

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-503655

(P2016-503655A)

(43) 公表日 平成28年2月8日(2016.2.8)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/09 (2006.01)
C 12 N 1/21 (2006.01)
A 61 K 39/02 (2006.01)
A 61 P 31/04 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/00
C 12 N 1/21
A 61 K 39/02
A 61 P 31/04

Z N A A

テーマコード(参考)

4 B 02 4
4 B 06 5
4 C 08 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 53 頁)

(21) 出願番号 特願2015-550820 (P2015-550820)
(86) (22) 出願日 平成25年12月27日 (2013.12.27)
(85) 翻訳文提出日 平成27年5月15日 (2015.5.15)
(86) 国際出願番号 PCT/US2013/078119
(87) 国際公開番号 WO2014/106123
(87) 国際公開日 平成26年7月3日 (2014.7.3)
(31) 優先権主張番号 61/746,237
(32) 優先日 平成24年12月27日 (2012.12.27)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 61/780,744
(32) 優先日 平成25年3月13日 (2013.3.13)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 515111543
アデュロバイオテック、インコーポレイテッド
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94
710-2224, バークリー, 3シー,
626 パンクロフト ウェイ
(74) 代理人 100114775
弁理士 高岡 亮一
(74) 代理人 100121511
弁理士 小田 直
(74) 代理人 100191086
弁理士 高橋 香元

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】リステリアの抗原配列の発現を容易にするシグナルペプチド融合パートナー、ならびにその調製方法およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、宿主細胞のサイトゾルに目的の抗原を効率よく発現および分泌させ、翻訳リーディングフレーム内のN末端融合パートナーとしてリステリアまたは他の細菌シグナルペプチド／分泌シャペロンを選択された、コードされた組換えタンパク質抗原に機能的に結合させることによってCD4およびCD8T細胞の効果的な応答を誘発する核酸、発現系およびワクチン株を提供する。これらのN末端融合パートナーは、その配列本来のいずれかのPEST配列および／またはいくつの疎水性残基に対して（実際の欠失により、変異により、またはこれらの方法の組み合わせのいずれかにより）除去される。

【選択図】図1

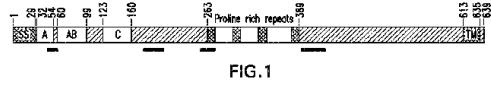


FIG.1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(a) プロモーターと、

(b) 前記プロモーターに作動可能に結合した核酸とを含むポリヌクレオチドであって、

前記核酸が分泌リステリアタンパク質配列の組換え修飾によって生じるポリペプチドと、非リステリア抗原とを含む融合タンパク質をコードし、

前記分泌リステリアタンパク質配列が、その非修飾形においてシグナル配列および 1 以上の P E S T モチーフを含み、前記修飾が、前記ポリペプチドがいずれの P E S T モチーフを欠如するような欠失による、もしくは 1 以上の残基による置換による前記各 P E S T モチーフの除去を含む、

ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

前記分泌リステリアタンパク質配列が A c t A または L L O である、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記修飾が前記分泌リステリアタンパク質配列の約 100 残基における切り詰めをさらに含む、請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

前記ポリペプチドが前記分泌リステリアタンパク質配列のシグナル配列を非修飾形で保持する、請求項 1 ~ 3 の 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

前記修飾が、

前記分泌リステリアタンパク質配列の前記シグナル配列の一部ではない 1 以上の疎水性ドメインの除去、および / または

前記分泌リステリアタンパク質配列の前記シグナル配列の一部ではない 1 以上の疎水性ドメイン内の 1 以上の残基の、非疎水性アミノ酸との置換をさらに含む、

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

前記分泌リステリアタンパク質配列が A c t A 配列であり、配列 K T E E Q P S E V N T G P の少なくとも 75 % が除去されている、請求項 1 ~ 5 の 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

前記配列 K T E E Q P S E V N T G P または K T E E Q P S E V N T G P R が除去される、請求項 1 ~ 5 の 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8】

前記分泌リステリアタンパク質配列が A c t A 配列であり、および前記配列 K T E E Q P S E V N T G P R 中の 1 以上の P 、 E 、 S および T 残基が P 、 E 、 S および T 以外の残基と置換されている、請求項 1 ~ 5 の 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 9】

前記配列 K T E E Q P S E V N T G P R 中の各 P 、 E 、 S および T 残基が K または R と置換されている、請求項 8 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 10】

前記分泌リステリアタンパク質配列が A c t A 配列であり、配列 L I A M L 内の 1 以上の疎水性残基が非疎水性アミノ酸と置換されている、請求項 1 ~ 9 の 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 11】

前記配列 L I A M L が配列 Q D N K R に置き換えられている、請求項 10 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 12】

10

20

30

40

50

前記ポリペプチドが図2のdIPESTおよびdIPEST qdnkrと呼ばれる配列の一つの少なくとも最初の95残基を含む、請求項1～5の1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項13】

前記分泌リステリアタンパク質配列がLL0配列であり、配列SISMAPPASP
PASP K T P I Eの少なくとも75%が除去されている、請求項1～5の1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項14】

配列KENSISSMAPPASPPASPKまたはNSISSMAPPASPPAS
PKTPIEKKHADが除去されている、請求項1～5の1項に記載のポリヌクレオチド。 10

【請求項15】

前記分泌リステリアタンパク質配列がLL0配列であり、配列SISMAPPASP
PASP K T P I E K K H A D中の1以上のP、E、SおよびT残基がP、E、Sおよび
T以外の残基と置換されている、請求項1～5の1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項16】

配列SISMAPPASPPASPKTPIEKKHAD中の各P、E、SおよびT
残基がKまたはRと置換されている、請求項15に記載のポリヌクレオチド。

【請求項17】

前記ポリペプチドが図2のLL0dIPESTおよびLL0dI26と呼ばれる配列の
一つの少なくとも最初の95残基を含む、請求項1～5の1項に記載のポリヌクレオチド。
。

【請求項18】

前記プロモーターがactAまたはhlyプロモーターである、請求項1～17の1項
に記載のポリヌクレオチド。

【請求項19】

前記非リステリア抗原ががん細胞、腫瘍または感染病原体抗原である、請求項1～17
の1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項20】

請求項1～19の1項に記載のポリヌクレオチドを含むプラスミド。 30

【請求項21】

請求項1～19の1項に記載のポリヌクレオチドを含むリステリア細菌。

【請求項22】

リステリア・モノサイトゲネスである、請求項21に記載のリステリア細菌。

【請求項23】

前記細菌のゲノムactA遺伝子の機能的欠失によって弱毒化されている、請求項21
または22に記載のリステリア細菌。

【請求項24】

請求項1～21の1項に記載の前記ポリヌクレオチドが前記細菌のゲノムactAまたは
in1B遺伝子に挿入されている、請求項21～23の1項に記載のリステリア細菌。 40

【請求項25】

哺乳動物において、請求項21～24の1項に記載の前記リステリア細菌の有効量を前
記哺乳動物に投与することを含む非リステリア抗原に対する免疫応答を刺激する方法であ
って、前記非リステリア抗原が前記哺乳動物の1以上の細胞中で発現する、方法。

【請求項26】

請求項21～24の1項に記載の前記リステリア細菌と、薬学的に許容される賦形剤と
を含むワクチン。

【請求項27】

ワクチン用にリステリア細菌を產生する方法であって、

請求項1～19の1項に記載のポリヌクレオチドを前記リステリア細菌のゲノム中に組み 50

込むことを含む、方法。

【請求項 28】

請求項 1～19 の 1 項に記載のポリヌクレオチドが前記細菌のゲノム a c t A または i n l B 遺伝子中に挿入される、請求項 22 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、2012年12月27日出願の米国特許仮出願第61/746,237号および2013年3月13日出願の米国特許仮出願第61/780,744号の優先権を主張する。すべての表、図および請求項を含む、これらのそれぞれ内容の全体を参照により本明細書に援用する。10

【背景技術】

【0002】

本発明の背景に関する以下の考察は、読者が本発明を理解するのを支援するために提供するに過ぎず、本発明の先行技術を説明または構成することを認めるものではない。

【0003】

リストリア・モノサイトゲネス (Listeria monocytogenes (Lm)) は、ワクチンにコードされた抗原に特異的な、強力かつ高機能の CD4 および CD8 の T 細胞免疫をもたらす深在性の自然免疫応答を誘発するその能力によって特徴付けられる通性細胞内細菌である。 Lm は、がんまたは他のウイルス誘発性免疫不全の患者、妊婦、高齢者および乳児などの免疫力が低下した個人の間で病原性が高い食物媒介細菌である。20

【0004】

選択された標的病原体または悪性腫瘍に関連する指定された抗原をコードするために設計された組換え修飾 Lm ワクチンプラットフォームは、いくつかのヒト臨床試験の基礎を形成してきた。リストリアは、病原体、特に免疫無防備状態では病原体になり得るので、投与工程は、目的とする抗原の発現可能な免疫学的に活性な部分をコードする弱毒化リストリアを投与することを含む。「弱毒化」とは、細菌がその病原性を和らげるか、または除去するように修飾されるが、目的とする疾患の予防薬または治療薬として作用するその能力を保持しているプロセスを指す。例として、マウスのリストリア症モデルにおいて 2 つの病原性遺伝子を除去し、> 99.9% に弱毒化している遺伝学的に定義された弱毒化生 Lm a c t A i n l B は、その免疫効力を保持しており、ヒト疾患のマウスモデルならびにヒトの両方において強い CD4 および CD8 の T 細胞免疫性を誘発することを示し、種々の固形悪性腫瘍の患者の臨床現場では、安全で良好な耐容性を示してきた。30

【0005】

リストリア株は、最も一般的には、リストイオリジン O (LLO) または A c t A などの分泌されたリストリアタンパク質のすべてまたは一部との融合体として腫瘍抗原を分泌するように遺伝子操作されている。そのようなワクチンコンスクレクトの有効性の考えられる理由は「P E S T」モチーフと呼ばれる LLO および A c t A 内のアミノ酸配列の存在であってよいことが示唆してきた。P E S T 領域 (P . プロリン ; E . グルタミン酸 ; S . セリン ; T . スレオニン) は、特定のタンパク質の N H 2 または C O O H 末端近くに存在する親水性アミノ酸配列である。これらは、細胞プロテアソームによる急速な分解ためタンパク質を標的にすると考えられている。T リンパ球によって認識されるためには、タンパク抗原は、抗原提示細胞の表面に提示される M H C 分子に結合した短鎖ペプチドに変わらなければならぬ。実際に、M H C クラス I 分子による提示で利用できるペプチドの供給は、タンパク質の細胞半減期を短くすることによって増やすことができるので、LLO の P E S T 領域はリストリアワクチンの成功にとって重大であることが示唆してきた。40

【発明の概要】

【0006】

50

本発明は、宿主細胞のサイトゾルに目的の抗原を効率よく発現および分泌させ、翻訳リーディングフレーム内のN末端融合パートナーとしてリストリアまたは他の細菌シグナルペプチド／分泌シャペロンを選択された、コードされた組換えタンパク質抗原に機能的に結合することによってCD4およびCD8T細胞の効果的な応答を誘発する核酸、発現系およびワクチン株を提供する。これらの細菌N末端シグナルペプチド／分泌シャペロン融合パートナーは、感染した宿主哺乳動物細胞中の組換え細菌から合成融合タンパク質の分泌を指示する。後述するように、これらのN末端融合パートナーは、その配列本来のいずれのPEST配列が（実際の欠失によって、突然変異によって、またはこれらの方の組み合わせのいずれかによって）除去されている。

【0007】

10

細菌N末端シグナルペプチド／分泌チャペロン融合パートナーは、PEST配列の修飾に関して、および任意選択でシグナル配列の外側の疎水性モチーフの長さおよび／または存在にも関して、天然ポリペプチド配列と比較して修飾される。例として、ActAは、C末端膜結合ドメインを除去するよう切り詰めることができ、特定の実施形態において、融合タンパク質中の非抗原残基の数をさらに減少させるように切断ができる。加えて、シグナル配列の一部でなく、ポリペプチド配列中の疎水性モチーフを形成するこれらN末端融合パートナー中の1以上の疎水性残基も、（ここでも、実際の欠失によって、突然変異によって、またはこれらの方の組み合わせのいずれかによって）除去される。結果として生じる融合タンパク質は、高レベルで発現し、融合タンパク質に含まれる目的の抗原に対して強力な免疫応答を起こす。

20

【0008】

第1の態様において、本発明は、

(a) プロモーターと、

(b) 前述のプロモーターに作動可能に結合した核酸とを含むポリヌクレオチドに関し、前述の核酸は分泌リストリアタンパク質配列の組換え修飾に由来するポリペプチドを含む融合タンパク質と、非リストリア抗原とをコードし、前述の分泌リストリアタンパク質配列はその非修飾形においてシグナル配列および1以上のPESTモチーフを含み、前述の修飾はポリペプチドがいずれのPESTモチーフを欠如するような欠失による、または1以上の残基による置換による各PESTモチーフの除去を含む。

【0009】

30

特定の実施形態において、N末端シグナルペプチド／分泌シャペロン融合パートナーは、ActAまたはLL0に由来する。ActAまたはLL0ポリペプチド配列のPESTモチーフ中の1以上のP、E、SおよびT残基、および好ましくは各P、E、SおよびT残基は、P、E、SおよびT以外の残基と置換されることができる。後述するように、単一の残基を除去することでもこのモチーフの「PEST様」を少なくすることができます。あるいは、ActAまたはLL0ポリペプチド配列のPESTモチーフ中の1以上のP、E、SおよびT残基、および好ましくは各P、E、SおよびT残基は、単純に除去されてもよい。例として、PESTモチーフ中の各P、E、SおよびTは、KまたはRと置換してもよい。生成されたポリペプチドは、最も好ましくは、非修飾形において分泌リストリアタンパク質配列（例えば、ActAまたはLL0）のシグナル配列を保持する。

40

【0010】

分泌リストリアタンパク質配列がActA配列である場合、PESTモチーフKTEEQPSEVNTGPの少なくとも75%が好ましくは除去されている。特定の好適な実施形態において、配列KTEEQPSEVNTGPまたはKTEEQPSEVNTGPRが、除去されている。分泌リストリアタンパク質配列がLL0配列である場合、PESTモチーフKENSISSMAPPASPPASPKの少なくとも75%が、好ましくは除去されている。特定の好適な実施形態において、配列KENSISSMAPPASPPASPKまたはNSISSMAPPASPPASPKTPIEKKHADは、好ましくは除去されている。

【0011】

50

任意選択で、疎水性モチーフを形成する配列は、疎水性でない 1 以上のアミノ酸と置換することができる。このように、N 末端シグナルペプチド / 分泌シャペロン融合パートナーの修飾は、分泌リステリアタンパク質配列のシグナル配列の一部でない 1 以上の疎水性ドメインの除去および / または分泌リステリアタンパク質配列のシグナル配列の一部でない 1 以上の疎水性ドメイン内の 1 以上の残基の疎水性でないアミノ酸との置換をさらに含むことができる。後述する例として、A c t A 中の配列 L I A M L は、配列 Q D N K R と置き換えることができる。

【 0 0 1 2 】

本明細書に記載するように、N 末端シグナルペプチド / 分泌チャペロン融合パートナーは、任意選択で親タンパク質（例えば、A c t A または L L O）の天然の長さと比較して切り詰める。例として、A c t A は、C 末端膜結合ドメインを除去するように切り詰めることができ、特定の実施形態において、該融合タンパク質中の非抗原の数を減らすようさらに切り詰めることができる。同様に、L L O は、コレステロール結合を抑制するために、約 484 残基前で切り詰めることができ、および特定の実施形態において、融合タンパク質中の非抗原の数を再び減らすようさらに切り詰めることができる。

10

【 0 0 1 3 】

好適な実施形態において、分泌リステリアタンパク質配列は、A c t A 配列から運ばれ、ポリペプチドは、図 2 に d 1 P E S T および d 1 P E S T q d n k r と呼ぶ配列の一つの少なくとも最初の 95 残基を含む。

20

【 0 0 1 4 】

好適な実施形態において、分泌リステリアタンパク質配列は、L L O 配列から運ばれ、ポリペプチドは、図 2 の L L O d 1 P E S T および L L O d 1 2 6 と呼ばれる配列の一つの少なくとも最初の 95 残基を含む。

30

【 0 0 1 5 】

特定の実施形態において、プロモーターは、宿主生物に細菌を導入すると、宿主細胞中で融合タンパク質の発現を誘発する制御配列を提供する。例としてのみ示すが、プロモーターは、P r f A 依存性であるリステリア・モノサイトゲネス・プロモーターである。P r f A 依存性プロモーターは、i n 1 A プロモーター、i n 1 B プロモーター、i n 1 C プロモーター、h p t プロモーター、h l y プロモーター、p l c A プロモーター、m p 1 プロモーターおよび a c t A プロモーターからなる群から選択されてよい。

【 0 0 1 6 】

本発明の融合タンパク質の非リステリア抗原部分は、コードされた異種抗原に特異的な所望の免疫応答を誘発するよう、すなわち、治療される状態の症状を減少、予防または寛解せしめるように選択される 1 以上の配列を含む。特定の実施形態において、非リステリア抗原は、がん細胞、腫瘍または感染病原体抗原をコードする 1 以上の配列を含む。

【 0 0 1 7 】

関連する一態様において、本発明のポリヌクレオチドは、プラスミド、ベクターまたはその他の成分として提供される。

【 0 0 1 8 】

別の関連する態様において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含むように修飾された組換えリステリア細菌を提供する。種々の実施形態において、ポリヌクレオチドはエピソームで提供されても、または細菌ゲノムに組み込まれてもよい。組換えリステリア細菌は、弱毒化するように、例えば細菌の a c t A および / または i n 1 B ゲノム遺伝子の機能的欠失によってさらに修飾されてもよい。特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、細菌の a c t A または i n 1 B ゲノム遺伝子に挿入される。本発明の細菌は、例えば、これらの遺伝子から発現される異種タンパク質に対して免疫応答を起こす目的で、細菌と異種の 1 以上の遺伝子を発現させる発現プラットフォームとして利用することができる。このように、本態様は、組換えリステリア細菌と、薬学的に許容される賦形剤とを含むワクチンを提供することができる。

40

【 0 0 1 9 】

50

さらに別の関連する態様において、本発明は、本明細書に記載の有効量のリストリア細菌を、哺乳動物の1以上の細胞で非リストリア抗原が発現する哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物において非リストリア抗原に対する免疫応答を刺激する方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】ActAのいくつかの機能的属性を模式的に示す。

【図2】ActAおよびLLOの配列への種々の修飾を示す。

【図3】pestfindアルゴリズムを使用してスコア化した、LLO配列中のPESTモチーフの位置を示す。

【図4】pestfindアルゴリズムを使用してスコア化した、ActA配列中の4つのPESTモチーフを示す。 10

【図5】種々の修飾ActAおよびLLO融合パートナーを有する融合コンストラクトを発現するリストリア・モノサイトゲネスによる免疫に続くB3ZT細胞活性化アッセイの結果を示す。

【図6】いくつかのLLO441(A)およびActAN100(B)ワクチン株からの応答を示す。

【図7】モデル系としてActAを使用して、PESTモチーフの除去で用いるいくつかの置換および欠失を示す。

【図8】ActAN100のハイドロパシープロット上で疎水性モチーフLIAMLを修飾する結果を示す。 20

【図9】CT-26腫瘍細胞の抗原投与に続く、ヒトメソテリン残基35-621に融合した修飾ActAN100配列を有する融合コンストラクトを発現するリストリア・モノサイトゲネスで免疫した動物のパーセント生存率を示す。

【図10】模式的に示した本発明のEGFRVIII₂₀₋₄₀/NY-ESO-1₁₋₁₆₅融合コンストラクトおよびウエスタンプロットによる融合コンストラクトの発現を示す。 30

【図11】EGFRVIII₂₀₋₄₀/NY-ESO-1₁₋₁₆₅に融合した修飾ActAN100配列を有する融合コンストラクトを発現するリストリア・モノサイトゲネスでの免疫に続く、(A)パーセントIFN- γ 陽性EGFRVIII特異的CD8+T細胞、および(B)脾臓当たりのIFN- γ 陽性EGFRVIII特異的CD8+T細胞の絶対数として、細胞内サイトカイン染色法により決定したEGFR特異的T細胞応答を示す。

【図12】EGFRVIII₂₀₋₄₀/NY-ESO-1₁₋₁₆₅に融合した修飾ActAN100配列を有する融合コンストラクトを発現するリストリア・モノサイトゲネスでの免疫に続く、NY-ESO-1特異的CD8+T細胞応答を示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明は、リストリア細菌中での発現用の抗原融合タンパク質を調製するための組成物および方法に関する。本発明は、弱毒化生ワクチンに適していないリスク便益プロファイルを有する疾患の治療または予防で用いる有利な安全性プロファイルと共に弱毒化細菌ワクチン株を提供することができる。リストリア・モノサイトゲネスに関して以下に詳細に述べるが、当業者は、本明細書に記載の方法および組成物が一般にリストリア種に適用できることを理解する。 40

【0022】

リストリア・モノサイトゲネス(LLM)は、ワクチンにコードされた抗原に特異的な、強力で高機能のCD4およびCD8T細胞免疫をもたらす深在性の自然免疫応答を誘発するその能力によって特徴付けられる通性細胞内細菌である。LLMは、がんまたは他のウイルス誘発性免疫不全の患者、妊婦、高齢者および乳児などの免疫力が低下した個人の間で病原性が増加する食物媒介細菌である。所望のCD8T細胞応答を刺激するために、LLMワクチンは、リストリオリジンO(LLLO)として知られているポア形成細胞溶解素の発 50

現によって仲介される過程で感染した樹状細胞（D C）の液胞から逃れる能力を保持する必要があり、および所望の抗原は、続いて処理されて、M H C クラス I 分子上に提示される細胞質で細菌から発現、分泌されるように操作されている。

【0023】

L mワクチン株の開発において抗原発現レベルと抗原プロセシングの要件との間にはある一定の二分法が明らかにある。L mワクチンの免疫学的効力が宿主細胞での抗原発現および分泌のレベルに直接的に関連しているが、有効なM H C クラス I とクラス I I プライミングおよび抗原特異的免疫応答の誘発は、細胞のタンパク質分解装置による抗原の急速なターンオーバーに依存すると示唆してきた。

【0024】

本明細書では、抗原発現力セットを提供する。これは、宿主細胞のサイトゾルへのコードされた抗原の効果的な発現および分泌を引き起こし、翻訳リーディングフレーム内のN末端融合パートナーとしてリストリアまたは他の細菌シグナルペプチド／分泌シャペロンを選択された、コードされた組換えタンパク質抗原に機能的に結合させることによってC D 4 およびC D 8 T 細胞の効果的な応答を誘発する。これらの細菌N末端シグナルペプチド／分泌シャペロン融合パートナーは、感染した宿主哺乳動物細胞中で組換え細菌から合成融合タンパク質の分泌を指示する。後述するように、これらのN末端融合パートナーは、その配列本来のいずれのP E S T 配列を（実際の欠失によって、突然変異によって、またはこれらの方の組み合わせのいずれかによって）除去される。任意選択で、シグナル配列の一部でないこれらのN末端融合パートナー中の疎水性残基も（ここでも、実際の欠失によって、突然変異によって、またはこれらの方の組み合わせのいずれかによって）除去される。結果として生じる融合タンパク質は、高レベルで発現し、融合タンパク質に含まれる目的の抗原に対して強力な免疫応答を起こす。

10

20

30

40

50

【0025】

好適な実施形態において、前述の融合タンパク質は、L m P r f A 誘導性プロモーターに機能的に結合される。好適な非限定例としては、野生型リストリア・モノサイトゲネスにおいて、それぞれリストイオリジンO（L L O）の発現を推進するh l y プロモーター、およびA c t A タンパク質の発現を推進するa c t A プロモーターがある。P r f A 依存性プロモーターは、感染した哺乳動物の宿主細胞内で誘発され、機能的に結合したタンパク質は高レベルで発現する。宿主細胞中でP r f A 依存性プロモーターに機能的に結合した選択された抗原を含むコードされた融合タンパク質の高レベル発現を一時的に調節することで、抗原プロセシングおよび提示を容易にし、最適なL mワクチン誘発免疫応答を引き起こす。

【0026】

後述するように、N末端シグナルペプチド／分泌シャペロン融合パートナーの好適な非限定例としては、リストリア・モノサイトゲネス由来の修飾L L OまたはA c t A タンパク質がある。L L O およびA c t A N末端シグナルペプチド／分泌シャペロン融合パートナーは、リストリアP r f A 依存性プロモーター（例えば、h l y プロモーターまたはa c t A プロモーター）に機能的に結合することができる。好適な実施形態において、いずれの選択された抗原配列と共にフレーム内に融合用のいずれのP E S T 様配列モチーフがないA c t A およびL L O N末端シグナルペプチド／分泌シャペロン融合パートナーが提供される。そのようなP E S T がないN末端融合パートナーは、本明細書ではP E S Tマイナス（P E S T - ）A c t A およびP E S T - L L Oと呼ぶ。

【0027】

図1は、A c t A の機能的属性のいくつかを模式的に示す。下線を引いた部分は、天然のA c t A 配列中のP E S T 配列の位置を示す。特定の実施形態において、膜貫通領域を含むC末端ドメインを除去するために、N末端シグナルペプチド／分泌シャペロンは、A c t A のシグナル配列を含み、A c t A の389アミノ酸残基あたりで切り詰められているA c t A に由来する。これと関連して、本明細書で用いる場合、「あたり」という用語は、± 25 アミノ酸残基を指す。

【0028】

N末端融合パートナーで用いるシグナルペプチド／分泌シャペロンをもたらすために分泌リステリアタンパク質の修飾に関して本明細書で用いる場合、「由来の」という用語は、リステリアタンパク質本来のP E S T配列の除去と、任意選択で天然の長さと比較しての切り詰め、および／またはシグナル配列の外側の1以上の疎水性モチーフの修飾を指す。例として、A c t Aは、C末端膜結合ドメインを除去するように切り詰めてもよく、特定の実施形態において、さらに融合タンパク質中の非抗原残基の数を減らすように切り詰めてもよい。加えて、シグナル配列の一部でなく、ポリペプチド配列中で疎水性モチーフを形成するこれらのN末端融合パートナー中の1以上の疎水性残基も（ここでも、実際の欠失によって、突然変異によって、またはこれらの方の組み合わせのいずれかによって）除去される。後述するように、結果として生じる融合タンパク質は高レベルで発現し、融合タンパク質に含まれる目的の抗原に対して強力な免疫応答を起こす。

10

【0029】

同様に、天然のL L Oは529残基を含み、25残基シグナル配列とそれに続く4つの構造ドメインを含む。ドメイン4は、およそ415～529の残基からなり、コレステロール結合領域を含む。ドメイン1は、単一のP E S T配列を含む。特定の実施形態において、N末端シグナルペプチド／分泌シャペロンは、L L Oのシグナル配列を含み、およびコレステロール結合を抑制するために、約484残基前で切り詰められているL L Oに由来する。これに関連して本明細書で用いる場合、「由来の」という用語は、長さ、P E S T配列の存在およびシグナル配列の外側の疎水性モチーフの存在に関連して、天然L L O配列と比較して修飾されることを指す。修飾A c t Aは約441残基で切り詰められることが好みしい。

20

【0030】

以下に示すように、P E S T配列および疎水性ドメインは、それらの除去によって、または残基の非保存的置換によって、またはこれらの方の組み合わせによるいずれかで、機能的に除去ができる。例としてのみ示すが、以下の例は、A c t A中のL I A M L疎水性モチーフのQ D N K R配列との置き換え、およびA c t A P E S T配列のすべてもしくは一部の実際の欠失を示す。

30

【0031】

本発明は、その用途において、構造体の詳細および以下の説明に記載のまたは図面に示した成分の配置に限定されないことを理解すべきである。本発明は、これらの記載および種々の方法で実行されおよび実施されるものに加えて、諸実施形態が可能である。また、本明細書で使用した表現および用語、ならびに要約は、説明を目的としており、限定するものとみなすべきではない。

40

【0032】

そのようなものとして、当業者は、本開示が基づく概念が本発明のいくつかの目的を実施するための他の構造、方法および系を設計するための基礎として容易に利用できることを理解するであろう。したがって、本発明の意図および範囲から逸脱しない限り、請求項はそのような均等構造体を含むとみなされることが重要である。

1. 定義

【0033】

遺伝子中の突然変異またはその遺伝子を含む細菌中の突然変異を示すように用いられる略語は以下の通りである。例として、略語「L . モノサイトゲネス a c t A」とは、a c t A遺伝子の一部またはすべてが除去されたことを意味する。記号（ ）は、欠失を意味する。上付きのマイナス記号（リステリアA c t A - ）を含む略語は、a c t A遺伝子が例えば、欠失、点変異またはフレームシフト変異の変異型に限定されないがこれらによって変異したことを意味する。

【0034】

ヒト、哺乳動物、哺乳動物対象、動物、家畜対象、プラセボ対象、研究対象、実験対象、細胞、組織、器官または生体液に適用される場合、「投与」とは、限定するものではな

50

いが、外因性リガント、試薬、プラセボ、小分子、医薬品、治療薬、診断薬または組成物を対象、細胞、組織、器官または生体液などに接触させることを指す。「投与」とは、例えば、治療方法、薬物動態方法、診断方法、研究方法、プラセボ方法および実験方法を指すことができる。細胞の処理は、細胞との試薬の接触、ならびに体液が細胞と接している場合、その体液と試薬の接触を包含する。また、「投与」は、例えば、細胞の、試薬、診断薬、結合組成物による、または別の細胞によるイン・ビトロおよびエクスピリオ処理を包含する。

【0035】

リガンドおよび受容体に関連する場合、「アゴニスト」とは、受容体を刺激する分子、分子の組み合わせ、複合体または試薬の組み合わせを含む。例えば、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)のアゴニストは、GM-CSF、GM-CSFのムテインもしくは誘導体、GM-CSFのペプチド模倣薬、GM-CSFの生体機能を模倣する小分子、またはGM-CSF受容体を刺激する抗体を包含することができる。10

【0036】

リガンドおよび受容体に関連する場合、「アンタゴニスト」とは、受容体を阻害する、対抗する、減少させるおよび/または脱感作する分子、分子の組み合わせまたは複合体を含む。「アンタゴニスト」とは、受容体の恒常的活性を阻害するいずれの試薬を包含する。恒常的活性は、リガンド/受容体相互作用がない場合明らかな活性である。また、「アンタゴニスト」は、受容体の刺激(または調節)活性を阻害または予防するいずれの試薬を包含する。例として、GM-CSF受容体のアンタゴニストとしては、いかなる限定を意味することなく、リガンド(GM-CSF)に結合して、リガンドが受容体に結合することを防ぐ抗体、または受容体に結合して、リガンドが受容体に結合することを防ぐ抗体、または抗体が不活性立体構造に受容体をロックする場合が挙げられる。20

【0037】

本明細書で用いる場合、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質に関して「類似体」または「誘導体」とは、元のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質と同様もしくは同一の機能を有するが、元のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質と同様もしくは同一のアミノ酸配列もしくは構造を必ずしも含まない別のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を指す。類似体は、(a)元のアミノ酸配列と少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質性薬剤；(b)ストリンジメント条件下で、元のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされたタンパク質性薬剤；および(c)元のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列と少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%同一であるヌクレオチド配列によってコードされたタンパク質性薬剤、の少なくとも一つを満たすことが好ましい。30

【0038】

「抗原提示細胞」(APC)は、抗原をT細胞に提示するために使用される免疫系の細胞である。APCとしては、樹状細胞、単核細胞、マクロファージ、辺縁帯クッパー細胞、小膠細胞、ランゲルハンス細胞、T細胞およびB細胞が挙げられる。樹状細胞は、少なくとも2つの系統で生じる。第1の系統は、プレDC1、骨髄系DC1および成熟DC1を包含する。第2の系統は、CD34⁺CD45RA⁻初期前駆多能性細胞、CD34⁺CD45RA⁺細胞、CD34⁺CD45RA⁺CD4⁺IL-3R⁺プロCD2細胞、CD4⁺CD11c⁻形質細胞様プレDC2細胞、リンパ球ヒトDC2形質細胞様由来DC2および成熟DC2を包含する。40

【0039】

10

20

30

40

50

「弱毒化」および「弱毒化した」とは、宿主への毒性を減少させるように修飾されている細菌、ウイルス、寄生体、感染性微生物、プリオン、腫瘍細胞、感染性微生物中の遺伝子等を包含する。宿主は、ヒトもしくは動物宿主、または器官、組織もしくは細胞であつてよい。非限定的な例を挙げれば、細菌は、宿主細胞への結合を減少させるよう、1つの宿主細胞から別の宿主細胞への伝播を減らすよう、細胞外増殖を減少させるよう、または宿主細胞内で細胞内増殖を減少させるように弱毒化することができる。弱毒化は、例えば、毒性の1つの兆候もしくは複数の兆候、LD₅₀、器官からの除去速度、または競合指數を測定することで評価することができる（例えば、Auernbuechler. (2001) Infect. Immun. 69: 5953-5957参照）。一般に、弱毒化はLD₅₀の増加および/または除去速度の少なくとも25%、より一般に少なくとも50%、最も一般に少なくとも100%（2倍）、通常は少なくとも5倍、より通常は少なくとも10倍、より通常は少なくとも50倍、多くの場合少なくとも100倍、より多くの場合少なくとも500倍、および最も多くの場合少なくとも1000倍、通常は少なくとも5000倍、より通常は少なくとも10,000倍、および最も通常は少なくとも50,000倍、および最も多くの場合少なくとも100,000倍の増加を引き起す。

【0040】

「弱毒化遺伝子」とは、宿主に毒性、病理または病原性を仲介し、宿主内の増殖、または宿主内の生存を仲介する遺伝子を包含する。この場合、遺伝子は毒性、病理または病原性を軽減する、減少させる、または除去する方法で変異している。減少または除去は、変異遺伝子が仲介する病原性または毒性を非変異（または親）遺伝子が仲介するものと比較することによって評価できる。「変異遺伝子」とは、遺伝子の調節領域、遺伝子のコード領域、遺伝子の非コード領域またはそれらのいずれの組み合わせにおける欠失、点変異およびフレームシフト変異を包含する。

【0041】

「保存的修飾変異体」とは、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、保存的修飾変異体は、同じアミノ酸配列をコードする核酸、または1以上の保存的置換を有するアミノ酸を指す。保存的置換の一例としては、以下の基の一つにあるアミノ酸と、同じ基の別のアミノ酸との交換である（Leeらに交付された米国特許第5,767,063号およびKyte and Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-132）。逆に、非保存的置換とは、

- (1)疎水性：ノルロイシン、Ile、Val、Leu、Phe、Cys、Met
- (2)中性の親水性：Cys、Ser、Thr
- (3)酸性：Asp、Glu
- (4)塩基性：Asn、Gln、His、Lys、Arg
- (5)鎖配向に影響する残基：Gly、Pro
- (6)芳香族：Trp、Tyr, Phe、および
- (7)小アミノ酸：Gly、Ala、Ser

のうちの基の一つにあるアミノ酸と、異なる基の別のアミノ酸との交換である。

【0042】

「有効量」とは、限定するものではないが、医学的状態または障害の症状もしくは徵候を寛解させる、逆転させる、軽減する、予防する、または診断することができる量を包含する。明示的にまたは文脈において特段の指示のない限り、「有効量」は、状態を寛解させるのに十分な必要最低限量に限定されない。

【0043】

「細胞外液」とは、例えば、血清、血漿、血液、間質液、脳脊髄液、分泌液、リンパ液、胆汁、汗、排泄物および尿を包含する。「細胞外液」は、膠質または懸濁液、例えば、全血または凝固血を含むことができる。

【0044】

ポリペプチドと関連して、「フラグメント」という用語は、より大きなポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも5の近接するアミノ酸残基、少なくとも10の近接するアミノ

酸残基、少なくとも 15 の近接するアミノ酸残基、20 の近接するアミノ酸残基、少なくとも 25 の近接するアミノ酸残基、少なくとも 40 の近接するアミノ酸残基、50 の近接するアミノ酸残基、少なくとも 60 の近接するアミノ酸残基、少なくとも 70 の近接するアミノ酸残基、少なくとも 80 の近接するアミノ酸残基、少なくとも 90 の近接するアミノ酸残基、100 の近接するアミノ酸残基、少なくとも 125 の近接するアミノ酸残基、少なくとも 150 の近接するアミノ酸残基、175 の近接するアミノ酸残基、少なくとも 200 の近接するアミノ酸残基、または少なくとも 250 の近接するアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むペプチドまたはポリペプチドが挙げられる。

【0045】

「遺伝子」とは、オリゴペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸配列を指す。オリゴペプチドまたはポリペプチドは、生物学的に活性、抗原的に活性、生物学的に不活性、または抗原的に不活性などであってよい。遺伝子という用語は、例えば、特定のオリゴペプチドまたはポリペプチドをコードするオープソリーディングフレーム(ORF)の総計；ORFと、イントロンをコードする核酸との総計；ORFと、作動可能に結合したプロモーターとの総計；ORFと、作動可能に結合したプロモーターと、いずれのイントロンとの総計；ORFと、作動可能に結合したプロモーターと、イントロンと、エンハンサーなどの他の調節エレメントとの総計を包含する。特定の実施形態において、「遺伝子」は、その遺伝子の発現を調節するシスで必要とされるいずれの配列を包含する。遺伝子という用語は、抗原またはペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質の抗原的に活性のフラグメントを包含するペプチドをコードする核酸を指すこともできる。遺伝子という用語は、コードされたペプチドもしくはタンパク質がいずれの生物活性を有し、またはペプチドもしくはタンパク質が抗原的に活性であることさえ、必ずしも意味するものではない。非発現可能な配列をコードする核酸配列は、一般に偽遺伝子と考えられている。また、遺伝子という用語は、rRNA、tRNAまたはリボザイムなどのリボ核酸をコードする核酸配列を包含する。

【0046】

リストリアなどの細菌の「増殖」とは、限定されることなく、コロニー形成、複製、タンパク質含有量の増加および/または脂質含有量の増加に関連する細菌生理学および遺伝子の機能を包含する。明示的にまたは文脈で特に明記しない限り、リストリアの増殖とは、宿主細胞外部の細菌の増殖および宿主細胞内部の増殖も包含する。増殖関連の遺伝子としては、いかなる限定も意味することなく、エネルギー生産(例えば、解糖、クレブス回路、シトクロム)、アミノ酸、糖、脂質、ミネラル、プリンおよびピリミジンの同化および/または異化、栄養素輸送、転写、翻訳および/または複製を仲介するものが挙げられる。一部の実施形態において、リストリア細菌の「増殖」とは、リストリア細菌の細胞内増殖、すなわち、哺乳動物細胞などの宿主細胞内の増殖を指す。リストリア細菌の細胞内増殖は光学顕微鏡検査またはコロニー形成単位(CFU)アッセイで測定されることができるが、増殖は測定のいかなる技術によって限定されない。リストリア抗原、リストリア核酸配列またはリストリア細菌に特異的な脂質の量などの生化学的パラメータを用いて増殖を評価することができる。一部の実施形態において、増殖を仲介する遺伝子は、特に細胞内増殖を仲介する遺伝子である。一部の実施形態において、具体的には細胞内増殖を仲介する遺伝子としては、限定するものではないが、遺伝子の不活性化により細胞内増殖の速度が低減するが、検出可能に、大幅にまたは感知できるほどに細胞外増殖(例えば、プロス中の増殖)の速度を低減しない遺伝子、または遺伝子の不活性化により細胞内増殖の速度を細胞外増殖の速度を低減するよりも大きな程度まで低減する遺伝子を包含する。非限定例を示すために、一部の実施形態において、不活性化により細胞内増殖の速度を細胞外増殖よりも大きな程度まで低減する遺伝子は、不活性化により細胞内増殖が正常値もしくは最大値の50%未満まで低減するが、細胞外増殖は最大値のわずか1~5%、5~10%または10~15%まで低減する状態を包含する。特定の態様において、本発明は、細胞内増殖を減弱させたが、細胞外増殖は減弱させてないリストリア、細胞内増殖を減弱させてなく、細胞外増殖も減弱させてないリストリア、ならびに細胞内増殖を減弱させてな

10

20

30

40

50

いが、細胞外増殖を減弱させたリストリアを包含する。

【0047】

「標識した」組成物は、直接的または間接的のいずれかで、分光法、光化学的方法、生化学的方法、免疫化学的方法、アイソトープ法または化学的方法によって検出可能である。例えば、有用な標識としては、³²P、³³P、³⁵S、¹⁴C、³H、¹²⁵I、安定同位体、エピトープタグ、蛍光色素、高電子密度の試薬、基質、または酵素（例えば、酵素結合免疫アッセイで使用されるもの）またはフルオレット（Rozinov and Nolan (1998) Chem. Biol. 5: 713-728 参照）が挙げられる。

【0048】

本明細書で用いる場合、「疎水性モチーフ」とは、アミノ酸残基がその一部であるタンパク質全体と関連して、ハイドロパシー分析によって疎水性を示す一連の近接するアミノ酸残基を指す。「ハイドロパシー分析」とは、KyteとDoolittle (A Simple Method for Displaying the Hydrophilic Character of a Protein". J. Mol. Biol. 157 (1982) 105-132) の方法によるポリペプチド配列の分析を指す。この方法では、各アミノ酸は、4.6と-4.6の間の疎水性スコアを与えられる。4.6のスコアは最も疎水性であり、-4.6のスコアは最も親水性である。次いで、ウインドウサイズを設定する。ウインドウサイズとは、その疎水性スコアが平均化され、ウインドウ内の第1のアミノ酸に割り当てるアミノ酸の数である。アミノ酸の第1のウインドウから算出を開始し、そのウインドウ内のすべての疎水性スコアの平均を算出する。次いで、ウインドウを1つ下のアミノ酸に移動し、第2のウインドウ内のすべての疎水性スコアの平均を算出する。このパターンをタンパク質の最後まで続け、各ウインドウの平均スコアを計算して、それをウインドウ内の第1のアミノ酸に割り当てる。次いで、平均値をグラフにプロットする。y軸は疎水性スコアを表し、x軸はウインドウ番号を表す。以下の疎水性スコアは、20の共通アミノ酸で用いる。

| | | |
|------------|------------|------------|
| Arg : -4.5 | Ser : -0.8 | Lys : -3.9 |
| Thr : -0.7 | Asn : -3.5 | Gly : -0.4 |
| Asp : -3.5 | Ala : 1.8 | Gln : -3.5 |
| Met : 1.9 | Glu : -3.5 | Cys : 2.5 |
| His : -3.2 | Phe : 2.8 | Pro : -1.6 |
| Leu : 3.8 | Tyr : -1.3 | Val : 4.2 |
| Trp : -0.9 | Ile : 4.5 | |

【0049】

「リガンド」とは、受容体のアゴニストまたはアンタゴニストである、小分子、ペプチド、ポリペプチドまたは膜関連分子もしくは膜結合分子を指す。「リガント」は、アゴニストまたはアンタゴニストでない結合剤も包含し、アゴニストまたはアンタゴニスト特性を持たない。慣例により、リガンドが第1の細胞上で膜結合している場合、受容体は通常第2の細胞上に生じる。第2の細胞は、同じ同一性（同じ名称）を持つこともあり得、または第1の細胞と異なる同一性（異なる名称）を持つこともある。リガンドまたは受容体は、完全に細胞内にあり得る、すなわち、それはサイトゾル、核内、または一部の他の細胞内区画内に存在し得る。リガンドまたは受容体は、その位置を、例えば、細胞内区画から細胞膜の外面に変わることもある。リガンドと受容体の複合体は、「リガンド受容体複合体」と称される。リガンドおよび受容体がシグナル経路に関与する場合、リガンドはシグナル経路の上流位置で生じ、受容体はシグナル経路の下流位置で生じる。

【0050】

「核酸」とは、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよびその一本鎖状、二本鎖状または多重鎖状のいずれかでのポリマーを指す。核酸の非限定的な例としては、例えば、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドがある。また、特定の核酸配列は、暗黙的に、「対立遺伝子バリアント」とおよび「スプライスバリア

10

20

30

40

50

ント」を包含する。

【0051】

mRNAをコードするプロモーターおよび核酸と関連して「作動可能に結合した」という用語は、そのプロモーターを用いてその核酸の転写を開始できることを意味する。

【0052】

「パーセント配列同一性」および「%配列同一性」という用語は、2つ以上のアミノ酸配列または核酸配列を比較することによってまたは一列に並べて見出される配列類似性のパーセンテージを指す。パーセント同一性は、2つの分子間の配列情報を直接比較することによって、配列を一列に並べて、並べた2つの配列間での一致の正確な数を数えて、短い配列の長さによって割り、その結果に100を乗じることで決定できる。パーセント同一性を算出するためのアルゴリズムは、Smith-Waterman相同性検索アルゴリズムがある（例えば、Kann and Goldstein (2002) Proteins 48: 367-376; Arslanら (2001) Bioinformatics 17: 327-337参照）。

10

【0053】

ポリペプチドを参照する場合、「精製された」および「単離した」によって、本来はそれが関連している本質的に存在しない他の生体高分子に存在することを意味する。本明細書で用いる場合、「精製された」という用語は、同一のポリペプチドが多くの場合、存在するポリペプチドの少なくとも50重量%を占める、より多くの場合少なくとも60重量%を占める、一般的に少なくとも70重量%を占める、より一般的に少なくとも75重量%を占める、最も一般的に少なくとも80重量%を占める、通常は少なくとも85重量%を占める、より通常は少なくとも90重量%を占める、最も通常は少なくとも95重量%を占める、および慣例的に少なくとも98重量%またはそれを超えて占めることを意味する。水、緩衝液、塩類、界面活性剤、還元剤、プロテアーゼ阻害剤、安定剤（アルブミンなどの添加タンパク質を含む）と賦形剤、および1000未満の分子量を有する分子は、通常ポリペプチド精製の決定で用いられない。例えば、Covacciらに交付された米国特許第6,090,611号においての精製の考察参照。

20

【0054】

「ペプチド」とは、アミノ酸が互いにペプチド結合によって結合されているアミノ酸の短い配列を指す。ペプチドは、遊離して、または高分子、脂質。オリゴ糖もしくは多糖および/またはポリペプチドなどの別の部分と結合して生じることができる。ペプチドがポリペプチド鎖に組み込まれる場合、「ペプチド」という用語を依然として用いて、アミノ酸の短い配列を具体的にいうこともある。「ペプチド」は、ペプチド結合または別のタイプの結合として、別の部分に結合することもある。ペプチド、長さにおいて少なくとも2つのアミノ酸および一般に長さにおいて約25未満のアミノ酸であり、最大長はカスタムまたは文脈の機能である。「ペプチド」および「オリゴペプチド」という用語は、互換的に用いることができる。

30

【0055】

「PESTモチーフ」は、本明細書ではP、E、SおよびTアミノ酸の局所濃度が高い少なくとも12アミノ酸長の親水性の伸長として定義され、epestfindアルゴリズムによって有効なPESTモチーフとしてスコア化する。負電荷アミノ酸はこれらのモチーフ内でクラスター形成されるが、正電荷アミノ酸、アルギニン(R)、ヒスチジン(H)およびリジン(K)は一般に禁じられている。正電荷アミノ酸が隣接するために必要とされるそのPESTモチーフにおいて、epestfindアルゴリズムは最後の判定基準をさらにいっそう厳しく定義する。正電荷側面の間のすべてのアミノ酸は数えられ、ウインドウサイズのパラメータと等しいまたは高い多くのアミノ酸を含むモチーフのみがさらに検討される。さらに、すべての「有効な」PEST領域は、少なくとも1つのプロリン(P)、1つのアスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)および少なくとも1つのセリン(S)またはトレオニン(T)を含むことを必要とする。上記の基準を満たさない配列は、「無効な」PESTモチーフとして分類される。

40

50

【0056】

「有効な」P E S T モチーフは、重要なアミノ酸の局所濃縮ならびにモチーフの疎水性に基づくスコアリングパラメータを用いて精製される。D、E、P、SおよびTの濃縮は、質量パーセント(w / w)で表示され、1当量のDまたはE、1当量のPおよび1当量のSまたはTを修正する。疎水性の算出は、原則としてJ. KyteおよびR. F. Doolittleの方法に従う。簡易算出の場合、本来はアルギニンの場合の-4.5からイソロイシンの場合の+4.5の範囲であるKyte-Doolittleハイドロパシー指数は、正整数に変換された。これは以下の線形変換によって達成され、アルギニンの0から、イソロイシンの90の値を得た。

$$\text{ハイドロパシー指数} = 10 * \text{Kyte - Doolittleハイドロパシー指数} + 45$$

10

【0057】

モチーフの疎水性は、モルパーセントの生成物および各アミノ酸種の疎水性指数にわたる合計として算出する。所望のP E S Tスコアは、以下の式によって表されるように、局所濃縮用語と疎水性用語の組み合わせてとして得られる。

$$\text{P E S Tスコア} = 0.55 * \text{D E P S T} - 0.5 * \text{疎水性指数}.$$

【0058】

加えて、e p e s t f i n dアルゴリズムは、南カリフォルニア大学のRobert H. Stellwagenによって導入されたチロシンのハイドロパシー指数の修正を含む。しかしP E S Tスコアは、ポリイソロイシンの場合の-45から、ポリアスパラギン酸に1つのプロリンと1つのセリンとを加えた場合の約+50の範囲であってよい。「有効な」P E S Tモチーフは、上記の5.0の閾値スコアのものであり、本当の生物学的目的と考えられる。

20

【0059】

「タンパク質」とは、一般にポリペプチド鎖を含むアミノ酸の配列を指す。タンパク質は、ポリペプチドの三次元構造を指すこともある。「変性タンパク質」とは、いくつかの残存する三次元構造を有する部分的に変性したポリペプチドを指すか、またはあるいは本質的にランダムな三次元構造、すなわちすっかり変性したポリペプチドを指す。本発明は、例えばグリコシル化、リン酸化、硫酸化、ジスルフィド結合形成、アミド分解、異性化、シグナルまたはリーダー配列プロセシングにおける切断点、共有および非共有結合補助因子、酸化変異体などを含むポリペプチド変異体の試薬およびこれらを用いる方法を包含する。ジスルフィド結合タンパク質の形成は記載されている(例えば、WoycechowskyおよびRaines(2000)Curr. Opin. Chem. Biol. 4: 533-539; Creightonら(1995)Trends Biotechnol. 13: 18-23参照)。

30

【0060】

例えば、核酸、細胞、動物、ウイルス、プラスミド、ベクターなどに関連して用いられる場合、「組換え体」とは、外因性、非天然核酸の導入による、天然核酸の変質による、または組換え核酸、細胞、ウイルス、プラスミドまたはベクターから全体もしくは一部の誘導による修飾を示す。組換えタンパク質は、例えば、組換え核酸、ウイルス、プラスミド、ベクターなどに由来するタンパク質を指す。「組換え細菌」とは、ゲノムが組換え方法によって、例えば、変異、欠失、挿入および/または再編成によって操作されている細菌を包含する。「組換え細菌」も、組換えゲノム外核酸、例えば、プラスミドもしくは第二染色体、または既存のゲノム外核酸が変化している細菌を含むように修飾された細菌を包含する。

40

【0061】

「試料」とは、ヒト、動物、プラセボまたは研究試料、例えば、細胞、組織、器官、体液、気体、エアゾール、スラリー、膠質または凝固体に由来する試料を指す。「試料」とは、ヒトまたは動物から除去せずに、イン・ビボで検査することもでき、またはイン・ビトロで検査されることもできる。試料は、プロセシングの後、例えば組織学的方法によって検査されることができる。「試料」は、例えば、体液もしくは組織試料を含む細胞、ま

50

たは体液もしくは組織試料から分離された細胞を指すこともある。「試料」は、ヒトまたは動物から新たに採取された細胞、組織、器官もしくは体液を指すことも、または処理もしくは貯蔵された細胞、組織、器官もしくは体液を指すこともある。

【0062】

「選択可能なマーカー」とは、選択可能なマーカーを含む細胞のために、または該細胞に対して選択することができる核酸を包含する。選択可能なマーカーの例としては、限定するものではないが、(1)別の毒化合物(例えば、抗生物質)に耐性を与える生成物をコードする核酸または別の無害な化合物(例えばショ糖)への感受性をコードする核酸；(2)あるいは受容細胞(例えば、tRNA遺伝子、栄養要求性マーカー)が欠如している生成物をコードする核酸；(3)遺伝子産物の活性を抑制する生成物をコードする核酸；(4)容易に特定されることができる生成物(例えば、-ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、細胞表面タンパク質、エピトープタグ、FLAGタグなどの表現型マーカー)をコードする核酸；(5)ハイブリッド形成技術、例えば、PCRまたは分子ビーコンによって特定されることができる核酸、が挙げられる。

10

【0063】

リガンド/受容体、核酸/相補的核酸、抗体/抗原、または他の結合対(例えば、サイトカイン受容体に対するサイトカイン)を参照する場合、「特異的に」または「選択的に」結合することは、タンパク質および他の生物製剤の不均一な集団中のタンパク質の存在を決定するような結合反応を示す。このように、所定の条件下で、特定されたリガンドは特定の受容体と結合して、試料中に存在する他のタンパク質と相当量で結合しない。特異的結合とは、例えば、考えられる方法の結合化合物、核酸リガンド、抗体または抗体の抗原結合部位に由来する結合組成物が、いずれの他の結合化合物との親和性よりも多くの場合少なくとも25%を超える、より多くの場合少なくとも50%を超える、最も多くの場合少なくとも100%(2倍)を超える、通常は少なくとも10倍を超える、より通常は少なくとも20倍を超える、最も通常は少なくとも100倍を超える親和性でその標的に結合することも意味することができる。

20

【0064】

一般的な実施形態において、抗体は、例えばScatchard分析(Munsenら(1980)Analyt.Biochem.107:220-239)によって決定されるように、約109リットル/モルを超える親和性を有する。一部の化合物は1以上の標的に特異的に結合することができ、例えば、抗体は抗体のオリゴ糖としてその抗原、レクチンに、および/または抗体のFc領域としてFc受容体に特異的に結合することを当業者は認識する。

30

【0065】

細菌の「伝播」とは、「細胞間伝播」を包含する。これは、例えば小胞によって介されるように、第1の宿主細胞から第2の宿主細胞への細菌の伝播である。伝播に関する機能としては、限定するものではないが、例えば、アクチン尾部の形成、偽足様伸長の形成および二重膜液胞の形成が挙げられる。

【0066】

本明細書で用いる場合、「対象」という用語は、ヒトまたは非ヒト生物を指す。このように、本明細書に記載の方法および組成物は、ヒト疾患および獣医学的疾患の両方に適用可能である。特定の実施形態において、対象は、「患者」、すなわち疾患または状態の医療を受けているヒト生体である。これは、症状の徴候を調べられている定義されてない疾患の患者も含む。

40

【0067】

リコンビナーゼの「標的部位」とは、リコンビナーゼによって認識、結合、および/または作用される核酸配列または領域である(例えば、Grahamらに交付された米国特許第6,379,943号；Smith and Thorpe(2002)Mol.Microbiol.44:299-307；Groth and Calos(2004)J.Mol.Biol.335:667-678；Nunes-Dubyら(1998

50

) N u c l e i c A c i d s R e s . 2 6 : 3 9 1 - 4 0 6 参照)。

【 0 0 6 8 】

「治療有効量」とは、患者の利益、すなわち治療される状態の症状を減少、予防するまたは寛解させるために示す、コードされた異種抗原に特異的な所望の免疫応答を誘発するのに十分な試薬または医薬組成物の量として定義される。薬剤または医薬組成物が診断薬を含む場合、「診断有効量」とは、シグナル、イメージまたは他の診断パラメータを生成するのに十分な量として定義される。医薬製剤の有効量は、個人の感受性の程度、年齢、性別および個人の体重、ならびに個人の特異体质の応答などの因子によって変わる(例えば、Nettiらに交付された米国特許第5,888,530号参照)。

【 0 0 6 9 】

「治療」または「治療する」(状態または疾患に関して)とは、好ましくは臨床結果を含み、有益な結果または所望の結果を得るための方法である。本発明のために、疾患に関して有益な結果または所望の結果とは、限定するものではないが、疾患に関連する状態を改善すること、疾患を治療すること、疾患の重症度を和らげること、疾患の進行を遅延させること、疾患に関連する1以上の症状を軽減すること、疾患の患者のクオリティ・オブ・ライフを上げること、および/または生存を延ばすこと、の1以上が挙げられる。同様に、本発明のために、状態に関して有益な結果または所望の結果とは、限定するものではないが、状態を改善すること、状態を治療すること、状態の重症度を和らげること、状態の進行を遅延させること、状態に関連する1以上の症状を軽減すること、状態の患者のクオリティ・オブ・ライフを上げること、および/または生存を延ばすこと、の1以上が挙げられる。

【 0 0 7 0 】

「ワクチン」は、予防ワクチンを包含する。ワクチンは、治療ワクチン、例えば、ワクチンによってもたらされる抗原またはエピトープに関連した状態または障害を含む、哺乳動物に投与されるワクチンも包含する。多くの細菌種はワクチンとしての使用用に開発されており、本発明において、シゲラ・フレキシネリ、エシェリキア・コリ、リストリア・モノサイトゲネス、エンテロコリチカ菌、サルモネラチフィムリウム、サルモネラ・チフィまたはマイコバクテリア種を含むがこれらに限定されず用いることが可能である。このリストは、限定を意図するものではない。例えば、国際公開第04/006837号、同第07/103225号および同第07/117371号参照。これらの各々は、すべての表、図および請求項を含みその全体を参照によって本明細書に組み込まれている。ワクチン組成物で使用される細菌ベクターは、通性、細胞内細菌ベクターであってよい。細菌は、本明細書に記載のポリペプチドを宿主生物中の抗原提示細胞に送達するために用いられることができる。本明細書に記載するように、L.モノサイトゲネスは本発明の抗原の発現用の好ましいワクチンプラットフォームを提供する。

抗原コンストラクト

標的抗原

【 0 0 7 1 】

本明細書に記載の融合タンパク質の好ましい特徴は、宿主内でL.モノサイトゲネスクチンプラットフォームによって組換えて発現する場合、抗原に対する自然免疫応答ならびに抗原特異的T細胞応答の両方を開始する能力である。例えば、本明細書に記載の抗原を発現するL.モノサイトゲネスは、ワクチン誘発免疫応答の性質を形づくる1型インターフェロン(IFN-)および同時制御されるケモカインとサイトカインタンパク質のカスケードを誘発することができる。この免疫刺激に反応応答して、NK細胞および抗原提示細胞(APC)は、静脈ワクチン接種経路に沿って、またはあるいは、ワクチン接種の他の経路に沿ってワクチン接種部位、例えば、筋肉内、皮下または皮内の免疫経路によって肝臓に補充される。特定の実施形態において、本発明のワクチンプラットフォームは、1以上の血清濃度で対象にワクチンプラットフォームを送達してから24時間で、および好ましくはIL-12p70、IFN-、IL-6、TNF およびMCP-1からなる群から選択されるすべてのサイトカインおよびケモカインは増加を誘発し、ワク

10

20

30

40

50

チップラットフォームによって発現される1以上の抗原に対してCD4+および/またはCD8+抗原特異的T細胞応答を誘発する。他の実施形態において、本発明のワクチンプラットフォームは、マウスモデル系におけるDX5、CD11bおよびCD43などの活性化マーカーの発現上昇によって、または標的細胞として使用された⁵⁻¹Cr-標識YAC-1細胞を用いて測定したNK細胞仲介細胞溶解活性によって示されるように、常在する未熟な肝臓NK細胞の成熟も誘発する。

【0072】

ワクチンベクターとして役立つL.モノサイトゲネスの能力は、Wesikirchら, Immunol. Rev. 158: 159-169 (1997)に明らかにされている。¹⁰L.モノサイトゲネスの自然生物学の多くの望ましい特徴により、治療ワクチンへの適用のための魅力的なプラットフォームになっている。中心的な理論的根拠は、L.モノサイトゲネスの細胞内ライフサイクルがCD4+およびCD8+T細胞免疫の効果的な刺激を可能にすることである。TLR (TLR2, TLR5, TLR9) ヌクレオチド結合オリゴマー化ドメイン (NOD) およびインターフェロン遺伝子の刺激装置 (STING) を含む複数の病原体関連分子パターン (PAMP) 受容体は、感染に応じてL.モノサイトゲネス高分子との相互作用を誘発し、自然免疫エフェクターのpan活性化およびTh-1活性化サイトカインの放出を引き起こし、発現した抗原に対するCD4+およびCD8+T細胞応答の発生に重大な影響を及ぼす。

【0073】

L.モノサイトゲネス株は、がんおよびHIVなどの病原体の注入ができない臨床状態に対して免疫応答を誘発するために、免疫系への抗原の送達をもたらす異種タンパク質の効果的な細胞内送達ビヒクルとして近年開発してきた。例えば、米国特許第6,051,237号; Gunnら, J. Immunol., 167: 6471-6479 (2001); Liauら, Cancer Research, 62: 2287-2293 (2002); 米国特許第6,099,848号; 国際公開第99/25376号; 国際公開第96/14087号; および米国特許第5,830,702号参照。これらの各々はすべての表、図および請求項を含みその全体を参照によって本明細書に組み込まれている。リンパ球性脈絡膜炎ウイルス (LCMV) 抗原を発現する組換えL.モノサイトゲネスも、抗原への保護細胞仲介免疫を誘発することが示されている (Shenら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 3987-3991 (1995)).²⁰

【0074】

特定の実施形態において、本発明のワクチン組成物で使用するL.モノサイトゲネスは、actAおよび/またはinlBに弱毒化変異体を含み、actAおよびinlB (本明細書では「Lm actA / inlB」と呼ぶ) のすべてまたは一部の欠失が好ましく、および目的の1以上の抗原の発現をコードする組換えDNAを含む。抗原は、細菌発現配列の制御下が好ましくは、L.モノサイトゲネスゲノムに安定して組み込まれる。³⁰

【0075】

本発明は、少なくとも1つの調節因子、例えば、プロモーターまたは転写調節因子で弱毒化されたリストリアも考えられる。以下は、プロモーターに関する。ActA発現は、2つの異なるプロモーターによって調節される (Vazquez-Bolandら (1992) Infect. Immun. 60: 219-230)。InlAおよびInlBの発現は共に、5つのプロモーターによって調節される (Lingnauら (1995) Infect. Immun. 63: 3896-3903)。転写因子prfAは、多くのL.モノサイトゲネス遺伝子、例えば、hly、plcA、ActA、mpl、prfAおよびiapの転写のために必要である。PrfAの調節特性は、例えば、PrfA依存的プロモーター (Pin1C) およびPrfAボックスによって仲介される。特定の実施形態において、本発明は、ActAプロモーター、inlBプロモーター、PrfA、Pin1C、PrfAボックスなどの少なくとも1つにおいて不活性、変異または欠失をコードする核酸を提供する (例えば、Lalic Mülthalerら (2001) Mol. Microbiol. 42: 111-120; Shetron-Ramaら (2005)⁴⁰

3) Mol . Microbiol . 48 : 1537 - 1551 ; Lu oら (2004) Mol . Microbiol . 52 : 39 - 52 参照) 。 PrfA は、 Gly145Ser 変異、 Gly155Ser 変異または Glu77Lys 変異によって構造的に活性させることができる (例えは、 Mueller and Freitag (2005) Infect . Immun . 73 : 1917 - 1926 ; Wong and Freitag (2004) J . Bacteriol . 186 : 6265 - 6276 ; Ripioら (1997) J . Bacteriol . 179 : 1533 - 1540 参照) 。

【 0076 】

本発明での使用を見出し得る標的抗原の例を以下の表に収載する。標的抗原は、表に収載した抗原の免疫学的に活性の部分を含むフラグメントまたは融合ポリペプチドであってもよい。本リストは、限定を意図するものではない。

【 0077 】

【表1】

| 抗原 | 参考 |
|---|--|
| 腫瘍抗原 | |
| メソテリン | GenBank 受入番号 NM_005823 ; U40434 ; NM_013404 ; BC003512(例えば、Hassanら(2004) Clin. Cancer Res. 10:3937-3942 ; Muminovaら(2004) BMC Cancer 4:19 ; Iacobuzio-Donahueら(2003) Cancer Res. 63:8614-8622 も参照)。 |
| ウイルム腫瘍-1 関連タンパク質(Wt-1)、イソ型A;イソ型B;イソ型C;イソ型Dを含む | WT-1 イソ型 A(GenBank 受入番号 <u>NM_000378</u> ; NP_000369)。WT-1 イソ型 B(GenBank 受入番号 <u>NM_024424</u> ; NP_077742)。WT-1 イソ型 C(GenBank 受入番号 <u>NM_024425</u> ; NP_077743)。WT-1 イソ型 D(GenBank 受入番号 <u>NM_024426</u> ; NP_077744)。 |
| 角質層キモトリブシン様酵素(SCCE)、およびその変異体 | GenBank 受入番号 NM_005046 ; NM_139277 ; AF332583。例えば、Bondurantら(2005) Clin. Cancer Res. 11:3446-3454 ; Santinら(2004) Gynecol. Oncol. 94:283-288 ; Shigemasaら(2001) Int. J. Gynecol. Cancer 11:454-461 ; Sepehrら(2001) Oncogene 20:7368-7374 も参照。 |
| MHC クラスI鎖関連タンパク質 A(MICA) ; MHC クラスI鎖関連タンパク質 B(MICB) | 例えば、Grohら(2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:6461-6466 ; GenBank 受入番号 NM_000247 ; BC_016929 ; AY750850 ; NM_005931 参照。 |
| ガストリン由来のガストリンおよびペプチド；ガストリン/CCK-2受容体(別名 CCK-B) | Harrisら(2004) Cancer Res. 64:5624-5631 ; Gilliamら(2004) Eur. J. Surg. Oncol. 30:536-543 ; Laheru and Jaffee(2005) Nature Reviews Cancer 5:459-467。 |
| グリビカン-3(例えば、肝細胞癌およびメラノーマの抗原) | GenBank 受入番号 <u>NM_004484</u> 。Nakatsuraら(2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 306:16-25 ; Capurroら(2003) Gasteroenterol. 125:89-97 ; Nakatsuraら(2004) Clin. Cancer Res. 10:6612-6621)。 |
| コアクトシン様タンパク質 | Nakatsuraら(2002) Eur. J. Immunol. 32:826-836 ; Laheru and Jaffee(2005) Nature Reviews Cancer 5:459-467。 |
| 前立腺幹細胞抗原(PSCA) | GenBank 受入番号 AF043498 ; AR026974 ; AR302232(例えば、Arganiら(2001) Cancer Res. 61:4320-4324 ; Christiansenら(2003) Prostate 55:9-19 ; Fuesselら(2003) |

10

20

30

40

| | |
|---|---|
| | 23:221-228 も参照)。 |
| 前立腺性酸性ホスファターゼ(PAP)；前立腺特異的抗原(PSA)；PSM；PSMA | Smallら(2000) <i>J. Clin. Oncol.</i> 18:3894-3903 ; Altwein and Luboldt(1999) <i>Urol. Int.</i> 63:62-71 ; Chanら(1999) <i>Prostate</i> 41:99-109 ; Itoら(2005) <i>Cancer</i> 103:242-250 ; Schmittgenら(2003) <i>Int. J. Cancer</i> 107:323-329 ; Millonら(1999) <i>Eur. Urol.</i> 36:278-285。 |
| 前立腺の6回膜貫通上皮抗原(STEAP) | 例えば、Machlenkinら(2005) <i>Cancer Res.</i> 65:6435-6442 ; GenBank受入番号NM_018234 ; NM_001008410 ; NM_182915 ; NM_024636 ; NM_012449 ; BC011802 参照。 |
| 前立腺細胞癌腫瘍抗原-1(PCTA-1) | 例えば、Machlenkinら(2005) <i>Cancer Res.</i> 65:6435-6442 ; GenBank受入番号L78132 参照。 |
| 前立腺腫瘍誘発遺伝子-1(PTI-1) | 例えば、Machlenkinら(2005) <i>Cancer Res.</i> 65:6435-6442)参照。 |
| Gタンパク質結合受容体への相同性を有する前立腺特異的遺伝子 | 例えば、Machlenkinら(2005) <i>Cancer Res.</i> 65:6435-6442)参照。 |
| 前立腺(アンオロゲン調節セリンプロテアーゼ) | 例えば、Machlenkinら(2005) <i>Cancer Res.</i> 65:6435-6442 ; GenBank受入番号BC096178 ; BC096176 ; BC096175 参照。 |
| プロティナーゼ3 | GenBank受入番号X55668。 |
| 精巣癌抗原、例えば、NY-ESO-1；SCP-1；SSX-1；SSX-2；SSX-4；GAGE、CT7；CT8；CT10；MAGE-1；MAGE-2；MAGE-3；MAGE-4；MAGE-6；LAGE-1。 | GenBank受入番号NM_001327(NY-ESO-1)(例えば、Liら(2005) <i>Clin. Cancer Res.</i> 11:1809-1814 ; Chenら(2004) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.</i> 101(25):9363-9368 ; Kubuschokら(2004) <i>Int. J. Cancer.</i> 109:568-575 ; Scanlanら(2004) <i>Cancer Immun.</i> 4:1 ; Scanlanら(2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047 ; Scanlanら(2000) <i>Cancer Lett.</i> 150:155-164 ; Dalerbaら(2001) <i>Int. J. Cancer</i> 93:85-90 ; Riesら(2005) <i>Int. J. Oncol.</i> 26:817-824も参照)。 |
| MAGE-A1、MAGE-A2；MAGE-A3；MAGE-A4；MAGE-A6；MAGE-A9；MAGE-A10；MAGE-A12；GAGE-3/6；NT-SAR-35；BAGE；CA125 | Otteら(2001) <i>Cancer Res.</i> 61:6682-6687 ; Leeら(2003) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 100:2651-2656 ; Sarcevicら(2003) <i>Oncology</i> 64:443-449 ; Linら(2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:5708-5716。 |
| GAGE-1；GAGE-2；GAGE-3；GAGE-4；GAGE-5；GAGE-6；GAGE-7；GAGE-8；GAGE-65；GAGE-9 | De Backerら(1999) <i>Cancer Res.</i> 59:3157-3165 ; Scarellaら(1999) <i>Clin. Cancer Res.</i> 5:335-341。 |

10

20

30

40

| | |
|---|---|
| GE-11 ; GAGE-13 ; GAG E-7B | |
| HIP1R ; LMNA ; KIAA1 416 ; Seb4D ; KNSL6 ; T RIP4 ; MBD2 ; HCAC5 ; MAGEA3 | Scanlanら(2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047。 |
| 遺伝子の DAM ファミリ ー、例えば、 DAM-1 ; DAM-6 | Fleishhauerら(1998) <i>Cancer Res.</i> 58:2969-2972。 |
| RCAS1 | Enjojiら(2004) <i>Dig. Dis. Sci.</i> 49:1654-1656。 |
| RU2 | Van Den Eyndeら(1999) <i>J. Exp. Med.</i> 190:1793-1800。 |
| CAMEL | Slagerら(2004) <i>J. Immunol.</i> 172:5095-5102 ; Slagerら(2004) <i>Cancer Gene Ther.</i> 11:227-236。 |
| 抗原関連結合腸癌、例えば、 NY-CO-8 ; NY-CO-9 ; N Y-CO-13 ; NY-CO-16 ; N Y-CO-20 ; NY-CO-38 ; N Y-CO-45 ; NY-CO-9/HD AC5 ; NY-CO-41/MBD2 ； NY-CO-42/TRIP4 ; NY -CO-95/KIAA1416; KNSL6 ; seb4D | Scanlanら(2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047。 |
| N-アセチルグルコサミン-転 移酵素 V(GnT-V) | Dosaka-Akitaら(2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:1773-1779。 |
| 伸長因子 2 変異型 (ELF2M) | Renkvistら(2001) <i>Cancer Immunol Immunother.</i> 50:3-15。 |
| HOM-MEL-40/SSX2 | Neumannら(2004) <i>Int. J. Cancer</i> 112:661-668 ; Scanlanら(2000) <i>Cancer Lett.</i> 150:155-164。 |
| BRDT | Scanlanら(2000) <i>Cancer Lett.</i> 150:155-164。 |
| SAGE ; HAGE | Sasakiら(2003) <i>Eur. J. Surg. Oncol.</i> 29:900-903。 |
| RAGE | 例えば、Li ら(2004) <i>Am. J. Pathol.</i> 164:1389-1397 ; Shirasawaら(2004) <i>Genes to Cells</i> 9:165-174。 |
| MUM-1(メラノーマ偏在変 異型) ; MUM-2 ; MUM-2 Arg-Gly 変異 ; MUM-3 | Gueguenら(1998) <i>J. Immunol.</i> 160:6188-6194 ; Hiroseら(2005) <i>Int. J. Hematol.</i> 81:48-57 ; Baurainら(2000) <i>J. Immunol.</i> 164:6057-6066 ; Chiariら(1999) <i>Cancer Res.</i> 59:5785-5792。 |

10

20

30

40

| | |
|--|--|
| | |
| LDLR/FUT メラノーマの融合タンパク質抗原 | Wangら(1999) <i>J. Exp. Med.</i> 189:1659-1667。 |
| NY-REN 腎癌抗原の系統 | Scanlanら(2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047 ; Scanlanら(1999) <i>Cancer Res.</i> 59:456-464。 |
| NY-BR 乳癌抗原の系統、例えば、 NY-BR-62 ; NY-BR-75 ; NY-BR-85 ; NY-BR-62 ; NY-BR-85 | Scanlanら(2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047 ; Scanlanら(2001) <i>Cancer Immunity</i> 1:4。 |
| BRCA-1 ; BRCA-2 | Stolierら(2004) <i>Breast J.</i> 10:475-480 ; Nicolettoら(2001) <i>Cancer Treat Rev.</i> 27:295-304。 |
| DEK/CAN 融合タンパク質 | Von Lindernら(1992) <i>Mol. Cell. Biol.</i> 12:1687-1697。 |
| Ras、例えば、野生型 ras、 コドン位 12、13、59、 または 61 に変異を有する ras、 例えば、 G12C ; G12D ; G12R ; G12S ; G12V ; G13D ; A59T ; Q61H。K-RAS ； H-RAS ; N-RAS 変異 | GenBank 受入番号 P01112 ; P01116 ; M54969 ; M54968 ; P01111 ; P01112 ; K00654。例えば、 GenBank受入番号M26261 ; M34904 ; K01519 ; K01520 ; BC006499 ; NM_006270 ; NM_002890 ; NM_004985 ; NM_033360 ; NM_176795 ; NM_005343 も参照。 30 |
| BRAF(RAF のイソ型) | Tannapfelら(2005) <i>Am. J. Clin. Pathol.</i> 123:256-2601 ; Tsao and Sober(2005) <i>Dermatol. Clin.</i> 23:323-333。 |
| メラノーマ抗原、HST-2 メラノーマ細胞抗原を含む | GenBank 受入番号 NM_206956 ; NM_206955 ; NM_206954 ; NM_206953 ; NM_006115 ; NM_005367 ; NM_004988 ; AY148486 ; U10340 ; U10339 ; M77481。例えば、 Suzuki ら(1999) <i>J. Immunol.</i> 163:2783-2791 参照。 40 |
| サバイビン | GenBank 受入番号 AB028869 ; U75285(例えば、 Tsurumaら(2004) <i>J. Translational Med.</i> 2:19(11 pages) ; Pisarevら(2003) <i>Clin. Cancer Res.</i> 9:6523-6533 ; Siegelら(2003) <i>Br. J. Haematol.</i> 122:911-914 ; Andersenら(2002) <i>Histol.</i> |

| | |
|--|---|
| | Histopathol. 17:669-675 も参照)。 |
| MDM-2 | <u>NM_002392</u> ; <u>NM_006878</u> (例えば、Mayoら(1997) Cancer Res. 57:5013-5016 ; Demidenko and Blagosklonny(2004) Cancer Res. 64:3653-3660 も参照)。. |
| Methyl-CpG-結合タンパク質(MeCP2 ; MBD2) | Mullerら(2003) Br. J. Cancer 89:1934-1939 ; Fangら(2004) World J. Gastroenterol. 10:3394-3398。 |
| NA88-A. | Moreau-Aubryら(2000) J. Exp. Med. 191:1617-1624。 |
| ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)、例えばHDAC5 | Waltregnyら(2004) Eur. J. Histochem. 48:273-290 ; Scanlanら(2002) Cancer Res. 62:4041-4047。 |
| シクロフィリンB(Cyp-B) | Tamuraら(2001) Jpn. J. Cancer Res. 92:762-767。 |
| CA 15-3 ; CA 27.29 | Clintonら(2003) Biomed. Sci. Instrum. 39:408-414。 |
| 熱ショックタンパク質Hsp70 | Faureら(2004) Int. J. Cancer 108:863-870。 |
| GAGE/PAGE ファミリー、例えば、PAGE-1 ; PAGE-2 ; PAGE-3 ; PAGE-4 ; XAGE-1 ; XAGE-2 ; XAGE-3 | Brinkmannら(1999) Cancer Res. 59:1445-1448。 |
| MAGE-A、B、C,およびD ファミリー、MAGE-B5 ; MAGE-B6 ; MAGE-C2 ; MAGE-C3 ; MAGE-3 ; MAGE-6 | Lucasら(2000) Int. J. Cancer 87:55-60 ; Scanlanら(2001) Cancer Immun. 1:4。 |
| キネシン2 ; TATAエレメント調節因子1 ; 腫瘍タンパク質D53 ; NY | Scanlanら(2001) Cancer Immun. 30:1-4。 |
| α -フェトプロテイン(AFP) | Grimmら(2000) Gastroenterol. 119:1104-1112。 |
| SART1 ; SART2 ; SART3 ; ART4 | Kumamuruら(2004) Int. J. Cancer 108:686-695 ; Sasatomiら(2002) Cancer 94:1636-1641 ; Matsumotoら(1998) Jpn. J. Cancer Res. 89:1292-1295 ; Tanaka、ら(2000) Jpn. J. Cancer Res. 91:1177-1184。 |
| メラノーマの優先的に発現する抗原(PRAME) | Matsushitaら(2003) Leuk. Lymphoma 44:439-444 ; Oberthuerら(2004) Clin. Cancer Res. 10:4307-4313。 |
| 癌胎児性抗原(CEA)、CAP1-6D エンハンサーアゴニストペプチド | GenBank 受入番号 <u>M29540</u> ; <u>E03352</u> ; <u>X98311</u> ; <u>M17303</u> (例えば、Zaremba(1997) Cancer Res. 57:4570-4577 ; Sarobeら(2004) Curr. Cancer Drug Targets 4:443-454 ; Tsangら(1997) Clin. Cancer Res. 3:2439-2449 ; Fongら(2001) Proc. Natl. |

10

20

30

40

| | |
|--|--|
| | Acad. Sci. USA 98:8809-8814 も参照)。. |
| HER-2/neu | Disisら(2004) J. Clin. Immunol. 24:571-578 ; Disis and Cheever(1997) Adv. Cancer Res. 71:343-371。 |
| Cdk4 ; cdk6 ; p16(INK 4) ; Rb タンパク質 | Ghazizadehら(2005) Respiration 72:68-73 ; Ericsonら(2003) Mol. Cancer Res. 1:654-664。 |
| TEL ; AML1 ; TEL/AML 1 | Stamsら(2005) Clin. Cancer Res. 11:2974-2980。 |
| テロメラーゼ(TERT) | Nairら(2000) Nat. Med. 6:1011-1017。 |
| 707-AP | Takahashiら(1997) Clin. Cancer Res. 3:1363-1370。 |
| Annexin、例えば、Annexin II | Zimmermanら(2004) Virchows Arch. 445:368-374。 |
| BCR/ABL ; BCR/ABL p210 ; BCR/ABL p190 ; CML-66 ; CML-28 | Cobalddaら(2000) Blood 95:1007-1013 ; Hakanssonら(2004) Leukemia 18:538-547 ; Schwartzら(2003) Semin. Hematol. 40:87-96 ; Limら(1999) Int. J. Mol. Med. 4:665-667。 |
| BCL2 ; BLC6 ; CD10 タンパク質 | Iqbalら(2004) Am. J. Pathol. 165:159-166。 |
| CDC27(これはメラノーマ抗原である) | Wangら(1999) Science 284:1351-1354。 |
| 精子タンパク質 17(SP17) ; 14-3-3-zeta ; MEMD ; KIAA0471 ; TC21 | Aroraら(2005) Mol. Carcinog. 42:97-108。 |
| チロシナーゼ関連タンパク質 1 および2(TRP-1 およびTRP-2) | GenBank 受入番号 NM_001922.(例えば、Bronteら(2000) Cancer Res. 60:253-258 も参照)。 |
| Gp100/pmel-17 | GenBank 受入番号 AH003567 ; U31798 ; U31799;U31807 ; U31799(例えば、Bronteら(2000) Cancer Res. 60:253-258 も参照)。 |
| TARP | 例えば、Cliftonら(2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:10166-10171 ; Virokら(2005) Infection Immunity 73:1939-1946 参照。 |
| チロシナーゼ関連タンパク質 および2(TRP-1 およびTRP-2). | GenBank 受入番号 NM_001922.(例えば、Bronteら(2000) Cancer Res. 60:253-258 も参照)。 |
| メラノコルチン1受容体(MC1R) ; MAGE-3 ; gp100 ; チロシナーゼ； ドパクロームトートメラーゼ(TRP-2) ; MART-1 | Salazar-Onfrayら(1997) Cancer Res. 57:4348-4355 ; Reynoldsら(1998) J. Immunol. 161:6970-6976 ; Changら(2002) Clin. Cancer Res. 8:1021-1032。 |

10

20

30

40

| | |
|---|---|
| | |
| MUC-1 ; MUC-2 | 例えば、Daviesら(1994) <i>Cancer Lett.</i> 82:179-184 ; Gambusら(1995) <i>Int. J. Cancer</i> 60:146-148 ; McCoolら(1999) <i>Biochem. J.</i> 341:593-600 参照。 |
| Spas-1 | 米国特許出願公開第 20020150588 号、Allisonら。 |
| CASP-8 ; FLICE ; MACH | Mandruzzatoら(1997) <i>J. Exp. Med.</i> 186:785-793。 |
| CEACAM6 ; CAP-1 | Duxburyら(2004) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 317:837-843 ; Morseら(1999) <i>Clin. Cancer Res.</i> 5:1331-1338。 |
| HMGB1(DNA 結合タンパク質およびサイトカイン) | Brezniceanuら(2003) <i>FASEB J.</i> 17:1295-1297。 |
| ETV6/AML1 | Codringtonら(2000) <i>Br. J. Haematol.</i> 111:1071-1079。 |
| 大腸腺腫様ポリポーシス(APC)の変異型および野生型； β -カテニン；c-met；p53；E-カドヘリン；シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2) | Clementsら(2003) <i>Clin. Colorectal Cancer</i> 3:113-120 ; Gulmannら(2003) <i>Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.</i> 11:230-237 ; Jungckら(2004) <i>Int. J. Colorectal Dis.</i> 19:438-445 ; Wangら(2004) <i>J. Surg. Res.</i> 120:242-248 ; Abutailyら(2003) <i>J. Pathol.</i> 201:355-362 ; Liangら(2004) <i>Br. J. Surg.</i> 91:355-361 ; Shirakawaら(2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:4342-4348。 |
| mAB G250 によって結合された腎細胞癌抗原 | Muldersら(2003) <i>Urol. Clin. North Am.</i> 30:455-465 ; Steffensら(1999) <i>Anticancer Res.</i> 19:1197-1200。 |
| EphA2 | 例えば、米国特許公開第 2005/0281783 A1 号；Genbank 受入番号 NM_004431(ヒト)；Genbank 受入番号 NM_010139(マウス)；Genbank受入番号 AB038986(トリ、部分配列)；GenBank 受入番号 NP_004422、AAH37166、および AAA53375(ヒト)；GenBank 受入番号 NP_034269(マウス)、AAH06954(マウス)、XP_345597(ラット)および BAB63910(トリ)。 |
| EGFRvIII | 例えば、国際公開第 2012/068360 号参照。 |
| 野兎病菌抗原 | |
| 野兎病菌 A および B | 亜種 Schu S4 の完全ゲノム (GenBank受入番号 AJ749949)；亜種 Schu 4 の完全ゲノム(GenBank受入番号 NC_006570)。外膜タンパク質(43 kDa) Bevangerら(1988) <i>J. Clin. Microbiol.</i> 27:922-926 ; Porsch-Ozcurumezら(2004) <i>Clin. Diagnostic. Lab. Immunol.</i> 11:1008-1015)。野兎病 |

10

20

30

40

| | |
|--|--|
| | 菌の抗原成分、例えば 80 抗原、10 kDa および 60 kDa シャペロニンを含む(Havlasovaら(2002) <i>Proteomics</i> 2:857-86)、ヌクレオシドジホスフェートキナーゼ、イソクエン酸デヒドログナーゼ、RNA-結合タンパク質 Hfq、the chaperone ClpB(Havlasovaら(2005) <i>Proteomics</i> 5:2090-2103).を含む。例えば、Oyston and Quarry(2005) Antonie Van Leeuwenhoek 87:277-281 ; Isherwood、ら(2005) <i>Adv. Drug Deliv. Rev.</i> 57:1403-1414 ; Biaginiら(2005) <i>Anal. Bioanal. Chem.</i> 382:1027-1034 も参照。 |
|--|--|

10

マラリア抗原

| | |
|---|---|
| スプロゾイト周囲タンパク質(CSP) ; SSP2 ; HEP17 ; 热帯热マリア原虫で見られるExp-1オルゾログ; および LSA-1 | 例えば、Haddadら(2004) <i>Infection Immunity</i> 72:1594-1602 ; Hoffmanら(1997) <i>Vaccine</i> 15:842-845 ; Oliveira-Ferreira and Daniel-Ribeiro(2001) <i>Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro</i> 96:221-227 参照。CSP(例えば、GenBank 受入番号 AB121024 参照)。SSP2(例えば、GenBank 受入番号 AF249739 参照)。LSA-1 例えば、GenBank 受入番号 Z30319 参照)。 |
| リング状感染赤血球表面タンパク質(RESA) ; メロゾイト表面タンパク質2(MSP2) ; Spf66 ; メロゾイト表面タンパク質1(MSP1) ; 195A ; BVp42 | 例えば、Stirnadelら(2000) <i>Int. J. Epidemiol.</i> 29:579-586 ; Krzychら(1995) <i>J. Immunol.</i> 155:4072-4077 参照。Goodら(2004) <i>Immunol. Rev.</i> 201:254-267 ; Goodら(2004) <i>Ann. Rev. Immunol.</i> 23:69-99 も参照。MSP2(例えば、GenBank 受入番号 X96399 ; X96397 参照)。MSP1(例えば、GenBank 受入番号 X03371 参照)。RESA(例えば、GenBank 受入番号 X05181 ; X05182 参照)。 |
| 頂端膜抗原1(AMA1) | Guptaら(2005) <i>Protein Expr. Purif.</i> 41:186-198. AMA1(例えば、GenBank受入番号 A`13 ; AJ494905 ; AJ490565 参照)。 |

20

30

ウイルスおよびウイルス抗原

| | |
|-----------|--|
| A型肝炎 | GenBank受入番号、例えば、NC_001489 ; AY644670 ; X83302 ; K02990 ; M14707。 |
| B型肝炎 | 完全ゲノム(例えば、GenBank 受入番号 AB214516 ; NC_003977 ; AB205192 ; AB205191 ; AB205190 ; AJ748098 ; AB198079 ; AB198078 ; AB198076 ; AB074756 参照)。 |
| C型肝炎 | 完全ゲノム(例えば、GenBank 受入番号 NC_004102 ; AJ238800 ; AJ238799 ; AJ132997 ; AJ132996 ; AJ000009 ; D84263 参照)。 |
| D型肝炎 | GenBank 受入番号、例えば、NC_001653 ; AB118847 ; AY261457。 |
| 高リスクサブタイプ | 例えば、Trimbleら(2003) <i>Vaccine</i> |

40

| | |
|--|---|
| 16、18、30、31、33、45などの全200+サブタイプ(16グループに分類する)「オ」含むヒトバピローマイルス | 21:4036-4042 ; Kimら(2004) Gene Ther. 11:1011-1018 ; Simonら(2003) Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 109:219-223 ; Jungら(2004) J. Microbiol. 42:255-266 ; Damasus-Awatai and Freeman-Wang(2003) Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 15:473-477 ; Jansen and Shaw(2004) Annu. Rev. Med. 55:319-331 ; Roden and Wu(2003) Expert Rev. Vaccines 2:495-516 ; de Villiersら(2004) Virology 324:17-24 ; Hussain and Paterson(2005) Cancer Immunol. Immunother. 54:577-586 ; Molijnら(2005) J. Clin. Virol. 32(Suppl. 1) S43-S51. GenBank 受入番号AY686584 ; AY686583 ; AY686582 ; NC_006169 ; NC_006168 ; NC_006164 ; NC_001355 ; NC_001349 ; NC_005351 ; NC_001596 参照)。 |
| ヒトT細胞リンパ球向性ウイルス(HTLV)I型とII型、HTLV I型(サブタイプコスモポリタン型中央アフリカ型およびオーストロメラネシア型)HTLV II型(サブタイプIia、Iib、IicおよびIid)を含む | 例えば、Capdepont、ら(2005) AIDS Res. Hum. Retrovirus 21:28-42 ; Bhigjee、ら(1999) AIDS Res. Hum. Retrovirus 15:1229-1233 ; Vandammeら(1998) J. Virol. 72:4327-4340 ; Vallejoら(1996) J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. 13:384-391 参照。 HTLV I型(例えば、GenBank受入番号AY563954 ; AY563953 参照。 HTLV II型(例えば、GenBank受入番号L03561 ; Y13051 ; AF139382 参照)。 |
| コロナウイルス、SARS-Coロナウイルス(SARS-CoV)およびトロウイルスなどのコロナウイルスを含む | 例えば、Brian and Baric(2005) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 287:1-30 ; Gonzalezら(2003) Arch. Virol. 148:2207-2235 ; Smitsら(2003) J. Virol. 77:9567-9577 ; Jamiesonら(1998) J. Infect. Dis. 178:1263-1269(GenBank受入番号AY348314 ; NC_004718 ; AY394850)参照。 |
| 風疹ウイルス | GenBank受入番号NC_001545 ; AF435866。 |
| 遺伝子型A、C、D、G、H、およびIを含む流行性耳下腺炎 | 例えば、Orvellら(2002) J. Gen. Virol. 83:2489-2496 参照。 例えば、GenBank受入番号AY681495 ; NC_002200 ; AY685921 ; AF201473 参照。 |
| セロタイプ1、11、13、15、17、18、19、20、21、22、および24を含むコクサッキーAウイルス(別名:ヒトエンテロウイルスC ; HEV-C) | 例えば、Brownら(2003) J. Virol. 77:8973-8984. GenBank受入番号AY421768 ; AY790926: X67706 参照。 |
| サブタイプ1-6を含むコクサッキーBウイルス | 例えば、Ahnら(2005) J. Med. Virol. 75:290-294 ; Patelら(2004) J. Virol. Methods 120:167-172 ; Rezigら(2004) J. Med. Virol. 72:268-274. GenBank受入番号X05690 参照。 |
| ヒトエンテロウイルス、例えば、ヒトエンテロウイルスA | 例えば、Obersteら(2004) J. Virol. 78:855-867. ヒトエンテロウイル |

10

20

30

40

| | | |
|---|--|----|
| (HEV-A、CAV2～CAV8、CAV10、CAV12、CAV14、CAV16,とEV71) およびHEV-B(CAV9、CBV1～CBV6、E1～E7、E9、E11～E21、E24～E27、E29～E33、およびEV69とE73)、ならびにHEVを含む | スA(GenBank受入番号NC_001612)；ヒトエンテロウイルスB(NC_001472)；ヒトエンテロウイルスC(NC_001428)；ヒトエンテロウイルスD(NC_001430)。サルエンテロウイルスA(GenBank受入番号NC_003988)参照。 | 10 |
| ポリオウイルス、PV1、PV2、およびPV3を含む | 例えば、Heら(2003) <i>J. Virol.</i> 77:4827-4835 ; Hahsidoら(1999) <i>Microbiol. Immunol.</i> 43:73-77. GenBank受入番号AJ132961(1型) ; AY278550(2型) ; X04468(3型)参照。 | |
| ウイルス性脳炎ウイルス、ウマ脳炎、ベネズエラウマ脳炎(VEE)(サブタイプIA、IB、IC、ID、IIIC、IIIDを含む)、東部ウマ脳炎(EEE)、西部ウマ脳炎(WEE)、セントルイス脳炎、マレー渓谷脳炎(オーストラリア脳炎)、日本脳炎およびダニ脳炎を含む | 例えば、Hoke(2005) <i>Mil. Med.</i> 170:92-105 ; Estrada-Francoら(2004) <i>Emerg. Infect. Dis.</i> 10:2113-2121 ; Dasら(2004) <i>Antiviral Res.</i> 64:85-92 ; Aguilarら(2004) <i>Emerg. Infect. Dis.</i> 10:880-888 ; Weaverら(2004) <i>Arch. Virol. Suppl.</i> 18:43-64 ; Weaverら(2004) <i>Annu. Rev. Entomol.</i> 49:141-174. 東部ウマ脳炎ウイルス(GenBank受入番号NC_003899 ; AY722102)；西部ウマ脳炎ウイルス(NC_003908)参照。 | 20 |
| ヒトヘルペスウイルス、(サイトメガロウイルス(CMV)、エプスタイ・バーウイルス(EBV)、ヒトヘルペスウイルス-1(HHV-1)、HHV-2、HHV-3、HHV-4、HHV-5、HHV-6、HHV-7、HHV-8、ヘルペスBウイルス、単純ヘルペスウイルス1型と2型(HSV-1、HSV-2)、および水痘帶状疱疹(VZV)を含む) | 例えば、Studahlら(2000) <i>Scand. J. Infect. Dis.</i> 32:237-248 ; Padillaら(2003) <i>J. Med. Virol.</i> 70(Suppl. 1) S103-S110 ; Jainkittivong and Langlais(1998) <i>Oral Surg. Oral Med.</i> 85:399-403. GenBank受入番号NC_001806(ヘルペスウイルス1型) ; NC_001798(ヘルペスウイルス2型) ; X04370およびNC_001348(ヘルペスウイルス3型) ; NC_001345(ヘルペスウイルス4型) ; NC_001347(ヘルペスプラス5型) ; X83413およびNC_000898(ヘルペスウイルス6型) ; NC_001716(ヘルペスウイルス7型).参照。ヒトヘルペスウイルス6型と7型(HHV-6 ; HHV-7)は、例えば、Padillaら(2003) <i>J. Med. Virol.</i> 70(Suppl. 1) S103-S110によって開示されている。サブタイプA-Eを含むヒトヘルペスウイルス8型(HHV-8)は、例えば、Treurnichtら(2002) <i>J. Med. Virul.</i> 66:235-240に開示されている。 | 30 |
| HIV-1(グループM(サブタイプA～Jを含む)およびグループO(いずれの識別可能なサブタイプ), HIV-2(サブタイプ、A～Eを含む | 例えば、Smithら(1998) <i>J. Med. Virol.</i> 56:264-268参照。例えば、GenBank受入番号DQ054367 ; NC_001802 ; AY968312 ; DQ011180 ; DQ011179 ; DQ011178 ; DQ011177 ; AY588971 ; AY588970 ; AY781127 ; AY781126 ; AY970950 ; AY970949 ; AY970948 ; X61240 ; AJ006287 ; AJ508597 ; およびAJ508596も | 40 |

| | |
|---|--|
| | 参照。 |
| エプスタイン・バーウイルス(EBV)(サブタイプAとBを含む) | 例えば、Pehら(2002) Pathology 34:446-450. エプスタイン・バーウイルス株B95-8(GenBank受入番号V01555)参照。 |
| レオウイルス(セロタイプおよび系統1、2と3、1型Lang、2型Jones、および3型Dearingを含む) | 例えば、Bartholdら(1993) Lab. Anim. Sci. 43:425-430; Ronerら(1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:12362-12366; Kediら(1995) J. Virol. 69:552-559. GenBank受入番号K02739(σ-3遺伝子表面タンパク質)参照。 |
| サイトメガロウイルス(CMV)サブタイプ(CMVサブタイプI-VIIを含む) | 例えば、Chernら(1998) J. Infect. Dis. 178:1149-1153; Vilas Boasら(2003) J. Med. Virol. 71:404-407; Trincadoら(2000) J. Med. Virol. 61:481-487. GenBank受入番号X17403参照。 |
| ライノウイルス(全てのセロタイプを含む) | ヒトライノウイルス2(GenBank受入番号X02316); ヒトライノウイルスB(GenBank受入番号NC_001490); ヒトライノウイルス89(GenBank受入番号NC_001617); ヒトライノウイルス39(GenBank受入番号AY751783)。 |
| アデノウイルス(全てのセロタイプを含む) | AY803294; NC_004001; AC_000019; AC_000018; AC_000017; AC_000015; AC_000008; AC_000007; AC_000006; AC_000005; AY737798; AY737797; NC_003266; NC_002067; AY594256; AY594254; AY875648; AJ854486; AY163756; AY594255; AY594253; NC_001460; NC_001405; AY598970; AY458656; AY487947; NC_001454; AF534906; AY45969; AY128640; L19443; AY339865; AF532578。 |
| フィロウイルス(マールブルグウイルスとエボラウイルス、およびエボラ-スーダン(EBO-S)、エボラ-ザイール(EBO-Z)、およびエボラ-レストン(EBO-R)などの系統を含む) | 例えば、Geisbert and Jahrling(1995) Virus Res. 39:129-150; Hutchinsonら(2001) J. Med. Virol. 65:561-566参照。Marburg virus(例えば、GenBank受入番号NC_001608参照)。Ebola virus(例えば、GenBank受入番号NC_006432; AY769362; NC_002549; AF272001; AF086833参照)。 |
| アレナウイルス(リンパ球性脈絡髄膜炎(LCM)ウイルス、ラッサウイルス、フニンウイルス、およびマチュポウイルスを含む) | フニンウイルス、セグメントS(GenBank受入番号NC_005081); フニンウイルス、セグメントL(GenBank受入番号NC_005080)。 |
| 狂犬病ウイルス | 例えば、GenBank受入番号NC_001542; AY956319; AY705373; AF499686; AB128149; AB085828; AB009663参照。 |
| アルボウイルス(西ナイルウイルス、デングウイルス1~4型、コロラドダニ熱ウイルス、シンドビウイルス、 | デングウイルス1型(例えば、GenBank受入番号AB195673; AY762084参照)。デングウイルス2型(例えば、GenBank受入番号NC_001474; AY702040; AY70 |

10

20

30

40

| | | |
|---|--|----|
| トガウイルス科、フラビウイルス科、ブニヤウイルス科、レオウイルス科、ラブドウイルス科、オルトミクソウイルス科などを含む) | 2039 ; AY702037 参照)。デングウイルス 3 型(例えば、GenBank受入番号AY923865 ; AT858043 参照)。デングウイルス 4 型(例えば、GenBank受入番号AY947539 ; AY947539 ; AF326573 参照)。シンドビスウイルス(例えば、GenBank受入番号NC_001547 ; AF429428 ; J02363 ; AF103728 参照)。西ナイルウイルス(例えば、GenBank受入番号NC_001563 ; AY603654 参照)。 | |
| ポックスウイルス(オルソポックスウイルス(痘瘡ウイルス、サル痘、ワクシニアウイルス、ウシ痘ウイルス)、ヤタポックスウイルス(タナポックスウイルス、ヤバサル腫瘍ウイルス)、パラポックスおよびモルシポックスウイルスを含む) | Viriola virus(例えば、GenBank受入番号NC_001611 ; Y16780 ; X72086 ; X69198 参照)。 | 10 |
| 黄熱病 | 例えば、GenBank受入番号NC_002031 ; AY640589 ; X03700 参照。 | |
| ハンタウイルス(セロタイプハンタン(HTN)、ソウル(SEO)、ドブラバ(DOB)、シンノンブル(SN)、プーマラウイルス(PUU)、およびドブラバ様サーレマー(SAAV)を含む) | 例えば、Elghら(1997) J. Clin. Microbiol. 35:1122-1130 ; Sjolanderら(2002) Epidemiol. Infect. 128:99-103 ; Zeierら(2005) ウィルス遺伝子 30:157-180. GenBank受入番号NC_005222 および NC_005219(ハンタウイルス)参照。例えば、GenBank受入番号NC_005218 ; NC_005222 ; NC_005219. も参照。 | 20 |
| フラビウイルス(デングウイルス、日本脳炎ウイルス、西ニルウイルスおよび黄熱病ウイルスを含む) | 例えば、Mukhopadhyayら(2005) Nature Rev. Microbiol. 3:13-22. GenBank受入番号NC_001474 および AY702040(デング)。GenBank受入番号NC_001563 および AY603654 参照。 | 30 |
| 麻疹ウイルス | 例えば、GenBank受入番号AB040874 および AY486084 参照。 | |
| ヒトパラインフルエンザ(HPV)(HPV1-56 型を含む) | ヒトパラインフルエンザウイルス 2 型(例えば、GenBank受入番号AB176531 ; NC003443 参照)。ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型(例えば、GenBank受入番号NC_001796 参照)。 | |
| インフルエンザウイルス(インフルエンザウイルス A、B, および C 型を含む) | インフルエンザヌクレオカプシド(例えば、GenBank受入番号AY626145 参照)。インフルエンザヘマグルチニン(例えば、GenBank受入番号AY627885 ; AY555153 参照)。インフルエンザノイラミニダーゼ(例えば、GenBank受入番号AY555151 ; AY577316 参照)。インフルエンザマトリックスタンパク質 2(例えば、GenBank受入番号AY626144 参照)。インフルエンザ塩基性タンパク質 1(例えば、 | 40 |

| | | |
|--|---|----|
| | GenBank受入番号AY627897参照)。インフルエンザボリメラーゼ酸性タンパク質(例えば、GenBank受入番号AY627896)参照。インフルエンザ核タンパク質(例えば、GenBank受入番号Y627895参照)。. | |
| インフルエンザA型ウイルスサブタイプ、例えば、ブタウイルス(SIV): H1N1 インフルエンザA型およびブタインフルエンザウイルス | H1N1のヘマグルチニン(GenBank受入番号S67220)。インフルエンザA型ウイルスマトリックスタンパク質(GenBank受入番号AY700216)。インフルエンザA型ウイルスH5H1核タンパク質(GenBank受入番号AY646426)。H1N1ヘマグルチニン(GenBank受入番号D00837)。GenBank受入番号BD006058; BD006055; BD006052も参照。例えば、Wentworthら(1994) J. Virol. 68:2051-2058; Wellsら(1991) J.A.M.A. 265:478-481も参照。 | 10 |
| 呼吸器多核体ウイルス(RSV)(サブグループAおよびサブグループBを含む) | 呼吸器多核体ウイルス(RSV)(例えば、GenBank受入番号AY353550; NC_001803; NC_001781参照)。 | 20 |
| ロタウイルス(ヒトロタウイルスA~E、ウシロタウイルス、アカゲザルロタウイルスおよびヒト-RVV遺伝子再集合を含む) | ヒトロタウイルスCセグメント8(GenBank受入番号AJ549087); ヒトロタウイルスG9株外側カプシドタンパク質(例えば、GenBank受入番号DQ056300参照)。ヒトロタウイルスB株非構造タンパク質4(例えば、GenBank受入番号AY548957参照)。ヒトロタウイルスA株主要な内側カプシドタンパク質(例えば、GenBank受入番号AY601554参照)。 | 30 |
| ポリオーマウイルス(サルウイルス40(SV40)、JCウイルス(JCV)およびBKウイルス(BKV)を含む) | 例えば、Engelsら(2004) J. Infect. Dis. 190:2065-2069; Vilchez and Butel(2004) Clin. Microbiol. Rev. 17:495-508; Shivapurkarら(2004) Cancer Res. 64:3757-3760; Carboneら(2003) Oncogene 2:5173-5180; Barbanti-Brodanoら(2004) Virology 318:1-9参照)。(SV40例えば、GenBank受入番号NC_001669; AF168994; AY271817; AY271816; AY120890; AF345344; AF332562における完全ゲノム)。 | 40 |
| コルチウイルス(コロラドダニ熱ウイルス、Eyachウイルスを含む) | Attouiら(1998) J. Gen. Virol. 79:2481-2489. Eyachウイルスのセグメント(例えば、GenBank受入番号AF282475; AF282472; AF282473; AF282478; AF282476; NC_003707; NC_003702; NC_003703; NC_003704; NC_003705; NC_003696; NC_003697; NC_003698; NC_003 | |

| | |
|---|---|
| | <u>699</u> ; <u>NC_003701</u> ; <u>NC_003706</u> ; <u>NC_003700</u> ; <u>AF282471</u> ; AF282477 参照)。 |
| カリシウイルス(遺伝子型 Norwalk、Snow Mountain グループ(SMA)、および Saaporo を含む) | Snow Mountain ウィルス(例えば、GenBank 受入番号AY134748 参照)。 |
| パルボウイルス科(ディペンドウイルス、パルボウイルス(B19 を含む)、およびエリスロウイルスを含む) | 例えば、Brown(2004) Dev. Biol.(Basel) 118:71-77 ; Alvarez-Lafuente ら(2005) Ann. Rheum. Dis. 64:780-782 ; Ziyaeyan ら(2005) Jpn. J. Infect. Dis. 58:95-97 ; Kaufman ら(2005) Virology 332:189-198 参照)。 |

10

【0078】

好適な抗原が当分野で知られている他の微生物としては、限定するものではないが、クラミジア・トラコマチス、化膿連鎖球菌(A群連鎖球菌)、連溶血性連鎖球菌(B群連鎖球菌)、肺炎球菌、黄色ブドウ球菌、大腸菌、インフルエンザ菌、髄膜炎菌、淋菌、コレラ菌、サルモネラ種(チフス、ネズミチフス菌を含む)、エンテリカ菌(ヘリコバクター・ピロリ菌、フレキシネリ赤痢菌および他のD群赤痢菌種を含む)、鼻疽菌、類鼻疽菌、クレブシェラ肺炎桿菌、クロストリジウム属種(ディフィシル菌を含む)、腸炎ビブリオおよびビブリオ・バルニフィカスが挙げられる。このリストは、限定を意図するものではない。

20

【0079】

本明細書に記載するように、抗原配列は、ActA または LLO 分泌シグナル配列と共に L. モノサイトゲネス ActA または LLO タンパク質インフレームの修飾アミノ末端部分に融合された単一のポリペプチドとして発現することが好ましい。ActA シグナル配列は、MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAA であり、LLO シグナル配列は、MKKIMLTVFITLILVSLPIAQ QTE である。好ましくは、使用される天然シグナル配列は、そのコンストラクトが修飾されていない。

30

【0080】

一部の実施形態において、修飾 ActA は、ActA のおよそ最初の 100 アミノ酸が修飾された型を含み、本明細書では ActA-N100 と呼ぶ。ActA-N100 は以下の配列を有する。

```
V G L N R F M R A M   M V V F I T A N C I   T I N P D I I F A A   T D S E D S S
L N T   D E W E E E K T E E   5 0
Q P S E V N T G P R   Y E T A R E V S S R   D I E E L E K S N K   V K N T N K A
D L I   A M L K A K A E K G   1 0 0
```

40

【0081】

この配列において、第 1 の残基は、バリンとして示され、ポリペプチドは、この位置でメチオニンと共にリステリアによって合成される。このように、ActA-N100 は、以下の配列も有してよい。

```
M G L N R F M R A M   M V V F I T A N C I   T I N P D I I F A A   T D S E D S S
L N T   D E W E E E K T E E   5 0
Q P S E V N T G P R   Y E T A R E V S S R   D I E E L E K S N K   V K N T N K A
D L I   A M L K A K A E K G   1 0 0
```

【0082】

本発明のコンストラクトは、修飾 ActA の C 末端残基と、抗原配列との間に位置する 1 以上の付加的な非 ActA 残基も含むことができる。以下の配列において、ActA -

50

N100は、BamH1部位の封入によって添加された、以下の2つの残基によって伸長される。

```
V G L N R F M R A M   M V V F I T A N C I   T I N P D I I F A A   T D S E D S S
L N T   D E W E E E K T E E   5 0
Q P S E V N T G P R   Y E T A R E V S S R   D I E E L E K S N K   V K N T N K A
D L I   A M L K A K A E K G   1 0 0
G S
```

第1の残基メチオニンで合成される場合、以下の配列を有する。

```
M G L N R F M R A M   M V V F I T A N C I   T I N P D I I F A A   T D S E D S S
L N T   D E W E E E K T E E   5 0
Q P S E V N T G P R   Y E T A R E V S S R   D I E E L E K S N K   V K N T N K A
D L I   A M L K A K A E K G   1 0 0
G S.
```

10

【0083】

次いで、これらの配列は、PESTモチーフおよびいずれの既存の疎水性モチーフの欠失（実際のまたは機能的）による修飾の基礎として役立つことができる。

このように、本発明の修飾ActAは、以下の配列（ダッシュは欠失を示し、太字のテキストは置換を示す）を含むか、またはこれからなってもよい。

```
V G L N R F M R A M   M V V F I T A N C I   T I N P D I I F A A   T D S E D S S
L N T   D E W E E E - - -   5 0
- - - - - - - - Y E T A R E V S S R   D I E E L E K S N K   V K N T N K A D
Q D N K R K A K A E K G   1 0 0
```

20

【0084】

この配列において、第1の残基は、バリンとして示され；ポリペプチドは、この位置でメチオニンと共にリステリアによって合成される。このように、修飾型も、以下の配列（配列番号4）を含むか、またはこれからなってもよい。

```
M G L N R F M R A M   M V V F I T A N C I   T I N P D I I F A A   T D S E D S S
L N T   D E W E E E - - -   5 0
- - - - - - - - Y E T A R E V S S R   D I E E L E K S N K   V K N T N K A
D Q D N K R K A K A E K G   1 0 0
```

30

【0085】

これらの場合、QDNKRとの置換は、任意選択でPESTモチーフの欠失と共に含まれ、上記のように本発明のこれらのコンストラクトは、修飾ActAのC末端残基と、抗原配列との間に位置する1以上の付加的な非ActA残基も含むことができる。

【0086】

あるいは、抗原配列は、ワクチン接種した宿主内で細菌から融合タンパク質の発現および分泌を可能にするL.モノサイトゲネスLL0タンパク質の修飾アミノ末端部分に融合した単一のポリペプチドとして発現するのが好ましい。これらの実施形態において、抗原コンストラクトは、融合タンパク質をコードする核酸配列に作動可能に結合したプロモーターを含むポリヌクレオチドであり得、融合タンパク質は、(a)修飾LL0と、(b)修飾LL0配列に続く融合タンパク質として発現する1以上の抗原エピトープとを含む。LL0シグナル配列は、MKKIMLVFIT LILVSLPIAQ QTEAKである。一部の実施形態において、プロモーターはhlyプロモーターである。

40

【0087】

一部の実施形態において、修飾LL0は、LL0のおよそ最初の441アミノ酸の修飾型を含み、本明細書ではLL0-N441と呼ぶ。LL0-N441は、以下の配列を有する。

10

20

30

40

50

60

```
MKKIMLVFIT LILVSLPIAQ QTEAKDASAF NKENSISSMA PPASPPASPK TPIEKKHADE
```

50

| | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | |
| IDKYIQGLDY NKNNVLVYHG DAVTNVPPRK GYKDGNEYIV VEKKKKSINQ NNADIQVVNA | | | | | | |
| | | | | | | |
| 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | |
| ISSLTYPGAL VKANSELVEN QPDVLPVKRD SLTLSIDLPG MTNQDNKIVV KNATKSNVNN | | | | | | |
| | | | | | | |
| 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | |
| AVNTLVERWN EKYAQAYPNV SAKIDYDDDEM AYESSQLIAK FGTAFKAVNN SLNVNFGAIS | | | | | | |
| | | | | | | |
| 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | 10 |
| EGKMQEEVIS FKQIYYNVNV NEPTRPSRFF GKAVTKEQLQ ALGVNAENPP AYISSVAYGR | | | | | | |
| | | | | | | |
| 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | |
| QVYKLSTNS HSTKVKAADF AAVSGKSVSG DVELTNIIKKN SSFKAVIYGG SAKDEVQIID | | | | | | |
| | | | | | | |
| 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 | |
| GNLGDLRDIL KKGATFNRET PGVPIAYTTN FLKDNEELAVI KNNSEYIETT SKAYTDGKIN | | | | | | |
| | | | | | | |
| 430 | 440 | | | | | |
| IDHSGGYVAQ FNISWDEVNYD | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | 20 |

この配列において、P E S T モチーフは、K E N S I S S M A P P A S P P A S P K によって表される。これは、以下の配列との置き換えによって機能的に除去されてよい（ダッシュは欠失を示し、太字のテキストは置換を示す）。

K E - - - - - - - - - - - - - - - - またはその完全な欠失。これは、例示のみを目的とする。

【 0 0 8 9 】
1つの微生物によってコードされる配列は、必ずしも選択されたワクチンプラットフォーム細菌株内での最適な発現用に最適化されたコドンではないので、本発明も、L. モノサイトゲネスなどの細菌によって発現するように最適化されたコドンによって変わる核酸を提供する 30

【 0 0 9 0 】 種々の実施形態において、いずれの非最適コドンの少なくとも1パーセントは、最適コドンを提供するように変化する、より通常は少なくとも5パーセントが変化する、最も通常は少なくとも10パーセントが変化する、多くの場合少なくとも20%が変化する、より多くの場合少なくとも30%が変化する、最も多くの場合少なくとも40%が変化する、通常は少なくとも50%が変化する、より通常は少なくとも60%が変化する、最も通常は少なくとも70%が変化する、最適には少なくとも80%が変化する、より最適には少なくとも90%が変化する、最も最適には少なくとも95%が変化する、および慣例的にいずれの非最適コドンの100%がリストリア発現のために最適化されたコドンである（表2）。

【 0 0 9 1 】

【表2】

表2. リステリア内での発現に最適なコドン

| アミノ酸 | A | R | N | D | C | Q | E | G | H | I |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 最適なリステリアコドン | GCA | CGU | AAU | GAU | UGU | CAA | GAA | GGU | CAU | AUU |
| アミノ酸 | L | K | M | F | P | S | T | W | Y | V |
| 最適なリステリアコドン | UUA | AAA | AUG | UUU | CCA | AGU | ACA | UGG | UAU | GUU |

【0092】

本発明は、本発明の細菌を作製するまたは操作するための多くのリステリア種および株を供給する。本発明のリステリアは、表3に開示する種および株によって限定されるものではない。

【0093】

【表3】

表3. 本発明での使用、例えば、ワクチンとしてまたは核酸の供給源として、好適なリストリア株

| | |
|--|--|
| L. モノサイトゲネス 10403S 野生型 | Bishop and Hinrichs (1987) J. Immunol. 139:2005-2009 ; Lauer ら(2002) J. Bact. 184:4177-4186。 |
| L. モノサイトゲネス DP-L4056(治療型ファージ)。治療型プロファージ 10403S 株を DP-L4056 と称する。 | Lauer ら (2002) J. Bact. 184:4177-4186。 |
| L. モノサイトゲネス DP-L4027、DP-L2161 で、hly 遺伝子を除去した治療型ファージ | Lauer ら(2002) J. Bact. 184:4177-4186 ; Jones and Portnoy (1994) Infect. Immunity 65:5608-5613。 |
| L. モノサイトゲネス DP-L4029、DP-L3078 で、ActA を除去した治療型ファージ | Lauer ら(2002) J. Bact. 184:4177-4186 ; Skoble ら (2000) J. Cell Biol. 150:527-538。 |
| L. モノサイトゲネス DP-L4042 (ΔPEST) | Brockstedt ら(2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837 ; 補足情報。 |
| L. モノサイトゲネス DP-L4097 (LLO-S44A). | Brockstedt ら (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837 ; 補足情報。 |
| L. モノサイトゲネス DP-L4364(ΔlplA ; リポ酸タンパク質リガーゼ) | Brockstedt ら (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837 ; 補足情報。 |
| L. モノサイトゲネス DP-L4405(ΔinlA) | Brockstedt ら(2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837 ; 補足情報。 |
| L. モノサイトゲネス DP-L4406(ΔinlB) | Brockstedt ら(2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837 ; 補足情報。 |
| L. モノサイトゲネス CS-L0001(ΔActA-ΔinlB) | Brockstedt ら (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837 ; 補足情報。 |
| L. モノサイトゲネス CS-L0002(ΔActA-ΔlplA) | Brockstedt ら (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837 ; 補足情報。 |
| L. モノサイトゲネス CS-L0003(L461T-ΔlplA) | Brockstedt ら(2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837 ; 補足情報。 |
| L. モノサイトゲネス DP-L4038(ΔActA-LLO L461T) | Brockstedt ら(2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837 ; 補足情報。 |
| L. モノサイトゲネス DP-L4384(S44A-LLO L461T). | Brockstedt ら (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; 補足情報。 |
| L. モノサイトゲネス リポ酸タンパク質リガーゼ (LplA1)中の変異 | O'Riordan ら (2003) Science 302:462-464。 |
| L. モノサイトゲネス DP-L4017(10403S hly (L461T) へモリジン遺伝子中の点変異 | 米国特許仮出願第 60/490,089 号、2003 年 7 月 24 日出願。 |
| L. モノサイトゲネス EGD | GenBank 受入番号 AL591824。 |
| L. モノサイトゲネス EGD-e | GenBank 受入番号 NC_003210。受入番号 AA-679。 |
| L. モノサイトゲネス株 EGD、完全ゲノムセグメント 3/12 | GenBank 受入番号 AL591975。 |
| L. モノサイトゲネス | 受入番号 13932 ; 15313 ; 19111-19120 ; 43248-43251 ; 51772-51782。 |
| L. モノサイトゲネス uvrAB 中の DP-L4029 除去型 | 米国特許仮出願第 60/541,515 号、2004 年 2 月 2 日出願。米国特許仮出願第. 60/490,080 号、2003 年 7 月 24 日出願。 |
| L. モノサイトゲネス ソラレンで処理した uvrAB 中の DP-L4029 除去型 | 米国特許仮出願第 60/541,515 号、2004 年 2 月 2 日出願。 |

10

20

30

40

| | |
|--|--|
| L. モノサイトゲネス Δ actA Δ inlB Δ uvrAB | Brockstedt (2005) Nature Medicine and KBMA 特許。 |
| L. モノサイトゲネス Δ actA Δ inlB Δ uvrAB treated with psoralen | Brockstedt (2005) Nature Medicine and KBMA 特許。 |
| L. モノサイトゲネス Δ actA Δ inlB Δ uvrAB prfA(G155S) | Lauer ら (2008) Infect. Immun. および国際公開第 2009/143085 号。 |
| L. モノサイトゲネス ソラレンで処理した Δ actA Δ inlB Δ uvrAB prfA(G155S) | Lauer ら (2008) Infect. Immun. および国際公開第 2009/143085 号。 |
| L. モノサイトゲネス ActA-/inlB-二重変異体 | 2003 年 10 月 3 日 ATCC に寄託。受入番号 PTA-5562。 |
| L. モノサイトゲネス lplA 変異体または hly 変異体 | 米国特許出願第 20040013690 号、Portnoy ら。 |
| L. モノサイトゲネス DAL/DAT 二重変異体 | 米国特許出願第 20050048081 号、Frankel および Portnoy。 |
| L. モノサイトゲネス str. 4b F2365 | GenBank 受入番号 NC_002973。 |
| リステリア・イバノビ | 受入番号 49954。 |
| リステリア・イノキュア Clip11262 | GenBank 受入番号 NC_003212 ; AL592022。 |
| リステリア・イノキュア, PrfA-調節病原性遺伝子クラスターを含む天然の溶血性株 | Johnson ら(2004) Appl. Environ. Microbiol. 70:4256-4266. |
| リステリ・ゼーリゲリ | Howard ら(1992) Appl. Environ. Microbiol. 58:709-712。 |
| リステリア・イノキュア L. モノサイトゲネス病原性アイランド遺伝子を含む | Johnson ら(2004) Appl. Environ. Microbiol. 70:4256-4266. |
| リステリア・イノキュア、例えば、プラスミドまたはゲノム核酸として L. モノサイトゲネスインターナリン A 遺伝子を含む | 例えば、Lingnau ら(1995) Infection Immunity 63:3896-3903 ; Gaillard ら(1991) Cell 65:1127-1141)。 |
| 本発明は、以下の遺伝子、hly (LLO ; リステリオリン) ; iap (p60) ; inlA ; inlB ; inlC ; dal(アラニンラセマーゼ) ; daaA(daaA ; D アミノ酸アミノトランスフェラーゼ) ; plcA ; plcB ; ActA のうちの一つまたは任意の組み合わせをコードする核酸、または増殖、伝播、単層ベシクルの分解、二重層ベシクルの分解、宿主細胞への結合、宿主細胞による取込みを仲介するいずれの核酸を含むために、上記のリステリア株、ならびに例えば、プラスミドによっておよび/またはゲノムの組込みによって修飾されるこれらの株を含む試薬および方法を包含する。本発明は、上で開示する特定の株によって限定されるものではない。 | |

治療用組成物

【 0 0 9 4 】

本明細書に記載の細菌組成物は、単独または薬学的に許容される賦形剤との組み合わせのいずれかで、適切な免疫応答を誘発する十分な量で宿主に投与することができる。免疫応答とは、限定するものではないが、特異的免疫応答、非特異的免疫応答、特異的および非特異的両免疫応答、自然免疫応答、一次免疫応答、適応免疫、二次免疫応答、記憶免疫反応、免疫細胞活性化、免疫細胞増殖、免疫細胞分化およびサイトカイン発現を含み得る。本発明のワクチンは、例えば、凍結して、凍結乾燥して、懸濁液として、細胞ペーストとして、固体マトリックスまたはゲルマトリックスと複合体を形成して貯蔵することができる。

【 0 0 9 5 】

10

20

30

40

50

特定の実施形態において、免疫応答を刺激するために、対象に第1のワクチンの有効用量を投与した後に第2のワクチンを投与する。これは、当分野では「プライム - ブースト」レジメンと呼ぶ。そのようなレジメンでは、本発明の組成物および方法は、「プライム」送達として、「ブースト」送達として、または「プライム」と「ブースト」の両方として使用することができる。「ブースト」免疫は任意の回数で、ワクチン誘発免疫応答の大きさまたは効果を維持するために送達されることができる。

【0096】

一例として、抗原ポリペプチドをコードし発現する、死滅しているが代謝的に活性のリストリアを含む第1のワクチンは、「プライム」として送達されることができ、抗原ポリペプチドをコードする弱毒化（生または死滅しているが代謝的に活性）リストリアを含む第2のワクチンは「ブースト」として送達されることができる。しかし、当然のことながら、各プライムとブーストは本発明の方法および組成物を利用する必要はない。むしろ、本発明は、本発明の細菌ワクチン方法および組成物と共に他のワクチン様式の使用を考慮する。好適な混合プライム - ブーストレジメンの例としては、DNA（例えば、プラスミド）ワクチンプライム / 細胞ワクチンブースト；ウイルスワクチンプライム / 細胞ワクチンブースト；タンパク質ワクチンプライム / 細胞ワクチンブースト；DNAプライム / 細菌ワクチンブースト + タンパク質ワクチンブースト；細菌ワクチンプライム / DNAワクチンブースト；細菌ワクチンプライム / ウィルスワクチンブースト；細菌ワクチンプライム / タンパク質ワクチンブースト；細菌ワクチンプライム / 細菌ワクチンブースト + タンパク質ワクチンブーストなどが挙げられる。このリストは限定を意図するものではない。

10

20

30

40

【0097】

プライムワクチンおよびブーストワクチンは、同じ経路で投与されても、または異なる経路で投与されてもよい。「異なる経路」という用語は、限定するものではないが、体の異なる部位、例えば、経口、非経口、経腸、腸管外、直腸、内部節（リンパ節）、静脈内、動脈、皮下、皮内、筋内、腫瘍内、腫瘍周囲、注入、粘膜、鼻、脳脊髄腔もしくは脳脊髄液中などを包含し、ならびに異なる方法によって、例えば経口、静脈内および筋内による方法を包含する。

【0098】

プライムまたはブーストワクチンの有効量は、単回投与で与えられてもよいが、単回投与に限定されない。したがって、投与は2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれ以上のワクチン投与回数であってよい。本発明の方法において、1回以上のワクチンの投与は、1分、2分、3分、4分、5分、6分、7分、8分、9分、10分またはそれを超える分の間隔で、およそ1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、24時間などの時間間隔であけることができる。時間に関連して、「およそ」という用語は、±30分以内のいずれの時間間隔を意味する。投与は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日およびその組み合わせの時間間隔をあけることもできる。本発明は、時間を等しくあける投与間隔に限定されることはないが、ただ非限定的な例を上げると、1日目、4日目、7日目および25日目での投与からなるプライミングスケジュールなどの非等間隔での投与を包含する。

【0099】

特定の実施形態において、ブーストワクチン接種の投与は、プライムワクチン接種を開始してから約5日後；プライムワクチン接種を開始してから約10日後；プライムワクチン接種の投与を開始してから約15日後；約20日後；約25日後；約30日後；約35日後；約40日後；約45日後；約50日後；約55日後；約60日後；約65日後；約70日後；約75日後；約80日後、約6カ月後、および約1年後に開始することができる。好ましくは、プライムおよびブーストの両ワクチン接種は、本発明の組成物の送達を

50

會む。

[0 1 0 0]

「薬学的に許容される賦形剤」または「診断的に許容される賦形剤」とは、限定するものではないが、滅菌蒸留水、生理食塩水、リン酸緩衝液、アミノ酸系の緩衝液または重炭酸塩緩衝液が挙げられる。選択される賦形剤および使用する賦形剤の量は、投与の方法に依存する。投与は、経口、静脈内、皮下、皮膚、皮内、筋内、粘膜、腸管外、臓器内、病巣内、鼻腔内、吸入、眼内、筋内、脈管内、結節内、スタンプ式、直腸、腹腔内、または投与の種々の周知の経路の任意の1つまたは組み合わせであってよい。投与は、注射、注入またはその組み合わせを含み得る。

[0 1 0 1]

非経口経路による本発明のワクチンの投与は、耐性を回避することができる。当該分野で公知の方法としては、静脈内、皮下、皮内、筋内、腹腔内、経口、粘膜、尿路を通って、生殖管を通って、消化管を通って、または吸入法による投与がある。

[0 1 0 2]

特定の患者のための有効量は、治療される状態、患者の全体の健康、投与経路および用量、副作用の重症度などの諸因子によって変化し得る。治療法および診断法のための指針は利用可能である（例えば、Maynardら（1996）A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent（2001）Good Laboratory and Good Clinical Practice, Churchill Publ., London, UK参照）。

〔 0 1 0 3 〕

本発明のワクチンは、投与量または投薬量で投与されることができ、各投与量は少なくとも 100 細菌細胞 / 体重 kg 以上；特定の実施形態において 1000 細菌細胞 / 体重 kg 以上；通常は少なくとも 10,000 細胞 / 体重 kg ；より通常は、少なくとも 100,000 細胞 / 体重 kg ；最も通常は、少なくとも 1 百万細胞 / 体重 kg ；多くの場合、少なくとも 1 千万細胞 / 体重 kg ；より多くの場合、少なくとも 1 億細胞 / 体重 kg ；一般的に少なくとも 10 億細胞 / 体重 kg ；通常は、少なくとも 100 億細胞 / 体重 kg ；慣例的に少なくとも 1 千億細胞 / 体重 kg ；および時として少なくとも 1 兆細胞 / 体重 kg を含む。本発明は、細菌投与の単位がコロニー形成単位 (CFU) であり、ソラレン処理前の CFU に相当する、または単位は細菌細胞の数である上記の投与量を提供する。

【 0 1 0 4 】

1.5 kg当たり) $5 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{12}$ の細菌; 体重70kg当たり(または表面積1.7平方メートル当たりまたは肝臓重量1.5kg当たり) $10^{12} \sim 10^{13}$ の細菌; 体重70kg当たり(または表面積1.7平方メートル当たりまたは肝臓重量1.5kg当たり) $2 \times 10^{12} \sim 2 \times 10^{13}$ の細菌; 体重70kg当たり(または表面積1.7平方メートル当たりまたは肝臓重量1.5kg当たり) $5 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{13}$ の細菌; 体重70kg当たり(または表面積1.7平方メートル当たりまたは肝臓重量1.5kg当たり) $10^{13} \sim 10^{14}$ の細菌; 体重70kg当たり(または表面積1.7平方メートル当たりまたは肝臓重量1.5kg当たり) $2 \times 10^{13} \sim 2 \times 10^{14}$ の細菌; 体重70kg当たり(または表面積1.7平方メートル当たりまたは肝臓重量1.5kg当たり) $5 \times 10^{13} \sim 5 \times 10^{14}$ の細菌; 体重70kg当たり(または表面積1.7平方メートル当たりまたは肝臓重量1.5kg当たり) $10^{14} \sim 10^{15}$ の細菌; 体重70kg当たり(または表面積1.7平方メートル当たりまたは肝臓重量1.5kg当たり) $2 \times 10^{14} \sim 2 \times 10^{15}$ の細菌などを、湿重量で含む。

【0105】

また、上記の投与量の1以上が提供され、該投与量は、毎日1回の注射、2日ごとに1回の注射、3日ごとに1回の注射、4日ごとに1回の注射、5日ごとに1回の注射、6日ごとに1回の注射、7日ごとに1回の注射の方法によって投与され、注射のスケジュールは例えば、1日のみ、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、2週間、3週間、4週間、5週間またはそれ以上長く維持される。また、本発明は上記の投与量とスケジュールの組み合わせ、例えば、比較的大きな初回細菌投与量に続いて比較的小さい継続投与量、または比較的小さい初回投与量に続いて大きな投与量の組み合わせを包含する。

【0106】

例えば、週1回、週2回、週3回、週4回、週5回、週6回、週7回、2週間ごとに1回、3週間ごとに1回、4週間ごとに1回、5週間ごとに1回などの投与スケジュールが本発明で利用可能である。投与スケジュールは、例えば、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、および12ヶ月の全期間を包含する。

【0107】

上記の投与スケジュールのサイクルが提供される。サイクルは、およそ、例えば7日間ごと、14日間ごと；21日間ごと；28日間ごと；35日間ごと；42日間ごと；49日間ごと；56日間ごと；63日間ごと；70日間ごとなどと繰り返すことができる。非投与の間隔は、1サイクルの間に生じてもよく、その間隔はおよそ、例えば7日間、14日間；21日間；28日間；35日間；42日間；49日間；56日間；63日間；70日間などであってよい。これに関連して、「およそ」という用語は、±1日、±2日、±3日、±4日、±5日、±6日または±7日を意味する。

【0108】

本発明は、経口であるリストリアの投与方法を包含する。静脈内であるリストリアの投与方法も提供する。さらに、経口、筋内、静脈内、皮内および/または皮下であるリストリアの投与方法が提供される。本発明は、肉をベースにした培地、または肉もしくは動物生成物に由来するポリペプチドを含む培地で増殖させることによって調製したリストリア細菌、またはリストリア細菌の培養物もしくは懸濁液を供給する。また、本発明が供給するは、肉もしくは動物生成物を含まない培地で増殖させることによって調製した、植物ポリペプチドを含む培地で増殖させることによって調製した、酵母生成物に基づいていない培地で増殖させることによって調製した、または酵母ポリペプチドを含む培地で増殖させることによって調製した、リストリア細菌またはリストリア細菌の培養物もしくは懸濁液である。

【0109】

さらなる治療薬との同時投与の方法は、当該分野において公知である(Hardmanら(編)(2001)Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第10版, Mc

10

20

30

40

50

Grav-Hill, New York, NY; Poole and Peterson (編) (2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner and Longo (編) (2001) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA)。

【0110】

細胞溶解性T細胞反応を起こすことに有益なさらなる薬剤も用いてよい。そのような薬剤を、本明細書では担体と称する。担体としては、限定するものではないが、B7共刺激分子、インターロイキン-2、インターフェロン- γ 、GM-CSF、CTLA-4アンタゴニスト、OX-40/OX-40リガンド、CD40/CD40リガンド、サルグラモスチム、レバミソール、ワクシニアウイルス、カルメット・グラン桿菌(BCG)、リポソーム、ミョウバン、フロイント完全もしくは不完全アジュvant、無毒化エンドトキシン、鉱物油、例えばリボレシチン、フルロニックポリオール、ポリアニオン、ブブチドの表面活性物質、および油エマルジョンもしくは炭化水素エマルジョンが挙げられる。細胞溶解性T細胞応答対抗体応答を優先的に刺激するT細胞免疫応答を誘発するための担体が好ましいが、とはいえた種類の応答を刺激するものも用いることができる。薬剤がポリペプチドである場合、ポリペプチドそれ自体またはそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを投与することができる。担体は、抗原提示細胞(APC)または樹状細胞などの細胞であってよい。抗原提示細胞は、マクロファージ、樹状細胞およびB細胞などの細胞の種類を含む。他の専門的な抗原提示細胞としては、単核細胞、辺縁帯クッパー細胞、小膠細胞、ラングルハンス細胞、指状嵌入樹状細胞、濾胞樹状細胞およびT細胞が挙げられる。通性抗原提示細胞も用いることができる。通性抗原提示細胞の例としては、アストロサイト、濾胞細胞、血管内皮および線維芽細胞が挙げられる。担体は、ポリペプチドを発現させるよう、またはワクチン接種した個人の細胞内でその後発現するポリヌクレオチドを送達するように形質転換されている細菌細胞であってよい。水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミニウムなどのアジュvantを添加して、免疫応答を引き起こす、増強するまたは延ばすワクチンの能力を高めることができる。別々にまたは記載の組成物と組み合わせて用いられる、サイトカイン、ケモカイン、およびCpGのような細菌核酸配列、トール様受容体(TLR)9アゴニスト、ならびにリポタンパク質、LP5、モノホスホリルリピドA、リポテイコ酸、イミキモド、レシキモドを含むTLR2、TLR4、TLR5、TLR7、TLR8、TLR9用のさらなるアゴニスト、およびc-di-GMP、c-di-AMP、c-di-IMPおよびc-AMP-GMPを含む環状ジヌクレオチドSTINGアゴニストなどの免疫修飾因子のような他のアゴニストも有望なアジュvantである。アジュvantの他の代表的な例としては、キラヤの樹皮から精製した均質のサポニンおよびコリネバクテリウム・バルバムを含む合成アジュvantQS-21が挙げられる(McCuneら, Cancer, 1979; 43: 1619)。アジュvantは最適化の対象となることを理解されたい。換言すれば、当業者は、使用に最適のアジュvantを決定するために、ルーチンの実験を行うことができる。

【0111】

治療薬の有効量は、通常は少なくとも10%、より通常は少なくとも20%、最も通常は少なくとも30%、一般的に少なくとも40%、より一般的に少なくとも50%、最も一般的に少なくとも60%、多くの場合少なくとも70%、より多くの場合少なくとも80%、および最も多くの場合少なくとも90%、慣例的に少なくとも95%、より慣例的に少なくとも99%、および最も慣例的に少なくとも99.9%、症状を低減するまたは寛解させる。

【0112】

本発明の試薬および方法は、1回のみのワクチン接種を含む;もしくは第1のワクチン接種を含む;もしくは少なくとも1回のブースターウクチン接種;少なくとも2回のブー

10

20

30

40

50

スターウクチン接種；もしくは少なくとも3回のブースターウクチン接種を含むワクチンを提供する。ブースターウクチン接種のためのパラメータの指針が利用可能である。例えば、Marth(1997) Biologicals 25:199-203; Ramsayら(1997) Immunol. Cell Biol. 75:382-388; Gherardiら(2001) Histol. Histopathol. 16:655-667; Leroux-Roelsら(2001) Acta Clin. Belg. 56:209-219; Greinerら(2002) Cancer Res. 62:6944-6951; Smithら(2003) J. Med. Virol. 70:Suppl. 1:S38-S41; Sepulveda-Amorら(2002) Vaccine 20:2790-2795参照。

10

【0113】

治療薬の製剤は、貯蔵用に生理的に許容される担体、賦形剤、または、例えば凍結乾燥粉末、スラリー、水溶液もしくは懸濁液の形状での安定剤と混合することによって調製されることができる（例えば、Hardmanら(2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro(2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avissら(編)(1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Liebermanら(編)(1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Liebermanら(編)(1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie(2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NY参照）。

20

実施例

【0114】

以下の実施例は、本発明を例示するものである。これらの実施例は、いかなる場合も本発明の範囲を限定することを意図しない。

30

実施例1.

【0115】

図2は、以下の実施例で試験した、ActAおよびLL0の配列の様々な修飾を示す。

【0116】

修飾ActA配列に関して、親ActA配列を残基100において切り詰めて、BamHI部位の封入によって添加した2つの残基（図では残基G101およびS102として示す）によって伸長させた。PEST配列への修飾は、図に示す欠失を含み、疎水性モチーフLIAMLのQDNKRへの任意選択の置換も示す。修飾LL0配列に関して、親LL0配列を残基441で切り詰めた。PEST配列への修飾は、図に示す欠失を含んだ。それぞれの場合、示したシグナルペプチド／分泌シャペロンエレメントは、選択した抗原配列にインフレームで機能的に結合させる。

40

実施例2.

【0117】

図3は、pestfindアルゴリズムを使用してスコア化した、LL0配列中のPESTモチーフの位置を示す。+4.72のスコアを有する単一モチーフは、実施例1で上記したように修飾した。また、図の上部にハイドロパシープロットを示す。多くの疎水性モチーフは、本明細書に記載するように、修飾し得ることを示す（模式的配列の上に上昇するピーク）。

【0118】

50

同様に、図4は、ActA配列中の`pestfind`アルゴリズムを使用してスコア化した4つのPESTモチーフを示す。これらのモチーフの第1のものは、+10.27のスコアを有し、実施例1で上述したように修飾した。残りのPESTモチーフは、残基100でActA配列の切り詰めることによって除去した。また、図の上部にハイドロパシープロットを示す。疎水性モチーフLIAAMLは、ActAN100の模式的配列の上に上昇するピークとして明白である。

実施例3.

【0119】

図5は、図に示すコンストラクトによる免疫に続くB3Z T細胞活性化アッセイの結果を示す。各抗原コンストラクトにおいて、HIVgagをSIEKE([SL8])エピトープタグに融合して発現させ、宿主Lm actA in1Bワクチン株のゲノムに挿入した。選択した株でDC2.4細胞を感染させて、OVA₂₅₇₋₂₆₄-特異的T細胞ハイブリドーマ、B3Zと共にインキュベートした。発色基質を用いて-ガラクトシダーゼ発現を測定することによってH-2K^bクラスI分子上のSIEKEエピトープの提示を評価した。図に示すように、PEST配列の欠失はアッセイ結果にプラス効果または中立的效果を及ぼした。

実施例4.

【0120】

図6は、LL0441(A)およびActAN100ワクチン株からの応答を示す。N末端LL0またはActA融合パートナーの組成のみが異なるこれらの同質遺伝子系統の免疫原性を直接的に比較するために、BALB/cマウスに、PESTモチーフを含有した、またはPESTモチーフを除去したN末端融合パートナーを含む、示したワクチン株を 5×10^6 コロニー形成単位(cfu)で静脈内に1回ワクチン接種した。ワクチン接種後7日目でのLmワクチン応答のピーク時に、マウスの脾臓を収集し、IFN-ELISpotアッセイによるH2K^d拘束性HIVGag₁₉₇₋₂₀₅エピトープAMQMLKETIに特異的なHIV-Gag CD8T細胞応答をLympholyte-哺乳動物(Gedarlane Labs, Burlington, NC)およびマウスIFN-ELISpot対(BD Bioscience, San Jose, CA)を用いて、マウス全血から単離したリンパ球を用いて行った。この実験の終了時に、ELISpotアッセイを脾細胞で行った。抗マウスIFN-被覆ELISpotプレート(Millipore, Billerica, MA)で 2×10^5 細胞/ウェルを適切なペプチドと共に終夜インキュベートした。陰性対照として、細胞をペプチドなしでインキュベートした。マウスELISpotをアルカリホスファターゼ検出試薬(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて開発し、免疫スポットプレートリーダーおよびソフトウェア(CTL Ltd, Cleveland, OH)を用いて走査して定量化した。

【0121】

PEST-LL0441N末端分泌/シャペロンエレメントを含むLmワクチン株でワクチン接種したマウスは、PESTモチーフと共にLL0₄₄₁N末端分泌/シャペロンエレメントを含む同質遺伝子的なLmワクチン株でワクチン接種したマウスよりも高いHIV Gag-特異的CD8T細胞応答を起こした。PEST-ActAN100N末端分泌/シャペロンエレメントを含むLmワクチン株でワクチン接種したマウスは、PESTモチーフと共にActAN100N末端分泌/シャペロンエレメントを含む同質遺伝子的なLmワクチン株でワクチン接種したマウスと少なくとも同等のHIV Gag-特異的CD8T細胞応答を起こした。

実施例5.

【0122】

図7は、モデル系としてActAを用いて、PESTモチーフを除去する際に用いるいくつかの代替置換および欠失を示す。ActAN100配列中のP、E、SおよびTの5つのアミノ酸(E50、P52, S53、E54、T57)のいずれかと、正電荷残基(

10

20

30

40

50

R、KまたはH)との置換は、pest finderアルゴリズムを用いる陽性スコアを抑制するのに十分であった。

【0123】

図8は、結果として生じるハイドロパシープロット上での疎水性モチーフ L I A M I を修飾する結果をより詳細に示す。Q D N K Rに対する非保存的置換は、この配列の疎水性質を除去するのに十分であった。

実施例6.

【0124】

A c t A - N 1 0 0 (M G L N R F M R A M M V V F I T A N C I T I N P D I I
 F A A T D S E D S S L N T D E W E E E K T E Q P S E V N T G P R Y E T A
 R E V S S R D I E E L E K S N K V K N T N K A D L I A M L K A K A E K G
 g s) および P E S T モチーフを除去して、非保存的な Q D N K R 置換を含む (M G L N
 R F M R A M M V V F I T A N C I T I N P D I I F A A T D S E D S S L N T
 D E W E E E Y E T A R E V S S R D I E E L E K S N K V K N T N K A D Q D N
 K R K A K A E K g l ; 本明細書では A c t A - N 1 0 0 * と呼ぶ) を用いて、ヒトメソテリン残基 35 - 621と共に融合コンストラクトを調製した (上記の小文字残基は、インフレーム融合を調製するために使用した制限部位の結果として、A c t A 配列とメソテリン配列の間に含まれていた) 。このコンストラクトをリストリア・モノサイトゲネス a c t A i n 1 B の染色体 t R N A ^{A r g} 遺伝子座で組み込んだ。検査当日、B a 1 b / c マウスにヒトメソテリンを発現させる 2 × 1 0 ⁵ C T - 2 6 腫瘍細胞を投与した。
 4日目と17日目に、リストリアワクチン株を治療としてマウスにワクチン接種したこの実験の結果をワクチン接種動物のパーセント生存率として図9に示す。示すように、A c t A - N 1 0 0 対 A c t A - N 1 0 0 * ベースのワクチンの間に有効性の差はなかった。

実施例7.

【0125】

実施例6のものと同様のリストリア・モノサイトゲネス a c t A i n 1 B を、メソテリン抗原配列を E G F R v I I I _{20 - 40} 配列と N Y - E S O - 1 _{1 - 1 6 5} の 5 コピーと置き換えることで調製した。抗原コンストラクトで用いたDNAおよびタンパク質配列は以下の通りである (小文字、下線なし : a c t A プロモーター ; 小文字、下線 : 制限部位 ; 大文字、太文字 : A c t A N 1 0 0 * 配列 ; 大文字、下線 : E G F R v I I I 2 0 - 4 0 × 5 ; 大文字、イタリック体 : N Y - E S O - 1 (1 - 1 6 5) (ペプチド配列中の各 E G F R v I I I _{20 - 40} の繰り返しは、二重下線を引き、リーディング V a 1 コドンを用いて Met をコードする) 。

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

10

20

30

40

50

T C A A T T A A A T T A T C A A A A G T C T T A C C A G C A T C T A G A G C T T
 T A G A G G A A A A G A A G G G T A A C T A T G T C G T A A C A G A T C A T G G
 A A G T T G T G C T G A C G G A A G T G T T A A A G C G T C G A A A G T A G C T
 C C A G C T T C T C G C G C A T T A G A A G A A A A G A A A G G C A A T T A T G
 T T G T A A C A G A C C A T G G T A G T T G T G G T G A T G G C T C G A T C A A
 A T T G T C A A A A G T T C T A C C G G C T T C T C G T G C G C T A G A A G A G
 A A G A A A G G A A A T T A C G T A G T T A C A G A C C A C G G C T C T T G C G
 C G G A T G G T T C C G T T A A A c a a t t g A T G C A A G C T G A A G G A A G
 A G G A A C T G G G G G T A G T A C A G G A G A T G C A G A T G G C C C T G G C
 G G A C C G G G T A T T C C T G A T G G A C C A G G G G G T A A T G C G G G T G
 G G C C A G G G C G A A G C A G G T G C T A C A G G G C G G T A G A G G G C C A C G
 A G G G G C A G G G A G C A G C G A G G A G G C T T C T G G A C C A G G T G G T G G C
 G C T C C A C G C G G T C C G C A T G G T G G T G C A G C G T C C G G C T T A A
 A C G G T T G C T G T C G C T G T G G A G G C T A G A G G A C C A G A A T C A C G
 T C T T T T A G A G T T C T A T T T G G C C A T G C C G T T T G C T A C G C C T
 A T G G A A G C A G A A C T A G C A C G T C G T A G C T T A G C G C A A G A T G
 C A C C T C C A T T A C C A G T T C C A G G C G T G T T G T T A A A G G A G T T
 C A C G G T C A G T G G T A A C A T A T T G A C A A T T C G C C T T A C T G C G
 G C T G A C C A C C G T C A A T T A C A G C T T A G C A T T C A T C T T G T T
 T A C A A C A A C T T T C G T T A C T T A T G T G G A T C A C C C A A T G C T A
 A g g c g g c c g c
 M G L N R F M R A M M V V F I T A N C I T I N P D I I F A A T D S E D S S L N T
 D E W E E E Y E T A R E V S S R D I E E
 L E K S N K V K N T N K A D Q D N K R K A K A E K G g s A S K V L P A S R A L E
 E K K G N Y V V T D H G S C A D G S V K
 T S A S K V A P A S R A L E E K K G N Y V V T D H G S C G D G S I K L S K V L P
 A S R A L E E K K G N Y V V T D H G S C
 A D G S V K A S K V A P A S R A L E E K K G N Y V V T D H G S C G D G S I K L S
 K V L P A S R A L E E K K G N Y V V T D
 H G S C A D G S V K q 1 M Q A E G R G T G G S T G D A D G P G G P G I P D G P G
 G N A G G P G E A G A T G G R G P R G A
 G A A R A S G P G G G A P R G P H G G A A S G L N G C C R C G A R G P E S R L L
 E F Y L A M P F A T P M E A E L A R R S
 L A Q D A P P L P V P G V L L K E F T V S G N I L T I R L T A A D H R Q L Q L S
 I S S C L Q Q L S L L M W I T Q C
 【0126】

融合コンストラクトを図10の左側パネルに模式的に示す。マウスの樹状細胞株D C 2 . 4にL m a c t A / i n l B (図10、右側パネル、レーン1)、B H 3 7 6 3 (E G F R v I I I 2 0 - 4 0 / N Y - E S O - 1 1 - 1 6 5)またはB H 3 8 1 6 (選択マーカーが除去されているE G F R v I I I 2 0 - 4 0 / N Y - E S O - 1 1 - 1 6 5 を含む臨床株)を感染させた。7時間後に、細胞を洗浄して、溶解し、S D S - P A G E 上に掛け、次いでニトロセルロースに移す。A c t Aタンパク質のアミノ末端に產生したウサギポリクローナル抗体でウエスタンプロットを行い、発現レベルをリストリアP 6 0 タンパク質に規準化した。これは感染した細胞の細菌数と関連する。高レベルの融合コンストラクトは、試験株および臨床株の両方で発現した。

【0127】

雌B10.Brマウス(1群当たりn=5)にB H 3 8 1 6 (L m a c t A i n l B E G F R v I I I - N Y - E S O - 1)を種々の投与量で静脈内にワクチン接種した。E G F R特異的T細胞応答を細胞内サイトカイン染色法によって決定し、図11に(A)パーセントI F N - 陽性E G F R v I I I - 特異的C D 8 + T細胞; および(B)脾

10

20

30

40

50

臓当たりの IFN - 陽性 E G F R v I I I - 特異的 C D 8 + T 細胞の絶対数として示した。強力な E G F R T 細胞応答が見られた。定義した H - 2^d 拘束性エピトープ A R G P E S R L L を用いた、プライムワクチン接種から 7 日後、細胞内サイトカイン染色法によって決定すると、図 12 に示すように、N Y - E S O - 1 - 特異的 C D 8 + T 細胞応答も見られた。

【 0 1 2 8 】

本発明が目的を成し遂げ、記載した目標および利点ならびにそれに内在するものを得るために十分に適合していることを当業者は容易に認識する。本明細書に提供する実施例は、好適な実施形態を代表しており、本発明の範囲を限定すること目的としていない。

10

【 0 1 2 9 】

本発明の範囲および意図を逸脱することなく、本明細書に開示する本発明に対して様々な置換および修飾を行えることが当業者には容易に明らかになるであろう。

【 0 1 3 0 】

本明細書に記載したすべての特許および刊行物は、本発明が関連する分野の当業者のレベルを表す。個々の刊行物が参照によって組み込まれることを具体的にかつ個別に示されているかのように、すべての特許および刊行物は同じ程度まで参照によって本明細書に組み込まれている。

【 0 1 3 1 】

本明細書に説明的に記載した本発明は、本明細書に具体的に開示されていない、いかなる要素もしくは複数の要素、限定事項もしくは複数の限定事項がなくても、実施することができる。したがって、例えば、本明細書の各例の場合、「含む」、「本質的にからなる」と「からなる」という用語は、残りの 2 つの用語のいずれかと置き換えることができる。用いられた用語および表現は、説明の限定ではなく用語として用いられ、そのような用語および表現の使用において、図示および記載された特徴の任意の相当物またはその一部を排除することを意図するものではなく、特許請求される本発明の範囲内で様々な修飾が認められる。したがって、本発明は好ましい実施形態および任意の特徴によって具体的に開示されているが、本明細書で開示された概念の修飾および変形例が当業者によって用いられることもあります、そのような修飾と変形例は、添付の特許請求の範囲によって定義されるように本発明の範囲内に含まれることが理解されるべきである。

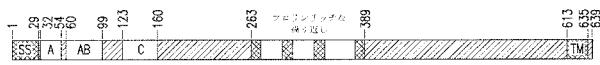
20

【 0 1 3 2 】

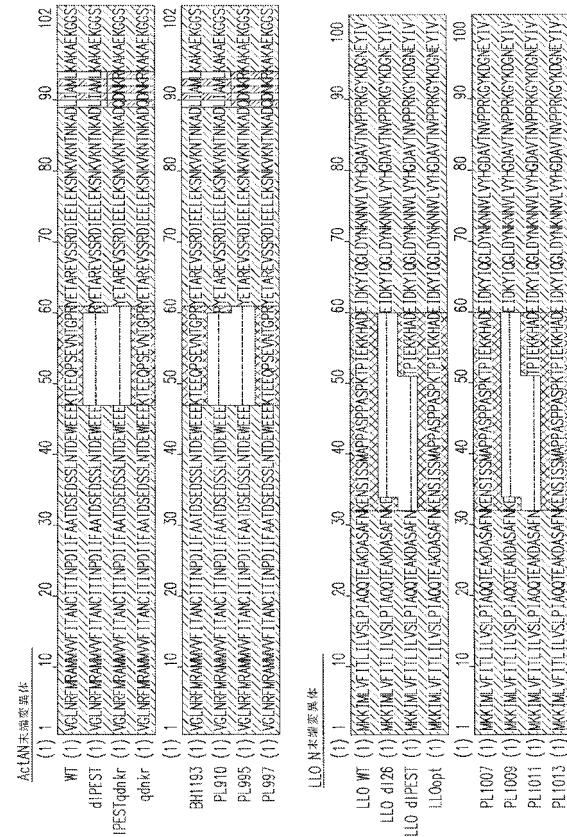
30

他の実施形態が、以下の特許請求の範囲内に記載される。

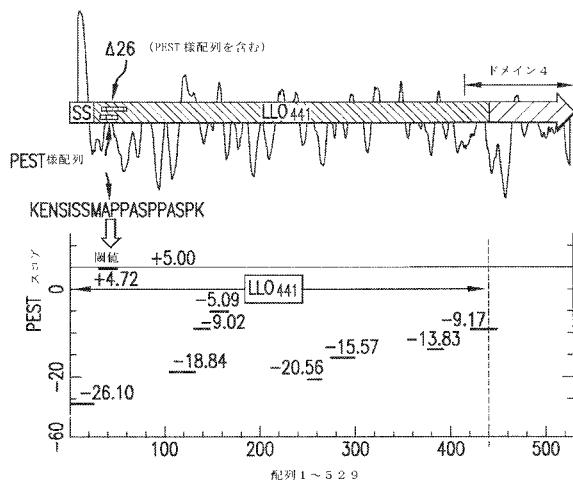
【図1】



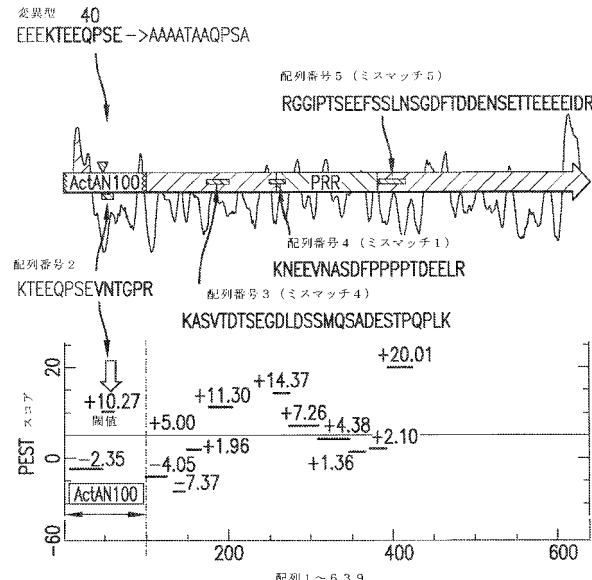
【図2】



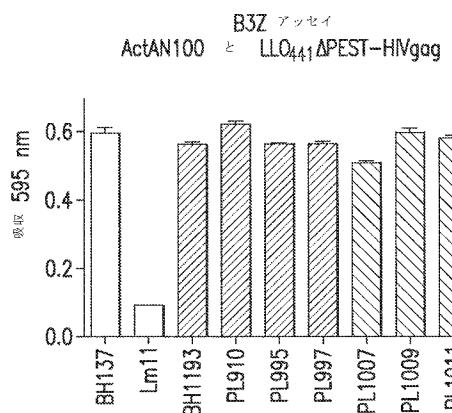
【図3】



【図4】

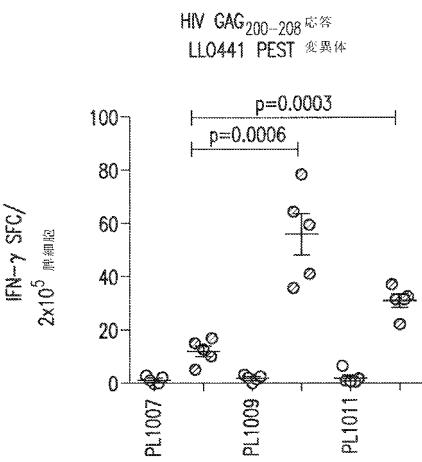


【図5】

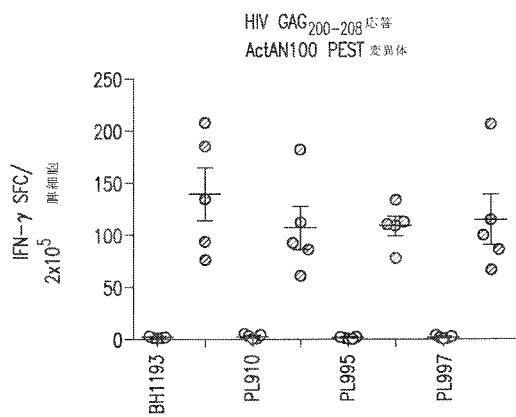


| 株 | コンストラクト |
|--------|--|
| BH137 | ActAN100-OVA 慣性対照 |
| Lm11 | 陰性対照 |
| BH1193 | ActAN100-HIVgagB-SL8 |
| PL910 | ActAN100ΔP-HIVgagB-SL8 |
| PL995 | ActAN100ΔP-QDNKR-HIVgagB-SL8 |
| PL997 | ActAN100-QDNKR-HIVgagB-SL8 |
| PL1007 | hlyp-LLO ₄₄₁ WT-A18K-HIVgagB-SL8 |
| PL1009 | hlyp-LLO ₄₄₁ Δ26-A18K-HIVgagB-SL8 |
| PL1011 | hlyp-LLO ₄₄₁ ΔPEST-A18K-HIVgagB-SL8 |

【図6 A】



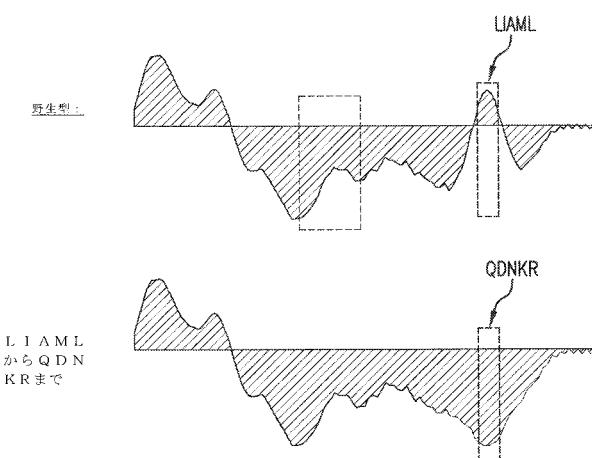
【図6 B】



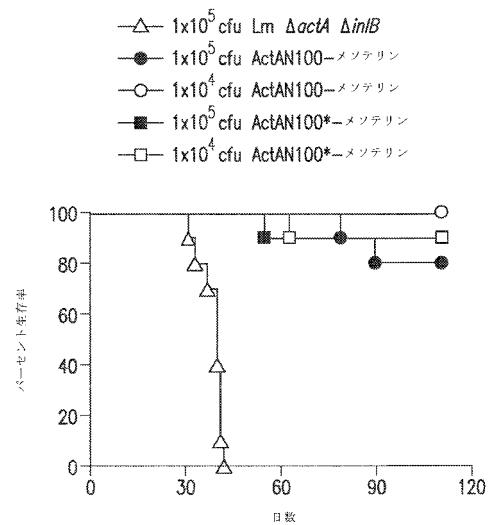
【図7】

WT ActA: LNTDEWEEEKTEEQPSEVNTGPRYETAREVSSR
変異型 40: LNTDEWAAAATAAQPSAVNTGPRYETAREVSSR
ΔP: LNTDEWEEE-----Δ-----YETAREVSSR
"RKR": LNTDEWEEEK**RKR**RKRVN**RKR**YETAREVSSR
"KRK": LNTDEWEEEK**KRK**RKRVN**KRK**YETAREVSSR

【図8】



【図 9】



【図 11】

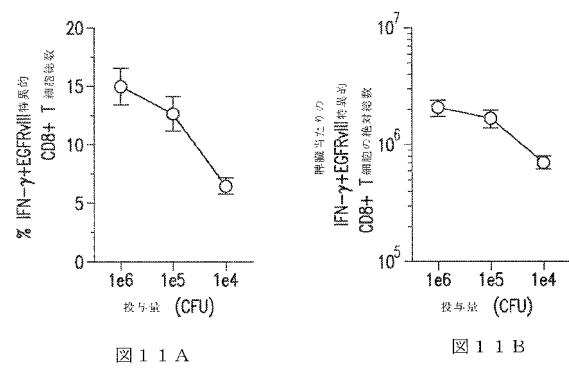
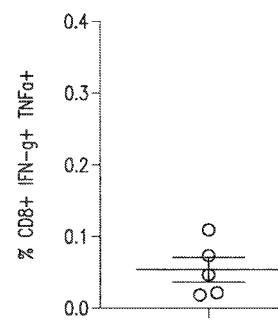
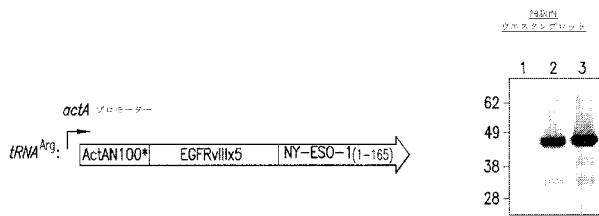


図 11 A

図 11 B

【図 12】

【図 10】



【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US13/78119 |
|--|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 14/195; C12N 15/74; A61K 39/00 (2014.01) USPC - 424/190.1; 435/252.3; 536/23.7 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C07H 21/04; C07K 14/195; C12N 15/74, 1/21; A61K 39/00, 48/00, 39/02 (2014.01) USPC: 424/190.1; 435/252.3, 69.3, 471; 536/23.7; 530/350 | | |
| 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) MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C, B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); Google; Google Scholar; PubMed; ProQuest; listerail, 'fusion protein,' 'antigen,' 'operably linked promoter,' 'PEST motif'. | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 2012/125551 A1 (ROTHMAN, J) September 20, 2012; paragraphs [00014], [00040]-[00041], [00046], [00048], [00051], [00055], [00058], [00060]-[00066], [00072], [00083], [00086]-[00087], [00091], [000114], [000119], [000127], [000133], [000165], [000167], [000168], [000183]; claims 2-6, 15, 30-31 | 1, 2, 3/1, 3/2 |
| A | US 2005/0249748 A1 (DUBENSKY, JR., TW et al.) November 10, 2005; paragraphs [0030], [0099], [0129], [0169], [0275]; table 6; claim 1 | 1, 2, 3/1, 3/2 |
| A | WO 2007/103225 A2 (DUBENSKY, JR., TW et al.) September 13, 2007; paragraphs [0028], [0109], [0128]-[0131], [0228]; Table 1; Claims 1, 5 | 1, 2, 3/1, 3/2 |
| A | US 2010/0291140 A1 (PATERSON, Y et al.) November 18, 2010; entire document | 1, 2, 3/1, 3/2 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" 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 31 March 2014 (31.03.2014) | Date of mailing of the international search report 25 APR 2014 | |
| Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450. Facsimile No. 571-273-3201 | Authorized officer: Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774 | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|-------------------------------|
| International application No. |
| PCT/US13/78119 |

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

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

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

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

3. Claims Nos.: 4-28 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- | | |
|--------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> | The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. |
| <input type="checkbox"/> | The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. |
| <input type="checkbox"/> | No protest accompanied the payment of additional search fees. |

フロントページの続き

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

(72)発明者 ラウア , ピーター , エム .

アメリカ合衆国 , カリフォルニア州 94706 , オールバニー , 1003 ソラーノ アベニュー
-

(72)発明者 ハンソン , ウィリアム , ジー .

アメリカ合衆国 , カリフォルニア州 94596 , ウォールナット クリーク , 101 キャムローズ ブレイス

(72)発明者 スコブル , ジャスティン

アメリカ合衆国 , カリフォルニア州 94703 , バーカリー , 2423 ルーズベルト アベニュー

(72)発明者 レオン , メレディス レイ , リン

アメリカ合衆国 , カリフォルニア州 94611 , オークランド , 6615 サローニ ドライブ

(72)発明者 ファッソ , マーセラ

アメリカ合衆国 , カリフォルニア州 94804 , リッチモンド , 57 サウスウィンド サークル

(72)発明者 ブロックステッド , ダーク

アメリカ合衆国 , カリフォルニア州 94804 , リッチモンド , 57 サウスウィンド サークル

(72)発明者 ドゥベンスキー , トーマス , ダブリュー .

アメリカ合衆国 , カリフォルニア州 94611 , ピードモント , 15 キング アベニュー

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA31 CA01 CA11 DA05 EA04 GA11

4B065 AA01X AB02 BA02 CA24 CA44

4C085 AA03 BA07 DD01 DD62 EE01