

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-536109

(P2024-536109A)

(43)公表日 令和6年10月4日(2024.10.4)

(51)国際特許分類		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K 38/20	4 C 0 8 4
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	4 C 0 8 5
A 6 1 K	35/761 (2015.01)	A 6 1 K 35/761	4 C 0 8 7
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全35頁)	最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-518987(P2024-518987)	(71)出願人	524115338
(86)(22)出願日	令和4年10月4日(2022.10.4)		ティルト バイオセラピューティクス オ ーワイ
(85)翻訳文提出日	令和6年4月18日(2024.4.18)		フィンランド国, 0 0 2 9 0 ヘルシン キ, トゥクホルマンカトゥ 8 ピー, バ イオメディカム 2 ピー内
(86)国際出願番号	PCT/FI2022/050662	(74)代理人	100114775
(87)国際公開番号	WO2023/057687		弁理士 高岡 亮一
(87)国際公開日	令和5年4月13日(2023.4.13)	(74)代理人	100121511
(31)優先権主張番号	20216026		弁理士 小田 直
(32)優先日	令和3年10月4日(2021.10.4)	(74)代理人	100202751
(33)優先権主張国・地域又は機関	フィンランド(FI)		弁理士 岩堀 明代
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100208580
			弁理士 三好 玲奈
		(74)代理人	100191086
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 インターロイキン - 7 (I L - 7) ポリペプチドをコードする腫瘍溶解性ウイルスベクター

(57)【要約】

本発明は、導入遺伝子としてインターロイキン7 (I L - 7) ポリペプチドまたはその変異体をコードする核酸配列を含む腫瘍溶解性アデノウイルスベクターを提供する。本発明はまた、前記腫瘍溶解性ベクターならびに以下：生理学的に許容可能な担体、緩衝液、賦形剤、アジュバント、添加物、消毒剤、防腐剤、充填剤、安定剤および/または増粘剤の少なくとも1つを含む医薬組成物を提供する。本発明の特定の目的は、癌または腫瘍、好ましくは固形腫瘍の処置における使用のための前記腫瘍溶解性ウイルスベクターまたは医薬組成物を提供することである。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

導入遺伝子としてインターロイキン7 (I L - 7) ポリペプチドまたはその変異体をコードする核酸配列を含む、腫瘍溶解性アデノウイルスベクターであって、前記腫瘍溶解性アデノウイルスベクターのバックボーンが、アデノウイルス血清型3 (A d 3) のファイバーノブを有するアデノウイルス血清型5 (A d 5) バックボーンである、腫瘍溶解性アデノウイルスベクター。

【請求項 2】

インターロイキン7 (I L - 7) ポリペプチドまたはその変異体をコードする前記核酸配列が、前記腫瘍溶解性アデノウイルスベクターのE3領域内における欠失した核酸配列の場所にある、請求項1に記載の腫瘍溶解性アデノウイルスベクター。

10

【請求項 3】

前記E3領域における核酸配列の前記欠失が、ウイルスg p 1 9 kおよび6 . 7 kリーディングフレームの欠失である、請求項2に記載の腫瘍溶解性アデノウイルスベクター。

【請求項 4】

前記腫瘍溶解性アデノウイルスベクターの前記アデノウイルスE1配列における24bp欠失 (2 4) を含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性アデノウイルスベクター。

【請求項 5】

A d 5 / 3 - E 2 F - d 2 4 バックボーンを含む、請求項1から4のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性アデノウイルスベクター。

20

【請求項 6】

前記構造A d 5 / 3 - E 2 F - d 2 4 - I L - 7 を有する、請求項5に記載の腫瘍溶解性アデノウイルスベクター。

【請求項 7】

さらなる導入遺伝子をコードする核酸配列を含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性アデノウイルスベクター。

【請求項 8】

前記さらなる導入遺伝子が、サイトカインをコードする、請求項7に記載の腫瘍溶解性アデノウイルスベクター。

30

【請求項 9】

前記サイトカインが：T N F アルファ、インターフェロンアルファ、インターフェロンベータ、インターフェロンガンマ、補体C 5 a、C D 4 0 L、I L - 1 2、I L - 2 3、I L - 2 1、I L - 1 5、I L - 1 7、I L - 1 8、I L - 2、C C L 1、C C L 1 1、C C L 1 2、C C L 1 3、C C L 1 4 - 1、C C L 1 4 - 2、C C L 1 4 - 3、C C L 1 5 - 1、C C L 1 5 - 2、C C L 1 6、C C L 1 7、C C L 1 8、C C L 1 9、C C L 2、C C L 2 0、C C L 2 1、C C L 2 2、C C L 2 3 - 1、C C L 2 3 - 2、C C L 2 4、C C L 2 5 - 1、C C L 2 5 - 2、C C L 2 6、C C L 2 7、C C L 2 8、C C L 3、C C L 3 L 1、C C L 4、C C L 4 L 1、C C L 5 (= R A N T E S)、C C L 6、C C L 7、C C L 8、C C L 9、C C R 1 0、C C R 2、C C R 5、C C R 6、C C R 7、C C R 8、C C R L 1、C C R L 2、C X 3 C L 1、C X 3 C R、C X C L 1、C X C L 1 0、C X C L 1 1、C X C L 1 2、C X C L 1 3、C X C L 1 4、C X C L 1 5、C X C L 1 6、C X C L 2、C X C L 3、C X C L 4、C X C L 5、C X C L 6、C X C L 7、C X C L 8、C X C L 9、C X C R 1、C X C R 2、C X C R 4、C X C R 5、C X C R 6、C X C R 7およびX C L 2 からなるリストから選択される、請求項8に記載の腫瘍溶解性アデノウイルスベクター。

40

【請求項 10】

前記サイトカインが、T N F アルファまたはI L - 1 5 である、請求項9に記載の腫瘍溶解性アデノウイルスベクター。

【請求項 11】

50

請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性アデノウイルスベクターならびに以下：生理学的に許容可能な担体、緩衝液、賦形剤、アジュバント、添加物、消毒剤、防腐剤、充填剤、安定剤および/または増粘剤の少なくとも 1 つを含む、医薬組成物。

【請求項 1 2】

癌または腫瘍、好ましくは固形腫瘍の処置における使用のための、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性アデノウイルスベクターまたは請求項 1 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載の癌または腫瘍の処置における使用のための腫瘍溶解性アデノウイルスベクターまたは医薬組成物であって、前記癌または腫瘍が、鼻咽腔癌、滑膜癌、肝細胞癌、腎臓癌 (renal cancer)、結合組織の癌、黒色腫、肺癌、腸癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、脳癌、咽喉癌、口腔癌、肝臓癌、骨癌、膵臓癌、絨毛癌、ガストリノーマ、褐色細胞腫、プロラクチノーマ、T 細胞白血病/リンパ腫、神経腫、フォン・ヒッペル・リンドウ病、ゾリンジャー・エリソン症候群、副腎癌、肛門癌、胆管癌、膀胱癌、尿管癌、乏突起神経膠腫、神経芽腫、髄膜腫、脊髄腫瘍、骨癌、骨軟骨腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、原発部位不明の癌、カルチノイド、消化管のカルチノイド、線維肉腫、乳癌、パジェット病、子宮頸癌、食道癌、胆嚢癌、頭部癌、眼癌、頸部癌、腎臓癌 (kidney cancer)、ウィルムス腫瘍、カポジ肉腫、前立腺癌、精巣癌、ホジキン氏病、非ホジキンリンパ腫、皮膚癌、中皮腫、多発性骨髄腫、卵巣癌、内分泌性膵臓癌、グルカゴノーマ、副甲状腺癌、陰茎癌、下垂体癌、軟部肉腫、網膜芽細胞腫、小腸癌、胃癌 (stomach cancer)、胸腺癌、甲状腺癌、栄養膜癌、胞状奇胎、子宮癌、子宮内膜癌、膣癌、外陰癌、聴神経腫瘍、菌状息肉症、インスリノーマ、カルチノイド症候群、ソマトスタチン産生腫瘍、歯肉癌、心臓癌、口唇癌、髄膜癌、口腔癌 (mouth cancer)、神経癌、口蓋癌、耳下腺癌、腹膜癌、咽頭癌、胸膜癌、唾液腺癌、舌癌および扁桃腺癌からなる群より選択される、腫瘍溶解性アデノウイルスベクターまたは医薬組成物。

【請求項 1 4】

養子細胞治療用組成物と一緒に用いる、請求項 1 2 または 1 3 に記載の癌の処置における使用のための腫瘍溶解性アデノウイルスベクターまたは医薬組成物。

【請求項 1 5】

免疫チェックポイント阻害剤と一緒に用いる、請求項 1 2 から 1 4 のいずれか一項に記載の癌または腫瘍の処置における使用のための腫瘍溶解性アデノウイルスベクターまたは医薬組成物。

【請求項 1 6】

前記免疫チェックポイント阻害剤が、PD-L1 または PD1 に選択的に結合する、請求項 1 5 に記載の癌または腫瘍の処置における使用のための腫瘍溶解性アデノウイルスベクターまたは医薬組成物。

【請求項 1 7】

PD-L1 または PD-1 に選択的に結合する前記免疫チェックポイント阻害剤が：BMS-936559、LY3300054、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、エンパフォリマブ、コシベリマブ、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、シンチリマブ、チスレリズマブ、スパルタリズマブ、トリパリマブ、ドスタリマブ、INCMA00012 および AMP-514 からなる群より選択される、請求項 1 6 に記載の癌の処置における使用のための腫瘍溶解性アデノウイルスベクターまたは医薬組成物。

【請求項 1 8】

放射線療法、モノクローナル抗体、化学療法、小分子阻害剤 (small molecular inhibitor)、ホルモン療法または対象への他の抗癌剤もしくは介入と一緒に用いる、請求項 1 2 から 1 7 のいずれか一項に記載の癌の処置における使用のための腫瘍溶解性アデノウイルスベクターまたは医薬組成物。

【請求項 1 9】

免疫チェックポイント阻害剤と一緒に用いる、請求項 12 から 17 のいずれか一項に記載の癌の処置における使用のための腫瘍溶解性アデノウイルスベクターまたは医薬組成物であって、前記アデノウイルスベクターが、前記構造 Ad5 / 3 - E2F - d24 - IL - 7 を有しており、前記免疫チェックポイント阻害剤が、PD - L1 または PD - 1 に選択的に結合する、腫瘍溶解性アデノウイルスベクターまたは医薬組成。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生命科学および医学の分野に関する。具体的には、本発明は、ヒトの癌治療に関する。より具体的には、本発明は、インターロイキン - 7 (IL - 7 または IL7) ポリペプチドをコードする核酸配列を含む腫瘍溶解性ウイルスベクターに関する。 10

【背景技術】

【0002】

IL - 7 は、免疫細胞の拡大および増殖に關与する主要なサイトカインの 1 つである。その主な機能は、ナイーブ T 細胞およびメモリー T 細胞の生存ならびにそれらの多様性を維持することである。IL - 7 は、T 細胞活性化の負の調節因子の抑制を介する T 細胞のエフェクター機能を改善することができ、IFN 産生を高めることができる (Rosenberg et al. 2006)。逆に、IL - 7 は、いくつかの機構を介する免疫抑制経路を拮抗する。制御性 T 細胞の活性化を防止し、エフェクター細胞を抑制するそれらの能力を阻害する (Pellegrini et al. 2012)。さらに、IL - 7 は、T 細胞の増殖の阻害を廃止し、それらの消耗を防止する (Heninger et al. 2012)。 20

【0003】

組換え IL - 7 は、前臨床実験では期待できる結果を示したが、第 I 相臨床試験では、オフターゲット毒性が、用量制限毒性を引き起こした。16 人のうち 1 人の患者のみが、腫瘍反応を起こしていた (Sportes et al. 2010)。

【0004】

従来技術において、Huang et al. 2021 は、IL - 7 をコードする腫瘍溶解性アデノウイルスベクターを開示しており、そのベクターのバックボーンは、アデノウイルス血清型 5 である。このベクターを膠芽腫の処置のために養子細胞療法 (ACT) と組み合わせて使用した。この処置は、担癌マウスの生存の延長につながった。しかし、著者らは、研究の 1 つの主要な制限が、マウス由来膠芽腫細胞に感染するのを妨げる、IL - 7 がロードされた腫瘍溶解性アデノウイルスベクターの設計であると述べている。確かに、この研究で使用されたアデノウイルスベクターは、すべての腫瘍細胞で発現しない CXAR 受容体を通して細胞に入る。 30

【0005】

Nakao et al. 2020 は、IL - 7 および IL - 12 遺伝子の両方を保持する腫瘍特異的ワクシニアウイルスベクターを開示する。ベクターは、抗 PD - 1 および抗 CTLA4 抗体と組み合わせて使用されて、マウスモデルにおける対側性腫瘍を処置し、腫瘍退縮をもたらす。しかし、著者らは、チェックポイント阻害剤が、ワクシニアウイルスの複製を妨げる可能性があるとして述べている。 40

【0006】

長年の開発の末、腫瘍溶解性ウイルスは、現在、癌の治療剤として使用され始めている。ウイルスの有効性に影響を及ぼす作用機序および要因に関する発見があったが、ウイルス療法に対する全体的な反応を決定する経路を同定する必要性が依然としてある。臨床試験において、腫瘍溶解性ウイルスは、好ましい安全性プロファイルおよび有望な有効性を示している。

【0007】

国際公開第 2014170389 号は、単独または治療的使用のための治療用組成物を一緒に用いる腫瘍溶解性アデノウイルスベクターおよび癌のための治療法に関する。例え 50

ば、養子細胞治療用組成物および腫瘍溶解性アデノウイルスベクターの個別投与が開示される。養子細胞療法 (therapiess) は、癌を処置するためだけでなく、感染症および移植片対宿主疾患などの他の疾患を処置するための強力なアプローチである。養子細胞移植は、免疫学的機能性および移植の特性を移植する目的で、エクスピボで増殖した細胞、最も一般的には免疫由来細胞の宿主への受動移入である。国際公開第 2014170389 号はまた、腫瘍溶解性アデノウイルスベクターの核酸配列を開示する。

【0008】

国際公開第 2016146894 号は、二重特異性モノクローナル抗体をコードする腫瘍溶解性アデノウイルスベクターを開示する。

【0009】

欧州特許第 3858369 号明細書は、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスと免疫チェックポイント阻害剤との併用による癌治療に関する。ウイルスは、2つのインターロイキン、IL-7 および IL-12 をコードし、免疫チェックポイント阻害剤とともに投与されて、抗腫瘍効果をさらに改善する。

【0010】

癌患者にとって、特に大きな転移負荷を有する患者における腫瘍溶解性ウイルス治療を改善する余地が依然としてある。腫瘍溶解性ウイルスの活性に関連する経路のさらなる特性評価は、ウイルス療法の有効性を改善するための潜在的な標的を明らかにする可能性がある。そのため、単独でまたは他の療法と一緒に腫瘍溶解性ウイルスベクターの有効性は、依然として改善される可能性がある。本発明は、特異的ウイルスベクターを利用することにより、例えば養子細胞療法および/または免疫チェックポイント阻害剤を用いる、癌治療剤にとっての効率的なツールおよび方法を提供する。

【発明の概要】

【0011】

本発明の目的は、癌処置における腫瘍溶解性アデノウイルスの使用に見られる制限を克服することである。したがって、本発明の目的は、効果がなく、危険で予測できない癌治療の問題を克服するための簡単な方法およびツールを提供することである。本発明の実施形態において、癌治療のための新規のアプローチおよび手段が、このように提供される。本発明の目的は、独立請求項で述べられているものにより特徴づけられている特異的ウイルスベクター、方法および配置により達成される。本発明の特定の実施形態は、従属請求項に開示されている。

【0012】

具体的には、本発明は、導入遺伝子としてインターロイキン 7 (IL-7) ポリペプチドをコードする核酸配列を含む腫瘍溶解性アデノウイルスベクターを提供する。本発明はまた、前記腫瘍溶解性ベクターならびに以下：生理学的に許容可能な担体、緩衝液、賦形剤、アジュバント、添加物、消毒剤、防腐剤、充填剤、安定剤および/または増粘剤の少なくとも一つを含む医薬組成物を提供する。本発明の特定の目的は、癌または腫瘍、好ましくは固形腫瘍の処置における使用のための前記腫瘍溶解性ウイルスベクターまたは医薬組成物を提供することである。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図 1】インビトロでの Ad5/3-E2F-d24-IL7 の機能性。(A) E2F ブロモーター；E1A 内の 24 塩基対の欠失；E3 領域内で挿入されたヒト IL7 導入遺伝子；および Ad5 ファイバー内の Ad3 血清型ノブを含有するキメラ 5/3 腫瘍溶解性アデノウイルスの図式提示。(B) 上皮腺癌 (A549) および横紋筋肉腫 (RD) における感染後 4 日目で 1 個、10 個、100 個または 1000 個のウイルス粒子 (VP) / 細胞の添加後の相対的なヒト癌細胞生存率。Ad5/3-E2F-d24-IL7 および Ad5/3-E2F-d24 の腫瘍細胞致死能間に大きな差異は観察されず、したがって、IL7 導入遺伝子の存在が、ヒト癌細胞における Ad5/3-E2F-d24-IL7 の腫瘍溶解力を低下させないことを示唆した。モックと比較した統計的有意性は、* p < 0

10

20

30

40

50

. 05、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、および**** $p < 0.0001$ として表される。(C) ハムスター肺癌 (HT100) およびハムスター平滑筋肉腫 (DDT1-MF2) における感染後5日目または、ハムスター膵臓癌 (HapT1) における感染後8日目で100、1000、5000または10000 VP / 細胞の添加後の相対的なハムスター癌細胞生存率。Ad5 / 3 - E2F - d24 - IL7 および Ad5 / 3 - E2F - d24 の細胞致死能間に大きな差異はなく、したがって、IL7 導入遺伝子の存在が、ハムスター癌細胞における Ad5 / 3 - E2F - d24 - IL7 の腫瘍溶解力を低下させないことを示唆した。モックと比較した統計的有意性は、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、および**** $p < 0.0001$ として表される。(D) IL7 発現を、トランスフェクト癌細胞から分析した。1000 VP / 細胞の感染後 (A549 および RD) または10000 VP / 細胞の感染後 (HT100 および DDT1 - MF2) 3日目に回収された細胞上清で、IL7 濃度を測定した。分析により、Ad5 / 3 - E2F - d24 - hIL7 が、多数の癌細胞株においてIL7 の発現を誘導することができることが示された。(E) A549 細胞株の1000 VP / 細胞の感染後に測定されたIL7 の生理活性。上清を濾過し、増殖培地で希釈して、IL7 依存性マウス細胞株 2E8 に適用した。組換えマウスIL7 (rmIL7) およびマウスIL7 (rhIL7) を、20 ng / ml で対照として使用した。これらのデータは、Ad5 / 3 - E2F - d24 - IL7 での感染で癌細胞により産生されたIL-7 が、機能的であることを示唆する。三連で実行されたインビトロのデータセットおよびすべてのデータを、平均 ± SEM と示す

10

【図2】インビボでの Ad5 / 3 - E2F - d24 - IL7 の有効性。(A) PBS、Ad5 / 3 - E2F - d24 または Ad5 / 3 - E2F - d24 - IL7 ウイルスで処置された実験群からの30日目までの腫瘍増殖。腫瘍体積を、0日目に対して正規化した。データを、中央値 + 範囲として表す。正規化された腫瘍体積からの統計的有意性は、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、および**** $p < 0.0001$ として表される。Ad5 / 3 - E2F - d24 - IL7 での処置により、実験対照 (非武装化 (unarmed) ウイルス (Ad5 / 3 - D24 - E2F) およびモック) と比べて腫瘍体積の有意な減少が引き起こされ、したがって最良の抗腫瘍効果を与えた。(B) 腫瘍分解物における免疫関連遺伝子発現の変化。全RNAを、腫瘍組織から単離し、その後、cDNA 合成および定量的リアルタイムPCRを行った。PCRを二連で実行し、データをモックに対して正規化した。データは、平均 + SEMとして表される。Ad5 / 3 - E2F - d24 - IL7 処置を受けた腫瘍は、モック処置動物と比べて免疫関連遺伝子の増加した転写を示し、IL-7 をコードするウイルスが、優れた局所的免疫活性化を誘導することができることを示唆した。

20

30

【図3】エクスビボの腫瘍培養での癌患者における溶解能力およびIL7 武装化 (armed) アデノウイルスの複製 (A) 卵巣 (HUSOV4 および OvCaS) ならびに頭頸部 (HUSHN11) 癌患者からの腫瘍分解物の生存率を、100 VP / 細胞での腫瘍溶解性ウイルスの感染後の異なる日に評価した。細胞生存率データを、非感染モックに対して正規化する。実験を、三連で実行した。統計的有意性は、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、および**** $p < 0.0001$ として表される。ほとんどの癌患者試料において Ad5 / 3 - E2F - d24 - IL7 および Ad5 / 3 - E2F - d24 の腫瘍細胞致死能間に大きな差異は観察されず、IL7 導入遺伝子の存在が、癌患者の腫瘍培養において Ad5 / 3 - E2F - d24 - IL7 の腫瘍溶解力を低下させないことを示唆した。(B) 卵巣 (HUSOV4 および OvCaS) ならびに頭頸部 (HUSHN11 および HUSHN10) 試料からの定量的リアルタイムPCRを通じた Ad5 / 3 複製評価。ウイルスのコピー数を、試料中のゲノムDNAの量に対して正規化し、ヒト - アクチンの発現量により決定した。PCRを、二連で実行した。データから、経時的な Ad5 / 3 - E2F - d24 および Ad5 / 3 - E2F - d24 - IL7 の間のウイルスDNAレベルの同様のパターンが示され、IL-7 導入遺伝子が、ウイルス複製を妨げないことを示唆した。(C) サイトカインビーズアレイ (CBA) アッセイにより測定された、卵巣 (HUSOV4 および OvCaS) ならびに頭頸部 (HUSHN15 および

40

50

H U S H N 1 7) 試料からの上清における I L 7 タンパク質濃度。実験を、三連で実行した。これにより、I L - 7 が、A d 5 / 3 - E 2 F - d 2 4 - I L 7 で感染させたヒト癌患者の試料で生成されることが示唆される。データはすべて、平均 + S E M として表される。

【図 4】腫瘍微小環境におけるサイトカインおよびケモカインの評価。腫瘍溶解性アデノウイルスの M O I 1 0 0 での感染 3 日後に卵巣癌試料 H U S O V 4、H U S O V 5 および O v C a S から得られた (A) 炎症性サイトカイン、(C) 抗炎症性サイトカインおよび (E) ケモカインのレベル。プールされた (B) 炎症性および (D) 抗炎症性の変化ならびに (F) 炎症性サイトカインの抗炎症性サイトカインに対する全体比率。炎症性サイトカインおよびケモカインの含有量の増加は、対照と比べて、ヒト癌患者の試料の微小環境を免疫刺激に良好に分極化させる、I L - 7 ウイルスの能力を示す。さらに、I L - 7 ウイルス処置ウェルでは、抗炎症性サイトカイン含有量における一般的な最小の影響または減少が観察された。データはすべて、モックに対して正規化された。すべての実験を、三連で実行し、得られるデータは、平均 + S E M として表される。統計的有意性は、* p < 0 . 0 5、** p < 0 . 0 1、*** p < 0 . 0 0 1、および **** p < 0 . 0 0 0 1 として表される。

【図 5】卵巣癌エクスピボ試料 (H U S O V 4 および O v C a S) における、浸潤 C D 4 + および C D 8 + T 細胞の活性化ならびに細胞傷害の評価。(A) C D 4 + および C D 8 + 細胞集団における、C D 6 9 + 細胞の頻度。(B) C D 4 + および C D 8 + 細胞での活性化受容体 C D 6 9 の発現量 (M F I、平均蛍光強度として指定される)。(C) H U S O V 4 試料における、パーフォリンおよびグランザイム B を発現する C D 4 + および C D 8 + 細胞の頻度。(D) O v C a S 試料における、パーフォリンおよびグランザイム B を発現する C D 4 + および C D 8 + 細胞の頻度。全体では、データは、A d 5 / 3 - E 2 F - d 2 4 - h I L 7 を用いる患者由来の卵巣のエクスピボ腫瘍培養の処置が、T 細胞亜集団を活性化し、その頻度を高めることを示唆している。すべてのフローサイトメトリー実験を、二連で行い、得られるデータは、平均 + S E M として表される。統計的有意性は、* p < 0 . 0 5、** p < 0 . 0 1 として表される。

【図 6】A d 5 / 3 - E 2 F - d 2 4 - I L 7 (T I L T - 5 1 7) および免疫チェックポイント阻害剤 (抗 P D 1 および抗 P D - L 1) で処理された患者由来の腎細胞癌 (R C C) 試料 (H U S R e n c a 5) の相対的な癌細胞生存率。(A) 1 日目、2 日目、3 日目、4 日目、および 5 日目での、H U S R e n c a 5 腫瘍細胞の全体的な細胞生存率。M T S アッセイにより評価された (B) 2 日目および (C) 5 日目の腫瘍細胞致死の詳細な視点。(B) および (C) において、試料は、左から右に：モック、T I L T - 5 1 7、抗 P D - 1、抗 P D - L 1、T I L T - 5 1 7 + 抗 P D - 1、T I L T - 5 1 7 + 抗 P D - L 1 であり；* p < 0 . 0 5、** p < 0 . 0 1 および *** p < 0 . 0 0 1 である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

インターロイキン 7 (I L - 7) およびその変異体

本明細書で使用されるように、「I L - 7」または「I L 7」は、天然か組換えかを問わず、野生型 I L - 7 アイソフォーム 1 ポリペプチド、または前記ポリペプチドをコードする核酸 (すなわち遺伝子) を意味する。成熟ヒト I L - 7 は、1 5 2 のアミノ酸配列として存在する (シグナルペプチドなし、追加の 2 5 の N 末端アミノ酸からなる)。ヒト I L - 7 のアミノ酸配列 (配列番号 1) は、アクセッション番号 N P _ 0 0 0 8 7 1 . 1 下、ジェンバンクで見つけられる。その最も広い意味では、用語「I L - 7」または「I L 7」はまた、癌治療に適した I L - 7 変異体のいずれかを指す場合がある。

【0015】

本明細書で使用されるように、「I L - 7 変異体」、「変異体 I L - 7」、「v I L 7」または「v I L - 7」は、ポリペプチドまたは前記ポリペプチドをコードする核酸 (すなわち遺伝子) を意味し、ここで、インターロイキン - 7 ポリペプチドに対する置換などの特定の変化または修飾が行われるかまたは見出されている。用語「ポリペプチド」は、

本明細書において、その長さまたは翻訳後修飾（例えば、グリコシル化またはリン酸化）に関係なく、アミノ酸残基のいずれかの鎖を指す。変異体 IL-7 ポリペプチドはまた、天然の IL-7 ポリペプチド鎖の 1 つもしくは複数の部位または他の残基でのアミノ酸の挿入、欠失、置換および修飾により特徴づけることができる。そのような挿入、欠失、置換および修飾はいずれも、結果的に、好ましくは癌治療のための IL-7 変異体の特性を改善する意図で受容体サブユニット IL-7 R またはその構成成分への修飾された結合を示す、変異体 IL-7 となる場合がある。代表的な変異体は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 またはそれより多いアミノ酸の置換を含むことができる。変異体はまた、IL-7 の他の位置（すなわち、変異体の活性または二次構造もしくは三次構造に対して最小限の効果を有する位置）で、保存的修飾および置換を含む場合がある。IL-7 変異体はまた、天然のアイソフォームを含む場合がある（Vudattu et al. 2008）。天然の IL-7 アイソフォーム前駆体のための配列は、アクセッション番号 NP_001186815.1（アイソフォーム 2）、NP_001186816.1（アイソフォーム 3）および NP_001186817.1（アイソフォーム 4）下、ジェンバンクで見つけることができるが、アイソフォーム 1 の配列と比較して、アイソフォーム 2 は、77 ~ 120 位で 44 - アミノ酸欠失を有し、アイソフォーム 3 は、121 ~ 138 位で 18 - アミノ酸欠失を有し、アイソフォーム 4 は、76 ~ 138 位で 62 - アミノ酸欠失を有する。

10

【0016】

代表的な変異体 IL-7 ポリペプチドは、配列番号 1 により表されるポリペプチドが IL-7 R を結合する親和性よりも高いまたは低いといった、変更された親和性を有する IL-7 R を結合する配列番号 1 と少なくとも約 80% 同一であるアミノ酸配列を含む。代表的な変異体 IL-7 ポリペプチドは、野生型 IL-7 と少なくとも約 50%、少なくとも約 65%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 87%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% 同一であり得る。変異体ポリペプチドは、アミノ酸残基の数または含有量における変化を含むことができる。例えば、変異体 IL-7 は、野生型 IL-7 よりも、より多いまたはより少ないアミノ酸残基の数を有することができる。あるいは、またはさらに、代表的な変異体ポリペプチドは、野生型 IL-7 に存在する 1 つまたは複数のアミノ酸残基の置換を含有することができる。

20

30

【0017】

別の実施形態において、IL-7 ポリペプチドはまた、IL-7 ポリペプチドおよび別の異種ポリペプチドを含む融合ポリペプチドまたはキメラポリペプチドとして調製され得る。IL-7 および抗体またはその抗原結合部分を含むキメラポリペプチドを生成することができる。キメラタンパク質の抗体または抗原結合成分は、標的化部分として機能することができる。例えば、キメラタンパク質を細胞または標的分子の特定のサブセットに局所化するために使用され得る。

【0018】

本発明は、特に、導入遺伝子として上述の IL-7 ポリペプチドのいずれかをコードする核酸配列を含む腫瘍溶解性ウイルスベクターの設計に向けられる。

40

【0019】

ウイルスベクター

腫瘍溶解性ウイルスベクターは、癌細胞に選択的に感染し、複製し、破壊することができる、治療的に有用な抗癌ウイルスである。最新の腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍選択性があるように適応されるかまたは設計されるが、癌細胞を自然に好む性質があるレオウイルスおよびムンプスウイルスなどのウイルスがある。多くの遺伝子操作された腫瘍溶解性ウイルスベクターは、腫瘍特異的プロモーター要素を利用して、癌細胞においてのみ自律増殖可能になる。癌細胞により選択的に発現された表面マーカーはまた、ウイルス侵入のための受容体として使用することにより、標的化され得る。アデノウイルス、レオウイルス、麻疹、単純ヘルペスウイルス、ニューキャッスル病ウイルスおよびワクシニアウイルス

50

を含む多数のウイルスは、現在、腫瘍溶解剤として臨床試験されている。

【0020】

好ましくは、本発明で使用される腫瘍溶解性ベクターは、ヒトまたは動物を処置するのに適したアデノウイルスベクターである。本明細書で使用されるように、「腫瘍溶解性アデノウイルスベクター」は、正常な細胞に対して腫瘍における選択的複製により癌細胞に感染し、死滅させることができるアデノウイルスベクターを指す。本明細書で使用されるように、表現「アデノウイルス血清型5 (Ad5) 核酸バックボーン」は、Ad5のゲノムを指す。同様に、「アデノウイルス血清型3 (Ad3) 核酸バックボーン」は、Ad3のゲノムを指す。「Ad5/3ベクター」は、Ad5およびAd3ベクターの両方の部分を含むまたはそれを有するキメラベクターを指す。

10

【0021】

本発明の一実施形態において、アデノウイルスベクターは、ヒトウイルスのベクターである。具体的には、アデノウイルスベクターは、Ad5/3ベクターである。一実施形態においてバックボーンは、Ad3ファイバーノブをさらに含むAd5核酸バックボーンである。換言すると、構築物は、Ad3由来のファイバーノブを有するが、ゲノムの残りの部分またはその残りの大部分は、Ad5由来である（例えば、国際公開第2014170389号を参照されたい）。

【0022】

アデノウイルスベクターは、当技術分野で既知のいずれかの方法、例えば任意のウイルス領域を欠失、挿入、突然変異または修飾することにより改変されている場合がある。ベクターは、複製に関して腫瘍特異的に作られている。例えば、アデノウイルスベクターは、腫瘍特異的プロモーターの挿入（例えばE1を駆動するため）、領域の欠失（例えば、「24」、E3/gp19k、E3/6.7kで使用されるE1の定常領域2）および1つまたは複数の導入遺伝子の挿入などの、E1、E3および/またはE4における改変を含む場合がある。

20

【0023】

特定の実施形態において、一般的にアデノウイルスベクターの複製を支援することが既知であるE1B 19K遺伝子は、国際公開第2020249873号に記載されるように、本ベクター内に無効な欠失dE1B 19Kを有する。

【0024】

腫瘍特異的腫瘍溶解性アデノウイルスの生成のための1つのアプローチは、E1の定常領域2 (CR2) に影響する、24塩基対 (bp) の欠失（「24」または「d24」）を設計することである。野生型アデノウイルスにおいて、CR2は、合成 (S) 期、すなわちDNA合成期または複製期の誘導のための細胞性Rb腫瘍抑制剤/細胞周期レギュレータータンパク質を結合する役割を担う。pRbとE1Aとの間の相互作用は、E1Aタンパク質保存領域のアミノ酸121~127を必要とする。ベクターは、Heise C. et al. (2000, Nature Med 6, 1134-1139) およびFueyo J. et al. (2000, Oncogene 19(1): 2-12) にしたがって、そのベクターのアミノ酸122~129に対応するヌクレオチドの欠失を含む場合がある。「24」を有するウイルスは、G1-Sチェックポイントを克服する能力が低下しており、すべてではないにしても、ほとんどのヒト腫瘍を含む、この相互作用が必要ではない細胞、例えば、Rb-p16経路内に欠陥のある腫瘍細胞でのみ効率的に複製することが知られている。本発明の一実施形態において、ベクターは、アデノウイルスE1のRb結合定常領域2における24bpの欠失（「24」または「d24」）を含む。

30

40

【0025】

また、E1A内在性ウイルスプロモーターを、例えば腫瘍特異的プロモーターにより置き換えることも可能である。例えば、E2F1（例えばAd5ベースのベクター内）またはhTERT（例えばAd3ベースのベクター内）プロモーターは、E1A内在性ウイルスプロモーターの代わりに利用され得る。このベクターは、E1Aの腫瘍特異的発現のた

50

めの E 2 F 1 プロモーターを含む場合がある。E 1 A プロモーターもまた、欠失され得る。

【 0 0 2 6 】

E 3 領域は、エクスビポのウイルス複製に必須ではないが、E 3 タンパク質は、宿主免疫応答の調節において、すなわち、自然免疫応答および適応免疫応答の両方の阻害において、重要な役割がある。本発明の一実施形態において、腫瘍溶解性アデノウイルスベクターの E 3 領域における核酸配列の欠失は、ウイルス g p 1 9 k および 6 . 7 k リーディングフレームの欠失である。E 3 における g p 1 9 k / 6 . 7 k の欠失は、アデノウイルス E 3 A 領域由来の 9 6 5 塩基対の欠失を指す。得られるアデノウイルス構築物において、g p 1 9 k および 6 . 7 k 遺伝子は両方とも欠失している (Kaner va A et al . 2 0 0 5 , Gene Therapy 1 2 , 8 7 - 9 4) 。 g p 1 9 k 遺伝子産物は、小胞体における主要組織結合性複合体 I (M H C 1 、 ヒトの H L A 1 として既知) 分子を結合し、分離すること、および細胞傷害性 T リンパ球により、感染した細胞の認識を妨げることが知られている。多くの腫瘍で H L A 1 / M H C 1 が不足しているため、g p 1 9 k の欠失は、ウイルスの腫瘍選択性を高める (ウイルスは、正常細胞からは野生型ウイルスよりも早く除去されるが、腫瘍細胞では差がない) 。 6 . 7 k タンパク質は、細胞表面に発現し、それらは、リガンド (T R A I L) 受容体 2 を含む T N F 関連アポトーシスのダウンレギュレーションに関与している。

10

【 0 0 2 7 】

本発明の一実施形態において、導入遺伝子、すなわちインターロイキン 7 (I L 7) をコードする遺伝子は、E 3 プロモーター下で g p 1 9 k / 6 . 7 k 欠失 E 3 領域に配置される。これは、腫瘍細胞に対する導入遺伝子の発現を制限し、ウイルスの複製およびその後続く E 3 プロモーターの活性化を可能にする。特定の実施形態において、インターロイキン 7 をコードする核酸配列は、ウイルス g p 1 9 k および 6 . 7 k リーディングフレームの欠失した核酸配列の場所に挿入される。本発明の別の実施形態において、E 3 g p 1 9 k / 6 . 7 k は、ベクター内に維持されるが、1 つまたは多くの他の E 3 領域は、欠失している (例えば、E 3 9 k D a 、 E 3 1 0 . 2 k D a 、 E 3 1 5 . 2 k D a および / または E 3 1 5 . 3 k D a) 。

20

【 0 0 2 8 】

E 3 プロモーターは、当技術分野で既知の任意の外来性 (例えば、C M V または E 2 F プロモーター) または内在性プロモーター、具体的には、内在性 E 3 プロモーターであり得る。E 3 プロモーターは、主に複製により活性化されるが、いくらかの発現は、E 1 が発現される場合に生じる。2 4 タイプのウイルスの選択性が、E 1 発現後に生じる (E 1 が R b を結合することができない場合) のため、これらのウイルスは、形質導入された正常細胞でも E 1 を発現する。したがって、腫瘍細胞に対して E 3 プロモーターが媒介する導入遺伝子発現を制限するために、E 1 発現も調節することは極めて重要である。

30

【 0 0 2 9 】

本発明の特定の実施形態は、複製が、二重選択性デバイス：定常領域 2 で突然変異しているアデノウイルス E 1 A 遺伝子の前に配置された E 2 F (例えば E 2 F 1) 腫瘍特異的プロモーターにより網膜芽細胞腫 (R b) / p 1 6 経路に制限されている腫瘍溶解性アデノウイルスベクター (例えば A d 5 / A d 3 ベクター) を含み、そのため、得られる E 1 A タンパク質は、細胞で R b を結合することができない。さらに、ファイバーは、5 / 3 キメリズムにより修飾されており、腫瘍細胞への効率的な侵入を可能にする。

40

【 0 0 3 0 】

本発明の特定の実施形態において、腫瘍溶解性アデノウイルスベクターは：

- 1) アデノウイルス E 1 の R b 結合定常領域 2 における 2 4 b p の欠失 (2 4) ；
- 2) ウイルス g p 1 9 k および 6 . 7 k リーディングフレームの核酸配列の欠失；ならびに
- 3) ポイント 2) で定義された欠失した核酸配列の代わりに、インターロイキン 7 (I L 7) 導入遺伝子をコードする核酸配列

50

を含む。

【0031】

以下の実験セクションにおいて、Ad5/3-E2F-d24バックボーンに基づいて腫瘍溶解性アデノウイルスを構築し、特徴づけ、IL7でそれを武装化(armed)した。ウイルスは、E2FプロモーターおよびE1A定常領域2における24塩基対の欠失(「D24」)を有しており、rb/p16経路欠陥細胞においてのみ、その複製を可能にするが、これはすべての癌細胞に共通の特徴の1つである。E1B領域は、癌細胞アポトーシス(dE1B 19K)を誘導するために欠失している。さらに、癌細胞に形質導入し、その抗腫瘍効果を強化するその能力を改善するため、ウイルスは、血清型3由来のファイバーノブを特徴とするが、ゲノムの残りは、血清型5に由来する。最も重要なことには、Ad5/3ウイルスは、ヒトでの良好な安全性プロファイルを有する。好ましくは、IL-7で武装化(armed)された腫瘍溶解性ウイルスは、潜在的なプラットフォームとして、T細胞併用療法またはチェックポイント阻害剤とともに使用され、現在不治の固形腫瘍を安全で効果的に処置する。特に、T細胞が機能障害性である腫瘍の種類は、処置されることが好ましい。

10

【0032】

一実施形態において、本発明は、インターロイキン7(IL7)導入遺伝子をコードする核酸配列を含む腫瘍溶解性ウイルスベクター、好ましくは腫瘍溶解性アデノウイルスベクターに向けられる。

【0033】

好ましい実施形態において、腫瘍溶解性アデノウイルスベクターのバックボーンは、アデノウイルス血清型5(Ad5)または血清型3(Ad3)核酸バックボーンである。

20

【0034】

より好ましい実施形態において、インターロイキン7(IL7)導入遺伝子をコードする前記核酸配列は、前記腫瘍溶解性アデノウイルスベクターのE3領域で欠失した核酸配列の場所にある。最も好ましくは、E3領域における核酸配列の欠失は、ウイルスgp19kおよび6.7kリーディングフレームの欠失である。

【0035】

別の好ましい実施形態において、ベクターはまた、前記腫瘍溶解性アデノウイルスベクターのアデノウイルスE1配列における24bpの欠失(24)を含む。

30

【0036】

別の好ましい実施形態において、ベクターはまた、E1B(dE1B 19K)の無効化欠失を含む。

【0037】

別の好ましい実施形態において、ベクターはまた、Ad5/3ファイバーノブを含む。

【0038】

別の好ましい実施形態において、ベクターは、さらなる導入遺伝子をコードする核酸配列を含む。より好ましくは、さらなる導入遺伝子は、サイトカインをコードする。一実施形態において、サイトカインは：TNFアルファ、インターフェロンアルファ、インターフェロンベータ、インターフェロンガンマ、補体C5a、CD40L、IL-2、IL-12、IL-23、IL-21、IL-15、IL-17、IL-18、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14-1、CCL14-2、CCL14-3、CCL15-1、CCL15-2、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23-1、CCL23-2、CCL24、CCL25-1、CCL25-2、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL3L1、CCL4、CCL4L1、CCL5(=RANTES)、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCR10、CCR2、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCRL1、CCRL2、CX3CL1、CX3CR、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CX

40

50

C L 7、C X C L 8、C X C L 9、C X C R 1、C X C R 2、C X C R 4、C X C R 5、C X C R 6、C X C R 7 および X C L 2 からなるリストから選択される。

【 0 0 3 9 】

より好ましい実施形態において、サイトカインは、T N F アルファまたは I L - 1 5 である。

【 0 0 4 0 】

本発明で使用されるウイルスベクターはまた、上述以外の他の修飾を含む場合がある。追加の成分または修飾はいずれも、場合によっては使用され得るが、本発明に必須ではない。

【 0 0 4 1 】

外来性の要素の挿入は、標的細胞におけるベクターの効果を高める場合がある。外来性の組織または腫瘍特異的プロモーターの使用は、組換えベクターにおいて一般的であり、それらもまた、本発明で使用することができる。

【 0 0 4 2 】

養子細胞療法

本発明の1つのアプローチは、癌と反応して癌を破壊することができる免疫エフェクター細胞の移動を使用する、癌を有する患者のための処置の開発である。腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) などの単離された免疫エフェクター細胞は、培地中で大量に増殖され、患者に注入される。本発明において、インターロイキン7 (I L 7) 導入遺伝子をコードする腫瘍溶解性ベクターは、免疫エフェクター細胞の影響を高めるために利用され得る。本明細書で使用されるように、「養子細胞療法の有効性を高めること」は、本発明の腫瘍溶解性ベクターが、養子細胞治療用組成物と一緒に使用される場合、養子細胞治療用組成物単独の治療効果と比較して、対象においてより強い治療効果を引き起こすことができる状況を指す。本発明の特定の実施形態は、対象における癌を処置する方法であり、この方法は、本発明の腫瘍溶解性ベクターの、対象への投与を含み、前記方法は、養子細胞治療用組成物の、対象への投与をさらに含む。養子細胞治療用組成物および本発明のベクターは、別個に投与される。養子細胞治療用組成物およびアデノウイルスベクターの個別投与の前に、骨髄除去または非骨髄除去のプレコンディショニング化学療法および/または放射線照射が行われる場合がある。養子細胞療法の処置は、患者における癌を縮小または除去することを目的とする。

【 0 0 4 3 】

本発明の特定の実施形態は、アデノウイルスベクターおよび養子細胞治療用組成物、例えば腫瘍浸潤リンパ球 (T I L)、T細胞受容体 (T C R) 修飾リンパ球またはキメラ抗原受容体 (C A R) 修飾リンパ球を用いる療法に関する。T細胞療法、特にナチュラルキラー (N K) または C A R - N K 細胞療法などの任意の他の養子細胞療法も、本発明において使用される場合がある。確かに、本発明によれば、養子細胞治療用組成物は、例えば T I L 療法における未修飾細胞、または遺伝子組換え細胞を含む場合がある。腫瘍特異的標的へのT細胞の遺伝子ターゲティングを達成するための2つの一般的な方法がある。1つは、既知の抗原特異性を有する、ヒト白血球抗原 (H L A、げっ歯類において主要な組織結合性複合体として既知) 型が一致したT細胞受容体 (T C R) の移動である。もう1つは、キメラ抗原受容体 (C A R) などの人工受容体を用いる細胞の修飾である。このアプローチは、H L A に依存しておらず、標的分子に関してより柔軟である。例えば、一本鎖抗体を使用することができ、C A R は、共刺激ドメインを組み込むこともできる。しかし、C A R 細胞の標的は、標的細胞の膜上にある必要があるが、T C R 修飾は、細胞内標的を使用することができる。

【 0 0 4 4 】

本明細書で使用されるように、「養子細胞治療用組成物」は、養子細胞移植に適した細胞を含む任意の組成物を指す。本発明の一実施形態において、養子細胞治療用組成物は、T I L、T C R (すなわち異種T細胞受容体) 修飾リンパ球および C A R (すなわちキメラ抗原受容体) 修飾リンパ球からなる群より選択される細胞型を含む。本発明の別の実施

10

20

30

40

50

形態において、養子細胞治療用組成物は、T細胞、CD8+細胞、CD4+細胞、NK細胞、樹状細胞、ガンマ-デルタT細胞、制御性T細胞および末梢血単核細胞からなる群より選択される細胞型を含む。別の実施形態において、TIL、T細胞、CD8+細胞、CD4+細胞、NK細胞、ガンマ-デルタT細胞、制御性T細胞または末梢血単核細胞は、養子細胞治療用組成物を形成する。本発明の特定の一実施形態において、養子細胞治療用組成物は、T細胞を含む。本明細書で使用されるように、「腫瘍浸潤リンパ球」またはTILは、血流から出て、腫瘍に移動した白血球を指す。リンパ球は、B細胞、T細胞およびNK細胞を含む3つの群に分割され得る。本発明の別の特定の実施形態において、養子細胞治療用組成物は、標的特異的CARまたは特別に選択されたTCRで修飾されているT細胞を含む。本明細書で使用されるように、「T細胞」は、CD4+ヘルパー細胞、CD4+細胞傷害性細胞、CD8+細胞傷害性T細胞、ガンマ-デルタT細胞およびNK T細胞を含むCD3+細胞を指す。

10

【0045】

適切な細胞に加えて、本発明で使用される養子細胞治療用組成物は、薬学的に許容される担体、緩衝液、賦形剤、アジュバント、添加物、消毒剤、充填剤、安定剤および/もしくは増粘剤、ならびに/または対応する製品に通常見られる任意の成分などの任意の他の薬剤を含む場合がある。組成物を配合するための適切な成分および適切な製造方法の選択は、当業者に一般的な知識に属している。

【0046】

養子細胞治療用組成物は、投与に適した固体、半固体または液体の形態などの任意の形態であり得る。製剤は、液剤、乳剤、懸濁剤、錠剤、ペレット剤およびカプセル剤からなる群より選択され得るがこれらに限定されない。組成物は、ある特定の製剤に限定されない；代わりに、組成物は、任意の既知の薬学的に許容される製剤に配合される可能性がある。医薬組成物は、当技術分野で既知の従来のプロセスのいずれかにより生成され得る。

20

【0047】

本発明の腫瘍溶解性アデノウイルスベクターと養子細胞治療用組成物との組み合わせは、腫瘍溶解性アデノウイルスベクターおよび養子細胞治療用組成物を、別個の組成物としてではなく一緒に使用することを指す。本発明の腫瘍溶解性アデノウイルスベクターおよび養子細胞治療用組成物が、1つの組成物として使用されないことは、当業者には明らかである。確かに、アデノウイルスベクターは、養子細胞を直接修飾するために使用されることはないが、標的腫瘍を修飾するために使用され、そのため、腫瘍は、細胞移植の望ましい影響をより受けやすい。特に、本発明は、養子移植の腫瘍へのリクルートメントを促進し、その活性をそこで高める。本発明の特定の実施形態において、組み合わせの腫瘍溶解性アデノウイルスベクターおよび養子細胞治療用組成物は、同時にまたは連続して、任意の順序で、対象に投与するためのものである。

30

【0048】**免疫チェックポイント阻害剤**

免疫チェックポイントタンパク質は、特定のリガンドと相互作用して、シグナルをT細胞に送り、T細胞機能を阻害する。癌細胞は、それらの表面上でのチェックポイントタンパク質の高レベルの発現を促進することによりこれを利用し、それによって制癌免疫応答を抑制する。

40

【0049】

本明細書に記載の免疫チェックポイント阻害剤(CPIまたはICIとも呼ばれる)は、免疫チェックポイントタンパク質の機能を阻害することができる任意の化合物である。阻害には、機能の低下および完全遮断が含まれる。特に、免疫チェックポイントタンパク質は、ヒトチェックポイントタンパク質である。したがって、免疫チェックポイント阻害剤は、好ましくはヒト免疫チェックポイントの阻害剤である。

【0050】

免疫チェックポイントタンパク質には、CTLA-4、PD-1(ならびにそのリガンドであるPD-L1およびPD-L2)、B7-H3、B7-H4、HVEM、TIM3

50

、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、BTLA、TIGITおよび/またはIDOが含まれるがこれらに限定されない。LAG3、BTLA、B7-H3、B7-H4、TIM3およびKIRが関与する経路は、CTLA-4およびPD-1依存経路と同様の免疫チェックポイント経路を構成することが当該技術分野で認識されている。免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4、PD-1（ならびにそのリガンドであるPD-L1およびPD-L2）、B7-H3、B7-H4、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、BTLA、TIGITおよび/またはIDOの阻害剤であり得る。いくつかの実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-L1またはPD-1の阻害剤である。好ましくは、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-L1に選択的に結合する、より好ましくは：BMS-936559、LY3300054、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、エンパフォリマブ、コシベリマブおよびアベルマブからなる群より選択されるモノクローナル抗体、またはPD-1に選択的に結合する、より好ましくは：ペムブロリズマブ、ニボルマブ、センプリマブ、シンチリマブ、チスレリズマブ、スパルタリズマブ、トリパリマブ、ドスタリマブ、INCMGA00012、AMP-514からなる群より選択されるモノクローナル抗体である。

10

【0051】

いくつかの実施形態において、組み合わせの免疫チェックポイント阻害剤は、抗体である。本明細書で使用される用語「抗体」は、例えば標的免疫チェックポイントまたはエピトープを結合することができる（例えば、抗原結合部分を保持することができる）、天然に存在する抗体および改変抗体ならびに完全長抗体またはそれらの機能性フラグメントもしくはそれらの類縁体を包含する。本明細書に記載の方法による使用のための抗体は、ヒト、ヒト化、動物またはキメラを含むがこれらに限定されない任意の起源に由来してもよく、IgG1またはIgG4アイソタイプが好ましいがどのようなアイソタイプであってもよく、さらにグリコシル化されていてもグリコシル化されていなくてもよい。抗体という用語には、抗体が本明細書に記載の結合特異性を示す限り、二重特異性抗体または多重特異性抗体も含まれる。

20

【0052】

癌

本発明の組換えベクターは、腫瘍細胞内で自律増殖可能である。本発明の一実施形態において、ベクターは、Rb-経路、具体的にはRb-p16経路に欠陥がある細胞内で自律増殖可能である。これらの欠陥のある細胞には、動物およびヒトにおけるすべての腫瘍細胞が含まれる。本明細書で 사용되는ように、「Rb-経路における欠陥」は、その経路の任意の遺伝子またはタンパク質における突然変異および/または後成的変化を指す。これらの欠陥のため、腫瘍細胞は、E2Fを過剰発現し、したがって、通常、効果的な複製に必要とされるE1ACR2によるRbの結合は不要である。さらなる選択性は、Rb/p16経路欠損細胞において見られるように、自由なE2Fの存在下でのみ活性化するE2Fプロモーターにより媒介される。自由なE2Fがないと、E1Aの転写は生じず、ウイルスは複製しない。E2Fプロモーターの包含は、E3プロモーターからの導入遺伝子の発現を可能にすることによって、直接的にも間接的にも毒性を引き起こす可能性があるE1Aが正常組織において発現することを防止するために重要である。

30

40

【0053】

本発明は、対象における癌を処置するためのアプローチに関する。本発明の一実施形態において、対象は、ヒトまたは哺乳動物、具体的には哺乳動物またはヒト患者、より具体的には癌に罹患したヒトまたは哺乳動物である。

【0054】

このアプローチは、悪性腫瘍および良性腫瘍の両方を含む任意の癌または腫瘍を処置するために使用することができ、原発性腫瘍および転移腫瘍は両方ともそのアプローチの標的であり得る。本発明の一実施形態において、癌は、腫瘍浸潤リンパ球を特徴とする。本発明のツールは、腫瘍浸潤リンパ球を特徴とする転移性固形腫瘍の処置にとって特に魅力的である。別の実施形態において、T細胞移植片は、腫瘍もしくは組織特異的T細胞受容

50

体またはキメラ抗原受容体により修飾されている。

【0055】

本明細書で使用されるように、用語「処置」または「処置すること」は、完全な治癒だけでなく、癌または腫瘍に関連する障害または症状の予防、改善、または軽減も含む目的のために、少なくとも腫瘍溶解性アデノウイルスベクターを対象、好ましくは哺乳動物またはヒト対象に投与することを指す。治療効果は、患者の症状、血液中の腫瘍マーカー、または例えば腫瘍の大きさもしくは患者の生存長をモニターすることにより評価される場合がある。

【0056】

本発明の別の実施形態において、癌または腫瘍は、鼻咽腔癌、滑膜癌、肝細胞癌、腎臓癌 (renal cancer)、結合組織の癌、黒色腫、肺癌、腸癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、脳癌、咽喉癌、口腔癌、肝臓癌、骨癌、膵臓癌、絨毛癌、ガストリノーマ、褐色細胞腫、プロラクチノーマ、T細胞白血病/リンパ腫、神経腫、フォン・ヒッペル・リンドウ病、ゾリンジャー・エリソン症候群、副腎癌、肛門癌、胆管癌、膀胱癌、尿管癌、乏突起神経膠腫、神経芽腫、髄膜腫、脊髄腫瘍、骨癌、骨軟骨腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、原発部位不明の癌、カルチノイド、消化管のカルチノイド、線維肉腫、乳癌、パジェット病、子宮頸癌、食道癌、胆嚢癌、頭頸部癌、眼癌、腎臓癌 (kidney cancer)、ウィルムス腫瘍、カボジ肉腫、前立腺癌、精巣癌、ホジキン氏病、非ホジキンリンパ腫、皮膚癌、中皮腫、多発性骨髄腫、卵巣癌、内分泌性膵臓癌、グルカゴノーマ、副甲状腺癌、陰茎癌、下垂体癌、軟部肉腫、網膜芽細胞腫、小腸癌、胃癌 (stomach cancer)、胸腺癌、甲状腺癌、栄養膜癌、胞状奇胎、子宮癌、子宮内膜癌、陰癌、外陰癌、聴神経腫瘍、菌状息肉症、インスリノーマ、カルチノイド症候群、ソマトスタチン産生腫瘍、歯肉癌、心臓癌、口唇癌、髄膜癌、口腔癌 (mouth cancer)、神経癌、口蓋癌、耳下腺癌、腹膜癌、咽頭癌、胸膜癌、唾液腺癌、舌癌および扁桃腺癌からなる群より選択される。好ましくは、処置される癌または腫瘍は、腎臓癌 (renal cancer)、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、乳癌、肺癌 (小細胞肺癌、非小細胞肺癌および扁平上皮非小細胞肺癌など)、胃癌 (gastric cancer)、軟部肉腫、古典的ホジキンリンパ腫、中皮腫、および肝臓癌からなる群より選択される。本発明の好ましい実施形態において、処置される癌または腫瘍は、メソテリンネガティブの癌または腫瘍である。

【0057】

ヒトまたは動物の患者を本発明の治療に適したものとして分類する前、臨床医は、患者を診察する場合がある。正常から逸脱し、腫瘍または癌が明らかになった結果に基づいて、臨床医は、患者のために本発明の処置を提案する場合がある。

【0058】

医薬組成物

本発明の医薬組成物は、少なくとも1種の本発明のウイルスベクターを含む。好ましくは、本発明は、(a)腫瘍溶解性ウイルスをそのまま、または(b)養子細胞組成物および/もしくは(c)免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせて含有する医薬組成物を提供する。本発明はまた、癌の処置における使用のための前記医薬品組み合わせ剤を提供する。さらに、組成物は、少なくとも2つ、3つまたは4つの異なるベクター含んでいてもよい。ベクターおよび養子細胞組成物または免疫チェックポイント阻害剤に加えて、医薬組成物はまた、他の治療効果のある薬剤や、薬学的に許容される担体、緩衝液、賦形剤、アジュバント、添加物、防腐剤、消毒剤、充填剤、安定剤および/もしくは増粘剤などの任意の他の薬剤、ならびに/または対応する製品に通常見られる任意の成分を含んでいてもよい。組成物を配合するための適切な成分および適切な製造方法の選択は、当業者に一般的な知識に属している。

【0059】

医薬組成物は、投与に適した固体、半固体または液体の形態などの任意の形態であり得る。製剤は、液剤、乳剤、懸濁剤、錠剤、ペレット剤およびカプセル剤からなる群より選択され得るがこれらに限定されない。本発明の組成物は、ある特定の製剤に限定されず、

10

20

30

40

50

代わりに、組成物は、任意の既知の薬学的に許容される製剤に配合される可能性がある。医薬組成物は、当技術分野で既知の従来のプロセスのいずれかにより生成され得る。

【0060】

本発明の医薬品キットは、導入遺伝子としてIL-7をコードする腫瘍溶解性アデノウイルスベクターおよび1つまたは複数の免疫チェックポイント阻害剤を含む。導入遺伝子としてIL-7をコードする腫瘍溶解性アデノウイルスベクターは、第1の製剤に配合され、前記1つまたは複数の免疫チェックポイント阻害剤は、第2の製剤に配合される。あるいは、本発明の医薬品キットは、第1の製剤に導入遺伝子としてIL-7をコードする腫瘍溶解性アデノウイルスベクターを、第2の製剤に養子細胞組成物を含む。本発明の別の実施形態において第1および第2の製剤は、同時にまたは連続して、任意の順序で、対象に投与するためのものである。別の実施形態において、前記キットは、癌または腫瘍の処置で使用するためのものである。

10

【0061】

投与

本発明のベクターまたは医薬組成物は、任意の哺乳動物対象に投与され得る。本発明の特定の実施形態において、対象はヒトである。哺乳動物は、ペット、家畜および生産動物（production animal）からなる群より選択され得る。

【0062】

従来の方法はいずれも、ベクターまたは組成物の対象への投与のために使用される場合がある。投与経路は、組成物の配合または形態、疾患、腫瘍の位置、患者、併存疾患および他の因子に応じて決定される。したがって、組み合わせにおける各治療薬の投与量および投与頻度は、一部が、特定の治療薬、処置される癌の重症度、および患者の特徴に応じて決定される。好ましくは、投薬計画は、副作用の許容可能なレベルと一致した患者に送達される各治療薬の量を最大化する。

20

【0063】

ベクターの有効量は、少なくとも、処置を必要とする対象、腫瘍型ならびに腫瘍の位置および腫瘍のステージに応じて決定される。用量は、例えば、約 1×10^8 のウイルス粒子（VP）から約 1×10^{14} VP、具体的には、約 5×10^9 VPから約 1×10^{13} VP、より具体的には、約 3×10^9 VPから約 2×10^{12} VPで変更され得る。一実施形態において、IL-7をコードする腫瘍溶解性アデノウイルスベクターは、 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{14}$ のウイルス粒子の量で投与される。本発明の別の実施形態において、用量は、約 $5 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{11}$ VPの範囲内である。

30

【0064】

本発明の一実施形態において、腫瘍溶解性ウイルスの投与は、腫瘍内、動脈内、静脈内、胸膜内、小胞内、腔内、節内もしくは腹腔内注射、または経口投与を通じて実行される。投与のどのような組み合わせも可能である。アプローチは、局所注射にも関わらず、全身効果を与えることができる。

【0065】

本発明の一実施形態において、(a) 導入遺伝子としてIL-7をコードする腫瘍溶解性アデノウイルスベクターおよび(b) 1つまたは複数の免疫チェックポイント阻害剤の対象への個別投与は、同時にまたは連続して、任意の順序で実行される。これは、(a) および(b) が、一緒に服用するための単一用量剤形または同時にもしくは一定の時間差で投与される別個の実体（例えば別の容器内で）で提供される場合があることを意味する。この時間差は、1時間から2週間、好ましくは12時間から3日間、より好ましくは24時間または48時間以内であり得る。好ましい実施形態において、アデノウイルスベクターの初回投与は、免疫チェックポイント阻害剤の初回投与の前に実行される。さらに、免疫チェックポイント阻害剤とは別の投与方法でウイルスを投与することが可能である。この点について、ウイルスまたは免疫チェックポイント阻害剤のいずれかを腫瘍内に投与し、他方を全身にまたは経口で投与することが有利である場合がある。特定の好ましい実施形態において、ウイルスは、腫瘍内に投与され、免疫チェックポイント阻害剤は、静脈

40

50

内に投与される。別の特定の好ましい実施形態において、ウイルスおよびチェックポイント阻害剤は両方とも、静脈内に投与される。好ましくは、ウイルスおよびチェックポイント阻害剤は、別個の化合物として投与される。2つの薬剤を用いる併用治療も可能である。

【0066】

好ましい実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤は、約0.2 mg/kg ~ 50 mg/kg、より好ましくは約0.2 mg/kg ~ 25 mg/kgの量で投与される。

【0067】

本明細書で使用されるように、「個別投与」または「別個」は、(a) 導入遺伝子としてIL-7をコードする腫瘍溶解性アデノウイルスベクターおよび(b) 1つまたは複数の免疫チェックポイント阻害剤が、2つの異なる製品であるか、互いに異なる組成物である状況を指す。

10

【0068】

他の処置または処置の組み合わせはいずれも、本発明の治療に加えて使用される場合がある。特定の実施形態において、本発明の方法または使用は、放射線療法、化学療法、血管新生阻害剤またはアルキル化剤、ヌクレオシド類縁体、細胞骨格修飾剤、細胞分裂抑制剤、モノクローナル抗体、キナーゼ阻害剤もしくは他の抗癌剤などの標的療法の同時または連続的な対象への投与または介入（外科手術を含む）をさらに含む。

【0069】

用語「処置する」または「高める」、ならびにそれらの原型化した単語は、本明細書で使用されるように、必ずしも100%もしくは完全な処置または向上を意味するものではない。むしろ、当業者が潜在的な利益または治療効果があると認識する程度は様々である。

20

【0070】

技術の進歩につれて、発明概念が、様々な方法で実行できることは、当業者にとって明らかであろう。本発明およびその実施形態は、上述の例に限定されるものではなく、特許請求の範囲内で変更することができる。

【0071】

実験セクション

材料および方法

30

細胞株

ヒト癌細胞株A549（上皮腺癌）およびRD（横紋筋肉腫）を、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）（マナサス、USA）から購入した。ゴールデンハムスター癌細胞株DDT1-MF2（平滑筋肉腫）は、William World博士からご厚意により譲り受けたものであり、ハムスターHapT1（膵管腺癌細胞株）は、ライプニッツ研究所（DSMZ、ブラウンシュヴァイク、ドイツ）から取得し、ハムスターHT100（肺腺癌）は、ジャパン・コレクション・オブ・リサーチ・バイオリソース細胞バンク（大阪、日本）から取得した。細胞株はすべて、推奨条件下で培養した。

【0072】

ウイルス構築

40

Ad5/3-E2F-d24-hIL7ウイルスを、前述の技術（Havunen et al. 2017）により構築した。腫瘍特異的複製は、ウイルス複製に関する腫瘍選択性を決定する2つの修飾：E2FプロモーターおよびE1Aの定常領域における24塩基対の欠失により達成された。細菌人工染色体（BAC）リコンビニアリング戦略を通じて、gp19kおよび6.7k遺伝子に代わってヒトIL7コード配列をE3領域に導入した。得られるウイルスベクター配列を、次世代シーケンシングにより確認した。

【0073】

感染多重度（MOI）1でA549細胞株のトランスフェクションによりウイルス粒子を生成し、続いて塩化セシウムグラジエントにより精製した。Lock at al. 2019に記載のプロトコルにしたがってTCID50アッセイにより、得られるウイルス

50

の感染力および濃度を決定した。

【0074】

細胞生存率アッセイ

ヒト細胞株 A549 および RD を 96 ウェルプレート (平底) に 1×10^4 細胞 / ウェルで 24 時間、三連で播種し、Ad5/3-E2F-d24 ウイルス (本文中ではバックボーンまたは非武装化 (unarmed) バックボーンとも呼ばれる)、または Ad5/3-E2F-d24-IL7 (本文中では IL7 ウイルス、IL7 武装化 (armed) ウイルス、IL7 をコードするウイルスまたは IL7 腫瘍溶解性アデノウイルスとも呼ばれる) のいずれかを用いて 1、10、100 もしくは 1000 VP / 細胞で感染させた。同様に、ハムスター細胞株 HT100、DDT1-MF2 および HapT1 を、 1×10^4 細胞 / ウェルで 24 時間、三連で播種し、バックボーンウイルス、もしくは Ad5/3-E2F-d24-hIL7 のいずれかを用いて 100、1000、5000 もしくは 10000 VP / 細胞で感染させた。

10

【0075】

4 日後 (A549 および RD)、5 日後 (HT100 および DDT1-MF2) または 8 日後 (HapT1)、ウェルを 2 時間、20% の CellTiter 96 Aqueous One Solution Proliferation Assay reagent (プロメガ、ウィスコンシン、USA) とともにインキュベートすることにより、細胞生存率を測定した。Fluostar OPTIMA アナライザー (BMG Labtech、オッフエンブルク、ドイツ) を使用して、490 nm で吸光度を読み取った。データを非感染のモック対照群に対して正規化した。

20

【0076】

サイトカイン発現および生理活性アッセイ

前述のヒトおよびハムスター細胞株を、Ad5/3-E2F-d24-hIL7 の 10000 VP / 細胞 (A549 および RD) または 10000 VP / 細胞 (HT100 および DDT1-MF2) のいずれかで 3 日間感染させた。メーカーの説明書にしたがって、BD サイトメトリックビーズアレイヒト可溶性タンパク質マスターバッファークット (BD バイオサイエンス、ニュージャージー、USA) をヒト IL7 Flex Set (BD バイオサイエンス、ニュージャージー、USA) と一緒に使用して細胞上清からヒト IL7 を測定した。BD Accuri フローサイトメーターを用いてビーズを検出し、FCAP Array ソフトウェア (バージョン 3.0.1; BD バイオサイエンス、ニュージャージー、USA) を用いて結果を分析した。

30

【0077】

ウイルスで産生されたヒト IL7 に生理活性があったことを確認するため、マウス IL7 依存性細胞株 2E8 (ATCC、バージニア、USA) を、10% FBS、1% L-グルタミンおよび 1% Pen/strep が添加されたマッコイ 5A 培地 (サーモフィッシャー、マサチューセッツ、USA) 中、 2.5×10^5 細胞 / ml で 24 時間、三連で培養した。Ad5/3-E2F-d24-hIL7 で感染させた A549 細胞由来の濾過済み上清を、1:1、1:4、1:16、1:64 および 1:256 の希釈で添加し、5 日間インキュベートしてから、上述したように 20% の CellTiter 96 Aqueous One Solution Proliferation Assay reagent を使用して生存率アッセイを行った。陽性対照として、組換えマウスおよびヒト IL7 を 20 ng / ml の濃度で使用した。

40

【0078】

動物実験

Ad5/3-E2F-d24-hIL7 の有効性を、アデノウイルス複製について半許容 (semi-permissive) のモデルである免疫正常 (immunocompetent) ゴールデンハムスターを使用して、インビボでテストした。5 週齢のオスシリアンゴールデンハムスター (Mesocricetus auratus) (Envigo、インディアナ、USA) の下背部右脇腹に、 2×10^6 の HapT1 細胞を皮下移植した。腫瘍が直径 5 ~ 6 mm に到達した

50

後、動物を無作為化し、Ad5/3-E2F-d24またはAd5/3-E2F-d24-hIL7のいずれかを用いて 1×10^9 VPで腫瘍内処置した。対照動物は、PBSの腫瘍内注射を受けた。腫瘍をデジタルノギスで測定し、腫瘍体積を(長さ \times 幅²)/2として算出した。64日目に安楽死させる前に、ハムスターは全12ラウンドのウイルス処置を受け、その後の分析のためにそれらの腫瘍および臓器を回収した。あるいは、最大許容腫瘍体積(22.0 mm)に到達し、腫瘍が潰瘍になったときはすぐに、または動物の福祉が損なわれたときはすぐに、動物を安楽死させた。

【0079】

遺伝子発現アッセイ

動物腫瘍試料の断片を、RNA later (シグマアルドリッチ、ミズーリ、USA) に保存し、さらなる使用まで-20 で保管した。メーカーの説明書にしたがってRNeasy抽出キット(キアゲン、ヒルデン、ドイツ)を使用して、試料からのRNAを単離し、Qubit4蛍光光度計(サーモフィッシャー、マサチューセッツ、USA)を使用してRNA濃度を測定した。精製済み全RNA250 ngを使用して、メーカーの説明書にしたがってHigh capacity cDNA Reverse Transcription kit (サーモフィッシャー、マサチューセッツ、USA)を用いてcDNAを合成した。得られるcDNAを定量的リアルタイムPCRに使用した。以下のプライマーおよびプローブ: グランザイムB (フォワードプライマー5' - CACTGTTCAGGGAGCTCAATAA - 3' (配列番号2)、リバースプライマー5' - TGGAGTAGTCCCTTGGGATTAATAGTC - 3' (配列番号3)、プローブ5' - Fam - CCTCCTTTCTTTGATGTTGTGGGC - BBQ - 3') (配列番号4)、パーフォリン (フォワードプライマー5' - TGAGTGCCTTCTGAAATCG - 3' (配列番号5)、リバースプライマー5' - TGTCTGCCTGTACAGTTTTCG - 3' (配列番号6)、プローブ5' - Fam - CTGGTACAGAGACCCTCCACTGCAC - BBQ - 3') (配列番号7)、CD25 (フォワードプライマー5' - TCATCAGTTTCCAGCCAGTGG - 3' (配列番号8)、リバースプライマー5' - GTATAAATGTCTCCATAGTTGTAGCTGC - 3' (配列番号9)、プローブ5' - Fam - TCCTGAGAGTGGAGACTTCTCTGTCCCATC - BBQ - 3') (配列番号10)、CD137 (フォワードプライマー5' - AGTGCATCGAGGGACTCC - 3' (配列番号11)、リバースプライマー5' - CAGTTTTCACAACCCTGCTCTG - 3' (配列番号12)、プローブ5' - Fam - CTCCTTGACCCGGCTTGC AATCC - BBQ - 3') (配列番号13)、インターフェロンガンマ (フォワードプライマー5' - GAACCTGGCAAAAAGGCTGG - 3' (配列番号14)、リバースプライマー5' - CCTTCAAGGCTTCAAAGAGTTT - 3' (配列番号15)、プローブ5' - Fam - CATTGAGAGCCAGATCGTCTCCTTCTACTT - BBQ - 3') (配列番号16)、Ki67 (フォワードプライマー5' - GACCGATCTTTTAGGTATGAAAAAGCG - 3' (配列番号17)、リバースプライマー5' - GTGGTTTGTGAAGCTTTCAGCAT - 3' (配列番号18)、プローブ5' - Fam - ACGGCGAGCCCTCGAGAGCTAG - BBQ - 3') (配列番号19)、PD1 (フォワードプライマー5' - GTGTCCTAGTGGGTGTC - 3' (配列番号20)、リバースプライマー5' - GCCCTCCTTCAAGAGGCT - 3' (配列番号21)、プローブ5' - GCTGCTGGCCTGGGTCTTA - BBQ - 3') (配列番号22)を使用して、遺伝子発現レベルを測定した。結果を、ハムスターガンマアクチンハウスキーピング遺伝子cDNAの含有量に対して、およびモックに対して正規化した(Ct)。すべてのPCR反応を二連で実行した。

【0080】

患者試料処理およびエクスピボ腫瘍培養の確立

我々のグループであらかじめ検証済みのプロトコルを使用して、新鮮な単細胞腫瘍分解物を腫瘍から調製した。要約すると、腫瘍を小さい断片に切り刻み、一晚の酵素消化のた

10

20

30

40

50

めに、+37 で振盪しながら、1% L-グルタミン、1% Pen/strep、I型コラゲナーゼ(170 mg/L)、IV型コラゲナーゼ(170 mg/L)、DNase I(25 mg/mL)およびエラスターゼ(25 mg/mL)(すべての酵素はワージントン・バイオケミカルから)が添加されたRPMI 1640を含有する50 mL容ファルコンチューブに入れた。消化後、70 μmフィルターを通して細胞懸濁液を濾過し、消化されなかった断片および赤血球の除去のために、ACK溶解バッファー(シグマアルドリッチ、ミズーリ、USA)で処理した。得られる単細胞懸濁液を使用して、 3×10^5 個の細胞を三連で96ウェルプレート(U底)に播種し、それらをAd5/3-E2F-d24またはAd5/3-E2F-d24-hIL7のいずれかの100VP/細胞で処置することにより、エクスピボ腫瘍培養を確立した；非感染細胞をモック対照として使用した。さらにフローサイトメトリーに使用される細胞を、3日目に90%ウシ胎児血清(FBS)および10%ジメチルスルホキシドを含有する凍結保存培地に回収し、さらに使用するまで-140 以下で保管した。

10

【0081】

細胞傷害性およびウイルス複製アッセイ

エクスピボ腫瘍培養の細胞生存率を、上述のように測定した。簡潔に言うと、Cell Titer 96 Aqueous One Solution Proliferation Assay reagentを用いて2時間インキュベートすることにより、3日目、5日目および7日目に細胞生存率を測定した。非感染の対照群に対してデータを正規化した。

20

【0082】

エクスピボ腫瘍培養におけるウイルス複製を測定するため、ウイルス感染後1日目、2日目および3日目に、リン酸緩衝生理食塩水に細胞を回収し、メーカーの説明書にしたがって、QIAMP DNAミニキット(キアゲン、ヒルデン、ドイツ)を用いてDNAを抽出した。フォワードプライマー(5'-GGAGTGC GCCGAGACAAC-3') (配列番号23)、リバースプライマー(5'-ACTACGTCCGGCGTTCCAT-3') (配列番号24)およびプローブ(Fam-TGGCATGACACTACGACCAACACGATCT-Tam) (配列番号25)を使用する、E4領域を標的化する定量的リアルタイムPCRによりウイルスの存在を確認した。既知の濃度のウイルスをコードするプラスミドを使用して生成された標準曲線にしたがって、E1Aの定量化を算出した。結果を、ヒトベータ-アクチンハウスキピング遺伝子DNAの含有量に対して正規化した。すべてのPCR反応を二連で実行した。

30

【0083】

ケモカインおよびサイトカイン分析

感染エクスピボ腫瘍培養由来の上清を、3日目に回収し、C-Cモチーフリガンド2(Ccl2)、C-Cモチーフリガンド5(Ccl5)、C-X-Cモチーフケモカイン10(Cxcl10)、インターロイキン2(IL2)、腫瘍壊死因子アルファ(TNFα)、IFNγ、インターフェロン1ベータ(IFN1β)、インターロイキン4(IL4)、インターロイキン6(IL6)、インターロイキン10(IL10)およびトランスフォーミング増殖因子ベータ-1(TGF-β1)の存在を、メーカーの説明書にしたがって、Essential Immune Response LEGENDplexパネル(Biolegend、カリフォルニア、USA)を使用して測定した。

40

【0084】

C-X-Cモチーフケモカイン9(Cxcl9; MIGとしても既知)および上清中のIL7のレバルを、それぞれヒトMIGおよびIL7 flexセット(BDバイオサイエンス、ニュージャージー、USA)を通じて測定した。Accuri C6フローサイトメーターを使用して試料を三連で測定し、LEGENDplexデータ解析ソフトウェア(Biolegend、カリフォルニア、USA)またはFCAP Arrayソフトウェアのいずれかを通じて分析した。各検体の濃度を、Qubit 4蛍光光度計(サーモフィッシャー、マサチューセッツ、USA)により測定された総タンパク質含有

50

量に対して正規化した。その後、このデータを、非感染の対照群に対して正規化した。

【0085】

フローサイトメトリー

購入したヒトCD3 (クローンSK7、蛍光色素Alexa Fluor 700、Biolegend、カリフォルニア、USA)、CD4 (クローンRPA-T4、蛍光色素V500、BDバイオサイエンス、ニュージャージー、USA)、CD8 (クローンRPA-T8、蛍光色素FITC、BDバイオサイエンス、ニュージャージー、USA)、CD69 (クローンFN50、蛍光色素PE/Cyanine7、Biolegend、カリフォルニア、USA)、CD127 (クローンHIL-7R-M21、蛍光色素PE-CF594、BDバイオサイエンス、ニュージャージー、USA)、グランザイムB (クローンGB11、蛍光色素BV421、BDバイオサイエンス、ニュージャージー、USA)、パーフォリン (Perforine) (クローンB-D48、蛍光色素PerCP/Cyanine5.5、Biolegend、カリフォルニア、USA)、CD107a (クローンH4A3、蛍光色素APC/Cyanine7、Biolegend、カリフォルニア、USA) に特異的な抗体を使用して、エクスピボ腫瘍培養由来の免疫細胞集団の分析を実行した。メーカーの説明書にしたがってBD Cytotfix/Cytoperm Plusキット (BD Golgi Plugとともに) (BDバイオサイエンス、ニュージャージー、USA) を使用して細胞内染色を実行した。試料はすべて、Fcブロッキング後に、ヒトTruStain FcX受容体ブロッキング溶液 (Biolegend、カリフォルニア、USA) を使用して染色された。FACS Aria IIセルソーター (BDバイオサイエンス、ニュージャージー、USA) を使用して、試料を二連で取得し、FlowJoソフトウェアv10 (FlowJo LLC、BDバイオサイエンス、ニュージャージー、USA) を使用して、データ解析を実行した。

10

20

【0086】

統計解析

データの統計解析およびグラフ表示のために、GraphPad Prism v. 8.4.2 (GraphPad Software) を使用した。シャピロ-ウィルク検定を使用して腫瘍進行データの正規性を実行し、等分散性については、ルビーン検定を使用した。これらの検定によれば、データは非正規であり、群間分散は異なっており、そのためノンパラメトリックなフリードマン検定を使用して多群の比較を行い、ダン検定を使用して、一対比較を実行した。対応のないt検定を使用して、インビトロ実験における群を比較した。結果は、 $p < 0.05$ の場合、統計的に有意であるとみなされた。

30

【0087】

実施例1. ヒトIL7で武装化 (armed) された腫瘍溶解性アデノウイルスは、導入遺伝子を癌細胞に送達し、多数の癌細胞株の生存率を低下させることができる

これまで、我々は、Ad5/3-E2F-d24ウイルスが、いくつかの癌細胞株に浸透し、複製する能力を示していた (Havunen et al. 2017)。ヒトIL7をコードする腫瘍溶解性アデノウイルスは、ファイバーノブを血清型3から運ぶアデノウイルス血清型5と同じバックボーンを利用し、E1A遺伝子の定常領域2における24-bpの欠失 (d24) およびE1A領域の上流での腫瘍特異的E2Fプロモーターの挿入を有する。ヒトIL7遺伝子は、部分的に欠失したE3遺伝子領域に導入され、導入遺伝子発現をウイルス複製に関連づけた (図1A)。

40

【0088】

Ad5/3-E2F-d24-hIL7が癌細胞に感染して溶解する能力を、いくつかのヒトおよびハムスター細胞株を使用してインビトロで評価した。ヒト肺および横紋筋肉腫の癌細胞株 (それぞれA549およびRD)、ならびにハムスター平滑筋肉腫、肺および膵臓癌の細胞株 (それぞれDDT1-MF2、HT100およびHapT1) を、様々な濃度のAd5/3-E2F-d24-hIL7で感染させた;非感染細胞および前述の (Havunen et al. 2017) 非武装化 (unarmed) Ad5/3-E2F-d24ウイルスで感染させた細胞を対照として使用した。したがって、Ad5/3-E

50

2 F - d 2 4 - h I L 7 ウイルスの溶解効果は、非武装化 (unarmed) ウイルスに匹敵していた (図 1 B および 図 1 C)。これらの結果は、I L 7 導入遺伝子の存在が、ウイルス腫瘍溶解性の特徴に影響しないことを示す。

【 0 0 8 9 】

ウイルスが癌細胞で導入遺伝子発現量を誘導する能力を評価するため、後者を A d 5 / 3 - E 2 F - d 2 4 - h I L 7 で感染させ、I L 7 タンパク質量の存在について上清を分析した。興味深いことに、ヒト細胞株は、より高い I L 7 の濃度を示し、A 5 4 9 により産生された 1 7 . 5 p g / m l が最大量であった (図 1 D)。ハムスター細胞株 H T 1 0 0 は、最も低いタンパク質量 (0 . 4 p g / m l) であったが、D D T 1 - M F 2 および R D 細胞株は、同等の生産性であった (図 1 D)。

10

【 0 0 9 0 】

次に、ウイルスにより産生されたヒト I L 7 の生理活性を評価した。これを行うため、I L 7 依存性マウス細胞株 2 E 8 を、A 5 4 9 上清のいくつかの希釈とインキュベートし、その後、M T S 細胞増殖測定を行った。対照群と比較して 1 : 4 希釈でより良好な結果として、用量依存的な細胞増殖が観察された (図 1 E)。

【 0 0 9 1 】

全体では、A d 5 / 3 - E 2 F - d 2 4 - h I L 7 が、癌細胞を死滅させ、生理活性のある I L 7 の発現を後者で誘導することができることが確認された。

【 0 0 9 2 】

実施例 2 . I L 7 腫瘍溶解性アデノウイルスは、膵臓癌のハムスターモデルにおいて腫瘍退縮を促進する

20

インビボでの A d 5 / 3 - E 2 F - d 2 4 - h I L 7 の有効性を、免疫正常 (immunocompetent) ゴールデンハムスター、アデノウイルス複製に対して半許容 (semi-permissive) の前臨床モデルでテストした。膵臓癌細胞株 H a p T 1 を皮下移植して、異所性腫瘍形成およびその後の腫瘍内ウイルス注入を可能にした。処置開始の 3 0 日後、モック対照群のハムスターは、ウイルス処置動物と比較した場合、腫瘍が有意に大きかった。バックボーンおよび I L 7 コーディングウイルス処置群は両方とも、腫瘍体積の減少の傾向を示したが、I L 7 コーディングウイルス処置動物は、モックおよび A d 5 / 3 - E 2 F - d 2 4 処置動物よりも有意に小さい腫瘍が見られた (それぞれ p 値が 0 . 0 0 1 3 および 0 . 0 1 5 5) (図 2 A)。

30

【 0 0 9 3 】

I L 7 武装化 (armed) アデノウイルスの免疫学的作用機序の良好な理解をさらに詳細に得るために、6 4 日目に動物から回収した腫瘍内のいくつかの免疫関連遺伝子の発現量を測定した。含まれているウイルス処置群の両方で、標準的な T 細胞活性化マーカーである C D 2 5、C D 1 3 7、K i 6 7 および P D 1 のかなりのアップレギュレーションが観察された (図 2 B)。I F N g およびパーフォリンの発現量はまた、ウイルス群で実質的に高く、腫瘍微小環境で免疫細胞の細胞傷害性を高めることを潜在的に示唆した。A d 5 / 3 - E 2 F - d 2 4 処置群は、ほとんどの分析されたサイトカインの量がより高いことを示した。全群にわたり、グランザイム B の量では、大きな差異は観察されなかった (図 2 B)。

40

【 0 0 9 4 】

結論として、A d 5 / 3 - E 2 F - d 2 4 - h I L 7 ウイルス処置により効果的なインビボ腫瘍退縮がもたらされ、主要な免疫刺激因子の活性化を可能にすることが示された。

【 0 0 9 5 】

実施例 3 . I L 7 で武装化 (armed) された腫瘍溶解性アデノウイルスは、患者由来のエクスピボ腫瘍モデルに感染し、複製する。

I L 7 で武装化 (armed) された腫瘍溶解性アデノウイルスの作用機序をさらに調べるため、より臨床的に関連性が高いエクスピボ腫瘍モデルに移行した。予想通り、細胞生存率試験は、卵巣癌 (H U S O V 4 および O v C a S) の場合、バックボーンおよび I L - 7 をコードするウイルスの両方について匹敵する溶解能力を示した：インキュベーション

50

ンの3日後、生存率は、70～80%まで低下し、7日目まで低下し続けた(図3A)。生存率の低下はまた、バックボーンおよびIL7をコードするウイルスでのウイルス感染後7日目に、頭頸部試料(HUSHN11)で観察された(図3A)。

【0096】

次に、アデノウイルスE4遺伝子を標的化する定量的リアルタイムPCRを通じてエクスピボ腫瘍試料でのウイルスコピー数を評価した。全体では、ウイルスの量は、テストされた全試料にわたってバックボーンおよびIL-7をコードするウイルスでは同程度であり、全体的にウイルスのゲノムコピーが経時的に増加する傾向があった(図3B)。しかし、試料癌種間でウイルスコピー総数において明らかな差異があった。OvCaSおよびHUSHN10試料は、ウイルスDNA量が最も高かったが、HUSHN11では、100倍低かった。HUSOV4は、中程度のウイルスコピー数を示した(図3B)。

10

【0097】

最後に、上清中のヒトIL7濃度を測定した。テストされた全試料において、1日目から3日目にIL7濃度の増加が見られたが、予想通り、タンパク質の量は、試料間で異なっていた。HUSOV4およびHHUSHN15試料は、IL7の量がより高く、それぞれ全IL7タンパク質の0.65pg/ugおよび0.57pg/ugに達するが、OvCaSおよびHUSHN17試料におけるIL7濃度は、3倍低かった(図3C)。

【0098】

全体では、このデータは、試料間で差異があるにも関わらず、IL7腫瘍溶解性アデノウイルスが患者由来の腫瘍分解物に感染し、複製し、癌細胞を溶解する能力を示す。

20

【0099】

実施例4. IL7で武装化(armed)された腫瘍溶解性アデノウイルスは、局所腫瘍微小環境を免疫促進に変換する

感染した患者由来のエクスピボ卵巣癌試料の免疫状態を評価するために、主要な免疫シグナル伝達分子-ケモカインおよびサイトカインの濃度を測定した。最初に、炎症性サイトカイン: IL2、TNF α 、IFN γ およびIL1bの量を比較した。テストされた全試料は、IL7をコードするウイルス群で感染させた場合、非感染の細胞およびバックボーンウイルス群と比較して、IFN γ の有意な増加を示した。IL7をコードするウイルスで感染させた場合、OvCaSおよびHUSOV5試料はまた、IL2のより高い発現を示したが、HUSOV4は、異なる実験群間で顕著なサイトカイン変化を示さなかった。さらに、OvCaS試料は、任意の他の処置群よりもIL7をコードするウイルス群でTNF α の顕著に高い濃度が見られた。興味深いことに、テストされた全試料でIL1bの量において変化は観察されなかった(図4A)。全体では、OvCaSおよびHUSOV5でプールされた炎症性サイトカインの量は、他の群と比較してIL7ウイルス処置群で顕著に高かった(図4B)。

30

【0100】

次に、抗炎症性サイトカイン: IL4、IL6、IL10およびTGF β の量を測定した。全体では、サイトカイン量の有意な増加は、非感染の細胞と比較してウイルス処置群で観察されなかった(図4C)。HUSOV4は、IL4、IL6およびIL10濃度における顕著な減少を示したが、OvCaSおよびHUSOV5は、IL7をコードするウイルスでの感染でTGF β の量が低下した。プールされた抗炎症性サイトカインの量は、IL7をコードするウイルスで感染させた培養において3つの試料のうち2つ(OvCaSおよびHUSOV5)で減少した。減少は、OvCaS試料においてバックボーンウイルスとIL7をコードするウイルスとの間で統計的に有意であった(図4D)。

40

【0101】

最後に、エクスピボ感染試料におけるケモカイン: Ccl2、Ccl5、Cxc19、Cxc110の量を測定した。特に、ウイルス処置試料は、Ccl5およびCxc110産生で顕著な増加を示し、IL7をコードするウイルスは、バックボーンよりも有意に高い産生をもたらした(図4E)。HUSOV4試料は、群間でケモカイン濃度における任意の他の変化を示さなかったが、OvCaS試料は、IL7をコードするウイルスで処置

50

した場合、C c l 2 および C x c l 9 のアップレギュレーションを示した。H U S O V 5 試料は、I L 7 をコードするウイルスでの感染で C c l 5、C x c l 9 および C x c l 1 0 の顕著なアップレギュレーションを示した。

【0102】

重要なことに、I L - 7 をコードするウイルスは、テストされたほとんどの卵巣癌患者試料で、抗炎症性のものよりも炎症性サイトカインの最も高い蔓延を誘導した（図 4 F）。全体では、これらのデータは、腫瘍微小環境を炎症誘発性に変換するために A d 5 / 3 - E 2 F - d 2 4 - h I L 7 がシグナル伝達分子の産生を誘導する能力を示し、これは、T 細胞の腫瘍への動員に特に有用である。

【0103】

実施例 5 . I L 7 で武装化 (armed) された腫瘍溶解性アデノウイルスは、浸潤 C D 4 + および C D 8 + T 細胞を活性化する

腫瘍浸潤リンパ球に対する A d 5 / 3 - E 2 F - d 2 4 - h I L 7 の影響を評価するため、フローサイトメトリーを通じて別個に、腫瘍溶解性アデノウイルスで処置した H U S O V 4 および O v C a S エクスビオ腫瘍培養からの C D 4 + および C D 8 + 細胞に対する活性化および細胞傷害性のマーカーの発現量を最初に検証した。I L 7 をコードするウイルスでの感染で、H U S O V 4 培養は、他の群と比較して C D 6 9 + C D 4 + T 細胞および C D 6 9 + C D 8 + T 細胞の量における有意な増加を示した（図 5 A）が、C D 8 + 細胞はまた、それらの表面上で C D 6 9 + 受容体の発現が高かった（図 5 B）。I L 7 をコードするウイルスで感染させた O v C a S 培養で同様のシナリオが観察され、非感染の培養と比較して C D 6 9 + C D 4 + T 細胞の増加が観察されたが、C D 8 + T 細胞では有意な変化は検出されなかった（図 5 A）。

【0104】

さらに、2つの強力な細胞溶解剤であるパーフォリン (P e r f) およびグランザイム B (G r z m B) を発現する細胞傷害性 T 細胞の数における変化を評価した。I L 7 をコードするウイルスで処置された H U S O V 4 培養において、C D 4 + および C D 8 + の両方で G r z m B + T 細胞の顕著な増加が観察された（図 5 C）が、O v C a S 試料では G r z m B + 細胞において変化は検出されなかった（図 5 D）。しかし、同じ試料では、I L 7 群において C D 8 + P e r f + 細胞の増加が検出され（図 5 D）、I L 7 をコードするウイルスで処置された H U S O V 4 における C D 4 + P e r f + および C D 8 + P e r f + 集団両方の頻度の増加が観察された。

【0105】

全体では、我々のデータは、A d 5 / 3 - E 2 F - d 2 4 - h I L 7 が、浸潤リンパ球を活性化し、細胞傷害性 C D 4 + および C D 8 + 細胞の割合を高めることができることを示す。

【0106】

実施例 6 . ヒト免疫チェックポイント阻害剤 (P D - 1 および / または P D L - 1) と組み合わせた I L 7 で武装化 (armed) された腫瘍溶解性アデノウイルス ウイルス構築物および免疫チェックポイント阻害剤 (I C I)

この概念実証研究で使用されたウイルスは、T I L T - 5 1 7 (A d 5 / 3 - E 2 F - d 2 4 - h I L 7) である。E 2 F プロモーター上の修飾、および E 1 A の定常領域における 2 4 塩基対の欠失ならびに導入遺伝子としてヒトインターロイキン - 7 タンパク質を組み込む細菌人工染色体リコンビニアリング技術によりウイルスを調製した。ヒト抗 P D - L 1 T e c e n t r i q (登録商標) (アテゾリズマブ、ロシュ;本文中では抗 P D - L 1 と呼ばれる) およびヒト抗 P D - 1 K E Y T R U D A (登録商標) (ペムプロリズマブ、メルク;本文中では抗 P D - 1 と呼ばれる) などの I C I を、単独および / または T I L T - 5 1 7 と組み合わせたいずれかの研究で使用した。

【0107】

患者試料処理およびエクスビオ腫瘍培養

腎細胞癌 (R C C) を有する患者由来の腫瘍試料を、ヘルシンキ大学病院 (H U S) が

10

20

30

40

50

ら取得した。要約すると、腫瘍を小さい断片に切り刻み、一晚の酵素消化のために、+ 37 で振盪しながら、1% L-グルタミン、1% Pen / strep、I型コラゲナーゼ (170 mg / L)、IV型コラゲナーゼ (170 mg / L)、DNase I (25 mg / mL) およびエラストーゼ (25 mg / mL) (すべての酵素はワージントン・バイオケミカルから) が添加された RPMI 1640 を含有する 50 mL 容ファルコンチューブに入れた。消化後、70 μ m フィルターに通して細胞懸濁液を濾過し、消化されなかった断片および赤血球の除去のために、ACK 溶解バッファー (シグマアルドリッチ、ミズーリ、USA) で処理した。すべてのこのプロセスにより、異種単細胞懸濁液がもたらされ、後者は、細胞生存率アッセイで使用するためのエクスピオ腫瘍培養、この場合は、HUSRenca5 を確立するために使用された。

10

【0108】

細胞生存率アッセイ

MTS アッセイを使用して、感染した腫瘍細胞の細胞生存率を評価した。20,000 個の生存可能な患者の腫瘍細胞を 96 ウェルプレート (U 底) に三連で播種した。翌日、TILT-517、抗 PD-1、抗 PDL-1、TILT-517 + 抗 PD-1 または TILT-517 + 抗 PDL-1 のいずれかで腫瘍を処置した。非感染の細胞をモック対照として使用した。ウイルスを 100 VP / 細胞の濃度で感染させた。使用された両方の ICI の濃度は、0.1 mg / ml であった。処置後の 1 日後、2 日後、3 日後、4 日後、および 5 日後に、Cell Titer 96 Aqueous One Solution Proliferation Assay reagent (プロメガ、ウィスコンシン、USA) との 2 時間のインキュベーションにより細胞生存率を評価した。Hide x Sense プレートリーダー (Hide x、トゥルク、フィンランド) を使用して、490 nm で吸光度を読み取った。データを非感染のモック対照群に対して正規化した。

20

【0109】

統計解析

Graph Pad Prism v9.2.0 (Graph Pad Software) を、データの統計解析およびグラフ表示のために使用した。群間で対応のない t 検定を使用することにより統計的検定を行い、 $p < 0.05$ の場合、有意性があるとみなされた。

【0110】

結果

図 6 A の結果から、TILT-517 およびその ICI との組み合わせを使用すると、RCC 試料において抗 PD-1 または抗 PDL-1 いずれかの単独の使用と比較して、より効果的に機能することが示される。ICI が、RCC の標準治療として使用される一般的な免疫療法であることを認めることが重要である。しかし、図 6 A で観察することができるように、抗 PD-1 および抗 PDL-1 の処置が、腫瘍培養の相対的な細胞生存率をわずか約 90% まで低下させるが、TILT-517 関与群は、40% 未満に達しても、日を追うごとに腫瘍の相対的な細胞生存率を低下させ続ける。

30

【0111】

注目すべきは、2 日目に、TILT-517 + 抗 PD-1 および TILT-517 + 抗 PDL-1 の併用群により媒介された腫瘍死滅は、モックと比較して統計的に有意である (図 6 B)。重要なことに、TILT-517、抗 PD-1 または抗 PDL-1 の単独療法と比較して培養の試料細胞生存率を低下させることで 20% を超える改善を示すので、この併用群は、有望な戦略であることを示した (図 6 B)。5 日目までに、この併用群は、抗 PD-1 または抗 PDL-1 単独のいずれかと比較して、統計的に有意に高い腫瘍細胞死滅を示した (図 6 C)。併用処置群によるより良好な腫瘍死滅の背景にある 1 つの可能な機構は、高い免疫細胞活性化による。

40

【0112】

全体では、TILT-517 + 抗 PDL-1 または抗 PD-1 の迅速で効果的な反応は、いずれかの療法単独と比較して、臨床実施に向けた有望なアプローチを示唆する。

50

【 0 1 1 3 】

参考文献

引用した非特許文献：

Havunen R, Siurala M, Sorsa S, Gronberg-Vaha-Koskela S, Behr M, Tahtinen S, Santos JM, Karell P, Rusanen J, Nettelbeck DM, et al.: Oncolytic Adenoviruses Armed with Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-2 Enable Successful Adoptive Cell Therapy. *Mol Ther Oncolytics* 2017, 4:77-86.

Heninger AK, Theil A, Wilhelm C, Petzold C, Huebel N, Kretschmer K, Bonifacio E, Monti P: IL-7 abrogates suppressive activity of human CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells and allows expansion of alloreactive and autoreactive T cells. *J Immunol* 2012, 189:5649-5658. 10

Huang J, Zheng M, Zhang Z, Tang X, Chen Y, Peng A, Peng X, Tong A, Zhou L: Interleukin-7-loaded oncolytic adenovirus improves CAR-T cell therapy for glioblastoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2021, 70:2453-2465.

Lock, M., et al., Measuring the Infectious Titer of Recombinant Adenovirus Using Tissue Culture Infection Dose 50% (TCID₅₀) End-Point Dilution and Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR). *Cold Spring Harbor Protoc*, 2019. 2019(8). 20

Nakao S, Arai Y, Tasaki M, Yamashita M, Murakami R, Kawase T, Amino N, Nakatake M, Kurosaki H, Mori M, et al.: Intratumoral expression of IL-7 and IL-12 using an oncolytic virus increases systemic sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science Translational Medicine* 2020, 12:eaax7992.

Pellegrini M, Calzascia T, Elford AR, Shahinian A, Lin AE, Dissanayake D, Dhanji S, Nguyen LT, Gronski MA, Morre M, et al.: Adjuvant IL-7 antagonizes multiple cellular and molecular inhibitory networks to enhance immunotherapies. *Nat Med* 2009, 15:528-536.

Rosenberg SA, Sportes C, Ahmadzadeh M, Fry TJ, Ngo LT, Schwarz SL, Stetler-Stevenson M, Morton KE, Mavroukakis SA, Morre M, et al.: IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 2006, 29:313-319. 30

Sportes C, Babb RR, Krumlauf MC, Hakim FT, Steinberg SM, Chow CK, Brown MR, Fleisher TA, Noel P, Maric I, et al.: Phase I study of recombinant human interleukin-7 administration in subjects with refractory malignancy. *Clin Cancer Res* 2010, 16:727-735.

Vudattu, N., Magalhaes, I., Hoehn, H., Pan D., and Maeurer M.J. (2009). Expression analysis and functional activity of interleukin-7 splice variants. *Genes Immun* 10, 132-140. 40

White, E., Sabbatini, P., Debbas, M., Wold, W.S.M., Kusher, D.I., and Gooding, L. (1992). The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor alpha. *Mol. Cell. Biol.* 1992; 12: 2570-2580.

【 0 1 1 4 】

引用した特許公開：

国際公開第 2 0 1 4 1 7 0 3 8 9 号

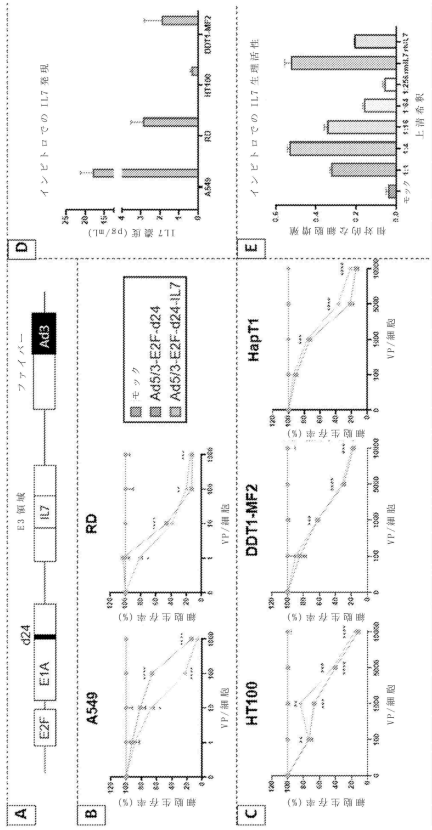
国際公開第 2 0 1 6 1 4 6 8 9 4 号

国際公開第 2 0 2 0 2 4 9 8 7 3 号

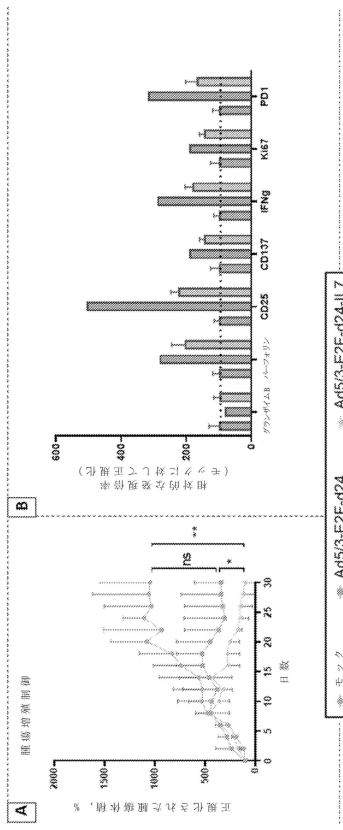
欧州特許第 3 8 5 8 3 6 9 号明細書

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

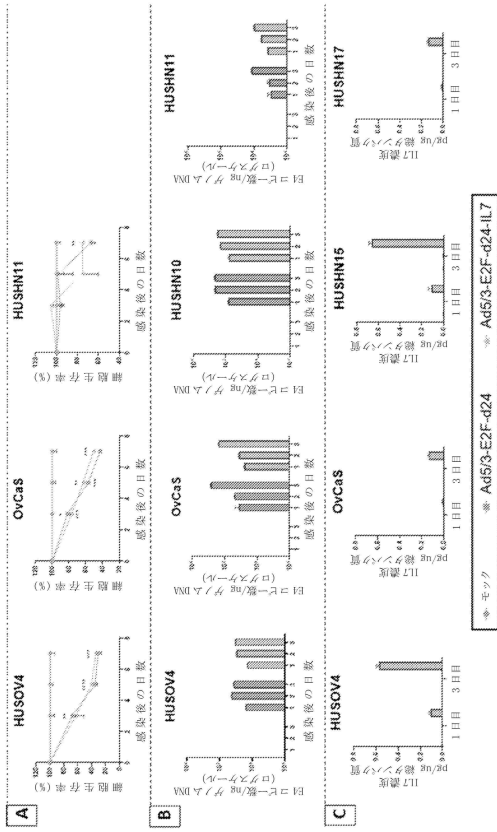
20

30

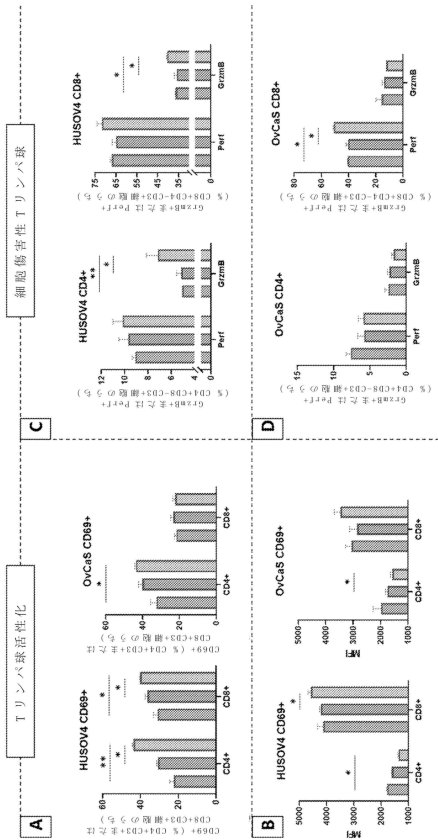
40

50

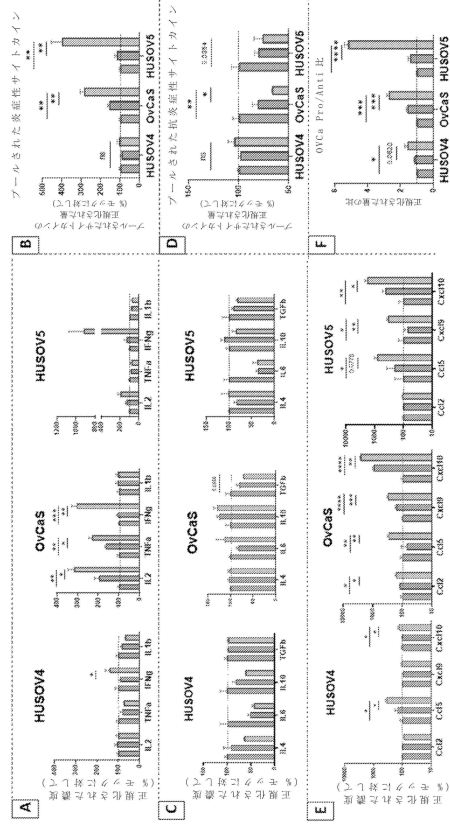
【 図 3 】



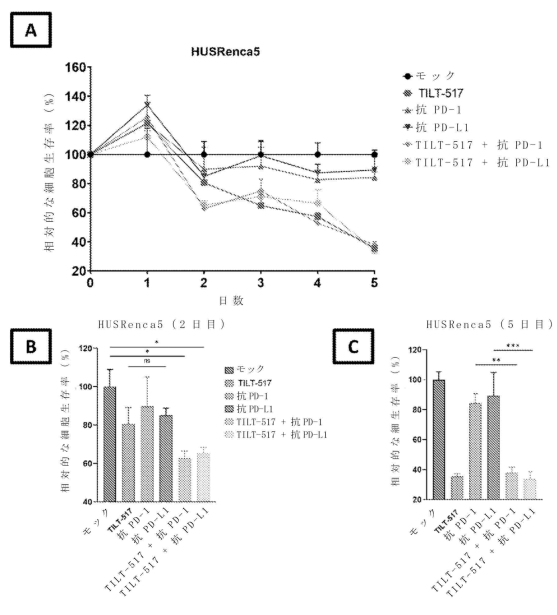
【 図 5 】



【 図 4 】



【 図 6 】



10

20

30

40

50

【配列表】

2024536109000001.xml

10

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和6年6月9日(2024.6.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2024536109000001.xml

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FI2022/050662

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/00 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) A61K												
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, Sequence Search, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	US 2021/038659 A1 (JUNE CARL H [US] ET AL) 11 February 2021 (2021-02-11) paragraphs [0032], [0245] -----	1-19										
A	JP 2016 522805 A (TILT BIOTHERAPEUTICS OY) 4 August 2016 (2016-08-04) -----	1-19										
A	WATANABE ET AL: "Oncolytic Adenovirus Expressing Cytokines Enhances Anti-Tumor Efficacy of Mesothelin-Redirected CAR-T Cells", INTERNET CITATION, 1 January 2016 (2016-01-01), XP002790340, Retrieved from the Internet: URL: http://www.bloodjournal.org/content/128/22/3360 [retrieved on 2019-04-03] the whole document -----	1-19										
-/--												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents : <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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											
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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											
"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)	"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											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report										
31 January 2023		08/02/2023										
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 Seranski, Peter										

10

20

30

40

2

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FI2022/050662

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KEISUKE WATANABE ET AL: "Oncolytic adenovirus armed with cytokines enhances CAR-T cell efficacy in pancreatic tumor model", MOLECULAR THERAPY,, vol. 24, no. Supplement 1, 1 May 2016 (2016-05-01), pages S205-S206, XP002790341, the whole document -----</p>	1-19

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI2022/050662

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.	<input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed.
b.	<input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
	<input type="checkbox"/> accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.	<input type="checkbox"/> 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/FI2022/050662

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2021038659 A1	11-02-2021	AU 2019215031 A1	20-08-2020
		CA 3090249 A1	08-08-2019
		EP 3746116 A1	09-12-2020
		US 2021038659 A1	11-02-2021
		WO 2019152660 A1	08-08-2019

JP 2016522805 A	04-08-2016	AU 2014255733 A1	26-11-2015
		AU 2019216631 A1	05-09-2019
		CA 2909432 A1	23-10-2014
		CN 105307671 A	03-02-2016
		CN 111658670 A	15-09-2020
		DK 2986311 T3	25-02-2019
		EP 2986311 A1	24-02-2016
		EP 3461491 A1	03-04-2019
		ES 2708749 T3	11-04-2019
		JP 6580555 B2	25-09-2019
		JP 7114532 B2	08-08-2022
		JP 2016522805 A	04-08-2016
		JP 2020011966 A	23-01-2020
		KR 20160002971 A	08-01-2016
		KR 20210084651 A	07-07-2021
		KR 20220056879 A	06-05-2022
		RU 2015148920 A	24-05-2017
		SG 10202004535P A	29-06-2020
		SG 11201508585P A	27-11-2015
		US 2015232880 A1	20-08-2015
		US 2017137786 A1	18-05-2017
WO 2014170389 A1	23-10-2014		
ZA 201507790 B	21-12-2016		

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	V
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
C 1 2 N 15/861 (2006.01)	C 1 2 N 15/861	Z Z N A
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	

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,N
E,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,J
M,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY
,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,T
H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 高橋 香元

- (72)発明者 カドリング, タチアナ
フィンランド国, 0 0 2 9 0 ヘルシンキ, トゥクホルマンカトゥ 8 ビー, バイオメディカム 2
ビー内, ティルト バイオセラピューティクス オーワイ内
- (72)発明者 ヘムミンキ, アクセリ
フィンランド国, 0 0 2 9 0 ヘルシンキ, トゥクホルマンカトゥ 8 ビー, バイオメディカム 2
ビー内, ティルト バイオセラピューティクス オーワイ内
- (72)発明者 クラブ, ジェームス
フィンランド国, 0 0 2 9 0 ヘルシンキ, トゥクホルマンカトゥ 8 ビー, バイオメディカム 2
ビー内, ティルト バイオセラピューティクス オーワイ内
- (72)発明者 キシャベイラ, ダフネ
フィンランド国, 0 0 2 9 0 ヘルシンキ, トゥクホルマンカトゥ 8 ビー, バイオメディカム 2
ビー内, ティルト バイオセラピューティクス オーワイ内
- (72)発明者 ハヴネン, リイカ
フィンランド国, 0 0 2 9 0 ヘルシンキ, トゥクホルマンカトゥ 8 ビー, バイオメディカム 2
ビー内, ティルト バイオセラピューティクス オーワイ内

F ターム (参考) 4C084 AA13 AA19 MA02 NA05 NA14 ZB091 ZB092 ZB261 ZB262 ZC751
ZC752
4C085 AA14 BB11 EE03
4C087 AA01 AA02 BB37 BC83 MA02 NA05 NA14 ZB09 ZB26 ZC75