

(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2016-513115

(P2016-513115A)

(43) 公表日 平成28年5月12日(2016.5.12)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/768 (2015.01)	A 6 1 K	35/768	Z N A 4 B 0 2 4
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N	15/00	A 4 B 0 6 5
C 12 N 7/01 (2006.01)	C 12 N	7/01	4 C 0 8 5
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K	35/761	4 C 0 8 7
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K	39/12	

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2015-558314 (P2015-558314)
(86) (22) 出願日	平成26年2月20日 (2014. 2. 20)
(85) 翻訳文提出日	平成27年10月19日 (2015.10.19)
(86) 國際出願番号	PCT/CA2014/050118
(87) 國際公開番号	W02014/127478
(87) 國際公開日	平成26年8月28日 (2014. 8. 28)
(31) 優先権主張番号	61/767,776
(32) 優先日	平成25年2月21日 (2013. 2. 21)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(71) 出願人 512151573
 チルドレンズ ホスピタル オブ イース
 タン オンタリオ リサーチ インスティ
 チュート インコーポレイテッド
 カナダ, ケ-1エイチ 8エル1, オ
 ンタリオ州, オタワ, スマイス ロー^ド
 401

(71) 出願人 505357317
 オタワ ホスピタル リサーチ インスティ
 チュート
 カナダ, ケ-1エイチ 8エル6, オ
 ンタリオ, オタワ, スマイス ロード
 501

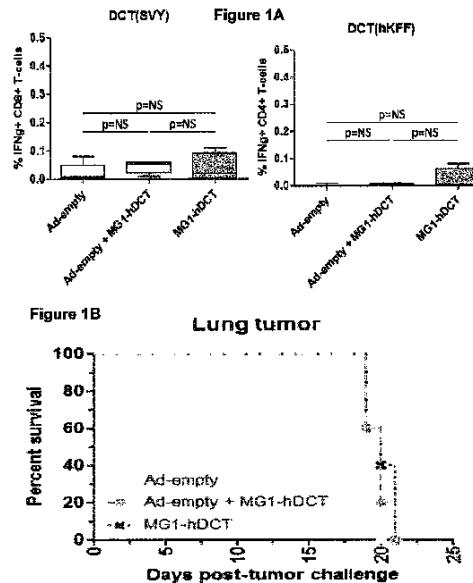
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ワクチン組成物

(57) 【要約】

MAGEA3、ヒトパピローマウイルスE6/E7融合タンパク質、前立腺タンパク質のヒト6回膜貫通型上皮抗原、若しくは癌精巣抗原1、又はその変異体を抗原タンパク質として発現し、哺乳動物においてタンパク質又はその変異体に対する免疫が生じるよう構築された、第1のウイルスを含む、哺乳動物において免疫応答を誘導する際に使用するためのキットが記載される。キットは、同一の抗原又は同一の抗原の変異体をコードするMaraba MG1ウイルスも含む。Maraba MG1ウイルスは、哺乳動物において免疫応答を誘導するよう構築される。第1のウイルスはMaraba MG1ウイルスと免疫学的に異なる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1 のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体を抗原タンパク質として発現し、哺乳動物において前記タンパク質又はその変異体に対する免疫が生じるよう構築された、第 1 のウイルス；及び

配列番号 1 のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体を抗原タンパク質としてコードし、哺乳動物において免疫応答を誘導するよう構築された、Maraba MG 1 ウィルス

を含む、哺乳動物において免疫応答を誘導する際に使用するためのキットであって、

前記第 1 のウイルスは前記 Maraba MG 1 ウィルスと免疫学的に異なる、キット

10

【請求項 2】

前記第 1 のウイルスにより発現される前記抗原タンパク質、及び前記 Maraba MG 1 ウィルスにより発現される前記抗原タンパク質が、同一である、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 3】

前記第 1 のウイルス、前記 Maraba MG 1 ウィルス、又は両方が、投与のため単離されたウイルスとして構築される、請求項 1 又は 2 に記載のキット。

【請求項 4】

前記 Maraba MG 1 ウィルスが、配列番号 2 のヌクレオチド配列を含む導入遺伝子の逆相補的 RNA バージョンを含む、

前記第 1 のウイルスが、マイナス鎖 RNA ウィルスであり、配列番号 2 のヌクレオチド配列を含む導入遺伝子の逆相補的 RNA バージョンを含む、

前記第 1 のウイルスが、DNA ウィルス又はプラスセンス RNA ウィルスであり、配列番号 2 のヌクレオチド配列を含む導入遺伝子を含む、或いは

前記 Maraba MG 1 ウィルスが、配列番号 2 のヌクレオチド配列を含む導入遺伝子の逆相補的 RNA バージョンを含み、且つ

a) 前記第 1 のウイルスが、マイナス鎖 RNA ウィルスであり、配列番号 2 のヌクレオチド配列を含む導入遺伝子の逆相補的 RNA バージョンを含む、又は

b) 前記第 1 のウイルスが、DNA ウィルス若しくはプラスセンス RNA ウィルスであり、配列番号 2 のヌクレオチド配列を含む導入遺伝子を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のキット。

30

【請求項 5】

前記 Maraba MG 1 ウィルスが、配列番号 3 のヌクレオチド配列を含む導入遺伝子の逆相補的 RNA バージョンを含む、

前記第 1 のウイルスが、マイナス鎖 RNA ウィルスであり、配列番号 3 のヌクレオチド配列を含む導入遺伝子の逆相補的 RNA バージョンを含む、或いは

前記第 1 のウイルスが、DNA ウィルス又はプラスセンス RNA ウィルスであり、配列番号 3 のヌクレオチド配列を含む導入遺伝子を含む、或いは

前記 Maraba MG 1 ウィルスが、配列番号 3 のヌクレオチド配列を含む導入遺伝子の逆相補的 RNA バージョンを含み、且つ

a) 前記第 1 のウイルスが、マイナス鎖 RNA ウィルスであり、配列番号 3 のヌクレオチド配列を含む導入遺伝子の逆相補的 RNA バージョンを含む、又は

b) 前記第 1 のウイルスが、DNA ウィルス若しくはプラスセンス RNA ウィルスであり、配列番号 3 のヌクレオチド配列を含む導入遺伝子を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のキット。

40

【請求項 6】

前記第 1 のウイルス、前記 Maraba MG 1 ウィルス、又は両方により発現される前記タンパク質変異体が、FLWGPRALV、KVAELVHFL、EGDCAPEEK、KKLLTQHFVQENYLEY、RKVAELVHFLLLKYR、及びKKL

50

L T Q H F V Q E N Y L E Y からなる群より選択される少なくとも 1 つの腫瘍関連エピトープを含み、配列番号 1 と少なくとも 70 % 同一である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 7】

前記変異体が配列番号 1 と少なくとも 80 % 同一である、請求項 6 に記載のキット。

【請求項 8】

前記変異体が配列番号 1 と少なくとも 90 % 同一である、請求項 6 に記載のキット。

【請求項 9】

前記変異体が配列番号 1 と少なくとも 95 % 同一である、請求項 6 に記載のキット。

【請求項 10】

前記第 1 のウイルス、Maraba MG 1 ウイルス、又は両方により発現される前記タンパク質変異体が、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する、請求項 6 に記載のキット。

【請求項 11】

前記タンパク質変異体が配列番号 5 のヌクレオチド配列によりコードされる、請求項 6 に記載のキット。

【請求項 12】

前記 Maraba MG 1 ウイルス及び前記第 1 のウイルスが、配列番号 1 の配列を含む前記タンパク質の異なる変異体を発現する、請求項 1 ~ 3 及び 6 ~ 11 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 13】

前記 Maraba MG 1 ウイルスが配列番号 2 又は 3 のヌクレオチド配列の逆相補的 RNA バージョンを含み、前記第 1 のウイルスが、マイナスセンス RNA ウイルスであり、配列番号 5 の逆相補的 RNA バージョンを含む、

前記 Maraba MG 1 ウイルスが配列番号 5 のヌクレオチド配列の逆相補的 RNA バージョンを含み、前記第 1 のウイルスが、マイナスセンス RNA ウイルスであり、配列番号 2 又は 3 の逆相補的 RNA バージョンを含む、

前記 Maraba MG 1 ウイルスが配列番号 2 又は 3 のヌクレオチド配列の逆相補的 RNA バージョンを含み、前記第 1 のウイルスが、DNA 又は RNA ウイルスであり、配列番号 5 である配列を含む、或いは

前記 Maraba MG 1 ウイルスが配列番号 5 のヌクレオチド配列の逆相補的 RNA バージョンを含み、前記第 1 のウイルスが、DNA 又は RNA ウイルスであり、配列番号 2 又は 3 である配列を含む、請求項 12 に記載のキット。

【請求項 14】

前記 Maraba MG 1 ウイルス又は前記第 1 のウイルスいずれかの一方が、配列番号 1 又は 4 の配列を含むタンパク質を発現でき、前記 Maraba MG 1 ウイルス及び前記第 1 のウイルスの他方が、他の配列を含むタンパク質を発現できる、請求項 12 に記載のキット。

【請求項 15】

前記第 1 のウイルスがアデノウイルスである、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 16】

配列番号 1 のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体をコードするゲノムを有する、単離された Maraba MG 1 ウイルス粒子。

【請求項 17】

配列番号 1 のアミノ酸配列を含む前記タンパク質の前記変異体が、F L W G P R A L V 、K V A E L V H F L 、E G D C A P E E K 、K K L L T Q H F V Q E N Y L E Y 、R K V A E L V H F L L K Y R 、及び K K L L T Q H F V Q E N Y L E Y からなる群より選択される少なくとも 1 つの腫瘍関連エピトープを有し、配列番号 1 と少なくとも 70 % 同一である、請求項 16 に記載の単離された Maraba MG 1 ウイルス粒子。

【請求項 18】

10

20

30

40

50

前記変異体が配列番号1と少なくとも80%同一である、請求項17に記載の単離されたMaraba MG1ウイルス粒子。

【請求項19】

前記変異体が配列番号1と少なくとも90%同一である、請求項17に記載の単離されたMaraba MG1ウイルス粒子。

【請求項20】

前記変異体が配列番号1と少なくとも95%同一である、請求項17に記載の単離されたMaraba MG1ウイルス粒子。

【請求項21】

配列番号1のアミノ酸配列を含む前記タンパク質の前記変異体が、配列番号4のアミノ酸配列を有する、請求項16に記載の単離されたMaraba MG1ウイルス粒子。 10

【請求項22】

前記ゲノムが配列番号2、3、又は5のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含む、請求項16に記載の単離されたMaraba MG1ウイルス粒子。

【請求項23】

前記ゲノムが配列番号6のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含む、請求項16に記載の単離されたMaraba MG1ウイルス粒子。

【請求項24】

配列番号7のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体を抗原タンパク質として発現し、哺乳動物において前記タンパク質又はその変異体に対する免疫が生じるよう構築された、第1のウイルス、及び 20

配列番号7のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体を抗原タンパク質としてコードし、哺乳動物において免疫応答を誘導するよう構築された、Maraba MG1ウイルス

を含む、哺乳動物において免疫応答を誘導する際に使用するためのキットであって、

前記第1のウイルスは前記Maraba MG1ウイルスと免疫学的に異なる、キット。 。

【請求項25】

前記第1のウイルスにより発現される前記抗原タンパク質、及び前記Maraba MG1ウイルスにより発現される前記抗原タンパク質が、同一である、請求項24に記載のキット。 30

【請求項26】

前記第1のウイルス、前記Maraba MG1ウイルス、又は両方が、投与のため単離されたウイルスとして構築される、請求項24又は25に記載のキット。

【請求項27】

前記Maraba MG1ウイルスが、配列番号8のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含むコドン最適化導入遺伝子を含む、

前記第1のウイルスが、マイナスセンスRNAウイルスであり、配列番号8のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含むコドン最適化導入遺伝子を含む、

前記第1のウイルスが、DNAウイルス又はプラスセンスRNAウイルスであり、配列番号8のヌクレオチド配列を含むコドン最適化導入遺伝子を含む、或いは 40

前記Maraba MG1ウイルスが、配列番号8のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含むコドン最適化導入遺伝子を含み、且つ

a) 前記第1のウイルスが、マイナスセンスRNAウイルスであり、配列番号8のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含むコドン最適化導入遺伝子を含む、又は

b) 前記第1のウイルスが、DNAウイルス若しくはプラスセンスRNAウイルスであり、配列番号8のヌクレオチド配列を含むコドン最適化導入遺伝子を含む、請求項24~26のいずれか一項に記載のキット。

【請求項28】

前記第1のウイルス、前記Maraba MG1ウイルス、又は両方により発現される 50

前記タンパク質変異体が、配列番号7の少なくとも1つの腫瘍関連エピトープを含み、配列番号7と少なくとも70%同一である、請求項24～26のいずれか一項に記載のキット。

【請求項29】

前記変異体が配列番号7と少なくとも80%同一である、請求項28に記載のキット。

【請求項30】

前記変異体が配列番号7と少なくとも90%同一である、請求項28に記載のキット。

【請求項31】

前記変異体が配列番号7と少なくとも95%同一である、請求項28に記載のキット。

【請求項32】

前記Maraba MG1ウイルス又は前記第1のウイルスいずれかの一方が、配列番号7の配列を含むタンパク質を発現でき、前記Maraba MG1ウイルス及び前記第1のウイルスの他方が、配列番号7の配列を含むタンパク質の変異体を発現できる、請求項24～26及び28～31のいずれか一項に記載のキット。

【請求項33】

前記Maraba MG1ウイルス及び前記第1のウイルスが、配列番号7の配列を含むタンパク質の異なる変異体を発現できる、請求項24～26及び28～31のいずれか一項に記載のキット。

【請求項34】

前記第1のウイルスがレンチウイルスである、請求項24～33のいずれか一項に記載のキット。

【請求項35】

配列番号7のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体をコードするゲノムを有する、単離されたMaraba MG1ウイルス粒子。

【請求項36】

前記ゲノムが配列番号8のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含む、請求項35に記載の単離されたMaraba MG1ウイルス粒子。

【請求項37】

前記ゲノムが配列番号9のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含む、請求項35に記載の単離されたMaraba MG1ウイルス粒子。

【請求項38】

配列番号10のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体を抗原タンパク質として発現し、哺乳動物において前記タンパク質又はその変異体に対する免疫が生じるよう構築された、第1のウイルス、及び

配列番号10のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体を抗原タンパク質としてコードし、哺乳動物において免疫応答を誘導するよう構築された、Maraba MG1ウイルス

を含む、哺乳動物において免疫応答を誘導する際に使用するためのキットであって、

前記第1のウイルスは前記Maraba MG1ウイルスと免疫学的に異なる、キット。

【請求項39】

前記第1のウイルスにより発現される前記抗原タンパク質、及び前記Maraba MG1ウイルスにより発現される前記抗原タンパク質が、同一である、請求項38に記載のキット。

【請求項40】

前記第1のウイルス、前記Maraba MG1ウイルス、又は両方が、投与のため単離されたウイルスとして構築される、請求項38又は39に記載のキット。

【請求項41】

前記Maraba MG1ウイルスが、配列番号11のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含むコドン最適化導入遺伝子を含む、

10

20

30

40

50

前記第1のウイルスが、マイナスセンスRNAウイルスであり、配列番号11のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含むコドン最適化導入遺伝子を含む、

前記第1のウイルスが、DNAウイルス又はプラスセンスRNAウイルスであり、配列番号11のヌクレオチド配列を含むコドン最適化導入遺伝子を含む、或いは

前記Maraba MG1ウイルスが、配列番号11のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含むコドン最適化導入遺伝子を含み、且つ

a) 前記第1のウイルスが、マイナスセンスRNAウイルスであり、配列番号11のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含むコドン最適化導入遺伝子を含む、又は

b) 前記第1のウイルスが、DNAウイルス若しくはプラスセンスRNAウイルスであり、配列番号11のヌクレオチド配列を含むコドン最適化導入遺伝子を含む、請求項38～40のいずれか一項に記載のキット。

【請求項42】

前記第1のウイルス、前記Maraba MG1ウイルス、又は両方により発現される前記タンパク質変異体が、配列番号10の少なくとも1つの腫瘍関連エピトープを含み、配列番号10と少なくとも70%同一である、請求項38～40のいずれか一項に記載のキット。

【請求項43】

前記変異体が配列番号10と少なくとも80%同一である、請求項42に記載のキット。

【請求項44】

前記変異体が配列番号10と少なくとも90%同一である、請求項42に記載のキット。

【請求項45】

前記変異体が配列番号10と少なくとも95%同一である、請求項42に記載のキット。

【請求項46】

前記Maraba MG1ウイルス又は前記第1のウイルスいずれかの一方が、配列番号10の配列を含むタンパク質を発現でき、前記Maraba MG1ウイルス及び前記第1のウイルスの他方が、配列番号10の配列を含むタンパク質の変異体を発現できる、請求項38～40及び42～45のいずれか一項に記載のキット。

【請求項47】

前記Maraba MG1ウイルス及び前記第1のウイルスが、配列番号10の配列を含むタンパク質の異なる変異体を発現できる、請求項38～40及び42～45のいずれか一項に記載のキット。

【請求項48】

前記第1のウイルスがレンチウイルスである、請求項38～47のいずれか一項に記載のキット。

【請求項49】

配列番号10のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体をコードするゲノムを有する、単離されたMaraba MG1ウイルス粒子。

【請求項50】

前記ゲノムが配列番号11のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含む、請求項49に記載の単離されたMaraba MG1ウイルス粒子。

【請求項51】

前記ゲノムが配列番号12のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含む、請求項49に記載の単離されたMaraba MG1ウイルス粒子。

【請求項52】

配列番号13のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体を抗原タンパク質として発現し、哺乳動物において前記タンパク質又はその変異体に対する免疫が生じるよう構築

10

20

30

40

50

された、第1のウイルス、及び

配列番号13のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体を抗原タンパク質としてコードし、哺乳動物において免疫応答を誘導するよう構築された、Maraba MG1ウイルス

を含む、哺乳動物において免疫応答を誘導する際に使用するためのキットであって、

前記第1のウイルスは前記Maraba MG1ウイルスと免疫学的に異なる、キット。

【請求項53】

前記第1のウイルスにより発現される前記抗原タンパク質、及び前記Maraba MG1ウイルスにより発現される前記抗原タンパク質が、同一である、請求項52に記載のキット。

【請求項54】

前記第1のウイルス、前記Maraba MG1ウイルス、又は両方が、投与のため単離されたウイルスとして構築される、請求項52又は53に記載のキット。

【請求項55】

前記Maraba MG1ウイルスが、配列番号14のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含むコドン最適化導入遺伝子を含む、

前記第1のウイルスが、マイナスセンスRNAウイルスであり、配列番号14のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含むコドン最適化導入遺伝子を含む、

前記第1のウイルスが、DNAウイルス又はプラスセンスRNAウイルスであり、配列番号14のヌクレオチド配列を含むコドン最適化導入遺伝子を含む、或いは

前記Maraba MG1ウイルスが、配列番号14のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含むコドン最適化導入遺伝子を含み、且つ

a) 前記第1のウイルスが、マイナスセンスRNAウイルスであり、配列番号14のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含むコドン最適化導入遺伝子を含む、又は

b) 前記第1のウイルスが、DNAウイルス若しくはプラスセンスRNAウイルスであり、配列番号14のヌクレオチド配列を含むコドン最適化導入遺伝子を含む、請求項52～54のいずれか一項に記載のキット。

【請求項56】

前記第1のウイルス、前記Maraba MG1ウイルス、又は両方により発現される前記タンパク質変異体が、配列番号13の少なくとも1つの腫瘍関連エピトープを含み、配列番号13と少なくとも70%同一である、請求項52～54のいずれか一項に記載のキット。

【請求項57】

前記変異体が配列番号13と少なくとも80%同一である、請求項56に記載のキット。

【請求項58】

前記変異体が配列番号13と少なくとも90%同一である、請求項56に記載のキット。

【請求項59】

前記変異体が配列番号13と少なくとも95%同一である、請求項56に記載のキット。

【請求項60】

前記Maraba MG1ウイルス又は前記第1のウイルスいずれかの一方が、配列番号13の配列を含むタンパク質を発現でき、前記Maraba MG1ウイルス及び前記第1のウイルスの他方が、配列番号13の配列を含むタンパク質の変異体を発現できる、請求項52～54及び56～59のいずれか一項に記載のキット。

【請求項61】

前記Maraba MG1ウイルス及び前記第1のウイルスが、配列番号13の配列を

10

20

30

40

50

含むタンパク質の異なる変異体を発現できる、請求項 52～54 及び 56～59 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 62】

前記第 1 のウイルスがレンチウイルスである、請求項 52～61 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 63】

配列番号 13 のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体をコードするゲノムを有する、単離された Maraba MG1 ウイルス粒子。

【請求項 64】

前記ゲノムが配列番号 14 のヌクレオチド配列の逆相補的 RNA バージョンを含む、請求項 63 に記載の単離された Maraba MG1 ウイルス粒子。

【請求項 65】

前記ゲノムが配列番号 15 のヌクレオチド配列の逆相補的 RNA バージョンを含む、請求項 63 に記載の単離された Maraba MG1 ウイルス粒子。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

[0001] 本出願は、2013 年 2 月 21 日付けで出願された米国特許仮出願第 61/767,776 号の優先権を主張し、仮出願は、本明細書により、参照により組み込まれる。

【分野】

【0002】

[0002] 本開示は、免疫応答を誘導するための腫瘍退縮ウイルスに関する。

【背景】

【0003】

[0003] 腫瘍退縮ウイルス (OV) は、影響を受けていない正常な組織をそのままにしつつ、悪性細胞に特異的に感染し、悪性細胞の中で複製し、悪性細胞を殺傷する。幾つかの OV は、種々の新生物の処置について、進んだ段階の臨床評価に達した (Russell SJ. ら、(2012) Nat Biotechnol 30: 658-670)。かつて承認されたかかるウイルス剤は、標準的な癌治療の代わりになるか、又は組み合わせることができ、低減された毒性及び改善された治療効果を可能にする。

【0004】

[0004] 水疱性口内炎ウイルス (VSV) (Stojdl DF. ら、(2000) Nat Med 6: 821-825; Stojdl DF. ら、(2003) Cancer Cell 4: 263-275) に加え、腫瘍退縮活性を発揮する他のラブドウイルスが最近記載されている (Brun J. ら、(2010) Mol Ther 18: 1440-1449; Mahoney DJ. ら、(2011) Cancer Cell 20: 443-456)。これらのウイルスのうち、非 VSV Maraba ウイルスは、インビトロで広範な腫瘍指向性を示した (国際公開第 2009/016433 号)。改善された腫瘍選択性及び正常細胞における低減された病原性を有する変異体 Maraba ウイルスが操作された。弱毒株は、G タンパク質変異 (Q242R) 及び M タンパク質変異 (L123W) の両方を含有する二重変異体株である。MG1 又は Maraba MG1 と呼ばれるこの弱毒株は、インビトロで、弱毒 VSV、VSV AM51 より優れた治療効果と共に、マウスの異種移植モデル及び同系腫瘍モデルにおいて強力な抗腫瘍活性を示した (国際公開第 2011/070440 号)。

【0005】

[0005] 過去数年に亘り蓄積されたデータは、腫瘍退縮ウイルスの抗腫瘍効果はその直接的な腫瘍退縮に依存するばかりでなく、抗腫瘍免疫を刺激するその能力に依存し得ることを明らかにした (Bridle BW. ら、(2010) Mol Ther 18: 4269-4275)。この免疫により仲介される腫瘍制御は、OV 治療の全体的な効果において重大な役割を果たすように思われる。実際に、腫瘍特異的適応免疫細胞は、組織を

10

20

30

40

50

巡回でき、OVから免れた腫瘍細胞を破壊することができる。さらに、その記憶コンパートメントは腫瘍の再発を防ぐことができる。

【0006】

[0006] OVにより誘導される抗腫瘍免疫を改善する種々の戦略が開発されている (P01 J. ら、(2012) Virus Adaptation and Treatment 4 : 1 - 21)。幾つかのグループは、免疫賦活性サイトカインを発現するOVを遺伝的に操作した。顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) を発現する単純ヘルペス及びワクシニアウイルスは、癌治療について、フェーズIIII及びIIBの臨床評価にそれぞれ達し、一方IFN- α を発現するVSVはフェーズIに丁度入った。

10

【0007】

[0007] 腫瘍退縮ワクチンとして定義される別の戦略は、腫瘍抗原をOVから発現させることからなる (Russell SJ. ら、(2012) Nat Biotechnol 30 : 658 - 670)。以前に、VSVが癌ワクチンベクターとしても用いられ得ることが示されている (Bridle BW. ら、(2010) Mol Ther 18 4 : 4269 - 4275)。マウスマラノーマモデルを処置するために異種プライム - ブースト設定で適用されるとき、VSVヒトドパクロムトートメラーゼ (hDCT) 腫瘍退縮ワクチンは、DCTに対する増大した腫瘍特異的免疫ばかりでなく、抗ウイルス適応免疫の随伴性低減を誘導した。結果として、治療効果は、生存期間中央値及び長期生存の両方の増大を伴い、劇的に改善された (国際公開第2010/105347号)。VSVは、hDCTの腫瘍関連抗原としての有効な使用であることが示されたが、どの腫瘍関連抗原が異種プライム - ブースト設定において有効であるかを予測する方法はない。

20

【0008】

[0008] 正常組織に対する低減した毒性と共に、腫瘍細胞を殺傷する患者の免疫系を、例えば、抗体及び/又はリンパ球を腫瘍の腫瘍関連抗原に対して活性化させることにより、活性化させるために用いられ得るワクチンベクターを提供することが所望される。かかるワクチンベクターは、腫瘍退縮活性、及び適応細胞免疫をブースト (boost) する能力の両方を発揮するかが所望される。

【概要】

【0009】

[0009] 以下の概要は、読者に本明細書に記載される1つ又は複数の発明を紹介することを意図し、発明の任意の1つを定義することを意図しない。

30

【0010】

[0010] 従来の抗癌ワクチンの少なくとも1つの欠点を取り除くか、又は軽減することが、本開示の目的である。

【0011】

[0011] 本開示の著者らは、MAGEA3、ヒトパピローマウイルスE6/E7融合タンパク質、前立腺タンパク質のヒト6回膜貫通型上皮抗原、及び癌精巣抗原1を、異種プライム - ブースト設定において用いて、哺乳動物において免疫応答を誘導することができることを、驚くべきことに見つけ出した。全ての腫瘍関連抗原が、異種プライム - ブーストを介して免疫応答を誘導することができるとは限らないので、これらの結果は予想外であり、予測可能ではない。例えば、本開示の著者らは、胎盤特異的タンパク質1 (PLAC-1) 及びエプスタイン - バー核抗原1が、異種プライム - ブーストを介して免疫応答を刺激することができないことも見つけ出した。

40

【0012】

[0012] 第1の態様において、哺乳動物において免疫応答を誘導する際に使用するためのキットが提供される。キットは、配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体を抗原タンパク質として発現し、哺乳動物において上記タンパク質又はその変異体に対する免疫が生じるよう構築された (formulated)、第1のウイルスを含む。キットは、配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体を抗原タンパク質としてコードし、哺乳動物において免疫応答を誘導するよう構築された、Maraba

50

MG1ウイルスも含み、第1のウイルスはMaraba MG1ウイルスと免疫学的に異なる。第1のウイルスにより発現される抗原タンパク質、及びMaraba MG1ウイルスにより発現される抗原タンパク質は、同一であってもよい。

【0013】

[0013]第1のウイルス、Maraba MG1ウイルス、又は両方は、投与のため単離されたウイルスとして構築されてもよい。

【0014】

[0014]Maraba MG1ウイルスは、配列番号2のヌクレオチド配列を含む導入遺伝子の逆相補的RNAバージョンを含んでもよい。Maraba MG1ウイルスは、配列番号3のヌクレオチド配列を含むコドン最適化導入遺伝子の逆相補的RNAバージョンを含んでもよい。

10

【0015】

[0015]第1のウイルスが、プラスセンスRNAウイルス、DNAウイルス、又はマイナスセンスRNAウイルスであるかどうかに依存して、第1のウイルスは、配列番号2又は3のヌクレオチド配列を含む導入遺伝子を含んでもよいか、又は配列番号2又は3のヌクレオチド配列を含む導入遺伝子の逆相補的RNAバージョンを含んでもよい。

【0016】

[0016]2つのウイルスは、配列番号1の配列を含むタンパク質の異なる変異体を発現する能力があってもよい。第1のウイルス、Maraba MG1ウイルス、又は両方により発現される配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質の変異体は、FLWGPRALV、KVAELVHFL、EGDCAPEEK、KKLLTQHFVQENYLEY、RKVAELVHFLLLKYR、及びKKLLTQHFVQENYLEYからなる群より選択される少なくとも1つの腫瘍関連エピトープを含んでもよく、配列番号1と少なくとも70%同一であってもよい。変異体は、配列番号1と少なくとも80%同一であることが好ましい。変異体は、配列番号1と少なくとも90%同一であることがより好ましい。変異体は、配列番号1と少なくとも95%同一であることがなにより好ましい。

20

【0017】

[0017]第1のウイルス、Maraba MG1ウイルス、又は両方により発現される配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質の変異体は、配列番号4のアミノ酸配列を有してもよい。変異体をコードするヌクレオチド配列は、配列番号5のヌクレオチド配列を含んでもよい。

30

【0018】

[0018]Maraba MG1ウイルスは、配列番号5のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含んでもよい。第1のウイルスが、プラスセンスRNAウイルス、DNAウイルス、又はマイナスセンスRNAウイルスであるかどうかに依存して、第1のウイルスは、配列番号5のヌクレオチド配列を含む導入遺伝子を含んでもよいか、又は配列番号5のヌクレオチド配列を含む導入遺伝子の逆相補的RNAバージョンを含んでもよい。

【0019】

[0019]第1のウイルスがマイナスセンスRNAウイルスである場合、Maraba MG1ウイルス又は第1のウイルスいずれかの一方は、配列番号2又は3のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含んでもよく、Maraba MG1ウイルス及び第1のウイルスの他方は、配列番号5の逆相補的RNAバージョンを含んでもよい。

40

【0020】

[0020]第1のウイルスがプラスセンスRNAウイルス又はDNAウイルスである場合、Maraba MG1ウイルスは配列番号2又は3のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含んでもよく、第1のウイルスは配列番号5のヌクレオチド配列を含んでもよい。あるいは、Maraba MG1ウイルスは配列番号5のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含んでもよく、第1のウイルスは配列番号2又は3のヌクレオチド配列を含んでもよい。

【0021】

50

[0021] Maraba MG1ウイルス又は第1のウイルスいずれかの一方は、配列番号1又は4の配列を含むタンパク質を発現する能力があつてもよい、Maraba MG1ウイルス及び第1のウイルスの他方は、他の配列を含むタンパク質を発現する能力があつてもよい。

【0022】

[0022]第1のウイルスはアデノウイルスであつてもよい。

【0023】

[0023]別の態様によると、配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体をコードするゲノムを有する、単離されたMaraba MG1ウイルス粒子が提供される。

10

【0024】

[0024]配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質の変異体は、配列番号4のアミノ酸配列を有してもよい。

【0025】

[0025]ゲノムは配列番号2又は3のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含んでもよい。

【0026】

[0026]ゲノムは配列番号5のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含んでもよい。

【0027】

[0027]ゲノムは配列番号6のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含んでもよい。

20

【0028】

[0028]別の態様において、哺乳動物において免疫応答を誘導する際に使用するためのキットが提供される。キットは、配列番号7のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体を抗原タンパク質として発現し、哺乳動物において上記タンパク質又はその変異体に対する免疫が生じるよう構築された、第1のウイルスを含む。キットは、配列番号7のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体を抗原タンパク質としてコードし、哺乳動物において免疫応答を誘導するよう構築された、Maraba MG1ウイルスも含み、第1のウイルスはMaraba MG1ウイルスと免疫学的に異なる。第1のウイルスにより発現される抗原タンパク質、及びMaraba MG1ウイルスにより発現される抗原タンパク質は、同一であつてもよい。

30

【0029】

[0029]第1のウイルス、Maraba MG1ウイルス、又は両方は、投与のため単離されたウイルスとして構築されてもよい。

【0030】

[0030]第1のウイルスがマイナスセンスRNAウイルスである場合、Maraba MG1ウイルス、第1のウイルス、又は両方は、配列番号8のヌクレオチド配列を含むコドン最適化導入遺伝子の逆相補的RNAバージョンを含んでもよい。第1のウイルスがDNAウイルス又はプラスセンスRNAウイルスである場合、第1のウイルスは、配列番号8のヌクレオチド配列を含むコドン最適化導入遺伝子を含んでもよい。

40

【0031】

[0031]第1のウイルス、Maraba MG1ウイルス、又は両方により発現される配列番号7のアミノ酸配列を含むタンパク質の変異体は、少なくとも1つの腫瘍関連エピトープを含んでもよく、配列番号7と少なくとも70%同一であつてもよい。変異体は、配列番号7と少なくとも80%同一であることが好ましい。変異体は、配列番号7と少なくとも90%同一であることがより好ましい。変異体は、配列番号7と少なくとも95%同一であることがなおより好ましい。

【0032】

[0032]Maraba MG1ウイルス又は第1のウイルスいずれかの一方は、配列番号

50

7の配列を含むタンパク質を発現する能力があつてもよく、Maraba MG1ウイルス及び第1のウイルスの他方は、配列番号7の配列を含むタンパク質の変異体を発現する能力があつてもよい。2つのウイルスは、配列番号7の配列を含むタンパク質の異なる変異体を発現する能力があつてもよい。

【0033】

[0033]第1のウイルスはレンチウイルスであつてもよい。

【0034】

[0034]別の態様によると、配列番号7のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体をコードするゲノムを有する、単離されたMaraba MG1ウイルス粒子が提供される。

10

【0035】

[0035]ゲノムは配列番号8のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含んでもよい。

【0036】

[0036]ゲノムは、配列番号9の逆相補的RNAバージョンであるヌクレオチド配列を含んでもよい。

【0037】

[0037]別の態様において、哺乳動物において免疫応答を誘導する際に使用するためのキットが提供される。キットは、配列番号10のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体を抗原タンパク質として発現し、哺乳動物において上記タンパク質又はその変異体に対する免疫が生じるよう構築された、第1のウイルスを含む。キットは、配列番号10のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体を抗原タンパク質としてコードし、哺乳動物において免疫応答を誘導するよう構築された、Maraba MG1ウイルスも含み、第1のウイルスはMaraba MG1ウイルスと免疫学的に異なる。第1のウイルスにより発現される抗原タンパク質、及びMaraba MG1ウイルスにより発現される抗原タンパク質は、同一であつてもよい。

20

【0038】

[0038]第1のウイルス、Maraba MG1ウイルス、又は両方は、投与のため単離されたウイルスとして構築されてもよい。

【0039】

[0039]第1のウイルスがマイナスセンスRNAウイルスである場合、Maraba MG1ウイルス、第1のウイルス、又は両方は、配列番号11のヌクレオチド配列を含むコドン最適化導入遺伝子の逆相補的RNAバージョンを含んでもよい。第1のウイルスがDNAウイルス又はプラスセンスRNAウイルスである場合、第1のウイルスは、配列番号11のヌクレオチド配列を含むコドン最適化導入遺伝子を含んでもよい。

30

【0040】

[0040]第1のウイルス、Maraba MG1ウイルス、又は両方により発現される配列番号10のアミノ酸配列を含むタンパク質の変異体は、少なくとも1つの腫瘍関連エピトープを含んでもよく、配列番号10と少なくとも70%同一であつてもよい。変異体は、配列番号10と少なくとも80%同一であることが好ましい。変異体は、配列番号10と少なくとも90%同一であることがより好ましい。変異体は、配列番号10と少なくとも95%同一であることがなにより好ましい。

40

【0041】

[0041]Maraba MG1ウイルス又は第1のウイルスいずれかの一方は、配列番号10の配列を含むタンパク質を発現する能力があつてもよく、Maraba MG1ウイルス及び第1のウイルスの他方は、配列番号10の配列を含むタンパク質の変異体を発現する能力があつてもよい。2つのウイルスは、配列番号10の配列を含むタンパク質の異なる変異体を発現する能力があつてもよい。

【0042】

[0042]第1のウイルスはレンチウイルスであつてもよい。

50

【0043】

[0043]別の態様によると、配列番号10のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体をコードするゲノムを有する、単離されたMaraba MG1ウイルス粒子が提供される。

【0044】

[0044]ゲノムは配列番号11のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含んでもよい。

【0045】

[0045]ゲノムは、配列番号12の逆相補的RNAバージョンであるヌクレオチド配列を含んでもよい。

10

【0046】

[0046]別の態様において、哺乳動物において免疫応答を誘導する際に使用するためのキットが提供される。キットは、配列番号13のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体を抗原タンパク質として発現し、哺乳動物において上記タンパク質又はその変異体に対する免疫が生じるよう構築された、第1のウイルスを含む。キットは、配列番号13のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体を抗原タンパク質としてコードし、哺乳動物において免疫応答を誘導するよう構築された、Maraba MG1ウイルスも含み、第1のウイルスはMaraba MG1ウイルスと免疫学的に異なる。第1のウイルスにより発現される抗原タンパク質、及びMaraba MG1ウイルスにより発現される抗原タンパク質は、同一であってもよい。

20

【0047】

[0047]第1のウイルス、Maraba MG1ウイルス、又は両方は、投与のため単離されたウイルスとして構築されてもよい。

【0048】

[0048]第1のウイルスがマイナスセンスRNAウイルスである場合、Maraba MG1ウイルス、第1のウイルス、又は両方は、配列番号14のヌクレオチド配列を含むコドン最適化導入遺伝子の逆相補的RNAバージョンを含んでもよい。第1のウイルスがDNAウイルス又はプラスセンスRNAウイルスである場合、第1のウイルスは、配列番号14のヌクレオチド配列を含むコドン最適化導入遺伝子を含んでもよい。

30

【0049】

[0049]第1のウイルス、Maraba MG1ウイルス、又は両方により発現される配列番号13のアミノ酸配列を含むタンパク質の変異体は、少なくとも1つの腫瘍関連エピトープを含んでもよく、配列番号13と少なくとも70%同一であってもよい。変異体は、配列番号13と少なくとも80%同一であることが好ましい。変異体は、配列番号13と少なくとも90%同一であることがより好ましい。変異体は、配列番号13と少なくとも95%同一であることがなにより好ましい。

【0050】

[0050]Maraba MG1ウイルス又は第1のウイルスいずれかの一方は、配列番号13の配列を含むタンパク質を発現する能力があってもよく、Maraba MG1ウイルス及び第1のウイルスの他方は、配列番号13の配列を含むタンパク質の変異体を発現する能力があってもよい。2つのウイルスは、配列番号13の配列を含むタンパク質の異なる変異体を発現する能力を有してもよい。

40

【0051】

[0051]第1のウイルスはレンチウイルスであってもよい。

【0052】

[0052]別の態様によると、配列番号13のアミノ酸配列を含むタンパク質又はその変異体をコードするゲノムを有する、単離されたMaraba MG1ウイルス粒子が提供される。

【0053】

[0053]ゲノムは配列番号14のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含んで

50

もよい。

【0054】

[0054]ゲノムは、配列番号15の逆相補的RNAバージョンであるヌクレオチド配列を含んでもよい。

【0055】

[0055]本開示の他の態様及び特徴は、添付の図面と併せて、以下の記載の特定の実施形態のレビューにて当業者に明らかとなるだろう。

【0056】

[0056]本開示の実施形態は、ここで、ただ例示の目的で、添付の図面に関連して記載される。

10

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1】図1A：MG1-hDCTを投与された、腫瘍を有するマウスでのCD8⁺又はCD4⁺T細胞応答を示す図である。図1B：転移性肺癌マウスモデルでの初回免疫ベクター(priming vector)として投与されたMG1-hDCTの治療効果を示す図である。

【図2】初回免疫ベクターとしてAd-hDCT、及び追加免疫ベクター(boosting vector)としてMaraba MG1-hDCT又はVSV-hDCTのいずれかでの、C57/B16マウスにおけるプライム-ブーストワクチン接種の免疫応答の比較を示す図である。

20

【図3】初回免疫ベクターとしてAd-エンプティー又はAd-hDCTのみの後、又は初回免疫ベクターとしてAd-hDCT、及び追加免疫ベクターとしてMaraba MG1 GFP又はMaraba MG1-hDCTのいずれかでのプライム-ブーストワクチン接種後の転移性肺癌マウスモデルにおけるT細胞応答を示す図である。

【図4】初回免疫ベクターとしてのAd-エンプティー又はAd-hDCTのみの後、又は初回免疫ベクターとしてのAd-hDCT、及び追加免疫ベクターとしてのMaraba MG1 GFP又はMaraba MG1-hDCTのいずれかでのプライム-ブーストワクチン接種後の転移性肺癌マウスモデルにおける生存プロットを示す図である。

【図5】初回免疫ベクターとしてのAd-エンプティー又はAd-hDCTのみの後、又は初回免疫ベクターとしてのAd-hDCT、及び追加免疫ベクターとしてのMaraba MG1-hDCTでのプライム-ブーストワクチン接種後の転移性脳癌マウスモデルにおける生存プロットを示す図である。

30

【図6】靈長類毒性/免疫原性研究において利用される初回免疫ベクターAd-MAGE A3、追加免疫ベクターMaraba MG1-MAGE A3、及びプライム-ブースト戦略の図である。

【図7】初回免疫ベクターとしてAd-MAGE A3、及び追加免疫ベクターとして高用量又は低用量のMG1-MAGE A3を付与された靈長類における平均T細胞応答を示す図である。T細胞応答は、追加免疫ベクターの5、13、及び84日後に測定された。

【図8】追加免疫ベクターの5日後、初回免疫ベクターとしてAd-MAGE A3、及び追加免疫ベクターとしてMG1-MAGE A3を付与された個々の靈長類におけるT細胞応答を示す図である。T細胞応答は、応答を刺激するために用いられるMAGE A3ペプチドプールについて分類された。

40

【図9】初回免疫ベクターとしてAd-hDCT対Ad-hDCT+シクロホスファミドのみの後、又は初回免疫ベクターとしてAd-hDCT対Ad-hDCT+シクロホスファミド、及び追加免疫ベクターとしてVSV-hDCTでプライム-ブーストワクチン接種後、転移性肺癌マウスモデルにおける生存プロットを示す図である。

【詳細な説明】

【0058】

[0067]本開示は、哺乳動物において免疫応答を誘導する際に使用するためのキットを提供する。キットは、MAGE A3、ヒトパピローマウイルスE6/E7融合タンパク質、

50

前立腺タンパク質のヒト 6 回膜貫通型上皮抗原若しくは癌精巣抗原 1、又はその変異体を抗原として発現し、哺乳動物において上記抗原に対する免疫が生じるよう構築された、第 1 のウイルスを含む。キットは、同一の抗原、又は同一の抗原の変異体をコードし、哺乳動物において免疫応答を誘導するよう構築された、Maraba MG 1 ウイルスも含む。第 1 のウイルスは、異種プライム - ブーストワクチン接種において「初回免疫」として作用し得るように、Maraba MG 1 ウイルスと免疫学的に異なる。

【0059】

[0068] プライム - ブースト免疫 (prime - boost immunization) は、「異種」プライム - ブーストフォーマットにおいて、同一の抗原を用いる一方、不一致のワクチンデリバリー法で、又は「相同性」プライム - ブーストにおいて、一致のワクチンデリバリー法で付与され得る。ベクター化ワクチンプラットフォームを同種ワクチン接種として用いることにより、第 2 の応答においてベクターと導入遺伝子の両方に対する応答の追加免疫が導かれるとき、異種プライム - ブースト法が好ましい。対照的に、第 1 及び第 2 のベクターに対する応答は、一次応答であり、それ故、それほど強くないので、異種システムは、第 2 の応答（すなわち、追加免疫された応答）を抗原に集中させる。

10

【0060】

[0069] 本開示において、第 1 のウイルス及び Maraba MG 1 ウイルスが、異種プライム - ブーストフォーマットにおいて用いられる。

【0061】

[0070] 上で挙げた抗原タンパク質は、胸腺でのしっかりと制御されたプロセスのマイナスセレクションを介した免疫系により (Kruisbeek AM 及び Amseň D, (1996) *Curr Opin Immunol* 8: 233 - 244; Stockinger B (1999) *Adv Immunol* 71: 229 - 265)、又は末梢寛容化により、既に寛容化された自己抗原である。これらの抗原タンパク質、及び任意の他の自己抗原に対するワクチンを開発する主要な挑戦は、癌細胞に対して選択的に向けられた、強力な免疫応答を誘導することである。多数の腫瘍関連抗原ペプチドが発見されているが、本開示の著者らは、どの腫瘍関連抗原ペプチドが、ワクチンを開発するために首尾よく用いられ得るかを予測することが不可能であることを見つけ出した。

20

【0062】

[0071] メラノーマ抗原、ファミリー A, 3 (MAGEA3) は、「癌精巣抗原」である。MAGE ファミリーの、腫瘍特異的抗原をコードする遺伝子は、De Plaenら、Immunogenetics 40: 360 - 369 (1994) で考察され、MAGEA3 は、メラノーマ、結腸直腸、及び肺を含む、広範の腫瘍で発現される。このタンパク質は、本開示の著者らにより、第 1 のウイルスと Maraba MG 1 ウイルスの両方で抗原タンパク質として用いられた。著者らは、MAGEA3 タンパク質の変異体も、第 1 のウイルスと Maraba MG 1 ウイルスの両方で抗原タンパク質として用いた。

30

【0063】

[0072] ヒトパピローマウイルス (HPV) 腫瘍性タンパク質 E6 / E7 は、頸癌で構造的に発現される (Zur Hausen, H (1996) *Biochem Biophys Acta* 1288: F55 - F78)。さらに、HPV タイプ 16 及び 18 は、頸癌の原因の 75 % のである (Walboomers JM (1999) *J Pathol* 189: 12 - 19)。本開示の著者らは、HPV タイプ 16 及び 18 の E6 / E7 腫瘍性タンパク質の融合タンパク質を抗原タンパク質として用いた。融合タンパク質は、HPV タイプ 16 / 18 E6 / E7 を融合タンパク質として共発現するヌクレオチド配列を用いて発現され、そして融合タンパク質を、発癌能を取り除くために変異させた。融合タンパク質は、本開示の著者らにより、第 1 のウイルスと Maraba MG 1 ウイルスの両方で抗原タンパク質として用いられた。

40

【0064】

[0073] 前立腺の 6 回膜貫通型上皮抗原 (hGSTEP) は、最近同定されたタンパク質であり、前立腺癌で過剰発現されること、並びに膵臓、結腸、乳房、精巣、頸部、膀胱

50

、卵巣、急性リンパ性白血病及びユーイング肉腫を含む複数の癌細胞株でアップレギュレーションされることが示されている (Hubert RSら、(1999) Proc Natl Acad Sci 96: 14523-14528)。STEAP遺伝子は、親水性のアミノ末端ドメイン及びカルボキシル末端ドメインにより隣接された、6つの潜在的な膜貫通領域を有するタンパク質をコードする。このタンパク質は、本開示の著者により、第1のウイルスと Maraba MG1ウイルスの両方で抗原タンパク質として用いられた。

【0065】

[0074]癌精巣抗原1 (NYESO1) は、精巣及び卵巣等の正常成人組織で、及び種々の癌で発現される癌 / 精巣抗原である (Nicholaou Tら、(2006) Immuno Cell Biol 84: 303-317)。癌精巣抗原は、固有ファミリーの抗原であり、正常な成人において精巣生殖細胞に制限された発現を有するが、軟部組織肉腫、メラノーマ及び上皮癌を含む、種々の固形腫瘍で異常に発現される。このタンパク質は、本開示の著者により、第1のウイルスと Maraba MG1ウイルスの両方で抗原タンパク質として用いられた。

10

【0066】

[0075]異種プライム - ブーストワクチンにおける抗原タンパク質としてのMAGEA3、HPV E6 / E7融合、huSTEAP、及びNYESO1タンパク質の良好な使用と対照的に、本開示の著者らは、エピスタイン - バー核抗原1 (EBDNA1、配列番号16、配列番号17によりコードされる) が、同様の免疫応答を生じることができないことを見つけ出した。EBDNA1は、エピスタイン - バーウィルス (EBV) と関連し (Sibille Hら、(2003) Proc Natl Acad Sci 100: 10989-10994)、EBV関連腫瘍で一貫して発現される (Young LSら、(2004) Nature Reviews - Cancer 4: 757-768)、多機能のウイルスタンパク質である。EBDNA1は、タンパク質をアミノ末端ドメイン及びカルボキシ末端ドメインに分離させる、グリシン - アラニン繰り返し配列を有する (Young LS (2004) Nature Reviews - Cancer 4: 757-768)。この配列は、プロテアソーム破壊を防ぎ、並びに抗原プロセシング及びMHCクラスI拘束性抗原提示を損ない、タンパク質を安定化させるようにも思われる。これにより、このタンパク質は、ウイルス感染細胞に対するCD8拘束性細胞傷害性T細胞応答を阻害する (Levitetskaya Jら、(1995) Nature 375: 685-688)。

20

【0067】

[0076]胎盤特異的タンパク質1 (PLAC-1) は、異種プライム - ブーストワクチンにおいて免疫応答を生じることができない、腫瘍関連抗原タンパク質の別の例である。

30

【0068】

[0077]本開示の内容において、腫瘍関連抗原タンパク質の「変異体」は、(a)腫瘍関連抗原タンパク質由来の少なくとも1つの腫瘍関連抗原エピトープを含み、(b)腫瘍関連抗原タンパク質と少なくとも70%同一である、タンパク質を指す。変異体は、腫瘍関連抗原タンパク質と少なくとも80%同一であることが好ましい。変異体は、腫瘍関連抗原タンパク質と少なくとも90%同一であることがより好ましい。変異体は、腫瘍関連抗原タンパク質と少なくとも95%同一であることがなにより好ましい。より高い配列同一性を有する変異体は、エピトープが同様の3次元的様式で野生型抗原タンパク質に提示される、増大した可能性を有する。

40

【0069】

[0078]一般的に、腫瘍関連抗原エピトープは、抗原タンパク質全体を重複する一連のペプチドにバラバラにするか、又は無作為のペプチドのライブラリーを作製し、ペプチドプールを用いて、タンパク質標的でワクチン接種した動物由来のPBM C又は脾細胞を刺激することによるT細胞応答を探すことにより、同定され得る。応答を有するプールは、そのペプチドを潜在的抗原エピトープとして同定する。このアプローチは、Morriss,

50

GEにより、Encyclopedia of Life Sciences、2007、1~3ページ(doi:10.1002/9780470015902.a0002624.pub2)で考察される。

【0070】

[0079]十分に受け入れられる抗原エピトープを集約するデータベースは、Van der Bruggen P、Stroobant V、Vigneron N、Van den Eynde Bにより、「T細胞確定ヒト腫瘍抗原のデータベース：2013年アップデート」Cancer Immun 2013 13:15、及び<http://www.cancerimmunity.org/peptide/>で提供される。

【0071】

[0080]腫瘍関連抗原エピトープは、MAGEA3について既に同定されている。したがって、MAGEA3タンパク質の変異体は、例えば、EVDPIGHLY、FLWGPRALV、KVAELVHFL、TFPDLESEF、VAELVHFLL、MEVDPIGHLY、EVDPIGHLY、REPVTKAEML、AELVHFLLL、MEVDPIGHLY、WQYFFPVIF、EGDCAPEEK、KKLLTQHFVQENYLEY、ACYEFLWGPRALVETS、RKVAELVHFLLLKYL、KKLLTQHFVQENYLEY、ACYVIFSKASSQL、VIFSKASSQL、VFGIELMEVDPIGHL、GDNQIMPKAGLLIIV、TSYVKVLHHMVKISG、RKVAELVHFLLLKYL、及びFLLLKYLAREPVTKAEからなる群より選択される少なくとも1つの腫瘍関連抗原エピトープを含み、MAGEA3タンパク質と少なくとも70%同一である抗原タンパク質であってもよい。

【0072】

[0081]腫瘍関連抗原タンパク質の変異体が、高いアレル頻度、例えば、集団の40%より高い頻度を有する抗原エピトープのみを含むことが所望されてもよい。したがって、MAGEA3の変異体の好ましい例は、FLWGPRALV、KVAELVHFL、EGDCAPEEK、KKLLTQHFVQENYLEY、RKVAELVHFLLLKYL、及びKKLLTQHFVQENYLEYからなる群より選択される少なくとも1つの抗原エピトープを含み、MAGEA3タンパク質と少なくとも70%同一である、タンパク質を含んでもよい。

【0073】

[0082]第1のウイルスにより発現される抗原は、Maraba MG1ウイルスにより発現される抗原と同一の配列を正確に有する必要はない。Maraba MG1により発現される抗原は、第1のウイルスにより発現される抗原に対する重複した免疫応答をただ誘導しなければならない。例えば、第1のウイルスはMAGEA3を発現してもよく、Maraba MGウイルスはMAGEA3変異体を発現してもよく、又は逆であってよい。MAGEA3とMAGEA3の変異体の両方は、重複する免疫応答を誘導する(MAGEA3とMAGEA3の変異体の両方は、少なくとも1つの同一の腫瘍関連抗原配列を含む)ので、第1のウイルスは初回免疫として作用し、Maraba MG1ウイルスは追加免疫として作用する。MG1ウイルスが投与されるとき、哺乳動物において第1の抗原に対して生じた免疫応答は、主に、MAGEA3又はMAGEA3変異体に対する免疫応答をもたらせば十分である。

【0074】

[0083]ウイルスはそれ自体でタンパク質を発現する能力を有しないので、本開示の内容において、「ウイルスにより発現されるタンパク質」の全ての考察及び参照は、ウイルスに感染した細胞により発現されるタンパク質をより正確に指すことは理解されるべきである。同様に、「タンパク質を発現するウイルス」又は「タンパク質を発現できるウイルス」の全開示、及び参照は、タンパク質がウイルスに感染した細胞により発現されるのに必要な遺伝情報を含む、ウイルスをより正確に指す。

【0075】

10

20

30

40

50

[0084]キットは、第1のウイルスを投与することにより、哺乳動物において生じた腫瘍関連抗原タンパク質に対する初回免疫応答を増大させる、免疫増強化合物 (immune-potentiating compound)、例えば、シクロホスファミド (C P A) をさらに含んでもよい。シクロホスファミドは、腫瘍関連抗原タンパク質に対する増強された免疫応答を導き得る、化学療法剤である。相乗マウスマラノーマ腫瘍モデルにおいて、初回免疫ベクターに先立ち投与された C P A は生存を有意に増大し、一方、追加免疫ベクターに先立ち投与された C P A は増大しなかった。

【0076】

[0085]本明細書に開示される治療アプローチは、(1)ウイルスワクチン、及び(2)腫瘍退縮ウイルスワクチンとしての Maraba MG1ウイルス(両方が、M A G E A 3、ヒトパピローマウイルス E 6 / E 7 融合タンパク質、前立腺タンパク質のヒト6回膜貫通型上皮抗原若しくは癌精巣抗原1、又はその変異体を発現する)を組み合わせる。腫瘍退縮ワクチンでの追加免疫は、ウイルスワクチンにより初回免疫された動物において、腫瘍退縮ウイルスによる腫瘍減量及び腫瘍特異的 C T L (細胞傷害性Tリンパ球)の多大な増大の両方を導き得る。逆説的に、腫瘍退縮ウイルスの複製が、腫瘍のない動物と比較して、腫瘍を有する動物で増幅されるので、この方法は、腫瘍のない動物と比較して、腫瘍を生じる際により大きな抗腫瘍応答を実際に生じさせ、腫瘍のない動物での腫瘍退縮ウイルスの複製、及び抗原特異的腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) の関連数と比較したとき、抗原特異的腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) の数の増大を導く。

【0077】

[0086]これらの遺伝子の発現産物は、ペプチドへとプロセシングされ、順に、細胞表面に発現される。これは、特異的 C T L による腫瘍細胞の溶解を導き得る。外来抗原に対する T 細胞応答は、細胞溶解性 T リンパ球とヘルパー T リンパ球の両方を含む。C D 8⁺ 細胞傷害性 T 細胞又は細胞溶解性 T 細胞 (C T L) は、活性化されたとき、H L A クラス I 分子により提示された適当な抗原を提示する細胞を溶解する T 細胞である。C D 4⁺ ヘルパー T 細胞は、適当な抗原を H L A クラス I I 分子により表面に提示するマクロファージ及び抗原産生 B 細胞を刺激するため、サイトカインを分泌する T 細胞である。

【0078】

[0087]タンパク質「M A G E A 3」は、「M A G E - A 3」とも称され、メラノーマ関連抗原3を表す。本開示による抗原 M A G E A 3 タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質である。このアミノ酸配列は配列番号2のヌクレオチド配列によりコードされてもよい。あるいは、アミノ酸配列は配列番号3のヌクレオチド配列を含むコドン最適化導入遺伝子によりコードされてもよい。配列番号1のタンパク質を発現するマイナスセンス R N A ウィルスは、配列番号2又は3のポリヌクレオチドの逆相補的 R N A バージョンを含んでもよい。配列番号1のタンパク質を発現するプラスセンス R N A ウィルス又はD N A ウィルスは、配列番号2又は3である配列を含んでもよい。

【0079】

[0088]本開示による抗原 M A G E A 3 変異体タンパク質の例は、配列番号4のアミノ酸配列を含むタンパク質である。このアミノ酸配列は配列番号5のヌクレオチド配列によりコードされてもよい。配列番号4のタンパク質を発現するマイナスセンス R N A ウィルスは、配列番号5の逆相補的 R N A バージョンである配列を含む R N A ポリヌクレオチドを含んでもよい。配列番号4のタンパク質を発現する D N A ウィルス又は R N A ウィルスは、配列番号5である配列を含んでもよい。

【0080】

[0089]かかるマイナスセンス R N A ウィルスの一例は、配列番号6の逆相補的 R N A バージョンを含む Maraba ウィルスである。

【0081】

[0090]本開示による抗原タンパク質「E 6 / 7 融合タンパク質」又は「ヒトパピローマウイルス E 6 / E 7 融合タンパク質」は、配列番号7のアミノ酸配列を含むタンパク質である。このアミノ酸配列は配列番号8のヌクレオチド配列によりコードされてもよい。

10

20

30

40

50

配列番号 7 のタンパク質を発現するマイナスセンス R N A ウィルスは、配列番号 8 のポリヌクレオチドの逆相補的 R N A バージョンを含んでもよい。配列番号 7 のタンパク質を発現する D N A ウィルス又はプラスセンス R N A ウィルスは、配列番号 8 のポリヌクレオチドを含んでもよい。かかるマイナスセンス R N A ウィルスの一例は、配列番号 9 の逆相補的 R N A バージョンを含む M a r a b a ウィルスである。

【 0 0 8 2 】

[0091] 本開示によるタンパク質「 h u S T E A P 」又は「前立腺タンパク質のヒト 6 回膜貫通型上皮抗原」は、配列番号 10 のアミノ酸配列を含むタンパク質である。このアミノ酸配列は配列番号 11 のヌクレオチド配列によりコードされてもよい。配列番号 10 のタンパク質を発現するマイナスセンス R N A ウィルスは、配列番号 11 のポリヌクレオチドの逆相補的 R N A バージョンを含んでもよい。配列番号 10 のタンパク質を発現する D N A ウィルス又は R N A ウィルスは、配列番号 11 である配列を含んでもよい。かかるマイナスセンス R N A ウィルスの一例は、配列番号 12 の逆相補的 R N A バージョンを含む、 M a r a b a ウィルスである。

10

【 0 0 8 3 】

[0092] 本開示によるタンパク質「 N Y E S O 1 」又は「ヒト癌精巣抗原 1 」は、配列番号 13 のアミノ酸配列を含むタンパク質である。このアミノ酸配列は配列番号 14 のヌクレオチド配列によりコードされてもよい。配列番号 13 のタンパク質を発現するマイナスセンス R N A ウィルスは、配列番号 14 のポリヌクレオチドの逆相補的 R N A バージョンを含んでもよい。配列番号 13 のタンパク質を発現する D N A ウィルス又は R N A ウィルスは、配列番号 14 である配列を含んでもよい。かかるマイナスセンス R N A ウィルスの一例は、配列番号 15 の逆相補的 R N A バージョンを含む、 M a r a b a ウィルスである。

20

【 0 0 8 4 】

[0093] 上で示された配列は付録 A に示される。

【 0 0 8 5 】

[0094] 用語「 哺乳動物 」は、ヒト、及び非ヒト哺乳動物を指す。用語「 癌 」は、対象のウィルスで用いられる、腫瘍関連抗原タンパク質（すなわち、 M A G E A 3 、ヒトパピローマウイルス E 6 / E 7 融合タンパク質、前立腺タンパク質のヒト 6 回膜貫通型上皮抗原、又は癌精巣抗原 1 ）を発現する任意の癌を包含するよう、本明細書で用いられる。

30

【 0 0 8 6 】

[0095] 例えば、 M A G E A 3 を抗原タンパク質とみなすとき、用語「 癌 」は、 M A G E A 3 を抗原として発現する任意の癌を包含する。かかる癌の例は、メラノーマ、非小細胞肺癌、頭部癌及び頸癌、結腸直腸癌、並びに膀胱癌を含むが、これらに限定されない。

【 0 0 8 7 】

[0096] E 6 / E 7 融合タンパク質を抗原タンパク質とみなすとき、用語「 癌 」は、 E 6 及び E 7 タンパク質を抗原タンパク質として発現する任意の癌を包含する。かかる癌の例は頸癌を含むが、これに限定されない。

【 0 0 8 8 】

[0097] 第 1 のウィルス、 M a r a b a M G 1 ウィルス、又は両方は、哺乳動物に、独立して、静脈内、筋肉内、腹腔内、又は鼻腔内投与されてもよい。ウィルスの投与後、免疫応答は、哺乳動物により、免疫応答間隔内、例えば、約 4 日以内に生じ、月、年、又はもしかすると一生まで延長する。

40

【 0 0 8 9 】

[0098] 第 1 のウィルスは、第 1 のウィルスが患者に投与された後、腫瘍関連抗原タンパク質又はその変異体に対する免疫応答を誘導する任意のウィルスであり得る。本開示により用いられ得るウィルスは、例えば、アデノウイルス（ A d ）、ポックスウイルス、レトロウイルス、及びアルファウイルスを含む。ポックスウイルスの例はワクシニアウイルスである。レトロウイルスの例はレンチウイルスである。アルファウイルスの例はセムリキ森林ウイルスである。

50

【0090】

[0099]腫瘍関連抗原タンパク質又はその変異体に対する免疫応答を確立するために、第1のウイルス及びMaraba MG1ウイルスを用いたワクチン接種は、十分に確立された技術を用いて行われてもよい。当業者は、免疫応答を生じさせるのに必要なウイルスの量が、例えば、選択された抗原、抗原をデリバリーするために用いられるウイルスベクター、及び処置されるべき哺乳動物を含む多数の要素、例えば、種、年齢、大きさなどで変動することを理解するだろう。この点において、例えば、マウスへの少なくとも約10⁷PFUのアデノウイルスベクターの筋肉内投与は、免疫応答を生じさせるのに十分である。対応する量は、ヒトへの投与が免疫応答を生じさせるのに十分であろう。

【0091】

[00100]哺乳動物において第1のウイルスの投与により免疫応答が生じた後、腫瘍関連抗原タンパク質又はその変異体をコードするMaraba MG1ウイルスは、腫瘍退縮ウイルス治療に適当な量で、適当な免疫応答間隔内で投与される。適当な免疫応答間隔は、例えば、少なくとも約24時間、好ましくは、少なくとも約2~4日又はそれ以上、例えば、少なくとも約1週間、又は少なくとも約2週間であってもよい。当業者によって理解されるであろうように、腫瘍退縮ウイルス療法に適当なMaraba MG1ウイルスの量は、処置すべき哺乳動物に応じて変動する。例えば、マウスに静脈内投与された10⁸PFUのMAGEA3をコードするMaraba MG1ウイルスは、腫瘍退縮治療に十分である。対応する量は、ヒトにおける使用に十分であろう。

【0092】

[00101]腫瘍関連抗原タンパク質又はその変異体をコードするMaraba MG1ウイルスは、腫瘍関連抗原タンパク質又はその変異体をコードする導入遺伝子の逆相補鎖(reverse complement)を、Maraba MG1ウイルスに標準的組換え技術を用いて組み込むことにより、調製してもよい。例えば、導入遺伝子の逆相補鎖は、Maraba MG1ウイルスのゲノムに組み込まれてもよいか、又は別法として、導入遺伝子を組み込んでいるプラスミドを用いて、ウイルスに組み込まれてもよい。腫瘍をコードする導入遺伝子は、コドン最適化導入遺伝子であってもよい。

【実施例】

【0093】

[00102]腫瘍退縮Maraba MG1は、強力な腫瘍退縮ワクチンプラットフォームである。Maraba MG1-ワクチンは、メラノーマ関連抗原に対する検出可能な応答を刺激することが不可能である一方、既存の腫瘍特異的CD4⁺及びCD8⁺T細胞免疫をブーストする能力を発揮した。同系マウスメラノーマ腫瘍モデルの処置に適用するとき、Maraba - MG1により仲介されるリコール免疫化は、処置した動物の20%より多くで、完全寛解と共に生存期間中央値の延長をもたらした。

【0094】

[00103]靈長類の毒性研究において、Ad-MAGEA3初回免疫、続いてMaraba - MG1 - MAGEA3追加免疫での異種プライム-ブーストワクチン接種は、同系マウス腫瘍モデルにおいて得られるT細胞応答に匹敵するT細胞応答をもたらし、これは、非近交系靈長類集団において、プライム-ブースト腫瘍退縮ワクチン戦略が、腫瘍を移植することができ且つ生存の劇的な延長を得る動物モデルに匹敵する、免疫応答を付与することを示す。

【0095】

[00104]本開示の著者らは、配列番号7、10、又は13の配列を有するタンパク質を用いて、免疫応答を、患者においてMaraba MG1での異種プライムブーストを用いて、刺激することができることも見つけ出した。対照的に、本開示の著者らは、EBDNA-1タンパク質又は胎盤特異的タンパク質1(PLAC-1)を発現する第1のウイルスの投与、続いてEBDNA-1タンパク質又はPLAC-1をそれぞれ発現するMaraba - MG1の投与が、免疫応答を刺激することができることを見つけ出した。

10

20

30

40

50

【0096】

[00105]実施例1：M G 1 - h D C T は弱い初回免疫ベクターであるが、強力な追加免疫ベクターである。

[00106]A d - エンプティー及びA d - h D C T は、ヒトセロタイプ5に基づく、複製欠損アデノウイルス(E 1 / E 3 欠失)である(Lane C. ら、(2004) Cancer Research 64: 1509 - 1514; Ng P. ら、(2001) Mol Ther 3: 809 - 815)。h D C T 導入遺伝子を発現するよう、複製欠損アデノウイルスベクターを操作し、ベクターは全長ヒトメラノーマ関連抗原D C T(ドパクロムトートメラーゼ)をコードし、一方、A d - エンプティーは導入遺伝子を有しない。得られたアデノウイルスベクターを「A d - h D C T」と呼ぶ。

10

【0097】

[00107]メラノーマ関連抗原h D C T 導入遺伝子のヒト形態を発現するよう、MarabaウイルスのM G 1変異体を操作した。得られたM G 1ウイルスベクターを、「M G 1 - h D C T」又は「Maraba M G 1 - h D C T」と呼ぶ。他のウイルスベクターを、同様の慣習を用いて命名する。

【0098】

[00108]Gウイルス遺伝子とLウイルス遺伝子の間での導入遺伝子挿入により、組換えMaraba及びV S Vを作製した。V S V - h D C T は、V S Vの野生型インディアナ(Indiana)株に由来する(Bridgeman BW. ら、(2009) 17: 1814 - 1821; Lawson ND. ら、(1995) Proc Natl Acad Sci USA 92: 4477 - 4481)。M G 1 - G F P(対照非免疫原性導入遺伝子挿入として用いた緑色蛍光タンパク質)、及びM G 1 - h D C T は、Marabaウイルスの弱毒株M G 1に由来する。インビオ研究に先立ち、10% F B S、2 mM L-グルタミン、100 U / m lペニシリン、及び100 mg / m lストレプトマイシンを含有する-M E M(全て、Invitrogen、Grand Island、NYより)にて培養した感染ペロ細胞由来の可溶化液のウエスタンプロットにより、ウイルスからのD C T(及びG F P)発現を確かめた。

20

【0099】

[00109]単独療法として投与したM G 1 - h D C T の治療効果をまず評価した。肺転移を生じさせるために、C 57 B 1 / 6マウス(研究開始時に8~10週齢)に、生理食塩水200 μl中2.5 × 10⁵個のB 16 - F 10細胞(マウスD C T抗原を発現するマウスメラノーマ細胞)を静脈内注射した。5又は14日後に腫瘍退縮ワクチンを全身的に注射し、メラノーマ抗原D C Tに対するT細胞応答を、19日目の血液で測定した。ウイルスを、高用量(P B S 200 μl中10⁹ p f u、静脈内)で全身的に投与した。P B M C又は脾細胞を単離し、これらを、それぞれ、D C TのM H C - I又はM H C - I I拘束性免疫優性エピトープに対応するS V Y D F F V W L(S V Y)又はK F F H R T C K C T G N F A(K F F)ペプチドで刺激することにより、T細胞応答を測定した。I F N - についての細胞内サイトカイン染色(I C S)後、フローサイトメトリーにより、応答しているT細胞を検出した。

30

【0100】

[00110]図1A及び1Bに示す通り、M G 1 - h D C T は、腫瘍を有するマウスにおいて、D C T特異的C D 8⁺又はC D 4⁺T細胞応答を刺激することができなかった(図1A)。単独で投与したM G 1 - h D C Tワクチンは、腫瘍の結果を改善しなかった。実際に、腫瘍曝露の14日後に処置したマウスは、無処置のマウスと同様の時間フレームでエンドポイントに達した(A d - エンプティー対照群について20日後、対してA d - エンプティー+M G 1 - h D C T群について21日後)(図1B)。さらに、マウスをM G 1 - h D C Tで処置したときでさえ、生存を延長せず、腫瘍移植の5日後の早さであった(M G 1 - h D C T群、図1B)。結論として、M G 1 - h D C T は、抗D C T免疫を誘導することに失敗したばかりでなく、M G 1 - h D C Tの腫瘍退縮活性は、治療上の利点を提示しなかった。これらの結果は、M G 1 - h D C T が、腫瘍抗原D C Tに対して有意な

40

50

T細胞応答を刺激することができず、したがって、弱い初回免疫ベクターであることを示す。

【0101】

[00111]腫瘍退縮VSVベクターが、既存の免疫の強力な追加免疫として働くことは、既に報告されている(Bridle BW.ら、(2010) Mol Ther 184:4269-4275;国際公開第2010/105347号)。本開示において、Maraba MG1ウイルスの追加免疫ワクチンとして働く能力を調べた。アデノウイルスベクターを初回免疫ベクターとして用い、 2×10^8 pfu(大腿当たり、PBS 50 μl 中 1×10^8 pfu)の総用量で、筋肉内(i.m.)投与した。アデノウイルス注射のため、5%吸入イソフルレンを含有する密閉チャンバー内でマウスを麻酔した。Ad-hDCTを初回免疫ベクターとして用いて、既存のDCT特異的応答の追加免疫としてMG1-hDCTを評価した。Marabaウイルスを追加免疫ベクターとして評価するために、種々の投与経路を評価した。このマウス株において十分に許容される腫瘍退縮用量の 1×10^9 pfuのウイルスを投与し、腫瘍モデルで実行可能である最長の間隔であるので、初回免疫後12日の間隔を選択した。この用量のMG1-Maraba-hDCTを、静脈内(i.v.)、鼻腔内(i.n.)、及び筋肉内(i.m.)経路により投与したとき、静脈内経路は、末梢CD8⁺T細胞においてIFN- γ についてのICSにより測定した通り、十分に優れていることが明らかになった(静脈内による28.33% ± 3.82%に対して、鼻腔内による4.73% ± 1.52%に対して、筋肉内13.84% ± 1.88%)。Maraba投与の5日後に応答を測定し、これは、MG1-hDCTにより介される追加免疫応答のピークと一致した。静脈内で追加免疫した動物において、有意な割合のDCT特異的CD8⁺T細胞も脾臓で測定し、これは、初回免疫のみした動物と比較して、両方のワクチンベクターを投与したマウスで3倍増大した(Ad-hDCT群での3.45% ± 0.45%に対して、Ad-hDCT + MG1-hDCT免疫動物で11.02% ± 2.14% (p = 0.0085**))。Ad-hDCTは、血中で検出可能なDCT特異的CD4⁺T細胞集団及び脾臓においてからうじて検出可能な集団を、誘導することができず、一方、MG1-Maraba-hDCT追加免疫は、静脈内で投与したときのみ、はっきりとした全身性CD4⁺T細胞応答を生じることができた(0.30% ± 0.11%)。応答は、0.14% ± 0.03%の、DCT-KFFペプチド曝露に反応している脾臓のCD4⁺T細胞を伴い、脾臓においても検出可能であった。VSVと同様に、MG1-Marabaウイルスによる最大追加免疫を、静脈内投与により達成する。結論として、 10^9 pfuの用量でのMaraba-ベクター化ワクチンの全身性デリバリーが、抗原特異的CD8⁺及びCD4⁺T細胞集団両方の効率的追加免疫を可能にするようであった。この理由のため、この経路及び用量を、Maraba MG1投与のためのその後のインビボ実験で用いた。

【0102】

[00112]Maraba MG1-hDCTがVSV-hDCTより強力な追加免疫ベクターであることを示すために、C57/B16マウスをAd-hDCTで初回免疫し(導入遺伝子を欠く対照ベクターとして、Ad-BHGを含んだ)、次に、14日後に、静脈内用量のVSV-hDCT又はMaraba-hDCTのいずれかで追加免疫した。追加免疫ベクターの5日後、末梢血において、CD8⁺T細胞応答の免疫分析を測定した。均等用量で、Marabaワクチン接種により誘導された応答は、VSVにより誘導された応答の3~8倍の大きさであった(図2)。

【0103】

[00113]実施例2:癌のマウスモデルにおけるMG1-hDCTワクチン戦略

[00114]追加免疫ベクターとして投与したMG1-hDCTの治療効果を、続いて調べた。動物において肺転移を生じさせるために、B16-F10移植の5日後に動物にAd-hDCT初回免疫ワクチンを与え、続いて9日後に、腫瘍退縮追加免疫ワクチンとして1回静脈内用量のMG1-Maraba-hDCTを与えた。Ad-hDCT初回免疫-MG1-hDCT追加免疫ワクチン接種は、非常に強力なDCT特異的CD8⁺T細胞応

10

20

30

40

50

答を生じ(平均% IFN- γ CD 8^+ T細胞 = 27.54 ± 2.17、図3)、これは追加免疫されていないマウス(Ad-hDCT群で1.95% ± 0.29、及びAd-hDCT + MG1-GFP群で1.91% ± 0.59、図3)におけるものより、14倍強かった。同様に、DCT特異的CD4 $^+$ T細胞応答を、MG1-hDCT追加免疫動物で測定し、一方、初回免疫のみのマウスでは稀に検出した(Ad-hDCT + MG1-hDCT群での平均% IFN- γ CD4 $^+$ T細胞 = 0.25% ± 0.06に対して、Ad-hDCT及びAd-hDCT + MG1-GFP群での<0.05%、図3)。

【0104】

[00115]処置結果で見る通り、Ad-hDCT免疫化は、無処置のマウスと比較して生存期間中央値の10日間の延長を可能にした(Ad-hDCT処置について31日に対して、Ad-エンプティー群について20.5日(図4))。Ad-hDCT処置、続くMG1 Maraba-GFP腫瘍退縮処置は、生存を改善しなかった(Ad-hDCT + MG1-GFP群について生存期間中央値27.5日、図4)。しかしながら、Maraba MG1-DCTワクチンで抗腫瘍免疫を追加免疫することは、Ad-hDCT初回免疫のみの動物と比較して、生存期間中央値の20日の延長を伴い、腫瘍結果を劇的に改善した(Ad-hDCT + MG1-hDCT群について51日、図4)。さらに重要なことに、腫瘍退縮MG1-hDCT追加免疫処置は、23.3%の長期生存をもたらした(図4)。

10

【0105】

[00116]治療効果における腫瘍特異的CD4 $^+$ 及びCD8 $^+$ T細胞応答のそれぞれの寄与を特徴付けるために、各T細胞区画を選択的に枯渇させた(データは示していない)。追加免疫の時点でのCD8 $^+$ T細胞集団の枯渇は、MG1-hDCT投与の治療上の利点を無効にした。対照的に、CD4 $^+$ T細胞の枯渇は治療効果に有意には影響しないようであり、このことは、CD8 $^+$ T細胞のMaraba免疫の追加免疫がCD4 $^+$ 非依存性であることを示している。腫瘍成長の制御におけるCD8 $^+$ T細胞の重大な役割を認める一方、これらの結果は、Marabaワクチンで腫瘍特異的CD8 $^+$ T細胞を追加免疫することが、癌治療の強力な改善方法であることを示す。

20

【0106】

[00117]最後に、Marabaワクチンを含むプライム-ブースト戦略の効果も、非常に挑戦的な、転移性メラノーマ脳癌の頭蓋内B16-F10モデルで評価した。Ad-hDCTにより仲介される免疫療法は、Ad-エンプティー対照について15日からAd-hDCT群について25.5日への中央値の延長を伴い、メラノーマ脳メチオニンを生じているマウスの生存を有意に改善した(図5)。既に報告した通り、かかる治療効果は、生じた腫瘍特異的エフェクターT細胞の血液脳関門を越え、腫瘍ベッドに浸潤する能力を示す(Bridle BW.ら、(2010) Mol Ther 184:4269-4275)。Maraba MG1-hDCT腫瘍退縮追加免疫のさらなる投与は、処置動物の21.4%において観察した曲線と共に42日に達した生存期間中央値を伴い、腫瘍結果をさらに改善した(Ad-hDCT + MG1-hDCT群、図5)。

30

【0107】

[00118]実施例3:抗mPLAC1 T細胞応答を誘導するためのワクチン戦略の失敗

40

[00119]Maraba MG1及びVSVは、hDCTを腫瘍関連抗原として用いた追加免疫ベクターとして作用することができるが、全ての腫瘍関連抗原が異種プライム-ブーストワクチン戦略で用いられ得るわけではない。本開示の著者らは、huAd5-mPLAC1を初回免疫ベクターとして、及びVSV-mPLAC1を追加免疫ベクターとして用いる異種プライム-ブーストワクチン戦略を試験した。

【0108】

[00120]PLAC1は、胎盤で発現するが、幾つかの腫瘍細胞株、及び乳癌、肺癌、肝臓癌、胃癌、及び結腸直腸癌患者の腫瘍でも報告された、最近記載された腫瘍関連抗原である(Silva, WAら、(2007) Cancer Immun 7:18)。

【0109】

50

[00121] Ad - mPLAC1は、ヒトセロタイプ5に基づく複製欠損アデノウイルス(E1 / E3欠失)である(Lane C.ら、(2004)Cancer Research 64:1509-1514; Ng P.ら、(2001)Mol Ther 3:809-815)。複製欠損アデノウイルスベクターを、全長マウス抗原PLAC1(胎盤特異的1)をコードするmPLAC1導入遺伝子を発現するよう操作した。得られたアデノウイルスベクターを、「Ad - mPLAC1」又は「huAd5 - mPLAC1」と呼ぶ。

【0110】

[00122] VS Vウイルスを、メラノーマ関連抗原mPLAC1導入遺伝子のヒト形態を発現するよう操作した。得られたVS Vウイルスベクターを、「VS V - mPLAC1」と呼ぶ。組換えVS Vを、Gウイルス遺伝子とLウイルス遺伝子の間での導入遺伝子挿入により作製した。VS V - mPLAC1は、VS Vの野生型インディアナ株に由来する(Bridle BW.ら、(2009)17:1814-1821; Lawson ND.ら、(1995)Proc Natl Acad Sci USA 92:4477-4481)。

10

【0111】

[00123] C57BL/6マウスを、Ad - mPLAC1(2 × 10⁹ PFU 筋肉内注射)で初回免疫し、次に14日後に、1回静脈内用量のVS V - mPLAC1(2 × 10⁹ PFU)で追加免疫した。脾細胞を単離し、これを、オーバーラップPLAC1ペプチドライブラー(overlapping PLAC1 peptide library)由来の個々の15merのペプチドで、合計6時間刺激する(ゴルジプラグを刺激に1時間加えた)ことにより、T細胞応答を測定した。刺激後、脾細胞を、CD4、CD8、及びIFN-について染色し、FACSCanto及びFlowJoで分析した。フローサイトメトリーにより、IFN-についての細胞内サイトカイン染色(ICS)後に、応答しているT細胞を検出した。mPLAC1ペプチドのいずれも、CD8又はCD4 T細胞のいずれかにおいてIFN-の産生を刺激することはできなかった。

20

【0112】

[00124] 実施例4: MAGEA3又はその変異体を有する腫瘍退縮ワクチンベクターの構築

[00125] Ad - MAGEA3は、全長ヒトMAGEA3遺伝子を含有する、ヒトセロタイプ5に基づく複製欠損アデノウイルス(E1 / E3欠失)である(Lane C.ら、(2004)Cancer Research 64:1509-1514; Ng P.ら、(2001)Mol Ther 3:809-815)。Maraba MG1 - h MAGEA3を開発し、これは、MarabaウイルスのMG1の二重変異体のGウイルス遺伝子とLウイルス遺伝子の間で挿入された、コドン最適化全長ヒトMAGEA3遺伝子を含有する(Brun J.ら、(2010)Mol Ther 18:1440-1449)。MAGEA3配列(NCBI遺伝子番号: 4102 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4102)を、哺乳動物での発現のためコドン最適化し、次に、3'末端のFLAGタグ、並びに3'及び5'末端のM1u1制限酵素部位と共に合成した。この配列を、シャトルベクターpMRB - MG1 / pNFにそのM1u1部位(G遺伝子とL遺伝子の間)でライゲーションし、そしてこれは、それぞれ、Kpn1及びNhe1部位により隣接して、Maraba - MG1ゲノムの一部をG遺伝子の開始からL遺伝子の終わりに含有する。ここで、MAGEA3フラグ(MAGEA3 Flag)をGとLの間に含有する、Kpn1からNhe1への全領域を、次に、pMRB - MG1 / pNFから取り除き、Kpn1及びNhe1部位を用いて、pMRB - MG1ゲノムプラスミドに再度ライゲーションした。次に、Maraba - MG1 - MAGEA3フラグを回収し、ラーク精製した。これを図6に説明する。

30

40

【0113】

[00126] アデノウイルスにより発現される全長ヒトMAGEA3タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列を含んでもよい。アデノウイルスは、配列番号2のヌクレオチド配列

50

を含んでもよい。あるいは、アミノ酸配列は、配列番号3のヌクレオチド配列を含むコドン最適化導入遺伝子によりコードされてもよい。したがって、アデノウイルスは配列番号3のコドン最適化ヌクレオチド配列を含んでもよい。

【0114】

[00127] M a r a b a M G 1 ウイルスは、配列番号2のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含んでもよい。あるいは、アミノ酸配列は、配列番号3のヌクレオチド配列を含むコドン最適化導入遺伝子によりコードされてもよい。したがって、M a r a b a M G 1 ウイルスは、配列番号3のコドン最適化ヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含んでもよい。

【0115】

[00128] M A G E A 3 の1つの変異体は、配列番号4のアミノ酸配列を含むタンパク質である。このアミノ酸配列は、配列番号5のヌクレオチド配列によりコードされてもよい。アデノウイルスは、配列番号5のヌクレオチド配列を含んでもよい。M a r a b a M G 1 ウイルスは、配列番号5のヌクレオチド配列の逆相補的RNAバージョンを含んでもよい。

10

【0116】

[00129] 配列番号4のタンパク質を発現するマイナスセンスRNAウイルス、例えば、M a r a b a ウイルスは、配列番号6の逆相補的RNAバージョンである配列を含むRNAポリヌクレオチドを含んでもよい。

【0117】

[00130] 実施例5：健常な靈長類におけるM G 1 - M A G E A 3 ワクチン免疫応答

[00131] 健常カニクイザルを、ヒトでの使用に可能性のあるM G 1 - M A G E A 3 腫瘍退縮ワクチンを開発するための、毒性及び免疫原性データを集めるよう設計した研究で用いた。カニクイザルの使用は、ヒトで予測されるものと定量的及び定性的に類似する応答を同定する可能性を最大にする。研究の開始に先立ち、靈長類を、動物到着時から血管アクセスポート移植術の時まで、4～6週間気候順化させた。手術後最短2～3週間後、それぞれの足に1用量当たり0.5ml、合計 1×10^{10} pfu、ゆっくりとした筋肉内注射により、注射して、動物を非複製アデノウイルスAd - M A G E A 3 初回免疫ベクターでワクチン接種した。Ad - M A G E A 3 / M G 1 - M A G E A 3 プライム - ブースト研究のため、M G 1 - M A G E A 3 追加免疫に先立ち、2週(-14日目)、又は4週(-28日目)のいずれかで、Ad - M A G E A 3 初回免疫を行った。故に、Ad - M A G E A 3 投与を-14日目又は-28日目に行い、M G 1 - M A G E A 3 追加免疫を0日及び3日に行った。Ad - M A G E A 3 投薬レベルの理論的根拠は、文献、及びマカク(及びヒト)での 1×10^{10} pfuの用量が毒性を観察せず、安全な用量であることを示す従前の実験(B e t t r a, V a c c i n e, 2 0 1 0)からもたらされる。2週間追加免疫する群の動物に対して、M G 1 - M A G E A 3 ウィルスを、実験0日及び3日(Ad - M A G E A 3 の14日及び17日後)で、低用量 1×10^{10} 、又は高用量 1×10^{11} のいずれかで静脈内注射した。4週間追加免疫する群の動物に対して、M G 1 - M A G E A 3 ウィルスを、実験0日及び3日(Ad - M A G E A 3 の28日及び31日後)で、低用量 1×10^{10} 、又は高用量 1×10^{11} のいずれかで静脈内注射した。追加免疫するウィルスを、滅菌食塩水(pH7.5)30ml中、30分かけて血管アクセスポートを通じて注入した。M G 1 - M A G E A 3 低投薬レベルの理論的根拠は、マウスの最大許容可能用量が 1×10^9 であることを示す、前臨床研究からもたらされる。マカクまでスケールアップした相対的体表面積は、これを計 $pfu 3.5 \times 10^{10}$ とみなす。M G 1 - M A G E A 3 高投薬レベルの理論的根拠は、 2×10^{11} pfuの用量レベルで毒性を観察しない、パイロット非ヒト靈長類(N H P)毒性学研究からもたらされる。プライム - ブースト研究での動物を、早期(14日目)又は後期(84日目)のいずれかで屠殺した。Ad - M A G E A 3 / M G 1 - M A G E A 3 プライム - ブースト研究のため、全ての動物から5つの異なる時間ポイントで、血液試料を採取した。2週間の異種プライム - ブーストコホートでの動物について、任意のワクチン接種に先立ち、及び-14日目の前日(

20

30

40

50

ベースライン)、並びに実験の5日目、13日目、及び84日目に、血液試料を集めた。4週間の異種プライム-ブーストコホートでの動物について、任意のワクチン接種に先立ち、及び-28日目の前日(ベースライン)、並びに実験の5日目、13日目、及び84日目に、血液試料を集めた。

【0118】

[00132] Ad - MAGEA3 / MG1 - MAGEA3での異種プライム-ブーストワクチン接種に対する靈長類における免疫応答を評価するために、末梢血単核細胞(PBMC)を、4時間(最後の3時間、プレフェルジンAの存在下で)、T細胞(再)刺激のため、10種のhMAGE-A3ペプチドのプールとインキュベーションした(又はバックグラウンドの評価のため無刺激のまま残した)。ペプチドは、N末端からC末端まで87種のペプチド(それぞれ、15mer)で全hMAGE-A3抗原をカバーする、オーバーラップペプチドライブリーに由來した。刺激後、T細胞を、蛍光抗CD8及び抗CD4抗体で25分間染色した。この表面染色後、細胞を透過処理し、BD Cytofix/Cytopermで20分間固定した。次に、蛍光抗IFN 及び抗TNF 抗体での25分間の細胞内染色によってサイトカイン発現を見ることにより、hMAGE-A3特異的T細胞を検出した。細胞分析を、BD Canto フローサイトメーターで行った。

10

【0119】

[00133] 図7は、Ad - MAGEA3初回免疫後、高用量及び低用量MG1 - MAGEA3を追加免疫ベクターとして投与したサルの平均CD8⁺T細胞免疫応答を示す。低用量MG1 - MAGEA3動物において、追加免疫の5日後、CD8⁺T細胞応答の有意な増大が存在し、そしてこれは時間が立つにつれしほみ、一方、高用量MG1 - MAGEA3動物において、追加免疫の5日後、CD8⁺T細胞応答の同様の有意な増大が存在し、そしてこれは、時間が立つにつれより高いレベルで持続する。図8は、研究の動物全で、高用量又は低用量に関係なく、MG1 - MAGEA3での追加免疫の5日後、CD8⁺T細胞応答の有意な増大を發揮したことを見た。靈長類におけるこれらのピークT細胞応答は、非近交系集団において、プライム-ブースト腫瘍退縮ワクチン戦略が、腫瘍を移植することができ且つ生存の劇的な延長を得る動物モデルに匹敵する、免疫反応を付与することを示す。

20

【0120】

[00134] 実施例6：ヒトパピローマウイルスE6 / E7融合タンパク質を発現するレンチウイルス初回免疫ベクター及び腫瘍退縮ワクチンベクターの構築及び免疫試験

30

[00135] HPV導入遺伝子は、Rb又はp53結合に必要なジンクフィンガーを取り除く(タンパク質の発癌能を取り除く)ために、全4つのヌクレオチド配列において欠失を有する、HPVセロタイプ16全長野生型E6(gi / 4927720 / gb / AAD33252.1 / AF125673_1 E6ヒトパピローマウイルスタイプ16)、及びE7(gi / 4927721 / gb / AAD33253.1 / AF125673_2 E7ヒトパピローマウイルスタイプ16)配列、及びHPVセロタイプ18全長野生型E6(gi / 137758 / sp / P06463.1 / VE6 HPV18 RecName: F11 = タンパク質E6)及びE7(gi / 137792 / sp / P06788.2 / VE7 HPV18 RecName: F11 = タンパク質E7)配列である。得られた融合タンパク質は、柔軟なグリシンリンカー+AY配列(それぞれの抗原を、抗原提示のため通常作製されるペプチドにタンパク質分解性に分解することを確かにするための、プロテアソーム切断部位として働く)を有する。コドン最適化融合ヌクレオチド配列は、527アミノ酸のHPV16 / 18 E6 / E7融合タンパク質(配列番号7)を生じる。

40

【0121】

[00136] ヒトパピローマウイルスE6 / E7融合導入遺伝子を発現するレンチウイルスを、pDY.EG.WSレンチウイルスベクターを用いて作製した。修飾したHPV導入遺伝子を、EcoRI制限部位を含有するプライマー(フォワードプライマーACTGG AATTCAATGCATCAGAACGCAACTGC、配列番号18)、及びBamH

50

I制限酵素部位を含有するプライマー(リバースプライマー-A C T G G G A T C C T C A C T G C T G G G A G G C A C A C、配列番号19)を用いてPCR増幅した。HPV導入遺伝子PCR産物をアガロースゲル精製した。pDY.EG.WSレンチウイルスベクターを、EcoRI及びBamHI部位で切断してEGFPを取り除き、アガロースゲル精製し、CIAP(Invitrogenカタログ18009-019)を用いて脱リン酸化した。次に、切断したベクターをさらにアガロースゲル精製した。次に、HPV導入遺伝子PCR産物を、EcoRI/BamHI切断ベクターに、T4DNAリガーゼ(Invitrogen)を用いてライゲーションした。ライゲーション反応物をコンピテント細胞を用いてトランスフォーメーションし、陽性コロニー由来のプラスミドDNAをミニプレップで増幅した。次に、修飾したHPV導入遺伝子を発現するpDY.EG.WSレンチウイルスベクターを、マキシプレップで増幅した。ヒトパピローマウイルスE6/E7融合導入遺伝子を発現するレンチウイルスを、3つのプラスミド：修飾したHPV導入遺伝子を発現するpDY.EG.WSレンチウイルスベクター、パッケージングpCMV-8.84プラスミド、及びエンベロープpMD2Gプラスミドそれぞれ6.4μgのトランスフェクション後、293T細胞にレスキュード。ウイルス上清を集め、0.45μのフィルターを通して濾過し、50,000×g、16で120分間遠心分離した。ヒトパピローマウイルスE6/E7融合導入遺伝子を発現するレンチウイルスを、PBSに再懸濁し、-80で保存した。

10

【0122】

[00137]MarabaウイルスのMG1二重変異体のGウイルス遺伝子とLウイルス遺伝子の間で挿入された、パピローマウイルスE6/E7融合導入遺伝子を含有するよう、Maraba MG1を操作した(Brun J.ら、(2010)Mol Ther 18:1440-1449)。導入遺伝子配列(配列番号8)は、哺乳動物細胞での発現のため、コドン最適化した。HPV E6/E7を含有する、得られたMaraba MG1を、「Maraba-MG1-HPV E6/E7」と一般的に命名した。修飾したMaraba MG1骨格を用いて、クローニングを促進した。サイレント変異を、Maraba MG1ゲノム骨格のL遺伝子に導入して、M1u1部位の1つを取り除いた。第2のM1u1部位を、GとLの間のクローニング領域で、BSiWI部位で置き換えた。これらのMaraba MG1ゲノム骨格への修飾は、シャトルプラスミドpMRB-MG1/pNFを用いることを回避するので、Brunらの文献に記載されたものより、より直接的なクローニングシステムを可能にした。HPV E6/E7融合導入遺伝子配列を、修飾したMaraba MG1ゲノム骨格に、そのM1u1部位及びBSiWI部位(GとLの間のクローニング領域)でライゲーションした。次に、Maraba-MG1-HPV E6/E7をレスキュード(Brunら、(2010)Mol Ther 18:1440-1449に既に記載される通り)、1回ブラーク精製し、オプティプレップ精製した。Maraba-MG1-HPV E6/E7は、配列番号9の逆相補的RNAバージョンであるゲノム配列を有する。

20

30

【0123】

[00138]一般的に、0日での初回免疫ベクター(レンチウイルス-HPV E6/E7+アジュバントとしてのpoly 1:C)の投与、及び14日での1e9PFUの追加免疫ベクター(Maraba-MG1-HPV E6/E7)の投与により、動物を免疫した。対照動物を、HPV E6/E7導入遺伝子の代わりに対照非免疫原性導入遺伝子挿入としてGFPをコードするウイルスベクターでプライム-ブーストした。初回免疫応答の分析を14日目に、追加免疫応答の分析を19日目に行った。それぞれのレンチウイルス-HPV E6/E7調製物を、初回免疫ウイルスにアジュバントとして加えたpoly 1:C 250μgと共に作製し、次に、それぞれのウイルスについて5匹の動物の間で分けた。マウスをイソフルレンで麻酔し、レンチウイルス-HPV E6/E7/poly 1:C 30μLを、後足蹠に注射した。残りのウイルスを、左の鼠径部リンパ節近くに、皮下注射した。初回免疫の14日後、血液を採取し、フローサイトメトリーにより分析した。次に、1×10⁹PFU MG1-HPV E6/E7で、マウスを静脈内で

40

50

追加免疫した。追加免疫の5日後、血液を抜き、免疫応答をフローサイトメトリーにより評価した。

【0124】

[00139]免疫分析を以下の通り行った。血液を、後眼窩出血を介して、ヘパリン処理した毛細管チューブを用いて集め、ヘパリン中に回収した。次に、赤血球をACK溶解バッファーを用いて溶解し、得られたPBMCを、腫瘍抗原に対する免疫応答について分析した。PBMCを、ペプチドの不存在下でインキュベーションするか、又は2μg/mlペプチド(RAHYNIVTF)で、合計5時間刺激した(ゴルジプラグを刺激に1時間加えた)。刺激後、PBMCを、CD4、CD8、及びIFNについて染色し、FACS Canto及びFlowJoにて分析した。応答するT細胞を、IFN-についての細胞内サイトカイン染色(ICS)後、フローサイトメトリーにより検出した。無刺激のPBMCの値をバックグラウンドとみなし、刺激したPBMCから得た値から引いた。データは平均+/-SEMを表す。表1において、HPV E6/E7ペプチドが、免疫応答の存在を示す、CD8細胞におけるIFN-産生を刺激することができることを示した。

10

【0125】

【表1】

表1.HPV E6/E7プライム-ブーストに対する免疫応答

刺激性ペプチドエピトープ	インターフェロン(IFN)γを分泌するCD8 T細胞の割合			
	対照群 レンチウイルス-GFP初回免疫 MG1-GFP追加免疫	免疫群 レンチウイルス-HPV E6/E7初回免疫 MG1-HPV E6/E7追加免疫 (N=5)		
RAHYNIVTF	0.0033±0.0033 (初回免疫後)	0.03±0.025 (追加免疫後)	0.036±0.012 (初回免疫後)	5.9±2.7 (追加免疫後)

20

【0126】

[00140]実施例7：癌精巣抗原1を発現するレンチウイルス初回免疫ベクター及び腫瘍退縮ワクチンベクターの構築及び免疫試験

[00141]NYESO1導入遺伝子は、180アミノ酸のタンパク質(配列番号13)が生じるようヒト及びマウスでの発現のためコドン最適化された、全長野生型配列(配列番号14)である。

30

【0127】

[00142]癌精巣抗原1導入遺伝子を発現するレンチウイルスを、pDY.EG.WSレンチウイルスベクターを用いて作製した。NYESO1導入遺伝子を、BamHI制限酵素部位を含有するプライマー(フォワードプライマー-ACCTGGGATCCATGCGAGGCCGAGGGCAGAG、配列番号20)、及びBamHI制限酵素部位を含有するプライマー(リバースプライマー-ACCTGGGATCCCTCATCTTCTCTGGCCGCTGG、配列番号21)を用いてPCR增幅した。NYESO1導入遺伝子PCR産物をアガロースゲル精製した。pDY.EG.WSレンチウイルスベクターを、BamHI部位で切断してeGFPを取り除き、アガロースゲル精製し、CIAP(Invitrogenカタログ18009-019)を用いて脱リン酸化した。次に、切断したベクターをさらにアガロースゲル精製した。次に、NYESO1導入遺伝子PCR産物を、BamHI切断ベクターに、T4DNAリガーゼ(Invitrogen)を用いてライゲーションした。ライゲーション反応物をコンピテント細胞を用いてトランスフォーメーションし、陽性コロニー由来のプラスミドDNAをミニプレップで増幅した。次に、修飾したHPV導入遺伝子を発現するpDY.EG.WSレンチウイルスベクターを、マキシプレップで増幅した。NYESO1導入遺伝子を発現するレンチウイルスを、3つのプラスミド：NYESO1導入遺伝子を発現するpDY.EG.WSレンチウイルスベクター、パッケージングpCMV-8.84プラスミド、及びエンベロープpMD2Gプラスミドそ

40

50

れぞれ $6.4 \mu\text{g}$ のトランスフェクション後、 293T 細胞にレスキューした。ウイルス上清を集め、 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターを通して濾過し、 $50,000 \times g$ 、 16 度で 120 分間遠心分離した。NYESO1導入遺伝子を発現するレンチウイルスを、PBSに再懸濁し、 -80 度保存した。

【0128】

[00143] Maraba MG1を、MarabaウイルスのMG1二重変異体のGウイルス遺伝子とLウイルス遺伝子の間で挿入された、癌精巣抗原1導入遺伝子を含有するよう操作した(Brunn J.ら、(2010) Mol Ther 18: 1440-1449)。導入遺伝子配列を、哺乳動物細胞での発現のためコドン最適化した。NYESO1タンパク質を含有する、得られたMaraba MG1を、「Maraba-MG1-NYESO1」又は「MG1-NYESO1」と命名した。
10

【0129】

[00144] NYESO1導入遺伝子を、シャトルベクターpMRB-MG1/pNFにそのMlu1部位(G遺伝子とL遺伝子の間)でライゲーションし、そしてこれは、それぞれ、Kpn1及びNhe1部位により隣接して、Maraba-MG1ゲノムの一部をG遺伝子の開始からL遺伝子の終わりに含有する。ここで、挿入されたNYESO1導入遺伝子をGとLの間に含有する、Kpn1からNhe1への全領域を、次に、pMRB-MG1/pNFから取り除き、Kpn1及びNhe1部位を用いて、pMRB-MG1ゲノムプラスミドに再度ライゲーションした。次に、Maraba-MG1-NYESO1をレスキューした(Brunn J.ら、(2010) Mol Ther 18: 1440-1449で既に記載される通り)。Maraba-MG1-NYESO1を3回プレーク精製し、スクロースクッショングリセリン精製を介して精製した。Maraba-MG1-NYESO1ウイルスは、配列番号15の逆相補的RNAバージョンであるゲノム配列を有する。
20

【0130】

[00145]一般的に、0日目の初回免疫ベクター(レンチウイルス-NYESO1+アジュバントとしてのpoly 1:C)の投与、及び14日目の1e9PFUの追加免疫ベクター(Maraba-MG1-NYESO1)の投与により、動物を免疫した。対照動物を、NYESO1導入遺伝子の代わりに対照非免疫原性導入遺伝子挿入としてGFPをコードするウイルスベクターでプライム-ブーストした。初回免疫応答の分析を、14日目及び19日目に行った。それぞれのレンチウイルス-NYESO1調製物を、初回免疫ウイルスにアジュバントとして加えたpoly 1:C 250 μg と共に作製し、次に、それぞれのウイルスについて5匹の動物の間で分けた。マウスをイソフルレンで麻酔し、レンチウイルス-NYESO1/poly 1:C 30 μL を、それぞれの後足蹠に注射した。残りのウイルスを、左の鼠径部リンパ節近くに、皮下注射した。初回免疫の14日後、血液を採取し、フローサイトメトリーにより分析した。次に、 $1 \times 10^9 \text{ PFU MG1-NYESO1}$ で、マウスを静脈内で追加免疫した。追加免疫の5日後、血液を抜き、免疫応答をフローサイトメトリーにより評価した。
30

【0131】

[00146]免疫分析を以下の通り行った。血液を、後眼窓出血を介して、ヘパリン処理した毛細管チューブを用いて集め、ヘパリン中に回収した。次に、赤血球をACK溶解バッファーを用いて溶解し、得られたPBMCを腫瘍抗原に対する免疫応答について分析した。PBMCを、ペプチドの不存在下でインキュベーションするか、又は $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ペプチド(RGPESRLL)で、合計5時間刺激した(ゴルジプラグを刺激に1時間加えた)。刺激後、PBMCを、CD4、CD8、及びIFN-について染色し、FACSCa nto及びFlowJoにて分析した。応答するT細胞を、IFN-についての細胞内サイトカイン染色(ICS)後、フローサイトメトリーにより検出した。無刺激のPBMCの値をバックグラウンドとみなし、刺激したPBMCから得た値から引いた。データは平均+/-SEMを表す。表2において、NYESO1ペプチドが、免疫応答の存在を示す、CD8細胞におけるIFN-産生を刺激することができることを示した。
40

【0132】

【表2】

表2.NYESO1 プライム-ブーストに対する免疫応答

刺激性ペプチドエピトープ	インターフェロン(IFN) γ を分泌するCD8 T細胞の割合			
	対照群 レンチウイルス-GFP初回免疫 MG1-GFP追加免疫		免疫群 レンチウイルス-NYESO1初回免疫 MG1-NYESO1追加免疫 (N=5)	
RGPESRLL	0±0 (初回免疫後)	0.013±0.0088 (追加免疫後)	0.027±0.015 (初回免疫後)	12.33 (追加免疫後)

【0133】

10

[00147]実施例8：前立腺タンパク質のヒト6回膜貫通型上皮抗原を発現するレンチウイルス初回免疫ベクター及び腫瘍退縮ワクチンベクターの構築及び免疫試験

[00148]h u S T E A P導入遺伝子は、341アミノ酸のタンパク質（配列番号10）が生じるようヒト及びマウスでの発現のためコドン最適化された、全長野生型配列（配列番号11）である。

【0134】

20

[00149]前立腺タンパク質のヒト6回膜貫通型上皮抗原を発現するレンチウイルスを、p D Y . E G . W S レンチウイルスベクターを用いて作製した。h u S T E A P導入遺伝子を、E c o R I 制限酵素部位を含有するプライマー（フォワードプライマー-A C T G G A A T T C A T G G A A T C A C G G A A G G A C A T C、配列番号22）、及びB a m H I 制限酵素部位を含有するプライマー（リバースプライマー-A C T G G G A T C C T T A A A G C T T C A G C T G G C T A C A G、配列番号23）を用いてP C R 増幅した。h u S T E A P導入遺伝子P C R 産物をアガロースゲル精製した。p D Y . E G . W S レンチウイルスベクターを、E c o R I / B a m H I 部位で切断しe G F Pを取り除き、アガロースゲル精製し、C I A P (I n v i t r o g e n カタログ18009-019)を用いて脱リン酸化した。次に、切断したベクターをさらにアガロースゲル精製した。次に、h u S T E A P導入遺伝子P C R 産物を、E c o R I / B a m H I 切断ベクターに、T 4 D N A リガーゼ (I n v i t r o g e n) を用いてライゲーションした。ライゲーション反応物をコンピテント細胞を用いてトランスフォーメーションし、陽性コロニー由来のプラスミドD N Aをミニプレップで増幅した。次に、修飾したh u S T E A P導入遺伝子を発現するp D Y . E G . W S レンチウイルスベクターを、マキシプレップで増幅した。h u S T E A P導入遺伝子を発現するレンチウイルスを、3つのプラスミド：h u S T E A P導入遺伝子を発現するp D Y . E G . W S レンチウイルスベクター、パッケージングp C M V - 8 . 8 4 プラスミド、及びエンベロープp M D 2 G プラスミドそれぞれ6 . 4 μ gのトランスフェクション後、293T細胞にレスキュード。ウイルス上清を集め、0 . 4 5 μ のフィルターを通して濾過し、50 , 0 0 0 \times g、16で120分間遠心分離した。h u S T E A P導入遺伝子を発現するレンチウイルスを、P B Sに再懸濁し、-80で保存した。

30

【0135】

30

[00150]M a r a b a M G 1を、M a r a b a ウィルスのM G 1二重変異体のG ウィルス遺伝子とL ウィルス遺伝子の間で挿入された、前立腺導入遺伝子のヒト6回膜貫通型上皮抗原を含有するよう操作した(B r u n J.ら、(2010)M o l T h e r 18 : 1440 - 1449)。導入遺伝子配列を、哺乳動物細胞での発現のためコドン最適化した。h u S T E A Pタンパク質を含有する、得られたM a r a b a M G 1を、「M a r a b a - M G 1 - h u S T E A P」又は「M G 1 - h u S T E A P」と命名した。修飾したM a r a b a M G 1骨格を用いて、クローニングを促進した。サイレント変異を、M a r a b a M G 1ゲノム骨格のL 遺伝子に導入して、M l u 1部位の1つを取り除いた。第2のM l u 1部位を、GとLの間のクローニング領域で、B s i W I 部位で置き換えた。これらのM a r a b a M G 1ゲノム骨格への修飾は、シャトルプラスミドp M R B - M G 1 / p N F を用いることを回避するので、B r u nらの文献に記載されたも

40

50

のより、より直接的なクローニングシステムを可能にした。h u S T E A P 導入遺伝子配列を、修飾した Maraba MG1ゲノム骨格に、その M l u l 部位及び B s i W I 部位 (GとLの間のクローニング領域)でライゲーションした。次に、Maraba - MG1 - h u S T E A P をレスキューレ (Brun J.ら、(2010) Mol Ther 18: 1440 - 1449 に既に記載される通り)、1回ブラーク精製し、オプティップレップ精製した。Maraba - MG1 - h u S T E A P は、配列番号12の逆相補的RNAバージョンであるゲノム配列を有する。

【0136】

[00151]一般的に、0日での初回免疫ベクター(レンチウイルス - h u S T E A P + アジュバントとしての p o l y 1 : C)の投与、及び14日での 1 e 9 P F U の追加免疫ベクター (Maraba - MG1 - h u S T E A P)の投与により、動物を免疫した。対照動物を、h u S T E A P 導入遺伝子の代わりに対照非免疫原性導入遺伝子挿入としてGFPをコードするウイルスベクターでプライム - ブーストした。初回免疫応答の分析を、14日及び19日で行った。それぞれのレンチウイルス - h u S T E A P 調製物を、初回免疫ウイルスにアジュバントとして加えた p o l y 1 : C 2 5 0 μ gと共に作製し、次に、それぞれのウイルスについて5匹の動物の間で分けた。マウスをイソフルレンで麻酔し、レンチウイルス - h u S T E A P / p o l y 1 : C 3 0 μ Lを、それぞれの後足蹠に注射した。残りのウイルスを、左の鼠径部リンパ節近くに、皮下注射した。初回免疫の14日後、血液を採取し、フローサイトメトリーにより分析した。次に、 1×10^9 P F U MG1 - h u S T E A P で、マウスを静脈内で追加免疫した。追加免疫の5日後、血液を抜き、免疫応答をフローサイトメトリーにより評価した。

10

20

30

【0137】

[00152]免疫分析を以下の通り行った。血液を、後眼窓出血を介して、ヘパリン処理した毛細管チューブを用いて集め、ヘパリン中に回収した。次に、赤血球を A C K 溶解バッファーを用いて溶解し、得られた P B M C を腫瘍抗原に対する免疫応答について分析した。P B M C を、ペプチドの不存在下でインキュベーションするか、又はペプチドで、合計5時間刺激した(ゴルジプラグを刺激に1時間加えた)。P B M C を、ペプチドの不存在下でインキュベーションするか、又は 2 μ g / m L ペプチド (R S R Y K L L)で、合計5時間刺激した(ゴルジプラグを刺激に1時間加えた)。刺激後、P B M C を、C D 4 、C D 8 、及び I F N について染色し、F A C S C a n t o 及び F l o w J o にて分析した。応答する T 細胞を、I F N - についての細胞内サイトカイン染色 (I C S) 後、フローサイトメトリーにより検出した。無刺激の P B M C の値をバックグラウンドとみなし、刺激した P B M C から得た値から引いた。データは平均 + / - S E M を表す。表3において、h u S T E A P ペプチドが、免疫応答の存在を示す、C D 8 細胞における I F N - 産生を刺激することができる事を示した。

【0138】

【表3】

表3.huSTEAP プライム-ブーストに対する免疫応答

刺激性ペプチドエピトープ	インターフェロン(IFN) γ を分泌するCD8 T細胞の割合			
	対照群 レンチウイルス-GFP初回免疫 MG1-GFP追加免疫		免疫群 レンチウイルス-huSTEAP初回免疫 MG1-huSTEAP追加免疫 (N=5)	
RSYRYKLL	0.0033±0.0033 (初回免疫後)	0.0033±0.0033 (追加免疫後)	0.008±0.0508 (初回免疫後)	0.406±0.11 (追加免疫後)

40

【0139】

[00153]実施例9:エプスタイン - バー核抗原1を発現するレンチウイルス初回免疫ベクター及び腫瘍退縮ワクチンベクターの構築及び免疫試験

[00154]E B D N A 1 導入遺伝子は、欠失した反復性配列を生じるグリシン - アラニンを有する、全長野生型 E B D N A 1 の部分的ヌクレオチド配列 (h t t p : / / w w w .

50

n c b i . n l m . n i h . g o v / p r o t e i n / Q 1 H V F 7 . 1)である(タンパク質をアミノ末端ドメイン及びカルボキシ末端ドメインに分離する)。この配列は、タンパク質を安定化させ、プロテアソーム破壊を防ぎ、並びに抗原プロセシング及びMHCクラスI拘束性抗原提示を障害するようである(Levitskaya Jら、(1995)Nature 375:685-688)。切断型EBDNA1スクレオチド配列(配列番号17)は、238アミノ酸のタンパク質(配列番号16)を生じるようヒト及びマウスでの発現のためコドン最適化された。

【0140】

[00155]エプスタイン-バー核抗原1タンパク質を発現するレンチウイルスを、pDY.EG.WSレンチウイルスベクターを用いて作製した。修飾したEBDNA1導入遺伝子を、EcoRI制限酵素部位を含有するプライマー(フォワードプライマー-ACCTGGAAATTCAATGCCAGTCGGCCAGGCTG、配列番号24)、及びBamHI制限酵素部位を含有するプライマー(リバースプライマー-ACCTGGGATCCCTTATTCCTGCCCTCTTCTCC、配列番号25)を用いてPCR増幅した。EBDNA1導入遺伝子PCR産物をアガロースゲル精製した。pDY.EG.WSレンチウイルスベクターを、EcoRI及びBamHI部位で切断しEGFPを取り除き、アガロースゲル精製し、CIAP(Invitrogenカタログ18009-019)を用いて脱リン酸化した。次に、切断したベクターをさらにアガロースゲル精製した。次に、EBDNA1導入遺伝子PCR産物を、EcoRI/BamHI切断ベクターに、T4DNAリガーゼ(Invitrogen)を用いてライゲーションした。ライゲーション反応物をコンピテント細胞を用いてトランスフォーメーションし、陽性コロニー由来のプラスミドDNAをミニプレップで増幅した。次に、EBDNA1導入遺伝子を発現するpDY.EG.WSレンチウイルスベクターを、マキシプレップで増幅した。EBDNA1導入遺伝子を発現するレンチウイルスを、3つのプラスミド:EBDNA1導入遺伝子を発現するpDY.EG.WSレンチウイルスベクター、パッケージングpCMV-8.84プラスミド、及びエンベロープpMD2Gプラスミドそれぞれ6.4μgのトランスフェクション後、293T細胞にレスキューした。ウイルス上清を集め、0.45μのフィルターを通して濾過し、50,000×g、16で120分間遠心分離した。EBDNA1導入遺伝子を発現するレンチウイルスを、PBSに再懸濁し、-80で保存した。

【0141】

[00156]Maraba MG1を、MarabaウイルスのMG1二重変異体のGウイルス遺伝子とLウイルス遺伝子の間で挿入された、エプスタイン-バー核抗原1導入遺伝子を含有するよう操作した(Brun J.ら、(2010)Mol Ther 18:1440-1449)。導入遺伝子配列を、哺乳動物細胞での発現のためコドン最適化した。EBV DNA1タンパク質を含有する、得られたMaraba MG1を、「Maraba-MG1-EBV DNA1」又は「MG1-EDV DNA1」と命名した。修飾したMaraba MG1骨格を用いて、クローニングを促進した。サイレント変異を、Maraba MG1ゲノム骨格のL遺伝子に導入して、M1u1部位の1つを取り除いた。第2のM1u1部位を、GとLの間のクローニング領域で、BsiWI部位で置き換えた。これらのMaraba MG1ゲノム骨格への修飾は、シャトルプラスミドpMRB-MG1/pNFを用いることを回避するので、Brunらの文献に記載されたものより、より直接的なクローニングシステムを可能にした。EBDNA1導入遺伝子配列を、修飾したMaraba MG1ゲノム骨格に、そのM1u1部位及びBsiWI部位(GとLの間のクローニング領域)でライゲーションした。次に、Maraba-MG1-EBDNA1導入遺伝子をレスキューし(Brun J.ら、(2010)Mol Ther 18:1440-1449に既に記載される通り)、1回ブラーク精製し、オプティップレップ精製した。

【0142】

[00157]一般的に、0日目で初回免疫ベクター(レンチウイルス-EBDNA1+アジュvantとしてのpoly 1:C)の投与、及び14日目の1e9PFUの追加免疫ベ

10

20

30

40

50

クター (Maraba-MG1-EBDNA1) の投与により、動物を免疫した。対照動物を、TAA導入遺伝子の代わりに对照非免疫原性導入遺伝子挿入としてGFPをコードするウイルスベクターでプライム・ブーストした。初回免疫応答の分析を、14日目及び19日目に行った。それぞれのレンチウイルス-EBDNA1調製物を、初回免疫ウイルスにアジュバントとして加えたpoly 1 : C250 μgと共に作製し、次に、それぞれのウイルスについて5匹の動物の間で分けた。マウスをイソフルレンで麻酔し、レンチウイルス-EBDNA1/poly 1 : C30 μLを、それぞれの後足蹠に注射した。残りのウイルスを、左の鼠径部リンパ節近くに、皮下注射した。初回免疫の14日後、血液を採取し、フローサイトメトリーにより分析した。次に、 1×10^9 PFU MG1-EBVDNA1で、マウスを静脈内で追加免疫した。追加免疫の5日後、血液を抜き、免疫応答をフローサイトメトリーにより評価した。

10

【0143】

[00158]免疫分析を以下の通り行った。血液を、後眼窩出血を介して、ヘパリン処理した毛細管チューブを用いて集め、ヘパリン中に回収した。次に、赤血球をACK溶解バッファーを用いて溶解し、得られたPBMCを腫瘍抗原に対する免疫応答について分析した。PBMCを、ペプチドの不存在下でインキュベーションするか、又は2 μg / mLペプチド (VYGGSKTSL) で、合計5時間刺激した (ゴルジプラグを刺激に1時間加えた)。刺激後、PBMCを、CD4、CD8、及びIFNについて染色し、FACS Canario及びFlowJoにて分析した。応答するT細胞を、IFN-についての細胞内サイトカイン染色 (ICS) 後、フローサイトメトリーにより検出した。無刺激のPBMCの値をバックグラウンドとみなし、刺激したPBMCから得た値から引いた。データは平均+/-SEMを表す。EBVDNA1ペプチドは、表4に示す通り、免疫応答の欠如を示す、いずれかのCD8 T細胞でのIFN-産生を刺激することができなかった。

20

【0144】

【表4】

表4.EBVDNA1 プライム-ブーストに対する免疫応答

刺激性ペプチドエピトープ	インターフェロン(IFN)γを分泌するCD8 T細胞の割合			
	対照群 レンチウイルス-GFP初回免疫 MG1-GFP追加免疫	免疫群 レンチウイルス-EBVDNA1初回免疫 MG1-EBVDNA1追加免疫 (N=5)	0.055±0.015 (初回免疫後)	0.01±0.0058 (追加免疫後)
VYGGSKTSL	0.055±0.015 (初回免疫後)	0.01±0.0058 (追加免疫後)	0.008±0.0049 (初回免疫後)	0.09±0.05 (追加免疫後)

30

【0145】

[00159]実施例10：アデノウイルス-OVワクチンプライム・ブースト戦略に対するシクロホスファミドの作用

[00160]シクロホスファミド (CPA) は、種々のタイプの癌を処置するために用いられる化学療法剤である。高用量のこの薬剤が有効な化学療法に必要とされる。高用量のCPAは免疫抑制を導くと考えられ、一方低用量の薬剤は様々な抗原に対する免疫応答の増強を導き得る。驚くべきことに、本開示の異種プライム・ブースト戦略において、CPAのみが、第1のウイルスによる免疫系の初回免疫に先立ち投与されたとき、免疫応答の増大をもたらす。

40

【0146】

[00161]肺転移を生じさせるために、C57BL/6マウス (研究開始時に8~10週齢) に、生理食塩水200 μL中 2.5×10^5 個のB16-F10細胞 (マウスDCT抗原を発現するマウスマラノーマ細胞) を0日で静脈内注射した。B16-F10移植の5日後、マウスにAd-hDCT初回免疫ワクチン (PBS200 μL中 2×10^8 pfu、筋肉内) を与え、続いて、14日後に、腫瘍退縮追加免疫ワクチンとして1回静脈内用量のVSV-hDCT (PBS200 μL中 2×10^9 pfu、静脈内) を与えた。加

50

えて、初回免疫に先立ち - 1 日、及び / 又は追加免疫に 1 3 日先立ち、マウスにビーグル又は C P A (1 m g / マウス 2 0 g 、腹腔内) を与えた。図 9 において、初回免疫ベクターに先立ち与えた C P A が生存を有意に増大し、一方追加免疫ベクターに先立ち投与した C P A は、生存を延長しない (データは示していない) ことを見ることができる。

【 0 1 4 7 】

[00162] 上の記載において、説明の目的のため、実施例の徹底的な理解をもたらすために、多数の詳細が説明される。上述の実施例は、代表例のみであることが意図される。変化、修飾、及びバリエーションが、添付の請求の範囲により単に定義される、範囲から逸脱することなく、当業者により、特定の実施例にもたらされ得る。

【 付録 A - タンパク質及びヌクレオチド配列 】

10

【 0 1 4 8 】

【 化 1 - 1 】

全長、野生型、ヒト M A G E A 3 のタンパク質配列 (配列番号 1) :

MPLEQRSQLHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPATEEQEAASSSTLVEVTLGEVPAAESPD
 PPQSPQGASSLPTTMNYPLWSQSYEDSSNQEEGPSTFPDLESEFQAALSRKVAELVHLL
 LKYRAREPVTKAEMLGSVVGWNQYFFPVIFSKASSLQLVFGIELMEVDPIGHLYIFATCLGL
 SYDGLLGDNQIMPKAGLLIVLAIAREGDCAPEEKIWEELSVLEVFEGRERDSILGDPKKLLTQ
 HFVQENYLEYRQVPGSDPACYEFLWGPRALVETSYVKVLHHMVKISGGPHISYPPLHEWVL
 REGEE*

20

全長、野生型、ヒト M A G E A 3 をコードする D N A 配列 (配列番号 2) :

ATGCCTCTTGAGCAGAGGAGTCAGCACTGCAAGCCTGAAGAAGGCCTTGAGGCCCGAG
 GAGAGGCCCTGGCCTGGTGGTGCAGCAGGCTCCTGCTACTGAGGAGCAGGAGGCTG
 CCTCCTCTTCTACTCTAGTTGAAGTCACCCCTGGGGAGGTGCCTGCTGCCGAGTC
 CCAGATCCTCCCCAGAGTCCTCAGGGAGCCTCCAGCCTCCCCACTACCATGAAC
 TACCTCTGGAGCCAATCCTATGAGGACTCCAGCAACCAAGAACAGGAGGGGCCAAC
 CTTCCCTGACCTGGAGTCCGAGTTCCAAGCAGCACTCAGTAGGAAGGTGGCCGAGTT
 GTTCATTTCTGCTCCTCAAGTATCGAGCCAGGGAGCCGGTCACAAAGGCAGAAATG
 GCTGGGAGTGTGTCGGAAATTGGCAGTATTCCTTGCTGATCTCAGCAAAGCTTCCA
 GTTCCTTGAGCTGGCTTTGGCATCGAGCTGATGGAAGTGGACCCATCGGCCACTT
 GTACATTTGCCACCTGCCTGGCCTCTCAGATGGCCTGCTGGGTGACAATCAGA
 TCATGCCCAAGGCAGGCCTCCTGATAATCGCCTGCCATAATCGCAAGAGAGGGCGA
 CTGTGCCCTGAGGAGAAAATCTGGGAGGAGCTGAGTGTGTTAGAGGTGTTGAGGG
 AGGGAAGACAGTATCTGGGGATCCCAAGAAGCTGCTACCCAACATTCTGAGG
 AAAACTACCTGGAGTACCGGCAGGTCCCCGGCAGTGATCCTGCATGTTATGAATT
 CCTGTTGGGTCCAAGGGCCCTGTTGAAACCAGCTATGTGAAAGTCCTGCACCATATGGTAAA
 GATCAGTGGAGGACCTCACATTCCCTACCCACCCCTGCATGAGTGGTTTGAGAGAG
 GGGGAAGAGTGA

30

40

【化1-2】

全長、野生型、ヒトMAGEA3タンパク質をコードするコドン最適化DNA配列（配列番号3）：

ATGCCCTGGAGCAGCGGTCTCAGCATTGCAAGCCAGAGGAGGGCCTCGAGGCGAGG
 GGCGAGGCCCTCGGCTTGGTGGGGCGCAGGCTCCTGCAACCGAGGAGCAAGAGGC
 CGCATCCAGTTCCCTACCCCTGGTGAGGTGACCTGGGTGAGGTGCCGCCGCGAG
 AGCCCCGACCCGCCTCAAAGCCCCCAGGGTCCAGCTCCCTGCCACAACAATGAAC
 ACCCACTCTGGAGTCAGTCTACGAGGACAGTAGTAACCAAGAGGAGGGACCC
 CACATTCCCAGACCTGGAGTCTGAATTCCAGGCAGCATTGTCTAGAAAAGTGGCG
 TGGTGCACTTCCTGCTGCTGAAGTATCGCGCCCGAGCCAGTCACAAAGCTGAA
 GCTGGGTTCTGTCGTGGAAATTGGCAGTACTTCTCCCGTGTCTCAGTAAAGCG
 CCAGCTCCTTGCAGCTGGCTTGGTATCGAGCTGATGGAGGTGGATCCCATCGGCC
 TCTGTATATCTTGCCACATGCCCTGGCCTGAGCTACGATGCCCTGCTGGCGACA
 CAGATCATGCCAAAAGCTGGCCTGCTGATCATCGTTCTGGCTATCGCTAGAGAAG
 AGATTGCGCCCTGAAGAAAAGATCTGGAGGAAGTGCAGCTGCTGGAAAGTCTTGAG
 GGTCTGAAGACAGCATTCTGGGGATCCCAAGAAGCTGCTGACCCAGCCTCGTGC
 AGGAGAACTATCTGGAGTACCGCCAGGTTCCCGCAGCGACCCCGCTTGCTACGAG
 CCTGTGGGGCCCCAGGGCCCTGGTCGAGACATCCTACGTGAAGGTCTGCACCATAT
 GTTAAAATCAGCGCGGGCCCCATATCTTATCCGCCGCTCCACGAGTGGGTGCTCC
 GGGAGGGAGAGGAG

10

20

全長、野生型、ヒトMAGEA3の変異体のタンパク質配列（配列番号4）：

MPLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPATEEQEAASSSTLVEVTLGEVPA
 AESPD
 PPQSPQGASSLPTTMNYPLWSQSYEDSSNQEEGPSTFPDLESEFQAALSRKVA
 ELVHFLL
 LKYRAREPVTKAEMLGSSVGNWQYFFPVIFSKASSSLQLVFGIELMEVDP
 IGHLYIFATCLGL
 SYDGLLDNQIMPKAGLLIIVLAI
 IAREGDCAPEEKIWEELSVLEV
 FEGREDISILGDPKKLLTQ
 HFVQENYLEYRQVPGSDPACYEFLWGPRALVETSYVKVLHHMVKISGGPH
 ISYPPLEHEWVL
 REGEEDYKDDDDK*

30

【化1-3】

全長、野生型、ヒトMAGEA3の変異体をコードするDNA配列（配列番号5）：

ATGCCCTGGAACAGCGGAGCCAGCACTGCAAGCCGAGGAAGGCCTGGAAGCCAGA
 GGCGAAGCCCTGGGACTGGTGGGAGCCAGGCCCTGCCACAGAACAGGAAGCC
 GCCAGCAGCAGCTCCACCCCTGGTGGAAAGTGACCTGGCGAAGTGCCTGCCGCCAG
 AGCCCTGATCCCCCTCAGTCTCCTCAGGGCGCCAGCAGCCTGCCACCACCATGA
 ACTACCCCTGTGGTCCCAGAGCTACGAGGACAGCAGCAACCAGGAAGAGGAAGGCC
 GCACCTTCCCCGACCTGGAAAGCGAGTCCAGGCCCTGAGCCGGAAAGGTGGCAG
 AGCTGGTGCACTTCTGCTGCTGAAGTACAGAGGCCCGAGGCCGTGACCAAGGCCGA

10

GATGCTGGGCAGCGTGGTGGAAACTGGCAGTACTTCTTCCCCGTGATCTTCTCCAAG
 GCCAGCAGCTCCCTGCAGCTGGTGTTCGGCATCGAGCTGATGGAAGTGGACCCCATCG
 GCCACCTGTACATCTCGCCACCTGTCTGGCCTGAGCTACGACGGCCTGCTGGCGA
 CAACCAGATCATGCCCAAGGCCGGCTGCTGATCATCGTGTGGCCATCATTGCCCGC
 GAGGGCGACTGCGCCCTGAGGAAAAGATCTGGGAGGAAGCTGAGCGTGCTGGAAGTG
 TTCGAGGGCAGAGAGGACAGCATCCTGGCGACCCCAAGAACGCTGCTGACCCAGCAC
 TTCGTGCAGGAAAACCTGGAATACCGCCAGGTGCCCCGGAGCGACCCCGCTGTT
 ACGAGTTCTGTGGGCCCCAGGGCTCTGGTGGAAACCAGCTACGTGAAGGTGCTGCA
 CCACATGGTAAAATCAGCGCGGACCCACATCAGCTACCCCCACTGCACGAGTGG
 GTGCTGAGAGAGGGCGAAGAGGAACATAAGGACGACGACGACAATGA

20

HPV E6/E7融合タンパク質のタンパク質配列（配列番号7）：

MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIIILECVYCKQQLLRREVYDFAFRDLCIVYR
 DGNPYAVDKLKFKYSKISEYRHYCYSVYGTTLQQYQNKPLCDLLIRINQKPLCPEEKQRHLDK
 KQRFHNIRGRWTGRCMSCCRSSRTRRETQLGGGGAAAYMARFEDPTRRPYKLPDLCTEL
 NTSLQDIEITCVYCKTVLELTEVFEFAFKDLFVYRDSIPHAAHKIDFYSRIRELRHYSDSVY
 GDTLEKLTNTGLYNLLIRLRQKPLNPAEKLRLNEKRRFHNIAGHYRGQCHSCCNRARQERL
 QRRRETQVGGGGAAYMHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYQLNDSSEEDEIDGPAGQAEP
 DRAHYNIVTFCCCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVPICSQKPGGGGGAAYMHGP
 KATLQDIVLHEPQNEIPV DLLQLSDSEEENDEIDGVNQHQLPARRAEPQRHTMLCMCKCE
 ARIKLVVESSADDLRAFQQQLFLNTLSFVPWCASQQ*

30

【化1-4】

HPV E6/E7融合タンパク質のDNA配列（配列番号8）：

ATGCATCAGAAGCGAACTGCTATGTTTCAAGGACCTCAGGAGCGGCCACGCAAACACTGC
 CTCAGCTGTGCACCGAACTGCAGACAACTATCCACGACATCATTCTGGAATGCGTGTAC
 TGTAAACCAGCACCTGCTGAGGAGAGAGGTCTATGACTTCGCTTTCGCGATCTGTGCAT
 CGTGTACCGAGACGGAAACCCATATGCAGTCGATAAGCTGAAGTTCTACAGCAAGATCT
 CCGAATAACAGGCATTACTGTTACAGCGTGTACGGGACCACACTGGAGCAGCAGTATAAC
 AAGCCCCTGTGCGACCTGCTGATCAGAATTAATCAGAAGCCCCTGTGCCCTGAGGAAAAA
 ACAGAGGCACCTGGATAAGAAACAGAGATTCATAACATCCGAGGACGATGGACCGGG
 CGGTGCATGTCCTGCTGTAGAAGCTCCCGGACTCGACGAGAGACCCAGCTGGCGGA
 GGAGGAGGAGCAGCTTACATGGCACGATTGAGGACCCCTACCCGAAGGCCATATAAGC
 TGCCCGACCTGTGCACAGAACTGAATACTTCTCTGAGGACATCGAGATTACATGCGTG
 TACTGTAAAACCGTCCTGGAGCTGACAGAAGTGTGAGTTGCTTCAAGGACCTGTT
 TGTGGTCTACCGGGATTCAATCCCTCACCGACGCCATAAAATCGACTTCTACAGCAGGA
 TCAGGGAACTGCGCCACTACTCCGACAGCGTGTACGGGATACTGGAGAAGCTGAC
 AAACACTGGCCTGTACAATCTGCTGATCCGACTGCGACAGAAGCCACTGAACCCAGCC
 GAAAAACTGAGACACCTGAACGAGAAGAGACGGTTCACAAATATTGAGGCCATTATAG
 GGGACAGTGCCATAGTTGCTGTAATCGAGCCAGGCAGGAAAGACTGCAGCGCCGAAG
 GGAGACTCAAGTCGGCGAGGAGGAGGACTGCATACATGCACGGCGACACCCCCAC
 ACTGCATGAATATATGCTGGATCTGCAGCCTGAGACTACCGACCTGTACAGCTGAACG
 ATTCTAGTGAGGAAGAGGGACGAAATCGACGGACCAGCAGGACAGGCAGAGCCTGACC
 GGGCCCACATAATATTGACATTCTGCTGTAAGTGCAGTCTACTCTGCGGCTGTGC
 GTGCAGAGTACTCATGTCGACATCCGCACCCCTGGAGGATCTGCTGATGGGACTCTGG
 GCATCGTCCAATTGTAGCCAGAAACAGGCGGGCGGCGAGCAGCTTACATGCA
 CGGACCCAAGGCTACCCCTGCAGGACATCGTGCATCTGGAACCTCAGAATGAGATT
 CCAGTCGACCTGCTGCAGCTGAGTGATTCAAAGAGGAAACGACGAGATCGACGGCG
 TGAATCACCAGCATCTGCCTGCTAGACGGCAGAGCCACAGCGACACACAATGCTGTG
 CATGTGCTGTAAGTGTGAAGCCAGGATCAAAGCTGGTGGTCAGTCAAGCGCCGACGAT
 CTGCGCGCCTTCCAGCAGCTGTTCTGAATACTCTGTCATTGTCATTGTCATTGTC
 CCAGCAGTGA

10

20

30

h u S T E A P タンパク質のタンパク質配列（配列番号10）：

MESRKDITNQEELWKMKP RRNLEEDDYLHKDTGETSMLKRPVLLHLHQTAHAD FDCPSEL
 QHTQELFPQWHLPIKIAIIASLTFLYTLREVIHPLATSHQQYFYKIPILVINKVLPMSITLLAL
 VYLPGVIAIIVQLHNGTKYKKFPHWL DKWMLTRKQFG LLSFFF AVLHAIYSL SYPMRRSYRY
 KLLNWAYQQVQQNKEDAWIEHDVWRMEIYVSLGIVGLAILALLAVTSIPS VSDSLT WREFHYI
 QSKLGIVSLLGTIHAFWNKWDIKQFVWYTPPTFMIAVFLPIVVLIFKSILFLPCLRKKILKIR
 HGWEDVTKINKTEICSQLKL*

40

【化1-5】

h u S T E A P タンパク質のDNA配列（配列番号11）：

ATGGAATCACGGAAGGACATCACTAATCAGGAGGAACGTGGAAAATGAAGCCAAGAA
 GGAATCTGGAAGAGGGACGACTATCTGCACAAGGACACCGGCGAAACAAGTATGCTGAA
 ACGACCAGTGCTGCTGCACCTGCATCAGACTGCTCACGCAGACGAGTTGATTGCC
 TCTGAAC TGAGCACACCCAGGAGCTTCCCACAGTGGCATCTGCCCATCAAGATTGC
 CGCTATCATTGCTTCACTGACATTCTGTACACTCTGCTGAGAGAAGTGTATCCACCC
 GGCCACCAGCCATCAGCAGTACTTCTATAAGATCCCTATCCTGGTCATCAACAAGGTCC
 TGCCAATGGTGAGCATCACACTGCTGGCCCTGGTCTACCTGCCTGGAGTGATCGCAGC
 CATTGTCCAGCTGCACAATGGGACAAAGTATAAGAAATTCCACATTGGCTGGATAAGT
 GGATGCTGACTAGGAAACAGTTCGGACTGCTGCTCTTTCGCCGTGCTGCACGCT
 ATCTACAGCCTGTCCTATCCCATGAGGAGGAGCTACCGGTATAAGCTGCTGAACGG
 CTTACCAAGCAGGTGCAGCAGAACAAAGGAGGAGCAGTGGATTGAAACATGACGTGTGGCG
 CATGGAAATCTACGTGAGCCTGGCATTGTCGGACTGGCCATCCTGGCTCTGCTGGCA
 GTGACCAAGTATCCCTCTGTCAGTCACTGACATGGAGAGAGTTCACTACATTCA
 GAGCAAGCTGGGATCGTGTCCCTGCTGCTGGCACCATCCATGCACTGATTGGCC
 TGGAAACAAGTGGATCGATATCAAGCAGTTCGTGTGGTATACTCCCCTACCTTATGATT
 GCCGTCTTCCTGCCCATCGTGGCCTGATCTTCAAGTCCATCCTGTTCTGCCCTGTCT
 GCGGAAGAAAATCCTGAAAATTGGCACGGATGGGAGGATGTCACCAAAATCAATAAGA
 CTGAAATCTGTAGCCAGCTGAAGCTTAA

10

20

30

N Y E S O 1 M A R タンパク質のタンパク質配列（配列番号13）：

MQAEGRGTGGSTGDADPGGGPGIPDGPGGNAGGPGEAGATGGRGPRGAGAARASGPG
 GGAPRGPHGGAASGLNGCCRCGARGPESRLLEFYLAMPATPMEAELARRSLAQDAPPLP
 VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHRQLQLSISSCLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR*

40

N Y E S O 1 M A R のDNA配列（配列番号14）：

ATGCAGGCCAGGGCAGAGGCACAGGGCGATCTACAGGCCGACGCCGATGGCCCTGGC
 GGCCCTGGAATTCTGACGGACCTGGCGCAATGCCGGCGACCCGGAGAACGCTGGC
 GCCACAGGCCAGAGAGGACCTAGAGGCCGCTGGCGCCGCTAGAGCTCTGGACCCAGGC
 GGAGGCCCTAGAGGACCTCATGGCGAGGCCGCTCCGGCCTGAACGGCTGTTGC
 AGATGTGGAGCCAGAGGCCAGAGGCCGCTGGAAATTCTACCTGCCATGCCCT
 TCGCCACCCCCATGGAAGCCGAGCTGGCCAGACGGTCCCTGGCCAGGATGCTCC
 CTCTGCCTGTGCCCGCGTGCTGAAAGAATTACCGTGTCCGGCAACATCCTGAC
 CATCCGGCTGACTGCCGCCGACCAAGACAGCAGCTCCAGCTGTCTATCAGCTCCTGCC
 CAGCAGCTGAGCCTGCTGATGTGGATCACCCAGTGCTTCTGCCGTGTTCTGGCTC
 AGCCCCCCCAGCGGCCAGAGAAGATGA

40

【化1-6】

E B D N A 1のタンパク質配列（配列番号16）：

MPVGQADYFEYHQEGGPDPGEPMPPGAIEQGPADDPGEGPSTGPRGQGDGGRRKKGG
WFGKHRGQGGSNQKFENIADGLRTLLARCHVERTTDEGTWAGVFVYGGSKTSLYNLR
GISLAIPQCRLTPLSRLPFGMAPGPGPQGPLRESIVCYFIVFLQTHIFAEGLKDAIKDLVMPK
PAPTCNIKATVCSFDDGVDLPPWFPPMVEGAAAEGDDGDDGDEGGDGDEEGEQE*

E B D N A 1のD N A配列（配列番号17）：

ATGCCAGTCGGCCAGGCTGATTACTTGAATACCAACCAGGAGGGGGGACCAGACGGAG
AACCAGACATGCCACCAGGAGCCATTGAACAGGGACCAGCAGACGATCCTGGAGAGG
GACCATCAACTGGACCCCGAGGACAGGGGGACGGCGGAAGGAGAAAGAAAGGGGAT
GGTCGAAAGCACCAGGGACAGGGAGGGAGCAACCAGAAATTGAAAATATCGCTGA
CGGCCTGCGAACACTGCTGGCAAGGTGCCATGTGGAGAGAACACAGATGAAGGCACA
TGGTCGCCGGAGTGGTCTACGGCGGAAGCAAGACTTCCCTGTATAACCTGCGGC
GCGGCATCTCTCTGGCCATTCCACAGTGCCGGCTGACCCCTCTGAGTCGCCTGCCATT
CGGGATGGCTCCTGGACCAGGACCACAGCCTGGACCCTGAGGGAGTCCATCGTGTG
CTACTTCATTGTCTTCTGCAGACACACATCTTGCGAAGGCCTGAAGGACGCCATCA
AGGACCTGGTCATGCCAACGCTGCACCAACTTGAATATCAAGGCCACCGTGTGCAG
TTTCGACGATGGCGTGGACCTGCCCCCTGGTTCCACCTATGGTGGAGGGAGCCGCT
GCAGAAGGGACGATGGCGATGACGGGACGATGGGATGAAGGCAGGGACGGCGA
TGAGGGAGAAGAGGGCAGGAATAA

10

20

【図2】

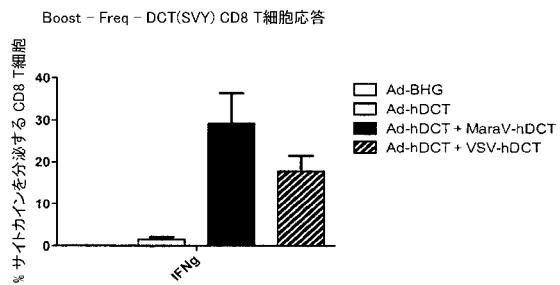


Figure 2

【図4】

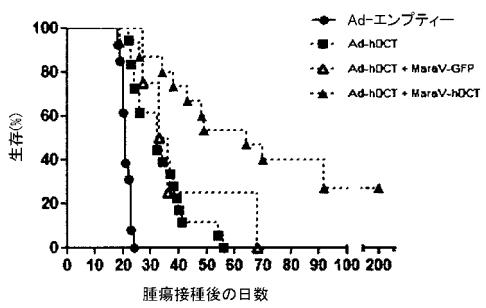


Figure 4

【図5】

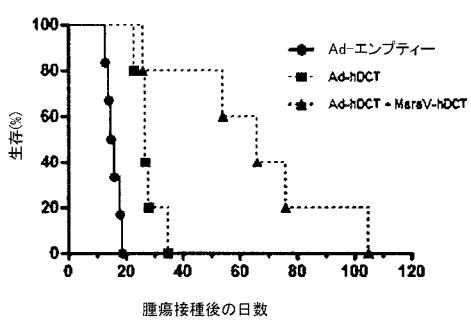


Figure 5

【図7】

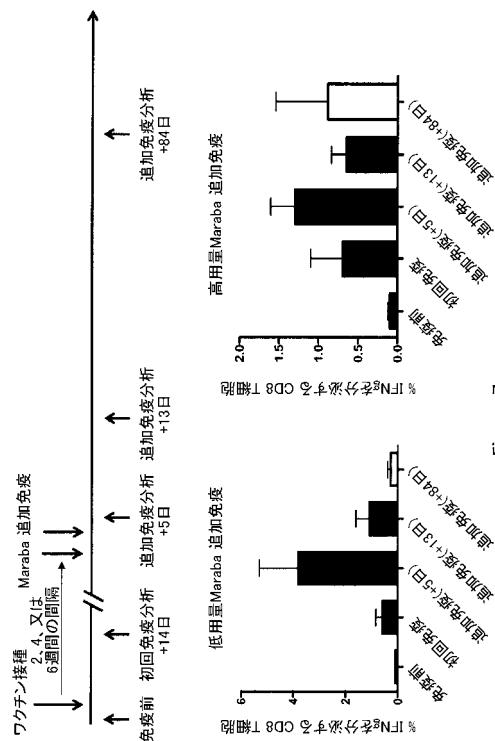
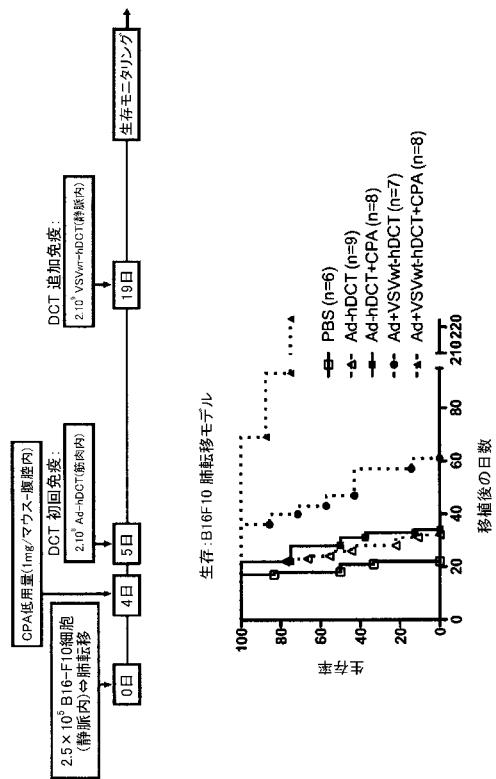


Figure 7

【図 9】



【図 1】

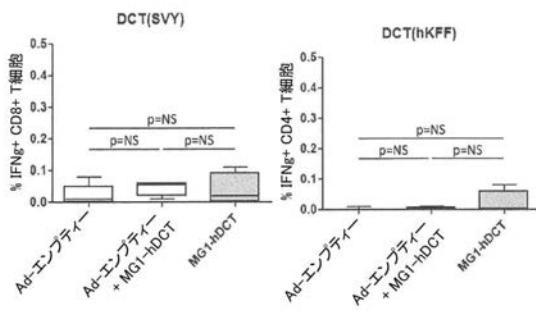


Figure 1A

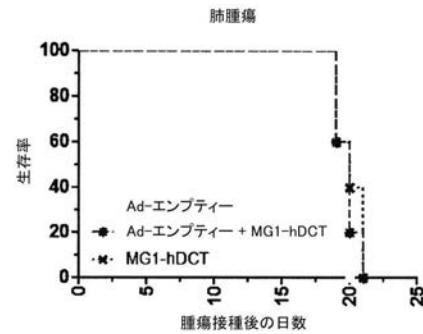
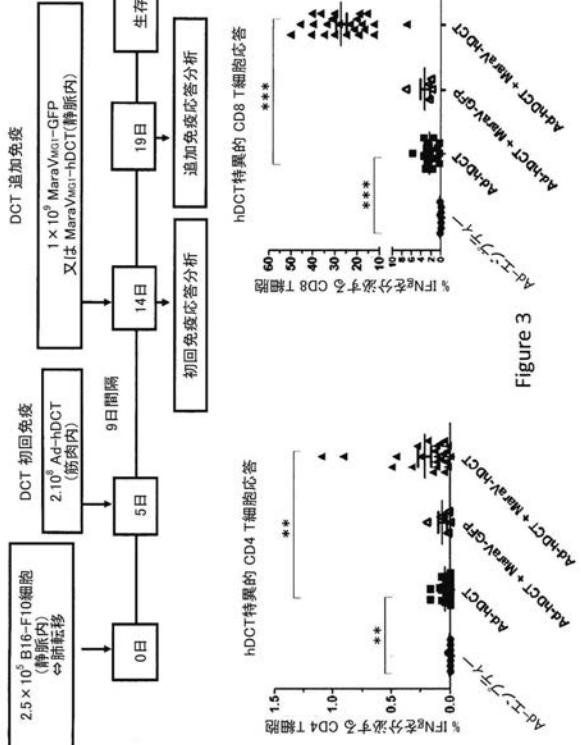


Figure 1B

【図 3】



【図 6】

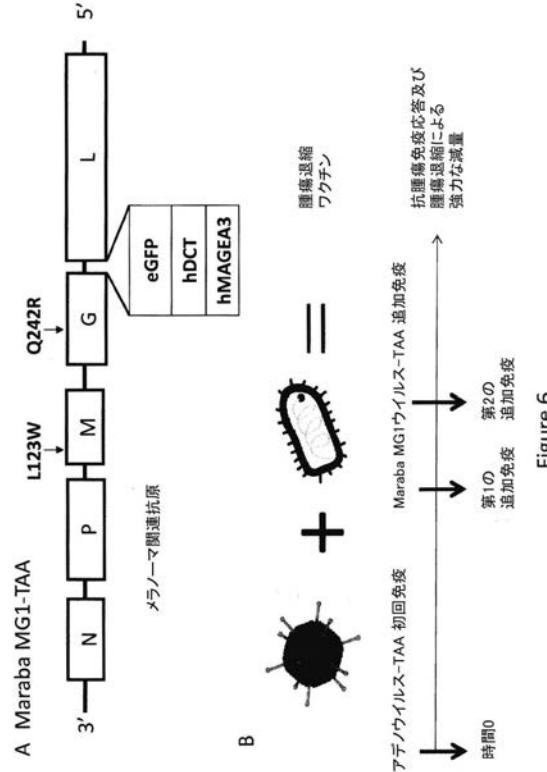


Figure 6

【図8】

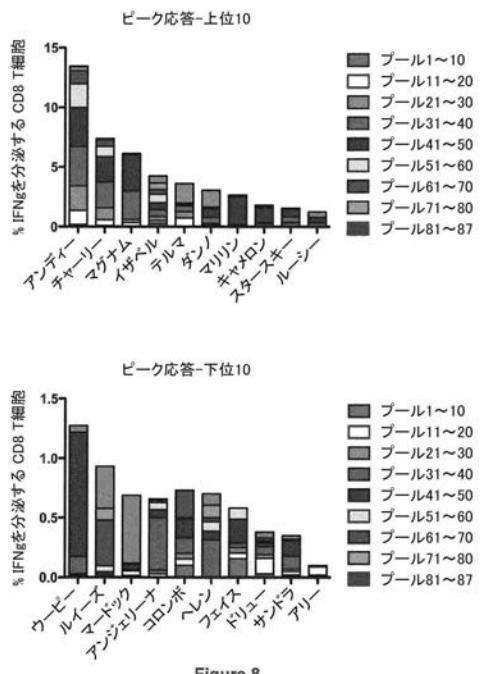


Figure 8

【配列表】

2016513115000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2014/050118												
<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C12N 7/01</i> (2006.01), <i>A61K 35/76</i> (2006.01), <i>A61K 39/00</i> (2006.01), <i>A61P 35/00</i> (2006.01), <i>A61P 37/04</i> (2006.01), <i>C07K 14/145</i> (2006.01) (more IPCs on the last page)</p>														
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: <i>C12N 7/01</i> (2006.01), <i>A61K 35/76</i> (2006.01), <i>A61K 39/00</i> (2006.01), <i>A61P 35/00</i> (2006.01), <i>A61P 37/04</i> (2006.01), <i>C07K 14/145</i> (2006.01) (more IPCs on the last page)</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p>														
<p>Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Canadian Patent Database, TotalPatent, Pubmed, Google Scholar, Google Keywords: Maraba, oncolytic, MAGE, HPV, STEAP1, NY-ESO-1, prime-boost, antigen</p>														
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">POL, J. ET AL.: "Use of oncolytic rhabdoviruses as potent tumour vaccine boosters". Abstract 145, Association for Cancer Immunotherapy (CIMT) 10th Annual Meeting, May 23-25, 2012. Retrieved from the internet: <URL:http://www.cimt.eu/cms/diskfiles/download/70/280f0c049fbe31b61c22ff76a844cf5/CIMT_Abstract_Book_2012.pdf> See entire document</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-23, 35-37, 49-51, 63-65</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">P, X</td> <td style="padding: 2px;">POL, J.G. ET AL.: "Maraba virus as a potent oncolytic vaccine vector". Molecular Therapy, Published online 10-December-2013, vol. 22(2), pp. 420-9. ISSN 1525-0016 See entire document</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-23, 35-37, 49-51, 63-65</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">WO 2010/105347 A1 (LICHTY, B. ET AL.) 23 September 2010 See entire document</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-65</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	POL, J. ET AL.: "Use of oncolytic rhabdoviruses as potent tumour vaccine boosters". Abstract 145, Association for Cancer Immunotherapy (CIMT) 10 th Annual Meeting, May 23-25, 2012. Retrieved from the internet: <URL: http://www.cimt.eu/cms/diskfiles/download/70/280f0c049fbe31b61c22ff76a844cf5/CIMT_Abstract_Book_2012.pdf > See entire document	1-23, 35-37, 49-51, 63-65	P, X	POL, J.G. ET AL.: "Maraba virus as a potent oncolytic vaccine vector". Molecular Therapy, Published online 10-December-2013, vol. 22(2), pp. 420-9. ISSN 1525-0016 See entire document	1-23, 35-37, 49-51, 63-65	A	WO 2010/105347 A1 (LICHTY, B. ET AL.) 23 September 2010 See entire document	1-65
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	POL, J. ET AL.: "Use of oncolytic rhabdoviruses as potent tumour vaccine boosters". Abstract 145, Association for Cancer Immunotherapy (CIMT) 10 th Annual Meeting, May 23-25, 2012. Retrieved from the internet: <URL: http://www.cimt.eu/cms/diskfiles/download/70/280f0c049fbe31b61c22ff76a844cf5/CIMT_Abstract_Book_2012.pdf > See entire document	1-23, 35-37, 49-51, 63-65												
P, X	POL, J.G. ET AL.: "Maraba virus as a potent oncolytic vaccine vector". Molecular Therapy, Published online 10-December-2013, vol. 22(2), pp. 420-9. ISSN 1525-0016 See entire document	1-23, 35-37, 49-51, 63-65												
A	WO 2010/105347 A1 (LICHTY, B. ET AL.) 23 September 2010 See entire document	1-65												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patient family annex.												
<table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%; padding: 2px;"> * "A" Special categories of cited documents: "E" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "L" earlier application or patent but published on or after the international filing date "O" 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) "P" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "T" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 10%; padding: 2px;"> "T" "X" "Y" "&" </td> <td style="width: 60%; padding: 2px;"> 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 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 document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* "A" Special categories of cited documents: "E" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "L" earlier application or patent but published on or after the international filing date "O" 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) "P" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "T" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" "X" "Y" "&"	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 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 document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art document member of the same patent family									
* "A" Special categories of cited documents: "E" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "L" earlier application or patent but published on or after the international filing date "O" 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) "P" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "T" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" "X" "Y" "&"	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 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 document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art document member of the same patent family												
Date of the actual completion of the international search 05 June 2014 (05-06-2014)		Date of mailing of the international search report 11 June 2014 (11-06-2014)												
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage L, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476		Authorized officer Stephen Misener (819) 934-4548												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2014/050118

C07K 14/47 (2006.01), *C07K 19/00* (2006.01), *C12N 15/13* (2010.01), *C12N 15/12* (2006.01),
C12N 15/47 (2006.01), *C12N 15/62* (2006.01), *C12N 15/86* (2006.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2014/050118
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/070440 A2 (BELL, J.C. ET AL.) 16 June 2011 See entire document	1-65

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2014/050118
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)		
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. <input type="checkbox"/> Claim 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. <input type="checkbox"/> Claim 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)		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: See supplemental sheet</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. <input checked="" type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. <input type="checkbox"/> 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 claim Nos.: 4. <input type="checkbox"/> 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 claim Nos.: 		
<p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> 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.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2014/050118

The specification is directed to oncolytic Maraba MG1 vaccine vectors comprising antigenic tumour proteins. The claims define 4 distinct Maraba MG1 viral particle constructs each encoding a different tumour antigen. The only technical feature in common is the use of Maraba MG1 as a vaccine vector. Such use was known in the prior art from POL, J. ET AL.: "Use of oncolytic rhabdoviruses as potent tumour vaccine boosters", Abstract 145, Association for Cancer Immunotherapy (CIMT) 10th Annual Meeting, May 23-25, 2012. The claims thus fail *a posteriori* to meet the criteria for unity of invention and define 4 separate inventions as follows:

Invention 1: Claims 1-23 as directed to an isolated Maraba MG1 viral particle having a genome that encodes a protein comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 corresponding to MAGE A3, or a variant thereof, and kits comprising same for use in inducing an immune response in a mammal.

Invention 2: Claims 24-37 as directed to an isolated Maraba MG1 viral particle having a genome that encodes a protein comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 corresponding to HPV E6/E7, or a variant thereof, and kits comprising same for use in inducing an immune response in a mammal.

Invention 3: Claims 38-51 as directed to an isolated Maraba MG1 viral particle having a genome that encodes a protein comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 corresponding to huSTEAP1, or a variant thereof, and kits comprising same for use in inducing an immune response in a mammal.

Invention 4: Claims 52-65 as directed to an isolated Maraba MG1 viral particle having a genome that encodes a protein comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 corresponding to NY-ESO-1, or a variant thereof, and kits comprising same for use in inducing an immune response in a mammal.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members			International application No. PCT/CA2014/050118
Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO2010105347A1	23 September 2010 (23-09-2010)	WO2010105347A1 CA2755790A1 CN102448487A EP2408473A1 EP2408473A4 US2012014990A1	23 September 2010 (23-09-2010) 23 September 2010 (23-09-2010) 09 May 2012 (09-05-2012) 25 January 2012 (25-01-2012) 13 February 2013 (13-02-2013) 19 January 2012 (19-01-2012)
WO2011070440A2	16 June 2011 (16-06-2011)	WO2011070440A2 WO2011070440A3 AU2010329551A1 CA2836117A1 CN102858959A EP2510088A2 EP2510088A4 IL220221D0 JP2013513378A MX2012006508A US2012275999A1	16 June 2011 (16-06-2011) 01 September 2011 (01-09-2011) 02 August 2012 (02-08-2012) 16 June 2011 (16-06-2011) 02 January 2013 (02-01-2013) 17 October 2012 (17-10-2012) 18 September 2013 (18-09-2013) 31 July 2012 (31-07-2012) 22 April 2013 (22-04-2013) 01 October 2012 (01-10-2012) 01 November 2012 (01-11-2012)

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 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 39/235 (2006.01)	A 6 1 K 39/235	

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,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,R,S,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,H,R,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,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,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 513212785

マックマスター ユニヴァーシティ
カナダ国、エル8エス 4エル8 オンタリオ州、ハミルトン、メイン ストリート ウエスト
1 2 8 0

(74) 代理人 100107456

弁理士 池田 成人

(74) 代理人 100162352

弁理士 酒巻 順一郎

(74) 代理人 100123995

弁理士 野田 雅一

(74) 代理人 100148596

弁理士 山口 和弘

(72) 発明者 ストドル, デイヴィッド, エフ

カナダ, オンタリオ ケー1ジー 6ピ-7, オタワ, グレイト オーク プライベート
1 7

(72) 発明者 ベル, ジョン, キャメロン

カナダ, オンタリオ ケー1ジー 0ケ-8, オタワ, ノックス クレセント 2 4 8

(72) 発明者 リクティー, ブライアン

カナダ, オンタリオ エヌ3ティー 5エル9, ブラントフォード, ハイウェイ 5 4 2
5 4

(72) 発明者 ポル, ジョナサン

フランス, パリ, 7 5 0 1 5, ルー カスタニヤリー 1 3, アパルトマン ピ-2

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA01 CA12 DA20 EA04 GA11

4B065 AA95X AB01 BA02 CA45

4C085 AA04 BA51 BA77 CC08 EE03

4C087 AA01 AA02 BC83 MA02 NA14 ZB26 ZC75