(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年9月6日(06.09.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/181525 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 35/76 (2015.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/007475

(22) 国際出願日： 2024年2月29日(29.02.2024)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
63/449,055 2023年3月1日(01.03.2023) US

(71) 出願人: バイオコモ株式会社 (**BIOCOMO INCORPORATION**) [JP/JP]; 〒5101233 三重県三重郡菰野町菰野１３２５番地 Mie (JP). 国立大学法人三重大学 (**MIE UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒5148507 三重県津市栗真町屋町１５７７ Mie (JP).

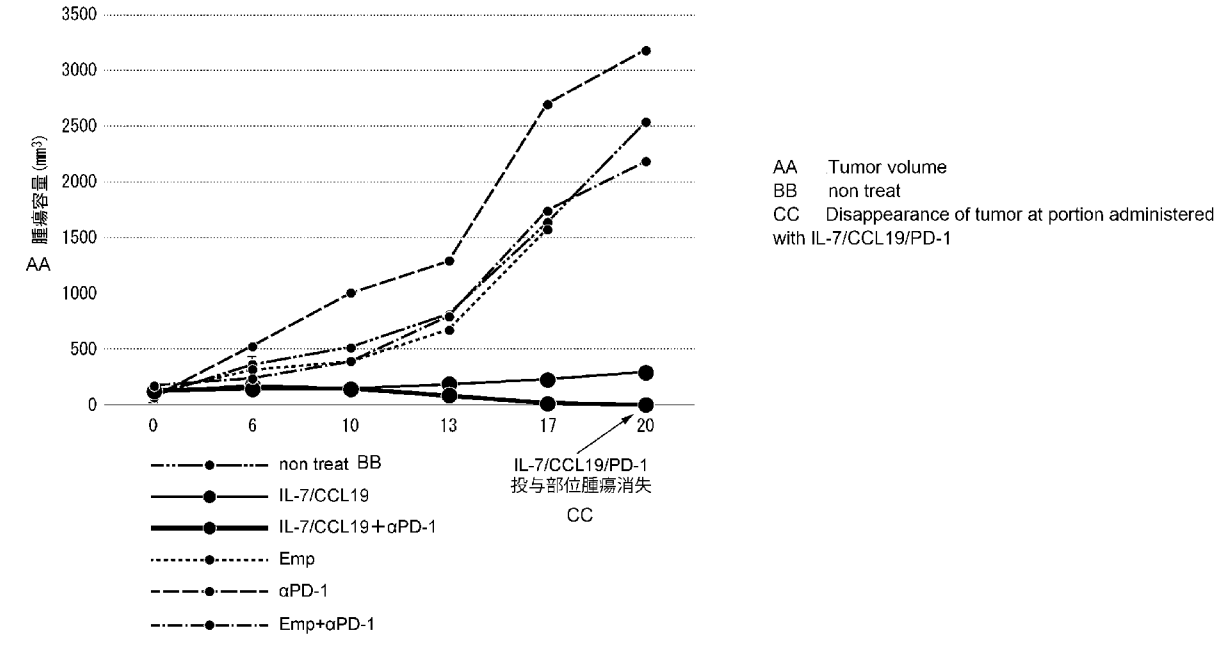
(72) 発明者: 福村 正之 (**FUKUMURA Masayuki**); 〒5101233 三重県三重郡菰野町菰野１３２５番地 バイオコモ株式会社内 Mie (JP). 大塚 順平 (**OHTSUKA Junpei**); 〒5101233 三重県三重郡菰野町菰野１３２５番地 バイオコモ株式会社内 Mie (JP). 松川 泰久 (**MATSUKAWA Yasuhisa**); 〒5101233 三重県三重郡菰野町菰野１３２５番地 バイオコモ株式会社内 Mie (JP). 野阪 哲哉 (**NOSAKA Tetsuya**); 〒5148507 三重県津市栗真町屋町１５７７ 国立大学法人三重大学内 Mie (JP). 大塚 智美 (**OHTSUKA Tomomi**); 〒5148507 三重県津市栗真町屋町１５７７ 国立大学法人三重大学内 Mie (JP).

WO 2024/181525 A1

(54) **Title:** ANTICANCER AGENT, PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR CANCER TREATMENT, KIT, AND ACTIVATOR

(54) 発明の名称： 抗がん剤、がん治療用医薬組成物、キット、及び活性化剤

[図10]



(57) **Abstract:** This anticancer agent is for solid cancer and contains, as an active ingredient: at least one cytokine selected from the group consisting of IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, and IL-18; or a combination between said cytokine and CCL19 and/or CCL21; or human parainfluenza virus 2 expressing variants of, but having an identical function as, the same.

[続葉有]

(74) 代理人：田 ▲ 崎 ▼ 聡，外 (TAZAKI Akira et al.)；〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目９番２号 Tokyo (JP).

(81) 指定国（表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能）：AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国（表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能）：ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

— 国際調査報告（条約第21条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

(57) 要約：ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１８からなる群から選ばれる少なくとも１種類のサイトカイン、或いは、前記サイトカインと、ＣＣＬ１９及び／又はＣＣＬ２１との組み合わせ、或いは、同一機能を有するこれらの変異体を発現したヒトパラインフルエンザウイルス２型を有効成分として含有する、固形がんに対する抗がん剤。

明　細　書

発明の名称 ：

抗がん剤、がん治療用医薬組成物、キット、及び活性化剤

技術分野

[0001]　本発明は、抗がん剤、がん治療用医薬組成物、キット、及び活性化剤に関する。

背景技術

[0002]　がん細胞は、免疫抑制機構、細胞増殖抑制機構、遺伝子の変異・転座等、代謝等の様々な異常により発生する。がん治療の面では、白血病等の血液がんは、抗ＰＤ１抗体のような免疫チェックポイント阻害剤及びＣＡＲ－Ｔ療法により奏効率が上昇している。（例えば、特許文献１参照）。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特表２０１９－５２３３０１号公報

特許文献2：特許第５８０１２０２号

特許文献3：特許第５８０７９１７号

特許文献4：特許第７３９８６８０号

特許文献5：特許第６３５８７０６号

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ.，（２０１３）２４（７）：６８３

非特許文献2：Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ（２０２３）１３：１１３６１

非特許文献3：Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ（２０１９）９：１３９９９

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかし、負の免疫を阻害する免疫チェックポイント阻害剤やＣＡＲ－Ｔ療法だけでは固形がんの奏効率を上げることは容易ではない。固形がんでは、血管形成不全により、低酸素やグルコース飢餓状態などのストレス状態等が、がん細胞の増悪化や薬剤耐性等の固形がん、線維芽細胞、マクロファージ、炎症細胞等の特異的な微小環境（ｔｕｍｏｒ　ｍｉｃｒｏｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔ（ＴＭＥ））を形成する。このような状況下では、ＣＡＲ－Ｔ細胞等の腫瘍浸潤リンパ球（ｔｕｍｏｒ　ｉｎｆｉｌｔｒａｔｉｎｇ　ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ）のがん組織への浸潤が阻害され、腫瘍退縮効果が低くなることが報告されている。また、ヒトでは固形がんとその辺縁細胞間の細胞等のマトリックス形成により、免疫細胞の腫瘍組織中への浸潤が妨げられ、マウスでは効果があるＴ細胞療法がヒトでは浸潤が阻害されやすく抗腫瘍効果が低減することも報告されている。

[0006] 本発明は上記事情を鑑みてなされたものであり、抗腫瘍効果に優れた抗がん剤、がん治療用医薬組成物、キット、及び活性化剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明は以下の態様を含む。

［１］ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１８からなる群から選ばれる少なくとも１種類のサイトカイン、或いは、前記サイトカインと、ＣＣＬ１９及び／又はＣＣＬ２１との組み合わせ、或いは、同一機能を有するこれらの変異体を発現したヒトパラインフルエンザウイルス２型を有効成分として含有する、固形がんに対する抗がん剤。

［２］前記少なくとも１種類のサイトカインは、ヘテロダイマーを構成するＩＬ－１２、又は同一機能を有する変異体である、［１］に記載の固形がんに対する抗がん剤。

［３］前記ヒトパラインフルエンザウイルス２型は、ゲノムよりＦ遺伝子を欠失した非増殖型である、［１］に記載の固形がんに対する抗がん剤。

［４］［１］～［３］のいずれかに記載の抗がん剤を含有する、固形がんに対するがん治療用医薬組成物。

［５］更に、免疫活性化剤及び／又は免疫チェックポイント阻害剤を含有する、［４］に記載の固形がんに対するがん治療用医薬組成物。

［６］前記免疫チェックポイント阻害剤は、抗ＰＤ１抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、抗ＣＴＬＡ４抗体、及び抗ＴＩＭ３抗体からなる群から選ばれる少なくとも１種類を含む、［５］に記載の固形がんに対するがん治療用医薬組成物。

［７］腫瘍内投与に用いられる、［４］に記載の固形がんに対するがん治療用医薬組成物。

［８］固形がんの治療に用いるためのキットであって、前記治療において、同時使用又は逐次使用するための、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１８からなる群からなる少なくとも１種類のサイトカイン、或いは、前記サイトカインと、ＣＣＬ１９及び／又はＣＣＬ２１との組み合わせ、或いは、同一機能を有するこれらの変異体を発現したヒトパラインフルエンザウイルス２型と、免疫活性化剤及び／又は免疫チェックポイント阻害剤と、を含むキット。

［９］前記少なくとも１種類のサイトカインは、ヘテロダイマーを構成するＩＬ－１２、又は同一機能を有する変異体である、［８］に記載のキット。

［１０］前記ヒトパラインフルエンザウイルス２型は、ゲノムよりＦ遺伝子を欠失した非増殖型である、［８］に記載のキット。

［１１］前記免疫チェックポイント阻害剤は、抗ＰＤ１抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、抗ＣＴＬＡ４抗体、及び抗ＴＩＭ３抗体からなる群から選ばれる少なくとも１種類を含む、［８］に記載のキット。

［１２］　腫瘍内投与に用いられる、［８］～［１１］のいずれかに記載のキット。

［１３］ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１８からなる群から選ばれる少なくとも１種類のサイトカイン、或いは、前記サイ

トカインと、ＣＣＬ１９及び／又はＣＣＬ２１との組み合わせ、或いは、同一機能を有するこれらの変異体を発現したヒトパラインフルエンザウイルス２型を有効成分として含有する、腫瘍浸潤Ｔ細胞及び樹状細胞活性化剤。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、抗腫瘍効果に優れた抗がん剤、がん治療用医薬組成物、キット、及び活性化剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図１は、ＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７単独、又はＣＣＬ１９若しくはＣＣＬ２１作製用プラスミドの説明図である。具体的には、Ｆ遺伝子を欠失したｈＰＩＶ２構築用プラスミドのＮｏｔＩ又はＭｌｕＩ制限酵素配列位に所望遺伝子を導入するための構築図である。

[図2]図２－図４は、ＩＬ－７単独、又はＣＣＬ１９若しくはＣＣＬ２１を導入したＢＣ－ＰＩＶの感染細胞におけるＩＬ－７、ＣＣＬ１９及びＣＣＬ２１の発現をウエスタンブロットにより確認した図である。図２は、ＩＬ－７を導入したＢＣ－ＰＩＶの感染細胞で発現を確認した図である。

[図3]図３は、ＩＬ－７及びＣＣＬ１９を導入したＢＣ－ＰＩＶの感染細胞で発現を確認した図である。

[図4]図４は、ＩＬ－７及びＣＣＬ２１のＢＣ－ＰＩＶ感染細胞で発現を確認した図である。

[図5]図５は、ヘテロダイマーであるＩＬ－１２遺伝子を導入したＢＣ－ＰＩＶ作製用プラスミドの説明図である。ＥＩＳはＢＣ－ＰＩＶの遺伝子発現を調整する配列である。

[図6]図６－図７は、ヘテロダイマーであるＩＬ－１２遺伝子を導入したＢＣ－ＰＩＶの感染細胞におけるＩＬ－１２（Ｐ３５）及びＩＬ－１２（Ｐ４０）の発現をウエスタンブロットにより確認した図である。図６は、ＢＣ－ＰＩＶのＥＩＳ配列を介して発現したＰ３５及びＰ４０のＢＣ－ＰＩＶ感染細胞での発現を確認した図である。

[図7]図７は、ＮｏｔＩとＭｌｕＩ制限酵素配列位にＰ４０及びＰ３５遺伝子

を導入し構築したＢＣ－ＰＩＶによるＰ３５及びＰ４０の発現をＢＣ－ＰＩＶ感染細胞で確認した図である。

[図8]図８は、ＥＬＩＳＡによるＩＬ－１２タンパク質（Ｐ７０）を確認したものである。

[図9]図９は、ＢＣ－ＰＩＶによる抗腫瘍効果を確認するための動物試験のスケジュールを示した図である。

[図10]図１０は、ＢＣ－ＰＩＶにより発現したＩＬ－７及びＣＣＬ１９による抗腫瘍効果及び抗マウスＰＤ１抗体とのシナジー効果を示す図である。

[図11]図１１は、ＢＣ－ＰＩＶにより発現したＩＬ－７及びＣＣＬ１９による抗腫瘍効果及び抗マウスＰＤ１抗体とのシナジー効果を示す図である。

[図12]図１２は、ＢＣ－ＰＩＶにより発現したＩＬ－７及びＣＣＬ１９又はＣＣＬ２１による抗腫瘍効果及び抗マウスＰＤ１抗体とのシナジー効果果を示す図である。

[図13]図１３は、ＢＣ－ＰＩＶにより発現したＩＬ－７及びＣＣＬ１９又はＣＣＬ２１による抗腫瘍効果及び抗マウスＰＤ１抗体とのシナジー効果果を示す図である。

[図14]図１４は、処理した腫瘍の病理解析図である。

[図15]図１５は、処理した腫瘍の病理解析図である。

[図16]図１６は、腫瘍内部及び腫瘍周辺部のＴ細胞の分布を、Ｔ細胞特異的抗体を用いて評価した図である。

[図17]図１７は、腫瘍内部及び腫瘍周辺部のＣＤ８陽性Ｔ細胞の分布を、ＣＤ８特異的抗体を用いて評価した図である。

[図18]図１８は、サイトカイン（ＩＬ－７）及びケモカイン（ＣＣＬ１９）を導入したＢＣ－ＰＩＶによる腎がんＲＥＮＣＡ細胞に対する抗腫瘍効果及び抗マウスＰＤ１抗体のシナジー効果を示す図である。

[図19]図１９は、ＩＬ－１２を導入したＢＣ－ＰＩＶによる抗腫瘍効果及び抗マウスＰＤ１抗体のシナジー効果を示す図である。

[図20]図２０は、ＩＬ－１２を導入したＢＣ－ＰＩＶによる抗腫瘍効果及び

抗マウスＰＤ１抗体のシナジー効果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0010] ≪腫瘍組織へのＴ細胞の取り込みの促進≫

［ケモカイン及びケモカイン受容体］

ケモカイン受容体７（ＣＣＲ７）は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、樹状細胞を集めて二次リンパ管に機能的微小環境を形成するための主要なホーミング受容体であり、抗原特異的免疫反応を開始するための重要な調節因子である。ＣＣＲ７には２種類の内因性リガンドが存在する。１つはＣＣＬ２１で、これは二次リンパ組織の高内皮細静脈（ＨＥＶ）に恒常的に発現している。炎症皮膚組織のリンパ管にも発現が誘導されることが報告されている。もう一方のＣＣＬ１９は、リンパ節のＴ細胞領域で産生されＨＥＶの基底膜側から内腔側にトランスサイトーシスされて提示される。これらケモカインリガンド２１（ＣＣＬ２１）及びケモカインリガンド１９（ＣＣＬ１９）は、がんにおいて明らかに相反する２つの役割持っていることが報告されている（特許文献２参照。）。１つは、ＣＣＲ７がリンパ系を介したがんの転移を促進する上で重要な役割を果たすというものであり、ＣＣＲ７のアップレギュレーションとリンパ節（ＬＮ）転移との相関は、膵臓がん、乳がん、食道がん、頭頸部がん、前立腺がん、結腸直腸がん等で報告されている。

他方で、このＣＣＲ７とＣＣＬ１９／２１の関係は、成長する腫瘍に対する免疫応答の調節にも関与し、樹状細胞（ＤＣ）、ＣＤ４陽性ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、Ｂ細胞およびメモリーＴ細胞等はＣＣＲ７を発現し、ＣＣＬ１９およびＣＣＬ２１との相互作用を通じて輸送され、ＣＣＲ７は抗原提示とＴ細胞媒介性応答の活性化に重要な役割を果たしており、ＣＣＬ１９およびＣＣＬ２１の腫瘍内導入は、腫瘍に対する免疫応答を増強することにより、がんの免疫療法に役立つと考えられている。

ＣＣＲ７はＧタンパク質共役型受容体であり、このような受容体は通常、脱感作を受けやすく、リガンドへの初回の曝露後、受容体はさらなるＧタンパク質活性化とは共役しない。ＣＣＬ２１は、ＣＣＲ７を介したＧタンパク

質シグナル伝達の活性化においてはＣＣＬ１９と同等の活性を示すにもかかわらず、受容体脱感作を引き起こさないことが知られている。

[0011] ［サイトカイン：ＩＬ－７］

ＩＬ－７は、胸腺上皮細胞のから分泌されるＩＬ－７は未熟Ｔ細胞の増殖を助け、Ｔ細胞の発生に寄与し、リンパ管内皮細胞より分泌されるＩＬ－７はナイーブ及びメモリーＴ細胞の生存・数の維持等に寄与している。

[0012] ［ケモカインとサイトカインの導入］

上述のサイトカイン単独での導入では、抗腫瘍効果のあるＣＴＬ細胞の増殖を促すことは可能であると思われるが、依然固形腫瘍の辺縁細胞マトリクスによってＣＴＬ細胞の固形腫瘍内への浸潤が阻害される可能性がある。固形腫瘍内部への腫瘍特異的ＣＴＬ細胞の浸潤を高めるためには、腫瘍組織の辺縁領域細胞でＣＴＬ細胞を積極的に取り込む対策が必要である。そのためには固形腫瘍内だけでなく、ＣＴＬ細胞が接触する細胞に異所性にＣＣＬ１９又はＣＣＬ２１を発現させ、ＣＣＲ７を発現するＣＴＬ細胞を能動的に腫瘍組織に取り込むことが抗腫瘍免疫を高めると考えられる。

[0013] ［サイトカインとケモカインの２種類を発現するベクター（ＢＣ－ＰＩＶ）］

発明者らは、これまでにヒトパラインフルエンザウイルス２型を用いて遺伝子とタンパク質を同時に運搬できるベクター：ＢＣ－ＰＩＶを開発してきた（特許文献３参照。）。ＢＣ－ＰＩＶは２つ以上の遺伝子とタンパク質を導入でき、これまでにＴＮＦＲＳＦのリガンドタンパク質をＢＣ－ＰＩＶに搭載した抗腫瘍免疫剤について有効性を示した（特許文献４参照。）。ここでは、ＢＣ－ＰＩＶに導入した２遺伝子が感染細胞で発現していることを確認しており、今回もサイトカインとケモカインの遺伝子をＢＣ－ＰＩＶに導入し、上述した効果を検討する。ＢＣ－ＰＩＶはヒトパラインフルエンザウイルス２型であり、宿主はヒトで、マウスではヒトパラインフルエンザウイルス２型はｐｏｏｒ　ｐｅｒｍｉｓｓｉｖｅであることが報告されており、導入遺伝子の高発現は望めないが、マウスで有効性が確認できればヒトへの

外挿性は高いと考えられる。

さらにＢＣ－ＰＩＶは樹状細胞の成熟化を促進することが示されており（非特許文献１参照。）、ＢＣ－ＰＩＶを腫瘍内部に直接投与することにより殺傷または損傷された腫瘍細胞が樹状細胞等の抗原提示細胞に取り込まれてＴ細胞に抗原を提示し、より効果的な抗腫瘍効果をもつＴ細胞等の増殖・活性化を図ることが可能になる。

[0014] ［サイトカイン：ＩＬ－１２のＢＣ－ＰＩＶへの導入］

ＩＬ－１２は、３５ｋＤａ及び４０ｋＤａからなるヘテロダイマーである。ＩＬ－１２は、樹状細胞・マクロファージ等が産生し、活性化Ｔ細胞の維持、キラーＴ細胞（ＣＴＬ）の発現の補助等の有用な活性を有する一方で最も強い炎症を誘導するサイトカインの１つである。そのため腫瘍組織に炎症を起こし、免疫療法の奏効率を高めるために使用できるのではないかと大きな関心が持たれている。一方、ＩＬ－１２は、全身性の免疫活性化により極めて毒性が強く、最大耐量（ＭＴＤ）であっても臨床効果は極めて限定的であることが分かっている。

多くの固形がんは、免疫抵抗性の微小環境を持ち、免疫細胞の浸潤、活性化、エフェクター機能が阻害されるため、抗ＰＤ１抗体や抗ＣＴＬＡ４抗体を含む免疫チェックポイント阻害剤（ＩＣＩ）による免疫療法に反応しないＣｏｌｄ　Ｔｕｍｏｒと呼ばれる状態にある。

そこで、３５ｋＤａ及び４０ｋＤａからなるヘテロダイマーのＩＬ－１２をＢＣ－ＰＩＶに導入し、腫瘍内局所にＩＬ－１２を発現させ腫瘍組織に炎症を起こし、免疫療法の奏効率を高めることができないかと考えた。さらに、ＢＣ－ＰＩＶは２個の遺伝子を導入できるため、２個のＩＬ－１２のサブユニット遺伝子の導入も検討した。

[0015] ≪サイトカイン・ケモカインの腫瘍組織での発現≫

固形がんでは、血管形成不全により、低酸素やグルコース飢餓状態などのストレス状態等が、がん細胞の増悪化や、薬剤耐性等の固形がん、線維芽細胞、マクロファージ、炎症細胞等の特異的な微小環境（ｔｕｍｏｒ　ｍｉｃ

ｒｏｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔ（ＴＭＥ））を形成する。さらに固形腫瘍の辺縁細胞マトリクスの形成により、ＣＴＬ細胞等の抗腫瘍免疫細胞の固形腫瘍内への浸潤が阻害されている。そのため、Ｔ細胞等の抗腫瘍免疫細胞の「能動的」な固形腫瘍組織への浸潤作用が必要と考えられる。

Ｔ細胞等のリンパ球は、特定のケモカインとケモカイン受容体によって、それぞれの生体内における移動と特定組織へのホーミングが制御され、生体における免疫システムの形成及び恒常性に関与する。また、病的状況下において異なるケモカインの発現誘導がリンパ球等の遊走によりさまざまな病態を引き起こす。

[0016] Ｔ細胞等リンパ球はケモカイン受容体のＣＣＲ７を発現している。ＣＣＬ１９及びＣＣＬ２１の２種類のケモカインは、ＣＣＲ７の共有のリガンドである。これらの関係性により、末梢血中のＴ細胞及びＢ細胞、また輸入リンパ管からの抗原感作樹状細胞の二次リンパ組織へのホーミングを誘導している。

したがって、これらケモカインを腫瘍内部だけでなく固形腫瘍組織境界部位の細胞に異所性に発現させることにより、ＣＣＲ７を発現するリンパ球、特に腫瘍特異的Ｔ細胞及びＣＴＬを腫瘍組織にリクルートし腫瘍組織への浸潤を能動的に高めることができるものと考えられる。

インターロイキン７（ＩＬ－７）は初期リンパ球の分化、成熟Ｔ細胞の維持、リンパ器官の形成に必須のサイトカインであり、免疫系の恒常性維持を担うサイトカインと考えられる。

[0017] ＜抗がん剤＞

１実施形態において、本発明は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１８からなる群から選ばれる少なくとも１種類のサイトカイン、或いは、前記サイトカインと、ＣＣＬ１９及び／又はＣＣＬ２１との組み合わせ、或いは、同一機能を有するこれらの変異体を発現したヒトパラインフルエンザウイルス２型を有効成分として含有する、固形がんに対する抗がん剤を提供する。

[0018] 本実施形態に用いられるウイルスは、ヒトパラインフルエンザウイルス２型（ｈＰＩＶ２）である。２次感染性粒子を産生させない観点から、ヒトパラインフルエンザウイルス２型は、膜融合機能を有するＦ遺伝子を欠損し、非増殖型であることが好ましい。

[0019] また、本実施形態に用いられるウイルスは、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１８からなる群から選ばれる少なくとも１種類のサイトカイン、或いは、前記サイトカインと、ＣＣＬ１９及び／又はＣＣＬ２１との組み合わせ、或いは、同一機能を有するこれらの変異体を発現している。

ウイルスが発現するリガンドの組み合わせとしては、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１８の各１種類のサイトカイン；ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１８からなる群から選ばれる２種類のサイトカイン；ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１８からなる群から選ばれる３種類以上のサイトカインの組み合わせが挙げられる。具体的には、ＩＬ－２とＣＣＬ１９又はＣＣＬ２１の組み合わせ、ＩＬ－７とＣＣＬ１９又はＣＣＬ２１の組み合わせ、ＩＬ－１２とＣＣＬ１９又はＣＣＬ２１の組み合わせ、ＩＬ－１５とＣＣＬ１９又はＣＣＬ２１の組み合わせ、ＩＬ－１８とＣＣＬ１９又はＣＣＬ２１の組み合わせが挙げられる。実施例にて後述するように、ヒトＩＬ－１２遺伝子を導入したＢＣ－ＰＩＶが、抗腫瘍効果を有することを確認している。ＩＬ－１２は、３５ｋＤａ及び４０ｋＤａからなるヘテロダイマーである。実施例にて後述するように、ＢＣ－ＰＩＶに導入するにあたり、ｐ３５遺伝子とｐ４０遺伝子をｈＰＩＶ２のＥＩＳ配列（ｃｔｃｔｃａｔａａｔｔｔａａｇａａａａａａｔｃａｔａｇｇｃｃｃｇｇａｃｇｇｇｔｔａｇ（配列番号４））で連結することが好ましい。

また、ウイルスが発現するリガンドの組み合わせとしては、上記サイトカインと、ＣＣＬ１９及び／又はＣＣＬ２１との組み合わせも挙げられる。係る組み合わせとしては、ＩＬ－７／ＣＣＬ１９、ＩＬ－７／ＣＣＬ２１、Ｉ

Ｌ－１２／ＣＣＬ１９、ＩＬ－１２／ＣＣＬ２１等が挙げられる。実施例にて後述するように、ヒトＩＬ－７遺伝子／ヒトＣＣＬ－１９遺伝子を導入したＢＣ－ＰＩＶ、ヒトＩＬ－７遺伝子／ヒトＣＣＬ－２１遺伝子を導入したＢＣ－ＰＩＶが、抗腫瘍効果を有することを確認している。

[0020] 同一機能を有するこれらの変異体とは、リガンドを構成するアミノ酸配列において、１又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつシグナル伝達能を有するものをいう。欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸の数としては、１～２０個が好ましく、１～１０個がより好ましく、１～５個が特に好ましい。

また、本実施形態に用いられるサイトカイン及び／又はケモカインとしては、そのホモログも含まれる。

[0021] ＜固形がんに対するがん治療用医薬組成物＞

１実施形態において、本発明は、上述した抗がん剤を含有する。本実施形態の固形がんに対するがん治療用医薬組成物は、更に、免疫活性化剤及び／又は免疫チェックポイント阻害剤を含んでもよい。

免疫活性化剤としては、ＴＮＦＲＳＦ受容体のアゴニスト抗体が挙げられ、抗Ｏ×４０アゴニスト抗体、抗ＧＩＴＲアゴニスト抗体、抗ＣＤ３０アゴニスト抗体、抗４－１ＢＢアゴニスト抗体、抗ＣＤ２７アゴニスト抗体等が挙げられる。

免疫チェックポイント阻害剤としては、抗ＰＤ１アンタゴニスト抗体、抗ＰＤ－Ｌ１アンタゴニスト抗体、抗ＣＴＬＡ４アンタゴニスト抗体、抗ＴＩＭ３アンタゴニスト抗体等が挙げられる。

[0022] 本実施形態の固形がんに対するがん治療用医薬組成物は、薬学的に許容される担体を含有することが好ましい。薬学的に許容される担体としては、通常製剤に用いられるものを特に制限なく用いることができ、例えば、滅菌水、生理食塩水等の溶媒；ゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴム等の結合剤、結晶性セルロース等の賦形剤；アルギン酸等の膨化剤等が挙げられる。

[0023] 本実施形態の固形がんに対するがん治療用医薬組成物は、添加剤を含んでいてもよい。添加剤としては、ステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤；ショ糖、乳糖、サッカリン等の甘味剤；ペパーミント、アカモノ油等の香味剤；ベンジルアルコール、フェノール等の安定剤；リン酸塩、酢酸ナトリウム等の緩衝剤；安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等の溶解補助剤；酸化防止剤；防腐剤；界面活性剤；乳化剤等が挙げられる。

[0024] 本実施形態の固形がんに対するがん治療用医薬組成物は、上記の薬学的に許容される担体及び添加剤を適宜組み合わせて、一般に認められた単位用量形態で混和することによって製剤化することができる。

[0025] 本実施形態の固形がんに対するがん治療用医薬組成物は、経口的に使用される剤型又は非経口的に使用される剤型に製剤化されていてもよく、非経口的に使用される剤型に製剤化されることが好ましい。経口的に使用される剤型としては、例えば錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤等が挙げられる。非経口的に使用される剤型としては例えば注射剤、軟膏剤、貼付剤等が挙げられるが、注射剤が好ましい。

[0026] 注射剤用の溶媒としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖、Ｄ－ソルビトール、Ｄ－マンノース、Ｄ－マンニトール、塩化ナトリウム等の補助薬を含む等張液が挙げられる。注射剤用の溶媒は、エタノール等のアルコール；プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等のポリアルコール；ポリソルベート８０（商標）、ＨＣＯ－５０等の非イオン性界面活性剤等を含有していてもよい。

[0027] 患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等のほか、鼻腔内的、経気管支的、筋肉内的、経皮的、または経口的方法が挙げられるが、腫瘍内投与が好ましい。

[0028] 本実施形態のがん治療用医薬組成物の１回あたりの投与量は、非経口的に投与する場合には、投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重６０ｋｇとして）においては、１日あたり１×１０^{6}ＢＣ－ＰＩＶ粒子から１×１０^{11}ＢＣ－ＰＩＶ粒子、例え

ば１×１０^{7}ＢＣ－ＰＩＶ粒子から１×１０^{11}ＢＣ－ＰＩＶ粒子を静脈注射又は腫瘍内を中心とする局所投与することが考えられる。また、上記の量を１日あたり１回又は数回に分けて投与してもよい。

[0029] 本実施形態の固形がんに対するがん治療用医薬組成物の適用対象としては、固形がんであれば限定されず、乳がん（例えば、浸潤性乳管がん、非浸潤性乳管がん、炎症性乳がん等）、前立腺がん（例えば、ホルモン依存性前立腺がん、ホルモン非依存性前立腺がん等）、膵臓がん（例えば、膵管がん等）、胃がん（例えば、乳頭腺がん、粘液性腺がん、腺扁平上皮がん等）、肺がん（例えば、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、悪性中皮腫等）、結腸がん（例えば、消化管間質腫瘍等）、直腸がん（例えば、消化管間質腫瘍等）、大腸がん（例えば、家族性大腸がん、遺伝性非ポリポーシス大腸がん、消化管間質腫瘍等）、小腸がん（例えば、非ホジキンリンパ腫、消化管間質腫瘍等）、食道がん、十二指腸がん、舌がん、咽頭がん（例えば、上咽頭がん、中咽頭がん、下咽頭がん等）、頭頸部がん、唾液腺がん、脳腫瘍（例えば、松果体星細胞腫瘍、毛様細胞性星細胞腫、びまん性星細胞腫、退形成性星細胞腫等）、神経鞘腫、肝臓がん（例えば、原発性肝がん、肝外胆管がん等）、腎臓がん（例えば、腎細胞がん、腎盂と尿管の移行上皮がん等）、胆嚢がん、胆管がん、子宮内膜がん、子宮頸がん、子宮肉腫、卵巣がん（例、上皮性卵巣がん、性腺外胚細胞腫瘍、卵巣性胚細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍等）、膀胱がん、尿道がん、皮膚がん（例えば、メルケル細胞がん等）、血管腫、メラノーマ（悪性黒色腫）、甲状腺がん（例えば、甲状腺髄様がん等）、副甲状腺がん、鼻腔がん、副鼻腔がん、骨腫瘍（例えば、骨肉腫、ユーイング肉腫、軟部組織肉腫等）、転移性髄芽腫、血管線維腫、隆起性皮膚線維肉腫、網膜肉腫、陰茎癌、精巣腫瘍、小児固形がん（例えば、ウィルムス腫瘍、小児腎腫瘍等）、カポジ肉腫、ＡＩＤＳに起因するカポジ肉腫、上顎洞腫瘍、線維性組織球腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、慢性骨髄増殖性疾患等が挙げられる。

[0030] ＜キット＞

１実施形態において、本発明は、がんの治療に用いるためのキットであって、前記治療において、同時使用又は逐次使用するための、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１８からなる群から選ばれる少なくとも１種類のサイトカイン、或いは、前記サイトカインと、ＣＣＬ１９及び／又はＣＣＬ２１との組み合わせ、或いは、同一機能を有するこれらの変異体を発現したヒトパラインフルエンザウイルス２型と、免疫活性化剤及び／又は免疫チェックポイント阻害剤と、を含むキットを提供する。

その他、本実施形態のキットの好ましい態様については、＜がん治療用医薬組成物＞と同様である。逐次投与の場合の順番は特に問わない。

[0031] ＜腫瘍浸潤Ｔ細胞及び樹状細胞活性化剤＞

１実施形態において、本発明は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１８からなる群から選ばれる少なくとも１種類のサイトカイン、或いは、前記サイトカインと、ＣＣＬ１９及び／又はＣＣＬ２１との組み合わせ、或いは、同一機能を有するこれらの変異体を発現したヒトパラインフルエンザウイルス２型を有効成分として含有する、腫瘍浸潤Ｔ細胞及び樹状細胞活性化剤を提供する。

実施例にて後述するように、ＩＬ－７／ＣＣＬ１９又はＩＬ－７／ＣＣＬ２１を搭載したＢＣ－ＰＩＶ投与群では、腫瘍内部のＴ細胞の浸潤及び腫瘍周辺でのリンパ球の浸潤が観察され、係る浸潤を介して抗腫瘍効果を奏している。

[0032] ＜治療方法＞

１実施形態において、本発明は、上述した抗がん剤又はがん治療用医薬組成物を、治療を必要とする患者に投与することを含む、がんの治療方法を提供する。

[0033] また、１実施形態において、本発明は、有効量の所望のサイトカイン、又は所望のサイトカインとケモカインとの組み合わせを発現したヒトパラインフルエンザウイルス２型と、有効量の免疫活性化剤及び／又は免疫チェックポイント阻害剤とを、治療を必要とする患者に、同時に、または、逐次投与

することを含む、がんの治療方法を提供する。その他、本実施形態の治療方法の好ましい態様については、＜がん治療用医薬組成物＞と同様である。逐次投与の場合の順番は特に問わない。

[0034] ［その他の実施形態］

１実施形態において、本発明は、がんの治療のための抗がん剤、がん治療用医薬組成物、又はキットを提供する。抗がん剤、がん治療用医薬組成物、又はキットとしては、上述したものと同様のものを使用することができる。

実施例

[0035] 次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

以下の実施例のＩＬ－７、ＩＬ－１２，ＣＣＬ１９及びＣＣＬ２１等表記において、ヒト由来とする。

[0036] ［実験例１］ＩＬ－７遺伝子、ＣＣＬ１９遺伝子及びＣＣＬ２１遺伝子を保持するＢＣ－ＰＩＶの構築

ＢＣ－ＰＩＶに、ＩＬ－７遺伝子、ＣＣＬ１９遺伝子及びＣＣＬ２１遺伝子を、単独導入した又は２遺伝子導入したＢＣ－ＰＩＶを構築するためのプラスミド（図１参照。）の組み合せは以下の通りである。

[0037] ＩＬ－７遺伝子単独、ＣＣＬ１９遺伝子単独、ＩＬ－７／ＣＣＬ１９の２遺伝子、ＩＬ－７／ＣＣＬ２１の２遺伝子の組み合せをＢＣ－ＰＩＶに導入した（図１参照。）。これら遺伝子配列はヒト由来の配列である。

この際使用したＩＬ－７遺伝子配列は、ＧｅｎＢａｎｋ：ＢＣ０４７６９８．１である（配列番号１）。ＣＣＬ１９遺伝子配列は、ＧｅｎＢａｎｋ：ＢＣ０２７９６８．１である（配列番号２）。ＣＣＬ２１遺伝子配列は、ＧｅｎＢａｎｋ：ＢＣ０２７９１８．１である（配列番号３）。これらの遺伝子を元にＢＣ－ＰＩＶに組込むタグを付加した遺伝子を全合成した。当該プラスミドよりＢＣ－ＰＩＶの回収は従来発明者らが用いていたリバースジェネティクス法により行った（特許文献４、５参照。）。

[0038] ［実験例２］ＩＬ－７、ＣＣＬ１９及びＣＣＬ２１遺伝子のＢＣ－ＰＩＶへ

の導入と感染細胞での所望遺伝子の確認

実施例１で回収できたＢＣ－ＰＩＶが、目的のタンパク質を発現しているかを調べた。実施例１で作製したウイルス作製用プラスミドのＮｏｔＩ制限酵素配列位及び／又はＭＩｕＩ制限酵素配列位に導入した、各々すべての遺伝子を保持するＢＣ－ＰＩＶを回収した。次いで、回収したＢＣ－ＰＩＶを、ｈＰＩＶ２のＦ膜タンパク質発現Ｖｅｒｏ細胞に感染させ７日間培養し、回収した細胞を、市販で入手可能な抗ヒトＩＬ－７抗体（ＧｅｎＴｅ×、Ｃａｔ＃：ＧＴ×１３１４４８）、抗ヒトＣＣＬ１９抗体（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｃａｔ＃：ＡＦ３６１）、抗ヒトＣＣＬ２１抗体（会社名Ａｂｃａｍ、Ｃａｔ＃：ａｂ９８５１）を用いてウエスタンブロットに供した。

図２に示すように、ＩＬ－７遺伝子をＮｏｔＩ制限酵素配列位に入れたＢＣ－ＰＩＶ、又はＣＣＬ１９遺伝子をＭＩｕＩ制限酵素配列位に入れたＢＣ－ＰＩＶにおいて、各タンパク質の発現が認められた。ウエスタンブロットでは、ＩＬ－７において３本のバンドが認められた。これは報告されているようにＧｌｙｃｏｓｙｌａｔｉｏｎの違いによるものと考えられる。

図３に示すように、ＣＣＬ１９及びＩＬ－７遺伝子の２遺伝子を導入したＢＣ－ＰＩＶでも両タンパク質の発現が認められた。

また、図４に示すように、ＩＬ－７遺伝子とＣＣＬ２１遺伝子の同時導入でも各タンパク質の発現が各遺伝子導入ＢＣ－ＰＩＶ感染細胞で認められた。

[0039] ［実験例３］ＩＬ－１２遺伝子を保持するＢＣ－ＰＩＶの構築

ＩＬ－１２遺伝子を導入したＢＣ－ＰＩＶを構築した（図５参照）。ＩＬ－１２サイトカインはヘテロダイマー（Ｐ３５及びＰ４０）である。ＢＣ－ＰＩＶのＮｏｔＩ制限酵素配列位とＭＩｕＩ制限酵素配列位にｐ３５遺伝子及び／又はｐ４０遺伝子を導入し、ＢＣ－ＰＩＶを回収した。

また、ＩＬ－１２サイトカインのようなヘテロダイマーから構成される２遺伝子を１組とするサイトカインの他に、ケモカイン等を組み合せるために、ｐ３５遺伝子とｐ４０遺伝子をｈＰＩＶ２のＥＩＳ配列（ｃｔｃｔｃａｔ

ａａｔｔｔａａｇａａａａａａｔｃａｔａｇｇｃｃｃｇｇａｃｇｇｇｔｔａｇ（配列番号４））で連結し、ＮｏｔＩ制限酵素配列位に挿入したＢＣ－ＰＩＶを回収した。

この際使用したＩＬ－１２のｐ３５遺伝子配列は、ＧｅｎＢａｎｋ：ＮＭ＿０００８８２．４であり（配列番号５）、ｐ４０遺伝子配列は、ＧｅｎＢａｎｋ：ＮＭ＿００２１８７．３である（配列番号６）。

[0040] ［実験例４］ＩＬ－１２遺伝子のＢＣ－ＰＩＶへの導入と感染細胞での所望遺伝子の確認

実施例３で回収したＢＣ－ＰＩＶが、目的のタンパク質を発現しているかを調べた。実施例３で作製したウイルス作製用プラスミドのＮｏｔＩ制限酵素配列位及び／又はＭｌｕＩ制限酵素配列位に導入したｐ３５及びｐ４０遺伝子を保持するＢＣ－ＰＩＶのＭｌｕＩ制限酵素配列位にｐ３５遺伝子及びｐ４０遺伝子をｈＰＩＶ２のＥＩＳ配列を介して導入しウイルスを回収した（図４参照。）。回収したＢＣ－ＰＩＶを、ｈＰＩＶ２のＦ膜タンパク質発現Ｖｅｒｏ細胞に感染させ７日間培養し、回収した細胞を、市販で入手可能な抗ヒトＰ３５抗体（Ａｂｃａｍ、Ｃａｔ＃：ａｂ１３１０３９）、抗ヒトＰ４０抗体（会社名Ａｂｃａｍ、ｃａｔ＃：ａｂ１３３７５２）を用いたウエスタンブロットに供した。図６に示すようにｈＰＩＶ２のＥＩＳ介して発現させたＰ４０及びＰ３５タンパク質を確認した。

また、図７において、図５に示すＮｏｔＩとＭｌｕＩの制限酵素配列位にＰ４０遺伝子及びＰ３５遺伝子を導入し回収したＢＣ－ＰＩＶの感染細胞でのＰ４０及びＰ３５タンパク質の発現を確認した。

以上の結果、ＢＣ－ＰＩＶはＰ４０及びＰ３５タンパク質を１つのベクターで１細胞内に同時発現できることを確認した。

[0041] ［実験例５］ＥＬＩＳＡによるＩＬ－１２の発現確認

ＢＣ－ＰＩＶを用いてＩＬ－１２を発現させた感染細胞上清液（感染４日）を、ＥＬＩＳＡに供した。ＥＬＩＳＡ測定キットはＢｉｏ　Ｌｅｇｅｎｄ、Ｃａｔ＃：４３１７０４を使用した。測定はキットの測定方法に沿って行

った。当該ＥＬＩＳＡでＰ７０特異的抗体を使って濃度を測定した。図８に示すような希釈倍率と標準曲線より、上清中におよそ１．０ｎｇ/ｍＬのＩＬ－１２タンパク質発現が確認された。

[0042] ［実験例６］サイトカイン（ＩＬ－７）及びケモカイン（ＣＣＬ１９）を導入したＢＣ－ＰＩＶによる抗腫瘍効果及び抗マウスＰＤ１抗体のシナジー効果（第１回）

取得済のＩＬ－７遺伝子及びＣＣＬ１９遺伝子を導入したＢＣ－ＰＩＶを用いて、ＣＴ２６マウス大腸がん細胞をＢＡＬＢ／ｃマウスに移植し抗腫瘍効果について検討した。ＢＣ－ＰＩＶはマウスの組織・細胞内では感染及び増殖がｐｏｏｒ　ｐｅｒｍｉｓｓｉｖｅであることが知られており、今回の試験で抗腫瘍効果が認められれば、ヒトへの外挿性が大いに期待できる。

マウスの腹側を除毛後、５×１０^{5}個のＣＴ２６マウス大腸がん細胞をマウスの腹側２か所の皮下に移植し、７日後に腫瘍径が５－７ｍｍ程度に増殖した片側腫瘍内に外来遺伝子非導入のＢＣ－ＰＩＶ（Ｅｍｐ）、ＩＬ－７／ＣＣＬ１９導入ＢＣ－ＰＩＶの効果を調べた。

今回免疫チェックポイント阻害剤の抗マウスＰＤ１抗体との相乗効果についても調べた。抗マウスＰＤ１抗体はマウスＢ１６Ｆ１０メラノーマ細胞に対する効果が低いことが報告されており、ＣＴ２６マウス大腸がん移植ＢＡＬＢ／ｃマウスを用いて評価を行った。

およそ１×１０^{7}ＴＣＩＤ$_{50}$ＢＣ－ＰＩＶを、移植７日及び９日後に投与し、また移植後１１日及び１３日後に抗マウスＰＤ１抗体２００μｇを腹腔内に投与した。その後３日又は４日おきに腫瘍径を測定し、腫瘍容量は（長径×短径^{2}）÷２で計算した。実験スケジュールを図９に示した。

マウスの群構成は、以下の６群である。

[0043] （１）：非処理群（ｎｏｎ－ｔｒｅａｔ）

（２）：ＢＣ－ＰＩＶ群（Ｅｍｐ）

（３）：抗マウスＰＤ１抗体群（αＰＰＤ１）

（４）：ＢＣ－ＰＩＶ＋抗マウスＰＤ１抗体群（Ｅｍｐ＋αＰＤ１）

（５）：ＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９群（ＩＬ－７／ＣＣＬ１９）

（６）：ＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９＋抗マウスＰＤ１抗体群（ＩＬ－７／ＣＣＬ１９＋αＰＤ１）

[0044] ［実験例７］サイトカイン（ＩＬ－７）及びケモカイン（ＣＣＬ１９）を導入したＢＣ－ＰＩＶによる抗腫瘍効果及び抗マウスＰＤ１抗体とのシナジー効果（第１回）

結果を図１０、図１１に示す。投与側の腫瘍容量（図１０参照。）は、非処理群、ＢＣ－ＰＩＶ群（Ｅｍｐ）、抗マウスＰＤ１抗体群（αＰＤ１）、ＢＣ－ＰＩＶ＋抗マウスＰＤ１抗体群（Ｅｍｐ＋αＰＤ１）では、顕著な抗腫瘍効果（腫瘍容量の減少）は認められなかった。また、今回の投与では単独の抗マウスＰＤ１抗体の抗腫瘍効果もほとんど認められなかった。

一方、ＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９群（ＩＬ－７／ＣＣＬ１９）及びＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９＋抗マウスＰＤ１抗体群（ＩＬ－７／ＣＣＬ１９＋αＰＤ１）では、抗腫瘍効果が認められた（図１０参照。）。非投与側では、ＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９＋抗マウスＰＤ１抗体群（ＩＬ－７／ＣＣＬ１９＋αＰＤ１）に抗腫瘍効果を示し、アブスコパル効果が認められた（図１１参照）。まとめると、投与側で、（５）及び（６）群マウスの移植腫瘍において抗腫瘍効果が認められた。非投与側でも（６）群マウスにおいて高い腫瘍退縮効果が認められ、抗マウスＰＤ１抗体とのシナジー効果によりさらに高いアブスコパル効果が認められた。

[0045] ［実験例８］サイトカイン（ＩＬ－７）及びケモカイン（ＣＣＬ１９又はＣＣＬ２１）を導入したＢＣ－ＰＩＶによる抗腫瘍効果及び抗マウスＰＤ１抗体とのシナジー効果（第２回）

実施例６と同じ手法に準じて試験を実施した。

マウスの群構成は、以下の６群である。

[0046] （１）：非処理群（ｎｏｎ－ｔｒｅａｔ）

（２）：ＢＣ－ＰＩＶ群（Ｅｍｐ）

（３）：ＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９群（ＩＬ－７／ＣＣＬ１９）

（４）：ＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ２１群（ＩＬ－７／ＣＣＬ２１）

（５）：ＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ２１＋抗マウスＰＤ１抗体群

（ＩＬ－７／ＣＣＬ２１＋αＰＤ１）

[0047] 結果を図１２、図１３に示す。実施例８の結果と同様に投与側の腫瘍容量は、非処理群、ＢＣ－ＰＩＶ群（Ｅｍｐ）では、顕著な抗腫瘍効果（腫瘍容量の減少）は認められなかった（図１２参照。）。一方、ＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９群（ＩＬ－７／ＣＣＬ１９）、ＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ２１群（ＩＬ－７／ＣＣＬ２１）及びＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９＋抗マウスＰＤ１抗体群（ＩＬ－７／ＣＣＬ１９＋αＰＤ１）では、抗腫瘍効果が認められた（図１２参照。）。非投与側では、ＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ２１＋抗マウスＰＤ１抗体群（ＩＬ－７／ＣＣＬ２１＋αＰＤ１）で高い抗腫瘍効果を示し、アブスコパル効果が認められた（図１３参照。）。ＣＣＬ１９とＣＣＬ２１を比較すると、ＣＣＬ２１の抗腫瘍効果が高い傾向にあった。ＣＣＬ２１は、ＣＣＲ７を介したＧタンパク質シグナル伝達の活性化においてはＣＣＬ１９と同等の活性を示すにもかかわらず、受容体脱感作を引き起こさないことが報告されており、より抗腫瘍効果が高い可能性がある。

[0048] ［実験例９］サイトカイン（ＩＬ－７）及びケモカイン（ＣＣＬ１９又はＣＣＬ２１）を導入したＢＣ－ＰＩＶによる抗腫瘍効果及び抗マウスＰＤ１抗体処理による初回投与８日後の腫瘍のＴ細胞／Ｂ細胞の活性化

ＢＣ－ＰＩＶ投与１１日後の処理マウスを４％パラホルムアルデヒドで灌流固定し投与側の腫瘍を摘出し（図１４参照。）、抗マウスＴ細胞抗体（会社名ＣＳＴ、ｃａｔ＃：７８５８８）及び、抗マウスＢ細胞抗体（会社名ＣＳＴ、Ｃａｔ＃：９８９４１）に供した。

マウスの群構成は、以下の５群である。

[0049] （１）：ＢＣ－ＰＩＶ群（Ｅｍｐ）

（２）：ＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９＋抗マウスＰＤ１抗体群

（ＩＬ－７／ＣＣＬ１９＋αＰＤ１）

（３）：非処理群（ｎｏｎ－ｔｒｅａｔ）

（４）：ＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９群（ＩＬ－７／ＣＣＬ１９）

（５）：ＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ２１群（ＩＬ－７／ＣＣＬ２１）

[0050] 腫瘍塊の大きさの様子から、ＩＬ－７／ＣＣＬ１９、ＩＬ－７／ＣＣＬ２１及びＩＬ－７／ＣＣＬ１９＋抗マウスＰＤ１抗体を投与したマウス腫瘍の大きさが小さく、腫瘍径と外観から抗腫瘍効果があることが推察された。

ＨＥ染色図（図１５参照。）によるこれらの処理腫瘍の特徴は、腫瘍内部での腫瘍細胞の壊死巣が大きく、壊死周囲の残存している腫瘍細胞も変性し始めているものが多く認められた。特に、特徴的な点は腫瘍との境界部、腫瘍外の血管周囲にリンパ球の多数の集積が認められた点である。この特徴は、腫瘍境界部の血管周辺でリンパ球の著しい増加が確認されているＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９投与腫瘍で認められた（図１５参照。）。

一方、ＢＣ－ＰＩＶ投与及び無処理腫瘍では、腫瘍内部へのＴ細胞の浸潤は、ＩＬ－７／ＣＣＬ１９、ＩＬ－７／ＣＣＬ２１及びＩＬ－７／ＣＣＬ１９＋抗マウスＰＤ１抗体投与群に比べて少ないが腫瘍内部でＴ細胞陽性細胞が認められた。しかし、腫瘍周辺領域へのリンパ球の集積は認められなかった（図１５参照。）。これは、ＢＣ－ＰＩＶの腫瘍内部及び腫瘍周辺細胞への感染によるＣＣＬ１９又はＣＣＬ２１ケモカインの発現により、ＣＣＲ７受容体を発現するリンパ球が腫瘍周辺に多数集積していることによるものと考えられた。

[0051] 図１６にＴ細胞の腫瘍内部及び腫瘍周辺での様子を示す。抗マウスＢ細胞抗体の陽性反応は、どの腫瘍にも認められず、当該処理によりＢ細胞の大きな集積はないものと考えられた。一方、ＩＬ－７／ＣＣＬ１９、ＩＬ－７／ＣＣＬ２１及びＩＬ－７／ＣＣＬ１９＋抗マウスＰＤ１抗体投与腫瘍では、腫瘍中及び腫瘍周辺にＴ細胞陽性の細胞が多数認められた。

ＩＬ－７／ＣＣＬ１９、ＩＬ－７／ＣＣＬ２１及びＩＬ－７／ＣＣＬ１９＋抗マウスＰＤ１抗体投与マウスの腫瘍がより小さいが、ＢＣ－ＰＩＶ単独投与腫瘍内部でも、Ｔ細胞陽性細胞の浸潤が認められた（図１６参照。）。

しかし、腫瘍周辺でのリンパ球の浸潤は認められなかった。これまでにＢＣ－ＰＩＶ単独投与で樹状細胞を成熟させる効果が高いことを（非特許文献１参照。）確認しているが、今回ＢＣ－ＰＩＶ単独投与では、Ｔ細胞を活性化させることができるが、投与部位近辺にこれらリンパ球を集積させる能力がないことが確認された。

図１７にＣＤ８陽性Ｔ細胞の腫瘍内部及び腫瘍周辺での様子を示す。ＣＤ４陽性Ｔ細胞の腫瘍内部腫瘍周辺部に抗マウスＢ細胞抗体の陽性反応は、どの腫瘍にもほとんど認められず、当該処理によりＣＤ４陽性Ｔ細胞の大きな集積はないものと考えられた。一方、ＩＬ－７／ＣＣＬ１９、ＩＬ－７／ＣＣＬ２１及びＩＬ－７／ＣＣＬ１９＋抗マウスＰＤ１抗体投与腫瘍では、腫瘍中及び腫瘍周辺にＴ細胞陽性の細胞が多数を認められた。

ＩＬ－７／ＣＣＬ１９、ＩＬ－７／ＣＣＬ２１及びＩＬ－７／ＣＣＬ１９＋抗マウスＰＤ１抗体投与マウスの腫瘍がより小さいが、ＢＣ－ＰＩＶ単独投与腫瘍内部でも、ＣＤ８陽性Ｔ細胞の浸潤が認められた（図１７参照。）。しかし、ＢＣ－ＰＩＶ単独投与では腫瘍周辺でのリンパ球の浸潤は認められなかった。

今回の試験においてマウスでは、ＢＣ－ＰＩＶはｐｏｏｒ　ｐｅｒｍｉｓｓｉｖｅであるため導入したＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＣＣＬ１９及びＣＣＬ２１の遺伝子発現はかなり低いと想定されるが、それでも高い抗腫瘍作用が認められており、ｐｅｒｍｉｓｓｉｖｅであるヒトでは発現がより高いと予想され抗腫瘍効果はより高いものと考えられる。

[0052] ［実験例１０］サイトカイン（ＩＬ－７）及びケモカイン（ＣＣＬ１９）を導入したＢＣ－ＰＩＶによる腎がんＲＥＮＣＡ細胞に対する抗腫瘍効果及び抗マウスＰＤ１抗体とのシナジー効果の検討

チロシンキナーゼ阻害剤(ＴＫＩ)及び免疫チェックポイント阻害剤（ＩＣＩ）、例えば抗ＰＤ１抗体を使用したいくつかの種類の全身療法が進行性腎細胞癌(ａＲＣＣ)患者に対して実施されており、ＩＣＩの単独又は他剤との組合せ検討されている。発明者らは、今回マウス腎がん由来細胞であるＲＥ

ＮＣＡ細胞へのＩＬ－７／ＣＣＬ１９導入ＢＣ－ＰＩＶと抗マウスＰＤ１抗体の効果について検討した。

ＣＴ２６細胞以外のマウスＲＥＮＣＡ腎がん細胞（８×１０^{4}個）をＢＡＬＢ／ｃマウスの背部に移植し、腫瘍径が３－５ｍｍに達したところで、増殖した片側腫瘍内に外来遺伝子非導入のＢＣ－ＰＩＶ（Ｅｍｐ）、ＩＬ－７／ＣＣＬ１９導入ＢＣ－ＰＩＶの効果を調べた。今回免疫チェックポイント阻害剤の抗マウスＰＤ１抗体との相乗効果についても調べた。Ｉｎ ｖｉｔｒｏ試験では抗マウスＰＤ１抗体処理単独ではＲＥＮＣＡ細胞に対し、細胞増殖の抑制効果がないことが報告されている(非特許文献２参照。)。

マウスの群構成は、以下の４群である。

[0053] （１）：非処理群（ｎｏｎ－ｔｒｅａｔ）

（２）：ＢＣ－ＰＩＶ群（Ｅｍｐ）

（３）：ＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９群（ＩＬ－７／ＣＣＬ１９）

（４）：ＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９＋抗マウスＰＤ１抗体群（ＩＬ－７／ＣＣＬ１９＋αＰＤ１）

[0054] 投与側の結果を図１８に示す。投与側ではＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９及びＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９＋抗マウスＰＤ１抗体群で効果があると思われる。ＲＥＮＣＡ細胞では抗マウスＰＤ１抗体単独では細胞増殖抑制効果が認められていないところ(非特許文献２参照。)、ＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９と併用することにより抗腫瘍効果が認められた。また、ＢＣ－ＰＩＶ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９単独投与でも抗腫瘍効果が認められた。図には示さないが、ウイルス非投与側ではいずれの腫瘍もでも同容量程度に生育し、抗腫瘍効果は認められなかった。

[0055] ［実験例１１］

サイトカイン（ＩＬ－１２）を導入したＢＣ－ＰＩＶによる抗腫瘍効果及び抗マウスＰＤ１抗体とのシナジー効果

ＩＬ－１２は、全身性の免疫活性化により極めて毒性が強く、最大耐量（

ＭＴＤ）であっても臨床効果は極めて限定的であることが分かっている。ＢＣ－ＰＩＶに導入し、腫瘍内への局所投与により毒性を下げることにより抗腫瘍効果を図った。今回導入したＩＬ－１２はヒト型であり、マウスとのｃｏｍｐａｔｉｂｉｌｉｔｙはほとんど認められていない。しかしながら、非特許文献３では、ヒトＩＬ－１２のマウスで抗腫瘍効果が報告されている。今回ＢＣ－ＰＩＶに導入したヒトＩＬ－１２のマウスでの抗腫瘍効果を検討した。

前述の方法と同様の手法で試験を実施した。

投与側（図１９参照。）及び非投与側（図２０参照。）で、ヒトＩＬ－１２単独の抗腫瘍効果は認められた。抗マウスＰＤ１抗体とともに投与するとより抗腫瘍効果がさらに高められた（図１９、図２０参照。）。

産業上の利用可能性

[0056] 本発明によれば、抗腫瘍効果に優れた、抗がん剤、がん治療用医薬組成物、キット、及び活性化剤を提供することができる。

請求の範囲

[請求項1] ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１８からなる群から選ばれる少なくとも１種類のサイトカイン、或いは、前記サイトカインと、ＣＣＬ１９及び／又はＣＣＬ２１との組み合わせ、或いは、同一機能を有するこれらの変異体を発現したヒトパラインフルエンザウイルス２型を有効成分として含有する、固形がんに対する抗がん剤。

[請求項2] 前記少なくとも１種類のサイトカインは、ヘテロダイマーを構成するＩＬ－１２、又は同一機能を有する変異体である、請求項１に記載の固形がんに対する抗がん剤。

[請求項3] 前記ヒトパラインフルエンザウイルス２型は、ゲノムよりＦ遺伝子を欠失した非増殖型である、請求項１に記載の固形がんに対する抗がん剤。

[請求項4] 請求項１～３のいずれか一項に記載の固形がんに対する抗がん剤を含有する、固形がんに対するがん治療用医薬組成物。

[請求項5] 更に、免疫活性化剤及び／又は免疫チェックポイント阻害剤を含有する、請求項４に記載の固形がんに対するがん治療用医薬組成物。

[請求項6] 前記免疫チェックポイント阻害剤は、抗ＰＤ１抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、抗ＣＴＬＡ４抗体、及び抗ＴＩＭ３抗体からなる群から選ばれる少なくとも１種類を含む、請求項４に記載の固形がんに対するがん治療用医薬組成物。

[請求項7] 腫瘍内投与に用いられる、請求項４に記載の固形がんに対するがん治療用医薬組成物。

[請求項8] 固形がんの治療に用いるためのキットであって、前記治療において、同時使用又は逐次使用するための、

ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１８からなる群から選ばれる少なくとも１種類のサイトカイン、或いは、前記サイトカインと、ＣＣＬ１９及び／又はＣＣＬ２１との組み合わせ

、或いは、同一機能を有するこれらの変異体を発現したヒトパラインフルエンザウイルス２型と、

免疫活性化剤及び／又は免疫チェックポイント阻害剤と、を含むキット。

[請求項9] 前記少なくとも１種類のサイトカインは、ヘテロダイマーを構成するＩＬ－１２、又は同一機能を有する変異体である、請求項８に記載のキット。

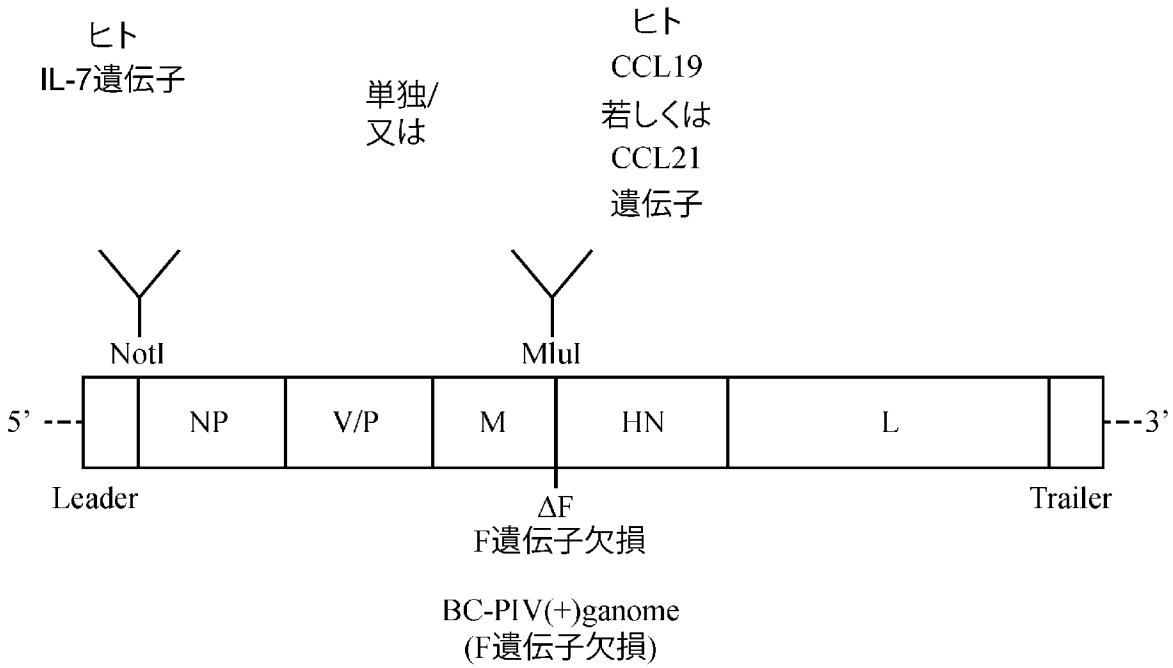
[請求項10] 前記ヒトパラインフルエンザウイルス２型は、ゲノムよりＦ遺伝子を欠失した非増殖型である、請求項８に記載のキット。

[請求項11] 前記免疫チェックポイント阻害剤は、抗ＰＤ１抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、抗ＣＴＬＡ４抗体、及び抗ＴＩＭ３抗体からなる群から選ばれる少なくとも１種類を含む、請求項８に記載のキット。

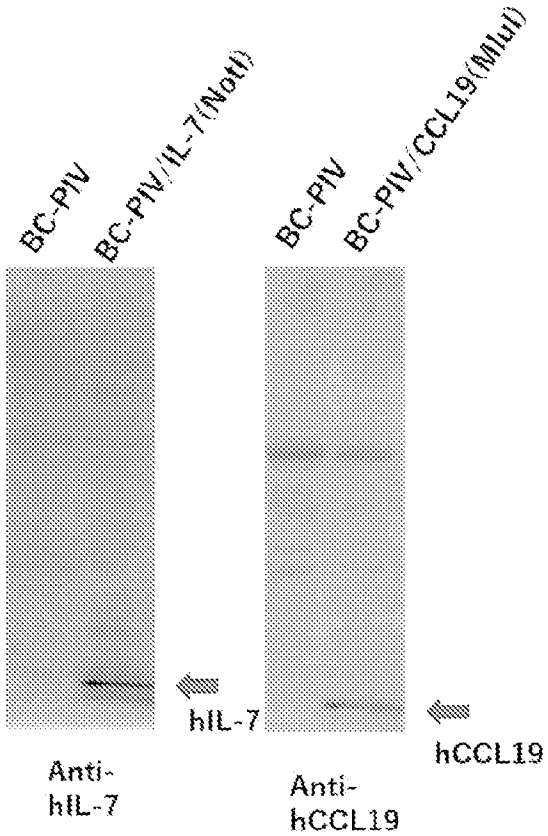
[請求項12] 腫瘍内投与に用いられる、請求項８～１１のいずれか一項に記載のキット。

[請求項13] ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１８からなる群から選ばれる少なくとも１種類のサイトカイン、或いは、前記サイトカインと、ＣＣＬ１９及び／又はＣＣＬ２１との組み合わせ、或いは、同一機能を有するこれらの変異体を発現したヒトパラインフルエンザウイルス２型を有効成分として含有する、腫瘍浸潤Ｔ細胞及び樹状細胞活性化剤。

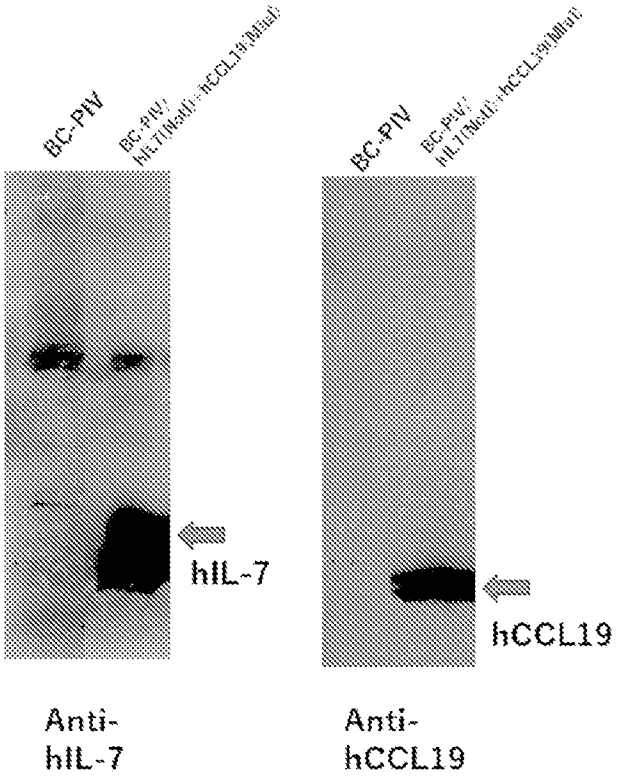
[図1]


ヒト
IL-7遺伝子
単独/
又は
ヒト
CCL19
若しくは
CCL21
遺伝子
NotI
MluI
5'
NP
V/P
M
HN
L
3'
Leader
ΔF
F遺伝子欠損
Trailer
BC-PIV(+)ganome
(F遺伝子欠損)

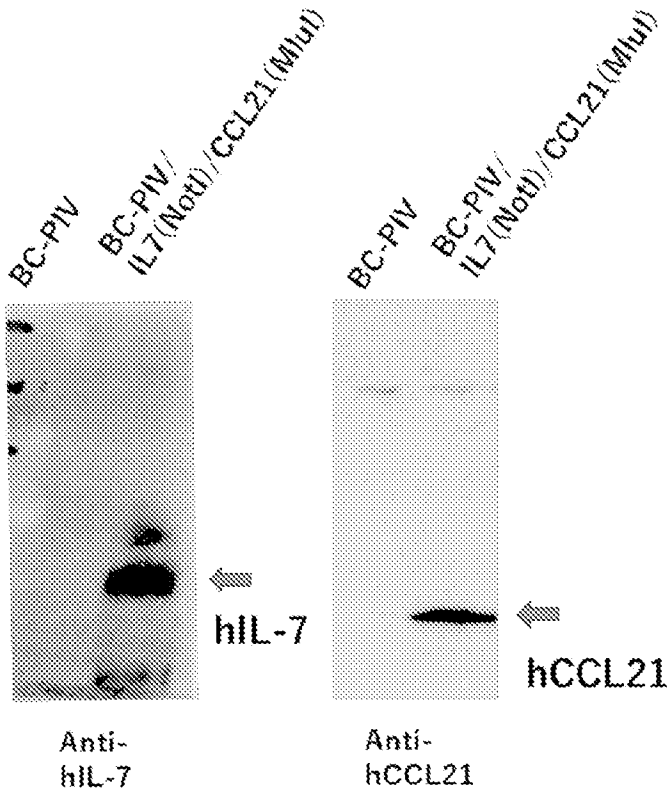
[図2]


BC-PIV
BC-PIV/IL-7(NotI)
BC-PIV
BC-PIV/CCL19(MluI)
hIL-7
hCCL19
Anti-
hIL-7
Anti-
hCCL19

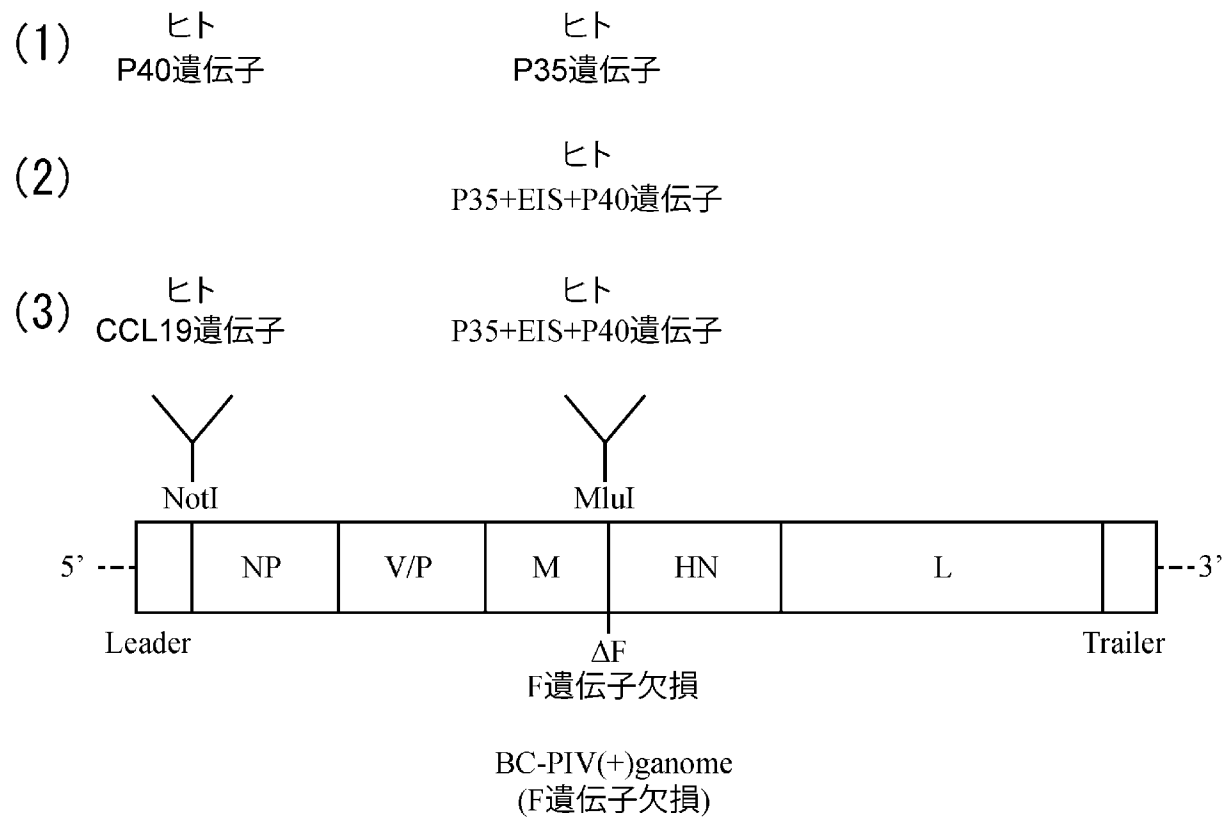
[図3]


BC-PIV
BC-PIV/
IL7(NotI)-hCCL19(MluI)
hIL-7
Anti-
hIL-7
BC-PIV
BC-PIV/
IL7(NotI)-hCCL19(MluI)
hCCL19
Anti-
hCCL19

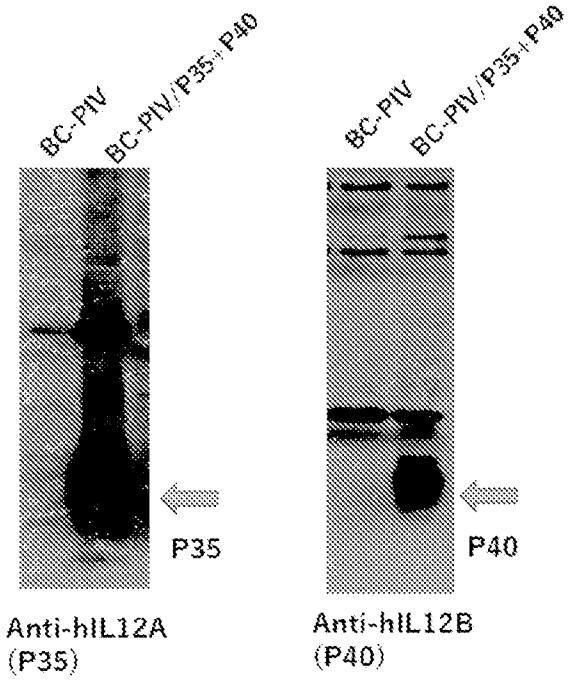
[図4]


BC-PIV
BC-PIV/
IL7(NotI)/CCL21(MluI)
hIL-7
Anti-
hIL-7
BC-PIV
BC-PIV/
IL7(NotI)/CCL21(MluI)
hCCL21
Anti-
hCCL21

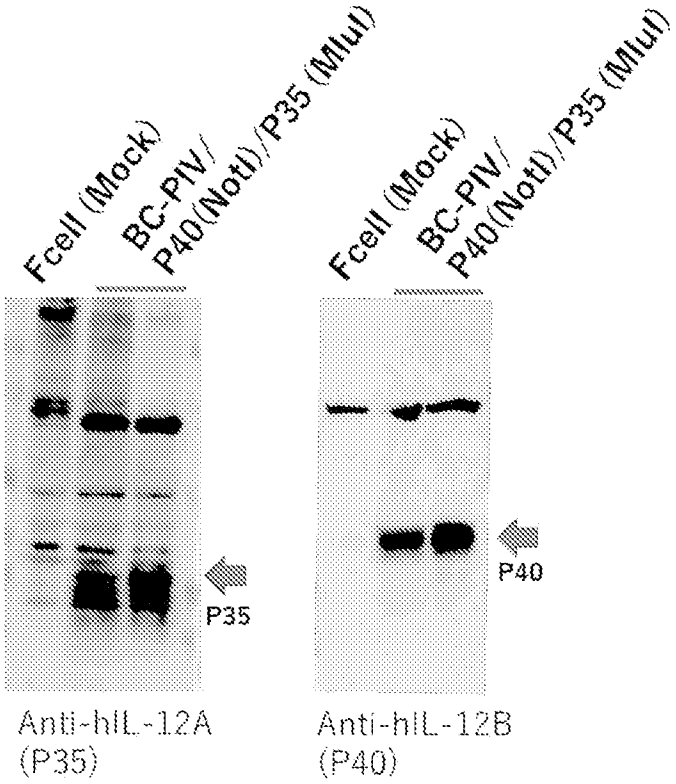
[図5]


(1)
ヒト
P40遺伝子
ヒト
P35遺伝子
(2)
ヒト
P35+EIS+P40遺伝子
(3)
ヒト
CCL19遺伝子
ヒト
P35+EIS+P40遺伝子
NotI
MluI
5'
NP
V/P
M
HN
L
3'
Leader
ΔF
F遺伝子欠損
Trailer
BC-PIV(+)ganome
(F遺伝子欠損)

[図6]


BC-PIV
BC-PIV/P35+P40
BC-PIV
BC-PIV/P35+P40
P35
P40
Anti-hIL12A
(P35)
Anti-hIL12B
(P40)

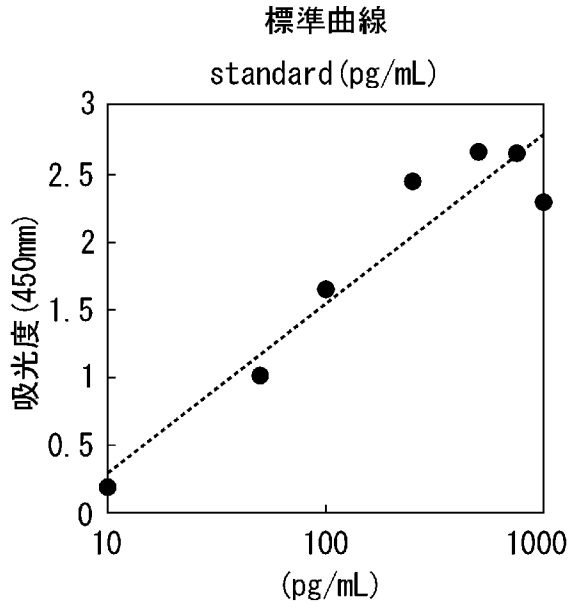
[図7]


Fcell (Mock)
BC-PIV/ P40(NotI)/P35 (MluI)
Fcell (Mock)
BC-PIV/ P40(NotI)/P35 (MluI)
P35
P40
Anti-hIL-12A (P35)
Anti-hIL-12B (P40)

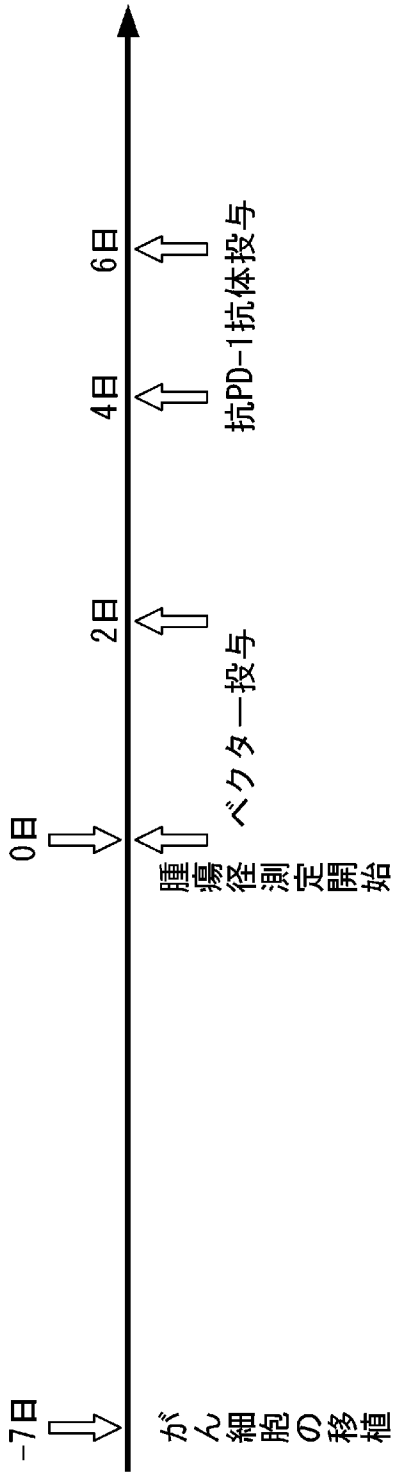
[図8]

450nm

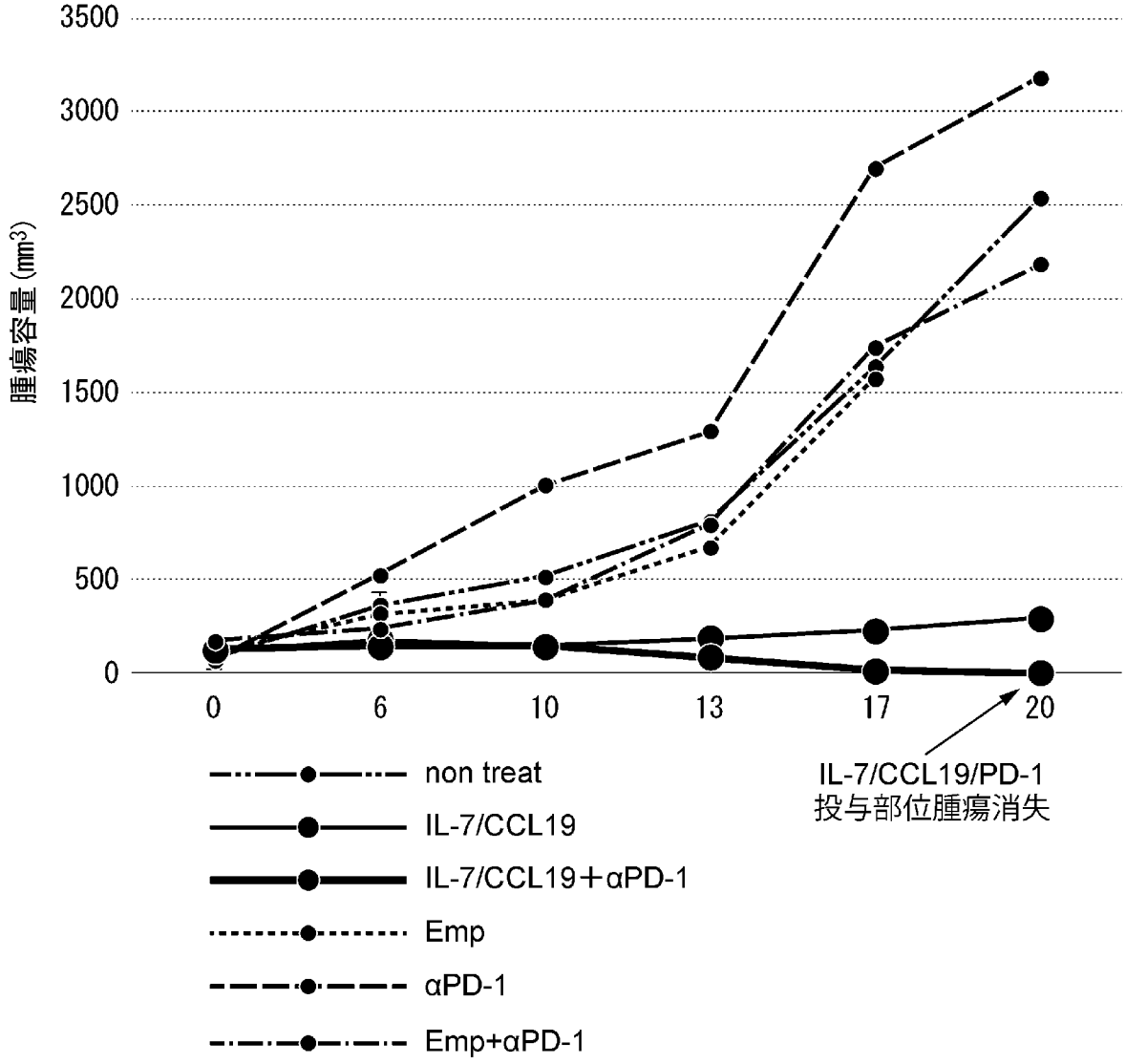
上清希釈倍率	F細胞		BC-PIV/GFP		BC-PIV/IL-12	
1	0.069	0.07	0.074	0.067	2.549	2.587
10	0.072	0.072	0.083	0.075	1.63	1.672
100	0.075	0.076	0.067	0.068	0.291	0.291
1000	0.064	0.077	0.074	0.069	0.097	0.098
10000	0.07	0.07	0.083	0.076	0.079	0.074
100000	0.077	0.076	0.073	0.068	0.066	0.076
1000000	0.078	0.072	0.073	0.07	0.08	0.071
10000000	0.074	0.079	0.087	0.074	0.078	0.075



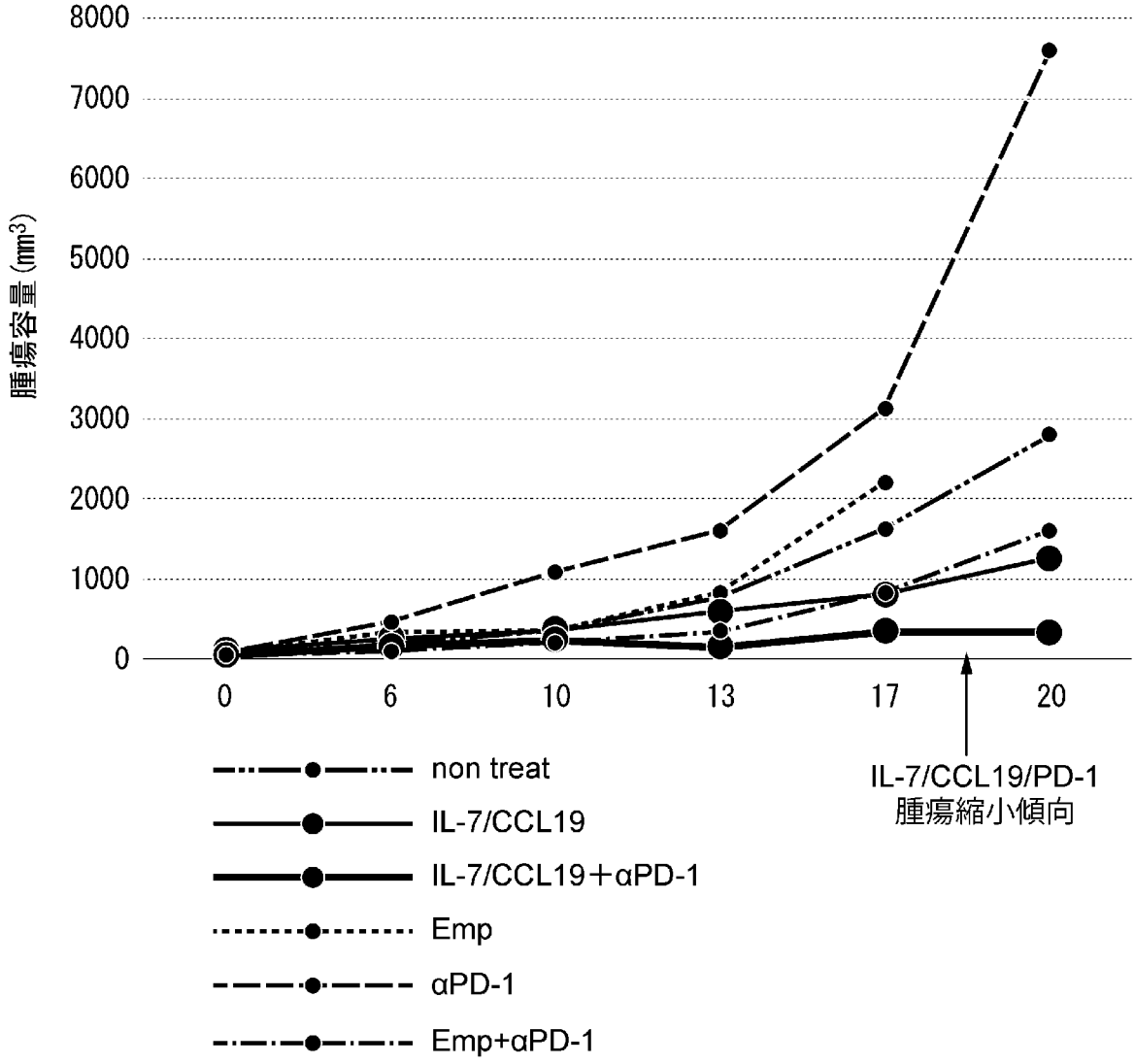
[図9]



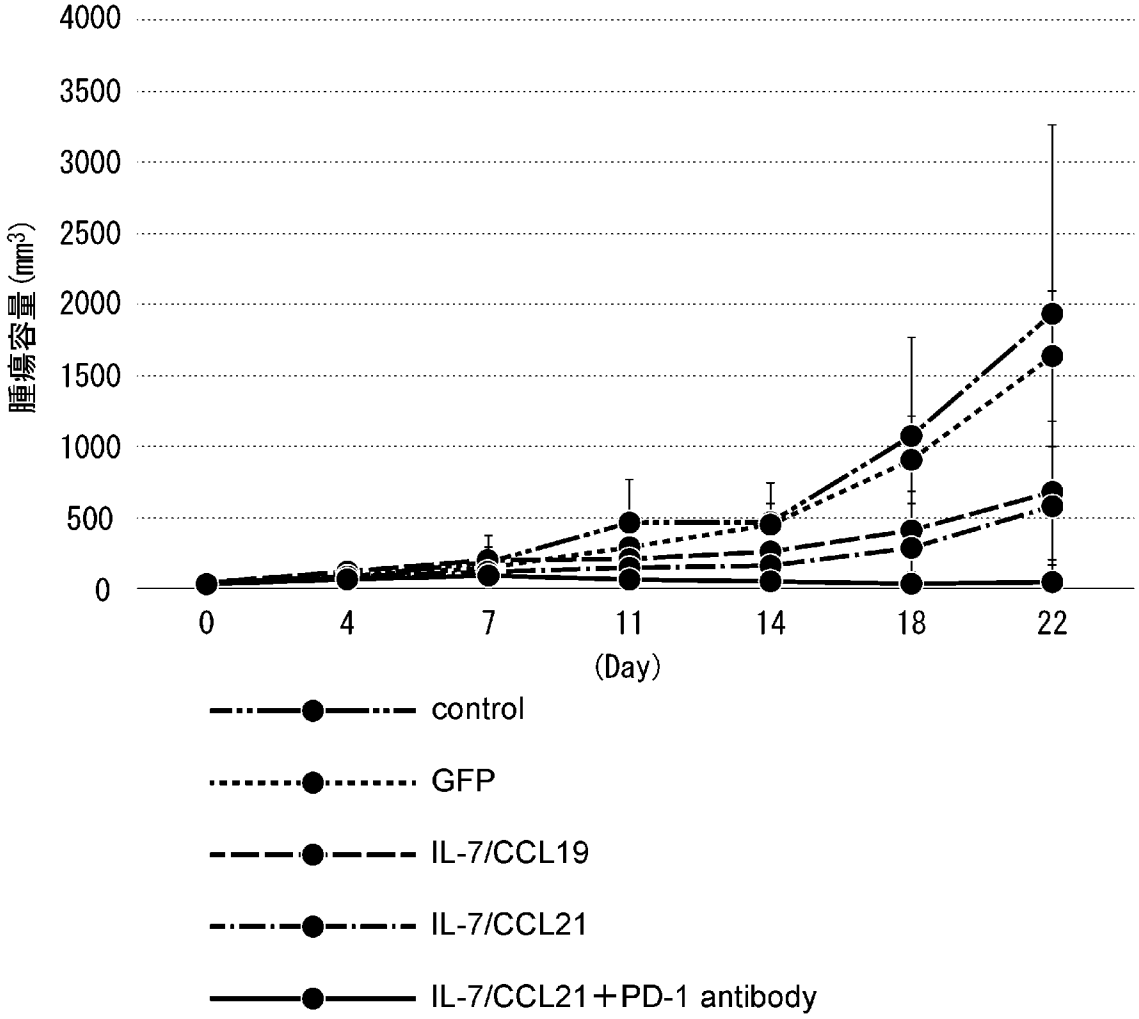
[図10]


3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
腫瘍容量(mm3)
0
6
10
13
17
20
IL-7/CCL19/PD-1
投与部位腫瘍消失
non treat
IL-7/CCL19
IL-7/CCL19＋αPD-1
Emp
αPD-1
Emp+αPD-1

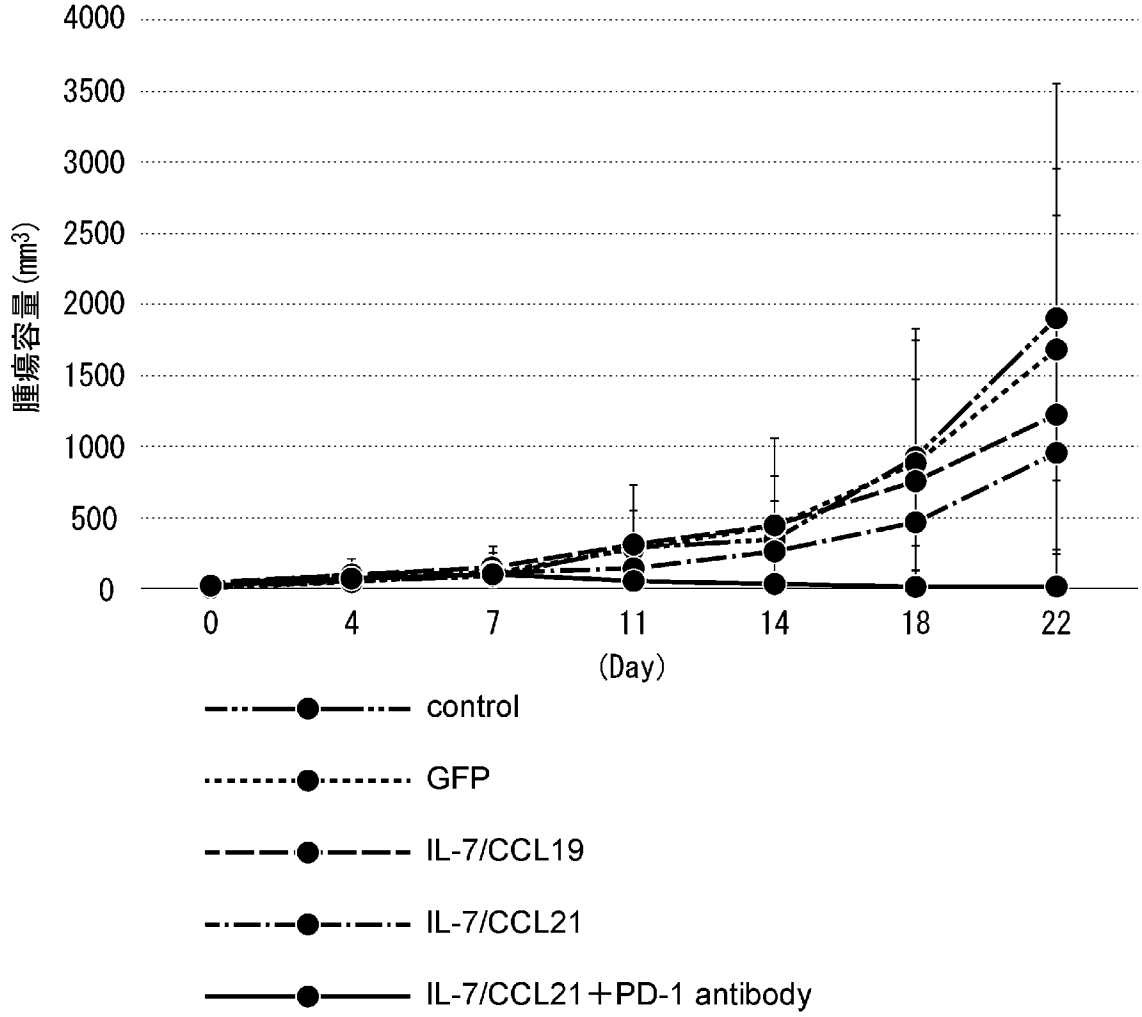
[図11]


8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
腫瘍容量 (mm3)
0
6
10
13
17
20
non treat
IL-7/CCL19
IL-7/CCL19＋αPD-1
Emp
αPD-1
Emp+αPD-1
IL-7/CCL19/PD-1
腫瘍縮小傾向

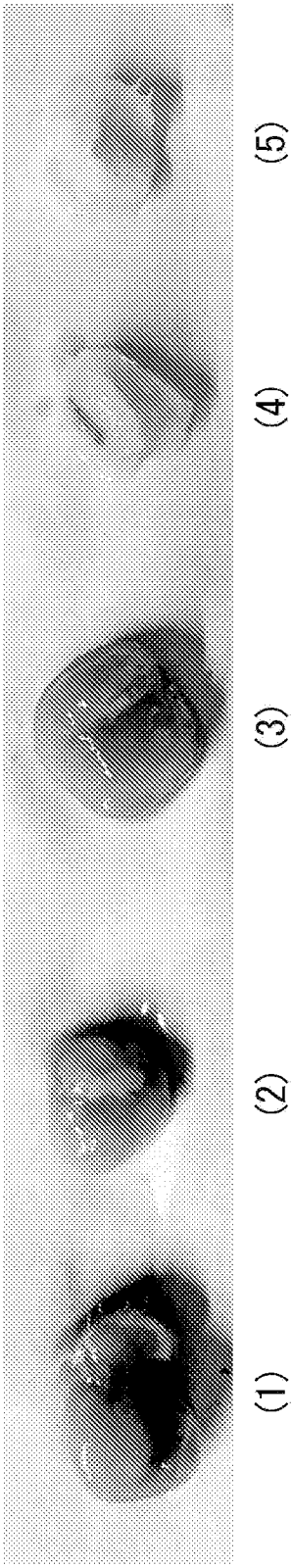
[図12]


4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
腫瘍容量 (mm3)
0
4
7
11
14
18
22
(Day)
control
GFP
IL-7/CCL19
IL-7/CCL21
IL-7/CCL21＋PD-1 antibody

[図13]


4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
腫瘍容量 (mm3)
0
4
7
11
14
18
22
(Day)
control
GFP
IL-7/CCL19
IL-7/CCL21
IL-7/CCL21＋PD-1 antibody

[図14]



(1) ：BC-PIV群（Emp）

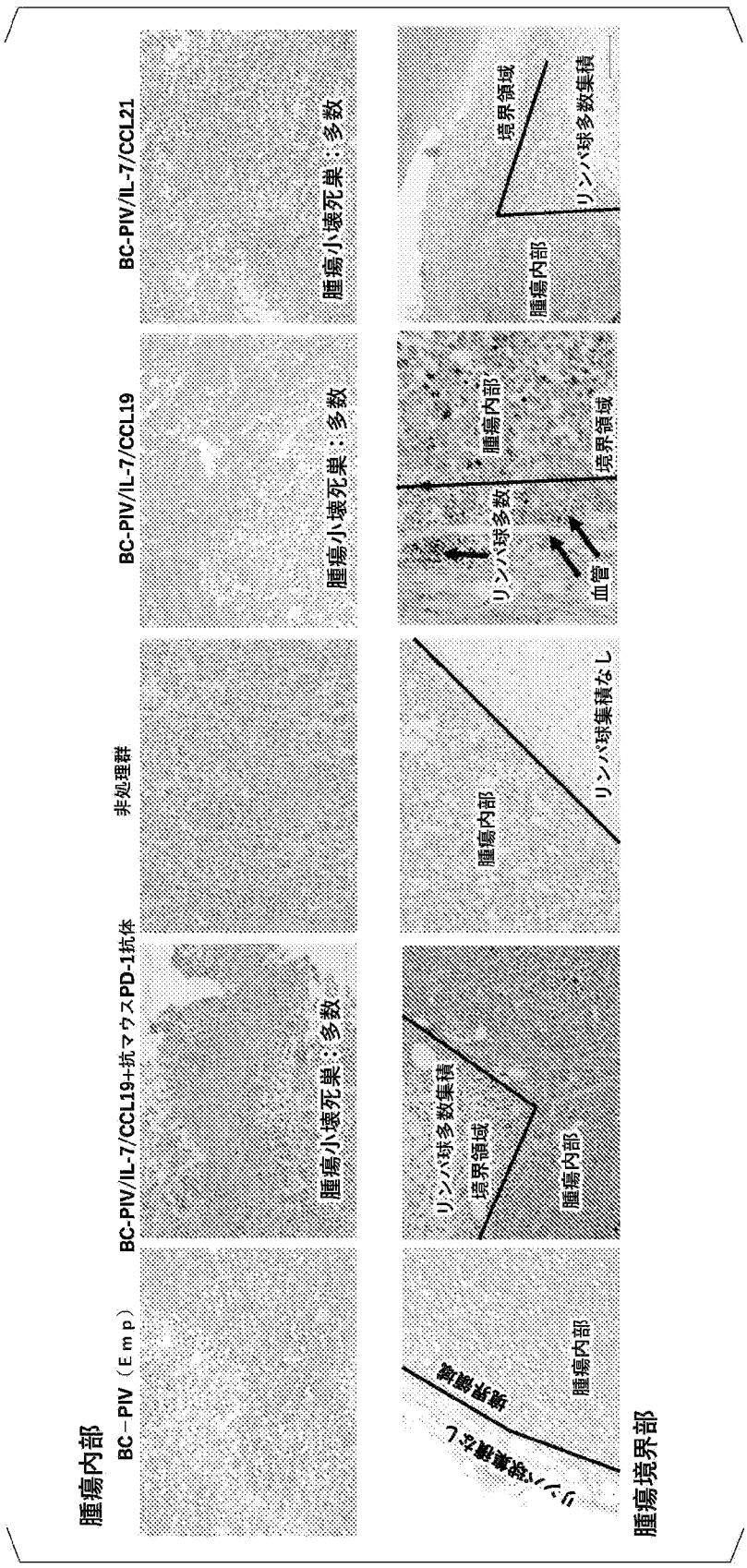
(2) ：BC-PIV／IL-7／CCL19＋抗マウスPD-1抗体群（IL-7／CCL19＋αPD-1）

(3) ：非処理群（non-treat）

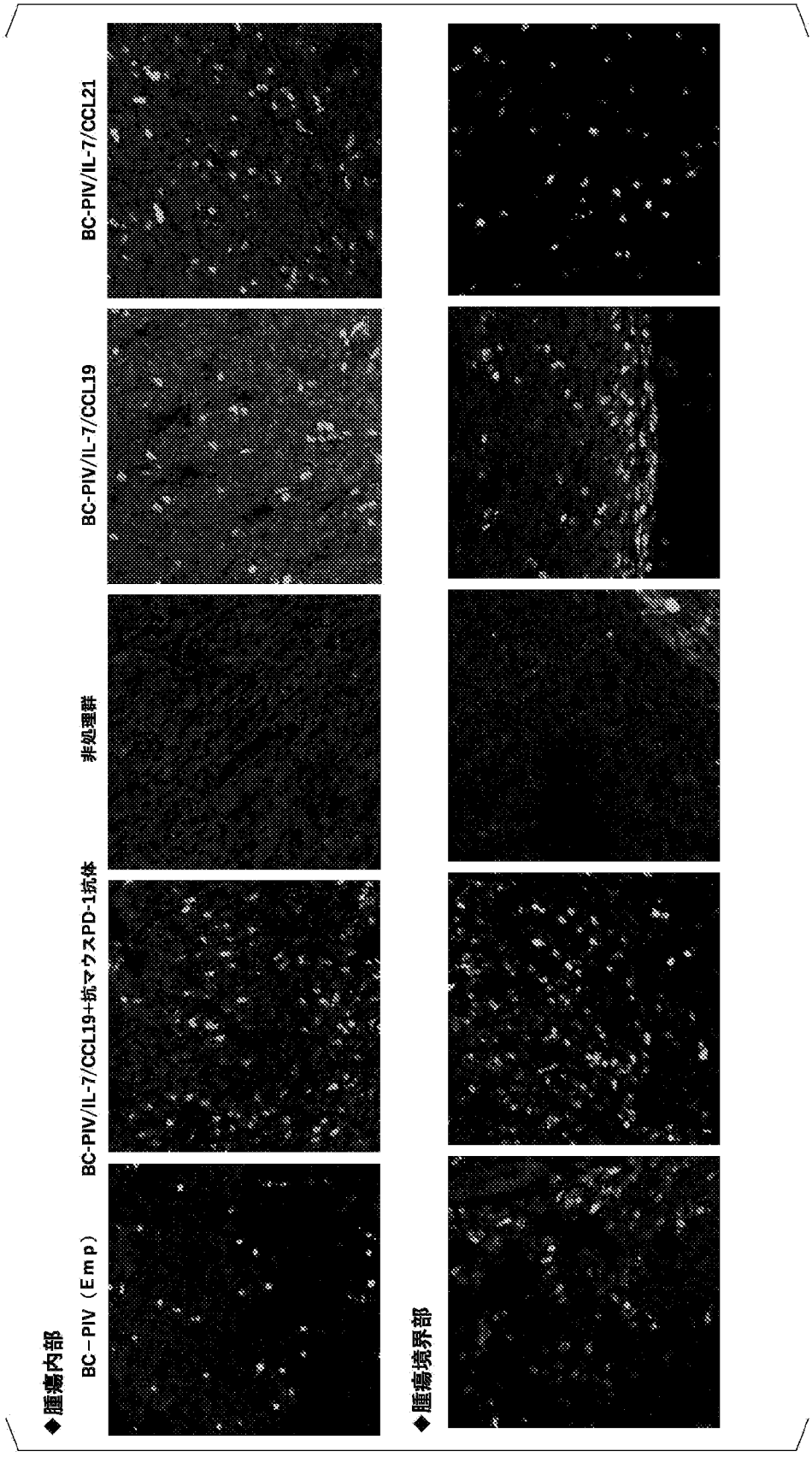
(4) ：BC-PIV／IL-7／CCL19群（IL-7／CCL19）

(5) ：BC-PIV／IL-7／CCL21群（IL-7／CCL21）

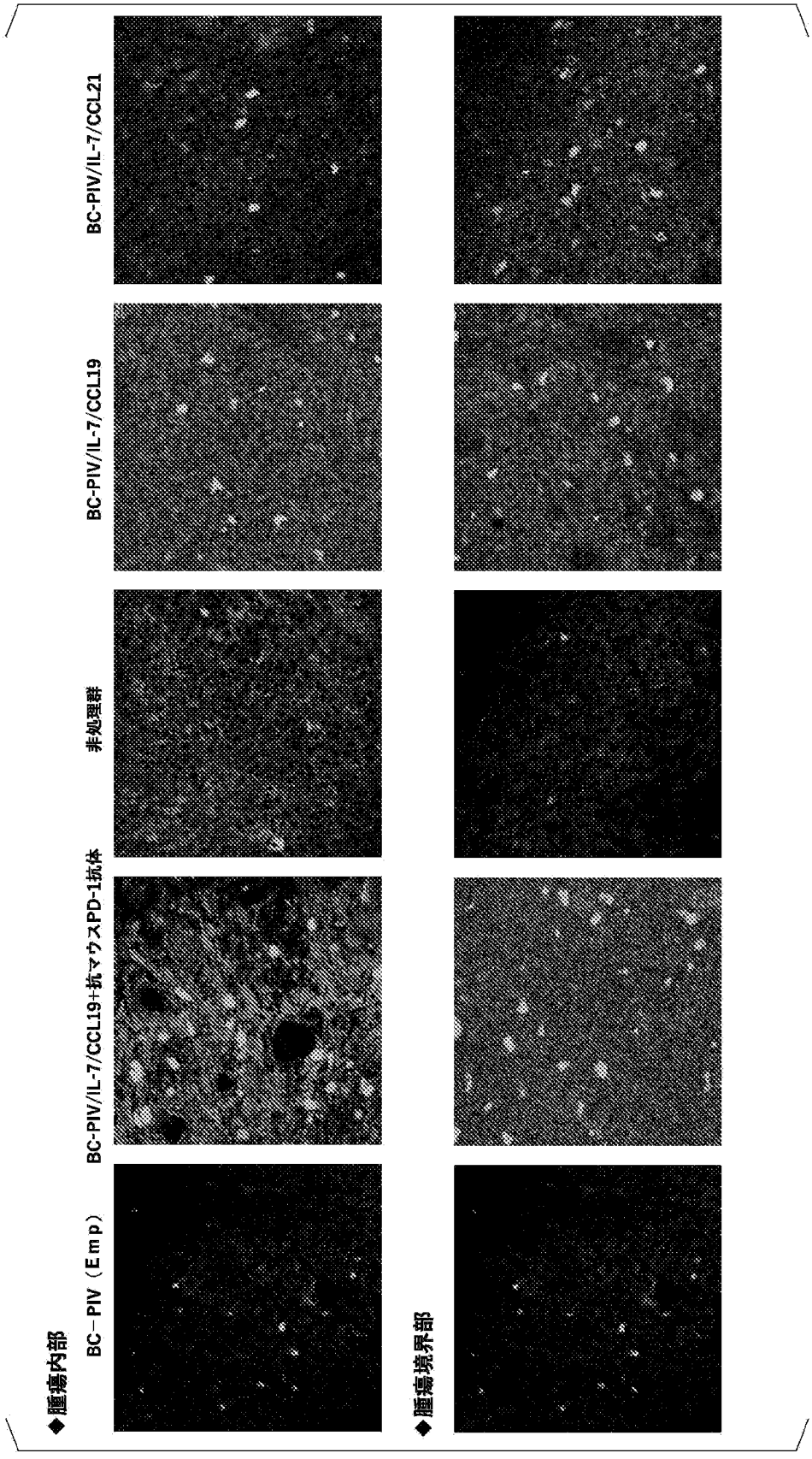
[図15]


腫瘍内部
腫瘍境界部
BC－PIV（Ｅｍｐ）
BC-PIV/IL-7/CCL19+抗マウスPD-1抗体
非処理群
BC-PIV/IL-7/CCL19
BC-PIV/IL-7/CCL21
腫瘍小壊死巣：多数
腫瘍小壊死巣：多数
腫瘍小壊死巣：多数
腫瘍内部
リンパ球多数集積
境界領域
腫瘍内部
腫瘍内部
リンパ球集積なし
リンパ球多数
腫瘍内部
境界領域
血管
境界領域
腫瘍内部
境界領域
リンパ球多数集積
リンパ球集積なし
腫瘍内部

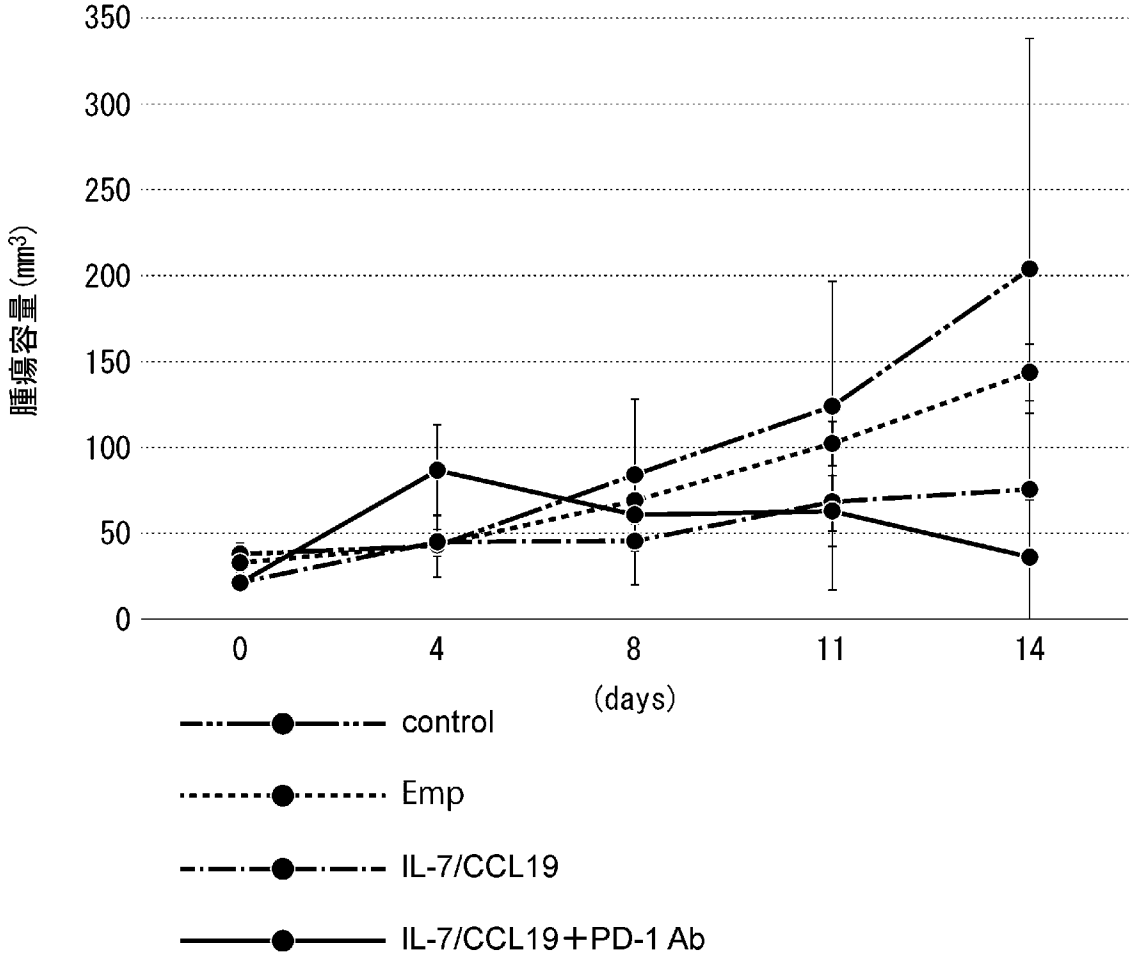
[図16]


◆腫瘍内部
◆腫瘍境界部
BC-PIV（Emp）
BC-PIV/IL-7/CCL19+抗マウスPD-1抗体
非処理群
BC-PIV/IL-7/CCL19
BC-PIV/IL-7/CCL21

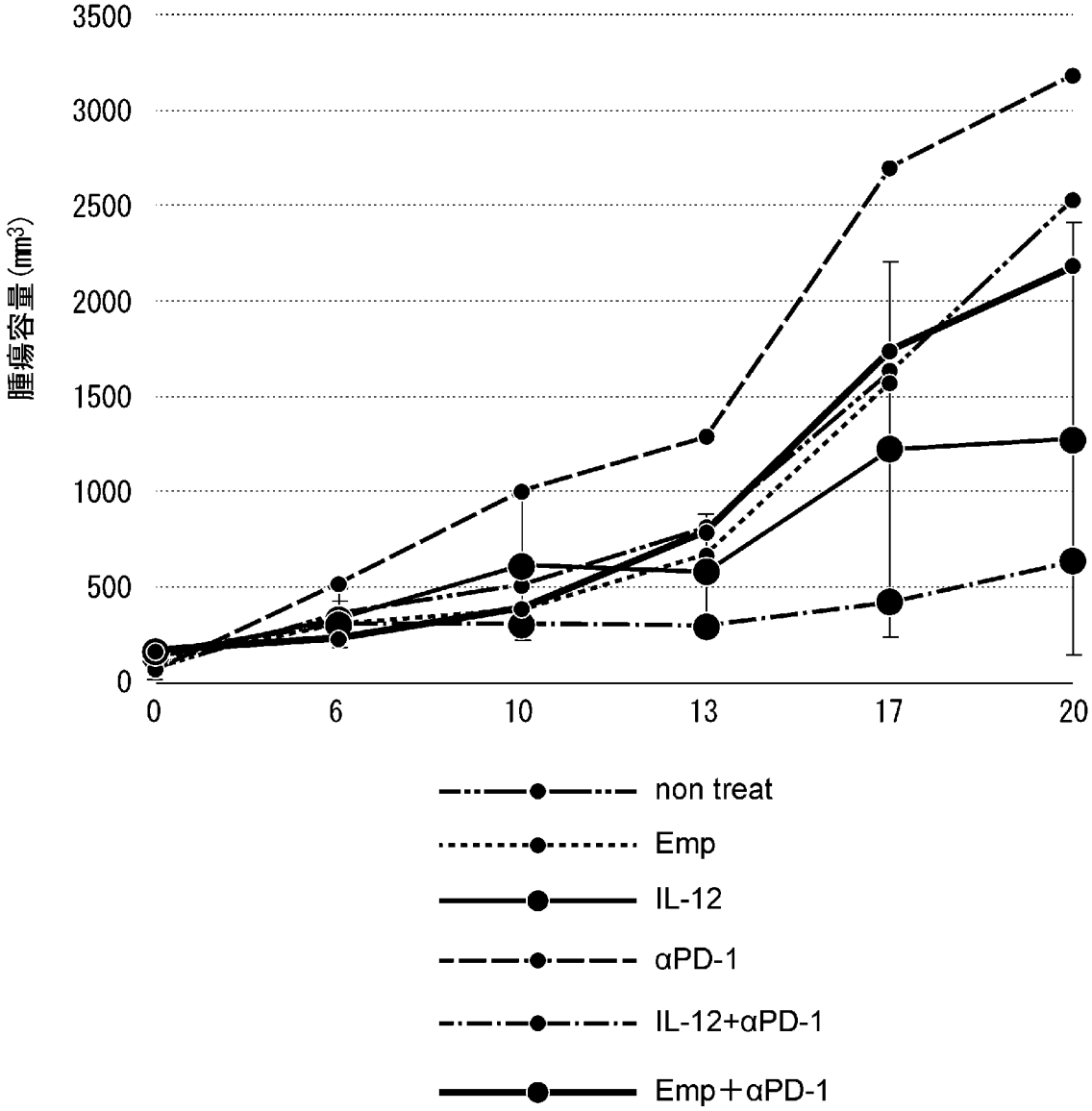
[図17]


◆腫瘍内部
◆腫瘍境界部
BC－PIV（Emp）
BC-PIV/IL-7/CCL19+抗マウスPD-1抗体
非処理群
BC-PIV/IL-7/CCL19
BC-PIV/IL-7/CCL21

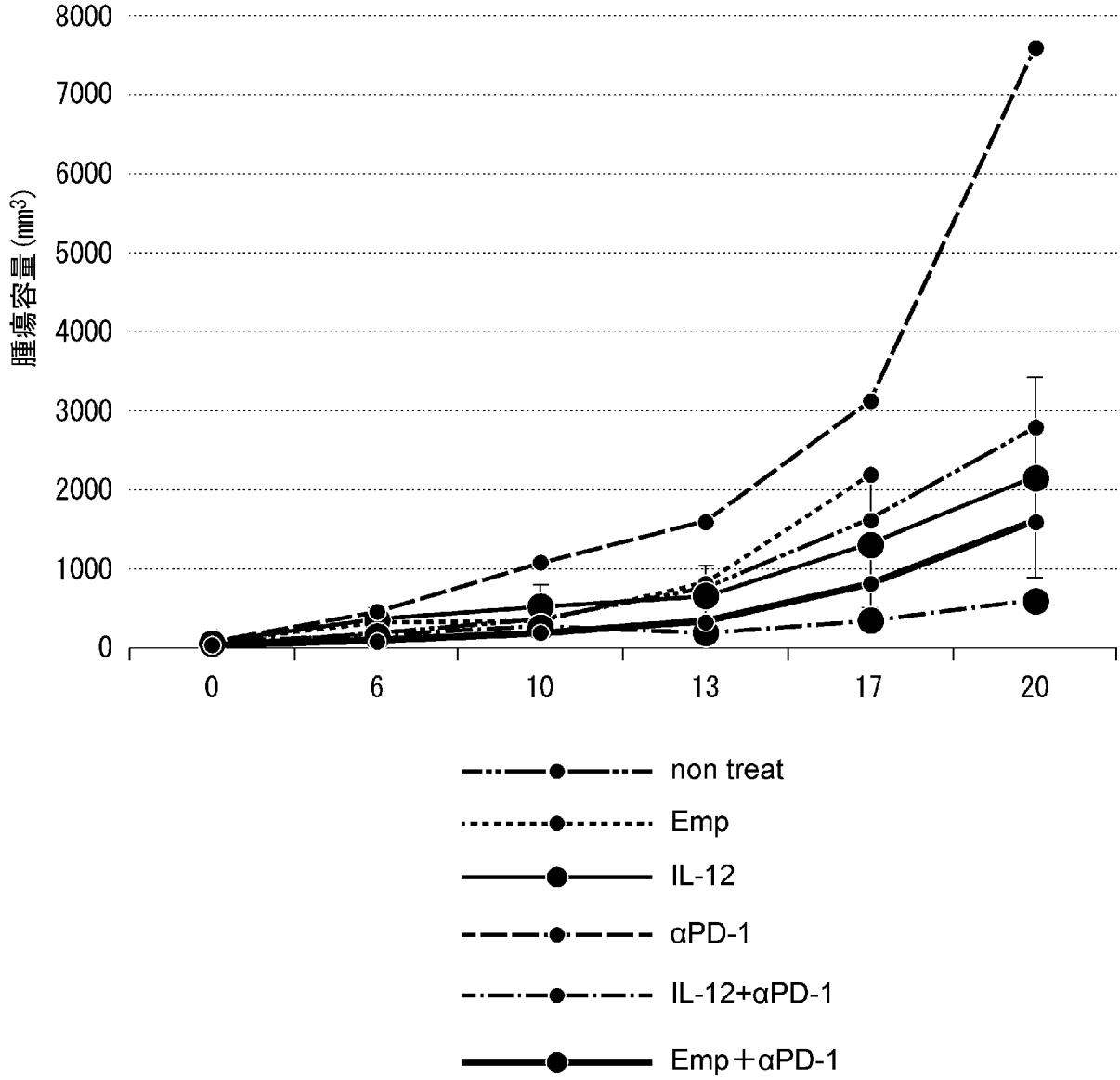
[図18]


350
300
250
200
150
100
50
0
腫瘍容量 (mm3)
0
4
8
11
14
(days)
control
Emp
IL-7/CCL19
IL-7/CCL19＋PD-1 Ab

[図19]


3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
腫瘍容量 (mm3)
0
6
10
13
17
20
non treat
Emp
IL-12
αPD-1
IL-12+αPD-1
Emp＋αPD-1

[図20]


8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
腫瘍容量(mm3)
0
6
10
13
17
20
non treat
Emp
IL-12
αPD-1
IL-12+αPD-1
Emp＋αPD-1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/007475

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/76(2015.01)i; ***A61K 38/19***(2006.01)i; ***A61K 39/395***(2006.01)i; ***A61K 48/00***(2006.01)i; ***A61P 35/00***(2006.01)i
FI: A61K35/76 ZNA; A61K48/00; A61K38/19; A61K39/395 U; A61P35/00

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)

A61K35/76; A61K38/19; A61K39/395; A61K48/00; A61P35/00

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/073973 A1 (UNIV YAMAGUCHI) 18 April 2019 (2019-04-18) claims, paragraphs [0026], [0051], [0093]-[0102], fig. 18, 19	1-13
Y	WO 2017/209053 A1 (ASTELLAS PHARMA INC.) 07 December 2017 (2017-12-07) claims, paragraphs [0026], [0103]-[0123]	1-13
Y	CN 1213004 A (BAIAO BIOTECHNOLOGY INST., CHENGDU) 07 April 1999 (1999-04-07) claims, examples	1-13
Y	RASOUL, L.M., et al. Use of viral vector to deliver IL-15 for cancer therapy: An Overview. Indian. J. Biochem. Biophys. 2017, vol. 54, no. 3&4, pp. 97-108 particularly abstract, p. 104, left column, fourth paragraph to p. 105, table 1	1-13
Y	CHENG, B., et al. Adenovirus-mediated combined gene therapy of interleukin-18 and interleukin-12 for prostate cancer: an experimental study. Natl. Med. J. China. 2013, vol. 93, no. 20, pp. 1590-1593 in particular, abstract, results	1-13

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 May 2024	**21 May 2024**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/007475

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/108195 A1 (MIE UNIV) 16 August 2012 (2012-08-16) claims, paragraph [0004]	1-13
Y	WO 2020/075672 A1 (BIOCOMO INC.) 16 April 2020 (2020-04-16) claims, examples, fig. 1	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/007475

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/007475

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2019/073973 A1	18 April 2019	US 2020/0352997 A1 claims, paragraphs [0056], [0081], [0123]-[0132], fig. 18, 19 EP 3695846 A1	
WO 2017/209053 A1	07 December 2017	US 2017/0340687 A1 claims, paragraphs [0082], [0188]-[0211] EP 3480307 A1	
CN 1213004 A	07 April 1999	(Family: none)	
WO 2012/108195 A1	16 August 2012	US 2014/0322760 A1 claims, paragraph [0006] EP 2674491 A1	
WO 2020/075672 A1	16 April 2020	US 2021/0379129 A1 claims, examples, fig. 1 EP 3865141 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/007475

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K 35/76(2015.01)i; A61K 38/19(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i
FI: A61K35/76 ZNA; A61K48/00; A61K38/19; A61K39/395 U; A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K35/76; A61K38/19; A61K39/395; A61K48/00; A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	WO 2019/073973 A1 (国立大学法人山口大学) 18.04.2019 (2019-04-18) 特許請求の範囲, 段落[0026],[0051],[0093]-[0102], 図18, 図19	1-13
Y	WO 2017/209053 A1 (アステラス製薬株式会社) 07.12.2017 (2017-12-07) 特許請求の範囲, 段落[0026],[0103]-[0123]	1-13
Y	CN 1213004 A (BAIAO BIOTECHNOLOGY INST., CHENGDU) 07.04.1999 (1999-04-07) 特許請求の範囲, 実施例	1-13
Y	RASOUL, L.M., et al., Use of viral vector to deliver IL-15 for cancer therapy: An Overview, Indian. J. Biochem. Biophys., 2017, vol.54, no.3&4, p.97-108 特にAbstract, p.104左欄第4段落-p.105, Table 1	1-13
Y	CHENG, B., et al., Adenovirus-mediated combined gene therapy of interleukin-18 and interleukin-12 for prostate cancer: an experimental study, Natl. Med. J. China, 2013, vol.93, no.20, p.1590-1593 特にAbstract, Results	1-13

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
"D" 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
08.05.2024	21.05.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）

池上　文緒 4U 3765

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	WO 2012/108195 A1 (国立大学法人三重大学) 16.08.2012 (2012-08-16) 特許請求の範囲，段落[0004]	1-13
Y	WO 2020/075672 A1 (バイオコモ株式会社) 16.04.2020 (2020-04-16) 特許請求の範囲，実施例，図1	1-13

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/007475

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（ＰＣＴ規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/007475

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2019/073973 A1	18.04.2019	US 2020/0352997 A1 特許請求の範囲，段落[0056],[0081],[0123]-[0132]，図18，図19 EP 3695846 A1	
WO 2017/209053 A1	07.12.2017	US 2017/0340687 A1 特許請求の範囲，段落[0082],[0188]-[0211] EP 3480307 A1	
CN 1213004 A	07.04.1999	（ファミリーなし）	
WO 2012/108195 A1	16.08.2012	US 2014/0322760 A1 特許請求の範囲，段落[0006] EP 2674491 A1	
WO 2020/075672 A1	16.04.2020	US 2021/0379129 A1 特許請求の範囲，実施例，図１ EP 3865141 A1	