

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-503721
(P2025-503721A)

(43)公表日 令和7年2月4日(2025.2.4)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/863 (2006.01)	C 1 2 N	15/863	Z Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/24 (2006.01)	C 1 2 N	15/24		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		4 C 0 8 7
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全44頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-542127(P2024-542127)	(71)出願人	518435943	ノイスコム アーゲー スイス国 4 0 5 1 バーゼル、ボイムラ インガッセ 1 8	
(86)(22)出願日	令和5年1月17日(2023.1.17)				
(85)翻訳文提出日	令和6年8月22日(2024.8.22)				
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/050917				
(87)国際公開番号	WO2023/135313	(74)代理人	100088904	弁理士 庄司 隆	
(87)国際公開日	令和5年7月20日(2023.7.20)				
(31)優先権主張番号	22151830.1	(74)代理人	100124453	弁理士 資延 由利子	
(32)優先日	令和4年1月17日(2022.1.17)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(74)代理人	100135208	弁理士 大杉 卓也	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,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	(74)代理人	100183656		
	最終頁に続く	(74)代理人	100224786	弁理士 庄司 晃	
			弁理士 大島 卓之		
		(74)代理人	100225015	最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 がん治療用免疫刺激タンパク質をコードする組換えオルソボックスウイルスベクター

(57)【要約】

本発明は、作動可能な連結において、（i）少なくとも1つのウイルス初期プロモーターエレメントおよび任意で少なくとも1つのウイルス後期プロモーターエレメント、または（i i）少なくとも1つのウイルス後期プロモーターエレメントおよび少なくとも3つのウイルス初期プロモーターエレメント、を含むまたはからなる第1のプロモーターおよびb）少なくとも1つの免疫刺激タンパク質をコードする第1の核酸配列、を含む組換えオルソボックスウイルスベクターに関する。本発明は、組換えオルソボックスウイルスベクターを含む細胞、ならびに組換えオルソボックスウイルスベクターまたは該細胞；および任意で、チェックポイント阻害剤をコードする核酸配列を含むさらなる組換えウイルスベクター、チェックポイント阻害剤をコードする核酸、またはチェックポイント阻害剤を含む組成物にも関する。さらに、本発明は、医薬に使用するための、特に癌の治療、改善または予防に使用するための、組換えオルソボックスウイルスベクター、およびそれを含む細胞および組成物を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 以下を含むまたはからなる第 1 のプロモーター

(i) 少なくとも 1 つのウイルス初期プロモーターエレメントおよび任意で少なくとも 1 つのウイルス後期プロモーターエレメントであって、該ウイルス初期プロモーターエレメントは核酸配列 AAN¹N²AN³TGAAN⁴N⁵N⁶N⁷N⁸A (配列番号 1) を含むまたはからなり、N¹、N²、N⁴、N⁵ および N⁶のそれぞれは独立して A または T から選択され、N³は C、G もしくは T から選択され、N⁷は C および A から選択され、並びに N⁸は A、C および T から選択される、または

(i i) 少なくとも 1 つのウイルス後期プロモーターエレメントおよび少なくとも 3 つのウイルス初期プロモーターエレメント

ならびに、

b) 少なくとも 1 つの免疫刺激タンパク質をコードする第 1 の核酸配列、
を作用可能な連結において含む、組換えオルソボックスウイルスベクター。

【請求項 2】

オルソボックスウイルスは、オルソボックスウイルスヴァリオラ (Orthopoxvirus variola)、オルソボックスウイルスワクシニア (Orthopoxvirus vaccinia)、オルソボックスウイルスシミアエ (Orthopoxvirus simiae)、オルソボックスウイルスボビス (Orthopoxvirus bovis)、オルソボックスウイルスムリス (Orthopoxvirus muris)、オルソボックスウイルスカメリ (Orthopoxvirus cameli)、アライグマボックスウイルス (Raccoonpox virus) またはタテラボックスウイルス (Taterapox virus) からなる群から選択される種である、好ましくは、オルソボックスウイルスワクシニアは亜種の改変ワクシニアアンカラウイルス (MVA) である、請求項 1 に記載の組換えオルソボックスウイルスベクター。

【請求項 3】

免疫刺激タンパク質は、炎症誘発性タンパク質であり、好ましくはサイトカイン、より好ましくは、インターロイキン 12 ファミリーのインターロイキンであり、および最も好ましくは、インターロイキン 12 (IL-12) である、請求項 1 または 2 に記載の組換えオルソボックスウイルスベクター。

【請求項 4】

IL-12 は、ヒト単鎖 IL-12 (sc-IL-12) であり、好ましくは配列番号 38 ~ 40 に示されるアミノ酸を有し、好ましくは配列番号 38 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 3 に記載の組換えオルソボックスウイルスベクター。

【請求項 5】

1 つもしくは複数の腫瘍抗原またはその抗原断片をコードする第 2 の核酸配列をさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組換えオルソボックスウイルスベクター。

【請求項 6】

第 2 の核酸配列は第 1 のプロモーターまたは第 2 のプロモーターに作用可能に連結される、請求項 5 に記載の組換えオルソボックスウイルスベクター。

【請求項 7】

ウイルス初期プロモーターエレメントのそれぞれは：

(i) ワクシニアウイルス (VV) p7.5 初期プロモーターエレメント；

(i i) 核酸配列 AAN¹N²AN³TGAAN⁴N⁵N⁶N⁷N⁸A (配列番号 1) を含むか、または、からなるウイルス初期プロモーターエレメントであって、N¹、N²、N⁴、N⁵ および N⁶のそれぞれは独立して A または T から選択され、N³は C、G もしくは T から選択され、N⁷は C および A から選択され、並びに N⁸は A、C および T から選択される、

好ましくは、核酸配列 AAN¹N²AN³TGAAN⁴N⁵N⁶N⁷N⁸AN⁹TCTAATTTATTGN¹⁰AN¹¹GG (配列番号 2) を含むか、または、からなるウイルス初期プロモーターエレメントであって、N¹、N²、N⁴、N⁵ および N⁶のそれぞれは独立して A または T から選択され、N³は C、G もしくは T から選択され、N⁷は C および A から選択され、N⁸は A、C および T

から選択され、 N^9 はGおよびTから選択され、 N^{10} はCおよびTから選択され、並びに N^{11} はAおよびCから選択される；好ましくは、核酸配列AAN¹N²AN³TGAAN⁴N⁵N⁶N⁷N⁸AGTCTAATTTATTGCACGG（配列番号3）を含むか、または、からなるウイルス初期プロモーターエレメントであって、 N^1 、 N^2 、 N^4 、 N^5 および N^6 のそれぞれは独立してAまたはTから選択され、 N^3 はC、GもしくはTから選択され、 N^7 はCおよびAから選択され、並びに N^8 はA、CおよびTから選択される、

好ましくは、初期プロモーターエレメントは配列番号4～11および配列番号43～46に示される核酸配列を有し、より好ましくは配列番号4、5、43、44、45および46のいずれか1つに示される核酸配列を有し、並び最も好ましくは配列番号4に示される核酸配列を有する；

10

および／または

(i) ワクシニアウイルス(VV) p7.5後期プロモーターエレメント；

(ii) 核酸配列TTTN¹N²N³N⁴N⁵N⁶N⁷N⁸N⁹TTTTTN¹⁰N¹¹N¹²N¹³N¹⁴N¹⁵N¹⁶ATAAATA（配列番号41）を含むか、または、からなるウイルス後期プロモーターエレメントであって、 N^1 から N^9 のそれぞれは独立してA、C、G、Tまたは不存在から選択され、および N^{10} から N^{16} のそれぞれは独立してA、C、G、Tまたは不存在から選択される；

好ましくは、核酸配列TTTN¹N²N³N⁴N⁵N⁶N⁷N⁸N⁹TTTTTN¹⁰N¹¹N¹²N¹³N¹⁴N¹⁵N¹⁶ATAAATA（配列番号42）を含むか、または、からなるウイルス後期プロモーターエレメントであって、 N^1 はCまたはTから選択され、 N^2 および N^9 のそれぞれは独立してA、GまたはTから選択され、 N^3 、 N^4 および N^8 のそれぞれは独立してAまたはTから選択され、 N^5 はG、Tまたは不存在から選択され、 N^6 はA、Tまたは不存在から選択され、 N^7 はA、G、Tまたは不存在から選択され、 N^{10} はC、GまたはTから選択され、 N^{11} はA、GまたはTから選択され、 N^{12} はAまたはCから選択され、 N^{13} はTまたは不存在から選択され、 N^{14} はGまたは不存在から選択され、 N^{15} はA、CまたはTから選択され、並びに N^{16} はA、CまたはTから選択される、

20

好ましくは、ウイルス後期プロモーターエレメントは、配列番号12～16のいずれか1つの核酸配列を有する、最も好ましくは、配列番号12の核酸配列を有する、

からなる群から独立して選択されるものであって、

ここで、それぞれの後期プロモーターエレメントおよび／または初期プロモーターエレメントは、好ましくは5、6、7または8ヌクレオチドの長さの核酸リンカーによって任意に連結されるものであり、

30

好ましくは、第1のプロモーターは配列番号18～30に示される核酸配列を含むまたはからなるものである、

請求項1～6のいずれか1項に記載の組換えオルソボックスウイルスベクター。

【請求項8】

請求項1～7のいずれか1項に記載の組換えオルソボックスウイルスベクターを含む細胞。

【請求項9】

a) 請求項1～9のいずれか1項に記載の組換えオルソボックスウイルスベクター、または請求項10に記載の細胞、および

40

b) 異なる治療用タンパク質をコードする複数の2つ以上のオルソボックスウイルスベクター、

c) 薬学的に許容可能な担体、および任意で、

d) チェックポイント阻害剤をコードする核酸配列を含む組換えウイルスベクター、チェックポイント阻害剤をコードする核酸、またはチェックポイント阻害剤を含む、組成物。

【請求項10】

チェックポイント阻害剤は、CTLA-4阻害剤、PD-1阻害剤、およびPD-L1阻害剤からなる群から選択され、好ましくは、PD-1阻害剤は、ニボルマブ、アテゾリ

50

ズマブ、ペンブロリズマブ、セミプリマブ、デュルバルマブおよびアベルマブからなる群から選択される抗PD1抗体である、請求項9に記載の組成物。

【請求項11】

医薬に使用するための、請求項1～7のいずれか1項に記載の組換えオルソボックスウイルスベクター、請求項8に記載の細胞、または請求項9もしくは10に記載の組成物。

【請求項12】

がんの治療、改善または予防に使用するための、請求項1～7のいずれか1項に記載の組換えオルソボックスウイルスベクター、請求項8に記載の細胞、または請求項9もしくは10に記載の組成物。

【請求項13】

がんは、乳がん、小腸がん、胃がん、腎臓がん、膀胱がん、子宮がん、卵巣がん、精巣がん、肺がん、結腸がん、前立腺がん、B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、またはホジキンリンパ腫である、請求項12に記載の組換えオルソボックスウイルスベクター、細胞、または組成物。

【請求項14】

組換えオルソボックスウイルスベクター、細胞、または組成物は、好ましくは手術前または手術中に直接注射により、または、カテーテルで、腫瘍組織に直接投与される、請求項12または13に記載の組換えオルソボックスウイルスベクター、細胞、または組成物。

【請求項15】

組換えオルソボックスウイルスベクター、および、チェックポイント阻害剤をコードする核酸配列を含む組換えウイルスベクター、チェックポイント阻害剤をコードする核酸、またはチェックポイント阻害剤は、同時にまたは連続して投与される、請求項12または13に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、作動可能な連結において、(i)少なくとも1つのウイルス初期プロモーターエレメントおよび任意で少なくとも1つのウイルス後期プロモーターエレメント、または(ii)少なくとも1つのウイルス後期プロモーターエレメントおよび少なくとも3つのウイルス初期プロモーターエレメント、を含むまたはからなる第1のプロモーター、およびb)少なくとも1つの免疫刺激タンパク質をコードする第1の核酸配列、を含む組換えオルソボックスウイルスベクター(Orthopox viral vector)に関する。本発明は、組換えオルソボックスウイルスベクターを含む細胞、ならびに組換えオルソボックスウイルスベクターまたは該細胞；および任意で、チェックポイント阻害剤をコードする核酸配列を含むさらなる組換えウイルスベクター、チェックポイント阻害剤をコードする核酸、またはチェックポイント阻害剤を含む組成物にも関する。さらに、本発明は、医薬に使用するための、特に癌の治療、改善または予防に使用するための、組換えオルソボックスウイルスベクター、およびそれを含む細胞および組成物を提供する。

【背景技術】

【0002】

現在、がん治療の分野では、抗腫瘍T細胞の機能を制限する敵対的な腫瘍微小環境(Tumour Microenvironment: TME)を克服するためのさまざまな取り組みが行われている。

マクロファージは単核食作用免疫系の白血球であり、異物を内部に取り込み消化する機能により、抗感染免疫、組織の恒常性の維持、および身体の保護に重要な役割を果たし、細胞残骸や腫瘍細胞などの有害物質を身体から除去する(非特許文献1、非特許文献2)。マクロファージのその他の機能には、自然免疫の仲介、獲得免疫の開始、さまざまなサイトカインやケモカインなどの免疫調節物質の分泌、炎症を引き起こす可能性のある補体系の活性化などがある。しかしながら、マクロファージの機能は、ケモカイン、サイトカ

10

20

30

40

50

イン、および腫瘍細胞によって分泌されるその他のさまざまな因子（例えば、CSF-1、CCL2、VEGF、TGFβなど）の存在下で、有害な形で改変され、破壊される可能性がある。そのため、それらは腫瘍微小環境に動員され、いわゆる腫瘍関連マクロファージ（tumor-associated macrophage: TAM）になる（非特許文献3）。腫瘍関連マクロファージは、例えば、腫瘍の成長と転移を促進し、遺伝的不安定性を促進し、プロテアーゼや他の分子を放出して細胞外マトリックスを再構築し、血管新生を促進し、免疫抑制メディエーターを分泌するなど、さまざまなレベルで腫瘍の進行に大きな役割を果たす（非特許文献4、非特許文献5）。TAMは、抗腫瘍活性を示すM1または癌の進行につながるM2のいずれかに極性化することが知られており、M1様またはM2様マクロファージとして説明される（非特許文献6）。

10

【0003】

そのため、敵対的なTMEを克服するための戦略の中で、TAMを標的とする戦略の開発にいくつかの取り組み、例えば、抗体（例えば、ペキシダルニチブ、AMG820mAb、カルマブ、エマクツズマブなど）を介した腫瘍由来因子（TDF）を阻害することによるマクロファージの動員の阻害、放射線療法および／またはTDF阻害薬（例えば、PLX3397、トラベクテジンなど）によるTAMの枯渇、またはToll様受容体を標的として、TAMを免疫抑制性のM2様表現型からより炎症性のM1様状態へのリプログラミング（例えば、イミキモド、レジキモドなど）、RNA送達（例えば、低分子干渉RNA、マイクロRNAなど）、または抗体（例えば、HU5F9-G4 mAb、CP-870,893、APX005M）が行われている（非特許文献7）。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】 Zhou et al., Front. Oncol. 2020

【非特許文献2】 Yona S. and Gordon S., Front Immunol. 2015

【非特許文献3】 Watkins et al., J. Immunol. 2021

【非特許文献4】 Mantovani et al., Nature Reviews Clinical Oncology 14, 2017

【非特許文献5】 Anfrey et al., Cells 2020

【非特許文献6】 Murray, P. J. et al., Immunity 41, 14-20, 2014

【非特許文献7】 Anfrey et al., Cells 2020

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、さまざまなTAMリプログラミングアプローチがあるにもかかわらず、その多くは治療選択性の欠如および全身毒性を伴う。そのため、腫瘍微小環境を免疫抑制状態から免疫刺激状態に移行させる安全かつ選択的な方法に対する需要が高まっている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

そこで、治療用タンパク質を局所的に送達し、全身毒性を伴うことなく、TMEを免疫抑制状態から免疫刺激状態に効果的に移行させるためのベクター支援微小環境プログラミング（Vector Aided Microenvironment Programming: VAMP）戦略が開発された。前記戦略は、TMEにおける治療用タンパク質の高い選択的産生およびTAMの活性化を可能にするプロモーターの制御下で、TMEにおける免疫刺激治療用分子を効果的に発現できる組換えオルソボックスウイルスベクターの提供に関する。前記プロモーターには、標的細胞、特にTAMにおける目的のタンパク質の発現を改善するための1つ以上の初期エレメントモチーフが含まれる。該組換えウイルスベクターは、とりわけ以下の利点：i）腫瘍に浸潤する正常細胞への感染を介して、目的のタンパク質、特に免疫刺激タンパク質の制御されたかつ再現性のある送達、ii）M2様マクロファージをM1様マクロファージに効率的にリプログラミング、iii）限定された全身毒性、iv）チェックポイント阻害剤（CPI）治療に耐性のある腫瘍に対する高い有効性、およびv）非常に

40

50

低用量であっても著しい腫瘍の縮小、を提供する。

【0007】

第1の態様において、本発明は、

a) 以下を含むまたはからなる第1のプロモーター

(i) 少なくとも1つのウイルス初期プロモーターエレメントおよび任意で少なくとも1つのウイルス後期プロモーターエレメントであって、該ウイルス初期プロモーターエレメントは核酸配列AAN¹N²AN³TGAAN⁴N⁵N⁶N⁷N⁸A (配列番号1)を含むまたはからなり、N¹、N²、N⁴、N⁵ および N⁶のそれぞれは独立してAまたはTから選択され、N³はC、GもしくはTから選択され、N⁷はCおよびAから選択され、並びにN⁸はA、CおよびTから選択される、または

(ii) 少なくとも1つのウイルス後期プロモーターエレメントおよび少なくとも3つのウイルス初期プロモーターエレメント

ならびに、

b) 少なくとも1つの免疫刺激タンパク質をコードする第1の核酸配列、

を作用可能な連結において、含む組換えオルソボックスウイルスベクターに関する。

【0008】

第2の態様において、本発明は、本発明の組換えオルソボックスウイルスベクターを含む細胞を提供する。

【0009】

第3の態様において、本発明は、

a) 本発明の第1の態様の組換えオルソボックスウイルスベクターまたは本発明の第2の態様の細胞、および

b) 薬学的に許容可能な担体、および

任意で、c) チェックポイント阻害剤をコードする核酸配列を含む組換えウイルスベクター、チェックポイント阻害剤をコードする核酸、またはチェックポイント阻害剤、を含む組成物に関する。

【0010】

第4の態様において、本発明は、医薬に使用するための、本発明の第1の態様の組換えオルソボックスウイルスベクター、本発明の第2の態様の細胞、または本発明の第3の態様の組成物を提供する。

【0011】

第5の態様において、本発明は、がんの治療または予防に使用するための、本発明の第1の態様の組換えオルソボックスウイルスベクター、本発明の第2の態様の細胞、または本発明の第3の態様の組成物を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】抗PD1耐性腫瘍における腫瘍内 (i t) 注入されたMVA-SynE1-IL12およびMVA-7.5-IL12の有効性。腫瘍を有するマウス (LLC腫瘍) は、腹腔内 (i p) に注射された抗PD1抗体と組み合わせて、合成初期プロモーターの制御下にあるIL12をコードするMVA (MVA-SynE1-IL12) または7.5プロモーターの制御下にあるMVA-IL12 (MVA-7.5-IL12) を10⁷感染単位 (i f u) の用量で治療された。治療は腫瘍の体積に応じてランダムに分けられたマウスに対して0日目から開始された。MVAの注射は2日目と4日目に繰り返され、抗PD1治療は17日目まで週2回実施された。異なる治療群に属する個々のマウスの腫瘍の成長の経時変化を示す。破線は非反応マウスを表す。

【図2】抗PD1治療下での低用量MVA-SynE1-IL12の有効性。腫瘍を有するマウス (LLC腫瘍) を、腹腔内 (i p) に注射された抗PD1抗体の存在下で、合成初期プロモーターの制御下でIL12をコードするMVA (MVA-SynE1-IL12) で10⁷感染単位 (i f u) または2 x 10⁵ i f uの用量で治療した。治療は腫瘍の体積に応じてランダムに分けられたマウスに対して0日目に開始された。MVA

10

20

30

40

50

の注射は2日目と4日目に繰り返し、抗PD1治療は17日目まで週2回実施した。時間の経過に伴う腫瘍の成長の曲線を示す。

【図3】低用量治療における単独治療としてのMVA-SynE1-IL12の有効性。腫瘍を有するマウス（LLC腫瘍）を、合成初期プロモーターの制御下でIL12をコードするMVA（MVA-SynE1-IL12）を 10^7 感染単位（ifu）または 2×10^5 ifuの用量で投与した（単独治療）。治療は腫瘍の体積に応じてランダムに分けられたマウスに対して0日目に開始された。MVAの注射は2日目と4日目に繰り返し、抗PD1治療は17日目まで週2回実施した。時間の経過に伴う腫瘍の成長の曲線を示す。

【図4】腹膜がん症（peritoneal carcinomatosis）モデルにおけるMVA-SynE1-IL12とAd-IL12の有効性の比較。CT26腫瘍細胞は治療開始の3日前にBALB/Cマウスに腹腔内注射された。0日目に、マウスは合成初期プロモーター下でIL12をコードするMVA（MVA-SynE1-IL12）を 10^7 感染単位（ifu）の用量で、または同等の用量のIL12をコードするAdenoで治療した。治療は2日目と4日目に繰り返された。コントロールマウス（未処理）、MVA-SynE1-IL12、およびAd-IL12で治療したマウスの全生存率を示す。

【図5】IL12をコードするAdenoまたはMVAに感染したHeLa細胞におけるIL12のインビトロ発現。HeLa細胞を、IL12をコードする指定されたベクターで1 MOI（1 感染単位／細胞）で感染させた。感染後24時間で上清を回収し、IL12 ELISAアッセイにかけた。MVAに感染した細胞の場合、結果は2つの独立した実験の平均SDになる。

【図6】マウスにおけるインビボ治療によるIL12の腫瘍内発現。腫瘍を有するマウス（LLC腫瘍）に、IL12をコードするAdeno（Ad-IL12）、天然の7.5プロモーターの制御下にあるIL12をコードするMVA（MVA-p7.5-IL12）、または合成初期プロモーターの制御下でIL12をコードするMVA（MVA-SynE1-IL12）を 10^7 ifuの用量で1回注射して治療した。収集した腫瘍からのIL12の発現は、ELISAアッセイによって経時的に測定され、pg/ugタンパク質溶解物として表した。

【図7】インビボ治療における筋肉と腫瘍におけるIL12の発現。マウスに、合成初期プロモーター下でIL12をコードするMVA（MVA-SynE1-IL12）を 10^7 ifuの用量で筋肉内または腫瘍内に注射した。腫瘍と筋肉からのIL12の発現はELISAアッセイによって測定され、pg/ugタンパク質溶解物として表した。

【図8】MVA-IL12による腫瘍内治療後の腫瘍内M1およびM2マクロファージのレベル。腫瘍を有するマウス（LLC腫瘍）に、合成初期プロモーター下でIL12をコードするMVA（MVA-SynE1-IL12）またはMVA mockを 10^7 ifuの用量で腫瘍内に注入により、0日目、2日目、4日目に投与した。7日目に腫瘍を収集し、フローサイトメトリーで分析し、治療後のM1およびM2マクロファージのレベルが測定した。

【図9】P7.5、SynE1、およびSynE2のプロモーターの配置の模式図。7.5L：P7.5プロモーター由来の後期エレメント；7.5E：P7.5プロモーター由来の初期エレメント；sL：合成後期エレメント（配列番号12）；7.5Emod：改変されたP7.5プロモーター由来の初期エレメント（配列番号4）。矢印は転写の方向を示す。

【図10】抗PD1活性に抵抗性のあるB16F10腫瘍モデルにおけるMVA-SynE1-IL12単独および抗PD1との併用の有効性。B16F10細胞を皮下注射したC57BL/6マウスの生存曲線。腫瘍が確立したマウス（1群あたりn=9）をランダムに分け、（ 6×10^5 IFUの投与量を、0日目から始めて4日ごとに4回の注射を2サイクルで）合成初期プロモーターの制御下にあるIL12をコードするMVA（MVA-SynE1-IL12）単独または抗PD1抗体との併用で、17日目まで週2回腹腔内注射して治療した。抗PD1を投与したマウスをコントロール群として使用した。

10

20

30

40

50

【図 1 1】MVA-SynE1-IL12 腫瘍内注射 (IT) は、注射されていない遠隔腫瘍の腫瘍増殖を制御する。(a~f) C57BL/6 マウスの両脇腹に MC38 細胞を皮下注射で接種した (両側腫瘍移植)。腫瘍が形成されたマウスは、腫瘍の体積が類似しているかどうかに応じてランダムに分けられた (1 群あたり $n = 7 \sim 10$ のマウス)。腫瘍の 1 つ (右側腹部) に、(0 日目から始めて 4 日ごとに 4 回の注射を 2 サイクルで) 抗 PD1 と組み合わせて、(a) MVA-mIL12 を 10^7 IFU で腫瘍内注入するか、または (b) MVA-mIL12 を 6×10^5 IFU で腫瘍内注入し、(d、e) もう 1 つの腫瘍 (左側腹部) は腫瘍内注射 (IT) 治療を受けなかった。抗 PD1 のみを投与したマウスを両脇腹のコントロールとして使用した。腫瘍の体積は時間の経過とともにモニタリングされた。グラフ内の線は、個々の腫瘍を表す (実線は反応腫瘍、点線は非反応腫瘍)。グラフ上のパーセンテージは奏効率 (完全奏効率、CR) を示す。

10

【図 1 2-1】コンセンサス配列番号 1 または配列番号 3 を含む SynE プロモーターは、P7.5 と比較してより強力な初期導入遺伝子発現を促進する。(a~b) テストされたさまざまな SynE プロモーターの概略図。初期 (黒枠) および後期 (白枠) プロモーターエレメントの ID は、該当する場合はそれぞれの配列番号とともに各ボックスに示されている。コンセンサス配列番号 3 は、初期エレメント配列番号 4 および配列番号 5 を含む。初期エレメント Early-A (配列番号 43)、Early-B (配列番号 44)、Early-C (配列番号 45)、および Early-D (配列番号 46) のヌクレオチド配列を b) に示し、これらのヌクレオチド配列には、より一般化されたコンセンサス配列番号 1 に含まれる配列が含まれており、配列番号 1 の固定ヌクレオチド位置は太字で示されている。7.5 L: P7.5 プロモーター由来の後期エレメント; 7.5 E: P7.5 プロモーター由来の初期エレメント; SynE1 は配列番号 18 に対応; SynE2 は配列番号 19 に対応; SynE5 は配列番号 22 に対応; SynE7 は配列番号 24 に対応。矢印は転写の方向を示す。

20

【図 1 2-2】(c) 初期プロモーター活性をテストするために、HeLa 細胞を MVA-Red (レポーター HcRed タンパク質をコードする MVA ベクター、この実験ではその発現は評価されていない) に感染させ、2.5 時間後に、さまざまな SynE プロモーターまたは P7.5 プロモーターの制御下にある mIL12 をコードするプラスミドをトランスフェクションした。中間/後期発現をブロックするために、MVA ベクターによる感染時に AraC ($40 \mu\text{g}/\text{ml}$) を添加した。mIL12 レベルは、トランスフェクション後 4 時間の細胞培養上清で ELISA によって測定され、P7.5-mIL12 をトランスフェクトした細胞で測定されたレベルに対する変化の倍数として表される。P7.5、SynE1、SynE2、SynE7 の場合は $n = 3$ 、SynE5、SynE14、SynE15、および SynE16 の場合は $n = 2$ 。FOC = 倍率変化。

30

【図 1 3】WIPO ST.25 形式での配列番号 1 の説明。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明を以下に詳細に説明する前に、本発明は、本明細書に記載された特定の方法、プロトコル、および試薬に限定されるものではなく、これらは変化する可能性があることを理解されたい。また、ここで使用される用語は、特定の実施形態を説明するためだけのものであり、本発明の範囲を制限するものではなく、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ制限されることも理解されたい。別途定義されていない限り、ここで使用されるすべての技術用語および科学用語は、当業者が一般的に理解する意味と同じ意味を持つ。

40

【0014】

好ましくは、ここで使用される用語は、「バイオテクノロジー用語の多言語用語集: (IUPAC 勧告)」、Leuenberger, H.G.W、Nagel, B. および Koelbl, H. eds. (1995)、Helvetica Chimica Acta、CH-4010 Basel、Switzerland に記載されているとおり定義される。

【0015】

50

本明細書の本文中には、いくつかの文書（すべての特許、特許出願、科学出版物、製造元の仕様書、指示などを含む）が引用されている。本明細書のいかなる内容も、先行発明により当該開示に先行する権利がないことを認めるものとして解釈されるものではない。

【0016】

定義

【0017】

以下、本発明の各要素について説明する。これらの要素は特定の実施形態とともにリストされているが、追加の実施形態を作成するために、任意の方法および任意の数で組み合わせることができることが理解されるべきである。様々に説明された例および好ましい実施形態は、本発明を明示的に説明された実施形態のみに限定するものと解釈されるべきではない。本明細書の説明は、明示的に説明された実施形態と、開示された要素および／または好ましい要素の任意の数とを組み合わせた実施形態をサポートし、包含するものと理解されるべきである。さらに、本願に記載されたすべての要素のいかなる順列および組み合わせも、文脈により別途示されない限り、本願の説明によって開示されているものとみなされるべきである。

10

【0018】

本明細書およびそれに続く請求項全体を通じて、文脈上別段の定めがない限り、「含む (comprise)」という語、および「含む (comprises)」や「含む (comprising)」などの変形は、記載された整数または工程、または整数または工程の群が含まれることを意味するものと理解されるが、その他の整数または工程、または整数または工程の群が除外されることを意味するものではない。本明細書および添付の請求項で使用されている単数形の「a」、「an」、および「the」は、内容が明確に別のことを指示しない限り、複数の指示対象を含む。

20

【0019】

本発明の文脈において、用語「核酸」は、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド塩基またはその両方の一本鎖または二本鎖のオリゴまたはポリマーを指す。ヌクレオチドモノマーは、核酸塩基、5炭素糖（リボースや2'-デオキシリボースなど）、および1〜3個のリン酸基で構成される。通常、核酸は個々のヌクレオチドモノマー間のホスホジエステル結合によって形成される。本発明の文脈において、核酸という用語には、リボ核酸 (RNA) およびデオキシリボ核酸 (DNA) 分子が含まれるが、これらに限定されるわけではなく、他の結合を含む核酸の合形成態も含む（例えば、Nielsenらによって記載されたペプチド核酸 (Science 254:1497-1500, 1991)）。通常、核酸は一本鎖または二本鎖の分子であり、天然に存在するヌクレオチドで構成される。核酸の一本鎖の描写は、相補鎖の配列も（少なくとも部分的に）定義する。核酸は一本鎖または二本鎖であるか、あるいは二本鎖と一本鎖の両方の配列の部分を含むことができる。例示されている二本鎖核酸分子は、3'または5'オーバーハングを持つことができ、そのため、全長にわたって完全に二本鎖である必要はなく、またそうであると想定されるわけでもない。核酸は、生物学的、生化学的、または化学的合成方法、あるいは増幅法、RNAの逆転写法を含むがこれらに限定されない、当該技術分野で既知の方法のいずれかによって得ることができる。核酸という用語には、染色体または染色体セグメント、ベクター（例えば、発現ベクター）、発現カセット、裸のDNAまたはRNAポリマー、プライマー、プローブ、cDNA、ゲノムDNA、組換えDNA、cRNA、mRNA、tRNA、マイクロRNA (miRNA)、または低分子干渉RNA (siRNA) が含まれる。核酸は、例えば、一本鎖、二本鎖、または三本鎖であってもよく、特定の長さには限定されない。別途示されない限り、特定の核酸配列は、明示的に示された配列に加えて、相補的な配列を含むか、またはコードする。

30

40

【0020】

「単離された核酸」分子とは、核酸の天然の供給源に存在する他の核酸分子から分離された分子である。例えば、ゲノムDNAに関して、「単離された」という用語には、ゲノムDNAが自然に関連付けられている染色体から分離された核酸分子が含まれる。好まし

50

くは、単離された核酸には、その核酸が由来する生物のゲノムDNA内の核酸に自然に隣接する配列（すなわち、核酸の5'末端と3'末端に位置する配列）を含まない。さらに、cDNA分子などの単離された核酸分子は、組換え技術によって生成された場合には他の細胞物質または培養培地が実質的に含まれなくてよく、化学的に合成された場合には化学前駆体または他の化学物質が実質的に含まれなくてよい。

【0021】

本発明の文脈において、用語「遺伝子」は、RNA転写産物またはポリペプチドをコードするヌクレオチドの集合体を指し、cDNAおよびゲノムDNA核酸を含む。「遺伝子」は、コード配列の前（5'非コード配列）およびコード配列の後（3'非コード配列）にある調節配列を含む、特定のタンパク質またはポリペプチドを発現する核酸断片を指すこともある。「ネイティブ遺伝子」とは、独自の制御配列を持つ自然界に見られる遺伝子を指す。「キメラ遺伝子」とは、天然遺伝子ではない遺伝子を指し、自然界では一緒には見られない制御配列および／またはコード配列を含む。すなわち、キメラ遺伝子には、異なる供給源に由来する調節配列およびコード配列、または同じ供給源に由来するが自然界に見られるものとは異なる方法で配置されている調節配列およびコード配列を含んでもよい。キメラ遺伝子は、異なる供給源に由来するコード配列および／または異なる供給源に由来する調節配列を含んでもよい。「内因性遺伝子」とは、生物のゲノム内の自然な位置にある天然の遺伝子を指す。「外来」遺伝子または「異種」遺伝子とは、宿主生物に通常は存在しないが、遺伝子転移によって宿主生物に導入される遺伝子を指す。外来遺伝子は、非在来生物に挿入された在来遺伝子、またはキメラ遺伝子を含んでもよい。

【0022】

本明細書で言及される用語「ゲノム」には、染色体だけでなく、ミトコンドリア、葉緑体、およびウイルスのDNAまたはRNAも含む。

【0023】

「ベクター」、「ベクター構築物」または「組換えベクター」という用語は、本発明の文脈では互換的に使用され、目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチド、または目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチドおよびポリペプチドを含む混合物を指し、細胞に導入されるものであるか、またはそこに含まれるタンパク質および／または核酸を細胞に導入することができるものである。ベクターの例には、プラスミド、コスミド、ファージ、ウイルス、人工染色体などが含まれるが、これらに限定されない。ベクターは、例えば外来DNAや異種DNAなどの目的の遺伝子産物を宿主細胞に導入するために使用される。特定のベクターは、機能的に連結されている遺伝子の発現を誘導することができる。

【0024】

本発明の文脈におけるベクターは、宿主細胞内で遺伝子の発現を駆動するのに適した少なくとも1つのプロモーターをさらに含んでもよい。「発現ベクター」という用語は、宿主への形質転換後に挿入された核酸配列の発現を可能にするために設計されたベクター、プラスミドまたは媒体を意味する。クローン化された遺伝子、すなわち挿入された核酸配列は、通常、プロモーター、最小プロモーター、エンハンサーなどの制御エレメントの制御下に置かれる。所望の宿主細胞内で核酸の発現を促進するために有用な開始制御領域またはプロモーターは数多く存在し、当業者にはよく知られている。

【0025】

ベクターには、宿主細胞内でのベクターの自律複製を促進する「レプリコン」ポリヌクレオチド配列が含まれてもよい。外来DNAは異種DNAとして定義され、異種DNAとは、宿主細胞に天然に存在しないDNAであり、たとえば、ベクター分子を複製したり、選択可能またはスクリーニング可能なマーカーをコードしたり、トランスジーンをコードしたりする。宿主細胞内に入ると、ベクターは宿主の染色体DNAとは独立して、または同時に複製することができ、ベクターと挿入されたDNAのコピーが複数生成される。さらに、ベクターには、挿入されたDNAをmRNA分子に転写したり、挿入されたDNAを複数のRNAのコピーに複製したりするために必要なエレメントも含むことができる。ベ

クターには、さらに、目的の遺伝子の発現を制御する「発現制御配列」が含まれてもよい。典型的には、発現制御配列は、ポリペプチドまたはプロモーター、エンハンサー、サイレンサー、インシュレーター、もしくはリプレッサーなどのポリヌクレオチドである。1つ以上の目的の遺伝子産物をコードする複数のポリヌクレオチドを含むベクターでは、発現は1つ以上の発現制御配列によって一緒にまたは個別に制御されてよい。より具体的には、ベクターに含まれる各ポリヌクレオチドは、別個の発現制御配列によって制御されてもよいし、ベクターに含まれるすべてのポリヌクレオチドは、単一の発現制御配列によって制御されてもよい。単一の発現制御配列によって制御される単一のベクターに含まれるポリヌクレオチドは、1つのオープンリーディングフレームを形成する場合がある。一部の発現ベクターには、挿入されたDNAに隣接した配列エレメントがさらに含まれており、これにより発現したmRNAの半減期が延長され、および／またはmRNAがタンパク質分子に翻訳されるようになる。挿入されたDNAによってコードされる多くのmRNAおよびポリペプチド分子をこのようにして迅速に合成することができる。このようなベクターは、対象に投与された際に前記ポリペプチドの発現を引き起こすか、または直接発現させるためのプロモーター、エンハンサー、ターミネーターなどの調節エレメントを含み得る。

10

【0026】

好ましくは、ベクターはプロモーターおよびコード配列を含む発現カセットを含むものであって、該コード配列の発現は前記プロモーターによって制御される。

20

【0027】

好ましくは、本発明の文脈におけるベクターはウイルスベクターである。「ウイルスベクター (viral vector)」または「ウイルスベクター (virus vector)」という用語は、少なくとも1つのウイルス起源のエレメントを含み、ウイルスベクター粒子にパッケージ化される能力を持ち、少なくとも1つの外因性核酸をコードする核酸ベクター構築物を指す。ベクターおよび／または粒子は、インビトロまたはインビボで任意の核酸を細胞に導入する目的で利用することができる。当技術分野では、多数の形態のウイルスベクターが知られている。用語「ビリオン」は、単一の感染性ウイルス粒子を指すために使用される。「ウイルスベクター」、「ウイルスベクター粒子」および「ウイルス粒子」という用語は、細胞の外部に存在するDNAまたはRNAコアとタンパク質コートを備えた完全なウイルス粒子も指す。

30

【0028】

好ましくは、本発明の文脈におけるウイルスベクターは、細胞および細胞株の感染、特にヒトを含む生きた動物の感染に使用することができる。より好ましくは、本発明によるウイルスベクターは、抗原提示細胞に感染し、最も好ましくはマクロファージに感染する。典型的なウイルスベクターは、アデノウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、アレナウイルス、フラウイルス、ラブドウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、パラミクソウイルス、またはピコルナウイルスから選択され得る。好ましくは、ウイルスベクターはポックスウイルス由来であり、より好ましくはワクシニアウイルス由来であり、最も好ましくは改変ワクシニアアンカラ (Modified Vaccinia Ankara: MVA) ウイルス由来である。

40

【0029】

一般的に、本発明の組換えウイルスベクターは、ウイルス粒子にパッケージ化することができる。例えば、本発明の組換え改変ワクシニアウイルスベクターは、改変ワクシニアウイルス粒子にパッケージ化することができる。好ましくは、ビリオンまたはウイルス粒子が弱毒化されているということは、ウイルスがニワトリ胚線維芽細胞 (CEF) や、アヒルカイリナ (Cairina) 初代網膜細胞などの鳥類初代細胞から得られた不死化細胞株などの鳥類細胞内では増殖複製できるが、ヒト胎児腎臓細胞株 293細胞、ヒト子宮頸部腺癌細胞株 HeLa細胞などのヒト細胞株内では増殖複製できないことを意味する。

【0030】

MVAは、ポックスウイルス科のオルソポックスウイルス属に属するワクシニアウイル

50

スに関連し、初代鶏胚線維芽細胞（C E F）細胞における570回以上の連続継代培養によって生成されている（Mayr, A et al., Infection 3, 6-14, 1975）。これらの長期にわたる継代の結果、ウイルスの宿主範囲は大幅に制限され、MVAが多くの哺乳類細胞に生産的に感染することができなくなった。他方、MVAは臨床において優れた安全性プロファイルと免疫原性を示し、忍容性も良好で、ワクチンおよび遺伝子治療候補の開発のための安全なベクターとしての可能性を強調している。本願で使用される用語「MVA」は、従来技術で知られている任意のMVA株も指す。本発明の組換えオルソボックスウイルスベクターの基礎となり得るMVA株の好ましい例は、株MVA-BN（この株のゲノムの核酸配列はGenBankアクセッション番号：DQ983238.1でアクセス可能）、株MVA572である（この株のゲノムの核酸配列はGenBankアクセッション番号：DQ983237.1でアクセス可能）、MVA-I721 MVA-I721（この株のゲノムの核酸配列は、GenBankアクセッション番号：DQ983236.1でアクセス可能）、Acambis 3000（GenBankアクセッション番号：AY603355.1）、または株MVATGN33.1である（この株のゲノムの核酸配列はGenBankアクセッション番号：EF675191.1でアクセス可能）である。

10

20

30

40

50

【0031】

本発明の文脈における用語「プロモーター」は、遺伝子の転写を可能にする遺伝子の上流（センス鎖の5'領域側）に一般的に位置するDNAの調節領域を指す。プロモーターには、転写因子として知られるタンパク質によって認識される特定のDNA配列と応答エレメントが含まれる。これらの因子はプロモーター配列に結合し、RNAポリメラーゼと、遺伝子のコード領域からRNAを合成する酵素をリクルートする。「上流」および「下流」という用語は、ヌクレオチド配列またはベクター内に存在する2つのエレメント間の相対的な方向を説明するために使用される用語である。別のエレメントの「上流」にあるエレメントは、他のエレメントよりも配列の5'末端に近い位置（つまり、分子が直線状である場合、リボースまたはデオキシリボース骨格の5'炭素にリン酸基が結合している分子の末端に近い位置）にある。あるエレメントが、他のエレメントと比較して、配列の3'末端（つまり、直線状分子のリボースまたはデオキシリボース骨格の3'炭素にヒドロキシル基が結合している分子の末端）に近い位置にある場合、そのエレメントは「下流」とあると言われる。

【0032】

本発明の文脈における用語「後期プロモーターエレメント」は、ウイルスによる細胞への感染後期にウイルス遺伝子の発現を促進する、ウイルスのゲノム内に存在する核酸配列を指す。用語「後期プロモーターエレメント」には、天然に存在するウイルス後期プロモーターエレメントの変異体も含まれる。好ましくは、このような変異体は、天然に存在するウイルス後期プロモーターエレメントに対して、少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%の核酸配列同一性を有するものであり、少なくとも、その変異ウイルス後期プロモーターエレメントの制御下にある遺伝子の転写を、天然に存在するウイルス後期プロモーターエレメントと同じレベルに導く。このようなプロモーターの制御下にある遺伝子の転写レベルは、特にウイルスベクターに感染した細胞から単離されたRNAから生成されたcDNAの定量的PCR（qPCR）を含む、当該技術分野で既知の方法を使用して決定することができる。

【0033】

本発明の文脈における「初期プロモーターエレメント」という用語は、ウイルスによる細胞の感染の初期段階でウイルス遺伝子の発現を促進する、ウイルスのゲノム内に存在する核酸配列を指す。用語「初期プロモーターエレメント」には、天然に存在するウイルス初期プロモーターエレメントの変異体、例えば変異ウイルス初期プロモーターエレメントも含まれる。好ましくは、このような変異体は、天然に存在するウイルス初期プロモーターエレメントに対して、少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくと

も95%の核酸配列同一性を有するものであり、少なくとも、その変異ウイルス初期プロモーターエレメントの制御下にある遺伝子の転写を、天然に存在するウイルス初期プロモーターエレメントと同じレベルに導く。このようなプロモーターの制御下にある遺伝子の転写レベルは、特にウイルスベクターに感染した細胞から単離されたRNAから生成されたcDNAの定量的PCR(qPCR)を含む、当該技術分野で既知の方法を使用して決定することができる。

【0034】

好ましくは、本発明の文脈におけるプロモーターは、ポックスウイルスにおける異種遺伝子の発現に適している。ポックスウイルスは、初期、中期、後期の3つの主要な遺伝子クラス(後の2つのクラスはゲノム複製後に発現する)が関与するカスケードのようなメカニズムを通じて、転写レベルで遺伝子発現を制御する。そのため、いずれかの遺伝子クラスに対して活性を持つプロモーターが好まれる。初期活性と後期活性の両方を持つプロモーターは、ワクチンベクターとして利用されるポックスウイルスベクターにおける外来抗遺伝子の発現を指示するために一般的に使用され、強力な免疫応答を誘導するために適切な時期に適切な発現レベルが存在するように、好ましくは筋肉内に注射される。このようなプロモーターには、p7.5k30kおよび40kプロモーターなどの、ウイルスタンパク質の発現を促進するネイティブポックスウイルスプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。さらに、合成プロモーターは複数の初期エレメントと後期エレメントを採用する場合がある。例えば、pHybプロモーターは、PrSプロモーターおよびp7.5kプロモーターと比較して、感染中初期に抗原の発現を促し、反復ワクチン接種後にCD8⁺T細胞応答をより強く誘導もすることが示されている。このように、本発明の文脈における用語「初期プロモーター」は、ウイルスDNAの複製が起こる前の初期段階で、ポックスウイルスまたはポックスウイルスに感染した細胞において、活性があるプロモーターを指す。すなわち、用語「後期プロモーター」は、DNA複製が行われた後に活性があるプロモーターを指す。したがって、本明細書の文脈における用語「初期-後期プロモーター」は、初期プロモーターと後期プロモーターの両方の時間枠で活性があるプロモーターを指す。本発明の文脈におけるプロモーターは、好ましくは合成プロモーターであり、少なくとも1つのポックスウイルス初期エレメントを含み、より好ましくは1つの後期ポックスウイルスプロモーターエレメントおよび少なくとも3つの初期ポックスウイルスプロモーターエレメントを含む。

【0035】

本発明の文脈における「作動可能な連結」または「作動可能に連結された」という用語は、2つ以上の構成要素の配置を指し、それらの構成要素は、協調して機能することを可能にする関係にある。例として、プロモーターがコード配列の転写を駆動する場合、プロモーターはコード配列に作動可能に連結されている。転写プロセスの態様には、これらに限定されないが、開始、伸長、減衰、終了などが含まれる。

【0036】

本発明における用語「治療用タンパク質」は、医薬分野において広く使用されている遺伝子組換えタンパク質を指す。薬理活性に基づいて、次の5つのグループに分類できる：
(a) 欠乏しているまたは異常なタンパク質を置き換えるもの；(b) 既存の経路を拡張するもの；(c) 新しい機能または活性を提供するもの；(d) 分子または生物に干渉するもの；および(e) 例えば、放射性核種、細胞傷害性薬剤、またはエフェクタータンパク質などの他の化合物またはタンパク質を送達するもの。これらはその分子タイプ(例えば、抗体ベースの薬物、Fc融合タンパク質、抗凝固剤、血液因子、骨形成タンパク質、人工タンパク質スキャフォールド、酵素、成長因子、ホルモン、インターフェロン、インターロイキン、および血栓溶解剤など)、または分子の活性メカニズム：(a) 標的に非共有結合的に結合するもの、例えば、mAb；(b) 共有結合に影響を与えるもの、例えば、酵素；および(c) 特異的な相互作用なしに活性を発揮するもの、例えば、血清アルブミン、に基づいて分類することもできる(Dimitrov, D. S., Methods Mol. Biol. 2012)。

【0037】

「免疫刺激分子」、「免疫刺激剤」または「免疫刺激因子」という用語は互換的に使用することができ、本発明の文脈では、免疫系の任意の成分の活性化を誘導するか、またはその活性を増加させ、それによって免疫系を刺激する物質を指す。免疫系を刺激する能力のある分子は当業者に多数知られている。この点で、本発明に関連して特に興味深いのは、炎症性分子または炎症誘発性分子である。

【0038】

本明細書で使用される「炎症性分子」または「炎症誘発性分子」という用語は、腫瘍微小環境（TME）を免疫抑制状態から免疫刺激状態に移行させることができる分子を指す。免疫刺激分子は、例えば、ヘルパーT細胞、マクロファージ、アストロサイト、単球などの炎症を促進する免疫細胞から分泌され得る。特に、用語「炎症性分子」はサイトカインを指す。

10

【0039】

本発明の文脈における「サイトカイン」または「炎症（誘発）性サイトカイン」という用語は、主に活性化マクロファージによって体全体で生成されるポリペプチドを指す。これらの分子は多くの生理学的反応において重要な役割を果たしており、自己分泌（それらを分泌する細胞に作用）、パラクリン（近くの細胞に作用）、内分泌（離れた細胞に作用）、および接触分泌作用（近接する細胞膜のオリゴ糖、脂質、またはタンパク質成分を介して伝達される）など、多様な効果がある。これらの分子の典型的な役割は、免疫および炎症プロセスの調節に関連している（Navarro-Gonzalez et al., Nat. Rev. Nephrol. 7, 327-340, 2011）。炎症に関与する典型的なサイトカインは、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-6、IL-12、IL-15）；インターフェロン（例えば、IFN α 、IFN β 、IFN γ ）；腫瘍壊死因子（例えば、TNF α 、TNF β ）；ケモカイン（例えば、CC、CXC、CX3ケモカイン）；コロニー刺激因子（例えば、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、IL-3）；成長因子（例えば、EPO、TPO、EGF、FGF、PDGF、BDNF、VGF、TGF β ）；接着分子（例えば、ICAM、VCAM）；酵素（例えば、ホスホリパーゼA）；補体関連分子（例えば、C3、C5）；その他の分子（例えば、PAI-1、MIF、ペントラキシン、SAA、ラクトフェリン、プロカルシトニン、LCN2）に分類できる。

20

【0040】

本発明で用いられる「インターロイキン」または「IL」という用語は、炎症および免疫反応を調節するサイトカインの一種を指す。インターロイキンの供給源は多岐にわたり、白血球だけでなく、ほぼすべてのリンパ球と腫瘍細胞も含まれる。インターロイキンはさまざまな細胞によって生成され、多くの細胞に作用して、複雑な制御ネットワークを構成する。一般的に、インターロイキンファミリーには3つの主な機能：i) 免疫細胞の活性化および調節、ii) さまざまな細胞に情報を伝達、iii) 炎症反応に関与、がある。現在、IL-1からIL-38までと命名されているインターロイキンは合計38種類確認されており、分子構造およびその受容体の違いにより、さらにIL-1、IL-6、IL-10、IL-12、およびIL-17ファミリー、およびケモカインファミリーのインターロイキンメンバー、および分類されていないインターロイキンに分類することができる。各インターロイキンファミリーには、複数のインターロイキンメンバーが含まれる。

30

40

【0041】

本発明の文脈において、「インターロイキン12」または「IL-12」という用語は、インターロイキン12（IL-12）ファミリーに属するヘテロ二量体サイトカインを指し、このファミリーはIL-12、IL-23、IL-27、およびIL-35の4つのメンバーで構成される。このファミリーは、抗原提示時の免疫反応の形成に重要な役割を果たし、分化中のナイーブT細胞の細胞運命決定に影響を与える。さらに、IL-12ファミリーは、免疫システムが適切に機能するために必要な細胞経路を制御し、一部のメンバーは炎症誘発反応を活性化して感染に対する防御をもたらす、他のメンバーは自己免疫疾患を引き起こす抑制されない免疫反応を抑制する（Sun et al., Cytokine 2015,

50

75(2): 249-255)。IL-12、IL-23、およびIL-27は活性化抗原提示細胞（APC）によって分泌され、ナイーブT細胞に抗原を提示するが、IL-35は制御性T細胞および制御性B細胞の産物である。各メンバーは、らせん構造を持つ α サブユニット（すなわち、IL-12p35、IL-23p19、およびIL27p28）と、ジスルフィド結合によって共有結合した β サブユニット（すなわち、IL-12p40、およびEbi3）で構成される。

【0042】

本明細書の文脈における用語「単鎖IL-12」（sc-IL12）は、リンカー配列を介してIL-12p35ポリペプチドに融合されたIL-12p40ポリペプチドを発現するように操作され、p40/p35分子が単一のポリペプチド鎖として生成されるIL-12を意味する。構成はどちらの順序でも可能であり、アミノ末端部分（N末端）としてのp40ポリペプチドから始まり、カルボキシル末端部分（C末端）としてのp35ポリペプチドに連結される、「p40-リンカー-p35」と呼ばれる形式で単一のポリペプチドが生成されてもよい。逆に、sc-IL12コンストラクトでは、「p35-リンカー-p40」と呼ばれる形式で、p35部分は、C末端部分としてのp40に連結されたN末端部分であり得る。さらに可能な構成としては、「p40-リンカー-p35-リンカー-p40」または「p35-リンカー-p40-リンカー-p35」も含まれる。sc-IL12の細胞外空間への分泌はsc-IL12のN末端におけるシグナルペプチドの存在によって達成され、好ましくはシグナルペプチドはヒトIL-12p40またはヒトIL-12p35由来であり、より好ましくはヒトIL-12p40由来である。

【0043】

本発明の文脈において、用語「リンカー」は、複合体の2つのパートまたは部分（例えば、2つのペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質、特定の機能を有する核酸（例えば、プロモーターエレメント））を立体的に分離する核酸配列またはアミノ酸配列を指す。ペプチドリンカーは、連結された2つの部分の間に柔軟性を提供する。一般的に、アミノ酸が小さいほど柔軟性が増す。通常、このようなリンカーは1～20個のアミノ酸を含むまたはからなる。すなわち、柔軟なペプチドリンカーは、小さなアミノ酸、特にグリシンおよび／またはアラニン、および／または例えば、セリン、スレオニン、アスパラギン、およびグルタミンなどの親水性アミノ酸の含有量が増加したものが含まれる。本発明の文脈では、2つのドメインの間に挿入されたリンカー、例えば1つ以上のアミノ酸は、例えば単一鎖コンストラクトにおいて、ドメインに十分な可動性を提供する。プロモーターエレメント間のヌクレオチドリンカーは、プロモーター結合タンパク質（例えば、転写活性化因子）に、それぞれのプロモーターエレメントに結合するのに十分なスペースを提供するための、エレメント間の間隔を空けることを目的としており、約7個の連続したヌクレオチドが二重らせんの1回転を構成する。2つのエレメントが7つのヌクレオチドで分離されている場合、それらは同じ空間方向（例えば、DNA二重らせんの同じ部位）に配置される。本発明のプロモーターにおける、後期プロモーターエレメント間、初期プロモーターエレメント間、および後期プロモーターエレメントと初期プロモーターエレメントとの間に挿入されるリンカーエレメントと同様に、ヌクレオチド配列エレメント間の核酸リンカーは5～8ヌクレオチドの長さを有することが好ましい。

【0044】

本発明で言及される「チェックポイント阻害剤」または「免疫チェックポイント阻害剤」（ICI）という用語は、免疫チェックポイントの特異的に標的とし、その機能を阻害するモノクローナル抗体などの薬剤を指し、主に腫瘍治療の分野で使用される。例えば、LAG3、TIGIT、TIM3、B7H3、CD39、CD73、アデノシンA2A受容体、およびCD47などの他の免疫チェックポイントを標的とするいくつかの小分子が臨床開発中である。チェックポイント阻害剤は、T細胞の抑制性ブレーキ（inhibitory break）を解除することによって作用し、免疫系を強力に活性化し、生産的な抗腫瘍免疫応答をもたらす。ICIは、標的とする分子に応じて、FDA（米国食品医薬品局）承認の3つの薬剤グループに分類できる。これらの薬剤には、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTL

A-4) に対する抗体、T細胞上の阻害受容体であるプログラム細胞死1 (PD-1) をブロックし、そのリガンドであるPD-L1およびPD-L2と相互作用して活性T細胞応答を邪魔する抗体、およびPD-L1に対する抗体が含まれます。承認されているCTLA-4阻害剤の例としては、イピリマブが挙げられる。承認されているPD-1またはPD-L1阻害剤の例としては、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、センプリマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、およびデュルバルマブなどが含まれる。

【0045】

用語「抗原」は、抗体、B細胞、またはT細胞によって認識され得る物質を意味する。本発明の文脈において使用される「腫瘍抗原」または「腫瘍関連抗原 (TAA)」という用語は、腫瘍細胞によって発現されるタンパク質またはポリペプチド、あるいはそれらの抗原性断片を指す。抗原性断片は通常、MHC-IまたはMHC-IIによって提示され、T細胞応答を引き起こす。

10

【0046】

本発明の文脈における用語「マクロファージ」は、あらゆる組織に存在し、異なる表現型と大きな機能的多様性を示す骨髄免疫細胞を指す。これらは、発生、恒常性、組織修復、免疫、および炎症プロセスにおいて重要な役割を果たす。大まかに言えば、マクロファージは、M1/M2パラダイムに基づいて、古典的に活性化されたマクロファージ (M1マクロファージ) と代替的に活性化されたマクロファージ (M2マクロファージ) の2つの異なるサブセットに活性化され得る。M1マクロファージは、コロニー刺激因子 (GM-CSF)、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、インターフェロン- γ (IFN- γ) などのTh1サイトカイン単独または細菌由来のリポ多糖 (LPS) との併用によって、インビトロで極性化される。M1マクロファージは、インターロイキン-1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-12、IL-23、およびTNF- α などの炎症誘発性サイトカインを発現する。対照的に、M2マクロファージは、IL-4やIL-13などのTh2サイトカインによって極性化され、IL-10や形質転換成長因子ベータ (TGF- β) などの抗炎症性サイトカインを産生する。マクロファージは、さまざまな刺激に応じて極性化を変化させる能力も持っている (Zhang et al., Front. Immunol., 2021)。

20

【0047】

用語「腫瘍関連マクロファージ (TAM)」は、腫瘍微小環境の形成に関与するマクロファージを指す。これらはさまざまな腫瘍に広く存在し、腫瘍の増殖、浸潤、転移、および薬剤耐性を促進することができる。

30

【0048】

本明細書の文脈における用語「極性化」は、マクロファージの表現型的特徴および機能的特徴を指す。表現型は、マクロファージによって発現される表面マーカーを通じて定義され得る。その機能性は、例えば、マクロファージによって発現されるケモカインおよび/またはサイトカインの性質および量に基づいて定義され得る。マクロファージは、その状態に応じて、炎症誘発性のM1様マクロファージまたは抗炎症性のM2様マクロファージのいずれかで、異なる表現型および機能的特徴を示す場合がある。

【0049】

本願の文脈における用語「M1マクロファージ」は、炎症誘発性マクロファージまたは古典的に活性化されたマクロファージを指す。これらは貪食作用が強く、大量の活性酸素と窒素種を生成し、それによってTh1応答を促進する。また、M1マクロファージは、CD68やCCR7などの表面マーカーの発現によっても定義される。M1マクロファージは、IL-12やIL-23などの炎症性サイトカインを高レベルで分泌する。IL-12はTh17細胞の活性化およびクローン増殖を誘導し、Th17細胞は炎症に寄与するIL-17を大量に分泌する。これらの特性により、M1マクロファージは転移を制御し、腫瘍の成長を抑制し、微生物感染を制御することができる。さらに、腫瘍部位へのM1マクロファージの浸潤と動員は、固形腫瘍患者の予後改善と全生存率の向上に相関する。悪性細胞は認識されると、接触依存性貪食作用や細胞毒性 (すなわち、TNF- α などのサイトカイン放出) を含むいくつかのメカニズムを通じてM1マクロファージによって

40

50

破壊され得る。

【0050】

本願の文脈における「M1様マクロファージ」または「M1極性化マクロファージ」という用語は、GM-CSFによって誘発されるような抗腫瘍反応および細胞毒性につながる極性化状態を含むマクロファージを指す。

【0051】

本明細書で使用される「M2様マクロファージ」または「M2極性化マクロファージ」という用語は、血管新生および組織修復のプロセスを助ける抗炎症性マクロファージを指す。これらは、CD206、PD-L1、およびCD200Rなどの表面マーカーの発現によって特徴付けられ、スカベンジャー受容体を発現し、IL-10や他の抗炎症性サイトカインを大量に産生する。M2マクロファージによるIL-10の発現はTh2応答を促進する。その結果、Th2細胞はIL-4とIL-3の産生を上方制御し、IL-3は、他のサイトカイン（例えば、エリスロポエチン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、およびIL-6）と連携して、骨髄系（例えば、顆粒球、単球、および樹状細胞）のすべての細胞の増殖を刺激する。M2マクロファージは、血管が悪性細胞に栄養を与え、その成長を促進することで、腫瘍の進行を助ける可能性がある機能を発揮する。さらに、M2マクロファージの存在は、乳がんの転移の可能性と関連している。

【0052】

本発明の文脈で使用される用語「アミノ酸」は、置換または非置換のアミノ基、置換または非置換のカルボキシ基、および1つ以上の側鎖または基、またはこれらの基のいずれかの類似体を含む任意のモノマー単位を指す。例示的な側鎖としては、例えば、チオール、セレノ、スルホニル、アルキル、アリール、アシル、ケト、アジド、ヒドロキシル、ヒドラジン、シアノ、ハロ、ヒドラジド、アルケニル、アルキニル、エーテル、ホウ酸、ボロン酸、ホスホ、ホスホノ、ホスフィン、複素環、エノン、イミン、アルデヒド、エステル、チオ酸、ヒドロキシルアミン、またはこれらの基の任意の組み合わせが挙げられる。本明細書において使用される、用語「アミノ酸」には、以下の20種類の天然または遺伝的にコード化されたアルファアミノ酸が含まれる：アラニン（AlaまたはA）、アルギニン（ArgまたはR）、アスパラギン（AsnまたはN）、アスパラギン酸（AspまたはD）、システイン（CysまたはC）、グルタミン（GlnまたはQ）、グルタミン酸（GluまたはE）、グリシン（GlyまたはG）、ヒスチジン（HisまたはH）、イソロイシン（IleまたはI）、ロイシン（LeuまたはL）、リジン（LysまたはK）、メチオニン（MetまたはM）、フェニルアラニン（PheまたはF）、プロリン（ProまたはP）、セリン（SerまたはS）、スレオニン（ThrまたはT）、トリプトファン（TrpまたはW）、チロシン（TyrまたはY）、およびバリン（ValまたはV）。「X」残基が定義されていない場合は、「任意のアミノ酸」として解釈される。これら20種の天然アミノ酸の構造は、例えば「Stryer et al., Biochemistry, 5th ed., Freeman and Company (2002)」に示される。

【0053】

本明細書で言及される「配列同一性」または「配列相同性」という用語は互換可能であり、ポリペプチドおよびヌクレオチド配列の比較に関して使用される。2つの配列を比較し、配列同一性のパーセンテージを計算する比較する参照配列が指定されていない場合、特に別途指定がない限り、比較する2つの配列のうち長い方を基準にして配列同一性を計算する必要がある。参照配列が示されている場合、特に別途示されていない限り、配列同一性は、配列番号によって示される参照配列の全長に基づいて決定される。例えば、200個のアミノ酸からなるポリペプチド配列を、参照の300個のアミノ酸長のポリペプチド配列と比較すると、配列同一性の最大パーセンテージは66.6%（200/300）となる可能性がある一方、150個のアミノ酸長の配列では、配列同一性の最大パーセンテージは50%（150/300）となる可能性がある。150個のアミノ酸のうち15個が300個のアミノ酸からなる参照配列のそれぞれのアミノ酸と異なる場合、配列同一性のレベルは45%に低下する。ヌクレオチド配列とアミノ酸配列の類似性、つまり配列

同一性のパーセンテージは、配列アライメントによって決定できる。このようなアライメントは、いくつかの当該技術分野で既知のアルゴリズム、好ましくは Karlin および Altschul の数学的アルゴリズム (Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877)、またはhmmalign (HMMER package, <http://hmmer.wustl.edu/>)、または<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>または<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>またはhttp://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.htmlなどで入手可能なCLUSTAL アルゴリズム (Thompson, J. D., Higgins, D.G. & Gibson, T. J. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4673-80) を使用して実行できます。好ましいパラメーターは<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>または<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>で設定されているデフォルトパラメーターである。配列同一性 (配列マッチング) のグレードは、例えば、BLAST、BLAT、またはBlastZ (またはBlastX) などを使用して計算できる。BLASTタンパク質検索は、BLASTPプログラム、スコア=50、ワード長=3を使用して実行される。比較目的でギャップ付きアライメントを取得するには、Altschulet al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402によって説明されているように、Gapped BLAST を利用する。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを使用する場合、それぞれのプログラムのデフォルトパラメーターが使用される。配列マッチング分析は、Shuffle-LAGAN (Brudno M., Bioinformatics2003b, 19 Suppl. 1: 154-162) またはMarkovランダムフィールドなどの確立された相同性マッピング技術によって補完されてもよい。配列データベース検索からの情報、3D構造を持つ利用可能なホモログ、およびユーザー定義の制約を使用して、複数のタンパク質配列および／または構造の構造ベースのアライメントも使用できる (Pei J, Grishin NV: PROMALS: towards accurate multiple sequence alignments of distantly related proteins. Bioinformatics 2007, 23:802-808; 3DCoffee@igs: a web server for combining sequences and structures into a multiple sequence alignment. Poirot O, Suhre K, Abergel C, O'Toole E, Notredame C. Nucleic Acids Res. 2004 Jul 1; 32: W37-40)。本願において配列同一性のパーセンテージが言及される場合、特に別途示されていない限り、これらのパーセンテージは、より長い配列の全長に対して計算される。

【0054】

本明細書において使用される用語「医薬組成物」は、活性剤と、不活性または活性の薬学的に許容される担体、希釈剤、および賦形剤との組み合わせを指し、治療用途に適した組成物となる。さらに、本発明のコンジュゲートを含む医薬組成物は、その化学的および物理的特性に応じて、経口、非経口、局所、吸入、直腸、舌下、経皮、皮下または腔適用経路用に製剤化することができる。医薬組成物は、固体、半固体、液体、または経皮治療システム (TTS) を含む。固体組成物は、錠剤、コーティング錠剤、粉末、顆粒、ペレット、カプセル、発泡錠または経皮治療システムからなる群から選択される。また、溶液、シロップ、注入液、抽出物、静脈内投与用溶液、注入用溶液、または本発明のコンジュゲートの溶液からなる群から選択される液体組成物も含まれる。本発明で使用する半固体組成物には、乳剤、懸濁液、クリーム、ローション、ゲル、グロビュール (globule)、バツカル錠、および坐剤が含まれる。必要に応じて、組成物には、少量の湿潤剤、乳化剤、またはpH緩衝剤も含まれてよい。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸剤、カプセル剤、粉末、徐放性製剤などの形態をとることができる。この組成物は、トリグリセリドなどの従来の結合剤および担体とともに坐剤として製剤化することができる。

【0055】

本発明の文脈において、「薬学的に」または「薬学的に許容される」との用語は、必要に応じて哺乳動物、特にヒトに投与された場合に有害反応、アレルギー反応、または他の望ましくない反応を引き起こさない分子実体および組成物を指す。薬学的に許容される担体または賦形剤とは、あらゆる種類の非毒性の固体、半固体または液体の充填剤、希釈剤

、カプセル化材料または製剤補助剤を指す。

【0056】

本発明の文脈における用語「担体」は、治療剤とともに投与される希釈剤、補助剤、賦形剤、または媒体を指す。このような医薬担体は液体または固体であってよい。液体担体には、水中および油中の生理食塩水などの滅菌液体が含まれるが、これらに限定されず、油には、例えば、ピーナッツ油、大豆油、ミネラルオイル、ゴマ油などの石油、動物、植物または合成起源のものが含まれるが、これらに限定されない。生理食塩水、水性デキストロース溶液、およびグリセロール溶液も、特に注射液用の液体担体として使用できる。医薬組成物を静脈内投与する場合、生理食塩水が好ましい担体である。適切な医薬担体の例はE. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。

10

【0057】

本発明の文脈における「薬学的に許容される担体」は、「薬学的に許容される希釈剤」または「薬学的に許容される媒体」とも呼ばれ、生理学的に適合性のある、溶媒、増量剤、安定剤、分散媒、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含み得る。

【0058】

本発明の文脈における用語「賦形剤」は、医薬品中に存在するか、または医薬品の製造に使用される、有効成分以外の任意の物質を指す。賦形剤は有効成分の担体として機能し、安定性、バイオ医薬品プロファイル、外観、および患者の許容性などの製品特性に貢献する。適切な医薬賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、脱脂乾燥乳、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノールなどが含まれる。

20

【0059】

本発明で言及される用語「アジュバント」は、ワクチン、医薬組成物、または医薬品に添加され、その有効成分の有効性を高め、免疫反応の規模と持続性を刺激および強化する物質または物質の組み合わせを意味する。

【0060】

「有効量」および「治療有効量」という用語は、疾患の治療をするために対象に投与された場合に、疾患の治療に影響を及ぼすのに十分な化合物の量を含む、所望の生物学的または医学的反応を誘発するのに有効である可能性がある量を指す。有効量は、化合物、疾患およびその重症度、治療対象の年齢、体重などに応じて変化するが、これは当業者によって容易に決定することができる。有効量には、さまざまな量を含めることができる。薬学的に有効な量には、他の薬剤と組み合わせたときに有効な薬剤の量が含まれる。

30

【0061】

本明細書において使用される、疾患または障害を「治療する (treat)」、「治療する (treating)」または「治療 (treatment)」とは、以下の1つ以上を達成することを意味する：(a) 疾患の重症度を軽減すること、(b) 治療対象の疾患に特徴的な症状の発症を制限または予防すること、(c) 治療中の疾患に特徴的な症状の悪化を抑制すること、(d) 以前に疾患を患ったことのある対象における疾患の再発を制限または予防すること、および(e) 以前に疾患の症状があった対象の症状の再発を制限または予防すること。

40

【0062】

本明細書において言及される、疾患または障害を「予防する (prevent)」、「予防する (preventing)」または「予防 (prevention)」という用語は、対象において障害が一定期間生じることを予防することを意味する。例えば、本明細書に記載の化合物が疾患または障害を予防する目的で対象に投与される場合、前記疾患または障害は、少なくとも投与当日、および投与日から1日以上、好ましくは投与日から数か月または数年後に生じることが予防される。より具体的には、がん予防において、がんへの進行を防ぐため

50

の前がん病変の治療にこれを適用することができる。

【0063】

本発明の文脈で使用される場合、疾患または障害の「改善する (ameliorate)」、「改善する (ameliorating)」または「改善 (amelioration)」という用語は、症状の軽減、寛解または減少、または対象の身体的健康の改善などの客観的または主観的なパラメーターを含む、前記疾患または障害の治療における成功のあらゆる兆候を指す。症状の改善は、身体検査や評価の結果を含む客観的または主観的なパラメーターに基づくことができる。

【0064】

本発明によれば、用語「対象」は、ヒトを含む動物を指す。用語「動物」は、ヒト、ゴリラ、およびサルを含む霊長類、マウスやラットなどのげっ歯類、ニワトリなどの家禽、ヤギ、ウシ、シカ、ヒツジなどの反芻動物、ならびにブタ、ウマ、ネコ、イヌ、およびウサギを含む他の動物など、あらゆる動物が含まれるが、これらに限定されない。

【0065】

実施形態

【0066】

本発明に至る研究において、驚くべきことに、本発明の組換えオルソボックスウイルスベクターは、腫瘍に浸潤する正常細胞の感染を介して、腫瘍への免疫刺激剤の再現可能かつ制御された送達を可能にすることがわかった。さらに、本発明によるベクターは、腫瘍のみに免疫刺激剤を制御送達することにより全身毒性を制限しながら、コードされた免疫刺激剤の驚くほど効率的かつ高い発現を示した。さらにまた、本発明のベクターは、M2様マクロファージをM1様マクロファージへと効率的にリプログラミングすることを示し、チェックポイント阻害剤 (CPI) 治療に耐性のある腫瘍に対して高い有効性を示し、および非常に低用量でも腫瘍を有意に縮小させることを示す。

【0067】

これらの結果に基づき、本発明は、第1の態様において、

a) 以下を含むまたはからなる第1のプロモーター：

(i) 少なくとも1つのウイルス初期プロモーターエレメントであって、該ウイルス初期プロモーターエレメントは核酸配列 $AAN^1N^2AN^3TGAAN^4N^5N^6N^7N^8A$ (配列番号1) を含むまたはからなり、 N^1 、 N^2 、 N^4 、 N^5 および N^6 のそれぞれは独立してAまたはT (好ましくはA) から選択され、 N^3 はC、GもしくはT (好ましくはT) から選択され、 N^7 はCおよびA (好ましくはC) から選択され、並びに N^8 はA、CおよびT (好ましくはT) から選択される、または

(ii) 少なくとも1つのウイルス後期プロモーターエレメントおよび少なくとも3つのウイルス初期プロモーターエレメント、ならびに

b) 少なくとも1つの免疫刺激タンパク質をコードする第1の核酸配列、
を作用可能な連結において含む、組換えオルソボックスウイルスベクターを提供する。

【0068】

いくつかの実施形態によれば、組換えオルソボックスウイルスベクターは、宿主細胞内で挿入された核酸の発現を媒介することができる発現ベクターである。この場合、本発明の発現ベクターは、作用可能に連結されたプロモーターの制御下にある少なくとも1つの治療用タンパク質をコードする挿入核酸を含む。当業者であれば、発現ベクターには、例えば、複製起点、翻訳開始配列 (例えば、リボソーム結合部位および開始コドン)、終止コドン、および転写終結配列など、発現に必要なさらなるエレメントも含まれる可能性があることが理解されるであろう。

【0069】

別の実施形態によれば、組換えオルソボックスウイルスベクターは発現カセットを含む。この点に関して、本発明の組換えオルソボックスウイルスベクター内の発現カセットは、プロモーター、目的遺伝子 (例えば免疫刺激分子および／または腫瘍抗原) を含む。ベクターには、例えば、哺乳類ゲノム配列やウイルスゲノム配列などの真核生物ゲノム配列

10

20

30

40

50

と相同な配列を含む発現カセットに隣接する配列が含まれる場合がある。

【0070】

さらなる1つの実施形態によれば、本発明の組換えオルソポックスウイルスベクターは、発現カセットを含む感染性のビリオンまたはウイルス粒子である。これらのビリオンまたはウイルス粒子は、さまざまな細胞や細胞株に感染する能力があり、特にヒトを含む生きた動物に感染する能力がある。好ましくは、ビリオンまたはウイルス粒子は、例えば、樹状細胞、マクロファージ、またはB細胞などの抗原提示細胞（APC）に効率的に感染する。より好ましくは、ビリオンまたはウイルス粒子は、マクロファージに感染する。さらにより好ましくは、ビリオンまたはウイルス粒子は、健常なマクロファージに感染する。ビリオンまたはウイルス粒子は腫瘍関連マクロファージにも感染する可能性もある。

10

【0071】

いくつかの実施形態において、細胞への感染は、ビリオンまたはウイルス粒子が細胞表面分子、好ましくは受容体に結合することによって起こる。より好ましくは、受容体はクラスAスカベンジャー受容体である。一般的なクラスAスカベンジャー受容体には、スカベンジャー受容体タイプ1（SR-A1、SCARA1またはMSR1とも呼ばれる）、SCARA2（MARCOまたはSR-A6とも呼ばれる）、SCARA3（MSRL1、APC7またはSR-A3とも呼ばれる）、SCARA4（COLEC12またはSR-A4とも呼ばれる）、およびSCARA5（TESRまたはSR-A5とも呼ばれる）が含まれる。好ましい実施形態では、細胞への感染は、MARCO（コラーゲン構造を有するマクロファージ受容体）としても知られるSCARA2を介して起こる。好ましくは、本発明の文脈におけるビリオンまたはウイルス粒子は、SCARA2（MARCO）に直接結合する。

20

【0072】

さらに、本発明の文脈におけるオルソポックスウイルスベクターは、細胞内でのウイルスの複製が損なわれている一方で感染性があり、それによってウイルスの感染に対する自然な制限を提供することが好適である。

【0073】

1つの実施形態によれば、組換えオルソポックスウイルスベクターは、オルソポックスウイルスヴァリオラ（*Orthopoxvirus variola*）、オルソポックスウイルスワクシニア（*Orthopoxvirus vaccinia*）、オルソポックスウイルスシミアエ（*Orthopoxvirus simiae*）、オルソポックスウイルスボビス（*Orthopoxvirus bovis*）、オルソポックスウイルスムリス（*Orthopoxvirus muris*）、オルソポックスウイルスカメリ（*Orthopoxvirus cameli*）、アライグマポックスウイルス（*Raccoonpoxvirus*）またはタテラポックスウイルス（*Taterapox virus*）からなる群から選択される種のウイルスに基づく。より好ましい1つの実施形態によれば、オルソポックスウイルスワクシニア種のオルソポックスウイルスは、亜種である改変ワクシニアアンカラウイルス（*Modified Vaccinia Ankara Virus: MVA*）に属する。

30

【0074】

改変ワクシニアアンカラウイルスに基づく組換えウイルスベクターは、主にマクロファージを含む抗原提示細胞に感染し、長期継代中にゲノム配列が欠失した結果として無毒性であると本発明者らが説明していることから、本発明の文脈において特に興味深いものである。さらに、MVAは安全性プロファイルが向上し、遺伝的可塑性も高いため、異種遺伝子の発現に非常に有望であり、その遺伝的可塑性により、感染性の低下や遺伝子発現の低下なしに大量の外来DNAを組み込むことができる。

40

【0075】

本発明の組換えオルソポックスウイルスベクターは、さらに、多数の外因性核酸配列の発現を促進する有用性も有する。本発明の組換えオルソポックスウイルスベクターは、免疫調節治療アプローチに使用される。すなわち、オルソポックスウイルスベクターは、少なくとも1つの免疫刺激分子をコードする第1の核酸配列を含む。

【0076】

1つの実施形態において、本発明の組換えオルソポックスウイルスベクターは、インビ

50

トロおよびインビボで 사용할 수 있다. 본 발명의 벡터에 의한 발현이想定される 유전자의 클래스에는、免疫刺激性 단백질 또는 면역調節성 단백질이 포함된다.

【0077】

1つの実施形態によれば、免疫刺激 단백질은 염증誘발성 단백질이다. 好ましい 1つの実施形態によれば、炎症誘발성 단백질은 사이토카인이다. さらにより好ましい 1つの実施形態によれば、사이토카인은 인터로킨이다.

【0078】

1つの特に好ましい実施形態において、인터로킨은 인터로킨 12 패밀리에 속한다. 인터로킨 12 (IL-12) 패밀리는、IL-12、IL-23、IL-27、IL-35의 4つの 멤버로 구성된다. 最も好ましい実施形態によれば、인터로킨은 인터로킨 12이다.

10

【0079】

IL-12는、樹狀細胞 또는 대식세포 등의 다양한造血細胞에서 분비된다. IL-12는 강력한 염증誘발성 사이토카인이며、腫瘍壊死因子 알파 (TNF- α)를 포함하는 다른 사이토카인의 분비를 촉진하고、TNF- α 는 IFN- γ 와 결합하여、CD4+ 세포傷害성 T림프구 (CTL)의 발달의 필요조건이 된다. IL-12는腫瘍 관련 대식세포의 재극화를 유도하는 것도 보고されている.

【0080】

IL-12는 IL-12 p35 서브유닛과 IL-12 p40 서브유닛으로 구성되어 있으며、生物學적으로 활성인 이량체 IL-12 p70을 생성するには、これらを同時に 발현させる必要がある。これは、介在する配列 내 리보솜進入部位 (IRES)을 사용하는か、もしくは、自己切断 아미노산配列을 코드하는配列을 사용하는か、もしくは、서브유닛을連結して 단일鎖 IL-12를 생성하는 리inker를 사용하는かして、兩方の 서브유닛을 1つの転写産物として 발현することにより、または同じ 프로모터 또는 2つの 프로모터에서 2つの 별개의 트랜스지언을 발현することによって達成될 수 있다. 적절한 아미노산配列은、配列 번호 31에 표시되는 아미노산配列을 가진 마우스 IL-12 p40 서브유닛、配列 번호 32에 표시되는 아미노산配列을 가진 마우스 IL-12 p35 서브유닛 (N末端 신호配列 없음)、配列 번호 33에 표시되는 아미노산配列을 가진 사람 IL-12 p40 서브유닛、配列 번호 34에 표시되는 아미노산配列을 가진 사람 IL-12 p35 서브유닛 (N末端 신호配列 없음)이다. 好ましくは、IL-12는 사람 단일鎖 IL-12 (sc-hIL-12)이며、好ましくは配列 번호 38~40의、好ましくは配列 번호 38의 아미노산配列을 가진다.

20

30

【0081】

いくつか의 실시形態によれば、組換え 올소박스 바이러스 벡터는 대식세포에 의한 IL-12 생성을 촉진한다. いくつか의 실시形態において、組換え 올소박스 바이러스 벡터는、대식세포의 다른 기능적 표현형으로의 변환 또는 재극화를 유도한다. 別の 실시形態によれば、대식세포는 염증誘발성의 M1 표현형에 대해 유도 (재극화)되며、および/또는 항염증성의 M2 표현형에서 멀어진다.

【0082】

別の 실시形態によれば、組換え 올소박스 바이러스 벡터는、少なくとも 1つの腫瘍抗原 또는 그抗原断片을 코드하는 제2의 핵산配列을さらに 포함한다.

40

【0083】

발현される該核酸配列は 프로모터에 작동可能에連結されて配置される。

【0084】

1つの 실시形態によれば、2つの 트랜스 유전자는 1つの 프로모터에連結され、介在する配列 내 리보솜進入部位 (IRES)에 의해分離されるか、または自己切断 아미노산配列을 코드하는配列에 의해分離される。

【0085】

別の 실시形態によれば、2つの 트랜스지언은、2つの 독립した 프로모터에連結され、該 프로모터는、同じ 프로모터 또는 好ましくは異なる 프로모터であ

50

てもよい。

【0086】

好ましくは、本発明のオルソボックスウイルスベクターに含まれる異なる核酸エレメントは、(コードヌクレオチド配列を参照して) 5' から 3' の方向に：

〔後期プロモーターエレメント〕_m－〔初期プロモーターエレメント〕_n－少なくとも1つの免疫刺激タンパク質をコードする核酸配列、が配置されるものであって、ここで、mは0～5、すなわち1、2、3、4、または5であり、nは1～10、すなわち1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であり、好ましくは2～8であり、より好ましくは4～6である。1つの特定の実施形態において、核酸リンカーは、2つまたはすべての初期プロモーターエレメントの間、および／または初期プロモーターエレメントと後期プロモーターエレメントの間に存在する。mは1または2であることが好ましく、より好ましくは1であり、すなわち、1つまたは2つの後期プロモーターエレメントが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個、好ましくは2～8個、より好ましくは4～6個の初期プロモーターエレメントの上流(または5' プライム)に位置する。

10

【0087】

本発明の第1の態様のオルソボックスウイルスベクターにおいて、ウイルス初期プロモーターエレメントは、オルソボックスウイルスに天然に存在するものである。好ましくは、ウイルス初期プロモーターエレメントは、オルソボックスウイルスヴァリオラ、オルソボックスウイルスワクシニア、オルソボックスウイルスシミアエ、オルソボックスウイルススポビス、オルソボックスウイルスムリス、オルソボックスウイルスカメリ、アライグマボックスウイルスまたはタテラボックスウイルスからなる群から選択される種のウイルスに天然に存在するエレメントである。好ましくは、ウイルスの初期プロモーターエレメントは、オルソボックスウイルスワクシニア種のウイルスに天然に見られるものである。より好ましい1つの実施形態によれば、ウイルス初期プロモーターエレメントは、改変ワクシニアアンカラウイルス(MVA)に天然に存在するエレメントである。あるいは、ウイルス初期プロモーターエレメントは、そのようなプロモーターエレメントの構造的変異体である。好ましくは、このような変異体は、天然に存在するウイルス初期プロモーターエレメントに対して、少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%の核酸配列同一性を有し、および、少なくとも、その変異ウイルス初期プロモーターエレメントの制御下にある遺伝子の転写レベルを、天然に存在するウイルス初期プロモーターエレメントと同じレベルに導くものである。このようなプロモーターの制御下にある遺伝子の転写レベルは、特にウイルスベクターに感染した細胞から単離されたRNAから生成されたcDNAの定量的PCR(qPCR)を含む、当該技術分野で既知の方法を使用して決定することができる。

20

30

【0088】

本発明の第1の態様のオルソボックスウイルスベクターにおいて、ウイルス後期プロモーターエレメントは、オルソボックスウイルスに天然に存在するものである。好ましくは、ウイルス後期プロモーターエレメントは、オルソボックスウイルスヴァリオラ、オルソボックスウイルスワクシニア、オルソボックスウイルスシミアエ、オルソボックスウイルススポビス、オルソボックスウイルスムリス、オルソボックスウイルスカメリ、アライグマボックスウイルスまたはタテラボックスウイルスからなる群から選択される種のウイルスに天然に存在するエレメントである。好ましくは、ウイルスの後期プロモーターエレメントは、オルソボックスウイルスワクシニア種のウイルスに天然に見られるものである。より好ましい1つの実施形態によれば、ウイルス後期プロモーターエレメントは、改変ワクシニアアンカラウイルス(MVA)に天然に存在するエレメントである。あるいは、ウイルス後期プロモーターエレメントは、そのようなプロモーターエレメントの構造的変異体である。好ましくは、このような変異体は、天然に存在するウイルス後期プロモーターエレメントに対して、少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましく

40

50

は少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%の核酸配列同一性を有し、および、少なくとも、その変異ウイルス後期プロモーターエレメントの制御下にある遺伝子の転写レベルを、天然に存在するウイルス後期プロモーターエレメントと同じレベルに導くものである。このようなプロモーターの制御下にある遺伝子の転写レベルは、特にウイルスベクターに感染した細胞から単離されたRNAから生成されたcDNAの定量的PCR(qPCR)を含む、当該技術分野で既知の方法を使用して決定することができる。

【0089】

第1の態様の組換えオルソボックスウイルスベクターの好ましい実施形態において、ウイルス初期プロモーターエレメントのそれぞれは：

10

(i) ワクシニアウイルス(VV) p7.5 初期プロモーターエレメント；

(ii) 核酸配列AAN¹N²AN³TGAAN⁴N⁵N⁶N⁷N⁸A(配列番号1)を含むか、または、からなるウイルス初期プロモーターエレメントであって、N¹、N²、N⁴、N⁵ および N⁶のそれぞれは独立してAまたはTから選択され、好ましくはAであり、N³はC、GもしくはTから選択され、好ましくはTであり、N⁷はCおよびAから選択され、好ましくはCであり、並びにN⁸はA、CおよびTから選択され、好ましくはTであり、したがって、特に好ましい実施形態では、N¹、N²、N⁴、N⁵ および N⁶はAであり、N³はTであり、N⁷はCであり、N⁸はTである；

好ましくは、核酸配列AAN¹N²AN³TGAAN⁴N⁵N⁶N⁷N⁸AN⁹TCTAATTTATTGN¹⁰AN¹¹GG(配列番号2)を含むか、または、からなるウイルス初期プロモーターエレメントであって、N¹、N²、N⁴、N⁵ および N⁶のそれぞれは独立してAまたはTから選択され、好ましくはAであり、N³はC、GもしくはTから選択され、好ましくはTであり、N⁷はCおよびAから選択され、好ましくはCであり、N⁸はA、CおよびTから選択され、好ましくはTであり、N⁹はGおよびTから選択され、好ましくはGであり、N¹⁰はCおよびTから選択され、好ましくはCであり、並びにN¹¹はAおよびCから選択され、好ましくはCであり、したがって、特に好ましい実施形態では、N¹、N²、N⁴、N⁵ および N⁶はAであり、N³はTであり、N⁷はCであり、N⁸はTであり、N⁹はGであり、N¹⁰はCであり、およびN¹¹はCである；

20

好ましくは、核酸配列AAN¹N²AN³TGAAN⁴N⁵N⁶N⁷N⁸AGTCTAATTTATTGCACGG(配列番号3)を含むか、または、からなるウイルス初期プロモーターエレメントであって、N¹、N²、N⁴、N⁵ および N⁶のそれぞれは独立してAまたはTから選択され、好ましくはAであり、N³はC、GもしくはTから選択され、好ましくはTであり、N⁷はCおよびAから選択され、好ましくはCであり、およびN⁸はA、CおよびTから選択され、好ましくはTであり、したがって、特に好ましい実施形態では、N¹、N²、N⁴、N⁵ および N⁶はAであり、N³はTであり、N⁷はCであり、およびN⁸はTである；

30

好ましくは、配列番号4～11のいずれか1つまたは最も好ましくは、配列番号4の核酸配列を有するウイルス初期プロモーターエレメントである；

および／または

(i) ワクシニアウイルス(VV) p7.5 後期プロモーターエレメント；

(ii) 核酸配列TTTN¹N²N³N⁴N⁵N⁶N⁷N⁸N⁹TTTTTN¹⁰N¹¹N¹²N¹³N¹⁴N¹⁵N¹⁶ATAAATA(配列番号41)を含むか、または、からなるウイルス後期プロモーターエレメントであって、N¹からN⁹のそれぞれは独立してA、C、G、Tまたは不存在から選択され、好ましくはTであり、N¹⁰からN¹⁶のそれぞれは独立してA、C、G、Tまたは不存在から選択され、好ましくは配列GGCATを有するものであり、

40

好ましくは、核酸配列TTTN¹N²N³N⁴N⁵N⁶N⁷N⁸N⁹TTTTTN¹⁰N¹¹N¹²N¹³N¹⁴N¹⁵N¹⁶ATAAATA(配列番号42)を含むか、または、からなるウイルス後期プロモーターエレメントであって、N¹はCまたはTから選択され、好ましくはTであり、N² および N⁹のそれぞれは独立してA、GまたはTから選択され、好ましくはTであり、N³、N⁴およびN⁸のそれぞれは独立してAまたはTから選択され、好ましくはTであり、N⁵はG、Tまたは不存在から選択され、好ましくはTであり、N⁶はA、Tまたは不存在から選択され、好

50

ましくはTであり、 N^7 はA、G、Tまたは不存在から選択され、好ましくはTであり、 N^{10} はC、GまたはTから選択され、好ましくはGであり、 N^{11} はA、GまたはTから選択され、好ましくはGであり、 N^{12} はAまたはCから選択され、好ましくはCであり、 N^{13} はTまたは不存在から選択され、好ましくは不存在であり、 N^{14} はGまたは不存在から選択され、好ましくは不存在であり、 N^{15} はA、CまたはTから選択され、好ましくはAであり、ならびに N^{16} はA、CまたはTから選択され、好ましくはTであり、好ましくは、配列番号12～16のいずれか1つまたは最も好ましくは、配列番号12の核酸配列を有するウイルス後期プロモーターエレメントである；
からなる群から独立して選択されるものであって、
ここで、それぞれの後期プロモーターエレメントおよび／または初期プロモーターエレメントは、好ましくは5、6または7ヌクレオチドの長さの核酸リンカーによって任意に連結されるものである。

10

【0090】

1つの好ましい実施形態において、本発明の第1の態様によるオルソボックスウイルスベクターの第1のプロモーター内のすべての初期プロモーターエレメントは同一である。

【0091】

本発明の第1の態様によるオルソボックスウイルスベクターの特に好ましい実施形態において、第1のプロモーターは配列番号18～30に示される核酸を含むまたはからなる。

20

【0092】

第1のプロモーターは、少なくとも2個から最大10個の初期エレメントを含むか、またはそれらからなるものであってよい。好ましくは、第1のプロモーターは、少なくとも3個から最大7個の初期エレメントを含むか、またはそれらからなる。より好ましくは、第1のプロモーターは、少なくとも4個から最大6個の初期エレメントを含むか、またはそれらからなる。最も好ましくは、第1のプロモーターは、少なくとも4個の初期エレメントを含むか、またはそれらからなる。

【0093】

1つの実施形態によれば、少なくとも1つの初期プロモーターエレメントは、一般化されたコンセンサス配列番号1によって選択される。1つの好ましい実施形態によれば、第1のプロモーターは、少なくとも1つの初期プロモーターエレメントを含むか、またはそれらからなる。1つのより好ましい実施形態によれば、初期プロモーターエレメントは、配列番号4～11および配列番号43～46のいずれか1つを含むか、または配列番号4～11および配列番号43～46のいずれか1つからなる。さらにより好ましい実施形態によれば、初期プロモーターエレメントは、配列番号4、5、43、44、45および46のいずれか1つを含むか、またはそれらからなる。最も好ましい実施形態によれば、初期プロモーターエレメントは、配列番号4を含むか、またはそれらからなる。

30

【0094】

1つの好ましい実施形態によれば、第1のプロモーターは少なくとも3つの初期プロモーターエレメントおよび少なくとも1つの後期プロモーターエレメントを含むか、またはそれらからなるものであって、少なくとも1つの初期プロモーターエレメントは、ヌクレオチドモチーフAAN¹N²AN³TGAAN⁴N⁵N⁶N⁷N⁸Aを含むものであって、N¹、N²、N⁴、N⁵およびN⁶のそれぞれは独立してAまたはTから選択され（好ましくはAであり）、N³はC、GもしくはTから選択され（好ましくはTであり）、N⁷はCおよびAから選択され（好ましくはCであり）、およびN⁸はA、CおよびTから選択され（好ましくはTであり）、少なくとも1つの後期プロモーターエレメントは、ヌクレオチドモチーフTTTN¹N²N³N⁴N⁵N⁶N⁷N⁸N⁹TTTTTN¹⁰N¹¹N¹²N¹³N¹⁴N¹⁵N¹⁶ATAAATAを含むものであって、N¹からN⁹のそれぞれは独立してA、C、G、Tまたは不存在から選択され（好ましくはTであり）、N¹⁰からN¹⁶のそれぞれは独立してA、C、G、Tまたは不存在から選択され（好ましくは配列GGCATを有する）ものである。

40

【0095】

50

1つのさらにより好ましい実施形態によれば、第1のプロモーターは、少なくとも4つの初期プロモーターエレメントおよび少なくとも1つの後期プロモーターエレメントを含むか、またはそれらからなるものであって、それぞれの初期プロモーターエレメントはヌクレオチドモチーフAAN¹N²AN³TGAAN⁴N⁵N⁶N⁷N⁸Aを含むものであって、N¹、N²、N⁴、N⁵ および N⁶のそれぞれは独立してAまたはTから選択され（好ましくはAであり）、N³はC、GもしくはTから選択され（好ましくはTであり）、N⁷はCおよびAから選択され（好ましくはCであり）、並びにN⁸はA、CおよびTから選択され（好ましくはTである）、

少なくとも1つの後期プロモーターエレメントは、ヌクレオチドモチーフTTTN¹N²N³N⁴N⁵N⁶N⁷N⁸N⁹TTTTTN¹⁰N¹¹N¹²N¹³N¹⁴N¹⁵N¹⁶ATAAATAを含むものであって、N¹はCまたはTから選択され（好ましくはTであり）、N² および N⁹のそれぞれは独立してA、GまたはTから選択され（好ましくはTであり）、N³、N⁴および N⁸のそれぞれは独立してAまたはTから選択され（好ましくはTであり）、N⁵はG、Tまたは不存在から選択され（好ましくはTであり）、N⁶はA、Tまたは不存在から選択され（好ましくはTであり）、N⁷はA、G、Tまたは不存在から選択され（好ましくはTであり）、N¹⁰はC、GまたはTから選択され（好ましくはGであり）、N¹¹はA、GまたはTから選択され（好ましくはGであり）、N¹²はAまたはCから選択され（好ましくはCであり）、N¹³はTまたは不存在から選択され（好ましくは不存在であり）、N¹⁴はGまたは不存在から選択され（好ましくは不存在であり）、N¹⁵はA、CまたはTから選択され（好ましくはAであり）、ならびにN¹⁶はA、CまたはTから選択される（好ましくはTである）。好ましくは、少なくとも1つの免疫刺激タンパク質をコードする第1の核酸配列に作動可能に連結されている第1のプロモーター内のプロモーターエレメントは、少なくとも1つの免疫刺激タンパク質をコードする第1の核酸配列の5'プライムにあり、5' - [後期プロモーターエレメント] - [初期プロモーターエレメント]_n - [少なくとも1つの免疫刺激タンパク質をコードする第1の核酸配列] の順序で並んでおり、nは4以上であり、好ましくはnは4～6である。

【0096】

この点に関し、初期プロモーターエレメントおよび後期プロモーターエレメントは、それぞれ同じであっても異なってもよい。本発明のウィルスベクター内のすべての初期プロモーターエレメントは、同じであることが好ましい。

【0097】

第1のプロモーターは、複数の後期プロモーターエレメントを含むか、または複数の後期プロモーターエレメントからなるものであってもよい。例えば、第1のプロモーターは、少なくとも2つのプロモーター後期エレメントから最大5つの後期プロモーターエレメントまでを含むか、またはそれらからなるものであってもよい。好ましくは、第1のプロモーターは、1つの後期プロモーターエレメントを含むかまたはそれからなる。

【0098】

別の実施形態によれば、個々の後期プロモーターエレメントと初期プロモーターエレメントは短いリンカーによって連結されている。1つの好ましい実施形態によれば、リンカーの長さは2～12ヌクレオチドであり、より好ましくは、リンカーの長さは3～8ヌクレオチドであり、さらに好ましくは、リンカーの長さは6～8ヌクレオチドである。最も好ましい実施形態によれば、リンカーの長さは5～8ヌクレオチドである。好ましくは、リンカーは、TCCGGT、TCCGGA、TCTGGA、TCTCGT、ATAGGA、またはAGCTTから選択される配列を有する。1つのプロモーター内の個々の後期プロモーターエレメントと初期プロモーターエレメントを連結するリンカーは同じである必要はない。

【0099】

1つの好ましい実施形態によれば、第1のプロモーターは配列番号18～30のいずれか1つに示される配列を含むかまたはからなる。1つのより好ましい実施形態によれば、第1のプロモーターは配列番号18、19、22、23または24のいずれか1つに示される配列を含むかまたはからなる。1つのさらにより好ましい実施形態によれば、第1の

プロモーターは配列番号 18、19、または 23 のいずれか 1 つに示される配列を含むかまたはからなる。最も好ましい実施形態によれば、第 1 のプロモーターは配列番号 18 に示される配列を含むかまたはからなる。

【0100】

第 2 の態様において、本発明は、本発明の第 1 の態様による組換えオルソボックスウイルスベクターを含む細胞を提供する。典型的には、このような細胞は、本発明の第 1 の態様のウイルスベクターによって形質転換、形質導入またはトランスフェクトされている。形質転換または形質導入のプロセスによって、DNA または RNA からなる外来核酸またはベクターを受け取った後それを発現する細胞は、「形質転換」または「形質導入」されている。好ましくは、本発明の細胞は、上記のようなウイルスベクターを含む。細胞は、真核細胞、例えば哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）、酵母、植物、動物、真菌、もしくは藻類、または原核細胞、例えば細菌、もしくは原生動物であってよい。好ましくは、細胞は、リンパ球または白血球などの哺乳動物細胞であり、より好ましくはマクロファージである。好ましくは、細胞はその表面にスカベンジャー受容体を持つ。より好ましくは、スカベンジャー受容体はタイプ 1 のスカベンジャー受容体である。最も好ましくは、スカベンジャー受容体は MARCO である。

10

【0101】

第 3 の態様によれば、本発明は、

a) 本発明の第 1 の態様の組換えオルソボックスウイルスベクターまたは本発明の第 1 の態様のウイルスベクターを含む細胞、および
b) 本発明の第 1 の態様による異なる治療用タンパク質をコードする 2 つ以上のオルソボックスウイルスベクター、および
c) 薬学的に許容可能な担体、および
任意で、d) チェックポイント阻害剤をコードする核酸配列を含む組換えウイルスベクター、チェックポイント阻害剤をコードする核酸、またはチェックポイント阻害剤、を含む組成物を提供する。

20

【0102】

1 つの実施形態において、本発明の組成物は、本発明の第 1 の態様による組換えオルソボックスウイルスベクター、もしくは本発明の第 2 の態様による細胞の治療有効量を含む、または、本発明の第 1 の態様による、異なる治療用タンパク質をコードする複数の 2 つ以上のオルソボックスウイルスベクターの治療有効量とともに、対象に適切に投与するための形態を提供するための適切な量の薬学的に許容される担体および／または賦形剤と一緒に含む。組成物の製剤化は投与方法に適合する必要がある。例えば、静脈内投与の場合、担体は水性担体であることが好ましい。別の実施形態によれば、組成物は、さらにチェックポイント阻害剤をコードする核酸配列を含む組換えウイルスベクター、チェックポイント阻害剤をコードする核酸、またはチェックポイント阻害剤を任意に含んでもよい。好ましくは、チェックポイント阻害剤は、CTLA-4 阻害剤、PD-1 阻害剤、および PD-L1 阻害剤からなる群から選択される。より好ましくは、チェックポイント阻害剤は、PD-1 阻害剤である。さらにより好ましくは、PD-1 阻害剤は、ニボルマブ、アテゾリズマブ、ペンブロリズマブ、センプリマブ、デュルバルマブおよびアベルマブからなる群から選択される抗 PD1 抗体である。

30

40

【0103】

1 つの実施形態によれば、薬学的に許容される担体は水性担体である。好ましくは、水性担体は、水中および油中（ピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油などの石油、動物、植物または合成起源のものを含むがこれらに限定されない）の生理食塩水などの滅菌液体からなる群から選択される。

【0104】

1 つの実施形態において、医薬組成物は、選択された投与方法に従って適切に投与されるように選択された薬学的にまたは生理学的に許容される製剤中に、補助剤および／または追加の有効成分など（ただしこれらに限定されない）の治療剤または薬理学的に活性化

50

物質をさらに含んでもよい。適切なアジュバントの非限定的な例としては、ミョウバン、リン酸アルミニウム、アルミニウム塩、水酸化アルミニウム、アルミニウムシリカ、リン酸カルシウム、不完全フロイントアジュバント、QS21、MPL-A、RIBIDETOXTM、および／またはこれらの組み合わせが挙げられる。

【0105】

1つの実施形態において、医薬組成物は、溶液、懸濁液、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、粉末、徐放性製剤などの形態をとることができる。本発明の医薬組成物を調製するために、医薬的に許容される担体は固体または液体のいずれであってもよく、好ましくは液体である。液体形態の組成物には、溶液、懸濁液、乳剤、例えば、水、生理食塩水、水性デキストロース、グリセロール溶液、または水／プロピレングリコール溶液が含まれる。非経口注射（例えば、静脈内、動脈内、骨内注入、筋肉内、皮下、腹腔内、皮内、および髄腔内注射など）の場合、液体製剤は、例えば水性ポリエチレングリコール溶液に溶解して製剤化することができる。医薬組成物を静脈内投与する場合、生理食塩水が好ましい担体である。

10

【0106】

1つの実施形態において、組成物は単位投与形態である。このような形態では、組成物は、適切な量の活性成分を含む単位用量または複数用量に細分化することができる。単位投与形態は、密封されたバイアルまたはアンプルに包装された錠剤、カプセル、および粉末など、組成物の個別の量を含む包装された組成物であることができる。また、単位投与形態は、カプセル、注射バイアル、錠剤、カシエ剤、またはロゼンジそのもの、またはこれらのいずれかを適切な数だけ包装した形態であってよい。必要に応じて、組成物には、少量の湿潤剤、乳化剤、またはpH緩衝剤も含まれてよい。組成物は、使用直前に滅菌液体キャリア、例えば注射用水を加えるだけで、フリーズドライ（凍結乾燥）状態で保存してもよい。

20

【0107】

組成物の形態、投与経路、投与量および投与計画は、当然のことながら、治療する症状、病気の重症度、対象の年齢、体重、性別、希望する治療期間などによって異なる。本発明の組成物は、対象に投与する所望の方法に応じて、任意の適切な形態であってよい。

【0108】

1つの実施形態において、本発明の第4の態様の医薬組成物は、注射可能な製剤として薬学的に許容される賦形剤を含む。これらは、特に等張性、滅菌性、生理食塩水（リン酸一ナトリウムまたは二ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムまたは塩化マグネシウムなど、またはそのような塩の混合物）であってよく、あるいは、乾燥したものであり、特に凍結乾燥組成物であり、場合によっては滅菌水または生理食塩水を加えることで、注射液の構成が可能なものであってよい。

30

【0109】

本発明の組成物を調製するために、本発明の第1の態様による組換えオルソボックスウイルスベクターの有効量、または、本発明の第2の態様による細胞の有効量および本発明の第1の態様による2種以上のオルソボックスウイルスベクターの有効量は、薬学的に許容される担体または水性媒体に分散されてもよい。任意で、チェックポイント阻害剤をコードする核酸配列を含む組換えウイルスベクター、チェックポイント阻害剤をコードする核酸、またはチェックポイント阻害剤をさらに添加することができる。

40

【0110】

注射に適した薬剤形態としては、滅菌水溶液または分散液、ゴマ油、ピーナッツ油、または水性プロピレングリコールを含む製剤、および滅菌注射液または分散液を即時に調製するための滅菌粉末が挙げられる。いずれの場合も、製剤は滅菌されており、注射しやすい程度に流動性がある必要がある。製造および保管の条件下で安定しており、細菌や真菌などの微生物による汚染から保護されなければならない。活性化合物の遊離塩基または薬理的に許容される塩の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合した水中で調製することができる。分散液は、グリセロール、液体ポリエチレング

50

リコール、およびそれらの混合物、ならびに油中で調製することもできる。通常の保管および使用条件下では、これらの製剤には微生物の増殖を防ぐための防腐剤が含まれている。滅菌注射液は、必要に応じて、適切な溶媒に必要量の活性化化合物を上記に列挙した他のさまざまな成分とともに混合し、その後ろ過滅菌することによって調製される。一般的に、分散液は、基本的な分散媒体および上記に列挙した他の必要な成分を含む滅菌媒体に、さまざまな滅菌された有効成分を組み込むことによって調製される。無菌注射液の調製のための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、予め無菌濾過された溶液から有効成分と任意の追加成分の粉末を生成する真空乾燥および凍結乾燥技術である。

【0111】

本発明は、第4の態様において、医薬に使用するための、本発明の第1の態様の組換えオルソボックスウイルスベクター、本発明の第1の態様の組換えオルソボックスウイルスベクターを含む細胞、または本発明の第3の態様の組成物を提供する。

10

【0112】

本発明は、第5の態様において、がんの治療、改善または予防に使用するための、本発明の第1の態様の組換えオルソボックスウイルスベクター、本発明の第2の態様の細胞、または本発明の第3の態様の組成物を提供する。

【0113】

1つの実施形態によれば、がんは、乳がん、小腸がん、胃がん、腎臓がん、膀胱がん、子宮がん、卵巣がん、精巣がん、肺がん、結腸がん、前立腺がん、B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、またはホジキンリンパ腫である。

20

【0114】

本発明で想定される癌のさらなる非限定的な例としては、以下のものが挙げられる：副腎皮質癌、エイズ関連癌、エイズ関連リンパ腫、肛門癌、虫垂癌、星細胞腫、神経芽腫、基底細胞癌、胆管がん、骨がん、脳腫瘍、小脳星細胞腫、脳星細胞腫／悪性神経膠腫、上衣腫、髄芽腫、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、視覚路および視床下部神経膠腫、気管支腺腫、中枢神経系リンパ腫、小脳星細胞腫、子宮頸がん、皮膚T細胞リンパ腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、子宮内膜がん、上衣腫、食道がん、ユーイング肉腫、胚細胞腫瘍、胆嚢がん、胃がん、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、神経膠腫、頭頸部がん、心臓癌、肝細胞癌（肝臓がん）、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、眼内黒色腫、膵島細胞癌、カボジ肉腫、喉頭がん、口唇および口腔がん、脂肪肉腫、肝臓がん、非小細胞および小細胞肺がん、リンパ腫、マクログロブリン血症、骨の悪性線維性組織球腫／骨肉腫、髄芽腫、黒色腫、中皮腫、原発不明転移性扁平上皮癌、口腔癌、多発性内分泌腫瘍症候群、骨髄異形成症候群、鼻腔および副鼻腔癌、鼻咽頭癌、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺癌、口腔癌、中咽頭癌、骨肉腫／骨悪性線維性組織球腫、卵巣癌、卵巣上皮癌、卵巣胚細胞腫瘍、膵臓癌、膵臓癌膵島細胞、副鼻腔および鼻腔がん、副甲状腺がん、陰茎がん、咽頭がん、褐色細胞腫、松果体星細胞腫、松果体胚細胞腫、下垂体腺腫、胸膜肺芽腫、形質細胞腫瘍、原発性中枢神経系リンパ腫、直腸がん、腎細胞がん、腎盂尿管移行上皮がん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺癌、肉腫、皮膚癌、メルケル細胞癌、軟部肉腫、扁平上皮癌、T細胞リンパ腫、咽頭がん、胸腺腫、胸腺がん、甲状腺がん、絨毛性腫瘍（妊娠性）、原発部位不明のがん、尿道がん、子宮肉腫、膣がん、外陰がん、ワルデンシュトレーママクログロブリン血症、およびウィルムス腫瘍（腎芽腫）など。

30

40

【0115】

好ましい実施形態において、がんは固形腫瘍を含んでなる。この点で、リンパ腫は一般的に固形腫瘍とはみなされないが、リンパ節にリンパ腫のアクセス可能な固形腫瘍が形成される可能性がある。

【0116】

本明細書に記載の組換えオルソボックスウイルスベクターまたは組成物は、がんの治療を必要とする対象に治療有効量で投与することができる。典型的には、本発明の組換えオルソボックスウイルスベクターはウイルス粒子にパッケージ化された後、該粒子が腫瘍部位に送達される。例えば、組換えウイルスベクターが医薬組成物の有効成分として投与さ

50

れる場合、組換えウイルスまたはウイルス粒子の投与量は、ウイルスまたはウイルス粒子のプラーク形成単位（PFU）で表される。「プラーク形成単位」という用語は、単位体積あたりにプラークを形成できるウイルス粒子の量を指す。適切な量は、例えば $10^2 \sim 10^{14}$ PFU、好ましくは $10^5 \sim 10^{12}$ PFU、さらに好ましくは $10^6 \sim 10^{10}$ PFUである。本明細書に記載の組換えオルソボックスウイルスベクターまたは組成物は、複数回投与されてもよい。1回の治療サイクルは、毎日、毎週、隔週、または毎月の間隔で2回、3回、または4回の投与に相当する。完全な治癒を得るために治療サイクルを数回繰り返すことができる。

【0117】

本発明の第1の態様の組換えオルソボックスウイルスベクター、本発明の第2の態様の細胞、または本発明の第3および第4の態様の組成物の量は、使用される特定の化合物、製剤化される特定の組成物、適用方法、腫瘍のサイズと種類、および化合物の受容者に応じて変化する可能性があることを理解する必要がある。本発明の第1の態様の組換えオルソボックスウイルスベクター、本発明の第2の態様の細胞、または本発明の第3および第4の態様の組成物は、1回のみ投与してもよいし、繰り返し投与してもよい。

10

【0118】

適切な投与経路の1つは、滅菌溶液中にあるウイルス粒子を注射することによるものである。粒子は単独で投与されてもよい。ウイルス粒子を医薬組成物または製剤として提供することが好ましい。したがって、組成物は、好ましくは、ウイルス粒子、1つ以上の許容される担体、および任意で上記のような他の治療成分を含む。担体は、組成物または製剤の他の成分と適合性があり、その受取人に有害ではないという意味で「許容可能」でなければならない。

20

【0119】

1つの実施形態によれば、本発明の第1の態様の組換えオルソボックスウイルスベクター、本発明の第2の態様の細胞、または本発明の第3および第4の態様の組成物は、腫瘍組織に直接投与することができる。好ましい1つの実施形態によれば、本発明の第1の態様の組換えオルソボックスウイルスベクター、本発明の第2の態様の細胞、または本発明の第3および第4の態様の組成物は、手術前または手術中に直接注射するか、カテーテルで投与される。本発明の第1の態様の組換えオルソボックスウイルスベクター、本発明の第2の態様の細胞、または本発明の第3および第4の態様の組成物は、局所灌流、腫瘍内への直接投与、体腔内への直接投与（腔内投与）、例えば腹腔内注射によって投与することもできる。好ましくは、投与経路は、皮内注射または筋肉内注射などの非経口注射である。

30

【0120】

その他の投与経路としては、これらに限定されないが、局所、経口、経腸、鼻腔（すなわち鼻腔内）、吸入、髄腔内、直腸、膈内、眼内、結膜下、舌下、皮内、経皮、または非経口投与（皮下、経皮、静脈内、筋肉内、腫瘍内、リンパ節内、胸骨内、海綿体内、膀胱内、または尿道内への注射または注入などを含む）などが挙げられる。

【0121】

1つの実施形態によれば、組換えオルソボックスウイルスベクターおよびチェックポイント阻害剤をコードする核酸配列を含む組換えウイルスベクター、チェックポイント阻害剤をコードする核酸、またはチェックポイント阻害剤は、同時にまたは連続して投与される。例えば、組換えオルソボックスウイルスベクターおよびチェックポイント阻害剤をコードする核酸配列を含む組換えウイルスベクター、チェックポイント阻害剤をコードする核酸、またはチェックポイント阻害剤は、例えば数時間、毎日、毎週、毎月の間隔で、または対象の特定の必要性に応じて、連続的に投与することができる。特定の実施形態において、組換えオルソボックスウイルスベクターは、チェックポイント阻害剤をコードする核酸配列を含む組換えウイルスベクター、チェックポイント阻害剤をコードする核酸、またはチェックポイント阻害剤の投与の少なくとも1時間前、少なくとも2時間前、少なくとも3時間前、少なくとも4時間前、少なくとも5時間前、少なくとも6時間前、少なく

40

50

とも7時間前、少なくとも8時間前、少なくとも9時間前、少なくとも10時間前、または少なくとも12時間前、または少なくとも18時間前に投与される。他の特定の実施形態において、組換えオルソボックスウイルスベクターは、チェックポイント阻害剤をコードする核酸配列を含む組換えウイルスベクター、チェックポイント阻害剤をコードする核酸、またはチェックポイント阻害剤の投与の少なくとも1日前、少なくとも2日前、少なくとも3日前、少なくとも4日前、少なくとも5日前、少なくとも6日前、または少なくとも7日前に投与される。他の実施形態において、組換えオルソボックスウイルスベクターは、チェックポイント阻害剤をコードする核酸配列を含む組換えウイルスベクター、チェックポイント阻害剤をコードする核酸、またはチェックポイント阻害剤の投与の1～36日前に投与される。組換えオルソボックスウイルスベクターは、チェックポイント阻害剤をコードする核酸配列を含む組換えウイルスベクター、チェックポイント阻害剤をコードする核酸、またはチェックポイント阻害剤の投与の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、または36日前に投与することができる。さらに別の実施形態において、組換えオルソボックスウイルスベクターおよびチェックポイント阻害剤をコードする核酸配列を含む組換えウイルスベクター、チェックポイント阻害剤をコードする核酸、またはチェックポイント阻害剤は、それぞれ、それを必要とする対象に、1回以上（例えば、2回、3回、または4回）連続して投与される。

10

20

【0122】

本発明は、以下の実施例によって説明されるが、これらの実施例は単なる例示として解釈されるべきであり、本発明の範囲を制限するものではない。

【実施例】

【0123】

組換えオルソボックスウイルスベクターの調製

【0124】

本発明による発現カセットまたはプロモーターをウイルスゲノム、特にワクシニアウイルスのゲノム、最も好ましくはMVAのゲノムに挿入する方法は、当業者に公知である。1つの例として、本発明による発現カセットまたはプロモーターもしくはその誘導体は、相同組換えによってMVAのゲノムに挿入することができる。この目的のために、核酸は、一次鳥類細胞株または鳥類由来細胞株などの許容細胞株にトランスフェクトされるものであり、該核酸は、本発明の発現カセットまたはプロモーターまたはその誘導体が挿入されるMVAゲノムの領域と相同性のあるヌクレオチド配列に挟まれた本発明の発現カセットまたはプロモーターまたはその誘導体を含む。細胞はMVAに感染し、感染した細胞内で核酸とウイルスゲノムの間で相同組換えが起こる。あるいは、まず細胞をMVAで感染させ、次に核酸を感染細胞に導入することも可能である。次に、組換えMVAは、従来技術で知られている方法によって選択される。組換えMVAの構築は、この特定の方法に限定されない。代わりに、この目的のために、当業者に知られている任意の適切な方法を使用することができる。

30

40

【0125】

実施例1： MVA-IL12と抗PD1治療を組み合わせた腫瘍内治療は、チェックポイント阻害剤（CPI）に耐性のある腫瘍に非常に効果的であり、天然のp7.5プロモーター（配列番号17）と比較してより強い効果を発揮する合成プロモーター（SynE1）（配列番号18による）の制御下にある単鎖マウスIL-12（sc-mIL12）（配列番号37による）をコードするMVAが使用される（図1）。

【0126】

腫瘍を有するマウス（ルイス肺癌モデル、LLC）は、腹腔内（ip）に注入された抗PD1抗体と組み合わせて、合成初期プロモーターの制御下にあるIL12をコードするMVA（MVA-SynE1-IL12）または7.5プロモーターの制御下にあるMVA-IL12（MVA-7.5-IL12）を10⁶感染単位（ifu）の用量で腫瘍

50

内 (i t) に治療された。治療は腫瘍の体積に応じてランダムに分けられたマウスに対して 0 日目に開始された。M V A による治療は 0 日目、2 日目、4 日目に実施され、抗 P D 1 治療は 1 7 日目まで週 2 回実施された。腫瘍の成長は、3 ~ 4 日ごとにデジタルノギスを使用して経時的に測定された。腫瘍の体積は、 $0.5 \times \text{長さ} \times \text{幅}^2$ という式を使用して計算され、ここで、長さはより長い方の寸法である。結果は、I L - 1 2 をコードする M V A と抗 P D 1 を組み合わせた場合の治療効果は非常に強いことを示し、M V A - S y n E 1 - I L 1 2 および M V A - 7 . 5 - I L 1 2 のそれぞれで治療したマウスの 9 0 % と 6 2 . 5 % で腫瘍の退縮と治癒が観察され (図 1)、M V A - S y n E 1 - I L 1 2 のより強力な活性が強調されている。このモデルでは、抗 P D 1 治療のみでは効果がなかった。

10

【 0 1 2 7 】

実施例 2 : 腫瘍内 M V A - S y n E 1 - I L 1 2 の有効性は低用量でも維持される (図 2)。

【 0 1 2 8 】

腫瘍を有するマウス (ルイス肺癌モデル、L L C) は、腹腔内 (i p) に注入された抗 P D 1 抗体の存在下で、S y n E 1 合成初期プロモーターの制御下にある I L 1 2 をコードする M V A (M V A - S y n E 1 - I L 1 2) を 10^7 感染単位 (i f u) または 2×10^5 i f u の用量で腫瘍内 (i t) に治療された。両群のマウスとも、治療は腫瘍の体積に応じてランダムに分けられたマウスに対して 0 日目に開始された。M V A の注射は 2 日目と 4 日目に繰り返し、抗 P D 1 治療は 1 7 日目まで週 2 回実施した。結果は、M V A - S y n E 1 - I L 1 2 の投与量を減らした場合でも、効果的で強力な抗腫瘍効果があることを示す。

20

【 0 1 2 9 】

実施例 3 : M V A - S y n E 1 - I L 1 2 は単独治療としても有効である (図 3)

【 0 1 3 0 】

M V A - S y n E 1 - I L 1 2 単独療法の抗腫瘍効果を腫瘍を有するマウス (実施例 1 および 2 で報告されたものと同じ腫瘍モデルおよび治療法) において 10^7 感染単位 (i f u) または 2×10^5 i f u の用量で調査した。腫瘍体積 (mm^3) を経時的に測定したところ、抗 P D 1 治療を行わない場合でも、両用量で M V A - S y n E 1 - I L 1 2 の活性が実証された。

30

【 0 1 3 1 】

実施例 4 : I L 1 2 をコードするアデノウイルスベクターは腹膜がん症モデルでは効果がない (図 4)

【 0 1 3 2 】

M V A - S y n E 1 - I L 1 2 の活性を、異なるウイルスベクター、より具体的には C M V プロモーターの制御下にある A d 5 をコードする s c - m I L - 1 2 の活性と比較した。C T 2 6 (マウス大腸癌細胞) を B A L B C マウスの腹膜に注入した。3 日後 (0 日目)、合成初期プロモーター下で I L 1 2 をコードする M V A (M V A - S y n E 1 - I L 1 2) を 10^7 感染単位 (i f u) の用量で、または I L 1 2 をコードする A d 5 を同等の用量でマウスを治療した。治療は 2 日目と 4 日目に繰り返された。全体的な生存率は経時的にモニタリングされ、未治療の対照マウスの生存率と比較され、その結果、M V A - S y n E 1 - I L 1 2 による腹膜がん症の効率的な抑制が示されたが、A d - I L 1 2 では抑制されず、3 0 日目の生存率はそれぞれ 1 0 0 % と 1 0 % だった。

40

【 0 1 3 3 】

実施例 5 : アデノウイルスベクターと I L 1 2 をコードする M V A ベクターは、インビトロで同様のカーゴレベル (cargolevel) を発現する (図 5)。

【 0 1 3 4 】

I L 1 2 をコードする A d e n o または M V A によって生成された I L 1 2 の発現をインビトロで測定した。H e L a 細胞に、M V A - S y n E 1 - I L 1 2 または M V A - p 7 . 5 - I L 1 2、または A d 5 - I L 1 2 を 1 M O I (1 感染単位 / 細胞) で感染さ

50

せた。感染後24時間で上清を採取し、IL12 Elisaアッセイにかけたところ、3つのベクターすべてで同様の発現レベルが示された。

【0135】

実施例6：MVA-SynE1プロモーターは腫瘍に注入されると非常に高いIL12発現を促進する（図6）

【0136】

IL12をコードするAdenoまたはMVAによって生成された腫瘍内IL12のレベルを、マウスでのインビボ治療時に測定した。腫瘍を有するマウス（LLC腫瘍）は、IL12をコードするAdeno（Ad-IL12）、天然の7.5プロモーター下でIL12をコードするMVA（MVA-p7.5-IL12）、または合成初期プロモーター下でIL12をコードするMVA（MVA-SynE1-IL12）を 10^7 i.f.u.の用量で腫瘍内に単回注射して治療された。回収した腫瘍からのIL12の発現は、ELISAアッセイによって経時的に測定され、MVA-SynE1プロモーターはMVA-p7.5プロモーターよりも約50倍高い発現で非常に高いIL12発現を促進することが示された。Ad-IL12で治療した腫瘍由来のIL12レベルは非常に低かった（図6）。

10

【0137】

実施例7：MVA-SynE1プロモーターは腫瘍内で非常に高いIL12発現を促進するが、筋肉内では促進しない（図7）。

【0138】

MVA-SynE1-IL12によるインビボ治療において、筋肉と腫瘍におけるIL12の発現を測定した。マウスに、 10^7 i.f.u.のMVA-SynE1-IL12を所与の筋肉内または腫瘍内に単回注射した。腫瘍と筋肉からのIL12のレベルをELISAアッセイで測定したところ、MVA-SynE1プロモーターは腫瘍内で非常に高いIL12発現を促進するが、筋肉内では促進しないことが実証された（図7）。

20

【0139】

実施例8：MVA-SynE1-IL12による腫瘍内治療は、抑制性M2マクロファージのレベルを低下させ、炎症誘発性M1マクロファージの量を増加させることで、腫瘍微小環境を効率的にリプログラミングする（図8）。

【0140】

本実施例において、MVA-SynE1-IL12またはMVA mockベクターを用いたインビボ治療後のM1およびM2マクロファージの頻度を測定した。マウスにMVA-SynE1-IL12またはMVA mockを 10^7 i.f.u.の用量で3回連続して注射し、0日目、2日目、4日目に投与し、腫瘍を採取し、フローサイトメトリーアッセイでM1およびM2マクロファージのレベルを評価したところ、MVA mockはM2免疫抑制細胞を減らすことができるが、M1炎症誘発細胞を減らすことはできないことが実証された。M2の減少とM1の増加の同時発生は、MVA-SynE1-IL12による治療でのみ達成された（図8）。

30

【0141】

実施例9：MVA-SynE1-IL12単独および抗PD1療法との併用による腫瘍内（IT）治療は、チェックポイント阻害剤（CPI）に耐性のあるB16F10腫瘍に非常に効果的である。

40

【0142】

本実施例において、我々は、CPIの活性に対して耐性があることが知られているマウス腫瘍モデルであるB16F10モデルにおけるMVA-SynE1-IL12の治療効果を調査した。腫瘍を有するマウス（各群n=9）を、腹腔内（i.p.）に注入した抗PD1抗体の存在下で、SynE1合成初期プロモーターの制御下にあるIL12をコードするMVA（MVA-SynE1-IL12）を 6×10^5 i.f.u.の用量で腫瘍内（i.t.）に投与した。両群のマウスとも、腫瘍の体積に応じてランダムに分けられたマウスに対して、0日目に治療が開始された。MVAの注射は4日ごとに合計8回繰り返され、抗P

50

D 1 治療は 1 7 日目まで週 2 回実施した。結果は、抗 P D - 1 単独療法を受けた対照群と比較して、M V A - S y n E 1 - I L 1 2 単独または M V A - S y n E 1 - I L 1 2 と抗 P D - 1 との併用による治療で腫瘍の増殖が効果的に制御されることを示す（図 1 0）。

【 0 1 4 3 】

実施例 1 0 : M V A - S y n E 1 - I L 1 2 I T 免疫療法は、注入された腫瘍と注入されていない遠隔腫瘍の両方の腫瘍増殖を制御する。

【 0 1 4 4 】

M V A - S y n E 1 - I L 1 2 によって誘発されるアブスコパル抗腫瘍反応を試験するために、両側 M C 3 8 腫瘍移植モデルを使用して、M V A - S y n E 1 - I L 1 2 が注入されていない遠隔腫瘍に対して抗腫瘍活性を持つかどうかを評価した。腫瘍を有するマウスの 2 つの塊のうちの 1 つに、腹腔内投与（i p）された抗 P D 1 の存在下で、 6×10^5 i f u または 10^7 i f u の用量で M V A - S y n E 1 - I L 1 2 の腫瘍内注射を行った。抗 P D 1 と M V A - S y n E 1 - I L 1 2 の併用により、どちらの用量でも、注入した腫瘍の大部分で腫瘍の完全な退縮が見られた（図 1 1 a ~ c）。注射されていない遠隔腫瘍も、それぞれ 6×10^5 i f u と 10^7 i f u の投与量で、治療により動物の 5 0 % と 6 0 % で根絶され、M V A - S y n E 1 - I L 1 2 が遠隔部位でも癌の増殖を制御できることが強調された（図 1 1 d ~ f）。

【 0 1 4 5 】

実施例 1 1 : コンセンサス配列番号 1 または配列番号 3 を含む S y n E プロモーターの強力な初期インビトロ活性

【 0 1 4 6 】

本実施例では、P 7 . 5 プロモーターの初期活性を、コンセンサス配列番号 3 またはより一般化されたコンセンサス配列番号 1 を含む異なる初期要素を含む S y n E プロモーターと比較する：異なる後期エレメントと組合わされている、または組み合わせされていない、初期エレメント Early-A（配列番号 4 3）、Early-B（配列番号 4 4）、Early-C（配列番号 4 5）、または Early-D（配列番号 4 6）（図 1 2 a および b）。

【 0 1 4 7 】

この目的のために、H e L a 細胞は、ポックスウイルスプロモーター発現に必要なすべてのウイルス機能を提供するために M V A に感染させられ、さまざまなプロモーターの制御下で m I L 1 2 をコードするプラスミドがトランスフェクトされた。参照として、P 7 . 5 プロモーターの制御下にある m I L 1 2 をコードするプラスミドを使用した。DNA 複製阻害剤であるシトシン β -D-アラビノフラノシド（A r a C）を細胞に加え、中期および後期の M V A 遺伝子発現を阻害した。これにより、後期の発現をサポートするウイルス機能が存在しない場合でも、初期プロモーターのアクティビティのみを分析できる（Chakrabarti S., Sisler J.R., Moss B. Compact, synthetic, vacciniavirus early/late promoter for protein expression. Biotechniques.1997;23:1094-1097）。試験した S y n E プロモーターはすべて、P 7 . 5 と比較して、m I L 1 2 の初期発現をより高いレベル（2 倍以上）で促進する（図 1 2 c）。

【 0 1 4 8 】

図面の用語

Tumor volume 腫瘍体積

Days 日

Percent Survival 生存率

Untreated 未処理

secreted IL12 分泌された I L 1 2

Intratumoral IL12 levels 腫瘍内 I L 1 2 レベル

proteins タンパク質

hrs 時間

tumor vs muscle 腫瘍対筋肉

macrophages マクロファージ

% M2 gated on F480+ ゲーティングされた F 4 8 0 + 中の M 2 の %
% M1 gated on F480+ ゲーティングされた F 4 8 0 + 中の M 1 の %
Right tumor 右腫瘍
Left tumor 左腫瘍
early promoter activity 初期プロモーター活性
FOC compared to P7.5 P 7 . 5 と比較した F O C

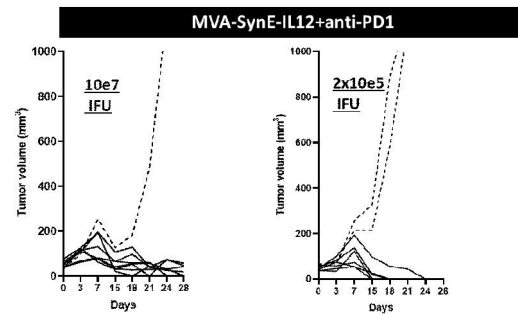
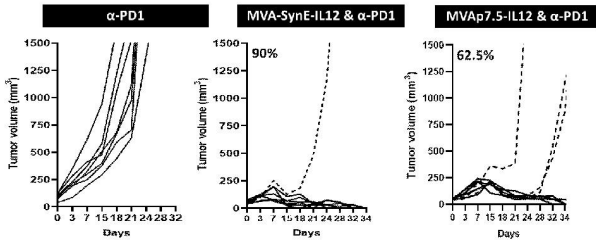
【図面】

【図 1】

【図 2】

Fig. 1

Fig. 2

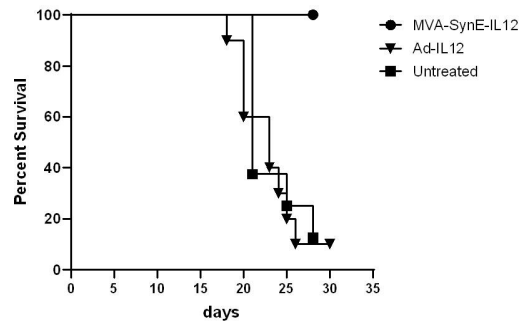
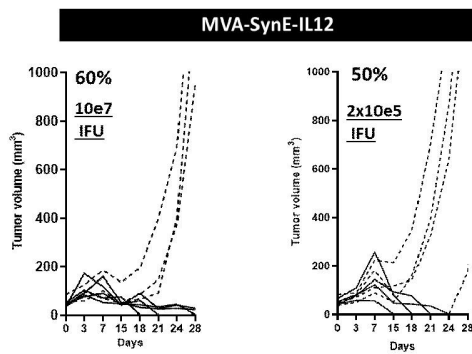


【図 3】

【図 4】

Fig. 3

Fig. 4



10

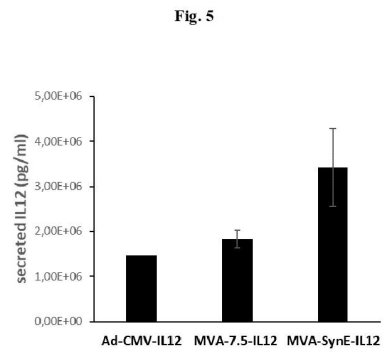
20

30

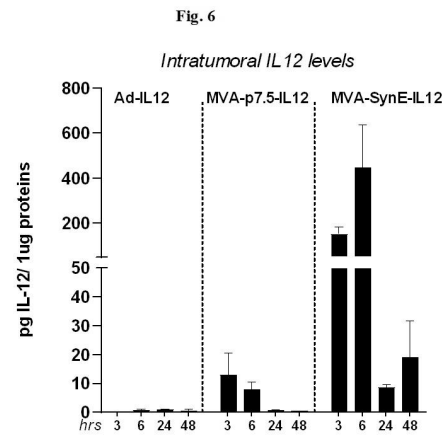
40

50

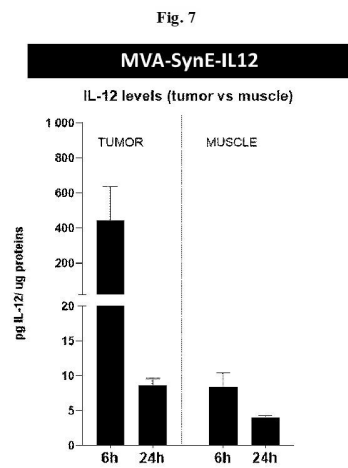
【 図 5 】



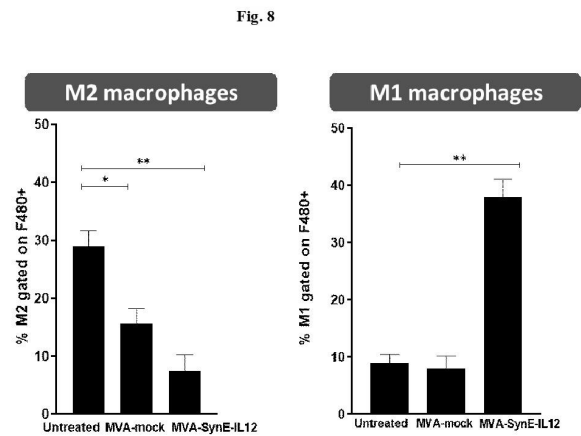
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



10

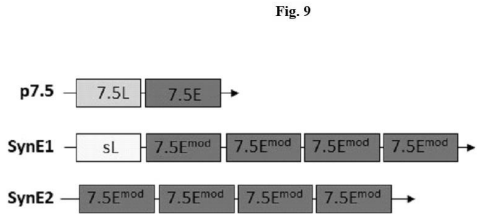
20

30

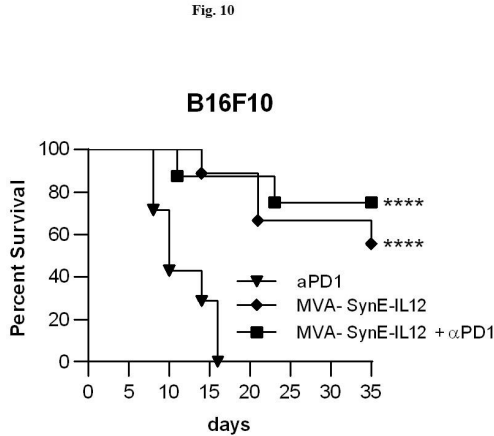
40

50

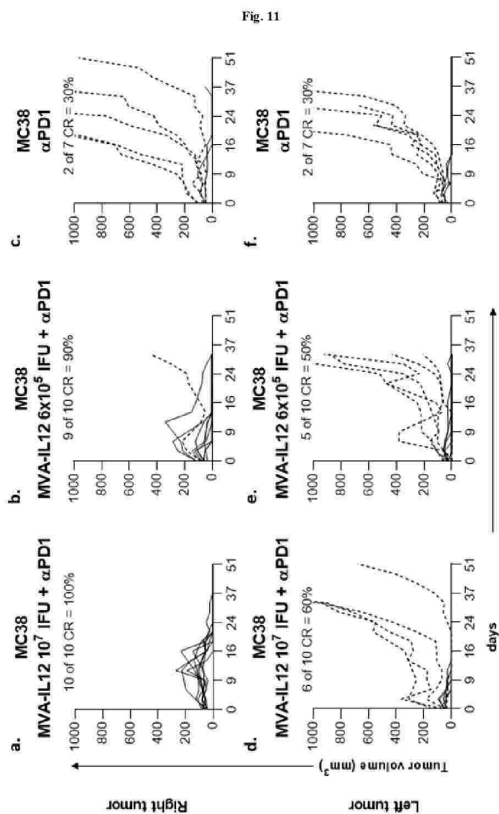
【 図 9 】



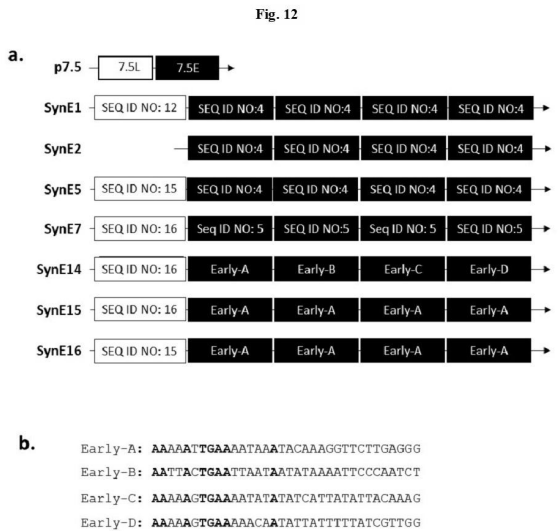
【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 - 1 】



10

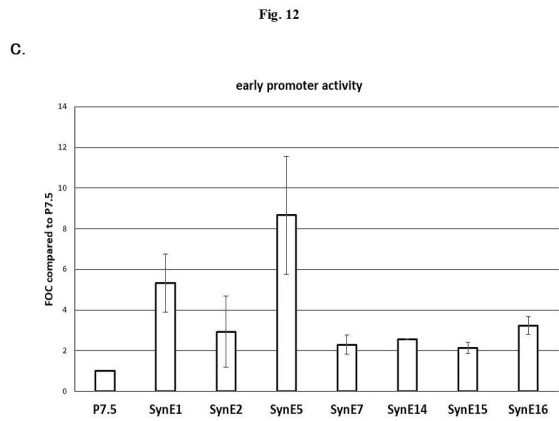
20

30

40

50

【 図 1 2 - 2 】



【 図 1 3 】

Fig. 13

```
<210> 1
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Consensus early promoter element

<220>
<221> misc_difference
<222> (3)..(3)
<223> N is A or T, preferably A

<220>
<221> misc_difference
<222> (4)..(4)
<223> N is A or T, preferably A

<220>
<221> misc_difference
<222> (6)..(6)
<223> N is C, G or T, preferably T

<220>
<221> misc_difference
<222> (11)..(11)
<223> N is A or T, preferably A

<220>
<221> misc_difference
<222> (12)..(12)
<223> N is A or T, preferably A

<220>
<221> misc_difference
<222> (13)..(13)
<223> N is A or T, preferably A

<220>
<221> misc_difference
<222> (14)..(14)
<223> N is C and A, preferably C

<220>
<221> misc_difference
<222> (15)..(15)
<223> N is A, C and T, preferably T

<400> 1
aennantgae nnnnna
```

10

20

30

40

50

【 配 列 表 】

2025503721000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/050917

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 C07K14/54 C07K14/52 A61P35/00 A61K38/20
C07K16/24 G01N33/569 C12N7/00

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61P A61K G01N C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/124274 A1 (OTTAWA HOSPITAL RES INST [CA]; TURNSTONE BIOLOGICS CORP [US]) 25 June 2020 (2020-06-25) [0006], [0008], [0031], [0039], [0049], [0122], [00269], [00349], [00454], [00529], [0017], [0111], [0011], [00110], [00595], [00675], [00677], [00522], [00281], [00148], [00649], [00149], [00652], [00150], [00154]-[00156], [00654], [00663], [00665]-[00668], [00671]-[00672], [00152]-[00153], [00656], [00659], [00721], [00241]; sequences 563, 568, 584 ----- --/--	1-15

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 April 2023

Date of mailing of the international search report

25/04/2023

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Landré, Julien

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/050917

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/100292 A2 (GENELUX CORP [US]; FRENTZEN ALEXA [US] ET AL.) 21 August 2008 (2008-08-21) p. 9, 1st , p. 14, 2nd , p. 25, 2nd , p. 68, penultimate -last , p. 82, 1st , p. 83, penultimate , p. 100, 2nd , p. 6, 2nd , p. 71, penultimate , p. 81, last , p. 5, 1st , p. 51, 2nd -penultimate , p. 8, 2nd , p. 49, 2nd , p. 97, penultimate , p. 11, 2nd , p. 11, 3rd , p. 112, last , p. 113, 2nd , p. 7, 1st , p. 12, 2nd -p. 13, 1st , p. 22, 2nd , p. 13, 2nd ; sequence 35 -----	1-3, 5-9, 11-14
Y	WO 2010/102822 A1 (BAVARIAN NORDIC AS [DK]; BRINKMANN KAY [DE] ET AL.) 16 September 2010 (2010-09-16) the whole document -----	1-15
Y	WO 2019/134048 A1 (BELL JOHN C [CA]; LE BOEUF FABRICE [CA] ET AL.) 11 July 2019 (2019-07-11) the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2023/050917

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/050917

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020124274 A1	25-06-2020	AU 2019404639 A1	12-08-2021
		AU 2019410148 A1	12-08-2021
		BR 112021011730 A2	31-08-2021
		BR 112021012078 A2	31-08-2021
		CA 3124287 A1	25-06-2020
		CA 3124301 A1	25-06-2020
		CL 2021001646 A1	18-02-2022
		CN 113454231 A	28-09-2021
		CN 113661246 A	16-11-2021
		CO 2021009354 A2	19-11-2021
		EC SP21053474 A	18-11-2021
		EP 3898997 A1	27-10-2021
		EP 3898998 A1	27-10-2021
		IL 284180 A	31-08-2021
		IL 284188 A	31-08-2021
		JP 2022514420 A	10-02-2022
		JP 2022516006 A	24-02-2022
		KR 20210132002 A	03-11-2021
		KR 20210132003 A	03-11-2021
		PE 20212307 A1	10-12-2021
		PH 12021551436 A1	06-12-2021
		SG 11202106460X A	29-07-2021
		TW 202039851 A	01-11-2020
		US 2022056480 A1	24-02-2022
		US 2022380799 A1	01-12-2022
		WO 2020124273 A1	25-06-2020
		WO 2020124274 A1	25-06-2020
WO 2008100292 A2	21-08-2008	EP 2097517 A2	09-09-2009
		EP 2415783 A1	08-02-2012
		EP 2426142 A2	07-03-2012
		US 2009053244 A1	26-02-2009
		US 2009098529 A1	16-04-2009
		US 2009155287 A1	18-06-2009
		US 2011293527 A1	01-12-2011
		US 2013273007 A1	17-10-2013
		US 2015175976 A1	25-06-2015
		US 2018195050 A1	12-07-2018
		WO 2008100292 A2	21-08-2008
WO 2010102822 A1	16-09-2010	AU 2010223524 A1	07-07-2011
		BR PI1009138 A2	08-03-2016
		CA 2751301 A1	16-09-2010
		CN 102341120 A	01-02-2012
		EA 201171128 A1	30-08-2012
		EP 2405939 A1	18-01-2012
		EP 3456349 A1	20-03-2019
		HK 1161677 A1	03-08-2012
		JP 6130876 B2	17-05-2017
		JP 2012520061 A	06-09-2012
		JP 2015180216 A	15-10-2015
		KR 20110129954 A	02-12-2011
		MX 355366 B	17-04-2018
		MY 156997 A	15-04-2016
		NZ 593525 A	21-12-2012
		SG 172115 A1	28-07-2011
		SG 10201400593V A	27-06-2014
		US 2010233203 A1	16-09-2010

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No	
Information on patent family members				PCT/EP2023/050917	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
		WO	2010102822 A1	16-09-2010	
		ZA	201106655 B	23-12-2014	

WO 2019134048	A1	11-07-2019	AU	2019205036 A1	20-08-2020
			BR	112020013769 A2	01-12-2020
			CA	3122431 A1	11-07-2019
			CN	113039277 A	25-06-2021
			EP	3735466 A1	11-11-2020
			IL	275813 A	31-08-2020
			JP	2021510082 A	15-04-2021
			KR	20200121297 A	23-10-2020
			SG	11202006457Y A	28-08-2020
			US	2020392535 A1	17-12-2020
			WO	2019134048 A1	11-07-2019

フロントページの続き

(51)国際特許分類 F I テーマコード (参考)

A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	

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

弁理士 中島 彩夏

(74)代理人 100231647

弁理士 千種 美也子

(72)発明者 コトゥグノ, ガブリエラ

イタリア共和国, 8 0 1 2 6 ネイブルズ, ヴィア ポ 1 0

(72)発明者 スカルセッリ, エリサ

イタリア共和国, 0 0 1 4 7 ローム, ビア メロピア 7 8

(72)発明者 モレナ ダリーゼ, アンナ

イタリア共和国, 0 0 1 4 4 ローム, ビア ナンチノ 4 8

(72)発明者 ラーム, アルミン

イタリア共和国, 0 0 1 5 3 ロム, 1 8, ピアッツァ サンタ マリア リベラトリス

(72)発明者 レオニ, グイド

イタリア共和国, 0 0 1 4 4 ローム, ヴィア ディ デシマ 2 5 6

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA95X AB01 BA30 CA24 CA44

4C084 AA13 AA22 MA02 NA05 NA14 ZB261 ZB262 ZC751 ZC752

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA05 NA14 ZB26 ZC75