

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7670705号
(P7670705)

(45)発行日 令和7年4月30日(2025.4.30)

(24)登録日 令和7年4月21日(2025.4.21)

(51)国際特許分類	F I		
A 6 1 K 35/768 (2015.01)	A 6 1 K 35/768	Z N A	
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17		
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H	
A 6 1 K 39/21 (2006.01)	A 6 1 K 39/21		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00		
請求項の数 33 (全57頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2022-528249(P2022-528249)	(73)特許権者	509296443 バヴァリアン・ノルディック・アクティ ーゼルスカブ デンマーク国、3 4 9 0 クヴィストゴ ード、ヘイレスコフヴェイ、1 0 アエ
(86)(22)出願日	令和2年11月20日(2020.11.20)	(74)代理人	100069556 弁理士 江崎 光史
(65)公表番号	特表2023-503858(P2023-503858 A)	(74)代理人	100111486 弁理士 鍛冶澤 實
(43)公表日	令和5年2月1日(2023.2.1)	(74)代理人	100139527 弁理士 上西 克礼
(86)国際出願番号	PCT/EP2020/082888	(74)代理人	100164781 弁理士 虎山 一郎
(87)国際公開番号	WO2021/099572	(74)代理人	100221981 弁理士 石田 大成
(87)国際公開日	令和3年5月27日(2021.5.27)		
審査請求日	令和5年10月18日(2023.10.18)		
(31)優先権主張番号	19210369.5		
(32)優先日	令和1年11月20日(2019.11.20)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		
(31)優先権主張番号	20191226.8		
(32)優先日	令和2年8月14日(2020.8.14)		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 4 - 1 B B L アジュバント添加した組み換え改変ワクシニアウイルスアンカラ (M V A) の医学的使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 腫瘍関連抗原 (T A A) をコードする第 1 の核酸と、
(b) 4 - 1 B B リガンド (4 - 1 B B L) をコードする第 2 の核酸と、
を含む、組み換え改変ワクシニアウイルスアンカラ (M V A) の、対象での固形腫瘍の、
その寛解中または寛解後の再発予防のための医薬の製造における使用であって、前記寛解が、
前記固形腫瘍に対する前記組み換え M V A の腫瘍内への投与によって誘導される、前記使用。

【請求項 2】

(a) 腫瘍関連抗原 (T A A) をコードする第 1 の核酸と、
(b) 4 - 1 B B リガンド (4 - 1 B B L) をコードする第 2 の核酸と、
を含む、組み換え改変ワクシニアウイルスアンカラ (M V A) の、対象での全身性抗腫瘍
免疫応答の誘導のための医薬の製造における使用であって、固形腫瘍に対して前記組み換
え M V A が腫瘍内に投与される、前記使用。

【請求項 3】

(a) 腫瘍関連抗原 (T A A) をコードする第 1 の核酸と、
(b) 4 - 1 B B リガンド (4 - 1 B B L) をコードする第 2 の核酸と、
を含む、組み換え改変ワクシニアウイルスアンカラ (M V A) の、
対象での二次腫瘍の治療、予防及び/または再発予防のための医薬の製造における使用で
あって、関連する原発固形腫瘍に対して前記組み換え M V A が腫瘍内に投与されるが、前

記二次腫瘍には投与されない前記使用、あるいは対象での原発固形腫瘍の治療及び/または再発予防における使用のための医薬の製造における使用であって、関連する二次性固形腫瘍に対して前記組み換えMVAが腫瘍内に投与されるが、前記原発固形腫瘍には投与されない前記使用、あるいは対象での二次腫瘍の治療、予防及び/または再発予防における使用のための医薬の製造における使用であって、別の関連する二次性固形腫瘍に対して前記組み換えMVAが腫瘍内に投与されるが、最初に言及した二次腫瘍には投与されない前記使用。

【請求項4】

前記組み換えMVAが、

- (a) 腫瘍関連抗原(TAA)をコードする第1の核酸と、
- (b) 4-1BBリガンド(4-1BBL)をコードする第2の核酸と、
- (c) TAAをコードする少なくとも1つのさらなる核酸と、を含む、請求項1~3のいずれか1項に記載の使用。

10

【請求項5】

前記TAAが、ネオアンチゲンまたは内在性自己抗原である、請求項1~3のいずれか1項に記載の使用。

【請求項6】

前記TAAが、内在性レトロウイルス(ERV)タンパク質、内在性レトロウイルス(ERV)ペプチド、がん胎児性抗原(CEA)、ムチン1細胞表面関連(MUC-1)、前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)、前立腺特異抗原(PSA)、ヒト上皮細胞成長因子受容体2(HER-2)、サバイピン、チロシン関連タンパク質1(TRP1)、チロシン関連タンパク質2(TRP2)、Brachyury、葉酸受容体アルファ(FOLR1)、メラノーマ優先発現抗原(PRAME)、及び前記内在性レトロウイルスペプチドMEL、ならびにそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項1~3のいずれか1項に記載の使用。

20

【請求項7】

前記ERVタンパク質が、ヒト内在性レトロウイルスK(HERV-K)ファミリー由来である、請求項6に記載の使用。

【請求項8】

前記ERVタンパク質が、HERV-Kエンベロープ(HERV-K-env)タンパク質及びHERV-K gagタンパク質から選択される、請求項6に記載の使用。

30

【請求項9】

前記ERVペプチドが、ヒト内在性レトロウイルスK(HERV-K)ファミリー由来である、請求項6に記載の使用。

【請求項10】

前記ERVペプチドが、HERV-Kエンベロープタンパク質(HERV-K-env/MEL)の偽遺伝子である、請求項6に記載の使用。

【請求項11】

前記固形腫瘍が、悪性腫瘍である、請求項1~3、および8~10のいずれか1項に記載の使用。

40

【請求項12】

前記固形腫瘍が、メラノーマまたはがん性の乳房腫瘍、結腸腫瘍もしくは卵巣腫瘍である、請求項11に記載の使用。

【請求項13】

前記二次腫瘍が、転移である、請求項3、7~10および12のいずれか1項に記載の使用。

【請求項14】

前記組み換えMVAが投与されない前記腫瘍が、郭清できないかまたは手術によるアクセスが困難である、請求項3、7~10および12のいずれか1項に記載の使用。

【請求項15】

50

前記組み換えMVAが、ヒト細胞株において生殖複製不能である、請求項1~3、7~10および12のいずれか1項に記載の使用。

【請求項16】

前記組み換えMVAが、European Collection of Cell Cultures (ECCACC)に番号V00083008として寄託されているMVA-BNに由来する、請求項15に記載の使用。

【請求項17】

複数の腫瘍を有する対象での免疫応答を刺激するための医薬の製造における組み換えMVAの使用であって、前記組み換えMVAは、少なくとも1つの、TAAをコードする第1の核酸と、4-1-BBLをコードする第2の核酸とを含み、前記刺激は、前記MVAを前記対象の全腫瘍数よりも少ない腫瘍に対して投与することを含み、前記対象において前記TAAに対する免疫応答が刺激される、前記使用。

10

【請求項18】

少なくとも1つのアクセスできない腫瘍及び少なくとも1つのアクセス可能な腫瘍を有する対象を治療するための医薬の製造における、少なくとも1つの、TAAをコードする第1の核酸と、4-1-BBLをコードする第2の核酸とを含む組み換えMVAの使用であって、前記治療は、前記MVAを前記対象の少なくとも1つのアクセス可能な腫瘍に対して投与することを含み、それにより、前記アクセスできない腫瘍の増殖を低下または停止させる、前記使用。

【請求項19】

(a) 腫瘍関連抗原(TAA)をコードする第1の核酸と、
(b) 4-1-BBLリガンド(4-1-BBL)をコードする第2の核酸と、
を含む組み換え改変ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)を含む、対象での固形腫瘍の、その寛解中または寛解後の再発予防のための医薬であって、前記寛解が、前記固形腫瘍に対する前記組み換えMVAの腫瘍内への投与によって誘導される、前記医薬。

20

【請求項20】

(a) 腫瘍関連抗原(TAA)をコードする第1の核酸と、
(b) 4-1-BBLリガンド(4-1-BBL)をコードする第2の核酸と、
を含む組み換え改変ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)を含む、対象での全身性抗腫瘍免疫応答の誘導のための医薬であって、固形腫瘍に対して前記組み換えMVAが腫瘍内に投与される、前記医薬。

30

【請求項21】

(a) 腫瘍関連抗原(TAA)をコードする第1の核酸と、
(b) 4-1-BBLリガンド(4-1-BBL)をコードする第2の核酸と、
を含む組み換え改変ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)を含む、対象での二次腫瘍の治療、予防及び/または再発予防のための医薬であって、関連する原発固形腫瘍に対して前記組み換えMVAが腫瘍内に投与されるが、前記二次腫瘍には投与されない前記医薬、あるいは

前記組み換え改変ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)を含む、対象での原発固形腫瘍の治療及び/または再発予防のための医薬であって、関連する二次性固形腫瘍に対して前記組み換えMVAが腫瘍内に投与されるが、前記原発固形腫瘍には投与されない前記医薬、あるいは

40

前記組み換え改変ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)を含む、対象での二次腫瘍の治療、予防及び/または再発予防のための医薬であって、別の関連する二次性固形腫瘍に対して前記組み換えMVAが腫瘍内に投与されるが、最初に言及した二次腫瘍には投与されない前記医薬。

【請求項22】

前記組み換えMVAが、
(a) 腫瘍関連抗原(TAA)をコードする第1の核酸と、
(b) 4-1-BBLリガンド(4-1-BBL)をコードする第2の核酸と、

50

(c) T A A をコードする少なくとも1つのさらなる核酸と、を含む、請求項 19 ~ 21 のいずれか1項に記載の医薬。

【請求項23】

前記 T A A が、ネオアンチゲンまたは内在性自己抗原である、請求項 19 ~ 21 のいずれか1項に記載の医薬。

【請求項24】

前記 T A A が、内在性レトロウイルス (E R V) タンパク質、内在性レトロウイルス (E R V) ペプチド、がん胎児性抗原 (C E A)、ムチン1細胞表面関連 (M U C - 1)、前立腺酸性ホスファターゼ (P A P)、前立腺特異抗原 (P S A)、ヒト上皮細胞成長因子受容体2 (H E R - 2)、サバイピン、チロシン関連タンパク質1 (T R P 1)、チロシン関連タンパク質1 (T R P 2)、B r a c h y u r y、葉酸受容体アルファ (F O L R 1)、メラノーマ優先発現抗原 (P R A M E)、及び前記内在性レトロウイルスペプチド M E L、ならびにそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 19 ~ 21 のいずれか1項に記載の医薬。

10

【請求項25】

前記 E R V タンパク質が、ヒト内在性レトロウイルス K (H E R V - K) ファミリー由来である、請求項 24 に記載の医薬。

【請求項26】

前記 E R V ペプチドが、ヒト内在性レトロウイルス K (H E R V - K) ファミリー由来である、請求項 24 に記載の医薬。

20

【請求項27】

前記固形腫瘍が、悪性腫瘍である、請求項 19 ~ 21 および 26 のいずれか1項に記載の医薬。

【請求項28】

前記二次腫瘍が、転移である、請求項 21、25 および 26 のいずれか1項に記載の医薬。

【請求項29】

前記組み換え M V A が投与されない前記腫瘍が、郭清できないかまたは手術によるアクセスが困難である、請求項 21、25 および 26 のいずれか1項に記載の医薬。

【請求項30】

前記組み換え M V A が、ヒト細胞株において生殖複製不能である、請求項 19 ~ 21、25 および 26 のいずれか1項に記載の医薬。

30

【請求項31】

前記組み換え M V A が、European Collection of Cell Cultures (E C A C C) に番号 V 0 0 0 8 3 0 0 8 として寄託されている M V A - B N に由来する、請求項 30 に記載の医薬。

【請求項32】

少なくとも1つの、T A A をコードする第1の核酸と、4 - 1 - B B L をコードする第2の核酸とを含む組み換え M V A を含む、複数の腫瘍を有する対象での免疫応答を刺激するための医薬であって、前記刺激は、前記 M V A を前記対象の全腫瘍数よりも少ない腫瘍に対して投与することを含み、前記対象において前記 T A A に対する免疫応答が刺激される、前記医薬。

40

【請求項33】

少なくとも1つの、T A A をコードする第1の核酸と、4 - 1 - B B L をコードする第2の核酸とを含む組み換え M V A を含む、少なくとも1つのアクセスできない腫瘍及び少なくとも1つのアクセス可能な腫瘍を有する対象を治療するための医薬であって、前記治療は、前記 M V A を前記対象の少なくとも1つのアクセス可能な腫瘍に対して投与することを含み、それにより、前記アクセスできない腫瘍の増殖を低下または停止させる、前記医薬。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、がん免疫療法の分野、特に、腫瘍溶解性ウイルス療法に関する。具体的には、本発明は、腫瘍及び転移の治療、予防及び/または再発予防における使用のための、腫瘍関連抗原 (TAA) 及び共刺激分子 4 - 1 BBL を発現している組み換え改変ワクシニアウイルスアンカラ (MVA) に関し、かかる組み換え MVA が、固形腫瘍に対し腫瘍内に投与される。本発明はまた、それぞれの治療方法にも関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトのがんは、腫瘍抗原の発現ならびに免疫の浸潤及び組成の点で極めて不均一である。しかしながら、共通する特徴として、宿主は、腫瘍増殖を効果的に妨げる強力な免疫応答を開始させることができない。多くの場合、固形腫瘍に対して自然にプライミングされた CD8⁺ T 細胞は、過酷な腫瘍微小環境のために十分な刺激及び腫瘍組織の効率的な透過が欠如している。

10

【0003】

免疫細胞が過酷な腫瘍微小環境 (TME) で浸潤するかまたはエフェクター機能を実施する能力が低いことによる、固形腫瘍に対する強力な免疫応答の欠如が、がん免疫療法の大きな課題となっている [1]。腫瘍指向性治療により免疫抑制の TME を炎症性のものに再プログラミングするという概念が、近年、大きな注目を集めている [2]。目的は、腫瘍及び局所リンパ節にすでにホーミングしている免疫細胞を活性化させること、または新たな免疫細胞を TME に動員すること、その一方で、残りの免疫系の不適切な活性化を最小限にすることである [3]。これを達成するため、病原体認識及びプログラムされていない細胞破壊に由来する生化学的シグナルの局所での放出及び活性化または免疫刺激性のモノクローナル抗体及びサイトカインの局所投与を利用するいくつかの戦略が、前臨床モデル及び臨床において検討されている [2]。

20

【0004】

局所腫瘍溶解性ウイルス療法は、腫瘍細胞の特異的感染及び破壊ならびに TME の調節による腫瘍標的療法の概念に依存している。Food and Drug Administration (FDA) が最近、ヒト GM - CSF をコードする改変単純ヘルペスウイルス 1 であるファーストインクラスの腫瘍溶解性薬剤 IMLYGIC を III 期メラノーマ患者について承認したこと [4] により、腫瘍溶解性ウイルス (OV) の大きな可能性が強調された。その腫瘍溶解性効果について検討されているウイルスファミリーは様々あり、中でも、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス及びアデノウイルスが含まれる [5]。

30

【0005】

従来、OV ウイルスの腫瘍細胞特異的な複製及び直接死滅させる活性が主な作用機序として考えられていたが、現在では、宿主の抗腫瘍免疫応答の開始または増強が腫瘍溶解性ウイルス療法に欠かせないことが知られている [6]。したがって、局所ウイルス療法は、損傷関連または病原体関連の分子パターンの放出及び腫瘍抗原放出を伴う免疫原性細胞死をもたらす、それが最終的に抗腫瘍の自然免疫応答及び適応免疫応答を引き起こす、インサイチュでのワクチンとして考えることができる [7]。

40

【0006】

大部分の OV の顕著な特徴は、それらの腫瘍特異性であり、また、それらがウイルス複製及び付随する腫瘍細胞溶解によって腫瘍組織を通じて広がる能力である [8]。操作された、それらの腫瘍細胞への組織指向性にもかかわらず、複製能を有するウイルスの患者における使用には、依然として安全性の懸念が生じる。MVA - BN は、天然痘及びサル痘に対する非複製性ワクチンとして FDA により承認された極めて弱毒化されたワクシニア株である (JYNNEOS (登録商標)) [9]。さらに、組み換え MVA - BN ワクチンベクターは、エボラワクチンの一部として European Medicines Agency (EMA) により最近承認されており、他は、様々な感染因子に対する臨床試験で用いられている [10]。MVA は、I 型インターフェロン (IFN) の強力な誘導

50

因子であり [1 1、1 2、1 3]、ベクターにコードされた異種抗原に対する強い体液性及び細胞性の免疫応答を誘発する [1 4、1 6]。重要なことには、M V A は、その複製能力が胚性トリ細胞に制限されているため、ヒト細胞では複製することができない [1 5]。したがって、M V A は、その優れた安全性プロファイル及び免疫刺激特性により、治療介入のための主要候補となる。

【 0 0 0 7 】

M V A には、抗原特異的 T 細胞応答を誘発し、特定の免疫活性化経路を増強させるための異種抗原及び免疫刺激性分子の組み込みを容易にする、大きな導入遺伝子インサートを収容することができる。C D 4 0 L アジュバント添加 M V A は、I V 注射時、自然免疫応答及び適応免疫応答を著しく増強させた [1 6、1 7]。さらに、共刺激分子または炎症性サイトカインで遺伝子が改変された O V は、腫瘍内 (I T) 治療後、治療効果を増大させた [1 8]。したがって、腫瘍関連抗原 (T A A) をコードする M V A を共刺激分子と共に用いる I T 処置により、T M E での抗腫瘍免疫応答が増強される可能性がある。

10

【 0 0 0 8 】

腫瘍壊死因子受容体 (T N F R) ファミリーメンバーの 4 - 1 B B または C D 1 3 7 は、T 細胞での真正な共刺激分子と定義される。4 - 1 B B は、T C R 刺激時に一過性に誘導され、それに続くこの共刺激受容体との会合は、サイトカイン分泌レベルの上昇及び抗アポトーシス性分子 B c l - 2 及び B c l - x l のアップレギュレーションをもたらす。これにより、増殖の増大、及び、免疫記憶の形成にとっても重要な活性化誘導 T 細胞死に対する防御をもたらされる [1 9、2 0]。4 - 1 B B の腫瘍浸潤 T 細胞 (T I L) での発現 [2 1] は、それが活性化 T 細胞の生存、増殖、及びエフェクター機能増強を促進する能力と相まって、がん免疫療法の魅力的な標的となっている。事実、共刺激経路 4 - 1 B B / 4 - 1 B B L の刺激は、単剤療法または 4 - 1 B B アゴニスト抗体もしくは 4 - 1 B B L - 発現ウイルスベクターを用いる併用療法を含め、多くのがん治療の状況において有益である [2 2]。4 - 1 B B 共刺激はまた、シグナル伝達を増強させ、その結果として腫瘍細胞を死滅させるよう、内部ドメインが腫瘍結合性キメラ受容体内に組み込まれている第 3 世代キメラ抗原受容体 (C A R) T 細胞による治療に重要である [2 3]。

20

【 0 0 0 9 】

それでもやはり、これまでのところ注目すべき進歩が遂げられてはいるものの、腫瘍溶解性ウイルス療法のさらなる医学的使用におけるニーズが依然としてある。

30

【発明の概要】

【 0 0 1 0 】

腫瘍溶解性ウイルスを使用する局所の、すなわち、腫瘍指向性のウイルス療法のさらなる医学的使用を提供することが本発明の目的である。

【 0 0 1 1 】

簡潔に述べると、本発明の目的は、以下における使用のための、T A A 及び共刺激分子 4 - 1 B B L を発現する組み換え M V A により解決される：

(i) 固形腫瘍に対して組み換え M V A が腫瘍内に投与される、固形腫瘍の再発の予防、あるいは

(i i) 別の固形腫瘍に対して組み換え M V A が腫瘍内に投与される、腫瘍の治療、予防及び/または再発予防。

40

【 0 0 1 2 】

特に、本発明は、添付の特許請求の範囲によって、また、以下の態様及びそれらの実施形態によって定義される。

【 0 0 1 3 】

一態様では、本発明は、

(a) 腫瘍関連抗原 (T A A) をコードする第 1 の核酸と、

(b) 4 - 1 B B リガンド (4 - 1 B B L) をコードする第 2 の核酸と、

を含む、組み換え M V A であって、対象での固形腫瘍の治療及び再発予防における使用のためのものであり、固形腫瘍に対して組み換え M V A が局所に、好ましくは腫瘍内に投与

50

される、組み換えMVAを提供する。

【0014】

さらなる態様では、本発明は、

(a) 腫瘍関連抗原(TAA)をコードする第1の核酸と、

(b) 4-1BBリガンド(4-1BBL)をコードする第2の核酸と、

を含む、組み換えMVAであって、対象での固形腫瘍の、その寛解中または寛解後の再発予防における使用のためのものであり、寛解が、固形腫瘍に対する組み換えMVAの局所の、好ましくは腫瘍内への投与によって誘導されるかまたはそれに続く、組み換えMVAを提供する。

【0015】

別の態様では、本発明は、

(a) 腫瘍関連抗原(TAA)をコードする第1の核酸と、

(b) 4-1BBリガンド(4-1BBL)をコードする第2の核酸と、

を含む、組み換えMVAであって、対象での二次腫瘍の治療、予防及び/または再発予防における使用のためのものであり、関連する原発固形腫瘍に対して組み換えMVAが局所に、好ましくは腫瘍内に投与されるが、二次腫瘍には投与されない、あるいは対象での原発固形腫瘍の治療及び/または再発予防における使用のためのものであり、関連する二次性固形腫瘍に対して組み換えMVAが局所に、好ましくは腫瘍内に投与されるが、原発固形腫瘍には投与されない、あるいは

対象での二次腫瘍の治療、予防及び/または再発予防における使用のためのものであり、別の関連する二次性固形腫瘍に対して組み換えMVAが局所に、好ましくは腫瘍内に投与されるが、最初に言及した二次腫瘍には投与されない、組み換えMVAを提供する。

【0016】

さらに別の態様では、本発明は、

(a) 腫瘍関連抗原(TAA)をコードする第1の核酸と、

(b) 4-1BBリガンド(4-1BBL)をコードする第2の核酸と、

を含む、組み換えMVAであって、対象での腫瘍の治療、予防及び/または再発予防における使用のためのものであり、腫瘍が、郭清できないかもしくは手術によるアクセスが困難であり、別の関連する固形腫瘍に対しては組み換えMVAが局所に、好ましくは腫瘍内に投与されるが、最初に言及した腫瘍には局所的、好ましくは腫瘍内に投与されない、組み換えMVAを提供する。

【0017】

さらに別の態様では、本発明は、

(a) 腫瘍関連抗原(TAA)をコードする第1の核酸と、

(b) 4-1BBリガンド(4-1BBL)をコードする第2の核酸と、

を含む、組み換えMVAであって、対象での全身性抗腫瘍免疫応答の誘導における使用のためのものであり、固形腫瘍に対して組み換えMVAが局所に、好ましくは腫瘍内に投与される、組み換えMVAを提供する。

【0018】

さらに別の態様では、本発明は、

(a) 腫瘍関連抗原(TAA)をコードする第1の核酸と、

(b) 4-1BBリガンド(4-1BBL)をコードする第2の核酸と、

を含む、組み換えMVAであって、全身性抗腫瘍療法における使用のためのものであり、固形腫瘍に対して組み換えMVAが局所に、好ましくは腫瘍内に投与される、組み換えMVAを提供する。

【0019】

さらに別の態様では、本発明は、

(a) 腫瘍関連抗原(TAA)をコードする第1の核酸と、

(b) 4-1BBリガンド(4-1BBL)をコードする第2の核酸と、

を含む、組み換えMVAであって、術前補助抗腫瘍療法における使用のためのものであり

10

20

30

40

50

、固形腫瘍に対して組み換えMVAが局所に、好ましくは腫瘍内に投与される、組み換えMVAを提供する。

【0020】

さらに別の態様では、本発明は、

(a) 腫瘍関連抗原(TAA)をコードする第1の核酸と、

(b) 4-1BBリガンド(4-1BBL)をコードする第2の核酸と、

を含む、組み換えMVAであって、対象での抗腫瘍免疫記憶の誘導における使用のためのものであり、固形腫瘍に対して組み換えMVAが局所に、好ましくは腫瘍内に投与される、組み換えMVAを提供する。

【0021】

さらに別の態様では、本発明は、

(a) 腫瘍関連抗原(TAA)をコードする第1の核酸と、

(b) 4-1BBリガンド(4-1BBL)をコードする第2の核酸と、

を含む、組み換えMVAであって、対象での複数の腫瘍の治療における使用のためのものであり、前記複数の腫瘍のうち、すべてにではなく少なくとも1つに対して組み換えMVAが局所に、好ましくは腫瘍内に投与される、組み換えMVAを提供する。

【0022】

本発明はまた、複数の腫瘍を有する患者のための治療方法であって、前記複数の腫瘍のうち、すべてにではなく少なくとも1つに対して組み換えMVAを局所に(好ましくは腫瘍内に)投与することを含み、組み換えMVAが、腫瘍関連抗原(TAA)をコードする第1の核酸及び4-1-BBリガンド(4-1-BBL)をコードする第2の核酸を含む、治療方法も提供する。

【0023】

これらの態様及びそれらの実施形態は、本発明の説明に関連してさらに詳細に記載される。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】関連しない大きな腫瘍のモデルにおけるMVA-TAA-4-1BBLの腫瘍内投与の治療効果は、抗原の選択とは無関係であることを示す。C57BL/6マウス(A~D)またはBalb/cマウス(E~F)に、 5×10^5 のB16.OVA細胞(A~B)、 5×10^5 のB16.F10細胞(C~D)または 5×10^5 のCT26.WT細胞(E~F)を側腹部に皮下投与(SC)した。7~14日後、腫瘍が 60 mm^3 を上回ったら、マウスをPBSによるかまたは示されているMVAコンストラクトのいずれかにより腫瘍内(IT)免疫した。初回免疫(破線)後、4日目または5日目及び8日目にIT免疫を繰り返した。(A)腫瘍サイズの経過観察($n = \text{マウス} 5 \text{ 匹/群}$)及び(B)PBS、 2×10^8 TCID₅₀のMVA-OVAまたは 2×10^8 TCID₅₀のMVA-OVA-4-1BBLのいずれかを注射されたB16.OVA担持マウスの全生存率($n = \text{マウス} 20 \text{ 匹/群}$)、(C)腫瘍サイズの経過観察($n = \text{マウス} 5 \text{ 匹/群}$)及び(D)PBS、 5×10^7 TCID₅₀のMVA-Gp70または 5×10^7 TCID₅₀のMVA-Gp70-4-1BBLのいずれかを注射されたB16.F10担持マウスの全生存率($n = \text{マウス} 15 \text{ 匹/群}$)、(E)腫瘍サイズの経過観察($n = \text{マウス} 5 \text{ 匹/群}$)及び(F)PBS、 5×10^7 TCID₅₀のMVA-Gp70または 5×10^7 TCID₅₀のMVA-Gp70-4-1BBLのいずれかを注射されたCT26.WT担持マウスの全生存率($n = \text{マウス} 10 \text{ 匹/群}$)。(A、C及びE)データは、少なくとも2つの独立した実験の代表である。(B、D及びF)統合された少なくとも2つの独立した実験の全生存率を表す。図B、D及びFでは、マウス生存のLog rank検定を実施した。*、 $p < 0.05$; **、 $p < 0.005$; ***、 $p < 0.0001$ 。

【図2A】MVA-TAA-4-1BBLで免疫された腫瘍担持マウスにおける末梢血のCD8⁺T細胞応答の増大を示す。B16.OVA腫瘍担持マウス($n = \text{マウス} 5 \text{ 匹/群}$)のPBS、MVA-OVAまたはMVA-OVA-4-1BBLでの最終IT免疫が

10

20

30

40

50

ら3日後の、末梢血のCD44⁺ OVA₂₅₇₋₂₆₄ Dex⁺ CD8⁺ T細胞の代表的ドットプロット及び頻度。データは、少なくとも2つの独立した実験の代表である。データは平均±SEMとして表されている。一元配置ANOVAを実施した。*** p < 0.005、**** p < 0.001。

【図2B】MVA-TAA-4-1BBLで免疫された腫瘍担持マウスにおける末梢血のCD8⁺ T細胞応答の増大を示す。B16.F10腫瘍担持マウス(n=マウス5匹/群)のPBS、MVA-Gp70またはMVA-Gp70-4-1BBLでの最終IT免疫から3日後の、p15E604-611ペプチドで再刺激された末梢血のCD44⁺ IFN⁺ CD8⁺ T細胞の代表的ドットプロット及び頻度。データは、少なくとも2つの独立した実験の代表である。データは平均±SEMとして表されている。一元配置ANOVAを実施した。*** p < 0.005、**** p < 0.001。

10

【図2C】MVA-TAA-4-1BBLで免疫された腫瘍担持マウスにおける末梢血のCD8⁺ T細胞応答の増大を示す。CT26.WT腫瘍担持マウス(n=マウス5匹/群)のPBS、MVA-Gp70またはMVA-Gp70-4-1BBLでの最終IT免疫から3日後の、AH16-14ペプチドで再刺激された末梢血のCD44⁺ IFN⁺ CD8⁺ T細胞の代表的ドットプロット及び頻度。データは、少なくとも2つの独立した実験の代表である。データは平均±SEMとして表されている。一元配置ANOVAを実施した。*** p < 0.005、**** p < 0.001。

【図2D】MVA-TAA-4-1BBLで免疫された腫瘍担持マウスにおける末梢血のCD8⁺ T細胞応答の増大を示す。IT MVA-TAA-4-1BBLで治癒したC57BL/6マウスでの白斑発症の代表的写真。データは、少なくとも2つの独立した実験の代表である。

20

【図2E】MVA-TAA-4-1BBLで免疫された腫瘍担持マウスにおける末梢血のCD8⁺ T細胞応答の増大を示す。IT MVA-TAA(MVA-OVAとMVA-Gp70を併せたデータ)及びMVA-TAA-4-1BBL(MVA-OVA-4-1BBLとMVA-Gp70-4-1BBLを併せたデータ)それぞれで治癒したC57BL/6マウスの白斑発生率を表す円グラフ。データは、少なくとも2つの独立した実験の代表である。

【図3】IT MVA注射時のMVAの局在化ならびにMVA-OVA及びMVA-OVA-4-1-BBLによる炎症性サイトカインの誘導を示す。(A)C57BL/6マウスに5×10⁵のB16.OVA細胞を皮下投与した。腫瘍が60mm³に達したら、マウスを群分けし(n=マウス3匹/群)、PBSまたは2×10⁸ TCID₅₀のMVA(TAAまたは4-1-BBLをコードしないMVA)をIT投与した。IT注射から6時間後、腫瘍、TdLN、NdLN、脾臓及び血液を瞬間凍結し、組織ライセートからウイルスDNAを抽出した。異なる器官におけるMVA遺伝子MVA082Lの遺伝子コピー(gcs)が示されている。データは平均±SEMとして表されている。二元配置ANOVAを実施した。*、p < 0.05；***、p < 0.005；****、p < 0.0001。(B)C57BL/6マウスに5×10⁵のB16.OVA細胞を投与した。腫瘍が60mm³に達したら、マウスを群分けし(n=マウス3匹/群)、PBSまたは2×10⁸ TCID₅₀のMVA、MVA-OVAまたはMVA-OVA-4-1BBLをIT投与した。IT注射から6時間後、腫瘍を摘出し、腫瘍溶解液を処理した。腫瘍溶解液中の、示されているサイトカイン/ケモカインの濃度(pg/ml)が示されている。データは平均±SEMとして表されている。一元配置ANOVAを実施した。*、p < 0.05；**、p < 0.01；****、p < 0.0001。

30

40

【図4】腫瘍内MVA-免疫療法は、未処置病変の拒絶を誘導することを示す。(A~D)両側腫瘍モデル。(A)実験レイアウト。Balb/cマウスに5×10⁵及び1×10⁵のCT26.WT腫瘍細胞をそれぞれ、右及び左の側腹部に皮下投与した。5日後、右側腹部腫瘍を、PBSまたは示されているMVAコンストラクトのいずれかでIT免疫した。初回免疫(矢印)後、5日目及び8日目にIT免疫を繰り返した。(B)PBSのIT注射後の、処置及び未処置の腫瘍の腫瘍サイズの経過観察(n=マウス10匹/群)

50

。(C) 5×10^7 TCID₅₀のMVA-gp70のIT注射後の、処置及び未処置の腫瘍の腫瘍サイズの経過観察 (n = マウス10匹/群)。(D) 5×10^7 TCID₅₀のMVA-Gp70-4-1BBLのIT注射後の、処置及び未処置の腫瘍の腫瘍サイズの経過観察 (n = マウス10匹/群)。

【図5A】腫瘍内MVA-TAA-4-1BBL処置マウスは、その後の局所及び全身の腫瘍再投与に対して抵抗性であることを示す。実験レイアウト。図1のA及びBのタイプC57BL/6マウスまたは長期生存(腫瘍消失後、12~36週間)マウスに、 5×10^5 のB16.OVA細胞を、治癒マウスの腫瘍タイプの側腹部皮下に再投与した。再投与前(-6日目)及び後(7日目)に、末梢血をフローサイトメトリーで分析した。腫瘍細胞接種後41日目に、血液、脾臓、NdLN及びTdLNにおける単核球を分析した。n = マウス5~11匹/群。

10

【図5B】腫瘍内MVA-TAA-4-1BBL処置マウスは、その後の局所及び全身の腫瘍再投与に対して抵抗性であることを示す。腫瘍のないマウスの経時的パーセンテージが示されている (n = マウス5~11匹/群)。角括弧内には、群あたりの腫瘍のないマウスの数が示されている。n = マウス5~11匹/群。

【図5C】腫瘍内MVA-TAA-4-1BBL処置マウスは、その後の局所及び全身の腫瘍再投与に対して抵抗性であることを示す。IT MVA-OVAまたはMVA-OVA-4-1BBLでの処置後のタイプマウス及び長期生存マウスの、B16.OVA再投与前後の末梢血CD44⁺OVA₂₅₇₋₂₆₄Dex⁺CD8⁺の頻度。n = マウス5~11匹/群。データは平均±SEMとして表されている。二元配置ANOVAを実施した：*、p < 0.05；**、p < 0.01；***、p < 0.005。

20

【図5D】腫瘍内MVA-TAA-4-1BBL処置マウスは、その後の局所及び全身の腫瘍再投与に対して抵抗性であることを示す。血液、脾臓、NdLN及びTdLNにおけるCD44⁺OVA₂₅₇₋₂₆₄Dex⁺CD8⁺Tの頻度。n = マウス5~11匹/群。データは平均±SEMとして表されている。二元配置ANOVAを実施した：*、p < 0.05；**、p < 0.01；***、p < 0.005。

【図5E】腫瘍内MVA-TAA-4-1BBL処置マウスは、その後の局所及び全身の腫瘍再投与に対して抵抗性であることを示す。OVA₂₅₇₋₂₆₄ペプチドでの再刺激後の脾臓のCD44⁺IFN⁺TNF⁺IL2⁺CD8⁺T細胞の頻度。n = マウス5~11匹/群。データは平均±SEMとして表されている。二元配置ANOVAを実施した：*、p < 0.05；**、p < 0.01；***、p < 0.005。

30

【図5F】腫瘍内MVA-TAA-4-1BBL処置マウスは、その後の局所及び全身の腫瘍再投与に対して抵抗性であることを示す。血液、脾臓、NdLN及びTdLNにおけるCD62L⁻CD127⁺CD69⁻OVA₂₅₇₋₂₆₄Dex⁺細胞(TEM)の頻度(左)。血液、脾臓、NdLN及びTdLNにおけるCD62L⁺CD127⁺OVA₂₅₇₋₂₆₄Dex⁺細胞(TCM)の頻度(中央)。B16.OVA細胞投与後41日目の、血液、脾臓、NdLN及びTdLNにおけるCD62L⁻CD127⁺CD69⁺OVA₂₅₇₋₂₆₄Dex⁺(TRM)の頻度(右)。n = マウス5~11匹/群。データは平均±SEMとして表されている。二元配置ANOVAを実施した：*、p < 0.05；**、p < 0.01；***、p < 0.005。

40

【図5G】腫瘍内MVA-TAA-4-1BBL処置マウスは、その後の局所及び全身の腫瘍再投与に対して抵抗性であることを示す。腫瘍の全身再投与。実験レイアウト。図1のCのタイプBalb/cマウスまたは長期生存マウスに、 2×10^5 のCT26.WT細胞をIVで再投与した。腫瘍細胞注射後19日目に脾臓及び肺を分析した。n = マウス5~11匹/群。データは平均±SEMとして表されている。二元配置ANOVAを実施した：*、p < 0.05；**、p < 0.01；***、p < 0.005。

【図5H】腫瘍内MVA-TAA-4-1BBL処置マウスは、その後の局所及び全身の腫瘍再投与に対して抵抗性であることを示す。腫瘍の全身再投与。タイプマウスまたは治癒マウスへの腫瘍細胞導入後19日目のブアン液に固定後の肺の代表的写真。肉眼的肺転移の総数を評価した (n = マウス2~9匹/群)。n = マウス5~11匹/群。データ

50

は平均 ± SEMとして表されている。二元配置ANOVAを実施した：*、 $p < 0.05$ ；**、 $p < 0.01$ ；***、 $p < 0.005$ 。

【図5I】腫瘍内MVA-TAA-4-1BBL処置マウスは、その後の局所及び全身の腫瘍再投与に対して抵抗性であることを示す。腫瘍の全身再投与。再投与から19日後のAH16-14ペプチドでの再刺激後の、脾臓のCD44⁺IFN⁺TNF⁺IL2⁺CD8⁺T細胞の頻度。データは平均 ± SEMとして表されている。一元配置ANOVAを実施した：*、 $p < 0.05$ ；**、 $p < 0.005$ ；***、 $p < 0.0005$ 。

【図6】腫瘍内MVA-Gp70-4-1BBL免疫療法は、局所的腫瘍再投与からの防御を付与することを示す。図1のC及びDのナイーブC57BL/6マウスまたは長期生存マウスに 5×10^5 のB16.F10細胞を、治癒マウスの腫瘍ナイーブの側腹部皮下に再投与した。再投与の前(-6日目)及び後(7日目)に、末梢血をフローサイトメトリーで分析した。腫瘍細胞接種後42日目に血液、脾臓、NdLN及びTdLNを分析した。(A)腫瘍のないマウスの経時的パーセンテージが示されている($n =$ マウス5~11匹/群)。角括弧内には、群あたりの腫瘍のないマウスの数が示されている。(B)B16.F10細胞再投与前後の、末梢血のCD44⁺p15E604-611Pent⁺CD8⁺T細胞の頻度。(C)血液、脾臓、NdLN及びTdLNにおけるCD62L⁺CD127⁺p15E604-611Pent⁺CD8⁺T細胞(T_{CM})の頻度。(D)血液、脾臓、NdLN及びTdLNにおけるCD62L⁻CD127⁺p15E604-611Pent⁺CD8⁺T細胞(T_{EM})の頻度。(E)血液、脾臓、NdLN及びTdLNにおけるCD62L⁻CD127⁺CD69⁺p15E604-611Pent⁺CD8⁺T細胞(T_{EM})の頻度。(A~E) $n =$ マウス5~11匹/群。(B~E)データは平均 ± SEMとして表されている。(C~E)一元配置ANOVAを実施した：**、 $p < 0.005$ ；***、 $p < 0.0005$ 。

【図7】複製型ウイルスは、感染した腫瘍細胞及び免疫細胞の死を誘導することを示す[33~35]。MVA、MVA-TAAまたはMVA-TAA-4-1BBLによる感染は、インビトロでB16.OVA及びCT26.WTの腫瘍細胞の死を増強させた(A)。MVAに選択的に感染することが示されているマクロファージ[36]は効果的に死滅し、それにより、この効果が4-1BBLアジュバントによって顕著に増大した(A)。細胞死は、自然免疫細胞により感知されて免疫応答の開始に寄与する高移動度ボックス1(HMGB1)等の細胞内タンパク質の放出をもたらす[37、38]。4-1BBLとは関係なく、腫瘍細胞またはマクロファージのMVA感染後にHMGB1の顕著な増大が検出された(B)。

【図8A】MVAに基づくベクターであるMVA-HERV-FOLR1-PRAME-h4-1-BBL(「MVA-mBN494」または「MVA-BN-4IT」)を示す。詳細については、実施例7を参照のこと。

【図8B】ベクターが、感染細胞のHLA内にTAAを取り込ませる能力を示す。詳細については、実施例7を参照のこと。

【図8C】h4-1-BBLを機能性形態、すなわち、h4-1-BB受容体と結合する形態で発現させる能力を示す。詳細については、実施例7を参照のこと。

【図9】MVAに基づくベクター「MVA-mBN502」(C)を示し、さらに、ERVk-env/MEL(A；MVA-mBN494で使用する場合)及びERVk-env/MEL_03(B；MVA-mBN502で使用する場合)の概略マップを示す。

【発明を実施するための形態】

【0025】

この研究では、TAAをコードするMVAの免疫刺激特性と4-1BBLの優れたT細胞増強能とを組み合わせ、固形腫瘍に対する治療効果を評価した。関連しない様々な腫瘍モデルにおいてMVA-TAA-4-1BBLのIT注射が強い客観的治療反応を示すことを見出した。治療は、強く再活性化された腫瘍特異的CD8⁺T細胞及びTMEにおける複数の炎症誘発性のケモカイン及びサイトカインの良好な誘導によるものであった。

さらに、IT MVA-TAA-4-1BBL注射は、全身性抗腫瘍免疫応答を誘導して、遠位部位の腫瘍病巣 (tumor deposit) の成長を阻害した。重要なことには、IT MVA-TAA-4-1BBLにより、多様化した腫瘍特異的記憶応答が誘発され、これにより局所及び転移性の再発から防御された。

【0026】

腫瘍関連抗原 (TAA) 及び免疫刺激アジュバント4-1BBLを、腫瘍内ウイルス療法に改変ワクシニアアンカラ (MVA) のゲノムにクローニングした。MVA-TAA-4-1BBLによる局所治療は、確立された腫瘍の制御をもたらした。腫瘍内注射時、MVAは主に腫瘍に局在し、腫瘍流入領域リンパ節への漏出は最小限であった。MVA-TAA-4-1BBLによるインサイチュでの感染により、複数の炎症誘発性分子及び免疫原性細胞死の誘導を含む、腫瘍微小環境の著しい変化が誘発された。これが、抗原を経験した、サイトカインを産生する腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞の再活性化及び増殖をもたらした。際だったことに、局所的MVA-TAA-4-1BBL処置による全身性抗腫瘍免疫応答の誘導は、遠位未処置病変での腫瘍増殖を制御し、局所及び全身の腫瘍再投与に対する防御を付与したことをここで報告する。いずれの場合でも、4-1BBLアジュバント添加MVAはMVAよりも優れていた。したがって、腫瘍内4-1BBLアジュバント添加MVA免疫療法は、強力な腫瘍特異的CD8⁺T細胞の増殖及び腫瘍微小環境の良好な炎症誘発性変化を誘導し、腫瘍の除去及び防御免疫記憶をもたらした。

【0027】

定義

本明細書で使用される場合、単数形「a」、「an」及び「the」には、文脈で別段の明確な指示がない限り、複数の言及物が含まれることに留意しなければならない。したがって、例えば、「核酸配列 (a nucleic acid) 」には、1つ以上の核酸配列が含まれる。

【0028】

本明細書で使用される場合、複数の記述されている要素の間の「及び/または」という接続語は、個々の選択肢と組み合わせの選択肢の両方を包含すると理解される。例えば、2つの要素が、「及び/または」によって連結されている場合、第1の選択肢では、第1の要素が第2の要素を用いずに適用可能であることを指す。第2の選択肢では、第2の要素が第1の要素を用いずに適用可能であることを指す。第3の選択肢では、第1の要素と第2の要素を併せて適用可能であることを指す。これらの選択肢のうちのいずれか1つが、その意味の範囲内に入り、したがって、本明細書で使用される「及び/または」という用語の要件を満たすことが理解される。選択肢のうちの2つ以上を同時に適用可能であることも、その意味の範囲内に入り、したがって、「及び/または」という用語の要件を満たすと理解される。

【0029】

本明細書及び添付の特許請求の範囲の全体を通じて、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、「含む (comprise) 」という語、ならびに「含む (comprises) 」及び「含む (comprising) 」のような変形は、記述されている、整数もしくは工程または整数群もしくは工程群の包含であって、他の任意の整数もしくは工程または整数群もしくは工程群の除外ではないことを示唆していることが理解される。本発明の説明中の態様または実施形態との関連において使用される場合、「含む (comprising) 」という用語は修正可能であり、したがって、「含有する (containing) 」もしくは「含む (including) 」という用語で置き換えられるかまたは本明細書で使用される場合は「有する (having) 」という用語で置き換えられ得る。同様に、前述の用語 (comprising、containing、including、having) のいずれも、本発明の説明中の態様または実施形態との関連において使用される場合はいかなる場合も、それぞれが司法によって異なる、特定の法的意味を表す、「からなる (consisting of) 」または「本質的に、からなる (consisting essentially of) 」という用語が含まれる。

【 0 0 3 0 】

本明細書で使用される場合、「からなる (c o n s i s t i n g o f) 」は、請求項の要素で指定されていない任意の要素、工程、または成分を除外する。本明細書で使用される場合、「から本質的になる (c o n s i s t i n g e s s e n t i a l l y o f) 」は、特許請求の範囲の基本的かつ新規な特徴に重大な影響を及ぼさない材料または工程を除外しない。

【 0 0 3 1 】

用語「組み換えMVA」とは、天然では親ウイルスに存在しない外因性核酸配列がそのゲノム内に挿入されているMVAを指す。したがって、組み換えMVAとは、MVA核酸配列と、合成または半合成に由来する核酸配列のセグメントとの人工的な組み合わせによって作製されているMVAであって、その組み合わせが天然では存在しないかまたは配置が異なっているものを指す。人工的な組み合わせは、十分に確立された遺伝子操作技術を使用する、核酸の単離されたセグメントの人工的操作によって達成されることが多い。一般に、本明細書に記載される「組み換えMVA」とは、標準の遺伝子操作方法によって製造されているMVAを指し、したがって、例えば、組み換えMVAは、遺伝子が操作されている、または遺伝子が改変されているMVAである。したがって、用語「組み換えMVA」には、少なくとも1つの組み換え核酸が、好ましくは転写単位の形態でそのゲノムに組み込まれているMVA（例えば、MVA-BN）が含まれる。転写単位としては、プロモーター、エンハンサー、終結因子及び/またはサイレンサーを挙げてよい。本発明の組み換えMVAは、調節エレメント、例えば、プロモーターの誘導時、異種抗原決定基、ポリペプチドまたはタンパク質（抗原）を発現するよう設計されている。

10

20

【 0 0 3 2 】

本明細書で使用される場合、用語「対象」とは、典型的には、哺乳類、例えば、非霊長類または霊長類（例えば、サルまたはヒト）であり、好ましくはヒトである、組み換えMVAのレシピエントを指す。用語には、ヒトまたは動物の「患者」及び実験動物が含まれる。用語「対象」及び「患者」は同じ意味で使用される。

【 0 0 3 3 】

用語「固形腫瘍」とは、例えば、白血病または血液がんとは対照的に、特定可能であるかまたは定着した腫瘍性組織を指す。

【 0 0 3 4 】

用語「原発腫瘍」とは、そこから腫瘍細胞が、体の他の部分に広がる場合があり、また新たな（「二次」）腫瘍を形成する場合がある、初期または第1の腫瘍を指す。

30

【 0 0 3 5 】

本明細書で使用される場合、用語「二次腫瘍」とは、「原発腫瘍」から、または別の「二次腫瘍」から広がった腫瘍細胞により形成された腫瘍を指す。特に、用語には「転移」が含まれる。

【 0 0 3 6 】

用語「転移」とは、がん性の原発または二次性の腫瘍に由来する腫瘍病巣を指す。

【 0 0 3 7 】

本明細書で使用される場合、「関連する」という表現は、2つの腫瘍が、同じ組み換えMVAまたはTAAに応答性であると考えられていることを意味する。それらは、例えば、同じ腫瘍タイプである。

40

【 0 0 3 8 】

本明細書で使用される場合、用語「空間的に遠位にある」は、個々の腫瘍として、例えば光学的手段によって、明確に識別可能であり、別の腫瘍から間隔が空いている腫瘍に関する。

【 0 0 3 9 】

用語「局所 (l o c a l) 」投与には、例えば、固形腫瘍に対する腫瘍内投与または局所 (t o p i c a l) 投与が含まれる。したがって、局所 (l o c a l) とは、部位上を意味する。投与は、組み換えMVAの、例えば、局所 (l o c a l) または局所 (t o p

50

ical)の適用によるか、または腫瘍内注射によって達成することができる。いくつかの実施形態では、例えば、皮膚に近い腫瘍またはメラノーマ等の皮膚細胞の腫瘍では、局所投与は、腫瘍のごく近傍での皮下注射により達成することができる。対照的に、「遠位」または「全身」のような用語は、部位上ではないことを意味する。

【0040】

本明細書で使用される場合、用語「全身」とは、「局所(local)」、の反対を意味する。したがって、全身とは、効果が局所に限局されていない、すなわち、むしろ体全体に関することを意味し得る。

【0041】

本明細書で使用される場合、用語「腫瘍指向性ウイルス療法」とは、全身腫瘍ウイルス療法と対照的な局所ウイルス療法を意味する。

10

【0042】

本明細書で使用される場合、用語「全身性抗腫瘍療法」とは、組み換えMVAは固形腫瘍に対して局所的に投与されるが、抗腫瘍活性が、局所的に処置されていない他の腫瘍まで及ぶことを意味する。

【0043】

本明細書で使用される場合、用語「全身性抗腫瘍免疫応答」とは、体内のどこでも生じる可能性のある抗腫瘍免疫応答を指す。

【0044】

本明細書で使用される場合、用語「再発(recurrence)」とは、腫瘍の再発(relapse)または再発(return)を指す。

20

【0045】

本明細書で使用される場合、用語「再発(recurrence)予防」は、寛解した腫瘍、すなわち、寛解中または寛解後の腫瘍、例えば、根絶された腫瘍の再発(relapse)が、予防または阻害されることを意味する。少なくとも、腫瘍の完全再発は阻害され、例えば、少なくとも50%阻害される。

【0046】

対照的に、用語「予防」は、腫瘍の最初の出現が予防されることを意味する。

【0047】

本明細書で使用される場合、用語「寛解」は、例えば、減少するかまたは根絶された腫瘍に関する。より一般的には、「寛解」は、腫瘍等の疾患の徴候及び症状の縮小または消失である。寛解は、部分寛解または完全解(complete)もしくは完全(full)寛解が考えられ得る。例えば、腫瘍の部分寛解は、身体診察、放射線学的検査、または血液検査もしくは尿検査からのバイオマーカーレベルで見出され得る、腫瘍増殖についての測定可能なパラメータにおける50%以上の減少と定義され得る。一方、完全寛解とは、再発の可能性にかかわらず、腫瘍の完全消失である。

30

【0048】

用語「術前補助療法」とは、主要な治療法の前治療を指す。ここでは、組み換えMVAを使用する術前補助療法は、腫瘍のサイズまたは範囲を、例えば、外科的切除の前に縮小することを目的とする。

40

選択略語 IT intratumoral(i.t.) 腫瘍内
MVA Modified Vaccinia Virus Ankara
(MVA) 改変ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)
OV oncolytic virus 腫瘍溶解性ウイルス
TAA tumor associated antigen 腫瘍関連抗原
TME tumor microenvironment 腫瘍微小環境

【0049】

実施形態

一実施形態では、組み換えMVAは、非複製性または複製欠損性MVAである。好ましくは、組み換えMVAは、ヒト細胞株では生殖複製不能である。

50

【0050】

一実施形態では、組み換えMVAは、European Collection of Cell Cultures (ECACC) に番号V00083008として寄託されているMVA-BNに由来するか、またはMVA-BN派生物に由来する。

【0051】

一実施形態では、組み換えMVAは、

- (a) 腫瘍関連抗原 (TAA) をコードする第1の核酸、
- (b) 4-1BBリガンド (4-1BBL) をコードする第2の核酸、及び
- (c) TAAをコードする少なくとも1つのさらなる核酸、を含む。

【0052】

一実施形態では、TAAをコードする第1の核酸及びTAAをコードする少なくとも1つのさらなる核酸は、同じであるかまたは異なる。

【0053】

一実施形態では組み換えMVAは、それぞれが異なるTAAをコードする2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、またはそれ以上の核酸を含む。

【0054】

一実施形態では、TAAは、ネオアンチゲンまたは内在性自己抗原である。

【0055】

一実施形態では、TAAは、転位因子 (TE) である。

【0056】

一実施形態では、TAAは、内在性レトロウイルスタンパク質 (HERV) である。

【0057】

一実施形態では、TAAは、長い散在反復配列 (LINE) である。

【0058】

一実施形態では、TAAは、短い散在反復配列 (SINE) である。

【0059】

一実施形態では、TAAは、内在性レトロウイルス (ERV) タンパク質、内在性レトロウイルス (ERV) ペプチド、がん胎児性抗原 (CEA)、ムチン1細胞表面関連 (MUC-1)、前立腺酸性ホスファターゼ (PAP)、前立腺特異抗原 (PSA)、ヒト上皮細胞成長因子受容体2 (HER-2)、サバイビン、チロシン関連タンパク質1 (TRP1)、チロシン関連タンパク質1 (TRP2)、Brachyury、葉酸受容体アルファ (FOLR1)、メラノーマ優先発現抗原 (PRAME)、及び内在性レトロウイルスペプチドMEL、ならびにそれらの組み合わせ、からなる群から選択される。既知の腫瘍または治療される患者の腫瘍と関連しており、かつ、発現された際に、免疫応答を生じさせるかまたは刺激する能力のある抗原である限り、どのTAAでも本発明の組成物及び/または方法における使用に好適である。

【0060】

一実施形態では、ERVタンパク質は、ヒト内在性レトロウイルスK (HERV-K) ファミリー由来であり、好ましくは、HERV-Kエンベロープ (HERV-K-env) タンパク質及びHERV-K gagタンパク質から選択される。

【0061】

一実施形態では、ERVペプチドは、ヒト内在性レトロウイルスK (HERV-K) ファミリー由来であり、好ましくは、HERV-Kエンベロープタンパク質 (HERV-K-env/MEL) の偽遺伝子から選択される。

【0062】

一実施形態では、組み換えMVAは、

- (i) HERV-K-env/MELをコードする核酸、
- (ii) HERV-K gagをコードする核酸、
- (iii) FOLR1及びPRAMEをコードし、好ましくは、融合タンパク質として発現される核酸、及び

10

20

30

40

50

(i v) 4 - 1 B B L をコードする核酸、を含む。

【 0 0 6 3 】

一実施形態では、(i) の核酸は、HERV - K env 表面 (S U) ユニットと HERV - K 膜貫通 (T M) ユニットとを含む HERV - K - env / M E L をコードし、HERV - K T M ユニットは変異しており、好ましくは、HERV - K T M ユニットは、免疫抑制ドメインが不活性化されるよう変異している。好ましくは、HERV - K - M E L は、変異 HERV - K T M ユニット内に挿入される。より好ましくは、HERV - K - M E L が、HERV - K T M の免疫抑制ドメインの一部に取って代わる。

【 0 0 6 4 】

一実施形態では、(i) の核酸配列は、配列番号 7 に示されているようなアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるアミノ酸配列をコードする。

【 0 0 6 5 】

一実施形態では、(i) の核酸配列は、配列番号 8 に示されているような核酸配列を含むかまたはそれからなる。

【 0 0 6 6 】

一実施形態では、(i) の核酸は、HERV - K env 表面 (S U) ユニットと HERV - K 膜貫通 (T M) ユニットとを含む HERV - K - env / M E L をコードし、HERV - K T M ユニットは、20 アミノ酸未満、好ましくは 10 アミノ酸未満、より好ましくは 8 アミノ酸未満、最も好ましくは 6 アミノ酸に短縮される。

【 0 0 6 7 】

一実施形態では、(i) の核酸は、HERV - K - env 表面 (S U) ユニットを含む HERV K - env / M E L をコードし、HERV - K - env S U ユニットの R S K R フューリン切断部位が欠失している。好ましくは、HERV - K - M E L は、HERV - K - env S U ユニットの C 末端に結合している。

【 0 0 6 8 】

一実施形態では、(i) の核酸は、異種膜アンカー、好ましくは、ヒト P D G F (血小板由来増殖因子) 受容体に由来するものを含む HERV K - env / M E L をコードする。

【 0 0 6 9 】

一実施形態では、(i) の核酸配列は、配列番号 11 に示されているようなアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるアミノ酸配列をコードする。

【 0 0 7 0 】

一実施形態では、(i) の核酸配列は、配列番号 12 に示されているような核酸配列を含むかまたはそれからなる。

【 0 0 7 1 】

一実施形態では、固形腫瘍、原発固形腫瘍及び/または二次腫瘍は、がん性または悪性の腫瘍である。

【 0 0 7 2 】

一実施形態では、固形腫瘍、原発固形腫瘍及び/または二次腫瘍は、メラノーマまたは悪性乳房腫瘍、結腸腫瘍もしくは卵巣腫瘍である。

【 0 0 7 3 】

一実施形態では、二次腫瘍は、転移である。

【 0 0 7 4 】

一実施形態では、二次腫瘍は、固形腫瘍である。あるいは、二次腫瘍は、例えば、血液リンパ等の体液中に浮遊している腫瘍細胞の集合であるか、または体腔、例えば、腹腔内に存在している。ただし、組み換え M V A が局所的または腫瘍内に投与される原発腫瘍または二次腫瘍は、常に固形腫瘍である。

【 0 0 7 5 】

一実施形態では、組み換え M V A が局所的または腫瘍内に投与されない腫瘍は、郭清できないかまたは手術によるアクセスが困難である。

【 0 0 7 6 】

10

20

30

40

50

一実施形態では、原発腫瘍及び二次腫瘍は、互いに空間的に遠位にある。

【0077】

一実施形態では、二次腫瘍及び別の二次腫瘍は、互いに空間的に遠位にある。

【0078】

一実施形態では、原発腫瘍及び二次腫瘍は、対象の体の同じ組織または器官内に位置する。

【0079】

一実施形態では、二次腫瘍及び別の二次腫瘍は、対象の同じ組織または器官内に位置する。

【0080】

一実施形態では、原発腫瘍及び二次腫瘍は、対象の体の異なる組織または器官内に位置する。

【0081】

一実施形態では、二次腫瘍及び別の二次腫瘍は、対象の体の異なる組織または器官内に位置する。一実施形態では、二次腫瘍はナイーブである、すなわち、以前に組み換えMVAにより局所に、好ましくは腫瘍内に処置されなかった。

【0082】

一実施形態では、腫瘍は、少なくとも部分寛解にあり、例えば、少なくとも50%超の寛解にあり、好ましくは、完全寛解にある。

【0083】

一実施形態では、組み換えMVAは、局所、好ましくは腫瘍内以外に投与されない。したがって、組み換えMVAは、対象に、例えば、全身、静脈内、腹腔、非経口、皮下、または鼻腔内に投与されない。

【0084】

一実施形態では、抗腫瘍免疫記憶は、長期である、すなわち、数日、数週間、数か月、数年または数十年持続する。

【0085】

治療方法

本発明は、2つ以上の腫瘍を有する対象のための治療方法であって、対象の全腫瘍数よりも少ない腫瘍が組み換えMVAの局所投与によって治療される、方法を提供する。すなわち、本発明は、複数の腫瘍を有する対象のための治療方法であって、前記複数の腫瘍のうち、すべてにではなく少なくとも1つに対して組み換えMVAを局所的に投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、組み換えMVAを局所的に投与する工程は、腫瘍内注射を含む。このようにして、治療方法は、組み換えMVAが局所的または腫瘍内に投与または注射された「治療腫瘍」または「注射腫瘍」、及び組み換えMVAが局所に投与されなかったかまたは組み換えMVAが注射されなかった「未治療腫瘍」または「未注射腫瘍」を生じさせると言うことができる。治療方法はまた、前記対象の少なくとも1つの他の腫瘍に組み換えMVAを局所に投与するかまたは腫瘍内に注射することによって、対象での未注射腫瘍を治療する方法を提供するということもできる。本発明の方法のいくつかの実施形態では、対象は、ヒト患者である。

【0086】

いくつかの実施形態では、治療方法は、第1または原発の腫瘍の転移または再発を、前記第1または原発の腫瘍への組み換えMVAの局所投与によって（いくつかの実施形態では、腫瘍内注射によって）治療することを含む。いくつかの実施形態では、対象における複数の腫瘍のうち、どれが第1に発生したもの（すなわち、「原発腫瘍」）かを決定することが不可能であり、方法は、複数の腫瘍のうちの少なくとも1つを、MVAの局所投与または腫瘍内注射によって治療することを含む。したがって、いくつかの実施形態では、「転移」または「二次腫瘍」とは、腫瘍が、「第1の腫瘍」または「原発腫瘍」として示された腫瘍とは異なる位置にあるかまたは異なる境界を有することを意図している。

【0087】

10

20

30

40

50

本発明の方法は、対象における複数の腫瘍のうちの少なくとも1つを、局所投与もしくは腫瘍内注射によって治療すること、または前記腫瘍のうち少なくとも2つの腫瘍、少なくとも3つ、少なくとも4つ、もしくはそれ以上を治療すること、または前記対象における複数の腫瘍のうち1つを除いたすべてを治療することを含む。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、対象の全腫瘍数よりも少ない腫瘍が組み換えMVAの局所投与または腫瘍内注射によって注射または治療される限り、対象におけるいかなる数の腫瘍もそのように注射または治療され得ることを提供する。

【0088】

本発明は、いかなる特定の機序または作用様式にも拘束されないが、前記対象における少なくとも1つのTAAもしくは腫瘍またはその細胞に対する免疫応答を刺激するか、あるいは少なくとも1つの二次腫瘍または未注射腫瘍の体積もしくはサイズの減少を生み出す限りは、どの方法も本発明の実施において好適である。「免疫応答を刺激する」とは、新規または増大した免疫応答の兆候が、例えば、本明細書での実施例で例示されるような、CD8+ T細胞集団の増加及び/または対象のCD8+ T細胞により産生されるIFN-ガンマ、TNF-アルファ及び/またはIL-2の量の増加のように、対象において特定することができることを意図している。このようにして、本発明はまた、対象に対し本発明の組み換えMVAを腫瘍内に投与する工程を含む、TAAに対する免疫応答を刺激する方法を提供する。

10

【0089】

いくつかの実施形態では、組み換えMVAは、(a)腫瘍関連抗原(TAA)をコードする第1の核酸、及び(b)4-1BBリガンド(4-1BBL)をコードする第2の核酸、を含む。組み換えMVAはさらに、追加のTAAをコードする追加の核酸を含んでよい。本発明の方法は、少なくとも1つのTAA及び4-1-BBLの両方をコードする組み換えMVAを用いる使用に好適である。いくつかの実施形態では、組み換えMVAは、少なくとも1つのTAA及び4-1-BBLを発現し、これは、当該技術分野で公知の技術を使用して示され得る。

20

【0090】

本発明の方法及び組成物において有用な様々なTAA及び4-1-BBLの配列は当該技術分野で公知であり、例えば、PCT/EP2019/081942(WO2020/104531として公開)及び欧州特許出願第19210369.5号に記載されており、それらはいずれも参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。例示的な4-1-BBL配列は、NCBI参照配列NP_003802.1(及び配列番号3に記載のアミノ酸配列、及び/または配列番号4に記載の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列)に記載されている。本発明の使用及び方法において有用な組み換えMVAはまた、例えば、欧州特許出願第19210369.5号に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0091】

特定の実施形態では、4-1-BBLをコードする核酸配列は、配列番号3とのアミノ酸配列同一性が少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、または100%である4-1-BBLをコードする。特定の実施形態では、核酸配列は、配列番号4に記載の配列であるか、または配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する4-1-BBLをコードする。

40

【0092】

特定の実施形態では、TAAをコードする核酸配列は、例えば、本明細書で提供されている配列表に記載の配列のような、これまでに既知のTAAとのアミノ酸配列同一性が少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、または100%であるTAAをコードする。特定の実施形態では、核酸配列は、配列表に記載のアミノ酸配列を有するTAA、または当該技術分野で公知のアミノ酸配列を有するTAAをコードする。

【0093】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの個々の腫瘍は、投与後に腫瘍が増殖を続け

50

ているのか、またはサイズが増大しているのか減少しているのかを決定するため、の組み換えMVAの局所投与（例えば、腫瘍内注射）の前後に測定される。いくつかの方法では、少なくとも1つの個々の腫瘍の反応を追跡するため、投与後、間隔をおいて追加の測定が行われる場合がある。そのような測定は、任意の好適な技術によるものでよく、それらとして、視覚的評価または外部測定ならびにX線、超音波イメージング、生体顕微鏡、または当該技術分野で公知の他の任意の好適な方法を挙げることができる。治療に対する腫瘍の反応及び/または治療の有効性を評価するために用いられる腫瘍測定には、例えば、腫瘍の少なくとも1つの直径及び/または腫瘍体積の推定を含めることができる。

【0094】

いくつかの実施形態では、1つ以上の腫瘍を有する対象を治療する方法は、(a)前記対象での腫瘍について第1の測定値を取得する、(b)少なくとも1つから1つ以上であるが、全部より少ないTAAを発現する組み換えMVAを前記対象の腫瘍に投与して、治療または注射された腫瘍と未治療または非注射の腫瘍を生じさせる、(c)前記未治療または非注射の腫瘍のうちの少なくとも1つについて第2の測定値を取得する、及び(d)前記第2の測定値を前記未治療または非注射の腫瘍の第1の測定値と比較する、という工程を含み、それにより、前記測定値の低下または前記測定値の上昇の欠如は、腫瘍が退縮したかもしくは体積が減少したこと、または腫瘍増殖が遅延されていることを示す。いくつかの実施形態では、本明細書の他の箇所ですらに考察されているように、これらの方法に使用する組み換えMVAは少なくとも1つのTAA及び4-1-BBLを発現する。

【0095】

いくつかの実施形態では、原発腫瘍及び1つ以上の転移、または転移の可能性を有する（すなわち、悪性腫瘍を有する）対象を治療する方法は、新規または追加の転移を予防することが意図され、これは、(a)転移のリスクがある1つ以上の腫瘍を対象において特定する、(b)前記対象の腫瘍のうち全部ではなく少なくとも1つに対し、TAAを発現する組み換えMVAを局所的に投与する（いくつかの実施形態では、腫瘍内注射による）、(c)前記対象において新たな腫瘍または転移が何も検出できないことを確認するため、前記対象において腫瘍の検出を行う、という工程を含む。いくつかの実施形態では、本明細書の他の箇所ですらに考察されているように、これらの方法に使用する組み換えMVAはTAA及び4-1-BBLを発現する。いくつかの実施形態では、これらの方法に使用する組み換えMVAは、TAAをコードする異種核酸及び4-1-BBLをコードする異種核酸を含むが、対象を治療するためにMVAの成分としてかまたは別々に使用される場合に、対象の免疫応答に影響を与え得るかまたは対象の免疫応答に影響を与えることが予想される異種核酸によりコードされるいかなる追加の遺伝子も含まない。

【0096】

いくつかの実施形態では、本発明は、複数の腫瘍のある対象でのアクセスできない腫瘍を治療する方法であって、複数の腫瘍のうち少なくとも1つのアクセス可能な腫瘍に組み換えMVAを局所的に投与する工程を含み、組み換えMVAが、腫瘍関連抗原(TAA)をコードする第1の核酸及び4-1-BBLリガンド(4-1-BBL)をコードする第2の核酸を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、組み換えMVAは、少なくとも1つの追加のTAAをコードする少なくとも1つの追加の核酸、または少なくとも2つ、3つ、もしくは4つ以上の追加のTAAをコードする少なくとも2つ、3つ、もしくは4つ以上の追加の核酸を含む。いくつかの実施形態では、組み換えMVAを局所的に投与する工程は、腫瘍内注射を含む。

【0097】

「アクセスできない腫瘍」とは、腫瘍内注射及び/または他の技術の使用等の組み換えMVAの局所投与によって直接治療することが困難な腫瘍を意図している。「アクセスできない腫瘍」または切除不能な腫瘍は、体内の敏感な領域、例えば、重要な神経もしくは血管の近傍もしくは周辺、または脳内、あるいは別の場所であって、手術及び/または組み換えMVAの局所投与が、対象への損傷のリスクとなる可能性がある場所及び/または投与することが困難と考えられる場所に位置している場合がある。本発明は、複数の腫瘍

10

20

30

40

50

がある対象でのアクセスできない腫瘍または切除不能な腫瘍を治療する方法であって、よりアクセスがしやすい、及び/または局所投与が対象への損傷を引き起こす可能性が高い異なる腫瘍への局所投与の工程を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、対象でのアクセスできない腫瘍を治療する方法を提供し、(a)対象において少なくとも1つのアクセスできない腫瘍及び少なくとも1つのアクセス可能な腫瘍を特定すること、及び(b)TAAを発現する組み換えMVAを、前記対象の少なくとも1つのアクセス可能な腫瘍に局所的に投与すること、を含む。任意選択で、この方法はさらに、腫瘍の増殖が減速または停止したことを確認する、及び/または組み換えMVAの投与の後に前記対象に増大免疫応答または新規免疫応答があるかどうかを決定する、前記アクセスできない腫瘍をモニタリングする工程を含む。

10

【0098】

いくつかの実施形態では、本発明は、複数の悪性腫瘍を有する対象を治療する方法であって、TAAを発現する組み換えMVAを前記腫瘍のうちの少なくとも1つに局所的に投与して治療腫瘍を生じさせることを含み、治療が、治療腫瘍及び組み換えMVAで直接治療または注射されなかった少なくとも1つの他の腫瘍(「未治療腫瘍」または「未注射腫瘍」とも言う)の腫瘍体積の縮小をもたらす、方法を提供する。

【0099】

いくつかの実施形態では、「腫瘍内注射」とは、腫瘍内、または腫瘍の境界内部に投与が行われることを意図している。いくつかの実施形態では、「局所投与」とは、腫瘍に近接して投与が行われることを意図している。当業者は、そのような注射はまた同時に、腫瘍の位置に応じて、例えば、非経口または皮下等の別の種類の投与として特徴付けられ得ることを認識している。

20

【0100】

詳細な記載

改変ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)

過去において、MVAは、ニワトリ胚線維芽細胞で、ワクシニアウイルスのアンカラ株(CVA)を516代連続継代することによって作製された(概説については、Mayer et al. 1975)。このウイルスは、その実質的に変化した特性を考慮して、継代570代目でCVAからMVAに改名された。MVAは570代目までさらなる継代を受けた。これらの長期継代の結果、得られたMVAウイルスのゲノムは、その約31キロベースのゲノム配列が欠失しており、そのため、トリ細胞での複製に関して、宿主細胞が非常に限られているものとして説明された(Meyer et al. 1991)。この得られたMVAが、完全に複製能のある出発材料と比較して大いに非病原性であることが様々な動物モデルにおいて示された(Mayrand Danner 1978)。

30

【0101】

本発明の実施において有用なMVAとしては、MVA-572(1994年1月27日にE C A C C V 9 4 0 1 2 7 0 7として寄託)、MVA-575(2000年12月7日にE C A C C V 0 0 1 2 0 7 0 7として寄託)、MVA-I721(Suter et al. 2009に参照されている)、NIHクローン1(2003年3月27日にATCC(登録商標)PTA-5095として寄託)、及びMVA-BN(2000年8月30日に、European Collection of Cell Cultures(E C A C C)に番号V00083008として寄託)が挙げられる。

40

【0102】

より好ましくは、本発明に従って使用されるMVAとしては、MVA-BN及びMVA-BN派生物が挙げられる。MVA-BNは、WO02/042480に記載されている。「MVA-BN派生物」とは、本明細書に記載されているようなMVA-BNと本質的に同じ複製特性を示すが、それらのゲノムの1つ以上の部分に差異を示す任意のウイルスを指す。

【0103】

MVA-BN、及びMVA-BN派生物は、複製能力がなく、複製能力がないとは、イ

50

ンビボ及びインビトロで生殖複製できないことを意味する。より具体的には、インビトロのMVA-BNまたはMVA-BN派生物は、ニワトリ胚線維芽細胞(CEF)で生殖複製できるが、ヒトケラチノサイト細胞株HaCat(Boukamp et al 1988)、ヒト骨肉腫細胞株143B(ECACCC寄託番号91112502)、ヒト胎児腎細胞株293(ECACCC寄託番号85120602)及びヒト子宮頸部腺癌細胞株HeLa(ATCC寄託番号CCL-2)では生殖複製不能であると説明されている。加えて、MVA-BNまたはMVA-BN派生物は、HeLa細胞及びHaCaT細胞株において、ウイルス増幅率がMVA-575の少なくとも2分の1、より好ましくは3分の1である。MVA-BN及びMVA-BN派生物のこれらの特性に関する試験及びアッセイは、W002/42480及びW003/048184に記載されている。

10

【0104】

上記で説明したように、インビトロでのヒト細胞株における「生殖複製不能である」という用語は、例えば、W002/42480に記載されており、これはまた、上記のような望ましい特性を有するMVAを得る方法も教示する。この用語は、W002/42480またはUS6,761,893に記載されているアッセイを使用して、感染後4日でインビトロでのウイルス増幅率が1未満であるウイルスに当てはまる。

【0105】

組み換えMVAウイルスの例示的作製

本明細書で開示されている組み換えMVAの作製には、異なる方法を適用してよい。ウイルスに挿入されるDNA配列は、ボックスウイルスのDNAのセクションに相同なDNAが挿入されているE.coliプラスミドコンストラクトに配置することができる。これとは別に、挿入されるDNA配列は、プロモーターに連結することができる。このプロモーター-遺伝子連結体は、そのプロモーター-遺伝子連結体が両端で、非必須座位を含有するボックスウイルスDNA領域に隣接しているDNA配列と相同なDNAと隣接するよう、プラスミドコンストラクト内に配置することができる。得られたプラスミドコンストラクトは、E.coli菌内での増殖により増幅させ、単離することができる。挿入されるDNA遺伝子配列を含有する単離されたプラスミドは、例えばニワトリ胚線維芽細胞(CEF)等の細胞培養物に、培養物がMVAに感染すると同時にトランスフェクトすることができる。プラスミド内の相同MVAウイルスDNAとウイルスゲノムとの間の組換えは、それぞれ、外来DNA配列、すなわち、SARS-CoV-2抗原をコードするヌクレオチド配列の存在により改変されているMVAを生成し得る。

20

30

【0106】

好ましい実施形態によれば、細胞培養に好適な細胞、例えばCEF細胞に、MVAウイルスを感染させることができる。続いて、感染した細胞に、本明細書で提供される核酸のうちの一つ以上等の外来または異種の遺伝子(複数可)を含む第1のプラスミドベクターを、好ましくはボックスウイルス発現制御エレメントの転写制御下で、トランスフェクトすることができる。上記で説明されているように、プラスミドベクターは、MVAウイルスゲノムの選択された部分への外来配列の挿入を誘導する能力がある配列も含む。任意選択で、プラスミドベクターはまた、ボックスウイルスプロモーターに機能的に連結されたマーカー遺伝子及び/または選択遺伝子を含むカセットも含有する。選択カセットまたはマーカーカセットの使用により、作製された組み換えMVAの特定及び単離が簡略になる。ただし、組み換えボックスウイルスは、PCR技術によっても同定することができる。その後、さらなる細胞に、上記のようにして得られた組み換えMVAを感染させ、それに第2の外来または異種の遺伝子(複数可)を含む第2のベクターをトランスフェクトすることができる。念のため、この遺伝子は、ボックスウイルスゲノムの異なる挿入部位に導入されるべきであり、第2のベクターにおいても、ボックスウイルスのゲノムへの第2の外来遺伝子(複数可)の組み込みを誘導する、ボックスウイルスと相同な配列が異なる。相同組み換えが行われた後、2つ以上の外来遺伝子または異種遺伝子を含む組み換えウイルスを単離することができる。追加の外来遺伝子を組み換えウイルスに導入する場合、前の感染工程で単離された組み換えウイルスを用いることによって、かつトランスフェクシ

40

50

オン用のさらなる外来遺伝子（複数可）を含むさらなるベクターを用いることによって、感染及びトランスフェクションの工程を繰り返すことができる。組み換えMVAを作製するために知られている他の技術が多数ある。

【0107】

本発明の実施では、特に明記しない限り、免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、及び組み換え技術の従来技術が用いられ、それらはいずれも当業者の技量の範囲内である。例えば、Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, 1989、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel FM, et al., eds, 1987、Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.) シリーズ、PCR2: A Practical Approach, MacPherson MJ, Ham s BD, Taylor GR, eds, 1995、Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds, 1988を参照のこと。

10

なお、本願は、特許請求の範囲に記載の発明に関するものであるが、他の態様として以下も包含し得る。

1. (a) 腫瘍関連抗原(TAA)をコードする第1の核酸と、
(b) 4-1BBリガンド(4-1BBL)をコードする第2の核酸と、
を含む、組み換え改変ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)であって、
対象での固形腫瘍の、その寛解中または寛解後の再発予防における使用のためのものであり、前記寛解が、前記固形腫瘍に対する前記組み換えMVAの局所の、好ましくは腫瘍内への投与によって誘導される、前記組み換え改変ワクシニアウイルスアンカラ。

20

2. (a) 腫瘍関連抗原(TAA)をコードする第1の核酸と、
(b) 4-1BBリガンド(4-1BBL)をコードする第2の核酸と、
を含む、組み換え改変ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)であって、
対象での全身性抗腫瘍免疫応答の誘導における使用のためのものであり、固形腫瘍に対して前記組み換えMVAが局所に、好ましくは腫瘍内に投与される、前記組み換え改変ワクシニアウイルスアンカラ。

3. (a) 腫瘍関連抗原(TAA)をコードする第1の核酸と、
(b) 4-1BBリガンド(4-1BBL)をコードする第2の核酸と、
を含む、組み換え改変ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)であって、
対象での二次腫瘍の治療、予防及び/または再発予防における使用のためのものであり、
関連する原発固形腫瘍に対して前記組み換えMVAが局所に、好ましくは腫瘍内に投与されるが、
前記二次腫瘍には投与されない、あるいは
対象での原発固形腫瘍の治療及び/または再発予防における使用のためのものであり、
関連する二次性固形腫瘍に対して前記組み換えMVAが局所に、好ましくは腫瘍内に投与されるが、
前記原発固形腫瘍には投与されない、あるいは
対象での二次腫瘍の治療、予防及び/または再発予防における使用のためのものであり、
別の関連する二次性固形腫瘍に対して前記組み換えMVAが局所に、好ましくは腫瘍内に投与されるが、
最初に言及した二次腫瘍には投与されない、前記組み換え改変ワクシニアウイルスアンカラ。

30

4. 前記組み換えMVAが、
(a) 腫瘍関連抗原(TAA)をコードする第1の核酸と、
(b) 4-1BBリガンド(4-1BBL)をコードする第2の核酸と、
(c) TAAをコードする少なくとも1つのさらなる核酸と、を含む、上記1~3のいずれか1項に記載の使用のための組み換えMVA。

5. 前記TAAが、ネオアンチゲンまたは内在性自己抗原である、上記1~4のいずれか1項に記載の使用のための組み換えMVA。

6. 前記TAAが、内在性レトロウイルス(ERV)タンパク質、内在性レトロウイルス

40

50

(E R V) ペプチド、がん胎児性抗原 (C E A)、ムチン 1 細胞表面関連 (M U C - 1)、前立腺酸性ホスファターゼ (P A P)、前立腺特異抗原 (P S A)、ヒト上皮細胞成長因子受容体 2 (H E R - 2)、サバイビン、チロシン関連タンパク質 1 (T R P 1)、チロシン関連タンパク質 2 (T R P 2)、B r a c h y u r y、葉酸受容体アルファ (F O L R 1)、メラノーマ優先発現抗原 (P R A M E)、及び前記内在性レトロウイルスペプチド M E L、ならびにそれらの組み合わせからなる群から選択される、上記 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の使用のための組み換え M V A。

7. 前記 E R V タンパク質が、ヒト内在性レトロウイルス K (H E R V - K) ファミリー由来であり、好ましくは、H E R V - K エンベロープ (H E R V - K - e n v) タンパク質及び H E R V - K g a g タンパク質から選択される、上記 6 に記載の使用のための組み換え M V A。

10

8. 前記 E R V ペプチドが、ヒト内在性レトロウイルス K (H E R V - K) ファミリー由来であり、好ましくは、H E R V - K エンベロープタンパク質 (H E R V - K - e n v / M E L) の偽遺伝子から選択される、上記 6 に記載の使用のための組み換え M V A。

9. 前記固形腫瘍が、悪性腫瘍、好ましくは、メラノーマまたはがん性の乳房腫瘍、結腸腫瘍もしくは卵巣腫瘍である、上記 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の使用のための組み換え M V A。

10. 前記二次腫瘍が、転移である、上記 3 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の使用のための組み換え M V A。

11. 前記組み換え M V A が局所に、好ましくは腫瘍内に投与されない前記腫瘍が、郭清できないかまたは手術によるアクセスが困難である、上記 3 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の使用のための組み換え M V A。

20

12. 前記組み換え M V A が、ヒト細胞株において生殖複製不能である、上記 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の使用のための組み換え M V A。

13. 前記組み換え M V A が、European Collection of Cell Cultures (E C A C C) に番号 V 0 0 0 8 3 0 0 8 として寄託されている M V A - B N に由来する、上記 12 に記載の使用のための組み換え M V A。

14. 複数の腫瘍を有する対象での免疫応答を刺激する方法であって、少なくとも 1 つの、T A A をコードする第 1 の核酸と、4 - 1 - B B L をコードする第 2 の核酸とを含む組み換え M V A を、前記対象の全腫瘍数よりも少ない腫瘍に対して局所的に投与する工程を含み、前記対象において前記 T A A に対する免疫応答が刺激される、前記方法。

30

15. 少なくとも 1 つのアクセスできない腫瘍及び少なくとも 1 つのアクセス可能な腫瘍を有する対象を治療する方法であって、少なくとも 1 つの、T A A をコードする第 1 の核酸と、4 - 1 - B B L をコードする第 2 の核酸とを含む組み換え M V A を、前記対象の少なくとも 1 つのアクセス可能な腫瘍に対して局所的に投与することを含み、それにより、前記アクセスできない腫瘍の増殖を低下または停止させる、前記方法。

【実施例】

【0108】

以下の実施例は、本開示をさらに例示する役割を果たす。それらは、範囲が添付の特許請求の範囲によって決定される本発明を限定するものとして理解されるべきではない。

40

【0109】

実施例 1 : 材料及び方法

1.1 M V A 組み換え体の作製

M V A 組み換え体の作製を、以前に報告されているように行った [1]。M V A - B N (登録商標) は、B a v a r i a n N o r d i c によって作製されたが、それは E u r o p e a n C o l l e c t i o n o f C e l l C u l t u r e s (E C A C C) に寄託されている (V 0 0 0 8 3 0 0 8)。オボアルブミンを発現する組み換え M V A (M V A - O V A) の作製は以前に報告された [1、2]。4 - 1 B B L をコードする遺伝子が合成され (G e n e a r t , L i f e T e c h n o l o g i e s)、M V A - O V A ゲノム内にクローニングされ、M V A - O V A - 4 - 1 B B L が作製された。マウス白血

50

病ウイルス由来エンベロープ糖タンパク質 Gp70 をコードする遺伝子が合成され (Geneart, Life Technologies)、MVA 及び MVA-4-1BBL それぞれのゲノムにクローニングされ、MVA-Gp70 及び MVA-Gp70-4-1BBL が作製された。動物実験に使用されたウイルスはいずれも、スクロースクッションにより 2 回精製された。

【0110】

1.2 倫理に関する記述

動物実験は、Upper Bavaria 行政機関の動物倫理委員会 (Regierung von Oberbayern, Sachgebiet 54, Tierschutz) によって承認され、動物実験のための承認ガイドラインに従って Bavarian Nordic GmbH にて行われた。両側の CT26.WT 腫瘍実験は、を行った、CIMA, University of Navarra (Pamplona, Spain) にて、Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC) を遵守して行われた。

10

【0111】

1.3 マウス及び腫瘍細胞株

6~8 週齢の雌の C57BL/6J (H-2^b) マウス及び Balb/cJ (H-2^d) マウスを Janvier Labs から購入した。全マウスとも、Bavarian Nordic GmbH、University of Zurich、または University of Navarra の動物施設にて機関のガイドラインに従って取り扱い、給餌、飼育及び維持が行われた。

20

【0112】

B16.OVAメラノーマ細胞株は、Roman Sporri (University of Zurich) のご厚意により贈与された。B16.F10 (ATCC (登録商標) CRL-6475 (商標)) 及び CT26.WT (ATCC (登録商標) CRL-2638 (商標)) の細胞株を American Type Culture Collection (ATCC) から購入した。腫瘍細胞は、10% FCS、1% NEAA、1% ピルビン酸ナトリウム及び 1% ペニシリン/ストレプトマイシン (試薬はいずれも Gibco 製) を添加した DMEM Glutamax 培地で 37、5% CO₂ のインキュベーターで培養された。Bavarian Nordic で行われた実験に使用されたすべての腫瘍細胞株は、Mycoplasma 陰性について定期的に PCR で検査された。

30

【0113】

1.4 腫瘍細胞注射

マウスに、 5×10^5 の腫瘍細胞を側腹部に皮下注射した。B16.OVA 及び B16.F10 に関しては、注射の前に、細胞を 7 mg/ml のマトリゲル (Trevigen) と混合した。皮下の両側腫瘍実験の場合、 5×10^5 及び 1×10^5 の CT26.WT 腫瘍細胞をそれぞれ、右側腹部及び左側腹部に注射した。腫瘍再投与実験は、腫瘍消失時、3~6 か月の間に実施した。皮下再投与は、 5×10^5 の腫瘍細胞を使用して反対側の側腹部に行った。静脈内再投与は、 2×10^5 の CT26.WT 細胞を注射して実施した。

40

【0114】

1.5 免疫

腫瘍内注射は、それぞれの MVA 組み換え体を含む総体積 50 μ l を用いて固形腫瘍塊内に投与された。腫瘍分類後 0 日目、5 日目及び 8 日目に連続腫瘍内注射を実施し、縦の点線でグラフに示した。必要に応じ、末梢血免疫細胞の表現型決定のために、最終腫瘍内免疫から 3 日後に血液を採取した。

【0115】

1.6 細胞の分離

必要に応じ、マウスから脾臓及びリンパ節を採取した。脾臓及びリンパ節の単一細胞懸

50

濁液を、40 μ mセルストレーナー (Falcon) に通して機械的に破壊することによって調製した。脾臓試料を赤血球溶解 (Sigma-Aldrich) に供した。

【0116】

2% FCS、0.1% アジ化ナトリウム及び2.5 U/ml のヘパリンを含有するPBSに血液を採取した。赤血球溶解バッファーで赤血球を溶解させることによって末梢血単核細胞 (PBMC) を調製した。上述の器官からの単核球を洗浄し、RPMI + 2% FCSに再懸濁させて計数し、さらなる分析まで氷上で維持した。100 μ l のTrue Count計数用ビーズ (BD Biosciences) を腫瘍細胞懸濁液に加えた。

【0117】

1.7 ペプチド再刺激

必要に応じ、単核球を、2.5 μ g/ml のMHCクラスI拘束性ペプチド [OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINF EKL); p15E₆₀₄₋₆₁₁ (KSPWF T TL); AH16-14 (SPSYVYHQF)] と共にT細胞培地及び10 μ g/ml のBFA中で37、5% CO₂にて5~6時間インキュベートした。ペプチドをGenScriptから購入した。

【0118】

1.8 フローサイトメトリー

染色前に固定可能live/dead生存率キット (Life Technologies) を使用して、単核球懸濁液、BMDMまたは腫瘍細胞を暗所で4にて30分間染色した。BD Biosciences、eBioscienceまたはBiolegendからの抗体を使用して単核球を染色した。必要に応じ、H-2K^b OVA₂₅₇₋₂₆₄-デキストラマー (Immudex)、H-2K^b p15E₆₀₄₋₆₁₁-ペンタマー (ProImmune) またはH-2L^d AH16-14 ペンタマー (ProImmune) を使用して細胞懸濁液を染色した。FoxP3転写因子及びKi67の染色では、FoxP3 Staining Kit (eBioscience) を使用して細胞を固定した。細胞内サイトカイン染色では、IC Fixation & Permeabilization Stainingキット (eBioscience) を使用して、細胞内サイトカイン検出用に細胞懸濁液を染色及び固定した。デジタルフローサイトメーター (LSRII, BD Biosciences) を使用して全細胞について取得し、データをFlowJoソフトウェアバージョン10.3 (Tree Star) で分析した。

【0119】

1.9 MVA特異的DNAゲノムコピーの定量のための定量的リアルタイムPCR

QIAamp DNA Mini Kitを製造者の指示書に従って使用して (Qiagen) 組織からゲノムDNA (gDNA) を単離し、NanoVue分光光度計 (Biochrom) で定量した。簡潔に述べると、MVAの骨格DNA検出のための標的である、MVAのオープンリーディングフレーム082Lを発現するプラスミドを使用して、5 \times 10⁷ のゲノムコピー (gcs) で開始する標準曲線を作成した。次いで、特異的プライマーのMVA082Lセンス5' - acgttttagccgccttttaatagag-3'、MVA082Lアンチセンス5' - tggtcagaactatcgctcgttgg-3'、及びフルオレセインプローブ6FAM - aatcccaccgcctttctggatctc - BBQを使用してTaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo-Fisher) で定量的リアルタイムPCRを実施した。Real-time PCRシステム (Applied Biosystems) の7500ソフトウェアにより計算を実施した。ソフトウェアは、あらゆる標準の希釈、コントロール及び反復について閾値サイクル (C_T) を決定し、これは、特定のDNAの遺伝子コピー量の対数に反比例する。標準曲線に基づいて、ソフトウェアが、各反復について測定されるC_T値を使用して標的遺伝子のそれぞれの遺伝子コピー数を決定した。試料の量 (gcs) は、その複製決定値の平均量により計算される。

【0120】

1.10 統計解析

GraphPad Prismバージョン7.02 (Windows用) (GraphPad Software, La Jolla, CA) を使用して、図面の説明に記載のように統計解析を実施した。免疫学的データの場合、結果は「平均」及び「平均値の標準誤差」(SEM)として示されている。多重比較検定または片側の対応のない学生t検定のいずれかと共に分散分析(ANOVA)を使用して、処置群間の統計学的有意性を決定した。処置後の腫瘍担持マウスの生存率の場合、Log rank検定を実施して処置群間の統計学的有意性を決定した。

【0121】

実施例2: 4-1BBLは腫瘍内MVA免疫療法を強化する

ポックスウイルスのIT適用は抗腫瘍応答を効果的に誘導することが様々な腫瘍モデルで示されている[24~28]。しかしながら、これらの研究の大部分は複製型ウイルスを用いて行われている。ここでは、腫瘍関連抗原(上記で定義したTAA)及び共刺激分子4-1BBLをコードする非複製性ポックスウイルスMVAを使用する、確立された腫瘍の局所治療が、強力な抗腫瘍効果を与えるかどうかを検討した。

【0122】

TAAオボアルブミン(本明細書ではMVA-OVAと呼ぶ)をコードするMVAのIT注射は、確立されたB16.OVAメラノーマを担持するマウスの腫瘍増殖及び生存延長を制御した(図1のA及びB)。注目すべきことに、MVA-OVA-4-1BBLのIT投与は、B16.OVA腫瘍担持マウスの腫瘍拒絶を50%に増大させた(図1のB)。最終IT注射後の末梢血リンパ球(PBL)の分析から、局所MVA-OVA処置により誘発された、TAA特異的CD8⁺T細胞の全身性の増殖が、MVA-OVA-4-1BBLのIT投与によって増大したことが明らかになった(図2A)。

【0123】

次に、他の独立した、確立された腫瘍モデルを評価した。内在性レトロウイルス抗原Gp70をコードするMVA(本明細書ではMVA-Gp70と呼ぶ)のIT投与[29、30]は、B16.F10メラノーマにおいて抗腫瘍効果をもたらした(図1のC及びD)。興味深いことに、IT MVA-Gp70-4-1BBLは、腫瘍増殖制御を顕著に延長し、マウスの生存率を顕著に改善した(図1のC及びD)。同様の結果が、MVA-Gp70またはMVA-Gp70-4-1BBLによるIT免疫後のCT26.WT腫瘍担持マウスにおいて観察された(図1のE及びF)。MVA-Gp70-4-1BBLの局所投与は、80%超のCT26.WT腫瘍拒絶をもたらした。Gp70由来ペプチドによるPBLの再刺激では、B16.F10及びCT26.WTの腫瘍を担持するマウスそれぞれにおいて、MVA-Gp70-4-1BBL ITレジメン時、p15E(H-2K^b拘束性Gp70ペプチド)特異的及びAH1(H-2K^d拘束性Gp70ペプチド)特異的なCD8⁺T細胞によるインターフェロンガンマ(IFN- γ)の強い誘導が明らかになった(それぞれ図2B及び図2C)。注目すべきことに、MVA-OVA-4-1BBLまたはMVA-Gp70-4-1BBLのIT処置時に治癒したC57BL/6マウスの70%超が白斑を発症した(図2D及び図2E)。以上をまとめると、4-1BBLアジュバント添加MVAのIT投与は、使用した腫瘍抗原または腫瘍モデルの種類とは関係なく、MVA媒介性抗腫瘍免疫応答を増強させる。

【0124】

実施例3: IT注射MVAは腫瘍に局所化し、腫瘍微小環境(TME)の変化を誘導する

IT MVA注射後にT細胞がTdLNで急速に増殖することが確立されたことから、複製欠損MVAは注射部位にのみに存在するのか、または他の器官へ移行するのかという疑問が生じた。このことに対処するため、IT注射から6時間後の腫瘍、TdLN、NdLN、脾臓及び血液におけるMVA由来ゲノムDNA(gDNA)の存在を決定した。重要なことには、B16.F10腫瘍では大量にMVA gDNAが検出され、TdLNで出現は最小限であった(図3のA)。

【0125】

IT適用後、MVA感染は主に腫瘍に限定され、したがって、ウイルスにより誘導され

10

20

30

40

50

た抗腫瘍免疫応答は腫瘍を起源とする可能性が高いことが示された。このことから、MVA-TAA-4-1BBLのIT注射はTMEの変化を誘導する可能性があるという仮説を立てた。B16-OVA腫瘍へのMVAまたはMVA-OVAのIT注射では、PBSと比較して炎症誘発性分子IFN及びTNFのアップレギュレーションがもたらされた。この効果は、MVA-OVA-4-1BBLにより顕著に増大した(図3のB)。興味深いことに、IFN及びGM-CSF等のサイトカインがほぼ例外なく4-1BBLアジュバント添加MVAによって誘導された(図3のB)。

【0126】

複製型ウイルスは、感染した腫瘍細胞及び免疫細胞の死を誘導する[33~35]。MVA、MVA-TAAまたはMVA-TAA-4-1BBLによる感染は、インビトロでB16-OVA及びCT26.WTの腫瘍細胞の死を増強させた(図7のA)。MVAに選択的に感染することが示されているマクロファージ[36]は効果的に死滅し、それにより、この効果が4-1BBLアジュバントによって顕著に増大した(図7のA)。細胞死は、自然免疫細胞により感知されて免疫応答の開始に寄与する高移動度ボックス1(HMGB1)等の細胞内タンパク質の放出をもたらす[37、38]。4-1BBLとは関係なく、腫瘍細胞またはマクロファージのMVA感染後にHMGB1の顕著な増大が検出された(図7のB)。

【0127】

今回の結果は、MVAの局所注射がMVAにコードされた遺伝子のIT発現を生じさせ、TMEにおける炎症、感染細胞の細胞死、及び免疫原性メディエーターの放出の誘導をもたらしたことを示唆している。

【0128】

実施例4：局所MVA免疫療法は遠位未治療病変の腫瘍増殖を制御する

腫瘍指向性免疫療法の目的は、遠隔転移も根絶する全身性抗腫瘍免疫応答を生じさせることである。MVA-TAA-4-1BBLによる局所処置は、強い腫瘍特異的T細胞応答をTMEにおいて誘導しただけではなく、血液でもまた誘導したことから、次に、遠位腫瘍病巣に対するIT MVA免疫療法の全身性抗腫瘍能を評価した。CT26.WT腫瘍細胞をBalb/cマウスの左右の側腹部に皮下移植した(図4のA)。MVA-Gp70のIT注射は、PBSと比較して腫瘍増殖を遅延させた(図4のB及びC)。IT MVA-Gp70-4-1BBL注射は、10匹中7匹のCT26.WT腫瘍担持マウスに治療腫瘍の消失をもたらした(図4のD)。重要なことには、MVA-Gp70及びMVA-Gp70-4-1BBLの局所投与はいずれも腫瘍増殖遅延をもたらし、いくつかの症例では未治療腫瘍病変の完全な腫瘍消失をもたらした(図4のC及びD)。このデータは、IT MVA-Gp70-4-1BBL免疫療法による、遠位未治療腫瘍病変に対する抗腫瘍免疫応答の効果的な誘導を示している。

【0129】

実施例5：IT MVA-TAA-4-1BBL治療は、局所及び全身の腫瘍再投与からの防御を付与する

がんワクチンの主な目標の1つは、腫瘍再発を予防するための長期防御免疫記憶を達成することである。したがって、最初に、IT MVA-TAA-4-1BBLで誘導された抗腫瘍応答が、局所腫瘍再投与に対して防御する免疫記憶を生じさせるかどうかを評価した(図5A)。コントロールとして使用されたナイーブマウスでは腫瘍が急速に増殖し、一方それまで、IT MVA-OVA処置後に治癒していたマウスでは、再投与時の腫瘍再増殖の有病率が高かった。対照的に、それまでにIT MVA-OVA-4-1BBLを投与されていたマウスの80%では、二次腫瘍増殖に対して抵抗性であった(11匹中9匹)(図5B)。同様の結果が、MVA-Gp70-4-1BBL処置後に治癒してB16.F10細胞の局所再投与を受けたマウスで得られた。前処置されたマウスの60%は、B16.F10腫瘍細胞移植後、腫瘍がないままであった(図6のA)。したがって、IT MVA-TAA-4-1BBL治療は、局所腫瘍再投与に対する強い防御免疫記憶を誘導する。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 0 】

OVA特異的CD8⁺T細胞は、MVA-OVAではなくMVA-OVA-4-1BBによるIT処置後に腫瘍を拒絶したマウスで再投与の前にすぐに検出することができた(図5C)。腫瘍細胞注射から7日後、OVA特異的T細胞集団は顕著に増殖していたが、これは効果的腫瘍認識を示す(図5C)。脾細胞OVA₂₅₇₋₂₆₄ペプチド再刺激では、IT MVA-OVA-4-1BB療法は、複数サイトカインを産生する抗原特異的CD8⁺T細胞の大きな集団を誘導したことが示された(図5E)。腫瘍再投与後41日目の脾臓、血液、TdLN及びNdLNの分析から、分析されたすべての器官におけるOVA特異的CD8⁺T細胞の蓄積が明らかになった(図5D)。メモリーサブセット検査[31]から、OVA特異的TCM細胞はすべての器官にわたり等しく分布していた一方で、TEM細胞は血液、脾臓及びTdLNに主に見られたが、NdLNではみられなかったことが明らかになった(図5F)。次に、抗腫瘍免疫において重要な役割を果たすことが示されている組織常在型メモリーT細胞(TRM)を分析した[32、33]。際だったことに、TdLNのみに位置する常在型メモリーT細胞(TRM)の相当量の集団も検出することができた(図5F)[34]。同様に、血液中のp15E特異的CD8⁺T細胞は、IT MVA-Gp70-4-1BB処置時に原発B16.F10腫瘍が除去されたマウスへの再投与の前後で検出された(図6のB)。さらに、p15E特異的TCM、TEM及びTRM細胞を、B16.F10再投与後42日目に同定することができ(図6のC~E)、それによると、後者はTdLNのみで見られた(図6のE)。今回の結果は、IT MVA-TAA-4-1BB免疫療法が、TCM細胞、TEM細胞及びTRM細胞を包含する腫瘍特異的メモリーCD8⁺T細胞の多様な集団の誘導をもたらしたことを示している。

10

20

【 0 1 3 1 】

IT MVA-TAA-4-1BB注射は、局所の再発腫瘍及び未処置病変の制御を媒介する全身免疫応答を誘導した。我々は、IT MVA注射によって生じた腫瘍特異的T細胞記憶が、転移再発に対して防御するのではないかと推測した(図5G)。CT26.WT腫瘍細胞のIV注射後の肺での腫瘍小結節の肉眼的定量では、ナイーブマウスにおける複数病変の発症が示された。それまでにIT MVA-Gp70またはMVA-Gp70-4-1BBにより治癒したマウスの肺では肉眼的転移性病変は見られなかった(図5H)。T細胞分析から、MVA-Gp70-4-1BBで治癒したマウスにおける多機能性AH1特異的CD8⁺T細胞の集団が明らかになった(図5I)。

30

【 0 1 3 2 】

以上をまとめると、腫瘍抗原を共刺激分子4-1BBと共に発現するよう遺伝子が改変されたMVAを使用する局所免疫療法では、自然免疫及び適応免疫の活性化を併せることにより強い抗腫瘍活性が与えられる。これは、全身性抗腫瘍効果の誘導だけではなく、局所及び全身の腫瘍再投与に対して防御する強力な腫瘍特異的記憶応答の発生ももたらした。

【 0 1 3 3 】

実施例6：結果についてのさらなる考察

今回の研究では、腫瘍指向性ウイルス療法に対して新手法を用い、TAA及び共刺激分子4-1BBを発現するよう遺伝子改変された非複製性MVAを使用した。これは、MVAの優れた免疫刺激特性[12]とその高い安全性プロファイル[35]に、4-1BBの免疫活性化能[22]を併せ持つ。IT MVA-TAA-4-1BB注射は、一連の即時及び長期の免疫イベントを活性化させ、最終的に腫瘍根絶をもたらす。IT MVA治療による複数の炎症誘発性メディエーターの誘導は、腫瘍特異的T細胞の再活性化及び増殖を促進する、それまで免疫抑制性のTMEの根本的な変化を示す。治療効果にとっても、また原発腫瘍に対する局所及び全身の長期免疫記憶の形成にとっても必須の細胞傷害性抗腫瘍免疫応答の定性的及び定量的な著しい変化が、MVAにコードされた4-1BBにより誘発された。

40

【 0 1 3 4 】

50

非複製性MVAのIT注射が強力な治療的抗腫瘍効果を与えることが今回初めて示される。興味深いことに、MVAではなく熱非働化MVAのIT送達により、主に細胞傷害性T細胞の活性化に依存した強い抗腫瘍効果が誘導されたことが報告されている[25]。この研究とは対照的に、ここでは、追加で発現する4-1BBLがあるTAA及び追加で発現する4-1BBLがないTAAをコードする活性MVAを利用した。重要なことには、MVA-TAAは単独ですでに腫瘍増殖を遅延させるのに効果的であるが、4-1BBLとのアジュバント作用により治療効果が顕著に改善し、複数のモデル内の確立された腫瘍の拒絶をもたらした。さらに、抗腫瘍効果は腫瘍抗原の選択とは独立したものであった。モデル抗原OVAとは別に、内在性レトロウイルスタンパク質Gp70をそのTAAとしての免疫原性について検討した。内在性レトロウイルスエレメントは、健全な組織ではエピジェネティックに抑制されているが、様々ながんにおいて再活性化され、発現されている[36]。同様に、Gp70は、いくつかのマウス腫瘍細胞株で高発現している[37]。ヒトでは、これらの非コード領域が強力な免疫原性特性を有し、したがって、がん免疫療法の優れたTAA標的となるというエビデンスが増えている[38~40]。Gp70そのものの性質を考えると[41]、Gp70発現腫瘍モデルにおいてIT MVA-Gp70-4-1BBL療法により得られる強い治療効果は、局所MVA療法が、ネオアンチゲンを発現している腫瘍の拒絶を誘導するだけでなく、内在性自己抗原に対する寛容も破綻させることができることを示唆している。

【0135】

ITウイルス療法では、ウイルスにより誘導される炎症及び細胞死を、免疫抑制性TMEを変化させるという目的で使う[50]。この一連の事象が、抗腫瘍特異的免疫を増強させるであろう。同様に、今回のデータは、MVA感染が、腫瘍細胞死、ひいてはHMGB1の放出を促進し(図7のA、7B)、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスと同様であることを示す[51]。さらに、MVAのIT注射はTME内に強い炎症応答を誘発し、これに、MVA関連の複数のサイトカイン及びケモカインの誘導が伴った[52]。4-1BBLアジュバント添加MVAのIT適用では、B16.OVA腫瘍でのIFN及びGM-CSFの濃度が著しく増加した(図3のB)。これは、それらの分子の誘導が4-1BBシグナル伝達の下流にあることを示している。事実、MVA感染腫瘍細胞によるOVA特異的CD8⁺T細胞のインビトロでの活性化は、MVAにコードされた4-1BBLの存在下でのみ、大量のIFN及びGM-CSF産生をもたらした(図3のB)。IT rMVA投与時のTdLN及び他の器官における、MVAにコードされた抗原の分布及びT細胞プライミング能を検討した。IT注射後の異なる器官内のrMVAの局在について包括的分析を実施することにより、これに対処した。MVA gDNAは、大部分が腫瘍部位に限局していた。しかしながら、MVA gDNAは、腫瘍と比較するとかなり少ない量ではあるが、TdLNでも検出された。したがって、TdLNもまた、腫瘍特異的T細胞のプライミング部位としての役割を果たし得る。今回の結果は、MVAの足蹠への注射後にMVAが流入領域LNの傍皮質領域に局在化することを示す先の研究と一致している[42]。これと一致して、NdLNではタンパク質またはgDNAは見られなかった。

【0136】

腫瘍指向性免疫療法の重要な側面は、遠隔転移を根絶させ、長期腫瘍免疫を誘導する全身性抗腫瘍免疫応答を生じさせることである。ここでは、局所的MVA-TAA-4-1BBL処置が、TME内で免疫応答を誘発しただけではなく、血液中での全身性の抗原特異的CD8⁺T細胞応答ももたらされたことを示した。さらに、多くの個々の実験及び用いた異なるTAAにわたり、IT MVA-TAA-4-1BBL処置時にメラノマを拒絶したマウスは、白斑を発症した。白斑は、毛の色素を沈着させる皮膚のメラノサイトを標的とする自己反応性CD8⁺T細胞によって引き起こされる。これらの細胞がIT MVA-TAA-4-1BBLウイルス療法によって活性化されており、抗原拡散を介した可能性が高く、これは、最初に焦点を当てた、主要エピトープ特異的な免疫応答、例えば、Gp70またはOVAからの、エピトープ特異性の多様化を説明する現象である。腫瘍抗原拡散は、それによって抗腫瘍応答が拡大し、TAA消失による腫瘍エスケープの可

能性が阻止されるため、がん免疫療法の望ましい特徴である。

【0137】

さらに、両側腫瘍モデルから得られた今回のデータで、IT MVA-TAA-4-1 BBL注射が、未処置病変において顕著な抗腫瘍効果をもたらすことが明確に実証された。したがって、これらの結果は、局所MVA-TAA-4-1 BBL投与により誘発された抗腫瘍応答は、原発腫瘍に対するシステム全体の免疫に関連したことを強く示している。

【0138】

以前の抗原との遭遇の記憶を維持する免疫系の能力は、長期免疫の基本である。ここでは、IT MVA投与時に誘導される免疫記憶の成分を定義した。使用された腫瘍モデルまたはマウス系統にかかわらず、腫瘍消失から数か月後に血中TAA特異的CD8⁺T細胞がマウスで検出された。CD8⁺T細胞の頻度は、4-1 BBLアジュバント添加MVAを使用した場合に顕著に増加した。それまでにIT MVA-TAA-4-1 BBLにより治癒したマウスは、MVA-TAAで処置された治癒マウスよりもB16.OVAまたはB16.F10による皮下への腫瘍再投与に対して抵抗性であったことを見出した。それらのマウスからの組織の分析では、T細胞メモリーサブセットが、血中だけではなく複数の解剖学的部位でも見られること示されたことから、免疫監視が示唆された。抗原特異的なCD8⁺T_{CM}及びT_{EM}サブセットの頻度増加が、以前に4-1 BBLをコードするMVAの投与を受けた治癒マウスの局所腫瘍再投与後に脾臓及び血液において検出された。CD8エフェクター及びメモリーT細胞の増殖及び維持を増強させる際に、4-1 BBL/4-1 BBLシグナルが特に強力であることは十分に確立されている[43~45]。同様に、MVAにコードされた4-1 BBL共刺激は、腫瘍特異的細胞傷害性T細胞の活性化及びエフェクター機能を増強させ、それにより、強力で多様なメモリーコンパートメントの形成がもたらされた。

【0139】

血中CD8⁺T_{CM}及びT_{EM}サブセットに加え、常在型CD8⁺T_{RM}細胞は、抗腫瘍免疫で協同することが示されている[32、33、46]。興味深いことに、IT 4-1 BBLアジュバント添加MVAの後に治癒したマウスでは、B16.OVAまたはB16.F10の局所再投与後、TdLNにおいてのみ腫瘍特異的T_{RM}細胞の頻度増加が示された。CD8⁺T_{RM}細胞は組織で最初に同定されたが、それらはまた、抗原との再遭遇時にマウスの組織から遊走して流入領域LNに蓄積することもできる[34、46、47]。今回の結果と一致して、4-1 BBLは、鼻腔内免疫時、肺におけるインフルエンザ特異的CD8⁺T_{RM}のプールの確立を促進することが示されている[48]。ここでは、IT 4-1 BBLアジュバント添加MVAの際の、TdLNでの腫瘍特異的CD8⁺T_{RM}細胞の増殖と、局所二次腫瘍再投与に対する治癒マウスによる良好な反応との間の関係を仮定する。

【0140】

がんでは、メモリーCD8⁺T細胞は、分化または維持状態が最適下であること、及び慢性的に抗原に曝露されていることにより、機能不全にあることが多い[49]。この現象は、IL-2及びTNF α が分泌不能であることと関連している[50、51]。重要なことには、IT 4-1 BBLアジュバント添加MVAは能力の高いCD8⁺T細胞記憶プールを生じさせ、これが、試験したすべての再投与モデルにおいて、腫瘍抗原との再遭遇時に増殖し、IT MVAと比較して多量のIFN γ 、TNF α 及びIL-2を産生した。

【0141】

要約すると、4-1 BBLと併せて腫瘍抗原を発現する非複製性MVAの局所注射に基づいた、新規の治療プラットフォームをここに記載する。ITウイルス注射は、TMEに重度の炎症誘発性の変化を誘導し、腫瘍特異的CD8⁺T細胞の再活性化及び増殖をもたらした。さらに、局所及び全身の腫瘍再投与から防御する多様なCD8⁺T細胞メモリー集団の発生が実証された。MVAの優れた安全性プロファイルと合わせると、今回の前臨床データは、臨床でこの手法を検討することの強い根拠を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 2 】

最終所見：本明細書の本文全体を通していくつかの文書が引用されている。本明細書で引用した文書の各々（すべての特許、特許出願、科学刊行物、製造者の仕様書、指示書等を含む）は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。参照により組み込まれる材料が矛盾するかまたは本明細書と一致しない範囲において、そのようないかなる材料にも本明細書が優先する。本明細書のいかなる記載も、本発明が先行発明を理由としてかかる開示に先行する権利がないことを承認すると解釈されるべきではない。

【 0 1 4 3 】

実施例 7：医学的使用のための M V A 組み換え体

7.1 M V A 組み換え体の構築

本開示の要素を実現させる組み換え M V A ウイルスの作製は、示されている導入遺伝子を、かかる導入遺伝子のプロモーターと共にベクター M V A - B N に挿入することによって行った。導入遺伝子は、導入遺伝子及び選択カセット、ならびに M V A - B N 内の標的座位と相同な配列を含有する、組み換えプラスミドを用いて挿入された。ウイルスゲノムと組み換えプラスミド間の相同組み換えは、M V A - B N に感染させた C E F 細胞への組み換えプラスミドのトランスフェクションによって達成した。選択カセットをその後、第 2 の工程中に除去したが、その際、選択カセットを挟んでいる 1 0 × P 部位を特異的に標的として介在配列を切り出す C R E リコンビナーゼを発現しているプラスミドを利用した。別法として、選択カセットの除去を、M V A 由来の内部反復配列を用いた M V A を介した組み換えによって達成した。

【 0 1 4 4 】

組み換え M V A - m B N ウイルスの作製の際には、C E F 細胞培養物にそれぞれ M V A - B N を接種し、それぞれに、対応する組み換えプラスミドをトランスフェクトした。次に、これらの細胞培養物からの試料を、選択圧をかける薬物を含有する培地中の C E F 培養物に接種し、蛍光を発現しているウイルスクローンをブランク精製によって単離した。これらのウイルスクローンからの蛍光タンパク質含有選択カセットの欠失は、第 2 の工程において、各コンストラクトでの選択カセットを挟んでいる 2 つの 1 0 × P 部位を含む C R E を介した組み換え、または M V A を介した内部組み換えによって媒介された。第 2 の組み換え工程後、M V A - B N の標的座位に挿入された導入遺伝子配列（例えば、4 - 1 B B L）及びそのプロモーターのみを保持した。選択カセットを欠くブランク精製済みウイルスのストックを調製した。同定導入遺伝子の発現は、記載されているコンストラクトを接種した細胞で実証される。

【 0 1 4 5 】

7.2 H E R V - K 抗原を含む組み換え M V A

M V A に基づくベクター（「M V A - H E R V - P r a m e - F O L R 1 - 4 - 1 - B B L - C D 4 0 L」とも呼ばれる「M V A - m B N 4 8 9」）は、ヒト内在性レトロウイルス K スーパーファミリータンパク質（H E R V - K）、具体的には、E R V - K - e n v 及び E R V - K - g a g である T A A を含めて設計された。M V A はまた、ヒトの F O L R 1 及び P R A M E をコードするよう、また h 4 - 1 B B L 及び h C D 4 0 L を発現するようにも設計された。

【 0 1 4 6 】

同様の「M V A - H E R V - P r a m e - F O L R 1 - 4 - 1 - B B L」と呼ばれる M V A に基づくベクターは、T A A E R V - K - e n v 及び E R V - K - g a g ならびにヒトの F O L R 1 及び P R A M E を発現するよう、また h 4 - 1 B B L を発現するよう設計された。具体的には、ベクター「M V A - B N - 4 I T」（「M V A - m B N 4 9 4」または「M V A - H E R V - F O L R 1 - P R A M E - h 4 - 1 - B B L」）は、図 8 A に概略的に例示されている。エンベロープ（e n v）タンパク質及び群特異抗原（g a g）タンパク質をコードする H E R V - K 遺伝子は通常、健全なヒト組織では休眠状態であるが、多くの腫瘍で活性化されている。F O L R 1 及び P R A M E は、乳癌及び卵巣癌の細胞において特異的にアップレギュレートされる遺伝子である。共刺激分子 4 - 1 - B B L

10

20

30

40

50

の追加発現は、TAAに対する免疫応答を増強させることを意図している。

【0147】

「MVA-HERV-Prme-FOLR-CD40Lと呼ばれる別のMVAに基づくベクターは、TAAERV-K-env及びERV-K-gagならびにヒトのFOLR1及びPRAMEを発現するよう、またhCD40Lを発現するよう設計された。これらのコンストラクトの各々は、本発明の方法において有用である。

【0148】

例示的配列は当該技術分野で既知であり、また提供されている配列表にも記載されている。関連するMVAに対して必要な機能を提供する限り、どの配列も本発明の組成物及び方法に使用することができる。

【0149】

上記のERV-K-env及びgagの配列では、少なくとも10の代表的配列からアミノ酸コンセンサス配列が生成され、以下に示すように、潜在的な免疫抑制ドメインが変異により不活性化され、部分的に免疫優勢T細胞エピトープHERV-K-melに置き換えられた。好適な配列は、配列番号5(ERV-K-gag合成タンパク質コンセンサス配列)、配列番号6(ERV-K-gag合成ヌクレオチド配列)、配列番号7(ERV-K-env/MEL合成タンパク質配列)、及び配列番号8(ERV-K-env/MELヌクレオチド配列)に記載されている。

【0150】

【化1】

MNPSEMQRKAPRRRRHRNRAPLTHKMNKMTSEEQMKLPSTKKAEPPTWAQLKKLTLQL
 ATKYLENTKVTQTPESMLLAALMIVSMVVSLPMPAGAAAANYTYWAYVPFPPMIRAVTWMD
 NPIEVYVNDVWVPGPIDDRCPAKPEEEGMMINISIGYRYPPICLGRAPGCLMPAVQNWLVE
 VPTVSPISRFTYHMVSGMSLRPRVNYLQDFSYQRSLKFRPKGKPCPKEIPKESKNTEVLVW
 EECVANSAVILQNNFGTIIDWAPRGQFYHNCSGQTQSCPSAQVSPAVIDSLTESLDKHKH
 KKLQSFYPWEWGEKGIPTPRPKIISPVSGPEHPELWRLTVASHHIRIWSGNQTLERDRKPF
 YTVDLNSSLTVPLQSCVKPPYMLVVGNIKIPDSQTITCENCRLTICIDSTFNWQHRILLVRAR
 EGVWIPVSMDRPWEASPSVHILTEVLKGVLNRSKRIFITLIIVIMGLIAVTATAAVAGVALHSS
 VQSVNFVNDWQKNSTRLLWNSQSSIDQKMLAVISCAVQTVIWMGDRLMSLEHRFQLQCDW
 NTSDFCITPQIYNESEHHWDMVRRHLQGREDNLTLDISKLKEQIFEASKAHLNLVPGTEAIG
 VADGLANLNPVTWVKTIGSTTIINLILVCLFCLLLVCRCTQQLRRDSDHRERAMMTMAVLSK
 RKGGNVGGKSKRDQIVTVSV

【0151】

ERV-K-envの改変コンセンサスアミノ酸(上記)の配列:

潜在的な免疫抑制ドメインは変異により不活性化された。導入された変異により、免疫抑制ドメインのかなりの部分が免疫優勢T細胞エピトープHERV-K-melに置き換えられる。

【0152】

これらのMVAのうちいくつかでは、hFOLR1及びPRAMEは、融合タンパク質として産生されるよう設計された。FOLR1(葉酸受容体アルファ)は、葉酸受容体のファミリーに属する。これは、葉酸及びその誘導体に対する高親和性を有し、膜タンパク質として分泌されるかまたは細胞表面に発現される。膜貫通タンパク質は、GPI(グリコシルホスファチジルイノシトール)アンカーを介して原形質膜に係留されており、タンパク質のC末端領域のセリン(Ser)残基を介して小胞体(ER)内で結合している可能性が高い。GPI-アンカーによるFOLR1の修飾と、ERでのhFOLR1-hPRAME融合タンパク質の完全なプロセッシングを回避するため、アミノ酸の234から257までのC末端領域(Ser残基を含む)を欠失させた。

【 0 1 5 3 】

PRAME (メラノーマ優先発現抗原) は、転写調節因子タンパク質である。これは、ヒトメラノーマの抗原として最初に報告され、自己細胞傷害性のT細胞媒介性免疫応答を引き起こし、様々な固形がん及び血液がんで発現する。PRAMEは、レチノイン酸受容体への結合を介してレチノイン酸シグナル伝達を阻害し、それにより、がん細胞に増殖優位性を提供し得る。PRAMEの機能性には核局在化を必要とするため、PRAMEの潜在的な核局在化シグナル(NLS)を、hFOLR1-hPRAME融合タンパク質の標的変異によって改変した。

【 0 1 5 4 】

したがって、hFOLR1-hPRAME融合タンパク質のアミノ酸配列では、FOLR1を、C末端のGPIアンカーシグナルを欠失させることにより改変し、PRAMEでは、2つの潜在的な核局在化シグナルをアミノ酸置換により不活性化させた。この融合タンパク質では、hFOLR1のN末端シグナル配列は、PRAMEの核局在化を回避するための追加的保護機構として働くよう、融合タンパク質のER指向性及び不完全プロセッシングをもたらすはずである。

10

【 0 1 5 5 】

ヒトFOLR1及びヒトPRAMEのタンパク質配列はそれぞれ、NCBI参照配列NP__000793.1及びNP__001278644.1に基づいた。上記の改変に加え、融合タンパク質のヌクレオチド配列をヒトのコドン使用について最適化し、ポリヌクレオチド区間、反復エレメント、及び負のシス作用エレメントを除去した。なお、ヌクレオチド配列は、配列番号10(「hFOLR1__hPRAME融合」ヌクレオチド配列)に記載され、融合タンパク質配列は、配列番号9に記載されている。

20

【 0 1 5 6 】

【化2】

MAQRMTTQLLLLLVVAVVGEAQTRIAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPW
RKNACCSTNTSQEAHKDVSYLRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIIQV
DQSWRKERVNLNPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGNWWTSGFNKCAVGAACQP
FHFYFPTPTVLCNEIWTSHYSKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAM**SGAG**
PWAAWPFLLSLALMLLWLLSMERRRLWGSIQSRYISMSVWTSRRLVELAGQSLLKDEAL
AIAALELLPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQAWPFTCLPLGLVLMKGQHLHLETFKAVLD
GLDVLLAQEVRPRRWKLQVLDLRKNSHQDFWTVWSGNRSLSYFPEPEAAQPMTTKAKV
DGLSTEAEQPFIPVEVLVDLFLKEGACDELFSYLIEKVAAKKNVLR**LCKKLIKAMPMDIK**
MILKMVQLDSIEDLEVTCTWKLPTLAKFSPYLGQMINLRLLLLSHIHASSYISPEKEEQYIAQF
TSQFLSLQCLQALYVDSLFFLRGRLDQLLRHVMNPLETLSITNCRLSEGDMHLSQSPSVSQ
LSVLSLSGVMLTDVSPEPLQALLERASATLQDLVFDECGITDDQLLALLPSLSHCSQLTTLSF
YGNSISISALQSLLOHLIGLSNLTHVLYPVPLESYEDIHGTLHLERLAYLHARLRELLCELGRP
SMVWLSANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCFMPN

30

40

【 0 1 5 7 】

hFOLR1-hPRAME融合タンパク質(上記)の配列:

改変ヒトFOLR1(N末端部)とPRAME(C末端部)の融合体であるhFOLR1-hPRAME融合タンパク質のアミノ酸配列。FOLR1は、C末端のGPIアンカーシグナルを欠失させることにより改変されている(取り消し線文字)。PRAME(下線付き文字)では、開始メチオニンを欠失させ、2つの潜在的な核局在化シグナルをアミノ酸置換により不活性化させた(太字、下線付き文字)。

【 0 1 5 8 】

このMVAに使用した膜結合型ヒト4-1BBLのタンパク質配列は、NCBI参照配列NP__003802.1と100%の同一性を示し、使用された膜結合型ヒトCD40

50

Lのタンパク質配列は、NCBI参照配列NP_000065.1と100%の同一性を示す。4-1BBL及びCD40Lいずれの場合も、ヌクレオチド配列をヒトのコドン使用について最適化し、ポリヌクレオチド区間、反復エレメント、及び負のシス作用エレメントを除去した。

【0159】

NCBI参照配列NP_000065.1からのhCD40Lのアミノ酸配列は配列番号1に記載されており、hCD40Lのヌクレオチド配列は配列番号2に記載されている。NCBI参照配列NP_003802.1からのh4-1BBLのアミノ酸配列は配列番号3に記載されており、h4-1BBLのヌクレオチド配列は配列番号4に記載されている。

10

【0160】

各コード領域は、ERV-K-gag及びh4-1BBLがいずれもPr1328プロモーターの制御下に置かれた以外は、異なるプロモーターの制御下に置かれた。Pr1328プロモーター(100bpの長さ)は、ワクシニアウイルスプロモーターPrB2Rの正確なホモログである。これは、前初期の強い発現及び後期の低レベルでの発現を誘導する。組み換えMVA-mBN489では、Pr13.5長プロモーターがERVK-env/MELの発現を誘導する。このプロモーターは、天然MVA13.5L遺伝子の発現を誘導する014L/13.5L間の124bpの遺伝子間領域を含み、2つの初期プロモーターコア配列によって生じる非常に強い初期発現を示す(Wennier et al. (2013) PLoS One 8(8): e73511を参照のこと)。ここでhCD40Lの発現を誘導するために用いたMVA1-40kプロモーターは、ワクシニアウイルスWyethのHind III H領域から161bpの断片として1986年に最初に単離された。これは、158bpのワクシニアウイルスWyeth、及び後期遺伝子転写因子VLTf-4を誘導する094L/095Rの遺伝子間領域内のMVAゲノムを含む。ここでhFOLR1-hPRAME融合タンパク質の発現を誘導するために用いたプロモーターPrH5mは、ワクシニアウイルスH5遺伝子プロモーターの改変型である。これは、強い初期及び後期エレメントからなり、組み換えMVAの感染の初期及び後期の両段階における発現をもたらす(Wyatt et al. (1996) Vaccine 14: 1451-58を参照のこと)。

20

【0161】

MVA-mBN494に基づいて(上記を参照のこと)、ERVK-env/MELに改変が含有されるよう、さらに別のベクターが設計された。得られたベクターは「MVA-mBN502」と呼ばれ、図9のCに概略的に例示されている。MVA-mBN502はまた、改変ERVK-env/MELに加え、ERVK-gag、hFOLR1-hPRAME融合タンパク質、及びh4-1BBLもコードする。

30

【0162】

本来、HERV-K-envは、翻訳後に切断されるシグナルペプチド、表面(SU)及び膜貫通ユニット(TM)からなる。2つのドメインへの切断は、細胞のプロテアーゼにより達成される。RSKR切断モチーフは、全長90kDaのタンパク質を切断してSU(およそ60kDa)ドメインとTM(およそ40kDa)ドメインにするのに必要かつ十分である。上記のMVA-mBN494の調製についての記載のように、少なくとも10の代表的配列に由来するenvのアミノ酸コンセンサス配列が生成され、TMの潜在的な免疫抑制ドメインが変異によって不活性化された。導入された変異により、免疫抑制ドメインのかなりの部分が免疫優勢T細胞エピトープHERV-K-melに置き換えられた。この導入遺伝子(MVA-mBN494に使用)をERVK-env/MELと命名した(図9のA)。

40

【0163】

MVA-mBN494と比較して、ERVK-env/MELのTMドメインは、MVA-mBN502では欠失している。このERVK-env/MELバリエーションを「ERVK-env/MEL_03」と呼ぶことにし、欠失させたRSKRフューリン切断部位

50

を除くSUドメイン全体で構成されている。MELペプチドをC末端に挿入し、続けてTMドメインの6つのアミノ酸（疎水性の強い融合ペプチド配列を除外）を挿入した。さらに、この改変ERVK-env/MELを、ヒトPDGF（血小板由来増殖因子）受容体に由来する膜アンカーを付加することにより原形質膜に指向させた。この膜アンカーを、可動性のグリシン含有リンカーを介してSUドメインに結合させた（図9のB）。得られたERVK-env/MELバリエント、すなわち、ERVK-env/MEL__03は、MVA-mBN502に含有されている（図9のC）。バリエントの好適な配列は、配列番号11（ERV-K-env/MEL__03合成タンパク質配列）及び配列番号12（ERV-K-env/MEL__03ヌクレオチド配列）に記載されている。

【0164】

7.3 MVA-HERV-FOLR1-PRAME-h4-1-BBL(MVA-BN-4IT)の生物活性

MVA-BN-4IT（すなわち、MVA-HERV-FOLR1-PRAME-h4-1-BBL；上記も参照のこと）による感染が、ヒト細胞でのHLA分子によるワクチン由来腫瘍抗原の提示をもたらすかどうかを調べた。このために、抗原提示細胞上のHLA-ABCペプチド複合体を免疫沈降させ、質量分析法により同定することができるのはどちらのHLA結合ペプチドなのかを分析した。

【0165】

抗原はHLAクラスIに搭載され得るため(Nyambura L. et al. J. Immunol 2016)、まず、ヒト単核球細胞株THP-1を、抗原提示能を示すマクロファージに分化させた(Daignault et al. PLoS One, 2010)。事実、THP-1細胞は、米国及び欧州で最も頻度が高いハプロタイプの1つである(集団の約30%)HLA-A*0201⁺を発現する。HLA-A*02:01:01Gとは別に、THP-1細胞は、HLA-B*15及びHLA-C*03を発現するという報告があった(Battle R. et al., Int. J. of Cancer)。ここでは、 8×10^5 /mlのTHP-1細胞を、200ng/mlのPMA(ホルボール-12-ミリストート-13-アセタート)の存在下で3日間培養してから培地を交換し、細胞を、PMAの非存在下でさらに2日間培養した。5日目、細胞に、4のInfU(感染単位)のMVA-BN-4ITを12時間感染させた。図8Bに示されるように、HERVK-env/MEL、HERVK-gag及び融合タンパク質FOLR1-PRAMEは、THP-1細胞のMVA-BN-4IT感染後に発現された(図8Bの「mBN494」)。対照的に、非感染THP-1細胞では抗原は内因性発現されなかった(図8Bの「ctr」)。

【0166】

次に、「ProPresent」HLA-ABCリガンドーム分析(ProImmune)を実施した。MVA-BN-4IT感染細胞では、4つの腫瘍抗原由来ペプチド、すなわち、HERV-KenvペプチドILTEVLKGV、HERV-KgagペプチドYLSFIKILL及びPRAMEペプチドのALQSLQLHL及びSLLQLHIGLが同定された。同定された2つのPRAMEペプチドは大部分が重複しており、共通のコアエピトープを共有している可能性が高い。どちらのペプチドも、HLA-A*02:01に非常に強く結合することが予測されているため、ALQSLQLHLは、結合順位がHLA-B*15とほぼ同様である。注目すべきことに、PRAMEペプチドSLLQLHIGLは、ヒトにおいて、免疫原性HLA-A*0201に提示される細胞傷害性Tリンパ球エピトープとしてすでに報告されている(Kessler JH. et al., J Exp Med., 2001)。勘案すると、データから、MVA-BN-4ITにより発現された抗原は、感染細胞のHLAに取り込まれ得ることが示されている。

【0167】

さらに、MVA-BN-4ITが、4-1-BBLを、その受容体である4-1-BBに結合する機能形態で発現する能力について試験した。その目的のため、市販キット(「4-1BB Bioassay」、Promega)を使用した。アッセイは、h4-

10

20

30

40

50

1 - B Bを発現している遺伝子操作されたJurkat T細胞株、及び4 - 1 - B Bリガンド刺激に応答することができる応答エレメント (R E) により駆動されるルシフェラーゼレポーターからなる。h 4 - 1 - B Bがh 4 - 1 - B B Lによって刺激されると、R Eは、細胞内部での細胞ルシフェラーゼ産生を活性化させる。細胞を溶解させ、「B i o - G l o」試薬 (P r o m e g a) を添加した後、ルミノメーターを使用して発光を測定し、定量する。簡潔に述べると、H e L a細胞を播種し (1×10^6)、それぞれに、図8 Cに示すM V Aに基づくコンストラクトを感染させ ($T C I D_{50} = 2$)、一晚 (37、5 % $C O_2$) 培養した後、J u r k a t - h 4 - 1 - B B細胞と共に (H e L a : J u r k a t = 4 : 1の比) 6時間共培養した。F cと架橋させたH i sタグ付きh 4 - 1 B B Lを参照 (陽性コントロール) として使用し、1 $\mu g / m l$ の架橋h 4 - 1 B B Lと共に培養したJ u r k a t - h 4 - 1 B B細胞によるルシフェラーゼ発現を1に設定した (図8 C、点線)。M V A - B N (すなわち、h 4 - 1 - B B Lをコードしない) を骨格コントロールとして使用した。図8 Cに示されるように、h 4 - 1 - B B Lを発現しているM V Aに基づくベクターで感染させたH e L a細胞では、参照と比較して (共培養J u r k a t - h 4 - 1 - B B細胞により) 6倍高いルシフェラーゼ産生が誘導された。注目すべきことに、M V A - B N - 4 I Tにより媒介されたルシフェラーゼ産生は、M V Aベクターを発現している他の2つのh 4 - 1 - B B Lにより媒介されたものよりもさらに高かった。したがって、M V A - m B N 4 9 4は、自身の4 - 1 B B受容体に効果的に結合する機能性h 4 - 1 - B B Lを発現する。

10

【 0 1 6 8 】

20

配列表

添付の配列表に列挙されている核酸配列及びアミノ酸配列は、米国特許法施行規則 1 . 8 2 2 に定義されているように、ヌクレオチド塩基については標準的な略号を、またアミノ酸については1文字表記または3文字表記のいずれかを用いて示されている。各核酸配列の1本の鎖のみが示されているが、表示されている鎖へのいかなる言及によっても、その相補鎖が含まれると理解される。

配列表中の配列 :

配列番号 1 : N C B I 参照配列 N P _ 0 0 0 0 6 5 . 1 からの h C D 4 0 L のアミノ酸配列。 (2 6 1 アミノ酸)

配列番号 2 : N C B I 参照配列 N P _ 0 0 0 0 6 5 . 1 からの h C D 4 0 L (7 9 2 ヌクレオチド)

30

配列番号 3 : N C B I 参照配列 N P _ 0 0 3 8 0 2 . 1 からの h 4 - 1 B B L (2 5 4 アミノ酸)

配列番号 4 : N C B I 参照配列 N P _ 0 0 3 8 0 2 . 1 からの h 4 - 1 B B L

配列番号 5 : E R V - K - g a g (6 6 6 アミノ酸) の合成コンセンサス配列

配列番号 6 : E R V - K - g a g ; ヌクレオチド配列

配列番号 7 : E R V - K - e n v / M E L (6 9 9 アミノ酸) の合成配列

配列番号 8 : E R V - K - e n v / M E L のヌクレオチド配列

配列番号 9 : h F O L R 1 _ _ h P R A M E 融合体 (7 4 1 アミノ酸)

配列番号 1 0 : h F O L R 1 _ _ h P R A M E 融合体 (7 4 1 アミノ酸) のヌクレオチド配列

40

配列番号 1 1 : E R V - K - e n v / M E L _ _ 0 3 (5 1 7 アミノ酸) の合成配列

配列番号 1 2 : E R V - K - e n v / M E L _ _ 0 3 のヌクレオチド配列

【 0 1 6 9 】

配列番号 1

N C B I 参照配列 N P _ 0 0 0 0 6 5 . 1 からの h C D 4 0 L 。 (2 6 1 アミノ酸)

M I E T Y N Q T S P R S A A T G L P I S M K I F M Y L L T V F L I T Q M I G S A
L F A V Y L H R R L D K I E D E R N L H E D F V F M K T I Q R C N T G E R S L S
L L N C E E I K S Q F E G F V K D I M L N K E E T K K E N S F E M Q K G D Q N P
Q I A A H V I S E A S S K T T S V L Q W A E K G Y Y T M S N N L V T L E N G K Q

50

L T V K R Q G L Y Y I Y A Q V T F C S N R E A S S Q A P F I A S L C L K S P G R
F E R I L L R A A N T H S S A K P C G Q Q S I H L G G V F E L Q P G A S V F V N
V T D P S Q V S H G T G F T S F G L L K L

【0170】

配列番号2

N C B I 参照配列 N P _ 0 0 0 0 6 5 . 1 . からの h C D 4 0 L。(792ヌクレオチド)

ヌクレオチド配列:

a t g a t c g a g a c a t a c a a c c a g a c a a g c c c t a g a a g c g c c g
c c a c a g g a c t g c c t a t c a g c a t g a a g a t c t t c a t g t a c c t
g c t g a c c g t g t t c c t g a t c a c c c a g a t g a t c g g c a g c g c c
c t g t t t g c c g t g t a c c t g c a c a g a c g g c t g g a c a a g a t c g
a g g a c g a g a g a a a c c t g c a c g a g g a c t t c g t g t t c a t g a a
g a c c a t c c a g c g g t g c a a c a c c g g c g a g a g a a g t c t g a g c
c t g c t g a a c t g c g a g g a a a t c a a g a g c c a g t t c g a g g g c t
t c g t g a a g g a c a t c a t g c t g a a c a a a g a g g a a a c g a a g a a
a g a g a a c t c c t t c g a g a t g c a g a a g g g c g a c c a g a a t c c t
c a g a t c g c c g c t c a c g t g a t c a g c g a g g c c a g c a g c a a g a
c a a c a a g c g t g c t g c a g t g g g c c g a g a a g g g c t a c t a c a c
c a t g a g c a a c a a c c t g g t c a c c c t g g a g a a c g g c a a g c a g
c t g a c a g t g a a g c g g c a g g g c c t g t a c t a c a t c t a c g c c c
a a g t g a c c t t c t g c a g c a a c a g a g a g g c c a g c t c t c a g g c
t c c t t t c a t c g c c a g c c t g t g c c t g a a g t c t c c t g g c a g a
t t c g a g c g g a t t c t g c t g a g a g c c g c c a a c a c a c a c a g c a
g c g c c a a a c c t t g t g g c c a g c a g t c t a t t c a c c t c g g c g g
a g t g t t t g a g c t g c a g c c t g g c g c a a g c g t g t t c g t g a a t
g t g a c a g a c c c t a g c c a g g t g t c c c a c g g c a c c g g c t t t a
c a t c t t t c g g a c t g c t g a a g c t g t g a t g a t a g

10

20

【0171】

配列番号3

N C B I 参照配列 N P _ 0 0 3 8 0 2 . 1 . からの h 4 - 1 B B L (254アミノ酸)

M E Y A S D A S L D P E A P W P P A P R A R A C R V L P W A L V A G L L L L L L
L A A A C A V F L A C P W A V S G A R A S P G S A A S P R L R E G P E L S P D D
P A G L L D L R Q G M F A Q L V A Q N V L L I D G P L S W Y S D P G L A G V S L
T G G L S Y K E D T K E L V V A K A G V Y Y V F F Q L E L R R V V A G E G S G S
V S L A L H L Q P L R S A A G A A A L A L T V D L P P A S S E A R N S A F G F Q
G R L L H L S A G Q R L G V H L H T E A R A R H A W Q L T Q G A T V L G L F R V
T P E I P A G L P S P R S E

30

【0172】

配列番号4

N C B I 参照配列 N P _ 0 0 3 8 0 2 . 1 からの h 4 - 1 B B L。

ヌクレオチド配列:

a t g g a a t a c g c c a g c g a c g c c t c t c t g g a c c c t g a a g c t c
c t t g g c c t c c a g c t c c t a g a g c c a g g g c t t g t a g a g t g c t
g c c t t g g g c t c t t g t g g c t g g a c t t c t g c t t c t g t t g c t c
c t g g c t g c t g c c t g c g c a g t g t t t c t t g c t t g t c c a t g g g
c t g t g t c a g g a g c c a g a g c a t c t c c t g g a t c t g c c g c t t c
t c c c a g a c t g a g a g a g g g a c c t g a a c t g a g c c c t g a t g a t
c c t g c t g g a c t g c t c g a c c t g a g a c a g g g c a t g t t t g c c c
a g c t g g t g g c c c a g a a t g t g c t g c t g a t t g a t g g c c c t c t
g a g c t g g t a c a g c g a t c c t g g a c t t g c t g g c g t t a g c c t g

40

50

a c t g g a g g c c t g a g c t a c a a g g a g g a c a c c a a a g a a c t g g
t g g t g g c c a a g g c t g g c g t g t a c t a c g t g t t c t t t c a g c t
g g a a c t g c g g a g a g t g g t g g c a g g c g a a g g a t c t g g a t c c
g t g t c t c t g g c a c t g c a t c t g c a g c c t c t g a g a t c t g c t g
c t g g t g c a g c t g c c c t g g c t c t g a c a g t t g a t c t g c c t c c
t g c c t c c a g c g a a g c c a g a a a c a g c g c c t t t g g c t t c c a a
g g c a g a c t g c t g c a c c t g t c t g c t g g c c a g a g a c t g g g a g
t g c a c c t c c a c a c a g a a g c a a g a g c a a g a c a c g c c t g g c a
g c t t a c a c a a g g c g c t a c a g t g c t g g g c c t g t t c a g a g t g
a c a c c t g a g a t t c c a g c t g g c t t g c c a t c t c c t c g c a g c g
a g t a a t g a

10

【0173】

配列番号5

ERV - K - env / MEL (699アミノ酸)

MNPSEMQRKAPPRRRRHRNRAPLTHKMNKMTSEEQMKLP
STKKAEPPTWAQLKKLTQLATKYLENTKVTQTPESMLLAA
LMIVSMVVS L PMPAGAAAANYTYWAYVPFPPIRAVTWMD
NPIEVYVND SVWVPGPIDDRCPAKPEEEGMMINISIGYRY
PPICLGRAPGCLMPAVQNWLV E V P T V S P I S R F T Y H M V S G M
SLRPRVNYLQDFS Y Q R S L K F R P K G K P C P K E I P K E S K N T E V
LVWEECVANS AV I L Q N N E F G T I I D W A P R G Q F Y H N C S G Q T Q
SCPSA Q V S P A V D S D L T E S L D K H K H K K L Q S F Y P W E W G E K G I
STPRPKIISPVS G P E H P E L W R L T V A S H H I R I W S G N Q T L E T
RDRKPFYTV D L N S S L T V P L Q S C V K P P Y M L V V G N I V I K P D S
QTITCENC R L L T C I D S T F N W Q H R I L L V R A R E G V W I P V S M D
RPWEASPSV H I L T E V L K G V L N R S K R F I F T L I A V I M G L I A V
TATAAVAGVALHSSVQSVNFVNDWQKNSTR L W N S Q S S I D Q
KMLAVISCAVQTVIWMGDR L M S L E H R F Q L Q C D W N T S D F C I
TPQIYNESEHHWDMVRRHLQGREDNLTLDISK L K E Q I F E A
SKAHLN L V P G T E A I A G V A D G L A N L N P V T W V K T I G S T T I I N
L I L I L V C L F C L L L V C R C T Q Q L R R D S D H R E R A M M T M A V L S K
R K G G N V G K S K R D Q I V T V S V

20

30

【0174】

配列番号6

ERV - K - env / MEL

ヌクレオチド配列

a t g a a c c c t a g c g a g a t g c a g a g a a a g g c t c c a c c t a g a c
g g a g a a g a c a c a g a a a c a g g g c t c c t c t g a c a c a c a a g a t
g a a c a a g a t g g t c a c c a g c g a g g a a c a g a t g a a a c t g c c c
a g c a c c a a g a a g g c c g a g c c t c c a a c a t g g g c t c a g c t g a
a g a a a c t g a c c c a g c t g g c c a c c a a g t a c c t g g a g a a c a c
c a a a g t g a c c c a g a c a c c t g a g a g c a t g c t g c t g g c a g c t
c t g a t g a t c g t g t c c a t g g t g g t g t c c c t g c c t a t g c c t g
c t g g t g c t g c c g c t g c c a a c t a c a c a t a c t g g g c c t a c g t
g c c c t t t c c t c c t a t g a t c a g a g c c g t g a c c t g g a t g g a c
a a c c c t a t t g a g g t g t a c g t g a a c g a c a g c g t g t g g g t g c
c a g g a c c t a t c g a c g a t a g a t g t c c t g c c a a a c c t g a g g a
a g a g g g c a t g a t g a t c a a c a t c a g c a t c g g c t a c c g g t a t
c c t c c a a t c t g c c t g g g c a g a g c a c c t g g c t g t c t t a t g c
c a g c t g t g c a g a a t t g g c t g g t g g a a g t g c c t a c c g t g t c

40

50

t c c c a t c a g c c g g t t c a c c t a c c a c a t g g t g t c c g g c a t g
a g c c t c a g a c c t a g a g t g a a c t a c t t g c a g g a c t t c a g c t
a t c a g c g g a g c c t g a a g t t c a g a c c c a a g g g a a a g c c c t g
t c c t a a a g a g a t t c c c a a a g a g t c c a a g a a c a c c g a g g t g
c t c g t g t g g g a a g a g t g c g t g g c c a a t t c t g c c g t g a t c c
t g c a g a a c a a c g a g t t c g g c a c c a t c a t t g a c t g g g c t c c
t a g a g g c c a g t t c t a c c a c a a t t g c a g c g g a c a g a c a c a g
a g c t g t c c t a g c g c a c a a g t g t c a c c a g c c g t g g a t a g c g
a t c t g a c c g a g a g c c t g g a c a a g c a c a a a c a c a a g a a a c t
t c a g a g c t t c t a t c c c t g g g a g t g g g g a g a g a a g g g c a t c
t c t a c a c c a a g g c c t a a g a t c a t t a g c c c t g t g t c t g g a c
c a g a a c a t c c c g a a c t t t g g a g a c t g a c a g t g g c c a g c c a
c c a c a t c a g a a t c t g g a g c g g c a a t c a g a c c c t g g a a a c a
c g g g a c a g a a a g c c c t t c t a c a c c g t c g a t c t g a a c a g c a
g c c t g a c c g t g c c t c t c c a g a g c t g t g t g a a g c c t c c t t a
c a t g c t g g t c g t g g g c a a c a t t g t g a t c a a g c c c g a c t c c
c a g a c c a t c a c a t g c g a g a a c t g c a g a c t g c t g a c c t g c a
t c g a c a g c a c c t t c a a c t g g c a g c a c c g g a t c c t g c t c g t
g c g a g c t a g a g a a g g c g t g t g g a t c c c t g t c t c t a t g g a c
a g g c c t t g g g a a g c c a g c c c t a g c g t g c a c a t t c t g a c a g
a g g t g c t g a a g g g c g t g c t c a a c a g a t c c a a g c g g t t c a t
c t t c a c c c t g a t c g c c g t c a t c a t g g g c c t g a t t g c t g t g
a c a g c c a c a g c t g c t g t t g c t g g c g t g g c c c t g c a t a g c t
c t g t g c a g a g c g t g a a c t t c g t g a a c g a t t g g c a g a a g a a
c a g c a c a c g g c t g t g g a a c a g c c a g a g c a g c a t c g a c c a g
a a g a t g c t g g c c g t g a t c t c c t g t g c c g t g c a g a c a g t t a
t c t g g a t g g g c g a c a g a c t g a t g a g c c t g g a a c a c c g g t t
c c a g c t g c a g t g c g a c t g g a a t a c c a g c g a c t t c t g c a t c
a c a c c t c a g a t c t a c a a c g a g a g c g a g c a c c a c t g g g a t a
t g g t c c g a a g g c a t c t g c a g g g c a g a g a g g a c a a c c t g a c
a c t g g a c a t c a g c a a g c t g a a a g a g c a g a t c t t c g a g g c c
a g c a a g g c t c a c c t g a a t c t g g t g c c t g g a a c c g a a g c t a
t t g c t g g a g t t g c a g a t g g c c t g g c c a a t c t g a a t c c t g t
g a c c t g g g t c a a g a c c a t c g g c a g c a c c a c a a t c a t c a a c
c t g a t c c t g a t c c t c g t g t g c c t g t t t g c c t g c t g c t t g
t g t g c a g a t g c a c c c a g c a g c t g a g a a g a g a c a g c g a c c a
t a g a g a a a g a g c c a t g a t g a c c a t g g c c g t c c t g a g c a a g
a g a a a g g g a g g c a a c g t g g g c a a g a g c a a g c g g g a t c a g a
t c g t g a c c g t g t c c g t t t g a t a a

10

20

30

【 0 1 7 5 】
配列番号 7

40

ERV - K - g a g (6 6 6 アミノ酸)
M G Q T K S K I K S K Y A S Y L S F I K I L L K R G G V K V S T K N L I K L F Q
I I E Q F C P W F P E Q G T L D L K D W K R I G K E L K Q A G R K G N I I P L T
V W N D W A I I K A A L E P F Q T E E D S V S V S D A P G S C I I D C N E N T R
K K S Q K E T E S L H C E Y V A E P V M A Q S T Q N V D Y N Q L Q E V I Y P E T
L K L E G K G P E L V G P S E S K P R G T S P L P A G Q V P V T L Q P Q K Q V K
E N K T Q P P V A Y Q Y W P P A E L Q Y R P P P E S Q Y G Y P G M P P A P Q G R
A P Y P Q P P T R R L N P T A P P S R Q G S E L H E I I D K S R K E G D T E A W
Q F P V T L E P M P P G E G A Q E G E P P T V E A R Y K S F S I K M L K D M K E

50

G V K Q Y G P N S P Y M R T L L D S I A H G H R L I P Y D W E I L A K S S L S P
 S Q F L Q F K T W W I D G V Q E Q V R R N R A A N P P V N I D A D Q L L G I G Q
 N W S T I S Q Q A L M Q N E A I E Q V R A I C L R A W E K I Q D P G S T C P S F
 N T V R Q G S K E P Y P D F V A R L Q D V A Q K S I A D E K A R K V I V E L M A
 Y E N A N P E C Q S A I K P L K G K V P A G S D V I S E Y V K A C D G I G G A M
 H K A M L M A Q A I T G V V L G G Q V R T F G G K C Y N C G Q I G H L K K N C P
 V L N K Q N I T I Q A T T T G R E P P D L C P R C K K G K H W A S Q C R S K F D
 K N G Q P L S G N E Q R G Q P Q A P Q Q T G A F P I Q P F V P Q G F Q G Q Q P P
 L S Q V F Q G I S Q L P Q Y N N C P P P Q A A V Q Q

【 0 1 7 6 】

10

配列番号 8

ERV - K - g a g

ヌクレオチド配列

a t g g g a c a g a c c a a g a g t a a g a t c a a g t c t a a g t a c g c c a
 g c t a c c t c a g c t t c a t c a a g a t c c t g c t g a a g a g a g g a g g
 c g t g a a a g t g t c c a c c a a g a a c c t g a t c a a g c t g t t c c a g
 a t c a t c g a g c a g t t c t g t c c c t g g t t t c c t g a g c a g g g c a
 c c c t g g a t c t g a a g g a c t g g a a g c g g a t c g g c a a a g a g c t
 g a a g c a g g c t g g c a g a a a g g g c a a c a t c a t c c c t c t g a c c
 g t g t g g a a c g a c t g g g c c a t c a t c a a a g c a g c t c t g g a a c
 c c t t c c a g a c c g a a g a g g a t a g c g t g t c c g t g t c t g a t g c
 t c c t g g c a g c t g c a t c a t c g a c t g c a a c g a g a a c a c c c g g
 a a g a a g t c c c a g a a a g a g a c a g a g a g c c t g c a c t g c g a g t
 a c g t g g c c g a a c c t g t g a t g g c t c a g a g c a c c c a g a a c g t
 g g a c t a c a a c c a g c t c c a a g a a g t g a t c t a t c c c g a a a c a
 c t g a a g c t g g a a g g c a a g g g a c c t g a a c t c g t g g g t c c t t
 c t g a g t c t a a g c c c a g a g g c a c a t c t c c t c t g c c t g c a g g
 a c a g g t g c c a g t g a c a c t g c a g c c t c a g a a a c a a g t g a a a
 g a g a a c a a g a c c c a g c c t c c t g t g g c c t a c c a g t a t t g g c
 c t c c a g c c g a g c t g c a g t a c a g a c c t c c t c c a g a g a g c c a
 g t a c g g c t a c c c t g g a a t g c c t c c t g c t c c t c a a g g c a g a
 g c t c c t t a t c c t c a g c c t c c t a c c a g a c g g c t g a a c c c t a
 c a g c t c c t c c t a g c a g a c a g g g c t c t g a g c t g c a c g a g a t
 c a t t g a c a a g a g c c g g a a a g a g g g c g a c a c c g a g g c t t g g
 c a g t t t c c c g t t a c a c t g g a a c c c a t g c c t c c a g g c g a a g
 g c g c t c a a g a a g g c g a a c c t c c t a c a g t g g a a g c c a g g t a
 c a a g a g c t t c a g c a t c a a g a t g c t g a a g g a c a t g a a g g a a
 g g c g t c a a g c a g t a c g g a c c t a a c a g c c c a t a c a t g c g g a
 c c c t g c t g g a t t c t a t t g c c c a c g g c c a c c g g c t g a t c c c
 t t a c g a t t g g g a g a t c c t g g c t a a g t c c t c t c t g a g c c c t
 a g c c a g t t c c t g c a g t t c a a g a c c t g g t g g a t c g a c g g c g
 t g c a a g a a c a a g t g a g a c g g a a c a g a g c t g c c a a t c c t c c
 t g t g a a c a t c g a c g c c g a c c a g c t c c t c g g a a t c g g c c a g
 a a t t g g a g c a c c a t c t c t c a g c a g g c t c t g a t g c a g a a c g
 a g g c c a t t g a a c a a g t c a g a g c c a t c t g c c t g a g a g c t t g
 g g a g a a g a t t c a g g a c c c a g g c a g c a c a t g t c c c a g c t t c
 a a t a c c g t t c g g c a g g g c a g c a a a g a g c c c t a t c c t g a c t
 t t g t g g c t a g a c t g c a g g a t g t g g c c c a g a a g t c t a t t g c
 c g a c g a g a a g g c t c g g a a a g t g a t c g t g g a a c t g a t g g c c
 t a c g a g a a c g c t a a t c c a g a g t g c c a g a g c g c c a t c a a g c

20

30

40

50

c c t t g a a g g g c a a a g t g c c t g c c g g a t c c g a t g t g a t c a g
c g a g t a t g t g a a g g c c t g c g a c g g a a t c g g a g g t g c c a t g
c a c a a a g c c a t g c t g a t g g c a c a g g c c a t c a c t g g c g t t g
t g c t c g g a g g a c a a g t t c g g a c c t t t g g a g g c a a g t g c t a
c a a c t g t g g c c a g a t c g g a c a c c t g a a g a a g a a c t g c c c t
g t g c t g a a c a a g c a g a a c a t c a c c a t c c a g g c c a c c a c c a
c c g g c a g a g a a c c t c c a g a t c t g t g c c c t a g a t g c a a g a a
g g g c a a g c a c t g g g c c a g c c a g t g c a g a a g c a a g t t c g a c
a a g a a c g g c c a g c c t c t g a g c g g c a a c g a a c a a a g a g g a c
a g c c t c a g g c t c c t c a g c a g a c t g g c g c a t t t c c a a t c c a
g c c c t t c g t g c c t c a a g g c t t c c a g g g a c a a c a g c c t c c a
c t g t c t c a g g t g t t c c a g g g c a t t a g c c a g c t c c c t c a g t
a c a a c a a c t g c c c t c c a c c t c a g g c t g c t g t g c a g c a g t g
a t g a

【0177】

配列番号9

hFOLR1 __hPRAME 融合体(741アミノ酸)

MAQRMTTQLLLLLLVWVAVVGEAQTRIAWARTELLNVCMNNA
KHHKEKPGPEDKLHEQCRPWKNAACSTNTSQEAHKDVSY
LYRFNWNHCGEMAPACKRHF IQDTCLYECSPNLGPWIIQQV
DQSWRKERV LNVPLCKEDCEQWVEDCRTSYTCKSNWHKGW
NWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVS
NYSRGSGRCIQMWFDP AQGNPNEEVARFYAAAMERRRLWG
SIQSRYISMSVWTS PRRLVELAGQSL LKDEALAI AALELL
PRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQAWPFTCLPLGLVLMK
GQHLHLETFKAVLDGLDVL LAQEVRRPRRWKLQVLDLRKNS
HQDFWTVWSGNRASLYSFPEPEAAQPMTTKAKVDGLSTEAE
EQPFIPEVVLVDLFLKEGACDELF SYLIEKVA AKKNVLRRL
CCKKLKIFAMPMQDIKMI LKMVQLDSIEDLEV TCTWKLPT
LAKFSPYLGQM INLRRL LLSHIHASSYISPEKEEQYIAQF
TSQFLSLQCLQALYVDSL FFLRGRLDQLLRHVMNPLETLS
ITNCRLSEGDVMHLSQS PVSQLSVLSLSGVMLTDVSPPEP
LQALLERASATLQDLV FDECGITDDQLLALLPSLSHCSQL
TTLSFYGNSISISALQS LLQH LIGLSNLTHVLYPVPLESY
EDIHGTLHLERLAYLHARLRELLCELGRPSMVWLSANPCP
HCGDRTFYDPEPI LCP CFMPN

【0178】

配列番号10

hFOLR1 __hPRAME 融合体(741アミノ酸)

ヌクレオチド配列

t g g c c c a g a g a a t g a c c a c a c a a c t g c t g c t g c t c c t g g t
g t g g g t t g c c g t t g t t g g a g a g g c c c a g a c c a g a a t t g c c
t g g g c c a g a a c c g a g c t g c t g a a c g t g t g c a t g a a c g c c a
a g c a t c a c a a a g a g a a g c c t g g a c c t g a a g a c a a g c t g c a
t g a a c a g t g t c g g c c t t g g a g a a a g a a t g c t t g c t g t a g c
a c c a a c a c c a g c c a a g a g g c c c a c a a g g a c g t g t c c t a c c
t g t a c c g g t t c a a c t g g a a c c a c t g c g g a g a a a t g g c t c c
t g c c t g c a a g a g a c a c t t c a t c c a g g a t a c c t g c c t g t a c
g a g t g c t c t c c c a a t c t c g g a c c t t g g a t c c a g c a a g t g g
a c c a g a g c t g g c g g a a a g a a c g g g t g c t g a a t g t g c c c t t

10

20

30

40

50

g t g c a a a g a g g a t t g c g a g c a g t g g t g g g a a g a t t g c c g g
a c c a g c t a c a c a t g t a a g a g c a a c t g g c a c a a a g g c t g g a
a c t g g a c c a g c g g c t t c a a c a a g t g t g c c g t g g g a g c t g c
c t g c c a g c c t t t c c a c t t c t a c t t c c c a a c a c c t a c c g t g
c t g t g c a a c g a a a t c t g g a c c c a c a g c t a c a a g g t g t c c a
a c t a c a g c a g a g g c a g c g g c a g g t g t a t c c a g a t g t g g t t
c g a t c c c g c t c a g g g c a a t c c c a a t g a g g a a g t g g c t a g a
t t c t a c g c t g c t g c c a t g g a a a g a a g a a g g c t c t g g g g c a
g c a t c c a g a g c c g g t a c a t t a g c a t g a g c g t g t g g a c a a g
c c c t a g a c g g c t g g t t g a a c t g g c t g g a c a g a g c c t g c t c
a a g g a t g a g g c c c t g g c c a t t g c t g c t c t g g a g c t g c t g c
c t a g a g a g c t g t t c c c t c c t c t g t t c a t g g c t g c c t t c g a
c g g c a g a c a c a g c c a g a c a c t g a a a g c c a t g g t g c a g g c c
t g g c c t t t c a c c t g t c t g c c t c t g g g a g t g c t g a t g a a g g
g c c a g c a t c t g c a c c t g g a a a c c t t c a a g g c c g t g c t g g a
c g g c c t g g a t g t t c t c c t g g c t c a a g a g g t g a g g c c t c g g
c g t t g g a a a c t g c a g g t t c t g g a t c t g c g g a a g a a c t c t c
a c c a g g a t t t c t g g a c c g t t t g g t c c g g c a a c a g a g c c a g
c c t g t a c a g c t t t c c t g a a c c t g a g g c t g c c c a g c c c a t g
a c c a c a a a g g c c a a a g t g g a t g g c c t g a g c a c a g a g g c c g
a g c a g c c t t t c a t t c c c g t c g a a g t g c t g g t g g a c c t g t t
c c t g a a a g a a g g a g c c t g c g a t g a g c t g t t c a g c t a c c t g
a t t g a g a a g g t g g c a g c c a a g a a g a a c g t g c t g c g g c t g t
g c t g c a a g a a g c t g a a g a t c t t t g c c a t g c c t a t g c a g g a
t a t c a a g a t g a t c c t g a a g a t g g t g c a g c t g g a c a g c a t c
g a g g a c c t g g a a g t g a c c t g t a c c t g g a a g c t g c c c a c a c
t g g c c a a g t t c a g c c c t t a c c t g g g a c a g a t g a t t a a c c t
g c g g a g g c t g c t g c t g t c t c a c a t c c a c g c c a g c t c c t a c
a t c a g c c c t g a g a a a g a g g a a c a g t a t a t c g c c c a g t t c a
c a a g c c a g t t t c t g a g c c t g c a g t g t c t g c a g g c c c t g t a
c g t g g a c a g c c t g t t c t t t c t g a g a g g c a g g c t g g a t c a g
c t g c t g c g g c a c g t g a t g a a c c c t c t g g a a a c c c t g a g c a
t c a c c a a c t g t a g a c t g a g c g a g g g c g a c g t g a t g c a c c t
g t c t c a g a g c c c a t c t g t g t c t c a g c t g a g c g t g c t g t c t
c t g t c t g g c g t g a t g c t g a c c g a t g t g a g c c c t g a a c c t c
t g c a g g c a c t g c t g g a a a g a g c c t c c g c t a c t c t g c a g g a
c c t g g t g t t c g a t g a g t g c g g c a t c a c c g a t g a c c a g c t g
c t t g c t c t g c t g c c a a g c c t g a g c c a c t g t a g c c a g c t g a
c a a c c c t g t c c t t c t a c g g c a a c a g c a t c t c c a t c t c t g c
c c t g c a g t c t c t c c t g c a g c a t c t g a t c g g c c t g t c c a a t
c t g a c c c a c g t g c t g t a c c c t g t g c c a c t g g a a a g c t a c g
a g g a c a t c c a c g g a a c c c t g c a c c t c g a g a g a c t g g c c t a
t c t g c a t g c t c g g c t g a g a g a a c t g c t g t g c g a a c t g g g c
a g a c c c a g c a t g g t t t g g c t g a g c g c c a a t c c a t g t c c t c
a c t g t g g c g a c c g g a c c t t c t a c g a c c c t g a g c c t a t c c t
g t g t c c t t g c t t c a t g c c c a a c t a a t a g

10

20

30

40

【 0 1 7 9 】

配列番号 1 1

ERV - K - e n v / M E L _ 0 3 (5 1 7 アミノ酸)

M N P S E M Q R K A P P R R R R H R N R A P L T H K M N K M V T S E E Q M K L P

50

S T K K A E P P T W A Q L K K L T Q L A T K Y L E N T K V T Q T P E S M L L A A
 L M I V S M V V S L P M P A G A A A A N Y T Y W A Y V P F P P M I R A V T W M D
 N P I E V Y V N D S V W V P G P I D D R C P A K P E E E G M M I N I S I G Y R Y
 P P I C L G R A P G C L M P A V Q N W L V E V P T V S P I S R F T Y H M V S G M
 S L R P R V N Y L Q D F S Y Q R S L K F R P K G K P C P K E I P K E S K N T E V
 L V W E E C V A N S A V I L Q N N E F G T I I D W A P R G Q F Y H N C S G Q T Q
 S C P S A Q V S P A V D S D L T E S L D K H K H K K L Q S F Y P W E W G E K G I
 S T P R P K I I S P V S G P E H P E L W R L T V A S H H I R I W S G N Q T L E T
 R D R K P F Y T V D L N S S L T V P L Q S C V K P P Y M L V V G N I V I K P D S
 Q T I T C E N C R L L T C I D S T F N W Q H R I L L V R A R E G V W I P V S M D
 R P W E A S P S V H I L T E V L K G V L N M L A V I S C A V A G V A L H G S A G
 S A A G S G E F V V I S A I L A L V V L T I I S L I I L I M L W Q K K P R

10

【0180】

配列番号12

ERV - K - env / MEL__03

ヌクレオチド配列

a t g a a c c c t a g c g a g a t g c a g a g a a a g g c t c c a c c t a g a c
 g g a g a a g a c a c a g a a a c a g g g c t c c t c t g a c a c a c a a g a t
 g a a c a a g a t g g t c a c c a g c g a g g a a c a g a t g a a a c t g c c c
 a g c a c c a a g a a g g c c g a g c c t c c a a c a t g g g c t c a g c t g a
 a g a a a c t g a c c c a g c t g g c c a c c a a g t a c c t g g a g a a c a c
 c a a a g t g a c c c a g a c a c c t g a g a g c a t g c t g c t g g c a g c t
 c t g a t g a t c g t g t c c a t g g t g g t g t c c c t g c c t a t g c c t g
 c t g g t g c t g c c g c t g c c a a c t a c a c a t a c t g g g c c t a c g t
 g c c c t t t c c t c c t a t g a t c a g a g c c g t g a c c t g g a t g g a c
 a a c c c t a t t g a g g t g t a c g t g a a c g a c a g c g t g t g g g t g c
 c a g g a c c t a t c g a c g a t a g a t g t c c t g c c a a a c c t g a g g a
 a g a g g g c a t g a t g a t c a a c a t c a g c a t c g g c t a c c g g t a t
 c c t c c a a t c t g c c t g g g c a g a g c a c c t g g c t g t c t t a t g c
 c a g c t g t g c a g a a t t g g c t g g t g g a a g t g c c t a c c g t g t c
 t c c c a t c a g c c g g t t c a c c t a c c a c a t g g t g t c c g g c a t g
 a g c c t c a g a c c t a g a g t g a a c t a c t t g c a g g a c t t c a g c t
 a t c a g c g g a g c c t g a a g t t c a g a c c c a a g g g a a a g c c c t g
 t c c t a a a g a g a t t c c c a a a g a g t c c a a g a a c a c c g a g g t g
 c t c g t g t g g g a a g a g t g c g t g g c c a a t t c t g c c g t g a t c c
 t g c a g a a c a a c g a g t t c g g c a c c a t c a t t g a c t g g g c t c c
 t a g a g g c c a g t t c t a c c a c a a t t g c a g c g g a c a g a c a c a g
 a g c t g t c c t a g c g c a c a a g t g t c a c c a g c c g t g g a t a g c g
 a t c t g a c c g a g a g c c t g g a c a a g c a c a a a c a c a a g a a a c t
 t c a g a g c t t c t a t c c c t g g g a g t g g g g a g a g a a g g g c a t c
 t c t a c a c c a a g g c c t a a g a t c a t t a g c c c t g t g t c t g g a c
 c a g a a c a t c c c g a a c t t t g g a g a c t g a c a g t g g c c a g c c a
 c c a c a t c a g a a t c t g g a g c g g c a a t c a g a c c c t g g a a a c a
 c g g g a c a g a a a g c c c t t c t a c a c c g t c g a t c t g a a c a g c a
 g c c t g a c c g t g c c t c t c a g a g c t g t g t g a a g c c t c c t t a
 c a t g c t g g t c g t g g g c a a c a t t g t g a t c a a g c c c g a c t c c
 c a g a c c a t c a c a t g c g a g a a c t g c a g a c t g c t g a c c t g c a
 t c g a c a g c a c c t t c a a c t g g c a g c a c c g g a t c c t g c t c g t
 g c g a g c t a g a g a a g g c g t g t g g a t c c c t g t c t c t a t g g a c
 a g g c c t t g g g a a g c c a g c c c t a g c g t g c a c a t t c t g a c a g

20

30

40

50

aggtgctgaaggcgctgctcaacatgctggccgctgatctc
 ctgtgccgtggctggcgtggccctgcatggctctgctgga
 tctgctgctggaagcggcggagttcgtgggtcatctctgcca
 ttctggctctggtggtgctgaccatcatcagcctgatcat
 cctgattatgctgtggcagaagaagcccccggtgataa

【0181】

参考文献

1. Pardoll DM. The blockade of immune check points in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(4): 252 - 64. doi: 10.1038/nrc3239 [オンライン先行出版 (published Online First): 2012 / 03 / 23] 10
2. Aznar MA, Tinari N, Rullan AJ, et al. Intratumoral Delivery of Immunotherapy - Act Locally, Think Globally. *J Immunol* 2017; 198(1): 31 - 39. doi: 10.4049/jimmunol.1601145 [オンライン先行出版 (published Online First): 2016 / 12 / 21]
3. Ellmark P, Mangsbo SM, Furebring C, et al. Tumor-directed immunotherapy can generate tumor-specific T cell responses through localized co-stimulation. *Cancer Immunol Immunother* 2017; 66(1): 1 - 7. doi: 10.1007/s00262-016-1909-3 [オンライン先行出版 (published Online First): 2016 / 10 / 08] 20
4. Pol J, Kroemer G, Galluzzi L. First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy. *Oncoimmunology* 2016; 5(1): e1115641. doi: 10.1080/2162402X.2015.1115641 [オンライン先行出版 (published Online First): 2016 / 03 / 05]
5. Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2015; 14(9): 642 - 62. doi: 10.1038/nrd4663 30
6. Davola ME, Mossman KL. Oncolytic viruses: how "lytic" must they be for therapeutic efficacy? *Oncoimmunology* 2019; 8(6): e1581528. doi: 10.1080/2162402X.2019.1596006 [オンライン先行出版 (published Online First): 2019 / 05 / 10]
7. Russell SJ, Barber GN. Oncolytic Viruses as Antigen-Agnostic Cancer Vaccines. *Cancer Cell* 2018; 33(4): 599 - 605. doi: 10.1016/j.ccell.2018.03.011 40
8. Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 2012; 30(7): 658 - 70. doi: 10.1038/nbt.2287
9. Pittman PR, Hahn M, Lee HS, et al. Phase 3 Efficacy Trial of Modified Vaccinia Ankara as a Vaccine against Smallpox. *N Engl J Med* 2019; 381(20): 1897 - 908. doi: 10.1056/NEJMoa1817307 [オンライン先行出版 (published Online First)] 50

: 2019/11/14]

10. Anywaine Z, Whitworth H, Kaleebu P, et al. Safety and Immunogenicity of a 2-Dose Heterologous Vaccination Regimen With Ad26. ZEBOV and MVA-BN-Filo Ebola Vaccines: 12-Month Data From a Phase 1 Randomized Clinical Trial in Uganda and Tanzania. *J Infect Dis* 2019; 220(1): 46-56. doi:10.1093/infdis/jiz070 [オンライン先行出版 (published Online First): 2019/02/24]

10

11. Waibler Z, Anzaghe M, Frenz T, et al. Vaccinia virus-mediated inhibition of type I interferon responses is a multifactorial process involving the soluble type I interferon receptor B18 and intracellular components. *J Virol* 2009; 83(4): 1563-71. doi:10.1128/JVI.01617-08 [オンライン先行出版 (published Online First): 2008/12/17]

12. Price PJ, Torres-Dominguez LE, Brandmuller C, et al. Modified Vaccinia virus Ankara: innate immune activation and induction of cellular signalling. *Vaccine* 2013; 31(39): 4231-4. doi:10.1016/j.vaccine.2013.03.017 [オンライン先行出版 (published Online First): 2013/03/26]

20

13. Samuelsson C, Hausmann J, Lauterbach H, et al. Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on TLR9, and therapeutic vaccination provides protection. *J Clin Invest* 2008; 118(5): 1776-84. doi:10.1172/JCI33940 [オンライン先行出版 (published Online First): 2008/04/10]

30

14. Harrer E, Bauerle M, Ferstl B, et al. The therapeutic vaccination of HIV-1-infected patients on HAART with a recombinant HIV-1 nef-expressing MVA: safety, immunogenicity and influence on viral load during treatment interruption. *Antivir Ther* 2005; 10(2): 285-300. [オンライン先行出版 (published Online First): 2005/05/04]

40

15. Suter M, Meisinger-Henschel C, Tzatzaris M, et al. Modified vaccinia Ankara strains with identical coding sequences actually represent complex mixtures of viruses that determine the biological properties of each strain. *Vaccine* 2009; 27(52): 7442-50. doi:10.1016/j.vaccine.2009.05.095 [オンライン先行出版 (published Online First): 2009/06/23]

16. Lauterbach H, Patzold J, Kassub R, et al. Genetic Adjuvantation of Recombinant MVA

50

- with CD40L Potentiates CD8 T Cell Mediated Immunity. *Front Immunol* 2013;4:251. doi:10.3389/fimmu.2013.00251 [オンライン先行出版 (published Online First):2013/08/30]
17. Medina-Echeverez J, Hinterberger M, Testori M, et al. Synergistic cancer immunotherapy combines MVA-CD40L induced innate and adaptive immunity with tumor targeting antibodies. *Nat Commun* 2019;10(1):5041. doi:10.1038/s41467-019-12998-6 [オンライン先行出版 (published Online First):2019/11/07] 10
18. Lawler SE, Speranza MC, Cho CF, et al. Oncolytic Viruses in Cancer Treatment: A Review. *JAMA Oncol* 2017;3(6):841-49. doi:10.1001/jamaoncol.2016.2064
19. Watts CWGHYLAJMTH. Immune regulation by 4-1BB and 4-1BBL: complexities and challenges. *Immunological Reviews* 2009
20. Hendriks J, Xiao Y, Rossen JW, et al. During viral infection of the respiratory tract, CD27, 4-1BB, and OX40 collectively determine formation of CD8+ memory T cells and their capacity for secondary expansion. *J Immunol* 2005;175(3):1665-76. doi:10.4049/jimmunol.175.3.1665 20
21. Palazon A, Martinez-Forero I, Teijeira A, et al. The HIF-1alpha hypoxia response in tumor-infiltrating T lymphocytes induces functional CD137 (4-1BB) for immunotherapy. *Cancer Discov* 2012;2(7):608-23. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0314 [オンライン先行出版 (published Online First):2012/06/22] 30
22. Bartkowiak T, Curran MA. 4-1BB Agonists: Multi-Potent Potentiators of Tumor Immunity. *Front Oncol* 2015;5:117. doi:10.3389/fonc.2015.00117 [オンライン先行出版 (published Online First):2015/06/25]
23. Imai C, Mihara K, Andreansky M, et al. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004;18(4):676-84. doi:10.1038/sj.leu.2403302 40
24. Nakao S, Arai Y, Tasaki M, et al. Intratumoral expression of IL-7 and IL-12 using an oncolytic virus increases systemic sensitivity to immune checkpoint blockade. *Sci Transl Med* 2020;12(526) doi:10.1126/scitranslmed.aax7992 [オンライン先行出版 (published Online First):2020/01/17] 50

25. Dai P, Wang W, Yang N, et al. Intratumoral delivery of inactivated modified vaccinia virus Ankara (iMVA) induces systemic anti-tumor immunity via STING and Batf3-dependent dendritic cells. *Sci Immunol* 2017; 2(11) doi:10.1126/sciimmunol.aal1713 [オンライン先行出版 (published Online First): 2017/08/02]
26. Kudo-Saito C, Schlom J, Hodge JW. Intratumoral vaccination and diversified subcutaneous/ intratumoral vaccination with recombinant poxviruses encoding a tumor antigen and multiple costimulatory molecules. *Clin Cancer Res* 2004; 10(3): 1090-9. doi:10.1158/1078-0432.ccr-03-0145 [オンライン先行出版 (published Online First): 2004/02/12] 10
27. Rivadeneira DB, DePeaux K, Wang Y, et al. Oncolytic Viruses Engineered to Enforce Leptin Expression Reprogram Tumor-Infiltrating T Cell Metabolism and Promote Tumor Clearance. *Immunity* 2019; 51(3): 548-60 e4. doi:10.1016/j.immuni.2019.07.003 [オンライン先行出版 (published Online First): 2019/09/01] 20
28. Kim HS, Kim-Schulze S, Kim DW, et al. Host lymphodepletion enhances the therapeutic activity of an oncolytic vaccinia virus expressing 4-1BB ligand. *Cancer Res* 2009; 69(21): 8516-25. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2522
29. Huang AY, Gulden PH, Woods AS, et al. The immunodominant major histocompatibility complex class I-restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(18): 9730-5. doi:10.1073/pnas.93.18.9730 [オンライン先行出版 (published Online First): 1996/09/03] 30
30. Risser R, Horowitz JM, McCubrey J. Endogenous mouse leukemia viruses. *Annu Rev Genet* 1983; 17: 85-121. doi:10.1146/annurev.genet.17.120183.000505 [オンライン先行出版 (published Online First): 1983/01/01] 40
31. Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, et al. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* 2003; 4(12): 1191-8. doi:10.1038/ni1009 [オンライン先行出版 (published Online First): 2003/11/20]
32. Enamorado M, Iborra S, Priego E, et al. Enhanced anti-tumour immunity requires the 50

- interplay between resident and circulating memory CD8(+) T cells. *Nat Commun* 2017;8:16073. doi:10.1038/ncomms16073 [オンライン先行出版 (published Online First):2017/07/18]
33. Nizard M, Roussel H, Diniz MO, et al. Induction of resident memory T cells enhances the efficacy of cancer vaccine. *Nat Commun* 2017;8:15221. doi:10.1038/ncomms15221 [オンライン先行出版 (published Online First):2017/05/26]
34. Beura LK, Wijeyesinghe S, Thompson EA, et al. T Cells in Nonlymphoid Tissues Give Rise to Lymph-Node-Resident Memory T Cells. *Immunity* 2018;48(2):327-38 e5. doi:10.1016/j.immuni.2018.01.015 [オンライン先行出版 (published Online First):2018/02/22]
35. Overton ET, Lawrence SJ, Wagner E, et al. Immunogenicity and safety of three consecutive production lots of the non replicating smallpox vaccine MVA: A randomised, double blind, placebo controlled phase III trial. *PLoS One* 2018;13(4):e0195897. doi:10.1371/journal.pone.0195897 [オンライン先行出版 (published Online First):2018/04/14]
36. Kassiotis G, Stoye JP. Immune responses to endogenous retroelements: taking the bad with the good. *Nat Rev Immunol* 2016;16(4):207-19. doi:10.1038/nri.2016.27
37. Scrimieri F, Askew D, Corn DJ, et al. Murine leukemia virus envelope gp70 is a shared biomarker for the high-sensitivity quantification of murine tumor burden. *Oncotarget* 2013;2(11):e26889. doi:10.4161/onci.26889
38. Attermann AS, Bjerregaard AM, Saini SK, et al. Human endogenous retroviruses and their implication for immunotherapeutics of cancer. *Ann Oncol* 2018;29(11):2183-91. doi:10.1093/annonc/mdy413
39. Wang-Johanning F, Radvanyi L, Rycacj K, et al. Human endogenous retrovirus K triggers an antigen-specific immune response in breast cancer patients. *Cancer Res* 2008;68(14):5869-77. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6838
40. Kong Y, Rose CM, Cass AA, et al. Transposable element expression in tumors is associated with immune infiltration and increased antigenicity. *Nat Commun* 2019;10(1):5228. doi:10.1038/s41467-019-13035-2
41. McWilliams JA, Sullivan RT, Jordan KR, et

- t al. Age-dependent tolerance to an endogenous tumor-associated antigen. *Vaccine* 2008; 26(15): 1863-73. doi:10.1016/j.vaccine.2008.01.052 [オンライン先行出版 (published Online First): 2008/03/11]
42. Reynoso GV, Weisberg AS, Shannon JP, et al. Lymph node conduits transport virions for rapid T cell activation. *Nat Immunol* 2019; 20(5): 602-12. doi:10.1038/s41590-019-0342-0 [オンライン先行出版 (published Online First): 2019/03/20] 10
43. Sanchez-Paulete AR, Labiano S, Rodriguez-Ruiz ME, et al. Deciphering CD137(4-1BB) signaling in T-cell costimulation for translation into successful cancer immunotherapy. *Eur J Immunol* 2016; 46(3): 513-22. doi:10.1002/eji.201445388 [オンライン先行出版 (published Online First): 2016/01/17]
44. Bertram EM, Lau P, Watts TH. Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection. *J Immunol* 2002; 168(8): 3777-85. doi:10.4049/jimmunol.168.8.3777 [オンライン先行出版 (published Online First): 2002/04/09] 20
45. Willoughby JE, Kerr JP, Rogel A, et al. Differential impact of CD27 and 4-1BB costimulation on effector and memory CD8 T cell generation following peptide immunization. *J Immunol* 2014; 193(1): 244-51. doi:10.4049/jimmunol.1301217 [オンライン先行出版 (published Online First): 2014/05/27] 30
46. Park SL, Buzzai A, Rautela J, et al. Tissue-resident memory CD8(+) T cells promote melanoma-immune equilibrium in skin. *Nature* 2019; 565(7739): 366-71. doi:10.1038/s41586-018-0812-9 [オンライン先行出版 (published Online First): 2019/01/02] 40
47. Schenkel JM, Fraser KA, Masopust D. Cutting edge: resident memory CD8 T cells occupy frontline niches in secondary lymphoid organs. *J Immunol* 2014; 192(7): 2961-4. doi:10.4049/jimmunol.1400003 [オンライン先行出版 (published Online First): 2014/03/07]
48. Zhou AC, Wagar LE, Wortzman ME, et al. Intrinsic 4-1BB signals are indispensable for the establishment of an influenza-specific tissue-resident memory CD8 T-cell po 50

pulation in the lung. *Mucosal Immunol* 2017 ; 10 (5) : 1294 - 309 . doi : 10 . 1038 / mi . 2016 . 124 [オンライン先行出版 (published Online First) : 2017 / 01 / 05]

49. Reading JL, Galvez - Cancino F, Swanton C , et al. The function and dysfunction of memory CD8 (+) T cells in tumor immunity. *Immunol Rev* 2018 ; 283 (1) : 194 - 212 . doi : 10 . 1111 / imr . 12657 [オンライン先行出版 (published Online First) : 2018 / 04 / 18]

10

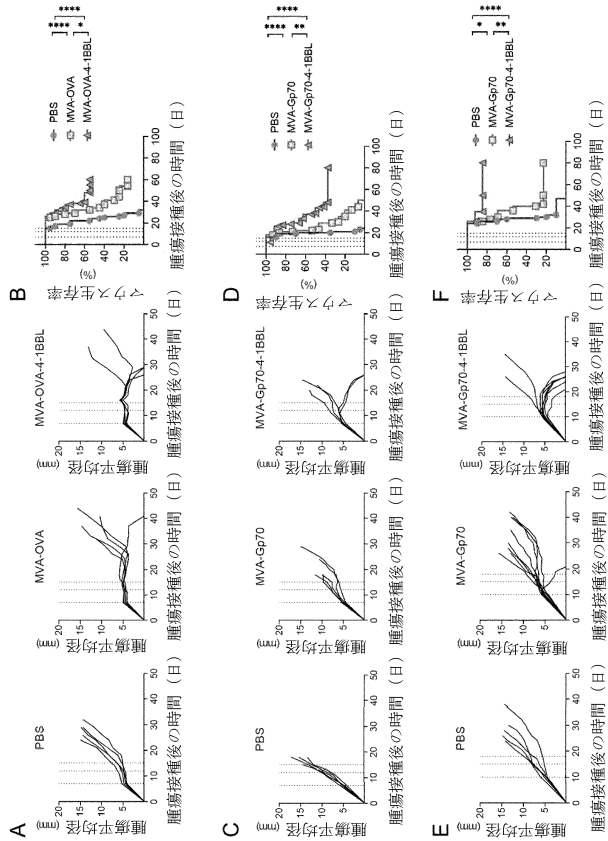
50. Wherry EJ, Blattman JN, Murali - Krishna K, et al. Viral persistence alters CD8 T - cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* 2003 ; 77 (8) : 4911 - 27 . doi : 10 . 1128 / jvi . 77 . 8 . 4911 - 4927 . 2003 [オンライン先行出版 (published Online First) : 2003 / 03 / 29]

51. Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, et al. HIV - specific CD8 (+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 2000 ; 192 (1) : 63 - 75 . doi : 10 . 1084 / jem . 192 . 1 . 63 [オンライン先行出版 (published Online First) : 2000 / 07 / 06]

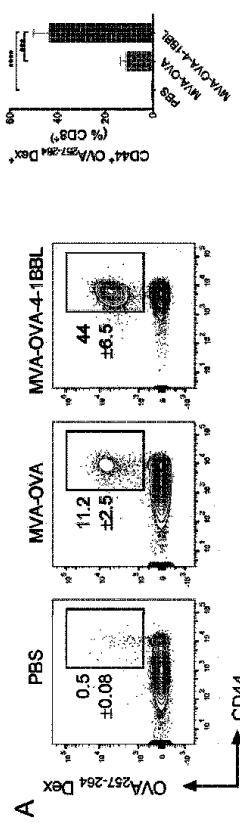
20

【 図面 】

【 図 1 】



【 図 2 A 】



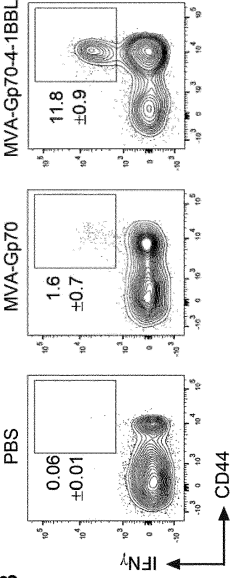
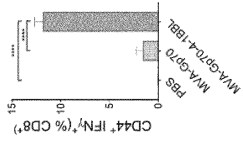
30

40

50

【 2 B 】

p15E₃₀₄₊₈₁₁ 再刺激



B

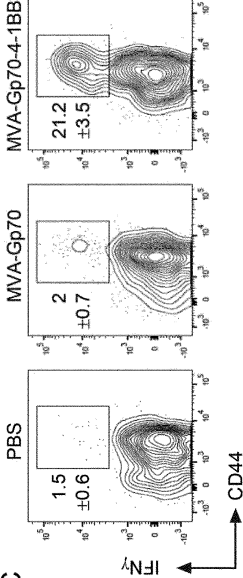
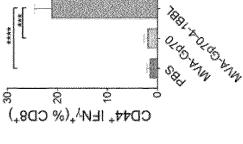
【 2 D 】



D

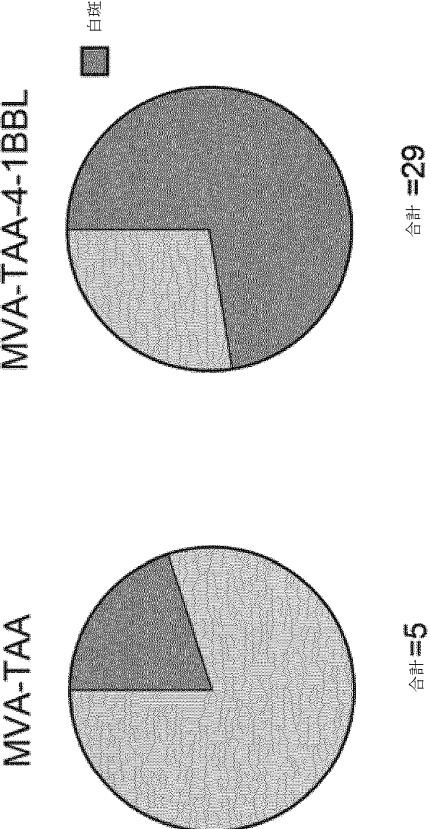
【 2 C 】

AH1₆₋₁₄ 再刺激



C

【 2 E 】



10

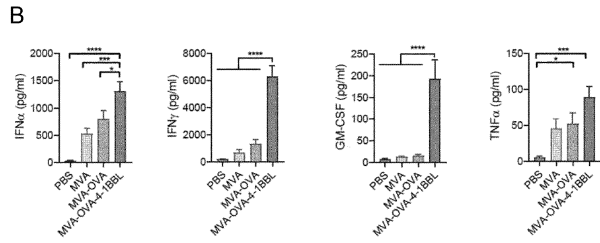
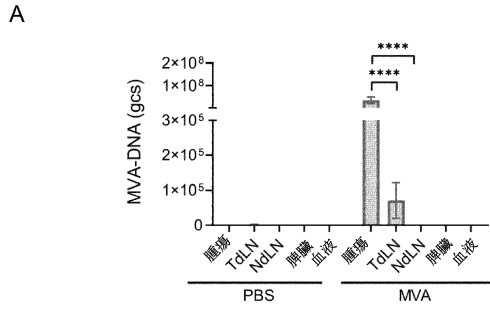
20

30

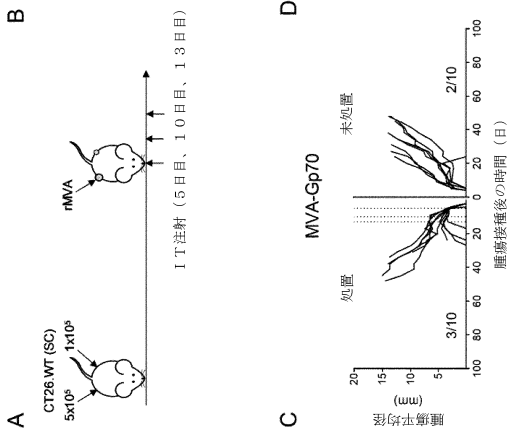
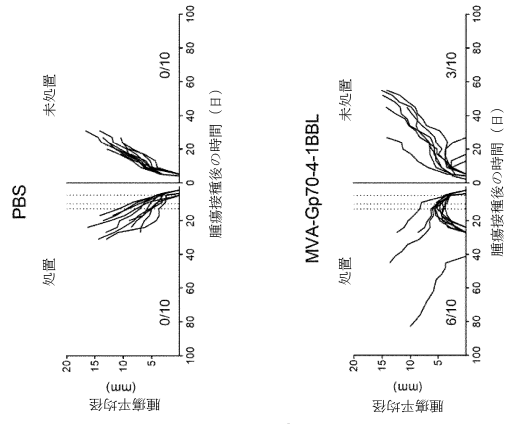
40

50

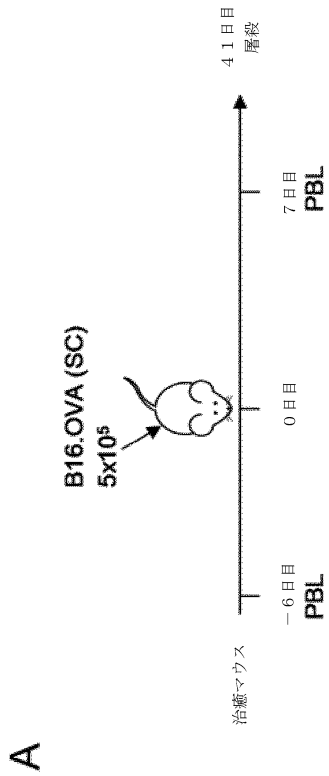
【図3】



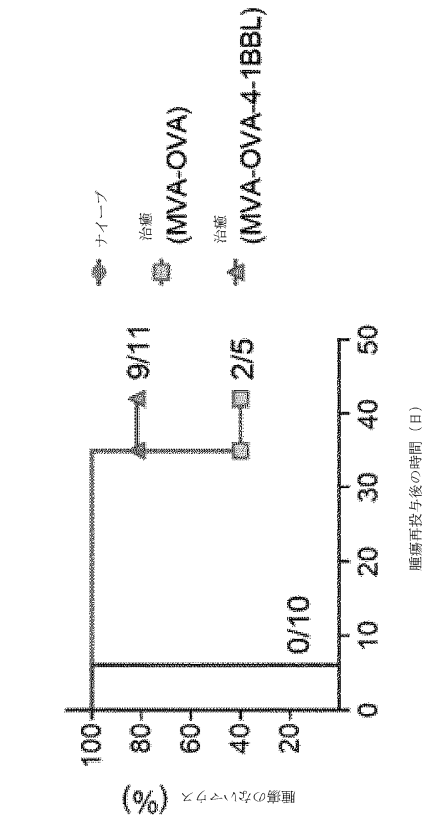
【図4】



【図5A】



【図5B】



10

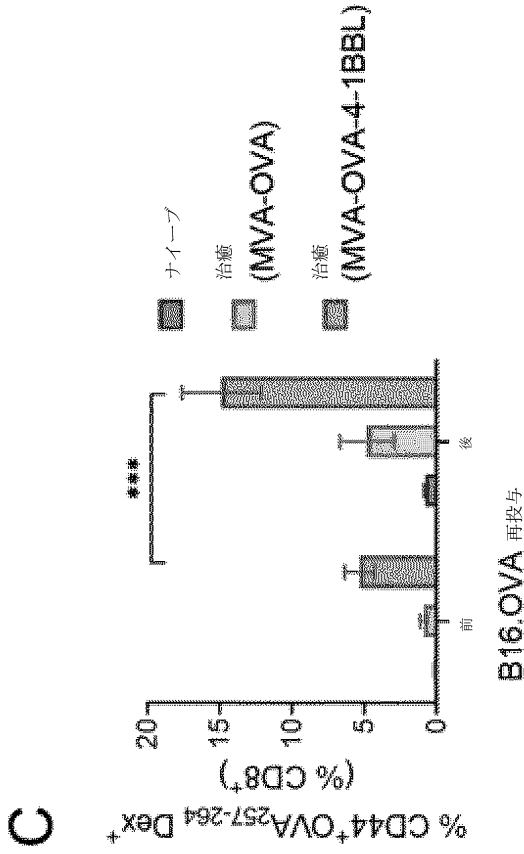
20

30

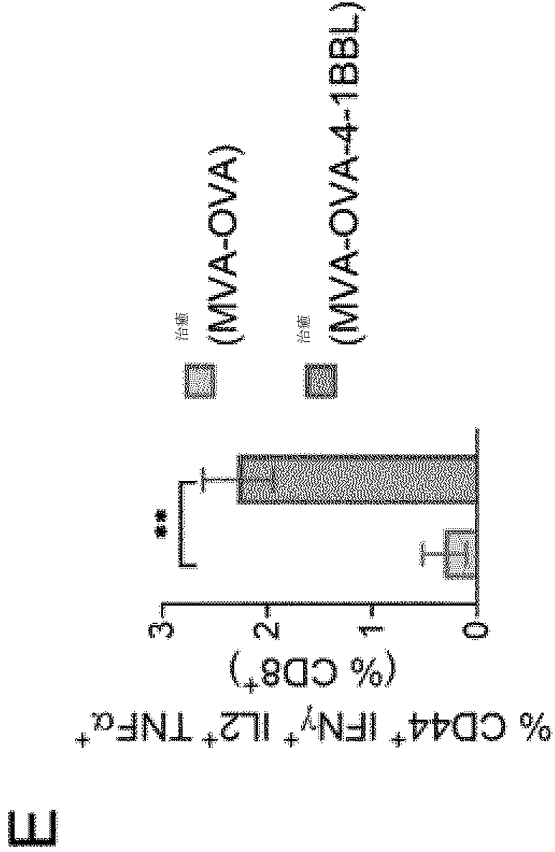
40

50

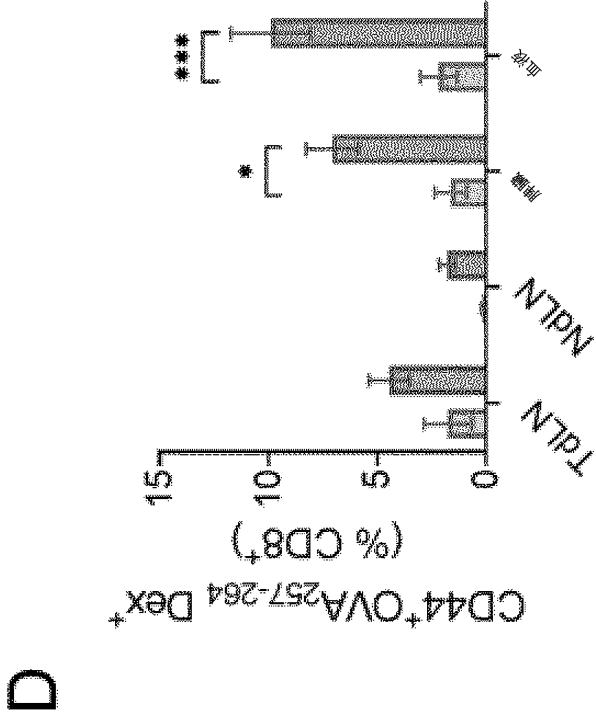
【図 5 C】



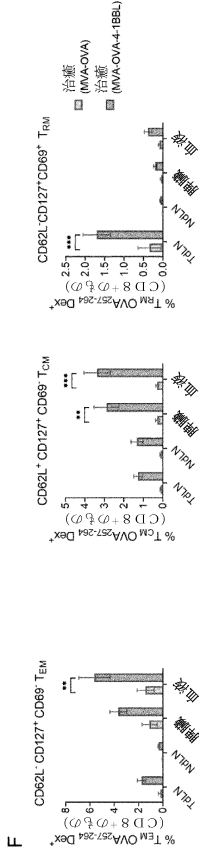
【図 5 E】



【図 5 D】



【図 5 F】



10

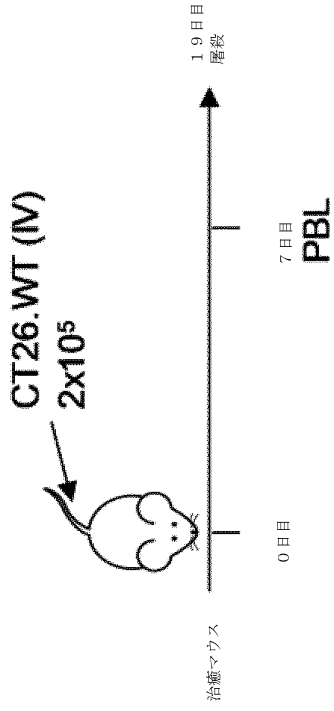
20

30

40

50

【図 5 G】



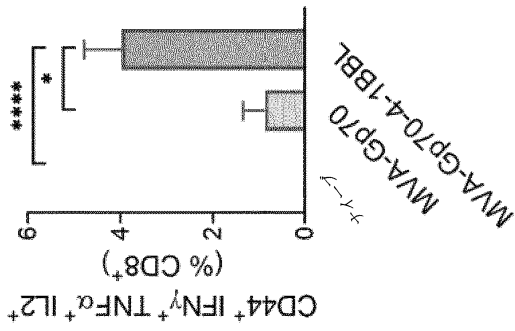
G

【図 5 H】



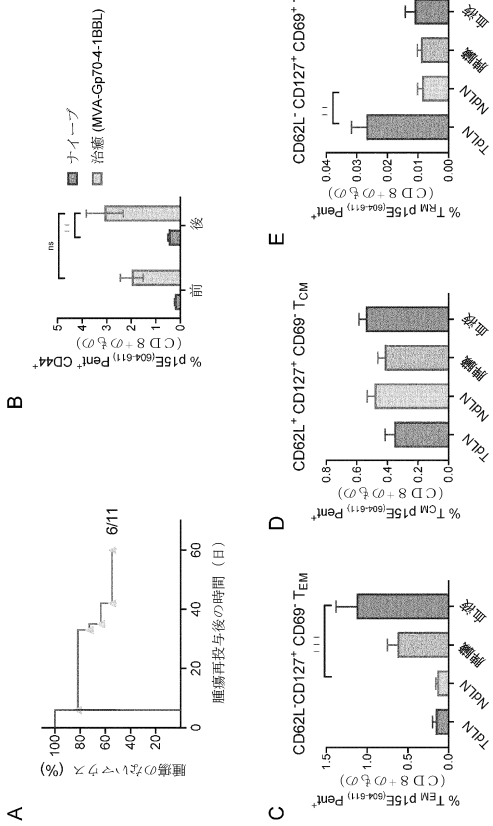
H

【図 5 I】



I

【図 9】



A

B

C

D

E

10

20

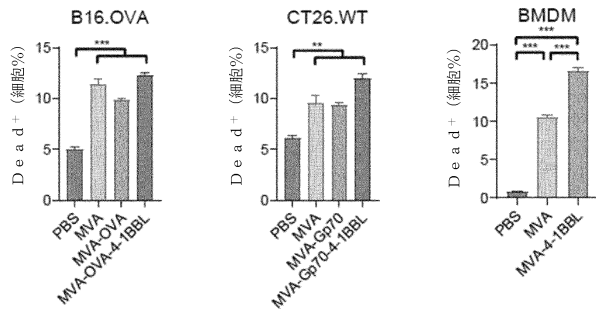
30

40

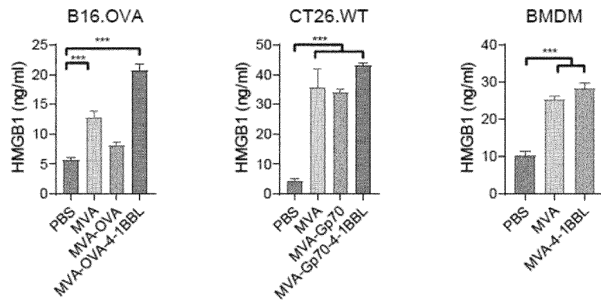
50

【 図 7 】

A

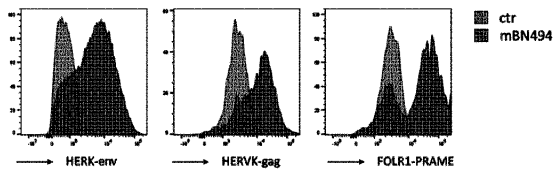


B



【 図 8 B 】

B



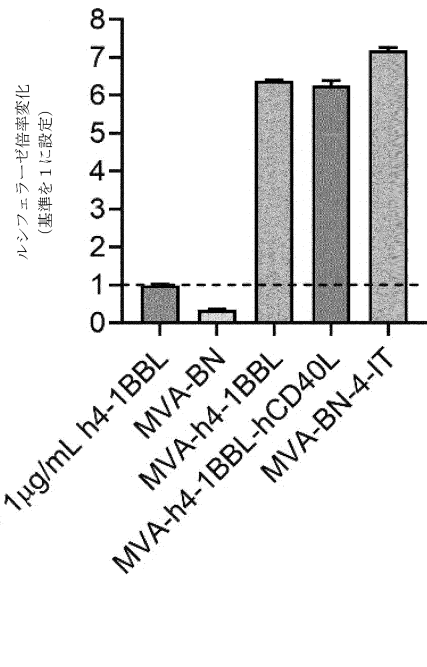
【 図 8 A 】

A



【 図 8 C 】

C



10

20

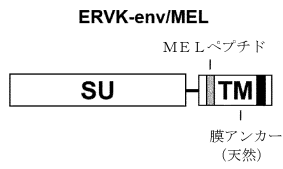
30

40

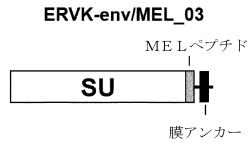
50

【 図 9 】

A

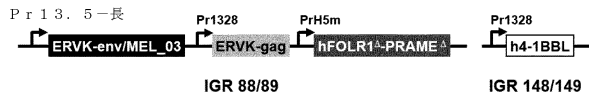


B



C

MVA-mBN502



10

【 配列表 】

[0007670705000001.app](#)

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 35/04 (2006.01)
C 1 2 N 7/01 (2006.01)

F I

A 6 1 P 35/04
C 1 2 N 7/01

(33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 20193706.7

(32)優先日 令和2年8月31日(2020.8.31)

(33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

微生物の受託番号 ECACC 0083008

(72)発明者 ヒンターベルガー・マリア

ドイツ連邦共和国、8 2 0 5 4 ザウアーラッハ、ダイゼンホーフエナー・ストラッセ、8

(72)発明者 メディナ・エチエベルス・ホセ

ドイツ連邦共和国、8 1 6 6 9 ミュンヒェン、ザンクト・カジェタンストラッセ、2 3

(72)発明者 ハビャン・マティアス

ドイツ連邦共和国、8 2 1 7 8 ブフハイム、ライナーストラッセ、1

(72)発明者 ハウスマン・ユルゲン

ドイツ連邦共和国、7 9 1 9 4 グンデルフィンゲン、アルテ・ブンデスストラッセ、1 3 0

(72)発明者 カッラ・マルクス

ドイツ連邦共和国、8 2 3 7 7 ベンツベルク、ヴェルフル、6 ツェー

審査官 池上 文緒

(56)参考文献 特表 2 0 1 9 - 5 0 0 9 0 7 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 4 / 0 3 7 1 2 4 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 9 / 0 3 8 3 8 8 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 2 0 / 1 0 4 5 3 1 (W O , A 1)

Vaccine, 2006年, vol.24, issue 23, p.4975-4986

PLoS One, 2014年, vol.9, issue 8, e105520, p.1-12

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 5 / 7 6 8

C 1 2 N 7 / 0 1

A 6 1 K 3 8 / 1 7

A 6 1 K 3 9 / 0 0

A 6 1 K 3 9 / 2 1

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 4

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)