

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-548746

(P2023-548746A)

(43)公表日 令和5年11月21日(2023.11.21)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76		4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/19 (2006.01)	C 1 2 N	15/19	Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 5
C 1 2 N	15/24 (2006.01)	C 1 2 N	15/24		4 C 0 8 7
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全196頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-520073(P2023-520073)	(71)出願人	523115900		
(86)(22)出願日	令和3年10月13日(2021.10.13)		クリヤ セラピューティクス インコーポ		
(85)翻訳文提出日	令和5年5月26日(2023.5.26)		レイテッド		
(86)国際出願番号	PCT/US2021/054871		アメリカ合衆国 9 4 3 0 6 カリフォル		
(87)国際公開番号	WO2022/081776		ニア州 パロ アルト ポーテージ アベニ		
(87)国際公開日	令和4年4月21日(2022.4.21)		ュー 3 8 0		
(31)優先権主張番号	63/091,270	(74)代理人	100102978		
(32)優先日	令和2年10月13日(2020.10.13)		弁理士 清水 初志		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100160923		
(31)優先権主張番号	63/108,838		弁理士 山口 裕孝		
(32)優先日	令和2年11月2日(2020.11.2)	(74)代理人	100119507		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 刑部 俊		
(31)優先権主張番号	63/141,921	(74)代理人	100142929		
			弁理士 井上 隆一		
		(74)代理人	100148699		
		最終頁に続く	最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 サイトカインをコードする核酸を送達するためのウイルスベクターコンストラクトおよびがんを処置するためのその使用

(57)【要約】

本開示は、免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントをコードする核酸の送達に適したベクター（例えばウイルスベクター）を含む遺伝子治療組成物、およびそれを使用する方法を提供する。本開示の特定の局面は、腫瘍への、2つ以上の免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントをコードする核酸のアデノ・ウイルスベクター（AAV）送達に向けられる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) (i) プロモーターと、(ii) 第1のインターロイキン-12 (IL-12) サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、(iii) 翻訳修飾配列と、(iv) 第2のIL-12サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチドを含むアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを含む第1組成物、および

(b) チェックポイント阻害物質を含む第2組成物を含む、併用療法。

【請求項 2】

AAVベクターがAAV血清型2 (AAV2) ベクターである、請求項1記載の併用療法。

【請求項 3】

翻訳修飾配列が、フューリン切断配列、2A自己プロセシングペプチド配列、配列内リボソーム進入部位 (IRES) 配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項1または2記載の併用療法。

【請求項 4】

翻訳修飾配列が、フューリン切断配列および2A自己プロセシングペプチド配列 (F2A) を含む、請求項3記載の併用療法。

【請求項 5】

プロモーターが、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1a (伸長因子1a) プロモーター、RSV (ラウス肉腫ウイルス) プロモーター、ユビキチン (UbC) プロモーター、CAGプロモーター、またはそれらの任意の組み合わせを含む、前記請求項のいずれか一項記載の併用療法。

【請求項 6】

前記ポリヌクレオチドが、ポリ (A) (pA) 配列をさらに含む、前記請求項のいずれか一項記載の併用療法。

【請求項 7】

前記ポリヌクレオチドが、2つの末端逆位反復配列 (ITR) 配列をさらに含む、前記請求項のいずれか一項記載の併用療法。

【請求項 8】

チェックポイント阻害物質が、プログラム細胞死タンパク質1 (PD-1)、プログラム死リガンド1 (PD-L1)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4 (CTLA-4)、リンパ球活性化遺伝子3 (LAG-3)、T細胞免疫グロブリンチン含有タンパク質3 (TIM-3)、BおよびTリンパ球アテニュエーター (BTLA)、IgおよびITIMドメインを持つT細胞免疫受容体 (TIGIT)、T細胞活性化のVドメインIgサブプレッサー (VISTA)、アデノシンA2a受容体 (A2aR)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR)、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO)、CD20、CD39、CD73、誘導性T細胞共刺激分子 (ICOS)、B7-H3の阻害物質、またはそれらの任意の組み合わせを含む、前記請求項のいずれか一項記載の併用療法。

【請求項 9】

チェックポイント阻害物質が、プログラム細胞死タンパク質1 (PD-1) 阻害物質を含む、前記請求項のいずれか一項記載の併用療法。

【請求項 10】

PD-1阻害物質が抗PD-1抗体である、請求項9記載の併用療法。

【請求項 11】

第1のIL-12サブユニットが、SEQ ID NO:80に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、第2のIL-12サブユニットが、SEQ ID NO:81に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項記載の併用療法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2】

第1核酸が、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、またはSEQ ID NO:77に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列を含み、第2核酸が、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、またはSEQ ID NO:92に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項記載の併用療法。

【請求項 1 3】

前記ポリヌクレオチドが、SEQ ID NO:82に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項記載の併用療法。

10

【請求項 1 4】

第1組成物が腫瘍内送達に適し、第2組成物が静脈内送達に適する、前記請求項のいずれか一項記載の併用療法。

【請求項 1 5】

腫瘍に罹患している対象を処置する方法であって、請求項1～14のいずれか一項記載の併用療法を該対象に施す工程を含む、該方法。

【請求項 1 6】

第1組成物が腫瘍内に投与される、請求項15記載の方法。

【請求項 1 7】

第1組成物が腫瘍の複数部位に投与される、請求項16記載の方法。

20

【請求項 1 8】

第1組成物が、第2組成物の投与前、投与と同時、または投与後に投与される、請求項15～17のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 9】

腫瘍が、皮膚がん、乳がん、脳のがん、骨がん、頭頸部がん、唾液腺がん、婦人科がん、泌尿器がん、胃腸がん、眼がん、胸部がん、血液がん、内分泌系のがん、軟部組織の肉腫、中枢神経系の新生物、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるがんに由来する、請求項15～18のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 0】

腫瘍が、肝細胞癌、結腸癌、および黒色腫からなる群より選択されるがんに由来する、請求項15～19のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 2 1】

(a) (i) プロモーターと、(ii) 第1サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、(iii) 翻訳修飾配列と、(iv) 第2サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および

(b) 送達ベクター

を含む、組成物。

【請求項 2 2】

第1サイトカインサブユニットおよび第2サイトカインサブユニットがIL-12サブユニットである、請求項21記載の組成物。

40

【請求項 2 3】

第1核酸または第2核酸が、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、またはSEQ ID NO:77と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む、請求項22記載の組成物。

【請求項 2 4】

第1核酸または第2核酸が、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、またはSEQ ID NO:92と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも

50

97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む、請求項22または23記載の組成物。

【請求項25】

(a) 第1免疫調節タンパク質、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、および/または第2免疫調節タンパク質、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントをコードする第2核酸、を含むポリヌクレオチド、ならびに

(b) 送達ベクター

を含む、組成物。

【請求項26】

第1免疫調節タンパク質、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメント、および/または第2免疫調節タンパク質、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントが、サイトカインまたはその機能的フラグメントである、請求項25記載の組成物。

【請求項27】

サイトカインが、腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α)、I型インターフェロン (INF)、II型IFN、インターロイキン (IL)-2、IL-12、IL-15、IL-21、IL-23、IL-27、IL-18、IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL17、IL33、TL1A、CD40L、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、それらの任意の機能的フラグメント、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項26記載の組成物。

【請求項28】

第1免疫調節タンパク質および第2免疫調節タンパク質がサイトカインである、請求項25～27のいずれか一項記載の組成物。

【請求項29】

第1免疫調節タンパク質が、IL-12、その1つもしくは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントである、請求項25～28のいずれか一項記載の組成物。

【請求項30】

第1核酸が、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸、および/またはIL-12 p40サブユニットをコードする核酸を含む、請求項25～29のいずれか一項記載の組成物。

【請求項31】

第1核酸が、SEQ ID NO:5～10、77のいずれかもしくは表2中の任意の核酸配列に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項25～30のいずれか一項記載の組成物。

【請求項32】

第2免疫調節タンパク質がIL-15またはその機能的フラグメントを含む、請求項25～31のいずれか一項記載の組成物。

【請求項33】

第2核酸がIL-15遺伝子を含む、請求項25～32のいずれか一項記載の組成物。

【請求項34】

第2核酸が、SEQ ID NO:11～13のいずれかもしくは表4中の任意の核酸配列に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項25～33のいずれか一項記載の組成物。

【請求項35】

第1免疫調節タンパク質、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメント、または第2免疫調節タンパク質、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントが、可溶性のCD40リガンド (CD40L)、CD19リガンド (CD19L)、CD48リガンド (CD48L)、CD20リガンド (CD20L)、それらの

10

20

30

40

50

任意の機能的フラグメント、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項25～27または29～34のいずれか一項記載の組成物。

【請求項36】

遺伝子治療組成物である、請求項21～35のいずれか一項記載の組成物。

【請求項37】

(a) 第1サイトカイン、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、および/または

(b) 第2サイトカイン、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項38】

第1サイトカインおよび第2サイトカインが、腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α)、I型インターフェロン (INF)、II型IFN、インターロイキン (IL) -2、IL-12、IL-15、IL-21、IL-23、IL-27、IL-18、IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL17、IL33、TL1A、CD40L、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、それらの任意の機能的フラグメント、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項37記載のポリヌクレオチド。

【請求項39】

第1サイトカインがIL-12、IL-18、IL-21、またはその機能的フラグメントである、請求項37または38のポリヌクレオチド。

【請求項40】

第1核酸が、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸、および/またはIL-12 p40サブユニットをコードする核酸を含む、請求項37～39のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項41】

第1核酸が、SEQ ID NO:5～10、77のいずれかもしくは表2中の任意の核酸配列に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項37～40のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項42】

第2サイトカインが、IL-15、IL-2、またはその機能的フラグメントである、請求項37～41のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項43】

第2核酸がIL-15遺伝子を含む、請求項37～42のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項44】

第2核酸が、SEQ ID NO:11～13、58のいずれかもしくは表4中の任意の核酸配列に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項37～43のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項45】

(i) プロモーターと、(ii) 第1サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、(iii) 翻訳修飾配列と、(iv) 第2サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含む、ポリヌクレオチド。

【請求項46】

第1サイトカインサブユニットおよび第2サイトカインサブユニットがIL-12サブユニットである、請求項45記載のポリヌクレオチド。

【請求項47】

第1核酸または第2核酸が、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、またはSEQ ID NO:77と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97

10

20

30

40

50

%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む、請求項45または46記載のポリヌクレオチド。

【請求項48】

第1核酸または第2核酸が、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、またはSEQ ID NO:92と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む、請求項45または46記載のポリヌクレオチド。

【請求項49】

前記ポリヌクレオチドがプロモーターをさらに含む、請求項21~36のいずれか一項記載の組成物または請求項37~48のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項50】

プロモーターが、第1核酸に機能的に連結された第1プロモーターを含む、請求項49記載の組成物またはポリヌクレオチド。

【請求項51】

プロモーターが、第2核酸に機能的に連結された第2プロモーターを含む、請求項49または50記載の組成物またはポリヌクレオチド。

【請求項52】

プロモーターが、恒常的に活性なプロモーター、細胞型特異的プロモーター、または誘導性プロモーターである、請求項48~50のいずれか一項記載の組成物またはポリヌクレオチド。

【請求項53】

プロモーターが、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1a（伸長因子1a）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、ユビキチン（UbC）プロモーター、CAGプロモーター、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項48~52のいずれか一項記載の組成物またはポリヌクレオチド。

【請求項54】

前記ポリヌクレオチドが、フューリン切断配列、2A自己プロセシングペプチド配列、配列内リボソーム進入部位（IRES）配列、またはそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される翻訳修飾配列をさらに含む、請求項21~36もしくは49~53のいずれか一項記載の組成物または請求項37~53のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項55】

前記ポリヌクレオチドが、エンハンサー配列、イントロン配列、マイクロRNA結合部位、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む、請求項21~36もしくは49~54のいずれか一項記載の組成物または請求項37~54のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項56】

前記ポリヌクレオチドがポリ（A）（pA）配列をさらに含む、請求項21~36もしくは49~55のいずれか一項記載の組成物または請求項37~55のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項57】

第1核酸が、IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーター、IRES配列、およびIL-15遺伝子またはその機能的フラグメントを含み、第2核酸が、IL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む、請求項21~36もしくは49~56のいずれか一項記載の組成物または請求項37~56のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項58】

第1核酸が、IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーター、フューリン切断配列および/または2A自己プロセシングペプチド配列、ならびにIL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメント

10

20

30

40

50

をコードする核酸を含み、第2核酸が、IL-15遺伝子またはその機能的フラグメントに機能的に連結されたプロモーターを含む、請求項21～36もしくは49～56のいずれか一項記載の組成物または請求項37～56のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項59】

第1核酸が、イントロン配列、pA配列、エンハンサー配列またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む、請求項57または58記載の組成物またはポリヌクレオチド。

【請求項60】

第1核酸が、イントロン配列およびヒト成長ホルモン（hGH）pA配列またはウシ成長ホルモン（bGH）pA配列をさらに含む、請求項59記載の組成物またはポリヌクレオチド。

【請求項61】

第2核酸が、イントロン配列、pA配列、エンハンサー配列、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む、請求項57～60のいずれか一項記載の組成物またはポリヌクレオチド。

【請求項62】

第2核酸が、SV40イントロン配列および合成（SYN）pA配列をさらに含む、請求項61記載の組成物またはポリヌクレオチド。

【請求項63】

前記ポリヌクレオチドがCMVエンハンサー配列を含む、請求項21～36もしくは49～62のいずれか一項記載の組成物または請求項37～62のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項64】

第1核酸のプロモーターが、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1a（伸長因子1a）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、ユビキチン（UbC）プロモーター、またはCAGプロモーターを含む、請求項21～36もしくは49～63のいずれか一項記載の組成物または請求項37～63のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項65】

第2核酸のプロモーターが、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1a（伸長因子1a）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、ユビキチン（UbC）プロモーター、またはCAGプロモーターを含む、請求項21～36もしくは49～64のいずれか一項記載の組成物または請求項37～64のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項66】

前記ポリヌクレオチドが2つの末端逆位反復配列（ITR）をさらに含む、請求項21～36もしくは49～65のいずれか一項記載の組成物または請求項37～65のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項67】

請求項37～66のいずれか一項記載のポリヌクレオチドまたは請求項107～116のいずれか一項記載の発現コンストラクトと、送達ベクターとを含む、組成物。

【請求項68】

腫瘍内、静脈内、腹腔内、脾臓内、髄腔内、肝臓内、骨内、皮内、もしくは実質内投与、または唾液腺への、もしくはリンパ節中への送達に適している、請求項21～36または49～67のいずれか一項記載の組成物。

【請求項69】

送達ベクターが、ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、およびヴォールト粒子からなる群より選択される、請求項21～36または49～68のいずれか一項記載の組成物。

【請求項70】

送達ベクターが、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、またはレトロウイルスベクターからなる群より選択される、請

10

20

30

40

50

請求項21～36または49～69のいずれか一項記載の組成物。

【請求項71】

送達ベクターが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11およびAAV12からなる群より選択されるAAV血清型を含む組換えAAV（rAAV）ベクターである、請求項21～36または49～70のいずれか一項記載の組成物。

【請求項72】

rAAVベクターがAAV2血清型である、請求項71記載の組成物。

【請求項73】

rAAVが野生型の血清型と比較して改変されている、請求項71または72記載の組成物。

10

【請求項74】

(a) IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結されたCAGプロモーターと、2A自己プロセシングペプチド（F2A）配列が続くフューリン切断配列と、IL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸と、成長ホルモンpA配列とを含むポリヌクレオチド、および

(b) AAVベクターを含む、組成物。

【請求項75】

腫瘍内送達に適した、請求項37～66のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含むアデノ随伴ウイルス（AAV）カプシド。

20

【請求項76】

AAVカプシド血清型が、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11およびAAV12からなる群より選択される、請求項75記載のAAVカプシド。

【請求項77】

AAV血清型がAAV2である、請求項76記載のAAVカプシド。

【請求項78】

AAVが野生型の血清型と比較して改変されている、請求項76または77記載のAAVカプシド。

30

【請求項79】

1つまたは複数の免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントを、その必要のある対象において発現させる方法であって、有効量の、請求項21～36もしくは49～74のいずれか一項記載の組成物、請求項37～66のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、または請求項75～78のいずれか一項記載のAAVカプシドを該対象に投与する工程を含む、該方法。

【請求項80】

投与が、腫瘍内投与、静脈内投与、脾臓内投与、髄腔内投与、肝臓内投与、骨内投与、皮内投与、実質内投与、唾液腺への送達による投与、またはリンパ節中への投与である、請求項79記載の方法。

40

【請求項81】

請求項21～36もしくは49～64のいずれか一項記載の組成物、請求項37～66のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、または請求項75～78のいずれか一項記載のAAVカプシドを、腫瘍への直接注射によって投与する工程を含む、1つまたは複数の免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントを腫瘍に送達する方法。

【請求項82】

腫瘍に罹患している対象において症状を処置または低減する方法であって、請求項21～36もしくは49～64のいずれか一項記載の組成物、請求項37～66のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、または請求項75～78のいずれか一項記載のAAVカプシドを該対象に投与する工程を含み、投与が、腫瘍内投与、静脈内投与、脾臓内投与、髄腔内投与、肝

50

臓内投与、骨内投与、皮内投与、実質内投与、唾液腺への送達による投与、またはリンパ球中への投与である、該方法。

【請求項 8 3】

その必要のある対象において腫瘍のサイズを低減する方法であって、請求項 21～36 もしくは 49～64 のいずれか一項記載の組成物、請求項 37～66 のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、または請求項 75～78 のいずれか一項記載の AAV カプシドを該対象に投与する工程を含み、投与が、腫瘍内投与、静脈内投与、脾臓内投与、髄腔内投与、肝臓内投与、骨内投与、皮内投与、実質内投与、唾液腺への送達による投与、またはリンパ球中への投与である、該方法。

【請求項 8 4】

腫瘍に罹患している対象において症状を処置または低減する方法であって、

(a) (i) IL-12 p35 サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第 1 核酸と、(ii) IL-12 p40 サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第 2 核酸とを含むポリヌクレオチド、および

(b) AAV ベクター

を含む組成物を該対象に投与する工程を含み、任意で、チェックポイント阻害物質を投与する工程をさらに含む、該方法。

【請求項 8 5】

その必要のある対象において腫瘍のサイズを低減する方法であって、

(a) (i) IL-12 p35 サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第 1 核酸と、(ii) IL-12 p40 サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第 2 核酸とを含むポリヌクレオチド、および

(b) AAV ベクター

を含む組成物を該対象に投与する工程を含み、任意で、チェックポイント阻害物質を投与する工程をさらに含む、該方法。

【請求項 8 6】

前記組成物の投与が、腫瘍内投与、静脈内投与、腹腔内投与、脾臓内投与、髄腔内投与、肝臓内投与、骨内投与、皮内投与、実質内投与、唾液腺への送達による投与、またはリンパ節中への投与である、請求項 84 または 85 記載の方法。

【請求項 8 7】

腫瘍が、肝細胞癌、結腸癌、黒色腫、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるがんに由来する、請求項 81～86 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 8】

前記対象が、肝細胞癌、結腸癌、黒色腫、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるがんに罹患している、請求項 79～86 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 9】

腫瘍が、皮膚がん、乳がん、脳のがん、骨がん、頭頸部がん、唾液腺がん、婦人科がん、泌尿器がん、胃腸がん、眼がん、胸部がん、血液がん、リンパ腫、内分泌系のがん、軟部組織の肉腫、中枢神経系の新生物、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるがんに由来する、請求項 81～86 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9 0】

前記対象が、転移性黒色腫、皮膚悪性黒色腫、皮膚扁平上皮癌、基底細胞癌、浸潤性乳がん、トリプルネガティブ乳がん、炎症性乳がん、多形性神経膠芽腫、髄芽腫、下垂体癌、脳幹神経膠腫、星状細胞腫、乏突起神経膠腫、血管周囲細胞腫、胚細胞性腫瘍、松果体腫瘍、脊索腫、軟骨肉腫、骨肉腫、ユーイング肉腫、線維肉腫、アダマンチノーマ、巨細胞腫、頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC)、唾液腺がん、中咽頭がん、下咽頭がん、喉頭がん、口唇・口腔がん、鼻咽頭がん、甲状腺がん、副甲状腺のがん、副鼻腔・鼻腔がん、卵巣がん、子宮がん、卵管がん、子宮内膜がん、子宮頸がん、膣がん、外陰がん、腎がん、尿道がん、尿路上皮がん、膀胱がん、腎臓または尿管のがん、腎盂のがん、精巣がん、陰茎がん、副腎のがん、肛門部のがん、胆管がん、結腸がん、小腸のがん、食道がん、胆嚢が

10

20

30

40

50

ん、消化管間質腫瘍、肝がん、膵がん、直腸がん、胃がん、ぶどう膜黒色腫、網膜芽細胞腫、メルケル細胞癌、眼内悪性黒色腫、粘膜関連リンパ組織リンパ腫、眼窩リンパ腫、眼窩肉腫、涙腺腫瘍、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、中皮腫、胸腺悪性疾患、気管腫瘍、一部の食道がん、慢性または急性白血病、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）（非T細胞性ALLを含む）、慢性リンパ性白血病（CLL）、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（NHL）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、縦隔原発B細胞性大細胞型リンパ腫（PMBC）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、濾胞性リンパ腫（FL）、形質転換濾胞性リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫（SMZL）、皮膚T細胞性リンパ腫（CTCL）、リンパ球性リンパ腫、原発性CNSリンパ腫、多発性骨髄腫、CNS;非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍、脊髄軸腫瘍、腫瘍血管新生、カボジ肉腫、類表皮がん、アスベストが誘発するがんを含む環境誘発性がん、他のB細胞性悪性疾患、神経芽細胞腫、嗅神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるがん罹患している、請求項15～20または79～89のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項91】

第1核酸と第2核酸が同時にまたは逐次的に投与される、請求項81～90のいずれか一項記載の方法。

【請求項92】

同時投与が、請求項21～36もしくは49～64のいずれか一項記載の組成物、請求項37～66のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、または請求項75～78のいずれか一項記載のAAVカプシドを投与する工程を含み、第1核酸と第2核酸が同じ送達ベクターまたは同じAAVカプシド中にある、請求項91記載の方法。

20

【請求項93】

同時投与または逐次投与が、請求項21～36もしくは49～64のいずれか一項記載の組成物、請求項37～66のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、または請求項75～8のいずれか一項記載のAAVカプシドを投与する工程を含み、第1核酸と第2核酸が異なる送達ベクターまたは異なるAAVカプシド中にある、請求項91記載の方法。

【請求項94】

請求項21～36もしくは49～64のいずれか一項記載の組成物、請求項37～66のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、または請求項75～78のいずれか一項記載のAAVカプシドが、チェックポイント阻害物質と組み合わせて投与される、請求項81～93のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項95】

チェックポイント阻害物質が、プログラム細胞死タンパク質1（PD-1）、プログラム死リガンド1（PD-L1）、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA-4）、リンパ球活性化遺伝子3（LAG-3）、T細胞免疫グロブリンムチン含有タンパク質3（TIM-3）、BおよびTリンパ球アテニュエーター（BTLA）、IgおよびITIMドメインを持つT細胞免疫受容体（TIGIT）、T細胞活性化のVドメインIgサプレッサー（VISTA）、アデノシンA2a受容体（A2aR）、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）、CD20、CD39、CD73、誘導性T細胞共刺激分子（ICOS）、B7-H3の阻害物質、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項94記載の方法。

40

【請求項96】

チェックポイント阻害物質がPD-1阻害物質である、請求項94または95記載の方法。

【請求項97】

PD-1阻害物質が抗PD-1抗体である、請求項96記載の方法。

【請求項98】

チェックポイント阻害物質がPD-L1阻害物質である、請求項1～8、94または95のいずれか一項記載の方法。

【請求項99】

50

チェックポイント阻害物質がCTLA-4阻害物質である、請求項1～8、94または95のいずれか一項記載の方法。

【請求項100】

チェックポイント阻害物質が、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、トリパリマブ、スパルタリズマブ、ドスタリマブ-gxly、チスレリズマブ、バルスチリマブ、BI-754091、ジムベレリマブ、INCMGA00012、カムレリズマブ、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項1～8または94～99のいずれか一項記載の方法。

【請求項101】

請求項21～36または49～64のいずれか一項記載の組成物、請求項37～66のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、または請求項75～78のいずれか一項記載のAAVカプシドが、チェックポイント阻害物質の投与前、投与と同時に、または投与後に投与される、請求項94～100のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項102】

転移リンパ節中のリンパ節、請求項68、82、83または86のいずれか一項記載の方法。

【請求項103】

腫瘍が転移性腫瘍である、請求項15～20および81～102のいずれか一項記載の方法。

【請求項104】

前記投与が、腫瘍への第1組成物または前記ポリヌクレオチドを含む組成物の直接注射を含む、請求項15～20および81～102のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項105】

SEQ ID NO:5～37、48～57、77、82もしくは92のいずれか、表2、表4もしくは表5に示される任意の核酸に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む、ポリヌクレオチド。

【請求項106】

SEQ ID NO:82に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項107】

- (a) X-I1-P1-E-P2-I2-X'-T-Y;
- (b) Y-I1-P1-E-P2-I2-X-T-X';
- (c) pA-X-I1-L-P1-E-P2-I2-X-T-Y-pA;
- (d) pA-Y-I1-L-P1-E-P2-I2-X-T-X'-pA;
- (e) P1-X-T-X'-pA;または
- (f) E-P1-I1-X-T-X'-pA

30

から選択される式を含む発現コンストラクトであって、式中、XおよびX'は第1免疫調節分子のサブユニットをコードし、I1およびI2はそれぞれイントロンであり、PおよびP2はそれぞれプロモーターであり、Eはエンハンサーであり、Tは翻訳修飾配列であり、Yは第2免疫調節分子をコードし、Lは長鎖末端反復 (long-terminal repeat) であり、pAはポリA配列である、該発現コンストラクト。

40

【請求項108】

P1またはP2が、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1a (伸長因子1a) プロモーター、RSV (ラウス肉腫ウイルス) プロモーター、ユビキチン (UbC) プロモーター、CAGプロモーター、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項107記載の発現コンストラクト。

【請求項109】

Tが、配列内リボソーム進入部位 (IRES) 配列、フューリン切断配列、2A自己プロセシングペプチド配列、またはそれらの任意の組み合わせである、請求項107または108記載の発現コンストラクト。

【請求項110】

50

マイクロRNA結合部位をさらに含む、請求項107～109のいずれか一項記載の発現コンストラクト。

【請求項111】

Xが、IL-12サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸であり、X'が、IL-12サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸であり、Yが、IL-15遺伝子またはその機能的フラグメントである、請求項107～110のいずれか一項記載の発現コンストラクト。

【請求項112】

Xが、IL-12サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸であり、X'が、IL-12サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸である、請求項107～110のいずれか一項記載の発現コンストラクト。

10

【請求項113】

IL-12サブユニットをコードする核酸が、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸またはIL-12 p40サブユニットをコードする核酸である、請求項111または112記載の発現コンストラクト。

【請求項114】

pAが、ヒト成長ホルモン(hGH) pA配列、ウシ成長ホルモン(BGH) pA配列、または合成(SYN) pA配列を含む、請求項107～113のいずれか一項記載の発現コンストラクト。

【請求項115】

20

I1、I2、またはその両方が、SV40イントロン配列またはCAGイントロン配列を含む、請求項107～114のいずれか一項記載の発現コンストラクト。

【請求項116】

EがCMVエンハンサー配列を含む、請求項107～115のいずれか一項記載の発現コンストラクト。

【請求項117】

その必要のある対象に、(a) 請求項21～36もしくは49～64のいずれか一項記載の組成物、請求項37～66もしくは105～106のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、請求項107～116のいずれか一項記載の発現コンストラクト、または請求項75～78のいずれか一項記載のAAVカプシドと、(b) チェックポイント阻害物質とを投与する工程を含む、対象における腫瘍縮小を誘導するための方法。

30

【請求項118】

チェックポイント阻害物質がPD-1阻害物質である、請求項117記載の方法。

【請求項119】

PD-1阻害物質が抗PD-1抗体である、請求項118記載の方法。

【請求項120】

抗PD-1抗体がペンブロリズマブまたはニボルマブである、請求項10記載の併用療法または請求項97もしくは119記載の方法。

【請求項121】

腫瘍が、肝細胞癌、結腸癌または黒色腫からなる群より選択されるがん由来する、請求項117～120のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項122】

請求項21～36もしくは49～64のいずれか一項記載の組成物、請求項37～66もしくは105～106のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、請求項107～116のいずれか一項記載の発現コンストラクト、または請求項75～78のいずれか一項記載のAAVカプシドが、腫瘍への直接注射によって投与される、請求項81～102、94～104または117～121のいずれか一項記載の方法。

【請求項123】

直接注射が腫瘍中への2回以上の注射を含む、請求項81、104または122のいずれか一項記載の方法。

50

【請求項 1 2 4】

チェックポイント阻害物質が静脈内注入によって投与される、請求項 15～20、84、85、94～104または117～123のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 2 5】

治療または予防における使用のための、請求項 1～14のいずれか一項記載の併用療法、請求項 21～36もしくは49～64のいずれか一項記載の組成物、請求項 37～66もしくは105～106のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、請求項 75～78のいずれか一項記載のAAVカプシド、または請求項 107～116のいずれか一項記載の発現コンストラクト。

【請求項 1 2 6】

遺伝子治療における使用のための、請求項 125記載の併用療法、組成物、ポリヌクレオチド、AAVカプシドまたは発現コンストラクト。

【請求項 1 2 7】

がん治療における使用のための、請求項 125または127記載の併用療法、組成物、ポリヌクレオチド、AAVカプシドまたは発現コンストラクト。

【請求項 1 2 8】

請求項 15～20、79～104、または117～124のいずれか一項記載の方法における使用のための、請求項 125～127のいずれか一項記載の併用療法、組成物、ポリヌクレオチド、AAVカプシドまたは発現コンストラクト。

【請求項 1 2 9】

請求項 21～36もしくは49～64のいずれか一項記載の組成物、請求項 37～66もしくは105～106のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、請求項 75～78のいずれか一項記載のAAVカプシド、または請求項 107～116のいずれか一項記載の発現コンストラクトを含む、薬学的組成物。

【請求項 1 3 0】

薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、請求項 129記載の薬学的組成物。

【請求項 1 3 1】

治療または予防における使用のための医薬の製造のための、請求項 1～14のいずれか一項記載の併用療法、請求項 21～36もしくは49～64のいずれか一項記載の組成物、請求項 37～66もしくは105～106～87のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、請求項 75～78のいずれか一項記載のAAVカプシド、または請求項 107～116のいずれか一項記載の発現コンストラクトの使用。

【請求項 1 3 2】

治療または予防が請求項 15～20、79～104または117～124のいずれか一項記載の方法を含む、請求項 131記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2021年4月30日に出願された米国仮出願第63/182,632号、2021年1月26日に出願された米国仮出願第63/141,921号、2020年11月2日に出願された米国仮出願第63/108,838号、および2020年10月13日に出願された米国仮出願第63/091,270号の優先権の恩典を主張し、これら仮出願のそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0002】

EFS-WEBを介して電子送信された配列表の参照

本願と共に提出される、ASCIIテキストファイルとして電子送信された、配列表（ファイル名:4525__032PC04__Seqlisting__ST25.txt、サイズ:254,424バイト、作成日:2021年10月13日）の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0003】

開示の分野

10

20

30

40

50

本開示は、腫瘍学および遺伝子治療を含む医療分野に関係する。本開示のある特定の局面は、免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）またはその機能的フラグメントを発現させるための組成物および方法、ならびにその使用に関する。

【背景技術】

【0004】

背景

サイトカインは免疫系の調節に関与する。がん治療に使用した場合、サイトカインは、抗腫瘍効果を有する免疫調節剤として作用することができ、さまざまなタイプの腫瘍に対する免疫応答を増加させることができる。しかし、迅速な血中クリアランスおよび腫瘍特異性の欠如ゆえに、免疫応答を活性化しまたは抗腫瘍効果を示すのに十分なサイトカイン濃度を腫瘍部位および/または他の関連組織（例えばリンパ節および脾臓）において達成するには、高用量のサイトカインを全身性に投与する必要がある。しかし、高レベルの全身性サイトカインは、臨床的に激しい毒性および有害反応につながりうる。

10

【発明の概要】

【0005】

概要

いくつかの局面において、本明細書では、（a）サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメント（例えばIL-12、またはその1つもしくは複数のサブユニット）をコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含む、ウイルスベクター（例えばAAVカプシド）と、任意で、（b）チェックポイント阻害物質（例えばPD-1またはPDL-1阻害物質）との組み合わせを含む、組成物（例えば遺伝子治療組成物）および方法が提供される。いくつかの局面では、ウイルスベクター（例えばポリヌクレオチドを含むAAVカプシド、これを本明細書ではAAV粒子ともいう）とチェックポイント阻害物質とが組み合わされて（例えば同時にまたは逐次的に）送達される。いくつかの局面において、本明細書記載のウイルスベクター（例えばAAV粒子）は、チェックポイント阻害物質の投与前、投与と同時、または投与後に投与することができる。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは、（i）第1サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、（ii）第2サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含む。いくつかの局面において、第1核酸は、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸および/またはIL-12 p40サブユニットをコードする核酸を含む。いくつかの局面において、第2核酸は、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸および/またはIL-12 p40サブユニットをコードする核酸を含む。

20

30

【0006】

いくつかの局面において、第1核酸は、SEQ ID NO:80もしくは81のいずれかのアミノ酸配列または表3中の任意のアミノ酸配列に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するポリペプチドをコードする。いくつかの局面において、第1核酸をコードする核酸（例えばIL-12 p35サブユニットをコードする核酸および/またはIL-12 p40サブユニットをコードする核酸）は、インフレームの停止コドン（例えばTGA、TAG、およびTAA）を含まない。いくつかの局面において、第1核酸および/または第2核酸は、SEQ ID NO:5~10、77、92のいずれかまたは表2中の任意の核酸配列に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの局面において、第1核酸および/または第2核酸は、SEQ ID NO:5~10、77、92のいずれかまたは表2中の任意の核酸配列の逆相補鎖に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの局面において、第1核酸は、SEQ ID NO:77に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列を含み、第2核酸は、SEQ ID NO:8に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列を含む。

40

【0007】

50

いくつかの局面において、本明細書では、(i) 第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、(ii) 第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための、1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）を含む、組成物および方法が提供される。いくつかの局面において、各送達ベクター（例えばウイルスベクター）は、第1核酸と第2核酸とを含むポリヌクレオチドを含む。いくつかの局面において、各送達ベクター（例えばウイルスベクター）は、第1核酸または第2核酸のどちらか一方を含み、この場合は、2つ以上の送達ベクターが組み合わされて（例えば同時にまたは逐次的に）送達される。いくつかの局面において、送達ベクターは、第1免疫調節タンパク質と第2免疫調節タンパク質のサブユニットとをコードする核酸を含むコンストラクトを含む。

10

【0008】

いくつかの局面において、(i) 第1免疫調節タンパク質、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、および/または(ii) 第2免疫調節タンパク質、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を送達するための送達ベクター（例えばウイルスベクター）は、チェックポイント阻害物質と組み合わせて投与される。いくつかの局面において、本明細書記載の送達ベクターは、チェックポイント阻害物質の投与前、投与と同時、または投与後に投与することができる。いくつかの局面において、ウイルスベクターは、第1免疫調節タンパク質と第2免疫調節タンパク質のサブユニットとをコードする核酸を含むコンストラクトを含む。

20

【0009】

いくつかの局面では、2つ以上の本明細書記載の送達ベクター（例えばウイルスベクター）が組み合わされて（例えば同時にまたは逐次的に）、かつチェックポイント阻害物質とさらに組み合わされて、送達される。いくつかの局面において、2つ以上の本明細書記載の送達ベクターは、チェックポイント阻害物質の投与前、投与と同時、または投与後に、投与することができる。

【0010】

いくつかの局面において、本明細書では、(a) 第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および(b) 送達ベクター（例えばウイルスベクター）を含む、組成物が提供される。

30

【0011】

いくつかの局面において、本明細書では、(a) 第1サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、(b) 第2サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含む、ポリヌクレオチドが提供される。

【0012】

いくつかの局面において、第1免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントおよび/または第2免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントは、サイトカインまたはその機能的フラグメントである。

40

【0013】

いくつかの局面において、サイトカイン（例えば第1サイトカインおよび/または第2サイトカイン）は、腫瘍壊死因子アルファ（TNF- α ）、I型インターフェロン（INF）、II型IFN、インターロイキン（IL）-2、IL-12、IL-15、IL-21、IL-23、IL-27、IL-18、IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL17、IL33、TL1A、CD40L、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、それらの任意の機能的フラグメント、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。

【0014】

50

いくつかの局面において、第1免疫調節タンパク質および第2免疫調節タンパク質はサイトカインである。

【0015】

いくつかの局面において、第1免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）はIL-12またはその機能的フラグメントである。いくつかの局面において、第1核酸はIL-12 p35遺伝子および/またはIL-12 p40遺伝子を含む。いくつかの局面において、第1免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）はIL-12またはその機能的フラグメントである。いくつかの局面において、第1核酸は、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸および/またはIL-12 p40サブユニットをコードする核酸を含む。いくつかの局面において、第1核酸は、SEQ ID NO:80もしくは81のいずれかのアミノ酸配列または表3中の任意のアミノ酸配列に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するポリペプチドをコードする。いくつかの局面において、第1核酸をコードする核酸（例えばIL-12 p35サブユニットをコードする核酸および/またはIL-12 p40サブユニットをコードする核酸）は、インフレームの停止コドン（例えばTGA、TAG、およびTAA）を含まない。いくつかの局面において、第1核酸は、SEQ ID NO:5~10、77のいずれかまたは表2中の任意の核酸配列に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの局面において、第1核酸は、SEQ ID NO:5~10、77、92のいずれかまたは表2中の任意の核酸配列の逆相補鎖に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列を含む。

10

20

【0016】

いくつかの局面において、第2免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）は、IL-15またはその機能的フラグメントを含む。いくつかの局面において、第2核酸はIL-15遺伝子を含む。いくつかの局面において、第2核酸は、SEQ ID NO:11~13、58のいずれかまたは表4中の任意の核酸配列に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの局面において、第2核酸は、SEQ ID NO:11~13、58のいずれかまたは表4中の任意の核酸配列の逆相補鎖に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列を含む。

【0017】

いくつかの局面において、本明細書では、IL-12、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントとIL-15またはその機能的フラグメントとの組み合わせをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを送達するための、1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）を含む、組成物および方法が提供される。いくつかの局面において、送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）。いくつかの局面において、各送達ベクターは、IL-12、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドとIL-15またはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドとを含む、AAVカプシド（例えばAAV2カプシド）である。

30

40

【0018】

いくつかの局面において、各送達ベクターは、IL-12、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドまたはIL-15もしくはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドのどちらか一方を含むAAVカプシド（例えばAAV2カプシド）であり、この場合は、それらAAVカプシドのうちの2つ以上が、組み合わせられて（例えば同時にまたは逐次的に）、例えば腫瘍内、静脈内、脾臓内、髄腔内、肝臓内に、または骨内注入によって、または皮内、実質内に、または唾液腺への送達によって、またはリンパ節中への送達によって、送達される。いくつかの局面において、IL-12、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドを含むAAVカプシド（例えばAAV2カプシド）は、腫

50

瘍内に投与される。

【0019】

いくつかの局面において、本明細書では、IL-18またはその機能的フラグメントとIL-15またはその機能的フラグメントとの組み合わせをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを送達するための、1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）を含む、組成物および方法が提供される。いくつかの局面において、各送達ベクターは、IL-18またはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドとIL-15またはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドとを含む、AAVカプシド（例えばAAV2カプシド）である。いくつかの局面において、各送達ベクターは、IL-18もしくはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドまたはIL-15もしくはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドのどちらか一方を含むAAVカプシド（例えばAAV2カプシド）であり、この場合は、それらAAVカプシドのうちの2つ以上が、組み合わせられて（例えば同時にまたは逐次的に）、例えば腫瘍内、脾臓内、髄腔内、肝臓内に、または骨内注入によって、または皮内、実質内に、または唾液腺への送達によって、またはリンパ節中への送達によって、送達される。いくつかの局面において、IL-18もしくはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドまたはIL-15もしくはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドを含むAAVカプシド（例えばAAV2カプシド）は、腫瘍内に投与される。

10

【0020】

いくつかの局面において、本明細書では、IL-12、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントとIL-2またはその機能的フラグメントとの組み合わせをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを送達するための、1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）を含む、組成物および方法が提供される。いくつかの局面において、各送達ベクターは、IL-12、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドとIL-2またはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドとを含む、AAVカプシド（例えばAAV2カプシド）である。いくつかの局面において、各送達ベクターは、IL-12、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドまたはIL-2もしくはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドのどちらか一方を含むAAVカプシド（例えばAAV2カプシド）であり、この場合は、それらAAVカプシドのうちの2つ以上が、組み合わせられて（例えば同時にまたは逐次的に）、例えば腫瘍内、静脈内、脾臓内、髄腔内、肝臓内に、または骨内注入によって、または皮内、実質内に、または唾液腺への送達によって、またはリンパ節中への送達によって、送達される。いくつかの局面において、IL-12もしくはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドまたはIL-2もしくはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドを含むAAVカプシド（例えばAAV2カプシド）は、腫瘍内に投与される。

20

30

【0021】

いくつかの局面において、本明細書では、IL-18またはその機能的フラグメントとIL-2またはその機能的フラグメントとの組み合わせをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを送達するための、1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）を含む、組成物および方法が提供される。いくつかの局面において、各送達ベクターは、IL-18またはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドとIL-2またはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドとを含む、AAVカプシド（例えばAAV2カプシド）である。いくつかの局面において、各送達ベクターは、IL-18もしくはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドまたはIL-2もしくはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドのどちらか一方を含むAAVカプシド（例えばAAV2カプシド）であり、この場合は、それらAAVカプシドのうちの2つ以上が、組み合わせられて（例えば同時にまたは逐次的に）、例えば腫瘍内、静脈内、脾臓内、髄腔内、肝臓内に、または骨内注入によって、または皮内、実質内に、または唾液腺への送達によって、またはリンパ節中への送達によって、送達される。いくつかの局面において、IL-18

40

50

もしくはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドまたはIL-2もしくはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドを含むAAVカプシド（例えばAAV2カプシド）は、腫瘍内に投与される。

【0022】

いくつかの局面において、本明細書では、IL-21またはその機能的フラグメントとIL-15またはその機能的フラグメントとの組み合わせをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを送達するための、1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）を含む、組成物および方法が提供される。いくつかの局面において、各送達ベクターは、IL-21またはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドとIL-15またはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドとを含む、AAVカプシド（例えばAAV2カプシド）である。いくつかの局面において、各送達ベクターは、IL-21もしくはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドまたはIL-15もしくはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドのどちらか一方を含むAAVカプシド（例えばAAV2カプシド）であり、この場合は、それらAAVカプシドのうちの2つ以上が、組み合わせられて（例えば同時にまたは逐次的に）、例えば腫瘍内、静脈内、脾臓内、髄腔内、肝臓内に、または骨内注入によって、または皮内、実質内に、または唾液腺への送達によって、またはリンパ節中への送達によって、送達される。いくつかの局面において、IL-21もしくはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドまたはIL-15もしくはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドを含むAAVカプシド（例えばAAV2カプシド）は、腫瘍内に投与される。

【0023】

いくつかの局面において、第1免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントまたは第2免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントは、可溶性のナチュラルキラー（NK）、B細胞、T細胞、好中球および/またはマクロファージリガンドである。

【0024】

いくつかの局面において、第1免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントまたは第2免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントは、可溶性のCD40リガンド（CD40L）、CD19リガンド（CD19L）、CD48リガンド（CD48L）、CD20リガンド（CD20L）、それらの任意の機能的フラグメント、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。

【0025】

いくつかの局面において、本明細書において開示されるポリヌクレオチドは、プロモーターをさらに含む。

【0026】

いくつかの局面において、プロモーターは、第1核酸に機能的に連結された第1プロモーターを含む。

【0027】

いくつかの局面において、プロモーターは、第2核酸に機能的に連結された第2プロモーターを含む。

【0028】

いくつかの局面において、プロモーターは、恒常的に活性なプロモーター、細胞型特異的プロモーター、または誘導性プロモーターである。

【0029】

いくつかの局面において、プロモーターは、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1a（伸長因子1a）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、ユビキチン（UbC）プロモーター、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0030】

いくつかの局面において、本明細書において開示されるポリヌクレオチドは、配列内リボソーム進入部位（IRES）配列、フューリン切断配列、2A自己プロセシングペプチド配列（F2A、E2A、P2AまたはT2A自己プロセシングペプチドを含む）、またはそれらの

組み合わせを、さらに含む。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは、フューリン切断配列および2A自己プロセシングペプチド配列（例えばF2A）を含む。

【0031】

いくつかの局面において、本明細書において開示されるポリヌクレオチドは、エンハンサー配列、イントロン配列、またはそれらの組み合わせを、さらに含む。

【0032】

いくつかの局面において、本明細書において開示されるポリヌクレオチドは、ポリ（A）（pA）配列（例えば成長ホルモンpA）をさらに含む。

【0033】

いくつかの局面において、本開示のポリヌクレオチドは、IL-12 p35遺伝子またはその機能的フラグメント（例えばSEQ ID NO:77に対応するもの）に機能的に連結されたプロモーター、フューリン切断配列および/または2A自己プロセシングペプチド配列（F2A、E2A、P2AまたはT2A自己プロセシングペプチドを含む）、ならびにIL-12 p40遺伝子またはその機能的フラグメント（例えばSEQ ID NO:8に対応するもの）、ならびにpA配列（例えば成長ホルモンpA）を含む。

【0034】

いくつかの局面において、第1核酸は、IL-12 p35遺伝子またはその機能的フラグメントに機能的に連結されたプロモーター、IRES配列、およびIL-15遺伝子またはその機能的フラグメントを含み、第2核酸は、IL-12 p40遺伝子またはその機能的フラグメントに機能的に連結されたプロモーターを含む。いくつかの局面において、第1核酸は、IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーター、IRES配列、およびIL-15遺伝子またはその機能的フラグメントを含み、第2核酸は、IL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む。

【0035】

いくつかの局面において、第1核酸は、IL-12 p35遺伝子またはその機能的フラグメントに機能的に連結されたプロモーター、フューリン切断配列および/または2A自己プロセシングペプチド配列（F2A、E2A、P2AまたはT2A自己プロセシングペプチドを含む）、ならびにIL-12 p40遺伝子またはその機能的フラグメントを含み、第2核酸は、IL-15遺伝子またはその機能的フラグメントに機能的に連結されたプロモーターを含む。いくつかの局面において、第1核酸は、IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーター、フューリン切断配列および/または2A自己プロセシングペプチド配列（F2A、E2A、P2AまたはT2A自己プロセシングペプチドを含む）、ならびにIL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸を含み、第2核酸は、IL-15遺伝子またはその機能的フラグメントに機能的に連結されたプロモーターを含む。

【0036】

いくつかの局面において、第1核酸は、イントロン配列、pA配列、エンハンサー配列、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む。

【0037】

いくつかの局面において、第1核酸は、ヒト成長ホルモン（hGH）pA配列をさらに含む。

【0038】

いくつかの局面において、第1核酸は、イントロン配列およびウシ成長ホルモン（BGH）pA配列をさらに含む。

【0039】

いくつかの局面において、第2核酸は、イントロン配列、pA配列、エンハンサー配列、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む。

【0040】

いくつかの局面において、第2核酸は、SV40イントロン配列および合成（SYN）pA配

10

20

30

40

50

列をさらに含む。

【0041】

いくつかの局面において、第1核酸のプロモーターは、CMVプロモーター、CBAプロモーター、EF-1a（伸長因子1a）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、またはユビキチン（UbC）プロモーターを含む。

【0042】

いくつかの局面において、第2核酸のプロモーターは、CMVプロモーター、CBAプロモーター、EF-1a（伸長因子1a）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、またはユビキチン（UbC）プロモーターを含む。

【0043】

本開示のある特定の局面は、

- (a) X-I1-P1-E-P2-I2-X'-T-Y;
- (b) Y-I1-P1-E-P2-I2-X-T-X';
- (c) pA-X-I1-L-P1-E-P2-I2-X-T-Y-pA;
- (d) pA-Y-I1-L-P1-E-P2-I2-X-T-X'-pA;
- (e) P1-X-T-X'-pA; または
- (f) E-P1-I1-X-T-X'-pA

から選択される式を含む発現コンストラクトに向けられ、式中、XおよびX'は第1免疫調節分子のサブユニットをコードし、I1およびI2はそれぞれイントロンであり、PおよびP2はそれぞれプロモーターであり、Eはエンハンサーであり、Tは翻訳修飾配列（translation modification sequence）であり、Yは第2免疫調節分子をコードし、Lは長鎖末端反復（long-terminal repeat）であり、pAはポリA配列である。

【0044】

いくつかの局面において、Xは、IL-12 p35サブユニットもしくはその機能的フラグメントをコードする核酸またはIL-12 p40サブユニットもしくはその機能的フラグメントをコードする核酸である。いくつかの局面において、X'は、IL-12 p35サブユニットもしくはその機能的フラグメントをコードする核酸またはIL-12 p40サブユニットもしくはその機能的フラグメントをコードする核酸である。いくつかの局面において、X（例えばIL-12 p35サブユニットおよび/またはIL-12 p40サブユニットをコードする核酸）は、インフレームの停止コドン（例えばTGA、TAG、およびTAA）を含まない。

【0045】

いくつかの局面において、P1またはP2は、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1a（伸長因子1a）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、ユビキチン（UbC）プロモーター、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの局面において、P1またはP2は、CBAプロモーターまたはそのフラグメントを含む。

【0046】

いくつかの局面において、EはCMVエンハンサー配列を含む。

【0047】

いくつかの局面において、I1またはI2は、SV40イントロン配列またはCAGイントロン配列を含む。

【0048】

いくつかの局面において、Tは、配列内リボソーム進入部位（IRES）配列、フューリン切断配列、2A自己プロセシングペプチド配列（F2A、E2A、P2AまたはT2A自己プロセシングペプチドを含む）、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの局面において、Tは、フューリン切断配列とそれに続く2A自己プロセシングペプチド配列（F2A）である。

【0049】

いくつかの局面において、発現コンストラクトはコザック配列をさらに含む。

【0050】

いくつかの局面において、発現コンストラクトはマイクロRNA結合部位をさらに含む。

10

20

30

40

50

【0051】

いくつかの局面において、Xは、IL-12サブユニット（例えばIL-12 p35またはIL-12 p40）またはその機能的フラグメントをコードする遺伝子を含み、X'は、IL-12サブユニット（例えばIL-12 p40またはIL-12 p35）またはその機能的フラグメントをコードする遺伝子を含む。いくつかの局面において、IL-12サブユニットをコードする遺伝子は、IL-12 p35遺伝子またはIL-12 p40遺伝子である。いくつかの局面において、Xは、IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸を含み、X'は、IL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸を含み、P1は、CBAプロモーターまたはそのフラグメントを含み、Tは、フューリン切断配列とそれに続く2A自己プロセシングペプチド（F2A）を含み、pAはヒト成長ホルモン（hGH）pA配列を含み、任意で、EはCMVエンハンサー配列を含み、I1はCAGイントロンを含む。

10

【0052】

いくつかの局面において、Xは、IL-12サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする遺伝子であり、X'は、IL-12サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする遺伝子であり、YはIL-15遺伝子またはその機能的フラグメントである。いくつかの局面において、IL-12サブユニットをコードする遺伝子は、IL-12 p35遺伝子またはIL-12 p40遺伝子である。いくつかの局面において、Xは、IL-12サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸であり、X'は、IL-12サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸であり、YはIL-15遺伝子またはその機能的フラグメントである。いくつかの局面において、IL-12サブユニットをコードする核酸は、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸またはIL-12 p40サブユニットをコードする核酸である。

20

【0053】

いくつかの局面において、Xは、IL-12サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸であり、X'は、IL-12サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸である。

【0054】

いくつかの局面において、pAの1つまたは複数は、ヒト成長ホルモン（hGH）pA配列、ウシ成長ホルモン（BGH）pA配列、または合成（SYN）pA配列を含む。

【0055】

いくつかの局面では、I1、I2、またはその両方が、SV40イントロン配列を含む。いくつかの局面では、I1、I2、またはその両方が、CAGイントロン配列を含む。

30

【0056】

いくつかの局面において、EはCMVエンハンサー配列を含む。

【0057】

いくつかの局面において、本明細書において開示されるポリヌクレオチドは2つの末端逆位反復配列（ITR）をさらに含む。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは、ITR配列が隣接する第1核酸および/または第2核酸を含む発現カセットを含む。

【0058】

いくつかの局面において、本開示は、SEQ ID NO:5～37、48～57、77、82、83、92のいずれかまたは表2、表4もしくは表5に示される任意の核酸に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む、ポリヌクレオチドに向けられる。

40

【0059】

いくつかの局面において、本開示のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:5～37、48～57、60、61、68、71、77、82、83、85、86、88、92のいずれかまたは表2、表4、表5、表6に示される任意の核酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0060】

50

いくつかの局面において、本明細書では、本明細書において開示されるポリヌクレオチドと送達ベクターとを含む組成物が提供される。いくつかの局面において、組成物は腫瘍内送達に適している。いくつかの局面において、組成物は静脈内送達に適している。いくつかの局面において、組成物は髄腔内送達に適している。いくつかの局面において、組成物は肝臓内送達に適している。いくつかの局面において、組成物は、リンパ器官（例えば脾臓、リンパ節、または骨髄）への送達に適している。

【0061】

いくつかの局面において、送達ベクターは、ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、およびヴォールト粒子からなる群より選択される。

10

【0062】

いくつかの局面において、送達ベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、またはレトロウイルスベクターからなる群より選択される。

【0063】

いくつかの局面において、送達ベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11およびAAV12からなる群より選択されるAAV血清型を含む組換えAAV（rAAV）ベクターである。

【0064】

いくつかの局面において、rAAVベクターはAAV2血清型である。いくつかの局面において、rAAVは、野生型の血清型と比較して改変されている。

20

【0065】

一部の局面において、本明細書では、本明細書において開示されるポリヌクレオチド（例えばITR配列が隣接する第1核酸および/または第2核酸を含む発現カセットを含むポリヌクレオチド）を含むアデノ随伴ウイルス（AAV）カプシドであって、本明細書において開示される核酸の腫瘍内送達に適したAAVカプシドが提供される。

【0066】

一部の局面において、本明細書では、本明細書において開示されるポリヌクレオチド（例えばITR配列が隣接する第1核酸および/または第2核酸を含む発現カセットを含むポリヌクレオチド）を含むアデノ随伴ウイルス（AAV）カプシドであって、本明細書において開示される核酸の静脈内送達に適したAAVカプシドが提供される。

30

【0067】

一部の局面において、本明細書では、本明細書において開示されるポリヌクレオチド（例えばITR配列が隣接する第1核酸および/または第2核酸を含む発現カセットを含むポリヌクレオチド）を含むアデノ随伴ウイルス（AAV）カプシドであって、リンパ器官（例えば脾臓、リンパ節、または骨髄）への、本明細書において開示される核酸の送達に適したAAVカプシドが提供される。

【0068】

いくつかの局面において、AAVカプシドは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11およびAAV12からなる群より選択されるAAV血清型を含む。

40

【0069】

いくつかの局面において、AAV血清型はAAV2である。いくつかの局面において、AAVは、野生型の血清型と比較して改変されている。

【0070】

いくつかの局面において、免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントは免疫刺激タンパク質またはその機能的フラグメントである。

【0071】

いくつかの局面において、本明細書では、2つ以上の免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントを、その必要のある対象において発現させる方法であって、有効量の、

50

本明細書において開示される第1核酸と第2核酸の組み合わせを、1つまたは複数の、本明細書において開示される送達ベクター、本明細書において開示されるポリヌクレオチド、本明細書において開示される組成物、またはAAVカプシド（例えばAAV粒子）を使って、該対象に投与する工程を含む、該方法が提供される。いくつかの局面において、投与は腫瘍内投与である。いくつかの局面において、投与は静脈内投与である。いくつかの局面において、投与は脾臓内投与である。いくつかの局面において、投与は髄腔内投与である。いくつかの局面において、投与は肝臓内投与である。いくつかの局面において、投与は骨内投与である。いくつかの局面において、投与はリンパ節中への投与である。いくつかの局面において、投与は皮内投与である。いくつかの局面において、投与は実質内投与である。いくつかの局面において、投与は唾液腺への送達による。いくつかの局面において、AAVカプシド（例えばAAV粒子）はAAV2血清型を有する。

10

【0072】

いくつかの局面において、本明細書では、2つ以上の免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントを腫瘍に送達する方法であって、本明細書において開示される第1核酸と第2核酸の組み合わせを、1つまたは複数の、本明細書において開示される送達ベクター、本明細書において開示されるポリヌクレオチド、本明細書において開示されるポリヌクレオチド、組成物またはAAVカプシド（例えばAAV2粒子）を、腫瘍に、直接注射によって投与する工程を含む、該方法が提供される。

【0073】

いくつかの局面において、本明細書では、腫瘍に罹患している対象において症状を処置または低減する方法であって、本明細書において開示される第1核酸と第2核酸の組み合わせを、1つまたは複数の、本明細書において開示される送達ベクター、本明細書において開示されるポリヌクレオチド、本明細書において開示される組成物またはAAVカプシド（例えばAAV2粒子）を使って、該対象に投与する工程を含み、投与が腫瘍内投与である、該方法が提供される。

20

【0074】

いくつかの局面において、本明細書では、腫瘍に罹患している対象において症状を処置または低減する方法であって、本明細書において開示される第1核酸と第2核酸の組み合わせを、1つまたは複数の、本明細書において開示される送達ベクター、本明細書において開示されるポリヌクレオチド、本明細書において開示される組成物またはAAVカプシド（例えばrAAV2）を使って、該対象に投与する工程を含み、投与が静脈内投与である、該方法が提供される。

30

【0075】

いくつかの局面において、本明細書では、腫瘍に罹患している対象において症状を処置または低減する方法であって、本明細書において開示される第1核酸と第2核酸の組み合わせを、1つまたは複数の、本明細書において開示される送達ベクター、本明細書において開示されるポリヌクレオチド、本明細書において開示される組成物またはAAVカプシド（例えばAAV2粒子）を使って、該対象に投与する工程を含み、投与が脾臓内投与である、該方法が提供される。

【0076】

いくつかの局面において、本明細書では、腫瘍に罹患している対象において症状を処置または低減する方法であって、本明細書において開示される第1核酸と第2核酸の組み合わせを、1つまたは複数の、本明細書において開示される送達ベクター、本明細書において開示されるポリヌクレオチド、本明細書において開示される組成物またはAAVカプシド（例えばAAV2粒子）を使って、該対象に投与する工程を含み、投与が髄腔内投与である、該方法が提供される。

40

【0077】

いくつかの局面において、本明細書では、腫瘍に罹患している対象において症状を処置または低減する方法であって、本明細書において開示される第1核酸と第2核酸の組み合わせを、1つまたは複数の、本明細書において開示される送達ベクター、本明細書におい

50

て開示されるポリヌクレオチド、本明細書において開示される組成物またはAAVカプシド（例えばAAV2粒子）を使って、該対象に投与する工程を含み、投与が肝臓内投与である、該方法が提供される。

【0078】

いくつかの局面において、本明細書では、腫瘍に罹患している対象において症状を処置または低減する方法であって、本明細書において開示される第1核酸と第2核酸の組み合わせを、1つまたは複数の、本明細書において開示される送達ベクター、本明細書において開示されるポリヌクレオチド、本明細書において開示される組成物またはAAVカプシド（例えばAAV2粒子）を使って、該対象に投与する工程を含み、投与が骨内投与である、該方法が提供される。

10

【0079】

いくつかの局面において、本明細書では、腫瘍に罹患している対象において症状を処置または低減する方法であって、本明細書において開示される第1核酸と第2核酸の組み合わせを、1つまたは複数の、本明細書において開示される送達ベクター、本明細書において開示されるポリヌクレオチド、本明細書において開示される組成物またはAAVカプシド（例えばAAV2粒子）を使って、該対象に投与する工程を含み、投与がリンパ節中への投与である、該方法が提供される。

【0080】

いくつかの局面において、本明細書では、腫瘍に罹患している対象において症状を処置または低減する方法であって、本明細書において開示される第1核酸と第2核酸の組み合わせを、1つまたは複数の、本明細書において開示される送達ベクター、本明細書において開示されるポリヌクレオチド、本明細書において開示される組成物またはAAVカプシド（例えばAAV2粒子）を使って、該対象に投与する工程を含み、投与が皮内投与である、該方法が提供される。

20

【0081】

いくつかの局面において、本明細書では、腫瘍に罹患している対象において症状を処置または低減する方法であって、本明細書において開示される第1核酸と第2核酸の組み合わせを、1つまたは複数の、本明細書において開示される送達ベクター、本明細書において開示されるポリヌクレオチド、本明細書において開示される組成物またはAAVカプシド（例えばAAV2粒子）を使って、該対象に投与する工程を含み、投与が実質内投与である、該方法が提供される。

30

【0082】

いくつかの局面において、本明細書では、腫瘍に罹患している対象において症状を処置または低減する方法であって、本明細書において開示される第1核酸と第2核酸の組み合わせを、1つまたは複数の、本明細書において開示される送達ベクター、本明細書において開示されるポリヌクレオチド、本明細書において開示される組成物またはAAVカプシド（例えばAAV2粒子）を使って、該対象に投与する工程を含み、投与が唾液腺への送達による投与である、該方法が提供される。

【0083】

いくつかの局面において、対象は固形腫瘍がん罹患している。いくつかの局面において、固形腫瘍は、肉腫、癌、またはリンパ腫である。いくつかの局面において、固形腫瘍は表面病変である。いくつかの局面において、固形腫瘍は内臓腫瘍である。

40

【0084】

いくつかの局面において、対象は、皮膚がん、胃腸がん、乳がん、脳のがん、骨がん、胸部がん、頭頸部がん、婦人科がん、泌尿器がん、眼がん、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるがん罹患している。

【0085】

いくつかの局面において、がんは、以下からなる群より選択される：

- ・皮膚がん（例えば転移性黒色腫、皮膚悪性黒色腫、皮膚扁平上皮癌、基底細胞癌）、
- ・乳がん（例えば浸潤性乳がん、トリプルネガティブ乳がん、炎症性乳がん）、

50

・脳のがん（例えば多形性神経膠芽腫、髄芽腫、下垂体癌、脳幹神経膠腫、星状細胞腫、乏突起神経膠腫、血管周囲細胞腫、胚細胞性腫瘍、松果体腫瘍）、

・骨がん（例えば脊索腫、軟骨肉腫、骨肉腫、ユーイング肉腫、線維肉腫、アダマンチノーマ、巨細胞腫）、

・頭頸部がん（例えば頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）；唾液腺がん、中咽頭がん、下咽頭がん、喉頭がん、口唇・口腔がん、鼻咽頭がん、甲状腺がん、副甲状腺のがん、副鼻腔・鼻腔がん）、

・婦人科がん（例えば卵巣がん、子宮がん、卵管がん、子宮内膜がん、子宮頸がん、膣がん、外陰がん）、

・泌尿器がん（例えば腎がん、尿道がん、尿路上皮がん、膀胱がん、腎臓または尿管のがん、腎盂のがん、精巣がん、陰茎がん、副腎のがん）、

・胃腸がん（例えば肛門部のがん、胆管がん、結腸がん、小腸のがん、食道がん、胆嚢がん、消化管間質腫瘍、肝がん、膵がん、直腸がん、胃がん（stomach/gastric cancer））、

・眼がん（例えばぶどう膜黒色腫、網膜芽細胞腫、メルケル細胞癌、眼内悪性黒色腫、粘膜関連リンパ組織リンパ腫、眼窩リンパ腫、眼窩肉腫、涙腺腫瘍）、

・胸部がん（例えば非小細胞肺癌がん、小細胞肺癌がん、中皮腫、胸腺悪性疾患、気管腫瘍、一部の食道がん）、

・白血病（例えば慢性または急性白血病、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）（非T細胞性ALLを含む）、慢性リンパ性白血病（CLL））、

・リンパ腫（例えばホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（NHL）、ワルデンシュトレーママクログロブリン血症、縦隔原発B細胞性大細胞型リンパ腫（PMBC）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、濾胞性リンパ腫（FL）、形質転換濾胞性リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫（SMZL）、皮膚T細胞性リンパ腫（CTCL）、リンパ球性リンパ腫、原発性CNSリンパ腫）、

・他の血液がん（例えば多発性骨髄腫）

・内分泌系のがん、軟部組織の肉腫、中枢神経系の新生物（例えばCNS；非定型奇形腫瘍/ラブドイド腫瘍、脊髄軸腫瘍）、腫瘍血管新生、カポジ肉腫、類表皮がん、アスベストが誘発するがんを含む環境誘発性がん、他のB細胞性悪性疾患、神経芽細胞腫（嗅神経芽細胞腫を含む）、横紋筋肉腫、およびそれらの任意の組み合わせ。

【0086】

いくつかの局面において、固形腫瘍は表面病変である。いくつかの局面において、固形腫瘍は内臓腫瘍である。

【0087】

いくつかの局面において、その必要がある対象において症状を処置または低減する方法は、本開示の組成物、遺伝子治療、ポリヌクレオチド、発現カセットまたはAAVカプシドを、チェックポイント阻害物質と組み合わせて、対象に投与する工程を含む。

【0088】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、プログラム細胞死タンパク質1（PD-1）、プログラム死リガンド1（PD-L1）、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA-4）、リンパ球活性化遺伝子3（LAG-3）、T細胞免疫グロブリンムチン含有タンパク質3（TIM-3）、BおよびTリンパ球アテニニューエーター（BTLA）、IgおよびITIMドメインを持つT細胞免疫受容体（TIGIT）、T細胞活性化のVドメインIgサブレッサー（VISTA）、アデノシンA2a受容体（A2aR）、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）、CD20、CD39、CD73、誘導性T細胞共刺激分子（ICOS）、B7-H3の阻害物質、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0089】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質はPD-1阻害物質である。いくつ

10

20

30

40

50

かの局面において、チェックポイント阻害物質はPD-L1阻害物質である。いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質はCTLA-4阻害物質である。いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、チェックポイント阻害物質の組み合わせ、例えばPD-1阻害物質の組み合わせ、PD-L1阻害物質の組み合わせ、CTLA-4阻害物質の組み合わせ、LAG-3阻害物質の組み合わせ、TIGIT阻害物質の組み合わせ、TIM-3阻害物質の組み合わせ、VISTA阻害物質の組み合わせ、BTLA阻害物質の組み合わせ、ICOS阻害物質の組み合わせ、B7-H3阻害物質の組み合わせ、またはそれらの任意の組み合わせの組み合わせである。

【0090】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、センプリマブ、トリパリマブ、スパルタリズマブ、ドスタリマブ-gxly、チスレリズマブ、バルスチリマブ、BI-754091、ジムベレリマブ、INCMGA00012、カムレリズマブ、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質はペンブロリズマブまたはニボルマブを含む。

10

【0091】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、デュルバルマブ、アテゾリズマブ、アベルマボル (avelumabor)、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0092】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、イピリムマブ、トレメリムマブ (旧名チシリムマブ)、ザリフレリマブ、クアボンリマブ、BA3071、YH001、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

20

【0093】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、レラトリマブ、BI-754111、ファベゼリマブ、エフチラギモドアルファ、LAG525、フィアンリマブ、TSR-033、Sym022、FS118、MGD013、マベゼリマブ (mavezelimab)、INCAGN02385またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0094】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、BMS-986207、ドムバナリマブ、AB308、チラゴルマブ、AGEN1327、ピボストリマブ (MK-7864)、エチガリマブ (etigalimab)、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

30

【0095】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、コボリマブ、BMS-986258、TSR-022、MBG453、Sym023、INCAGN2390、LY3321367、SHR-1702、INCAGN02390、サボトリマブ (sabotolimab)、R07121661、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0096】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、JNJ-61610588 (CI-8993)、CA-170、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0097】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、INBRX-106、PF-04518600、キュダロリマブ (cudarolimab) (IBI101)、TAB004 (JS004)、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

40

【0098】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、GSK3359609、ボプラテリマブ (JTX-2011)、MEDI-570、アロムフィリマブ (alomfilimab) (KY1044)、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0099】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、エノブリツズマブ、DS-7300a、オルロタマブ (orlotamab)、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0100】

50

いくつかの局面において、本開示の遺伝子治療、組成物、ポリヌクレオチド、発現カセット、またはAAVカプシドは、チェックポイント阻害物質の投与前、投与と同時、または投与後に投与することができる。

【0101】

いくつかの局面において、本明細書では、(a) サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする核酸を含むポリヌクレオチドと、(b) ウイルスベクター（例えばAAVカプシド、例えばAAV2血清型）とを含む、組成物が提供される。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは、(i) 第1サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、(ii) 第2サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含む。

10

【0102】

いくつかの局面において、サイトカインは、IL-12、腫瘍壊死因子アルファ（TNF- α ）、I型インターフェロン（INF）、II型IFN、IL-2、IL-15、IL-21、IL-23、IL-27、IL-18、IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL17、IL33、TL1A、CD40L、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。いくつかの局面において、サイトカインはIL-12である。

【0103】

いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸および/またはIL-12 p40サブユニットをコードする核酸を含む。いくつかの局面において、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸（例えば第1核酸）および/またはIL-12 p40サブユニットをコードする核酸は、インフレーションの停止コドン（例えばTGA、TAG、およびTAA）を含まない。

20

【0104】

いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは1つまたは複数のプロモーターをさらに含む。いくつかの局面において、コンストラクトは、第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12 p35サブユニット）をコードする核酸のためのプロモーター、および第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12 p40サブユニット）をコードする核酸配列のためのプロモーターを含むことができる。いくつかの局面において、前記2つ以上のプロモーターは同じである。いくつかの局面において、前記2つ以上のプロモーターは異なる。いくつかの局面では、1つのプロモーターが、第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12 p35サブユニット）と第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12 p40サブユニット）の両方の発現を駆動することができる。いくつかの局面において、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸および/またはIL-12 p40サブユニットをコードする核酸は、インフレーションの停止コドン（例えばTGA、TAG、およびTAA）を含まない。

30

【0105】

いくつかの局面において、プロモーターは、恒常的に活性なプロモーター、細胞型特異的プロモーター、または誘導性プロモーターである。いくつかの局面において、プロモーターは、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1a（伸長因子1a）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、ユビキチン（UbC）プロモーター、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの局面において、プロモーターはCBAプロモーターを含む。いくつかの局面において、プロモーターは、CMVエンハンサー、CBAプロモーター、およびCAGイントロン配列（例えばSEQ ID NO:71）を含む。

40

【0106】

いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは、翻訳修飾配列、例えばフューリン切断配列、2A自己プロセシングペプチド配列（F2A、E2A、P2AまたはT2A自己プロセシングペプチドを含む）、配列内リボソーム進入部位（IRES）配列またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む。いくつかの局面において、核酸は、フューリン切断配列とそれに続く2A自己プロセシングペプチド配列（F2A）をコードする核酸の組み合わせを含む。いくつかの局面において、フューリン切断配列とそれに続く2A自己プロセシングペプチ

50

ド配列 (F2A) は、IL-12 p35サブユニットもしくはその機能的フラグメントまたはIL-12 p40サブユニットもしくはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、IL-12 p35サブユニットもしくはその機能的フラグメントまたはIL-12 p40サブユニットもしくはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との間に位置する。いくつかの局面において、第1核酸 (例えばIL-12 p35サブユニットをコードする核酸および/またはIL-12 p40サブユニットをコードする核酸) は、インフレーションの停止コドン (例えばTGA、TAG、およびTAA) を含まない。

【0107】

いくつかの局面において、ポリヌクレオチドはポリ (A) (pA) 配列をさらに含む。いくつかの局面において、pA配列はヒト成長ホルモン (HGH) pA配列である。いくつかの局面において、pA配列はウシ成長ホルモン (BGH) pA配列である。

10

【0108】

いくつかの局面において、本明細書では、

(a) CMVエンハンサーと、IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結されたCBAプロモーターまたはそのフラグメントと、2A自己プロセシングペプチド配列 (F2A) が続くフューリン切断配列と、IL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸と、ヒト成長ホルモン (HGH) pA配列とを含むポリヌクレオチド、および

(b) ウイルスペクター (例えばAAVカプシド)

を含む組成物が提供される。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドはイントロン配列 (例えばCAGイントロン) をさらに含む。

20

【0109】

いくつかの局面において、本明細書では、

(a) CMVエンハンサーと、IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結されたCBAプロモーターまたはそのフラグメントと、2A自己プロセシングペプチド (F2A) が続くフューリン切断配列と、IL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸と、ウシ成長ホルモン (BGH) pA配列とを含むポリヌクレオチド、および

(b) ウイルスペクター (例えばAAVカプシド)

を含む組成物が提供される。

30

【0110】

いくつかの局面において、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸は、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、またはSEQ ID NO:77と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む。いくつかの局面において、IL-12 p40サブユニットをコードする核酸は、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、またはSEQ ID NO:92と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む。いくつかの局面において、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸は、インフレーションの停止コドン (例えばTGA、TAG、およびTAA) を含まない。いくつかの局面において、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸は、SEQ ID NO:77と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む。いくつかの局面において、IL-12 p40サブユニットをコードする核酸は、インフレーションの停止コドン (例えばTGA、TAG、およびTAA) を含まない。いくつかの局面において、IL-12 p40サブユニットをコードする核酸は、SEQ ID NO:92と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む。

40

【0111】

いくつかの局面において、本明細書では、腫瘍に罹患している対象において症状を処置または低減する方法であって、

50

(a) (i) IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と(ii) IL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および

(b) AAVベクター (例えばAAV2血清型)

を含む組成物を該対象に投与する工程を含む、該方法が提供される。

【0112】

いくつかの局面において、本明細書では、その必要がある対象において腫瘍のサイズを低減する方法であって、

(a) (i) IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と(ii) IL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および

(b) AAVベクター (例えばAAV2血清型)

を含む組成物を該対象に投与する工程を含む、該方法が提供される。

【0113】

いくつかの局面において、IL-12 p35サブユニットおよび/またはIL-12 p40サブユニットをコードする核酸は、インフレームの停止コドン (例えばTGA、TAG、およびTAA) を含まない。

【0114】

いくつかの局面において、投与は、腫瘍内投与、静脈内投与、腹腔内投与、脾臓内投与、髄腔内投与、肝臓内投与、骨内投与、皮内投与、実質内投与、唾液腺への送達による投与、またはリンパ節中への投与である。

【0115】

いくつかの局面において、腫瘍は、肝細胞癌、結腸癌、黒色腫、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるがん由来する。いくつかの局面において、対象は、肝細胞癌、結腸癌、黒色腫、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるがん罹患している。

【0116】

いくつかの局面において、腫瘍は、皮膚がん (例えば転移性黒色腫、皮膚悪性黒色腫、皮膚扁平上皮癌、基底細胞癌); 乳がん (例えば浸潤性乳がん、トリプルネガティブ乳がん、炎症性乳がん); 脳のがん (例えば多形性神経膠芽腫、髄芽腫、下垂体癌、脳幹神経膠腫、星状細胞腫、乏突起神経膠腫、血管周囲細胞腫、胚細胞性腫瘍、松果体腫瘍); 骨がん (例えば脊索腫、軟骨肉腫、骨肉腫、ユーイング肉腫、線維肉腫、アダマンチノーマ、巨細胞腫); 頭頸部がん (例えば頭頸部扁平上皮癌 [HNSCC]); 唾液腺がん、中咽頭がん、下咽頭がん、喉頭がん、口唇・口腔がん、鼻咽頭がん、甲状腺がん、副甲状腺がん、副鼻腔・鼻腔がん); 婦人科がん (例えば卵巣がん、子宮がん、卵管がん、子宮内膜がん、子宮頸がん、膣がん、外陰がん); 泌尿器がん (例えば腎がん、尿道がん、尿路上皮がん、膀胱がん、腎臓または尿管のがん、腎盂のがん、精巣がん、陰茎がん、副腎のがん); 胃腸がん (例えば肛門部のがん、胆管がん、結腸がん、小腸のがん、食道がん、胆嚢がん、消化管間質腫瘍、肝がん、脾がん、直腸がん、胃がん); 眼がん (例えばぶどう膜黒色腫、網膜芽細胞腫、メルケル細胞癌、眼内悪性黒色腫、粘膜関連リンパ組織リンパ腫、眼窩リンパ腫、眼窩肉腫、涙腺腫瘍); 胸部がん (例えば非小細胞肺癌、小細胞肺癌、中皮腫、胸腺悪性疾患、気管腫瘍、一部の食道がん)、白血病 (例えば慢性または急性白血病、急性骨髄性白血病 (AML)、慢性骨髄性白血病 (CML)、急性リンパ芽球性白血病 (ALL) (非T細胞性ALLを含む)、慢性リンパ性白血病 (CLL))、リンパ腫 (例えばホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫 (NHL)、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、縦隔原発B細胞性大細胞型リンパ腫 (PMBC)、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL)、濾胞性リンパ腫 (FL)、形質転換濾胞性リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫 (SMZL)、皮膚T細胞性リンパ腫 (CTCL)、リンパ球性リンパ腫、原発性CNSリンパ腫)、他の血液がん (例えば多発性骨髄腫)、内分泌系のがん、軟部組織の肉腫、中枢神経系の新生物 (例えばCNS; 非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍、脊髄軸腫瘍)、

10

20

30

40

50

腫瘍血管新生、カボジ肉腫、類表皮がん、アスベストが誘発するがんを含む環境誘発性がん、他のB細胞性悪性疾患、神経芽細胞腫（嗅神経芽細胞腫を含む）、横紋筋肉腫、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるがんに由来する。

【0117】

いくつかの局面において、組成物はチェックポイント阻害物質を、さらに含む。

【0118】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、プログラム細胞死タンパク質1（PD-1）、プログラム死リガンド1（PD-L1）、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA-4）、リンパ球活性化遺伝子3（LAG-3）、T細胞免疫グロブリンムチン含有タンパク質3（TIM-3）、BおよびTリンパ球アテニュエーター（BTLA）、IgおよびITIMドメインを持つT細胞免疫受容体（TIGIT）、T細胞活性化のVドメインIgサブレッサー（VISTA）、アデノシンA2a受容体（A2aR）、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）、CD20、CD39、CD73、誘導性T細胞共刺激分子（ICOS）、B7-H3の阻害物質、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

10

【0119】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、チェックポイント阻害物質の組み合わせ、例えばPD-1阻害物質の組み合わせ、PD-L1阻害物質の組み合わせ、CTLA-4阻害物質の組み合わせ、LAG-3阻害物質の組み合わせ、TIGIT阻害物質の組み合わせ、TIM-3阻害物質の組み合わせ、VISTA阻害物質の組み合わせ、BTLA阻害物質の組み合わせ、ICOS阻害物質の組み合わせ、B7-H3阻害物質の組み合わせ、またはそれらの任意の組み合わせの組み合わせである。

20

【0120】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質はPD-1阻害物質である。いくつかの局面において、PD-1阻害物質は抗PD-1抗体である。いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、トリパリマブ、スパルタリズマブ、ドスタリマブ-gxly、チスレリズマブ、バルスチリマブ、BI-754091、ジムベレリマブ、INCMGA00012、カムレリズマブ、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質はペンブロリズマブまたはニボルマブを含む。

30

【0121】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質はPD-L1阻害物質である。いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、デュルバルマブ、アテゾリズマブ、アベルマボル、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0122】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質はCTLA-4阻害物質である。いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、イピリムマブ、トレメリムマブ（旧名チシリムマブ）、ザリフレリマブ、クアボンリマブ、BA3071、YH001、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0123】

いくつかの局面において、本明細書において開示される組成物、本明細書において開示されるポリヌクレオチド、または本明細書において開示されるAAVカプシドは、チェックポイント阻害物質の投与前、投与と同時、または投与後に投与される。

40

【図面の簡単な説明】

【0124】

【図1】図1Aは、バックボーン、隣接ITR、プロモーター、ポリA、およびオープンリーディングフレーム（ORF）を含むように設計された例示的AAVコンストラクトを表す。図1Bは、プロモーター、オープンリーディングフレーム（ORF）（第1サイトカインをコードする配列、リンカー、および第2サイトカインをコードする配列を含む）、随意的miRNA、およびポリ（A）シグナル配列を含む発現カセットにITR配列が隣接するよう

50

に設計された、例示的AAVコンストラクトを表す。このコンストラクトはバックボーンをさらに含む。

【図2A】図2Aは、合成(SYN)ポリ(A)(pA)(SYNpA)配列、関心対象の遺伝子(GOI)(例えばIL-12 p40遺伝子)、イントロン配列、5'長鎖末端反復(LTR)、プロモーター(プロモーター1)、エンハンサー配列、第2プロモーター(プロモーター2)、イントロン、関心対象の遺伝子(GOI)(例えばIL-12 p35遺伝子)、配列内リボソーム進入部位(IRES)配列、関心対象の遺伝子(GOI)(例えばIL-15遺伝子)、およびポリA(例えばウシ成長ホルモン(BGH)pA(BGHpA))配列を含む、例示的発現カセットを表す。

【図2B】図2Bは、合成(SYN)ポリ(A)(pA)(SYNpA)配列;関心対象の遺伝子(GOI)(IL-15遺伝子);イントロン配列;5'長鎖末端反復(LTR)、プロモーター(プロモーター1);エンハンサー配列;第2プロモーター(プロモーター2);イントロン;関心対象の遺伝子(GOI)(IL-12 p35遺伝子);フューリン切断配列とそれに続く2A自己プロセシングペプチド(F2A);関心対象の遺伝子(GOI)(IL-12 p40遺伝子);およびポリA(例えばウシ成長ホルモン(BGH)pA(BGHpA))配列を含む例示的発現カセットを表す。

【図2C】図2Cおよび図2Dは、2つのプロモーターと3つの関心対象の遺伝子(例えばIL-15、IL-12A、またはIL-12B)を含む、例示的マルチシストロニック発現カセットを表す。

【図2D】図2Cの説明を参照のこと。

【図3】図3は、同系マウスがんモデルを作出するために使用した5つの異なるがん細胞株(MC38、B16F10、Cloudman S91(CloudmanS91)、CT26、およびA20)における、2000~40500vp/細胞の範囲にわたるMOIでのAAV2ルシフェラーゼベクターによるインビトロ形質導入の2日後および5日後の、ルシフェラーゼ発現を表すグラフである。

【図4】図4Aおよび図4Bは、AAV2-ルシフェラーゼベクターを腫瘍内注射した後の、MC38腫瘍(図4A)およびCloudman S91腫瘍(図4B)におけるルシフェラーゼ発現を示す、バイオルミネセンスイメージングを表す。ルシフェラーゼ活性を21日にわたって測定した。

【図5A】図5A~図5Eは、AAV2-ルシフェラーゼベクターを腫瘍内注射した後のCT26(図5A)、B16F10(図5B)、A20(図5C)、MC38(図5D)、およびCloudman S91(図5E)について、腫瘍内注射後に腫瘍塊と共局在するルシフェラーゼ発現を示す、バイオルミネセンスイメージングを表す。

【図5B】図5Aの説明を参照のこと。

【図5C】図5Aの説明を参照のこと。

【図5D】図5Aの説明を参照のこと。

【図5E】図5Aの説明を参照のこと。

【図6A】図6Aおよび図6Bは、AAV2-ルシフェラーゼベクターを腫瘍内注射した後の、A20(図6A)およびCloudman S91(図6B)におけるルシフェラーゼ発現を示す、バイオルミネセンスイメージングを表す。

【図6B】図6Aの説明を参照のこと。

【図7A】図7A~図7Dは、媒体(図7A)、AAV2-IL12(図7B)、抗PD-1抗体(図7C)、またはAAV2-IL12および抗PD-1抗体(図7D)による処置後の同系H22肝細胞がんマウスモデルにおける、腫瘍体積(mm³)によって測定した、腫瘍縮小を表す。各線は個々のマウスを表す。水平の破線(-----)は最大腫瘍体積を表す(この体積を越えたら動物を安楽死させる)。x軸は処置後の日数(0、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70および75日)を表す。

【図7B】図7Aの説明を参照のこと。

【図7C】図7Aの説明を参照のこと。

【図7D】図7Aの説明を参照のこと。

【図 8】図 8A および図 8B は、媒体、AAV2-IL12、AAV2-IL12 および抗 PD-1 抗体、または抗 PD-1 抗体による処置後の同系 H22 肝細胞がんマウスモデルにおける、腫瘍成長の平均曲線下面積 (AUC) (図 8A) またはメジアン曲線下面積 (AUC) (図 8B) によって測定した、腫瘍縮小を表す。図 8A では、データが平均値 ± 平均の標準偏差 (SEM) として表されている (ns = 有意差なし; * $p < 0.05$; *** < 0.0001 ; 両側 t 検定)。

【図 9 A】図 9A ~ 図 9E は、媒体 (図 9A)、AAV2-IL12 (図 9B および図 9E)、抗 PD-1 抗体 (図 9C)、または AAV2-IL12 (1×10^{11} ウイルスゲノム) および抗 PD-1 抗体 (図 9D) による処置後の同系 MC38 結腸直腸がんマウスモデルにおける、腫瘍体積 (mm^3) によって測定した、腫瘍縮小を表す。AAV2-IL12 は 1×10^{11} ウイルスゲノム (図 9B) および 3×10^{10} ウイルスゲノム (図 9E) の投薬量で投与した。各線は個々のマウスを表す。水平の破線 (-----) は最大腫瘍体積を表す (この体積を越えたら動物を安楽死させる)。x 軸は処置後の日数 (0、10、20、30、40、50 および 60 日) を表す。

10

【図 9 B】図 9A の説明を参照のこと。

【図 9 C】図 9A の説明を参照のこと。

【図 9 D】図 9A の説明を参照のこと。

【図 9 E】図 9A の説明を参照のこと。

【図 10】図 10A および図 10B は、媒体、用量が 1×10^{11} ウイルスゲノムの AAV2-IL12、用量が 3×10^{10} ウイルスゲノムの AAV2-IL12、AAV2-IL12 および抗 PD-1 抗体、または抗 PD-1 抗体による処置後の同系 MC38 結腸直腸がんマウスモデルにおける、腫瘍成長の平均曲線下面積 (AUC) (図 10A) またはメジアン曲線下面積 (AUC) (図 10B) によって測定した、腫瘍縮小を表す。図 10A では、データが平均値 ± 平均の標準偏差 (SEM) として表されている (ns = 有意差なし; * $p < 0.05$; *** < 0.0001 ; 両側 t 検定)。

20

【図 11 A】図 11A ~ 図 11E は、媒体 (図 11A)、AAV2-IL12 (図 11B および図 11E)、抗 PD-1 抗体 (図 11C)、または AAV2-IL12 (1×10^{11} ウイルスゲノム) および抗 PD-1 抗体 (図 11D) による処置後の同系 Cloudman S91 黒色腫がんマウスモデルにおける、腫瘍体積 (mm^3) によって測定した、腫瘍縮小を表す。AAV2-IL12 は 1×10^{11} ウイルスゲノム (図 11B) および 3×10^{10} ウイルスゲノム (図 11E) の投薬量で投与した。各線は個々のマウスを表す。水平の破線 (-----) は最大腫瘍体積を表す (この体積を越えたら動物を安楽死させる)。x 軸は処置後の日数 (0、5、10、15、20、25、30、35、40 および 45 日) を表す。

30

【図 11 B】図 11A の説明を参照のこと。

【図 11 C】図 11A の説明を参照のこと。

【図 11 D】図 11A の説明を参照のこと。

【図 11 E】図 11A の説明を参照のこと。

【図 12】図 12A および図 12B は、媒体、用量が 1×10^{11} ウイルスゲノムの AAV2-IL12、用量が 3×10^{10} ウイルスゲノムの AAV2-IL12、AAV2-IL12 および抗 PD-1 抗体、または抗 PD-1 抗体による処置後の同系 Cloudman S91 黒色腫がんモデルにおける、腫瘍成長の平均曲線下面積 (AUC) (図 12A) またはメジアン曲線下面積 (AUC) (図 12B) によって測定した、腫瘍縮小を表す。図 12A では、データが平均値 ± 平均の標準偏差 (SEM) として表されている (ns = 有意差なし; * $p < 0.05$; *** < 0.0001 ; 両側 t 検定)。

40

【図 13 A】図 13A ~ 図 13D は、媒体 (図 13A)、AAV2-IL12 (図 13B)、抗 PD-1 抗体 (図 13C)、または AAV2-IL12 および抗 PD-1 抗体 (図 13D) による処置後の同系 Hepa1-6 肝細胞がんマウスモデルにおける、腫瘍体積 (mm^3) によって測定した、腫瘍縮小を表す。各線は個々のマウスを表す。水平の破線 (-----) は最大腫瘍体積を表す (この体積を越えたら動物を安楽死させる)。x 軸は処置後の日数 (0、5、10、15、20、25 および 30 日) を表す。

【図 13 B】図 13A の説明を参照のこと。

【図 13 C】図 13A の説明を参照のこと。

【図 13 D】図 13A の説明を参照のこと。

50

【図13E】図13E～図13Fは、対照（媒体）、AAV2-IL12、AAV2-IL12および抗PD-1抗体、または抗PD-1抗体による処置後の同系Hepa1-6肝細胞がんマウスモデルにおける、腫瘍成長の平均曲線下面積（AUC）（図13E）またはメジアン曲線下面積（AUC）（図13F）によって測定した、腫瘍縮小を表す。図13Eでは、データが平均値±平均の標準偏差（SEM）として表されている（ns＝有意差なし）。

【図13F】図13Eの説明を参照のこと。

【図14A】図14A～図14Dは、媒体（図14A）、AAV2-IL12（図14B）、抗PD-1抗体（図14C）、またはAAV2-IL12および抗PD-1抗体（図14D）による処置後の同系B16F10黒色腫がんマウスモデルにおける、腫瘍体積（mm³）によって測定した、腫瘍縮小を表す。各線は個々のマウスを表す。水平の破線（-----）は最大腫瘍体積を表す（この体積を越えたら動物を安楽死させる）。x軸は処置後の日数（0、5、10、15、20、25および30日）を表す。

10

【図14B】図14Aの説明を参照のこと。

【図14C】図14Aの説明を参照のこと。

【図14D】図14Aの説明を参照のこと。

【図15】図15Aおよび図15Bは、媒体、AAV2-IL12、AAV2-IL12および抗PD-1抗体、または抗PD-1抗体による処置後の同系B16F10黒色腫がんマウスモデルにおける、腫瘍成長の平均曲線下面積（AUC）（図15A）またはメジアン曲線下面積（AUC）（図15B）によって測定した、腫瘍縮小を表す。図15Aでは、データが平均値±平均の標準偏差（SEM）として表されている（ns＝有意差なし；*p<0.05；***<0.0001；両側t検定）。

20

【図16】図16は、媒体、AAV2-IL12、AAV2-IL12および抗PD-1抗体、または抗PD-1抗体による処置後の、同系H22肝細胞がんマウスモデルの全生存期間（%生存率）を表す。x軸は処置後の日数（0、5、10、15、20、25、30、35、50、45および50日）を表す。水平の破線（-----）は50%生存を示す。

【図17】図17は、媒体、AAV-IL12、AAV-IL12および抗PD-1抗体、または抗PD-1抗体による処置後の、同系MC38結腸直腸がんマウスモデルの全生存期間（%生存率）を表す。x軸は処置後の日数（0、5、10、15、20、25、30、35、50、45および50日）を表す。水平の破線（-----）は50%生存を示す。

【図18】図18は、媒体、AAV2-IL12、AAV2-IL12および抗PD-1抗体、または抗PD-1抗体による処置後の、同系Cloudman S91黒色腫がんマウスモデルの全生存期間（%生存率）を表す。x軸は処置後の日数（0、5、10、15、20、25、30、35、50、45および50日）を表す。水平の破線（-----）は50%生存を示す。

30

【図19】図19は、媒体、AAV2-IL12、AAV2-IL12および抗PD-1抗体、または抗PD-1抗体による処置後の、同系B16F10黒色腫がんマウスモデルの全生存期間（%生存率）を表す。x軸は処置後の日数（0、5、10、15、20、25、30、35、50、45および50日）を表す。

【図20A】図20A～図20Eは、媒体、AAV2-IL2（ 1×10^{11} ウイルスゲノムまたは 3×10^{10} ウイルスゲノム）、AAV2-IL12（ 1×10^{11} ウイルスゲノム）および抗PD-1抗体、または抗PD-1抗体による処置後の、同系H22肝細胞（図20A）、B16F10黒色腫（図20B）、Cloudman S91黒色腫（図20C）、MC38結腸直腸（図20D）およびHepa1-6肝細胞（図20E）がんマウスモデルの、1日目と比較した平均体重変化（%）を表す。

40

【図20B】図20Aの説明を参照のこと。

【図20C】図20Aの説明を参照のこと。

【図20D】図20Aの説明を参照のこと。

【図20E】図20Aの説明を参照のこと。

【図21】図21は、用量を漸増させたAAV2-IL12（ 1×10^9 ウイルスゲノム、 1×10^{10} ウイルスゲノムまたは 1×10^{11} ウイルスゲノム）または対照緩衝液が静脈内投与された正常マウスの体重（グラム数）を表す。

50

【図 2 2】図 22 は、AAV2-IL12 コンストラクト（AAV2 ベクター #1（AAV2-CAG-mIL12a-IRES-mIL12b-bgh PA）または AAV2 ベクター #2（AAV2-CAG-mIL12a-F2A-mIL12b-hgh PA）のどちらか一方を投与した後の、インビトロでの IL12 発現（ng/mL）を表す。

【図 2 3 A】図 23 A は、CMV エンハンサー、CBA プロモーター、CAG イントロン、コザック配列、マウスネイティブ IL-12 p35 サブユニットをコードする第 1 核酸、フューリン切断配列とそれに続く 2A 自己プロセシングペプチド（F2A）、マウスネイティブ IL-12 p40 サブユニットをコードする第 2 核酸、およびヒト成長ホルモン（hGH）ポリ A シグナル配列を含む発現カセットに ITR 配列が隣接するように設計された、AAV2 コンストラクト（「AAV2-CAG-mIL12a-F2A-mIL12b-hgh PA」）を表す。

【図 2 3 B】図 23 B は、CMV エンハンサー、CBA プロモーター、CAG イントロン、コザック配列、ヒトネイティブ IL-12 p35 サブユニットをコードする第 1 核酸、フューリン切断配列とそれに続く 2A 自己プロセシングペプチド（F2A）、ヒトネイティブ IL-12 p40 サブユニットをコードする第 2 核酸、およびヒト成長ホルモン（hGH）ポリ A シグナル配列を含む発現カセットに ITR 配列が隣接するように設計された、AAV2 コンストラクト（「AAV2-CAG-hIL12a-F2A-hIL12b-hgh PA」）を表す。

【発明を実施するための形態】

【0125】

開示の詳細な説明

本開示のいくつかの局面は、(i) 第 1 免疫調節タンパク質、その 1 つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第 1 核酸と、(ii) 第 2 免疫調節タンパク質、その 1 つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第 2 核酸との組み合わせを送達するための、1 つまたは複数のウイルスベクター（例えば AAV ベクター）を含む、組成物（例えば遺伝子治療組成物）および/または組み合わせならびに方法に向けられる。いくつかの局面において、各ウイルスベクター（例えば AAV ベクター）は、第 1 核酸と第 2 核酸とを含むポリヌクレオチド（例えば発現カセット）を含む。いくつかの局面において、各送達ベクター（例えばウイルスベクター）は、第 1 核酸または第 2 核酸のどちらか一方を含み、この場合は、2 つ以上のウイルスベクター（例えば AAV ベクター）が、組み合わせられて（例えば同時にまたは逐次的に）送達される。いくつかの局面において、送達ベクターは、第 1 免疫調節タンパク質と第 2 免疫調節タンパク質のサブユニットとをコードする核酸を含むコンストラクトを含む。

【0126】

いくつかの局面において、本開示は、(a) 第 1 免疫調節タンパク質、その 1 つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第 1 核酸と、第 2 免疫調節タンパク質、その 1 つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第 2 核酸とを含むポリヌクレオチド（例えば発現カセット）、および (b) 送達ベクター（例えばウイルスベクター）を含む、組成物に向けられる。いくつかの局面において、発現カセットは、第 1 免疫調節タンパク質と第 2 免疫調節タンパク質のサブユニットとをコードする核酸を含む。

【0127】

いくつかの局面において、本開示は、(a) 第 1 サイトカイン、その 1 つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第 1 核酸と、(b) 第 2 サイトカイン、その 1 つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第 2 核酸とを含む、ポリヌクレオチド（例えば発現カセット）に向けられる。

【0128】

いくつかの局面において、本開示は、(a) 第 1 免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）、その 1 つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第 1 核酸と、第 2 免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）、その 1 つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第 2 核酸とを含むポリヌクレオチド、および (b) 送達ベクター（例えばウイルスベクター）を含む、組成物に向けら

れる。本開示のいくつかの局面は、(a) 第1サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、(b) 第2サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含む、ポリヌクレオチドに向けられる。

【0129】

いくつかの局面において、本開示は、本明細書において開示されるポリヌクレオチドの1つまたは複数を含むアデノ随伴ウイルス (AAV) カプシドであって、本明細書において開示される免疫調節タンパク質 (例えばサイトカイン) をコードする核酸の腫瘍内送達に適したAAVカプシドに向けられる。

【0130】

いくつかの局面において、本開示は、本明細書において開示されるポリヌクレオチドの1つまたは複数を含むアデノ随伴ウイルス (AAV) カプシドであって、本明細書において開示される免疫調節タンパク質 (例えばサイトカイン) をコードする核酸の静脈内送達に適したAAVカプシドに向けられる。

【0131】

いくつかの局面において、本開示は、本明細書において開示されるポリヌクレオチドの1つまたは複数を含むアデノ随伴ウイルス (AAV) カプシドであって、本明細書において開示される免疫調節タンパク質 (例えばサイトカイン) をコードする核酸の、リンパ器官 (例えば脾臓、リンパ節、または骨髄) への送達に適したAAVカプシドに向けられる。

【0132】

いくつかの局面において、AAVカプシドは、AAV2であるAAV血清型を含む。いくつかの局面において、AAVは、野生型の血清型と比較して改変されている。

【0133】

本開示のいくつかの局面は、2つ以上の免疫調節タンパク質、そのサブユニット、またはその機能的フラグメントを、その必要のある対象において発現させる方法であって、有効量の、本明細書において開示される組成物 (例えば遺伝子治療組成物) またはAAVカプシドを、該対象に投与する工程を含む、該方法に向けられる。いくつかの局面において、投与は腫瘍内投与である。いくつかの局面において、投与は静脈内投与である。いくつかの局面において、投与は脾臓内投与である。いくつかの局面において、投与は髄腔内投与である。いくつかの局面において、投与は肝臓内投与である。いくつかの局面において、投与は骨内投与である。いくつかの局面において、投与はリンパ節中への投与である。いくつかの局面において、投与は皮内投与である。いくつかの局面において、投与は実質内投与である。いくつかの局面において、投与は唾液腺への送達である。

【0134】

いくつかの局面において、発現は腫瘍内発現である。いくつかの局面において、組成物は、直接注射によって、腫瘍内に投与される。いくつかの局面において、直接注射は、腫瘍への組成物の複数回の注射を含む。いくつかの局面において、投与は、1回または複数回の注射を含む単回投与である。

【0135】

本開示のいくつかの局面は、2つ以上の免疫調節タンパク質、そのサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする核酸を、腫瘍に送達する方法であって、本明細書において開示される組成物 (例えば遺伝子治療組成物)、ポリヌクレオチド、またはAAVカプシドを投与する工程を含み、投与が直接注射による腫瘍への投与である方法に向けられる。

【0136】

本開示のいくつかの局面は、腫瘍に罹患している対象において症状を処置または低減する方法であって、本明細書において開示される組成物 (例えば遺伝子治療組成物)、ポリヌクレオチド、発現カセット、またはAAVカプシド (例えばAAV2粒子) を該対象に投与する工程を含み、投与が、腫瘍内投与、静脈内投与、脾臓内投与、髄腔内投与、肝臓内投与、骨内投与、皮内投与、実質内投与、唾液腺への送達による投与、またはリンパ節中

10

20

30

40

50

への投与である、該方法に向けられる。

【0137】

いくつかの局面において、対象は、皮膚がん、胃腸がん、乳がん、脳のがん、またはそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるがんに罹患している。いくつかの局面において、がんは、黒色腫、結腸直腸がん、乳がん、多形性神経膠芽腫、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。

【0138】

いくつかの局面において、対象は、皮膚がん（例えば転移性黒色腫、皮膚悪性黒色腫、皮膚扁平上皮癌、基底細胞癌）；乳がん（例えば浸潤性乳がん、トリプルネガティブ乳がん、炎症性乳がん）；脳のがん（例えば多形性神経膠芽腫、髄芽腫、下垂体癌、脳幹神経膠腫、星状細胞腫、乏突起神経膠腫、血管周囲細胞腫、胚細胞性腫瘍、松果体腫瘍）；骨がん（例えば脊索腫、軟骨肉腫、骨肉腫、ユーイング肉腫、線維肉腫、アダマンチノーマ、巨細胞腫）；頭頸部がん（例えば頭頸部扁平上皮癌 [HNSCC]）；唾液腺がん、中咽頭がん、下咽頭がん、喉頭がん、口唇・口腔がん、鼻咽頭がん、甲状腺がん、副甲状腺のがん、副鼻腔・鼻腔がん）；婦人科がん（例えば卵巣がん、子宮がん、卵管がん、子宮内膜がん、子宮頸がん、膣がん、外陰がん）；泌尿器がん（例えば腎がん、尿道がん、尿路上皮がん、膀胱がん、腎臓または尿管のがん、腎盂のがん、精巣がん、陰茎がん、副腎のがん）；胃腸がん（例えば肛門部のがん、胆管がん、結腸がん、小腸のがん、食道がん、胆嚢がん、消化管間質腫瘍、肝がん、膵がん、直腸がん、胃がん）；眼がん（例えばぶどう膜黒色腫、網膜芽細胞腫、メルケル細胞癌、眼内悪性黒色腫、粘膜関連リンパ組織リンパ腫、眼窩リンパ腫、眼窩肉腫、涙腺腫瘍）；胸部がん（例えば非小細胞肺癌、小細胞肺癌、中皮腫、胸腺悪性疾患、気管腫瘍、一部の食道がん）、白血病（例えば慢性または急性白血病、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）（非T細胞性ALLを含む）、慢性リンパ性白血病（CLL））、リンパ腫（例えばホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（NHL）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、縦隔原発B細胞性大細胞型リンパ腫（PMBC）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、濾胞性リンパ腫（FL）、形質転換濾胞性リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫（SMZL）、皮膚T細胞性リンパ腫（CTCL）、リンパ球性リンパ腫、原発性CNSリンパ腫）、他の血液がん（例えば多発性骨髄腫）、内分泌系のがん、軟部組織の肉腫、中枢神経系の新生物（例えばCNS;非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍、脊髄軸腫瘍）、腫瘍血管新生、カポジ肉腫、類表皮がん、アスベストが誘発するがんを含む環境誘発性がん、他のB細胞性悪性疾患、神経芽細胞腫（嗅神経芽細胞腫を含む）、横紋筋肉腫、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるがんに罹患している。

【0139】

いくつかの局面において、本明細書において開示されるコンストラクト、ポリヌクレオチド、発現カセット、送達ベクター、および組成物は、（a）免疫刺激性モチーフを導入し、排除し、または低減し、（b）最適なゲノム長を利用し、（c）リバースパッケージング（reverse packaging）を低減し、（d）標的組織および/または標的細胞における発現を増強し、（e）CpGモチーフを低減または増加させ、または（f）それらの任意の組み合わせを実現するように、設計される。

【0140】

さまざまな局面の非限定的な例を本開示に示す。

【0141】

1. 定義

本開示をより容易に理解することができるように、ある特定の用語をまず定義する。追加の定義は詳細な開示全体にわたって記載される。

【0142】

「1つの（aまたはan）」実体という用語は、1つまたは複数の当該実体を指すことに注意されたい。例えば「核酸配列（a nucleic acid sequence）」は、別段の言明がある場合を除き、1つまたは複数の核酸配列を表すと理解される。したがって、「1つの

10

20

30

40

50

「aまたはan」, 「1つまたは複数の (one or more)」および「少なくとも1つの (at least one)」という用語は、本明細書では、相互可換的に使用されうる。

【0143】

さらにまた、本明細書において使用される場合、「および/または」は、特定された2つの特徴または構成要素のそれぞれの、他方を伴う、または他方なしでの、具体的開示と解釈されるものとする。したがって、本明細書において「Aおよび/またはB」などの表現で使用される用語「および/または」は、「AおよびB」、「AまたはB」、「A」(のみ)、および「B」(のみ)を包含するものとする。同様に、「A、Bおよび/またはC」などの表現において使用される用語「および/または」は、以下の局面のそれぞれを包含するものとする:A、BおよびC;A、BまたはC;AまたはC;AまたはB;BまたはC;AおよびC;AおよびB;BおよびC;A(のみ);B(のみ);およびC(のみ)。

10

【0144】

本明細書において局面が「を含む」という言い回しで記載されている場合は常に、「からなる」および/または「から本質的になる」という用語を使って記載される点以外は同様の局面も提供されると理解される。

【0145】

「約」という用語は、本明細書では、およそ、ほぼ、前後、またはその近くを意味するものとする。「約」という用語が数値範囲と一緒に使用される場合、これは、示された数値の上下に境界を延長することによって、当該範囲を改変する。一般に「約」という用語は、数値を、言明された値の上下に、例えば10パーセント上へのまたは下への変化によって(高くまたは低く)改変することができる。

20

【0146】

数字または一連の数字に先立つ「少なくとも」という用語は、「少なくとも」という用語に隣接する数字と、文脈から明らかであるように論理的に含まれうる、後続のすべての数字または整数を含むと理解される。例えば核酸分子中のヌクレオチドの数は整数でなければならない。例えば「21ヌクレオチドの核酸分子のうちの少なくとも18ヌクレオチド」とは、18、19、20または21ヌクレオチドが表示の性質を有することを意味する。少なくともという用語が一連の数字または範囲の前に存在する場合、「少なくとも」はそれら一連の数字または範囲中の数字のそれぞれを修飾できると理解される。また、「少なくとも」は整数に限定されない(例えば「少なくとも5%」には、有効数字の桁数を考慮しなければ、5.0%、5.1%、5.18%が含まれる)。

30

【0147】

本明細書において使用される「以下 (no more than)」または「未満 (less than)」は、この表現に隣接する値およびそれより論理的に低い、文脈上論理的にゼロまでの、値または整数 (logical lower value or integer) と理解される。「以下」が一連の数字または範囲の前に存在する場合、「以下」はそれら一連の数字または範囲中の数字のそれぞれを修飾できると理解される。

【0148】

本明細書において使用される「免疫応答」という用語は、外来作用物質または異常細胞(例えば腫瘍細胞)に対する生物内での生物学的応答を指し、その応答は、そのような作用物質/細胞およびそれらが引き起こす疾患から、その生物を保護する。免疫応答は、免疫系の細胞(例えばTリンパ球(T細胞)、Bリンパ球(B細胞)、ナチュラルキラー(NK)細胞、マクロファージ、好酸球、肥満細胞、樹状細胞または好中球)およびそれらの細胞のいずれかまたは肝臓によって産生される可溶性高分子(抗体、サイトカインおよび補体)の作用によって媒介され、その作用が、侵入した病原体、病原体に感染した細胞もしくは組織、がん細胞もしくは他の異常細胞、または自己免疫疾患もしくは病的炎症の場合には正常なヒト細胞もしくはヒト組織の選択的なターゲティング、それらへの結合、それらの損傷、破壊、および/または当該生物の身体からのそれらの排除をもたらす。いくつかの局面において、免疫反応には、例えば、T細胞、例えばエフェクターT細胞またはTh細胞の、例えばCD4⁺またはCD8⁺T細胞の、活性化または阻害、または制御性T細胞

40

50

(Treg細胞)の阻害が含まれる。

【0149】

本明細書において使用される「免疫調節タンパク質」、「免疫調節物質」、「免疫制御タンパク質」または「免疫制御物質」という用語は、免疫応答の刺激、調節、制御または修飾に関与することができる作用物質、例えばシグナル伝達経路の構成要素を指す。免疫応答を「調節する」、「制御する」または「修飾する」とは、免疫系の細胞の、またはそのような細胞（例えばエフェクターT細胞）の活性の、任意の変更を指す。そのような調節には、さまざまな細胞タイプの数の増減、それらの細胞の活性の増減、または免疫系内で起こりうる他の任意の変化によって顕在化されうる、免疫系の刺激または抑制が含まれる。阻害性免疫調節物質と刺激性免疫調節物質がどちらも同定されており、それらの一部は、腫瘍微小環境において増強された機能を持つことができる。いくつかの局面において、免疫調節物質はT細胞表面上に位置する。「免疫調節標的」または「免疫制御標的」とは、ある物質、作用物質、部分、化合物または分子による結合の標的となり、その結合によって活性が変化する、免疫調節物質である。免疫調節標的には、例えば、細胞表面上の受容体（「免疫調節受容体」）および受容体リガンド（「免疫調節リガンド」）を含めることができる。いくつかの局面において、免疫調節タンパク質はサイトカインである。いくつかの局面において、免疫調節タンパク質は、可溶性のナチュラルキラー（NK）細胞、Bリンパ球細胞、Tリンパ球細胞、好中球またはマクロファージリガンドである。

【0150】

本明細書において使用される「その機能的フラグメント」という用語は、タンパク質、例えば免疫調節タンパク質の、フラグメントまたは部分であって、完全なタンパク質に付随する1つまたは複数の機能（例えば免疫応答を刺激し、調節し、制御し、または修飾する機能）を依然として果たすことができるものを指す。

【0151】

本明細書において使用される「チェックポイント阻害物質」という用語は、負のチェックポイント制御物質にとっての阻害物質または負のチェックポイント制御物質の結合パートナーにとっての阻害物質を指す。いくつかの局面において、ある特定の局面において、負のチェックポイント制御物質は、プログラム細胞死タンパク質1（PD-1）、プログラム死リガンド1（PD-L1）、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA-4）、リンパ球活性化遺伝子3（LAG-3）、T細胞免疫グロブリンチン含有タンパク質3（TIM-3）、BおよびTリンパ球アテニュエーター（BTLA）、IgおよびITIMドメインを持つT細胞免疫受容体（TIGIT）、T細胞活性化のVドメインIgサプレッサー（VISTA）、アデノシンA2a受容体（A2aR）、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）、CD20、CD39、CD73、誘導性T細胞共刺激分子（ICOS）、B7-H3、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0152】

本明細書において使用される「サイトカイン」という用語は、細胞に対して、例えば成長または増殖に影響を及ぼすなどの効果を発揮する、1つまたは複数の因子を指す。いくつかの局面において、サイトカインは、以下の性質のうちの1つまたは複数を持つことができる：さまざまな免疫細胞間で情報伝達物質として作用することにより、免疫防御機能を媒介および/または制御する能力；短い半減期を持つ短距離での機能；さまざまな細胞タイプによって産生されること；免疫系内の多様な細胞標的および/または組織に作用する能力；成長を刺激および/または阻害する能力；および/またはサイトカインカスケードを直接的または間接的に引き起こすこと。いくつかの局面において、サイトカインには、インターロイキン、インターフェロン、コロニー刺激因子および腫瘍壊死因子を含めることができる。本開示の実施に際して単独でまたは組み合わせて使用することができるサイトカインの非限定的な例としては、腫瘍壊死因子 α （TNF α ）、I型インターフェロン（IFN）、II型IFN、インターロイキン-2（IL-2）、インターロイキン-12（IL-12）、インターロイキン-15（IL-15）、インターロイキン-21（IL-21）、インターロイキン-23（IL-23）、インターロイキン-27（IL-27）、インターロイキン-18（IL-18）、IL-1、I

L-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL17、IL33、TL1A、CD40L、幹細胞因子（SCF）、インターロイキン-3（IL-3）、インターロイキン-4（IL-4）、インターロイキン-6（IL-6）、インターロイキン-11（IL-11）、インターロイキン-13（IL-13）、顆粒球-コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージ-コロニー刺激因子（GM-CSF）、インターロイキン-1ベータ（IL-1 β ）、プロスタグランジンE₂（PGE₂）、MIP-11、白血病抑制因子（LIF）、c-kitリガンド、トロンボポエチン（TPO）およびflt3リガンドが挙げられる。常に明示されるわけではないが、野生型のまたは精製されたサイトカイン（例えば組換え生産されたサイトカイン、その機能的フラグメントまたはムテイン）と類似する生物学的活性を有する分子は、本開示の範囲内で使用されることが意図されるものとする。

10

【0153】

「サブユニット」という用語は、別のポリペプチドと集合して複合体（例えばヘテロ二量体）を形成することができるポリペプチドを指す。いくつかの局面において、サイトカインは、単一のコードされたポリペプチド、または複数のコードされたポリペプチドサブユニット（例えばp35サブユニットとp40サブユニット）を含むことができる。例えばp35サブユニットは、インターロイキン12のサブユニットアルファ（IL-12A、細胞傷害性リンパ球成熟因子p35、またはインターロイキン-12サブユニットp35としても公知である）であることができる。例えばp40サブユニットは、インターロイキン12のサブユニットベータ（IL-12B、ナチュラルキラー細胞刺激因子2、細胞傷害性リンパ球成熟因子p40、またはインターロイキン-12サブユニットp40としても公知である）であることができる。

20

【0154】

「ヘテロ二量体」とは、組成が異なる2つのポリペプチド鎖で構成されるポリペプチドを指す。例えばインターロイキン12は、1つのp35サブユニットと1つのp40サブユニットとからなるヘテロ二量体である。

【0155】

「免疫治療」という用語は、免疫応答を誘導し、増強し、抑制し、または他の形で修飾することによる、疾患の処置を指す。対象の「処置」または「治療」とは、疾患（例えばがん）に付随する症状、合併症もしくは状態、または生化学的徴候の開始、進行、発生、重症度または再発を反転させ、緩和し、改善し、阻害し、減速し、または防止することを目的とする、対象に実施される任意のタイプの介入もしくはプロセス、または対象への活性作用物質の投与を指す。

30

【0156】

本明細書において使用される「Toll様受容体9（TLR9）」という用語は、ヒトではTLR9遺伝子によってコードされるタンパク質を指す。TLR9は、CD289（分化抗原群（cluster of differentiation）289）とも呼ばれていた。これはToll様受容体（TLR）ファミリーの一メンバーである。TLR9は、樹状細胞、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、および他の抗原提示細胞を含む免疫系細胞において発現される受容体である。TLR9は、非メチル化細菌CpG DNAを認識し、炎症性サイトカインの産生につながるシグナル伝達カスケードを開始する。例えばMartinez-Campos C, et al., *Viral Immunology*.30 (2):98-105 (2017)、Notley CA et al., *Scientific Reports*.7:42204 (2017)を参照されたい。CpG DNAの刺激効果は、特定塩基コンテキスト下の非メチル化CpGジヌクレオチド（CpGモチーフ）によって付与され、それらのモチーフがCpG DNAの種特異的活性も決定する。コア配列GACGTTを含有するCpGモチーフがマウスTLR9を高度に刺激するのに対し、2つ以上のCpGとコア配列GTCGTTとを含有するCpGモチーフはヒトTLR9の最適な誘導物質である。がん、感染および組織損傷はいずれもTLR9の発現と活性化を調節することができる。いくつかの局面において、本明細書において開示される核酸、コンストラクト、ポリヌクレオチドおよび/または発現カセットは、Toll様受容体9（TLR9）刺激モチーフが低減または排除された配列を含む。

40

【0157】

50

「免疫刺激治療」または「免疫調節治療」とは、例えばがんを処置するための、対象における免疫応答の増加（誘導または増強）をもたらす治療を指す。

【0158】

本明細書において使用される「送達ベクター」または「ベクター」という用語は、宿主細胞中に核酸をクローニングおよび/または移入するための任意の媒体、例えばプラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、人工染色体、ウイルス、ビリオンなどを指す。ベクターは、別の核酸セグメントを取り付けて、取り付けられたセグメントの複製を生じさせることが可能な、レプリコンであることができる。「レプリコン」とは、インビボで自律的複製単位として機能する、すなわち自らのコントロール下に複製することができる、任意の遺伝要素（例えばプラスミド、ファージ、コスミド、染色体、ウイルス）を指す。「送達ベクター」または「ベクター」という用語は、インビトロ、エクスピボまたはインビボで細胞中に核酸を導入するための、ウイルス媒体および非ウイルス媒体をどちらも包含する。例えばプラスミド、改変真核生物ウイルス、または改変細菌ウイルスなど、当技術分野では多数のベクターが公知であり、使用されている。適切なベクターへのポリヌクレオチドの挿入は、適当なポリヌクレオチドフラグメントを、相補的付着末端を有する選ばれたベクター中にライゲートすることによって、達成することができる。ベクターは、そのベクターを組み込んだ細胞の選択または同定に備えて、選択可能マーカーまたはレポーターをコードするように操作することができる。選択可能マーカーまたはレポーターの発現は、ベクター上に含有される他のコード領域を組み入れて発現させる宿主細胞の同定および/または選択を可能にする。当技術分野において公知であり使用されている選択マーカー遺伝子の例としては、アンピシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ハイグロマイシン、ピアラホス除草剤、スルホンアミドなどに対する耐性を与える遺伝子、および表現型マーカーとして使用される遺伝子、すなわちアントシアニン制御遺伝子、イソペンタニルトランスフェラーゼ遺伝子などが挙げられる。当技術分野において公知であり使用されているレポーターの例としては、ルシフェラーゼ（Luc）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、 β -ガラクトシダーゼ（LacZ）、 β -グルクロニダーゼ（Gus）などが挙げられる。選択可能マーカーはレポーターであるともみなすこともできる。いくつかの局面において、送達ベクターは、ウイルスベクター（例えばAAVベクター）、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子からなる群より選択される。

【0159】

本開示のいくつかの局面は、生物学的ベクターに向けられ、これには、ウイルス、特に弱毒化および/または複製欠損型ウイルスが含まれる。

【0160】

本明細書において使用される「プロモーター」という用語は、遺伝子の転写を開始するのに必要な、細胞の機構または導入された合成機構によって認識される、DNA配列を指す。「プロモーター」という用語には、細胞型特異的、組織特異的であるようにコントロール可能な、または外からのシグナルもしくは作用物質による誘導が可能な、プロモーター依存的遺伝子発現にとって十分な核酸要素も包含されるものとし、そのような要素はネイティブ遺伝子の5'領域または3'領域に位置することができる。いくつかの局面において、プロモーターは、恒常的に活性なプロモーター、細胞型特異的プロモーター、または誘導性プロモーターである。

【0161】

いくつかの局面では、ベクターが媒介する導入遺伝子発現の特異性を増大させるために、マイクロRNAターゲティング配列を含める。例えばAnja Geisler and Henry Fechner, World J Exp Med., 20;6 (2):37-54 (2016) を参照されたい。

【0162】

本明細書において使用される「エンハンサー」という用語は、近接する遺伝子の転写を刺激または阻害するシス作用性要素である。転写を阻害するエンハンサーは「サイレンサ

ー」とも呼ばれる。エンハンサーは、コード配列から、および転写領域の下流にある位置から、最大数千塩基対 (kb) の距離越しに、いずれかの方向で、機能することができる (例えばコード配列と関連づけられうる)。

【0163】

本明細書において使用される「制御可能プロモーター」という用語は、その活性がシス作用性またはトランス作用性因子 (例えば誘導性プロモーター、例えば外からのシグナルまたは作用物質) の影響を受ける任意のプロモーターをいう。

【0164】

本明細書において使用される「恒常的プロモーター」という用語は、多くのまたはすべての組織/細胞タイプにおいて、ほとんど常にRNA産生を指示する、任意のプロモーター、例えば哺乳動物細胞においてクローニングされたDNAインサートの恒常的発現を促進するヒトCMV前初期エンハンサー/プロモーター領域をいう。

【0165】

「転写制御タンパク質」、「転写制御因子」および「転写因子」は、本明細書では相互可換的に使用され、DNA応答要素に結合し、よって関連づけられた1つまたは複数の遺伝子の発現を転写制御する、核タンパク質を指す。転写制御タンパク質は、一般的には、DNA応答要素に直接結合するが、DNAへの結合が別のタンパク質への結合を介して間接的であり、当該別のタンパク質が次にDNA応答要素に結合するか、または結合している場合もある。

【0166】

本明細書において使用される「終結シグナル配列」という用語は、RNAポリメラーゼに転写を終結させる任意の遺伝要素、例えばポリアデニル化 (ポリAまたはpA) シグナル配列などであることができる。ポリアデニル化シグナル配列は、ポリアデニル化コンセンサス配列AATAAAが後続しているRNA転写産物のエンドヌクレアーゼ切断に必要な認識領域である。ポリアデニル化シグナル配列は「ポリA部位」、すなわち、転写後ポリアデニル化によってアデニン残基が付加されることになるRNA転写産物上の部位を与える。

【0167】

本明細書において使用される「マルチシストロニック」または「マルチシストロニックベクター」という用語は、2つ以上のオープンリーディングフレーム (例えば遺伝子) を有する核酸配列を指す。この文脈におけるオープンリーディングフレームは、ポリペプチドまたはタンパク質 (例えばタンパク質サブユニット、例えばサイトカインサブユニット) に翻訳可能なコドンの配列である。「ビシストロニック」または「ビシストロニックベクター」とは、2つのオープンリーディングフレーム (例えば遺伝子) を有する核酸配列を指す。この文脈におけるオープンリーディングフレームは、ポリペプチドまたはタンパク質 (例えばタンパク質サブユニット、例えばサイトカインサブユニット) に翻訳可能なコドンの配列である。いくつかの局面において、本開示のコンストラクトはマルチシストロニック (例えばビシストロニック) コンストラクト (例えば複数のサイトカイン (例えばIL-12) サブユニットを含むもの) である。

【0168】

本明細書において使用される「配列内リボソーム進入部位」または「IRES」という用語は、シストロン (タンパク質コード領域) の開始コドン、例えばATGへの、直接的な配列内リボソーム進入を促進し、よって遺伝子のキャップ非依存的翻訳をもたらす要素を指す。例えばJackson R J et al., Trends Biochem Sci 15 (12):477-83 (1990)、Jackson R J and Kaminski, A. RNA 1 (10):985-1000 (1995) を参照されたい。本明細書にいう「IRESの翻訳コントロール下」とは、翻訳がIRESと関連し、キャップ非依存的に進行することを意味する。

【0169】

本明細書において使用される「自己プロセシング切断部位」または「自己プロセシング切断配列」という用語は、翻訳後または翻訳時プロセシング切断部位または配列を指す。そのような「自己プロセシング切断」部位または配列は、本明細書では2A部位、配列も

10

20

30

40

50

しくはドメインまたは2A様部位、配列もしくはドメインによって例示される、DNA配列またはアミノ酸配列を指す。適切な2A部位としてF2A、E2A、P2AまたはT2A自己プロセシング部位が挙げられる。「自己プロセシングペプチド」という用語は、本明細書では、翻訳された時に、自己プロセシング切断部位を含むタンパク質またはポリペプチドの迅速な分子内（シス）切断を媒介することで、別々の成熟タンパク質またはポリペプチド産物をもたらす、自己プロセシング切断部位または配列をコードするDNA配列のペプチド発現産物と定義される。

【0170】

本明細書において使用される「追加のタンパク質分解切断部位」という用語は、本開示の発現コンストラクトに、2A配列または2A様配列などの自己プロセシング切断部位に隣接して組み入れられて、自己プロセシング切断配列による切断後に残っている余分なアミノ酸を除去する手段になる配列を指す。例示的な「追加のタンパク質分解切断部位」は本明細書に記載されており、例えばコンセンサス配列RXK(R)R (SEQ ID NO:1)を持つフューリン切断部位が挙げられるが、それに限定されない。

【0171】

そのようなフューリン切断部位は、タンパク質分泌経路内で、内在性サブチリシン様プロテアーゼ、例えばフューリンおよび他のセリンプロテアーゼによって切断されうる。いくつかの局面では、例えばLie et al., Sci Rep 7, 2193 (2017)に記載されているように、他の例示的な「追加のタンパク質分解切断部位」を使用することができる。

【0172】

「機能的に連結される」、「機能的に挿入される」、「機能的に配置される」、「コントロール下」または「転写コントロール下」という用語は、プロモーターが、核酸に対して、その遺伝子のRNAポリメラーゼ開始および発現をコントロールするのに正しい位置と向きにあることを意味する。いくつかの局面において、「機能的に連結される」という用語は、適当な分子（例えば転写活性化因子タンパク質）が制御配列に結合した場合に遺伝子発現が可能になるような形でDNA配列と制御配列とが接続されていることを意味する。いくつかの局面において、「機能的に挿入される」とは、細胞中に導入された関心対象のDNAが、導入されたDNAの転写および翻訳を指示するDNA配列に隣接して配置されること（すなわち、関心対象のDNAによってコードされるポリペプチドなどの産生を助長すること）を意味する。

【0173】

「発現ベクター」、「発現コンストラクト」または「発現カセット」という用語は、核酸を含有する任意のタイプの遺伝子コンストラクトであって、核酸コード配列の一部または全部が転写されうるものを意味する。

【0174】

「ウイルスベクター」とは、関心対象の分子、例えばタンパク質、ペプチド、およびオリゴヌクレオチド、またはそれらの複数をコードする、または含む、1つまたは複数のポリヌクレオチド領域を含む配列を指す。ウイルスベクターは、遺伝物質を細胞中に送達するために使用することができる。ウイルスベクターは、具体的な応用のために改変することができる。いくつかの局面において、本開示の送達ベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、またはレトロウイルスベクターからなる群より選択されるウイルスベクターである。

【0175】

本明細書において使用される「アデノ随伴ウイルスベクター」または「AAVベクター」という用語は、アデノ随伴ベクターの構成要素を含むか、またはそれに由来する、任意のベクターを指し、哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞を感染させるのに適している。AAVベクターという用語は、典型的には、ペイロードを含むAAV型のウイルス粒子すなわちビリオンを示す。AAVベクターは、血清型の組み合わせ（すなわち「シュードタイプ化」AAV）を含むさまざまな血清型またはさまざまなゲノム（例えば一本鎖または自己相補鎖）に由来することができる。加えて、AAVベクターは複製欠損型および/または標

的型であることができる。本明細書において使用される「アデノ随伴ウイルス」(AAV)という用語は、限定するわけではないが、AAV1型、AAV2型、AAV3型(3A型および3B型を含む)、AAV4型、AAV5型、AAV6型、AAV7型、AAV8型、AAV9型、AAV10型、AAV11型、AAV12型、AAV13型、AAVrh8、AAVrh10、AAVrh.74、ヘビAAV、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、ヒツジAAV、ヤギAAV、エビAAV、Gao et al. (J.Virol.78:6381 (2004)) および Moris et al. (Virology, volume 33:375 (2004)) によって開示されているAAV血清型およびクレード、ならびに現在公知のまたは今後発見される他の任意のAAVを包含する。例えばFIELDS et al. VIROLOGY, volume 2, chapter 69 (4th ed., Lippincott-Raven Publishers) を参照されたい。いくつかの局面において、「AAVベクター」には、公知AAVベクターの誘導体が含まれる。いくつかの局面において、「AAVベクター」には、改変または人工AAVベクターが含まれる。「AAVゲノム」、「AAVカプシド」および「AAVベクター」という用語は、相互可換的に使用することができる。いくつかの局面において、AAVベクターは、野生型のAAV血清型配列と比較して、改変されているか、または変異している。

10

20

30

40

50

【0176】

本明細書にいう「AAV粒子」とは、少なくとも1つのペイロード領域(例えばサイトカインをコードするポリヌクレオチド)と少なくとも1つの末端逆位反復配列(ITR)領域とを有するAAVベクターを含む、AAVウイルスである。いくつかの局面において、「本開示のAAVベクター」または「AAVベクター」という用語は、例えばAAV粒子に封入された、サイトカインをコードするポリヌクレオチドを含む、AAVベクターを指す。

【0177】

「コード配列」または特定分子(例えば治療分子)を「コードする」配列は、プロモーターなどの適当な制御配列に機能的に連結された場合に、インビトロまたはインビボで、転写され(DNAの場合)、またはポリペプチドに翻訳される(mRNAの場合)、核酸である。コード配列の境界は、5'(アミノ)末端の開始コドンと3'(カルボキシ)末端の翻訳停止コドンとによって決定される。コード配列には、限定するわけではないが、原核生物または真核生物のmRNAからのcDNA、原核生物または真核生物のDNAからのゲノムDNA配列、および合成DNA配列を含めることができる。転写終結配列は、通常、コード配列の3'側に位置するだろう。

【0178】

本明細書において使用される「に由来する」という用語は、指定された分子もしくは生物から単離された、または指定された分子もしくは生物を使って作られた、または指定された分子もしくは生物からの情報(例えばアミノ酸配列または核酸配列)を使って作られた、構成要素を指す。例えば、第2の核酸配列(例えば別のAAVベクター)に由来する核酸配列(例えばAAVベクター)は、第2の核酸配列のヌクレオチド配列と同一の、または実質的に類似する、ヌクレオチド配列を含むことができる。

【0179】

本明細書において開示されるポリヌクレオチドの場合、派生種は、例えば天然の変異導入、人工的な指向性変異導入、または人工的なランダム変異導入によって得ることができる。ポリヌクレオチドを得るために使用される変異導入は、意図的に指向性であるか、意図的にランダムであるか、またはそれぞれの混合であることができる。最初のポリヌクレオチドとは異なるポリヌクレオチドを作出するためのポリヌクレオチドの変異導入は、ランダム事象(例えばポリメラーゼの不忠実性が引き起こすもの)であることができ、派生したポリヌクレオチドの同定は、適当なスクリーニング方法によって行うことができる。

【0180】

本明細書において使用される「変異」という用語は、後続の世代に伝達されうるバリエント(「変異体」ともいう)型をもたらす、遺伝子構造の任意の変化を指す。遺伝子中の変異は、DNA中の単一塩基の改変によって、または遺伝子もしくは染色体のより大きな区画の欠失、挿入もしくは再編成によって引き起こされうる。

【0181】

本明細書において使用される「投与」という用語は、対象または系への、本開示の組成物（例えば本明細書において開示されるAAVベクターまたは組成物（例えば遺伝子治療組成物））の投与を指す。動物対象（例えばヒト）への投与は、腫瘍中への直接注射など、任意の適当な経路によることができる。

【0182】

本明細書において使用される「再投与」、「反復投与」および「再投薬」という用語は、治療剤、例えば本開示の遺伝子治療、送達コンストラクト、AAVカプシド、または組成物の、最初の投与に続く、さらに1回または複数回の投与を指す。

【0183】

本明細書において使用される「改変された」という用語は、本開示の分子の変化した状態または構造を指す。分子は、さまざまな方法で、例えば化学的、構造的および機能的に改変することができる。

【0184】

本明細書において使用される「合成」という用語は、人の手で生産、調製および/または製造されたことを意味する。本開示のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたは他の分子の合成は、化学的または酵素的であることができる。

【0185】

「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」は、本願では相互可換的に使用される。これらの用語は分子の一次構造だけを指す。したがってこれらの用語は、二本鎖および一本鎖DNAならびに二本鎖および一本鎖RNAを包含する。本明細書において使用される「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、当業者に広く理解されているとおり、共有結合で連結された2つ以上のヌクレオシドを含む分子と定義される。共有結合されたそのようなヌクレオシドは核酸分子またはオリゴマーともいうことができる。ポリヌクレオチドは、組換え的に、酵素的に、または合成的に、例えば固相化学合成と、それに続く精製とによって、作ることができる。ポリヌクレオチドまたは核酸の配列に言及する場合は、共有結合で連結されたヌクレオチドまたはヌクレオシドの核酸塩基部分の配列もしくは順序またはその改変に言及する。

【0186】

本明細書において使用される「mRNA」という用語は、1つまたは複数のポリペプチド鎖のアミノ酸配列をコードする一本鎖RNAを指す。

【0187】

本明細書において使用される「アンチセンス」という用語は、ある遺伝子、一次転写産物またはプロセシングされたmRNAの全部または一部分に対して、その内在性遺伝子の発現を妨害するのに十分な相補性を持つ核酸を指す。「相補的」ポリヌクレオチドとは、標準的なワトソン-クリック相補性規則に従って塩基対合することができるものである。具体的には、プリン類はピリミジン類と塩基対合して、シトシンと対合したグアニン（G:C）の組み合わせ、およびDNAの場合はチミンと対合したアデニン（A:T）、RNAの場合はウラシルと対合したアデニン（A:U）の組み合わせを形成することになる。2つのポリヌクレオチドは、たとえそれらが互いに完全には相補的でなくても、それぞれが他方に対して実質的に相補的な少なくとも1つの領域を有するのであれば、互いにハイブリダイズできると理解される。

【0188】

「アンチセンス鎖」および「ガイド鎖」という用語は、標的配列、例えばmRNAに対して実質的に相補的な領域を含む、dsRNAの、例えばshRNAの、鎖である。アンチセンス鎖は、所望の標的mRNA配列に対して、標的特定のサイレンシングを指示するのに十分に相補的である配列、例えばRNAi機構またはRNAiプロセスによる所望の標的mRNAの破壊をトリガーするのに十分な相補性を有する。

【0189】

本明細書において使用される「センス鎖」および「パッセンジャー鎖」とは、本明細書に定義される用語としてのアンチセンス鎖の一領域に実質的に相補的である一領域を含む

10

20

30

40

50

、dsRNAの、例えばshRNAの、鎖を指す。dsRNAの、例えばshRNAの、アンチセンス鎖およびセンス鎖は、ハイブリダイズして二重鎖構造を形成する。

【0190】

本明細書において使用される「ポリペプチド」という用語は、単数の「ポリペプチド」も、複数の「ポリペプチド」も包含するものとし、2つ以上のアミノ酸の任意の1つまたは複数の鎖を含む。したがって本明細書にいう「ペプチド」、「ペプチドサブユニット」、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、「アミノ酸配列」、または2つ以上のアミノ酸の1つもしくは複数の鎖を指すために使用される他の任意の用語は、それぞれに、より具体的な意味を有しうるものの、いずれも「ポリペプチド」の定義に包含される。「ポリペプチド」という用語は、これらの用語のいずれかの代わりに、またはこれらの用語のいずれかと相互可換的に使用することができる。この用語は、翻訳後修飾または合成後修飾、例えばパルミトイル基のコンジュゲーション、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/遮断基による誘導体化、タンパク質分解的切断、または非天然アミノ酸による修飾などを経たポリペプチドを、さらに包含する。本明細書において使用される「ペプチド」という用語は、完全長ペプチドおよびそのフラグメント、バリエーションまたは誘導体を包含する。本明細書において開示される「ペプチド」は、半減期を増加させるために例えばFcドメインまたはアルブミンドメインなどの追加の構成要素を含む、融合ポリペプチドの一部であることができる。本明細書記載のペプチドは、いくつかの異なる方法で誘導体化することもできる。本明細書記載のペプチドは、パルミトイル基のコンジュゲーションなどといった修飾を含むことができる。

10

20

【0191】

「治療剤」または「治療分子」という用語には、有効量で存在した場合に、望ましい治療効果、薬理学的および/または生理学的効果を、その必要のある対象にもたらす、化合物または分子が含まれる。これには、対象に投与した場合に、対象に対して測定可能な効果または伝達可能な効果 (conveyable effect) を有する、例えば疾患、障害または状態の症状を緩和しまたは減少させる、任意の化合物、例えば低分子薬、または生物製剤 (例えばポリペプチド薬または核酸薬) が含まれる。いくつかの局面において、治療分子は免疫調節タンパク質 (例えばサイトカイン) またはその機能的フラグメントである。

【0192】

本明細書において使用される「阻害物質」という用語は、タンパク質のレベルおよび/または活性を低減する任意の作用物質を指す。阻害物質の非限定的な例として、dsRNA、例えばsiRNAまたはshRNA、およびdsRNA、例えばsiRNAまたはshRNAをコードするポリヌクレオチドを含むベクター、例えばAAVが挙げられる。本明細書において使用される「低減する」という用語は、「サイレンシングする」、「ダウンレギュレートする」、「抑制する」、および他の類似する用語と相互可換的に使用され、任意のレベルの低減を包含する。

30

【0193】

本明細書において使用される「細胞を接触させる」 (例えば細胞を、本開示のAAVベクター、AAVカプシドまたは組成物 (例えば遺伝子治療組成物) と接触させる) という表現は、細胞を直接的または間接的に接触させることを含む。いくつかの局面において、細胞をAAVベクター、AAVカプシドまたは組成物 (例えば遺伝子治療組成物) と接触させることには、細胞をインビトロで組成物 (例えば遺伝子治療組成物)、AAVベクターまたはAAVカプシドと接触させること、または細胞をインビボでAAVベクター、AAVカプシドまたは組成物 (例えば遺伝子治療組成物) と接触させることが含まれる。したがって、例えばAAVベクター、AAVカプシドまたは組成物 (例えば遺伝子治療組成物) は、本方法を実施する者によって細胞と物理的に接触した状態にされるか、あるいは、AAVベクター、AAVカプシドまたは組成物 (例えば遺伝子治療組成物) は、それが、後に細胞と接触することが可能になる状況、または後に細胞と接触する原因となる状況に、置かれる。

40

【0194】

50

いくつかの局面において、細胞をインビトロで接触させることは、例えば細胞をAAVベクターと共にインキュベートすることによって行うことができる。いくつかの局面において、細胞をインビボで接触させることは、例えば本開示のAAVベクター、AAVカプシドまたは組成物（例えば遺伝子治療組成物）を、細胞が位置する組織（例えば腫瘍）中に、またはその近くに、注射することによって、またはAAVベクター、AAVカプシドもしくは組成物（例えば遺伝子治療組成物）を別の領域中に、例えば血流中または皮下腔中に、後に作用物質が、接触させようとする細胞が位置する組織に到達することになるように、注射することによって、行うことができる。例えば、AAVベクターを関心対象の部位へ向かわせるリガンドに、AAVベクターを封入および/またはカップリングすることができる。インビトロ接触法とインビボ接触法の組み合わせも可能である。例えば、細胞をインビトロでAAVベクター、AAVカプシドまたは組成物（例えば遺伝子治療組成物）と接触させ、次にそれを対象に移植することができる。

10

【0195】

いくつかの局面において、細胞を本開示のAAVベクター、AAVカプシドまたは組成物（例えば遺伝子治療組成物）と接触させることには、AAVベクター、AAVカプシドまたは組成物（例えば遺伝子治療組成物）を、細胞中への取り込みまたは吸収を助長するまたは達成することにより、細胞中に（直接的または間接的に）「導入する」または「送達する」ことが含まれる。細胞中へのAAVベクター、AAVカプシドまたは組成物（例えば遺伝子治療組成物）の導入は、インビトロおよび/またはインビボで行うことができる。例えばインビボ導入の場合は、AAVベクター、AAVカプシド、組成物（例えば遺伝子治療組成物）を、特定組織部位（例えば治療効果が望まれる場所）中に注射するか、または全身性に投与する（例えば治療効果が望まれる場所にターゲティングされるAAVベクターを投与する）ことができる。細胞へのインビトロ導入には、当技術分野において公知の方法、例えばエレクトロポレーションおよびリポフェクションが含まれる。

20

【0196】

本明細書において使用される場合、例えば本明細書において開示されるAAVベクター、AAVカプシドまたは組成物（例えば遺伝子治療組成物）の、「有効量」、「治療有効量」および「十分量」という用語は、ヒトを含む対象に投与した場合に、臨床結果などの有益な結果または所望の結果を達成するのに十分な量を指し、したがって「有効量」またはその同義語は、それが適用されている文脈に依存する。いくつかの局面において、作用物質（例えば本明細書において開示されるAAVベクター、AAVカプシド、組成物（例えば遺伝子治療組成物））の治療有効量は、対象において、対照と比較して有益な結果または所望の結果をもたらす量である。

30

【0197】

所与の作用物質（例えば本明細書において開示されるAAVベクター、AAVカプシドまたは組成物（例えば遺伝子治療組成物））の量は、例えば当該所与の作用物質、薬学的製剤、投与経路、疾患または障害のタイプ、対象の素性（例えば年齢、性別および/または体重）または処置される宿主などといったさまざまな要因に依存して変動するそのような量に、対応するだろう。

【0198】

40

本明細書において使用される「遺伝子治療」という用語は、疾患を処置し、疾患の症状を低減し、または疾患の可能性を低減するための、個体の細胞および/または組織中への核酸配列（例えば本明細書において開示される免疫調節タンパク質（例えばサイトカインまたはそのサブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含むポリヌクレオチド）の挿入である。遺伝子治療には、阻害性である導入遺伝子、すなわち内在性の遺伝子またはタンパク質、例えば望ましくないまたは異常な（例えば病原性の）遺伝子またはタンパク質の発現、活性または機能を阻害し、減少させまたは低減する導入遺伝子の挿入も含まれる。そのような導入遺伝子は外因性であることができる。外因性の分子または配列とは、処置される細胞、組織および/または個体には通常は存在しない分子または配列であると理解される。後天性疾患と先天性疾患

50

はどちらも遺伝子治療の対象となる。

【0199】

本明細書において使用される「予防有効量」という用語には、ある疾患または障害（例えばがん）を有するかまたはその素因を持つ対象に投与した場合に、その疾患もしくは障害、またはその疾患もしくは障害の1つもしくは複数の症状を、防止し、低減または改善するのに十分な、作用物質（例えば本明細書において開示されるAAVベクター、AAVカプシドまたは組成物（例えば遺伝子治療組成物））の量が含まれる。疾患または障害の改善には、疾患または障害の経過を送らせること、または後に発生する疾患もしくは障害の重症度を低減することが含まれる。「予防有効量」は、作用物質、例えばAAVベクター、AAVカプシドまたは組成物（例えば遺伝子治療組成物）の特徴、作用物質の投与方法、疾患のリスクの程度、および病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝的体質、先行処置または並行処置があれば、そのタイプ、および処置される患者の他の個人的特徴に依存して変動しうる。

10

【0200】

本明細書にいう「オフターゲット」とは、任意の1つまたは複数の標的、遺伝子または細胞転写産物に対する、任意の意図せぬ効果を指す。

【0201】

本明細書において使用される「インビトロ」という用語は、生物（例えば動物、植物または微生物）内ではなく、人工的環境で起こる、例えば試験管または反応槽、細胞培養、ペトリ皿などにおいて起こる、事象を指す。

20

【0202】

本明細書において使用される「インビボ」という用語は、生物（例えば動物、植物もしくは微生物またはその細胞もしくは組織）内で起こる事象を指す。

【0203】

本明細書において使用される「トランスフェクション」という用語は、外因性核酸を細胞中に導入する方法を指す。トランスフェクションの方法には、化学的方法、物理的处理およびカチオン性脂質または混合物などがあるが、それらに限定されない。細胞中にトランスフェクトすることができる作用物質のリストは膨大であり、例えばsiRNA、shRNA、センス配列および/またはアンチセンス配列、ベクターなどの発現プラスミド中に編成された1つまたは複数の遺伝子をコードするDNAなどが、これに含まれる。

30

【0204】

「タンパク質のレベルを決定する」とは、タンパク質またはそのタンパク質をコードするmRNAの、当技術分野において公知の方法による、直接的または間接的な検出を意味する。「直接的に決定する」とは、物理的実体または値を得るためのプロセスを実施すること（例えば試料に対してアッセイまたは検査を実施すること、または本明細書に定義される用語としての「試料を分析する」こと）を意味する。「間接的に決定する」とは、物理的実体または値を別の団体または供給源（例えば物理的実体または値を直接獲得した第三者研究室）から受け取ることを指す。タンパク質レベルを測定する方法には、一般に、ウェスタンブロットティング、イムノブロットティング、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、免疫沈降、免疫蛍光、表面プラズモン共鳴、化学ルミネセンス、蛍光偏光、リン光、免疫組織化学解析、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型（MALDI-TOF）質量分析、液体クロマトグラフィー（LC）-質量分析、マイクロサイトメトリー、顕微鏡法、蛍光活性化細胞選別（FACS）、およびフローサイトメトリー、ならびにタンパク質の性質、例えば限定するわけではないが、酵素活性または他のタンパク質パートナーとの相互作用に基づくアッセイなどがあるが、それらに限定されない。mRNAレベルを測定するための方法は当技術分野において公知である。

40

【0205】

リファレンスポリヌクレオチド配列またはリファレンスポリペプチド配列に対する「パーセント（%）配列同一性」は、パーセント配列同一性が最大になるように配列を整列し、必要であればギャップを導入した後の、リファレンスポリヌクレオチド配列またはリフ

50

アレンスポリペプチド配列中の核酸またはアミノ酸と同一である、候補配列中の核酸またはアミノ酸のパーセンテージと定義される。パーセント核酸またはアミノ酸配列同一性を決定するためのアラインメントは、当業者の能力内にあるさまざまな方法で、例えばBLAST、BLAST-2またはMegalignソフトウェアなどの公に利用できるコンピュータソフトウェアを使って、達成することができる。当業者は、配列を整列させるための適当なパラメータを、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するのに必要なあらゆるアルゴリズムを含めて、決定することができる。例えばパーセント配列同一性は配列比較コンピュータプログラムBLASTを使って生成させることができる。

【0206】

「レベル」とは、タンパク質、またはそのタンパク質をコードするmRNAの、任意でリファレンスと比較した、レベルまたは活性を意味する。リファレンスは、本明細書において定義される任意の有用なリファレンスであることができる。タンパク質の「レベルの減少」または「レベルの増加」とは、リファレンスと比較したタンパク質レベルの減少または増加を意味する。

【0207】

タンパク質のレベルは、質量/体積（例えばg/dL、mg/mL、μg/mL、ng/mL）または試料中の総タンパク質または総mRNAに対するパーセンテージで表すことができる。

【0208】

本明細書において使用される「薬学的組成物」という用語は、薬学的に許容される賦形剤と共に製剤化された、本明細書記載の化合物または分子、例えば本明細書において開示されるAAVベクターを含む組成物を表し、これは、哺乳動物における疾患の処置のための治療レジメンの一部として、政府規制機関の承認を得て製造または販売することができる。

【0209】

本明細書にいう「薬学的に許容される賦形剤」は、患者において実質的に無毒性および非炎症性であるという性質を有する、本明細書記載の化合物以外の、任意の成分（例えば活性化合物を懸濁または溶解することができる媒体）を指す。

【0210】

「リファレンス」とは、タンパク質またはmRNAのレベルまたは活性を比較するために使用される任意の有用なリファレンスを意味する。リファレンスは、比較のために使用される任意の試料、標準、標準曲線またはレベルであることができる。リファレンスは、正常リファレンス試料またはリファレンス標準もしくはリファレンスレベルであることができる。「リファレンス試料」は、例えば対照、例えば予め決定された陰性対照値、例えば同じ対象から採取された「正常対照」または以前の試料;正常健康対象からの試料、例えば正常細胞または正常組織;疾患を有しない対象からの試料（例えば細胞または組織）;疾患と診断されたが本明細書記載の化合物による処置はまだ受けていない対象からの試料;本明細書記載の化合物による処置を受けた対象からの試料;または公知の正常濃度にある精製タンパク質（例えば本明細書記載のいずれか）であることができる。

【0211】

本明細書において使用される「対象」という用語は、本明細書において開示される組成物、例えば本開示のAAVベクターまたは組成物（例えば遺伝子治療組成物）を、例えば実験、診断、予防および/または治療目的で、投与することができる、任意の生物を指す。典型的な対象としては、任意の動物（例えば哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、およびヒト）が挙げられる。対象は、特定の疾患または状態のための、処置を探しているまたは欲しているか、または処置を必要としているか、処置を受けているか、将来処置を受けることになるか、または熟練した専門家による医療を受けているヒトもしくは動物であることができる。

【0212】

いくつかの局面において、ヒトは免疫無防備状態（immunocompromised）または免疫不全状態（immunodeficient）であることができる。いくつかの局面において、

10

20

30

40

50

ヒトは高齢者であることができる。いくつかの局面において、ヒトは、免疫無防備状態または免疫不全状態かつ高齢者であることができる。

【0213】

「がん」は、身体における異常細胞の抑制のない成長を特徴とする、多種多様な一群の疾患を指す。無秩序な細胞分裂と成長は、隣接組織に侵入すると共にリンパ系または血流を介して身体の遠隔部に転移することもできる悪性腫瘍の形成をもたらす。いくつかの局面において、本開示の方法は、例えば皮膚がん（例えば転移性黒色腫、皮膚悪性黒色腫、皮膚扁平上皮癌、基底細胞癌）；乳がん（例えば浸潤性乳がん、トリプルネガティブ乳がん、炎症性乳がん）；脳のがん（例えば多形性神経膠芽腫、髄芽腫、下垂体癌、脳幹神経膠腫、星状細胞腫、乏突起神経膠腫、血管周囲細胞腫、胚細胞性腫瘍、松果体腫瘍）；骨がん（例えば脊索腫、軟骨肉腫、骨肉腫、ユーイング肉腫、線維肉腫、アダマンチノーマ、巨細胞腫）；頭頸部がん（例えば頭頸部扁平上皮癌 [HNSCC]）；唾液腺がん、中咽頭がん、下咽頭がん、喉頭がん、口唇・口腔がん、鼻咽頭がん、甲状腺がん、副甲状腺のがん、副鼻腔・鼻腔がん）；婦人科がん（例えば卵巣がん、子宮がん、卵管がん、子宮内膜がん、子宮頸がん、膣がん、外陰がん）；泌尿器がん（例えば腎がん、尿道がん、尿路上皮がん、膀胱がん、腎臓または尿管のがん、腎盂のがん、精巣がん、陰茎がん、副腎のがん）；胃腸がん（例えば肛門部のがん、胆管がん、結腸がん、小腸のがん、食道がん、胆嚢がん、消化管間質腫瘍、肝がん、膵がん、直腸がん、胃がん）；眼がん（例えばぶどう膜黒色腫、網膜芽細胞腫、メルケル細胞癌、眼内悪性黒色腫、粘膜関連リンパ組織リンパ腫、眼窩リンパ腫、眼窩肉腫、涙腺腫瘍）；胸部がん（例えば非小細胞肺癌、小細胞肺癌、中皮腫、胸腺悪性疾患、気管腫瘍、一部の食道がん）、白血病（例えば慢性または急性白血病、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）（非T細胞性ALLを含む）、慢性リンパ性白血病（CLL））、リンパ腫（例えばホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（NHL）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、縦隔原発B細胞性大細胞型リンパ腫（PMBC）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、濾胞性リンパ腫（FL）、形質転換濾胞性リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫（SMZL）、皮膚T細胞性リンパ腫（CTCL）、リンパ球性リンパ腫、原発性CNSリンパ腫）、他の血液がん（例えば多発性骨髄腫）、内分泌系のがん、軟部組織の肉腫、中枢神経系の新生物（例えばCNS；非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍、脊髄軸腫瘍）、腫瘍血管新生、カボジ肉腫、類表皮がん、アスベストが誘発するがんを含む環境誘発性がん、他のB細胞性悪性疾患、神経芽細胞腫（嗅神経芽細胞腫を含む）、横紋筋肉腫、および前記癌の任意の組み合わせに由来する腫瘍の腫瘍サイズを低減するために使用することができる。

10

20

30

【0214】

本明細書において使用される「腫瘍」という用語は、良性（非がん性）または悪性（がん性）いずれかの、前がん病変を含む、過剰な細胞成長または細胞増殖に起因する任意の組織塊を指す。

【0215】

本明細書において使用される「リンパ器官」という用語は、骨髄および胸腺を含む一次リンパ器官と、リンパ節、脾臓、扁桃および身体の（例えば腸の）さまざまな粘膜層におけるある特定の組織を含む二次リンパ器官とを指す。

40

【0216】

本明細書において使用される「処置する」、「処置される」および「処置」という用語は、望ましくない生理的状态、障害もしくは疾患を防止または減速（縮減）すること、または有益なもしくは望ましい臨床結果を得ることを目的とする、治療的処置と予防または防止措置の両方を指す。いくつかの局面において、処置は疾患または障害に付随する症状を低減または縮減する。いくつかの局面において、処置は有益な臨床結果または望ましい臨床結果をもたらす。

【0217】

有益な臨床結果または望ましい臨床結果としては、症状の緩和；状態、障害もしくは疾

50

患の程度の減弱;状態、障害または疾患の状態の安定化(すなわち悪化しないこと);状態、障害または疾患の発生の進行の遅延または減速;検出可能であるか、検出不可能であるかを問わず、状態、障害もしくは疾患状態の改善または寛解(部分的であるか完全であるかを問わない);患者にとって必ずしも識別可能でない、少なくとも1つの測定可能な物理的パラメータの改善;または状態、障害もしくは疾患の増強もしくは改善が挙げられるが、それらに限定されない。いくつかの局面において、処置は、過剰なレベルの副作用を伴わずに、臨床的に有意な応答を引き出すことを含む。いくつかの局面において、処置は、処置を受けていない場合に予想される生存期間と比較して、生存期間の延長を含む。本明細書において使用される「改善」または「改善する」という用語は、状態または疾患の少なくとも1つの指標の重症度の縮減を指す。本明細書において使用される「防止する」または「防止」という用語は、状態または疾患の開始、発生または進行を、ある期間にわたって、例えば数週間、数ヶ月または数年にわたって、遅延させまたは未然に防ぐことを指す。

10

【0218】

II. 関心対象の免疫調節タンパク質およびポリヌクレオチド

本開示は、免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含む、組成物、例えば遺伝子治療組成物を提供する。いくつかの局面において、免疫調節タンパク質は、サイトカイン、または可溶性のナチュラルキラー(NK)細胞、B細胞、T細胞、好中球もしくはマクロファージリガンド、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの局面において、免疫調節タンパク質はサイトカインである。いくつかの局面において、免疫調節タンパク質は、可溶性のナチュラルキラー(NK)細胞、B細胞、T細胞、好中球またはマクロファージリガンドである。

20

【0219】

サイトカイン

サイトカインは、免疫応答の媒介物質であるタンパク質性のシグナル伝達化合物である。これらは、増殖、分化および細胞の生存/アポトーシスを含む、多くの異なる細胞機能をコントロールする。サイトカインは、ウイルス感染および自己免疫疾患を含むいくつかの病態生理学的プロセスにも関与する。サイトカインは、さまざまな刺激を受けて、自然免疫系の細胞(単球、マクロファージ、樹状細胞)および適応免疫系の細胞(T細胞およびB細胞)をどちらも含む種々の細胞によって合成される。

30

【0220】

表1にサイトカイン受容体ファミリーの分類を示す。

【0221】

(表1) サイトカイン受容体ファミリーの分類

40

50

受容体ファミリー	リガンド	構造/機能
I型サイトカイン受容体	IL-2 IL-3 IL-4 IL-5 IL-6 IL-7 IL-9 IL-11 IL-12 IL-13 IL-15 IL-21 IL-23 IL-27 IL-33	多量体鎖で構成される。 共通のシグナル伝達鎖を使い JAK-STAT経路を介して シグナル伝達する。 サイトカイン結合鎖を含有する。
I型サイトカイン受容体	エリスロポエチン GM-CSF G-CSF 成長ホルモン プロラクチン オンコスタチンM 白血病抑制因子	多量体鎖で構成される。 共通のシグナル伝達鎖を使い JAK-STAT経路を介して シグナル伝達する。 サイトカイン結合鎖を含有する。
II型サイトカイン受容体	IFN- α/β IFN- γ IL-10 IL-20 IL-22 IL-28	免疫グロブリン様ドメイン。 ヘテロ二量体鎖および多量体鎖を 使用する。 JAK-STATを介してシグナル伝達する。
免疫グロブリンスーパーファミリー受容体	IL-1 CSF1 c-kit IL-18	免疫グロブリン構造との間に相同性を 有する。
IL-17受容体	IL-17 IL-17B IL-17C IL-17D IL-17E IL-17F	
Gタンパク質共役受容体 (GPCR)	IL-8 CCケモカイン CXCケモカイン	細胞の活性化および遊走を 媒介するように機能する。
TGF- β 受容体1/2	TGF- β	
腫瘍壊死因子受容体 (TNFR)	<u>CD27</u> <u>CD30</u> <u>CD40</u> <u>CD120</u> リンフォトキシン- β	共刺激受容体および 共抑制受容体として機能する。

CD-分化抗原群;c-kit-マスト/幹細胞成長因子受容体;CSF-コロニー刺激因子;G-CSF-顆粒球-コロニー刺激因子;GM-CSF-顆粒球マクロファージコロニー刺激因子;IL-インターロイキン;JAK-ヤヌスキナーゼ;STAT-シグナル伝達兼転写活性化因子;TGF-トランスフォーミング増殖因子。例えばLee S.et al.,Cancer,3:3856-3893(2011)を参照されたい。

【0222】

いくつかの局面において、本開示は、表1に示されるサイトカインのいずれかから選択されるサイトカインをコードする核酸、または表1に示されるマルチサブユニット（例えばヘテロ二量体型）サイトカインのいずれかから選択されるサイトカインの1つまたは複

数のサブユニットをコードする核酸に向けられる。

【0223】

本開示は、第1サイトカイン、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、および/または第2サイトカイン、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含むポリヌクレオチドを含む、組成物（例えば遺伝子治療組成物）およびAAVベクターを提供する。いくつかの局面において、組成物（例えば遺伝子治療組成物）は、マルチシストロニック（例えばビシストロニック）コンストラクト（例えば複数のサイトカイン（例えばIL-12）サブユニットを含むもの）を含む。

【0224】

いくつかの局面において、本明細書では、（a）免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメント（例えばサイトカインまたはその1つもしくは複数のサブユニット）をコードする核酸を含むポリヌクレオチドと、（b）送達ベクター（例えばAAVカプシド）とを含む、組成物（例えば遺伝子治療組成物）が提供される。

【0225】

いくつかの局面において、サイトカインは完全長であるか、サイトカインの機能的フラグメントであるか、またはサイトカインの機能的バリエーション、例えば1つまたは複数の変異を含むサイトカインである。いくつかの局面において、サイトカインは、2つ以上のサブユニットで構成されるヘテロ二量体型サイトカインである。いくつかの局面において、サイトカイン分子は単量体または二量体であることができる。いくつかの局面において、サイトカイン分子は受容体ドメイン、例えばサイトカイン受容体ドメインを、さらに含む。

【0226】

いくつかの局面において、サイトカインは、腫瘍壊死因子アルファ（TNF- α ）、I型インターフェロン（INF）、II型INF、インターロイキン（IL）-2、IL-12、IL-15、IL-21、IL-23、IL-27、IL-18、IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL17、IL33、TL1A、CD40L、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、それらの任意の機能的フラグメント、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。

【0227】

IFN- γ は、Treg脆弱性（Treg fragility）を促進し、腫瘍微小環境における抑制を低減することができる。IL-21およびIL-23はTregによる炎症誘発性IL-17の産生を誘導し、および/またはTregをTヘルパー17細胞（Th17）T細胞サブセットに変換させることができる。IL-12はTregにおけるIFN- γ 産生を促進して、Treg脆弱性および全般的な免疫産生促進環境（general pro-immunogenic environment）をもたらす。TNF- α は、Treg発生を損なうと共に、既存のTregの機能を低減する。したがってこれらのサイトカインはTreg発生を損ない、Treg機能を低減し、または免疫活性化細胞へのTregの分化転換を誘導することができる。がんとの関連では、Treg活性を低減することが望ましい。例えば国際公開WO2019/010219を参照されたい。

【0228】

本開示は、（a）第1サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と（b）第2サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチドも提供する。

【0229】

本開示は、（a）第1サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、（b）第2サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチドも提供する。

【0230】

いくつかの局面において、第1サイトカインは、IL-12、IL-18、IL-21、またはその機能的フラグメントである。いくつかの局面において、第1核酸はIL-12 p35遺伝子および/またはIL-12 p40遺伝子を含む。いくつかの局面において、第1サイトカインはIL-12またはその機能的フラグメントである。いくつかの局面において、第1核酸は、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸および/またはIL-12 p40サブユニットをコードする核酸を含む。

【0231】

いくつかの局面において、第1核酸（例えばIL-12 p35サブユニットをコードする核酸および/またはIL-12 p40サブユニットをコードする核酸）は、インフレームの停止コドン（例えばTGA、TAG、およびTAA）を含まない。

【0232】

いくつかの局面において、第1核酸は、SEQ ID NO:5~10、77、92または表2に示される任意の核酸配列に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの局面において、第1核酸は、SEQ ID NO:5~10、77、92または表2に示される任意の核酸配列の逆相補鎖に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0233】

いくつかの局面において、本開示のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:5~10、77、92または表2に示される任意の核酸配列に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む、1つまたは複数の核酸を含む。いくつかの局面において、本開示のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:5~10、77、92または表2に示される任意の核酸配列の逆相補鎖に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む、1つまたは複数の核酸を含む。

【0234】

（表2）IL-12の核酸配列

IL-12	IL-12 核酸配列 (SEQ ID NO)
ヒトIL-12A (p35) （「野生型」CpG修飾なし）	ATGTGTCCAGCGCGCAGCCTCCTCCTTGTGGCTACCCTGGTCCTCCTGGACCACCTCA GTTTGGCCAGAAACCTCCCCGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCCTTCA CCACTCCCCAAACCTGCTGAGGGCCGTCAGCAACATGCTCCAGAAGGCCAGACAAACT CTAGAATTTTACCCTTGCACTTCTGAAGAGATTGATCATGAAGATATCACAAAAGATA AAACCAGCACAGTGGAGGCCTGTTTACCATTGGAATTAACCAAGAATGAGAGTTGCCT AAATTCAGAGAGACCTCTTTCATAACTAATGGGAGTTGCCTGGCCTCCAGAAAGACC TCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGTAGTATTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGG TGGAGTTCAAGACCATGAATGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTTTCT AGATCAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATGCAGGCCCTGAATTTCAACAGT GAGACTGTGCCACAAAATCCTCCCTTGAAGAACCGGATTTTTATAAACTAAAATCA AGCTCTGCATACTTCTTCATGCTTTCCggATTCGGGCAGTGACTATTGATAGAGTGAT GAGCTATCTGAATGCTTCCTGA (SEQ ID NO: 5)
ヒトIL-12A (p35) （「野生型」CpG修飾なし かつインフレームの 停止コドンなし）	ATGTGTCCAGCGCGCAGCCTCCTCCTTGTGGCTACCCTGGTCCTCCTGGACCACCTCA GTTTGGCCAGAAACCTCCCCGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCCTTCA CCACTCCCCAAACCTGCTGAGGGCCGTCAGCAACATGCTCCAGAAGGCCAGACAAACT CTAGAATTTTACCCTTGCACTTCTGAAGAGATTGATCATGAAGATATCACAAAAGATA

10

20

30

40

50

	AAACCAGCACAGTGGAGGCCTGTTTACCATTGGAATTAACCAAGAATGAGAGTTGCCT AAATTCCAGAGAGACCTCTTTTCATAACTAATGGGAGTTGCCTGGCCTCCAGAAAGACC TCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGTAGTATTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGG TGGAGTTCAAGACCATGAATGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTTTCT AGATCAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATGCAGGCCCTGAATTTCAACAGT GAGACTGTGCCACAAAAATCCTCCCTTGAAGAACCGGATTTTATAAACTAAAATCA AGCTCTGCATACTTCTTCATGCTTTCCggATTTCGGGCAGTGACTATTGATAGAGTGAT GAGCTATCTGAATGCTTCC (SEQ ID NO: 77)
ヒトIL-12A (p35) (CpG修飾あり)	ATGTGTCCAGCGCGCAGCCTCCTCCTTGTGGCTACCCTGGTCCTCCTGGACCACCTCA GTTTGGCCAGAAACCTCCCTGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCCTTCA CCACTCCCAAACCTGCTGAGGGCTGTGAGCAACATGCTCCAGAAGGCCAGACAAACT CTAGAATTTTACCCTTGCCTTCTGAAGAGATTGATCATGAAGATATCAGAAAAGATA AAACCAGCACAGTGGAGGCCTGTTTACCATTGGAATTAACCAAGAATGAGAGTTGCCT AAATTCCAGAGAGACCTCTTTTCATAACTAATGGGAGTTGCCTGGCCTCCAGAAAGACC TCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGTAGTATTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGG TGGAGTTCAAGACCATGAATGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTTTCT AGATCAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATGCAGGCCCTGAATTTCAACAGT GAGACTGTGCCACAAAAATCCTCCCTTGAAGAACCTGATTTTATAAACTAAAATCA AGCTCTGCATACTTCTTCATGCTTTCCggATTTCGGGCAGTGACTATTGATAGAGTGAT GAGCTATCTGAATGCTTCTCGA (SEQ ID NO: 6)
ヒトIL-12A (p35) (CpG修飾あり)	ATGTGTCCAGCTAGGAGCCTCCTCCTTGTGGCTACCCTGGTCCTCCTGGACCACCTCA GTTTGGCCAGAAACCTCCCTGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCCTTCA CCACTCCCAAACCTGCTGAGGGCAGTCAAGCAACATGCTCCAGAAGGCCAGACAAACT CTAGAATTTTACCCTTGCCTTCTGAAGAGATTGATCATGAAGATATCAGAAAAGATA AAACCAGCACAGTGGAGGCCTGTTTACCATTGGAATTAACCAAGAATGAGAGTTGCCT AAATTCCAGAGAGACCTCTTTTCATAACTAATGGGAGTTGCCTGGCCTCCAGAAAGACC TCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGTAGTATTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGG TGGAGTTCAAGACCATGAATGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTTTCT AGATCAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATGCAGGCCCTGAATTTCAACAGT GAGACTGTGCCACAAAAATCCTCCCTTGAAGAACCTGATTTTATAAACTAAAATCA AGCTCTGCATACTTCTTCATGCTTTCCggATTTCGGGCAGTGACTATTGATAGAGTGAT GAGCTATCTGAATGCTTCTCGA (SEQ ID NO: 7)
ヒトIL-12B (p40) (「野生型」CpG修飾なし かつ停止コドンあり)	ATGTGTCAACAGCAGTTGGTTCATCTCTTGGTTTTCCCTGGTTTTCTGGCATCTCCCC TCGTGGCCATATGGGAAGTGAAGAAAGATGTTTATGTCGTAGAAATTGGATTGGTATCC GGATGCCCCCTGGAGAAATGGTGGTCCCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGATGGTATC ACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTTAGGCTCTGGCAAAACCTGACCATCC AAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCTGGCCAGTACACCTGTCAAAAGGAGGCGAGGTTCT AAGCCATTGCTCCTGCTGCTTCACAAAAGGAAGATGGAATTTGGTCCACTGATATT TTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTTTCTAAGATGCGAGGCCAAGAATT ATTCTGGACGTTTTACCTGCTGGTGGCTGACGACAATCAGTACTGATTGACATTCAG TGTCAAAGCAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGACGTGCGGAGCTGCTACA CTCTCTGCAGAGAGAGTCAAGAGGGGACAACAAGGAGTATGAGTACTCAGTGGAGTGCC AGGAGGACAGTGCCTGCCCAGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCCATTTAGGTTgATGGTGGA TGCCGTTTCAAGCTCAAGTATGAAAATAACCCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACATC ATCAAACCTGACCCACCAAGAACTTGCAGCTGAAGCCATTAAAGAATTCTCGGCAGG TGGAGGTGAGTGGGAGTACCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCCTACTTCTCCCT GACATTTCTGCGTTCAaGTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTC ACGGACAAAGACCTCAGCCACGGTCATCTGCCGCAAAATGCCAGCATTAGCGTGCAGG CCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTGGAGCGAATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTTG A (SEQ ID NO: 8)
ヒトIL-12B (p40) (CpG修飾あり)	TGTGTCAACAGCAGTTGGTTCATCTCTTGGTTTTCCCTGGTTTTCTGGCATCTCCCC TGTGGCCATATGGGAAGTGAAGAAAGATGTTTATGTTGGTAGAATTGGATTGGTATCCT GATGCCCCCTGGAGAAATGGTGGTCCCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGATGGTATCA CCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTTAGGCTCTGGCAAAACCTGACCATCCA AGTCAAAGAGTTTGGAGATGCTGGCCAGTACACCTGTCAAAAGGAGGGGAGGTTCTA AGCCATTCCCTCCTGCTGCTTCACAAAAGGAAGATGGAATTTGGTCCACTGATATTT TAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTTTCTAAGATGTGAGGCCAAGAATTA TTCTGGAAGGTTCACTGCTGGTGGCTGACTACAATCAGTACTGATTGACATTCAGT GTCAAAGCAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGACATGCGGAGCTGCTACAC

10

20

30

40

	TCTCTGCAGAGAGAGTCCAGAGGGGACAACAAGGAGTATGAGTACTCAGTGGAGTGCCA GGAGGACAGTGCCTGCCAGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCATTGAGGTgATGGTGGAT GCGGTTTCAAGCTCAAGTATGAAAACCTACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACATCA TCAAACCTGACCCACCAAGAAGCTTGCAGCTGAAGCCATTAAAGAATTCTAGGCAGGT GGAGGTCAGCTGGGAGTACCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCTACTTCTCCCTG ACATTCTGTGTTCAaGTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTCA CTGACAAGACCTCAGCCACAGTCATCTGCCGCAAAAATGCCAGCATTTTCAGTGCGGGC CCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTGGTCAGAATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTTGA (SEQ ID NO: 9)
ヒト IL-12B (p40) (CpG修飾あり)	ATGTGTCCAGCAGCTTGGTCATCTCTTGGTTTTCCCTGGTTTTTCTGGCATCTCCCC TTGTGGCCATATGGGAACTGAAGAAAGATGTTTATGTGGTAGAATTGGATTGGTATCC TGATGCCCTGGAGAAATGGTGGTCTCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGATGGTATC ACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTTAGGCTCTGGCAAAACCTGACCATCC AAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCTGGCCAGTACACCTGTACAAAAGGAGGGGAGGTTCT AAGCCATTCCCTCCTGTCTGCTTCAAAAAAGGAAGATGGAATTGGTCCACTGATATT TTAAAGGACCAGAAAGAACCACAAAATAAGACCTTTCTAAGATGTGAGGCCAAGAATT ATTCTGGAAGGTTACCTGTCTGGTGGCTGACTACAATCAGTACTGATTTGACATTTCAG TGTCAAAAGCAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGACATGTGGAGCTGCTACA CTCTCTGCAGAGAGAGTCCAGAGGGGACAACAAGGAGTATGAGTACTCAGTGGAGTGCC AGGAGGACAGTGCCTGCCAGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCCATTTGAGGTgATGGTGGGA TGCAGTTTCAAGCTCAAGTATGAAAACCTACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACATC ATCAAACCTGACCCACCAAGAAGCTTGCAGCTGAAGCCATTAAAGAATTCTAGGCAGG TGGAGGTGAGTGGGAGTACCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCTACTTCTCCCT GACATTCTGTGTTCAaGTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTC ACTGACAAGACCTCAGCCACAGTCATCTGCAGGAAAAATGCCAGCATTTTCAGTGAAGG CCAGGACAGaTACTATAGCTCATCTTGGTCAGAATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTTG A (SEQ ID NO: 10)
WTマウス IL-12A (p35) (インフレームの 停止コドンなし)	atggtcagcggttccaacagcctcaccctcggcatccagcagctcctctcagt gccggtccagcatgtgtcaatcacgctacctcctcttttggccacccttgc cctcctaaaccacctcagtttggccagggtcattccagtcctctggacctgcc aggtgtcttagccagtcgccaaacctgctgaagaccacagatgacatggtga agacggccagagaaaaactgaaacattattcctgcactgctgaagacatcga tcatgaagacatcacacgggacccaaccagcacattgaagacctgtttacca ctggaactacacaagaacgagagttgcctggctactagagagacttcttcca caacaagagggagctgcctgccccacagaagacgtctttgatgatgacct gtgcttggtagcatctatgaggacttgaagatgtaccagacagagttccag gccatcaacgcagcacttcagaatcacaccatcagcagatcattctagaca agggcatgctggtggccatcgatgagctgatgcagtcctctgaatcataatgg cgagactctgcccagaaacctcctgtgggagaagcagaccttacagagtg aaaatgaagctctgcatcctgcttcacgccttcagcaccgcgctcgtgacca tcaacaggggtgatgggctatctgagctccgcc (SEQ ID NO: 90)
WT マウス IL-12B (p40)	atgtgtcctcagaagctaaccatctcctgggtttgccatcgttttgctgggtgt ctccactcatggccatgtgggagctggagaaagacgtttatgttgtagaggt ggactggactcccgatgcccctggagaaacagtgaacctcacctgtgacacg cctgaagaagatgacatcacctggacctcagaccagagacatggagtcatag gctctggaaagacctgacctcactgtcaaagagtttctagatgctggcca gtacacctgccacaaaggaggcgagactctgagccactcacatctgctgctc cacaagaaggaaaatggaatttgggtccactgaaattttaaaaaatttcaaaa acaagactttcctgaagtgtgaagcaccaaattactccggacgggttcacgtg ctcatggctggtgcaaagaacatggacttgaagttcaacatcaagagcagt agcagttccctctgactctcgggcagtgacatgtggaatggcgtctctgtctg cagagaagggtcacactggaccaaagggactatgagaagtattcagtgctcctg ccaggaggatgtcacctgcccactgccgaggagacctgcccattgaactg gcgttggaaagcacggcagcagaataaatatgagaactacagcaccagcttct tcatcaggacatcatcaaaccagacccgcccagaacttgcagatgaagcc

10

20

30

40

	tttgaagaactcacaggtggaggtcagctgggagtagccctgactcctggagc actccccattcctacttctccctcaagttctttgttcgaatccagcgcaaga aagaaaagatgaaggagacagaggaggggtgtaccagaaaaggagcggttcct cgtagagaagacatctaccgaagtccaatgcaaaggcggggaatgtctgcgtg caagctcaggatcgctattacaattcctcatgcagcaagtgggcatgtgttc cctgcagggtccgatcctga (SEQ ID NO: 91)
ヒトIL-12B (p40) (「野生型」 CpG修飾なし かつインフレームの 停止コドンなし)	ATGTGTCACCAGCAGTTGGTCATCTCTTGGTTTTCCCTGGTTTTCTGGCATCTCCCC TCGTGGCCATATGGGAAGTGAAGAAAGATGTTTATGTCGTAGAAATTGGATTGGTATCC GGATGCCCCCTGGAGAAATGGTGGTCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGATGGTATC ACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTTAGGCTCTGGCAAAACCTGACCATCC AAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCTGGCCAGTACACCTGTCAAAAGGAGGCGAGGTTCT AAGCCATTCTGCTCCTGCTGCTTCACAAAAGGAAGATGGAATTTGGTCCACTGATATT TTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTTTCTAAGATGCGAGGCCAAGAATT ATTCTGGACGTTTTACCTGCTGGTGGCTGACGACAATCAGTACTGATTTGACATTGAG TGTCAAAGCAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGACGTGCGGAGCTGCTACA CTCTCTGCAGAGAGAGTCAAGAGGGGACAACAAGGAGTATGAGTACTCAGTGGAGTGCC AGGAGGACAGTGCCTGCCCAGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCCATTGAGGTgATGGTGGA TGCCGTTTCAAGCTCAAGTATGAAAACCTACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACATC ATCAAACCTGACCCACCCAAAGAACTTGCAGCTGAAGCCATTAAAGAATTCTCGGCAGG TGGAGGTGAGCTGGGAGTACCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCTACTTCTCCCT GACATTCTGCGTTTCAAGTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTC ACGGACAAGACCTCAGCCACGGTCATCTGCCGCAAAATGCCAGCATTAGCGTGCGGG CCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTGGAGCGAATGGGCATCTGTGCCCTGCAGT (SEQ ID NO: 92)

10

20

【 0 2 3 5 】

(表 3) IL-12のアミノ酸配列

IL-12	IL-12 アミノ酸配列 (SEQ ID NO)
マウス IL-12A (p35) NP_001152896	MVSVPTASPSASSSSSSQCRSSMCQSRYLFLATLALLNHLNHLARVIPVSGPARCLSQS RNLLKTDDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLAT RETSSTTRGSLPPQKTSLLMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNNHQIILDK GMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGY LSSA (SEQ ID NO: 78)
マウス IL-12B (p40) NP_001290173	MCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLCTDTPPEEDDI TWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGETLSHSHLLLHKKENGIIWSTEI LKNFKNKTFKLKCEAPNYSGRFTCSWLVRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASLSA EKVTLQDRDYKYSVSCQEDVTCPTAETLPIELALEARQQNKYENYSTSFFIRDIK PDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQ KGAFLVEKTSTEVQCKGGNVCVQAQDRYNNSSCSKWACVPCRVS (SEQ ID NO: 79)
ヒト IL-12A (p35) NP_000873	MWPPGSASQPPPSPAATGLHPAARPVSLQCRLSMCPARSLLLVATLVLLDHLNHLARN LPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTFEYFPTSEEIDHEDITKDKTSTV EACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKT MNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCIL LHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (SEQ ID NO: 80)
ヒト IL-12B (p40) NP_002178	MCHQQQLVISWFSVLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLCTDTPPEEDGI TWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSHLLLHKKEDGIWSTDI LKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAAT LSAERVRGDNKEYEYSVEQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI IKPDPPKNLQKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVF TDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCS (SEQ ID NO: 81)

30

40

【 0 2 3 6 】

IL-12

50

いくつかの局面において、サイトカインはIL-12分子、例えば完全長、IL-12の機能的フラグメント、またはIL-12のバリエーション、例えばヒトIL-12である。いくつかの局面において、IL-12分子は野生型ヒトIL-12である。別の態様において、IL-12分子はヒトIL-12のバリエーション、例えば1つまたは複数のアミノ酸改変を有するものである。いくつかの局面において、組成物（例えば遺伝子治療組成物）は、マルチシストロニック（例えばビスシストロニック）コンストラクト（例えばIL-12AサブユニットとIL-12Bサブユニットを含むもの）である本開示のコンストラクトを含む。

【0237】

インターロイキン-12（IL-12）は、それぞれIL-12AおよびIL-12Bという2つの別個の遺伝子によってコードされるp35サブユニットとp40サブユニットとで構成される、ヘテロ二量体型サイトカインである。IL-12は、ナイーブT細胞の、Th1細胞への分化に関与する。これは、T細胞の成長と機能を刺激することができるT細胞刺激因子として、公知である。これは、T細胞およびナチュラルキラー（NK）細胞からのIFN- γ およびTNF- α の産生を刺激し、IL-4が媒介するIFN- γ の抑制を低減する。IL-12を産生するT細胞は、IL-12活性と関連する補助受容体CD30を有する。

【0238】

IL-12は、NK細胞およびTリンパ球の活性において重要な役割を果たす。IL-12は、NK細胞およびCD8⁺細胞傷害性Tリンパ球の細胞傷害活性の増強を媒介する。IL-2とNK細胞におけるIL-12のシグナル伝達との間にも関連があるらしい。IL-2は2つのIL-12受容体IL-12R- β iおよびIL-12R-P2の発現を刺激して、NK細胞におけるIL-12シグナル伝達に関与する決定的タンパク質の発現を維持する。機能的応答の増強は、IFN- γ 産生および標的細胞の死滅によって実証される。

【0239】

IL-12は、抗血管新生活性も有し、これは、IL-12が新しい血管の形成を阻止できることを意味する。IL-12は、IFN- γ の産生を増加させ、それが次に、誘導性タンパク質10（IP-10またはCXCL10）と呼ばれるケモカインの産生を増加させることによって、これを行う。次にIP-10がこの抗血管新生効果を媒介する。免疫応答を誘導するその能力と、その抗血管新生活性ゆえに、IL-12を抗がん薬候補として検証することには興味もたれてきた。

【0240】

IL-12は、IL-12R- β iおよびIL-12R-P2によって形成されるヘテロ二量体型受容体であるIL-12受容体に結合する。IL-12R-P2は、IL-12機能に重要な役割を果たすと考えられている。これは活性化T細胞上に見いだされ、Th1細胞発生を促進するサイトカインによって刺激され、Th2細胞発生を促進するサイトカインでは阻害されるからである。結合すると、IL-12R-P2はチロシンホスホリル化された状態になり、キナーゼTyk2およびJak2のための結合部位を提供する。これらは、T細胞およびNK細胞におけるIL-12シグナル伝達と関係づけられるSTAT4などの決定的転写因子タンパク質を活性化するのに重要である。IL-12は、固形腫瘍における抗炎症性環境を再構築する潜在力を持つ強力なサイトカインである。しかし、その臨床的有用性は、可溶性投与でも、IL-12を分泌するように操作された養子移入T細胞でも、その激しい毒性によって制限されている。例えば米国特許US8026223B1、国際公開WO2019/010219、Liu, Y., et al., Cancer Gene Ther., 9:9-15 (2002)、Heinzerling L, et al., Hum Gene Ther., 16 (1): 35-48 (2005)を参照されたい。

【0241】

いくつかの局面において、本明細書では、エンハンサー（例えばCMVエンハンサー）、第1のIL-12サブユニットまたはその機能的フラグメント（例えばIL-12 p35サブユニットまたはIL-12 p40サブユニット）をコードする第1核酸に機能的に連結されたプロモーター、例えば恒常的プロモーター（例えばCBAプロモーターまたはそのフラグメント）、翻訳修飾配列（例えばフューリン切断配列とそれに続く2A自己プロセシングペプチド（F2A））、IL-12サブユニットまたはその機能的フラグメント（例えばIL-12

p35サブユニットまたはIL-12 p40サブユニット)をコードする第2核酸、およびpA配列(例えばヒト成長ホルモン(HGH)またはウシ成長ホルモン(BGH)pA配列)を含む、ポリヌクレオチド、組成物およびウイルスベクターが提供される。いくつかの局面において、ポリヌクレオチド、組成物およびウイルスベクターは、イントロン(例えばCAGイントロン)を、さらに含む。いくつかの局面において、ポリヌクレオチド、組成物およびウイルスベクターは、コザック配列を、さらに含む。

【0242】

いくつかの局面において、第1核酸は、SEQ ID NO:80もしくは81のいずれかのアミノ酸配列または表3中の任意のアミノ酸配列に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するポリペプチドをコードする。いくつかの局面において、第2核酸は、SEQ ID NO:80もしくは81のいずれかのアミノ酸配列または表3中の任意のアミノ酸配列に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するポリペプチドをコードする。いくつかの局面において、第1核酸(例えばIL-12 p35サブユニットをコードする核酸)はインフレームの停止コドン(例えばTGA、TAG、およびTAA)を含まない。

【0243】

いくつかの局面において、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸は、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、またはSEQ ID NO:77と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む。いくつかの局面において、IL-12 p40サブユニットをコードする核酸は、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、またはSEQ ID NO:92と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む。

【0244】

いくつかの局面において、本開示のポリヌクレオチドは、IL-12 p35遺伝子またはその機能的フラグメント(例えばSEQ ID NO:77に対応するもの)に機能的に連結されたプロモーター、フューリン切断配列および/または2A自己プロセシングペプチド配列(F2A、E2A、P2AまたはT2A自己プロセシングペプチドを含む)、ならびにIL-12 p40遺伝子またはその機能的フラグメント(例えばSEQ ID NO:8に対応するもの)、ならびにpA配列(例えば成長ホルモンpA)を含む。いくつかの局面において、プロモーターはCBAプロモーターまたはそのフラグメントを含み、任意で、CMVエンハンサーが含まれる。いくつかの局面において、プロモーターは、CBAプロモーターまたはそのフラグメントである。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドはイントロン(例えばCAGイントロン)をさらに含む。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドはコザック配列をさらに含む。

【0245】

いくつかの局面において、第2サイトカインはIL-15、IL-2、またはその機能的フラグメントである。いくつかの局面において、第2核酸はIL-15遺伝子を含む。いくつかの局面において、第2核酸は、SEQ ID NO:11~13、58または表4に示される任意の核酸に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの局面において、第2核酸は、SEQ ID NO:11~13、58または表4に示される任意の核酸の逆相補鎖に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの局面において、本開示のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:11~13、58または表4に示される任意の核酸配列に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列

、またはそれらの任意の組み合わせを含む、1つまたは複数の核酸を含む。

【0246】

(表4) IL-15の核酸配列

IL-15	IL-15 核酸配列 (SEQ ID NO)
IL-15 (「野生型」 CpG修飾なし)	ATGAGAATTTGCGAAACCACATTTGAGAAGTATTTCCATCCAGTGCTACTTGTGTTT ACTTCTAAACAGTCATTTTCTAACTGAAGCTGGCATTTCATGTCTTCATTTTGGGCT GTTTCTctGCAGGGCTTCCTAAACAGAAGCCAAGTGGGTGAATGTAATAAGTGAT TTGAAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATAC GGAAAGTGATGTTTCACCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGG AGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAA AATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATC TGGATGCAAAGAATGTGAGGAAGTGGAGGAAAAAAATATTAAAGAATTTTGCAGA GTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTGA (SEQ ID NO: 11)
IL-15 (CpG修飾あり)	ATGAGAATTAGCAAACCACATTTGAGAAGTATTTCCATCCAGTGCTACTTGTGTTT ACTTCTAAACAGTCATTTTCTAACTGAAGCTGGCATTTCATGTCTTCATTTTGGGCT GTTTCTctGCAGGGCTTCCTAAACAGAAGCCAAGTGGGTGAATGTAATAAGTGAT TTGAAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATAC TGAAAGTGATGTTTCACCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGG AGTTACAAGTTATTTCACTTGAGAGCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAA AATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATC TGGATGCAAAGAATGTGAGGAAGTGGAGGAAAAAAATATTAAAGAATTTTGCAGA GTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTGA (SEQ ID NO: 12)
IL-15 (CpG修飾あり)	ATGAGAATTAGCAAACCACATTTGAGAAGTATTTCCATCCAGTGCTACTTGTGTTT ACTTCTAAACAGTCATTTTCTAACTGAAGCTGGCATTTCATGTCTTCATTTTGGGCT GTTTCTctGCAGGGCTTCCTAAACAGAAGCCAAGTGGGTGAATGTAATAAGTGAT TTGAAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATAC TGAAAGTGATGTTTCACCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGG AGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAA AATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATC TGGATGCAAAGAATGTGAGGAAGTGGAGGAAAAAAATATTAAAGAATTTTGCAGA GTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTGA (SEQ ID NO: 13)
IL-15 (スプライスバリエント 修飾)	ATGAGAATTTGCGAAACCACATTTGAGAAGTATTTCCATCCAGTGCTACTTGTGTTT ACTTCTAAACAGTCATTTTCTAACTGAAGCTGGCATTTCATGTCTTCATTTTGGGCT GTTTCTCTGCTGGGCTTCCTAAACAGAAGCCAAGTGGGTGAATGTAATAAGTGAT TTGAAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATAC GGAAAGTGATGTTTCACCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGG AGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAA AATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATC TGGATGCAAAGAATGTGAGGAAGTGGAGGAAAAAAATATTAAAGAATTTTGCAGA GTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTGA (SEQ ID NO: 58)

10

20

30

40

【0247】

IL-15

いくつかの局面において、サイトカインはIL-15分子、例えば完全長、IL-15の機能的フラグメント、またはIL-15のバリエント、例えばヒトIL-15である。いくつかの局面において、IL-15分子は野生型ヒトIL-15である。別の態様において、IL-15分子はヒトIL-15のバリエント、例えば1つまたは複数のアミノ酸改変を有するものである。

【0248】

IL-15は、IL-2様の免疫調節機能を呈する4 α -ヘリックスバンドルサイトカインであり、T細胞、B細胞およびNK細胞の増殖と分化を支援する。加えて、IL-15は、骨髄前駆体からのNK細胞の分化をコントロールし、NKの抗腫瘍細胞溶解機能を刺激し、NK細胞に対する走化性刺激として作用すると、報告されている。NK細胞の発生と機能におけるIL-15の決定的役割も、IL-15発現を欠き、NK欠損表現型を呈する、IFN制御因子1 (IR

50

F-1) ノックアウトマウスにおいて立証された。したがってIL-15は、がんの免疫治療または遺伝子治療戦略にとって、好適な候補とみなされてきた。例えばDi Carlo et al., J Immunol, 165 (6) :3111-3118 (2000) を参照されたい。

【0249】

いくつかの局面において、第1核酸は、IL-12 p35遺伝子またはその機能的フラグメントに機能的に連結されたプロモーター、IRES配列、およびIL-15遺伝子またはその機能的フラグメントを含み、第2核酸は、IL-12 p40遺伝子またはその機能的フラグメントに機能的に連結されたプロモーターを含む（図2A参照）。いくつかの局面において、第1核酸は、IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーター、IRES配列、および任意で、IL-15遺伝子またはその機能的フラグメントを含み、第2核酸は、IL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む。いくつかの局面において、第1核酸は、IL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーター、IRES配列、および任意で、IL-15遺伝子またはその機能的フラグメントを含み、第2核酸は、IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む。

【0250】

いくつかの局面において、第1核酸は、IL-12 p35遺伝子またはその機能的フラグメントに機能的に連結されたプロモーター、フューリン切断配列および/または2A自己プロセシングペプチド（F2A、E2A、P2AまたはT2A自己プロセシングペプチドを含む）、ならびにIL-12 p40遺伝子またはその機能的フラグメントを含み、第2核酸は、IL-15遺伝子またはその機能的フラグメントに機能的に連結されたプロモーターを含む（図2B参照）。いくつかの局面において、第1核酸は、IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーター、フューリン切断配列および/または2A自己プロセシングペプチド（F2A、E2A、P2AまたはT2A自己プロセシングペプチドを含む）、ならびにIL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸を含み、任意で、第2核酸は、IL-15遺伝子またはその機能的フラグメントに機能的に連結されたプロモーターを含む。いくつかの局面において、第1核酸は、IL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーター、フューリン切断配列および/または2A自己プロセシングペプチド（F2A、E2A、P2AまたはT2A自己プロセシングペプチドを含む）、ならびにIL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸を含み、任意で、第2核酸は、IL-15遺伝子またはその機能的フラグメントに機能的に連結されたプロモーターを含む。

【0251】

いくつかの局面では、第1核酸が、IL-12 p35遺伝子またはその機能的フラグメントに機能的に連結されたプロモーター、IRES配列、およびIL-15遺伝子またはその機能的フラグメントを含み、第2核酸が、IL-12 p40遺伝子またはその機能的フラグメントに機能的に連結されたプロモーターを含み、コンストラクトは、SEQ ID NO:14~37および48~57のいずれかまたは表5に示される任意の核酸に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列を含む。

【0252】

いくつかの局面では、第1核酸が、IL-12 p35遺伝子またはその機能的フラグメントに機能的に連結されたプロモーター、フューリン切断配列および/または2A自己プロセシングペプチド（F2A、E2A、P2AまたはT2A自己プロセシングペプチドを含む）、ならびにIL-12 p40遺伝子またはその機能的フラグメントを含み、第2核酸が、IL-15遺伝子またはその機能的フラグメントに機能的に連結されたプロモーターを含み、コンストラクトは、SEQ ID NO:14~37および48~57のいずれかまたは表5に示される任意の核酸に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または1

00%の同一性を有する核酸配列を含む。

【0253】

(表5) IL-12および/またはIL-15の例示的発現カセットまたはコンストラクトの核酸配列

1	発現カセット	IL-12および/またはIL-15発現カセットまたは コンストラクトの核酸配列 (配列番号)
	ヒト EF-1a - 野生型 IL- 12A/IL-12B/IL-15 - IRES (CpG修飾なし)	(SEQ ID NO: 14)
2	ヒト EF-1a- 野生型 IL- 12A/IL-12B/IL-15 - F2A(CpG修飾なし)	(SEQ ID NO: 15)
3	ヒト EF-1a - 改変 IL- 12A/IL-12B/IL-15 - IRES (CpG修飾あり)	(SEQ ID NO: 16)
4	ヒト EF1a- 改変 IL- 12A/IL-12B/IL-15 - F2A (CpG修飾あり)	(SEQ ID NO: 17)
5	ヒト EF1a - 改変 IL- 12A/IL-12B/IL-15 - IRES (CpG修飾あり)	(SEQ ID NO: 18)
6	ヒト EF-1a - 改変 IL- 12A/IL-12B/IL-15 - F2A (CpG修飾あり)	(SEQ ID NO: 19)
7	ヒト EF-1a- 野生型 IL- 12A/IL-12B/IL-15 - ODN- IRES (CpG修飾なし)	(SEQ ID NO: 20)
8	ヒト EF-1a - 野生型 IL-12A/IL-12B/IL-15 - ODN - F2A (CpG修飾なし)	(SEQ ID NO: 21)
9	ヒト UbC - 野生型 IL- 12A/IL-12B/IL-15 - IRES (CpG修飾なし)	(SEQ ID NO: 22)
10	ヒト UbC - 野生型 IL- 12A/IL-12B/IL-15 - F2A (CpG修飾なし)	(SEQ ID NO: 23)
11	ヒト UbC - 改変 IL- 12A/IL-12B/IL-15 - IRES (CpG修飾あり)	(SEQ ID NO: 24)
12	ヒト UbC -改変 IL- 12A/IL-12B/IL-15 - F2A (CpG修飾あり)	(SEQ ID NO: 25)
13	ヒト UbC - 改変 IL- 12A/IL-12B/IL-15 - IRES (CpG修飾あり)	(SEQ ID NO: 26)

10

20

30

40

50

14	ヒト UbC - 改変 IL-12A/IL-12B/IL-15 - F2A - (CpG修飾あり)	(SEQ ID NO: 27)
15	ヒト UbC- 野生型 IL-12A/IL-12B/IL-15 -ODN-IRES (CpG修飾なし)	(SEQ ID NO: 28)
16	ヒト UbC- 野生型 IL-12A/IL-12B/IL-15 -ODN-F2A (CpG修飾なし)	(SEQ ID NO: 29)
17	ヒト CMV- 野生型 IL-12A/IL-12B - -F2A (CpG修飾なし)	(SEQ ID NO: 30)
18	ヒト CMV- 野生型 IL-15 (CpG修飾なし)	(SEQ ID NO: 31)
19	ヒト CAG - 野生型 IL-12A/IL-12B - IRES (CpG修飾なし) コンストラクト	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCG GGCGTCGGGCGACCTTTGGTTCGCCCCGGCCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTC TTAGTATTAAACGCGTGTGACATTGATTATTGACTAGTTATT AATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATAT GGAGTTCCGCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCCGCTGGC TGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGT ATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCA ATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCCACTTGGCAGTACAT CAAGTGATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATG ACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTT ATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC GCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACT CTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTGTATTAT TTATTTTAAATATTTTGTGCGAGCGATGGGGGCGGGGGGGG GGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGG CGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGCGCAGCCAATCAGAGCGGC GCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGCGGC GGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGC GCGCTGCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCGCGCCCTCGCGC CGCCCCCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGA GCGGGCGGGACGCGCCCTTCTCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTT GGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGC CTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCT CGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTG CGGCTCCGCGCTGCCCGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGC GCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGAGGAGCGCG CCGGGGCGGTGCCACGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAA CAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGGTGAGCAGG GGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGCTGTAACCCCCCTGCACCC CCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGG CTCCGTGCGGGGCTGGCGCGGGGCTCGCCGTCCGCGCGGGG GGTGGCGGCGGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGCCGCTCG GGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGCGGCCCGCGAGC GCCGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTT TATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCA AATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCCGCACCCCC TCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCGGCGAGGAAGG AAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTGCCTGCGCGCGCGCTC CCTTCTCCCTCTCCAGCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGACGGC TGCTTCGGGGGGGACGGGCGAGGGCGGGGTTGCGCTTCTGGC GTGTGACCGCGGTCTAGACTCTGCTAACCTTGTTTCATGCCTT CTTCTCTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTGTGTG CTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCAAGCTTCCAGCTAGCG CCACCATGTGTCCAGCGCGCAGCCTCCTCCTGTGGCTACCT

10

20

30

40

50

	GGTCCTCCTGGACCACCTCAGTTTGGCCAGAAACCTCCCCGTG GCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCCTTCACCACTCCC AAAACCTGCTGAGGGCCGTGAGCAACATGCTCCAGAAGGCCAG ACAAACTCTAGAATTTTACCCTTGCACTTCTGAAGAGATTGAT CATGAAGATATCACAAAAGATAAAACCAGCACAGTGGAGGCCCT GTTTACCATTGGAATTAAACCAAGAATGAGAGTTGCCTAAATTC CAGAGAGACCTCTTTCATAACTAATGGGAGTTGCCTGGCCTCC AGAAAGACCTCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGTAGTATTT ATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGAA TGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTTCTAGAT CAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATGCAGGCCCTGA ATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAATCCTCCCTTGAAGA ACCGGATTTTATAAACTAAATCAAGCTCTGCATACCTTCTT CATGCTTTCCGGATTCCGGCAGTGACTATTGATAGAGTGATGA GCTATCTGAATGCTTCCCTGAGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCT AACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAAATAAGGCCGCTGTGCCT TTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAA TGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATT CCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGT TGAATGTGCTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAG ACAAACAACGTCTGTAGCGACCTTTTGACGGCAGCGGAACCCC CCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTAT AAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGT GAGTTGGATAGTTGTGGAAGAGTCAATGGCTCTCCTCAAGC GTATTCAACAAGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCAT GTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTACACATGCTTTACATG TGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCAC GGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCC ACAATGTGTACCAGCAGTTGGTCATCTCTTGGTTTTCCCTGG TTTTCTGGCATCTCCCTCGTGCCCATATGGGAAGTGAAGAA AGATGTTTATGTGCTAGAATTGGATTGGTATCCGGATGCCCT GGAGAAATGGTGGTCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGATG GTATCACCTGGACCTTGGACAGAGCAGTGAGGTCTTAGGCTC TGGCAAAACCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCT GGCCAGTACACCTGTCAAAAGGAGGCGAGGTTCTAAGCCATT CGCTCCTGCTGCTTCAAAAAAGGAAGATGGAATTTGGTCCAC TGATATTTTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTTT CTAAGATGCGAGGCCAAGAATTATTCTGGACGTTTACCTGCT GGTGGCTGACGACAATCAGTACTGATTTGACATTCAAGTGTCAA AAGCAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGACGTGCGGA GCTGCTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAGAGGGGACAACAAGG AGTATGAGTACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTGCCTGCCC AGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCCATTTAGGTGATGGTGGATGCC GTTCAACAAGCTCAAGTATGAAAACACACAGCAGCTTCTTCA TCAGGGACATCATCAAACCTGACCCACCAAGAACTTGACGCT GAAGCCATTAAAGAATTCTCGGCAGGTGGAGGTGAGCTGGGAG TACCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCTTCTCTCCCTGA CATTTCTGCTTCAAGTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAAGAA AGATAGAGTCTTACGGACAAGACCTCAGCCACGGTCATCTGC CGCAAAAATGCCAGCATTAGCGTGCGGGCCAGGACCGCTACT ATAGCTCATCTTGGAGCGAATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTTG ACAATTGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTGTTTGCC CCTCCCCCGTGCTTCCCTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCCAC TGTCTTTTCCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGCTCG AGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACA GCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGA TGCGGTGGGCTCTATGGAGCTCGAGAGGAACCCCTAGTGATGG AGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGC CGGGCGACCAAAGGTCGCCCAGCGCCGGGCTTTGCCCGGGC
10	
20	
30	
40	

10

20

30

40

		GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCAGATCTG (SEQ ID NO: 34)
19	ヒトCAG-野生型IL-12A/IL-12B-IRES (CpG修飾なし) 発現配列	GCTAGCGCCACCATGTGTCCAGCGCGCAGCCTCCTCCTTGTGG CTACCCCTGGTCCTCCTGGACCACCTCAGTTTGGCCAGAAACCT CCCCGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCTTCAC CACTCCCAAAACCTGCTGAGGGCCGTCAGCAACATGCTCCAGA AGGCCAGACAAACTCTAGAATTTTACCCTTGCACTTCTGGAAGA GATTGATCATGAAGATATCACAAAAGATAAAACCAGCACAGTG GAGGCCTGTTTACCATTGGAATTAACCAAGAATGAGAGTTGCC TAAATTCAGAGAGACCTCTTTTATAAATAATGGGAGTTGCCT GGCCTCCAGAAAGACCTCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGT AGTATTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGA CCATGAATGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTT TCTAGATCAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATGCAG GCCCTGAATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAATCCTCCC TTGAAGAACCGGATTTTTATAAACTAAATCAAGCTCTGCAT ACTTCTTCATGCTTTCCGGATTCCGGCAGTGACTATTGATAGA GTGATGAGCTATCTGAATGCTTCTGAGCCCTCTCCCTCCCC CCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAAGCCCGG TGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTCCACCATATTGCCGTCTT TTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGAC GAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAA GGTCTGTTGAATGTGCGTAAGGAAGCAGTTCTCTGGAAGCTT CTTGAAGACAAACAACGCTCTGTAGCGACCCCTTGCAGGCAGCG GAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCA CGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCC ACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTC CTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTA CCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTACACATGCT TTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGCTTAGGCCCCCC GAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACAGATGATAA TATGGCCACAATGTGTCAACAGCAGTTGGTCATCTCTTGGTTT TCCCTGGTTTTTCTGGCATCTCCCTCGTGGCCATATGGGAAC TGAAGAAAGATGTTTATGTGCTAGTAATTGGATTGGTATCCGGA TGCCCTTGAGAAATGGTGGTCCCTACCTGTGACACCCCTGAA GAAGATGGTATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCT TAGGCTCTGGCAAAACCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGG AGATGCTGGCCAGTACACCTGTCAAAAGGAGGCGAGGTTCTA AGCCATTGCTCCTGCTGCTTCAAAAAAGGAAGATGGAATTT GGTCCACTGATATTTTAAAGGACCAAGAAAGAACCCAAAATAA GACCTTTCTAAGATGCGAGGCCAAGAATTATTCTGGACGTTTC ACCTGCTGGTGGCTGACGACAATCAGTACTGATTGACATTCA GTGTCAAAGCAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCAAGGGGTGAC GTGCGGAGCTGCTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAGAGGGGAC AACAAGGAGTATGAGTACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTG CCTGCCCAGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCATTGAGGTGATGGT GGATGCCGTTCACAAGCTCAAGTATGAAAATAACACAGCAGC TTCTTCATCAGGGACATCATCAACCTGACCCACCCAAGAACT TGCAGCTGAAGCCATTAAAGAATTCTCGGCAGGTGGAGGTGAG CTGGGAGTACCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCTACTTC TCCCTGACATTCTGCGTTCAAGTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAG AAAAGAAAAGATAGAGTCTTACGAGACAAGACCTCAGCCACGGT CATCTGCCGCAAAAATGCCAGCATTAGCGTGCGGGCCAGGAC CGTACTATAGCTCATCTTGAGCGAATGGGCATCTGTGCCCT GCAGTTGACAATTG (SEQ ID NO: 35)
20	ヒトCAG-野生型IL-15 (CpG修飾なし) コンストラクト	(SEQ ID NO: 36)

10

20

30

40

50

20	ヒトCAG-野生型IL-15 (CpG修飾なし) 発現配列	(SEQ ID NO: 37)
21	マウスEF1a-野生型IL-15 (CpG修飾なし) および改変IL-12B (CpG修飾あり) 完全コンストラクトおよび発現配列	それぞれSEQ ID NO:38および39
22	マウスEF1a-改変IL-12B/IL-15 (CpG修飾) 完全コンストラクトおよび発現配列	それぞれSEQ ID NO:40および41
23	マウスCAG-野生型IL-12B-IRES (CpG修飾なし) 完全コンストラクト および発現配列	それぞれSEQ ID NO:42および43
24	マウスCAG-野生型IL-15 (CpG修飾なし) 完全コンストラクトおよび発現配列	それぞれSEQ ID NO:44および45
25	マウスCAG-野生型IL-12B-F2A (CpG修飾なし) 発現配列	それぞれSEQ ID NO:46および47
26	ヒトCAG-改変IL-12A/IL-12B-F2A (CpG修飾) コンストラクト	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCG GGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTC TTAGTATTAAACGCGTGTGACATTGATTATTGACTAGTTATT AATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGC TGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGT ATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCA ATGGGTGGACTATTTACGGTAACTGCCCCACTTGGCAGTACAT CAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATG ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTT ATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC GCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACT CTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTGTATTTAT TTATTTTTTAATTATTTTGTGTCAGCGATGGGGGCGGGGGGGG GGGGGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGG CGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGC GCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGCGGC GGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCTGCTGC GCGCTGCCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCTCGCGC CGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGA GCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTT GGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGC CTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCT CGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTG CGGCTCCGCGCTGCCCGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGC GCGGGGCTTTGTGCGCTCCGAGTGTGCGCGAGAGGAGCGCGG CCGGGGGCGGTGCCACGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAA CAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGCGGGGGGGTGTGAGCAGG GGGTGTGGGCGCGCGGTGCGGCTGTAACCCCCCTGCACCC

10

20

30

40

50

	CCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGCTTCGGGTGCGGGG CTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGG GGTGGCGGCGGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCG GGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGGGCGGCCCGGAGC GCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCGCTTT TATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCA AATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCGCCGACCCCC TCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGG AAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCGCGCGCCGCTCC CCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGACGGC TGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTGCGCTTCTGGC GTGTGACCGGCGGTCTAGACTCTGCTAACCATTGTTTCATGCCTT CTTCTCTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTGTTGTG CTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCAAGCTTCCAGCTAGCG CCACCATGTGTCCAGCTAGGAGCCTCCTCCTTGTGGCTACCCCT GGTCCTCCTGGACCACCTCAGTTTGGCCAGAAACCTCCCTGTG GCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCCTTCAACACTCCC AAAACCTGCTGAGGGCAGTCAGCAACATGCTCCAGAAGGCCAG ACAAACTCTAGAATTTTACCCTTGCACTTCTGAAGAGATTGAT CATGAAGATATCACAAAAGATAAAACCAGCACAGTGGAGGCCCT GTTTACCATTGGAATTAACCAAGAATGAGAGTTGCTTAAATTC CAGAGAGACCTCTTTCATAACTAATGGGAGTTGCTTGGCCTCC AGAAAGACCTCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGTAGTATTT ATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGAA TGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTTTCTAGAT CAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATGCAGGCCCTGA ATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAATCCTCCCTTGAAGA ACCTGATTTTATATAAACTAAATCAAGCTCTGCATACTTCTT CATGCTTTCCGGATTAGGGCAGTGACTATTGATAGAGTGATGA GCTATCTGAATGCTTCCAGAAAGAGAAGGAGTGGCTCAGGAGC CCCTGTGAAACAGACCCTGAACCTTGACCTCTTGAAGCTTGCT GGGGATGTGGAGTCTAATCCTGGTCCAATGTGTCAACAGCAGT TGGTCATCTCTTGGTTTTCCTGGTTTTCTGGCATCTCCCTT TGTGGCCATATGGGAACTGAAGAAAGATGTTTATGTGGTAGAA TTGGATTGGTATCCTGATGCCCTGGAGAAATGGTGGCTCA CCTGTGACACCCCTGAAGAAGATGGTATCACCTGGACCTTGGA CCAGAGCAGTGAGGTCTTAGGCTCTGGCAAAACCTGACCATC CAAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCTGGCCAGTACACCTGTCA AAGGAGGGGAGGTTCTAAGCCATTCCCTCCTGTGCTTCACAA AAAGGAAGATGGAATTTGGTCCACTGATATTTTAAAGGACCAG AAAGAACCCAAAAATAAGACCTTTCTAAGATGTGAGGCCAAGA ATTATTCTGGAAGGTTACCTGTGTGGTGGCTGACTACAATCAG TACTGATTTGACATTCAAGTGTCAAAGCAGCAGAGGCTCTTCT GACCCCCAAGGGGTGACATGTGGAGCTGCTACACTCTCTGCAG AGAGAGTCAGAGGGGACAACAAGGAGTATGAGTACTCAGTGGA GTGCCAGGAGGACAGTGCTGCCAGCTGCTGAGGAGAGTCTG CCCATTTGAGGTGATGGTGGATGCAGTTCAAGCTCAAGTATG AAAACCTACACAGCAGCTTCTTCATCAGGGACATCATCAAACC TGACCCACCCAAGAACTTGACAGCTGAAGCCATTAAAGAATTCT AGGCAGGTGGAGGTGAGCTGGGAGTACCCTGACACCTGGAGTA CTCCACATTCTACTTCTCCCTGACATTCTGTGTTCAAGTCCA GGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTCACTGAC AAGACCTCAGCCACAGTCATCTGCAGGAAAAATGCCAGCATTT CAGTGAGGGCCCAGGACAGATACTATAGCTCATCTTGGTCAGA ATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTTGACAATTGCTGTGCCTTCTA GTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTT GACCTTGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTTCCCTAATAAAAT GAGGAAATTGCATCGCATTTGTCTGAGTAGGTGTCTTCTATTC TGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGA	10
		20
		30
		40

		AGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAG CTCGAGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCT GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGTTCGCC CGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAG CGCGCAGCTGCAGATCTG (SEQ ID NO: 48)
26	ヒトCAG-改変IL-12A/IL-12B-F2A (CpG修飾) 発現配列	GCTAGCGCCACCATGTGTCCAGCTAGGAGCCTCCTCCTTGTGG CTACCCCTGGTCTCTCTGGACCACCTCAGTTTGGCCAGAAACCT CCCTGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCTTCAC CACTCCCAAAACCTGCTGAGGGCAGTCAGCAACATGCTCCAGA AGGCCAGACAAACTCTAGAATTTTACCCTTGCACTTCTGAAGA GATTGATCATGAAGATATCACAAAAGATAAAACCAGCACAGTG GAGGCTGTGTTTACCATTGGAATTAACCAAGAATGAGAGTTGCC TAAATTCAGAGAGACCTCTTTCATAACTAATGGGAGTTGCCCT GGCCTCCAGAAAGACCTCTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGT AGTATTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGA CCATGAATGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTT TCTAGATCAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATGCAG GCCCTGAATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAATCCTCCC TTGAAGAACCTGATTTTTATAAACTAAAATCAAGCTCTGCAT ACTTCTTCATGCTTTCGGGATTAGGGCAGTGACTATTGATAGA GTGATGAGCTATCTGAATGCTTCCAGAAAGAGAAGGAGTGGCT CAGGAGCCCTGTGAAACAGACCCTGAACCTTGACCTCTTGAA GCTTGCTGGGGATGTGGAGTCTAATCCTGGTCCAATGTGTCAC CAGCAGTTGGTCACTCTCTGGTTTTCCCTGGTTTTCTGGCAT CTCCCCCTGTGGCCATATGGGAACGAAGAAAGATGTTTATGT GGTAGAATTGGATTGGTATCCTGATGCCCTGGAGAAATGGTG GTCCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGATGGTATCACCTGGA CCTTGAGACCAGAGCAGTGAGGTCTTAGGCTCTGGCAAAACCT GACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCTGGCCAGTACACC TGTCACAAAGGAGGGGAGGTTCTAAGCCATTCCTCCTGCTGC TTCACAAAAGGAAGATGGAATTTGGTCCACTGATATTTTAAA GGACCAGAAAGAACCCAAAATAAGACCTTTCTAAGATGTGAG GCCAAGAATTATTCTGGAAGGTTACCTGCTGGTGGCTGACTA CAATCAGTACTGATTTGACATTCACTGTCAAAGCAGCAGAGG CTCTTCTGACCCCAAGGGGTGACATGTGGAGCTGCTACACTC TCTGCAGAGAGAGTCAAGAGGGGACACAAGGAGTATGAGTACT CAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTGCTGCCCAGCTGCTGAGGA GAGTCTGCCCATGAGGTGATGGTGGATGCAGTTCACAGCTC AAGTATGAAAATACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACATCA TCAAACCTGACCCACCAAGAACTTGACGCTGAAGCCATTAAA GAATTCAGGCAGGTGGAGGTGAGCTGGGAGTACCCTGACACC TGGAGTACTCCACATTCTACTTCTCCCTGACATTCTGTGTTT AAGTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTT CACTGACAAGACCTCAGCCACAGTCATCTGCAGGAAAAATGCC AGCATTTCAGTGAGGGCCAGGACAGATACTATAGCTCATCTT GGTCAGAATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTTGACAATTG (SEQ ID NO: 49)
27	ヒトCAG-改変IL-12A/IL-12B-F2A (CpG修飾) コンストラクト	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCGCCGGGCAAAGCCG GGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTC TTAGTATTAACCGGTGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATT AATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATAT GGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGC TGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCATAATGACGCT ATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC ATGGGTGGACTATTTACGGTAACTGCCCACTTGGCAGTACAT CAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCATG ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTT ATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC

10

20

30

40

	GCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACT CTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTAT TTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGG GGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGG CGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGC GCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGGCGGCGGCG GGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGGCGGGCGGGAGTTCGCTGC GCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCTCGCGC CGCCCGCCCCGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGA GCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTT GGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGC CTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCT CGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGAGCGCCGCGTG CGGCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGC GCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGAGTGTGCGCGAGAGGAGCGCG CCGGGGCGGCTGCCACGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAA CAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGG GGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGCTGTAACCCCCCTGCACCC CCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGCTTCGGGTGCGGGG CTCCGTGCGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGG GGTGCGCGCGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCG GGCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGC GCCGGCGGCTGTGAGGCGCGCGAGCCGAGCCATTGCCTTT TATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCA AATCTGTGCGGAGCGAAATCTGGGAGGCGCGCGCGCACCCCC TCTAGCGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCGGCGAGGAAGG AAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTGCGCGCGCGCGCTCC CCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGC TGCCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGC GTGTGACCGGCGGTCTAGACTCTGCTAACCATGTTTATGCCTT CTTCTCTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTGTTGTG CTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCAAGCTTCCAGCTAGCG CCACCATGTGTCCAGCGCGCAGCCTCCTCCTTGTGGCTACCTT GGTCTCTCTGGACCACCTCAGTTTGGCCAGAAACCTCCCTGTG GCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCCTTCACCACTCC AAAACCTGCTGAGGGCTGTCAGCAACATGCTCCAGAAGGCCAG ACAACTCTAGAATTTTACCCTTGCACTTCTGAAGAGATTGAT CATGAAGATATCACAAAAGATAAAACCAGCACAGTGGAGGCTC GTTTACCATTGGAATTAACCAAGAATGAGAGTTGCCTAAATTC CAGAGAGACCTCTTTTATAAATAAATGGGAGTTGCTGGCCTCC AGAAAGACCTCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGTAGTATTT ATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGAA TGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCGAGATCTTCTAGAT CAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATGCAGGCCCTGA ATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAATCCTCCCTTGAAGA ACCTGATTTTTATAAACTAAAATCAAGCTCTGCATACTTCTT CATGCTTTCGGATTTCGCGAGTGACTATTGATAGAGTGATGA GCTATCTGAATGCTTCCAGAAAGAGAAGGAGTGGCTCAGGAGC CCCTGTGAAACAGACCCTGAACTTTGACCTCTTGAAGCTTGCT GGGGATGTGGAGTCTAATCCTGGTCCAATGTGTCCACGAGCT TGGTCTATCTTGGTTTTCCCTGGTTTTTCTGGCATCTCCCCCT TGTGGCCATATGGGAACTGAAGAAAGATGTTTATGTGGTAGAA TTGGATTGGTATCCTGATGCCCTGGAGAAATGGTGGTCTCA CCTGTGACACCCCTGAAGAAGATGGTATCACCTGGACCTTGG CCAGAGCAGTGAGGTCTTAGGCTCTGGCAAAACCTGACCATC CAAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCTGGCCAGTACACCTGTCA AAGGAGGGGAGGTTCTAAGCCATTCCCTCCTGCTGCTTACAA AAAGGAAGATGGAATTTGGTCCACTGATATTTAAAGGACCAG AAAGAACCCAAAAATAAGACCTTCTAAGATGTGAGGCCAAGA
10	
20	
30	
40	

10

20

30

40

		ATTATTCTGGAAGGTTACCTGCTGGTGGCTGACTACAATCAG TACTGATTTGACATTTCAGTGTCAAAGCAGCAGAGGCTCTTCT GACCCCCAAGGGGTGACATGCGGAGCTGTACACTCTCTGCAG AGAGAGTCAGAGGGGACAACAAGGAGTATGAGTACTCAGTGGGA GTGCCAGGAGGACAGTGCCTGCCAGCTGCTGAGGAGAGTCTG CCCATTTGAGGTGATGGTGGATGCGGTTCAAGCTCAAGTATG AAAACCTACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACATCATCAAACC TGACCCACCCAAGAACTTGCAGCTGAAGCCATTAAAGAATTCT AGGCAGGTGGAGGTGAGTGGGAGTACCTGACACCTGGAGTA CTCCACATTCTACTTCTCCCTGACATTCTGTGTTCAAGTCCA GGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTCACTGAC AAGACCTCAGCCACAGTCATCTGCCGCAAAAATGCCAGCATT CAGTGCGGGGCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTGGTCAGA ATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTTGACAATTGCTGTGCCTTCTA GTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCTCT GACCCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCTTCTCCTAATAAAAT GAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTC TGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGA AGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAG CTCGAGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCT GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCGC CGACGCCGGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAG CGCGCAGCTGCAGATCTG (SEQ ID NO: 50)	10
27	ヒトCAG-改変IL-12A/IL-12B-F2A (CpG修飾) 発現配列	GCTAGCGCCACCATGTGTCCAGCGCGCAGCCTCCTCTTGTGG CTACCCCTGGTCTCTCTGGACCACCTCAGTTTGGCCAGAAACCT CCCTGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCATGCTTCCAC CACTCCCAAAACCTGCTGAGGGCTGTGAGCAACATGCTCCAGA AGGCCAGACAAACTCTAGAATTTTACCCCTGCACTTCTGAAGA GATTGATCATGAAGATATCAGAAAAGATAAAACCAGCACAGTG GAGGCCCTGTTTACCATTGGAATTAACCAAGAATGAGAGTTGCC TAAATTCCAGAGAGACCTCTTTCATAACTAATGGGAGTTGCCT GGCCTCCAGAAAGACCTCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGT AGTATTTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGA CCATGAATGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTT TCTAGATCAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATGCGAG GCCCTGAATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAAATCCTCCC TTGAAGAACCTGATTTTATAAACTAAAATCAAGCTCTGCAT ACTTCTTCATGCTTCCGGATTGCGCGCAGTGACTATTGATAGA GTGATGAGCTATCTGAATGCTTCCAGAAAGAGAAGGAGTGGCT CAGGAGCCCTGTGAAACAGACCTGAACCTTTGACCTCTTGAA GCTTGCTGGGGATGTGGAGTCTAATCCTGGTCCAATGTGTAC CAGCAGTTGGTCATCTCTTGGTTTTCCCTGGTTTTTCTGGCAT CTCCCCCTGTGGCCATATGGGAACTGAAGAAAGATGTTTATGT GGTAGAATTGGATTGGTATCCTGATGCCCTGGAGAAATGGTG GTCCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGATGGTATCACCTGGA CCTTGAGCCAGAGCAGTGAGGTCTTAGGCTCTGGCAAAACCT GACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCTGGCCAGTACACC TGTCACAAAGGAGGGGAGGTTCTAAGCCATTCCTCCTGCTGC TTCACAAAAAGGAAGATGGAATTTGGTCCACTGATATTTTAA GGACCAGAAAGAACCACAAAAATAAGACCTTTCTAAGATGTGAG GCCAAGAATTATTCTGGAAGGTTACCTGCTGGTGGCTGACTA CAATCAGTACTGATTGACATTTCAGTGTCAAAGCAGCAGAGG CTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGACATGCGGAGCTGCTACACTC TCTGCAGAGAGAGTCAGAGGGGACAACAAGGAGTATGAGTACT CAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTGCTGCCAGCTGCTGAGGA GAGTCTGCCCATTTGAGGTGATGGTGGATGCGGTTCAAGCTC AAGTATGAAAACTACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACATCA TCAAACCTGACCCACCAAGAACTTGCAGCTGAAGCCATTAA GAATTCTAGGCAGGTGGAGGTGAGTGGGAGTACCCTGACACC	20 30 40

		TGGAGTACTCCACATTCTACTTCTCCCTGACATTCTGTGTTC AAGTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTT CACTGACAAGACCTCAGCCACAGTCATCTGCCGCAAAAATGCC AGCATTTTCAGTGCGGGCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTT GGTCAGAAATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTTGACAAATTG (SEQ ID NO:51)
28	ヒトCAG-改変IL-12A/IL-12B-IRES (CpG修飾) コンストラクト	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCG GGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCC TTAGTATTAAACGCGTGTGACATTGATTATTGACTAGTTATT AATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT GGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGC TGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGT ATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCA ATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACAT CAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATG ACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTT ATGGGACTTTCTACTTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC GCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACT CTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTAT TTATTTTAAATTATTTTGTGACGATGGGGGCGGGGGGGGGG GGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGG CGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGC GCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGCGCGC GGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGC GCGCTGCTTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCCGCCGCTCGCGC CGCCCCCGGCTCTGACTGACCGGTTACTCCACAGGTGA GCGGGCGGACCGGCCCTTCTCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTT GGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGC CTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGAGCGGCT CGGGGGGTGCGTGCCTGTGTGTGTGCGTGCGGAGCGCCGCGTG CGGCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGC GCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGAGTGTGCGCGAGAGGAGCGCGG CCGGGGGCGGTGCCACGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAA CAAAGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGCGGGGGGGGTGACAG GGGTGTGGGCGCGCGGTGCGGCTGTAACCCCCCTGCACCC CCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGG CTCCGTGCGGGGCTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGG GGTGGCGGCGGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCCTCG GGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGCGGCCCGCCGAGC GCCGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTT TATGGTAATCGTGCAGAGGGGCGCAGGGACTTCTTTGTCCCA AATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCACCCCC TCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCGGCGAGGAAG AAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCCCGCGCGCCGCTCC CCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGC TGCTTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCCGCTTCTGGC GTGTGACCGGCGGTCTAGACTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTT CTTCTCTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTGTTGTG CTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCAAGCTTCCAGCTAGCG CCACCATGTGTCCAGCTAGGAGCCTCCTCCTTGTGGCTACCTT GGTCTCTTGGACCACCTCAGTTTGGCCAGAACTCCCTGTG GCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCCCTTACCACCTCCC AAAACCTGCTGAGGGCAGTCAGCAACATGCTCCAGAAGGCCAG ACAAACTCTAGAATTTTACCCTTGCACTTCTGAAGAGATTGAT CATGAAGATATCACAAAAGATAAAACCAGCACAGTGGAGGCCT GTTTACCATTGGAATTAACCAAGAATGAGAGTTGCCATAATTTC CAGAGAGACCTCTTTCATAACTAATGGGAGTTGCCTGGCCTCC AGAAAGACCTCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGTAGTATT

10

20

30

40

		ATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGAA TGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTTTCTAGAT CAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATGCAGGCCCTGA ATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAATCCTCCCTTGAAGA ACCTGATTTTATAAACTAAATCAAGCTCTGCATACTTCTT CATGCTTTCCGGATTAGGGCAGTGACTATTGATAGAGTGATGA GCTATCTGAATGCTTCCTGAGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCT AACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGT TTGTCTATATGTTATTTCCACCATATTGCCGTCTTTGGCAA TGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATT CCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGT TGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCTCTGGAAGCTTCTTGAAG ACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTCAGGCAGCGGAACCCC CCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTAT AAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGT GAGTTGGATAGTTGTGGAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGC GTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCATT GTATGGGATCTGATCTGGGGCTCGGTACACATGCTTTACATG TGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCAC GGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACAGATGATAATATGGCC ACAATGTGTCACCAGCAGTTGGTCATCTCTTGGTTTTCCCTGG TTTTTCTGGCATCTCCCTTGTGGCCATATGGGAAGTGAAGAA AGATGTTTATGTGGTAGAATTGGATTGGTATCCTGATGCCCCT GGAGAAATGGTGGTCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGATG GTATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTTAGGCTC TGGCAAAACCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCT GGCCAGTACACCTGTACAAAGGAGGGGAGGTTCTAAGCCATT CCCTCCTGCTGCTTACAAAAGGAAGATGGAATTTGGTCCAC TGATATTTTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTTT CTAAGATGTGAGGCCAAGAATTATTCTGGAAGGTTCACTGTG GGTGGCTGACTACAATCAGTACTGATTTGACATTCAAGTGTCAA AAGCAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGACATGTGGA GCTGCTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAGAGGGGACAACAAGG AGTATGAGTACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTGCCTGCC AGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCATTGAGGTGATGGTGGATGCA GTTCAACAAGCTCAAGTATGAAAACACACCAGCAGCTTCTTCA TCAGGGACATCATCAAACCTGACCCACCAAGAACTTGCAGCT GAAGCCATTAAAGAATTCTAGGCAGGTGGAGGTCACTGGGAG TACCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCTTCTCTCCCTGA CATTCTGTGTTCAAGTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAGAA AGATAGAGTCTTCACTGACAAGACCTCAGCCACAGTCATCTGC AGGAAAAATGCCAGCATTTCAGTGAGGGCCAGGACAGATACT ATAGCTCATCTTGGTCAGAATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTTG ACAATTGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCC CCTCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAC TGTCTTTCTTAATAAAATGAGGAAATGCATCGCATTGTCTG AGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACA GCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGA TGCGGTGGGCTCTATGGAGCTCGAGAGGAACCCCTAGTGATGG AGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGC CGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCAGATCTG (SEQ ID NO: 52)	10
28	ヒトCAG-改変IL-12A/IL-12B-IRES (CpG修飾) 発現配列	GCTAGCGCCACCATGTGTCCAGCTAGGAGCCTCCTCCTTGTGG CTACCCTGGTCTCCTGGACCACCTCAGTTTGGCCAGAAACCT CCCTGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCCTTAC CACTCCCAAAACCTGCTGAGGGCAGTCAGCAACATGCTCCAGA AGGCCAGACAACTCTAGAATTTTACCTTGCATTCTTGAAGA GATTGATCATGAAGATATCACAAAAGATAAAACCAGCACAGTG	20
			30
			40

		GAGGCCTGTTTACCATTGGAATTAACCAAGAATGAGAGTTGCC TAAATTCCAGAGAGACCTCTTTTCATAACTAATGGGAGTTGCCT GGCCTCCAGAAAGACCTCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGT AGTATTTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGA CCATGAATGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTT CTAGATCAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATGCAG GCCCTGAATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAAATCCTCCC TTGAAGAACCTGATTTTTATAAACTAAAATCAAGCTCTGCAT ACTTCTTCATGCTTTCCGGATTAGGGCAGTGACTATTGATAGA GTGATGAGCTATCTGAATGCTTCCTGAGCCCCCTCTCCCTCCCC CCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGG TGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTT TTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGAC GAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAA GGTCTGTTGAATGTGCTGAAGGAAGCAGTTCTCTGGAAGCTT CTTGAAGACAAACAACGCTCTGTAGCGACCTTTTGCAAGCAGCG GAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCA CGTGATATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCC ACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGAAAGAGTCAATGGCTCTC CTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTA CCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTACACATGCT TTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGCTTAGGCCCCC GAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACAGATGATAA TATGGCCACAATGTGTACCAGCAGTTGGTCATCTCTTGGTTT TCCCTGGTTTTTCTGGCATCTCCCTTGTGGCCATATGGGAAC TGAAGAAAGATGTTTATGTGGTAGAATTGGATTGGTATCCTGA TGCCCCCTGGAGAAATGGTGGTCTCACCTGTGACACCCCTGAA GAAGATGTTATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCT TAGGCTCTGGCAAAACCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGG AGATGCTGGCCAGTACACCTGTCAAAAGGAGGGGAGGTTCTA AGCCATTCCCTCCTGCTGCTTCACAAAAAGGAAGATGGAATTT GGTCCACTGATATTTTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAA GACCTTTCTAAGATGTGAGGCCAAGAATTATTCTGGAAGGTTCT ACCTGCTGGTGGCTGACTACAATCAGTACTGATTTGACATTCA GTGTCAAAAGCAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGAC ATGTGGAGCTGCTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAAGGGGAC AACAAGGAGTATGAGTACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTG CCTGCCCAGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCCATTTAGGTGATGGT GGATGCAGTTTACAAGCTCAAGTATGAAAACTACACCAGCAGC TTCTTTCATCAGGGACATCATCAAACCTGACCCACCCAAGAAT TGCAGCTGAAGCCATTAAAGAATTCTAGGCAGGTGGAGGTGAG CTGGGAGTACCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCTTACTTC TCCCTGACATTCTGTGTTCAAGTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAG AAAAGAAAGATAGAGTCTTCACTGACAAGACCTCAGCCACAGT CATCTGCAGGAAAAATGCCAGCATTTTCAGTGAGGGCCCAAGGAC AGATACTATAGCTCATCTTGGTCAGAATGGGCATCTGTGCCCT GCAGTTGACAATTG (SEQ ID NO: 53)	10
29	ヒトCAG-改変IL-12A/IL-12B-IRES (CpG修飾) コンストラクト	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCG GGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCC TTAGTATTAACCGCGTGTGACATTGATTATTGACTAGTTATT AATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT GGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGC TGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGT ATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCA ATGGGTGGACTATTTACGGTAACTGCCCACTTGGCAGTACAT CAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATG ACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTT ATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC	20
			30
			40

40

		TGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCAC GGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCC ACAATGTGTCACCAGCAGTTGGTCATCTCTTGGTTTTCCCTGG TTTTTCTGGCATCTCCCCCTGTGGCCATATGGGAACTGAAGAA AGATGTTTTATGTGGTAGAATTGGATTGGTATCCTGATGCCCT GGAGAAATGGTGGTCCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGATG GTATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTTAGGCTC TGGCAAAACCCCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCT GGCCAGTACACCTGTCAAAAGGAGGGGAGGTTCTAAGCCATT CCCTCCTGCTGCTTCACAAAAAGGAAGATGGAATTTGGTCCAC TGATATTTTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTTT CTAAGATGTGAGGCCAAGAATTATTCTGGAAGGTTACCTGCT GGTGGCTGACTACAATCAGTACTGATTTGACATTAGTGTCAA AAGCAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGACATGCGGA GCTGTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAGAGGGGACAACAAGG AGTATGAGTACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTGCCTGGCC AGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCATTGAGGTGATGGTGGATGCG GTTTCAAGCTCAAGTATGAAACTACACCAGCAGCTTCTTCA TCAGGGACATCATCAAACCTGACCCACCCAAGAATTGACAGCT GAAGCCATTAAAGAATTCTAGGCAGGTGGAGGTCAGCTGGGAG TACCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCTACTTCTCCCTGA CATTCTGTGTTCAAGTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAGAA AGATAGAGTCTTCACTGACAAGACCTCAGCCACAGTCATCTGC CGCAAAATGCCAGCATTTAGTGGGGGCCAGGACCGCTACT ATAGCTCATCTTGGTCCAGAAATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTTG ACAATTGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCC CCTCCCCGTGCCTTCTTGGACCTGGAAGGTGCCACTCCCAC TGTCTTTCTTAATAAAATGAGGAAATGCATCGCATTGTCTG AGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACA GCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGA TGCGGTGGGCTCTATGGAGCTCGAGAGGAACCCCTAGTGATGG AGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGC CGGGCGACCAAGGTGCGCCGACGCGCGGGCTTTGCCCGGGCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCAGATCTG (SEQ ID NO: 54)	10
29	ヒトCAG-改変IL-12A/IL-12B-IRES (CpG修飾) 発現配列	GCTAGCGCCACCATGTGTCCAGCGCGCAGCCTCCTCCTTGTGG CTACCCTGGTCTCCTGGACCACCTCAGTTTGGCCAGAAACCT CCCTGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCCTTCA CACTCCCCAAACCTGCTGAGGGCTGTGAGCAACATGCTCCAGA AGGCCAGACAAACTCTAGAATTTTACCCTTGCACTTCTGAAGA GATTGATCATGAAGATATCACAAAAGATAAAACCAGCACAGTG GAGGCCTGTTTACCATTGGAATTAACCAAGAATGAGAGTTGCC TAAATTCAGAGAGACCTCTTTCATAACTAATGGGAGTTGCCT GGCCTCCAGAAAGACCTCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGT AGTATTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGA CCATGAATGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTT TCTAGATCAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATGCAG GCCCTGAATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAATCCTCCC TTGAAGAACCTGATTTTATAAACTAAATCAAGCTCTGCAT ACTTCTTCATGCTTTCGGATTGCGCGCAGTGAATTTGATAGA GTGATGAGCTATCTGAATGCTTCTGAGCCCTCTCCCTCCCC CCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGG TGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTT TTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGAC GAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGC GGTCTGTTGAATGTGCTGAAGGAAGCAGTTCTCTGGAAGCTT CTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCTTTGCGAGGCAGCG GAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCA CGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCC	20 30 40

		ACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTC CTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTA CCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTACACATGCT TTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCCTAGGCCCCCC GAACCACGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAA TATGGCCACAATGTGTCAACAGCAGTTGGTCATCTCTTGGTTT TCCCTGGTTTTTCTGGCATCTCCCTTGTGGCCATATGGGAAC TGAAGAAAGATGTTTATGTGGTAGAATTGGATTGGTATCCTGA TGCCCCCTGGAGAAATGGTGGTCCTCACCTGTGACCCCCGAA GAAGATGGTATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCT TAGGCTCTGGCAAACCCCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGG AGATGCTGGCCAGTACACCTGTCAAAAGGAGGGGAGGTTCTA AGCCATTCCCTCCTGCTGCTTCAAAAAAGGAAGATGGAATTT GGTCCACTGATATTTTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAA GACCTTTCTAAGATGTGAGGCCAAGAATTATTCTGGAAGGTT ACCTGCTGGTGGCTGACTACAATCAGTACTGATTGACATTCA GTGTCAAAGCAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGAC ATGCGGAGCTGCTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAGAGGGGAC AACAAGGAGTATGAGTACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTG CCTGCCAGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCATTGAGGTGATGGT GGATGCGGTTTCAAGCTCAAGTATGAAACTACACAGCAGC TTCTTTCATCAGGGACATCATCAAACCTGACCCACCCAAGAACT TGCAGCTGAAGCCATTAAAGAATTCTAGGCAGGTGGAGGTGAG CTGGGAGTACCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCTTACTTCT TCCCTGACATTCTGTGTTCAAGTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAG AAAAGAAAGATAGAGTCTTCACTGACAAGACCTCAGCCACAGT CATCTGCCGCAAAAAATGCCAGCATTTAGTGCGGGCCAGGAC CGCTACTATAGCTCATCTTGGTCAGAATGGGCATCTGTGCCCT GCAGTTGACAATTG (SEQ ID NO: 55)	10
30	ヒトCAG-野生型IL-12A/IL-12B-F2A (CpG修飾) コンストラクト	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGCAAGCCCG GGCGTCGGGCGACCTTTGGTCCCGCGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCC TTAGTATTAAACGCGTGTGACATTGATTATTGACTAGTTATT AATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTATAGCCCATATAT GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGC TGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGT ATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCA ATGGGTGGACTATTTACGGTAACTGCCCACTTGGCAGTACAT CAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATG ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTT ATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC GCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACT CTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTAT TTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGG GGGGGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGG CGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGC GCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGC GGCCCTATAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGC GCGCTGCCTTCCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCGCGCTCGCGC CGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGA GCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTT GGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGC CTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCT CGGGGGGTGCGTGCCTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCTG CGGCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGC GCGGGGCTTTGTGCGCTCCGAGTGTGCGCGAGAGGAGCGCGG CCGGGGGCGGTGCCACGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAA CAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGGTGAGCAGG GGGTGTGGGCGGCGGCTCGGGCTGTAACCCCCCCTGCACCC	30
			40

40

		AGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAG CTCGAGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCT GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGTTCGCC CGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAG CGCGCAGCTGCAGATCTG (SEQ ID NO: 56)
31	ヒトCAG-野生型IL-12A/IL-12B-F2A (CpG修飾) 発現配列	GCTAGCGCCACCATGTGTCCAGCGCGCAGCCTCCTCCTTGTGG CTACCTGGTCTCTCTGGACCACCTCAGTTTGGCCAGAAACCT CCCCGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCTTCAC CACTCCCAAAACCTGCTGAGGGCCGTCAGCAACATGCTCCAGA AGGCCAGACAAACTCTAGAATTTTACCCTTGCACTTCTGAAGA GATTGATCATGAAGATATCACAAAAGATAAAACCAGCACAGTG GAGGCTGTGTTTACCATTGGAATTAACCAAGAATGAGAGTTGCC TAAATTCAGAGAGACCTCTTTCATAACTAATGGGAGTTGCCCT GGCCTCCAGAAAGACCTCTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGT AGTATTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGA CCATGAATGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTT TCTAGATCAAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATGCAG GCCCTGAATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAAATCCTCCC TTGAAGAACCGGATTTTTATAAACTAAAATCAAGCTCTGCAT ACTTCTTCATGCTTTCGGGATTCGGGCAGTGACTATTGATAGA GTGATGAGCTATCTGAATGCTTCCAGAAAGAGAAGGAGTGGCT CAGGAGCCCTGTGAAACAGACCCTGAACCTTGACCTCTTGAA GCTTGTCTGGGGATGTGGAGTCTAATCCTGGTCCAATGTGTAC CAGCAGTTGGTCATCTCTGGTTCCTCCTGGTTCCTTCTGGCAT CTCCCCCTCGTGGCCATATGGGAACGAAGAAAGATGTTTATGT CGTAGAATTGGATTGGTATCCGGATGCCCTGGAGAAATGGTG GTCCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGATGGTATCACCTGGA CCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTTAGGCTCTGGCAAAACCT GACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCTGGCCAGTACACC TGTCACAAAGGAGGCGAGGTTCTAAGCCATTGCTCCTGCTGTC TTCACAAAAAGGAAGATGGAATTTGGTCCACTGATATTTAAA GGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTTTCTAAGATGCGAG GCCAAGAATTATTCTGGACGTTTCACCTGCTGGTGGCTGACGA CAATCAGTACTGATTTGACATTCAAGTGTCAAAGCAGCAGAGG CTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGACGTGCGGAGCTGCTACACT TCTGCAGAGAGAGTCAAGAGGGGACACAAGGAGTATGAGTACT CAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTGCCTGCCAGCTGCTGAGGA GAGTCTGCCCATTTGAGGTGATGGTGGATGCCGTTTCAAGCTC AAGTATGAAAACTACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACATCA TCAAACCTGACCCACCAAGAACTTGACGTGAAGCCATTAAA GAATTCTCGGCAGGTGGAGGTGAGTGGGAGTACCCTGACACC TGGAGTACTCCACATTCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTC AAGTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTT CACGGACAAGACCTCAGCCACGGTCATCTGCCGCAAAAATGCC AGCATTAGCGTGCGGGCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTT GGAGCGAATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTTGACAATTG (SEQ ID NO: 57)
32	CMVエンハンサー-CBAプロモーター-WT ヒトIL-12A (インフレーションの 停止コドンなし) -F2A-WTヒトIL-12B (停止コドンあり) -HGHポリA	ctgcgcgctcgctcgctcactgagccgccccgggcaaaagccg ggcgctggggcgaccttgggtcgcccgccctcagtgagcgagcg agcgcgagagagggagtggccaactccatcactaggggtcc ttagattaaacgctgtcgacattgattattgactagttatt aatagtaatcaattacgggggtcattagttcatagcccatatat ggagttccgcttacataacttacggtaaatggcccgccctggc tgaccgccccacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgt atgttcccatagtaacgccaatagggaactttccattgacgtca atgggtggactatttacggtaaactgcccacttggcagtacat caagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatg acggtaaatggcccgccctggcattatgcccagtacatgacctt atgggactttctacttggcagtacatctacgtattagtcac

10

20

30

40

	gctattaccatgggtcgaggtgagccccacgttctgcttcaact ctccccatctccccccctccccaccccccaattttgtatttat ttattttttaattattttgtgcagcgatgggggcggggggggg gggggcgcgcgccaggcggggcggggcggggcgagggcgggg cggggcgagggcgaggggtgcggcggcagccaatcagagcggc gcgctccgaaagtctcttttatggcgaggcgggcgggcggc ggccctataaaaaagcgaagcgcgggcgggcgggagtcgctgc gcgctgccttcgccccgtgccccgctccgcccgcgctcgcg cgcccgccccggctctgactgacgcgcttactcccacaggtga gcgggcgggacggcccttctcctccgggtgtaattagcgctt ggtttaatgacggctcgtttcttttctgtggctgcgtgaaagc cttgaggggctccgggagggccctttgtcggggggagcggt cggggggtgcgtgcgtgtgtgtgtgcgtggggagcgccgctg cggtccgcgctgcccggcggtgtgagcgctgcgggcgcggc gcggggctttgtgcgctccgcagtggtgcgcgagaggagcgcg ccggggcggtgcccacgcggtgcggggggggctgcgaggggaa caaaggctgcgtgcgggtgtgtgcgtggggggggtgagcagg gggtgtggcgcgcggtcggtcggtgtgtaacccccctgcaccc ccctccccgagttgctgagcacggccccggttcgggtgcgggg ctccgtgcggggctggcgcggggtcgccgtgcggggcgggg gggtggcgcggggtgggggtgcggggcgggcgggcgccctcg ggccggggagggctcgggggagggcgcgggcgcccccgagc gcggcggtgtgcagggcgcgcgagccgcagccattgccttt tatggtaatcgtgcgagagggcgagggacttcccttgtccca aatctgtgcggagcgaatctgggagcgccgcgcaccccc tctagcggcgcgggcggaagcggtgcggcgccgaggaagg aaatggcggggagggccttctgtgcgtcgccgcgcgcgctcc ccttctccctctccagcctcggggtgtccgcgggggagcggc tgcttcgggggggacggggcagggcggggttcggcttctggc gtgtgacggcggtctagactctgctaaccatgttcatgcctt cttctcttctctacagctcctgggcaacgtgctggttgtgtg ctgtctcatcattttggcaaagaattcaagcttccagctagcg ccaccatgtgtccagcgcgagcctcctccttgtggctaccc ggtcctcctggaccacctcagtttggccagaaacctccccgtg gccactccagaccaggaatgttcccatgccttcaccactccc aaaacctgctgagggccgtcagcaacatgctccagaaggccag acaaactctagaattttacccttgcacttctgaagagattgat catgaagatatcacaaaagataaaaccagcacagtgaggcct gtttaccattggaattaaaccaagaatgagagttgcctaaattc cagagagacctctttcataactaatgggagttgcctggcctcc agaaagacctcttttatgatggccctgtgccttagtagtattt atgaagacttgaagatgtaccaggtggagttcaagaccatgaa tgcaaagcttctgatggatcctaagaggcagatcttcttagat caaaacatgctggcagttattgatgagctgatgcaggccctga atctcaacagtgagactgtgcccacaaaaatcctccttgaaga accggatttttataaaactaaaatcaagctctgcatacttctt catgctttccggattcgggcagtgactattgatagagtgatga gctatctgaatgcttcagaaaagagaaggagtggtcaggagc ccctgtgaaacagaccctgaactttgacctcttgaagcttgct ggggatgtggagtctaatacctgggtccaatgtgtcaccagcag tggtcatctcttggttttccctgggttttctggcatctccct cgtggccataggggaactgaagaaagatgtttatgtcgtagaa ttggatttggtatccggatgccccggagaaatgggtggtcctca cctgtgacaccctgaagaagatggtatcacctggaccttgga ccagagcagtgaggtcttaggctctggcaaaacctgacctc caagtcaaagagtttgagatgctggccagtagacctgtcaca aaggaggcgaggttctaagccattcgctcctgctgcttcacaa aaaggaagatggaatttggtccactgatattttaaggaccag aaagaacccaaaaataagaccttcttaagatgcgagggccaaga	10
		20
		30
		40

10

20

30

40

		attattctggacgtttcacctgctgggtggctgacgacaatcag tactgatttgacattcagtggtcaaaagcagcagaggtcttct gaccccaagggtgacgtgaggagctgctacactctctgcag agagagtcagaggggacaacaaggagtagagtagtcagtgga gtgccaggaggacagtgcctgccagctgctgaggagagtcg ccatttgaggtgatggtggatgccgttcacaagctcaagtag aaaactacaccagcagcttcttcatcaggacatcatcaaacc tgacccaccaagaacttgacgtgaagccattaaagaattct cggcaggtggaggtcagctgggagtagcctgacacctggagta ctccacattcctacttctcctgacattctgcgttcaagtcca gggcaagagcaagagagaaaaagaaagtagagtagcttcacggac aagacctcagccacggtagctgcccgaataatgccagcatta gcgtgaggggccaggaccgctactatagctcatcttgagcga atgggcatctgtgcctgcagttgacaattggatctacgggtg gcacccctgtgaccctcccagtgctctcctggccctggaa gttgccactccagtggccaccagccttgcctaataaaattaa gttgcatcatcttctgactaggtgtccttctataatattat ggggtggaggggggtggtatggagcaaggggcaagttgggaag acaacctgtagggtgcggggtctattgggaaccaagctgga gtgcagtgccacaatcttggtcactgcaatctccgctcctg ggttcaagcgatttctcctgctcagcctcccgagttgtggga ttccaggcatgcatgaccaggctcagctaattttgtttttt ggtagagacggggttccaccatattggccaggctggtctccaa ctcctaattctcaggtgatctaccaccttggcctcccaaattg ctgggattacaggcgtgaaccactgctccttccctgtccttc tggagctcgagagggaaccctagtgatggagttggccactcc tctctgcgcgtcgctcgctcactgaggccgggagccaaagg tcgcccgcgcggggttggccgggagggcctcagtgagcga gcgagcgcgcagctgcagatctg (SEQ ID NO: 82)	10
33	CMVエンハンサー-CBAプロモーター WTマウスIL-12A (インフレームの 停止コドンなし) -F2A-WTマウスIL-12B (停止コドンあり) -HGHポリA	ctgcgcgtcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccg ggcgtcgggagacctttgggtcgccggcctcagtgagcagcgcg agcgcgcagagaggagtggtgccaactccatcactaggggttcc ttagtattaaacgcgtgtcgacattgattattgactagttatt aatagtaatacattacggggtcattagttcatagccatata ggagttccgcgttacataaacttacggtaaatggccgcctggc tgaccgcccacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgt atgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtca atgggtggactatttacggtaaaactgcccacttggcagtagat caagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatg acggtaaatggccccgctggcattatgcccagtagatgacct atgggactttcctacttggcagtagatctacgtattagtcac gctattaccatgggtcgaggtgagccccacgttctgcttca ctccccatctccccccctccccaccccccaattttgtatttat ttatTTTTAattattttgtgcagcgtgggggcggggcgaggggcgggg gggggcgcgcgcaggcggggcggggcggggcgaggggcgggg cggggcgagggcgagaggtgcggcggcagccaatcagagcggc gcgtccgaaagtttccttttatggcgaggcggcgggcgggc ggccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcgggagtcgctgc gcgtgccttcgcccgtgcccgcctccgcgcgcgcctcggc cgcccgcccggctctgactgaccgcgttactccacaggtaga gcgggcgggacggcccttctcctccgggtgtaattagcgtt ggtttaatgacggctcgtttctttctgtggctgcgtgaaagc cttgaggggtcggggaggccctttgtgccccgggagcggct cggggggtgcgtgcgtgtgtgtgtgcgtggggagcgcgcgtg cggtccgcgtgcccggcggtgtgagcgtgcgggcgcggc gcggggctttgtgcgtccgcagtggtgcgcgagaggagcgcgcg ccggggcggtgccacgcggtgcggggggggtgcgaggggaa caaaggctgcgtgcggggtgtgtgcgtgggggggtgagcagg	20
		ctgcgcgtcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccg ggcgtcgggagacctttgggtcgccggcctcagtgagcagcgcg agcgcgcagagaggagtggtgccaactccatcactaggggttcc ttagtattaaacgcgtgtcgacattgattattgactagttatt aatagtaatacattacggggtcattagttcatagccatata ggagttccgcgttacataaacttacggtaaatggccgcctggc tgaccgcccacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgt atgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtca atgggtggactatttacggtaaaactgcccacttggcagtagat caagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatg acggtaaatggccccgctggcattatgcccagtagatgacct atgggactttcctacttggcagtagatctacgtattagtcac gctattaccatgggtcgaggtgagccccacgttctgcttca ctccccatctccccccctccccaccccccaattttgtatttat ttatTTTTAattattttgtgcagcgtgggggcggggcgaggggcgggg gggggcgcgcgcaggcggggcggggcggggcgaggggcgggg cggggcgagggcgagaggtgcggcggcagccaatcagagcggc gcgtccgaaagtttccttttatggcgaggcggcgggcgggc ggccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcgggagtcgctgc gcgtgccttcgcccgtgcccgcctccgcgcgcgcctcggc cgcccgcccggctctgactgaccgcgttactccacaggtaga gcgggcgggacggcccttctcctccgggtgtaattagcgtt ggtttaatgacggctcgtttctttctgtggctgcgtgaaagc cttgaggggtcggggaggccctttgtgccccgggagcggct cggggggtgcgtgcgtgtgtgtgtgcgtggggagcgcgcgtg cggtccgcgtgcccggcggtgtgagcgtgcgggcgcggc gcggggctttgtgcgtccgcagtggtgcgcgagaggagcgcgcg ccggggcggtgccacgcggtgcggggggggtgcgaggggaa caaaggctgcgtgcggggtgtgtgcgtgggggggtgagcagg	30
		ctgcgcgtcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccg ggcgtcgggagacctttgggtcgccggcctcagtgagcagcgcg agcgcgcagagaggagtggtgccaactccatcactaggggttcc ttagtattaaacgcgtgtcgacattgattattgactagttatt aatagtaatacattacggggtcattagttcatagccatata ggagttccgcgttacataaacttacggtaaatggccgcctggc tgaccgcccacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgt atgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtca atgggtggactatttacggtaaaactgcccacttggcagtagat caagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatg acggtaaatggccccgctggcattatgcccagtagatgacct atgggactttcctacttggcagtagatctacgtattagtcac gctattaccatgggtcgaggtgagccccacgttctgcttca ctccccatctccccccctccccaccccccaattttgtatttat ttatTTTTAattattttgtgcagcgtgggggcggggcgaggggcgggg gggggcgcgcgcaggcggggcggggcggggcgaggggcgggg cggggcgagggcgagaggtgcggcggcagccaatcagagcggc gcgtccgaaagtttccttttatggcgaggcggcgggcgggc ggccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcgggagtcgctgc gcgtgccttcgcccgtgcccgcctccgcgcgcgcctcggc cgcccgcccggctctgactgaccgcgttactccacaggtaga gcgggcgggacggcccttctcctccgggtgtaattagcgtt ggtttaatgacggctcgtttctttctgtggctgcgtgaaagc cttgaggggtcggggaggccctttgtgccccgggagcggct cggggggtgcgtgcgtgtgtgtgtgcgtggggagcgcgcgtg cggtccgcgtgcccggcggtgtgagcgtgcgggcgcggc gcggggctttgtgcgtccgcagtggtgcgcgagaggagcgcgcg ccggggcggtgccacgcggtgcggggggggtgcgaggggaa caaaggctgcgtgcggggtgtgtgcgtgggggggtgagcagg	40

40

		gccaccagccttgctcctaataaaattaagttgcatcattttg tctgactaggtgctccttctataatattatgggggtggagggggg tggatggagcaaggggcaagttgggaagacaacctgtagggc ctgcggggtctattgggaaccaagctggagtgcagtggcacaa tcttggctcactgcaatctccgctcctgggttcaagcgattc tctgctcagcctcccgagttggtgggattccaggcatgcat gaccaggctcagctaatttttgttttttggtagagacggggg ttcaccataattggccaggctgggtctccaactcctaattctcagg tgatctacccaccttggcctcccaaattgctgggattacaggc gtgaaccactgctcccttccctgctccttctggagctcgagagg aacccttagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcg ctgctcactgagggcgggaccaaaggtcgcccgacgcccg ggcttggccggggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgagct gcagatctg (SEQ ID NO: 83)
--	--	--

10

【 0 2 5 4 】

(表 6) ヒト IL-12A (p35) および IL-12B (p40) の例示的コンストラクトの核酸配列

SEQ ID NO	名称	核酸配列
SEQ ID NO: 84	AAV2 5' ITR	ctgcgcgctcgctcgctcactgagggcgccggggcaaagcccgggcgctcgg gcgaccttgggtcgccggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggga gtggccaactccatcactaggggtcct
SEQ ID NO: 68	CMV エンハンサー	gacattgattattgactagtattataatagtaataattacgggggtcattagttcatag cccatatatggagtccggttacataacttacggtaaatggcccgctggctga ccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagta acgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggactattacggtaaaactg cccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgt caatgacggtaaatggcccgctggcattatgccagttacatgaccttatggga ctcttctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatg
SEQ ID NO: 85	ニワトリ・ ベータアクチン (CBA) プロモーター	tcgaggtgagccccacgttctgcttactctccccatctccccccctccccacc cccaattttgtattttattttttaatttttgtgcagcgatgggggaggggggg gggggggcgcgcgccaggcgggggcgggggcgggggcgagggggcggggagc gggcgaggcgagaggtgcggcgagccaatcagagcgggcgcgctccg aaagtctctttatggcgaggcgggcgggcgggcgggccctataaaaagcgaa gcgcgcgggcgggcg
SEQ ID NO: 86	CAG イントロン	ggagtcgctgcgcgtgccttcgccccgtgccccgctccgcccgcgctcgc gccgccccgggctctgactgaccgcgttactccacaggtgagcggggcg ggacggcccttctctccgggtgtaattagcgttggttaatgacggctcgttt ctttctgtggctgcgtgaaagccttgaggggctccgggagggcccttctgtgcg

20

30

40

50

		gggggagcggctcggggggtgcgtgcgtgtgtgcgtggggagcgcg cgtgcggctccgcgtgcccggcggtgtgagcgtgcgggcgcggcgcg gggctttgtgcgtccgcagtgtgcgcgagaggagcgcggccggggcggt gccacgcggtgcgggggggctgcgaggggaacaaaggctgcgtgcggg gtgtgtgcgtggggggggtgagcagggggtgtgggcgcggcggtcgggctg taacccccctgcacccccctccccgagttgctgagcacggccccgcttcgg gtgcggggctccgtgcggggcgtggcgcggggctgccgtgccgggcggg gggtggcgcggggtgggggtgccggcgggggcggggcccctcgggccg gggagggctcgggggaggggcgcggcgccccggagcgccggcggt gtcagggcgcgcgagccgagccattgcctttatgtaatcgtgcgagagg gcgcagggacttcctttgtcccaaatctgtgcggagccgaaatctgggagggc ccggcgacccccctagcgggcgcggggcgaagcgggtgcggcgccggca ggaaggaaatggcggggagggccttcgtgcgtgccgcggcgccgtcccc ttctcctctccagcctcggggctgtccgcgggggacggctgccttcggggg ggacggggcagggcggggttcggcttctggcgtgtgaccggcggtctagact ctgctaaccatgttcacgtctcttctcttctacagctcctgggcaacgtgctggt tgtgtgctgtctcatcattttggcaaa	10
SEQ ID NO: 87	Kozak	gccac	
SEQ ID NO: 77	IL-12A (p35) (「野生型」 CpG修飾なし かつ インフレームの 停止コドンなし)	ATGTGTCCAGCGCGCAGCCTCCTCCTTGTGGCTACCTGGTCTCC TGGACCACCTCAGTTTGGCCAGAAACCTCCCCGTGGCCACTCCAGA CCCAGGAATGTTCCCATGCCTTCACCACTCCAAAACCTGCTGAGG GCCGTCAGCAACATGCTCCAGAAGGCCAGACAACTCTAGAATTTT ACCCTTGCACTTCTGAAGAGATTGATCATGAAGATATCACAAAAGA TAAACCAGCACAGTGGAGGCCTGTTTACCATTGGAATTAACCAAG AATGAGAGTTGCCTAAATTCCAGAGAGACCTCTTTCATAACTAATG GGAGTTGCCTGGCCTCCAGAAAGACCTCTTTTATGATGGCCCTGTG CCTTAGTAGTATTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTC AAGACCATGAATGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCT TTCTAGATCAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATGCAGGC CCTGAATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAAATCCTCCCTTGAA GAACCGGATTTTATAAACTAAATCAAGCTCTGCATACTTCTTC ATGCTTTCcggATTGGGCGAGTACTATTGATAGAGTGATGAGCTA TCTGAATGCTTCC	30
			40

SEQ ID NO: 60	フューリン 切断部位と リンカーの 組み合わせ	agaaagagaaggagtggtcagga
SEQ ID NO: 61	2A 部位	gcccctgtgaaacagaccctgaactttgacctcttgaagcttgctgggatgtgg agtctaactcctggtcca
SEQ ID NO: 8	IL-12B (p40) (「野生型」 CpG修飾なし かつ 停止コドンあり)	ATGTGTCACCAGCAGTTGGTCATCTCTTGGTTTTCCCTGGTTTTTC TGGCATCTCCCCTCGTGGCCATATGGGAAGTGAAGAAAGATGTTTA TGTCTGATAGAATTGGATTGGTATCCGGATGCCCTGGAGAAATGGTG GTCCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGATGGTATCACCTGGACCT TGGACCAGAGCAGTGAGGTCTTAGGCTCTGGCAAAACCTGACCAT CCAAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCTGGCCAGTACACCTGTACAAA GGAGGCGAGGTTCTAAGCCATTGCTCCTGTGCTTCAAAAAAGG AAGATGGAATTTGGTCCACTGATATTTTAAAGGACCAGAAAGAACC CAAAAAATAAGACCTTTCTAAGATGCGAGGCCAAGAATTATTCTGGA CGTTTCACCTGCTGGTGGCTGACGACAATCAGTACTGATTTGACAT TCAGTGTCAAAAGCAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGAC GTGCGGAGCTGCTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAGAGGGGACAAC AAGGAGTATGAGTACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTGCCTGCC CAGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCCATTGAGGTgATGGTGGATGCCGT TCACAAGCTCAAGTATGAAAACACACCAGCAGCTTCTTCATCAGG GACATCATCAAACCTGACCCACCCAAGAAGTTCAGCTGAAGCCAT TAAAGAATTCTCGGCAGGTGGAGGTGAGCTGGGAGTACCTGACAC CTGGAGTACTCCACATTCCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAa GTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTCACGG ACAAGACCTCAGCCACGGTCATCTGCCGCAAAAATGCCAGCATTAG CGTGCGGGGCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTGGAGCGAATGG GCATCTGTGCCCTGCAGTTGA
SEQ ID NO: 88	ヒト成長 ホルモン (HGH) ポリ (A)	gatctacgggtggcatccctgtgaccctccccagtgctctcctggccctgga agttgccactccagtggccaccagcctgtcctaataaaaattaagttgcatctttt gtctgactaggtgtcctctataatattatggggtggaggggggtgtatggagc aaggggcaagttgggaagacaacctgtagggcctgcggggtctattgggaac caagctggagtgcagtggcacaatcttggtcactgcaatctccgctcctggg ttcaagcgattctcctcagcctcccgagttgttgggattccaggcatgcatg accaggctcagctaattttgttttttgtagagacggggttcaccatattggcc aggctggtctcaactcctaactcaggtgatctaccaccttggtcctccaaatt gctgggattacaggcgtgaaccactgctcccttcctgtcctctg

SEQ ID NO: 89	AAV2 3' ITR	aggaaccctagtgtgaggttgccactccctctctgcgcgtcgctcgctca ctgaggccgggacgacaaaggtcggcgacgcccgggctttgcccgggagg cctcagtgcgagcgcgcgcagctgcagatctg
---------------	-------------	--

【 0 2 5 5 】

本開示のいくつかの局面は、SEQ ID NO: 5～37および48～57のいずれか、または表2、表4もしくは表5に示される任意の核酸に対して、少なくとも80%、85%、90%、9

10

20

30

40

50

5%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせを含むポリヌクレオチドに向けられる。

【0256】

本開示のいくつかの局面は、SEQ ID NO:8、60、61、68、71、77、82および84~89のいずれか、または表6に示される任意の核酸に対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせを含むポリヌクレオチドに向けられる。本開示のいくつかの局面は、SEQ ID NO:82に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列を含むポリヌクレオチドに向けられる。

10

【0257】

本開示のいくつかの局面は、SEQ ID NO:78、79に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するアミノ酸配列またはそれらの組み合わせをコードするポリヌクレオチドに向けられる。

【0258】

本開示のいくつかの局面は、SEQ ID NO:80、81に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するアミノ酸配列またはそれらの組み合わせをコードするポリヌクレオチドに向けられる。

【0259】

いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは、(i) 第1サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、(ii) 第2サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含む。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸であって、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7またはSEQ ID NO:77と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む核酸を含む。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは、IL-12 p40サブユニットをコードする核酸であって、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10またはSEQ ID NO:92と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む核酸を含む。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは、(i) SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7またはSEQ ID NO:77と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸と、(ii) SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:92と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む、IL-12 p40サブユニットをコードする核酸とを含む。

20

30

【0260】

いくつかの局面において、免疫調節タンパク質は、可溶性のナチュラルキラー(NK)細胞、B細胞、T細胞、好中球またはマクロファージリガンドである。いくつかの局面において、第1免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントまたは第2免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントは、可溶性のCD40リガンド(CD40L)、CD19リガンド(CD19L)、CD48リガンド(CD48L)、CD20リガンド(CD20L)、それらの任意の機能的フラグメント、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。

40

【0261】

また本明細書では、例えばコドン/RNA修飾、異種シグナル配列による置き換え、およびmRNA不安定性要素の排除などによって改変された、本明細書記載の免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドも提供される。コドン変化(例えば遺伝暗号の縮重ゆえに同じアミノ酸をコードするコドン変化)を導入するこ

50

とおよび/またはmRNA中の阻害領域を排除することによって組換え発現用に本明細書記載の免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントをコードする改変核酸を生成させるための方法は、例えば米国特許第5,965,726号、同第6,174,666号、同第6,291,664号、同第6,414,132号および同第6,794,498号に記載の方法を相応に適合させることによって実行することができ、これらの文献のそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0262】

免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドは、当技術分野において周知の方法（例えばPCRその他の分子クローニング法）を使って、適切な供給源からの核酸から生成させることができる。

10

【0263】

本明細書において提供されるポリヌクレオチドは、例えばRNAの形態またはDNAの形態にあることができる。DNAには、cDNA、ゲノムDNA、および合成DNAが含まれ、DNAは二本鎖または一本鎖であることができる。一本鎖である場合、DNAはコード鎖または非コード鎖（アンチセンス）鎖であることができる。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドはcDNAであるか、または1つもしくは複数の内在性イントロンを欠くDNAである。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは非天然ポリヌクレオチドである。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは組換え生産される。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは単離される。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは実質的に純粋である。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは天然構成要素から精製される。いくつかの局面において、本開示のコンストラクトはマルチシストロニック（例えばビシストロニック）コンストラクト（例えば複数のサイトカイン（例えばIL-12）サブユニットをコードする核酸を含むもの）である。いくつかの局面において、マルチシストロニック（例えばビシストロニック）コンストラクトは、F2A要素またはIRES要素を、さらに含む。いくつかの局面において、マルチシストロニックコンストラクトは、F2A、E2A、P2AまたはT2A要素を含む。いくつかの局面において、マルチシストロニックコンストラクトはF2A要素を含む。

20

【0264】

いくつかの局面において、ウイルスベクターは、2つ以上の関心対象の免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントのためのコード領域を含むポリヌクレオチドを含む。前記2つ以上の関心対象の免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントは、互いに同じであるかまたは異なることができる。2つ以上の関心対象の免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメント、2つ以上の個別のポリペプチド鎖、または関心対象の免疫調節タンパク質の2つ以上のサブユニットもしくはその機能的フラグメントのためのコード領域を1つのウイルスベクターに含めることが望まれる場合は、第1コード領域以降の各追加コード領域が、好ましくは、宿主細胞におけるタンパク質の共発現を容易にする要素、例えば配列内リボソーム進入配列（IRES）要素（例えば米国特許第4,937,190号参照）または2A要素に連結される。いくつかの局面において、IRES要素または2A要素（例えばF2A、E2A、P2AまたはT2A）は、単一のベクターがマルチサブユニットタンパク質の各サブユニットをコードする配列を含む場合に、使用することができる。

30

40

【0265】

ウイルスベクターは、2つ以上の関心対象の免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントのためのコード領域を含むことができる。例えばウイルスベクターは、第1の関心対象の免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントのためのコード領域および第2の関心対象の免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントのためのコード領域を含むことができる。第1の関心対象の免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントおよび第2の関心対象の免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントは、同じであるかまたは異なることができる。いくつかの局面において、ウイルスベクターは、第3もしくは第4の関心対象の免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントのためのコード領域を含むことができる。第3および第4の関心対象の免疫調節タンパク質またはその

50

機能的フラグメントは、同じであるかまたは異なることができる。1つのウイルスベクターによってコードされる2つ以上の関心対象の免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントの全長は、さまざまであることができる。例えば、2つ以上のタンパク質の全長は、少なくとも約400アミノ酸、少なくとも約450アミノ酸、少なくとも約500アミノ酸、少なくとも約550アミノ酸、少なくとも約600アミノ酸、少なくとも約650アミノ酸、少なくとも約700アミノ酸、少なくとも約750アミノ酸、少なくとも約800アミノ酸、またはそれ以上であることができる。

【0266】

いくつかの局面において、本明細書では、インターロイキン (IL) -12、腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α)、I型インターフェロン (INF)、II型IFN、IL-2、IL-15、IL-21、IL-23、IL-27、IL-18、IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL17、IL33、TL1A、CD40L、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、それらの任意の機能的フラグメント、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、サイトカインまたはその機能的フラグメントをコードする核酸を含む、ポリヌクレオチドが提供される。

【0267】

いくつかの局面において、サイトカインは、IL-12、IL-18、IL-21、またはその機能的フラグメントである。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは、(i) 第1のIL-12サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、(ii) 第2のIL-12サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含む。いくつかの局面において、核酸は、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸および/またはIL-12 p40サブユニットをコードする核酸を含む。いくつかの局面において、核酸は、SEQ ID NO:5~10のいずれかまたは表2中の任意の核酸配列に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは、(i) SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7またはSEQ ID NO:77と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸、および/または(ii) SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:92と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む、IL-12 p40サブユニットをコードする核酸を含む。

【0268】

コザックコンセンサス配列、コザックコンセンサスまたはコザック配列は、真核mRNA上に存在し、コンセンサス (gcc) gccRccAUGGを有する配列として公知であり、コンセンサス中のRは、「G」がもう一つ続く開始コドン (AUG) の3塩基上流にあるプリン (アデニンまたはグアニン) である。いくつかの局面において、ベクターは、コザックコンセンサス配列に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%またはそれ以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの局面において、ベクターはコザックコンセンサス配列を含む。いくつかの局面において、ベクターは、例えばベクター中のプロモーターの下流にある制限部位に挿入された1つまたは複数の関心対象の免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチド後に、コザックコンセンサス配列を含む。例えばベクターはGCCGCCATG (SEQ ID NO:2) のヌクレオチド配列を含むことができ、ここでATGは関心対象のタンパク質の開始コドンである。いくつかの局面において、ベクターはGCGGCCGCCATG (SEQ ID NO:3) のヌクレオチド配列を含み、ここでATGは関心対象のタンパク質の開始コドンである。

【0269】

関心対象の免疫調節タンパク質は、所望であれば、当業者に公知の従来の方法に従って、単離し、精製することができる。例えば、発現宿主細胞の溶解物を調製し、その溶解物

を、HPLC、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）、アニオン交換クロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、限外濾過、ゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィーおよび/または他の精製技法を使って、精製することができる。

【0270】

III. コンストラクト

本開示のいくつかの局面は、免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする関心対象のDNAに機能的に連結された真核生物プロモーターを有する核酸コンストラクトまたは発現コンストラクト（例えば発現カセットを含むもの）に向けられる。いくつかの局面において、本開示に従って使用することができるDNA配列（または対応するRNA配列）を含有するコンストラクトは、関心対象のDNAまたはRNA配列を含有する任意の真核生物発現コンストラクトであることができる。例えばプラスミドまたはウイルスコンストラクト（例えばAAVベクター）を切断して、ライゲーション可能な末端を有する直線状DNAを得ることができる。これらの末端は、ライゲーション可能な末端のような相補性を有する外因性DNAに結合して、完全なレプリコンおよび所望の表現型特性を有する生物学的に機能的な組換えDNA分子を与える。いくつかの局面において、コンストラクトは、真核宿主と原核宿主の両方で複製能を有し、それらのコンストラクトは、当技術分野で公知のバックボーンを含むことができ、市販されている。

【0271】

いくつかの局面において、本開示において使用される外因性（すなわちドナー）DNAは適切な細胞から得られ、コンストラクトは、当技術分野において周知の技法を使って調製することができる。また、遺伝子改変宿主細胞における外因性DNAまたはRNA配列の発現を得るための技法は、当技術分野において公知である（例えばKornal et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:2150-2154 (1987)、Sambrook et al. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Ed., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.を参照されたい。これらの文献はそれぞれ、関心対象のDNAの真核発現のための方法および組成物に関して、参照により本明細書に組み入れられる）。

【0272】

いくつかの局面において、本開示の発現コンストラクトはマルチシストロニック（例えばビシストロニック）コンストラクト（例えば複数のサイトカイン（例えばIL-12）サブユニットをコードする核酸を含むもの）である。いくつかの局面において、マルチシストロニック（例えばビシストロニック）コンストラクトは、F2A要素またはIRES要素を、さらに含む。いくつかの局面において、マルチシストロニックコンストラクトはF2A要素を含む。

【0273】

いくつかの局面において、本開示は、

- (a) X-I1-P1-E-P2-I2-X'-T-Y;
- (b) Y-I1-P1-E-P2-I2-X-T-X';
- (c) pA-X-I1-L-P1-E-P2-I2-X-T-Y-pA;
- (d) pA-Y-I1-L-P1-E-P2-I2-X-T-X'-pA;
- (e) E-P1-I1-X-T-X'-pA;または
- (f) P1-X-T-X'-pA

から選択される式を含む、またはその式によって定義される、発現コンストラクト（例えば発現カセットを含むもの）に向けられ、式中、XおよびX'は第1免疫調節分子のサブユニットをコードし、I1およびI2はイントロンであり、P1およびP2はプロモーターであり、Eはエンハンサーであり、Tは翻訳修飾配列であり、Yは第2免疫調節分子をコードし、Lは長鎖末端反復であり、pAはポリA配列である。いくつかの局面において、Xは、IL-12 p35サブユニットもしくはその機能的フラグメントをコードする核酸またはIL-12

10

20

30

40

50

p40サブユニットもしくはその機能的フラグメントをコードする核酸であることができる。いくつかの局面において、X'は、IL-12 p35サブユニットもしくはその機能的フラグメントをコードする核酸またはIL-12 p40サブユニットもしくはその機能的フラグメントをコードする核酸であることができる。

【0274】

いくつかの局面において、EはCMVエンハンサーであり、P1はCBAプロモーターであり、I1またはI2はCAGイントロンであり、XはIL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸であり、Tはフューリン切断配列とそれに続く2A自己プロセシングペプチド配列（F2A）であり、X'はIL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸であり、pAはヒト成長ホルモン（HGH）pAである。

10

【0275】

いくつかの局面において、本明細書では、CMVエンハンサーと、ヒトIL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結されたCBAプロモーターと、2A自己プロセシングペプチド（F2A）が続くフューリン切断配列と、ヒトIL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸と、ヒト成長ホルモン（HGH）pA配列とを含むポリヌクレオチドを含むコンストラクトが提供される。いくつかの局面において、コンストラクトは、イントロン配列（例えばCAGイントロン）およびコザック配列を、さらに含む。

【0276】

いくつかの局面において、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸は、インフレーションの停止コドン（例えばTGA、TAG、およびTAA）を含まない。

20

【0277】

いくつかの局面において、コンストラクトは、腫瘍内での関心対象のDNA（例えば第1または第2免疫調節分子、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメント）の発現を容易にするためのプロモーターを含有する。いくつかの局面において、プロモーターは、強い真核生物プロモーター、例えばサイトメガロウイルス（CMV）、マウス乳房腫瘍ウイルス（MMTV）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）、またはアデノウイルスからのプロモーターである。例示的なプロモーターとしては、ヒトCMVの前初期遺伝子からのプロモーター（Boshart et al., Cell 41:521-530 (1985)、およびRSVの長鎖末端反復（LTR）からのプロモーター（Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777-6781 (1982)）が挙げられるが、それらに限定されない。いくつかの局面において、プロモーターは、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1a（伸長因子1a）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、ユビキチン（UbC）プロモーター、またはそれらの任意の組み合わせである。

30

【0278】

あるいは、使用するプロモーターは、組織特異的プロモーターであることができる。いくつかの局面において、プロモーターは、発現を腫瘍にターゲティングすること、または発現を腫瘍に（例えば本開示の方法によって処置される腫瘍に）限定することができる。

【0279】

いくつかの局面において、コンストラクト（例えば発現コンストラクト）は、2つ以上のプロモーター、例えば第1免疫調節タンパク質、そのサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸のための第1プロモーターと、第2免疫調節タンパク質、そのサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2の核酸配列のための第2プロモーターとを含むことができる。いくつかの局面において、前記2つ以上のプロモーターは同じである。いくつかの局面において、前記2つ以上のプロモーターは異なる。いくつかの局面において、プロモーターは、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1a（伸長因子1a）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、ユビキチン（UbC）プロモーター、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

40

【0280】

いくつかの局面において、第1プロモーターをコードする核酸配列および第2プロモ-

50

ターをコードする核酸配列は機能的に連結される。いくつかの局面において、第1プロモーターをコードする核酸配列および第2プロモーターをコードする核酸配列は、停止要素（pause element）によって、機能的に連結される。いくつかの局面において、停止要素は、SEQ ID NO:74と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるヌクレオチド配列を含む。

【0281】

いくつかの局面において、コンストラクト（例えば発現コンストラクト）は翻訳修飾配列を含む。いくつかの局面において、翻訳修飾配列は、配列内リボソーム進入部位（IRES）配列、2A自己プロセシングペプチド（例えばF2Aペプチド、P2Aペプチド、E2Aペプチド、またはT2Aペプチド）、フューリン切断配列、またはそれらの任意の組み合わせから選択される。いくつかの局面において、本開示のコンストラクトは、配列内リボソーム進入部位（IRES）配列、F2Aペプチド、P2Aペプチド、E2Aペプチド、T2Aペプチド、フューリン切断配列、またはそれらの組み合わせを含むことができる。いくつかの局面において、IRESは、SEQ ID NO:59と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるヌクレオチド配列を含む。いくつかの局面において、フューリン切断部位は、SEQ ID NO:60と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるヌクレオチド配列を含む。いくつかの局面において、2a部位は、SEQ ID NO:61と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるヌクレオチド配列を含む。

【0282】

いくつかの局面において、本開示のコンストラクト（例えば発現コンストラクト）は、エンハンサー配列、イントロン配列、長鎖末端反復（LTR）配列、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含むことができる。いくつかの局面において、エンハンサー配列はCMVエンハンサー配列である。いくつかの局面において、CMVエンハンサーは、SEQ ID NO:68と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるヌクレオチド配列を含む。いくつかの局面において、イントロンはSV40イントロンである。いくつかの局面において、イントロンは、ヒトベータグロビンイントロンと免疫グロブリン重鎖イントロンのキメラである。いくつかの局面において、イントロンはCAGイントロンである。いくつかの局面において、イントロンは、SEQ ID NO:66、71、76および86のいずれかと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるヌクレオチド配列を有する。

【0283】

いくつかの局面において、本開示のコンストラクト（例えば発現コンストラクト）は、ポリ（A）（pA）配列を、さらに含むことができる。いくつかの局面において、pA配列は、合成pA（SYNpA）配列、BGHpA配列、HGHPA、またはそれらの組み合わせである。いくつかの局面において、SYNpAは、SEQ ID NO:72と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるヌクレオチド配列を含む。いくつかの局面において、BGHpAは、SEQ ID NO:73と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるヌクレオチド配列を含む。いくつかの局面において、HGHPAは、SEQ ID NO:88と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるヌクレオチド配列を含む。

【0284】

いくつかの局面において、本開示のコンストラクト（例えば発現コンストラクト）は、

IL-12 p35遺伝子またはその機能的フラグメントに機能的に連結されたプロモーター、IRES配列、およびIL-15遺伝子またはその機能的フラグメントを含む第1核酸と、IL-12 p40遺伝子またはその機能的フラグメントに機能的に連結されたプロモーターを含む第2核酸とを含むことができる。いくつかの局面において、本開示のコンストラクトは、IL-12 p35遺伝子またはその機能的フラグメントに機能的に連結されたプロモーター、フューリン切断配列および/または2A自己プロセシングペプチド（例えばF2A、E2A、P2AまたはT2A自己プロセシングペプチド）、ならびにIL-12 p40遺伝子またはその機能的フラグメントを含む第1核酸と、IL-15遺伝子またはその機能的フラグメントに機能的に連結されたプロモーターを含む第2核酸とを含むことができる。

【0285】

いくつかの局面において、本開示のコンストラクト（例えば発現コンストラクト）は、IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む第1核酸、IRES配列、およびIL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む第2核酸を含むことができる。いくつかの局面において、本開示のコンストラクト（例えば発現コンストラクト）は、IL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む第1核酸、IRES配列、およびIL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む第2核酸を含むことができる。いくつかの局面において、本開示のコンストラクトは、IL-12 p35サブユニットもしくはその機能的フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーター、フューリン切断配列および/または2A自己プロセシングペプチド（例えばF2A、E2A、P2AまたはT2A自己プロセシングペプチド）をコードする第1核酸と、IL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むことができる。いくつかの局面において、本開示のコンストラクトは、IL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーター、フューリン切断配列および/または2A自己プロセシングペプチドを含む第1核酸と、IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むことができる。

【0286】

いくつかの局面において、第1核酸（例えばIL-12 p35サブユニットをコードする核酸）はインフレームの停止コドン（例えばTGA、TAG、およびTAA）を含まない。

【0287】

いくつかの局面において、第1核酸は、イントロン配列、pA配列、エンハンサー配列、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む。いくつかの局面において、第1核酸は、イントロン配列およびヒト成長ホルモン（HGH）pA配列をさらに含む。いくつかの局面において、第1核酸は、イントロン配列およびウシ成長ホルモン（BGH）pA配列をさらに含む。

【0288】

いくつかの局面において、第1核酸はイントロン配列（例えばCAGイントロン）をさらに含む。いくつかの局面において、第2核酸は、イントロン配列、pA配列、エンハンサー配列、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む。いくつかの局面において、第2核酸は、SV40イントロン配列および合成（SYN）pA配列をさらに含む。

【0289】

いくつかの局面において、第1核酸のプロモーターは、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1a（伸長因子1a）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、ユビキチン（UbC）プロモーター、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの局面において、第2核酸のプロモーターは、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1a（伸長因子1a）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、ユビキチン（UbC）プロモーター、EF1αプロモーターに融合されたCMVエンハンサー、SV40イントロンに融合されたCMVプロモーター、CMVエンハンサーに融合された

CMVプロモーター、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの局面において、1つまたは複数のプロモーターは、SEQ ID NO:67~71または85のいずれか1つと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である核酸配列を有する。

【0290】

いくつかの局面において、本開示のコンストラクト（例えば発現コンストラクト）は、マイクロRNA（miR）結合部位も含むことができる。いくつかの局面において、マイクロRNA結合部位は、安全性を改良し、腫瘍特異的発現を可能にするために、含まれる。いくつかの局面において、マイクロRNA結合部位は、正常な健常組織における発現と比べて腫瘍では存在しないかまたは低レベルにしか発現しないという理由で選択されたその相補的マイクロRNAの発現に基づいて発現をコントロールするための、条件付きスイッチ（conditional switch）として作用することができる。いくつかの局面では、マイクロRNA結合部位を含めることにより、本明細書において開示される免疫調節タンパク質の発現を、正常細胞を避けて腫瘍細胞に制限することができる。いくつかの局面において、マイクロRNA標的結合部位は、miR-1-3p、miR-122-5p、miR-124-3p、miR-126-3p、miR-128-3p、miR-137、miR-143-3p、miR-204-5p、miR-217、miR-219a-5p、またはそれらの任意の組み合わせに対する結合部位から選択される。いくつかの局面において、miRNA結合部位はmiR-142結合部位である。いくつかの局面において、miRNA結合部位は、スペーサーで隔てられた4つのmiR-142結合部位を含む。いくつかの局面において、miR-142結合部位は、SEQ ID NO:64と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である核酸配列を有する。いくつかの局面において、この4×miR-142結合部位は、SEQ ID NO:65と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である核酸配列を有する。

【0291】

いくつかの局面において、本明細書では、CMVエンハンサー（例えばSEQ ID NO:68）と、ヒトIL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸（例えばSEQ ID NO:77）に機能的に連結されたCBAプロモーター（例えばSEQ ID NO:85）と、2A自己プロセシングペプチド（F2A）が続くフュリン切断配列と、ヒトIL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸（例えばSEQ ID NO:8）と、ヒト成長ホルモン（HGH）pA配列（例えばSEQ ID NO:88）とを含むポリヌクレオチドを含むコンストラクトが提供される。いくつかの局面において、コンストラクトは、イントロン配列（例えばCAGイントロン、例えばSEQ ID NO:86）およびコザック配列を、さらに含む。いくつかの局面において、コンストラクトは、CMVエンハンサー、CBAプロモーターおよびCAGイントロン（例えばSEQ ID NO:71）を含む。

【0292】

いくつかの局面において、本開示のコンストラクト（例えば発現コンストラクト）は、コンストラクトを含有しおよび/または発現する細胞の選択を助けるためのマーカー（例えば抗生物質耐性遺伝子（アンピシリン耐性遺伝子など）またはβ-ガラクトシダーゼ）、細菌細胞におけるコンストラクトの安定な複製のための複製起点（好ましくは高コピー数複製起点）、核局在化シグナル、またはDNAコンストラクト、もしくはそれによってコードされるタンパク質、またはその両方の産生を容易にする他の要素などといった、他の構成要素も含むことができる。

【0293】

真核発現用に、コンストラクト（例えば発現コンストラクト）は、関心対象のDNAに機能的に連結された真核生物プロモーターを少なくとも含むことができ、それはさらに、ポリアデニル化配列に機能的に連結される。ポリアデニル化シグナル配列は、当技術分野において公知のさまざまなポリアデニル化シグナル配列のいずれからでも選択することが

できる。いくつかの局面において、ポリアデニル化シグナル配列はSV40初期ポリアデニル化シグナル配列である。コンストラクトは、特に関心対象のDNAがcDNAである（例えば天然配列のイントロンを含有しない）場合に、関心対象のDNAの発現レベルを増加させることができる、1つまたは複数のイントロンも含むことができる。当技術分野において公知のさまざまなイントロンはいずれも使用することができる（例えばヒトβ-グロビンイントロン、これはコンストラクトの、関心対象のDNAに対して5'側の位置に、挿入することができる）。

【0294】

関心対象のDNAは、免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントが融合タンパク質（例えばβ-ガラクトシダーゼまたはその一部をN末端に有し、治療タンパク質をC末端部分に有する、融合タンパク質）として発現されるように、コンストラクトに挿入することができる。融合タンパク質の産生は、そのタンパク質を発現する形質転換細胞の（例えばその融合タンパク質に結合する抗体を使った酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）による）同定を容易にする。

10

【0295】

いくつかの局面において、本明細書において開示される核酸、コンストラクト、ポリヌクレオチドおよび/または発現カセットは、CpG含量が改変されかつ/またはToll様受容体9（TLR9）刺激モチーフが低減または排除された配列を含む。

【0296】

関心対象のDNAを送達するためのベクターは、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターのいずれかであることができ、またはウイルス粒子（例えばAAV粒子）もしくはカチオン性脂質もしくはリボソームなどのアジュバントと混合された裸のDNAで構成されていてもよい。「アジュバント」は、それだけでは所望の効果を生じないが、活性化化合物の作用を増強しまたは他の形で改良するように作用する物質である。使用される具体的なベクターおよびベクター製剤は、遺伝子移入の標的となる腫瘍などといったいくつかの因子に依存するだろう。

20

【0297】

ある特定の局面では、第1免疫調節タンパク質、そのサブユニットもしくはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、および/または第2免疫調節タンパク質、そのサブユニットもしくはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含む核酸コンストラクトまたは発現コンストラクトを含む送達ベクター、例えばウイルスベクターを含む組成物が、腫瘍内送達に適している。

30

【0298】

ある特定の局面では、第1免疫調節タンパク質、そのサブユニットもしくはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、および/または第2免疫調節タンパク質、そのサブユニットもしくはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含む核酸コンストラクトまたは発現コンストラクトを含む送達ベクター、例えばウイルスベクターを含む組成物が、静脈内送達に適している。

【0299】

ある特定の局面では、第1免疫調節タンパク質、そのサブユニットもしくはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、および/または第2免疫調節タンパク質、そのサブユニットもしくはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含む核酸コンストラクトまたは発現コンストラクトを含む送達ベクター、例えばウイルスベクターを含む組成物が、リンパ器官（例えば脾臓、リンパ節、または骨髄）への送達に適している。

40

【0300】

いくつかの局面において、本明細書において開示されるコンストラクトは、表7に列挙される要素のうちの1つまたは複数を含む。

【0301】

（表7）サイトカインを生成させるためのコンストラクト中の要素の核酸配列

50

SEQ ID NO	名称	核酸配列
SEQ ID NO: 59	IRES	GCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCG AAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTAT ATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGT GAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGC ATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGC AAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCT GGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGAC CCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAG GTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACA CCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTG AGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCT CAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGA AGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCG GTACACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAA

10

20

30

40

50

		AAACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTT TCCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACA
SEQ ID NO: 60	フューリン 切断部位	AGAAAGAGAAGGAGTGGCTCAGGA
SEQ ID NO: 61	2A 部位	GCCCCTGTGAAACAGACCCTGAACTTTGACCTCTTGA AGCTTGCTGGGGATGTGGAGTCTAATCCTGGTCCA
SEQ ID NO: 62	IL-2リーダー	ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAA GTCTTGCACTTGTCACAAACTCG
SEQ ID NO: 63	IL-10リーダー	ATGCACAGCTCAGCACTGCTCTGTTGCCTGGTCCTCC TGACTGGGGTGAGGGCC
SEQ ID NO: 64	miR-142 結合部位	TCCATAAAGTAGGAAACACTACA
SEQ ID NO: 65	4x miR-142 結合部位	TCCATAAAGTAGGAAACACTACA _{ctat} TCCATAAAGTA GGAAACACTACA _{tcac} TCCATAAAGTAGGAAACACTAC A _{agtc} TCCATAAAGTAGGAAACACTACA
SEQ ID NO: 66	SV40 イントロン	GTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTTCAGGTCCCGG ATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAG TGGATGTTGCCTTTACTTCTAG
SEQ ID NO: 67	EF-1 α	GCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCC CACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCTGGCAA TTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAA CTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTT CCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTA GTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGCCG CCAGAACACAG
SEQ ID NO: 68	CMV エンハンサー	GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAAT TACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTC CGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCT GACCGCCCAACGACCCCGCCCATGACGTCAATAAT GACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTC CATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTG CCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAG

10

20

30

40

50

		TACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC GCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACT TTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCT ATTACCATG
SEQ ID NO: 69	CMVp	GTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGAT AGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCC CATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAAT CAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCC CATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGG AGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG
SEQ ID NO: 70	CMV エンハンサー および プロモーター (CMVe/p)	GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAAT TACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTC CGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCT GACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTTGACGTCAATAAT GACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTC CATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTG CCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAG TACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC GCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACT TTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCT ATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATG GGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCGAAG TCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGG CACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACA ACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGT ACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTG AACCG
SEQ ID NO: 71	CAG プロモーター	GTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATC AATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAG TTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTG GCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTTGACGTCAAT AATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACT

10

20

30

40

50

	TTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAA CTGCCCACCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC AAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGG CCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGG ACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC GCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTTCTGC TTCCTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAAT TTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGAT GGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGG GCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCG GAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCT CCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGG CGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGA GTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCG CCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGAC CGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCC TTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGAC GGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGA GGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGG CTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGC GCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCCGGCGGCTGTGAGC GCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAG TGTGCGCGAGAGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCAC GCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTG CGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGGTGAGCAGGGG GTGTGGGCGCGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCCTGC ACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGGCTTC GGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGCGCGGGGCT CGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCGGGTGGGGGT GCCGGGCGGGGCGGGGCCCGCTCGGGCCGGGGAGGG CTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGAGCGCCGG CGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTT
--	---

10

20

30

40

50

		TTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTT TGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGC GCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGC GGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAG GGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCCGTCCCTTCTCC CTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTG CCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTT CTGGCGTGTGACCGGCGGTCTAGACTCTGCTAACCAT GTTTCATGCCTTCTTCTCTTTCTACAGCTCCTGGGCAA CGTGCTGGTTGTTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAA	10
SEQ ID NO: 72	合成ポリ(A)	AATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGG TTTTTTGTGTG	
SEQ ID NO: 73	BGH ポリ(A)	CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCC TCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTC CCACTGTCCTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATC GCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGT GGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGA AGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTC TATG	20
SEQ ID NO: 74	停止要素	AACATACGCTCTCCATCAAAACAAAACGAAACAAAA CAAAGTAGCAAAATAGGCTGTCCCCAGTGCAAGTGC AGGTGCCAGAACATTTCTCT	
SEQ ID NO: 75	5' LTR	GGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCCCTA CCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCT GCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGTCC GCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGG GCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGAGCCTACCTAGACT CAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTC AACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTCTGTTCTGCGCCGT TACAGATC	30
SEQ ID NO: 76	イントロン (ヒト	GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGAC CAATAGAAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGACTC	40

	ベータグロビン イントロンと 免疫グロブリン 重鎖イントロンの キメラ)	TTGCGTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACAT CCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG
--	--	---

10

20

30

40

50

【0302】

III.A. 送達ベクター

いくつかの局面において、送達ベクターは、ウイルスペクター、非ウイルスペクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子である。

【0303】

ある特定の局面において、第1免疫調節タンパク質、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントをコードするもしくは含む第1核酸、および/または第2免疫調節タンパク質、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントをコードするもしくは含む第2核酸を含む、送達ベクター（例えばウイルスペクター、非ウイルスペクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）を含む組成物は、腫瘍への送達に適している。

10

【0304】

III.A.1. 非ウイルスペクター

いくつかの局面において、関心対象のDNAは、非ウイルスペクターを使って投与することができる。本明細書にいう「非ウイルスペクター」には、裸のDNA（例えばDNAとカチオン性化合物（例えばデキストラン硫酸）の製剤）と、ウイルス粒子などのアジュバントと混合された裸のDNA（すなわち関心対象のDNAはウイルス粒子内に含まれていないが、形質転換製剤は裸のDNAとウイルス粒子（例えばAAV粒子）の両方で構成される（例えばCuriel et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 6:247-52 (1992) 参照））が含まれるものとする。したがって「非ウイルスペクター」には、DNA+ウイルス粒子で構成され、ウイルス粒子が関心対象のDNAをウイルスゲノム内に含有していないベクターを含めることができる。

20

【0305】

いくつかの局面において、非ウイルスペクターは細菌ベクターである。例えばBaban et al., Bioeng Bugs., 1 (6):385-394 (2010) を参照されたい。

【0306】

いくつかの局面において、関心対象のDNAは、ポリ-L-リジンまたはDEAC-デキストランなどのポリカチオン性物質、ターゲティングリガンドおよび/またはDNA結合タンパク質（例えばヒストン）と複合体化することができる。DNA-またはRNA-リポソーム複合体製剤は、遺伝物質（DNAまたはRNA）に結合して細胞中への核酸の送達を容易にする、脂質の混合物を含む。本開示に従って使用することができるリポソームは、DOPE（ジオレイルホスファチジエタノールアミン）、CUDMEDA（N-（5-コレストラム-3-β-オール3-ウレタニル）-N',N'-ジメチルエチレンジアミン）を含む。

30

【0307】

本開示に従って使用することができる脂質には、DOPE（ジオレイルホスファチジエタノールアミン）、コレステロール、およびCUDMEDA（N-（5-コレストラム-3-オール3ウレタニル）-N',N'-ジメチルエチレンジアミン）などがあるが、それらに限定されない。一例として、DNAは、以下のカチオン性リポソーム製剤のうちの1つを含有する溶液として投与することができる:Lipofectin（商標）（LTI/BRL）、Transfast（商標）（Promega Corp）、Tfx50（商標）（Promega Corp）、Tfx10（商標）（Promega Corp）またはTfx20（商標）（Promega Corp）。リポソーム溶液の濃度は、約2.5%~15%体積:体積の範囲、好ましくは約6%~12%体積:体積の範囲にわたる。本開示の方法による送達のための核酸（例えばDNA、ウイルス粒子内に含まれてないDNAまたはRNAを含む）の製剤化のための、さらなる例示的な方法および組成物は、米国特許第5,892,071号、同第5,744,625号、同第5,925,623号、同第5,527,928号、同第5,824,812号、同第5,869,715号に記載されている。

40

【0308】

いくつかの局面では、ポリマーに基づく遺伝子送達のために、タンパク質粒子を本開示

50

に従って使用することができる。例えばPutnam et al., PNAS 98 (3) :1200-1205 (2001) を参照されたい。

【0309】

いくつかの局面において、関心対象のDNAは、宿主細胞の生物学的性質を改変する目的で、宿主細胞への送達を容易にする担体分子（例えば抗体または受容体リガンド）にカップリングされたDNAまたはRNAの化学製剤として、投与することができる。「化学製剤」という用語は、タンパク質もしくは脂質またはそれらの誘導体などといった担体分子への核酸化合物のカップリングを可能にするための核酸の修飾を指す。

【0310】

ある特定の局面において、本明細書において開示される、第1免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードするもしくは含む第1核酸および/または第2免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードするもしくは含む第2核酸を含む非ウイルス送達ベクターを含む組成物は、腫瘍内送達に適している。

10

【0311】

ある特定の局面において、本明細書において開示される、第1免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードするもしくは含む第1核酸および/または第2免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードするもしくは含む第2核酸を含む非ウイルス送達ベクターを含む組成物は、静脈内送達に適している。

【0312】

ある特定の局面において、本明細書において開示される、第1免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードするもしくは含む第1核酸および/または第2免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードするもしくは含む第2核酸を含む非ウイルス送達ベクターを含む組成物は、リンパ器官（例えば脾臓、リンパ節、または骨髄）への送達に適している。

20

【0313】

III.A.2. ウイルスベクター

一般に、本開示に従って使用されるウイルスベクターは、ウイルス複製欠損性になるようにつく本開示による関心対象の組換え遺伝子を発現するように遺伝子改変された、天然ウイルス由来のウイルス粒子で構成される。ウイルスがその遺伝物質を細胞に送達しても、それが新たな感染性ウイルスを生成させることはないが、外来性組換え遺伝子は細胞中に、好ましくは細胞のゲノム中に、導入される。

30

【0314】

いくつかの局面において、ウイルスベクターは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、サイトメガロウイルス（CMV）、ワクシニアまたはポリオウイルスベクターである。いくつかの局面において、レトロウイルスベクターはそれほど好ましくない。レトロウイルスは複製細胞を必要とし、分泌腺は、大半が複製の遅い細胞および/または最終分化した細胞で構成されているからである。いくつかの局面において、アデノウイルスおよびAAVは好ましいウイルスベクターである。このウイルスは複製の遅い細胞および/または最終分化した細胞に効率よく感染するからである。いくつかの局面において、送達ベクター（例えばウイルスベクター）は、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、またはレトロウイルスベクターからなる群より選択される。

40

【0315】

複製欠損性ウイルスがウイルスベクターとして使用される場合、関心対象のDNAに対応するDNAまたはRNAのどちらかを含有する感染性ウイルスの産生は、ウイルス複製にとって不可欠な欠損構成要素を提供する組換え細胞株中にウイルスコンストラクトを導入することによってもたらすことができる。いくつかの局面において、組換えウイルスベクターによる組換え細胞株の形質転換が、例えば導入されたウイルスベクターへの組換え細胞株のウイルス配列の相同組換えによる、複製能を持つウイルス産生をもたらすことはないだろう。関心対象の核酸を含有する複製欠損性ウイルス粒子の産生方法は、当技術分野

50

において周知であり、例えばRosenfeld et al., Science 252:431-434 (1991) およびRosenfeld et al., Cell 68:143-155 (1992) (アデノウイルス)、米国特許第5,139,941号 (アデノ随伴ウイルス)、米国特許第4,861,719号 (レトロウイルス) および米国特許第5,356,806号 (ワクシニアウイルス) に記載されている。

【0316】

本開示のある特定の局面は、本明細書において開示される、IL-12サブユニット (例えばIL-12 p35) もしくはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、および/またはIL-12サブユニット (例えばIL-12 p40) もしくはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含むポリヌクレオチドを含むウイルス送達ベクターに向けられる。

【0317】

本開示のある特定の局面は、CMVエンハンサー (例えばSEQ ID NO:68) と、ヒトIL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸 (例えばSEQ ID NO:77) に機能的に連結されたCBAプロモーター (例えばSEQ ID NO:71) と、2A自己プロセシングペプチド (F2A) が続くフーリン切断配列と、ヒトIL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸 (例えばSEQ ID NO:8) と、ヒト成長ホルモン (HGH) pA配列 (例えばSEQ ID NO:88) とを含むポリヌクレオチドを含むウイルス送達ベクターに向けられる。いくつかの局面において、コンストラクトは、イントロン配列 (例えばCAGイントロン、例えばSEQ ID NO:86) およびコザック配列を、さらに含む。いくつかの局面において、コンストラクトは、CMVエンハンサー、CBAプロモーターおよびCAGイントロン (例えばSEQ ID NO:71) を含む。

【0318】

ある特定の局面において、本明細書において開示される、第1免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードするもしくは含む第1核酸および/または第2免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードするもしくは含む第2核酸を含むウイルス送達ベクターを含む組成物は、腫瘍内送達に適している。

【0319】

ある特定の局面において、本明細書において開示される、第1免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードするもしくは含む第1核酸および/または第2免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードするもしくは含む第2核酸を含むウイルス送達ベクターを含む組成物は、静脈内送達に適している。

【0320】

ある特定の局面において、本明細書において開示される、第1免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードするもしくは含む第1核酸および/または第2免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードするもしくは含む第2核酸を含むウイルス送達ベクターを含む組成物は、リンパ器官 (例えば脾臓、リンパ節、または骨髄) への送達に適している。

【0321】

いくつかの局面において、ウイルスベクターは、直接注射による固形腫瘍 (例えば肉腫、癌またはリンパ腫) への送達に適している。いくつかの局面において、固形腫瘍は表面病変である。いくつかの局面において、固形腫瘍は内臓腫瘍である。

【0322】

本開示のいくつかの局面において、本明細書において開示されるウイルスベクターは、チェックポイント阻害物質と組み合わせて投与することができる。

【0323】

IV. アデノ随伴ウイルス (AAV) 媒介遺伝子治療

デPENDウイルス (Dependovirus) 属に属するパルボウイルスであるAAVは、他のウイルスには見られない魅力的な特徴をいくつか有する。例えばAAVは非分裂細胞を含む幅広い宿主細胞に感染することができる。さらにまた、AAVはさまざまな種からの細胞に感染することができる。重要なことに、AAVは、どのヒト疾患または動物疾患とも関連づけられておらず、組み込まれても宿主細胞の生理学的性質を変えないようである。

最後に、AAVは幅広い物理的および化学的条件において安定であり、それが、生産、貯蔵および輸送要件に合致する。

【0324】

およそ4700ヌクレオチド（AAV-2ゲノムは4681ヌクレオチドからなる）を含有する直線状一本鎖DNA分子であるAAVゲノムは、一般に、各末端に末端逆位反復配列（ITR）が隣接している内側の非繰り返しセグメントを含む。ITRは、およそ145ヌクレオチド長であり（AAV-1は143ヌクレオチドのITRを有する）、複製起点として機能することおよびウイルスゲノムのパッケージングシグナルとして機能することなどといった、複数の機能を有する。

【0325】

ゲノムの内側の非繰り返し部分は、2つの大きなオープンリーディングフレーム（ORF）を含み、それらはAAVの複製（rep）領域およびカプシド（cap）領域として公知である。これらのORFは、それぞれ複製遺伝子産物およびカプシド遺伝子産物をコードし、複製遺伝子産物およびカプシド遺伝子産物（すなわちタンパク質）は、完全なAAVビリオンの複製、集合およびパッケージングを可能にする。より具体的には、AAV rep領域からは少なくとも4つのウイルスタンパク質のファミリー、すなわちRep78、Rep68、Rep52およびRep40が発現され、これらはいずれもそれぞれの見かけの分子量にちなんで命名されている。AAV cap領域は少なくとも3つのタンパク質、すなわちVP1、VP2およびVP3をコードしている。

【0326】

AAVは、ヘルパー依存性ウイルスであり、機能的に完全なAAVビリオンを形成させるには、ヘルパーウイルス（例えばアデノウイルス、ヘルペスウイルス、またはワクシニアウイルス）による共感染を必要とする。ヘルパーウイルスの共感染がない場合、AAVは潜伏状態を確立し、その状態では、ウイルスゲノムが宿主細胞染色体に挿入されるか、またはエピソーム型として存在するものの、感染性ビリオンが産生されることはない。ヘルパーウイルスによるその後の感染は、組み込まれたゲノムを「救出（rescue）」して、それが複製され、ウイルスカプシド中にパッケージングされることを可能にし、それによって感染性ビリオンを再構成する。AAVはさまざまな種からの細胞に感染することができるが、ヘルパーウイルスは宿主細胞と同じ種のもでなければならない。したがって例えばヒトAAVは、イヌアデノウイルスを共感染させたイヌ細胞中で複製するだろう。

【0327】

HNAを含有する組換えAAV（rAAV）ビリオンを産生させるには、HNAを含有するがrepおよびcapを欠くAAVベクターを、適切な宿主細胞株にトランスフェクトする。次に、その宿主細胞を野生型（wt）AAVおよび適切なヘルパーウイルスに感染させて、rAAVビリオンを形成させる。あるいは、wtAAV遺伝子（repおよびcapを含むヘルパー機能遺伝子として公知であるもの）およびヘルパーウイルス機能遺伝子（アクセサリー機能遺伝子として公知であるもの）を、1つまたは複数のプラスミドとして用意し、それによって、rAAVビリオンの産生におけるwtAAVおよびヘルパーウイルスの必要を排除することもできる。ヘルパー機能遺伝子産物とアクセサリー機能遺伝子産物は宿主細胞中で発現されて、異種遺伝子を含有するrAAVベクターに対してトランスに作用する。すると、あたかもwtAAVゲノムであるかのように、異種遺伝子が複製されパッケージングされて、組換えAAVビリオンが形成される。その結果生じたrAAVビリオンを使って患者の細胞に形質導入すると、HNAが侵入し、患者の細胞中で発現される。患者の細胞はrep遺伝子およびcap遺伝子ならびにアクセサリー機能遺伝子を欠くので、rAAVビリオンがそのゲノムをさらに複製し、パッケージすることはできない。さらにまた、rep遺伝子とcap遺伝子の供給源がないので、wtAAVビリオンが患者の細胞中で形成されうることもない。例えば米国特許出願公開第2003/0147853号を参照されたい。

【0328】

いくつかの局面において、本開示のAAVベクターは、任意の天然または組換えAAV血清を含むか、またはそれに由来することができる。本開示によれば、AAV血清型は、AA

10

20

30

40

50

V1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11およびAAV12であることができるが、それらに限定されない。いくつかの局面において、AAV血清型はAAV2である。

【0329】

本開示のある特定の局面は、本明細書において開示される、IL-12サブユニット（例えばIL-12 p35）もしくはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、および/またはIL-12サブユニット（例えばIL-12 p40）もしくはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含むポリヌクレオチドを含むAAV送達ベクターを含む組成物に向けられる。

【0330】

本開示のある特定の局面は、CMVエンハンサー（例えばSEQ ID NO:68）と、ヒトIL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸（例えばSEQ ID NO:77）に機能的に連結されたCBAプロモーター（例えばSEQ ID NO:85）と、2A自己プロセシングペプチド（F2A）が続くフーリン切断配列と、ヒトIL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸（例えばSEQ ID NO:8）と、ヒト成長ホルモン（HGH）pA配列（例えばSEQ ID NO:88）とを含むポリヌクレオチドを含むAAV送達ベクターを含む組成物に向けられる。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは、イントロン配列（例えばCAGイントロン、例えばSEQ ID NO:86）およびコザック配列を、さらに含む。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは、CMVエンハンサー、CBAプロモーターおよびCAGイントロン（例えばSEQ ID NO:71）を含む。

【0331】

ある特定の局面において、本明細書において開示される、第1免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードするもしくは含む第1核酸および/または第2免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードするもしくは含む第2核酸を含むAAV送達ベクターを含む組成物は、腫瘍内送達に適している。

【0332】

ある特定の局面において、本明細書において開示される、第1免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードするもしくは含む第1核酸および/または第2免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードするもしくは含む第2核酸を含むAAV送達ベクターを含む組成物は、静脈内送達に適している。

【0333】

ある特定の局面において、本明細書において開示される、第1免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードするもしくは含む第1核酸および/または第2免疫調節タンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードするもしくは含む第2核酸を含むAAV送達ベクターを含む組成物は、リンパ器官（例えば脾臓、リンパ節、または骨髄）への送達に適している。

【0334】

いくつかの局面において、サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメント（例えばIL-12、またはその1つもしくは複数のサブユニット）をコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含むAAV送達ベクターと、任意で、（b）チェックポイント阻害物質（例えばPD-1阻害物質）とを含む組成物は、腫瘍内送達に適している。

【0335】

いくつかの局面において、サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメント（例えばIL-12、またはその1つもしくは複数のサブユニット）をコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含むAAV送達ベクターと、任意で、（b）チェックポイント阻害物質（例えばPD-1阻害物質）とを含む組成物は、静脈内送達に適している。

【0336】

いくつかの局面において、サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、または

その機能的フラグメント（例えばIL-12、またはその1つもしくは複数のサブユニット）をコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含むAAV送達ベクターと、任意で、（b）チェックポイント阻害物質（例えばPD-1阻害物質）とを含む組成物は、リンパ器官（例えば脾臓、リンパ節、または骨髄）への送達に適している。

【0337】

いくつかの局面では、ウイルスベクターとチェックポイント阻害物質とが組み合わされて（例えば同時にまたは逐次的に）送達される。いくつかの局面において、本明細書記載のウイルスベクターは、チェックポイント阻害物質の投与前、投与と同時、または投与後に投与することができる。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは、（i）第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12 p35サブユニットまたはIL-12 p40サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、（ii）第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12 p35サブユニットまたはIL-12 p40サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含む。いくつかの局面において、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸は、インフレームの停止コドン（例えばTGA、TAG、およびTAA）を含まない。

【0338】

いくつかの局面において、AAV送達ベクターは、直接注射による固形腫瘍（例えば肉腫、癌またはリンパ腫）への送達に適している。いくつかの局面において、固形腫瘍は表面病変である。いくつかの局面において、固形腫瘍は内臓腫瘍である。

【0339】

IV.A. AAVベクター構成要素

IV.A.1. 末端逆位反復配列（ITR）

本開示のAAVベクターは、少なくとも1つのITR領域と、ペイロード領域、例えば1つまたは複数の免疫調節タンパク質（例えばIL-12またはその1つもしくは複数のサブユニット）またはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドとを持つウイルスゲノムを含む。いくつかの局面において、AAVベクターは2つのITRを含む。これら2つのITRはペイロード領域の5'端と3'端に隣接する。ITRは複製のための認識部位を含む複製起点として機能する。ITRは、相補的で対称的に配置されうる配列領域を含む。本開示のAAVベクターに組み入れられるITRは、天然のポリヌクレオチド配列または組換え法で得られたポリヌクレオチド配列で構成されうる。

【0340】

ITRは、本明細書において列挙する血清型のいずれかから選択されるカプシドと同じ血清型に由来するか、またはその誘導体であることができる。ITRはカプシドとは異なる血清型であることができる。いくつかの局面において、AAVベクターは2つ以上のITRを有する。非限定的な一例では、AAVベクターが2つのITRを含むウイルスゲノムを有する。いくつかの局面において、ITRは互いに同じ血清型である。いくつかの局面において、ITRは異なる血清型である。非限定的な例では、ITRのうち、0個、1個または両方が、カプシドと同じ血清型を有する。いくつかの局面では、AAVベクターの両方のITRがAAV2 ITRである。

【0341】

各ITRは、独立して、約75～約175ヌクレオチド長であることができる。ITRは、約100～105ヌクレオチド長、約106～110ヌクレオチド長、約111～115ヌクレオチド長、約116～120ヌクレオチド長、約121～125ヌクレオチド長、約126～130ヌクレオチド長、約131～135ヌクレオチド長、約136～140ヌクレオチド長、約141～145ヌクレオチド長または約146～150ヌクレオチド長である。いくつかの局面において、ITRは約140～142ヌクレオチド長である。ITRの長さの非限定的な例は、約102、約140、約141、約142、約145ヌクレオチド長、およびそれに対して少なくとも95%の同一性を有するものである。

【0342】

いくつかの局面において、AAVベクターは、例えば、限定するわけではないが、約75

10

20

30

40

50

～80、約75～85、約75～100、約80～85、約80～90、約80～105、約85～90、約85～95、約85～110、約90～95、約90～100、約90～115、約95～100、約95～105、約95～120、約100～105、約100～110、約100～125、約105～110、約105～115、約105～130、約110～115、約110～120、約110～135、約115～120、約115～125、約115～140、約120～125、約120～130、約120～145、約125～130、約125～135、約125～150、約130～135、約130～140、約130～155、約135～140、約135～145、約135～160、約140～145、約140～150、約140～165、約145～150、約145～155、約145～170、約150～155、約150～160、約150～175、約155～160、約155～165、約160～165、約160～170、約165～170、約165～175または約170～175ヌクレオチドの長さを有する、少なくとも1つの末端逆位反復配列を含む。

10

【0343】

いくつかの局面において、AAVベクター用の第1および/または第2 ITR領域の長さは、約75～80、約75～85、約75～100、約80～85、約80～90、約80～105、約85～90、約85～95、約85～110、約90～95、約90～100、約90～115、約95～100、約95～105、約95～120、約100～105、約100～110、約100～125、約105～110、約105～115、約105～130、約110～115、約110～120、約110～135、約115～120、約115～125、約115～140、約120～125、約120～130、約120～145、約125～130、約125～135、約125～150、約130～135、約130～140、約130～155、約135～140、約135～145、約135～160、約140～145、約140～150、約140～165、約145～150、約145～155、約145～170、約150～155、約150～160、約150～175、約155～160、約155～165、約160～165、約160～170、約165～170、約165～175および約170～175ヌクレオチドであることができる。

20

【0344】

いくつかの局面において、AAVベクターは、免疫調節タンパク質（例えばIL-12またはその1つもしくは複数のサブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする核酸を含み、それは、ベクター中のフリップ（flip）ITRの5'端近くに位置することができる。いくつかの局面において、AAVベクターは、本明細書において開示される免疫調節タンパク質（例えばIL-12またはその1つもしくは複数のサブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする核酸を含み、それは、ベクター中のフリップITRの3'端近くに位置することができる。いくつかの局面において、AAVベクターは、本明細書において開示される免疫調節タンパク質（例えばIL-12またはその1つもしくは複数のサブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする核酸配列を含み、それは、ベクター中のフロップ（flop）ITRの5'端近くに位置することができる。いくつかの局面において、AAVベクターは、本明細書において開示される免疫調節タンパク質（例えばIL-12またはその1つもしくは複数のサブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする核酸配列を含み、それは、ベクター中のフロップITRの3'端近くに位置することができる。いくつかの局面において、AAVベクターは、本明細書において開示される免疫調節タンパク質（例えばIL-12またはその1つもしくは複数のサブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする核酸配列を含み、それは、ベクター中のフリップITRの5'端とフロップITRの3'端の間に位置することができる。いくつかの局面において、AAVベクターは、本明細書において開示される免疫調節タンパク質（例えばIL-12またはその1つもしくは複数のサブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする核酸配列を含み、それは、ベクター中のフリップITRの3'端とフリップITRの5'端の間（例えばフリップITRの5'端とフロップITRの3'端の間、またはフロップITRの3'端とフリップITRの5'端の間）に位置することができる。

30

40

【0345】

いくつかの局面において、AAVベクターは、本明細書において開示される免疫調節タンパク質（例えばIL-12またはその1つもしくは複数のサブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする核酸配列を含み、それは、ベクター中のITR（例えばフリップ

50

ITRまたはフロップITR)の5'端または3'端の下流または上流、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30または約30ヌクレオチド超以内に位置することができる。

【0346】

もう一つの非限定的な例として、AAVベクターは、本明細書において開示される免疫調節タンパク質(例えばIL-12またはその1つもしくは複数のサブユニット)またはその機能的フラグメントをコードする核酸配列を含み、それは、ベクター中のITR(例えばフリップITRまたはフロップITR)の5'端または3'端の下流または上流、約1~5、約1~10、約1~15、約1~20、約1~25、約1~30、約5~10、約5~15、約5~20、約5~25、約5~30、約10~15、約10~20、約10~25、約10~30、約15~20、約15~25、約15~30、約20~25、約20~30または約25~30ヌクレオチド以内に位置することができる。

10

【0347】

いくつかの局面において、AAVベクターは、本明細書において開示される免疫調節タンパク質(例えばIL-12またはその1つもしくは複数のサブユニット)またはその機能的フラグメントをコードする核酸配列を含み、それは、ベクター中のITR(例えばフリップITRまたはフロップITR)の5'または3'端の上流にあるヌクレオチドの最初の約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約15%、約20%、約25%または約25%超以内に位置することができる。

20

【0348】

もう一つの非限定的な例として、AAVベクターは、本明細書において開示される免疫調節タンパク質(例えばIL-12またはその1つもしくは複数のサブユニット)またはその機能的フラグメントをコードする核酸配列を含み、それは、ベクター中のITR(例えばフリップITRまたはフロップITR)の5'端または3'端の下流、最初の約1~5%、約1~10%、約1~15%、約1~20%、約1~25%、約5~10%、約5~15%、約5~20%、約5~25%、約10~15%、約10~20%、約10~25%、約15~20%、約15~25%または約20~25%に位置することができる。

【0349】

本開示のある特定の局面は、本明細書において開示される、IL-12サブユニット(例えばIL-12 p35)もしくはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、および/またはIL-12サブユニット(例えばIL-12 p40)もしくはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含むポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含むAAVベクターに向けられ、前記ポリヌクレオチドはITR配列(例えばAAV2 ITR)をさらに含む。

30

【0350】

本開示のある特定の局面は、CMVエンハンサー(例えばSEQ ID NO:68)と、ヒトIL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸(例えばSEQ ID NO:77)に機能的に連結されたCBAプロモーター(例えばSEQ ID NO:85)と、2A自己プロセシングペプチド(F2A)が続くフューリン切断配列と、ヒトIL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸(例えばSEQ ID NO:8)と、ヒト成長ホルモン(HGH) pA配列(例えばSEQ ID NO:88)とを含むポリヌクレオチドを含むウイルス送達ベクターに向けられる。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは、イントロン配列(例えばCAGイントロン、例えばSEQ ID NO:86)、コザック配列、およびITR配列(例えばAAV2 ITR)を、さらに含む。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは、CMVエンハンサー、CBAプロモーターおよびCAGイントロン(例えばSEQ ID NO:71)を含む。

40

【0351】

IV.A.2. プロモーター

いくつかの局面において、AAVベクターのペイロード領域は、核酸の特異性および/または発現を増強するための要素を、少なくとも1つは含む。核酸の特異性および発現を増

50

強するための要素の非限定的な例には、例えばプロモーター、内在性miRNA、転写後制御要素（PRE）、ポリアデニル化（ポリA）シグナル配列、ならびに上流エンハンサー（USE）、CMVエンハンサーおよびイントロンなどがある。

【0352】

標的細胞への送達後または標的細胞のゲノムDNAへの組込み後の本開示の核酸の発現には、例えば限定するわけではないが、種特異的、誘導性、組織特異的または細胞周期特異的なプロモーターなどといった特異的なプロモーターが必要な場合がある（Parr et al., Nat. Med. 3:1145-9（1997）、この文献の内容は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。

【0353】

いくつかの局面において、プロモーターが、AAVベクターのペイロード領域に保持された本明細書において開示される免疫調節タンパク質（例えばIL-12またはその1つもしくは複数のサブユニット）またはその機能的フラグメントの発現を駆動する場合、そのプロモーターは有効であるとみなされる。いくつかの局面において、プロモーターが、標的とする細胞（例えば腫瘍細胞）における本開示の免疫調節タンパク質（例えばIL-12またはその1つもしくは複数のサブユニット）またはその機能的フラグメントの発現を駆動する場合、そのプロモーターは有効であるとみなされるプロモーターである。

【0354】

プロモーターは、天然または非天然であることができる。プロモーターの非限定的な例には、ウイルスプロモーターおよび哺乳動物プロモーターがある。いくつかの局面において、プロモーターはヒトプロモーターであることができる。いくつかの局面において、プロモーターは切断型であることができる。大半の組織において発現を駆動または促進するプロモーターには、ヒト伸長因子1 α -サブユニット（EF1 α ）、サイトメガロウイルス（CMV）前初期エンハンサーおよび/またはプロモーター、ニワトリ β -アクチン（CBA）およびその誘導体CAG、 β グロクロニダーゼ（GUSB）、またはユビキチンC（UBC）などがあるが、それらに限定されない。いくつかの局面において、プロモーターは、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1 α （伸長因子1 α ）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、ユビキチン（UbC）プロモーター、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの局面では、発現をある特定の細胞タイプに制限するために、組織特異的発現要素、例えば限定するわけではないが筋特異的なプロモーター、B細胞プロモーター、単球プロモーター、白血球プロモーター、マクロファージプロモーター、脾臓細胞プロモーター、内皮細胞プロモーター、肺組織プロモーター、アストロサイトプロモーター、または発現をニューロン、アストロサイトもしくはオリゴデンドロサイトに制限するために使用することができる神経系プロモーターなどを使用することができる。

【0355】

筋特異的なプロモーターの非限定的な例には、哺乳動物筋クレアチンキナーゼ（MCK）プロモーター、哺乳動物デスミン（DES）プロモーター、哺乳動物トロポニンI（TNNI2）プロモーターおよび哺乳動物骨格アルファ-アクチン（ASKA）プロモーターがある（例えば米国特許出願公開公報第20110212529号、この文献の内容は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。ニューロン用の組織特異的発現要素の非限定的な例には、ニューロン特異エノラーゼ（NSE）、血小板由来増殖因子（PDGF）、血小板由来増殖因子 β 鎖（PDGF- β ）、シナプシン（Syn）、メチル-CpG結合タンパク質2（MeCP2）、Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII（CaMKII）、代謝調節型グルタミン酸受容体2（mGluR2）、ニューロフィラメント軽鎖（NFL）またはニューロフィラメント重鎖（NFH）、 β -グロビンミニ遺伝子 $\eta\beta$ 2、プレプロエンケファリン（PPE）、エンケファリン（Enk）および興奮性アミノ酸輸送体2（EAAT2）プロモーターがある。アストロサイト用の組織特異的発現要素の非限定的な例には、グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）およびEAAT2プロモーターなどがある。オリゴデンドロサイト用の組織特異的発現要素の非限定的な例には、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）プロモ-

10

20

30

40

50

ターがある。いくつかの局面において、プロモーターはCAGプロモーターである。

【0356】

いくつかの局面において、プロモーターは1kb未満であることができる。いくつかの局面において、プロモーターは、約15~20、約10~50、約20~30、約30~40、約40~50、約50~60、約50~100、約60~70、約70~80、約80~90、約90~100、約100~110、約100~150、約110~120、約120~130、約130~140、約140~150、約150~160、約150~200、約160~170、約170~180、約180~190、約190~200、約200~210、約200~250、約210~220、約220~230、約230~240、約240~250、約250~260、約250~300、約260~270、約270~280、約280~290、約290~300、約200~300、約200~400、約200~500、約200~600、約200~700、約200~800、約300~400、約300~500、約300~600、約300~700、約300~800、約400~500、約400~600、約400~700、約400~800、約500~600、約500~700、約500~800、約600~700、約600~800または約700~800ヌクレオチドの長さを有することができる。

10

【0357】

いくつかの局面において、プロモーターは、同じまたは異なる出発プロモーターまたは親プロモーターの、例えば限定するわけではないが、CMVおよびCBAの、2つ以上の構成要素の組み合わせであることができる。いくつかの局面において、プロモーターは、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1a（伸長因子1a）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、ユビキチン（UbC）プロモーター、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの局面において、前記2つのプロモーターのうちの1つは、EF1 α プロモーターに融合されたCMVエンハンサーである。いくつかの局面において、前記2つのプロモーターのうちの1つは、SV40イントロンに融合されたCMVプロモーターである。いくつかの局面において、前記2つのプロモーターのうちの1つは、CMVプロモーターに融合されたCMVエンハンサーである。いくつかの局面において、前記2つのプロモーターのうちの1つは、SEQ ID NO:67~71または85のいずれか1つと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である核酸配列を有する。

20

【0358】

いくつかの局面において、プロモーター中の各構成要素は、約200~300、約200~400、約200~500、約200~600、約200~700、約200~800、約300~400、約300~500、約300~600、約300~700、約300~800、約400~500、約400~600、約400~700、約400~800、約500~600、約500~700、約500~800、約600~700、約600~800または約700~800ヌクレオチドの長さを有することができる。いくつかの局面において、プロモーターは、382ヌクレオチドのCMVエンハンサー配列と260ヌクレオチドのCBAプロモーター配列の組み合わせである。

30

【0359】

いくつかの局面において、プロモーターの組み合わせは、CMVエンハンサー、CBAプロモーターおよびCAGイントロン（例えばSEQ ID NO:71）を含む。

【0360】

いくつかの局面において、AAVベクターは遍在性プロモーターを含む。遍在性プロモーターの非限定的な例には、例えばCMV、CBA（誘導体CAG、CBhなどを含む）、EF-1a、PGK、UBC、GUSB（hGBp）およびUCOE（HNRPA2B1-CBX3のプロモーター）などがある。

40

【0361】

いくつかの局面において、プロモーターは細胞特異的でない。いくつかの局面において、プロモーターはユビキチンc（UBC）プロモーターである。UBCプロモーターは300~350ヌクレオチドのサイズを有することができる。いくつかの局面において、UBCプロモーターは332ヌクレオチドである。いくつかの局面において、プロモーターは β -グルクロニダーゼ（GUSB）プロモーターである。GUSBプロモーターは350~400ヌクレオ

50

チドのサイズを有することができる。いくつかの局面において、GUSBプロモーターは378ヌクレオチドである。いくつかの局面において、プロモーターはニューロフィラメント軽鎖（NFL）プロモーターである。NFLプロモーターは600～700ヌクレオチドのサイズを有することができる。いくつかの局面において、NFLプロモーターは650ヌクレオチドである。いくつかの局面において、コンストラクトは、AAV-プロモーター-CMV/グロビンイントロン-調節ポリヌクレオチド-RBGであることができ、ここで、AAVは自己相補的であることができ、AAVはDJ血清型であることができる。

【0362】

いくつかの局面において、AAVベクターはPol IIIプロモーターを含む。いくつかの局面において、AAVベクターはPIプロモーターを含む。いくつかの局面において、AAVベクターはFXNプロモーターを含む。いくつかの局面において、プロモーターはホスホグリセリン酸キナーゼ1（PGK）プロモーターである。いくつかの局面において、プロモーターはニワトリβ-アクチン（CBA）プロモーターである。いくつかの局面において、プロモーターはCAGプロモーターであり、これは、キメライントロンを持つニワトリベータ-アクチン（CBA）プロモーターに融合されたサイトメガロウイルス（CMV）エンハンサーを含むコンストラクトである。いくつかの局面において、プロモーターはサイトメガロウイルス（CMV）プロモーターである。いくつかの局面において、AAVベクターはH1プロモーターを含む。いくつかの局面において、AAVベクターはU6プロモーターを含む。いくつかの局面において、AAVベクターはSP6プロモーターを含む。

【0363】

いくつかの局面において、プロモーターは肝臓プロモーターまたは骨格筋プロモーターである。肝臓プロモーターの非限定的な例には、ヒトα-1-アンチトリプシン（hAAT）およびチロキシン結合グロブリン（TBG）がある。骨格筋プロモーターの非限定的な例には、デスミン、MCKまたは合成C5-12がある。いくつかの局面において、プロモーターはRNA pol IIIプロモーターである。いくつかの局面において、RNA pol IIIプロモーターはU6である。いくつかの局面において、RNA pol IIIプロモーターはH1である。いくつかの局面において、AAVベクターは2つのプロモーターを含む。いくつかの局面において、プロモーターはEF1αプロモーターおよびCMVプロモーターである。

【0364】

いくつかの局面において、AAVベクターは、エンハンサー要素、プロモーターおよび/または5'UTRイントロンを含む。本明細書において「エンハンサー」ともいうエンハンサー要素は、限定するわけではないが、CMVエンハンサーであることができ、プロモーターは、限定するわけではないが、CMV、CBA、UBC、GUSB、NSE、シナプシン、MeCP2、EF1α、およびGFAPプロモーターであることができ、5'UTR/イントロンは、限定するわけではないが、SV40、ベータグロビンイントロンと免疫グロブリン重鎖イントロンのキメラ、およびCBA-MVM（マウス微小ウイルス）であることができる。いくつかの局面において、組み合わせて使用されるエンハンサー、プロモーターおよび/またはイントロンは、（1）CMVエンハンサー、CMVプロモーター、SV40 5'UTRイントロン；（2）CMVエンハンサー、CBAプロモーター、SV40 5'UTRイントロン；（3）CMVエンハンサー、CBAプロモーター、CBA-MVM 5'UTRイントロン；（4）UBCプロモーター；（5）GUSBプロモーター；（6）NSEプロモーター；（7）シナプシンプロモーター；（8）MeCP2プロモーター；（9）GFAPプロモーター；（10）H1プロモーター；（11）U6プロモーター；（12）CMVエンハンサー、EF1αプロモーター；（13）CMVプロモーター、SV40イントロン；（14）CMVエンハンサー、CMVプロモーター；または（15）ヒトベータグロビンイントロンと免疫グロブリン重鎖イントロンのキメラ、CMVエンハンサー、EF1αプロモーター、CMVプロモーター、SV40イントロンであることができる。いくつかの局面において、AAVベクターは、CMV初期エンハンサー/ニワトリβ-アクチン（CAG）プロモーターを含む。いくつかの局面において、AAVベクターは操作されたプロモーターを含む。いくつかの局面において、AAVベクターは天然に発現するタンパク質からのプロモーターを含む。

【0365】

いくつかの局面において、コンストラクトは、2つ以上のプロモーター、例えば重鎖をコードする核酸のためのプロモーターおよび軽鎖をコードする核酸配列のためのプロモーターを含むことができる。いくつかの局面において、前記2つ以上のプロモーターは同じである。いくつかの局面において、コンストラクトは、第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12 p35サブユニットまたはIL-12 p40サブユニット）をコードする核酸のためのプロモーター、および第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12 p40サブユニットまたはIL-12 p35サブユニット）をコードする核酸配列のためのプロモーターを含むことができる。いくつかの局面において、前記2つ以上のプロモーターは同じである。いくつかの局面において、前記2つ以上のプロモーターは異なる。

10

【0366】

IV.A.3. 非翻訳領域（UTR）

遺伝子の野生型非翻訳領域（UTR）は、定義上、転写されるが、翻訳されない。一般に、5'UTRは転写開始部位で始まって開始コドンで終わり、3'UTRは停止コドンの直後から始まって転写終結シグナルまで続く。

【0367】

転写産物の安定性および生産を増強するために、特異的標的器官の大量発現遺伝子に典型的に見いだされる特徴を、UTR中に工作することができる。いくつかの局面において、肝臓中で通常発現するmRNA（例えばアルブミン、血清アミロイドA、アポリポタンパク質A/B/E、トランスフェリン、アルファフェトプロテイン、エリスロポエチンまたは第VIII因子）からの5'UTRを、脳組織、特に神経細胞における発現を増強するために、本開示のAAVベクターにおいて使用することができる。

20

【0368】

野生型5'非翻訳領域（UTR）は翻訳開始に関与する特徴を含む。リボソームが数多くの遺伝子の翻訳を開始するプロセスに関与することが一般に公知であるコザック配列は、通常は、5'UTRに含まれる。コザック配列はコンセンサスCCR（A/G）CCAUGG（SEQ ID NO:4）を有し、ここでRは、'Gがもう一つ続く開始コドン（ATG）の3塩基上流にあるプリン（アデニンまたはグアニン）である。いくつかの局面において、本開示のAAVベクター中の5'UTRはコザック配列を含む。いくつかの局面において、本開示のAAVベクター中の5'UTRは、コザック配列を含まない。

30

【0369】

野生型3'UTRにアデノシンとウリジンのストレッチが埋め込まれていることは公知である。これらのAUリッチシグネチャーは代謝回転率が高い遺伝子では、特に優勢である。AUリッチ要素（ARE）は、その配列特徴および機能的性質に基づいて、3つのクラスに分けることができる（Chen et al, 1995、この文献の内容は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。クラスI ARE、例えば限定するわけではないがc-MycおよびMyoDでは、Uリッチ領域内に数コピーのAUUUA（SEQ ID NO:32）モチーフが散在している。クラスII ARE、例えば限定するわけではないがGM-CSFおよびTNF- α は、2つ以上のオーバーラップしたUUAUUA（U/A）（U/A）（SEQ ID NO:33）ノナーを有する。クラスIII ARE、例えば限定するわけではないがc-Junおよびミオゲニンについては、あまり明確な定義がない。これらのUリッチ領域はAUUUAモチーフを含有しない。AREに結合する大半のタンパク質はメッセンジャーを不安定化することが公知であるが、ELAVファミリーのメンバー、最も注目すべきはHuRは、mRNAの安定性を増加させることが記録されている。HuRは上記3クラスすべてのAREに結合する。HuR特異的結合部位を核酸分子の3'UTR中に工作することは、HuR結合に、したがってインビボでのメッセージの安定化に、つながるだろう。

40

【0370】

ポリヌクレオチドの安定性を調節するために、3'UTR AUリッチ要素（ARE）の導入、除去または改変を使用することができる。特異的ポリヌクレオチド、例えばウイルスゲノムのペイロード領域を操作する時に、ポリヌクレオチドの安定性を低下させ、それによ

50

って翻訳を抑え、結果として生じるタンパク質の産生を減少させるために、1コピーまたは複数コピーのAREを導入することができる。また、細胞内安定性を増加させ、それによって翻訳とその結果生じるタンパク質の産生を増加させるために、AREを同定し、それを除去するか、または変異させることもできる。

【0371】

いくつかの局面において、本開示のAAVベクターの3'UTRは、ポリAテールを追加するためのオリゴ(dT)配列を含むことができる。いくつかの局面において、本開示のAAVベクターは、少なくとも1つのmiRNAシード、結合部位または完全配列を含むことができる。マイクロRNA(またはmiRNAもしくはmir)は、核酸標的的部位に結合して、核酸分子の安定性を低減することまたは翻訳を阻害することのいずれかによって遺伝子発現をダウンレギュレートする、19~25ヌクレオチドの非コードRNAである。マイクロRNA配列は、「シード」領域、すなわち成熟マイクロRNAの2~8番目の領域にある配列を含み、この配列は、核酸のmiRNA標的配列に対して、完全なワトソンクリック相補性を有する。

10

【0372】

いくつかの局面において、本開示のAAVベクターを操作して、少なくとも1つのmiRNA結合部位、配列またはシード領域を含め、改変し、または除去することができる。

【0373】

本開示のAAVベクターには、当技術分野において公知の任意の遺伝子からの任意のUTRを組み入れることができる。これらのUTRまたはその一部分は、それが選択された元の遺伝子における向きと同じ向きに置くことができ、あるいは向きまたは場所を変えることもできる。いくつかの局面において、本開示のAAVベクターにおいて使用されるUTRは、反転させ、短縮し、延長し、当技術分野において公知の1つまたは複数の他の5'UTRまたは3'UTRを使って作製することができる。UTRに関する場合、本明細書において使用される「改変された」という用語は、そのUTRにはリファレンス配列と比べて何らかの形で変化が加えられていることを意味する。例えば3'UTRまたは5'UTRは、野生型またはネイティブUTRと比較して、上で教示したように向きまたは場所の変化によって改変するか、または追加のヌクレオチドの組み入れ、ヌクレオチドの欠失、ヌクレオチドの交換または転置によって改変することができる。いくつかの局面において、本開示のAAVベクターは、野生型UTRのバリエーションではない少なくとも1つの人工的UTRを含む。いくつかの局面において、本開示のAAVベクターは、そのタンパク質が共通の機能、構造、特徴または性質を有する転写産物のファミリーから選択されたUTRを含む。

20

30

【0374】

IV.A.4. ポリアデニル化配列

いくつかの局面において、本開示のAAVベクターは、少なくとも1つのポリアデニル化配列を含む。本開示のAAVベクターは、ペイロードコード配列の3'端と3'ITRの5'端の間にポリアデニル化配列を含むことができる。

【0375】

いくつかの局面において、ポリアデニル化配列または「ポリA配列」は、存在しないか、または約500ヌクレオチド長までの範囲にわたることができる。

40

【0376】

いくつかの局面において、ポリアデニル化配列は、約50~100、約50~150、約50~160、約50~200、約60~100、約60~150、約60~160、約60~200、約70~100、約70~150、約70~160、約70~200、約80~100、約80~150、約80~160、約80~200、約90~100、約90~150、約90~160または約90~200ヌクレオチド長である。

【0377】

いくつかの局面において、AAVベクターは、本明細書において開示される免疫調節タンパク質(例えばIL-12またはその1つもしくは複数のサブユニット)またはその機能的フラグメントをコードする核酸配列を含み、それは、ベクター中のポリアデニル化配列の

50

上流に位置することができる。いくつかの局面において、AAVベクターは、本明細書において開示される免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントをコードする核酸配列を含み、それは、ベクター中のプロモーターの、例えば限定するわけではないが、CMV、U6、CAG、もしくはCBAプロモーター、またはSV40イントロン、MVMイントロンもしくはヒトベータグロビンイントロンを伴うCBAプロモーターの、下流に位置することができる。

【0378】

いくつかの局面において、本開示のAAVベクターは、本明細書において開示される免疫調節タンパク質（例えばIL-12またはその1つもしくは複数のサブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする核酸配列を含み、それは、ベクター中のプロモーターの下流および/またはポリアデニル化配列の上流、約1～5、約1～10、約1～15、約1～20、約1～25、約1～30、約5～10、約5～15、約5～20、約5～25、約5～30、約10～15、約10～20、約10～25、約10～30、約15～20、約15～25、約15～30、約20～25、約20～30または約25～30ヌクレオチド以内に位置することができる。

【0379】

いくつかの局面において、AAVベクターはウサギグロビンポリアデニル化（ポリA）シグナル配列を含む。いくつかの局面において、AAVベクターはヒト成長ホルモンポリアデニル化（ポリA）シグナル配列を含む。いくつかの局面において、AAVベクターはヒト成長ホルモンポリアデニル化（ポリA）（HGHpA）シグナル配列を含む。いくつかの局面において、HGHpAは、SEQ ID NO:88と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である核酸配列を有する。いくつかの局面において、AAVベクターはウシ成長ホルモンポリアデニル化（ポリA）（BGHpA）シグナル配列を含む。いくつかの局面において、BGHpAは、SEQ ID NO:73と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である核酸配列を有する。いくつかの局面において、AAVベクターは合成（SYN）ポリアデニル化（ポリA）（SYNpA）シグナル配列を含む。いくつかの局面において、SYNpAは、SEQ ID NO:72と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である核酸配列を有する。

【0380】

IV.A.5. イントロン

いくつかの局面において、本開示のAAVベクターのペイロード領域は、発現を増強するための少なくとも1つの要素、例えば1つまたは複数のイントロンまたはその一部分を含む。イントロンの非限定的な例には、MVM（67～97bp）、FIX切断型イントロン1（300bp）、 β -グロビンSD/免疫グロブリン重鎖スプライスアクセプター（250bp）、アデノウイルススプライスドナー/イムノグロビンスプライスドナー（500bp）、SV40後期スプライスドナー/スプライスアクセプター（19S/16S）（180bp）およびハイブリッドアデノウイルススプライスドナー/IgGスプライスアクセプター（230bp）がある。いくつかの局面において、キメライントロンは、ヒトベータグロビンイントロンとおヒトイムノグロビン重鎖イントロンのキメラであることができる。いくつかの局面において、イントロンは、SEQ ID NO:66および76のいずれかと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるヌクレオチド配列を有することができる。

【0381】

いくつかの局面において、イントロンまたはイントロン部分は、約100～約500ヌクレオチド長であることができる。いくつかの局面において、イントロンは、約80～100、約80～120、約80～140、約80～160、約80～180、約80～200、約80～250、約80～300、約80～350、約80～400、約80～450、約80～500、約200～300、約200～400、約200～500、約300～400、約300～500または約400～500ヌクレ

オチドの長さを有することができる。

【0382】

いくつかの局面において、AAVベクターは、プロモーター、例えば限定するわけではないが、CMV、CBAまたはU6を含むことができる。いくつかの局面において、本開示のAAVベクターのためのプロモーターはCMVプロモーターである。いくつかの局面において、本開示のAAVベクターのためのプロモーターはCBAプロモーターである。いくつかの局面において、AAVベクターは、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1a（伸長因子1a）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、ユビキチン（UbC）プロモーター、またはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。もう一つの非限定的な例として、本開示のAAVベクターのためのプロモーターはU6プロモーターである。いくつかの局面において、AAVベクターは、CMVおよびU6プロモーターを含むことができる。いくつかの局面において、AAVベクターはH1プロモーターを含むことができる。いくつかの局面において、AAVベクターはCBAプロモーターを含むことができる。いくつかの局面において、AAVベクターはキメライントロンを含むことができる。いくつかの局面において、本開示のAAVベクターは、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1a（伸長因子1a）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、ユビキチン（UbC）プロモーター、EF1 α プロモーターに融合されたCMVエンハンサー、SV40イントロンに融合されたCMVプロモーター、CMVプロモーターに融合されたCMVエンハンサー、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの局面において、プロモーターは、SEQ ID NO:67~71または85のいずれか1つと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるヌクレオチド配列を含む。

【0383】

いくつかの局面において、本明細書において開示されるコードされた免疫調節タンパク質（例えばIL-12またはその1つもしくは複数のサブユニット）またはその機能的フラグメントは、発現ベクター中のプロモーターの、例えば限定するわけではないが、SV40などのイントロンまたは当技術分野において公知の他のイントロンを伴うCMV、U6、HI、CBA、CAGまたはCBAプロモーターの、下流に位置することができる。さらにまた、本明細書において開示されるコードされた免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントは、発現ベクター中のポリアデニル化配列の上流にも位置することができる。いくつかの局面において、本明細書において開示されるコードされた免疫調節タンパク質（例えばIL-12またはその1つもしくは複数のサブユニット）またはその機能的フラグメントは、ベクター中のプロモーターの下流および/またはポリアデニル化配列の上流、約1~5、約1~10、約1~15、約1~20、約1~25、約1~30、約5~10、約5~15、約5~20、約5~25、約5~30、約10~15、約10~20、約10~25、約10~30、約15~20、約15~25、約15~30、約20~25、約20~30または約25~30ヌクレオチド以内に位置することができる。

【0384】

IV.A.6. フィラー配列（Filler Sequence）

いくつかの局面において、AAVベクターは、1つまたは複数のフィラー配列（「スタッファー配列（stuffer sequence）」ともいう）を含む。いくつかの局面において、AAVベクターは、AAVベクターの長さをパッケージングにとって最適なサイズにするために、1つまたは複数のフィラー配列を含む。いくつかの局面において、AAVベクターは、AAVベクターの長さを約2.0~2.5kb、例えば約2.3kbにするために、少なくとも1つのフィラー配列を含む。いくつかの局面において、AAVベクターは、AAVベクターの長さを約4.6kbにするために、少なくとも1つのフィラー配列を含む。いくつかの局面において、ベクターバックボーンはフィラー配列を含む。

【0385】

いくつかの局面において、AAVベクターは、ベクターゲノム（例えば本明細書記載の調節ポリヌクレオチド、例えばIL-12またはその1つもしくは複数のサブユニット）のヘ

アピン構造が、発現および/またはパッケージング中に末端逆位反復配列 (ITR) として読み取られうる可能性を低減させるために、1つまたは複数のフィラー配列を含む。いくつかの局面において、AAVベクターは、AAVベクターの長さを約2.0~2.5 kb、例えば約2.3 kbにするために、少なくとも1つのフィラー配列を含む。いくつかの局面において、AAVベクターは、AAVベクターの長さを約4.6 kbにするために、少なくとも1つのフィラー配列を含む。

【0386】

いくつかの局面において、AAVベクターは一本鎖 (ss) AAVベクターであり、約0.1 kb~約3.8 kb、例えば限定するわけではないが、約0.1 kb、約0.2 kb、約0.3 kb、約0.4 kb、約0.5 kb、約0.6 kb、約0.7 kb、約0.8 kb、約0.9 kb、約1 kb、約1.1 kb、約1.2 kb、約1.3 kb、約1.4 kb、約1.5 kb、約1.6 kb、約1.7 kb、約1.8 kb、約1.9 kb、約2 kb、約2.1 kb、約2.2 kb、約2.3 kb、約2.4 kb、約2.5 kb、約2.6 kb、約2.7 kb、約2.8 kb、約2.9 kb、約3 kb、約3.1 kb、約3.2 kb、約3.3 kb、約3.4 kb、約3.5 kb、約3.6 kb、約3.7 kbまたは約3.8 kbの長さを有する1つまたは複数のフィラー配列を含む。

10

【0387】

いくつかの局面において、AAVベクターは、自己相補的 (sc) AAVベクターであり、約0.1 kb~約1.5 kb、例えば限定するわけではないが、約0.1 kb、約0.2 kb、約0.3 kb、約0.4 kb、約0.5 kb、約0.6 kb、約0.7 kb、約0.8 kb、約0.9 kb、約1 kb、約1.1 kb、約1.2 kb、約1.3 kb、約1.4 kbまたは約1.5 kbの長さを有する1つまたは複数のフィラー配列を含む。

20

【0388】

いくつかの局面において、AAVベクターはフィラー配列の任意の部分を含む。ベクターは、例えば約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%または約99%のフィラー配列を含むことができる。

【0389】

いくつかの局面において、AAVベクターは一本鎖 (ss) AAVベクターであり、AAVベクターを約4.6 kbの長さにするために、1つまたは複数のフィラー配列を含む。いくつかの局面において、AAVベクターは少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列は5' ITR配列の3'側に位置する。いくつかの局面において、AAVベクターは少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列はプロモーター配列の5'側に位置する。いくつかの局面において、AAVベクターは少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列はポリアデニル化シグナル配列の3'側に位置する。いくつかの局面において、AAVベクターは少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列は3' ITR配列の5'側に位置する。いくつかの局面において、AAVベクターは少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列は2つのイントロン配列の間に位置する。いくつかの局面において、AAVベクターは少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列はイントロン配列内に位置する。いくつかの局面において、AAVベクターは2つのフィラー配列を含み、第1フィラー配列は5' ITR配列の3'側に位置し、第2フィラー配列はポリアデニル化シグナル配列の3'側に位置する。いくつかの局面において、AAVベクターは2つのフィラー配列を含み、第1フィラー配列はプロモーター配列の5'側に位置し、第2フィラー配列はポリアデニル化シグナル配列の3'側に位置する。いくつかの局面において、AAVベクターは2つのフィラー配列を含み、第1フィラー配列は5' ITR配列の3'側に位置し、第2フィラー配列は5' ITR配列の5'側に位置する。

30

40

【0390】

いくつかの局面において、AAVベクターは自己相補的 (sc) AAVベクターであり、AAVベクターを約2.3 kbの長さにするために、1つまたは複数のフィラー配列を含む。いくつかの局面において、AAVベクターは少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列は5' ITR配列の3'側に位置する。いくつかの局面において、AAVベクターは少なくと

50

も1つのフィラー配列を含み、フィラー配列はプロモーター配列の5'側に位置する。いくつかの局面において、AAVベクターは少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列はポリアデニル化シグナル配列の3'側に位置する。いくつかの局面において、AAVベクターは少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列は3' ITR配列の5'側に位置する。

【0391】

いくつかの局面において、AAVベクターは少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列は2つのイントロン配列の間に位置する。いくつかの局面において、AAVベクターは少なくとも1つのフィラー配列を含み、フィラー配列はイントロン配列内に位置する。いくつかの局面において、AAVベクターは2つのフィラー配列を含み、第1フィラー配列は5' ITR配列の3'側に位置し、第2フィラー配列はポリアデニル化シグナル配列の3'側に位置する。いくつかの局面において、AAVベクターは2つのフィラー配列を含み、第1フィラー配列はプロモーター配列の5'側に位置し、第2フィラー配列はポリアデニル化シグナル配列の3'側に位置する。いくつかの局面において、AAVベクターは2つのフィラー配列を含み、第1フィラー配列は5' ITR配列の3'側に位置し、第2フィラー配列は5' ITR配列の5'側に位置する。

【0392】

いくつかの局面において、AAVベクターは、AAVベクターの1つまたは複数の領域間に1つまたは複数のフィラー配列を含むことができる。いくつかの局面において、フィラー領域は、ある領域、例えば限定するわけではないが、ペイロード領域、ITR、プロモーター領域、イントロン領域、エンハンサー領域および/またはポリアデニル化シグナル配列領域の前に位置することができる。いくつかの局面において、フィラー領域は、ある領域、例えば限定するわけではないが、ペイロード領域、ITR、プロモーター領域、イントロン領域、エンハンサー領域および/またはポリアデニル化シグナル配列領域の後に位置することができる。いくつかの局面において、フィラー領域は、ある領域、例えば限定するわけではないが、ペイロード領域、ITR、プロモーター領域、イントロン領域、エンハンサー領域および/またはポリアデニル化シグナル配列領域の前および後に位置することができる。

【0393】

いくつかの局面において、AAVベクターは、AAVベクターの少なくとも1つの領域を二つに分岐させる1つまたは複数のフィラー配列を含むことができる。AAVベクターの二つに分岐した領域は、その領域の約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%または約99%を、フィラー配列領域の5'側に含むことができる。

【0394】

いくつかの局面において、フィラー配列は、少なくとも1つの領域を、その領域の約10%がフィラー配列の5'側に位置し、その領域の約90%がフィラー配列の3'側に位置するように、二つに分岐させることができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、少なくとも1つの領域を、その領域の約20%がフィラー配列の5'側に位置し、その領域の約80%がフィラー配列の3'側に位置するように、二つに分岐させることができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、少なくとも1つの領域を、その領域の約30%がフィラー配列の5'側に位置し、その領域の約70%がフィラー配列の3'側に位置するように、二つに分岐させることができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、少なくとも1つの領域を、その領域の約40%がフィラー配列の5'側に位置し、その領域の約60%がフィラー配列の3'側に位置するように、二つに分岐させることができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、少なくとも1つの領域を、その領域の約50%がフィラー配列の5'側に位置し、その領域の約50%がフィラー配列の3'側に位置するように、二つに分岐させることができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、少なくとも1つの領域を、その領域の約60%がフィラー配列の5'側に位置し、その領域の約40%が

フィラー配列の3'側に位置するように、二つに分岐させることができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、少なくとも1つの領域を、その領域の約70%がフィラー配列の5'側に位置し、その領域の約30%がフィラー配列の3'側に位置するように、二つに分岐させることができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、少なくとも1つの領域を、その領域の約80%がフィラー配列の5'側に位置し、その領域の約20%がフィラー配列の3'側に位置するように、二つに分岐させることができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、少なくとも1つの領域を、その領域の約90%がフィラー配列の5'側に位置し、その領域の約10%がフィラー配列の3'側に位置するように、二つに分岐させることができる。

【0395】

10

いくつかの局面において、AAVベクターは5'ITRの後にフィラー配列を含む。いくつかの局面において、AAVベクターはプロモーター領域の後にフィラー配列を含む。いくつかの局面において、AAVベクターはペイロード領域の後にフィラー配列を含む。いくつかの局面において、AAVベクターはイントロン領域の後にフィラー配列を含む。いくつかの局面において、AAVベクターはエンハンサー領域の後にフィラー配列を含む。いくつかの局面において、AAVベクターはポリアデニル化シグナル配列領域の後にフィラー配列を含む。いくつかの局面において、AAVベクターはプロモーター領域の前にフィラー配列を含む。いくつかの局面において、AAVベクターはペイロード領域の前にフィラー配列を含む。いくつかの局面において、AAVベクターはイントロン領域の前にフィラー配列を含む。

20

【0396】

いくつかの局面において、AAVベクターはエンハンサー領域の前にフィラー配列を含む。いくつかの局面において、AAVベクターはポリアデニル化シグナル配列領域の前にフィラー配列を含む。いくつかの局面において、AAVベクターは3'ITRの前にフィラー配列を含む。いくつかの局面において、フィラー配列は、2つの領域の間に、例えば限定するわけではないが、5'ITRとプロモーター領域の間に、位置することができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、2つの領域の間に、例えば限定するわけではないが、5'ITRとペイロード領域の間に、位置することができる。

【0397】

いくつかの局面において、フィラー配列は、2つの領域の間に、例えば限定するわけではないが、5'ITRとイントロン領域の間に、位置することができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、2つの領域の間に、例えば限定するわけではないが、5'ITRとエンハンサー領域の間に、位置することができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、2つの領域の間に、例えば限定するわけではないが、5'ITRとポリアデニル化シグナル配列領域の間に、位置することができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、2つの領域の間に、例えば限定するわけではないが、プロモーター領域とペイロード領域の間に、位置することができる。

30

【0398】

いくつかの局面において、フィラー配列は、2つの領域の間に、例えば限定するわけではないが、プロモーター領域とイントロン領域の間に、位置することができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、2つの領域の間に、例えば限定するわけではないが、プロモーター領域とエンハンサー領域の間に、位置することができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、2つの領域の間に、例えば限定するわけではないが、プロモーター領域とポリアデニル化シグナル配列領域の間に、位置することができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、2つの領域の間に、例えば限定するわけではないが、プロモーター領域と3'ITRの間に、位置することができる。

40

【0399】

いくつかの局面において、フィラー配列は、2つの領域の間に、例えば限定するわけではないが、ペイロード領域とイントロン領域の間に、位置することができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、2つの領域の間に、例えば限定するわけではないが、ペ

50

イロード領域とエンハンサー領域の間に、位置することができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、2つの領域の間に、例えば限定するわけではないが、ペイロード領域とポリアデニル化シグナル配列領域の間に、位置することができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、2つの領域の間に、例えば限定するわけではないが、ペイロード領域と3' ITRの間に、位置することができる。

【0400】

いくつかの局面において、フィラー配列は、2つの領域の間に、例えば限定するわけではないが、イントロン領域とエンハンサー領域の間に、位置することができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、2つの領域の間に、例えば限定するわけではないが、イントロン領域とポリアデニル化シグナル配列領域の間に、位置することができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、2つの領域の間に、例えば限定するわけではないが、イントロン領域と3' ITRの間に、位置することができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、2つの領域の間に、例えば限定するわけではないが、エンハンサー領域とポリアデニル化シグナル配列領域の間に、位置することができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、2つの領域の間に、例えば限定するわけではないが、エンハンサー領域と3' ITRの間に、位置することができる。いくつかの局面において、フィラー配列は、2つの領域の間に、例えば限定するわけではないが、ポリアデニル化シグナル配列領域と3' ITRの間に、位置することができる。

10

【0401】

いくつかの局面において、AAVベクターは2つのフィラー配列を含むことができる。2つのフィラー配列は、本明細書記載の2つの領域間に位置することができる。

20

【0402】

IV.A.7. 組換えAAVを産生させるための方法

本開示は、ウイルス複製細胞におけるウイルスゲノム複製によってAAV粒子を生成させるための方法であって、ウイルス複製細胞をAAVポリヌクレオチドまたはAAVゲノム（例えば本開示のAAVベクター）と接触させる工程を含む該方法も提供する。本開示において、本明細書において開示されるAAVベクター、例えば本明細書において開示される免疫調節タンパク質（例えばIL-12またはその1つもしくは複数のサブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを含むAAVベクターは、AAVペイロードコンストラクトベクターとみなされる。

30

【0403】

いくつかの局面において、AAV粒子は、

(1) コンピテント細菌細胞に、バクミドベクターと、ウイルスコンストラクトベクターおよび/またはAAVペイロードコンストラクトベクターのいずれかとを、共トランスフェクトする工程、

(2) 結果として生じたウイルスコンストラクト発現ベクターおよびAAVペイロードコンストラクト発現ベクターを単離し、個別にウイルス複製細胞にトランスフェクトする工程、

(3) 結果として生じた、ウイルスコンストラクト発現ベクターまたはAAVペイロードコンストラクト発現ベクターを含む、ペイロードおよびウイルスコンストラクト粒子を、単離、精製する工程、

40

(4) ウイルス複製細胞を、ウイルスコンストラクト発現ベクターまたはAAVペイロードコンストラクト発現ベクターを含むAAVペイロードおよびウイルスコンストラクト粒子の両方に共感染させる工程、および

(5) パルボウイルスゲノムを含むウイルス粒子を収集し精製する工程を含む方法によって産生される。

【0404】

一局面において、本開示は、AAV粒子を産生させるための方法であって、(1) 哺乳動物細胞に、例えば限定するわけではないが、HEK293細胞に、ペイロード領域（例えば本開示の免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチ

50

ド)、rep遺伝子およびcap遺伝子を発現させるコンストラクト、ならびにヘルパーコンストラクトを同時に共トランスフェクトする工程、および(2) ウイルスゲノムを含むAAV粒子を収集し、精製する工程を含む、該方法を提供する。

【0405】

いくつかの局面において、AAV粒子は、昆虫細胞を含むウイルス複製細胞において産生させることができる。培養下の昆虫細胞のための成長条件および培養下の昆虫細胞における異種産物の産生は、当技術分野において周知である。例えば米国特許第6,204,059号を参照されたい。

【0406】

ウイルス複製細胞は、原核(例えば細菌)細胞および真核細胞、例えば昆虫細胞、酵母細胞および哺乳動物細胞を含む任意の生物から選択することができる。ウイルス複製細胞は、A549、WEH1、3T3、10T1/2、BHK、MDCK、COS1、COS7、BSC1、BSC40、BMT10、VERO、W138、HeLa、HEK293、Saos、C2C12、L細胞、HT1080、HepG2などの哺乳動物細胞、ならびに哺乳動物由来の初代線維芽細胞、肝細胞および筋芽細胞を含むことができる。ウイルス複製細胞は、限定するわけではないがヒト、サル、マウス、ラット、ウサギおよびハムスターを含む哺乳動物種由来の細胞、または限定するわけではないが線維芽細胞、肝細胞、腫瘍細胞、細胞株形質転換細胞などを含む細胞タイプを含む。

【0407】

本明細書において開示されるウイルス産生では、本明細書において開示される免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントなどのペイロードをコードするポリヌクレオチド配列を含むペイロード、例えば組換えウイルスコンストラクトを送達するために標的細胞と接触する、AAV粒子を産生させるためのプロセスおよび方法を述べる。

【0408】

いくつかの局面では、AAV粒子を、哺乳動物細胞を含むウイルス複製細胞において産生させることができる。組換えAAV粒子の産生によく使用されるウイルス複製細胞には、293細胞、COS細胞、HeLa細胞およびKB細胞などがあるが、それらに限定されない。

【0409】

いくつかの局面において、AAV粒子は、3つすべてのVPタンパク質が1:1:10(VP1:VP2:VP3)に近い化学量論で発現される哺乳動物細胞において産生される。このコントロールされた発現レベルを可能にする制御機序には、ディファレンシャルスプライシングによって産生される2つのmRNA、一方がVP1のmRNAであり、他方がVP2およびVP3のmRNAであるものの産生が含まれる。

【0410】

いくつかの局面において、AAV粒子は、ペイロードコンストラクト、パルボウイルスRepおよびパルボウイルスCap、ならびにヘルパーコンストラクトが、3つの異なるコンストラクト内に含まれる、三重トランスフェクション法を使って、哺乳動物細胞において産生される。AAV粒子産生の3つの構成要素の三重トランスフェクション法は、形質導入効率、標的組織(指向性)評価および安定性を含むアッセイ用に、小ロットのウイルスを産生させるためにも利用することができる。

【0411】

いくつかの局面において、ウイルスコンストラクトベクターおよびAAVペイロードコンストラクトベクターは、それぞれ、当業者が実施する公知の標準的分子生物学技法により、バキュロウイルスプラスミドとしても公知のバクミド中に、トランスポゾン/アクセプター系によって組み込まれうる。別々のウイルス産生細胞集団のトランスフェクションにより、2つのバキュロウイルス、すなわちウイルスコンストラクト発現ベクターを含むものと、AAVペイロードコンストラクト発現ベクターを含むもう一つとが、産生される。AAV粒子産生のために、これら2つのバキュロウイルスを使って、単一のウイルス産生細胞集団を感染させることができる。

【0412】

10

20

30

40

50

昆虫細胞、例えば限定するわけではないがヨトウガ (*Spodoptera frugiperda*) (Sf9) 細胞において、ウイルス粒子を産生させるためのバキュロウイルス発現ベクターは、高力価のウイルス粒子産物を与える。ウイルスコンストラクト発現ベクターおよびAAVペイロードコンストラクト発現ベクターをコードする組換えバキュロウイルスは、ウイルス複製細胞の増殖性感染を開始する。一次感染から放出された感染性バキュロウイルス粒子は、培養中のさらなる細胞に二次感染し、初期感染多重度 (MOI) の関数である数回の感染サイクルで、細胞培養集団全体を指数的に感染する。例えばUrabe, M. et al., J Virol. 2006 Feb; 80 (4) :1874-85を参照されたい。この文献の内容は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0413】

10

昆虫細胞系におけるバキュロウイルスを使ったAAV粒子の産生は、バキュロウイルスの公知の遺伝的および物理的不安定性に対処することができる。バキュロウイルスに感染したウイルス産生細胞は、アリコートに分けて収集され、それらは液体窒素中で凍結保存することができる。これらのアリコートは、大規模ウイルス産生細胞培養を感染させるための生存能および感染性を保つ (Wasilko DJ et al., Protein Expr Purif. 2009 Jun; 65 (2) :122-32)。

【0414】

いくつかの局面において、バキュロウイルス感染を許容する安定なウイルス複製細胞は、AAV複製とウイルス粒子産生に必要な要素、例えば限定するわけではないが、全AAVゲノム、Rep遺伝子とCap遺伝子、Rep遺伝子、Cap遺伝子、個別の転写カセットとしての各Repタンパク質、個別の転写カセットとしての各VPタンパク質、AAP (アセンブリ活性化タンパク質)、またはネイティブプロモーターもしくは非ネイティブプロモーターを持つバキュロウイルスヘルパー遺伝子のうちの少なくとも1つなどのいずれかが、少なくとも1コピーは安定に組み込まれるように操作される。

20

【0415】

いくつかの局面において、AAV粒子産生には、産生のスケールを増大させるための改変を加えることができる。大スケール培養フォーマットでの複製細胞のトランスフェクションは、当技術分野において公知の任意の方法に従って実行することができる。

【0416】

いくつかの局面において、細胞培養バイオリアクターは、大スケールウイルス産生に使用することができる。

30

【0417】

場合により、バイオリアクターは攪拌タンクリアクターを含む。

【0418】

IV.A.8. 細胞溶解

本開示の細胞は、限定するわけではないが、ウイルス産生細胞を含めて、当技術分野において公知の任意の方法による細胞溶解に付すことができる。細胞溶解は、本開示の任意の細胞内に存在する1つまたは複数の作用物質 (例えばウイルス粒子) を得るために、実行することができる。

【0419】

40

細胞溶解法は化学的または機械的であることができる。化学的細胞溶解は、典型的には、1つまたは複数の細胞を1つまたは複数の溶解作用物質と接触させる工程を含む。機械的溶解は、典型的には、1つまたは複数の細胞を1つもしくは複数の溶解条件および/または1つもしくは複数の溶解力にさらす工程を含む。いくつかの局面では、細胞を溶解するために化学的溶解を使用することができる。本明細書において使用される「溶解作用物質」という用語は、細胞の崩壊を助けることができる任意の作用物質を指す。場合により、溶解作用物質は、溶解溶液または溶解緩衝液と呼ばれる溶液として導入される。本明細書において使用される「溶解溶液」という用語は、1つまたは複数の溶解作用物質を含む溶液 (典型的には水溶液) を指す。溶解溶液は、溶解作用物質の他にも、1つまたは複数の緩衝剤、可溶化剤、界面活性剤、保存剤、凍結保護物質、酵素、酵素阻害物質および/ま

50

たはキレート剤を含むことができる。

【0420】

塩の濃度は、細胞膜の破裂にとって有効な濃度になるように増減することができる。洗浄剤 (detergent) を含む溶解作用物質は、イオン性洗浄剤または非イオン性洗浄剤を含むことができる。洗浄剤は、細胞構造、例えば限定するわけではないが細胞膜、細胞壁、脂質、炭水化物、リポタンパク質および糖タンパク質を、バラバラにし、または溶解するように機能することができる。

【0421】

いくつかの局面では、機械的細胞溶解が実行される。機械的細胞溶解は、1つもしくは複数の溶解条件および/または1つもしくは複数の溶解力の使用を含むことができる。本明細書において使用される「溶解条件」という用語は、細胞の崩壊を促進する状態または状況を指す。溶解条件には、ある特定の温度、圧力、浸透純度 (osmotic purity)、塩分などが含まれる。いくつかの局面において、溶解条件には温度の増減が含まれる。いくつかの局面において、溶解条件には、細胞の崩壊を促進するための温度変化が含まれる。そのような局面に従って実行される細胞溶解には凍結乾燥溶解が含まれる。

【0422】

本明細書において使用される「溶解力」という用語は、細胞を崩壊させるために使用することができる物理的動作を指す。溶解力には、機械力、重力、光学力、電気力などが含まれるが、それらに限定されない。機械力によって実行される細胞溶解を本明細書では「機械的溶解」という。機械的溶解法に従って使用することができる機械力には、高流体せん断力 (high shear fluid force) が含まれる。

【0423】

いくつかの局面では、効率の良いスケーラブルなAAV粒子産生のために、溶解を伴わずにAAV粒子を収集するための方法を使用することができる。非限定的な例において、AAV粒子は、米国特許出願公開第20090275107号に記載されているように、細胞培養中で、ヘパリン結合部位を欠くAAV粒子を培養し、それによってAAV粒子が上清中にできることを可能にし、培養から上清を収集し、上清からAAV粒子を単離することによって、産生される。

【0424】

IV.A.9. AAV精製

ウイルス粒子を含む細胞溶解物は、清澄化 (clarification) に付すことができる。清澄化とは、細胞溶解物からウイルス粒子を精製する際に取りられる最初の工程を指す。清澄化は、大きな不溶性デブリを除去することによって、さらなる精製のための溶解物を調製するのに役立つ。清澄化工程は、限定するわけではないが、遠心分離および濾過を含む。

【0425】

いくつかの局面において、AAV粒子は、清澄化された細胞溶解物から、1つまたは複数のクロマトグラフィー法によって精製される。クロマトグラフィーとは、1つまたは複数の要素を混合物から分離するための、当技術分野において公知の多くの方法を指す。そのような方法には、イオン交換クロマトグラフィー (例えばカチオン交換クロマトグラフィーおよびアニオン交換クロマトグラフィー)、イムノアフィニティクロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーが含まれるが、それらに限定されない。

【0426】

V. 処置および使用の方法

本開示のいくつかの局面は、免疫調節タンパク質 (例えば2つ以上の免疫調節タンパク質 (例えばサイトカイン)、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメント) を腫瘍に送達する方法であって、本開示のポリヌクレオチド、AAVカプシド (例えばAAV粒子)、または組成物 (例えば遺伝子治療組成物) を、その必要がある対象に投与する工程を含む、該方法に向けられる。いくつかの局面において、本開示の方法は、マルチシストロニック (例えばビシストロニック) コンストラクト (例えば複数のサ

イトカイン（例えばIL-12）サブユニットをコードする核酸を含むもの）の送達を含む。いくつかの局面において、本開示の方法は、チェックポイント阻害物質（例えばPD-1阻害物質）を投与する工程をさらに含む。

【0427】

いくつかの局面において、2つ以上の免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントを送達する方法は、（i）第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、（ii）第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための、1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）を含む組成物の直接注射によって、腫瘍に投与する工程を含む。

10

【0428】

いくつかの局面において、免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン、またはその1つもしくは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメント）を送達する方法は、（i）第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12 p35サブユニットまたはIL-12 p40サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と（ii）第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12 p40サブユニットまたはIL-12 p35サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを送達するための送達ベクター（例えばウイルスベクター）を含む組成物の直接注射によって、腫瘍に投与する工程を含む。いくつかの局面において、第1核酸（例えばIL-12 p35サブユニットをコードする核酸）はインフレームの停止コドン（例えばTGA、TAG、およびTAA）を含まない。

20

【0429】

いくつかの局面において、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸は、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、またはSEQ ID NO:77と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む。いくつかの局面において、IL-12 p40サブユニットをコードする核酸は、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、またはSEQ ID NO:92と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む。いくつかの局面において、送達ベクター（例えばAAVベクター）は、（i）SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7またはSEQ ID NO:77と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸と、（ii）SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10またはSEQ ID NO:92と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む、IL-12 p40サブユニットをコードする核酸とを含むポリヌクレオチドを含む。

30

【0430】

本開示のある特定の局面は、

（a）（i）プロモーターと、（ii）第1のインターロイキン-12（IL-12）サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、（iii）翻訳修飾配列と、（iv）第2のIL-12サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチドを含むアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを含む第1組成物、および

40

（b）チェックポイント阻害物質を含む第2組成物を含む併用療法に向けられる。

【0431】

いくつかの局面において、AAVベクターはAAV血清型2（AAV2）ベクターである。

【0432】

いくつかの局面において、翻訳修飾配列は、フューリン切断配列、2A自己プロセシン

50

グペプチド配列、配列内リボソーム進入部位 (IRES) 配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの局面において、翻訳修飾配列は、フーリン切断配列および 2A 自己プロセシングペプチド配列 (F2A) を含む。

【0433】

いくつかの局面において、プロモーターは、CAGプロモーター、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1a (伸長因子1a) プロモーター、RSV (ラウス肉腫ウイルス) プロモーター、ユビキチン (UbC) プロモーター、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0434】

いくつかの局面において、ポリヌクレオチドはポリ (A) (pA) 配列をさらに含む。

【0435】

いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは2つの末端逆位反復配列 (ITR) 配列をさらに含む。

【0436】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、プログラム細胞死タンパク質 1 (PD-1)、プログラム死リガンド 1 (PD-L1)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質 4 (CTLA-4)、リンパ球活性化遺伝子 3 (LAG-3)、T細胞免疫グロブリンムチン含有タンパク質 3 (TIM-3)、BおよびTリンパ球アテニュエーター (BTLA)、IgおよびITIMドメインを持つT細胞免疫受容体 (TIGIT)、T細胞活性化のVドメインIgサブレッサー (VISTA)、アデノシンA2a受容体 (A2aR)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR)、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO)、CD20、CD39、CD73、誘導性T細胞共刺激分子 (ICOS)、B7-H3の阻害物質、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0437】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質はプログラム細胞死タンパク質 1 (PD-1) 阻害物質 (例えば抗PD-1抗体) を含む。いくつかの局面において、抗PD-1抗体はペンブロリズマブまたはニボルマブである。

【0438】

いくつかの局面において、第1のインターロイキン-12 (IL-12) サブユニットは、SEQ ID NO:80に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、第2のIL-12サブユニットは、SEQ ID NO:81に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0439】

いくつかの局面において、第1核酸は、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、またはSEQ ID NO:77に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列を含み、第2核酸は、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、またはSEQ ID NO:92に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列を含む。

【0440】

いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:82に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列を含む。

【0441】

いくつかの局面において、第1組成物は腫瘍内送達に適し、第2組成物は静脈内送達に適する。

【0442】

本開示のある特定の局面は、腫瘍に罹患している対象を処置する方法であって、本明細書において開示される併用療法を該対象に施す工程を含む該方法に向けられる。いくつか

10

20

30

40

50

の局面において、第1組成物は腫瘍内に投与される。いくつかの局面において、第1組成物は腫瘍の複数部位に投与される。いくつかの局面において、第1組成物は、第2組成物の投与前、投与と同時、または投与後に投与される。

【0443】

いくつかの局面において、腫瘍は、皮膚がん、乳がん、脳のがん、骨がん、頭頸部がん、唾液腺がん、婦人科がん、泌尿器がん、胃腸がん、眼がん、胸部がん、血液がん、内分泌系のがん、軟部組織の肉腫、中枢神経系の新生物、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるがんに由来する。

【0444】

いくつかの局面において、腫瘍は、肝細胞癌、結腸癌および黒色腫からなる群より選択されるがんに由来する。 10

【0445】

本開示のある特定の局面は、(i) 第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12 p35サブユニットまたはIL-12 p40サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と(ii) 第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12 p40サブユニットまたはIL-12 p35サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを送達するための送達ベクター（例えばウイルスベクター）を含む組成物を投与する工程を含む、使用の方法に向けられる。いくつかの局面において、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸は、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、またはSEQ ID NO:77と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む。いくつかの局面において、IL-12 p40サブユニットをコードする核酸は、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、またはSEQ ID NO:92と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む。 20

【0446】

本開示のある特定の局面は、(i) SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7またはSEQ ID NO:77と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸、および/または(ii) SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10またはSEQ ID NO:92と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む、IL-12 p40サブユニットをコードする核酸とを含むポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを投与する工程を含む、使用の方法に向けられる。 30

【0447】

本開示のある特定の局面は、

(a) CMVエンハンサーと、IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結されたCBAプロモーターまたはそのフラグメントと、2A自己プロセシングペプチド(F2A)が続くフューリン切断配列と、IL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸と、ヒト成長ホルモン(HGH) pA配列とを含むポリヌクレオチド、および 40

(b) ウイルスベクター（例えばAAVカプシド）

を含む組成物を投与する工程を含む、使用の方法に向けられる。いくつかの局面において、ポリヌクレオチドは、イントロン（例えばCAGイントロン）、コザック配列および/またはITR配列を、さらに含む。

【0448】

本開示のある特定の局面は、治療または予防における使用のための、本開示の組成物、ポリヌクレオチド、AAVカプシドまたは発現コンストラクトに向けられる。

【0449】

本開示のある特定の局面は、遺伝子治療における使用のための、組成物、ポリヌクレオ 50

チド、AAVカプシドまたは発現コンストラクトに向けられる。

【0450】

本開示のある特定の局面は、がん治療における使用のための、組成物、ポリヌクレオチド、AAVカプシドまたは発現コンストラクトに向けられる。

【0451】

本開示のある特定の局面は、本開示において規定される方法における使用のための、組成物、ポリヌクレオチド、AAVカプシドまたは発現コンストラクトに向けられる。

【0452】

治療または予防における使用のための医薬の製造のための、本開示の組成物、ポリヌクレオチド、AAVカプシドまたは発現コンストラクトの使用。ある特定の局面において、治療または予防は本明細書に規定される方法を含む。

【0453】

本開示のある特定の局面は、治療または予防における使用のための複数の組成物に向けられる。

【0454】

本開示のある特定の局面は、遺伝子治療における使用のための複数の組成物に向けられる。

【0455】

本開示のある特定の局面は、がん治療における使用のための複数の組成物に向けられる。

【0456】

いくつかの局面において、前記複数の組成物は、サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメント（例えばIL-12、またはその1つもしくは複数のサブユニット）をコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含むAAV送達ベクターと、（b）チェックポイント阻害物質（例えばPD-1阻害物質）とを含む組成物を含む。

【0457】

本開示の組成物、ポリヌクレオチド、AAVカプシドおよび発現コンストラクトは、実証済の動物モデルにおいて検証することができ、結果として得られるデータは、ヒト対象における使用のための、ヒトバージョンの組成物、ポリヌクレオチド、AAVカプシドおよび発現コンストラクトを与えるだろう。

【0458】

いくつかの局面において、各送達ベクター（例えばウイルスベクター）は、第1核酸（例えば第1サイトカインサブユニットをコードするもの）と第2核酸（例えば第2サイトカインサブユニットをコードするもの）とを含むポリヌクレオチドを含む。いくつかの局面において、各送達ベクター（例えばウイルスベクター）は、第1核酸または第2核酸のどちらか一方を含み、この場合は、2つ以上の送達ベクターが組み合わされて（例えば同時にまたは逐次的に）送達される。

【0459】

いくつかの局面において、2つ以上の免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）またはその機能的フラグメントを送達する方法は、（a）第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および（b）送達ベクター（例えばウイルスベクター）を含む組成物の直接注射によって、腫瘍に投与する工程を含む。

【0460】

いくつかの局面において、2つ以上の免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）またはその機能的フラグメントを送達する方法は、（a）第1サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と（b）第2サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチドを含む組成物の直接注射によって、腫瘍に投与

10

20

30

40

50

する工程を含む。

【0461】

いくつかの局面において、免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）またはその機能的フラグメントを送達する方法は、（a）第1サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と（b）第2サイトカインサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチドを含む組成物の直接注射によって腫瘍に投与する工程を含む。

【0462】

いくつかの局面において、2つ以上の免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）またはその機能的フラグメントを送達する方法は、第1免疫調節タンパク質（例えば第1サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結された第1プロモーターと第2免疫調節タンパク質（例えば第2サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸に機能的に連結された第2プロモーターとを含む送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）の直接注射によって腫瘍に投与する工程を含む。

【0463】

いくつかの局面において、サイトカインまたはその機能的フラグメントを送達する方法は、第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結されたプロモーターと第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸に連結された翻訳修飾配列（例えばF2A）とを含む発現コンストラクトを含む送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）の直接注射によって腫瘍に投与する工程を含む。いくつかの局面において、翻訳修飾配列は、2A自己プロセシングペプチド（例えばF2Aペプチド、P2Aペプチド、E2Aペプチド、またはT2Aペプチド）、フューリン切断配列、配列内リボソーム進入部位（IRES）配列、またはそれらの任意の組み合わせから選択される。いくつかの局面において、発現コンストラクトはポリAをさらに含むことができる。

【0464】

本開示のいくつかの局面は、1つまたは複数の免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントを、その必要のある対象において発現させる方法であって、本開示のポリヌクレオチド、AAVカプシド、または組成物（例えば遺伝子治療組成物）を、その必要のある対象に投与する工程を含む、該方法に向けられる。

【0465】

いくつかの局面において、2つ以上の免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）またはその機能的フラグメントを、その必要のある対象において発現させる方法は、（i）第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、（ii）第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）を含む組成物の直接注射によって、腫瘍に投与する工程を含む。いくつかの局面において、各送達ベクター（例えばウイルスベクター）は、第1核酸と第2核酸とを含むポリヌクレオチドを含む。いくつかの局面において、各送達ベクター（例えばウイルスベクター）は、第1核酸または第2核酸のどちらか一方を含み、この場合は、2つ以上の送達ベクターが組み合わせられて（例えば同時にまたは逐次的に）送達される。

【0466】

いくつかの局面において、1つまたは複数の免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン

）またはその機能的フラグメントを、その必要のある対象において発現させる方法は、第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結されたプロモーターと第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸に連結された翻訳修飾配列（例えばF2A）とを含む1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）を含む組成物の直接注射によって腫瘍に投与する工程を含む。

【0467】

いくつかの局面において、2つ以上の免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）またはその機能的フラグメントを、その必要のある対象において発現させる方法は、（a）第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および（b）送達ベクター（例えばウイルスベクター）を含む組成物の直接注射によって、腫瘍に投与する工程を含む。

【0468】

いくつかの局面において、1つまたは複数の免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）またはその機能的フラグメントを、その必要のある対象において発現させる方法は、第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結されたプロモーターと第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸に連結された翻訳修飾配列（例えばF2A）とを含む発現コンストラクトを含む組成物の直接注射によって腫瘍に投与する工程を含む。

【0469】

いくつかの局面において、2つ以上の免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）またはその機能的フラグメントを、その必要のある対象において発現させる方法は、有効量の本開示の組成物（例えば遺伝子治療組成物）、ポリヌクレオチドまたはAAVカプシドを、対象に投与する工程を含む。いくつかの局面において、2つ以上の免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）またはその機能的フラグメントを発現させる方法は、第1免疫調節タンパク質（例えば第1サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結された第1プロモーターと第2免疫調節タンパク質（例えば第2サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸に機能的に連結された第2プロモーターとを含む送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）を、腫瘍内投与する工程を含む。

【0470】

いくつかの局面において、1つまたは複数の免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）またはその機能的フラグメントを、その必要のある対象において発現させる方法は、有効量の、本開示の組成物（例えば遺伝子治療組成物）、ポリヌクレオチドまたはAAVカプシドを、対象に投与する工程を含む。いくつかの局面において、1つまたは複数の免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）またはその機能的フラグメントを発現させる方法は、第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結されたプロモーターと第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸に連結された翻訳修飾配列（例えばF2A）とを含む送達ベクター（例えばウイルスベクター）を腫瘍内投与する工程を含む。

【0471】

いくつかの局面において、2つ以上の免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）またはその機能的フラグメントを発現させる方法は、第1免疫調節タンパク質（例えば第1サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコ

10

20

30

40

50

ードする第1核酸に機能的に連結された第1プロモーターと第2免疫調節タンパク質（例えば第2サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸に機能的に連結された第2プロモーターとを含む送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）を静脈内投与する工程を含む。

【0472】

本開示のいくつかの局面は、腫瘍に罹患している対象に本開示のポリヌクレオチド、AAVカプシドまたは組成物（例えば遺伝子治療組成物）を投与する工程を含む、その必要のある対象において症状を処置または低減する方法に向けられる。

【0473】

いくつかの局面において、腫瘍に罹患している対象において症状を処置または低減する方法は、(i) 第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、(ii) 第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）を含む組成物の直接注射によって腫瘍に投与する工程を含む。いくつかの局面において、各送達ベクター（例えばウイルスベクター）は、第1核酸と第2核酸とを含むポリヌクレオチドを含む。いくつかの局面において、各送達ベクター（例えばウイルスベクター）は、第1核酸または第2核酸のどちらか一方を含み、この場合は、2つ以上の送達ベクターが組み合わせられて（例えば同時にまたは逐次的に）送達される。いくつかの局面において、(i) 第1免疫調節タンパク質、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、および/または(ii) 第2免疫調節タンパク質、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を送達するための送達ベクター（例えばウイルスベクター）は、チェックポイント阻害物質と組み合わせて（例えば同時にまたは逐次的に）投与される。

【0474】

いくつかの局面において、腫瘍に罹患している対象において症状を処置または低減する方法は、第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結されたプロモーターと第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸に連結された翻訳修飾配列（例えばF2A）とを含む1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）を含む組成物の直接注射によって腫瘍に投与する工程を含む。いくつかの局面において、送達ベクター（例えばウイルスベクター）は、チェックポイント阻害物質（例えばPD-1阻害物質）と組み合わせて（例えば同時にまたは逐次的に）送達される。

【0475】

いくつかの局面では、2つ以上の本明細書記載の送達ベクターが組み合わせられて（例えば同時にまたは逐次的に）、かつチェックポイント阻害物質とさらに組み合わせられて、送達される。

【0476】

いくつかの局面において、腫瘍に罹患している対象において症状を処置または低減する方法は、

(a) 第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および

(b) 送達ベクター（例えばウイルスベクター）

を含む組成物の直接注射によって腫瘍に投与する工程を含む。

【0477】

10

20

30

40

50

いくつかの局面において、腫瘍に罹患している対象において症状を処置または低減する方法は、

(a) (i) IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と(ii) IL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および

(b) 送達ベクター (例えばAAVベクター)

を含む組成物の直接注射によって腫瘍に投与する工程を含む。いくつかの局面において、送達ベクター (例えばウイルスベクター) は、チェックポイント阻害物質 (例えばPD-1阻害物質) と組み合わせて (例えば同時にまたは逐次的に) 送達される。

【0478】

いくつかの局面において、本明細書では、その必要がある対象において腫瘍のサイズを低減する方法であって、

(a) (i) IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と(ii) IL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および

(b) (b) 送達ベクター (例えばAAVベクター)

を含む組成物を該対象に投与する工程を含む、該方法が提供される。いくつかの局面において、送達ベクター (例えばウイルスベクター) は、チェックポイント阻害物質 (例えばPD-1阻害物質) と組み合わせて (例えば同時にまたは逐次的に) 送達される。

【0479】

いくつかの局面において、その必要がある対象において症状を処置または低減する方法は、本開示の遺伝子治療、ポリヌクレオチドまたはAAVカプシドを対象に投与する工程を含む。

【0480】

いくつかの局面において、本明細書において開示される方法は、本開示の遺伝子治療、ポリヌクレオチド、AAVカプシドまたは組成物を対象に再投与する工程を含む。

【0481】

いくつかの局面において、対象は腫瘍に罹患している。いくつかの局面において、腫瘍は、皮膚がん (例えば転移性黒色腫、皮膚悪性黒色腫、皮膚扁平上皮癌、基底細胞癌); 乳がん (例えば浸潤性乳がん、トリプルネガティブ乳がん、炎症性乳がん); 脳のがん (例えば多形性神経膠芽腫、髄芽腫、下垂体癌、脳幹神経膠腫、星状細胞腫、乏突起神経膠腫、血管周囲細胞腫、胚細胞性腫瘍、松果体腫瘍); 骨がん (例えば脊索腫、軟骨肉腫、骨肉腫、ユーイング肉腫、線維肉腫、アダマンチノーマ、巨細胞腫); 頭頸部がん (例えば頭頸部扁平上皮癌 [HNSCC]; 唾液腺がん、中咽頭がん、下咽頭がん、喉頭がん、口唇・口腔がん、鼻咽頭がん、甲状腺がん、副甲状腺のがん、副鼻腔・鼻腔がん); 婦人科がん (例えば卵巣がん、子宮がん、卵管がん、子宮内膜がん、子宮頸がん、膣がん、外陰がん); 泌尿器がん (例えば腎がん、尿道がん、尿路上皮がん、膀胱がん、腎臓または尿管のがん、腎盂のがん、精巣がん、陰茎がん、副腎のがん); 胃腸がん (例えば肛門部のがん、胆管がん、結腸がん、小腸のがん、食道がん、胆嚢がん、消化管間質腫瘍、肝がん、膵がん、直腸がん、胃がん); 眼がん (例えばぶどう膜黒色腫、網膜芽細胞腫、メルケル細胞癌、眼内悪性黒色腫、粘膜関連リンパ組織リンパ腫、眼窩リンパ腫、眼窩肉腫、涙腺腫瘍); 胸部がん (例えば非小細胞肺癌がん、小細胞肺癌がん、中皮腫、胸腺悪性疾患、気管腫瘍、一部の食道がん)、白血病 (例えば慢性または急性白血病、急性骨髄性白血病 (AML)、慢性骨髄性白血病 (CML)、急性リンパ芽球性白血病 (ALL) (非T細胞性ALLを含む)、慢性リンパ性白血病 (CLL))、リンパ腫 (例えばホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫 (NHL)、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、縦隔原発B細胞性大細胞型リンパ腫 (PMBC)、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL)、濾胞性リンパ腫 (FL)、形質転換濾胞性リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫 (SMZL)、皮膚T細胞性リンパ腫 (CTCL)、リンパ球性リンパ腫、原発性CNSリンパ腫)、他の血液がん (例えば多発性骨髄腫)、内分泌系のがん、軟部組織の肉腫、中枢神経系の新生物 (例えばC

10

20

30

40

50

NS;非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍、脊髄軸腫瘍)、腫瘍血管新生、カポジ肉腫、類表皮がん、アスベストが誘発するがんを含む環境誘発性がん、他のB細胞性悪性疾患、神経芽細胞腫(嗅神経芽細胞腫を含む)、横紋筋肉腫、および前記のがんの任意の組み合わせからなる群より選択されるがん由来する。いくつかの局面において、腫瘍は、肝細胞癌、結腸癌、黒色腫、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるがん由来する。

【0482】

いくつかの局面において、対象はがん罹患している。いくつかの局面において、対象は、皮膚がん(例えば転移性黒色腫、皮膚悪性黒色腫、皮膚扁平上皮癌、基底細胞癌);乳がん(例えば浸潤性乳がん、トリプルネガティブ乳がん、炎症性乳がん);脳のがん(例えば多形性神経膠芽腫、髄芽腫、下垂体癌、脳幹神経膠腫、星状細胞腫、乏突起神経膠腫、血管周囲細胞腫、胚細胞性腫瘍、松果体腫瘍);骨がん(例えば脊索腫、軟骨肉腫、骨肉腫、ユーイング肉腫、線維肉腫、アダマンチノーマ、巨細胞腫);頭頸部がん(例えば頭頸部扁平上皮癌[HNSCC];唾液腺がん、中咽頭がん、下咽頭がん、喉頭がん、口唇・口腔がん、鼻咽頭がん、甲状腺がん、副甲状腺のがん、副鼻腔・鼻腔がん);婦人科がん(例えば卵巣がん、子宮がん、卵管がん、子宮内膜がん、子宮頸がん、膣がん、外陰がん);泌尿器がん(例えば腎がん、尿道がん、尿路上皮がん、膀胱がん、腎臓または尿管のがん、腎盂のがん、精巣がん、陰茎がん、副腎のがん);胃腸がん(例えば肛門部のがん、胆管がん、結腸がん、小腸のがん、食道がん、胆嚢がん、消化管間質腫瘍、肝がん、膵がん、直腸がん、胃がん);眼がん(例えばぶどう膜黒色腫、網膜芽細胞腫、メルケル細胞癌、眼内悪性黒色腫、粘膜関連リンパ組織リンパ腫、眼窩リンパ腫、眼窩肉腫、涙腺腫瘍);胸部がん(例えば非小細胞肺癌、小細胞肺癌、中皮腫、胸腺悪性疾患、気管腫瘍、一部の食道がん)、白血病(例えば慢性または急性白血病、急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病(CML)、急性リンパ芽球性白血病(ALL)(非T細胞性ALLを含む)、慢性リンパ性白血病(CLL))、リンパ腫(例えばホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、縦隔原発B細胞性大細胞型リンパ腫(PMBCL)、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、濾胞性リンパ腫(FL)、形質転換濾胞性リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫(SMZL)、皮膚T細胞性リンパ腫(CTCL)、リンパ球性リンパ腫、原発性CNSリンパ腫)、他の血液がん(例えば多発性骨髄腫)、内分泌系のがん、軟部組織の肉腫、中枢神経系の新生物(例えばCNS;非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍、脊髄軸腫瘍)、腫瘍血管新生、カポジ肉腫、類表皮がん、アスベストが誘発するがんを含む環境誘発性がん、他のB細胞性悪性疾患、神経芽細胞腫(嗅神経芽細胞腫を含む)、横紋筋肉腫、および該がんの任意の組み合わせからなる群より選択されるがん罹患している。いくつかの局面において、対象は、皮膚がん、胃腸がん、乳がん、脳のがん、またはそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるがん罹患している。

【0483】

いくつかの局面において、がんは、黒色腫、結腸直腸がん、乳がん、多形性神経膠芽腫、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。

【0484】

いくつかの局面において、対象は黒色腫(例えばぶどう膜黒色腫)に罹患している。例えばSheppard et al., PLoS 8(4):e62753(2013)、Yang J. et al., Ther Adv Med Oncol. 2018;10, 2018年2月21日発行, 2018、Pelster et al., Journal of Clinical Oncology 37(15):9522-9522(2019)参照。いくつかの局面において、対象は転移性黒色腫に罹患している。

【0485】

いくつかの局面において、対象は結腸直腸がん罹患している。例えばTu SP et al., Gastroenterology, 128:361-375(2005)、Xue Z. et al., Oncology Reports., 25:1039-1046(2011)を参照されたい。

【0486】

いくつかの局面において、対象は乳がん罹患している。例えばLu L. et al., *Oncol Rep.*, 28 (4):1332-1338 (2012) を参照されたい。

【0487】

いくつかの局面において、対象は多形性神経膠芽腫 (GMB) に罹患している。例えばMaguire CA, et al., *J Neurooncol.* 96 (3):337-347 (2010) を参照されたい。

【0488】

いくつかの局面において、本開示の方法は、例えば皮膚がん (例えば転移性黒色腫、皮膚悪性黒色腫、皮膚扁平上皮癌、基底細胞癌); 乳がん (例えば浸潤性乳がん、トリプルネガティブ乳がん、炎症性乳がん); 脳のがん (例えば多形性神経膠芽腫、髄芽腫、下垂体癌、脳幹神経膠腫、星状細胞腫、乏突起神経膠腫、血管周囲細胞腫、胚細胞性腫瘍、松果体腫瘍); 骨がん (例えば脊索腫、軟骨肉腫、骨肉腫、ユーイング肉腫、線維肉腫、アダマンチノーマ、巨細胞腫); 頭頸部がん (例えば頭頸部扁平上皮癌 [HNSCC]; 唾液腺がん、中咽頭がん、下咽頭がん、喉頭がん、口唇・口腔がん、鼻咽頭がん、甲状腺がん、副甲状腺のがん、副鼻腔・鼻腔がん); 婦人科がん (例えば卵巣がん、子宮がん、卵管がん、子宮内膜がん、子宮頸がん、膣がん、外陰がん); 泌尿器がん (例えば腎がん、尿管がん、尿路上皮がん、膀胱がん、腎臓または尿管のがん、腎盂のがん、精巣がん、陰茎がん、副腎のがん); 胃腸がん (例えば肛門部のがん、胆管がん、結腸がん、小腸のがん、食道がん、胆嚢がん、消化管間質腫瘍、肝がん、膵がん、直腸がん、胃がん); 眼がん (例えばぶどう膜黒色腫、網膜芽細胞腫、メルケル細胞癌、眼内悪性黒色腫、粘膜関連リンパ組織リンパ腫、眼窩リンパ腫、眼窩肉腫、涙腺腫瘍); 胸部がん (例えば非小細胞肺癌がん、小細胞肺癌がん、中皮腫、胸腺悪性疾患、気管腫瘍、一部の食道がん)、白血病 (例えば慢性または急性白血病、急性骨髄性白血病 (AML)、慢性骨髄性白血病 (CML)、急性リンパ芽球性白血病 (ALL) (非T細胞性ALLを含む)、慢性リンパ性白血病 (CLL))、リンパ腫 (例えばホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫 (NHL)、ワルデンシュトレーマクログロブリン血症、縦隔原発B細胞性大細胞型リンパ腫 (PMBC)、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL)、濾胞性リンパ腫 (FL)、形質転換濾胞性リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫 (SMZL)、皮膚T細胞性リンパ腫 (CTCL)、リンパ球性リンパ腫、原発性CNSリンパ腫)、他の血液がん (例えば多発性骨髄腫)、内分泌系のがん、軟部組織の肉腫、中枢神経系の新生物 (例えばCNS; 非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍、脊髄軸腫瘍)、腫瘍血管新生、カポジ肉腫、類表皮がん、アスベストが誘発するがんを含む環境誘発性がん、他のB細胞性悪性疾患、神経芽細胞腫 (嗅神経芽細胞腫を含む)、横紋筋肉腫、および前記癌の組み合わせに由来する腫瘍の腫瘍サイズを低減するために使用することができる。いくつかの局面において、固形腫瘍は表面病変である。いくつかの局面において、固形腫瘍は内臓腫瘍である。

【0489】

いくつかの局面において、対象は転移がん罹患している。いくつかの局面において、対象は、進行性または転移性の黒色腫、皮膚扁平上皮癌、結腸直腸がん、前立腺がん、乳がんまたは食道がん罹患している。

【0490】

いくつかの局面において、その必要がある対象において症状を処置または低減する方法は、本開示の遺伝子治療、ポリヌクレオチド、AAVカプシドまたは組成物を、チェックポイント阻害物質と組み合わせて投与する工程を含む。

【0491】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、プログラム細胞死タンパク質1 (PD-1)、プログラム死リガンド1 (PD-L1)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4 (CTLA-4)、リンパ球活性化遺伝子3 (LAG-3)、T細胞免疫グロブリンムチン含有タンパク質3 (TIM-3)、BおよびTリンパ球アテニューエーター (BTLA)、IgおよびITIMドメインを持つT細胞免疫受容体 (TIGIT)、T細胞活性化のVドメインIgサプレッサー (VISTA)、アデノシンA2a受容体 (A2aR)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR)、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO)、CD20、CD39、CD73、誘

10

20

30

40

50

導性T細胞共刺激分子（ICOS）、B7-H3の阻害物質、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0492】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質はPD-1阻害物質である。いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質はPD-L1阻害物質である。いくつかの局面において、PD-1阻害物質は抗PD-1抗体である。いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、トリパリマブ、スパルタリズマブ、ドスタリマブ-gxly、チスレリズマブ、バルスチリマブ、BI-754091、ジムベレリマブ、INCMGA00012、カムレリズマブ、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

10

【0493】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質はPD-L1阻害物質である。いくつかの局面において、PD-L1阻害物質は抗PD-L1抗体である。いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、デュルバルマブ、アテゾリズマブ、アベルマボル、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0494】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質はCTLA-4阻害物質である。いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、イピリムマブ、トレメリムマブ（旧名チシリムマブ）、ザリフレリマブ、クアポンリマブ、BA3071、YH001、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

20

【0495】

いくつかの局面において、本開示の遺伝子治療、ポリヌクレオチドまたはAAVカプシドは、チェックポイント阻害物質の投与前、投与と同時に、または投与後に投与することができる。

【0496】

いくつかの局面において、本明細書において開示される方法は、AAVベクターを含む組成物（例えば遺伝子治療組成物）、AAVベクター、AAVカプシド、本開示のAAVベクターを含む細胞、本開示のAAVカプシドを含む細胞、本開示の免疫調節タンパク質（例えば第2サイトカイン）またはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドがそのゲノムDNAに組み込まれている細胞、または上記のいずれかを含む薬学的組成物の投与によって、実施することができる。したがって、本開示のAAVベクターの投与を具陳する、本明細書において開示される方法は、これらの組成物のいずれを投与することによっても、実施することができる。

30

【0497】

本明細書において開示される方法によれば、その必要のある対象における、治療における使用のための、医薬としての使用のための、または疾患もしくは障害（例えば腫瘍またはがん）の処置における使用のための、本開示の、AAVベクターを含む組成物（例えば遺伝子治療組成物）、AAVベクター、またはAAVカプシドが、想定される。いくつかの局面において、本明細書において開示される免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントのコード配列を含む遺伝子治療コンストラクトは、永続的な受動防御を提供することができる。

40

【0498】

いくつかの局面において、本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）、ポリヌクレオチド、またはAAVカプシドは、例えば腫瘍への直接注射によって、腫瘍内に投与される。

【0499】

いくつかの局面において、本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）、ポリヌクレオチド、またはAAVカプシドは、静脈内に投与される。

【0500】

いくつかの局面において、本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成

50

物)、ポリヌクレオチド、またはAAVカプシドは、髄腔内に投与される。

【0501】

いくつかの局面において、本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）、ポリヌクレオチド、またはAAVカプシドは、肝臓内に投与される。

【0502】

がんを持つ対象に投与される場合、ある特定の局面において、本開示の組成物（例えば遺伝子治療組成物）、ポリヌクレオチド、またはAAVカプシドは、免疫応答をアップレギュレートし、対象の免疫系の腫瘍ターゲティングを増強することができる。いくつかの局面において、処置されるがんは、腫瘍微小環境への白血球（T細胞、B細胞、マクロファージ、樹状細胞、単球）の浸潤、すなわちいわゆる「ホットな腫瘍」または「炎症性腫瘍」を特徴とする。いくつかの局面において、処置されるがんは、腫瘍微小環境への白血球浸潤のレベルが低いか、または検出不可能なレベルであること、すなわちいわゆる「コールドな腫瘍」または「非炎症性腫瘍」を特徴とする。いくつかの局面において、本開示の組成物（例えば遺伝子治療組成物）、ポリヌクレオチド、またはAAVカプシドは、「コールドな腫瘍」を「ホットな腫瘍」に変換するのに十分な量で、十分な時間、投与される。すなわち該投与は、腫瘍微小環境への白血球（T細胞など）の浸潤をもたらす。本明細書において使用される「遠位腫瘍（distal tumor）」または「遠隔腫瘍（distant tumor）」という用語は、元の（すなわち原発）腫瘍から遠隔器官または遠隔組織、例えばリンパ節へと伝播した腫瘍を指す。いくつかの局面において、本開示の組成物（例えば遺伝子治療組成物）、ポリヌクレオチド、またはAAVカプシドは、転移拡散後の腫瘍を処置する。いくつかの局面において、本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）、ポリヌクレオチド、またはAAVカプシドは、脾臓内に投与される。いくつかの局面において、本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）、ポリヌクレオチド、またはAAVカプシドは、髄腔内に投与される。いくつかの局面において、本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）、ポリヌクレオチド、またはAAVカプシドは、肝臓内に投与される。いくつかの局面において、本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）、ポリヌクレオチド、またはAAVカプシドは、骨内注入によって投与される。いくつかの局面において、本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）、ポリヌクレオチド、またはAAVカプシドは、皮内に投与される。いくつかの局面において、本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）、ポリヌクレオチド、またはAAVカプシドは、実質内経路によって投与される。いくつかの局面において、本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）、ポリヌクレオチド、またはAAVカプシドは、唾液腺に投与される。いくつかの局面において、本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）、ポリヌクレオチド、またはAAVカプシドは、リンパ節中に（例えば直接注射によって）投与される。いくつかの局面において、リンパ節は転移リンパ節である。

【0503】

いくつかの局面において、その必要のある対象において、単独治療として投与するか、またはチェックポイント阻害物質との併用療法として投与することができる、本明細書において開示される遺伝子治療、ポリヌクレオチド、AAVカプシドまたは組成物の、対象における抗腫瘍効力は、全奏効率（overall response rate）について（RECIST v1.1（または類似のガイドライン）（例えばEisenhauer et al., Eur J Cancer, 45:228-247（2009）を参照されたい）を使って）評価することができる。いくつかの局面において、対象は、抗PD-1抗体治療で快方に向かっている。

【0504】

いくつかの局面において、最良全客観的奏効率（best overall objective response rate）（ORR）は、類似する対象集団における単独治療としてのチェックポイント阻害についての公知の率と対比して、改良される。ORRは、完全奏効（CR）+部分奏効（PR）の和に等しい。

【0505】

10

20

30

40

50

いくつかの局面において、有用なバイオマーカーとしては、例えばBuisseret L., et al., Oncoimmunology.6 (1) :e1257452 (2017) に記載されているように、PD-L1発現レベル（例えば免疫組織化学（IHC）によって評価されるもの）および腫瘍浸潤リンパ球（TIL）プロファイル（例えば腫瘍組織におけるCD8+T細胞密度によって評価されるもの）を挙げることができる。いくつかの局面では、処置の前後で、PD-L1発現の変化を評価することができる。

【0506】

VI. 薬学的組成物

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、本明細書において開示される免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする核酸配列に機能的に連結されたプロモーターを含む本開示の送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、腫瘍内投与に適した形態で含む。

【0507】

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメント（例えばIL-12、またはその1つもしくは複数のサブユニット）をコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含むAAV送達ベクターを含み、任意で、（b）チェックポイント阻害物質（例えばPD-1阻害物質）は、腫瘍内投与に適している。

【0508】

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、本明細書において開示される免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする核酸配列に機能的に連結されたプロモーターを含む本開示の送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、静脈内投与に適した形態で含む。

【0509】

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメント（例えばIL-12、またはその1つもしくは複数のサブユニット）をコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含むAAV送達ベクターを含み、任意で、（b）チェックポイント阻害物質（例えばPD-1阻害物質）は静脈内投与に適している。

【0510】

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、本明細書において開示される免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする核酸配列に機能的に連結されたプロモーターを含む本開示の送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、脾臓内投与に適した形態で含む。

【0511】

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメント（例えばIL-12、またはその1つもしくは複数のサブユニット）をコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含むAAV送達ベクターを含み、任意で、（b）チェックポイント阻害物質（例えばPD-1阻害物質）は脾臓内投与に適している。

【0512】

10

20

30

40

50

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、本明細書において開示される免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする核酸配列に機能的に連結されたプロモーターを含む本開示の送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、髄腔内投与に適した形態で含む。

【0513】

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメント（例えばIL-12、またはその1つもしくは複数のサブユニット）をコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含むAAV送達ベクターを含み、任意で、（b）チェックポイント阻害物質（例えばPD-1阻害物質）は髄腔内投与に適している。

10

【0514】

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、本明細書において開示される免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする核酸配列に機能的に連結されたプロモーターを含む本開示の送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、またはリソソーム）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、肝臓内投与に適した形態で含む。

20

【0515】

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメント（例えばIL-12、またはその1つもしくは複数のサブユニット）をコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含むAAV送達ベクターを含み、任意で、（b）チェックポイント阻害物質（例えばPD-1阻害物質）は肝臓内投与に適している。

【0516】

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、本明細書において開示される免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする核酸配列に機能的に連結されたプロモーターを含む本開示の送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、骨内投与に適した形態で含む。

30

【0517】

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメント（例えばIL-12、またはその1つもしくは複数のサブユニット）をコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含むAAV送達ベクターを含み、任意で、（b）チェックポイント阻害物質（例えばPD-1阻害物質）は骨内投与に適している。

40

【0518】

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、本明細書において開示される免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする核酸配列に機能的に連結されたプロモーターを含む本開示の送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、リンパ節中への投与に適した形態で含む。

【0519】

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、サイトカイン

50

、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメント（例えばIL-12、またはその1つもしくは複数のサブユニット）をコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含むAAV送達ベクターを含み、任意で、（b）チェックポイント阻害物質（例えばPD-1阻害物質）はリンパ節中への投与に適している。

【0520】

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメント（例えばIL-12、またはその1つもしくは複数のサブユニット）をコードする核酸を含むポリヌクレオチドを含むAAV送達ベクターを含み、任意で、（b）チェックポイント阻害物質（例えばPD-1阻害物質）は腹腔内投与に適している。

【0521】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、（i）第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、（ii）第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、腫瘍内投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、薬学的組成物は、第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、腫瘍内投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、各送達ベクター（例えばウイルスベクター）は、第1核酸と第2核酸とを含むポリヌクレオチドを含む。

【0522】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、（i）第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、（ii）第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、静脈内投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、薬学的組成物は、第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、静脈内投与に適した形態で含む。

【0523】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、（i）第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、（ii）第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、脾臓内投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、薬学的組成物は、第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、脾臓内投与に適した形態で含む。

【0524】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、（i）第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、（ii

10

20

30

40

50

）第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、髄腔内投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、薬学的組成物は、第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、髄腔内投与に適した形態で含む。

【0525】

10

いくつかの局面において、薬学的組成物は、（i）第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、（ii）第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、肝臓内投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、薬学的組成物は、第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、肝臓内投与に適した形態で含む。

20

【0526】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、（i）第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、（ii）第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、骨内投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、薬学的組成物は、第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、骨内投与に適した形態で含む。

30

【0527】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、（i）第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、（ii）第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、皮内投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、薬学的組成物は、第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、皮内投与に適した形態で含む。

40

【0528】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、（i）第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、（ii）第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベ

50

クター（例えばウイルスベクター）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、実質内投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、薬学的組成物は、第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、実質内投与に適した形態で含む。

【0529】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、(i) 第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、(ii) 第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、唾液腺への送達による投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、薬学的組成物は、第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、唾液腺への送達による投与に適した形態で含む。

【0530】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、(i) 第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、(ii) 第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、リンパ節中への投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、薬学的組成物は、第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、リンパ節中への投与に適した形態で含む。

【0531】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、腹腔内投与に適した形態で含む。

【0532】

いくつかの局面において、各送達ベクター（例えばウイルスベクター）は、第1核酸または第2核酸のどちらか一方を含み、この場合は、2つ以上の送達ベクターが組み合わされて（例えば同時にまたは逐次的に）送達される。

【0533】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、(a) 第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および (b) 送達ベクター（例えばウイルスベクター）、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、腫瘍内投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、薬学的組成物は、(a) 第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第

1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および（b）送達ベクター（例えばウイルスベクター）、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、腫瘍内投与に適した形態で含む。

【0534】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、（a）第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および（b）送達ベクター（例えばウイルスベクター）、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、静脈内投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、薬学的組成物は、（a）第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および（b）送達ベクター（例えばウイルスベクター）、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、静脈内投与に適した形態で含む。

10

【0535】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、（a）第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および（b）送達ベクター（例えばウイルスベクター）、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、脾臓内投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、薬学的組成物は、（a）第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および（b）送達ベクター（例えばウイルスベクター）、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、脾臓内投与に適した形態で含む。

20

【0536】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、（a）第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および（b）送達ベクター（例えばウイルスベクター）、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、髄腔内投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、薬学的組成物は、（a）第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および（b）送達ベクター（例えばウイルスベクター）、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、髄腔内投与に適した形態で含む。

30

【0537】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、（a）第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および（b）送達ベクター（例えばウイルスベクター）、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、肝臓内投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、薬学的組成物は、（a）第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および（b）送達ベク

40

50

ター（例えばウイルスベクター）、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、肝臓内投与に適した形態で含む。

【0538】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、（a）第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および（b）送達ベクター（例えばウイルスベクター）、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、骨内投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、薬学的組成物は、（a）第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および（b）送達ベクター（例えばウイルスベクター）、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、骨内投与に適した形態で含む。

10

【0539】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、（a）第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および（b）送達ベクター（例えばウイルスベクター）、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、皮内投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、薬学的組成物は、（a）第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および（b）送達ベクター（例えばウイルスベクター）、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、皮内投与に適した形態で含む。

20

【0540】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、（a）第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および（b）送達ベクター（例えばウイルスベクター）、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、実質内投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、薬学的組成物は、（a）第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および（b）送達ベクター（例えばウイルスベクター）、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、実質内投与に適した形態で含む。

30

【0541】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、（a）第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および（b）送達ベクター（例えばウイルスベクター）、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、唾液腺への送達による投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、薬学的組成物は、（a）第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および（b）送達ベクター（例えばウイルスベクター）、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、唾液腺への送達による投与に適した形態で含む。

40

50

【0542】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、(a) 第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および (b) 送達ベクター（例えばウイルスベクター）、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、リンパ節中への投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、薬学的組成物は、(a) 第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および (b) 送達ベクター（例えばウイルスベクター）、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、リンパ節中への投与に適した形態で含む。

10

【0543】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、(a) 第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および (b) 送達ベクター（例えばウイルスベクター）、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、腹腔内投与に適した形態で含む。

20

【0544】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、(a) 第1サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、(b) 第2サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、腫瘍内投与に適した形態で含む。

【0545】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、(a) 第1サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、(b) 第2サイトカイン、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、静脈内投与に適した形態で含む。いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、第1免疫調節タンパク質（例えば第1サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結された第1プロモーターと、第2免疫調節タンパク質（例えば第2サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸に機能的に連結された第2プロモーターとを含む、本開示の送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、腫瘍内投与に適した形態で含む。

30

【0546】

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、第1免疫調節タンパク質（例えば第1サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結された第1プロモーターと、第2免疫調節タンパク質（例えば第2サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸に機能的に連結された第2プロモーターとを含む、本開示の送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、静脈内投与に適した形態で含む。

40

【0547】

50

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、第1免疫調節タンパク質（例えば第1サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結された第1プロモーターと、第2免疫調節タンパク質（例えば第2サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸に機能的に連結された第2プロモーターとを含む、本開示の送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、脾臓内投与に適した形態で含む。

【0548】

10

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、第1免疫調節タンパク質（例えば第1サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結された第1プロモーターと、第2免疫調節タンパク質（例えば第2サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸に機能的に連結された第2プロモーターとを含む、本開示の送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、髄腔内投与に適した形態で含む。

【0549】

20

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、第1免疫調節タンパク質（例えば第1サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結された第1プロモーターと、第2免疫調節タンパク質（例えば第2サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸に機能的に連結された第2プロモーターとを含む、本開示の送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、肝臓内投与に適した形態で含む。

【0550】

30

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、第1免疫調節タンパク質（例えば第1サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結された第1プロモーターと、第2免疫調節タンパク質（例えば第2サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸に機能的に連結された第2プロモーターとを含む、本開示の送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、骨内投与に適した形態で含む。

【0551】

40

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、第1免疫調節タンパク質（例えば第1サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結された第1プロモーターと、第2免疫調節タンパク質（例えば第2サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸に機能的に連結された第2プロモーターとを含む、本開示の送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、皮内投与に適した形態で含む。

【0552】

50

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、第1免疫調節タンパク質（例えば第1サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結された第1プロモーターと、第2免疫調節タンパク質（例えば第2サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸に機能的に連結された第2プロモーターとを含む、本開示の送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、実質内投与に適した形態で含む。

【0553】

10

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、第1免疫調節タンパク質（例えば第1サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結された第1プロモーターと、第2免疫調節タンパク質（例えば第2サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸に機能的に連結された第2プロモーターとを含む、本開示の送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、唾液腺への送達による投与に適した形態で含む。

【0554】

20

いくつかの局面において、本明細書において開示される薬学的組成物は、第1免疫調節タンパク質（例えば第1サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結された第1プロモーターと、第2免疫調節タンパク質（例えば第2サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸に機能的に連結された第2プロモーターとを含む、本開示の送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）、および薬学的に許容される賦形剤または担体を、リンパ節中への投与に適した形態で含む。

【0555】

30

いくつかの局面において、薬学的組成物は、(i) プロモーター、(ii) 第1サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、(iii) 翻訳修飾配列、および(iv) 第2サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含むポリヌクレオチド、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、腫瘍内投与に適した形態で含む。

【0556】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、(i) プロモーター、(ii) 第1サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、(iii) 翻訳修飾配列、および(iv) 第2サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含むポリヌクレオチド、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、静脈内投与に適した形態で含む。

40

【0557】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、(i) プロモーター、(ii) 第1サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、(iii) 翻訳修飾配列、および(iv) 第2サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含むポリヌクレオチド、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、脾臓内投与に適した形態で含む。

【0558】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、(i) プロモーター、(ii) 第1サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、(iii) 翻訳修飾配

50

列、および (iv) 第2サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含むポリヌクレオチド、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、髄腔内投与に適した形態で含む。

【0559】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、(i) プロモーター、(ii) 第1サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、(iii) 翻訳修飾配列、および (iv) 第2サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含むポリヌクレオチド、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、肝臓内投与に適した形態で含む。

【0560】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、(i) プロモーター、(ii) 第1サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、(iii) 翻訳修飾配列、および (iv) 第2サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含むポリヌクレオチド、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、骨内投与に適した形態で含む。

【0561】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、(i) プロモーター、(ii) 第1サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、(iii) 翻訳修飾配列、および (iv) 第2サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含むポリヌクレオチド、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、皮内投与に適した形態で含む。

【0562】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、(i) プロモーター、(ii) 第1サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、(iii) 翻訳修飾配列、および (iv) 第2サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含むポリヌクレオチド、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、実質内投与に適した形態で含む。

【0563】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、(i) プロモーター、(ii) 第1サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、(iii) 翻訳修飾配列、および (iv) 第2サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含むポリヌクレオチド、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、唾液腺への送達による投与に適した形態で含む。

【0564】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、(i) プロモーター、(ii) 第1サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、(iii) 翻訳修飾配列、および (iv) 第2サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含むポリヌクレオチド、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、リンパ節中への投与に適した形態で含む。

【0565】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、(i) プロモーター、(ii) 第1サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、(iii) 翻訳修飾配列、および (iv) 第2サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含むポリヌクレオチド、ならびに薬学的に許容される賦形剤または担体を、腹腔内投与に適した形態で含む。

【0566】

いくつかの局面において、第1サイトカインサブユニットおよび第2サイトカインサブユニットはIL-12サブユニットである。いくつかの局面において、第1核酸または第2核酸は、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7またはSEQ ID NO:77と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少

10

20

30

40

50

なくとも99%または100%同一である配列を含む。いくつかの局面において、第1核酸または第2核酸は、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9またはSEQ ID NO:10と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む。

【0567】

薬学的に許容される賦形剤または担体は、一つには、投与される特定組成物によって、またその組成物を投与するために使用される特定方法によって決まる。

【0568】

したがって、1つまたは複数の本開示の送達ベクター（例えばAAVベクター）（例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., ペンシルベニア州イーストン, 第18版（1990）参照）および/または本明細書において開示される1つもしくは複数のshRNAを含む薬学的組成物には、多種多様な適切な製剤がある。薬学的組成物は、一般に、無菌的に、かつ米国食品医薬品局の医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準（Good Manufacturing Practice: GMP）のすべての規定に完全に準拠して、製剤化される。いくつかの局面において、薬学的組成物は、2つ以上の本開示のAAVベクターを含み、各ベクターは、本明細書において開示される少なくとも1つをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む。

【0569】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、(i) 本明細書において開示される1つまたは複数の送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）と、(ii) 障害の処置のための1つまたは複数の治療剤とを含む。いくつかの局面において、本明細書において開示される1つまたは複数の送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）および疾患または障害（例えばがん、腫瘍）のための1つまたは複数の治療剤は、別々の薬学的組成物として共投与される。

【0570】

いくつかの局面において、本明細書において開示される1つまたは複数の送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）を含む薬学的組成物は、疾患または障害（例えばがん、腫瘍）の処置のための1つまたは複数の治療剤を含む薬学的組成物の投与前に投与される。いくつかの局面において、本明細書において開示される1つまたは複数の送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）を含む薬学的組成物は、疾患または障害（例えばがん、腫瘍）の処置のための1つまたは複数の治療剤を含む薬学的組成物の投与後に投与される。いくつかの局面において、本明細書において開示される1つまたは複数の送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）を含む薬学的組成物は、疾患または障害（例えばがん、腫瘍）の処置のための1つまたは複数の治療剤を含む薬学的組成物の投与と同時に投与される。

【0571】

また本明細書では、所望の純度を有する本明細書において開示される送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）および薬学的に許容される担体または賦形剤を、対象への投与に適した形態で含む薬学的組成物も提供される。薬学的に許容される賦形剤または担体は、一つには、投与される特定組成物によって、またその組成物を投与するために使用される特定方法によって決めることができる。したがって、複数のベクター、例えば本明細書記載のAAVベクターを含む薬学的組成物には、多種多様な適切な製剤がある（例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., ペンシルベニア州イーストン, 第21版（2005）参照）。薬学的組成物は、一般に、無菌的に、かつ米国食品医薬品局の医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準（GMP）のすべての規定に完全に準拠して、製剤化される。

【0572】

許容される担体、賦形剤または安定剤は、使用される投薬量および濃度において、レシピエント（例えば動物またはヒト）にとって無毒性である。

【0573】

担体または希釈剤の例としては、水、食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンが挙げられるが、それらに限定されない。従来の培地または化合物は、それが本明細書において開示される送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）と不適合である場合を除き、いずれも、本組成物におけるその使用が想定される。いくつかの局面において、薬学的組成物は、意図したその投与経路と適合するように製剤化される。本明細書において開示される送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）は、静脈内、非経口、外用、静脈内、経口、皮下、動脈内、皮内、経皮、直腸、頭蓋内、腹腔内、鼻腔内、腫瘍内もしくは筋肉内経路によって、または吸入薬として、投与することができる。いくつかの局面において、本明細書において開示される送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）を含む薬学的組成物は、腫瘍内に、例えば直接注射によって、投与される。いくつかの局面において、本明細書において開示される送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）を含む薬学的組成物は、静脈内に投与される。いくつかの局面において、本明細書において開示される送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）を含む薬学的組成物は、脾臓内に投与される。いくつかの局面において、本明細書において開示される送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）を含む薬学的組成物は、髄腔内に投与される。いくつかの局面において、本明細書において開示される送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）を含む薬学的組成物は、肝臓内に投与される。いくつかの局面において、本明細書において開示される送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）を含む薬学的組成物は、骨内注入によって投与される。いくつかの局面において、本明細書において開示される送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）を含む薬学的組成物は、皮内に投与される。いくつかの局面において、本明細書において開示される送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）を含む薬学的組成物は、実質内経路によって投与される。

10

20

30

40

50

【0574】

いくつかの局面において、本明細書において開示される送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）を含む薬学的組成物は、唾液腺への送達によって投与される。いくつかの局面において、本明細書において開示される送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）を含む薬学的組成物は、リンパ節中への直接注射によって投与される。いくつかの局面において、リンパ節は転移リンパ節である。

【0575】

本明細書において開示される送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）は、任意で、本明細書において開示される送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）が対象とする疾患、障害または状態の処置において少なくとも部分的に有効である他の治療剤と組み合わせて投与することができる。いくつかの局面において、本明細書において開示されるベクターは、PD-1阻害物質（例えば抗PD-1抗体）と組み合わせて投与される。

【0576】

本明細書において開示される送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）は、（1）安定性を増加させ、（2）細胞のトランスフェクションまたは形質導入を増加させ、（3）持続的放出または遅延放出を可能にし、または（4）生体内分布を変化させる（例えばAAVベクターを特異的組織または細胞タイプにターゲティングする）ために、1つまたは複数の賦形剤を使って製剤化することができる。

【0577】

VII. 投与

本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）および送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）は、治療的に有効なアウトカムをもたらす任意の経路によって投与することができる。いくつかの局面において、本明細書において開示される方法は、本開示の遺伝子治療、ポリヌクレオチド、AAVカプシドまたは組成物を対象に再投与する工程を含むことができる。

【0578】

いくつかの局面において、投与（または送達）は、腫瘍内、静脈内、脾臓内、髄腔内、肝臓内に、または骨内注入によって、または皮内、実質内に、または唾液腺への送達によって、またはリンパ節中への送達によって行われる。

【0579】

いくつかの局面において、送達は腫瘍内に、例えば腫瘍への直接注射によって、行うことができる。いくつかの局面において、本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）および送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）は、単回投与として投与される。いくつかの局面において、単回投与は1回または複数回の注射を含むことができる。いくつかの局面において、単回投与は腫瘍の異なる領域への複数の注射を含む。

10

【0580】

いくつかの局面において、送達は静脈内であることができる。

【0581】

いくつかの局面において、送達は脾臓内であることができる。例えばXiao et al., Molecular Therapy: Methods & Clinical Development, 1 (4): 323-329 (2000)、Ahmed et al. 「Gene transfer in the liver using recombinant adeno-associated virus」 Current Protocols in Microbiology vol. Chapter 14 (2013) を参照されたい。

【0582】

いくつかの局面において、送達は髄腔内送達であることができる。

20

【0583】

いくつかの局面において、送達は肝臓内送達であることができる。

【0584】

いくつかの局面において、送達は骨内であることができる。例えばLee et al., Molecular Therapy: Methods & Clinical Development, 15: 101-111 (2019) を参照されたい。

【0585】

いくつかの局面において、送達は皮内であることができる。

【0586】

いくつかの局面において、送達は実質内であることができる。

30

【0587】

いくつかの局面において、送達は唾液腺への送達であることができる。

【0588】

いくつかの局面において、送達はリンパ節中への直接的な送達であることができる。いくつかの局面において、リンパ節は転移リンパ節である。例えば、2015年4月21日のオンラインで公表されたSato et al., PLoS One., 2015; 10 (4): e0123619を参照されたい。

【0589】

いくつかの局面において、核酸を含むベクター（例えばウイルスベクター（例えばAAVベクター）または非ウイルスベクター（裸のDNAを含む）のいずれか）は、腫瘍に投与される。ベクターは身体の「外側」から細胞に提示されるので、血液または間質液中への形質転換製剤およびそれらのアジュバントの投与の結果としてよく観察される免疫反応および炎症反応は、回避されうる。

40

【0590】

十分な数の腫瘍細胞を形質転換し、治療レベルのタンパク質の発現をもたらすための核酸の量は、例えば動物モデル（例えば齧歯類（マウスまたはラット）または他の哺乳動物モデル）を使って、形質転換の効率、達成されるタンパク質発現のレベル、標的分泌腺細胞の形質転換の起こしやすさ、ならびに腫瘍細胞を形質転換するのに必要なベクターおよび/または核酸の量などといった因子を評価することによって、評価することができる。

50

【0591】

投与されるベクターおよび/または核酸の正確な量は、標的細胞の形質転換の起こしやすさ、対象のサイズおよび重量、所望するタンパク質発現レベル、および処置されるべき状態を含むいくつかの因子に応じて、大きく変動するだろう。

【0592】

本開示の方法は、血流への長期的な（例えばコンストラクトの反復投与によるもの）または短期的な（例えば数時間または数日間の）、免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントの送達を達成するために使用することができる。これに関して、本開示は、血流へのポリペプチドの投薬量をコントロールするための手段を提供するために、導入されたコンストラクトによって形質転換された細胞の通常の代謝回転を利用する。

10

【0593】

いくつかの局面において、免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントをコードする核酸配列に機能的に連結されたプロモーターを含む本開示の送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）は、腫瘍への直接注射によって投与される。

【0594】

いくつかの局面において、第1免疫調節タンパク質（例えば第1サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結された第1プロモーターと、第2免疫調節タンパク質（例えば第2サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸に機能的に連結された第2プロモーターとを含む、本開示の送達ベクター（例えばウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、タンパク質粒子、細菌ベクター、またはリソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、またはヴォールト粒子）は、腫瘍への直接注射によって投与される。

20

【0595】

いくつかの局面において、本開示の送達ベクター（例えばウイルスベクター）は、(i) プロモーター、(ii) 第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12 p35サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、(iii) 翻訳修飾配列、および(iv) 第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12 p40サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含み、腫瘍への直接注射によって投与される。

30

【0596】

本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）および送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）は、任意の適切な形態で、溶液または懸濁液として、あるいは溶液または溶液への懸濁に適した固形物として、投与することができる。

【0597】

いくつかの局面において、本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）またはAAVカプシドは、ヒトに投与される。さらなる局面において、本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）またはAAVカプシドは、高齢者（すなわち65歳以上のヒト）に投与される。別の局面において、本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）またはAAVカプシドは、免疫無防備状態または免疫不全状態にあるヒトに投与される。いくつかの局面において、免疫無防備状態または免疫不全状態にあるヒトは、B細胞免疫不全症、T細胞免疫不全症、食細胞障害、補体欠陥（complement defects）、慢性および/または重大疾患（chronic and/or serious disease）、免疫調節薬治療、ならびにその他と診断されているか、その処置を受けているか、またはそれらから回復したヒトである。B細胞免疫不全症としては、例えばブルトン型無ガンマグロブリン血症、分類不能型免疫不全、高IgM症候群および選択的IgA欠損症が挙げられる。いくつかの局面において、T細胞免疫不全症としては、例えばディジ

40

50

ョージ症候群、裸リンパ球症候群およびオーメン症候群が挙げられる。食細胞障害としては、例えば慢性肉芽腫症、白血球接着不全症、チェディアック・東症候群および周期性好中球減少症、コストマン病が挙げられる。補体欠陥としては、C1、C2またはC4欠損症-免疫複合体の除去における欠陥、C3またはC5欠損症-代替経路および古典経路における遮断、ならびにC6、C7、C8またはC9欠損症-MACの集合および機能における欠陥が挙げられる。慢性および/または重大疾患としては、例えばHIV/AIDS、がん（例えば白血病、リンパ腫）、高レベル免疫抑制薬で処置される慢性炎症性疾患、および代謝性疾患（例えば糖尿病、肥満、尿毒症）が挙げられる。免疫調節薬治療としては、例えば細胞傷害性作用物質/化学治療、高用量コルチコステロイドおよび疾患修飾性抗リウマチ薬（DMARD）が挙げられる。さらなる免疫不全として、例えば栄養失調、老化、外科手術（例えば脾摘出術）、およびPID以外の遺伝性欠陥（例えばダウン症候群、嚢胞性線維症、鎌形血球症）が挙げられる。

10

【0598】

いくつかの局面において、本明細書では、a) 本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）、本明細書において開示されるポリヌクレオチド、または本明細書において開示されるAAVカプシド、およびb) チェックポイント阻害物質を含む併用療法が提供される。

【0599】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、プログラム細胞死タンパク質1（PD-1）、プログラム死リガンド1（PD-L1）、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA-4）、リンパ球活性化遺伝子3（LAG-3）、T細胞免疫グロブリンムチン含有タンパク質3（TIM-3）、BおよびTリンパ球アテニュエーター（BTLA）、IgおよびITIMドメインを持つT細胞免疫受容体（TIGIT）、T細胞活性化のVドメインIgサブレッサー（VISTA）、アデノシンA2a受容体（A2aR）、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）、CD20、CD39、CD73、誘導性T細胞共刺激分子（ICOS）、B7-H3の阻害物質、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

20

【0600】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質はPD-1阻害物質である。いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質はPD-L1阻害物質である。いくつかの局面において、PD-1阻害物質は抗PD-1抗体である。いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、トリパリマブ、スパルタリズマブ、ドスタリマブ-gxly、チスレリズマブ、バルスチリマブ、BI-754091、ジムベレリマブ、INCMGA00012、カムレリズマブ、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

30

【0601】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質はPD-L1阻害物質である。いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、デュルバルマブ、アテゾリズマブ、アベルマボル、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0602】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質はCTLA-4阻害物質である。いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は、イピリムマブ、トレメリムマブ（旧名チシリムマブ）、ザリフレリマブ、クアボンリマブ、BA3071、YH001、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

40

【0603】

いくつかの局面において、本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）、本明細書において開示されるポリヌクレオチド、または本明細書において開示されるAAVカプシドは、チェックポイント阻害物質の投与前、投与と同時、または投与後に投与される。

【0604】

50

いくつかの局面において、本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）は、チェックポイント阻害物質の投与前、投与と同時、または投与後に投与される。

【0605】

いくつかの局面において、本明細書において開示されるポリヌクレオチドは、チェックポイント阻害物質の投与前、投与と同時、または投与後に投与される。

【0606】

いくつかの局面において、本明細書において開示されるAAVカプシドは、チェックポイント阻害物質の投与前、投与と同時、または投与後に投与される。

【0607】

いくつかの局面において、本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）は、チェックポイント阻害物質と同じ組成物に入れて投与される。

10

【0608】

いくつかの局面において、本明細書において開示されるポリヌクレオチドは、チェックポイント阻害物質と同じ組成物に入れて投与される。

【0609】

いくつかの局面において、本明細書において開示されるAAVカプシドは、チェックポイント阻害物質と同じ組成物に入れて投与される。

【0610】

いくつかの局面において、本明細書において開示される組成物（例えば遺伝子治療組成物）は、チェックポイント阻害物質とは異なる組成物に入れて投与される。

20

【0611】

いくつかの局面において、本明細書において開示されるポリヌクレオチドは、チェックポイント阻害物質とは異なる組成物に入れて投与される。

【0612】

いくつかの局面において、本明細書において開示されるAAVカプシドは、チェックポイント阻害物質とは異なる組成物に入れて投与される。

【0613】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は静脈内に投与される（例えば静脈内注入）。いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は単回投与として投与される。いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質は複数回投与される。

30

【0614】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質（例えばニボルマブ）は、2週間ごとに約240mgまたは4週間ごとに約480mgの用量で、静脈内に投与される。

【0615】

いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質（例えばペンブロリズマブ）は、3週間ごとに200mgまたは6週間ごとに400mgの用量で、静脈内に投与される。いくつかの局面において、チェックポイント阻害物質（例えばペンブロリズマブ）は、3週間ごとに2mg/kg（200mgまで）の用量で、静脈内に投与される。

【0616】

いくつかの局面において、本開示の組成物（例えば遺伝子治療組成物）、ポリヌクレオチド、発現コンストラクトまたはAAVカプシド（例えばAAV粒子）が投与される対象は、固形腫瘍がん罹患している対象である。いくつかの局面において、固形腫瘍は、肉腫、癌、またはリンパ腫である。いくつかの局面において、固形腫瘍は表面病変である。いくつかの局面において、固形腫瘍は内臓腫瘍である。

40

【0617】

いくつかの局面において、対象は、皮膚がん、胃腸がん、乳がん、脳のがん、骨がん、胸部がん、頭頸部がん、婦人科がん、泌尿器がん、眼がん、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるがん罹患している。

【0618】

いくつかの局面において、がんは、

50

- ・皮膚がん（例えば転移性黒色腫、皮膚悪性黒色腫、皮膚扁平上皮癌、基底細胞癌）、
- ・乳がん（例えば浸潤性乳がん、トリプルネガティブ乳がん、炎症性乳がん）、
- ・脳のがん（例えば多形性神経膠芽腫、髄芽腫、下垂体癌、脳幹神経膠腫、星状細胞腫、乏突起神経膠腫、血管周囲細胞腫、胚細胞性腫瘍、松果体腫瘍）、
- ・骨がん（例えば脊索腫、軟骨肉腫、骨肉腫、ユーイング肉腫、線維肉腫、アダマンチノーマ、巨細胞腫）、
- ・頭頸部がん（例えば頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）；唾液腺がん、中咽頭がん、下咽頭がん、喉頭がん、口唇・口腔がん、鼻咽頭がん、甲状腺がん、副甲状腺のがん、副鼻腔・鼻腔がん）、
- ・婦人科がん（例えば卵巣がん、子宮がん、卵管がん、子宮内膜がん、子宮頸がん、膣がん、外陰がん）、
- ・泌尿器がん（例えば腎がん、尿道がん、尿路上皮がん、膀胱がん、腎臓または尿管のがん、腎盂のがん、精巣がん、陰茎がん、副腎のがん）、
- ・胃腸がん（例えば肛門部のがん、胆管がん、結腸がん、小腸のがん、食道がん、胆嚢がん、消化管間質腫瘍、肝がん、膵がん、直腸がん、胃がん）、
- ・眼がん（例えばぶどう膜黒色腫、網膜芽細胞腫、メルケル細胞癌、眼内悪性黒色腫、粘膜関連リンパ組織リンパ腫、眼窩リンパ腫、眼窩肉腫、涙腺腫瘍）、
- ・胸部がん（例えば非小細胞肺癌がん、小細胞肺癌がん、中皮腫、胸腺悪性疾患、気管腫瘍、一部の食道がん）、
- ・白血病（例えば慢性または急性白血病、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）（非T細胞性ALLを含む）、慢性リンパ性白血病（CLL））、
- ・リンパ腫（例えばホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（NHL）、ワルデンシュトレーママクログロブリン血症、縦隔原発B細胞性大細胞型リンパ腫（PMBC）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、濾胞性リンパ腫（FL）、形質転換濾胞性リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫（SMZL）、皮膚T細胞性リンパ腫（CTCL）、リンパ球性リンパ腫、原発性CNSリンパ腫）、
- ・他の血液がん（例えば多発性骨髄腫）
- ・内分泌系のがん、軟部組織の肉腫、中枢神経系の新生物（例えばCNS；非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍、脊髄軸腫瘍）、腫瘍血管新生、カポジ肉腫、類表皮がん、アスベストが誘発するがんを含む環境誘発性がん、他のB細胞性悪性疾患、神経芽細胞腫（嗅神経芽細胞腫を含む）、横紋筋肉腫、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。

10

20

30

40

50

【0619】

いくつかの局面において、固形腫瘍は表面病変である。いくつかの局面において、固形腫瘍は内臓腫瘍である。

【0620】

VIII. キット

本開示は、（i）本開示の送達ベクターまたは本開示の薬学的組成物、および（ii）任意で、使用説明書（例えば本明細書記載の方法のいずれかを実施するための指示を含む添付文書）を含む、キットまたは製造品も提供する。

【0621】

いくつかの局面において、キットまたは製造品は、（i）本開示の送達ベクター（例えば本明細書において開示される免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）またはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドを含むAAVベクター）または本開示の薬学的組成物、（ii）任意で、追加の治療剤、および（iii）任意で、使用説明書（例えば本明細書記載の方法のいずれかを実施するための指示を含む添付文書も想定される）を含む。

【0622】

いくつかの局面において、キットまたは製造品は、（i）第1サイトカインサブユニッ

ト（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチドを含むAAVベクター、または本開示の薬学的組成物、(ii) 任意で、追加の治療剤（例えばチェックポイント阻害物質（例えばPD-1阻害物質））、および(iii) 任意で、使用説明書（例えば本明細書記載の方法のいずれかを実施するための指示を含む添付文書も想定される）を含む。

【0623】

いくつかの局面において、キットまたは製造品は、(i) 本開示のポリヌクレオチド、AAVカプシドまたは組成物（例えば遺伝子治療組成物）、(ii) 任意で、追加の治療剤、および(iii) 任意で、使用説明書（例えば本明細書記載の方法のいずれかを実施するための指示を含む添付文書も想定される）を含む。

10

【0624】

いくつかの局面において、キットまたは製造品は、(i) (a) 第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と(b) 第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばウイルスベクター）を含む組成物、(ii) 任意で、追加の治療剤、および(iii) 任意で、使用説明書（例えば本明細書記載の方法のいずれかを実施するための指示を含む添付文書も想定される）を含む。いくつかの局面において、キットまたは製造品は、(i) 第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸との組み合わせを送達するための1つまたは複数の送達ベクター（例えばAAVベクター）を含む組成物、または本開示の薬学的組成物、(ii) 任意で、追加の治療剤（例えばチェックポイント阻害物質（例えばPD-1阻害物質））、および(iii) 任意で、使用説明書（例えば本明細書記載の方法のいずれかを実施するための指示を含む添付文書も想定される）を含む。

20

【0625】

いくつかの局面において、各送達ベクター（例えばウイルスベクター）は、第1核酸と第2核酸とを含むポリヌクレオチドを含む。いくつかの局面において、各送達ベクター（例えばウイルスベクター）は、第1核酸または第2核酸のどちらか一方を含み、この場合は、2つ以上の送達ベクターが組み合わせられて（例えば同時にまたは逐次的に）送達される。

30

【0626】

いくつかの局面において、キットまたは製造品は、(i) (a) 第1免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、第2免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および(b) 送達ベクター（例えばウイルスベクター）を含む組成物、(ii) 任意で、追加の治療剤、および(iii) 任意で、使用説明書（例えば本明細書記載の方法のいずれかを実施するための指示を含む添付文書も想定される）を含む。

40

【0627】

いくつかの局面において、キットまたは製造品は、(i) (a) (i) プロモーター、(i) 第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、(iii) 翻訳修飾配列、および(iv) 第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含むポリヌクレオチド、および(b) 送達ベクター（例えばAAVベクター）を含む組成物、(ii) 任意で、追加の治療剤（例えばチェックポイント阻害物質（例えばPD-1阻害物質））、および(iii) 任意で、使用説明書（例えば本明細書記載の方法のいずれかを実施するための指示を含む添付文書も想定される）を含む。

50

【0628】

いくつかの局面において、キットまたは製造品は、(i) 本開示の送達ベクター（例えば本明細書において開示される第1免疫調節タンパク質（例えば第1サイトカイン）、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、および/または第2免疫調節タンパク質（例えば第2サイトカイン）、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含むポリヌクレオチドを含むAAVベクター）、または本開示の薬学的組成物、(ii) 任意で、追加の治療剤、および(iii) 任意で、使用説明書（例えば本明細書記載の方法のいずれかを実施するための指示を含む添付文書も想定される）を含む。

【0629】

いくつかの局面において、キットまたは製造品は、(i) 本開示の送達ベクター（例えば(i) プロモーターと、(ii) 第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、(iii) 翻訳修飾配列と、(iv) 第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチドを含むAAVベクター）、または本開示の薬学的組成物、(ii) 任意で、追加の治療剤（例えばチェックポイント阻害物質（例えばPD-1阻害物質））、および(iii) 任意で、使用説明書（例えば本明細書記載の方法のいずれかを実施するための指示を含む添付文書も想定される）を含む。

【0630】

いくつかの局面において、本明細書において開示されるキットまたは製造品の構成要素は、1つまたは複数の容器に入っている。いくつかの局面において、キットまたは製造品は、(i) 本明細書において開示される免疫調節タンパク質、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドを含むAAVベクター、および(ii) AAVベクターにポリヌクレオチドを挿入するための指示を含む小冊子を含む。

【0631】

いくつかの局面において、キットまたは製造品は、(i) サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）をコードするポリヌクレオチドを含むAAVベクター、および(ii) AAVベクターにポリヌクレオチドを挿入するための指示を含む小冊子を含む。

【0632】

いくつかの局面において、本明細書において開示されるキットまたは製造品の構成要素は、1つまたは複数の容器に入っている。いくつかの局面において、キットまたは製造品は、(i) 本明細書において開示される、第1免疫調節タンパク質（例えば第1サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と第2免疫調節タンパク質（例えば第2サイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチドを含む、AAVベクター、および(ii) AAVベクターにポリヌクレオチドを挿入するための指示を含む小冊子を含む。

【0633】

いくつかの局面において、キットまたは製造品は、(i) 第1サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と第2サイトカインサブユニット（例えばIL-12サブユニット）またはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチドを含むAAVベクター、および(ii) AAVベクターにポリヌクレオチドを挿入するための指示を含む小冊子を含む。

【0634】

いくつかの局面において、本開示のキットまたは製造品は、少なくとも1つの送達ベクター（例えばAAVベクターまたはAAVカプシド）を含む。いくつかの局面において、本開示のキットまたは製造品は、本明細書において開示される、少なくとも1つの免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む。いくつかの局

10

20

30

40

50

面において、本開示のキットまたは製造品は、本明細書において開示される、2つ以上の免疫調節タンパク質（例えばサイトカイン）、その1つまたは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0635】

本開示のベクター、ポリヌクレオチドおよび薬学的組成物、またはそれらの組み合わせが、当技術分野において周知の確立されたキットフォーマットのうちの1つに容易に組み込まれることは、当業者には容易に理解されるだろう。

【0636】

本開示のある特定の局面（E）には、以下に挙げるものが含まれる。

【0637】

E1. (a) (i) プロモーターと、(ii) 第1のインターロイキン-12（IL-12）サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、(iii) 翻訳修飾配列と、(iv) 第2のIL-12サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチドを含むアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを含む第1組成物、および

(b) チェックポイント阻害物質を含む第2組成物を含む、併用療法。

【0638】

E2. AAVベクターがAAV血清型2（AAV2）ベクターである、E1の併用療法。

【0639】

E3. 翻訳修飾配列が、フューリン切断配列、2A自己プロセシングペプチド配列、配列内リボソーム進入部位（IRES）配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む、E1またはE2の併用療法。

【0640】

E4. 翻訳修飾配列が、フューリン切断配列および2A自己プロセシングペプチド配列（F2A）を含む、E3の併用療法。

【0641】

E5. プロモーターが、CAGプロモーター、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1a（伸長因子1a）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、ユビキチン（UbC）プロモーター、またはそれらの任意の組み合わせを含む、E1～E5のいずれか1つの併用療法。

【0642】

E6. 前記ポリヌクレオチドが、ポリ（A）（pA）配列をさらに含む、E1～E5のいずれか1つの併用療法。

【0643】

E7. 前記ポリヌクレオチドが、2つの末端逆位反復配列（ITR）配列をさらに含む、E1～E6のいずれか1つの併用療法。

【0644】

E8. チェックポイント阻害物質が、プログラム細胞死タンパク質1（PD-1）、プログラム死リガンド1（PD-L1）、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA-4）、リンパ球活性化遺伝子3（LAG-3）、T細胞免疫グロブリンムチン含有タンパク質3（TIM-3）、BおよびTリンパ球アテニュエーター（BTLA）、IgおよびITIMドメインを持つT細胞免疫受容体（TIGIT）、T細胞活性化のVドメインIgサブレッサー（VISTA）、アデノシンA2a受容体（A2aR）、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）、CD20、CD39、CD73、誘導性T細胞共刺激分子（ICOS）、B7-H3の阻害物質、またはそれらの任意の組み合わせを含む、E1～E7のいずれか1つの併用療法。

【0645】

E9. チェックポイント阻害物質が、プログラム細胞死タンパク質1（PD-1）阻害物質を含む、E1～E8のいずれか1つの併用療法。

10

20

30

40

50

【0646】

E10. PD-1阻害物質が抗PD-1抗体である、E9の併用療法。

【0647】

E11. 第1のIL-12サブユニットが、SEQ ID NO:80に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、第2のIL-12サブユニットが、SEQ ID NO:81に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、E1～E10のいずれか1つの併用療法。

【0648】

E12. 第1核酸が、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、またはSEQ ID NO:77に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列を含み、第2核酸が、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、またはSEQ ID NO:92に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列を含む、E1～E11のいずれか1つの併用療法。

【0649】

E13. 前記ポリヌクレオチドが、SEQ ID NO:82に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列を含む、E1～E12のいずれか1つの併用療法。

【0650】

E14. 第1組成物が腫瘍内送達に適し、第2組成物が静脈内送達に適する、E1～E13のいずれか1つの併用療法。

【0651】

E15. 腫瘍に罹患している対象を処置する方法であって、E1～E14のいずれか1つの併用療法を該対象に施す工程を含む、方法。

【0652】

E16. 第1組成物が腫瘍内に投与される、E15の方法。

【0653】

E17. 第1組成物が腫瘍の複数部位に投与される、E16の方法。

【0654】

E18. 第1組成物が、第2組成物の投与前、投与と同時に、または投与後に投与される、E15～E17のいずれか1つの方法。

【0655】

E19. 腫瘍が、皮膚がん、乳がん、脳のがん、骨がん、頭頸部がん、唾液腺がん、婦人科がん、泌尿器がん、胃腸がん、眼がん、胸部がん、血液がん、内分泌系のがん、軟部組織の肉腫、中枢神経系の新生物、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるがん由来する、E15～E18のいずれか1つの方法。

【0656】

E20. 腫瘍が、肝細胞癌、結腸癌、および黒色腫からなる群より選択されるがん由来する、E15～E19のいずれか1つの方法。

【0657】

E21. (a) (i) プロモーターと、(ii) 第1サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、(iii) 翻訳修飾配列と、(iv) 第2サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および

(b) 送達ベクターを含む、組成物。

【0658】

E22. 第1サイトカインサブユニットおよび第2サイトカインサブユニットがIL-12サブユニットである、E21の組成物。

10

20

30

40

50

【0659】

E23. 第1核酸または第2核酸が、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、またはSEQ ID NO:77と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む、E22の組成物。

【0660】

E24. 第1核酸または第2核酸が、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、またはSEQ ID NO:92と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む、E22またはE23の組成物。

10

【0661】

E25. (a) 第1免疫調節タンパク質、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、および/または第2免疫調節タンパク質、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントをコードする第2核酸、を含むポリヌクレオチド、ならびに

(b) 送達ベクター

を含む、組成物。

【0662】

E26. 第1免疫調節タンパク質、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメント、および/または第2免疫調節タンパク質、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントが、サイトカインまたはその機能的フラグメントである、E25の組成物。

20

【0663】

E27. サイトカインが、腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α)、I型インターフェロン (INF)、II型IFN、インターロイキン (IL) -2、IL-12、IL-15、IL-21、IL-23、IL-27、IL-18、IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL17、IL33、TL1A、CD40L、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、それらの任意の機能的フラグメント、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、E26の組成物。

【0664】

E28. 第1免疫調節タンパク質および第2免疫調節タンパク質がサイトカインである、E25～E27のいずれか1つの組成物。

30

【0665】

E29. 第1免疫調節タンパク質が、IL-12、その1つもしくは複数のサブユニット、またはその機能的フラグメントである、E25～E28のいずれか1つの組成物。

【0666】

E30. 第1核酸が、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸、および/またはIL-12 p40サブユニットをコードする核酸を含む、E25～E29のいずれか1つの組成物。

【0667】

E31. 第1核酸が、SEQ ID NO:5～10、77のいずれかもしくは表2中の任意の核酸配列に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む、E25～E30のいずれか1つの組成物。

40

【0668】

E32. 第2免疫調節タンパク質がIL-15またはその機能的フラグメントを含む、E25～E31のいずれか1つの組成物。

【0669】

E33. 第2核酸がIL-15遺伝子を含む、E25～E32のいずれか1つの組成物。

【0670】

E34. 第2核酸が、SEQ ID NO:11～13のいずれかもしくは表4中の任意の核酸配列

50

に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む、E25～E33のいずれか1つの組成物。

【0671】

E35. 第1免疫調節タンパク質、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメント、または第2免疫調節タンパク質、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントが、可溶性のCD40リガンド (CD40L)、CD19リガンド (CD19L)、CD48リガンド (CD48L)、CD20リガンド (CD20L)、それらの任意の機能的フラグメント、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、E25～E27またはE29～E34のいずれか1つの組成物。

10

【0672】

E36. 遺伝子治療組成物である、E21～E35のいずれか1つの組成物。

【0673】

E37. (a) 第1サイトカイン、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントをコードする第1核酸、および/または

(b) 第2サイトカイン、その1つもしくは複数のサブユニット、もしくはその機能的フラグメントをコードする第2核酸を含む、ポリヌクレオチド。

【0674】

E38. 第1サイトカインおよび第2サイトカインが、腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α)、I型インターフェロン (INF)、II型IFN、インターロイキン (IL) -2、IL-12、IL-15、IL-21、IL-23、IL-27、IL-18、IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL17、IL33、TL1A、CD40L、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、それらの任意の機能的フラグメント、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、E37のポリヌクレオチド。

20

【0675】

E39. 第1サイトカインがIL-12、IL-18、IL-21、またはその機能的フラグメントである、E37またはE38のポリヌクレオチド。

【0676】

E40. 第1核酸が、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸、および/またはIL-12 p40サブユニットをコードする核酸を含む、E37～E39のいずれか1つのポリヌクレオチド。

30

【0677】

E41. 第1核酸が、SEQ ID NO:5～10、77のいずれかもしくは表2中の任意の核酸配列に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む、E37～E40のいずれか1つのポリヌクレオチド。

【0678】

E42. 第2サイトカインが、IL-15、IL-2、またはその機能的フラグメントである、E37～E41のいずれか1つのポリヌクレオチド。

40

【0679】

E43. 第2核酸がIL-15遺伝子を含む、E37～E42のいずれか1つのポリヌクレオチド。

【0680】

E44. 第2核酸が、SEQ ID NO:11～13、58のいずれかもしくは表4中の任意の核酸配列に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む、E37～E43のいずれか1つのポリヌクレオチド。

【0681】

E45. (i) プロモーターと、(ii) 第1サイトカインサブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、(iii) 翻訳修飾配列と、(iv) 第2サイトカイン

50

サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含む、ポリヌクレオチド。

【0682】

E46. 第1サイトカインサブユニットおよび第2サイトカインサブユニットがIL-12サブユニットである、E45のポリヌクレオチド。

【0683】

E47. 第1核酸または第2核酸が、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、またはSEQ ID NO:77と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む、E45またはE46のポリヌクレオチド。

10

【0684】

E48. 第1核酸または第2核酸が、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、またはSEQ ID NO:92と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一である配列を含む、E45またはE46のポリヌクレオチド。

【0685】

E49. 前記ポリヌクレオチドがプロモーターをさらに含む、E21~E36のいずれか1つの組成物またはE37~E48のいずれか1つのポリヌクレオチド。

【0686】

E50. プロモーターが、第1核酸に機能的に連結された第1プロモーターを含む、E49の組成物またはポリヌクレオチド。

20

【0687】

E51. プロモーターが、第2核酸に機能的に連結された第2プロモーターを含む、E49またはE50の組成物またはポリヌクレオチド。

【0688】

E52. プロモーターが、恒常的に活性なプロモーター、細胞型特異的プロモーター、または誘導性プロモーターである、E48~E50のいずれか1つの組成物またはポリヌクレオチド。

【0689】

E53. プロモーターが、CAGプロモーター、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1a（伸長因子1a）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、ユビキチン（UbC）プロモーター、またはそれらの任意の組み合わせを含む、E48~E52のいずれか1つの組成物またはポリヌクレオチド。

30

【0690】

E54. 前記ポリヌクレオチドが、フューリン切断配列、2A自己プロセシングペプチド配列、配列内リボソーム進入部位（IRES）配列、またはそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される翻訳修飾配列をさらに含む、E21~E36もしくはE49~E53のいずれか1つの組成物またはE37~E53のいずれか1つのポリヌクレオチド。

【0691】

E55. 前記ポリヌクレオチドが、エンハンサー配列、イントロン配列、マイクロRNA結合部位、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む、E21~E36もしくはE49~E54のいずれか1つの組成物またはE37~E54のいずれか1つのポリヌクレオチド。

40

【0692】

E56. 前記ポリヌクレオチドがポリ（A）（pA）配列をさらに含む、E21~E36もしくはE49~E55のいずれか1つの組成物またはE37~E55のいずれか1つのポリヌクレオチド。

【0693】

E57. 第1核酸が、IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーター、IRES配列、およびIL-15遺伝子またはその機能的フラグメントを含み、第2核酸が、IL-12 p40サブユニットまたはその機能的

50

フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む、E21～E36もしくはE49～E56のいずれか1つの組成物またはE37～E56のいずれか1つのポリヌクレオチド。

【0694】

E58. 第1核酸が、IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸に機能的に連結されたプロモーター、フューリン切断配列および/または2A自己プロセシングペプチド配列、ならびにIL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸を含み、第2核酸が、IL-15遺伝子またはその機能的フラグメントに機能的に連結されたプロモーターを含む、E21～E36もしくはE49～E56のいずれか1つの組成物またはE37～E56のいずれか1つのポリヌクレオチド。

10

【0695】

E59. 第1核酸が、イントロン配列、pA配列、エンハンサー配列またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む、E57またはE58の組成物またはポリヌクレオチド。

【0696】

E60. 第1核酸が、イントロン配列およびヒト成長ホルモン(hGH) pA配列またはウシ成長ホルモン(bGH) pA配列をさらに含む、E59の組成物またはポリヌクレオチド。

【0697】

E61. 第2核酸が、イントロン配列、pA配列、エンハンサー配列、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む、E57～E60のいずれか1つの組成物またはポリヌクレオチド。

20

【0698】

E62. 第2核酸が、SV40イントロン配列および合成(SYN) pA配列をさらに含む、E61の組成物またはポリヌクレオチド。

【0699】

E63. 前記ポリヌクレオチドがCMVエンハンサー配列を含む、E21～E36もしくはE49～E62のいずれか1つの組成物またはE37～E62のいずれか1つのポリヌクレオチド。

【0700】

E64. 第1核酸のプロモーターが、CAGプロモーター、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1a(伸長因子1a)プロモーター、RSV(ラウス肉腫ウイルス)プロモーター、またはユビキチン(UbC)プロモーターを含む、E21～E36もしくはE49～E63のいずれか1つの組成物またはE37～E63のいずれか1つのポリヌクレオチド。

30

【0701】

E65. 第2核酸のプロモーターが、CAGプロモーター、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1a(伸長因子1a)プロモーター、RSV(ラウス肉腫ウイルス)プロモーター、またはユビキチン(UbC)プロモーターを含む、E21～E36もしくはE49～E64のいずれか1つの組成物またはE37～E64のいずれか1つのポリヌクレオチド。

【0702】

E66. 前記ポリヌクレオチドが2つの末端逆位反復配列(ITR)をさらに含む、E21～E36もしくはE49～E65のいずれか1つの組成物またはE37～E65のいずれか1つのポリヌクレオチド。

40

【0703】

E67. E37～E66のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはE107～E116のいずれか1つの発現コンストラクトと、送達ベクターとを含む、組成物。

【0704】

E68. 腫瘍内、静脈内、腹腔内、脾臓内、髄腔内、肝臓内、骨内、皮内、もしくは実質内投与、または唾液腺への、もしくはリンパ節中への送達に適している、E21～E36またはE49～E67のいずれか1つの組成物。

【0705】

E69. 送達ベクターが、ウイルスベクター、プラスミド、脂質、タンパク質粒子、細菌ベクター、リソソーム、ウイルス様粒子、ポリマー粒子、エクソソーム、およびヴォー

50

ルト粒子からなる群より選択される、E21～E36またはE49～E68のいずれか1つの組成物。

【0706】

E70. 送達ベクターが、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、またはレトロウイルスベクターからなる群より選択される、E21～E36またはE49～E69のいずれか1つの組成物。

【0707】

E71. 送達ベクターが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11およびAAV12からなる群より選択されるAAV血清型を含む組換えAAV（rAAV）ベクターである、E21～E36またはE49～E70のいずれか1つの組成物。

10

【0708】

E72. rAAVベクターがAAV2血清型である、E71の組成物。

【0709】

E73. rAAVが野生型の血清型と比較して改変されている、E71またはE72の組成物。

【0710】

E74. (a) IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸に機能的に連結されたCAGプロモーターと、2A自己プロセシングペプチド（F2A）配列が続くフューリン切断配列と、IL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸と、成長ホルモンpA配列とを含むポリヌクレオチド、および

20

(b) AAVベクター

を含む、組成物。

【0711】

E75. 腫瘍内送達に適した、E37～E66のいずれか1つのポリヌクレオチドを含むアデノ随伴ウイルス（AAV）カプシド。

【0712】

E76. AAVカプシド血清型が、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11およびAAV12からなる群より選択される、E75のAAVカプシド。

【0713】

E77. AAV血清型がAAV2である、E76のAAVカプシド。

30

【0714】

E78. AAVが野生型の血清型と比較して改変されている、E76またはE77のAAVカプシド。

【0715】

E79. 1つまたは複数の免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントを、その必要のある対象において発現させる方法であって、有効量の、E21～E36もしくはE49～E74のいずれか1つの組成物、E37～E66のいずれか1つのポリヌクレオチド、またはE75～E78のいずれか1つのAAVカプシドを該対象に投与する工程を含む、該方法。

【0716】

40

E80. 投与が、腫瘍内投与、静脈内投与、脾臓内投与、髄腔内投与、肝臓内投与、骨内投与、皮内投与、実質内投与、唾液腺への送達による投与、またはリンパ節中への投与である、E79の方法。

【0717】

E81. E21～E36もしくはE49～E64のいずれか1つの組成物、E37～E66のいずれか1つのポリヌクレオチド、またはE75～E78のいずれか1つのAAVカプシドを、腫瘍への直接注射によって投与する工程を含む、1つまたは複数の免疫調節タンパク質またはその機能的フラグメントを腫瘍に送達する方法。

【0718】

E82. 腫瘍に罹患している対象において症状を処置または低減する方法であって、E2

50

1～E36もしくはE49～E64のいずれか1つの組成物、E37～E66のいずれか1つのポリヌクレオチド、またはE75～E78のいずれか1つのAAVカプシドを該対象に投与する工程を含み、投与が、腫瘍内投与、静脈内投与、脾臓内投与、髄腔内投与、肝臓内投与、骨内投与、皮内投与、実質内投与、唾液腺への送達による投与、またはリンパ球中への投与である、該方法。

【0719】

E83. その必要のある対象において腫瘍のサイズを低減する方法であって、E21～E36もしくはE49～E64のいずれか1つの組成物、E37～E66のいずれか1つのポリヌクレオチド、またはE75～E78のいずれか1つのAAVカプシドを該対象に投与する工程を含み、投与が、腫瘍内投与、静脈内投与、脾臓内投与、髄腔内投与、肝臓内投与、骨内投与、皮内投与、実質内投与、唾液腺への送達による投与、またはリンパ球中への投与である、該方法。

10

【0720】

E84. 腫瘍に罹患している対象において症状を処置または低減する方法であって、

(a) (i) IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、(ii) IL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および

(b) AAVベクター

を含む組成物を該対象に投与する工程を含み、任意で、チェックポイント阻害物質を投与する工程をさらに含む、該方法。

20

【0721】

E85. その必要のある対象において腫瘍のサイズを低減する方法であって、

(a) (i) IL-12 p35サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第1核酸と、(ii) IL-12 p40サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする第2核酸とを含むポリヌクレオチド、および

(b) AAVベクター

を含む組成物を該対象に投与する工程を含み、任意で、チェックポイント阻害物質を投与する工程をさらに含む、該方法。

【0722】

E86. 前記組成物の投与が、腫瘍内投与、静脈内投与、腹腔内投与、脾臓内投与、髄腔内投与、肝臓内投与、骨内投与、皮内投与、実質内投与、唾液腺への送達による投与、またはリンパ節中への投与である、E84またはE85の方法。

30

【0723】

E87. 腫瘍が、肝細胞癌、結腸癌、黒色腫、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるがんに由来する、E81～E86のいずれか1つの方法。

【0724】

E88. 前記対象が、肝細胞癌、結腸癌、黒色腫、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるがんに罹患している、E79～E86のいずれか1つの方法。

【0725】

E89. 腫瘍が、皮膚がん、乳がん、脳のがん、骨がん、頭頸部がん、唾液腺がん、婦人科がん、泌尿器がん、胃腸がん、眼がん、胸部がん、血液がん、リンパ腫、内分泌系のがん、軟部組織の肉腫、中枢神経系の新生物、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるがんに由来する、E81～E86のいずれか1つの方法。

40

【0726】

E90. 前記対象が、転移性黒色腫、皮膚悪性黒色腫、皮膚扁平上皮癌、基底細胞癌、浸潤性乳がん、トリプルネガティブ乳がん、炎症性乳がん、多形性神経膠芽腫、髄芽腫、下垂体癌、脳幹神経膠腫、星状細胞腫、乏突起神経膠腫、血管周囲細胞腫、胚細胞性腫瘍、松果体腫瘍、脊索腫、軟骨肉腫、骨肉腫、ユーイング肉腫、線維肉腫、アダマンチノーマ、巨細胞腫、頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)、唾液腺がん、中咽頭がん、下咽頭がん、喉頭がん、口唇・口腔がん、鼻咽頭がん、甲状腺がん、副甲状腺のがん、副鼻腔・鼻腔が

50

ん、卵巣がん、子宮がん、卵管がん、子宮内膜がん、子宮頸がん、膣がん、外陰がん、腎がん、尿道がん、尿路上皮がん、膀胱がん、腎臓または尿管のがん、腎盂のがん、精巣がん、陰茎がん、副腎のがん、肛門部のがん、胆管がん、結腸がん、小腸のがん、食道がん、胆嚢がん、消化管間質腫瘍、肝がん、膵がん、直腸がん、胃がん、ぶどう膜黒色腫、網膜芽細胞腫、メルケル細胞癌、眼内悪性黒色腫、粘膜関連リンパ組織リンパ腫、眼窩リンパ腫、眼窩肉腫、涙腺腫瘍、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、中皮腫、胸腺悪性疾患、気管腫瘍、一部の食道がん、慢性または急性白血病、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）（非T細胞性ALLを含む）、慢性リンパ性白血病（CLL）、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（NHL）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、縦隔原発B細胞性大細胞型リンパ腫（PMBC）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、濾胞性リンパ腫（FL）、形質転換濾胞性リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫（SMZL）、皮膚T細胞性リンパ腫（CTCL）、リンパ球性リンパ腫、原発性CNSリンパ腫、多発性骨髄腫、CNS;非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍、脊髄軸腫瘍、腫瘍血管新生、カポジ肉腫、類表皮がん、アスベストが誘発するがんを含む環境誘発性がん、他のB細胞性悪性疾患、神経芽細胞腫、嗅神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるがんに罹患している、E15～E20またはE79～E89のいずれか1つの方法。

10

【0727】

E91. 第1核酸と第2核酸が同時にまたは逐次的に投与される、E81～E90のいずれか1つの方法。

20

【0728】

E92. 同時投与が、E21～E36もしくはE49～E64のいずれか1つの組成物、E37～E66のいずれか1つのポリヌクレオチド、またはE75～E78のいずれか1つのAAVカプシドを投与する工程を含み、第1核酸と第2核酸が同じ送達ベクターまたは同じAAVカプシド中にある、E91の方法。

【0729】

E93. 同時投与または逐次投与が、E21～E36もしくはE49～E64のいずれか1つの組成物、E37～E66のいずれか1つのポリヌクレオチド、またはE75～E78のいずれか1つのAAVカプシドを投与する工程を含み、第1核酸と第2核酸が異なる送達ベクターまたは異なるAAVカプシド中にある、E91の方法。

30

【0730】

E94. E21～E36もしくはE49～E64のいずれか1つの組成物、E37～E66のいずれか1つのポリヌクレオチド、またはE75～E78のいずれか1つのAAVカプシドが、チェックポイント阻害物質と組み合わせて投与される、E81～E93のいずれか1つの方法。

【0731】

E95. チェックポイント阻害物質が、プログラム細胞死タンパク質1（PD-1）、プログラム死リガンド1（PD-L1）、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA-4）、リンパ球活性化遺伝子3（LAG-3）、T細胞免疫グロブリンムチン含有タンパク質3（TIM-3）、BおよびTリンパ球アテニュエーター（BTLA）、IgおよびITIMドメインを持つT細胞免疫受容体（TIGIT）、T細胞活性化のVドメインIgサブプレッサー（VISTA）、アデノシンA2a受容体（A2aR）、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）、CD20、CD39、CD73、誘導性T細胞共刺激分子（ICOS）、B7-H3の阻害物質、またはそれらの任意の組み合わせを含む、E94の方法。

40

【0732】

E96. チェックポイント阻害物質がPD-1阻害物質である、E94またはE95の方法。

【0733】

E97. PD-1阻害物質が抗PD-1抗体である、E96の方法。

【0734】

E98. チェックポイント阻害物質がPD-L1阻害物質である、E1～E8、E94またはE9

50

5のいずれか1つの方法。

【0735】

E99. チェックポイント阻害物質がCTLA-4阻害物質である、E1～E8、E94またはE95のいずれか1つの方法。

【0736】

E100. チェックポイント阻害物質が、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、トリパリマブ、スパルタリズマブ、ドスタリマブ-gxly、チスレリズマブ、バルスチリマブ、BI-754091、ジムベレリマブ、INCMGA00012、カムレリズマブ、またはそれらの任意の組み合わせを含む、E1～E8またはE94～E99のいずれか1つの方法。

【0737】

E101. E21～E36またはE49～E64のいずれか1つの組成物、E37～E66のいずれか1つのポリヌクレオチド、またはE75～E78のいずれか1つのAAVカプシドが、チェックポイント阻害物質の投与前、投与と同時に、または投与後に投与される、E94～E100のいずれか1つの方法。

【0738】

E102. 転移リンパ節中のリンパ節、E68、E82、E83またはE86のいずれか1つの方法。

【0739】

E103. 腫瘍が転移性腫瘍である、E15～E20およびE81～E102のいずれか1つの方法。

【0740】

E104. 前記投与が、腫瘍への第1組成物または前記ポリヌクレオチドを含む組成物の直接注射を含む、E15～E20およびE81～E102のいずれか1つの方法。

【0741】

E105. SEQ ID NO:5～37、48～57、77、82もしくは92のいずれか、表2、表4もしくは表5に示される任意の核酸に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する核酸配列、またはそれらの任意の組み合わせを含む、ポリヌクレオチド。

【0742】

E106. SEQ ID NO:82に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有する核酸配列を含む、ポリヌクレオチド。

【0743】

- E107. (a) X-I1-P1-E-P2-I2-X'-T-Y;
 (b) Y-I1-P1-E-P2-I2-X-T-X';
 (c) pA-X-I1-L-P1-E-P2-I2-X-T-Y-pA;
 (d) pA-Y-I1-L-P1-E-P2-I2-X-T-X'-pA;
 (e) P1-X-T-X'-pA;または
 (f) E-P1-I1-X-T-X'-pA

から選択される式を含む発現コンストラクトであって、式中、XおよびX'は第1免疫調節分子のサブユニットをコードし、I1およびI2はそれぞれイントロンであり、PおよびP2はそれぞれプロモーターであり、Eはエンハンサーであり、Tは翻訳修飾配列であり、Yは第2免疫調節分子をコードし、Lは長鎖末端反復 (long-terminal repeat) であり、pAはポリA配列である、該発現コンストラクト。

【0744】

E108. P1またはP2が、CAGプロモーター、CBAプロモーター、CMVプロモーター、EF-1a (伸長因子1a) プロモーター、RSV (ラウス肉腫ウイルス) プロモーター、ユビキチン (UbC) プロモーター、またはそれらの任意の組み合わせを含む、E107の発現コンストラクト。

【0745】

E109. Tが、配列内リボソーム進入部位 (IRES) 配列、フューリン切断配列、2A自

10

20

30

40

50

己プロセッシングペプチド配列、またはそれらの任意の組み合わせである、E107またはE108の発現コンストラクト。

【0746】

E110. マイクロRNA結合部位をさらに含む、E107～E109のいずれか1つの発現コンストラクト。

【0747】

E111. Xが、IL-12サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸であり、X'が、IL-12サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸であり、Yが、IL-15遺伝子またはその機能的フラグメントである、E107～E110のいずれか1つの発現コンストラクト。

【0748】

E112. Xが、IL-12サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸であり、X'が、IL-12サブユニットまたはその機能的フラグメントをコードする核酸である、E107～E110のいずれか1つの発現コンストラクト。

【0749】

E113. IL-12サブユニットをコードする核酸が、IL-12 p35サブユニットをコードする核酸またはIL-12 p40サブユニットをコードする核酸である、E111またはE112の発現コンストラクト。

【0750】

E114. pAが、ヒト成長ホルモン（hGH）pA配列、ウシ成長ホルモン（BGH）pA配列、または合成（SYN）pA配列を含む、E107～E113のいずれか1つの発現コンストラクト。

【0751】

E115. I1、I2、またはその両方が、SV40イントロン配列またはCAGイントロン配列を含む、E107～E114のいずれか1つの発現コンストラクト。

【0752】

E116. EがCMVエンハンサー配列を含む、E107～E115のいずれか1つの発現コンストラクト。

【0753】

E117. その必要のある対象に、（a）E21～E36もしくはE49～E64のいずれか1つの組成物、E37～E66もしくはE105～E106のいずれか1つのポリヌクレオチド、E107～E116のいずれか1つの発現コンストラクト、またはE75～E78のいずれか1つのAAVカプシドと、（b）チェックポイント阻害物質とを投与する工程を含む、対象における腫瘍縮小を誘導するための方法。

【0754】

E118. チェックポイント阻害物質がPD-1阻害物質である、E117の方法。

【0755】

E119. PD-1阻害物質が抗PD-1抗体である、E118の方法。

【0756】

E120. 抗PD-1抗体がペンブロリズマブまたはニボルマブである、E10の併用療法またはE97もしくはE119の方法。

【0757】

E121. 腫瘍が、肝細胞癌、結腸癌または黒色腫からなる群より選択されるがんに由来する、E117～E120のいずれか1つの方法。

【0758】

E122. E21～E36もしくはE49～E64のいずれか1つの組成物、E37～E66もしくはE105～E106のいずれか1つのポリヌクレオチド、E107～E116のいずれか1つの発現コンストラクト、またはE75～E78のいずれか1つのAAVカプシドが、腫瘍への直接注射によって投与される、E81～E102、E94～E104またはE117～E121のいずれか1つの方法。

10

20

30

40

50

【0759】

E123. 直接注射が腫瘍中への2回以上の注射を含む、E81、E104またはE122のいずれか1つの方法。

【0760】

E124. チェックポイント阻害物質が静脈内注入によって投与される、E15～E20、E84、E85、E94～E104またはE117～E123のいずれか1つの方法。

【0761】

E125. 治療または予防における使用のための、E1～E14のいずれか1つの併用療法、E21～E36もしくはE49～E64のいずれか1つの組成物、E37～E66もしくはE105～E106のいずれか1つのポリヌクレオチド、E75～E78のいずれか1つのAAVカプシド、またはE107～E116のいずれか1つの発現コンストラクト。

10

【0762】

E126. 遺伝子治療における使用のための、E125の併用療法、組成物、ポリヌクレオチド、AAVカプシドまたは発現コンストラクト。

【0763】

E127. がん治療における使用のための、E125またはE127の併用療法、組成物、ポリヌクレオチド、AAVカプシドまたは発現コンストラクト。

【0764】

E128. E15～E20、E79～E104、またはE117～E124のいずれか1つの方法における使用のための、E125～E127のいずれか1つの併用療法、組成物、ポリヌクレオチド、AAVカプシドまたは発現コンストラクト。

20

【0765】

E129. E21～E36もしくはE49～E64のいずれか1つの組成物、E37～E66もしくはE105～E106のいずれか1つのポリヌクレオチド、E75～E78のいずれか1つのAAVカプシド、またはE107～E116のいずれか1つの発現コンストラクトを含む、薬学的組成物。

【0766】

E130. 薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、E129の薬学的組成物。

【0767】

E131. 治療または予防における使用のための医薬の製造のための、E1～E14のいずれか1つの併用療法、E21～E36もしくはE49～E64のいずれか1つの組成物、E37～E66もしくはE105～E106のいずれか1つのポリヌクレオチド、E75～E78のいずれか1つのAAVカプシド、またはE107～E116のいずれか1つの発現コンストラクトの使用。

30

【0768】

E132. 治療または予防がE15～E20、E79～E104またはE117～E124のいずれか1つの方法を含む、E131の使用。

【0769】

本開示の実施では、別段の表示がある場合を除き、当技術分野の技能の範囲内にある細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNAおよび免疫学の従来技法を使用することになる。そのような技法は文献に詳しく説明されている。

40

【0770】

上で引用したすべての文献および本明細書において引用するすべての文献は、参照によりそれぞれの全体が本明細書に組み入れられる。

【0771】

本明細書において提供される実施例はいずれも、例示のためであって、限定のためではない。

【実施例】

【0772】

実施例1: 複数のがん細胞株モデルにおけるAAV-2ルシフェラーゼの発現の生体内分布お

50

よび動態の評価

5つの異なる同系マウスがんモデル（MC38、B16F10-p436、Cloudman S91、CT26-p928、およびA20-p165）におけるAAV2-ルシフェラーゼベクターの形質導入を検証した。この試験の目的は、AAVベクターによって効率よく形質導入される腫瘍タイプを同定することにあった。形質導入効率ならびに導入遺伝子発現のレベルおよび動態をインビトロとインビボの両方で評価した。形質導入は、腫瘍内注射後の動態を決定するために、21日にわたって評価した。ルシフェラーゼ発現は、3週間にわたって週に複数日、全身バイオルミネセンスイメージングによって評価した。注射部位からのAAV2の生体内分布またはエスケープを評価するために、肝臓および脾臓を、免疫組織化学およびPCRによる評価用に採取した。全身曝露を制限しつつ最大の腫瘍形質導入および導入遺伝子発現をサポートする比を、評価した。インビトロ形質導入とインビボ形質導入の相関関係も評価した。その結果、AAV2はすべての腫瘍モデルにうまく投与されうることが示された。

【0773】

方法

ベクターの詳細

AAV2/2ホタルルシフェラーゼ（AAV2-luc）は、Vector Biolabs（ペンシルベニア州モールバン）から、 1.0×10^{13} GC/mLの力価で購入した。rAAVゲノムは、AAV2末端逆位反復配列（ITR）、CAGプロモーター、ホタルルシフェラーゼをコードする導入遺伝子およびウシ成長ホルモン（bGH）ポリアデニル化シグナルを含んだ。

【0774】

マウス腫瘍株

A20リンパ腫、CT26結腸癌およびCloudman S91はAmerican Type Culture Collection（ATCC）から入手した。MC38結腸直腸腺癌細胞はNational Cancer Institute（NCI）から入手した。B16F10マウス結腸癌細胞株は、University of North Carolina（UNC）Lineberger Comprehensive Cancer Centerから入手した。細胞はすべて供給業者の仕様書に従って細胞培養培地中で維持した。

【0775】

インビトロアッセイ

複製細胞に、2000～40500vp/細胞の範囲のMOIで、AAV2-lucをトランスフェクトした。ルシフェラーゼ発現（バイオルミネセンスによって決定-IVIS spectrum CT、Perkin Elmer）を、トランスフェクションの2日後および5日後に決定した。

【0776】

インビボアッセイ

同系BALB/c、C57Bl/6またはDBA/2において、皮下で成長させた、樹立A20リンパ腫、Cloudman S91黒色腫、B16F10黒色腫、CT26結腸直腸腫瘍およびMC38結腸直腸腫瘍。マウスの右側腹部の皮下に、0.01ml、0.025mlまたは0.05mlの媒体中の 1×10^{11} vpを、直接注射した。トランスフェクション後、5日目から一定の間隔で、ルシフェリンの注射後に、腫瘍を、バイオルミネセンスについて縦断的に撮像した（IVIS spectrum CT、Perkin Elmer）。これらの試験は、21日目か、または腫瘍体積が最大許容体積（典型的には $1500 \sim 2000 \text{ mm}^3$ ）を越えた時のどちらかに終了した。試験の最後に、マウスを安楽死させ、さらなる分析のために、腫瘍、肝臓および脾臓の試料を収集した。

【0777】

結果

インビトロトランスフェクションは活発なルシフェラーゼ発現をもたらす

B16F10、Cloudman S91、CT26およびMC38ルシフェラーゼ発現は、トランスフェクションの2日後に検出された（図3）。対照的に、A20におけるルシフェラーゼ発現は、5日目まで明白にはならなかった（図3）。最も高いMOIでのルシフェラーゼ発現によれば、光子強度に関して、順位序列はCloudman S91>B16F10=MC38>CT26>

10

20

30

40

50

A20だった（図3）。ルシフェラーゼ発現のレベルはMOI依存的だった。Cloudman S91では2000のMOIで2日目にはルシフェラーゼ発現が検出されたのに対し、A20におけるルシフェラーゼ発現は、はるかに高いMOI（>135000）でしか観察されず、その場合でも5日目まで観察されなかった（図3）。

【0778】

AAV2-lucによるマウス同系腫瘍の腫瘍内注射は活発なルシフェラーゼ発現をもたらす

同系マウス腫瘍へのAAV2-Lucのトランスフェクションは、検証した5つの同系マウス腫瘍株すべてにおいて、ルシフェラーゼ発現（バイオルミネセンスによって決定）につながった。B16F10およびCloudman S91について、図4Aおよび図4Bに、時間経過を示す。バイオルミネセンスは、トランスフェクトされた腫瘍の大半において、最初の時点（4日目、Cloudman S91;5日目、B16F10）で検出され、評価可能な最後の時点（21日目、Cloudman S91;12日目、B16F10）において依然として腫瘍中に検出可能であった。持続的なルシフェラーゼ発現を示した（図4Aおよび図4B）。群番号（Grp）1には対照食塩水注射を与え、群番号2には腫瘍体積の10%に相当する10uLのAAV2-luc注射を与え、群番号3には腫瘍体積の25%に相当する25uLのAAV2-luc注射を与え、群番号4には腫瘍体積の50%に相当する50uLのAAV2-luc注射を与えた。

10

【0779】

バイオルミネセンスのパターン

CT26（図5A）、B16F10（図5B）、MC38（図5D）およびCloudman S91（図5E）については、バイオルミネセンスは一般に腫瘍塊/注射部位と共局在した。ただし、A20リンパ腫モデルでは、原発腫瘍塊とは離れた場所に、最大用量（約50%腫瘍体積）でのみ、多少の弱いバイオルミネセンスシグナルが観察された（図5C、動物番号1および5）。各腫瘍株について用量50ulでの代表的な画像を示す。

20

【0780】

インビトロluc発現とインビボluc発現の間の相関関係の欠如

A20株のAAV2-lucトランスフェクション効率が残りの4つの細胞株と比べて低いようであったインビトロ試験（図3）とは対称的に、A20腫瘍におけるバイオルミネセンス（ルシフェラーゼ発現を示す）のインビボ出現は、他の腫瘍株と同様だった（図6Aおよび図6B）。さらにまた、バイオルミネセンスは14日目でも依然として検出可能だった（図6Aおよび図6B）。

30

【0781】

実施例2:H22肝細胞癌マウスモデルにおけるAAV2-IL12および抗PD-1抗体治療のインビボ評価

AAV2-IL2（AAV2-CAG-mIL12a-F2A-mIL12b-hgh PA）処置の抗腫瘍効力を、単独で、および抗PD-1抗体（RMP1-14）治療と組み合わせて、雌BALB/cマウスにおけるH22肝細胞癌（HCC）モデルで評価した。この試験は、媒体、AAV2-IL12およびRMP1-14について、表8に示すようにデザインした。

【0782】

（表8）H22に関する試験デザイン

40

モデル	H22
株	BALB/c
試験に供したマウスの数	32
群の数	4
各群のN	8
接種	皮下-後部右側腹部
投与レジメン	単回 (AAV)/ BIW _{x3} (PD-1)
投与経路	腫瘍内 (IT) - (AAV) / 腹腔内 (IP) (RMP-1-14)
投与期間	3週間 (抗PD-1抗体)
BWおよびTV測定頻度	2×/週
ランダム化範囲	80-120 mm ³
栄養補助剤	>10%の体重減少、群内のすべてのマウス
休薬日 (PD-1)	>20%の体重減少、個々のマウス
組織収集	血液 (頬) 第1週、第2週、第4週 腫瘍 (IHC)
最大腫瘍体積 (MTV)	3000 mm ³

10

【 0 7 8 3 】

2.1 腫瘍細胞調製

腫瘍細胞が入っている低温バイアルを融解し、供給者のプロトコールに従って培養した。注射の日に、細胞を無血清培地で洗浄し、計数し、生H22細胞2E7個/100 μLの濃度で、冷たい無血清培地に再懸濁した。動物施設への輸送中は、細胞懸濁液を氷上に保った。その懸濁液を冷却した1mLスリップチップシリンジに吸引することによって、注射用に細胞を準備した。充填したシリンジは氷上に保った。

20

【 0 7 8 4 】

2.2 腫瘍埋植

100 μLの細胞懸濁液をマウスの後部側腹部に皮下注射した。動物を最大7日間放置してから腫瘍成長について観察した。

【 0 7 8 5 】

2.3 腫瘍測定

動物を、触知可能な腫瘍、または外見もしくは挙動の何らかの変化について、毎週監視した。腫瘍が触知可能になったら、カリパスを使って週に少なくとも2回は腫瘍を測定した。腫瘍体積は次の式を使って計算した: (最大径×最小径²)/2。腫瘍が試験を開始するのに適当なサイズに達したら、試験の継続期間中は週に2回、腫瘍および体重を測定した。

30

【 0 7 8 6 】

2.4 ランダム化および用量選択

平均腫瘍体積が80~120 mm³に到達したら、マウスをそれぞれの処置群にランダムに割り当て、ランダム化から24時間以内に投薬を行った。基準日:0日目を投与開始日と定義した。

40

【 0 7 8 7 】

2.5 試験の終了

試験は最初の投与の12週間後に終了した。

【 0 7 8 8 】

2.6 体重測定およびガイドライン

体重は、ランダム化と処置の開始後、週に2回測定した。動物には、体重減少を理由として、ヒドロゲル/ダイエットゲル (diet gel) および/または休薬日を与え、体重減少は、処置初日のマウスの体重に基づいて計算した。休薬日および/または栄養補助剤は、試験責任者による動物の健康状態の評価に基づいて、動物に提供される場合があった。回

50

復の徴候がない場合は、人道的理由から動物を 殺した。

【0789】

2.6.1 抗PD-1処置の休業日

体重の20%を越える体重減少が1回測定された後に、個々のマウスに休業日を与え、同じ群の他のマウスには予定どおりに投与した。

【0790】

2.6.2 補助ゲル回復投与

10%超の体重減少が1匹の動物で観察された後は、ヒドロゲル/ダイエットゲルを同じ群内のすべての動物に供給した。

【0791】

2.7 臨床観察

臨床観察は、腫瘍および体重の測定時に、週に2回実施した。毎日の日常的監視では、腫瘍成長および処置が移動、食物および水の消費などといった挙動に及ぼす何らかの有害作用、眼/被毛のツヤの消失、ならびに他の何らかの異常について、動物をチェックした。死亡および観察された異常な臨床徴候は個々の動物について詳細に記録した。罹病または死亡の何らかの徴候を示すマウスについては毎日の監視を行った。

【0792】

2.8 組織収集

腫瘍試料は表9（腫瘍）および表10（血液）に従って収集した。

【0793】

（表9）H22に関する腫瘍組織収集

群	N	時点	組織		
1-4	32	12週/MTVの終了時	腫瘍		

*ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）

【0794】

（表10）H22に関する血液収集

群	N	時点
1-4	32	1回目の投薬の1週間前 (接種の1日前)
1-4	32	1回目の投薬の2週間後
1-4	32	1回目の投薬の4週間後

【0795】

2.8.1 Meso-Scale Discovery (MSD) .

H22血清試料は、Meso-Scale Discovery (MSD、米国メリーランド州ロックビル) によるIL-12定量用に加工される。MSDアッセイは三重に実施される。標準およびブランク対照は二重に実施される。

【0796】

試料はDiluent2 (MSDカタログ番号R51BB) で希釈される (最低2倍希釈)。1枚のプレートでは、60 μ Lの各50 $\times$ 検出抗体原液を混合する。Diluent2を加えて最終体積を6mLにする。1枚のプレートでは、10mLのRead Buffer T (4 $\times$) (MSDカタログ番号R92TD) および10mLの脱イオン水を混合して2 $\times$ Read Buffer溶液を調製する。余った希釈Read Buffer Tは、密閉容器中、室温で最大1か月保存した。

【0797】

凍結乾燥校正物質バイアルに1000 μ LのDiluent2を加え、ボルテックスすることな

10

20

30

40

50

く、3～5回上下反転させることで、較正物質 (calibrator) 1 (最高濃度較正物質) (MSDカタログ番号C0060-2) を再構成することにより、7つの較正用試料とゼロ較正用標準を調製する。再構成された溶液を室温で15～30分間平衡化してから、短いパルスを使って手短にボルテックスする。この最高濃度較正物質100 µLを300 µLのDiluent2に移し、ボルテックスすることによって、よく混合する。7つの較正物質を作成するために4倍段階希釈をさらに5回繰り返す。Diluent2がゼロ較正物質として使用される。

【0798】

プレートを洗浄緩衝液150 µL/ウェルで3回洗浄する。50 µLの較正用標準または試料を各ウェルに二重に加える。プレートをプレートシールで密封し、振とうしながら室温で2時間インキュベートする。プレートを洗浄緩衝液150 µL/ウェルで3回洗浄する。各ウェルに25 µLの検出抗体溶液を加える。プレートをプレートシールで密封し、振とうしながら室温で2時間インキュベートする。プレートを少なくとも洗浄緩衝液150 µL/ウェルで3回洗浄する。150 µLの2×Read Buffer Tを各ウェルに加える。次にプレートをMSD機器で解析する。

10

【0799】

標準の合格基準 (acceptance criteria) を決定するために、データ結果をMSDディスカバリーワークベンチ解析ソフトウェア (MSD discovery workbench analysis software) によって解析する。回帰モデルは、1/Y2の重み付けによる4パラメータロジスティックモデル (シグモイド用量応答) とする。標準曲線の相関係数は $R^2 > 0.98$ であれば合格とする。定量の上限および下限を含む標準曲線上の少なくとも6つの非ゼロ点のバイアス%は、 $\pm 20.0\%$ (定量の上限および下限は $\pm 30.0\%$) を越えないだろう。バイアス% = (測定された濃度 - 理論濃度) / 理論濃度 $\times 100\%$ 。定量の上限および下限を含む標準曲線上の少なくとも6つの非ゼロ点のCV%は、 $\pm 20.0\%$ (定量の上限および下限は $\pm 30.0\%$) を越えなかった。CV% = 測定された濃度のSD / 測定された濃度の平均 $\times 100\%$ 。

20

【0800】

2.9 結果

媒体 (図7A)、AAV2-IL12 (図7B)、RMP1-14 (抗PD-1抗体) (図7C)、またはAAV-IL12およびRMP1-14 (図7D) による処置後のH22肝細胞がんマウスモデルにおける腫瘍体積 (mm^3) によって、腫瘍縮小を測定した。一部の腫瘍は成長することができなかったものの、媒体による処置はヒストリカルデータと合致した。AAV-IL12による処置は、AAV-IL12に対する不均一な応答を示し、腫瘍成長の遅延は、8つの試料中、5つの試料に観察された。RMP1-14による処置も不均一な応答を示し、8つの試料中、3つの試料が完全奏効を示した。AAV2-IL12およびRMP1-14による処置は、RMP1-14単独と比較して改良された全奏効を示し、8つの試料中、5つの試料が完全奏効を示した。体重に対する意味のある負の影響は、AAV2-IL12単独でも、AAV2-IL12とRMP1-14との組み合わせでも、観察されなかった (図20A)。

30

【0801】

媒体、AAV-IL12、AAV-IL12とRMP1-14との組み合わせ、またはRMP1-14単独での処置後のH22肝細胞がんマウスモデルにおける腫瘍成長の平均曲線下面積 (AUC) (図8A) およびメジアン曲線下面積 (AUC) (図8B) の両方でも、腫瘍縮小を測定した。AAV2-IL12 + 抗PD-1抗体 (RMP1-14) およびRMP1-14単独の効果は、媒体およびAAV2-IL12単独のどちらと比較しても、有意だった ($p < 0.05$)。AAV2-IL12 + RMP1-14は、RMP1-14単独と比較して低いAUCをもたらしたが、その効果は統計的に有意でなかった ($p > 0.05$) (図8A)。

40

【0802】

媒体、AAV-IL12、RMP1-14と組み合わせたAAV-IL12、またはRMP1-14単独による処置後のH22肝細胞がんマウスモデルにおける全生存期間も測定した (図16)。その結果、RMP1-14抗体とAAV2-IL12との併用処置は全生存期間の有意な改良につながることを示された。

50

【0803】

実施例3: MC38マウス結腸癌マウスモデルのAAV2-IL12および抗PD-1抗体治療のインビボ評価

雌C57BL/6マウスを使って、MC38マウス結腸癌マウスモデルにおけるAAV2-IL12 (AAV2-CAG-mIL12a-F2A-mIL12b-hgh PA) ベクターの抗腫瘍効力を実証した。この試験は表11に示すようにデザインされた。

【0804】

(表11) MC38マウス結腸癌に関する試験デザイン

群	N	作用物質	活性用量	経路	スケジュール
1 [#]	8	媒体	n/a	腫瘍内	1日目
2	8	AAV2-IL12	1E+11 vg/マウス	腫瘍内	1日目
3	8	AAV2-IL12	3E+10 vg/マウス	腫瘍内	1日目
4	8	AAV2-IL12 // 抗PD-1 RMP1-14	1E+11 vg/マウス // 5 mg/kg	腫瘍内// 腹腔内	1日目// biwk×2
5	8	抗PD-1 RMP1-14	5 mg/kg	腹腔内	biwk×2

10

#-対照群

【0805】

細胞の埋植に向けて、潰瘍形成を低減するために、マウスをイソフルランで麻酔した。雌C57BL/6マウス (Charles River Laboratories、米国) の側腹部に、0%マトリゲル中の 5×10^5 個のMC38腫瘍細胞を皮下注射した (総細胞注射体積=0.1mL/マウス)。マウスは開始日に8~12週齢だった。腫瘍が80~120mm³の平均サイズに到達して処置を始める時に、ペアマッチを実施した。

20

【0806】

体重を5日間、毎日測定し、その後は試験の最後まで、週に2回、体重を測定した。腫瘍は、試験の最後まで、週に2回、カリパスで測定した。有害反応または死亡はいずれも直ちに報告された。30%超の体重減少が1回観察されるか、または25%超の体重減少が3回連続して測定された個々の動物はいずれも、安楽死させた。平均体重減少が20%超であるか、または死亡率が10%超である群はいずれも、投与を停止した。その群は安楽死させずに、回復させた。体重減少が20%超である群内で、個々の体重減少エンドポイントに達した動物は安楽死させた。群処置関連体重減少が元の体重の10%以内まで回復した場合は、より低い用量またはより低頻度の投与スケジュールで、投与を再開した。無処置体重%回復の例外はケースバイケースで認めた。

30

【0807】

動物は個別に監視した。実験のエンドポイントは、1500mm³の腫瘍体積または29日のどちらか早い方とした。レスポンドはより長く追跡した。エンドポイントに到達したら、動物を安楽死させた。

【0808】

AAV2-IL12ベクターは、PBS中の5%ソルビトール+高350mM NaClに入れて提供した。媒体は、PBS中の5%ソルビトール+高350mM NaClに入れて提供した。媒体およびAAV2-IL12ベクターの投与体積は0.025mL/マウスとし、体重に合わせて体積を調節することはなかった。各シリンジを初めて使用する時は、AAV2-IL12ベクター投与シリンジを媒体緩衝液で前もって湿らせてから、投与溶液を吸引した。抗マウスPD-1抗体 (RMP1-14) の投与体積は10mL/kg (0.200mL/20gマウス) とし、体積は体重に応じて調節した。

40

【0809】

媒体 (図9A)、AAV2-IL12 (図9Bおよび図9E)、RMP1-14 (図9C)、またはRMP1-14と組み合わせたAAV-IL12 (図9D) による処置後のMC38結腸直腸がんマウスモデルにおける腫瘍体積 (mm³) によって腫瘍縮小を測定した。媒体処置動物における腫

50

瘍成長はヒストリカルデータと合致した。AAV-IL12処置動物における腫瘍成長は、 1×10^{11} ウイルスゲノムの用量（図9B）でも 3×10^{10} ウイルスゲノムの用量（図9E）でも、AAV-IL12に対する不均一な応答を示し、多少の腫瘍成長遅延を伴った。抗PD-1抗体処置動物における腫瘍成長は不均一な応答を示し、8匹中1匹が完全奏効を示した。AAV2-IL12とRMP1-14との組み合わせで処置された動物における腫瘍成長は、他の処置よりも優れた奏効を示し、8匹中5匹が完全奏効を示した。体重に対する意味のある負の影響は、AAV2-IL12単独でも、AAV2-IL12とRMP1-14との組み合わせでも、観察されなかった（図20D）。

【0810】

媒体、AAV-IL12、AAV-IL12+RMP1-14の組み合わせ、またはRMP1-14単独での処置後のMC38結腸直腸がんマウスモデルにおける腫瘍成長の平均曲線下面積（図10A）およびメジアン曲線下面積（図10B）の両方でも、腫瘍縮小を測定した。併用療法AAV2-IL12+RMP1-14は、他のどの処置または媒体と比べても、腫瘍AUCの有意な低減をもたらした（ $p < 0.03$ ）（図10A）。

【0811】

媒体、AAV-IL12、AAV-IL12とRMP1-14の併用療法、またはRMP1-14単独による処置後のMC38結腸直腸がんマウスモデルにおける全生存期間も測定した（図17）。RMP1-14またはAAV2-IL12による単独治療は全生存期間を同じように改良した。しかし、AAV-IL12と抗PD1抗体の組み合わせは、全生存期間および全奏効に関して、どちらか一方の作用物質単独よりも優れていた。

【0812】

実施例4:Cloudman S91黒色腫マウスモデルのAAV2-IL12および抗PD-1抗体治療のインビボ評価

雌DBA/2マウスを使って、Cloudman S91黒色腫マウスモデルにおけるAAV2-IL12（AAV2-CAG-mIL12a-F2A-mIL12b-hgh PA）ベクターの抗腫瘍効力を実証した。この試験は表12に示すようにデザインされた。

【0813】

（表12）Cloudman S91黒色腫に関する試験デザイン

群	N	作用物質	活性用量	経路	スケジュール
1 [#]	8	媒体	n/a	腫瘍内	1日目
2	8	AAV2-IL12	$1E+11$ vg/マウス	腫瘍内	1日目
3	8	AAV2-IL12	$3E+10$ vg/マウス	腫瘍内	1日目
4	8	AAV2-IL12 // 抗PD-1 RMP1-14	$1E+11$ vg/マウス // 5 mg/kg	腫瘍内// 腹腔内	1日目// biwk×2
5	8	抗PD-1 RMP1-14	5 mg/kg	腹腔内	biwk×2

- 対照群

【0814】

雌DBA/2マウスの側腹部に、50%マトリゲル中の 5×10^5 個のCloudman S91腫瘍細胞を皮下注射した（総細胞注射体積=0.1 mL/マウス）。マウスは開始日に8~12週齢だった。腫瘍が $80 \sim 120 \text{ mm}^3$ の平均サイズに到達して処置を始める時に、ペアマッチを実施した。

【0815】

体重を5日間、毎日測定し、その後は試験の最後まで、週に2回、体重を測定した。腫瘍は、試験の最後まで、週に2回、カリパスで測定した。有害反応または死亡はいずれも直ちに報告された。30%超の体重減少が1回観察されるか、または25%超の体重減少が3回連続して測定された個々の動物はいずれも、安楽死させた。平均体重減少が20%超であるか、または死亡率が10%超である群はいずれも、投与を停止した。その群は安楽死させずに、回復させた。体重減少が20%超である群内で、個々の体重減少エンドポイ

ントに達した個体は安楽死させた。群処置関連体重減少が元の体重の10%以内まで回復した場合は、より低い用量またはより低頻度の投与スケジュールで、投与を再開した。無処置体重%回復の例外はケースバイケースで認めた。

【0816】

動物は個別に監視した。実験のエンドポイントは、2000mm³の腫瘍体積または29日のどちらか早い方とした。レスポnderはより長く追跡した。エンドポイントに到達したら、動物を安楽死させた。

【0817】

AAV2-IL12ベクターは、PBS中の5%ソルビトール+高350mM NaClに入れて提供した。媒体は、PBS中の5%ソルビトール+高350mM NaClに入れて提供した。媒体およびAAV2-IL12ベクターの投与体積は0.025mL/マウスとし、体重に合わせて体積を調節することはなかった。各シリンジを初めて使用する時は、AAV-IL12ベクター投与シリンジを媒体緩衝液で前もって湿らせてから、投与溶液を吸引した。RMP1-14の投与体は10mL/kg (0.200mL/20gマウス) とし、体積は体重に応じて調節した。

【0818】

媒体 (図11A)、AAV2-IL12 (図11Bおよび図11E)、RMP1-14 (図11C)、またはAAV-IL12とRMP1-14との併用療法 (図11D) による処置後のCloudman S91黒色腫がんモデルにおける腫瘍体積によって腫瘍縮小を測定した。媒体処置動物はヒストリカルデータと合致する腫瘍成長を示した。AAV2-IL12処置動物は、IL12単独に対して、 1×10^{11} ウイルスゲノムの用量 (図11B) でも 3×10^{10} ウイルスゲノムの用量 (図11E) でも、感受性があり、腫瘍体積の減少を示した。RMP1-14で処置した動物は、ヒストリカルデータと合致して、不均一な応答を示した。AAV2-IL12およびRMP1-14処置動物は最善の奏効を示し、この併用処置が単剤治療より優れていることを示した。体重に対する意味のある負の影響は、AAV2-IL12単独でも、AAV2-IL12とRMP1-14との組み合わせでも、観察されなかった (図20C)。

【0819】

媒体、AAV-IL12、AAV-IL12およびRMP1-14、またはRMP1-14抗体単独での処置後のCloudman S91黒色腫がんマウスモデルにおける腫瘍成長の平均曲線下面積 (図12A) およびメジアン曲線下面積 (図12B) の両方でも、腫瘍縮小を測定した。用量が 1×10^{11} および 3×10^{10} のAAV2-IL-12による処置、ならびにAAV2-IL12+RMP1-14の併用による処置は、いずれも、媒体およびRMP1-14単独と比較してAUCの有意な低減をもたらした ($p=0.01$)。しかし、用量が 1×10^{11} および 3×10^{10} のAAV2-IL-12、ならびにAAV2-IL12+RMP1-14は、いずれも、互いに有意差がなかった (図12A)。

【0820】

RMP1-14で処置された動物とAAV2-IL12単独で処置された動物の間には、有意差が観察された。AAV2-IL12とRMP1-14との併用療法で処置された動物のAUCは最も低かったが、結果にAAV2-IL12単独処置との有意差はなかった。

【0821】

媒体、AAV-IL12、AAV-IL12およびRMP1-14、またはRMP1-14単独による処置後のCloudman S91黒色腫がんマウスモデルにおける全生存期間も測定した (図18)。全生存期間はRMP1-14治療ではわずかに改良されなかった。AAV2-IL12単独およびRMP1-14と組み合わせたAAV2-IL12を投与されたマウスは100%が、試験の最後に生き残っていた。

【0822】

実施例5:Hepa1-6肝細胞癌モデルにおけるAAV2-IL12および抗PD-1抗体治療のインビボ評価

AAV2-IL2 (AAV2-CAG-mIL12a-F2A-mIL12b-hgh PA) 処置の抗腫瘍効力を、単独で、および抗PD-1抗体 (RMP1-14) 治療と組み合わせて、雌C57BL/6マウスにおける肝細胞癌 (HCC) モデルHepa1-6で評価した。媒体、AAV2-IL12、RMP1-14、またはAAV2-IL12とRMP1-14の組み合わせについて、試験デザインを表13に示す。

【0823】

(表13) Hepa1-6に関する試験デザイン

モデル	Hepa1-6
株	C57BL/6
試験に供したマウスの数	32
群の数	4
各群のN	8
接種	皮下-後部右側腹部
投与レジメン	単回 (AAV)/ BIW _{x3} (PD-1)
投与経路	腫瘍内 (AAV) /腹腔内 (IP) (RMP-1-14)
投与期間	3週間 (PD-1)
BWおよびTV測定頻度	2×/週
ランダム化範囲	80-120 mm ³
栄養補助剤	>10%の体重減少、群内のすべてのマウス
休薬日(PD-1)	>20%の体重減少、個々のマウス
組織収集	血液(頬) 第1週、第2週、第4週 腫瘍 (IHC)
最大腫瘍体積 (MTV)	3000 mm ³

10

20

【0824】

腫瘍細胞調製、腫瘍埋植、腫瘍測定、ランダム化および用量選択、試験終了、体重測定、臨床観察、抗PD-1処置の休薬日、補助ゲル回復投与、および組織収集は、上記実施例2で述べたように行った。

【0825】

媒体(図13A)、AAV2-IL12(図13B)、抗PD-1抗体(図13C)、またはAAV-IL12および抗PD-1抗体(図13D)による処置後のHepa1-6肝細胞がんモデルにおける腫瘍体積によって、腫瘍縮小を測定した。媒体、AAV-IL12、AAV-IL12およびRMP1-14、またはRMP1-14単独での処置後のHepa1-6肝細胞マウスモデルにおける腫瘍成長の平均曲線下面積(図13E)およびメジアン曲線下面積(図13F)の両方でも、腫瘍縮小を測定した。AAV2-IL12+RMP1-14は、抗PD-1抗体単独と比較して低いAUCをもたらしたが、その効果は統計的に有意でなかった(図13E)。

30

【0826】

体重に対する意味のある影響は、AAV2-IL12単独でも、AAV2-IL12とRMP1-14との組み合わせでも、観察されなかった(図20E)。

【0827】

実施例6:B16F10黒色腫マウスモデルのAAV2-IL12および抗PD-1抗体治療のインビボ評価

雌B6D2F1マウスを使って、B16F10黒色腫がんモデルにおけるAAV2-IL12(AAV2-CAG-mIL12a-F2A-mIL12b-hgh PA)ベクターの抗腫瘍効力を実証した。この試験は表14に示すようにデザインされた。

40

【0828】

(表14) B16F10黒色腫に関する試験デザイン

50

群	N	作用物質	活性用量	経路	スケジュール
1 [#]	8	媒体	n/a	腫瘍内	1日目
2	8	AAV2-IL12	1E+11 vg/マウス	腫瘍内	1日目
3	8	AAV2-IL12	3E+10 vg/マウス	腫瘍内	1日目
4	8	AAV2-IL12 // 抗PD-1 RMP1-14	1E+11 vg/マウス // 5 mg/kg	腫瘍内// 腹腔内	1日目// biwk×2
5	8	抗PD-1 RMP1-14	5 mg/kg	腹腔内	biwk×2

- 対照群

10

【0829】

CR雌B6D2F1マウスの側腹部に、0%マトリゲル中の 5×10^5 個のB16F10腫瘍細胞を皮下注射した（総細胞注射体積＝0.1 mL/マウス）。マウスは開始日に8～12週齢だった。腫瘍が60～90 mm³の平均サイズに到達して処置を始める時に、ペアマッチを実施した。

【0830】

体重を5日間、毎日測定し、その後は試験の最後まで、週に2回、体重を測定した。腫瘍は、試験の最後まで、週に2回、カリパスで測定した。有害反応または死亡はいずれも直ちに報告された。30%超の体重減少が1回観察されるか、または25%超の体重減少が3回連続して測定された個々の動物はいずれも、安楽死させた。平均体重減少が20%超であるか、または死亡率が10%超である群はいずれも、投与を停止した。その群は安楽死させずに、回復させた。体重減少が20%超である群内で、個々の体重減少エンドポイントに達した個体は安楽死させた。群処置関連体重減少が元の体重の10%以内まで回復した場合は、より低い用量またはより低頻度の投与スケジュールで、投与を再開した。無処置体重パーセント回復の例外はケースバイケースで認めた。

20

【0831】

動物は個別に監視した。実験のエンドポイントは、2000 mm³の腫瘍体積または29日のどちらか早い方とした。レスポンドはより長く追跡した。エンドポイントに到達したら、動物を安楽死させた。

【0832】

30

AAV2-IL12ベクターは、PBS中の5%ソルビトール＋高350 mM NaClに入れて提供した。媒体は、PBS中の5%ソルビトール＋高350 mM NaClに入れて提供した。媒体およびAAV2-IL12ベクターの投与体積は0.025 mL/マウスとし、体重に合わせて体積を調節することはなかった。各シリンジを初めて使用する時は、AAV-IL12ベクター投与シリンジを媒体緩衝液で前もって湿らせてから、投与溶液を吸引した。抗PD-1抗体（RMP1-14）の投与体積は10 mL/kg（0.200 mL/20 gマウス）とし、体積は体重に応じて調節した。

【0833】

媒体（図14A）、AAV2-IL12（図14B）、RMP1-14（図14C）、またはAAV-IL12およびRMP1-14（図14D）による処置後のB16F10黒色腫がんモデルにおける腫瘍体積（mm³）によって腫瘍縮小を測定した。媒体処置動物はヒストリカルデータと合致する腫瘍成長を示した。AAV2-IL12処置動物は腫瘍成長のあまり大きくない遅延を示した。RMP1-14処置動物はB16F10がRMP1-14に対して抵抗性であることを示し、それは文献と合致した。AAV2-IL12とRMP1-14との組み合わせで処置された動物は不均一な応答を示し、8つ試料のうち5つの試料が腫瘍成長の遅延を示した。体重に対する意味のある影響は、AAV2-IL12単独でも、AAV2-IL12とRMP1-14との組み合わせでも、観察されなかった（図20B）。

40

【0834】

媒体、AAV-IL12、AAV-IL12およびRMP1-14、またはRMP1-14での処置後のB16F10黒色腫がんモデルにおける腫瘍成長の平均曲線下面積（図15A）およびメジアン曲

50

線下面積（図15B）の両方でも、腫瘍縮小を測定した。AAV2-IL-12+抗PD-1抗体の併用処置は、対照および他のすべての処置と比較してAUCのわずかな減少をもたらしたが、その効果は統計的に有意でなかった（図15A）。

【0835】

媒体、AAV-IL12、AAV-IL12およびRMP1-14、またはRMP1-14単独による処置後のB16F10黒色腫がんモデルにおける全生存期間も解析した（図19）。B16F10黒色腫はRMP1-14単独に対して抵抗性であった。これは、この黒色腫モデルにおけるヒストリカルデータと合致している。最後に、AAV2-IL12単独には全生存期間に対する効果があり、AAV2-IL12と抗PD1抗体治療の組み合わせは、全生存期間の改良につながった。

【0836】

実施例7. 静脈内注射後のAAV2-IL12忍容性のインビボ評価

正常マウスにおけるAAV2-IL12（AAV2-CAG-mIL12a-F2A-mIL12b-hgh PA）の忍容性を決定するために、用量を漸増させたAAV-IL12（ 1×10^9 ウイルスゲノム、 1×10^{10} ウイルスゲノムまたは 1×10^{11} ウイルスゲノム）または対照を、マウスに静脈内投与した。漸増するこれらの用量は腫瘍内注射後のベクターのエスケープを表す。 1×10^9 ウイルスゲノムという用量は効力試験に使用した用量の1%に相当し、 1×10^{10} ウイルスゲノムという用量は効力試験に使用した用量の10%に相当し、 1×10^{11} ウイルスゲノムという用量は効力試験に使用した用量に等しい。AAV2-IL12を正常マウスに投与した2週間後に、有害な臨床観察結果も体重の変化もなかった（図21）。

【0837】

実施例8:IL-12発現のインビトロ評価

HEK-293細胞に、MOIが 3.0×10^4 、 1.0×10^5 または 3.0×10^5 GC/細胞いずれかの、AAV2ベクター#1（AAV2-CAG-mIL12a-IRES-mIL12b-bgh PA）またはAAV2ベクター#2（AAV2-CAG-mIL12a-F2A-mIL12b-hgh PA）で、形質導入を行った。形質導入の48時間後に、上清を評価するために、各ウェルから培地を収集した。48時間上清を使用し、IL-12 ELISAキット（Abcam、カタログ番号ab119531）を使って、IL-12 ELISAアッセイを実施した。IL-12濃度は製造者の説明書に従って測定した。

【0838】

インビトロIL-12機能アッセイ

ELISA定量結果に基づいて48時間上清を100ng/ml IL-12まで希釈した。HEK-Blue IL-12レポーター細胞（InvivoGen、カタログ番号hkb-il12）は、製造者の説明書に従って培養した。陽性対照（0.5ng、1ng、2ngおよび4ng）、20ulの希釈48時間上清、または20ulの陰性対照（非形質導入細胞からの上清）が予め投入されているウェルに、細胞を分配した。細胞を24時間培養した。24時間の培養後に、Quanti-Blue溶液（InvivoGen、カタログ番号rep-qbs）を使用し、製造者の説明書に従って、Quanti-Blue培地を調製した。Quanti-Blue培地が予め投入されているウェルにHEK-Blue IL-12細胞からの上清を加え、37Cで最大6時間インキュベートした。マイクロプレートリーダーを使って、650nmにおける光学密度（OD）を測定した。AAV2ベクター#1（AAV2-CAG-mIL12a-IRES-mIL12b-bgh PA）またはAAV2ベクター#2（AAV2-CAG-mIL12a-F2A-mIL12b-hgh PA）はどちらも、機能的IL-12を産生した（図22参照）。

【0839】

実施例9. AAV2-hIL12ベクターの構築

ヒトIL12AサブユニットとヒトIL12Bサブユニットの発現を駆動するようにAAV2ベクターを設計した。CMVエンハンサー、CBAプロモーター、CAGイントロン、インフレーションの停止コドンを持たないヒトIL12A野生型コード配列（SEQ ID NO:77）、フーリン切断配列、2A自己プロセシングペプチド配列、停止コドンを持つヒトIL12B野生型コード配列（SEQ ID NO:8）、およびヒト成長ホルモンのポリA部位を含む発現カセットに隣接するAAV2 ITRを含むコンストラクトを含むように、AAV2ベクターを操作した（AAV2-CAG-hIL12a-F2A-hIL12b-hgh PA）。

【0840】

10

20

30

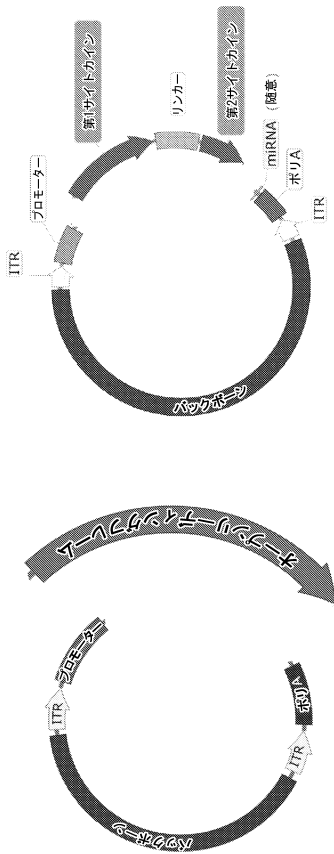
40

50

上述のマウス試験用コンストラクト（AAV2-CAG-mIL12a-F2A-mIL12b-hgh PA）（図23Aも参照されたい）に基づくヒト試験用のコンストラクトを調製した。結果として得られたヒト試験用コンストラクト（AAV2-CAG-hIL12a-F2A-hIL12b-hgh PA）を図23Bおよび表5に示す。このコンストラクトは、SEQ ID NO:82に対応する核酸配列を有する。

【図面】

【図1】



【図2A】



10

20

30

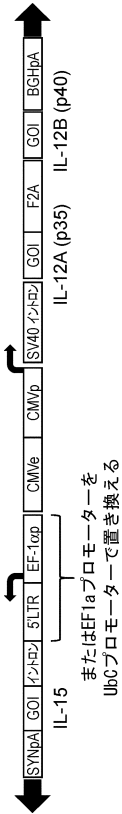
40

50

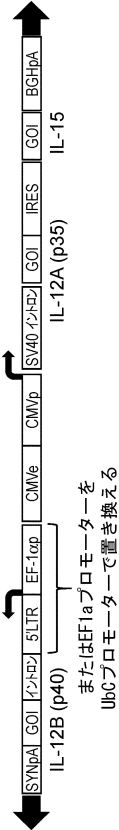
【図 2 B】



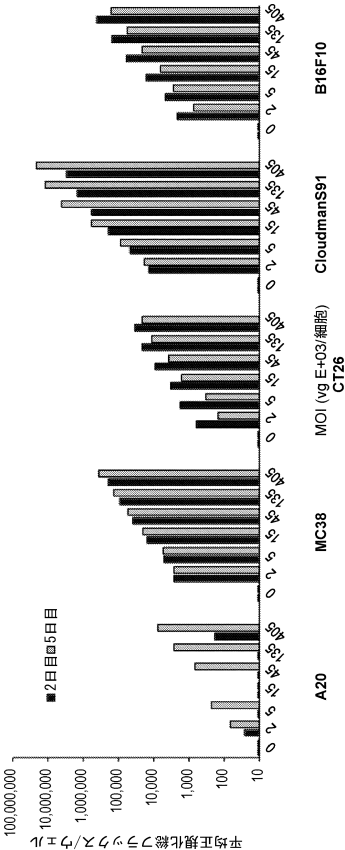
【図 2 C】



【図 2 D】



【図 3】



10

20

30

40

50

10

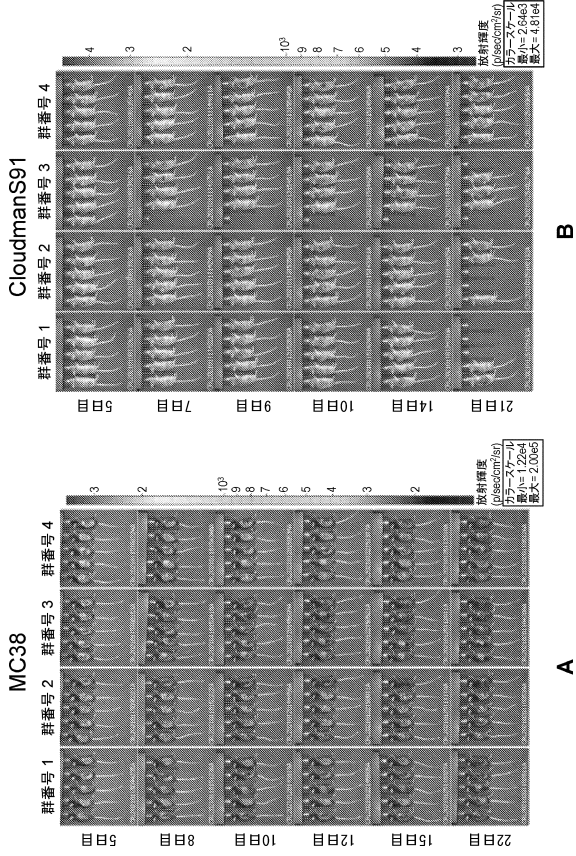
20

30

40

50

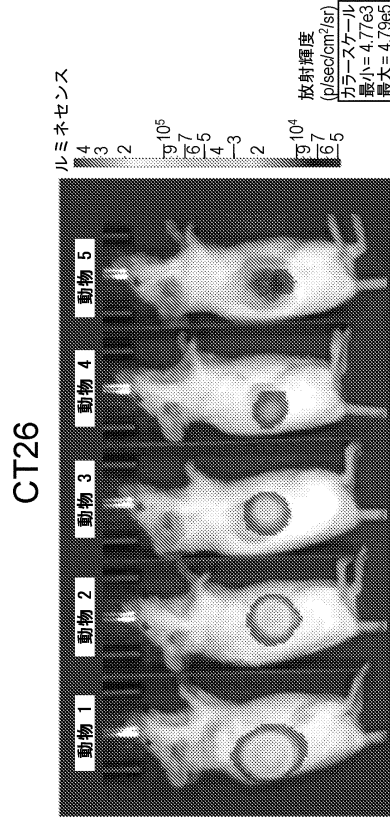
【図 4】



B

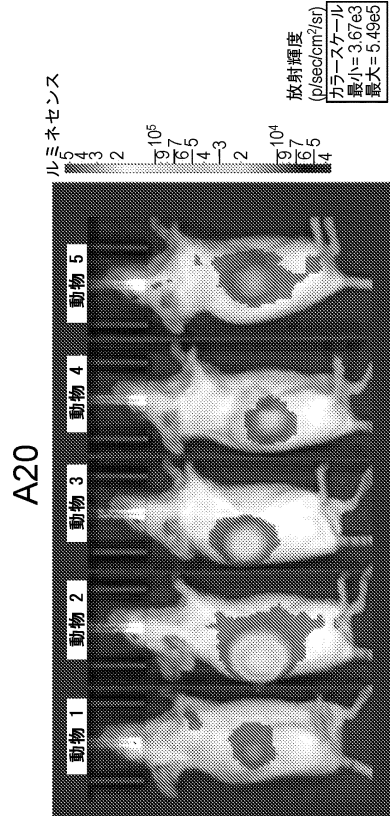
A

【図 5 A】



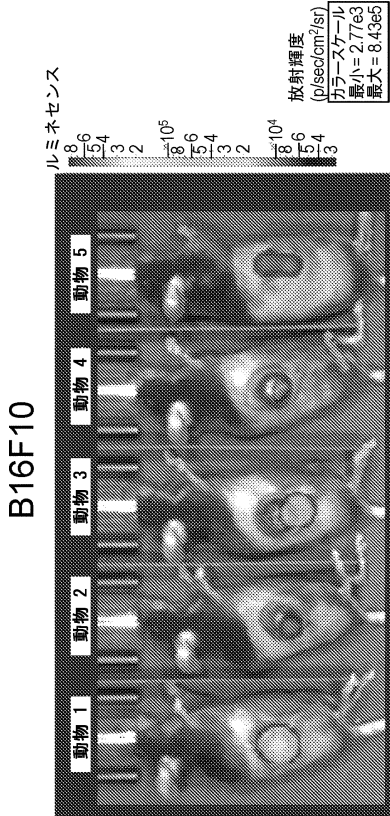
CT26

【図 5 C】



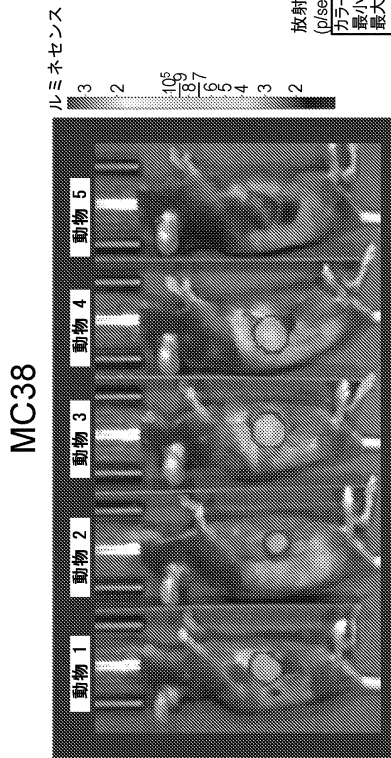
A20

【図 5 B】

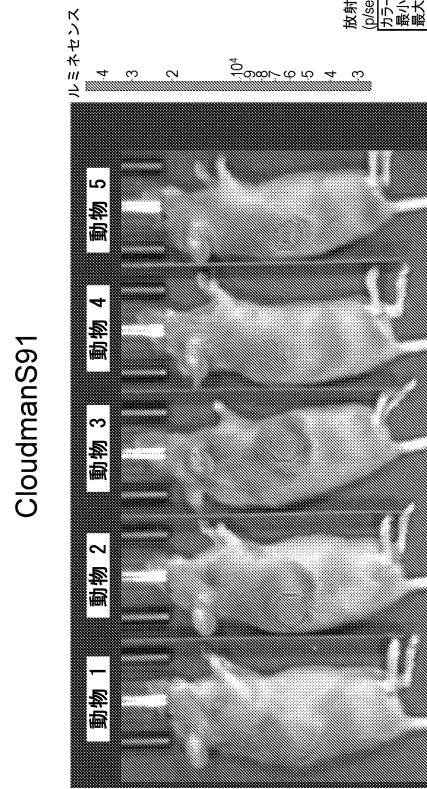


B16F10

【図 5 D】



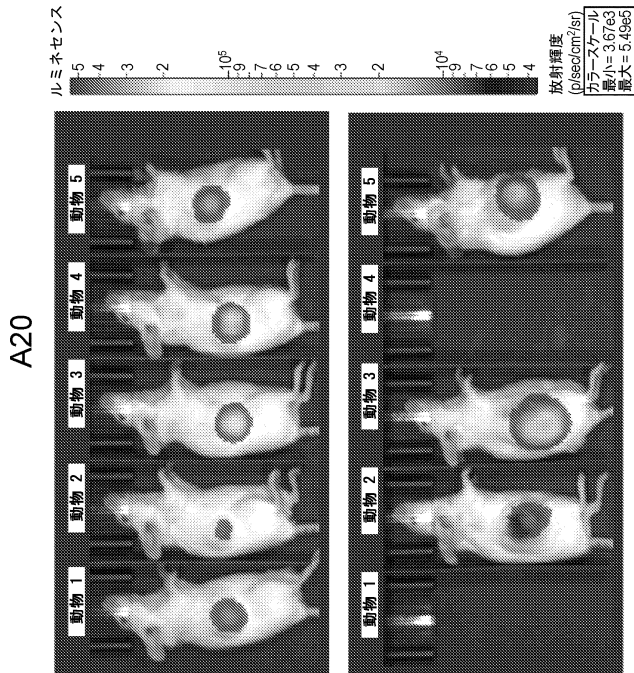
【図 5 E】



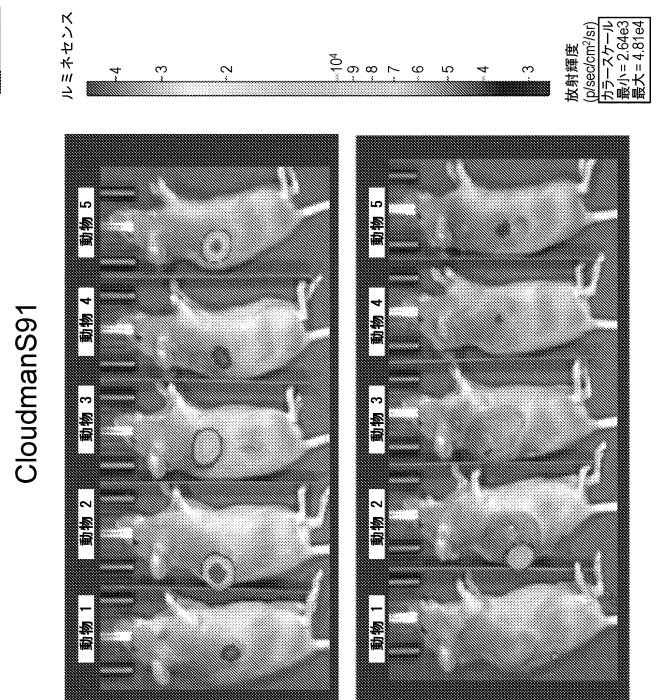
10

20

【図 6 A】



【図 6 B】



30

40

50

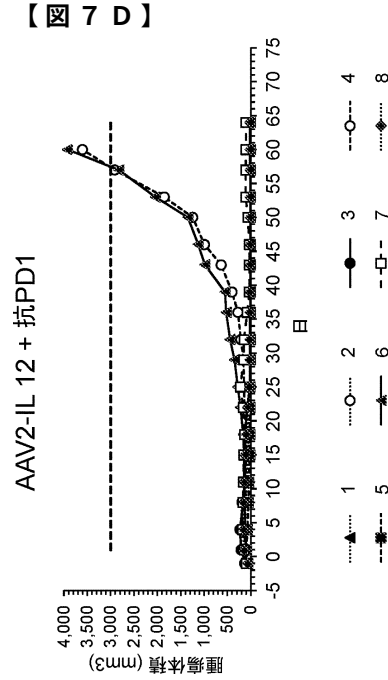
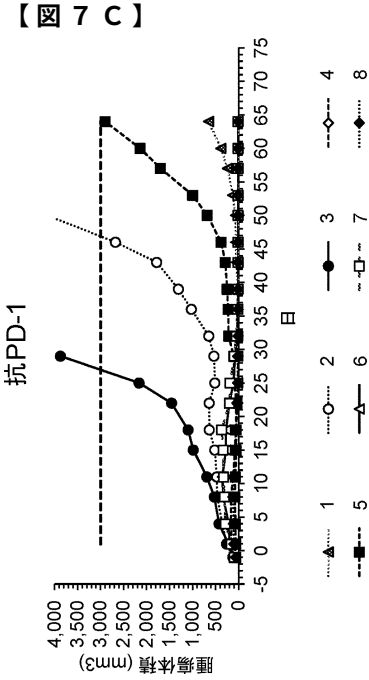
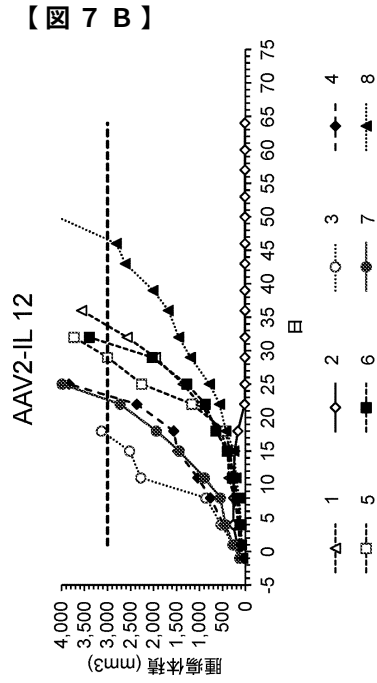
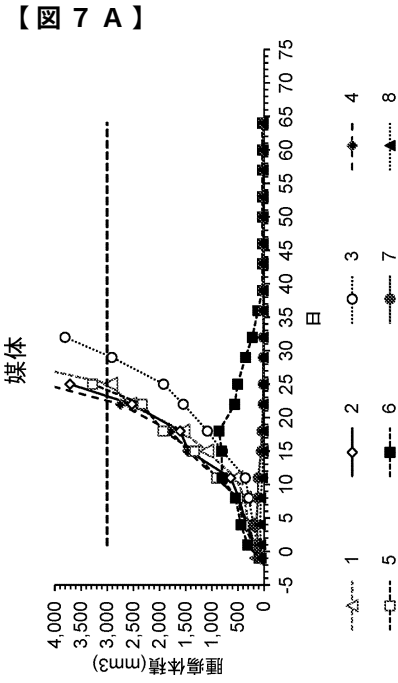
10

20

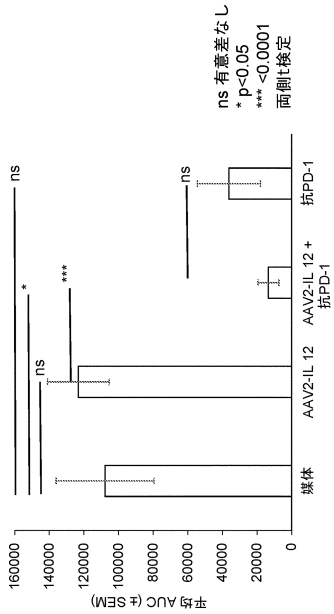
30

40

50

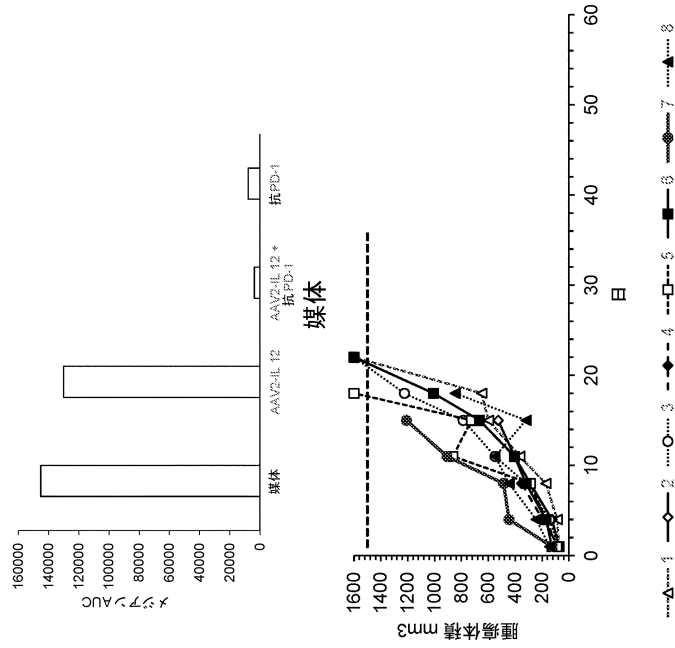


【図 8】



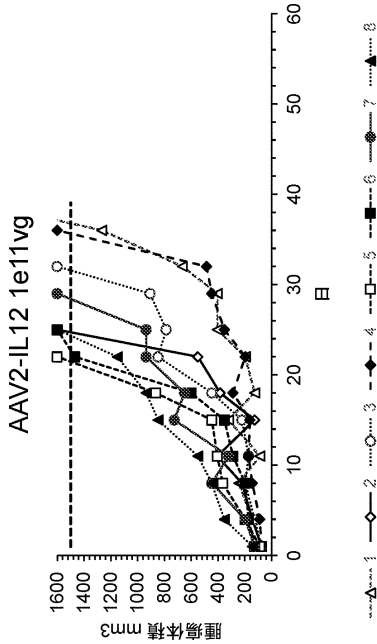
A

【図 9 A】

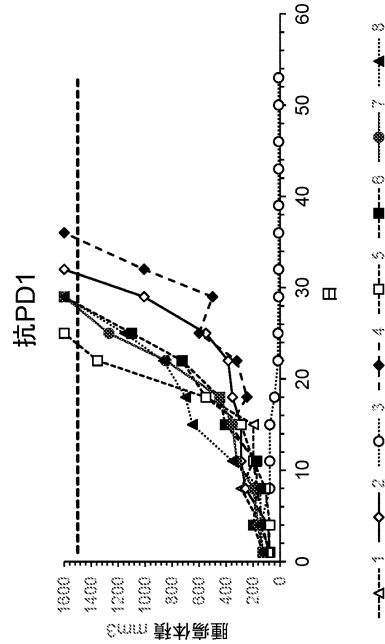


B

【図 9 B】



【図 9 C】



10

20

30

40

50

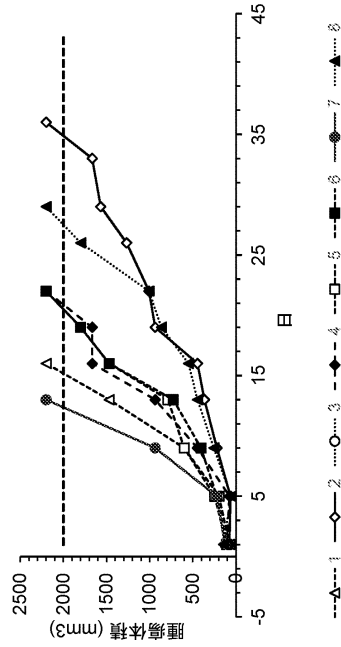
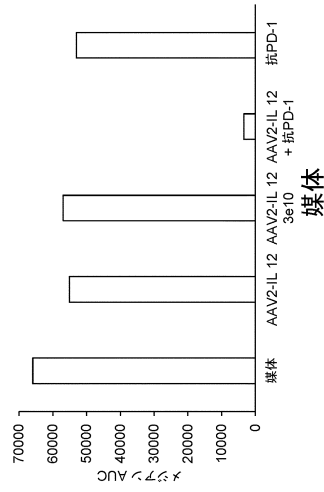
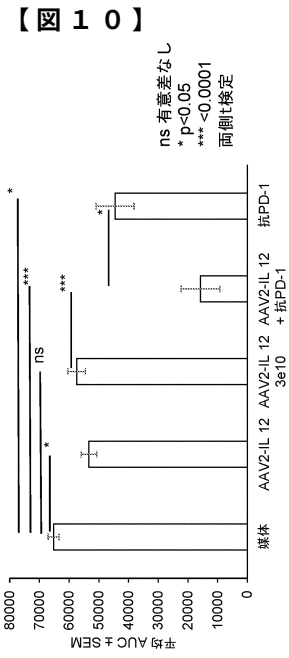
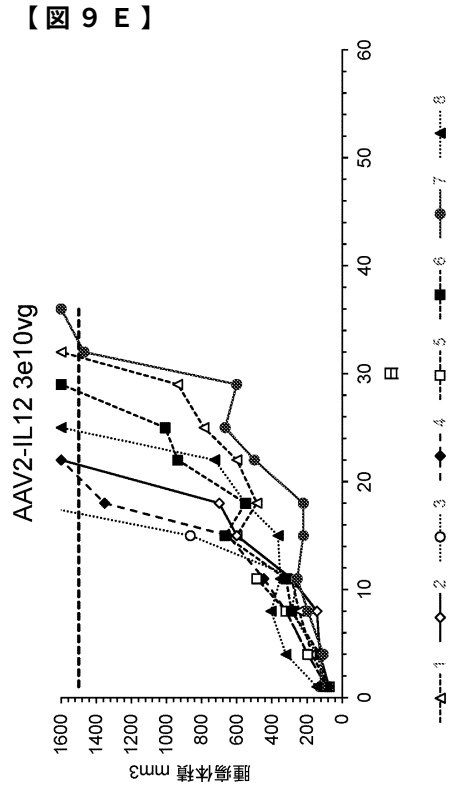
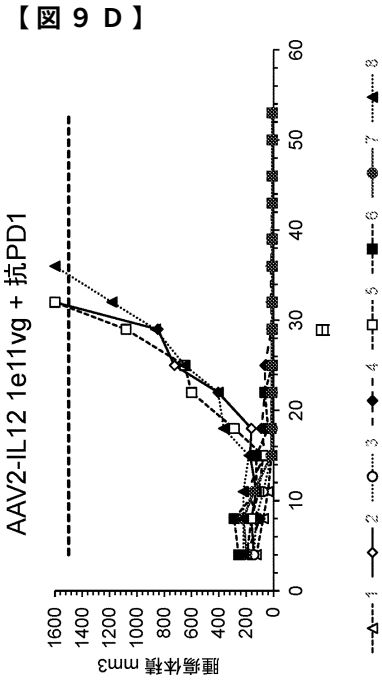
10

20

30

40

50



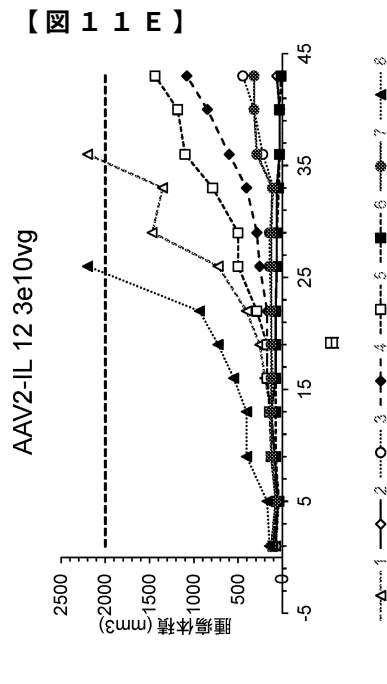
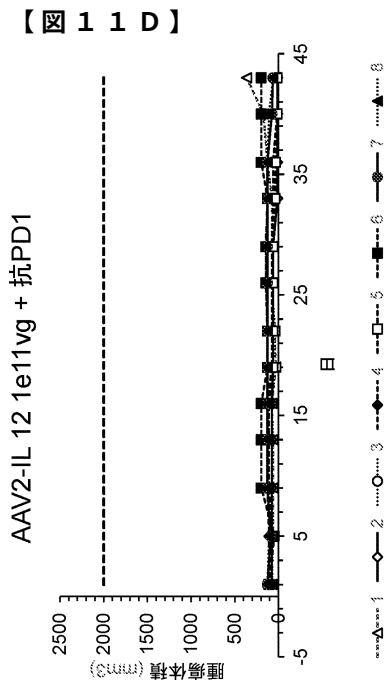
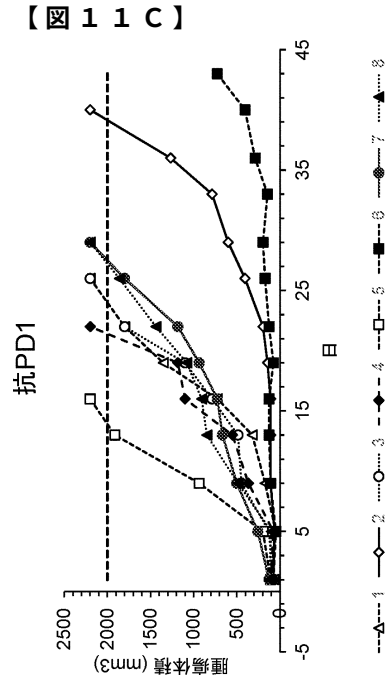
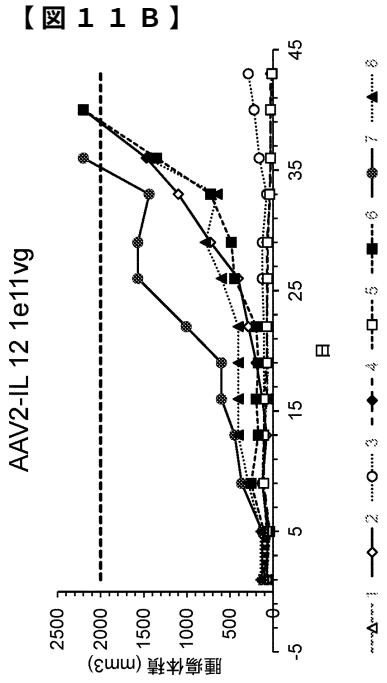
10

20

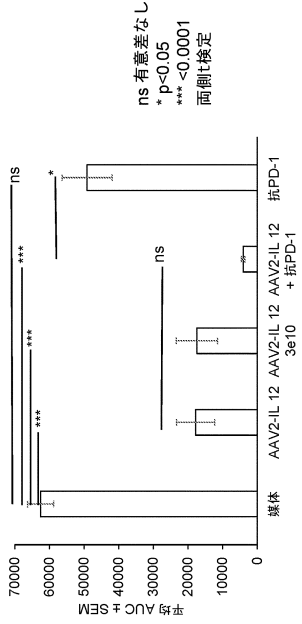
30

40

50

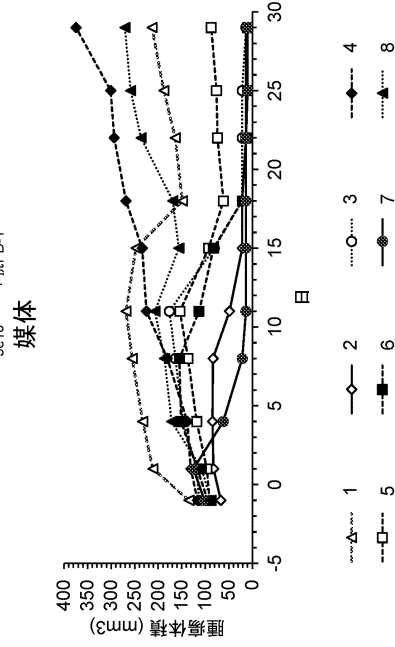


【図 1 2】



A

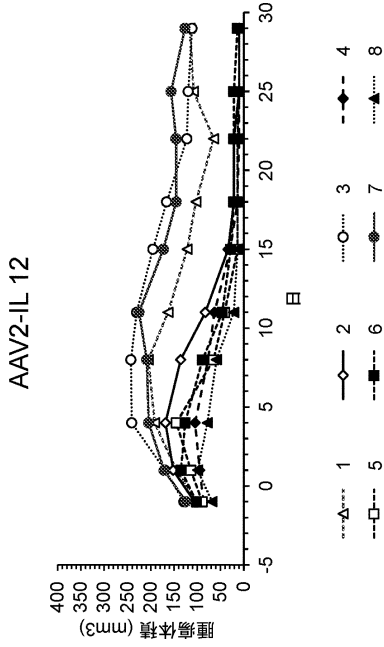
【図 1 3 A】



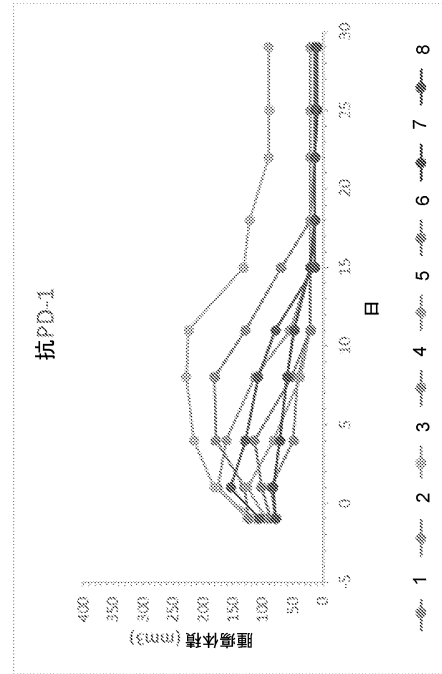
10

20

【図 1 3 B】



【図 1 3 C】



30

40

50

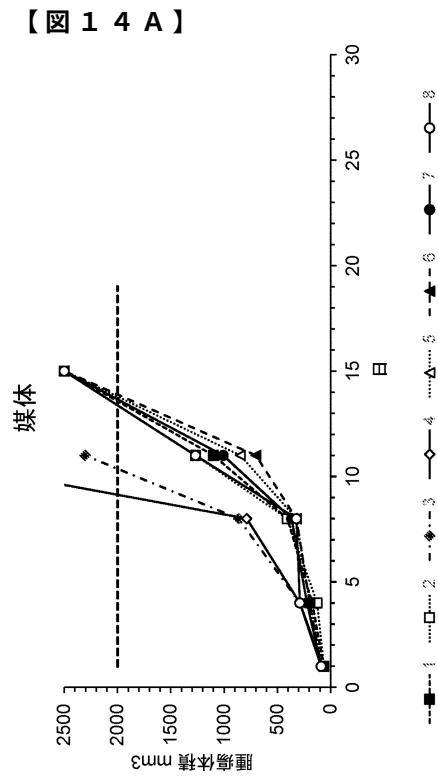
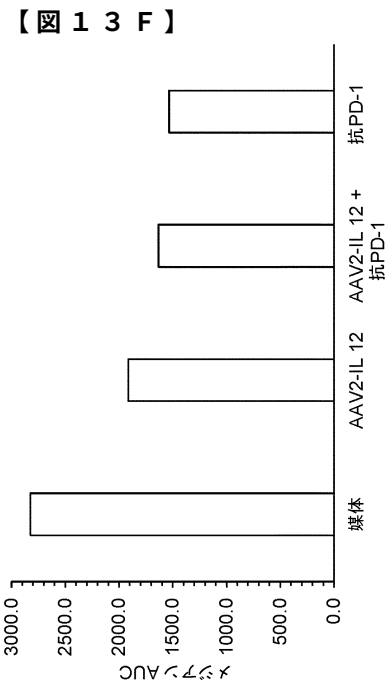
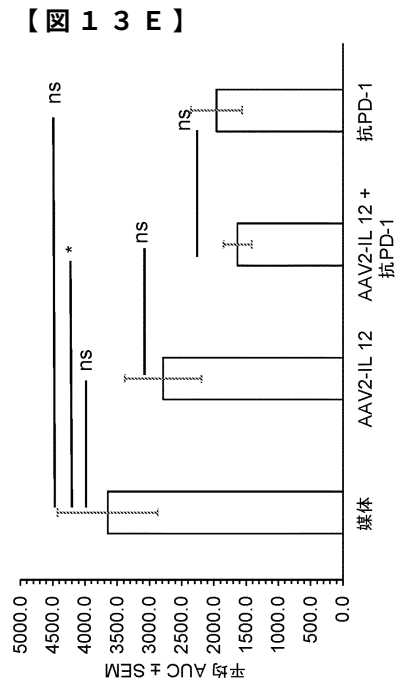
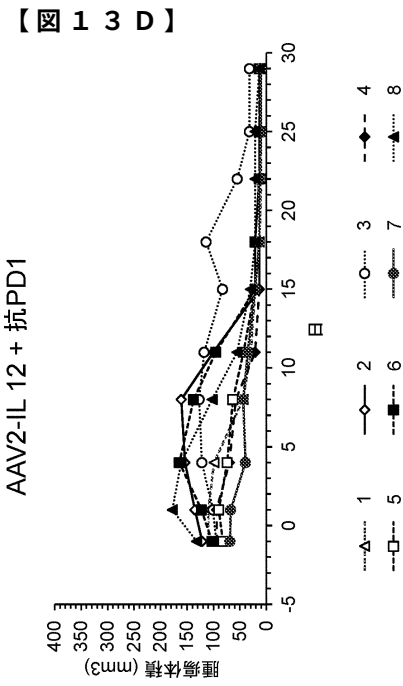
10

20

30

40

50



10

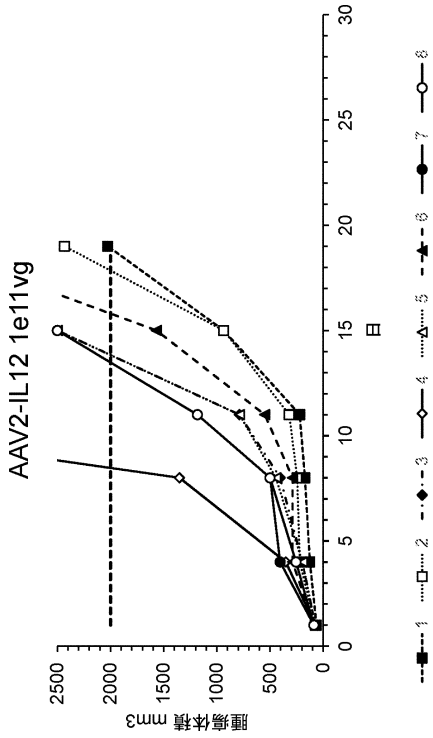
20

30

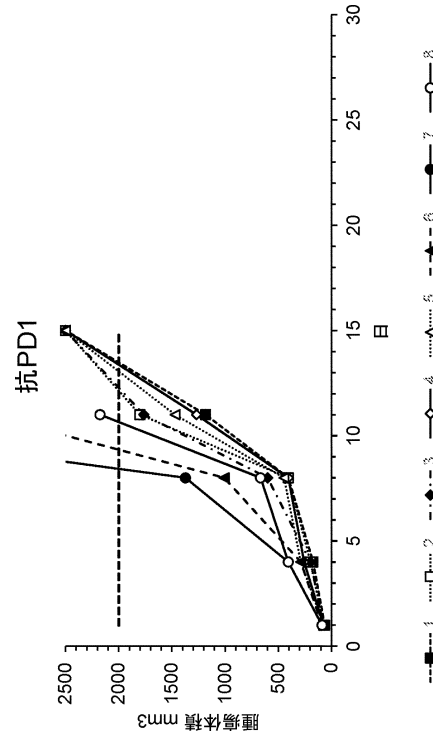
40

50

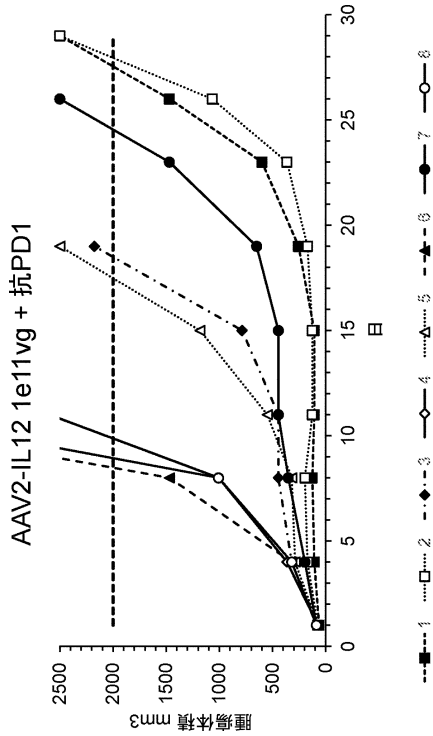
【図 1 4 B】



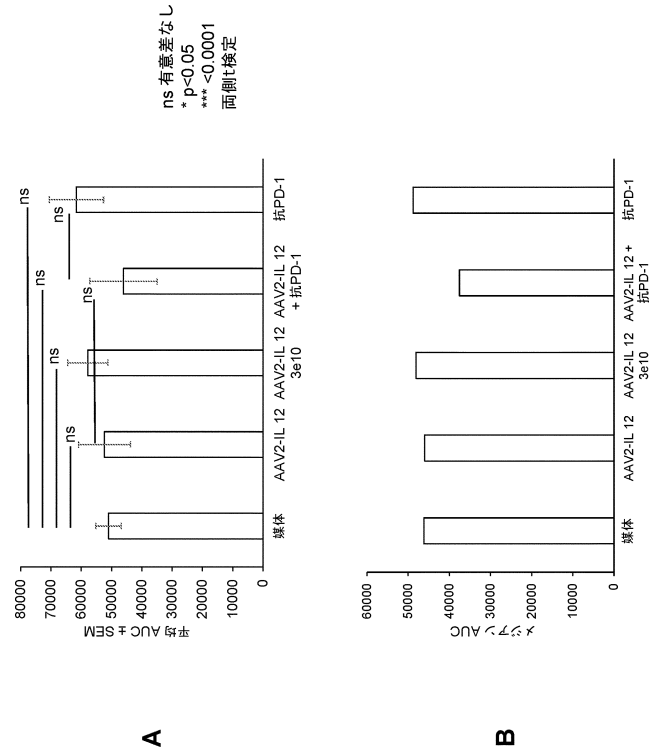
【図 1 4 C】



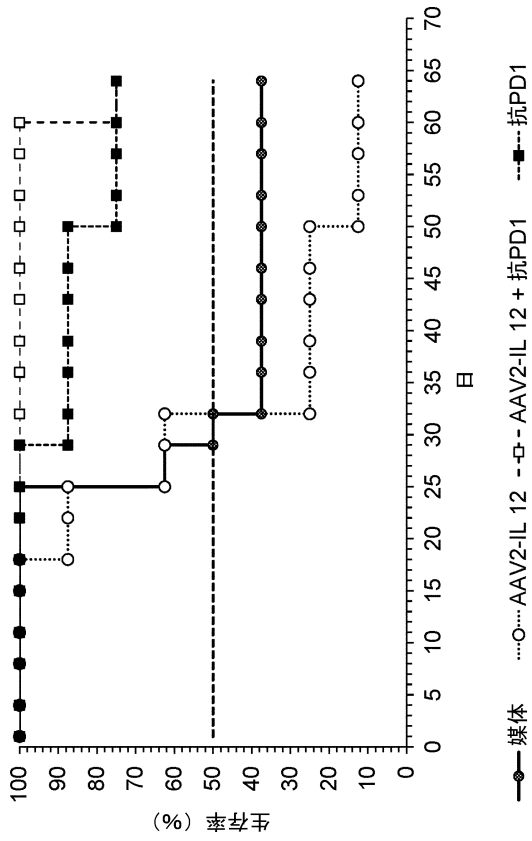
【図 1 4 D】



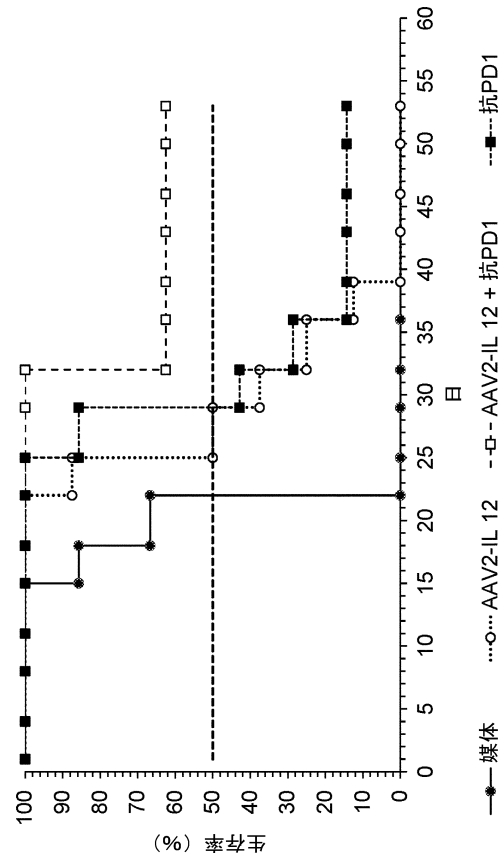
【図 1 5】



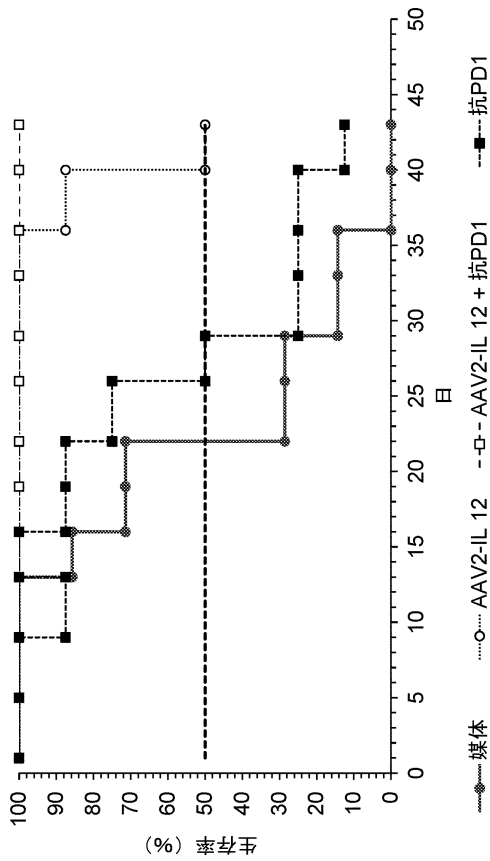
【図 16】



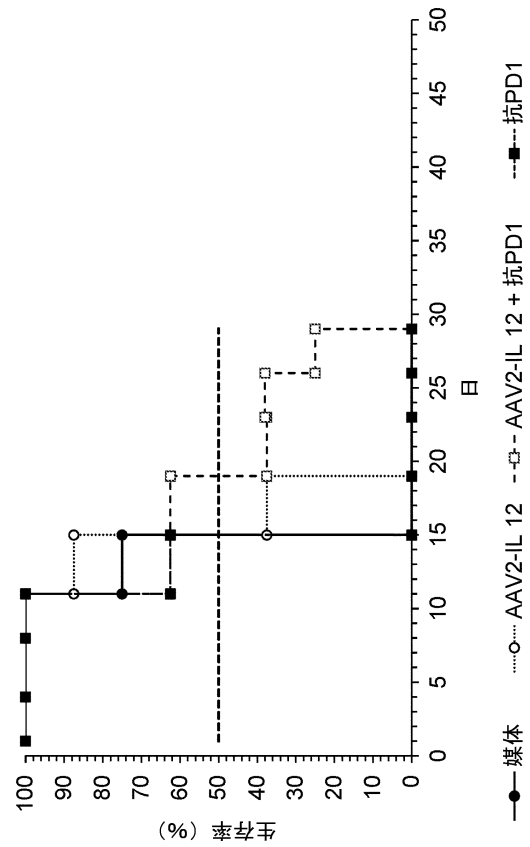
【図 17】



【図 18】



【図 19】



10

20

30

40

50

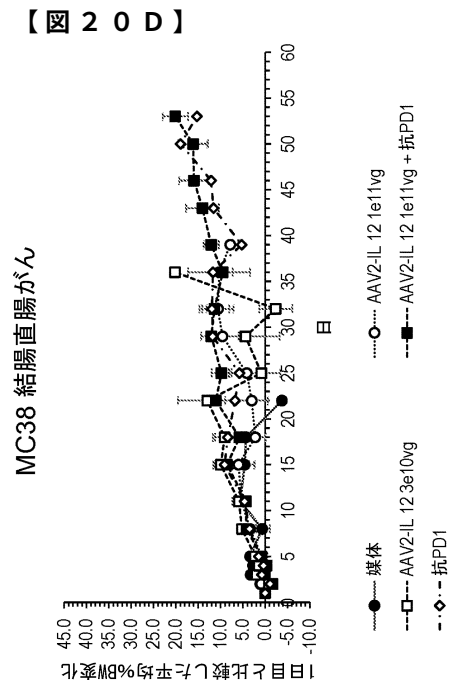
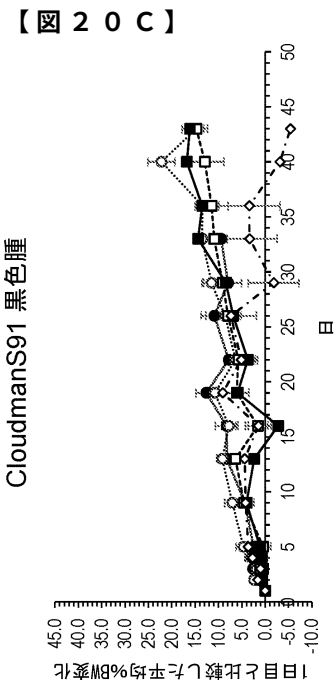
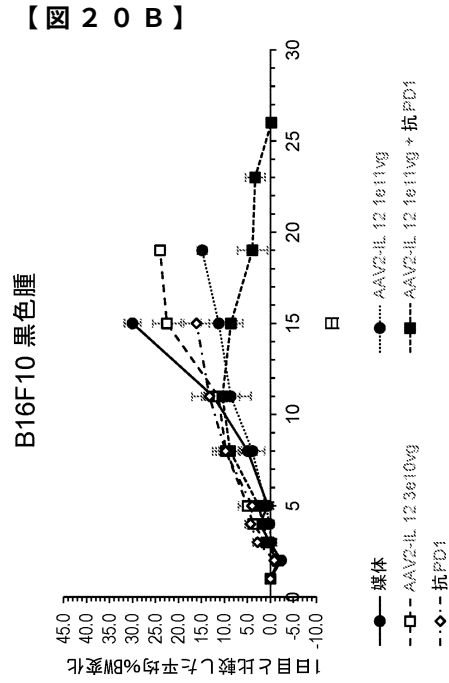
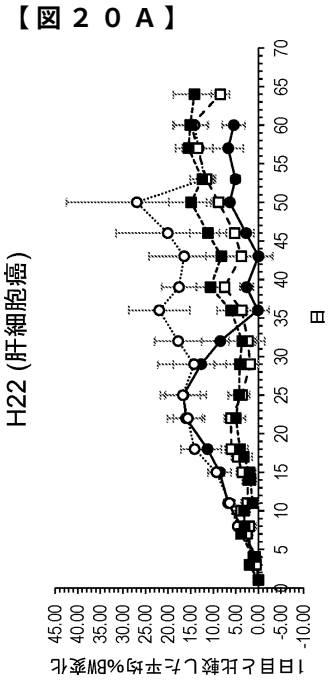
10

20

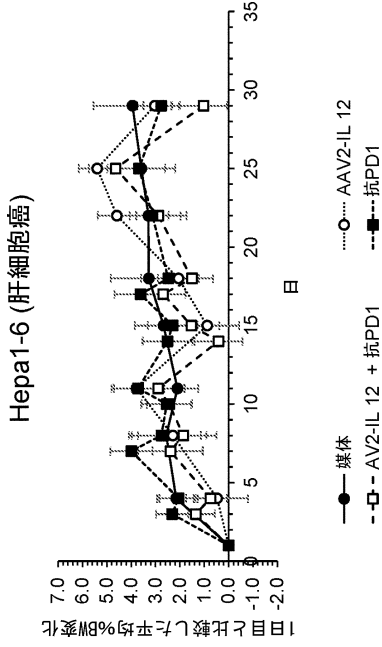
30

40

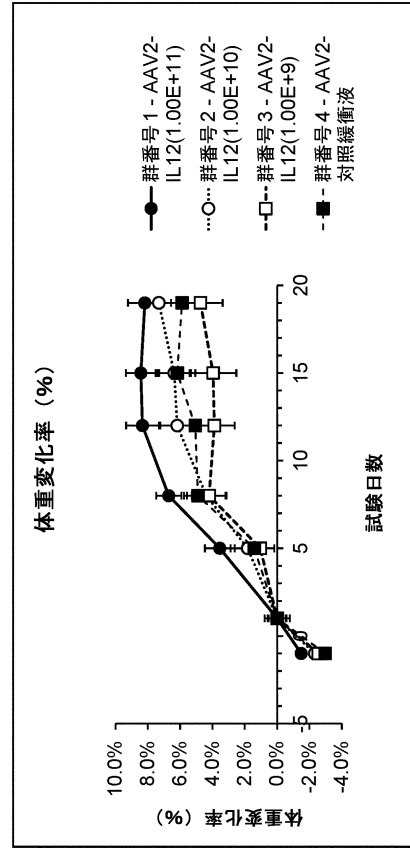
50



【図 20 E】



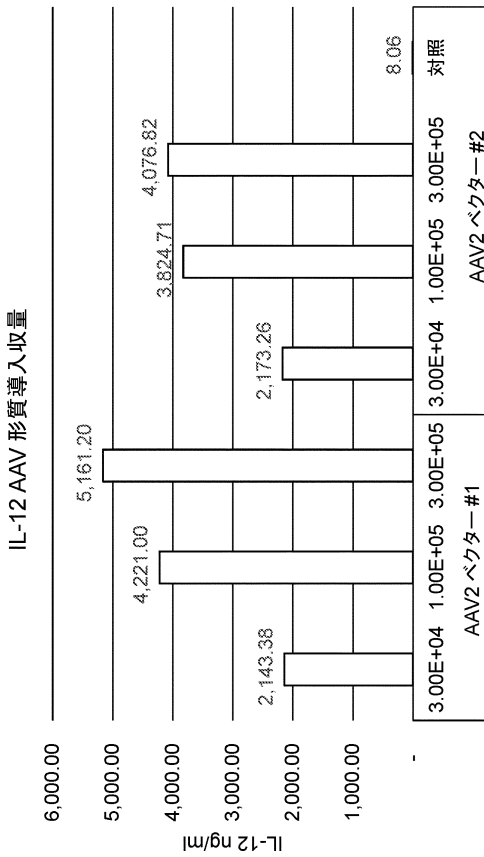
【図 21】



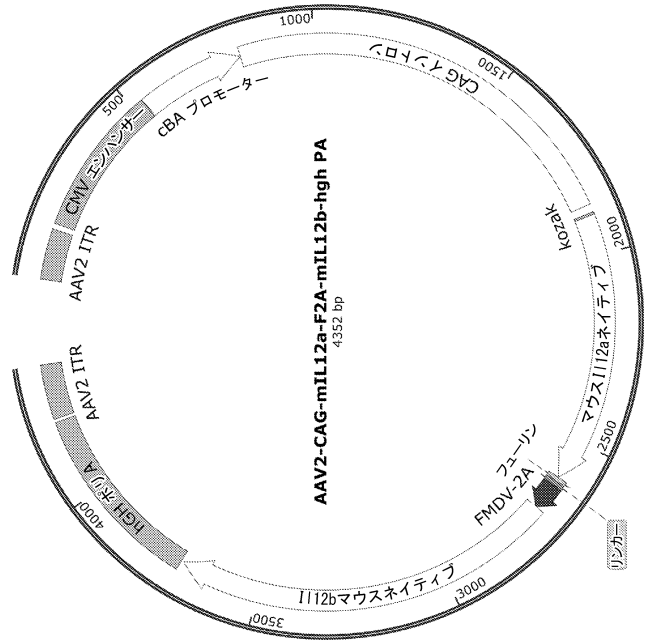
10

20

【図 22】



【図 23 A】

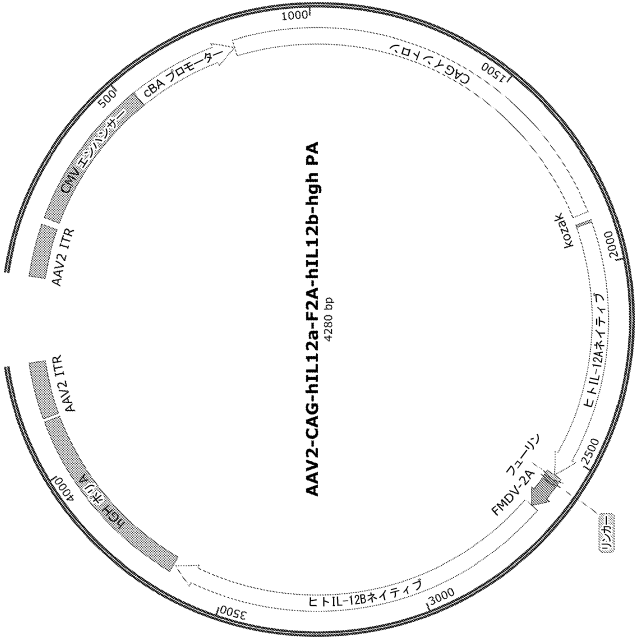


30

40

50

【図 23 B】



10

【配列表】

2023548746000001.app

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/054871

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K31/00 C07K14/54 C12N15/861
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K C12N

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 3 552 614 A1 (GENEMEDICINE CO LTD [KR]) 16 October 2019 (2019-10-16) the whole document claims 1,6; figure 3 -----	1-132
X	WO 2008/140173 A1 (UNIV SOGANG IND UNIV COOP FOUN [KR]; YUN CHAE-OK [KR]) 20 November 2008 (2008-11-20) the whole document abstract; claim 9 -----	1-132
X	WO 2020/123602 A1 (ONCOSEC MEDICAL INC [US]) 18 June 2020 (2020-06-18) the whole document figure 1; table 3 page 27 page 61 ----- -/--	1-132

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 March 2022

Date of mailing of the international search report

23/03/2022

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Weinberg, Suzanna

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/054871

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TSUNG-LANG CHIU ET AL: "The treatment of glioblastoma multiforme through activation of microglia and TRAIL induced by rAAV2-mediated IL-12 in a syngeneic rat model", JOURNAL OF BIOMEDICAL SCIENCE, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 19, no. 1, 22 April 2012 (2012-04-22) , page 45, XP021124539, ISSN: 1423-0127, DOI: 10.1186/1423-0127-19-45 the whole document -----	1-132
X	WO 2007/126805 A2 (CELL GENESYS INC [US]; UNIV CALIFORNIA [US] ET AL.) 8 November 2007 (2007-11-08) the whole document paragraph [0104] paragraph [0119] paragraph [0126] - paragraph [0135] paragraph [0154] - paragraph [0155] paragraph [0059] -----	1-132
X	WO 2018/026872 A1 (VIROGIN BIOTECH CANADA LTD [CA]) 8 February 2018 (2018-02-08) the whole document paragraph [0064]; figure 5 paragraph [0069] - paragraph [0077] paragraph [0080] -----	1-132
A	WO 2016/073704 A1 (CHILDREN S RES INST CHILDREN S NAT MEDICAL CT [US] ET AL.) 12 May 2016 (2016-05-12) the whole document example 1 -----	1-132

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/054871

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/054871

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 3552614 A1	16-10-2019	AU 2017371301 A1	25-07-2019
		AU 2021203142 A1	17-06-2021
		CA 3046452 A1	14-06-2018
		CN 110582292 A	17-12-2019
		EP 3552614 A1	16-10-2019
		JP 2020500947 A	16-01-2020
		KR 20180066871 A	19-06-2018
		RU 2019120849 A	12-01-2021
		US 2019358277 A1	28-11-2019
		WO 2018106068 A1	14-06-2018
WO 2008140173 A1	20-11-2008	EP 2041287 A1	01-04-2009
		JP 5028553 B2	19-09-2012
		JP 2009544310 A	17-12-2009
		KR 20080100640 A	19-11-2008
		US 2011124048 A1	26-05-2011
		WO 2008140173 A1	20-11-2008
WO 2020123602 A1	18-06-2020	AU 2019398202 A1	05-08-2021
		CA 3122395 A1	18-06-2020
		CN 113302304 A	24-08-2021
		EP 3894563 A1	20-10-2021
		JP 2022513201 A	07-02-2022
		KR 20210091323 A	21-07-2021
		SG 11202105472Q A	29-06-2021
		US 2022040328 A1	10-02-2022
		WO 2020123602 A1	18-06-2020
WO 2007126805 A2	08-11-2007	AU 2007245187 A1	08-11-2007
		CA 2648067 A1	08-11-2007
		EP 2002263 A2	17-12-2008
		EP 2772262 A1	03-09-2014
		ES 2476891 T3	15-07-2014
		JP 5638800 B2	10-12-2014
		JP 5798223 B2	21-10-2015
		JP 2009532350 A	10-09-2009
		JP 2012193196 A	11-10-2012
		JP 2015013865 A	22-01-2015
		US 2008014222 A1	17-01-2008
		US 2013309267 A1	21-11-2013
		WO 2007126805 A2	08-11-2007
WO 2018026872 A1	08-02-2018	AU 2017305335 A1	07-03-2019
		CA 3032669 A1	08-02-2018
		EP 3490583 A1	05-06-2019
		JP 2019523022 A	22-08-2019
		US 2019169253 A1	06-06-2019
		WO 2018026872 A1	08-02-2018
WO 2016073704 A1	12-05-2016	AU 2015343048 A1	18-05-2017
		CA 2966988 A1	12-05-2016
		CN 107207597 A	26-09-2017
		EP 3215539 A1	13-09-2017
		HK 1244015 A1	27-07-2018
		JP 2018501302 A	18-01-2018
		KR 20180004094 A	10-01-2018
		US 2019119353 A1	25-04-2019
		WO 2016073704 A1	12-05-2016

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/054871

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/20 (2006.01)	C 1 2 N 15/20	
C 1 2 N 15/26 (2006.01)	C 1 2 N 15/26	
C 1 2 N 15/27 (2006.01)	C 1 2 N 15/27	
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 K 38/20 (2006.01)	A 6 1 K 35/761	
A 6 1 K 38/02 (2006.01)	A 6 1 K 38/20	
A 6 1 K 38/19 (2006.01)	A 6 1 K 38/02	
A 6 1 K 38/21 (2006.01)	A 6 1 K 38/19	
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 38/21	
A 6 1 K 47/10 (2017.01)	A 6 1 K 47/02	
	A 6 1 K 47/10	

(32)優先日 令和3年1月26日(2021.1.26)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/182,632

(32)優先日 令和3年4月30日(2021.4.30)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

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

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ファーマンスキ ブライアン

アメリカ合衆国 9 4 3 0 6 カリフォルニア州 パロ アルト ポーテージ アベニュー 3 8 0 ク
リヤ セラピューティクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 グプタ ナチ

アメリカ合衆国 9 4 3 0 6 カリフォルニア州 パロ アルト ポーテージ アベニュー 3 8 0 ク
リヤ セラピューティクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 シュネップ ブルース

アメリカ合衆国 9 4 3 0 6 カリフォルニア州 パロ アルト ポーテージ アベニュー 3 8 0 ク
リヤ セラピューティクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 ストーン ミシェル

アメリカ合衆国 9 4 3 0 6 カリフォルニア州 パロ アルト ポーテージ アベニュー 3 8 0 ク
リヤ セラピューティクス インコーポレイテッド内

F ターム (参考) 4B065 AA90Y AA95X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4C076 AA12 BB11 CC27 DD23 DD23Z DD26Z DD38 FF61
4C084 AA02 AA13 AA19 BA44 CA53 DA01 DA12 DA13 DA14 DA15
DA16 DA17 DA18 DA19 DA22 DA23 DA25 DC50 MA02 MA66 NA05
ZB021 ZB022 ZB091 ZB092 ZB261 ZB271 ZC751
4C085 AA13 AA14 BB01 BB12 EE03 GG02
4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA12 MA02 MA66 NA05 ZB02 ZB09
ZB26 ZB27 ZC75