-2011
WO 2009052328 A1	23-04-2009		

10

20

30

40

50

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)

C 0 7 K	14/82 (2006.01)	C 0 7 K	14/82	
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47	
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 K	38/46 (2006.01)	A 6 1 K	38/46	
A 6 1 K	38/44 (2006.01)	A 6 1 K	38/44	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	13/08 (2006.01)	A 6 1 P	13/08	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1

,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,D
K,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),O
A(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,B
B,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,Z
W

弁理士 星川 亮

(72)発明者

ゴッターディス, マルコ

アメリカ合衆国 1 9 4 7 7 ペンシルベニア州, スプリング ハウス, ウェールズ アンド マッキ
ーン ロード

(72)発明者

カーン, セリナ

オランダ国 2 3 3 3 セーエン ライデン アルヒメーデスウェッハ 4

(72)発明者

セプルベダ, マニュエル, アレハンドロ

アメリカ合衆国 1 9 4 7 7 ペンシルベニア州, スプリング ハウス, ウェールズ アンド マッキ
ーン ロード

(72)発明者

ヤマダ, ダグラス エイチ.

アメリカ合衆国 1 9 4 7 7 ペンシルベニア州, スプリング ハウス, ウェールズ アンド マッキ
ーン ロード

(72)発明者

ザン, ローランド

オランダ国 2 3 3 3 セーエン ライデン アルヒメーデスウェッハ 4

(72)発明者

ルブノウ, プレント

アメリカ合衆国 1 9 4 7 7 ペンシルベニア州, スプリング ハウス, ウェールズ アンド マッキ
ーン ロード

F ターム (参考)

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA45
4C084 AA02 AA06 AA13 AA19 BA01 DC22 DC23 MA02 NA05 NA14
ZB091 ZB261 ZB262 ZC412 ZC75
4C085 AA04 BB22 DD62 EE03
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA02 NA05 NA14
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 CA41 DA86 DA89 EA20
EA31 FA74