

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-533871

(P2023-533871A)

(43)公表日 令和5年8月4日(2023.8.4)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z Z N A 4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/31	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/33 (2006.01)	C 1 2 N 15/33	4 H 0 4 5
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全73頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2023-503113(P2023-503113)
 (86)(22)出願日 令和3年7月14日(2021.7.14)
 (85)翻訳文提出日 令和5年3月14日(2023.3.14)
 (86)国際出願番号 PCT/EP2021/069582
 (87)国際公開番号 WO2022/013277
 (87)国際公開日 令和4年1月20日(2022.1.20)
 (31)優先権主張番号 20185743.0
 (32)優先日 令和2年7月14日(2020.7.14)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁(EP)
 (31)優先権主張番号 20207526.3
 (32)優先日 令和2年11月13日(2020.11.13)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁(EP)
 (31)優先権主張番号 21171319.3

最終頁に続く

(71)出願人 521293464
 エヴァクシオン・バイオテック・アクテ
 イエセルスカブ
 デンマーク 2 9 7 0 ヘアスホルム、デー
 エル・ニアゴーズ・ヴァイ 5 エフ
 (74)代理人 100145403
 弁理士 山尾 憲人
 (74)代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史
 (74)代理人 100157956
 弁理士 稲井 史生
 (74)代理人 100170520
 弁理士 笹倉 真奈美
 (74)代理人 100221545
 弁理士 白江 雄介

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫療法のためのA P C 標的化単位

(57)【要約】

本発明は、免疫療法およびワクチン、例えばがん免疫療法、または細菌もしくはウイルス感染症などの微生物による感染症のためのワクチンに関する。特に、本発明は、特異的な融合ポリペプチドまたはそのような融合ポリペプチドをコードする核酸を投与する事による、がんまたは微生物による感染症を予防または処置するための方法および物に関する。

【選択図】 図 1

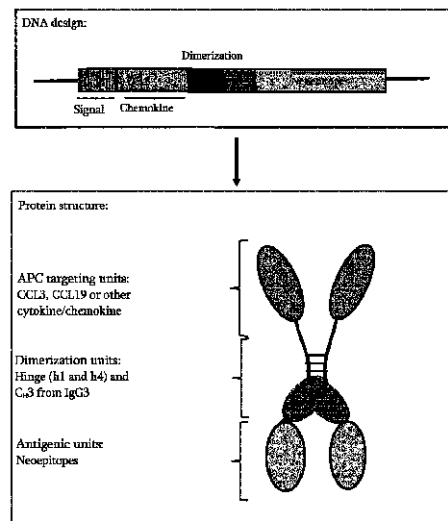


Fig. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

i) 少なくとも 1 つの抗原単位；
 i i) 樹状細胞を標的とする、少なくとも 1 つの抗原提示細胞 (A P C) 標的化単位；
 i i i) 任意選択で多量体化単位、例えば二量体化単位であって、2 つ以上の抗原単位および 2 つ以上の抗原提示細胞 (A P C) 標的化単位を含むように該融合ポリペプチドの多量体化をもたらす多量体化単位；
 を含む、融合ポリペプチド。

【請求項 2】

抗原単位が、患者からの腫瘍細胞のネオエピトープである少なくとも 1 つのエピトープ
 のアミノ酸配列からなる、またはそれを含む、請求項 1 に記載の融合ポリペプチド。 10

【請求項 3】

抗原単位が患者からの腫瘍細胞のネオエピトープを含まない、請求項 1 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 4】

抗原単位が細菌またはウイルス抗原である、例えば少なくとも 1 つの細菌またはウイルスエピトープのアミノ酸配列を含む抗原単位である、請求項 1 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 5】

A P C 標的化単位が成熟樹状細胞 (m D C) を標的とする、請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項
 に記載の融合ポリペプチド。 20

【請求項 6】

A P C 標的化単位が、例えばヒト型の、C C L 1 9 および C C L 2 1 から選択される、請求項 1 ~ 5 の何れか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 7】

A P C 標的化単位が受容体 C C R 7 を標的とする、請求項 1 ~ 6 の何れか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 8】

A P C 標的化単位が、例えばヒト型の、C C L 3、C C L 4、C C L 5、C C L 2 0、
 または X C L 1 から選択される、請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載の融合ポリペプチド。 30

【請求項 9】

A P C 標的化単位が未成熟樹状細胞 (i m D C) を標的とする、請求項 8 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 10】

A P C 標的化単位が、C C R 1、C C R 3、C C R 5、C C R 6、および X C R 1 から
 選択される受容体を標的とする、請求項 8 または 9 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 11】

A P C 標的化単位が、抗原提示細胞上の標的表面分子、例えば C L E C 9 A または D E C 2 0 5 に対する特異性を持つ抗体結合領域、例えば抗 - C L E C 9 A、抗 - D E C 2 0 5、
 またはその変異体、例えば抗 - C L E C 9 A F v、抗 - D E C 2 0 5 F v からなる、
 またはそれを含む、請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載の融合ポリペプチド。 40

【請求項 12】

A P C 標的化単位がリガンド、例えば C E L C 9 ペプチドリガンドからなる、またはそれ
 を含む、請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 13】

A P C 標的化単位が、X c l 1、G M - C S F、抗 - D E C - 2 0 5 F v、抗 - C L E C 9 F v、
 および C L E C 9 リガンドから選択される、請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に
 記載の融合ポリペプチド。

【請求項 14】

A P C 標的化単位が、サイトカイン、例えば G M - C S F、例えば C D 1 1 6 に結合す 50

る A P C 標的化単位である、請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 15】

抗原単位が、リンカー、例えば G S リンカー、例えばアミノ酸配列 G S G S G S G S G S (配列番号 13) を持つリンカー、または免疫グロブリン分子 (I g)、例えば I g G に由来するリンカー、例えば鎖間共有結合の形成を介して多量体化に寄与する、および/または非共有結合もしくは相互作用の形成を介して多量体化に寄与するリンカー、を介して標的化単位に連結される、前述の請求項の何れか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 16】

リンカーが、ヒンジ領域、例えば I g、例えば I g G 由来ヒンジ領域、d H L X タンパク質、h M H D 2、カラーゲン三量体化ドメイン、p 5 3 合成タンパク質、またはフィブリチン T 4 三量体化ドメインである、またはそれを含む、およびリンカーが 1) 鎖間共有結合、例えばジスルフィド架橋の形成を介して、または 2) 非共有相互作用を介して多量体化に寄与する、請求項 15 に記載の融合ポリペプチド。

10

【請求項 17】

リンカーが、カルボキシル末端 C ドメイン (C H 3 ドメイン)、例えば I g のカルボキシル末端 C ドメイン (C 3 ドメイン)、または該 C ドメインに実質的に相同である配列、例えば I g G 3 の C H 3 ドメインを含む、請求項 15 ~ 16 の何れか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 18】

ヒンジおよび C H 3 ドメインがアミノ酸配列 G G G S S (配列番号 66) によって、例えばアミノ酸 G G G S S の 3 重配列 (配列番号 72) によって連結されている、またはここでヒンジおよび C H 3 ドメインがアミノ酸配列 G G G S S G G G S G (配列番号 70) を介して連結されている、請求項 17 に記載の融合ポリペプチド。

20

【請求項 19】

リンカーが、疎水性相互作用を介して、例えば C H 3 ドメインを介して多量体化に参加する、二量体化モチーフまたは任意のその他の多量体化ドメインを含む、請求項 15 ~ 18 の何れか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 20】

リンカーが I g G、例えば I g G 2 または I g G 3 に由来する h 1 + h 4 または h 4 を含むヒンジ領域を含む、請求項 15 ~ 19 の何れか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

30

【請求項 21】

少なくとも 1 つの抗原単位が、少なくともまたは約 5、例えば少なくともまたは約 10、少なくともまたは約 15、少なくともまたは約 20、少なくともまたは約 25、および少なくともまたは約 30 個のエピトープからなる、またはそれを含む、前述の請求項の何れか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 22】

少なくとも 1 つの抗原単位が、腫瘍細胞において同定されるエピトープ間の平均以上、例えば上位四分の一の M H C 結合安定性を示す少なくとも 1 つのエピトープを含む、前述の請求項の何れか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 23】

少なくとも 1 つの抗原単位が、細菌またはウイルス抗原であって、例えば各細菌またはウイルス抗原間の平均以上、例えば上位四分の一の M H C 結合安定性を示す細菌またはウイルス抗原である、前述の請求項の何れか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

40

【請求項 24】

抗原単位が、 - コロナウイルス由来の (特にスパイクタンパク質由来)、例えば S A R S コロナウイルス由来の (特にスパイクタンパク質由来) および好ましくは S A R S - C o V - 2 由来の、特に S A R S - C o V - 2 スパイクタンパク質由来のアミノ酸配列を含む、請求項 23 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 25】

アミノ酸配列が、 S A R S - C o V - 2 スパイクタンパク質からのリボソーム結合タン

50

パク質 (R B D) を含む、または構成する、請求項 2 4 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 2 6】

アミノ酸配列が、NCBI 参照配列番号：YP__009724390 の残基 319 ~ 541 からなる、もしくはそれを含む、またはそれに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する、例えば、それに対して少なくとも 85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる、もしくはそれを含む、請求項 2 5 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 2 7】

多量体化単位、例えば二量体化単位が、二量体、三量体、四量体、五量体またはより高次の多量体の形成を可能にする、前述の請求項の何れか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

10

【請求項 2 8】

請求項 1 ~ 2 6 の何れか 1 項において規定される融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、発現ベクター。

【請求項 2 9】

ヌクレオチド配列が cDNA 配列である、請求項 2 8 に記載の発現ベクター。

【請求項 3 0】

ヌクレオチド配列が、請求項 1 ~ 2 7 の何れか 1 項において規定される融合ポリペプチドをコードする RNA 配列である、請求項 2 8 に記載の発現ベクター。

【請求項 3 1】

配列が、少なくとも 1 つの免疫刺激配列 (ISS) をさらに含むかまたはコードする、請求項 2 8 ~ 3 0 の何れか 1 項に記載の発現ベクター。

20

【請求項 3 2】

ISS が、少なくとも 1 つの CpG モチーフを含むオリゴデオキシリボヌクレオチド (ODN) であり、ここで ODN が好ましくはホスホロチオエート基を含む、請求項 3 1 に記載の発現ベクター。

【請求項 3 3】

ISS がオリゴリボヌクレオチドであるかまたはそれを含む、請求項 3 1 に記載の発現ベクター。

【請求項 3 4】

i) 少なくとも 1 つの抗原単位をコードするヌクレオチド配列を含む第 1 の発現構築物、および ii) 樹状細胞を標的とする少なくとも 1 つの抗原提示細胞 (APC) 標的化単位をコードするヌクレオチド配列を含む第 2 の発現構築物を含む、少なくとも 2 つの発現構築物の系。

30

【請求項 3 5】

第 1 の発現構築物が、請求項 2 ~ 4 および 2 1 ~ 2 6 の何れか 1 項において規定される少なくとも 1 つの抗原単位をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 に記載の少なくとも 2 つの発現構築物の系。

【請求項 3 6】

第 2 の発現構築物が、請求項 5 ~ 1 4 の何れか 1 項において規定される樹状細胞を標的とする少なくとも 1 つの抗原提示細胞 (APC) 標的化単位をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 ~ 3 5 の何れか 1 項に記載の少なくとも 2 つの発現構築物の系。

40

【請求項 3 7】

少なくとも 1 つの抗原単位をコードするヌクレオチド配列を含む第 1 の発現構築物が、該少なくとも 1 つの抗原単位の多量体化をもたらす多量体化単位、例えば二量体化単位をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 3 4 ~ 3 7 の何れか 1 項に記載の少なくとも 2 つの発現構築物の系。

【請求項 3 8】

少なくとも 2 つの発現構築物が、同一の発現ベクター上で発現される、例えば 2 つの異なるプロモーターの制御下において発現される、請求項 3 4 ~ 3 7 の何れか 1 項に記載の少なくとも 2 つの発現構築物の系。

50

【請求項 39】

少なくとも2つの発現構築物が、少なくとも2つの異なるベクターによって発現される、請求項34～37の何れか1項に記載の少なくとも2つの発現構築物の系。

【請求項 40】

特異的な疾患抗原単位、例えば患者において通常の細胞によって発現されないエピトープまたは患者にとって外来のものであるエピトープを示す事によって特徴づけられる疾患の処置のための方法であって、ここで該方法は、請求項1～27の何れか1項に規定される融合ポリペプチド、請求項28～33の何れか1項に規定される少なくとも1つの発現ベクター、または請求項34～39の何れか1項に記載の少なくとも2つの発現構築物の系を含む免疫原的有効量の組成物を投与し、それによって患者の体細胞が発現ベクター内に含まれるヌクレオチド配列を発現するようになる工程を含み、およびここで該方法は、任意選択で、薬学的に許容できる担体、希釈剤または賦形剤を投与する工程をさらに含む、方法。

10

【請求項 41】

哺乳類患者において、腫瘍、例えば悪性腫瘍を処置するための方法、または係る腫瘍に対する治療的または改善的な免疫応答を誘導する方法であって、ここで腫瘍は患者の非腫瘍性細胞が示さないエピトープ（ネオエピトープ）を示し、ここで該方法は、請求項1～22および請求項1～22に従属する限りにおける請求項27の何れか1項において規定される融合ポリペプチド、または請求項1～22の何れか1項に従属する限りにおける請求項28～33の何れか1項において規定される少なくとも1つの発現ベクター、または請求項1～22の何れか1項に従属する限りにおける請求項34～39の何れか1項に記載の少なくとも2つの発現構築物の系を含む、免疫原的有効量の組成物を投与し、それによって患者の体細胞が発現ベクター内に含まれるヌクレオチド配列を発現するようになる工程を含み、およびここで該方法は、任意選択で、薬学的に許容できる担体、希釈剤または賦形剤を投与する工程をさらに含む、方法。

20

【請求項 42】

細菌またはウイルス感染症の処置のための方法であって、ここで細菌またはウイルスは該細菌またはウイルスに特異的な抗原単位を示す事によって特徴づけられ、ここで該方法は、請求項1～27の何れか1項に規定される融合ポリペプチド、請求項28～33の何れか1項に規定される少なくとも1つの発現ベクター、または請求項34～39の何れか1項に記載の少なくとも2つの発現構築物の系を含む免疫原的有効量の組成物を投与し、それによって患者の体細胞が発現ベクター内に含まれるヌクレオチド配列を発現するようになる工程を含み、ここで該方法は、任意選択で、薬学的に許容できる担体、希釈剤または賦形剤を投与する工程をさらに含む、ここで該ウイルス感染症が好ましくは - コロナウイルス、例えばSARSコロナウイルス、特にSARS-CoV-2による感染症であり、およびここで該融合ポリペプチドが請求項24～26の何れか1項において規定される、方法。

30

【請求項 43】

患者がヒトである、請求項40～42の何れか1項に記載の方法。

【請求項 44】

免疫原的有効量の組成物が、非経口的、例えば筋肉内経路、皮内経路、経皮経路、皮下経路、静脈内経路、動脈内経路、髄腔内経路、骨髄内経路、髄腔内経路、脳室内経路、腹腔内、鼻腔内経路、膈経路、眼内経路、もしくは肺経路で投与される；または経口経路、舌下経路、頬経路、または肛門経路で投与される；または局所投与される、請求項40～42の何れか1項に記載の方法。

40

【請求項 45】

薬学的に許容できる担体、希釈剤または賦形剤が水性緩衝液である、請求項40～44の何れか1項に記載の方法。

【請求項 46】

水性緩衝液がタイロード緩衝液である、請求項45に記載の方法。

50

【請求項 47】

タイロート緩衝液が、140 mM NaCl、6 mM KCl、3 mM CaCl₂、2 mM MgCl₂、10 mM 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタン
スルホン酸 (Hepes)、pH 7.4、および 10 mM グルコースの組成を有する、
請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

タイロート緩衝液の濃度が約 35 % v / v である、請求項 46 ~ 47 の何れか 1 項に記載
の方法。

【請求項 49】

緩衝液がリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) である、請求項 45 に記載の方法。

10

【請求項 50】

請求項 10 ~ 15 の何れか 1 項において規定される少なくとも 1 つの発現ベクターを含
む免疫原的有効量の組成物を、0.1 μg から 25 mg の発現ベクターの有効量で、例え
ば 0.5 μg から 20 mg、5 μg から 15 mg、50 μg から 10 mg、および 500
μg から 8 mg、特に、約 0.0001、約 0.0005、約 0.001、約 0.005
、約 0.01、約 0.05、約 0.1、約 0.5、約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6
、約 7 および約 8 mg で投与する事を含む、請求項 40 ~ 49 の何れか 1 項に記載の方法
。

【請求項 51】

免疫原的有効量の組成物が、ポリ(エチレンオキシド)およびポリ(プロピレンオキシ
ド)のブロックを含む、有効量の両親媒性ブロック共重合体、例えば Kolliphor
(登録商標) P 188 をさらに含む、請求項 40 ~ 50 の何れか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 52】

処置方法における使用のための請求項 5 ~ 14 の何れか 1 項において規定される抗原提
示細胞 (APC) 標的化単位であって、ここで該方法は、抗原単位、例えば選択のエピト
ープを含む抗原単位を哺乳類患者における樹状細胞へと向かわせる工程を含み、および例
えば請求項 1 ~ 27 の何れか 1 項において規定される構築物中のものである、抗原提示細
胞 (APC) 標的化単位。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

技術分野

本発明は、免疫療法、例えばがん免疫療法、または微生物による感染症、例えば細菌も
しくはウイルス感染症のための免疫療法およびワクチンに関する。特に、本発明は特異的
な融合ポリペプチドまたは当該融合ポリペプチドをコードする核酸を投与する事による、
がんまたは微生物による感染症を処置または予防するための方法および物に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

患者における悪性腫瘍の処置は、伝統的に外科手術、放射線治療、および/または非悪
性細胞の死滅に比して悪性細胞を優先的に死滅させることを狙いとした投与レジメンにお
ける、細胞傷害性薬剤を用いた化学療法によって、悪性組織の根絶/除去することに焦点
を当ててきた。

40

【0003】

細胞傷害性薬剤の使用に加えて、より最近のアプローチでは、従来の化学療法によっ
て現れる全身の副作用を軽減するために、がん細胞において特異的な生物学的なマーカーを
標的とすることに焦点を当てている。がん関連抗原を標的としたモノクローナル抗体療法
は、多くの悪性腫瘍において、平均余命の延長に非常に効果的であることを示した。成功
した薬ではあるが、がん関連抗原を標的とするモノクローナル抗体は、その性質上、周知
の、および複数の患者で見られる発現産物を標的とするようにのみ開発され得る、つまり

50

、下記を参照するように、多くのがん特異的抗原は、一人の患者からの腫瘍のみに現れるため、がん特異的抗原の大多数はこの種の治療法で取り扱うことができない。

【 0 0 0 4 】

早くも 1950 年代後半に、Burnet および Thomas によって提唱された免疫監視理論では、リンパ球が、変化した抗原決定基を示す自家細胞 - がん細胞を含む - を認識および排除する事を示唆し、および今日では免疫系が高度に発がんを阻害することが一般的に受け入れられている。しかし、免疫監視は 100% 有効ではなく、がん細胞を排除する免疫系の能力を改善する / 刺激するような、がん療法を考案する事は継続的な課題である。

【 0 0 0 5 】

1 つのアプローチは、がん関連抗原に対する免疫を誘導する事であり、このアプローチは有効な可能性が有るが、限られた数の抗原しか取り扱えないという、抗体療法と同様の欠点を負っている。

【 0 0 0 6 】

全てとは言わないが、多くの腫瘍は変異を発現している。これらの変異は、新規の標的抗原 (ネオ抗原) を作り出す可能性があり、臨床的に適切な時間内にネオ抗原およびその抗原決定基を同定する事が可能であれば、ネオ抗原は、特異的 T 細胞免疫療法において有効である可能性がある。現代技術を用いれば、細胞のゲノムを完全にシーケンスする事、および変化したまたは新たな発現産物の存在を解析する事が可能であるため、ネオ抗原に基づく個別化ワクチンの設計が可能である。しかし、満足のいく臨床結果を提供しようとする試みは、今日のところほとんど失敗している。

【 0 0 0 7 】

1990 年代初頭から詳細に研究されてきたワクチン接種の 1 つの様式が、核酸ワクチン接種 (または DNA ワクチン接種と呼ばれる) であり、これにおいては、DNA は非ウイルス性のプラスミドの形態で哺乳類の体細胞に投与され、プラスミド内に含まれる遺伝子の発現をもたらす; DNA ワクチン接種において、コードされる物質は免疫原性のポリペプチドであり、体細胞で産生された際、免疫反応を誘導することができる。このアプローチは、高価な組み換え発現システムを用いて、臨床グレードの純度でタンパク質免疫原を生産する必要を回避するため、魅力的である。しかし、投与された DNA から、ヒトにおいて満足のいく免疫応答を引き起こすのに十分な発現量を得る事が困難であることが示されてきた。

【 0 0 0 8 】

抗原提示細胞 (APC) は効果的な適応免疫応答に不可欠であり、主要組織適合性複合体 (MHC) と複合体化した抗原を自身の表面上に提示する細胞である。この細胞には、マクロファージ、B 細胞および樹状細胞が含まれ、ヘルパー T 細胞に外来抗原を提示する。また、ウイルスに感染した細胞またはがん細胞は細胞内部に由来する抗原を細胞障害性 T 細胞に提示する事ができる。結論として、抗原提示細胞を標的とする事で、優れた免疫応答を誘導する機会を得る事ができる。

【 0 0 0 9 】

抗がんワクチンなどの腫瘍細胞 (neoplastic cell) に対するワクチンに加えて、細菌およびウイルスを含む微生物などの外来抗原に対する改善したかまたは効果的なワクチン、特に、ネオ抗原に加えて細菌およびウイルス抗原を効果的に標的とし得る、且つワクチン接種したヒトにおいて臨床的に顕著な免疫応答を誘導し得る核酸ワクチンを提供する必要性が存在する。

【 0 0 1 0 】

発明の目的

本発明の実施形態の目的は、優れた抗微生物効果または抗腫瘍効果を有し、知られたワクチンよりも高い T 細胞応答を誘導し得るポリペプチド構築物およびそのようなポリペプチド構築物をコードする核酸分子を提供する事である。

【 0 0 1 1 】

10

20

30

40

50

本発明の実施形態のさらなる目的は、A P Cへと向かい、A P Cによる細菌もしくはウイルス由来の抗原単位またはがんのネオエピトープの取り込みを補助する、任意には、がん、細菌またはウイルスに対する非常に効果的な防御免疫の提供を可能にするサイトカインカスケードを伴うA P Cの活性化を補助するように設計されたポリペプチド構築物およびそのようなポリペプチド構築物をコードする核酸分子を提供することである。

【0012】

本発明の実施形態のさらなる目的は、ポリペプチド構築物およびそのようなポリペプチド構築物をコードする核酸の使用法の提供することである。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

【0013】

発明の概要

本発明者らは、抗原提示細胞(A P C) - 標的化単位を利用した次世代核酸(D N AまたはR N A)免疫療法、例えばネオエピトープ免疫療法または感染性病原体を標的とする免疫療法を生み出す新規且つ改良されたポリペプチド構築物およびそのようなポリペプチド構築物をコードする核酸分子を設計した。

【0014】

本発明らによって、A P Cの標的化を、ネオエピトープワクチンの抗腫瘍活性を維持したまま、免疫治療効果を向上させるために使用してもよく、これは知られるワクチンよりも高いT細胞応答を引き出す優れた抗腫瘍効果を可能にする事が見出された。また、S A R S - C o V - 2スパイクタンパク質などのウイルス抗原も、本質的に同じ技術によって成功裏に対処し得ることが見出されている。

20

【0015】

よって、第1の態様では、本発明は、

- i) 少なくとも1つの抗原単位；
 - i i) 樹状細胞を標的とする、少なくとも1つの抗原提示細胞(A P C)標的化単位；
 - i i i) 任意選択で多量体化単位、例えば二量体化単位であって、2つ以上の抗原単位および2つ以上の抗原提示細胞(A P C)標的化単位を含むように該融合ポリペプチドの多量体化をもたらす多量体化単位；
- を含む、融合ポリペプチドに関する。

30

【0016】

第2の態様では、本発明は、本発明の融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターに関する。

【0017】

さらなる態様では、本発明は、i) 少なくとも1つの抗原単位をコードするヌクレオチド配列を含む第1の発現構築物、およびi i) 樹状細胞を標的とする少なくとも1つの抗原提示細胞(A P C)標的化単位をコードするヌクレオチド配列を含む第2の発現構築物、を含む少なくとも2つの発現構築物の系に関する。

【0018】

さらなる態様では、本発明は、特異的な疾患抗原単位、例えば患者において通常の細胞によって発現されないエピトープまたは患者にとって外来のものであるエピトープを示す事によって特徴づけられる疾患の処置のための方法であって、ここで該方法は、本発明の融合ポリペプチド、本発明の少なくとも1つの発現ベクター、または本発明の少なくとも2つの発現構築物の系を含む免疫原的有効量の組成物を投与し、それによって患者の体細胞が該発現ベクター内に含まれるヌクレオチド配列を発現ようになる工程を含み、およびここで該方法は、任意選択で、薬学的に許容できる担体、希釈剤または賦形剤を投与する工程をさらに含む、方法に関する。

40

【0019】

さらなる態様では、本発明は、哺乳類患者において、腫瘍、例えば悪性腫瘍を処置するための方法、または係る腫瘍に対する治療的または改善的な免疫応答を誘導する方法であ

50

って、ここで腫瘍は患者の非腫瘍性細胞が示さないエピトープ（ネオエピトープ）を示し、ここで該方法は、本発明の融合ポリペプチド、または本発明の少なくとも1つの発現ベクター、または本発明の少なくとも2つの発現構築物の系を含む、免疫原的有効量の組成物を投与し、それによって患者の体細胞が該発現ベクター内に含まれるヌクレオチド配列を発現するようになる工程を含み、およびここで該方法は、任意選択で、薬学的に許容できる担体、希釈剤または賦形剤を投与する工程をさらに含む、方法に関する。

【0020】

さらなる態様では、本発明は、細菌またはウイルス感染症の予防または処置のための方法であって、ここで細菌またはウイルスは該細菌またはウイルスに特異的な抗原単位および/またはエピトープのセットを示す事によって特徴づけられ、ここで該方法は、本発明の融合ポリペプチド、本発明の少なくとも1つの発現ベクター、または本発明の少なくとも2つの発現構築物の系を含む免疫原的有効量の組成物を投与し、それによって患者の体細胞が該発現ベクター内に含まれるヌクレオチド配列を発現するようになる工程を含み、ここで該方法は、任意選択で、薬学的に許容できる担体、希釈剤または賦形剤を投与する工程をさらに含む、方法に関する。好ましくは、該ウイルス感染症は - コロナウイルス、例えばSARSコロナウイルス、特にSARS-CoV-2による感染症であり、このような実施形態では、融合タンパク質は、抗原単位が コロナウイルスに由来する、上記に開示する融合タンパク質の何れか1つであり得る。

10

【0021】

いくつかの実施形態では、患者はヒトである。いくつかの実施形態では、免疫原的有効量の組成物は、非経口的、例えば筋肉内経路、皮内経路、経皮経路、皮下経路、静脈内経路、動脈内経路、髄腔内経路 (intratechal route)、骨髄内経路 (intramedullary route)、髄腔内経路、脳室内経路、腹腔内、鼻腔内経路、腔経路、眼内経路、もしくは肺経路で投与される；または経口経路、舌下経路、頬経路、または肛門経路で投与される；または局所投与される。

20

【0022】

いくつかの実施形態では、薬学的に許容できる担体、希釈剤または賦形剤は水性緩衝液である。いくつかの実施形態では、水性緩衝液はタイロッド緩衝液である。いくつかの実施形態では、タイロッド緩衝液は140 mM NaCl、6 mM KCl、3 mM CaCl₂、2 mM MgCl₂、10 mM 4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンエタンスルホン酸 (Hepes)、pH 7.4、および10 mM グルコースの組成を有する。いくつかの実施形態では、タイロッド緩衝液の濃度は約35% v/vである。いくつかの実施形態では、水性緩衝液はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 緩衝液である。

30

【0023】

いくつかの実施形態では、方法は、請求項10~15の何れか1項において規定される少なくとも1つの発現ベクターを含む免疫原的有効量の組成物を、0.1 μgから25 mgの発現ベクターの有効量で、例えば0.5 μgから20 mg、5 μgから15 mg、50 μgから10 mg、および500 μgから8 mg、特に、約0.0001、約0.0005、約0.001、約0.005、約0.01、約0.05、約0.1、約0.5、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7および約8 mgで投与する事を含む。

40

【0024】

いくつかの実施形態では、方法は、ポリ(エチレンオキシド)およびポリ(プロピレンオキシド)のブロックを含む、有効量の両親媒性ブロック共重合体、例えばKolliphor (登録商標) P188、をさらに含む免疫原的有効量の組成物を投与する事を含む。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】図1：好適な融合ポリペプチドの1つの提案される設計およびそれをコードするDNAの図。この例では、構築物はCCL3またはその他サイトカイン/ケモカインであるAPC標的化単位；ヒンジ(h1およびh4)およびIgG3由来のCH3を含む二量体化単位；ならびにネオエピトープである抗原単位を含む。

50

【0026】

【図2】図2：図1に示すようなDNAワクチンの作用機序の図。

【0027】

【図3A】図3：本発明の融合ポリペプチドの設計のための異なるAPC標的化単位の図。A)は実施例1の構築物を示し、一方、B)は実施例2の構築物を示す。

【図3B】同上。

【0028】

【図4】図4：Aldevron社製のpUMVC4のプラスミドマップ。詳細は実施例および配列番号29に記載する。

【0029】

【図5】図5：APC標的化の設計例として、pUMVC4 mCCL19 S16Aのプラスミドマップ。pUMVC4ベクターは、kozak配列、APC標的化単位としてマウスCCL19、ヒンジ1、ヒンジ4およびヒトIgG由来のCh3、続いて5つのネオエピトープC22、C23、C38、C25、C30をコードするインサートを含む。

【0030】

【図6】図6：Kolliphor（登録商標）およびワクチンプラスミドをワクチン接種したマウスにおける腫瘍容積の減少。APC標的化ワクチンをコントロール群（未処置マウスまたは空のモックプラスミドで処置したマウス）と比較した。 $*: p < 0.05$ (Kruskal-Wallis test)。詳細は実施例1を参照。

【0031】

【図7】C22 MHC I多量体の検出を示す図。グラフは実験DNAワクチンでマウスにワクチン接種した際の、C22ペプチドに反応するマウスCD8+T細胞の頻度を示す。詳細は実施例1を参照。

【0032】

【図8】図8：Kolliphor（登録商標）およびワクチンプラスミドでワクチン接種されたマウス由来のT細胞におけるIFN- γ 産生。詳細は実施例1を参照。

【0033】

【図9】図9：Kolliphor（登録商標）およびワクチンプラスミドでワクチン接種したマウスにおける腫瘍容積の減少。詳細は実施例2を参照。

【0034】

【図10】図10：C22 MHC I多量体の検出を示す図。グラフは実験DNAワクチンでマウスにワクチン接種した際の、C22ペプチドに反応するマウスCD8+T細胞の頻度を示す。詳細は実施例2を参照。

【0035】

【図11】図11：Kolliphor（登録商標）およびワクチンプラスミドでワクチン接種されたマウス由来のT細胞におけるIFN- γ 産生。詳細は実施例2を参照。

【0036】

【図12】図12：Kolliphor（登録商標）およびワクチンプラスミドでワクチン接種したマウスにおける腫瘍容積の減少。詳細は実施例3を参照。

【0037】

【図13】図13：C22 MHC I多量体の検出を示す図。グラフは実験DNAワクチンでマウスにワクチン接種した際の、C22ペプチド-搭載MHC I四量体に反応するマウスCD8+T細胞の頻度を示す。詳細は実施例3を参照。

【0038】

【図14】図14：Kolliphor（登録商標）およびワクチンプラスミドでワクチン接種されたマウス由来のT細胞におけるIFN- γ 産生。詳細は実施例3を参照。

【0039】

【図15】図15：本発明の融合タンパク質の別々の単位をコードするDNA設計の図。実施例4の構築物を示す。

【0040】

10

20

30

40

50

【図16】図16：Kolliphor（登録商標）およびワクチンプラスミドでワクチン接種したマウスにおける腫瘍容積の減少。詳細は実施例4を参照。

【0041】

【図17】図17：C22 MHC I多量体の検出を示す図。グラフは実験DNAワクチンでマウスにワクチン接種した際の、C22ペプチド搭載MHC I四量体に反応するマウスCD8+T細胞の頻度を示す。詳細は実施例4を参照。

【0042】

【図18】図18：本発明のDNA設計。

【0043】

【図19】図19：選択されたAPC標的化候補の設計の模式図。

10

【0044】

【図20】図20：本発明の融合タンパク質の模式図。

【0045】

【図21】図21：本発明のベクターのプラスミドマップ。

【0046】

【図22】図22：ELISPOTアッセイにおける、脾臓細胞からのIFN-放出を示す棒グラフ。

【0047】

【図23】図23：本発明の構築物によって誘導された抗体の力価を示す散布図および棒グラフ。

20

【0048】

【図24】図24：血清のSARS-CoV-2中和活性の比較を示す棒グラフ。

【0049】

本発明の詳細な開示

DNA免疫療法またはワクチン、例えば樹状細胞を標的とするAPC標的化エレメントを含むDNAネオエピトープ免疫療法は、i) APCによるネオエピトープの取り込みの指向および補助、および/またはii) サイトカインカスケードが続くAPCの活性化、の何れかによって、それを持たないDNA技術と比較して優れた効果、例えば抗腫瘍効果を有し、且つより高いT細胞応答を引き起こし得る事が期待される。

【0050】

本発明の融合ポリペプチド構築物は、抗原単位、例えばがん、細菌またはウイルス抗原の抗原単位、例えばこの微生物のエピトープを含む細菌またはウイルス抗原の抗原単位、またはエピトープ、ネオペプチド、例えば患者の非腫瘍細胞によって示されないT細胞エピトープを含む抗原単位を含む。

30

【0051】

抗原単位はウイルスまたは細菌に由来し得る。抗原単位が由来する、および本発明の融合ポリペプチドと共に使用するためのウイルスの例には、HIV、HCV、CMV、HPV、インフルエンザ、アデノウイルス、レトロウイルス、ピココロナウイルス、コロナウイルスなどを含むがこれに限定されない。レトロウイルス抗原の非限定な例は、例えばヒト免疫不全ウイルス(HIV)抗原、例えばgag、polおよびenv遺伝子の遺伝子産物、Nefタンパク質、逆転写酵素および他のHIV成分、に由来するレトロウイルス抗原である；肝炎ウイルス抗原は、例えばB型肝炎ウイルスのS、M、およびLタンパク質、B型肝炎ウイルスのプレS抗原、および他の肝炎ウイルス、例えばA型、B型およびC型肝炎ウイルス成分、例えばC型肝炎ウイルスRNAである；インフルエンザウイルス抗原は、例えばヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼおよび他のインフルエンザウイルス成分である；麻疹ウイルス抗原は、例えば麻疹ウイルス融合タンパク質および他の麻疹ウイルス成分である；風疹ウイルス抗原は、例えばE1およびE2タンパク質および他の風疹ウイルス成分である；ロタウイルス抗原は、例えばVP7sおよび他のロタウイルス成分である；サイトメガロウイルス抗原は、例えばエンペローブ糖タンパク質Bおよび他のサイトメガロウイルス抗原成分である；呼吸器合胞体ウイルス抗原は、例えばRSV融

40

50

合タンパク質、M2タンパク質および他の呼吸器合胞体ウイルス抗原成分である；単純ヘルペスウイルス抗原は、例えば全初期タンパク質(immediate early protein)、糖タンパク質Dおよび他の単純ヘルペスウイルス抗原成分である；水痘帯状疱疹ウイルス抗原は、例えばgp1、gp11および他の水痘帯状疱疹ウイルス抗原成分である；日本脳炎ウイルス抗原は、例えば、タンパク質E、M-E、M-E-NS1、NS1、NS1-NS2A、80%Eおよび他の日本脳炎ウイルス抗原成分である；狂犬病ウイルス抗原は、例えば狂犬病糖タンパク質、狂犬病核タンパク質および他の狂犬病ウイルス抗原成分である。ウイルス抗原のさらなる例は、Fundamental Virology, Second Edition, eds. Fields, B.N. and Knipe, D.M. (Raven Press, New York, 1991)を参照のこと。

10

【0052】

本発明の融合ポリペプチドに組み込まれる抗原単位は、アデノウイルス、レトロウイルス、ピココロナウイルス、ヘルペスウイルス、ロタウイルス、ハンタウイルス、コロナウイルス、トガウイルス、フラビウイルス(flavivirus)、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、オルトミクソウイルス、ブニヤウイルス、アレナウイルス、レオウイルス、パピローマウイルス、パルボウイルス、ポックスウイルス、ヘブタドナウイルス、またはスポンジフォームウイルス由来であり得る。ある特定の非限定的な例では、ウイルス抗原は、HIV、CMV、A、BおよびC型肝炎、インフルエンザ、麻疹、ポリオ、天然痘、風疹；呼吸器合胞体、単純ヘルペス、水痘帯状疱疹、エプスタイン-バー、日本脳炎、狂犬病、インフルエンザ、および/または風邪ウイルスの少なくとも一つから得られたペプチドである。

20

【0053】

用語「抗原単位」とは、物質中の領域、例えば免疫系の特異的認識成分(抗体、T細胞)によって認識される外来生物の一部などを示す。

【0054】

「ネオエピトープ」は、ネオエピトープをコードする遺伝子の欠失によって、個体における通常の体細胞由来の発現産物として存在しないが、同個体の変異した細胞(例えばがん細胞)において発現産物として存在する、抗原決定基(典型的にはMHCクラスIまたはIIに拘束されるエピトープ)である。その結果、ネオエピトープは免疫学的な観点からみて、自己起源にも関わらず真に非自己であって、およびそのためネオエピトープが発現産物を構成する個体において、ネオエピトープは腫瘍特異的抗原として特徴づけられ得る。非自己であるため、ネオエピトープは、個体において特異的な適応免疫応答を引き起こし得る可能性があり、その際、誘発される免疫応答はネオエピトープを有する抗原および細胞に対して特異的である。一方、ネオエピトープは、同じネオエピトープが他の個体で発現産物となる可能性が最小限であるため、個体に対して特異的である。よってネオエピトープは例えば腫瘍特異的抗原のエピトープとは異なるいくつかの特徴がある：後者は典型的には同じ種類の複数のがんに見られる(活性化されたがん遺伝子からの発現産物である可能性があるため)、および/または、がん細胞における関連遺伝子の過剰発現によって、わずかな量ではあるが、非悪性細胞において存在し得る。

30

40

【0055】

「ネオペプチド」は自身の配列内に本文中で規定されるネオエピトープを含むペプチド(すなわち約50アミノ酸残基までのポリアミノ酸)である。ネオペプチドは典型的には「天然」である、すなわち該ネオペプチドのアミノ酸配列全体が個体から単離され得る発現産物のフラグメントを構成するが、しかしネオペプチドはまた、「人工的」なもので有り得る、つまり、ネオペプチドは、ネオエピトープの配列および少なくとも1つが該ネオエピトープの配列と天然に関連していない1つまたは2つの付加アミノ酸配列によって構成される。後者の場合において、付加アミノ酸配列は、単にネオエピトープの担体として働くか、またはさらにネオエピトープの免疫原性を向上させ得る(例えば、抗原提示細胞によるネオペプチドの処理を促進したり、ネオペプチドの生物学的な半減期を改善したり

50

、または溶解度を変える事によって)。

【0056】

「ネオ抗原」とはネオエピトープを含む任意の抗原である。典型的にはネオ抗原はタンパク質から構成されるが、ネオ抗原はまた、その長さによってネオエピトープまたはネオペプチドと同一で有り得る。

【0057】

「アミノ酸配列」という用語は、ペプチドおよびタンパク質の鎖中で、ペプチド結合によって連結したアミノ酸残基の順番である。配列は慣習的にN末端からC末端の方向に記載される。

【0058】

本発明の融合ポリペプチド構築物は、少なくとも1つの抗原提示細胞(APC)標的化単位をさらに含む。

【0059】

抗原提示細胞(APC)は、腫瘍組織適合複合体(MHC)と複合体化した抗原をその細胞表面に提示する細胞であり、この過程は抗原提示として知られる。分化した抗原提示細胞にはマクロファージ、B細胞および樹状細胞を含み、ウイルス感染細胞(またはがん細胞)がその細胞内由来の抗原を細胞障害性T細胞に提示し得るのに対して、これらは外来抗原をヘルパーT細胞に提示する。抗原提示細胞(APC)標的化単位は、APC上の異なる表面分子を特異的に標的とする事などによって、これらのAPCを特異的に標的化するために好適な任意の分子またはリガンドである。

【0060】

本発明において使用される好適な標的化単位は以下および対応するヒト配列を含む：

【表1】

分子	機能	配列番号
mCCL3	APC標的化	配列番号36
mCCL4	APC標的化	配列番号37
mCCL5	APC標的化	配列番号38
mCCL19	APC標的化	配列番号39
mXcl1	APC標的化	配列番号40
mCCL20	APC標的化	配列番号41
mCCL21	APC標的化	配列番号42
GM-CSF	APC標的化	配列番号43
分泌シグナル、マウス血清アルブミン	分泌シグナル	配列番号44
抗マウスDEC-205Fv	APC標的化	配列番号45
抗マウスCLEC9Fv	APC標的化	配列番号46
CLEC9リガンド	APC標的化	配列番号47
mFLT3L	APC標的化	配列番号48

【0061】

本発明において使用される好適な標的化単位は、Takashi Sato et al. Blood. 2011 Mar 24; 117(12): 3286-3293; Cagan Gurer et al. Blood. 2008 Aug 15; 112(4): 1231-1239; Wan-Lun Yan et al. Immunotherapy (2017) 9(4), 347-360; Gerty Schreibelt et al. BLOOD, 8 MARCH 2012, VOLUME 119, NUMBER 10; および Zhongyi Yan et al. Oncotarget, Vo

10

20

30

40

50

1.7, No. 26, May 2016, p. 40437の内の何れか1つにおいて開示されている。

【0062】

定義

本明細書で使用する場合、「未成熟樹状細胞 (imDC)」とは、1つ以上の古典的な樹状細胞表面マーカー、CD1a、CD11c、CD11b、CD40、HLADRおよび主要組織適合性複合体クラスII (MHCII)の発現によって特徴づけられる原始的な未成熟樹状細胞のサブタイプを示す。

【0063】

本明細書で使用する場合、「成熟樹状細胞 (mDC)」とは、CD80、CD83およびCD86などの表面成熟マーカーの上方制御のレベルによって特徴付けられる樹状細胞のサブタイプを示す。

10

【0064】

本明細書の文脈において、「発現構築物」とは、必要な遺伝子エレメントを含むヌクレオチド配列であって、これにより宿主細胞は発現構築物中に存在するコード配列を発現することができる - このようなものとして、発現構築物は発現ベクター、典型的にはプラスミドまたはウイルス中に組み込まれる。発現構築物は最小限として、プロモーター/エンハンサー領域、ならびに、開始コドンによって開始する、および終止コドンによって終結するコード配列を含む。さらに、発現構築物は、リボソーム結合部位および転写終結配列を含み得る。さらに、様々な調節エレメントが発現構築物中に含まれ得る。

20

【0065】

本明細書に使用される場合、「リンカー」とは、2つ以上の異なるまたは同一の直鎖状ペプチド配列またはサブユニットを多量体ポリペプチドへと組み立てるために好適な任意の化合物を示す。この用語は、ペプチド化学において有用とされる任意のリンカーを含む。多量体ポリペプチドまたは融合ポリペプチドは、直鎖状に標準的なペプチド結合で組み立てまたは連結され得るため、リンカーという用語はまた、「ペプチドスペーサー」(「スペーサー」とも呼ばれる)を含む。リンカーが本発明の融合ポリペプチドにおけるコードされるネオエピトープ同士を分離するため、または融合ポリペプチドのネオエピトープを融合ポリペプチドの抗原提示細胞 (APC) 標的化単位から分離するための両方に使用され得る事が理解されるはずである。

30

【0066】

リンカーは「リジッド」であってよく、これはリンカーが接続する2つのアミノ酸配列が、互いに自由に動くことを実質的に許さないことを意味する。同様に「フレキシブル」なリンカーでは、リンカーを介して接続された2つの配列が互いに実質的に自由に動くことが可能である。1つ以上のネオエピトープを含むコードされた発現産物において、どちらの型のリンカーも有用である。

【0067】

本発明において使用される発現ベクターにコードされ得る、関心のあるリンカーを以下の表に示す：

40

【表 2】

種類	名称	配列
フレキシブル	FS	GSGGGA (配列番号1)
フレキシブル	FL	GSGGGAGSGGGA (配列番号2)
フレキシブル	FV1	GSGGGAGSGGGAGSGGGA (配列番号3)
フレキシブル	FV2	GSGGGAGSGGGAGSGGGAGSGGGA (配列番号4)
フレキシブル	FM	GENLYFQSGG (配列番号5)
リジッド	RL1	KPEPKPAPAPKP (配列番号6)
リジッド	RL2	AEEAAKEAAKA (配列番号7)
リジッド	RM	SACYCELS (配列番号8)
フレキシブル		SGGSSSGGS (配列番号9)
フレキシブル		GGGSGGGGS (配列番号10)
フレキシブル		SSGGSSSGG (配列番号11)
フレキシブル		GGSGGGSGG (配列番号12)
フレキシブル		GSGSGSGSGS (配列番号13)
ヒンジ	H1	ELKTPLGDTTHT (配列番号59)
ヒンジ	H4	EPKSCDTPPPCPRCP (配列番号60)
フレキシブル		GGGSSGGGSG (配列番号70)
フレキシブル		GGGSS (配列番号71)
フレキシブル		GGGSSGGGSSGGGSS (配列番号72)
フレキシブル		GLGGL (配列番号73)
フレキシブル		GLGGLAAA (配列番号74)

10

20

【0068】

いくつかの実施形態では、リンカーはペプチド配列である。いくつかの実施形態では、リンカーはペプチド配列ではない。いくつかの実施形態では、リンカーは分岐ペプチド配列ではない。

【0069】

いくつかの実施形態では、リンカーは、それ自身、ネオエピトープ配列および/または抗原提示細胞 (APC) 標的化単位に由来するかまたは同一であるペプチド配列を含まない。

30

【0070】

いくつかの実施形態では、リンカーはIgG由来など、免疫グロブリン分子 (Ig) に由来する。

【0071】

いくつかの実施形態では、リンカーは、ヒンジ領域、例えばフレキシブルなヒンジ領域、例えばIgG由来などの免疫グロブリン分子 (Ig) に由来するヒンジ領域であるかまたはこれを含む。

【0072】

本発明に従って使用される代替の好適なリンカーは以下である：

40

50

【表 3】

分子	機能	配列番号
dHLXタンパク質	二量体化	配列番号49
hMHD2 (ヒトIgM)	二量体化	配列番号51
コラーゲン三量体化ドメイン	三量体化	配列番号52
p53合成タンパク質	四量体化	配列番号53
T4フィブリチンドメイン	三量体化	配列番号69

10

【0073】

したがって、いくつかの実施形態では、リンカーはIgMに由来するヒンジ領域を含むかまたはそれからなる、および/または配列番号51にコードされる配列に由来する二量体化モチーフを含むかまたはそれからなる。

【0074】

いくつかの実施形態では、リンカーは、三量体化ドメイン、例えばコラーゲン三量体化ドメイン、例えば配列番号52にコードされる配列に由来する三量体化ドメインを含むかまたはそれからなる。

【0075】

いくつかの実施形態では、リンカーは、hMHD2またはdHXLに由来する二量体化を含むかまたはそれからなり、任意には、本明細書に記載のH1などのヒンジ領域をさらに含み得る。

20

【0076】

いくつかの実施形態では、リンカーは、四量体化ドメイン、例えばp53に由来するドメイン、例えば配列番号53にコードされる配列に由来する四量体化ドメインを含むかまたはそれからなり、任意には、本明細書に記載のH1などのヒンジ領域をさらに含む。

【0077】

本発明に従って使用するために好適なリンカーはまた、以下の何れか1つにも記載されている: Ana Alvarez - Cienfuegos et al, Scientific Reports 2016, 6: 28643 | DOI: 10.1038/srep28643; Victor J. Sanchez - Arevalo Lobo et al. Int. J. Cancer: 119, 455 - 462 (2006); Oliver Seifert et al. Protein Engineering, Design & Selection vol. 25 no. 10 pp. 603 - 612, 2012; および Jorg Willuda et al. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 276, No. 17, Issue of April 27, pp. 14385 - 14392, 2001.

30

【0078】

本明細書で使用される場合、「免疫原性の担体」または「薬学的に許容できる担体」は免疫原/ハプテンに対する免疫応答を増強するまたは誘発を可能にするために、免疫原またはハプテンと結合し得る分子または部分である。免疫原性の担体は、従来的には、自身の権能では免疫原性が不十分な免疫原/ハプテンに融合またはコンジュゲートし得る比較的大きな分子(例えば、破傷風トキソイド、KLH、ジフテリアトキソイドなど)であって、典型的には、免疫原性の担体は、免疫原および免疫原性の担体によって構成される結合物質に対する強力なTヘルパーリンパ球の応答を誘発し得る、よってこれはBリンパ球および細胞傷害性リンパ球による免疫原に対しての増強した応答を供する。より最近では、大きな担体分子は、無差別(promiscuous)Tヘルパーエピトープと呼ばれる、すなわち、集団のHLAハプロタイプの大部分に認識される、およびTヘルパーリンパ球の応答を誘発する、より短いペプチドにある程度代替されている。

40

50

【 0 0 7 9 】

「Tヘルパーリンパ球応答」は、ペプチドによって誘発される免疫応答であって、該ペプチドは、抗原提示細胞におけるMHCクラスII分子（例えば、HLAクラスII分子）に結合する事ができ、および該ペプチドおよび該ペプチドを提示するMHCクラスII分子の複合体をT細胞受容体が認識する結果として、動物種においてTヘルパーリンパ球を刺激する。

【 0 0 8 0 】

「免疫原」はその免疫系が免疫原に直面している宿主において、適応免疫応答を誘導し得る物質である。このように、免疫原はより大きな「抗原」属のサブセットであって、免疫系によって特異的に認識され得る物質（例えば、抗体によって結合される、または代わりにMHC分子に結合した抗原のフラグメントが、T細胞受容体に認識される場合がある。）であるが、必ずしも免疫を誘導できない、しかし、抗原は常に免疫を誘発し得る、つまり抗原に対しての確立した免疫記憶を有する宿主は、該抗原に対して特異的な免疫応答を起こすことになる。

【 0 0 8 1 】

「ハプテン」とは、免疫応答を誘導および誘発できない小分子であるが、免疫原性の担体とコンジュゲートすると、該ハプテンを認識する抗体またはTCRが、免疫系とハプテン担体コンジュゲートの接触の際に誘導され得る。

【 0 0 8 2 】

「適応免疫応答」とは抗原または免疫原との接触に対応した免疫応答であって、免疫応答は、抗原/免疫原の抗原決定基に特異的である。適応免疫応答の例は、抗原特異的抗体の生産の誘導、またはTヘルパーリンパ球または細胞傷害性リンパ球の抗原特異的な誘導/活性化である。

【 0 0 8 3 】

「防御的、適応免疫応答」とは抗原による免疫（人工的なまたは天然の）への反応として対象内で誘導される抗原特異的免疫応答であって、該免疫応答はその後の抗原、または抗原を含む病理関連物質の挑戦から対象を防御し得る。典型的には、予防接種は1つまたはいくつかの病原に対する防御的適応免疫応答を確立することを目的とする。

【 0 0 8 4 】

「免疫系の刺激」とは、物質または物質の組成物が一般的な、非特異的な免疫刺激作用を示すことを意味する。多くのアジュバントおよび推定アジュバント（例えば特定のサイトカイン）は免疫系を刺激する能力を共有する。免疫刺激剤を使用した結果として、免疫系の「覚醒度（alertness）」が高まる、つまり、免疫原を単独で使用した場合と比較して、同時またはその後の免疫原による免疫が、顕著により効果的な免疫応答を誘導する。

【 0 0 8 5 】

「ポリペプチド」という用語は、本願の文脈において、2から50アミノ酸残基の短いペプチド、50から100アミノ酸残基のオリゴペプチド、および100アミノ酸残基以上のポリペプチドのいずれも意味することを意図する。さらに、該用語はまた、タンパク質、すなわち、少なくとも1つのポリペプチドを含む機能性生体分子を含むことも意図しており、機能性生体分子が、少なくとも2つのポリペプチドを含む場合には、これらは複合体を形成していても、共有結合をしていても、非共有結合をしていてもよい。また、タンパク質中のポリペプチドは、グリコシル化され得る、および/または脂質化され得る、および/または、補欠分子族を含み得る。

【 0 0 8 6 】

「融合ポリペプチド」という用語は、本願の文脈において、意図された異なる機能を有するポリペプチドエレメントまたはアミノ酸配列を含むポリペプチドを意味する事を意図する。異なるポリペプチドエレメントもしくはアミノ酸配列はリンカー、これは単なる別のアミノ酸配列であり得る、を介して連結されるか、または融合ポリペプチドの異なるポリペプチドエレメントもしくはアミノ酸配列は、単に標準的なペプチド結合によって直鎖

10

20

30

40

50

状に連結され得る。

【0087】

本発明に従って使用される発現ベクターは、典型的におよび好ましくは、プラスミドを含む、またはプラスミドから構成されるが、その他の発現ベクターを採用することもできる。本発明の組成物は、「裸の」DNA、すなわち、DNA発現ベクターであり、標的細胞への発現ベクターの導入に影響を与え得る細菌またはウイルスの一部ではない発現ベクターを細胞へ確実に送達する事を目的としている。よって、本発明の組成物および方法において有用なベクターは、環状または直鎖状、一本鎖または二本鎖であり、およびプラスミドに加えて、例えばコスミド、ミニ染色体またはエピソームでもあり得る。

【0088】

各コード（および発現可能な）領域は、同一または別々のベクター上に存在し得るが、しかし、1つ以上のコード領域は単一のベクター上に存在し得る事、およびこれらのコード領域は単一または複数のプロモーターの制御下に置かれ得る事は理解されるべきである。これは、発現ベクターが、各コードされた融合ポリペプチドについて別々のペプチド発現産物をコードし得る事、または発現ベクターが、複数のペプチド発現産物をコードし得る事を意味し、ここで、少なくともいくつかの発現産物はコードされた複数の融合ポリペプチドを示し、その融合ポリペプチドのうちの少なくともいくつかは任意にはペプチドリinkerによって分離される。

【0089】

言い換えると、いくつかの場合では1つの単一発現ベクターのみが投与および発現され、およびこの発現ベクターは複数の別々のタンパク質性発現産物をコードしてもよく、またはたった2つもしくは1つの単一発現産物をコードしてもよい、本願の文脈では、コードされた融合ポリペプチドが満足に免疫系に提示されるかどうかのみが関係しており、よってそれらが別々の発現産物中または結合した発現産物中に存在するかの選択はあまり関係していない。好ましい実施形態では、発現ベクターは、少なくともまたは約5個、例えば少なくともまたは約10、少なくともまたは約15、少なくともまたは約20、少なくともまたは約25、少なくともまたは約30個のタンパク質性発現産物を発現する。これ以上の数について考慮すると、限界値は主に、特定の腫瘍から同定し得る融合ポリペプチドのネオエピトープの数によって設定される。言うまでもなく、発現ベクター中にコードされる融合ポリペプチドのネオエピトープの数は、関連する悪性組織で見つかるネオエピトープの数を超えることはできない。

【0090】

コードされたネオエピトープ発現産物を分離するためにペプチドリinkerを使用することで、融合タンパク質の発現産物内でエピトープ同士を空間的に分離することができる。これはいくつかの利点を含み得る：リンカーによって、確実に各ネオエピトープを最適化された配座で免疫系に提示し得る、また、適切なリンカーを使用することで、複数のエピトープを含む発現産物において、1つのネオエピトープのC末端と隣接する次のネオエピトープのN末端から構成される領域に生じる「接合部エピトープ(junctional epitope)」に対しての無関係な免疫応答が誘導されるという問題を最小化し得る。

【0091】

コードされたペプチドリinkerは「フレキシブル」または「リジッド」、好ましいコードされたペプチドリinkerが記載される上記の定義を参照、の何れかで有り得る。また、いくつかの実施形態において本発明に用いられるリンカーは切断可能で有り得る、すなわち、エンドペプチダーゼ、例えば、フォーリン、カスパーゼ、カテプシンなどのエンドペプチダーゼのための認識部位を含むことが想定される。

【0092】

発現ベクターにコードされるネオエピトープはそれ自体が知られた手法で同定し得る：同一個体における悪性細胞のゲノム、および健康な細胞のゲノム、または標準健康ゲノムの「ディープシーケンシング」によって、悪性細胞に固有の潜在的な免疫原性発現産物を

10

20

30

40

50

提供する、発現DNA部分を同定し得る。同定されたDNA配列はその後、コドン最適化（典型的にはヒト細胞による発現のために）され、および大きなキメラ構築物の一部である個別の発現領域のいずれかとして発現ベクターに含まれ得る。

【0093】

ベクターによって発現される細菌およびウイルスエピトープまたはがんネオエピトープの同定と選択を最適化するために、この目的のために利用できる任意の予測方法が実際に有効である。最先端の予測アルゴリズムの1例は、NetMHCpan-4.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan-4.0/; Juritz Vet al., *J Immunol* (2017), [doi:10.1093/immunol.170.0893](https://doi.org/10.1093/immunol/170.0893))である。この方法は、従来のMS由来リガンドおよびpMHC親和性データの組み合わせにおいて学習される。他の例は、NetMHCstabpan-1.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCstabpan-1.0/; Rasmussen Met al., *Accepted for Jof Immunol*, June 2016)である。この方法は、*in vitro*で各ペプチドを合成する、およびMHC分子に複合体化させるアッセイを用いた*in vitro* pMHC安定性測定のデータセットで学習される。このアッセイにおいて細胞処理は行われず、およびpMHC安定性が測定される環境は幾分か人工的である。本方法は、一般的にはNetMHCpan-4.0よりも精度が低い。米国特許第10,055,540号は従来のMSで検出されたりガンドを用いたネオエピトープの同定のための方法を記載する。同様の技術を用いたその他の特許出願は、国際公開第2019/104203号、国際公開第2019/075112号、国際公開第2018/195357号(MHCクラスII特異的)、および国際公開第2017106638号である。最後に、MHCflurry: ([DOI:doi.org/10.1016/j.jcel.2018.05.014](https://doi.org/10.1016/j.jcel.2018.05.014); <https://github.com/openvax/mhcflurry>)は、MSで検出されたりガンドデータとpMHC親和性で学習されたNetMHCpanのようなものである。また、ペプチド-MHCクラスII相互作用予測法は、最近の出版物であるGarde Cet al., *Immunogenetics*, [DOI:doi.org/10.1007/s00251-019-01122-z](https://doi.org/10.1007/s00251-019-01122-z)に開示される。この出版物では、MHCクラスIIから溶出した天然処理ペプチドを学習のセットの一部として使用し、およびリガンドとして確認された場合は1の、ネガティブな場合は0の結合対象値を割り当てる。

【0094】

一般的に、これらの予測システムは人工ニューラルネットワーク(ANN)を採用している: ANNは非線形の相関関係を同定し得る: 非線形の相関関係の定量化は、単純な計算では計算が困難であるため、容易な仕事ではない。これは主に、非線形の相関関係が線形の相関関係よりも多くのパラメーターで記述され、およびおそらく全ての特徴をまとめて考慮した際に初めて現れるためである。よって、特徴間の依存関係を捉えるためには、全ての特徴を考慮に入れる必要がある。

【0095】

選択され、コードされたネオエピトープが効果的な免疫応答を供する可能性をさらに向
上させるために、どちらも2019年9月13日に開示された欧州特許出願第19197
295.9号および第19197306.4号に開示される技術を好ましくは使用し得る
。これらの出願は、ペプチドとMHC分子間の結合の安定性が決定され得ることを可能に
する、およびネオエピトープの検出および選択の一部として、ネオエピトープのMHC結
合安定性を決定することを可能にする技術を開示する。簡単に言うと、安定性の決定から
得られたデータは、例えばANNの学習セットに用いる、およびANNはその後、関連し
たMHC分子に対する予測された結合安定性にしたがって、同定されたペプチドを順位付
けし得る。

【0096】

核酸ワクチンを患者に投与した際、対応する遺伝子産物(例えば、所望の抗原)が患者

の体内で産生される。いくつかの実施形態では、治療的または予防的な免疫応答を誘導するために、最適化された組み換えポリヌクレオチドを含む核酸ワクチンベクターをヒトに送達し得る。

【0097】

プラスミドおよびその他のDNAベクターは、典型的には筋肉組織への遺伝子導入においてより効率的である。経口投与による粘膜表面へのDNAベクターの送達の可能性がまた報告されており、およびDNAプラスミドは、筋肉以外の組織への遺伝子の直接的な導入に用いられている。DNAワクチンは主に筋肉内注射、遺伝子銃による送達、ジェット注射（PharmaJet社のStratis（登録商標）デバイスなどのデバイスを使用）、またはエレクトロポレーション法によって動物に導入され、これらの各投与様式は本開示の方法に適用する。導入後、プラスミドは一般的に複製されることなくエピソーム性で維持される。コードされたタンパク質の発現は長時間持続し、B細胞およびT細胞の両者を刺激することが示されている。

10

【0098】

本明細書に開示される処置方法において投与するベクターの有効量の決定のために、医師は、ベクターの毒性、処置されるがんの進行度、および、存在する場合には、抗ベクター抗体の生産量を評価する。投与は単回または分割投与によってなされ、典型的には時間差の有る一連の投与（series of time separated administration）であり得る。本明細書に開示される方法において、時間差のある一連の免疫における免疫あたりの有効ヒト投与用量は0.1μgから500mgの間であり、0.1μgから25mgの間の発現ベクターの投与量が好ましい。すなわち、本明細書で開示された方法の実施において、ヒトにおける0.5μgから20mgの間の投与量が典型的に使用され、および投与量は通常、5μgから15mgの間、50μgから10mgの間、および500μgから8mgの間であり、および特に関心のある投与量は約0.0001、約0.0005、約0.001、約0.005、約0.01、約0.05、約0.1、約0.5、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7および約8mgである。

20

【0099】

有効量を用いた一連の免疫は、典型的には2回、3回、4回、5回、6回またはそれ以上の一連の投与を形成する。例えば悪性腫瘍を長時間抑制するためには、複数回（例えば6回以上）の投与が関係し得る、およびこのような状況では、ワクチンベクター内のコードされたネオエピトープの正確な選択は、悪性細胞のゲノムおよびプロテオームの変化に応じて、経時的に変更し得る。悪性細胞によって、新規のネオエピトープが生産される場合は、これらのネオエピトープは都合によってワクチンの標的として含めることができる。

30

【0100】

本明細書に開示される方法において使用されるワクチンは、1以上の発現ベクターを含む；例えば、ワクチンは、少なくとも1つの免疫原性のポリペプチドを生産するために、それぞれが哺乳類細胞においてヌクレオチドのコード領域を自律的に発現し得る複数の発現ベクターを含んでいてよい。発現ベクターはしばしば真核生物のプロモーター配列、例えば、1つ以上のコード領域と作動可能に連結した強力な真核生物のプロモーターのヌクレオチド配列を含む。本明細書の組成物および方法は任意の特定の真核生物プロモーターの使用を含んでいてよく、多種多様なものが知られている；例えば、CMVまたはRSVプロモーター。プロモーターは、宿主細胞に対して異種のもので有り得る。使用されるプロモーターは構成的プロモーターであってもよい。使用されるプロモーターは、エンハンサー領域およびイントロン領域を含むことで、発現量を向上させ得るが、これには例えばCMVプロモーターを用いる場合などがある。

40

【0101】

当分野で知られている数多くのプラスミドを、核酸ワクチンの生産に使用し得る。核酸ワクチンの好適な実施形態では、ベクターとしてプラスミドVR1012（Vical Inc., San Diego Calif.）、pCMV1-UBF3/2（S. Jo

50

hnston, University of Texas)、pTVG4 (Johnson et al., 2006, Vaccine 24(3); 293-303)、pVAX1 (Thermo Fisher Scientific, 上記および以下の実施例を参照)、またはpcDNA3.1 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Calif.)を用いた構築物を採用する。

【0102】

さらに、ベクター構築物は、本発明に従って有利に免疫刺激配列(ISS)を含み得る。ワクチンベクター内にかかる配列を用いる目的はコードされたネオエピトープに対するT細胞応答、特に、Th1細胞応答を増強する事であり、この応答は、TOLL様受容体TLR3、TLR7-TLR8、およびTLR9のアゴニスト、および/または細胞質RNA受容体、例えば、RIG-1、MDA5およびLGP2などを含むがこれに限定されない、のアゴニストを組み込んだアジュバントによって誘発される(Desmet et al., 2012, Nat. Rev. Imm. 12(7), 479-491)。

10

【0103】

ISSを採用する事の1つの可能性は、6塩基の一般的な配列NNCGNN(哺乳類DNAに比べて細菌DNAでは20倍の頻度で出現する)をもつ非メチル化CGリッチモチーフ(CpGモチーフと呼ばれる)を用いて、部分的または完全にホスホロチオエート化したバックボーンを含む小さな合成DNAオリゴ(ODN)として直接投与するか、またはCpGモチーフをDNAベクターバックボーンに組み込むことの一つのいずれかによって刺激することで、TLR9を活性化する細菌の感染を模倣する事である。免疫刺激性CpGは、DNAバックボーンの一部であるか、またはISSに濃縮されていてもよく、CpG配列は典型的に、ネオエピトープをコードする配列の終止コドンとポリAテイルをコードする配列の間に位置する(すなわち、ISSは終止コドンとポリアデニル化シグナルの間に位置する)。しかし、CpG配列は、長いDNA分子内におけるそれらの位置とは無関係に効力を発揮するため、CpGモチーフの存在が、ワクチン抗原のコード領域を発現するというベクターの能力を妨げない限り、その位置は原理的にはワクチンベクター内の任意の場所で有り得る。

20

【0104】

ワクチン内に個別のODNとして存在する場合であって、ODNが免疫学的なアジュバントとして機能する場合、CpGモチーフを含むオリゴヌクレオチドは、典型的には選択された送達技術によって、DNAワクチンと共に投与/製剤化され、および典型的には配列NNCGNNまたはその逆相補的な配列を含む6塩基またはそれ以上の多塩基のDNAを構成する。この目的のために有用なODNは、例えば、In vivo Gen社(5 Rue Jean Rodier, F-31400, Toulouse, France)から市販されており、クラスA、B、Cの範囲のODNが販売されている。例を以下に示す：

30

40

50

【表 4】

ODN1585	(5'-ggGGTCAACGTTGAgggggg-3'),	配列番号 1 4
ODN2216	(5'-ggGGGACGATCGTCgggggg-3'),	配列番号 1 5
ODN2336	(5'-gggGACGACGTCGTGgggggg-3'),	配列番号 1 6
ODN1668	(5'-tccatgacgttcctgatgct-3'),	配列番号 1 7
ODN1826	(5'-tccatgacgttcctgacgtt-3'),	配列番号 1 8
ODN2006	(5'-tcgtcgttttgctgctttgctgctt-3'),	配列番号 1 9
ODN2007	(5'-tcgtcgttgctgctttgctgctt-3'),	配列番号 2 0
ODNBW006	(5'-tcgacgttcgctgcttcgctgcttc-3'),	配列番号 2 1
ODND-SL01	(5'-tcgacgttcgctgcttcgctgcttc-3'),	配列番号 2 2
ODN2395	(5'-tcgtcgtttcggtcgcgcgcg-3'),	配列番号 2 3
ODNM362	(5'-tcgtcgctgcttcaacgacgttgat-3'),	配列番号 2 4
ODND-SL03	(5'-tcgcaacgttcgctgcttcaacgctg-3'),	配列番号 2 5

10

20

【0105】

これら 12 個の ODN において、大文字のヌクレオチドは、ホスホジエステルであり、小文字のヌクレオチドはホスホロチオエートであり、下線部はパ lindro ム配列である。

【0106】

CpG 配列が、プラスミドバックボーンに存在する（それによって「自己アジュバント」となる）場合、同一配列として、または CpG モチーフに非同一な配列の形態で、またはステムループ構造を形成し得るパ lindro ム配列の形態で、任意の数の可能な NNGCNN または NNC GNN 配列が本発明に従って存在し得る。例えば、以下の CpG モチーフが関心の的である：AACGAC および GTCGTT、さらには CTCGTT、および GCTGTT。このような CpG をコードする配列の使用例は市販の pTVG4 ワクチンベクターバックボーンから抜粋し以下の配列である：

30

【化 1】

```
...agatctaacgacaaaacgacaaaacgacaaaggcgccca
gactcggcgttttcgttttgtcgttttgtcgttagatc
...
```

(配列番号 26)

ここで、下線部のヌクレオチドは pTVG4 プラスミドベクター配列中に存在する CpG を構成している。

40

【0107】

もう一つの可能性は、ポリ I : C (ポリイノシン酸 - ポリシチジル酸)、ポリ IC : U12 (ウリジン置換ポリ I : C) などの合成 RNA オリゴとして、または合成 RNA オリゴヌクレオチド (ORN) の形態で、二本鎖 (ds) RNA を加えることにより、TLR3 を活性化する RNA ウイルス感染を模倣することであり、これらの RNA 分子のワクチンへの添加は、ODN アプローチと同様に、アジュバント活性を獲得する方法である。あるいは、dsRNA は DNA ベクターバックボーンにコードされることもでき、これはワ

50

クチン接種後にRNAに転写される - この場合、DNAワクチンは免疫学的アジュバントをコードしていることになる。このアプローチでは、100塩基対までの長さのヘアピンRNAをコードするDNA配列を含むことができ、ここで、配列は非特異的である。また、DNAは同時に、既知配列のODNを含み、既知配列のORNをコードし得る；よってDNAはTLR3および/またはRIG-1、MDA5、およびLGP2などの細胞質RNA受容体を活性化し得る二本鎖RNAに転写されると共に、TLR9を活性化するODNを含み得る。免疫刺激性CpGおよびdsRNAを含む/コードする、特異的DNA配列の例は、例えば、5'-GGTGCATCGA TGCAGGGGGG-3' (配列番号27) および5'-GGTGCATCGA TGCAGGGGGG TATATATA TTGAGGACAG GTTAAGCTCC CCCCAGCTTA ACCTGTC CTT CAATATATA TATA-3' (配列番号28) である (Wu et al. 2011、Vaccine 29(44):7624-30を参照)。

10

20

30

40

50

【0108】

ISSが、DNAワクチンベクター内に存在する場合、TLR9を活性化するCpGを用いるアプローチと、TLR3ならびに/またはRIG-1、MDA5、およびLGP2などの細胞質RNA受容体を活性化する免疫刺激性RNAをコードする配列の存在とを組み合わせることが可能、および有利である；Grossmann C et al. 2009, BMC Immunology 10:43 および Desmet et al. 2012. Nat. Rev. Imm. 12(7), 479-491を参照。同様に、ORNおよびODNをワクチン中に別々のアジュバントとして(単独または組み合わせて)組み込むことは、DNAワクチンベクターに両方の種類のISSを組み込む事と組み合わせてよい。

【0109】

CpGモチーフの場合と同様に、免疫刺激性RNA ISSをコードするDNAは、終止コドンとポリアデニル化シグナルの間に位置することが好ましいが、しかしこれが意図したポリペプチド発現産物の産生を損なわない限り、ベクターの任意の部分に存在し得る。

【0110】

いくつかの特定の実施形態において、ISSはワクチン組成物に含まれる、および、特定の実施形態において、これは免疫学的に活性があるおよび医薬的に許容される量のポリI:Cおよび/またはポリIC:U12を組み込むことによって達成される。ポリI:Cは、一方の鎖がイノシン酸の重合体であり、もう一方の鎖がシチジル酸の重合体であるミスマッチ二本鎖RNA(dsRNA)から構成される。ポリIC:U12は、ウリジンがポリI:C鎖の中に導入されたポリI:Cのパリアントである。これら2つの物質は、その文脈では免疫学的アジュバント、すなわち、それ自身は特異的な適応免疫応答を誘発しないが、ワクチン抗原(または本願の場合、コードされた抗原)への特異的な適応免疫応答を増強する物質、として機能する。

【0111】

ポリI:CまたはポリIC:U12(例えば、Ampligen(登録商標))は、好ましくは、発現ベクターの有効量の投与あたり、0.1から20mgの間の投与用量になるように組成物中に存在する。すなわち、組成物中の存在量はこの投与あたりの用量になるように調節される。好ましくは、ポリI:CまたはポリIC:U12の投与量は、発現ベクターの有効量の投与あたり0.2から15mgの間、例えば0.3mgから12mg、0.4mgから10mg、および0.5mgから8mgの間であり、好ましくは約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9および4.0mgである。特に好ましくは、投与あたり0.5から2.0mgの範囲である。

【0112】

ある特定の実施形態では、ワクチン組成物は、ポリ(エチレンオキシド)およびポリ(プロピレンオキシド)のブロックを含む両親媒性ブロック共重合体、例えばポロキサマー、すなわち、2つの親水性のポリオキシエチレン(ポリ(エチレンオキシド))鎖に挟まれた中央の疎水性のポリオキシプロピレン(ポリ(プロピレンオキシド))鎖からなる非イオン性のトリブロック共重合体、を含み得る。1つの特定の好ましい両親媒性ブロック共重合体は、ポロキサマー188(BASF社のKolliphor(登録商標)P188)である。両親媒性ブロック共重合体の投与量は、発現ベクターの有効投与量あたり、0.2% w/vから20% w/v、例えば0.2% w/vから18% w/v、例えば0.2% w/vから16% w/v、例えば0.2% w/vから14% w/v、例えば0.2% w/vから12% w/v、例えば0.2% w/vから10% w/v、例えば0.2% w/vから8% w/v、例えば0.2% w/vから6% w/v、例えば0.2% w/vから4% w/v、例えば0.4% w/vから18% w/v、例えば0.6% w/vから18% w/v、例えば0.8% w/vから18% w/v、例えば1% w/vから18% w/v、例えば2% w/vから18% w/v、例えば1% w/vから5% w/v、例えば2% w/vから4% w/vである。特に好ましくは、1投与あたり、0.5% w/vから5% w/vである。

10

【0113】

したがって、本発明のワクチン組成物、例えばDNAワクチン組成物は、ポリ(エチレンオキシド)およびポリ(プロピレンオキシド)のブロックを含む、薬理的に許容される両親媒性ブロック共重合体を含み、これは以下に詳細に記載される：

20

【0114】

両親媒性ブロック共重合体は定義の見出しにおいてより一般的に説明されているが、しかし、好ましい両親媒性ブロック共重合体はポロキサマーまたはポロキサミンである。ポロキサマーは、その性質に関してわずかに異なるのみであるが、好ましくはポロキサマー407および188であり、特にポロキサマー188である。

【0115】

両親媒性ブロック共重合体がポロキサミンである場合、好ましい種類は式(PEO-PPO)4-EDの逐次的ポロキサミンであり、ここで、PEOはポリ(エチレンオキシド)、PPOはポリ(プロピレンオキシド)およびEDはエチレンジアミニル基である。これらの分子はPEO-PPO基が中心のエチレンジアミニル基から突き出たX字様の形状を得ている。特に好ましいポロキサミンは、それぞれ(登録商標)Tetronic(登録商標)904、704、および304で販売されているものである。これらのポロキサミンの特著は以下の通りである：Tetronic(登録商標)904の総平均分子量は6700であり、PPO単位の総平均重量は4020、およびPEOの割合は約40%である。Tetronic(登録商標)704の総平均分子量は5500であり、PPO単位の総平均重量は3300、およびPEOの割合は約40%である。Tetronic(登録商標)304総平均分子量は1650であり、PPO単位の総平均重量は990、およびPEOの割合は約40%である。

30

【0116】

本明細書に開示される方法において使用される場合、ワクチン組成物中の両親媒性ブロック共重合体の濃度は好ましくは2%から5% w/v、例えば約3% w/vである。

40

【0117】

本明細書で使用される場合、「PEO-PPO」両親媒性ブロック共重合体は、ポリ(エチレンオキシド)(「PEO」)のブロックおよびポリ(プロピレンオキシド)(「PPO」)のブロックを含むか、またはそれからなる直鎖状または分枝状の共重合体である。有用なPEO-PPO両親媒性ブロック共重合体の典型例は、PEO-PPO-PEO(「ポロキサマー」)、PPO-PEO-PPO、(PEO-PPO-)4ED(「ポロキサミン」)、および(PPO-PEO-)4ED(「逆ポロキサミン」)の一般的な構造を有し、ここで、「ED」はエチレンジアミニル基である。

【0118】

50

「ポロキサマー」とは、ポリ(エチレンオキシド) (「PEO」) の1つのブロックと連結したポリ(プロピレンオキシド) (「PPO」) の1つのブロックにさらにPEOの1つのブロックが連結した構成である、すなわち式EO_a-PO_b-EO_aの構造を持つ直鎖状の両親媒性ブロック共重合体であり、ここで、EOはエチレンオキシド、POはプロピレンオキシド、aは2から130の間の整数、およびbは15から67の整数である。ポロキサマーは伝統的に3桁の識別子を用いて表され、最初の2桁に100を掛けたものがPPO含有量のおおよその分子量を表し、および最後の桁に10を掛けたものがPEO含有量のおおよその割合を示す。例えば、「ポロキサマー188」は、Mw: 約1800 (b: 約31のPPOに対応) のPPOブロック、および約80% (w/w) のPEO (a: 約82に対応) を含む重合体を指す。しかし、この値はある程度変化する事が知られており、研究用グレードのLutrol (登録商標) F68および臨床用グレードのKolliphor (登録商標) P188などの市販製品は、製造元のデータシートでは両者共にポロキサマー188であるが、分子量に大きな違いがあり(7680から9510の間)、これら特定の製品について提供されたaおよびbの値は、それぞれ約79および約28であることが示されている。これはブロック共重合体の不均一な性質を反映しており、aおよびbの値は最終製剤中の平均値であることを意味する。

【0119】

「ポロキサミン」または「逐次的ポロキサミン」(Tetronic (登録商標) の商品名で市販されている) は、4本のPEO-PPOの腕が、PEO-PPO-基の遊離OH基とエチレンジアミンの1級アミン基との結合を介して、中心のエチレンジアミンに接続されたX字型のブロック共重合体であり、および「逆ポロキサミン」も同様に、4本のPPO-PEOの腕が、PPO-PEO-基の遊離OH基とエチレンジアミンの1級アミン基との間の結合を介して、中心のエチレンジアミンに接続されたX字型のブロック共重合体である。

【0120】

核酸ワクチンはまた、ネオエピトープを含む1つ以上の免疫原性ポリペプチドを含む融合産物をコードし得る。プラスミドDNAはまた、弱毒性細菌を送達システムとして使用することで送達され得、この方法は経口投与されるDNAワクチンにとって好適である。細菌は独立して複製するプラスミドで形質転換され、プラスミドは宿主細胞内で弱毒化細菌が死んだ後、宿主細胞の細胞質に放出される。

【0121】

所望の抗原をコードするDNAを含むDNAワクチンは、フラグメント単独、直鎖状プラスミド、環状プラスミド、複製可能プラスミド、エピソーム、RNAなどを含む、任意の適した形態で宿主細胞に導入され得る。好ましくは、遺伝子はプラスミドに含まれる。特定の実施形態では、プラスミドは発現ベクターである。遺伝子物質を発現し得る個別の発現ベクターは、標準的な組み換え技術を用いて生産され得る。

【0122】

投与経路には、筋肉内、鼻腔内、腹腔内、皮内、皮下、静脈内、動脈内、眼球内および経口、加えて吸入または座薬によって局所的、経皮的に、または洗浄によって、例えば膺、直腸、尿道、頬および舌下組織などの粘膜組織への投与を含むが、これらに限定しない。言い換えると、投与経路は、筋肉内経路、皮内経路、経皮経路、皮下経路、静脈内経路、動脈内経路、髄腔内経路 (the intrathecal route)、骨髄内経路 (the intramedullary route)、髄腔内経路、心室内経路、腹腔内経路、鼻腔内経路、膺内経路、眼内経路、または肺内経路などを介した任意の非経口経路の1つから選択されてよく；経口経路、舌下経路、頬経路、または肛門経路を介して投与される；または局所投与される。

【0123】

典型的な投与経路には、筋肉内、腹腔内、皮内および皮下注射が含まれる。遺伝子構築物は、従来の注射器、無針注射装置、「微粒子銃型遺伝子銃」、またはエレクトロポレーション (「EP」)、流体力学的な方法、もしくは超音波などのその他の物理的方法を

含むが、これらに限定されない手段によって投与され得る。DNAワクチンは、細胞内でDNAが発現され、および所望の抗原が生成される限りにおいて、DNAの送達に用いられ得る任意の方法で送達され得る。

【0124】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるDNAワクチン組成物は、カチオン性リポソーム、フルオロカーボンエマルジョン、蝸牛殻状、細管、金粒子、生分解性マイクロスフェア、またはカチオン性ポリマーなどの既知のトランスフェクション試薬を介して、またはそれらと組み合わせて送達される。蝸牛殻状送達ビヒクルはフォスファチジルセリン、コレステロール、およびカルシウムからなる安定なリン脂質カルシウム沈殿剤であり、この無毒で非炎症性のトランスフェクション試薬は消化器系に存在し得る。生分解性マイクロスフェアはトランスフェクションのためのDNAマイクロカプセルの製造に使用できるポリエステルであるポリ(ラクチド-コ-グリコリド)などの重合体を含む。脂質ベースのマイクロチューブはしばしば螺旋状に巻かれた2層の脂質からなり、それらの端が互いに結合することでパックされている。細管が用いられる場合、核酸は、動物の体内への送達および放出制御のために、その中央の中空部へ配置され得る。

10

【0125】

DNAワクチンは、マイクロスフェアを介して、粘膜表面へと送達され得る。生体接着性マイクロスフェアは様々な技術を用いて調製され、目、鼻腔、尿路、結腸および胃腸などに見られる任意の粘膜組織に付着するように調製され得るため、ワクチンの全身的な放出制御に加えて局所的な放出制御の可能性を供する。特定の粘膜組織への生体接着性マイクロスフェアの適用は、局所的なワクチン作用にも使用し得る。いくつかの実施形態では、粘膜ワクチンの送達のための代替アプローチは、特異的タンパク質抗原の遺伝子をコードするプラスミドDNA発現ベクターを、粘膜表面に直接投与することである。

20

【0126】

開示されるDNAプラスミドワクチンは、用いられる投与様式に従って製剤化される。典型的には、DNAプラスミドワクチンは、注射可能な組成物であって、それらは無菌であり、および/またはパイロジェンフリーおよび/または粒子フリーである。いくつかの実施形態では、等張性剤が好ましく使用される。一般的に、等張性のための添加剤には、塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトール、およびラクトースが含まれ得る、いくつかの実施形態では、リン酸緩衝生理食塩水などの等張液が好ましい；1つの好ましい溶液はタイロード緩衝液である。いくつかの実施形態では、安定化剤にゼラチンおよびアルブミンを含む。いくつかの実施形態では、LGSまたは他のポリカチオンもしくはポリアニオンなどの、製剤が室温または周囲の温度で長時間安定である事を可能にする安定化剤が製剤に添加される。

30

【0127】

本明細書に開示される組成物中の第2の構成要素は、医薬的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤であって、これは好ましくは緩衝溶液の形態である。非経口ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロースおよび塩化ナトリウム、ラクトリンゲル液、または揮発性油を含む。静脈内ビヒクルとしては、水分および栄養分補給剤、リンゲルデキストロースをベースにしたものなどの電解質補給剤などを含む。防腐剤、抗菌剤には、酸化防止剤、キレート剤、不活性ガスなどを含む。好ましい保存剤には、ホルマリリン、チメロサル、ネオマイシン、ポリミキシンB、およびアンフォテリシンBを含む。

40

【0128】

好ましい実施形態では、緩衝溶液は「タイロード緩衝液」として知られるものであり、および好ましい実施形態では、このタイロード緩衝液は140 mM NaCl、6 mM KCl、3 mM CaCl₂、2 mM MgCl₂、10 mM 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンサルホン酸(Hepes)(pH 7.4)、および10 mM グルコースの組成を有する。タイロード緩衝液(またはその代替)の濃度は、典型的には約35% v/vであるが、懸濁したプラスミドの水分量に依存して、この濃度は大きく変化し得る - というのも、この緩衝液は生理学的に許容されるため、組成物の水相の任

50

意の割合を構成し得る。

【0129】

さらに、好ましい実施形態では緩衝溶液はPBSであり、好ましい実施形態ではPBSは、1ml溶液あたり、0.28mgのリン酸二水素カリウム、1.12mgのリン酸水素ナトリウム・二水和物および9.0の塩化ナトリウムの組成を有する。

【0130】

追加的な担体物質が含まれていてもよく、これにはタンパク質、糖などを含み得る。かかる担体は、水性または非水性の溶液、懸濁液、およびエマルジョンであってよい。非水性の担体の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、オレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性の担体には、水、アルコール性/水性溶液、エマルジョンまたは懸濁液を含み、生理食塩水を含む。

10

【0131】

本発明の特定の実施形態

上記のように、本発明は、

i) 少なくとも1つの抗原単位；
 ii) 樹状細胞を標的とする、少なくとも1つの抗原提示細胞（APC）標的化単位；
 iii) 任意選択で多量体化単位、例えば二量体化単位であって、2つ以上の抗原単位および2つ以上の抗原提示細胞（APC）標的化単位を含むように該融合ポリペプチドの多量体化をもたらす多量体化単位；
 を含む、融合ポリペプチドに関する。

20

【0132】

いくつかの実施形態では、APC標的化単位は、患者からの腫瘍細胞のネオエピトープである少なくとも1つのエピトープのアミノ酸配列からなる、またはそれを含む。

【0133】

いくつかの実施形態では、APC標的化単位は、患者からの腫瘍細胞のネオエピトープを含まない。

【0134】

いくつかの実施形態では、APC標的化単位は細菌またはウイルス抗原である、例えば少なくとも1つの細菌またはウイルスエピトープのアミノ酸配列を含む抗原単位である。

【0135】

いくつかの実施形態では、APC標的化単位は成熟樹状細胞（mDC）を標的とする。

30

【0136】

いくつかの実施形態では、APC標的化単位は、例えばヒト型の、CCL19およびCCL21から選択される。

【0137】

いくつかの実施形態では、APC標的化単位は受容体CCR7を標的とする。

【0138】

いくつかの実施形態では、APC標的化単位は、例えばヒト型の、CCL3、CCL4、CCL5、CCL20、またはXCL1から選択される。

【0139】

いくつかの実施形態では、APC標的化単位は未成熟樹状細胞（imDC）を標的とする。

40

【0140】

いくつかの実施形態では、APC標的化単位は、CCR1、CCR3、CCR5、CCR6、およびXCR1から選択される受容体を標的とする。

【0141】

いくつかの実施形態では、APC標的化単位は、抗原提示細胞上の標的表面分子、例えばCLEC9AまたはDEC205に対する特異性を有する抗体結合領域、例えば抗-CLEC9A、抗-DEC205、またはその変異体、例えば抗-CLEC9A Fv、抗-DEC205 Fvからなる、またはそれを含む。

50

【 0 1 4 2 】

いくつかの実施形態では、A P C 標的化単位はリガンド、例えば C E L C 9 ペプチドリガンドからなる、またはそれを含む。

【 0 1 4 3 】

いくつかの実施形態では、A P C 標的化単位は、X c l 1、G M - C S F、抗 - D E C - 2 0 5 F v、抗 - C L E C 9 F v、および C L E C 9 リガンドから選択される。

【 0 1 4 4 】

いくつかの実施形態では、A P C 標的化単位はサイトカイン、例えば G M - C S F、例えば C D 1 1 6 に結合する A P C 標的化単位である。

【 0 1 4 5 】

いくつかの実施形態では、抗原単位は、リンカー、例えば G S リンカー、例えばアミノ酸配列 G S G S G S G S G S (配列番号 1 3) を持つリンカー、または免疫グロブリン分子 (I g)、例えば I g G に由来するリンカー、例えば鎖間共有結合の形成を介して多量体化に寄与するリンカー、を介して標的化単位に連結される。いくつかの実施形態では、リンカーは、ヒンジ領域、例えば I g、例えば I g G 由来ヒンジ領域であるかまたはそれを含み、および鎖間共有結合、例えばジスルフィド架橋の形成を介して多量体化に寄与する、および/または非共有相互作用 (ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用および極性相互作用およびイオン結合を含む親水性相互作用) の形成を介して多量体化に寄与する。いくつかの実施形態では、リンカーは、カルボキシル末端 C ドメイン (C H 3 ドメイン)、例えば I g のカルボキシル末端 C ドメイン (C 3 ドメイン)、または該 C ドメインに実質的に相同である配列、例えば I g G 3 の C H 3 ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ヒンジおよび C H 3 ドメインは、アミノ酸配列 G G G S S (配列番号 6 6) によって、例えばアミノ酸 G G G S S の 3 重配列 (すなわち、配列 G G G S S G G G S S G G G S S ; 配列番号 7 2) によって連結されている。ヒンジと C H 3 間の代替的な連結はアミノ酸配列 G G G S S G G G S G (配列番号 7 0) を介し得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、疎水性相互作用を介して、例えば C H 3 ドメインを介して多量体化に参加する、二量体化モチーフまたは任意のその他の多量体化ドメインを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは I g G、例えば I g G 2 または I g G 3 に由来する h 1 + h 4 または h 4 を含むヒンジ領域を含む。

【 0 1 4 6 】

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの抗原単位は、少なくともまたは約 5、例えば少なくともまたは約 1 0、少なくともまたは約 1 5、少なくともまたは約 2 0、少なくともまたは約 2 5、および少なくともまたは約 3 0 個のエピトープからなる、またはそれを含む。

【 0 1 4 7 】

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの抗原単位は、腫瘍細胞において、または感染性細菌もしくはウイルスにおいて同定されるエピトープ / 抗原間の平均以上、例えば上位四分の一の M H C 結合安定性を示す少なくとも 1 つのエピトープを含む。

【 0 1 4 8 】

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの抗原単位は細菌またはウイルス抗原である。

【 0 1 4 9 】

このような実施形態では、抗原単位は、 - コロナウイルス由来の (特にスパイクタンパク質由来)、例えば S A R S コロナウイルス由来の (特にスパイクタンパク質由来) および好ましくは S A R S - C o V - 2 由来の、特に S A R S - C o V - 2 スパイクタンパク質由来のアミノ酸配列を含み得る。特に関心のある (および本明細書において例示される) 実施形態は、アミノ酸配列が S A R S - C o V - 2 スパイクタンパク質からのリボソーム結合タンパク質 (R B D) である事を伴う。したがって、重要な実施形態では、アミノ酸配列は、N C B I 参照配列番号 : Y P _ 0 0 9 7 2 4 3 9 0 の残基 3 1 9 ~ 5 4 1 からなる、もしくはそれを含む、またはそれに対して少なくとも 8 0 % の配列同一性、例え

10

20

30

40

50

ば、それに対して少なくとも 85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる、もしくはそれを含む。

【0150】

いくつかの実施形態では、本発明の融合タンパク質は、二量体、三量体、四量体、五量体またはより高次の多量体の形成を可能にする多量体化単位、例えば二量体化単位を含む。好適な多量体化単位の例は、上記の本発明において有用なリンカーについての議論において提供され、配列番号 49、51、52、53、および 69 のアミノ酸配列を有するものを含む。

【0151】

本発明はさらに、i) 少なくとも 1 つの抗原単位をコードするヌクレオチド配列を含む第 1 の発現構築物、および ii) 樹状細胞を標的とする少なくとも 1 つの抗原提示細胞 (APC) 標的化単位をコードするヌクレオチド配列を含む第 2 の発現構築物、を含む少なくとも 2 つの発現構築物の系に関する。

【0152】

いくつかの実施形態では、第 1 の発現構築物は本発明において規定される少なくとも 1 つの抗原単位をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0153】

いくつかの実施形態では、第 2 の発現構築物は、本発明において規定される樹状細胞を標的とする少なくとも 1 つの抗原提示細胞 (APC) 標的化単位をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0154】

いくつかの実施形態では、第 1 の発現構築物は、少なくとも 1 つの抗原単位をコードするヌクレオチド配列を含み、および少なくとも 1 つの抗原単位の多量体化をもたらす多量体化単位、例えば二量体化単位をコードするヌクレオチド配列をさらに含む。

【0155】

いくつかの実施形態では、少なくとも 2 つの発現構築物は、同一の発現ベクター上で発現される、例えば 2 つの異なるプロモーターの制御下において発現される。

【0156】

いくつかの実施形態では、少なくとも 2 つの発現構築物は、少なくとも 2 つの異なるベクターによって発現される。

【実施例】

【0157】

[実施例 1]

ネオエピトープ送達のための APC 標的化単位としてのケモカインの評価

本研究の目的は、本発明である APC 標的化 DNA ワクチンによるネオペプチド特異的 T 細胞を誘導し、腫瘍増殖を低減する能力を試験する事、およびワクチン接種したマウス健康状態に対するワクチンの影響を観察する事である。

【0158】

DNA ワクチン接種のためのプラスミドは Aldevron 社から入手可能な市販の pUMVC4 (商標) に基づく。

【0159】

pUMVC4 (商標) は、製造元の書類によると、4479 kb のプラスミドベクターであって、E. coli における高コピー数の複製、およびほとんどの哺乳類細胞におけるコードされた目的タンパク質の高レベルな一過性発現を可能にする。このベクター (図 4 を参照) は以下のエレメントを含む:

- 1) 広範囲な哺乳類細胞における高レベル発現のためのヒトサイトメガロウイルス前初期 (CMV) プロモーター、
- 2) 効率的な転写終結および mRNA のポリアデニル化のためのウサギベータ - グロブリン ポリアデニル化シグナル、

10

20

30

40

50

- 3) E. coli の選別のためのカナマイシン耐性遺伝子、および
 4) in vivo での免疫応答誘導に適したものとする、アンピシリン耐性遺伝子由来の免疫刺激配列 (ISS)。

【0160】

pUMVC4 (商標) プラスミドの全配列を配列番号29に記載する。

【0161】

pUMVC4 をバックボーンとして用い、且つ S16A におけるネオエピトープをガイドする APC 標的化単位を用いて生成した5つの発現ベクターを構築した。APC 標的化単位として使用した種々のケモカインを以下の表に示す：

【表5】

10

APC標的化単位	配列番号
mCCL3	配列番号36
mCCL4	配列番号37
mCCL5	配列番号38
mCCL19	配列番号39
mXCL1	配列番号40

【0162】

5つの S16A ネオエピトープは、マウス結腸がん株 CT26 および BALB/c マウス由来の正常組織サンプルの全エクソームシーケンシング、およびがん細胞でのみ見られたペプチドを選択する事によって初めに同定された。この実験では、同定されたネオエピトープに対するマウスの免疫応答生成能力を評価した。

20

【0163】

pUMVC4 APC 標的化 S16A を、APC 標的化単位 (配列番号36~43)、ヒト IgG3 ヒンジ1、ヒンジ4 および CH3 ドメイン (配列番号31、32 および34) ならびに、連続的に連結された5つのネオエピトープ C22、C23、C25、C30、および C38 (配列番号61~65) を含むペプチドをコードするコドン最適化された (例えばマウスにおける発現のため) DNA、を含む DNA インサートを pUMVC4 発現カセットにライゲーションする事で構築した (図5を参照)。コントロールとして、APC 標的化単位を含まないが、ヒト IgG3 ヒンジ1、ヒンジ4 および CH3 ドメイン、ならびに同じ5つのネオエピトープ C22、C23、C25、C30、および C38 (配列番号61~65) をコードするインサートを含む pUMVC4 プラスミドを使用した。pUMVC4 APC 標的化 S16A ベクターにおいて、インサートはまた効率的な翻訳開始のために Kozak コンセンサス配列を含む。この実験において (および以下の実施例においても) 使用された5つのネオエピトープのアミノ酸配列を以下の表に示す：

30

【表6】

ペプチド	AA配列	配列番号
C22	QIETQQRKFKASRASILSEMKMLKEKR	配列番号61
C23	VILPQAPSGPSYATYLQPAQAQMLTTPP	配列番号62
C25	DTLSAMSNPRAMQVLLQIQGGLQTLAT	配列番号63
C30	DGQLELLAQGALDNALSSMGALHALPR	配列番号64
C38	RLHVVKLLASALSTNAAALTQELLVLD	配列番号65

40

【0164】

滅菌水に溶かしたプラスミド pUMVC4 mCCL3 S16A、pUMVC4 mCCL4 S16A、pUMVC4 mCCL5 S16A、pUMVC4 mCCL1

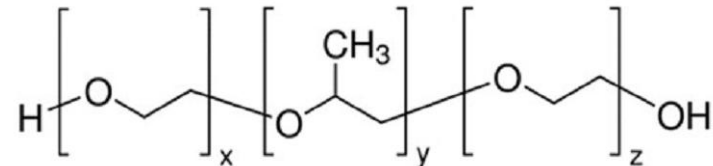
50

9 S 1 6 A、p U M V C 4 m X c l 1 S 1 6 A および（空の）p U M V C 4 をそれぞれポロキサマー 1 8 8（B A S F 社の K o l l i p h o r（登録商標））およびタイロート緩衝液と混合し、タイロート緩衝液中に 3 % w / v ポロキサマー 1 8 8 および 0 . 0 5 μ g / μ l プラスミドの組成物を得た。

【 0 1 6 5 】

D N A と組み合わせて試験する両親媒性ブロック共重合体は、以下の一般式を有する K o l l i p h o r（登録商標）P 1 8 8（もしくは本開示では単に K o l l i p h o r と称する、または L u t r o l（登録商標）F 6 8）である：

【化 2】



【 0 1 6 6 】

研究計画

マウスに、0日目にC T 2 6 腫瘍を移植し、- 1 6 日目、- 9 日目、- 3 日目、5 日目、1 2 日目に試験ワクチンで免疫した。各免疫は、左右の脛骨におけるそれぞれ 5 0 μ l のワクチンの注射によって構成された。腫瘍の移植から 7 日後に、四量体アッセイにおける C 2 2 M H C I の試験のための血液サンプルを試験動物から採取した。

【 0 1 6 7 】

各 1 4 匹の 6 つの群はそれぞれ以下のワクチン組成物を受けた：

- 1 . p U M V C 4 m C C L 3 S 1 6 A 5 μ g + K o l l i p h o r
- 2 . p U M V C 4 m C C L 4 S 1 6 A 5 μ g + K o l l i p h o r
- 3 . p U M V C 4 m C C L 5 S 1 6 A 5 μ g + K o l l i p h o r
- 4 . p U M V C 4 m C C L 1 9 S 1 6 A 5 μ g + K o l l i p h o r
- 5 . p U M V C 4 m X C L 1 S 1 6 A 5 μ g + K o l l i p h o r
- 6 . p U M V C 4 5 μ g + K o l l i p h o r

7 . 未処置

ナイーブマウスの 8 群目は 5 匹の動物を含む。

【 0 1 6 8 】

四量体アッセイは、以下のように行った：

M H C クラス I 分子を製造し、この分子に U V 光を照射することで C 2 2 エピトープと交換される安定化ペプチドを搭載させた。この M H C I 分子を蛍光標識したストレプトアビジンと結合させることで多量体化した。ネオエピトープにポジティブな C D 8 + T 細胞を同定するために、細胞を多量体および蛍光色素を結合させた抗 C D 3、抗 C D 4 および抗 C D 8 抗体で共染色した。そしてサンプルをフローサイトメトリーで分析し、M H C : C 2 2 ポジティブな C D 8 + の割合を算出した。

【 0 1 6 9 】

T 細胞の活性化を測るために、以下の再刺激実験を行った：

脾臓細胞を 5 つのネオペプチド含有ワクチンで刺激した。脾臓細胞のサンプル中において、抗原提示細胞はネオエピトープを処理し、その後それらを T 細胞へと提示することで、同種の C D 4 + および C D 8 + T 細胞の活性化がもたらされる。活性化 T 細胞はインターフェロン（I F N - ）を含む、サイトカインの合成を増加させる。I F N - 産生 T 細胞は E L I S p o t 解析によって検出された。

【 0 1 7 0 】

結果

10

20

30

40

50

免疫の腫瘍増殖に対する効果を図6に示す。予防免疫によって、共重合体Kolliphorと共に5 μ gのpUMVC4 APC標的化S16Aプラスミドベクターを受けたマウスにおいて50~100%の腫瘍容積の減少がもたらされた。Kolliphorと共にAPC標的化S16Aを含まない5 μ gのpUMVC4で処置された群と比べて、Kolliphorと共に5 μ gのpUMVC4 mCCL19 S16Aで処置された群において腫瘍の減少は顕著に向上した。

【0171】

腫瘍移植後7日目に全てのマウスから全血を回収し、蛍光標識したC22 MHC I四量体で染色した。C22をコードするpUMVC4 APC標的化S16Aワクチンを用いた免疫は、高頻度でC22ネオエピトープ特異的なCD8+T細胞を誘導した(平均0.3~0.6頻度)。図7を参照。

10

【0172】

S16Aプラスミドを用いたワクチン接種は、続くネオペプチドによる刺激に応答してIFN γ を産生可能なT細胞を誘導し、一方で、S16Aで免疫しなかった動物由来サンプルは、該ネオペプチドによる刺激に際してサイトカインシグナルを示さなかった。図8を参照。

【0173】

さらに、DNAワクチンはマウスにおいて十分に忍容性があった；副作用の徴候は観察されず、体重変化の増加から示されるようにマウスの体重は研究を通して継続的に増加し、健康且つ影響を受けていないマウスである事が示された。

20

30

40

50

【表 7】

ネオエプトープ送達のためのA P C 標的化単位としてケモカインをコードするDNAで免疫したマウスの体重変化の評価

日数	CCL3			CCL4			CCL5			CCL19			XCL1		
	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N
-16	0	0	14	0	0	14	0	0	14	0	0	14	0	0	14
-15	0.8863754	1.3309119	14	1.9423182	2.6624305	14	1.2735783	2.1555161	14	1.4415903	3.6817642	14	-0.366308	3.2720866	14
-11	1.2574794	3.185451	14	2.1802261	3.3544355	14	4.3486595	4.0783625	14	1.4575305	3.8991463	14	0.9944677	4.1273903	14
-9	0.220809	4.7964973	14	0.283442	3.0857483	14	3.0598174	4.661057	14	0.3365991	4.3996313	14	0.2157471	3.6052114	14
-7	2.7427221	4.0704744	14	1.7739198	3.3477789	14	3.8801771	3.4525704	14	1.5629255	3.6565118	14	1.1870868	2.573715	14
-3	2.41419	4.4013287	14	2.5137031	4.8636941	14	4.9504809	3.8026727	14	2.0791244	4.6838491	14	2.6463785	4.2702206	14
1	2.3830701	4.762877	14	2.5370244	4.4049527	14	4.2645075	4.2478137	14	3.1472585	6.6713694	14	3.2033645	4.0126726	14
4	0.6451327	5.4944956	14	1.1731022	5.3330388	14	2.6162068	4.4934448	14	0.8815458	6.3940253	14	1.3979628	6.0343284	14
5	2.9150697	5.8397319	14	3.7419904	4.0857969	14	4.9224552	4.3104744	14	2.5304266	5.8941714	14	3.7315569	3.77523	14
6	3.3658798	6.429654	14	4.5936267	3.8893079	14	5.112862	5.3888527	14	2.4540823	4.7813688	14	4.8482379	3.8677259	14
8	3.3451757	5.9851109	14	4.3506699	3.4117179	14	5.9742509	5.3270059	14	2.7657444	4.6035696	14	4.43983	4.3553127	14
11	4.9910845	5.5779741	14	4.6701795	4.1931341	14	6.8725523	5.2499513	14	3.951975	5.2856939	14	6.5905758	5.3637017	14
12	5.1640227	6.917586	14	4.4077461	3.7743819	14	7.702807	5.1709529	14	5.1074123	5.2650377	14	5.7051446	5.4879028	14
13	5.5916725	6.15574	14	5.1101704	5.1916002	14	8.3171774	5.4028654	14	5.188319	4.7721888	14	7.93995	5.7825594	14
15	6.2193684	7.3421511	14	6.1394359	4.7025327	14	8.5074718	4.6757277	14	6.266911	5.221704	14	7.8882129	5.9709272	14
18	7.2649069	7.775726	14	7.9329011	4.1813369	13	11.858912	5.5201394	12	6.3197803	4.7643997	14	9.4112441	5.2223158	13
20	11.524643	7.3146213	12	8.4188041	4.3620684	12	14.791602	5.3405828	12	7.7426458	4.7014022	13	12.864004	6.1921514	13

10

20

30

40

50

【表 8】

日数	APC標的化無し			空プラスミド			処置無し			ナイーブマウス		
	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N
-16	0	0	14	0	0	14	0	0	13	0	0	5
-15	0.8790025	1.2659416	14	1.3411582	1.6355957	14	1.6689002	3.3525154	13	-0.118611	1.9190125	5
-11	1.957351	3.2190635	14	1.212813	2.731037	14	2.3310089	2.3660826	13	-0.162533	1.9362329	5
-9	1.8717848	3.2461756	14	-0.257312	2.9411571	14	1.7733589	3.308048	13	1.3992846	3.9184503	5
-7	2.1313298	3.1622751	14	0.634383	3.618878	14	2.0655841	4.0365386	13	2.3689432	3.7546783	5
-3	3.9748831	2.3939841	14	3.0305458	4.5913096	14	3.444122	3.8061839	13	2.7756258	2.2299571	5
1	4.4819436	3.1414049	14	2.8390304	4.309384	14	3.5162211	4.2468904	13	3.0060962	1.076782	5
4	2.3293464	4.337663	14	1.4497727	4.4667143	14	-0.245309	7.7964932	13	-0.249337	3.2368439	5
5	4.4258209	4.1108208	14	3.5042952	4.5394432	14	3.7433095	5.1731233	13	2.1795295	1.2681	5
6	4.7680391	4.4982046	14	3.7676028	3.7914055	14	4.422164	5.9939937	13	2.9423582	1.3548533	5
8	5.9081958	5.2074227	14	4.0142092	4.0396446	14	5.0562335	6.120553	13	3.4004358	1.1941085	5
11	5.0619503	4.2023491	14	6.27957	4.0380831	14	4.8483895	5.9276173	13	4.4244347	1.5398234	5
12	6.3130952	3.9546609	14	6.9780764	5.7678588	14	5.8418009	5.4677348	13	5.9894487	0.9256987	5
13	7.8154602	4.4499296	14	7.1979332	4.0540421	14	6.6638885	6.4712168	13	6.760866	1.752727	5
15	8.9640968	4.814026	14	8.5884406	5.9671708	14	7.0848026	7.4386101	13	9.3695385	2.843451	5
18	11.698208	3.0616748	12	10.358708	6.3822571	11	9.3929114	7.7285807	10	8.7600563	3.8239072	4
20	12.650733	4.3147454	11	11.427638	5.4351893	9	8.7648269	8.578872	7	7.2360458	6.5963891	5

10

20

30

40

50

【0174】

結論

異なるAPC標的化単位およびS16Aネオエピトープを含む、Kolliphorと送達されるpUMVC4プラスミドベクターは、CT26抗腫瘍効果をもたらした。5µgという低用量のDNAはコントロール群と比較して非常に顕著な腫瘍容積AUCの減少をもたらし、APC標的化DNAワクチンの高い有効性を実証した。S16Aネオペプチドの再刺激では、脾臓細胞において、APC標的化単位に依らずS16Aプラスミドベクターを受けた群間で類似のT細胞免疫原性プロファイルを示した。

【0175】

ワクチンはマウスにおいて十分に忍容性があった；副作用の徴候は観察されず、マウスの体重は研究を通して継続的に増加し、健康且つ影響を受けていないマウスである事が示さ

れた。

【0176】

[実施例2]

ネオエピトープの送達のためのAPC標的化単位として、その他のケモカイン、サイトカイン、Fvフラグメントおよびペプチドの評価。

この研究では、本発明者らは、その他のケモカインおよびサイトカイン、ならびにケモカインファミリー外のAPC標的化分子、例えばAPC上の受容体を認識する抗体またはAPC上の表面受容体に結合する小ペプチドリガンドが、以前の研究で見られたものと同程度に、ネオペプチド特異的なT細胞を誘導し、および腫瘍増殖を減少させ得るかを試験する事を意図した。さらに本発明者らはワクチン接種したマウスの健康状態に対するワクチンの影響を観察する事を意図した。

10

【0177】

DNAワクチン接種のためのプラスミドはAldevron社から入手可能な市販のpUMVC4(商標)に基づく。

【0178】

pUMVC4をバックボーンとして用い、且つS16AにおけるネオエピトープをガイドするAPC標的化単位を用いて生成した8つの発現ベクターを構築した。APC標的化単位として使用した種々のケモカイン、Fvフラグメントおよびペプチドリガンドを以下の表に示す：

【表9】

20

APC標的化単位	配列番号
mCCL19	配列番号39
mCCL20	配列番号41
mCCL21	配列番号42
mGM-CSF	配列番号43
抗-mDEC-205Fvフラグメント	配列番号45
抗-mCLEC-9Fvフラグメント	配列番号46
CLEC9リガンド	配列番号47
FLT3リガンド	配列番号48

30

【0179】

研究計画

マウスに、0日目にCT26腫瘍を移植し、-15日目、-8日目、-1日目、6日目、13日目に試験ワクチンで免疫した。各免疫は、左右の脛骨におけるそれぞれ50μlのワクチンの注射で構成された。腫瘍の移植から-2日後および8日後に、四量体アッセイにおけるC22 MHC Iの試験のための血液サンプルを試験動物から採取した。

【0180】

各13匹の9つの群はそれぞれ以下のワクチン組成物を受けた：

40

1. pUMVC4 mCCL19 S16A 5μg + Kolliphor
 2. pUMVC4(空) 5μg + Kolliphor
 3. pUMVC4 抗mCLEC9 Fv S16A 5μg + Kolliphor
 4. pUMVC4 mCLEC-9リガンド S16A 5μg + Kolliphor
 5. pUMVC4 mCCL20 S16A 5μg + Kolliphor
 6. pUMVC4 mCCL21 S16A 5μg + Kolliphor
 7. pUMVC4 抗mDEC-205 Fv S16A 5μg + Kolliphor
 8. pUMVC4 mFLT3L S16A 5μg + Kolliphor
 9. pUMVC4 mGM-CSF S16A 5μg + Kolliphor
- ナイーブマウスの10群目は5匹の動物を含む。

50

【0181】

実験の読み出し (Read-out) は腫瘍容積、循環するネオエピトープ特異的 CD8 + T 細胞および脾臓から単離された機能的なネオエピトープ特異的 T 細胞の測定、である。

【0182】

結果

免疫の腫瘍増殖に対する効果を図9に示す。予防免疫によって、共重合体 Kolliphor と共に 5 μg の pUMVC4 APC 標的化 S16A プラスミドベクターを受けたマウスにおいて、Kolliphor と併用する 5 μg の pUMVC4 に比して、50 ~ 100 % の腫瘍サイズの減少がもたらされた。

10

【0183】

- 2日目に全てのマウスから全血を回収し、蛍光標識した C22 MHC I 四量体で染色した。C22 をコードする pUMVC4 APC 標的化 S16A ワクチンを用いた免疫は、高頻度で C22 ネオエピトープ特異的な CD8 + T 細胞を誘導した (平均 0.3 ~ 0.6 頻度)。図10を参照。この効果は、ネオエピトープを含まないコントロールの空ベクター (平均 0.1 頻度以下) よりも際立って優れていた。

【0184】

終点 (end point) では、全ての S16A を含むプラスミドを用いたワクチン接種は、続くネオペプチドによる刺激に応答して IFN を産生可能な脾臓由来の T 細胞を誘導した。S16A で免疫しなかった動物由来のサンプル (空のプラスミドおよびナイーブマウス) はネオペプチドによる刺激に際してサイトカインシグナルを示さなかった。図11を参照。

20

【0185】

さらに、DNA ワクチンはマウスにおいて十分に忍容性があった ; 副作用の徴候は観察されず、体重変化の増加から示されるように、マウスの体重は研究を通して継続的に増加し、健康且つ影響を受けていないマウスである事が示された。

30

40

50

【表 10】

ネオエピトープ送達のためのAPC標的化単位としてFvフラグメントおよびペプチドをコードするDNAで免疫したマウスの体重量変化の評価

日数	CCL19			空ベクター			Fv 抗-Clec9			Clec9 ペプチドリガンド			CCL20		
	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N
-15	0	0	13	0	0	8	0	0	13	0	0	13	0	0	13
-14	1.139148	1.353041	13	0.7274891	1.6277915	8	1.0104646	2.2013327	13	1.4586595	1.9248236	13	0.6307569	2.4728171	13
-12	1.9608584	2.8363333	13	0.076736	2.0535941	8	0.7951009	2.8320476	13	2.1721557	2.9426216	13	2.1195786	3.2126495	13
-8	4.8871238	3.3673985	13	2.9945308	3.5834629	8	2.4139883	4.3354556	13	4.27686	4.2014545	13	4.6943438	2.9687584	13
-5	3.993838	2.417825	13	3.3228029	2.966784	8	6.0817445	3.1310146	13	5.012723	3.5305563	13	4.3350389	1.9419675	13
-1	2.5248411	1.7932877	13	4.8718416	2.8314056	8	4.2528719	3.0745385	13	4.7154367	2.5850021	13	3.9570983	1.9996787	13
2	6.0475665	2.4763482	13	7.2299469	1.5077816	8	6.5465987	3.2364261	13	7.6309345	2.5155128	13	7.8824803	3.9559045	13
5	7.4167472	2.8104202	13	8.1439476	2.9839372	8	7.8874323	3.2500325	13	7.8902886	2.9573388	13	8.7628661	3.7619537	13
7	8.0583294	3.2876568	13	10.222268	3.6128255	8	9.0977444	3.9930344	13	8.3282824	2.6349014	13	11.224134	1.9098859	13
9	7.8405825	3.8765573	13	9.5793539	3.052331	8	8.9420401	3.6235839	13	8.8672662	2.9374285	13	9.7266611	3.6525425	13
12	9.3909254	2.8600445	13	10.344554	4.3233427	8	10.068073	5.2140401	13	10.69861	3.2917778	13	11.340991	2.9263815	13
14	8.0597907	2.7665782	13	10.881072	3.9925636	8	9.8156458	3.7635493	13	9.818513	2.8993949	13	9.742928	3.7752266	13
16	9.6136928	2.6133819	13	14.541798	5.6578245	8	12.050101	2.9271745	12	11.801434	3.223206	13	11.899696	3.4063403	13
19	10.352757	3.5465027	12	15.176842	5.9073788	7	13.363635	4.0756288	11	11.143421	3.7802431	13	12.246312	3.8715511	13

10

20

30

40

50

【表 1 1】

日数	CC121			Fv 抗-DEC205			FL13L			GM-CSF			ナイーブ		
	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N
-15	0	0	13	0	0	13	0	0	13	0	0	13	0	0	4
-14	1.3543557	1.7192062	13	0.6293231	1.9084697	13	1.6487397	3.0170806	13	1.5531263	1.7891121	13	-0.563251	0.8442212	4
-12	1.8293204	1.8917054	13	2.100173	3.1837618	13	3.1594828	3.6284443	13	3.0322935	1.4896749	13	-0.803813	1.7905142	4
-8	4.3742356	2.9070852	13	4.1636965	2.5322817	13	6.4052386	5.152845	13	5.1544162	4.6237373	13	3.3374585	2.5580524	4
-5	5.5359249	2.966961	13	4.5458723	2.2127792	13	6.4713217	4.1792643	13	8.29216	3.3715389	13	6.0071692	4.7847333	4
-1	4.3963027	2.8908727	13	3.8951226	2.6855639	13	4.9651132	2.2349646	12	5.8838183	2.5453088	13	3.096435	1.3922387	4
2	5.3131697	2.8459311	13	6.5721784	3.5730706	13	7.8271327	3.7384128	12	7.6394922	3.0395695	13	5.967283	1.5412159	4
5	7.4036597	5.122963	13	7.1031392	3.9039116	13	8.8922992	3.8481706	12	8.6807205	3.2160132	12	6.4137115	1.5640278	4
7	9.7279721	3.3447985	13	9.7004289	3.8788376	13	9.8318543	4.8462709	12	10.390035	3.8090331	12	7.6586037	2.8712901	4
9	9.4743827	3.7748095	13	8.7800297	5.5312064	13	9.5842145	3.5666071	12	9.9943916	3.9615974	12	8.6974545	0.9864127	4
12	9.7580625	2.6018417	13	11.043509	3.6359454	13	11.190934	4.0935224	12	12.309059	4.5705428	12	9.522338	2.2707586	4
14	9.6435734	2.4700711	13	10.085142	3.0395913	13	11.369933	3.6257843	12	10.605977	3.3638856	12	10.327501	2.7798875	4
16	11.569268	3.3297408	13	11.596663	2.8781698	12	14.019179	5.0670855	12	13.42857	3.6152313	12	11.444177	2.2889767	4
19	11.66981	3.477578	13	11.882038	2.5270066	12	13.274705	2.505272	10	13.055231	3.2021551	12	9.7444706	2.2332287	4

10

20

30

40

【 0 1 8 6 】

結論

異なる APC 標的化単位および S 1 6 A ネオエピトープを含む、K o l l i p h o r と送達される p U M V C 4 プラスミドベクターは、C T 2 6 抗腫瘍効果および循環する C 2 2 ネオエピトープ特異的 C D 8 + T 細胞をもたらした。5 μ g という低用量の DNA はコントロール群と比較して腫瘍容積の減少をもたらし、APC 標的化 DNA ワクチンの高い有効性を実証した。S 1 6 A ネオエピトープ再刺激は、脾臓細胞において、APC 標的化単位に依らず S 1 6 A プラスミドベクターを受けた群間で類似の T 細胞免疫原性プロファイルを示した。さらに、実験中の体重変化から評価されるように、DNA ワクチンはマウ

50

スにおいて十分に忍容性があった。

【0187】

[実施例3]

ネオエピトープの送達のためのAPC標的化技術のための種々の多量体化単位の評価

この研究では、本発明者らは、ヒトIgG3由来フラグメント以外の多量体化単位、例えばその他の免疫グロブリン(Ig)、合成タンパク質またはコラーゲンフラグメントを用いたAPC標的化ネオエピトープワクチンが、ネオエピトープ特異的なT細胞を誘導し、且つ腫瘍増殖を減少させ得るかを試験する事を意図した。マウスCCL19をAPC標的化単位として使用した。さらに、本発明者らはワクチン接種したマウスの健康状態に対するワクチンの影響を観察する事を意図した。

10

【0188】

DNAワクチン接種のためのプラスミドはAldevron社から入手可能な市販のpUMVC4(商標)に基づく。

【0189】

pUMVC4をバックボーンとして用い、且つS16AにおけるネオエピトープをガイドするAPC標的化単位としてCCL19を用いて生成した5つの新たな発現ベクターを構築した。種々の構築物に用いた種々の多量体化単位を以下の表に示す：

【表12】

分子	機能	配列番号
GSリンカー(単量体用)	非多量体化	配列番号13
dHLXタンパク質	二量体化	配列番号49
hMHD2(ヒトIgM)	二量体化	配列番号51
コラーゲンXVIIII三量体化ドメイン	三量体化	配列番号52
p53合成タンパク質	四量体化	配列番号53

20

【0190】

新たなDNA構築物を、IgG3二量体化ドメインを持つmCCL19 H1H4CH3 S16A構築物と比較した(配列番号59、60、および34)。図18および19の概要を参照。

30

【0191】

研究計画

マウスに、0日目にCT26腫瘍を移植し、-14日目、-7日目、1日目、8日目および15日目に試験ワクチンで免疫した。各免疫は、左右の脛骨におけるそれぞれ50μlのワクチンの注射で構成された。腫瘍の移植から7日後に、四量体アッセイにおけるC22 MHC Iの試験のための血液サンプルを試験動物から採取した。

【0192】

各13匹の7つの群はそれぞれ以下のワクチン組成物を受けた：

40

1. pUMVC4(空) 5μg + Kolliphor
2. pUMVC4 mCCL19 S16A単量体 5μg + Kolliphor
3. pUMVC4 mCCL19 H1H4CH3 S16A 5μg + Kolliphor
4. pUMVC4 mCCL19 H1dHLX S16A 5μg + Kolliphor
5. pUMVC4 mCCL19 H1p53 S16A 5μg + Kolliphor
6. pUMVC4 mCCL19 hMHD2 S16A 5μg + Kolliphor
7. pUMVC4 mCCL19 mCollagenXVIIII S16A 5μg + Kolliphor

ナイーブマウスの8群目は4匹の動物を含む。

【0193】

50

実験の読み出し情報は、初回免疫時の重さと比べての体重の変化、腫瘍容積の減少、循環するネオエピトープ特異的CD8+T細胞および脾臓から単離された機能的なネオエピトープ特異的T細胞の測定、である。

【0194】

結果

免疫の腫瘍増殖に対する効果を図12に示す：予防免疫によって、Kolliphorと共にネオエピトープS16Aを含む5μgのプラスミドベクターpUMVC4 mCCL19を受けた全ての群のマウスにおいて、Kolliphorと併用する5μgの空のプラスミドに比して、50～100%の腫瘍サイズの減少がもたらされた。Ig由来またはコラーゲンの多量体化単位を持つDNA設計を受けた群が最も優れていた。

10

【0195】

7日目に全てのマウスから全血を回収し、蛍光標識したC22 MHC I四量体で染色した。C22をコードするpUMVC4 CCL19 S16Aワクチンは全て検出可能なレベルのC22ネオペプチド特異的CD8+T細胞を生じた(平均で0.3～5%頻度)。図13を参照。この効果はIgGを含む設計(H1H4CH3およびhMHD2、平均で約2%頻度)において最も顕著であり、単量体および三量体(単量体およびhCollagenXVII、平均で1%強の頻度)では中程度の応答があり、合成タンパク質の設計(H1dHLXおよびH1p53、平均で0.5%弱の頻度)および空のプラスミドコントロールよりも顕著に優れていた。

【0196】

20

終点では、全てのS16Aを含むプラスミドを用いたワクチン接種は、ネオペプチドによる続く刺激に应答してIFNを産生可能な脾臓由来のT細胞を誘導した。S16Aで免疫しなかった動物由来のサンプル(空のプラスミドおよびナイーブ)はネオペプチドによる刺激に際してサイトカインシグナルを示さなかった。図14を参照。

【0197】

さらに、DNAワクチンはマウスにおいて十分に忍容性があった；副作用の徴候は観察されず、体重変化の増加から示されるように、マウスの体重は研究を通して継続的に増加し、健康且つ影響を受けていないマウスである事が示された。

30

40

50

ネオエピトープ送達のためのAPC標的化技術のための種々の多量体化単位をコードするDNAで免疫したマウスの体重変化の評価

日数	空プラズミド			mCCL19_S16 単量体			mCCL19_h1h4CH3_S16A			mCCL19_H1dHXL_S16A		
	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N
-14	0		0	0		0	0		0		0	0
-13	1.8065903	1.4658816	15	1.6868882	2.0734565	14	2.051628	1.9325912	15	2.5402176	1.3812768	14
-10	3.5160765	2.1254483	15	4.6467974	2.9015154	14	4.6245979	2.0965962	15	4.0723021	2.1302442	14
-7	3.770133	2.0686022	15	4.8105898	4.0003457	14	5.4134208	2.8454668	15	4.9851396	1.9122281	14
-5	6.628435	3.010984	15	7.1382895	4.7086045	14	9.0138749	3.3928789	15	7.5185625	3.0997695	14
-3	7.0289117	2.4257649	15	7.0974051	4.3724483	14	9.1890066	3.1346121	15	7.619037	3.197423	14
0	7.3468783	3.4857441	15	8.3409671	3.9141863	14	8.4347524	2.1744504	15	6.5620459	2.8396834	14
1	4.5328145	3.6591673	15	5.4788081	4.116406	14	6.6809992	3.0757316	15	5.0012801	3.6445776	14
2	5.9201369	3.5739631	15	8.0948364	5.1165168	14	8.8516984	3.5081711	15	4.8054743	3.5353776	14
4	6.85005	3.4916068	15	9.0792098	3.9091538	14	10.529619	3.8993072	15	6.6966493	4.0431882	14
7	7.1445987	2.9992626	15	11.510528	6.0430493	14	11.210636	4.2788492	15	7.6657322	4.5257821	14
9	10.542385	4.6710614	15	10.840238	3.6489439	14	13.746003	5.5857997	15	10.329819	4.839032	14
11	10.462602	3.9313322	15	12.058571	2.3601854	14	14.688285	6.4618683	15	9.9963472	3.7006016	14
14	13.315998	4.5686599	15	13.551067	3.7850659	14	14.282771	5.9143999	15	10.760224	3.9935569	13
16	13.755865	4.6056887	14	14.472833	5.4109189	13	15.354434	5.5457766	15	13.055214	3.9912675	13
18	15.261076	3.7202453	14	16.056548	5.4333788	12	17.775144	7.3666753	14	14.707669	5.3675715	12

【表 1 4】

日数	mCCL19_H1p53_S16A			mCCL19_mMHD2_S16A			mCCL19_hCollagenXVIII_S16A			ナイーブ		
	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N
-14	0	0	14	0	0	14	0	0	14	0	0	4
-13	1.7149315	2.2405615	14	1.0994299	1.7883377	14	1.6382333	1.4133702	14	1.0119102	0.9299167	4
-10	5.21012	3.4689379	14	3.0213857	2.5928036	14	4.1856776	2.6809016	14	5.3438235	1.4548287	4
-7	4.7338799	4.3510254	14	4.2950687	2.9643819	14	4.4349953	2.7134899	14	5.150205	3.0529469	4
-5	6.0298098	4.0751979	14	6.7843427	2.9550719	14	6.7596373	2.4500964	14	6.7241385	2.8091057	4
-3	6.3863026	3.5903038	14	7.020561	3.1511815	14	7.2101461	3.3531306	14	6.6671358	3.0599535	4
0	5.0115533	3.4082094	14	4.0979031	5.4476714	14	8.1756837	4.4501707	14	6.8818255	3.1676591	4
1	4.1558597	3.3628039	14	3.2625642	3.8224016	14	5.5607829	4.9334063	14	3.4020269	2.5567755	4
2	4.6349486	3.6688398	14	4.0306469	2.8672514	14	7.211852	4.228828	14	5.0527072	3.859303	4
4	6.5396079	3.8835809	14	6.1143302	2.917494	14	8.3746865	5.0902167	14	7.3629684	2.1437738	4
7	8.2979131	3.4064541	14	7.2981185	3.7648275	14	8.7555461	4.1548737	14	8.0605716	3.2966171	4
9	10.093287	3.6543979	14	11.022503	4.1735587	14	10.427133	4.2394149	14	10.407827	3.1963835	4
11	11.298379	4.1873395	14	11.46006	5.5782851	14	11.462716	3.88127	14	11.031481	3.5252434	4
14	12.696664	3.7677507	14	12.026869	5.2600742	14	11.312763	3.9910123	14	11.057459	5.3188489	4
16	13.333518	4.8120939	14	12.579142	4.4309364	13	11.480441	4.5051312	11	12.035978	4.2855628	4
18	14.617345	3.6781525	13	14.078862	5.3951134	11	13.006091	3.3628816	11	16.391946	5.8096504	3

10

20

30

40

【 0 1 9 8 】

結論

mCCL19、異なる多量体化単位およびS16Aネオエピトープを含む、Kolliphorと送達されるpUMVC4プラスミドベクターは、50~100%のCT26抗腫瘍効果をもたらした。Ig由来またはコラーゲンの多量体化単位を持つDNA設計を受けた群が最も優れていた。7日目におけるネオエピトープ特異的CD8+T細胞応答は抗腫瘍効果に相当し、および終点における機能性T細胞のレベル(IFN分泌によって測定)は、ネオエピトープを含むDNA設計を受けた群間で同程度であった。さらに実験中の体重変化から評価されるように、DNAワクチンはマウスにおいて十分に忍容性があ

50

た。

【0199】

[実施例4]

ネオエピトープの送達のためのAPC標的化技術のための、別々の単位の組合せ/分離の評価

この研究では、本発明者らは、最適に機能するためには3つのモジュール：APC標的化ドメイン、多量体化ドメインおよびネオエピトープ、の全てが融合タンパク質産物として物理的に一体に結合されている必要があるのか、またはケモカインがアジュバントとして存在するのみで十分なのか、およびネオエピトープの二量体/分泌がAPC標的化ネオエピトープワクチンの抗腫瘍効果およびT細胞応答に寄与するか試験する事を意図した。10
全てのDNA構築物について、ケモカインとしてマウスCCL19を使用した。図15の概要を参照。

【0200】

DNAワクチン接種のためのプラスミドはAldevron社から入手可能な市販のpUMVC4(商標)に基づく。

【0201】

pUMVC4をバックボーンとして用い、mCCL19のみ(配列番号39)、ネオエピトープS16Aのみ、または分泌シグナル(SecSig)、IgG3の二量体化ドメインH1H3CH3(配列番号59、60および34)およびS16Aネオエピトープ、の何れかを含む3つの新たな発現ベクターを生成した。図15に示した。20

【0202】

新たなDNA構築物およびその組み合わせを、融合タンパク質をコードするmCCL19 H1H4CH3 S16A構築物(以下mCCL19 S16A二量体と称する)、およびmCCL19 S16A単量体と比較した。

【0203】

研究計画

マウスに、0日目にCT26腫瘍を移植し、-14日目、-7日目、1日目、8日目および15日目に試験ワクチンで免疫した。各免疫は、左右の脛骨におけるそれぞれ50μlのワクチンの注射で構成された。腫瘍の移植から9日後に、四量体アッセイにおけるC22 MHC Iの試験のための血液サンプルを試験動物から採取した。30

【0204】

各13匹の8つの群はそれぞれ以下のワクチン組成物を受けた：

1. pUMVC4(空) 10μg + Kolliphor
2. pUMVC4 mCCL19 S16A 二量体 5μg + Kolliphor
3. pUMVC4 mCCL19 S16A 単量体
4. pUMVC4 mCCL19 5μg + pUMVC4 S16A 5μg + Kolliphor
5. pUMVC4 mCCL19 5μg + pUMVC4 SecSig H1H4CH3 S16A 5μg + Kolliphor
6. pUMVC4 SecSig H1H4CH3 S16A 5μg + Kolliphor 40
7. pUMVC4 mCCL19 5μg + Kolliphor
8. pUMVC4 S16A 5μg + Kolliphor

ナীবマウスの9群目は4匹の動物を含む。

【0205】

実験の読み出し情報は、初回免疫時の重さと比べての体重の変化、腫瘍容積、循環するネオエピトープ特異的CD8+T細胞の測定である。

【0206】

結果

免疫による腫瘍増殖に対する効果を図16に示す：予防免疫によって、mCCL19およびネオエピトープを受けた全ての群のマウスにおいて、成分が融合タンパク質としてコ 50

ードされたかまたは別々のタンパク質産物としてコードされたかに関わらず、腫瘍サイズの減少がもたらされた。SecSig、H1H4CH3二量体化ドメインおよびネオエピトープを含む非標的化融合タンパク質もまた顕著な抗腫瘍効果を有し、ネオエピトープの分泌および二量体化が抗腫瘍効果を向上させる事が示された。

【0207】

9日目に全てのマウスから全血を回収し、蛍光標識したC22 MHC I四量体で染色した。S16Aの一部であるエピトープC22を含む全てのワクチンによる免疫は検出可能なレベルのC22ネオペプチド特異的CD8+T細胞を生じた(平均で0.5~15%頻度)。図17を参照。この効果は融合タンパク質の設計(mCCL19 S16A二量体およびmCCL19 S16A単量体、平均で約4%頻度)において最も顕著であり、また個別のmCCL19産物とSecSig、H1H4CH3二量体化ドメインおよびネオエピトープを含む非標的化融合タンパク質との組み合わせも高いT細胞レベル(平均で1.5%強の頻度)を生じ、単一成分(mCCL19およびS16A、平均で0.5%弱の頻度)および空のプラスミドコントロールの効果よりも顕著に優れていた。

10

【0208】

さらに、DNAワクチンはマウスにおいて十分に忍容性があった;副作用の徴候は観察されず、体重変化の増加から示されるように、マウスの体重は研究を通して継続的に増加し、健康且つ影響を受けていないマウスである事が示された。

20

30

40

50

【表 15】

ネオエピトープ送達のためのA P C標的化技術のための別個の単位の組合せ/分離をコードするDNAで免疫したマウスの
体重変化の評価

日数	空プラズミド			mCCL19_S16A 二量体			mCCL19_S16A 単量体			mCCL19 + S16A			mCCL19 + SecS1aのみ_S16A		
	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N
-14	0	0	13	0	0	13	0	0	13	0	0	13	0	0	13
-13	0.2479374	1.885907	13	0.8746918	2.0789501	13	0.1278129	2.3391707	13	0.3363469	2.849276	13	-0.116557	2.6235486	13
-10	0.2764575	3.6292702	13	-1.438595	2.359862	13	-0.252501	2.9117128	13	0.5399017	3.6302872	13	0.6659715	2.2319833	13
-7	4.0769331	2.9879401	13	1.151358	3.1574658	13	3.5386661	2.6480586	13	2.046673	3.1052509	13	1.9990015	2.4132224	13
-5	4.5127835	2.8127309	13	1.0586818	3.412296	13	4.1373635	3.2804711	13	1.2998661	3.9683796	13	2.3140846	3.5211091	13
-3	4.766386	2.3286143	13	0.6268969	3.0403871	13	3.7652486	3.7242678	13	1.7950791	4.7893222	13	2.3299099	3.8583017	13
0	5.5395726	2.8854379	13	2.1639226	2.906687	13	5.4709868	3.1712732	13	4.2355916	4.8691098	13	3.5191472	4.8268418	13
1	6.8068808	3.0850282	13	2.8658581	3.4593078	13	6.1834534	3.3165246	13	5.5265159	5.4295635	13	4.4592385	4.6489957	13
4	7.0636339	3.6822052	13	3.0011873	4.279804	13	6.8730869	3.0296104	13	6.9732772	5.7256578	13	5.0415309	4.9076359	13
7	8.3959052	3.6970511	13	2.4068579	4.0702307	13	6.2602932	2.6446528	13	7.7894873	5.3121054	13	4.9024561	4.5869409	13
9	9.6960336	4.190404	13	4.2797275	4.0123717	13	7.0100454	2.8612889	13	10.113595	6.0080605	13	7.5243626	4.3852818	13
11	11.120657	4.5962658	13	4.496152	4.1939636	13	7.668049	2.8675434	13	11.198316	6.6055411	13	8.363441	4.4455726	13
15	13.102226	5.2525782	13	7.9140611	5.2474548	13	9.9850326	3.0585043	13	13.045409	6.9021566	13	11.316722	3.9478518	13
16	14.407905	5.4190699	13	8.4805843	4.8019046	11	11.626924	3.7116911	12	13.006024	5.1353393	13	11.428477	5.0110762	12
18	13.254147	5.5683011	13	10.344788	4.3066984	11	10.378468	3.3180765	12	13.472109	5.0797797	13	11.816541	4.8421463	12
21	15.940184	3.4543543	11	9.2196447	3.951199	11	10.189654	3.0927191	12	14.609935	5.0919702	12	12.123724	6.9178058	10

10

20

30

40

50

【表 1 6】

日数	SecSiq のみ_S16A			mCCL19			S16A			ナイーブ		
	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N
-14	0	0	13	0	0	13	0	0	13	0	0	4
-13	-0.309505	1.8179041	13	0.2011712	2.0668417	13	0.6493899	1.8358658	13	1.9587938	3.0031867	4
-10	-0.856511	2.7405685	13	0.3715118	2.1207847	13	-0.771033	2.46286	13	-1.984108	0.9269933	4
-7	2.0901239	2.6036258	13	3.2748973	2.60265	13	2.4137476	3.2404891	13	1.1103235	3.0020634	4
-5	1.9946168	3.0938226	13	2.7416809	2.9657343	13	2.1622042	3.5767841	13	1.664205	6.8774572	4
-3	2.28857	3.1360442	13	3.069653	3.2998084	13	1.4646322	3.8788568	13	-0.146879	6.1310353	4
0	4.7952941	4.1107589	13	3.7361795	4.2160861	13	2.4367049	3.8790624	13	-0.873845	5.1622466	4
1	5.3686055	4.6343427	13	4.7030953	4.9425986	13	1.3353305	3.155075	13	0.5438803	4.6703385	4
4	5.6706553	4.77519	13	7.0207128	5.0954049	13	3.2412657	3.5901768	13	0.8475327	5.8467054	4
7	6.3273279	4.3344147	13	7.5854634	4.6983045	13	4.7469959	4.7736347	13	-1.028012	4.4306542	4
9	8.2943677	5.1991386	13	9.8063817	6.215638	13	7.3217606	4.9660625	13	3.2754155	5.942024	4
11	8.6891917	4.9273341	13	10.064959	7.3266931	13	6.4435091	4.9761201	13	1.9369119	5.1442084	4
15	9.7067576	5.8957347	13	12.105985	6.1545446	13	8.3733404	4.2085153	13	4.9621835	6.5217102	4
16	11.375989	5.3506485	12	13.613458	4.8249237	13	12.170933	4.5587239	13	10.136396	6.4251012	4
18	12.286157	5.4958607	12	13.58406	6.0444586	12	11.298329	4.7964645	13	8.4741938	7.0103076	4
21	12.880792	5.7666514	12	14.558129	6.2365685	11	12.104161	4.5924463	11	6.3500841	5.749858	4

10

20

30

40

【 0 2 0 9】

結論

mCCL19、異なる多量体化単位およびS16Aネオエピトープを含む、Kolliphorと送達されるpUMVC4プラスミドベクターは、50~100%のCT26抗腫瘍効果をもたらした。Ig由来またはコラーゲンの多量体化単位を持つDNA設計を受けた群がもっともすぐれていた。7日目のネオエピトープ特異的CD8+T細胞応答は抗腫瘍効果に相当し、および終点における機能性T細胞のレベル(IFN分泌によって測定)は、ネオエピトープを含むDNA設計を受けた群間で同程度であった。さらに、DNAワクチンはマウスにおいて十分に忍容性があった。

50

【0210】

[実施例5]

SARS-CoV-2由来のスパイクタンパク質を用いたAPC標的化

この研究の目的は、Kolliphorと共に送達したスパイク受容体結合ドメイン(RBD)を使用したAPC(CCL19)標的化DNAプラスミドの性能を、水酸化アルミニウムでアジュバント化された組み換えRBDの性能と比較する事であった。目標は、マイクロ中和アッセイにおいて、T細胞応答の大きさ、液性の抗原特異的な抗体応答、および生成された抗体のウイルスによる細胞への感染を阻止する能力を決定する事であった。

【0211】

多数のベクター設計が作られ、そのうちP00055(以下を参照)を本研究において評価した。選択されるRBDは、全長SARS-CoV-2スパイクタンパク質(Acc ID: YP_009724390.1)から、Arg319からPhe541までのアミノ酸を切り出して取得した。ベクター設計を図20に模式的に示す。

【0212】

試験構築物P0055と比較して、P0069は発現レベルを増加する事を目的として構築された。同様に、P0072は1)発現レベルを増加する事、および2)発現産物の二量体ではなく三量体を形成する事を目的として構築されたが、まだ検証されていない。

【0213】

P0075およびP0083はコントロールであり、それぞれ多量体化およびCCL19標的化の効果を調べるために設計された。

【0214】

発現ベクターP0055は図21にプラスミドマップとして示されており、および配列番号67に記載されている。このプラスミドによってコードされるRBD配列は配列番号68に提供される。

【0215】

動物実験の詳細

マウスを0日目、7日目、14日目、21日目および28日目に試験DNAプラスミドで免疫した。各免疫は、左右の脛骨におけるそれぞれ50 μ lのDNAプラスミドの筋肉内注射で構成された。組み換えRBDワクチンの投与レジメンは、初回免疫として20 μ gのタンパク質を投与し、続いて、14日目と28日目に20 μ gのブースト免疫を2回行った。各免疫は、100 μ lのRBD+水酸化アルミニウムのワクチンの皮下投与で構成された。動物は35日目にサクリファイスした。

【0216】

4群(1~4)のマウス(それぞれ5匹、7匹、7匹および5匹の個体)を以下の処置に割り当てた:

群1: プラスミドP0053-pTGV4-CCL19(モック、すなわちスパイクタンパク質を持たないDNAプラスミド、25 μ g。

群2: プラスミドP0055(すなわち、標的化単位CCL19およびスパイクタンパク質由来のRBDを持つDNAプラスミドpTGV4)、25 μ g。

群3: 2% Alhydrogel中のRBDタンパク質、20 μ g。

群4: Alhydrogel 2%。

【0217】

読み出し情報は、体重変化(3週間の測定に基づく)および血液サンプル採取(19日目および35日目)および脾臓サンプル採取(35日目)に基づく測定である。実施された測定は、血中の抗RBD IgGの測定、脾臓T細胞の活性化(ペプチドで再刺激された脾臓細胞におけるIFN- γ 放出ELISPOT)、およびin vitroでのSARS-CoV-2の中和であった。

【0218】

結果

10

20

30

40

50

図 2 2 は、群 2 のマウスの T 細胞からの I F N - 放出を可視化した棒グラフを示す。T 細胞は、ペプチドまたはコンカナバリン A (c o n c a n a v a l i n A) (c o n A、I F N - 放出のポジティブコントロール) のどちらかで再刺激された。左端の 2 つのバーは、刺激されない細胞および無関係なペプチドで刺激された細胞からの放出を示す。プール 1、2 および 3 は、以下の分布に従って、R B D タンパク質からの重複するペプチドによって構成された：

プール R B D 1 : C o V 2 __ s - 3 1 9、C o V 2 __ s - 3 2 5、C o V 2 __ s - 3 3 1、C o V 2 __ s - 3 3 7、C o V 2 __ s - 3 4 3、C o V 2 __ s - 3 4 9、C o V 2 __ s - 3 5 5、C o V 2 __ s - 3 6 1、C o V 2 __ s - 3 6 7、C o V 2 __ s - 3 7 3、C o V 2 __ s - 3 7 9、C o V 2 __ s - 3 8 5 ;

プール R B D 2 : C o V 2 __ s - 3 9 1、C o V 2 __ s - 3 9 7、C o V 2 __ s - 4 0 3、C o V 2 __ s - 4 0 9、C o V 2 __ s - 4 1 5、C o V 2 __ s - 4 2 1、C o V 2 __ s - 4 2 7、C o V 2 __ s - 4 3 9、C o V 2 __ s - 4 4 5、C o V 2 __ s - 4 5 1、C o V 2 __ s - 4 5 7 ;

プール R B D 3 : C o V 2 __ s - 4 6 3、C o V 2 __ s - 4 6 9、C o V 2 __ s - 4 7 5、C o V 2 __ s - 4 8 1、C o V 2 __ s - 4 8 7、C o V 2 __ s - 4 9 3、C o V 2 __ s - 4 9 9、C o V 2 __ s - 5 0 5、C o V 2 __ s - 5 1 1、C o V 2 __ s - 5 1 7、C o V 2 __ s - 5 2 3、C o V 2 __ s - 5 2 9

【 0 2 1 9 】

プール 2 およびプール 3 で刺激された細胞は、刺激無しまたは無関係なペプチドで刺激された 2 つの群に比して顕著に高い I F N - の放出を示した。

【 0 2 2 0 】

図 2 3 は、3 5 日目からのマウスの血清中の全 R B D 特異的 I g G の E L I S A 測定を示し、ここで群 1 および群 4 についてはプールしたプラセボ血清とし、群 2 および群 3 については個々のマウスをアッセイした。結果的な終点の力価を図 2 3 に棒グラフとして示す。P 0 0 5 5 C C L - 1 9 R B D を用いた免疫は、水酸化アルミニウム (a l u m h y d r o x i d) を用いた組み換えスパイク R B D と同等の抗体力価が達成されるため、免疫したマウスにおいて R B D タンパク質の細胞外発現に成功した事を示し、その結果、強力な体液性応答が得られる事を示した。

【 0 2 2 1 】

最後に、図 2 4 は、4 つの試験群における抗体、および回復期の患者の血清からの抗体の中和効果を可視化した棒グラフを示す。明らかのように、群 2 からのマウスは、群 3 および回復期の患者が産生する抗体と中和効果において同等である抗体を産生する。これは、スパイクタンパク質またはその断片を用いた A P C 標的化の応用を支持する。

【 0 2 2 2 】

結論

本発明の構築物は、スパイク R B D 設計を使用して、強力な T 細胞応答を誘導する。さらに、本発明のスパイク R B D 設計によって、組み換えスパイク R B D + 2 % A l u m によるものと同程度に、体液性応答を誘導し得る。最後に、誘導された抗体力価は、回復期の患者の血清に匹敵する中和効果を示した。

【 0 2 2 3 】

本発明の A P C 標的化単位：

【表 17】

本発明に記載のAPC標的化単位

分子	*標的細胞種	*他の標的細胞種	配列番号
mCCL3	未成熟樹状細胞受容体; CCR1およびCCR5	単球/マクロファージ、T細胞 (TH1>TH2)、NK細胞、好塩基球、好酸球、好中球、アストロサイト、線維芽細胞、破骨細胞	配列番号36
mCCL4	未成熟樹状細胞受容体; CCR5>>およびCCR1	単球/マクロファージ、T細胞 (TH1>TH2)、NK細胞、好塩基球、好酸球、B細胞	配列番号37
mCCL5	未成熟樹状細胞受容体; CCR1、CCR3およびCCR5	単球/マクロファージ、T細胞 (記憶T細胞>T細胞; TH1>TH2)、NK細胞、好塩基球、好酸球	配列番号38
mCCL19	成熟樹状細胞受容体; CCR7	ナイーブT細胞、B細胞	配列番号39
mXc11	CD8α+樹状細胞	T細胞、ナチュラルキラー細胞	配列番号40
mCCL20	未成熟樹状細胞受容体; CCR6	T細胞 (記憶T細胞、TH17細胞)、血液単核細胞、活性化B細胞、NKT細胞、GALT発生	配列番号41
mCCL21	成熟樹状細胞受容体; CCR7	ナイーブT細胞、B細胞、胸腺細胞、NK細胞、	配列番号42
GM-CSF	GM-CSFは、単球、好中球、好酸球上に発現する受容体CD116に結合する。	骨髄単球系細胞、特に樹状細胞の成長・分化を刺激する	配列番号43
抗-マウスDEC-205Fv	樹状細胞	DEC205は樹状細胞に存在する受容体で、抗原取り込み受容体と推定されるものである	配列番号45
抗-マウスCLEC9Fv	樹状細胞	Clec9 (CD370)は樹状細胞、NK細胞上に発現する受容体である。抗ウイルス免疫のためのCD8T細胞のクロスプライミングに重要である。	配列番号46
CLEC9リガンド	同上	同上	配列番号47

10

20

30

40

50

【表 18 - 1】

配列：

配列番号 1：
G S G G G A

配列番号 2：
G S G G G A G S G G G A

配列番号 3：
G S G G G A G S G G G A G S G G G A

配列番号 4：
G S G G G A G S G G G A G S G G G A G S G G G A

10

配列番号 5：
G E N L Y F Q S G G

配列番号 6：
K P E P K P A P A P K P

配列番号 7：
A E A A A K E A A A K A

配列番号 8：
S A C Y C E L S

配列番号 9：
S G G G S S G G G S

配列番号 10：
G G G G S G G G G S

20

配列番号 11：
S S G G G S S G G G

配列番号 12：
G G S G G G G S G G

配列番号 13：
G S G S G S G S G S

配列番号 14：
g g G G T C A A C G T T G A g g g g g g

配列番号 15：
g g G G G A C G A T C G T C g g g g g g

配列番号 16：
g g g G A C G A C G T C G T G g g g g g g

30

配列番号 17：
t c c a t g a c g t t c c t g a t g c t

配列番号 18：
t c c a t g a c g t t c c t g a c g t t

配列番号 19：
t c g t c g t t t t g t c g t t t t g t c g t t

配列番号 20：
t c g t c g t t g t c g t t t t g t c g t t

40

【表 18 - 2】

配列番号 21 :

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

配列番号 22 :

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

配列番号 23 :

t c g t c g t t t t c g g c g c g c g c c g

配列番号 24 :

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

配列番号 25 :

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

10

配列番号 26 :

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

配列番号 27 :

GGTGCATCGA TGCAGGGGGG

配列番号 28 :

GGTGCATCGA TGCAGGGGGG TATATATATA TTGAGGACAG GT
TAAGCTCC CCCCAGCTTA ACCTGTCCTT CAATATATA TATA

配列番号 29 : ベクターバックボーン; pUMVC4a (Aldevron)

t g g c c a t t g c a t a c g t t g t a t c c a t a t c a t a a t a t g t a c a t t t a t a
t l g g c t c a t g t c c a a c a t t a c c g c c a t g t t g a c a t t g a t t a t t g a c
t a g t t a t t a a t a g t a a t c a a t t a c g g g g t c a t t a g t t c a t a g e c c a
t a l a l g g a g t t c c g c g l t a c a t a a c l t a c g g t a a a t g g c c c g c c l g
g c l g a c c g c c c a a c g a c c c c c g c c c a t t g a e g t c a a t a a t g a c g t a
t g t t c c c a t a g t a a c g c c a a t a g g g a c t t t c c a t t g a c g t c a a t g g
g l g g a g t a t t t t a c g g t a a a c t g c c c a c t t l g g c a g t a c a t c a a g t g t
a t c a t a t g c c a a g t a c g c c c c t a t t g a c g t c a a t g a c g g t a a a t g
g c c c g c c l g g c a t t a t g c c c a g t a c a t g a c c t t a t g g g a c t t t c c t
a c t t g g e a g t a c a t e t a c g t a t t a g t e a t c g c t a t t a c c a t g g t g a
t g c g g t t t t g g c a g t a c a t e a a t g g g c g t g g a t a g c g g t t t g a c t c
a c g g g g a t t t c c a a g t c t c c a c c c a t t g a c g t c a a t g g g a g l t t g
t t t t g g c a c c a a a a t c a a c g g g a c t t t c c a a a a t g t c g t a a c a a c t
c c g c c c c a t t g a c g c a a a t g g g c g g t a g g c g t g t a c g g t g g g a g g t
c l a t a t a a g c a g a g c t e g t t t a g t g a a c c g t c a g a t e g c c t g g a g a
e g c e a t e c a e g c t g t t t t g a c e t c e a t a g a a g a c a c e g g g a c c g a t
c e a g c e t c e g c g g c c g g g a a c g g t g c a t t g g a a c g c g g a t t e c c c g
l g c c a a g a g t g a c g t a a g t a c e g c c t a t a g a g t c t a t a g g c c c a c c
c c c t t g g c t t c t t a t g c a t g c t a t a e t g t t t t t g g c t t g g g t c t a
t a c a c c c c g c t t c c t c a t g t t a t a g g t g a t g g t a t a g c t t a g c c t
a t a g g t g t g g g t t a t t g a c c a t t a t t g a c c a c t t c c a a c g g t g g a g g
g c a g t g t a g t c t g a g c a g t a c t e g t t g c t g c c g c g c g c g c c a c c a g
a c a t a a t a g c l g a c a g a c t a a e a g a c t g l t e c t t t e c a t g g g t c t t
t t c t g c a g t c a c e g t e g t e g a e g g t a t e g a t a a g c t t g a t a t e g a a
t t c a c g t g g g c c e g t a c e g t a t a c t c t a g a g e g g c e g c g g a t c c a
g a t c t t t t t c c c t c g c c a a a a t t a t g g g g a c a t c a t g a a g c c c t
t g a g c a t c t g a c t t c t g g c t a a t a a a g g a a a t t t a t t t c a t t g c a a
t a g t g t g t l g g a a t t t t t t g l g t c t c t c a c t c g g a a g g a c a l a t g g

20

30

40

50

【表 18 - 3】

gagggc a a a t c a t t t a a a a c a t c a g a a t c a g t a t t t g g t t t a g a g t
 t t g g c a a c a t a t a t g c c a t t c t t c c g c t t c c t e g c t c a c t g a c t c g c t
 g c g c t c g g t c g t t c g g c t g c g g c g a g c g g t a t c a g c t c a c t c a a a g
 g c g g t a a l a c g g t t a l c c a c a g a a t c a g g g g a t a a c g c a g g a a a g a
 a c a t g t l g a g c a a a a g g c c a g c a a a a g g c c a g g a a c e g t a a a a a g g c
 c g c g t t g c t g g c g t t t t t c c a t a g g c t c c g c c c c c e t g a c g a g c a t
 c a c a a a a a t c g a c g c t c a a g t c a g a g g t g g c g a a a c c e g a c a g g a c
 t a t a a a a g a t a c c a g g c g t t t t c c c c t g g a a g c t c c c t c g t g c g c t c
 t c c t g t t c c g a c c c t g c c g c t t a c c g g a l a a c c t g t c c g c e t t t c t c
 c c t t c g g g a a g c t g t g g c g c t t t c t c a a t g c t c a c g c t g t a g g t a t c
 t c a g t t t c g g t g t a g g t c g t t c g t t c c a a g c t g g g c t g t g t g c a c g a
 a c c c c c g t t c a g e c c g a e c g c t g c g c c l t a t c e g g t a a c t a l e g t
 c t t g a g t c c a a c c e g g t a a g a c a e g a c t t a t e g c c a c t g g c a g c a g
 c c a c t g g t a a c a g g a t t a g c a g a g c g a g g t a t g t a g g c g g t g c t a c
 a g a g t t c t l g a a g t l g g l g g c c l a a c t a c g g c t a c a c t a g a a g g a c a
 g t a t t l g g t a t c t g c g c t c t g c l g a a g c c a g t t a c c t t c g g a a a a a
 g a g t t g g t a g c t c t t g a t c c g g c a a a c a a a c c a c c g c t g g t a g c g g
 t g g t t t t t t g t t t g t t t g c a a g c a g c a g a t t a c g c g c a g a a a a a a g g a
 t c l c a a g a a g a t c c t t t g a t c i t t t t c t a c g g g g t c t g a c g c t c a g t
 g g a a c g a a a a c t c a c g t t a a g g g a t t t t g g t c a t g a g a t t a t c a a a
 a a g g a t e t t c a c c t a g a t e c t l t t a a a t t a a a a a t g a a g t t t t a a a
 t c a a t c t a a a g t a t a t a t a t g a g t a a a c t t g g t c t g a c a g t t a c c a a t
 g c l l a a t c a g l g a g g c a c c l a l c l c a g c g a l c t g l c t a t l l e g t l c
 a l c c a l a g l i g c c l g a c l c c g g g g g g g g g g g g c g c t g a g g l c l g c c
 t c g t g a a g a a g g t g t t g c t g a c t c a t a c c a g g g c a a c g t t g t t g c c
 a t t g c t a c a g g c a t e t g t g g l g t c a c g e t e g t e g t t t g g t a t g g c t t
 c a t t c a g c t c c g g t t c c c a a c g a t c a a g g c g a g t t a c a t g a t c e c c
 c a l g l l g t l g c a a a a a a g c g g t l a g c t c c l t e g g t c e t c e g a l e g t l
 g t c a g a a g t a a g t t g g c c g c a g t g t t a t c a c t c a t g g t t a t g g c a g
 c a c t g c a t a a t t c t c t t a c t g t c a t g c c a t c c g t a a g a t g c t t t t c
 l g l g a c l g g l g a g t a c t c a a c c a a g l c a l t c l g a g a a t a g t g l a t g
 c g g c g a c c g a g t t g c t c t t g c c c g g c g t c a a t a c g g g a t a a t a c c g
 c g c c a c a t a g c a g a a c t t t a a a a g t g c t c a t c a t t g g a a a a c g t t c
 t l e g g g g c g a a a a c t e t c a a g g a t c i t a c e g c t g t t g a g a t c e a g t
 t e g a t g t a a c c c a c t e g t g c a c c t g a a t e g c c c a t c a t e c a g c c a
 g a a a g t g a g g g a g c c a c g g t t g a t g a g a g c t t t g t t g t a g g t g g a c
 c a g t t g g t g a t t t t g a a c i t t t l g c t t t g c c a c g g a a c g g t c t g c g t
 l g l c g g g a a g a t g c g t g a t c t g a t c c t t c a a c t c a g c a a a a g t t c g
 a t t t a t t c a a c a a a g c c g c c g t c c c g t c a a g t c a g c g t a a t g c t c t
 g c c a g t g t t a c a a c c a a t t a a c c a a t t e t g a t t a g a a a a a c t c a t e
 g a g c a t c a a a t g a a a c t l g c a a t t t a t t c a t a t c a g g a t t a t c a a t a
 c c a t a l t t t l g a a a a a g c g t t l c l g t a a t g a a g g a g a a a a c l c a c
 c g a g g c a g t t c c a t a g g a t g g c a a g a t e c t g g t a t c g g t c t g c g a t
 t c c g a c t c g t c c a a c a t c a a t a c a a c c t a t t a a t t t c c c c t c g t c a
 a a a a t a a g g t t a t c a a g l g a g a a a t c a c c a t g a g t g a c g a c t g a a t
 c c g g t g a g a a t g g c a a a a g c t t a t g c a t t t e t t t c a g a c t t g t t c
 a a c a g g c c a g e c a t t a e g t e g t e a t c a a a a t c a c t e g e a t e a a c c
 a a a c c g t t a t t c a t t e g t g a t t g e g c c t g a g e g a g a c g a a a t a e g c
 g a t c g c t g t t a a a a g g a c a a t t a c a a a c a g g a a t c g a a t g c a a c c g
 g c g c a g g a a c a c t l g c c a g c g c a l c a a c a a t a t t t t c a c c l g a a t c a
 g g a t a t t c t t c t a a a t a c c t g g a a t g c t g t t t t c c c g g g g a t c g c a g

10

20

30

40

50

【表 18 - 4】

```

tgggtgagtaaccatgcatc atcaggagtaacggataaaaatgctt gat
ggtcggaaagaggc ataaaattccgctcagccagtttagtctgaccatc
tcatctgtataacatcatttggcaacgctacctttgccaatgtttcagaa
acaactctlggcgc atcgggcttcccaatacaaatcgatagalltgcgc
acctgattgcccgaacattatcgcgagcccatttatacecaataaaa
teagc atccatg tttggaatttaategcggcctcagagcaagaagcttt
cccgttgaataatggctc ataaacacccccttgta ttaactgtttatgta
agcagacagttttat tgttcatgatgataata tttttatctt gttgca
atgtaacatcagagat ttttgagacacaacgltggctttcccccccc
ccca tttat tgaagcattt atcagggttattgtctc atgagcggata
cata ttttgaatgtattttagaaaaataaaca aataggggttcccggc
aca tttccccgaaa agtggcaacctgacgltc taagaaacca tttat
tcatgacattaaacctataaaa ataggcggtatc acgagggccctttcg
tctctgcgcggttttcgggtgatgacgggtgaaaacctctgacacatgca
gctccccggagacggltcacagc tttgtctlgtaagcggatgcccgggagc
agacaagcccgtcagggcgccgtcagcgggtgttggcgggtgtcggg
gctggcttaactatgcggc atcagagcagattgtactgagagtgca
ccatattgcgggtgtgaaaataccgcacagatg cgttaaggagaaaaatac
cgcatcagatttggctat

```

10

配列番号30：エンハンサー、ATGを含まない開始Kozak配列
CGCCGCCACC

配列番号31：二量体ヒンジ1、ヒトIgG3
GAGCTCAAAACCCC ACTTGGTGACACA ACTCACACA

20

配列番号32：二量体ヒンジ4、ヒトIgG3
GAGCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCGTGCCCAAGGTGCCCA

配列番号33：二量体Gly-serリンカー
GGCGGTGGAAGCAGCGGAGGTGGAAGTGG A

配列番号34：二量体CH3、ヒトIgG3
GGACAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCCGGG
AGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG
CTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAGCGGGCAG
CCGGAGAACAAC TACAACACCACGCCCTCCCATGCTGGACTCCGAG
GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG
GCAGCAGGGGAACATCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
CACAAACCGCTTACGCAGAAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

30

配列番号35：二量体Gly-Leuリンカー
GGCCTCGGTGGCCTG

配列番号36：APC標的化mCCL3
ATGAAGGTCTCCACC ACTGCCCTTGCTGTTCTTCTCTGTACCATGA
CACTCTGCAACCAAGTCTTCTCAGCGCCATATGGAGCTGACACCCC
GACTGCCTGCTGCTTCTCCTACAGCCGGAAGATTCCACGCCAATTC
ATCGTTGACTATTTTGA AACAGCAGCCTTTGCTCCAGCCAGGTG
TCATTTTCTGACTAAGAGAAAACCGGCAGATCTGCGCTGACTCCAA
AGAGACCTGGGTCCAAGAATACATCACTGACCTGGA ACTGAATGCC

配列番号37：APC標的化mCCL4
ATGAAGCTCTGCGTGTCTGCCCTCTCTCTCCTCTTGCTCGTGGCTG
CCTTCTGTGCTCCAGGGTTCTCAGCACCAATGGGCTCTGACCCTCC

40

50

【表 18 - 5】

CACTTCCTGCTGTTTCTCTTACACCTCCCGGCAGCTTCACAGAAGC
 TTTGTGATGGATTACTATGAGACCAGCAGTCTTTGCTCCAAGCCAG
 CTGTGGTATTCTGACCAAAAGAGGCAGACAGATCTGTGCTAACCC
 CAGTGAGCCCTGGGTCACTGAGTACATGAGTGACTTGGAG

配列番号38：APC標の化mCCL5

ATGAAGATCTCTGCAGCTGCCCTCACCATCATCCTCACTGCAGCCG
 CCCTCTGCACCCCCGCACCTGCCTCACCATATGGCTCGGACACCAC
 TCCCTGCTGCTTTGCCTACCTCTCCCTCGCGCTGCCTCGTGCCAC
 GTCAAGGAGTATTTCTACACCAGCAGCAAGTGCTCCAATCTTGCA
 TCGTGTGTTGTCACCTCGAAGGAACCGCCAAGTGTTGTGCCAACCCAGA
 GAAGAAGTGGGTTCAAGAATACATCAACTATTTGGAGATGAGC

10

配列番号39 APC標の化mCCL19

ATGGCCCCCGTGTGACCCCACTCCTGGCCCTCAGCCTGCTGGTTC
 TCTGGACCTTCCCAGCCCCAACTCTGGGGGGTGCTAATGATGCGGA
 AGACTGCTGCCTGTCTGTGACCCAGCGCCCATCCCTGGGAACATC
 GTGAAAGCCTTCCGCTACCTTCTTAATGAAGATGGCTGCAGGGTGC
 CTGCTGTTGTGTTCAACCACACTAAGGGGCTATCAGCTCTGTGCACC
 TCCAGACCAGCCCTGGGTGGATCGCATCATCCGAAGACTGAAGAAG
 TCTTCTGCCAAGAACAAGGCAACAGCACCAGAAGGAGCCCTGTGT
 CT

配列番号40：APC標の化mXc11

ATGAGACTTCTCCTCCTGACTTTTCCCTGGGAGTCTGCTGCCTCACCC
 CATGGGTGTGGAAGGTGTGGGGACTGAAGTCCTAGAAGAGAGTAG
 CTGTGTGAACTTACAAACCCAGCGGCTGCCAGTTCAAAAAATCAAG
 ACCTATATCATCTGGGAGGGGGCCATGAGAGCTGTAATTTTGTCA
 CCAAACGAGGACTAAAAATTTGTGCTGATCCAGAAGCCAAATGGGT
 GAAAGCAGCGATCAAGACTGTGGATGGCAGGGCCAGTACCAGAAAG
 AACATGGCTGAAACTGTTCCACAGGAGCCAGAGGTCCACCAGCA
 CAGCGATAACCCTGACTGGG

20

配列番号41：APC標の化mCCL20

ATGGCCTGCGGTGGCAAGCGTCTGCTCTTCCTTGCTTTGGCATGGG
 TACTGCTGGCTCACCTCTGCAGCCAGGCAGAAGCAGCAAGCAACTA
 CGACTGTTGCCTCTCGTACATACAGACGCCTCTTCCTTCCAGAGCT
 ATTGTTGGGTTTTCACAAGACAGATGGCCGATGAAGCTTGTGACATTA
 ATGCTATCATCTTTTACACGAAGAAAAGAAAATCTGTGTGCGCTGA
 TCCAAAGCAGAAGTGGGTGAAAAGGGCTGTGAACCTCCTCAGCCTA
 AGAGTCAAGAAGATG

30

配列番号42：APC標の化mCCL21

ATGGCTCAGATGATGACTCTGAGCCTCCTTAGCCTGGTCCTGGCTC
 TCTGCATCCCCCTGGACCCAAGGCAGTGATGGAGGGGGTCAGGACTG
 CTGCCCTTAAGTACAGCCAGAAGAAAATTCCTACAGTATTGTCCGA
 GGCTATAGGAAGCAAGAACC AAGTTTAGGCTGTCCCATCCCGGCAA
 TCCTGTTCTCACCCCGGAAGCACTCTAAGCCTGAGCTATGTGCAAA
 CCCTGAGGAAGGCTGGGTGCAGAACCCTGATGCGCCGCCTGGACCAG
 CCTCCAGCCCCAGGGAAACAAGCCCCGGCTGCAGGAAGAACC GGG
 GAACCTCTAAGTCTGGAAAAGAAAAGGAAAGGGCTCCAAGGGCTGCAA
 GAGA ACTGAACAGACACAGCCCTCAAGAGGA

40

50

【表 18 - 6】

配列番号43：APC標的化GM-CSF

ATGTGGCTGCAGAATTTACTTTTCTGGGCATTGTGGTCTACAGCC
 TCTCAGCACCCACCCGCTCACCCATCACTGTCACCCGGCCTTGGAA
 GCATGTAGAGGCCATCAAAGAAGCCCTGAACCTCCTGGATGACATG
 CCTGTACGTTGAATGAAGAGGTAGAAGTCGTCTCTAACGAGTTCT
 CCTTCAAAGAAGCTAACATGTGTGCAGACCCGCTGAAGATATTCGA
 GCAGGGTCTACGGGGCAATTTACCAAACCTCAAGGGCGCCTTGAAC
 ATGACAGCCAGCTACTACCAGACATACTGCCCCCCAACTCCGGAAA
 CGGACTGTGAAACACAAGTTACCACCTATGCGGATTTTCATAGACAG
 CCTTAAACCTTTCTGACTGATATCCCCTTTGAATGCAAAAAACCA
 GCCAAAAA

10

配列番号44：APC上の分泌シグナル+分泌シグナル、マウス血清アルブミン

ATGAAATGGGTGACCTTTCTGCTGCTGCTGTTTGTGAGCGGCAGCG
 CGTTTAGCG

配列番号45：APC標的化抗-マウスDEC-205Fv

CGGCCAGCCGGCCATGGCGGACTACAAACAGGCTGTTGTGACTCA
 GGAATCAGCACTCACACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACT
 TGTGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAATTAGTAACTATGCCAACT
 GGGTCCAAGAAAAACCAGATCATTATTCACTGGTCTAATAGGTGG
 TACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCTGCCAGATTCTCAGGCTCC
 CTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAGACTG
 AGGATGAGGCAATCTATTTCTGTGCTCTATGGTACAACAACCAGTT
 TATTTTCGGCAGTGGAACCAAGGTCAGTCTCCTAGGTGGTGGTGGT
 GTTCTGTTGGTGGTGGTGGATCCGGCGGGCGGCTCTGGCGGGCGG
 GCTCTGAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGTGCTGGTGAAGCC
 TGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGTAAGGCTTCTGGAAACACATTC
 ACTGACTCCTTTATGCACTGGATGAAACAGAGCCATGGAAAGAGTC
 TTGAGTGGATTGGAATTAATAATCCTTATAACGGCGGTACTAGCTA
 CAACCAGAAATTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTTGACAAGTCC
 TCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGACT
 CTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAAACGGGGTGCAGTACTACTTTGA
 CTA CTG GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCGGCCTCGGGG
 GCC

20

配列番号46：APC標的化抗-マウスCLEC9Fv

GCGGCCAGCCGGCCATGGCGGACTACAAACAGGCTGTTGTGACTC
 AGGAATCAGCACTCACACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCAC
 TTGTCGCTCAAGTAAAAGCAGCCAGAGCGTGTGTATGATGAAAAC
 AAAAAAAAACTATCTGGCCAACTGGGTCCAAGAAAAACCAGATCATT
 TATTCAGTGGTCTAATAGGTTGGGCGAGCACCGGCGAAAAGCAACCG
 AGCTCCAGGTGTTCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGAC
 AAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAGACTGAGGATGAGGCAA
 TCTATTTCTGTTATTATGATTTTCCGCGTTCGGCAGTGGAACCAA
 GGTCAGTGTCTAGGTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGATCC
 GGCGGCGGCGGCTCTGGCGGCGGCGGCTCTGAGGTCCAGCTGCAAC
 AGTCTGGACCTGTGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC
 CTGTAAGGCTTCTAACGCGGCGATTTATATGCACTGGATGAAACAG
 AGCCATGGAAAGAGTCTTGAGTGGATTGGAATTCGCATTCGCACCC
 GCCCGAGCAAATATGCGACCGATTATGCGGATAGCGTGCGCGGCAG
 CTACAACCAGAAATTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTTGACAAG

30

40

50

【表 18 - 7】

TCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGG
 ACTCTGCAGTCTATTACTGTCTCGCGCACC GAAGATGTGCCGTTTTA
 TTA CTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCGGCCTCGGG
 GCC

配列番号47：APC標的化CLEC9リガンド

TGGCCCAGGTTCCACAGCAGCGTGTTCACACCCAC

配列番号48：APC標的化mFLT3L

ATGACACCTGACTGTTACTTTCAGCCACAGTCCCATCTCCTCCA
 ACTTCAAAGTGAAGTTTAGAGAGTTGACTGACCACCTGCTTAAAGATTA
 CCCAGTCACTGTGGCCGTCAATCTTCAGGACGAGAAGCACTGCAAG
 GCCTTGTGGAGCCTCTTCCCTAGCCAGCGCTGGATAGAGCAACTGA
 AGACTGTGGCAGGGTCTAAGATGCAAACGCTTCTGGAGGACGTCAA
 CACCGAGATACATTTTGTACCTCATGTACCTTCCAGCCCCTACCA
 GAATGTCTGCGATTTCGTCCAGACCAACATCTCCCACCTCCTGAAGG
 ACACCTGCACACAGCTGCTTGCTCTGAAGCCCTGTATCGGGGAAGGC
 CTGCCAGAATTTCTCTCGGTGCCCTGGAGGTGCAGTGCCAGCCGGAC
 TCCTCCACCTGCTGCCCCCAAGGAGTCCCATAGCCCTAGAAGCCA
 CGGAGCTCCAGAGCCTCGGCCAGGCAG

10

配列番号49：二量体、dHLXタンパク質

GGAGA ACTGGAGGAATTA CTTAAACATCTCAAGGAGTTGCTCAAAG
 GCCCTAGGAAGGGAGA ACTGGAGGA ACTCCTCAAACATCTCAAGGA
 GTTACTAAAGGGA

配列番号50：二量体、GS-リンカー

GGCAGCGGCAGCGGCAGCGGCAGCGGCAGC

20

配列番号51：二量体、hMHD2 (ヒトIgM)

GCCGA ACTCCCGCCCAAGGTGTCCGTGTTTCGTCCCTCCCCGCGATG
 GGTTCTTCGGCAATCCACGAAAATCCAAACTGATTTGTCAGGCCAC
 CGGCTTCTCCCCCGACAGATCCAGGTGAGTTGGCTACGAGAGGGT
 AAACAGGTGGGGAGCGGAGTGACCACTGACCAAGGTGCAGGCCGAGG
 CCAAGGAAAGCGGACCCACAACATACAAAGTGACAAGCACTCTGAC
 GATTAAGGAGTCAGACTGGCTCGGCCAATCCATGTTTACATGCCGG
 GTTGATCACAGAGGGTTGACCTTCCAACAGAACGCATCCAGTATGT
 GCGTTCCAGAT

配列番号52：三量体コラーゲン三量体化ドメイン

GCTGGGCAGGTGAGGATCTGGGCCACATACCAGACCATGCTGGACA
 AGATCCGGGAGGTGCCGGAGGGCTGGCTCATCTTTGTGGCCGAGAG
 GGAAGAGCTCTATGTACGCGTTAGAAATGGCTTCCGGAAGGTGCTG
 CTGGAGGCCCGGACAGCCCTCCCGAGAGGCACGGGCAATGAG

30

配列番号53：四量体p53合成タンパク質*

AAGCCTCTGGACGGAGAGTATTTCACTCTCCAGATCCGGGGCCCCG
 AAAGGTTTCGAAATGTTCCGGGAGCTTAACGAGGCCTTGGAGCTGAA
 AGACGCACAGGCCGGAAAGGAACCG

配列番号54：

Q I E T Q R K F K A S R A S I L S E M K M L K E K R

配列番号55：

V I L P Q A P S G P S Y A T Y L Q P A Q A Q M L T P P

40

50

【表 18 - 8】

配列番号56 :
DTLSAMSNPRAMQVLLQIQQGLQTLAT

配列番号57 :
DGQLELLAQQALDNALSSMGALHALPR

配列番号58 :
RLHVVKLLASALSTNAAAALTQELLVLD

配列番号59 : 二量体ヒンジ1、ヒトIgG3タンパク質配列 :
ELKTPLGDTTHT

配列番号60 : 二量体ヒンジ4、ヒトIgG3タンパク質配列 :
EPKSCDTPPPCPRCP

10

配列番号61 C22ネオエピトープアミノ酸配列 :
QIETQQRKFKASRASILSEMKMLKEKR

配列番号62 C23ネオエピトープアミノ酸配列 :
VILPQAPSGPSYATYLPQAQAQMLTTPP

配列番号63 C25ネオエピトープアミノ酸配列 :
DTLSAMSNPRAMQVLLQIQQGLQTLAT

配列番号64 C30ネオエピトープアミノ酸配列 :
DGQLELLAQQALDNALSSMGALHALPR

配列番号65 C38ネオエピトープアミノ酸配列 :
RLHVVKLLASALSTNAAAALTQELLVLD

20

配列番号66 : 代替GS-リンカー :
GGGSS

配列番号67 >P0055_pTVG4_mCCL19_h1h4CH3_スパイク_RBD :
TGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAAATATGTACATTTATA
TTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGAC
TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCA
TATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCCTG
GCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTTGACGTCAATAAATGACGTA
TGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGG
GTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGT
ATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATG
GCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCT
ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTTCATCGCTATTACCATGGTGA
TGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTC
ACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTG
TTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACT
CCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGT
CTATATAAGCAGAGCTCGTTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGA
CGCCATCCACGCTGTTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGAT
CCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGATTCCTCCG
TGCCAAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGACTCTATAGGCACACC
CCTTTGGCTCTTATGCATGCTATACTGTTTTTTGGCTTGGGGCCTAT
ACACCCCGCTTCCTTATGCTATAGGTGATGGTATAGCTTAGCCTA

30

40

50

【表 18 - 9】

TAGGTGTGGGTTATTGACCATTATTGACCACTCCAACGGTGGAGGG
CAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGCGCCACCAGA
CATAATAGCTGACAGACTAACAGACTGTTTCCTTTCATGGGTCTTT
TCTGCAGTCAACCGTTCGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAAT
TCCGCGCCACCATGGCCCCCGTGTGACCCCACTCCTGGCCTTCA
GCCTGCTGGTTCTCTGGACCTTCCCAGCCCCAACTCTGGGGGGTGC
TAATGATGCGGAAGACTGCTGCCTGTCTGTGACCCAGCGCCCCATC
CCTGGGAACATCGTGAAAGCCTTCCGCTACCTTCTTAATGAAGATG
GCTGACAGGGTGCCTGCTGTTGTGTTTACCACACTAAGGGGCTATCA
GCTCTGTGCACTCCTGACCCAGCCCTGGGTGGATCGCATCATCCGA
AGACTGAAGAAGTCTTCTGCCAAGAACAAGGCAACAGCACCAGAA
GGAGCCCTGTGTCTGAGCTCAAAAACCCCACTTGGTGACACAACCTCA
CACAGAGCCCAAAATCTTGTGACACACCTCCCCCGTGCCCAAGGTGC
CCAGGCGGTGGAAGCAGCGGAGGTGGAAGTGGAGGACAGCCCCGAG
AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAA
GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAGCGGGCAGCCGGAGAACAAC
ACAACACCACGCCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCT
CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
ATCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCGCTTCA
CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGGCTCGGTGGCCT
GGCGGCCGCGAGGGTGCAGCCGACTGAGAGTATCGTTTCGTTTCCCT
AACATTACGAACCTATGTCCGTTTGGAGAGGTATTTAATGCTACCA
GATTTCGCATCAGTCTATGCTTGGAAACAGGAAACGGATATCAAAC
CGTGGCCGACTATAGCGTTCTCTACAACAGTGCCTCTTTTAGCACT
TTCAAGTGTCTACGGAGTCTCCCCAACCAAGCTAAACGACCTGTGCT
TCACAAAACGTCTACGCTGACTCCTTTGTCAATCAGAGGCGATGAGGT
GCGGCAAAATCGCACCTGGACAAAACGGAAAAATCGCCGACTATAAC
TATAAGCTGCCCGATGACTTTACTGGATGCGTGATCGCTTGGAAAT
CAAACAATCTCGACAGTAAGGTAGGAGGCAATTACAACCTACCTTTA
TCGGCTCTTCCGAAAAATCAAACCTGAAACCCCTTTGAGCGTGATATC
TCGACTGAAATTTACCAAGCTGGCAGCACTCCTTGCAACGGAGTGG
AGGGCTTCAATTTACTTTCCTCTGTCAGAGCTACGGATTCCCAAC
TACAAAACGGGGTAGGCTACCAACCCCTACCGAGTGGTGGTGTGAGC
TTTGAGCTGCTCCATGCTCCAGCAACTGTATGCGGCCCTAAGAAGT
CAACTAACCTGGTTAAGAATAAATGCGTCAACTTTTAGGGATCCAG
ATCTAACGACAAAACGACAAAACGACAAGGCGCCAGATCTGGCGTT
TCGTTTTGTGCTTTTGTGCTTAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAAT
TATGGGGACATCATGAAGCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAAT
AAAGGAAATTTATTTTCAATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTG
TCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAAACAT
CAGAATGAGTATTTGGTFTTAGAGTTTGGCAACATATGCCCATTTCT
CCGCTTCTCTGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCCGGCTGCG
GCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACA
GAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGC
AAAAGGCCAGGAAACCGTAAAAAGGCCGCGTGTGCTGGCGTTTTTCCA
TAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGT
CAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTC
CCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCT
TACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTT
TCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTT

10

20

30

40

50

【表 18 - 10】

GCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAAACCCCGTTTCAGCCCGACCG
 CTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGA
 CACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCA
 GAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCC
 TAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTG
 CTGAAGCCAGTTACCTTCCGAAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCG
 GCAAACAAACCACCGCTGGTAGCAGGTGGTTTTTTTTGTTTTGCAAGCA
 GCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATC
 TTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAG
 GGATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCT
 TTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAG
 TAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTA
 TCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCGG
 GGGGGGGGGCGCTGAGGTCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGAC
 TCATACCAGGCCTGAATCGCCCCATCATCCAGCCAGAAAGTGAGGG
 AGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGGTGGACCAGTTGGTGAT
 TTTGAACCTTTTGCTTTTGCCACGGAACGGTCTGCGTTGTCGGGAAGA
 TCGGTGATCTGATCCTTCAACTCAGCAAAAAGTTTCGATTTATTCAAC
 AAAGCCCGCGTCCCCTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTTAC
 AACCAATTAACCAATTCTGATTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAAAT
 GAAACTGCAATTTATTTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTTG
 AAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTC
 CATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTC
 CAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAAATAAGGTT
 ATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAAT
 GGCAAAAAGCTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGC
 CATTACGCTCGTCATCAAAAATCACTCGCATCAACC AAAACCGTTATT
 CATTTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTA
 AAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCCGGCGCAGGAACA
 CTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTC
 TAATACCTGGAATGCTGTTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAAC
 CATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAAATGCTTGATGGTTCGGAAGAG
 GCATAAATTCGCTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAAAC
 ATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTTCAGAAAACAACCTCTGGC
 GCATCGGGCTTCCCATAACAATCGATAGATTGTGCGCACCTGATTGCC
 CGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCAT
 GTTGGAATTTAATCGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATA
 TGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTTATGTAAGCAGACAGTT
 TTATTGTTTCATGATGATATATTTTTTATCTTGTGCAATGTAACATCA
 GAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTTCCCCCCCCCCCCATTATTGA
 AGCATTTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAAT
 GTATTTAGAAAAATAAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCG
 AAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTA
 ACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTCTCGCGCGTT
 TCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGAC
 GGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGT
 CAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGGGCTGGCTTAAC
 ATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTG
 TGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGATTG
 GCTAT

10

20

30

40

50

【表 18 - 11】

配列番号68：P0055に対して用いる受容体結合ドメイン（RBD）

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRI SNCVAD
YSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV RQI
APGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLF
RKS NLKPFERDISTE IYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNG
VGYQPYRVVVL SFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNF

配列番号69：T4フィブリチン（Fibrin itin）三量体化ドメイン

GYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFL

配列番号70：リンカー配列

GGGSSGGGSG

配列番号71：リンカー配列

GGGSS

配列番号72：リンカー配列

GGGSSGGGSSGGGSS

配列番号73：リンカー配列

GLGGL

配列番号74：リンカー配列

GLGGLAAA

10

20

【図面】

【図 1】

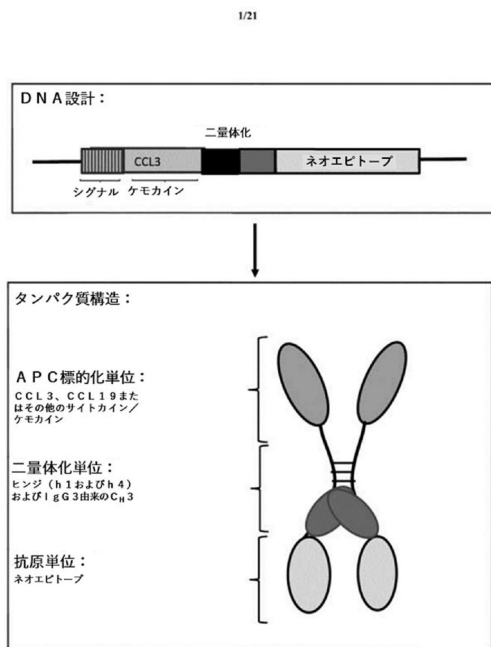


Fig. 1

【図 2】

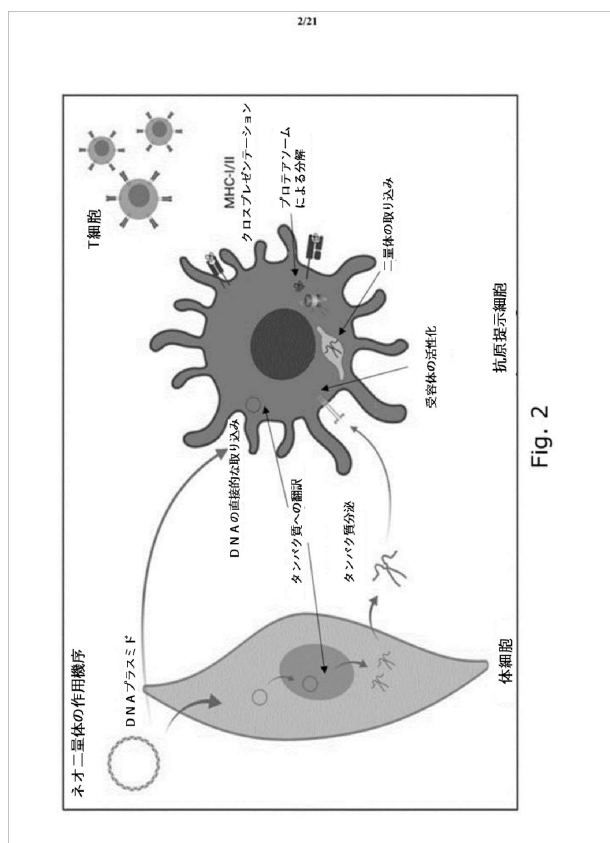


Fig. 2

30

40

50

【 図 3 A 】

3/21

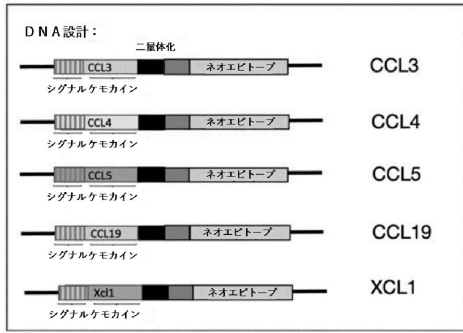


Fig. 3A

【 図 3 B 】

4/21

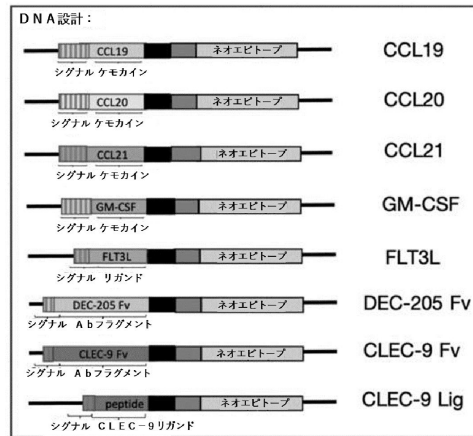


Fig. 3B

10

20

【 図 4 】

5/21

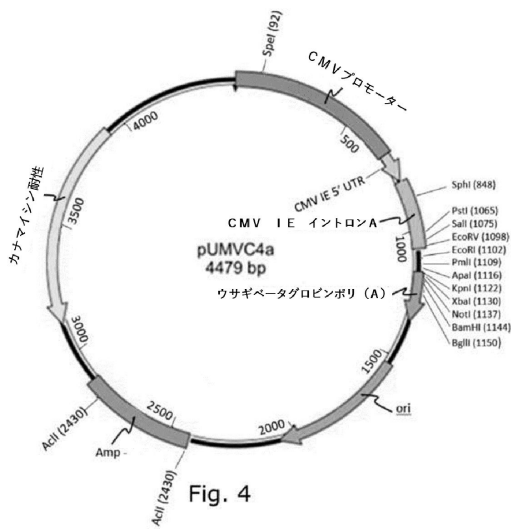


Fig. 4

【 図 5 】

6/21

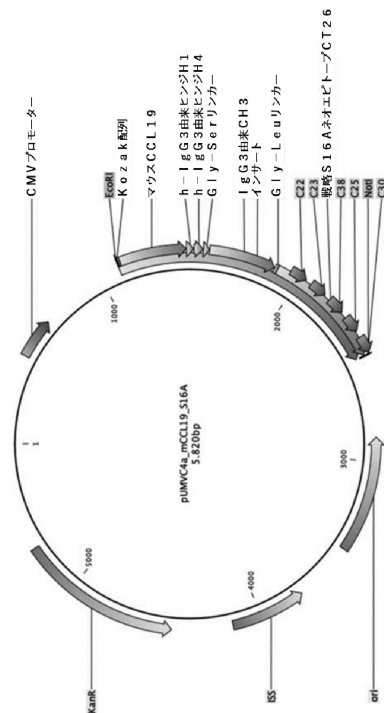


Fig. 5

30

40

50

【 図 6 】

7/21

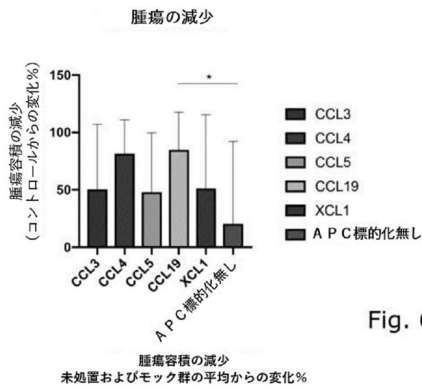
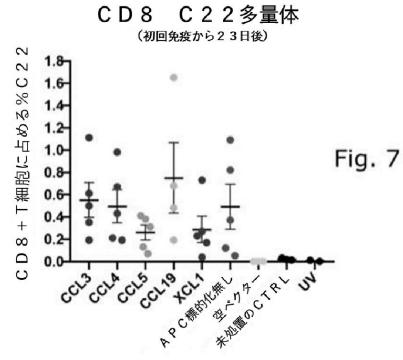


Fig. 6

【 図 7 】



10

【 図 8 】

8/21

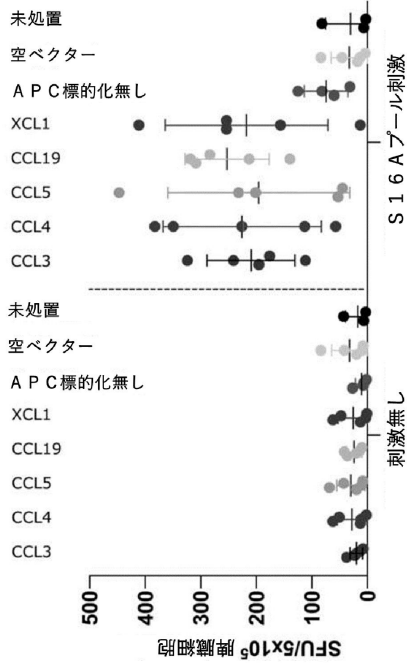
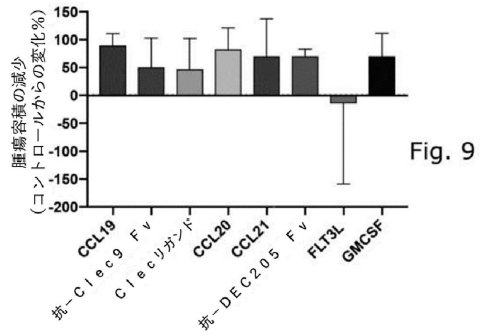


Fig. 8

【 図 9 】

9/21



20

30

40

50

【 図 1 0 】

CD 2 2 特異的 CD 8 細胞 - 2 日 目
(四量体染色)

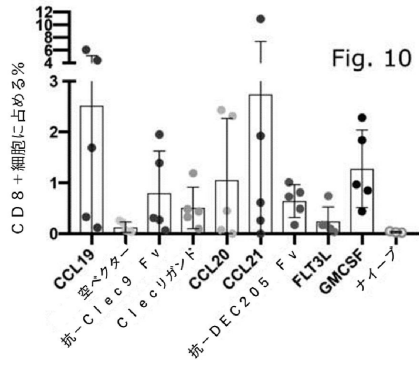


Fig. 10

【 図 1 1 】

Figure 11

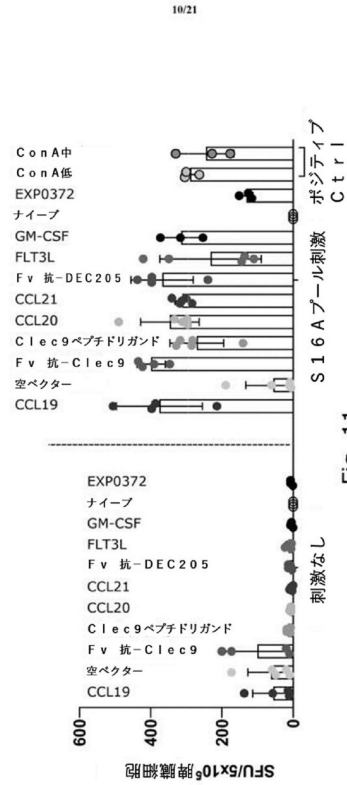


Fig. 11

【 図 1 2 】

11/21

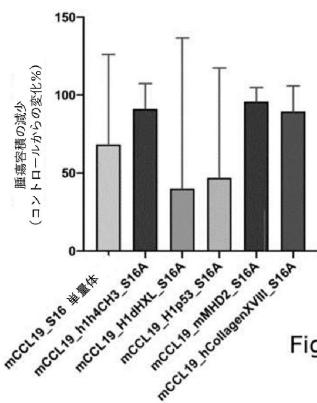


Fig. 12

【 図 1 3 】

CD 2 2 特異的 CD 8 + T 細胞 7 日 目

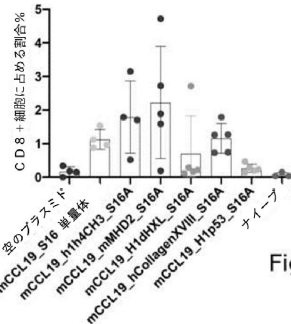


Fig. 13

10

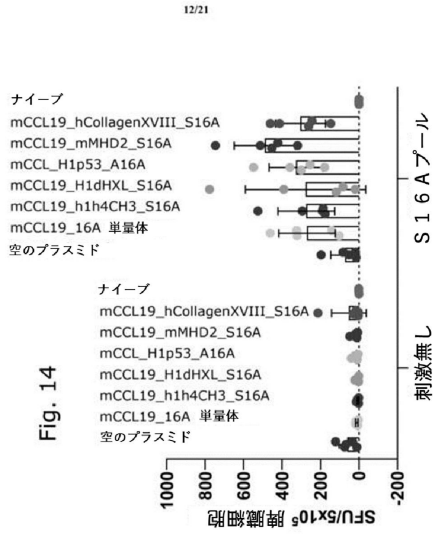
20

30

40

50

【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

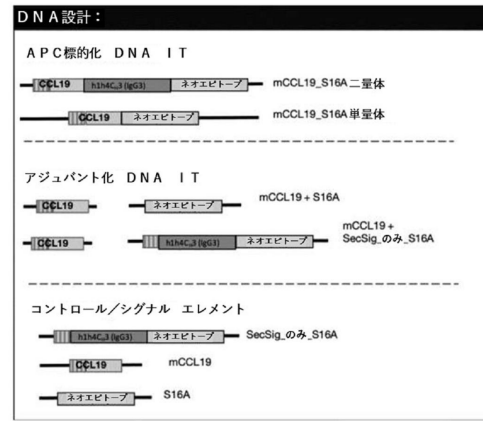


Fig. 15

10

20

【 図 1 6 】

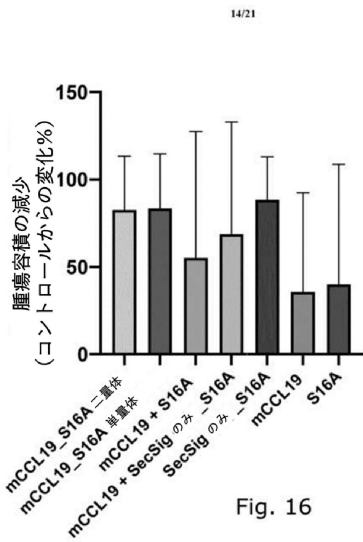


Fig. 16

【 図 1 7 】

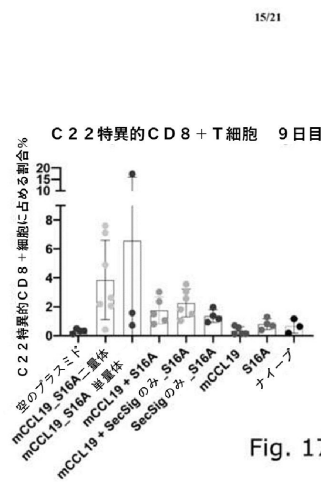


Fig. 17

30

40

50

【 図 2 2 】

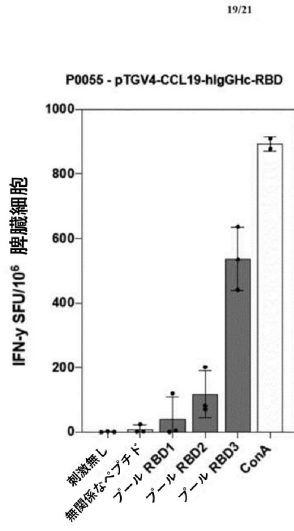


Fig. 22

【 図 2 3 】

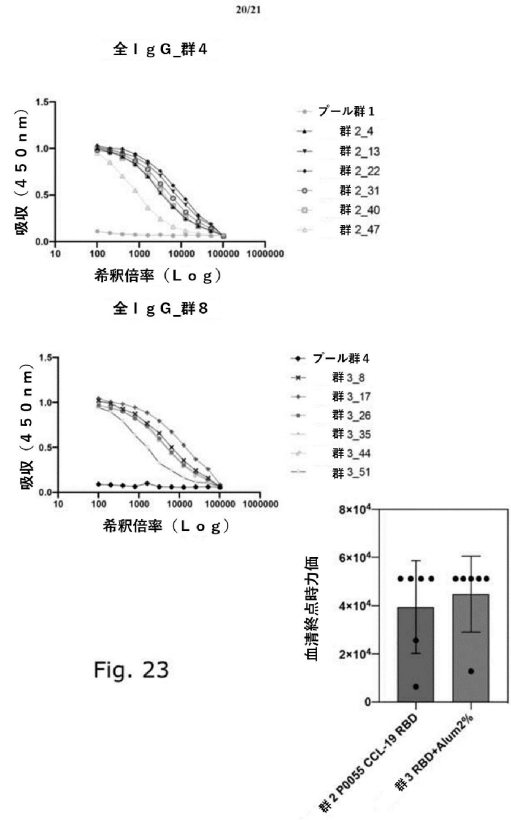


Fig. 23

10

20

【 図 2 4 】

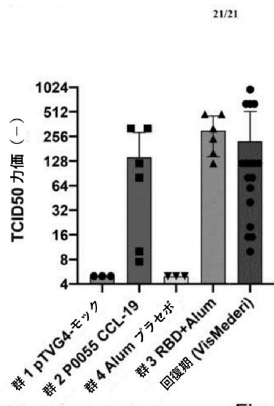


Fig. 24

30

40

50

【配列表】

2023533871000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2021/069582

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/00 A61K39/12 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/041966 A1 (UNIV OSLO [NO]; BOGEN BJARNE [NO] ET AL.) 28 March 2013 (2013-03-28)	1-5, 8-10, 15-23, 27-33, 40-52
Y	page 2, paragraph 1 - page 4, paragraph 4 page 11, paragraph 3 - page 14, paragraph 1 page 14, last paragraph - page 16, paragraph 1 ----- -/--	24-26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 11 November 2021		Date of mailing of the international search report 23/11/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Montero Lopez, B

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

page 1 of 3

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2021/069582

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/161244 A1 (VACCIBODY AS [NO]; RUFFINI PIER ADELCHI [IT] ET AL.) 29 December 2011 (2011-12-29)	1-5, 8-10, 15-23, 27-33, 40-52
Y	page 2, line 12 - page 4, line 24 page 6, line 27 - page 10, line 20 page 15, line 13 - page 18, line 4 -----	24-26
X	ZHONGYI YAN ET AL: "A novel peptide targeting Clec9a on dendritic cell for cancer immunotherapy", ONCOTARGET, vol. 7, no. 26, 26 May 2016 (2016-05-26), XP055498880, DOI: 10.18632/oncotarget.9624 abstract page 40437, left-hand column, paragraph 1 - page 40438, left-hand column, paragraph 2 page 4038, right-hand column, last paragraph - page 40446, right-hand column, last paragraph -----	1,3,5, 11-13, 28,29, 40,41, 44,45,52
X	US 2018/161412 A1 (MARKHAM RICHARD [US]) 14 June 2018 (2018-06-14) page 2, paragraph 0026 - paragraph 0027 page 4, paragraph 0062 page 5, paragraph 0070 - page 7, paragraph 0090 page 7, paragraph 0097 - page 10, paragraph 0116; examples 4, 8, 9, 15-17 -----	1,3,4, 6-10,14, 15,28, 29,40, 42-45, 49-52
Y	RAVICHANDRAN SUPRIYA ET AL: "Antibody signature induced by SARS-CoV-2 spike protein immunogens in rabbits", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 12, no. 550, 8 June 2020 (2020-06-08) , page eabc3539, XP055790608, ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/scitranslmed.abc3539 abstract -----	24-26
X	WO 2018/201017 A1 (UNIV WASHINGTON [US]; PREC VIROLOGICS INC [US]) 1 November 2018 (2018-11-01) page 9, paragraph 1 - page 10, paragraph 1; examples ----- -/--	34-39

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/069582

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AU 2013 224 658 A1 (CALIFORNIA INST OF TECHN [US]) 19 September 2013 (2013-09-19) page 2, paragraph 0006 - page 3, paragraph 0010 page 11, paragraph 0056 page 26, paragraph 0110 page 30, paragraph 0121 - page 35, paragraph 139 page 36, paragraph 0143 -----	34-39
E	WO 2021/204911 A1 (EVAXION BIOTECH AS [DK]) 14 October 2021 (2021-10-14) the whole document -----	1-3,6,8, 12-22, 27-41, 43-52

10

20

30

40

2

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2021/069582

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013041966 A1	28-03-2013	AU 2012311238 A1	17-04-2014
		BR 112014006887 A2	04-04-2017
		CA 2849374 A1	28-03-2013
		CN 104136039 A	05-11-2014
		EP 2758072 A1	30-07-2014
		JP 2014534807 A	25-12-2014
		KR 20140069222 A	09-06-2014
		US 2014234316 A1	21-08-2014
		WO 2013041966 A1	28-03-2013
		WO 2011161244 A1	29-12-2011
CA 2803058 A1	29-12-2011		
CN 102985109 A	20-03-2013		
DK 2585107 T3	11-02-2019		
EP 2585107 A1	01-05-2013		
EP 3441085 A1	13-02-2019		
JP 6538622 B2	03-07-2019		
JP 2013532971 A	22-08-2013		
JP 2016202185 A	08-12-2016		
KR 20130087517 A	06-08-2013		
KR 20180099918 A	05-09-2018		
RU 2013103335 A	27-07-2014		
US 2013171140 A1	04-07-2013		
US 2020239568 A1	30-07-2020		
WO 2011161244 A1	29-12-2011		
US 2018161412 A1	14-06-2018	NONE	
WO 2018201017 A1	01-11-2018	NONE	
AU 2013224658 A1	19-09-2013	NONE	
WO 2021204911 A1	14-10-2021	NONE	

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47	
C 0 7 K	14/195 (2006.01)	C 0 7 K	14/195	
C 0 7 K	14/005 (2006.01)	C 0 7 K	14/005	
C 0 7 K	14/165 (2006.01)	C 0 7 K	14/165	
C 1 2 N	15/50 (2006.01)	C 1 2 N	15/50	
C 1 2 N	15/85 (2006.01)	C 1 2 N	15/85	Z
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08	
A 6 1 K	47/02 (2006.01)	A 6 1 K	47/02	
A 6 1 K	47/20 (2006.01)	A 6 1 K	47/20	
A 6 1 K	47/26 (2006.01)	A 6 1 K	47/26	
A 6 1 K	47/10 (2017.01)	A 6 1 K	47/10	

(32)優先日 令和3年4月29日(2021.4.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

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

(72)発明者 レヌ , ビアギッテ

デンマーク 2 9 7 0 ヘアスホルム、デーエル・ニアゴーズ・ヴァイ 5 エフ、エヴァクシオン・パイオテック・アクティエセルスカブ内

(72)発明者 カルボ , マリナ パルリオ

デンマーク 2 9 7 0 ヘアスホルム、デーエル・ニアゴーズ・ヴァイ 5 エフ、エヴァクシオン・パイオテック・アクティエセルスカブ内

(72)発明者 セレンセン , アナス プンゴー

デンマーク 2 9 7 0 ヘアスホルム、デーエル・ニアゴーズ・ヴァイ 5 エフ、エヴァクシオン・パイオテック・アクティエセルスカブ内

(72)発明者 チューエセン , クリスティアン

デンマーク 2 9 7 0 ヘアスホルム、デーエル・ニアゴーズ・ヴァイ 5 エフ、エヴァクシオン・パイオテック・アクティエセルスカブ内

(72)発明者 クリングエルム , イェンス

デンマーク 2 9 7 0 ヘアスホルム、デーエル・ニアゴーズ・ヴァイ 5 エフ、エヴァクシオン・パイオテック・アクティエセルスカブ内

(72)発明者 フリース , スティーネ

デンマーク 2 9 7 0 ヘアスホルム、デーエル・ニアゴーズ・ヴァイ 5 エフ、エヴァクシオン・パイオテック・アクティエセルスカブ内

F ターム (参考) 4C076 AA12 BB01 BB02 BB11 BB13 BB14 BB15 BB16 BB21 BB22

BB24 BB25 BB27 BB29 BB30 BB31 CC27 CC32 CC35 DD23Z DD26Z

DD57Z DD67Z EE23

F ターム (参考)

4C084 AA13 MA17 MA52 MA55 MA56 MA57 MA58 MA59 MA60 MA63
MA66 NA14 ZB091 ZB211 ZB261 ZB331 ZB351
4C085 AA03 EE01 GG01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG08 GG10
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA86 EA28 EA29
FA74