

(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2017-508797

(P2017-508797A)

(43) 公表日 平成29年3月30日 (2017. 3. 30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/74 (2015.01)	A 6 1 K 35/74 A	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-573685 (P2016-573685)
 (86) (22) 出願日 平成27年3月5日 (2015. 3. 5)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年9月7日 (2016. 9. 7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/018915
 (87) 国際公開番号 W02015/134722
 (87) 国際公開日 平成27年9月11日 (2015. 9. 11)
 (31) 優先権主張番号 61/948, 453
 (32) 優先日 平成26年3月5日 (2014. 3. 5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514231424
 アドバクシス, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 ニュージャージー 08
 540, プリンストン, カレッジ ロ
 ード イースト 305

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Tエフェクター細胞の調節性T細胞に対する比を増加するための方法および組成物

(57) 【要約】

本発明はT細胞エフェクター細胞の調節性T細胞に対する比を増加するための方法を対象とする。本発明は、被験者にLLO断片および腫瘍関連抗原を含む融合ペプチドを含む組み換え型リステリア株を投与する工程を含み、腫瘍を治療する、腫瘍に対して保護する、および腫瘍に対する免疫応答を誘発する方法をさらに対象とする。本発明は、有益な免疫応答を引き起こすために、調節性T細胞の免疫抑制効果をどのようにして克服することができるかを詳細に示す、効果的かつ安全な免疫療法を提供する。この免疫療法は、内在性dal、dat、およびactAの突然変異を含み、かつエピソームとして発現するN末端切断LLOを含む弱毒化組み換え型リステリアの使用を採用している。

【選択図】 図9

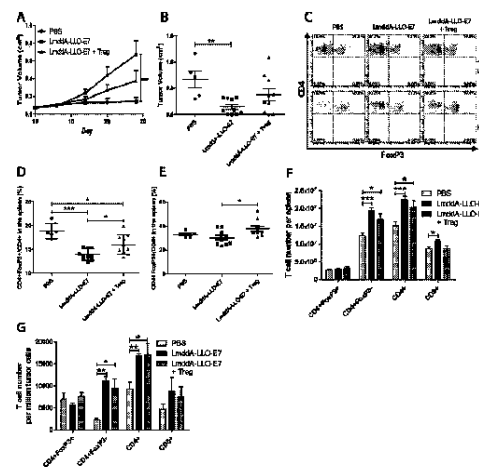


Figure 9

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腫瘍またはガンを有する被験者内で抗腫瘍 T 細胞応答を引き出す方法であって、前記被験者に組み換え型核酸を含む組み換え型リステリア株を投与する工程を含み、前記核酸分子が組み換え型ポリペプチドをコードする第 1 のオープンリーディングフレームと代謝をコードする第 2 のオープンリーディングフレームとを含み、前記組み換え型ポリペプチドは異種抗原またはその断片に融合した切断 L L O タンパク質を含み、前記リステリアは内在性アラニンラセマーゼ遺伝子 (d a l)、D-アミノ酸トランスフェラーゼ遺伝子 (d a t)、および a c t A 遺伝子内の突然変異を含み、かつ前記 T 細胞応答は T エフェクター細胞の調節性 T 細胞 (T r e g) に対する比の増加を含み、これによって前記被験者内で抗腫瘍 T 細胞応答を引き出す、方法。

10

【請求項 2】

前記腫瘍関連抗原がヒトパピローマウイルス E 7 抗原である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記切断 L L O タンパク質が N 末端 L L O である、請求項 1 ~ 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4】

前記 L L O が配列番号：2 で示される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記異種抗原が腫瘍関連抗原である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記腫瘍関連抗原が血管形成抗原である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記リステリアが抗生剤耐性遺伝子を欠いている、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記組み換え型核酸が前記リステリア内のプラスミド内にある、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記プラスミドがエピソーム性プラスミドである、請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記プラスミドがマルチコピープラスミドである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記プラスミドが組み込みプラスミドである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

前記代謝酵素がアミノ酸代謝酵素である、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記代謝酵素が D-アミノ酸トランスフェラーゼ酵素またはアラニンラセマーゼ酵素である、請求項 12 に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記被験者にアジュバントを投与することをさらに含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

前記アジュバントが、顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F)、サポニン Q S 2 1、モノホスホリルリピド A a、C p G 含有オリゴヌクレオチド、または細菌毒素を含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記組み換え型リステリアの前記投与の前またはその後に免疫チェックポイントタンパク質阻害剤を同時投与することをさらに含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方

50

法。

【請求項 17】

前記免疫チェックポイントタンパク質が、プログラム細胞死タンパク質 1 (PD1)、T 細胞膜タンパク質 3 (TIM3)、アデノシン A2a 受容体 (A2aR) およびリンパ球活性化遺伝子 3 (LAG3)、キラー免疫グロブリン受容体 (KIR)、または細胞毒性 T-リンパ球抗原-4 (CTLA-4) である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記抗腫瘍免疫応答を強化するサイトカインを同時投与することをさらに含む、請求項 1～15 または請求項 1～16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記サイトカインが、I 型インターフェロン (IFN- α / IFN- β)、TNF- α 、IL-1、IL-4、IL-12、INF- γ である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記方法が末梢リンパ器官内での前記 T エフェクター細胞の増殖を誘発し、前記腫瘍部位における T エフェクター細胞の存在の強化をもたらす、請求項 1～19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

前記 T エフェクター細胞の増殖が前記 Treg の数に影響を与えずに前記末梢内および腫瘍部位における T エフェクター細胞の調節性 T 細胞に対する比の増加をもたらす、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記 T エフェクター細胞が CD4 + FoxP3- および CD8 + T 細胞である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記 T エフェクター細胞が CD4 + FoxP3- T 細胞である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 24】

前記調節性 T 細胞が CD4 + FoxP+ T 細胞である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 25】

被験者の脾臓内の T エフェクター細胞の調節性 T 細胞 (Treg) に対する比を増加するための方法であって、前記方法は切断 LLO タンパク質をコードする組み換え型核酸を含む組み換え型リステリア株を前記被験者に投与する工程を含み、前記リステリアは前記内在性アラニンラセマーゼ遺伝子 (dal)、D-アミノ酸トランスフェラーゼ遺伝子 (dat)、および actA 遺伝子内での突然変異を含み、前記 T 細胞応答が T エフェクター細胞の調節性 T 細胞 (Treg) に対する比の増加を含む、方法。

【請求項 26】

前記腫瘍関連抗原がヒトパピローマウイルス E7 抗原である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記切断 LLO タンパク質が N 末端 LLO である、請求項 25～26 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

前記 LLO が配列番号：2 で示される、請求項 25～27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

前記リステリアが抗生剤耐性遺伝子を欠いている、請求項 25～28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

前記核酸が前記リステリア内のプラスミド内にある、請求項 25～29 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 1】

前記プラスミドがエピソード性プラスミドである、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記プラスミドがマルチコピープラスミドである、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記プラスミドが組み込みプラスミドである、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記被験者にアジュバントを投与することをさらに含む、請求項 2 5 ～ 3 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 5】

10

前記アジュバントが、顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、サポニン QS 2 1、モノホスホリルリピド A、CpG 含有オリゴヌクレオチド、または細菌毒素を含む、請求項 2 5 ～ 3 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記組み換え型リステリアの前記投与の前またはその後に免疫チェックポイントタンパク質阻害剤を同時投与することをさらに含む、請求項 2 5 ～ 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 7】

20

前記免疫チェックポイントタンパク質が、プログラム細胞死タンパク質 1（PD1）、T 細胞膜タンパク質 3（TIM3）、アデノシン A 2 a 受容体（A 2 a R）およびリンパ球活性化遺伝子 3（LAG3）、キラー免疫グロブリン受容体（KIR）、または細胞毒性 T-リンパ球抗原-4（CTLA-4）である、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記抗腫瘍免疫応答を強化するサイトカインを同時投与することをさらに含む、請求項 2 5 ～ 3 5 または請求項 2 5 ～ 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記サイトカインが、I 型インターフェロン（IFN- α ／IFN- β ）、TNF- α 、IL-1、IL-4、IL-12、INF- γ である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

30

前記方法が末梢リンパ器官内で前記 T 効果細胞の増殖を誘発する、請求項 2 5 ～ 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記 T 効果細胞の増殖が前記 Treg の数に影響を与えずに、前記末梢での T 効果細胞の調節性 T 細胞に対する比の増加をもたらす、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記 T 効果細胞が CD4+FoxP3- および CD8+T 細胞である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

40

前記 T 効果細胞が CD4+FoxP3-T 細胞である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記調節性 T 細胞が CD4+FoxP+T 細胞である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 5】

腫瘍またはガンを有する被験者内で抗腫瘍 T 細胞応答を引き出すことが前記被験者内の前記腫瘍またはガンを治療することを可能にする、請求項 1 ～ 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 6】

50

腫瘍またはガンを有する被験者内で抗腫瘍 T 細胞応答を引き出すことが前記被験者内の前記腫瘍またはガンを治療することを可能にする、請求項 2 5 ～ 4 4 のいずれか 1 項に記

載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

政府の関与

本発明は部分的に共同研究開発契約（C R A D A）# 0 2 6 4 8によって支援されている。米国政府は本発明に関してある特定の利益を有する場合がある。

【0002】

本発明はT細胞エフェクター細胞の調節性T細胞に対する比を増加するための方法を対象とする。本発明は、被験者にL L O断片および腫瘍関連抗原を含む融合ペプチドを含む組み換え型リステリア株を投与する工程を含み、腫瘍を治療する、腫瘍に対して保護する、および腫瘍に対する免疫応答を誘発する方法をさらに対象とする。

【背景技術】

【0003】

リステリア・モノサイトゲネス（L m）は、リステリア症を発生させるグラム陽性の通性細胞内病原体である。宿主細胞に侵入すると、L mは、血管膜を溶解し、細胞質の中に入ることを可能にして、そこで複製してアクチン重合化タンパク質（A c t A）の移動度に基づいて隣接する細胞に拡散する孔形成タンパク質、ステリオシンO（L L O）の生成を通してファゴリソソームから脱出する。細胞質内では、L m-分泌タンパク質はプロテアソームによって分解され、そして小胞体内のM H CクラスI分子と関連するペプチドへと処理される。この特有の特徴により、これは大変魅力的なガンワクチンベクターとされ、この中で腫瘍抗原は腫瘍に特異的な細胞毒性Tリンパ球（C T L）を活性化するためにM H CクラスI分子を提示される。

【0004】

予防的なH P Vワクチンは、H P V感染からおよび子宮頸部上皮内腫瘍（C I N）の発生からの保護に効果的であることが示されているが、進行子宮頸ガン患者のための治療ワクチンは、未だ開発中である。切断L L OおよびE 7抗原の全長から成る融合タンパク質を生成および分泌する、L m-L L O-E 7ワクチン、弱毒生L mベースのワクチンの構築が進歩してきている。L m-L L O-E 7が、マウス内で定着H P V不死化T C-1腫瘍の完全な退行を誘発できたことが示された。L m-L L O-E 7によって誘発された抗腫瘍活性は、これらの枯渇が腫瘍成長の障害を完全に無効にするので、C D 8+T細胞によって決定的に媒介され、そしてL m-L L O-E 7ワクチンが調節性T細胞（T r e g）を減少させることも観察された。C D 4+F o x P 3+（または最初に発見されたときは、C D 4+C D 2 5+）T細胞として識別されるT r e gは、免疫性を抑制する小集団である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

L m-L L O-E 7誘発性のT r e gの減少が、その抗腫瘍効果に寄与しうることが考えられるが、どのようにしてL m-L L O-E 7ワクチンがT r e gの減少を誘発するかは未だ不明確なままである。T r e gを操作する新規治療戦略を開発することによってその抗腫瘍有効性をさらに改善するために、L m-L L O-E 7がT r e gを減少させる機構を特定する必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、有益な免疫応答を引き起こすために、調節性T細胞の免疫抑制効果をどのようにして克服することができるかを詳細に示す、効果的かつ安全な免疫療法を提供する。この免疫療法は、内在性d a l、d a t、およびa c t Aの突然変異を含み、かつエピソームとして発現するN末端切断L L Oを含む弱毒化組み換え型リステリアの使用を採用している。

10

20

30

40

50

【0007】

一実施形態では、本発明は、前記腫瘍を有する被験者内で抗腫瘍T細胞応答を引き出す方法であって、前記被験者に組み換え型核酸を含む組み換え型リステリア株を投与する工程を含み、前記核酸分子は組み換え型ポリペプチドをコードする第1のオープンリーディングフレームと代謝をコードする第2のオープンリーディングフレームとを含み、前記組み換え型ポリペプチドは異種抗原またはその断片に融合した切断LLOタンパク質を含み、前記リステリアは前記内在性アラニンラセマーゼ遺伝子(dal)、D-アミノ酸トランスフェラーゼ遺伝子(dat)、およびactA遺伝子内に突然変異を含み、前記T細胞応答には、前記被験者の脾臓内でのTエフェクター細胞の調節性T細胞(Treg)に対する比の増加を含む、方法に関する。別の実施形態では、腫瘍またはガンを有する被験者内で抗腫瘍T細胞応答を引き出すことが前記被験者内の前記腫瘍またはガンを治療することを可能にする。別の実施形態では、腫瘍またはガンを有する被験者内で抗腫瘍T細胞応答を引き出すことが前記被験者内の転移の定着を防止する。

10

【0008】

別の実施形態では、本発明は、被験者の脾臓内のTエフェクター細胞の調節性T細胞(Treg)に対する比を増加するための方法であって、この方法は切断LLOタンパク質をコードする組み換え型核酸を含む組み換え型リステリア株を前記被験者に投与する工程を含み、前記リステリアは内在性アラニンラセマーゼ遺伝子(dal)、D-アミノ酸トランスフェラーゼ遺伝子(dat)、およびactA遺伝子内での突然変異を含み、前記T細胞応答がTエフェクター細胞の調節性T細胞(Treg)に対する比の増加を含む、方法に関する。

20

【0009】

以下の詳細な記述例、および図面から本発明の他の特徴および利点が明らかとなるであろう。しかしながら、詳細な説明から当業者には本発明の趣旨および範囲内での様々な変更および修正が明らかとなるので、この詳細な説明および具体的な実施例は本発明の好ましい実施形態を示す一方で、単に例示としてのみ与えられることを理解するべきである。

【図面の簡単な説明】

【0010】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、かつ本開示のある特定の態様をさらに実証するために含まれ、本明細書に提示した具体的な実施形態の詳細な説明と組み合わせてこれらの図面のうちの1つ以上を参照することによって本発明をより良好に理解することができる。本特許ファイルまたは本特許出願ファイルは、少なくとも1つのカラーで作成された図面を含む。本特許または本特許出願のカラー図面(複数可)付きの出版物の複製物は、要求に応じ、かつ必要な料金の支払いに応じて米国特許商標局から提供される。

30

【0011】

【図1】LmddA-LLO-E7は、Treg頻度の減少を伴うTC-1腫瘍の退行を誘発する。C57BL/6マウスに、各々 1×10^5 のTC-1腫瘍細胞を皮下接種し、腫瘍チャレンジ後10日目および17日目に、PBS($100 \mu\text{l}$)中、 0.1 LD_{50} のLmddA-LLO-E7($1 \times 10^8 \text{ CFU}$)、Lm-E7($1 \times 10^6 \text{ CFU}$)、またはLmddA-LLO($1 \times 10^8 \text{ CFU}$)で腹腔内免疫した。電子キャリパーを使用して、週に2回腫瘍を測定した。次の式によって腫瘍体積を測定した：長さ $\times$ 幅 $\times$ 幅 $\div 2$ 。腫瘍直径がおおよそ 2.0 cm に達したとき、または24日目にフローサイトメトリー解析のためにマウスを屠殺した。(A) 10日目 $\sim$ 24日目の平均腫瘍体積。(B) 24日目の腫瘍体積。(C) 生存パーセンテージ。(D) CD4+T細胞のうちのCD4+FoxP3+T細胞のフローサイトメトリープロファイル。(E) 脾臓内でのCD4+T細胞のうちのCD4+FoxP3+T細胞のパーセンテージ。(F) 脾臓内でのCD4+FoxP3+T細胞のCD8+T細胞に対する比。(G) 腫瘍内でのCD4+T細胞のうちのCD4+FoxP3+T細胞のパーセンテージ。(H) 腫瘍内でのCD4+FoxP3+T細胞のCD8+T細胞に対する比。データは平均 $\pm$ 標準誤差として提示されている。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、および*** $P < 0.001$ (マン・ホイットニー検

40

50

定)。データは3つの独立した実験(AおよびB)からのものであり、そしてこれは3つの独立した実験の代表である(C~H)。

【図2】LmddA-LLO-E7は定着TC-1腫瘍の退行を誘発する。C57BL/6マウスに、各々 1×10^5 のTC-1腫瘍細胞を皮下接種し、腫瘍チャレンジ後10日目および17日目に、PBS($100 \mu\text{l}$)中、0.1LD50のLmddA-LLO-E7(1×10^8 CFU)、Lm-E7(1×10^6 CFU)、またはLmddA-LLO(1×10^8 CFU)で腹腔内免疫した。電子キャリパーを使用して、週に2回腫瘍を測定した。次の式によって腫瘍体積を測定した：長さ×幅×幅/2。(A)PBS。(B)LmddA。(C)Lm-E7。(D)LmddA-LLO-E7。データは、3つの独立した実験からのものである。

【図3】LmddA-LLO-E7およびLm-E7は、類似のE7に特異的なCD8+T細胞応答を誘発する。C57BL/6マウスに、各々 1×10^5 のTC-1腫瘍細胞を皮下接種し、腫瘍チャレンジ後10日目および17日目に、PBS($100 \mu\text{l}$)中、0.1LD50のLmddA-LLO-E7(1×10^8 CFU)、LmddA-LLO(1×10^8 CFU)、LmddA(1×10^8 CFU)、Lm-E7(1×10^6 CFU)、または0.5LD50野生型Lm10403S(1×10^4 CFU)で、腹腔内免疫した。マウスを24日目に屠殺し、リンパ球を脾臓から分離し、そして腫瘍をフローサイトメトリーによって解析した。A.脾臓および腫瘍内のCD8+T細胞のうちのH-2D^bE7四量体+CD8+T細胞のフローサイトメトリープロファイル。(BおよびC)脾臓(B)および腫瘍(C)内のCD8+T細胞のうちのH-2D^bE7四量体+CD8+T細胞のパーセンテージ。(DおよびE)マウスの脾臓当たり(D)および腫瘍細胞100万個当たり(E)のH-2D^bE7四量体+CD8+T細胞の数。 $n = 3 \sim 10$ 。データは、3つの独立した実験の代表である。

【図4】L.モノサイトゲネスは、Treg頻度の減少を誘発するのに十分である。C57BL/6マウスに、各々 1×10^5 TC-1腫瘍細胞を皮下接種し、腫瘍チャレンジ後10日目および17日目に、PBS($100 \mu\text{l}$)中、0.1LD50のLmddA(1×10^8 CFU)または0.5LD50の野生型Lm10403S(1×10^4 CFU)で腹腔内免疫した。マウスを24日目に屠殺し、リンパ球を脾臓から分離し、そして腫瘍をフローサイトメトリーによって解析した。(A)CD4⁺T細胞のうちのCD4+FoxP3+T細胞のフローサイトメトリープロファイル。(B)脾臓内でのCD4+T細胞のうちのCD4+FoxP3+T細胞のパーセンテージ。(C)脾臓内でのCD4+FoxP3+T細胞のCD8+T細胞に対する比。(D)腫瘍内でのCD4+T細胞のうちのCD4+FoxP3+T細胞のパーセンテージ。(E)腫瘍内でのCD4+FoxP3+T細胞のCD8+T細胞に対する比。データは平均±標準誤差として提示されている。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、および*** $P < 0.001$ (マン・ホイットニー検定)。データは、3つの独立した実験の代表である。

【図5】L.モノサイトゲネスは、CD4+FoxP3-T細胞およびCD8+T細胞増殖を優先的に誘発することによってTreg頻度を減少させる。C57BL/6マウスに、各々 1×10^5 のTC-1腫瘍細胞を皮下接種し、腫瘍チャレンジ後10日目および17日目に、PBS($100 \mu\text{l}$)中、0.1LD50のLmddA-LLO-E7(1×10^8 CFU)、LmddA-LLO(1×10^8 CFU)、LmddA(1×10^8 CFU)、Lm-E7(1×10^6 CFU)、または0.5LD50野生型Lm10403S(1×10^4 CFU)で、腹腔内免疫した。マウスを24日目に屠殺し、腫瘍から分離したリンパ球をフローサイトメトリーによって解析した。データは平均±標準誤差として提示されている。 $n = 3 \sim 10$ 。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ (マン・ホイットニー検定)。データは、3つの独立した実験の代表である。

【図6】CD4+FoxP3-T細胞およびCD8+T細胞のL.モノサイトゲネス誘発性増殖はLLOに依存し、かつLLOによって媒介される。C57BL/6マウスに、PBS($100 \mu\text{l}$)中、 1×10^4 CFUの10403S、 Δhly 、 $\Delta hly::pfo$ 、または $hly::Tn917-lac(pAM401-hly)$ を、腹腔内注射した。

10

20

30

40

50

マウスを注射後7日目に屠殺し、リンパ球を脾臓から分離し、そして腫瘍をフローサイトメトリーによって解析した。(A)脾臓内のT細胞数。(B)CD4+T細胞のうちのCD4+FoxP3+T細胞のフローサイトメトリープロファイル。(C)CD4+T細胞のうちのCD4+FoxP3+T細胞のパーセンテージ。(D)CD4+FoxP3+T細胞のCD8+T細胞に対する比。 $*P<0.05$ (マン・ホイットニー検定)。データは、3つの独立した実験の代表である。

【図7】LmddA内の切断LLOのエピソームの発現はCD4+FoxP3-T細胞およびCD8+T細胞のより高いレベルまでの増殖を誘発する。C57BL/6マウスに、PBS (100 μ l) 中、 1×10^8 CFUのLmddAまたはLmddA-LLOを、腹腔内注射した。マウスを注射後7日目に屠殺し、リンパ球を脾臓から分離し、そして腫瘍をフローサイトメトリーによって解析した。(A)脾臓内のT細胞数。(B)CD4+T細胞のうちのCD4+FoxP3+T細胞のフローサイトメトリープロファイル。(C)CD4+T細胞のうちのCD4+FoxP3+T細胞のパーセンテージ。(D)CD4+FoxP3+T細胞のCD8+T細胞に対する比。(E)Ki-67+T細胞のフローサイトメトリープロファイル。(F)Ki-67+T細胞のパーセンテージ。(G)Ki-67+T細胞の蛍光強度。データは平均±標準誤差として提示されている。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、および $***P<0.001$ (マン・ホイットニー検定)。データは、3つの独立した実験の代表である。

【図8】Lm-E7とLmddA-LLOとの組み合わせは、定着TC-1腫瘍の退行を誘発する。C57BL/6マウスに、各々 1×10^5 TC-1腫瘍細胞を皮下接種し、腫瘍チャレンジ後10日目および17日目に、PBS (100 μ l) 中、0.05 LD50のLm-E7 (5×10^5 CFU)、0.05 LD50のLmddA-LLO (5×10^7 CFU)、0.05 LD50のLm-E7プラス0.05 LD50のLmddA-LLOで腹腔内免疫した。電子キャリパーを使用して腫瘍を週に2回測定し、そして腫瘍体積を次の式で計算した：長さ×幅×幅/2。24日目にマウスの生存を観察するかまたは屠殺し、脾臓から分離したリンパ球をフローサイトメトリーによって解析した。(A)10日目～24日目の平均腫瘍体積。(B)24日目の腫瘍体積。(C)生存パーセンテージ。(D)脾臓内のT細胞の数。(E)CD4+T細胞のうちのCD4+FoxP3+T細胞のフローサイトメトリープロファイル。(F)CD4+T細胞のうちのCD4+FoxP3+T細胞のパーセンテージ。(G)CD4+FoxP3+T細胞のCD8+T細胞に対する比。データは平均±標準誤差として提示されている。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、および $***P<0.001$ (マン・ホイットニー検定)。データは、2つの独立した実験の代表である。

【図9】Tregの養子移植は、LmddA-LLO-E7の定着TC-1腫瘍に対する抗腫瘍有効性を損なう。C57BL/6マウス (生後11週) に、各々 1×10^5 TC-1腫瘍細胞を皮下注射し、腫瘍チャレンジ後9日目にCD4+CD25+Treg (1×10^6 細胞/各) を静注した。マウスを、腫瘍チャレンジ後10日目および17日目に、PBS (100 μ l) 中の0.1 LD50のLmddA-LLO-E7 (1×10^8 CFU) で腹腔内免疫した。電子キャリパーを使用して腫瘍を週に2回測定し、そして腫瘍体積を次の式で計算した：長さ×幅×幅/2。マウスを注射後24日目に屠殺し、脾臓から分離したリンパ球をフローサイトメトリーによって解析した。(A)10日目～24日目の平均腫瘍体積。(B)24日目の腫瘍体積。(C)CD4+T細胞のうちのCD4+FoxP3+T細胞のフローサイトメトリープロファイル。(D)脾臓内でのCD4+T細胞のうちのCD4+FoxP3+T細胞のパーセンテージ。(E)腫瘍内でのCD4+T細胞のうちのCD4+FoxP3+T細胞のパーセンテージ。(F)脾臓内のT細胞の数。(G)腫瘍細胞100万個当たりのT細胞の数。データは平均±標準誤差として提示されている。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、および $***P<0.001$ (マン・ホイットニー検定)。データは、2つの独立した実験の代表である。

【図10】LmddAはLm-E7抗腫瘍活性を増強しない。C57BL/6マウスに、各々 1×10^5 TC-1腫瘍細胞を皮下接種し、腫瘍チャレンジ後10日目および17日

10

20

30

40

50

目に、PBS (100 μ l) 中、0.05 LD50 の Lm-E7 (5×10^5 CFU)、0.05 LD50 の LmddA (5×10^7 CFU)、または0.05 LD50 の Lm-E7 プラス0.05 LD50 の LmddA で腹腔内免疫した。電子キャリパーを使用して腫瘍を測定し、腫瘍体積を次の式で計算した：長さ×幅×幅／2。24日目の腫瘍体積を示す。データは平均±標準誤差として提示されている。

【発明を実施するための形態】

【0012】

一態様では、本発明は、組み換え型ポリペプチドをコードする組み換え型核酸を含む組み換え型リステリアワクチンベクターを提供し、組み換え型ポリペプチドは異種抗原に融合した非溶血性N末端リステリオリシン (LLO) を含み、前記リステリアは内在性 d a l / d a t および a c t A 遺伝子内の突然変異を含み、前記T細胞応答は前記被験者の脾臓内のTエフェクター細胞の調節性T細胞 (T r e g) に対する比の増加を含む。

10

【0013】

別の態様では、本発明は、前記腫瘍を有する被験者内で抗腫瘍T細胞応答を引き出す方法であって、前記被験者に組み換え型核酸を含む組み換え型リステリア株を投与する工程を含み、前記核酸分子は組み換え型ポリペプチドをコードする第1のオープンリーディングフレームと代謝をコードする第2のオープンリーディングフレームとを含み、前記組み換え型ポリペプチドは異種抗原またはその断片に融合した切断LLOタンパク質を含み、前記リステリアは前記内在性アラニンラセマーゼ遺伝子 (d a l)、D-アミノ酸トランスフェラーゼ遺伝子 (d a t)、および a c t A 遺伝子内に突然変異を含み、前記T細胞応答には、前記被験者の脾臓内でのTエフェクター細胞の調節性T細胞 (T r e g) に対する比の増加を含む、方法を提供する。別の実施形態では、腫瘍またはがんを有する被験者内で抗腫瘍T細胞応答を引き出すことが前記被験者内の前記腫瘍またはがんを治療することを可能にする。別の実施形態では、腫瘍またはがんを有する被験者内で抗腫瘍T細胞応答を引き出すことが前記被験者内の転移の定着を防止する。

20

【0014】

別の実施形態では、異種抗原は腫瘍関連抗原である。

【0015】

一実施形態では、前記被験者の脾臓内のTエフェクター細胞の調節性T細胞 (T r e g) に対する比を増加することは、前記被験者内のより著名な抗腫瘍応答を可能にする。

30

【0016】

一実施形態では、本明細書に提供される組み換え型リステリア株は、抗生剤耐性遺伝子を欠いている。

【0017】

さらなる態様では、本発明は、被験者の脾臓内のTエフェクター細胞の調節性T細胞 (T r e g) に対する比を増加するための方法であって、この方法は切断LLOタンパク質をコードする組み換え型核酸を含む組み換え型リステリア株を前記被験者に投与する工程を含み、前記リステリアは内在性アラニンラセマーゼ遺伝子 (d a l)、D-アミノ酸トランスフェラーゼ遺伝子 (d a t)、および a c t A 遺伝子内での突然変異を含み、前記T細胞応答がTエフェクター細胞の調節性T細胞 (T r e g) に対する比の増加を含む、方法を提供する。

40

【0018】

一実施形態では、本明細書に提供される組み換え型リステリアは、ファゴリソソームを避ける能力を有する。

【0019】

別の実施形態では、Tエフェクター細胞はCD4 + F o x P 3 - T細胞を含む。別の実施形態では、Tエフェクター細胞はCD4 + F o x P 3 - T細胞である。別の実施形態では、Tエフェクター細胞はCD4 + F o x P 3 - T細胞およびCD8 + T細胞を含む。別の実施形態では、Tエフェクター細胞はCD4 + F o x P 3 - T細胞およびCD8 + T細胞である。別の実施形態では、調節性T細胞はCD4 + F o x P 3 + T細胞である。

50

【0020】

一実施形態では、本発明は、腫瘍またはガンを治療する、腫瘍またはガンから保護する、および腫瘍またはガンに対する免疫応答を誘発する方法を提供し、これには本明細書に提供される組み換え型リステリア株を被験者に投与する工程を含む。

【0021】

一実施形態では、本発明はヒト被験者内の腫瘍またはガンを治療する方法を提供し、これには被験者に本明細書に提供される組み換え型リステリア株を投与する工程を含み、この組み換え型リステリア株はLLOタンパク質のN末端断片および腫瘍関連抗原を含む組み換え型ポリペプチドを含み、それによってこの組み換え型リステリア株が腫瘍関連抗原に対する免疫応答を誘発し、これによってヒト被験者内の腫瘍またはガンを治療する。別の実施形態では、免疫応答はT細胞応答である。別の実施形態では、T細胞応答はCD4 + FoxP3 - T細胞応答である。別の実施形態では、T細胞応答はCD8 + T細胞応答である。別の実施形態では、T細胞応答はCD4 + FoxP3 - T細胞応答およびCD8 + T細胞応答である。

【0022】

別の実施形態では、本発明は腫瘍またはガンから被験者を保護する方法を提供し、これには本明細書に提供される組み換え型リステリア株を被験者に投与する工程を含む。別の実施形態では、本発明は、被験者内で腫瘍の退行を誘発する方法を提供し、これには本明細書に提供される組み換え型リステリア株を被験者に投与する工程を含む。別の実施形態では、本発明は腫瘍またはガンの発生または再発を減少させる方法を提供し、これには本明細書に提供される組み換え型リステリア株を被験者に投与する工程を含む。別の実施形態では、本発明は被験者内での腫瘍の形成を抑制する方法を提供し、これには本明細書に提供される組み換え型リステリア株を被験者に投与する工程を含む。別の実施形態では、本発明は被験者内でガンの寛解を誘発する方法を提供し、これには本明細書に提供される組み換え型リステリア株を被験者に投与する工程を含む。

【0023】

一実施形態では、リステリアゲノムは、一実施形態では病原性因子である内在性ActA遺伝子の欠失を含む。一実施形態では、かかる欠失は、より弱毒化し、ひいてはヒトの使用のためにより安全なリステリア株を提供する。この実施形態によると、抗原性ポリペプチドは、リステリア染色体では、フレーム内でLLOと統合される。別の実施形態では、統合核酸分子は、ActA遺伝子座へと統合される。別の実施形態では、ActAをコードする染色体の核酸は、抗原をコードする核酸分子によって置き換えられる。

【0024】

一実施形態では、本明細書に提供される核酸分子は、異種抗原またはその断片を含む組み換え型ポリペプチドをコードする第1のオープンリーディングフレームを含む。別の実施形態では、組み換え型ポリペプチドは異種抗原と融合したN末端LLOをさらに含む。別の実施形態では、本明細書に提供される核酸分子は代謝酵素をコードする第2のオープンリーディングフレームをさらに含む。別の実施形態では、代謝酵素は、組み換え型リステリア株の染色体を欠いている内在性遺伝子を相補する。別の実施形態では、第2のオープンリーディングフレームによってコードされる代謝酵素はアラニンラセマーゼ酵素(dal)である。別の実施形態では、第2のオープンリーディングフレームによってコードされる代謝酵素はD-アミノ酸トランスフェラーゼ酵素(dat)である。別の実施形態では、本明細書に提供される組み換え型リステリア株はゲノムのdal / dat遺伝子の突然変異または欠失を含む。別の実施形態では、リステリアはdal / dat遺伝子を欠いている。

【0025】

別の実施形態では、本発明の方法および組成物の核酸分子は、プロモーター／調節性配列に動作可能にリンクする。別の実施形態では、本発明の方法および組成物の第1のオープンリーディングフレームは、プロモーター／調節性配列に動作可能にリンクする。別の実施形態では、本発明の方法および組成物の第2のオープンリーディングフレームは、プ

ロモーター／調節性配列に動作可能にリンクする。別の実施形態では、オープンリーディングフレームの各々はプロモーター／調節性配列に動作可能にリンクする。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

【0026】

別の実施形態では、「代謝酵素」は、宿主細菌によって要求される栄養素の合成に関与する酵素を指す。別の実施形態では、この用語は宿主細菌によって要求される栄養素の合成のために要求される酵素を指す。別の実施形態では、この用語は宿主細菌によって利用される栄養素の合成に関与する酵素を指す。別の実施形態では、この用語は宿主細菌の増殖の保持のために要求される栄養素の合成に関与する酵素を指す。別の実施形態では、この酵素は栄養素の合成のために要求される。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

10

【0027】

別の実施形態では、組み換え型リステリアは、弱毒化栄養要求性株である。

【0028】

一実施形態では、弱毒化株は、Lm dal (−) dat (−) (Lmdd) である。別の実施形態では、弱毒化株は、Lm dal (−) dat (−) ΔactA (LmddA) である。LmddAは、リステリアワクチンベクターに基づき、これは病原性遺伝子actAの欠失に起因して弱毒化され、かつインビボおよびインビトロでの望ましい異種抗原または切断LLO発現のためにdal遺伝子の相補によってプラスミドを保持する。

【0029】

別の実施形態では、弱毒化株はLmddaである。別の実施形態では、本明細書に提供されるリステリア株はゲノムのdal/dat/actA遺伝子の突然変異または欠失を含む。別の実施形態では、リステリアはdal/dat/actA遺伝子を欠いている。別の実施形態では、弱毒化株はLmΔactAである。別の実施形態では、弱毒化株はLmΔPrfAである。別の実施形態では、弱毒化株はLmΔPlcBである。別の実施形態では、弱毒化株はLmΔPlcAである。別の実施形態では、株は上述の株のいずれかの二重変異体または三重変異体である。別の実施形態では、この株は、リステリアベースのワクチンの先天的な特性である強いアジュバント効果を発揮する。別の実施形態では、この株はEGDリステリアバックボーンから作られる。別の実施形態では、本発明で使用する株は非溶血性LLOを発現するリステリア株である。

20

30

【0030】

別の実施形態では、リステリア株は、栄養要求性突然変異体である。別の実施形態では、リステリア株はビタミン合成遺伝子をコードする遺伝子が欠損している。別の実施形態では、リステリア株はパントテン酸シンターゼをコードする遺伝子が欠損している。

【0031】

一実施形態では、D-アラニンに欠損したリステリアのAA株の生成は、例えば、欠失突然変異生成、挿入突然変異生成、およびフレームシフト突然変異の発生の結果として生じる突然変異生成、タンパク質の中途終始を生じる突然変異、または遺伝子発現に影響を与える調節性配列の突然変異を含む、当業者には周知の数多くの方法で達成されうる。別の実施形態では、組み換え型DNA技法を使用して、または変異原性化学薬品もしくは放射、およびそれに続く突然変異体の選択を使用する従来の突然変異生成技術を使用して突然変異生成を達成することができる。別の実施形態では、栄養要求性表現型の復帰をとまなう可能性が低いため、欠失変異体が好ましい。別の実施形態では、本明細書に提示されるプロトコルに従って生成されるD-アラニンの変異体は、単純な実験室の培養アッセイでD-アラニンの非存在下で成長する能力を試験される場合がある。別の実施形態では、この化合物の非存在下で成長することができない変異体がさらなる研究のために選択される。

40

【0032】

別の実施形態では、本明細書に提供されるように、リステリアの突然変異生成のための標的として上述のD-アラニンに関連する遺伝子に加えて、代謝酵素の合成に関与する他

50

の遺伝子が使用されてもよい。

【0033】

別の実施形態では、代謝酵素は、組み換え型細菌株の染色体の残りのものに欠けている内在性代謝遺伝子を相補する。一実施形態では、内在性代謝遺伝子は、染色体内で突然変異する。別の実施形態では、内在性代謝遺伝子は染色体から欠失される。別の実施形態では、前記代謝酵素はアミノ酸代謝酵素である。別の実施形態では、前記代謝酵素は前記組み換え型リステリア株内で細胞壁合成のために使用されるアミノ酸の形成を触媒する。別の実施形態では、前記代謝酵素はアラニンラセマーゼ酵素である。別の実施形態では、前記代謝酵素はD-アミノ酸トランスフェラーゼ酵素である。各々の可能性は本明細書に提供される方法および組成物の別個の実施形態を代表する。

10

【0034】

一実施形態では、前記栄養要求性リステリア株は、前記栄養要求性リステリア株の栄養要求性を相補する代謝酵素を含むエピソームの発現ベクターを含む。別の実施形態では、構成物はエピソームの様式でリステリア株内に含有される。別の実施形態では、外来抗原は組み換え型リステリア株が抱えるベクターから発現される。別の実施形態では、前記エピソームの発現ベクターは抗生物質耐性マーカーを欠いている。一実施形態では、本明細書に提供される方法および組成物の抗原はP E S T配列を含むポリペプチドに融合される。別の実施形態では、P E S T配列を含む前記ポリペプチドは切断L L Oである。別の実施形態では、P E S T配列を含む前記ポリペプチドはA c t Aである。

20

【0035】

別の実施形態では、リステリア株はA A代謝酵素が欠損している。別の実施形態では、リステリア株はDグルタミン酸シンターゼ遺伝子が欠損している。別の実施形態では、リステリア株はd a t遺伝子が欠損している。別の実施形態では、リステリア株はd a l遺伝子が欠損している。別の実施形態では、リステリア株はd g a遺伝子が欠損している。別の実施形態では、リステリア株は、ジアミノピメリン酸の合成に関与する遺伝子が欠損している。C y s K。別の実施形態では、遺伝子はビタミンB 1 2に依存しないメチオニンシンターゼである。別の実施形態では、遺伝子はt r p Aである。別の実施形態では、遺伝子はt r p Bである。別の実施形態では、遺伝子はt r p Eである。別の実施形態では、遺伝子はa s n Bである。別の実施形態では、遺伝子はg l t Dである。別の実施形態では、遺伝子はg l t Bである。別の実施形態では、遺伝子はl e u Aである。別の実施形態では、遺伝子はa r g Gである。別の実施形態では、遺伝子はt h r Cである。別の実施形態では、リステリア株は上述の遺伝子のうちの1つ以上が欠損している。

30

【0036】

別の実施形態では、リステリア株はシンターゼ遺伝子が欠損している。別の実施形態では、遺伝子は、A A合成遺伝子である。別の実施形態では、遺伝子は、f o l Pである。別の実施形態では、遺伝子はジヒドロウリジンシンターゼファミリータンパク質である。別の実施形態では、遺伝子はi s p Dである。別の実施形態では、遺伝子はi s p Fである。別の実施形態では、遺伝子はホスホエノールピルビン酸シンターゼである。別の実施形態では、遺伝子はh i s Fである。別の実施形態では、遺伝子はh i s Hである。別の実施形態では、遺伝子はf l i Iである。別の実施形態では、遺伝子はリボソームの大型サブユニットシュドウリジンシンターゼである。別の実施形態では、遺伝子はi s p Dである。別の実施形態では、遺伝子は二機能性G M Pシンターゼ／グルタミンアミドトランスフェラーゼタンパク質である。別の実施形態では、遺伝子はc o b Sである。別の実施形態では、遺伝子はc o b Bである。別の実施形態では、遺伝子はc b i Dである。別の実施形態では、遺伝子はウロポルフィリンーI I I C-メチルトランスフェラーゼ／ウロポルフィリノーゲンーI I Iシンターゼである。別の実施形態では、遺伝子はc o b Qである。別の実施形態では、遺伝子はu p p Sである。別の実施形態では、遺伝子はt r u Bである。別の実施形態では、遺伝子はd x sである。別の実施形態では、遺伝子はm v a Sである。別の実施形態では、遺伝子はd a p Aである。別の実施形態では、遺伝子はi s p Gである。別の実施形態では、遺伝子はf o l Cである。別の実施形態では、遺

40

50

伝子は、クエン酸シンターゼである。別の実施形態では、遺伝子はa r g Jである。別の実施形態では、遺伝子は3-デオキシ-7-ホスホヘプトロン酸シンターゼである。別の実施形態では、遺伝子はインドール-3-グリセロールリン酸シンターゼである。別の実施形態では、遺伝子はアントラニル酸シンターゼ／グルタミンアミドトランスフェラーゼ構成成分である。別の実施形態では、遺伝子はm e n Bである。別の実施形態では、遺伝子はメナキノン特異的イソコリスミ酸シンターゼである。別の実施形態では、遺伝子はホスホリボシルホルミルグリシンアミジンシンターゼ I または I I である。別の実施形態では、遺伝子はホスホリボシルアミノイミダゾールスクシノカルボキサミドシンターゼである。別の実施形態では、遺伝子はc a r Bである。別の実施形態では、遺伝子はc a r Aである。別の実施形態では、遺伝子はt h y Aである。別の実施形態では、遺伝子はm g s Aである。別の実施形態では、遺伝子はa r o Bである。別の実施形態では、遺伝子はh e p Bである。別の実施形態では、遺伝子はr l u Bである。別の実施形態では、遺伝子はi l v Bである。別の実施形態では、遺伝子はi l v Nである。別の実施形態では、遺伝子はa l s Sである。別の実施形態では、遺伝子はf a b Fである。別の実施形態では、遺伝子はf a b Hである。別の実施形態では、遺伝子はシュドウリジンシンターゼである。別の実施形態では、遺伝子はp y r Gである。別の実施形態では、遺伝子はt r u Aである。別の実施形態では、遺伝子はp a b Bである。別の実施形態では、遺伝子はa t p シンターゼ遺伝子（例えば、a t p C、a t p D-2、a p t G、a t p A-2、等々）である。

【0037】

別の実施形態では、遺伝子はp h o Pである。別の実施形態では、遺伝子はa r o Aである。別の実施形態では、遺伝子はa r o Cである。別の実施形態では、遺伝子はa r o Dである。別の実施形態では、遺伝子はp l c Bである。

【0038】

別の実施形態では、リステリア株はペプチド輸送体が欠損している。別の実施形態では、遺伝子はA B C 輸送体／A T P 結合／パーミアーズタンパク質である。別の実施形態では、遺伝子はオリゴペプチドA B C 輸送体／オリゴペプチド結合タンパク質である。別の実施形態では、遺伝子はオリゴペプチドA B C 輸送体／パーミアーズタンパク質である。別の実施形態では、遺伝子は亜鉛A B C 輸送体／亜鉛結合タンパク質である。別の実施形態では、遺伝子は糖A B C 輸送体である。別の実施形態では、遺伝子はリン酸輸送体である。別の実施形態では、遺伝子はZ I P 亜鉛輸送体である。別の実施形態では、遺伝子はE m r B／Q a c A ファミリーの薬剤耐性輸送体である。別の実施形態では、遺伝子は硫酸輸送体である。別の実施形態では、遺伝子はプロトン依存性オリゴペプチド輸送体である。別の実施形態では、遺伝子はマグネシウム輸送体である。別の実施形態では、遺伝子は蟻酸塩／亜硝酸輸送体である。別の実施形態では、遺伝子はスペルミジン／プトレッシンA B C 輸送体である。別の実施形態では、遺伝子はN a／P i 共輸送体である。別の実施形態では、遺伝子は糖リン酸輸送体である。別の実施形態では、遺伝子はグルタミンA B C 輸送体である。別の実施形態では、遺伝子はメジャーファシリテーターファミリーの輸送体である。別の実施形態では、遺伝子はグリシンベタイン／L-プロリンA B C 輸送体である。別の実施形態では、遺伝子はモリブデンA B C 輸送体である。別の実施形態では、遺伝子はテイコ酸A B C 輸送体である。別の実施形態では、遺伝子はコバルトA B C 輸送体である。別の実施形態では、遺伝子はアンモニウム輸送体である。別の実施形態では、遺伝子はアミノ酸A B C 輸送体である。別の実施形態では、遺伝子は細胞分裂A B C 輸送体である。別の実施形態では、遺伝子はマンガンA B C 輸送体である。別の実施形態では、遺伝子は鉄化合物A B C 輸送体である。別の実施形態では、遺伝子はマルトース／マルトデキストリンA B C 輸送体である。別の実施形態では、遺伝子はB c r／C f l A ファミリーの薬剤耐性輸送体である。別の実施形態では、遺伝子は上記のタンパク質のうちの1つのサブユニットである。

【0039】

一実施形態では、組み換え型リステリアに到達するために、リステリアを形質転換する

ために使用される核酸分子が本明細書に提供される。別の実施形態では、リステリアを形質転換するために使用される本明細書に提供される核酸は病原性遺伝子を欠いている。別の実施形態では、核酸分子はリステリアゲノムの中へと組み込まれ、そして非機能的病原性遺伝子を担持する。別の実施形態では、病原性遺伝子は組み換え型リステリアのゲノム内で突然変異する。別の実施形態では、病原性遺伝子は組み換え型リステリアのゲノム内で欠失する。別の実施形態では、病原性遺伝子は組み換え型リステリアのゲノム内で切断される。さらに別の実施形態では、核酸分子はリステリアゲノム内に存在する内在性遺伝子を不活性化するために使用される。さらに別の実施形態では、病原性遺伝子は、a c t A 遺伝子、i n l A 遺伝子、および i n l B 遺伝子、i n l C 遺伝子、i n l J 遺伝子、p l b C 遺伝子、b s h 遺伝子、p r f A 遺伝子、またはこれらの組み合わせである。病原性遺伝子は、組み換え型リステリア内で病原性に関連することが当該技術分野で知られている任意の遺伝子としうることを当業者は理解するであろう。

10

【0040】

さらに別の実施形態では、リステリア株は、i n l A 突然変異体、i n l B 突然変異体、i n l C 突然変異体、i n l J 突然変異体、p r f A 突然変異体、a c t A 突然変異体、p r f A 突然変異体、p l c B 欠失突然変異体、p l c A および p l c B 遺伝子の両方の二重変異体、または a c t A および i n l B 遺伝子の二重変異体である。別の実施形態では、リステリアはこれらの遺伝子の個別または組み合わせでの欠失または突然変異を含む。別の実施形態では、本明細書に提供されるリステリアは、遺伝子のうちの各々1つを欠いている。別の実施形態では、本明細書に提供されるリステリアは、a c t A、p r f A、および d a l / d a t 遺伝子を含む、本明細書に提供される任意の遺伝子のうちの少なくとも1つでかつ最高10個を欠いている。一実施形態では、弱毒生リステリアは、組み換え型リステリアである。別の実施形態では、組み換え型リステリアは、ゲノムインターナリンC (i n l C) 遺伝子の突然変異または欠失を含む。別の実施形態では、組み換え型リステリアは、ゲノム a c t A 遺伝子およびゲノムインターナリンC 遺伝子の突然変異または欠失を含む。一実施形態では、リステリアの隣接するT細胞への転座は、プロセス中に関与する a c t A 遺伝子および／または i n l C 遺伝子の欠失によって阻害され、これはプロセスに関与するので、それによって、免疫原性の増加およびワクチンバックボーンとしての有用性によって結果として予想外に高いレベルの弱毒化が得られる。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

20

30

【0041】

一実施形態では、代謝遺伝子、病原性遺伝子などはリステリア株の染色体を欠いている。別の実施形態では、代謝遺伝子、病原性遺伝子などはリステリア株の染色体および何らかのエピソーム性の遺伝子的な要素を欠いている。別の実施形態では、代謝遺伝子、病原性遺伝子などは、病原性株のゲノムを欠いている。一実施形態では、病原性遺伝子は、染色体内で突然変異する。別の実施形態では、病原性遺伝子は染色体から欠失される。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

【0042】

一実施形態では、本明細書に提供される代謝酵素または相補する遺伝子をコードするプラスミドを含む栄養要求性細菌を選択するために、形質転換した栄養要求性細菌をアミノ酸代謝遺伝子または相補遺伝子の発現を選択する培地上で成長させる。別の実施形態では、D-グルタミン酸合成のための栄養要求性の細菌は、D-グルタミン酸合成のための遺伝子を含むプラスミドを用いて形質転換され、そして栄養要求性細菌はD-グルタミン酸無しで成長し、一方でプラスミドを用いて形質転換されていない栄養要求性細菌、またはD-グルタミン酸合成のためのタンパク質をコードするプラスミドを発現していない栄養要求性細菌は、成長しないことになる。別の実施形態では、D-アラニン合成のための栄養要求性の細菌は、プラスミドがD-アラニン合成のためのアミノ酸代謝酵素をコードする分離された核酸を含む場合、本発明のプラスミドを形質転換し、かつ発現するときD-アラニン無しで成長することになる。必要な増殖因子、補助剤、アミノ酸、ビタミン、抗生剤、およびこれに類するものを含んでいる、または欠いている適切な培地を作成するた

40

50

めのかかる方法は当該技術分野で既知であり、そして市販されている（B e c t o n - D i c k i n s o n、米国ニュージャージー州 F r a n k l i n L a k e s）。各々の方法は本発明の別個の実施形態を代表する。

【0043】

別の実施形態では、本発明のプラスミドを含む栄養要求性細菌が適切な培地上で一旦選択されると、この細菌は選択的な圧力の存在下で繁殖する。かかる繁殖は、栄養要求性因子を有しない培地内での細菌の成長を含む。栄養要求性細菌内でのアミノ酸代謝酵素を発現するプラスミドの存在は、細菌とともにプラスミドが複製することを確保し、したがってプラスミドを持つ細菌を継続的に選択する。本開示および本明細書の方法を備えるとき、プラスミドを含む栄養要求性細菌が成長する培地の体積を調節することによって、当業者は、リステリアワクチンベクターの生産を容易にスケールアップすることができる。

10

【0044】

別の実施形態では、他の栄養要求性株および相補系が本発明の使用に適合されることを当業者は理解するであろう。

【0045】

一実施形態では、N末端 L L O タンパク質断片および異種抗原は、別の実施形態では、相互に直接融合している。別の実施形態では、N末端 L L O タンパク質断片および異種抗原をコードする遺伝子は相互に直接融合している。別の実施形態では、N末端 L L O タンパク質断片および異種抗原はリンカーペプチドを介して付着している。別の実施形態では、N末端 L L O タンパク質断片および異種抗原は異種ペプチドを介して付着している。別の実施形態では、N末端 L L O タンパク質断片は異種抗原へのN末端である。別の実施形態では、N末端 L L O タンパク質断片は、融合タンパク質のN最末端部分である。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。本明細書に提供されるように、L L O を発現する組み換え型リステリア株は脾臓内で、C D 4 + F o x P 3 - T 細胞および C D 8 + T 細胞の数を、切断 L L O を発現しない組み換え型リステリア株より高いレベルまで予想外に増加させ（実施例 5）、これによって C D 4 + F o x P 3 - T 細胞および C D 8 + T 細胞の増殖が L L O によって直接媒介されることを実証している（実施例 4）。本明細書にさらに提供されるように、切断 L L O をエピソーム的に発現する組み換え型リステリアは、T r e g の数を減少せずに C D 4 + F o x P 3 - T 細胞および C D 8 + T の増殖を誘発することによって、C D 4 + F o x P 3 - T 細胞および C D 8 + T 細胞の C D 4 + F o x P 3 + T 細胞（調節性 T 細胞、すなわち T r e g）に対する比を予想外に増加させ、これによって T r e g の頻度をそれに比例して減少させる。本明細書にさらに提供されるように、L L O を有する融合タンパク質の状況で H P V - E 7 を発現する組み換え型リステリアは、C D 4 + F o x P 3 - T 細胞および C D 8 + T 細胞増殖を選択的に誘発し、これはワクチンの抗腫瘍活性を強化し、ケモカイン受容体 C C R 5 および C X C R 3 の発現を C D 4 + F o x P 3 - T 細胞および C D 8 + T 細胞上で上方制御するが、C D 4 + F o x P 3 + T 細胞上では上方制御せず、C C R 5 および C X C R 3 が T h 1 および C D 8 + T 細胞輸送のために極めて重要であることを示している（実施例 7 参照）。

20

30

【0046】

一実施形態では、本明細書に提供される組み換え型リステリア株は組み換え型ポリペプチドを含む。別の実施形態では、本明細書に提供される組み換え型リステリア株は、組み換え型ポリペプチドを発現する。別の実施形態では、組み換え型リステリア株は組み換え型ポリペプチドをコードするプラスミドを含む。別の実施形態では、組み換え型リステリア株は本明細書に提供される組み換え型ポリペプチドをコードする組み換え型核酸を含む。別の実施形態では、本明細書に提供されるプラスミドは、前記組み換え型リステリア株の染色体の中へと統合されないエピソーム性プラスミドである。別の実施形態では、プラスミドは前記リステリア株の染色体の中へと組み込まれる組み込みプラスミドである。別の実施形態では、プラスミドはマルチコピープラスミドである。

40

【0047】

別の実施形態では、本発明の方法は、本明細書に提供される弱毒化リステリア株を含む

50

免疫原性組成物を用いて被験者をブーストすることをさらに含む。別の実施形態では、本発明の方法は本明細書に提供される弱毒化リステリア株を含む免疫原性組成物のブースター用量を投与する工程を含む。別の実施形態では、ブースター用量は前記免疫原性組成物の代替形態である。別の実施形態では、本発明の方法は被験者にブースター免疫原性組成物を投与する工程をさらに含む。一実施形態では、ブースター用量は前記免疫原性組成物の単一のプライミング用量の後に続く。別の実施形態では、プライミング用量の後に単一のブースター用量を投与する。別の実施形態では、プライミング用量の後に2回のブースター用量を投与する。別の実施形態では、プライミング用量の後に3回のブースター投与量を投与する。一実施形態では、本明細書に提供される弱毒化リステリアを含む免疫原性組成物のプライム用量とブースト用量との間の期間は当業者によって実験的に決定される。別の実施形態では、この用量は当業者によって実験的に決定される。別の実施形態では、プライム用量とブースト用量との間の期間は1週間であり、別の実施形態では、これは2週間であり、別の実施形態では、これは3週間であり、別の実施形態では、これは4週間であり、別の実施形態では、これは5週間であり、別の実施形態では、これは6～8週間であり、さらに別の実施形態では、ブースト用量を免疫原性組成物のプライム用量の8～10週間後に投与する。

10

【0048】

異種「プライムブースト」戦略は免疫応答および多数の病原体に対する保護を強化するために効果的であった。Schneider et al., Immunol. Rev. 170:29-38 (1999); Robinson, H. L., Nat. Rev. Immunol. 2:239-50 (2002); Gonzalo, R. M. et al., Strain 20:1226-31 (2002); Tanghe, A., Infect. Immun. 69:3041-7 (2001)。プライム注射とブースト注射において異なる形態で抗原を提供すると、抗原に対する免疫応答を最大化するように思われる。DNA株プライミングの後にアジュバント中のタンパク質を用いたブースティング、または抗原をコードするDNAのウイルスベクター送達が続くのが、抗原特異的抗体およびCD4+T細胞応答またはCD8+T細胞応答のそれぞれの改善の最も効果的なやり方であるように思われる。Shiver J. W. et al., Nature 415:331-5 (2002); Gilbert, S. C. et al., Strain 20:1039-45 (2002); Billaut-Mulot, O. et al., Strain 19:95-102 (2000); Sin, J. I. et al., DNA Cell Biol. 18:771-9 (1999)。サルワクチン接種の研究からの最近のデータは、サルにHIV gag DNAをプライムでワクチン接種し、HIV gagを発現するアデノウイルスベクター (Ad5-gag) を用いたブーストを後に続けた場合、CRL1005ポロクサマー (12 kDa、5% POE) をHIV gag抗原をコードするDNAに加えることがT細胞応答を強化することを示唆している。DNA/ポロクサマーのプライムの後にAd5-gagブーストを続けることに対する細胞免疫応答は、DNA (ポロクサマーを用いない) プライムの後に続くAd5-gagブーストで、またはAd5-gagのみで誘発される応答より大きい。Shiver, J. W. et al. Nature 415:331-5 (2002)。米国特許出願公開第US2002/0165172A1号は、免疫応答が生成されるような、抗原の免疫原性の部分をコードするベクター構築体と抗原の免疫原性の部分を含むタンパク質との同時投与を記述している。このドキュメントは、B型肝炎抗原およびHIV抗原に限られる。さらに、米国特許第6,500,432号は対象となるポリヌクレオチドおよびポリペプチドの同時投与によって核酸ワクチン接種の免疫応答を強化する方法を対象としている。この特許によると、同時投与は、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの同一の免疫応答の間の投与を意味し、相互の間が0～10日間または3～7日間であるのが好ましい。この特許によって意図される抗原としては、数ある中でも、肝炎 (すべての形態)、HSV、HIV、CMV、EBV、RSV、VZV、HPV、ポリオ、インフルエンザ、寄生虫 (例えば、プラスモジウム属からの)、および病原性細菌 (結核菌、ライ菌、クラミジア、シゲラ、ラ

20

30

40

50

イム病ボレリア、毒素原性大腸菌、サルモネラ・ティフォサ、ピロリ菌、コレラ菌、百日咳菌など挙げられるがこれに限定されない）が挙げられる。すべての上記の参考文献はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0049】

別の実施形態では、組み換え型リステリア株はブースター接種で使用される。別の実施形態では、ブースター接種で使用される組み換え型リステリア株は初期の「プライミング」接種で使用される株と同一である。別の実施形態では、ブースター株はプライミング株とは異なる。別の実施形態では、ブースター接種で使用される組み換え型免疫チェックポイント阻害剤は、初期の「プライミング」接種で使用される阻害剤と同一である。別の実施形態では、ブースター阻害剤は、プライミング阻害剤とは異なる。別の実施形態では、プライミング接種とブースティング接種とでは同一の用量が使用される。別の実施形態では、ブースターではより大きい用量が使用される。別の実施形態では、ブースターではより小さい用量が使用される。別の実施形態では、本発明の方法は被験者にブースターワクチン接種を実施する工程をさらに含む。一実施形態では、ブースターワクチン接種は単一のプライミングワクチン接種に続いて行われる。別の実施形態では、プライミングワクチン接種の後に単一のブースターワクチン接種を実施する。別の実施形態では、プライミングワクチン接種の後、2回のブースターワクチン接種を実施する。別の実施形態では、プライミングワクチン接種の後、3回のブースターワクチン接種を実施する。一実施形態では、プライム株とブースト株との間の期間は、当業者によって実験的に決定される。別の実施形態では、プライム株とブースト株との間の期間は1週間であり、別の実施形態では、これは2週間であり、別の実施形態では、これは3週間であり、別の実施形態では、これは4週間であり、別の実施形態では、これは5週間であり、別の実施形態では、これは6～8週間であり、さらに別の実施形態では、ブースト株をプライム株の8～10週間後に投与する。

【0050】

一実施形態では、本発明の治療プロトコルは治療的である。別の実施形態では、プロトコルは予防的である。別の実施形態では、当業者であれば理解するであろうように、本発明の組成物は、家族性遺伝のためまたはこれらのタイプの病気にかかりやすくなる他の状況のために、乳ガンまたは他のタイプの腫瘍などのガンのリスクがある人々を保護するために使用される。別の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、外科手術による腫瘍成長の減量術、従来の化学療法、または放射線治療の後のガン免疫療法として使用される。かかる治療に続いて、本発明のワクチンを投与し、これによってワクチンの腫瘍抗原に対するCTL応答が残りの転移を破壊し、ガンからの寛解を長持ちさせる。別の実施形態では、本発明のワクチンは、以前に定着した腫瘍の成長に作用し、既存の腫瘍細胞を死滅させるために使用される。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

【0051】

一実施形態では、本明細書に提供される方法は、本発明の組み換え型リステリア株を用いてヒト被験者をブーストする工程を含む。別の実施形態では、方法はE7抗原を含む免疫原性組成物を用いてヒト被験者をブーストする工程をさらに含む。別の実施形態では、方法は被験者の細胞がE7抗原を発現するように導く免疫原性組成物を用いてヒト被験者をブーストする工程をさらに含む。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

【0052】

別の実施形態では、「ブースティング」とは、追加的なワクチン用量または追加的な治療量の被験者への投与を指す。本発明の方法の別の実施形態では、2回のブースト（すなわち、合計3回の接種）が投与される。別の実施形態では、3回のブーストが投与される。別の実施形態では、4回のブーストが投与される。別の実施形態では、5回のブーストが投与される。別の実施形態では、6回のブーストが投与される。別の実施形態では、7回以上のブーストが投与される。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

【0053】

一実施形態では、本明細書に提供される方法は組み換え型リステリアを追加的な療法と

ともに同時投与する工程を含む。別の実施形態では、追加的な療法は外科手術、化学療法、免疫療法、またはこれらの組み合わせである。別の実施形態では、組み換え型リステリアの投与より追加的療法を先に行う。別の実施形態では、組み換え型リステリアの投与に続いて追加的療法を行う。別の実施形態では、追加的療法は抗体療法である。別の実施形態では、抗体療法は、抗PD1、抗CTLA4である。別の実施形態では、Tエフェクター細胞に対する調節性T細胞の比を増加し、より強力な抗腫瘍免疫応答を生成するために、組み換え型リステリアは漸増用量で投与される。細胞の免疫応答を強化するために、腫瘍を有する被験者にIFN- γ 、TNF- α 、および当該技術分野で既知の他のサイトカインを含むがこれに限定されないサイトカインを提供することによって、抗腫瘍免疫応答をさらに強化することができる。これが当業者によって理解されるであろう。これらのうちのいくつかは米国特許第6,991,785号に記載されており、この特許は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0054】

いくつかの実施形態では、「抗体」という用語は、Fab、F(ab')₂、およびFvなど、本明細書に記述される所望の標的と特異的に相互作用する（例えば、食作用を有する細胞と結合することなどの）能力を有する無傷の分子ならびにその機能的断片を指す。いくつかの実施形態では、抗体断片は以下のものを含む。

【0055】

(1) Fab、抗体分子の一価抗原結合断片を含有する断片で、これは無傷の軽鎖および1つの重鎖の一部分を得るために酵素パプインを用いた抗体全体の消化によって生成できる。

20

【0056】

(2) F(ab')₂、無傷の軽鎖および重鎖の一部分を得るためにペプシンを用いて抗体全体を処理し、引き続いて還元することによって得られる抗体分子の断片、抗体分子当たり2つのFab'断片が得られる。

【0057】

(3) (F(ab')₂)₂、酵素ペプシンを用いて、引き続いて還元を行わずに抗体全体を処理することによって得られる抗体の断片、F(ab')₂は2つのジスルフィド結合によって一緒に保持される2つのFab'断片の二量体である。

【0058】

(4) Fv、2つの鎖として発現される軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作された断片。

30

【0059】

(5) 一本鎖抗体（「SCA」）、遺伝子学的に融合した一本鎖分子として好適なポリペプチドリンカーによってリンクされた、軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作された分子。

【0060】

これらの断片を作製する方法は当該技術分野で既知である。（例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988、（参照により本明細書に組み込まれる）を参照）。

40

【0061】

いくつかの実施形態では、抗体断片は、抗体のタンパク質加水分解、または大腸菌もしくは哺乳類細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞培養または他のタンパク質発現系）内での断片をコードするDNAの発現によって調製される場合がある。

【0062】

いくつかの実施形態では、抗体断片は、従来の方法による抗体全体のペプシンまたはパプイン消化によって得られる。例えば、F(ab')₂で表される5S断片を提供するためにペプシンを用いた抗体の酵素的開裂によって、抗体断片を生成することができる。チオール還元剤、および任意選択的にジスルフィド結合の開裂の結果として得られるスルフ

50

ヒドリル基の保護基を使用して、この断片をさらに開裂して3.5 Fab' 一価断片を生成することができる。あるいは、ペプシンを使用する酵素的開裂は、2つの一価 Fab' 断片および1つのFc断片を直接的に生成する。これらの方法は、例えば、Goldenbergの米国特許第4,036,945号および同第4,331,647号、およびその中に含有される参考文献によって記述され、これらの特許はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。Porter, R. R., Biochem. J., 73:119-126, 1959も参照のこと。断片が無傷の抗体によって識別される抗原に結合する限り、一価の軽重鎖断片を形成するための重鎖の分離、断片のさらなる開裂、または他の酵素的、化学的、または遺伝子学的な技法など、抗体を開裂する他の方法を使用してもよい。

10

【0063】

Fv断片はVH鎖およびVL鎖の会合を含む。この会合は、Inbar et al., Proc. Nat. 'l Acad. Sci. USA 69:2659-62, 1972に記述されるように非共有結合性である場合がある。あるいは、可変鎖を分子間ジスルフィド結合によってリンクする、またはグルタルアルデヒドなどの化学薬品によって架橋することができる。Fv断片はペプチドリンカーによって接続されたVH鎖およびVL鎖を含むことが好ましい。これらの単一鎖抗原結合タンパク質(sFv)は、オリゴヌクレオチドによって接続されるVHドメインおよびVLドメインをコードするDNA配列を含む構造遺伝子を構築することによって調製される。構造的遺伝子は発現ベクター内へと挿入され、これはその後大腸菌などの宿主細胞の中へと導入される。組み換え型宿主細胞は、2つのVドメインを架橋するリンカーペプチドを用いて単一のポリペプチド鎖を合成する。sFvを生成するための方法は、例えば、WhitlowおよびFilpulaによる方法、2:97-105, 1991; Bird et al., Science 242:423-426, 1988; Pack et al., Bio/Technology 11:1271-77, 1993; およびLadnerらの米国特許第4,946,778号(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)、に記述されている。

20

【0064】

抗体断片の別の形態は、単一の相補性決定領域(CDR)をコードするペプチドである。対象となる抗体のCDRをコードする遺伝子を構築することによって、CDRペプチド(「最小認識単位」)を得ることができる。かかる遺伝子は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応を使用して抗体生成細胞のRNAから可変領域を合成することによって調製される。例えば、Larrick and Fry, Methods, 2:106-10, 1991を参照のこと。

30

【0065】

いくつかの実施形態では、本明細書に記述される抗体または断片は、抗体の「ヒト化形態」を含む場合がある。いくつかの実施形態では、「抗体のヒト化形態」という用語は、非ヒト(例えば、マウスの)抗体を指し、これは非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有する免疫グロブリンのキメラ型分子、免疫グロブリン鎖、またはその断片(Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、または抗体の他の抗原結合部分配列など)である。ヒト化抗体は、その中でレシピエントの相補性決定領域(CDR)からの残基が、非ヒト種(ドナー抗体)(所望の特異性、親和性、および容量を有するマウス、ラット、またはウサギなど)のCDRからの残基によって置き換えられる、ヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。いくつかの事例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。ヒト化抗体は、レシピエント抗体でも移入したCDRまたはフレームワーク配列でも見られない残基も含む場合がある。一般に、ヒト化抗体は少なくとも1つの、そして典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含むことになり、ここでCDR領域のすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域のすべてまたは実質的にすべてはヒト免疫グロブリン共通配列のものである。最適にはヒト化抗体は、典型的にはヒト免疫グロブリンの免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部分も含むことになる [Jones

40

50

s et al.、Nature、321:522-525 (1986); Riechmann et al.、Nature、332:323-329 (1988); および Presta、Curr. Op. Struct. Biol.、2:593-596 (1992)]。

【0066】

非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該技術分野で周知である。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトの供給源からその中に導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば移入残基と称され、これらは典型的には移入可変ドメインから取られる。ヒト化は本質的にウィンターおよびその協力者の方法 [Jones et al.、Nature、321:522-525 (1986); Riechmann et al.、Nature、332:323-327 (1988); Verhoeyen et al.、Science、239:1534-1536 (1988)] に従って、齧歯類のCDRまたはCDR配列をヒト抗体の対応配列の代わりに用いることによって遂行できる。したがって、かかるヒト化抗体はキメラ型抗体 (米国特許第4,816,567号) であり、無傷のヒト可変ドメインより大幅に少ないものが非ヒト種からの対応配列によって置換されている。実際には、ヒト化抗体は典型的にはヒト抗体であり、この中でいくつかのCDR残基および場合によってはいくつかのFR残基は齧歯類の抗体の類似部位からの残基によって置換されている。

【0067】

ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーを含む、当該技術分野で既知の様々な技法を使用しても生産することができる [Hoogenboom and Winter、J. Mol. Biol.、227:381 (1991); Marks et al.、J. Mol. Biol.、222:581 (1991)]。Coleらの技法およびBoernerらの技法もヒトモノクローナル抗体の調製のために利用可能である (Cole et al.、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R. Liss、p. 77 (1985)、およびBoerner et al.、J. Immunol.、147(1):86-95 (1991)]。同様に、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物、例えば、マウスの中へと導入することによってヒトを作製することができ、この中で内在性免疫グロブリン遺伝子は部分的にまたは完全に無効化されている。チャレンジに際して、ヒト抗体の生成が観察され、これは遺伝子の再配列、組立、および抗体レパートリーを含むすべてに関してヒトの中で見られるものと酷似している。この取り組みは、例えば、米国特許第5,545,807号、同第5,545,806号、同第5,569,825号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、同第5,661,016、および以下の科学出版物: Marks et al.、Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg et al.、Nature 368 856-859 (1994); Morrison、Nature 368 812-13 (1994); Fishwild et al.、Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger、Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg and Huszar、Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995) に記述されている。

【0068】

「エピトープ」または「抗原決定基」という用語は、免疫グロブリンまたは抗体、またはその断片がこれに特異的に結合する抗原上の部位を指す。タンパク質の3次折り畳みによって並置された連続アミノ酸または不連続アミノ酸の両方から、エピトープを形成することができる。連続的なアミノ酸から形成されたエピトープは、典型的には変性溶剤への曝露に対して保持されるが、3次折り畳みによって形成されたエピトープは典型的には変性溶剤を用いた処理で失われる。エピトープは固有の空間的配座にある典型的に少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個のアミノ酸を含む。エピトープの空間的配座を決定する方法としては、例えば、X線結晶構造解析

、および2次元核磁気共鳴が挙げられる。

【0069】

一実施形態では、本発明の組成物は治療的モノクローナル抗体または免疫調節性モノクローナル抗体を含む。別の実施形態では、本発明の組成物はLm株および治療的モノクローナル抗体または免疫調節性モノクローナル抗体を含む。別の実施形態では、本発明の組成物は治療的モノクローナル抗体または免疫調節性モノクローナル抗体を含み、組成物は本明細書に提供されるリステリア株を含まない。

【0070】

一実施形態では、異種抗原は腫瘍関連抗原である。別の実施形態では、腫瘍関連抗原はHPV-E7である。別の実施形態では、抗原はHPV-E6である。別の実施形態では、抗原はHer-2である。別の実施形態では、抗原はNY-ESO-1である。別の実施形態では、抗原はテロメラーゼである。別の実施形態では、抗原はSCCEである。別の実施形態では、抗原はWT-1である。別の実施形態では、抗原はHIV-1 Gagである。別の実施形態では、抗原はプロテイナーゼ3である。別の実施形態では、抗原はチロシナーゼ関連タンパク質2である。別の実施形態では、抗原はPSA（前立腺特異抗原）である。別の実施形態では、抗原はE7、E6、Her-2、NY-ESO-1、テロメラーゼ、SCCE、WT-1、HIV-1 Gag、プロテイナーゼ3、チロシナーゼ関連タンパク質2、PSA（前立腺特異抗原）から選択される。別の実施形態では、抗原は腫瘍関連抗原である。別の実施形態では、抗原は感染性疾患抗原である。

【0071】

別の実施形態では、腫瘍関連抗原は血管形成抗原である。別の実施形態では、血管形成抗原は活性化した周皮細胞と腫瘍血管形成血管系内の周皮細胞との両方の上で発現され、これは別の実施形態では、インビボでの新血管形成と関連付けられる。別の実施形態では、血管形成抗原はHMW-MAAである。別の実施形態では、血管形成抗原は当該技術分野で既知のものであり、国際特許出願公開第WO2010/102140号で提供され、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【0072】

一実施形態では、本発明の組成物はインターフェロン γ の強い刺激を誘発し、これは、一実施形態では抗血管形成特性を有する。一実施形態では、本発明のリステリアはインターフェロン γ の強い刺激を誘発し、これは、一実施形態では、抗血管形成特性を有する（Dominiacki et al., Cancer Immunol Immunother. 2005 May; 54 (5): 477-88. Epub 2004 Oct 6、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる；Beatty and Patterson, J Immunol. 2001 Feb 15; 166 (4): 2276-82、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。一実施形態では、リステリアの抗血管形成特性は、CD4⁺T細胞によって媒介される（Beatty and Patterson, 2001）。別の実施形態では、リステリアの抗血管形成特性は、CD8⁺T細胞によって媒介される。別の実施形態では、リステリアワクチン接種の結果としてのIFN- γ 分泌は、NK細胞、NK T細胞、Th1 CD4⁺T細胞、TC1 CD8⁺T細胞、またはこれらの組み合わせによって媒介される。

【0073】

別の実施形態では、本発明の組成物は1つ以上の抗血管形成タンパク質または因子の生産を誘発する。一実施形態では、抗血管形成タンパク質はIFN- γ である。別の実施形態では、抗血管形成タンパク質は、色素上皮由来因子（PEDF）、アンジオスタチン、エンドスタチン、fms様チロシンキナーゼ（sFlt）-1、または可溶性エンドグリン（sEng）である。一実施形態では、本発明のリステリアは、抗血管形成因子の放出に関与し、したがって一実施形態では、抗原を被験者に導入するためのベクターとしての役割に加えて、治療的な役割を有する。各々のリステリア株およびそのタイプは、本発明の別個の実施形態を表す。

【0074】

10

20

30

40

50

他の実施形態では、本明細書に提供される組成物および方法で使用するための抗原は、菌類病原体、細菌、寄生虫、蠕虫、またはウイルスに由来する。別の実施形態では、抗原は、破傷風トキソイド、インフルエンザウイルスからの血球凝集素分子、ジフテリアトキソイド、H I V g p 1 2 0、H I V g a g タンパク質、I g A プロテアーゼ、インシュリンペプチド B、粉状そうか病菌抗原、ビブリオ症菌抗原、サルモネラ抗原、肺炎球菌抗原、呼吸器合胞体ウイルス抗原、インフルエンザ菌外膜タンパク質、ヘリコバクター・ピロリ菌ウレアーゼ、髄膜炎菌ピリン、淋菌ピリン、メラノーマ関連抗原 (T R P - 2、M A G E - 1、M A G E - 3、g p - 1 0 0、チロシナーゼ、M A R T - 1、H S P - 7 0、 β -H C G)、タイプ H P V - 1 6、- 1 8、- 3 1、- 3 3、- 3 5、または - 4 5 からのヒトパピロマウイルス抗原 E 1 および E 2、腫瘍抗原 C E A、突然変異したまたはしていない r a s タンパク質、突然変異したまたはしていない p 5 3 タンパク質、M u c 1、メソテリン、E G F R V I I I、または p S A から選択される。

【0075】

他の実施形態では、本明細書に提供される組成物および方法で使用するための抗原は以下の疾患のうちの 1 つと関連付けられる。コレラ、ジフテリア、ヘモフィルス、A 型肝炎、B 型肝炎、インフルエンザ、麻疹、髄膜炎、おたふく風邪、百日咳、天然痘、肺炎球菌性肺炎、ポリオ、狂犬病、風疹、破傷風、結核、腸チフス、水痘帯状疱疹、百日咳、黄熱病、アジソン病由来のイムノゲンおよび抗原、アレルギー、アナフィラキシー、ブルートン症候群、固形及び血液由来の腫瘍を含むガン、湿疹、橋本甲状腺炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、1 型糖尿病、後天性免疫不全、腎臓、心臓、脾臓、肺、骨、及び肝臓などの移植拒否反応、グラベス病、多内分泌自己免疫疾患、肝炎、顕微鏡的多発性動脈炎、結節性多発動脈炎、天疱瘡、原発性胆汁性肝硬変症、悪性貧血、セリアック病、抗体媒介性腎炎、糸球体腎炎、リウマチ、全身性紅斑性狼瘡、関節リウマチ、血清反応陰性脊椎関節症、鼻炎、シェーグレン症候群、全身性硬化症、硬化性胆管炎、ヴェーゲナー肉芽腫症、疱疹状皮膚炎、乾癬、白斑、多発性硬化症、脳脊髄炎、ギラン・バレー症候群、重症筋無力症、ランバート・イートン筋無力症候群、強膜 (sclera)、上強膜 (episclera)、ブドウ膜炎、慢性粘膜皮膚カンジダ症、じんましん、乳児一過性低ガンマグロブリン血症、骨髄腫、X 連鎖高 I g m 症候群、ウィスコット・アルドリッチ症候群、毛細血管拡張性運動失調症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、自己免疫性好中球減少症、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、類でんぶん症、慢性リンパ球性白血病、非ホジキンリンパ腫、マラリアのスポロゾイト周囲タンパク、微生物抗原、ウイルス抗原、自己抗原、及びリステリア症。

【0076】

他の実施形態では、本明細書に提供される組成物および方法で使用するための抗原は以下の腫瘍抗原、M A G E (メラノーマ関連抗原 E) タンパク質、例えば、M A G E 1、M A G E 2、M A G E 3、M A G E 4、チロシナーゼ；突然変異 r a s タンパク質；突然変異 p 5 3 タンパク質；進行ガンと関連付けられた p 9 7 メラノーマ抗原、r a s ペプチド、もしくは p 5 3 ペプチド；子宮頸ガンと関連付けられた H P V 1 6 / 1 8 抗原、乳ガンと関連付けられた K L H 抗原、結腸直腸ガンと関連付けられた C E A (ガン胎児抗原)、g p 1 0 0、メラノーマと関連付けられた M A R T 1 抗原、または前立腺ガンと関連付けられた P S A 抗原、のうちの 1 つである。

【0077】

本発明の方法の標的である H P V は、別の実施形態では H P V 1 6 である。別の実施形態では、H P V は H P V - 1 8 である。別の実施形態では、H P V は H P V - 1 6 および H P V - 1 8 から選択される。別の実施形態では、H P V は H P V - 3 1 である。別の実施形態では、H P V は H P V - 3 5 である。別の実施形態では、H P V は H P V - 3 9 である。別の実施形態では、H P V は H P V - 4 5 である。別の実施形態では、H P V は H P V - 5 1 である。別の実施形態では、H P V は H P V - 5 2 である。別の実施形態では、H P V は H P V - 5 8 である。別の実施形態では、H P V は高リスク H P V タイプである。別の実施形態では、H P V は粘膜 H P V タイプである。各々の可能性は別個の本発明

の実施形態を表す。

【0078】

一実施形態では、本明細書に提供される疾患は感染性疾患、ガン、または腫瘍である。

【0079】

一実施形態では、感染性疾患は以下の病原体（しかしこれに限定されない）のうちの1つによって生じたものである。BCG／結核、マラリア、熱帯熱マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、ロタウイルス、コレラ、ジフテリアー破傷風、百日咳、インフルエンザ菌、B型肝炎、ヒトパピローマウイルス、季節性インフルエンザ）、汎発性インフルエンザA（H1N1）、麻疹および風疹、おたふく風邪、髄膜炎菌A+C、経口ポリオワクチン、一価、二価、および三価、肺炎球菌、狂犬病、破傷風トキソイド、黄熱病、バチルス・アントラシス（炭疽菌）、クロストリジウム・ボツリヌス毒素（ボツリヌス中毒症）、エルシニア・ペスチス（ペスト）、大痘瘡（天然痘）、および他の関連するポックスウイルス、フランシセラ・ツラレンシス（野兎病）、ウイルス性出血熱、アレナウイルス（LCM、フニンウイルス、マチュポウイルス、グアナリトウイルス、ラッサ熱）、ブニヤウイルス（ハンタウイルス、リフトバレー熱）、フラビウイルス（デング）、フィロウイルス（エボラ、マールブルグ）、バークホルデリア・シェードマレイ、コクシエラ・バーネティー（Q熱）、ブルセラ種（ブルセラ症）、バークホルデリア・マレイ（鼻疽）、クラミジア・シタッシ（オウム病）、リシン毒素（リシナス・コンムニス由来）、クロストリジウム・パーフリンゲンのイブシロン毒素、スタフィロコッカス・エンテロトキシンB、発疹チフス（リケッチャ・プロワゼキ）、他のリケッチャ食品由来および水由来の病原体、細菌（下痢原性大腸菌、病原性ビブリオ、シゲラ種、サルモネラBCG／、カンピロバクター・ジェジュニ、エルシニア・エンテロコリチカ）、ウイルス（カルシウイルス、A型肝炎、西ナイルウイルス、ラクロス、カリフォルニア脳炎、VEE、EEE、WEE、日本脳炎ウイルス、キャサヌールフォレストウイルス、ニパウイルス、ハンタウイルス、ダニ媒介出血熱ウイルス、チクングニアウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、単純ヘルペスウイルス（HSV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトパピローマウイルス（HPV））、原虫（クリプトスポリジウム・パルバム、シクロスポラ・カイエタネンシス、ランブル鞭毛虫、赤痢アメーバ、トキソプラズマ）、真菌類（微孢子虫）、黄熱病、薬剤耐性TBを含む結核、狂犬病、プリオン、コロナウイルスに関連付けられた重症急性呼吸器症候（SARS-CoV）、コクシジオイデス・ボサダシ、コクシジオイデス・イミチス、細菌性膣症、トラコーマクラミジア、サイトメガロウイルス、鼠径肉芽腫、軟性下疳菌、淋菌、梅毒トレポネーマ、腔トリコモナス、または本明細書に列挙されていない当該技術分野で既知の任意の他の感染性疾患。別の実施形態では、被験者の免疫系が損なわれている場合があるとき、移植術の後に感染が生じる。

【0080】

別の実施形態では、感染性疾患は、家畜の感染性疾患である。別の実施形態では、家畜の疾患は、人間に伝染する可能性があり、「人獣共通感染症」と呼ばれる。別の実施形態では、これらの疾患としては、口蹄疫、西ナイルウイルス、狂犬病、イヌパルボウイルス、ネコ白血病ウイルス、ウマインフルエンザウイルス、ウシ感染性鼻気管炎（IBR）、仮性狂犬病、ブタコレラ（CSF）、牛の1型ウシヘルペスウイルス（BHV-1）感染によって生じるIBR、および豚の仮性狂犬病（オーエスキー病）、トキソプラズマ症、炭疽病、水疱性口内炎ウイルス、ロドコッカス・エクイ、野兎病、ペスト（エルシニア・ペスチス）、トリコモナスが挙げられるがこれらに限定されない。

【0081】

一実施形態では、本発明の方法で治療されるガンは乳ガンである。別の実施形態では、このガンは子宮頸ガンである。別の実施形態では、このガンはHER2を発現するガンである。別の実施形態では、このガンはメラノーマである。別の実施形態では、このガンは膵臓ガンである。別の実施形態では、このガンは卵巣ガンである。別の実施形態では、このガンは胃ガンである。別の実施形態では、このガンは膵臓のガンの病巣である。別の実

施形態では、このガンは肺腺ガンである。別の実施形態では、これは多形性膠芽腫である。別の実施形態では、このガンは大腸腺ガンである。別の実施形態では、このガンは肺扁平上皮腺ガンである。別の実施形態では、このガンは胃腺ガンである。別の実施形態では、このガンは卵巣表面の上皮性新生物（例えば、その良性の、増殖性の、または悪性の変種）である。一実施形態では、これは、低酸素固形腫瘍である。別の実施形態では、このガンは口腔扁平上皮ガンである。別の実施形態では、このガンは非小細胞肺ガンである。別の実施形態では、このガンは子宮内膜ガンである。別の実施形態では、このガンは膀胱ガンである。別の実施形態では、このガンは頭頸部ガンである。別の実施形態では、このガンは前立腺ガンである。別の実施形態では、このガンは中咽頭ガンである。別の実施形態では、このガンは肺ガンである。別の実施形態では、このガンは肛門ガンである。別の実施形態では、このガンは大腸ガンである。別の実施形態では、このガンは食道ガンである。別の実施形態では、このガンは中皮腫である。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

10

【0082】

一実施形態では、本明細書に提供される切断 L L O は推定 P E S T アミノ酸 (A A) 配列を含む。別の実施形態では、P E S T アミノ酸配列は 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。別の実施形態では、リステリアから他の L M P E S T A A 配列への抗原の融合は、抗原の免疫原性も強化することになる。

【0083】

別の実施形態では、本発明の方法および組成物の N 末端 L L O タンパク質断片は配列番号：1 を含む。別の実施形態では、断片は L L O シグナルペプチドを含む。別の実施形態では、断片は配列番号：2 を含む。別の実施形態では、断片は配列番号：2 をほぼ含む。別の実施形態では、断片は配列番号：2 を本質的に含む。別の実施形態では、断片は配列番号：2 に対応する。別の実施形態では、断片は配列番号：2 と相同である。別の実施形態では、断片は配列番号：2 の断片と相同である。いくつかの実施例で使用される Δ L L O は、システイン 484 を含有する活性化領域を含むアミノ末端からの 88 個の残基が切断されるので、416 A A 長さ (単一配列を含まない) である。活性化領域を有しない、そして特にシステイン 484 を有しない任意の Δ L L O は本発明の方法および組成物のために好適であることが当業者には明らかであろう。別の実施形態では、P E S T A A 配列、配列番号：1 を含む、異種抗原の任意の Δ L L O への融合は、媒介される細胞、および抗原の抗腫瘍免疫性を強化する。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

20

30

【0084】

別の実施形態では、本発明のワクチンを構築するために利用される L L O タンパク質は以下の配列を有する：

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
D A V T N V P P R K G Y K D G N E Y I V V E K K K K S I N Q N N A D I Q V V N A
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 P 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 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 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
S N K V D N P I E (G e n B a n k アクセション番号 P 1 3 1 2 8 、配列番号：3、
核酸配列は G e n B a n k アクセション番号 X 1 5 1 2 7 に示される)。この配列に対

40

50

応する前駆タンパク質の最初の25個のAAはシグナル配列であり、細菌によって分泌されるときにLLOから切断される。こうして、この実施形態では、全長の活性LLOタンパク質は504残基長である。別の実施形態では、上記のLLO断片は本発明のワクチンに組み込まれるLLO断片の供給源として使用される。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

【0085】

別の実施形態では、本発明の組成物および方法で利用されるLLOタンパク質のN末端断片は、以下の配列を有する：

MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKENSSISSVA
PPASPPASPKTPIEKKHADEIDKYIQGLDYNKNNVLVYHG
DAVTNVPPRKG YKDGNEYIVVEKKKKKSINQNNADIQVVNA
ISSLTYPGALVKANSELVENQPDVLPVKRDSLTLSDLP
MTNQDNKIVVKNATKSNVNNAVNTLVERWNEKYAQAYSNV
SAKIDYDDEMAYSESQLIAKFGTAFKAVNNNSLNVNFGAIS
EGKMQUEEVISFKQIYYNVNVNEPTRPSRFFFGKAVTKEQLQ
ALGVNAENPPAYISSVAYGRQVYLKLSSTNSHSTKVKAAFD
AAVSGKSVSGDVELTNI IKNSSFKAVIYGGSAKDEVQIID
GNLGLDLRDLILKKGATFNRET PGVP IAYTTNFLKDNE LAVI
KNNSEYIETTSKAYTDGKINIDHSGGYVAQFNISWDEVNY
D（配列番号：2）。 10 20

【0086】

別の実施形態では、LLO断片は本明細書で利用されるAA20～442のLLOタンパク質にほぼ対応する。

【0087】

別の実施形態では、LLO断片は、以下の配列を有する：

MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKENSSISSVA
PPASPPASPKTPIEKKHADEIDKYIQGLDYNKNNVLVYHG
DAVTNVPPRKG YKDGNEYIVVEKKKKKSINQNNADIQVVNA
ISSLTYPGALVKANSELVENQPDVLPVKRDSLTLSDLP
MTNQDNKIVVKNATKSNVNNAVNTLVERWNEKYAQAYSNV
SAKIDYDDEMAYSESQLIAKFGTAFKAVNNNSLNVNFGAIS
EGKMQUEEVISFKQIYYNVNVNEPTRPSRFFFGKAVTKEQLQ
ALGVNAENPPAYISSVAYGRQVYLKLSSTNSHSTKVKAAFD
AAVSGKSVSGDVELTNI IKNSSFKAVIYGGSAKDEVQIID
GNLGLDLRDLILKKGATFNRET PGVP IAYTTNFLKDNE LAVI
KNNSEYIETTSKAYTDGKINIDHSGGYVAQFNISWDEVNY
DMKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKENSSISSV
APPASPPASPKTPIEKKHADEIDKYIQGLDYNKNNVLVYH
GDAVTNVPPRKG YKDGNEYIVVEKKKKKSINQNNADIQVVN
AIISSLTYPGALVKANSELVENQPDVLPVKRDSLTLSDLP
GMTNQDNKIVVKNATKSNVNNAVNTLVERWNEKYAQAYSN
VSAKIDYDDEMAYSESQLIAKFGTAFKAVNNNSLNVNFGAI
SEGKMQUEEVISFKQIYYNVNVNEPTRPSRFFFGKAVTKEQL
QALGVNAENPPAYISSVAYGRQVYLKLSSTNSHSTKVKAAAF
DAAVSGKSVSGDVELTNI IKNSSFKAVIYGGSAKDEVQIID
DGNLGLDLRDLILKKGATFNRET PGVP IAYTTNFLKDNE LAVI
IKNNSEYIETTSKAYTD（配列番号：4）。 30 40

【0088】

一実施形態では、本発明はリステリオシンO（LLO）タンパク質またはこれを発現する組み換え型リステリアを含む組み換え型タンパク質またはポリペプチドを提供し、前記 50

L L Oタンパク質は前記L L Oタンパク質のコレステロール結合ドメイン（C B D）の残基C 4 8 4、W 4 9 1、W 4 9 2、またはこれらの組み合わせの突然変異を含む（米国特許第8, 7 7 1, 7 0 2号を参照、本特許は参照により本明細書に組み込まれる）。一実施形態では、前記C 4 8 4、W 4 9 1、およびW 4 9 2残基は、配列番号：3の残基C 4 8 4、W 4 9 1、およびW 4 9 2であるが、別の実施形態では、当業者には既知のように、これらは配列アラインメント使用して推測することができるような対応残基である。一実施形態では、残基C 4 8 4、W 4 9 1、およびW 4 9 2は突然変異している。一実施形態では、突然変異は置換であり、別の実施形態では、欠失である。一実施形態では、C B D全体が突然変異しており、一方で別の実施形態では、C B Dの部分が突然変異しており、一方で別の実施形態では、C B D内の特異的な残基のみが突然変異している。

10

【0089】

別の実施形態では、「切断L L O」または「Δ L L O」はP E S T配列を含むL L Oの非溶血性断片を指す。別の実施形態では、これらの用語はP E S T領域を含むL L Oの断片を指す。別の実施形態では、L L O断片はN末端L L O断片である。別の実施形態では、L L O断片は少なくとも4 9 2アミノ酸（A A）長である。別の実施形態では、L L O断片は4 9 2～5 2 8 A A長である。別の実施形態では、非L L Oペプチドは1～5 0アミノ酸長である。別の実施形態では、突然変異領域は1～5 0アミノ酸長である。別の実施形態では、非L L Oペプチドは突然変異領域と同一の長さである。別の実施形態では、非L L Oペプチドは突然変異領域より短く、または別の実施形態では、突然変異した領域より長い。別の実施形態では、置換は溶血活性に関する不活化突然変異である。別の実施形態では、組み換え型ペプチドは野生型L L Oに関する溶血活性の減少を呈する。別の実施形態では、組み換え型ペプチドは非溶血性である。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

20

【0090】

一実施形態では、本発明は突然変異L L Oタンパク質またはその断片を含む組み換え型タンパク質またはポリペプチドを提供し、突然変異L L Oタンパク質またはその断片は突然変異L L Oタンパク質またはその断片の突然変異領域に対する非L L Oペプチドの置換を含み、突然変異領域はC 4 8 4、W 4 9 1、およびW 4 9 2から選択された残基を含む。

【0091】

本明細書に提供されるように、突然変異体L L Oタンパク質は残基C 4 8 4、W 4 9 1、およびW 4 9 2の野生型L L Oの置換を含む。

30

【0092】

別の実施形態では、L L O断片はL L Oタンパク質のおよそ最初の4 4 1 A Aから構成される。別の実施形態では、L L O断片はL L Oのおよそ最初の4 2 0 A Aから構成される。別の実施形態では、L L O断片はL L Oタンパク質の非溶血性形態である。

【0093】

別の実施形態では、L L O断片はおよそ残基1～2 5から構成される。別の実施形態では、L L O断片はおよそ残基1～5 0から構成される。別の実施形態では、L L O断片はおよそ残基1～7 5から構成される。別の実施形態では、L L O断片はおよそ残基1～1 0 0から構成される。別の実施形態では、L L O断片はおよそ残基1～1 2 5から構成される。別の実施形態では、L L O断片はおよそ残基1～1 5 0から構成される。別の実施形態では、L L O断片はおよそ残基1 1 7 5から構成される。別の実施形態では、L L O断片はおよそ残基1～2 0 0から構成される。別の実施形態では、L L O断片はおよそ残基1～2 2 5から構成される。別の実施形態では、L L O断片はおよそ残基1～2 5 0から構成される。別の実施形態では、L L O断片はおよそ残基1～2 7 5から構成される。別の実施形態では、L L O断片はおよそ残基1～3 0 0から構成される。別の実施形態では、L L O断片はおよそ残基1～3 2 5から構成される。別の実施形態では、L L O断片はおよそ残基1～3 5 0から構成される。別の実施形態では、L L O断片はおよそ残基1～3 7 5から構成される。別の実施形態では、L L O断片はおよそ残基1～4 0 0から構

40

50

成される。別の実施形態では、L L O断片はおよそ残基1～425から構成される。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

【0094】

別の実施形態では、L L O断片は上記のA A範囲のうちの1つに対応する相同L L Oタンパク質の残基を含有する。別の実施形態では、残基番号は上記に列挙した残基番号と必ずしも正確に対応する必要はなく、例えば、相同L L Oタンパク質が本明細書で利用されるL L Oタンパク質に対して挿入または欠失を有する場合、残基番号を適宜調節することができる。別の実施形態では、L L O断片は当該技術分野で既知の任意の他のL L O断片である。

【0095】

別の実施形態では、相同L L Oは、L L O配列（例えば、配列番号：2～4）に対する同一性が70%より高いことを指す。別の実施形態では、相同L L Oは、配列番号：2～4のうちの1つに対する同一性が72%より高いことを指す。別の実施形態では、相同は、配列番号：2～4のうちの1つに対する同一性が75%より高いことを指す。別の実施形態では、相同は、配列番号：2～4のうちの1つに対する同一性が78%より高いことを指す。別の実施形態では、相同は、配列番号：2～4のうちの1つに対する同一性が80%より高いことを指す。別の実施形態では、相同は、配列番号：2～4のうちの1つに対する同一性が82%より高いことを指す。別の実施形態では、相同は、配列番号：2～4のうちの1つに対する同一性が83%より高いことを指す。別の実施形態では、相同は、配列番号：2～4のうちの1つに対する同一性が85%より高いことを指す。別の実施形態では、相同は、配列番号：2～4のうちの1つに対する同一性が87%より高いことを指す。別の実施形態では、相同は、配列番号：2～4のうちの1つに対する同一性が88%より高いことを指す。別の実施形態では、相同は、配列番号：2～4のうちの1つに対する同一性が90%より高いことを指す。別の実施形態では、相同は、配列番号：2～4のうちの1つに対する同一性が92%より高いことを指す。別の実施形態では、相同は、配列番号：2～4のうちの1つに対する同一性が93%より高いことを指す。別の実施形態では、相同は、配列番号：2～4のうちの1つに対する同一性が95%より高いことを指す。別の実施形態では、相同は、配列番号：2～4のうちの1つに対する同一性が96%より高いことを指す。別の実施形態では、相同は、配列番号：2～4のうちの1つに対する同一性が97%より高いことを指す。別の実施形態では、相同は、配列番号：2～4のうちの1つに対する同一性が98%より高いことを指す。別の実施形態では、相同は、配列番号：2～4のうちの1つに対する同一性が99%より高いことを指す。別の実施形態では、相同は、配列番号：2～4のうちの1つに対する同一性が100%であることを指す。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

【0096】

別の実施形態では、「相同性」という用語は、本明細書に提供されるいずれかの核酸配列を参照するとき、対応するネイティブ核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセンテージを同様に示す。

【0097】

一実施形態では、当該技術分野で十分に記述される方法によって、相同性は配列アライメントに対するコンピューターアルゴリズムによって決定される。例えば、核酸配列相同性のコンピューターアルゴリズム解析は入手可能な任意の数のソフトウェアパッケージの利用を含む場合があり、これらは、例えば、BLAST、DOMA IN、BEAUTY（BLAST増強アラインメントユーティリティ）、GENPEPT、およびTREMBLパッケージなどである。

【0098】

別の実施形態では、「相同性」は本明細書に提供される配列番号：1～5から選択された配列との同一性が70%より大きいことを指す。別の実施形態では、「相同性」は配列番号：1～5から選択された配列との同一性が72%より大きいことを指す。別の実施形態では、同一性は75%より大きい。別の実施形態では、同一性は78%より大きい。別

の実施形態では、同一性は80%より大きい。別の実施形態では、同一性は82%より大きい。別の実施形態では、同一性は83%より大きい。別の実施形態では、同一性は85%より大きい。別の実施形態では、同一性は87%より大きい。別の実施形態では、同一性は88%より大きい。別の実施形態では、同一性は90%より大きい。別の実施形態では、同一性は92%より大きい。別の実施形態では、同一性は93%より大きい。別の実施形態では、同一性は95%より大きい。別の実施形態では、同一性は96%より大きい。別の実施形態では、同一性は97%より大きい。別の実施形態では、同一性は98%より大きい。別の実施形態では、同一性は99%より大きい。別の実施形態では、同一性は100%である。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

【0099】

別の実施形態では、相同性は候補配列ハイブリダイゼーションの決定を介して決定され、その方法は当該技術分野で十分に記述されている（例えば、“Nucleic Acid Hybridization” Hames, B. D., and Higgins S. J., Eds. (1985)、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N. Y., および Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y.を参照のこと）。例えば、ハイブリダイゼーションの方法は、ネイティブカスパーゼペプチドをコードするDNAの補体に対して中程度からストリンジェントな条件下で実行される場合がある。例えば、ハイブリダイゼーション条件は、10~20%のホルムアミド、5×SSC (150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム (pH7.6)、5×デンハート液、10%の硫酸デキストラン、および20μg/mLの変性断片化サケ精子DNAを含む溶液中42℃にて一晩のインキュベーションである。

【0100】

本明細書に列挙された任意のアミノ酸配列に対するタンパク質および／またはペプチド相同性は、一実施形態では、イムノプロット解析を含む当該技術分野において十分に記述される方法によって、または確立された方法を介して利用可能な任意の数のソフトウェアパッケージを利用したアミノ酸配列のコンピューターアルゴリズム解析を介して決定される。これらのパッケージのうちのいくつかはFASTA、BLAST、MPsrch、またはScanpsパッケージを含んでもよく、そして、例えば、スミスーウォーターマンアルゴリズムの使用、および／または解析のための広範囲／局所的もしくはBLOCKSアラインメントを採用してもよい。各々の相同性を決定する方法は、本発明の別個の実施形態を代表する。

【0101】

別の実施形態では、本明細書に提供される構築体または核酸分子は相同的組み換えを使用してリステリア染色体の中へと組み込まれる。相同的組み換えのための技法は当該技術分野で周知であり、例えば以下の文献に記述されている。Baloglu S、Boyle SM、et al. (Immune responses of mice to vaccinia virus recombinants expressing either Listeria monocytogenes partial listeriolysin or Brucella abortus ribosomal L7/L12 protein. Vet Microbiol 2005、109 (1-2): 11-7)、およびJiang LL, Song HH, et al., (Characterization of a mutant Listeria monocytogenes strain expressing green fluorescent protein. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2005、37 (1): 19-24)。別の実施形態では、相同的組み換えは米国特許第6,855,320号に記述されるように実施される。この場

合、E7を発現する組み換え型Lm株は、hlyプロモーターの制御下で、また遺伝子生成物の分泌を確保するためにhlyシグナル配列を含めることによって、E7遺伝子の染色体組み込みによって作成され、Lm-AZ/E7と称される組み換え型を得る。別の実施形態では、温度感受性プラスミドが、組み換え型を選択するために使用される。各々の技法は本発明の別個の実施形態を代表する。

【0102】

別の実施形態では、構築体または核酸分子はトランスポゾン挿入を使用してリステリア染色体の中へと組み込まれる。トランスポゾン挿入の技法は当該技術分野で周知であり、とりわけ以下のSunらの文献(Infec¹⁰tion and Immunity 1990, 58:3770-3778)にDP-L967の構築について記述されている。トランスポゾン突然変異生成は、別の実施形態では、安定したゲノム挿入変異体を形成することができるという利点を有するが、外来性遺伝子が挿入されたゲノム内の位置が未知であるという欠点を有する。

【0103】

別の実施形態では、構築体または核酸分子は、ファージ組み込み部位を使用してリステリア染色体の中へと組み込まれる(Lauer P, Chow MY et al, Construction, characterization, and use of two Listeria monocytogenes site-specific phage integration vectors. J Bacteriol 2002; 184(15):4177-86)。この方法のある特定の実施形態では、異種20遺伝子を、ゲノム内の任意の適切な部位でありうる対応する付着部位(例えば、comKまたはarg tRNA遺伝子の3'端)へと挿入するために、バクテリオファージ(例えば、U153またはPSAリステリオファージ)のインテグラーゼ遺伝子および付着部位が使用される。別の実施形態では、内在性プロファージは構築体または異種遺伝子組み込みの前に利用された付着部位から治療する。別の実施形態では、この方法は結果として単一コピー組み込み体をもたらす。別の実施形態では、本発明は、臨床用途のためのファージベースの染色体組み込みシステムをさらに含み、ここでd-アラニン・ラセマーゼを含むがこれに限定されない必須酵素のための栄養要求性である宿主株を使用することができ、例えば、Lmdal(-)dat(-)である。別の実施形態では、「ファージ治療工程」を避けるためにPSAに基づくファージ組み込みシステムを使用する。別の実施形態では、これは組み込まれた遺伝子を維持するための抗生物質による継続的な選択を要求する。こうして、別の実施形態では、本発明は、抗生物質を用いた選択を必要としないファージベースの染色体組み込みシステムの確立を可能にする。代わりに、栄養要求性宿主株を相補することができる。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。30

【0104】

別の実施形態では、構築体または核酸分子は、LLO、PEST、もしくはActA配列またはその断片をコードする核酸配列を用いてエピソード性ベクターまたはプラスミドベクターから発現される。別の実施形態では、抗生物質選択が無い状態で、プラスミドは組み換え型リステリアワクチン株内で安定して維持される。別の実施形態では、プラスミドは組み換え型リステリアに抗生物質抵抗性を与えない。別の実施形態では、断片は機能的断片である。別の実施形態では、断片は免疫原性断片である。40

【0105】

別の実施形態では、「免疫原性断片」は、単独でまたは本明細書に提供されるようなワクチンもしくは組成物内で被験者に投与されるとき、免疫応答を引き出す免疫原性断片である。別の実施形態では、かかる断片は適応免疫応答を引き出すために必要なエピトープを含有する。

【0106】

別の実施形態では、「安定して維持される」とは、選択(例えば、抗生物質選択)無しで検出可能な損失を伴わずに、核酸分子またはプラスミドを10世代の間、維持することを指す。別の実施形態では、期間は15世代である。別の実施形態では、期間は20世代50

である。別の実施形態では、期間は25世代である。別の実施形態では、期間は30世代である。別の実施形態では、期間は40世代である。別の実施形態では、期間は50世代である。別の実施形態では、期間は60世代である。別の実施形態では、期間は80世代である。別の実施形態では、期間は100世代である。別の実施形態では、期間は150世代である。別の実施形態では、期間は200世代である。別の実施形態では、期間は300世代である。別の実施形態では、期間は500世代である。別の実施形態では、期間は世代を超えるものである。別の実施形態では、核酸分子またはプラスミドは、インビトロで（例えば、培養液内で）安定して維持される。別の実施形態では、核酸分子またはプラスミドは、インビボで安定して維持される。別の実施形態では、核酸分子またはプラスミドは、インビトロおよびインビトロの両方で安定して維持される。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

10

【0107】

別の実施形態では、「機能的断片」は免疫原性断片であり、単独でまたは本明細書に提供されるワクチンもしくは組成物内で被験者に投与されるとき、免疫応答を引き出す。別の実施形態では、当業者は理解するであろうように、また本明細書にさらに提供されるように、機能的断片は生物活性を有する。

【0108】

別の実施形態では、組み換え型リステリア株をヒト被験者に $1 \times 10^9 \sim 3.31 \times 10^{10}$ CFUの用量で投与する。別の実施形態では、用量は $5 \sim 500 \times 10^8$ CFUである。別の実施形態では、用量は $7 \sim 500 \times 10^8$ CFUである。別の実施形態では、用量は $10 \sim 500 \times 10^8$ CFUである。別の実施形態では、用量は $20 \sim 500 \times 10^8$ CFUである。別の実施形態では、用量は $30 \sim 500 \times 10^8$ CFUである。別の実施形態では、用量は $50 \sim 500 \times 10^8$ CFUである。別の実施形態では、用量は $70 \sim 500 \times 10^8$ CFUである。別の実施形態では、用量は $100 \sim 500 \times 10^8$ CFUである。別の実施形態では、用量は $150 \sim 500 \times 10^8$ CFUである。別の実施形態では、用量は $5 \sim 300 \times 10^8$ CFUである。別の実施形態では、用量は $5 \sim 200 \times 10^8$ CFUである。別の実施形態では、用量は $5 \sim 150 \times 10^8$ CFUである。別の実施形態では、用量は $5 \sim 100 \times 10^8$ CFUである。別の実施形態では、用量は $5 \sim 70 \times 10^8$ CFUである。別の実施形態では、用量は $5 \sim 50 \times 10^8$ CFUである。別の実施形態では、用量は $5 \sim 30 \times 10^8$ CFUである。別の実施形態では、用量は $5 \sim 20 \times 10^8$ CFUである。別の実施形態では、用量は $1 \sim 30 \times 10^9$ CFUである。別の実施形態では、用量は $1 \sim 20 \times 10^9$ CFUである。別の実施形態では、用量は $2 \sim 30 \times 10^9$ CFUである。別の実施形態では、用量は $1 \sim 10 \times 10^9$ CFUである。別の実施形態では、用量は $2 \sim 10 \times 10^9$ CFUである。別の実施形態では、用量は $3 \sim 10 \times 10^9$ CFUである。別の実施形態では、用量は $2 \sim 7 \times 10^9$ CFUである。別の実施形態では、用量は $3 \sim 5 \times 10^9$ CFUである。

20

30

【0109】

別の実施形態では、用量は 1×10^9 生命体である。別の実施形態では、用量は 1.5×10^9 生命体である。別の実施形態では、用量は 2×10^9 生命体である。別の実施形態では、用量は 3×10^9 生命体である。別の実施形態では、用量は 4×10^9 生命体である。別の実施形態では、用量は 5×10^9 生命体である。別の実施形態では、用量は 6×10^9 生命体である。別の実施形態では、用量は 7×10^9 生命体である。別の実施形態では、用量は 8×10^9 生命体である。別の実施形態では、用量は 10×10^9 生命体である。別の実施形態では、用量は 1.5×10^{10} 生命体である。別の実施形態では、用量は 2×10^{10} 生命体である。別の実施形態では、用量は 2.5×10^{10} 生命体である。別の実施形態では、用量は 3×10^{10} 生命体である。別の実施形態では、用量は 3.3×10^{10} 生命体である。別の実施形態では、用量は 4×10^{10} 生命体である。別の実施形態では、用量は 5×10^{10} 生命体である。

40

【0110】

50

各々の用量および用量の範囲は本発明の別個の実施形態を代表する。

【0111】

別の実施形態では、本発明の方法の組み換え型ポリペプチドは組み換え型リステリア株によって発現される。別の実施形態では、発現は組み換え型リステリア株によって担持されるヌクレオチド分子によって媒介される。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

【0112】

別の実施形態では、本発明の方法および組成物の組み換え型リステリア株は、組み換え型リステリア・モノサイトゲネス株である。別の実施形態では、リステリア株は組み換え型リステリア・シーリゲリ株である。別の実施形態では、リステリア株は組み換え型リステリア・グレイ株である。別の実施形態では、リステリア株は組み換え型リステリア・イバノビ株である。別の実施形態では、リステリア株は組み換え型リステリア・ムライ株である。別の実施形態では、リステリア株は組み換え型リステリア・ウェルシメリ株である。別の実施形態では、リステリア株は、当該技術分野で既知の任意の他のリステリア種の組み換え型株である。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

【0113】

別の実施形態では、本発明の組み換え型リステリア株は動物宿主を通して継代されている。別の実施形態では、継代は株のワクチンベクターとしての有効性を最大化する。別の実施形態では、継代はリステリア株の免疫原性を安定化する。別の実施形態では、継代はリステリア株の病原性を安定化する。別の実施形態では、継代はリステリア株の免疫原性を増加する。別の実施形態では、継代はリステリア株の病原性を増加する。別の実施形態では、継代はリステリア株の不安定な垂株を除去する。別の実施形態では、継代はリステリア株の不安定な垂株の普及を減少する。別の実施形態では、リステリア株は抗原含有組み換え型ペプチドをコードする遺伝子のゲノム挿入を含有する。別の実施形態では、リステリア株は抗原含有組み換え型ペプチドをコードする遺伝子を含むプラスミドを担持する。別の実施形態では、継代は本明細書に記述されるように実施される。別の実施形態では、当該技術分野で既知の任意の他の方法によって継代を遂行する。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

【0114】

別の実施形態では、本発明のワクチンはアジュバントをさらに含む。別の実施形態では、本発明の方法および組成物で使用されるアジュバントは顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）タンパク質である。別の実施形態では、アジュバントはGM-CSFタンパク質を含む。別の実施形態では、アジュバントはGM-CSFをコードするヌクレオチド分子である。別の実施形態では、アジュバントはGM-CSFをコードするヌクレオチド分子を含む。別の実施形態では、アジュバントはサポニンQS21である。別の実施形態では、アジュバントはサポニンQS21を含む。別の実施形態では、アジュバントは、モノホスホリルリピドAである。別の実施形態では、アジュバントはモノホスホリルリピドAを含む。別の実施形態では、アジュバントはSBAS2である。別の実施形態では、アジュバントはSBAS2を含む。別の実施形態では、アジュバントはメチル化されていないCpG含有オリゴヌクレオチドである。別の実施形態では、アジュバントはメチル化されていないCpG含有オリゴヌクレオチドを含む。別の実施形態では、アジュバントは免疫刺激サイトカインである。別の実施形態では、アジュバントは免疫刺激サイトカインを含む。別の実施形態では、アジュバントは免疫刺激サイトカインをコードするヌクレオチド分子である。別の実施形態では、アジュバントは免疫刺激サイトカインをコードするヌクレオチド分子を含む。別の実施形態では、アジュバントはクイルグリコシドであるか、またはこれを含む。別の実施形態では、アジュバントは細菌マイトジェンであるか、またはこれを含む。別の実施形態では、アジュバントは細菌毒素であるか、またはこれを含む。別の実施形態では、アジュバントは当該技術分野で既知の任意の他のアジュバントであるか、またはこれを含む。各々の可能性は別個の本発明の実施形態を表す。

。

10

20

30

40

50

【0115】

一実施形態では、本明細書に提供される方法は、前記組み換え型リステリア株の投与の前または後に免疫チェックポイントタンパク質阻害剤を含む免疫原性組成物を同時投与する工程をさらに含む。別の実施形態では、免疫原性組成物は免疫チェックポイントタンパク質阻害剤である。当該技術分野で既知の任意の免疫チェックポイントタンパク質が、免疫チェックポイント阻害剤による標的となりうることを当業者は理解するであろう。免疫チェックポイントタンパク質は、以下のものから選択されてもよいがこれに限定されない。プログラム細胞死タンパク質1 (PD1)、T細胞膜タンパク質3 (TIM3)、アデノシンA2a受容体 (A2aR) およびリンパ球活性化遺伝子3 (LAG3)、キラー免疫グロブリン受容体 (KIR)、または細胞毒性T-リンパ球抗原-4 (CTLA-4)。

別の実施形態では、チェックポイント阻害剤タンパク質は、B7/C D 2 8 受容体スーパーファミリーに属するものである。

10

【0116】

一実施形態では、本明細書に提供される方法は、前記被験者内で抗腫瘍免疫応答を強化するサイトカインを含む免疫原性組成物を同時投与する工程をさらに含む。免疫応答を強化するように機能するサイトカインは周知であり、I型インターフェロン (IFN- α /IFN- β)、TNF- α 、IL-1、IL-4、IL-12、INF- γ 、および免疫応答を強化することが既知の任意の他のサイトカインを含むことを当業者は理解するであろう。別の実施形態では、サイトカインは炎症性サイトカインである。

【0117】

「免疫原性組成物」が本明細書に提供される組み換え型リステリア、およびアジュバント、免疫チェックポイントタンパク質阻害剤、および本明細書に提供されるサイトカインを含んでもよいことが理解されるであろう。別の実施形態では、免疫原性組成物は本明細書に提供される組み換え型リステリアを含む。別の実施形態では、免疫原性組成物は当該技術分野で既知のまたは本明細書に提供されるアジュバントを含む。別の実施形態では、免疫原性組成物は当該技術分野で既知のまたは本明細書に提供される免疫チェックポイント阻害剤を含む。別の実施形態では、免疫原性組成物は当該技術分野で既知のまたは本明細書に提供されるサイトカインを含む。本明細書にさらに提供されるように、かかる組成物が免疫応答を強化する、またはTエフェクター細胞の調節性T細胞に対する比を増加するもしくは抗腫瘍免疫応答を引き出すことも理解されるべきである。

20

30

【0118】

本明細書に提供される組み換え型リステリア投与に続いて、単独、または本明細書に提供される免疫原性組成物と同時投与するとき、本明細書に提供される方法は末梢リンパ器官内でのTエフェクター細胞の増殖を誘発し、腫瘍部位におけるTエフェクター細胞の存在の強化をもたらす。別の実施形態では、本明細書に提供される方法は末梢リンパ器官におけるTエフェクター細胞の増殖を誘発し、Tエフェクター細胞の末梢における存在の強化をもたらす。Tエフェクター細胞のかかる増殖は、本明細書で実証するように、Tregの数に影響を与えずに、末梢内および腫瘍部位におけるTエフェクター細胞の調節性T細胞に対する比の増加をもたらす（実施例参照）。末梢リンパ器官としては、脾臓、パイエル板、リンパ節、アデノイドなどが挙げられるが、これに限らないことを当業者は理解するであろう。一実施形態では、Tregの数に影響を与えずに、Tエフェクター細胞の調節性T細胞に対する比の増加が末梢で生じる。別の実施形態では、末梢、リンパ器官、および腫瘍部位で、これらの部位でのTregの数に影響を与えずに、Tエフェクター細胞の調節性T細胞に対する比の増加が生じる。別の実施形態では、Tエフェクター細胞の比の増加はTregの頻度を減少するが、この部位におけるTregの総数は減少しない。

40

【0119】

一実施形態では、本明細書で実証するように、切断LLOおよび異種抗原の融合タンパク質を発現する弱毒化組み換え型リステリア株を、同一の抗原を発現する組み換え型リステリアと組み合わせることは、完全な腫瘍退行をもたらす（実施例6参照）。

50

【0120】

別の実施形態では、本発明の組み換え型核酸は、リステリア株内のコードしたペプチドの発現を駆動するプロモーター／調節性配列に動作可能にリンクしている。遺伝子の構成的発現を駆動するために有用なプロモーター／調節性配列が当該技術分野で周知であり、これらとしては、例えば、リステリアの P_{hlyA} プロモーター、 P_{ActA} プロモーター、および $p60$ プロモーター、ストレプトコッカス bac プロモーター、ストレプトマイセス・グリセウス $sglA$ プロモーター、およびバシルス・チューリングエンシス $phaZ$ プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。別の実施形態では、本発明のペプチドをコードする核酸の誘発性でかつ組織に特異的な発現は、ペプチドをコードする核酸を誘発性または組織特異的プロモーター／調節性配列の制御下に置くことによって遂行される。この目的のために有用な組織特異的または誘発性プロモーター／調節性配列の実施例としては、MMTV LTR 誘発性プロモーター、およびSV40 後期エンハンサー／プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。別の実施形態では、金属、グルココルチコイド、およびこれに類するものなどの誘発剤に応答して誘発されたプロモーターが利用される。こうして、本発明は、既知または未知のいずれかで、かつこれらに動作可能にリンクする所望のタンパク質の発現を駆動する能力を有する、任意のプロモーター／調節性配列の使用を含むことが理解されるであろう。

医薬組成物

【0121】

別の実施形態では、本発明のワクチンおよび組成物を含有する医薬組成物は、非経口的、癌近傍に、経粘膜的、経皮的、筋肉内、静脈内、皮内、皮下、腹腔内、脳室内、頭蓋内、腔内、または腫瘍内など、当業者に既知の任意の方法によって被験者に投与される。

【0122】

一実施形態では、本発明の組成物は、組み換え型リステリア・モノサイトゲネス (Lm) 株を含む。

【0123】

全体を通して使用されるように、「組成物」、「ワクチン」、および「免疫原性組成物」という用語はすべて同一の意味と質を有して交換可能である。いくつかの実施形態では、「医薬組成物」という用語は、例えば、必要な被験者に投与するなど、医薬用途に好適な組成物を指す。別の実施形態では、「医薬組成物」という用語は、リステリア株を医薬的に許容される担体または希釈剤とともに含む治療的に有効な量の活性成分（複数可）を包含する。「治療的に有効な量」という用語が、所与の病状および投与レジメンに対して治療的効果を提供する量を指すことが理解されるであろう。

【0124】

被験者内に強化した抗腫瘍T細胞応答を引き出すため、被験者内で腫瘍を薬物治療した免疫抑制を阻害するため、もしくは被験者の脾臓および腫瘍のTエフェクター細胞の調節性T細胞 (Treg) に対する比を増加するため、またはこれらの任意の組み合わせの目的で、本発明の組成物を本発明の方法で使用してもよい。

【0125】

本明細書に提供される方法および組成物の別の実施形態では、組成物は経口投与され、したがって経口投与に好適な形態、すなわち固形製剤または液体製剤として処方される。好適な固形の経口剤形としては、錠剤、カプセル、丸薬、顆粒、ペレット、およびこれに類するものが挙げられる。好適な液状の経口剤形としては、溶液、懸濁液、分散体、エマルジョン、オイル、およびこれに類するものが挙げられる。本発明の別の実施形態では、活性成分はカプセルで処方される。この実施形態によると、本発明の組成物は活性化化合物および不活性担体または希釈剤に加えて、硬いゼラチンカプセルを含む。

【0126】

別の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、液体製剤の静脈内、動脈内、または筋肉内注射によって投与される。好適な液体剤形としては、溶液、懸濁液、分散体、エマルジョン、オイルおよびこれに類するものが挙げられる。一実施形態では、医薬組成物

は静脈内に投与され、したがって静脈内投与に好適な形態で処方される。別の実施形態では、医薬組成物は動脈内に投与され、したがって動脈内投与に好適な形態で処方される。別の実施形態では、医薬組成物は筋肉内に投与され、したがって筋肉内投与に好適な形態で処方される。

【0127】

「投与する」という用語は被験者に本発明の組成物との接触をもたらすことを包含することを当業者は理解するであろう。一実施形態では、投与はインビトロで、すなわち、試験管内で、またはインビボで、すなわち、生命体、例えば、ヒトの細胞または組織の中で遂行することができる。一実施形態では、本発明は、本発明のリステリア株およびその組成物を被験者に投与することを包含する。

10

【0128】

本出願全体を通して、本発明の様々な実施形態が範囲の形式で提示される場合がある。範囲の形式の記述は、単に利便性および簡潔性の目的に過ぎず、本発明の範囲の一定不動の制限として解釈するべきではないことを理解するべきである。したがって、範囲の記述はすべての可能性のある部分的範囲ならびにその範囲内の個別の数値を具体的に開示したものと考えるべきである。例えば、1～6などのような範囲の記述は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6、等々などの具体的に開示された部分的範囲、ならびにこの範囲内の個別の数、例えば、1、2、3、4、5、および6を有すると考えるべきである。これは、範囲の幅広さに関わらず適用される。

【0129】

本明細書に数値的範囲が示されるときはいつも、示される範囲内のあらゆる引用された数値（分数または整数）を含むことを意味する。第1に示す数と第2に示す数と「の間の範囲」という句、および第1に示す数「から」第2に示す数「までの範囲」という句は、本明細書で互換的に使用され、第1に示す数および第2に示す数ならびにそれらの間のすべての分数および整数を含むことを意味する。

20

【0130】

本明細書で使用される時「方法」という用語は、化学技術、薬学技術、生物学技術、生化学技術、および医術の実践者に既知であるか、または既知の様式、手段、技法、および手順からこれらの施術者によって容易に開発される様式、手段、技法、および手順を含むがこれに限定されない、所与の課題を遂行するための様式、手段、技法、および手順を指す。

30

【0131】

本明細書で使用される時、単数形（「1つの（a、an）」および「その（the）」）は複数形の参照を含むが、その文脈によってそうでないことが明らかに示される場合はその限りではない。例えば、「1つの化合物」または「少なくとも1つの化合物」は、これらの混合物を含む複数の化合物を含む場合がある。

【0132】

本明細書で使用される時、「約」という用語は数量的にプラスもしくはマイナス5%を意味し、または別の実施形態では、プラスもしくはマイナス10%を意味し、または別の実施形態では、プラスもしくはマイナス15%を意味し、または別の実施形態では、プラスもしくはマイナス20%を意味する。

40

【0133】

「被験者」という用語は、一実施形態では、症状もしくはその後遺症の療法を必要とする、または症状もしくはその後遺症を受けやすい、ヒトを含む哺乳類を指す。被験者は、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ラット、およびマウス、ならびにヒトを含んでもよい。「被験者」という用語はあらゆる点で正常な個体を除外しない。

【0134】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態をより完全に例示するために提示される。しかしながら、これらは本発明の幅広い範囲を制限するものとはけっして理解するべきでない。

50

【実施例】

【0135】

実施例

材料および方法：

マウス

メスの生後6～8週（記載のない限り）のC57BL/6マウスをFrederick National Laboratory for Cancer Research（FNLCR）から購入した。マウスを米国国立ガン研究所（Bethesda）の動物施設で飼育した。実験用マウスの使用のためのプロトコルは、米国国立衛生研究所の実験動物委員会で承認された。

10

細胞株

【0136】

低いレベルのE6およびE7を発現するTC-1細胞は、原発性C57BL/6マウスの肺上皮細胞から、HPV-16 E6およびE7ならびにrasガン遺伝子活性化を用いた形質転換によって派生させた。細胞をRPMI 1640内で、10%のFBS、100U/mLのペニシリン、100μg/mLのストレプトマイシン、2mMのL-グルタミン、1mMのピルビン酸ナトリウム、100μMの非必須アミノ酸、および0.4mg/mLのG418を補充して、37℃にて5%CO₂を用いて成長させた。

L. モノサイトゲネス株

【0137】

Advaxis Inc（米国ニュージャージー州Princeton）で、Lmd dA-LLO-E7、ならびにその対照Lmd dA-LLOおよびLmd dAが生成された。dal dat Δact A株（Lmd dA）は、dal dat株から構築されたが、これはLm野生型株10403Sに基づいてストレプトマイシン耐性遺伝子を染色体に組み込んだものである。dal、dat、およびact Aを突然変異させることによって、Lmd dAは高度に弱毒化される。Lmd dA-LLO-E7株は、prf A、並びにプラスミド中のクロラムフェニコール耐性遺伝子の欠失後、pTV3プラスミドを用いたLmd dAの形質転換によって構築された。上述のように、LLO-E7融合タンパク質の発現および分泌がLmd dA-LLO-E7株の培養上清でウエスタンブロットによって確認された。Lmd dA-LLO対照株の構築は、Lmd dA-LLO-E7株のものと類似であるが、pTV3プラスミドでprf AとE7との両方が欠失された。Lm野生型株である10403Sと、Δhly、Δhly::pfo、およびhly::Tn917-lac（pAM401-hly）を含むいくつかの突然変異株は、好意によりD. Portnoy博士（University of California（米国カリフォルニア州Berkeley））によって提供された。株hly::Tn917-lacは、野生型Lmの非溶血性突然変異体であり、この中でTn917-lac融合遺伝子はhly遺伝子（LLOをコードする遺伝子）の中へと挿入され、LLO溶血活性を妨害する。LLO（pAM401-hly）を発現するプラスミドを用いてこの突然変異体がトランスフェクトされたとき、それはLLOを有するので溶血活性を再度獲得する。全長のE7遺伝子がLm染色体に組み込まれているLm-E7株は、好意によりY. Paterson博士（University of Pennsylvania（米国ペンシルバニア州Philadelphia））によって提供された。細菌をブレインハートインフュージョン培地にストレプトマイシン（100μg/mL）を加えたもののの中で、D-アラニン（100μg/mL）の存在下または非存在下で培養した。

20

30

40

試薬

【0138】

蛍光共役抗マウス抗体CD4-PerCP-Cy5.5（GK1.5）およびCD8-Brilliant Violet 421（53-6.7）はBiolegend（米国カリフォルニア州San Diego）から得た。FoxP3-FITC（FJK-16s）はeBioscience（米国カリフォルニア州San Diego）から得た

50

。E7ペプチド(RAHYNIVTF)、配列番号:5をロードしたH-2D^b四量体は、好意により米国国立アレルギー感染症研究所四量体コア施設(National Institute of Allergy and Infectious Diseases Tetramer Core Facility)および米国国立衛生研究所AIDS試薬の研究および寄託プログラム(National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program)によって提供された。CountBright(商標)絶対計数ビーズはLife Technologies(米国ニューヨーク州Grand Island)から得た。

腫瘍接種およびマウスのワクチン接種 ワクチン接種

10

【0139】

0日目にTC-1細胞(10⁵細胞/マウス)をマウスの右の脇腹に皮下移植した。10日目に、腫瘍が直径5~6mmになったとき、マウスにLmd dA-LLO-E7ワクチンまたは適正な対照を0.1 LD50の用量で腹腔内注射した。17日目にワクチン接種をブーストした。腫瘍を週に2回電子キャリパーを使用して測定し、腫瘍サイズを次の式によって計算した:長さ×幅×幅/2。腫瘍の直径が2.0cmに達したとき、マウスを安楽死させた。

フローサイトメトリー

【0140】

マウスの脾臓細胞または腫瘍から採取した細胞をCD4-PerCP-Cy5.5、CD8-Brilliant Violet 421、およびH-2D^bE7四量体-APCで30分間染色した。細胞を固定し、透過処理して、FoxP3-FITCで一晩染色した。細胞をフローサイトメトリーによって解析した。リンパ球ゲートを、TregがCD4+FoxP3+と識別されたところにセットした。絶対細胞数を計数するためにCountBright(商標)絶対計数ビーズを添加した。

20

CD4+CD25+Tregの養子移植

【0141】

Dynal(登録商標)CD4+CD25+Tregキット(Life Technologies(米国ニューヨーク州Grand Island))によってマウスの脾臓からCD4+CD25+T細胞が分離された。腫瘍細胞接種後9日目に、TC-1腫瘍を持つマウスの中へと細胞を静脈内注射した。Treg導入の1日後、マウスにLmd dA-LLO-E7(0.1 LD50)を用いて、1週間の間隔で2回腹腔内免疫付与した。腫瘍の成長を監視した。

30

統計

【0142】

非パラメトリックなマン・ホイットニー検定を使用してデータを解析した。P<0.05で有意性を判定した。

実施例1:Lmd dA-LLO-E7は、Treg頻度の減少に付随して起こる定着したTC-1腫瘍の退行を誘発する。

【0143】

Lmベースのワクチン、Lm-LLO-E7は、融合タンパク質LLO-E7ならびにPrfAがリステリアXFL-7のprfA陰性株中でエピソード発現されるとき、定着したTC-1腫瘍の完全な退行を誘発したことが以前報告された。ここで、融合タンパク質LLO-E7をdal、dat、およびactA変異型Lm株中でプラスミドによって生成する、別の高度に弱毒化されたLmベースのワクチン、Lmd dA-LLO-E7の抗腫瘍活性を調査した。クロラムフェニコール耐性遺伝子およびPrfAがプラスミドから除去されているので、Lmd dA-LLO-E7は、Lm-LLO-E7と比較してより弱毒化されている。Lm-LLO-E7と同様に、Lmd dA-LLO-E7も定着したTC-1腫瘍の成長を著しく阻害することが観察された(図1、AおよびB、図2)。TC-1腫瘍を持つマウスのおよそ40%では、Lmd dA-LLO-E7を2回用いたワ

40

50

クチン接種後に腫瘍は完全に退行した（図1Bおよび図2）。再発し、3か月で死んだ1匹のマウスを除いて、腫瘍退行を示した他のマウス（全動物の33%）は再発なしで少なくとも6か月生存した（図1C）。Lm-E7はTC-1腫瘍の成長を遅らせたが、完全な腫瘍退行を誘発することはできなかった（図1、AおよびB、ならびに図2）。Lmd d A-LLO（E7無し）は、TC-1腫瘍成長を著しく阻害することができず（図1、AおよびB、ならびに図2）、先天的な免疫応答はTC-1腫瘍細胞を撲滅するのに十分ではないことを示唆した。Lmd d A-LLO-E7およびLm-E7は脾臓内に類似のH-2D^bE7四量体+CD8+T細胞応答を誘発し（図3、Aの上のパネル、B、およびD）、これは以前の所見と一致する。次いで、CD4+FoxP3+Tregを解析した。予想外に、PBS対照と比較して、Lmd d A-LLO-E7、Lm-E7、およびLmd d A-LLOがすべて脾臓内でTreg頻度を著しく減少させ、この減少は腫瘍内でより劇的であったが、Lmd d A-LLO-E7およびLmd d A-LLOがLm-E7よりも頻度を減少することが観察された（図1、D~H）。

実施例2：Lmは、Treg頻度の減少を誘発するのに十分である

【0144】

最初、Treg頻度の減少が切断LLOによって媒介されることが疑われた。しかし切断LLOの発現無しでも、Lm-E7はTreg頻度を減少することができた（図1、D~H）。この観察は、LmがTreg頻度を減少することができる場合があることを示唆する。実際、Lmd d A-LLO-E7に対するベクター対照であるLmd d Aと、野生型Lm株でかつLm-E7に対するベクター対照である10403Sの両方は、Treg頻度を脾臓内で著しく減少し、腫瘍内ではより著しく減少する（図4）。

実施例3：LmはCD4+FoxP3-T細胞およびCD8+T細胞増殖を選択的に誘発することによってTreg頻度を減少する

【0145】

相対的Treg頻度（総T細胞の比率）はTregの数だけではなく、CD4+FoxP3-T細胞およびCD8+T細胞の数によっても決定される。どのようにしてLmがTreg頻度を減少するのかを調査するために、Lmd d A-LLO-E7、Lmd d A-LLO、Lmd d A、Lm-E7、またはLm（10403S）で処置されたTC-1腫瘍を持つマウス内のCD4+FoxP3+Treg、CD4+FoxP3-T細胞、およびCD8+T細胞の数を定量した。驚くべきことに、図5に示すように、Lmd d Aは腫瘍内のCD4+FoxP3+T細胞の数を目立って変化させないことが見出された。これは実際にはCD4+FoxP3-T細胞およびCD8+T細胞を増加し、ひいてはTreg頻度を相対的に減少させている。Lmd d A-LLOおよびLmd d A-LLO-E7内での切断LLOのエピソーム性発現は、CD4+FoxP3-T細胞およびCD8+T細胞をさらに増加し、ひいてはCD4+FoxP3+T細胞の頻度をさらに減少させる。野生型Lm 10403SおよびLm-E7は、CD4+FoxP3+T細胞の数を著しく変化しない一方で、CD4+FoxP3-T細胞およびCD8+T細胞の増加も誘発する。Lm-LLO-E7は、腫瘍内のCD4+FoxP3-T細胞およびCD8+T細胞の密度を著しく増加させる。これらの結果は、LmがCD4+FoxP3-T細胞およびCD8+T細胞の増殖を選択的に誘発して、CD4+FoxP3+T細胞の頻度を減少させることを実証する。

実施例4：Lmに誘発されたCD4+FoxP3-T細胞およびCD8+T細胞の増殖はLLOに依存し、それによって媒介される

【0146】

hly遺伝子によってコードされたLLOは、孔形成細胞溶解素であり、Lmはこれによって宿主細胞ファゴソームの液胞から細胞質の中へと脱出することができる。Lmd d A-LLO-E7、Lm-E7、およびすべてのこれらの対照はLLOを生成するので、その中でhly遺伝子がシャトルベクターの使用に続く相同的組み換えで欠失される、10403Sに由来するLLO欠損Lm突然変異体が、CD4+FoxP3-T細胞およびCD8+T細胞の増殖を誘発する上でLLOが役割を果たすかどうかを研究するために使

10

20

30

40

50

用された。 $\Delta h l y L m$ は、単回投与後7日目にマウスの脾臓内の $C D 4 + F o x P 3 - T$ 細胞および $C D 8 + T$ 細胞を増加することができなかったことが見出され（図6A）、 $C D 4 + F o x P 3 - T$ 細胞および $C D 8 + T$ 細胞の増殖の誘発が $L L O$ に依存することを示した。これは $L L O$ の直接的な効果、またはファゴリソソームから逃れるための要件である可能性がある。この質問に対処するために、 $L L O$ を $P F O$ で置き換えた $L M$ を研究した。クロストリジウム・パーフリンジェンスによって生成されたパーフリンゴリジン O （ $P F O$ ）は、アミノ酸については $L L O$ と43%同一であり、液胞膜を溶解することもできる。 $h l y$ プロモーターの制御下で $P F O$ をコードする $p f o$ 遺伝子は、 $\Delta h l y$ 株の染色体の中へと遺伝子組み換えされて、 $\Delta h l y :: p f o$ 株を形成した。 $\Delta h l y :: p f o$ は食作用から逃れて細胞質内に入ることができたが、マウスの脾臓内で $C D 4 + F o x P 3 - T$ 細胞および $C D 8 + T$ 細胞を増加することはできなかった（図6A）。対照的に、 $h l y :: T n 9 1 7 - l a c$ （ $p A M 4 0 1 - h l y$ ）、野生型 $L m$ の非溶血性 $T n 9 1 7 - l a c$ 突然変異体（その中で $T n 9 1 7 - l a c$ 融合遺伝子が $h l y$ 遺伝子の中へと挿入され、 $L L O$ 溶血活性を妨害する）は、 $L L O$ 発現プラスミド $p A M 4 0 1 - h l y$ で形質転換され、マウスの脾臓の $C D 4 + F o x P 3 - T$ 細胞および $C D 8 + T$ 細胞の増殖を誘発した（図6A）。これらの結果は $C D 4 + F o x P 3 - T$ 細胞および $C D 8 + T$ 細胞の増殖が $L L O$ によって直接的に媒介されることを示唆する。 $L m$ は $C D 4 + F o x P 3 + T$ 細胞の増殖を有意に誘発しなかったので、 $L m$ で誘発された $T r e g$ は $C D 4 + F o x P 3 - T$ 細胞および $C D 8 + T$ 細胞の増加の結果得られた頻度を減少する（図6、A～D）。

実施例5： $L m d d A$ 内の切断 $L L O$ のエピソーム性発現は、 $C D 4 + F o x P 3 - T$ 細胞および $C D 8 + T$ 細胞のより高いレベルへの増殖を誘発する

【0147】

次に、 $L m d d A$ および $L m d d A - L L O$ を比較し、ここで後者は健康で腫瘍を持っていないマウス内の T 細胞増殖の誘発で、プラスミドによってエピソーム的に切断 $L L O$ を生成する。単回投与の7日目に $L m d d A$ がマウスの脾臓内の $C D 4 + F o x P 3 - T$ 細胞および $C D 8 + T$ 細胞の数をわずかに増加することができると見出されたが、 $L m d d A - L L O$ はより高いレベルへのかかる増加をさらに誘発した（図7A）。対照的に、 $L m d d A$ または $L m d d A - L L O$ 感染の後、 $C D 4 + F o x P 3 + T$ 細胞の数は著しくは変化しなかった（図7A）。これらは、 $P B S$ 対照と比較して、 $L m d d A - L L O$ 投与後に $T r e g$ の比例した著しい減少をもたらした（図7、B～D）。これらの細胞内での細胞増殖マーカー $K i - 6 7$ の存在を調べた。 $L m d d A$ は、 $K i - 6 7 + C D 4 + F o x P 3 - T$ 細胞および $K i - 6 7 + C D 8 + T$ 細胞の頻度および絶対数を増加したが、 $L m d d A - L L O$ は数をより大幅に増加した（図7、E～G）。 $C D 4 + F o x P 3 - T$ 細胞および $C D 8 + T$ 細胞内の $K i - 6 7$ 発現のレベルもこれに応じて増加した（図7H）。対照的に、 $C D 4 + F o x P 3 + T$ 細胞内での $K i - 6 7 + C D 4 + F o x P 3 + T$ 細胞および $K i - 6 7$ 発現の頻度および絶対数は、顕著には変化せず、 $L m d d A$ および $L m d d A - L L O$ がこれらの増殖を誘発しなかったことを示している。

実施例6： $L m - E 7$ と $L m d d A - L L O$ との組み合わせは定着した $T C - 1$ 腫瘍の退行を誘発する。

【0148】

$L m - E 7$ ワクチン単独では $C D 4 + F o x P 3 - T$ 細胞および $C D 8 + T$ 細胞の増殖をあまり誘発しなかった（図5）。これは $T C - 1$ 腫瘍退行を誘発できなかったことを説明する可能性がある。 $L m d d A - L L O$ が $C D 4 + F o x P 3 - T$ 細胞および $C D 8 + T$ 細胞の増殖を誘発したので（図5および図7A）、 $L m d d A - L L O$ の存在下で $L m - E 7$ の抗腫瘍効果が改善する場合があると考えられる。実際、 $L m - E 7$ と $L m d d A - L L O$ との組み合わせは定着した $T C - 1$ 腫瘍のほぼ完全な退行を誘発した（図8、A～C）。対照的に、 $L m d d A$ の追加は $L m - E 7$ に誘発された抗腫瘍活性を増強する事ができず（データ非表示）、 $L m - E 7$ ワクチンの抗腫瘍有効性を改善するうえでの切断非溶血性 $L L O$ の重要性を示す。予想されるように、 $C D 4 + F o x P 3 - T$ 細胞および C

D 8 + T細胞の数は、L m - E 7またはP B Sで処置したものと比較して組み合わせ群のマウスの脾臓内で著しく増加する（図8 D）。この場合もC D 4 + F o x P 3 +の数は比較的变化しないので、組み合わせたm - E 7とL m d d A - L L OとによるC D 4 + F o x P 3 - T細胞およびC D 8 + T細胞の数のより高いレベルまでの増加は、結果としてC D 4 + F o x P 3 + T細胞の比率のより大きな減少をもたらす（図8、E ~ G）。

【0149】

さらにL m d d Aは、L m d d A - L L OとL m - E 7との同時投与の間に非溶血性切斷L L Oが果たす役割を決定するために、対照としてL m - E 7とも同時投与された。L m d d A株の追加はL m - E 7誘発性抗腫瘍活性を増強できなかったことが観察され、L m d d Aによって生成された内在性L L OはL m - E 7誘発性抗腫瘍活性を補助することができないことを示した（図10）。

実施例7：T r e gの養子移植はL m d d A - L L O - E 7の定着したT C - 1腫瘍に対する抗腫瘍有効性を損なう。

【0150】

L m d d A - L L O - E 7はT r e gの数を著しくは変化しなかったが、T r e g頻度を減少した（図1、D ~ H）。T r e gのC D 4 + F o x P 3 - T細胞またはC D 8 + T細胞に対する比は、T r e g抑制能力を決定するための広く受け入れられているパラメータである。T r e gの比率がL m d d A - L L O - E 7の抗腫瘍有効性に何らかの影響を有するかどうかを判定するために、無処置のC 5 7 B L / 6マウスからC D 4 + C D 2 5 + T r e gを分離し、これらをT C - 1腫瘍を持つマウスに静脈注射し、引き続いてL m d d A - L L O - E 7ワクチン接種を行った。L m d d A - L L O - E 7はT r e gの養子移植なしで、マウス内でのT C - 1腫瘍成長を著しく阻害した（図9、AおよびB）。しかしながら、T r e gを与えられたマウスでは、L m d d A - L L O - E 7は、T C - 1腫瘍の成長を有意に阻害することができなかった（図9、AおよびB）。T r e gを受容したマウスは、脾臓内でT r e gの数のわずかな増加を示したが、腫瘍内ではより大きい減少を示した。一方で、T r e gを受容したマウスは、L m d d A - L L O - E 7を用いてワクチン接種した後、L m d d A - L L O - E 7対照と比較してより少ないC D 4 + F o x P 3 - T細胞およびC D 8 + T細胞を有し、T r e gの用紙移植がC D 4 + F o x P 3 - T細胞とC D 8 + T細胞増殖を阻害することを示した（図9、FおよびG）。これらと一緒にして、結果としてT r e g受容マウス内のT r e g頻度の増加した（図9、C ~ E）。

【0151】

腫瘍抗原に特異的なC T Lは、腫瘍細胞を殺すうえで主要な役割を果たし、L mは、細胞内細菌としてM H CクラスI分子と関連付けられた抗原を送達してC T Lを活性化することができる。しかしながら、2つのL mベースのワクチンである、L m - L L O - E 7およびL m - E 7は類似のレベルのH P V E 7に特異的なC T Lを脾臓内で誘発するにもかかわらず、なぜ異なる抗腫瘍活性を呈し、前者（L m - L L O - E 7）はより強い抗腫瘍効果を誘発するのであろうか（図1、A ~ C、図2、図3）。C D 8 + T細胞の枯渇がL m - L L O - E 7誘発性腫瘍退行を無効にするので、C D 8 + T細胞が腫瘍細胞を殺すことに関与していることは疑いが無い。E 7発現を欠いているL m d d A - L L OはT C - 1腫瘍の成長を有意に阻害することができなかったのも、腫瘍細胞を殺すためにはある特定のレベルの腫瘍抗原特異的C T Lが必要であることも明らかである（図1、A ~ C、および図2）。L m - E 7がT r e gの増加を誘発して宿主免疫応答を抑制し、ひいてはその抗腫瘍免疫性を損なうということが提案されている。しかしながら、発明者らの側では、P B S対照と比較してT C - 1腫瘍モデル内で実際にL m - E 7とL m d d A - L L O - E 7の両方がT r e g頻度を減少することを見出した（図1、D ~ H）。さらにL m - E 7もL m d d A - L L O - E 7も、ワクチン接種後にT C - 1腫瘍内のT r e gの総数を有意に増加しないことが見出された（図5）。

【0152】

事実、L m d d A - L L O - E 7とL m - E 7との間の主な違いは、前者はC D 4 + F

ox P 3-T細胞およびCD 8+T細胞の数の際立った増加を誘発することができ、一方で後者は増加をずっと少ない程度まで誘発したことであることが見出された(図5)。これは、なぜL m d d A-L L O-E 7がT r e gパーセンテージをL m-E 7より大きい程度まで減少するかを説明する(図1、D~H)。L mベクターが、CD 4+F o x P 3-T細胞およびCD 8+T細胞の数を増加するのに十分であることが観察された。しかしながら、切断L L Oのエピソーム性発現によって、L mはCD 4+F o x P 3-T細胞およびCD 8+T細胞の数をより高いレベルまで劇的に増加し、ひいてはT r e gの頻度をなおさらに減少する(図7)。したがって、CD 4+F o x P 3-T細胞およびCD 8+T細胞の数の増加を誘発するうえでL L Oは重要な役割を果たすと考えられる。実際、L L OはL. モノサイトゲネスがファゴソームから脱出するために必要なだけでなく、CD 4+F o x P 3-T細胞およびCD 8+T細胞を直接的に増殖させるが、その理由はL mが細胞質に入ることを可能にするP F Oを発現する、L L O-マイナス($\Delta h l y$) L. モノサイトゲネス株も $\Delta h l y::p f o$ 株のどちらもCD 4+F o x P 3-T細胞およびCD 8+T細胞の増殖の誘発には成功しなかったが、L L O発現プラスミドを使用した非溶血性L L O突然変異L m株の形質転換は、CD 4+F o x P 3-T細胞およびCD 8+T細胞の増殖を復元したからである(図6)。L m d d A内での非溶血性切断L L Oのエピソーム性の発現がCD 4+F o x P 3-T細胞およびCD 8+T細胞の増殖を大いに増強するので、L L O誘発性のCD 4+F o x P 3-T細胞およびCD 8+T細胞の増殖は、その溶血活性には無関係である(図7)。L L OによるCD 4+T細胞とCD 8+T細胞との両方の応答の増殖は抗原非特異的アジュバント効果であるように思われるが、L L Oはこれらの2つの細胞タイプの免疫優勢エピトープも含有する場合がある。実際、初期の研究は、L L Oが2つのCD 4+T細胞エピトープ(それぞれ残基189~201および残基215~226)と、1つのCD 8+T細胞エピトープ(残基91~99)とを持つことを特定した。

【0153】

L m d d A-L L O-E 7の優れた抗腫瘍効果は、これがCD 4+F o x P 3-T細胞およびCD 8+T細胞の著しい増加を誘発するという事実に起因する可能性がある。対照的に、L m-E 7がCD 4+F o x P 3-T細胞およびCD 8+T細胞の数の際立った増加を誘発することができないのは、腫瘍の撲滅におけるその非効率性が原因であり、これはL m-E 7単独と比較してCD 4+F o x P 3-T細胞およびCD 8+T細胞の数を劇的に増加したL m-E 7とL m d d A-L L Oとの組み合わせが、定着T C-1腫瘍のほぼ完全な退行を誘発したことで示される(図8)。発明者らのデータは、L m d d A-L L O-E 7が誘発したT r e g頻度の減少が、CD 4+F o x P 3-T細胞およびCD 8+T細胞の数の増加の結果であることを示している。T r e gのCD 4+F o x P 3-T細胞に対する比、またはCD 8+T細胞に対する比は、CD 4+F o x P 3-T細胞およびCD 8+T細胞の機能を抑制するために重要である。実際、T r e gの腫瘍を持つマウスへの養子移植に続くL m d d A-L L O-E 7のワクチン接種によってインビボのT r e g比を増加することは、CD 4+F o x P 3-T細胞およびCD 8+T細胞の増殖を阻害し、その結果としてワクチンの抗腫瘍有効性を損なった(図9)。

【0154】

選択的にCD 4+F o x P 3-T細胞およびCD 8+T細胞増殖を誘発することに加えて、切断非溶血性L L Oは、L m d d A-L L O-E 7ワクチンの抗腫瘍有効性の改善にその他の貢献もする。L m-E 7およびL m d d A-L L O-E 7はE 7特異的CD 8+T細胞の類似の増殖を誘発したが、これは腫瘍の場合にはあてはまらないことが観察された。切断L L O(L m d d A-L L O-E 7)のエピソーム性の発現により、腫瘍内でより多くのE 7特異的CD 8+T細胞が誘発される傾向があった(図3E)。L m d d A-L L O-E 7が、ケモカイン受容体C C R 5およびC X C R 3の発現をCD 4+F o x P 3-T細胞およびCD 8+T細胞上で上方制御することを見出したが、CD 4+F o x P 3+T細胞上では上方制御せず、T h 1およびCD 8+T細胞の輸送のためにはC C R 5およびC X C R 3が極めて重要であることを示す。これらの結果は、C C R 5およびC X

C R 3 の上方制御を通した、C D 4 + F o x P 3 - T 細胞および C D 8 + T 抗原特異的細胞の腫瘍微小環境への遊走を、L L O が誘発することを示唆する。さらに、抗原の L m からの効率的な分泌のために切断 L L O が必要であり、また L m ベクターから分泌されていない抗原は結果としてあまり効果的でない抗腫瘍免疫性の誘発をもたらすことが知られている。したがって、L m - E 7 ベクターの強力な抗腫瘍活性の欠如は、C D 4 + F o x P 3 - T 細胞および C D 8 + T 細胞を効果的に増殖できないことに起因するだけでなく、感染している抗原提示細胞および非効果的な抗原特異的 T 細胞応答のプライミングの状況での L m からの抗原の非効率性な分泌にも起因する可能性がある。

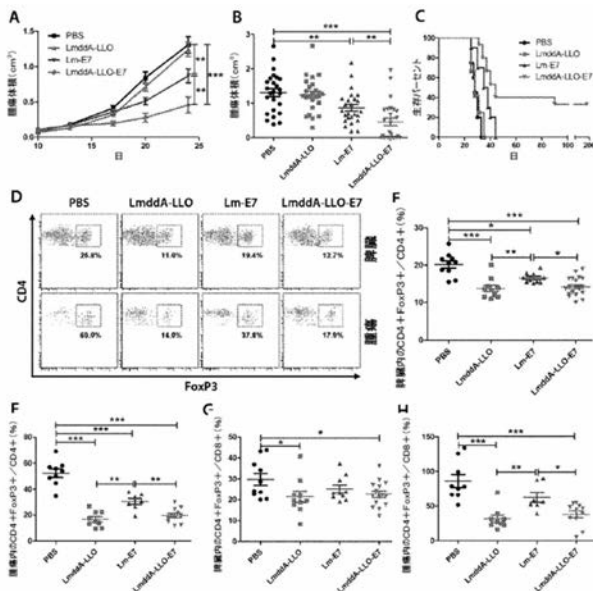
【0155】

総合的に、L m d d A - L L O - E 7 ワクチンでの非溶血性切断 L L O のエピソーム性の発現が、ワクチンの抗腫瘍活性を強化する C D 4 + F o x P 3 - T 細胞および C D 8 + T 細胞の増殖を選択的に誘発することが実証された。結論としてこの結果は、効果的な抗腫瘍免疫応答を引き起こすためには、ある特定のレベルの抗原特異的 C T L、ある特定のレベルの非腫瘍抗原特異的 C D 4 + F o x P 3 - T 細胞および C D 8 + T 細胞、ならびに T r e g 比率の減少などの数多くの因子がすべて必要であり、そして本明細書に提供されるリステリア構築体を用いてこれを遂行することができることを示す。さらに、L L O は C D 4 + F o x P 3 - T 細胞および C D 8 + T 細胞増殖を選択的に誘発し、ひいては全体的に T r e g 頻度を減少し好ましい免疫応答を支援して腫瘍細胞を死滅させるという点で、この特許は L L O が有望なワクチンアジュバントであることを示している。

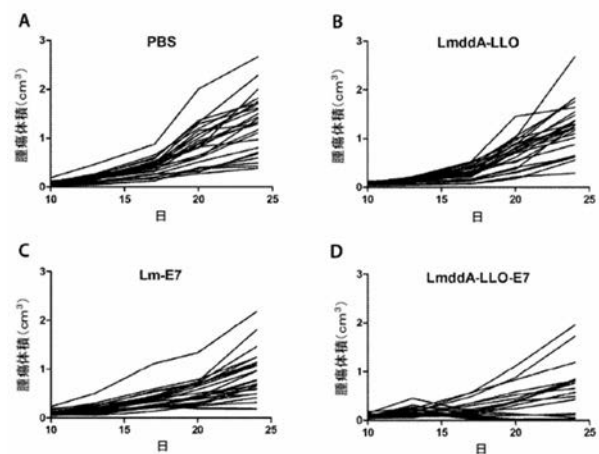
【0156】

添付の図面を参照して本発明の好ましい実施形態を記述してきたが、本発明は厳密に実施形態に限定されず、かつ添付の特許請求の範囲に定義されるように、当業者によって本発明の範囲または趣旨から逸脱することなくこれらに様々な変更および修正がなされてもよいことが理解されるであろう。

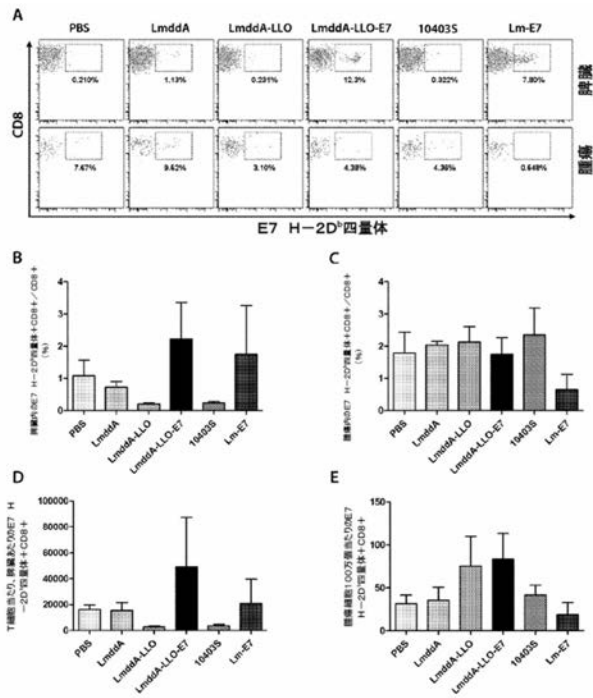
【図 1】



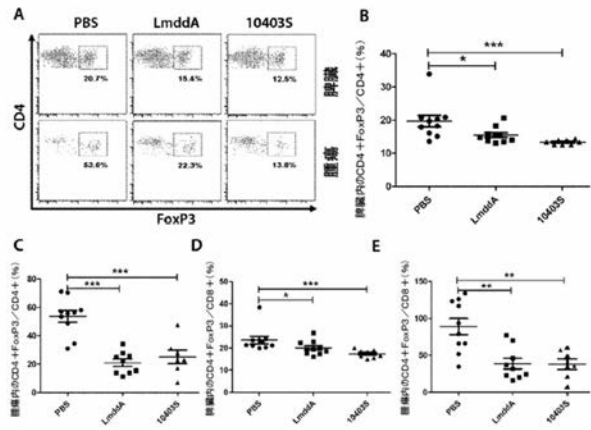
【図 2】



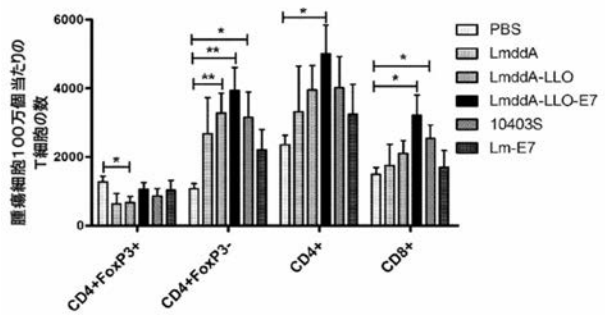
【図 3】



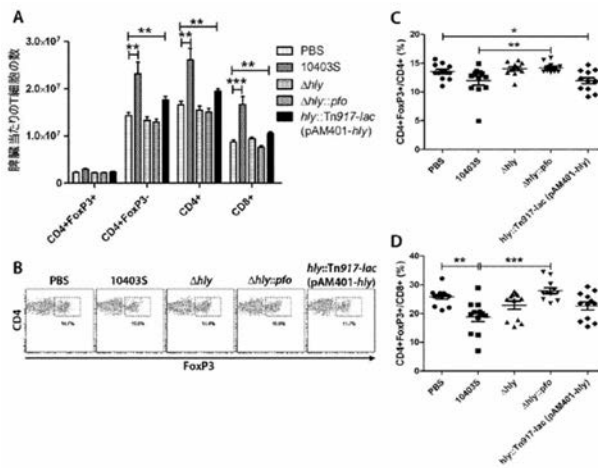
【図 4】



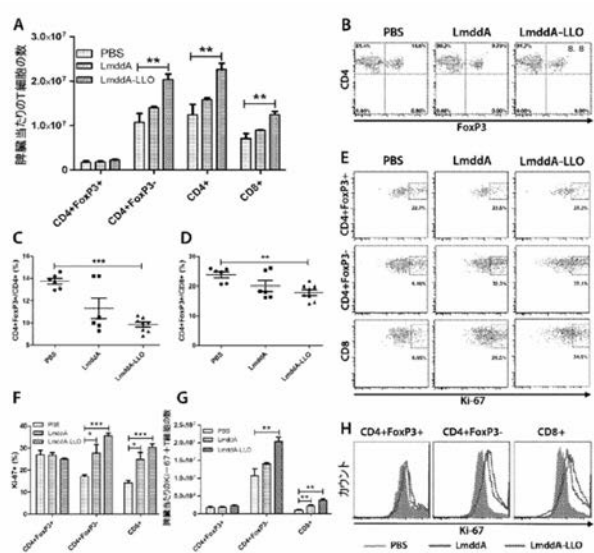
【図 5】



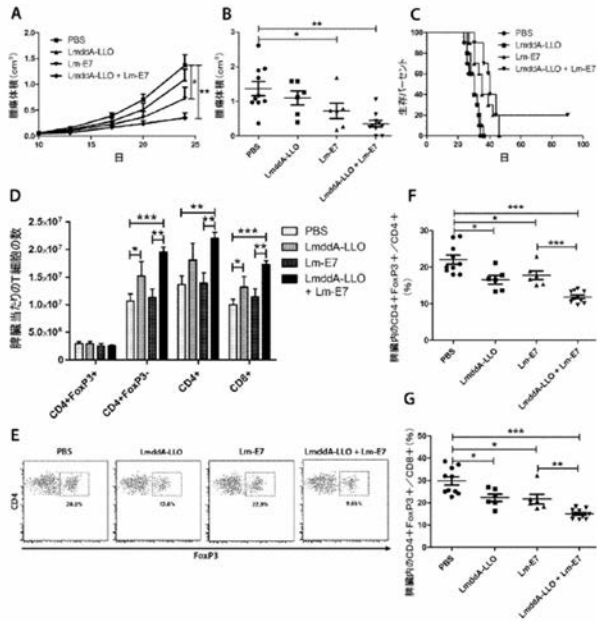
【図 6】



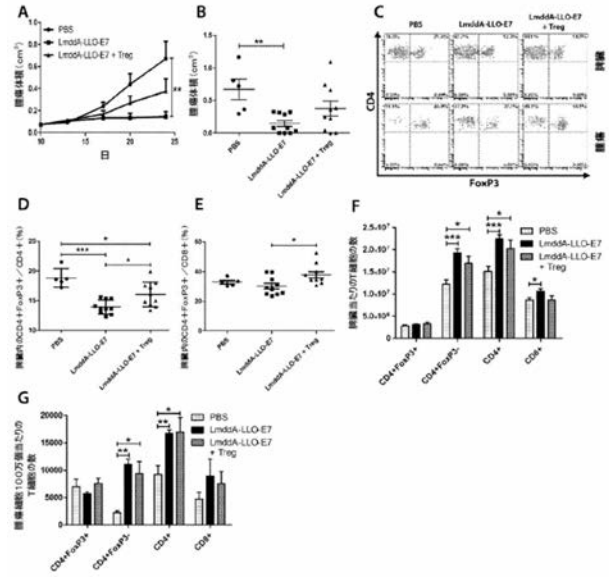
【図 7】



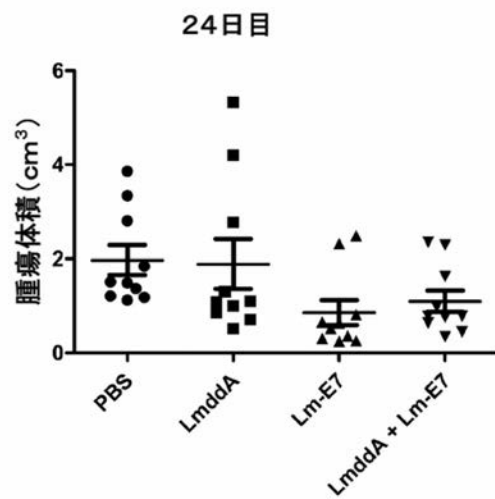
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【配列表】

2017508797000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US15/18915

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/02 (2015.01) CPC - A61K 2039/523 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) IPC(8): A61K 39/00, 39/02, 39/07 (2015.01) CPC: A61K 35/74, 39/0208, 48/00, 2035/11, 2039/523 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Dialog ProQuest; IP.com; Google; Google Scholar; 'anti-tumor,' 'T cell,' response, 'Listeria,' mutation, 'dal,' 'dat,' 'actA,' metabolic, truncated, 'LLO protein'		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2013/138337 A1 (ADVAXIS, INC.) September 19, 2013; abstract; paragraphs [00015], [00053], [00070], [00080], [00083], [00088], [00100], [00105], [00130], [00133]	1-4, 25-27
Y	US 2006/0104991 A1 (PATERSON, Y et al.) May 18, 2006; abstract; paragraphs [0058], [0113]	1-4, 25-27
Y	US 7662396 B2 (PATERSON, Y et al.) February 16, 2010; abstract; column 3, lines 34-41; column 44, lines 35-39; column 47	4
A	US 2011/0223187 A1 (SHAHABI, V et al.) September 15, 2011; abstract	1-4, 25-27
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 May 2015 (22.05.2015)		Date of mailing of the international search report 19 JUN 2015
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4500 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/18915

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☒ on paper or in the form of an image file.
- b. ☒ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/18915

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.: 5-24, 28-46
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 38/21 (2006.01)	A 6 1 K 37/66	G
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
	A 6 1 P 43/00	Z N A

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

(71)出願人 516265399

ナショナル インスティテューツ オブ ヘルス (エヌアイエイチ), ユー. エス. デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サービスズ (ディーエイチエイチエス), ユー. エス. ガバメント エヌアイエイチ ディビジョン オブ エクストラミューラル インベンションズ アンド テクノロジー リソースズ (ディーイーアイティーアール)
アメリカ合衆国 メリーランド 20892-7980, ベセスダ, エムエスシー 7980, ロックレッジ ドライブ 6705, スイート 310

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ブティ, ロバート

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 18940, ニュータウン (ライトスタウン), パーソ
ンズ レーン 149

(72)発明者 ワレチャ, アヌ

アメリカ合衆国 ペンシルバニア 19067, ヤードリー, ワイルドフラワー サークル
201

(72)発明者 チェン, ジソン

アメリカ合衆国 メリーランド 20854, ポトマック, タッカーマン レーン 8818

(72)発明者 ベルゾフスキー, ジェイ エー.

アメリカ合衆国 メリーランド 20814, ベセスダ, ブラッドリー ブールバード 59
08

(72)発明者 クレイフ, サミル

アメリカ合衆国 メリーランド 20906, シルバー スプリングス, ハサウェイ ドライ
ブ 13408

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA19 BA44 DA01 DA12 DA13 DA16 DA22 DA23 MA02

ZB26