

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7305300号
(P7305300)

(45)発行日 令和5年7月10日(2023.7.10)

(24)登録日 令和5年6月30日(2023.6.30)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 38/19 (2006.01)

A 6 1 K

38/19

Z N A

A 6 1 K 35/12 (2015.01)

A 6 1 K

35/12

A 6 1 K 35/15 (2015.01)

A 6 1 K

35/15

A 6 1 K 35/761 (2015.01)

A 6 1 K

35/761

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K

39/395

D

請求項の数 19 (全76頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2017-525120(P2017-525120)

(86)(22)出願日 平成27年11月5日(2015.11.5)

(65)公表番号 特表2017-538680(P2017-538680
A)

(43)公表日 平成29年12月28日(2017.12.28)

(86)国際出願番号 PCT/US2015/059297

(87)国際公開番号 WO2016/073759

(87)国際公開日 平成28年5月12日(2016.5.12)

審査請求日 平成30年11月1日(2018.11.1)

審判番号 不服2021-645(P2021-645/J1)

審判請求日 令和3年1月15日(2021.1.15)

(31)優先権主張番号 62/075,532

(32)優先日 平成26年11月5日(2014.11.5)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 506115514

ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシテ
ィ オブ カリフォルニアThe Regents of the U
niversity of Califo
rniaアメリカ合衆国、カリフォルニア州 9
4 6 0 7 - 5 2 0 0, オークランド, フ
ランクリン ストリート 1 1 1 1, 1 2
番 フロア

(74)代理人 110000523

アクシス国際弁理士法人

(72)発明者 ステイブン・エム・ドゥピネット

アメリカ合衆国 9 0 0 7 7 カルフォルニ
ア州ロサンジェルス、ロスクーメア・ロ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 併用免疫療法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体において非小細胞肺癌（NSCLC）固形腫瘍を治療するか又はその再発を予防するための同時用途の治療剤であって、次の a . 及び b . を含む治療剤：

a . は、(i) S L C ポリペプチド、(i i) 該 S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現可能なように含む組換えポリヌクレオチド、(i i i) 該組換えポリヌクレオチドを発現可能なように導入してなる細胞、又は(i v) それらの組み合わせから選択され、及び

b . は、P D - 1 阻害剤、P D 1 - L 1 阻害剤及びそれらの組み合わせから選択される免疫チェックポイント阻害剤である。

【請求項 2】

前記免疫チェックポイント阻害剤が P D - 1 阻害剤である、請求項 1 に記載の治療剤。

【請求項 3】

前記免疫チェックポイント阻害剤が抗体である、請求項 2 に記載の治療剤。

【請求項 4】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 3 に記載の治療剤。

【請求項 5】

前記 P D - 1 阻害剤がニボルマブ、ペムブロリズマブ、ピジリズマブ、ラムプロリズマブ、B G B A 3 1 7、A M P - 2 2 4、A M P 2 2 4、A U N P 1 2、B G B 1 0 8、M C L A 1 3 4、M E D I 0 6 8 0、P D R 0 0 1、R E G N 2 8 1 0、S H R 1 2 1 0、

S T I A 1 1 0 X、S T I A 1 1 1 0 及び T S R 0 4 2 よりなる群から選択され、

前記 P D 1 - L 1 阻害剤が B M S - 9 3 6 5 5 9、M P D L 3 2 8 0 A、M E D I - 4 7 3 6、M S B 0 0 1 0 7 1 8 C、A L N - P D L、K D 0 3 3、K Y 1 0 0 3、S T I A 1 0 0 X、S T I A 1 0 1 0、S T I A 1 0 1 1、S T I A 1 0 1 2 及び S T I A 1 0 1 4 よりなる群から選択される、請求項 1 に記載の治療剤。

【請求項 6】

前記 S L C ポリペプチドが配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、非小細胞肺癌（N S C L C）固形腫瘍を治療するか又はその再発を予防するための用途の、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の治療剤。

【請求項 7】

前記 S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドがベクターに挿入され、そして該ベクターが前記被験体に投与されるものである、非小細胞肺癌（N S C L C）固形腫瘍を治療するか又はその再発を予防するための用途の、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の治療剤。

【請求項 8】

前記ベクターが複製欠損アデノウイルスベクターであってよいアデノウイルスベクター、C M V ベクター、ワクシニアウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター又はヘルペスウイルスベクターである、請求項 7 に記載の治療剤。

【請求項 9】

前記組換えポリヌクレオチドを発現可能なように導入してなる細胞が抗原提示細胞（A P C）である、非小細胞肺癌（N S C L C）固形腫瘍を治療するか又はその再発を予防するための用途の、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の治療剤。

【請求項 10】

前記抗原提示細胞（A P C）が前記被験体に対して自己由来であってよい樹状細胞である、請求項 9 に記載の治療剤。

【請求項 11】

前記組換えポリヌクレオチドを発現可能なように導入してなる少なくとも又は約 1×10^6 個の細胞が前記被験体に投与されるものである、非小細胞肺癌（N S C L C）固形腫瘍を治療するか又はその再発を予防するための用途の、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の治療剤。

【請求項 12】

前記細胞が 2 4 時間以内に 1×10^6 個の細胞当たり少なくとも又は約 0 . 2 5 n g の S L C を産生する、請求項 1 1 に記載の治療剤。

【請求項 13】

前記被験体が非小細胞肺癌（N S C L C）固形腫瘍を含み、前記細胞が前記被験体に腫瘍内投与されるものである、非小細胞肺癌（N S C L C）固形腫瘍を治療するか又はその再発を予防するための用途の、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の治療剤。

【請求項 14】

（i）S L C ポリペプチド、（i i）該 S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現可能なように含む組換えポリヌクレオチド、（i i i）該組換えポリヌクレオチドを発現可能なように導入してなる細胞又は（i v）それらの組み合わせが、免疫チェックポイント阻害剤の前に開始してかつ該免疫チェックポイント阻害剤と共に継続して投与されるか、又は該免疫チェックポイント阻害剤と同時に開始して前記被験体に投与されるものである、非小細胞肺癌（N S C L C）固形腫瘍を治療するか又はその再発を予防するための用途の、請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の治療剤。

【請求項 15】

（i）S L C ポリペプチド、（i i）該 S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現可能なように含む組換えポリヌクレオチド、（i i i）該組換えポリヌクレオチドを発現可能なように導入してなる細胞又は（i v）それらの組み合わせが、免疫チェックポイント阻害剤の最初の投与の約 2 週間前に開始して、その後該免疫チェックポイン

10

20

30

40

50

ト阻害剤の2週間毎の投与時に前記被験体に毎月投与されるものである、非小細胞肺癌（NSCLC）固形腫瘍を治療するか又はその再発を予防するための用途の、請求項1～13のいずれかに記載の治療剤。

【請求項16】

（i）SLCポリペプチド、（ii）該SLCポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現可能なように含む組換えポリヌクレオチド、（iii）該組換えポリヌクレオチドを発現可能なように導入してなる細胞又は（iv）それらの組み合わせが前記被験体に2回以上投与されるものである、非小細胞肺癌（NSCLC）固形腫瘍を治療するか又はその再発を予防するための用途の、請求項1～13のいずれかに記載の治療剤。

【請求項17】

（i）SLCポリペプチド、（ii）該SLCポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現可能なように含む組換えポリヌクレオチド、（iii）該組換えポリヌクレオチドを発現可能なように導入してなる細胞又は（iv）それらの組み合わせが1ヶ月に1回又は3週間毎に1回前記被験体に投与されるものである、非小細胞肺癌（NSCLC）固形腫瘍を治療するか又はその再発を予防するための用途の、請求項14に記載の治療剤。

【請求項18】

前記免疫チェックポイント阻害剤が前記被験体に2回以上投与されるものである、非小細胞肺癌（NSCLC）固形腫瘍を治療するか又はその再発を予防するための用途の、請求項1～15のいずれかに記載の治療剤。

【請求項19】

前記免疫チェックポイント阻害剤が2週間毎又は3週間毎に1回被験体に投与されるものである、非小細胞肺癌（NSCLC）固形腫瘍を治療するか又はその再発を予防するための用途の、請求項16に記載の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2014年11月5日に出願された米国仮特許出願第62/075,532号の優先権を主張する。その内容は参照により本明細書において援用する。

【0002】

発明の分野

本発明は、癌などの病理学的状態に関連するものを含めた哺乳動物生理学的プロセスを調節するために二次リンパ器官ケモカインを使用する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

発癌性、癌退行、再発及び転移に影響を与える免疫機構を理解することは、新規免疫療法の開発の重要な側面である。この状況において、当業者であれば、免疫応答の基本的な側面は、生物の免疫細胞が自己免疫抗原と非自己抗原とを区別することができることでありと理解する。したがって、癌における免疫機構を解明しようとする臨床関連モデルは、腫瘍細胞が宿主免疫系の細胞と遺伝的背景を共有する（すなわち、同系である）という事実を考慮しなければならない。残念ながら、動物に癌細胞系を導入する癌の多くの動物モデルは、宿主動物の遺伝的背景と評価されている癌細胞系との間の差異に影響を受ける免疫応答によって混乱を来してしまう。具体的には、宿主動物及び癌細胞株が本質的に同一の遺伝的背景を共有しない癌モデルでは、個体間での移植臓器の拒絶反応に見られるものに類似する宿主の免疫系による「非自己」免疫応答に関連する問題を含めて、様々な問題がある。自発癌細胞上の非自己抗原（癌では当然には生じない現象）の宿主免疫系認識から生じる場合のある非自己免疫応答は、ヒト癌では起こらない癌細胞に対する免疫応答を生じさせる。したがって、癌の発生及び進行を忠実に模倣し、それによって免疫機構の臨床的に関連する分析を行うことができるようにする癌モデルが絶えず必要とされている。

10

20

30

40

50

【0004】

腫瘍細胞に対する効果的な免疫応答は、APCエフェクター及びリンパ球エフェクターの両方を必要とする（例えば、Huang外, *Science*, 264:961-965, 1994参照）。腫瘍細胞は、MHC抗原の発現が制限され、共刺激分子を欠失する場合が多いため、それらは効果的でないAPCである（例えば、Restifo外, *J. Exp. Med.*, 177:265-272, 1993参照）。さらに、腫瘍細胞は、宿主免疫監視の回避に寄与する免疫抑制メディエーターを分泌する（例えば、Huang外, *Cancer Res.*, 58:1208-1216, 1998; Sharma外, *J. Immunol.*, 163:5020-5028, 1999; 及びUzzo, *J. Clin. Invest.*, 104:769-776, 1999参照）。この問題を回避するために、研究者は、生体外で生成されたDCを使用して生体内で抗腫瘍免疫応答を刺激している。実験マウスモデルでは、腫瘍関連抗原ペプチドがパルスされたDC (Nair外, *Eur. J. Immunol.*, 27:589-597, 1997) や腫瘍RNAがトランスフェクトされたDCは、生体内で抗原特異的抗腫瘍応答を誘導することが示されている (Boczkowski外, *J. Exp. Med.*, 184:465-472, 1996)。同様に、DCと腫瘍細胞との融合又はサイトカイン修飾DCの腫瘍内注射も、抗腫瘍免疫を増強することが示されている (Gong外, *Nat. Med.*, 3:558-561, 1997; Celluzzi外, *J. Immunol.*, 160:3081-3085, 1998; Miller外, *Hum. Gene Ther.*, 11:53-65, 2000)。結果として、効果的な抗癌免疫は、腫瘍抗原提示のために特殊分化宿主APCを動員して特異的T細胞活性化を促進することによって達成できることが示唆されている (Soto外, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:675-705, 1997)。したがって、DC及びリンパ球エフェクターの両方をリンパ節及び腫瘍部位に引きつけるケモカインは、癌免疫療法において強力な薬剤として機能することができると考えられる。

【0005】

相同であるが機能的に異なるタンパク質の一群であるケモカインは、白血球の移動及び活性化を直接仲介し、血管新生の調節に所定の役割を果たす (Baggiolini外, *Rev. Immunol.*, 15:675-705, 1997)。また、ケモカインは、免疫ホメオスタシス及び二次リンパ器官の構造を維持するように機能する (Jung外, *Curr. Opin. Immunol.*, 11:319-325, 1999)。いくつかのケモカインは、抗腫瘍活性を有することが知られている。腫瘍細胞がMIP1、RANTES、リンホタクチン、TCA3、JE/MCP-1/MCAF、MIP3、MIP3及びIP-10を含めたケモカインで修飾された様々なマウス腫瘍モデルにおいて腫瘍拒絶が注目されている (Lustre外, *J. Exp. Med.*, 178:1057-1065, 1993; Bottazzini外, *J. Immunol.*, 148:1280-1285, 1992; Kellermann外, *J. Immunol.*, 162:3859-3864, 1999; Sallusto外, *Eur. J. Immunol.*, 28:2760-2769, 1998; Sozzani外, *J. Immunol.*, 161:1083-1086, 1998; Dieu外, *J. Exp. Med.*, 188:373-386, 1998; Campell外, *J. Cell Biol.*, 141:1053-1059, 1998; Saeki外, *J. Immunol.*, 162:2472-2475, 1991; Nagira外, *Eur. J. Immunol.*, 28:1516-1523, 1998)。

【0006】

二次リンパ組織ケモカイン (SLC、Exodus 2又は6Ckineとも呼ばれる) は、ナイーブT細胞及びDCを強力に誘引する、高内皮細静脈並びに脾臓及びリンパ節のT細胞ゾーンで通常発現される高内皮由来CCケモカインである (Cyster外, *J. Exp. Med.*, 189:447-450, 1999. 24; Ogata外, *Blood*, 93:3225-3232, 1999; Chan外, *Blood*, 93:3610-

10

20

30

40

50

3616, 1999; Hedrick 外, J. Immunol., 159: 1589 - 1593, 1997; Hromas 外, J. Immunol., 159: 2554 - 2558, 1997; Nagira 外, J. Biol. Chem., 272: 19518 - 19524, 1997; Tanabe 外, J. Immunol., 159: 5671 - 5679, 1997; Willmann 外, Eur. J. Immunol., 28: 2025 - 2034, 1998)。SLCは、2つの特異的Gタンパク質共役型7回膜貫通ドメインケモカイン受容体のCCR7及びCXCR3を介してその効果を仲介する(Yoshida 外, J. Biol. Chem. 273: 7118; Jenh 外, J. Immunol. 162: 3765)。CCR7はナイーブT細胞及び成熟DC上で発現されるのに対し、CXCR3は記憶表現型を有するTh1サイトカイン産生リンパ球上で優先的に発現される(Yoshida 外, J. Biol. Chem. 273: 7118; Jenh 外, J. Immunol. 162: 3765)。

10

【0007】

DCを化学結合させるSLCの能力(Kellermann 外, J. Immunol., 162: 3859 - 3864, 1999)は、他のケモカインと共有される特性である(Sallusto 外, Eur. J. Immunol., 28: 2760 - 2769, 1998; Sozzani 外, J. Immunol., 161: 1083 - 1086, 1998; Dieu 外, J. Exp. Med., 188: 373 - 386, 1998)。しかし、SLCは、生体内での1型サイトカイン応答を誘発することができるため、明らかに有利な場合がある(Sharma 外, J. Immunol., 164: 4558 - 4563, 2000)。DCは、免疫応答の開始に關与するユニークに強力なAPCである(Banchereau 外, Nature (Lond.), 392: 245 - 252, 1998)。免疫系のセンチネルとして機能するDCは、末梢における抗原の獲得、その後、特異的な免疫応答を開始するリンパ器官におけるT細胞領域への輸送を担当する。SLCは、ナイーブリンパ球及び抗原刺激DCの両方を二次リンパ器官のT細胞ゾーンに動員し、これらの初期免疫応答成分を共局在化させ、同族T細胞活性化を達成する(Cyster 外, J. Exp. Med., 189: 447 - 450, 1999. 24)。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

30

当該技術分野においては、例えば宿主サイトカインプロファイルがSLCによってどのように調節されるのかのみならず、SLCが同系癌細胞に対する効果的な細胞仲介免疫応答を編成する能力を試験するために癌における免疫機構を忠実に模倣する癌モデルが必要とされている。さらに、このような臨床関連モデルに基づく免疫機能並びに免疫療法モダリティの新たなアッセイが必要とされている。ここで提供される発明は、これらのニーズを満たすものである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

発明の概要

本明細書に開示される発明は、本質的に同一の遺伝的背景を有する宿主動物及び癌細胞を利用することによって、癌における免疫機構を忠実に模倣する動物モデルを提供する。これらのモデルは、SLCが同系癌細胞に対する効果的な細胞仲介免疫応答を編成する能力を実証するために使用される。さらに、これらのモデルを使用して、同系癌細胞に対するSLC調節免疫応答に關連する宿主サイトカインプロファイルを評価することができる。

40

【0010】

本明細書に開示するように、二次リンパ器官ケモカインの抗腫瘍効率を、腫瘍を自発的に発生するトランスジェニックマウスを含めた多数の同系モデルにおいて評価した。これらのトランスジェニックマウスでは、両側多巣性肺腺癌が臓器特異的に発生する。当該技術分野において知られている同種モデルと比較して、このトランスジェニックマウスモデルにおいて生じる自発性腫瘍は非自己抗原を発現しないため、ヒト癌に似ている。

50

【 0 0 1 1 】

本明細書で開示される同系モデルにおいて、腫瘍内及び／又は腋窩リンパ節領域内における組換え S L C の注入により、腫瘍の広範囲にわたるリンパ球及び D C 浸潤が著しく減少し、生存率が向上した。これらの同系ネズミモデルに S L C 注射をすると、腫瘍部位、リンパ節及び脾臓で C D 4 及び C D 8 リンパ球並びに D C が有意に増加した。細胞浸潤は、1 型サイトカイン及び抗血管新生ケモカイン I F N - 誘導性タンパク質 1 0、及び I F N - (M I G) によって誘導されるモノカインの同化作用の向上を伴った。対照的に、免疫抑制性サイトカイン形質転換増殖因子 のリンパ節及び腫瘍部位産生は、S L C 処置に応答して減少した。試験管内では、照射自己腫瘍による刺激後に、S L C 処置マウスからの脾細胞は、より多くの I F N - 及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子を有意に分泌したが、インターロイキン 1 0 のレベルを低下させた。腫瘍が器官特異的に発生するモデルにおける腫瘍負荷の有意な減少は、腫瘍免疫及び癌免疫療法を調節する際の S L C の使用方法を提供する。

10

【 0 0 1 2 】

本明細書で開示される発明は多数の実施形態を有する。本発明の典型的な実施形態は、哺乳動物に、癌細胞の増殖を阻害するのに十分な量の二次リンパ組織ケモカイン (S L C) ポリペプチドを投与することによって哺乳動物における自発癌の増殖を阻害する方法である。好ましい方法では、S L C は配列番号 1 で示されるポリペプチド配列を有する。これらの方法では、S L C ポリペプチドは、典型的には、腫瘍内注射又はリンパ節注射によって哺乳動物に全身的に投与される。さらに別の投与態様では、S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを有する発現ベクターを哺乳動物に投与し、S L C ポリペプチドは、S L C 発現ベクターで形質導入された哺乳動物細胞によって産生される。

20

【 0 0 1 3 】

本発明の関連する実施形態は、哺乳動物に二次リンパ組織ケモカイン (S L C) を投与することを含む、哺乳動物における同系癌細胞 (最も好ましくは自発的癌細胞) の増殖を阻害する方法であって、配列番号 1 に示される S L C をコードするポリヌクレオチドを哺乳動物の細胞に形質導入することによって S L C を哺乳動物に投与し、それによって、該形質導入された細胞が癌細胞の増殖を阻害するのに十分な量で S L C ポリペプチドを発現する方法である。好ましくは、ベクターは、腫瘍内注射又はリンパ節内注射によって哺乳動物に全身的に投与される。

30

【 0 0 1 4 】

本発明の別の実施形態は、哺乳動物又は哺乳動物に由来する細胞の集団におけるサイトカイン発現を、同系の腫瘍細胞の増殖を阻害するのに十分な量の二次リンパ系組織ケモカイン (S L C) ポリペプチドに該細胞集団を曝露することによって達成する又は調節する (例えば、既存のサイトカインプロファイルを変化させる) 方法である。本明細書に開示されるように、本明細書中に開示される同系モデルは、S L C の添加がどのようにサイトカイン発現を協調的に調節し、かつ、腫瘍細胞の増殖を阻害するのかを実証するため、これらの現象の観察 (サイトカイン発現の調節及び腫瘍増殖の阻害) は、潜在的な免疫刺激性化合物又は免疫阻害性試験化合物の効果を評価するように設計された細胞系アッセイで利用できる。

40

【 0 0 1 5 】

本発明の別の実施形態は、同系哺乳動物細胞の集団におけるインターフェロン - (I F N -) ポリペプチドの発現の増加及び形質転換増殖因子 - (T G F -) ポリペプチドの発現の減少を、C D 8 陽性 T 細胞、C D 4 陽性 T 細胞、抗原提示細胞及び腫瘍細胞を含む腫瘍細胞の増殖を阻害するのに十分な量の二次リンパ組織ケモカイン (S L C) ポリペプチドに該細胞集団を曝露することによって達成する方法である。好ましい方法では、酵素結合免疫吸着 (E L I S A) アッセイによって測定したときに、インターフェロン - (I F N -) ポリペプチドの発現の増加は少なくとも約 2 倍であり、形質転換増殖因子 - (T G F -) ポリペプチドの発現の減少は少なくとも約 2 倍である。

【 0 0 1 6 】

50

様々な実施形態では、本発明は、被験体に (i) S L C ポリペプチド、(i i) S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、(i i i) ポリヌクレオチドを含む細胞、又は (i v) それらの組み合わせを投与し、そして該被験体に免疫チェックポイント阻害剤を投与し、それによって該被験体において癌又は固形腫瘍を治療することを含む、被験体において癌又は固形腫瘍を治療する方法も提供する。

【 0 0 1 7 】

また、腫瘍増殖若しくは腫瘍体積を減少させる方法、腫瘍進行を緩徐化若しくは低下させる方法、又は被験体における腫瘍再発を予防又は改善する方法であって、(i) S L C ポリペプチド、(i i) S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、(i i i) ポリヌクレオチドを含む細胞、又は (i v) それらの組み合わせを投与することを含む方法も意図される。

10

【 0 0 1 8 】

様々な実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、C T L A - 4 阻害剤、C T L A - 4 受容体阻害剤、プログラム細胞死 1 (P D - 1) 阻害剤、P D 1 - L 1 阻害剤、P D 1 - L 2 阻害剤、4 - 1 B B 阻害剤、O X 4 0 阻害剤、リンパ球活性化遺伝子 3 (L A G - 3) 阻害剤、T 細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン 3 (T I M - 3) 阻害剤又はそれらの組み合わせよりなる群から選択される。

【 0 0 1 9 】

様々な実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、C T L A - 4、C T L A - 4 受容体、P D - 1、P D 1 - L 1、P D 1 - L 2、4 - 1 B B、O X 4 0、L A G - 3、T I M - 3 又はそれらの組み合わせの 1 種以上に特異的な抗体、任意にモノクローナル抗体である。

20

【 0 0 2 0 】

様々な実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、C T L A - 4、C T L A - 4 受容体、P D - 1、P D 1 - L 1、P D 1 - L 2、4 - 1 B B、O X 4 0、L A G - 3、T I M - 3 又はそれらの組み合わせの 1 種以上の活性を阻害する小分子阻害剤である。

【 0 0 2 1 】

様々な実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、C T L A - 4 阻害剤、任意にイピリムマブ又はトレミリムマブである。

【 0 0 2 2 】

様々な実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ピジリズマブ、ラムプロリズマブ、B M S - 9 3 6 5 5 9、アテゾリズマブ並びに A M P - 2 2 4、A M P 2 2 4、A U N P 1 2、B G B 1 0 8、M C L A 1 3 4、M E D I 0 6 8 0、P D R 0 0 1、R E G N 2 8 1 0、S H R 1 2 1 0、S T I A 1 1 0 X、S T I A 1 1 1 0 及び T S R 0 4 2 よりなる群から選択される P D 1 阻害剤である。

30

【 0 0 2 3 】

様々な実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、B M S - 9 3 6 5 5 9、M P D L 3 2 8 0 A、M E D I - 4 7 3 6、M S B 0 0 1 0 7 1 8 C、A L N - P D L、B G B A 3 1 7、K D 0 3 3、K Y 1 0 0 3、S T I A 1 0 0 X、S T I A 1 0 1 0、S T I A 1 0 1 1、S T I A 1 0 1 2 及び S T I A 1 0 1 4 よりなる群から選択される P D 1 - L 1 阻害剤である。

40

【 0 0 2 4 】

様々な実施形態において、4 - 1 B B の免疫チェックポイント阻害剤は、4 - 1 B B に特異的に結合するモノクローナル抗体であり、B M S - 6 6 3 5 1 3 及び P F - 0 5 0 8 2 5 6 6 が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 2 5 】

様々な実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は O X 4 0 の阻害剤である。例示的な態様では、O X 4 0 の阻害剤は、O X 4 0 に特異的に結合するモノクローナル抗体である。

【 0 0 2 6 】

50

様々な実施形態において、S L C ポリペプチドは、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列を含む。

【0027】

様々な実施形態では、S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをベクターに挿入し、このベクターを被験体に投与する。様々な実施形態では、ベクターはアデノウイルスベクターである。様々な実施形態では、アデノウイルスベクターは、複製欠損アデノウイルスベクターである。

【0028】

様々な実施形態では、S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む細胞は抗原提示細胞 (A P C) である。様々な実施形態において、A P C は樹状細胞である。様々な実施形態において、樹状細胞は、被験体に対して自己由来である。

10

【0029】

様々な実施形態では、S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む少なくとも又は約 1×10^6 個の細胞を被験体に投与する。様々な実施形態では、細胞は、24 時間以内に 1×10^6 個の細胞当たり少なくとも約 0.25 ng の C C L 2 1 を産生する。

【0030】

様々な実施形態では、被験体は固形腫瘍を含み、細胞を該被験体に腫瘍内投与する。様々な実施形態では、固形腫瘍は非小細胞肺癌 (N S C L C) 固形腫瘍である。

【0031】

様々な実施形態において、(i) S L C ポリペプチド、(i i) S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、(i i i) ポリヌクレオチドを含む細胞、又は (i v) それらの組み合わせを、免疫チェックポイント阻害剤の前に被験体に投与する。様々な実施形態では、(i) S L C ポリペプチド、(i i) S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、(i i i) ポリヌクレオチドを含む細胞、又は (i v) それらの組み合わせを、免疫チェックポイント阻害剤の約 2 週間前に被験体に投与する。

20

【0032】

様々な実施形態において、(i) S L C ポリペプチド、(i i) S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、(i i i) ポリヌクレオチドを含む細胞、又は (i v) それらの組み合わせを被験体に 2 回以上投与する。

【0033】

様々な実施形態において、(i) S L C ポリペプチド、(i i) S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、(i i i) ポリヌクレオチドを含む細胞、又は (i v) それらの組み合わせを 1 ヶ月に 1 回被験体に投与する。

30

【0034】

様々な実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤を被験体に 2 回以上投与する。様々な実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤を 2 週間に 1 回被験体に投与する。

【0035】

また、(i) S L C ポリペプチド、(i i) S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、(i i i) ポリヌクレオチドを含む細胞又は (i v) それらの組み合わせと免疫チェックポイント阻害剤とを含むキットも意図される。

40

【0036】

様々な実施形態において、キットは、C T L A - 4 阻害剤、C T L A - 4 受容体阻害剤、P D - 1 阻害剤、P D 1 - L 1 阻害剤、P D 1 - L 2 阻害剤、4 - 1 B B 阻害剤、O X 4 0 阻害剤、L A G - 3 阻害剤、T I M - 3 阻害剤又はそれらの組み合わせよりなる群から選択される免疫チェックポイント阻害剤を提供する。

【0037】

様々な実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、C T L A - 4、C T L A - 4 受容体、P D - 1、P D 1 - L 1、P D 1 - L 2、4 - 1 B B、O X 4 0、L A G - 3、T I M - 3 又はそれらの組み合わせの 1 種以上に特異的な抗体、任意にモノクローナル抗体である。

50

【 0 0 3 8 】

様々な実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、C T L A - 4、C T L A - 4 受容体、P D - 1、P D 1 - L 1、P D 1 - L 2、4 - 1 B B、O X 4 0、L A G - 3、T I M - 3 又はそれらの組み合わせの 1 種以上の活性を阻害する小分子阻害剤である。

【 0 0 3 9 】

様々な実施形態では、キット中の免疫チェックポイント阻害剤は、C T L A - 4 阻害剤、任意にイピリムマブ又はトレミリムマブである。

【 0 0 4 0 】

様々な実施形態では、キット中の免疫チェックポイント阻害剤は、ニボルマブ、ペムブリゾマブ、ビジリズマブ、ラムプロリズマブ、B M S - 9 3 6 5 5 9、アテゾリズマブ並びに A M P - 2 2 4、A M P 2 2 4、A U N P 1 2、B G B 1 0 8、M C L A 1 3 4、M E D I 0 6 8 0、P D R 0 0 1、R E G N 2 8 1 0、S H R 1 2 1 0、S T I A 1 1 0 X、S T I A 1 1 1 0 及び T S R 0 4 2 よりなる群から選択される P D 1 阻害剤である。

【 0 0 4 1 】

様々な実施形態では、キット中の免疫チェックポイント阻害剤は、B M S - 9 3 6 5 5 9、M P D L 3 2 8 0 A、M E D I - 4 7 3 6、M S B 0 0 1 0 7 1 8 C、A L N - P D L、B G B A 3 1 7、K D 0 3 3、K Y 1 0 0 3、S T I A 1 0 0 X、S T I A 1 0 1 0、S T I A 1 0 1 1、S T I A 1 0 1 2 及び S T I A 1 0 1 4 よりなる群から選択される P D 1 - L 1 阻害剤である。

【 0 0 4 2 】

様々な実施形態において、4 - 1 B B の免疫チェックポイント阻害剤は、4 - 1 B B に特異的に結合するモノクローナル抗体であり、B M S - 6 6 3 5 1 3 及び P F - 0 5 0 8 2 5 6 6 が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 4 3 】

様々な実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は O X 4 0 の阻害剤である。様々な実施形態では、O X 4 0 の阻害剤は、O X 4 0 に特異的に結合するモノクローナル抗体である。

【 0 0 4 4 】

様々な実施形態では、チェックポイント阻害剤は L A G - 3 阻害剤である。様々な実施形態では、L A G - 3 の阻害剤は、L A G - 3 に特異的に結合するモノクローナル抗体である。

【 0 0 4 5 】

様々な実施形態では、チェックポイント阻害剤は T I M - 3 阻害剤である。様々な実施形態では、T I M - 3 の阻害剤は、T I M - 3 に特異的に結合するモノクローナル抗体である。

【 0 0 4 6 】

様々な実施形態において、S L C ポリペプチドは、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 7 】

様々な実施形態では、S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをベクターに挿入し、このベクターを被験体に投与する。様々な実施形態では、ベクターはアデノウイルスベクターである。様々な実施形態では、アデノウイルスベクターは、複製欠損アデノウイルスベクターである。

【 0 0 4 8 】

また、S L C (例えば、S L C ポリペプチド、S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含む細胞若しくはそれらの組合せ) 及び/又はチェックポイントタンパク質シグナル伝達を調節する上記抗体若しくはポリペプチド、例えば C T L A - 4 阻害剤、C T L A - 4 受容体阻害剤、プログラム細胞死 1 (P D - 1) 阻害剤、P D 1 - L 1 阻害剤、P D 1 - L 2 阻害剤、4 - 1 B B 阻害剤、O X 4 0 阻害剤、リンパ球活性化遺伝子 3 (L A G - 3) 阻害剤、T 細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン 3 (T I M - 3) 阻害剤若しくはそれらの組み合わせなどのチェックポイント阻害剤のいずれ

10

20

30

40

50

かの、本明細書に記載の障害のいずれかを治療するための医薬品の製造における使用も意図される。様々な実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、C T L A - 4、C T L A - 4 受容体、P D - 1、P D 1 - L 1、P D 1 - L 2、4 - 1 B B、O X 4 0、L A G - 3、T I M - 3 又はそれらの組み合わせの 1 種以上に特異的な抗体、任意にモノクローナル抗体である。

【 0 0 4 9 】

また、上記抗体又はポリペプチドのいずれかを任意に適切な使用説明書と共に含むシリンジ、例えば、一回使用シリンジ又は予め充填されたシリンジ、滅菌密封容器、例えば、バイアル、ボトル、容器、及び / 又はキット若しくはパッケージも意図される。

【 0 0 5 0 】

本明細書に記載された上記抗体又はポリペプチドのいずれかを、補助療法として当該分野において知られている又は本明細書に記載されている任意の化学療法剤と同時に投与することができる。また、本発明の上記抗体又はポリペプチドのいずれかを化学療法剤と共に含む組成物も意図される。

【 0 0 5 1 】

本明細書に記載される各特徴若しくは実施形態又は組み合わせは、本発明の態様のいずれかの非限定的で例示的な実施形態であり、それ自体本明細書に記載された他の任意の特徴若しくは実施形態又は組み合わせと組み合わせることが可能であることを意味すると解される。例えば、特徴が「一実施形態」、「いくつかの実施形態」、「さらなる実施形態」、「特定の例示的な実施形態」及び / 又は「別の実施形態」などの用語で記載される場合には、これらのタイプの実施形態のそれぞれは、可能な全ての組み合わせを列挙することなく、本明細書に記載される任意の他の特徴又は特徴の組み合わせと組み合わせられることを目的とした特徴の非限定的な例である。

【 0 0 5 2 】

このような特徴又は特徴の組み合わせは、本発明のいずれの態様にも適用される。同様に、所定の方法において、所定の特徴によって特徴付けられる抗体などのポリペプチド結合剤を同定する記載がある場合には、それらの特徴によって特徴付けられるポリペプチド結合剤も本発明によって企図される。範囲内に入る値の例が開示されている場合には、これらの例のいずれも範囲の可能な終点として考えられ、そのような終点間の任意の数値及び全ての数値が考慮され、上限値及び下限値の任意かつ全ての組み合わせが想定される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 3 】

【図 1】S L C は、免疫コンピテントマウスにおける抗腫瘍応答を仲介する：C D 4 及び C D 8 リンパ球サブセットについての要件。3 L L (H - 2 d) 又は L 1 C 2 (H - 2 b) 細胞 (10^5) を、C 5 7 B L / 6 マウス及び B A L B / c マウスの上肩甲上部領域に皮下注射した。腫瘍形成 5 日後に、注射当たり 0 . 5 μ g のマウス組換え S L C 又は P B S 希釈剤 (1 \times) を週 3 回腫瘍内投与した。等量のマウス血清アルブミンを対照注射用の無関係なタンパク質として使用したところ、これは腫瘍体積を変化させなかった。腫瘍体積を週 3 回 (n = 1 0 ~ 1 2 マウス / 群) 監視した。腫瘍内 S L C 投与により、未処置の腫瘍保有マウスと比較して腫瘍体積が有意に減少した (p < 0 . 0 1)。S L C 治療群では、マウスの 4 0 % が完全な腫瘍撲滅 (A 及び D) を示した。S L C 仲介抗腫瘍応答は、この療法が S C I D マウスにおける腫瘍増殖を変化させなかったという事実によって立証されるように、リンパ球依存性である (図 1 E)。また、C D 4 及び C D 8 ノックアウトマウスで行われた研究から、S L C 仲介腫瘍退縮に関する C D 4 及び C D 8 エフェクターサブセットの両方の要件が示された (図 1 B 及び C)。

【図 2】腫瘍内 S L C 投与は、リンパ節 (L N) 由来リンパ球の細胞溶解能力を増大させる。照射 3 L L 腫瘍による刺激の 1 週間後に、S L C 処置及び希釈剤対照腫瘍保有マウス由来のリンパ節由来リンパ球の細胞溶解能力を決定した。リンパ節由来リンパ球 (5×10^6 細胞 / m l) を、照射 3 L L (10^5 細胞 / m l) 腫瘍と共に総体積 5 m l 中 5 0 : 1 の割合で培養した。5 日間培養した後に、リンパ節由来リンパ球の細胞溶解能力を $^{51}C r$

10

20

30

40

50

標識 3 L L 腫瘍標的に対して評価した。腫瘍内 S L C 投与後に、L N D L の細胞溶解能力は、希釈剤処理腫瘍保有マウス由来のリンパ球のそれよりも有意に高かった。 $*p < 0.01$ 。

【図 3】図 3 A ~ 3 E。S L C は、自発性肺癌のネズミモデルにおいて強力な抗腫瘍応答を仲介する。S V 40 の大きな T A g がネズミクララ細胞特異的プロモーターである C C - 10 (G a b r i l o v i c h 外, B l o o d, 92: 4150 - 4166, 1998) の制御下で発現されるトランスジェニックマウスにおける自発気管支癌モデルにおいて S L C の抗腫瘍効果を評価した。導入遺伝子を発現するマウスは、びまん性両側気管支肺癌を発症し、4 ヶ月の平均寿命を有する。4 週齢のトランスジェニックマウスの腋窩リンパ節領域に S L C ($0.5 \mu\text{g}$ / 注射) 又は同濃度のネズミ血清アルブミンを 1 週間に 3 回 8 週間にわたって注射した。対照マウスが進行性肺腫瘍の増殖のため死亡し始めた 4 ヶ月目に、全ての処置群のマウスを 殺し、肺を単離し、そしてパラフィンに包埋した。対照処置マウスからのパラフィン包埋肺腫瘍切片の H & E 染色により、検出可能なリンパ球浸潤なしに両肺全体にわたって大きな腫瘍塊が明らかになった (3 A 及び 3 C)。これに対し、S L C 療法群は、腫瘍負荷の顕著な低下を伴う広範囲のリンパ球浸潤が明らかになった (3 B 及び 3 D)。3 D に示した矢印は、腫瘍 (* 1) 及び浸潤 (* 2) を示す (3 A 及び 3 B、 $\times 32$; 3 C 及び 3 D、 $\times 320$)。3 E は、S L C 処置マウスにおける腫瘍負荷を低減した。腫瘍負荷は、校正された目盛り ($1 - \text{cm}^2$ グリッドを 100 個の $1 - \text{mm}^2$ の正方形に細分した) で H & E 染色パラフィン包埋切片の顕微鏡検査によって肺内で定量した。その領域の $> 50\%$ を占める腫瘍を有する格子の正方形を陽性としてスコア化し、陽性の正方形の総数を決定した。肺の 4 つの組織学的切片からの 10 個の別個の視野を高出力 (20 倍の対物レンズ) で検査した。S L C 処置 C C - 10 マウスでは、希釈剤処置対照群と比較して腫瘍負荷が減少した。対照処置マウスの生存期間中央値は 18 ± 2 週間であった。対照的に、S L C で処置したマウスの生存期間中央値は 34 ± 3 週間であった。 ($P < 0.001$; $n = 10$ マウス / 群)。

【図 4 A】A d - S L C の腫瘍内投与は、生体内で肺癌の増殖を低下させる。マウスに 100000 個の L 1 C 2 腫瘍細胞を接種し、5 日後に 10^8 pfu の A d - C V 又は A d - S L C のいずれかで 3 週間週にわたって 1 週間に 1 回腫瘍内処置した。この M O I では、生体内で形質導入された A d - S L C、L 1 C 2 腫瘍細胞は、 $10 \text{ ng} / \text{ml} / 10^6$ 細胞 / 24 時間の S L C を分泌した。経時的な腫瘍体積の減少を図 4 A にグラフ形式で示す。

【図 4 B】A d - S L C の腫瘍内投与は、生体内で肺癌の増殖を低下させる。マウスに 100000 個の L 1 C 2 腫瘍細胞を接種し、5 日後に 10^8 pfu の A d - C V 又は A d - S L C のいずれかで 3 週間週にわたって 1 週間に 1 回腫瘍内処置した。この M O I では、生体内で形質導入された A d - S L C、L 1 C 2 腫瘍細胞は、 $10 \text{ ng} / \text{ml} / 10^6$ 細胞 / 24 時間の S L C を分泌した。治療後に完全に腫瘍撲滅したマウスの数を図 4 B に表形式で示す。

【図 5】図 5 A 及び 5 B は、それぞれ表 1 A 及び 1 B を示す。表 1 A は、腫瘍内 S L C 投与が T h 1 サイトカイン及び抗血管新生ケモカインの放出及び免疫抑制性メディエーターの減少を促進させることを示す。腫瘍におけるサイトカインプロファイルは S L C で腫瘍内処置されたマウスにおいて決定し、そして腫瘍を有する希釈剤処置対照マウスにおけるサイトカインプロファイルと比較した。非壊死性腫瘍を採取し、小片に切断し、そしてふるいに通した。腫瘍を、一晚培養した後の上清中において E L I S A によって I L - 10、I L - 12、G M - C S F、I F N - γ 、T G F - β 、V E G F、M I G 及び I P - 10 の存在について評価し、また E I A によって P G E₂ の存在について評価した。腫瘍由来のサイトカイン、P G E₂ 及び V E G F の決定を、B r a d f o r d アッセイによって全タンパク質について補正した。結果を、総タンパク質 1 ミリグラム当たりのピコグラム / 24 時間として表す。希釈剤処置腫瘍保有コントロールからの腫瘍結節と比較すると、S L C で腫瘍内処置したマウスは、P G E₂、V E G F、I L - 10 及び T G F - β が有意に減少したが、I F N - γ 、G M - C S F、I L - 12、M I G 及び I P - 10 は増加した。実験を 2 回繰り返した。表 1 B は、C C - 10 タグマウスの S L C 処置がどのように 1 型

サイトカイン及び抗血管新生ケモカイン放出を促進し、免疫抑制性及び血管形成性サイトカイン TGF- β と VEGF の低下を促進するかを示す。SLC の腋窩リンパ節領域注射後に、CC-10 タグマウスにおける肺、リンパ節及び脾臓サイトカインプロファイルを測定し、希釈剤処置腫瘍を有する対照マウス及び非腫瘍性同系対照のものと比較した。肺を採取し、小片に切断し、ふるいに通し、そして 24 時間培養した。脾細胞及びリンパ節由来リンパ球 (5×10^6 細胞 / ml) を 24 時間培養した。培養後、上清を回収し、サイトカインを ELISA で定量し、PGE-2 を EIA で定量した。肺由来の全ての決定を、ブラッドフォードアッセイによって全タンパク質について補正し、結果を pg / ミリグラム総タンパク質 / 24 時間で表す。脾臓及びリンパ節からのサイトカイン及び PGE-2 決定値を pg / ml で表す。希釈剤処置 CC-10 腫瘍保有マウスの肺と比較して、SLC 処置 CC-10 マウスは、VEGF 及び TGF- β が有意に減少したが、IFN- γ 、IP-10、IL-12、MIG 及び GM-CSF が有意に増加した。希釈剤処置 CC-10 タグマウスと比較して、SLC 処置 CC-10 マウスの脾細胞は IFN- γ 、IP-10、MIG 及び IL-12 のレベルが減少したが、希釈剤処置 CC-10 マウスと比較して TGF- β レベルが低下した。与えた値は、6 匹のマウス / 群についての平均 \pm SE を反映する。

【図 6 A】図 6 A は表 2 A を示す。表 2 A は、CD4 及び CD8 リンパ球サブセットが IFN- γ 及び GM-CSF と CD11c + DEC205 発現 DC を分泌する頻度を SLC が増加させることを示す。SLC 及び希釈剤処置腫瘍保有マウス由来の腫瘍結節及びリンパ節の単細胞懸濁液を調製した。GM-CSF 及び IFN- γ についての細胞質内染色並びに CD4 及び CD8 T リンパ球についての細胞表面染色をフローサイトメトリーによって評価した。また、リンパ節及び腫瘍結節単細胞懸濁液における細胞表面マーカー CD11c 及び DEC205 に対して陽性に染色された DC も評価した。細胞を、順方向及び側方散乱プロファイルに基づいてゲーティングすることによってリンパ球又は DC として同定した：細胞探索ソフトウェアを使用して 15,000 のゲートイベントを収集し分析した。ゲートされた T リンパ球集団の中で、SLC の腫瘍内注射は、希釈剤処置腫瘍を有する対照マウスと比較して、CD4 及び CD8 細胞が腫瘍結節及びリンパ節において GM-CSF 及び IFN- γ を分泌する頻度の増加をもたらした。ゲートされた DC 集団内では、希釈剤処置対照腫瘍保有マウスと比較して、SLC 処理腫瘍保持マウスにおける DC の頻度の有意な増加があった。DC 染色について、MCF は DEC205 に対するものである。MCF は平均チャネル蛍光である。実験を 2 回繰り返した。

【図 6 B】図 6 B は表 2 B を示す。表 2 B は、CC-10 タグマウスの SLC 処置により、腫瘍部位、リンパ節及び脾臓の樹状細胞及び T 細胞の浸潤が増強することを示す。SLC 及び希釈剤処置腫瘍保持マウス由来の腫瘍結節、リンパ節及び脾臓の単細胞懸濁液を調製した。GM-CSF 及び IFN- γ についての細胞質内染色並びに CD4 及び CD8 T リンパ球についての細胞表面染色をフローサイトメトリーによって評価した。リンパ節、腫瘍結節及び脾臓単細胞懸濁液中における細胞表面マーカー CD11c 及び DEC205 に対して陽性に染色された DC も評価した。細胞を、順方向及び側方散乱プロファイルに基づいてゲーティングすることによってリンパ球又は DC として同定した；15,000 のゲートイベントを収集し、Cell Quest ソフトウェアを使用して分析した。SLC で処置されたマウス由来のゲート T リンパ球集団内で、CD4 + 及び CD8 + 細胞が腫瘍部位、リンパ節及び脾臓において GM-CSF 及び IFN- γ を分泌する頻度が希釈剤処置腫瘍保持対照マウスと比較して増加した。ゲートされた DC 集団内では、希釈剤対照腫瘍保持マウスと比較して SLC 処理腫瘍保持マウスにおける DC の頻度の有意な増加があった。

【図 7 A】図 7 A は、表 3 A を示す。図 3 A は、SLC 処置後の 1 型サイトカインの特異的全身誘導及び IL-10 の下方調節を示す。脾臓細胞又はリンパ節由来リンパ球 (5×10^6 細胞 / ml) を、照射 3LL (10^5 細胞 / ml) 腫瘍と共に総体積 5 ml 中 50 : 1 の割合で培養した。一晚培養した後に、上清を採取し、GM-CSF、IFN- γ 、IL-12 及び IL10 を ELISA によって決定した。照射腫瘍細胞で刺激した後、SL

C 処置マウスの脾細胞及びリンパ節由来細胞は、有意に増強したレベルの I F N - 、 G M - C S F 及び I L - 1 2 のレベルを分泌したが、希釈剤処置保有マウスと比較して I L - 1 0 のレベルは低下した。結果を 1 ミリリットル当たりのピコグラムとして表す。実験を 2 回繰り返した。

【図 7 B】図 7 B は、表 3 B を示す。表 3 B は、S L C 処置後の 1 型サイトカインの全身誘導及び I L - 1 0 の下方調節を示す。脾臓リンパ球 (5×10^6 細胞 / m l) を、照射 C C - 1 0 (10^5 細胞 / m l) 腫瘍と共に総容量 5 m l 中において 5 0 : 1 の割合で培養した。一晚培養した後、上清を採取し、G M - C S F、I F N - 、及び I L - 1 0 を E L I S A によって決定した。照射腫瘍細胞で刺激した後に、脾細胞は、希釈剤腫瘍保持マウスと比較して有意に多い I F N - 及び G M - S C F を分泌したが、S L C 処置マウスから I L - 1 0 のレベルが低下した。結果を p g / m l で表す (希釈剤処置マウス並びに S L C 処置構成的レベルと比較して $P < 0.01$)。与えられた値は、5 匹のマウス / 群の平均 \pm S E を反映する。

10

【図 8】図 8 は、S L C 及びチェックポイント阻害剤での処置前後の被験体において調査される例示的な免疫細胞マーカーのチャートである。

【図 9】図 9 は、C C L 2 1 - D C 処置マウスが、対照抗体と比較して P D - 1 抗体の存在下で自己腫瘍に対して有意に大きな細胞溶解活性を有することを示す。

【発明を実施するための形態】

【0054】

発明の詳細な説明

20

本発明は、C C L 2 1 (S L C) をチェックポイント阻害剤と組み合わせて投与して、腫瘍進行に関与する免疫系を調節することを含む、腫瘍の治療方法、腫瘍体積の減少方法及び癌の進行の減少方法を提供する。

【0055】

特に定義しない限り、本明細書で使用される全ての技術用語、表記及び他の科学用語又は表現は、本発明が属する技術分野において通常の知識を有する者によって一般的に理解される意味を有するものとする。場合によっては、一般的に理解される意味を有する用語は、明瞭化及び / 又は参照を容易にするために本明細書で定義され、このような定義の包含は、必ずしも当該技術分野で一般的に理解されるものに対して実質的な相違を表すものと解釈すべきではない。本明細書において記載されている又は参照されている技術及び手順の多くはよく理解されており、当業者により従来の方法、例えば、Ausubel 外, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995) 及び Sambrook 外, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第 2 版 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. に記載された幅広く使用されている分子クローニング方法などを使用して一般的に採用されている。必要に応じて、市販のキット及び試薬の使用を含む手順を、特記しない限り、一般に、製造者が定めたプロトコール及び / 又はパラメーターに従って実施する。

30

【0056】

40

本明細書で使用される略語としては次のものが挙げられる：A P C、抗原提示細胞；S L C、二次リンパ器官ケモカイン；D C、樹状細胞；I P - 1 0、I F N - 誘導性タンパク質 1 0；T G F - 、形質転換増殖因子；G M - C S F、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子；I L、インターロイキン；F B S、ウシ胎仔血清；m A b、モノクローナル抗体；V E G F、血管内皮増殖因子；E I A、酵素イムノアッセイ；S V 4 0 T A g、シミアンウイルス 4 0 ラージ T 抗原；A g、抗原；P G E 2、プロスタグランジン E 2；P E、フィコエリトリン；L N、リンパ節。

【0057】

A. 本発明の特徴の簡単なキャラクターゼーション

本発明は、二次リンパ組織 - 組織ケモカイン (S L C) が、同系腫瘍細胞に対する免疫

50

応答におけるサイトカインプロファイルを調節し、これらの細胞の増殖を阻害することができるという本明細書で開示された発見に基づくものである。ここで提供される開示は、マウスが自発的に腫瘍を発生させる臨床関連マウスモデルにおけるS L Cの抗腫瘍効率を実証するものである。例えば、組換えS L Cの注射（例えば、腋窩リンパ節領域内）により、腫瘍の広範なリンパ球及びD C浸潤と生存の延長とを伴ってこの同系腫瘍負荷が有意に減少する。S L C注射により、腫瘍部位、リンパ節及び脾臓におけるC D 4及びC D 8リンパ球並びにD Cが有意に増加する。

【0058】

後述するように、同系腫瘍の部位で観察された細胞浸潤には、1型サイトカインと抗血管新生ケモカインI F N - 誘導性タンパク質10との同化作用の増強と、I F N - (M I G) によって誘導されるモノカインとを伴った。対照的に、免疫抑制性サイトカイン形質転換増殖因子 のリンパ節及び腫瘍部位産生は、S L C処置に応答して減少した。試験管内では、照射自己腫瘍による刺激後に、S L C処置マウスからの脾細胞は、I F N - 及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子を有意に分泌したが、インターロイキン10のレベルは低下した。器官特異的に腫瘍が発生するモデルにおける腫瘍負荷の有意な減少は、腫瘍免疫の調節及び肺癌免疫療法におけるその使用におけるS L Cの追加評価のための強力な理論的根拠を提供する。

【0059】

本明細書で提供される開示を考慮すると、D CはT細胞の主要な活性化因子として機能する強力なA P Cであるため、S L CがD C及びT細胞の両方の共局在化を促進させることができることは、腫瘍仲介免疫抑制を逆転させ、同系の状況において有効な細胞仲介免疫応答を組織化することを示す。その免疫療法の可能性に加えて、S L Cは強力な血管新生抑制作用を有することが分かっているため(S o t o 外 , A n n u . R e v . I m m u n o l . , 15 : 675 - 705 , 1997)、癌治療での使用に対する追加の根拠となる。

【0060】

本出願人は、移植可能なマウス肺癌モデルを使用して、S L Cの抗腫瘍効果がT細胞依存性であることを示す。これらの移植モデルでは、S L Cの抗腫瘍効果を、皮下注射部位で増殖した移植可能な腫瘍を使用して決定した。この移植可能なモデルでは、腫瘍内投与された組換えS L Cは、処置されたマウスの40%において完全な腫瘍根絶をもたらした。S L C仲介抗腫瘍応答は、C D 4及びC D 8リンパ球サブセットの両方に依存し、かつ、腫瘍のD C浸潤を伴った。このケモカインの抗血管形成能力を直接的に支持する最近の研究において、A r e n b e r g 外 (A r e n b e r g 外 , C a n c e r I m m u n o l . I m m u n o t h e r . , 49 : 587 - 592 , 2000) は、S L CがS C I Dマウスモデルにおいてヒト肺癌成長及び血管形成を阻害することを報告している。

【0061】

本明細書で検討する自発腫瘍モデルは、腺癌が臓器特異的に発症する癌の臨床関連モデルにおいてS L Cの抗腫瘍特性を実証する。具体的には、このモデルでは、ネズミクララ細胞特異的プロモーターC C - 10の制御下でS V 40の大きなT A g 導入遺伝子を発現するトランスジェニックマウスは、びまん性両側気管支肺胞癌を発症し、平均寿命が4ヶ月である(M a g d a l e n o 外 , C e l l G r o w t h D i f f e r . , 8 : 145 - 155 , 1997)。S L Cの抗腫瘍活性は、トランスジェニックマウスの腋窩リンパ節領域に組換えS L Cを注射することによって肺癌のための自発的モデルで決定される。リンパ節領域にS L Cを注射することに対する理論的根拠は、特異的な抗腫瘍免疫応答を開始することができるリンパ節のT細胞領域にD Cを共局在化させることである。多くの臨床状況において、注射のためのリンパ節部位へのアクセスは、腫瘍内投与よりも容易に達成できる場合もある。これらの結果は、このアプローチが全身性抗腫瘍応答を生成する際に有効であることを示す。C C - 10 T A gマウスの腋窩リンパ節領域に注射されたS L Cは、希釈剤対照注射を受けたC C - 10 T A gマウスと比較して、腫瘍負荷の減少及び生存利益を伴う強力な抗腫瘍応答を示した。S L C処置マウスにおける腫瘍負荷の

10

20

30

40

50

減少は、腫瘍部位、リンパ節及び脾臓の広範なリンパ球浸潤のみならずDC浸潤を伴った。

【0062】

SLC治療の結果として、CC-10 Tagマウスの腫瘍部位、リンパ節及び脾臓からのサイトカイン産生も変化した。次のサイトカイン：VEGF、IL-10、PGE-2、TGF- β 、IFN- γ 、GM-CSF、IL-12、MIG及びIP-10を測定した(表1B)。これらのサイトカインの産生は、腫瘍部位がPGE-2、VEGF、IL-10及びTGF- β の豊富な供給源であることが明らかにされており、これらの分子の腫瘍部位における存在により免疫応答が抑制されることが示されている(Huang外, Cancer Res., 58:1208-1216, 1998; Gabriilovich外, Nat. Med., 2:1096-1103, 1996; Bellone外, Am J. Pathol., 155:537-547, 1999)。また、VEGF、PGE-2及びTGF- β は、以前に血管形成を促進することが実証されている(Fajardo外, Lab. Invest., 74:600-608, 1996; Ferrara, N. Breast Cancer Res. Treat., 36:127-137, 1995; Tsujii外, Cell, 93:705-716, 1998)。VEGF、TGF- β 、PGE-2及びIL-10に対する抗体は、生体内モデル系において腫瘍増殖を抑制する能力を有する。また、VEGFはDC成熟を妨げることも示されている(Gabriilovich外, Nat. Med., 2:1096-1103, 1996)。IL-10及びTGF- β の両方は、Ag提示を強力に抑制し、かつ、CTL生成及びマクロファージ活性化に拮抗することのできる免疫抑制性サイトカインである(Sharma外, J. Immunol., 163:5020-5028, 1999; Bellone外, Am J. Pathol., 155:537-547, 1999)。より高い薬理学的濃度では、IL-10は腫瘍の減少を引き起こすことができるが、このサイトカインの生理学的濃度は抗腫瘍応答を抑制する(Sharma外, J. Immunol., 163:5020-5028, 1999; Sun外, Int. J. Cancer, 80:624-629, 1999; Halak外, Cancer Res., 59:911-917, 1999; Stolina外, J. Immunol., 164:361-370, 2000)。トランスジェニック腫瘍保持マウスにおけるSLC処置の前に、免疫抑制タンパク質VEGF、PGE-2及びTGF- β のレベルは、正常対照マウスでのレベルと比較して上昇した。IL-10に関してはこのような増加はなかった。同様に、SLC治療後のIL-4及びIL-5の有意な変化はなかった。SLC処置CC-10 Tagマウスは、VEGF及びTGF- β の有意な減少を示した。免疫抑制性サイトカインの減少は肺に限定されず、全身的に明らかであった。CC-10 TagトランスジェニックマウスのSLC処置により、リンパ節由来細胞においてTGF- β が減少し、脾細胞からのPGE-2及びVEGFのレベルが減少した。したがって、これらのサイトカインにおけるSLC仲介減少の利点としては、抗原提示及びCTL生成の促進(Sharma外, J. Immunol., 163:5020-5028, 1999; Bellone外, Am J. Pathol., 155:537-547, 1999)並びに血管形成の制限(Fajardo外, Lab. Invest., 74:600-608, 1996; Ferrara, N. Breast Cancer Res. Treat., 36:127-137, 1995; Tsujii外, Cell, 93:705-716, 1998)が挙げられる。

【0063】

成功した免疫療法は、腫瘍特異的T細胞応答を2型から1型サイトカインプロファイルにシフトさせることが十分に立証されている(Hu外, J. Immunol., 161:3033-3041, 1998)。応答は、抗癌免疫を促進する一連の生物学的効果を仲介するIL-12及びIFN- γ に依存する。マクロファージによって産生されるサイトカインであるIL-12(Trinchieri外, 70:83-243, 1998)及びDC(Johnson外, J. Exp. Med., 186:1799-1802, 1997)は、細胞免疫応答の誘導に重要な役割を果たす(Ma外, Chem. Immunol., 68:1, 1997)。IL-12は、CTLの誘導、1型仲介免疫応答及びナチ

10

20

30

40

50

ユラルキラー活性化 (Trinchieri 外, 70: 83 - 243, 1998) 並びに腫瘍血管新生の障害 (Voest 外, J. Natl. Cancer Inst., 87: 581 - 586, 1995) を伴ういくつかの作用の結果である強力な抗腫瘍効果を仲介することが分かっている。IP - 10 及び MIG は、CXCR3 ケモカイン受容体を発現する活性化 T 細胞を化学誘引する CXC ケモカインである (Loetscher 外, J. Exp. Med., 184: 963 - 969, 1996)。IP - 10 及び MIG の両方は、強力な抗腫瘍特性及び抗血管新生特性を有することが知られている (Lustre 外, J. Exp. Med., 178: 1057 - 1065, 1993; Brunda 外, J. Exp. Med., 178: 1223 - 1230, 1993; Arenberg 外, J. Exp. Med., 184: 981 - 992, 1996; Sgadari 外, Blood, 89: 2635 - 2643, 1997)。SLC 処置 CC - 10 TAg マウスの肺は、IFN - γ 、IL - 12、IP - 10、MIG 及び GM - CSF の有意な増加を示した。MIG 及び IP - 10 は、IFN - γ によって誘導される強力な血管新生抑制因子であり (Arenberg 外, J. Exp. Med., 184: 981 - 992, 1996; Strieter 外, Biochem. Biophys. Res. Commun., 210: 51 - 57, 1995; Tannenbaum 外, J. Immunol., 161: 927 - 932, 1998)、SLC 投与後の CC - 10 TAg マウスの腫瘍減少の一部を担う可能性がある。SLC は、直接的な抗血管新生効果を有することが立証されているため (Soto 外, Annu. Rev. Immunol., 15: 675 - 705, 1997; Arenberg 外, Am. J. Resp. Crit. Care Med., 159: A746, 1999)、このモデルで観察された腫瘍減少は、T 細胞依存性免疫並びに血管新生を阻害する際に IFN - γ を分泌する T 細胞による関与に起因する可能性がある (Tannenbaum 外, J. Immunol., 161: 927 - 932, 1998)。したがって、SLC 処置マウスの腫瘍部位での IFN - γ の増加は、IP - 10 及び MIG の相対的増加を説明するものであろう。MIG 及び IP - 10 の両方は、腫瘍部位で IFN - γ をさらに増幅することのできる刺激 CXCR3 発現 T リンパ球に対して走化性である (Farber 外, J. Leukoc. Biol., 61: 246 - 257, 1997)。フローサイトメトリー測定から、CD4 及び CD8 細胞の両方が SLC 処置マウスにおける GM - CSF 及び IFN - γ の分泌の増加の原因であることが明らかになった。SLC 処置マウスにおける GM - CSF の増加は、DC の成熟及び抗原提示を増強することができた (Banchereau 外, Nature (Lond.), 392: 245 - 252, 1998)。SLC 仲介抗腫瘍応答にとって重要な宿主サイトカインを正確に定義するためには、さらなる研究が必要である。

【0064】

1 型サイトカインの増加は肺に限定されず、全身的に明らかであった。CC - 10 TAg トランスジェニックマウスの SLC 処置により、I 型サイトカイン及び抗血管新生ケモカインが全身的に増加した。したがって、SLC 処置 CC - 10 TAg マウス由来の脾細胞は、希釈剤処置 CC - 10 TAg マウスと比較して、GM - CSF、IL - 12、MIG 及び IP - 10 が増加した。同様に、SLC 処置マウスからのリンパ節由来細胞は、有意に増強した IFN - γ 、IP - 10、MIG 及び IL - 12 レベルを分泌した。最近の研究から、LN 部位での 1 型応答の評価により、免疫療法を受けている患者の抗腫瘍応答についての洞察が得られる可能性があることが示唆されている (Chu 外, Eur. J. Nuc. Med., 26: s50 - 53, 1999)。SLC 処置マウスの脾臓及びリンパ節における GM - CSF 及び IFN - γ の増加は、CD4 及び CD8 細胞がこれらのサイトカインを分泌する頻度の増加によって部分的に説明できた。1 型サイトカインの増加は、部分的には、自己腫瘍に対する特異性の増加に起因していた；照射された CC - 10 TAg 腫瘍細胞と共に培養した場合に、SLC 処置 CC - 10 TAg マウス由来の脾細胞は有意に増加した量の GM - CSF 及び IFN - γ を分泌したが、IL - 10 のレベルは低下した。CC - 10 細胞の細胞表面染色、その後のフローサイトメトリーからは、検出可能なレベルの MHC クラス II 分子が示されなかった。腫瘍は MHC クラス I

I 発現を示さなかったが、アッセイにおいて脾臓 APC が存在したために CD 4 + 1 型サイトカイン産生が生じた可能性がある。SLC 処置マウス由来の試験管内腫瘍刺激脾臓 T 細胞は IL - 10 の発現の減少を示したが、SLC 治療は生体内での IL - 10 レベルの低下をもたらさなかった。in situ 微小環境は、IL - 10 の全レベルを決定する T 細胞に加えて、細胞構成要素からの他の重要な因子を与えることができる。

【0065】

まとめると、本明細書で提供される開示は、SLC、例えば臨床的に関連する自発性肺癌モデルにおける腋窩リンパ節領域に注射された SLC の投与がどのようにして全身性抗腫瘍応答を生じさせるのかを実証する。特定の理論に限定されないが、SLC の抗腫瘍特性は、DC 及び T 細胞の共同在化におけるその走化性能力並びに IFN - 、IP - 10、MIG 及び IL - 12 などの重要なサイトカインの誘導に起因する場合がある。本明細書に開示されるモデルを使用して、さらなる研究は、SLC 仲介抗腫瘍応答におけるこれらのサイトカインのそれぞれの重要性を説明することができる。この自発性気管支肺がんのモデルで実証された強力な抗腫瘍特性は、腫瘍免疫の SLC 調節のさらなる評価及び肺癌などの癌に対する免疫療法におけるその使用に関する強力な理論的根拠となる。

【0066】

以下に詳細に説明するように、本明細書に記載の発明は多数の実施形態を有する。典型的な実施形態としては、哺乳動物において同系の生理学的過程を調節する方法、例えば、CD 8 陽性 T 細胞、CD 4 陽性 T 細胞、抗原提示細胞及び腫瘍細胞を含む同系哺乳類細胞の集団中におけるインターフェロン - (IFN -) ポリペプチドなどの可溶性サイトカインの発現の増加及び形質転換増殖因子 - (TGF -) ポリペプチドなどの可溶性サイトカインの発現の低下を、該細胞集団を腫瘍細胞の増殖を阻害するのに十分な量の二次リンパ組織ケモカイン (SLC) ポリペプチドにさらすことによって達成する方法が挙げられる。密接に関連する実施形態は、哺乳動物に SLC の治療有効量を投与することによって哺乳動物における癌又は過剰増殖性細胞増殖を治療する方法である。

【0067】

治療又は治療の目的のための「哺乳動物」とは、ヒト、飼育動物及び家畜、並びにイヌ、ウマ、ネコ、ウシなどの動物園の動物、スポーツ用動物又はペット動物を含めた哺乳類として分類される任意の動物をいう。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0068】

用語「癌」、「癌性」又は「悪性」とは、典型的には調節されていない細胞増殖を特徴とする哺乳動物の生理学的状態をいう又は説明する。癌の例としては、癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫及び白血病が挙げられるが、これらに限定されない。このような癌の具体的な例としては、腺癌、乳癌、卵巣癌、結腸癌、結腸直腸癌、直腸癌、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫、肝臓癌、膀胱癌、肝臓癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、甲状腺癌、前立腺癌、前立腺癌、肺癌及び各種の頭頸部癌が挙げられる。

【0069】

能動的癌免疫療法を設計する際の重大な問題の 1 つは、癌細胞が正常な宿主細胞に由来することである。したがって、癌細胞の抗原性プロファイルは、正常細胞のそれをよく模倣する。さらに、腫瘍抗原は真に外来のものではなく、腫瘍抗原は、感染症及び臓器移植で認識される抗原に対する非自己パラダイムと比較して、自己 / 改変自己パラダイムとより多く適合する (例えば、Lewis 外, Semin Cancer Biol 6 (6) : 321 - 327 (1995))。これに関連して、本発明の重要な側面は、癌細胞が自発的であり、癌細胞に応答する免疫細胞が同系である動物モデルにおける SLC の効果の特徴づけである。これに関連して、同系とは、特に抗原又は免疫学的反応に対して極めて近い遺伝的類似性又は同一性をいうことが当該技術分野において知られている。同系システムとしては、例えば、器官と細胞 (例えば、癌細胞及びその非癌性対応物) が同じ個体に由来するモデル、及び / 又は器官と細胞が同系交配株のものである異なる個々の動物に由来するモデルが挙げられる。同系モデルは、腫瘍形成及び化学療法分子の研究に特に有

10

20

30

40

50

用である。同系モデルの具体例は、本明細書に記載の自発性気管支肺癌の C C - 1 0 T A g トランスジェニックマウスモデルである。これに関して、免疫学の分野における当業者であれば、哺乳類の発育中に、免疫系が自己抗原（例えば、動物の生殖系列 D N A における遺伝子によってコードされるもの）に対して寛容であることが分かる。T - A g がトランスジェニック動物の生殖系列に存在すると、トランスジェニック動物の免疫系は、免疫系の成熟中にこのタンパク質に対して寛容される。

【 0 0 7 0 】

同系とは対照的に、用語「同種異系」とは、組織又は細胞間の遺伝的相違であってそれぞれの組織又は細胞に存在する異なる抗原に対する所定のタイプの免疫学的メカニズム又は応答を達成するのに十分なものを暗示するために使用される。同種異系モデルの具体例は、マウスの一方の系統由来の癌細胞がマウスの他方の系統に移植されたものである。同種異系モデルは、移植免疫の研究と、移植組織上に存在する非自己抗原に対する免疫応答を抑制することができる分子の評価とに特に有用である。

10

【 0 0 7 1 】

免疫系を含む様々な病態を研究するための臨床関連パラダイムを提供するために、免疫応答を評価するように設計された動物モデルは、外来（非自己）組織に対する免疫系応答の理解を前提としなければならない。これに関連して、移植免疫の分野の当業者であれば、同種異系組織に対する動物の免疫応答が同系組織に対する動物の免疫応答とは非常に異なること（すなわち応答がさらに生じることになるかどうか）を理解する。これは、例えば、同種異系臓器移植における免疫抑制剤の必要性（免疫抑制剤は、移植組織上に存在する非自己抗原に対する応答を阻害するために必要とされる）によって示される。したがって、臨床関連モデルは、このことが免疫応答に及ぼす深い意味を考慮しかつ特徴付けることなく異なる免疫表現型を混合することはできない。腫瘍細胞は、本明細書に記載された自発性気管支肺癌の C C - 1 0 T A g トランスジェニックマウスモデルにおいて同系であるため、このモデルは、異なる免疫表現型を混合することに起因する交絡免疫応答に関連する問題を特に回避する。

20

【 0 0 7 2 】

当該技術分野で知られているように、サイトカインは免疫応答の重要なメディエーターである。これに関連して、様々なサイトカイン、様々な濃度のサイトカイン及び／又はサイトカインの様々な組み合わせを使用して、特定の状況において特異的免疫応答を生成する。これに関して、当該技術分野では、様々な免疫応答が様々なサイトカインプロファイルを伴うことが知られている。したがって、自己組織に対する免疫応答と比較した非自己組織に対する免疫応答の固有の相違は、各応答に関与するサイトカインプロファイルの内在的な相違に部分的に起因する。

30

【 0 0 7 3 】

免疫応答の一般的な検査に関する臨床関連パラダイムも、多数の他の要因を考慮しなければならない。例えば、当該技術分野では、所定のネズミ株は、同一の薬剤に対するそれらの免疫応答が高い変動性を示すことが知られている。例えば、マウス株 C 5 7 B L 6、B A L B / c 及び B D F (1) が 2 - デオキシ - D - グルコース誘発ストレスに対する免疫応答において高い変動性を示すことを教示する、D r e a u 外、P h y s i o l o B e h a v 2 0 0 0 7 0 (5) : 5 1 3 - 5 2 0 を参照されたい。さらに、一般的なマウス株間の遺伝的多型が、刺激された未感作 C D 4 T 細胞における早期サイトカイン産生に有意に影響を及ぼす場合があることが知られている（例えば、L o 外、I n t R e v I m m u n o l 1 9 9 5 , 1 3 (2) : 1 4 7 - 1 6 0 参照）。したがって、免疫応答性の臨床関連モデルは、異なるマウス株からの組織及び細胞を混合するモデルによって生じる免疫応答が有する重大な示唆を考慮し特徴づけることなく、免疫応答において高い変動性を示すことが知られているマウス株由来の組織及び細胞を混合してはならない。このモデルは、本明細書に記載の自発性気管支肺癌の C C - 1 0 T A g トランスジェニックマウスモデルにおいて異なるマウス株由来の組織及び細胞の混合がないため、このモデルは、異なる免疫表現型の混合に起因する混乱した免疫応答に関連する問題を特に回避す

40

50

る。

【 0 0 7 4 】

また、癌細胞に対する免疫応答の特異的評価のための臨床関連パラダイムは、いくつかの要因も考慮しなければならない。例えば、多くの腫瘍細胞株は、浸潤性及び転移性の挙動の向上などの特定の特性を有するように選択されてきた（例えば、Poste外, Cancer Res. 42 (7) : 2770 - 2778 (1982) 参照）。当該技術分野で知られているように、このような特性の選択は、このような細胞株の免疫原性などの因子を変化させる場合があり、同様に、当該細胞系は、このような細胞株を利用する免疫応答のモデルを混乱させる可能性がある（例えば、De Baetselier外, Nature 1980 13 ; 288 (5787) : 179 - 181）。また、当該技術分野で知られているように、組織培養における細胞系の増殖は、生体内での腫瘍細胞増殖とは必ずしも一致しない特性である、培地中の最大の適合性に関連する特徴を有するクローンの派生物を選択する。本明細書に記載のCC - 10 T Agトランスジェニックマウスモデルは自発性癌細胞を産生するので（細胞系と比較して）、このモデルは、組織培養におけるその期間中に特異的（及び非特異的）選択圧に供された細胞株の使用に関連する問題を特に回避する。

10

【 0 0 7 5 】

腫瘍細胞に関する上記の問題に加えて、多くの培養腫瘍系が腫瘍増殖を促進するようなサイトカインを産生することができることに関連するこのようなモデルにおける細胞系の使用に関連する問題がある。具体的には、当該技術分野において、所定の腫瘍細胞株が、非癌性の対応物によっては産生されないサイトカイン又は正常組織において多量に産生されるサイトカインを発現することが知られている（例えば、B16メラノーマクローンのオートクリン増殖を検討するStackpole外, In Vitro Cell Dev Biol Anim 1995, 31 (3) : 244 - 251 及び結腸癌結腸26クローンの自己分泌増殖を検討する清水外, Cancer Res 1996, 56 (14) : 3366 - 3370）。免疫応答において免疫応答を評価する又は免疫応答におけるサイトカインプロファイルを測定する状況において、癌モデルにおける細胞系の使用は、細胞系（これはこれらの細胞の環境においてサイトカインプロファイルを変化させることができる）によって産生されるサイトカインの存在によって混乱する場合がある。したがって、例えば免疫応答性の臨床関連モデルにおいてサイトカインプロファイルを評価及び/又は調節しようとする方法では、当業者は、サイトカインによって生じた細胞株の存在がモデルによって生成された免疫応答を示すという深刻な影響を考慮及び特徴付けることなく、サイトカイン生成細胞株をマウスに使用すべきではない。

20

30

【 0 0 7 6 】

上記のように、当業者であれば、免疫系は、自己組織（例えば、同系移植）に対するものとは異なって非自己組織（例えば、同種移植）に応答することを理解する。自己と非自己とを区別する能力は免疫の基本的な側面であるので、当業者であれば、外来組織に応答する際に観察される免疫反応は自己組織に対する免疫応答を予測する（すなわち、免疫応答がさらに起こることになる場合）ものではないことを理解する。これは、例えば、免疫抑制剤を摂取するために同種異系臓器移植を受けた個人の必要性によって説明される。結果として、免疫応答の臨床関連モデルは、この免疫の基本的な側面、特に、自己組織の異常増殖によって特徴付けられる病気である癌に対する免疫応答を評価するように設計されたものを考慮しなければならない。ここで使用されるトランスジェニックマウスモデルは動物の免疫系を非自己抗原に曝露せず、異なる免疫学的特徴を有することが観察されたマウス株由来の細胞及び組織を混合せず、しかもその代わりに自発性腫瘍に対する免疫応答を評価することに関連するため、このモデルによって提供されるデータは、ヒト癌の状況において臨床的に関連する。

40

【 0 0 7 7 】

「中和抗体」とは、結合する標的抗原の生物学的機能を排除し又は有意に低下させることができる抗体分子のことである。したがって、「中和」抗標的抗体は、酵素活性、リガ

50

ンド結合又は細胞内シグナル伝達などの生物学的機能を排除する又は有意に低下させることができる。

【0078】

「特異的に結合する」、「標的特異的」である、標的「に特異的な」又は標的抗原と「免疫反応性」である抗体とは、同様の抗原よりも高い親和性で標的抗原に結合する抗体又は抗体物質をいう。本発明の一態様では、標的結合ポリペプチド又はその断片、変異体若しくは誘導体は、他の種、すなわち非ヒト種の標的に対するその結合親和性と比較して、ヒト標的に対してより大きな親和性で結合するが、標的の相同分子種を認識し結合する結合ポリペプチドは、提供される範囲内にある。

【0079】

例えば、その同族抗原に「特異的」な抗体又はその断片は、抗体の可変領域が検出可能な選択物で目的のポリペプチドを認識して結合させることを示す（すなわち、ファミリーメンバー間の局在配列同一性、相同性又は類似性の存在が可能性にもかかわらず、結合親和性における測定可能な相違に起因して同じファミリーの他の既知のポリペプチドから目的のポリペプチドを区別することができる）。また、特異的抗体は、抗体の可変領域の外側、特にその分子の定常領域内の配列との相互作用を介して、他のタンパク質（例えば、黄色ブドウ球菌プロテインA又はELISA技術における他の抗体）と相互作用することもできることが分かる。本発明の方法で使用するための抗体の結合特異性を決定するためのスクリーニングアッセイは、当該分野において周知でありかつ日常的に実施されている。このようなアッセイの包括的な議論については、Harlow外（著者）、Antibodies A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988)、第6章を参照されたい。

【0080】

ここで、用語「治療有効量」は、治療される疾患の症状又は徴候を改善又は軽減するのに有効な本発明の標的特異的組成物の量を示すために使用される。

【0081】

本明細書における方法に関して使用するとき、用語「治療する」、「治療される」、「治療用」及び「治療」とは、事象、疾患又は状態の臨床的症状、兆候又は進行を一時的又は永久的に部分的に又は完全に無くす、低減する、抑制する又は改善することをいう。このような治療は絶対的に有用である必要はない。

【0082】

B. 本発明の実施形態を実施するための典型的な方法

本明細書中に開示されるいくつかの方法は、当該技術分野において、宿主動物に投与された遺伝的に非同一の癌細胞などの非自己（すなわち、同種異系）組織に対する免疫応答の状況においてSLCの効果を研究するために使用できることが知られている一般的な方法に関する。

【0083】

本明細書に開示される方法は、哺乳動物における病的状態、例えば癌や免疫関連疾患を処置するためのプロトコールにおいて使用できる。典型的な方法では、SLCポリペプチドを哺乳動物に単独で又はさらに他の治療剤や技術と組み合わせて投与する。当業者であれば、本明細書に記載の様々な病的状態の哺乳動物における診断を行うことができる。例えば、哺乳動物における癌や免疫関連疾患の診断又は検出を可能にする診断技術が当該技術分野で利用可能である。例えば、癌は、触診、血液分析、X線、NMRなどを含めた（ただしこれらに限定されない）技術によって同定できる。例えば、悪性腫瘍に関連する遺伝子の発現（PSA、PSCA、PSM及びヒト腺カリクレインの発現を含む）並びに肉眼的な細胞学的な検査といった、癌に関連することが当該技術分野において知られている多種多様な診断因子を利用することができる（例えば、Bocking外、Anal Quant Cytol. 6(2): 74-88 (1984); Eptsein, Hum Pathol. 1995 Feb; 26(2): 223-9 (1995); Thorson

10

20

30

40

50

外, Mod Pathol. 1998 Jun; 11(6): 543-51; Baisden 外, Am J Surg Pathol. 23(8): 918-24 (1999)。

【0084】

本発明の方法は、過剰増殖性障害及び癌の治療に有用であり、特に固形腫瘍の治療に特に有用である。本発明の方法に従って治療できる固形腫瘍のタイプとしては、肺癌、黒色腫、乳癌、頭頸部腫瘍、卵巣癌、子宮内膜癌、尿路癌、胃癌、白血病、リンパ腫、骨癌、肝臓癌、結腸癌、直腸癌、上記の転移及び原発不明の転移が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、本発明の好ましい実施形態では、SLCを投与してサイトカインプロファイルを調節し、及び/又は腺癌系統の自発性腫瘍細胞の増殖を阻害する(本明細書においてトランスジェニックマウスモデルにおいて実証されるように)。当該技術分野で知られているように、腺癌系統の腫瘍細胞は、多数の異なる臓器系において自発的に生じることがある(例えば、Yagi 外, Gan No Rinsho 1984 30(11): 1392-1397 参照)。

10

【0085】

本発明の方法において有用なポリペプチドは、天然に存在するタンパク質並びにその変異及び修飾形態の両方を包含する。上記のように、「SLCポリペプチド又はタンパク質」は、二次リンパ系組織ケモカインを意味する。SLCとしては、以下で定義するように、天然に存在する哺乳類SLC、並びにその変異体及び断片が挙げられる。好ましくは、SLCは、ヒト又はマウス由来のものである(例えば、それぞれ表4の配列番号1及び2参照)。最も好ましくは、SLCはヒトSLCである。ヒトSLCはクローニングされかつ配列決定されている(例えば、Nagira 外(1997) J Biol Chem 272: 19518; その内容は参照により援用される)。その結果、ヒトSLCのcDNA及びアミノ酸配列は当該技術分野において知られている(例えば受託番号BAA21817及びAB002409参照)。また、マウスSLCもクローニングされかつ配列決定されている(例えば受託番号NP_035465及びNM_011335参照)。Hromas 外(1997) J. Immunol 159: 2554; Hedrick 外(1997) J. Immunol 159: 1589; 及びTanabe 外(1997) J. Immunol 159: 5671; その内容は参照により本明細書において援用する。

20

【0086】

本明細書に開示される方法における使用のためのSLCポリペプチドは、SLC変異体、SLC断片、アナログ及び誘導体とすることができる。「アナログ」は、1個以上のアミノ酸の置換、挿入又は欠失を有する天然のSLC配列及び構造を含むSLC又はSLC断片のいずれかのアナログを意図する。また、1個以上のペプチド(ペプチド模倣物)を有するペプチドも用語「アナログ」に包含される(WO91/04282)。「誘導体」は、所望の活性が保持される限り、グリコシル化、リン酸化又は外来部分の他の付加(例えば、以下に記載されるようなペグ化)といったSLC、SLC断片又はそれらのそれぞれのアナログの任意の好適な修飾を意図する。当該技術分野では、SLC断片、アナログ及び誘導体をマスキングする方法が利用可能である。

30

【0087】

例示的なSLC誘導体では、例えばWO93/00109号に開示されているように、ポリオールがリシン残基を含めた1個以上のアミノ酸残基でSLC分子に結合することができる。使用されるポリオールは、任意の水溶性ポリ(アルキレンオキシド)重合体とすることができ、直鎖又は分岐鎖を有することができる。好適なポリオールとしては、1個以上のヒドロキシル位で化学基、例えば1個~4個の炭素を有するアルキル基で置換されたものが挙げられる。典型的には、ポリオールは、ポリ(エチレングリコール)(PEG)などのポリ(アルキレングリコール)であるため、説明を容易にするために、この議論の残りの部分は、使用されるポリオールがPEGであり、ポリオールをSLCタンパク質又は変異体に結合させるプロセスを「ペグ化」という例示的な実施形態に関する。しかし、当業者であれば、例えばポリ(プロピレングリコール)及びポリエチレン・ポリプロピレングリコール共重合体などの他のポリオールを、本明細書においてPEGについて記載

40

50

したコンジュゲーション技術を用いて採用することができることが分かる。本発明のS L C変異体のペグ化度は、対応する非ペグ化タンパク質と比較して、望ましく増加した生体内半減期（以下、「半減期」）を与えるように調節できる。

【0088】

タンパク質をペグ化するための様々な方法が記載されている。例えば、生理学的に活性な非免疫原性組成物を産生するためにP E G及びポリプロピレングリコールに対して多数のホルモン及び酵素を結合させることが記載される米国特許第4,179,337号(D a v i s 外に対して発行)を参照されたい。一般に、少なくとも1個の末端ヒドロキシ基を有するP E Gをカップリング剤と反応させて末端反応性基を有する活性化P E Gを形成する。次いで、この反応性基はタンパク質の - 及び - アミンと反応して共有結合を形成することができる。都合のよいことに、P E G分子の他の末端をメトキシ基などの非反応性化学基で「ブロック」してタンパク質分子のP E G架橋複合体の形成を減少させることができる。

10

【0089】

ここで使用するとき、S L C 遺伝子及びS L C タンパク質には、本明細書に具体的に記載されるネズミ及びヒトS L C 遺伝子及びタンパク質、並びにこれらの生物学的に活性な構造的及び/又は機能的に類似の変異体又はアナログが含まれる。S L C ペプチドアナログは、一般に、少なくとも約50%、60%、70%、80%又は90%以上のアミノ酸相同性を共有する(B L A S T 基準を用いて)。例えば、%同一性値は、W U - B L A S T - 2 によって生成できる(A l t s c h u l 外, 1996, M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 266:460-480)。

20

【0090】

S L C ヌクレオチドアナログは、50%、60%、70%、80%又は90%以上の核酸相同性を共有することが好ましい(B L A S T 基準を使用)。しかし、いくつかの実施形態では、当業者であれば分かるように、種特異的コドン選好及び/又は特定の標的集団に合わせた最適ペプチドエピトープの観点から好ましい残基を選択するために、より低い相同性が好ましい。異なるS L C タンパク質又はその断片の部分、並びにS L C タンパク質及び異種ポリペプチドの融合タンパク質を組み合わせた融合タンパク質も含まれる。このようなS L C タンパク質をまとめてS L C 関連タンパク質、本発明のタンパク質又はS L C という。

30

【0091】

用語「変異体」とは、具体的に記載されたタンパク質の対応する1以上の位置に1個以上の異なるアミノ酸残基を有するタンパク質などの、記載されたタイプ又は基準からの変化を示す分子をいう。アナログが変異体タンパク質の例である。ここで使用するとき、S L C 関連遺伝子及びS L C 関連タンパク質には、本明細書において具体的に記載されるS L C 遺伝子及びタンパク質、並びにこれらの構造的及び/又は機能的に類似する変異体又はアナログが含まれる。S L C ペプチドアナログは、一般に、少なくとも約50%、60%、70%、80%又は90%以上のアミノ酸相同性を共有する(B L A S T 基準を使用)。S L C ヌクレオチドアナログは、50%、60%、70%、80%又は90%以上の核酸相同性を共有することが好ましい(B L A S T 基準を使用)。しかし、いくつかの実施形態では、当業者であれば分かるように、種特異的コドン選好及び/又は特定の標的集団に合わせた最適ペプチドエピトープの観点から好ましい残基を選択するために、より低い相同性が好ましい。

40

【0092】

本明細書に開示される本発明の実施形態は、アミノ酸の挿入、欠失及び置換を有するポリペプチドなどのS L C タンパク質の広範囲の技術的に許容される変位体又はアナログを含む。S L C 変異体は、部位特異的突然変異誘発、アラニンスキニング、及びP C R 突然変異誘発などの当該技術分野に知られている方法を用いて作製できる。部位特異的突然変異誘発(C a r t e r 外, N u c l . A c i d s R e s . , 13:4331(1986); Z o l l e r 外, N u c l . A c i d s R e s . , 10:6487(1987))

50

)、カセット突然変異誘発 (Wells 外, Gene, 34:315 (1985))、制限選択突然変異誘発 (Wells 外, Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 317:415 (1986)) 又は他の技術をクローニングされた DNA に対して実施して又は他の公知の技術を実施して SLC 変異体 DNA を生成させることができる。得られた突然変異体について生物学的活性を試験することができる。結合に重要な部位は、結晶化、光親和性標識、核磁気共鳴などの構造分析によって決定される。de Vos 外 (1992) Science 255:306 及び Smith 外 (1992) J. Mol. Biol. 224:899 参照。

【0093】

当該技術分野で知られているように、タンパク質の機能的活性を変化させることなく保存的アミノ酸置換をタンパク質内で行うことができる場合が多い。本発明のタンパク質は、保存的置換を含むことができる。このような変化は、典型的には、イソロイシン (I)、バリン (V) 及びロイシン (L) のいずれかをこれらの疎水性アミノ酸のいずれか他のものに置換すること；アスパラギン酸 (D) をグルタミン酸 (E) に置換すること及びその逆；グルタミン (Q) をアスパラギン (N) に置換すること及びその逆；セリン (S) をスレオニン (T) に置換すること又はその逆を含む。また、他の置換も、特定のアミノ酸の環境及びタンパク質の三次元構造におけるその役割に依存して保存的であるとみなすことができる。例えば、アラニン (A) 及びバリン (V) がそうであるように、グリシン (G) 及びアラニン (A) は交換可能とすることができる場合が多い。比較的疎水性であるメチオニン (M) は、ロイシン及びイソロイシンと、場合によってはバリンと交換することができる場合が多い。リシン (K) 及びアルギニン (R) は、アミノ酸残基の重要な特徴がその電荷であり、これら 2 つのアミノ酸残基の異なる pK が重要でない場所で交換可能な場合が多い。さらに他の変化は、特定の環境において「保存的」とみなすことができる。

【0094】

また、スキニングアミノ酸分析を使用して、タンパク質・タンパク質相互作用などの特定の生物学的活性に關与する連続配列に沿って 1 個以上のアミノ酸を同定することもできる。好ましいスキニングアミノ酸の中には比較的小さな中性アミノ酸がある。このようなアミノ酸としては、アラニン、グリシン、セリン及びシステインが挙げられる。この群のうち、アラニンが典型的に好ましいスキニングアミノ酸である。というのは、このものは、ベータ炭素を超える側鎖を排除し、変異体の主鎖立体配座を変更する可能性が低いからである。また、アラニンは、最も一般的なアミノ酸であるため、典型的に好ましい。さらに、このものは、埋め込まれた位置及び露出した位置の両方に見出される場合が多い (Creighton, The Proteins (W. H. Freeman & Co., N. Y.) ; Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976))。アラニン置換が適切な量の変異体を生じさせない場合には、等価アミノ酸を使用することができる。

【0095】

本発明の方法において有用な変異体 SLC タンパク質及び SLC ポリペプチド断片は、SLC 生物活性を有していなければならない。具体的には、これらのものは、本来のタンパク質の所望の生物学的活性、すなわち、本明細書に記載の樹状細胞化学誘引物質活性、血管新生抑制活性又は抗腫瘍活性を有していなければならない。本発明の目的のために、「SLC 変異体」は、SLC の樹状細胞・化学誘引物質活性、腫瘍阻害活性又は血管新生抑制活性の少なくとも 30% を示す。より典型的には、変異体は、これらの活性の少なくとも 1 つの 60% 超を示す；より典型的には、変異体は、これらの活性の少なくとも 1 つの 80% 超を示す。ここで開示されるように、SLC タンパク質の生物学的活性は、インターフェロン - (IFN -) ポリペプチドの発現の増加と CD8 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞、抗原提示細胞及び腫瘍細胞を含めた同系哺乳類細胞の集団における形質転換増殖因子 - (TGF -) ポリペプチドの発現の減少とをもちたすといった、SLC が生体内でサイトカイン発現を調節する能力を試験することによっても評価できる。あるいは

10

20

30

40

50

は、S L C タンパク質の生物学的活性は、所定量の二次リンパ組織ケモカイン (S L C) ポリペプチドに細胞集団を曝露し、そしてこの分子が同系腫瘍細胞の増殖を阻害しなければならない能力を試験することによっても評価できる。

【 0 0 9 6 】

S L C は、S L C ポリペプチド、S L C 変異体又は S L C 断片を被験体に又は被験体上に導入することによって直接投与できる。あるいは、S L C を、S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの投与後にその場で生成させることができ、S L C 変異体又は S L C 断片を被験体に導入することができる。

【 0 0 9 7 】

本発明の S L C 剤は、天然 S L C ポリペプチド、天然 S L C 核酸配列、ポリペプチド及び核酸変異体、抗体、モノクローナル抗体、並びに S L C 発現、活性及び受容体結合の操作によって免疫応答をブロックすることができる他の成分を含む。このような成分としては、例えば、S L C プロモーター活性を妨害又は増強するタンパク質又は小分子；転写調節因子を誘引するタンパク質又は小分子；S L C m R N A を安定化又は分解するポリヌクレオチド、タンパク質又は低分子；受容体結合を妨害するタンパク質又は小分子などが挙げられる。

【 0 0 9 8 】

本発明は任意の特定の方法に限定されないと認められる。S L C が成熟樹状細胞及び T 細胞に対して走化性であると認識すると、例えば受容体結合を妨害すること、S L C プロモーター活性を妨害すること、遺伝子発現、m R N A 安定性又はタンパク質安定性を妨げることなどによって S L C 活性を抑制又は増強する任意の手段を使用して、一次免疫応答を調節することができ、これらは本発明に包含される。S L C のアミノ酸及び D N A 配列は当該技術分野において知られている。例えば、P a c h y n s k i 外 (1 9 9 8) J . I m m u n o l . 1 6 1 : 9 5 2 ; Y o s h i d a 外 (1 9 9 8) J . B i o l . C h e m . 2 7 3 : 7 1 1 8 , N a g i r a 外 (1 9 9 8) E u r . J . I m m u n o l . 2 8 : 1 5 1 6 - 1 5 2 3 ; N a g i r a 外 (1 9 9 7) J . B i o l . C h e m . 2 : 1 9 5 1 8 を参照。これらの全ては、参照により本明細書で援用する。

【 0 0 9 9 】

本明細書に開示される方法で使用するためのポリヌクレオチドは、対立遺伝子変異体、ホモログ、オーソログなどの天然型であることができ、又は組換え D N A 法や化学合成によって構築できる。あるいは、変異体ポリペプチドは、非天然型とすることができ、突然変異誘発を含めた当該技術分野で知られている技術によって作製できる。ポリヌクレオチド変異体は、ヌクレオチド置換、欠失、逆位及び挿入を含むことができる。

【 0 1 0 0 】

実施例 8 に示すように、S L C をコードする核酸分子をベクターに挿入し、これを遺伝子治療ベクターとして使用することができる。本明細書に開示される例示的なアデノウイルスベクターの他に、S L C タンパク質又はその断片の発現に適した広範囲の他の宿主・ベクター系が利用可能である (例えば、S a m b r o o k 他 , 1 9 8 9 , C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , 1 9 9 5 前出参照) 。遺伝子治療ベクターは、例えば、静脈注射、局所投与 (米国特許第 5 , 3 2 8 , 4 7 0 号) 、移植又は定位注射 (例えば、C h e n 外 , P N A S 9 1 : 3 0 5 4 - 3 0 5 7 (1 9 9 4) を参照) によって被験体に送達できる。哺乳動物宿主における発現用のベクターは、W u 外 (1 9 9 1) J . B i o l . C h e m . 2 6 6 : 1 4 3 3 8 ; W u 及び W u (1 9 8 8) J . B i o l . C h e m . 2 6 3 : 1 4 6 2 1 ; 並びに Z e n k e 外 (1 9 9 0) P r o c . N a t ' l . A c a d . S c i . U S A 8 7 : 3 6 5 5 に記載されている。遺伝子治療ベクターの医薬製剤は、許容できる希釈剤中の遺伝子治療ベクターを含むことができ、又は遺伝子送達ビヒクルが埋め込まれた徐放性マトリックスを含むことができる。あるいは、完全な遺伝子送達ベクターを組換え細胞から無傷で製造することができる場合、例えば、レトロウイルスベクターの場合には、医薬製剤は、遺伝子送達系を産生する 1 種以上の細胞を含むことができる。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 1 】

本発明における使用には、アデノウイルスベクター、特にテトラサイクリン制御アデノウイルスベクターが好ましい。これらのベクターは、様々な遺伝子を送達及び発現させるために使用でき、インターロイキン遺伝子ファミリー及びインターロイキン遺伝子ファミリーのものなどのサイトカイン遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 1 0 2 】

発現構築物の送達のための好ましい方法は、アデノウイルス発現ベクターの使用を伴う。アデノウイルスベクターは、ゲノムDNAへの組込みの能力が低いことが知られているが、この特徴は、これらのベクターによってもたらされる高い遺伝子導入効率によって相殺される。「アデノウイルス発現ベクター」とは、(a) 相補的パッケージング機能を有する宿主細胞において構築物のパッケージングを支持する及び(b) その中でクローン化された目的の異種遺伝子を最終的に発現するのに十分なアデノウイルス配列を含む構築物を含むことを意味する。

10

【 0 1 0 3 】

発現ベクターは、アデノウイルスの遺伝子操作された形態を含む。36 kbの線状二本鎖DNAウイルスであるアデノウイルスの遺伝子構成の知識から、アデノウイルスDNAの大きな断片を外来配列で置換することが可能になる(Grunhaus及びHorwitz, 1992)。レトロウイルスとは対照的に、宿主細胞のアデノウイルス感染は、野生型アデノウイルスDNAが潜在的な遺伝毒性なしにエピソーム的に複製することができるため、染色体には組み込まれない。また、アデノウイルスは構造的に安定であり、広範な増幅後にゲノム再編成は検出されていない。

20

【 0 1 0 4 】

アデノウイルスは、その中型サイズのゲノム、操作の容易さ、高い力価、広い標的細胞範囲及び高い感染力のため、遺伝子導入ベクターとしての使用に特に好適である。ウイルスゲノムの両末端は、ウイルスDNAの複製及びパッケージングに必要なシスエレメントである100~200塩基対の逆方向反復配列(I T R)を含む。ゲノムの初期(E)及び後期(L)領域は、ウイルスDNA複製の開始によって分割される異なる転写単位を含む。E1領域(E 1 A 及び E 1 B)は、ウイルスゲノム及び少数の細胞遺伝子の転写の調節を担うタンパク質をコードする。E2領域(E 2 A 及び E 2 B)の発現により、ウイルスDNA複製のためのタンパク質が合成される。これらのタンパク質は、DNA複製、後期遺伝子発現及び宿主細胞の遮断に関与する(Renan, 1990)。ウイルスカプシドタンパク質の大部分を含めた後期遺伝子産物は、主要後期プロモーター(M L P)によって生じる単一の一次転写物の有意なプロセシングの後にのみ発現される。M L P (1 6 . 8 m . u . に位置する) は、感染後期の間に特に有効であり、このプロモーターから生じる全てのmRNAは、それらを翻訳のための好ましいmRNAにする5' - 三成分リーダー(T P L)配列を有する。

30

【 0 1 0 5 】

現在の系では、シャトルベクターとアデノウイルスゲノム骨格を含むマスタープラスミドとの間の相同組換えから組換えアデノウイルスが生成される。アデノウイルスゲノムの骨格とウイルスゲノムの欠損部分を含むヘルパー細胞の細胞DNAとの間の起こり得る組換えにより、このプロセスから野生型アデノウイルスが生成され得る。したがって、ウイルスの単一のクローンを個々のプラークから単離し、そのゲノム構造を調べることが重要である。

40

【 0 1 0 6 】

複製欠損である大部分のアデノウイルスベクターの生成及び増殖は、Ad5 DNA断片によってヒト胚腎細胞から形質転換され、かつ、E1タンパク質を構成的に発現する独特のヘルパー細胞株293に依存する。E3領域はアデノウイルスゲノム(Jones及びShenk, 1978)からは不要であるため、現在のアデノウイルスベクターは、293細胞の助けを借りて、E1、E3又は両方の領域に外来DNAを保持する。本来、アデノウイルスは野生型ゲノムの約105%をパッケージングすることができ、約2 kbの

50

余分なDNAの容量を与えることができる。E1及びE3領域内で置換可能な約5.5 kbのDNAと組み合わせると、大部分のアデノウイルスベクターの最大容量は、少なくとも7.5 kb、又はベクターの全長の約15%である。アデノウイルスのウイルスゲノムの80%超がベクターの骨格に残存する。

【0107】

組換えE1欠損アデノウイルスを用いた生体内での遺伝子導入により、宿主免疫応答を誘発することのできる早期及び後期ウイルス遺伝子発現が生じ、それにより遺伝子治療のための導入遺伝子発現の持続期間及びアデノウイルスの使用が制限される。これらの潜在的な問題を回避するために、原核生物Cre-loxP組換え系は、免疫原性及び/又は細胞傷害性ウイルスタンパク質の発現を最小限に抑えるために、ウイルスゲノムにおいて広範囲の欠失を有する組換えアデノウイルスを生成するように適合されてきた。

10

【0108】

ヘルパー細胞株は、ヒト胚性腎臓細胞、筋肉細胞、造血細胞又は他のヒト胚間葉又は上皮細胞などのヒト細胞に由来することができる。あるいは、ヘルパー細胞は、ヒトアデノウイルスに対して寛容な他の哺乳動物種の細胞に由来することができる。このような細胞としては、例えば、ペロ細胞又は他のサル胚間葉系細胞若しくは上皮細胞が挙げられる。上記のように、好ましいヘルパー細胞株は293である。

【0109】

近年、Racher外(1995)は、293細胞を培養し、アデノウイルスを増殖させるための改良方法を開示した。一方の形式では、100~200 mlの培地を含む1リットルのシリコン処理スピナーフラスコ(Techné, Cambridge, UK)に個々の細胞を接種することにより天然細胞凝集物を増殖させる。40 rpmで撹拌した後に、トリパンブルーで細胞生存率を評価する。他方の形式では、以下のように、Fibra-Cellマイクロキャリア(Bibby Sterlin, Stone, UK)(5 g/l)を使用する。5 mlの培地に再懸濁した細胞接種物を250 ml三角フラスコ中のキャリア(50 ml)に添加し、時々撹拌しながら1~4時間静置する。次いで、培地を50 mlの新たな培地と交換し、振盪を開始する。ウイルス産生のために、細胞を約80%コンフルエンスまで増殖させ、その後培地を交換し(最終容量の25%まで)、アデノウイルスを0.05のMOIで添加する。培養物を一晩静置し、その後容量を100%に増加させ、振盪をさらに72時間開始する。

20

30

【0110】

場合によっては、複数の細胞型へのアデノウイルス仲介性遺伝子送達は、上皮由来細胞と比較してはるかに効率が低いことが分かっている。新たなアデノウイルスAdPKを構築してこの非効率性が克服されており(Wickham外, 1996)、AdPKは、多くの細胞型で広範に発現するヘパリン含有細胞受容体に対するウイルスを標的とするヘパリン結合ドメインを含む。したがって、AdPKは、未修飾アデノウイルスよりも高い効率で複数の細胞型に遺伝子を送達し、それによって遺伝子導入効率を改善し、効率的なアデノウイルス仲介遺伝子治療に適した組織を拡大する。

【0111】

アデノウイルスベクターが複製欠損である又は少なくとも条件付きで欠損しているという要件以外に、アデノウイルスベクターの性質は、本発明の成功のために重要であるとは考えられていない。アデノウイルスは、42種の異なる既知の血清型又はサブグループA~Fのいずれかのものであることができる。サブグループCのアデノウイルス5型は、本発明で使用するための条件付き複製欠損アデノウイルスベクターを得るために好ましい出発物質である。これは、アデノウイルス5型が多く of の生化学的及び遺伝的情報が知られているヒトアデノウイルスであり、アデノウイルスをベクターとして使用する大部分の構築のために歴史的に使用されているからである。

40

【0112】

上記のように、本発明の典型的なベクターは複製欠損であり、アデノウイルスE1領域を有さない。したがって、E1コード配列が除去された位置に外来遺伝子発現カセットを

50

導入することが最も便利であろう。しかしながら、アデノウイルス配列内への構築物の挿入位置は、本発明にとって重要ではない。また、目的の遺伝子をコードするポリヌクレオチドは、Karls son外(1986)によって記載されるようにE3置換ベクター中の欠失E3領域の代わりに又はヘルパー細胞株若しくはヘルパーウイルスがE4欠損を補完するE4領域にも挿入できる(Brough外, 1996)。

【0113】

アデノウイルスの増殖及び操作は当業者に知られており、試験管内及び生体内で広い宿主範囲を示す。このウイルス群は、高い力価、例えば1mlあたり $10^9 \sim 10^{11}$ のプラーク形成単位で得ることができ、これらは高度に感染性である。アデノウイルスのライフサイクルは、宿主細胞ゲノムへの組み込みを必要としない。アデノウイルスベクターによって送達される外来遺伝子はエピソーム性であるため、宿主細胞に対する遺伝毒性が低い。野生型アデノウイルスによるワクチン接種の研究において重篤な副作用は報告されていない(Couch外, 1963; Top外, 1971)が、これは、ビバ遺伝子伝達ベクターと同様にそれらの安全性及び治療可能性を示すものである。

【0114】

アデノウイルスベクターは、真核生物の遺伝子発現(Levrero外, 1991; Gomez-Foix外, 1992)及びワクチン開発(Grunhaus及びHorwitz, 1992; Graham及びPrevec, 1992)に使用されてきた。近年、動物実験により、遺伝子治療のために組換えアデノウイルスを使用することが示唆された(Stratford-Perricaudet及びPerricaudet, 1991; Stratford-Perricaudet外, 1991; Rich外, 1993)。組換えアデノウイルスを異なる組織に投与する研究としては、気管注入(Rosenfeld外, 1991; 1992)、筋肉注射(Ragot外, 1993)、末梢静脈注射(Herz及びGerard, 1993)及び脳への定位的接種(LeGalLaSalle外, 1993)が挙げられる。組換えアデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス(下記参照)は、分裂していないヒト初代細胞に感染し、形質導入することができる。

【0115】

また、アデノ随伴ウイルス(AAV)は、遺伝子の送達及び発現のためのベクターの構築に使用するのに魅力的な系である。というのは、AAVは高頻度の組込みを有し、非分裂細胞に感染することができ、それによって、例えば組織培養(Muzyczka, 1992)又は生体内において哺乳類細胞に遺伝子を送達するのを有用にするからである。AAVは、感染性のための広い宿主範囲を有する(Tratschin外, 1984; Laughlin外, 1986; Lebkowski外, 1988; McLaughlin外, 1988)。rAAVベクターの生成及び使用に関する詳細は、米国特許第5,139,941号及び米国特許第4,797,368号に記載されており、それぞれ参照により本明細書で援用する。

【0116】

遺伝子送達におけるAAVの使用を実証する研究としては、LaFace外(1988); Zhou外(1993); Flotte外(1993); 及びWalsh外(1994)が挙げられる。組換えAAVベクターは、マーカー遺伝子(Kaplitte外, 1994; Lebkowski外, 1988; Samulski外, 1989; Yoder外, 1994; Zhou外, 1994; Hermonat及びMuzyczka, 1984; Tratschin外, 1985; McLaughlin外, 1988)並びにヒト疾患に関与する遺伝子(Flotte外, 1992; Luo外, 1994; Ohi外, 1990; Walsh外, 1994; Wei外, 1994)の試験管内及び生体内形質導入に使用することが成功している。近年、嚢胞性線維症の治療のための第I相ヒト試験についてAAVベクターが承認されている。

【0117】

AAVは、培養細胞において生産的感染を受けるために別のウイルス(アデノウイルス又はヘルペスウイルスファミリーのメンバー)との同時感染を必要とするという点で依存

10

20

30

40

50

性のパルボウイルスである (M u z y c z k a , 1992)。ヘルパーウイルスとの共感染がない場合には、野生型 AAV ゲノムは、その末端を介してヒト 19 番染色体に組み込み、そこでプロウイルスとして潜伏状態で存在する (K o t i n 外, 1990; S a m u l s k i 外, 1991) が、r AAV は、AAV R e p タンパク質も発現しない限り、組み込みについて 19 番染色体に限定されない (S h e l l i n g 及び S m i t h , 1994)。AAV プロウイルスを保有する細胞がヘルパーウイルスに重複感染すると、AAV ゲノムは染色体又は組換えプラスミドから「レスキュー」され、正常な生産的感染が確立される (S a m u l s k i 外, 1989; M c L a u g h l i n 外, 1988; K o t i n 外, 1990; M u z v c z k a , 1992)。

【0118】

典型的には、組換え AAV (r AAV) ウイルスは、2つの AAV 末端反復 (M c L a u g h l i n 外, 1988; S a m u l s k i 外, 1989; それぞれ本明細書において参照により援用される) に隣接する目的の遺伝子を含むプラスミドと、末端反復を伴わない野生型 AAV コード配列を含むプラスミド、例えば、p l M 4 S (M c C a r t y 外, 1991; 参照により本明細書において援用される) とを同時トランスフェクトすることによって作製される。また、細胞に、AAV ヘルパー機能のために必要とされるアデノウイルス遺伝子を保有するアデノウイルス又はプラスミドも感染又はトランスフェクトすると、このようにして作製された r AAV ウイルスストックは、熱ショックによって不活性化されなければならない又は r AAV 粒子から物理的に分離されなければならない (例えば、塩化セシウム密度遠心分離によって) アデノウイルスで汚染される。あるいは、AAV コード領域を含むアデノウイルスベクター又は AAV コード領域とアデノウイルスヘルパー遺伝子のいくつか若しくは全てとを含む細胞株を使用することができるであろう (Y a n g 外, 1994; C l a r k 外, 1995)。また、組み込まれたプロウイルスとしての r AAV D N A を保有する細胞株も使用することができる (F l o t t e 外, 1995)。

【0119】

本発明の特定の態様では、レトロウイルス感染の使用を通じた標的細胞への選択された遺伝子の送達が望まれる。レトロウイルスは、逆転写プロセスによって感染細胞内においてそれらの RNA を二本鎖 DNA に変換することができることを特徴とする一本鎖 RNA ウイルス群である (C o f f i n , 1990)。その後、得られた DNA はプロウイルスとして細胞染色体に安定に組み込まれ、ウイルスタンパク質の合成を指示する。この組み込みにより、レシピエント細胞及びその子孫にウイルス遺伝子配列が保持される。レトロウイルスゲノムは、カプシドタンパク質、ポリメラーゼ酵素及びエンベロープ成分をそれぞれコードする 3 種の遺伝子 g a g、p o l 及び e n v を含む。g a g 遺伝子の上流に見出される配列は、ゲノムをビリオンにパッケージングするためのシグナルを含む。ウイルスゲノムの 5' 及び 3' 末端には 2 つの長い末端反復配列 (L T R) が存在する。これらは強力なプロモーター及びエンハンサー配列を含み、また宿主細胞ゲノムへの組み込みに必要である (C o f f i n , 1990)。

【0120】

レトロウイルスベクターを構築するために、目的の遺伝子をコードする核酸を所定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入して複製欠損型ウイルスを産生する。ビリオンを産生するために、g a g、p o l 及び e n v 遺伝子を含むがただし L T R 及びパッケージング成分を含まないパッケージング細胞株を構築する (M a n n 外, 1983)。レトロウイルス L T R 及びパッケージング配列と共に c D N A を含む組換えプラスミドをこの細胞株に導入すると (例えばリン酸カルシウム沈殿によって)、パッケージング配列により、組換えプラスミドの RNA 転写産物をウイルス粒子にパッケージングすることができ、その後、これは培養培地中に分泌される (N i c o l a s 及び R u b e n s t e i n , 1988; T e m i n , 1986; M a n n 外, 1983)。次いで、組換えレトロウイルスを含む培地を収集し、任意に濃縮し、そして遺伝子導入のために使用する。レトロウイルスベクターは広範囲の細胞型に感染することができる。しかしながら、組み込み及び

10

20

30

40

50

安定発現は、宿主細胞の分裂を必要とする (P a s k i n d 外 , 1 9 7 5) 。

【 0 1 2 1 】

欠損レトロウイルスベクターの使用に関連する懸念は、パッケージング細胞において野生型複製コンピテントウイルスが出現する可能性である。これは、組換えウイルスからのインタクトな配列が、宿主細胞ゲノムに組み込まれた g a g、p o l、e n v 配列の上流に挿入される組換え事象により生じる場合がある。しかし、現在では、新たなパッケージング細胞株が利用可能であり、これは組換えの可能性を大幅に減少させるはずである (M a r k o w i t z 外 , 1 9 8 8 ; H e r s d o r f f e r 外 , 1 9 9 0) 。

【 0 1 2 2 】

場合によっては、限定的な宿主細胞範囲及び低力価のレトロウイルスベクターは、これら真核細胞における安定した遺伝子伝達のために使用することを制限する場合がある。これらの潜在的な困難を克服するために、レトロウイルスエンベロープ糖タンパク質が水疱性口内炎ウイルスの G 糖タンパク質によって完全に置換されたネズミ白血病ウイルス由来ベクターが開発されている (B u r n s 外 , 1 9 9 3)。これらのベクターは、非常に高い力価 (10^9 コロニー形成単位 / m l) に濃縮することができ、かつ、通常はレトロウイルスエンベロープタンパク質を含むベクターによる感染に対して耐性の細胞に感染することができる。これらのベクターは、遺伝子治療モデル研究及び生体内でのベクターの直接送達を必要とする他の遺伝子導入研究を促進させることができる。

【 0 1 2 3 】

本発明における発現ベクターの構築には、他のウイルスベクターを用いることができる。ワクシニアウイルス (R i d g e w a y , 1 9 8 8 ; B a i c h w a l 及び S u g d e n , 1 9 8 6 ; C o u p a r 外 , 1 9 8 8)、シンドビスウイルス及びヘルペスウイルスなどのウイルス由来のベクターを用いることができる。これらは、様々な哺乳動物細胞にいくつかの魅力的な特徴を与える (F r i e d m a n n , 1 9 8 9 ; R i d g e w a y , 1 9 8 8 ; B a i c h w a l 及び S u g d e n , 1 9 8 6 ; C o u p a r 外 , 1 9 8 8 ; H o r w i c h 外 , 1 9 9 0) 。

【 0 1 2 4 】

B 型肝炎ウイルスの欠損が最近認識され、様々なウイルス配列の構造・機能関係に新たな洞察が得られた。試験管内研究から、このウイルスは、そのゲノムの 8 0 % まで欠失しているにもかかわらず、ヘルパー依存性パッケージング及び逆転写の能力を保持することができることが示された (H o r w i c h 外 , 1 9 9 0)。このことは、ゲノムの大部分が外来遺伝物質と置換され得ることを示唆した。近年、C h a n g 外 (1 9 9 1) は、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T) 遺伝子を、ポリメラーゼ、表面及びプレ表面コード配列の代わりにアヒル B 型肝炎ウイルスゲノムに導入した。鳥類の肝癌細胞株に野生型ウイルスを共トランスフェクトした。高力価の組換えウイルスを含有する培養培地を使用して一次アヒル肝細胞に感染させた。トランスフェクション後少なくとも 2 4 日間にわたって、安定した C A T 遺伝子発現が検出された (C h a n g 外 , 1 9 9 1) 。

【 0 1 2 5 】

本発明の方法は、患者が示す特定の疾患又は障害の治療において一般的に使用されている任意の他の方法と組み合わせることができる。例えば、固形腫瘍の治療に関連して、本発明の方法は、手術、放射線療法などの古典的アプローチと組み合わせて使用することができる。特定の治療アプローチがそれ自体有害であることが知られていない限り又は S L C 療法の有効性を妨げる限り、それと本発明との組み合わせが意図される。1 種以上の薬剤を S L C 療法と組み合わせて使用する場合には、明らかに望ましいものの、各治療を別々に行われた場合に観察される効果を組み合わせた結果に加味する必要はなく、また、確かに可能であり有利であるものの、組み合わせた治療が相乗効果を発揮する必要は特にない。

【 0 1 2 6 】

外科手術に関しては、任意の外科的介入を本発明と組み合わせて実施することができる

10

20

30

40

50

。放射線療法に関しては、 γ 線照射、X線、UV照射、マイクロ波、さらには電子放射などの腫瘍細胞内で局所的にDNA損傷を誘発するための任意のメカニズムが企図される。また、腫瘍細胞への放射性同位元素の指向性送達も意図されており、これは、標的化抗体その他の標的化手段に関連して使用できる。また、サイトカイン療法は、併用療法レジメンのための有効なパートナーであることも証明されている。様々なサイトカインをこのような併用アプローチで使用できる。サイトカインの例としては、IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、TGF-、GM-CSF、M-CSF、TNF、TNF、LAF、TCGF、BCGF、TRF、BAF、BDG、MP、LIF、OSM、TMF、PDGF、IFN-、IFN-、IFN-が挙げられる。サイトカインは、患者の状態及びサイトカインの相対毒性のような臨床適応と一致する標準的なレジメンに従って投与される。以下は、本発明の所定の実施形態で使用するためのサイトカイン遺伝子の例示的な表であるが、ただしこれらに限定されない。

【0127】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表A

| サイトカイン | 参考文献 | |
|-------------------|---|----|
| ヒトIL-1 α | March外, Nature, 315:641, 1985 | |
| ネズミIL-1 α | Lomedico外, Nature, 312:458, 1984 | |
| ヒトIL-1 β | March外, Nature, 315:641, 1985; Auron外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:7907, 1984 | |
| ネズミIL-1 β | Gray, J. Immunol., 137L3644m 1986l Tekfirdm Nucl. Acids Res., 14:9955, 1986 | |
| ヒトIL-1 α | Eisenberg外, Nature, 343:341, 1990 | 10 |
| ヒトIL-2 | Taniguchi外, Nature, 302:305, 1983; Maeda外, Biochem. Biophys. Res. Commun., 115:1040, 1983 | |
| ヒトIL-2 | Taniguchi外, Nature, 302:305, 1983 | |
| ヒトIL-3 | Yang外, Cell, 47:3, 1986 | |
| ネズミIL-3 | Yokota外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1070, 1984; Fung外, Nature, 307:233, 1984; Miyatake外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:316, 1985 | |
| ヒトIL-4 | Yokota外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:5894, 1986 | |
| ネズミIL-4 | Norma外, Nature, 319:640, 1986; Lee外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:2061, 1986 | |
| ヒトIL-5 | Azuma外, Nucl. Acids Res., 14:9149, 1986 | 20 |
| ネズミIL-5 | Kinashi外, Nature, 324:70, 1986; Mizuta外, Growth Factors, 1:51, 19 | |
| ヒトIL-6 | Hirona外, Nature, 324:73, 1986 | |
| ネズミIL-6 | Van Snick外, Eur. J. Immunol., 18:193, 1988 | |
| ヒトIL-7 | Goodwin外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:302, 1989 | |
| ネズミIL-7 | Namen外, Nature, 333:571, 1988 | |
| ヒトIL-8 | Schmid外, J. Immunol., 139:250, 1987; Matsushima外, J. Exp. Med., 167:1883, 1988; Lindley外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:9199, 1988 | |
| ヒトIL-9 | Renauld外, J. Immunol., 144:4235, 1990 | |
| ネズミIL-9 | Renauld外, J. Immunol., 144:4235, 1990 | |
| ヒトアンギオゲニン | Kurachi外, Biochemistry, 24:5494, 1985 | 30 |
| ヒトGRO α | Richmond外, EMBO J., 7:2025, 1988 | |
| ネズミMIP-1 α | Davatelis外, J. Exp. Med., 167:1939, 1988 | |
| ネズミMIP-1 β | Sherry外, J. Exp. Med., 167:2251, 1988 | |
| ヒトMIF | Weiser外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:7522, 1989 | |
| ヒトG-CSF | Nagata外, Nature, 319:415, 1986; Souza外, Science, 232:61, 1986 | |
| ヒトGM-CSF | Cantrell外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:6250, 1985; Lee外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4360, 1985; Wong外, Science, 228:810, 1985 | |
| ネズミGM-CSF | Gough外, EMBO J., 4:645, 1985 | |
| ヒトM-CSF | Wong, Science, 235:1504, 1987; Kawasaki, Science, 230:291, 1985; Ladner, EMBO J., 6:2693, 1987 | 40 |

【表 1 - 2】

| | | |
|-------------------|---|----|
| ヒト EGF | Smith外, Nucl. Acids Res., 10:4467, 1982; Bell外, Nucl. Acids Res., 14:8427, 1986 | |
| ヒト TGF- α | Derynck外, Cell, 38:287, 1984 | |
| ヒト FGF酸性 | Jaye外, Science, 233:541, 1986; Gimenez-Gallego外, Biochem. Biophys. Res. Commun., 138:611, 1986; Harper外 Biochem., 25:4097, 1986 | |
| ヒト β -ECGF | Jaye外, Science, 233:541, 1986 | |
| ヒト FGF塩基性 | Abraham外, EMBO J., 5:2523, 1986; Sommer外, Biochem. Biophys. Res. Comm., 144:543, 1987 | 10 |
| ネズミ IFN- β | Higashi外, J. Biol. Chem., 258:9522, 1983; Kuga, Nucl. Acids Res., 17:3291, 1989 | |
| ヒト IFN- γ | Gray外, Nature, 295:503, 1982; Devos外, Nucl. Acids Res., 10:2487, 1982; Rinderknecht, J. Biol. Chem. 259:6790, 1984 | |
| ヒト IGF-I | Jansen外, Nature, 306:609, 1983; Rotwein外, J. Biol. Chem., 261:4828, 1986 | |
| ヒト IGF-II | Bell外, Nature, 310:775, 1984 | |
| ヒト β -NGF | Ullrich外, Nature, 303:821, 1983 | 20 |
| ヒト PDGF A鎖 | Betsholtz外, Nature, 320:695, 1986 | |
| ヒト PDGF B鎖 | Johnsson外, EMBO J., 3:921, 1984; Collins外, Nature, 316:748, 1985 | |
| ヒト TGF- β 1 | Derynck外, Nature, 316:701, 1985 | |
| ヒト TNF- α | Pennica外, Nature, 312:724, 1984; Fransen外, Nucl. Acids Res., 13:4417, 1985 | |
| ヒト TNF- β | Gray外, Nature, 312:721, 1984 | |
| ネズミ TNF- β | Gray外, Nucl. Acids Res., 15:3937, 1987 | |

【 0 1 2 8 】

本発明の組成物は、本明細書に記載のチェックポイント阻害剤及び／又は以下に例示するような化学療法剤である化合物（第2薬剤）の有効量と組み合わせた治療投与のための操作されたウイルス又は細胞の有効量を有することができる。このような組成物は、一般に、薬学的に許容されるキャリア又は水性媒体に溶解又は分散される。多種多様な化学療法剤を本発明の治療遺伝子と併用することができる。これらのものは、例えば、DNAを直接架橋する薬剤、DNAにインターカレートする薬剤、及び核酸合成に影響を与えることによって染色体及び有糸分裂異常を引き起こす薬剤であることができる。

【 0 1 2 9 】

様々な化学療法剤を、本明細書に開示される併用治療方法において使用することが意図される。例示の化学療法剤としては、エトポシド（VP-16）、アドリアマイシン、5-フルオロウラシル（5FU）、カンプトテシン、アクチノマイシンD、マイトマイシンC、シスプラチン（CDDP）、さらには過酸化水素が挙げられる。

【 0 1 3 0 】

当業者であれば分かるように、化学療法剤の適切な用量は、一般に、化学療法剤が単独で又は他の化学療法剤と組み合わせて投与される臨床療法において、およそ既に使用されている量であろう。ほんの一例として、シスプラチンなどの薬剤及び他のDNAアルキル化剤を使用することができる。シスプラチンは癌の治療に広く使用されており、臨床応用において使用される有効用量は、合計3コースで3週間毎に5日間にわたって20mg/in²である。シスプラチンは経口吸収されないため、静脈内注射、皮下注射、腫瘍内注射又は腹腔内注射によって送達されなければならない。

【 0 1 3 1 】

10

20

30

40

50

核酸、具体的にはDNAを直接架橋する薬剤は、DNA損傷を生じさせ、相乗的な抗新生物の組み合わせをもたらすことが想定され、これは本明細書に示されている。シスプラチンなどの薬剤及び他のDNAアルキル化剤を使用することができる。

【0132】

さらに有用な薬剤としては、DNA複製、有糸分裂及び染色体分離を妨害する化合物が挙げられる。このような化学療法化合物としては、ドキソルビシン、エトポシド、ベラパミル、ポドフィロトキシンなどとしても知られるアドリマイシンが挙げられる。新生物の治療のための臨床現場で広く使用されているこれらの化合物は、アドリマイシンについては21日間隔で25～75mg/in²の範囲の用量で静脈内ボース投与によって投与され、エトポシドについては35～50mg/in²まで静脈内投与され又は静脈内投与量の2倍経口で投与される。

10

【0133】

ポリヌクレオチド前駆体の合成及び忠実度を破壊する薬剤も使用することができる。特に有用なのは、広範な試験を受け、かつ、容易に入手可能な薬剤である。このように、5-フルオロウラシル(5-FU)などの薬剤が新生物組織によって優先的に使用され、この薬剤を新生細胞に対する標的化のために特に有用なものにする。非常に毒性であるが、5-FUは、局所を含めて広範囲のキャリアに適用できるが、3～15mg/kg/日の範囲の用量を用いた静脈内投与が一般的に使用されている。

【0134】

また、タキソールのなどの植物アルカロイドも本発明の所定の態様において使用することが考えられる。タキソールは、トネリコであるタクサス・ブレヴィフォリア(*Taxus brevifolia*)の樹皮から単離される実験的な有糸分裂阻害剤である。このものはチューブリンに結合し(ピンカアルカロイドによって使用される部位とは異なる部位に)、微小管の集合を促進する。タキソールは現在臨床的に評価されている;このものは悪性黒色腫及び卵巣癌に対して活性を有する。最大投与量は、5日間にわたって1日当たり30mg/m²又は3週間ごとに1回210～250mg/m²である。言うまでもなく、これらの投薬量の全ては例示的なものであり、これらの点間の任意の投薬量も本発明での使用であると予想される。

20

【0135】

併用療法に関連して有用な例示的な化学療法剤を表Bに列挙する。ここに列挙されている薬剤のそれぞれは例示的なものであり、限定ではない。「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15版、第33章、特に624～652ページを参照されたい。治療される被験体の状態によって投薬量のいくらかの変動が必然的に生じるであろう。いずれにしても、投与を担当する者は、個々の被験体に適切な用量を決定するであろう。さらに、ヒトへの投与について、製剤は、FDA Office of Biologics基準で要求されるように、無菌性、発熱原性、一般的安全性及び純度基準を満たさなければならない。

30

【0136】

40

【表 2 - 1】

表B

表4

腫瘍性疾患に有用な化学療法剤

| クラス | 薬剤の種類 | 一般名 (他の名称) | 疾患 |
|--------|------------------|---|--|
| アルキル化剤 | ナイトロジェンマスタード | メクロレタミン(HN ₂) | ホジキン病、非ホジキンリンパ腫 |
| | | シクロホスファミドイホスファミド | 急性及び慢性リンパ球性白血病、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、胸部、卵巣、肺、ウィルムス腫瘍、頸部、精巣、軟組織肉腫 |
| | | メルファラン (L-サルコリン) | 多発性骨髄腫、胸部、卵巣 |
| | | クロラムブシル | 慢性リンパ球性白血病、原発性マクログロブリン血症、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫 |
| | エチレンイミン及びメチルメラミン | ヘキサメチルメラミン | 卵巣 |
| | | チオテパ | Bladder、胸部、卵巣 |
| | アルキルスルホネート | ブスルファン | 慢性顆粒球性白血病 |
| | ニトロソウレア | カルムスチン (BCNU) | ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、原発性脳腫瘍、多発性骨髄腫、悪性黒色腫 |
| | | ロムスチン (CCNU) | ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、原発性脳腫瘍、small-cell 肺 |
| | | セムスチン (メチル-CCNU) | 原発性脳腫瘍、胃、結腸 |
| | | ストレプトゾシン (ストレプトゾトシン) | 悪性膵臓インスリノーマ、悪性カルチノイド |
| | トリアジン | ダカルバジン (DTIC; ジメチルトリイミノイミダゾールオレカルボキサミド) | 悪性黒色腫、ホジキン病、軟組織肉腫 |

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

| | | |
|---------------------------|---|--|
| 葉酸アナログ | メトトレキサート (アメトプテリン) | 急性リンパ球性白血病、 絨毛癌、菌状息肉腫、胸 部、頭頸部、肺、骨形成 性肉腫 |
| | フルオロウラシル (5-フル オロウラシル;5-FU) フロクスウリジン (フルオロデオキシウリ ジン;FUdR) | 胸部、結腸、胃、膵臓、 卵巣、頭頸部、膀胱、前 悪性皮膚病変 (局所的) |
| ピリミジンアナログ | シタラビン (シトシンアラ ビノシド) | 急性顆粒球性及び急性リ ンパ球性白血病 |
| プリンアナログ及び関連阻 代謝拮抗物質 害剤 | メルカプトプリン (6-メルカプトプリン;6-M P) | 急性リンパ球性、急性顆 粒球性及び慢性顆粒球性 白血病s |
| | チオグアニン (6-チオグアニン; TG) | 急性顆粒球、急性リンパ 球性及び慢性顆粒球性白 血病s |
| | ペントスタチン (2-デオキシコルモマイシ ン) | 毛状細胞白血病、菌状息 肉腫、慢性リンパ球性白 血病 |
| | ビンカアルカロイド | ホジキン病、非ホジキン リンパ腫、胸部、精巣 |
| ビンカアルカロイド | ビンクリスチン | 急性リンパ球性白血病、 神経芽細胞腫、ウィルム ス腫瘍、横紋筋肉腫、ホ ジキン病、非ホジキンリ ンパ腫、小細胞肺 |
| | エトポシド (VP16) タチポシド | 精巣、小細胞肺及び他の 肺、胸部、ホジキン病、 非ホジキンリンパ腫、急 性顆粒球性白血病、カボ ジ肉腫 |
| エビポドフィロトキシン | ダクチノマイシン (アクチノマイシンD) | 絨毛癌、ウィルムス腫瘍 、横紋筋肉腫、精巣、カ ボジ肉腫 |
| | ダウノルビシン (ダウノマイシン; ルビドマイシン) | 急性顆粒球性及び急性リ ンパ球性白血病s |

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

| | | | |
|-------|----------------|------------------------------|---|
| 抗生物質 | 抗生物質 抗生物質続き | ドキソルビシン | 軟組織、骨形成及び他の肉腫; ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、急性白血病、胸部、泌尿生殖器、甲状腺、肺、胃、神経芽細胞腫 |
| | | ブレオマイシン | 精巣、頭頸部、皮膚、食道、肺及び尿生殖路; ホジキン病、非ホジキンリンパ腫 |
| | | プリカマイシン (ミトラマイシン) | 精巣、悪性高カルシウム血症 |
| | | マイトマイシン (マイトマイシンC) | 胃、頸部、結腸、胸部、膵臓、膀胱、頭頸部 |
| 天然生成物 | 酵素 | L-アスパラギナーゼ | 急性リンパ球性白血病 |
| | 生物応答修飾子 | インターフェロン α | 毛状細胞白血病、カポジ肉腫、メラノーマ、カルチノイド、腎細胞、卵巣、膀胱、非ホジキンリンパ腫、菌状息肉腫、多発性骨髄腫、慢性顆粒球性白血病 |
| | 白金配位錯体 | シスプラチン (シス-DDP) カルボプラチン | 精巣、卵巣、膀胱、頭頸部、肺、甲状腺、頸部、子宮内膜、神経芽細胞腫、骨形成性肉腫 |
| 他の薬剤 | アントラセンジオン | ミトキサントロン | 急性顆粒球性白血病、胸部 |
| | 置換尿素 | ヒドロキシ尿素 | 慢性顆粒球性白血病、真性赤血球増加症、本態性血小板増加症、悪性黒色腫 |
| | メチルヒドラジン誘導体 | プロカルバジン (N-メチルヒドラジン、MIH) | ホジキン病 |
| | 副腎皮質抑制物質 | ミトタン (o,p'-DDD) アミノグルテチミド | 副腎皮質 胸部 |
| | 副腎皮質ステロイド | プレドニゾン (いくつかの他の同等の製剤が利用可能) | 急性及び慢性リンパ球性白血病、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、胸部 |

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

| | | | |
|-------------------|-----------------------|--|---------|
| ホルモン及び アンタゴニスト | プロゲステン | カプロン酸ヒドロキシプロ ゲステロン 酢酸メドロキシプロゲステ ロン 酢酸メゲストロール | 子宮内膜、胸部 |
| | エストロゲン | ジエチルスチルベストロー ル エチニルエストラジオール (他の利用可能な製剤) | 胸部、前立腺 |
| | 抗エストロゲン剤 | タモキシフェン | 胸部 |
| | アンドロゲン | プロピオン酸テストステロ ンフルオキシ メステロン (他の利用可能 な製剤) | 胸部 |
| | 抗アンドロゲン | フルタミド | 前立腺 |
| | ゴナドトロピン放出ホルモ ンアナログ | ロイプロリド | 前立腺 |

10

20

【0137】

チェックポイントタンパク質

細胞傷害性Tリンパ球抗原4 (CTLA-4) (CD152) は、T細胞活性化のB7-1/B7-2調節経路に關与する周知の共刺激分子である。CTLA-4は、ヘルパーT細胞の表面上で発現し、T細胞に阻害シグナルを伝達する (例えば、Krummel外, J. Exp. Med. 182 (2): 459-65, 1995参照)。CTLA-4に結合する抗体としては、イピリムマブ及びトレミリムマブが挙げられる。

30

【0138】

分化クラスター279 (CD279) としても知られているプログラム細胞死タンパク質1 (PD-1) は、活性化T細胞、B細胞及びマクロファージ上で発現する細胞表面共抑制性受容体であり、免疫チェックポイント封鎖の成分である (Shinozaki外, Genomics, 23 (3): 704 (1994); Francisco外, Immunol Rev., 236: 219 (2010))。PD-1は、その2つのリガンドPD-L1 (B7-H1; CD274としても知られる) 及びPD-L2 (B7-DC; CD273) との相互作用によりT細胞の活性を制限する (Postow外, J Clin Oncol. 33: 9 (2015))。PD-1とPD-L1及びPD-L2との相互作用は、T細胞増殖、サイトカイン産生及び細胞傷害活性を低下させる (Freeman GJ外, J Exp Med., 192: 1027-34 (2000); Brown JA外, J Immunol., 170: 1257-66 (2003))。

40

【0139】

2種のモノクローナル抗体がPD-1免疫療法の阻害について米国食品医薬品局 (FDA) によって承認されている。転移性黒色腫での使用についてペムブロリズマブ (KEYTRUDA (登録商標)、Merck Sharp & Dohme Corp.) が承認され、転移性黒色腫及び転移性扁平上皮性非小細胞肺癌 (NSCLC) での使用についてニボルマブ (Opdivo (登録商標)、Bristol-Myers Squibb) が承認されている。これらの抗体の両方はPD-1受容体に結合し、そのリガンドであるPD-L1及びPD-L2とのその相互作用を遮断する。

50

【0140】

また、PD-L1の阻害剤は、膀胱癌、頭頸部癌及び胃腸癌における固形腫瘍の阻害に有効であることが示されている(Herbst RS外, J Clin Oncol., 31:3000(2013); Heery CR外, J Clin Oncol., 32:5s, 3064(2014); Powles 外, J Clin Oncol, 32:5s, 5011(2014); Segal NH外, J Clin Oncol., 32:5s, 3002(2014))。

【0141】

4-1BB(CD137)は、TNFスーパーファミリーの2型細胞表面受容体であり、活性化Tリンパ球及び樹状細胞上で発現する。4-1BBは、T細胞増殖を引き起こす共刺激分子として作用する。

10

【0142】

リンパ球活性化遺伝子3(LAG-3、CD223)は、活性化T細胞、ナチュラルキラー細胞、B細胞及び形質細胞様樹状細胞上で発現する細胞表面分子チェックポイントである。LAG-3は、CTLA-4及びPD-1と同様に、T細胞の細胞増殖、活性化及びホメオスタシスを負に調節する(Workman外, Journal of Immunology 172:5450-5, 2004)。LAG-3モノクローナル抗体BMS-986016は、臨床試験の対象となっている。

【0143】

TIM-3は、IFN- γ 産生CD4+Tヘルパー1(Th1)及びCD8+T細胞傷害性1(Tc1)T細胞上で発現する受容体である(Anderson A., Cancer Immunol Res 2;393, 2014)。

20

【0144】

例示的な実施形態では、SLCポリペプチド、SLC変異体、SLC断片、SLCアナログ、SLC誘導体、前記ポリペプチド、変異体又は断片をコードするSLCポリヌクレオチド、及び/又は本明細書に記載のSLC剤を免疫チェックポイント阻害剤と併用する。細胞性免疫は、T細胞が特定の混合組織適合複合体(MHC)分子に結合したAPCの被験体で発現する細胞内タンパク質の特異的ペプチド断片を認識するときに始まる。この相互作用は、CD28に結合する共刺激分子であるB7の存在を必要とする。この活性化の結果は、細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTLA-4)のアップレギュレーションである。CTLA-4がTリンパ球上のその受容体に結合すると、T細胞活性化の負の調節に至る。別の同時阻害経路は、活性化T細胞上に存在する別の阻害性受容体であるプログラム細胞死1受容体(PD-1)を使用する。PD-1がそのリガンド(PD-L1)に結合すると、有効な免疫応答を生成する活性化T細胞の能力が下方調節される。

30

【0145】

したがって、本発明は、(a)被験体に、(i)SLCポリペプチド、(ii)SLCポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、(iii)ポリヌクレオチドを含む細胞、又は(iv)それらの組み合わせを投与し、及び(b)被験体に免疫チェックポイント阻害剤を投与することを含む。例示的な態様では、本方法は、被験体における癌又は固形腫瘍の治療方法である。

40

【0146】

免疫チェックポイント阻害剤は、当該技術分野において知られており(例えばBrahmmer and Pardoll, Cancer Immunol Res 1;85(2013)及びそこに引用されている参考文献を参照)、また、免疫チェックポイント阻害剤のいずれか1種又はそれらの組合せは、SLCポリペプチド、SLC変異体、SLC断片、SLCアナログ、SLC誘導体、前記ポリペプチド、変異体若しくは断片をコードするSLCポリヌクレオチド、及び/又は本明細書に記載のSLC剤との併用療法に有用である。

【0147】

様々な実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4、CTLA-4受

50

容体、PD - 1、PD 1 - L 1、PD 1 - L 2、4 - 1 B B、OX 4 0、LAG - 3、TIM - 3又はそれらの組み合わせのうちの1種以上に特異的な抗体、任意にモノクローナル抗体である。

【0148】

例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤はCTLA - 4の阻害剤である。例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤はCTLA - 4受容体の阻害剤である。例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤はPD - 1の阻害剤である。例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、PD 1 - L 1及びPD 1 - L 2を含めた任意のPD - 1リガンドの阻害剤である。例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA - 4又はCTLA - 4受容体に特異的に結合するモノクローナル抗体である。例示的な態様において、CTLA - 4に特異的に結合するモノクローナル抗体は、イピリムマブ及びトレミリムマブである。モノクローナル抗体を作製する方法は当該技術分野において知られている。例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow及びLane著, CSHL Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988を参照されたい。

10

【0149】

例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、PD - 1又はそのリガンドのいずれか1種に特異的に結合するモノクローナル抗体である。例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、PD - L 1に特異的に結合するモノクローナル抗体である。例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、PD 1 - L 2に特異的に結合するモノクローナル抗体である。

20

【0150】

例示的な態様では、PD - 1に特異的に結合するモノクローナル抗体は、ニボルマブ(BMS 936558; Bristol Meyers Squibb)、ペムプロリズマブ(MK - 3475; Merck)、ピジリズマブ(CT - 011; CureTech)、ラムプロリズマブ、BMS - 936559、アテゾリズマブ又はAMP - 224(GSK / Amplimmune)、AMP 224(MedImmune); AUNP 12(Dr. Reddy's Laboratories Ltd.); BGB 108(BeiGene); MCLA 134(Merus BV); MEDI 0680(MedImmune); PDR 001(Novartis); REGN 2810(Regeneron / Sanofi); SHR 1210(Jiangsu Hengrui Medicine / Incyte); STIA 110X(Sorrento); STIA 1110(Sorrento); TSR 042(AnaptysBio / Tesaro)である。典型的な態様において、PD 1 - L 1に特異的に結合するモノクローナル抗体は、BMS - 936559(BMS / Ono)、MPDL 3280A(Roche / Genentech)、又はMEDI - 4736(MedImmune)、MSB 0010718C(Merck / Serono)、ALN - PDL(Alnylam); BGBA 317(BeiGene); KD 033(Kadmon Corp.); KY 1003(Kymab Ltd.); STIA 100X(Sorrento); STIA 1010(Sorrento); STIA 1011(Sorrento); STIA 1012(Sorrento)及びSTIA 1014(Sorrento)である。

30

40

【0151】

例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、4 - 1 B B(CD 137としても知られている)の阻害剤である。例示的な態様において、4 - 1 B Bの免疫チェックポイント阻害剤は、4 - 1 B Bに特異的に結合するモノクローナル抗体であり、BMS - 663513(Bristol - Myers Squibb)及びPF - 05082566(PF - 2566)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0152】

例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤はOX 4 0の阻害剤である。例示的な態様において、OX 4 0の阻害剤はOX 4 0に特異的に結合するモノクローナル抗体

50

である。例示的なOX40モノクローナル抗体は、Curti外, A phase I trial of monoclonal antibody to OX40 in patients with advanced cancer (要約). International Society for Biological Therapy of Cancer Annual Meeting, 2007に記載されている。

【0153】

例示的な実施形態では、チェックポイント阻害剤はLAG-3阻害剤である。例示的な態様において、LAG-3の阻害剤は、LAG-3に特異的に結合するモノクローナル抗体である。

【0154】

例示的な実施形態では、チェックポイント阻害剤は、TIM-3阻害剤である。例示的な態様において、TIM-3の阻害剤は、TIM-3に特異的に結合するモノクローナル抗体である。

【0155】

様々な実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4、CTLA-4受容体、PD-1、PD1-L1、PD1-L2、4-1BB、OX40、LAG-3、TIM-3又はそれらの組み合わせの1種以上の活性を阻害する小分子阻害剤である。

【0156】

例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤、例えばPD1又はPD-L1阻害剤は、約1~20mg/kgの範囲内の用量で投与される。例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤、例えばPD1又はPD-L1阻害剤は、約1~10mg/kgの範囲の用量で投与される。例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤、例えばPD1又はPD-L1阻害剤は、静脈内など非経口的に投与される。例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤、例えばPD1又はPD-L1阻害剤は、1~2週間ごとに投与される。例示的な態様では、免疫チェックポイント阻害剤、例えばPD1又はPD-L1を2週間に1回投与する。用量及びレジメンを調節して、被験体が例えば疲労、発疹、下痢、皮膚疾患、胃腸事象、内分泌障害を含めた有害事象を経験するのを防止する又は最小限に抑える。

【0157】

例示的な態様において、SLCポリペプチドは、免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせて投与され、任意に、SLCポリペプチドは、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列を含む。

【0158】

例示的な態様において、SLCポリペプチドをコードするSLCポリヌクレオチドを免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせて投与する。任意に、コードされたSLCポリペプチドは、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列を含む。例示的な態様では、SLCポリヌクレオチドは、ベクター、例えば組換え発現ベクターに挿入され、すなわちその一部であり、このベクターが免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせて被験体に投与される。例示的な態様において、ベクターはアデノウイルスベクターである。アデノウイルスベクターは、本明細書中に記載されるベクターのうちの任意のものであることができる。例示的な態様において、アデノウイルスベクターは、複製欠損アデノウイルスベクターである。例示的な態様では、被験体は固形腫瘍を含み、SLCポリヌクレオチドは被験体に腫瘍内投与される。別の態様において、SLCポリヌクレオチドは、被験体に対して非経口的に、例えば、静脈内又は皮下投与される。

【0159】

例示的な態様において、SLCポリペプチドをコードするSLCポリヌクレオチドを含み、発現する細胞は、免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせて投与される。例示的な態様において、細胞は細胞集団の一部であり、細胞集団はSLCポリペプチドをコードするSLCポリヌクレオチドを含み、これを発現する。例示的な態様において、細胞の集団は、免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせて投与される。例示的な態様において、細

10

20

30

40

50

胞又は細胞集団は、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列を含む S L C ポリペプチドをコードする S L C ポリヌクレオチドを含み、これを発現する。例示的な態様において、S L C ポリヌクレオチドを含みかつこれを発現する細胞又は細胞集団は、A P C 又はその集団である。例示的な態様において、S L C ポリヌクレオチドを含みかつこれを発現する細胞又は細胞集団は、樹状細胞又はその集団である。例示的な態様において、A P C、例えば樹状細胞又はその集団は、治療される被験体に対して自己由来である。このような態様では、この方法は *ex vivo* 法である。

【0160】

例示的な態様において、S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含みかつこれを発現する少なくとも約 1×10^5 個又は少なくとも約 1×10^6 個の細胞を被験体に投与する。例示的な態様では、S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含みかつこれを発現する少なくとも約 2×10^6 個の細胞、少なくとも約 3×10^6 個の細胞、少なくとも約 4×10^6 個の細胞、少なくとも約 5×10^6 個の細胞、少なくとも約 6×10^6 個の細胞、少なくとも約 7×10^6 個の細胞、 8×10^6 個の細胞、少なくとも約 9×10^6 個の細胞、少なくとも約 1×10^7 個の細胞、少なくとも約 2×10^7 個の細胞、又は少なくとも約 3×10^7 個の細胞を被験体に投与する。例示的な態様では、細胞は所定の時間内に十分な量の S L C を産生する。例示的な態様では、細胞は、24 時間内に 1×10^6 個の細胞当たり少なくとも約 0.10 ng の S L C を産生する。例示的な態様では、細胞は、24 時間以内に 1×10^6 個の細胞当たり少なくとも約 0.15 ng の S L C を産生する。例示的な態様では、細胞は、24 時間以内に 1×10^6 個の細胞当たり少なくとも約 0.20 ng の S L C を産生する。例示的な態様では、細胞は、24 時間以内に 1×10^6 個の細胞当たり少なくとも約 0.25 ng の S L C を産生する。例示的な態様では、細胞は、24 時間以内に 1×10^6 個の細胞当たり少なくとも約 0.30 ng の S L C を産生する。例示的な態様では、細胞は、24 時間以内に 1×10^6 個の細胞当たり少なくとも約 0.35 ng の S L C を産生する。例示的な態様では、細胞は、24 時間以内 1×10^6 個の細胞当たり少なくとも約 0.40 ng の S L C を産生する。例示的な態様では、細胞は、24 時間以内に 1×10^6 細胞当たり少なくとも約 0.45 ng の S L C を産生する。例示的な態様では、細胞は、24 時間以内に 1×10^6 個の細胞当たり少なくとも約 0.50 ng の S L C を産生する。例示的な態様では、 $1 \sim 3000$ 万個の細胞は、24 時間以内に 1×10^6 個の細胞当たり約 0.2 ~ 0.45 ng (例えば、0.292 ng ~ 約 0.413 ng) の S L C を産生する。

【0161】

例示的な態様では、本明細書に記載された S L C ポリペプチド、S L C 変異体、S L C 断片、S L C アナログ、S L C 誘導体、該ポリペプチド、変異体若しくは断片をコードする S L C ポリヌクレオチド及び / 又は S L C 剤を、免疫チェックポイント阻害剤の投与前に投与する。例示的な態様では、本明細書に記載された S L C ポリペプチド、S L C 変異体、S L C 断片、S L C アナログ、S L C 誘導体、該ポリペプチド、変異体若しくは断片をコードする S L C ポリヌクレオチド及び / 又は S L C 剤を、約 1 日、約 2 日、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、約 1 週間、約 2 週間、約 3 週間又は約 4 週間投与することができる。

【0162】

例示的な態様では、本明細書に記載された S L C ポリペプチド、S L C 変異体、S L C 断片、S L C アナログ、S L C 誘導体、該ポリペプチド、変異体若しくは断片をコードする S L C ポリヌクレオチド及び / 又は S L C 剤は、免疫チェックポイント阻害剤の投与後に投与される。例示的な態様では、本明細書に記載された S L C ポリペプチド、S L C 変異体、S L C 断片、S L C アナログ、S L C 誘導体、該ポリペプチド、変異体若しくは断片をコードする S L C ポリヌクレオチド及び / 又は S L C 剤は、免疫チェックポイント阻害剤の投与の約 1 日、約 2 日、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、約 1 週間、約 2 週間、約 3 週間又は約 4 週間後に投与される。

【0163】

例示的な態様では、本明細書に記載された S L C ポリペプチド、S L C 変異体、S L C 断片、S L C アナログ、S L C 誘導体、該ポリペプチド、変異体若しくは断片をコードする S L C ポリヌクレオチド及び／又は S L C 剤は、免疫チェックポイント阻害剤と同時に投与される。様々な実施形態において、これらの薬剤は、別々の処方で投与され、かつ、同時に投与され、ここで、「同時に」とは、複数の薬剤を互いに 30 分以内に投与することをいう。また、S L C 組成物及びチェックポイント阻害剤を、第 2 薬剤、例えば、S L C 組成物及び／又はチェックポイント阻害剤のいずれかと共に投与する前に、S L C 組成物及び／又はチェックポイント阻害剤のいずれかと共に投与した後に、又は S L C 組成物及び／又はチェックポイント阻害剤のいずれかと同時に投与することができる化学療法剤と共に投与する方法も提供する。

10

【0164】

様々な実施形態において、S L C 剤及びチェックポイント阻害剤は、同じ処方で同時に与えることができると考えられる。

【0165】

例示的な態様では、本明細書に記載された S L C ポリペプチド、S L C 変異体、S L C 断片、S L C アナログ、S L C 誘導体、該ポリペプチド、変異体若しくは断片をコードする S L C ポリヌクレオチド及び／又は S L C 剤を、免疫チェックポイント阻害剤の投与前後に投与する。例示的な態様では、本明細書に記載された S L C ポリペプチド、S L C 変異体、S L C 断片、S L C アナログ、S L C 誘導体、該ポリペプチド、変異体若しくは断片をコードする S L C ポリヌクレオチド及び／又は S L C 剤を、免疫チェックポイント阻害剤の投与前、免疫チェックポイント阻害剤の投与後、及び免疫チェックポイント阻害剤と同時に投与する。

20

【0166】

例示的な態様では、(i) S L C ポリペプチド、(i i) S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、(i i i) ポリヌクレオチドを含む細胞又は (i v) それらの組み合わせを、被験体に 2 回以上投与する。典型的な態様では、(i) S L C ポリペプチド、(i i) S L C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、(i i i) ポリヌクレオチドを含む細胞又は (i v) それらの組み合わせを、被験体に対して、1 週間に 2 回、1 週間に 1 回、2 週間に 1 回、3 週間に 1 回又は毎月 1 回投与する。例示的な態様では、免疫チェックポイント阻害剤を被験体に 2 回以上投与する。典型的な態様では、免疫チェックポイント阻害剤を、被験体に対して 1 週間に 2 回、1 週間に 1 回、2 週間に 1 回、3 週間に 1 回又は毎月 1 回投与する。

30

【0167】

例示的な態様において、被験体は固形腫瘍を含み、細胞は被験体に腫瘍内投与される。別の態様では、細胞は、被験体に対して非経口的に、例えば静脈内又は皮下投与される。

【0168】

典型的な態様では、この方法は、被験体に対して、免疫チェックポイント阻害剤を約 1 ~ 約 20 mg / kg の用量で約 2 週間に 1 回静脈内投与し、被験体に対して、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列を含む S L C ポリペプチドをコードする S L C ポリヌクレオチドを含みかつこれを発現する約 1 ~ 約 3 , 0 0 0 万個の細胞を腫瘍内投与することを含む。典型的な態様では、この方法は、被験体に対して、免疫チェックポイント阻害剤を約 1 ~ 約 20 mg / kg の用量で約 2 週間に 1 回静脈内投与し、及び、被験体に対して、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列を含む S L C ポリペプチドをコードする S L C ポリヌクレオチドを腫瘍内投与することを含む。例示的な態様において、細胞又は S L C ポリペプチドを、被験体に対して、免疫チェックポイント阻害剤の最初の投与の約 2 週間前に投与する。典型的な態様において、細胞又は S L C ポリペプチドを、被験体に対して、細胞又は S L C ポリペプチドの最初の投与後毎月投与する。例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤を、免疫チェックポイント阻害剤の最初の投与後の 2 週間目に開始して 2 週間毎に投与する。

40

【0169】

50

例示的な態様において、この方法は、被験体において癌又は固形腫瘍を治療する方法である。癌は、本明細書に記載される又は当該分野において知られている癌のいずれかとしてすることができる。例示的な態様において、癌は、急性リンパ球性癌、急性骨髄性白血病、肺胞性横行性肉腫、骨癌、脳腫瘍、乳癌、肛門癌、肛門管又は肛門直腸癌、眼癌、肝内胆管癌、関節の癌、頸部、胆嚢又は胸膜の癌、鼻、鼻腔又は中耳の癌、口腔癌、外陰部の癌、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、結腸癌、食道癌、子宮頸癌、胃腸カルチノイド腫瘍、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、腎臓癌、喉頭癌、肝癌、肺癌、悪性中皮腫、メラノーマ、多発性骨髄腫、鼻咽頭癌、非ホジキンリンパ腫、卵巣癌、膵臓癌、腹膜、大網及び腸間膜癌、咽頭癌、前立腺癌、直腸癌、腎臓癌（例えば、腎細胞癌（RCC））、小腸癌、軟組織癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、尿管癌、及び膀胱癌よりなる群から選択される。特定の態様において、癌は、頭部及び頸部癌、卵巣癌、子宮頸癌、膀胱癌及び食道癌、膵臓癌、胃腸癌、乳癌、子宮内膜癌及び結腸直腸癌、肝細胞癌、グリア芽細胞腫、膀胱癌、肺癌、例えば、非小細胞肺癌（NSCLC）、気管支肺癌よりなる群より選択される。

【0170】

典型的な態様における固形腫瘍は、次の固形腫瘍である：腫瘍型データの状況急性骨髄性白血病（AML）、乳癌（BRCA）、発色団腎細胞癌（KICH）、明確な細胞腎癌（KIRC）、結腸及び直腸腺癌（COAD、READ）、皮膚黒色腫（SKCM）、多形性膠芽腫（GBM）、頭頸部扁平上皮癌（HNSC）、低悪性度グリオーマ（LGG）、肺腺癌（LUAD）、肺扁平上皮癌（LUSC）、卵巣漿液性嚢胞腺腫（OV）、乳頭状甲状腺癌（THCA）、胃腺癌（STAD）、前立腺腺癌（PRAD）、子宮体部子宮体癌（UCEC）、尿路上皮膀胱癌（BLCA）、乳頭状腎癌（KIRP）、肝臓肝細胞癌（LIHC）、子宮頸癌（CESC）、子宮癌肉腫（UCS）、副腎皮質癌（ACC）、食道癌（ESCA）、褐色細胞腫及びパラガングリオーマ（PCPG）、膵管腺癌（PAAD）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBC）、胆管癌（CHOL）、中皮腫（MESO）、肉腫（SARC）、精巣生殖細胞癌（TGCT）、白質黒色腫（UVM）。例示的な態様において、固形腫瘍は肺腫瘍である。例示的な態様において、固形腫瘍は非小細胞肺癌（NSCLC）固形腫瘍である。

【0171】

本発明の方法において有用なSLCポリペプチド、SLCポリペプチド変異体、SLCポリペプチド断片、該ポリペプチド、変異体及び断片をコードするSLCポリヌクレオチド並びにSLC剤は、哺乳動物への投与に適した医薬組成物に配合できる。ここで使用するとき、用語「哺乳動物」とは、ヒト、ウシ、ウマ、イヌ及びネコを含めて、哺乳動物として分類される任意の哺乳動物をいう。本発明の好ましい実施形態では、哺乳動物はヒトである。このような組成物は、典型的には、少なくとも1種のSLCポリペプチド、SLCポリペプチド変異体、SLCポリペプチド断片、該ポリペプチド、変異体若しくは断片をコードするSLCポリヌクレオチド、SLC剤、又はその組み合わせと、薬学的に許容されるキャリアを含む。薬学的投与のために本発明のSLC化合物を処方するための方法は当業者に知られている。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第19版、Gennaro（著）1995, Mack Publishing Company, Easton, PAを参照されたい。

【0172】

ここで使用するとき、用語「薬学的に許容されるキャリア」には、薬学的投与に適合する任意の及び全ての溶媒、分散媒、被覆剤、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などが含まれるものとする。薬学的に活性な物質のために当該媒体及び薬剤を使用することは当該技術分野において周知である。任意の従来の媒体又は薬剤が活性化化合物と不相溶性である場合を除いて、このような媒体は、本発明の組成物において使用できる。追加の活性化化合物も組成物に配合できる。本発明の医薬組成物は、その目的の投与経路に適合するように処方される。

10

20

30

40

50

【 0 1 7 3 】

投与経路は所望の結果に応じて変わる。一般に、免疫応答の開始のために、炎症又は応答の所望の部位又はその付近での薬剤の注入が利用される。あるいは、疾患の状態に応じて他の投与経路を確保することもできる。すなわち、新生物又は腫瘍増殖の抑制のために、腫瘍部位又は付近での医薬組成物の注入が好ましい。あるいは、移植片拒絶の予防のために、全身投与を使用してもよい。

【 0 1 7 4 】

同様に、自己免疫疾患の治療又は予防のためには、全身投与が好ましい場合がある。全身投与の経路の例としては、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（局所）、経粘膜及び直腸投与が挙げられる。非経口、皮内又は皮下適用に使用される溶液又は懸濁液は、次の成分を含むことができる：注射用水、生理食塩水などの滅菌希釈剤；固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールその他の合成溶媒；ベンジルアルコール又はメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸又は重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤；EDTAなどのキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩などの緩衝剤、及び塩化ナトリウム又はデキストロースのような張性調整剤が挙げられる。

【 0 1 7 5 】

一実施形態では、医薬組成物は、SLCタンパク質又はSLCタンパク質の発現に適したDNA構築物を含む徐放性製剤又はマトリックスを介して、身体内の部位又はその周囲に送達できる。このようにして、所望の移植部位に一時的にリンパ節を作製して免疫応答を開始する樹状細胞及びT細胞を誘引することができる。

【 0 1 7 6 】

医薬組成物を、投与のための説明書と共に容器、パック又はディスペンサーに含めることができる。その結果、疾患の兆候、症状若しくは原因が軽減し及び／又は生物学的系の任意の他の所望の改変が生じることができる。SLCポリペプチド、SLCポリペプチド変異体、SLCポリペプチド断片、該SLCポリペプチド、変異体及び断片をコードするポリヌクレオチド、並びにSLC剤を含む本発明の薬学的組成物は、治療上有効な量で投与される。「治療有効量」とは、所望の生物学的結果（例えば、免疫応答の増強）を誘導するのに十分な非毒性投与量レベルをいう。癌の場合、薬剤の治療有効量は、癌細胞の数を減少させることができ；腫瘍のサイズを縮小させることができ；末梢器官への癌細胞の浸潤を阻害する（すなわち、ある程度まで遅らせ、好ましくは停止させる）ことができ；腫瘍転移を阻害する（すなわち、ある程度まで遅らせさせ、好ましくは停止させる）ことができ；腫瘍成長をある程度阻害することができる；及び／又は疾患に関連する1以上の症状をある程度緩和することができる。薬剤が既存の癌細胞の増殖を防止し及び／又は死滅させることができる範囲で、該薬剤は細胞増殖抑制性及び／又は細胞傷害性としてすることができる。癌治療の場合、生体内での有効性は、例えば、腫瘍の負荷又は量、疾患進行までの時間（TTP）及び／又は応答率（RR）の決定によって測定できる。

【 0 1 7 7 】

投与量は、所望の活性、治療される哺乳動物の疾患状態、投与形態、投与方法、患者の因子、例えば年齢、性別、及び疾患の重篤度に基づいて変更できる。治療有効量は、広範囲の濃度で提供されると認められる。このような範囲は、結合アッセイ、走化性アッセイ及び生体内アッセイに基づいて決定できる。

【 0 1 7 8 】

投与レジメンは様々であることができる。薬剤の単回注射や複数回注射を使用することができる。同様に、発現ベクターは、薬剤の連続発現のために標的部位で使用できる。このようなレジメンは、疾患の重篤度及び所望の結果に依存して変化する。好ましい実施形態では、SLC又はLC組成物は、腫瘍又は腫瘍部位に直接注射される。腫瘍周囲部位とは、腫瘍の外縁から約15cm未満の部位を意味する。非常に好ましい実施形態において、SLC又はSLC組成物は、腫瘍の近位にあるリンパ節に注射される。SLC投与は、1以上の部位に行うことができる。好ましくは、SLC投与は、腫瘍内及び／又は腫瘍周

10

20

30

40

50

辺の複数の部位で行う。

【0179】

S L C ポリペプチドは、好ましくはキャリア、好ましくは薬学的に許容されるキャリア中で哺乳動物に投与される。好適なキャリア及びそれらの処方物は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, 1980, Mack Publishing Co., Oslo 外編に記載されている。典型的には、適量の薬学的に許容される塩を製剤に使用して製剤を等張にする。キャリアの例としては、生理食塩水、リンゲル液及びデキストロース溶液が挙げられる。溶液のpHは、好ましくは約5~約8、より好ましくは約7~約7.5である。さらなるキャリアとしては、例えばS L C ポリペプチドを含む固体疎水性重合体の半透性マトリックスなどの徐放性製剤が挙げられ、このマトリックスは成形品、例えばフィルム、リポソーム又は微粒子の形態である。当業者であれば、所定のキャリアが、例えば投与経路及び投与されるS L C ポリペプチドの濃度に依存することがさらに好ましいことは明らかであろう。

10

【0180】

S L C ポリペプチドは、注射（例えば、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、門脈内）によって、又は効果的な形態で血流への送達を確実にする注入などの他の方法によって哺乳動物に投与できる。S L C ポリペプチドを単離組織灌流などの単離灌流技術によって投与して、局所治療効果を発揮することもできる。局所又は静脈内注射が好ましい。

【0181】

S L C ポリペプチドを投与するのに有効な投薬量及びスケジュールは経験的に（例えば、本明細書に開示されるモデルを使用して）決定でき、このような決定を行うことは当業者の範囲内である。当業者であれば、投与されなければならないS L C ポリペプチドの投与量は、例えば、S L C ポリペプチドを受け入れる哺乳動物、投与経路、使用される特定のタイプの分子（例えば、ポリペプチド、ポリヌクレオチド等）及び哺乳動物に投与される他の薬物に依存して変化する。

20

【0182】

上記のように、S L C ポリペプチドは、連続的に又は1種以上の他の治療剤と同時に投与できる。この分子及び治療剤の量は、例えば、使用される薬物のタイプ、治療される病理学的状態、投与スケジュール及び投与経路に依存するが、一般的に、個々に使用される場合よりも少ないであろう。また、アンタゴニスト又はブロックングS L C 抗体も治療において使用できると考えられる。例えば、S L C 抗体を哺乳動物（上記のようなもの）に投与してS L C 受容体結合をブロックすることができる。

30

【0183】

哺乳動物へのS L C ポリペプチドの投与後に、哺乳動物の生理学的状態を当業者に周知の様々な方法でモニターすることができる。本発明のS L C ポリペプチドの治療効果は、試験管内アッセイにおいて及び生体内動物モデルを使用して試験できる。様々な周知の動物モデルを用いて、例えば免疫関連疾患や癌の発症及び病因におけるS L C の役割をさらに理解し、候補治療剤の有効性を試験することができる。このようなモデルの生体内での性質は、ヒト患者における応答を特に予測するのを可能にする。免疫関連疾患の動物モデルとしては、非組換え動物及び組換え（トランスジェニック）動物の両方が挙げられる。非組換え動物モデルとしては、例えば、ネズミモデルなどのげっ歯類が挙げられる。このようなモデルは、標準的な技術、例えば皮下注射、尾静脈注射、脾臓移植、腹腔内移植及び腎被膜下の移植を使用して同系マウスに細胞を導入することによって生成できる。

40

【0184】

本発明のさらなる実施形態では、病理学的状態の治療又はS L C の検出若しくは精製に有用な物質を含有する製品及びキットが提供される。製品は、ラベル付きの容器を備える。適切な容器としては、例えば、ボトル、バイアル及び試験管が挙げられる。容器は、ガラスやプラスチックなどの様々な材料から形成できる。容器は、癌などの病的状態の治療に有効な活性剤を有する組成物を保持する。組成物中の活性剤は、好ましくはS L C である。容器上のラベルは、組成物が病理学的状態の治療又はS L C の検出若しくは精製に使

50

用されることを示し、また、上記のような生体内又は試験管内使用のための指示を示すこともできる。

【0185】

本発明のキットは、上記の容器と、緩衝剤を含む第2容器とを備える。このものは、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジ及び使用説明書付きの添付文書を含めて、商業的観点及びユーザーの観点から望ましい他の物質をさらに含むことができる。

【0186】

例示的な態様において、キットは、(i) SLCポリペプチド、(ii) 該SLCポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、(iii) 該ポリヌクレオチドを含む細胞又は(iv) それらの組み合わせ、及び免疫チェックポイント阻害剤を含む。例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤はCTLA-4の阻害剤である。例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤はCTLA-4受容体の阻害剤である。例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤はPD-1の阻害剤である。例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、PD1-L1及びPD1-L2を含む任意のPD-1リガンドの阻害剤である。

【0187】

様々な実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4、CTLA-4受容体、PD-1、PD1-L1、PD1-L2、4-1BB、OX40、LAG-3、TIM-3又はそれらの組み合わせの1種以上に対して特異的な抗体、任意にモノクローナル抗体である。

【0188】

様々な実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4、CTLA-4受容体、PD-1、PD1-L1、PD1-L2、4-1BB、OX40、LAG-3、TIM-3又はそれらの組み合わせの1種以上の活性を阻害する小分子阻害剤である。

【0189】

例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4又はCTLA-4受容体に特異的に結合するモノクローナル抗体である。例示的な態様において、CTLA-4に特異的に結合するモノクローナル抗体は、イピリムマブ又はトレミリムマブである。

【0190】

例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1に特異的に結合するモノクローナル抗体又はそのリガンドのいずれか1種である。例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-L1に特異的に結合するモノクローナル抗体である。例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、PD1-L2に特異的に結合するモノクローナル抗体である。

【0191】

例示的な態様では、PD-1に特異的に結合するモノクローナル抗体は、ニボルマブ(BMS936558; Bristol Meyers Squibb)、ペムブロリズマブ(MK-3475; Merck)、ピジリズマブ(CT-011; CureTech)、ラムプロリズマブ、BMS-936559、アテゾリズマブ又はAMP-224(GSK/Amplimmune)、AMP224(MedImmune); AUNP12(Dr. Reddy's Laboratories Ltd.); BGB108(BeiGene); MCLA134(Merus BV); MEDI0680(MedImmune); PDR001(Novartis); REGN2810(Regeneron/Sanofi); SHR1210(Jiangsu Hengrui Medicine/Incyte); STIA110X(Sorrento); STIA1110(Sorrento); TSR042(AnaptysBio/Tesaro)である。

【0192】

例示的な態様において、PD1-L1に特異的に結合するモノクローナル抗体は、BMS-936559(BMS/Ono)、MPDL3280A(Roche/Genent

10

20

30

40

50

ech)、又はMEDI-4736(MedImmune)、MSB0010718C(Merck/Serono)、ALN-PDL(Alnylam); BGBA317(BeiGene); KD033(Kadmon Corp.); KY1003(Kymab Ltd.); STIA100X(Sorrento); STIA1010(Sorrento); STIA1011(Sorrento); STIA1012(Sorrento)及びSTIA1014(Sorrento)である。

【0193】

例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、4-1BB(CD137としても知られている)の阻害剤である。例示的な態様において、4-1BBの免疫チェックポイント阻害剤は、4-1BBに特異的に結合するモノクローナル抗体であり、BMS-663513が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0194】

例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤はOX40の阻害剤である。例示的な態様において、OX40の阻害剤はOX40に特異的に結合するモノクローナル抗体である。例示的なOX40モノクローナル抗体は、Curti外, A phase I trial of monoclonal antibody to OX40 in patients with advanced cancer(要約). International Society for Biological Therapy of Cancer Annual Meeting, 2007に記載されている。

【0195】

20

例示的な実施形態では、チェックポイント阻害剤はLAG-3阻害剤である。例示的な態様において、LAG-3の阻害剤は、LAG-3に特異的に結合するモノクローナル抗体である。

【0196】

例示的な実施形態では、チェックポイント阻害剤は、TIM-3阻害剤である。例示的な態様において、TIM-3の阻害剤は、TIM-3に特異的に結合するモノクローナル抗体である。

【0197】

例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤、例えばPD1又はPD-L1阻害剤は、約1~20mg/kgの用量でキットに提供される。例示的な態様では、免疫チェックポイント阻害剤、例えばPD1又はPD-L1阻害剤は、約1~10mg/kgの用量でキットに提供される。例示的な態様において、免疫チェックポイント阻害剤、例えばPD1又はPD-L1阻害剤は、非経口、例えば、静脈内投与に適した形態でキットに提供される。

30

【0198】

典型的な態様において、キットは、SLCポリペプチド及び免疫チェックポイント阻害剤を含み、必要に応じて、SLCポリペプチドは、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列を含む。

【0199】

例示的な態様において、キットは、SLCポリペプチドをコードするSLCポリヌクレオチド及び免疫チェックポイント阻害剤を含む。場合により、コードされたSLCポリペプチドは、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列を含む。例示的な態様において、SLCポリヌクレオチドは、ベクター、例えば組換え発現ベクターに挿入されるため、ベクターの一部であり、このベクターは本発明のキットの一部である。例示的な態様において、ベクターはアデノウイルスベクターである。アデノウイルスベクターは、本明細書に記載されるベクターのうちの任意のものであることができる。例示的な態様において、アデノウイルスベクターは、複製欠損アデノウイルスベクターである。例示的な態様において、SLCポリヌクレオチドは、腫瘍内投与に適した形態でキットに提供される。別の態様では、SLCポリヌクレオチドは、非経口、例えば、静脈内投与に適した形態でキットに提供される。

40

50

【0200】

例示的な態様において、キットは、SLCポリペプチドをコードするSLCポリヌクレオチドを含みかつこれを発現する細胞と免疫チェックポイント阻害剤とを含む。例示的な態様において、細胞は細胞集団の一部であり、細胞集団はSLCポリペプチドをコードするSLCポリヌクレオチドを含みかつこれを発現する。例示的な態様において、細胞の集団は、免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせて投与される。例示的な態様において、細胞又は細胞集団は、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列を含むSLCポリペプチドをコードするSLCポリヌクレオチドを含みかつ発現する。例示的な態様において、SLCポリヌクレオチドを含みかつ発現する細胞又は細胞集団は、APC又はその集団である。例示的な態様において、SLCポリヌクレオチドを含みかつ発現する細胞又は細胞集団は、樹状細胞又はその集団である。

10

【0201】

例示的な局面では、SLCポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含みかつ発現する少なくとも約 1×10^5 個又は少なくとも約 1×10^6 個の細胞がキットに提供される。例示的な態様では、SLCポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含みかつ発現する少なくとも約 2×10^6 個の細胞、少なくとも約 3×10^6 個の細胞、少なくとも約 4×10^6 個の細胞、少なくとも約 5×10^6 個の細胞、少なくとも約 6×10^6 個の細胞、少なくとも約 7×10^6 個の細胞、 8×10^6 個の細胞、少なくとも約 9×10^6 個の細胞、少なくとも約 1×10^7 個の細胞、少なくとも約 2×10^7 個の細胞、又は少なくとも約 3×10^7 個の細胞がキットに提供される。例示的な態様では、細胞は所定の時間内に十分な量のSLCを産生する。

20

【0202】

例示的な態様において、細胞は、24時間以内に 1×10^6 個の細胞あたり少なくとも約0.10 ngのSLCを産生する。例示的な態様において、細胞は、24時間以内に 1×10^6 個の細胞あたり少なくとも約0.15 ngのSLCを産生する。例示的な態様において、細胞は、24時間以内に 1×10^6 個の細胞あたり少なくとも約0.20 ngのSLCを産生する。例示的な態様において、細胞は、24時間以内に 1×10^6 個の細胞あたり少なくとも約0.25 ngのSLCを産生する。例示的な態様において、細胞は、24時間以内に 1×10^6 個の細胞あたり少なくとも約0.30 ngのSLCを産生する。例示的な態様において、細胞は、24時間以内に 1×10^6 個の細胞あたり少なくとも約0.35 ngのSLCを産生する。例示的な態様において、細胞は、24時間以内に 1×10^6 個の細胞あたり少なくとも約0.40 ngのSLCを産生する。例示的な態様において、細胞は、24時間以内に 1×10^6 個の細胞あたり少なくとも約0.45 ngのSLCを産生する。例示的な態様において、細胞は、24時間以内に 1×10^6 個の細胞あたり少なくとも約0.50 ngのSLCを産生する。

30

【0203】

本発明の例示的な実施形態

本明細書で開示される発明は多くの実施形態を有する。本発明の好ましい実施形態は、哺乳動物又は哺乳動物由来の細胞集団において、細胞集団を、本明細書に記載されるトランスジェニックマウスモデルにおいて生じる自発性癌腫細胞などの同系腫瘍細胞の増殖を阻害するのに十分な量の二次リンパ組織ケモカイン(SLC)に曝露することによってサイトカイン発現を達成又は調節する(例えば、既存のサイトカインプロファイルを変化させる)方法である。ここに開示されるように、本明細書に開示される同系モデルは、SLCの添加がどのようにサイトカイン発現を協調的に調節し、かつ、腫瘍細胞の増殖を阻害するかを示すため、これらの現象の観察(サイトカイン発現の調節及び腫瘍増殖の阻害)は見込まれる免疫刺激性又は免疫阻害性試験化合物の効果を評価するように設計された細胞系アッセイで使用できる。例えば、本明細書で提供される開示は、試験化合物がSLCのサイトカイン発現調節能力に及ぼす影響を試験すること、及び有利な態様でサイトカインプロファイルを調節する化合物を同定することを可能にする。

40

【0204】

50

本明細書に記載の方法は、多くの状況で使用する事ができる。例えば、上記の方法は、サイトカインプロファイルを調節する能力を有する化合物の効果を調査したときに連続的に実施できる。このような本発明の一実施形態では、所定の癌モデルにおけるSLCに
10 応答するサイトカインプロファイル（及び／又は腫瘍増殖の阻害）を最初に調査して、その特定の状況におけるSLCの効果を決定する。その後、そのモデルにおけるSLCの効果を確認するために、このようなアッセイの結果を、SLCが既知の癌モデル（例えば、本明細書に記載のトランスジェニックマウスモデル）に及ぼす影響と比較することができる。次に、SLCの代わりに試験化合物を使用してこの方法の変形を繰り返し、次いでモデルにおける試験化合物に対する応答を有するサイトカインプロファイルを調べて、SLCと類似又は非類似の生理学的効果を生じることのできる分子を同定する（例えば、特定の
15 方法でサイトカインプロファイル及び／又は腫瘍増殖の阻害を調節する）。関連する実施形態では、試験化合物がいくつかの臨床的適用性を有するようにSLCの効果を調節して、例えば、サイトカインプロファイルを、腫瘍増殖の阻害を向上させ、より少ない副作用で成長の阻害を可能にするように調節する場合には、SLC及び試験化合物を同時に添加することができる。これらのモデルがサイトカインプロファイル及び／又は腫瘍増殖の阻害を測定しかつ比較するときに、これらのものがリンクされていることが示されているので、モデルは新たな興味のある分子の同定及び解剖が細胞生理学に及ぼす影響を容易にする内部基準を提供する。

【0205】

これらの方法は、治療法と平行しているため、特に有用な臨床モデルを提供する。具体的には、SLCによる癌の治療は、哺乳動物又は哺乳類由来の所定の細胞集団において、細胞集団を、同系腫瘍細胞の増殖を阻害するのに十分な量の二次リンパ組織ケモカイン（SLC）ポリペプチドに曝露することによってサイトカイン発現を達成又は調節する（例えば、既存のサイトカインプロファイルを変化させる）方法を必要とする。このような臨床状況において、所定の系におけるSLCの効果は、多数の方法で観察又は監視でき、例えば、SLCの効果を、サイトカインプロファイルの変化の評価、腫瘍増殖又は腫瘍死滅の阻害の評価（例えば、腫瘍サイズの減少及び／又は腫瘍及び／又は腫瘍増殖に伴う症状の重症度の低下を観察することによる）、生存率の増加（本明細書に開示されるトランス
20 ジェニックマウスモデルで観察されるとき）などによって観察できる。

【0206】

本発明のこの実施形態の特定の実施形態は、腫瘍細胞の増殖を阻害するのに十分な量の二次リンパ系組織ケモカイン（SLC）ポリペプチドに細胞集団を曝露し、その後この方法を繰り返し、小分子又はポリペプチド剤からなる試験化合物に細胞集団を暴露することを含む、CD8陽性T細胞、CD4陽性T細胞、抗原提示細胞、及び腫瘍細胞を含めた同系哺乳動物細胞の集団におけるインターフェロン-（IFN-）ポリペプチドの発現の増加及び形質転換成長因子-（TGF-）ポリペプチドの発現の減少を達成する方法である。次いで、これらのアッセイからのデータを比較して、試験化合物がIFN-ポリペプチドの発現又はTGF-ポリペプチドの発現に及ぼす効果を観察することができる。
30

【0207】

当該分野で知られている任意の分子は、所定のサイトカインのレベルの変化によって検出されるSLCの活性を模倣又は調節（増加又は減少）するその能力について試験できる。SLC活性を模倣又は調節する分子を同定するために、サイトカイン発現の変化を検出するために候補分子を生体内又は試験管内で細胞又は被験体に直接与えることができる。さらに、当該分野で公知の任意の鉛活性化剤又は阻害剤構造を、本発明のスクリーニング及び治療方法と組み合わせて使用することができる。このような構造は、例えば、SLCの活性化剤及び／又は阻害剤の開発を助けるために使用できる。
40

【0208】

この本発明の態様は、サイトカインレベルの変化によって測定されるSLCの活性を調節する、例えば、阻害する、拮抗する、又は作用する、又は模倣する分子の化学的ライブ
50

ライブラリーをスクリーニングするのに適している。この化学ライブラリーは、ペプチドライブラリー、ペプチド模倣ライブラリー、化学合成ライブラリー、組換え、例えばファージディスプレイライブラリー、及び試験管内翻訳ベースライブラリー、他の非ペプチド合成有機ライブラリーなどとすることができる。

【0209】

例示的なライブラリーは、いくつかの供給元 (ArQule、Tripos/Panlabs、ChemDesign、Pharmacopeia) から市販されている。場合によっては、これらの化学的ライブラリーは、メンバー化合物が結合している基質上のライブラリーの各メンバーの同一性をコードするコンビナトリアルストラテジーを用いて生成されるため、有効なモジュレーターである分子の直接的かつ即時の同定が可能になる。したがって、多くのコンビナトリアルアプローチにおいて、化合物のプレート上の位置は、その化合物の組成を特定する。また、一例では、単一のプレート位置は、目的の相互作用を含むウェルへの投与によってスクリーニングできる1~20種の化学物質を有することができる。したがって、調節が検出された場合には、相互作用対の一層小さなプールを調節活性についてアッセイすることができる。このような方法により、多くの候補分子をスクリーニングすることができる。

10

【0210】

使用に適した多くの多様性ライブラリーが当該分野において公知であり、かつ、本発明に従って試験される化合物を提供するために使用できる。あるいは、標準的な方法を用いてライブラリーを構築することができる。化学(合成)ライブラリー、組換え発現ライブラリー、又はポリソーム系ライブラリーは、使用できる例示的なタイプのライブラリーである。

20

【0211】

ライブラリーは、拘束性若しくは半剛性(ある程度の構造剛性を有する)又は線状若しくは非拘束性であることができる。ライブラリーは、cDNA又はゲノム発現ライブラリー、ランダムペプチド発現ライブラリー又は化学的に合成されたランダムペプチドライブラリー、又は非ペプチドライブラリーとすることができる。発現ライブラリーはアッセイが行われる細胞に導入され、そこでライブラリーの核酸が発現してそのコードされたタンパク質を産生する。

【0212】

一実施形態では、本発明で 사용할 ことができるペプチドライブラリーは、試験管内で化学的に合成されるライブラリーとすることができる。このようなライブラリーの例としては、各ペプチド中の第1及び第2残基が個々に及び特異的に定義された遊離のヘキサペプチドの混合物を記載するHoughten外, 1991, Nature 354: 84-86; 収集中に各ビーズがその上にアミノ酸残基の単一のランダムな配列を固定したペプチドライブラリーを固相スプリット合成スキームが産生する「1ビーズ、1ペプチド」アプローチを記載するLam外, 1991, Nature 354: 82-84; スプリット合成法及びT-バグ合成法を記載するMedynski, 1994, Bio/Technology 12: 709-710; Gallop外, 1994, J. Medicinal Chemistry 37(9): 1233-1251が挙げられる。単なる他の例として、コンビナトリアルライブラリーは、Ohlmeyer外, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10922-10926; Erb外, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422-11426; Houghten外, 1992, Biotechniques 13: 412; Jayawickreme外, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 1614-1618; 又はSalmon外, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11708-11712の方法に従って使用のために調製できる。PCT出願公開第WO93/20242及びBrenner及びLerner, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5381-5383には、各化学重合体ライブラリーメンバーについてのオリゴヌクレオチド識別子を含む「

30

40

50

コードされたコンビナトリアル化学ライブラリー」が記載されている。

【0213】

好ましい実施形態では、スクリーニングされたライブラリーは、ランダムペプチドファミリーディスプレイライブラリーである生物学的発現ライブラリーであり、その際、ランダムペプチドは制約される（例えば、ジスルフィド結合を有することにより）。

【0214】

さらに、より一般的な構造的に制約された有機多様性（例えば、非ペプチド）ライブラリーも使用することができる。一例として、ベンゾジアゼピンライブラリー（例えば、Bunnell外，1994，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4708-4712を参照）を使用することができる。

10

【0215】

立体構造的に制約されたライブラリーとしては、酸化環境においてジスルフィド結合によって架橋してシステインを形成する不変システイン残基を含むもの、修飾ペプチド（例えば、フッ素、金属、同位体標識を取り込む、リン酸化されるなど）、1種以上の非天然アミノ酸を含むペプチド、非ペプチド構造、及びカルボキシグルタミン酸の有意な画分を含むペプチドを使用することができるが、これらに限定されない。

【0216】

非ペプチド、例えばペプチド誘導体（例えば、1種以上の非天然アミノ酸を含む）のライブラリーを使用することもできる。これらの一例はペプチドライブラリーである（Simon外，1992，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9367-9371）。ペプチドは、アルファ炭素ではなく主鎖アミノ窒素に結合した天然型側鎖を有する非天然アミノ酸の重合体である。ペプチドはヒトの消化酵素によって容易には分解されないため、有利には薬物使用に容易に適合できる。ペプチド中のアミド官能基がペルメチル化されて化学的に変性されたコンビナトリアルライブラリーを生成した、使用できるライブラリーの別の例は、Ostresh外，1994，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11138-11142に記載されている。

20

【0217】

本発明に従ってスクリーニングすることができるペプチドライブラリーのメンバーは、20種の天然アミノ酸を含むことに限定されない。特に、化学的に合成されたライブラリー及びポリソーム系ライブラリーは、20種の天然アミノ酸のほかにアミノ酸を使用することを可能にする（ライブラリー産生で使用される前駆体プールに含ませることによって）。特定の実施形態では、ライブラリーメンバーは、1種以上の非天然又は非古典的アミノ酸又は環状ペプチドを含む。非古典的アミノ酸としては、一般的なアミノ酸のD-異性体、 β -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸； ϵ -Abu、 ϵ -Ahx、6-アミノヘキサニン酸；Aib、2-アミノイソ酪酸；3-アミノプロピオン酸；オルニチン；ノルロイシン；ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、システイン酸、 ϵ -ブチルグリシン、 ϵ -ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 γ -アラニン、デザイナーアミノ酸、例えば一般に α -メチルアミノ酸、 β -メチルアミノ酸、 γ -メチルアミノ酸、フルオロアミノ酸及びアミノ酸アナログが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、アミノ酸はD（右旋性）又はL（左旋性）であることができる。

30

【0218】

特定の実施形態では、本発明のタンパク質の断片及び/又はアナログ、特にペプチド模倣体は、活性の競合的又は非競合的阻害剤としての活性についてスクリーニングされる。

【0219】

本発明の別の実施形態では、コンビナトリアルケミストリーを用いてモジュレーターを同定することができる。コンビナトリアル化学は数十万の化合物を含むライブラリーを作成することができ、その多くは構造的に類似している場合がある。ハイスループットスクリーニングプログラムは、これらの巨大なライブラリーを既知の標的に対する親和性についてスクリーニングできるとともに、より小さな次元のライブラリーを達成す

50

るが、最大の化学的多様性をもたらす新規アプローチが開発されている。(例えば、Matter, 1997, Journal of Medicinal Chemistry 40:1219-1229を参照)。

【0220】

従来、コンビナトリアルケミストリーの1つの方法である親和性フィンガープリンティングを使用して、規定されたタンパク質パネルに対する結合親和性のための小分子の別個のライブラリーが試験されていた。スクリーニングによって得られたフィンガープリントを用いて、個々のライブラリーメンバーの、他のタンパク質又は目的の受容体に対する親和性を予測する。フィンガープリントと、目的のタンパク質と反応することが知られている他の化合物から得られたフィンガープリントと比較して、ライブラリー化合物が同様に反応する場合があるかどうかを予測する。例えば、複合体又はタンパク質成分との相互作用について大きなライブラリー中における全てのリガンドを試験するのではなく、その活性を有することが知られている他の化合物と同様のフィンガープリントを有するリガンドのみを試験することができる。(例えば、Kauvar外, 1995, Chemistry and Biology 2:107-118; Kauvar, 1995, Affinity fingerprinting, Pharmaceutical Manufacturing International. 8:25-28及びKauvar, Toxic-Chemical Detection by Pattern Recognition in New Frontiers in Agrochemical Immunoassay, D. Kurtz, L. Stanker and J. H. Skerritt. Editors, 1995, AOAC: Washington, D.C., 305-312。)。

【0221】

Kay外, 1993, Gene 128:59-65 (Kay)には、従来の任意のライブラリーよりも長い完全にランダムな配列のペプチドをコードするペプチドライブラリーを構築する方法が開示されている。Kayに開示されたライブラリーは、約20アミノ酸長を超える完全に合成されたランダムペプチドをコードする。このようなライブラリーは、複合モジュレーターを同定するために有利にスクリーニングできる(1996年3月12日付の米国特許第5,498,538号及び1994年8月18日付けのPCT公開第WO94/18318も参照)。

【0222】

様々のタイプのペプチドライブラリーの包括的な概説がGallop外, 1994, J. Med. Chem. 37:1233-1251に記載されている。

【0223】

これらの方法で使用される同系哺乳類細胞の集団としては、典型的には、CD8陽性T細胞(すなわち、CD8抗原を発現するT細胞)、CD4陽性T細胞(すなわちCD8抗原を発現するT細胞)、抗原提示細胞(APC)及び腫瘍細胞が挙げられる。用語「抗原提示細胞」とは、クラスII MHC分子を構成的に発現し、かつ、TH細胞に刺激性抗原を提示する細胞をいう。APCとして機能する3つの主要クラスの細胞がある。これらのクラスは、マクロファージ、樹状細胞及びBリンパ球である。樹状細胞は、抗原提示細胞の中で最も強力であり、一次免疫応答の開始に不可欠であると考えられている(例えば、Lanzavecchia(1993) Science 260:937及びGrabbe外(1995) Immunology Today 16:117)。腫瘍細胞は、典型的には多種多様な技術によって同定され、当該技術としては触診、血液分析、X線、NMRなどが挙げられるが、これに限定されない。さらに、悪性に関連する遺伝子の発現(例えば、PSA、PSCA、PSM及びヒト腺カリクレイン発現)並びに総体的な細胞学的観察といった、癌に関連することが当該技術分野において知られている多種多様な診断因子を利用して腫瘍細胞を同定することができる(Bocking外, Anal Quant Cytol. 6(2):74-88(1984); Eptsein, Hum Pat hol. 1995 Feb; 26(2):223-9(1995); Thorson外,

Mod Pathol. 1998 Jun; 11(6): 543-51; Baisden 外, Am J Surg Pathol. 23(8): 918-24 (1999)。

【0224】

本明細書に開示されるモデル及び方法を使用して、免疫反応におけるSLCの投与がサイトカインプロファイルをどのように調節するか、及び/又は様々な自発性腫瘍の増殖をどのように阻害するかを容易に評価することができる。本発明の好ましい実施形態において、SLCは、本明細書で実証されるように、サイトカインプロファイルを調節し及び/又は腺癌系統の自発性腫瘍細胞の増殖を阻害するために投与される。当該技術分野で知られているように、腺癌、扁平上皮細胞癌、小細胞癌及び大細胞癌を含めた肺癌の主要な形態は、共通の細胞系統内の分化の連続を表し、多数の腫瘍関連抗原を発現する（例えば、Berger 外, J Clin Endocrinol Metab 1981 53(2): 422-429 及び Niho 外, Gan To Kagaku Ryoho 2001: 28(13): 2089-93; Ohshio 外, Tumori 1995 81(1): 67-73 及び Hamasaki 外, Anticancer Res 2001 21(2A): 979-984)。その結果、共通の系統関係及び抗原プロファイルは、SLCが肺のこれらの癌（すなわち、腺癌関連肺癌）の増殖に対して非常に類似した効果を及ぼすことの証拠を提供する。

10

【0225】

好ましくは、サイトカイン発現を達成する又は調節する方法は、同系哺乳動物細胞の集団におけるインターフェロン-（IFN-、例えば受託番号AAB59534及びP01580参照）ポリペプチドの発現の増加及び/又は形質転換成長因子-（TGF-、例えば、受託番号AAA50405及びAAK56116を参照）ポリペプチドの発現の減少を伴う。好ましい方法では、酵素結合免疫吸着（ELISA）アッセイによって測定したときに、インターフェロン-（IFN-）ポリペプチドの発現の増加は少なくとも約2倍であり、形質転換増殖因子-（TGF-）ポリペプチドの発現の減少は少なくとも約2倍である。所定の系におけるSLCの効果は、本明細書に記載されるELISAアッセイに加えて、多数の他の方法で観察できる。例えば、SLCの効果は、腫瘍増殖又は腫瘍死の阻害を評価し（腫瘍サイズの減少を観察することによって）、及び生存率の増加（本明細書に開示されるトランスジェニックマウスモデルで観察されるとき）などを評価することによって観察できる。

20

30

【0226】

本明細書に開示されるように、この細胞集団に対するSLCの添加は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF、例えば受託番号：2144692及びgi: 69708参照）ポリペプチド、IFN-（MIG、例えば受託番号P18340及びQ07325参照）ポリペプチドによって誘導されるモノカイン、インターロイキン-12（IL-12、例えば受託番号NP__032377 AAD56385及びAAD56386参照）ポリペプチド又はIFN-誘導性タンパク質10（例えば、受託番号P02778及びAAA02968参照）ポリペプチドの増加；プロスタグランジンE（2）ポリペプチド又は血管内皮増殖因子（VEGF、例えば受託番号NP__003367及びNP__033531参照）ポリペプチドの減少に影響を及ぼす。したがって、好ましい方法としては、SLCの投与を介してこれらの分子のサイトカインプロファイルの変化を生じさせる方法が挙げられる。このポリペプチド発現の調節は、本明細書で開示されるELISAアッセイのような遺伝子発現を評価するために当該技術分野で使用される多種多様な方法のいずれか1つによって決定できる。好ましい方法では、ポリペプチドの発現の増加及び/又は減少は、酵素結合免疫吸着（ELISA）アッセイによって測定して少なくとも約2倍である。追加のプロファイリング技術は、当該技術分野で公知である（例えば、Peale 外, J. Pathol 2001; 195(1): 7-19参照）。

40

【0227】

腫瘍増殖の阻害は、当該技術分野で知られている様々な方法のいずれか1つによって測定できる。好ましくは、同系腫瘍細胞の増殖の阻害は、腫瘍表面積の定量によって測定さ

50

れる。好ましい方法では、同系腫瘍細胞は自発性癌細胞である。本明細書に開示するように、ネズミクララ細胞特異的プロモーター制御下でSV40の大きなTag導入遺伝子を発現するトランスジェニックは、びまん性両側気管支肺胞癌を発症する。このモデルは、本明細書に記載の方法に従って利用することができる当該技術分野において知られている多くの同系癌モデル動物モデルの1つである(Hakem外, Annu. Rev. Genet. 2001; 35: 209-41; Mundy Semin. Oncol. 2001 28(4 Suppl 11): 2-8; Silks外, Toxicol Lett 2001 120(1-3): 1887-198; Kitchin, Toxicol Appl Pharmacol 2001; 172(3): 249-61; 及びD'Angelo外, J. Neurooncol 2000; 50(1-2): 89-98)。

10

【0228】

上記に開示した方法において、同系細胞は、様々な方法、例えば、腫瘍内注射を介して哺乳動物にSLCポリペプチドを投与することによって、又はリンパ節内注射によってSLCポリペプチドを哺乳動物に投与することによってSLCに曝露できる。さらに別の投与様式では、SLCポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを有する発現ベクターが哺乳動物に投与され、SLCポリペプチドは、SLCポリペプチドをコードする発現ベクターで形質導入された同系哺乳動物細胞によって産生される。

【0229】

本発明のさらに別の実施形態は、同系のCD8陽性T細胞、CD4陽性T細胞及び抗原提示細胞の集団における自発的哺乳動物癌細胞の増殖を、癌細胞の増殖を阻害するのに十分な量の二次リンパ組織ケモカイン(SLC)ポリペプチドに曝露することによって阻害する方法である。本発明の密接に関連した実施形態は、哺乳類被験体における同系癌を治療する方法であって、SLCの治療有効量を被験体に投与することを含む。好ましい方法において、SLCはヒトSLCである。非常に好ましい方法において、SLCは配列番号1に示されるポリペプチド配列を有する。好ましくは、SLCポリペプチドは、腫瘍内注射又はリンパ節内注入を介して哺乳動物に投与される。さらに別の投与様式では、SLCポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを有する発現ベクターが哺乳動物に投与され、SLCポリペプチドは、SLCポリペプチドをコードする発現ベクターで形質導入された同系哺乳動物細胞によって産生される。非常に好ましい実施形態において、細胞は、SLCポリペプチドをコードする発現ベクターで形質導入された哺乳動物細胞によって発現するSLCポリペプチドに曝露される。本発明の関連する実施形態は、SLCポリペプチドをコードする発現ベクターで形質導入された同系宿主細胞からなる。この本発明の態様の非常に好ましい実施形態において、同系宿主細胞は、生体内でSLCポリペプチドをコードする発現ベクターで形質導入されている。

20

30

【0230】

本発明のさらに別の実施形態は、哺乳動物に二次リンパ組織ケモカイン(SLC)を投与することを含む、哺乳動物における癌細胞(最も好ましくは自発性癌細胞)の増殖を阻害する方法である。ここで、SLCは、形質導入された細胞が癌細胞の増殖を阻害するのに十分な量でSLCポリペプチドを発現するように、配列番号1に示されるSLCをコードするポリヌクレオチドを哺乳動物の細胞に形質導入することによって哺乳動物に投与される。好ましくは、ベクターは、腫瘍内注射によって、又はその代わりにリンパ節内注射によって哺乳動物に投与される。

40

【0231】

本発明のさらに別の実施形態は、哺乳動物細胞に二次リンパ組織ケモカイン(SLC)をex vivoで投与することを含む、哺乳動物における癌細胞(最も好ましくは自発性癌細胞)の増殖を阻害する方法である。実施例10に示すように、好ましい実施形態において、SLCは、形質導入細胞が同系癌細胞の増殖を阻害するのに十分な量のSLCポリペプチドを発現するようにSLCをコードするポリヌクレオチド(例えば、配列番号1に示すSLC)を哺乳動物の細胞に形質導入することによって哺乳動物に投与される。このような実施形態では、細胞の集団は、当該技術分野で公知の様々な方法のいずれか1つ

50

によって哺乳動物から除去できる。典型的には、細胞を腫瘍細胞の近位部位（例えば、腫瘍の部位又は腫瘍の近位のリンパ節）で哺乳動物から取り出し、続いてＳＬＣの投与後に哺乳動物に再導入する（典型的には、腫瘍の部位又は腫瘍の近位のリンパ節などの癌細胞の近位部位に）。

【０２３２】

本発明のこのような一実施形態は、治療有効量のＳＬＣを被験体に投与することを含む、哺乳動物被験体における同系の癌の生体外治療方法であり；ＳＬＣは、配列番号１又は３に示されるＳＬＣポリペプチドをコードする発現ベクターを形質導入した哺乳動物細胞によって発現され、発現ベクターは、哺乳動物被験体に由来するＤＣ細胞に形質導入された後に投与される。

10

【０２３３】

本発明の関連する実施形態は、治療有効量のＳＬＣを被験体に投与することを含む、哺乳動物被験体における同系の癌を治療する生体外方法であって、このように投与されたＳＬＣは、配列番号１のＳＬＣポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが形質導入された自己細胞であり；該自己細胞を哺乳動物被験体に投与する方法である。

【０２３４】

本発明のさらに別の実施形態は、配列番号１のＳＬＣポリペプチドをコードするベクターを同系細胞に形質導入し、それによってＳＬＣポリペプチドを同系細胞によって発現させ、及び腫瘍抗原を発現する同系腫瘍細胞の近位に同系細胞を配置することを含む、哺乳動物被験体における抗原提示細胞による生体内腫瘍抗原取り込み及び提示を促進する生体外方法である。同系細胞は自己ＤＣ細胞であることが好ましいが、当該分野で公知の類似の抗原提示細胞の使用も考えられる。

20

【０２３５】

本発明の別の実施形態は、Ｔリンパ球又は成熟宿主樹状細胞を哺乳類の同系腫瘍（例えば、腺癌）の部位に誘引する方法であって、次の工程：該哺乳動物から樹状細胞を得；該樹状細胞に、配列番号１に示す二次リンパ組織ケモカインをコードする外因性ポリヌクレオチドを導入し（例えば、この配列を含むベクターによる形質導入を介して）、それによって該細胞が二次リンパ組織ケモカインを発現するようにし；その後、このようにして生成された樹状細胞を哺乳類の同系腫瘍の部位に配置する（例えば、腫瘍内注射を介して）ことを含み；その後、該樹状細胞によって発現された二次リンパ組織ケモカインは、Ｔリンパ球又は成熟宿主樹状細胞を、走化性を介して哺乳動物の同系腫瘍の部位に引きつける方法である。実施例１０に示すように、この方法は、生体内で末梢血リンパ球及び樹状細胞の腫瘍部位への有意な走化性を誘発させるために首尾よく使用できる。これに対応して、この方法で処置したマウスの６０％は、この方法で処置した同系腫瘍の完全撲滅を示したが、未修飾又は対照樹状細胞で処置したマウスのわずか１２％しか応答しなかった。この方法には多くの用途がある。例えば、この方法は、治療状況に（例えば、癌に罹患している個体の治療に）適用することができる。さらに、この方法は、免疫監視に関連する様々な生理学的プロセス、特に哺乳動物が癌に応答しなければならない自然の能力を解剖するためのモデルを提供する。さらに、このモデルは、様々な既知の化学療法剤の協調的使用、例えば、特定の化学療法剤が試験管内で末梢血リンパ球及び樹状細胞の腫瘍部位への走化性に関連する免疫応答に対して奏する効果を研究するために使用できる。

30

40

【０２３６】

このような方法において、内因性ＳＬＣを発現する自己細胞は、当該技術分野で公知の様々な方法によって哺乳動物被験体に投与できる。好ましくは、内因性ＳＬＣを発現する自己細胞は、腫瘍内注射によって被験体に投与される。あるいは、内因性ＳＬＣを発現する自己細胞は、リンパ節内注射によって被験体に投与される。このような方法は、様々な癌、最も好ましくは腺癌の治療に使用できる。

【０２３７】

本発明の別の実施形態では、ＳＬＣは、標的細胞における生理学的プロセスを調節する（例えば、免疫監視に関連するポリペプチドの発現をアップレギュレートする）のに十分

50

な量の S L C ポリペプチドとして投与され、このように調節された生理学的プロセスは、標的細胞の同系癌細胞の増殖の阻害を促進する。

【 0 2 3 8 】

本発明の他の実施形態は、病理学的状態を有する哺乳動物に投与するための S L C 組成物を製造することによって、癌を含む病理学的状態を治療するための薬剤の製造方法を含む。関連する方法は、癌の治療のための医薬の製造における有効量の S L C の使用であり、癌細胞は同系癌細胞である。このような方法は、典型的には、上記のサイトカインプロファイルを調節し及び/又は生体内での同系（好ましくは自発的）癌細胞の増殖を阻害するのに十分な量の S L C と、生理学的に許容されるキャリアの適切な量とを含める工程を伴う。当該技術分野で知られているように、場合により他の薬剤をこれらの製剤に含めることができる。

10

【 0 2 3 9 】

この出願を通して、様々な刊行物を参照する（例えば括弧内）。これらの刊行物の開示は、参照によりその全体を本明細書で援用する。例えば、本明細書に開示される本発明で使用される方法に関連する所定の一般的方法は、国際特許出願公開第 W O 0 0 / 3 8 7 0 6 号に記載されており、その内容は参照により本明細書で援用する。本発明の様々な典型的な態様の理解を容易にするために、これらの援用された材料の所定の態様をここに再現する。

【 0 2 4 0 】

本発明は、本発明の個々の態様の単なる例示を目的とする本明細書に開示される実施形態によって範囲が限定されるべきものではなく、機能的に均等なものいづれも本発明の範囲内にある。本明細書に記載されたものに加えて、本発明のモデル及び方法に対する様々な改変は、当業者であれば上記の説明及び教示から明らかになるであろうし、同様に本発明の範囲内にあると考えられる。このような改変又は他の実施形態は、本発明の真の範囲及び精神から逸脱することなく実施できる。ただし、本発明は、特許請求の範囲によってのみ限定される。

20

【実施例】

【 0 2 4 1 】

実施例 1：同系移植性腫瘍モデルで S L C などの免疫調節性分子を検査するための方法及び材料

30

【 0 2 4 2 】

1. 細胞培養及び腫瘍形成モデル

生体内での抗腫瘍応答の評価のために、2種の弱免疫原性肺癌、ライン 1 肺胞癌（L 1 C 2、H - 2 d）及びルイス肺癌（3 L L、H - 2 b）を利用した。これらの細胞を、10 % F B S（G e m i n i B i o p r o d u c t s、C a l a b a s a s、C A）、ペニシリン（100 U / m l）、ストレプトマイシン、2 m M グルタミン（J R H B i o s c i e n c e s、L e n e x a、K S）を補充した R P M I 1 6 4 0（I r v i n e S c i e n t i f i c、S a n t a A n a、C A）を含む 2 5 c m³組織培養フラスコ中で単層として従来通り培養し、空気中 5 % C O₂を含む加湿雰囲気中で 3 7 °C に維持した。細胞系はマイコプラズマ無添加であり、細胞を、液体 N₂ から凍結ストック細胞を解凍する前に 10 継代まで使用した。腫瘍形成実験のために、10⁵個の 3 L L 又は L 1 C 2 腫瘍細胞に、C 5 7 B L / 6 又は B A L B / c マウスの右上顎尖部領域に皮下注射によって接種し、腫瘍体積を週に 3 回監視した。5 日齢の確立腫瘍を 0 . 5 μ g のネズミ組換え S L C 又は P B S 希釈液（P e p r o T e c h、R o c k y H i l l、N J）の腫瘍内注射により 2 週間にわたって週 3 回処置した。製造業者によって報告されたエンドトキシンレベルは、< 0 . 1 n g / μ g（1 E U / μ g）の S L C であった。注射に使用された S L C の量（0 . 5 μ g）は、製造業者によって提供された試験管内生物活性データによって決定された。総ネズミ T 細胞についての S L C の最大走化活性は 1 0 0 n g / m l であった。S L C 仲介性抗腫瘍特性の生体内評価のために、出願人は、各腫瘍内注射に対してこの量よりも 5 倍多く利用した。同量のマウス血清アルブミン（S i g m a、S t . L o u i

40

50

s、MO)を対照注射用の無関係なタンパク質として利用した腫瘍形成実験も行った。腫瘍接種時にSLCを投与する実験も行った。SLC投与後の抗腫瘍応答を仲介する際の免疫系の重要性を決定するために、SCIDベージュCB17マウスにおいて腫瘍形成実験を行った。SLCを腫瘍接種の時点で、続いて週に3回皮下注射により投与した。CD4及びCD8ノックアウトマウスを利用して、腫瘍撲滅におけるCD4及びCD8細胞の寄与を決定した。各腫瘍の2つの二等分線直径をキャリパーで測定した。容積は、式 $(0.4)(ab^2)$ を用いて計算し、ここでaはより大きい直径であり、bはより小さな直径である。

【0243】

2. 腫瘍結節、リンパ節及び脾臓からのサイトカイン決定

腫瘍、リンパ節及び脾臓におけるサイトカインプロファイルを、以前に記載されたように(Sharma外, J. Immunol. 163:5020)SLC及び希釈剤処置マウスの両方で測定した。非壊死性腫瘍を採取し、小片に切断し、ふるい(Bellco Glass, Vineland, NJ)を通過させた。腫瘍排出性リンパ節及び脾臓を、SLC処置腫瘍保有腫瘍、対照腫瘍保有マウス及び正常対照マウスから採取した。リンパ節と脾臓とを解きほぐし、RBCを二重蒸留水で枯渇させ、1xPBSで張性にした。腫瘍結節について、一晚培養した後の上清中においてIL-10、IL-12、GM-CSF、IFN- γ 、TGF- β 、血管内皮増殖因子(VEGF)、IFN- γ (MIG)によって誘導されるモノカインの産生、並びにELISAによりIP-10及び酵素免疫測定法(EIA)によりPGE2について評価した。腫瘍由来サイトカイン及びPGE2濃度をブラッドフォードアッセイ(Sigma, St. Louis, MO)により総タンパク質に対して補正した。照射腫瘍細胞(5×10^6 細胞/ml)による二次刺激後のサイトカイン測定のために、脾臓又はリンパ節由来のリンパ球を5mlの総容量で照射3LL(10^5 細胞/ml)と共に50:1の比で共培養した。一晚培養した後に上清を回収し、ELISAによってGM-CSF、IFN- γ 、IL-12及びIL-10を決定した。

【0244】

3. サイトカインELISA

腫瘍結節、リンパ節及び脾臓由来のサイトカインタンパク質濃度を、以前に記載されたように(Huang外, Cancer Res. 58:1208)ELISAによって決定した。簡潔に説明すると、96ウェルCostar(Cambridge, MA)プレートを、測定されるサイトカインに対する $4 \mu\text{g/ml}$ の適切な抗マウスmAbで一晩被覆した。このプレートのウェルをPBS中の10%ウシ胎仔血清(Gemini Bio products)で30分間ブロックした。次いで、プレートをAgと共に1時間インキュベートし、過剰のAgをPBS-Tweenで洗い流した。プレートを適切なサイトカインに対する $2 \mu\text{g/ml}$ のビオチン化mAb(PharMingen, San Diego, CA)と共に30分間インキュベートし、そして過剰のAbをPBS-Tweenで洗い流した。プレートをアビジンペルオキシダーゼと共にインキュベートし、OPD基質中で所望の消光までインキュベートした後、その後の色の变化をMicroplate Reader(Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA)を用いて490nmで読み取った。アッセイの標準物質として使用された組換えサイトカインはPharMingenから得た。IL-12(Biosource)及びVEGF(Oncogene Research Products、ケンブリッジ、マサチューセッツ州)を製造者の指示に従ってキットにより決定した。MIG及びIP-10を、以前に記載されたような二重リガンド法の改変によって定量した(Standiford外, J. Clin. Invest. 86:1945)。MIG及びIP-10抗体及びタンパク質は、R&D(ミネソタ州ミネアポリス)から入手した。IL-10、GM-CSF、IFN- γ 、TGF- β 、MIG及びIP-10 ELISAの感受性は 15 pg/ml であった。IL-12及びVEGFについて、感受性は $5 \mu\text{g/ml}$ であった。

【0245】

4. PGE2 EIA

PGE₂濃度を、以前に記載されたように(Huang外, Cancer Res. 58:1208)、メーカーの指示に従ってCayman Chemical(Ann Arbor, MI)製のキットを用いて決定した。EIAプレートをMolecular Dynamics Microplate Readerで読み取った。

【0246】

5. 細胞溶解実験

細胞溶解活性を以前に記載されているように評価した(Sharma外, J. Immunol. 163:5020)。照射された腫瘍細胞による二次刺激後の腫瘍細胞溶解を定量するために、SLC処置及び希釈剤腫瘍保持マウスからのリンパ節由来リンパ球(5×10^6 細胞/ml)を、照射3LL(10^5 細胞/ml)と共に5mlの総体積中において50:1の比で培養した。5日間の培養後、リンパ節由来リンパ球の溶解能を、96ウェルプレートにおいて様々なE:Tでクロム標識した(^{51}Cr 、Amersham Arlington Heights, IL; sp. act. 250-500mCi/mg)3LL標的に対して4時間にわたって決定した。5%トリトンXによる自然放出及び最大放出も評価した。4時間のインキュベーション後に上清を除去し、ガンマカウンター(Beckman, Fullerton, CA)で活性を測定した。%特異的溶解を次式: %溶解 = $100 \times (\text{実験cpm} - \text{自然放出}) / (\text{最大放出} - \text{自然放出})$ によって算出した。

【0247】

6. フローサイトメトリー

フローサイトメトリー実験のために、2種又は3種の蛍光色素(PE、FITC及びTri-color)(PharMingen)を使用して腫瘍結節単一細胞懸濁液のCD3⁺リンパ球集団をゲートした。DCを、腫瘍結節及びリンパ節内のCD11c及びDEC205の明るい集団として定義した。順方向及び側方散乱プロファイルに基づいてゲーティングすることにより、細胞をリンパ球又はDCとして同定した。フローサイトメトリー分析は、カリフォルニア大学ロサンゼルス校のJonsson Cancer Center Flow Cytometry Core FacilityのFACSscanフローサイトメーター(Becton Dickinson, San Jose, CA)で行った。5,000~15,000個のゲートイベントを収集し、Cell Questソフトウェア(Becton Dickinson)を用いて分析した。

【0248】

7. 細胞内サイトカイン分析

SLC処置及び希釈剤処置3LL腫瘍保有マウスの腫瘍結節及びリンパ節の単一細胞懸濁液からのTリンパ球を、蒸留し脱イオンしたH₂OでRBCを枯渇させ、細胞質内GM-CSF及びIFN- γ の存在について評価した。細胞懸濁液を、製造者の指示に従ってタンパク質輸送阻害剤キットGolgiPlug(PharMingen)で処理した。細胞を採取し、2%FBS-PBSで2回洗浄した。細胞(5×10^5)を、細胞表面抗原であるCD3、CD4及びCD8に特異的な0.5 μg のFITC結合mAbと共に200 μl の2%FBS-PBS中に4で30分間再懸濁した。2%FBS-PBSで2回洗浄した後に細胞を固定し、透過処理し、Cytofix/Cytopermキット(PharMingen)を用いて製造業者のプロトコールに従って洗浄した。細胞ペレットを100 μl のPerm/Wash溶液に再懸濁し、細胞内染色のために0.25 μg のPE結合抗GM-CSF抗体及び抗IFN- γ m抗体で染色した。細胞を暗所において室温で30分間インキュベートし、2回洗浄し、300 μl のPBS、2%パラホルムアルデヒド溶液に再懸濁し、そしてフローサイトメトリーで分析した。

【0249】

典型的なSLCポリペプチド

以下の表4は、例示的なヒト及びネズミSLCポリペプチド配列を与える。

【0250】

10

20

30

40

【表 3】

表 4

ヒトSLC

MAQSLALSLLILVLAFGIPRTQGSDGGAQDCCLKYSQRKI
PAKVVRYSYRKQEPSLGCSPAILFLPRKRSQAELCADPKE
LWVQQLMQHLDKTPSPQKPAQGCRKDRGASKTGKKGKGSK
GCKRTERSQTTPKGP (配列番号1)

ネズミ

SLCMAQMMTSLSLSLDLALCIPWTQGSDGGGQDCCLKYSQ
KKIPYSIVRGYRKQEPSLGCPIPAILFLPRKIISKPELCAN
PEEGWVQNLMRRLDQPPAPGKQSPGCRKNRGTSKSGKKGK
GSKGCKRTEQTQPSRG (配列番号2)

10

【0251】

実施例2：例示的な分子としてSLCを使用した同系移植性腫瘍モデルにおける免疫調節性分子の試験

ここで与える開示は、2種の同系移植マウス肺癌モデルを利用してSLCの抗腫瘍特性を試験する。いずれのモデルにおいても、腫瘍内SLC投与は、希釈剤処置腫瘍保有対照マウス ($p < 0.01$) と比較して腫瘍体積の有意な減少をもたらし、40%のマウスが完全な腫瘍撲滅を示した (図1A及びD)。腫瘍体積の減少がL1C2及び3LLに及ぼすSLCの直接的な影響に起因するかどうかを決定するために、腫瘍細胞の試験管内増殖をSLCの存在下で評価した。12ウェルCostarプレートに播種された 10^5 個のL1C2細胞及び3LL細胞にSLC (200 ng/ml) を添加し、細胞数を3日間にわたって毎日モニターした。SLCはこれらの腫瘍細胞の生体内増殖速度を変化させなかった。

20

【0252】

SLC仲介性抗腫瘍応答における宿主免疫の役割を評価するために、腫瘍を有するSCIDベージュCB17マウスにSLCを腫瘍内注射した。SLC投与はSCIDマウスの腫瘍体積を変化させなかった (図1E)。同様に、CD4及びCD8ノックアウトマウスでは、SLCは腫瘍体積を減少させることができなかったが、これは、SLC仲介性抗腫瘍応答がCD4及びCD8依存性であることを示す (図1B及びC)。

30

【0253】

腫瘍の進行は、宿主サイトカインプロファイル (Alleva外, J. Immunol. 153:1674; Rohrer外, J. Immunol. 155:5719) によって改変される場合があるため、腫瘍内SLC投与後の腫瘍結節からのサイトカイン産生を調べた。次のサイトカインを測定した: VEGF、IL-10、PGE2、TGF- β 、IFN- γ 、GM-CSF、IL-12、MIG及びIP-10 (表1A)。これらのサイトカインの産生は、以下の理由で評価した。腫瘍部位は、PGE-2、VEGF、IL-10及びTGF- β の豊富な供給源であることが証明されており、腫瘍部位におけるこれらの分子の存在は免疫応答を抑制することが示されている (Huang外, Cancer Res. 58:1208; Bellone外, Am. J. Pathol. 155:537; Gabrilovich外, Nat. Med. 2:1096)。また、VEGF、PGE2及びTGF- β は、以前に、血管新生を促進することが証明されている (Fajardo外, Lab. Invest. 74:600; Ferrara外, Breast Cancer Res. Treat. 36:127; 28; Tsujii外, Cell 93:705)。VEGF、TGF- β 、PGE-2及びIL-10に対する抗体は、生体内モデル系において腫瘍増殖を抑制する能力を有する。VEGFはDCの成熟を妨げることも示されている (Gabrilovich外, Nat. Med. 2:1096)。IL-10及びTGF- β の両方は、抗原提示を強力に抑制し、CTL生成及びマクロファージ

40

50

活性に拮抗することのできる免疫抑制性サイトカインであるため、腫瘍が免疫検出を免れることを可能にする (Sharma 外, J. Immunol. 163: 5020; Bellone 外, Am. J. Pathol. 155: 537)。SLCで腫瘍内処置したマウスは、希釈剤処置腫瘍保有対照からの腫瘍結節と比較して、PGE2 (3.5倍)、VEGF (4倍)、IL-10 (2倍) 及びTGF- β (2.3倍) が有意に減少した (表1A)。SLC投与後の腫瘍部位におけるIL-10及びTGF- β の全体的な減少は、抗原提示及びCTL生成を促進した可能性がある。SLC投与後の腫瘍部位におけるVEGF及びTGF- β の減少は、血管新生の阻害に寄与した可能性がある。これに対し、SLC投与後には、IFN- γ (5倍)、GM-CSF (10倍)、IL-12 (2倍)、MIG (6.6倍) 及びIP-10 (2倍) が有意に減少した (表1A)。

10

【0254】

IL-12は1型サイトカインの重要な誘導物質であるが、IFN- γ は細胞仲介性免疫を促進する1型サイトカインである。IL-12の増加 (2倍) は、SLC処置マウスの腫瘍部位におけるIFN- γ の相対的増加 (5倍) を説明することができた (表1A)。この研究に用いた腫瘍細胞は検出可能なレベルのIL-12を作らない。したがって、本発明者は、マクロファージ及びDCが腫瘍部位におけるIL-12の主要な供給源であること推測する。

【0255】

MIG及びIP-10は、IFN- γ によって誘導される強力な血管新生抑制因子であり、部分的にはIL-12仲介性腫瘍の縮小に関与する場合がある (Strieter 外, Biochem. Biophys. Res. Commun. 210: 51; Tannenbaum 外, J. Immunol. 161: 927; Arenberg 外, J. Exp. Med. 184: 981)。したがって、SLC処置マウスの腫瘍部位におけるIFN- γ の増加は、MIG (6.6倍) 及びIP-10 (2倍) の相対的増加を説明することができた (表1A)。MIGとIP-10の両方は、刺激されたCXCR3発現Tリンパ球に対して走化性であり、また、これは、腫瘍部位でIFN- γ を増加させる可能性もある (Farber 外, J. Leukocyte Biol. 61: 246)。SLC処置マウスの腫瘍結節におけるGM-CSFの増加 (10倍) は、DC成熟及び抗原提示を増強する可能性がある (Banchereau 外, Nature 392: 245)。

20

【0256】

現在の結果に基づけば、免疫抑制サイトカインの減少及び1型サイトカインの付随的増加は、腫瘍結節内に存在する細胞に及ぼすSLCの直接的な効果の可能性がある。あるいは、これらの変化は、SLC補充T細胞及びDCの結果の可能性がある。この問題に取り組むために、試験管内でSLCに応答した腫瘍及びリンパ節由来細胞からの1型及び免疫抑制性サイトカインの産生を評価した。腫瘍細胞 (1×10^6) 又はリンパ節由来細胞 (5×10^6) をサイトカイン測定のためにSLC (200 ng/ml) と24時間共培養した。SLCは、VEGF、TGF- β 、IL-10又はPGE-2の腫瘍細胞産生に影響を与えなかった。対照未処置リンパ節細胞と比較して、SLCは、試験管内培養で一晩、リンパ節由来IL-12を有意に増加させた (288 ± 15 pg/ml 対 400 ± 7 pg/ml) のに対し、IL-10 (110 ± 5 pg/ml 対 67 ± 1 pg/ml)、PGE2 (210 ± 4 pg/ml 対 70 ± 2 pg/ml) 及びTGF- β (258 ± 9 pg/ml 対 158 ± 7 pg/ml) の産生を減少させた。SLCは、試験管内でIFN- γ 及びGM-CSFのリンパ節由来リンパ球産生を変化させなかった。SLCは抗血管新生効果を有することが証明されているので (Soto 外, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8205; Arenberg 外, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 159: A746)、これらのモデルで観察された腫瘍の減少は、T細胞依存性免疫並びに血管新生の阻害におけるT細胞の関与によるものである可能性がある (Tannenbaum 外, J. Immunol. 161: 927)。SLC投与後の免疫抑制性サイトカインの減少及び1型サイトカインの増加に重要な細胞型及びタンパク質を描き出すためには、さらなる研究が必要であろう。

30

40

50

【0257】

S L C に応答した腫瘍結節中の G M - C S F 及び I F N - の増加がこれらのサイトカインを分泌する C D 4 及び C D 8 T 細胞サブセットの頻度の増加によって説明できるかどうかを決定するために、フローサイトメトリー分析を行った。細胞表面マーカー C D 4 又は C D 8 に対して陽性に染色された C D 3 T 細胞を、腫瘍結節からの単一細胞懸濁液で評価した。ゲートされた T リンパ球集団内の S L C 処置マウスの腫瘍結節では、希釈剤処置マウスと比較して C D 4 及び C D 8 T リンパ球の頻度が有意に増加した（それぞれ 25 及び 33 % 対 15 % 及び 11 % ; $p < 0.01$ ）。腫瘍部位及びリンパ節における C D 4 及び C D 8 T 細胞の G M - C S F 及び I F N - プロファイルを細胞質内染色によって決定した。S L C 投与により、G M - C S F 及び I F N - を分泌する腫瘍結節及びリンパ節からの C D 4 及び C D 8 T リンパ球の頻度が増加した（表 2 A）。

10

【0258】

D C は、免疫応答の開始に関与する独特の強力な A P C であり、S L C が成熟 D C を強く引きつけることが十分に実証されている（Chan 外, Blood here 93:3610; Banchereau 外, Nature 392:245）。腫瘍内 S L C 投与により腫瘍が有意に縮小したため、腫瘍内 S L C 投与により腫瘍結節及びリンパ節の D C 浸潤が促進されるかどうか疑われた。D C 表面マーカー C D 11c 及び D E C 205 に対して、S L C 及び希釈剤処置腫瘍保有マウス由来の腫瘍結節及びリンパ節の単一細胞懸濁液を染色した。S L C 処置腫瘍保有マウスでは、希釈剤処置 3 L L 保有腫瘍と比較して、腫瘍結節及びリンパ節における C D 11c 及び D E C 205 の細胞表面染色について D C の頻度及び平均チャネル蛍光強度の両方が増加した（表 2 A）。これらの知見は、腫瘍内 S L C 投与が腫瘍部位に D C を効果的に動員したことを示している。

20

【0259】

次に、腫瘍内 S L C 投与が有意な全身免疫反応を誘導するかどうかを検討した。この問題に対処するために、S L C 及び希釈剤で処置した腫瘍を有するマウスからのリンパ節及び脾細胞を 24 時間にわたって照射腫瘍細胞と共培養し、そして G M - C S F、I F N -、I L - 10 及び I L - 12 レベルを E L I S A で決定した。照射腫瘍細胞による二次刺激の後に、S L C 処置腫瘍保有マウスからの脾細胞及びリンパ節由来細胞は、有意に増加したレベルの I F N -（13 倍～28 倍）、G M - C S F（3 倍脾臓のみ）及び I L - 12（1.3～4 倍）を分泌した。対照的に、I L - 10 分泌は、S L C 処置マウスにおいて減少した（6～9 倍）（表 3 A）。さらに、腫瘍内 S L C 投与により、親腫瘍細胞に対するリンパ節由来リンパ球細胞溶解活性が増強された（図 2）。本発明者は、S L C が S C I D マウスの腫瘍増殖に影響を与えなかったため、細胞溶解実験におけるエフェクター細胞集団の表現型が C D 8 + T リンパ球であると推測する。しかしながら、C D 4 及び C D 8 ノックアウトマウスを利用した腫瘍形成実験から、効果的な腫瘍縮小のためには C D 4 及び C D 8 T リンパ球サブセットが重要であることが示されている。C D 4 T リンパ球は、細胞溶解性エフェクターとしても働くことができるので（Sun 外, Cell Immunol. 195:81; Semino 外, Cell Immunol. 196:87）、S L C 仲介性腫瘍減少における C D 4 T リンパ球の役割を描き出すためにはさらなる研究が必要となるであろう。

30

40

【0260】

この研究の結果は、腫瘍内 S L C 投与により腫瘍結節及び T 細胞依存性腫瘍拒絶反応内における D C 及び T リンパ球が共局在することを示す。これらの知見は、腫瘍免疫における S L C のさらなる評価及び癌免疫療法におけるその使用のための強力な理論的根拠を提供する。

【0261】

実施例 3：自然発生腫瘍モデルにおける S L C などの免疫調節性分子を検査するための方法及び材料

1. 細胞培養

10% F B S (G e m i n i B i o p r o d u c t s、C a l a b a s a s、C A)、

50

ペニシリン (100 単位/ml)、ストレプトマイシン (0.1 mg/ml) 及び 2 mM グルタミン (JRH Biosciences、Lenexa、KS) を補充した RPMI 1640 (Irvine Scientific、Santa Ana、CA) で増殖させた新たに切除した肺腫瘍からクララ細胞肺腫瘍細胞 (CC-10 タグ及び H-2 q) から誘導し、空气中 5% CO₂ を含む加湿雰囲気において 37 で維持した。2 回の生体内継代後に、CC-10 TAG 腫瘍クローンを単離した。細胞株はマイコプラズマフリーであり、液体窒素から凍結ストック細胞を解凍する前に細胞を 10 継代まで使用した。

【0262】

2. CC10TAG マウス

これらの研究では、SV40 large TAG がネズミクララ細胞特異的プロモーターの制御下で発現するトランスジェニック CC-10 TAG マウスを使用した (Mag daleno 外, Cell Growth Differ., 8:145-155, 1997)。導入遺伝子を発現する全てのマウスは、びまん性両側気管支肺胞癌を発症した。腫瘍は、4 週齢程度の早い段階で顕微鏡検査によって両側的に明らかであった。3 ヶ月後、腫瘍増殖の気管支肺胞パターンが合体して、複数の両側性腫瘍結節を形成した。CC-10 TAG トランスジェニックマウスの平均寿命は 4 ヶ月であった。胸腔内転移は認められなかった。これらのマウスの繁殖ペアは、寛大にも Francesco J. DeMayo (Baylor College of Medicine、TX、Houston) によって提供された。トランスジェニックマウスを West Los Angeles Veteran Affairs 動物施設で飼育し、動物研究施設で維持した。CC-10 TAG トランスジェニックマウスを用いた各実験の前に、導入遺伝子の存在をマウス尾生検の PCR によって確認した。5' プライマー配列は、SM19-TAG: 5' - TGGACCTTCTAGGTTCTTGAAAGG - 3' (配列番号 3) であり、3' プライマー配列は、SM36-TAG: 5' - AGGCATTCTCCACCACTGCTCCCATTT - 3' (配列番号 4) であった。得られた PCR フラグメントのサイズは 650 bp である。10 mM の Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM の KCl、200 µM の各デオキシヌクレオチドリホスフェート、0.1 µM のプライマー、2.5 mM の MgCl₂ 及び 2.5 単位の Taq ポリメラーゼを含有する総容量 50 µl で DNA (1 µg) を増幅させた。PCR は Perkin-Elmer 製 DNA サーマルサイクラー (Norwalk、CT) で行った。SV40 導入遺伝子についての増幅プロファイルは、94 で 3 分間の変性、58 で 1 分間のアニーリング、72 で 1 分間の伸長の 40 サイクル、続いて 94 で 1 分間の変性及び同じアニーリング及び伸長条件の 39 サイクルからなるものであった。最後のサイクルの伸長工程は 10 分であった。増幅後、臭化エチジウムで染色した 1.5% アガロースゲル上で生成物を分子量基準に対して視覚化した。全ての実験では、病原体を含まない CC-10 TAG トランスジェニックマウスを 4~5 週齢で使用した。

【0263】

3. CC-10 TAG マウスにおける SLC 治療モデル

CC-10 TAG トランスジェニックマウスの腋窩リンパ節に、ネズミ組換え SLC (0.5 µg/注射; Peprro Tech、Rocky Hill、NJ) 又は等量のマウス血清アルブミン (Sigma Chemical Co.、ミズーリ州セントルイス) を対照注射のための無関係のタンパク質として含有する通常の生理食塩水希釈剤を注射した。4~5 週齢から始めて、SLC 又は対照注射液を 8 週間にわたって週に 3 回投与した。製造業者によって報告されたエンドトキシンレベルは、SLC の < 0.1 ng/µg (1 エンドトキシン単位/µg) であった。SLC の用量は (0.5 µg/注射) を、本発明者の以前の研究 (Arenberg 外, J. Exp. Med. 184:981) 及び製造業者によって提供された試験管内生体活性データに基づいて選択した。総ネズミ T 細胞についての SLC の最大走化活性は 100 ng/ml であることが分かった。SLC 仲介性抗腫瘍特性の生体内評価のために、各注射についてこの量よりも 5 倍多く使用した。4 ヶ月後にマウスを 殺し、肺を腫瘍表面積の定量のために単離した。腫瘍負荷は、校正された目盛り (1 cm² の格子を 100 個の 1 mm² の正方形に細分した) で H & E 染色切片

10

20

30

40

50

の顕微鏡検査によって評価した。腫瘍がその面積の $>50\%$ を占めるグリッド正方形を陽性としてスコア化し、陽性の正方形の総数を以前に記載されたように決定した (Sharma 外, J. Immunol., 163: 5020 - 5028, 1999)。肺の4つの組織学的切片からの10個の別々の視野を高倍率 ($\times 20$ 対物レンズ) で検査した。各群の10匹のマウスを殺しなかったので、生存を評価することができた。

【0264】

4. 腫瘍結節、リンパ節及び脾臓からのサイトカイン決定

腫瘍、リンパ節及び脾臓におけるサイトカインプロファイルを、以前に記載されたように (Sharma 外, J. Immunol., 163: 5020 - 5028, 1999) SLC 及び希釈剤処置マウスの両方で測定した。非壊死性腫瘍を採取し、小片に切断し、ふるい (Bellco, Vineland, NJ) を通過させた。腋窩リンパ節及び脾臓を、SLC 処置腫瘍保有マウス、対照腫瘍保有マウス及び正常対照マウスから採取した。リンパ節及び脾臓を解きほぐし、RBC を ddH₂O で枯渇させ、 $1 \times \text{PBS}$ で張性にした。24時間の培養期間後に、腫瘍小結節の上澄を IL-10、IL-12、GM-CSF、IFN- γ 、TGF- β 、VEGF、MIG 及び IP-10 の産生について ELISA によって評価し及び EIA によって PGE-2 の産生について評価した。腫瘍由来サイトカイン及び PGE-2 濃度をブラッドフォードアッセイ (Sigma Chemical Co.) により全タンパク質について補正した。照射腫瘍細胞による二次刺激後のサイトカイン測定のために、脾臓細胞 (5×10^6 細胞/ml) を照射 (100 Gy 、Cs¹³⁷X線) CC-10 TAg 腫瘍細胞 (10^5 細胞/ml) と共に全量 5 ml において 50:1 の比で共培養した。24時間培養した後に上清を回収し、GM-CSF、IFN- γ 及び IL-10 を ELISA によって決定した。

【0265】

5. サイトカイン ELISA

腫瘍結節、リンパ節及び脾臓由来のサイトカインタンパク質濃度を、以前に記載されているように (Sharma 外, Gene Ther., 4: 1361 - 1370, 1997) ELISA によって決定した。簡潔に説明すると、96ウェル Costar (Cambridge, MA) プレートで、測定されるサイトカインに対する $4 \mu\text{g/ml}$ の適切な抗マウス mAb で一晩被覆した。プレートのウェルを PBS 中 10% FBS (ジェミニバイオプロダクツ社) で30分間ブロックした。次いで、プレートを抗原と共に1時間にわたってインキュベートし、過剰の抗原を PBS/Tween 20 で洗い流した。プレートを適切なサイトカインに対する $2 \mu\text{g/ml}$ ビオチン化 mAb (PharMingen) と30分間インキュベートし、余分な抗体を PBS/Tween 20 で洗い流した。プレートをアビジンペルオキシダーゼと共にインキュベートし、O-フェニレンジアミン基質中で所望の消光までインキュベートした後、後の色の变化を Molecular Devices Microplate Reader (Sunnyvale, CA) を用いて 490 nm で読み取った。アッセイにおいて基準物質として使用された組換えサイトカインは PharMingen から得た。IL-12 (Biosource) 及び VEGF (Oncogene Research Products、マサチューセッツ州ケンブリッジ) を、製造者の指示に従ってキットを用いて決定した。MIG 及び IP-10 を、以前に記載されているような二重リガンド法の改変を用いて定量した (Standiford 外, J. Clin. Invest., 86: 1945 - 1953, 1990)。MIG 及び IP-10 の抗体及びタンパク質を R&D (Minneapolis, MN) から得た。IL-10、GM-CSF、IFN- γ 、TGF- β 、MIG 及び IP-10 の ELISA 感受性は 15 pg/ml であった。IL-12 及び VEGF について、ELISA 感受性は $5 \mu\text{g/ml}$ であった。

【0266】

5. PGE2 EIA

PGE2 濃度を、以前に記載されているように (Huang 外, Cancer Res., 58: 1208 - 1216, 1998) メーカーの指示に従って Cayman Ch

emical Co. (Ann Arbor, MI) 製のキットを用いて決定した。EIA プレートを、Molecular Devices Microplateリーダー (Sunnyvale, CA) によって読み取った。

【0267】

6. フローサイトメトリー

フローサイトメトリー実験のために、2種又は3種の蛍光色素 (PE、FITC及びTri-color) (PharMingen) を使用して腫瘍結節、リンパ節及び脾臓単一細胞懸濁液のCD3⁺ Tリンパ球集団をゲートした。DCを、腫瘍結節、リンパ節及び脾臓内のCD11c及びDEC205の明るい集団として定義した。順方向及び側方散乱プロファイルに基づいてゲーティングすることにより、細胞をリンパ球又はDCとして同定した。フローサイトメトリー分析は、カリフォルニア大学ロサンゼルス校のJonsson Cancer Center Flow Cytometry Core FacilityのFACScanフローサイトメーター (Becton Dickinson, San Jose, CA) で行った。5,000~15,000個のゲートイベントを収集し、Cell Questソフトウェア (Becton Dickinson) を用いて分析した。

10

【0268】

7. 細胞内サイトカイン分析

SLC処置及び希釈剤処置CC-10 TAgトランスジェニックマウスの腫瘍結節、リンパ節及び脾臓の単一細胞懸濁液からのTリンパ球を、蒸留し脱イオンしたH₂OでRBCを枯渇させ、細胞質内GM-CSF及びIFN- γ の存在について評価した。細胞懸濁液を、製造者の指示に従ってタンパク質輸送阻害剤キットGolgi Plug (PharMingen) で処理した。細胞を採取し、2% FBS - PBSで2回洗浄した。細胞 (5×10^5) を、細胞表面抗原であるCD3、CD4及びCD8に特異的な0.5 μ gのFITC結合mAbと共に200 μ lの2% FBS - PBS中に4℃で30分間再懸濁した。2% FBS - PBSで2回洗浄した後に細胞を固定し、透過処理し、Cytofix / Cytopermキット (PharMingen) を用いて製造業者のプロトコールに従って洗浄した。細胞ペレットを100 μ lのPerm/Wash溶液に再懸濁し、細胞内染色のために0.25 μ gのPE結合抗GM-CSF抗体及び抗IFN- γ m抗体で染色した。細胞を暗所において室温で30分間インキュベートし、2回洗浄し、300 μ lのPBS、2%パラホルムアルデヒド溶液に再懸濁し、そしてフローサイトメトリーで分析した。

20

30

【0269】

実施例4: SLCは自発気管支癌のマウスモデルにおいて強力な抗腫瘍応答を仲介する

実施例3に記載の材料及び方法を使用して、SV40の大きなTAgがネズミクララ細胞特異的プロモーターの制御下で発現するトランスジェニックマウスにおける自発気管支肺胞細胞癌モデルにおけるSLCの抗腫瘍効力を評価した (Magdaleno外, Cell Growth Differ., 8:145-155, 1997)。導入遺伝子を発現するマウスは、びまん性両側気管支肺胞癌を発症し、平均寿命は4ヶ月である。SLC (0.5 μ g/注射) 又は同濃度のネズミ血清アルブミンを4週齢から始めて1週間あたり3回、8週間継続して腋窩リンパ節領域に注射した。対照マウスが進行性の肺腫瘍の増殖のため死亡し始めた4ヶ月目に、マウスを全ての処置群で殺し、肺を単離し、パラフィン包埋した。対照処置マウスからのパラフィン包埋肺腫瘍切片のH&E染色から、両肺全体に大きな腫瘍塊が明らかになり、リンパ球浸潤は最小限であった (図3A及びC)。対照的に、SLC処置マウスは、広範なリンパ球浸潤を伴う有意に小さな腫瘍結節を有していた (図3B及びD)。SLCで処置したマウスは、希釈剤処置した対照マウスと比較して、肺腫瘍の負荷が著しく減少した (図3E)。SLC処置マウスは対照注射を受けたマウスと比較して生存期間が延長した。対照処置マウスについて生存期間の中央値は18 \pm 2週間であったが、SLCで処置したマウスの生存期間の中央値は34 \pm 3週間であった (P < 0.001)。

40

50

【0270】

実施例5：CC-10タグマウスのSLC処置は1型サイトカイン及び抗血管形成性ケモカイン放出と免疫不全性細胞質TGF- β 及びVEGFの衰退を促進する。

腫瘍進行が宿主サイトカインプロファイルによって改変され得ることを示す以前の報告に基づいて(Alleeva外, J. Immunol., 153:1674-1686, 1994; Rohrer外, J. Immunol., 155:5719-5727, 1995)、SLC療法後の腫瘍部位、リンパ節及び脾臓からのサイトカイン産生を評価した。組換えSLCで処置したCC-10 TAGマウスの肺、脾臓及びリンパ節におけるサイトカインプロファイルを、腫瘍を有する希釈剤処置対照マウス及び非腫瘍保有対照のマウスと比較した。CC-10 TAGマウスのSLC処置は1型サイトカインの全身性誘導をもたらしたが、免疫抑制性メディエーターの産生を減少させた。肺、リンパ節及び脾臓を採取し、24時間の培養期間後に、上清をVEGF、IL-10、IFN- γ 、GM-CSF、IL-12、MIG、IP-10及びTGF- β の存在についてELISAにより評価し、PGE-2の存在についてEIAにより評価した。SLCで処置したCC-10 TAGマウスは、希釈剤処置群の肺と比較して、VEGF(3.5倍)及びTGF- β (1.83倍)の有意な減少を示したが、IFN- γ (160.5倍)、IP-10(1.7倍)、IL-12(2.1倍)、MIG(2.1倍)及びGM-CSF(8.3倍;表1B)の増加を示した。希釈剤処置群と比較して、SLC処置CC-10 TAGマウス由来の脾細胞は、PGE-2(14.6倍)及びVEGF(20.5倍)のレベルの減少を示したが、GM-CSF(2.4倍)、IL-12(2倍)、MIG(3.4倍)及びIP-10(4.1倍;表1B)の増加を示した。SLCで処置したマウス由来のリンパ節由来細胞は、希釈剤処置したCC-10 TAGマウスと比較して、有意に向上したレベルのIFN- γ (2.2倍)、IP-10(2.3倍)、MIG(2.3倍)及びIL-12(2.5倍)を分泌したが、TGF- β のレベルは低下した(1.8倍;表1B)。免疫抑制メディエーターPGE-2及びIL-10は、SLC処置マウスの腫瘍部位では変化しなかった。しかし、SLC処置マウスの脾臓におけるPGE-2レベルの有意な減少があった。SLC投与が有意な特異的全身性免疫応答を誘導するかどうかを決定するために、SLC及び希釈剤処置CC-10 TAGマウスからの脾臓細胞を、放射線照射したCC-10 TAG腫瘍細胞と共に試験管内で24時間共培養し、そしてGM-CSF、IFN- γ 及びIL-10をELISAによって決定した。照射腫瘍細胞による二次刺激の後、SLC処置腫瘍保有マウス由来の脾細胞は、有意に増加したレベルのIFN- γ (5.9倍)及びGM-CSF(2.2倍)を分泌した。対照的に、IL-10分泌は5倍減少した(表3B)。

【0271】

実施例6：CC-10タグマウスのSLC処置は腫瘍部位、リンパ節及び脾臓のDC及びT細胞浸潤が向上する。

GM-CSF及びIFN- γ の細胞供給源を決定するために、腫瘍、リンパ節及び脾臓の単一細胞懸濁液をSLC及び希釈剤対照処置CC-10 TAGマウスから単離した。Tリンパ球浸潤及び細胞内サイトカイン産生をフローサイトメトリーによって評価した。細胞を染色して、各部位のDC浸潤を定量した。希釈剤処置対照群と比較して、SLC処置CC-10 TAGマウスは、腫瘍部位、リンパ節及び脾臓で細胞がDC表面マーカーのCD11c及びDEC205を発現する頻度の有意な増加を示した(表2B)。同様に、希釈剤処置対照群と比較して、SLC処置CC-10 TAGの腫瘍部位、リンパ節及び脾臓でCD4及びCD8細胞がIFN- γ 及びGM-CSFを発現する頻度の有意な増加があった(表2B)。

【0272】

実施例7：SLC仲介抗腫瘍応答はIFN- γ 、MIG及びIP-10を必要とする

ここで提示される研究は、SLC仲介抗腫瘍応答が腫瘍部位でのIFN- γ 、IP-10及びMIGの同化作用の向上を伴うことを教示する。IP-10、MIG及びIFN- γ は生体内で強力な抗腫瘍活性を有することが知られている。この文脈において、これら

10

20

30

40

50

のサイトカインの増大がS L C 仲介腫瘍減少におけるエフェクター分子として役立つかどうかを決定するために研究を行った。ここでは、S L C 仲介抗腫瘍応答がサイトカインI P - 1 0、M I G 及びI F N - を必要とすることを示す。

【0273】

生体内S L C 仲介抗腫瘍応答におけるI F N - 、I F N - 誘導性タンパク質I P - 1 0 (I P - 1 0) 及びI F N - (M I G) によって誘導されるモノカインの役割を決定した。生体内でのI P - 1 0、M I G 及びI F N - の枯渇は、S L C の抗腫瘍効果を有意に減少させた。腫瘍部位でのサイトカイン産生の評価から、I F N - 、M I G 及びI P - 1 0 の相互依存性が示された。これらのサイトカインのいずれか1つを生体内で中和すると、3つのサイトカインの全てが同時に減少した。これらの知見は、S L C 仲介抗腫瘍応答が腫瘍部位でI P - 1 0、M I G 及びI F N - の誘導を必要とすることを示す。

10

【0274】

材料及び方法

細胞培養及び腫瘍形成モデル

弱い免疫原性肺癌であるL e w i s 肺癌 (3 L L、H - 2^b) を、生体内でのS L C 仲介抗腫瘍応答に重要なサイトカインの評価に利用した。細胞を、10%ウシ胎仔血清 (F B S) (G e m i n i B i o p r o d u c t s、C a l a b a s a s、C A)、ペニシリン (100 U / m l)、ストレプトマイシン (0.1 m g / m l)、2 m M グルタミン (J R H B i o s c i e n c e s、L e n e x a、K S) を補充したR P M I 1640 培地 (I r v i n e S c i e n t i f i c、S a n t a A n n a、C A) を含む25 c m³ 組織培養フラスコ中で単層として通常通り培養し、空気中5% C O₂ を含む加湿雰囲気中で37℃に維持した。細胞系はマイコプラズマフリーであり、液体N₂から凍結ストック細胞を解凍する前に10継代まで使用した。腫瘍形成実験のために、10⁵個の3 L L 腫瘍細胞をC 57 B 1 / 6 の右上肩甲上領域に皮下注射し、腫瘍体積を週に3回モニターした。5日目に、確立された腫瘍を、0.5 µ g のネズミ組換えS L C 又はP B S 希釈液 (P e p r o T e c h、R o c k y H i l l、N J) の腫瘍内注射で週に3回2週間にわたって投与して処置した。製造業者によって報告されたエンドトキシンレベルは、1 µ g (1 E U / µ g) あたり0.1 n g 未満のS L C であった。注射に使用したS L C の量 (0.5 µ g) を、製造業者によって提供された試験管内生物活性データによって決定した。総ネズミT細胞に対するS L C の最大走化活性は100 n g / m l であることが分かった。S L C 仲介抗腫瘍特性の生体内評価のために、各腫瘍内注射についてこの量よりも5倍多く利用した。同量のマウス血清アルブミン (S i g m a、S t . L o u i s、M O) を対照注射のために無関係なタンパク質として利用した腫瘍形成実験も行った。S L C 処置の24時間前、次いで週3回、マウスを実験期間中に35 m g / 用量の抗I P - 1 0 又は抗M I G、及び100 µ g / 用量の精製I F N - (A T C C R 4562) 又は35 m g / 用量の対照抗体で腹腔内投与により処置した。そこで投与された抗体の用量では、腫瘍部位でのそれぞれのサイトカインの有意な生体内枯渇があった。各腫瘍の2つの二等分線直径をキャリパーで測定した。容量は、式 (0.4) (a b²) を用いて計算した。ここで、「a」はより大きい直径、「b」をより小さい直径とした。

20

30

【0275】

サイトカインE L I S A

M I G、I P - 1 0 及びI F N - を、上記二重リガンド法の改変を用いて定量した。M I G 及びI P 10 抗体並びに組換えサイトカインタンパク質は、R & D (M i n n e a p o l i s、M N) から得た。I F N - 抗体対及び組換えサイトカインはP h a r m i n g e n 製であった。I F N -、M I G 及びI P - 1 0 のE L I S A 感受性は15 p g / m l であった。

【0276】

結果

S L C は直接的な抗血管新生効果を有することが証明されているため、本発明のモデルで観察された腫瘍の減少は、血管新生を阻害する際におけるI F N - を分泌するT細胞

40

50

によるT細胞依存性免疫並びに関与が原因である可能性がある。IFN- は、抗癌免疫を促進する一連の生物学的効果を仲介する。MIG及びIP-10は、IFN- によって誘導される強力な血管新生抑制因子であるため、本発明者は、これらがIFN- に加えてSLC投与後の腫瘍縮小の一部を担うと推定した。

【0277】

腫瘍部位へのDC及びT細胞の共局在がSLC仲介抗腫瘍応答にとって十分であったかどうか、及び/又は、腫瘍部位でのサイトカインMIG、IP-10及びIFN- の付随的な相対的増加が腫瘍縮小の役割を果たすかどうかを決定するために、これらのサイトカインを、SLC処置マウスにおいて抗体で枯渇させた。抗IP-10、MIG及びIFN- 抗体は、SLCの有効性を有意に阻害した(対照抗体群と比較して $*p < 0.01$)。腫瘍部位でのサイトカイン測定は、IFN- の中和がこれらのサイトカインの減少を引き起こしたため、腫瘍部位でのMIG及びIP-10の相対的増加がIFN- 依存性であることを示した。したがって、SLC処置マウスの腫瘍部位でのIFN- の増加により、IP-10及びMIGの相対的増加を説明することができた。また逆も観察された。これらのサイトカインの中和はIFN- の減少を引き起こしたため、腫瘍部位におけるIFN- 産生はMIG及びIP-10に依存することが分かった。したがって、SLC処置マウスにおけるIFN- 、MIG及びIP-10は相互依存性を示した。というのは、これらのサイトカインのいずれか1種の生体内での中和は、3種のサイトカインの全ての付随する減少を引き起こしたからである。MIGとIP-10の両方は、腫瘍部位でさらにIFN- を増幅することができる刺激CXCR3発現活性化Tリンパ球に対して走化性である。本発明の結果は、SLCの抗腫瘍特性がDC及びT細胞の共局在化におけるその走化性能力のみならずIFN- 、IP-10、MIGなどの重要なサイトカインの誘導に起因する可能性があることを示唆する。

【0278】

10^5 個の3LL腫瘍をC57BL/6マウスに移植した。腫瘍移植の5日後に、マウスを0.5 µgの組換えマウスSLCで週3回腫瘍内処置した。SLC投与の1日前に、マウスにそれぞれのサイトカイン抗体を腹腔内注射した。抗体を週に3回投与した。SLC処置マウスは、希釈剤処置対照腫瘍保有マウスと比較して、IFN- 、MIG及びIP-10を有意に誘導した($p < 0.001$)。生体内でのIFN- の中和はIFN- 、IP-10及びMIGを減少させたが、MIG及びIP-10の中和はこれらのサイトカインの相対的な減少をもたらした。また、MIGの中和は、IFN- 及びIP-10の減少に至った。結果を総タンパク質のpg/mgとして表す。総タンパク質はBradfordアッセイによって決定した。これらの実験の結果を以下の表5に示す。

【0279】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 5

| 処置群 | IFN γ | MIG | IP10 |
|-------------------------|----------------|------------------|------------------|
| 希釈剤処置 | 306 \pm 25 | 599 \pm 29 | 562 \pm 54 |
| 対照抗体 + S L C | 2,200 \pm 57 | 10,350 \pm 159 | 10,900 \pm 168 |
| 抗 I F N 抗体 + S L C | 800 \pm 38 | 30 \pm 27 | 5400 \pm 14 |
| 抗体 I P - 1 0 抗体 + S L C | 990 \pm 102 | 3390 \pm 150 | 2001 \pm 45 |
| 抗 M I G 抗体 + S L C | 725 \pm 33 | 7970 \pm 138 | 5760 \pm 78 |

【 0 2 8 0 】

実施例 8：遺伝子療法系アプローチのマウスモデルにおける S L C 仲介抗腫瘍応答

上記の実施例で提供されたデータは、S L C ポリペプチドが生体内で同系 T 細胞依存性抗腫瘍応答をどのように仲介するのかを実証するものである。直接注射可能なベクターを使用した遺伝子治療系抗腫瘍アプローチを探索するために、本発明者はネズミ S L C c D N A (A d - S L C) を発現するアデノウイルス構築物を作製した。これらの構築物では、ネズミ二次リンパ系ケモカインの c D N A を I n v i t r o g e n 製 p M H 4 プラスミドの C M V プロモーターの下流にクローニングし、シャトルベクターとして使用した。

【 0 2 8 1 】

全 E 1 欠損 A d - 5 ゲノムを含む p J M 1 7 プラスミドを組換えベクターとして使用した（例示的な方法については、例えば、C a n c e r G e n e T h e r 1 9 9 7 J a n - F e b ; 4 (1) : 1 7 - 2 5 を参照されたい）。マウス A d S L C を、マウス S L C c D N A を含むシャトルプラスミド p M H 4 と p J M 1 7 プラスミドとの間の組換え事象を介した 2 9 3 細胞における試験管内組換え事象によって調製した。

【 0 2 8 2 】

A d S L C のクローンを、2 9 3 細胞に及ぼす細胞変性効果を誘導する培地能力の希釈分析を制限することによって得、本発明者の研究室で開発したネズミ S L C 特異的 E L I S A によって確認した。ウイルスストックを、2 9 3 細胞の増幅、その後 C s C l 精製、透析及び - 8 0 °C でのグリセロール (1 0 % v o l / v o l) ストックとして保存によって得た（例えば、C a n c e r G e n e T h e r 1 9 9 7 J a n - F e b ; 4 (1) : 1 7 - 2 5 ）。

【 0 2 8 3 】

1 系統肺胞癌細胞 (L 1 C 2) 及びルイス肺癌細胞 (C 5 7 B L / 6 由来の 3 L L) の試験管内形質導入は、これらの細胞系により、S L C 特異的 E L I S A により決定される時に 1 0 0 : 1 の M O I で 1 0 n g / m l / 1 0 ⁶ 細胞 / 2 4 時間 S L C の産生に至った。次に、移植可能なネズミ L 1 C 2 肺腫瘍モデルを使用して A d - S L C 構築物の生体内抗腫瘍効果を決定した。ウイルスストックの 1 0 ⁸ p f u を C 5 7 B L / 6 マウスへの腫瘍内注射のために 1 0 0 μ l の P B S に添加した。1 0 ⁵ 個の細胞をマウスの上肩甲上部領域に注射し、5 日後に A d - S L C 又は対照 A d ベクターの腫瘍内注射で、1 0 ⁷ ~ 1 0 ⁹ の p f u 範囲で 3 週間にわたって 1 週間に 1 回処置した。インスリン注射器を用いてウイルス

を腫瘍に注射し、その際、注射液をゆっくりと送達して、腫瘍内にウイルス粒子を均一に分布させた。

【0284】

図4に示すように、Ad-SLCベクターの腫瘍内注入により、マウスの60%において腫瘍が完全に退縮したが、対照Adベクターはこの効果を示さなかった。また、本発明者は、 10^8 p f uでのAd-SLCの単一腫瘍内用量の抗腫瘍効果を決定し、そして、これが3用量程度に有効であることを見出した。Ad-SLC療法に応答して腫瘍を拒絶するマウスは、 5×10^5 の親腫瘍の二次的チャレンジを拒絶することができた。これらの結果は、生体内SLC遺伝子治療戦略により、同系肺癌モデルにおいて腫瘍を有意に縮小させることができることを示す。

10

【0285】

本明細書に開示される生体内遺伝子導入方法は、癌を治療するための臨床関連モデルを提供する。特に、これらの生体内モデルは、癌が自発的に発生する（したがって、同系である）ため、直接的に関連する癌モデルである。さらに、本明細書に開示される遺伝子治療法は、臨床モデル、すなわちSLCポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの投与と直接並行する。この遺伝子治療ベクターの投与が腫瘍負荷を低減することが示されるという事実は、癌を治療するための臨床的方法における当該ベクターの使用を強力に支持する直接的な証拠を提供する。結果として、このモデルは、SLC系遺伝子療法を最適化し特徴付けるのに特に有用なツールとなる。

【0286】

20

実施例9：ヒト遺伝子治療系アプローチにおけるSLC仲介抗腫瘍応答

ヒトSLC cDNAを発現するアデノウイルス構築物などのベクターを使用して、ヒト遺伝子治療系抗腫瘍アプローチを採用できる。これらの構築物において、ヒト二次リンパ系ケモカイン用のcDNAを、CMVプロモーターなどの適切な程度の発現を可能にするプロモーターの下流にクローニングすることができる。

【0287】

全E1欠損Ad-5ゲノムを含むpJM17プラスミドなどのプラスミドを組換えベクターとして使用することができる（例示方法については、例えば、Cancer Gene Ther 1997 Jan - Feb; 4(1): 17-25を参照されたい）。ヒトAdSLCを、ヒトSLC cDNAを含むシャトルプラスミドと組換えプラスミドとの間の組換え事象を介した293細胞における試験管内組換え事象によって調製することができる。

30

【0288】

AdSLCのクローンを、293細胞などの細胞に及ぼす細胞変性効果を誘導する培地能力の希釈分析を制限することによって得、本発明者の研究室で開発したヒトSLC特異的ELISAによって確認することができる。ウイルスストックを、細胞の増幅、その後CsCl精製、透析及び-80でのグリセロール(10% vol/vol)ストックとして保存によって得ることができる（例えば、Cancer Gene Ther 1997 Jan - Feb; 4(1): 17-25）。

【0289】

1系統肺胞癌細胞(L1C2)及びルイス肺癌細胞(3LL)などの系統の試験管内形質導入は、これらの細胞系により、SLC特異的ELISAにより決定されるときに100:1のMOIでSLCの産生に使用できる。移植可能なネズミL1C2肺腫瘍モデルと同等の細胞を使用してAdSLC構築物の生体内抗腫瘍効果を決定することができる。ウイルスストックの 10^8 p f uを腫瘍内注射のために100 μ lのPBSに添加することができる。10⁵個の細胞を腫瘍近傍に注射し、5日後に腫瘍を、10⁷~10⁹のp f u範囲で3週間にわたって1週間に1回のSLCベクターの腫瘍内注射で処置した。一方法では、インスリン注射器を用いてウイルスを腫瘍に注射し、その際、注射液をゆっくりと送達して、腫瘍内にウイルス粒子を均一に分布させた。

40

【0290】

実施例10：NSCLCにおける典型的な腫瘍内樹状細胞(DC)ベースのエキスビボ療

50

法におけるアデノウイルス CCL-21 / SLC の使用

この例では、*ex vivo* で生成された遺伝子改変 DC の腫瘍内投与を利用して、その場での腫瘍抗原取り込み及び提示を達成する方法を実証する。この実施例では、成熟宿主 DC を腫瘍部位に引きつけるために、DC に CCL-21 (二次リンパ組織ケモカイン (SLC)) を発現するアデノウイルスベクター構築物を形質導入した。CCL-21 は成熟 DC 及び活性化 T 細胞を強力に引きつけるので、CCL-21 を発現する DC の腫瘍内注射 (*i.t.*) により肺癌モデルにおいて強力な抗腫瘍応答が得られる。

【0291】

この例示的なモデルでは、 10^5 個の系統 1 肺胞細胞癌 (L1C2) 細胞を利用して同系 BALB/c マウスに皮下腫瘍を確立させた。確立された腫瘍を 1 週間間隔で 10^6 個の DC-Ad-CCL-21 (CCL-21 の $10\text{ ng/ml} / 10^6$ 細胞 / 24 時間) で 3 週間にわたって処置した。DC-Ad-CCL-21 で腫瘍内処置したマウスの 60% が完全な腫瘍撲滅を示した。対照的に、非改変ベクター又は対照ベクター改変 DC (DC-Ad-CV) で処置したマウスの 12% しか応答しなかった。これらの結果に基づいて、本発明者は、ヒト CCL-21 (Ad-CCL-21) を発現するアデノウイルスベクターを構築し特徴付けた。ヒト単球由来の DC を、GM-CSF 及び IL-4 を含む培地で培養した。6 日目の形質導入後に、CCL-21 タンパク質産生を ELISA によって 8 日目に評価した。50:1 又は 100:1 の MOI で Ad-CCL-21 が形質導入された DC は、 $71 \pm 15\text{ ng/ml}$ 及び $91 \pm 5\text{ ng/ml} / 10^6$ 細胞 / 48 時間を生じた。評価された MOI では、DC は、CD83 又は CCR7R 発現を有意に上方調節することなく細胞生存率及び未成熟表現型を維持した。さらに、DC-Ad-CCL-21 は 10^5 個よりも少なくとも末梢血リンパ球及び LPS 刺激 DC の有意な走化性を引き起こした。

【0292】

これらの研究は、NSCLC における腫瘍内 DC-Ad-CCL-21 療法の使用が成功することに関する証拠となる。

【0293】

実施例 11: PDL1 発現は CCL21 遺伝子改変樹状細胞の第 1 相試験における免疫応答と相関する

背景

患者が CCL21 を受けた (細胞仲介免疫応答を刺激しかつ血管新生を阻害することによって抗腫瘍応答を誘発するために Tech ID: 20538 / UC Case 2001-381-0 ケモカインに記載された CCL21 遺伝子修飾 DC の注射による腫瘍への導入を介して) 最初の試験において、治療の開始時に肺癌細胞上で PDL1 表面発現を上方調節した患者は、CCL21 療法に対する特異的免疫応答が限られている又は全くないことが分かった。また、CCL21 療法後に PDL1 がさらに上昇した患者もいた。これは、抗体その他の手段によって PD1 / PDL1 経路を遮断することが、CCL21 又は PD1 / PDL1 経路療法のいずれかを改善するための有効な手段であるという証拠となる。これは、併用療法が非常に有効であることを示している。

【0294】

肺癌患者の抗腫瘍免疫応答は、二次リンパ系ケモカイン (SLC / CCL21) 遺伝子を発現するために複製欠損アデノウイルス (Ad) ベクターが形質導入された自己樹状細胞 (DC) の腫瘍内 (IT) 投与によって誘発できる。ここで、腫瘍 PD-L1 発現の状況における CCL21 遺伝子改変 DC (Ad-CCL21-DC) 投与後の腫瘍特異的免疫応答を分析した。

【0295】

方法

第 I 相非ランダム化用量漸増マルチコホート試験を実施してステージ III B / IV の NSCLC 患者を登録した。16 人の患者が IT 注射 (0 日目及び 7 日目) により Ad-CCL21-DC の用量で 2 回のワクチン接種を受けた (A、B、C 又は D; 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 又は 3×10^7 個の細胞 / 注射)。末梢血を抗原特異的 ELISP

OTアッセイのために収集し、そして原発性肺癌のCT誘導針生検を、リアルタイムPCR及び免疫組織化学による細胞浸潤の評価によってPD-L1発現のために得た。

【0296】

結果

16人の被験体の末梢血をELISPOTアッセイによって評価した。陽性応答は、>20スポット/2×10⁵細胞の絶対数(ポジティブレスポnder; PR)を有するバックグラウンドを超えるスポット数の2倍の増加として定義した。混合応答は、ワクチン接種後の時点(混合レスポnder; MR)と比較して0日目に高いIFN- γ バックグラウンド発現を有する陽性応答として定義した。全レスポnderの38%(6/16)に対して19%(3/16)のMR及び19%(3/16)MRがあった。平均PD-L1遺伝子コピー数は、7日目に394(MR)及び684(PR)と比較して1344(非レスポnder; NR)であった。腫瘍CD8のT細胞浸潤は、40%(6/15; 全被験者)、33%(3/9; NR)及び50%(3/6; MR及びPR)で誘導された。

【0297】

結論

SLC/CCL21遺伝子を発現する自己樹状細胞の腫瘍内投与は、(1)抗腫瘍特異的免疫応答が誘発され、かつ、より低いPD-L1発現と相関すること、及び(2)腫瘍へのCD8 T細胞浸潤が誘導されることを実証した。

【0298】

実施例12: 腫瘍内CCL21及びチェックポイント遮断療法の生体内モデル

組換えネズミCCL21(rmCCL21、SLC)又は関連する対照を、NSCLC肺腫瘍(それぞれ3LL又はLKR13)を有する同系マウス(C57/B16又は129/sv)に注射する。SLCを、腫瘍サイズが8×8mm(典型的には約d10)に達したときに腫瘍内に注射し、そして8日後に再度腫瘍内に注射して天然に存在する宿主抗腫瘍免疫応答を増大させる。以前の知見に基づいて、SLCはT細胞(ヘルパー及び細胞傷害性)及び有益なマクロファージを化学走性化するであろう。宿主の抗腫瘍免疫応答が上昇するにつれて、肺腫瘍は、T細胞上のPD-1受容体との結合についてのPD-L1及びPD-L2のアップレギュレーションを含めた免疫回避シグナル伝達事象を開始してT細胞を失活させ、かつ、腫瘍に対するT細胞の将来の動員を阻害するという証拠がある。このため、抗PD1(ネズミ)を、CCL21の最初の注射の2日後、その後実験の期間中4日ごとに腹腔内注射する。全体として、宿主抗腫瘍免疫応答はSLCで補強され、腫瘍の免疫回避は、抗PD1の適切なタイミングでの送達によって防止されることが予想される。これらのマウス研究の主要評価項目は腫瘍増殖率である。二次エンドポイントは、治療前浸潤(n=2マウス/群)に対する治療後(n=4マウス/群)の免疫細胞浸潤である。未処置対照群の腫瘍が22×22mm(典型的にはd28)に達したときに全ての処置後マウスを安楽死させる。これらの最初の併用研究の完了後に、抗PD1処置と組み合わせたときの同腹仔に適合したマウスからのCCL21遺伝子改変自己樹状細胞の腫瘍内注射の有効性を評価する。これらの前臨床試験の結果を使用して、進行期のNSCLC患者におけるこの組み合わせの安全性及び有効性を試験するように現在設計されている第I/II相臨床試験をガイドする。

【0299】

図8は、各群から処置前及び処置後のマウスにおいて調査される例示的な免疫細胞マーカーのチャートである。これらのマーカーは、IHC及び他の手段による腫瘍浸潤免疫細胞における測定値であることができる。

【0300】

実施例13: 腫瘍内CCL21及びチェックポイント遮断はNSCLC腫瘍増殖を協同的に阻害する

CCL21-DCは、肺癌のよく特徴付けられた同系KRASG12Dネズミモデルにおいて、単独療法として以前に評価されていた。このモデルでは、腫瘍成長の減少、自己腫瘍に対する腫瘍浸潤リンパ球(TIL)細胞溶解活性の増加、並びに腫瘍における及び

脾臓における全身的に I F N 及び T N F の増加が観察された。同じ L K R 1 3 マウスモデルを使用して、C C L 2 1 療法とチェックポイントインヒビター療法との組み合わせを分析した。抗 P D - 1 抗体 (1 μ g / m l) 又は対照抗体 (1 μ g / m l) n = 8 マウス / 群の存在下で、自己腫瘍に対する試験管内 T 細胞細胞溶解活性を評価した。T I L は、希釈剤 C C L 2 1 - D C 処置群の腫瘍由来であった。

【 0 3 0 1 】

抗 P D - 1 単独療法も腫瘍の増殖を阻害し、自己腫瘍に対する T I L 細胞溶解活性を増加させ、そして腫瘍内において及び脾臓において全身的に I F N 及び T N F を増加させることが観察された。C C L 2 1 - D C 処置群からの T I L 活性が P D - 1 遮断によって増強され得るかどうかを決定するために、試験管内細胞溶解アッセイを実施した。C C L 2 1 - D C 群からの T I L は、対照抗体と比較して P D - 1 抗体の存在下で自己腫瘍に対して有意に大きな細胞溶解活性を有していた (図 9 、希釈剤に対して * p < 0 . 0 5 、C C L 2 1 - D C + 対照抗体に対して * * p < 0 . 0 5) 。

10

【 0 3 0 2 】

組み合わせて投与した腫瘍内 (I T) C C L 2 1 及び腹腔内抗 P D - 1 を、L K R 1 3 腫瘍保有マウスにおいても評価した。両単独療法は、最終腫瘍体積を約 3 倍に減少させ、その組み合わせは、いずれかの薬剤単独よりも有効であることが判明した。同系 3 L L マウス肺癌モデルを利用して同様の結果が得られた。両単独療法は、腫瘍の増殖を有意に低下させ、それによって、剖検時の最終腫瘍体積は対照群の約半分であり、チェックポイント遮断と C C L 2 1 との併用は抗腫瘍活性をほぼ 2 倍に増強した。まとめると、これらのデータは、腫瘍内 C C L 2 1 及びチェックポイント遮断がいずれかの単独療法よりも N S C L C 腫瘍増殖を協同的に阻害するという仮説を支持するものである。

20

【 0 3 0 3 】

当業者であれば、上記の例示的な実施例に示された本発明の多くの変更及び変形が想起されると予想される。結果として、本発明は、特許請求の範囲においてのみ限定されるべきである。

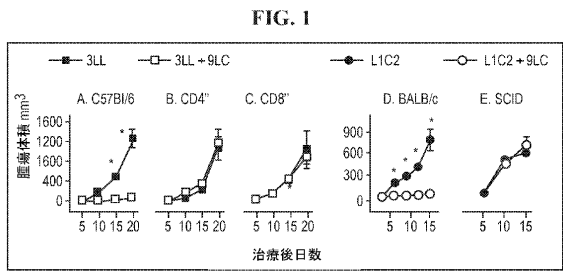
30

40

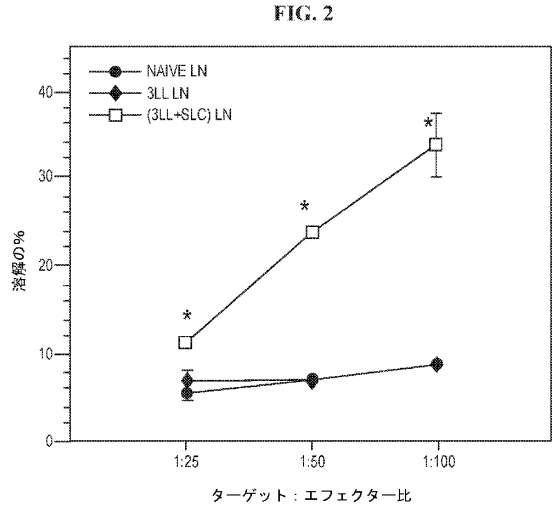
50

【図面】

【図 1】

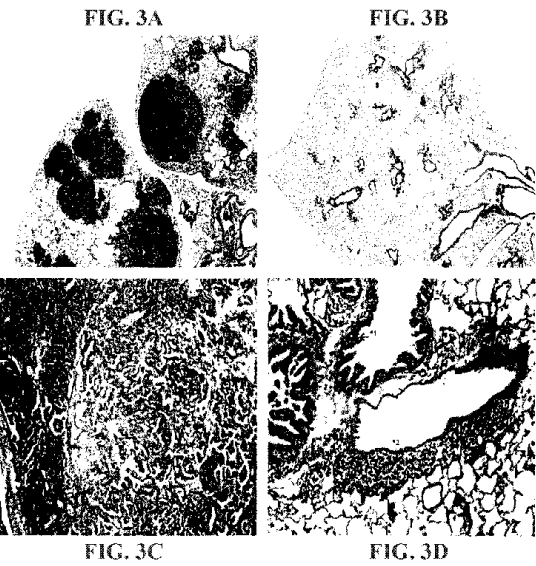


【図 2】

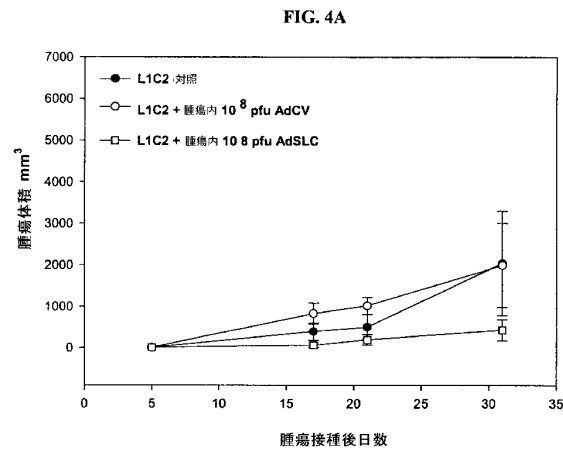


10

【図 3】

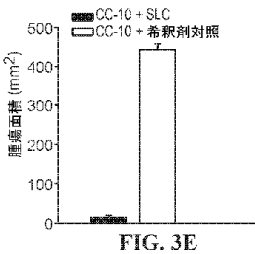


【図 4 A】



20

30



40

50

【図 6 A】

FIG. 6A
表 2 A

| 群 | CD4 | | | | CD8 | | | | CD11c+DEC205 | | | |
|-----------|---------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|
| | IFN- γ | GM-CSF | IFN- γ | GM-CSF | IFN- γ | GM-CSF | IFN- γ | GM-CSF | IFN- γ | GM-CSF | IFN- γ | GM-CSF |
| 腫瘍 | % | MCF | % | MCF | % | MCF | % | MCF | % | MCF | % | MCF |
| 3LL | 3.6 | 103 | 4.8 | 31 | 1.9 | 389 | 1.7 | 44 | 4 | 103 | | |
| 3LL + SLC | 7.4* | 187 | 5.3 | 52* | 3.2* | 306 | 2.7* | 47 | 13* | 108 | | |
| LN | 0.9 | 66 | 0.8 | 50 | 0.9 | 131 | 0.5 | 78 | 32 | 79 | | |
| 3LL + SLC | 17* | 340* | 1.2* | 181* | 1.7* | 181 | 1.3* | 107* | 40* | 118* | | |

* $p<0.01$ ($n = 6$ マウス/群)

FIG. 4B

| 治療 | 治療後完全に腫瘍撲滅したマウスの数 |
|-----------------------|-------------------|
| L1C2 対照 + 治療なし | 0/8 |
| L1C2 + 腫瘍内 pfu Ad-CV | 0/8 |
| L1C2 + 腫瘍内 pfu Ad-SLC | 5/8 |

【図 4 B】

【図 6 B】

FIG. 6B
表 2B

| 群 | CD4 ⁺ | | | | CD8 ⁺ | | | | CD11c+DEC205 | | | |
|-------------|------------------|--------|---------------|--------|------------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|
| | IFN- γ | GM-CSF | IFN- γ | GM-CSF | IFN- γ | GM-CSF | IFN- γ | GM-CSF | IFN- γ | GM-CSF | IFN- γ | GM-CSF |
| 腫瘍 | % | MCF | % | MCF | % | MCF | % | MCF | % | MCF | % | MCF |
| CC-10 + 希釈剤 | 2 | 124 | 2.4 | 38 | 2 | 307 | 1.5 | 53 | 3.2 | 121 | | |
| CC-10 + SLC | 5* | 187 | 5.2* | 89 | 5.3* | 311 | 3.7 | 89 | 11.7* | 132 | | |
| リンパ節 | | | | | | | | | | | | |
| CC-10 + 希釈剤 | 3.2 | 154 | 3.3 | 80 | 1 | 200 | 1.3 | 52 | 5.3 | 54.4 | | |
| CC-10 + SLC | 6.8* | 173 | 5.7* | 102 | 6.8* | 244.9* | 5* | 55 | 12.7* | 79 | | |
| 脾臓 | | | | | | | | | | | | |
| CC-10 + 希釈剤 | 3.9 | 163 | 1.5 | 60 | 1.1 | 311 | 0.7 | 88 | 5.9 | 82 | | |
| CC-10 + SLC | 4.7 | 206* | 1.6 | 168* | 3.8* | 352 | 2.1* | 54 | 11.4* | 101 | | |

* $P<0.01$, $n = 6$ 匹マウス/群。D O染色については、MCF (平均チャネル/蛍光) をDEC205について記録する。実験を2回繰り返した。

FIG. 5A
表 1 A

| 群 | NG2 | VEGF | IFN- γ | GM-CSF | IL-10 | IL-12 | TGF- β | MIG | IP-10 |
|---------------|------------------|---------------|---------------|-------------|--------------|-------------|-----------------|------------------|---------------------|
| 3LL + diluent | 28,510 \pm 400 | 757 \pm 26 | 104 \pm 15 | <5 | 244 \pm 6 | 24 \pm 6 | 5,820 \pm 578 | 1,000 \pm 200 | 15,100 \pm 1,100 |
| 3LL + SLC | 8,737 \pm 210* | 222 \pm 34* | 540 \pm 10* | 56 \pm 11 | 42 \pm 13* | 42 \pm 1* | 2,473 \pm 26* | 6,600 \pm 100* | 39,400 \pm 2,300* |

* $p<0.01$ 希釈剤処置腫瘍維持マウスと比較。 $n = 6$ マウス/群

FIG. 5B
表 1 B

| 群 | NG2 | VEGF | IFN- γ | GM-CSF | IL-12 | MIG | IP-10 | TGF- β |
|--------------|------------------|---------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|---------------|
| CC-10 + 希釈剤 | 12,410 \pm 384 | 980 \pm 38 | 213 \pm 11 | 74 \pm 5 | 110 \pm 8 | 47.8 \pm 5 | 108 \pm 6 | 281 \pm 0 |
| CC-10 + SLC | 11,945 \pm 208 | 222 \pm 53* | 239 \pm 20 | 611 \pm 1* | 235 \pm 15* | 98.4 \pm 4 | 187 \pm 2* | 154 \pm 15* |
| FVB 対照 | 6,023 \pm 40 | 222 \pm 53 | 129 \pm 8 | 73 \pm 3 | 167 \pm 7 | 72.3 \pm 6 | 57 \pm 5 | 118 \pm 9 |
| 腫瘍維持マウス | | | | | | | | |
| FVB 希釈剤マウス | 74 \pm 2 | 107 \pm 36 | 85 \pm 0 | 44 \pm 1 | 66 \pm 8 | 89 | 56 \pm 5 | 20 \pm 2 |
| 希釈剤処置 CC-10 | 643 \pm 51 | 262 \pm 4 | 87 \pm 5 | 45 \pm 3 | 67 \pm 6 | 42 | 63 \pm 3 | <15 |
| SLC 処置 CC-10 | 44 \pm 10* | 13 \pm 1* | 84 \pm 11 | 110 \pm 5* | 137 \pm 5* | 142* | 216 \pm 5* | 17 \pm 5 |
| リンパ節 | | | | | | | | |
| FVB 対照マウス | 148 \pm 3 | 204 \pm 18 | 78 \pm 6 | 66 \pm 2 | 195 \pm 5 | 70 | <15 | 102 \pm 4 |
| 希釈剤処置 CC-10 | 94 \pm 3 | 142 \pm 12 | 81 \pm 4 | 42 \pm 2 | 95 \pm 10 | 46 | 43 \pm 3 | 139 \pm 6 |
| SLC 処置 CC-10 | 113 \pm 4 | 221 \pm 32 | 86 \pm 20 | 44 \pm 3 | 233 \pm 6* | 106* | 100 \pm 2* | 89 \pm 7* |

* $P<0.01$ 希釈剤処置 CC-10 腫瘍維持マウスと比較

【図 7 A】

FIG. 7A
表 3 A

| 群 | IFN- γ | GM-CSF | IL-10 | IL-12 |
|------------------------------|----------------|-------------|---------------|--------------|
| 腫瘍形成 | | | | |
| 腫瘍なしのマウス、 3 L L で構成的に刺激 | 220 \pm 30 | 0 | 0 | 78 \pm 1 |
| 希釈剤処置、3 L L で 構成的に刺激 | 85 \pm 19 | 37 \pm 2 | 0 | 16 \pm 3 |
| 希釈剤処置、C C - 1 O 細胞で構成的に刺激 | 117 \pm 41 | 0 | 18 \pm 1 | 60 \pm 12 |
| S L C 処置、3 L L で 構成的に刺激 | 97 \pm 15 | 25 \pm 9* | 156 \pm 93 | 51 \pm 1 |
| リンパ節 | 113 \pm 21 | 0 | 16 \pm 1 | 111 \pm 1 |
| 腫瘍なしのマウス、 3 L L で構成的に刺激 | 2731 \pm 99* | 71 \pm 2* | 181 \pm 14* | 206 \pm 7* |
| 希釈剤処置、3 L L で 構成的に刺激 | 248 \pm 11 | 16 \pm 1 | 0 | 60 \pm 1 |
| 希釈剤処置、C C - 1 O 細胞で構成的に刺激 | 87 \pm 12 | 34 \pm 7 | 0 | 48 \pm 1 |
| S L C 処置、3 L L で 構成的に刺激 | 166 \pm 16 | 16 \pm 1 | 297 \pm 10 | 25 \pm 1 |
| リンパ節 | 96 \pm 17 | 52 \pm 8 | 816 \pm 25 | 84 \pm 6 |
| 腫瘍なしのマウス、 3 L L で構成的に刺激 | 256 \pm 10 | 19 \pm 1 | 0 | 25 \pm 1 |
| 希釈剤処置、3 L L で 構成的に刺激 | 1242 \pm 70* | 49 \pm 6 | 133 \pm 17* | 108 \pm 3* |

* $p < 0.01$ 希釈剤処置マウス及び S L C 構成的レベルと比較 : $n = 6$ マウス / 群。

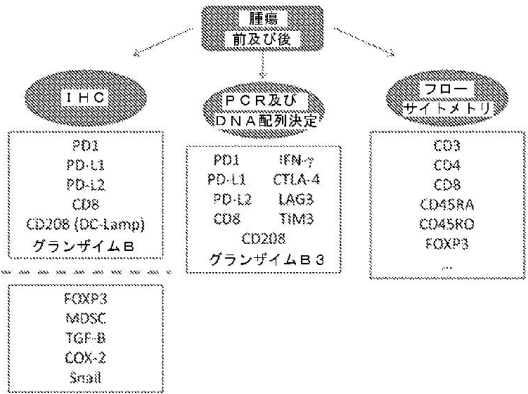
【図 7 B】

FIG. 7B
表 3 B

| 群 | IFN- γ | GM-CSF | IL-10 |
|----------------------------------|-----------------|---------------|----------------------|
| 腫瘍なし | | | |
| 腫瘍なしのマウス、C C - 1 O 細胞で構成的に刺激 | 634 \pm 45 | 55 \pm 7 | 32 \pm 4 |
| 希釈剤処置 | 685 \pm 39 | 87 \pm 5 | 147 \pm 8 |
| 希釈剤処置、C C - 1 O 細胞 で構成的に刺激 | 400 \pm 38 | 104 \pm 11 | 78 \pm 2 |
| S L C 処置 | 379 \pm 28 | 132 \pm 5 | 1000 \pm 69 |
| S L C 処置、C C - 1 O 細胞で 構成的に刺激 | 617 \pm 42 | 185 \pm 3 | 49 \pm 2 |
| リンパ節 | 2265 \pm 107* | 287 \pm 10* | 200 \pm 7 α |

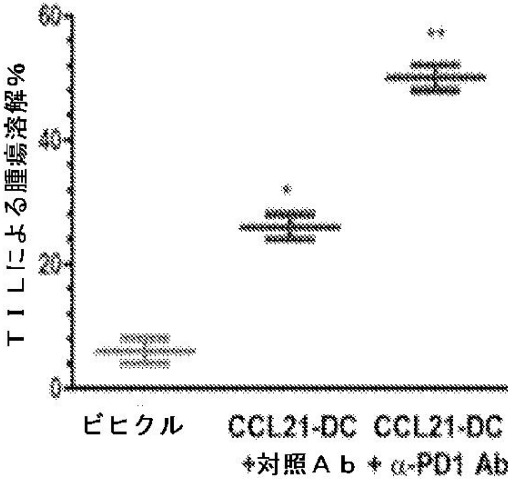
【図 8】

Figure 8



【図 9】

Figure 9



【配列表】

0007305300000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 C 0 7 K 14/52 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 N 15/19 (2006.01)

F I

A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 P 35/00
 C 0 7 K 14/52
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 N 15/19

ード 2 1 2 5

(72)発明者

シャーベン・シャルマ

アメリカ合衆国 9 0 2 3 2 カルフォルニア州カルバー・シティ、ライトクレスト・ドライブ 5 9 1
 0

(72)発明者

ジェイ・エム・リー

アメリカ合衆国 9 0 0 2 4 カルフォルニア州ロサンジェルス、ナンバー 2 0 5、レバリング・アベ
 ニュー 9 1 9

合議体

審判長 森井 隆信

審判官 星 功介

審判官 岡崎 美穂

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 3 / 1 8 5 0 5 2 (WO, A 1)

Reviews on Recent Clinical Trials, 2012年, Vo
 l. 7, pp. 10 - 23

Cancer Research, 2001年, Vol. 61, pp. 8794 - 8802

The Journal of Immunology, 2004年, Vol. 173, pp
 . 4919 - 4928

(58)調査した分野

(Int.Cl., DB名)

A61K38/00-38/58

MEDLINE / CAPLUS / BIOSIS / EMBASE / WPIDS (STN)