

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-526533

(P2010-526533A)

(43) 公表日 平成22年8月5日(2010. 8. 5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B 0 5 0
C 1 2 N 9/52 (2006.01)	C 1 2 N 9/52	4 B 0 6 5
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 37/54	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 130 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-507485 (P2010-507485)
 (86) (22) 出願日 平成20年5月12日 (2008. 5. 12)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年12月24日 (2009. 12. 24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/006048
 (87) 国際公開番号 W02008/140812
 (87) 国際公開日 平成20年11月20日 (2008. 11. 20)
 (31) 優先権主張番号 11/798, 177
 (32) 優先日 平成19年5月10日 (2007. 5. 10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500429103
 ザ・トラスティーズ・オブ・ザ・ユニバー
 シティ・オブ・ペンシルバニア
 アメリカ合衆国ペンシルバニア州1910
 4-6283, フィラデルフィア, チェス
 ナット・ストリート 3160, スウィー
 ト 200
 (71) 出願人 509250870
 アドバクシス
 アメリカ合衆国ニュージャージー州089
 02・ノースブランスウィック・675
 ユーエス ルート 1・スイート 117
 ・ザ テクノロジー センター オブ ニ
 ュージャージー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 K L K 3、P S C A、またはF O L H 1 抗原を含む組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、K L K 3 ペプチド、P S C A ペプチド、F O L H 1 ペプチド、それを含む組換えポリペプチド、それをコードする組換えヌクレオチド分子、それを含む組換えリステリア株、およびそれを利用する免疫原性的方法および治療方法を提供する。もう1つの実施態様において、本発明は、カリクレイン関連ペプチダーゼ3 (K L K 3) ペプチドを発現する組換えリステリア株を提供する。もう1つの実施態様において、K L K 3 ペプチドの配列は配列番号: 25、27、29ないし32、34、および36ないし39から選択される。もう1つの実施態様において、K L K 3 ペプチドは免疫原性K L K 3 ペプチドである。もう1つの実施態様において、K L K 3 ペプチドは当該分野で知られたいずれかの他のK L K 3 ペプチドである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

カリクレイン関連ペプチダーゼ 3 (K L K 3) ペプチドを発現する組換えリステリア株であって、該 K L K 3 ペプチドの配列が配列番号：25、27、29ないし32、34、および36ないし39に記載された配列から選択される配列を含む組換えリステリア株。

【請求項 2】

前記 K L K 3 ペプチドが融合ペプチドの形態であり、該融合ペプチドは、さらに、非 K L K 3 ペプチドを含み、ここで該非 K L K 3 ペプチドが該断片の免疫原性を増強させる請求項 1 記載の組換えリステリア株。

【請求項 3】

前記非 K L K 3 ペプチドが非溶血性リステリオリシン (L L O) ペプチドである請求項 1 記載の組換えリステリア株。

【請求項 4】

前記非 K L K 3 ペプチドが A c t A ペプチドおよび P E S T 様配列ペプチドから選択される請求項 1 記載の組換えリステリア株。

【請求項 5】

前記 K L K 3 ペプチドが K L K 3 シグナル配列を含有しない請求項 1 記載の組換えリステリア株。

【請求項 6】

前記組換えリステリア株が栄養要求性リステリアである請求項 1 記載の組換えリステリア株。

【請求項 7】

前記栄養要求性リステリア株が d a l / d a t 突然変異体である請求項 6 記載の組換えリステリア株。

【請求項 8】

前記栄養要求性リステリア株が、さらに、内因性 A c t A 遺伝子において欠失を含む請求項 6 記載の組換えリステリア株。

【請求項 9】

前記栄養要求性リステリア株が、該栄養要求性組換えリステリア株の栄養を補充する代謝酵素を含むエピソード発現ベクターを含む請求項 6 記載の組換えリステリア株。

【請求項 10】

前記代謝酵素がアラニンラセマーゼ酵素である請求項 9 記載の組換えリステリア株。

【請求項 11】

前記代謝酵素が D-アミノ酸トランスフェラーゼ酵素である請求項 9 記載の組換えリステリア株。

【請求項 12】

前記組換えリステリア株が組換えリステリア・モノサイトゲネス株である請求項 1 記載のリステリア株。

【請求項 13】

前記組換えリステリア株が動物宿主を通じて継代されている請求項 1 記載のリステリア株。

【請求項 14】

請求項 1 記載の組換えリステリア株およびアジュバントを含むワクチン。

【請求項 15】

対象において抗カリクレイン関連ペプチダーゼ 3 (K L K 3) 免疫応答を誘導するための組成物の調製における、請求項 1 記載の組換えリステリア株の使用。

【請求項 16】

対象においてカリクレイン関連ペプチダーゼ 3 (K L K 3) 蛋白質発現前立腺癌を治療し、それにより、該対象は該 K L K 3 蛋白質発現前立腺癌に対する免疫応答を増強させるための組成物の調製における請求項 1 記載の組換えリステリア株の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

カリクレイン関連ペプチダーゼ 3 (K L K 3) 蛋白質発現前立腺癌を阻害し、または抑制し、それにより、該対象は K L K 3 蛋白質に対する免疫応答を増強させ、それにより、K L K 3 蛋白質発現前立腺に対してヒト対象を保護するための組成物の調製における請求項 1 記載の組換えリステリア株の使用。

【請求項 18】

非 K L K 3 ペプチドに操作可能に連結されたカリクレイン関連ペプチダーゼ 3 (K L K 3) ペプチドを含む組換えポリペプチドであって、該非 K L K 3 ペプチドは非溶血性リステリオリシン (L L O) ペプチド、A c t A ペプチド、および P E S T 様アミノ酸配列から選択される組換えポリペプチド。

10

【請求項 19】

前記組換えポリペプチドをコードするヌクレオチド分子の翻訳の工程を含む製法によって作成された請求項 18 記載の組換えポリペプチド。

【請求項 20】

前記非 K L K 3 ペプチドを含むポリペプチドに対して該 K L K 3 ペプチドを含むポリペプチドを化学的に共役させる工程を含む製法によって作成された請求項 18 記載の組換えポリペプチド。

【請求項 21】

請求項 18 記載の組換えポリペプチドおよびアジュバントを含むワクチン。

【請求項 22】

請求項 18 記載の組換えポリペプチドをコードする組換えワクチンベクター。

20

【請求項 23】

請求項 18 記載の組換えポリペプチドをコードするヌクレオチド分子。

【請求項 24】

請求項 23 記載の核酸分子およびアジュバントを含むワクチン。

【請求項 25】

請求項 23 記載のヌクレオチド分子を含む組換えワクチンベクター。

【請求項 26】

対象において抗 K L K 3 免疫応答を誘導するための組成物の調製における請求項 18 記載の組換えポリペプチドを含む免疫原性組成物の使用。

30

【請求項 27】

対象において K L K 3 蛋白質発現前立腺癌を治療し、それにより、該対象は該 K L K 3 蛋白質発現前立腺癌に対する免疫応答を高め、それにより、対象において K L K 3 蛋白質発現前立腺癌を治療するための免疫原性組成物の調製における請求項 18 記載の組換えポリペプチドの使用。

【請求項 28】

対象において K L K 3 蛋白質発現前立腺癌を阻害し、または抑制し、それにより、該対象は該 K L K 3 蛋白質発現前立腺癌に対する免疫応答を高め、それにより、対象において K L K 3 蛋白質発現前立腺癌を阻害し、または抑制するための免疫原性組成物の調製における請求項 18 記載の組換えポリペプチドの使用。

40

【請求項 29】

対象において抗 K L K 3 免疫応答を誘導するための免疫原性組成物の調製における請求項 23 記載の組換えヌクレオチドの使用。

【請求項 30】

対象において K L K 3 蛋白質発現前立腺癌を治療し、それにより、該対象は該 K L K 3 蛋白質発現前立腺癌に対する免疫応答を高め、それにより、対象において K L K 3 蛋白質発現前立腺癌を治療するための免疫原性組成物の調製における請求項 23 記載の組換えヌクレオチドの使用。

【請求項 31】

対象において K L K 3 蛋白質発現前立腺癌を阻害し、または抑制し、それにより、該対

50

象は該 K L K 3 蛋白質発現前立腺癌に対する免疫応答を高め、それにより、対象において K L K 3 蛋白質発現前立腺癌を阻害し、または抑制するための免疫原性組成物の調製における請求項 2 3 記載の組換えヌクレオチドの使用。

【請求項 3 2】

葉酸ヒドロラーゼ 1 (F O L H 1) ペプチドを発現する組換えリステリア株であって、該 F O L H 1 ペプチドの配列が配列番号： 4 1、4 3、4 4 および 4 5 に記載された配列から選択される配列を含む組換えリステリア株。

【請求項 3 3】

前記 F O L H 1 ペプチドが融合ペプチドの形態であり、ここで該融合ペプチドはさらに非 F O L H 1 ペプチドを含み、ここで該非 F O L H 1 ペプチドは該断片の免疫原性を増強させる請求項 3 2 記載の組換えリステリア株。

10

【請求項 3 4】

前記非 F O L H 1 ペプチドが非溶血性リステリオリシン (L L O) ペプチド、A c t A ペプチド、および P E S T 様配列ペプチドから選択される請求項 3 2 記載の組換えリステリア株。

【請求項 3 5】

前記 F O L H 1 ペプチドが F O L H 1 シグナル配列を含有しない請求項 3 2 記載の組換えリステリア株。

【請求項 3 6】

前記組換えリステリア株が栄養要求性リステリア株である請求項 3 2 記載の組換えリステリア株。

20

【請求項 3 7】

前記栄養要求性リステリア株が d a l / d a t 突然変異体である請求項 3 6 記載の組換えリステリア株。

【請求項 3 8】

前記栄養要求性リステリア株が、さらに、内因性 A c t A 遺伝子において欠失を含む請求項 3 6 記載の組換えリステリア株。

【請求項 3 9】

前記栄養要求性リステリア株が、該栄養要求性リステリア株の栄養を補充する代謝酵素を含むエピソーム発現ベクターを含む請求項 3 6 記載の組換えリステリア株。

30

【請求項 4 0】

前記代謝酵素がアラニンラセマーゼ酵素である請求項 3 9 記載の組換えリステリア株。

【請求項 4 1】

前記代謝酵素が D - アミノ酸トランスフェラーゼ酵素である請求項 3 9 記載の組換えリステリア株。

【請求項 4 2】

請求項 3 2 記載の組換えリステリア株およびアジュバントを含むワクチン。

【請求項 4 3】

前記組換えリステリア株が組換えリステリア・モノサイトゲネス株である請求項 3 2 記載の組換えリステリア株。

40

【請求項 4 4】

前記組換えリステリア株が動物宿主を通じて継代されている請求項 3 2 記載のリステリア株。

【請求項 4 5】

対象において抗 F O L H 1 免疫応答を誘導するための組成物の調製における請求項 3 2 記載の組換えリステリア株の使用。

【請求項 4 6】

対象において葉酸ヒドロラーゼ 1 (F O L H 1) 発現前立腺癌を治療し、それにより、該対象は該 F O L H 1 蛋白質発現前立腺癌に対する免疫応答を高め、それにより、該対象において該 F O L H 1 蛋白質発現前立腺癌を治療するための組成物の調製における請求項

50

3 2 記載の組換えリステリア株の使用。

【請求項 4 7】

対象において葉酸ヒドロラーゼ 1 (F O L H 1) 発現前立腺癌を阻害し、または抑制し、それにより、該対象は該 F O L H 1 蛋白質に対する免疫応答を高め、それにより、該対象において該 F O L H 1 蛋白質発現前立腺癌を治療し、または抑制するための組成物の調製における請求項 3 2 記載の組換えリステリア株の使用。

【請求項 4 8】

非 F O L H 1 ペプチドに操作可能に連結された葉酸ヒドロラーゼ 1 (F O L H 1) を含む組換えポリペプチドであって、該非 F O L H 1 ペプチドは非溶血性リステリオリシン (L L O) ペプチド、A c t A ペプチド、および P E S T 様アミノ酸配列から選択される組換えポリペプチド。

10

【請求項 4 9】

請求項 4 8 記載の組換えポリペプチドおよびアジュバントを含むワクチン。

【請求項 5 0】

請求項 4 8 記載の組換えポリペプチドをコードする組換えワクチンベクター。

【請求項 5 1】

請求項 4 8 記載の組換えポリペプチドをコードするヌクレオチド分子。

【請求項 5 2】

請求項 5 2 記載のヌクレオチド分子およびアジュバントを含むワクチン。

【請求項 5 3】

請求項 5 2 記載のヌクレオチド分子を含む組換えワクチンベクター。

20

【請求項 5 4】

対象において抗 F O L H 1 免疫応答を誘導するための免疫原性組成物の調製における請求項 4 8 記載の組換えポリペプチドの使用。

【請求項 5 5】

対象において F O L H 1 蛋白質発現前立腺癌を治療し、それにより、該対象は該 F O L H 1 蛋白質発現前立腺癌に対する免疫応答を高め、それにより、該対象において該 F O L H 1 蛋白質発現前立腺癌を治療するための免疫原性組成物の調製における請求項 4 8 記載の組換えポリペプチドの使用。

【請求項 5 6】

対象において F O L H 1 蛋白質発現前立腺癌を阻害し、または抑制し、それにより、該対象は該 F O L H 1 蛋白質に対する免疫応答を高め、それにより、該対象において該 F O L H 1 蛋白質発現前立腺癌を阻害し、または抑制するための免疫原性組成物の調製における請求項 4 8 記載の組換えポリペプチドの使用。

30

【請求項 5 7】

対象において抗 F O L H 1 免疫応答を誘導するための免疫原性組成物の調製における請求項 5 1 記載のヌクレオチド分子の使用。

【請求項 5 8】

対象において F O L H 1 蛋白質発現前立腺癌を治療し、それにより、該対象は該 F O L H 1 蛋白質発現前立腺癌に対する免疫応答を高め、それにより、該対象において該 F O L H 1 蛋白質発現前立腺癌を治療するための免疫原性組成物の調製における請求項 5 1 記載のヌクレオチド分子の使用。

40

【請求項 5 9】

対象において F O L H 1 蛋白質発現前立腺癌を阻害し、または抑制し、それにより、該対象は該 F O L H 1 蛋白質に対する免疫応答を高め、それにより、該対象において該 F O L H 1 蛋白質発現前立腺癌を阻害し、または抑制するための免疫原性組成物の調製における請求項 5 1 記載のヌクレオチド分子の使用。

【請求項 6 0】

前立腺幹細胞抗原 (P S C A) ペプチドを発現する組換えリステリア株であって、該 P S C A ペプチドの配列は配列番号：6 3 に記載された配列を含む組換えリステリア株。

50

【請求項 6 1】

前記 P S C A ペプチドが融合ペプチドの形態であり、ここで該融合ペプチドは、さらに、非 P S C A ペプチドを含み、ここで該非 P S C A ペプチドは該断片の免疫原性を増強させる請求項 6 0 記載の組換えリステリア株。

【請求項 6 2】

前記非 P S C A ペプチドが非溶血性リステリオリシン (L L O) ペプチド、A c t A ペプチド、P E S T 様配列ペプチドから選択される請求項 6 1 記載の組換えリステリア株。

【請求項 6 3】

前記 P S C A ペプチドが P S C A シグナル配列を含有しない請求項 6 0 記載の組換えリステリア株。

10

【請求項 6 4】

前記組換えリステリア株が栄養要求性リステリア株である請求項 6 0 記載の組換えリステリア株。

【請求項 6 5】

前記栄養要求性リステリア株が d a l / d a t 突然変異体である請求項 6 4 記載の組換えリステリア株。

【請求項 6 6】

前記栄養要求性リステリア株が、さらに、内因性 A c t A 遺伝子において欠失を含む請求項 6 4 記載の組換えリステリア株。

【請求項 6 7】

前記栄養要求性リステリア株が該栄養要求性リステリア株の栄養要求性を補充する代謝酵素を含むエピソーム発現ベクターを含む請求項 6 4 記載の組換えリステリア株。

20

【請求項 6 8】

前記代謝酵素がアラニンラセマーゼ酵素である請求項 6 7 記載の組換えリステリア株。

【請求項 6 9】

前記代謝酵素が D - アミノ酸トランスフェラーゼ酵素である請求項 6 7 記載の組換えリステリア株。

【請求項 7 0】

請求項 6 0 記載の組換えリステリア株およびアジュバントを含むワクチン。

【請求項 7 1】

前記組換えリステリア株が組換えリステリア・モノサイトゲネス株である請求項 6 0 記載の組換えリステリア株。

30

【請求項 7 2】

前記組換えリステリア株が動物宿主を通じて継代されている請求項 6 0 記載の組換えリステリア株。

【請求項 7 3】

対象において抗 P S C A 免疫応答を誘導するための組成物の調製における請求項 6 0 記載の組換えリステリア株の使用。

【請求項 7 4】

対象において P S C A 発現前立腺癌を治療し、それにより、該対象は該 P S C A 蛋白質発現前立腺癌に対する免疫応答を高め、それにより、該対象において該 P S C A 蛋白質発現前立腺癌を治療するための組成物の調製における請求項 6 0 記載の組換えリステリア株の使用。

40

【請求項 7 5】

対象において P S C A 発現前立腺癌を阻害し、または抑制し、それにより、該対象は該 P S C A 蛋白質に対する免疫応答を高め、それにより、該対象において該 P S C A 蛋白質発現前立腺癌を阻害し、または抑制するための組成物の調製における請求項 6 0 記載の組換えリステリア株の使用。

【請求項 7 6】

非 P S C A ペプチドに操作可能に連結された前立腺幹細胞抗原 (P S C A) ペプチドを

50

含む組換えポリペプチドであって、該非 P S C A ペプチドは非溶血性リステリオリシン（L L O）ペプチド、A c t A ペプチド、および P E S T 様アミノ酸配列から選択される組換えポリペプチド。

【請求項 77】

請求項 76 記載の組換えポリペプチドおよびアジュバントを含むワクチン。

【請求項 78】

請求項 76 記載の組換えポリペプチドをコードする組換えワクチンベクター。

【請求項 79】

請求項 76 記載の組換えポリペプチドをコードするヌクレオチド分子。

【請求項 80】

請求項 79 記載のヌクレオチド分子およびアジュバントを含むワクチン。

【請求項 81】

請求項 79 記載のヌクレオチド分子を含む組換えワクチンベクター。

【請求項 82】

対象において抗 P S C A 免疫応答を誘導するための免疫原性組成物を調製するための請求項 76 記載の組換えリステリア株の使用。

【請求項 83】

対象において P S C A 蛋白質発現前立腺癌を治療し、それにより、該対象は該 P S C A 蛋白質発現前立腺癌に対する免疫応答を高め、それにより、該対象において該 P S C A 蛋白質発現前立腺癌を治療するための免疫原性組成物の調製における請求項 76 記載の組換えリステリア株の使用。

【請求項 84】

対象において P S C A 蛋白質発現前立腺癌を阻害し、または抑制し、それにより、該対象は該 P S C A 蛋白質に対する免疫応答を高め、それにより、該対象において該 P S C A 蛋白質発現前立腺癌を阻害し、または抑制するための免疫原性組成物の調製における請求項 76 記載の組換えリステリア株の使用。

【請求項 85】

対象において抗 P S C A 免疫応答を誘導するための免疫原性組成物の調製における請求項 79 記載のヌクレオチド分子の使用。

【請求項 86】

対象において P S C A 蛋白質発現前立腺癌を治療し、それにより、該対象は該 P S C A 蛋白質発現前立腺癌に対する免疫応答を高め、それにより、該対象において該 P S C A 蛋白質発現前立腺癌を治療するための免疫原性組成物の調製における請求項 79 記載のヌクレオチド分子の使用。

【請求項 87】

対象において P S C A 蛋白質発現前立腺癌を阻害し、または抑制し、それにより、該対象は該 P S C A 蛋白質に対する免疫応答を高め、それにより、該対象において該 P S C A 蛋白質発現前立腺癌を阻害し、または抑制するための免疫原性組成物の調製における請求項 79 記載のヌクレオチド分子の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、K L K 3 ペプチド、P S C A ペプチド、F O L H 1 ペプチド、それを含む組換えポリペプチド、それをコードする組換えヌクレオチド分子、それを含む組換えリステリア株、およびそれを利用する免疫原性的方法および治療方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

免疫応答の刺激は、宿主免疫系によって外来として認識される抗原の存在に依存する。サルモネラ（*Salmonella enthraca*）およびマイコバクテリウム・ボビス B C G のような細菌抗原はファゴソームに残っており、主要組織適合性クラス I I 分子を通じて抗原提示

10

20

30

40

50

を介してCD4⁺T細胞を刺激する。対照的に、リステリア・モノサイトゲネスのような細菌抗原はファゴソームを出て細胞質に入る。リステリア・モノサイトゲネスのファゴリソーム逃避は、リステリア抗原の主要組織適合性クラスI抗原提示を容易とするユニークなメカニズムである。この逃避は、ポア形成性スルフヒドリル活性化サイトリシン、リステリオリシンO (LLO) に依存する。

【0003】

ActAは表面結合リステリア蛋白質であって、感染した宿主細胞において足場として作用して、宿主のアクチンポリマーの重合、組立、および活性化を容易として、細胞質を通じてリステリア生物を推進する。哺乳動物細胞のサイトゾルへの進入後間もなく、リステリア・モノサイトゲネスは宿主のアクチンフィラメントの重合を誘導し、アクチン重合によって生じた力を用いて、まず、細胞内に、次いで、細胞から細胞に移動する。単一の細菌蛋白質であるActAは、アクチンの核形成およびアクチンベースの運動性を媒介することを担う。ActA蛋白質は宿主の細胞骨格成分に対する多重結合部位を供し、それにより、細胞のアクチン重合機構を組み立てるための足場として作用する。ActAのNH₂末端はモノマーアクチンに結合し、固有のアクチン核形成活性を刺激することによって構造的に活性な核形成促進因子として作用する。ActAおよびhlyは、共に、転写アクチベータPrfAによって調節された10kb遺伝子クラスターのメンバーであって、哺乳動物サイトゾルにおいてほぼ226倍アップレギュレートされる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】米国特許出願第2006/0233835号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

前立腺癌はアメリカの男性において最も頻繁なタイプの癌であり、この集団において癌関連死亡の二番目に重要な原因である。前立腺特異的抗原 (PSA) は、前立腺腫瘍によって高度に発現される前立腺癌についてのマーカーである。抗原、特に、腫瘍および細胞内病原体の予防および治療に有用な抗原の免疫原性を高めるための組成物および方法を開発する要望が長年存在する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、KLK3ペプチド、PSCAペプチド、FOLH1ペプチド、それを含む組換えポリペプチド、それをコードする組換えヌクレオチド分子、それを含む組換えリステリア株、およびそれを利用する免疫原性的方法および治療方法を提供する。

【0007】

もう1つの実施態様において、本発明は、カリクレイン関連ペプチダーゼ3 (KLK3) ペプチドを発現する組換えリステリア株を提供する。もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドの配列は配列番号：25、27、29ないし32、34、および36ないし39から選択される。もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドは免疫原性KLK3ペプチドである。もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドは当該分野で知られたいずれかの他のKLK3ペプチドである。各可能性は、本発明の別の態様を表わす。

【0008】

もう1つの実施態様において、本発明は、前立腺幹細胞抗原 (PSCA) ペプチドを発現する組換えリステリア株を提供する。もう1つの実施態様において、PSCAペプチドの配列は本明細書中に記載されたPSCA配列から選択される。もう1つの実施態様において、PSCAペプチドは免疫原性PSCAペプチドである。もう1つの実施態様において、PSCAペプチドは当該分野で知られたいずれかの他のPSCAペプチドである。各可能性は本発明の別々の実施態様を表わす。

【0009】

もう1つの実施態様において、本発明は、葉酸ヒドロラーゼ1（FOLH1）ペプチドを発現する組換えリステリア株を提供する。もう1つの実施態様において、FOLH1ペプチドの配列は配列番号：41、43、44および45から選択される。もう1つの実施態様において、FOLH1ペプチドは免疫原性FOLH1ペプチドである。もう1つの実施態様において、FOLH1ペプチドは当該分野で知られたいずれかの他のFOLH1ペプチドである。各可能性は本発明の別々の実施態様を表わす。

【0010】

もう1つの実施態様において、本発明は、非KLK3ペプチドに操作可能に連結されたKLK3ペプチドを含む組換えポリペプチドを提供する。もう1つの実施態様において、非KLK3ペプチドは非溶血LLOペプチドである。もう1つの実施態様において、非KLK3ペプチドはActAペプチドである。もう1つの実施態様において、非KLK3ペプチドはPEST様配列ペプチドである。もう1つの実施態様において、非KLK3ペプチドはKLK3ペプチドの免疫原性を増強させる。もう1つの実施態様において、非KLK3ペプチドは当該分野で知られたいずれかの他の種類のペプチドである。各可能性は本発明の別々の実施態様を表わす。

10

【0011】

もう1つの実施態様において、本発明は、非PSCAペプチドに操作可能に連結されたPSCAペプチドを含む組換えポリペプチドを提供する。もう1つの実施態様において、非PSCAペプチドは非溶血LLOペプチドである。もう1つの実施態様において、非PSCAペプチドはActAペプチドである。もう1つの実施態様において、非PSCAペプチドはPEST様配列ペプチドである。もう1つの実施態様において、非PSCAペプチドはPSCAペプチドの免疫原性を増強させる。もう1つの実施態様において、非PSCAペプチドは当該分野で知られたいずれかの他の種類のペプチドである。各可能性は本発明の別々の実施態様を表わす。

20

【0012】

もう1つの実施態様において、本発明は、非FOLH1ペプチドに操作可能に連結されたFOLH1ペプチドを含む組換えポリペプチドを提供する。もう1つの実施態様において、非FOLH1ペプチドは非溶血LLOペプチドである。もう1つの実施態様において、非FOLH1ペプチドはActAペプチドである。もう1つの実施態様において、非FOLH1ペプチドはPEST様配列ペプチドである。もう1つの実施態様において、非FOLH1ペプチドはFOLH1ペプチドの免疫原性を増強させる。もう1つの実施態様において、非FOLH1ペプチドは当該分野で知られたいずれかの他の種類のペプチドである。各可能性は本発明の別々の実施態様を表わす。

30

【0013】

もう1つの実施態様において、本発明は本発明の組換えポリペプチドをコードする組換えワクチンベクターを提供する。

【0014】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えポリペプチドをコードするヌクレオチド分子を提供する。

【0015】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与し、それにより、対象において抗KLK3免疫応答を誘導することを含む、対象において抗KLK3免疫応答を誘導する方法を提供する。

40

【0016】

もう1つの実施態様において、本発明は対象においてKLK3蛋白質発現腫瘍を治療する方法を提供し、該方法は本発明の組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与する工程を含み、それにより、対象はKLK3蛋白質発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、対象においてKLK3蛋白質発現腫瘍を治療する。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0017】

50

もう1つの実施態様において、本発明は、K L K 3 蛋白質発現腫瘍に対してヒト対象を保護する方法を提供し、該方法は本発明の組換えリステリア株を含む組成物をヒト対象に投与する工程を含み、それにより、対象はK L K 3 蛋白質に対する免疫応答を高め、それにより、ヒト対象をK L K 3 蛋白質発現腫瘍から保護する。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0018】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与し、それにより、対象において抗P S C A免疫応答を誘導することを含む、対象において抗P S C A免疫応答を誘導する方法を提供する。

【0019】

もう1つの実施態様において、本発明は、対象においてP S C A蛋白質発現腫瘍を治療する方法を提供し、該方法は本発明の組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与する方法を含み、それにより、対象はP S C A蛋白質発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、対象においてP S C A蛋白質発現腫瘍を治療する。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0020】

もう1つの実施態様において、本発明は、P S C A蛋白質発現腫瘍に対してヒト対象を保護する方法を提供し、該方法は本発明の組換えリステリア株を含む組成物をヒト対象に投与する方法を含み、それにより、対象はP S C A蛋白質に対する免疫応答を高め、それにより、対象はP S C A蛋白質発現腫瘍に対してヒト対象を保護する。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0021】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与し、それにより、対象において抗F O L H 1免疫応答を誘導することを含む、対象において抗F O L H 1免疫応答を誘導する方法を提供する。

【0022】

もう1つの実施態様において、本発明は、対象においてF O L H 1蛋白質発現腫瘍を治療する方法を提供し、該方法は本発明の組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与する工程を含み、それにより、対象はF O L H 1蛋白質発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、対象においてF O L H 1蛋白質発現腫瘍を治療する。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0023】

もう1つの実施態様において、本発明は、F O L H 1蛋白質発現腫瘍に対してヒト対象を保護する方法を提供し、該方法は本発明の組換えリステリア株を含む組成物をヒト対象に投与する工程を含み、それにより、対象はF O L H 1蛋白質発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、F O L H 1蛋白質発現腫瘍に対してヒト対象を保護する。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】L m - E 7およびL m - L L O - E 7はE 7を発現し、それを分泌するのに異なる発現系を用いる。L m - E 7は、遺伝子カセットをリステリア・モノサイトゲネスゲノム(A)のo r f Zドメインに導入することによって生成した。h l yプロモーターは、h l yシグナル配列、およびL L Oの最初の5つのアミノ酸(A A)、続いての、H P V - 1 6 E 7の発現を駆動する。B) L m - L L O - E 7は、p r f A - 株X F L - 7をプラスミドp G G - 5 5で形質転換することによって生じさせた。p G G - 5 5は、L L O - E 7の非溶血融合の発現を駆動するh l yプロモーターを有する。また、p G G - 5 5は、イン・ビボでのX F L - 7によるプラスミドの保持について選択するためにp r f A遺伝子を含む。

【図2】L m - E 7およびL m - L L O - E 7はE 7を分泌する。L m - G a g (レーン1)、L m - E 7 (レーン2)、L m - L L O - N P (レーン3)、L m - L L O - E 7

10

20

30

40

50

(レーン4)、XFL-7 (レーン5) および10403S (レーン6) をLuria-Bertoni培地中で37℃にて一晚成長させた。600nm吸光度においてODによって決定されたように、等しい数の細菌をペレット化し、18mlの各上清をTCA沈殿させた。E7発現をウェスタンブロットによって分析した。ブロットを抗E7 mAb、続いて、HRP共役抗マウス (Amersham) でプローブし、次いで、ECL検出試薬を用いて発色させた。

【図3A】LLO-E7融合の腫瘍免疫治療効力。マウスにおけるミリメートルで表した腫瘍のサイズを、腫瘍接種から7、14、21、28および56日後において示す。ナイーブマウス：白三角形；Lm-LLO-E7：黒丸印；Lm-E7：黒菱形；Lm-Gag：X印；およびLm-LLO-NP：+符号。

【図3B】LLO-Ova融合の腫瘍免疫治療効果。

【図4】TC-1細胞に曝露すると、Lm-LLO-E7免疫化マウスからの脾臓細胞は増殖する。C57BL/6マウスを免疫化し、Lm-LLO-E7、Lm-E7、または対照rLm株をブースター注射した。脾臓細胞をブースター注射から6日後に収穫し、示した比率で照射したTC-1細胞を平板培養した。細胞を³Hチミジンでパルスし、収穫した。Cpmは(実験cpm) - (TC-1無し対照)と定義される。

【図5】LM中で発現させたNP抗原の腫瘍免疫治療効果。マウスにおけるミリメートルで表した腫瘍サイズを、腫瘍接種から10、17、24および38日後において示す。ナイーブマウス：X印；Lm-LLO-NPを投与したマウス：黒菱形；Lm-NP：四角；Lm-Gag：黒丸印。

【図6】HPV16 E7蛋白質の異なる形態を発現するワクシニアウイルス構築体の描写。

【図7】VacLLOE7は、C57BL/6マウスに皮下注射された 2×10^5 TC-1細胞から樹立された腫瘍の長期退行を引き起こす。 10^7 PFUのVacLLOE7、VacSigE7LAMP-1、またはVacE7/マウス腹腔内注射で、腫瘍負荷から11および18日後にマウスに注射し、あるいはマウスを未処理のまま放置した(ナイーブ)。処理群当たり8匹のマウスを用い、各腫瘍についての断面(2つの測定の平均)を、腫瘍接種から後の示された日数について示す。

【図8A】4つのLMワクチンを作成するのに用いたプラスミドインサートの模式図。Lm-LLO-E7インサートは、用いたリステリア遺伝子の全てを含有する。それはhlyプロモーター、(蛋白質LLOをコードする)最初の1.3kbのhly遺伝子、およびHPV-16 E7遺伝子を含有する。該最初の1.3kbのhlyはシグナル配列(ss)およびPEST領域を含む。Lm-PEST-E7はhlyプロモーター、シグナル配列、およびPESTおよびE7配列を含むが、切形されたLLO遺伝子の残りを排除する。Lm-ΔPEST-E7はPEST領域を排除するが、hlyプロモーター、シグナル配列、E7、および切形されたLLOの残りを含有する。Lm-E7epiは、hlyプロモーター、シグナル配列、およびE7のみを有する。

【図8B】組換えリステリア細菌からE7を発現させ、およびそれを分泌させるのに用いるpActA-E7発現系の模式図。hlyプロモーター(pHLY)は発現を駆動し、prfA遺伝子を用いて、イン・ビボでの組換えリステリアによるプラスミドの保持を選択する。

【図8C】頂部パネル：PEST領域を含有するリステリア構築体は腫瘍退行を誘導する。黒三角形：ナイーブマウス；丸印：Lm-LLO-E7；四角：Lm-E7epi；+符号：Lm-ΔPEST-E7；白三角形：Lm-PEST-E7。

【図8D】2つの別々の実験での腫瘍負荷から28日後における平均腫瘍サイズ。

【図8E】PEST領域を含有するリステリア構築体は、脾臓においてより高いパーセンテージのE7特異的リンパ球を誘導する。3つの実験からのデータの平均およびSEを描く。

【図9】Lm-ActA-E7 (白四角)、Lm-E7 (黒丸印)、Lm-LLO-E7 (×)を投与したマウス、およびナイーブマウス (非ワクチン接種；黒三角形)における

10

20

30

40

50

腫瘍のサイズ。

【図10A】TC-1腫瘍細胞を投与し、続いて、Lm-E7、Lm-LLO-E7、Lm-ActA-E7を投与し、またはワクチンを投与しない（ナイブ）マウスにおける、脾臓におけるE7-特異的IFN-ガンマ分泌CD8⁺T細胞の誘導、および腫瘍に貫入する数。

【図10B】図10Aで記載したマウスの脾臓および腫瘍におけるE7特異的CD8⁺細胞の誘導および貫入。

【図11A】PEST領域を含有するリステリア構築体は腫瘍内でより高いパーセンテージのE7特異的リンパ球を誘導する。1つの実験からの代表的なデータ。

【図11B】3つの実験からのデータの平均およびSE。

【図12】pGG55におけるpAdv34の模式的地図。CAT（G-）、E. coliについてのクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ；CAT（G+）、Lmについてのクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ；Ori、複製領域；prfA、Lm病原性調節因子A；LLO-PSA、そのプロモーターを含めた、C末端切形リステリオリシンOをコードする遺伝子、およびヒトPSAをコードする遺伝子の間の融合。

【図13】Lm-LLO-PSAによるLLO-PSA融合蛋白質の発現および分泌。細菌を一晩増殖させ、4℃にて10%TCAの存在下で細胞上清を沈殿させた。蛋白質をSDS-PAGEによって分離し、抗PSA（A）および抗LLO（B）抗体でプロットした。PSA陽性対照は、PSA/ワクシニアを感染させたBscI細胞溶解物であった。親細菌株XFL7、およびヒトHer2/neu抗原の断片を発現する2つの無関係なLm株を陰性対照として用いた。

【図14】マクロファージにおけるLm-LLO-PSAの摂取および成長。マウスマクロファージ様細胞（J774A.1）に、イン・ビトロにて、Lm-LLO-PSA、親Lm XFL7または野生型Lm 10403s株で1:1のMOIにて感染させた。細胞内成長を、細胞からの1時間おきに二連試料を採取し、BHIプレート上で細菌を滴定することによって8時間モニターした。CFU：コロニー形成単位。

【図15】Lm-LLO-PSA免疫化に際しての腫瘍退行。8匹のマウスの群を、0日において、 5×10^6 T-PSA23細胞で皮下接種し、1週間間隔で3回Lm-LLO-PSA、Lm-LLO-E7で腹腔内免疫化させるか、あるいは免疫化を受けさせなかった（ナイブ）。電子キャリパーを用いて腫瘍を毎週モニターし、2つの垂直直径の平均として表す。腫瘍が直径15ないし18mmのサイズに到達すると、マウスを犠牲にした。結果は、各個体マウスからの腫瘍のサイズとして表す。表は、腫瘍接種から1週間または7ないし8週間後の群当たりのマウスの合計数に対する、腫瘍がない（上方パネル）または生存した（下方パネル）のいずれかの各群におけるマウスの数を示す。この実験は3回反復し、同様な結果を示す。

【図16】脾臓および腫瘍におけるPSA特異的CD8⁺T細胞。T-PSA23細胞をマトリゲルとの混合物として皮下移植した。マウスをLm-LLO-PSA、またはLm-LLO-E7で2回免疫化するか、あるいはナイブのまま放置した。脾臓および腫瘍を2回目の免疫化から6日後に抽出し、FACS分析によってCD8⁺/PSAテトラマー陽性T細胞の存在についてテストした。Lm-LLO-PSA免疫化の結果、脾臓（上方パネル）および腫瘍（下方パネル）双方において、PSA特異的CD8⁺細胞が生じた。各コーナーにおける数は、各組織におけるCD8⁺T細胞の合計数を超えたPSA陽性細胞の%を示した。

【図17】脾臓および腫瘍におけるTregsの存在に対するLmワクチンでのワクチン接種の効果。単離された脾臓細胞、および従前の実験において3つの腫瘍を担うマウスから抽出されたTILをプールし、CD4、CD25およびFoxP3について染色して、これらの組織におけるTregsの存在に対するLm-LLO-PSAでの免疫化の効果を解明した。各欄は、各プールにおける合計CD4⁺T細胞に関するCD25⁺/FoxP3⁺T細胞集団の%を表わす。

10

20

30

40

50

【図18】ELISpotアッセイによって検出されたLm-LLO-PSAワクチン接種によって刺激されたIFN- γ 分泌。マウスを0.1 LD₅₀のLm-LLO-PSAで3回免疫化した。単離された脾臓細胞を調製し、1 μ MのPSA特異的H2D^bペプチド、HCIRNKSVILの存在下で一晩インキュベートした。単離された細胞によるIFN- γ 分泌が、MabtechからのELISpotキットを用いて検出し、スポット形成細胞(SFC)/100万細胞として表した。Lm-LLO-WT1免疫化またはナイーブマウスからの脾臓細胞を陰性対照として用いた。(※はp<0.0001でのナイーブ群に関する統計学的有意性を示す)。

【図19】細胞内染色によって検出されたLm-LLO-PSAワクチン接種によって刺激されたIFN- γ の生産。マウスを0.1 LD₅₀のLm-LLO-PSAで3回免疫化した。単離された脾臓を調製し、PSA特異的H2D^bペプチドの存在下で5時間インキュベートした。活性化されたCD8⁺T細胞によるIFN- γ 生産は方法において記載されたように決定された。Lm-LLO-WT1免疫化またはナイーブマウスからの脾臓を陰性対照として用いた。

【図20】マウスにおけるPSA特異的細胞傷害性応答。動物を(Lm陰性対照としての)0.1 LD₅₀のLm-LLO-PSA、Lm-LLO-HPV16E7E6で3回免疫化するか、あるいはナイーブなまま放置した。単離された脾臓細胞を調製し、PSA発現刺激体細胞と共に5日間インキュベートした。エフェクター細胞(E)を、PSA H2D^bペプチドでパルスした標的EL4細胞と共に：A)異なるE:T比率/固定されたペプチド濃度(1 μ M)にて；またはB)1:25の固定されたE:T比率であるが、異なるペプチド濃度にてインキュベートすることによって、CTLアッセイを4時間行った。

【図21】他のPSAベースのワクチンとの、Lm-LLO-PSAの抗腫瘍効果の比較。8匹のマウスの群に、0日において、5 $\times$ 10⁶ T-PSA23細胞で皮下接種し、1週間間隔で2回、Lm-LLO-PSA、ワクシニア-PSAまたはpDNA(PSA+GM-CSF)で免疫化するか、あるいは免疫化を受けさせなかった(ナイーブ)。電子キャリパーを用いて腫瘍を毎週モニターし、2つの垂直直径の平均として表す。腫瘍が直径20mmのサイズに到達すると、マウスを犠牲にした。結果を各個々のマウスからの腫瘍サイズとして表す(21A)。表は、腫瘍がないか、あるいは腫瘍接種後に8週間生存下のいずれかの各群におけるマウスの数を示す。21B)各群における腫瘍サイズの平均。腫瘍が20mmのサイズに到達すると、マウスを犠牲にした。それらには、平均曲線を作成するために20mmの値を与えた。この実験は、2回反復し、同様な結果を示す。

【図22】Lm-PSAの安定性。Lm-PSAを成長させ、イン・ビトロにて7連続日の間継代した。プラスミドDNAを、イン・ビトロ成長の間に毎日採取した細菌試料から精製し、PCR(22A)またはプラスミド(22B)のEcoRI/HindIII制限マッピングによるPSA遺伝子の増幅によってテストした。

【発明を実施するための形態】

【0025】

本発明は、KLK3ペプチド、PSCAペプチド、FOLH1ペプチド、それを含む組換えポリペプチド、それをコードする組換えヌクレオチド分子、それを含む組換えリステリア株、およびそれを利用する免疫原および治療方法を提供する。

【0026】

もう1つの実施態様において、本発明はカリクレイン関連ペプチダーゼ3(KLK3)ペプチドを発現する組換えリステリア株を提供する。もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドの配列は配列番号：25、27、29ないし32、34、および36ないし39から選択される。もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドの配列は配列番号：25に記載されている。もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドの配列は配列番号：27に記載されている。もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドの配列は配列番号：29に記載されている。もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドの配

10

20

30

40

50

列は配列番号：30に記載されている。もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドの配列は配列番号：31に記載されている。もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドの配列は配列番号：32に記載されている。もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドの配列は配列番号：34に記載されている。もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドの配列は配列番号：36に記載されている。もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドの配列は配列番号：37に記載されている。もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドの配列は配列番号：38に記載されている。もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドの配列は配列番号：39に記載されている。もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドの配列は当該分野で公知のいずれかの他のKLK3蛋白質配列である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

10

【0027】

もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドの配列は配列番号：25、27、29ないし32、34、および36ないし39から選択される配列を含む。

【0028】

もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドはより大きなKLK3ペプチドの免疫原性断片であり、より大きなKLK3ペプチドの配列は配列番号：25、27、29ないし32、34、および36ないし39から選択される配列である。もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドはより大きなKLK3ペプチドの免疫原性断片であり、より大きなKLK3ペプチドの配列は配列番号：25に記載されている。もう1つの実施態様において、より大きなKLK3ペプチドの配列は配列番号：27に記載されている。もう1つの実施態様において、より大きなKLK3ペプチドの配列は配列番号：29に記載されている。もう1つの実施態様において、より大きなKLK3ペプチドの配列は配列番号：30に記載されている。もう1つの実施態様において、より大きなKLK3ペプチドの配列は配列番号：31に記載されている。もう1つの実施態様において、より大きなKLK3ペプチドの配列は配列番号：32に記載されている。もう1つの実施態様において、より大きなKLK3ペプチドの配列は配列番号：34に記載されている。もう1つの実施態様において、より大きなKLK3ペプチドの配列は配列番号：36に記載されている。もう1つの実施態様において、より大きなKLK3ペプチドの配列は配列番号：37に記載されている。もう1つの実施態様において、より大きなKLK3ペプチドの配列は配列番号：38に記載されている。もう1つの実施態様において、より大きなKLK3ペプチドの配列は配列番号：39に記載されている。もう1つの実施態様において、より大きなKLK3ペプチドの配列は当該分野で知られたいずれかの他のKLK3蛋白質配列である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

20

30

【0029】

もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドの配列は配列番号：25、27、29ないし32、34、および36ないし39から選択される配列の免疫原性断片を含む。

【0030】

もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドは当該分野で公知のいずれかの他のKLK3ペプチドである。もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドは当該分野で公知のいずれかの他のKLK3ペプチドの断片である。KLK3ペプチドの各タイプは、本発明の別の実施態様を表わす。

40

【0031】

「KLK3ペプチド」とは、もう1つの実施態様において、全長KLK3蛋白質をいう。もう1つの実施態様において、該用語はKLK3蛋白質の断片をいう。もう1つの実施態様において、該用語は、KLK3シグナルペプチドを欠如するKLK3蛋白質の断片をいう。もう1つの実施態様において、該用語は、KLK3シグナルペプチドを除いた全KLK3配列を含有するKLK3蛋白質をいう。「KLK3シグナル配列」とは、もう1つの実施態様において、天然でKLK3蛋白質に見出されるいずれのシグナル配列もいう。もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物のKLK3蛋白質はいずれのシグナル配列も含有しない。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

50

【0032】

1つの実施態様において、「変種」とは、集団の大部分とは異なるが、それらのうち1つであると考えられるべき共通の態様と依然として十分に同様であるアミノ酸または核酸配列（あるいは他の実施態様においては、生物または組織）、例えば、スプライス変種をいう。

【0033】

1つの実施態様において、「イソ形態」とは、もう1つのイソ形態と比較して僅かな差のみを持つ分子、例えば、蛋白質のバージョン、または同一蛋白質のバージョンをいう。1つの実施態様において、イソ形態は異なるが関連する遺伝子から生じさせることができ、あるいはもう1つの実施態様において、オルタナティブスプライシングによって同一遺伝子から生じさせることができる。もう1つの実施態様において、イソ形態は単一ヌクレオチド多形によって引き起こされる。

10

【0034】

1つの実施態様において、「断片」とは、全長蛋白質またはポリペプチドよりも短い、またはより少ないアミノ酸を含む蛋白質またはポリペプチドをいう。もう1つの実施態様において、断片とは、全長核酸よりも短い、またはより少ないヌクレオチドを含む核酸をいう。もう1つの実施態様において、該断片はN末端断片である。もう1つの実施態様において、該断片はC末端断片である。1つの実施態様において、該断片は蛋白質、ペプチド、または核酸の配列内セクションである。1つの実施態様において、該断片は機能的断片である。もう1つの実施態様において、該断片は免疫原性断片である。1つの実施態様において、断片は10ないし20核酸またはアミノ酸を有し、他方、もう1つの実施態様において、断片は5を超える核酸またはアミノ酸を有し、他方、もう1つの実施態様において、断片は100ないし200核酸またはアミノ酸を有し、他方、もう1つの実施態様において、断片は100ないし500核酸またはアミノ酸を有し、他方、もう1つの実施態様において、断片は50ないし200核酸またはアミノ酸を有し、他方、もう1つの実施態様において、断片は10ないし250核酸またはアミノ酸を有する。

20

【0035】

1つの実施態様において、「ホモログ」とは、特定の核酸またはアミノ酸配列に対するあるパーセンテージの配列同一性を共有する核酸またはアミノ酸配列をいう。もう1つの実施態様において、本明細書中で提供される組成物および方法において有用な配列は、本明細書中に記載されるいずれかの配列のホモログであってよい。1つの実施態様において、ホモログは特定の配列に対して少なくとも70%同一性を有する。もう1つの実施態様において、ホモログは特定の配列に対して少なくとも72%同一性を有する。もう1つの実施態様において、ホモログは特定の配列に対して少なくとも75%同一性を有する。もう1つの実施態様において、ホモログは特定の配列に対して少なくとも78%同一性を有する。もう1つの実施態様において、ホモログは特定の配列に対して少なくとも80%同一性を有する。もう1つの実施態様において、ホモログは特定の配列に対して少なくとも82%同一性を有する。もう1つの実施態様において、ホモログは特定の配列に対して少なくとも83%同一性を有する。もう1つの実施態様において、ホモログは特定の配列に対して少なくとも85%同一性を有する。もう1つの実施態様において、ホモログは特定の配列に対して少なくとも87%同一性を有する。もう1つの実施態様において、ホモログは特定の配列に対して少なくとも88%同一性を有する。もう1つの実施態様において、ホモログは特定の配列に対して少なくとも90%同一性を有する。もう1つの実施態様において、ホモログは特定の配列に対して少なくとも92%同一性を有する。もう1つの実施態様において、ホモログは特定の配列に対して少なくとも93%同一性を有する。もう1つの実施態様において、ホモログは特定の配列に対して少なくとも95%同一性を有する。もう1つの実施態様において、ホモログは特定の配列に対して少なくとも96%同一性を有する。もう1つの実施態様において、ホモログは特定の配列に対して少なくとも97%同一性を有する。もう1つの実施態様において、ホモログは特定の配列に対して少なくとも98%同一性を有する。もう1つの実施態様において、ホモログは特定の配列に

30

40

50

対して少なくとも99%同一性を有する。もう1つの実施態様において、ホモログは特定の配列に対して100%同一性を有する。各可能性は本明細書中で提供された別の実施態様を表わす。

【0036】

1つの実施態様において、本明細書中で提供された、および／または本明細書中で記載された配列のいずれかのホモログが本発明の一部であると考えられることは理解されるべきである。

【0037】

1つの実施態様において、本明細書中で用いられる「異種」は、参照種とは異なる種に由来する核酸、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、蛋白質等を記載する。かくして、例えば、異種ポリペプチドを発現するリステリア株は、1つの実施態様において、天然ではない、またはリステリア株に対して内因性であるポリペプチドを発現し、あるいはもう1つの実施態様において、リステリア株によって通常は発現されないポリペプチド、あるいはもう1つの実施態様において、リステリア株以外の源からのポリペプチドを発現するであろう。

【0038】

1つの実施態様において、本明細書中で用いる「内因性」は、参照生物内に発生したまたは由来し、あるいは参照生物内の原因から生起した、核酸、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、蛋白質等を記載する。もう1つの実施態様において、内因性とは天然をいう。

【0039】

もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物のKLK3ペプチドの源であるカリクレイン関連ペプチダーゼ3 (KLK3蛋白質) はPSA蛋白質である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質はP-30抗原蛋白質である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質はガンマーセミノプロテイン蛋白質である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質はカリクレイン3蛋白質である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質はセミノゲラーゼ蛋白質である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質はセミニン蛋白質である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は、当該分野で公知のいずれかの他のタイプのKLK3蛋白質である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0040】

もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質はスプライス変種1 KLK3蛋白質である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質はスプライス変種2 KLK3蛋白質である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質はスプライス変種3 KLK3蛋白質である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は転写体変種1 KLK3蛋白質である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は転写体変種2 KLK3蛋白質である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は転写体変種3 KLK3蛋白質である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は転写体変種4 KLK3蛋白質である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は転写体変種5 KLK3蛋白質である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は転写体変種6 KLK3蛋白質である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質はスプライス変種RP5 KLK3蛋白質である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は、当該分野で公知のいずれかの他のスプライス変種KLK3蛋白質である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は、当該分野で公知のいずれかの他の転写体変種KLK3蛋白質である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0041】

もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は成熟KLK3蛋白質である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質はプロ-KLK3蛋白質である。もう1つの実施態様において、リーダー配列は、本発明の方法および組成物の成熟KLK3蛋白質から除去されている。成熟KLK3蛋白質の例は、配列番号：40のaa378-1088によってコードされる。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

10

20

30

40

50

【0042】

もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物のKLK3ペプチドの源であるKLK3蛋白質はヒトKLK3蛋白質である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は霊長類KLK3蛋白質である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は当該分野で公知のいずれかの他の種のKLK3蛋白質である。もう1つの実施態様において、前記KLK3蛋白質の1つは「KLK3蛋白質」と当該分野で称される。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0043】

もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は以下の配列を有する：

MWVPVVFLLTSLVTWIGAAPLIILSRIVGGWCEKEKHSQPWQV
LVASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRNKSIVILLGRHSL
FHPEDTGQVFQVSHSFPHPLYDMSLLKNRFLRPGDDSSHD
LMLLRLSEPAELTDAVKVMDLPTQEPALGTTTCYASGWGSI
EPEEFLLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVTKFMLCAG
RWTGGKSTCSGDSGGPLVCNGVLQGITSWGSEPCALPERP
SLYTKVVHYRKWKIDTIVANP（配列番号：25；GenBankアクセ
ス番号X14810）。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：25
のホモログである。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：25の変
種である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：25のイソ形態で
ある。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：25の断片である。各
可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0044】

もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は以下の配列を有するヌクレオチド分子
によってコードされる：

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

ctgactcttagccccagactcttcatctcagtgggcccaact
tttccttaggaaaaacatgagcatccccagccacaactgc
cagctctctgaggtccccaaatctgcatccttttcaaaaacc
taaaaaacaaaaaagaaaaaacaaataaaaaacaaaaccactca
gaccagaactgttttctcaaccctggggacttccctaaaacttt
ccaaaaaccttccctcttccagcaactgaacctcggccataag
gcacttatccctgggttccctagcaccccttatcccttcaga
atccacaaacttgtaccaaagtttcccttctccccagttccaa
acccccaaaatcacccacaaaaggaccccaatccccagactcaa
atatgggtctggggcgcctgtcttgtgtgtctccctaccctgatcc
ctggggttcaactctgtctccagagcatgaagcctctccac
cagcacccagccacccaacctgcaaaacctagggaagattgac
agaatttcccagcccttccccagctccccctggcccatgtccc
aggactccccagcccttgggttctctctgccccccgtgtcttttca
aacccacacatcctaaaatccatctctcttatccgaggtccccccag
ttccccctgtcaaacctgatctccccctgatctagcaccccc
tctgcaggcgcctgcggccccctcatcctgtctcggattgtgg
gaggctgggaggtgcgagaaagcattccccaaacctgggcagggt
gcttgtgtggcctctcgtgggcaggggcagttctgcggcggtgtt
ctgggtgcacccccagtggggtcctcacagctgcccactgca
tcagggaagtgaagtaggggccctgggggtctggggagcagggtg
tctgtgttcccagaggaataaacagctggggcattttccccag
gataaacctctaaaggccagcccttggggactggggggaagagg
gaaagttctgggttcagggtcacatgggggagggcagggttggg
gctgggaccacctcccccatggctgcctgggtctccatctg
tgtccccctctatgtctcttttgtgtcgcctttcatatatgtctc
ttgggtaaactggccttcgggttgtgtgtctctccgtgtgactatt
ttgttctctctctctccccctctctctctctctgtcttccagtctcca
tatctccccccctctctctctgtctctctctctgggtccccctctctag
ccagtggtgtctcacccctgtatctctctctgcccaggcctctgtc
tctcgggtctctgtctctcacctgtgtccctctccccctactgaac
acacgcacgggagtgggccctggggggaacctgagaaaaaggaa
gggcttttggcctggggcgcgggtggcctcacacacctgtaatccca
gcacttttgggagggccaagggcagggtagatcacctgagggtca
ggaggttcgagaccagccctgggccaaactgggtgaaacccccatc
tctactaaaaaatacaaaaaaataatagccaggcgtgggtggcgc
atgccctgtagctcccagctactcaggagctgaggggaggaga
attgcattgaacctggaggggttgagggttgaggtgagccgag
accgtgccaactgcactccagccctggggtgacagagtgagac
tccgccctcaaaaaaanaaaaaaanaaaaaaanaaaaaaaga
aaagaaaaagaaaaaggaaagtgttttatccctgatgt
gtgtgggtatgagggtatgagaggggccccctctcactccat
tcccttctccaggaacatccccctccactcttggggagacacaga
gaaggggctgggttccagctggagctggggagggggcaattgag
ggaggagggaaggaggaagggggaagggaacagggtatggg
ggaaagggaacctgggggagcgaagtggagggatacaaccttg
ggcctgcagggcaggcctacctaccacacttggaacccacgc
caaaagccgcgcatctacagctgagccacctctgaggcctcccc
tccccggcggtccccactcagctccaaagtctctctctccct
tttctctccccacactttatcatccccccggattctctctcta

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

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

t c c t g g c c c t t g t c c c a c c g a c c t g t c t a c a a g g a c t g t c
c t c g t g g a c c c t c c c c t c t g c a c a g g a g c t g g a c c c t g a a
g t c c c t t c c t a c c g g c c a g g a c t g g a g c c c c t a c c c c t c t
g t t g g a a t c c c t g c c c a c c t t c t t c t g g a a g t c g g c t c t g
g a g a c a t t t c t c t c t t c t t c c a a a g c t g g g a a c t g c t a t c
t g t t a t c t g c c t g t c c a g g t c t g a a a g a t a g g a t t g c c c a
g g c a g a a a c t g g g a c t g a c c t a t c t c a c t c t c t c c c t g c t
t t t a c c c t t a g g g t g a t t c t g g g g g c c c a c t t g t c t g t a a
t g g t g t g c t t c a a g g t a t c a c g t c a t g g g g c a g t g a a c c a
t g t g c c c t g c c c g a a a g g c c t t c c c t g t a c a c c a a g g t g g
t g c a t t a c c g g a a g t g g a t c a a g g a c a c c a t c g t g g c c a a
c c c c t g a g c a c c c c t a t c a a g t c c c t a t t g t a g t a a a c t t
g g a a c c t t g g a a a t g a c c a g g c c a a g a c t c a a g c c t c c c c
a g t t c t a c t g a c c t t t g t c c t t a g g t g t g a g g t c c a g g g t
t g c t a g g a a a a g a a a t c a g c a g a c a c a g g t g t a g a c c a g a
g t g t t t c t t a a a t g g t g t a a t t t t g t c c t c t c t g t g t c c t
g g g g a a t a c t g g c c a t g c c t g g a g a c a t a t c a c t c a a t t t
c t c t g a g g a c a c a g t t a g g a t g g g g t g t c t g t g t t a t t t g
t g g g a t a c a g a g a t g a a a g a g g g g t g g g a t c c (配列番号：26

10

20

30

；GenBankアクセス番号X14810)。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：26の残基401ないし446、1688ないし1847、3477ないし3763、3907ないし4043、5413ないし5568、またはその組合せによってコードされる。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：26のホモログによってコードされる。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：26の変種によってコードされる。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：26のイソ形態によってコードされる。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：26の断片によってコードされる。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0045】

もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は以下の配列を有する：

MWVPVVFLLTSLSVTWIGAAPLILSRIVGGWCEKEKHSQPWQV
LVASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRNKSVILLGRHSL
FHPEDTGQVFQVSHSFPHPLYDMSLLKNRFLRPGDDSSHD
LMLRLRLSEPAELTDAVKVMDLPTQEPALGTTTCYASGWGS
IEPEEFLLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVTKFMLCAG
RWTGGKSTCSWVILITELTMPALPMVLHGSLVPWRGGV (配
列番号：27；GenBankアクセス番号NM_001030047)。もう1つの実
施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：27のホモログである。もう1つの実施態
様において、KLK3蛋白質は配列番号：27の変種である。もう1つの実施態様におい
て、KLK3蛋白質は配列番号：27のイソ形態である。もう1つの実施態様において、
KLK3蛋白質は配列番号：27の断片である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わ
す。

40

【0046】

もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は、以下の配列を有するヌクレオチド分
子によってコードされる：

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

50

t g g a t t g g t g c t g c a c c c c t c a t c c t g t c t c g g a t t g t g g
g a g g c t g g g a g t g c g a g a a g c a t t c c c a a c c c t g g c a g g t
g c t t g t g g c c t c t c g t g g c a g g g c a g t c t g c g g c g g t g t t
c t g g t g c a c c c c c a g t g g g t c c t c a c a g c t g c c c a c t g c a
t c a g g a a c a a a a g c g t g a t c t t g c t g g g t c g g c a c a g c c t
g t t t c a t c c t g a a g a c a c a g g c c a g g t a t t t c a g g t c a g c
c a c a g c t t c c c a c a c c c g c t c t a c g a t a t g a g c c t c c t g a
a g a a t c g a t t c c t c a g g c c a g g t g a t g a c t c c a g c c a c g a
c c t c a t g c t g c t c c g c c t g t c a g a g c c t g c c g a g c t c a c g
g a t g c t g t g a a g g t c a t g g a c c t g c c c a c c c a g g a g c c a g
c a c t g g g g a c c a c c t g c t a c g c c t c a g g c t g g g g c a g c a t
t g a a c c a g a g g a g t t c t t g a c c c c a a a g a a a c t t c a g t g t
g t g g a c c t c c a t g t t a t t t c c a a t g a c g t g t g t g c g c a a g
t t c a c c c t c a g a a g g t g a c c a a g t t c a t g c t g t g t g c t g g
a c g c t g g a c a g g g g g c a a a a g c a c c t g c t c g t g g g t c a t t
c t g a t c a c c g a a c t g a c c a t g c c a g c c c t g c c g a t g g t c c
t c c a t g g c t c c c t a g t g c c c t g g a g a g g a g g t g t c t a g t c
a g a g a g t a g t c c t g g a a g g t g g c c t c t g t g a g g a g c c a c g
g g g a c a g c a t c c t g c a g a t g g t c c t g g c c c t t g t c c c a c c
g a c c t g t c t a c a a g g a c t g t c c t c g t g g a c c c t c c c c t c t
g c a c a g g a g c t g g a c c c t g a a g t c c c t t c c c c a c c g g c c a
g g a c t g g a g c c c c t a c c c c t c t g t t g g a a t c c c t g c c c a c
c t t c t t c t g g a a g t c g g c t c t g g a g a c a t t t c t c t c t t c t
t c c a a a g c t g g g a a c t g c t a t c t g t t a t c t g c c t g t c c a g
g t c t g a a a g a t a g g a t t g c c c a g g c a g a a a c t g g g a c t g a
c c t a t c t c a c t c t c t c c c t g c t t t a c c c t t a g g g t g a t t
c t g g g g g c c c a c t t g t c t g t a a t g g t g t g c t t c a a g g t a t
c a c g t c a t g g g g c a g t g a a c c a t g t g c c c t g c c c g a a a g g
c c t t c c c t g t a c a c c a a g g t g g t g c a t t a c c g g a a g t g g a
t c a a g g a c a c c a t c g t g g c c a a c c c c t g a g c a c c c c t a t c
a a c c c c c t a t t g t a g t a a a c t t g g a a c c t t g g a a a t g a c c
a g g c c a a g a c t c a a g c c t c c c c a g t t c t a c t g a c c t t t g t
c c t t a g g t g t g a g g t c c a g g g t t g c t a g g a a a a g a a a t c a
g c a g a c a c a g g t g t a g a c c a g a g t g t t t c t t a a a t g g t g t
a a t t t t g t c c t c t c t g t g t c c t g g g g a a t a c t g g c c a t g c
c t g g a g a c a t a t c a c t c a a t t t c t c t g a g g a c a c a g a t a g
g a t g g g g t g t c t g t g t t a t t t g t g g g g t a c a g a g a t g a a a
g a g g g g t g g g a t c c a c a c t g a g a g a g t g g a g a g t g a c a t g
t g c t g g a c a c t g t c c a t g a a g c a c t g a g c a g a a g c t g g a g
g c a c a a c g c a c c a g a c a c t c a c a g c a a g g a t g g a g c t g a a
a a c a t a a c c c a c t c t g t c c t g g a g g c a c t g g g a a g c c t a g
a g a a g g c t g t g a g c c a a g g a g g g a g g g t c t t c c t t t g g c a
t g g g a t g g g g a t g a a g t a a g g a g a g g g a c t g g a c c c c c t g
g a a g c t g a t t c a c t a t g g g g g a g g t g t a t t g a a g t c c t c
c a g a c a a c c c t c a g a t t t g a t g a t t t c c t a g t a g a a c t c a
c a g a a a t a a a g a g c t g t t a t a c t g t g (配列番号：28；GenBa
nkアクセス番号NM 001030047)。もう1つの実施態様において、KLK3
蛋白質は配列番号：28の残基42ないし758によってコードされる。もう1つの実施
態様において、KLK3蛋白質は配列番号：28のホモログによってコードされる。もう
1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：28の変種によってコードされる

。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：28のイソ形態によってコードされる。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：28の断片によってコードされる。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0047】

もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は、以下の配列を有する：

MWVPVVFLLTSLVTWIGAAPLILSRIVGGWCEKHSQPWQV
LVASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRK（配列番号：29；GenBank
アクセス番号NM_001030050）。もう1つの実施態様において、KLK3
蛋白質は配列番号：29のホモログである。もう1つの実施態様において、KLK3
蛋白質は配列番号：29の変種である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質
の配列は配列番号：29を含む。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番
号：29のイソ形態である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：
29の断片である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

10

【0048】

もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドの源であるKLK3蛋白質は、以下の配列を有する：

MWVPVVFLLTSLVTWIGAAPLILSRIVGGWCEKHSQPWQV
LVASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRNKSIVILLGRHSL
FHPEDTGQVFQVSHSFPHPLYDMSLLKNRFLRPGDDSSIE
PEEFLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVTKFMLCAGR
WTGGKSTCSGDSGGPLVCNGVLQGITSWGSEPCALPERPS
LYTKVVHYRKWIKDTIVANP（配列番号：30；GenBank
アクセス番号NM_001030049）。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列
番号：30のホモログである。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号
：30の変種である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：30の
イソ形態である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：30の断片
である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

20

【0049】

もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は、以下の配列を有する：

MWVPVVFLLTSLVTWIGAAPLILSRIVGGWCEKHSQPWQV
LVASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRKPGDDSSHDML
LRLSEPAELTDAVKVMDLPTQEPALGTTTCYASGWGSIEPE
EFLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVTKFMLCAGRWT
GGKSTCSGDSGGPLVCNGVLQGITSWGSEPCALPERPSLY
TKVVHYRKWIKDTIVANP（配列番号：31；GenBank
アクセス番号NM_001030048）。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号
：31のホモログである。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：3
1の変種である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：31のイソ
形態である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：31の断片であ
る。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

30

40

【0050】

もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は、以下の配列を有する：

MWVPVVFLLTSLVTWIGAAPLILSRIVGGWCEKHSQPWQV
LVASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRNKSIVILLGRHSL
FHPEDTGQVFQVSHSFPHPLYDMSLLKNRFLRPGDDSSHD
LMLLRLSEPAELTDAVKVMDLPTQEPALGTTTCYASGWGS
IEPEEFLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVTKFMLCAGR
RWTGGKSTCSGDSGGPLVCNGVLQGITSWGSEPCALPERP
SLYTKVVHYRKWIKDTIVANP（配列番号：32；GenBank
アクセス番号NM_001648）。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号

50

： 3 2 のホモログである。もう 1 つの実施態様において、K L K 3 蛋白質は配列番号： 3 2 の変種である。もう 1 つの実施態様において、K L K 3 蛋白質は配列番号： 3 2 のイソ形態である。もう 1 つの実施態様において、K L K 3 蛋白質は配列番号： 3 2 の断片である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【 0 0 5 1 】

もう 1 つの実施態様において、K L K 3 蛋白質は、以下の配列を有するヌクレオチド分子によってコードされる：

```

a g c c c c a a g c t t a c c a c c c t g c a c c c g g a g a g c t g t g t c a c
c a t g t g g g t c c c g g t t g t c t t c c t c a c c c t g t c c g t g a c g
t g g a t t g g t g c t g c a c c c c t c a t c c t g t c t c g g a t t g t g g
g a g g c t g g g a g t g c g a g a a g c a t t c c c a a c c c t g g c a g g t
g c t t g t g g c c t c t c g t g g c a g g g c a g t c t g c g g c g g t g t t
c t g g t g c a c c c c c a g t g g g t c c t c a c a g c t g c c c a c t g c a
t c a g g a a c a a a a g c g t g a t c t t g c t g g g t c g g c a c a g c c t
g t t t c a t c c t g a a g a c a c a g g c c a g g t a t t t c a g g t c a g c
c a c a g c t t c c c a c a c c c g c t c t a c g a t a t g a g c c t c c t g a
a g a a t c g a t t c c t c a g g c c a g g t g a t g a c t c c a g c c a c g a
c c t c a t g c t g c t c c g c c t g t c a g a g c c t g c c g a g c t c a c g
g a t g c t g t g a a g g t c a t g g a c c t g c c c a c c c a g g a g c c a g
c a c t g g g g a c c a c c t g c t a c g c c t c a g g c t g g g g c a g c a t
t g a a c c a g a g g a g t t c t t g a c c c c a a a g a a a c t t c a g t g t
g t g g a c c t c c a t g t t a t t t c c a a t g a c g t g t g t g c g c a a g
t t c a c c c t c a g a a g g t g a c c a a g t t c a t g c t g t g t g c t g g
a c g c t g g a c a g g g g g c a a a a g c a c c t g c t c g g g t g a t t c t
g g g g g c c c a c t t g t c t g t a a t g g t g t g c t t c a a g g t a t c a
c g t c a t g g g g c a g t g a a c c a t g t g c c c t g c c c g a a a g g c c
t t c c c t g t a c a c c a a g g t g g t g c a t t a c c g g a a g t g g a t c
a a g g a c a c c a t c g t g g c c a a c c c c t g a g c a c c c c t a t c a a
c c c c c t a t t g t a g t a a a c t t g g a a c c t t g g a a a t g a c c a g
g c c a a g a c t c a a g c c t c c c c a g t t c t a c t g a c c t t t g t c c
t t a g g t g t g a g g t c c a g g g t t g c t a g g a a a a g a a a t c a g c
a g a c a c a g g t g t a g a c c a g a g t g t t t c t t a a a t g g t g t a a
t t t t g t c c t c t c t g t g t c c t g g g g a a t a c t g g c c a t g c c t
g g a g a c a t a t c a c t c a a t t t c t c t g a g g a c a c a g a t a g g a
t g g g g t g t c t g t g t t a t t t g t g g g g t a c a g a g a t g a a a g a
g g g g t g g g a t c c a c a c t g a g a g a g t g g a g a g t g a c a t g t g
c t g g a c a c t g t c c a t g a a g c a c t g a g c a g a a g c t g g a g g c
a c a a c g c a c c a g a c a c t c a c a g c a a g g a t g g a g c t g a a a a
c a t a a c c c a c t c t g t c c t g g a g g c a c t g g g a a g c c t a g a g
a a g g c t g t g a g c c a a g g a g g g a g g g t c t t c c t t t g g c a t g
g g a t g g g g a t g a a g t a a g g a g a g g g a c t g g a c c c c c t g g a
a g c t g a t t c a c t a t g g g g g g a g g t g t a t t g a a g t c c t c c a
g a c a a c c c t c a g a t t t g a t g a t t t c c t a g t a g a a c t c a c a
g a a a t a a a g a g c t g t t a t a c t g t g (配列番号： 3 3 ; GenBank
アクセス番号NM_001648)。もう 1 つの実施態様において、K L K 3 蛋白質は配
列番号： 3 3 の残基 4 2 ないし 8 2 7 によってコードされる。もう 1 つの実施態様におい
て、K L K 3 蛋白質は配列番号： 3 3 のホモログによってコードされる。もう 1 つの実施
態様において、K L K 3 蛋白質は配列番号： 3 3 の変種によってコードされる。もう 1 つ
の実施態様において、K L K 3 蛋白質は配列番号： 3 3 のイソ形態によってコードされる
。もう 1 つの実施態様において、K L K 3 蛋白質は配列番号： 3 3 の断片によってコード

```

される。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0052】

もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は、以下の配列を有する：

MWVPVVFLLTSLVTWIGAAPLILSRIVGGWCEKHSQPWQV
 LVASRGRGAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRNKSVILLGRHSL
 FHPEDTGQVFQVSHSFPHPLYDMSLLKNRFLRPGDDSSHD
 LMLLRLSEPAELTDAVKVMDLPTQEPALGTTCTCYASGWGS
 EPEEFLLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVTKFMLCAG
 RWTGGKSTCSGDSGGPLVCNGVLQGITSWGSEPCALPERP
 SLYTKVVHYRKWKIKDTIVANP（配列番号：34；GenBankアクセ
 ス番号BC056665）。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：
 34のホモログである。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：34
 の変種である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：34のイソ形
 態である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：34の断片である。
 各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0053】

もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は、以下の配列を有するヌクレオチド分
 子によってコードされる：

gggggagccccaagccttaccacccctgcaccccggaagagcctgt
 gtcacccatgtgggtcccggttgtctctccctcacccctgtccg
 tgacgtggatgtgggtgctgcacccctcatcctgtctcggat
 tgtgggaggcctgggagtgcgagaaagcattccccaacccctgg
 cagggtgcttgtgtggcctctcgtggcaggggcagtcctgcggcg
 gtgttctgggtgcacccccagtggtgtccctcacagcctgccca
 ctgcatcaggaaacaaaagcgtgatcttgtgtgggtcgggcac
 agcctgttttcatcctgaagacacaggccagggtattttcagg
 tcaggccacagccttcccaacacccgctctacgatattgagcct
 cctgaagaaatcgatctcctcaggccagggtgatgactccagc
 cacgacctcatgctgctccgcccgtgtcagagccctgccgagc
 tcacggatgctgtgaagggtcatggacctgcccaacccaggga
 gccagcacctgggggacccacctgctacgccctcaggcctggggc
 agcattgaaccagaggaggttcttgaccccaaaagaaacttc
 agtgtgtggacctccatgtttatttccaatgacgtgtgtgtgc
 gcaagttcacccctcagaagggtgaccaagttcatgctgtgtgt
 gctggacgctggacaggggggcaaaaagcacctgctcgggtgt
 attctggggggcccaacttgtctgttaattggtgtgtgtgtgt
 tatcacgtcatggggcagtgaaacctgtgccctgcccgaa
 aggcccttccctgtacaccaagggtggtgcattaccgggaagt
 ggatcaaggacacccatcgtggccaacccctgagcacccct
 atcaactccctattgtagtaaaacttggaaccttggaagt
 accaggcccaagactcaggccctccccaagtcttactgacctt
 tgtccttaggtgtgagggtccagggttgtctagggaagaaaga
 tcagcagacacagggtgtagaccagaggtgtttctttaaatgg
 tgtaattttgtctctctctgtgtcctgggggaatactggcca
 tgccctggagacatatcactcaatttctcttgaggacacaga
 taggatgggggtgtctgtgtttatttgtgggggtacagagatg
 aaagagggggtgggatccacacctgagagaggtggagaggtgac
 atgtgtgctggacacctgtccatgaagcacctgagcagaagcgtg
 gaggcacaaacgcaccagacacctcacagcaaggatggagcct
 gaaaacataaacccacctctgtcctggagggcactgggaagcc

0

20

30

40

50

50

もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は、以下の配列を有する：
 MWV P V V F L T L S V T W I G E R G H G W G D A G E G A S P D C Q A E A L S P
 P T Q H P S P D R E L G S F L S L P A P L Q A H T P S P S I L Q Q S S L P H Q V
 P A P S H L P Q N F L P I A Q P A P C S Q L L Y（配列番号：38；GenBank
 アクセス番号AJ459784）。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列
 番号：38のホモログである。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号
 ：38の変種である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質の配列は配列番号：
 38を含む。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：38のイソ形態
 である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：38の断片である。

50

各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0057】

もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は、以下の配列を有する：

MWVPVVFLLTSLVTWIGAAPLILSRIVGGWCEKHSQPWQV
 LVASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRNKSIVILLGRHSL
 FHPEDTGQVFQVSHSFPHPLYDMSLLKNRFLRPGDDSSHD
 LMLLRLSEPAELTDAVKVMDLPTQEPALGTTCTCYASGWGS
 EPEEFLLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVTKFMLCAG
 RWTGGKSTCSGDSGGPLVCNGVLQGITSWGSEPCALPERP
 SLYTKVVHYRKWKIKDTIVANP（配列番号：39；GenBankアクセ
 ス番号AJ459783）。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：
 39のホモログである。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：39
 の変種である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：39のイソ形
 態である。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号：39の断片である。
 各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0058】

もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は、以下の配列を有するヌクレオチド分
 子によってコードされる：

aagtttcccttctccagttccaagacccccaatatcaccaca
 aaggaccacaatccccagactcaagatatgggtctgggctgct
 gtcttgtgtgtctctaccctgatccctgggttcaactctgc
 tcccagagcatgaagccctctccaccagcaccagccacca
 cctgcaaacctagggaagattgacagaattcccagcccttt
 cccagctccccctgcccattgtcccaggactcccagcccttg
 gtctctctgtcccccggtgtcttttcaaacccacatcctaaat
 ccatctctctatatccgaggtcccccaagttctctctgtcaacc
 tgattccccctgatctagcaccctctgtaggtgtgtgcac
 cctctatctctgtctcggattgtgggaggctgggagggtgcga
 gaagcatctcccaaacctgggtaggtgtgtgttagcctctcgt
 ggtagggcaggtctgtcggcggtgttctgtgtgacccccaggt
 ggggtcttcacagctaccacactgcatcaggaaacaaaagcgt
 gatcttgtgtgtgggtcggcacagccctgtttcatcctgaagac
 acaggccagggtattttcagggtcagccacagcttcccacacc
 cgtctctacgatattgagccctctgaagaaatcgattctctcag
 gccagggtgatgactccagccacgacctcatgctgctccgc
 ctgttcagagccctgcccagagctcacggatgctatgaagggtca
 tggacctgcccacccaggagccagcactgggggaccacctg
 ctacgccctcaggctggggcagcattgaaccagaggaggattc
 ttgacccccaaaagaaaacttcaggtgtgtgtggacctccatgtta
 tttccaatgacgtgtgtgtgcgcaagttcacccctcagaagggt
 gaccaagttcatgctgtgtgtgtgtggacctgggacaggggggc
 aaaaagcacctgctcgggtgatcttggggggcccaacttgtct
 gtaattggtgtgtgtgttcaagggtatcacgtcatgggggcagtg
 accatgtgtccctgcccgaagggccttccctgtacaccaag
 gtgggtgcattaccgggaagtggaatcaaggacaccatcgtgg
 ccaacccctgagcacccctatcaactccctatttgtagtaaa
 acttggaaccttggaagatgaccaggcccaagactcaggccct
 ccccagttctactgacctttgtctcttaggtgtgagggtcca
 ggggtgtgttaggaaaagaaaatcagcagacacagggtgtgac
 cagagtggtttcttaaatgggtgttaattttgtctctctgtg

t c c t g g g g a a t a c t g g c c a t g c c t g g a g a c a t a t c a c t c a
a t t t c t c t g a g g a c a c a g a t a g g a t g g g g t g t c t g t g t t a
t t t g t g g g g t a c a g a g a t g a a a g a g g g g t g g g a t c c a c a c
t g a g a g a g t g g a g a g t g a c a t g t g c t g g a c a c t g t c c a t g
a a g c a c t g a g c a g a a g c t g g a g g c a c a a c g c a c c a g a c a c
t c a c a g c a a g g a t g g a g c t g a a a a c a t a a c c c a c t c t g t c
c t g g a g g c a c t g g g a a g c c t a g a g a a g g c t g t g a a c c a a g
g a g g g a g g g t c t t c c t t t g g c a t g g g a t g g g g a t g a a g t a
a g g a g a g g g a c t g a c c c c c t g g a a g c t g a t t c a c t a t g g g
g g g a g g t g t a t t g a a g t c c t c c a g a c a a c c c t c a g a t t t g
a t g a t t t c c t a g t a g a a c t c a c a g a a a t a a a g a g c t g t t a
t a c t g t g a a (配列番号: 40; GenBank アクセス番号 X07730)。も
う1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号: 40の残基67ないし1088
によってコードされる。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列番号: 40
のホモログによってコードされる。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は配列
番号: 40の変種によってコードされる。もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質
は配列番号: 40のイソ形態によってコードされる。もう1つの実施態様において、KL
K3蛋白質は配列番号: 40の断片によってコードされる。各可能性は本発明の別の実施
態様を表わす。

【0059】

もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は以下のGenBankアクセス番号:
BC005307、AJ310938、AJ310937、AF335478、AF33
5477、M27274、およびM26663の1つに記載された配列を有する。もう1
つの実施態様において、KLK3蛋白質は前記GenBankアクセス番号の1つに記載
された配列によってコードされる。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0060】

もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は以下のGenBankアクセス番号:
NM_001030050、NM_001030049、NM_001030048、A
J459782、AJ512346またはAJ459784の1つに記載された配列によ
ってコードされる。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0061】

もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は以下のGenBankアクセス番号:
X13943、X13942、X13940、X13941、およびX13944の1つ
に記載された配列を含む配列を有する。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0062】

もう1つの実施態様において、KLK3蛋白質は当該分野で公知のいずれかの他のKL
K3蛋白質である。各KLK3蛋白質は本発明の別の実施態様を表わす。

【0063】

もう1つの実施態様において、本発明は、前立腺幹細胞抗原(PSCA)ペプチドを発
現する組換えリステリア株を提供する。

【0064】

1つの実施態様において、PSCAペプチドは、ここに引用して援用する米国特許第6
267960号に記載されている通りである。1つの実施態様において、PSCAは、高
グレード前立腺上皮内新形成(PIN)、アンドロゲン依存性およびアンドロゲン非依存
性前立腺腫瘍を含めた、全ての段階の前立腺癌を横切って広く過剰発現される。1つの実
施態様において、PSCA遺伝子は、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)
アンカー細胞表面抗原のThy-1/Ly6ファミリーのメンバーである幹細胞抗原-
2(SCA-2)に対して30%相同性を示し、アミノ末端シグナル配列、カルボキシ末
端GPIアンカリング配列、および多重N-グリコシル化部位を持つ123アミノ酸蛋白
質をコードする。1つの実施態様において、PSCA mRNA発現は正常な男性組織に

において前立腺特異的であり、アンドロゲン依存性およびアンドロゲン非依存性前立腺癌異種移植片双方において高度にアップレギュレートされる。1つの実施態様において、PSCA mRNA発現は基底細胞表皮、すなわち、前立腺の推定幹細胞区画に局所化される。1つの実施態様において、PSCAは細胞表面で圧倒的に発現され、GPI結合によってアンカーされる。1つの実施態様において、PSCA遺伝子は、80%を超える前立腺癌における対立遺伝子利得の領域である染色体8q24.2に局所化される。

【0065】

もう1つの実施態様において、PSCAペプチドの配列は本明細書中に記載されたPSCA配列から選択される。もう1つの実施態様において、PSCAペプチドの配列は当該分野で公知のいずれかの他のPSCA蛋白質配列である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

10

【0066】

もう1つの実施態様において、PSCAペプチドの配列は本明細書中に記載されたPSCA配列から選択される配列を含む。

【0067】

もう1つの実施態様において、PSCAペプチドはより大きなPSCAペプチドの免疫原性断片であり、より大きなPSCAペプチドの配列は本明細書中に記載されたPSCA配列から選択される配列である。もう1つの実施態様において、PSCAペプチドはより大きなPSCAペプチドの免疫原性断片であり、より大きなPSCAペプチドの配列は本明細書中に記載された通りである。もう1つの実施態様において、より大きなPSCAペプチドの配列は当該分野で公知のいずれかの他のPSCA蛋白質配列である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

20

【0068】

もう1つの実施態様において、PSCAペプチドの配列は本明細書中に記載されたPSCA配列の免疫原性断片を含む。

【0069】

「PSCAペプチド」とは、もう1つの実施態様においては、全長PSCA蛋白質をいう。もう1つの実施態様において、該用語はPSCA蛋白質の断片をいう。もう1つの実施態様において、該用語はPSCAシグナルペプチドを欠如するPSCA断片をいう。もう1つの実施態様において、該用語はPSCAシグナルペプチドを除く全PSCA配列を含有するPSCA蛋白質をいう。「PSCAシグナル配列」とは、もう1つの実施態様において、PSCA蛋白質に天然に見出されるいずれかのシグナル配列をいう。もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物のPSCA蛋白質はいずれのシグナル配列も含有しない。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

30

【0070】

もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物のPSCAペプチドの源であるPSCA蛋白質はヒトPSCA蛋白質である。もう1つの実施態様において、PSCA蛋白質はマウスPSCA蛋白質である。もう1つの実施態様において、PSCA蛋白質はげっ歯類PSCA蛋白質である。もう1つの実施態様において、PSCA蛋白質は当該分野で公知のいずれかの他の種のPSCA蛋白質である。もう1つの実施態様において、前記PSCA蛋白質の1つは「PSCA蛋白質」として当該分野では称される。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

40

【0071】

1つの実施態様において、PSCA蛋白質は、1つの実施態様においてヒトPSCA配列である、以下のGenBankアクセス番号：AAC39607、CAB97347、AAH23582、NP__005663、O43653、EAW82313、EAW82312、NP__005137、NP__036581の1つに記載されている配列を有する。もう1つの実施態様において、PSCA蛋白質は、1つの実施態様においてマウスPSCA配列である、以下のGenBankアクセス番号：NP__082492、AAK84073、EDL29439、AAI10463、P57096、NP__081675、A

50

AK83126の1つに記載されている配列を有する。

【0072】

1つの実施態様において、PSCAポリペプチドは以下の配列を有する：

MKAVLLALLM AGLALQPGTA LLCYSCKAQV SNEDCLQ
VEN CTQLGEQCWT ARIRAVGLLT VISKGC SLNC VDD
SQDY YVG KKNITCCDDTD LCNASGAHAL QPAAAILALL
PALGLLLWGP GQL (配列番号：63)。

【0073】

もう1つの実施態様において、PSCA蛋白質は以下のGenBankアクセス番号：
AF043498.1、AJ297436.1、AK092432.1、AY358912.1、BC023582.2、BC048808.1、BC065183.1、BM768967.1. の1つに記載された配列によってコードされる。もう1つの実施態様において、PSCA蛋白質は以下のGENBANKアクセス番号：AC118022.12 (144659. . 146889)、CH466545.1、AF319173.1、AK008851.1、BC110462.2の1つに記載されている配列によってコードされる。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0074】

もう1つの実施態様において、PSCAポリペプチドは以下の核酸配列によってコードされる：

a g g g a g a g g c a g t g a c c a t g a a g g c t g t g c t g c t t g c c c t
g t t g a t g g c a g g c t t g g c c c t g c a g c c a g g c a c t g c c c t g
c t g t g c t a c t c c t g c a a a g c c c a g g t g a g c a a c g a g g a c t
g c c t g c a g g t g g a g a a c t g c a c c c a g c t g g g g g a g c a g t g
c t g g a c c g c g c g c a t c c g c g c a g t t g g c c t c c t g a c c g t c
a t c a g c a a a g g c t g c a g c t t g a a c t g c g t g g a t g a c t c a c
a g g a c t a c t a c g t g g g c a a g a a g a a c a t c a c g t g c t g t g a
c a c c g a c t t g t g c a a c g c c a g c g g g g c c c a t g c c c t g c a g
c c g g c t g c c g c c a t c c t t g c g c t g c t c c c t g c a c t c g g c c
t g c t g c t c t g g g g a c c c g g c c a g c t a t a g g c t c t g g g g g g
c c c c g c t g c a g c c c a c a c t g g g t g t g g t g c c c c a g g c c t t
t g t g c c a c t c c t c a c a g a a c c t g g c c c a g t g g g a g c c t g t
c c t g g t t c c t g a g g c a c a t c c t a a c g c a a g t t t g a c c a t g
t a t g t t t g c a c c c c t t t t c c c c n a a c c c t g a c c t t c c c a t
g g g c c t t t t c c a g g a t t c c n a c c n g g c a g a t c a g t t t t a g
t g a n a c a n a t c c g c n t g c a g a t g g c c c c t c c a a c c n t t t n
t g t t g n t g t t t c c a t g g c c c a g c a t t t t c c a c c c t t a a c c
c t g t g t t c a g g c a c t t n t t c c c c c a g g a a g c c t t c c c t g c
c c a c c c c a t t t a t g a a t t g a g c c a g g t t t g g t c c g t g g t g
t c c c c c g c a c c c a g c a g g g g a c a g g c a a t c a g g a g g g c c c
a g t a a a g g c t g a g a t g a a g t g g a c t g a g t a g a a c t g g a g g
a c a a g a g t t g a c g t g a g t t c c t g g g a g t t t c c a g a g a t g g
g g c c t g g a g g c c t g g a g g a a g g g g c c a g g c c t c a c a t t t g
t g g g g n t c c c g a a t g g c a g c c t g a g c a c a g c g t a g g c c c t
t a a t a a a c a c c t g t t g g a t a a g c c a a a a a a (配列番号：64)。

【0075】

もう1つの実施態様において、PSCA蛋白質は本明細書中に記載されたPSCA配列
のホモログである。もう1つの実施態様において、PSCA蛋白質は本明細書中に記載さ
れたPSCA配列の変種である。もう1つの実施態様において、PSCA蛋白質は本明細
書中に記載されたPSCA配列のイソ形態である。もう1つの実施態様において、PSC
A蛋白質は本明細書中に記載されたPSCA配列の断片である。各可能性は本発明の別の

実施態様を表わす。

【0076】

もう1つの実施態様において、PSCA蛋白質は前記GenBankアクセス番号の1つに記載された配列を含む配列を有する。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0077】

もう1つの実施態様において、PSCA蛋白質は当該分野で公知のいずれかの他のPSCA蛋白質である。各PSCA蛋白質は本発明の別の実施態様を表わす。

【0078】

もう1つの実施態様において、本発明は葉酸ヒドロラーゼ1 (FOLH1) ペプチドを発現する組換えリステリア株を提供する。もう1つの実施態様において、FOLH1ペプチドの配列は配列番号：41、43、44、および45から選択される。もう1つの実施態様において、FOLH1ペプチドの配列は配列番号：41に記載されている。もう1つの実施態様において、FOLH1ペプチドの配列は配列番号：43に記載されている。もう1つの実施態様において、FOLH1ペプチドの配列は配列番号：44に記載されている。もう1つの実施態様において、FOLH1ペプチドの配列は配列番号：45に記載されている。もう1つの実施態様において、FOLH1ペプチドの配列は当該分野で公知のいずれかの他のFOLH1配列である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0079】

もう1つの実施態様において、FOLH1ペプチドの配列は配列番号：41、43、44、および45から選択される配列を含む。

【0080】

もう1つの実施態様において、FOLH1ペプチドはより大きなFOLH1ペプチドの免疫原性断片であり、より大きなFOLH1ペプチドの配列は配列番号：41、43、44、および45から選択される配列である。もう1つの実施態様において、FOLH1ペプチドはより大きなFOLH1ペプチドの免疫原性断片であり、より大きなFOLH1ペプチドの配列は配列番号：41に記載されている。もう1つの実施態様において、より大きなFOLH1ペプチドの配列は配列番号：43に記載されている。もう1つの実施態様において、より大きなFOLH1ペプチドの配列は配列番号：44に記載されている。もう1つの実施態様において、より大きなFOLH1ペプチドの配列は配列番号：45に記載されている。もう1つの実施態様において、より大きなFOLH1ペプチドの配列は当該分野で公知のいずれかの他のFOLH1蛋白質配列である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0081】

もう1つの実施態様において、FOLH1ペプチドの配列は配列番号：41、43、44、および45から選択される配列の免疫原性断片を含む。

【0082】

「FOLH1ペプチド」とは、もう1つの実施態様において、全長FOLH1蛋白質をいう。もう1つの実施態様において、該用語はFOLH1蛋白質の断片をいう。もう1つの実施態様において、該用語はFOLH1シグナルペプチドを欠如するFOLH1蛋白質の断片をいう。もう1つの実施態様において、該用語はFOLH1シグナルペプチドを除いた全FOLH1配列を含有するFOLH1蛋白質をいう。「FOLH1シグナル配列」とは、もう1つの実施態様において、天然でFOLH1蛋白質に見出されるいずれかのシグナル配列をいう。もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物のFOLH1蛋白質はいずれのシグナル配列も含有しない。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0083】

もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物のFOLH1ペプチドの源であるFOLH1蛋白質はヒトFOLH1蛋白質である。もう1つの実施態様において、FOLH1蛋白質はマウスFOLH1蛋白質である。もう1つの実施態様において、FOLH1蛋白質はげっ歯類FOLH1蛋白質である。もう1つの実施態様において、FOLH

10

20

30

40

50

1 蛋白質は当該分野で公知のいずれかの他の種の F O L H 1 蛋白質である。もう 1 つの実施態様において、前記 F O L H 1 蛋白質の 1 つは「F O L H 1 蛋白質」として当該分野では称される。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0084】

本発明の方法および組成物の F O L H 1 ペプチドの源である F O L H 1 蛋白質は葉酸ヒドロラーゼ（前立腺特異的膜抗原）蛋白質である。もう 1 つの実施態様において、F O L H 1 蛋白質は P S M A 蛋白質である。もう 1 つの実施態様において、F O L H 1 蛋白質は N-アセチル化アルファ連結酸性ジペプチダーゼ 1 蛋白質である。もう 1 つの実施態様において、F O L H 1 蛋白質は葉酸ヒドロラーゼ 1 蛋白質である。もう 1 つの実施態様において、F O L H 1 蛋白質はフォリルポリーガンマーグルタミン酸カルボキシペプチダーゼ 10 蛋白質である。もう 1 つの実施態様において、F O L H 1 蛋白質はグルタミン酸カルボキシラーゼ I I 蛋白質である。もう 1 つの実施態様において、F O L H 1 蛋白質はグルタミン酸カルボキシペプチダーゼ I I 蛋白質である。もう 1 つの実施態様において、F O L H 1 蛋白質は膜グルタミン酸カルボキシペプチダーゼ蛋白質である。もう 1 つの実施態様において、F O L H 1 蛋白質はプテロイルポリーガンマーグルタミン酸カルボキシペプチダーゼ蛋白質である。もう 1 つの実施態様において、F O L H 1 蛋白質は当該分野で公知であるいずれかの他のタイプの F O L H 1 蛋白質である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0085】

もう 1 つの実施態様において、F O L H 1 蛋白質は以下の配列を有する：

MWNL LHETDS AVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGFLFG
WFIKSSNEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQI
PHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGGLDSVELAHYDVL LSY P
NKTHPNYIS I INEDGNEIFNTSLFEP PPPPGYENVSDI VPP
FSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINC SGKI
VIARYGKVFRGNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVK
SYPDGWNLPGGGVQRGNI LNLNGAGDPLTPGYPAN EYAYR
RGI AEAVGLPSIPVHP I GYYDAQKLLEKMGGSAPPDSSWR
GSLKVPYNVGP GF TGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIG
TLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVR 30
SFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRL
LLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDC TPLMYSLVHNLTKEL
LKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISKLGSGND
FEVFFQRLG I ASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYE
LVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFELANSIVLPFDCRDY
AVVLRKYADK I YS I SMKHPQEMKTYSVSFD SLFSAVKNFTE
E I ASKFSERLQDFDKSKHVIYAPSSH NKYAGESFPGIYDA
LFDIESKVDPSKAWGEVKRQ I YVAAFTVQAAAETLSEVA（
配列番号：41；GenBankアクセス番号：BC025672）。もう 1 つの実施態
様において、F O L H 1 蛋白質は配列番号：41 のホモログである。もう 1 つの実施態様 40
において、F O L H 1 蛋白質は配列番号：41 の変種である。もう 1 つの実施態様におい
て、F O L H 1 蛋白質は配列番号：41 のイソ形態である。もう 1 つの実施態様におい
て、F O L H 1 蛋白質は配列番号：41 の断片である。各可能性は本発明の別の実施態様を
表わす。

【0086】

もう 1 つの実施態様において、F O L H 1 蛋白質は以下の配列を有するヌクレオチド分子によってコードされる：

ctggacc c c c aggtctggagcgaattccagccctgcagg g c t
gataagc g aggcattagtgagattgagagagactttacc c
cgccgtggtggttggagg g c g c g c agtagagcagcagcac 50

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

10

20

30

40

50

MWNLLHETDSAVATARRRPRWLCAGALVLAGGGFFLLGFLFG
WFIKSSNEATNITPKHNMKAF LDELKAENIKKF LYNFTQI
PHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFG LDSVELAHYDVLLSYP
NKTHPNYISIINEDGNEIFNTSLFEP PPPPGYENVSDIVPP
FSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINC SGKI
VIARYGKVFRGNKVKN AOLAGAKGVILYSDPADYFAPGVK

SYPDGWNLPGGGVQRGNI LNLNGAGDPLTPGYPAN EYAYR
RGI AEAVGLPSIPVHP IGY YDAQKLLEKMGGSAPPDSSWR
GSLKVPYNVGP GFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIY NVIG
TLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAV VHEIVR
SFGTLKKEGWPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENS R
LLQERGVAYINADSSIEGNYTLRV DCTPLMYS LVHNLTK E
LKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSP EFSGMPRI SKLGSGND
FEVFFQRLG IASGRARYTKNWE TNKFSGYPLYH SVYETYE
LVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFELANSI VLPFD CRDY
AVVLRKYADKIYSISM KHPQEMKTYSVS FDSLFS AVKNFT
EIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLG
LPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVD
PSKAWGEVKRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA（配列番号：44；G
enBankアクセス番号：NM__004476）。もう1つの実施態様において、FO
LH1蛋白質は配列番号：44のホモログである。もう1つの実施態様において、FO
LH1蛋白質は配列番号：44の変種である。もう1つの実施態様において、FO
LH1蛋白質は配列番号：44のイソ形態である。もう1つの実施態様において、FO
LH1蛋白質は配列番号：44の断片である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0089】

もう1つの実施態様において、FOLH1蛋白質は以下の配列を有する：

IPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELAHYDVL LSY
PNKTHPNYISII NEDGNEIFNTSLFEP PPPGYENVSDI VP
PFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDDFFKLERDMKINC SGK
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
KSYPDGWNLPGGGVQRGNI LNLNGAGDPLTPGYPAN EYAY
RRGI AEAVGLPSIPVHP IGY YDAQKLLEKMGGSAPPDSSW
RGS LKVPYNVGP GFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIY NVI
GTLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAV VHEIV
RSFGTLKKEGWPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENS
RLLQERGVAYINADSSIEGNYTLRV DCTPLMYS LVHNLTK
ELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSP EFSGMPRI SKLGSGN
DFEVFFQRLG IASGRARYTKNWE TNKFSGYPLYH SVYETYE
ELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFELANSI VLPFD CRD
YAVVLRKYADKIYSISM KHPQEMKTYSVS FDSLFS AVKNF
TEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPL
GLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALFDIESKV
DPSKAWGEVKRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA（配列番号：45；
GenBankアクセス番号：BC108719）。もう1つの実施態様において、FO
LH1蛋白質は配列番号：45のホモログである。もう1つの実施態様において、FO
LH1蛋白質は配列番号：45の変種である。もう1つの実施態様において、FO
LH1蛋白質は配列番号：45のイソ形態である。もう1つの実施態様において、FO
LH1蛋白質は配列番号：45の断片である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0090】

もう1つの実施態様において、FOLH1蛋白質は以下のGenBankアクセス番号
：NF__001014986、NM__004476、BC108719の1つに記載され
た配列のよってコードされる。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0091】

もう1つの実施態様において、FOLH1蛋白質は前記GenBankアクセス番号の
1つに記載された配列を含む配列を有する。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0092】

もう1つの実施態様において、F O L H 1 蛋白質は当該分野で公知のいずれかの他の F O L H 1 蛋白質である。各 F O L H 1 蛋白質は本発明の別の実施態様を表わす。

【0093】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えリステリア株およびアジュバントを含むワクチンを提供する。

【0094】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えリステリア株を含む免疫原性組成物を提供する。

【0095】

もう1つの実施態様において、組換えリステリア株はK L K 3 ペプチドを含む組換えポリペプチドを発現する。もう1つの実施態様において、組換えリステリア株は組換えポリペプチドを含み、該組換えペプチドはK L K 3 ペプチドを含む。もう1つの実施態様において、組換えリステリア株は、組換えポリペプチドをコードする組換えヌクレオチドを含む。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

10

【0096】

もう1つの実施態様において、組換えリステリア株はP S C A ペプチドを含む組換えポリペプチドを発現する。もう1つの実施態様において、組換えリステリア株は組換えポリペプチドを含み、組換えペプチドはP S C A ペプチドを含む。もう1つの実施態様において、組換えリステリア株は組換えポリペプチドをコードする組換えヌクレオチドを含む。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

20

【0097】

もう1つの実施態様において、組換えリステリア株は、F O L H 1 ペプチドを含む組換えポリペプチドを発現する。もう1つの実施態様において、組換えリステリア株は組換えポリペプチドを含み、組換えペプチドはF O L H 1 ペプチドを含む。もう1つの実施態様において、組換えリステリア株は、組換えポリペプチドをコードする組換えヌクレオチドを含む。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0098】

組換えリステリア株によって発現されるK L K 3 ペプチドは、もう1つの実施態様において、融合ペプチドの形態である。もう1つの実施態様において、融合ペプチドは、非K L K 3 ペプチドをさらに含む。もう1つの実施態様において、非K L K 3 ペプチドはK L K 3 ペプチドの免疫原性を高める。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

30

【0099】

もう1つの実施態様において、組換えリステリア株によって発現されるP S C A ペプチドは融合ペプチドの形態である。もう1つの実施態様において、融合ペプチドは非P S C A ペプチドをさらに含む。もう1つの実施態様において、非P S C A ペプチドはP S C A ペプチドの免疫原性を高める。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0100】

もう1つの実施態様において、組換えリステリア株によって発現されるF O L H 1 ペプチドは融合ペプチドの形態である。もう1つの実施態様において、融合ペプチドは非F O L H 1 ペプチドをさらに含む。もう1つの実施態様において、非F O L H 1 ペプチドはF O L H 1 ペプチドの免疫原性を高める。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

40

【0101】

もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物の非K L K 3 / 非F O L H 1 ペプチドは、L L O ペプチドである。もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物の非K L K 3 / 非F O L H 1 ペプチドは非溶血性L L O ペプチドである。もう1つの実施態様において、非K L K 3 / 非F O L H 1 / 非P S C A ペプチドはA c t A ペプチドである。もう1つの実施態様において、非K L K 3 / 非F O L H 1 / 非P S C A ペプチドは、P E S T 様配列含有ペプチドである。もう1つの実施態様において、非K L K 3 / 非F O L H 1 / 非P S C A ペプチドは当該分野で公知のいずれかの他の非K L K 3 / 非F O L H 1 / 非P S C A ペプチドである。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

50

【0102】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えポリペプチドを含む組換えリステリア株を提供する。もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えポリペプチドをコードする組換えヌクレオチドを含む組換えリステリア株を提供する。もう1つの実施態様において、リステリアワクチン株は種リステリア・モノサイトゲネス（LM）の株である。もう1つの実施態様において、本発明は、リステリア株を含む組成物を提供する。もう1つの実施態様において、本発明は、リステリア株を含む免疫原性組成物を提供する。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0103】

もう1つの実施態様において、リステリア株は組換えリステリア・シーリジェリー株である。もう1つの実施態様において、リステリア株は組換えリステリア・グレイ株である。もう1つの実施態様において、リステリア株は組換えリステリア・イバノビイ株である。もう1つの実施態様において、リステリア株は組換えリステリア・ムライ株である。もう1つの実施態様において、リステリア株は組換えリステリア・ウェルシメリー株である。もう1つの実施態様において、リステリア株は当該分野で公知のいずれかの他のリステリア種の組換え株である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0104】

もう1つの実施態様において、本発明の組換えリステリア株は動物宿主を通じて継体されてきた。もう1つの実施態様において、該継体はワクチンベクターとしての株の効率を最大化させる。もう1つの実施態様において、該継体はリステリア株の免疫原性を安定化させる。もう1つの実施態様において、該継体はリステリア株のビルレンスを安定化させる。もう1つの実施態様において、該継体はリステリア株の免疫原性を増加させる。もう1つの実施態様において、該継体はリステリア株のビルレンスを増加させる。もう1つの実施態様において、該継体はリステリア株の不安定なサブ株を除去する。もう1つの実施態様において、該継体はリステリア株の不安定なサブ株の広まりを低下させる。もう1つの実施態様において、リステリア株はKLK3ペプチド含有組換えペプチドをコードする遺伝子のゲノム挿入を含有する。もう1つの実施態様において、リステリア株はPSCAペプチド含有組換えペプチドをコードする遺伝子のゲノム挿入を含有する。もう1つの実施態様において、リステリア株はFOLH1ペプチド含有組換えペプチドをコードする遺伝子のゲノム挿入を含有する。もう1つの実施態様において、リステリア株はKLK3ペプチド含有組換えペプチドをコードする遺伝子を含むプラスミドを運ぶ。もう1つの実施態様において、リステリア株は、PSCAペプチド含有組換えペプチドをコードする遺伝子を含むプラスミドを運ぶ。もう1つの実施態様において、リステリア株はFOLH1ペプチド含有組換えペプチドをコードする遺伝子を含むプラスミドを運ぶ。動物宿主を通じて組換えリステリア株を継体する方法は当該分野でよく知られており、例えば、ここに引用して援用する米国特許出願第2006/0233835号（特許文献1）に記載されている。もう1つの実施態様において、該継体は当該分野で公知のいずれか他の方法によって行われる。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0105】

もう1つの実施態様において、本発明の方法で利用される組換えリステリア株は凍結された細胞バンクに貯蔵されている。もう1つの実施態様において、組換えリステリア株は、凍結乾燥された細胞バンクに貯蔵されている。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0106】

もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物の細胞バンクは、マスター細胞バンクである。もう1つの実施態様において、細胞バンクはワーキング細胞バンクである。もう1つの実施態様において、細胞バンクはGMP（Good Manufacturing Practice）細胞バンクである。もう1つの実施態様において、細胞バンクは臨床グレードの材料の生産を意図している。もう1つの実施態様において、細胞バンクはヒト使用のために規制プラクティスに適合している。もう1つの実施態様において、細胞バンクは当該分野で公

10

20

30

40

50

知のいずれかの他のタイプの細胞バンクである。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0107】

「GMP (Good Manufacturing Practice)」は、もう1つの実施態様において、米国連邦規則集の(21 CFR 210-211)によって定義されている。もう1つの実施態様において、「GMP (Good Manufacturing Practice)」は、臨床グレードの材料の生産のための、またはヒト消費のための他の標準；例えば、米国以外の国の標準によって定義される。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0108】

もう1つの実施態様において、本発明の方法で利用される組換えリステリア株はワクチン用量のバッチからのものである。

【0109】

もう1つの実施態様において、本発明の方法で利用される組換えリステリア株は、本明細書中に開示された方法によって生産される凍結されたストックからのものである。

【0110】

もう1つの実施態様において、本発明の方法で利用される組換えリステリア株は本明細書中に開示された方法によって生産される凍結乾燥ストックからのものである。

【0111】

もう1つの実施態様において、本発明のワクチン用量の細胞バンク、凍結されたストック、またはバッチは、90%を超える解凍に際して活力を呈する。もう1つの実施態様において、解凍に続いて、24時間、低温保存のために貯蔵し、または凍結貯蔵する。もう1つの実施態様において、貯蔵は2日間である。もう1つの実施態様において、貯蔵は3日間である。もう1つの実施態様において、貯蔵は4日間である。もう1つの実施態様において、貯蔵は1週間である。もう1つの実施態様において、貯蔵は2週間である。もう1つの実施態様において、貯蔵は3週間である。もう1つの実施態様において、貯蔵は1ヶ月間である。もう1つの実施態様において、貯蔵は2ヶ月間である。もう1つの実施態様において、貯蔵は3ヶ月間である。もう1つの実施態様において、貯蔵は5ヶ月間である。もう1つの実施態様において、貯蔵は6ヶ月間である。もう1つの実施態様において、貯蔵は9ヶ月間である。もう1つの実施態様において、貯蔵は1年間である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0112】

もう1つの実施態様において、本発明のワクチン用量の細胞バンク、凍結されたストック、またはバッチは、リステリア株の培養を栄養培地中で成長させ、グリセロールを含む溶液中で培養を凍結し、リステリア株を摂氏-20°未満で貯蔵することを含む方法によって低温保存される。もう1つの実施態様において、該温度は約摂氏-70°である。もう1つの実施態様において、該温度は約摂氏-70ないし-80°である。

【0113】

もう1つの実施態様において、本発明のワクチン用量の細胞バンク、凍結されたストック、またはバッチは、(後に記載するように)リステリア株の培養を本発明の規定された培地中で成長させ、該培養をグリセロールを含む溶液中で凍結し、リステリア株を摂氏-20°未満で貯蔵することを含む方法によって低温保存される。もう1つの実施態様において、該温度は約摂氏-70°である。もう1つの実施態様において、該温度は約摂氏-70ないし-80°である。もう1つの実施態様において、本発明の定義された微生物学的培地のいずれかをこの方法で用いてもよい。各定義された微生物学的培地は本発明の別の実施態様を表わす。

【0114】

本発明の方法および組成物のもう1つの実施態様において、培養(例えば、リステリアワクチン用量のバッチを生産するのに用いるリステリアワクチン株の培養)は細胞バンクから接種する。もう1つの実施態様において、培養は凍結されたストックから接種される。もう1つの実施態様において、培養はスターター培養から接種される。もう1つの実施

10

20

30

40

50

態様において、培養はコロニーから接種される。もう1つの実施態様において、培養は中期10g成長相において接種される。もう1つの実施態様において、培養はほぼ中期10g成長相において接種される。もう1つの実施態様において、培養はもう1つの成長相において接種される。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0115】

もう1つの実施態様において、凍結に用いられる溶液は、グリセロールの代わりに、もう1つの束一的な添加剤、または凍結防止特性を持つ添加剤を含有する。もう1つの実施態様において、凍結のために用いる溶液は、グリセロールに加えてもう1つの束一的添加剤、または凍結防止特性を持つ添加剤を含有する。もう1つの実施態様において、添加剤はマンニトールである。もう1つの実施態様において、添加剤はDMSOである。もう1つの実施態様において、添加剤はスクロースである。もう1つの実施態様において、添加剤は、当該分野で知られている、いずれかの他の束一的添加剤または凍結防止特性を持つ添加剤である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0116】

もう1つの実施態様において、リステリア株の培養を成長させるのに利用される栄養培地はLBである。もう1つの実施態様において、栄養培地はTBである。もう1つの実施態様において、栄養培地は修飾された動物産物フリーのテリフィックブロス (Terrific Broth) である。もう1つの実施態様において、栄養培地は規定された培地である。もう1つの実施態様において、栄養培地は本発明の規定された培地である。もう1つの実施態様において、栄養培地は当該分野で公知のいずれかの他のタイプの栄養培地である。各可能性は本発明の別の実施態様を表す。

【0117】

本発明の方法および組成物のもう1つの実施態様において、成長させる工程はシェーカーフラスコ中で行う。もう1つの実施態様において、フラスコは邪魔板を備えたシェーカーフラスコである。もう1つの実施態様において、成長はバッチファメンター中で行う。もう1つの実施態様において、成長は攪拌されたタンクまたはフラスコ中で行う。もう1つの実施態様において、成長はエアフリットファメンター中で行う。もう1つの実施態様において、成長は供給バッチ中で行う。もう1つの実施態様において、成長は連続的細胞リアクター中で行う。もう1つの実施態様において、成長は固定された細胞リアクター中で行う。もう1つの実施態様において、成長は当該分野で知られた細菌を成長させるいずれかの他の手段で行う。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0118】

もう1つの実施態様において、一定のpHを（例えば、バッチファメンター中での）培養の成長の間に維持する。もう1つの実施態様において、pHは約7.0に維持する。もう1つの実施態様において、pHは約6である。もう1つの実施態様において、pHは約6.5である。もう1つの実施態様において、pHは約7.5である。もう1つの実施態様において、pHは約8である。もう1つの実施態様において、pHは6.5ないし7.5である。もう1つの実施態様において、pHは6ないし8である。もう1つの実施態様において、pHは6ないし7である。もう1つの実施態様において、pHは7ないし8である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0119】

もう1つの実施態様において、一定の温度を培養の成長の間に維持する。もう1つの実施態様において、該温度は約37℃に維持する。もう1つの実施態様において、該温度は37℃である。もう1つの実施態様において、該温度は25℃である。もう1つの実施態様において、該温度は27℃である。もう1つの実施態様において、該温度は28℃である。もう1つの実施態様において、該温度は30℃である。もう1つの実施態様において、該温度は32℃である。もう1つの実施態様において、該温度は34℃である。もう1つの実施態様において、該温度は35℃である。もう1つの実施態様において、該温度は36℃である。もう1つの実施態様において、該温度は38℃である。もう1つの実施態様において、該温度は39℃である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0120】

もう1つの実施態様において、一定の溶解酸素濃度を培養の成長の間に維持する。もう1つの実施態様において、溶解酸素濃度は飽和の20%に維持する。もう1つの実施態様において、該濃度は飽和の15%である。もう1つの実施態様において、該濃度は飽和の16%である。もう1つの実施態様において、該濃度は飽和の18%である。もう1つの実施態様において、該濃度は飽和の22%である。もう1つの実施態様において、該濃度は飽和の25%である。もう1つの実施態様において、該濃度は飽和の30%である。もう1つの実施態様において、該濃度は飽和の35%である。もう1つの実施態様において、該濃度は飽和の40%である。もう1つの実施態様において、該濃度は飽和の45%である。もう1つの実施態様において、該濃度は飽和の50%である。もう1つの実施態様において、該濃度は飽和の55%である。もう1つの実施態様において、該濃度は飽和の60%である。もう1つの実施態様において、該濃度は飽和の65%である。もう1つの実施態様において、該濃度は飽和の70%である。もう1つの実施態様において、該濃度は飽和の75%である。もう1つの実施態様において、該濃度は飽和の80%である。もう1つの実施態様において、該濃度は飽和の85%である。もう1つの実施態様において、該濃度は飽和の90%である。もう1つの実施態様において、該濃度は飽和の95%である。もう1つの実施態様において、該濃度は飽和の100%である。もう1つの実施態様において、該濃度は飽和の100%近くである。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

10

【0121】

本発明の方法および組成物のもう1つの実施態様において、リステリア培養は液体窒素中でフラッシュ凍結し、続いて、最終の凍結温度にて貯蔵する。もう1つの実施態様において、培養は、例えば培養のバイアルを最終の貯蔵温度とすることによって、より徐々に凍結させる。もう1つの実施態様において、培養は、細菌培養を凍結するための当該分野で知られたいずれかの他の方法によって凍結させる。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

20

【0122】

本発明の方法および組成物のもう1つの実施態様において、培養の貯蔵温度は摂氏-20℃および-80℃の間である。もう1つの実施態様において、該温度は-20℃をかなり下まわる。もう1つの実施態様において、該温度は-70℃よりも暖かくはない。もう1つの実施態様において、該温度は-70℃である。もう1つの実施態様において、該温度は約-70℃である。もう1つの実施態様において、該温度は-20℃である。もう1つの実施態様において、該温度は約-20℃である。もう1つの実施態様において、該温度は-30℃である。もう1つの実施態様において、該温度は-40℃である。もう1つの実施態様において、該温度は-50℃である。もう1つの実施態様において、該温度は-60℃である。もう1つの実施態様において、該温度は-80℃である。もう1つの実施態様において、該温度は-30ないし-70℃である。もう1つの実施態様において、該温度は-40ないし-70℃である。もう1つの実施態様において、該温度は-50ないし-70℃である。もう1つの実施態様において、該温度は-60ないし-70℃である。もう1つの実施態様において、該温度は-30ないし-80℃である。もう1つの実施態様において、該温度は-40ないし-80℃である。もう1つの実施態様において、該温度は-50ないし-80℃である。もう1つの実施態様において、該温度は-60ないし-80℃である。もう1つの実施態様において、該温度は-70ないし-80℃である。もう1つの実施態様において、該温度は-80℃よりも冷たい。もう1つの実施態様において、該温度は-80℃よりも冷たい。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

30

40

【0123】

組換えリステリア株の凍結乾燥および低温保存のための方法は当業者によく知られている。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0124】

本発明の方法および組成物のリステリア含有組成物は、もう1つの実施態様において、

50

免疫原性組成物である。もう1つの実施態様において、該組成物は、それが本発明のリス
テリア株を含むことによって固有に免疫原性である。もう1つの実施態様において、該組
成物はさらにアジュバントを含む。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0125】

いくつかの実施態様において用語「含む」とは、他の組換えポリペプチド、アミノ酸配
列、または核酸配列を含むこと、ならびに1つの実施態様においては、抗原またはリス
テリアポリペプチド、アミノ酸配列、または核酸配列を含んでもよい当該分野で知られて
いるであろう他のポリペプチド、アミノ酸配列、または核酸配列を含むことをいう。いく
つかの実施態様において、用語「より実質的になる」とは、具体的な組換えポリペプチド、
アミノ酸配列、または核酸配列、あるいはその断片を有する、本明細書中で提供された方
法で用いるための組成物についてをいう。しかしながら、組換えポリペプチドの有用性に
直接的には関与しない他のポリペプチド、アミノ酸配列、または核酸配列を含めてもよい
。いくつかの実施態様において、用語「よりなる」とは、本明細書中に記載されたいずれ
かの形態または実施態様における特定の組換えポリペプチド、アミノ酸配列、または核酸
配列、あるいは断片、あるいは本明細書中で提供された組換えポリペプチド、アミノ酸配
列、または核酸配列、あるいは断片の組合せを有する、本明細書中に提供された方法で用
いるための組成物についてをいう。

【0126】

もう1つの実施態様において、本発明は、非K L K 3 ペプチドに操作可能に連結された
K L K 3 ペプチドを含む組換えポリペプチドを提供する。もう1つの実施態様において、
非K L K 3 ペプチドはL L O ペプチドである。もう1つの実施態様において、非K L K 3
ペプチドはA c t A ペプチドである。もう1つの実施態様において、非K L K 3 ペプチド
はP E S T 様配列ペプチドである。もう1つの実施態様において、非K L K 3 ペプチドは
、K L K 3 ペプチドの免疫原性を高める。もう1つの実施態様において、非K L K 3 ペ
プチドは当該分野で公知のいずれかの他のタイプのペプチドである。各可能性は本発明の別
の実施態様を表わす。

【0127】

もう1つの実施態様において、本発明は、非P S C A ペプチドに操作可能に連結された
P S C A ペプチドを含む組換えポリペプチドを提供する。もう1つの実施態様において、
非P S C A ペプチドはL L O ペプチドである。もう1つの実施態様において、非P S C A
ペプチドはA c t A ペプチドである。もう1つの実施態様において、非P S C A ペプチド
はP E S T 様配列ペプチドである。もう1つの実施態様において、非P S C A ペプチドは
P S C A ペプチドの免疫原性を高める。もう1つの実施態様において、非P S C A ペプ
チドは当該分野で公知のいずれかの他のタイプのペプチドである。各可能性は本発明の別
の実施態様を表わす。

【0128】

もう1つの実施態様において、本発明は、非F O L H 1 ペプチドに操作可能に連結され
たF O L H 1 ペプチドを含む組換えポリペプチドを提供する。もう1つの実施態様におい
て、非F O L H 1 ペプチドはL L O ペプチドである。もう1つの実施態様において、非F
O L H 1 ペプチドはA c t A ペプチドである。もう1つの実施態様において、非F O L H
1 ペプチドはP E S T 様配列ペプチドである。もう1つの実施態様において、非F O L H
1 ペプチドはF O L H 1 ペプチドの免疫原性を高める。もう1つの実施態様において、非
F O L H 1 ペプチドは当該分野で公知のいずれかの他のタイプのペプチドである。各可能
性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0129】

本明細書中で提供されるように、L L O - K L K 3 融合を発現する組換えリステリア株
はマウスを腫瘍から保護し、抗原特異的C T Lの形成を誘導する。かくして、前立腺特異
的抗原（例えば、前立腺特異的抗原／K L K 3、前立腺特異的膜抗原／F O L H 1、前立
腺幹細胞抗原／P S C A等）を発現するリステリア株は抗原性であって、ワクチン接種方
法において有効である。さらに、前立腺特異的抗原（例えば、前立腺特異的抗原／K L K

3、前立腺特異的膜抗原／F O L H 1、前立腺幹細胞抗原／P S C A等）に対するL L Oおよびその断片の融合は抗原性であって、ワクチン接種方法において有効である。

【0130】

さらに、本明細書中で提供されるように、L m-L L O-E 7は、C 5 7 B 1／6マウスからの樹立された皮下H P V-1 6不滅化腫瘍の退行を誘導する（実施例1）。さらに、本明細書中で提供されるように、L m-L L O-N Pはマウスを腎臓細胞癌腫であるR E N C A-N Pから保護する（実施例3）。さらに、本明細書中で提供されるように、A c t AおよびP E S T様配列に対する抗原の融合は同様な結果を生じる。かくして、非溶血性L L O、A c t A、およびP E S T様配列は、全て、K L K 3、P S C AおよびF O L H 1ペプチドの免疫原性を高めるにおいて有効である。

10

【0131】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えポリペプチドおよびアジュバントを含むワクチンを提供する。

【0132】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えポリペプチドを含む免疫原性組成物を提供する。

【0133】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えポリペプチドをコードする組換えワクチンベクターを提供する。

【0134】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えポリペプチドをコードするヌクレオチド分子を提供する。

20

【0135】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明のヌクレオチド分子およびアジュバントを含むワクチンを提供する。

【0136】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明のヌクレオチド分子を含む免疫原性組成物を提供する。

【0137】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明のヌクレオチド分子を含む組換えワクチンベクターを提供する。

30

【0138】

他の実施態様において、本発明の方法および組成物のアジュバントはモンタニド I S A 5 1である。モンタニド I S A 5 1は天然代謝可能油および精製された乳化剤を含有する。もう1つの実施態様において、アジュバントはG M-C S Fである。もう1つの実施態様において、アジュバントはK L Hである。組換えG M-C S Fは、もう1つの実施態様において、酵母（*S.cerevisiae*）ベクターにおいて成長させたヒト蛋白質である。G M-C S Fは造血系先祖細胞、A P C、ならびに樹状細胞およびT細胞のクローン拡大および分化を促進する。

【0139】

もう1つの実施態様において、アジュバントはサイトカインである。もう1つの実施態様において、アジュバントは成長因子である。もう1つの実施態様において、アジュバントは細胞集団である。もう1つの実施態様において、アジュバントはQ S 2 1である。もう1つの実施態様において、アジュバントはフロイントの不完全アジュバントである。もう1つの実施態様において、アジュバントはリン酸アルミニウムである。もう1つの実施態様において、アジュバントは水酸化アルミニウムである。もう1つの実施態様において、アジュバントはB C Gである。もう1つの実施態様において、アジュバントはミョウバンである。もう1つの実施態様において、アジュバントはインターロイキンである。もう1つの実施態様において、アジュバントはメチル化されていないC p Gオリゴヌクレオチドである。もう1つの実施態様において、アジュバントはクイール（*quill*）グリコ

40

50

シドである。もう1つの実施態様において、アジュバントはモノホスホリル脂質Aである。もう1つの実施態様において、アジュバントはリポソームである。もう1つの実施態様において、アジュバントは細菌マイトジェンである。もう1つの実施態様において、アジュバントは細菌トキシンである。もう1つの実施態様において、アジュバントはケモカインである。もう1つの実施態様において、アジュバントは当該分野で公知のいずれかの他のタイプのアジュバントである。もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物のワクチンは前記アジュバントのうち2つを含む。他の実施態様において、ワクチンは2を超える前記アジュバントを含む。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0140】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与し、それにより、対象において抗KLK3免疫応答を誘導することを含む、対象において抗KLK3免疫応答を誘導する方法を提供する。

【0141】

もう1つの実施態様において、本発明は対象においてKLK3発現腫瘍を治療する方法を提供し、該方法は、本発明の組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与する工程を含み、それにより、対象はKLK3発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、対象においてKLK3発現腫瘍を治療する。もう1つの実施態様において、KLK3発現腫瘍はKLK3発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、KLK3発現腫瘍はKLK3発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、KLK3発現腫瘍はKLK3発現腺癌である。もう1つの実施態様において、KLK3発現腫瘍はKLK3発現前立腺の腺癌である。もう1つの実施態様において、KLK3発現腫瘍はKLK3発現乳癌である。もう1つの実施態様において、KLK3発現腫瘍はKLK3発現卵巣腫瘍である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0142】

1つの実施態様において、「治療する」とは、治療的処置および予防または予防的手段を共にいい、目的は本明細書中に記載された標的とされた病理学的疾患または障害を予防し、または軽減することにある。かくして、1つの実施態様において、治療は、病気、障害または疾患に直接的に影響させ、またはそれらを治癒し、抑制し、阻害し、予防し、その重症度を低下させ、その開始を遅延させ、またはそれに関連する兆候を低下させ、またはその組合せを含んでもよい。かくして、1つの実施態様において、「治療する」とは、とりわけ、進行を遅延させ、緩解を早め、緩解を誘導し、緩解を増大させ、回復を早め、別の治療法に対する抵抗性の効力を増大させ、またはその抵抗性を減少させ、またはその組合せをいう。1つの実施態様において、「予防する」または「妨げる」とは、とりわけ、兆候の開始を遅延させ、病気の再発を予防し、再発エピソードの数または頻度を減少させ、兆候的エピソードの間の潜伏期を増大させ、またはその組合せをいう。1つの実施態様において、「抑制する」、「阻害する」または「に対して保護する」とは、とりわけ、兆候の重症度を低下させ、急性エピソードの重症度を低下させ、兆候の数を低下させ、病気関連兆候の発生率を低下させ、兆候の潜伏期を低下させ、兆候を緩和し、二次的兆候を低下させ、二次的感染を低下させ、患者の生存を遅延させ、またはその組合せをいう。

【0143】

もう1つの実施態様において、本発明は、KLK3発現腫瘍に対してヒト対象を保護する方法を提供し、該方法は、本発明の組換えリステリア株を含む組成物をヒト対象に投与する工程を含み、それにより、対象はKLK3発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、KLK3発現腫瘍からヒト対象を保護する。もう1つの実施態様において、KLK3発現腫瘍はKLK3発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、KLK3発現腫瘍はKLK3発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、KLK3発現腫瘍はKLK3発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0144】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与し、それにより、対象において抗PSCA免疫応答を誘導することを含む、対

象において抗PSCA免疫応答を誘導する方法を提供する。

【0145】

もう1つの実施態様において、本発明は、対象においてPSCA発現腫瘍を治療する方法を提供し、該方法は本発明の組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与する工程を含み、それにより、対象はPSCA発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、対象においてPSCA発現腫瘍を治療する。もう1つの実施態様において、PSCA発現腫瘍はPSCA発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、PSCA発現腫瘍はPSCA発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、PSCA発現腫瘍はPSCA発現腺癌である。もう1つの実施態様において、PSCA発現腫瘍はPSCA発現前立腺の腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

10

【0146】

もう1つの実施態様において、本発明は、PSCA発現腫瘍に対してヒト対象を保護する方法を提供し、該方法は、本発明の組換えリステリア株を含む組成物をヒト対象に投与する工程を含み、それにより、対象はPSCA発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、PSCA発現腫瘍に対してヒト対象を保護する。もう1つの実施態様において、PSCA発現腫瘍はPSCA発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、PSCA発現腫瘍はPSCA発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、PSCA発現腺癌はPSCA発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0147】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与し、それにより、対象において抗FOLH1免疫応答を誘導することを含む、対象において抗FOLH1免疫応答を誘導する方法を提供する。

20

【0148】

もう1つの実施態様において、本発明は、対象においてFOLH1発現腫瘍を治療する方法を提供し、該方法は、本発明の組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与する工程を含み、それにより、対象はFOLH1発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、対象においてFOLH1発現腫瘍を治療する。もう1つの実施態様において、FOLH1発現腫瘍はFOLH1発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、FOLH1発現腫瘍はFOLH1発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、FOLH1発現腫瘍はFOLH1発現腺癌である。もう1つの実施態様において、FOLH1発現腫瘍はFOLH1発現前立腺の腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

30

【0149】

もう1つの実施態様において、本発明は、FOLH1発現腫瘍に対してヒト対象を保護する方法を提供し、該方法は本発明の組換えリステリア株を含む組成物をヒト対象に投与する工程を含み、それにより、対象はFOLH1発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、ヒト対象をFOLH1発現腫瘍から保護する。もう1つの実施態様において、FOLH1発現腫瘍は、FOLH1発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、FOLH1発現腫瘍はFOLH1発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、FOLH1発現腫瘍はFOLH1発現腺癌である。もう1つの実施態様において、各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

40

【0150】

前立腺癌ワクチンの効力を評価する方法は当該分野においてよく知られており、例えば、Dzójic H et al. (Adenovirus-mediated CD40 ligand therapy induces tumor cell apoptosis and systemic immunity in the TRAMP-C2 mouse prostate cancer model. Prostate. 2006 Jun 1;66(8):831-8)、Naruishi K et al. (Adenoviral vector-mediated RTV P-1 gene-modified tumor cell-based vaccine suppresses the development of experimental prostate cancer. Cancer Gene Ther. 2006 Jul;13(7):658-63)、Sehgal I et al. (Cancer Cell Int. 2006 Aug 23;6:21)、およびHeinrich JE et al. (Vaccination against prostate cancer using a live tissue factor deficient cell line in Lobund-Wistar rats. Cancer Immunol Immunother 2007;56(5):725-30)に記載されている。各可

50

能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0151】

もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物をテストするのに用いる前立腺癌モデルはP S A発現T R A M P - C 1マウス腫瘍モデル(T P S A 2 3)である。もう1つの実施態様において、前立腺癌モデルは1 7 8 - 2 B M A細胞モデルである。もう1つの実施態様において、前立腺癌モデルはP A I I I 腺癌細胞モデルである。もう1つの実施態様において、前立腺癌モデルはP C - 3 Mモデルである。もう1つの実施態様において、前立腺癌モデルは当該分野で公知のいずれかの他の前立腺癌モデルである。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0152】

もう1つの実施態様において、ワクチンがヒト対象においてテストされ、効力を、例えば、腫瘍転移の数またはサイズを決定し、または病気兆候(咳、胸部疼痛、体重喪失等)をモニターすることによって、例えば、C D 4 ⁺およびC D 8 ⁺ T細胞応答を直接的に測定し、または病気進行を測定する、当該分野でよく知られた方法を用いてモニターする。ヒト対象における前立腺癌ワクチンの効力を評価する方法は当該分野でよく知られており、例えば、Uenaka A et al. (T cell immunomonitoring and tumor responses in patients immunized with a complex of cholesterol-bearing hydrophobized pullulan(CHP) and NY-ESO-1 protein. Cancer Immun. 2007 Apr 19;7:9)、およびThomas-Kaskel AK et al. (Vaccination of advanced prostate cancer patients with PSCA and PSA peptide-loaded dendritic cells induces DTH responses that correlate with superior overall survival. Int J Cancer. 2006 Nov 15;119(10):2428-34)に記載されている。各方法は本発明の別の実施態様を表わす。

【0153】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えポリペプチドを含む免疫原性組成物を対象に投与し、それにより、対象において抗K L K 3免疫応答を誘導することを含む、対象において抗K L K 3免疫応答を誘導する方法を提供する。

【0154】

もう1つの実施態様において、本発明は、対象においてK L K 3発現腫瘍を治療する方法を提供し、該方法は本発明の組換えポリペプチドを含む免疫原性組成物を対象に投与する工程を含み、それにより、対象はK L K 3発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、対象においてK L K 3発現腫瘍を治療する。もう1つの実施態様において、K L K 3発現腫瘍はK L K 3発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、K L K 3発現腫瘍はK L K 3発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、K L K 3発現腫瘍はK L K 3発現腺癌である。もう1つの実施態様において、K L K 3発現腫瘍はK L K 3発現乳癌である。もう1つの実施態様において、K L K 3発現腫瘍はK L K 3発現卵巣腫瘍である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0155】

もう1つの実施態様において、本発明は、K L K 3発現腫瘍に対してヒト対象を保護する方法を提供し、該方法は本発明の組換えポリペプチドを含む免疫原性組成物をヒト対象に投与する工程を含み、それにより、対象はK L K 3発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、ヒト対象をK L K 3発現腫瘍に対して保護する。もう1つの実施態様において、K L K 3発現腫瘍はK L K 3発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、K L K 3 - 発現腫瘍はK L K 3 - 発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、K L K 3発現腫瘍はK L K 3発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0156】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明のヌクレオチド分子を含む免疫原性組成物を対象に投与し、それにより、対象において抗K L K 3免疫応答を誘導することを含む、対象において抗K L K 3免疫応答を誘導する方法を提供する。

【0157】

もう1つの実施態様において、本発明は、対象においてK L K 3発現腫瘍を治療する方

法を提供し、該方法は本発明のヌクレオチド分子を含む免疫原性組成物を対象に投与する工程を含み、それにより、対象はK L K 3 発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、対象においてK L K 3 発現腫瘍を治療する。もう1つの実施態様において、K L K 3 発現腫瘍はK L K 3 発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、K L K 3 発現腫瘍はK L K 3 発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、K L K 3 発現腫瘍はK L K 3 発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0158】

もう1つの実施態様において、本発明は、K L K 3 発現腫瘍に対してヒト対象を保護する方法を提供し、該方法は、本発明のヌクレオチド分子を含む免疫原性組成物をヒト対象に投与する工程を含み、それにより、対象はK L K 3 発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、ヒト対象をK L K 3 発現腫瘍から保護する。もう1つの実施態様において、K L K 3 発現腫瘍はK L K 3 発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、K L K 3 発現腫瘍はK L K 3 発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、K L K 3 発現腫瘍はK L K 3 発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

10

【0159】

もう1つの実施態様において、本発明は、組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与することを含む、対象において抗K L K 3 免疫応答を誘導する方法を提供し、該株は本発明の組換えポリペプチドを含み、それにより、対象において抗K L K 3 免疫応答を誘導する。

【0160】

もう1つの実施態様において、本発明は対象においてK L K 3 発現腫瘍を治療する方法を提供し、該方法は組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与する工程を含み、該株は本発明の組換えポリペプチドを含み、それにより、対象はK L K 3 発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、対象においてK L K 3 発現腫瘍を治療する。もう1つの実施態様において、K L K 3 発現腫瘍はK L K 3 発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、K L K 3 発現腫瘍はK L K 3 発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、K L K 3 発現腫瘍はK L K 3 発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

20

【0161】

もう1つの実施態様において、本発明はヒト対象をK L K 3 発現腫瘍から保護する方法を提供し、該方法は組換えリステリア株を含む組成物をヒト対象に投与する工程を含み、該株は本発明の組換えポリペプチドを含み、それにより、対象はK L K 3 発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、ヒト対象をK L K 3 発現腫瘍に対して保護する。もう1つの実施態様において、K L K 3 発現腫瘍はK L K 3 発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、K L K 3 発現腫瘍はK L K 3 発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、K L K 3 発現腫瘍はK L K 3 発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

30

【0162】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与し、それにより、対象においてK L K 3 発現前立腺癌腫瘍の成長を妨げることを含む、対象においてK L K 3 発現前立腺癌腫瘍の成長を妨げる方法を提供する。

40

【0163】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与し、それにより、K L K 3 発現前立腺癌腫瘍に対する対象の免疫耐性を克服することを含む、K L K 3 発現前立腺癌腫瘍に対する対象の免疫耐性を克服する方法を提供する。もう1つの実施態様において、本発明は、1つの実施態様においてはリステリアで初回免疫し、ポリペプチドでブースター注射することを含む、該治療の組合せを提供する。

【0164】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えポリペプチドを含む免疫原性

50

組成物を対象に投与し、それにより、対象においてK L K 3 発現前立腺癌腫瘍の成長を妨げることを含む、対象においてK L K 3 発現前立腺癌腫瘍の成長を妨げる方法を提供する。

【0165】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えポリペプチドを含む免疫原性組成物を対象に投与し、それにより、K L K 3 発現前立腺癌腫瘍に対する対象の免疫耐性を克服することを含む、K L K 3 発現前立腺癌腫瘍に対する対象の免疫耐性を克服する方法を提供する。

【0166】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明のヌクレオチド分子を含む免疫原性組成物を対象に投与し、それにより、対象においてK L K 3 発現前立腺癌腫瘍の成長を妨げることを含む、対象においてK L K 3 発現前立腺癌腫瘍の成長を妨げる方法を提供する。

10

【0167】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明のヌクレオチド分子を含む免疫原性組成物を対象に投与し、それにより、K L K 3 発現前立腺癌腫瘍に対する対象の免疫耐性を克服することを含む、K L K 3 発現前立腺癌腫瘍に対する対象の免疫耐性を克服する方法を提供する。

【0168】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えポリペプチドを含む免疫原性組成物を対象に投与し、それにより、対象において抗P S C A免疫応答を誘導することを含む、対象において抗P S C A免疫応答を誘導する方法を提供する。

20

【0169】

もう1つの実施態様において、本発明は、対象においてP S C A 発現腫瘍を治療する方法を提供し、該方法は本発明の組換えポリペプチドを含む免疫原性組成物を対象に投与する工程を含み、それにより、対象はP S C A 発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、対象においてP S C A 発現腫瘍を治療する。もう1つの実施態様において、P S C A 発現腫瘍はP S C A 発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、P S C A 発現腫瘍はP S C A 発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、P S C A 発現腫瘍はP S C A 発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

30

【0170】

もう1つの実施態様において、本発明はP S C A 発現腫瘍に対してヒト対象を保護する方法を提供し、該方法は本発明の組換えポリペプチドを含む免疫原性組成物をヒト対象に投与する工程を含み、それにより、対象はP S C A 発現腫瘍に対する免疫原性組成物を高め、それにより、ヒト対象をP S C A 発現腫瘍に対して保護する。もう1つの実施態様において、P S C A 発現腫瘍はP S C A 発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、P S C A 発現腫瘍はP S C A 発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、P S C A 発現腫瘍はP S C A 発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0171】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明のヌクレオチド分子を含む免疫原性組成物を対象に投与し、それにより、対象において抗P S C A免疫応答を誘導することを含む、対象において抗P S C A免疫応答を誘導する方法を提供する。

40

【0172】

もう1つの実施態様において、本発明は対象においてP S C A 発現腫瘍を治療する方法を提供し、該方法は、本発明のヌクレオチド分子を含む免疫原性組成物を対象に投与する工程を含み、それにより、対象はP S C A 発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、対象においてP S C A 発現腫瘍を治療する。もう1つの実施態様において、P S C A 発現腫瘍はP S C A 発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、P S C A 発現腫瘍はP S C A 発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、P S C A 発現腫瘍はP S C A 発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

50

【0173】

もう1つの実施態様において、本発明は、PSCA発現腫瘍に対してヒト対象を保護する方法を提供し、該方法は本発明のヌクレオチド分子を含む免疫原性組成物をヒト対象に投与する工程を含み、それにより、対象はPSCA発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、ヒト対象をPSCA発現腫瘍に対して保護する。もう1つの実施態様において、PSCA発現腫瘍はPSCA発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、PSCA発現腫瘍はPSCA発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、PSCA発現腫瘍はPSCA発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0174】

もう1つの実施態様において、本発明は、組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与することを含む、対象において抗PSCA免疫応答を誘導する方法を提供し、該株は本発明の組換えポリペプチドを含み、それにより、対象において抗PSCA免疫応答を誘導する。

10

【0175】

もう1つの実施態様において、本発明は、対象においてPSCA発現腫瘍を治療する方法を提供し、該方法は組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与する工程を含み、該株は本発明の組換えポリペプチドを含み、それにより、対象はPSCA発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、対象においてPSCA発現腫瘍を治療する。もう1つの実施態様において、PSCA発現腫瘍はPSCA発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、PSCA発現腫瘍はPSCA発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、PSCA発現腫瘍はPSCA発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

20

【0176】

もう1つの実施態様において、本発明は、PSCA発現腫瘍に対してヒト対象を保護する方法を提供し、該方法は組換えリステリア株を含む組成物をヒト対象に投与する工程を含み、該株は本発明の組換えポリペプチドを含み、それにより、対象はPSCA発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、ヒト対象をPSCA発現腫瘍に対して保護する。もう1つの実施態様において、PSCA発現腫瘍はPSCA発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、PSCA発現腫瘍はPSCA発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、PSCA発現腫瘍はPSCA発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

30

【0177】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与し、それにより、対象においてPSCA発現前立腺癌腫瘍の成長を妨げることを含む、対象においてPSCA発現前立腺癌腫瘍の成長を妨げる方法を提供する。

【0178】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与し、それにより、PSCA発現前立腺癌腫瘍に対する対象の免疫耐性を克服することを含む、PSCA発現前立腺癌腫瘍に対する対象の免疫耐性を克服する方法を提供する。

40

【0179】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えポリペプチドを含む免疫原性組成物を対象に投与し、それにより、対象においてPSCA発現前立腺癌腫瘍の成長を妨げることを含む、対象においてPSCA発現前立腺癌腫瘍の成長を妨げる方法を提供する。

【0180】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えポリペプチドを含む免疫原性組成物を対象に投与し、それにより、PSCA発現前立腺癌腫瘍に対する対象の免疫耐性を克服することを含む、PSCA発現前立腺癌腫瘍に対する対象の免疫耐性を克服する方法を提供する。

50

【0181】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明のヌクレオチド分子を含む免疫原性組成物を対象に投与し、それにより、対象においてPSCA発現前立腺癌腫瘍の成長を妨げることを含む、対象においてPSCA発現前立腺癌腫瘍の成長を妨げる方法を提供する。

【0182】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明のヌクレオチド分子を含む免疫原性組成物を対象に投与し、それにより、PSCA発現前立腺癌腫瘍に対する対象の免疫耐性を克服することを含む、PSCA発現前立腺癌腫瘍に対する対象の免疫耐性を克服する方法を提供する。

【0183】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えポリペプチドを含む免疫原性組成物を対象に投与し、それにより、対象において抗FOLH1免疫応答を誘導することを含む、対象において抗FOLH1免疫応答を誘導する方法を提供する。

【0184】

もう1つの実施態様において、本発明は、対象においてFOLH1発現腫瘍を治療する方法を提供し、該方法は本発明の組換えポリペプチドを含む免疫原性組成物を対象に投与する工程を含み、それにより、対象はFOLH1発現腫瘍に対して免疫応答を高め、それにより、対象においてFOLH1発現腫瘍を治療する。もう1つの実施態様において、FOLH1発現腫瘍はFOLH1発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、FOLH1発現腫瘍はFOLH1発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、FOLH1発現腫瘍はFOLH1発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0185】

もう1つの実施態様において、本発明は、FOLH1発現腫瘍に対してヒト対象を保護する方法を提供し、該方法は本発明の組換えポリペプチドを含む免疫原性組成物をヒト対象に投与する工程を含み、それにより、対象はFOLH1発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、FOLH1発現腫瘍に対してヒト対象を保護する。もう1つの実施態様において、FOLH1発現腫瘍はFOLH1発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、FOLH1発現腫瘍はFOLH1発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、FOLH1発現腫瘍はFOLH1発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0186】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明のヌクレオチド分子を含む免疫原性組成物を対象に投与し、それにより、対象において抗FOLH1免疫応答を誘導することを含む、対象において抗FOLH1免疫応答を誘導する方法を提供する。

【0187】

もう1つの実施態様において、本発明は対象において抗FOLH1発現腫瘍を治療する方法を提供し、該方法は本発明のヌクレオチド分子を含む免疫原性組成物を対象に投与する工程を含み、それにより、対象はFOLH1発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、対象においてFOLH1発現腫瘍を治療する。もう1つの実施態様において、FOLH1発現腫瘍はFOLH1発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、FOLH1発現腫瘍はFOLH1発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、FOLH1発現腫瘍はFOLH1発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0188】

もう1つの実施態様において、本発明はFOLH1発現腫瘍に対してヒト対象を保護する方法を提供し、該方法は、本発明のヌクレオチド分子を含む免疫原性組成物をヒト対象に投与する工程を含み、それにより、対象はFOLH1発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、ヒト対象をFOLH1発現腫瘍に対して保護する。もう1つの実施態様において、FOLH1発現腫瘍はFOLH1発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、FOLH1発現腫瘍はFOLH1発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様にお

いて、F O L H 1 発現腫瘍はF O L H 1 発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0189】

もう1つの実施態様において、本発明は組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与することを含む、対象において抗F O L H 1 免疫応答を誘導する方法を提供し、該株は本発明の組換えポリペプチドを含み、それにより、対象において抗F O L H 1 免疫応答を誘導する。

【0190】

もう1つの実施態様において、本発明は対象においてF O L H 1 発現腫瘍を治療する方法を提供し、該方法は組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与する工程を含み、該株は本発明の組換えポリペプチドを含み、それにより、対象はF O L H 1 発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、対象においてF O L H 1 発現腫瘍を治療する。もう1つの実施態様において、F O L H 1 発現腫瘍はF O L H 1 発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、F O L H 1 発現腫瘍はF O L H 1 発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、F O L H 1 発現腫瘍はF O L H 1 発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0191】

もう1つの実施態様において、本発明はF O L H 1 発現腫瘍に対してヒト対象を保護する方法を提供し、該方法は組換えリステリア株を含む組成物をヒト対象に投与する工程を含み、該株は本発明の組換えポリペプチドを含み、それにより、対象はF O L H 1 発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、ヒト対象をF O L H 1 発現腫瘍に対して保護する。もう1つの実施態様において、F O L H 1 発現腫瘍はF O L H 1 発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、F O L H 1 発現腫瘍はF O L H 1 発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、F O L H 1 発現腫瘍はF O L H 1 発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0192】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与し、それにより、対象においてF O L H 1 発現前立腺癌腫瘍の成長を妨げることを含む、対象においてF O L H 1 発現前立腺癌腫瘍の成長を妨げる方法を提供する。

【0193】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えリステリア株を含む組成物を対象に投与し、それにより、F O L H 1 発現前立腺癌腫瘍に対する対象の免疫耐性を克服することを含む、F O L H 1 発現前立腺癌腫瘍に対する対象の免疫耐性を克服する方法を提供する。

【0194】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えポリペプチドを含む免疫原性組成物を対象に投与し、それにより、対象においてF O L H 1 発現前立腺癌腫瘍の成長を妨げることを含む、対象においてF O L H 1 発現前立腺癌腫瘍の成長を妨げる方法を提供する。

【0195】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えポリペプチドを含む免疫原性組成物を対象に投与し、それにより、F O L H 1 発現前立腺癌腫瘍に対する対象の免疫耐性を克服することを含む、F O L H 1 発現前立腺癌腫瘍に対する対象の免疫耐性を克服する方法を提供する。

【0196】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明のヌクレオチド分子を含む免疫原性組成物を対象に投与し、それにより、対象においてF O L H 1 発現前立腺癌腫瘍の成長を妨げることを含む、対象においてF O L H 1 発現前立腺癌腫瘍の成長を妨げる方法を提供する。

【0197】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明のヌクレオチド分子を含む免疫原性組成物を対象に投与し、それにより、F O L H 1 発現前立腺癌腫瘍に対する対象の免疫耐性を克服することを含む、F O L H 1 発現前立腺癌腫瘍に対する対象の免疫耐性を克服する方法を提供する。

【0198】

「耐性」とは、もう1つの実施態様において、抗原に対する宿主の応答性の欠如をいう。もう1つの実施態様において、該用語は抗原に対する宿主の検出可能な応答性の欠如をいう。もう1つの実施態様において、該用語は宿主における抗原の免疫原性の欠如をいう。もう1つの実施態様において、耐性は、イン・ビトロC T Lアッセイにおける応答性の欠如によって測定される。もう1つの実施態様において、耐性は、遅延型過敏アッセイにおける応答性の欠如によって測定される。もう1つの実施態様において、耐性は当該分野で公知のいずれかの他の適当なアッセイにおける応答性の欠如によって測定される。もう1つの実施態様において、耐性は、本明細書中の実施例に示されたように決定され、または測定される。各可能性は本発明のもう1つの実施態様を表わす。

10

【0199】

「克服する」とは、もう1つの実施態様において、ワクチンによる耐性の可逆性をいう。もう1つの実施態様において、該用語はワクチンによる検出可能な免疫応答の付与をいう。もう1つの実施態様において、免疫耐性の克服は本明細書中の実施例に示されたように決定され、または測定される。各可能性は本発明のもう1つの実施態様を表わす。

【0200】

もう1つの実施態様において、本発明は対象において良性前立腺過形成（B P H）を治療する方法を提供し、該方法は本発明のK L K 3 発現リステリア株を対象に投与し、それにより、対象においてB P Hを治療する工程を含む。もう1つの実施態様において、本発明は対象においてB P Hの進行を妨げる方法を提供し、該方法は本発明のK L K 3 発現リステリア株を対象に投与し、それにより、対象においてB P Hの進行を妨げる工程を含む。

20

【0201】

もう1つの実施態様において、本発明は対象においてB P Hを治療する方法を提供し、該方法は本発明のP S C A 発現リステリア株を対象に投与し、それにより、対象においてB P Hを治療する工程を含む。もう1つの実施態様において、本発明は、対象においてB P Hの進行を妨げる方法を提供し、該方法は本発明のP S C A 発現リステリア株を対象に投与し、それにより、対象においてB P Hの進行を妨げる工程を含む。

30

【0202】

もう1つの実施態様において、本発明は対象においてB P Hを治療する方法を提供し、該方法は本発明のF O L H 1 発現リステリア株を対象に投与し、それにより、対象においてB P Hを治療する工程を含む。もう1つの実施態様において、本発明は対象においてB P Hの進行を妨げる方法を提供し、該方法は本発明のF O L H 1 発現リステリア株を対象に投与し、それにより、対象においてB P Hの進行を妨げる工程を含む。

【0203】

もう1つの実施態様において、本発明は対象において前立腺上皮内新形成（P I N）を治療する方法を提供し、該方法は本発明のK L K 3 発現リステリア株を対象に投与し、それにより、対象においてP I Nを治療する工程を含む。もう1つの実施態様において、本発明は対象においてP I Nの進行を妨げる方法を提供し、該方法は本発明のK L K 3 発現リステリア株を対象に投与し、それにより、対象においてP I Nの進行を妨げる工程を含む。

40

【0204】

もう1つの実施態様において、本発明は、対象において前立腺上皮内新形成（P I N）を治療する方法を提供し、該方法は本発明のP S C A 発現リステリア株を対象に投与し、それにより、対象においてP I Nを治療する工程を含む。もう1つの実施態様において、本発明は対象においてP I Nの進行を妨げる方法を提供し、該方法は本発明のP S C A 発

50

現リステリア株を対象に投与し、それにより、対象においてP I Nの進行を妨げる工程を含む。

【0205】

もう1つの実施態様において、本発明は対象において前立腺上皮内新形成（P I N）を治療する方法を提供し、該方法は本発明のF O L H 1 発現リステリア株を対象に投与し、それにより、対象においてP I Nを治療する工程を含む。もう1つの実施態様において、本発明は対象においてP I Nの進行を妨げる方法を提供し、該方法は本発明のF O L H 1 発現リステリア株を対象に投与し、それにより、対象においてP I Nの進行を妨げる工程を含む。

【0206】

もう1つの実施態様において、本発明は対象においてB P Hを治療する方法を提供し、該方法は本発明のK L K 3 含有ペプチドを対象に投与し、それにより、対象においてB P Hを治療する工程を含む。もう1つの実施態様において、本発明は対象においてB P Hの進行を妨げる方法を提供し、該方法は本発明のK L K 3 含有ペプチドを対象に投与し、それにより、対象においてB P Hの進行を妨げる工程を含む。

【0207】

もう1つの実施態様において、本発明は対象においてB P Hを治療する方法を提供し、該方法は本発明のP S C A 含有ペプチドを対象に投与し、それにより、対象においてB P Hを治療する工程を含む。もう1つの実施態様において、本発明は、対象においてB P Hの進行を妨げる方法を提供し、該方法は本発明のP S C A 含有ペプチドを対象に投与し、それにより、対象においてB P Hの進行を妨げる工程を含む。

【0208】

もう1つの実施態様において、本発明は対象においてB P Hを治療する方法を提供し、該方法は本発明のF O L H 1 含有ペプチドを対象に投与し、それにより、対象においてB P Hを治療する工程を含む。もう1つの実施態様において、本発明は対象においてB P Hの進行を妨げる方法を提供し、該方法は本発明のF O L H 1 含有ペプチドを対象に投与し、それにより、対象においてB P Hの進行を妨げる工程を含む。

【0209】

もう1つの実施態様において、本発明は対象において前立腺上皮内新形成（P I N）を治療する方法を提供し、該方法は本発明のK L K 3 含有ペプチドを対象に投与し、それにより、対象においてP I Nを治療する工程を含む。もう1つの実施態様において、本発明は対象においてP I Nの進行を妨げる方法を提供し、該方法は本発明のK L K 3 含有ペプチドを対象に投与し、それにより、対象においてP I Nの進行を妨げる工程を含む。

【0210】

もう1つの実施態様において、本発明は対象において前立腺上皮内新形成（P I N）を治療する方法を提供し、該方法は本発明のP S C A 含有ペプチドを対象に投与し、それにより、対象においてP I Nを治療する工程を含む。もう1つの実施態様において、本発明は対象においてP I Nの進行を妨げる方法を提供し、該方法は本発明のP S C A 含有ペプチドを対象に投与し、それにより、対象においてP I Nの進行を妨げる工程を含む。

【0211】

もう1つの実施態様において、本発明は対象において前立腺上皮内新形成（P I N）を治療する方法を提供し、該方法は本発明のF O L H 1 含有ペプチドを対象に投与し、それにより対象においてP I Nを治療する工程を含む。もう1つの実施態様において、本発明は対象においてP I Nの進行を妨げる方法を提供し、該方法は本発明のF O L H 1 含有ペプチドを対象に投与し、それにより、対象においてP I Nの進行を妨げる工程を含む。

【0212】

もう1つの実施態様において、本発明は対象においてB P Hを治療する方法を提供し、該方法は本発明のK L K 3 をコードするヌクレオチド分子を対象に投与し、それにより、対象においてB P Hを治療する工程を含む。もう1つの実施態様において、本発明は対象においてB P Hの進行を妨げる方法を提供し、該方法は本発明のK L K 3 をコードするヌ

10

20

30

40

50

クレオチド分子を対象に投与し、それにより、対象においてB P Hの進行を妨げる工程を含む。

【0213】

もう1つの実施態様において、本発明は対象においてB P Hを治療する方法を提供し、該方法は本発明のP S C Aをコードするヌクレオチド分子を対象に投与し、それにより、対象においてB P Hを治療する工程を含む。もう1つの実施態様において、本発明は対象においてB P Hの進行を妨げる方法を提供し、該方法は本発明のP S C Aをコードするヌクレオチド分子を対象に投与し、それにより、対象においてB P Hの進行を妨げる工程を含む。

【0214】

もう1つの実施態様において、本発明は対象においてB P Hを治療する方法を提供し、該方法は本発明のF O L H 1をコードするヌクレオチド分子を対象に投与し、それにより、対象において、B P Hを治療する工程を含む。もう1つの実施態様において、本発明は対象においてB P Hの進行を妨げる方法を提供し、該方法は本発明のF O L H 1をコードするヌクレオチド分子を対象に投与し、それにより、対象においてB P Hの進行を妨げる工程を含む。

【0215】

もう1つの実施態様において、本発明は対象において前立腺上皮内新形成を治療する方法を提供し、該方法は本発明のK L K 3をコードするヌクレオチド分子を対象に投与し、それにより、対象において前立腺上皮内新形成を治療する工程を含む。もう1つの実施態様において、本発明は対象において前立腺上皮内新形成の進行を妨げる方法を提供し、該方法は本発明のK L K 3をコードするヌクレオチド分子を対象に投与し、それにより、対象において前立腺上皮内新形成の進行を妨げる工程を含む。

【0216】

もう1つの実施態様において、本発明は対象において前立腺上皮内新形成を治療する方法を提供し、該方法は本発明のP S C Aをコードするヌクレオチド分子を対象に投与し、それにより、対象において前立腺上皮内新形成を治療する工程を含む。もう1つの実施態様において、本発明は対象において前立腺上皮内新形成の進行を妨げる方法を提供し、該方法は本発明のP S C Aをコードするヌクレオチド分子を対象に投与し、それにより、対象において前立腺上皮内新形成の進行を妨げる工程を含む。

【0217】

もう1つの実施態様において、本発明は対象において前立腺上皮内新形成を治療する方法を提供し、該方法は本発明のF O L H 1をコードするヌクレオチド分子を対象に投与し、それにより、対象において前立腺上皮内新形成を治療する工程を含む。もう1つの実施態様において、本発明は対象において前立腺上皮内新形成の進行を妨げる方法を提供し、該方法は本発明のF O L H 1をコードするヌクレオチド分子を対象に投与し、それにより、対象において前立腺上皮内新形成の進行を妨げる工程を含む。

【0218】

もう1つの実施態様において、本発明の融合蛋白質はL Mによって発現される必要はなく、むしろ、蛋白質の発現および単離で用いられる他のベクターおよび細胞系から発現させ、単離することができる。

【0219】

本明細書中で提供されるように、L L O - E 7融合は有意な治療効力を呈する。これらの実験において、L L Oの非溶血切形形態との融合蛋白質としてE 7を発現するワクシニアベクターを構築した。ブランク精製ワクシニアによるL L O - E 7融合産物の発現は、L L O蛋白質配列に対して向けられた抗体を用いることによってウェスタンブロットによって証明された。V a c - L L O - E 7は、各々、B a l b / cおよびC 5 7 / B L 6マウスのL L O (9 1ないし9 9) およびE 7 (4 9ないし5 7) エピトープを用いて決定されるように、L L OおよびE 7に対して特異的なC D 8 + T細胞を生産することが示された。結果はC T Lアッセイによって確認した(実施例4)。

10

20

30

40

50

【0220】

かくして、リステリアにおける宿主細胞系およびリステリア以外の宿主細胞系における L L O、A c t A、または P E S T 様配列の非溶血切形形態との融合蛋白質としての、抗原、例えば、K L K 3、P S C A または F O L H 1 の発現の結果、抗原の増強された免疫原性が得られる。比較実験をワクシニアを用いて行い、他方、これらの融合蛋白質を発現させるのに用いることができる多数の他のプラスミドおよび発現系が知られている。例えば、本発明において有用な細菌ベクターは、限定されるものではないが、Salmonella sp.、Shigella sp.、B C G、リステリア・モノサイトゲネスおよび S.gordonni を含む。加えて、ファゴリソソーム融合から逃避し、細胞の細胞質において生きるように修飾された組換え細菌ベクターによって融合蛋白質を送達することができる。本発明で有用なウイルスベクターは、限定されるものではないが、ワクシニア、アビポックス、アデノウイルス、A A V、ワクシニアウイルス N Y V A C、修飾されたワクシニア株アンカラ (M V A)、セムリキ森林熱ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、ヘルペスウイルス、レトロウイルスを含む。裸の D N A ベクターを用いることもできる。

【0221】

もう1つの実施態様において、標的腫瘍細胞によって発現された K L K 3 蛋白質は、リステリアベクターによって発現された (ペプチドの長さ全体に渡って) K L K 3 ペプチドに対して完全な相同性を有する。もう1つの実施態様において、K L K 3 蛋白質はリステリアベクターによって発現された K L K 3 ペプチドに対して (ペプチドの長さ全体に渡って) 高度に相同である。「高度に相同な」とは、もう1つの実施態様において、90%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は92%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は93%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は94%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は95%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は96%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は97%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は98%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は99%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は100%の相同性をいう。各可能性は本発明の別の実施態様を表す。

【0222】

もう1つの実施態様において、標的腫瘍細胞によって発現された P S C A 蛋白質はリステリアベクターによって発現された (ペプチドの長さの全体に渡る) P S C A ペプチドに対する完全な相同性を有する。もう1つの実施態様において、P S C A 蛋白質はリステリアベクターによって発現された P S C A ペプチドに対して (ペプチドの長さ全体に渡って) 高度に相同である。「高度に相同な」とは、もう1つの実施態様において、90%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は92%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は93%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は94%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は95%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は96%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は97%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は98%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は99%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は100%の相同性をいう。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0223】

もう1つの実施態様において、標的腫瘍細胞によって発現された F O L H 1 蛋白質はリステリアベクターによって発現された (ペプチド長さ全体に渡って) F O L H 1 ペプチドに対する完全な相同性を有する。もう1つの実施態様において、F O L H 1 蛋白質は、リステリアベクターによって発現された F O L H 1 ペプチドに対して (ペプチドの長さ全体に渡って) 高度に相同である。「高度に相同な」とは、もう1つの実施態様において、90%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は92%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は93%を超える相同性をいう。もう1

つの実施態様において、該用語は94%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は95%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は96%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は97%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は98%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は99%を超える相同性をいう。もう1つの実施態様において、該用語は100%の相同性をいう。各可能性は本発明の別の実施態様を表す。

【0224】

本発明の方法および組成物のKLK3ペプチドは、もう1つの実施態様において、長さが200ないし261アミノ酸(AA)である。もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドは約100ないし261AA長である。もう1つの実施態様において、該長さは100ないし261AAである。もう1つの実施態様において、該長さは110ないし261AAである。もう1つの実施態様において、該長さは120ないし261AAである。もう1つの実施態様において、該長さは130ないし261AAである。もう1つの実施態様において、該長さは140ないし261AAである。もう1つの実施態様において、該長さは150ないし261AAである。もう1つの実施態様において、該長さは160ないし261AAである。もう1つの実施態様において、該長さは175ないし261AAである。もう1つの実施態様において、該長さは190ないし261AAである。もう1つの実施態様において、該長さは200ないし261AAである。もう1つの実施態様において、該長さは210ないし261AAである。もう1つの実施態様において、該長さは220ないし261AAである。もう1つの実施態様において、該長さは230ないし261AAである。もう1つの実施態様において、該長さは240ないし261AAである。もう1つの実施態様において、該長さは250ないし261AAである。もう1つの実施態様において、該長さは100ないし150AAである。もう1つの実施態様において、該長さは100ないし160AAである。もう1つの実施態様において、該長さは100ないし170AAである。もう1つの実施態様において、該長さは100ないし180AAである。もう1つの実施態様において、該長さは100ないし190AAである。もう1つの実施態様において、該長さは100ないし200AAである。もう1つの実施態様において、該長さは100ないし210AAである。もう1つの実施態様において、該長さは100ないし220AAである。もう1つの実施態様において、該長さは100ないし240AAである。もう1つの実施態様において、該長さは50ないし150AAである。もう1つの実施態様において、該長さは50ないし160AAである。もう1つの実施態様において、該長さは50ないし170AAである。もう1つの実施態様において、該長さは50ないし180AAである。もう1つの実施態様において、該長さは50ないし190AAである。もう1つの実施態様において、該長さは50ないし200AAである。

【0225】

もう1つの実施態様において、該長さは約175AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約200AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約220AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約240AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約260AAである。

【0226】

各長さは、本発明の別の実施態様を表す。

【0227】

もう1つの実施態様において、KLK3ペプチドはKLK3蛋白質の約1/3ないし1/2よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約1/10ないし1/5よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約1/5ないし1/4よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約1/4ないし1/3よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約1/3ないし1/2よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約1/2ないし3/4よりなる。もう1つの実施態様において、断片はKLK3蛋白質に対して約3/4よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約5ないし1

[illegible]

片はその約30ないし70%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約40ないし80%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約50ないし90%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約60ないし100%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約5ないし55%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約10ないし60%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約20ないし70%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約30ないし80%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約40ないし90%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約50ないし100%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約5ないし65%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約10ないし70%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約20ないし80%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約30ないし90%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約40ないし100%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約5ないし75%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約10ないし80%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約20ないし90%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約30ないし100%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約10ないし90%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約20ないし100%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約10ないし100%よりなる。

【0228】

もう1つの実施態様において、断片はKLK3蛋白質の約5%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約6%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約8%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約10%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約12%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約15%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約18%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約20%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約25%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約30%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約35%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約40%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約45%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約50%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約55%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約60%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約65%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約70%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約75%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約80%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約85%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約90%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約95%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約100%よりなる。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0229】

もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物のKLK3ペプチド、PSCAペプチド、またはFOLH1ペプチドは免疫原性ペプチドである。「免疫原性」とは、もう1つの実施態様において、対象に投与した場合に免疫応答を誘導する能力をいう。もう1つの実施態様において、対象はヒト対象である。もう1つの実施態様において、誘導される免疫応答はT細胞応答である。もう1つの実施態様において、誘導される免疫応答は細胞傷害性Tリンパ球（CTL）応答である。もう1つの実施態様において、誘導される免疫応答は検出可能である。もう1つの実施態様において、誘導される免疫応答はイン・ビトロアッセイによって検出できる。もう1つの実施態様において、該アッセイはサイトカイン放出アッセイ（例えば、蛍光活性化細胞ソーティング；またはFACS）である。もう1つの実施態様において、該アッセイはクロム放出アッセイ、または他のイン・ビトロ細胞傷害性アッセイである。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0230】

もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物のKLK3ペプチドに含有される、配列番号：25、27、29ないし32、34および36ないし39に記載された配列から選択される配列の免疫原性断片は約10ないし150AA長である。もう1つの実施態様において、該長さは15ないし150AAである。もう1つの実施態様において、該長さは20ないし150AAである。もう1つの実施態様において、該長さは30ないし150AAである。もう1つの実施態様において、該長さは40ないし150AAである。もう1つの実施態様において、該長さは50ないし150AAである。もう1つの実施態様において、該長さは60ないし150AAである。もう1つの実施態様において、該長さは70ないし150AAである。もう1つの実施態様において、該長さは80ないし150AAである。もう1つの実施態様において、該長さは90ないし150AAである。もう1つの実施態様において、該長さは100ないし150AAである。もう1つの実施態様において、該長さは10ないし100AAである。もう1つの実施態様において、該長さは15ないし100AAである。もう1つの実施態様において、該長さは20ないし100AAである。もう1つの実施態様において、該長さは30ないし100AAである。もう1つの実施態様において、該長さは40ないし100AAである。もう1つの実施態様において、該長さは50ないし100AAである。もう1つの実施態様において、該長さは60ないし100AAである。もう1つの実施態様において、該長さは70ないし100AAである。もう1つの実施態様において、該長さは10ないし80AAである。もう1つの実施態様において、該長さは15ないし80AAである。もう1つの実施態様において、該長さは20ないし80AAである。もう1つの実施態様において、該長さは30ないし80AAである。もう1つの実施態様において、該長さは40ないし80AAである。もう1つの実施態様において、該長さは50ないし80AAである。もう1つの実施態様において、該長さは60ないし80AAである。もう1つの実施態様において、該長さは70ないし80AAである。もう1つの実施態様において、該長さは10ないし60AAである。もう1つの実施態様において、該長さは15ないし60AAである。もう1つの実施態様において、該長さは20ないし60AAである。もう1つの実施態様において、該長さは30ないし60AAである。もう1つの実施態様において、該長さは40ないし60AAである。もう1つの実施態様において、該長さは50ないし60AAである。もう1つの実施態様において、該長さは10ないし50AAである。もう1つの実施態様において、該長さは15ないし50AAである。もう1つの実施態様において、該長さは20ないし50AAである。もう1つの実施態様において、該長さは30ないし50AAである。もう1つの実施態様において、該長さは40ないし50AAである。もう1つの実施態様において、該長さは10ないし40AAである。もう1つの実施態様において、該長さは15ないし40AAである。もう1つの実施態様において、該長さは20ないし40AAである。もう1つの実施態様において、該長さは30ないし40AAである。もう1つの実施態様において、該長さは10ないし30AAである。もう1つの実施態様において、該長さは15ないし30AAである。もう1つの実施態様において、該長さは20ないし30AAである。もう1つの実施態様において、該長さは5ないし20AAである。もう1つの実施態様において、該長さは10ないし20AAである。もう1つの実施態様において、該長さは15ないし20AAである。

【0231】

もう1つの実施態様において、免疫原性断片の長さは約10AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約15AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約20AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約30AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約40AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約50AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約60AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約70AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約80AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約90AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約100AAである。

【0232】

10

20

30

40

50

【 0 2 3 3 】

50

態様において、該長さは50ないし450AAである。もう1つの実施態様において、該長さは50ないし500AAである。

【0234】

もう1つの実施態様において、該長さは約175AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約200AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約220AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約240AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約260AAである。

【0235】

各長さは本発明の別の実施態様を表す。

【0236】

もう1つの実施態様において、PSCAまたはFOLH1ペプチドは、各々、PSCAまたはFOLH1蛋白質の約1/3ないし1/2よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約1/10ないし1/5よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約1/5ないし1/4よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約1/4ないし1/3よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約1/3ないし1/2よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約1/2ないし3/4よりなる。もう1つの実施態様において、断片は、PSCAまたはFOLH1蛋白質に対して約3/4よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約5ないし10%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約10ないし15%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約15ないし20%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約20ないし25%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約25ないし30%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約30ないし35%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約35ないし40%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約45ないし50%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約50ないし55%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約55ないし60%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約5ないし15%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約10ないし20%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約15ないし25%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約20ないし30%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約25ないし35%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約30ないし40%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約35ないし45%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約45ないし55%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約50ないし60%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約55ないし65%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約60ないし70%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約65ないし75%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約70ないし80%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約5ないし20%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約10ないし25%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約15ないし30%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約20ないし35%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約25ないし40%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約30ないし45%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約35ないし50%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約45ないし60%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約50ないし65%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約55ないし70%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約60ないし75%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約65ないし80%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約70ないし85%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約75ないし90%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約80ないし95%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約85ないし100%よりなる。もう1つの実施態様において、断片はその約5ないし25%よりなる

10

20

30

40

50

30

40

50

【 0 2 3 8 】

50

80 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは70ないし80 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは10ないし60 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは15ないし60 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは20ないし60 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは30ないし60 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは40ないし60 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは50ないし60 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは10ないし50 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは15ないし50 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは20ないし50 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは30ないし50 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは40ないし50 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは10ないし40 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは15ないし40 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは20ないし40 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは30ないし40 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは10ないし30 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは15ないし30 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは20ないし30 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは5ないし20 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは10ないし20 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは15ないし20 AAである。

10

【0239】

もう1つの実施態様において、免疫原性断片の長さは約10 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約15 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約20 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約30 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約40 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約50 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約60 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約70 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約80 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約90 AAである。もう1つの実施態様において、該長さは約100 AAである。

20

【0240】

免疫原性断片の各長さは本発明の別の実施態様を表わす。

【0241】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えリステリア株を含むワクチン、免疫原性組成物、またはベクターを投与し、それにより、KLK3発現腫瘍のサイズを低下させることを含む、KLK3発現腫瘍のサイズを低下させる方法を提供する。もう1つの実施態様において、腫瘍の細胞はKLK3を発現する。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

30

【0242】

もう1つの実施態様において、本発明は：(a) KLK3ペプチドに融合した蛋白質のN末端断片を含む組換えリステリア株；または(b) 組換えポリペプチドをコードする組換えヌクレオチドのいずれかを含む有効量のワクチンを投与することを含む、KLK3発現腫瘍の形成を抑制する方法を提供し、それにより、対象はKLK3発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、KLK3発現腫瘍の形成を抑制する。

40

【0243】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えポリペプチドを含むワクチン、免疫原性組成物、または、ベクターを投与し、それにより、KLK3発現腫瘍のサイズを低下させることを含む、KLK3発現腫瘍のサイズを低下させる方法を提供する。もう1つの実施態様において、該腫瘍の細胞はKLK3を発現する。各可能性は、本発明の別の実施態様を表わす。

【0244】

もう1つの実施態様において、本発明は：(a) KLK3ペプチドに融合した蛋白質のN末端断片を含む組換えポリペプチド；または(b) 該組換えポリペプチドをコードする

50

組換えヌクレオチドのいずれかを含む有効量のワクチンを投与することを含む、K L K 3 発現腫瘍の形成を抑制する方法を提供し、それにより、対象はK L K 3 発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、K L K 3 発現腫瘍の形成を抑制する。

【0245】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組換えヌクレオチド分子を含むワクチン、免疫原性組成物、またはベクターを投与し、それにより、K L K 3 発現腫瘍のサイズを低下させることを含む、K L K 3 発現腫瘍のサイズを低下させる方法を提供する。もう1つの実施態様において、該腫瘍の細胞はK L K 3 を発現する。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0246】

もう1つの実施態様において、本発明は：(a) K L K 3 ペプチドに融合した蛋白質のN末端断片を含む組換えヌクレオチド分子；または(b) 該組換えポリペプチドをコードする組換えヌクレオチドのいずれかを含む有効量のワクチンを投与することを含む、K L K 3 発現腫瘍の形成を抑制する方法を提供し、それにより、対象はK L K 3 発現腫瘍に対する免疫応答を高め、それにより、K L K 3 発現腫瘍の形成を抑制する。

【0247】

本発明の方法および組成物の非K L K 3 / 非F O L H 1 / 非P S C A ペプチドは、もう1つの実施態様において、リステリオリシン(L L O) ペプチドである。もう1つの実施態様において、非K L K 3 / 非F O L H 1 / 非P S C A ペプチドはA c t A ペプチドである。もう1つの実施態様において、非K L K 3 / 非F O L H 1 / 非P S C A ペプチドはP E S T 様配列ペプチドである。もう1つの実施態様において、非K L K 3 / 非F O L H 1 / 非P S C A ペプチドは、K L K 3、F O L H 1、またはP S C A ペプチドの免疫原性を高めることができるいずれかの他のペプチドである。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0248】

もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物の組換え融合ペプチドはL L O - K L K 3 融合ペプチドである。もう1つの実施態様において、融合ペプチドは配列番号：54に記載された配列を有する。もう1つの実施態様において、融合ペプチドは配列番号：54に記載された配列に相同である。もう1つの実施態様において、融合ペプチドは配列番号：54に記載された配列の変種である。もう1つの実施態様において、「相同性」とは、配列番号：54の1つに対する72%よりも大きい同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は75%よりも大きい。もう1つの実施態様において、「相同性」とは、配列に対する78%よりも大きい同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は80%よりも大きい。もう1つの実施態様において、相同性は82%よりも大きい。もう1つの実施態様において、「相同性」とは配列に対する83%よりも大きい同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は85%よりも大きい。もう1つの実施態様において、相同性は87%よりも大きい。もう1つの実施態様において、「相同性」とは配列に対する88%よりも大きい同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は90%よりも大きい。もう1つの実施態様において、相同性は92%よりも大きい。もう1つの実施態様において、「相同性」とは配列に対する93%よりも大きい同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は95%よりも大きい。もう1つの実施態様において、「相同性」とは配列に対する96%よりも大きい同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は97%よりも大きい。もう1つの実施態様において、相同性は98%よりも大きい。もう1つの実施態様において、相同性は99%よりも大きい。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0249】

本発明のワクチンを構築するのに利用されるL L O 蛋白質の配列は、もう1つの実施態様において、以下のとおりである：

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

DAVTNVPPRKG YKDGNEY I VVEKKKKKS INQNNADI QVVNA
ISSLTYPGALVKANSELVENQPDVLPVKRDSL T L S I D L P G
MTNQDNK I VVKNA TKSNVNN AVNTL VERWNEKYAQA YPNV
SAKIDYDDE MAYSES Q L I A K F G T A F K A V N N S L N V N F G A I S
EGKMQEEV I S F K Q I Y Y N V N V N E P T R P S R F F G K A V T K E Q L Q
ALGVNAENPPAY I S S V A Y G R Q V Y L K L S T N S H S T K V K A A F D
AAVSGKSVSGDVELTNI I K N S S F K A V I Y G G S A K D E V Q I I D
GNLGD L R D I L K K G A T F N R E T P G V P I A Y T T N F L K D N E L A V I
KNNSEY I E T T S K A Y T D G K I N I D H S G G Y V A Q F N I S W D E V N Y
D P E G N E I V Q H K N W S E N N K S K L A H F T S S I Y L P G N A R N I N V Y
A K E C T G L A W E W W R T V I D D R N L P L V K N R N I S I W G T T L Y P K Y
SNKVDNPIE (GenBank アクセス番号 P13128 ; 配列番号 : 17 ; 核酸
配列は GenBank アクセス番号 X15127 に記載されている)。この配列に対応す
るプロ蛋白質の最初の 25 のアミノ酸はシグナル配列であって、それが細菌によって分泌
されると、LLO から切断される。かくして、この実施態様において、全長活性 LLO 蛋
白質は 504 残基長である。もう 1 つの実施態様において、LLO 蛋白質は配列番号 : 1
7 のホモログである。もう 1 つの実施態様において、LLO 蛋白質は配列番号 : 17 の変
種である。もう 1 つの実施態様において、LLO 蛋白質は配列番号 : 17 のイソ形態であ
る。もう 1 つの実施態様において、LLO 蛋白質は配列番号 : 17 の断片である。各可能
性は本発明の別の実施態様を表わす。

10

20

【0250】

もう 1 つの実施態様において、「LLO ペプチド」および「LLO 断片」とは、LLO
蛋白質の N 末端断片をいう。もう 1 つの実施態様において、該用語は全長であるが、非溶
血性 LLO 蛋白質をいう。もう 1 つの実施態様において、該用語は配列番号 : 17 のシス
テイン 484、あるいは相同な LLO 蛋白質におけるその対応する残基において点突然変
異を含有する非溶血性蛋白質をいう。各可能性は本発明の別の実施態様を表す。

【0251】

もう 1 つの実施態様において、本発明の組成物および方法で利用される LLO 蛋白質の
N 末端断片は配列 :

MKKIMLVF I T L I L V S L P I A Q Q T E A K D A S A F N K E N S I S S V A
P P A S P P A S P K T P I E K K H A D E I D K Y I Q G L D Y N K N N V L V Y H G
DAVTNVPPRKG YKDGNEY I VVEKKKKKS INQNNADI QVVNA
ISSLTYPGALVKANSELVENQPDVLPVKRDSL T L S I D L P G
MTNQDNK I VVKNA TKSNVNN AVNTL VERWNEKYAQA YSNV
SAKIDYDDE MAYSES Q L I A K F G T A F K A V N N S L N V N F G A I S
EGKMQEEV I S F K Q I Y Y N V N V N E P T R P S R F F G K A V T K E Q L Q
ALGVNAENPPAY I S S V A Y G R Q V Y L K L S T N S H S T K V K A A F D
AAVSGKSVSGDVELTNI I K N S S F K A V I Y G G S A K D E V Q I I D
GNLGD L R D I L K K G A T F N R E T P G V P I A Y T T N F L K D N E L A V I
KNNSEY I E T T S K A Y T D G K I N I D H S G G Y V A Q F N I S W D E V N Y
D (配列番号 : 18) を有する。もう 1 つの実施態様において、LLO 断片は配列番号 :
18 のホモログである。もう 1 つの実施態様において、LLO 断片は配列番号 : 18 の変
種である。もう 1 つの実施態様において、LLO 断片は配列番号 : 18 のイソ形態である
。もう 1 つの実施態様において、LLO 断片は配列番号 : 18 の断片である。各可能性は
本発明の別の実施態様を表す。

30

40

【0252】

もう 1 つの実施態様において、LLO 断片は配列 :

MKKIMLVF I T L I L V S L P I A Q Q T E A K D A S A F N K E N S I S S V A
P P A S P P A S P K T P I E K K H A D E I D K Y I Q G L D Y N K N N V L V Y H G
DAVTNVPPRKG YKDGNEY I VVEKKKKKS INQNNADI QVVNA

50

I S S L T Y P G A L V K A N S E L V E N Q P D V L P V K R D S L T L S I D L P G
M T N Q D N K I V V K N A T K S N V N N A V N T L V E R W N E K Y A Q A Y S N V
S A K I D Y D D E M A Y S E S Q L I A K F G T A F K A V N N S L N V N F G A I S
E G K M Q E E V I S F K Q I Y Y N V N V N E P T R P S R F F G K A V T K E Q L Q
A L G V N A E N P P A Y I S S V A Y G R Q V Y L K L S T N S H S T K V K A A F D
A A V S G K S V S G D V E L T N I I K N S S F K A V I Y G G S A K D E V Q I I D
G N L G D L R D I L K K G A T F N R E T P G V P I A Y T T N F L K D N E L A V I
K N N S E Y I E T T S K A Y T D (配列番号：19)を有する。もう1つの実施態様
において、L L O断片は配列番号：19のホモログである。もう1つの実施態様において、
L L O断片は配列番号：19の変種である。もう1つの実施態様において、L L O断片は
配列番号：19のイソ形態である。もう1つの実施態様において、L L O断片は配列番号
：19の断片である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

10

【0253】

もう1つの実施態様において、L L O断片は当該分野で公知のいずれかの他のL L O断片である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0254】

「A c t Aペプチド」とは、もう1つの実施態様において、全長A c t A蛋白質をいう。もう1つの実施態様において、該用語はA c t A断片をいう。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0255】

本発明の方法および組成物のA c t A断片は、もう1つの実施態様において、N末端A c t A断片である。もう1つの実施態様において、断片は当該分野で公知のA c t A断片のいずれかの他のタイプである。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

20

【0256】

1つの実施態様において、本明細書中で提供される方法および組成物の抗原は、A c t A蛋白質に融合しており、これは、1つの実施態様において、A c t A蛋白質のN末端断片であり、これは、1つの実施態様においては、A c t Aの最初の390AA、もう1つの実施態様においては、A c t Aの最初の418AA、もう1つの実施態様においてはA c t Aの最初の50AA、もう1つの実施態様においてはA c t Aの最初の100AAを含み、またはそれよりなり、これは、1つの実施態様においては、配列番号：1に供されたもののようなP E S T様配列を含む。もう1つの実施態様において、本明細書中で提供される方法および組成物において利用されるA c t A蛋白質のN末端断片はA c t Aの最初の150AA、もう1つの実施態様において、A c t Aの最初のほぼ200AAを含み、またはそれよりなり、これは、1つの実施態様において、本明細書中に記載された2つのP E S T様配列を含む。もう1つの実施態様において、本明細書中で提供される方法および組成物で利用されるA c t A蛋白質のN末端断片はA c t Aの最初の250AA、もう1つの実施態様において、A c t Aの最初の300AAを含み、またはそれよりなる。もう1つの実施態様において、A c t A断片は前記AAの範囲の1つに対応する相同なA c t A蛋白質の残基を含有する。該残基の数は、もう1つの実施態様において、先に挙げた残基の数と正確に対応する必要はなく；例えば、もし相同なA c t A蛋白質が本明細書中で利用されるA c t A蛋白質に対して挿入または欠失を有するならば、当該分野でよく知られているN C B I B L A S Tのような配列整列ツールを用いて当業者にルーチ的なように、残基の数はそれに従って調整することができる。

30

40

【0257】

もう1つの実施態様において、A c t A蛋白質のN末端部分は、本明細書中に記載された方法およびアルゴリズムを用い、または当該分野で知られた代替法を用いることによって、決定できるように、1つの実施態様においては、本明細書中に記載された通りである、または他のP E S T様配列である、少なくとも1、2、3、または4のP E S T様配列を含む。

【0258】

50

もう1つの実施態様において、A c t A蛋白質のN末端断片は配列：

MRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSLNTDEWEE E
KTEEQPSEVNTGPRYETAREVSSRDIKELEKSNKVRNTNK
ADLIAMLKKEKAEKGPNINNNNSEQTENAAINEEASGADRP
AIQVERRHPGLPSDSA AEIKKRRKAIASSDSELESLTYPD
KPTKVNKKKVAKE SVADASESDLDSSMQSADESSPQPLKA
NQQPFFPKVFKKIKDAGKWVRDKIDENPEVKKAI VDKSAG
LIDQLLTKKKSEE VNASDFPPPTDEELRLALPETPMLLG
FNAPATSEPS SFEFPPTDEELRLALPETPMLLGFNAPA
TSEPS SFEFPPTDELEI IRETASSLDSSSFTTRGDLASL

10

RNA INRH S QNF SDF PPI PTEEE L NGR GGR P（配列番号：15）を有する。もう1つの実施態様において、A c t A断片は配列番号：15を含む。もう1つの実施態様において、A c t A断片は当該分野で公知のいずれかの他のA c t A断片である。もう1つの実施態様において、A c t A蛋白質は配列番号：15のホモログである。もう1つの実施態様において、A c t A蛋白質は配列番号：15の変種である。もう1つの実施態様において、A c t A蛋白質は配列番号：15のイソ形態である。もう1つの実施態様において、A c t A蛋白質は配列番号：15の断片である。もう1つの実施態様において、A c t A蛋白質は配列番号：15のホモログの断片である。もう1つの実施態様において、A c t A蛋白質は配列番号：15のホモログの断片である。もう1つの実施態様において、A c t A蛋白質は配列番号：15の変種の断片である。もう1つの実施態様において、A c t A蛋白質は配列番号：15のイソ形態の断片である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

20

【0259】

もう1つの実施態様において、A c t A蛋白質のN末端断片は配列：

MRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSLNTDEWEE E
KTEEQPSEVNTGPRYETAREVSSRDIKELEKSNKVRNTNK
ADLIAMLKKEKAEKGPNINNN（配列番号：14）を有する。もう1つの実施態様において、A c t A断片は配列番号：14のホモログである。もう1つの実施態様において、A c t A断片は配列番号：14の変種である。もう1つの実施態様において、A c t A断片は配列番号：14のイソ形態である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

30

【0260】

もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物のA c t A断片はP E S T様配列を含む。もう1つの実施態様において、A c t A断片に含有されるP E S T様配列は、配列番号：2ないし5から選択される。もう1つの実施態様において、A c t A断片は配列番号：2ないし5に記載されたP E S T様配列の少なくとも2つを含む。もう1つの実施態様において、A c t A断片は配列番号：2ないし5に記載されたP E S T様配列の少なくとも3つを含む。もう1つの実施態様において、A c t A断片は配列番号：2ないし5に記載された4つのP E S T様配列を含む。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

40

【0261】

もう1つの実施態様において、N末端A c t A断片は、配列番号：16の配列を有するヌクレオチド分子によってコードされる。：

atgcgtgcgatgatgggtgttttcat t actgccaat t gca
ttacgat t aaccccgacataatatt t gcagcgacagatag
cgaagattctag t ctaaacacagatgaatgggaagaagaa
aaaacagaagagcaaccaaagcgagg t aaatacgggaccaa
gatacga a actgcacgtgaag t aag t t c acgtgatattaa
agaactag aaaaatcgaataaag t g a g a a a t a c g a a c a a a
gcagacc t aatagcaatgt t g a a a g a a a a a g c a g a a a a a g

50

g t c c a a a t a t c a a t a a t a a c a a c a g t g a a c a a a c t g a g a a
t g c g g c t a t a a a t g a a g a g g c t t c a g g a g c c g a c c g a c c a
g c t a t a c a a g t g g a g c g t c g t c a t c c a g g a t t g c c a t c g g
a t a g c g c a g c g g a a a t t a a a a a a a g a a g g a a a g c c a t a g c
a t c a t c g g a t a g t g a g c t t g a a a g c c t t a c t t a t c c g g a t
a a a c c a a c a a a a g t a a a t a a g a a a a a a g t g g c g a a a g a g t
c a g t t g c g g a t g c t t c t g a a a g t g a c t t a g a t t c t a g c a t
g c a g t c a g c a g a t g a g t c t t c a c c a c a a c c t t t a a a a g c a
a a c c a a a c a a c c a t t t t t c c c t a a a g t a t t t a a a a a a a t a a
a a g a t g c g g g g a a a t g g g t a c g t g a t a a a a t c g a c g a a a a
t c c t g a a g t a a a g a a a g c g a t t g t t g a t a a a a g t g c a g g g
t t a a t t g a c c a a t t a t t a a c c a a a a a g a a a a g t g a a g a g g
t a a a t g c t t c g g a c t t c c c g c c a c c a c c t a c g g a t g a a g a
g t t a a g a c t t g c t t t g c c a g a g a c a c c a a t g c t t c t t g g t
t t t a a t g c t c c t g c t a c a t c a g a a c c g a g c t c a t t c g a a t
t t c c a c c a c c a c c t a c g g a t g a a g a g t t a a g a c t t g c t t t
g c c a g a g a c g c c a a t g c t t c t t g g t t t t a a t g c t c c t g c t
a c a t c g g a a c c g a g c t c g t t c g a a t t t c c a c c g c c t c c a a
c a g a a g a t g a a c t a g a a a t c a t c c g g g a a a c a g c a t c c t c
g c t a g a t t c t a g t t t t a c a a g a g g g g a t t t a g c t a g t t t g
a g a a a t g c t a t t a a t c g c c a t a g t c a a a a t t t c t c t g a t t
t c c c a c c a a t c c c a a c a g a a g a a g a g t t g a a c g g g a g a g g
c g g t a g a c c a (配列番号：16)、これは、1つの実施態様においては、リステ
リア・モノサイトゲネスにおけるA c t Aをコードする最初の1170ヌクレオチドであ
る。

10

20

【0262】

もう1つの実施態様において、A c t A断片は配列番号：16を含むヌクレオチド分子
によってコードされる。もう1つの実施態様において、A c t A断片は配列番号：16の
ホモログであるヌクレオチド分子によってコードされる。もう1つの実施態様において、
A c t A断片は配列番号：16の変種であるヌクレオチド分子によってコードされる。も
う1つの実施態様において、A c t A断片は配列番号：16のイソ形態であるヌクレオチ
ド分子によってコードされる。もう1つの実施態様において、A c t A断片は配列番号：
16の断片であるヌクレオチド分子によってコードされる。各可能性は本発明の別の実施
態様を表わす。

30

【0263】

本明細書中で提供される方法および組成物で利用されるA c t A蛋白質のN末端断片は
、もう1つの実施態様において、配列番号：61に記載された配列：

M R A M M V V F I T A N C I T I N P D I I F A A T D S E D S S L N T D E W E E E
K T E E Q P S E V N T G P R Y E T A R E V S S R D I E E L E K S N K V K N T N K
A D L I A M L K A K A E K G P N N N N N G E Q T G N V A I N E E A S G V D R P
T L Q V E R R H P G L S S D S A A E I K K R R K A I A S S D S E L E S L T Y P D
K P T K A N K R K V A K E S V V D A S E S D L D S S M Q S A D E S T P Q P L K A
N Q K P F F P K V F K K I K D A G K W V R D K I D E N P E V K K A I V D K S A G
L I D Q L L T K K K S E E V N A S D F P P P P T D E E L R L A L P E T P M L L G
F N A P T P S E P S S F E F P P P P T D E E L R L A L P E T P M L L G F N A P A
T S E P S S F E F P P P P T E D E L E I M R E T A P S L D S S F T S G D L A S L
R S A I N R H S E N F S D F P L I P T E E E L N G R G G R P (配列番号：61)を
有し、これは、1つの実施態様においては、リステリア・モノサイトゲネス株10403
SからのA c t Aについての最初の390AAである、である。もう1つの実施態様にお
いて、A c t A断片は配列番号：61に記載された配列を含む。もう1つの実施態様にお

40

50

いて、A c t A断片は当該分野で公知のいずれかの他のA c t A断片である。もう1つの実施態様において、A c t A蛋白質は配列番号：61のホモログである。もう1つの実施態様において、A c t A蛋白質は配列番号：61の変種である。もう1つの実施態様において、A c t A蛋白質は配列番号：61のイソ形態である。もう1つの実施態様において、A c t A蛋白質は配列番号：61の断片である。もう1つの実施態様において、A c t A蛋白質は配列番号：61のホモログの断片である。もう1つの実施態様において、A c t A蛋白質は配列番号：61の変種の断片である。もう1つの実施態様において、A c t A蛋白質は配列番号：61のイソ形態の断片である。各可能性は本明細書中で提供される方法および組成物の別の実施態様を表わす。

【0264】

10

もう1つの実施態様において、A c t A蛋白質の断片をコードする組換えヌクレオチドは、配列番号：62に記載された配列：

```
atg cgt g c g a t g a t g g t a g t t t t c a t t a c t g c c a a c t g c a  
t t a c g a t t a a c c c c g a c a t a a t a t t t g c a g c g a c a g a t a g  
c g a a g a t t c c a g t c t a a a c a c a g a t g a a t g g g a a g a a g a a  
a a a a c a g a a g a g c a g c c a a g c g a g g t a a a t a c g g g a c c a a  
g a t a c g a a a c t g c a c g t g a a g t a a g t t c a c g t g a t a t t g a  
g g a a c t a g a a a a a t c g a a t a a a g t g a a a a a t a c g a a c a a a  
g c a g a c c t a a t a g c a a t g t t g a a a g c a a a a g c a g a g a a a g  
g t c c g a a t a a c a a t a a t a a c a a c g g t g a g c a a a c a g g a a a  
t g t g g c t a t a a a t g a a g a g g c t t c a g g a g t c g a c c g a c c a  
a c t c t g c a a g t g g a g c g t c g t c a t c c a g g t c t g t c a t c g g  
a t a g c g c a g c g g a a a t t a a a a a a a g a a g a a a a g c c a t a g c  
g t c g t c g g a t a g t g a g c t t g a a a g c c t t a c t t a t c c a g a t  
a a a c c a a c a a a a g c a a a t a a g a g a a a a g t g g c g a a a g a g t  
c a g t t g t g g a t g c t t c t g a a a g t g a c t t a g a t t c t a g c a t  
g c a g t c a g c a g a c g a g t c t a c a c c a c a a c c t t t a a a a g c a  
a a t c a a a a a c c a t t t t t c c c t a a a g t a t t t t a a a a a a a t a a  
a a g a t g c g g g g a a a t g g g t a c g t g a t a a a a t c g a c g a a a a  
t c c t g a a g t a a a g a a a g c g a t t g t t g a t a a a a g t g c a g g g  
t t a a t t g a c c a a t t a t t a a c c a a a a a g a a a a g t g a a g a g g  
t a a a t g c t t c g g a c t t c c c g c c a c c a c c t a c g g a t g a a g a  
g t t a a g a c t t g c t t t g c c a g a g a c a c c g a t g c t t c t c g g t  
t t t a a t g c t c c t a c t c c a t c g g a a c c g a g c t c a t t c g a a t  
t t c c g c c g c c a c c t a c g g a t g a a g a g t t a a g a c t t g c t t t  
g c c a g a g a c g c c a a t g c t t c t t g g t t t t a a t g c t c c t g c t  
a c a t c g g a a c c g a g c t c a t t c g a a t t t c c a c c g c c t c c a a  
c a g a a g a t g a a c t a g a a a t t a t g c g g g a a a c a g c a c c t t c  
g c t a g a t t c t a g t t t t a c a a g c g g g g a t t t a g c t a g t t t g  
a g a a g t g c t a t t a a t c g c c a t a g c g a a a a t t t c t c t g a t t  
t c c c a c t a a t c c c a a c a g a a g a a g a g t t g a a c g g g a g a g g  
c g g t a g a c c a (配列番号：62)を含み、これは、1つの実施態様においては、
```

20

30

40

リステリア・モノサイトゲネス 10403S株においてA c t Aをコードする最初の1170ヌクレオチドである。もう1つの実施態様において、組換えヌクレオチドは配列番号：62に記載された配列を有する。もう1つの実施態様において、組換えヌクレオチドはA c t A蛋白質の断片をコードするいずれかの他の配列を含む。各可能性は本明細書中に提供された方法および組成物の別の実施態様を表わす。

【0265】

もう1つの実施態様において、A c t A断片は当該分野で公知のいずれかの他のA c t A断片である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

50

【0266】

もう1つの実施態様において、A c t A断片は、当該分野で公知のもう1つのA c t A断片であり、1つの実施態様においては、P E S T配列を含むいずれかの断片である、。かくして、1つの実施態様において、A c t A断片はA c t A配列のアミノ酸1ないし100である。1つの実施態様において、A c t A断片はA c t A配列のアミノ酸1ないし200である。1つの実施態様において、A c t A断片はA c t A配列のアミノ酸200ないし300である。1つの実施態様において、A c t A断片はA c t A配列のアミノ酸300ないし400である。1つの実施態様において、A c t A断片はA c t A配列のアミノ酸1ないし300である。もう1つの実施態様において、本明細書中で提供された組換えヌクレオチドは、A c t A蛋白質の断片をコードするいずれかの他の配列を含む。もう1つの実施態様において、組換えヌクレオチドは全A c t A蛋白質をコードするいずれかの他の配列を含む。各可能性は本明細書中に提供された方法および組成物の別の実施態様を表わす。

10

【0267】

1つの実施態様において、本明細書中で提供される組成物および方法で用いるA c t A配列は、リステリア・モノサイトゲネスからのものであり、これは、1つの実施態様においては、E G D株、10403S株（G e n b a n kアクセス番号：D Q 0 5 4 5 8 5）、N I C P B P 54002株（G e n b a n kアクセス番号：E U 3 9 4 9 5 9）、S3株（G e n b a n kアクセス番号：E U 3 9 4 9 6 0）、N C T C 5348株（G e n b a n kアクセス番号：E U 3 9 4 9 6 1）、N I C P B P 54006株（G e n b a n kアクセス番号：E U 3 9 4 9 6 2）、M7株（G e n b a n kアクセス番号：E U 3 9 4 9 6 3）、S19株（G e n b a n kアクセス番号：E U 3 9 4 9 6 4）、または当該分野で公知のリステリア・モノサイトゲネスのいずれかの他の株である。

20

【0268】

もう1つの実施態様において、本発明の組換えヌクレオチドは、A c t A蛋白質の断片をコードするいずれかの他の配列を含む。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0269】

本発明の方法および組成物のもう1つの実施態様において、P E S T様A A配列はK L K 3ペプチド、P S C AペプチドまたはF O L H 1ペプチドに融合している。もう1つの実施態様において、P E S T様A A配列は配列番号：2ないし7および20から選択される配列を有する。もう1つの実施態様において、P E S T様配列は当該分野で公知のいずれかの他のP E S T様配列である。各可能性は、本発明の別の実施態様を表わす。

30

【0270】

もう1つの実施態様において、P E S T様A A配列はK E N S I S S M A P P A S P P A S P K T P I E K K H A D E I D K（配列番号：1）である。もう1つの実施態様において、P E S T様配列はK E N S I S S M A P P A S P P A S P K（配列番号：21）である。もう1つの実施態様において、本明細書中で挙げたP E S T様A A配列のうちの1つを含むいずれかのL L O配列に対するK L K 3ペプチド、P S C AペプチドまたはF O L H 1ペプチドの融合は、K L K 3、P S C AまたはF O L H 1に対する細胞媒介免疫性を増強させるのに有効である。

40

【0271】

また、本発明は、細胞媒介および抗腫瘍免疫性を増強させる方法、およびK L K 3、P S C A、またはF O L H 1の抗原に融合した原核生物に由来したP E S T様アミノ酸配列を含む増強された免疫原性を持つ組成物も提供する。もう1つの実施態様において、1 P E S T様配列は抗原内に包埋される。もう1つの実施態様において、P E S T様配列は抗原のいずれかのアミノ末端に融合される。もう1つの実施態様において、P E S T様配列はカルボキシ末端に融合される。本明細書中に示すように、L MのP E S T様配列への抗原の融合は、抗原の細胞媒介および抗腫瘍免疫性を増強させた。かくして、他の原核生物に由来する他のP E S T様配列への抗原の融合もまた、K L K 3、P S C A、またはF O L H 1の免疫原性を増強させるであろう。他の原核生物のP E S T様配列は、例えば、L

50

MについてのRechsteinerおよびRogers (1996, Trends Biochem.Sci.21:267-271) によって記載されたような方法に従ってルーチン的に同定することができる。もう1つの実施態様において、他の原核生物からのPEST様AA配列はこの方法に基づいて同定される。もう1つの実施態様において、PEST様AA配列はもう1つのリステリア種からのものである。例えば、LM蛋白質ActAは4つのそのような配列を含有する。

【0272】

もう1つの実施態様において、PEST様AA配列はリステリア ActA蛋白質からのPEST様配列である。もう1つの実施態様において、PEST様配列はKTEEQPSEVNTGPR (配列番号: 2)、KASVTDTSEGDLDSSMQSADESTPQPLK (配列番号: 3)、KNEEVNASDFPPPTDEELR (配列番号: 4)、またはRGGIPTSEEFSSLSGDFTTDENSETTEEEIDR (配列番号: 5) である。もう1つの実施態様において、PEST様配列はlso遺伝子によってコードされるリステリア・シーリジェリー・サイトリシンからのものである。もう1つの実施態様において、PEST様配列はRSEVTISP AETPE SP PATP (配列番号: 20) である。もう1つの実施態様において、PEST様配列はStreptococcus sp.のストレプトリシンO蛋白質からのものである。もう1つの実施態様において、PEST様配列はStreptococcus pyogenesストレプトレシンOからのものであり、例えば、AA35ないし51におけるKQNTASTETTTTNEQPK (配列番号: 6) である。もう1つの実施態様において、PEST様配列はStreptococcus equisimilisストレプトリシンOからのものであり、例えば、AA38ないし54におけるKQNTANTETTTTNEQPK (配列番号: 7) である。もう1つの実施態様において、PEST様配列は配列番号: 1ないし7および20ないし21から選択された配列を有する。もう1つの実施態様において、PEST様配列は配列番号2ないし7および20から選択される配列を有する。もう1つの実施態様において、PEST様配列は原核生物に由来するもう1つのPEST様AA配列である。

【0273】

他の原核生物のPEST様配列は、もう1つの実施態様において、例えば、LMについてのRechsteinerおよびRogers (1996, Trends Biochem.Sci.21:267-271) によって記載されたような方法に従って同定される。別法として、他の原核生物からのPEST様AA配列もまたこの方法によって同定することができる。PEST様AA配列が予測される他の原核生物は限定されるものではないが、他のリステリア種を含む。もう1つの実施態様において、PEST様配列は抗原性蛋白質内に包埋される。かくして、もう1つの実施態様において、「融合」とは、KLK3ペプチドおよび当該KLK3ペプチドの1つの端部において連結されたPEST様アミノ酸配列を含む抗原性蛋白質をいう。もう1つの実施態様において、該用語とは、PSCAペプチドおよび当該PSCAペプチドの1つの端部において連結されたPEST様アミノ酸配列を含む抗原性蛋白質をいう。もう1つの実施態様において、該用語とは、FOLH1ペプチドおよび当該FOLH1ペプチドの1つの端部において連結されたPEST様アミノ酸配列を含む抗原性蛋白質をいう。もう1つの実施態様において、該用語とは、KLK3ペプチド内に包埋されたPEST様アミノ酸配列を含む抗原性蛋白質をいう。もう1つの実施態様において、該用語はPSCAペプチド内に包埋されたPEST様アミノ酸配列を含む抗原性蛋白質をいう。もう1つの実施態様において、該用語とは、FOLH1ペプチド内に包埋されたPEST様アミノ酸配列を含む抗原性蛋白質をいう。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0274】

もう1つの実施態様において、PEST様配列はPEST発見プログラムを用いて同定される。もう1つの実施態様において、PEST様配列は高い局所的濃度のプロリン (P)、アスパルテート (D)、グルタメート (E)、セリン (S)、および／またはスレオニン (T) 残基を持つ長さが少なくとも12AAの親水性ストレッチと定義される。もう1つの実施態様において、PEST様配列は正に荷電していないAA、すなわち、アルギニン (R)、ヒスチジン (H)、およびリシン (K) を含有する。

【0275】

もう1つの実施態様において、PESTモチーフの同定は特定の蛋白質配列内の正に荷電したAA R、H、およびKについての最初のスキャンによって達成される。正に荷電したフラнкの間の全てのAAをカウントし、ウィンドウサイズのパラメータと同等な、またはそれよりも多い多数のAAを含有するモチーフのみをさらに考慮する。もう1つの実施態様において、PEST様配列は少なくとも1つのP、1つのDまたはE、および少なくとも1つのSまたはTを含有しなければならない。

【0276】

もう1つの実施態様において、PESTモチーフの質は、臨界的AAの局所的濃縮ならびにモチーフの疎水性に基づくパラメータをスコア採りすることによって改善する。D、E、P、SおよびTの濃縮は質量パーセント(w/w)で表され、1等量のDまたはE、1等量のPおよび1等量のSまたはTについて補正する。もう1つの実施態様において、疎水性の計算は、原理的には、J.KyteおよびR.F.Doolittle (Kyte, J and Doolittle, R.F. J.Mol.Biol.157,105(1982))の方法に従う。単純化された計算のためには、以下の線形変換を用い、元来は、アルギニンについての-4.5ないしイソロイシンについての+4.5の範囲であったKyte-Doolittleハイドロパシー指標を正の整数に変換し、これはアルギニンについての0からイソロイシンについての90の値を生じた。

【0277】

ハイドロパシー指標 = 10 * Kyte-Doolittleハイドロパシー指標 + 45

【0278】

もう1つの実施態様において、潜在的なPESTモチーフの疎水性が、各AA種についてのモルパーセントおよび疎水性指標の積にわたる総和として計算される。所望のPESTスコアは、以下の方程式によって表されるように局所的濃縮項および疎水性項の組合せとして得られる。

【0279】

PESTスコア = 0.55 * DEPT - 0.5 * 疎水性指標

【0280】

もう1つの実施態様において、「PEST様配列」、「PEST様配列ペプチド」、または「PEST様配列含有ペプチド」とは前記アルゴリズムを用いて少なくとも+5のスコアを有するペプチドをいう。もう1つの実施態様において、該用語は少なくとも6のスコアを有するペプチドをいう。もう1つの実施態様において、該ペプチドは少なくとも7のスコアを有する。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも8である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも9である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも10である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも11である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも12である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも13である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも14である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも15である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも16である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも17である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも18である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも19である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも20である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも21である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも22である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも22である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも24である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも24である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも25である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも26である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも27である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも28である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも29である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも30である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも32である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも35である

。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも38である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも40である。もう1つの実施態様において、スコアは少なくとも45である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0281】

もう1つの実施態様において、PEST様配列は、当該分野で公知のいずれかの他の方法またはアルゴリズム、例えば、CaSPredictor (Garay-Malpartida HM, Occhiucci JM, Alvares J, Belizario JE. Bioinformatics. 2005 Jun; 21 Suppl 1: i169-76) を用いて同定される。もう1つの実施態様において、以下の方法が用いられる。

【0282】

PEST指標は、AA Ser、Thr、Pro、Glu、Asp、Asn、またはGlnに1の値を帰属させることによって、適切な長さの各ストレッチ（例えば、30ないし35のAAストレッチ）について計算する。PEST残基の各々についての係数値（CV）は1であり、他のAA（非PEST）の各々については0である。

【0283】

PEST様配列を同定するための各方法は本発明の別の実施態様を表わす。

【0284】

もう1つの実施態様において、「PEST様配列ペプチド」または「PEST様配列は含有ペプチド」とは、前記で定義したように、PEST様配列を含有するペプチドをいう。

【0285】

「PEST様配列への融合」とは、もう1つの実施態様において、PEST様配列を含む蛋白質断片への融合をいう。もう1つの実施態様において、該用語は、蛋白質断片がPEST様配列以外の周囲の配列を含む場合を含む。もう1つの実施態様において、蛋白質断片はPEST様配列よりなる。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0286】

本明細書中で提供されるように、PEST様配列抗原融合を発現する組換えリステリア株は抗腫瘍免疫性を誘導し（実施例5）、抗原特異的腫瘍浸潤T細胞を生じさせる（実施例6）。

【0287】

もう1つの実施態様において、「相同性」とは、配列番号：25ないし40から選択される配列において記載されたKLK3配列に対して70%よりも大きな同一性をいう。もう1つの実施態様において、「相同性」とは、72%よりも大きな配列番号：25ないし40の1つに対する同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は75%よりも大である。もう1つの実施態様において、「相同性」とは78%よりも大きな配列に対する同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は80%よりも大である。もう1つの実施態様において、相同性は82%よりも大である。もう1つの実施態様において、「相同性」とは83%よりも大きな配列に対する同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は85%よりも大である。もう1つの実施態様において、相同性は87%よりも大である。もう1つの実施態様において、「相同性」とは88%よりも大きな配列に対する同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は90%よりも大である。もう1つの実施態様において、相同性は92%よりも大である。もう1つの実施態様において、「相同性」とは93%よりも大きな配列に対する同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は95%よりも大である。もう1つの実施態様において、「相同性」とは96%よりも大きな配列に対する同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は97%よりも大である。もう1つの実施態様において、相同性は98%よりも大である。もう1つの実施態様において、相同性は99%よりも大である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0288】

もう1つの実施態様において、「相同性」とは、本明細書中に記載された配列に記載されたPSCA配列に対して70%を超える同一性をいう。もう1つの実施態様において、

10

20

30

40

50

大である。もう1つの実施態様において、相同性は98%よりも大である。もう1つの実施態様において、相同性は99%よりも大である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0291】

もう1つの実施態様において、「相同性」とは、配列番号：14ないし16から選択される配列に記載されたA c t Aに対して70%を超える同一性をいう。もう1つの実施態様において、「相同性」とは72%よりも大きな配列番号：14ないし16の1つに対する同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は75%よりも大である。もう1つの実施態様において、「相同性」とは78%よりも大きな配列に対する同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は80%よりも大である。もう1つの実施態様において、相同性は82%よりも大である。もう1つの実施態様において、「相同性」とは83%よりも大きな配列に対する同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は85%よりも大である。もう1つの実施態様において、相同性は87%よりも大である。もう1つの実施態様において、「相同性」とは88%よりも大きな配列に対する同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は90%よりも大である。もう1つの実施態様において、相同性は92%よりも大である。もう1つの実施態様において、「相同性」とは93%よりも大きな配列に対する同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は95%よりも大である。もう1つの実施態様において、「相同性」とは96%よりも大きな配列に対する同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は97%よりも大である。もう1つの実施態様において、相同性は98%よりも大である。もう1つの実施態様において、相同性は99%よりも大である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

10

20

【0292】

もう1つの実施態様において、「相同性」とは、配列番号：1ないし7および20ないし21から選択される配列に記載されたP E S T様配列に対して70%を超える同一性をいう。もう1つの実施態様において、「相同性」とは72%よりも大きな配列番号：1ないし7および20ないし21の1つに対する同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は75%よりも大である。もう1つの実施態様において、「相同性」とは78%よりも大きな配列に対する同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は80%よりも大である。もう1つの実施態様において、相同性は82%よりも大である。もう1つの実施態様において、「相同性」とは83%よりも大きな配列に対する同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は85%よりも大である。もう1つの実施態様において、相同性は87%よりも大である。もう1つの実施態様において、「相同性」とは88%よりも大きな配列に対する同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は90%よりも大である。もう1つの実施態様において、相同性は92%よりも大である。もう1つの実施態様において、「相同性」とは93%よりも大きな配列に対する同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は95%よりも大である。もう1つの実施態様において、「相同性」とは96%よりも大きな配列に対する同一性をいう。もう1つの実施態様において、相同性は97%よりも大である。もう1つの実施態様において、相同性は98%よりも大である。もう1つの実施態様において、相同性は99%よりも大である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

30

40

【0293】

関連する蛋白質における対応する配列を同定する方法は当該分野でよく知られており、例えば、A A配列整列を含む。各方法は本発明の別の実施態様を表わす。

【0294】

本発明のもう1つの実施態様において、「核酸」または「ヌクレオチド」とは、少なくとも2つの塩基-糖-リン酸の組合せのストリングをいう。該用語は、1つの実施態様において、DNAおよびRNAを含む。「ヌクレオチド」とは、1つの実施態様において、核酸ポリマーのモノマー単位をいう。RNAは、1つの実施態様において、tRNA（トランスファーRNA）、snRNA（小核RNA）、rRNA（リボソームRNA）、m

50

RNA（メッセンジャーRNA）、アンチセンスRNA、低分子阻害RNA（siRNA）、マイクロRNA（miRNA）およびリボザイムの形態であってよい。siRNAおよびmiRNAの使用は記載されている（Caudy AA et al., Genes&Devel 16:2491-96およびそこに引用された文献）。DNAはプラスミドDNA、ウイルスDNA、線状DNAまたは染色体DNAまたはこれらの群の誘導体の形態であってよい。加えて、DNAおよびRNAのこれらの形態は一本鎖、二本鎖、三本鎖、または四本鎖であってよい。該用語は、もう1つの実施態様において、他のタイプの骨格を含有してもよいが、同一の塩基を含有する人工核酸も含む。1つの実施態様において、人工核酸はPNA（ペプチド核酸）である。PNAはペプチド骨格およびヌクレオチド塩基を含有し、1つの実施態様においては、DNAおよびRNA双方の分子に結合することができる。もう1つの実施態様において、ヌクレオチドはオキセタン修飾されている。もう1つの実施態様において、ヌクレオチドは、1以上のホスホジエステル結合のホスホロチオエート結合での置換によって修飾される。もう1つの実施態様において、人工核酸は当該分野で公知の天然核酸のリン酸骨格のいずれかの他の変種を含有する。ホスホロチオレート核酸およびPNAの使用は当業者に知られており、例えば、Nielsen PE, Curr Opin Struct Biol 9:353-57; および Raz NK et al. Biochem Biophys Res Commun. 297:1075-84に記載されている。核酸の生産および使用は当業者に知られており、例えば、Molecular Cloning, (2001), Sambrook and Russell, eds. and Methods in Enzymology: Methods for molecular cloning in eukaryotic cells (2003) Purchio and G.C. Fareedに記載されている。各核酸誘導体は本発明の別の実施態様を表わす。

10

20

【0295】

本明細書中に列挙されたいずれのアミノ酸配列についての蛋白質および／またはペプチドの相同性も、1つの実施態様においては、イムノプロット分析を含めた当該分野でよく記載された方法によって、あるいは確立された方法を介する、多数の入手可能なソフトウェアパッケージのいずれかを利用するアミノ酸配列のコンピュータアルゴリズム分析を介して決定される。これらのパッケージのいくつかはFASTA、BLAST、MPsrchまたはScanspパッケージを含むことができ、例えば、分析のためのSmith and Watermanアルゴリズム、および／またはグローバル／ローカルまたはBLOCKS整列の使用を使用してもよい。相同性を決定する各方法は本発明の別の実施態様を表わす。

【0296】

もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の方法を実行するのに利用される試薬を含むキットを提供する。もう1つの実施態様において、本発明は、本発明の組成物、ツール、または機器を含むキットを提供する。

30

【0297】

もう1つの実施態様において、ActAまたはLLO断片は化学的共役によってKLK3、PSCA、またはFOLH1ペプチドに付着される。もう1つの実施態様において、パラホルムアルデヒドは共役で用いられる。もう1つの実施態様において、マレイミドは共役のために用いられる。もう1つの実施態様において、共役は当該分野で公知のいずれかの適当な方法を用いて実施される。各可能性は本発明のもう1つの実施態様を表わす。

【0298】

もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物によって標的化されたKLK3発現腫瘍はKLK3発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、KLK3発現腫瘍はKLK3発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、KLK3発現腫瘍はKLK3発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

40

【0299】

もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物によって標的化されたPSCA発現腫瘍はPSCA発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、PSCA発現腫瘍はPSCA発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、PSCA発現腫瘍はPSCA発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0300】

50

もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物によって標的化されたFOLH1発現腫瘍はFOLH1発現前立腺癌である。もう1つの実施態様において、FOLH1発現腫瘍はFOLH1発現前立腺癌腫である。もう1つの実施態様において、FOLH1発現腫瘍はFOLH1発現腺癌である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0301】

もう1つの実施態様において、KLK3、PSCAまたはFOLH1発現腫瘍は乳癌である。もう1つの実施態様において、癌はメラノーマである。もう1つの実施態様において、癌は神経膠腫である。もう1つの実施態様において、癌は卵巣新生物である。もう1つの実施態様において、癌は乳房癌腫である。もう1つの実施態様において、癌は上衣細胞腫である。

10

【0302】

もう1つの実施態様において、癌はメラノーマである。もう1つの実施態様において、癌は肉腫である。もう1つの実施態様において、癌は癌腫である。もう1つの実施態様において、癌はリンパ腫である。もう1つの実施態様において、癌は白血病である。もう1つの実施態様において、癌は中皮腫である。もう1つの実施態様において、癌は神経膠腫である。もう1つの実施態様において、癌は生殖細胞腫瘍である。もう1つの実施態様において、癌は絨毛腫である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0303】

もう1つの実施態様において、癌は膵臓癌である。もう1つの実施態様において、癌は卵巣癌である。もう1つの実施態様において、癌は胃癌である。もう1つの実施態様において、癌は膵臓の癌腫病巣である。もう1つの実施態様において、癌は肺腺癌である。もう1つの実施態様において、癌は結直腸腺癌である。もう1つの実施態様において、癌は肺扁平細胞腺癌である。もう1つの実施態様において、癌は胃腺癌である。もう1つの実施態様において、癌は卵巣表面上皮新生物（例えば、その良性、増殖性または悪性変種）である。もう1つの実施態様において、癌は口腔扁平細胞癌腫である。もう1つの実施態様において、癌は非小細胞肺癌腫である。もう1つの実施態様において、癌は子宮内膜癌腫である。もう1つの実施態様において、癌は膀胱癌である。もう1つの実施態様において、癌は頭頸部癌である。もう1つの実施態様において、癌は前立腺癌腫である。

20

【0304】

もう1つの実施態様において、癌は急性骨髄性白血病（AML）である。もう1つの実施態様において、癌は骨髄異形成症候群（MDS）である。もう1つの実施態様において、癌は非小細胞肺癌（NSCLC）である。もう1つの実施態様において、癌はウィルムス腫瘍である。もう1つの実施態様において、癌は白血病である。もう1つの実施態様において、癌はリンパ腫である。もう1つの実施態様において、癌は繊維形成性小円形細胞腫瘍である。もう1つの実施態様において、癌は中皮腫（例えば、悪性中皮腫）である。もう1つの実施態様において、癌は胃癌である。もう1つの実施態様において、癌は結腸癌である。もう1つの実施態様において、癌は肺癌である。もう1つの実施態様において、癌は生殖細胞腫瘍である。もう1つの実施態様において、癌は卵巣癌である。もう1つの実施態様において、癌は子宮癌である。もう1つの実施態様において、癌は甲状腺癌である。もう1つの実施態様において、癌は肝細胞癌腫である。もう1つの実施態様において、癌は甲状腺癌である。もう1つの実施態様において、癌は肝臓癌である。もう1つの実施態様において、癌は腎臓癌である。もう1つの実施態様において、癌はカポシス（Kaposi）である。もう1つの実施態様において、癌は肉腫である。もう1つの実施態様において、癌はもう1つの癌腫または肉腫である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

30

40

【0305】

もう1つの実施態様において、癌は当該分野で公知のいずれかの他のKLK3、PSCAまたはFOLH1発現癌である。癌の各タイプは本発明の別の実施態様を表わす。

【0306】

本明細書中で提供されるように、増強された細胞媒介免疫性は、PEST様アミノ酸配

50

列、配列番号：1を含有する抗原および切形されたL L Oを含む融合蛋白質について示された。実施例のいくつかで用いたΔ L L Oは、システイン484を含有する活性化ドメインを含むカルボキシ末端からの88残基が切形されたように、（シグナルペプチドの切断後には）416アミノ酸長であった。しかしながら、本開示から、活性化ドメイン、特に、システイン484を含まない他のΔ L L Oは本発明の方法で効果的である。もう1つの実施態様において、いずれかの非溶血性L L O蛋白質またはその断片、A c t A蛋白質またはその断片、またはP E S T様アミノA Aに対するK L K 3、P S C A、またはF O L H 1の融合は、得られるワクチンの細胞媒介および抗腫瘍免疫性を増強させる。

【0307】

本明細書中で提供されるように、リステリオリシンO（L L O）の非溶血性切形形態への抗原の融合は免疫原性を増強させた。ヒトパピローマウイルス（H P V）株16E7およびL L Oの融合産物を発現し、分泌するL Mベクターは、E7蛋白質単独を分泌するL MよりもH P V不滅化腫瘍に対するより効力がある癌免疫治療剤であった。さらに、融合蛋白質L L O－E7についての遺伝子を運ぶ組換えワクシニアウイルスは、E7蛋白質単独についての遺伝子を運ぶワクシニアの同系株よりもH P V不滅化腫瘍に対してより効力がある癌免疫治療剤である。比較において、プロモーター、シグナル配列およびL L Oの最初の7つのA A残基に融合したE7抗原を含む短い融合蛋白質L m－A Z／－E7は不十分な抗腫瘍免疫治療剤であった。この短い融合蛋白質はP E S T様配列の直前で終了し、それを含有しない。

【0308】

「融合蛋白質」とは、もう1つの実施態様において、ペプチド結合または他の化学結合によって一緒に連結された2以上の蛋白質を含む蛋白質をいう。もう1つの実施態様において、蛋白質はペプチドまたは他の化学結合によって直接的に一緒に連結されている。もう1つの実施態様において、蛋白質は2以上の蛋白質の間で1以上のアミノ酸（例えば、「スパーサー」）で一緒に連結されている。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0309】

K L K 3、P S C AまたはF O L H 1ペプチドを含む融合蛋白質は、もう1つの実施態様において、いずれかの適当な実施態様によって調製される。もう1つの実施態様において、融合蛋白質は、適当な配列のクローニングおよび制限、あるいは以下に議論する方法による直接的化学的合成によって調製される。もう1つの実施態様において、サブ配列はクローン化され、適当なサブ配列は適当な制限酵素を用いて切断される。次いで、もう1つの実施態様においては、断片が連結されて、所望のD N A配列を生じる。もう1つの実施態様において、K L K 3、P S C AまたはF O L H 1ペプチドをコードするD N Aは、D N A増幅方法、例えば、ポリメラーゼ鎖反応（P C R）を用いて生成される。まず、新しい末端のいずれか側の天然D N Aのセグメントは別々に増幅される。1つの増幅された配列の5′末端はペプチドリinkerをコードし、他方、他の増幅された配列の3′末端もペプチドリinkerをコードする。第一の断片の5′末端は第二の断片の3′末端に相補的であるので、（例えば、L M Pアガロース上での部分的な精製後の）2つの断片を第三のP C R反応で重複する鋳型として用いることができる。増幅された配列はコドン、（今や、アミノ配列を形成する）開いた部位のカルボキシ側のセグメント、リンカー、および（今や、カルボキシ配列を形成する）開いた部位のアミノ側の配列を含有するであろう。次いで、K L K 3、P S C A、またはF O L H 1ペプチドをコードする遺伝子をプラスミドに連結する。

【0310】

もう1つの実施態様において、当業者によく知られた多数の手段のいずれかによって、K L K 3、P S C AまたはF O L H 1ペプチドは切形されたA c t A蛋白質、切形されたL L O蛋白質またはP E S T様蛋白質に共役される。もう1つの実施態様において、K L K 3、P S C AまたはF O L H 1ペプチドは、直接的にまたはリンカー（スパーサー）を介してのいずれかで、A c t A蛋白質またはL L O蛋白質に共役している。K L K 3、P S C AまたはF O L H 1ペプチドおよびA c t A蛋白質またはL L O蛋白質の双方がポリ

ペプチドであるもう1つの実施態様において、キメラ分子が単一鎖融合蛋白質として組換えにより発現される。

【0311】

K L K 3、P S C AまたはF O L H 1 ペプチドおよび／またはA c t A蛋白質、L L O蛋白質またはP E S T様配列が比較的短い（すなわち、約50 A A未満）であるもう1つの実施態様において、それらは標準的な化学的ペプチド合成技術を用いて合成される。双方の分子が比較的短い場合、もう1つの実施態様において、キメラ分子は単一の連続的ポリペプチドとして合成される。もう1つの実施態様において、K L K 3、P S C AまたはF O L H 1 ペプチドおよびA c t A蛋白質、L L O蛋白質またはP E S T様配列は別々に合成され、次いで、他の分子のカルボキシル末端との1つの分子のアミノ末端の縮合によって融合され、それにより、ペプチド結合を形成する。もう1つの実施態様において、K L K 3、P S C AまたはF O L H 1 ペプチドおよびA c t A蛋白質、L L O蛋白質またはP E S T様配列、各々、ペプチドスパーサー分子の1つの末端と縮合され、それにより、連続的な融合蛋白質を形成する。

【0312】

もう1つの実施態様において、本発明のペプチドおよび蛋白質は、Stewart et al. in Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Edition, 1984, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill. によって記載され；およびBodanszky and Bodanszky (The Practice of Peptide Synthesis, 1984, Springer-Verlag, New York) によって記載された標準的な定評のある固相ペプチド合成（S P P S）によって容易に調製される。開始時に、適当に保護されたアミノ酸残基は、そのカルボキシル基を通じて、架橋されたポリスチレンまたはポリアミド樹脂のような、誘導体化された不溶性ポリマー支持体に付着される。「適切に保護された」とは、アミノ酸のアルファアミノ基上の、およびいずれかの側鎖官能基上の保護基の存在をいう。側鎖保護基は、一般には、合成を通じて用いられる溶媒、試薬および反応条件に対して安定しており、最終のペプチド産物に影響しない条件下で除去することができる。オリゴペプチドの段階的合成は、最初のアミノ酸からのN保護基の除去によって行われ、所望のペプチドの配列における次のアミノ酸のカルボキシル末端のそれへカップリングされる。このアミノ酸はやはり適切に保護されている。生じるアミノ酸のカルボキシルを活性化して、カルボジイミド、対称な酸無水物、またはヒドロキシベンゾトリアゾールもしくはペンタフルオロフェニルエステルのような「活性エステル」基への形成のような、反応性基への形成によって支持体結合アミノ酸のN末端と反応させることができる。

【0313】

固相ペプチド合成方法の例は、アルファアミノ保護基としてt e r t -ブチルオキシカルボニルを利用したB O C方法、およびアミノ酸残基のアルファアミノを保護するために9-フルオレニルメチルオキシカルボニルを利用したF M O C方法を含み、その双方の方法は当業者によく知られている。

【0314】

固相ペプチド合成方法に対して慣用的なプロトコルを用い、Nおよび／またはCブロック基の取込みを達成することもできる。C末端ブロック基の取込みのためには、例えば、固相として、樹脂からの切断の結果、所望のC末端ブロック基を有するペプチドが生じるように化学的に修飾されている支持樹脂を用い、所望のペプチドの合成を典型的に行う。C末端が第一級アミノブロック基を担うペプチドを提供するためには、例えば、ペプチド合成が完了すると、ヨウ化水素酸での処理が所望のC末端アミド化ペプチドを放出するように、p-メチルベンズヒドリルアミン（M B H A）樹脂を用いて合成を行う。同様に、H F処理に際して、N-メチルアミド化C末端を担うペプチドを放出するN-メチルアミノエチル誘導体化D V B樹脂を用い、C末端におけるN-メチルアミノブロック基の取込みを達成する。エステル化によるC末端のブロックは、慣用的な手法を用いて達成することもできる。これは、樹脂からの側鎖ペプチドの放出を行って、所望のアルコールとの引き続いての反応を可能として、エステル機能を形成する樹脂／ブロック基組合せの使用を含む。F M O C保護基は、メトキシアルコキシベンジルアルコールまたは同等なリンカー

で誘導体化したDVB樹脂と組合せて、この目的で用いることができ、支持体からの切断はジクロロメタン中のTFAによって行われる。次いで、所望のアルコールの添加、引き続いての、エステル化されたペプチド産物の脱保護および単離によって、例えば、DCCでの適当に活性化されたカルボキシル機能のエステル化を進行させることができる。

【0315】

合成されたペプチドが、例えば、適当な無水物およびニトリルでの処理によって依然として樹脂に付着している間に、N末端ブロック基の取込みを達成することができる。N末端におけるアセチルブロック基を取り込むためには、例えば、樹脂結合ペプチドをアセトニトリル中の20%酢酸無水物で処理することができる。次いで、Nブロックペプチド産物を樹脂から切断し、脱保護し、引き続いて単離することができる。

10

【0316】

もう1つの実施態様において、化学的または生物学的合成技術いずれかから得られたペプチドが所望のペプチドであることを確実とするためには、ペプチド組成の分析を行う。もう1つの実施態様において、アミノ酸組成分析は、ペプチドの分子量を決定するために高分解能質量分析計を用いて行う。別法としてあるいは加えて、ペプチドのアミノ酸含有量は、水性酸中でペプチドを加水分解し、HPLC、またはアミノ酸アナライザーを用いて混合物の成分を分離し、同定し、定量することによって確認することができる。順次にペプチドを分解し、その順序でアミノ酸を同定する蛋白質シーケンサを用いて、ペプチドの配列を明確に決定してもよい。

【0317】

もう1つの実施態様において、その使用に先立って、ペプチドを精製して、汚染物を除去する。この点に関し、ペプチドは精製されて、適当な規制当局およびガイドラインによって設定された標準を満足すると認識されるであろう。多数の慣用的な精製手法のいずれか1つを用いて、例えば、C₄-、C₈-またはC₁₈-シリカのようなアルキル化シリカカラムを用いる逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を含めた所望のレベルの純度を達成することができる。有機物含有量を増加させる勾配移動相、例えば、通常は少量のトリフルオロ酢酸を含有する水性緩衝液中のアセトニトリルを通常は用いて精製を達成する。イオン交換クロマトグラフィーを用いてその電荷に基づいてペプチドを分離することができる。

20

【0318】

配列のC末端AAを不溶性支持体に付着させ、続いて、配列中に残りのアミノ酸を順次に加える固相合成を、もう1つの実施態様において、本発明のポリペプチドの化学的合成で用いる。固相合成のための技術は、Barany and Merrifield in Solid-Phase Peptide Synthesis; pp.3-284 in The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol.2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A., Merrifield et al. J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2156 (1963), and Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984)によって記載されている。

30

【0319】

もう1つの実施態様において、本発明のペプチドは、活性に影響することなく修飾されるAA残基を取り込むことができる。例えば、末端を誘導体化して、ブロック基、すなわち、「望ましくない分解」からNおよびC末端を保護し、および／または安定化させるのに適した化学的置換基を含めることができ、該用語は化合物の機能に影響するようなその末端における化合物の酵素的、化学的または生化学的分解、すなわち、その末端における化合物の順次の分解のいずれのタイプも含むことを意図する。

40

【0320】

もう1つの実施態様において、ブロック基は、ペプチドのイン・ビボ活性に悪影響しないであろうペプチド化学の分野において慣用的に用いられる保護基を含む。例えば、適当なN末端ブロック基はN末端のアルキル化またはアシル化によって導入することができる。適当なN末端ブロック基の例は、C₁-C₅分岐または非分岐アルキル基、ホルミルおよびアセチル基のようなアシル基、ならびにアセトアミドメチル（AcM）基のようなそ

50

の置換された形態を含む。アミノ酸のデスアミノアナログは有用なN末端ブロック基でもあり、ペプチドのN末端にカップリングできるか、あるいはN末端残基の代わりに用いることができる。C末端のカルボキシル基が組み込まれているか、またはいないのいずれかである適当なC末端ブロック基はエステル、ケトンまたはアミドを含む。エステルまたはケトン形成性アルキル基、特に、メチル、エチルおよびプロピルのような低級アルキル基、および第一級アミン ($-NH_2$) のようなアミド形成性アミノ基、およびメチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、メチルエチルアミノ等のようなモノーおよびジアルキルアミノ基はC末端ブロック基の例である。アグマチンのようなデスカルボキシル化アミノ酸アナログは有用なC末端ブロック基でもあり、ペプチドのC末端残基にカップリングさせることができるか、あるいはその代りに用いることができる。さらに、末端における遊離アミノおよびカルボキシル基はペプチドから一緒に除去して、ペプチド活性に対する影響なくしてそのデスアミドおよびデスカルボキシル化形態を生じさせることができると認識されるであろう。

10

【0321】

もう1つの実施態様において、他の修飾は活性に悪影響することなく取り込まれる。もう1つの実施態様において、そのような修飾は、限定されるものではないが、D異性体形態のアミノ酸での、天然L異性体形態の1以上のアミノ酸の置換を含む。かくして、ペプチドは1以上のD-アミノ酸残基を含んでもよく、あるいは全てがD形態であるアミノ酸を含んでもよい。本発明によるペプチドのレトロインベルソ形態、例えば、全てのアミノ酸がD-アミノ酸で置換された反転ペプチドも考えられる。

20

【0322】

もう1つの実施態様において、本発明の酸付加塩ペプチドはその機能的同等体として利用される。もう1つの実施態様において、ペプチドの水溶性塩を供するために、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等のような無機酸、あるいは酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、シンナミド、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸等のような有機酸で処理された本発明によるペプチドは本発明で用いるのに適している。

【0323】

もう1つの実施態様において、(通常は一次配列を改変しない)修飾はポリペプチドのイン・ビボまたはイン・ビトロ化学的誘導体化、例えば、アセチル化またはカルボキシル化を含む。また、グリコシル化の修飾、例えば、その合成および処理の間の、あるいはさらなる処理工程におけるポリペプチドのグリコシル化パターンを修飾することによって;例えば、グリコシル化に影響する酵素、例えば、哺乳動物グリコシル化または脱グリコシル化酵素にポリペプチドを暴露することによってなされたものも含まれる。また、リン酸化されたアミノ酸残基、例えば、ホスホチロシン、ホスホセリン、またはホスホスレオニンを有する配列も含まれる。

30

【0324】

もう1つの実施態様において、通常分子生物学技術を用いてポリペプチドを修飾して、蛋白質分解に対するその抵抗性を改良し、あるいは溶解特性を最適化し、あるいは治療剤としてそれらをより適当とする。そのようなポリペプチドのアナログは、天然に存在するL-アミノ酸以外の残基、例えば、D-アミノ酸または天然に存在しない合成アミノ酸を含有する物を含む。本発明のペプチドは本明細書中に列挙された具体的な例示のプロセスのいずれかの産物に限定されない。

40

【0325】

もう1つの実施態様において、本発明のキメラ融合蛋白質は組換えDNA技術を用いて合成される。一般に、これは融合蛋白質をコードするDNA配列を生じさせ、該DNAを、特定のプロモーター/調節エレメントの制御下に、本発明のプラスミドのような発現カセット中のDNAを置き、該蛋白質を発現させることを含む。

【0326】

50

本発明の融合蛋白質をコードするDNAは、もう1つの実施態様において、例えば、適当な配列のクローニングおよび制限、あるいはNarang et al. (1979, Meth. Enzymol. 68:90-99) のホストトリエステル方法; Brown et al. (1979, Meth. Enzymol. 68:109-151) のホスホジエステルの方法; Beaucage et al. (1981, Tetra. Lett., 22:1859-1862) のジエチルホスホルアミダイト方法; および米国特許第4, 458, 066号の固体支持体方法のような方法による直接的化学的合成を含めたいずれかの適当な方法によって調製される。

【0327】

化学的合成は一本鎖オリゴヌクレオチドを生じる。これは、もう1つの実施態様においては、相補的配列とのハイブリダイゼーションによって、あるいは鋳型として一本鎖を用いるDNAポリメラーゼでの重合によって二本鎖DNAに変換される。当業者であれば、DNAの化学合成は約100塩基の配列に限定され、他方、より長い配列はより短い配列の連結によって得ることができるのを認識するであろう。

【0328】

もう1つの実施態様において、「単離された核酸」は、本発明の融合蛋白質をコードするRNAまたはDNA配列、およびそれが細胞なしとなった場合、あるいはそれが細胞と会合した場合にはヌクレオチド配列をより安定とするDNAまたはRNAの化学的修飾を含めたそのいずれかの修飾された形態を含む。ヌクレオチドの化学的修飾を用いて、ヌクレオチド配列が細胞によって取り込まれる効率、あるいはそれが細胞において発現される効率を高めることができる。そのような修飾は本明細書中において他の箇所で詳細に記載される。ヌクレオチド配列の修飾のいずれかおよび全ての組合せが本発明で考えられる。

【0329】

もう1つの実施態様において、本発明は非溶血性LLO、切形されたActA蛋白質、またはPEST様配列に操作可能に連結されたKKK3、PSCA、またはFOLH1ペプチドをコードする単離された核酸を提供し、ここで単離された核酸は、該核酸が、好ましくは、核酸によってコードされる蛋白質の発現を指令することができるように、プロモーター／調節配列を含む。かくして、本発明は、例えば、Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)、およびAusubel et al. (1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York) に記載されたもののような細胞における外因性DNAの同時発現での、外因性DNAの細胞への導入のための発現ベクターおよび方法を含む。

【0330】

もう1つの実施態様において、本発明のヌクレオチドはリステリア株においてコードされたペプチドの発現を駆動するプロモーター／調節配列に操作可能に連結されている。遺伝子の構成的発現を駆動するのに有用なプロモーター／調節配列は当該分野でよく知られており、例えば、リステリアのPhlyA、PActA、およびp60プロモーター、Streptococcus bacプロモーター、Streptomyces griseus sgiAプロモーター、およびB. thuringiensis phaZプロモーターを含む。かくして、本発明は、それに操作可能に連結された所望の蛋白質の発現を駆動することができるいずれのプロモーター／調節配列の使用も含むと認識されるであろう。

【0331】

ベクターを用いる非溶血性LLO、切形されたActA、またはPEST様配列に操作可能に連結されたKKK3、PSCA、またはFOLH1ペプチドの発現は、多量の組換えにより生産される蛋白質の単離を可能とする。特定のプロモーター／調節配列を選択し、それらのプロモーター／調節配列を、所望のポリペプチドをコードするDNA配列に操作可能に連結させるのは十分に当業者の技量内のものである。そのような技術は当該分野でよく知られており、例えば、Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)、およびAusubel et al. (1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York) に記載されている。

【0332】

もう1つの実施態様において、本発明は、非溶血性LLO、切形されたActA、またはPEST様配列に操作可能に連結されたKLK3、PSCA、またはFOLH1ペプチドをコードする単離された核酸を含むベクターを提供する。所望の核酸のベクターへの取込み、およびベクターの選択は、例えば、Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)、およびAusubel et al. (1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York) に記載されている。

【0333】

もう1つの実施態様において、本発明はそのようなベクターを含有する細胞、ウイルス、プロウイルス等を提供する。ベクターおよび／または外因性核酸を含む細胞を生産する方法は当該分野でよく知られている。例えば、Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)、およびAusubel et al. (1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York) 参照。

10

【0334】

もう1つの実施態様において、非溶血性LLO、切形されたActA、またはPEST様配列に操作可能に連結されたKLK3、PSCA、またはFOLH1ペプチドをコードする核酸をプラスミドベクターにクローン化する。もう1つの実施態様において、組換えリステリア株をプラスミドベクターで形質転換する。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

20

【0335】

一旦本発明を備えると、非溶血性LLO、切形されたActA、またはPEST様配列に操作可能に連結されたKLK3、PSCA、またはFOLH1ペプチドをコードする他の核酸は、本明細書中に開示された他の融合蛋白質の生成についての実験の詳細のセクションにて本明細書中に記載された以下の手法（例えば、部位特異的突然変異誘発、フレームシフト突然変異等）、および当該分野における手法によって得ることができる。

【0336】

融合蛋白質の誘導体または変種形態の生成のための方法は当該分野でよく知られており、とりわけ、例えば、Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)、およびAusubel et al. (1997, Current Protocols in Molecular Biology, Green & Wiley, New York) に、および本明細書中における他の箇所に記載されたもののような当該分野でよく知られた組換えDNA方法を用いることを含む。

30

【0337】

もう1つの実施態様において、本発明は、非溶血性LLO、切形されたActA蛋白質、またはPEST様配列に操作可能に連結されたKLK3、PSCA、またはFOLH1ペプチドをコードする核酸を提供し、ここで標識ポリペプチドをコードする核酸はそれに共有結合により連結される。すなわち、本発明はキメラ核酸を含み、ここで標識ポリペプチドをコードする核酸配列はKLK3、PSCA、またはFOLH1ペプチド含有蛋白質をコードする核酸に共有結合により連結されている。そのようなtagポリペプチドは当該分野でよく知られており、例えば、緑色蛍光蛋白質 (GFP)、myc、myc-ピルビン酸キナーゼ (myc-PK)、His₆、マルトース結合蛋白質 (MBP)、インフルエンザウイルス血球凝集素標識ポリペプチド、フラグ標識ポリペプチド (FLAG)、およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 標識ポリペプチドを含む。しかしながら、本発明は前記で列挙した標識ポリペプチドをコードする核酸に限定されるとは断じて解釈されるべきではない。むしろ、これらの標識ポリペプチドに実質的に同様に機能し得るポリペプチドは本発明に含まれると解釈されるべきである。

40

【0338】

また、本発明は、本発明のActA、LLO、およびPEST様配列、その断片、蛋白質、またはペプチドのアナログも提供する。アナログは、もう1つの実施態様において、

50

保存的アミノ酸配列の差によって、配列に影響しない修飾によって、または双方によって、天然に存在する蛋白質またはペプチドとは異なる。

【0339】

もう1つの実施態様において、本発明は増強された免疫原性を持つK L K 3 ペプチドを提供する。もう1つの実施態様において、本発明は増強された免疫原性を持つP S C A ペプチドを提供する。もう1つの実施態様において、本発明は増強された免疫原性を持つF O L H 1 ペプチドを提供する。すなわち、本明細書中に開示されたデータが示すように、切形されたA c t A蛋白質、非溶血性L L O蛋白質、またはP E S T様配列に融合されたK L K 3、P S C A、またはF O L H 1 ペプチドの結果、動物に投与された場合、存在する腫瘍の除去、および腫瘍または感染された細胞に浸潤することができる抗原特異的細胞傷害性リンパ球の誘導が起こる。本開示、ならびに本明細書中に開示された方法および組成物を備えた場合、当業者であれば、本発明は多数の疾患の治療および／または予防に使用できると容易に認識するであろう。

10

【0340】

もう1つの実施態様において、市販のプラスミドを本発明で用いる。そのようなプラスミドは種々の源、例えば、Invitrogen (Carlsbad, Calif.), Stratagene (La Jolla, Calif.), Clontech (Palo Alto, Calif.) から入手可能であるか、あるいは当該分野でよく知られた方法を用いて構築することができる。原核生物における発現を容易とするための原核生物の複製起点およびプロモーター／調節エレメントを持つ原核生物発現ベクターである、p E T (Gibbstown, NJ) のような市販のプラスミド。

20

【0341】

本発明は、さらに、(a) K L K 3、P S C A、またはF O L H 1 ペプチド；および(b) 切形されたA c t A蛋白質、切形されたL L O蛋白質、またはP E S T様配列をコードする単離された核酸を含むプラスミドでそのようなリステリア株を形質転換することを含む。もう1つの実施態様において、もしL M ワクチン株がp r f A遺伝子またはa c t A遺伝子において欠失を含むならば、プラスミドは突然変異を補充するためのp r f Aまたはa c t A遺伝子を含み、それにより、リステリア・モノサイトゲネスワクチン株に対して機能を回復させる。本明細書中において他の箇所で記載したように、細菌を形質転換する方法は当該分野でよく知られているように、塩化カルシウムコンピテント細胞ベースの方法、エレクトロポレーション方法、バクテリオファージ媒介形質導入、化学的および物理的形質転換技術を含む (de Boer et al., 1989, Cell 56:641-649; Miller et al., 1995, FASEB J., 9:190-199; Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Ausubel et al., 1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Gerhardt et al., eds., 1994, Methods for General and Molecular Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, D.C.; Miller, 1992, A Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) を含む。

30

【0342】

本発明のプラスミドはもう1つの実施態様において、融合蛋白質をコードする遺伝子に操作可能に連結されたプロモーター／調節配列を含む。

40

【0343】

本発明で有用なプラスミドおよび他の発現ベクターは本明細書中で他の箇所に記載されており、プロモーター／調節配列、グラム陰性および／またはグラム陽性細菌のための複製の起点、および融合蛋白質をコードする単離された核酸のような特徴を含むことができる。さらに、融合蛋白質をコードする単離された核酸は、そのような単離された核酸の発現を駆動するのに適したそれ自体のプロモーターを有する。細菌系において発現を駆動するのに有用なプロモーターは当該分野でよく知られており、バクテリオファージラムダ、p B R 3 2 2 のベクターラクタマーゼ遺伝子のb l aプロモーター、およびp B R 3 2 5 のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子のC A Tプロモーターを含む。例えば、原核生物プロモーターの例はバクテリオファージラムダの主要な右側および左

50

側プロモーター（ P_L および P_R ）、*E.coli* の *trp*、*recA*、*lacZ*、*lacd*、および *gal* プロモーター、*B.subtilis* のアルファアミラーゼ（Ulmanen et al,1985.J.Bacteriol.162:176-182）および *S28* -特異的プロモーター（Gilman et al,1984 Gene 32:11-20）、*Bacillus* のバクテリオファージのプロモーター（Gryczan,1982,In:The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press,Inc.,New York）、および *Streptomyces* プロモーター（Ward et al,1986,Mol.Gen.Genet.203:468-478）を含む。本発明で考えられるさらなる原核生物プロモーターは、例えば、Glick（1987,J.Ind.Microbiol.1:277-282）；Cenatiempo,（1986,Biochimie,68:505-516）；および Gottesman,（1984,Ann.Rev. Genet.18:415-442）にレビューされている。本発明で考えられるプロモーター／調節エレメントは、限定されるものではないが、*Listeria* の *prfA* プロモーター（GenBank アクセス番号 Y07639）、*Listeria* の *hly* プロモーター（GenBank アクセス番号 X15127）、および *Listeria* の *p60* プロモーター（GenBank アクセス番号 AY126342）、またはその断片を含む。

【0344】

もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物の *Listeria* 株は *KLK3* ペプチドを含むペプチドをコードする一体化された遺伝子を含む。もう1つの実施態様において、*Listeria* 株は *PSCA* ペプチドを含むペプチドをコードする一体化された遺伝子を含む。もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物の *Listeria* 株は *FOLH1* ペプチドを含むペプチドをコードする一体化された遺伝子を含む。

【0345】

もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物の *Listeria* 株は、部位特異的の一体化ベクターを用いて作成される。もう1つの実施態様において、一体化された遺伝子を含む *Listeria* 株は相同組換えを用いて作成される。もう1つの実施態様において、一体化された遺伝子を含む *Listeria* 株は、*Listeria* 染色体に遺伝子を組み込む当該分野で公知のいずれかの他の方法を用いて作成される。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0346】

もう1つの実施態様において、組込みベクターは *PSA attPP'* 部位を含む。もう1つの実施態様において、組込みベクターは *PSA* インテグラーゼをコードする遺伝子を含む。もう1つの実施態様において、組込みベクターは *U153 attPP'* 部位を含む。もう1つの実施態様において、組込みベクターは *U153* インテグラーゼをコードする遺伝子を含む。もう1つの実施態様において、組込みベクターは *A118 attPP'* 部位を含む。もう1つの実施態様において、組込みベクターは *A118* インテグラーゼをコードする遺伝子を含む。もう1つの実施態様において、組込みベクターは当該分野で公知のいずれかの他の *attPP'* 部位を含む。もう1つの実施態様において、組込みベクターは当該分野で公知のいずれかのファージインテグラーゼを含む。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0347】

もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物の *Listeria* 株は代謝遺伝子において突然変異または栄養要求性を含む。もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物の *Listeria* 株、さらに、内因性 *ActA* 遺伝子において突然変異を含む。もう1つの実施態様において、*KLK3* ペプチド、*PSCA* ペプチドまたは *FOLH1* ペプチドを運ぶプラスミドは、突然変異または栄養要求性を補う代謝遺伝子を含む。もう1つの実施態様において、*KLK3* ペプチド、*PSCA* ペプチドまたは *FOLH1* ペプチドをコードする組込みベクター、または *Listeria* 染色体への組込みで用いられる構築体は、該突然変異または栄養要求性を補う遺伝子を含む。もう1つの実施態様において、該代謝遺伝子は抗生物質耐性遺伝子の代わりの選択で用いられる。もう1つの実施態様において、代謝遺伝子は、抗生物質耐性遺伝子に加えて選択で用いられる。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0348】

もう1つの実施態様において、代謝遺伝子はアミノ酸代謝酵素をコードする遺伝子である。もう1つの実施態様において、代謝酵素はアラニンラセマーゼ (dal) 酵素である。もう1つの実施態様において、代謝酵素はD-アミノ酸トランスフェラーゼ酵素 (dat) である。

【0349】

もう1つの実施態様において、代謝酵素は、細菌成長プロセスで用いられるアミノ酸 (AA) を代謝する。もう1つの実施態様において、産物AAは複製プロセスで用いられる。もう1つの実施態様において、産物AAは細胞壁合成で用いられる。もう1つの実施態様において、代謝酵素は細胞壁合成で用いるアミノ酸の形成を触媒する。もう1つの実施態様において、代謝酵素はアミノ酸代謝酵素である。もう1つの実施態様において、産物AAは蛋白質合成で用いられる。もう1つの実施態様において、産物AAは脂肪酸の代謝で用いられる。もう1つの実施態様において、産物AAは当該分野で公知のいずれかの他の成長または複製プロセスで用いられる。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

10

【0350】

もう1つの実施態様において、代謝酵素は細胞壁合成で用いるAAの形成を触媒する。もう1つの実施態様において、代謝酵素は細胞壁合成で用いるAAの合成を触媒する。もう1つの実施態様において、代謝酵素は細胞壁合成で用いるAAの合成に関与する。もう1つの実施態様において、AAは細胞壁合成で用いられる。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0351】

20

もう1つの実施態様において、代謝酵素は、細胞壁成分であるD-グルタミン酸についての合成酵素である。

【0352】

もう1つの実施態様において、代謝酵素はアラニンラセマーゼ遺伝子 (dal) 遺伝子によってコードされる。D-グルタミン酸合成は、部分的には、D-glutamate + D-alanine への変換、および逆反応に関与する dal 遺伝子によって制御される。

【0353】

もう1つの実施態様において、本発明の方法および組成物の dal 蛋白質は配列：

[001] MVTGWHRPTWIEIDRAAIR ENIKNEQNKLPESVDL
WAVVKANAYGHGII EVARTAKEAGAKGFCVAI LDEALALR
EAGFQDDFI LVLGATR KEDANLAAKNHISLTVFREDWLEN
LTLEATLRIHLKVDSGMGRLGIRTT EEARRIEATSTNDHQ
LQLEG IYTHFATADQLETSYFEQQ LAKFQTI L TSLKKRPT
YVHTANSAA SLLQPQIGFDAIRFGISMYGLTPSTEIKTSL
PFELKPALALYTEMVHVKE LAPGDSVSYGATY TATEREWV
ATLP IGYADGLIRHYS GFHVLVDGEPAPI IGRVCM DQTI I
KLPREFQTGSKVTI I GKDHGNTVTADDA AQYLD TINYEVT
CLLNERIPRKYIH (配列番号：56；GenBank アクセス番号：AF03
8438) を有する。もう1つの実施態様において、dal 蛋白質は配列番号：56 に対
して相同である。もう1つの実施態様において、dal 蛋白質は配列番号：56 の変種で
ある。もう1つの実施態様において、dal 蛋白質は配列番号：56 のイソ形態である。
もう1つの実施態様において、dal 蛋白質は配列番号：56 の断片である。もう1つの
実施態様において、dal 蛋白質は配列番号：56 のホモログの断片である。もう1つの
実施態様において、dal 蛋白質は配列番号：56 の変種の断片である。もう1つの実施
態様において、dal 蛋白質は配列番号：56 のイソ形態の断片である。

30

40

【0354】

もう1つの実施態様において、dal 蛋白質は当該分野で公知のいずれかの他のリステリア dal 蛋白質である。もう1つの実施態様において、dal 蛋白質は当該分野で公知のいずれかのBacillus subtilis dal 蛋白質である。もう1つの実施態様において、d

50

a l 蛋白質は当該分野で公知のいずれかの他のグラム陽性 d a l 蛋白質である。もう 1 つの実施態様において、d a l 蛋白質は当該分野で公知のいずれかの他の d a l 蛋白質である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0355】

本発明の方法および組成物の d a t 蛋白質は、もう 1 つの実施態様において、配列：
 MKVLVNNHLVEREDATVDIEDRGYQFGDGVYEVVRLYNGK
 FFTYNEHIDRLYASAAKIDLVI PYSKEELRELLKLV AEN
 NINTGNVYLQVTRGVQNPRNHVIPDDFPLEGVLTA AAREV
 PRNERQFVEGGTAITEEDVRWLRCDIKSLNLLGNILAKNK
 AHQQNAL EAILHRGEQVTECSASNVSIIKDGVLWTHAADN
 LILNGITRQVIIDVAKKNGIPVKEADFTLTDLREADEVF I
 SSTTIEITPITHIDGVQVADGKRGPI TAQLHQYFVEE ITR
 ACGELEFAK（配列番号：57；GenBank アクセス番号：AF038439）
 によってコードされる。もう 1 つの実施態様において、d a t 蛋白質は配列番号：57
 に対して相同である。もう 1 つの実施態様において、d a t 蛋白質は配列番号：57 の変
 種である。もう 1 つの実施態様において、d a t 蛋白質は配列番号：57 のイソ形態であ
 る。もう 1 つの実施態様において、d a t 蛋白質は配列番号：57 の断片である。もう 1
 つの実施態様において、d a t 蛋白質は配列番号：57 のホモログの断片である。もう 1
 つの実施態様において、d a t 蛋白質は配列番号：57 の変種の断片である。もう 1 つの
 実施態様において、d a t 蛋白質は配列番号：57 のイソ形態の断片である。

10

20

【0356】

もう 1 つの実施態様において、d a t 蛋白質は当該分野で公知のいずれかの他のリス
 テリア d a t 蛋白質である。もう 1 つの実施態様において、d a t 蛋白質は当該分野で
 公知のいずれかの他のグラム陽性 d a t 蛋白質である。もう 1 つの実施態様において、
 d a t 蛋白質は当該分野で公知のいずれかの他の d a t 蛋白質である。各可能性は本発明の
 別の実施態様を表わす。

【0357】

もう 1 つの実施態様において、代謝酵素は D-グルタミン酸合成遺伝子である。もう 1
 つの実施態様において、代謝酵素は d g a によってコードされる。もう 1 つの実施態様
 において、代謝酵素は a l r（アラニラセマーゼ）遺伝子によってコードされる。もう 1
 つの実施態様において、代謝酵素はアラニン合成に関与する当該分野で公知のいずれかの
 他の酵素である。

30

【0358】

もう 1 つの実施態様において、代謝酵素は s e r C、ホスホセリンアミノトランスフェ
 ラーゼによってコードされる。もう 1 つの実施態様において、代謝酵素は、細胞壁構成
 アミノピメリン酸の合成に関与する a s d（アスパルテートベーターセミアルデヒドデヒ
 ドロゲナーゼ）によってコードされる。もう 1 つの実施態様において、代謝酵素は、（S）
 -4-アミノ-5-オコソペンタノエートからの 5-アミノレプリネートの形成を触媒
 する g s a B-グルタメート-1-セミアルデヒドアミノトランスフェラーゼによってコ
 ードされる。もう 1 つの実施態様において、代謝酵素は、（S）-4-アミノ-5-オキ
 ソペンタノエートからの 5-アミノレプリネートの形成を触媒する H e m L によってコ
 ードされる。もう 1 つの実施態様において、代謝酵素は、L-アスパルテートおよび 2-オ
 キソグルタレートからのオキサロ酢酸および L-グルタメートの形成を触媒するアスパ
 ルテートアミノトランスフェラーゼである a s p B によってコードされる。もう 1 つの実
 施態様において、代謝酵素はアルギニン生合成に関与する a r g F-1 によってコードされ
 る。もう 1 つの実施態様において、代謝酵素はアミノ酸生合成に関与する a r o E によ
 ってコードされる。もう 1 つの実施態様において、代謝酵素は 3-デヒドロキネート生合
 成に関与する a r o B によってコードされる。もう 1 つの実施態様において、代謝酵素はア
 ミノ酸生合成に関与する a r o D によってコードされる。もう 1 つの実施態様において、
 代謝酵素はアミノ酸生合成に関与する a r o C によってコードされる。もう 1 つの実施態

40

50

様において、代謝酵素はヒスチジン生合成に関与する *his B* によってコードされる。もう1つの実施態様において、代謝酵素はヒスチジン生合成に関与する *his D* によってコードされる。もう1つの実施態様において、代謝酵素はヒスチジン生合成に関与する *his G* によってコードされる。もう1つの実施態様において、代謝酵素はメチオニン生合成に関与する *met X* によってコードされる。もう1つの実施態様において、代謝酵素はプロリン生合成に関与する *pro B* によってコードされる。もう1つの実施態様において、代謝酵素はアルギニン生合成に関与する *arg R* によってコードされる。もう1つの実施態様において、代謝酵素はアルギニン生合成に関与する *arg J* によってコードされる。もう1つの実施態様において、代謝酵素はチアミン生合成に関与する *thi I* によってコードされる。もう1つの実施態様において、代謝酵素はトリプトファン生合成に関与する *LMOf 2365__16522* によってコードされる。もう1つの実施態様において、代謝酵素はトリプトファン生合成に関与する *aro A* によってコードされる。もう1つの実施態様において、代謝酵素はバリンおよびイソロイシン生合成に関与する *ilv D* によってコードされる。もう1つの実施態様において、代謝酵素はバリンおよびイソロイシン生合成に関与する *ilv C* によってコードされる。もう1つの実施態様において、代謝酵素はロイシン生合成に関与する *leu A* によってコードされる。もう1つの実施態様において、代謝酵素はリシン生合成に関与する *dap F* によってコードされる。もう1つの実施態様において、代謝酵素はスレオニン生合成に関与する *thr B* によってコードされる（全て *GenBank* アクセス番号 *NC__002973*）。

10

【0359】

20

もう1つの実施態様において、代謝酵素は *tRNA* シンテターゼである。もう1つの実施態様において、代謝酵素はトリプトファン *tRNA* シンテターゼをコードする *trp S* 遺伝子によってコードされる。もう1つの実施態様において、代謝酵素は当該分野で公知のいずれかの他の *tRNA* シンテターゼである。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0360】

もう1つの実施態様において、宿主株細菌は Δ (*trp S aro A*) であり、双方のマーカは組込みベクターに含有される。

【0361】

もう1つの実施態様において、代謝酵素はジアミノピメリン酸の合成に関与する *mur E* によってコードされる（*GenBank* アクセス番号：*NC__003485*）。

30

【0362】

もう1つの実施態様において、代謝酵素はテイコ酸生合成に関与する *LMOf 2365__2494* によってコードされる。

【0363】

もう1つの実施態様において、代謝酵素は *Wee E*（リボ多糖生合成蛋白質 *rf f A*；*GenBank* アクセス番号：*AE014075.1*）によってコードされる。もう1つの実施態様において、代謝酵素は *ami A*、*N*-アセチルムラモイル-*L*-アラニンアミダーゼによってコードされる。もう1つの実施態様において、代謝酵素はアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼである。もう1つの実施態様において、代謝酵素はヒスチノール-リン酸アミノトランスフェラーゼ（*GenBank* アクセス番号：*NP__466347*）である。もう1つの実施態様において、代謝酵素は細胞壁テイコ酸グリコシル化蛋白質 *Gtc A* である。

40

【0364】

もう1つの実施態様において、代謝酵素はペプチドグリカン成分または前駆体についての合成酵素である。もう1つの実施態様において、成分は *UDP-N*-アセチルムラミル-ペンタペプチドである。もう1つの実施態様において、成分は *UDP-N*-アセチルグルコサミンである。もう1つの実施態様において、成分は *MurNAc*-（ペンタペプチド）-ピロホスホリル-ウンデカプレノールである。もう1つの実施態様において、成分は *GlcNAc-β-(1,4)-MurNAc*-（ペンタペプチド）-ピロホスホリル

50

ーウンデカプレノールである。もう1つの実施態様において、成分は当該分野で公知のいずれかの他のペプチドグリカン成分または前駆体である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0365】

もう1つの実施態様において、代謝酵素はmurGによってコードされる。もう1つの実施態様において、代謝酵素はmurDによってコードされる。もう1つの実施態様において、代謝酵素はmurA-1によってコードされる。もう1つの実施態様において、代謝酵素はmurA-2によってコードされる（全てGenBankアクセス番号：NC_002973に記載されている）。もう1つの実施態様において、代謝酵素はペプチドグリカン成分または前駆体についてのいずれかの他の合成酵素である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

10

【0366】

もう1つの実施態様において、代謝酵素はトランスグリコシラーゼである。もう1つの実施態様において、代謝酵素はトランスペプチダーゼである。もう1つの実施態様において、代謝酵素はカルボキシーペプチダーゼである。もう1つの実施態様において、代謝酵素は当該分野で公知のいずれかの他のクラスの代謝酵素である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0367】

もう1つの実施態様において、代謝酵素は当該分野で公知のいずれかの他のリステリア・モノサイトゲネス代謝酵素である。

20

【0368】

もう1つの実施態様において、代謝酵素は当該分野で公知のいずれかの他のリステリア代謝酵素である。

【0369】

もう1つの実施態様において、代謝酵素は当該分野で公知のいずれかの他のグラム陽性細菌代謝酵素である。

【0370】

もう1つの実施態様において、代謝酵素は当該分野で公知のいずれかの他の代謝酵素である。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

【0371】

もう1つの実施態様において、組込みベクターはリステリアを感染させることができる当該分野で公知のいずれかの他の部位特異的組込みベクターである。各可能性は本発明の別の実施態様を表わす。

30

【0372】

もう1つの実施態様において、本発明はLLOの非溶血性切形形態（「ΔLLO」）への抗原の融合を介してKLK3、PSCA、またはFOLH1抗原の免疫原性を増強させる方法を提供する。もう1つの実施態様において、抗原はPEST様配列に融合される。もう1つの実施態様において、PEST様アミノ酸配列はLLOの配列番号：1である。本発明は、さらに、切形されたActA蛋白質、切形されたLLO蛋白質、またはその断片に抗原を融合させることによって、KLK3、PSCA、またはFOLH1抗原の免疫原性を増強させるための方法および組成物を提供する。本明細書中に開示されるデータによって示されるように、ActA蛋白質へ融合された抗原は、存在する腫瘍を除去し、その結果、抗原特異的細胞傷害性リンパ球が誘導される免疫応答を誘導する。

40

【0373】

もう1つの実施態様において、本発明の融合蛋白質は、KLK3ペプチドおよび非KLK3ペプチド双方をコードするプラスミドまたはヌクレオチド分子の、細菌における、転写および翻訳を介して組換えにより生産される。もう1つの実施態様において、もう1つの実施態様において、融合蛋白質は、PSCAペプチドおよび非PSCAペプチド双方をコードするプラスミドまたはヌクレオチド分子の、細菌における、転写および翻訳を介して組換えにより生産される。もう1つの実施態様において、融合蛋白質は、FOLH1ペ

50

プチドおよび非 F O L H 1 ペプチド双方をコードするプラスミドまたはヌクレオチド分子の、細菌における、転写および翻訳を介して組換えにより生産される。もう 1 つの実施態様において、プラスミドまたはヌクレオチドはイン・ビトロで転写されおよび／または翻訳される。もう 1 つの実施態様において、抗原は、リステリア・モノサイトゲネスの P E S T 様 A A 配列、またはもう 1 つの原核生物に由来する P E S T 様 A A 配列を含む L L O の切形された形態に化学的に共役される。「抗原」とは、もう 1 つの実施態様において、同定された T 細胞エピトープを含むこれらの天然 K L K 3、P S C A、または F O L H 1 遺伝子産物または切形されたバージョンをいう。もう 1 つの実施態様において、次いで、これらの融合蛋白質を、対象への投与のためのワクチンに取り込んで、融合蛋白質の抗原に対する増強された免疫応答を誘導する。他の実施態様において、本発明の融合蛋白質は D N A ワクチン、R N A ワクチンまたは複製 R N A ワクチンとして送達される。本開示に際して、当業者に明らかなように、本発明の融合蛋白質を含むワクチンは、感染症および新生物疾患の予防および治療で特に有用である。

10

【0374】

本発明は、さらに、有効量の本発明のワクチンを含む組成物を動物またはヒトに投与する方法を含む。該組成物は、とりわけ、医薬上許容される担体を含む。もう 1 つの実施態様において、組成物は、K L K 3、P S C A、または F O L H 1 ペプチドに融合した、切形された A c t A 蛋白質、切形された L L O 蛋白質、またはその断片を含むリステリアワクチン株、および医薬上許容される担体を含む。

【0375】

20

もう 1 つの実施態様において、本発明は、切形された L L O 蛋白質、切形された A c t A 蛋白質、または P E S T 様配列に融合された、K L K 3、P S C A、または F O L H 1 ペプチド、および／またはそれを含むリステリアワクチン株を含む組成物、アプリケーション、および本発明の方法を実行するための化合物の使用を記載する指示資料を含むキットを提供する。モデルキットを以下に記載するが、他の有用なキットの内容は本開示に徴して当業者に明らかであろう。これらのキットの各々は本発明内にあると考えられる。

【0376】

もう 1 つの実施態様において、本発明は抗原に対する増強された免疫応答を誘導するキットを提供し、該キットは切形された A c t A 蛋白質、切形された L L O 蛋白質、または P E S T 様配列に融合した K L K 3、P S C A、または F O L H 1 ペプチド、および医薬上許容される担体を含み、該キットは、さらに、アプリケーション、およびその使用のための指示資料を含む。

30

【0377】

もう 1 つの実施態様において、本発明は抗原に対する増強された免疫応答を誘導するキットを提供する。該キットは本発明について本明細書中に開示された方法と同一の方法で用いられる。もう 1 つの実施態様において、キットは、切形された A c t A 蛋白質、切形された L L O 蛋白質、または P E S T 様配列に融合した K L K 3、P S C A、または F O L H 1 ペプチドを含むリステリアワクチン株を投与するために用いられる。もう 1 つの実施態様において、キットはアプリケーション、該キットの使用のための指示資料を含む。これらの指示は、単純に、本明細書中に提供された例を具体化する。

40

【0378】

もう 1 つの実施態様において、本発明は抗原に対する増強された免疫応答を誘導するキットを提供する。該キットは本発明について本明細書中に開示された方法と同一の方法で用いられる。簡単に述べれば、キットは A c t A 蛋白質、L L O 蛋白質、または P E S T 様配列に融合した抗原を投与するために用いることができる。加えて、キットはアプリケーション、該キットの使用のための指示資料を含む。これらの指示は、単純に、本明細書中に提供された例を具体化する。

【実施例】**【0379】**

実施例 1：L L O 抗原融合は抗腫瘍免疫性を誘導する。

50

【0380】

材料および実験方法（実施例1ないし2）

【0381】

細胞系

【0382】

C57BL/6同系TC-1腫瘍を、HPV-16 E6およびE7で不滅化し、c-Ha-ras癌遺伝子で形質転換した。TC-1は低レベルのE6およびE7を発現し、高度に腫瘍形成性である。TC-1を、RPMI1640、10%FCS、2mMのL-グルタミン、100U/mlのペニシリン、100μg/mlのストレプトマイシン、100μMの非必須アミノ酸、1mMのピルビン酸ナトリウム、50マイクロモル（mM）の2-ME、400マイクログラム（mcg）/mlのG418、および10%National Collection Type Culture-109培地中で37°にて10%CO₂にて成長させた。C3はHPV16の完全なゲノムで不滅化され、かつpeJ-rasで形質転換されたC57BL/6マウスからのマウス胚細胞である。EL-4/E7は、E7でレトロウイルスにより形質導入された胸腺腫EL-4である。

10

【0383】

リステリア・モノサイトゲネス株および増殖

【0384】

用いたリステリア株はLm-LLO-E7（エピソード発現系におけるhly-E7融合遺伝子；図1A）、Lm-E7（リステリアゲノムに組込まれた単一コピーE7遺伝子カセット）、Lm-LLO-NP（「DP-L2028」；エピソード発現系におけるhly-NP融合遺伝子）、およびLm-Gag（「ZY-18」；染色体に組み込まれた単一コピーHIV-1 Gag遺伝子カセット）であった。

20

【0385】

pGG-55を生じさせるために、LLO-E7プラスミド、E7を、プライマー5'-GGCTCGAGCATGGAGATACACC-3'（配列番号：8；XhoI部位に下線を施す）および5'-GGGGAGCTAGTTTATGGTTTCTGAGAACAA-3'（配列番号：9；SpeI部位に下線を施す）を用いてPCRによって増幅し、pCR2.1（Invitrogen, San Diego, CA）に連結させた。E7をXhoI/SpeI消化によってpCR2.1から切り出し、pDP-2028（Ikonomidis G et al. Delivery of a viral antigen to the class I processing and presentation pathway by *Listeria monocytogenes*. J Exp Med. 1994 Dec 1; 180(6):2209-18）に連結させた。hly-E7融合遺伝子および多能性転写因子prfAを増幅し、マルチコピーシャトルプラスミド（Wirth R et al., J Bacteriol, 165:831, 1986）であるpAM401にサブクローンし、pGG-55を生じさせた。hlyプロモーターおよび遺伝子断片を、プライマー5'-GGGGGCTAGCCCTCTCTTTGATTAGTATATTTC-3'（配列番号：10；NheI部位に下線を施す）および5'-CTCCCCTCGAGATCATAAATTTACTTTCATC-3'（配列番号：11；XhoI部位に下線を施す）を用いて増幅した。prfA遺伝子は、プライマー5'-GACTACAAAGGACGATGACCGACAAAGTGATAACCCGGGATCTAAATAAATCCGTTT-3'（配列番号：12；XbaI部位に下線を施す）および5'-CCCCTCGACCAAGCTCTTCTTTGGTGAAG-3'（配列番号：13；SalIに下線を施す）を用いてPCR増幅した。

30

40

【0386】

得られたプラスミドpGG-55において、hlyプロモーターは、E7遺伝子にXhoI部位によって連結された、引き続いて切断されるシグナル配列を含めたhly遺伝子産物の最初の441AAの発現を駆動し、hly-E7融合遺伝子が生じ、これを転写し、LLO-E7として分泌させる。このLLO断片は溶血性C末端を欠如し、配列番号：18に記載された配列を有する。これを以下において「ΔLLO」といい、これは、単に、本発明の方法および組成物で用いることができる多くのうちの例示的なΔLLOである

50

。(ペンシルバニア大学のHao Shen博士によって提供された) リステリアの p r f A 陰性株 X F L-7 の p G G-55 での形質転換は、イン・ビボでのプラスミドの保持について選択された (図 1 A ないし 1 B)。

【0387】

L m-E 7 は、h l y プロモーター、および E 7 の発現および分泌を駆動するシグナル配列を含有する発現カセットを L M ゲノムの o r f Z ドメインに導入することによって生じさせた。E 7 は、プライマー 5'-G C G G A T C C C A T G G A G A T A C A C C T A C-3' (配列番号: 22; B a m H I 部位に下線を施す) および 5'-G C T C T A G A T T A T G G T T T C T G A G-3' (配列番号: 23; X b a I 部位に下線を施す) を用いる P C R によって増幅した。次いで、E 7 を p Z Y-21 シャトルベクターに連結した。L M 株 10403 S を、L M ゲノムの o r f X、Y、Z ドメインに対応する 1.6-kb 配列の中央に挿入された発現カセットを含む得られたプラスミド p Z Y-21-E 7 で形質転換した。相同性ドメインは、相同組換えによる、E 7 遺伝子カセットの o r f Z ドメインへの挿入を可能とする。クローンを、E 7 遺伝子カセットの o r f Z ドメインへの組み込みについてスクリーニングした。細菌を、(L m-L L O-E 7 および L m-L L O-N P) を含む、または (L m-E 7 および Z Y-18) クロラムフェニコール (20 μ g/ml) を含まないブレインハートインフュージョン培地中で成長させた。細菌を-80°C にて少量ずつ凍結させた。発現はウェスタンブロッティングによって確認した (図 2)。

【0388】

ウェスタンブロッティング

【0389】

リステリア株を 37°C にてルリアーベルトニ培地中で成長させ、600nm で測定した同一光学密度で収穫した。上清を T C A 沈殿させ、0.1N N a O H を補足した 1× 試料緩衝液中に再懸濁させた。同一量の各細胞ペレットまたは各 T C A 沈殿上清を 4 ないし 20% T r i s-グリシン S D S-P A G E ゲル (NOVEX, San Diego, CA) 上に負荷した。ゲルをニフッ化ポリビニリデンに移し、抗 E 7 モノクローナル抗体 (m A b) (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA) でプローブし、次いで、H R P 共役抗マウス二次 A b (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, U.K.) と共にインキュベートし、Amersham ECL 検出試薬で発色させ、Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech) に曝露した。

【0390】

腫瘍成長の測定

【0391】

腫瘍を、最も短いおよび最も長い直径に渡るキャリパーで 1 日置きに測定した。これらの 2 つの測定の平均を種々の時点に対してミリメートルで表した平均腫瘍直径としてプロットした。腫瘍の直径が 20mm に到達すると、マウスを犠牲にした。各時点についての腫瘍測定を生存マウスについてのみ示す。

【0392】

樹立された腫瘍成長に対するリステリア組換え体の効果

【0393】

6 ないし 8 週齢の C 5 7 B L/6 マウス (Charles River) に、左脇腹に 2×10^5 T C-1 細胞を皮下にて投与した。腫瘍接種から 1 週間後に、腫瘍は直径が 4 ないし 5mm の可触サイズに到達した。次いで、8 匹のマウスの群を、7 日および 14 日に、0.1 L D₅₀ 腹腔内 L m-L L O-E 7 (10^7 C F U)、L m-E 7 (10^6 C F U)、L m-L L O-N P (10^7 C F U) または L m-G a g (5×10^5 C F U) で処理した。

【0394】

⁵¹Cr 放出アッセイ

【0395】

6ないし8週齢のC57BL/6マウスを0.1LD₅₀ Lm-LLO-E7、Lm-E7、Lm-LLO-NP、またはLm-Gagで腹腔内免疫化した。免疫化から10日後に、脾臓を収穫した。脾臓細胞をフィーダー細胞としての照射されたTC-1細胞(100:1、脾臓細胞:TC-1)を含む培養で樹立させ;イン・ビトロにて5日間刺激し、次いで、以下の標的:EL-4、EL-4/E7、またはEL-4、またはE7 H-2bペプチド(RAHYNIVTF)でパルスしたEL-4を用い、標準⁵¹Cr放出アッセイで用いた。三連で行ったE:T細胞比率は80:1、40:1、20:1、10:1、5:1および2.5:1であった。37℃での4時間のインキュベーション後に、細胞をペレット化し、50μl上清を各ウェルから除去した。試料をWallac 1450シンチレーションカウンター(Gaithersburg,MD)でアッセイした。パーセント特異的溶解は[(分当たりの実験的カウント-分当たりの自然発生カウント)/(分当たりの合計カウント-分当たりの自然発生カウント)]×100として決定した。

10

【0396】

TC-1-特異的増殖

【0397】

C57BL/6マウスを0.1LD₅₀で免疫化し、20日後に、1回のLD₅₀ Lm-LLO-E7、Lm-E7、Lm-LLO-NP、またはLm-Gagで腹腔内注射によりブースター注射した。ブースティングから6日後に、脾臓を免疫化およびナイーブマウスから収穫した。脾臓細胞を、E7 Agの源としての2.5×10⁴、1.25×10⁴、6×10³、または3×10³照射TC-1細胞/ウェルを含む、またはTC-1細胞を含まない、または10μg/ml Con A.を含む平底96ウェルプレート中で5×10⁵/ウェルにて培養で樹立した。細胞を45時間後に0.5μCi [³H]チミジン/ウェルでパルスした。プレートを、Tomtecハーベスター96(Orange,CT)を用いて18時間後に収穫し、増殖をWallac 1450シンチレーションカウンターで評価した。分当たりのカウントの変化を、分当たりの実験カウント-分当たりのAg無しカウントとして計算した。

20

【0398】

フローサイトメトリー分析

【0399】

C57BL/6マウスを0.1LD₅₀ Lm-LLO-E7またはLm-E7で静脈内(i.v.)免疫化し、30日後にブースター注射した。CD8(53-6.7, PE共役)、CD62リガンド(CD62L; MEL-14, APC共役)、およびE7 H-2Dbテトラマーについての3色フローサイトメトリーを、CellQuest(登録商標)ソフトウェア(Becton Dickinson, Mountain View, CA)を備えたFACS Calibur(登録商標)フローサイトメーターを用いて行った。ブーストから5日後に収穫した脾臓細胞を、E7ペプチド(RAHYNIVTF)または対照(HIV-Gag)ペプチドを負荷したH-2Dbテトラマーで室温にて染色した。テトラマーは1/200希釈で用い、これは、Larry R. Pease博士(Mayo Clinic, Rochester, MN)によって、およびNational Institute of Allergy and Infectious Diseases Tetramer Core Facilityおよびthe National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Programによって供給された。テトラマー⁺、CD8⁺、CD62L^{low}細胞を分析した。

30

40

【0400】

特異的免疫成分の枯渇

【0401】

CD8⁺細胞、CD4⁺細胞およびIFNを、腫瘍負荷から6、7、8、10、12、および14日後に、各々、mAbのマウス当たり0.5mg:2.43、GK1.5、またはxmg1.2をマウスに注射することによってTC-1担持マウスにおいて枯渇させた。CD4⁺およびCD8⁺細胞集団を99%だけ低下させた(フローサイトメトリー分析)。CD25⁺細胞を、4および6日に、0.5mg/マウス抗CD25 mAb(PC61, Andrew J. Catonによって供給された)の腹腔内注射によって枯渇させた。TGF

50

は、6、7、8、10、12、および14、16、18、および20日に、TC-1担持マウスへの、抗TGF- α (2G7, H.I.Levitskyによって供給された) の腹腔内注射によって枯渇させた。腫瘍負荷から7日後に、マウスを 10^7 Lm-LLO-E7またはLm-E7で処理した。

【0402】

養子導入

【0403】

ドナーC57BL/6マウスを免疫化し、7日後に、 0.1 LD_{50} Lm-E7またはLm-Gagでブースター注射した。ドナー脾臓細胞を収穫し、ナイロン羊毛カラムに通して、T細胞を濃縮させた。CD8⁺T細胞を、 $0.1 \mu\text{g}$ 2.43抗CD8 mAbと共に室温にて30分間インキュベートすることによってイン・ビトロによって枯渇させた。次いで、標識された細胞をウサギ補体で処理した。ドナー脾臓細胞は $>60\%$ CD4⁺T細胞であった(フローサイトメトリ分析)。腫瘍負荷から7日後に、TC-1腫瘍担持レシピエントマウスを 0.1 LD_{50} で免疫化した。CD4⁺濃縮ドナー脾臓細胞(10^7)を腫瘍負荷から7日後に静脈内注射によってレシピエントマウスに導入した。

10

【0404】

B16F0-Ova実験

【0405】

24匹のC57BL/6マウスに 5×10^5 B16F0-Ova細胞を接種した。3、10、および17日に、8匹のマウスの群を 0.1 LD_{50} Lm-OVA (10^6 cfu)、Lm-LLO-OVA (10^8 cfu)で免疫化し、8匹のマウスを処理しないまま放置した。

20

【0406】

統計学

【0407】

腫瘍直系の比較のために、各群についての腫瘍サイズの平均およびSDを決定し、スチューデントt検定によって統計学的有意性を決定した。 $p \leq 0.05$ が有意であると考えられた。

【0408】

結果

30

【0409】

Lm-E7およびLm-LLO-E7を、TC-1成長に対してインパクトを与えるその能力について比較した。皮下腫瘍をC57BL/6マウスの左脇腹に樹立した。7日後に、腫瘍は可触サイズ(4ないし5mm)に達した。マウスに、7および14日に、 0.1 LD_{50} Lm-E7、Lm-LLO-E7、または対照としての、Lm-GagおよびLm-LLO-NPをワクチン接種した。Lm-LLO-E7は樹立されたTC-1腫瘍の75%の完全な退行を誘導し、他方、該群における他の2匹のマウスはその腫瘍の成長を制御した(図3A)。対照的に、免疫化Lm-E7およびLm-Gagは腫瘍の退行を誘導しなかった。この結果を多数回反復し、常に、非常に同様な結果が伴った。加えて、異なる免疫化プロトコルの下で、同様な結果がLm-LLO-E7で達成された。もう1つの実験において、単一の免疫化は、樹立された5mm TC-1腫瘍のマウスを治癒することができた。

40

【0410】

他の実験において、同様な結果が、2つの他のE7発現腫瘍細胞系：C3およびEL-4/E7で得られた。Lm-LLO-E7でのワクチン接種の効果を確認するために、その腫瘍を排除した動物を、各々、60日または40日に、TC-1またはEL-4/E7腫瘍細胞で再度負荷した。Lm-LLO-E7で免疫化した動物は、実験の終了(TC-1の場合に124日、およびEL-4/E7については54日)まで腫瘍がないままであった。

【0411】

50

同様な実験をニワトリオボアルブミン抗原（O V A）で行った。マウスを L m - O V A または L m - L L O - O V A いずれかで免疫化し、次いで、O V A を発現するように操作した E L - 4 胸腺腫、または非常に低い M H C クラス I 発現を有する非常に攻撃的なマウスメラノーマ細胞系 B 1 6 F 0 - O v a いずれかで負荷した。双方の場合において、L m - O V A はそうでなかったが、L m - L L O - O V A は樹立された腫瘍の退行を誘導した。例えば、B 1 6 F 0 実験の最後（25日）には、ナイーブ群および L m - O v a 群におけるすべてのマウスは死亡した。全ての L m - L L O - O V A マウスは生きており、それらの50%は腫瘍がなかった（図3B）。

【0412】

かくして、Δ L L O との融合蛋白質としての抗原遺伝子の発現は、抗原の免疫原性を増強させる。

【0413】

実施例2：L m - L L O - E 7 処理は T C - 1 特異的脾臓細胞増殖を誘導する。

【0414】

r L m 免疫化マウスからの脾臓細胞の L m - L L O - E 7、T C - 1 特異的増殖応答で、L m - E 7 による T 細胞の誘導を測定するために、抗原特異的免疫適格性の尺度を評価した。L m - L L O - E 7 免疫化マウスからの脾臓細胞は、20：1、40：1、80：1、および160：1の脾臓細胞：T C - 1 比率にて、E 7 の源としての照射された T C - 1 細胞に暴露された場合に増殖した（図4）。逆に、L m - E 7 および r L m 対照免疫化マウスからの脾臓細胞はバックグラウンドレベルの増殖を呈したに過ぎなかった。

【0415】

実施例3：L L O への N P の融合はその免疫原性を増強させる。

【0416】

材料および実験方法

【0417】

インフルエンザ核蛋白質（N P）が抗原としての E 7 を置き換えた以外は、図1に示したように L m - L L O - N P を調製した。32匹の B A L B / c マウスに 5×10^5 R E N C A - N P 腫瘍細胞を接種した。R E N C A - N P は（ここで引用して援用する米国特許第5,830,702号に記載された）インフルエンザ核蛋白質 N P でレトロウイルスにより形質導入された腎臓細胞癌腫である。可触巨視的腫瘍が10日に成長した後に、各群における8匹の動物を0.1 L D₅₀の各リステリアベクターで腹腔内免疫化した。動物には1週間後に第二の免疫化を受けさせた。

【0418】

結果

【0419】

抗原に L L O を融合させると、増強された免疫性が付与されるという発見の一般性を確認するために、（L m - E 7 ベクターと同系であるが、インフルエンザ抗原を発現する）L m - L L O - N P および L m - N P を構築し、ベクターを腫瘍退行を誘導する能力について、陰性対照としての（発現された抗原を除いて L m - N P と同系の）L m - G a g と比較した。図5に示すように、L m - L L O - N P を受けたマウスの6/8は腫瘍がなかった。対照的に、各々、L m - G a g および L m - N P 群における1/8および2/8マウスのみが腫瘍がなかった。ナイーブ群における全てのマウスは大きな腫瘍を有しており、40日までに死亡した。かくして、N P および L L O - N P 融合を発現する L L O 株は免疫原性であった。同様な結果が、異なる免疫化プロトコルの下で L m - L L O - E 7 について達成された。さらに、たった1回の免疫化は5mm直径の樹立された T C - 1 のマウスを治癒することが示された。

【0420】

実施例4：L L O への抗原の融合による免疫原性の増強はリステリアベクターを必要としない。

【0421】

材料および実験方法

【0422】

V a c - S i g E 7 L a m p の構築

【0423】

ワクシニアのWR株を受容体として用い、融合遺伝子をリステリアのプラスミドから切り出し、p75プロモーターの制御下でpSC11に挿入した。このベクターを選択したのは、それがワクシニア構築体V a c - S i g E 7 L a m pおよびV a c - E 7で用いる導入ベクターだからであり、従って、V a c - L L O - E 7との直接的比較を可能とするであろう。このように、全ての3つのワクシニア組換え体は同一の初期／後期化合物プロモーターp7.5の制御下で発現されるであろう。加えて、SC11はTK選択に対する組換えウイルスプラークの選択、およびベクターガラクトシダーゼスクリーニングを可能とする。図6は、これらの実験で用いる種々のワクシニア構築体を表す。V a c - S i g E 7 L a m pは、リソソーム結合膜蛋白質（LAMP-1）シグナル配列、およびLAMP-1の細胞質テールからの配列の間で融合されたE7蛋白質を発現する組み換えワクシニアウイルスである。それは、MHCクラスII経路への抗原の標的化を容易とするように設計された。

10

【0424】

以下の修飾を施して、ワクシニアによる遺伝子産物の発現を可能とした：（a）ワクシニアによる初期転写を妨げるT5XT配列を、PCRによってLLO-E7の5'部分から除去した。（b）さらなるXmaI制限部位をPCRによって導入して、LLO-E7のSC11への最終的挿入を可能とした。（LLO-E7についてコードする元の配列の喪失なくしての）これらの変化の導入の成功は、スクリーニングによって確認された。得られたpSC11-E7構築体を用いて、野生型ワクシニア株WRで感染されているTK-ve細胞系CV1をトランスフェクトした。この共感染／トランスフェクションから得られた細胞溶解物は、3回プラーク精製したワクシニア組換え体を含む。プラーク精製ワクシニアによるLLO-E7融合産物の発現は、LLO蛋白質の配列に対して向けられた抗体を用いるウェスタンブロットによって確認した。加えて、LLOおよびE7に特異的なCD8⁺T細胞を生じさせるV a c - L L O - E 7の能力を、各々、B a l b / cおよびC57／BL6マウスのLLO（91-99）およびE7（49-57）エピートープを用いて決定した。結果はクロム放出アッセイにおいて確認された。

20

30

【0425】

結果

【0426】

LLOへの抗原の融合による免疫原性の増強がリステリアベクターを必要とするか否かを決定するために、LLO（ΔLLO）の非溶血性切形形態との融合蛋白質としてのE7を発現するワクシニアベクターを構築した。腫瘍拒絶実験は、実施例1に記載されたプロトコルに従ってTC-1で行った。処理を開始する前に、2つの実験を異なる遅延を伴って行った。1つの実験においては、腫瘍が直径約3mmとなった時に処理を開始した（図7）。76日に関しては、V a c - L L O - E 7処理マウスの50%は腫瘍がなく、他方、V a c - S i g E 7 L a m pマウスの25%のみが腫瘍がなかった。他の実験において、ΔLLO抗原融合は、並列比較において、S B A S 2または非メチル化CpGオリゴヌクレオチドと混合されたE7ペプチドよりも免疫原性であった。

40

【0427】

これらの結果は、（a）ΔLLO抗原融合はリステリアの関係のみならず、他の関係においても免疫原性であり；および（b）ΔLLO抗原融合の免疫原性は他の認められたワクチンアプローチと好都合に比較されることを示す。

【0428】

実施例5：A c t A抗原およびP E S T抗原融合は抗腫瘍免疫性を付与する

【0429】

材料および実験方法

50

【0430】

Lm-PEST-E7、Lm-ΔPEST-E7、およびLm-E7epiの構築（図8A）

【0431】

Lm-PEST-E7は、それがプロモーターおよびhly遺伝子のPEST配列、特にLLOの最初の50AAを含有する以外はLm-LLO-E7と同一である。Lm-PEST-E7を構築するためには、SOE（重複延長による遺伝子スプライシング）PCR技術を用いて、hlyプロモーターおよびPEST領域を全長E7遺伝子に融合した。E7遺伝子およびhly-PEST遺伝子断片を、LLOの最初の441AAを含有するプラスミドpGG-55から増幅し、慣用的なPCR技術によって一緒にスプライシングした。最終のプラスミドpVS16.5を作り出すために、hly-PEST-E7断片およびprfA遺伝子を、イン・ビトロでの選択のためのクロラムフェニコール耐性遺伝子を含むプラスミドpAM401にサブクローンし、得られたサブクラスを用いてXFL-E7を形質転換した。

10

【0432】

Lm-ΔPEST-E7は、それがPEST配列を欠如する以外は、Lm-LLO-E7と同一である組換えリステリア株である。それは、PEST含有領域（bp333-387）をhly-E7融合遺伝子から除去するために設計されたプライマーを用いてエピソード発現系を構築した以外は、Lm-PEST-E7について実質的に記載されたように作成した。Lm-E7epiは、PEST領域またはLLOなくしてE7を分泌する組換え株である。この株を形質転換するのに用いるプラスミドは、hlyプロモーターの遺伝子断片、およびE7遺伝子に融合したシグナル配列を含有する。この構築体は、染色体に組み込まれたE7遺伝子の単一コピーを発現する元来のLm-E7とは異なる。Lm-E7epiは、発現されたE7抗原の形態を除いては、Lm-LLO-E7、Lm-PEST-E7、およびLm-ΔPEST-E7と完全に同系である。

20

【0433】

Lm-actA-E7の構築

【0434】

Lm-actA-E7は、actA蛋白質の切形されたバージョンに融合したE7蛋白質を発現するプラスミドを含むLMの組換え株である。Lm-actA-E7は、pDDP-2028を修飾することによって構築されたプラスミドベクターpDD-1をLMに導入することによって生じさせた。pDD-1は、actA-E7の発現および分泌を駆動する、310bp hlyプロモーターおよびhlyシグナル配列（ss）；4つのPEST配列を含む1170bpのactA遺伝子（配列番号：16）（切形されたActAポリペプチドは分子の最初の390AAよりなる、配列番号：15）；300bp HPV-E7*遺伝子；1019bp prfA*遺伝子（病原性病原性遺伝子の制御発現）；および形質転換された細菌クロンの選択のためのCAT遺伝子（クロラムフェニコール耐性遺伝子）のコピーを発現する発現カセットを含む（図8B）。

30

【0435】

hlyプロモーター（pHly）および遺伝子断片は、プライマー5'-GGGGTCTAGAGCCTCCTTTGATTAGTATATTC-3'（XbaI部位に下線を施す；配列番号：46）および5'-ATCTTCGCTATCTGTCTGCCGCCGTGCTTTCAGTTTGTTCGCGC-3'（NotI部位に下線を施す；最初の18ヌクレオチドはActA遺伝子重複であり；配列番号：47）を用いてpGG-55（実施例1）からPCR増幅させた。actA遺伝子は、プライマー5'-GCGCAACAAACTGAAAGCAGCGGCCGCGACAGATAGCGAAGAT-3'（NotI部位に下線を施す；配列番号：48）およびプライマー5'-TGTAAGGTGTATCTTCCATGCTCGAGAGCTAGGCGATCAATTTC-3'（XhoI部位に下線を施す；配列番号：49）を用いてLM 10403s野生型ゲノムからPCR増幅した。E7遺伝子はプライマー5'-GGAATTGATCGCCT

40

50

AGCTCTCGAGCATGGAGATACACCTACA-3' (XhoI 部位に下線を施す; 配列番号: 50) およびプライマー 5'-AAACGGATTATTTAGATCCCGGGTTATGGTTTCTGAGAACAA-3' (XmaI 部位に下線を施す; 配列番号: 51) を用いて pGG55 (pLLO-E7) から PCR 増幅した。p r f A 遺伝子は、プライマー 5'-TGTTCTCAGAAACCAATAACCCGGGATCTAAATAAATCCGTTT-3' (XmaI 部位に下線を施す; 配列番号: 52) およびプライマー 5'-GGGGGTCTGACCAAGCTCTTCTTGGTGAAG-3' (SalI 部位に下線を施す; 配列番号: 53) を用いて LM 10403 s 野生型ゲノムから PCR 増幅した。h l y プロモーターを a c t A 遺伝子 (p H l y - a c t A) に融合し、PCR 生成し、上流 p H l y プライマー (配列番号: 46) および下流 a c t A プライマー (配列番号: 49) を用いて精製された p H l y DNA および精製された a c t A DNA から増幅した。

【0436】

p r f A 遺伝子 (E7-p r f A) に融合した E7 遺伝子を PCR 生成させ、上流 E7 プライマー (配列番号: 50) および下流 p r f A 遺伝子プライマー (配列番号: 53) を用いて精製された E7 DNA および精製された p r f A DNA から増幅した。

【0437】

E7-p r f A 融合産物に融合された p H l y - a c t A 融合産物を PCR 生成させ、上流 p H l y プライマー (配列番号: 46) および下流 p r f A 遺伝子プライマー (配列番号: 53) を用いて、精製された融合 p H l y - a c t A DNA 産物および E7-p r f A DNA 産物から増幅させ、p C R I I (Invitrogen, La Jolla, Calif.) に連結させた。適格 E. c o l i (TOP10'F, Invitrogen, La Jolla, Calif.) を p C R I I - A c t A E7 で形質転換した。溶解および単離の後に、B a m H I (予測される断片サイズ 770 b p および 6400 b p (またはインサートがベクターに戻される場合: 2500 b p および 4100 b p)) および B s t X I (予測される断片サイズ 2800 b p および 3900 b p) を用いる制限分析によってプラスミドをスクリーニングし、また、上流 p H l y プライマー (配列番号: 46) および下流 p r f A 遺伝子プライマー (配列番号: 53) を用いる PCR 分析でスクリーニングした。

【0438】

p H l y - A c t A - E7 - P r f A DNA インサートを、X b a I および S a l I での二重消化によって p C R I I から切り出し、やはり X b a I および S a l I で消化した p D P - 2028 に連結した。発現系 p A c t A E7 で TOP10'F コンピテント E. c o l i (Invitrogen, La Jolla, Calif.) を形質転換した後に、クロラムフェニコール耐性クローンを、上流 p H l y プライマー (配列番号: 46) および下流 P r f A 遺伝子プライマー (配列番号: 53) を用いて PCR 分析によってスクリーニングした。p H l y - A c t A - E7 を運ぶクローンを、20 m c g (マイクログラム) / m l (ミリリットル) クロラムフェニコール (Difco, Detroit, MI) を含むブレインハートインフュージョン培地中で成長させ、ミニプレップ DNA 精製システムキット (Promega, Madison, Wis.) を用い、p A c t A E7 を細菌細胞から単離した。ペニシリン処理リステリア株 X F L - 7 を p A c t A E7 で形質転換し、クローンをイン・ビボにてプラスミドの保持について選択した。クローンを、37℃にて、クロラムフェニコール (20 m c g / m l) を含むブレインハートインフュージョン中で成長させた。細菌を -80℃にて少量ずつ凍結させた。

【0439】

結果

【0440】

L m - A c t A - E7 対 L m - L L O - E7 によって誘導された抗腫瘍免疫性を比較するために、 2×10^5 TC-1 腫瘍細胞をマウスに皮下移植し、可触サイズ (ほぼ 5 ミリメートル [mm]) まで成長させた。7 および 14 日に、マウスを L m - A c t A - E7 (5×10^8 CFU) (十字)、L m - L L O - E7 (10^8 CFU) (四角) または L m - E7 (10^6 CFU) (丸) いずれかの 1 つの LD₅₀ でマウスを腹腔内免疫化した

。26日までに、Lm-LLO-E7およびLm-ActA-E7における動物の全ては腫瘍がなく、かつそのままであり、他方、ナイーブ動物（三角）およびLm-E7で免疫化した動物の全てはより大きな腫瘍を成長させた（図9）。かくして、ActA-E7融合でのワクチン接種は腫瘍退行を引き起こす。

【0441】

加えて、Lm-LLO-E7、Lm-PEST-E7、Lm-ΔPEST-E7、およびLm-E7epiを、E7発現腫瘍の退行を引き起こすその能力について比較した。皮下TC-1腫瘍は40匹のC57BL/6マウスの左脇腹で樹立された。腫瘍が4ないし5mmに到達した後、マウスを8匹のマウスの5群に分割した。各群を4つの組換えLMワクチンの1つで処理し、1つの群は未処理のまま放置した。Lm-LLO-E7およびLm-PEST-E7は、各々、5/8および3/8の場合に樹立された腫瘍の退行を誘導した。いずれの時点においても、Lm-PEST-E7またはLm-LLO-E7で処理したマウスの平均腫瘍サイズの間には統計学的差はなかった。しかしながら、PEST配列、Lm-ΔPEST-E7およびLm-E7epiを含まないE7を発現したワクチンは、1つを除いて全てのマウスにおいて腫瘍退行を引き起こさなかった（図8C）。これは2つの実験の代表であり、そこでは、28日における平均腫瘍サイズの統計学的に有意な差がLm-LLO-E7またはLm-PEST-E7で処理した腫瘍、およびLm-E7epiまたはLm-ΔPEST-E7の間で観察された（ $P < 0.001$ 、スチューデントt検定；図8D）。加えて、テトラマー陽性脾臓細胞のパーセンテージの増大は、PEST含有ワクチンで接種したマウスの脾臓における3つの実験にわたって再現性よく見られた（図8E）。かくして、PEST-E7融合でのワクチン接種は腫瘍退行を引き起こす。

【0442】

実施例6：LLO、ActAまたはPEST様配列へのE7の融合は抗原特異的免疫性を増強させ、腫瘍浸潤E7特異的CD8⁺細胞を生じさせる

【0443】

材料および実験方法

【0444】

リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中の100mclの 2×10^5 TC-1腫瘍細胞+400mclのMATRIGEL（登録商標）（BD Biosciences, Franklin Lakes, N.J.）を含む500mcl（マイクロリットル）のMATRIGEL（登録商標）を12匹のC57BL/6マウスの左脇腹に皮下移植した（ $n = 3$ ）。マウスを7、14および21日に腹腔内免疫化し、脾臓および腫瘍を28日に収穫した。腫瘍MATRIGELをマウスから取り出し、氷上で、2ミリリットル（ml）のRP 10培地を含有するチューブ内で4℃にて一晩インキュベートした。腫瘍を鉗子でミンチし、2mmのブロックに切断し、3mlの酵素混合物（PBS中の0.2mg/ml コラゲナーゼP、1mg/ml DNase-1）と共に37℃にて1時間インキュベートした。組織懸濁液を、ナイロンメッシュを通して濾過し、テトラマーおよびIFN-ガンマ染色のために、PBS中の5%胎児ウシ血清+0.05%のNaN₃で洗浄した。

【0445】

脾臓細胞および腫瘍細胞を、 10^7 細胞/mのプレフェルジンAの存在下で、1マイクロモル（mcm）のE7ペプチドと共に5時間インキュベートした。細胞を2回洗浄し、50mclの抗マウスFc受容体上清（2.4 G2）中で4℃にて1時間または一晩インキュベートした。細胞を表面分子CD8およびCD62Lについて染色し、浸透させ、浸透キットGolgi-stop（登録商標）またはGolgi-Plug（登録商標）（Pharmingen, San Diego, Calif.）を用いて固定し、IFN-ガンマについて染色した。500, 000事象を2-レーザーフローサイトメーターFACSカリブールを用いて獲得し、Cellquest Software（Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ）を用いて分析した。活性化された（CD62L^{low}）CD8⁺T細胞内のIFN-ガンマ分泌細胞のパーセンテージを計算した。

【0446】

テトラマー染色のために、H-2D^b テトラマーにフィコエリスリン (P E) 共役 E 7 ペプチド (R A H Y N I V T F, 配列番号: 24) に負荷し、室温で1時間染色し、抗アロフィコシアニン (A P C) 共役 M E L-14 (C D 6 2 L) および F I T C-共役 C D 8 □で4℃にて30分間染色した。細胞を、脾臓および腫瘍におけるテトラマー⁺ C D 8⁺ C D 6 2 L¹ o w 細胞を比較して分析した。

【0447】

結果

【0448】

抗原特異的免疫性を増強させる L m-A c t A-E 7 の能力を分析するために、マウスに T C-1 腫瘍細胞を移植し、L m-L L O-E 7 (1×10^7 C F U)、L m-E 7 (1×10^6 C F U) または L m-A c t A-E 7 (2×10^8 C F U) いずれかで免疫化し、あるいは未処理とした (ナイーブ)。L m-L L O-E 7 および L m-A c t A-E 7 群からのマウスの腫瘍は、L m-E 7 またはナイーブマウスにおけるよりも、より高いパーセンテージの I F N-ガンマ分泌 C D 8⁺ T 細胞 (図 10 A) およびテトラマー特異的 C D 8⁺ 細胞 (図 10 B) を含有した。

【0449】

もう1つの実施態様において、腫瘍担持マウスに L m-L L O-E 7、L m-P E S T-E 7、L m-Δ P E S T-E 7、または L m-E 7 e p i を投与し、腫瘍内の E 7 特異的リンパ球のレベルを測定した。マウスを 0. 1 L D₅₀ の4つのワクチンで7および14日に処理した。腫瘍を21日に収穫し、C D 6 2 L、C D 8 に対する抗体で、および E 7 / D b テトラマーで染色した。腫瘍内のテトラマー陽性リンパ球のパーセンテージの増大が、L m-L L O-E 7 および L m-P E S T-E 7 でワクチン接種したマウスで見られた (図 11 A)。この結果は3つの実験にわたって再現性があった (図 11 B)。

【0450】

かくして、L m-L L O-E 7、L m-A c t A-E 7、および L m-P E S T-E 7 は、腫瘍親潤 C D 8⁺ T 細胞の誘導および腫瘍退行において各々有効である。

【0451】

実施例 7: リステリア-L L O-P S A 構築体の作成および確認

【0452】

材料および実験方法

【0453】

オリゴおよび p C D N A 3. 1 は Invitrogen (Carlsbad, CA) から購入し、D N A 配列決定は Genewiz Inc (Plainfield, NJ) によって行った。ペプチドは EZbiolabs (Westfield, IN) によって合成された。フローサイトメリー試薬は Becton Dickinson (B D) Biosciences (San Diego, CA) から購入した。細胞培養基および補足物は Gibco/Invitrogen からのものであった。E L I S p o t 抗体 Mabtech AB (Cincinnati, OH) から購入した。他の試薬は、示しているものでなければ、S i g m a (St. Louis, MO) からのものであった。P S A / ワクシニアは、親切にも、National Cancer institute, Bethesda, MD の S c h l o m 博士によって提供された。

マウス、細胞系および培地

【0454】

C 5 7 B L / 6 マウスは Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) から購入した。マウスは Rutgers University, New Brunswick, NJ の Cook Campus 動物施設に維持した。マウスについての実験は、Institutional Animal Care and Use Committee of Rutgers University による規制に従って行った。全ての細胞系は A T C C (Manassas, VA) から購入した。C 5 7 B L / 6 マウスから由来する T R A M P C-1 (Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (マウス前立腺のトランスジェニック腺癌)) 細胞系は従前に記載されている。細胞を、5 μ g / m l のウシインスリン、10 n M デヒドロイソアンドロステロン、5 % 胎児ウシ血清および 5 % N u-S e r u m I V を補足した、1. 5 g / L 炭酸

10

20

30

40

50

水素ナトリウムおよび 4.5 g/L グルコースを含有するように調整された 4 mM L-グルタミンを含むダルベッコ修飾イーグル培地中で成長させ、維持した。(C57BL/6 バックグラウンドからの) MC57G 繊維芽肉腫細胞を、1.5 g/L 炭酸水素ナトリウム、0.1 mM 非必須アミノ酸、ならびに 1.0 mM ピルビン酸ナトリウムおよび 10 % 胎児ウシ血清を含有するように調整された 2 mM L-グルタミンおよびイーグルの BSS を含むイーグルの最小必須培地 (EMEM) 中に維持した。EL4 リンパ腫細胞を、1.5 g/L 炭酸水素ナトリウムおよび 4.5 g/L グルコース、10 % 胎児ウシ血清を含有するように調整された、4 mM L-グルタミンを含むダルベッコ修飾イーグル培地中で維持した。マウス細胞系である J774A.1 を、1.5 g/L 炭酸水素ナトリウムおよび 4.5 g/L グルコース、10 % 胎児ウシ血清を含有するように調整された、4 mM L-グルタミンを含む RPMI 1640 培地中に維持した。完全な RPMI (C-RPMI) 培地は、2 mM グルタミン、0.1 mM 非必須アミノ酸、ならびに 1.0 mM ピルビン酸ナトリウムおよび 10 % 胎児ウシ血清を補足した RPMI 1640 を含有した。

10

【0455】

PSA/pCDNA3.1 ワクチンの構築

【0456】

そのシグナル配列を含めた PSA の全オープンリーディングフレームを、XbaI および XhoI 部位において pCDNA3.1⁽⁻⁾ ベクターバックボーン (Invitrogen) にクローン化した。このプラスミドにおいて、PSA の発現は CMV プロモーターの制御下にあり、293 細胞系 (ATCC) への一過的なトランスフェクションによって確認された。トランスフェクトされた細胞による PSA の分泌は、抗 PSA ELISA キット (American Qualex, San Clemente, CA) を用いて培養された細胞の上澄液中で確認された。プラスミド GM-CSF/pCDNA は University of Pennsylvania, Philadelphia, PA の Vonderheide 博士からの親切な贈物であった。

20

【0457】

Lm-LLO-PSA ワクチンの構築

【0458】

(その分泌シグナル配列を排除する) ヒト PSA についてコードする遺伝子を、pfx ポリメラーゼ、順方向オリゴ: gtgCTCGAGattgtggaggcctggagggtg (配列番号: 58) および逆方向オリゴ: gatACTAGTtttaggggttgccacgattgg (配列番号: 59) を用いて増幅した。pGG55 における LLO への融合としての PSA のフレームクローニングで用いた 2 つの制限部位 XhoI および SpeI は大文字で示す。LLO-PSA 融合蛋白質の翻訳を停止させるための停止コドンは逆方向オリゴにおいて下線を施す。増幅された PSA を、制限部位 XhoI および SpeI の間にて、LLO の N 末端における最初の 441 アミノ酸に対する融合蛋白質 (pAdv34, 図 12) としての、Lm プラスミド pGG55 にクローン化した。得られたプラスミドを配列決定して、突然変異の不存在を確認した。プラスミド pAdv34 を (ゲノム prfA 遺伝子を欠如する) Lm 株 XF7 にエレクトロポレーションし、それは、元来、ストレプトマイシン耐性株 Lm10403s に由来した。プラスミド (Lm-LLO-PSA) を含有するリステリア e を、ブレインハートインフュージョン (BHI/Chl/S) プレート上でクロラムフェニコール (34 μg/ml) および 250 μg/ml のストレプトマイシンを用いて選択した。クローンを PCR によってスクリーニングして、PSA 遺伝子の存在を確認した。

30

40

【0459】

LLO-PSA のサブクローニング

【0460】

その分泌シグナル配列を欠如する、切形された PSA オープンリーディングフレーム (GenBank アクセス番号 NM_001648) の最初の 24 AA を、プライマー: Adv60-PSA (XhoI-ATG なし) F: gtgCTCGAGattgtggagg

50

g g c t g g g a g t g (配列番号: 58) および Adv61-PSA (SpeI-StoP) R: g a t A C T A G T t t a g g g g t t g g c c a c g a t g g (配列番号: 59) を用いて増幅し、LLOの最初の441アミノ酸とインフレームにてサブクローンした(図12)。プラスミドバックボーンpGG55(実施例1)もまた、リステリア病原性遺伝子prfAのコピー、およびグラム陽性およびグラム陰性細菌株双方においてクロラムフェニコール耐性とする2つのクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子のコピーを有する。LLO-PSAのAA配列は以下の通りである:

【0461】

MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKENSSISSM
 APPASPPASPKTPIEKKHADEIDKYIQGLDYNKNNVLVYH
 GDAVTNVPPrKGYKDGNEYIVVEKKKKKSINQNNADIQVVN
 AISSLTYPGALVKANSELVENQPDVLPVKRDSLTLSDLP
 GMTNQDNKIVVKNATKSNVNNNAVNTLVERWNEKYAQAYPN
 VSAKIDYDDEMAYSESQLI AKFGTAFKAVNNSLVNNGFAI
 SEGKMQEEVVSFKQIYYNVNVNEPTRPSRFFFGKAVTKEQL
 QALGVNAENPPAYISSVAYGRQVYLKLSSTNSHSTKVKA AF
 DAAVSGKSVSGDVELTNI IKNSSFKAVIYGGSAKDEVQII
 DGNLGLDRDILKKGATFNRETPGVPIAYTTNFLKDNE LAV
 IKNNSEYIETTSKAYTDGKINIDHSGGYVAQFNISWDEVN
 YDLEIVGGWEC EKHSQPWQVLVASRGRAVCGGVLVHPQWV
 LTA AHCIRNKSVILLGRHSLFHPEDTGQVFQVSHSFPHPL
 YDMSLLKNRFLRPGDDSSHDLMLLRLSEPAELTD AVKVM D
 LPTQEPALGTTTCYASGWGSI EPEEFLLTPKKLQCVDLHVIS
 NDVCAQVHPQKVTKFMLCAGRWTGGKSTCSGDSGGPLVCY
 GVLQGITSWGSEPCALPERPSLYTKVVHYRKWKIKDTIVAN
 P (配列番号: 54; PSAに下線を施す)。

【0462】

位置N221Yにおいて、このPSA、およびNM_001648中の配列の間に1つのAAの差がある。pGG55-LLO-PSAをリステリア・モノサイトゲネス XFL-7にエレクトロポレーションした(実施例1)。

【0463】

細菌ワクチン株の成長および貯蔵

【0464】

組換えリステリア-PSAを、37℃にて、シェーカーインキュベーター中で、34 μg/mlクロラムフェニコールおよび250 μg/mlストレプトマイシンの存在下で、動物産物がない培地(Modified Terrific Broth)中で成長させた。対数成長相を示す0.5の光学密度(OD₆₀₀)に到達した後、細菌を遠心によって収集し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で2回洗浄し、2%グリセロールを含有するPBS中に再懸濁し、次いで、アリコットし、-80℃で貯蔵した。1つのアリコットを1日のうちに解凍し、滴定して、細菌力価(コロニー形成単位/ml)を決定した。このようにして貯蔵したリステリアワクチンは1年まで安定である。次いで、これらのアリコットを解凍し、1×10⁷ CFU/用量で希釈し、以下のように、免疫原性実験で用いた。

【0465】

Lm-LLO-PSAによるLLO-PSAの発現

【0466】

Lm-LLO-PSAコロニーを37℃および225 rpmにおいて、BHI/Chl/Sブロス中で8時間成長させた。細菌を10,000 gでの遠心によって5分間で培養基から分離し、上清を回収した。培養上清中の蛋白質を、4℃の10% v/vのトリクロロ酢酸の存在下で少なくとも1時間沈殿させ、4ないし20%ゲル上でSDS-PAGEによって分離した。蛋白質をPVDF膜に移した後に、LLO-PSA融合蛋白質を、

ウサギポリクローナル抗 L L O (ハウスにおいて作成) または抗 P S A 抗体 (Sigma) いずれかでのイムノプロテイングによって検出した。シグナルはWestern-Breeze発色性キット (Invitrogen) を用いて発色させた。

L m - L L O - P S A のイン・ビボ継代

【0467】

L m - L L O - P S A をイン・ビボにて2回継代した。簡単に述べれば、 1×10^6 C F U の用量の L m - L L O - P S A を6ないし8週齢のマウスに腹腔内 (i . p .) 注射した。脾臓を注射から3日後に収獲し; 単一細胞懸濁液を脾臓から調製し、B H I / C h l / S プレートで平板培養して、L m - L L O - P S A 成長について選択した。第一の継代からの L L O - P S A 陽性コロニーを用い、この腫瘍をさらに1回反復した。2回のイン・ビボ継代後に回収された L m - L L O - P S A コロニーを L L O - P S A 分泌についてテストした。単一クローンを選択して、プラスミド D N A 配列決定、腫瘍の実験および他の機能アッセイのために用いた。

10

【0468】

イン・ビボ病原性実験

【0469】

病原性実験を行って、マウスにおける L m - L L O - P S A の安全な用量を決定した。4匹の雄 C 5 7 B L / 6 マウス (7週齢) の2つの群に2つの異なる用量の L m - P S A : 1×10^8 および 5×10^7 C F U / 用量で腹腔内注射した。マウスを、接種から5日後まで疾患の兆候についてモニターした。

20

プラスミド配列決定

【0470】

L m - L L O - P S A を、 37°C および 225 rpm において、 200 ml の B H I / C h l / S 中で一晩成長させた。細菌を、 4°C の10分間の $10,000\text{ g}$ における遠心によって培養ブロスから分離した。細菌ペレットをリゾチウム (2 mg / ml) で 37°C にて30分間処理して、細胞壁を破壊した。プラスミド p A d v 3 4 を、製造業者の指示に従って、P u r e L i n k プラスミドミニプレップキット (Invitrogen) を用いて精製し、ジデオキシ鎖ターミネーター方法によって全部を配列決定した。

【0471】

結果

30

【0472】

切形された P S A (カリクレイン関連ペプチダーゼ3) に融合された非溶血性 L L O を発現するリステリア株を作成した。得られた組換えリステリア株は L L O - P S A についての予測されたサイズ (75 Kd) の蛋白質を分泌し、これは抗 L L O および抗 P S A 抗体双方によって検出され、これは、L L O - P S A 蛋白質が発現され、分泌されたことを示す (図13)。

【0473】

P S A を発現する組換えリステリア・モノサイトゲネスの作成。ヒト P S A についてコードする遺伝子を、そのN末端において保存された P E S T 配列を含有する L L O の切形された非溶血性セグメントとの融合蛋白質としてクローン化した (図12)。従前に記載されているプラスミドバックボーン p G G 5 5 は、ゲノム病原性因子 p r f A が欠如している減弱化 L m 株 X F L 7 によるエピソード起源からの L L O 融合蛋白質の発現および分泌を可能とする。p r f A 遺伝子は L m のイン・ビボ生存に必要とされ、かくして、プラスミドに運ばれたコピーによって補充される。P S A シグナル配列を欠失させて、L m - L L O - P S A における L L O 分泌シグナル配列によって媒介される、L L O - P S A 融合蛋白質の適切な分泌でのこの配列のいずれの介入も回避した。

40

【0474】

L m - L L O - P S A は L L O - P S A 融合蛋白質を発現し、分泌できる。L m からの L L O - P S A 融合蛋白質の発現および分泌を、細菌のイン・ビトロ成長後に細胞培養上澄においてテストした。本発明者らは L m - L L O - P S A の4つのコロニーをテストし

50

、全ては、抗LLOおよび抗PSA抗体双方で検出された融合蛋白質LLO-PSAを分泌することができた（図13）。この分泌は、マウスにおける2回のイン・ビボ継代後に単離された細菌において維持され（データは示さず）、これは、プラスミドはイン・ビボにて少なくとも3日間安定であって、保持されることを示唆する。安定性を確認するために、pAdv34を継代されたLm-LLO-PSAから抽出し、全部を配列決定した。本発明者らの参照プラスミドpGG55およびヒトPSA遺伝子配列（NCBI：NM_001648）と比較して、2回のイン・ビボ継代後に、プラスミドバックボーンまたはPSA遺伝子において検出される突然変異はなかった。Lm-LLO-PSAの安全な用量が動物実験で用いられるかを決定するために、この構築体の2つの用量を腹腔内注射（ 1×10^8 および 5×10^7 CFU/用量）によってマウスにおいてテストした。動物実験で用いた用量（ 1×10^7 CFU/マウス）を、免疫化されたマウスに対する有害効果を有することが観察された最低の用量の $1/10$ と定義した。

10

【0475】

Lm-PSAのイン・ビトロ安定性をテストするために、株を、修飾されたテリフィックブロス中で7連続日の間成長させ、継代した。この時点の後に、細菌はプラスミドを保持し、プラスミドはPSA遺伝子を含み、プラスミドにおいて欠失または再編成はなく、プラスミドの安定性を示す（図22）。

【0476】

Lm-PSAのイン・ビボ安定性をテストするために、株をマウスを通じて2回継代した。次いで、プラスミドをGenewiz（商標）によって配列決定し、次の配列を有することが判明した：

20

【0477】

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

30

40

50

TATCCGGTAAC TATCGTCTTGTAGTCCAACCCGGAAAGACA
TGCAAAAGCACCACTGGCAGCAGCCACTGGTAATTGATTT
AGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCAATGCGCCGGTTAAGGCTAA
ACTGAAAGGACAAGTTTTGGTGACTGCGCTCCTCCAAGCC
AGTTACCTCGGTTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGAGAACCCTT
CGAAAAACCGCCCTGCAAGGCGGGTTTTTTTCGTTTTTCAGAG
CAAGAGATTACGCGCAGACCAAAACGATCTCAAGAAGATC
ATCTTTATTAATCAGATAAAAATATTTCTAGCCCTCCTTTGA
TTAGTATATTTCTATCTTAAAGTTACTTTTATGTGGAGGC
ATTAACATTTGTTAATGACGTCAAAAGGATAGCAAGACTA 10
GAATAAAGCTATAAAGCAAGCATATAATATTGCGTTTTCAT
CTTTAGAAAGCGAATTTTCGCCAATATTTATAATTATCAAAAG
AGAGGGGTGGCAAACGGTATTTGGCATTTATTAGGTTAAAA
AATGTAGAAAGGAGAGTGAAACCCCATGAAAAAAATAATGCT
AGTTTTTTATTTACACTTTATATTTAGTTAGTCTACCAATTGCG
CAACAAACTGAAGCAAAAGGATGCATCTGCATTCAATAAAG
AAAAATTCAATTTTCATCCATGGCACCCAGCATCTCCGCC
TGCAAGTCCTAAGACGCCAATCGAAAAAGAAACACGCGGAT
GAAATCGATAAGTATATACAAGGATTGGATTACAATAAAA
ACAATGTATTAGTATACCACGGAGATGCAGTGACAAATGT 20
GCCGCCAAGAAAAAGGTTACAAAGATGGAAATGAATATATT
GTTGTGGAGAAAAAGAAAGAAATCCATCAATCAAAATAATG
CAGACATTTCAAGTTGTGAATGCAATTTTCGAGCCTAACCTA
TCCAGGTGCTCTCTCGTAAAAGCGAATTCGGGAATTAGTAGAA
AATCAACCAGATGTTCTCCCTGTAAAACGTGATTCTATTAA
CACTCAGCATTTGATTTGCCAGGTATGACTAATCAAGACAA
TAAAATAGTTGTAAAAAATGCCACTAAATCAAAACGTTAAC
AACGCAGTAAATACATTTAGTGGAAGATGGAAATGAAAAAT
ATGCTCAAGCTTTATCCAAATGTAAAGTGCAAAAAATTGATTA
TGATGACGAAATGGCTTTACAGTGAAATCACAAATTAATTGCG 30
AAATTTTGGTACAGCATTTTAAAGCTGTAAATAATAGCTTGA
ATGTAAACTTTCGGCGCAATCAGTGAAAGGGAATAATGCAAGA
AGAAGTCATTAGTTTTTAAACAAATTTACTATAACGTGAAT
GTTAATGAACCTACAAGACCTTCCAGATTTTTTTCGGCAAAG
CTGTTACTAAAGAGCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAAATGC
AGAAAAATCCTCCTGCATATATCTCAAGTGTTGGCGTATGGC
CGTCAAGTTTTATTTGAAATTAATCAACTAATTTCCCATAGTA
CTAAAGTAAAAAGCTGCTTTTTGATGCTGCCGTAAAGCGGAAA
ATCTGTCTCAGGTGATGTAGAACTAACAAATATCATCAAA
AATTCCTTCCTTCAAAGCCCGTAATTTACGGAGGTTCCGCAA 40
AAGATGAAGTTCAAATCATCGACGGCAACCTCGGAGACTT
ACGCGATATTTTTGAAAAAAGGCGCTACTTTTAAATCGAGAA
ACACCAGGAGTTCCCATTTGCTTTATACAACAAACTTCTCTAA
AAGACAATGAATTAGCTGTTATTA AAAACA ACTCAGAAATA
TATTGAAACA ACTTCAAAGCTTTATACAGATGGAAAAATT
AACATCGATCACTCTGGAGGATACGTTTGCTCAATTCAACA
TTTTCTTGGGATGAAGTAAATTTATGATCTCGAGattgtggg
aggctgggagtgcgagaaagcatcccaaccctggcagggtg
cttggtggccctctcgtggcaggggcagtcctgcggcggtgttc
tggtgcacccccagtggggtccctcacagctgcccactgcat 50

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

TTCTTCTCGCTTTCGGGCGGCATCGGGATGCCCCGCGTTTGCA
GGCCATGCTGTCCAGGCAGGTAGATGACGACCATCAGGGA
CAGCTTCAAGGATCGCTCGCGGGCTCTTACCAGCCTAACTT
CGATCATTTGGACCGCTGATCGTCAACGGCGATTATGCCGC
CTCGGCGAGCACATGGAACGGGTGTGGCATGGATTGTAGGC
GCCGCCCTATACCTTTGTCTGCCTCCCCGCGTTGCGTCGCG
GTGCATGGAGCCGGGCGCACCTCGACCTGAATGGAAGCCGG
CGGCACCTCGCTAACGGATTACCACTCCAAGAAATTGGAG
CCAATCAATTCTTTGCGGAGAACTGTGAATGCGCAAACCAA
CCCTTTGGCAGAACATATCCATCGCGCTCCGCCATCTCCAGC
AGCCGCGACGCGGCGCATCTCGGCTTTTCGATTTTGTTTTTTGA
ATGGTTTTATCCGATAAAGAAAGTTGAAGAACAAACTGGAAAT
CAATCGCCGAAACGTTTTAGAAAGGTATCGAGCAAAGATATAAC
GTGACAGTCGATCAAAGAAAAAACAATGAAAAAGAGGGATA
GTTAATGAGTACGGTTATTTTTAGCTGAAAAAACCAAGCCAG
GCATTAGCCTACGCAAGTGCTTTAAAAACAAGCACCAAAA
AAGACGGTTATTTTTGAGATCAAAGACCCACTATTTACAGA
TGAAACGTTTTATCACCTTTTGGTTTTTGGGCATTTAGTGGAA
TTAGCAGAACCCAGGTCATTTATGACGAAAAAGTGGCAAATAAT
GGAAACTTTGAATCTTTTGCCGATTTTTTCTCTGATCGATACGA
TTTTTGAAGTTTGCAAAAGATAAGGGAAAGCAGTTTAAAAATT
GTTGCAAGAACTTCTCAAAAAGGCAAAATACAATTATTGTTG
CAACAGATAGCGACAGAGAAAGGTGAAAAATATCGCCTGGTTC
GATTTATCCATAAAGCAAATGCTTTTTCAAAAAGATAAAAACA
TTTAAAAAGACTATGGATCAATAGCTTAGAAAAAGATGTAA
TCCGAAGCGGTTTTTCAAAAATTTGCAACCTGGAATGAATT
CTATCCCTTTTTATCAAGAAAGCGCAAACACGCCAAATTGCC
GATTTGGTTGATCGGCGATGAACGCAAGCCCTTTGTATACGT
TAAATTTTACAACAGAAAGGGCGGTACAAGGTACATTTTTCAC
AGGACGTGTTCAAAACGCCCACTTATACCTTATTTTTTTCAG
CGCCAGGAAGCCATAGAGAAATTTTAAAAAAGAAACCTTTTT
TCGAGGTGGAAGCTAGTATAAAAGTAAACCAAGGGTCTGTT
TAAGGGCGGTTCTAAGCCCCACACAGCGTTTTTAAAAACCCAA
GAGGAGCTTTTTAGCTTTTTGTTTTCTTCTAAACAAGCTAAAA
TAGGCAATCAAGAGGGGATAATTGCTGATGTTCAAAACCAA
AGAGAAGAAAAACGAATAGTCCGAGTTTTGTTTTCTTTAAGT
AGTTTGCAATCAAAAGTCAATCAGCTTTTATAAAGCGACAG
CGAGCCAAACTTTAAAAAGCTATTTTCTTTTTTTAATAACTTA
AAAAATAAACTTTAATGTAAACAGCAAGCACAGTCAAGGTATA
CACCTTTTGACAAAAAATAGCACATTCCTCTATCGAAAAATTT
TTGCTTATTTTTTTTAAATTATTTTGGGAAATTTTCCCAATC
CCTTTTTTCTAACTCAAAAAAATAATAATCACTCAAAAAATTTAA
AAGGGCGCACCTTATACATCATTTTTTAAAAAAATTTGATGTAA
GTGCTAAGTTTCAAAACAAAGGGCGCACCTTATACACGATTT
TCAATCTTGTATATTTCTAACGAAAAAGCGTGCGCCAAAAAA
ACCCCTTTCGTCAATTTTTGACAGGGGGCTTTTTTGATGTAA
AAATTTTCTATCGAAATTTTAAAAAATTCGCTTTCACCTCATGTT
ATAAAGACTTTAAAAATAAAATAAATCTTTTAAAAATCTTTTGC
TAGTTGTTCTTCAATATTTTTTTTATTCGGTGCATCTTCCAA
GTAAAGTATAACACACTAGACTTATTTTACTACGTTTTCTATA

AGTCATTAAATGCGTGCTCTGCGAGGCTAGTTTTTTGTGC
AAGCACAAAAAATGGACTGAATAAATCAGTCCATAAGTTTC
AAAACCAAATTCAAAAATCAAAACCAAGCAACCAAAAAA
TGTGGTTTGTATACGTTTCATAAATTTTATGATCACTTACG
TGTATAAAAATTAATAATTCACCTTTCAAAAATCTAAAAA
TCCAATCATCTACCCCTATGAATTTATATCTTGAAATTCATT
CATAAATAGTGAAGCATGGTAACCATCACATACAGAATGA
TGAAGTTGTCAGAGCAACTGGGTATATAAATTTTATTATCT
CACTATAAAAATTTACCTATCGTAAATAAATAGGCAATAAAA
GCTGCTATTGTTTACCAATATTTTAAATTTAAATGAACATAAAA
TCAATCCAAGGAATCATTTGAAATCGGGTATGGTGTTTTTTCAG
GTATCGGTTTTTTTTAGGAAACATTTCTTCTTTATCTTTATA
TTCAAGCAAGTTCATTTTTTATAATTTATTAATAAAGAAATG
AAGTTTTTTATCAGATTCAGTCCAAATGTTAGTAAATTTTTT
CAGTTTTGCTTATTAAAAAAGTGTATACAAAGGATTTAACTT
ATCCCAATAAACCTAATTTTATTTCTCACTATTAAATTCCTGTT
CTAAACACTTTTATTTTTTATTTTACAACCTTCCATAATTGCAT
AAATTTAAAGAGGGATAAATTTTCATATCCTTTTCTTTTTTAT
CATATCTTTTAAACAAAGTAATATCAATTTCTTTTAGTAATG
CTATAAGTAGTTTTGCTGATTAAAAATAGTGTTCAAAAATATT
CTTTTTCTATCCCAATTTTCTAATTCAAATAATATTAAAGT
CATATATAACTTTCCTCCTAAATTTTTTAAATTTTTTATATTTA
GGAGGAATAATCCTCTGATTTTTTTTCATACGTTATGTCACC
TCGTAAATATTTAATTTATACTGAATTTAGCAATTTTTTTATCAA
ATAAAACTTTATTTTTACTTCCAAACCTAAATTCACGTTGTC
CAAAAAATCAATCTGCTTTTTTGCAATTTGTTTTTCTGTTCTGCTT
TTAAAGTCGATTTTCATTTAATTTCCGTTAAATCAATTTGGAGA
TATTTTCTCTAATCAATTTTTTTTAAATTTTAGTCTTAGTATTC
TTACTTAGCTTTTCCCCACATACCTTTCTTTCATGCAACAAAG
TATAAACCATAGCTTTGCTCATTTAATTTTTTTCTAAAGTAGC
CCACGCGAGGTTTCAAGATGTGTAAATCATTTAAACCAATCA
TTCCAGTAATCAACCATATCTCTTTTTTAAATTCAACTTCTA
CACGCCATAAATGTTTCAGACACAACCTTCAACATCTGCGGTT
ATCTTTTACGTTTCTTGTTTTTTTTATTTATAAATTCATAATAAAT
CTATCACTATCACGGACACCAAAATATTTTTGTTTTCTGGCT
TGCCATTACGACCATAAAAAACAGTTTTTCTTAACTGCTTTT
ATCAGTCATTGCAATAGTAATCGCTCAAAATCATCTTCAAAA
TCAAAAGCTAAGTCTAATCTTTGTAAACCGGTCATCTTCCA
TGTAGTCGATAAATATTTTTGTTTTTAAACCAAAATCATTTCTTC
ATGTGTGAGTTTTATTGGGATTAAATTTCAACACGCATATTAA
CGTCTATCCCAAGTATCTGCTTTTTTACTTTGTTCATATTCTGA
TATAAACTTTTTTCTTGAAGTGCCTTAGCTTTTAAACTTTTGT
TTGAAGTATATCCCAAGTCTGTAATTTGTGGCTCTACACTC
ATAAAGTCAGATAGCTTTTTTAGCATTAGTTTTGTTCAAAT
TTCCAACGATTGTTCATGGCATCAAAACTTTAATGCGGGTTG
AGATTTTTCCCAAGTTTTGACCACTTAACCGGCTATTACTT
AACCGGCTATTAGAGACGGAACTAACTCAACGCTAGTAGT
GGATTTTAAATCCCAAAATGAGCCAAACAGAACCAAGAACCA
ACAGAACAAAGTAACATTTGGAGTTAGAAATGGAAGAAAGAAA
AAAGCAATGATTTTCGTGTGAATAATGCACGAAATCATTTGC

TTATTTTAAAGCGATATACTAGATATAACGAAACA
ACGAACCTGAATAAAGAAATACAAAAAAGAGCCACGACCAG
TTAAAGCCTGAGAAACTTTAACTGCGAGCCTTAATTGATT
ACCACCAATCAATTAAAGAAAGTCGAGACCCAAAAATTTGGT
AAAGTATTTAATTACTTTATTAATCAGATACTTAAATATC
TGTAACCCATTATATTCGGGTTTTTTGAGGGGATTTCAAGT
CTTTAAGAAAGATACCAGGCAATCAATTAAAGAAAAACTTAG
TTGATTGCTTTTTTTTGTGTGTGATTCAACTTTGATCGTAGC
TTCCTAACTAATTAAATTTTCGTAAAGAAAGGAGAACAGCTGA
ATGAATATCCCTTTTTGTGTGTAGAAACTGTGCTTTCATGACG 10
GCTTGTTAAAGTACAAATTTTAAAAAATAGTAAAAATTCGCTC
AATCACTACCAAGCCAGGTAAAAAGTAAAGGGGCTATTTTTT
GCGTATCGCTCAAAAAAAGCATGATTGGCGGACGTGGCG
TTGTTCTGACTTCCGAAGAAAGCGATTTCACGAAAAATCAAGA
TACATTTTACGCATTGGACACCAAAACGTTTTATCGTTATGGT
ACGTATGCGAGACGAAAAACCGTTTCATACACTAAAGGACATT
CTGAAAAACAATTTAAGACAAATCAATACCTTCTTTATTGA
TTTTTGATATTTCACACGGAAAAAAGAAACTATTTTCAGCAAGC
GATATTTTAAACAACAGCTATTGATTTTAGGTTTTTATGCCCTA
CGTTAATTATCAAAATCTGATAAAGGTTATCAAGCATATTT 20
TGTTTTTAGAAACGCCAGTCTATGTGACTTCAAAAAATCAGAA
TTTAAATCTGTCAAGCAGCCAAAAATAATCTCGCAAAAAATA
TCCGAGAATATTTTTGGAAAGTCTTTGCCAGTTGATCTAAC
GTGCAATCATTTTTTGGGATTGCTCGTATACCAAGAACGGAC
AATGTAGAATTTTTTTTGATCCCAATTACCGTTATTCTTTCA
AAGAATGGCAAGATTGGTCTTTCAAAACAACAGATAATAA
GGGCTTTTACTCGTTTCAAGTCTAACGGTTTTTAAGCGGTACA
GAAGGCAAAAAACAAGTAGATGAACCCCTGGTTTTAATCTCT
T
ATTGCAACGAAACGAAATTTTTTCAGGAGAAAAAGGGTTTTAGTA 30
GGGCGCAATAGCGTTATGTTTTACCCCTCTCTTTTAGCCTACT
TTAGTTTCAGGCTATTCAATCGAAACGTGCGAATAATAATAT
GTTTTGAGTTTAAATAATCGATTAGATCAACCCCTTAGAAGAA
AAAGAAGTAATCAAAATTTGTTAGAAAGTGCCCTATTCAGAAA
ACTATCAAGGGGCTAATAGGGAATACATTACCATTTCTTTG
CAAGCTTTGGGTATCAAGTGATTTTAAACCAGTAAAGATTTA
TTTGTCCTGTCAGGGGTGGTTTTAAATTCAGAAAAAAGAA
GCGAACGTCAACGTGTTTCATTTGTCAGAAATGGAAAGAAAG
TTTAATGGCTTTATATTAGCGAAAAAAGCGATGTATACAAG
CCTTATTTAGCGACGACCAAAAAAAGAGATTAGAGAAGTG 40
TAGGCATTTCTGAAACGGACATTAGATAAATTTGCTGAAGGT
ACTGAAGGCGAATCAGGAAATTTTTCTTTAAGATTAAACCA
GGAAGAAATGGTGGCATTCAACTTTGCTAGTGTTAAATCAT
TGTTGCTATCGATCATTAATAATTAAAAAAAGAAAGAACGAGA
AAGCTATATAAAGGCGCTGACAGCTTTCGTTTTAATTTAGAA
CGTACATTTATTCAAGAAACTCTAAACAATAATTGGCAGAAC
GCCCCAAAAACGGACCCACAACCTCGATTTGTTTTAGCTACGA
TACAGGCTGAAAAATAAAACCCGCCTATGCCATTACATTT
ATATCTATGATACGTGTTTTGTTTTTTCTTTGCTGTTTTAGTG
AATGATTAGCAGAAATATACAGAGTAAGATTTTTAATTAAAT 50

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

G A C G A A A A C A T A T T C T C A A T A A A C C C T T T A G G G A A A T A G
G C C A G G T T T T C A C C G T A A C A C G C C A C A T C T T G C G A A T A T A
T G T G T A G A A A C T G C C G G A A A T C G T C G T G G T A T T C A C T C C A
G A G C G A T G A A A A C G T T T C A G T T T G C T C A T G G A A A A C G G T G
T A A C A A G G G T G A A C A C T A T C C C A T A T C A C C A G C T C A C C G T
C T T T C A T T G C C A T A C G G (配列番号：55)。該配列は、p G G 55にクロ
ーン化されたP S Aの正確に予測された配列にマッチする。L L O - P S Aオープンリー
ディングフレームに下線を施し、より低い場合の文字はP S A単独の配列を示す。

【0478】

実施例8：リステリアーL L O - P S A構築体は抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球を誘
導し、腫瘍保護を提供する－I

10

【0479】

材料および実験方法

【0480】

C T Lアッセイ

【0481】

雄C 5 7 B L / 6 マウスを0. 1 L D 5 0 のL m - P S Aまたは0. 1 L D 5 0 のL m
- H P V 1 6 E 7 E 6 T Mのいずれかで腹腔内免疫化し、2週間後に1回ブースター注射
する。脾臓をブーストから6日後に収穫した。単離された脾臓細胞を調製し、フィーダー
としてのマイトマイシン処理P S Aワクシニア感染M C 5 7 G細胞で5日間刺激した。最
初の実験において、以下のE : T比率2 5 : 1、8 : 1、2. 8 : 1、0. 9 : 1、0.
3 : 1、0. 1 : 1および0. 0 3 : 1を用い、1 0 0 μ Mのユーロピウム (Sigma) で
標識した標的としてのP S A H 2 D bペプチド (1 μ M, H C I R N K S V I L ; 配列
番号：60) でパルスしたE L 4細胞を用いてC T Lアッセイを行った。混合された標的
およびエフェクターの4時間のインキュベーション後に、細胞を遠心によって培養上清か
ら分離した。上清中の溶解した細胞からの放出されたユーロピウムを以下のように決定し
た：1 0 μ lの上清を1 0 0 μ lのユーロピウム増強溶液 (Delfia) に加えた。V i c t
o r I I分光計 (Perkin Elmer) を用い、吸光度を5 9 0 n mで読んだ。ユーロピウム
の最大放出は、1 %トリトンX - 1 0 0を含む標識標的細胞の上清から決定し、自然放出
は、エフェクター細胞の不存在下においてインキュベートされた標的細胞から決定した。
第二の実験において、E : T比率を2 5 : 1に一定に保ち、ペプチド濃度を示されたよう
に変化させた。パーセント特異的溶解は [(実験放出 - 自然放出) / (最大放出 - 自然放
出)] × 1 0 0として計算した。

20

30

【0482】

サイトカイン分泌アッセイ

【0483】

雄C 5 7 B L / 6 マウスをL m - P S Aまたはウィルムス腫瘍抗原の異なる断片を発現
するリステリアのいずれかで免疫化し (陰性対照)、あるいは免疫化しないまま放置した
。マウスを2週間後に1回ブースター注射し、ブーストから6日後に脾臓を収穫した。単
離された脾臓細胞を調製し、1 μ M P S A H 2 D bペプチドの存在下でイン・ビトロ
にて一晚刺激した。単離された脾臓細胞によるI F N - γ分泌はE L I S p o tアッセイ
によって決定した。

40

【0484】

細胞培養、材料および試薬

【0485】

C 5 7 B L / 6 マウス前立腺腫瘍に由来するT R A M P - C 1マウス前立腺腺癌はA T
C Cから購入した。細胞系はP S A発現について陰性である。細胞を、0. 0 0 5 m g /
m l ウシインスリンおよび1 0 n Mデヒドロイソアンドロステロン、9 0 % ; 胎児ウシ血
清、5 % ; N u血清I V, 5 %を補足した、1. 5 g / L炭酸水素ナトリウム、および4
. 5 g / Lグルコースを含有するように調整された4 m M L - グルタミンを含むダルベ

50

ッコ修飾イーグル培地中に細胞を維持した。そのシグナル配列を含めた全長ヒト P S A 蛋白質をコードする遺伝子を p U V 6 / v 5 プラスミド (Invitrogen) にサブクローンした。正しい配列の確認後、プラスミドを線状化し、Lipofectamine 2000 (商標) (Invitrogen) を用いて T R A M P - C 1 細胞にトランスフェクトした。陽性クローンを $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ プラスチジンの存在下で選択した。いくつかの安定に発現する P S A クローンを単離し、ヒト P S A の細胞培養基への分泌をテストした。

【0486】

皮下腫瘍接種

【0487】

P S A 発現 T R A M P - C 1 細胞の 2 つの異なるクローンを、 200mc l 用量当り 5×10^6 細胞にて再懸濁した。雄 C 5 7 B L / 6 マウス (群当たり 8, 6 ないし 8 週齢) を左側脇腹に皮下接種した。

【0488】

腫瘍退行実験

【0489】

腫瘍接種から 7 日後に、マウスを 0.1LD_{50} の L m - P S A (10^7CFU)、 0.1LD_{50} の L m - H P V 1 6 E 7、または P B S いずれかで免疫化した。2 つのブーストを腫瘍接種から 15 および 25 日後に投与する。腫瘍を 90 日間モニターする。腫瘍のサイズを 2 つの垂直直径の平均として定義する。

【0490】

前立腺腫瘍細胞の同所性注射

【0491】

6 週齢雄 C 5 7 B L / 6 マウスを 2 % イソフルランで麻酔する。滅菌場において、より低い中線切開を行って、前立腺にアクセスする。後ろ側前立腺の左側葉に、 $50 \mu\text{l}$ Hamilton シリンジに契合させた 27 ゲージ針を用い、P B S 中の単一細胞懸濁液からの 1×10^5 T R A M P C - 1 / P S A 腫瘍を注射した。マウスを縫合し、縫合糸を外科的処置から 10 日後に除去する。7 日後に、マウスを L m - P S A、L m H P V 1 6 E 7 または P B S で静脈内免疫化する。マウスを異なる時点で犠牲にし、前立腺を外科的に摘出し、腫瘍成長の決定のために重量を測定する。

【0492】

腫瘍保護実験

【0493】

C 5 7 B L / 6 マウスを免疫化し、先の実施例に記載したように、L m - P S A、L m H P V 1 6 E 7 または P B S でブースター注射する。ブーストから 7 日後に、マウスに 5×10^6 T R A M P C - 1 / P S A 腫瘍細胞を皮下注射する。腫瘍の成長は、キャリパーで 90 日間測定することによってモニターする。

【0494】

前立腺癌転移の阻害

【0495】

同所性腫瘍インキュベーションのために 8 ないし 10 週齢の雄 C 5 7 B L / 6 マウス (Jackson labs) をイソフルランで麻酔する。包皮腺に対して頭側の下腹部皮膚切開を行い、精嚢を注意深く外部に取り出して、後一側前立腺を露出させる。29 ゲージインスリンシリンジを用い、P B S に懸濁させた 5×10^5 T R A M P C - 1 / P S A 細胞を、 $20 \square \text{L}$ 容量にて後一側前立腺に注射する。精嚢および前立腺を 1 分間保持して、注射された細胞を該腺に沈降させ、次いで、腹腔に穏やかに再度入れる。体壁および閉じた皮膚創傷を、各々、5-0 P D S および 5-0 ナイロンで閉じた。

【0496】

腫瘍を 50 日間発達させる。一次腫瘍を剖検の間に取り出し、ホルマリン中で固定し、次いで、パラフィンに包埋させ、区分化し、H & E で染色する。? 部領域からの拡大されたリンパ節を外科的顕微鏡観察下で可視化し、次いで、切開し、固定し、包埋し、前立腺

癌細胞について組織学的に分析する。

【0497】

腫瘍免疫染色

【0498】

ホルマリン固定前立腺腫瘍細胞をパラフィン包埋し、区分化し、Plus slides (商標) (VWR Corp) に適用し、次いで、Dako自動染色機システムを用いて染色する。スライドを3.0%過酸化水素で10分間予備処理し、次いで、濯ぎ、プロテイナーゼK溶液の $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液で3分間処理して、抗原の検索を高める。非特異的結合部位を正常なヤギ血清の添加によって30分間ブロックし、次いで、ウサギ抗ヒトPSA抗体 (Sigma) またはウサギ抗ヒト増殖細胞核抗原 (AB15497, AbCam抗体) の $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液を組織に30分間適用する。一次抗体を洗浄によって除去し、適当な西洋ワサビペルオキシダーゼ標識二次抗体を30分間適用し、8分のインキュベーションにおいて、NovaRed (商標) 基質 (Vector Labs, Burlingame, CA) を用いて検出する。スライドを染色の前にヘマトキシリンで逆染色する。

10

【0499】

一次およびリンパ節セクションのスライドからの細胞を、ヒトPSAについて陽性または陰性としてスコア採りする。各スライドの4つの領域をランダムに選択し、各領域からの20細胞をスコア採りする。腫瘍におけるPSA染色を同一マウスからのリンパ節転移と比較する。

20

【0500】

リステリア株

【0501】

リステリアワクチンを調製し、従前の実施例に記載したように貯蔵する。

【0502】

結果

【0503】

LLO-PSAの免疫原性をテストするために、6ないし8週齢C57BL/6マウス (Jackson Laboratories) をLm-PSA (0.1LD_{50} , $1\times 10^7\text{CFU}/\text{用量}$)、またはLm-HPV16E7E6TM (陰性対照, 0.1LD_{50} , $1\times 10^6\text{CFU}/\text{用量}$) いずれかで腹腔内免疫化し、あるいは免疫化せずに放置した。ワクチン接種したマウスからの脾臓細胞を、CTLアッセイにおいてイン・ビトロでPSAペプチド提示細胞を認識し、それを溶解する能力についてテストした。免疫化されたマウスからの脾臓細胞は、高い効率にてPSAペプチドでパルスした腫瘍細胞を認識し、それを溶解することができた (図20A)。さらに、応答は、標的細胞によって提示された抗原の量に関して用量依存的であった (図20B)。

30

【0504】

さらなるアッセイにおいて、マウスを、Lm-PSA、またはWilms腫瘍抗原の断片を発現する株で免疫化し (陰性対照)、サイトカイン分泌を、PSAペプチドとのインキュベーション応答させて、決定した。ワクチン接種したマウスからの脾臓細胞は高レベルのIFN- γ 分泌を呈した (図18)。

40

【0505】

かくして、PSA発現LM株およびLLO-PSA融合は、標的細胞溶解およびIFN- γ 分泌が可能である抗原特異的CTLの誘導において効果的である。従って、PSA発現LM株およびLLO-PSA融合はPSA発現前立腺癌に対する治療および予防ワクチン接種において有効である。

【0506】

先の実施例に記載されたリステリアワクチンを、同所性前立腺癌腫動物モデルにおける腫瘍保護実験で用いる。マウスをLm-PSA、LmHPV16E7、またはPBSいずれかで免疫化し、次いで、TRAMP C-1 Lm-PSAでの注射は、マウスを腫瘍形成から保護する。

50

【0507】

さらなる実験において、マウスを、まず、TRAMP C-1 / PSA 前立腺癌細胞で注射し、4日後に、Lm-PSA、LmHPV16E7、またはPBSでワクチン接種し、同一ワクチンでブースター注射する。Lm-PSAは前立腺転移の成長を妨げる。

【0508】

かくして、PSA生産LM株およびLLO-PSA融合は腫瘍保護を誘導する。

【0509】

実施例9：リステリア-LLO-PSA構築体は抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球を誘導し、腫瘍保護を提供する-I I

【0510】

材料および実験方法

【0511】

イン・ビトロマクロファージ侵入実験。マウスマクロファージ様J774A.1細胞を24ウェルプレートのウェル当たり 1×10^6 にて平板培養した。後の日に、細胞を、抗生物質の不存在下で、異なるLm株で1:1のMOIで感染させた。細胞外細菌は、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のゲンタマイシンを含有する培地中で細胞を 37°C および $5\% \text{CO}_2$ にて30分間洗浄し、インキュベートすることによって排除した。細胞内細菌成長は、異なる時点において8時間まで試料を採取し、引き続いて、 dH_2O で細胞を溶解した後にBHIプレート上での細菌の滴定によってモニターした。

【0512】

抗腫瘍有効性。TRAMP C-1はC57BL/6マウスバックグラウンドでのマウス腺癌前立腺腫瘍細胞系であり、これを用いて、ワクチンとしての、Lm-LLO-PSAの効率をテストするためのPSA分泌前立腺腫瘍モデルを構築した。分子のN末端におけるその分泌シグナル配列を含めた、完全なヒトPSAオープンリーディングフレームを、プラスミドpUB6/V5 (Invitrogen)中のUbCプロモーターの制御下でクローン化した。得られたプラスミド(pAdv63)を、正しいPSA遺伝子配列の確認のために配列決定し、リポフェクトアミン2000 (Invitrogen)を用いてTRAMP C-1細胞系にトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のプラスチジン (Invitrogen)を含有する培地中で細胞を培養することによって選択した。単一クローンを限界希釈法によって単離し、抗ヒトPSA ELISAキットを用い、PSAの細胞外培養基の分泌のためにスクリーニングした。いくつかの陽性クローンが得られ、拡大培養し、液体窒素中で貯蔵した。1つのクローン(T-PSA23)をさらなる実験のために選択した。

【0513】

腫瘍退行実験。8匹の雄C57BL/6マウス(6ないし8週齢)の群を、 5×10^6 T-PSA23細胞で右横腹に皮下接種した。7日後に、腫瘍が4ないし5mmの平均直径に到達すると、それをLm-LLO-PSA(1×10^7 CFU/用量)、Lm-LLO-E7(1×10^8 CFU/用量)で腹腔内免疫化するか、または処理しなかった。Gunn et al.によって従前に記載されたLm-LLO-E7を、Lm-LLO-PSAと同様に構築したが、PSAの代わりに、それはHPV16E7を発現し、無関係なLm対照としてこの実験で用いた。免疫化を1週間間隔で2回反復した。腫瘍を7週間毎週モニターした。全ての実験動物からの血液試料を、尾静脈からの腫瘍接種後40日に収集し、血清中のPSA蛋白質の存在を、PSA ELISAキットを用いてテストした。比較実験のために、腫瘍細胞を前記したように注射したマウスをLm-LLO-PSA($200 \mu\text{l}$ PBS中 1×10^7 CFUs/用量)、組換えPSA-ワクシニア($200 \mu\text{l}$ PBS中の 1×10^7 PFU/用量の腹腔内投与)または $50 \mu\text{l}$ 容量中のPSA/pCDNA3.1($100 \mu\text{g}$)とGM-CSF/pCDNA3.1($100 \mu\text{g}$)との混合物を含むpDNAワクチンのいずれかで、左大腿四頭筋中への筋肉内注射によって2回免疫化した。電子キャリパーを用いて腫瘍を1週間につき1回モニターし、腫瘍サイズを、2つの垂直直系の平均として発現した。

10

20

30

40

50

【0514】

マウスにおける免疫原性の実験

【0515】

ELISpotアッセイ：4ないし5匹の雄C57BL/6マウス（6ないし8週齢）の群を、Lm-LLO-PSA、または陰性対照としての無関係抗原を含有する同様な構築体（Lm-LLO-WT1）で3回免疫化し、あるいは免疫化しなかった（ナイーブ）。ブーストから6日後に、脾臓を収穫し、単一細胞懸濁液に処理した。赤血球細胞をACK溶解溶液との2分間のインキュベーション、続いての、C-RPMI培地での2回の洗浄によって溶解させた。単離された脾臓細胞を、マウスIFN- γ 抗体（mAb AN18）で従前に被覆されたELISpotプレート上で、 $1\mu\text{M}$ PSA₆₅₋₇₄ペプチド（H2D^b?制限PSAエピトープHCIRNKSVIL）の存在下で 2×10^5 細胞/ウェルで平板培養した。プレートを37℃にて一晩インキュベートした。製造業者の指示（Mabtech AB）に従って、スポット形成細胞（SFC）を検出した。スポットは切開顕微鏡を用いてカウントした。

10

【0516】

IFN- γ についての細胞内染色。免疫化された、対照またはナイーブマウスから単離された脾臓細胞を、IL-2（50U/ml）およびモノニンA（StopGolgi, BD Biosciences）の存在下で、 $1\mu\text{M}$ のPSA₆₅₋₇₄ペプチドまたは対照ペプチドいずれかを含有丸底96ウェルプレート中で、 2×10^6 細胞/ウェルにて5時間刺激した。ペプチドを含まない培地中でインキュベートした細胞を陰性対照として用いた。インキュベーションの後、細胞を抗マウスCD8-FITC、CD3-PerCP-Cy5.5およびCD62L-APC抗体で染色した。引き続いて、細胞を浸透させ、抗マウスIFN- γ -PE抗体で染色し、FACS Calibur（BD Biosciences）サイトメーターで分析した。データはCellQuest Proソフトウェアを用いて分析した。細胞をCD3⁺CD8⁺CD62L^{low}としてゲートし、IFN- γ 陽性細胞の数を合計ゲート細胞のパーセンテージとして表した。

20

【0517】

細胞傷害性アッセイ。Lm-LLO-PSAワクチン接種に応答してのT細胞の細胞傷害性活性をPSA特異的CTLアッセイによって測定した。4匹の雄C57BL/6マウスの群を、1週間間隔で、3つの用量のLm-LLO-PSA（ 1×10^7 CFU）または無関係抗原（HPV16E7E6）を発現するリステリアで腹腔内注射した。ナイーブ群はいずれの免疫化も受けなかった。免疫化されたおよびナイーブマウスの脾臓を最後のブーストから6日後に収穫した。脾臓細胞を、PSA/ワクシニア（4時間のMOI5）で感染させたMC57G細胞の存在下で、20U/mlのマウスIL-2（Sigma）を含有するC-RPMI培地中で5日間インキュベートし、1:20のエフェクター：ステイミューレーター比率にてマイトマイシンCで処理した。細胞傷害性アッセイは、エフェクター細胞をEL4標的細胞と共にインキュベートすることによって4時間行い、H2D^b、PSA₆₅₋₇₄ペプチドで1時間パルスし、ユーロピウムで標識した。溶解された細胞から放出されたユーロピウムは、細胞培養上澄の試料をユーロピウム増強溶液（Delfia/Perkin Elmer, Waltham, MA）と混合し、590nmで吸光度を読む（Perkin Elmer/Wallac, VictorII）ことによって測定した。2つの組のアッセイを：a） $1\mu\text{M}$ の固定されたペプチド濃度にて、異なるエフェクター：標的（E:T）比率を用い；およびb）25:1の固定されたE:T比率のPSAペプチドの異なる濃度を用いて行った。SC₅₀値は、用いた最大ペプチド濃度の値（ $1\mu\text{M}$ ）の50%に必要なペプチドの濃度から0 μM におけるバックグラウンドレベルを差し引いたものとして計算した。

30

40

【0518】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の分析：マトリゲルに包埋されたT-PSA23細胞を、7および14日にLm-LLO-PSA、対照Lmワクチンで免疫化するか、あるいは未処理のまま放置した、雄C57BL/6マウスの右脇腹に皮下接種した。20日に、腫瘍を外科的に切り出し、氷冷PBS中で洗浄し、外科用メスでミンチした。腫瘍を、氷上で

50

、マトリゲル細胞回収溶液 (BD Biosciences) 中で 2 時間インキュベートした。シリンジプランジを用い、細胞ストレーナ中の組織の機械的破壊によって T I L をさらに放出させた。単離された細胞を P S A₆₅₋₇₄ H-2 D^b テトラマー-P E および抗マウス C D 8-F I T C、C D 3-P e r C P-C y 5. 5 および C D 6 2 L-A P C 抗体で染色して、P S A エピトープに対して特異的な C T L を特徴付けた。腫瘍中の調節 T 細胞を分析するために、T I L を C D 4-F I T C、C D 3-P e r C P-C y 5. 5 および C D 2 5-A P C でも染色した。細胞を引き続いて透過させ、抗 F o x P 3-P E 抗体 (Milteny Biotec) で染色した。細胞を FACS Calibur (BD Biosciences) サイトメーター中で分析した。データは CellQuest Pro ソフトウェアを用いて分析した。調節 T 細胞は C D 3⁺ C D 4⁺ C D 2 5⁺ F o p 3⁺ 細胞として定義した。

10

【0519】

統計学的分析：非パラメータ Mann-Whitney および Kruskal Wallis テストを適用して、異なる処理群の間で腫瘍のサイズを比較した。腫瘍のサイズは統計学的分析のために 40 日に比較した。なぜならば、これは各群におけるマウスの最高数を伴う最も遅い時点だからであった。スチューデント t 検定を用いて、E L I S p o t 実験において平均を比較した。0.05 未満の p 値がこれらの分析において統計学的に有意と考えられた。

【0520】

結果

【0521】

L m-L L O-P S A はイン・ビトロにてマクロファージに感染することができる。樹状細胞およびマクロファージのような抗原提示細胞による摂取は、L m ベースのワクチンにとって、抗原を免疫系に首尾よく送達し、提示するための必須の要件である。この特性を、マウスマクロファージ様細胞系 J 7 7 4 A. 1 を感染させ、L m ワクチン株が適切に細胞に進入し、増幅したことの指標である、細胞内細菌成長を定量することによってイン・ビトロによってテストすることができる。このアッセイにおいて、L m-L L O-P S A はマクロファージに侵入し、同様に野生型 L m 株 1 0 4 0 3 s までは成長することができることが示された。対照的に、p r f A が欠如し、ファゴリソソームから逃避しない L m 株 X F L 7 は、J 7 7 4 A. 1 細胞中で増殖できず、その力価は感染から数時間後に一定のままである (図 1 4)。プラスミド p A d v 3 4 での L m 株 X F L 7 における p r f A の実施の結果、該株のイン・ビトロ侵入性特性が回復し、これは野生型株のそれと同程度であった。

20

30

【0522】

L m-L L O-P S A は、マウスにおいて予め樹立された P S A 発現腫瘍の退行を引き起こす。P S A 発現腫瘍を退行させるにおける L m-L L O-P S A の効率は、P S A トランスフェクト T R A M P C-1 細胞系を用いてマウスモデルでテストした。元来、マウス前立腺癌腫瘍に由来する T r a m p C-1 細胞を、ヒトユビキチン C プロモーターの制御下でヒト P S A 遺伝子で安定にトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞による P S A の分泌は E L I S A によって確認した。4 つのクローンを拡大培養し、抗生物質選択マーカーであるプラスチジンの不存在下で 2 5 世代の間継代した。細胞培養上澄を、初期の継代および継代 2 5 において細胞間度と同程度であることが示された P S A 分泌のレベルについてテストした (データは示さず)。これらのクローンの 1 つはイン・ビボにて腫瘍形成性を保持し、雄 C 5 7 B L/6 マウスにおける皮下接種に際して固体腫瘍を形成した。このクローンの初期の継代を腫瘍実験で用い、それを T-P S A 2 3 という。8 匹のマウスの 3 つの群を 5×10^6 T-P S A 2 3 細胞で皮下接種し、毎日腫瘍の成長についてモニターした。7 日後に、直径が 4 ないし 5 mm の固体腫瘍の塊が各群で 8 匹のうち 7 匹に検出された (図 1 5)。この時点において、マウスを L m-L L O-P S A (1×10^7 C F U/マウス)、L m-L L O-E 7 (1×10^8 C F U/マウス) で免疫化するか、あるいは未処理のまま放置した。一次免疫化に続いて、プライムと同一の用量にて 1 週間間隔で 2 回ブースター用量を投与した。対照群の各々におけるマウス (8 匹のうち 7 匹) は遅い成長腫瘍を発生し、これは接種から 7 週間以内に 2 c m の直径に到

40

50

達し（図15）、その時点でそれを犠牲にした。各群において1匹のマウスはいずれの時点においてもいずれの腫瘍の兆候も示さなかった。最初の免疫化から5日後に、腫瘍の低下がLm-LLO-PSA免疫化群の8匹のうち7匹で観察され、完全な腫瘍退行は1週間後にこれらのマウスのうち5匹で観察された。Lm-LLO-PSA免疫化群における腫瘍の1つは、第三の免疫化まで安定なままであった。しかしながら、第三のワクチン接種から1週間後に、この腫瘍も退行し、検出不可能となった。この群におけるもう1匹のマウスは遅い成長腫瘍を発生させ、これは7週間以内に18ないし20mmのサイズに到達し、犠牲にした。腫瘍接種から8週間後の実験の最後において、Lm-LLO-PSA免疫化群における8匹のマウスのうち7匹は依然として腫瘍がなかった。この実験を同様な結果を伴って2回反復した。非パラメータKruskal-Wallis統計学的分析を、ナイーブおよびLm-LLO-E7群におけるマウスが犠牲とされる前に、40日に腫瘍のサイズについて行った。ナイーブ群におけるマウス、およびLm-LLO-E7で免疫化したマウスの腫瘍のサイズの間に統計学的に有意な差はなかった（ $p=0.613$ ）。しかしながら、Lm-LLO-PSAでの免疫化は、T-PSA23腫瘍成長に対して有意なインパクトを与えることが示された（ $p=0.002$ ）。対照およびLm-LLO-PSA免疫化マウスからの血清試料を腫瘍負荷から40日後に収集し、抗ヒトPSA ELISAキット（American Qualex）を用いてPSAの存在についてテストした。PSAの有意なレベル（ $5-10\text{ ng/ml}$ ）が対照マウスの血清において、および腫瘍を有するLm-LLO-PSA群におけるマウスで検出された。腫瘍退行後に、Lm-LLO-PSA免疫化マウスの血清においてPSAは見出されなかった。

【0523】

Lm-LLO-PSAは脾臓および腫瘍の双方においてPSAに対して免疫性を有する。Lm-LLO-PSA誘導PSA特異的CTLでのワクチン接種が腫瘍に浸潤できるかを解明するために、マウスにT-PSA23細胞+マトリゲルの混合物を皮下移植し、2つの用量のLm-LLO-PSA、Lm-LLO-E7で免疫化するか、または何もしなかった。脾臓および腫瘍を最後の免疫化から6日後に収穫し、FACS分析によって、 $CD8^+/PSA_{65-74}$ （ $H2D^b$ 制限）テトラマー陽性T細胞の存在についてテストした。ナイーブ（0.05%）またはLm-LLO-E7（0.09%）ワクチン接種マウスの脾臓において、有意な抗PSA応答は観察されなかった（図16、上方パネル）。しかしながら、Lm-LLO-PSAでの免疫化に際して、有意な数のPSA特異的 $CD8^+$ T細胞が脾臓で見出された。興味深いことには、本発明者らがTILの存在についてこれらのマウスから切り出された腫瘍をテストすると、少数のPSA特異的 $CD8^+$ T細胞がナイーブおよびLm-LLO-E7免疫化マウスの双方で同定された（各々、1.5%および0.51%）。Lm-LLO-PSAでの免疫化は、この数のかなりの増加を引き起こした。というのは、全ての $CD8^+$ TILの16.1%が PSA_{65-74} 特異的であることが示されたからである（図16、下方パネル）。

【0524】

Lm-LLO-PSAでの免疫化は脾臓ではなく腫瘍においてT調節細胞での減少を引き起こす。 $CD4^+/CD25^+/FoxP3^+$ T調節（Treg）腫瘍浸潤細胞の存在は、腫瘍進行の増加機会と関連することが示されている。従って、本発明者らは、Lm-LLO-PSA免疫化または対照マウスの腫瘍におけるこのT細胞集団の存在を調べた。興味深いことには、Lm-LLO-PSAまたはLm-LLO-E7いずれかでの免疫化は、ナイーブマウスからの腫瘍と比較して、腫瘍におけるTregの頻度のかかなりの減少を引き起こした（図17）。事実、Lm-LLO-PSAは腫瘍浸潤Tregの頻度においてLm-LLO-E7よりもわずかにより大きなインパクトを有した。他方、Lm-LLO-PSAまたは対照マウスの脾臓から単離された $CD4^+/CD25^+/FoxP3^+$ T細胞のパーセンテージの間に有意な差はなかった。

【0525】

Lm-LLO-PSAでの免疫化の結果、PSAに対して強い細胞免疫応答が生じる。Lmベースのワクチンによって誘導された免疫応答は、液性応答よりもむしろ細胞応答を

生じることが示された。本発明者らは、免疫化マウスの脾臓において $Lm-LLO-PSA$ によって誘導された $CD8^+T$ 細胞の活性化および機能性を調べた。

【0526】

サイトカイン分泌。 $H2D^b$ PSA ペプチドでのイン・ビトロ刺激に応答しての活性化された T 細胞による $IFN-\gamma$ の分泌を、 $ELISPOT$ および細胞内サイトカイン染色によってテストした。マウスを $Lm-LLO-PSA$ または $Lm-LLO-WT-1$ (陰性対照としての $Lm-LLO-Wilm's$ 腫瘍抗原で3回免疫化するか、あるいは免疫化しなかった(ナイーブ))。次いで、単離された脾臓細胞を調製し、 PSA ペプチドと共にインキュベートし、 $IFN-\gamma$ 分泌 $CD8^+$ 細胞を定量した。双方のアッセイにおいて、 $Lm-LLO-PSA$ で免疫化したマウスは、陰性対照よりもペプチドパルシングに 10
 $ELISPOT$ アッセイによって測定された $IFN-\gamma$ 分泌細胞の数は、対照よりもほぼ11倍高かった(図18)。 $IFN-\gamma$ について細胞内サイトカイン染色によってテストすると、 $Lm-LLO-PSA$ 免疫化マウスからの $CD8^+CD62L^{low}$ $IFN-\gamma$ 分泌細胞の数の30倍増加が、対照と比較して検出された($Lm-LLO-PSA$ について4.22% *vs* ナイーブについては0.15%) (図19)。

【0527】

細胞傷害性 (CTL) アッセイ。 PSA 特異的な T 細胞の機能的活性を決定するために、免疫化またはナイーブマウスからの脾臓細胞を、 $H2D^b$ PSA ペプチドでパルスした細胞に対して CTL アッセイでテストした。固定されたペプチド濃度 ($1\mu M$) を用い 20
、 $Lm-LLO-PSA$ 免疫化マウスからの脾臓細胞は60%の最大特異的溶解を示し、これは $E:T$ 比率に比例して低下した(図20A)。この結果は、ただ $0.1\mu M$ のペプチド濃度に到達する最大値を持つ溶解アッセイにおけるペプチド濃度に依存した(図20B)。平均 T 細胞結合力の有用な尺度であるポリクローナル集団の SC_{50} 値はほぼ $1pM$ であった。この実験からの結果は、 $Lm-LLO-PSA$ での免疫化が、標的抗原 PSA を呈する細胞を溶解することができる高い結合力の特異的細胞溶解性 T 細胞を生じたことも確認した。

【0528】

$Lm-LLO-PSA$ の抗腫瘍効果と他の PSA ベースのワクチン様式との比較。最後に、 $Lm-LLO-PSA$ ワクチンをさらに評価するために、本発明者らはその抗腫瘍 30
効率を、文献に記載されている2つの他の PSA ベースのワクチン、すなわち、組換え DNA およびワクシニアベースのワクチンと比較した。このために、 PSA の完全なオープンリーディングフレームを対照 $hCMV$ プロモーター下で $pCDNA3.1$ クローン化した ($pAdv40.1$)。同様な DNA ワクチンは、同様なベクターバックボーン、すなわち、 $pVax$ (Invitrogen) を用いる *Roos et al* によって従前に記載された。2つのベクターバックボーン ($pCDNA3.1$ および $pVax$) の間の差は、その抗生物質選択 40
マーカーにのみある。 $pAdv40.1$ を、他の DNA ワクチンのための有効なアジュバントとして用いられてきた $GM-CSF/pCDNA$ との混合物として筋肉内注射した。 $PSA/pCDNA$ プラスミドからの PSA の発現は、 $293FT$ 細胞系へのイン・ビトロトランスフェクションによって確認された(データは示さず)。組換え PSA -ワクシ 40
ニアは *Hudge et al.* によって従前に記載されている。マウスに先に記載したように $T-PSA23$ 腫瘍細胞を移植し、次いで、文献に引用された最適な用量および投与経路によってワクチンの各々で2回免疫化した。 PSA /ワクシニアでの免疫化は $T-PSA23$ 腫瘍の成長に対してなんらインパクトも有しなかった。というのは、全てのナイーブおよび PSA /ワクシニア免疫化マウスは腫瘍を発生し、これは7ないし8週間以内に $20cm$ のサイズに到達したからであり、それらは犠牲としなければならなかった(図21b)。しかしながら、 PSA / DNA ワクチンで免疫化した8匹のマウスのうち1匹、および $Lm-LLO-PSA$ でワクチン接種した8匹のマウスのうち3匹は90日にわたって腫瘍がないままであり、その時点で、実験を終了した(図21Aおよび表インサート)。この実験を2回反復し、同様な結果が示された。かくして、 $Lm-LLO-PSA$ は、樹立さ 50

れたP S A発現腫瘍を退行させるにおいて3つのP S Aワクチン様式の最も有効なワクチンであることが証明された。比較実験において、他の2つのワクチンの入手可能性が限定されているため、2つの用量のみが投与されたことに注意されるべきである。したがって、L m-L L O-P S Aは、3回注射した場合（ここで、図15に見られるように8つの腫瘍のうち7つが退行した）よりも、効果が少ない（完全な腫瘍退行は8つのうち3つのみ観察された）ことが示された。この観察は、いくつかの他の実験で確認された（データは示さず）。

【0529】

実施例10：リステリアーL L O-葉酸ヒドロラーゼ1（F O L H 1）およびリステリアーL L O-前立腺幹細胞抗原（P S C A）構築体は抗原特異的細胞溶解性T細胞を誘導する

10

【0530】

材料および実験方法

【0531】

細菌ワクチン株の成長および貯蔵

【0532】

組換えリステリアーL L O-F O L H 1およびリステリアーL L O-P S C Aを、前記実施例7においてリステリアーP S Aについて記載したように成長させ、維持する。

【0533】

結果

20

【0534】

その分泌シグナル配列を除いて、F O L H 1の完全なオープンリーティングフレームを含有する切形されたF O L H 1をコードする遺伝子を、前記実施例7においてK L K 3について記載したのと同様に、リステリオリシンOの切形された非溶血性断片をコードする遺伝子に融合させる。同様に、その分泌シグナル配列を除いて、P S C Aの完全なオープンリーティングフレームを含有する切形されたP S C Aをコードする遺伝子を、リステリオリシンOの切形された非溶血性断片をコードする遺伝子に融合させる。各遺伝子をリステリアプラスミドp G G 5 5にクローン化し、L M X F L-7にエレクトロポレーションする。L L O-F O L H 1蛋白質およびL L O-P S C A蛋白質は、かくして発現され、別の組換えリステリア株からエピソードにより分泌される。

30

【0535】

L L O-F O L H 1およびL L O-P S C Aの免疫原性をテストするために、マウスを、前記実施例7においてL L O-K L K 3について記載したように、L m-L L O-F O L H 1、L m-L L O-P S C AまたはL m W T 1 A（無関係抗原対照）またはP B S（陰性対照）いずれかで再度免疫化した。5日間のワクチニア-P S A感染スティミュレーター細胞での培養に続き、F O L H 1-ワクチン接種マウスからの脾臓細胞は、C T L アッセイにおいて高い効率でF O L H 1-ペプチドでパルスした腫瘍細胞を認識し、溶解でき、P S C Aワクチン接種マウスからの脾臓細胞は、C T L アッセイにおいて高い効率でP S C Aペプチドパルス腫瘍細胞を認識し、溶解させることができる。加えて、脾臓細胞は、各々、F O L H 1ペプチドまたはP S C Aペプチドと一緒にインキュベーションに応答して、高いレベルのI F N- γ 分泌を呈する。

40

【0536】

かくして、F O L H 1発現L M株、P S C A発現L M株、L L O-P S C A融合およびL L O-F O L H 1融合は、標的細胞溶解およびI F N- γ 分泌が可能な抗原特異的C T Lの誘導において有効である。従って、F O L H 1発現L M株、P S C A発現L M株、L L O-P S C A融合およびL L O-F O L H 1融合は、P S A発現前立腺癌に対する治療的および予防的ワクチン接種において有効である。

【0537】

実施例11：リステリアーL L O-F O L H 1構築体は腫瘍保護を提供する。

【0538】

50

先の実施例に記載されたリステリアワクチンは、前記実施例 8 および 9 に記載された同所性前立腺癌腫動物モデルにおいて腫瘍保護実験で用いられる。マウスを *Lm-FOLH1*、*Lm-PSCA*、*LmWT1A*、または *PBS* いずれかで免疫化し、次いで、*PC3M-LN4* または *22Rv1* 細胞を注射した。*Lm-FOLH1* および *Lm-PSCA* は腫瘍形成からマウスを保護する。

【0539】

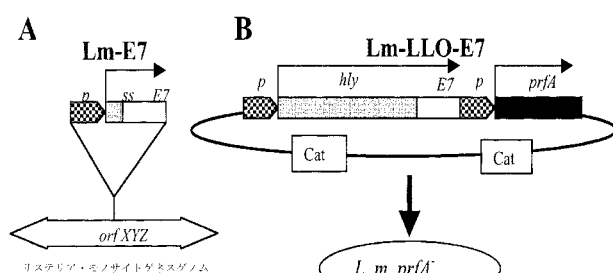
さらなる実験において、前記実施例 8 および 9 に記載したように、マウスをまず *PC3M* 前立腺癌細胞を注射し、4 日後に、*Lm-FOLH1*、*Lm-PSCA*、*LmWT1A*、または *PBS* でワクチン接種し、同一ワクチンでブースター注射する。*Lm-FOLH1* および *Lm-PSCA* は前立腺転移を妨げる。

【0540】

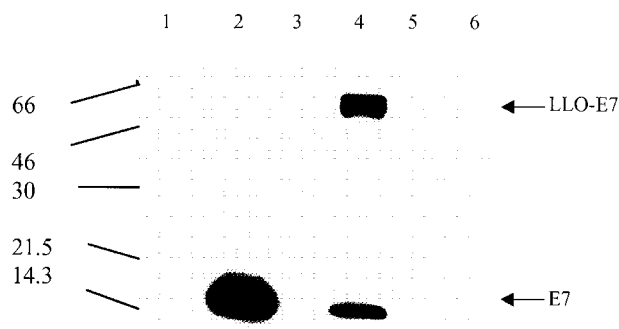
かくして、*FOLH1* および *PSCA* 生産 *LM* 株および *Lm-FOLH1* および *Lm-PSCA* 融合は腫瘍保護を誘導する。

10

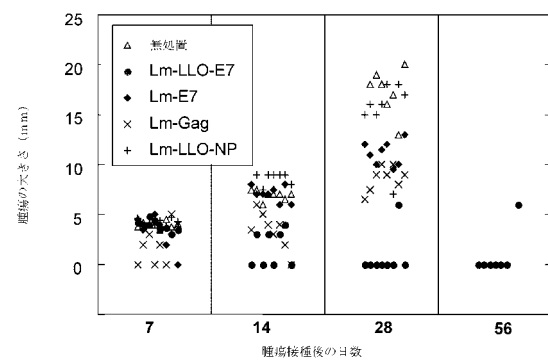
【図 1】



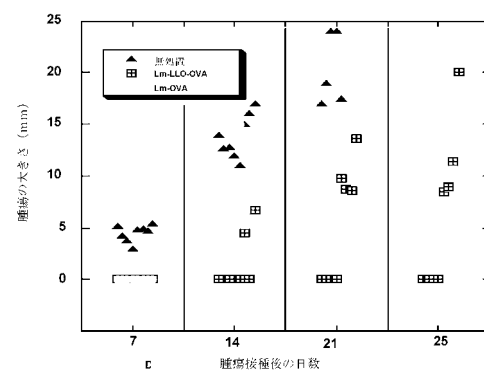
【図 2】



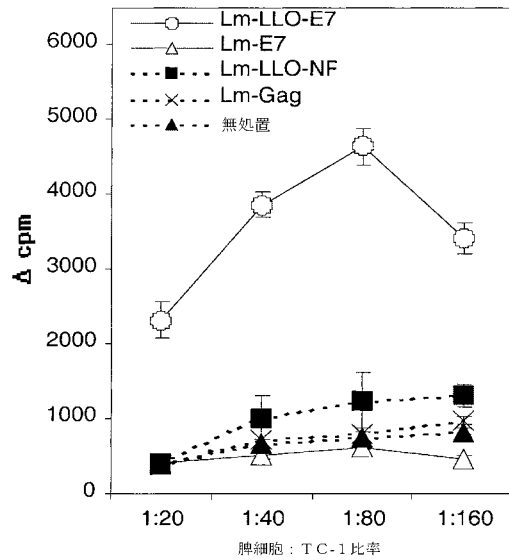
【図 3 A】



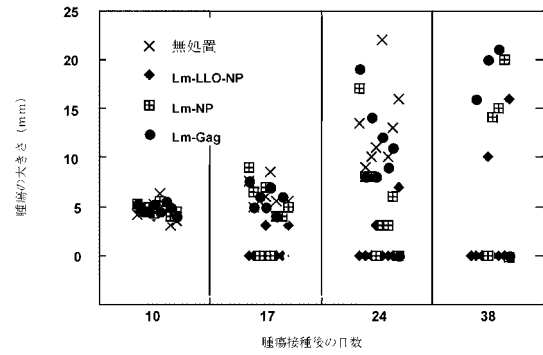
【図 3 B】



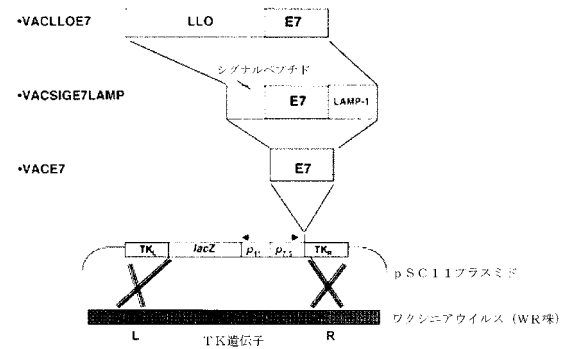
【図 4】



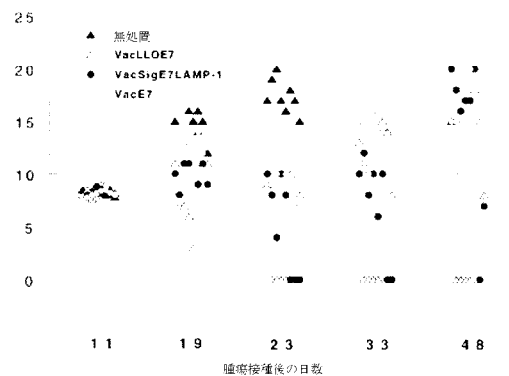
【図 5】



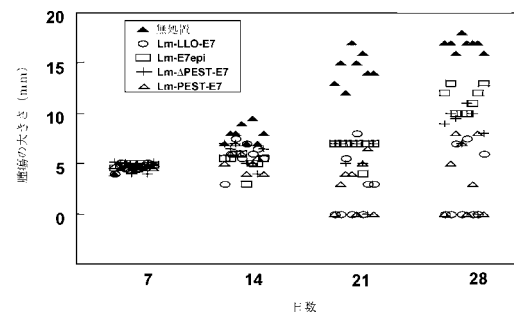
【図 6】



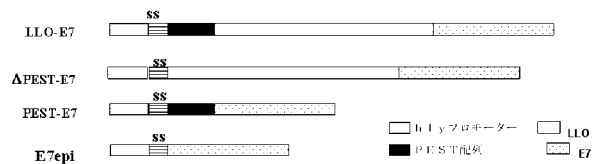
【図 7】



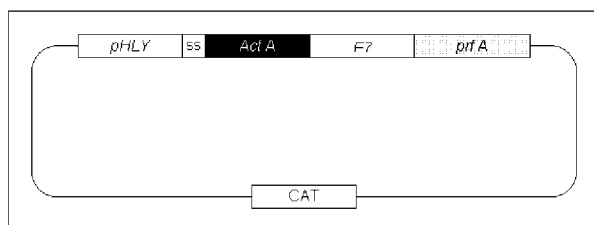
【図 8 C】



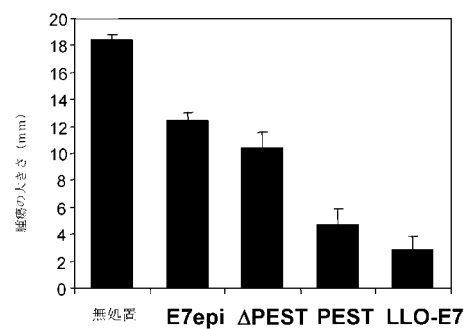
【図 8 A】



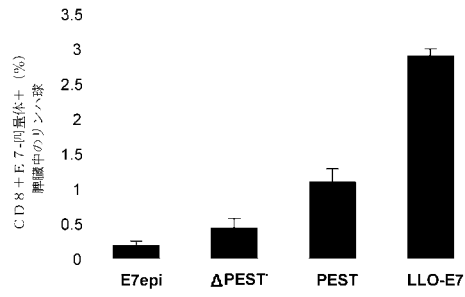
【図 8 B】



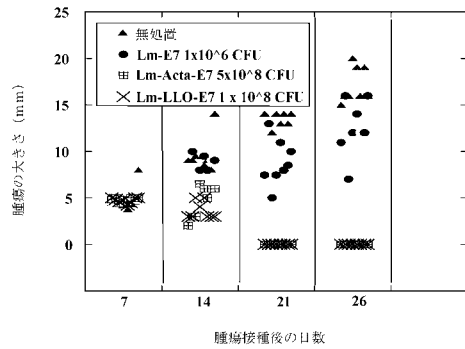
【図 8 D】



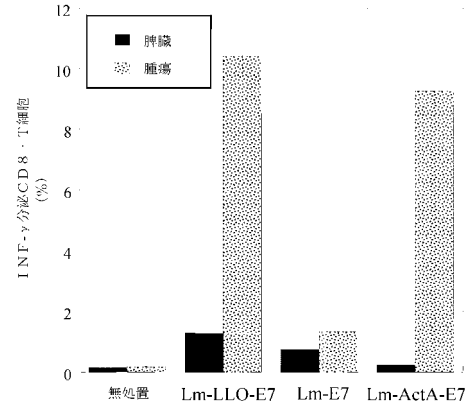
【図 8 E】



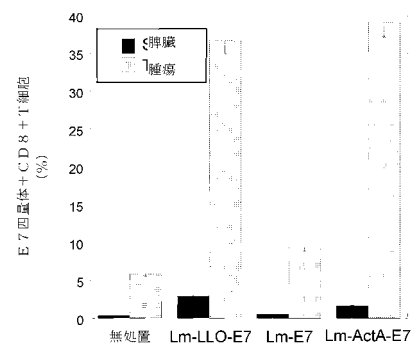
【図 9】



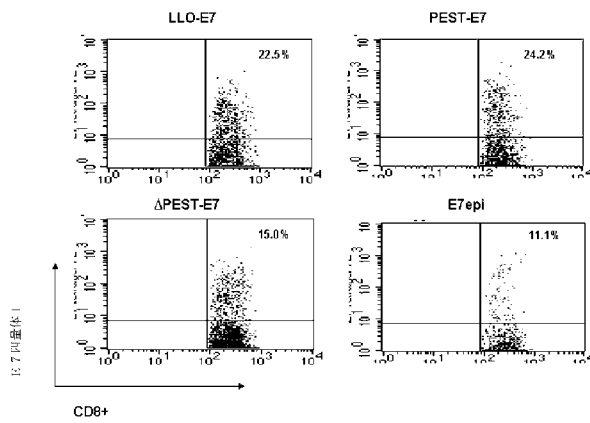
【図 10 A】



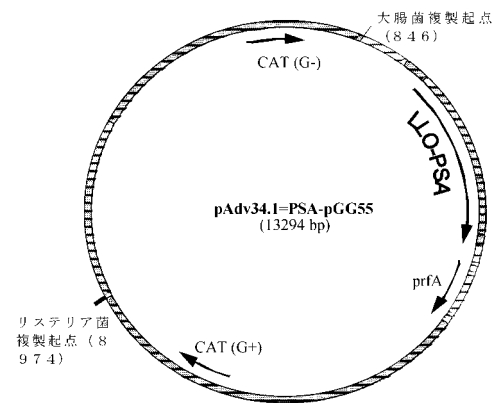
【図 10 B】



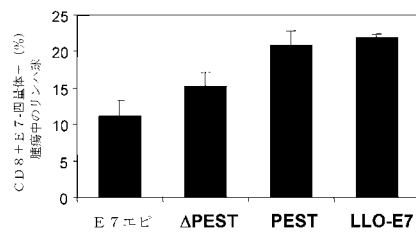
【図 11 A】



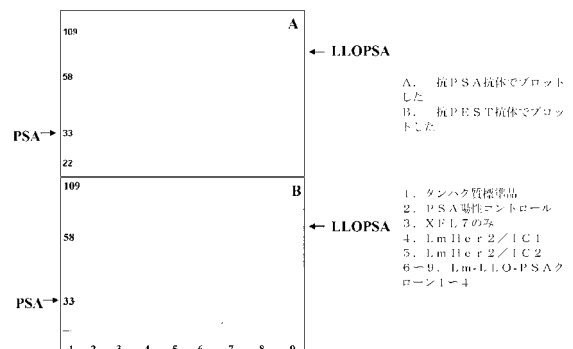
【図 12】



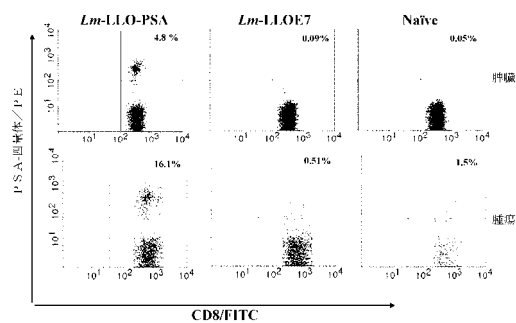
【図 11 B】



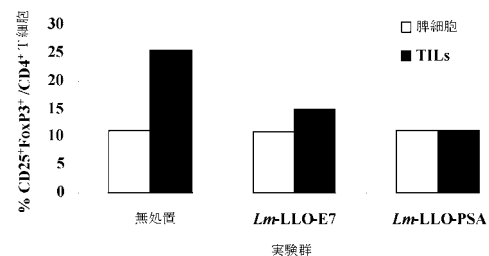
【図 13】



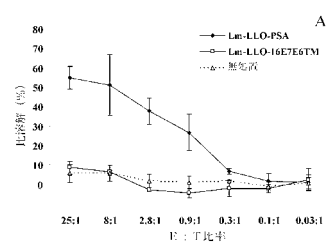
【图 16】



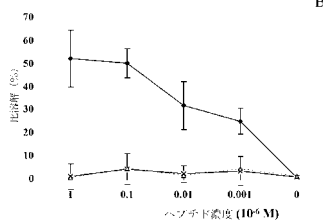
【図 17】



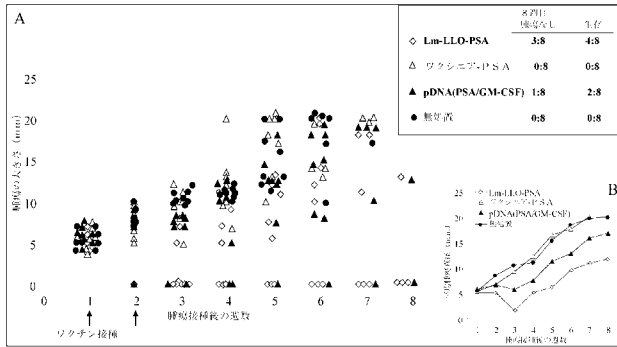
【図 20】



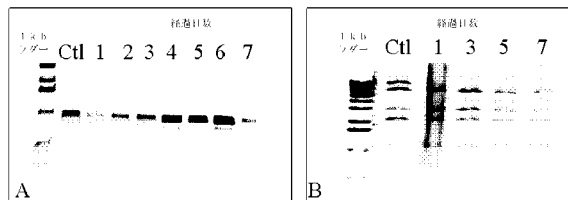
B



【図 2 1】



【図 2 2】



【配列表】

2010526533000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成22年1月13日(2010.1.13)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

カリクレイン関連ペプチダーゼ 3 (K L K 3) ペプチドを発現する組換えリステリア株であって、該 K L K 3 ペプチドの配列が配列番号：25、27、29ないし32、34、および36ないし39に記載された配列から選択される配列を含む組換えリステリア株。

【請求項 2】

前記 K L K 3 ペプチドが融合ペプチドの形態であり、該融合ペプチドは、さらに、非 K L K 3 ペプチドを含み、ここで該非 K L K 3 ペプチドが該断片の免疫原性を増強させる請求項 1 記載の組換えリステリア株。

【請求項 3】

前記非 K L K 3 ペプチドが非溶血性リステリオリシン (L L O) ペプチド、A c t A ペプチドまたは P E S T 様配列ペプチドである請求項 2 記載の組換えリステリア株。

【請求項 4】

前記 K L K 3 ペプチドが K L K 3 シグナル配列を含有しない請求項 1 記載の組換えリステリア株。

【請求項 5】

非 K L K 3 ペプチドに操作可能に連結されたカリクレイン関連ペプチダーゼ 3 (K L K 3) ペプチドを含む組換えポリペプチドであって、該非 K L K 3 ペプチドは非溶血性リステリオリシン (L L O) ペプチド、A c t A ペプチドおよび P E S T 様アミノ酸配列から選択される組換えポリペプチド。

【請求項 6】

前記組換えポリペプチドをコードするヌクレオチド分子の翻訳の工程を含む製法によって作成された請求項 5 記載の組換えポリペプチド。

【請求項 7】

前記非 K L K 3 ペプチドを含むポリペプチドに対して、該 K L K 3 ペプチドを含むポリペプチドを化学的に共役させる工程を含む製法によって作成された請求項 5 記載の組換えポリペプチド。

【請求項 8】

請求項 5 記載の組換えポリペプチドをコードするヌクレオチド分子。

【請求項 9】

対象において抗カリクレイン関連ペプチダーゼ 3 (K L K 3) 免疫応答を誘導するための組成物の調製における、請求項 1 記載の組換えリステリア株、請求項 5 記載の組換えポリペプチド、または請求項 8 記載のヌクレオチド分子の使用。

【請求項 10】

対象においてカリクレイン関連ペプチダーゼ 3 (K L K 3) 蛋白質発現前立腺癌を治療し、それにより、該対象は該 K L K 3 蛋白質発現前立腺癌に対する免疫応答を高めるための組成物の調製における、請求項 1 記載の組換えリステリア株、請求項 5 記載の組換えポリペプチド、または請求項 8 記載のヌクレオチド分子の使用。

【請求項 11】

カリクレイン関連ペプチダーゼ 3 (K L K 3) 蛋白質発現前立腺癌を阻害し、または抑制し、それにより、該対象は該 K L K 3 蛋白質に対する免疫応答を高め、それにより、K L K 3 蛋白質発現前立腺癌に対してヒト対象を保護するための組成物の調製における、請求項 1 記載の組換えリステリア株、請求項 5 記載の組換えポリペプチド、または請求項 8 記載のヌクレオチド分子の使用。

【請求項 12】

葉酸ヒドロラーゼ 1 (F O L H 1) ペプチドを発現する組換えリステリア株であって、該 F O L H 1 ペプチドの配列が配列番号：41、43、44 および 45 に記載された配列から選択される配列を含む組換えリステリア株。

【請求項 13】

前記 F O L H 1 ペプチドが融合ペプチドの形態であり、該融合ペプチドは、さらに、非 F O L H 1 ペプチドを含み、ここで該非 F O L H 1 ペプチドが該断片の免疫原性を増強させる請求項 12 記載の組換えリステリア株。

【請求項 14】

前記非 F O L H 1 ペプチドが非溶血性リステリオリシン (L L O) ペプチド、A c t A ペプチドおよび P E S T 様配列ペプチドから選択される請求項 13 記載の組換えリステリア株。

【請求項 15】

前記 F O L H 1 ペプチドが F O L H 1 シグナル配列を含有しない請求項 12 記載の組換えリステリア株。

【請求項 16】

非 F O L H 1 ペプチドに操作可能に連結された葉酸ヒドロラーゼ 1 (F O L H 1) ペプチドを含む組換えポリペプチドであって、該非 F O L H 1 ペプチドは非溶血性リステリオリシン (L L O) ペプチド、A c t A ペプチドおよび P E S T 様アミノ酸配列から選択される組換えポリペプチド。

【請求項 17】

請求項 16 記載の組換えポリペプチドをコードするヌクレオチド分子。

【請求項 18】

対象において抗 F O L H 1 免疫応答を誘導するための組成物の調製における、請求項 12 記載の組換えリステリア株、請求項 16 記載の組換えポリペプチド、または請求項 17 記載のヌクレオチド分子の使用。

【請求項 19】

対象において葉酸ヒドロラーゼ 1 (F O L H 1) 発現前立腺癌を治療し、それにより、該対象は該 F O L H 1 蛋白質発現前立腺癌に対する免疫応答を高め、それにより、該対象において該 F O L H 1 蛋白質発現前立腺癌を治療するための請求項 12 記載の組換えリステリア株、請求項 16 記載の組換えポリペプチド、または請求項 17 記載のヌクレオチド分子の使用。

【請求項 20】

対象において葉酸ヒドロラーゼ 1 (F O L H 1) 発現前立腺癌を阻害し、または抑制し、それにより、該対象は該 F O L H 1 蛋白質に対する免疫応答を高め、それにより、該対象において該 F O L H 1 蛋白質発現前立腺癌を阻害し、または抑制するための請求項 12 記載の組換えリステリア株、請求項 16 記載の組換えポリペプチド、または請求項 17 記載のヌクレオチド分子の使用。

【請求項 21】

前立腺幹細胞抗原 (P S C A) ペプチドを発現する組換えリステリア株であって、該 P S C A ペプチドの配列は配列番号：63 に記載された配列を含む組換えリステリア株。

【請求項 22】

前記 P S C A ペプチドが融合ペプチドの形態であり、該融合ペプチドは、さらに、非 P S C A ペプチドを含み、該非 P S C A ペプチドは該断片の免疫原性を増強させる請求項 21 記載の組換えリステリア株。

【請求項 23】

前記非 P S C A ペプチドが非溶血性リステリオリシン (L L O) ペプチド、A c t A ペプチドまたは P E S T 様配列ペプチドから選択される請求項 22 記載の組換えリステリア株。

【請求項 24】

前記 P S C A ペプチドが P S C A シグナル配列を含有しない請求項 21 記載の組換えリステリア株。

【請求項 25】

前記組換えリステリア株が栄養要求性リステリア株または組換えリステリア・モノサイトゲネス株である請求項 1、請求項 12 または請求項 21 記載の組換えリステリア株。

【請求項 26】

前記栄養要求性リステリア株が d a l / d a t 突然変異体である請求項 25 記載の組換えリステリア株。

【請求項 27】

前記栄養要求性リステリア株が、さらに、内因性 A c t A 遺伝子において欠失を含む請求項 25 記載の組換えリステリア株。

【請求項 28】

前記栄養要求性リステリア株が、該栄養要求性リステリア株の栄養要求性を補充する代謝酵素を含むエピソーム発現ベクターを含む請求項 25 記載の組換えリステリア株。

【請求項 29】

前記代謝酵素がアラニンラセマーゼ酵素または D-アミノ酸トランスフェラーゼ酵素である請求項 28 記載の組換えリステリア株。

【請求項 30】

請求項 1、請求項 12 または請求項 21 記載の組換えリステリア株およびアジュバントを含むワクチン。

【請求項 31】

前記組換えリステリア株が組換えリステリア・モノサイトゲネス株である請求項 1、請

求項 1 2 または請求項 2 1 記載の組換えリステリア株。

【請求項 3 2】

前記組換えリステリア株が動物宿主を通じて継代されている請求項 1、請求項 1 2 または請求項 2 1 記載の組換えリステリア株。

【請求項 3 3】

非 P S C A ペプチドに操作可能に連結された前立腺幹細胞抗原 (P S C A) ペプチドを含む組換えポリペプチドであって、該非 P S C A ペプチドは非溶血性リステリオリシン (L L O) ペプチド、A c t A ペプチド、および P E S T 様アミノ酸配列から選択される組換えポリペプチド。

【請求項 3 4】

請求項 5、請求項 1 6 または請求項 3 3 記載の組換えポリペプチドおよびアジュバントを含むワクチン。

【請求項 3 5】

請求項 5、請求項 1 6 または請求項 3 3 記載の組換えポリペプチドをコードする組換えワクチンベクター。

【請求項 3 6】

請求項 3 3 記載の組換えポリペプチドをコードするヌクレオチド分子。

【請求項 3 7】

請求項 8、請求項 1 7 または請求項 3 6 記載のヌクレオチド分子、およびアジュバントを含むワクチン。

【請求項 3 8】

請求項 8、請求項 1 7 または請求項 3 6 記載のヌクレオチド分子を含む組換えワクチンベクター。

【請求項 3 9】

対象において抗 P S C A 免疫応答を誘導するための組成物の調製における、請求項 2 1 記載の組換えリステリア株、請求項 3 3 記載の組換えポリペプチド、または請求項 3 6 記載のヌクレオチド分子の使用。

【請求項 4 0】

対象において P S C A 発現前立腺癌を治療し、それにより、該対象は該 P S C A 蛋白質発現前立腺癌に対する免疫応答を高め、それにより、該対象において該 P S C A 蛋白質発現前立腺癌を治療するための組成物の調製における、請求項 2 1 記載の組換えリステリア株、請求項 3 3 記載の組換えポリペプチド、または請求項 3 6 記載のヌクレオチド分子の使用。

【請求項 4 1】

対象において P S C A 発現前立腺癌を阻害し、または抑制し、それにより、該対象は該 P S C A 蛋白質に対する免疫応答を高め、それにより、該対象において該 P S C A 蛋白質発現前立腺癌を阻害し、または抑制するための組成物の調製における、請求項 2 1 記載の組換えリステリア株、請求項 3 3 記載の組換えポリペプチド、または請求項 3 6 記載のヌクレオチド分子の使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/06048

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 39/02; C07K 14/00 (2008.04)

USPC - 424/200.1; 530/350

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)
USPC - 424/200.1; 530/350Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 424/197.11; 536/23.1Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WEST(DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB), Google Scholar: KLK3 listeria monocytogenes vaccine, prostate specific antigen listeria monocytogene, "prostate specific antigen" listeria monocytogenes vaccine.
GenCore: SEQ ID NO: 25

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2003/0220239 A1 (SIMARD et al) 27 Nov 2003 (27.11.2003); para [0033]-[0034], [0090], [0111], [0118], [0151]; Table 1, SEQ ID No: 78	1, 12, 14-17 2-13
X --- Y	US 2006/0210540 A1 (PATERSON et al) 21 Sep 2006 (21.09.2006); claims 5-6, 25-26; para [0006], [0088], [0119], [0120], [0122], [0126]-[0128], [0179]-[0180], [0225]	18-31 5
Y	US 2006/0104991 A1 (PATERSON et al) 18 May 2006 (18.05.2006); para [0024], [0033], [0036], [0058], [0060], [0073], [0083], [0092]	2-4, 6-11
Y	US 2006/0223835 A1 (PATERSON et al) 19 Oct 2006 (19.10.2006); para [0009]	13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* 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

"G" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 November 2008 (13.11.2008)

Date of mailing of the international search report

20 NOV 2008

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized official

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT QSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/06048

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group I, claims 1-31, drawn to a recombinant *Listeria* strain expressing a kallikrein-related peptidase 3 (KLK3) peptide of SEQ ID No: 25 and its uses.
 Groups II-XI, claims 1-31, drawn to a recombinant *Listeria* strain expressing a kallikrein-related peptidase 3 (KLK3) peptide of SEQ ID No: 27, 29-32, 34, and 36-39, respectively.
 Groups XII-XV, claims 32-59, drawn to a recombinant *Listeria* strain expressing a folate hydrolase 1 (FOLH1) peptide, limited to SEQ ID No: 41, 43, 44, and 45, respectively.
 Group XVI, claims 60-87, drawn to a recombinant *Listeria* strain expressing a prostate stem cell antigen (PSCA) peptide and its use.
 The inventions listed as Groups I-XVI do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

-----see Supplemental Sheet-----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-31, limited to SEQ ID NO: 25

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US 08/06048

***** SUPPLEMENTAL PAGE *****

Box No. III

Although Groups I-XVI do share a technical feature of *Listeria monocytogenes* as a delivery vehicle for prostate associated antigens, this shared technical feature does not represent a contribution over the prior art. Specifically, the article entitled "Regression of Established Tumors in Mice Mediated by the Oral Administration of a Recombinant *Listeria monocytogenes* Vaccine" by Pan et al. (CANCER RESEARCH 1995, 55:4770-4779) teaches *Listeria monocytogenes* as a potent vector for targeting tumor-specific antigens to the immune system (abstract). Thus this shared technical feature cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

As to Groups I-XI, XII-XV, and XVI, they lack unity because a kallikrein-related peptidase 3 (KLK3) peptide, a folate hydrolase 1 (FOLH1) peptide, and a prostate stem cell antigen (PSCA) peptide do not share a significant structural element that is essential to their common property of being prostate cancer markers.

As to Groups I-XI, they lack unity because US 2004/0056342 A1 to Yosef et al. teaches the claimed kallikrein-related peptidase 3 (KLK3) peptide of SEQ ID NO: 25 (Yosef et al., SEQ ID NO: 33).

As to Groups XII-XV, they lack unity because the Q8TAY3 submission to GenBank by Strausberg et al. (31-OCT-2006) [Retrieved from the Internet on 31 Aug 2008: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=74730404> >] discloses the claimed Folate Hydrolase (Prostate-specific membrane antigen) 1. of SEQ ID NO: 41. Therefore unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K	35/74	(2006.01)	A 6 1 K 35/74	A 4 C 0 8 7
A 6 1 P	13/08	(2006.01)	A 6 1 P 13/08	4 H 0 4 5
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K	39/39	(2006.01)	A 6 1 K 39/39	
C 1 2 N	9/14	(2006.01)	C 1 2 N 9/14	1 0 1
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K 19/00	

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

(74)代理人 100089266

弁理士 大島 陽一

(72)発明者 ペーターソン、イボンヌ

アメリカ合衆国ペンシルバニア州1 9 1 4 3・フィラデルフィア・サウス5 1 4 4 6ストリート

(72)発明者 ロスマン、ジョン

アメリカ合衆国ニュージャージー州0 8 8 3 3・レバノン・ビッセルロード 7 7

(72)発明者 シャハビ、ヴァハ

アメリカ合衆国ペンシルバニア州1 9 4 8 1・バレー フォルゲ・ジャグ ホロー ロード 2 0 0

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA14 BA31 CA02 CA07 DA05 EA04 HA01

4B050 CC04 CC05 CC08 DD02 LL01

4B065 AA01X AA01Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA31 CA33 CA45

4C084 AA02 AA13 BA18 BA19 BA44 CA04 CA18 CA53 DC22 NA14

ZA81 ZB05 ZB09 ZB26 ZC19

4C085 AA03 AA38 BB01 BB11 CC07 CC21 DD62 EE01 EE06 FF02

FF03 FF13 FF14 FF19

4C087 AA01 AA02 BC76 CA12 NA14 ZA81 ZB05 ZB09 ZB26 ZC19

4H045 AA30 BA41 CA11 DA86 DA89 EA31 FA74