

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7410139号
(P7410139)

(45)発行日 令和6年1月9日(2024.1.9)

(24)登録日 令和5年12月25日(2023.12.25)

(51)国際特許分類

| | | | | | |
|---------|------------------|-----|---------|--------|---------|
| C 1 2 N | 15/863 (2006.01) | F I | C 1 2 N | 15/863 | Z Z N A |
| C 1 2 N | 15/19 (2006.01) | | C 1 2 N | 15/19 | |
| C 1 2 N | 15/13 (2006.01) | | C 1 2 N | 15/13 | |
| C 1 2 N | 15/12 (2006.01) | | C 1 2 N | 15/12 | |
| C 1 2 N | 15/11 (2006.01) | | C 1 2 N | 15/11 | Z |

請求項の数 16 (全45頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-519114(P2021-519114)
 (86)(22)出願日 令和1年10月10日(2019.10.10)
 (65)公表番号 特表2022-502066(P2022-502066
 A)
 (43)公表日 令和4年1月11日(2022.1.11)
 (86)国際出願番号 PCT/GB2019/052877
 (87)国際公開番号 WO2020/074902
 (87)国際公開日 令和2年4月16日(2020.4.16)
 審査請求日 令和4年9月26日(2022.9.26)
 (31)優先権主張番号 1816547.2
 (32)優先日 平成30年10月10日(2018.10.10)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 英国(GB)

(73)特許権者 512316611
 クイーン マリー ユニバーシティ オブ
 ロンドン
 英国, イー 1 4 エヌエス ロンドン, マ
 イル エンド ロード
 (74)代理人 100101281
 弁理士 辻永 和徳
 (72)発明者 ワン ヤオヘ
 英国 イーシー 1 エム 6 ピーキュー ロ
 ンドン グレーター ロンドン、ジョン
 バン サイエンス センター、クイーン
 マリー ユニバーシティ オブ ロンドン
 、グランド フロア、パーツ キャンサ
 - インスティテュート、モレキュラー
 オンコロジー

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 癌治療のための修飾B 5 R 遺伝子を有する腫瘍溶解性ワクシニアウイルス

(57)【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ワクシニアウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子に挿入された S C R 1 - 、 S C R 2 - 、 S C R 3 - 、 および S C R 4 - ドメイン欠失 B 5 R 遺伝子 (B 5 R S C R 1 - S C R 2 - S C R 3 - S C R 4 -) をコードする核酸配列を含むワクシニアウイルスベクターであつて、ネイティブ B 5 R 遺伝子がインタクトのままであるワクシニアウイルスベクター。

【請求項 2】

ワクシニアウイルスの N 1 L 遺伝子に挿入された生物学的に活性なタンパク質をコードする核酸配列をさらに含む、請求項 1 に記載のワクシニアウイルスベクター。

【請求項 3】

生物学的に活性なタンパク質が、サイトカイン、抗体、抗体フラグメント、サイトカイン受容体およびサイトカイン受容体フラグメントからなる群から選択される、請求項 2 に記載のワクシニアウイルスベクター。

【請求項 4】

生物学的に活性なタンパク質がサイトカインである、請求項 3 に記載のワクシニアウイルスベクター。

【請求項 5】

サイトカインが、 I L - 2 1 、 G M - C S F 、 I L - 2 、 I L - 7 、 I L - 1 2 、 I L - 1 5 、 I L - 1 8 、 I F N - 、 およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項 4 に記載のワクシニアウイルスベクター。

【請求項 6】

S C R 1 - 、 S C R 2 - 、 S C R 3 - 、 および S C R 4 - ドメイン欠失 B 5 R 遺伝子 (B 5 R S C R 1 - S C R 2 - S C R 3 - S C R 4 -) をコードする核酸配列が S E Q I D N o : 6 8 である、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のワクシニアウイルスベクター。

【請求項 7】

該生物学的に活性なタンパク質が免疫チェックポイント阻害剤分子である、請求項 4 に記載のワクシニアウイルスベクター。

【請求項 8】

該免疫チェックポイント阻害剤分子が、可溶性 P D 1 、可溶性 P D - L 1 、可溶性 T I M - 3 、可溶性 C T L A - 4 、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項 7 記載のワクシニアウイルスベクター。

10

【請求項 9】

S C R 1 - 、 S C R 2 - 、 S C R 3 - 、 および S C R 4 - ドメイン欠失 B 5 R 遺伝子 (B 5 R S C R 1 - S C R 2 - S C R 3 - S C R 4 -) をコードする核酸配列が S E Q I D N o : 6 8 である、請求項 7 または 8 記載のワクシニアウイルスベクター。

【請求項 10】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のワクシニアウイルスベクターを含む組成物。

【請求項 11】

請求項 7 から 9 のいずれか一項に記載のワクシニアウイルスベクターを含む組成物。

20

【請求項 12】

癌の治療に使用するための、請求項 1 0 または 1 1 に記載のワクシニアウイルスベクターを含む組成物。

【請求項 13】

癌の治療における別個の、逐次的な、または同時の使用のための、請求項 1 0 に記載のワクシニアウイルスベクターを含む組成物。

【請求項 14】

癌の治療における別個の、逐次的な、または同時の使用のための、請求項 1 1 に記載のワクシニアウイルスベクターを含む組成物。

【請求項 15】

30

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のワクシニアウイルスベクターと、薬学的に許容されるアジュバント、希釈剤および / または緩衝剤を含むキット。

【請求項 16】

請求項 7 または 8 に記載のワクシニアウイルスベクターと、薬学的に許容されるアジュバント、希釈剤および / または緩衝剤を含むキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本開示は、癌の治療に使用するための修飾腫瘍溶解性ウイルス (m o d i f i e d o n c o l y t i c v i r u s e s) に関する。

40

【0 0 0 2】

新しい治療法の進歩にもかかわらず、多くの固形腫瘍タイプの患者の生存率は依然として最大の課題の 1 つである。より効果的な治療法が大いに必要とされている。腫瘍溶解性ウイルスは、従来の治療法に耐性のある癌の治療のための魅力的な治療法である (Wong et al. , Viruses 2 , 78-106 (2010)) 。

【0 0 0 3】

腫瘍溶解性ウイルスは、癌細胞を特異的に標的にして殺すことができるウイルスである。さらに、腫瘍溶解性ウイルスは、宿主の抗腫瘍免疫応答の誘導と増幅に不可欠な危険信号を提供する。

【0 0 0 4】

50

ワクシニアウイルス(VV)は、腫瘍溶解療法の魅力的な候補となる多くの特徴を備えた二本鎖DNAを持つウイルスである(AI Yaghchi C. et al., *Immunotherapy* 7(12): 1249-58(2015))。それは細胞内で急速に複製し、腫瘍内で効率的に広がり、感染した細胞を溶解することができる。さらに、VVは広く研究されており、大きなクローニング能力とさまざまな天然および合成プロモーターを備えた明確な分子生物学を備えているため、異種核酸配列を運ぶためのベクターとして理想的である。VVは、天然痘の根絶に使用した後の安全性プロファイルを十分に確立しており、そのため、制御されていない感染症の治療法をすぐに利用できる。さらに、固形腫瘍に一般的に見られる低酸素微小環境は、多くの種類の腫瘍溶解性ウイルスの複製と有効性に有害であるが、VVはこの環境で効果的に複製する(Hiley et al., *Gene Therapy* 17, 281-287(2010))。ワクチン株または遺伝子組み換え株のいずれかを使用した初期の臨床結果は、抗腫瘍効果を示している(Haddad et al., *Annals of Surgical Oncology* 19 Suppl 3, S665-674(2012); Park et al., *Lancet Oncol* 9:533-542, 2008; Breitbach et al., *Nature* 477:99-102, 2011)。

【0005】

ワクシニアウイルスのさまざまな欠失変異体が報告されている。チミジンキナーゼ(TK)遺伝子とウイルス成長因子(VGF)遺伝子が欠失したウエスタンリザーブ株変異体は、腫瘍抗原に対して免疫系を効率的にプライミングすることができる(McCart et al., *Cancer Res* 61, 8751-8757(2001))。さらに、異種遺伝子、例えばサイトカインをコードする遺伝子でウイルスを武装させると、抗腫瘍免疫応答をさらに活性化することができる。

【0006】

細胞溶解を介して感染細胞からVVを放出すると、ウイルスは循環血液を介してより多くの細胞に局所的および遠隔的に感染することができる。感染性VVには、細胞内成熟ウイルス(IMV)と細胞外エンベロープウイルス(extracellular env enveloped virus ; EEV)の2つの主要な形態があり(Appleyard et al., *J. Gen. Virology* 13, 9-17(1971))、IMVはウイルスの最初の感染性形態であり、感染性の子孫の大部分を表している。EEVは宿主細胞タンパク質でコーティングされており、抗原的に比較的静かで、宿主内での広範囲かつ長距離の伝播を可能にする先天性(補体)および適応性(中和抗体)の全身性宿主防御に拮抗する能力がある(Smith, GL & Vander plasschen, A & Law, M., *J. Gen. Virol.* 83, 2915-2931(2002); Payne, LG & Kris tensson, K., *J. Gen. Virol.* 66(3), 643-646(1985))。ただし、EEVは、VVのほとんどの株において少數しか生成されない(すべての感染性子孫の1%未満)。

【0007】

6つの遺伝子がEEV特異的タンパク質をコードすることが知られている。これらは、A56R、F13L、B5R、A34R、A36R、およびA33Rである。B5Rは、「ショートコンセンサスリピート」(SCR)と呼ばれる50?70アミノ酸のリピートの4つのコピーを含む42kDaの糖タンパク質をコードする。B5Rを削除すると、ブラークサイズが小さくなり、EEV形成が大幅に減少する(10倍)(Blasco, R. & Moss, B., *J. Virol.* 65, 5910-5920(1991); Engelstad, M. & Smith, GL, *Virology* 194, 627-637(1993))。B5Rの膜貫通および細胞質尾部内の配列は、タンパク質をラッピング膜にターゲティングするために重要である(Katz et al., *J. Virol.* 71, 3178-3187(1997))。SCR4、SCR3、4、またはSCR2, 3, 4が削除された変異型VVは小さなブラークを生成するが、野生型ウイルスの約50倍の感染性EEVを生成し、コメット型のブラークを形成する(Sanderson et al., *J. Gen. Virol.* 79(6), 1415-1425(1998); Mathew et al., *J. Virol.* 72, 2429-2438(1998))。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

腫瘍溶解性ウイルスの分野での進歩にもかかわらず、ワクシニアに基づく治療薬はまだ

10

20

30

40

50

市場に出回っていない。したがって、癌の治療に使用するためのより効果的な形態の腫瘍溶解性ワクシニアウイルスに対する満たされていない必要性がある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の第1の態様によれば、ワクシニアウイルスのTK遺伝子に挿入された、SCR1-、SCR2-、SCR3-、およびSCR4ドメイン欠失B5R遺伝子(SCR1-, SCR2-, SCR3-, and SCR4-domain deleted B5R gene)(B5R SCR1-、SCR2-、SCR3-、SCR4-)をコードする核酸配列を含むワクシニアウイルスベクター(vaccinia virus vector)が提供される。

10

【0010】

該核酸配列は、天然、合成または組換えであり得る。それは、例えば、cDNA、PCR産物、またはゲノム配列であり得る。単離することも、プラスミド、ベクター、宿主細胞の一部であることもできる。プラスミドは、染色体DNAとは独立して複製する能力を持つ環状染色体外DNA分子(circular extrachromosomal DNA molecule)である。

【0011】

「核酸」という用語は、その最も広い意味で、オリゴヌクレオチド鎖に組み込まれている、または組み込まれ得る任意の化合物および/または物質を指す。いくつかの実施形態において、核酸は、ホスホジエステル結合を介してオリゴヌクレオチド鎖に組み込まれる、または組み込まれ得る化合物および/または物質である。いくつかの実施形態において、「核酸」は、個々の核酸残基(例えば、ヌクレオチドおよび/またはヌクレオシド)を指す。いくつかの実施形態において、「核酸」は、個々の核酸残基を含むオリゴヌクレオチド鎖を指す。本明細書で使用される場合、「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」という用語は交換可能に使用することができる。いくつかの実施形態において、「核酸」は、RNAならびに一本鎖および/または二本鎖DNAおよび/またはcDNAを包含する。さらに、「核酸」、「DNA」、「RNA」という用語、および/または同様の用語には、核酸類似体、すなわち、ホスホジエステル骨格以外を有する類似体も含まれる。例えば、当技術分野で知られており、骨格にホスホジエステル結合の代わりにペプチド結合を有する、いわゆる「ペプチド核酸」は、本発明の範囲内であると見なされる。

20

【0012】

「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」という用語は、互いに縮重したバージョンである、および/または同じアミノ酸配列をコードするすべてのヌクレオチド配列を含む。タンパク質および/またはRNAをコードするヌクレオチド配列は、イントロンを含み得る。核酸は、天然源から精製したもの、組換え発現システムを使用して生成し、任意に精製されたもの、化学的に合成されたものであることができる。例えば、化学的に合成された分子の場合、核酸は、化学的に修飾された塩基または糖または骨格修飾などを有する類似体などのヌクレオシド類似体を含むことができる。特に明記しない限り、核酸配列は5'から3'の方向に提示される。「核酸セグメント」という用語は、本明細書では、より長い核酸配列の一部である核酸配列を指すために使用される。多くの実施形態において、核酸セグメントは、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の残基を含む。いくつかの実施形態において、核酸は、天然のヌクレオシド(例えば、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、およびデオキシシチジン);ヌクレオシド類似体(例えば、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロ-ピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニル-シチジン、C-5プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、O(6)-メチルグアニン、およ

30

40

50

び 2 - チオシチジン) ; 化学的に修飾された塩基; 生物学的に修飾された塩基(例えば、メチル化された塩基);挿入された塩基;修飾糖(例えば、2' - フルオロリボース、リボース、2' - デオキシリボース、アラビノース、およびヘキソース);および/または修飾リン酸基(例えば、ホスホロチオエートおよび5' - N - ホスホルアミダイト結合)であるか、またはそれらを含む。いくつかの実施形態において、本発明は、送達を促進または達成するために化学的に修飾されていない核酸(例えば、ヌクレオチドおよび/またはヌクレオシドを含むポリヌクレオチドおよび残基)を意味する「非修飾核酸(unmodified nucleic acids)」を特に対象とする。

【0013】

ワクシニアウイルスのB5R遺伝子は、EEV形成に不可欠な膜タンパク質をコードするオープンリーディングフレーム(open reading frame; ORF)を持っている。B5R ORFの欠失は、EEVの劇的な減少に起因し、その結果、ウイルスは *in vitro* で小さなプラーカを生成し、*in vivo* で大幅に弱毒化される。B5Rの細胞外部分は、主に、補体調節タンパク質(complement regulatory proteins)に存在する短いコンセンサスリピート(short consensus repeats; SCR)に類似した4つのドメインで構成されている。本発明の部分的B5R遺伝子は、ワクシニアウイルスの天然B5Rタンパク質のシグナルペプチド(SP)、ストーク領域(STALK)、膜貫通領域(TM)および細胞質尾部(CT)をコードする核酸領域を適切に含む。

【0014】

部分的なB5R遺伝子は、発現を駆動するための上流プロモーターを有する発現力セットの形態で存在し得る。したがって、第1の態様の核酸配列は、発現力セットの一部であり得る。発現力セットはベクターの一部であり得る。これは、プロモーター、オープンリーディングフレーム、および3' 非翻訳領域を含む。プロモーターは、1または複数の特定の遺伝子の転写を開始する特定の配列を持つDNAの領域である。ワクシニアにおける異種遺伝子の発現に使用されるプロモーターには、初期および後期の転写活性を制御するプロモーター、例えば、mH5、H5、P7.5およびPE/Lが含まれる。本明細書で使用される異種遺伝子とは、ウイルスには通常見られない遺伝子である。修飾されたH5プロモーターであるmH5は、主に初期の活性を持ち、天然に存在するH5よりも優れた安定性を示す。

【0015】

適切には、プロモーターは、H5プロモーターまたはp7.5初期/後期合成またはpH5Rプロモーターであり得る。発現力セットは、赤色蛍光タンパク質(RFP)などのレポータータンパク質をさらに含み得る。第2のプロモーターは、レポータータンパク質の上流に提供され得、H5プロモーターまたはp7.5初期/後期合成またはpH5Rプロモーターなどのレポータータンパク質の発現を駆動するために使用され得る。

【0016】

第1の態様の一実施形態では、核酸配列は、ベクター中に存在し得る。本明細書で使用されるベクターは、発現または複製のために核酸配列を細胞またはウイルスに導入するための構築物を指す。それは、組換え構築物、例えば、プラスミド、ウイルス、または細胞またはウイルスへの導入時に核酸配列の発現または複製が可能な任意の他の構築物を指す。

【0017】

したがって、プラスミドを使用して、発現力セットを宿主細胞に導入することができる。プラスミドはまた、宿主細胞においてポリペプチドを発現するために使用され得る。例えば、宿主細胞は、そのポリペプチドを発現するために、特定のポリペプチドをコードすることができるプラスミドでトランスフェクトされ得る。

【0018】

発現力セットは、ワクシニアウイルスのチミジンキナーゼ(TK)遺伝子に挿入することができる。任意の好適な部位特異的組換えまたは遺伝子挿入技術を使用することができる。適切には、挿入は、相同組換えを使用して行われる。例えば、Cre-Loxまたは

10

20

30

40

50

F1p / FRTシステムなどの、任意の適切な相同組換えシステムを使用することができる。例えば、組み込み部位は、レポータータンパク質をコードする核酸配列の周り、および部分的B5R遺伝子の発現を駆動するプロモーター領域の上流で、発現カセットに追加され得る。

【0019】

本発明の好ましい実施形態において、ワクシニアウイルスベクターは、図31のいずれか1つに示される配列と実質的に相同(homologous)であるヌクレオチド配列を含む。20%を超える同一性(例えば、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%)を有するヌクレオチド配列は相同配列と見なされる。本明細書で使用される場合、実質的に相同とは、少なくとも60%または70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%、99%以上の同一性(identity)を示す配列を指す。本発明の一実施形態では、配列は、図31のいずれかに示される配列配列セットと少なくとも80%以上(例えば、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%など)の相同性を有する。

10

【0020】

本明細書で使用される場合、相同性および同一性という用語は交換可能に使用される。相同性を決定するための配列比較は、容易に入手可能な配列比較ソフトウェアを使用して実行することができる。例えば、BLAST(Ausubel et al., 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed-Chapter 18を参照)およびFASTA(Altschul et al., 1990 J.Mol.Biol.403-410)が含まれるが、これらに限定はされない。BLASTとFASTAはどちらも、オンライン検索とオンライン検索に使用できる(Ausubel et al., 1999, Short Protocols in Molecular Biology, pages 7-58 to 7-60を参照)。

20

【0021】

本発明の一実施形態では、ワクシニアウイルスベクターは、図31のいずれかに記載されている配列と少なくとも80%以上(例えば、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%など)の相同性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0022】

本明細書で使用される場合、「同一性」という用語は、ポリマー分子間、例えば、核酸分子(例えば、DNA分子および/またはRNA分子)間、および/またはポリペプチド分子間の全体的な関連性を指す。例えば、2つの核酸配列のパーセント同一性の計算は、最適な比較目的のために2つの配列を整列させることによって実行され得る(例えば、ギャップは、最適な整列のために第1および第2の核酸配列の一方または両方に導入され得る。同一でない配列は、比較のために無視できる)。

30

【0023】

特定の実施形態において、比較目的のために整列される配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または実質的に100%である。次に、対応するヌクレオチド位置のヌクレオチドが比較される。最初の配列の位置が2番目の配列の対応する位置と同じヌクレオチドで占められている場合、分子はその位置で同一である。2つの配列間のパーセント同一性は、2つの配列の最適なアライメントのために導入される必要があるギャップの数、および各ギャップの長さを考慮に入れて、配列によって共有される同一の位置の数の関数である。2つのシーケンス間のシーケンスの比較と同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを使用して実行できる。たとえば、2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、PAM 120重量残基表を使用してALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれているMeyers and Miller(CABIOS, 1989, 4: 11-17)のアルゴリズムを使用してギャップ長ペナルティ12およびギャップペナルティ4として決定できる。あるいは、2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、NWSeqapDNA.CMPマトリックスを使用するGCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムを使用して

40

50

決定することができる。

【0024】

本発明の一実施形態では、ワクシニアウイルスベクターは、図31のいずれかに記載されている配列と少なくとも80%以上（例えば、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%など）の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0025】

本明細書で使用される場合、「単離された」という用語は、（1）最初に製造されたときに関連していた成分、および／または（2）製造、調製、および／または人間の手によって製造された成分の少なくともいくつかから分離された物質および／または実体（entity）を指す（自然界および／または実験環境であるかどうかにかかわらず）。単離された物質および／または実体は、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約99%以上で、それらが最初に共にあった他のコンポーネントから分離される。いくつかの実施形態において、単離された薬剤は、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約99%以上の純度である。本明細書で使用される場合、物質は、他の成分を実質的に含まない場合、「純粋」である。本明細書で使用される場合、単離された物質および／または実体のパーセント純度の計算は、賦形剤（例えば、緩衝液、溶媒、水など）を含むべきではない。

10

【0026】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」は、一般的に言えば、ペプチド結合によって互いに結合された少なくとも2つのアミノ酸のストリングである。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、少なくとも3?5個のアミノ酸を含み得、それらのそれぞれは、少なくとも1つのペプチド結合を介して他のものに結合している。当業者は、ポリペプチドが、「非天然」アミノ酸またはそれにもかかわらず、必要に応じてポリペプチド鎖に組み込むことができる他の実体を含むことがあることを理解するであろう。

20

【0027】

本明細書で使用される場合、「タンパク質」という用語は、ポリペプチド（すなわち、ペプチド結合によって互いに連結された少なくとも2つのアミノ酸のストリング）を指す。タンパク質は、アミノ酸以外の部分（例えば、糖タンパク質、プロテオグリカンなど）を含み得、および／または他の方法で処理または修飾され得る。当業者は、「タンパク質」が、細胞によって産生されるような完全なポリペプチド鎖（シグナル配列の有無にかかわらず）であり得るか、またはその特徴的な部分であり得ることを理解するであろう。当業者は、タンパク質が、例えば、1つまたは複数のジスルフィド結合によって連結されているか、または他の手段によって連結されている、複数のポリペプチド鎖を含むことがあることを理解するであろう。ポリペプチドは、1-アミノ酸、d-アミノ酸、またはその両方を含み得、当技術分野で知られている様々なアミノ酸修飾または類似体のいずれかを含み得る。有用な修飾には、例えば、末端アセチル化、アミド化、メチル化などが含まれる。いくつかの実施形態において、タンパク質は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、合成アミノ酸、およびそれらの組み合わせを含み得る。「ペプチド」という用語は、一般に、約100アミノ酸未満、約50アミノ酸未満、20アミノ酸未満、または10アミノ酸未満の長さを有するポリペプチドを指すために使用される。いくつかの実施形態において、タンパク質は、抗体、抗体フラグメント、それらの生物学的に活性な部分、および／またはその特徴的な部分である。「ペプチド」という用語は、一般に、約100アミノ酸未満、約50アミノ酸未満、20アミノ酸未満、または10アミノ酸未満の長さを有するポリペプチドを指すために使用される。いくつかの実施形態において、タンパク質は、抗体、抗体フラグメント、それらの生物学的に活性な部分、および／またはその特徴的な部分である。

30

【0028】

ワクシニアには複数の菌株があり、人間と動物に対してさまざまなレベルの病原性がある。

40

【0028】

ワクシニアには複数の菌株があり、人間と動物に対してさまざまなレベルの病原性があ

50

る。1950年代には、天然痘撲滅プログラムの一環として、世界中で多くのウイルス株が使用された。世界のさまざまな地域でさまざまな株が使用された。たとえば、ニューヨーク市保健委員会（NYCBOH）株とその派生株であるワイスは米国で一般的であり、コペンハーゲン（CPN）とリスター株はヨーロッパで優勢だった。好ましい実施形態では、ワクシニア株はリスター株である。

【0029】

ワクシニアウイルスベクターは、チミジンキナーゼ欠損（TK欠損）ワクシニアウイルスである。本明細書で使用されるTK欠損ワクシニアウイルスは、内因性チミジンキナーゼ（TK）の欠如と一致する表現型を示すワクシニアウイルスを指す。TK欠損ワクシニアウイルスは、宿主細胞によって產生されるチミジンキナーゼに依存している。チミジンキナーゼは、腫瘍細胞で構成され產生されるが、正常細胞では產生されない。したがって、TK欠損ワクシニアウイルスは、特にEGFR/Ras/ERK経路の活性化により、腫瘍細胞内で選択的に生存することができる。

10

【0030】

ワクシニアウイルスのTK遺伝子（L090）を相同組換えの標的にするために、本発明のベクターを作製するために使用される発現カセットは、TK遺伝子および／またはTK遺伝子に隣接する遺伝子に相補的な追加の配列を備え得る。例えば、追加の配列は、発現カセットの上流端および下流端にそれぞれ提供され得る。言い換えれば、TK遺伝子の左側（L089）を標的とするためにTKレフトアーム（Lアーム）が提供され得、TK遺伝子の右側（L091）を標的とするためにTKライトアーム（Rアーム）が提供され得る。次に、部分的なB5R遺伝子および遺伝子挿入要素を含む実際の発現カセットは、ワクシニアウイルスのTK領域への挿入の準備ができているTK-LアームとTK-Rアームとの間に配置され得る。発現カセットはワクシニアウイルスベクターのトランسفォーメーションの前にシャトルベクター（shuttle vector）に挿入することができる。

20

【0031】

したがって、発現カセットは、以下の核酸配列要素から構成され得る：

【0032】

INT - PRO - REP - INT - PRO - SP - STC

30

【0033】

ここで、INTは遺伝子挿入エレメント、PROはオプションのプロモーター、REPはレポータータンパク質をコードするオプションの核酸配列、SPはシグナルペプチドをコードする核酸配列、STCは上で定義した本発明の部分的なB5R遺伝子をコードする核酸である。オプションのプロモーターは、オプションのレポータータンパク質をコードする配列が存在する場合にのみ存在する。シグナルペプチド（SP）ドメインは、SP（シグナルペプチド）がウイルスに感染した細胞でのタンパク質合成後に部分的なB5R遺伝子（STC）の修飾を指示するため、組換えウイルスによって発現されるタンパク質には現れない。シグナルタンパク質（SP）は、部分的なB5Rタンパク質が発現し、翻訳後修飾を受けた後、STCから切断される。

40

【0034】

一実施形態では、発現カセットは、以下の要素から構成され得る：

【0035】

Loxp - H5 - RFP - Loxp - H5 - SP + STC

【0036】

ここで、遺伝子挿入要素はLoxp部位であり、プロモーターはH5プロモーターであり、オプションのレポータータンパク質はRFPである。

【0037】

したがって、SCR1-、SCR2-、SCR3-、およびSCR4-ドメインが欠失したB5R遺伝子（B5R SCR1- SCR2- SCR3- SCR4-）をコードする核酸配列は、ワクシニアウイルスのTK遺伝子に挿入される外因性配列（exogen

50

ous sequence)である。

【0038】

本明細書に記載の不活性化は、転写または転写後レベルでの遺伝子のサイレンシング、遺伝子の欠失、遺伝子の突然変異、核酸配列の挿入による遺伝子の破壊、またはウイルス完全に機能する遺伝子産物を作成できないようにする他の方法を指す。遺伝子の不活性化は部分的または完全であることができる。本明細書に記載されるように、本発明のワクシニアウイルスにおけるTK遺伝子の不活性化は、部分的B5R遺伝子をコードする核酸配列の挿入によって引き起こされる。挿入は、本明細書に記載されるような相同組換え(homologous recombination)によって促進され得る。

【0039】

本発明のワクシニアウイルスペクターは、部分的B5R遺伝子をコードする核酸配列をワクシニアウイルスのTK遺伝子に挿入することにより、上記のように調製することができる。部分的なB5R核酸配列の挿入は、部位特異的組換えの任意の適切な方法によって達成され得る。しかし、相同組換えは、この目的のために一般的に適用可能な方法である。

【0040】

一実施形態では、ワクシニアウイルスペクターの天然のB5R遺伝子はインタクト(intact)のままであり得る。

【0041】

本発明のワクシニアウイルスペクターは、さらなるタンパク質をコードする追加の核酸配列をさらに含み得る。適切には、タンパク質は、生物学的に活性なタンパク質であり得る、すなわち、それは治療効果を有し、および/またはそれはレポータータンパク質であり得る。タンパク質をコードする核酸配列が、部位特異的組換えによってワクシニアウイルスペクターに挿入されるに便利である。

【0042】

任意の便利な部位特異的組換えまたは遺伝子挿入技術を使用することができる。適切には、挿入は、相同組換えを使用して行われる。標的配列への核酸配列の挿入は、当業者に周知の方法によって容易にできる。たとえば、方法は以下に開示されている; Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, by J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis (2003), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Virology Methods Manual, edited by Brian W J Mahy and Hillar O Kangro (1996) Academic Press and Expression of genes by Vaccinia virus vectors. Current Protocols in Molecular Biology, published by John Wiley and Son (1998), Chapter 16.

【0043】

レポーター遺伝子を除去するための、例えばCre-Lox、またはFlp/FRTシステムなど、任意の適切な相同組換えシステムを使用することができる。遺伝子挿入エレメントは、タンパク質をコードする核酸配列の周り、およびタンパク質の発現を駆動するプロモーター領域の上流の発現カセットに加えることができる。

【0044】

ワクシニアウイルスペクターのN1L遺伝子にさらに異種タンパク質を挿入することが適切である場合がある。ワクシニアウイルスのN1L遺伝子(L025)を相同組換えの標的にするために、発現カセットは、N1L遺伝子および/またはN1L遺伝子に隣接する遺伝子に相補的な追加の配列を備えていてもよい。たとえば、追加の配列は、発現カセットの上流端および下流端にそれぞれ提供され得る。言い換えれば、N1Lレフトアーム(Lアーム)は、N1L遺伝子および/または次の遺伝子(L024)の左側を、N1Lライトアーム(Rアーム)は、N1L遺伝子および/または次の遺伝子(L026)の右側を標的とするために提供され得る。次に、タンパク質をコードする核酸配列および遺伝子挿入要素を含む実際の発現カセットは、ワクシニアウイルスのN1L遺伝子への挿入の準備ができているN1L-LアームとN1L-Rアームとの間に位置し得る。発現カセットは、ワクシニアウイルスペクターの形質転換の前にシャトルベクターに適切に挿入され得る。

10

20

30

40

50

【0045】

したがって、発現力セットは、以下の核酸配列要素から構成され得る：

【0046】

INT - PRO - REP - INT - PRO - X

【0047】

ここで、INTは遺伝子挿入エレメント、PROはオプションのプロモーター、REPはレポータータンパク質をコードするオプションの核酸配列、Xは異種タンパク質（たとえば生物学的に活性なタンパク質）をコードする核酸配列である。オプションのプロモーターは、オプションのレポータータンパク質をコードする配列が存在する場合にのみ存在する。異種タンパク質は、抗癌活性、例えば細胞増殖抑制、細胞毒性、または免疫原性活性を有する治療用タンパク質であり得る。

10

【0048】

本明細書で使用されるポリペプチドは、ペプチド結合によって一緒に結合された複数のアミノ酸残基を指す。それは、タンパク質、ペプチド、オリゴペプチドと交換可能に使用され、糖タンパク質およびそれらの誘導体を含む。「ポリペプチド」という用語はまた、元のポリペプチドと同じ生物学的機能または活性を保持するポリペプチドの類似体および誘導体を包含することを意図している。本明細書で使用される異種ポリペプチドは、自然界でウイルスによって通常は発現されない任意のポリペプチドを指す。異種ポリペプチドは生物学的に活性であり得る。本明細書で使用される生物学的に活性なポリペプチドは、生物学的機能または活性を有するポリペプチドを指す。

20

【0049】

異種タンパク質は、サイトカインまたは抗腫瘍免疫を促進するために抑制性サイトカインを中和するように作用するタンパク質、例えば、抗体、またはフラグメント抗原結合(Fab)または一本鎖可変フラグメント(scFv)などの抗体フラグメント、サイトカイン受容体またはサイトカイン受容体フラグメントであることができる。

【0050】

「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、本明細書では交換可能に使用される。抗体分子は、ジスルフィド結合によって結合された2つの同一の重鎖(H)と2つの同一の軽鎖(L)で構成されている。各重鎖はFcポリペプチドを含む。2つのFcポリペプチド重鎖は二量体化して抗体分子のFc領域を形成する。「Fc領域」という用語は、CH1-CLドメイン対を形成する軽鎖(CL)の定常部分と相互作用する重鎖(CH1)の第1の定常領域免疫グロブリンドメインを除く抗体の定常領域を指す。したがって、Fc領域は、IgA、IgD、およびIgGの最後の2つの定常領域免疫グロブリンドメイン(CH2およびCH3)、およびIgEおよびIgMの最後の3つの定常領域免疫グロブリンドメイン(CH2、CH3およびCH4)を含む、様々な免疫グロブリン定常ドメインのポリペプチドは、本発明に従って二量体化ドメインとして使用することができる。

30

【0051】

いくつかの抗体エフェクター機能は、リンパ球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞などの多くの細胞の表面にあるFc受容体(FcR)へのFc領域の結合によって媒介される。FcRsは抗体アイソタイプに対する特異性によって定義される。たとえば、IgG抗体のFc受容体はFcγRと呼ばれる。

40

【0052】

本明細書で言及される「抗体フラグメント」は、全長抗体の任意の部分を意味する。抗体フラグメントの例には、これらに限定されないが、Fab、Fab'、F(ab')2、scFv、Fv、dsFvダイアボディおよびFdフラグメントが含まれる。

【0053】

「一本鎖可変フラグメント」または「scFv」という用語は、重鎖ドメインと軽鎖ドメインが連結されているFvフラグメントを指す。1つまたは複数のscFvフラグメントを他の抗体フラグメント（たとえば重鎖または軽鎖の定常ドメイン）に連結して、1つまたは複数の抗原認識部位を有する抗体構築物を形成することができる。

50

【0054】

異種タンパク質は、IL-21、GM-CSF、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18およびIFN-a、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるサイトカインであり得る。他の適切な異種タンパク質には、抗原提示増強分子(antigen presentation enhancing molecule)(HSP96)、またはPD-L1または抗PD-1阻害剤(例えば、抗PD-L1または抗PD-1抗体)などの免疫チェックポイント阻害阻害剤(immune checkpoint blocking inhibitors)が含まれる。抗PD-L1抗体の例には、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブが含まれる。抗PD-1抗体の例には、ベンプロリズマブ、ニボルマブ、ビジリズマブ、およびセミプリマブが含まれる。他の適切なPD-L1または抗PD-1阻害剤には、抗体のフラグメントの融合タンパク質、例えば、PD-1リガンドプログラム細胞死リガンド2(PD-L2)、たとえばAMP-224の細胞外ドメインに融合した抗体のFcドメインが含まれる。他の免疫チェックポイント阻害阻害剤には、PD-1、PD-L1、TIM-3、CTLA-4、およびそれらの任意の組み合わせが含まれる。免疫チェックポイント阻害阻害剤分子は可溶性がある。免疫チェックポイント阻害阻害剤は、免疫チェックポイント阻害分子と呼ばれることがある。

10

【0055】

「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、本明細書では互換的に使用される。抗体分子は、ジスルフィド結合によって結合された2つの同一の重鎖(H)と2つの同一の軽鎖(L)で構成されている。各重鎖はFcポリペプチドを含む。2つの重鎖からの2つのFcポリペプチドは二量体化して、抗体分子のFc領域を形成する。「Fc領域」という用語は、CH1-CLドメイン対を形成する軽鎖(CL)の定常部分と相互作用する重鎖(CH1)の第1の定常領域免疫グロブリンドメインを除く抗体の定常領域を指す。したがって、Fc領域は、IgA、IgD、およびIgGの最後の2つの定常領域免疫グロブリンドメイン(CH2およびCH3)と、IgEおよびIgMの最後の3つの定常領域免疫グロブリンドメイン(CH2、CH3およびCH4)を含む。

20

【0056】

いくつかの抗体エフェクター機能は、たとえばリンパ球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞などの多くの細胞の表面にあるFc受容体(FcR)へのFc領域の結合によって媒介される。FcRは抗体アイソタイプに対する特異性によって定義される。たとえば、IgG抗体のFc受容体はFcγRと呼ばれる。

30

【0057】

本明細書で言及される「抗体フラグメント」は、全長抗体の任意の部分を意味する。抗体フラグメントの例には、これらに限定されないが、Fab、Fab'、F(ab')2、scFv、Fv、dsFvダイアボディおよびFdフラグメントが含まれる。

【0058】

「一本鎖可変フラグメント」または「scFv」という用語は、重鎖ドメインと軽鎖ドメインが連結されているFvフラグメントを指す。1つまたは複数のscFvフラグメントを他の抗体フラグメント(たとえば重鎖または軽鎖の定常ドメイン)に連結して、1つまたは複数の抗原認識部位を有する抗体構築物を形成することができる。

40

【0059】

一実施形態では、異種タンパク質をコードする発現カセットは、以下の要素から構成され得る：

【0060】

FRT - H5 - RFP - FRT - H5 - X

【0061】

ここで、遺伝子挿入エレメントはFRTサイト、プロモーターはH5プロモーター、オプションのレポータータンパク質はRFPである。いくつかのさらなる実施形態において、異種タンパク質(X)は、サイトカイン、例えば、IL-21、IL-15、IL-1

50

2またはGM-CSFなどのインターロイキンであり得る。

【0062】

さらなる実施形態において、サイトカインは、IL-15 / 受容体融合遺伝子であり得る。IL-15 / 受容体融合遺伝子は、IL-15 / IL-15受容体融合タンパク質をコードすることができる。例えば、融合タンパク質は、可溶性IL-15 / IL-15Rアルファ複合体であり得る。理論に縛られることなく、IL-15は免疫応答を増強するための免疫療法剤として大きな可能性を秘めている。ただし、IL-15の活動は、サイトカインが細胞結合高親和性IL-15Ra1phaによって、IL-15Rbetaと共にガムマ鎖を発現する標的細胞に伝達されるという独特的メカニズムによって媒介される。したがって、投与されたIL-15単独の有効性は、遊離IL-15Ra1phaの利用可能性によって制限される可能性がある。可溶性IL-15 / IL-15Ra1pha複合体は、in vivoでのIL-15半減期とバイオアベイラビリティを大幅に向上させ、IL-15活性を最大化する可能性がある。10

【0063】

本明細書におけるIL-12への言及は、IL-12A(例えば、GenBankアクセション番号AF404773.1G1:15128214)および/またはIL-12B(例えば、GenBankアクセション番号AY008847.1G1:11192034)を含む。成熟したIL-12タンパク質には両方のサブユニットが含まれている。本明細書におけるIL-21への言及は、アイソフォーム1(例えば、GenBankアクセション番号NP_068575.1/GI:11141875)および/またはアイソフォーム2(GenBankアクセション番号NP_001193935.1/GI:333033767)を含む。本明細書におけるGM-CSFへの言及は、GenBankアクセション番号AF373868.2/GI:14278709を含む。本明細書におけるIL-15への言及は、GenBankアクセション番号U14407.1を含む。一般的に、配列はヒトの配列である。20

【0064】

本明細書で使用されるレポーターポリペプチドは、その発現が、宿主細胞またはウイルスにおける核酸配列、発現カセットまたはベクターの存在を示すポリペプチドを指す。レポーターポリペプチドの例には、蛍光ポリペプチド、化学発光ポリペプチド、生物発光ポリペプチド、リン光ポリペプチド、ならびに酵素が含まれるが、これらに限定されない。30

【0065】

本発明の一実施形態では、レポーターポリペプチドは蛍光ポリペプチドである。蛍光ポリペプチドには、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、シアノ蛍光タンパク質およびそれらの誘導体が含まれるが、これらに限定されない。

【0066】

しかしながら、患者の癌の治療のための臨床使用において、発現カセットがレポータンパク質を含まないことが好ましい。

【0067】

制限部位は、制限酵素によって認識および切断される特定のヌクレオチド配列である。制限酵素の例は、Sal I、Bgl II、Hind III、Sma I、Bam HI、およびMlu Iである。Bam HI制限部位はBam HIによって認識される制限部位である。他の酵素の制限部位も同様に命名されている。40

【0068】

本発明の一実施形態では、核酸配列またはベクターは、1つまたは複数の制限部位を含む。本発明の好ましい実施形態は、Sal I、Bgl II、Hind III、Sma I、Bam HIおよびMlu I制限部位を含む核酸配列またはベクターである。

【0069】

本発明の一実施形態では、核酸配列またはベクターは、ワクシニアウイルス内に含まれる。本発明の特定の実施形態において、核酸配列は、図31のいずれか1つに示される式を有する。50

【 0 0 7 0 】

本発明の第2の態様によれば、本発明の第1の態様のワクシニアウイルスベクターを含む組成物が提供される。この態様による本発明の実施形態では、組成物は、任意に、薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含む。したがって、本発明は、本明細書に記載されるような医薬組成物を含む。

【 0 0 7 1 】

組成物は、任意の適切な経路、例えば、経口（頬側または舌下を含む）、局所（頬側、舌下または経皮を含む）、または非経口（皮下、筋肉内、静脈内、動脈内、動脈内、髄腔内、胸膜内、眼内、心臓内、腹腔内または皮内経路を含む）による投与に適合させることができる。

10

【 0 0 7 2 】

非経口投与に適合した医薬組成物には、製剤を意図されたレシピエントの血液と実質的に等張にする抗酸化剤、緩衝液、静菌剤および溶質を含み得る水性および非水性滅菌注射溶液、懸濁剤および増粘剤を含み得る水性および非水性滅菌懸濁液が包含される。

【 0 0 7 3 】

注射可能な溶液に使用できる賦形剤には、例えば、水、アルコール、ポリオール、グリセリン、および植物油が含まれる。組成物は、単位用量または複数用量の容器、例えば密封されたアンプルおよびバイアルで提供され得、そして滅菌液体、例えば注射用水を使用前に添加することのみを必要とするフリーズドライ（凍結乾燥）状態で保存され得る。即時注射溶液および懸濁液は、無菌の粉末、顆粒および錠剤から調製することができる。

20

【 0 0 7 4 】

医薬組成物は、保存剤、可溶化剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、甘味料、着色剤、臭気剤、塩（本発明の物質自体が薬学的に許容される塩の形態で提供され得る）、緩衝液、コーティング剤または抗酸化剤を含み得る。それらはまた、本発明の物質に加えて、治療的に活性な薬剤を含み得る。

【 0 0 7 5 】

本発明の第3の態様によれば、癌の治療のためにそれを必要とする対象に本発明の第2の態様の組成物を投与することを含む治療方法が提供される。組成物は、任意に、薬学的に許容されるアジュバント、希釈剤、および／または緩衝剤と共に処方され得る。したがって、組成物は、医薬組成物として処方することができる。

30

【 0 0 7 6 】

本発明のこの態様の実施形態は、癌の治療に使用するために本明細書で定義されるワクシニアウイルスベクターを含む組成物にまで及ぶ。そのような実施形態は、癌の治療に使用するための薬剤の製造における本明細書で定義されるような核酸配列またはワクシニアウイルスベクターを含む。

【 0 0 7 7 】

本明細書で使用される場合、対象は、人間を含む動物を指す。動物には、マウス、ラット、ニワトリなどの家禽、ウシ、ヤギ、鹿、ヒツジなどの反芻動物、およびブタ、ネコ、イヌ、およびヒト、チンパンジー、ゴリラ、サルなどの霊長類などの他の動物が含まれ得る。

40

【 0 0 7 8 】

治療上有効な量は、腫瘍崩壊を誘発するのに十分な用量である。送達および投与のための用量は、動物の疾患モデルを使用して、または任意にヒトの臨床試験において、経験的に決定された現在の既存のプロトコルに基づくことができる。最初の研究用量は、例えば、マウスについての、本明細書に記載の動物研究に基づくことができる。用量は、治療が予防的であるか治療的であるか、治療が受けられる疾患の種類、発症状態、進行度、重症度、頻度、期間、または確率、望ましい臨床エンドポイント、以前のまたは同時の治療、対象の全体的な健康状態、年齢、性別、人種または免疫学的能力、および当業者によって評価される他の要因に応じて変化する。投与量、数、頻度または期間は、治療または治療の有害な副作用、合併症または他の危険因子、ならびに対象の状態によって示されるよう

50

に、比例して増加または減少し得る。当業者は、治療的または予防的利益を提供するのに十分な量を提供するために必要な投薬量およびタイミングに影響を及ぼし得る要因を理解するであろう。

【0079】

本発明のこの態様の実施形態では、本発明の方法は、対象に追加の癌治療を適用することをさらに含む。本明細書で使用される癌治療は、医学的または物理的手段による癌の治療を指す。追加の癌治療は、化学療法、生物学的治療、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法、抗血管療法、凍結療法、毒素療法、および／または手術、およびそれらの組み合わせを含む。

【0080】

本明細書に開示される本発明の方法および使用は、対象が治療の対象となる疾患を有すると同定された直後、または数日、数ヶ月、または数年後に実施することができる。

【0081】

この方法には、さまざまなスケジュールでウイルスを投与することが含まれる。ウイルスの単回投与は、1、2、5、10、15、20、または24時間にわたって対象または腫瘍に投与され得る。ウイルスは、1、2、3、4、5、6、7日またはそれ以上の日数または数週間にわたって投与することができる。注射の間隔は、1、2、3、4、5、6、7日または数週間にすることができる。典型的には、複数の用量が、腫瘍の近くなど、または静脈内投与の場合、対象の血流またはリンパ系の特定の入口点など、同じ一般的な標的領域に投与される。ワクシニアウイルスペクターは、2、3、4、5、またはそれ以上の回数投与することができる。ワクシニアウイルスペクターは、腫瘍を切除する前に、さまざまなスケジュールと用量で投与することができる。

【0082】

本発明の方法および使用はまた、ウイルスの1つ、2つ、3つ、または4つの異なる実施形態を別々に、逐次的にまたは同時に投与することを含み得る。第1の異種タンパク質をコードする核酸配列を含む第1のウイルスおよび第2の異種タンパク質をコードする核酸配列を含む第2のウイルスは、別々に、逐次的に、または同時に投与され得る。ウイルスの異なる実施形態のその後の投与間の間隔は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、または24時間であり得る。

【0083】

例えば、免疫チェックポイント阻害剤をコードする核酸配列を含む第1のウイルスは、サイトカインをコードする核酸配列を含む第2のウイルスに続いて投与され得る。

【0084】

免疫チェックポイント阻害タンパク質は、PD1、PD-L1、TIM-3、CTLA-4、またはそれらの任意の組み合わせであることができる。免疫チェックポイント阻害タンパク質は可溶性であることができる。

【0085】

サイトカインは、IL-21、GM-CSF、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18およびIFN-、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。

【0086】

一実施形態では、生物学的に活性なタンパク質が可溶性PD1であるワクシニアウイルスペクターが、生物学的に活性なタンパク質がIL-12であるワクシニアウイルスペクターに続いて投与される。

【0087】

本発明の方法および使用はまた、ウイルスおよび異種タンパク質を別々に、逐次的にまたは同時に投与することを含み得る。逐次的な投与の間隔は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、または24時間であり得る。例えば、サイトカインをコードする核酸配列を含むウイルスに続いて抗体を投与することができる。

【0088】

本発明の第1または第2の態様または異種タンパク質の別個の、逐次的にまたは同時の

10

20

30

40

50

投与は、投与が静脈内、腹腔内、筋肉内、経口、鼻腔内または皮下である任意の便利な経路によって達成され得る。本発明の第1または第2の態様および異種タンパク質は、組み合わせた調製物として調製することができ、または別個の成分として調製することができる。

【0089】

この方法には、異なるウイルス濃度でウイルスを投与することが含まれる。特定の態様において、対象は、少なくとも 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 、 5×10^{11} 、 1×10^{12} 以上のウイルス粒子またはplaques形成単位(pfu)で、さまざまな値とその間の範囲を含み投与される。ウイルスの投与量は、0.1 mL、1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL、6 mL、7 mL、8 mL、9 mL、10 mL以上で、その間のすべての値と範囲を含んで投与できる。投与量は、時間の経過とともに、または個別の注射によって拡大することができる。10

【0090】

特定の実施形態では、対象は、癌および/または腫瘍を有するヒトである。癌は、胃腸癌、気道癌、泌尿生殖器癌、造血癌、肉腫、腺癌、扁平上皮癌、または非悪性腫瘍/過形成であり得る。腫瘍は、治療前は切除不能であり、治療後に切除可能である場合がある。腫瘍は、再発性、原発性、転移性、および/または多剤耐性腫瘍である場合がある。特定の局面において、腫瘍は臍上または臍内に位置している。他の局面において、腫瘍は、神経内分泌腫瘍、内分泌腫瘍、末梢中枢神経系腫瘍、脳癌腫瘍、頭頸部癌腫瘍、食道癌腫瘍、皮膚癌腫瘍、肺癌腫瘍、肝臍腫瘍、胸腺腫瘍、胃癌腫瘍、結腸癌腫瘍、卵巣癌腫瘍、子宮癌腫瘍、膀胱癌腫瘍、睾丸癌腫瘍、膀胱腫瘍、直腸癌腫瘍、黒色腫あるいは乳癌腫瘍であり得る。20

【0091】

本発明に開示される組成物および方法は、異なるタイプの遺伝子治療、例えば、腫瘍抑制遺伝子治療、自殺遺伝子治療、ウイルスベクター、予防接種戦略、抗血管新生療法、アポトーシス促進遺伝子治療および遺伝子置換療法において使用され得る。“Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Overcoming the Obstacles” (Wong et al. Viruses 2010, 2, 78-106)は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。30

【0092】

本発明に開示される組成物および方法は、癌の治療における追加の治療手段または方法、例えば、外科手術、化学療法、放射線療法、分子癌療法、または本明細書に記載の本発明の核酸とは異なる遺伝子の投与であり得るさらなる遺伝子療法と組み合わせて使用され得る。30

【0093】

本発明の第4の態様によれば、ワクシニアウイルスのSCR1-、SCR2-、SCR3-、およびSCR4ドメイン欠失B5R遺伝子(B5R SCR1- SCR2- SCR3- SCR4-)をコードする核酸配列が提供される。

【0094】

本発明の第5の態様によれば、本明細書で定義されるワクシニアウイルスベクターと、薬学的に許容されるアジュバント、希釈剤および/または緩衝液とを含むキットが提供される。したがって、このキットは癌の治療に有用である。キットは、化学療法剤などのさらなる治療剤、および/または使用説明書をさらに含み得る。40

【0095】

本開示は、新規の組換えワクシニアウイルス発現ベクターおよび癌治療およびワクチン接種におけるその応用について記載している。本発明のベクター(VVL15TK-STCと名付けられた)は、天然痘の予防のために何億人もの人々に安全に使用されてきたワクチン株リスター・ワクシニアウイルスに由来し、より具体的には1つのウイルス遺伝子(チミジンキナーゼ遺伝子)の欠失を含む。この新規変異VVは、その親ウイルスよりも10?30倍多くの感染性EVを生成するが、変異VVの総計での複製は弱められない。50

【0096】

本開示の一実施形態において、複製能力のあるリスター株ワクシニアウイルス (replication-competent Lister strain vaccinia virus) (VV15 TK-STC) は、チミジンキナーゼ (TK) 領域の B5R 遺伝子 (STC) の一部およびインタクトな B5R 遺伝子を含むと記載され、これはより良いコメットテール (comet tail) 形成、ブラークの通常のサイズでの EEV 產生を示す。部分的な B5R 遺伝子 (STC) は、B5R 遺伝子はインタクトのままワクシニアウイルスゲノムの非生体領域に挿入できる。このような修飾により、修飾されたウイルスは VV15 TK-STC と同じ機能を有する。VV15 TK-STC ウイルスは、in vivo で強化された抗腫瘍効果を有する。治療遺伝子 IL-21 で武装した (armed with therapeutic gene IL-21) VV15 TK-STC ウイルスは、抗腫瘍免疫を改善する。VV15 TK-STC ウイルスは、IL-12 などの他の治療遺伝子を有することができる。VV15 TK-STC ウイルスは、局所投与 (腫瘍内注射) および全身投与 (静脈内注射) することができる。

10

【0097】

本開示の一実施形態では、ウイルス遺伝子の特定の操作、チミジンキナーゼ領域への部分的 B5R 遺伝子 (STC) の挿入、および癌治療へのその使用を伴う、リスター株 VV に由来する新規 VV ベクターが記載される。

【0098】

元の B5R 遺伝子を元の位置に保持したまま変異 B5R 遺伝子 (STC) を TK 領域に導入すると、in vitro で正常なブラークサイズを生成するウイルスが作成される。これは、ウイルスの拡散を改善するために重要である。この修飾により、より多くの EEV が生成され、ウイルスが長距離に拡散する能力が向上する。したがって、この修飾は、本開示に示されるように、ウイルスの抗腫瘍効力を増強し、静脈内送達により適したウイルスを作り出す。

20

【0099】

腫瘍溶解性ウイルスの静脈内送達は、インビボでの抗腫瘍効果を改善するために望ましい。なぜなら、静脈内送達ウイルスは、患者内の原発腫瘍に加えて、転移性および循環腫瘍細胞をより容易に標的とすることが期待できるからである。本開示の重要な利点は、腫瘍溶解性ウイルスをより効果的に静脈内に送達できることである。本明細書に記載の変異ウイルスは、EEV を形成する能力が増強されており、ワクシニアウイルスの EEV 形態は、免疫介在性ウイルスクリアランスに対して本質的に耐性があるため、さらに有利である。本開示は、腫瘍向性 (TK および N1L 欠失による) VV を修飾して、修飾 VV 内にウイルス B5R 遺伝子の STC 領域の第 2 のコピーを組み込むことにより、EEV 形成を増強し得る一方で、オリジナルの全長 B5R 領域の発現を保持する。この開示は、臨床的に静脈内送達されたときにまだ有効性を実証していない、静脈内送達可能な腫瘍溶解性ウイルス療法の前進を表す。修飾されたウイルスはまた、原発部位と転移部位の両方で腫瘍に対する免疫応答を増強するために、さらなる導入遺伝子を組み込むことができる。

30

【0100】

本発明の第 2 およびその後の態様の好ましい特徴は、必要な変更を加えて第 1 の態様と同様である。

40

【0101】

本発明は、添付の図面を参照することにより説明されるが、これは例示のみを目的として含まれており、本発明を限定するものとして解釈されるべきではない。

【図面の簡単な説明】**【0102】**

【図1】図1は、pGEMT-B5R-STC および pGEMT-B5R-S-STC シャトルベクター (shuttle vector) の発現カセット (expression cassette) を示している。上のパネルは、B5R タンパク質と pGEMT-B5R-STC および S-STC シャトルベクターの発現カセットの構造を示している。シグ

50

ナルペプチド (SP) を含む発現 S T A L K - T M - C T (STC) およびシグナルペプチド (SP) を含む S C R I - S T A L K - T M - C T (S-STC)。下のパネルは、p G E M T - B 5 R STC シャトルベクターの発現カセットであり、マーカー遺伝子 R F P と S T A L K - T M - T C (STC) の両方が H 5 プロモーターによって駆動される。シグナルペプチド (SP) を含む S T A L K - T M - C T (STC) の発現は H 5 プロモーターによって駆動され、シグナルペプチド (SP) を含む S C R I - S T A L K - T M - C T (S-STC) はネイティブ B 5 R プロモーターによって駆動される。マーカー遺伝子 R F P は H 5 プロモーターによって駆動される。SP = B 5 R 遺伝子のシグナルペプチド。p G E M T - B 5 R - STC および p G E M T - B 5 R S - STC シャトルベクターの相同組換えセクション。T K L アームは、T K 遺伝子の左側 (L 0 8 9) をターゲットにする。T K R アームは、T K 遺伝子の右側 (L 0 9 1) をターゲットにする。発現カセットは T K L アームと T K R アームの間に位置する。

【0103】

【図2】図2は、*in vitro*でのワクシニアウイルスのブラークとコメットテールの形成の比較を示している。6ウェルプレート内のCV-1細胞を、希釈したコントロールウイルスVVL15、組換えVVL15 B5R-STC、組換えVVL15 B5RS-STCに感染させた。感染の3日後、感染した細胞を前述のようにクリスタルバイオレットを使用して染色した。プレートを写真スキャンした。

【0104】

【図3】図3は、発現カセットと T K - S T C シャトルベクターおよび相同組換えを示している。上のパネル：最初の H 5 プロモーター（左から）が R F P 式を駆動し、2番目の H 5 プロモーターが S T C を駆動する。SP : シグナルペプチド (B 5 R から) ; S T C : S t a l k (S)、T M (T)、C T (C)。T M は B 5 R タンパク質の膜貫通ドメインであり、C T は B 5 R タンパク質の細胞質尾部である。下のパネル：T K - S T C シャトルベクターの相同組換えセクション。T K レフトアーム (L アーム) は T K 遺伝子の左側 (L 0 8 9) をターゲットにし、T K ライトアーム (R アーム) は T K 遺伝子の右側 (L 0 9 1) をターゲットにする。発現カセット (L o x p - H 5 - R F P - L o x p - H 5 - S P + S T C) は、T K 領域の T K L アームと T K - R アームの間に位置する。

【0105】

【図4】図4は、VVL15 T K - S T C ウィルスの確認を示している。A : VVL15 R F P ウィルス。B : VVL15 T K - S T C ウィルス。VVL15 T K - S T C ブラーク精製の最終ラウンドでは、CV1細胞のウェル内のすべてのコロニーで R F P が発現していることが確認された。CV1溶解物から抽出されたウィルスDNAからPCRによって S T C 遺伝子と下流の T K 遺伝子の一部を増幅するために特異性のプライマーペアを使用した。PCR産物は VVL15 R F P DNA には存在しなかったが、VVL15 T K - S T C DNA には存在した。これは、VVL15 T K - S T C での T K 遺伝子の欠失と、T K 領域での S T C の存在を示している。B 5 R 遺伝子の SP 上のフォワードプライマーと B 5 R 細胞質尾部のリバースプライマーを PCR で使用して、B 5 R 遺伝子全体と変異型 B 5 R S T C を増幅した。完全長の B 5 R は VVL15 R F P と VVL15 T K - S T C に存在したが、変異体 S P - S T C は予想どおり VVL15 T K - S T C にのみ存在していた。

【0106】

【図5】図5は、ワクシニアウイルスのブラークの比較を示している。6ウェルプレート中のCV-1細胞を、希釈したコントロールウイルスVVL15 R F P、組換えVVL15 T K - S T C に感染させ、アガロースゲルで覆った。3日後、アガロースゲルを除去し、クリスタルバイオレットを使用して細胞を染色した。プレートは左に示すように写真スキャンされた。ブラークのサイズは、右に示す画像Jを使用して測定した。

【0107】

【図6】図6は、ワクシニアウイルスのブラークとコメットテールの形成の比較を示している。6ウェルプレート中のCV-1細胞は、コントロールウイルスVVL15 R F P

10

20

30

40

50

および組換えVV L 15 TK STCに感染された。感染の3日後、クリスタルバイオレットを使用して細胞を染色し、プレートを写真スキャンした。

【0108】

【図7】図7は、CV1細胞株におけるVV L 15 RFPおよびVV L 15 TK STCウイルスによるEEV産生を示している。0.01 PFU/細胞VVを使用して、6ウェルプレートのCV-1細胞に感染させた。細胞培養培地と感染細胞を感染の48時間後と72時間後に別々のチューブに集め、ウイルスをそれぞれタイトレート(titrate)した。産生されたEEVの比率は、細胞培養培地から回収されたウイルスの総量を感染細胞から回収されたウイルスの総量と比較することによって計算された。

【0109】

【図8】図8は、脇臓癌細胞株におけるVV L - DDおよびVV L - DD STCウイルスによるEEV産生を示している。0.01 PFU/細胞VVを使用して、6ウェルプレートの細胞を感染させた。細胞培養培地と感染細胞を感染後18、24、48時間に別々のチューブに集め、ウイルスをそれぞれタイトレートした。産生されたEEVの比率は、細胞培養培地から回収されたウイルスの総量を感染細胞から回収されたウイルスの総量と比較することによって計算された。TB11831:マウス脇臓癌細胞株、STUITT-2およびMIA PaCa-2はヒト脇臓癌細胞株である。

【0110】

【図9】図9は、肺がん細胞株におけるVV L - DDおよびVV L - DD STCウイルスによるEEV産生を示している。0.01 PFU/細胞VVを使用して、6ウェルプレート中の細胞に感染させた。細胞培養培地と感染細胞を感染後18、24、48時間に別々のチューブに集め、ウイルスをそれぞれタイトレートした。産生されたEEVの比率は、細胞培養培地から回収されたウイルスの総量を感染細胞から回収されたウイルスの総量と比較することによって計算された。LLC:マウス肺がん細胞株。H460、H1299 MIAおよびA549はヒト肺がん細胞株である。

【0111】

【図10】図10は、CV1細胞株における複製VV L 15 RFPおよびVV L 15 TK STCウイルスを示している。PFU/細胞におけるウイルス力価は、1 PFU/腫瘍細胞による感染の24、48および72時間後に収集されたウイルス溶解物に対してTCID₅₀アッセイを実施することによって決定された。各アッセイは3回行った。

【0112】

【図11】図11は、VV L 15 RFPウイルスとVV L 15 TK STCウイルスの溶解力の比較を示している。MTSアッセイを実施して、細胞株CV1、CT26、およびDT6606に対するVV L 15 RFPおよびVV L 15 TK STCウイルスの細胞毒性を測定した。グラフは、対応するウイルスの用量反応(細胞死の割合)曲線(図示せず)から得られたEC₅₀値(細胞の50%を殺すために使用されるウイルス用量)のプロットである。

【0113】

【図12】図12は、結腸癌モデルにおいて、VV L 15 TK STCがVV L 15 RFPよりも効果的であることを示している。同系CT26皮下臍腹モデルは、Balb/C免疫応答性マウス(immunocompetent mice)で確立された。腫瘍体積が平均100mm³に達したとき、1×10⁸ PFUのウイルスまたは同等量のビヒクルバッファー(50 μlのPBS)の1日量(合計5)をIT注射した(グループあたりn=5-7)。腫瘍の成長は、週に2回のノギス測定によって追跡された。

【0114】

【図13】図13は、脇臓がんモデルにおいて、VV L 15 TK STCがVV L 15 RFPよりも効果的であることを示している。同系のDT6606皮下臍腹モデルは、免疫応答性C57/B16マウスで確立された。腫瘍体積が平均100mm³に達したとき、1×10⁸ PFUのウイルスまたは同等量のビヒクルバッファー(50 μlのPBS)の1日量(合計5)をIT注射した(グループあたりn=5-7)。腫瘍の成長は、週に

10

20

30

40

50

2回のノギス測定によって追跡された。

【0115】

【図14】図14は、発現力セットとmIL-21またはhIL-21を発現するN1Lシャトルベクターおよび相同組換えを示している。Creリコンビナーゼによって切除されたRFPを含む修飾VV-TK-STCを使用して、N1L領域にサイトカイン導入遺伝子を発現するウイルスを作成した。N1Lシャトルベクター内におけるmIL-21またはhIL-21およびRFPの発現は、H5プロモーターによって駆動された。RFPとそのプロモーターH5はFRTに隣接していたため、RFPとそのプロモーターH5は最終修飾ウイルスのFRTに作用するフリッパーゼによって切除され、修飾されたマーカーフリーウイルスを作成できる。

10

【0116】

【図15】図15は、VTK-STC hIL-21ウイルスにおけるhIL-21発現の確認を示している。CV-1細胞におけるhIL-21の発現は、野生型VV(VVWT)、TK-STC VV(CTRL)、VVL12 N1L hIL-21(hHIL21)、およびTK STChIL-21の感染から3日後にELISAによって測定された。

20

【0117】

【図16】図16は、TK-STC mIL-21ウイルスにおけるmIL-21発現の確認を示している。示された感染後時間でのDT6606細胞におけるmIL-21の発現をELISAによって測定した。使用したすべてのウイルスはTKおよびN1L遺伝子が欠失している。mIL21はウイルス感染後の細胞で発現する。d = 削除。

20

【0118】

【図17】図17は、免疫応答性C57/B16マウスの皮下に確立されたDT6606腫瘍内のVVの存在を示している。触知可能になったら、マウスを経口胃管栄養法によりCAL101(10mg/Kg)で治療し、3時間後、B5Rの修飾第2コピーを含まないVVL TK N1LまたはVVL TK-STC N1Lの 1×10^8 PFU/注射を使用した静脈内注射を行った。最後の治療から1、3、5日後に投与し、腫瘍を切除し、qPCRを使用してウイルス負荷を分析した(n=3/グループ)。スクエアトアンペアードT検定を使用して、2つのグループのウイルス量を比較した(* p > 0.05)。

30

【0119】

【図18】図18は、免疫応答性シリアハムスターに腹腔内に確立されたSHPC6腫瘍を示している。ハムスターは、腫瘍移植後4、6、および8日目に、 1×10^7 PFU/注射のVVL TK N1LまたはVVL TK-STC N1Lで治療された。ログランク(Mantel-cox)検定を使用したカプランマイヤー生存分析を使用して生存を評価した(n=10/グループ)。

40

【0120】

【図19】図19は、免疫応答性のシリアンハムスターに腹腔内に確立されたSHPC6腫瘍を示している。ハムスターは、腫瘍移植後4、6、および8日目に、 1×10^7 PFU/注射VVL TK-STC N1LおよびVVL TK-STC - N1L-hIL21で治療された。ログランク(Mantel-cox)検定を使用したカプランマイヤー生存分析を使用して生存を評価した(n=10/グループ)。

【0121】

【図20】図20は、CaI101(マクロファージの一過性阻害剤)とVVの組み合わせによる癌の治療を示している。CaI101は、ワクシニアウイルス、PBS、TK-STCコントロールウイルス(STC Ctrl)およびTK STC mIL-21(STC VV121)の静脈内注射の3時間前に強制経口投与された。腫瘍の大きさは週に2回測定された。

【0122】

【図21】図21は、CaI101、抗PD1抗体およびVVの組み合わせによる癌の治

50

療を示している。C a I 1 0 1は、P B S、T K - S T Cコントロールウイルス(S T C C t r 1)およびT K - S T C m I L - 2 1(S T C V V I 2 1)の静脈内注射の3時間前に強制経口投与された。腫瘍の大きさは週に2回測定された。V V L - D DはV V D T K - D N 1 Lとも呼ばれ、V V L - D D S T CはV V D T K - S T C - D N 1 Lとも呼ばれる。

【0 1 2 3】

【図22】図22は、T K - S T C m I L - 1 2ウイルスにおけるm I L - 1 2発現の確認を示している。S u i t - 2細胞におけるm I L - 1 2の発現は、T K - S T Cワクシニアウイルス(d T K - S T C - d N 1 L)、T K - S T C m I L - 1 2(d T K - S T C - d N 1 L - m I L - 1 2)の感染から3日後にE L I S Aによって測定された。V V L - D DはV V D T K - D N 1 Lとも呼ばれ、V V L - D D S T CはV V D T K - S T C - D N 1 Lとも呼ばれる。

10

【0 1 2 4】

【図23】図23は、T K - S T C h I L - 1 2ウイルスにおけるh I L - 1 2発現の確認を示している。C F P a c 1細胞におけるm I L - 1 2の発現は、T K - S T Cワクシニアウイルス(d T K - S T C - d N 1 L)、T K - S T C h I L - 1 2(d T K - S T C - d N 1 L - h I L - 1 2)の感染から3日後にE L I S Aによって測定された。V V L - D DはV V D T K - D N 1 Lとも呼ばれ、V V L - D D S T CはV V D T K - S T C - D N 1 Lとも呼ばれる。

20

【0 1 2 5】

【図24】図24は、免疫応答性C 5 7 / B I 6マウスの皮下に確立されたL L C肺がん腫瘍を示している。触知可能になったら、マウスを1、3、5、7、9、11日目に腫瘍内P B Sで、または1、4、7日目に2 0 0 μ g / 注射で腹腔内投与したP D - 1抗体で、または1 × 1 0 8 P F U / 注射の腫瘍内注射の、1、3、5日目のV V L T K - S T C N 1 L - m I L 1 2(7、9、11日目のP B Sの腹腔内注射が続く)、または1、3、5日目のV V L T K - S T C N 1 L - m I L 1 2と続く7、9、11日目のP D - 1抗体の腹腔内注射で治療した。腫瘍の成長をモニターし、各グループの最初の動物が死亡するまで示した。ポンフェローニ事後検定を使用した双方向A N O V Aを使用して、各時点での有意性を比較した。

30

【0 1 2 6】

【図25】図25は、免疫応答性C 5 7 / B I 6マウスの皮下に確立されたL L C肺がん腫瘍を示している。触知可能になったら、マウスを1、3、5、7、9、11日目に腫瘍内P B Sで、または1、4、7日目に2 0 0 μ g / 注射で腹腔内投与したP D - 1抗体で、または1 × 1 0 8 P F U / 注射の腫瘍内注射の、1、3、5日目のV V L T K - S T C N 1 L - m I L 1 2(7、9、11日目のP B Sの腹腔内注射が続く)、または1、3、5日目のV V L T K - S T C N 1 L - m I L 1 2と続く7、9、11日目のP D - 1抗体の腹腔内注射で治療した。ログランク(M a n t e l - c o x)検定を使用したカプランマイヤー生存分析を使用して生存を評価した(n = 1 0 / グループ)。

40

【0 1 2 7】

【図26】図26は、免疫応答性C 5 7 / B I 6マウスの皮下に確立されたL L C肺がん腫瘍を示している。触知可能になったら、マウスを1、3、5、7、9、11日目に腫瘍内P B Sで、または1、4、7日目に2 0 0 μ g / 注射で腹腔内投与したP D - 1抗体で、または1 × 1 0 8 P F U / 注射の腫瘍内注射の、1、3、5日目のV V L T K - S T C N 1 L - m I L 1 2(7、9、11日目のP B Sの腹腔内注射が続く)、1、3、5日目のV V L T K - S T C N 1 L - m I L 1 2と続く7、9、11日目のP D - 1抗体、または1、3、5日目のV V L T K - S T C N 1 L - m I L 1 2と続く7、9、11日目のV V L T K N 1 L - s P D 1(可溶性P D 1を発現)の腹腔内注射で治療した。腫瘍の成長をモニターし、各グループの最初の動物が死亡するまで示した。

【0 1 2 8】

【図27】図27は、免疫応答性C 5 7 / B I 6マウスの皮下に確立されたC M T 6 4肺

50

がん腫瘍を示している。触知可能になつたら、マウスを1、3、5、7、9、11日目に腫瘍内PBSで、または1、3、5日目に1×10⁸PFU/注射のVVLT_K-STC_{N1L-mIL12}と続く7、9、11日目のVVLT_K_{N1L-sPD1}、またはその逆で治療した。腫瘍の成長をモニターし、各グループの最初の動物が死亡するまで示した。

【0129】

【図28】図28は、核酸配列によってコードされる対応するアミノ酸配列を含む、図1からの構築物B_{5R-S-STC}の核酸配列を示す。構築物B_{5R-S-STC}は、示されているようにドメインSP-SCR1-STALK-TM-CT-H5-RFPを含む(a)シグナルペプチドドメインSPはアミノ酸残基1?19からなる。(b)ドメインSCR1はアミノ酸残基20-72からなる。(c)ドメインSTALKはアミノ酸残基237-275からなる。(d)膜貫通ドメインTMはアミノ酸残基276-303からなる。(e)C末端ドメインCTはアミノ酸残基304-317からなる。構築物B_{5R-S-STC}のアミノ酸残基の番号付けは、未修飾のB_{5R}遺伝子によってコードされるネイティブB_{5R}タンパク質のアミノ酸配列に関して与えられる。(f)H5プロモーターは示されている核酸配列を有する。(g)存在する場合、構築物によって発現される赤色蛍光タンパク質(RFP)は、示される核酸配列によってコードされるアミノ酸残基1?225からなる。ドメインH5-RFPは、シングルH5プロモーターにより置換することができる。(h)SP(aa 1-19)-SCR1(aa 20-72)-STALK(aa 237-275)-TM(aa 276-303)-CT(aa 304-317)。

10

20

【0130】

【図29】図29は、核酸配列によってコードされる対応するアミノ酸配列を含む、図1からの構築物B_{5R-STC}の核酸配列を示す。構築物B_{5R-STC}は、示されるドメイン(H5-RFP-H5)-SP-STALK-TM-CTを含む。オプションのドメインH5-RFP-H5は、存在する場合には示されるように核酸配列によってコードされるアミノ酸残基1-225からなる構築物により発現される赤色蛍光タンパク質(RFP)をコードする核酸配列(b)の端のH5プロモーター(a)および(c)の核酸配列の2つのコピーからなる。ドメインH5-RFP-H5は、シングルH5プロモーターで置き換えることができる。(d)シグナルペプチドドメインSPは、アミノ酸残基1-19からなる。(e)ドメインSTALKはアミノ酸残基237-275からなる。(f)膜貫通ドメインTMはアミノ酸残基276-303からなる。(g)C末端ドメインCTはアミノ酸残基304-317からなる。構築物B_{5R-STC}のアミノ酸残基の番号付けは、未修飾のB_{5R}遺伝子によってコードされるネイティブB_{5R}タンパク質のアミノ酸配列に関して与えられる。

30

【0131】

【図30】図30は、核酸配列によってコードされる対応するアミノ酸配列を含む、図2および3からの構築物TK-STCの核酸配列を示す。構築物は、ドメイン(Loxp-H5-RFP-Lox-H5)-SP-STALK-TM-CTを含む。ドメイン(Loxp-H5-RFP-Lox-H5)は、2つのLoxp要素(a)と(d)、H5プロモーター(b)および(e)、および存在する場合、アミノ酸残基1?225からなる構築物によって発現される赤色蛍光タンパク質(RFP)(c)をコードするオプションの核酸配列からなる。LoxpエレメントとH5プロモーターは、示された核酸配列を有する。(f)シグナルペプチドドメインSPは、アミノ酸残基1-19からなる。(g)ドメインSTALKはアミノ酸残基237-275からなる。(h)膜貫通ドメインTMはアミノ酸残基276-303からなる。(i)C末端ドメインCTはアミノ酸残基304-317からなる。構築物TK-STCのアミノ酸残基の番号付けは、未修飾B_{5R}遺伝子によってコードされるネイティブB_{5R}タンパク質のアミノ酸配列に関して与えられる。

40

【0132】

【図31】図31は、(a)構築物STCの核酸配列、および(b)コードされた対応す

50

るアミノ酸配列を示す。

【0133】

材料および方法：

細胞株：使用したすべての腫瘍細胞株は、ATCCまたはCancer Research UK細胞株サービスユニットから、または協力者から提供されたものとして、私たちの研究室に保管された。すべてのヒト癌細胞株は、STRアッセイによって遺伝子型が決定された。この研究で使用されたマウス腫瘍細胞株は次のとおりである：結腸直腸癌細胞株CT26はBALB/c株に由来した。DT6606（肺臓癌）は、肺臓を条件とするK-Rasおよびp53遺伝子に変異があるC57BL/6系統のトランスジェニックマウスに由来する。これは、David Tuveson教授（CRUK、ケンブリッジ研究所、ケンブリッジ、英国）からの親切な贈り物であった。CV1は、米国VAのATCCから入手したアフリカングリーンモンキーの「正常な」腎臓細胞株であり、ウイルスの大量生産を促進するためのストック細胞株として、またすべてのウイルスのタイトレートアッセイで使用された。10

【0134】

ウイルス：VV L15は、lacZレポーターおよびホタルルシフェラーゼ遺伝子をワクシニアウイルスのリストーウクチン株（VVリスター）のTK領域に、それぞれ合成初期／後期およびp7.5プロモーターの制御下で、先に記載されたインビトロ細胞内組換え技術を使用して挿入することによって構築された(Hung, CF et al., Gene Ther 14, 20-29(2007))。VV L15 TK-RFPは、TK遺伝子の代わりにRFPを使用して先に構築された（データは公開されていない）。20

【0135】

VVL15 B5R - STCシャトルベクターの構築：

RFPは、H5-RFPフォワードプライマー（5'-A G A T C T A A A A A T T G AAAATAAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATAGCTACCGGACTCAGATCCA-3'）（BgIIIに下線が引かれている）およびH5-RFPリバースプライマー（5'-A C G C G T C C C G G A A G C T T T A T T G A T T A T T C T C G C TTTCAATTAAACACAACCCCTCAAGAACCTTGTATTATTTCGAATTTCGCCTTAAGATACATTGATGAG-3'）（M1UI、SmaIおよびHindIIIサイトに下線が引かれている）で、DsRedプラスミド（Clontech）からのPCRにより増幅された。SP+STC+B5Rライトアームは、レフトアームフォワードプライマー（5'-A A G C T TAAATAAAAAATGAAAACGATTTC-3'）（HindIIIサイトに下線が引かれている）とライトアームリバースプライマー（5'-C C C G G G G A A T T C A G A T C T T T T A TTTATGAGCGTTAAAAATAGTATA-3'）（SmaIおよびBgIIIサイトには下線が引かれている）で、WR-STCゲノム（スペイン、Rafeal Blasco）からのPCRにより増幅された。B5Rレフトアームは、フォワードプライマー（5'-T A T A C T G C G T G T A T G A C C G-3'）およびリバースプライマー（5'-C C C G G G G A A T T C A G A T C T T T T A T G A G C G T T A A AAATAGTATA-3'）を使用してVVリスターゲノムから増幅された（SmaIおよびBgIIIサイトには下線が引かれている）。すべてのPCR産物は、製造元の指示に従ってpGEMT-easyベクター（Promega）にクローニングされた。正しいシーケンスは、シーケンシングによって検証された。pGEMT-easy-B5Rレフトアームは、BgIIIおよびSmaI制限酵素でリニアライズされた（linearized）。H5-RFP-H5は、BgIIIおよびHindIII制限酵素を使用してpGEMT-easy-H5-RFP-H5からリリースされた。B5Rライトアームは、HindIIIおよびSmaI制限酵素を使用してpGEMT-easy-B5Rライトアームからリリースされた。pGEMT-easy-レフトアームは、BgIIIおよびSmaI制限酵素でリニアライズされた。H5-RFP-H5（BgIII+HindI304050

I I) 、 S T C + B 5 R ライトアーム (H i n d I I I + S m a I) をリニアライズされた p G E M T - e a s y B 5 R レフトアーム (B g L I I + S m a I) にライゲーションした。得られたシャトルベクター p G E M T - e a s y - B 5 R レフトアーム + H 5 - R F P - H 5 + S T C + B 5 R ライトアームをシーケンシングによって検証した。以下、シャトルベクターを V V L 1 5 B 5 R S T C シャトルベクターと表記する。 V V L 1 5 B 5 R S T C シャトルベクターの発現カセットを図 1 に示す。

【 0 1 3 6 】

V V L 1 5 B 5 R S - S T C シャトルベクターの構築 :

B 5 R S - S T C (シグナルペプチド / S P + S C R 1 + s t a l k + 膜貫通ドメイン + 細胞質尾部 / S T C : S P - S C R 1 - S T C) 。レフトアームおよび S P + S C R 1 は、プライマー B 5 R レフトアームフォワード (5 ' - T A T A C T G C G T G T A T G A C C G - 3 ') および B 5 R S C R 1 リバース (5 ' C-T C G A G G A A T T C A A G C T T G C A T G G A T T T C G T A T T C - 3 ') を使用して VV リスター ゲノムから PCR によって増幅された (X h o I および H i n d I I I 部位には下線が引かれている) 。 S T C は、 B 5 R ストークプライマー フォワード (5 ' A A G C T T T G T G T A C G A A C T A A C G A A A A A - 3 ') (H i n d I I I サイトに下線が引かれている) および細胞質尾部リバースプライマー (5 ' A G A T C T T C A C G G T A G C A A T T T A T G G - 3 ') (B g L I I サイトに下線が引かれている) を使用した PCR によって増幅された。 H 5 - R F P は、フォワードプライマー (5 ' A G A T C T A A A A A T T G A A A A T A A A T A C A A A G G T T C T T G A G G G T T G T G T T A A A T T G A A A G C G A G A A A T A A T C A T A A A T A G C - 3 ') (B g L I I サイトに下線が引かれている) およびリバースプライマー (5 ' A C G C G T C G C C T T A A G A T A C A T T G A T G A G - 3 ') (M 1 U I サイトに下線が引かれている) を使用した PCR によって増幅された。 B 5 R ライトアームは、 B 5 R ライトアームフォワードプライマー (5 ' - A C G C G T C T A C C G T G A A T A T A A A T C C G T - 3 ') (M 1 U I サイトに下線が引かれている) および B 5 R ライトアームリバースプライマー (5 ' - C T C G A G G G A T G T A T A C C A T C G T C G T - 3 ') (X h o I サイトに下線が引かれている) を使用した PCR によって増幅された。) 。すべての PCR 産物は、製造元の指示に従って p G E M T - e a s y ベクター (p r o m e g a) にクローニングされた。正しいシーケンスは、シーケンシングによって検証された。 p G E M T - e a s y - B 5 R レフトアーム + S P + S C R 1 は X h o I および H i n d I I I 制限酵素でリニアライズされた。 S T C は、 H i n d I I I および B g L I I 制限酵素を使用して p G E M T - e a s y - S T C からリリースされた。 H 5 - R F P は、 B g L I I および M 1 U I 制限酵素を使用して p G E M T - e a s y - H 5 - R F P からリリースされた。 B 5 R ライトアームは、 M 1 U I と X h o I 制限酵素を使用して p G E M T - e a s y - B 5 R ライトアームからリリースされた。消化された S T C (H i n d I I I + B g L I I) 、 H 5 - R F P (B g L I I + M 1 U I) および B 5 R ライトアーム (M 1 U I + X h o I) をリニアライズされた p G E M T - e a s y - B 5 R レフトアーム + S P + S C R 1 (H i n d I I I + X h o I) にライゲーションした。得られたシャトルベクター p G E M T - e a s y - B 5 R レフトアーム + S P + S C R 1 + S T C + H 5 - R F P + B 5 R ライトアームをシーケンシングによって検証した。以下、シャトルベクターを V V L 1 5 B 5 R S - S T C シャトルベクターと呼ぶ。 V V L 1 5 B 5 R S - S T C シャトルベクターの発現カセットを図 1 に示す。

【 0 1 3 7 】

T K - S T C シャトルベクターの構築 :

L o x P 部位に隣接する R F P を含む T K 指向シャトルベクター (T K - d i r e c t e d s h u t t l e v e c t o r) は以前に構築された (Yuan, M. et al., Mol Ther-Meth Clin D 2 (2015)) 。 B 5 R 遺伝子のシグナルペプチド (S P) は、フォワードプライマー (5 ' T T A A T T A A A A A T A A A A A T G A A A A C G A T T T C C G - 3 ') (P a c I に下線が引かれている) およびリバースプライマー (5 ' G-C T A G C G

10

20

30

40

50

A A T T C A A G C T T T G A A T A A A C A A C A G C - 3') (N h e I 、 E c o R I 10
 および H i n d I I I に下線が引かれている) を使用した P C R によって増幅された。 B
 S T C フラグメント (S T A L K + T M + T C) は、フォワードプライマー (5' -
A A G C T T T G T G T A C G A A C T A A C G A A A A A - 3') (H i n d I I I には
 下線が引かれている) およびリバースプライマー (5' G C T A G C T C A C G G T A G
C A A T T T A T G G A A C T - 3') (N h e I には下線が引かれている) を使用した P
 C R によって増幅された。 S P フラグメントは、 p E G M T e a s y - S P として指定さ
 れた p G E M T e a s y ベクターにクローン化された。 S T C フラグメントを p G E M T
 e a s y - S P の H i n d I I I および N h e I サイトにクローニングして、 p E G M T
 e a s y - S P + S T C を取得した。 S P + S T C は、 P a c I および N h e I 制限酵素
 を使用して p E G M T e a s y - S P + S T C からリリースされ、 L o x P サイトに隣接
 する R F P を含む T K 指向シャトルベクターの P a c I および N h e I サイトにクローン
 化された。結果のシャトルベクターは、 T K S T C シャトルベクターと呼ばれる。 T K
 S T C シャトルベクターの発現カセットを図 3 に示す。

【 0 1 3 8 】

サイトカイン N 1 L - m I L - 1 2 および N 1 L - h I L 1 2 シャトルベクターの構築 :
 相同組換えのために F R T 部位に隣接する R F P を含む N 1 L 指向シャトルベクターは以前に生成され(Yuan et al.、 Mol Ther-Meth Clin D 2(2015))、このシャトルベクターは以後 N 1 L シャトルベクターと呼ばれる。 m I L - 1 2 および h I L - 1 2 を N 1 L シャトルベクターの P m e I および N h e I サイトにクローニングして、 N 1 L - m I L - 1 2 および N 1 L - h I L 1 2 シャトルベクターを取得した(図 2 2)。

【 0 1 3 9 】

N 1 L - m I L - 2 1 および N 1 L - h I L 2 1 シャトルベクターの構築 :

m I L - 2 1 および h I L - 2 1 を N 1 L シャトルベクターの S a I I および B g I I I サイトにクローニングして、 N 1 L - m I L - 2 1 および N 1 L - h I L 2 1 シャトルベクターを取得した(図 1 4)。

【 0 1 4 0 】

前述の C a s 9 を介した相同組換え :

簡単に説明すると、 3×10^5 C V - 1 細胞をトランスフェクションの前日に 6 ウェルプレートの 1 つのウェルに播種した。 g R N A ベクター (N 1 L 領域を標的とするための N I L g R N A 、 T K 領域を標的とするための T K g R N A) を、 C a s 9 とともに 6 ウェルプレートの C V - 1 細胞にコトランスフェクトした。翌日、トランスフェクトされたウェルを 0 . 0 1 P F U / 細胞のバックボーンウイルスに感染させた。相同組換えのためのシャトルベクターは、ウイルス感染の 2 時間後に感染したウェルにトランスフェクトされた。 2 4 時間後に細胞を回収し、 プラーク精製のために - 8 0 で凍結した。

【 0 1 4 1 】

目的のウイルスの精製 :

C a s 9 を介した相同組換えから収集した細胞溶解物を解凍し、この溶解物の $1 \mu l$ を使用して、 8 0 ? 9 0 % のコンフルエンスまで増殖した C V 1 細胞を含む 6 ウェルプレートの 6 ウェルすべてに感染させた。この低いウイルス量は、十分に分離された P F U の出現を確実にする。さらに 4 8 時間後、各ウェルを緑色の光の下で注意深く精査し、赤色に蛍光を発するウイルス P F U を探した。陽性コロニーが特定されると、それらの位置がプレートの下面に細い先端の油性ペンでマークされた。ウェルから培地を吸引した後、コロニーを $2 0 \mu l$ チップで注意深く採取された。次に、チップを $2 5 0 \mu l$ の 5 % F C S C M を含むクライオチューブに沈めた。さらに凍結融解サイクルを行った後、 $5 ? 2 0 \mu l$ のこのウイルス溶液を、以前と同様に C V 1 細胞を含む新しい 6 - W P の各ウェルに添加した。このプロセスは、すべての P F U が赤く蛍光を発するまで、つまりすべてのウイルスコロニーが組換えウイルスによるものになるまで繰り返された。一般に、組換えウイルスの純粋なバッチを取得するには、 6 ? 1 0 ラウンドのプラーク精製が必要だった。この時点で、ウイルス溶解物をスクレープハーベスティングし、ウイルス D N A をカラムベース

のシステム（すなわち、QiagenのBlood Mini Kit）を介して抽出した。ウイルスの純度は、抽出されたウイルスDNAからの標的遺伝子のPCR増幅によって確認された。その存在は、親ウイルスであるVVLによる汚染を示す(Wang et al., JCI in Invest 119, 1604-1615(2009))。

【0142】

予備調査により、STCを発現する純粋な組換えウイルスの生成の可能性が確認されたら、50 μlのウイルス溶解物をCV1細胞を含むT175フラスコに加え、約30 m¹の5%FCS CM中で80?90%のコンフルエンスまで再び増殖させました。細胞と培地は48時間後にスクレープハーベスティングされ、「一次ウイルス増殖物」として保持された。

10

【0143】

TK STC VACVの検証：

DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を製造元のプロトコルに従って使用して、VACV DNAを抽出した。TK領域へのSTCの挿入を確認するために、SP-STCのSP部分をターゲットとするフォワードプライマーは(5' - A A A T A A A A A T G A A A A C G A T T T C C G - 3')、TK遺伝子のライトアーム側をターゲットとするリバースプライマーは(5' - G G A T G T A T A T A C C A T C G T C G T - 3')であった。A46RおよびA47L遺伝子にまたがるコントロールDNAフラグメントは、フォワードプライマー(5' - T T G G C T A T T A A A C A G T A T G G A - 3')およびリバースプライマー(5' - G G A T C C C G A T A A C A A A T G - 3')を使用したPCRによって増幅された。Extensor Long PCR Reddy Mix Master MixをすべてのPCR反応に使用した。PCR産物を1%アガロースゲル電気泳動で分析した。

20

【0144】

変異体N1L VACVの検証：

CV-1細胞は精製されたブラークに感染された。感染した細胞は、感染の2日後に採取された。DNeasy Blood & Tissue Kitを使用して、製造元のプロトコルに従ってVACV DNAを抽出した。N1L遺伝子の欠失を確認するために、N1L遺伝子とL026遺伝子にまたがるDNA断片を、フォワードプライマー(5' - T A T C T A G C A A T G G A C C G T - 3')(N1L遺伝子内)とリバースプライマー(5' - C C G A A G G T A G T A G C A T G G A - 3')(L026遺伝子内)を使用したPCRによって増幅した。A46RおよびA47L遺伝子にまたがるコントロールDNAフラグメントは、フォワードプライマー(5' - T T G G C T A T T A A A C A G T A T G G A - 3')およびリバースプライマー(5' - G G A T C C C G A T A A C A A A T G - 3')を使用したPCRによって増幅された。Extensor Long PCR Reddy Mix Master MixをすべてのPCR反応に使用した。PCR産物を1%アガロースゲル電気泳動で分析した。

30

【0145】

Creリコンビナーゼを使用したRFPの切除：

pCAG-Cre (Addgene製)を6ウェルプレートの1ウェルのCV-1細胞にトランスフェクトした。pCAG-Creによるトランスフェクションの24時間後、CV-1細胞を100?200PFUのCre-RFPVACVに感染させた。2日後、RFP陰性ブラークを採取し、6ウェルプレートのCV-1細胞に感染させて、RFP陰性ブラークを精製した。次に、RFP陰性ブラークを採取し、2日ごとに蛍光顕微鏡でRFP陽性ブラークが見られなくなるまでCV-1細胞を感染させた。CreリコンビナーゼによるウイルスからのRFPの切除は、RFP遺伝子のPCRによってテストされた。

40

【0146】

F1pリコンビナーゼを使用したRFPの切除：

pCAG-F1p (Addgene製)を6ウェルプレートの1ウェルのCV-1細胞にトランスフェクトした。pCAG-F1pによるトランスフェクションの24時間後

50

、 CV - 1 細胞を 100?200 PFU の F1p - RFPVACV に感染させました。2 日後、 RFP 陰性 プラークを採取し、6 ウェルプレートの CV - 1 細胞に感染させて、 RFP 陰性 プラークを精製した。次に、 RFP 陰性 プラークを採取し、2 日ごとに蛍光顕微鏡で RFP 陽性 プラークが見られなくなるまで CV - 1 細胞を感染させました。

【0147】

VVL-DD および VVL-DD STC ウィルスの生成：

RFP を使用しない VVL - DD ウィルスの生成については、以前に説明されている (Yuan, M. et al., Mol Ther-Meth Clin D 2(2015))。VVL - DD STC は、VVL - DD ウィルスと同じ方法で作成されたが、TK シャトルの代わりに TK - STC シャトルベクター (図 3) を使用した (Yuan, M. et al., Mol Ther-Meth Clin D 2 (2015))。VVL - DD STC ウィルスは、N1L が欠失し、TK 領域に STC が挿入された F RP 陰性 ウィルスである。

【0148】

酵素免疫測定法：

mIL - 12、hIL - 12、mIL - 21、および hIL - 21 の発現は、製造元の指示に従って酵素結合免疫吸着測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay) (eBioscience, UK) によって検出された。

【0149】

大量のウィルス産生：

上記の一次ウィルス増殖物を 2 回急速に凍結融解し、CV1 細胞を含む 36?40 個の T175 フラスコに感染するのに必要な 5% FCS CM の必要量中に希釈した (80?90% のコンフルエンス)。48 時間後、感染した CV1 細胞を搔き取り、2,000 rpm (4) の速度で遠心分離を繰り返し、単一のペレットに収集した。ペレットを PBS で洗浄し、12ml の 10 mM の Tris - HCl (pH 9) バッファーに再懸濁し、後日精製するために -80° で保存した。

【0150】

ウィルス精製：

上記の濃縮したウィルス溶解物懸濁液を 2 回凍結融解し、ダウンス (dounce) ホモジナイザー (Thermofisher) に移し、60 回のストロークでホモジナイズした。次にそれを 30 秒間超音波処理した。2,000 rpm、4° で 5 分間遠心分離した後、上清 (放出されたビリオン粒子を含む) を収集し、10 mM の Tris - HCl バッファーで総量 30 ml に希釈した。溶液は 4 つに分けられた。それぞれを 36 ml のベックマン超遠心管内の 17 ml の 36% グルコース溶液上に穏やかに層状にし、4° で 80 分間 13,500 rpm で遠心分離した。得られたペレットを 10 mM Tris - HCl で合計 16 ml に再懸濁し、再び 4 つに分割し、別の 4 つのグルコース勾配に注意深く重ねた。今回は表面近くの 25% w / m から各チューブの底から 40% まで段階的に変化した。2 回目の超遠心分離を行った。これは、マウスに静脈内投与すると毒性を示す可能性のある粒子状の細胞破片をさらに除去するために必要だった。最終ペレットを 1?4 ml のウィルス再懸濁バッファー (PBS; 10% グリセロール; 138 mM NaCl; pH 7.4) に再懸濁した。精製されたウィルスのサンプルは、以下に説明するよう 40 に T CID50 アッセイを介してタイトレートされた。

【0151】

ウィルス複製

細胞は、増殖速度に応じて、ウェルあたり 2 から 4×10^5 細胞で、10% FCS を含む培地の 6 ウェルプレートの 3 つのウェルに播種し、16?18 時間後に 1 PFU / 細胞のワクシニアウイルスに感染させた。サンプルは、最大 144 時間まで 24 時間間隔で 3 回づつ収集された。ウィルス複製は、以前に記載されたように (Wang, Y. et al., J.Clin.Invest. 119, 1604-1615 (2009))、T CID50 (50% 細胞死率) によって検出された。

【0152】

10

20

30

40

50

in vitroでのウイルス細胞毒性の評価

細胞は、成長速度に応じて、 9×10^3 および 1×10^4 細胞 / ウエルで播種し、16?18時間後にウイルスを感染させた。ウイルス感染後6日目の細胞生存率をMTSアッセイで測定し、EC50値（腫瘍細胞の50%を殺すウイルス用量）を前述のように計算した(Wang, Y. et al., J.Clin.Invest.119, 1604-1615(2009))。すべてのアッセイは少なくとも3回実施された。

【0153】

異なる株のVVを比較するためのin vivo有効性実験：

側腹部腫瘍は $1 - 5 \times 10^6$ 癌細胞の皮下注射により処置群あたり10匹のマウスで確立され、直径0.4?0.5センチメートルに到達させ、次いでマウスを腫瘍サイズによって再編成し、1, 3, 5日または1, 2, 3, 4, 5日に、3回の $50 \mu l$ のIT注射により、 1.0×10^7 PFU（ヌードマウス）または 1×10^8 PFU（免疫応答性マウス）またはPBSを与えた。腫瘍体積を週に2回、評価した（体積 = (長さ × 幅² × TT) / 6）。評価は腫瘍体積が 1.00 cm^3 に達したとき、または3か月間存在していたときにマウスを犠牲にするまで続けられた。4?5週齢の雄マウス系統BALB/cおよびC57BL/6は、Harlan UK Ltdから入手した。

10

【0154】

臍臓および結腸直腸側腹部腫瘍モデルに対するVVL組換え体のIT注射の有効性：

2×10^6 CT26細胞または 3×10^6 DT6606細胞をBALB/cまたはC57BL/6雄マウスの剃毛右脇腹の皮下に移植した。腫瘍体積が約 100 mm^3 に達した後、それら3つのグループに無作為に分け、 $50 \mu l$ のPBS中のウイルスの 1×10^8 PFUまたは $50 \mu l$ のPBSビヒクルバッファコントロールを、表3に示した治療スケジュールに従って注射した（スケジュール1および2）。腫瘍体積を週2回のノギス測定によりモニターし、マウスの体重を週1回測定した。

20

【0155】

臍臓腫瘍モデルに対するVVL組換え体のIV注射の有効性：

3×10^6 DT6606を、皮下C57BL/6雄マウスの剃毛右脇腹の皮下に移植した。DT6606細胞（ 3×10^6 細胞 / マウス）を8週齢の雄C57/B16マウスの右脇腹に皮下移植した。腫瘍が触知可能となったとき、マウスは治療群に層別化された。マウスは1, 3, 5日に、強制経口投与を介して $10 \text{ mg} / \text{kg}$ のCAL101又はビヒクルバッファを投与され、3時間後に 1×10^8 PFU / 注射でウイルス（またはPBS）注射され、週二回腫瘍増殖が測定された。ウイルスはPBSに再懸濁され、尾静脈から静脈内注射された。PD-1抗体を最終濃度 $200 \mu g$ / マウスでPBSに再懸濁し、3, 6, 8日目に注射した。腫瘍体積を週2回のノギス測定でモニターし、マウスの体重を毎週測定した。

30

【0156】

シリアンハムスターの播種性臍臓腫瘍モデルに対する腹腔内(IP)注射VVL組換え体の有効性：

1×10^7 SHPC6細胞を、シリアンハムスターの右下の腹腔内に接種した。4日後、群当たり10匹のハムスターに $500 \mu l$ のPBSまたは 2×10^7 PFUのウイルスの腹腔内注射を、0, 2, 4日にした。ハムスターの生存をモニターした。

40

【0157】

腫瘍におけるウイルス量を評価するための定量的ポリメラーゼ連鎖反応：

ウイルスDNA抽出は、Qiaagen DNeasy Blood & Tissue Kitを使用して実施した。ウイルスゲノムのコピー数の定量は、Applied Biosystemsが提供するTaqMan PCRシステムを使用して達成された。VVの定量のために、プライマーとプローブはワクシニアウイルス後期転写因子1(VLTF-1)遺伝子用に設計された。フォワード；5' - AACCCATAGAACGCCACGAATCC、リバース；5' - TGAGACATACAAGGGTGTTGAAAGT、プローブ；シーケンスATTTTAGAACAGAAATACCC。プライマーはSigma-Aldri

50

ch から提供された。標準はVVTVV DNAで、サンプルあたり 40 ng のDNAをテンプレートとして使用した。ウイルスゲノムのコピー数は、ロードされた全DNAによって正規化された。

【0158】

統計分析：

特に明記されていない限り、比較統計分析にはGraphpad Prism 5を使用した。アンペアードスチューデントt検定を使用して、二重条件の比較を行いました。複数の条件または時間などの追加の変数について、それぞれ1元配置分散分析または2元配置分散分析が実行された。事後検定（一元配置分散分析の場合はNewman-Kuels、二元配置分散分析の場合はBonferroni）で、実験内の特定の条件のペアを比較した。生存データは、グループ間の差異が統計的に有意であるかどうかを示すために、ログランク分析を使用したカプランマイヤープロットとして表された。

10

【0159】

実施例1：in vitroでのVV L15、VV L15-B5R-STCおよびVV L15 B5R S-STC VVのブラークとコメットテールの形成の比較

VVL15ウイルスよりも多くのEEVを生成するウイルスを生成するために、VV L15 - B5R - STC および VVL15 B5R S - STC VV が作成された。VV L15 - B5R - STC ウィルスの B5R - STC または VVL15 B5R S - STC の B5R S - STC は、それぞれ B5R 遺伝子の全長を置き換える（図1）。6ウェルプレート中の CV - 1 細胞を、等量のコントロールウイルス VVL15、VV L15 - B5R - STC、および VVL15 B5R S - STC VV に感染させた。感染の3日後、感染細胞を前述のようにクリスタルバイオレットを使用して染色した。VV L15 - B5R - STC および VVL15 B5R S - STC VV は、VV L15 と比較してより多くのEEVを生成したことを示す、より小さなサイズのブラークとより多くのコメットテールを形成した（図2）。

20

【0160】

実施例2：VV L15 TK - STC ウィルスの生成

修飾された VVL15 - B5R - STC および VVL15 B5R S - STC VV（図1）は、対照ウイルス VVL15 よりも小さいサイズのブラークとより多くのコメットテール（図2）を形成した。バックボーンウイルス VVL15 と比較して通常のブラークサイズとより多くのEEVを生成する修飾された VV を作成するために、図3に示すように、VV L TK - STC ワクシニアウイルスが生成された。STC は TK 遺伝子（Sta1k、TM および CT）を置き換え、このウイルスは B5R の完全なコピーを保持する。VV L TK - STC ワクシニアウイルスの精製では、ブラーク精製の最終ラウンドの目視検査（赤色蛍光灯下）により、感染した CV 1 細胞のウェル内のすべてのブラークが STC - TK シャトルベクターからの RFP を発現していることが確認された（図4）。ウイルスの検証には、CV 1 ライセートから抽出したウイルス DNA から PCR によって STC 遺伝子と TK 下流遺伝子の一部を增幅するための特定のプライマーペアを使用した。PCR 産物は VVL15 RFP DNA には存在しなかったが、VV L15 TK - STC DNA には存在した。これは、TK 遺伝子が VVL15 TK - STC では欠失して、STC が TK 領域にあることを示している。B5R 遺伝子の SP に対して設計されたフォワードプライマーと B5R 細胞質尾部を認識するリバースプライマーを PCR で使用して、B5R 遺伝子全体と STC を増幅した。予想どおり全長 B5R は VVL15 RFP と VVL15 TK - STC に存在したが、STC は VVL15 TK - STC にのみ存在していた（図4）。

30

【0161】

実施例3：in vitroでのVV L15 TK - RFP と VVL TK - STC VV のブラークとコメットテールの形成の比較

VVL15 TK - STC ウィルスは、B5R 遺伝子のコピーをそのまま保持し、TK 遺伝子領域に追加の STC 挿入部を有し、腫瘍選択性のためにウイルス TK を不活性化する

40

50

。VVL15 TK-STCウイルスのブラークとコメットテールの形成を評価するためには、6ウェルプレートのCV-1細胞に等量のコントロールウイルスVVL15 TK-RFPとVVL15 TK-STCを感染させた。感染の3日後、感染した細胞を前述のようにクリスタルバイオレットを使用して染色し、プレートを写真スキャンした（図5および6）。VVL15 TK-STCは、VVL15 TK-RFPと比較して、通常のサイズのブラークを生成し（図5）、より多くのコメットテールを生成した（図6）。

【0162】

実施例4：組換えVVL15 TK-STCにおけるEEV産生の評価

VVL15 TK-STCウイルスとそのコントロールウイルスで生成されたEEVを定量化するために、0.01 p.f.u./細胞のワクシニアウイルスを使用して6ウェルプレートのCV-1細胞に感染させた。細胞培養培地と感染細胞を感染の48時間後と72時間後に別々のチューブに集め、ウイルスをそれぞれタイトレートした。生成されたEEVの量は、細胞培養培地中のVVの総量を感染細胞によって生成されたVVの総量と比較することによって計算された。VVL15 TK-STCは、親ウイルスVVL15 RFPと比較して、感染後48時間で10倍のEEVを生成し、72時間の時点で30倍のEEVを生成する（図7）。

10

【0163】

実施例5：組換えVVL-DD STCにおけるEEV産生の評価

組換えVVL-DDおよびVVL-DD STCウイルスが作成された。VVL-DDは、TKおよびN1L領域が欠失したウイルスである（VV TK-N1Lとも呼ばれる）。VVL-DD STCは、TKおよびN1L領域が欠失し、STCがTK領域に挿入されたウイルスである（VV TK-STC-N1Lとも呼ばれる）。VVL-DD STCウイルスとそのコントロールウイルス（VVL-DD）で生成されたEEVを定量化するために、0.01 p.f.u./細胞のワクシニアウイルスを6ウェルプレートの細胞に使用した。細胞培養培地と感染細胞を感染の48時間後と72時間後に別々のチューブに集め、ウイルスをそれぞれタイトレートした。生成されたEEVの量は、細胞培養培地中のVVの総量を感染細胞によって生成されたVVの総量と比較することによって計算された。

20

【0164】

実施例6：in vitroでのVVの複製および細胞毒性の比較

VVL15 TK-STCとその親VVL15 RFPウイルスの複製を比較した（図10）。VVL15 TK-STCは、CT26（マウス結腸癌細胞株）およびDT6606（マウス肺臓癌細胞株）癌細胞株において、VVL15 RFPよりも効果的に複製する。VVL15 TK-STCおよびVVL15 RFPの細胞毒性は、CV1、CT26、およびDT6606細胞株で測定された（図10）。DT6606細胞の2つのウイルス間で細胞毒性に有意差はなかった。VVL15 TK-STCは、CV-1およびCT26細胞の死滅において、親のVVL15 RFPよりも有意に強力だった（図11）。

30

【0165】

実施例7：in vivoでのVVの抗腫瘍効力の比較

VVL15 TK-STCウイルスの抗腫瘍効力をテストするために、CT26結腸癌CT26（図12）およびDT6606肺臓癌モデル（図13）の皮下モデルを使用した。VVL15 RFPおよびVVL15 TK-STCウイルスを腫瘍内に注射した（図12および13）。CT26腫瘍モデルの場合、1日目、3日目、および5日目に2×10⁷PFU/注射のウイルスを3回投与した。DT6606腫瘍モデルの場合、指定された時点で2×10⁸PFU/注射のウイルスを5回投与した（図13）。VVL15 TK-STCは、コントロールウイルスVVL15 RFPと比較して改善された抗腫瘍効果を一貫して示した。

40

【0166】

実施例8：VVL15 TK-STCウイルスを発現するヒトIL-21(hIL-21)およびマウスIL-21(mIL-21)の作成

50

抗腫瘍免疫を改善するために、VVL15 TK-STCウイルスは、インターロイキン-21 (IL-21)、NK細胞およびT細胞刺激性サイトカインで武装した (armed)。ヒトIL-21 (hIL-21) およびマウスIL-21 (mIL-21) を発現するウイルスは、図14に示すように、RFPが削除されたVVL15 TK-STCウイルスを使用して作成され、hIL-21 およびmIL-21 がN1L領域にクローン化された (図14)。感染細胞におけるウイルスによるhIL-21 およびmIL-21 の発現が確認された (図15および16)。

【0167】

実施例9：TK STC mIL-21ウイルスの静脈内注射は、mIL-21を含まない対照ウイルスと比較して優れた抗腫瘍能力を示す

静脈内注射後のVVの持続性を延長するために、マクロファージ機能の一過性阻害剤であるCal101を、VVを静脈内注射する3時間前に送達した (iv)。TK STC mIL-21の抗腫瘍効力は、皮下DT6606腫瘍モデルでテストされた。TK STC mIL-21のIV送達は、非武装の (unarmed) TK STCコントロールウイルス (mIL-21発現なし) と比較して改善された抗腫瘍効力を示す (図16)。注射後の腫瘍におけるワクシニアウイルスDNAの蓄積は、1、3、および5日目に与えられた3回の注射の最後の5日後にqPCRを使用して決定された (1×10^8 PFU / 注射) (図17)。STCウイルスは、コントロールウイルスと比較してより高いレベルに蓄積した。TK STC mIL-21の抗腫瘍効力は、シリアのハムスターの腹膜播種SHPC6臍臓癌モデルでテストされた。TK STC N1L欠失ウイルスの腹腔内送達は、TKドメインにSTCが存在しなかった対照ウイルスと比較して改善された有効性を示している (図18)。さらに、TK-STC-N1LをIL-21で武装させると、シリアンハムスターの腹膜播種性臍臓癌を治療することができる (図19)。

【0168】

実施例10：チェックポイント阻害剤抗PD-1抗体は、TK STC mIL-21ウイルスの抗腫瘍効果を改善する

抗PD-1抗体は、さまざまな種類の腫瘍における抗腫瘍免疫を強化するために広く使用されており、臨床的証拠は、一部の癌患者の生存率の大幅な改善を示している。抗PD1抗体がTK STC mIL-21の抗腫瘍効力を増強できるかどうかを調べるために、抗PD1抗体をCal101およびVVのiv注射と組み合わせて使用した。抗PD1抗体は、TK STC mIL-21ウイルスの抗腫瘍力を劇的に改善する (図21)。Cal101と抗PD1抗体の組み合わせを使用して腫瘍を治療した場合、治療計画にTK STC mIL-21 (STC VV121) を含めると、Cal101と抗PD1抗体の組み合わせの抗腫瘍効果が大幅に向上した (図21)。

【0169】

実施例11：TK STCウイルスを発現するヒトIL-12 (hIL-12) およびマウスIL-12 (mIL-12) の作成

抗腫瘍免疫を改善するために、VVL15 TK-STCウイルスをインターロイキン-12 (IL-12) で武装した。これは適応性および自然免疫系のほとんどの細胞を刺激する。ヒトIL-12 (hIL-12) およびマウスIL-12 (mIL-12) 発現ウイルスは、図14に示すVVL15 TK-STC発現IL-21を作成するのと同じ戦略で、RFP欠失を伴うVVL15 TK-STCウイルスを使用して作成された。hIL-12 およびmIL-12 はN1L領域にクローン化された (図14)。ウイルスによる感染細胞でのmIL-12 およびhIL-12 の発現が確認された (図22および23)。

【0170】

実施例12：TK STCウイルスを発現するIL-12は、腫瘍内投与後の肺癌モデルにおいて有効であり、チェックポイント阻害剤抗PD1抗体の抗腫瘍効果を増強した
皮下肺癌モデルは、ルイス肺癌細胞 (LLC) を使用して免疫応答性マウスで確立された。マウスは、腫瘍内STC-mIL12ウイルス (1×10^8 PFU / 注射) で1、3、

10

20

30

40

50

5日に三回処理した）。必要に応じて、 - P D 1 抗体を 7、 9、 11 日目に投与した（
20 μg / マウス）。S T C - m I L 1 2 ウィルスは、腫瘍増殖率の低下において、P
B S または - P D 1 抗体療法単独よりも効果的だった。ウィルス治療への - P D 1 抗
体の追加は、長期的な有効性をさらに高めた（図 2 4 および 2 5）。

【 0 1 7 1 】

実施例 1 3

第 1 に I L 1 2 を発現し、第 2 に可溶性 P D 1 を発現するウィルスの連続使用は、I L
1 2 を発現するウィルス、続いて - P D 1 抗体を使用するのと同じくらい効果的である
。可溶性 P D 1 を発現するウィルスの使用は、 - P D 1 抗体の使用と同じくらい効果的
だった（図 2 6）。

10

【 0 1 7 2 】

実施例 1 4

異なる免疫調節分子を特定の順序で発現するウィルスの投与は重要である（図 2 7）、
すなわち、m I L - 1 2 を発現するウィルスは、可溶性 P D 1 (s P D 1) を発現するウ
イルスの前に送達されなければならない。それらが逆に与えられる場合には、優れた抗腫
瘍効果は失われる。

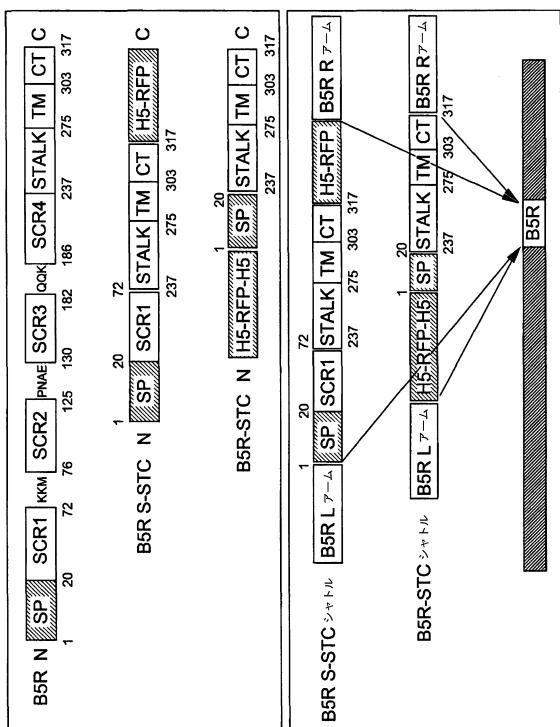
20

30

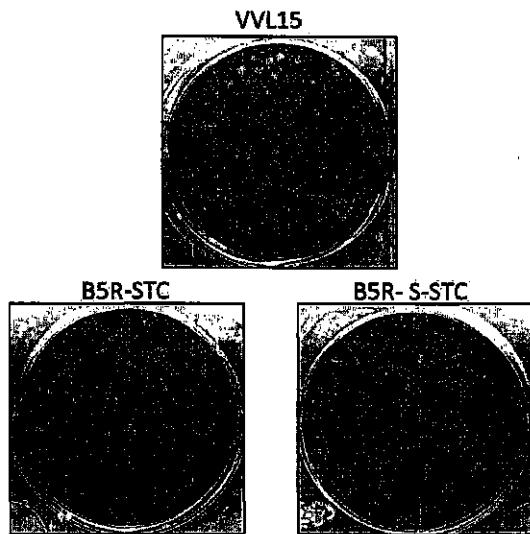
40

50

【図面】
【図 1】



【図 2】

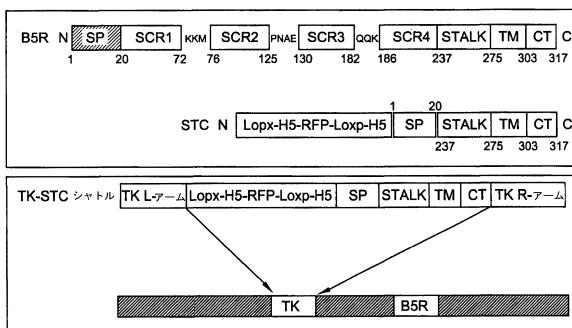


10

20

Fig.2

【図 3】



【図 4】



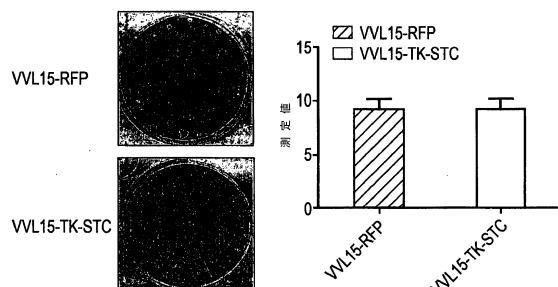
30

Fig.4

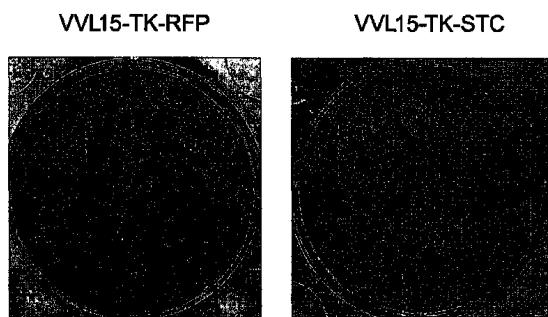
40

50

【図 5】



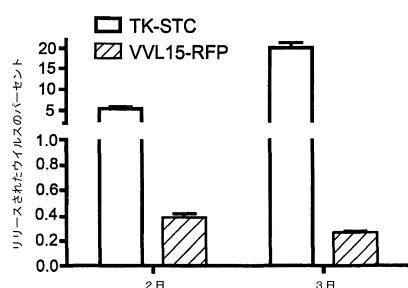
【図 6】



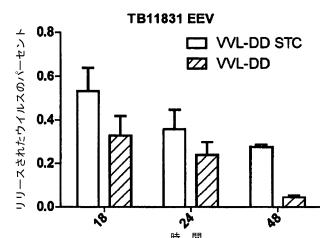
10

Fig.6

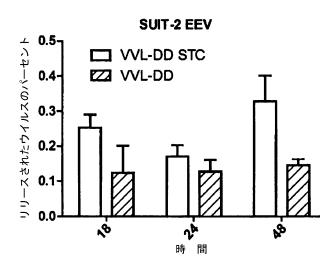
【図 7】



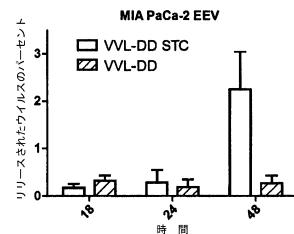
【図 8 - 1】



20



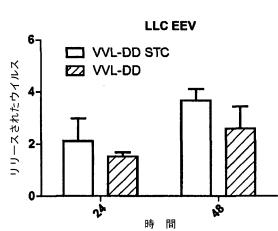
30



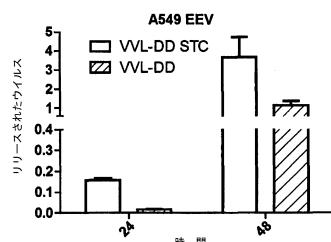
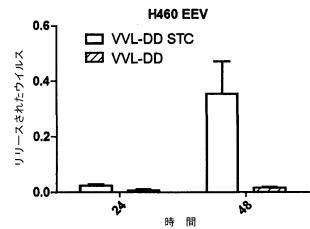
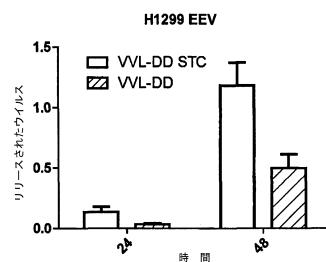
40

50

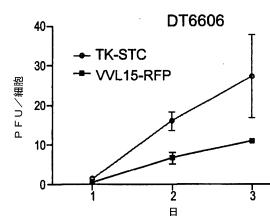
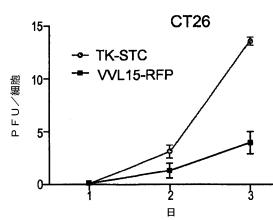
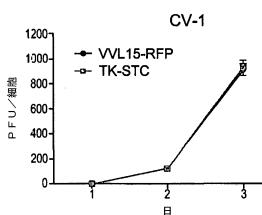
【図 8 - 2】



【図 9】



【図 10】



【図 11】

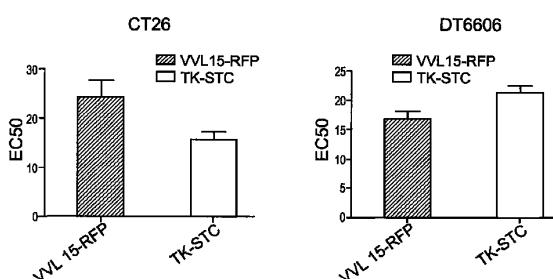
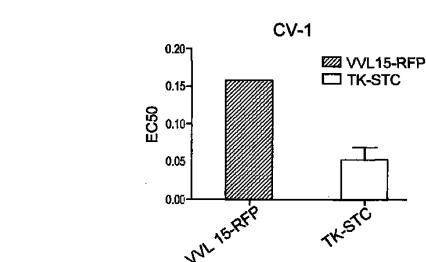


Fig.11

10

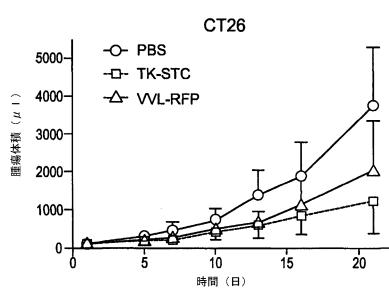
20

30

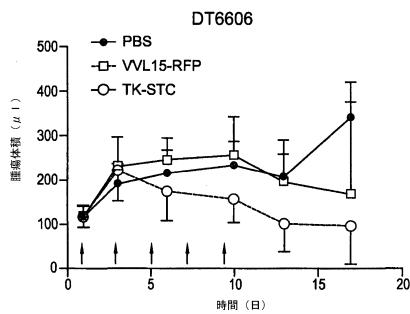
40

50

【図 1 2】

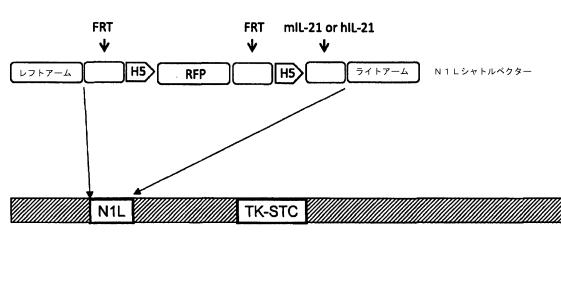


【図 1 3】

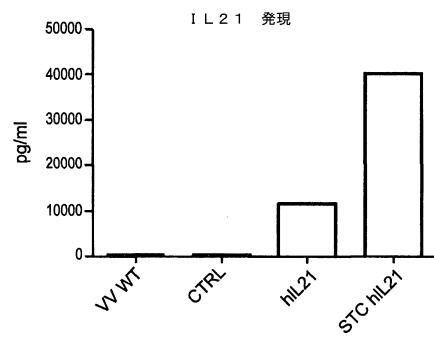


10

【図 1 4】

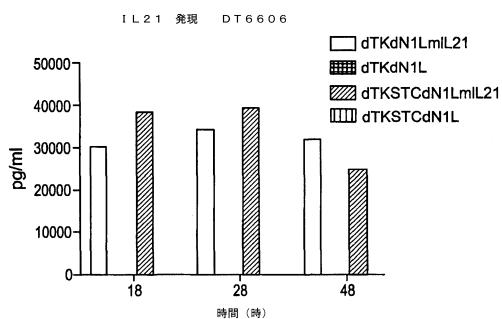


【図 1 5】

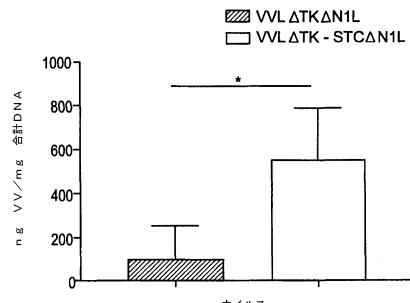


20

【図 1 6】



【図 1 7】

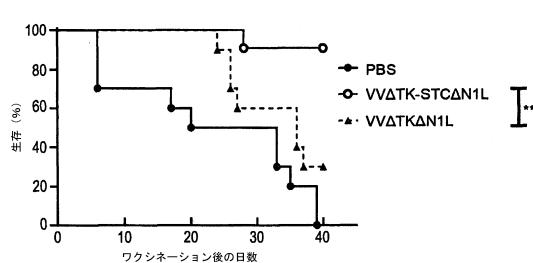


30

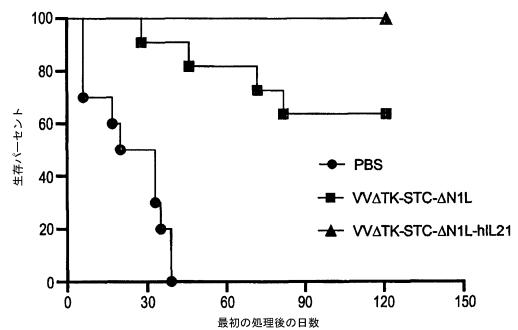
40

50

【図 18】

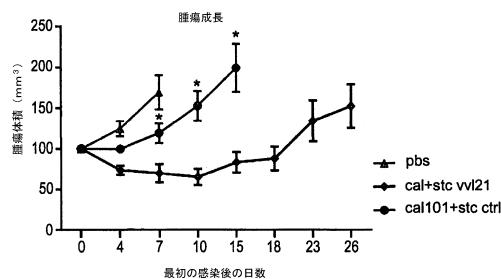


【図 19】

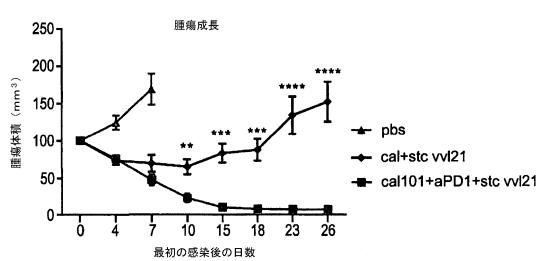


10

【図 20】

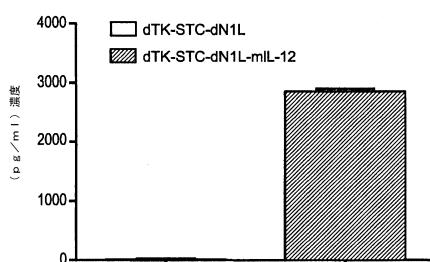


【図 21】

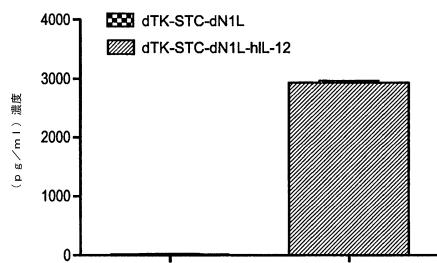


20

【図 22】



【図 23】

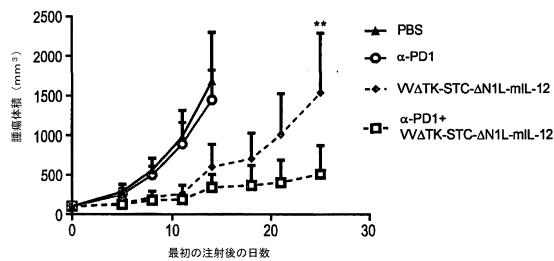


30

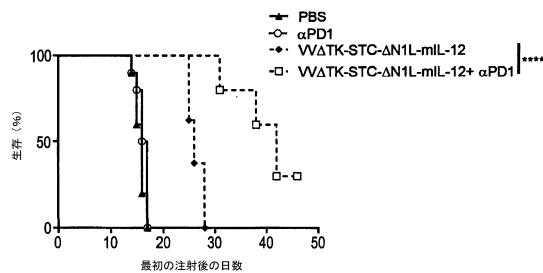
40

50

【図24】

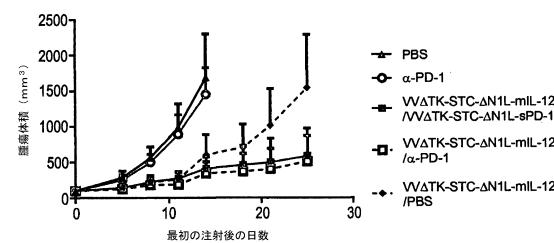


【図25】

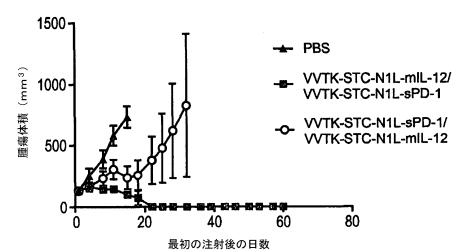


10

【図26】



【図27】



20

30

40

50

【図28(a)】

【図28(b)】

Fig. 28(a) SP(aa 1-19):

Fig. 28(c) STALK(aa 237-275)

CYRTNEKEDPVYBDRGPDDETDISSKLSSKDVKVOYEOFIESLIE

【図28(c)】

【図28(d)】

Ergonomics in Design 38(1)

Fig. 28(d) TM(22 276-303)

gcaacttataatcatagtggcggttacaattatggcgctattttaatc
ATYHIIIVALTIMGVIFLI

【図28(e)】

Fig. 28(e) CT(aa 304-317)

SSV1VLVCSCKNNNDQYKFHKLLP
tcgcgttatagttatgttgttccgtgcacaaaataatgaccataaagtccataattgttctaccgtta

【図28(f)】

Fig. 28(f) H5

【図28(h)】

Fig. 2B(h) SP(aa 1-19)-SCR1(aa 20-72)-STALK(aa 237-275)-TM(aa 276-303)-CT(aa 304-317)

MKTISVVTLLCVLPAAVYSTCTVPTMNNAKLTSTSETSNDKQKVTC
DCDQGYHSSDPNAVCETDKWVKYENPCVRTEKFDPVDDGPDDET
FTCDSSKSDVQYEQEIESLEATYHIIIVALTIGVIFLISVIVLCSC
DKNNDQYKFHKLLP

【図29(a)】

Fig 29(a) H5:

【図29(c)】

aaaaattgaaaataatcaaaggttcttgggttgttaatttggaaagcgagaaaataatcataata

Fig. 29(c) H5:

【図29(b)】

Fig 29(h) REP aa 1-225

【図29(d)】

Fig. 29(d) SP(aa 1-19):

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| M | K | T | I | S | V | V | T | L | L | C | V | L | P | A | V | V | Y | S | T |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

atgaaaaacgatttcgttgttacgttgttatgcgtactacgtctgtttatccat

Fig. 29(d) SP(aa 1-19):

MKTISVVTI; I; CVI; PAVVYST

【図29(e)】

Fig. 29(e) STALK(a) 237-275

SVIVLVCSCDKNNDOYKFHKILLP

【図29(g)】

tccgttatagtatattatgttttgttgcacaaaataatgaccataataatgttcataatgttttgttgc

【图29(f)】

Fig. 29(f) TM(aa 276-303)

【図30(a)】

Fig. 30(a) Loxp
 acttcgtatagccatacattatacgaaggat

Fig. 30(a) Lexp

10

20

30

40

50

【図30(b)】

Fig. 30(d) Loxp:
acttcgttatagcatacatatatacgaaaggttat

Fig. 30(b) H5:

【図30(c)】

【図3-0(e)】

Fig. 30(e) H5:

Fig. 30(e) H5:

Ej q 30(c) REP aa 1.225.

【図30(f)】

【図30(g)】

Fig. 30(f) SP(aa 1-19):
Fig. 30(h) TM(aa 276-303):

ATYHIIIVALTIMGVIFLI

【図30(h)】

【図30(i)】

Fig. 30(i) CT(aa 304-317);

S V I V L V C S C D K N N D Q Y K F H K L L P
ccccgtatatgtattatgtttgttgcacaaaataatggccataaa

Fig. 30(g) STALK(aa 237-275):
 CVRTNEKFDPVDDGPD
 tgtagcacaatggatccaggaa
 aaaaatggaaaatccgtttaaaa

43)

JP 7410139 B2 2024.1.9

10

20

30

40

50

【図31】

10

20

【配列表】

0007410139000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

| | F I | | |
|---------|------------------|---------|--------|
| A 6 1 K | 35/768 (2015.01) | A 6 1 K | 35/768 |
| A 6 1 K | 48/00 (2006.01) | A 6 1 K | 48/00 |
| A 6 1 P | 43/00 (2006.01) | A 6 1 P | 43/00 |
| A 6 1 P | 35/00 (2006.01) | A 6 1 P | 35/00 |
| A 6 1 P | 37/04 (2006.01) | A 6 1 P | 37/04 |
| C 1 2 N | 5/09 (2010.01) | C 1 2 N | 5/09 |
| C 1 2 N | 5/10 (2006.01) | C 1 2 N | 5/10 |
| A 6 1 K | 38/19 (2006.01) | A 6 1 K | 38/19 |
| A 6 1 K | 38/20 (2006.01) | A 6 1 K | 38/20 |
| A 6 1 K | 38/21 (2006.01) | A 6 1 K | 38/21 |
| A 6 1 K | 38/17 (2006.01) | A 6 1 K | 38/17 |

(72)発明者 ユアン ミング

英国 イーシー1エム 6 ピーキュー ロンドン グレーター ロンドン、ジョン バン サイエンス
センター、クイーン マリー ユニバーシティ オブ ロンドン、グランド フロア、バーツ キャ^ンサー インスティテュート、モレキュラー オンコロジー

審査官 馬場 亮人

(56)参考文献 米国特許出願公開第2017/0340687 (U.S., A1)

Journal of Virology, 1998年, Vol.72, No.3, P.2429-2438

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

| | |
|---|-------------|
| C 1 2 N | 1 5 / 8 6 3 |
| C 1 2 N | 1 5 / 1 9 |
| C 1 2 N | 1 5 / 1 3 |
| C 1 2 N | 1 5 / 1 2 |
| C 1 2 N | 1 5 / 1 1 |
| A 6 1 K | 3 5 / 7 6 8 |
| A 6 1 K | 4 8 / 0 0 |
| A 6 1 P | 4 3 / 0 0 |
| A 6 1 P | 3 5 / 0 0 |
| A 6 1 P | 3 7 / 0 4 |
| C 1 2 N | 5 / 0 9 |
| C 1 2 N | 5 / 1 0 |
| A 6 1 K | 3 8 / 1 9 |
| A 6 1 K | 3 8 / 2 0 |
| A 6 1 K | 3 8 / 2 1 |
| A 6 1 K | 3 8 / 1 7 |
| J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I) | |
| C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N) | |