

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-524951

(P2022-524951A)

(43)公表日 令和4年5月11日(2022.5.11)

| (51)国際特許分類              | F I           | テーマコード(参考)        |
|-------------------------|---------------|-------------------|
| C 1 2 N 15/87 (2006.01) | C 1 2 N 15/87 | Z 4 B 0 6 5       |
| C 1 2 N 15/63 (2006.01) | C 1 2 N 15/63 | Z Z N A 4 C 0 7 6 |
| C 1 2 N 15/88 (2006.01) | C 1 2 N 15/88 | Z 4 C 0 8 4       |
| C 1 2 N 1/21 (2006.01)  | C 1 2 N 1/21  | 4 C 0 8 5         |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01)  | C 1 2 N 5/10  | 4 C 0 8 7         |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全230頁) 最終頁に続く

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| (21)出願番号 特願2021-549951(P2021-549951) | (71)出願人 520012231<br>アクティム・セラピューティクス・イン<br>コーポレイテッド<br>Act y m T h e r a p e u t i c s ,<br>I n c .<br>アメリカ合衆国 9 4 7 1 0 カリフォルニ<br>ア州パークリー、バンクロフト・ウェイ<br>6 2 6 番、スウィート・エイ |
| (86)(22)出願日 令和2年2月27日(2020.2.27)     |   |
| (85)翻訳文提出日 令和3年10月25日(2021.10.25)    |   |
| (86)国際出願番号 PCT/US2020/020240         |   |
| (87)国際公開番号 WO2020/176809             |   |
| (87)国際公開日 令和2年9月3日(2020.9.3)         |   |
| (31)優先権主張番号 62/962,140               |   |
| (32)優先日 令和2年1月16日(2020.1.16)         |   |
| (33)優先権主張国・地域又は機関<br>米国(US)          | (74)代理人 100145403<br>弁理士 山尾 憲人  |
| (31)優先権主張番号 62/934,478               | (74)代理人 100122301<br>弁理士 富田 憲史  |
| (32)優先日 令和1年11月12日(2019.11.12)       |   |
| (33)優先権主張国・地域又は機関<br>米国(US)          | (74)代理人 100157956<br>弁理士 稲井 史生  |
| (31)優先権主張番号 62/811,521               | (74)代理人 100170520   |

最終頁に続く

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 腫瘍、腫瘍常在免疫細胞および腫瘍微小環境にコロナー形成するよう操作した免疫刺激性細菌

(57)【要約】

腫瘍、腫瘍微小環境および/または腫瘍常在免疫細胞へのコロナー形成が増加し、抗腫瘍活性が増強した送達免疫刺激性細菌が提供される。免疫刺激性細菌は、鞭毛をコードする遺伝子の欠失による修飾または機能的鞭毛が産生されないように遺伝子の修飾および/または p a g P の欠失による修飾または不活性 P a g P 産物を産生するよう p a g P の修飾により修飾される。その結果、免疫刺激性細菌はフラジエリン および/または p a g P ' である。免疫刺激性細菌は、所望により細菌がアデノシンおよび/またはプリン栄養要求株となるさらなるゲノム修飾を有する。細菌は、所望により a s c t , p u r I および m s b B の 1 以上のである。サルモネラ種などの免疫刺激性細菌は、I 型インターフェロン(I F N) 発現を誘導するタンパク質または I 型 I F N 発現を誘導する活性が増加したそのバリエーションまたは I 型 I F N の構成的発現をもたらすそのバリエーションをコードするよう修飾される。細菌は、ヒト S T I N G と比較して低 N F - B シグナル伝達活性、および、所望により、高 I 型 I F N 経路シグナル伝達活性である、非ヒト種からの修

Human and Tasmanian devil STING:

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| Human     | 1 M P E S S L H P S I P C P R G H G A Q K A A L V L L S A C I A T V T W L G L G F P E H T L R Y L V L H | 50  |
| Tasmanian | 1 M P R S H L P S I P Q P R G W G A G A C V L L S L C M A A V Y L L G S A A P L Q W L L P Y             | 50  |
| Human     | 51 I A S I Q L G L L I N G V C S L A E I R R H I S Y R P G S Y W R T V R A C L G C P L R R G A L L L    | 100 |
| Tasmanian | 51 F T T V Q V G L L L K G A V C L A E E L Y H I Q S R P G S Y W A I Q A C H I Y F P Q R I S L L L      | 100 |
| Human     | 101 L S I Y F T Y S L F N A V G P P P T W M L A L L G L S Q A I N T L L G L K G L A P A R I S A V C E K | 150 |
| Tasmanian | 101 L S G Y P Y V T L S N K P N P S L T W T F A L L G L S H A L S F I L G L Q N L T S A B I S E V C E K | 150 |
| Human     | 151 G N F N V A H G L A W S Y Y I G Y L R L L P E L Q A R I R T Y N Q H Y N N L R G A V S Q R L Y I     | 200 |
| Tasmanian | 151 R H L A V A H G L A W S Y Y I G Y L R L L P F L Q T R I Q L Y N Q E N K N D V L S P E G H R L H I   | 200 |
| Human     | 201 L E F L D C G V P E N I S M A D E N I P E L D K L P Q T G D H A G I K D R V N S I Y E L L E N       | 250 |
| Tasmanian | 201 L E F L D C S V P E N I S Q A D E N I Q F L Q E L P Q H K L D R A G I K R I Y T S I Y K I S E D     | 250 |
| Human     | 251 G Q R A G T C V L E Y A T F L Q T L F A M S Q Y S Q A G F S R E D R L E Q A K L F C R T L E D I L A | 300 |
| Tasmanian | 251 G Q P A D V C V L E F A T F I Q T L F A M S Q A R A G F S R E D R L E Q A K L F C R T L E D I L E   | 300 |
| Human     | 301 D A F E S Q N N C R L L A Y Q E P A D D - S S F S L S Q E V L R H L R Q E B B E V T V S L E T       | 348 |
| Tasmanian | 301 D A F E A R D C C R L V V Q E F E D K A V S N F L S K E L L R H L R Q E R Q E S A L G E N R A       | 350 |
| Human     | 349 S A V F S T S T M S Q E P E L L S G M E K P L P L R T D - F S 379                                   |     |
| Tasmanian | 351 M V T T S S T L S Q E P Q L L S G M E Q P L S L R T D G F - 381                                     |     |

FIGURE 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

非ヒト種からの修飾インターフェロン遺伝子刺激物質(STING)タンパク質であって、ここで、非ヒトSTINGがヒトSTINGのNF- $\kappa$ Bシグナル伝達活性と比較して低いNF- $\kappa$ Bシグナル伝達活性および所望により、ヒトSTINGと比較して高いI型インターフェロン(IFN)経路シグナル伝達活性を有し、非ヒトSTINGタンパク質が、活性が増加するまたはサイトゾル核酸の非存在下で構成的に作用するように1以上の変異を含むよう修飾され；変異がアミノ酸の挿入、欠失および/または置換であり；そして所望によりSTINGタンパク質がTRAF6結合部位の欠失を有するものである、  
修飾STINGタンパク質。

10

## 【請求項 2】

非ヒト種からの修飾インターフェロン遺伝子刺激物質(STING)タンパク質またはキメラヒトSTINGタンパク質またはキメラSTINGタンパク質のバリエーションであり、修飾STINGタンパク質およびキメラSTINGタンパク質のバリエーションが、コード化STINGタンパク質の構成的活性化および/または内因性リガンドに対する感受性増強または親和性もしくは結合増加をもたらす機能獲得型(GOF)と関連する1以上の変異を含み；

STINGタンパク質が、1以上のアミノ酸の挿入、欠失および置換の1以上により修飾され；

20

キメラヒトSTINGタンパク質はヒトSTINGタンパク質の部分および非ヒトSTINGタンパク質の部分を含み；

非ヒトまたはキメラSTINGタンパク質がヒトSTINGのNF- $\kappa$ Bシグナル伝達活性と比較して、IFN- $\beta$ シグナル伝達活性および減弱した活性化B細胞の核因子カッパ軽鎖エンハンサー(NF- $\kappa$ B)シグナル伝達活性を有し；そして

1以上の変異がIFN- $\beta$ 産生を誘導するSTING活性増加または構成的活性をもたらすものである、

修飾STINGタンパク質。

## 【請求項 3】

非修飾ヒトSTINGタンパク質が配列番号305~309の何れかに示すアミノ酸の配列を含むまたは配列番号305~309の何れかに示すアミノ酸の配列と少なくとも98%配列同一性を有するそのヒトアレルバリエーションである、請求項1または請求項2の修飾STINGタンパク質。

30

## 【請求項 4】

STINGタンパク質が、第一種からのSTINGタンパク質におけるC末端テイル(CTT)領域の第二種からのSTINGタンパク質のCTTでの置き換えを含むキメラであり；

第二種のSTINGタンパク質がヒトSTINGのNF- $\kappa$ Bシグナル伝達活性より低いNF- $\kappa$ Bシグナル伝達活性を有し；そして

CTTにおけるTRAF6結合部位が所望により欠失している、

40

請求項1~3の何れかの修飾STINGタンパク質。

## 【請求項 5】

1以上の変異がヒト自己炎症性疾患乳児期発症STING関連脈管障害(SAVI)と関連するものである、請求項1~4の何れかの修飾STINGタンパク質。

## 【請求項 6】

キメラである修飾インターフェロン遺伝子刺激物質(STING)タンパク質であって、第一種からのCTT(C末端テイル)領域の第二種からのSTINGのCTTへの置き換えを含み、

第二種のSTINGタンパク質がヒトSTINGのNF- $\kappa$ Bシグナル伝達活性より低いNF- $\kappa$ Bシグナル伝達活性を有し；そして

50

C T TにおけるT R A F 6 結合部位が欠失している、  
修飾S T I N Gタンパク質。

【請求項 7】

キメラがヒトS T I N Gタンパク質の部分および非ヒトS T I N Gタンパク質の部分を含  
み；および

ヒトS T I N Gタンパク質が配列番号305～309の何れかに示すアミノ酸の配列を含  
むまたは配列番号305～309の何れかに示すアミノ酸の配列と少なくとも98%配列  
同一性を有するそのヒトアレルバリエーションである、請求項2～6の何れかの修飾S T I N  
Gタンパク質。

【請求項 8】

2つの種からのS T I N Gタンパク質の部分を含むキメラであり、それにより得られたS  
T I N Gタンパク質がI F N - ベータシグナル伝達活性を有し、ここで、第一種がヒトで  
あり、第二種がタスマニアデビル、マーモセット、ウシ、ネコ、ダチョウ、イノシシ、  
コウモリ、マナティ、トキ、シーラカンス、マウスおよびゾウギンザメから選択される、  
請求項2および4～7の何れかの修飾S T I N Gタンパク質。

【請求項 9】

非ヒトS T I N GのI型I F Nシグナル伝達活性が野生型ヒトS T I N Gタンパク質の少  
なくとも30%または少なくとも約30%である、請求項1～8の何れかの修飾S T I N  
Gタンパク質。

【請求項 10】

非ヒトS T I N GのN F - Bシグナル伝達活性が野生型ヒトS T I N G N F - Bシ  
グナル伝達活性の30%未満、20%未満、15%未満、10%未満または5%未満であ  
る、請求項1～9の何れかの修飾S T I N Gタンパク質。

【請求項 11】

非ヒト種または第二種がタスマニアデビル、マーモセット、ウシ、ネコ、ダチョウ、イ  
ノシシ、コウモリ、マナティ、トキ、シーラカンス、マウスおよびゾウギンザメから選  
択される、請求項1～10の何れかの修飾S T I N Gタンパク質。

【請求項 12】

S T I N Gの修飾が、ヒトS T I N Gを基準として、アラインメントして、インターフェ  
ロン症を生ずる変異に対応する1以上の変異であり、アラインメントが実施されるヒトS T  
I N Gの配列が配列番号305～309の何れかに示すものである、請求項1～11の何  
れかの修飾S T I N Gタンパク質。

【請求項 13】

C末端テイル(C T T)の、ヒトS T I N GのN F - Bシグナル伝達活性と比較してN F  
- Bシグナル伝達活性が低減した第二S T I N Gタンパク質からのC T Tへの置き換え  
を含む、請求項1～12の何れかの修飾S T I N Gタンパク質。

【請求項 14】

C T TにおけるT R A F 6 結合部位が欠失している、請求項1～13の何れかの修飾S T  
I N Gタンパク質。

【請求項 15】

第二C T Tがタスマニアデビル、マーモセット、ウシ、ネコ、ダチョウ、イノシシ、コ  
ウモリ、マナティ、トキ、シーラカンス、マウスまたはゾウギンザメS T I N Gタンパク  
質からである、請求項13または請求項14の修飾S T I N Gタンパク質。

【請求項 16】

第二C T Tがタスマニアデビル、マーモセット、ウシ、ネコ、ダチョウ、イノシシ、コ  
ウモリ、マナティ、トキ、シーラカンス、マウスまたはゾウギンザメS T I N Gタンパク  
質からであり、ヒトS T I N G C T Tを置き換える、請求項13または請求項14の修  
飾S T I N Gタンパク質。

【請求項 17】

置き換えC T Tが次の種から選択され、次の配列を有するまたは少なくとも98%配列同

10

20

30

40

50

一性を有するこれらの配列の各々のアレルバリエーションである、請求項 13 ~ 16 の何れかの修飾 S T I N G タンパク質：

## 【表 1】

|                     |  |              |    |
|---------------------|--|--------------|----|
| タスマニアアンデビル          | RQEEFAIGPKRAMTVTTSSTLSQEPQLLI<br>SGMEQPLSLRTDGF    | 配列番号 353、    |    |
| マーモセット              | EEEEVTVGSLKTSEVPSTSTMSQEPELLIS<br>GMEKPLPLRSDLF    | 配列番号 354、    |    |
| ウシ                  | EREVTMGSTETSVMPGSSVLSQEPELLIS<br>GLEKPLPLRSDVF     | 配列番号 355、    |    |
| ネコ                  | EREVTVGSVGTSMVRNPSVLSQEPNLLIS<br>GMEQPLPLRTDVF     | 配列番号 356、    | 10 |
| ダチョウ                | RQEEYTVCDGTLCSTDLSLQISESDLPQP<br>LRSDCL            | 配列番号 357、    |    |
| イノシシ                | EREVTMGSAETSVVPTSSTLSQEPELLIS<br>GMEQPLPLRSDIF     | 配列番号 358、    |    |
| コウモリ                | EKEEVTVGTVGTYEAPGSSTLHQEPELL<br>ISGMDQPLPLRTDIF    | 配列番号 359、    |    |
| マナティ                | EREEVTVGSVGTSSVPSPPSTSSLSQEP<br>KLLISGMEQPLPLRTDVF | 配列番号 360、    |    |
| トキ                  | CHEEYTVYEGNQPHNPSTTLHSTELNLQ<br>ISESDLPQPLRSDCF    | 配列番号 361、    | 20 |
| シーラカンス<br>(バリエント 1) | QKEEYFMSEQTQPNSSSTSCSTEPQLMI<br>SDTDAPHTLKRQVC     | 配列番号 362、    |    |
| シーラカンス<br>(バリエント 2) | QKEEYFMSEQTQPNSSSTSCSTEPQLMI<br>SDTDAPHTLKSGF      | 配列番号 363、    |    |
| ゾウギンザメ              | LTEYPVAEPSNANETDCMSSEPHLMISD<br>DPKPLRSYCP         | 配列番号 365 および |    |
| マウス                 | EKEEVTMNAPMTSVAPPSVLSQEPRLLI<br>SGMDQPLPLRTDLI     | 配列番号 366     | 30 |

## 【請求項 18】

ヒト S T I N G C T T が配列 EKEEVTVGSLKTS AVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS (配列番号 352) を含むまたはそれと少なくとも 98% 配列同一性を有するアレルバリエーションである、請求項 4 ~ 17 の何れかの修飾 S T I N G タンパク質。

## 【請求項 19】

修飾 S T I N G タンパク質がヒト S T I N G C T T がタスマニアアンデビル S T I N G からの C T T で置換されているキメラである、請求項 4 ~ 18 の何れかの修飾 S T I N G タンパク質。

40

## 【請求項 20】

タスマニアアンデビル S T I N G からの C 末端テイル (C T T) が配列：RQEEFAIGPKRAMTVTTSSTLSQEPQLLISGMEQPLSLRTDGF (配列番号 353) を含むまたはそれと少なくとも 98% 配列同一性を有するアレルバリエーションである、請求項 19 の修飾 S T I N G タンパク質。

## 【請求項 21】

T R A F 6 結合部位の欠失を含む、請求項 1 ~ 20 の何れかの修飾 S T I N G タンパク質。

## 【請求項 22】

S T I N G がヒト S T I N G であり、T R A F 6 結合部位が C 末端にアミノ酸残基 D F S

50

を含む、請求項 2 1 の修飾 S T I N G タンパク質。

【請求項 2 3】

I 型インターフェロンシグナル伝達活性を増加させるまたはサイトゾル核酸の非存在下で活性を構成的とする修飾を含む、請求項 1 ~ 2 2 の何れかの修飾 S T I N G タンパク質。

【請求項 2 4】

修飾が、ヒト S T I N G を基準として、アラインメントして、インターフェロン症を生ずる変異に対応し、ここで、ヒト S T I N G は、配列番号 3 0 5 ~ 3 0 9 の何れかに示す配列を有する、請求項 2 3 の修飾 S T I N G タンパク質。

【請求項 2 5】

活性を増加させるまたは構成的活性とする修飾が、配列番号 3 0 5 ~ 3 0 9 の何れかに示すヒト S T I N G の配列を基準として、S 1 0 2 P、V 1 4 7 L、V 1 4 7 M、N 1 5 4 S、V 1 5 5 M、G 1 6 6 E、C 2 0 6 Y、G 2 0 7 E、S 1 0 2 P / F 2 7 9 L、F 2 7 9 L、R 2 8 1 Q、R 2 8 4 G、R 2 8 4 S、R 2 8 4 M、R 2 8 4 K、R 2 8 4 T、R 1 9 7 A、D 2 0 5 A、R 3 1 0 A、R 2 9 3 A、T 2 9 4 A、E 2 9 6 A、R 1 9 7 A / D 2 0 5 A、S 2 7 2 A / Q 2 7 3 A、R 3 1 0 A / E 3 1 6 A、E 3 1 6 A、E 3 1 6 N、E 3 1 6 Q、S 2 7 2 A、R 2 9 3 A / T 2 9 4 A / E 2 9 6 A、D 2 3 1 A、R 2 3 2 A、K 2 3 6 A、Q 2 7 3 A、S 3 5 8 A / E 3 6 0 A / S 3 6 6 A、D 2 3 1 A / R 2 3 2 A / K 2 3 6 A / R 2 3 8 A、S 3 5 8 A、E 3 6 0 A、S 3 6 6 A、R 2 3 8 A、R 3 7 5 A および S 3 2 4 A / S 3 2 6 A の 1 以上に対応する 1 以上のアミノ酸置換である、請求項 1 ~ 2 4 の何れかの修飾 S T I N G タンパク質。

10

20

【請求項 2 6】

非ヒト S T I N G タンパク質が配列番号 3 3 1 のタスマニアンデビル S T I N G タンパク質または配列番号 3 3 1 の S T I N G タンパク質と少なくとも 9 8 % 配列同一性を有するそのアレルバリエーションである、請求項 1 ~ 2 5 の何れかの修飾 S T I N G タンパク質。

【請求項 2 7】

配列番号 3 0 5 ~ 3 0 9 の何れかに示すヒト S T I N G の配列を基準として C 2 0 6 Y または R 2 8 4 G に対応する置換を含む、請求項 1 ~ 2 6 の何れかの修飾 S T I N G タンパク質。

【請求項 2 8】

配列番号 3 3 2 または 3 3 3 に示すアミノ酸の配列を含む、請求項 2 7 の修飾 S T I N G タンパク質。

30

【請求項 2 9】

非ヒト種 S T I N G タンパク質の配列が配列番号 3 3 1、3 3 8 および 3 4 1 ~ 3 5 1 に示すものまたは非ヒト S T I N G タンパク質がそれと少なくとも 9 8 % 配列同一性を有する配列番号 3 3 1、3 3 8 および 3 4 1 ~ 3 5 1 の何れかのアレルバリエーションである、請求項 1 ~ 2 5 の何れかの修飾 S T I N G タンパク質。

【請求項 3 0】

請求項 1 ~ 2 9 の何れかの修飾 S T I N G タンパク質をコードするまたは非ヒト種からの S T I N G タンパク質をコードするプラスミドを含み、ここで、S T I N G タンパク質が I 型 I F N シグナル伝達活性を有し、ヒト S T I N G の N F - B シグナル伝達活性と比較して減弱した N F - B シグナル伝達活性を有する、免疫刺激性細菌。

40

【請求項 3 1】

非ヒト種がタスマニアンデビル、マーモセット、ウシ、ネコ、ダチョウ、イノシシ、コウモリ、マナティ、トキ、シーラカンス、マウスおよびゾウギンザメから選択される、請求項 3 0 の免疫刺激性細菌。

【請求項 3 2】

非修飾形態で、I 型インターフェロン ( I F N ) の発現をもたらすサイトゾル D N A / R N A センサー経路の一部の免疫刺激性タンパク質の機能獲得型バリエーションをコードするプラスミドを含む、免疫刺激性細菌。

【請求項 3 3】

50

機能獲得型(GOF)バリエーションが、ヒトにおいてインターフェロン症を促進するまたは引き起こす免疫刺激性タンパク質の構成的活性バリエーションである；および免疫刺激性細菌のゲノムが細菌が腫瘍常在免疫細胞に優先的に感染するように修飾されているおよび/または免疫刺激性細菌のゲノムが腫瘍常在免疫細胞の細胞死誘導が少ない(パイロトーシス減少)ように修飾されており、それにより免疫刺激性細菌が腫瘍または腫瘍微小環境または腫瘍常在免疫細胞に蓄積し、それにより構成的活性型免疫刺激性タンパク質が宿主細胞に送達され、I型IFNの発現が刺激または誘導される、請求項32の免疫刺激性細菌。

【請求項34】

GOFバリエーションタンパク質が免疫刺激性タンパク質におけるリン酸化部位を排除する変異を含み、それにより活性化B細胞の核因子カッパ軽鎖エンハンサー(NF- $\kappa$ B)シグナル伝達を低減する、請求項32または請求項33の免疫刺激性細菌。

10

【請求項35】

I型IFNを誘導する免疫刺激性タンパク質がSTING、RIG-I、IRF-3、IRF-7またはMDA5である、請求項32～34の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項36】

I型IFNの発現を誘導する免疫刺激性タンパク質または活性が増加したもしくは構成的活性を有するバリエーションをコードするプラスミドを含み、免疫刺激性タンパク質がSTING、RIG-I、IRF-3、IRF-7またはMDA5である、免疫刺激性細菌。

【請求項37】

免疫刺激性タンパク質がI型IFNの発現増加をもたらす機能獲得型変異を含むSTING、RIG-I、IRF-3、IRF-7またはMDA5のバリエーションである、請求項32～36の何れかの免疫刺激性細菌。

20

【請求項38】

免疫刺激性タンパク質がSTING、RIG-I、IRF-3、IRF-7またはMDA5のバリエーションであり、ウイルス感染の結果としてリン酸化される1以上のセリン(S)またはスレオニン(T)残基がアスパラギン酸(D)残基で置換され、それにより得られたバリエーションタンパク質が構成的にI型IFNを誘導するリン酸化模倣体である、請求項32～37の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項39】

バリエーションタンパク質がIRF-3であり、配列番号312を基準として位置385、386、396、398、402、404および405に対応する残基に1以上の置換を含み；そして

30

残基がアスパラギン酸残基で置き換えられる、

請求項38の免疫刺激性細菌。

【請求項40】

バリエーションIRF-3タンパク質が、配列番号312を基準として、置換396Dを有する、請求項39の免疫刺激性細菌。

【請求項41】

バリエーションIRF-3タンパク質が、配列番号312を基準として、置換S396D/S398D/S402D/T404D/S405Dまたはその保存的置換を含む、請求項39の免疫刺激性細菌。

40

【請求項42】

バリエーションIRF-3タンパク質が、配列番号312を基準として、置換S396D/S398D/S402D/T404D/S405Dを含む、請求項39の免疫刺激性細菌。

【請求項43】

免疫刺激性タンパク質が、対象で発現されたとき、I型IFNの構成的発現に至るバリエーションである、請求項32～42の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項44】

修飾免疫刺激性タンパク質または修飾STINGタンパク質が対応する非修飾タンパク質

50

と少なくとも 95% 配列同一性を有するまたは挿入、欠失および置換から選択される 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 アミノ酸修飾を有する、請求項 30 ~ 43 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 45】

免疫刺激性タンパク質が、対象で発現されたとき、I 型 IFN の構成的発現に至るバリエーションである、請求項 32 ~ 44 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 46】

免疫刺激性タンパク質が、その非修飾形態で、サイトゾル核酸、ヌクレオチド、ジヌクレオチドまたは環状ジヌクレオチドを感知するまたは直接的もしくは間接的に相互作用し、I 型 IFN の発現を誘導し、バリエーションタンパク質がサイトゾル核酸、ヌクレオチド、ジヌクレオチドまたは環状ジヌクレオチドの感知または相互作用非存在下で I 型 IFN の発現を誘導する、請求項 32 ~ 44 の何れかの免疫刺激性細菌。

10

【請求項 47】

免疫刺激性タンパク質が I 型 IFN の発現をもたらすのにサイトゾル核酸、ヌクレオチド、ジヌクレオチドまたは環状ジヌクレオチドを必要としない機能獲得型 (GOF) バリエーションである、請求項 46 の免疫刺激性細菌。

【請求項 48】

免疫刺激性タンパク質が、非修飾形態で、I 型 IFN を活性化するまたは発現を誘導する、請求項 32 ~ 47 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 49】

免疫刺激性タンパク質の非修飾形態が I 型 IFN を活性化する自然サイトゾル DNA / RNA 認識に関与する、請求項 32 ~ 48 の何れかの免疫刺激性細菌。

20

【請求項 50】

I 型 IFN がインターフェロン - またはインターフェロン - である、請求項 49 の免疫刺激性細菌。

【請求項 51】

免疫刺激性タンパク質が STING、RIG-I、MDA-5、IRF-3、IRF-7、TRIM56、RIP1、Sec5、TRAF3、TRAF2、TRAF6、STAT1、LGP2、DDX3、DHX9、DDX1、DDX21、DHX15、DHX33、DHX36、DDX60 および SNRNP200 から選択される、請求項 32 ~ 50 の何れかの免疫刺激性細菌。

30

【請求項 52】

免疫刺激性タンパク質が TRIM56、RIP1、Sec5、TRAF3、TRAF2、TRAF6、STAT1、LGP2、DDX3、DHX9、DDX1、DDX21、DHX15、DHX33、DHX36、DDX60 および SNRNP200 から選択される、請求項 32 ~ 50 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 53】

サイトゾル DNA / RNA センサー経路の一部である免疫刺激性タンパク質が、機能獲得型変異または I 型インターフェロンまたは他の免疫メディエーター / モジュレーターの発現を構成的とする変異を含むバリエーションである、請求項 32 ~ 52 の何れかの免疫刺激性細菌。

40

【請求項 54】

サイトゾル DNA / RNA を感知する免疫刺激性タンパク質がバリエーション STING、MDA5、RIG-I、IRF-7 または IRF-3 タンパク質であり；

非修飾 STING が、配列番号 305 ~ 309 の何れかに示す配列を有し、非修飾 MDA5 が配列番号 310 に示す配列を有し、非修飾 RIG-I が配列番号 311 に示す配列を有し、非修飾 IRF-7 が配列番号 313 に示す配列を有し、非修飾 IRF-3 が配列番号 312 に示す配列を有し；そして

修飾免疫刺激性タンパク質が置換、欠失および挿入から選択される 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 アミノ酸修飾を有する、

50

請求項 5 3 の免疫刺激性細菌。

【請求項 5 5】

免疫刺激性タンパク質が STING、MDA5、IRF-3、IRF-7 および RIG-I から選択され、STING、MDA5、IRF-3、IRF-7 または RIG-I を構成的に活性とし、それにより I 型 IFN 発現を構成的とする機能獲得型変異を含む、請求項 3 2 ~ 5 4 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 5 6】

アミノ酸置換である修飾が次のもの：

- a) STING において、配列番号 3 0 5 ~ 3 0 9 を基準として、S 1 0 2 P、V 1 4 7 L、V 1 4 7 M、N 1 5 4 S、V 1 5 5 M、G 1 6 6 E、C 2 0 6 Y、G 2 0 7 E、S 1 0 2 P / F 2 7 9 L、F 2 7 9 L、R 2 8 1 Q、R 2 8 4 G、R 2 8 4 S、R 2 8 4 M、R 2 8 4 K、R 2 8 4 T、R 1 9 7 A、D 2 0 5 A、R 3 1 0 A、R 2 9 3 A、T 2 9 4 A、E 2 9 6 A、R 1 9 7 A / D 2 0 5 A、S 2 7 2 A / Q 2 7 3 A、R 3 1 0 A / E 3 1 6 A、E 3 1 6 A、E 3 1 6 N、E 3 1 6 Q、S 2 7 2 A、R 3 7 5 A、R 2 9 3 A / T 2 9 4 A / E 2 9 6 A、D 2 3 1 A、R 2 3 2 A、K 2 3 6 A、Q 2 7 3 A、S 3 5 8 A / E 3 6 0 A / S 3 6 6 A、D 2 3 1 A / R 2 3 2 A / K 2 3 6 A / R 2 3 8 A、S 3 5 8 A、E 3 6 0 A、S 3 6 6 A、R 2 3 8 A および S 3 2 4 A / S 3 2 6 A から選択される 1 以上；
- b) MDA5 において、配列番号 3 1 0 を基準として、T 3 3 1 I、T 3 3 1 R、A 4 8 9 T、R 8 2 2 Q、G 8 2 1 S、A 9 4 6 T、R 3 3 7 G、D 3 9 3 V、G 4 9 5 R、R 7 2 0 Q、R 7 7 9 H、R 7 7 9 C、L 3 7 2 F および A 4 5 2 T の 1 以上；
- c) RIG-I において、配列番号 3 1 1 を基準として、E 3 7 3 A および C 2 6 8 F の一方または両方；
- d) IRF-3 において、配列番号 3 1 2 を基準として、S 3 9 6 D；
- e) IRF-7 において、配列番号 3 1 3 を基準として、S 4 7 7 D / S 4 7 9 D、S 4 7 5 D / S 4 7 7 D / S 4 7 9 D および S 4 7 5 D / S 4 7 6 D / S 4 7 7 D / S 4 7 9 D / S 4 8 3 D / S 4 8 7 D の 1 以上；および
- f) I 型インターフェロンの活性を増加するか発現を構成的とする保存的アミノ酸置換から選択される、請求項 5 4 または請求項 5 5 の免疫刺激性細菌。

【請求項 5 7】

免疫刺激性タンパク質が、配列番号 3 0 5 ~ 3 0 9 を基準として、S 1 0 2 P、V 1 4 7 L、V 1 4 7 M、N 1 5 4 S、V 1 5 5 M、G 1 6 6 E、C 2 0 6 Y、G 2 0 7 E、S 1 0 2 P / F 2 7 9 L、F 2 7 9 L、R 2 8 1 Q、R 2 8 4 G、R 2 8 4 S、R 2 8 4 M、R 2 8 4 K、R 2 8 4 T、R 1 9 7 A、D 2 0 5 A、R 3 1 0 A、R 2 9 3 A、T 2 9 4 A、E 2 9 6 A、R 1 9 7 A / D 2 0 5 A、S 2 7 2 A / Q 2 7 3 A、R 3 1 0 A / E 3 1 6 A、E 3 1 6 A、E 3 1 6 N、E 3 1 6 Q、S 2 7 2 A、R 2 9 3 A / T 2 9 4 A / E 2 9 6 A、D 2 3 1 A、R 2 3 2 A、K 2 3 6 A、Q 2 7 3 A、S 3 5 8 A / E 3 6 0 A / S 3 6 6 A、D 2 3 1 A / R 2 3 2 A / K 2 3 6 A / R 2 3 8 A、S 3 5 8 A、E 3 6 0 A、S 3 6 6 A、R 2 3 8 A、R 3 7 5 A および S 3 2 4 A / S 3 2 6 A から選択される 1 以上のアミノ酸置換を含むバリエーション STING である、請求項 5 4 ~ 5 6 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 5 8】

非修飾形態で、サイトゾル RNA / DNA を感知する免疫刺激性タンパク質である修飾 STING タンパク質をコードする核酸を含み、ここで、STING タンパク質がプラスミドにコード化され、コード化核酸が真核生物宿主により認識される制御配列に操作可能に連結されている、免疫刺激性細菌。

【請求項 5 9】

修飾 STING タンパク質が活性に環状ジヌクレオチド (CDN) を必要としない、請求項 5 8 の免疫刺激性細菌。

【請求項 6 0】



S T I N Gにおける修飾が活性に c G A M Pを必要としないよう活性を構成的とし；  
 修飾 S T I N Gタンパク質が修飾 T M E M 1 7 3 遺伝子によりコードされ；  
 修飾がアミノ酸の挿入、欠失または置換を含み；そして  
 修飾 S T I N Gタンパク質が、非修飾 S T I N Gタンパク質と比較して増強された免疫刺激性活性を有する、  
 修飾 S T I N Gタンパク質をコードするヌクレオチドの配列を含む、請求項 5 8 または請求項 5 9 の免疫刺激性細菌。

【請求項 6 1】

S T I N Gにおけるアミノ置換が、配列番号 3 0 5 ~ 3 0 9 を基準として、S 1 0 2 P、  
 V 1 4 7 L、V 1 4 7 M、N 1 5 4 S、V 1 5 5 M、G 1 6 6 E、C 2 0 6 Y、G 2 0 7  
 E、S 1 0 2 P / F 2 7 9 L、F 2 7 9 L、R 2 8 1 Q、R 2 8 4 G、R 2 8 4 S、R 2  
 8 4 M、R 2 8 4 K、R 2 8 4 T、R 1 9 7 A、D 2 0 5 A、R 3 1 0 A、R 2 9 3 A、  
 T 2 9 4 A、E 2 9 6 A、R 1 9 7 A / D 2 0 5 A、S 2 7 2 A / Q 2 7 3 A、R 3 1 0  
 A / E 3 1 6 A、E 3 1 6 A、E 3 1 6 N、E 3 1 6 Q、S 2 7 2 A、R 2 9 3 A / T 2  
 9 4 A / E 2 9 6 A、D 2 3 1 A、R 2 3 2 A、K 2 3 6 A、Q 2 7 3 A、S 3 5 8 A /  
 E 3 6 0 A / S 3 6 6 A、D 2 3 1 A / R 2 3 2 A / K 2 3 6 A / R 2 3 8 A、S 3 5 8  
 A、E 3 6 0 A、S 3 6 6 A、R 2 3 8 A、R 3 7 5 A および S 3 2 4 A / S 3 2 6 A お  
 よびその保存的アミノ酸置換から選択される 1 以上である、請求項 5 9 または請求項 6 0  
 の免疫刺激性細菌。

【請求項 6 2】

宿主における非免疫細胞の毒性または感染性を低減する細菌のゲノムにおける変異を含む、  
 請求項 3 0 ~ 6 1 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 6 3】

免疫刺激性細菌のゲノムが修飾され、それにより細菌がフラジェリン - ( f l i C - / f  
 l j B - ) および / または p a g P - である、請求項 3 0 ~ 6 2 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 6 4】

免疫刺激性細菌のゲノムが修飾され、それにより細菌がフラジェリン - ( f l i C - / f  
 l j B - ) である、請求項 3 0 ~ 6 3 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 6 5】

免疫刺激性細菌のゲノムが修飾され、それにより細菌が p a g P - / m s b B - である、  
 請求項 3 0 ~ 6 4 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 6 6】

細菌がフラジェリン - ( f l i C - / f l j B - ) および p a g P - である、請求項 3 0 ~  
 6 3 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 6 7】

免疫刺激性細菌がアスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ - ( a s d - ) である、  
 請求項 3 0 ~ 6 6 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 6 8】

細菌がアスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ ( a s d ) をコードする内因性遺伝  
 子の全てまたは一部が破壊または欠失し、それにより内因性 a s d が発現されないこと  
 により a s d - である、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ - ( a s d - ) であ  
 る、請求項 3 0 ~ 6 6 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 6 9】

細菌プロモーター制御下にプラスミドにアスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ  
 ( a s d ) をコードする、請求項 3 0 ~ 6 8 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 7 0】

m s b B - である、請求項 3 0 ~ 6 9 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 7 1】

p u r I - ( p u r M - ) である、請求項 3 0 ~ 7 0 の何れかの免疫刺激性細菌。

10

20

30

40

50

## 【請求項 72】

a s d<sup>-</sup>、p u r I<sup>-</sup>、m s b B<sup>-</sup>、フラジエリン<sup>-</sup>(f l i C<sup>-</sup> / f l j B<sup>-</sup>)および p a g P<sup>-</sup>である、請求項 30 ~ 71 の何れかの免疫刺激性細菌。

## 【請求項 73】

S P I - 1 依存的侵襲に関与する 1 以上の遺伝子またはオペロンが欠失または不活性化され、それにより免疫刺激性細菌が上皮細胞に侵入または感染しない、請求項 30 ~ 72 の何れかの免疫刺激性細菌。

## 【請求項 74】

a v r A、h i l A、h i l D、i n v A、i n v B、i n v C、i n v E、i n v F、i n v G、i n v H、i n v I、i n v J、i a c P、i a g B、s p a O、s p a Q、s p a R、s p a S、o r g A、o r g B、o r g C、p r g H、p r g I、p r g J、p r g K、s i c A、s i c P、s i p A、s i p B、s i p C、s i p D、s i r C、s o p B、s o p D、s o p E、s o p E 2、s p r B および s p t P の 1 以上が欠失または不活性化されている、請求項 73 の免疫刺激性細菌。

10

## 【請求項 75】

S P I - 1 非依存的侵襲に関与する 1 以上の遺伝子が欠失または不活性化され、免疫刺激性細菌が上皮細胞に侵入または感染しない；および 1 以上の遺伝子が p a g N、h l y E、p e f I、s r g D、s r g A、s r g B および s r g C から選択される、請求項 30 ~ 72 の何れかの免疫刺激性細菌。

20

## 【請求項 76】

細菌が腫瘍常在免疫細胞の細胞死誘導が少なくなる、細菌ゲノムの修飾；および/または他の細胞型と比較して細菌が優先的に腫瘍常在免疫細胞に感染するようになる、細菌ゲノムの修飾

を含む、請求項 30 ~ 75 の何れかの免疫刺激性細菌。

## 【請求項 77】

細菌がプラスミドに a s d をコードし、その発現が真核生物対象の腫瘍微小環境(T M E)で発現されるプロモーターの制御下にある、請求項 30 ~ 76 の何れかの免疫刺激性細菌。

## 【請求項 78】

アデノシンおよびアデニンに対して栄養要求性である、請求項 30 ~ 77 の何れかの免疫刺激性細菌。

30

## 【請求項 79】

アデノシンに対して栄養要求性である、請求項 30 ~ 77 の何れかの免疫刺激性細菌。

## 【請求項 80】

アデノシンに対して栄養要求性であり、鞭毛を欠き、ここで、野生型細菌が鞭毛を有する、請求項 30 ~ 79 の何れかの免疫刺激性細菌。

## 【請求項 81】

宿主における非免疫細胞の毒性または感染性を低減する細菌のゲノムにおける変異を含む、請求項 30 ~ 80 の何れかの免疫刺激性細菌。

40

## 【請求項 82】

細菌が p a g P<sup>-</sup>である、請求項 30 ~ 81 の何れかの免疫刺激性細菌。

## 【請求項 83】

免疫刺激性細菌がフラジエリン<sup>-</sup>(f l i C<sup>-</sup> / f l j B<sup>-</sup>)および/または p a g P<sup>-</sup>および p u r I<sup>-</sup>(p u r M<sup>-</sup>)、m s b B<sup>-</sup>、p u r D<sup>-</sup>、a d r A<sup>-</sup>、c s g D<sup>-</sup>、q s e C<sup>-</sup>および h i l A<sup>-</sup>、l p p A<sup>-</sup>または l p p B<sup>-</sup>の 1 以上である、請求項 30 ~ 82 の何れかの免疫刺激性細菌。

## 【請求項 84】

免疫刺激性細菌が h i l A<sup>-</sup>、p a g P<sup>-</sup>およびフラジエリン<sup>-</sup>(f l i C<sup>-</sup> / f l j B<sup>-</sup>)である、請求項 30 ~ 83 の何れかの免疫刺激性細菌。

50

## 【請求項 85】

C p Gモチーフをコードする核酸を含み、C p Gモチーフをコードする核酸がプラスミド上にコード化される細菌遺伝子に含まれるまたはその一部である、請求項 30 ~ 84 の何れかの免疫刺激性細菌。

## 【請求項 86】

C p Gを含む遺伝子が a s d であり、ここで、a s d がプラスミド上にコード化される、請求項 85 の免疫刺激性細菌。

## 【請求項 87】

フラジェリン欠損であり、ここで、野生型細菌が鞭毛を含む、請求項 30 ~ 86 の何れかの免疫刺激性細菌。

## 【請求項 88】

プラスミドが、シグナル配列を欠くリステリオリシン O (L L O) タンパク質である c y t o L L O をコードする核酸を含む、請求項 30 ~ 87 の何れかの免疫刺激性細菌。

## 【請求項 89】

プラスミド上にコード化された D N A 核ターゲティング配列 (D T S) を含む、請求項 30 ~ 88 の免疫刺激性細菌。

## 【請求項 90】

D T S が S V 4 0 D T S である、請求項 89 の免疫刺激性細菌。

## 【請求項 91】

エンドヌクレアーゼ I (e n d A) をコードする遺伝子に欠失または修飾を有し、それにより e n d A 活性が阻害または排除される、請求項 30 ~ 90 の何れかの免疫刺激性細菌。

## 【請求項 92】

プラスミドが C p Gモチーフ、プラスミド維持のための a s d 遺伝子選択可能マーカーおよび D N A 核ターゲティング配列の 1 以上を含む、請求項 30 ~ 91 の何れかの免疫刺激性細菌。

## 【請求項 93】

免疫刺激性細菌が p u r I 欠失、m s b B 欠失、a s d 欠失および a d r A 欠失を含む、請求項 30 ~ 92 の何れかの免疫刺激性細菌。

## 【請求項 94】

請求項 30 ~ 93 の何れかの免疫刺激性細菌であって、

r f a L、r f a G、r f a H、r f a D、r f a P、r F b、r f a、m s b B、h t r B、f i r A、p a g L、p a g P、l p x R、a r n T、e p t A および l p x T の 1 以上から選択されるリポ多糖の生合成を改変する遺伝子における 1 以上の変異；および / または

自殺遺伝子を導入し、s a c B、n u k、h o k、g e f、k i l および p h l A の 1 以上から選択される 1 以上の変異；および / または

細菌融解遺伝子を導入し、h l y および c l y の一方または両方から選択される 1 以上の変異；および / または

I s y A、p a g、p r g、i s c A、v i r G、p l c および a c t から選択される 1 以上の病原性因子における変異；および / または

r e c A、h t r A、h t p R、h s p および g r o E L から選択されるストレス応答を修飾する遺伝子における 1 以上の変異；および / または

細胞周期を妨害する m i n における変異；および / または

c y a、c r p、p h o P / p h o Q および o m p R から選択される制御機能を破壊または不活性化する遺伝子における 1 以上の変異

を含む、免疫刺激性細菌。

## 【請求項 95】

m s b B - / a s d - / p u r I - である、請求項 30 ~ 94 の何れかの免疫刺激性細菌。

## 【請求項 96】

10  
20  
30  
40  
50

p r g Hおよび/または p r g Kが不活性化または欠失している、請求項 30 ~ 95の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 97】

プラスミド上の免疫刺激性タンパク質または S T I N G タンパク質をコードする核酸が分泌シグナルをコードする核酸に操作可能に連結し、それにより、宿主における発現により、産物が分泌される、請求項 30 ~ 96の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 98】

免疫刺激性タンパク質をコードするプラスミドが低コピー数または中コピー数で存在する、請求項 30 ~ 97の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 99】

プラスミドが中乃至低コピー数複製起点を含む、請求項 30 ~ 98の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 100】

プラスミドが低コピー数複製起点を含む、請求項 30 ~ 98の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 101】

プラスミドが低コピー数で存在する、請求項 30 ~ 100の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 102】

中コピー数が150未満または約150未満および20または約20超または20または25 ~ 150である、請求項 98 ~ 101の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 103】

低コピー数が25未満または20未満または約25未満または約20未満コピーである、請求項 101の免疫刺激性細菌。

【請求項 104】

プラスミドの複製起点が p B R 3 2 2、p 1 5 A、p S C 1 0 1、p M B 1、c o l E 1、c o l E 2、p P S 1 0、R 6 K、R 1、R K 2 および p U C 由来の起点から選択される、請求項 30 ~ 103の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 105】

非修飾形態がサイトゾルRNA/DNAを感知する免疫刺激性タンパク質または S T I N G タンパク質をコードする核酸がプラスミド上にあり、真核生物宿主により認識される制御配列に操作可能に連結されている、請求項 30 ~ 104の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 106】

プラスミドが真核生物プロモーター制御下に免疫刺激性タンパク質または S T I N G をコードする、請求項 30 ~ 105の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 107】

制御配列がRNAポリメラーゼIIプロモーターまたはRNAポリメラーゼIIIプロモーターを含む、請求項 105または請求項 106の免疫刺激性細菌。

【請求項 108】

制御配列がSV40、hGH、BGH、ニワトリベータ-グロブリンおよび r b G l o b (ウサギグロブリン) 遺伝子から選択されるターミネーターおよび/またはプロモーターを含む、請求項 105または請求項 106の免疫刺激性細菌。

【請求項 109】

プロモーターがRNAポリメラーゼIIプロモーターである、請求項 107の免疫刺激性細菌。

【請求項 110】

プロモーターがウイルスプロモーターまたは哺乳動物RNAポリメラーゼIIプロモーターであるRNAポリメラーゼIIプロモーターである、請求項 107の免疫刺激性細菌。

【請求項 111】

プロモーターがサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、SV40プロモーター、エプスタイン・バールウイルス(EBV)プロモーター、ヘルペスウイルスプロモーター、呼吸器多核体ウイルス(RSV)プロモーターおよびアデノウイルスプロモーターから選択さ

10

20

30

40

50

れるウイルスプロモーターである、請求項 1 1 0 の免疫刺激性細菌。

【請求項 1 1 2】

プラスミドでコード化異種タンパク質の 1 以上の発現を制御するプロモーターが伸長因子 - 1 (E F - 1) アルファプロモーターまたは U B C プロモーターまたは P G K プロモーターまたは M N D プロモーターまたは C A G G プロモーターである、請求項 1 0 5 ~ 1 1 0 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 1 1 3】

プロモーターが E F - 1 アルファプロモーター、C M V プロモーター、S V 4 0 プロモーター、P G K プロモーター、M N D プロモーター、E I F 4 A 1 プロモーター、C A G プロモーターまたは C D 6 8 プロモーターである、請求項 1 0 5 ~ 1 1 0 の何れかの免疫刺激性細菌。

10

【請求項 1 1 4】

プロモーターが E F - 1 アルファプロモーターである、請求項 1 1 3 の免疫刺激性細菌。

【請求項 1 1 5】

プロモーターが後期プロモーターであるウイルスプロモーターである、請求項 1 0 5 ~ 1 1 3 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 1 1 6】

細菌がグラム陰性細菌である、請求項 3 0 ~ 1 1 5 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 1 1 7】

細菌が斑点熱リケッチア(*Rickettsia rickettsiae*)、発疹チフスリケッチア(*Rickettsia prowazekii*)、ツツガムシ病リケッチア(*Rickettsia tsutsugamuchi*)、発疹熱リケッチア(*Rickettsia mooseri*)、リケッチア・シビリカ(*Rickettsia sibirica*)、気管支敗血症菌(*Bordetella bronchiseptica*)、髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)、淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、エロモナス・オイクレノフィラ(*Aeromonas euc renophila*)、エロモナス・サルモニシダ(*Aeromonas salmonicida*)、野兔病菌(*Francisella tularensis*)、ヒツジ偽結核菌(*Corynebacterium pseudotuberculosis*)、サイトロバクター・フレウンディイ(*Citrobacter freundii*)、肺炎クラミジア(*Chlamydia pneumoniae*)、ヘモフィルス・ソムナス(*Haemophilus somnus*)、ウシ流産菌(*Brucella abortus*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ(*Mycobacterium intracellulare*)、在郷軍人病菌(*Legionella pneumophila*)、ロドコッカス・エクイ(*Rhodococcus equi*)、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、ヘリコバクター・ムステラエ(*Helicobacter mustelae*)、コレラ菌(*Vibrio cholerae*)、枯草菌(*Bacillus subtilis*)、ブタ丹毒菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、エルシニア・エンテロコリティカ(*Yersinia enterocolitica*)、ロシャリメア・クインターナ(*Rochalimaea quintana*)またはアグロバクテリウム・ツメルファシウム(*Agrobacterium tumerfacium*)または前記細菌株の何れかの弱毒株もしくは修飾株である、請求項 3 0 ~ 1 1 6 の何れかの免疫刺激性細菌。

20

30

【請求項 1 1 8】

細菌がサルモネラの株、シゲラ(*Shigella*)、大腸菌(*E. coli*)、ビフィドバクテリア(*Bifidobacteriae*)、リケッチア(*Rickettsia*)、ビブリオ(*Vibrio*)、リステリア(*Listeria*)、クレブシエラ(*Klebsiella*)、ボルデテラ(*Bordetella*)、ナイセリア(*Neisseria*)、エロモナス(*Aeromonas*)、フランシセラ(*Francisella*)、コレラ(*Cholera*)、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)、サイトロバクター(*Citrobacter*)、クラミジア(*Chlamydia*)、ヘモフィルス(*Haemophilus*)、ブルセラ(*Brucella*)、マイコバクテリウム(*Mycobacterium*)、マイコプラズマ(*Mycoplasma*)、レジオネラ(*Legionella*)、ロドコッカス(*Rhodococcus*)、シュードモナス(*Pseudomonas*)、ヘリコバクター(*Helicobacter*)、バシラス(*Bacillus*)またはエリジペロスリックス(*Erysipelothrix*)または前記細菌株の何れかの弱毒株もしくは修飾株である、請求項 3 0 ~ 1 1 6 の何れかの免疫刺激性細菌。

40

【請求項 1 1 9】

50

弱毒化細菌である、請求項 30 ~ 118 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 120】

サルモネラの株である、請求項 30 ~ 119 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 121】

ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)株である、請求項 120 の免疫刺激性細菌。

【請求項 122】

非修飾サルモネラが野生型株である、請求項 120 または請求項 121 の免疫刺激性細菌。

【請求項 123】

非修飾サルモネラ株が弱毒化されている、請求項 120 または請求項 121 の免疫刺激性細菌。

【請求項 124】

免疫刺激性細菌が AST-100、VNP20009、YS1646(ATCC #202165)、RE88、SL7207、8429、8431 および 8468 と命名された株から選択されるまたは ATCC 寄託番号 14028 として寄託された株の同定された特徴の全てを有する野生型細菌由来であるまたは株 ATCC 14028 である弱毒化ネズミチフス菌株である、請求項 30 ~ 123 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 125】

請求項 30 ~ 124 の何れかの免疫刺激性細菌であって、プラスミド上にコード化された

a) STING の機能獲得型変異体、RIG-I、MDA5、IRF3 および IRF7 の 1 以上をコードする核酸；および

b) IL-2、IL-7、IL-12p70(IL-12p40 + IL-12p35)、IL-15、IL-15/IL-15R アルファ鎖複合体、IL-2Ra への結合が減弱した IL-2、IL-2Ra に結合しないように修飾された IL-2、IL-18、IL-36 ガンマ、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CCL3、CCL4、CCL5、T 細胞の動員/残留性に関与するまたは影響するまたは増強するタンパク質、CD40、CD40 リガンド(CD40L)、OX40、OX40 リガンド(OX40L)、4-1BB、4-1BB リガンド(4-1BBL)、B7-CD28 ファミリーメンバー、TNF-β ポリペプチドアンタゴニストおよび腫瘍壊死因子受容体(TNFR)スーパーファミリーメンバーの 1 以上をコードする核酸を含む、免疫刺激性細菌。

【請求項 126】

a) における 2 個のタンパク質および b) における 2 個のタンパク質をコードする核酸を含む、請求項 125 の免疫刺激性細菌。

【請求項 127】

異なるプロモーターおよびターミネーターが各タンパク質の制御を発現する、請求項 125 または請求項 126 の免疫刺激性細菌。

【請求項 128】

遺伝子が単一プロモーターから発現され、単一ターミネーターを含み、各タンパク質をコードする配列が配列内リボソーム進入部位(IRES)を含み、それによりコード化核酸が多シストロン性である、請求項 125 または請求項 126 の免疫刺激性細菌。

【請求項 129】

プロモーターが EF-1 アルファ、CMV および GAPDH プロモーターから選択され、ターミネーターが SV40、hGH、BGH および rbglob から選択される、請求項 125 ~ 128 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 130】

タンパク質をコードするプラスミドが、エンハンサー、プロモーター、タンパク質をコードするオープンリーディングフレームおよびポリ A テイルを含む構築物を含む、請求項 3

10

20

30

40

50

0 ~ 1 2 9 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 1 3 1】

タンパク質をコードするプラスミドがエンハンサー、プロモーター、IRES、タンパク質をコードするオープンリーディングフレームおよびポリAテイルを含む構築物を含む、請求項 3 0 ~ 1 3 0 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 1 3 2】

タンパク質をコードするプラスミドがエンハンサー、プロモーター、IRES、局在化配列、タンパク質をコードするオープンリーディングフレームおよびポリAテイルを含む構築物を含む、請求項 3 0 ~ 1 3 1 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 1 3 3】

タンパク質をコードするプラスミドの構築物がウッドチャック肝炎ウイルス(WHP)、転写後制御要素(WPRE)またはB型肝炎ウイルス転写後制御要素(HPRE)を含む、請求項 3 0 ~ 1 3 2 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 1 3 4】

SPI-2 複合体に欠失を有する、請求項 3 0 ~ 1 3 3 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 1 3 5】

細菌が発熱原性を低減するためにポリミキシンで処理される、請求項 3 0 ~ 1 3 4 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 1 3 6】

請求項 1 ~ 2 9 の何れかの修飾STINGタンパク質をコードする核酸を含む、送達媒体

【請求項 1 3 7】

非ヒト種からのSTINGタンパク質をコードする核酸を含み、ここで、STINGタンパク質がI型IFNシグナル伝達活性を有し、ヒトSTINGのNF- $\kappa$ Bシグナル伝達活性と比較して減弱したNF- $\kappa$ Bシグナル伝達活性を有するものである、送達媒体。

【請求項 1 3 8】

ヒトSTINGタンパク質が配列番号 3 0 5 ~ 3 0 9 の何れかに示す配列または配列番号 3 0 5 ~ 3 0 9 の何れかに示すアミノ酸の配列と少なくとも 9 8 % 配列同一性を有するそのヒトアレルバリエーションを含む、請求項 1 3 6 または請求項 1 3 7 の送達媒体。

【請求項 1 3 9】

I型IFNシグナル伝達活性が野生型ヒトSTINGの少なくとも 3 0 % または少なくとも約 3 0 % のI型IFNシグナル伝達活性である、請求項 1 3 6 ~ 1 3 8 の何れかの送達媒体。

【請求項 1 4 0】

NF- $\kappa$ Bシグナル伝達活性がヒトSTINGの 3 0 % 未満、2 0 未満%、1 5 % 未満、1 0 % 未満または 5 % 未満のNF- $\kappa$ Bシグナル伝達活性である、請求項 1 3 6 ~ 1 3 9 の何れかの送達媒体。

【請求項 1 4 1】

非ヒト種がタスマニアデビル、マーモセット、ウシ、ネコ、ダチョウ、イノシシ、コウモリ、マナティ、トキ、シーラカンス、マウス、ゼブラフィッシュまたはゾウギンザメである、請求項 1 3 6 ~ 1 4 0 の何れかの送達媒体。

【請求項 1 4 2】

対象が発現されたとき、I型IFNの構成的発現に至る免疫刺激性タンパク質をコードする核酸を含み、ここで、送達媒体がナノ粒子、リポソーム、エクソソーム、細菌、ウイルス、細胞およびマイクロ小胞から選択される、送達媒体。

【請求項 1 4 3】

免疫刺激性タンパク質がサイトゾル核酸、ヌクレオチド、ジヌクレオチド、環状ヌクレオチドまたは環状ジヌクレオチドを感知するまたは直接的もしくは間接的に相互作用するシグナル伝達経路にある、請求項 1 4 2 の送達媒体。

【請求項 1 4 4】

10

20

30

40

50

サイトゾル核酸、ヌクレオチド、ジヌクレオチド、環状ヌクレオチドまたは環状ジヌクレオチドを感知するまたは直接的もしくは間接的に相互作用するシグナル伝達経路にある免疫刺激性タンパク質が I 型 I F N を活性化する、請求項 1 4 3 の送達媒体。

【請求項 1 4 5】

免疫刺激性タンパク質が I 型インターフェロンを活性化する先天性 D N A / R N A 認識に関与し、S T I N G、R I G - I、M D A - 5、I R F - 3、I R F - 7、T R I M 5 6、R I P 1、S e c 5、T R A F 3、T R A F 2、T R A F 6、S T A T 1、L G P 2、D D X 3、D H X 9、D D X 1、D D X 2 1、D H X 1 5、D H X 3 3、D H X 3 6、D D X 6 0 および S N R N P 2 0 0 から選択される、請求項 1 4 2 ~ 1 4 4 の何れかの送達媒体。

10

【請求項 1 4 6】

免疫刺激性タンパク質が S T I N G、M D A 5、I R F - 3、I R F - 7 および R I G - 1 から選択される、請求項 1 4 2 ~ 1 4 5 の何れかの送達媒体。

【請求項 1 4 7】

非修飾 S T I N G タンパク質が配列番号 3 0 5 ~ 3 0 9 の何れかに示す配列を有する；  
非修飾 M D A 5 タンパク質が配列番号 3 1 0 に示す配列を有する；  
非修飾 R I G - I タンパク質が配列番号 3 1 1 に示す配列を有する；  
非修飾 I R F - 3 タンパク質が配列番号 3 1 2 に示す配列を有する；および  
非修飾 I R F - 7 タンパク質が配列番号 3 1 3 に示す配列を有する、  
請求項 1 4 6 の送達媒体。

20

【請求項 1 4 8】

免疫刺激性タンパク質が活性を構成的とするアミノ酸置換を含む、請求項 1 4 2 ~ 1 4 7 の何れかの送達媒体。

【請求項 1 4 9】

免疫刺激性タンパク質が、対象で生じたとき、インターフェロン症をもたらす、請求項 1 4 2 ~ 1 4 8 の何れかの送達媒体。

【請求項 1 5 0】

免疫刺激性タンパク質が 1 以上の機能獲得型変異を含むバリエント S T I N G、バリエント M D A 5、バリエント I R F - 3、バリエント I R F - 7 およびバリエント R I G - I から選択される、請求項 1 4 2 ~ 1 4 9 の何れかの送達媒体。

30

【請求項 1 5 1】

機能獲得型変異が構成的 I 型インターフェロンの発現をもたらす、請求項 1 5 0 の送達媒体。

【請求項 1 5 2】

変異が次のとおり：

a) S T I N G において、配列番号 3 0 5 ~ 3 0 9 を基準として、S 1 0 2 P、V 1 4 7 L、V 1 4 7 M、N 1 5 4 S、V 1 5 5 M、G 1 6 6 E、C 2 0 6 Y、G 2 0 7 E、S 1 0 2 P / F 2 7 9 L、F 2 7 9 L、R 2 8 1 Q、R 2 8 4 G、R 2 8 4 S、R 2 8 4 M、R 2 8 4 K、R 2 8 4 T、R 1 9 7 A、D 2 0 5 A、R 3 1 0 A、R 2 9 3 A、T 2 9 4 A、E 2 9 6 A、R 1 9 7 A / D 2 0 5 A、S 2 7 2 A / Q 2 7 3 A、R 3 1 0 A / E 3 1 6 A、E 3 1 6 A、E 3 1 6 N、E 3 1 6 Q、S 2 7 2 A、R 2 9 3 A / T 2 9 4 A / E 2 9 6 A、D 2 3 1 A、R 2 3 2 A、K 2 3 6 A、Q 2 7 3 A、S 3 5 8 A / E 3 6 0 A / S 3 6 6 A、D 2 3 1 A / R 2 3 2 A / K 2 3 6 A / R 2 3 8 A、S 3 5 8 A、E 3 6 0 A、S 3 6 6 A、R 2 3 8 A、R 3 7 5 A および S 3 2 4 A / S 3 2 6 A から選択される 1 以上；

40

b) M D A 5 において、配列番号 3 1 0 を基準として、T 3 3 1 I、T 3 3 1 R、A 4 8 9 T、R 8 2 2 Q、G 8 2 1 S、A 9 4 6 T、R 3 3 7 G、D 3 9 3 V、G 4 9 5 R、R 7 2 0 Q、R 7 7 9 H、R 7 7 9 C、L 3 7 2 F および A 4 5 2 T の 1 以上；

c) R I G - I において、配列番号 3 1 1 を基準として、E 3 7 3 A および C 2 6 8 F の一方または両方；

50



d) I R F - 3において、配列番号 3 1 2 を基準として、S 3 9 6 D ; a n d  
 e) I R F - 7において、配列番号 3 1 3 を基準として、S 4 7 7 D / S 4 7 9 D、S 4  
 7 5 D / S 4 7 7 D / S 4 7 9 D および S 4 7 5 D / S 4 7 6 D / S 4 7 7 D / S 4 7 9  
 D / S 4 8 3 D / S 4 8 7 D の 1 以上  
 である、請求項 1 5 0 または請求項 1 5 1 の送達媒体。

【請求項 1 5 3】

非修飾 S T I N G が配列番号 3 0 5 ~ 3 0 9 の何れかに示す配列を有し、非修飾 M D A 5  
 が配列番号 3 1 0 に示す配列を有し、非修飾 R I G - I が配列番号 3 1 1 に示す配列を有  
 し、非修飾 I R F - 3 が配列番号 3 1 2 に示す配列を有し、非修飾 I R F - 7 が配列番号  
 3 1 3 に示す配列を有し、各修飾タンパク質が非修飾タンパク質と少なくとも 9 5 % 配列  
 同一性を有する、請求項 1 5 2 の送達媒体。 10

【請求項 1 5 4】

細胞、エクソソーム、腫瘍溶解性ウイルスまたはウイルスベクター、リポソームまたは他  
 の脂質ベースの媒体または免疫刺激性細菌である、請求項 1 3 6 ~ 1 5 3 の何れかの送達  
 媒体。

【請求項 1 5 5】

送達媒体が幹細胞または免疫細胞である細胞である、請求項 1 5 4 の送達媒体。

【請求項 1 5 6】

エクソソームである、請求項 1 3 6 ~ 1 5 4 の何れかの送達媒体。

【請求項 1 5 7】

腫瘍溶解性ウイルスである、請求項 1 3 6 ~ 1 5 4 の何れかの送達媒体。 20

【請求項 1 5 8】

腫瘍溶解性アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、単純ヘルペスウイル  
 ス、ラブドウイルス、パピローマウイルス、水疱性口内炎ウイルス、麻疹ウイルス、ニュー  
 ーカッスル病ウイルス、ピコルナウイルス、シンドビスウイルス、ポックスウイルス、パ  
 ルボウイルス、レオウイルス、コクサッキーウイルス、インフルエンザウイルス、ムンプ  
 スウイルス、ポリオウイルス、セネカバレーウイルス、センダイウイルス、デングウイル  
 ス、ポリオウイルス、セムリキ森林熱ウイルス、アルファウイルスおよびフラビウイルス  
 から選択される腫瘍溶解性である、請求項 1 3 6 ~ 1 5 の何れかの送達媒体。

【請求項 1 5 9】

腫瘍溶解性ウイルスがワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、麻疹ウイルスまたはレオ  
 ウイルスである、請求項 1 5 8 の送達媒体。 30

【請求項 1 6 0】

免疫刺激性タンパク質をコードする核酸が真核生物制御配列の制御下に発現される、請求  
 項 1 3 6 ~ 1 5 9 の何れかの送達媒体。

【請求項 1 6 1】

免疫刺激性タンパク質をコードする核酸が真核生物プロモーターの制御下に発現される、  
 請求項 1 3 6 ~ 1 6 0 の何れかの送達媒体。

【請求項 1 6 2】

免疫刺激性タンパク質が構成的活性型 S T I N G タンパク質である、請求項 1 3 6 ~ 1 6  
 1 の何れかの送達媒体。 40

【請求項 1 6 3】

、哺乳動物対象で発現されたとき、腫瘍微小環境における抗腫瘍免疫を付与するまたは貢  
 献する免疫刺激性タンパク質をコードする核酸をさらに含む、請求項 1 3 6 ~ 1 6 2 の何  
 れかの送達媒体。

【請求項 1 6 4】

免疫刺激性タンパク質がサイトカイン、ケモカイン、共刺激タンパク質または受容体また  
 はサイトゾルドメイン欠失を有する共刺激受容体である、請求項 1 6 3 の送達媒体。

【請求項 1 6 5】

細胞である、請求項 1 3 6 ~ 1 6 4 の何れかの送達媒体。 50

## 【請求項 166】

細胞が幹細胞である、請求項 165 の送達媒体。

## 【請求項 167】

幹細胞が間葉性幹細胞(MSC)である、請求項 166 の送達媒体。

## 【請求項 168】

MSCが免疫調節性サイトカインの組み合わせを発現するよう遺伝子修飾される、請求項 167 の送達媒体。

## 【請求項 169】

サイトカインがインターロイキン 12(IL-12)およびインターロイキン 21(IL-21)である、請求項 168 の送達媒体。

10

## 【請求項 170】

I型インターフェロンがインターフェロン- またはインターフェロン- である、請求項 1 ~ 169 の何れかの送達媒体、STINGタンパク質、免疫刺激性タンパク質または免疫刺激性細菌。

## 【請求項 171】

請求項 136 ~ 164 の何れかの送達媒体を含む、単離細胞。

## 【請求項 172】

免疫細胞、幹細胞、腫瘍細胞または初代細胞株である、請求項 171 の細胞。

## 【請求項 173】

造血細胞である、請求項 172 の細胞。

20

## 【請求項 174】

T細胞である、請求項 172 の細胞。

## 【請求項 175】

細胞を送達媒体で感染させることによりエクスピボで産生される、請求項 171 ~ 174 の何れかの細胞。

## 【請求項 176】

免疫刺激性細菌を含む単離細胞であって、免疫刺激性細菌を腫瘍常在免疫細胞に優先的に感染するように修飾するおよび/または免疫刺激性細菌のゲノムを腫瘍常在免疫細胞の細胞死誘導が少ないように修飾する；および免疫細胞、幹細胞、初代細胞株からの細胞または腫瘍細胞であるものである、

30

## 【請求項 177】

免疫刺激性細菌がフラジェリン-(fljC-/fljB-)であるサルモネラ種である、請求項 176 の細胞。

## 【請求項 178】

請求項 30 ~ 135 の何れかの免疫刺激性細菌を含む、単離細胞または培養細胞。

## 【請求項 179】

T細胞または造血細胞である、請求項 176 ~ 178 の何れかの細胞。

## 【請求項 180】

細胞の免疫刺激性細菌での感染によりエクスピボで産生される、請求項 177 ~ 179 の何れかの細胞。

40

## 【請求項 181】

請求項 176 ~ 180 の何れかの細胞を、固形腫瘍を含むまたは造血器腫瘍である癌を有する対象に投与することを含む、癌を処置する方法。

## 【請求項 182】

癌が固形腫瘍を含む、請求項 181 の方法。

## 【請求項 183】

癌が転移である、請求項 181 または請求項 182 の方法。

## 【請求項 184】

癌が乳房、心臓、肺、小腸、結腸、脾臓、腎臓、膀胱、頭頸部、結腸直腸、卵巣、前立腺

50

、脳、脾臓、皮膚、骨、骨髄、血液、胸腺、子宮、精巣、子宮頸および肝臓の癌、胃癌、リンパ腫および白血病から選択される、請求項 1 8 1 ~ 1 8 3 の何れかの方法。

【請求項 1 8 5】

癌の処置のための、請求項 1 7 6 ~ 1 8 0 の何れかの細胞の使用。

【請求項 1 8 6】

癌が固形腫瘍または造血器腫瘍を含む、請求項 1 8 5 の使用。

【請求項 1 8 7】

癌が転移である、請求項 1 8 5 または請求項 1 8 6 の使用。

【請求項 1 8 8】

癌が乳房、心臓、肺、小腸、結腸、脾臓、腎臓、膀胱、頭頸部、結腸直腸、卵巣、前立腺、脳、脾臓、皮膚、骨、骨髄、血液、胸腺、子宮、精巣、子宮頸および肝臓の癌、胃癌、リンパ腫および白血病から選択される、請求項 1 8 5 ~ 1 8 7 の何れかの使用。

【請求項 1 8 9】

薬学的に許容される媒体中に請求項 1 ~ 2 9 の何れかの修飾 S T I N G タンパク質、請求項 3 0 ~ 1 3 5 の何れかの免疫刺激性細菌、請求項 1 3 6 ~ 1 7 0 の何れかの送達媒体または請求項 1 7 1 ~ 1 8 0 の何れかの細胞を含む、医薬組成物。

【請求項 1 9 0】

請求項 1 ~ 2 9 の何れかの修飾 S T I N G タンパク質、請求項 3 0 ~ 1 3 5 の何れかの免疫刺激性細菌または請求項 1 3 6 ~ 1 7 0 の何れかの送達媒体を含み、細胞が受精ヒト卵の接合子ではない、単離細胞。

【請求項 1 9 1】

免疫細胞、幹細胞、腫瘍細胞または初代細胞株である、請求項 1 9 0 の細胞。

【請求項 1 9 2】

造血細胞であり、造血細胞がマクロファージであるキメラ抗原骨髄細胞である、請求項 1 9 1 の細胞。

【請求項 1 9 3】

T細胞である、請求項 1 9 1 の細胞。

【請求項 1 9 4】

細胞を修飾 S T I N G タンパク質、免疫刺激性細菌または送達媒体で感染させることによりエクスピボで産生した、請求項 1 9 0 ~ 1 9 3 の何れかの細胞。

【請求項 1 9 5】

請求項 1 ~ 2 9 の何れかの修飾 S T I N G タンパク質または請求項 3 0 ~ 1 3 5 の何れかの免疫刺激性細菌または請求項 1 3 6 ~ 1 7 0 の何れかの送達媒体または請求項 1 7 1 ~ 1 8 0 および 1 9 0 ~ 1 9 4 の何れかの細胞または請求項 1 8 9 の医薬組成物または請求項 1 9 0 ~ 1 9 4 の何れかの細胞を、固形腫瘍を含むまたは造血器腫瘍である癌を有する対象に投与することを含む、癌を処置する方法。

【請求項 1 9 6】

癌が固形腫瘍を含む、請求項 1 9 5 の方法。

【請求項 1 9 7】

癌が転移である、請求項 1 9 5 または請求項 1 9 6 の方法。

【請求項 1 9 8】

癌がリンパ腫、白血病、胃癌および乳房、心臓、肺、小腸、結腸、脾臓、腎臓、膀胱、頭頸部、結腸直腸、卵巣、前立腺、脳、脾臓、皮膚、骨、骨髄、血液、胸腺、子宮、精巣、子宮頸および肝臓の癌から選択される、請求項 1 9 5 ~ 1 9 7 の何れかの方法。

【請求項 1 9 9】

癌の処置のための、請求項 1 ~ 2 9 の何れかの修飾 S T I N G タンパク質または請求項 3 0 ~ 1 3 5 の何れかの免疫刺激性細菌または請求項 1 3 6 ~ 1 7 0 の何れかの送達媒体または請求項 1 7 1 ~ 1 8 0 および 1 9 0 ~ 1 9 4 の何れかの細胞または請求項 1 8 9 の医薬組成物または請求項 1 9 0 ~ 1 9 4 の何れかの細胞の使用。

【請求項 2 0 0】

10

20

30

40

50

癌が固形腫瘍または造血器腫瘍を含む、請求項 199 の使用。

【請求項 201】

癌が転移である、請求項 199 または請求項 200 の使用。

【請求項 202】

癌がリンパ腫、白血病、胃癌および乳房、心臓、肺、小腸、結腸、脾臓、腎臓、膀胱、頭頸部、結腸直腸、卵巣、前立腺、脳、膵臓、皮膚、骨、骨髄、血液、胸腺、子宮、精巣、子宮頸および肝臓の癌から選択される、請求項 199 ~ 201 の何れかの使用。

【請求項 203】

非ヒト S T I N G タンパク質が配列番号 331、338 または 341 ~ 351 に示すアミノ酸配列を有するまたは配列番号 331、338 または 341 ~ 351 に示すアミノ酸配列と少なくとも 98% 配列同一性を有する各種のアレル S T I N G タンパク質のバリエーションである、請求項 1 ~ 202 の何れかの修飾 S T I N G タンパク質、送達媒体、免疫刺激性細菌、医薬組成物、細胞、方法または使用。

10

【請求項 204】

非ヒト S T I N G タンパク質またはキメラが配列番号 332 ~ 337、339 または 340 の何れかに示すアミノ酸配列を有する、請求項 1 ~ 202 の何れかの修飾 S T I N G タンパク質、送達媒体、免疫刺激性細菌、医薬組成物、細胞、方法または使用。

【請求項 205】

薬学的に許容される媒体中に請求項 30 ~ 135 の何れかの免疫刺激性細菌を含む、医薬組成物。

20

【請求項 206】

希釈せずに投与するために製剤化される、請求項 189 または請求項 205 の医薬組成物。

【請求項 207】

1 回量として製剤化される、請求項 189、205 および 206 の何れかの医薬組成物。

【請求項 208】

非経腸投与用に製剤化される、請求項 189 および 205 ~ 207 の何れかの医薬組成物。

【請求項 209】

請求項 189 および 205 ~ 208 の何れかの医薬組成物を投与することを含む、対象における固形腫瘍を含むまたは造血器腫瘍である癌を処置する方法。

30

【請求項 210】

対象における固形腫瘍を含むまたは造血器腫瘍である癌の処置のための、請求項 189 および 205 ~ 208 の何れかの医薬組成物の使用。

【請求項 211】

対象における固形腫瘍を含むまたは造血器腫瘍である癌の処置に使用するための、請求項 30 ~ 135 の何れかの免疫刺激性細菌。

【請求項 212】

対象がヒトである、請求項 195 ~ 202 および 209 ~ 211 の何れかの方法または使用または免疫刺激性細菌。

40

【請求項 213】

処置が、第二の抗癌剤または処置が適用される組み合わせ治療を含む、請求項 195 ~ 202 および 209 ~ 212 の何れかの方法または使用または免疫刺激性細菌。

【請求項 214】

第二の抗癌剤または処置が免疫刺激性細菌の前、同時、後または間欠的に投与される、請求項 213 の方法または使用または免疫刺激性細菌。

【請求項 215】

第二の抗癌剤または処置が免疫療法である、請求項 214 の方法または使用または免疫刺激性細菌。

【請求項 216】

50

タンパク質、細胞、送達媒体、医薬組成物または免疫刺激性細菌の投与が非経腸的である、請求項 195 ~ 202 および 209 ~ 215 の何れかの方法または使用または免疫刺激性細菌。

【請求項 217】

投与が経口または直腸または肺へのエアロゾルまたは腫瘍内である、請求項 195 ~ 202 および 209 ~ 216 の何れかの方法または使用または免疫刺激性細菌。

【請求項 218】

投与が静脈内、筋肉内または皮下である、請求項 195 ~ 202 および 209 ~ 216 の何れかの方法または使用または免疫刺激性細菌。

【請求項 219】

癌が白血病、リンパ腫、胃癌および乳房、心臓、肺、小腸、結腸、脾臓、腎臓、膀胱、頭頸部、結腸直腸、卵巣、前立腺、脳、膵臓、皮膚、骨、骨髄、血液、胸腺、子宮、精巣、子宮頸および肝臓の癌から選択される、請求項 195 ~ 202 および 209 ~ 218 の何れかの方法または使用または免疫刺激性細菌。

【請求項 220】

免疫療法が抗 PD - 1 または抗 PD - L 1 または抗 CTLA - 4 抗体の投与を含む、請求項 215 の方法または使用または免疫刺激性細菌。

【請求項 221】

ゲノムを修飾することを含み、それにより細菌がフラジェリン - ( f l i C - / f l j B - ) および / または p a g P - である、治療細菌の腫瘍にコロニー形成する能力を増加させる方法。

【請求項 222】

治療細菌が免疫刺激性細菌である、請求項 221 の方法。

【請求項 223】

細菌がサルモネラ種である、請求項 221 または請求項 222 の方法。

【請求項 224】

ヒト患者におけるインターフェロン症を促進する変異機能獲得型、構成的活性免疫刺激タンパク質を同定し；そして

同定されたタンパク質をコードする核酸を腫瘍ターゲティング細菌またはウイルスに導入することを含み、それにより得られた細菌またはウイルスが、対象に導入されたとき、腫瘍微小環境の免疫刺激を促進するものである、

癌処置のための免疫刺激性細菌または腫瘍溶解性ウイルスを産生する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

出願人アクティム・セラピューティクス・インコーポレイテッドおよび発明者クリストファー・ディ・サノス、ローラ・ヒックス・グリックマン、ジャスティン・スコープル、アレクサンドル・チャールズ・ミシェル・イアネッロおよびハイシン・キーオの、「Immunostimulatory Bacteria Engineered To Colonize Tumors, Tumor-Resident Immune Cells, And The Tumor Microenvironment」なる表題の 2020 年 1 月 16 日出願の米国仮出願 62 / 962,140 に基づく優先権の利益を主張する。

【0002】

出願人アクティム・セラピューティクス・インコーポレイテッドおよび発明者クリストファー・ディ・サノス、ローラ・ヒックス・グリックマン、ジャスティン・スコープルおよびアレクサンドル・チャールズ・ミシェル・イアネッロの、「Immunostimulatory Bacteria Engineered To Colonize Tumors And The Tumor Microenvironment」なる表題の 2019 年 11 月 12 日出願の米国仮出願 62 / 934,478 に基づく優先権の利益も主張する。

【0003】

10

20

30

40

50

出願人アクティム・セラピューティクス・インコーポレイテッドおよび発明者クリストファー・ディ・サノス、ローラ・ヒックス・グリックマン、ジャスティン・スコープルおよびアレクサンドル・チャールズ・ミシェル・イアネッロの、「Salmonella Strains Engineered To Colonize Tumors And The Tumor Microenvironment」なる表題の2019年4月03日出願の米国仮出願62/828,990に基づく優先権の利益も主張する。

【0004】

出願人アクティム・セラピューティクス・インコーポレイテッドおよび発明者クリストファー・ディ・サノス、ローラ・ヒックス・グリックマン、ジャスティン・スコープルおよびアレクサンドル・チャールズ・ミシェル・イアネッロの、「Tumor-Targeting Microorganisms that Promote Immuno-Stimulation of the Tumor Microenvironment」なる表題の2019年2月27日出願の米国仮出願62/811,521に基づく優先権の利益も主張する。

10

【0005】

許容される限り、これら出願の各々の主題を、引用により全体として本明細書に包含させる。これら出願の各々において提供される免疫刺激性細菌を本明細書に記載のとおり修飾でき、かつこのような細菌は、引用により本明細書に包含させる。

【0006】

電子的に提出した配列表の参照による取り込み

配列表の電子バージョンをここに提出し、その内容を、引用により全体として本明細書に包含させる。電子ファイルは2020年2月27日に作成し、603キロバイトサイズであり、1706SEQPC.txtなる名称である。

20

【背景技術】

【0007】

背景

腫瘍は、深く免疫抑制性の環境を発展させてきた。免疫監視を回避する複数の機構を創出し、抗腫瘍免疫細胞を免疫抑制させるために再プログラム化し、最新癌治療に対する抵抗性を継続的に変異させている(例えば、Mahoney et al. (2015) Nat. Rev. Drug Discov. 14(8):561-584)。癌免疫療法分野は、抗CTLA4、抗PD-1および抗PD-L1免疫チェックポイント抗体の臨床的成功により証明されるとおり、大きな進歩を遂げている(例えば、Buchbinder et al. (2015) J. Clin. Invest. 125:3377-3383; Hodi et al. (2015) J. Clin. Invest. 125:3392-4000; およびChen et al. (2015) J. Clin. Invest. 125:3384-3391参照)。現在の免疫療法の自己免疫性関連毒性を制限しながら、免疫耐容性および回避を克服する免疫療法の設計は、癌免疫学分野の課題である。それ故に、付加的かつ革新的免疫療法および他の治療が必要である。

30

【発明の概要】

【0008】

概要

ここに提供されるのは、抗癌治療のために免疫刺激性であるように修飾された細菌である。ここに提供される免疫刺激性細菌は、抗腫瘍治療に多面的アプローチを提供する。細菌は、抗腫瘍免疫刺激性活性を引き出す多くの経路をもたらすプラットフォームを提供する。ここで提供するサルモネラ種のような細菌は、腫瘍、腫瘍常在免疫細胞および/または腫瘍微小環境(TME)の中に蓄積または標的とする能力の増強により、強力な抗腫瘍活性を有するように綿密に調製されている。これは、例えば、それらが感染できる細胞のタイプ(指向性)、毒性、補体による不活性化回避などの免疫系を回避する能力および/または増殖できる環境を変える修飾により達成され得る。免疫刺激性細菌はまた、例えば、免疫応答を誘導または増強する産物および他の治療剤/抗癌剤もコードできる。ここに提供される免疫刺激性細菌は、腫瘍/腫瘍微小環境/腫瘍常在免疫細胞のコロニー形成および補体および他の抗細菌免疫応答に対する抵抗性の改善により、全身投与され得る。

40

【0009】

50

細菌は、生来免疫系を刺激する；細菌感染は免疫および炎症経路ならびに応答を誘導し、その一部は抗腫瘍処置に望ましく、他方は望ましくない。望ましくない炎症応答をもたらす遺伝子および産物の欠失または修飾および望ましい免疫刺激性抗腫瘍応答を誘導する遺伝子の付加または修飾による細菌の修飾は、細菌の抗腫瘍活性を改善する。

【 0 0 1 0 】

細菌は腫瘍細胞および組織に蓄積し、その中で複製することにより細胞を溶解できる。細菌は投与部位から移動し、他の(例えば、遠位/転移)腫瘍および腫瘍細胞に蓄積して、遠達効果を提供できる。ここに提供される細菌は、優先的に腫瘍常在免疫細胞、腫瘍および腫瘍微小環境に感染かつ蓄積し、治療抗腫瘍タンパク質をコードするプラスミドおよび産物を送達するように修飾される。ここで、その細菌のこれらの性質は、個々にかつ相乗的に作用し得る複数の抗腫瘍活性および性質を伴う確実に免疫刺激性の細菌を生じるよう利用されている。

10

【 0 0 1 1 】

ここに提供される細菌のゲノムは腫瘍および腫瘍常在免疫細胞およびまた腫瘍微小環境における蓄積が増加するように修飾される。これは、ここでは、上皮細胞などの非腫瘍細胞の感染または侵襲を担う遺伝子の欠失または無効化および/または特に免疫細胞および腫瘍常在免疫細胞への細菌の細胞病原性の低下により実施される。

【 0 0 1 2 】

腫瘍常在免疫細胞への蓄積により、真核生物制御シグナル制御下に、プラスミドにコードされたタンパク質が発現され、TMEに分泌される。ここに提供される免疫刺激性細菌は、抗腫瘍免疫応答の修飾によるような抗癌活性を有するタンパク質をコードする。ここに提供される細菌は、I型インターフェロン(IFN)の発現をもたらすタンパク質をコードする。このようなタンパク質は、STING(インターフェロン遺伝子刺激物質)およびI型IFNの発現をもたらすサイトゾルDNA/RNAセンサー経路の一部である他の免疫刺激性タンパク質および、またI型IFNの発現を増加させるまたはIFNの構成的発現をもたらすこれらタンパク質のパリアントを含む。例えば、免疫刺激性タンパク質は、機能獲得型変異を有するものなどのサイトゾルDNA/RNAセンサーの構成的活性型パリアントを含む。

20

【 0 0 1 3 】

組成物、その使用および癌の処置を含む疾患の処置のために免疫応答を調節する方法が提供される。組成物は、ここに提供される免疫刺激性細菌を含む。処置方法および処置のための細菌の使用もまた提供される。処置対象は、ヒトおよび他の霊長類、イヌおよびネコなどのペットならびにウマ、ウシおよびその他の農業用および動物園の動物などの他の動物を含む。

30

【 0 0 1 4 】

免疫刺激性細菌を含む医薬組成物ならびに疾患および障害、特に固形腫瘍および血液系腫瘍を含む腫瘍などの増殖性障害の処置のための方法および使用が提供される。

【 0 0 1 5 】

免疫刺激性細菌または医薬組成物の投与によりまたは処置のための組成物の使用により固形腫瘍の増殖を阻害するまたは体積を低減する方法もまた提供される。例えば、固形腫瘍癌を有するヒト患者などの対象に、単回投与量で有効量のサルモネラ種などの免疫刺激性細菌を含む組成物を投与するまたは使用する方法が提供される。

40

【 0 0 1 6 】

I型IFNの発現を刺激または誘起する構成的活性型タンパク質をコードする免疫刺激性細菌が提供される。免疫刺激性細菌はまたRNAiおよびサイトカインおよびケモカインなどの他の抗腫瘍治療剤をコードでき、ここに記載する他の細菌およびプラスミドの修飾を、あらゆる所望の組み合わせで組み合わせ得る。

【 0 0 1 7 】

腫瘍、腫瘍微小環境および/または腫瘍常在免疫細胞のコロニー形成が増強されたおよび抗腫瘍活性が増強された免疫刺激性細菌が提供される。免疫刺激性細菌は、鞭毛をコード

50

する遺伝子の欠失および/または機能的鞭毛が産生されないよう遺伝子の修飾および/または p a g P の欠失または不活性 P a g P 産物を産生するよう p a g P の修飾により修飾される。その結果、免疫刺激性細菌はフラジェリン - ( f l i C - / f l j B - ) および/または p a g P - である。これとは別にまたはこれに加えて、免疫刺激性細菌は p a g P - / m s b B - であり得る。

【 0 0 1 8 】

免疫刺激性細菌は、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ ( a s d ) をコードする内因性遺伝子の全てまたは一部の破壊または欠失によるなどアスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ - ( a s d - ) であり得て、それにより内因性 a s d は発現されない。免疫刺激性細菌は、細菌がインビボで複製が制限されるように、インビトロで細菌増殖のために細菌プロモーター制御下にプラスミドでアスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ ( a s d ) をコードするように修飾され得る。

10

【 0 0 1 9 】

免疫刺激性細菌は、所望により、細菌がアデノシンまたはプリン栄養要求株であるようなさらなるゲノム修飾を有する。細菌は、所望により a s d - 、 p u r I - および m s b B - の 1 以上であり得る。サルモネラ種などの免疫刺激性細菌は、腫瘍微小環境における抗腫瘍活性を付与する免疫刺激性タンパク質をコードするように修飾されるおよび/または細菌が腫瘍微小環境または腫瘍常在免疫細胞における免疫細胞に優先的に感染するおよび/または他の細胞より少ない免疫細胞の細胞死を誘導するように修飾される。免疫刺激性細菌の投与による固形腫瘍の増殖を阻害するまたは体積を低減する方法もまた提供される。

20

【 0 0 2 0 】

免疫刺激性細菌のゲノムがフラジェリン - ( f l i C - / f l j B - ) であり、それにより鞭毛が産生されないおよび/または p a g P - であるように修飾することによる、サルモネラ種などのような免疫刺激性細菌の腫瘍コロニー形成を増加させる方法が提供される。特に、細菌はフラジェリン - アデノシン栄養要求株であり、 a s d - でもある。フラジェリン - である細菌は、鞭毛を発現する細菌種由来である。

【 0 0 2 1 】

細菌はまた抗腫瘍剤、対象の免疫応答を増加させるタンパク質および/またはインターフェロン - を含む I 型インターフェロン ( I F N ) のような免疫刺激タンパク質の構成的発現または発現増加をもたらすタンパク質などの治療産物をコードするプラスミドも含む。これは、I 型 I F N 発現をもたらす経路の一部として免疫系を刺激するタンパク質であって、特に、このようなタンパク質を構成的活性型とするもののコード化を含む。プラスミドはまた、対象における抗腫瘍免疫応答を増加するサイトカインなどの免疫刺激性タンパク質もコードし得る。細菌は、免疫チェックポイント遺伝子および産物および免疫抑制性である経路で役割を有する他の標的を抑制、阻害、妨害または他にサイレンシングするよう設計されたマイクロRNA、 s h R N A および s i R N A を含む干渉RNAなどの抗癌治療剤をコードするプラスミドを含む。細菌はまた腫瘍に対する免疫応答を刺激するプラスミドに腫瘍抗原もコードし得る。コード化タンパク質は、哺乳動物および動物またはウイルスプロモーターなどの真核生物により認識されるプロモーターの制御下に発現される。細菌は、機能獲得型免疫刺激性タンパク質および/またはサイトカインの組み合わせを含む、1 個、2 個またはそれ以上の治療タンパク質/産物を発現し得る。これら異種タンパク質は、真核生物宿主により認識される、RNAポリメラーゼIIまたはIIIプロモーターなどのプロモーター制御した、プラスミド上にコード化される。

30

40

【 0 0 2 2 】

真核生物プロモーター制御下に産物をコードするプラスミドを含む免疫刺激性細菌であって、免疫刺激性細菌のゲノムが修飾され、それにより細菌がフラジェリン - ( f l i C - / f l j B - ) および/または p a g P - である細菌が提供される。細菌は、フラジェリン - ( f l i C - / f l j B - ) および p a g P - の一方または両方であり得る。これらの免疫刺激性細菌は、腫瘍/腫瘍微小環境および腫瘍常在免疫細胞コロニー形成の増加を示

50



し、増加した抗腫瘍活性を有する。

【0023】

真核生物プロモーター制御下に治療産物をコードするプラスミドを含む免疫刺激性細菌であって、免疫刺激性細菌のゲノムが修飾され、それにより細菌が *pagP*<sup>-</sup>/*msbB*<sup>-</sup>である細菌もまた提供される。これらの細菌は、腫瘍、腫瘍常在免疫細胞および腫瘍微小環境のコロニー形成も増加する。細菌膜および構造の結果的变化により、補体活性などの宿主免疫応答が、細菌が全身投与により排除されないよう改変される。これらの細菌はフラジェリン<sup>-</sup> (*fliC*<sup>-</sup>/*fliJ*<sup>B</sup><sup>-</sup>)であってよく、細胞の、感染し、腫瘍微小環境、腫瘍および腫瘍常在免疫細胞における蓄積をもたらし得るよう改変する修飾を含む、ここに記載する他の修飾も含み得る。それ故に、ここに提供される免疫刺激性細菌を全身投与し、高レベルの腫瘍/腫瘍微小環境および/または腫瘍常在免疫細胞コロニー形成を示し得る。免疫刺激性細菌は、*purI*<sup>-</sup> (*purM*<sup>-</sup>)、*asd*<sup>-</sup> および *msbB*<sup>-</sup> の1以上およびフラジェリン<sup>-</sup> (*fliC*<sup>-</sup>/*fliJ*<sup>B</sup><sup>-</sup>) および *pagP*<sup>-</sup> の一方または両方であり得る。

10

【0024】

免疫刺激性細菌は、*purI*<sup>-</sup> (*purM*<sup>-</sup>)、*msbB*<sup>-</sup>、*purD*<sup>-</sup>、フラジェリン<sup>-</sup> (*fliC*<sup>-</sup>/*fliJ*<sup>B</sup><sup>-</sup>)、*pagP*<sup>-</sup>、*adrA*<sup>-</sup>、*csgD*<sup>-</sup>、*qseC*<sup>-</sup>、*hilA*<sup>-</sup>、*lppA*<sup>-</sup> および *lppB*<sup>-</sup> および特にフラジェリン<sup>-</sup> (*fliC*<sup>-</sup>/*fliJ*<sup>B</sup><sup>-</sup>) および/または *pagP*<sup>-</sup> および/または *msbB*<sup>-</sup>/*pagP*<sup>-</sup> の1以上であり得る。例えば、免疫刺激性細菌は、宿主における非免疫細胞の毒性または感染性を低減する欠失または破壊などの、ゲノムにおける変異を含み得る。例えば、免疫刺激性細菌は *pagP*<sup>-</sup> であり得る。他の例として、免疫刺激性細菌はフラジェリン<sup>-</sup> (*fliC*<sup>-</sup>/*fliJ*<sup>B</sup><sup>-</sup>) であり得て、かつ *pagP*<sup>-</sup> でもあり得る。細菌を、腫瘍常在免疫細胞および腫瘍微小環境 (TME) に蓄積し、治療産物を発現し、それにより免疫療法抗腫瘍産物を有益な活性を有する環境に送達し、他の細胞/環境における発現による有害なまたは毒性副作用を回避するように修飾し得る。免疫刺激性タンパク質/治療産物をコードする核酸は、発現のために分泌シグナルをコードする核酸に操作可能に連結でき、それにより、発現により、宿主において、免疫刺激性タンパク質/治療産物が腫瘍微小環境に分泌される。

20

【0025】

上記のとおり、免疫刺激性細菌のゲノムは、細菌が腫瘍常在免疫細胞などの免疫細胞に優先的に感染するようにも修飾されるおよび/またはゲノムは細菌が非修飾細菌より少ない腫瘍常在免疫細胞の細胞死を誘導する(パイロトーシス減少)ように修飾される。その結果、免疫刺激性細菌は、腫瘍または腫瘍微小環境または腫瘍常在免疫細胞に蓄積するか、または修飾がないものより大きな程度で蓄積し、それにより免疫刺激性タンパク質およびその構成的活性型バリエーションおよび他の治療産物を細胞に送達し、I型インターフェロンの発現を刺激または誘導する。細菌は、フラジェリン<sup>-</sup> (*fliC*<sup>-</sup>/*fliJ*<sup>B</sup><sup>-</sup>)、*pagP*<sup>-</sup> および *msbB*<sup>-</sup> の1以上であり得て、ここに記載するような他の修飾を含み得る。

30

【0026】

免疫刺激性細菌は、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (*asd*) をコードする内因性遺伝子の全てまたは一部の破壊または欠失によるなど、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ<sup>-</sup> (*asd*<sup>-</sup>) でもあり得て、それにより内因性 *asd* は発現されない。これらの免疫刺激性細菌は、細菌がインビトロで産生され得るように、細菌プロモーター制御下にプラスミドでアスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (*asd*) をコードするように修飾され得る。

40

【0027】

免疫刺激性細菌は、アデノシンおよびアデニンなどの腫瘍微小環境で多いまたは蓄積される特定の栄養素に対して栄養要求性とし得る。また、複製能を低減または排除するために、このような栄養素に対して栄養要求性であるよう修飾し得る。不活性化/欠失細菌ゲノム遺伝子は、宿主により認識されるプロモーター制御下にそれらを置くことにより補われ得る。

50

## 【0028】

さらに、免疫刺激性細菌のゲノムを、腫瘍常在免疫細胞に優先的に感染するように修飾する。これは、細菌侵襲性または感染性に役割を有するおよび/または細胞死誘導に役割を有する細菌遺伝子の欠失または破壊により達成される。細菌は、腫瘍常在免疫細胞に優先的に感染するおよび/または非修飾細菌よりもしくは細菌が感染できる他の細胞より少ない細胞死をこのような細胞に誘導するように修飾される。

## 【0029】

ここに提供される免疫刺激性細菌は、細菌が誘導する腫瘍常在免疫細胞の細胞死が少なくなる細菌ゲノムの修飾;および/または細菌が腫瘍、TMEまたは腫瘍常在免疫細胞により効率的に蓄積するようにする細菌ゲノムの修飾を含み得る。これらの免疫刺激性細菌を、細菌が腫瘍常在免疫細胞に優先的に感染するように修飾できるおよび/または免疫刺激性細菌のゲノムを、腫瘍常在免疫細胞の細胞死誘導が少ない(パイロトーシス減少)ように修飾でき、それにより免疫刺激性細菌が腫瘍または腫瘍微小環境または腫瘍常在免疫細胞に蓄積し、それによりI型IFN発現を刺激または誘導するように構成的活性型免疫刺激性タンパク質または他の治療産物を細胞に送達する。

10

## 【0030】

免疫刺激性細菌は、SPI-1依存性侵襲(および/またはSPI-2)に關与する1以上の遺伝子またはオペロンの欠失または修飾を含み得て、それにより免疫刺激性細菌は上皮細胞に侵襲または感染しない。欠失または不活性化され得る遺伝子の例は、avrA、hilA、hilD、invA、invB、invC、invE、invF、invG、invH、invI、invJ、iacP、iagB、spaO、spaP、spaQ、spaR、spaS、orgA、orgB、orgC、prgH、prgI、prgJ、prgK、sicA、sicP、sipA、sipB、sipC、sipD、sirC、sopB、sopD、sopE、sopE2、sprBおよびsptPの1以上である。上皮細胞に感染する能力の排除は、rck、pagN、hlyE、pefI、srgD、srgA、srgBおよびsrgCから選択される遺伝子の1以上などの、SPI-1非依存性侵襲に關与するタンパク質をコードする遺伝子のノックアウトまたは欠失を含むように、ここに記載する免疫刺激性細菌を操作することにより達成され得る。同様に、免疫刺激性細菌は、例えば、細菌がサルモネラ含有液胞(SCV)を回避するように、SPI-2における遺伝子および/またはオペロンの欠失を含み得る。これらの遺伝子は、例えば、sifA、sseJ、sseL、sopD2、pipB2、sseF、sseG、spvBおよびsteAを含む。

20

30

## 【0031】

例えば、免疫刺激性細菌は、修飾がない細菌と比較して、病原性が低減し、それにより上皮および/または他の非免疫細胞の感染が低減するように修飾できる。これらは、3型分泌装置(T3SS)または4型分泌装置(T4SS)の修飾、例えば、ここに記載し、例示するサルモネラのSPI-1経路またはT3SS系の修飾を含む。細菌は、さらに、細菌の病原性を低減する、PagP(リポドAパルミトイルトランスフェラーゼ)をコードする核酸の欠失または破壊によるなど、細胞死の誘導が少ないよう修飾され得る。

## 【0032】

ここに提供される免疫刺激性細菌のゲノムを、食細胞のような免疫細胞、特に腫瘍微小環境における免疫細胞の感染を増加または促進するように修飾され得る。これは、上皮細胞のような非免疫細胞の感染低減または免疫細胞の感染増加を含み得る。細菌はまた免疫細胞におけるパイロトーシスが減少するように修飾され得る。細菌ゲノムの多数の修飾は、免疫細胞の感染増加およびパイロトーシスの減少の一方または両方を行い得る。ここに提供される免疫刺激性細菌は、例えば、hilAの破壊または欠失のようなSPI-1 T3SS経路に關与する遺伝子の欠失および/または破壊および/またはフラジェリン、棒状タンパク質(PrgJ)、針状タンパク質(PrgI)およびQseCをコードする遺伝子の破壊/欠失などの修飾を含む。

40

## 【0033】

50

ヒトのような真核生物宿主で発現するためのプラスミドにコードされる治療産物は、RNAポリメラーゼIIまたはIIIにより認識されるプロモーターのような真核生物プロモーターを含む真核生物制御配列の制御下にある。これらは、ウイルスおよび哺乳動物RNAポリメラーゼIIプロモーターを含む。

【0034】

ウイルスプロモーターの例は、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、SV40プロモーター、エプスタイン・バールウイルス(EBV)プロモーター、ヘルペスウイルスプロモーター、呼吸器多核体ウイルス(RSV)プロモーターおよびアデノウイルスプロモーターを含むが、これらに限定されない。他のRNAポリメラーゼIIプロモーターは、伸長因子-1(EF-1)アルファプロモーターまたはUbCプロモーター(レンチウイルス)またはPGK(3-ホスホグリセラートキナーゼ)プロモーター、合成MNDプロモーターおよびCAGG(またはCAG)プロモーターなどの合成プロモーターを含むが、これらに限定されない。合成CAGプロモーターは、サイトメガロウイルス(CMV)初期エンハンサー要素(C);ニワトリベータ-アクチン遺伝子(A)のプロモーター、第一エクソンおよび第一イントロン;およびウサギベータ-グロビン遺伝子(G)のスプライスアクセプターを含む。MNDは、修飾MoMuLVLTRのU3領域と骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー(マウス白血病ウイルス由来MNDプロモーター(骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、陰性対照領域欠失、dl587revプライマー結合部位置換;例えば、Li et al. (2010) J. Neurosci. Methods 189:56-64参照)を含む、合成プロモーターである。他の強い制御可能または構成的プロモーターが使用され得る。プロモーターの例は、EF-1アルファプロモーター、CMV、SV40、PGK、EIF4A1、CAGおよびCD68プロモーターである。制御配列はまたターミネーター、エンハンサー、分泌および他の輸送シグナルも含む。

【0035】

免疫刺激性細菌に含まれるプラスミドは、低コピー数複製起点のような中乃至低コピー数をもたらす複製起点の選択によるような、低コピー数または中コピー数で存在し得る。細菌の抗腫瘍活性および他の性質が、プラスミドが低乃至中コピー数で存在するとき改善されることがここで示され、ここで、中コピー数は150未満または約150未満かつ20または約20超または20もしくはは25~150であり、低コピー数は25未満または20未満または約25未満または約20未満のコピーである。

【0036】

ここに提供される免疫刺激性細菌は、ここに記載しかつ例示するように、免疫刺激性タンパク質を発現および/または腫瘍微小環境もしくは腫瘍常在免疫細胞に優先的に感染および/またはその中の免疫細胞に低毒性であるようにさらに修飾された、米国出願16/033,187に記載の株および細菌の何れかを含む。

【0037】

コード化治療タンパク質/産物

免疫刺激性細菌は、細菌のプラスミド上に、哺乳動物対象で発現されたとき、腫瘍微小環境における抗腫瘍免疫を付与するまたは貢献する治療タンパク質または産物を、真核生物プロモーターの制御下にコードする。

【0038】

免疫刺激性細菌によりコードされる産物は、I型インターフェロン(IFN)の発現をもたらすサイトゾルDNA/RNAセンサー経路の一部であるタンパク質およびそのバリエーションを含む。これらは、活性が増加したバリエーションタンパク質およびI型インターフェロンの構成的発現をもたらすバリエーションタンパク質を含む。これらはまた、天然にまたは変異により、望ましくない免疫応答をもたらす経路におけるシグナル伝達活性が減少しているが、天然ヒトタンパク質と同等以上のI型インターフェロン刺激活性および/またはインターフェロン-刺激活性を有する、タンパク質も含む。特に、免疫刺激性細菌は、非修飾形態で、I型インターフェロン(IFN)の発現をもたらすサイトゾルDNA/RNAセンサー経路の一部である、免疫刺激性タンパク質の機能獲得型(GOF)バリエーションをコー

10

20

30

40

50

ドする。例は、ヒトにおいて、インターフェロン症を促進するまたは引き起こす、免疫刺激性タンパク質の機能獲得型、構成的活性型バリエーションであり、ここで、免疫刺激性細菌のゲノムが細菌が腫瘍常在免疫細胞に優先的に感染するように修飾されているおよび/または免疫刺激性細菌のゲノムが腫瘍常在免疫細胞の細胞死誘導が少ない(パイロトーシス減少)ように修飾されており、それにより免疫刺激性細菌が腫瘍または腫瘍微小環境または腫瘍常在免疫細胞に蓄積し、それによりI型IFNの発現を刺激または誘導するように細胞に構成的活性型免疫刺激性タンパク質を送達する。バリエーションは、免疫刺激性タンパク質におけるリン酸化部位を排除する変異を含み得て、それにより活性化B細胞の核因子カッパ軽鎖エンハンサー(NF- $\kappa$ B)シグナル伝達を低減する。これらは、例えば、STING、RIG-I、MDA-5、IRF-3、IRF-5、IRF-7、TRIM56、RIP1、Sec5、TRAF3、TRAF2、TRAF6、STAT1、LGP2、DDX3、DHX9、DDX1、DDX9、DDX21、DHX15、DHX33、DHX36、DDX60およびSNRNP200およびそのバリエーション、例えばインターフェロン症で発現されるものおよび構成的活性を有するかまたは活性が増加したその保存的変種を含む。ある実施態様において、これらは、STING、RIG-I、IRF-3、IRF-7またはMDA5のようなI型IFNを誘導するタンパク質および活性が増加したまたは構成的活性を有するそのバリエーションを含み、ここで、免疫刺激性タンパク質はSTING、RIG-I、IRF-3、IRF-7またはMDA5である。

10

#### 【0039】

それ故に、ここで、非修飾形態で、I型インターフェロン(IFN)の発現をもたらすサイトゾルDNA/RNAセンサー経路の一部である免疫刺激性タンパク質の機能獲得型バリエーションをコードする異種核酸を含むプラスミドを含む、免疫刺激性細菌が提供される。これらの機能獲得型タンパク質は、プロモーターおよび所望により他の制御シグナル、例えばエンハンサー、ポリAおよび転写ターミネーターを含む真核生物制御シグナルの制御下、プラスミド上にコード化される。プラスミド上のタンパク質/産物をコードする核酸は多重化されていてよく、それにより複数の産物がコードされる。多遺伝子共発現のための戦略は、単一ベクターにおける複数のプロモーター、融合タンパク質、遺伝子間のタンパク質切断部位、配列内リボソーム進入部位(IRES)および「自己開裂」(リボソームスキッピング)2Aペプチドの使用を含む。2Aペプチドは、真核生物細胞における翻訳中、ポリペプチドの「開裂」に介在する、18~22アミノ酸(aa)長ウイルスオリゴペプチドである。それ故に、コーディング部分間にT2A、P2A、F2AおよびE2Aなどの2A自己開裂ペプチドを包含させることによる、単一プロモーター制御下、プラスミドで治療産物をコードするプラスミドが提供される。

20

30

#### 【0040】

非修飾形態の免疫刺激性タンパク質は、シグナル伝達経路におけるサイトゾルDNA/RNAを感知するタンパク質である。それらは、活性を増加させるおよび/または活性を構成的とするアミノ酸置換または欠失で修飾されたタンパク質を含む。提供されるのは、免疫刺激性タンパク質の機能獲得型、構成的活性型バリエーションをコードするプラスミドを含む、免疫刺激性細菌である。これらの機能獲得型タンパク質は、ヒトにおいて、インターフェロン症を促進するまたは引き起こすタンパク質およびI型インターフェロンの構成的発現をもたらすように修飾された、選択されている、機能獲得型変異体を含む、シグナル伝達経路においてI型インターフェロンの発現をもたらすタンパク質を含む。非修飾形態の免疫刺激性タンパク質は、直接的または、シグナル伝達経路の一部として、間接的に、I型インターフェロンの発現を誘導するように、サイトゾル核酸、ヌクレオチド、ジヌクレオチドまたは環状ジヌクレオチドを感知または相互作用し、バリエーションタンパク質はサイトゾル核酸、ヌクレオチド、ジヌクレオチドまたは環状ジヌクレオチド(CDN)の感知または相互作用非存在下で、I型インターフェロンの発現を誘導する。包含されるのは、I型インターフェロンの発現をもたらすのに、サイトゾル核酸、ヌクレオチド、ジヌクレオチドまたは環状ジヌクレオチドを必要としない機能獲得型バリエーションである。このようなタンパク質の例は、STING、RIG-I、MDA-5、IRF-3、IRF-5、

40

50

IRF - 7、TRIM56、RIP1、Sec5、TRAF3、TRAF2、TRAF6、STAT1、LGP2、DDX3、DHX9、DDX1、DDX9、DDX21、DHX15、DHX33、DHX36、DDX60およびSNRNP200を含む。

【0041】

これらの免疫刺激性細菌において、コード化バリエーション機能獲得型タンパク質は、免疫刺激性タンパク質におけるリン酸化部位が排除され、それにより活性化B細胞の核因子カッパ軽鎖エンハンサー(NF- $\kappa$ B)シグナル伝達が低減されるものであり得る。あるいは、細菌は、リン酸化部位でのアミノ酸セリン(S)またはスレオニン(T)の、リン酸化模倣体であり、活性増加または構成的活性をもたらす、アスパラギン酸(D)への1以上の置換を含み得る。I型インターフェロン発現をもたらすシグナル伝達経路におけるタンパク質の例は、STING、RIG-I、IRF-3、IRF-7およびMDA5である。ここに記載されるのは、これらのタンパク質の各々について機能獲得型活性をもたらす変異の例である。変異は、コード化免疫刺激性タンパク質がバリエーションSTING、RIG-I、IRF-3、IRF-7またはMDA5であり、ウイルス感染の結果リン酸化される1以上のセリン(S)またはスレオニン残基がアスパラギン酸(D)に置き換えられ、それにより得られたバリエーションは、I型インターフェロンを構成的に誘導するリン酸化模倣体である。例えば、免疫刺激性タンパク質が、385位、386位、396位、398位、402位、404位および405位の残基に1以上の置換を有し、残基がアスパラギン酸残基で置き換えられているIRF-3である免疫刺激性細菌が提供され；これは、配列番号312を基準として、置換396Dを有するIRF-3および配列番号312を基準として、変異396D/S398D/S402D/T404D/S405Dを含むIRF-3を含む。他の例は、免疫刺激性タンパク質がSTING、MDA5、IRF-7およびRIG-Iから選択され、変異が次のa)STINGにおいて、配列番号305~309のヒトSTINGを基準として、S102P、V147L、V147M、N154S、V155M、G166E、C206Y、G207E、S102P/F279L、F279L、R281Q、R284G、R284S、R284M、R284K、R284T、R197A、D205A、R310A、R293A、T294A、E296A、R197A/D205A、S272A/Q273A、R310A/E316A、E316A、E316N、E316Q、S272A、R293A/T294A/E296A、D231A、R232A、K236A、Q273A、S358A/E360A/S366A、D231A/R232A/K236A/R238A、S358A、E360A、S366A、R238A、R375AおよびS324A/S326Aから選択される1以上；b)MDA5において、配列番号310を基準として、T331I、T331R、A489T、R822Q、G821S、A946T、R337G、D393V、G495R、R720Q、R779H、R779C、L372FおよびA452Tの1以上；c)RIG-Iにおいて、配列番号311を基準として、E373AおよびC268Fの一方または両方；およびd)IRF-7において、配列番号313を基準として、S477D/S479D、S475D/S477D/S479D、S475D/S476D/S477D/S479D/S483D/S487Dおよび247-467の1以上から選択される、免疫刺激性細菌である。これらの置き換えの何れも、下記例示的保存的アミノ酸置換の表に従う保存的変異で置き換え得る。

【0042】

上記および本明細書の他の箇所に記載される機能獲得型タンパク質および他の治療産物をコードする核酸を含む、エクソソーム、リポソーム、腫瘍溶解性ウイルス、ナノ粒子、免疫刺激性細菌および他のこのような媒体などの送達媒体もまた提供される。例えば、I型インターフェロンの発現をもたらすシグナル伝達経路の一部である、機能獲得型免疫刺激性タンパク質をコードする核酸、一般にDNAを含む、送達媒体が提供される。機能獲得型バリエーションは、I型インターフェロンの発現を構成的とし得る。例えば、これらのバリエーションは、修飾STINGなどのここに記載した何れかを含み、ここで、STINGにおける修飾は、その活性を構成的とし、活性のためにcGAMP(または他のリガンド/C

10

20

30

40

50

D N)を必要としない；修飾 S T I N G は、修飾 T M E M 1 7 3 遺伝子によりコードされる；修飾はアミノ酸の挿入、欠失または置換を含む；そして修飾 S T I N G は、非修飾 S T I N G と比較して増強された免疫刺激性活性を有する。配列番号 3 0 5 ~ 3 0 9 を基準として、S T I N G におけるこれらのアミノ酸置換は、S 1 0 2 P、V 1 4 7 L、V 1 4 7 M、N 1 5 4 S、V 1 5 5 M、G 1 6 6 E、C 2 0 6 Y、G 2 0 7 E、S 1 0 2 P / F 2 7 9 L、F 2 7 9 L、R 2 8 1 Q、R 2 8 4 G、R 2 8 4 S、R 2 8 4 M、R 2 8 4 K、R 2 8 4 T、R 1 9 7 A、D 2 0 5 A、R 3 1 0 A、R 2 9 3 A、T 2 9 4 A、E 2 9 6 A、R 1 9 7 A / D 2 0 5 A、S 2 7 2 A / Q 2 7 3 A、R 3 1 0 A / E 3 1 6 A、E 3 1 6 A、E 3 1 6 N、E 3 1 6 Q、S 2 7 2 A、R 2 9 3 A / T 2 9 4 A / E 2 9 6 A、D 2 3 1 A、R 2 3 2 A、K 2 3 6 A、Q 2 7 3 A、S 3 5 8 A / E 3 6 0 A / S 3 6 6 A、D 2 3 1 A / R 2 3 2 A / K 2 3 6 A / R 2 3 8 A、S 3 5 8 A、E 3 6 0 A、S 3 6 6 A、R 2 3 8 A、R 3 7 5 A および S 3 2 4 A / S 3 2 6 A から選択される 1 以上を含む。

10

#### 【 0 0 4 3 】

ここに提供される免疫刺激性細菌はまた、哺乳動物対象で発現されたとき、腫瘍微小環境における抗腫瘍免疫を付与するまたは貢献する、免疫刺激性タンパク質をコードするヌクレオチドの配列も含み得る；免疫刺激性タンパク質は、真核生物プロモーターの制御下、細菌におけるプラスミド上にコード化される。プロモーターの例は、伸長因子 - 1 (E F 1) アルファプロモーターまたは U b C プロモーターまたは P G K プロモーターまたは C A G G または C A G プロモーターを含むが、これらに限定されない。

20

#### 【 0 0 4 4 】

免疫刺激性細菌はまた、哺乳動物対象で発現されたとき、抗腫瘍免疫を付与するまたは貢献する、阻害性 R N A (R N A i) もコードし得る。R N A i は、真核生物プロモーターの制御下、細菌におけるプラスミド上にコード化される。免疫刺激性細菌のゲノムは、腫瘍常在免疫細胞の細胞死誘導が少ないおよび / または腫瘍常在免疫細胞および腫瘍微小環境 / 腫瘍に蓄積されるように、修飾される。

#### 【 0 0 4 5 】

ここに提供される免疫刺激性細菌はまた他の免疫刺激性タンパク質もコードし得る。免疫刺激性タンパク質は、ケモカインのようなサイトカインであり得る。免疫刺激性タンパク質の例は、I L - 2、I L - 7、I L - 1 2 p 7 0 (I L - 1 2 p 4 0 + I L - 1 2 p 3 5)、I L - 1 5、I L - 1 5 / I L - 1 5 R アルファ鎖複合体、I L - 3 6 ガンマ、I L - 1 8、C X C L 9、C X C L 1 0、C X C L 1 1、C C L 3、C C L 4、C C L 5、T 細胞の動員 / 残留性に関与するまたは効果があるまたは増強するタンパク質、C D 4 0、C D 4 0 リガンド (C D 4 0 L)、O X 4 0、O X 4 0 リガンド (O X 4 0 L)、4 - 1 B B、4 - 1 B B リガンド (4 - 1 B B L)、B 7 - C D 2 8 ファミリーメンバーおよび腫瘍壊死因子受容体 (T N F R) スーパーファミリーメンバーを含む。ある実施態様において、これらは、例えば、I L - 2、I L - 7、I L - 1 2 p 7 0 (I L - 1 2 p 4 0 + I L - 1 2 p 3 5)、I L - 1 5、I L - 2 3、I L - 3 6 ガンマ、I L - 2 R a への結合が減弱した I L - 2、I L - 1 5 / I L - 1 5 R アルファ鎖複合体、I L - 1 8、I L - 2 R a に結合しないように修飾された I L - 2、C X C L 9、C X C L 1 0、C X C L 1 1、

30

40

#### 【 0 0 4 6 】

免疫刺激性細菌は、所望により免疫チェックポイントの発現を阻害、抑制または妨害する阻害性 R N A (R N A i) をコードするヌクレオチドの配列も含み得る。R N A i は、細菌のプラスミド上にコード化され得る。免疫刺激性タンパク質および所望により R N A i をコードするヌクレオチドは、低乃至中コピー数で存在するプラスミドにあり得る。

50

## 【 0 0 4 7 】

免疫刺激性細菌はまた免疫チェックポイントの発現を阻害、抑制または妨害するRNAiまたはCRISPRカセットまたは阻害、抑制または破壊が対象における抗腫瘍免疫応答を増加させる他の標的などの治療産物もコードできる；RNAiまたはCRISPRカセットは、細菌のプラスミド上にコード化される。他の治療産物は、例えば、抗PD-1、抗PD-L1および抗CTLA-4抗体など、例えば、活性を阻害するように免疫チェックポイントに結合する抗体を含む。

## 【 0 0 4 8 】

RNAiは、標的化核酸の発現のサイレンシングに使用され得る全形態の二本鎖RNAを含む。RNAiは、shRNA、siRNAおよびマイクロRNA(miRNA)を含む。これらの形態の何れも、ここに開示かつ記載される実施態様において相互交換可能に使用され得る。一般に、RNAiは、細菌のプラスミド上にコード化される。プラスミドは、細菌に活性または産物を調節または付加する目的の産物または細菌で処置する対象の免疫系を調節できる他のこのような産物をコードする他の異種核酸を含み得る。細菌遺伝子はまた付加、欠失または破壊され得る。これらの遺伝子は、細菌の増殖および複製のための産物または宿主の細菌への免疫応答をまた調節する産物をコードし得る。

10

## 【 0 0 4 9 】

細菌種は、例えば、サルモネラ、シゲラ(*Shigella*)、リステリア(*Listeria*)、大腸菌(*E. coli*)およびビフィドバクテリア(*Bifidobacteriae*)の株を含むが、これらに限定されない。例えば、種は、ソンネ赤痢菌(*Shigella sonnei*)、フレクスナー赤痢菌(*Shigella flexneri*)、志賀赤痢菌(*Shigella dysenteriae*)、リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*)、チフス菌(*Salmonella typhi*)、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)、トリチフス菌(*Salmonella gallinarum*)およびゲルトネル菌(*Salmonella enteritidis*)を含む。

20

## 【 0 0 5 0 】

種は、例えば、サルモネラ、シゲラ、大腸菌、ビフィドバクテリア、リケッチア(*Rickettsia*)、ビブリオ(*Vibrio*)、リステリア、クレブシエラ(*Klebsiella*)、ボルデテラ(*Bordetella*)、ナイセリア(*Neisseria*)、エロモナス(*Aeromonas*)、フランシセラ(*Francisella*)、コレラ(*Cholera*)、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)、サイトロバクター(*Citrobacter*)、クラミジア(*Chlamydia*)、ヘモフィルス(*Haemophilus*)、ブルセラ(*Brucella*)、マイコバクテリウム(*Mycobacterium*)、マイコプラズマ(*Mycoplasma*)、レジオネラ(*Legionella*)、ロドコッカス(*Rhodococcus*)、シュードモナス(*Pseudomonas*)、ヘリコバクター(*Helicobacter*)、バシラス(*Bacillus*)およびエリジペロスリックス(*Erysipelothrix*)の株または前記細菌株の何れかの弱毒株もしくは修飾株を含む。

30

## 【 0 0 5 1 】

他の適当な細菌種は、リケッチア、クレブシエラ、ボルデテラ、ナイセリア、エロモナス、フランシセラ、コリネバクテリウム、サイトロバクター、クラミジア、ヘモフィルス、ブルセラ、マイコバクテリウム、マイコプラズマ、レジオネラ、ロドコッカス、シュードモナス、ヘリコバクター、ビブリオ、バシラスおよびエリジペロスリックスを含む。例えば、斑点熱リケッチア(*Rickettsia rickettsiae*)、発疹チフスリケッチア(*Rickettsia prowazekii*)、ツツガムシ病リケッチア(*Rickettsia tsutsugamuchi*)、発疹熱リケッチア(*Rickettsia mooseri*)、リケッチア・シビリカ(*Rickettsia sibirica*)、気管支敗血症菌(*Bordetella bronchiseptica*)、髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)、淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、エロモナス・オイクレノフィラ(*Aeromonas eucrenophila*)、エロモナス・サルモニシダ(*Aeromonas salmonicida*)、野兔病菌(*Francisella tularensis*)、ヒツジ偽結核菌(*Corynebacterium pseudotuberculosis*)、サイトロバクター・フレウンディイ(*Citrobacter freundii*)、肺炎クラミジア(*Chlamydia pneumoniae*)、ヘモフィルス・ソムナス(*Haemophilus somnus*)、ウシ流産菌(*Brucella abortus*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ(*Mycobacterium i*

40

50

ntracellulare)、在郷軍人病菌(*Legionella pneumophila*)、ロドコッカス・エクイ(*Rhodococcus equi*)、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、ヘリコバクター・ムステラエ(*Helicobacter mustelae*)、コレラ菌(*Vibrio cholerae*)、枯草菌(*Bacillus subtilis*)、ブタ丹毒菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、エルシニア・エンテロコリテイカ(*Yersinia enterocolitica*)、ロシャリメア・クインターナ(*Rochalimaea quintana*)およびアグロバクテリウム・ツメルファシウム(*Agrobacterium tumefaciens*)を含む。

#### 【0052】

サルモネラ、特に、ネズミチフス菌株、例えば Y S 1 6 4 6 (ATCC #202165) と命名された株または V N P 2 0 0 0 9 および ATCC #14028 として寄託された株または ATCC #14028 の同定された特徴全てを有する株がここに例示される。他の株は、例えば、R E 8 8、S L 7 2 0 7、 8 4 2 9、 8 4 3 1 および 8 4 6 8 を含む。ここに提供されるサルモネラ株の例は、免疫刺激性細菌株 A S T - 1 0 4、A S T - 1 0 5、A S T - 1 0 6、A S T - 1 0 8、A S T - 1 1 0、A S T - 1 1 2、A S T - 1 1 3、A S T - 1 1 5、A S T - 1 1 7、A S T - 1 1 8、A S T - 1 1 9、A S T - 1 2 0、A S T - 1 2 1、A S T - 1 2 2 および A S T - 1 2 3 である。これらの株を、I 型インターフェロンまたは他の免疫調節性タンパク質の発現をもたらすシグナル伝達経路におけるタンパク質の機能獲得型パリアントである免疫刺激性タンパク質をコードするようにさらに修飾し得る。免疫刺激性細菌はまたサイトカインなどの腫瘍微小環境における免疫応答を増加させる免疫刺激性タンパク質もコードし得る。免疫刺激性細菌はまた、ここに記載するのとおり、優先的に腫瘍微小環境における免疫細胞に感染するまたは腫瘍常在免疫細胞に感染するおよび/またはこのような免疫細胞における細胞死の誘導が少ないようにも修飾され得る。その配列および説明は、詳細な記載、実施例および配列表に提供される。免疫刺激性細菌は、細菌弱毒株由来であってよく、または a s d 欠失などのここに記載する修飾により弱毒化となり、それにより複製がインビボに限定される。

#### 【0053】

細菌遺伝子が修飾されかつここに言及される場合、免疫刺激性細菌が産生され得る細菌の例である、サルモネラ種におけるその命名(名称)を基準として記載することは理解される。当業者は、他の種が対応するタンパク質を有するが、その命名または名称はサルモネラにおける名称と異なり得ることを認識する。しかしながら、本明細書における一般的記載は、他の細菌種にも適用され得る。例えば、ここに示すとおり、サルモネラにおけるフラジェリン-(*f l i C* - / *f l j B* -) および/または *p a g P* の欠失または不活性化は、腫瘍のコロニー形成を増加させる。鞭毛の類似の遺伝子または感染の類似の機能を、腫瘍コロニー形成増加を達成するために、他の細菌種で修飾し得る。同様に、ここに記載するのとおり、*p a g P* および/または *m s b B* の産物などの細菌産物の不活性化/欠失は、補体活性化および/または他の炎症性応答を低減でき、それにより腫瘍、腫瘍常在免疫細胞および腫瘍微小環境へのターゲティングを増加できる。補体経路または他の炎症性経路の活性化に關与する他の種における対応する遺伝子を、ここでサルモネラにより例示されたとおり、欠失させ得る。

#### 【0054】

ここに提供される免疫刺激性細菌は、抗腫瘍免疫応答の低減に寄与する種々の遺伝子の阻害剤をコードするおよび/または免疫系を刺激し、それにより免疫刺激性である遺伝子および/または遺伝子産物および/または産物を発現する。

#### 【0055】

ここに提供される免疫刺激性細菌は、それらを免疫刺激性とする性質を有する。アデノシン栄養要求性はまた免疫刺激性である。それらはまた、プラスミドに、機能獲得型/構成的活性型 S T I N G 変異体および他の免疫刺激性タンパク質などの治療剤ペイロードをコードし得る。この組み合わせの効果は、アデノシンリッチ免疫抑制性腫瘍微小環境(TME)への優先的蓄積または動員を提供する、アデノシンに対する栄養要求性であるここに提供される株により増強される。このようなTMEにおけるアデノシン低減は、免疫刺激



性効果をさらに増強する。既知のまたは治療投与用に操作され得る細菌株の何れかの形質のこのような組み合わせは、類似の免疫刺激性効果を提供する。

【 0 0 5 6 】

ここに提供されるネズミチフス菌免疫刺激性細菌などの操作した免疫刺激性細菌は、腫瘍が持続性抗腫瘍免疫を打ち破るおよび回避するために利用する免疫チェックポイント経路を阻害しながら、腫瘍抗原特異的免疫応答を促進するための非炎症性腫瘍(cold tumor)の免疫再活性化を誘導する複数の相乗的モダリティを含む。本実施態様に含まれるのは、アデノシン栄養要求性および血管破壊増強である。アデノシン栄養要求性を介する腫瘍ターゲット改善および血管破壊増強は、他の免疫療法モダリティで観察される全身性サイトカイン暴露および自己免疫性毒性を限定するために炎症を局在化させながら、効力を

10

【 0 0 5 7 】

免疫刺激性タンパク質および機能獲得型免疫刺激性タンパク質などの異種タンパク質およびRNAは、RNAポリメラーゼII(RNAP II)およびRNAポリメラーゼIII(RNAP III)プロモーターなどの真核生物宿主細胞転写機構により認識されるプロモーター制御下に、プラスミドに発現される。RNAP IIIプロモーターは、一般に真核生物宿主で構成的に発現される；RNAP IIプロモーターは制御され得る。治療産物/免疫刺激性タンパク質は、細菌により安定に発現されるプラスミドに提供される。このような細菌の例はサルモネラ株、一般に、継代または他の方法またはアデノシン栄養要求性などのここに記載する修飾により弱毒化されている、弱毒株である。サルモネラ株の例は、欠損asd遺伝子を有する修飾ネズミチフス菌株である。これらの細菌は、導入されたプラスミドに機能的asd遺伝子の担持を含むように修飾され得る；これは、抗生物質ベースのプラスミド維持/選択系が必要でないように、プラスミドの選択を維持する。プラスミドに機能的asd遺伝子を含まないasd欠損株は、宿主で自己融解される。

20

【 0 0 5 8 】

プロモーターは、腫瘍微小環境(TME)で発現されるプロモーター、低酸素条件で発現されるプロモーターまたはpHが7未満である条件で発現されるプロモーターなど、腫瘍細胞の環境に対して選択され得る。

【 0 0 5 9 】

上に記載し、挙げた細菌の何れかにおけるプラスミドは治療産物をコードする。プラスミドは、多いまたは少ないコピーで存在し得る。これは、複製起点などの要素の選択により制御され得る。低および高および中コピー数プラスミドおよび複製起点は当業者に周知であり、選択され得る。ここでの免疫刺激性細菌の実施態様において、プラスミドは、約150または150以下のコピーなどの低乃至中コピー数から約25未満または約20または25コピーである低コピー数で存在し得る。複製起点の例は、pBR322、p15A、pSC101、pMB1、colE1、colE2、pPS10、R6K、R1、RK2およびpUC由来のものである。

30

【 0 0 6 0 】

プラスミドは、インターフェロン症で発現されるものなどの、I型インターフェロンを誘導するポリペプチドなどの治療ポリペプチドおよび/またはここに記載するおよび/または癌治療における使用が当業者に知られる何れかの治療タンパク質をコードする。プラスミドはまたシグナル配列を欠くりステリオリシンO(LO)タンパク質(cytoLO)、CpGモチーフ、DNA核ターゲット配列(DTS)およびレチノイン酸誘導性遺伝子-I(RIG-I)結合要素をコードする、核酸の配列を含み得る。核酸を含む免疫刺激性細菌は、ツール様受容体9(TLR9)により認識されるCpGモチーフを含み得る。CpGモチーフは、プラスミド上にコード化され得る。CpGモチーフは、プラスミド上にコード化される細菌遺伝子に包含され得るかまたはその一部であり得る。例えば、CpGを含む遺伝子は、プラスミド上にコード化されるasdであり得る。ここに提供される免疫刺激性細菌は、CpGモチーフ、プラスミド維持のためのasd遺伝子選択可能マーカ-およびDNA核ターゲット配列の1以上を含み得る。

40

50

## 【0061】

免疫刺激性細菌は、鞭毛をコードする遺伝子の欠失または破壊によるなど、フラジェリン欠損であり得る。例えば、フラジェリンサブユニット *fliC* および *fliB* の一方または両方をコードする遺伝子に欠失を含み、それにより細菌が鞭毛欠損であり、ここで、野生型細菌が鞭毛を発現する免疫刺激性細菌が提供される。免疫刺激性細菌はまたエンドヌクレアーゼ I (*endA*) をコードする遺伝子に欠失または修飾を有し得て、それにより *endA* 活性が阻害または排除される。

## 【0062】

ここに提供される免疫刺激性細菌は、DAP 添加培地での増殖を可能とするが、処置対象に投与したときインビボでの複製を制限するアスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (*asd*) であり得る。このような細菌は、処置のために有利であり得る自己限定的である。細菌は、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (*asd*) をコードする内因性遺伝子の全てまたは一部の破壊または欠失により *asd* であり得て、それにより内因性 *asd* は発現されない。他の実施態様において、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、インビボ発現のためにプラスミドに包含される。

10

## 【0063】

ここに提供される免疫刺激性細菌の何れも、一般に、プラスミド上に、CpG モチーフまたは CpG 島を含む核酸を含み得て、ここで、CpG モチーフは Toll 様受容体 9 (TLR9) により認識される。CpG モチーフまたは島をコードする核酸は原核生物に豊富であり、故に、CpG モチーフは、プラスミド上にコード化される細菌遺伝子に包含されるかまたはその一部であり得る。例えば、細菌遺伝子 *asd* は、免疫刺激性 CpG を含む。

20

## 【0064】

ここに提供される免疫刺激性細菌は、アデノシンまたはアデノシンとアデニンに対して栄養要求性であり得る。ここでの細菌の何れも、アデノシンに対して栄養要求性とし得て、これは、アデノシンが多く腫瘍で蓄積され、免疫抑制性であるため、抗腫瘍活性を有利に増加させ得る。

## 【0065】

ここに提供される免疫刺激性細菌は、野生型細菌が鞭毛を含むとき、フラジェリン欠損であり得る。鞭毛をコードする 1 以上の遺伝子の全てまたは一部の破壊または欠失により、フラジェリン欠損とし得る。例えば、フラジェリンサブユニット *FliC* および *FliB* の一方または両方をコードする遺伝子に欠失を有し、それにより細菌が鞭毛欠損である、免疫刺激性細菌が提供される。

30

## 【0066】

ここに提供される免疫刺激性細菌は、周辺質分泌シグナル配列を欠き、サイトゾルに蓄積するリステリオリシン O (LLO) タンパク質である *cytO* をコードする核酸を含み得る。この変異は、*asd* 細菌と有利に組み合わせられる。LLO は、細菌のファゴソーム回避に介在するリステリア・モノサイトゲネスからのコレステロール依存性孔形成溶血素である。自己融解株がヒトのような腫瘍担持宿主に導入されたとき、細菌は貪食免疫細胞により取り込まれ、空胞に入る。この環境で、DAP の欠失は細菌複製を防止し、空胞における細菌の自己融解をもたらし、融解がプラスミドを放出し、蓄積された LLO がコレステロール含有空胞膜に孔を形成し、プラスミドの宿主細胞のサイトゾルへの送達を可能とする。ここで、治療産物は宿主細胞機構を使用して発現され得て、抗腫瘍治療を行うために腫瘍微小環境に放出される。

40

## 【0067】

免疫刺激性細菌は、プラスミド上にコード化された DNA 核ターゲティング配列 (DTS)、例えば、SV40 DTS を含み得る。

## 【0068】

免疫刺激性細菌は、エンドヌクレアーゼ - 1 (*endA*) をコードする遺伝子に欠失または

50

修飾を有し得て、それにより *end A* 活性が阻害または排除される。これらの例は、CpGモチーフ、プラスミド維持のための *asd* 遺伝子選択可能マーカーおよびDNA核ターゲティング配列の1以上を含む免疫刺激性細菌である。

【0069】

免疫刺激性細菌は、プラスミド上に、免疫チェックポイントの発現を阻害、抑制または妨害する2以上の異なるRNA分子または免疫抑制性であるまたは免疫抑制性経路にある代謝物の阻害剤をコードするRNA分子をコードする核酸を含み得る。

【0070】

*shRNA* または *miRNA* または *siRNA* のようなRNAiをコードする核酸は、RNAコード化核酸の後、転写ターミネーターを含み得る。全実施態様において、免疫刺激性細菌でプラスミド上にコード化されたRNAiは、短鎖ヘアピン型RNA(*shRNA*) またはマイクロRNA(*miRNA*)であり得る。

10

【0071】

免疫刺激性細菌の何れかにおけるプラスミドはまたレチノイン酸誘導性遺伝子I(*RIG-I*)のアゴニストまたは*RIG-I*結合要素であるヌクレオチドの配列をコードし得る。

【0072】

免疫刺激性細菌は、*purI*<sup>-</sup>(*purM*<sup>-</sup>)、*msbB*<sup>-</sup>、*purD*<sup>-</sup>、フラジェリン- (*fliC*<sup>-</sup>/*fliJ*<sup>-</sup>)、*pagP*<sup>-</sup>、*adrA*<sup>-</sup>、*csgD*<sup>-</sup> および *hilA*<sup>-</sup> の1以上などの、遺伝子の1以上の欠失を含み得る。免疫刺激性細菌は、*msbB*<sup>-</sup> であり得る。例えば、免疫刺激性細菌は、*purI*欠失、*msbB*欠失、*asd*欠失および*adrA*欠失の1以上および所望により*csgD*欠失を含み得る。細菌遺伝子欠失/修飾の例は、次の何れかである。

20

*rfaL*、*rfaG*、*rfaH*、*rfaD*、*rfaP*、*rFb*、*rfa*、*msbB*、*ht r B*、*firA*、*pagL*、*pagP*、*lpxR*、*arnT*、*eptA* および *lpxT* の1以上から選択されるリポ多糖の生合成を改変する遺伝子における1以上の変異；および/または

自殺遺伝子を導入し、*sacB*、*nuk*、*hok*、*gef*、*kil* または *phlA* の1以上から選択される1以上の変異；および/または

細菌融解遺伝子を導入し、*hly* および *cly* の一方または両方から選択される1以上の変異；および/または

30

*IsyA*、*pag*、*prg*、*iscA*、*virG*、*plc* および *act* から選択される1以上の病原性因子における変異；および/または

*recA*、*ht r A*、*ht p R*、*hsp* および *groEL* から選択されるストレス応答を修飾する1以上の変異；および/または

細胞周期を妨害する *min* における変異；および/または

*cya*、*crp*、*phoP*/*phoQ* および *ompR* から選択される制御機能を妨害または不活性化する1以上の変異。

【0073】

免疫刺激性細菌は、サルモネラ、シゲラ、大腸菌、ビフィドバクテリア、リケッチア、ピブリオ、リステリア、クレブシエラ、ボルデテラ、ナイセリア、エロモナス、フランシセラ、コレラ、コリネバクテリウム、サイトロバクター、クラミジア、ヘモフィルス、ブルセラ、マイコバクテリウム、マイコプラズマ、レジオネラ、ロドコッカス、シュードモナス、ヘリコバクター、バシラスまたはエリジペロスリックスの株または前記細菌株の何れかの弱毒株もしくは修飾株であり得る。

40

【0074】

免疫刺激性細菌の例は、プラスミドがシグナル配列を欠くリステリオリシンO(*LLO*)タンパク質(*cyt o L L O*)、CpGモチーフ、DNA核ターゲティング配列(*DT S*)およびレチノイン酸誘導性遺伝子-I(*RIG-I*)結合要素をコードする核酸の配列の1以上を含むものである。

50

## 【0075】

プラスミドが2以上の治療産物を別々のプロモーターの制御下に含むとき、それぞれは、少なくとも約75ヌクレオチドまたは少なくとも75ヌクレオチドから約または少なくとも100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500ヌクレオチド(または塩基対)まで、約1600または1600ヌクレオチド(または塩基対)までまたは75~1500または1600ヌクレオチド(または塩基対)離される。

## 【0076】

他の免疫刺激性細菌の例は、アデノシンに対して栄養要求性であり、鞭毛をコードする遺伝子に1以上の欠失；*endA*に欠失；*CytO*をコードするプラスミド；核局在化配列；および*asd*プラスミド補完系を含み、ここに記載する何れかのような、非修飾形態では、I型インターフェロン(IFN)の発現をもたらすサイトゾルDNA/RNAセンサー経路の一部である免疫刺激性タンパク質の機能獲得型バリエーションを含む治療産物をコードするものである。

10

## 【0077】

このような免疫刺激性細菌は、ATCC寄託番号14028下に寄託されている株またはATCC寄託番号14028下に寄託された株の同定された特徴の全てを有する株などの野生型ネズミチフス菌株のような、サルモネラの株を含む。他の株は、例えば、AST-100、VNP20009または株YS1646(ATCC #202165)と命名された株、RE88、SL7207、8429、8431および8468から選択される弱毒化ネズミチフス菌株を含む。

20

## 【0078】

免疫刺激性細菌は、腫瘍細胞における蓄積を増加させるおよび/または細胞死を低減させる修飾に加えて、*purI*欠失、*msbB*欠失、*asd*欠失および*adrA*欠失の1以上を含み得て、ここに記載する免疫刺激性タンパク質をコードできる。免疫刺激性細菌はまた

*rfaL*、*rfaG*、*rfaH*、*rfaD*、*rfaP*、*rFb*、*rfa*、*msbB*、*ht rB*、*firA*、*pagL*、*pagP*、*lpxR*、*arnT*、*eptA*および*lpxT*の1以上から選択されるリポ多糖の生合成を改変する遺伝子における1以上の変異；および/または

30

自殺遺伝子を導入し、*sacB*、*nuk*、*hok*、*gef*、*kil*および*phlA*の1以上から選択される1以上の変異；および/または

細菌融解遺伝子を導入し、*hly*および*cly*の一方または両方から選択される1以上の変異；および/または

*isyA*、*pag*、*prg*、*iscA*、*virG*、*plc*および*act*から選択される1以上の病原性因子における変異；および/または

*recA*、*ht rA*、*ht pR*、*hsp*および*groEL*から選択されるストレス応答を修飾する1以上の変異；および/または

細胞周期を妨害する*min*における変異；および/または

40

*cy a*、*crp*、*phoP*/*phoQ*および*ompR*から選択される制御機能を妨害または不活性化する1以上の変異

も含み得る。

## 【0079】

株は、*msbB*<sup>-</sup>、*asd*<sup>-</sup>、*hilA*<sup>-</sup>および/またはフラジェリン-(*fliC*<sup>-</sup>/*fliJ*<sup>B</sup>-)および/または*pagP*<sup>-</sup>の1以上であり得る。非修飾形態では、I型インターフェロン(IFN)の発現をもたらすサイトゾルDNA/RNAセンサー経路の一部である免疫刺激性タンパク質の機能獲得型バリエーション、RNAiおよびケモカイン/サイトカインなどの免疫刺激性タンパク質などの治療産物は、ここに記載されるとおり、RNA P IIIプロモーターまたはRNA P IIプロモーターのような宿主により認識されるプ

50

ロモーターの制御下に発現される。免疫刺激性細菌は、サルモネラ、シゲラ、大腸菌、ピフイダクテリア、リケッチア、ピブリオ、リステリア、クレブシエラ、ボルデテラ、ナイセリア、エロモナス、フランシセラ、コレラ、コリネバクテリウム、サイトロバクター、クラミジア、ヘモフィルス、ブルセラ、マイコバクテリウム、マイコプラズマ、レジオネラ、ロドコッカス、シュードモナス、ヘリコバクター、バシラスまたはエリジペロスリックスの株または前記細菌株の何れかの弱毒株もしくは修飾株であり得る。一般に、株は、感染する細胞およびある細胞または全細胞で複製する能力を含み、弱毒株としてまたはその性質を変える修飾により、宿主において弱毒化されているものである。ネズミチフス菌のようなサルモネラ株が細菌の例である。株の例は、A S T - 1 0 0、V N P 2 0 0 0 9 または株 Y S 1 6 4 6 (ATCC #202165) と命名された株、R E 8 8、S L 7 2 0 7、8 4 2 9、8 4 3 1、8 4 6 8 および野生型株 ATCC #14028 由来のネズミチフス菌株を含む。

10

#### 【0080】

免疫刺激性細菌を含む組成物が提供される。このような組成物は、細菌および薬学的に許容される賦形剤または媒体を含む。免疫刺激性細菌は、ここにまたはここに包含する特許/出願に記載のまたは当業者に知られる何れをも含む。このような細菌は、I型インターフェロンの発現をもたらすシグナル伝達経路の一部である免疫刺激性タンパク質のバリエーションをコードするよう修飾される。S T I N G タンパク質などのタンパク質は、インターフェロン - またはインターフェロン - のようなI型インターフェロンの活性が増加するおよび/または構成的発現をもたらすように修飾される。細菌は、サイトカインなどの腫瘍微小環境または腫瘍において抗腫瘍活性を増加させる免疫刺激性タンパク質もコードし得る。細菌のゲノムは、免疫細胞の感染性が増加するおよび/または非免疫細胞の感染性が低減するおよび/または免疫細胞に細胞死を誘導する能力が低減するように修飾され得る。それ故に、細菌は、腫瘍または腫瘍微小環境または腫瘍常在免疫細胞における蓄積および/または抗腫瘍活性を促進する免疫刺激性タンパク質の送達のために、ここに記載するとおり修飾される。免疫刺激性細菌は、免疫チェックポイントを標的とするまたは他に細菌の抗腫瘍活性を増強する m i R N A または s h R N A などの R N A i または C R I S P R カセットをコードするプラスミドをさらに含み得る。

20

#### 【0081】

1 回量は、免疫刺激が処置をもたらす疾患または障害の処置に治療上有効である。このような刺激の例は、特異的免疫応答および非特異的免疫応答の一方または両方、特異的および非特異的免疫応答、先天性応答、一次免疫応答、適応免疫、二次免疫応答、記憶免疫応答、免疫細胞活性化、免疫細胞増殖、免疫細胞分化およびサイトカイン発現を含むが、これらに限定されない免疫応答である。

30

#### 【0082】

c G A S アゴニストである免疫刺激性細菌が提供される。このような細菌の例は、c G A S アゴニストおよびインターフェロン遺伝子刺激物質 (S T I N G) アゴニストの一方または両方である、ネズミチフス菌のようなサルモネラ種である。これらは、例えば、サイトゾル D N A が産生または蓄積される放射線療法および化学療法などの使用または方法において、投与され得る。S T I N G は、サイトゾルにおける核酸を感知する応答において自然免疫を活性化する。下流シグナル伝達は、サイトゾル二本鎖 D N A (d s D N A) への結合に応答する細菌または宿主酵素 c G A S により合成される、環状ジヌクレオチド (C D N) の結合を介して活性化される。細菌が産生する C D N と宿主が産生する C D N のリン酸架橋構造は異なり、これにより S T I N G を活性化する能力が異なる。C D N は、サイトゾル d s D N A の結合に応答して細菌または宿主酵素 c G A S により合成される。I F N - は、活性化 S T I N G のシグネチャーサイトカインである。

40

#### 【0083】

修飾非ヒト S T I N G タンパク質および S T I N G タンパク質キメラならびに細菌、リポソーム、エクソソーム、ミニ細胞、ナノ粒子、ベクター、例えば、腫瘍溶解性ウイルスを含む、ここに記載の何れかを含む、送達媒体、タンパク質および/または送達媒体を含む

50

医薬組成物、これら S T I N G タンパク質をコードするまたは含むおよび / または送達媒体を含む細胞およびその癌を処置するための使用および方法もまた提供される。修飾非ヒト S T I N G タンパク質および S T I N G タンパク質キメラならびに送達媒体、細胞、免疫刺激性細菌、使用、方法および医薬組成物は、次のものを含むが、これらに限定されない。

【 0 0 8 4 】

1. 修飾非ヒト S T I N G タンパク質であって、ここで、非ヒト S T I N G タンパク質はヒト S T I N G タンパク質より低い N F - B 活性化を有し、かつ、所望により、野生型 ( W T ) ヒト S T I N G タンパク質と比較して、高い I 型インターフェロン活性化 / シグナル伝達活性を有するものである。これらの非ヒト S T I N G タンパク質は、活性が増加するまたはサイトゾル核酸シグナル伝達非存在下で構成的に作用するように、1 以上の変異を含むよう修飾される。変異は、ヒト S T I N G について上記したような、一般にヒトにおいてインターフェロン症で生じるアミノ酸変異である。対応する変異は、非ヒト種 S T I N G タンパク質に導入され、ここで、対応するアミノ酸残基は、アライメントにより同定される (例えば、図 1 ~ 1 3 参照)。また、ある実施態様において、S T I N G タンパク質の C 末端テイル ( C T T ) における T R A F 6 結合部位は欠失し、N F - B シグナル伝達活性が低減される。

10

【 0 0 8 5 】

2. ヒトなどのある種からの S T I N G タンパク質における C T T ( C 末端テイル ) 領域が、ヒト S T I N G より低 N F - B シグナル伝達活性および / または高 I 型 I F N シグナル伝達活性を有する、他の、非ヒト種の S T I N G タンパク質からの C T T で置き換えられているキメラである、修飾 S T I N G タンパク質、特にヒト S T I N G タンパク質。また、T R A F 6 結合部位は、これらキメラにおいて所望により C T T から欠失される。

20

【 0 0 8 6 】

3. 1 の変異も含む、2 の修飾 S T I N G タンパク質。

【 0 0 8 7 】

4. 1 ~ 3 の何れかの修飾 S T I N G タンパク質をコードする、エクソソーム、ミニ細胞、リポソーム、ナノ粒子、腫瘍溶解性ウイルスおよび他のウイルスベクターを含む、ここに提供するまたは当業者に知られる何れかの免疫刺激性細菌などの送達媒体。

【 0 0 8 8 】

5. S T I N G タンパク質がヒト S T I N G と比較して N F - B シグナル伝達活性が低減しており、かつ所望により I 型インターフェロン刺激 / シグナル伝達活性が増加している非ヒト種からの非修飾 S T I N G をコードする、エクソソーム、ミニ細胞、リポソーム、ナノ粒子、腫瘍溶解性ウイルスおよび他のウイルスベクターを含む、ここに提供するまたは当業者に知られる何れかの免疫刺激性細菌などの送達媒体。

30

【 0 0 8 9 】

6. 細胞治療に使用する細胞、例えば T 細胞および幹細胞および 1 ~ 3 の何れかのタンパク質の産生に使用する細胞などの細胞 ( ヒトであるならば、非接合子 ) 。

【 0 0 9 0 】

7. 1 ~ 3 の S T I N G タンパク質または 4 および 5 の送達媒体または 6 の細胞を含む、医薬組成物。

40

【 0 0 9 1 】

8. 免疫刺激性細菌についてここに記載するとおり、1 ~ 7 の何れかの投与により、癌を処置するための使用および方法。

【 0 0 9 2 】

9. 非ヒト S T I N G タンパク質、特にヒト S T I N G と比較して低い N F - B 活性 ( シグナル伝達活性 ) および類似のまたは高い I 型インターフェロン刺激活性またはインターフェロン - 刺激活性を有する何れかをコードする免疫刺激性細菌もまた提供される。

【 0 0 9 3 】

S T I N G の N F - B 活性 ( シグナル伝達活性 ) および I 型インターフェロン刺激活性ま

50

たはインターフェロン - 刺激活性を評価するアッセイおよび方法がここに記載され、また当業者に知られる。方法は、例えば、de Oliveira Mann et al. (2019) Cell Reports 27:1165-1175に記載のものを含み、これは、とりわけ、ヒトを含む種々の種からのSTINGタンパク質のインターフェロン - およびNF - Bシグナル伝達活性、それによりヒトSTINGより低いNF - B活性を有するおよびまたヒトSTINGと同等または高いインターフェロン - 活性を有する種々の種からのSTINGタンパク質の同定を記載する。de Oliveira Mann et al. (2019)は種アライメントを記載し、CTTドメインを含む各種におけるSTINGのドメインを同定する(また、Supplemental Information for de Oliveira Mann et al. (2019)も参照)。

【0094】

非ヒトSTINGタンパク質は、次の種からのSTINGタンパク質であり得るが、これらに限定されない：タスマニアンデビル(*Sarcophilus harrisii*; 配列番号331)、マーモセット(*Callithrix jacchus*; 配列番号341)、ウシ(*Bos taurus*; 配列番号342)、ネコ(*Felis catus*; 配列番号338)、ダチョウ(*Struthio camelus australis*; 配列番号343)、トキ(*Nipponia nippon*; 配列番号344)、シーラカンス(*Latimeria chalumnae*; 配列番号345~346)、イノシシ(*Sus scrofa*; 配列番号347)、コウモリ(*Rousettus aegyptiacus*; 配列番号348)、マナティ(*Trichechus manatus latirostris*; 配列番号349)、ゾウギンザメ(*Callorhinchus milii*; 配列番号350)、マウス(*Mus musculus*; 配列番号351)およびゼブラフィッシュ(*Danio rerio*; 配列番号330)。これらの脊椎動物STINGタンパク質はヒト細胞で容易に免疫シグナル伝達を活性化し、STINGシグナル伝達の分子機構が脊椎動物で共有されていることを示す(de Oliveira Mann et al. (2019) Cell Reports 27:1165-1175参照)。

【0095】

免疫刺激性細菌の何れかおよび他の送達媒体を含む医薬組成物もまた提供される。癌の処置のためのその使用および癌を処置する方法も同様である。方法および使用は、ヒトなどの対象に免疫刺激性細菌または医薬組成物を投与することを含む、癌を有する対象の処置を含む。免疫刺激性細菌を投与することを含む、癌を有する対象を処置する方法が提供される。

【0096】

方法および使用は、第二の抗癌剤または処置が適用される、組み合わせ治療を含む。第二抗癌剤は、サイトゾルDNAをもたらす化学療法剤または放射線療法または抗PD - 1または抗PD - L1または抗CTLA - 4抗体などの免疫チェックポイント阻害剤またはCAR - T細胞または幹細胞、TIL細胞および癌治療のための修飾細胞などの他の治療細胞であり得る。

【0097】

投与は、非経腸などの何れかの適当な経路であってよく、送達を促進または増強し得るさらなる薬剤を含んでよい。投与は経口または直腸または肺へのエアロゾルまたは腫瘍内、静脈内、筋肉内または皮下であり得る。投与は、例えば、経口または直腸または肺へのエアロゾル、腫瘍内、静脈内、筋肉内または皮下を含む、非経腸のような全身または局所または外用を含む、何れかの適当な経路であり得る。

【0098】

癌は、リンパ腫、白血病、胃癌および乳房、心臓、肺、小腸、結腸、脾臓、腎臓、膀胱、頭頸部、結腸直腸、卵巣、前立腺、脳、膵臓、皮膚、骨、骨髄、血液、胸腺、子宮、精巣、子宮頸および肝臓の癌などの、しかし、これらに限定されない固形腫瘍および血液系腫瘍を含む。

【0099】

免疫刺激性細菌は、懸濁液など、投与用組成物に製剤化され得る。乾燥させ、粉末として保管し得る。免疫刺激性細菌と他の抗癌剤の組み合わせもまた提供される。

【0100】

10

20

30

40

50

癌および悪性腫瘍の処置のための組み合わせ治療が提供される。免疫刺激性細菌は、放射線療法、化学療法、特にサイトゾルDNAをもたらず遺伝毒性化学療法および抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体および抗CTLA-4抗体を含むチェックポイント阻害剤抗体および他のこのような免疫療法などの免疫療法を含む他の癌治療の前に、後に、間欠的にまたは同時に投与し得る。

【0101】

免疫刺激性細菌を含むまたはここに記載する機能獲得型バリエーションタンパク質および他の治療生をコードする核酸を含むエクソソーム、リポソームおよび他のこのような媒体などの他の送達媒体の何れかを含む単離細胞もまた提供される。細胞は、免疫細胞、幹細胞、腫瘍細胞、初代細胞株および細胞治療に使用される他の細胞を含むが、これらに限定されない。細胞の例は、例えば、T細胞および造血幹細胞のような造血細胞を含む。造血細胞は、マクロファージのようなキメラ抗原骨髄細胞であり得る。送達媒体および免疫刺激性細菌を、エクスピボで細胞に導入し得る。それ故に、例えば、免疫刺激性細菌を含む単離細胞が提供され、ここで、免疫刺激性細菌は、腫瘍常在免疫細胞に優先的に感染するように修飾されおよび/または免疫刺激性細菌のゲノムを腫瘍常在免疫細胞の細胞死誘導が少ないように修飾され；そして細胞は免疫細胞、幹細胞、初代細胞株からの細胞または腫瘍細胞である。細胞は、癌の処置のためなど、細胞治療の方法において使用される。細胞は、処置対象に対して同種でも自己でもよい。

10

【0102】

免疫刺激性細菌による腫瘍/腫瘍微小環境コロニー形成を増加する方法もまた提供される。方法は、例えば、細菌のゲノムを細菌フラジェリン-(fliC-/fliB-)および/またはpagP-とするよう修飾することを含む。

20

【0103】

用いられる用語および表現は、記述のために使用し、限定するものではなく、示し、かつ記載する性質の何らかの同等物またはその一部を除外する意図でこのような用語および表現を使用しておらず、むしろ、種々の修飾が意図されることが認識される。

【図面の簡単な説明】

【0104】

【図1】野生型ヒトおよびタスマニアデビルSTINGタンパク質のアライメントを記載する。

30

【0105】

【図2】野生型ヒトおよびマーモセットSTINGタンパク質のアライメントを記載する。

【0106】

【図3】野生型ヒトおよびウシSTINGタンパク質のアライメントを記載する。

【0107】

【図4】野生型ヒトおよびネコSTINGタンパク質のアライメントを記載する。

【0108】

【図5】野生型ヒトおよびダチョウSTINGタンパク質のアライメントを記載する。

【0109】

【図6】野生型ヒトおよびトキSTINGタンパク質のアライメントを記載する。

40

【0110】

【図7】野生型ヒトおよびシーラカンス(配列番号345)STINGタンパク質のアライメントを記載する。

【0111】

【図8】野生型ヒトおよびゼブラフィッシュSTINGタンパク質のアライメントを記載する。

【0112】

【図9】野生型ヒトおよびイノシシSTINGタンパク質のアライメントを記載する。

【0113】

50



【図10】野生型ヒトおよびコウモリSTINGタンパク質のアライメントを記載する。

【0114】

【図11】野生型ヒトおよびマナティSTINGタンパク質のアライメントを記載する。

【0115】

【図12】野生型ヒトおよびゾウギンザメSTINGタンパク質のアライメントを記載する。

【0116】

【図13】野生型ヒトおよびマウスSTINGタンパク質のアライメントを記載する。

【発明を実施するための形態】

【0117】

10

詳細な記載

概要

A. 定義

B. 免疫刺激性細菌の概要

C. 癌免疫療法

1. 免疫療法

2. 養子免疫療法

3. 癌ワクチンおよび腫瘍溶解性ウイルス

D. 細菌癌免疫療法

1. 細菌治療

2. 細菌およびウイルスに対する免疫応答の比較

3. サルモネラ治療

a. 腫瘍指向性細菌

b. ネズミチフス菌(*Salmonella enterica* serovar typhimurium)

c. 細菌弱毒化

i. msbB - 変異体

ii. purI - 変異体

iii. 弱毒化変異の組み合わせ

iv. VN P 2 0 0 0 9 および他の弱毒化ネズミチフス菌株

v. 巨大分子を送達するよう操作したネズミチフス菌

4. 腫瘍常在免疫細胞における治療指数および発現増加のための免疫刺激性細菌の増強

a. asd 遺伝子欠失

b. アデノシン栄養要求性

c. フラジェリン欠損株

d. LPS 合成経路における遺伝子の欠失

e. バイオフィーム形成に必要な遺伝子の欠失

f. サルモネラ含有液胞(SCV)を回避するよう操作したサルモネラ

g. 鞭毛の欠失を含む、細菌が上皮細胞に感染する能力を排除するためのSPI - 1 およびSPI - 2 遺伝子および / または他の遺伝子の欠失

i. サルモネラ病原性島1(SPI - 1)

SPI - 1 依存性宿主細胞侵襲

SPI - 1 非依存的宿主細胞侵襲

ii. サルモネラ病原性島2(SPI - 2)

h. プラスミド送達を増加するためのエンドヌクレアーゼ - 1(endA)変異

i. RIG - I 結合配列

j. DNase II 阻害

k. RNase H2 阻害

l. スタピリン - 1 / CLEVER - 1 阻害

m. CpGモチーフおよびCpG島

5. 免疫細胞によるサルモネラなどのグラム陰性細菌の取り込みを増加させかつ免疫細胞

50

## 死を低減する修飾

- a. 免疫細胞による細菌取り込み
  - b. マクロファージパイロトーシス
    - i. フラジェリン
    - ii. S P I - 1 タンパク質
- 棒状タンパク質(P r g J)  
針状タンパク質(P r g I)

## iii. Q s e C

## 6. 細菌培養条件

## 7. 腫瘍コロニー形成増加

E. 非ヒト S T I N G タンパク質および腫瘍微小環境において免疫応答を刺激するためのタンパク質における機能獲得型変異

- 1. I 型インターフェロンおよび経路
- 2. I 型インターフェロン症および機能獲得型変異体
- 3. S T I N G 介在免疫活性化
- 4. T M E M 1 7 3 アレル
- 5. 構成的 S T I N G 発現および機能獲得型変異
- 6. 非ヒト S T I N G タンパク質および活性が増加したまたは構成的であるそのバリエーションおよび S T I N G キメラおよび活性が増加したまたは構成的であるそのバリエーション
- 7. サイトゾル D N A / R N A センサーとして作用する他の遺伝子産物および構成的バリエーション

## a. レチノイン酸誘導性遺伝子 I ( R I G - I ) 様受容体 ( R L R )

## b. M D A 5 / I F I H 1

## c. R I G - I

## d. I R F - 3 および I R F - 7

## 8. 他の I 型 I F N 制御タンパク質

## 9. 他の治療産物

F. タンパク質をコードする免疫刺激性細菌および例示的プラスミドおよび送達媒体の構築

- 1. 複製起点およびプラスミドコピー数
- 2. プラスミド維持/選択成分
- 3. R N A ポリメラーゼプロモーター
- 4. D N A 核ターゲティング配列
- 5. C R I S P R

G. 非ヒト S T I N G タンパク質および I 型インターフェロンおよび他の治療産物を構成的に誘導する機能獲得型修飾タンパク質をコードする他の送達媒体

- 1. エクソソーム、細胞外小胞および他の小胞送達媒体
- 2. 腫瘍溶解性ウイルス
  - a. アデノウイルス
  - b. 単純ヘルペスウイルス
  - c. ポックスウイルス
  - d. 麻疹ウイルス
  - e. レオウイルス
  - f. 水疱性口内炎ウイルス ( V S V )
  - g. ニューカッスル病ウイルス
  - h. パルボウイルス
  - i. コクサッキーウイルス
  - j. セネカバレーウイルス

## H. 医薬品、組成物および製剤

## 1. 製造

10

20

30

40

50

- a. 細胞バンク製造
- b. 原薬製造
- c. 製剤製造
- 2. 組成物
- 3. 製剤
  - a. 液体、注射、エマルジョン
  - b. 乾燥させた熱安定性製剤
- 4. 他の投与経路用組成物
- 5. 用法・用量
- 6. 包装および製品
- I. 処置方法および使用
  - 1. 腫瘍
  - 2. 投与
  - 3. モニタリング
- J. 実施例

10

## 【0118】

## A. 定義

他に定義されない限り、ここで使用する全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する分野の当業者により共通して理解されるのと同じ意味を有する。本明細書の開示全体を通して引用される全ての特許、特許出願、公開出願および刊行物、GenBank配列、データベース、ウェブサイトおよび他の刊行物は、断らない限り、それら全体として引用により本明細書に包含させる。ここで用語に複数の定義があるならば、本セクションのものが優先する。URLまたは他のこのような識別子またはアドレスが参照されるとき、このような識別子は変わることがあり、インターネット上の特定の情報は現れては消えることがあるが、インターネットの検索により、同等な情報が見つかり得ることは理解される。それらの言及は、このような情報が入手可能であり、公に頒布されていることを証明する。

20

## 【0119】

ここで使用する治療細菌は、ヒトなどの対象に投与したとき、癌または抗腫瘍治療などの治療をもたらす細菌である。

30

## 【0120】

ここで使用する免疫刺激性細菌は、対象に導入されたとき、腫瘍のような免疫特権組織(immunoprivileged tissue)および細胞に蓄積するおよび複製するおよび/または免疫刺激性であるまたは免疫刺激をもたらす産物を発現する、治療細菌である。例えば、免疫刺激性細菌は、主に免疫特定環境以外、免疫刺激性細菌は産物を複製および/または発現できない(または複製/産物発現が低減)ように、毒性または病原性低減および/または毒性または病原性を低減するコード化産物により宿主において弱毒化される。ここに提供される免疫刺激性細菌は、免疫刺激性とする、1以上の産物をコードするまたは形質もしくは性質を示すよう、修飾される。このような産物、性質および形質は、例えば、サイトカインまたは共刺激分子などの免疫刺激性タンパク質; DNA/RNAセンサーまたはその機能獲得型バリエーション(例えば、STING、MDA5、RIG-I); TREX1および/またはPD-L1などのチェックポイント遺伝子を標的とし、妨害し、または阻害するsiRNA(shRNAおよびマイクロRNA)などのRNAi、CRISPR; または抗免疫チェックポイント抗体などの免疫チェックポイントの阻害剤の少なくとも一つを含むが、これらに限定されない。免疫刺激性細菌はまた、細菌をアデノシンなどの免疫抑制性であるまたは免疫抑制性経路にある代謝物に対して栄養要求性とする修飾も含み得る。

40

## 【0121】

ここで使用する菌株表示VNP20009(例えば、国際PCT出願公開WO99/13053参照、米国特許6,863,894もまた参照)およびYS1646および41.2.9は相互交換可能に使用され、各々American Type Culture Collection(ATCC)に

50

寄託され、寄託番号 A T C C 2 0 2 1 6 5 を付与された株をいう。V N P 2 0 0 0 9 は、m s b B および p u r I に欠失を有し、野生型株 A T C C 1 4 0 2 8 から産生されたネズミチフス菌の修飾弱毒株をいう。

【 0 1 2 2 】

ここで使用する菌株表示 Y S 1 4 5 6 および 8 . 7 は相互交換可能に使用され、各々 A T C C に寄託され、寄託番号 A T C C 2 0 2 1 6 4 を付与された株をいう(米国特許 6 , 8 6 3 , 8 9 4 参照)。

【 0 1 2 3 】

ここで使用するインターフェロン症は、インターフェロンの発現を制御または誘導する経路に關与する遺伝子産物の変異によるインターフェロンの上方制御と關連する障害をいう。産物の活性は、通常サイトゾル D N A または R N A またはヌクレオチドなどのメディエーターにより制御される；変異したとき、活性は構成的である。I 型インターフェロン症は、アイカルディ・グティエール症候群 ( A G S ) の重症形態および軽度家族性チルブランループス ( F C L ) を含む、一連の状態を含む。これらの性質を有する変異産物をコードする核酸分子を、正常な活性を有するアレルの産物と比較して、産物に機能獲得をもたらすまたはここに記載する疾患關連機能獲得型変異体と比較して、さらに機能獲得型を有する変異の選択によるなど、インビトロで産生し得る。

10

【 0 1 2 4 】

ここで使用する機能獲得型変異は、変異がない同じタンパク質と比較して、タンパク質の活性が増加したものである。例えば、タンパク質が受容体であるならば、リガンドへの親和性が増加している；酵素であるならば、構成的活性を含む活性の増加がある。

20

【 0 1 2 5 】

ここで使用する複製起点は、染色体、プラスミドまたはウイルスで複製が開始される、D N A の配列である。細菌プラスミドおよび小ウイルスを含む小 D N A については、単一の起点で十分である。

【 0 1 2 6 】

複製起点は、選択した複製起点に依存して、ベクターコピー数を決定する。例えば、発現ベクターが低コピー数プラスミド p B R 3 2 2 由来であるならば、約 2 5 ~ 5 0 コピー / 細胞であり、高コピー数プラスミド p U C 由来であるならば、1 5 0 ~ 2 0 0 コピー / 細胞であり得る。

30

【 0 1 2 7 】

ここで使用する細胞におけるプラスミドの中コピー数は、約 1 5 0 もしくは 1 5 0 または 1 5 0 未満であり、低コピー数は 1 5 ~ 3 0 、例えば 2 0 または 2 0 未満である。低乃至中コピー数は、1 5 0 未満である。高コピー数は、1 5 0 コピー / 細胞を超える。

【 0 1 2 8 】

ここで使用する 2 A ペプチドは、真核生物細胞における翻訳中のポリペプチドの開裂に介在する、1 8 ~ 2 2 アミノ酸 ( a a ) 長ウイルスオリゴペプチドである。名称「 2 A 」は、ウイルスゲノムの特異的領域をいい、異なるウイルス 2 A は、一般にそれが由来するウイルスに由来して名付けられている。これらの例は、F 2 A (口蹄疫ウイルス 2 A )、E 2 A (馬鼻炎 A ウイルス)、P 2 A (豚テシオウイルス - 1 2 A ) および T 2 A (Thosea asig na ウイルス 2 A ) である(例えば、コード化配列について Liu et al. (2017) Scientific Reports 7:2193、図 1 参照；また、配列番号 3 6 7 ~ 3 7 0 も参照)。

40

【 0 1 2 9 】

ここで使用する C p G モチーフは、中央 C p G (「 p 」は、連続する C と G 間のヌクレオチドホスホジエステル結合をいう)に隣接する(3 ' および 5 ' 側)少なくとも一つの塩基に囲まれた、非メチル化中央 C p G を含む、塩基のパターンをいう。C p G オリゴデオキシヌクレオチドは、少なくとも約 1 0 ヌクレオチド長であり、非メチル化 C p G を含むオリゴデオキシヌクレオチドである。少なくとも 5 ' C G 3 ' の C は非メチル化である。

【 0 1 3 0 】

ここで使用する R I G - I 結合配列は、5 ' 三リン酸 (5 ' p p p ) 構造を直接的に、または 50

R I G - I との相互作用により R I G - I 経路を介して I 型 I F N を活性化できるポリ ( d A - d T ) 配列から R N A p o l I I I により合成されたものをいう。R N A は、少なくとも 4 個の A リボヌクレオチド ( A - A - A - A ) を含む ; これは、4、5、6、7、8、9、10 またはそれ以上含み得る。R I G - I 結合配列は、ポリ A の転写のために、細菌におけるプラスミドに導入される。

【 0 1 3 1 】

ここで使用する「サイトカイン」は広範であり、大まかに細胞シグナル伝達に重要である小タンパク質 ( 約 5 ~ 2 0 k D a ) のカテゴリーである。サイトカインは、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカインおよび腫瘍壊死因子を含む。サイトカインは、免疫応答における細胞間コミュニケーションを助け、炎症、感染および外傷の部位に向けた細胞の移動を刺激する細胞シグナル伝達分子である。 10

【 0 1 3 2 】

ここで使用する「ケモカイン」は、ケモカイン受容体に結合する化学誘引物質 ( 走化性 ) サイトカインをいい、天然源から単離されたおよび組み換え手段または化学合成により合成されたタンパク質を含む。ケモカインの例は、I L - 8、I L - 1 0、G C P - 2、G R O - 、G R O - 、G R O - 、E N A - 7 8、P B P、C T A P I I I、N A P - 2、L A P F - 4、M I G ( C X C L 9 )、C X C L 1 0、C X C L 1 1、P F 4、I P - 1 0、S D F - 1、S D F - 1、S D F - 2、M C P - 1、M C P - 2、M C P - 3、M C P - 4、M C P - 5、M I P - 1 ( C C L 3 )、M I P - 1 ( C C L 4 )、M I P - 1、M I P - 2、M I P - 2、M I P - 3、M I P - 3、M I P - 4、M I P - 5、M D C、H C C - 1、A L P、ラングカイン、T i m - 1、エオタキシン - 1、エオタキシン - 2、I - 3 0 9、S C Y A 1 7、T R A C、R A N T E S ( C C L 5 )、D C - C K - 1、リンホタクチンおよびフラクタルカインおよび当業者に知られるその他を含むが、これらに限定されない。ケモカインは、免疫細胞の炎症部位への遊走ならびに免疫細胞の成熟および適応免疫応答の産生に關与する。 20

【 0 1 3 3 】

ここで使用する「免疫刺激性タンパク質」は、腫瘍微小環境で抗腫瘍免疫応答を示すまたは促進するタンパク質をいう。このようなタンパク質の例は、G M - C S F、I L - 2、I L - 7、I L - 1 2、I L - 1 5、I L - 1 8、I L - 2 1、I L - 2 3、I L - 3 6 ガンマ、I F N、I F N、I L - 1 2 p 7 0 ( I L - 1 2 p 4 0 + I L - 1 2 p 3 5 )、I L - 1 5 / I L - 1 5 R アルファ鎖複合体、C X C L 9、C X C L 1 0、C X C L 1 1、C C L 3、C C L 4、C C L 5、T 細胞の潜在的動員 / 残留性に關与する分子、C D 4 0、C D 4 0 リガンド ( C D 4 0 L )、O X 4 0、O X 4 0 リガンド ( O X 4 0 L )、4 - 1 B B、4 - 1 B B リガンド ( 4 - 1 B B L )、B 7 - C D 2 8 ファミリーメンバーおよび T N F R スーパーファミリーメンバーを含むが、これらに限定されない、サイトカイン、ケモカインおよび共刺激分子を含む。 30

【 0 1 3 4 】

ここで使用するサイトゾル D N A / R N A センサー経路は、I 型インターフェロン産生をもたらす、D N A、R N A、ヌクレオチド、ジヌクレオチド、環状ヌクレオチドおよび / または環状ジヌクレオチドまたは他の核酸分子の存在により開始されるものである。サイトゾルにおける核酸分子は、ウイルスまたは細菌または放射線または他のこのような暴露から生じ、宿主における免疫応答の活性化をもたらす。 40

【 0 1 3 5 】

ここで使用する I 型インターフェロン誘導など自然免疫応答を誘導する免疫刺激性タンパク質は、I 型インターフェロンなどの免疫応答メディエーターの発現をもたらすサイトゾル D N A / R N A センサー経路の一部であるタンパク質である。例えば、ここに記載しかつ当業者に知られるとおり、サイトゾル D N A は c G A S により感知され、c G A M P 産生およびその後の S T I N G ( インターフェロン遺伝子刺激物質 ) / T B K 1 ( T A N K 結合キナーゼ 1 ) / I R F 3 ( インターフェロン制御因子 ) シグナル伝達および I 型 I F N 産生をもたらす。細菌環状ジヌクレオチド ( 細菌環状ジ - A M P などの C D N ) は、S T I N 50

Gも活性化する。それ故に、STINGは、I型インターフェロンを誘導する免疫刺激性タンパク質である。5'-三リン酸RNAおよび二本鎖RNAはRIG-IおよびMDA-5単独またはMDA-5/LGP2により感知される。これは、ミトコンドリアMAVS(ミトコンドリア抗ウイルス-シグナル伝達タンパク質)の重合に至り、TBK1およびIRF3も活性化する。このような経路におけるタンパク質は、I型インターフェロンなどの自然免疫応答メディエーターの発現をもたらす免疫刺激性タンパク質である。DNA/RNAセンサー経路における免疫刺激性タンパク質は、活性が増加するかまたは構成的に、サイトゾル核酸の非存在下で、作用して、I型インターフェロンの発現などの免疫応答をもたらすよう修飾され得る。

#### 【0136】

ここで使用する自然免疫タンパク質STINGの「カルボキシ末端テイル」または「C末端テイル」(CTT)は、STINGタンパク質のC末端部分をいい、これは、野生型STINGタンパク質において、可撓性リンカー領域によりcGAMP結合ドメインに係留されている。CTTは、IRF3結合部位、TBK1結合部位およびTRAF6結合部位を含む。STINGは、TANK結合キナーゼ1(TBK1)によるSTINGタンパク質C末端テイル(CTT)のリン酸化を経て、インターフェロンベータ(IFN- $\beta$ )産生の誘導を促進する。STINGとTBK1の相互作用は、STINGのカルボキシ末端テイル(CTT)の進化的に保存された8アミノ酸残基のストレッチが介在する。TRAF6は、STINGのK63結合ユビキチン鎖の形成を触媒し、転写因子NF- $\kappa$ Bの活性化および代替的STING依存性遺伝子発現プログラムの誘導をもたらす。CTTにおけるTRAF6結合部位の欠失は、NF- $\kappa$ Bシグナル伝達の活性化を低減し得る。ヒトCTT(またはその一部)の低NF- $\kappa$ B活性化である種のSTINGからのCTT(またはその対応する部分)での置換は、ヒトSTINGによるNF- $\kappa$ B活性化を低減し得る。STING-CTTは、STINGリン酸化およびIRF3の動員に必要な配列モチーフを含む、約40アミノ酸の非構造化ストレッチである(de Oliveira Mann et al. (2019) Cell Reports 27:1165-1175参照)。ヒトSTING残基366は、インターフェロンシグナル伝達を活性化する自然免疫アダプタータンパク質で共有されるLxISモチーフの一部である、一次TBK1リン酸化部位として同定されている(de Oliveira Mann et al. (2019) Cell Reports 27:1165-1175参照)。ヒトSTING-CTTは、TBK1結合に必要な残基L374を含む第二PxPLRモチーフを含む; LxISおよびPxPLR配列は、脊椎動物STINGアレルで保存されている(de Oliveira Mann et al. (2019) Cell Reports 27:1165-1175参照)。STING-CTT配列およびIRF3、TBK1およびTRAF6結合部位の例を、下表に示す。

10

20

30

40

50

【表 1】

| 種              | C末端テイル(CTT)配列  | 配列番号 | IRF3結合部位 | TBK1結合部位 | TRAF6結合部位 |
|----------------|--|------|----------|----------|-----------|
| ヒト             | EKEEVTVGSLKTS AVPSTS<br>TMSQEPELLISGMEKPLPL<br>RTDFS                               | 352  | PELLIS   | PLPLRT   | DFS       |
| タスマニアデビル       | RQEEFAIGPKRAMTVTTSS<br>TLSQEPQLLISGMEQPLSL<br>RTDGF                                | 353  | PQLLIS   | PLSLRT   | DGF       |
| マモセット          | EEEEVTVGSLKTSEVPSTS<br>TMSQEPELLISGMEKPLPL<br>RSDLF                                | 354  | PELLIS   | PLPLRS   | DLF       |
| ウシ             | EREVTMGSTETSVMPGSSV<br>LSQEPELLISGLEKPLPLRS<br>DVF                                 | 355  | PELLIS   | PLPLRS   | DVF       |
| ネコ             | EREVTGSGVGTSMVRNPS<br>VLSQEPNLLISGMEQPLPL<br>RTDVF                                 | 356  | PNLLIS   | PLPLRT   | DVF       |
| ダチョウ           | RQEEYTVCDGTLCSTDLS<br>LQISESDLPPQLRSDCL  | 357  | LSLQIS   | PQPLRS   | DCL       |
| イノシシ           | EREVTMGSAETS VVPTSST<br>LSQEPELLISGMEQPLPLRS<br>DIF                                | 358  | PELLIS   | PLPLRS   | DIF       |
| コウモリ           | EKEEVTVGTVGTYEAPGS<br>STLHQEPELLISGMDQPLP<br>LRTDIF                                | 359  | PELLIS   | PLPLRT   | DIF       |
| マナティ           | EREVTGSGVGTSVVPSPS<br>SPSTSSLSQEPKLLISGMEQ<br>PLPLRTDVF                            | 360  | PKLLIS   | PLPLRT   | DVF       |
| トキ             | CHEEYTVYEGNQPHNPST<br>TLHSTELNLQISESDLPPQ<br>LRSDCF                                | 361  | LNLQIS   | PQPLRS   | DCF       |
| シーラカンス(ハリアント1) | QKEEYFMSEQTQPNSST<br>CLSTEPQLMISDTDAPHTL<br>KRQVC                                  | 362  | PQLMIS   | PHTLKR   | QVC       |
| シーラカンス(ハリアント2) | QKEEYFMSEQTQPNSST<br>CLSTEPQLMISDTDAPHTL<br>KSGF                                   | 363  | PQLMIS   | PHTLKS   | GF        |
| ゼブラフィッシュ       | DGEIFMDPTNEVHPVPEE<br>GPVGNCGALQATFHEEP<br>MSDEPTLMFSRQPQLRSEP<br>VETTDYFNPSSAMKQN | 364  | PTLMFS   | PQSLRS   | EPVETTDY  |
| ゾウキンザメ         | LTEYPVAEPSNANETDCM<br>SSEPHLMISDDPKPLRSYCP   | 365  | PHLMIS   | PKPLRS   | YCP       |
| マウス            | EKEEVTMNAPMTSVAPPPS<br>VLSQEPRLISGMDQPLPL<br>RTDLI                                 | 366  | PRLIS    | PLPLRT   | DLI       |

10

20

30

40

## 【0137】

ここで使用する「腫瘍常在免疫細胞に少ない細胞死を誘導する」ように修飾される細菌は、修飾がない細菌より低毒性であるまたは修飾がない細菌と比較して病原性が低減したものをいう。このような修飾の例は、パイロトシスを排除するものおよび細菌のLPSプロファイルを変更するものを含む。これらの修飾は、フラジェリン遺伝子、hilA、棒状タンパク質、針状タンパク質、QsCおよびpagPなどのSPI-1経路の1以上の成分の破壊または欠失を含む。

## 【0138】

ここで使用する「腫瘍常在免疫細胞に優先的に感染するよう修飾された」細菌は、免疫細

50

胞以外の細胞に感染する能力を低減する修飾をゲノムに有する。このような修飾の例は、3型分泌系または4型分泌系または細菌が非免疫細胞に侵襲する能力に影響する他の遺伝子もしくはシステムを破壊する修飾である。例えば、サルモネラによる、上皮細胞などの細胞の感染に必要なが、食細胞などの免疫細胞の感染に影響しないSPI-1成分の破壊/欠失がある。

【0139】

ここで使用する「修飾」は、ポリペプチドのアミノ酸配列または核酸分子のヌクレオチド配列の修飾に関連し、それぞれ、アミノ酸またはヌクレオチドの欠失、挿入および置換を含む。ポリペプチドを修飾する方法は、組み換えDNA方法の使用によるなど、当業者には日常的である。

10

【0140】

ここで使用する細菌ゲノムまたはプラスミドもしくは遺伝子の修飾は、核酸の欠失、置換および挿入を含む。

【0141】

ここで使用するRNA干渉(RNAi)は、RNA分子が、標的化mRNA分子を標的化遺伝子の翻訳およびそれにより発現を阻害するよう中和することにより、遺伝子発現または翻訳を阻害する生物学的過程である。

【0142】

ここで使用するRNAiを介して働くRNA分子は、標的化遺伝子発現のサイレンシングにより、阻害性と称する。発現サイレンシングは、標的化遺伝子の発現が低減または抑制または阻害されることを意味する。

20

【0143】

ここで使用するRNAiを経る遺伝子サイレンシングは、標的化遺伝子の発現を阻害、抑制、破壊またはサイレンスさせると言える。標的化遺伝子は、阻害性RNAの配列に対応し、それにより阻害性RNAがmRNAの発現をサイレンスさせる、ヌクレオチドの配列を含む。小干渉RNA(siRNA)は、通常約21ヌクレオチド長の、二本鎖(ds)RNAの小片であり、特異的配列でメッセンジャーRNA(mRNA)に結合し、分解を促進することにより、タンパク質の翻訳に「干渉」するのに使用される3'オーバーハング(2ヌクレオチド)を各末端に有する。その際に、siRNAは、対応するmRNAのヌクレオチド配列に基づき、特異的タンパク質の産生を阻止する。過程はRNA干渉(RNAi)と呼ばれ、またsiRNAサイレンシングまたはsiRNAノックダウンとも称される。短ヘアピンRNAまたは小ヘアピンRNA(shRNA)は、RNA干渉(RNAi)を経る標的遺伝子発現のサイレンスに使用できる、密接なヘアピントーンを有する人工RNA分子である。細胞におけるshRNAの発現は、一般にプラスミドの送達またはウイルスもしくは細菌ベクターを介して達成される。

30

【0144】

ここで使用する標的化遺伝子の阻害、抑制、破壊またはサイレンシングは、標的化遺伝子の翻訳などの発現を改変し、それにより標的化遺伝子によりコードされる産物の活性または発現が低減する、過程をいう。低減は、完全なノックアウトまたは部分的ノックアウトを含み、それにより、ここに提供される免疫刺激性細菌およびここでの投与に関連して、処置が実施される。

40

【0145】

ここで使用する腫瘍微小環境(TME)は、周囲の血管、免疫細胞、線維芽細胞、骨髄由来炎症性細胞、リンパ球、シグナル伝達分子および細胞外マトリクス(ECM)を含み、腫瘍が存在する細胞環境である。存在する状態は、血管新生増加、低酸素状態、低pH、乳酸濃度増加、ビルビン酸濃度増加、間質液圧増加および、腫瘍の兆候である、高アデノシンレベルなどの代謝物もしくは代謝改変を含むが、これらに限定されない。

【0146】

ここで使用するヒトI型インターフェロン(IFN)は、免疫系の活性を制御するインターフェロンタンパク質のサブグループである。全てのI型IFNは、IFN-受容体など

50



の特異的細胞表面受容体複合体に結合する。I型インターフェロンは、とりわけ、IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  を含む。IFN- $\gamma$  タンパク質は線維芽細胞により産生され、主に自然免疫応答に含まれる抗ウイルス活性を有する。2タイプのIFN- $\beta$  は、IFN- $\beta 1$  (IFNB1) および IFN- $\beta 3$  (IFNB3) である。

【0147】

ここで使用する核酸またはコード化RNAが遺伝子を標的とするとの記載は、それが、何らかの機構により遺伝子の発現を阻害または抑制またはサイレンスすることを意味する。一般に、このような核酸は、標的化遺伝子は少なくとも相補的である部分を含み、ここで、部分は、相補的部分とハイブリッドを形成するのに十分である。

【0148】

ここで使用する「欠失」は、核酸またはポリペプチド配列と対比するとき、標的ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたは天然もしくは野生型配列などの配列と比較して、1以上のヌクレオチドまたはアミノ酸の削除をいう。

【0149】

ここで使用する「挿入」は、核酸またはアミノ酸配列対比するとき、標的、天然、野生型または他の関連配列内への1以上のヌクレオチドまたはアミノ酸の付加包含をいう。それ故に、野生型配列と比較して1以上の挿入を含む核酸分子は、配列の直線長に1以上の付加ヌクレオチドを含む。

【0150】

ここで使用する核酸およびアミノ酸配列への「付加」は、他の配列と比較して、何れかの末端へのヌクレオチドまたはアミノ酸の付加をいう。

【0151】

ここで使用する「置換」または「置き換え」は、分子の長さ(残基の数により表される)を変えことなく、天然、標的、野生型または他の核酸またはポリペプチド配列における1以上のヌクレオチドまたはアミノ酸の代替的ヌクレオチドまたはアミノ酸への置き換えをいう。それ故に、分子における1以上の置換は、分子のアミノ酸残基またはヌクレオチドの数を変えない。特定のポリペプチドと比較したアミノ酸置換は、ポリペプチド配列の長さに沿ったアミノ酸残基の数に関して表現され得る。

【0152】

ここで使用する配列表に示すような配列と「対応する位置」またはそのヌクレオチドまたはアミノ酸位置に「対応する」ヌクレオチドまたはアミノ酸の位置についての記載は、GAPアルゴリズムなどの標準的アライメントアルゴリズムを使用して同一性を最大化するように、開示する配列とアライメントして同定されたヌクレオチドまたはアミノ酸位置をいう。配列の整列により、当業者は、例えば、保存および同一アミノ酸残基をガイドとして使用して、対応する残基を同定できる。一般に、対応する位置を同定するために、アミノ酸の配列は、最上位マッチが得られるように配列される(例えば、Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; および Carrillo et al. (1988) SIA M J Applied Math 48:1073 参照)。

【0153】

ここで使用する配列のアライメントは、2以上のヌクレオチドの配列またはアミノ酸の整列のための相同性の使用をいう。一般に、50%以上の同一性により関連する2以上の配列が整列される。整列された配列セットは、対応する位置で整列される2以上の配列をいい、ESTなどのRNA由来の配列およびゲノムDNA配列と整列された他のcDNAの整列を含む。関連またはバリエーションポリペプチドまたは核酸分子は、当業者に知られる何

10

20

30

40

50

らかの方法で整列され得る。このような方法は、一般にマッチを最大化し、手動アライメントを使用するおよび利用可能な多数のアライメントプログラム(例えば、BLASTP)の使用によるおよび当業者に知られるその他などの方法を含む。ポリペプチドまたは核酸の配列の整列により、当業者は、保存および同一アミノ酸残基をガイドとして使用して、類似部分または位置を同定できる。さらに、当業者は、保存アミノ酸またはヌクレオチド残基をガイドとして使用して、ヒト配列と非ヒト配列間の対応するアミノ酸またはヌクレオチド残基も発見できる。対応する位置はまた、例えばタンパク質構造をコンピューター・シミュレーションしたアライメントの使用により、構造的アライメントにも基づき得る。他の例において、対応する領域が同定され得る。当業者はまた保存アミノ酸残基をガイドとして使用して、ヒト配列と非ヒト配列間の対応するアミノ酸残基も発見し得る。

10

## 【0154】

ここで使用する抗体などのポリペプチドの「性質」は、結合特異性、構造的配置または立体構造、タンパク質安定性、タンパク質分解に対する抵抗性、立体構造的安定性、熱的耐容性およびpH条件に対する耐容性を含むが、これらに限定されない、ポリペプチドにより示されるあらゆる性質をいう。性質の変化は、ポリペプチドの「活性」を改変し得る。例えば、抗体ポリペプチドの結合特異性における変化は、ポリペプチドの親和性またはアビディティーまたはインビボ活性などの、抗原に結合する能力および/または種々の結合活性を改変し得る。

## 【0155】

ここで使用する抗体などのポリペプチドの「活性」または「機能的活性」は、ポリペプチドにより示されるあらゆる活性をいう。このような活性は、経験的に決定され得る。活性の例は、例えば、抗原結合、DNA結合、リガンド結合もしくは二量体化を介して生体分子と相互作用する能力または酵素活性、例えば、キナーゼ活性またはタンパク質分解活性を含むが、これらに限定されない。抗体(抗体フラグメントを含む)について、活性は、特定の抗原に特異的に結合する能力、抗原結合の親和性(例えば、高または低親和性)、抗原結合のアビディティー(例えば、高または低アビディティー)、結合速度、解離速度、抗原中和または排除、ウイルス中和を促進する能力などのエフェクター機能および病原体の感染または侵襲を防止するまたは排除もしくは体内の特定の組織または流体または細胞への浸透を促進する能力などのインビボ活性を含むが、これらに限定されない。活性は、ELISA、フローサイトメトリー、結合または解離速度を測定するための表面プラズモン共鳴または同等のアッセイ、免疫組織化学および免疫蛍光組織学および顕微鏡、細胞ベースのアッセイ、フローサイトメトリーおよび結合アッセイ(例えば、パニングアッセイ)などの認識されたアッセイを使用して、インビトロまたはインビボで評価され得る。

20

30

## 【0156】

ここで使用する「結合」、「結合した」またはその文法的異形は、2つの分子が互いに近接近する安定な会合をもたらす、他の分子との何らかの誘引性相互作用への分子の参加をいう。結合は、非共有結合、共有結合(例えば可逆性および不可逆性共有結合)を含むが、これらに限定されず、タンパク質、核酸、炭水化物、脂質および薬物に含まれる化学化合物などの小分子を含むが、これらに限定されない分子間の相互作用を含む。

## 【0157】

ここで使用する「抗体」は、天然であれ、組み換えにより産生など一部または完全に合成されたものであれ、免疫グロブリンならびに抗原結合部位の形成に十分であり、組み立てたとき、抗原に特異的に結合する、免疫グロブリン分子の可変重鎖および軽鎖領域の少なくとも一部を含む、そのフラグメントを含む、免疫グロブリンフラグメントをいう。それ故に、抗体は、免疫グロブリン抗原結合ドメイン(抗体結合部位)と相同または実質的に相同である結合ドメインを有する、あらゆるタンパク質を含む。例えば、抗体は、2つの重鎖(HおよびH'と表示され得る)および2つの軽鎖(LおよびL'と表示され得る)を含み、各重鎖が完全長免疫グロブリン重鎖または抗原結合部位の形成に十分であるその一部(例えば、重鎖は、VH鎖、VH-CH1鎖およびVH-CH1-CH2-CH3鎖を含むが、これらに限定されない)であってよく、各軽鎖が完全長軽鎖または抗原結合部位の形成

40

50

に十分であるその一部(例えば、軽鎖は、V L 鎖および V L - C L 鎖を含むが、これらに限定されない)であってよい、抗体をいう。各重鎖(HおよびH')は、一つの軽鎖(各LおよびL')と対形成する。一般に、抗体は、最小限で可変重(VH)鎖および/または可変軽(VL)鎖の全てまたは少なくとも一部を含む。抗体は、定常領域の全てまたは一部も含み得る。

【0158】

ここでの目的のために、用語抗体は、完全長抗体および抗EGFR抗体フラグメントなどの抗体フラグメントを含むその一部を含む。抗体フラグメントは、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、Fvフラグメント、ジスルフィド結合Fv(dsFv)、Fdフラグメント、Fd'フラグメント、一本鎖Fv(scFv)、一本鎖Fab(scFab)、二重特異性抗体、抗イディオタイプ(抗Id)抗体または上記何れかの抗原結合フラグメントを含むが、これらに限定されない。抗体はまた合成抗体、組み換えにより産生された抗体、多特異的抗体(例えば、二特異的抗体)、ヒト抗体、非ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体およびイントラポディも含む。ここで提供される抗体は、あらゆる免疫グロブリンクラス(例えば、IgG、IgM、IgD、IgE、IgAおよびIgY)、あらゆるサブクラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)またはサブ・サブクラス(例えば、IgG2aおよびIgG2b)のメンバーを含む。

10

【0159】

ここで使用する「核酸」は、一般に、ホスホジエステル結合により結合された、デオキシリボ核酸(DNA)およびリボ核酸(RNA)を含む、少なくとも2つの結合されたヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体をいう。用語「核酸」は、ペプチド核酸(PNA)、ホスホロチオエートDNAおよび他のこのようなアナログおよび誘導体またはこれらの組み合わせなどの核酸のアナログもまた含む。核酸はまた、例えば、ホスホジエステル結合、例えば、ホスホトリエステル結合、ホスホロアミダート結合、ホスホロチオエート結合、チオエステル結合またはペプチド結合(ペプチド核酸)以外のヌクレオチドアナログまたは「主鎖」結合を含む、DNAおよびRNA誘導体も含む。本用語はまた、等価物として、誘導体、ヌクレオチドアナログ、一本鎖(センスまたはアンチセンス)および二本鎖核酸から製造されるRNAまたはDNAのバリエーションおよびアナログも含む。デオキシリボヌクレオチドは、デオキシアデノシン、デオキシシチジン、デオキシグアノシンおよびデオキシチミジンを含む。RNAについて、ウラシル塩基はウリジンである。

20

30

【0160】

ここで使用する単離核酸分子は、核酸分子の天然源に存在する他の核酸分子から分離されたものをいう。cDNA分子などの「単離」核酸分子は、他の細胞物質または組み換え技術により産生されたとき培養培地が実質的にないまたは化学合成されたとき化学前駆体または他の化学物質が実質的にないものであり得る。ここで提供される単離核酸分子の例は、抵抗される抗体または抗原結合フラグメントをコードする単離核酸分子を含む。

【0161】

ここで使用する核酸配列、領域、要素またはドメインに関して「操作可能に連結した」は、核酸領域が互いに機能的に関連することを意味する。例えば、リーダーペプチドをコードする核酸は、ポリペプチドをコードする核酸と操作可能に連結でき、それにより核酸が機能的融合タンパク質を発現するよう転写および翻訳され得て、ここで、リーダーペプチドは、融合ポリペプチドを分泌させる。いくつかの例において、第一ポリペプチド(例えば、リーダーペプチド)をコードする核酸は、第二ポリペプチドをコードする核酸と操作可能に連結され、核酸は単一mRNA転写物として転写されるが、mRNA転写物の翻訳は、2つのポリペプチドの一方の発現をもたらし得る。例えば、アンバー停止コドンが、部分的アンバーサプレッサー細胞に導入されたとき、得られた単一mRNA転写物が第一および第二ポリペプチドを含む融合タンパク質を産生するよう翻訳され得るかまたは第一ポリペプチドのみを産生するよう翻訳されるように、第一ポリペプチドをコードする核酸と第二ポリペプチドをコードする核酸の間に位置し得る。他の例において、プロモーター

40

50

を、ポリペプチドをコードする核酸と操作可能に連結でき、それにより、プロモーターは、核酸の転写を制御または仲介する。

【0162】

例えば、合成核酸分子または合成遺伝子または合成ペプチドに関して、ここで使用する「合成」は、組み換え方法および/または化学合成方法により産生された核酸分子またはポリペプチド分子をいう。

【0163】

ここで使用する天然に存在する  $\alpha$ -アミノ酸の残基は、ヒトにおいて、同族 mRNA コドンによる搭載 tRNA 分子の特異的認識によりタンパク質に取り込まれる、天然に見られる 20 種の  $\alpha$ -アミノ酸の残基である。

10

【0164】

ここで使用する「ポリペプチド」は、共有結合により結合された 2 以上のアミノ酸をいう。用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、ここでは相互交換可能に使用される。

【0165】

ここで使用する「ペプチド」は、2 から約 40 またはちょうど 40 アミノ酸長であるポリペプチドをいう。

【0166】

ここで使用する「アミノ酸」は、アミノ基およびカルボン酸基を含む有機化合物である。ポリペプチドは、2 以上のアミノ酸を含む。ここでの目的のために、提供される抗体に含まれるアミノ酸は、20 種の天然に存在するアミノ酸(下表参照)、非天然アミノ酸およびアミノ酸アナログ(例えば、 $\beta$ -炭素が側鎖を有するアミノ酸)を含む。ここに記載するポリペプチドの種々のアミノ酸配列に存在するここで使用するアミノ酸は、周知の、三文字または一文字略称(下表参照)により特定される。種々の核酸分子およびフラグメントに存在するヌクレオチドは、当分野で日常的に使用される標準的一文字命名で指定される。

20

【0167】

ここで使用する「アミノ酸残基」は、ペプチド結合でのポリペプチドの化学消化(加水分解)により形成されたアミノ酸をいう。ここに記載されるアミノ酸残基は、一般に「L」異性型である。「D」異性型の残基は、所望の機能的性質がポリペプチドにより保持される限り、何らかの L-アミノ酸残基に置換され得る。NH<sub>2</sub> は、ポリペプチドのアミノ末端に存在する遊離アミノ基をいう。COOH は、ポリペプチドのカルボキシル末端に存在する遊離カルボキシ基をいう。J. Biol. Chem., 243:3557-59 (1968)に記載され、37 C.F.R. §§ 1.821-1.822で承認された標準的ポリペプチド命名法に従って、アミノ酸残基の略語を下表に示す。

30

40

50

【表 2】  
対応表

| 記号  |       |                      |
|-----|-------|----------------------|
| 1文字 | 3文字   | アミノ酸                 |
| Y   | T y r | チロシン                 |
| G   | G l y | グリシン                 |
| F   | P h e | フェニルアラニン             |
| M   | M e t | メチオニン                |
| A   | A l a | アラニン                 |
| S   | S e r | セリン                  |
| I   | I l e | イソロイシン               |
| L   | L e u | ロイシン                 |
| T   | T h r | スレオニン                |
| V   | V a l | バリン                  |
| P   | P r o | プロリン                 |
| K   | L y s | リシン                  |
| H   | H i s | ヒスチジン                |
| Q   | G l n | グルタミン                |
| E   | G l u | グルタミン酸               |
| Z   | G l x | グルタミン酸および/またはグルタミン   |
| W   | T r p | トリプトファン              |
| R   | A r g | アルギニン                |
| D   | A s p | アスパラギン酸              |
| N   | A s n | アスパラギン               |
| B   | A s x | アスパラギン酸および/またはアスパラギン |
| C   | C y s | システイン                |
| X   | X a a | 未知またはその他             |

10

20

30

## 【0168】

式によりここに示される全てのアミノ酸残基の配列は、アミノ末端からカルボキシル末端の慣用の方向で左から右配向を有する。用語「アミノ酸残基」は、上記対応表に列記されたアミノ酸、修飾、非天然および異常なアミノ酸を含むことが定義される。アミノ酸残基配列の始点または終点の点線は、1以上アミノ酸残基のさらなる配列またはNH<sub>2</sub>などのアミノ末端基もしくはCOOHなどのカルボキシル末端基へのペプチド結合を示す。

## 【0169】

ペプチドまたはタンパク質において、アミノ酸の適当な保存的置換は当業者に知られ、一般に得られる分子の生物学的活性を変えないことになされ得る。当業者は、一般に、ポリペプチドの非必須領域における一アミノ酸置換は、生物学的活性を実質的に変えないことを認識する(例えば、Watson et al., Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224参照)。

40

## 【0170】

ここに記載しかつ提供される機能獲得型変異におけるなどのこのような置換は、下表に示す置換セット例に従い、行い得る。

50

【表 3】

## 保存的アミノ酸置換の例

| 元の残基      | 保存的置換例                |
|-----------|-----------------------|
| A l a (A) | G l y ; S e r         |
| A r g (R) | L y s                 |
| A s n (N) | G l n ; H i s         |
| C y s (C) | S e r                 |
| G l n (Q) | A s n                 |
| G l u (E) | A s p                 |
| G l y (G) | A l a ; P r o         |
| H i s (H) | A s n ; G l n         |
| I l e (I) | L e u ; V a l         |
| L e u (L) | I l e ; V a l         |
| L y s (K) | A r g ; G l n ; G l u |
| M e t (M) | L e u ; T y r ; I l e |
| P h e (F) | M e t ; L e u ; T y r |
| S e r (S) | T h r                 |
| T h r (T) | S e r                 |
| T r p (W) | T y r                 |
| T y r (Y) | T r p ; P h e         |
| V a l (V) | I l e ; L e u         |

10

20

## 【0171】

他の置換もまた許容され、経験的にまたは他の既知保存的または非保存的置換に従い決定され得る。

## 【0172】

ここで使用する「天然に存在するアミノ酸」は、ポリペプチドに存在する20種のL-アミノ酸をいう。

30

## 【0173】

ここで使用する用語「非天然アミノ酸」は、天然アミノ酸に類似の構造を有するが、天然アミノ酸の構造および反応性を模倣するよう構造的に修飾されている、有機化合物をいう。故に、天然に存在しないアミノ酸は、例えば、20種の天然に存在するアミノ酸以外のアミノ酸またはアミノ酸のアナログを含み、アミノ酸のD-立体異性体を含むが、これらに限定されない。非天然アミノ酸の例は当業者に知られ、2-アミノアジピン酸(A a d)、3-アミノアジピン酸(b A a d)、 $\beta$ -アラニン/ $\beta$ -アミノ-プロピオン酸(B a l a)、2-アミノ酪酸(A b u)、4-アミノ酪酸/ピペリジン酸(4 A b u)、6-アミノカプロン酸(A c p)、2-アミノヘプタン酸(A h e)、2-アミノイソ酪酸(A i b)、3-アミノイソ酪酸(B a i b)、2-アミノピメリン酸(A p m)、2,4-ジアミノ酪酸(D b u)、デスモシン(D e s)、2,2'-ジアミノピメリン酸(D p m)、2,3-ジアミノプロピオン酸(D p r)、N-エチルグリシン(E t G l y)、N-エチルアスパラギン(E t A s n)、ヒドロキシリシン(H y l)、アロ-ヒドロキシリシン(A h y l)、3-ヒドロキシプロリン(3 H y p)、4-ヒドロキシプロリン(4 H y p)、イソデスモシン(I d e)、アロ-イソロイシン(A i l e)、N-メチルグリシン、サルコシン(M e G l y)、N-メチルイソロイシン(M e I l e)、6-N-メチルリシン(M e L y s)、N-メチルバリン(M e V a l)、ノルバリン(N v a)、ノルロイシン(N l e)およびオルニチン(O r n)を含むが、これらに限定されない。

40

## 【0174】

50

ここで使用するDNA構築物は、天然で見られない様式で組み合わせかつ並列されたDNAのセグメントを含む、一本鎖または二本鎖、直線状または環状DNA分子である。DNA構築物は、ヒト操作の結果として存在し、操作分子のクローンおよび他のコピーを含む。

【0175】

ここで使用するDNAセグメントは、特定された属性を有する大型DNA分子の一部である。例えば、特定のポリペプチドをコードするDNAセグメントは、5'から3'方向に読んだとき、特定のポリペプチドのアミノ酸配列をコードする、プラスミドまたはプラスミドフラグメントなどの長いDNA分子の一部である。

【0176】

ここで使用する用語ポリヌクレオチドは、5'から3'末端に読むデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド塩基の一本鎖または二本鎖ポリマーを意味する。ポリヌクレオチドはRNAおよびDNAを含み、天然起源から単離され、インビトロで合成されまたは天然分子と合成分子の組み合わせから調製されることができる。ポリヌクレオチド分子の長さは、ここではヌクレオチド(略語「nt」)または塩基対(略語「bp」)のとして示す。用語ヌクレオチドは、可能である限り、一本鎖および二本鎖分子に対して使用する。本用語が二本鎖分子に対して適用されるとき、全体的長さを意味するよう使用され、用語塩基対と同等であることが理解される。二本鎖ポリヌクレオチドの鎖長はわずかに異なってもよく、その末端はずれていてよいことは当業者により認識される；故に、二本鎖ポリヌクレオチド分子内の全ヌクレオチドは対形成され得ない。このような不對末端は、一般に、20ヌクレオチド長を超えない。

【0177】

ここで使用する組み換え方法による産生は、クローン化DNAによりコードされるタンパク質の発現のための分子生物学の周知方法の使用を意味する。

【0178】

ここで使用する「異種核酸」は、それが発現される細胞によりインビボで通常産生されない産物(すなわち、RNAおよび/またはタンパク質)をコードする核酸または通常存在しない座位にあるまたは転写、翻訳もしくは他の制御可能な生化学的過程に影響することによりDNAなどの内因性核酸の発現を変えるメディエーターを仲介またはコードする核酸である。DNAなどの異種核酸は外来核酸とも称される。当業者が発現される細胞に対して異種または外来であると認識するまたはみなすDNAなどのあらゆる核酸がここでは異種核酸により包含される；異種核酸は、内因性にも発現される外因的に加えられた核酸を含む。異種核酸は、一般に導入される細胞に内因性ではなく、他の細胞から得られるかまたは合成により調製されるかまたは天然に生じないゲノム座位に導入されるかまたはその発現が天然制御配列または配列と異なる1以上の制御配列の制御下にある。

【0179】

ここでの異種核酸の例は、DNA/RNAセンサー経路におけるタンパク質またはその機能獲得型バリエーションまたは腫瘍微小環境における抗腫瘍免疫を付与するまたは貢献するサイトカインなどの免疫刺激性タンパク質をコードする核酸を含むが、これらに限定されない。免疫刺激性細菌において、異種核酸は、一般に導入されたプラスミドにコード化されるが、細菌産物の発現を変えるプロモーターなど細菌のゲノムに導入され得る。DNAなどの異種核酸は、何らかの方法で、治療産物をコードするDNAの発現に介在できるまたは、何らかの方法で、治療産物の発現に、直接的または間接的に、介在するペプチドまたはRNAなどの産物をコードできる、核酸を含む。

【0180】

ここで使用する細胞治療は、疾患または状態を処置するための対象への細胞の送達を含む。同種または自己であり得る細胞は、対象に導入されたとき産物を送達または発現するように、細胞をここに提供される免疫刺激性細菌で感染させるなど、エクスピボで修飾される。

【0181】

10

20

30

40

50

ここで使用する遺伝子治療は、このような治療が探究されている障害または状態を有する哺乳動物、特にヒトの標的細胞などのある細胞への、DNAなどの異種核酸の導入を含む。DNAなどの核酸は、DNAなどの異種核酸が発現され、それによりコードされる治療産物が産生されるような方法で、選択した標的細胞に導入される。遺伝子治療はまた、欠損遺伝子を複製するまたは導入する哺乳動物もしくは細胞により産生される遺伝子産物を補う遺伝子産物をコードする核酸の送達にも使用され得る。導入された核酸は、哺乳動物宿主で通常産生されないまたは治療有効量でもしくは治療上有用な時間産生されない治療化合物、例えば増殖因子もしくはその阻害剤または腫瘍壊死因子もしくはその阻害剤、例えばその受容体をコードし得る。治療産物をコードするDNAなどの異種核酸は、産物またはその発現を増強するかまたは他に変えるために、罹患宿主の細胞への導入前に修飾され得る。遺伝子治療はまた遺伝子発現の阻害剤またはリプレッサーまたは他のモジュレーターの送達にも関与し得る。

10

**【0182】**

ここで使用する「発現」は、ポリヌクレオチドの転写および翻訳によりポリペプチドが産生される過程をいう。ポリペプチドの発現レベルは、例えば、宿主細胞から産生されるポリペプチドの量を決定する方法を含む、当分野で知られる何れかの方法を使用して評価され得る。このような方法は、ELISAによる細胞可溶化物におけるポリペプチドの定量、ゲル電気泳動後のクマシーブルー染色、ローリータンパク質アッセイおよびブラッドフォードタンパク質アッセイを含み得るが、これらに限定されない。

20

**【0183】**

ここで使用する「宿主細胞」は、ベクターを受け、維持し、再生しおよび/または増幅する細胞をいう。宿主細胞をまたベクターによりコードされるポリペプチドの発現にも使用し得る。ベクターに含まれる核酸は、宿主細胞が分裂したとき複製され、それにより核酸が増幅される。

**【0184】**

ここで使用する「ベクター」は、ベクターが適切な宿主細胞に形質転換されたとき発現され得る、1以上の異種タンパク質が複製可能な核酸である。ベクターの記載は、一般に、制限消化およびライゲーションにより、ポリペプチドをコードする核酸またはそのフラグメントが導入され得るベクターを含む。ベクターの記載はまた、修飾抗EGFR抗体などのポリペプチドをコードする核酸を含むベクターも含む。ベクターを使用して、ポリペプチドをコードする核酸を、核酸増幅または核酸によりコードされるポリペプチドの発現/提示のために宿主細胞に導入する。ベクターは、一般にエピソームに留まるが、遺伝子またはその一部のゲノムの染色体への組込みを行うよう設計され得る。また考慮されるのは、酵母人工染色体および哺乳動物人工染色体のような人工染色体であるベクターである。このような媒体の選択および使用は当業者に周知である。ベクターは「ウイルスベクター」または「ウイルス性ベクター」も含む。ウイルスベクターは、細胞に外来遺伝子を導入(媒体またはシャトルとして)するために外来遺伝子に操作可能に連結された操作されたウイルスである。

30

**【0185】**

ここで使用する「発現ベクター」は、プロモーター領域などの制御配列と操作可能に連結されたDNAの発現が可能なベクターを含み、制御配列は、このようなDNAフラグメントの発現を実施できる。このような付加的セグメントはプロモーターおよびターミネーター配列を含み得て、所望により1以上の複製起点、1以上の選択可能マーカ、エンハンサー、ポリアデニル化シグナルなどを含み得る。発現ベクターは、一般にプラスミドまたはウイルスDNAに由来しまたは両者の要素を含み得る。それ故に、発現ベクターは、適切な宿主細胞への導入により、クローン化DNAの発現をもたらす、プラスミド、ファージ、組み換えウイルスまたは他のベクターなどの組み換えDNAまたはRNA構築物をいう。適切な発現ベクターは当業者に周知であり、真核生物細胞および/または原核生物細胞で複製可能であるおよびエピソームに留まるまたは宿主細胞ゲノムに統合されるものを含む。

40

50



【0186】

ここで使用する「一次配列」は、ポリペプチドのアミノ酸残基の配列または核酸分子のヌクレオチド配列をいう。

【0187】

ここで使用する「配列同一性」は、試験ポリペプチドまたはポリヌクレオチドと対照ポリペプチドまたはポリヌクレオチド間の比較における、同一または類似のアミノ酸またはヌクレオチド塩基の数をいう。配列同一性は、類似性または同一性の領域を同定するための、核酸またはタンパク質配列の配列アライメントにより決定され得る。ここでの目的のために、配列同一性は、一般に同一残基を同定するためのアライメントにより決定される。アライメントは局所的でも包括的でもよい。マッチ、ミスマッチおよびギャップを比較配列間で同定し得る。ギャップは、同一または類似の特性が整列されるよう、整列配列の残基間に挿入されたヌルアミノ酸またはヌクレオチドである。一般に、内部および末端ギャップが存在し得る。ギャップペナルティを使用するとき、配列同一性は、末端ギャップに関してはペナルティなしで決定され得る(例えば、末端ギャップはペナルティが科せられない)。あるいは、配列同一性は、ギャップを考慮することなく、同一位置数/総整列配列の長さ×100として決定され得る。

10

【0188】

ここで使用する「包括的アライメント」は、2つの配列を始めから末端まで、各配列の各文字を1回のみ整列させて、整列させるアライメントである。アライメントは、配列間に類似性または同一性があるかないかに関わらず作成される。例えば、「包括的アライメント」に基づく50%配列同一性は、各100ヌクレオチド長の2つの比較配列の完全配列のアライメントにおいて、残基の50%が同一である。包括的アライメントはまた整列配列の長さが同じでなくても、配列同一性の決定に使用され得ることは理解される。配列の末端の差異を、「末端ギャップについてペナルティなし」が選択されない限り、配列同一性の決定において考慮する。一般に、包括的アライメントは、その長さの大部分にわたり相当な類似性を共有する配列に使用する。包括的アライメントの実施のためのアルゴリズムの例は、Needleman-Wunschアルゴリズム(Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48: 443を含む)。包括的アライメントを実施するためのプログラムの例は公に利用可能であり、アメリカ国立生物工学情報センター(NCBI)ウェブサイト(ncbi.nlm.nih.gov/)で入手可能なGlobal Sequence Alignment Toolおよびdeepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.htmlで利用可能なプログラムを含む。

20

30

【0189】

ここで使用する「局所アライメント」は、2つの配列を整列するが、類似性または同一性を共有する配列の部分のみ整列するアライメントである。それ故に、局所アライメントは、一方の配列のサブセグメントが他方の配列に存在するかを決定する。類似性がなければ、アライメントは回答されない。局所アライメントアルゴリズムは、BLASTまたはSmith-Watermanアルゴリズム(Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981))を含む。例えば、「局所アライメント」に基づく50%配列同一性は、何らかの長さの2つの比較配列の完全配列のアライメントにおいて、100ヌクレオチド長の類似性または同一性の領域が、その類似性または同一性の領域で同一である50%の残基を有することを意味する。

40

【0190】

ここでの目的のために、配列同一性は、各供給者により確立されたデフォルトギャップペナルティを用いて使用する、標準的アライメントアルゴリズムプログラムにより決定され得る。GAPプログラムのデフォルトパラメータは、(1)Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)に記載のGribskov et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745による単項比較マトリクス(一致について1および非一致について0の値を含む)および重みつき比較マトリクス;(2)各ギャップにペナルティ3.0および各ギャップにおける各記号に付加的0.10ペナルティ;および(3)末端ギャップについてペナルティなしを含み得る。何れかの2つの核酸分子のヌクレオチド配列または何れ

50

かの2つのポリペプチドのアミノ酸配列が少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%「同一」またはパーセント同一性を使用する他の類似の相異を有するかは、局所アライメントまたは包括的アライメントに基づく既知コンピュータアルゴリズムを使用して、決定され得る(例えば、多数の既知のおよび公に利用可能なアライメントデータベースおよびプログラムへのリンクを提供するwikipedia.org/wiki/Sequence\_alignment\_software参照)。一般に、ここでの目的のために配列同一性は、NCBI/BLAST([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&Page\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&Page_TYPE=BlastHome))で利用可能なNeedleman-Wunsch包括的配列アライメントツール; LAlign(Huang and Millerアルゴリズムを実装するWilliam Pearson(Adv. Appl. Math. (1991) 12:337-357)); およびdeepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.htmlで利用可能なXiaoqui Huangのプログラムなどの包括的アライメントに基づくコンピュータアルゴリズムを使用して決定される。一般に、比較ポリペプチドまたはヌクレオチドの各々の完全長配列は、包括的アライメントにおける各配列の完全長にわたり整列される。局所アライメントはまた比較される配列が実質的に同じ長さであるときも使用され得る。

10

## 【0191】

それ故に、ここで使用する用語「同一性」は、試験ポリペプチドまたはポリヌクレオチドと対照ポリペプチドまたはポリヌクレオチド間の比較またはアライメントをいう。ある非限定的例において、「少なくとも90%同一」は、対照ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して90~100%のパーセント一致をいう。90%以上のレベルの同一性は、例示目的のために、100アミノ酸またはヌクレオチドの試験ポリペプチドまたはポリヌクレオチドおよび対照ポリペプチドまたはポリヌクレオチド長さを比較したと仮定して、試験ポリペプチドまたはポリヌクレオチドにおける対照ポリペプチドと異なるアミノ酸またはヌクレオチドが10%(すなわち、100中10)を超えないとの事実の指標である。類似の比較を試験ポリヌクレオチドと対照ポリヌクレオチド間で実施し得る。このような差異は、アミノ酸配列の全長にわたり無作為に分散している点変異を表し得るかまたは許容できる最大、例えば、10/100アミノ酸差異までの種々の長さの1以上の位置がクラスタ化し得る(約90%同一性)。差異はまたアミノ酸残基の欠失または短縮化によるものであり得る。差異は、核酸またはアミノ酸置換、挿入または欠失として定義され得る。比較配列の長さによって、約85~90%を超える相同性または一致レベルで、結果は、プログラムおよびギャップパラメータセットに非依存적であり得る;このような高レベルの同一性は、しばしば、ソフトウェアに頼ることなく容易に評価され得る。

20

30

## 【0192】

ここで使用する「疾患または障害」は、感染、後天的状態および遺伝的状态を含むが、これに限定されない原因または状態に起因し、識別可能な症状により特徴づけられる生物における病態をいう。

## 【0193】

ここで使用する疾患または状態を有する対象の「処置」は、処置後対象の症状が部分的にまたは完全に軽減するかまたは静止したままであることを意味する。

## 【0194】

ここで使用する処置は、疾患または障害の症状を好転させる、何らかの効果をいう。処置は、予防、治療および/または治癒を含む。処置はまたここに提供する免疫刺激性細菌または組成物の何れかの薬学的用途も包含する。

40

## 【0195】

ここで使用する予防は、疾患の可能性の予防および/または症状悪化もしくは疾患進行の予防をいう。

## 【0196】

ここで使用する「予防」または防止およびその文法的に等価な形態は、疾患または状態を発症するリスクまたは可能性を低減する方法をいう。

## 【0197】

50

ここで使用する「薬学的に有効な薬剤」は、例えば、麻酔剤、血管収縮剤、分散剤ならびに小分子薬物および治療タンパク質を含む慣用の治療薬物を含むが、これらに限定されないあらゆる治療剤または生物活性剤を含む。

【0198】

ここで使用する「治療効果」は、対象の処置に起因する、疾患または状態の症状を変える、一般に改善または好転するまたは疾患または状態を治癒する、効果をいう。

【0199】

ここで使用する「治療有効量」または「治療有効用量」は、対象への投与後、少なくとも治療効果を生じるのに十分である、薬剤、化合物、物質または化合物を含む組成物の量をいう。それ故に、疾患または障害の症状の予防、治癒、好転、抑止または部分的抑止に必要な量である。

10

【0200】

ここで使用する「治療有効性」は、薬剤、化合物、物質または化合物を含む組成物が投与されている対象において、治療効果を生じる、薬剤、化合物、物質または化合物を含む組成物の能力をいう。

【0201】

ここで使用する「予防有効量」または「予防有効用量」は、対象に投与したとき、意図する予防効果、例えば、予防または疾患または症状の発症または再発の遅延、疾患または症状の発症または再発の可能性の低減またはウイルス感染の発生率減少を有する、薬剤、化合物、物質または化合物を含む組成物の量をいう。1回投与で完全な予防効果が必ずしも生じず、一連の投与後のみ生じ得る。それ故に、予防有効量は1回以上の投与で投与され得る。

20

【0202】

ここで使用する医薬組成物または他の治療剤の投与によるなどの処置による特定の疾患または障害の症状の改善は、組成物または治療の投与によるまたは関連するものであり得る、症状の、持続的であれ一過性であれ、何らかの低減をいう。

【0203】

ここで使用する「抗癌剤」は、悪性細胞および組織に破壊的または毒性であるあらゆる薬剤をいう。例えば、抗癌剤は、癌細胞を死滅させるかまたは他の点で腫瘍または癌細胞の増殖を阻害もしくは障害させる薬剤を含む。抗癌剤の例は化学療法剤である。

30

【0204】

ここで使用する「治療活性」は、治療ポリペプチドのインビボ活性をいう。一般に、治療活性は、疾患または状態の処置と関連する活性である。

【0205】

ここで使用する用語「対象」は、ヒトなどの哺乳動物を含む動物をいう。

【0206】

ここで使用する患者は、ヒト対象をいう。

【0207】

ここで使用する動物は、ヒト、ゴリラおよびサルを含む霊長類；マウスおよびラットなどの齧歯類；ニワトリなどの家禽；ヤギ、ウシ、シカおよびヒツジなどの反芻動物；およびブタおよび他の動物などの、しかし、これらに限定されないあらゆる動物を含む。非ヒト動物は、考慮される動物としてヒトを除外する。ここに提供されるポリペプチドは、あらゆる起源、動物、植物、原核生物および真菌由来である。大部分のポリペプチドは、哺乳動物起源を含む動物起源である。

40

【0208】

ここで使用する「組成物」は、何らかの混合物をいう。それは、溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水性、非水性またはそれらの何らかの組み合わせであり得る。

【0209】

ここで使用する「組み合わせ」は、2以上のアイテムの何らかの結びつきをいう。組み合わせは、2つの組成物または2つのコレクションなどの2以上の別々のアイテム、2以上

50

のアイテムの単一混合物などのそれらの混合物またはその何らかの変形物をいう。組み合わせの要素は、一般に機能的に結びついているかまたは関連している。

【0210】

ここで使用する組み合わせ治療は、2以上の異なる治療剤の投与をいう。異なる治療剤は、別々に、逐次的に、間欠的に提供および投与してよくまたは単一組成物で提供してよい。

【0211】

ここで使用するキットは、活性化、投与、診断および生物学的活性または性質の評価を含むが、これらに限定されない目的のために、所望により付加的試薬および組み合わせまたはその要素の使用指示などの他の要素を含む、包装された組み合わせをいう。

10

【0212】

ここで使用する「単位剤形」は、当分野で知られるとおり、ヒトおよび動物対象に適し、かつ個々に包装された、物理的に別個の単位をいう。

【0213】

ここで使用する「単回投与量製剤」は、直接投与のための製剤をいう。

【0214】

ここで使用する多回用量製剤は、治療剤の複数用量を含み、治療剤の数回の1回量を提供するために直接投与され得る、製剤をいう。分、時間、週、日または月にわたり複数用量を投与し得る。多回用量製剤は、用量調節、用量蓄積および/または用量分割を可能とし得る。多回用量製剤は時間をかけて使用されるため、一般に微生物増殖を阻害するために1以上の防腐剤を含む。

20

【0215】

ここで使用する「製品」は、製造および販売される生産物である。本明細書を通して使用される限り、本用語は、包装物に含まれる、ここに提供される組成物の何れかを包含することを意図する。

【0216】

ここで使用する「流体」は、流動できるあらゆる組成物をいう。流体は、故に、半固体、ペースト、溶液、水性混合物、ゲル、ローション、クリームおよび他のこのような組成物の形態である組成物を包含する。

【0217】

ここで使用する単離または精製ポリペプチドまたはタンパク質(例えば、単離抗体または抗原結合そのフラグメント)またはその生物学的活性部分(例えば、単離抗原結合フラグメント)は、タンパク質が由来する細胞または組織からの細胞物質または他の夾雑タンパク質が実質的にないまたは化学合成されたとき化学前駆体または他の化学物質が実質的にない。薄層クロマトグラフィー(TLC)、ゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィー(HPLC)など当業者にこのような純度の評価のために使用される標準的分析方法で容易に検出可能な不純物がないように見えるまたはさらなる精製が物質の酵素および生物学的活性などの物理的および化学性質を検出可能に変えないのに十分純粋であるならば、調製物は実質的に他を含まないと決定できる。実質的に化学的に純粋な化合物を製造するための化合物の精製方法は当業者に知られる。しかしながら、実質的に化学的に純粋な化合物は、立体異性体の混合物であり得る。このような場合、さらなる精製は、化合物の比活性を増加する。ここで使用する「細胞抽出物」または「溶解物」は、溶解または破壊細胞から製造される調製物またはフラクションをいう。

30

40

【0218】

ここで使用する「対照」は、試験パラメーターで処置されない、または、血漿サンプルであるならば、問題の状態を有しない正常ボランティア由来であり得る以外、試験サンプルと実質的に同一であるサンプルをいう。対照は内部対照でもあり得る。

【0219】

ここで使用する単数表現は、明らかに異なる指示がない限り、複数の指示対象を含む。それ故に、例えば、「免疫グロブリンドメイン」を含むポリペプチドの記載は、1個または

50

複数の免疫グロブリンドメインを有するポリペプチドを含む。

【0220】

ここで使用する用語「または」は、代替のみをいうまたは代替が相互排他的であることが明確に示されない限り、「および/または」を意味するために使用される。

【0221】

ここで使用する範囲および量は、「約」特定の値または範囲として表され得る。約はまたちょうどの量も示す。故に、「約5アミノ酸」は「約5アミノ酸」およびまた「5アミノ酸」を意味する。

【0222】

ここで使用する「任意の」または「所望により」は、その後に記載される事象または状況が生じるまたは生じないことを意味し、本記載は、該事象または状況が生じる場合および生じない場合を含む。例えば、所望によりバリエーション部分は、部分がバリエーションまたは非バリエーションであることを意味する。

10

【0223】

ここで使用する保護基、アミノ酸および他の化合物の何れかの略語は、特に断らない限り、その一般的使用、認識されている略語またはIUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureに従う(Biochem. (1972) 11(9):1726-1732参照)。

【0224】

開示を明確化するためかつ限定の目的ではなく、詳細な記載をさらなる小区分に分ける。

【0225】

20

B. 免疫刺激性細菌の概要

腫瘍で蓄積および/または複製し、処置対象におけるRNAの発現による、阻害、抑制またはサイレンシングが効果腫瘍治療を発揮する遺伝子を標的とする、設計されたshRNAおよび設計されたマイクロRNAなどの阻害性RNAをコードする、ここで免疫刺激性細菌と称する修飾細菌が提供される。修飾のための細菌株は、治療使用に適する何れでもよい。修飾ここに提供される免疫刺激性細菌は、癌を処置するための使用および方法のためである。細菌は、このような使用および方法のために修飾される。

【0226】

ここに提供される免疫刺激性細菌は、炎症性応答を減弱するため細菌遺伝子の欠失または修飾により修飾され、かつ該細菌で処置される宿主における抗腫瘍免疫応答を増強するため修飾される。例えば、宿主において、抗腫瘍産物などの治療産物をコードするプラスミドが細菌に包含され、細菌はアデノシンに対して栄養要求性であり得る。細菌に対する炎症性応答の減弱は、宿主におけるTNF-アルファを減少させるmsbB遺伝子の欠失および/またはフラジェリン遺伝子ノックアウトにより行われ得る。細菌は、例えば、免疫刺激性タンパク質、STINGタンパク質、バリエーションSTINGタンパク質および宿主免疫チェックポイントを標的とするタンパク質をコードするプラスミドの付加および核酸へのCpGの付加により、宿主抗腫瘍活性を刺激するよう修飾される。

30

【0227】

細菌株は、弱毒株または標準的方法により弱毒化されたもしくはここに提供される修飾により、コロニー形成する能力が主に免疫特権組織および臓器、特に免疫および固形腫瘍を含む腫瘍細胞に限定されたことにより、弱毒化された株であり得る。ここでの目的のために、細菌はそれ自体弱毒化される必要はなく、むしろ、細菌により感染される細胞を制限するまたは変えるゲノム修飾などの修飾を含む。細菌は、例えば、サルモネラ、シゲラ、リステリア、大腸菌およびピフィドバクテリアの株を含むが、これらに限定されない。例えば、種は、ソンネ赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、志賀赤痢菌、リステリア・モノサイトゲネス、チフス菌、ネズミチフス菌、トリチフス菌およびゲルトネル菌を含む。他の適当な細菌種は、リケッチア、クレブシエラ、ボルデテラ、ナイセリア、エロモナス、フランシセラ、コリネバクテリウム、サイトロバクター、クラミジア、ヘモフィルス、ブルセラ、マイコバクテリウム、マイコプラズマ、レジオネラ、ロドコッカス、シュードモナス、ヘリコバクター、ピプリオ、バシラスおよびエリジペロスリックス。例えば、斑点熱リケ

40

50

ツチア、発疹チフスリケッチア、ツツガムシ病リケッチア、発疹熱リケッチア、リケッチア・シビリカ、気管支敗血症菌、髄膜炎菌、淋菌、エロモナス・オイクレノフィラ、エロモナス・サルモニシダ、野兔病菌、ヒツジ偽結核菌、サイトロバクター・フレウンディイ、肺炎クラミジア、ヘモフィルス・ソムナス、ウシ流産菌、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ、在郷軍人病菌、ロドコッカス・エクイ、緑膿菌、ヘリコバクター・ムステラエ、コレラ菌、枯草菌、ブタ丹毒菌、エルシニア・エンテロコリティカ、ロシャリメア・クインターナおよびアグロバクテリウム・ツメルファシウムを含む。

【0228】

細菌は、免疫特権組織または臓器または環境への拡散、遊走および走化性を含む1以上の性質により、栄養素もしくは栄養要求性である他の分子を提供する環境および/または細菌の侵入および複製のための環境を提供する複製細胞を含む環境に蓄積する。ここに提供される免疫刺激性細菌およびこのような治療を発揮する種は、サルモネラ種、リステリアおよび大腸菌を含む。細菌は、RNAポリメラーゼ(RNAP)IIまたはIIIプロモーターなどの真核生物プロモーターの制御下に1以上の治療産物をコードするプラスミドを含む。一般に、RNAP III(POL IIIとも称される)プロモーターは構成的であり、RNAP II(POL IIとも称される)は制御され得る。複数の産物がコードされるとき、各発現は異なるプロモーターの制御下にあつてよい。

10

【0229】

ここに提供される細菌の中でも、アデノシンに対して栄養要求性であるように修飾された細菌である。これは、プリン合成、代謝または輸送に関与する遺伝子の修飾または欠失により達成され得る。例えば、チフス菌などのサルモネラ種におけるtsx遺伝子の破壊はアデノシン栄養要求性をもたらす。アデノシンは免疫抑制性であり、腫瘍に高濃度で蓄積される；アデノシンに対して栄養要求性は、細菌がアデノシンに富む組織で選択的に複製するため、細菌の抗腫瘍活性を改善する。

20

【0230】

asd遺伝子が欠損するように修飾された細菌もまた提供される。インビボでの使用のためのこれらの細菌は、導入されたプラスミドに機能的asd遺伝子の運搬を含むよう修飾される；これは抗生物質ベースのプラスミド維持/選択系を不要とするようにプラスミドの選択を維持する。また提供されるのは、プラスミドに機能的asd遺伝子を含まず、故に、宿主において自己融解であるように操作したasd欠損株の使用である。

30

【0231】

鞭毛の産生が不可能であるように修飾された細菌もまた提供される。これは、フラジェリンサブユニットをコードする遺伝子の欠失の手段により細菌を修飾することにより達成され得る。フラジェリンを欠く修飾細菌は低炎症性であり、それ故により忍容性が高く、かつより強力な抗腫瘍応答を誘導する。

【0232】

食細胞におけるプラスミド送達を改善するリステリオリシンOを産生するように修飾された細菌もまた提供される。

【0233】

低コピー、CpG含有プラスミドを担持するよう修飾された細菌もまた提供される。プラスミドは他の修飾をさらに含み得る。

40

【0234】

細菌はまた細菌が、サルモネラ種であるならば、毒性SPI-1(サルモネラ病原性島-1)遺伝子をあまり発現しないような方法で増殖させるように修飾できる。サルモネラにおいて、病原性、侵襲、生存および腸外拡散を担う遺伝子はサルモネラ病原性島(SPI)に位置する。

【0235】

細菌を、プラスミド維持の選択、特に抗生物質を用いない選択、株の調製を含む他の望ましい形質のためにさらに修飾し得る。免疫刺激性細菌は、所望により抗腫瘍治療ポリペプチドを含む治療ポリペプチドおよび薬剤をコードし得る。

50

## 【0236】

ここに提供される免疫刺激性細菌も例は、サルモネラ種である。ここに記載される修飾のための細菌の例は、*asd* 遺伝子ノックアウトおよび無抗生物質プラスミド維持を補うためにプラスミドで操作された株 Y S 1 6 4 6 (ATCC Catalog # 202165 ; また、国際 P C T 出願公開 W O 9 9 / 1 3 0 5 3 も参照、V N P 2 0 0 0 9 と称される) などのネズミチフス菌の操作した株である。

## 【0237】

アデノシンに対して栄養要求性とした修飾免疫刺激性細菌株は、腫瘍および癌を処置する方法における使用のために、ヒトなどの対象への投与用に製剤化された、このような株を含む医薬組成物としてここに提供される。

## 【0238】

操作したここに提供される免疫刺激性細菌は、腫瘍が持続性抗腫瘍免疫を打ち破るおよび回避するために利用する免疫チェックポイント経路を阻害しながら、非炎症性腫瘍の免疫再活性化を誘導しかつ腫瘍抗原特異的免疫応答を促進する複数の相乗的モダリティを含む。アデノシン栄養要求性および血管破壊増強を介して改善された腫瘍ターゲティングは、他の免疫療法モダリティで観察される全身性サイトカイン暴露および自己免疫毒性を制限するために炎症を局在化させながら、改善された効力を有する。このように修飾された細菌の例は、株 Y S 1 6 4 6、特に *asd* - 株および野生型株のこのような修飾を含む、ネズミチフス菌株である。

## 【0239】

## C. 癌免疫療法

腫瘍微小環境 (T M E) 内で見られる免疫抑制性環境は、腫瘍開始および進行の駆動機構である。癌は、免疫系が腫瘍の制御および封じ込めに失敗した後、出現する。複数の腫瘍特異的機構は、免疫系が腫瘍およびその細胞を、排除ではなく、許容するよう強いられた腫瘍環境を作る。癌免疫療法の目標は、腫瘍を排除する免疫系の天然の能力の奪還である。

## 【0240】

## 1. 免疫療法

数種の臨床的癌免疫療法が、抗腫瘍免疫に対する免疫抑制を平衡を混乱させることを探究する。I L - 2 および I F N - などのサイトカインの直接投与を介する免疫刺激の戦略は、少数の患者で中程度の臨床応答がみられるが、重度全身性炎症関連毒性を誘導する (Sharma et al. (2011) Nat. Rev. Cancer 11:805-812)。免疫系は、T 細胞のプログラム細胞死タンパク質 1 (P D - 1)、および、抗原提示細胞 (A P C) および腫瘍細胞両方で発現される同族リガンド、プログラム死 - リガンド 1 (P D - L 1) へのその結合の上方制御などの、自己免疫を制御するいくつかのチェックおよびバランスを進化させている。P D - L 1 の P D - 1 への結合は、C D 8 + T 細胞シグナル伝達経路を妨害し、C D 8 + T 細胞の増殖およびエフェクター機能を傷害し、T 細胞耐性を誘導する。P D - 1 および P D - L 1 は、多数の阻害性「免疫チェックポイント」の 2 例であり、免疫応答の下方制御により機能する。他の阻害性免疫チェックポイントは、細胞毒性 T リンパ球関連タンパク質 4 (C T L A - 4)、シグナル制御タンパク質 (S I R P)、T 細胞活性化の V - ドメイン I g サプレッサー (V I S T A)、プログラム死 - リガンド 2 (P D - L 2)、インドールアミン 2, 3 - ジオキシゲナーゼ (I D O) 1 および 2、リンパ球 - 活性化遺伝子 3 (L A G 3)、G a レクチン - 9、I g および I T I M ドメインを有する T 細胞免疫受容体 (T I G I T)、T 細胞免疫グロブリンおよびムチン - ドメイン含有 - 3 (T I M - 3、A 型肝炎ウイルス細胞受容体 2 (H A V C R 2) としても知られる)、ヘルペスウイルス侵入メディエーター (H V E M)、C D 3 9、C D 7 3、B 7 - H 3 (C D 2 7 6 としても知られる)、B 7 - H 4、C D 4 7、C D 4 8、C D 8 0 (B 7 - 1)、C D 8 6 (B 7 - 2)、C D 1 5 5、C D 1 6 0、C D 2 4 4 (2 B 4)、B - および T リンパ球アテニューエーター (B T L A または C D 2 7 2) および癌胎児性抗原関連細胞接着分子 1 (C E A C A M 1 または C D 6 6 a) を含む。

## 【0241】

10

20

30

40

50

抗PD-1(例えば、ペムブロリズマブ、ニボルマブ)および抗PD-L1(例えば、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ)などの免疫チェックポイントを遮断するよう設計された抗体は、持続的なT細胞アネルギー防止および免疫耐容性破壊が成功している。治療を受けた患者のうち、臨床的な効果が得られるのはごく一部であり、そのような患者はしばしば自己免疫関連の毒性を示す(例えば、Ribas(2015) N. Engl. J. Med. 373:1490-1492; Topalian et al. (2012) N. Engl. J. Med. 366:2443-2454参照)。これは、より有効でありかつ低毒性である、ここに提供される治療の必要性をさらに証明する。

#### 【0242】

他のチェックポイント遮断戦略は、T細胞のCTLA-4の阻害であり、CTLA-4は、CD80またはCD86などのAPC上の共刺激受容体と結合し、阻害し、同じ受容体に、しかし、低親和性で結合する共刺激分化抗原群28(CD28)を打ち負かす。これは、CTLA-4からの阻害性シグナルを伝達し、T細胞活性化を防止しながら、CD28からの刺激シグナルを遮断する(Phan et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100:8372-8377参照)。抗CTLA-4治療(例えば、イピリムマブ)は、一部患者で臨床的成功および持続性があるが、重度免疫関連有害事象のさらに大きな発生を示す(例えば、Hodi et al. (2010) N. Engl. J. Med. 363:711-723; Schadendorf et al. (2015) J. Clin. Oncol. 33:1889-1894参照)。腫瘍は抗免疫チェックポイント抗体に対する耐性を獲得することが示されており、ここに提供されているような、より持続性の抗癌治療の必要性を強調する。

#### 【0243】

##### 2. 養子免疫療法

非炎症性腫瘍をより免疫原性とするための再活性化の追求において、養子細胞治療(ACT)として知られる一群の免疫療法は、免疫細胞を利用し、抗腫瘍活性を有するそれらを再プログラム化する多様な戦略を包含する(Zielinski et al. (2011) Immunol. Rev. 240:40-51)。樹状細胞ベースの治療は、より免疫刺激性の性質を有する遺伝子操作樹状細胞(DC)を導入する。これらの治療は、癌への免疫耐容性の破壊ができないため、成功していない(例えば、Rosenberg et al. (2004) Nat. Med. 12:1279参照)。GVAXとして知られる、DC動員を刺激するための内因性腫瘍抗原および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を含む照射腫瘍細胞全体を使用する方法は、腫瘍耐容性を破壊する能力がないため、同様に臨床で失敗している(Copier et al. (2010) Curr. Opin. Mol. Ther. 12:14-20)。別の自己細胞ベースの治療、シプロイセルT(Provenge)は、2010年、去勢抵抗性前立腺癌に対してFDAで承認された。患者から回収したAPCを利用し、T細胞応答を刺激するための前立腺酸ホスファターゼ(PAP)抗原を発現するよう再武装させ、次いで、リンパ除去後再導入される。残念ながら、観察される客観的応答率が低く、高価なことからその広い適用は制限され、その使用は前立腺癌の早期段階に限定されている(Anassi et al. (2011) P T. 36(4):197-202)。同様に、自己T細胞治療(ATC)は、患者自身のT細胞を回収し、エクスピボで腫瘍耐容性を克服するよう再活性化され、次いで、リンパ除去後患者に導入される。ATCの臨床的成功は限定的であり、黒色腫のみであり、同時に有用性を制限する重度安全性および実現可能性問題を生じる(Yee et al. (2013) Clin. Cancer Res. 19:4550-4552)。

#### 【0244】

キメラ抗原受容体T細胞(CAR-T)治療は、T細胞受容体と抗体Ig可変細胞外ドメインの融合タンパク質を発現するよう再操作されている、患者から採取したT細胞である。これは、抗体の抗原認識性質と活性化T細胞の細胞溶解性質を付与する(Sadelain (2015) Clin. Invest. 125:3392-400)。成功は、致命的免疫関連有害事象という代償を払って、B細胞および造血悪性腫瘍に限定されている(Jackson et al. (2016) Nat. Rev. Clin. Oncol. 13:370-383)。腫瘍はまたCD19(Ruella et al., (2016) Comput Struct Biotechnol J. 14: 357-362)およびEGFRvIII(O'Rourke et al. (2017) Sci Transl Med. Jul. 19; 9(399):eaaa0984)を含む標的抗原による認識



を回避するよう変異もでき、それにより免疫回避を助長する。CAR-T治療は血液系腫瘍の状況で承認されているが、固形腫瘍処置の実現可能性について、相当な障害である固形腫瘍微小環境の高度な免疫抑制性質の克服に直面している。既存のCAR-T治療への多数の付加的修飾が、固形腫瘍に対する実現可能性を提供する可能性のために、必要である(Kakarla, et al. (2014) Cancer J. Mar-Apr; 20(2):151-155)。

#### 【0245】

### 3. 癌ワクチンおよび腫瘍溶解性ウイルス

非炎症性腫瘍は、T細胞および樹状細胞(DC)浸潤を欠き、非T細胞炎症性である(Sharma et al. (2017) Cell 9;168(4):707-723)。非炎症性腫瘍をより免疫原性とするための再活性化の追求において、他のクラスの免疫療法は、天然にまたは操作により腫瘍に蓄積する微生物を利用する。これらは、腫瘍抗原を発現し、それにより腫瘍を排除する免疫系の活性化および再プログラム化をするための免疫系を刺激するよう設計されたウイルスを含む。ウイルスベースの癌ワクチンは、ウイルスベクター自体への既存のまたは後天的免疫および腫瘍抗原での発現のための十分な免疫原性の欠如を含む、多数の因子により臨床的に失敗している(Larocca et al. (2011) Cancer J. 17(5):359-371)。APCの適切なアジュバント活性化の欠如はまたDNAワクチンなどの他の非ウイルスベクター癌ワクチンを妨害する。腫瘍溶解性ウイルスは、健常組織より分裂腫瘍細胞で優先的に複製し、それにより、その後の腫瘍細胞融解が免疫原性腫瘍細胞死およびさらにウイルス伝搬に至る。修飾単純ヘルペスウイルスとDC動員サイトカインGM-CSFの組み合わせを使用する腫瘍溶解性ウイルスタリモジンラヘルパレブベク(T-VEC)は、転移黒色腫に対してFDAで承認されている(Bastin et al. (2016) Biomedicines 4(3):21)。一部黒色腫患者で臨床的利益が示され、他の免疫療法より免疫毒性が少ないが、その有効性は限定的である；遠位腫瘍有効性がなく、他の腫瘍タイプへの広範な適用がない。数ある中で、パラミクソウイルス、レオウイルスおよびピコルナウイルスを利用するような他の腫瘍溶解性ウイルス(OV)ベースのワクチンは、全身抗腫瘍免疫の誘導において同様の限界に遭遇している(Chiocca et al. (2014) Cancer Immunol. Res. 2(4):295-300)。腫瘍溶解性ウイルスの全身投与は、特有の課題がある。IV投与により、ウイルスは容易に希釈され、故に肝毒性をもたらし得る高力価を必要とする。既存の免疫が存在するならば、ウイルスは血中で急速に中和され、その後後天的免疫が反復投与を制限する(Maroun et al. (2017) Future Virol. 12(4):193-213)。

#### 【0246】

ウイルスベースのワクチンベクターおよび腫瘍溶解性ウイルスの制限の中で、最大の制限はウイルス自体であり得る。ウイルス抗原は、腫瘍抗原と比較してヒトT細胞受容体(TCR)に際だって高い親和性を有する(Aleksic et al. (2012) Eur J Immunol. 42(12):3174-3179)。硬度に活性化APCの表面にMHC-1によりウイルスベクター抗原と共に提示される腫瘍抗原は、TCRへの結合について打ち負かされ、抗原特異的抗腫瘍免疫が非常に悪くなる。高親和性T細胞エピトープをそれ自体提供しないここで提供する腫瘍ターゲティング免疫刺激性ベクターは、これらの制限を回避し得る。

#### 【0247】

### D. 細菌癌免疫療法

ここに提供されるのは、腫瘍常在免疫細胞に蓄積され、上皮性または他の細胞に感染しないように修飾された免疫刺激性細菌である。免疫刺激性細菌は、宿主認識プロモーターの制御下、I型IFNの発現をもたらす、サイトゾルDNA/RNAセンサー経路の一部である免疫刺激性タンパク質などの治療産物をコードおよび発現する、プラスミドを含む。それ故に、免疫刺激性細菌は、細菌ゲノムの修飾およびコード化治療産物により、免疫療法を直接腫瘍微小環境に送達する癌治療である。ここに提供する細菌および方法および使用は、他の癌免疫療法で遭遇した先の課題を解決する。I型IFNの発現をもたらすサイトゾルDNA/RNAセンサー経路の一部である免疫刺激性タンパク質は、ここに提供される免疫刺激性細菌の発現に加えて、エクソソーム、リポソーム、腫瘍溶解性ウイルスおよび遺伝子治療ベクターなどの他の送達媒体によりコード化または提供される。

## 【0248】

## 1. 細菌治療

微生物感染に付随する急性炎症は、数世紀にわたる観測に基づいて腫瘍の自然排出と関連づけられている。細菌が抗癌活性を有するとの認識は、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) に感染した患者の腫瘍退縮が数名の医師により観察された1800年代に戻る。William Coleyは、末期癌の処置のための細菌の使用の初めての研究を開始し、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*S. pyogenes*) およびセラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) からなるワクチンを開発した。このワクチンは、肉腫、癌腫、リンパ腫および黒色腫を含む多様な癌の処置への使用で成功した。それ以来、クロストリジウム (*Clostridium*)、マイコバクテリウム、ビフィズス菌 (*Bifidobacterium*)、リステリア、例えばリステリア・モノサイトゲネス (*L. monocytogenes*) およびエシェリキア (*Escherichia*) の種を含む多数の細菌が、抗癌ワクチンの源として研究されている (例えば、公開国際PCT出願WO1999/013053およびWO2001/025399; Bermudes et al. (2002) *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5:194-199; Patyar et al. (2010) *Journal of Biomedical Science* 17:21; およびPawelek et al. (2003) *Lancet Oncol.* 4:548-556参照)。

10

## 【0249】

細菌は動物およびヒト細胞に感染でき、一部は、DNAを細胞のサイトゾルに送達する先天的能力を有する。細菌はまた経口投与でき、インビトロおよびインビボで容易に繁殖し、凍結乾燥状態で保管および輸送できるため、治療剤として適当である。細菌遺伝子は、操作が容易であり、多くの株の完全なゲノムが十分特徴づけされている (Felgner et al. (2016) *mbio* 7(5):e01220-16)。その結果、細菌は、サイトカイン、血管形成阻害剤、毒素およびプロドラッグ変換酵素をコードするものを含む多様な遺伝子の送達および発現に使用されている。例えば、サルモネラは、腫瘍処置のためにIL-18 (Loeffler et al. (2008) *Cancer Gene Ther.* 15(12):787-794)、LIGHT (Loeffler et al. (2007) *PNAS* 104(31):12879-12883) および Fasリガンド (Loeffler et al. (2008) *J. Natl. Cancer Inst.* 100:1113-1116) などの免疫刺激分子を発現するために使用されている。細菌ベクターはまたウイルスベクターより安価かつ製造が容易であり、細菌送達は、必要であれば、抗生物質により迅速に排除され得て、安全な代替案となるため、ウイルス送達より好都合である。

20

30

## 【0250】

しかしながら、使用するためには、株は病原性でなく、または治療剤として使用するために、修飾後に病原性ないべきである。例えば、癌の処置において、治療細菌株は、全身性疾患および/または敗血症性ショックを引き起こさないために弱毒化または十分に非毒性とし、なお腫瘍に有効にコロニー形成するために一定レベルの感染性を維持すべきである。直接殺腫瘍性効果を誘発するおよび/または殺腫瘍性分子を送達するための抗腫瘍剤として使用される遺伝子修飾細菌が記載されている (Clairmont, et al. (2000) *J. Infect. Dis.* 181:1996-2002; Bermudes, D. et al. (2002) *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5:194-199; Zhao, M. et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:755-760; Zhao, M. et al. (2006) *Cancer Res.* 66:7647-7652)。これらに含まれるのは生物工学によって作られたネズミチフス菌 (*S. typhimurium*) の株である。これらの細菌は、正常組織より腫瘍に優先的に $> 1,000$ 倍多く蓄積し、腫瘍組織に均一に分散する (Pawelek, J. et al. (1997) *Cancer Res.* 57:4537-4544; Low, K. B. et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:37-41)。優先的複製により、細菌は、正常組織への毒性を最小化しながら、腫瘍内で直接高濃度で多様な抗癌治療剤を産生および送達できる。これらの弱毒化細菌は、静脈内投与したとき、マウス、ブタおよびサルで安全であり (Zhao, M. et al. (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102:755-760; Zhao, M. et al. (2006) *Cancer Res* 66:7647-7652; Tjuvajev J. et al. (2001) *J. Control Release* 74:313-315; Zheng, L. et al. (2000) *Oncol. Res.* 12:127-135)、ある生存弱毒化サルモネラ株は、ヒト臨床試験で経口投与後忍容性

40

50

が良好であることが示されている(Chatfield, S. N. et al. (1992) *Biotechnology* 10:888-892; DiPetrillo, M. D. et al. (1999) *Vaccine* 18:449-459; Hohmann, E. L. et al. (1996) *J. Infect. Dis.* 173:1408-1414; Sirard, J. C. et al. (1999) *Immunol. Rev.* 171:5-26)。ネズミチフス菌 *phoP / phoQ* オペロンは、膜関連センサーキナーゼ (*PhoQ*) およびサイトゾル転写レギュレーターからなる、典型的細菌 2 成分制御システムである(*PhoP*: Miller, S. I. et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5054-5058; Groisman, E. A. et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7077-7081)。*PhoP / phoQ* は病原性に必要であり、その欠失は、マクロファージにおけるこの細菌の生存を不十分とし、マウスおよびヒトにおける顕著な弱毒化をもたらす(Miller, S. I. et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5054-5058; Groisman, E. A. et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7077-7081; Galan, J. E. and Curtiss, R. III. (1989) *Microb Pathog* 6:433-443; Fields, P. I. et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:51)。*PhoP / phoQ* 欠失株は有効なワクチン送達媒体として用いられている(Galan, J. E. and Curtiss, R. III. (1989) *Microb Pathog* 6:433-443; Fields, P. I. et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5189-5193; Angelakopoulos, H. and Hohmann, E. L. (2000) *Infect Immun* 68:2135-2141)。弱毒化サルモネラ属菌 (*Salmonellae*) は、殺腫瘍性タンパク質の標的化送達に使用されている(Bermudes, D. et al. (2002) *Curr Opin Drug Discov Devel* 5:194-199; Tjuvajev J. et al. (2001) *J Control Release* 74:313-315)。

10

20

#### 【0251】

細菌ベースの癌治療の臨床的利益は限定的であることが示されている。ノービー菌 (*Clostridium novyi*) (Dang et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(26):15155-15160; 米国特許公開 2017/0020931 および 2015/0147315; および米国特許 7,344,710 および 3,936,354)、ウシ型結核菌 (*Mycobacterium bovis*) (米国特許公開 2015/0224151 および 2015/0071873)、ビフィドバクテリウム・ビフィドゥム (*Bifidobacterium bifidum*) (Kimura et al. (1980) *Cancer Res.* 40:2061-2068)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) (Yasutake et al. (1984) *Med Microbiol Immunol.* 173(3):113-125)、リステリア・モノサイトゲネス (Le et al. (2012) *Clin. Cancer Res.* 18(3):858-868; Starks et al. (2004) *J. Immunol.* 173:420-427; 米国特許公開 2006/0051380) および大腸菌 (*Escherichia coli*) (米国特許 9,320,787) を含む多様な細菌種は、抗癌治療のための可能性のある薬剤として研究されている。

30

40

#### 【0252】

例えば、カルメット・ゲラン桿菌 (*BCG*) 株は、ヒトにおける膀胱癌の処置に承認され、膀胱内化学療法よりも有効であり、しばしば第一選択処置として使用される (Gardlik et al. (2011) *Gene therapy* 18:425-431)。他のアプローチは、マウスにおいて発現された腫瘍抗原に対して惹起される強力な  $CD8^+$  T 細胞を誘導できる生存弱毒化細胞内細菌であるリステリア・モノサイトゲネスである (Le et al. (2012) *Clin. Cancer Res.* 18(3):858-868)。腫瘍抗原メソテリンを取り込むリステリアベースのワクチンの臨床試験において、プライム・ブーストアプローチで同種膵臓癌ベースの *GVAX* ワクチンと合わせて、進行型膵臓癌を有する患者で 6.1 カ月の中央生存が示され、対して、*GVAX* ワクチン単独で処置された患者の中央生存は 3.9 カ月であった (Le et al. (2015) *J. Clin. Oncol.* 33(12):1325-1333)。これらの結果は大規模フェーズ 2 b 治験で再現されず、おそらくメソテリンなどの低親和性自己抗原に対する免疫を誘導する試みの難しさを示す。

#### 【0253】

細菌株は、ここに記載するとおり修飾され得る。株は弱毒化できまたは細胞標的を、標準的方法および/または遺伝子の欠失または修飾および、細菌をインビボで、主に、TME、腫瘍細胞、腫瘍常在免疫細胞および固形腫瘍などの免疫特権環境で増殖可能とする遺伝

50

子の変更または導入により修飾し得る。ここに記載する修飾のための出発株は、例えば、シゲラ、リステリア、大腸菌、ピフィドバクテリアおよびサルモネラから選択され得る。例えば、ソンネ赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、志賀赤痢菌、リステリア・モノサイトゲネス、チフス菌、ネズミチフス菌、トリチフス菌およびゲルトネル菌。他の適当な細菌種は m リケッチア、クレブシエラ、ボルデテラ、ナイセリア、エロモナス、フランシセラ、コリネバクテリウム、サイトロバクター、クラミジア、ヘモフィルス、ブルセラ、マイコバクテリウム、マイコプラズマ、レジオネラ、ロドコッカス、シュードモナス、ヘリコバクター、ビブリオ、バシラスおよびエリジペロスリックスを含む。例えば、斑点熱リケッチア、発疹チフスリケッチア、ツツガムシ病リケッチア、発疹熱リケッチア、リケッチア・シビリカ、気管支敗血症菌、髄膜炎菌、淋菌、エロモナス・オイクレノフィラ、エロモナス・サルモニシダ、野兎病菌、ヒツジ偽結核菌、サイトロバクター・フレウンディイ、肺炎クラミジア、ヘモフィルス・ソムナス、ウシ流産菌、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ、在郷軍人病菌、ロドコッカス・エクイ、緑膿菌、ヘリコバクター・ムステラエ、コレラ菌、枯草菌、ブタ丹毒菌、エルシニア・エンテロコリティカ、ロシャリメア・クインターナおよびアグロバクテリウム・ツメルファシウム。免疫刺激性を含む何らかの治療用に知られる細菌は、ここに記載するとおり修飾され得る。

10

#### 【 0 2 5 4 】

##### 2. 細菌およびウイルスに対する免疫応答の比較

ウイルスなどの細菌は、天然に免疫刺激性である利点を有する。細菌およびウイルスは、宿主細胞パターン認識受容体 (P R R) により感知される、病原体関連分子パターン (P A M P) として知られる保存構造を含む。P R R による P A M P の認識は、下流シグナル伝達カスケードを誘導し、これはサイトカインおよびケモカインの誘導および病原体排除に至る免疫応答の開始をもたらす (Iwasaki and Medzhitov (2010) Science 327(5963):291-295)。自然免疫系が P A M P により結合される方法およびどのタイプの感染因子由来かは、侵入病原体と闘う適切な適応免疫応答を決定する。

20

#### 【 0 2 5 5 】

T o l l 様受容体 (T L R) として知られる P R R クラスは、細菌およびウイルス起源由来の P A M P を認識し、細胞内の種々の区画に位置する。T L R は、リポ多糖 (T L R 4)、リポタンパク質 (T L R 2)、フラジェリン (T L R 5)、DNA における非メチル化 C p G モチーフ (T L R 9)、二本鎖 RNA (T L R 3) および一本鎖 RNA (T L R 7 および T L R 8) を含む、一定範囲のリガンドと結合する (Akira et al. (2001) Nat. Immunol. 2(8):675-680; Kawai and Akira (2005) Curr. Opin. Immunol. 17(4):338-344)。例えば、ネズミチフス菌の宿主監視は、大部分 T L R 2、T L R 4 および T L R 5 を介して媒介される (Arpaia et al. (2011) Cell 144(5):675-688)。これらの T L R は、M y D 8 8 および T R I F アダプター分子を介してシグナル伝達し、T N F -、I L - 6 および I F N - などの N F - B 依存的炎症促進性サイトカインの誘導に介在する (Pandey et. al. (2015) Cold Spring Harb Perspect Biol 7(1):a016246)。

30

#### 【 0 2 5 6 】

P R R の他のカテゴリーは、n o d 様受容体 (N L R) ファミリーである。これらの受容体は宿主細胞のサイトゾルに存在し、細胞内 P A M P を認識する。例えば、ネズミチフス菌フラジェリンは、感染マクロファージのパイロプトーシス細胞死に至る、カスパーゼ - 1 開裂および炎症促進性サイトカイン I L - 1 および I L - 1 8 の誘導をもたらす、N L R C 4 / N A I P 5 インフラマソーム経路を活性化することが示された (Fink et al. (2007) Cell Microbiol. 9(11):2562-2570)。

40

#### 【 0 2 5 7 】

T L R 2、T L R 4、T L R 5 およびインフラマソームの関与は、細菌排除を誘導する炎症促進性サイトカインを媒介するが、抗腫瘍免疫に必要な D C および C D 8 + T 細胞ではなく、主に好中球、マクロファージおよび C D 4 + T 細胞の動員および活性化をもたらす N F - B 駆動シグナル伝達カスケードを活性化する (Liu et al. (2017) Signal Transduct Target Ther. 2:e17023)。C D 8 + T 細胞介在抗腫瘍免疫を活性化するため

50

に、IRF3/IRF7依存性I型インターフェロンシグナル伝達は、CD8+T細胞ブライミングのためのDC活性化および腫瘍抗原交差提示に重要である(Diamond et al. (2011) J. Exp. Med. 208(10):1989-2003; Fuertes et al. (2011) J. Exp. Med. 208(10):2005-2016)。I型インターフェロン(IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ )は、2つの異なるTLR依存性およびTLR非依存的シグナル伝達経路により誘導されるシグネチャーサイトカインである。IFN- $\alpha$ を誘導するためのTLR依存性経路は、病原体のエンドサイトーシス後に生じ、それによりTLR3、7、8および9は、エンドソーム内の病原体由来DNAおよびRNA要素を検出する。TLR7および8は、ウイルスヌクレオチドおよびヌクレオチドを認識し、レシキモドおよびイミキモドなどのそれらの合成アゴニストが臨床的に評価されている(Chi et al. (2017) Frontiers in Pharmacology 8:304)。ポリイノシン・ポリシチジン酸(ポリ(I:C))およびRNAse消化に耐えるようポリリシンを用いて製剤化したアナログであるポリICLCなどの合成dsRNAは、TLR3およびMDA5経路のアゴニストであり、IFN- $\alpha$ の強力なインデューサーである(Caskey et al. (2011) J. Exp. Med. 208(12):2357-66)。ウイルスおよび細菌DNAに存在するエンドソームCpGモチーフのTLR9検出は、IRF3を介してIFN- $\alpha$ も誘導する。さらに、TLR4は、IRF3のMyD88非依存的TRIF活性化を介してIFN- $\alpha$ を誘導することが示されている(Owen et al. (2016) mBio.7:1 e02051-15)。その後、DCのTLR4活性化はI型IFN非依存的であることが示され、故に、I型IFNを介してDCを活性化するTLR4の能力は、生物学的に関連する可能性はない(Hu et al. (2015) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112(45):13994-13999)。さらに、TLR4シグナル伝達は、CD8+T細胞を直接動員または活性化することは示されていない。

10

20

#### 【0258】

TLR非依存的I型IFN経路の中で、一つは、サイトゾルにおける一本鎖(ss)および二本鎖(ds)RNAが介在する宿主認識である。これらは、レチノイン酸誘導性遺伝子I(RIG-I)、黒色腫分化関連遺伝子5(MDA-5)を含むRNAヘリカーゼにより、およびIRF-3転写因子のIFN- $\alpha$ プロモータ刺激因子1(IPS-1;ミトコンドリア抗ウイルス-シグナル伝達タンパク質またはMAVSとしても知られる)アダプタータンパク質介在リン酸化を介して感知され、IFN- $\alpha$ の誘導をもたらす(Ireton and Gale (2011) Viruses 3(6):906-919)。合成RIG-I結合要素はまたU6プロモーター転写開始部位のAAジヌクレオチド配列の形で、一般的レンチウイルスshRNAベクターにおいても意図せずに発見されている。プラスミドにおけるその後の欠失は、標的外I型IFN活性化の混乱を阻止した(Pebernard et al. (2004) Differentiation. 72:103-111)。

30

#### 【0259】

第二タイプのTLR非依存的I型インターフェロン誘導経路は、現在、感染性病原体または異常宿主細胞損傷からのサイトゾルdsDNAを感知する中央メディエーターとして認識されている、サイトゾルER常在アダプタータンパク質であるインターフェロン刺激物質(STING)を介して介在される(Barber (2011) Immunol. Rev 243(1):99-108)。STINGシグナル伝達は、TANK結合キナーゼ(TBK1)/IRF3軸およびNF- $\kappa$ Bシグナル伝達軸を活性化し、IFN- $\alpha$ ならびに自然免疫および適応免疫を強力に活性化する他の炎症促進性サイトカインおよびケモカインの誘導をもたらす(Burdette et al. (2011) Nature 478(7370):515-518)。STINGを介するサイトゾルdsDNAの感知は、dsDNAに直接結合する、宿主細胞ヌクレオチジルトランスフェラーゼである環状GMP-AMPシターゼ(cGAS)を必要とし、応答して、STINGに結合し、活性化する環状ジヌクレオチド(CDN)第二メッセンジャー、環状GMP-AMP(cGAMP)を合成する(Sun et al. (2013) Science 339(6121):786-791; Wu et al. (2013) Science 339(6121):826-830)。細胞内リステリア・モノサイトゲネスから産生されたc-ジ-AMPなどの細菌由来CDNはマウスSTINGに直接結合できるが、5つのヒトSTINGアレル中3つのみにしか結合できない。2

40

50

つのプリンヌクレオシドが 3' - 3' 結合のリン酸架橋により結合している細菌により産生される CDN と異なり、哺乳動物 c G A S により合成された c G A M P のヌクレオチド間リン酸架橋は、非標準的 2' - 3' 結合により結合する。これらの 2' - 3' 分子は、細菌 3' - 3' CDN より 300 倍良好な親和性で S T I N G に結合し、故に、ヒト S T I N G のより強力な生理学的リガンドである(例えば、Civril et al. (2013) Nature 498(7454):332-337; Diner et al. (2013) Cell Rep. 3(5):1355-1361; Gao et al. (2013) Sci. Signal 6(269):pl1; Ablasser et al. (2013) Nature 503(7477):530-534 参照)。

#### 【0260】

ヒトにおける c G A S / S T I N G シグナル伝達経路は、細菌病原体よりウイルス病原体に優先的に応答するよう進化しており、これは、先の宿主腫瘍抗原を担持する細菌ワクチンがヒトで CD8 + T 細胞プライミングベクターとして不十分であったかを説明し得る。慣用の DC からの S T I N G 依存性 I 型 I F N シグナル伝達による CD8 + T 細胞の T L R 非依存的活性化は、ウイルスが検出される一次機構であり、形質細胞様 DC による T L R 依存性 I 型 I F N 産生と共に、S T I N G 経路がウイルス性に不活性化されているときのみ作動する(Hervas-Stubbs et al. (2014) J. Immunol. 193:1151-1161)。さらに、ネズミチフス菌などの細菌について、T L R 4 を介する I F N - の誘導は可能であるが、CD8 + T 細胞は、排除または保護的免疫を誘導せずまたは必要でもない(Le e et al. (2012) Immunol Lett. 148(2): 138-143)。ネズミチフス菌を含む多くの細菌株で生理学的に関連する CD8 + T エピトープがないことは、細菌ワクチン開発およびその後の感染に対する保護的免疫を、同じ遺伝子株由来でも妨害した(Lo et al. (1999) J. Immunol. 162:5398-5406)。細菌ベースの癌免疫療法は、I 型 I F N が、腫瘍抗原交差提示および持続性抗腫瘍免疫促進に必要な、CD8 + T 細胞の動員および活性化を誘導する能力により生物学的に制限される。しかしながら、ここに提供される免疫刺激性細菌は、この課題を解決するよう操作された。ここに提供される免疫刺激性細菌は、T L R 依存性細菌免疫シグナル伝達ではなく、優先的に CD8 + T 細胞介在抗腫瘍免疫を誘導する、ウイルス様 T L R 非依存的 I 型 I F N シグナル伝達を含む。

#### 【0261】

S T I N G は、サイトゾルにおける核酸を感知する応答において自然免疫を活性化する。下流シグナル伝達は、サイトゾル ds DNA への結合に応答して細菌または宿主酵素 c G A S により合成される、CDN の結合を介して活性化される。細菌が産生する CDN と宿主が産生する CDN のリン酸架橋構造は異なり、これにより S T I N G を活性化する能力が異なる。I F N - は、活性化 S T I N G のシグネチャーサイトカインであり、細菌性に誘導される I F N ではなく、ウイルス性に誘導される I 型 I F N であり、有効な CD8 + T 細胞介在抗腫瘍免疫に必要である。ここに提供される免疫刺激性細菌は、S T I N G アゴニストであるものおよび S T I N G を発現するものを含む。

#### 【0262】

##### 3. サルモネラ治療

サルモネラは、癌治療剤として使用できる細菌属の例である。ここで例示されるサルモネラは、弱毒化種またはここに記載する修飾により、癌治療剤としての使用のために、毒性が低減されているものである。

#### 【0263】

##### a. 腫瘍指向性細菌

多数の細菌種が、遠位部位から注射されたとき、固形腫瘍内での優先的複製を示している。これらは、サルモネラ種、ピフィズス菌(Bifodobacterium)、クロストリジウム(Clostridium)およびエシェリキアを含むが、これらに限定されない。細菌の天然の腫瘍帰巢性質と、細菌感染に対する宿主の自然免疫応答の組み合わせは、抗腫瘍応答を媒介すると考えられる。この腫瘍組織向性は、種々の程度まで腫瘍のサイズを減少することが示されている。これらの細菌種の腫瘍向性に対する寄与因子は、無酸素または低酸素環境で複製する能力である。多数のこれらの天然に腫瘍指向性細菌は、抗腫瘍応答効力を増加する

ためにさらに操作されている(Zu et al. (2014) Crit Rev Microbiol. 40(3):225-235; and Felgner et al. (2017) Microbial Biotechnology 10(5):1074-1078にレビュー)。

#### 【0264】

##### b. ネズミチフス菌

ネズミチフス菌は、抗癌治療剤として使用される細菌種の例である。細菌を癌に対する宿主免疫刺激に使用するアプローチは、腫瘍微小環境を含む体の低酸素および壊死性領域に優先的に蓄積するグラム陰性通性嫌気性生物ネズミチフス菌を介するものである。ネズミチフス菌は、組織壊死からの栄養素の利用可能性、漏れやすい腫瘍脈管構造および免疫系回避腫瘍微小環境で生存する可能性の増加により、これら環境に蓄積する(Baban et al. (2010) Bioengineered Bugs 1(6):385-394)。ネズミチフス菌は有酸素および無酸素両者の条件下で生存可能である；それ故に、あまり低酸素ではない小腫瘍およびより低酸素である大腫瘍にコロニー形成できる。

#### 【0265】

ネズミチフス菌は、糞口経路により伝播される、グラム陰性、通性病原体である。局在化消化器感染を引き起こし得るだけでなく、経口摂取後血流およびリンパ系に入り、肝臓、脾臓および肺などの全身性組織に感染する。野生型ネズミチフス菌の全身投与はTNF- $\alpha$ 誘導を過剰刺激し、処置しなければ、致命的であり得るサイトカインカスケードおよび敗血症性ショックに至る。その結果、ネズミチフス菌などの病原性細菌株は、効率的に腫瘍組織にコロニー形成する能力を完全に抑制することなく、全身性感染を防止するために弱毒化しなければならない。弱毒化は、しばしば細菌外膜などの免疫応答を誘導し得る細胞構造の変異または補助的栄養素非存在下での複製能力の制限により達成される。

#### 【0266】

ネズミチフス菌は、マクロファージなどの骨髄細胞により迅速に取り込まれ、または上皮細胞などの非食細胞における自身の取り込みを誘導できる細胞内病原体である。細胞内に入ったら、サルモネラ含有液胞(SCV)内で複製でき、また一部上皮細胞のサイトゾルに回避し得る。ネズミチフス菌病原性の分子決定因子の多くが同定されており、遺伝子はサルモネラ病原性島(SPI)にクラスター化されている。二つの最も特徴づけられた病原性島は、非食細胞の細菌侵襲の介在を担うSPI-1およびSCV内での複製に必要なSPI-2である(Agbor and McCormick (2011) Cell Microbiol. 13(12):1858-1869)。これらの病原性島の両者は、宿主膜を超えてエフェクタータンパク質を転座できるタイプ3分泌系(T3SS)と称される巨大分子構造をコードする(Galan and Wolf-Watz (2006) Nature 444:567-573)。

#### 【0267】

##### c. 細菌弱毒化

癌処置剤として投与するための治療細菌は、疾患を引き起こさないように修飾されなければならない。これを達成するための種々の方法は、当分野で知られる。例えば、細菌が必須栄養素を合成することを不可能とする、栄養要求性変異およびaro、pur、gua、thy、nadおよびasdなどの遺伝子における欠失/変異(米国特許公開2012/0009153)は、広範に使用される。これらの遺伝子が関与するにより産生される栄養素は、しばしば宿主細胞で入手不可能であり、そのため、細菌生存は挑戦的である。例えば、サルモネラおよび他の種の弱毒化は、芳香族アミノ酸生合成への解糖に接続する、シキミ酸経路の一部であるaroA遺伝子の欠失により達成され得る(Felgner et al. (2016) mBio 7(5):e01220-16)。aroAの欠失は、それ故に芳香族アミノ酸に対する細菌栄養要求性およびその後の弱毒化をもたらす(米国特許公開2003/0170276、2003/0175297、2012/0009153および2016/0369282；国際出願公開WO2015/032165およびWO2016/025582)。同様に、aroCおよびaroDを含む芳香族アミノ酸の生合成経路における他の酵素は、弱毒化を達成するために欠失されている(米国特許公開2016/0369282；国際出願公開WO2016/025582)。例えば、ネズミチフス菌株L7207は

、芳香族アミノ酸栄養要求株 (*aroA* - 変異体) であり；株 A1 および A1 - R はロイシン - アルギニン栄養要求株である。VNP20009 は、プリン栄養要求株 (*purI* - 変異体) である。ここに示すとおり、免疫抑制性ヌクレオシドアデノシンに対する栄養要求性でもある。

#### 【0268】

細菌を弱毒化するための変異は、*rfaL*、*rfaG*、*rfaH*、*rfaD*、*rfaP*、*rFb*、*rfa*、*msbB*、*htrB*、*firA*、*pagL*、*pagP*、*lpxR*、*arnT*、*eptA* および *lpxT* などのリポ多糖生合成を変える遺伝子の変異；*sacB*、*nuk*、*hok*、*gef*、*kil* または *phlA* などの自殺遺伝子を導入する変異；*hly* および *cly* などの細菌融解遺伝子を導入する変異；*isyA*、*pag*、*prg*、*iscA*、*virG*、*plc* および *act* などの病原性因子における変異；*recA*、*htrA*、*htpR*、*hsp* および *groEL* などのストレス応答を修飾する変異；*min* などの細胞周期を破壊する変異；および *cya*、*crp*、*phoP* / *phoQ* および *ompR* などの制御機能を破壊または不活性化する変異を含むが、これらに限定されない(米国特許公開 2012/0009153、2003/0170276、2007/0298012；米国特許 6,190,657；国際出願公開 WO 2015/032165；Felgner et al. (2016) *Gut Microbes* 7(2):171-177；Broadway et al. (2014) *J. Biotechnology* 192:177-178；Frahm et al. (2015) *mBio* 6(2):e00254-15；Kong et al. (2011) *Infection and Immunity* 79(12):5027-5038；Kong et al. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(47):19414-19419)。理想的には、遺伝的弱毒化は、病原性表現型への復帰をもたらす自発的代償性変異を阻止するために、点変異ではなく遺伝子欠失を含む。

10

20

#### 【0269】

##### i. *msbB* - 変異体

ネズミチフス菌において *msbB* 遺伝子によりコードされる酵素リポド A 生合成ミリスチルトランスフェラーゼは、リポ多糖 (LPS) のリポド A ドメインへの末端ミリスチル基の付加を触媒する (Low et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17(1):37-41)。故に、*msbB* の欠失は、グラム陰性細菌外膜の主成分である、LPS のリポド A ドメインのアシル組成を変える。この修飾は、LPS が敗血症性ショックを誘導する能力を顕著に低減し、細菌株を弱毒化し、TNF の有害な可能性のある産生を低減し、そうして、全身性毒性を低減する。ネズミチフス菌 *msbB* 変異体は、マウスで他の組織よりも腫瘍に優先的にコロニー形成する能力を維持し、抗腫瘍活性を保持し、そうして、サルモネラベースの免疫療法の治療指数を高める (例えば、米国特許公開 2003/0170276、2003/0109026、2004/0229338、2005/0255088 および 2007/0298012 参照)。

30

#### 【0270】

例えば、ネズミチフス菌株 VNP20009 における *msbB* の欠失は、天然ヘキサアシル化 LPS より低毒性であるペンタアシル化 LPS の優勢な産生をもたらし、毒素ショックを誘導することなく、全身性送達が可能となる (Lee et al. (2000) *International Journal of Toxicology* 19:19-25)。病原性を劇的に低減し、低毒性を提供し、高用量での投与を可能とする他の LPS 変異は、サルモネラ株を含むここに提供される細菌株に導入され得る。

40

#### 【0271】

##### ii. *purI* - 変異体

プリン (例えば、アデニン)、ヌクレオシド (例えば、アデノシン) またはアミノ酸 (例えば、アルギニン および ロイシン) などの 1 以上の必須栄養素に対して栄養要求性とするにより弱毒化され得る免疫刺激性細菌が用いられる。特に、ネズミチフス菌などのここに提供される免疫刺激性細菌の実施態様において、細菌は、腫瘍微小環境に優先的に蓄積するアデノシンに対する栄養要求性とされる。それ故に、ここに記載される免疫刺激性細菌の株は、増殖にアデノシンを必要とし、下記のとおり、アデノシンが豊富な TME に優先

50



的にコロニー形成するため、弱毒化される。

【0272】

*pur I* 遺伝子 (*pur M* 遺伝子と同義) によりコードされる酵素であるホスホリボシルアミノイミダゾールシンターゼは、プリン<sup>1</sup>の生合成経路に關与する。故に、*pur I* 遺伝子の破壊は、細菌をプリンに対して栄養要求性とする。弱毒化に加えて、*pur I* - 変異体は、腫瘍環境で濃縮され、相当な抗腫瘍活性を有する (Pawelek et al. (1997) *Cancer Research* 57:4537-454)。このコロニー形成は、迅速な細胞代謝回轉の結果として、腫瘍の間質液に存在するプリンが高濃度であることによりもたらされると以前に記載された。*pur I* - 細菌がプリンの合成ができないため、アデニンの外部供給源を必要とし、これがプリン富化腫瘍微小環境に限定された増殖をもたらすと考えられた (Rosenberg et al. (2002) *J. Immunotherapy* 25(3):218-225)。VNP 20009 株は、当初は *pur I* 遺伝子の欠失を含むと報告されたが (Low et al. (2003) *Methods in Molecular Medicine* Vol. 90, *Suicide Gene Therapy*:47-59)、その後の VNP 20009 のゲノム全体の分析は、*pur I* 遺伝子が欠失しているのではなく、染色体位により破壊されたことを示した (Broadway et al. (2014) *Journal of Biotechnology* 192:177-178)。遺伝子全体は、挿入配列により隣接された、VNP 20009 染色体の二つの部分内に含まれる (その一方はアクティブなトランスポザゼを有する)。

10

【0273】

ここで、*pur I* 変異体ネズミチフス菌株が、腫瘍微小環境で高度に豊富なヌクレオシドアデノシンに対して栄養要求性であることが示される。それ故に、VNP 20009 を使用したとき、アデノシン栄養要求性を達成するために、何らかのさらなる修飾を導入する必要はない。他の株および細菌について、*pur I* 遺伝子を、VNP 20009 におけるように破壊できまたは野生型遺伝子への復歸を阻止するために、*pur I* 遺伝子の全てまたは一部の欠失を含み得る。

20

【0274】

iii. 弱毒化変異の組み合わせ

染色体の異なる領域における遺伝子欠失の手段により複数の遺伝的弱毒化を伴う細菌は、野生型遺伝子材料との相同組み換えによる遺伝子の獲得による病原性表現型への復歸の可能性を低減しながら、弱毒化が増加され得るため、細菌免疫療法に望ましい。相同組み換えによる病原性の復活は、同じ生物で2つの別々の組み換え事象が生じる必要がある。理想的には、免疫療法剤における使用のために選択された弱毒化変異の組み合わせは、効力を落とすことなく忍容性を増加させ、それにより治療指数を増加させる。

30

【0275】

例えば、下記のとおり、ネズミチフス菌株 VNP 20009 における *msb B* および *pur I* 遺伝子の破壊が、腫瘍ターゲティングおよび増殖抑制のために使用されており、動物モデルにおいて低毒性が誘導される (Clairmont et al. (2000) *J. Infect. Dis.* 181:1996-2002; Bermudes et al. (2000) *Cancer Gene Therapy: Past Achievements and Future Challenges*, edited by Habib Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 57-63; Low et al. (2003) *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 90, *Suicide Gene Therapy*:47-59; Lee et al. (2000) *International Journal of Toxicology* 19:19-25; Rosenberg et al. (2002) *J. Immunotherapy* 25(3):218-225; Broadway et al. (2014) *J. Biotechnology* 192:177-178; Loeffler et al. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(31):12879-12883; Luo et al. (2002) *Oncology Research* 12:501-508)。しかしながら、VNP 20009 は、ヒト治療で同じ腫瘍蓄積および抗腫瘍活性を示さない。故に、何らかの抗腫瘍活性が現れるために必要である高用量は、毒性のために不可能である。治療指数を改善する望ましい性質で、とりわけ、例えば、病原性を低減する、忍容性を増加する、上皮性(および他の非免疫)細胞の細菌感染を低減または排除する、腫瘍常在免疫細胞における蓄積を増加するおよび腫瘍常在免疫細胞の細胞死を減少する、遺伝子修飾の組み合わせを含むここに提供される免疫刺激性細菌は、この課題に取り組む。

40

50

## 【 0 2 7 6 】

iv. VNP 20009 および他の弱毒化ネズミチフス菌株

ここに記載するとおり修飾され得る治療細菌の例は、VNP 20009 (ATCC # 202165, YS1646) と命名された株である。臨床候補、VNP 20009 (ATCC # 202165, YS1646) は、msbB および purI 両遺伝子の欠失により、安全性のために少なくとも 50,000 倍弱毒化された (Clairmont et al. (2000) J. Infect. Dis. 181:1996-2002; Low et al. (2003) Methods in Molecular Medicine, Vol. 90, Suicide Gene Therapy:47-59; Lee et al. (2000) International Journal of Toxicology 19:19-25)。弱毒化された類似のサルモネラの株も考慮される。上記のとおり、msbB の欠失は、グラム陰性細菌外膜の主成分であるリポ多糖のリポドAドメインの組成を変える (Low et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17(1):37-41)。これは、TNF の有害な可能性のある産生を低減しながら、リポ多糖誘導敗血症性ショックを阻止し、細菌株を弱毒化し、全身性毒性を低減する (Low et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17(1):37-41)。purI 遺伝子の欠失は、細菌をプリンに対して栄養要求性とし、これは、さらに細菌を弱毒化し、腫瘍微小環境に濃縮させる (Pawelek et al. (1997) Cancer Res. 57:4537-4544; Broadway et al. (2014) J. Biotechnology 192:177-178)。

10

## 【 0 2 7 7 】

腫瘍における VNP 20009 の蓄積は、親株、ATCC #14028 の固有の侵襲性、低酸素環境で複製する能力および腫瘍の間質液に存在する高濃度のプリンに対する要求を含む因子の組み合わせに起因する。ここでは、VNP 20009 が腫瘍微小環境に病的レベルで蓄積され、免疫抑制性腫瘍微小環境に寄与する、ヌクレオシドアデノシンに対しても栄養要求性であることも示される (Peter Vaupel and Arnulf Mayer Oxygen Transport to Tissue XXXVII, Advances in Experimental Medicine and Biology 876 chapter 22, pp. 177-183)。VNP 20009 が同系またはヒト異種移植腫瘍を担持するマウスに投与されたとき、細菌は、300 ~ 1000 : 1 を超える比で腫瘍の細胞外成分内に優先的に蓄積し、TNF 誘導を低減し、対照マウスと比較して、腫瘍増殖阻害および長期生存を示した (Clairmont et al. (2000) J. Infect. Dis. 181:1996-2002)。しかしながら、ヒトにおけるフェーズ I 臨床試験結果は、VNP 20009 が比較的安かつ忍容性が良好であるもの、ヒト黒色腫瘍への不十分な蓄積が観察され、抗腫瘍活性はほとんど示されなかった (Toso et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(1):142-152)。何らかの抗腫瘍活性を発揮するために必要であろう高用量は、高レベルの炎症促進性サイトカインと相関する毒性により不可能であった。

20

30

## 【 0 2 7 8 】

例えば、ロイシン - アルギニン栄養要求株 A - 1 (Zhao et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102(3):755-760; Yu et al. (2012) Scientific Reports 2:436; 米国特許 8,822,194; 米国特許公開 2014/0178341) およびその誘導体 AR - 1 (Yu et al. (2012) Scientific Reports 2:436; Kawaguchi et al. (2017) Oncotarget 8(12):19065-19073; Zhao et al. (2006) Cancer Res. 66(15):7647-7652; Zhao et al. (2012) Cell Cycle 11(1):187-193; Tome et al. (2013) Anticancer Research 33:97-102; Murakami et al. (2017) Oncotarget 8(5):8035-8042; Liu et al. (2016) Oncotarget 7(16):22873-22882; Binder et al. (2013) Cancer Immunol Res. 1(2):123-133); aroA - 変異体ネズミチフス菌株 L7207 (Guo et al. (2011) Gene therapy 18:95-105; 米国特許公開 2012/0009153、2016/0369282 および 2016/0184456) およびその偏性嫌気性誘導体 YB1 (国際出願公開 WO 2015/032165; Yu et al. (2012) Scientific Reports 2:436; Leschner et al. (2009) PLoS ONE 4(8):e6692); SL1344 (野生型) の誘導体である株 aroA - / aroD - 変異体ネズミチフス菌株 BRD509 (Yoon et al. (2017) European J. of Cancer 70:48-61); asd - / cya - / crp - 変異体ネズミチフス菌株 4550 (

40

50

Sorenson et al. (2010) *Biologics: Targets & Therapy* 4:61-73)および p h o P - / p h o Q - ネズミチフス菌株 L H 4 3 0 (国際出願公開 W O 2 0 0 8 / 0 9 1 3 7 5)などの、ネズミチフス菌の他の株を、腫瘍標的化送達および治療に使用し得る。

【 0 2 7 9 】

株 V N P 2 0 0 0 9 は、進行型黒色腫を有する患者が関与する治験で臨床的利益を示すことができなかったが、処置は、進行型癌患者に安全に投与された。最大耐用量 (M T D) が確立された。それ故に、この株および他の同様に操作した細菌株を、腫瘍ターゲティング治療送達媒体の出発物質として使用し得る。ここに提供される修飾は、治療剤の抗腫瘍効率および/または安全性および忍容性の増加により有効性を増加するための戦略を提供する。

10

【 0 2 8 0 】

v. 巨大分子を送達するよう操作したネズミチフス菌  
ネズミチフス菌はまた適応免疫を誘導するための A P C に対する腫瘍関連抗原 (T A A) サバイピン (S V N) を送達するようにも修飾されている (米国特許公開 2 0 1 4 / 0 1 8 6 4 0 1 ; Xu et al. (2014) *Cancer Res.* 74(21):6260-6270)。S V N は、細胞生存を延長し、細胞周期を制御し、全固形腫瘍に過発現され、正常組織でほとんど発現されないアポトーシスタンパク質 (I A P) の阻害剤である。この技術は、サルモネラ病原性島 2 (S P I - 2) およびそのタイプ III 分泌装置 (T 3 S S) を用いて T A A を A P C のサイトゾルに送達し、次いで、T A A 特異的 C D 8 + T 細胞および抗腫瘍免疫を誘導するように活性化される (Xu et al. (2014) *Cancer Res.* 74(21): 6260-6270)。リステリアベースの T A A ワクチンと同様、このアプローチは、マウスモデルで有望性が示されているが、ヒトにおける有効な腫瘍抗原特異的 T 細胞プライミングは、まだ示されていない。

20

【 0 2 8 1 】

遺伝子送達に加えて、ネズミチフス菌はまた癌治療のための小干渉 RNA (s i R N A) および短鎖ヘアピン型 RNA (s h R N A) の送達に使用されている。例えば、弱毒化ネズミチフス菌は、S T A T 3 および I D O 1 を標的とするようなある種の s h R N A を発現するように修飾されている (国際出願公開 W O 2 0 0 8 / 0 9 1 3 7 5 ; および米国特許 9 , 4 5 3 , 2 2 7)。免疫抑制性遺伝子インドールアミンデオキシゲナーゼ (I D O) に対する s h R N A プラスミドで形質転換した V N P 2 0 0 0 9 は、マウス黒色腫モデルで I D O 発現のサイレンスに成功し、腫瘍細胞死および好中球による顕著な腫瘍浸潤をもたらす (Blache et al. (2012) *Cancer Res.* 72(24):6447-6456)。このベクターと P E G P H 2 0 (細胞外ヒアルロン酸を枯渇させる酵素) の共投与の組み合わせは、膵管腺癌腫瘍処置で良い結果を示している (Manuel et al. (2015) *Cancer Immunol. Res.* 3(9):1096-1107 ; 米国特許公開 2 0 1 6 / 0 1 8 4 4 5 6)。他の研究で、p h o P / p h o Q 欠失により弱毒化され、シグナル伝達性転写因子 3 (S T A T 3) 特異的 s h R N A を発現するネズミチフス菌株は、C 5 7 B L 6 マウスで腫瘍増殖を阻害し、転移臓器数を減らし、寿命を延長することが判明した (Zhang et al. (2007) *Cancer Res.* 67(12):5859-5864)。他の例において、ネズミチフス菌株 L 7 2 0 7 は、 $\beta$ -カテニンをコードする遺伝子である C T N N B 1 をターゲティングする s h R N A の送達に使用されており (Guo et al. (2011) *Gene therapy* 18:95-105 ; 米国特許公開 2 0 0 9 / 0 1 2 3 4 2 6、2 0 1 6 / 0 3 6 9 2 8 2)、一方ネズミチフス菌株 V N P 2 0 0 0 9 は、S T A T 3 をターゲティングする s h R N A の送達に利用されている (Manuel et al. (2011) *Cancer Res.* 71(12):4183-4191 ; 米国特許公開 2 0 0 9 / 0 2 0 8 5 3 4、2 0 1 4 / 0 1 8 6 4 0 1 および 2 0 1 6 / 0 1 8 4 4 5 6 ; 国際出願公開 W O 2 0 0 8 / 0 9 1 3 7 5 および W O 2 0 1 2 / 1 4 9 3 6 4)。オートファジー遺伝子 A t g 5 およびベクリン 1 をターゲティングする s i R N A は、ネズミチフス菌株 A 1 - R および V N P 2 0 0 0 9 を使用して、腫瘍細胞に送達されている (Liu et al. (2016) *Oncotarget* 7(16):22873-22882)。より効率的に免疫応答を刺激し、ここに提供される免疫刺激性細菌のような他の有利な性質を有するようなこのような株の改善が必要である。種

30

40

50

々の細菌のさらなるかつ代替的修飾は、公開国際PCT出願公開WO2019/014398および米国公開2019/0017050A1に記載されている。これら公報の各々に記載され、かつここにも記載される細菌は、さらに免疫刺激性および腫瘍ターゲティング性質を改善するために、ここに記載するとおり修飾され得る。

【0282】

細菌は、炎症性効果が低減し、故に、低毒性であるように、ここに記載するとおり修飾され得る。その結果、例えば、高投与量で投与され得る。これらのサルモネラの株ならびに当業者に知られるおよび/または上記およびここに挙げる他の細菌種の何れも、アデノシン栄養要求性の導入によるなど、ここに記載するとおり修飾され得る。例は、ここに記載するネズミチフス菌種である。

【0283】

ここに提供される細菌株は、治療分子/産物を送達するよう操作される。ここでの株は、腫瘍微小環境で抗腫瘍免疫応答を促進する、I型IFN発現および他のサイトカインなどの免疫刺激性タンパク質を構成的に誘起/誘導できる、サイトゾルDNA/RNAセンサーの修飾機能獲得型バリエーションを含む免疫刺激性タンパク質を送達する。株はまた、食細胞のパイロトーシスを低減し、それにより、より強い免疫応答を提供するおよび/または上皮細胞に感染/侵襲する能力が低減もしくは排除されるが、腫瘍および腫瘍常在免疫細胞により効率的に蓄積するように、食細胞に感染/侵襲する能力を保持するゲノム修飾も含み得る。細菌株は治療産物をコードする。腫瘍常在免疫細胞における蓄積は、コード化治療産物を発現させ、腫瘍微小環境に分泌させ、治療有効性を増加する。

【0284】

4. 腫瘍常在免疫細胞における治療指数および発現増加のための免疫刺激性細菌の増強  
ここに提供されるのは、毒性を低減し、抗腫瘍活性を改善する、免疫刺激性細菌の増強である。このような増強の例は以下である。それらは、サルモネラ、特にネズミチフス菌に関連して記載される；当業者が、他の細菌種および他のサルモネラ株で類似の増強を実施できることは理解される。

【0285】

a. *asd* 遺伝子欠失

細菌の *asd* 遺伝子は、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする。ネズミチフス菌の *asd* - 変異体は、細胞壁合成に必要であるジアミノピメリン酸(DAP)に対する偏性要求を有し、DAPを欠く環境で融解を受ける。このDAP栄養要求性を、*asd* 遺伝子が、プラスミドで *trans* で補完されたとき、抗生物質を用いることなく、インピボでプラスミド選択およびプラスミド安定性の維持に使用できる。抗生物質を利用しないプラスミド選択系は有利であり、1)有害症状の場合には迅速な排除機構としての抗生物質の投与の使用および2)このような使用が一般に避けられるところでの産生の無抗生物質スケールアップを可能とする。*asd* 遺伝子補完系は、このような選択のために提供される(Galan et al. (1990) Gene 94(1):29-35)。腫瘍微小環境でプラスミドを維持するための *asd* 遺伝子補完系の使用は、ここに記載するとおり、STINGタンパク質および他の免疫刺激性タンパク質などのプラスミドコード化遺伝子および治療産物/タンパク質を送達するよう操作したネズミチフス菌の効力を増加させることが期待される。

【0286】

ネズミチフス菌の *asd* 変異体の別の使用は、宿主腫瘍に持続性にコロニー形成する能力なく、細胞に感染する巨大分子の送達のための自己融解(または自殺)株を産生するDAP栄養要求性の利用のためである。*asd* 遺伝子の欠失により、インピトロまたはインピボで増殖したとき、細菌をDAPに対する栄養要求性とし(例えば、実施例3参照)、DAPに対して栄養要求性であり、治療産物をコードするが、*asd* 補完遺伝子を含まないプラスミドを含み、インピボで複製が欠損した株をもたらす、*asd* 欠失株を提供する。この株はDAP存在下、インピトロで繁殖し、正常に増殖し、次いでDAPが存在しない哺乳動物宿主に免疫療法剤として投与される。自殺株は宿主細胞に侵襲できるが、哺乳動物組

10

20

30

40

50

織に D A P がいないため複製できず、自動的に融解し、サイトゾルそのサイトゾル内容物(例えば、プラスミドまたはタンパク質)を送達する。

【 0 2 8 7 】

ここに提供する例において、V N P 2 0 0 0 9 の a s d 遺伝子欠失株を、内因性周辺質分泌シグナル配列を欠く L L O タンパク質(c y t o L L O)を発現するようにさらに修飾し、サルモネラのサイトゾルに蓄積するようにさせる。L L O は、細菌のファゴソーム回避に介在するリステリア・モノサイトゲネスからのコレステロール依存性孔形成溶血素である。自己融解株が腫瘍担持マウスに導入されたとき、細菌は貪食免疫細胞により取り込まれ、サルモネラ含有液胞(S C V)に入る。この環境で、D A P の欠失は細菌複製を防止し、S C V での細菌の自己融解をもたらす。次いで、自殺株の融解によりプラスミドおよび蓄積 L L O が放出され、コレステロール含有 S V C 膜に孔を形成し、宿主細胞のサイトゾルへのプラスミドの送達を可能とする。ここで、真核生物プロモーターの制御下である、プラスミド上にコード化された遺伝子産物は、宿主細胞機構により発現され得る。

10

【 0 2 8 8 】

b. アデノシン栄養要求性

トリプトファンおよび A T P / アデノシン経路由来の代謝物は、腫瘍内の免疫抑制性環境の形成における主要駆動機構である。細胞の内外に放出形態で存在するアデノシンは、免疫機能のエフェクターである。アデノシンは N F -  $\kappa$  B の T 細胞受容体誘導活性化を低減し、I L - 2、I L - 4 および I F N -  $\gamma$  を阻害する。アデノシンは T 細胞の細胞毒性を低減し、T 細胞アネルギーを増加し、F o x p 3 + または L a g - 3 + 制御 T 細胞(T - r e g s)への T 細胞分化を増加する。N K 細胞で、アデノシン I F N -  $\gamma$  産生を減少し、N K 細胞の細胞毒性を抑制する。アデノシンは好中球接着および溢出を遮断し、食作用を低減し、スーパーオキシドおよび一酸化窒素のレベルを減衰させる。アデノシンはまたマクロファージの T N F -  $\alpha$ 、I L - 1 2 および M I P - 1 (C C L 3)の発現を減少し、M H C クラス II 発現を減衰し、I L - 1 0 および I L - 6 のレベルを増加させる。アデノシン免疫調節活性は、腫瘍の細胞外空間への放出および標的免疫細胞、癌細胞または内皮細胞の表面でのアデノシン受容体(A D R)の活性化後に生じる。腫瘍微小環境における高アデノシンレベルは、免疫系が癌細胞を排除する能力を制限する局所免疫抑制をもたらす。

20

【 0 2 8 9 】

細胞外アデノシンは、死亡したまたは瀕死の細胞から産生される A T P または A D P のホスホ加水分解によるアデノシンの産生と共に、腫瘍間質細胞に発現される膜付随エクトエンザイム、C D 3 9 および C D 7 3 の統発的活性により産生される。C D 3 9 は細胞外 A T P (または A D P)を 5 ' A M P に変換し、これは、C D 7 3 によりアデノシンに変換される。内皮細胞の C D 3 9 および C D 7 3 の発現は、腫瘍微小環境の低酸素条件下増加し、それによりアデノシンのレベルが増加する。腫瘍低酸素状態は、酸素の送達を障害する、不適切な血液供給および無秩序な腫瘍脈管構造に起因し得る(Carroll and Ashcroft (2005) Expert. Rev. Mol. Med. 7(6):1-16)。腫瘍微小環境で生じる低酸素状態は、アデノシンを A M P に変換するアデニル酸キナーゼ(A K)も阻害し、きわめて高い細胞外アデノシン濃度に至る。低酸素腫瘍微小環境のアデノシンの細胞外濃度は 1 0 - 1 0 0  $\mu$  M と測定され、典型的細胞外アデノシン濃度の約 0.1  $\mu$  M より最大約 1 0 0 ~ 1 0 0 0 倍高い(Vaupel et al. (2016) Adv Exp Med Biol. 876:177-183; Antonioli et al. (2013) Nat. Rev. Can. 13:842-857)。腫瘍の低酸素領域が微小血管から遠位であるため、腫瘍のある領域のアデニンの局所濃度は、他より高い可能性がある。

30

40

【 0 2 9 0 】

免疫系を阻害する効果を指示するため、アデノシンはまた癌細胞増殖、アポトーシスおよび血管形成に作用することにより、癌細胞増殖および伝搬を制御できる。例えば、アデノシンは、主に、A 2 A および A 2 B 受容体の刺激を介して、血管形成を促進できる。内皮細胞の受容体の刺激は、内皮細胞の細胞間接着分子 1 (I C A M - 1) および E - セクチンの発現を制御し、血管完全性を維持し、血管増殖を促進できる(Antonioli et al. (201

50

3) Nat. Rev. Can. 13:842-857)。アデノシンによる種々の細胞のA<sub>2A</sub>、A<sub>2B</sub>またはA<sub>3</sub>の1以上の活性化は、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、インターロイキン-8(IL-8)またはアンジオポエチン2などの血管新生促進因子の産生を刺激できる(Antonioli et al. (2013) Nat. Rev. Can. 13:842-857)。

#### 【0291】

アデノシンはまた癌細胞の受容体との相互作用を介して、腫瘍細胞増殖、アポトーシスおよび転移を直接制御もできる。例えば、ある乳癌細胞株でA<sub>1</sub>およびA<sub>2A</sub>受容体の活性化は腫瘍細胞増殖を刺激し、結腸癌細胞でA<sub>2B</sub>受容体の活性化は癌増殖促進性質を有することを示す研究がある(Antonioli et al. (2013) Nat. Rev. Can. 13:842-857)。アデノシンは癌細胞のアポトーシスも誘導でき、種々の試験は、この活性と、A<sub>3</sub>を介する外因性アポトーシス経路またはA<sub>2A</sub>およびA<sub>2B</sub>を介する内因性アポトーシス経路の活性化を関連づけている(Antonioli et al. (2013))。アデノシンは、細胞運動性増加、細胞外マトリクスへの接着ならびに細胞移動および運動性を促進する細胞付着タンパク質および受容体の発現により、腫瘍細胞遊走および転移を促進できる。

10

#### 【0292】

アデノシン三リン酸(ATP)の細胞外放出は、刺激免疫細胞および損傷した、瀕死のまたはストレスを受けた細胞から生じる。NLRファミリーパイロドメイン含有3(NLRP3)インフラマソームは、ATPのこの細胞外放出により刺激されたとき、カスパーゼ-1を活性化し、サイトカインIL-1およびIL-18の分泌をもたらし、これが、その後自然免疫および適応免疫応答を活性化する(Stagg and Smyth (2010) Oncogene 29:5346-5358)。ATPは、酵素CD39およびCD73によりアデノシンに異化される。活性化アデノシンは、ネガティブ・フィードバック機構を介して高度に免疫抑制性の代謝物として作用し、低酸素腫瘍微小環境で複数の免疫細胞型に多面的効果を有する(Stagg and Smyth (2010) Oncogene 29:5346-5358)。アデノシン受容体A<sub>2A</sub>およびA<sub>2B</sub>は多様な免疫細胞で発現され、cAMP介在シグナル伝達変化を促進するようにアデノシンにより刺激され、T細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞、肥満細胞、マクロファージ、好中球およびNK T細胞の免疫抑制性表現型をもたらす。この結果、アデノシンレベルは、CD73などのエクトヌクレオチダーゼを過発現することが示されている、固形腫瘍などの病的組織で正常濃度の100倍を超えて蓄積され得る。アデノシンは、腫瘍血管形成および進展を促進することも示されている。アデノシンに対して栄養要求性である操作した細菌は、故に、腫瘍ターゲティングおよびコロニー形成の増強を示す。

20

30

#### 【0293】

チフス菌などの免疫刺激性細菌は、tsx遺伝子の欠失(Bucarey et al. (2005) Infection and Immunity 73(10):6210-6219)またはpurDの欠失(Husseiny (2005) Infection and Immunity 73(3):1598-1605)により、アデノシンに対して栄養要求性とし得る。グラム陰性細菌イネ白葉枯病菌(Xanthomonas oryzae)において、purD遺伝子ノックアウト株はアデノシンに対して栄養要求性であることが示された(Park et al. (2007) FEMS Microbiol Lett 276:55-59)。ここに例示するとおり、ネズミチフス菌株VNP20009は、purI欠失によりアデノシンに対して栄養要求性であり、それ故に、さらにアデノシンに対して栄養要求性とする修飾は必要ない。それ故に、ここで提供する免疫刺激性細菌株の実施態様は、アデノシンに対して栄養要求性である。このような栄養要求性細菌は腫瘍微小環境で選択的に複製し、さらに腫瘍における投与細菌の蓄積および複製を増加し、腫瘍内および周囲のアデノシンレベルを減少させ、それによりアデノシンの蓄積が原因の免疫抑制を低減または排除する。ここに提供するこのような細菌の例は、アデノシン栄養要求性を提供するためのpurI-/msbB-変異を含むネズミチフス菌の修飾株である。他のゲノム変異も、ここに記載するとおり、細菌に他の有利な性質を付与するために包含させ得る。

40

#### 【0294】

c. フラジェリン欠損株

鞭毛は、移動手段を提供するために、時計周りまたは反時計周りに回転できる回転モータ

50

ーにフックを介して接続された長繊維からなる、細菌表面の小器官である。ネズミチフス菌における鞭毛は、走化性、および、消化管の粘液層を超える運動性を介在する能力により、経口経路を介する感染の確立に重要である。鞭毛はインビトロで腫瘍類円柱体への走化性およびコロニー形成に必要であり(Kasinskis and Forbes (2007) *Cancer Res.* 67(7):3201-3209)、運動性は腫瘍浸透に重要であることが示されているが(Toley and Forbes (2012) *Integr Biol (Camb)*. 4(2):165-176)、鞭毛は、細菌が静脈内投与されたとき、動物における腫瘍コロニー形成に必要なない(Stritzker et al. (2010) *International Journal of Medical Microbiology* 300:449-456)。各鞭毛フィラメントは、数万のフラジェリンサブユニットからなる。ネズミチフス菌染色体は、抗原性に異なるフラジェリン単量体をコードする、2つの遺伝子、*fliC*および*fliB*を含む。*fliC*および*fliB*両者を欠損する変異体は、感染の経口経路で投与したとき非運動性および非病原性であるが、非経腸的に投与したとき、病原性を維持する。

10

## 【0295】

フラジェリンは、サルモネラの主要な炎症促進性決定因子であり(Zeng et al. (2003) *J. Immunol.* 171:3668-3674)、細胞表面のTLR5およびサイトゾルのNLR4により直接認識される(Lightfield et al. (2008) *Nat Immunol.* 9(10):1171-1178)。何れの経路も、IL-1、IL-18、TNF- $\alpha$ およびIL-6を含むサイトカインの分泌をもたらす炎症促進性応答に至る。*fliC*および*fliB*によりコードされるフラジェリンより強度の炎症を誘導する、ピブリオ・バルニフィカス(*Vibrio vulnificus*)フラジェリンBを分泌するよう細菌を操作することにより、フラジェリンに対する炎症促進性応答を増加させることによる、より強力なサルモネラベースの癌免疫療法を作る試みがなされている(Zheng et al. (2017) *Sci. Transl. Med.* 9(376):eaak9537)。

20

## 【0296】

炎症促進性シグナル伝達を低減するために、フラジェリンサブユニット*fliC*および*fliB*両者を欠くよう操作したサルモネラ種ネズミチフス菌などの免疫刺激性細菌が提供される。例えば、ここに示すとおり、TNF- $\alpha$ 誘導減少をもたらす*msbB*を欠くサルモネラ株は、*fliC*および*fliB*ノックアウトと組み合わせられる。得られたサルモネラ株は、TNF- $\alpha$ 誘導低減およびTLR5認識低減の組み合わせを有する。これらの修飾、*msbB*-、*fliC*-および*fliB*-を、例えば、STING経路機能獲得型タンパク質パリアント、免疫刺激性サイトカインおよび/または同様に阻害性RNAi分子などの、異種タンパク質の真核生物プロモーター制御下の発現を提供するように、所望により、*CpG*およびまた*cDNA*発現カセットを含む細菌プラスミドと組み合わせ得る。得られた細菌は、低減された炎症促進性シグナル伝達および強い抗腫瘍活性を有する。

30

## 【0297】

鞭毛の排除は、細菌の治療指数を増加させる付加的な有利な性質を付与する。例えば、ここに示すとおり(例えば、実施例6参照)、鞭毛の排除(すなわち、サルモネラにおいて、*fliC*-/*fliB*-)は、マウスマクロファージおよびヒト単球でパイロトシスを減少させ、上皮細胞での感染を不可能とし、細菌の取り込みを腫瘍常在免疫/骨髄細胞に制限する。

40

## 【0298】

本明細書で下におよび他の箇所に記載するとおり、鞭毛の欠失を、例えば、*asd*-、*msbB*-、*purI*-、*pagP*-、*csd*-、*adrA*-および/またはここに記載する他の修飾を含む、細菌の治療指数を改善する有利な性質を付与する1以上の他のゲノム修飾と組み合わせ得る。このような修飾細菌を、例えば、サイトゾルDNA/RNAセンサーおよびその機能獲得型変異体、ならびにサイトカインなどの免疫刺激性タンパク質を含む、対象における抗腫瘍免疫応答を増加する治療産物をコードするプラスミドで形質転換し得る。

## 【0299】

50

例えば、ここで提供するとおり、*f l i C* - および *f l j B* - 二重変異体を、ネズミチフス菌株 *V N P 2 0 0 0 9* の *a s d* 欠失株で構築した。*P u r I / p u r M* の破壊により病原性について弱毒化した *V N P 2 0 0 0 9* は、*m s b B* 欠失を含むようにも操作し、これは野生型リポド A より低毒素産生性である *L P S* のリポド A サブユニットの産生をもたらす。これは、野生型リポド A を有する株と比較して、静脈内投与後マウスモデルにおける *T N F* - 産生の低減をもたらす。また、*f l i C* - および *f l j B* - 二重変異体を、*a s d*、*p u r I / p u r M* および *m s b B* 欠失を含むネズミチフス菌の野生型株に構築した。得られた株は、*T L R 2 / 4* シグナル伝達を低減するためのリポド A の修飾ならびに *T L R 5* 認識およびインフラマソーム誘導を低減するためのフラジェリンサブユニットの欠失により、細菌炎症について弱毒化した株の例である。*L P S* の修飾と組み合わせたフラジェリンサブユニットの欠失は、宿主における大きな忍容性、免疫刺激性タンパク質の産生に対する免疫刺激性応答の指示および / または抗腫瘍応答を誘導し、腫瘍に対する適応免疫応答を促進する *T M E* における所望の標的に対する *R N A* 干渉の送達を可能とする。

10

#### 【0300】

##### d. *L P S* 生合成経路における遺伝子の欠失

グラム陰性細菌のリポ多糖 (*L P S*) は、細菌膜の外葉の主要成分である。3つの主要部分、リポド A、非反復コアオリゴサッカライドおよび O 抗原 (または O 多糖) からなる。O 抗原は、*L P S* の最も外側の部分であり、細菌透過性に対する防護層として働くが、しかしながら、O 抗原の糖組成は、株間で広範に変わる。リポド A およびコアオリゴサッカライドはあまり変わらず、より一般には同じ種の株内で保存的である。リポド A はエンドトキシン活性を含む *L P S* の部分である。一般に、複数の脂肪酸で装飾された二糖である。これらの疎水性脂肪酸鎖は、*L P S* を細菌膜に固定し、*L P S* の残りは、細胞表面から突出する。

20

#### 【0301】

リポド A ドメインは、グラム陰性細菌の大半の毒性を担う。一般に、血中の *L P S* は、顕著な病原体関連分子パターン (*P A M P*) として認識され、重度の炎症促進性応答を誘導する。*L P S* は、*C D 1 4*、*M D 2* および *T L R 4* を含む膜結合受容体複合体のリガンドである。*T L R 4* は、*N F*  $\kappa$  *B* 経路を刺激し、*T N F* - および *I L* - 1 などの炎症促進性サイトカインの産生をもたらすよう *M y D 8 8* および *T R I F* 経路を介してシグナル伝達される膜貫通タンパク質であり、その結果は、致命的であり得るエンドトキシンショックであり得る。哺乳動物細胞のサイトゾルにおける *L P S* は、カスパーゼ 4、5 および 11 の *C A R D* ドメインに結合し、自己活性化およびパイロプトーシス細胞死をもたらす (Hagar et al. (2015) *Cell Research* 25:149-150)。

30

#### 【0302】

リポド A の組成およびリポド A バリエーションの毒素原性は、文献の裏づけが十分にある。例えば、一リン酸化リポド A は、複数のリン酸基を有するリポド A よりはるかに炎症性が低い。リポド A のアシル鎖の数および長さも、毒性の程度に大きな影響を有し得る。大腸菌からの標準的リポド A は 6 個のアシル鎖を有し、このヘキサ - アシル化は、強力に毒性である。ネズミチフス菌リポド A は大腸菌のものに類似する；4つの一級および2つの二級ヒドロキシアシル鎖を有するグルコサミン二糖である ((Raetz and Whitfield (2002) *Annu. Rev. Biochem.* 71:635-700)。上記のとおり、ネズミチフス菌の *m s b B* - 変異体は *L P S* の末端ミリストイル化を受けず、ヘキサアシル化リポド A より顕著に低毒性であるペンタアシル化リポド A を主に産生する。パルミチン酸でのリポド A の修飾は、パルミトイルトランスフェラーゼ (*P a g P*) により触媒される。*p a g P* 遺伝子の転写は、*p h o P / p h o Q* 系の制御下にあり、これは、例えば、*S C V* 内の低濃度のマグネシウムにより活性化される。それ故に、ネズミチフス菌のアシル含量は可変であり、野生型細菌では、ヘキサ - またはペンタ - アシル化であり得る。ネズミチフス菌がそのリポド A をパルミチン酸化する能力は、ファゴリソソームに分泌される抗菌ペプチドへの抵抗性を増加する。

40

50



## 【0303】

野生型ネズミチフス菌において、p a g Pの発現は、ヘプタ - アシル化されたリピド A をもたらす。m s b B - 変異体(リピド A の末端アシル鎖が付加され得ない)において、p a g Pの誘導はヘキサアシル化 L P S をもたらす(Kong et al. (2011) Infection and Immunity 79(12):5027-5038)。ヘキサアシル化 L P S は、最も炎症促進性であることが示されている。例えば、ヘキサアシル化 L P S のみを産生させるための p a g P の欠失によるなど(Felgner et al. (2016) Gut Microbes 7(2):171-177; Felgner et al. (2018) Oncoimmunology 7(2): e1382791)、この炎症促進性シグナルに関して他のグループによって研究されているが、これは、L P S の T N F - 介在炎症促進性質および逆説的に低い適応免疫により、忍容性を損ない得る(Kocijancic et al. (2017) Oncotarget 8(30):49988-50001)。

10

## 【0304】

L P S は、T N F - および I L - 6 を誘導する強力な T L R 4 アゴニストである。1 E 9 C F U / m <sup>2</sup> での I . V . V N P 2 0 0 0 9 臨床試験における用量規制毒性(Toso et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(1):142-152)は、サイトカイン介在(発熱、低血圧)であり、2 時間で血清で T N F - レベル > 1 0 0 , 0 0 0 p g / m l および I L - 6 レベル > 1 0 , 0 0 0 p g / m l であった。V N P 2 0 0 0 9 における m s b B 欠失および低減された発熱原性にも関わらず、L P S は、おそらくヘキサアシル化 L P S の存在により、高用量でなお毒性であり得る。それ故に、p a g P - / m s b B - 株は、ヘキサアシル化 L P S を産生できないため、高用量でより耐性が高く、ヒトに 1 E 9 C F U / m <sup>2</sup> 以上での投与を可能とする。高投与は腫瘍コロニー形成を増加させ、免疫刺激性細菌の治療有効性を増加させ得る。

20

## 【0305】

ここで、ネズミチフス菌などのサルモネラ細菌は、炎症促進性シグナル伝達を低減するために、フラジェリンサブユニット f l i C および f l j B 両者を欠失するよう操作される。例えば、ここに示すとおり、T N F - アルファ誘導減少をもたらす m s b B を欠くサルモネラ株は、f l i C および f l j B ノックアウトと組み合わせられる。これは、T N F - アルファ誘導低減および T L R 5 認識低減の組み合わせを有するサルモネラ株をもたらす。これらの修飾は、p a g P - およびここに記載する他のゲノム修飾の組み合わせであり得て、得られた細菌株は、所望により C p G を含む、免疫刺激性プラスミド(コード化免疫刺激性タンパク質)で形質転換され得る。得られた細菌は、炎症促進性シグナル伝達が低減されているが、強い抗腫瘍活性を有する。

30

## 【0306】

ここに例示されるのは、ペントアシル化 L P S のみ産生でき、m s b B 遺伝子の欠失を含み(上記のとおり、リピド A の末端ミリストイル化を阻害する)、さらに p a g P の欠失により修飾されている(パルミトイル化阻害)、ネズミチフスの例示株などの生存弱毒化サルモネラ株菌である。ペントアシル化 L P S を産生するように修飾された株は、異種免疫刺激タンパク質および/または、例えば、免疫チェックポイントに対する、干渉 R N A などの治療産物を発現するようにさらに修飾されたとき、炎症促進性サイトカインが低レベルであり、血中の安定性が改善し、補体固定への抵抗性が改善し、抗菌ペプチドに対する感受性が増加し、忍容性が増強し、抗腫瘍免疫が増加することが可能である。

40

## 【0307】

ここで提供する、例えば、p a g P - 変異体はまたネズミチフス菌 V N P 2 0 0 0 9 またはここに記載する他の株または野生型ネズミチフス菌の a s d 、 m s b B 、 p u r I / p u r M および f l i C / f l j B 欠失株にも構築され得る。得られた株は、T L R 2 / 4 シグナル伝達を低減するためのリピド A の修飾および T L R 5 認識およびインフラマソーム誘導を低減するためのフラジェリンサブユニットの欠失およびペントアシル化 L P S を産生するための p a g P の欠失により、細菌炎症について減弱された株の例である。L P S の修飾と組み合わせたフラジェリンサブユニットの欠失は、宿主における大きな忍容性および血中の大きな安定性および補体固定に対する抵抗性を可能とし、免疫刺激性タンパ

50

ク質などの何らかの遺伝子産物の産生に向けた免疫刺激性応答の指示および/または抗腫瘍応答を誘発し、腫瘍に対する適応免疫応答を促進するためのTMEにおける所望の標的に対するRNA干渉の送達のための腫瘍部位への輸送を改善する。

【0308】

e. バイオフィルム形成に必要な遺伝子の欠失

細菌および真菌は、バイオフィルムと呼ばれる多細胞構造を形成できる。細菌バイオフィルムは、分泌され、集合的に細胞外ポリマー物質として知られる細胞壁関連多糖、糖タンパク質および糖脂質ならびに細胞外DNAの混合物内に封入される。これらの細胞外ポリマー物質は、細菌を洗浄剤、抗生物質および抗菌ペプチドなどの複数の侵襲から保護する。細菌バイオフィルムは、表面のコロニー形成を可能とし、注入ポートおよびカテーテルなどの補装具な感染の相当の原因である。バイオフィルムはまた、感染の経過中に組織に形成もされ得て、これは細菌残留性および排出の期間を延長させ、抗生物質治療の有効性を制限する。バイオフィルムにおける細菌の慢性残留性は、例えば、胆嚢のチフス菌(*S. typhi*)感染における腫瘍形成を増加させる(Di Domenico et al. (2017) *Int. J. Mol. Sci.* 18:1887)。

10

【0309】

ネズミチフス菌バイオフィルム形成はCs g Dにより制御される。Cs g Dはc s g B A C オペロンを活性化し、これは、クルリ線毛サブユニットCs g AおよびCs g Bの産生増加をもたらす(Zakikhany et al. (2010) *Molecular Microbiology* 77(3):771-786)。Cs g Aは、TLR2によりPAMPとして認識され、ヒトマクロファージからのIL-8産生を誘導する(Tukel et al. (2005) *Molecular Microbiology* 58(1):289-304)。さらに、Cs g Dは、ジグアニル酸シクラーゼをコードするadr A 遺伝子の活性化により、間接的にセルロース産生を増加する。Adr Aにより産生される小分子環状ジ-グアノシンモノホスフェート(c-ジ-GMP)は、ほぼ全ての細菌種に見られるユビキタス二次メッセンジャーである。c-ジ-GMPのAdr A介在増加は、セルロースシンターゼ遺伝子bcs Aの発現を増加させ、これが、その後bcs A B Z Cおよびbcs E F G オペロンの刺激を経てセルロース産生を増加させる。ネズミチフス菌などの免疫刺激性細菌の、バイオフィルムを形成する能力の低減は、例えば、c s g D、c s g A、c s g B、a d r A、b c s A、b c s B、b c s Z、b c s E、b c s F、b c s G、d s b Aまたはd s b Bなどの、バイオフィルム形成に関与する遺伝子の欠失により達成され得る(Anwar et al. (2014) *PLoS One* 9(8):e106095)。

20

30

【0310】

ネズミチフス菌は、宿主免疫細胞による食作用に対する防御として、固形腫瘍にバイオフィルムを形成する。バイオフィルムを形成できないサルモネラ変異体は、宿主食細胞により、より迅速に取り込まれ、感染腫瘍から排除される(Crull et al. (2011) *Cellular Microbiology* 13(8):1223-1233)。食細胞内の細胞内局在化のこの増加は、細胞外細菌の残留性を低減し、ここに記載するとおり、プラスミド送達、発現およびTMEへのコード化治療産物の放出ならびにRNA干渉による遺伝子ロックダウンの有効性を増強する。バイオフィルム形成が低減するよう操作された免疫刺激性細菌は、腫瘍/組織からの排除速度が増加し、それ故に治療の忍容性が増加し、患者における補装具のコロニー形成を阻止し、それによりこれらの株の治療利益を増加させる。アデノシン模倣体は、ネズミチフス菌バイオフィルム形成を阻止でき、腫瘍微小環境における高アデノシン濃度が、腫瘍関連バイオフィルム形成に寄与し得ることを示す(Koopman et al. (2015) *AntiMicrob Agents Chemother* 59:76-84)。pur I破壊を含む(およびそれ故に、コロニー形成アデノシンリッチ腫瘍)およびまたバイオフィルム形成に必要な1以上の遺伝子の欠失によりバイオフィルム形成も阻止された、ここで提供するネズミチフス菌などの生存細菌弱毒株は、強い抗腫瘍免疫応答を刺激するために、サイトゾルDNA/RNAセンサーおよび機能獲得型そのバリエーションおよび他のサイトカインなどの免疫刺激性タンパク質および干渉RNAなどの治療産物をコードするプラスミドを送達するために操作される。

40

50

## 【0311】

*adrA* 遺伝子は、ネズミチフス菌バイオフィーム形成に必要な *c*-ジ-GMP を産生するジグアニル酸シクラーゼをコードする。*c*-ジ-GMP は、宿主サイトゾルタンパク質 *STING* に結合し、アゴニストである。*adrA* の欠失により *c*-ジ-GMP 産生が低減した免疫刺激性細菌は反直感的であるがバイオフィームの形成ができないネズミチフス菌変異体などの細菌変異体 (*adrA* 変異体を含む) は、マウス腫瘍モデルで治療能の低減が示されている (Crull et al. (2011) *Cellular Microbiology* 13(8):1223-1233)。 *STING* の数種のヒトアレルは、細菌産生  $3'3'$  *CDN* への結合に抵抗性である (Corrales et al. (2015) *Cell Reports* 11:1018-1030)。

## 【0312】

ここに記載するとおり、アデノシン栄養要求性であるように操作され、LPS の修飾および/またはフラジェリンの欠失および/またはバイオフィーム形成に必要な遺伝子の欠失により炎症促進性サイトカインを誘導する能力が低減されたネズミチフス菌株などの細菌株は、強い抗腫瘍免疫応答を促進するために、干渉RNA ならびにサイトゾルDNA/RNA センサーおよび機能獲得型そのバリエーション (例えば、*STING* およびその他) およびサイトカインを含む免疫刺激性タンパク質などの他の治療用抗癌産物を送達するために、さらに修飾される。

## 【0313】

f. サルモネラ含有液胞 (SCV) を回避するよう操作したサルモネラ

ネズミチフス菌などのサルモネラは、主にサルモネラ含有液胞 (SCV) と称される膜結合区画で複製する細胞内病原体である。ネズミチフス菌は、一部上皮細胞株で、かつ低頻度であるが、複製できる場所であるサイトゾル内に回避することが示されている。高い効率で SCV を回避するよう操作したサルモネラは、SCV の脂質二重層が電位障壁であるため、宿主細胞サイトゾルにプラスミドなどの巨大分子をより効率的に送達する。宿主サイトゾルへのプラスミド放出は、プラスミドにコードされた治療産物の発現を可能にし、これは、真核生物プロモーターなどの宿主認識制御シグナルの制御下にあり、特に細菌が腫瘍常在免疫細胞により貪食されたとき、治療産物の産生および送達の効率を上げ、細菌の治療指数を改善する。

## 【0314】

ここに提供されるのは、SCV 回避の頻度が増強されたサルモネラ株および方法である。下記および本明細書の他の箇所に記載するとおり、これは、サルモネラ誘導繊維 (SIF) 形成に必要な遺伝子の欠失により達成される。これらの変異体は、SCV 回避の頻度が増加し、宿主細胞のサイトゾルで複製できる。例えば、ネズミチフス菌の *sifA* 変異体を使用するプラスミド送達増強が示されている。*sifA* 遺伝子は、宿主 *GT Pase* の *RhoA* ファミリーを模倣または活性化する *SPI-2 T3SS-2* 分泌エフェクタータンパク質をコードする (Ohlson et al. (2008) *Cell Host & Microbe* 4:434-446)。SIF 形成に關与する他の分泌エフェクターをコードする遺伝子は標的化され得る。これらは、例えば、*sseJ*、*sseL*、*sopD2*、*pipB2*、*sseF*、*sseG*、*spvB* および *steA* を含む。SIF 形成の阻止によるネズミチフス菌の回避増強は、生存細菌を、複製可能な場所であるサイトゾルに放出させる。

## 【0315】

ネズミチフス菌の SCV 回避を増強し、プラスミドなどの巨大分子のサイトゾルへの送達を増加する他の方法は、SCV 膜の孔形成または破裂をもたらす異種溶血素の発現である。あるこのような溶血素は、*hlyA* 遺伝子によりコードされる、リステリア・モノサイトゲネスからのリステリオリシン O タンパク質 (LLO) である。LLO は、リステリア・モノサイトゲネスから分泌され、主にファゴソーム回避および宿主細胞のサイトゾルへの侵入を担う、コレステロール依存性孔形成細胞溶解素である。ネズミチフス菌からの LLO の分泌は、細菌回避をもたらし得て、サイトゾルにおける複製に至る。無傷のネズミチフス菌が SCV を回避し、サイトゾルで複製することを阻止するために、分泌シグナル配列をコードするヌクレオチドを遺伝子から除去することができ、*cytLLO* を産生す

10

20

30

40

50

る。この方法で、活動的 L L O は、ネズミチフス菌のサイトゾル内に含まれ、細菌が融解を受けたときのみ L L O が放出される(例えば、a s d - 株における細胞内 D A P 欠失のため)。S C V における細菌融解は、プラスミドの放出と c y t o L L O 蓄積を可能とし、これは、S C V に孔を形成し、プラスミドの、コード化治療産物が発現され得る場所である、宿主細胞サイトゾルへの送達を可能とする。

#### 【0316】

ここで提供する、S T I N G タンパク質およびそのバリエーションおよび他の免疫刺激性タンパク質などの治療産物発現のために、プラスミド送達を増強するように c y t o L L O を発現するよう操作したネズミチフス菌株 V N P 2 0 0 0 9 などのサルモネラ株は、免疫刺激性細菌の治療効力が増加され得る。これは、細菌がここに記載するとおり腫瘍常在免疫細胞における蓄積のために操作され、それにより腫瘍微小環境に直接治療産物が放出されるため、有利である。

10

#### 【0317】

g. 毛の欠失を含む、細菌が上皮細胞に感染する能力を排除するための S P I - 1 および S P I - 2 遺伝子および / または他の遺伝子の欠失

上記のとおり、ネズミチフス菌などのサルモネラ種を含むある細菌種の病因は、サルモネラ病原性島 (S P I) と称される遺伝子クラスターが関与する。ネズミチフス菌は、マクロファージなどの骨髄細胞により迅速に取り込まれるまたは上皮細胞などの非食細胞への自身の取り込みを誘導できる細胞内病原体である。細胞に入ったら、サルモネラ含有液胞 (S C V) 内で複製でき、また一部上皮細胞でサイトゾルに回避する。二つの最も特徴づけられた病原性島は、上皮細胞などの非食細胞の細菌侵襲の介在を担う S P I - 1 および S C V 内での複製に必要な S P I - 2 である (Agbor and McCormick (2011) Cell Microbiol. 13(12):1858-1869)。S P I - 1 および S P I - 2 は、宿主膜を超えてエフェクタータンパク質を転座できるタイプ 3 分泌系 (T 3 S S) と称される巨大分子構造をコードする (Galan and Wolf-Watz (2006) Nature 444:567-573)。

20

#### 【0318】

i. サルモネラ病原性島 1 (S P I - 1)

S P I - 1 依存性宿主細胞侵襲

3 型分泌装置 (T 3 S S) を含む侵襲関連サルモネラ病原性島 1 (S P I - 1) は、サルモネラの取り込みに至るアクチン再配置を引き起こす、エフェクタータンパク質の宿主細胞のサイトゾルへの転座を担う。サルモネラは、S P I - 1 によりコードされる 3 型分泌装置 (T 3 S S) を使用して非食細胞腸上皮細胞に浸潤し、これは、エフェクタータンパク質を宿主細胞のサイトゾルに直接注入する針様構造を形成する。これらのエフェクタータンパク質は、真核生物細胞の細胞骨格の再配置をもたらし、腸上皮の侵襲を促進し、炎症促進性サイトカインも誘導する。S P I - 1 座位は、この侵襲系の成分をコードする 39 個の遺伝子からなる (例えば、Kimbrough et al. (2002) Microbes Infect. 4(1):75-82 参照)。S P I - 1 遺伝子は、s i t A B C D、s p r B、a v r A、h i l C、o r g A B C、p r g K J I H、h i l D、h i l A、i a g B、s p t P、s i c C、i a c P、s i p A D C B、s i c A、s p a O P Q R S、i n v F G E A B C I J および i n v H を含む多数のオペロンを含む。オペロンおよび遺伝子およびその機能は、例えば、Kimbrough et al. ((2002) Microbes Infect. 4(1):75-82) に記載および描写されている。S P I - 1 遺伝子は、a v r A、h i l A、h i l D、i n v A、i n v B、i n v C、i n v E、i n v F、i n v G、i n v H、i n v I、i n v J、i a c P、i a g B、s p a O、s p a P、s p a Q、s p a R、s p a S、o r g A、o r g B、o r g C、p r g H、p r g I、p r g J、p r g K、s i c A、s i c P、s i p A、s i p B、s i p C、s i p D、s i r C、s o p B、s o p D、s o p E、s o p E 2、s p r B および s p t P を含むが、これらに限定されない。

30

40

#### 【0319】

T 3 S S は、A T P 依存的様式で細菌タンパク質エフェクターを宿主細胞に直接注入することにより、グラム陰性細菌の感染性に大きな役割を有する複合体である。T 3 S S 複合

50

体は、内部および外部細菌膜を通過し、宿主細胞との接触により真核生物細胞膜に孔を形成する。それらは、排出装置、針複合体および針の先端のトランスロコンからなる(例えば、Kimbrough et al. (2002) *Microbes Infect.* 4(1):75-82参照)。針複合体は、複合体を細菌膜に固定する基底小体である針状タンパク質 Pr g I を含み、タンパク質 Pr g H、Pr g K および In v G および In v H、Pr g J (棒状タンパク質) および In v J を含む他のタンパク質からなる。宿主細胞に孔を形成するトランスロコンは、タンパク質 S i p B、S i p C および S i p D の複合体である。エフェクタータンパク質の転座を可能とする排出装置は、タンパク質 S p a P、S p a Q、S p a R、S p a S、In v A、In v C および O r g B からなる。タンパク質分泌の一定の順序を確立するサイトゾルソーティングプラットフォームは、タンパク質 S p a O、O r g A および O r g B からなる(例えば、Manon et al. (2012), *Salmonella*, Chapter 17, eds. Annous and Gurtler, Rijeka, pp. 339-364参照)。

10

## 【0320】

T3SS-1(SPI-1のT3SS)により宿主細胞に転座したエフェクターは、細胞侵襲に必須の S i p A、S i p C、S o p B、S o p D、S o p E、S o p E 2 および S p t P を含む。例えば、ネズミチフス菌 s i p A 変異体は、侵襲の60~80%減少を示し、s i p C 欠失は侵襲を95%減少させ、s o p B 欠失は侵襲を50%減少させる(例えば、Manon et al. (2012), *Salmonella*, Chapter 17, eds. Annous and Gurtler, Rijeka, pp. 339-364参照)。他のエフェクターは、サルモネラ誘導炎症を制御する A v r A を含む。分泌タンパク質に結合し、それを分泌能力のある立体構造に維持するシャペロンは、S i c A、In v B および S i c P を含む。転写レギュレーターは、H i l A、H i l D、In v F、S i r C および S p r B を含む。III型分泌に種々の機能を有する未分類T3SS SPI-1タンパク質は、O r g C、In v E、In v I、I a c P および I a g B を含む(例えば、Kimbrough et al. (2002) *Microbes Infect.* 4(1):75-82参照)。

20

## 【0321】

SPI-1 T3SSは、消化管上皮層の横断に必須であるが、細菌が非経腸的に注入されたとき、感染に重要でない。一部タンパク質(例えば、Pr g I および Pr g J) および針複合体自体の注入も、インフラマソーム活性化および食細胞のパイロトーシスを誘導できる。この炎症促進性細胞死は、抗原提示細胞(APC)の死を直接誘導し、サイトカイン環境を記憶T細胞産生を阻止するよう修飾することにより、強い適応免疫応答の開始を制限できる。それ故に、SPI-1に關与する1以上の遺伝子の不活性化またはロックアウトを介するSPI-1依存的侵襲不活性化は、細菌が上皮細胞に感染する能力を排除するが、腫瘍関連骨髄細胞などの貪食免疫細胞を含む食細胞に感染または侵入する能力に影響しない。これらのSPI-1遺伝子は、a v r A、h i l A、h i l D、i n v A、i n v B、i n v C、i n v E、i n v F、i n v G、i n v H、i n v I、i n v J、i a c P、i a g B、s p a O、s p a P、s p a Q、s p a R、s p a S、o r g A、o r g B、o r g C、p r g H、p r g I、p r g J、p r g K、s i c A、s i c P、s i p A、s i p B、s i p C、s i p D、s i r C、s o p B、s o p D、s o p E、s o p E 2、s p r B および s p t P の1以上を含むが、これらに限定されない。

30

40

## 【0322】

SPI-1非依存的宿主細胞侵襲

T3SS-1を欠くサルモネラ変異体は、インベイン R c k、P a g N および H l y E を含む数タンパク質が關与するT3SS-1非依存的侵襲機構により、多数の細胞株/タイプに侵入することが示されている。r c k オペロンは、p e f I、s r g D、s r g A、s r g B、r c k および s r g C の6個のオープンリーディングフレームを含む。p e f I は、P e f 線毛の生合成に關与する p e f オペロンの転写レギュレーターである。これらの線毛は、仔マウスにおけるバイオフィーム形成、マウス小腸への接着および流体蓄積に關与する。S r g A は、P e f 線毛の主要構造的サブユニットである P e f A のジスルフィド結合を酸化する。s r g D は、推定転写レギュレーターをコードする；S r g D

50

は、P e f Iと共に、鞭毛遺伝子発現の相乗的な負の制御の誘導のために働く。s r g Bは推定外膜タンパク質をコードし、s r g Cは推定転写レギュレーターをコードする(例えば、Manon et al. (2012), Salmonella, Chapter 17, eds. Annous and Gurtler, Rijeka, pp. 339-364参照)。

#### 【0323】

R c kは、腸炎菌(*S. Enteritidis*)およびネズミチフス菌(*S. Typhimurium*)の大病原性プラスミドによりコードされる17kDa外膜タンパク質であり、上皮細胞への接着および侵襲を誘導し、膜攻撃複合体の形成阻止により、補体による中和に対する高レベルの抵抗性を付与する。r c k変異体は、野生型株と比較して上皮細胞侵襲の2~3倍減少を示すが、R c k過発現は、侵襲を増加させる。R c kは、受容体介在過程により細胞侵入を誘導し、局所アクチンリモデリングおよび弱くかつ密着した膜拡張を促進する。それ故に、サルモネラは、T3SS-1複合体が介在するトリガー機構およびR c kにより誘導されるジッパー機構の2つの異なる機構により細胞に侵入できる(例えば、Manon et al. (2012), Salmonella, Chapter 17, eds. Annous and Gurtler, Rijeka, pp. 339-364参照)。

10

#### 【0324】

インベシオンP a g Nは、またサルモネラ侵襲に役割を有することが示されている外膜タンパク質である。p a g N発現は、p h o Pにより制御される。特定の刺激、例えば、酸性化マクロファージファゴソーム環境または低Mg<sup>2+</sup>濃度がP h o Qにより感知され、次いで、特異的遺伝子を制御するためにP h o Pが活性化される。ネズミチフス菌におけるp a g Nの欠失は、細胞接着を変え、腸細胞の侵襲の3倍減少をもたらすことが示されている。P a g N介在侵入機構は十分には理解されていないが、アクチン重合が侵襲に必要であることが示されている。P a g Nが、BALB/cマウスにおけるサルモネラ生存に必要であり、p a g N変異体が親株よりマウスの脾臓のコロニー形成に低競争的であることを示す研究がある。p a g NがP h o Pにより活性化されるため、SPI-1島コード化T3SS-1が下方制御されている細胞内で大部分発現される。故に、上皮細胞またはマクロファージを出る細菌が、最適P a g N発現レベルを有することが可能であるが、その後宿主細胞破壊で遭遇するその後の他の細胞との相互作用を介在できるT3SS-1発現が低く、サルモネラ病因におけるP a g Nの役割を示す(例えば、Manon et al. (2012), Salmonella, Chapter 17, eds. Annous and Gurtler, Rijeka, pp. 339-364参照)。

20

30

#### 【0325】

h l y Eは、大腸菌H l y E(C l y A)溶血素と90%を超える配列同一性を共有する。H l y Eタンパク質は、外膜小胞放出を介して細菌細胞から輸出されたとき上皮細胞を溶解し、上皮細胞侵襲に関与する。H l y Eはまた全身性サルモネラ感染の確立にも関与する(例えば、Manon et al. (2012), Salmonella, Chapter 17, eds. Annous and Gurtler, Rijeka, pp. 339-364参照)。

#### 【0326】

その結果、細菌が上皮細胞に感染する能力の排除は、遺伝子r c k、p a g N、h l y E、p e f I、s r g D、s r g A、s r g Bおよびs r g Cの1以上などのSPI-1非依存的侵襲に関与するタンパク質をコードする遺伝子のノックアウトまたは欠失/破壊を含むよう、ここに記載する免疫刺激性細菌を操作することによっても達成され得る。

40

#### 【0327】

ここに提供される免疫刺激性細菌は、h i l A遺伝子および/またはT3SS経路における他の遺伝子の欠失または破壊を有するものを含む。これらの細菌を、静脈内または腫瘍内などにより投与したとき、感染は、取り込みにSPI-1 T3SSを必要としない、マクロファージおよび樹状細胞などの食細胞に向かって収束される。これは、ここに提供される免疫刺激性細菌の安全性プロファイルを増強する。標的外細胞侵襲を阻止し、糞口伝播を阻止する。上皮細胞などの非食細胞によるサルモネラの取り込みの低減に加えて、この経路における遺伝子の欠失または破壊はまたインフラマソーム活性化およびマクロフ

50

ァージのパイロトーシス阻止により食細胞の寿命も延長し、そうして、この経路に欠失を含まない細菌と比較して、ヒトマクロファージの細胞死をあまり誘導しない。例えば、SPI-1経路(例えば、針および棒状タンパク質など)における遺伝子の欠失は、インフラマソーム活性化によるパイロトーシスを阻害するが、TLR5シグナル伝達は維持することができる。これは、次に、STINGタンパク質またはここに提供される免疫刺激性細菌によりコードされる他の治療/抗腫瘍産物などのコード化タンパク質の長期分泌を可能にし、腫瘍へのマクロファージ輸送を可能にし、故に免疫刺激性細菌の有効性を改善する。

【0328】

ここに記載するとおり、上皮細胞に感染しないが、腫瘍常在免疫細胞を含む食細胞に感染する能力は維持し、それにより腫瘍微小環境に免疫刺激性細菌およびコード化治療産物を効率的にターゲティングするよう修飾された免疫刺激性細菌が提供される。これは、avrA、hilA、hilD、invA、invB、invC、invE、invF、invG、invH、invI、invJ、iacP、iagB、spaO、spaP、spaQ、spaR、spaS、orgA、orgB、orgC、prgH、prgI、prgJ、prgK、sicA、sicP、sipA、sipB、sipC、sipD、sirC、sopB、sopD、sopE、sopE2、sprBおよびsptPの1以上ならびにrck、pagN、hlyE、pefI、srgD、srgA、srgBおよびsrgCの1以上の欠失を含むが、これらに限定されない、SPI-1におけるタンパク質の何れかの欠失またはノックアウトにより達成される。

【0329】

上皮細胞に感染しない免疫刺激性細菌を、例えば、I型インターフェロンを誘導する産物(例えば、サイトゾルDNA/RNAセンサーおよびそのGOFバリエーション)を含む、免疫系を刺激する治療産物をコードし、またサイトカインなどの免疫刺激性タンパク質もコードするように、ここに記載するとおりさらに修飾し得る。細菌は、一般に哺乳動物宿主で複製不可能とするために、asd欠失を有する。例えば、1以上のSPI-1遺伝子の欠失により修飾され、またpurI欠失、msbB欠失およびasd欠失の1以上により修飾され、さらにI型インターフェロンおよび/または免疫刺激性サイトカインを誘導するサイトゾルDNA/RNAセンサーおよびその機能獲得型変異体などの免疫系を刺激するタンパク質などの治療産物をコードするプラスミドの送達により修飾される、ネズミチフス菌の株が提供される。

【0330】

例えば、SPI-1関連3型分泌装置(T3SS-1)の発現に必要な制御遺伝子(例えば、hilAまたはinvF)、T3SS-1構造的遺伝子(例えば、invGまたはprgH)および/またはT3SS-1エフェクター遺伝子(例えば、sipAまたはavrA)が欠失した細菌が提供される。上記のとおり、この分泌装置は、細菌の取り込みを引き起こす、上皮細胞などの非食作用性宿主細胞のサイトゾルへのエフェクタータンパク質の注入を担う；これら遺伝子の1以上の欠失は、上皮細胞の感染/侵襲を排除する。hilAなどの1以上の遺伝子の欠失は、静脈内または腫瘍内投与できる免疫刺激性細菌を提供し、取り込みにSPI-1 T3SSを必要としない食細胞の感染をもたらす、またこれら食細胞の寿命を延長する。hilA変異はまた炎症促進性サイトカインの量を減少し、治療の忍容性および適応免疫応答の質を増加させる。

【0331】

これに加えてまたはこれとは別に、免疫刺激性細菌は、遺伝子pagN、hlyE、pefI、srgD、srgA、srgBおよびsrgCの1以上などのSPI-1非依存的感染/侵襲に関与する産物を不活性化のための遺伝子のノックアウトまたは欠失を含み、細菌が上皮細胞に感染する能力を低減または排除し得る。

【0332】

ここに記載するとおり、SPI-1経路および細菌鞭毛に関与する遺伝子は、食細胞(免疫細胞)におけるインフラマソームを活性化し、パイロトーシスを誘導する。SPI-1遺伝子および鞭毛をコードする遺伝子のノックアウトまたは破壊は、パイロトーシスを低

10

20

30

40

50

減または排除し、また、上皮細胞の感染を排除し、食細胞の感染を増加させる。それ故に、免疫刺激性細菌は、インフラマソームにより直接認識されるタンパク質をコードする遺伝子など、腫瘍常在免疫細胞の細胞死を誘導する遺伝子産物の不活性化を誘導するためのノックアウトまたは欠失を含み得る；これらは、*fljB*、*fliC*、*prgI*および*prgJ*を含む。ここに示すとおり(例えば、実施例6参照)、鞭毛の排除(すなわち、サルモネラにおいて、*fliC* - / *fljB* -)、マウスマクロファージおよびヒト単球でパイロトシスを減少させ、上皮細胞での感染を不可能とし、細菌の取り込みを腫瘍常在免疫/骨髄細胞に制限する。

#### 【0333】

それ故に、RNAポリメラーゼIIなどの真核生物制御シグナルにより制御されるプラスミドにコードされた産物を発現する、食細胞、特に腫瘍常在免疫細胞に蓄積する免疫刺激性細菌が提供される。産物は、I型インターフェロンの発現を増加させる経路を介するなど、免疫応答を誘起するものを含み、これは、腫瘍微小環境における宿主免疫応答を増加させる。免疫刺激性細菌はまたIL-2などの免疫刺激性タンパク質を含む他の産物もコードでき、さらに腫瘍微小環境における免疫応答が増強される。

10

#### 【0334】

ii. サルモネラ病原性島2(SPI-2)

サルモネラはまた、細菌の宿主細胞への侵入後活性化され、ファゴソーム成熟を妨害し、サルモネラが細胞内生存および複製中常在する特殊化したサルモネラ含有液胞(SCV)の形成をもたらす、他のT3SSをコードするサルモネラ病原性島2(SPI-2)も有する。SPI-2 T3SSエフェクターは、細胞内細菌周囲のF-アクチンコートの組み立てを担う*SseB*、*SseC*、*SseD*および*Spic*を含む；このアクチンコートは、SCVとアクチン含有またはアクチン推進小胞の融合を促進し、不都合な区画との融合を阻止する。*SifA*は、感染細胞における個々のSCVを接続する細管であるサルモネラ誘導繊維(SIF)の形成を担う。*SifA*は、SCV完全性の維持に必須であり、*sifA*変異体は宿主細胞のサイトゾルに放出される。*SseF*および*SseG*は、細菌の生存および複製に必要な物質をSCVに向ける、SCV位置調整および細胞輸送過程に関与するSPI-2 T3SSの成分である。*SseF*および*SseG*はまたSIF形成にも関与する。他のSPI-2 T3SSエフェクターは、SIFおよびSCV形成および空胞完全性維持に関与する*PipB2*、*SopD2*および*SseJ*；宿主免疫シグナル伝達に関与する*SpvC*、*SseL*および*SspH1*；および感染食細胞の遊走におけるSCV F-アクチン網の形成ならびに感染細胞におけるアクチン重合阻害およびP-body脱集合に関与する*Stc*、*SspH2*、*SrfH*/*SseI*および*SpvB*を含む(Coburn et al. (2007) *Clinical Microbiology Reviews* 20(4):535-549; Figueira and Holden (2012) *Microbiology* 158:1147-1161)。

20

30

#### 【0335】

ここに記載する免疫刺激性細菌は、SCVおよびSIFなどの関連構造の形成または完全性に影響するSPI-2 T3SS遺伝子の何れかに欠失または修飾を含み得る。これらの変異体は、SCV回避の頻度が増加し、サイトゾルにおける複製ができる。例えば、SCVを回避するよう操作したサルモネラ種などの免疫刺激性細菌は、SCVの脂質二重層が電位障壁であるため、プラスミドなどの巨大分子の宿主細胞サイトゾルへの送達により効率的である。SIF形成阻止によるSCVからの細菌の回避の増強は、宿主細胞機構制御(すなわち、真核生物プロモーターなどの真核生物制御要素制御)コード化治療産物またはタンパク質を複製および発現できる場所である、サイトゾルに生存細菌を放出する。これは、細菌の治療有効性を増強し、例えば、*sifA*、*sseJ*、*sseL*、*sopD2*、*pipB2*、*sseF*、*sseG*、*spvB*および*stcA*を含む、サルモネラ誘導繊維(SIF)形成に必要な遺伝子の欠失または変異により達成される。

40

#### 【0336】

SCVを回避できる免疫刺激性細菌を、例えば、I型インターフェロンを誘導する産物を含む免疫系を刺激する産物をコードしたサイトカインもコードするように、さらにここ

50



に記載するとおり修飾し得る。細菌は、一般に *a s d* 欠失を有し、哺乳動物宿主での複製が不可能である。

#### 【0337】

h. プラスミド送達を増加するためのエンドヌクレアーゼ - 1 (*e n d A*) 変異 *e n d A* 遺伝子(例えば、配列番号 250)は、グラム陰性細菌のペリプラズムで二本鎖 DNA (*d s D N A*) 分解に介在するエンドヌクレアーゼ(例えば、配列番号 251)である。実験室大腸菌の最も一般的な株は、*e n d A* 遺伝子の変異がプラスミド DNA の高い収率を可能とするため、*e n d A* - である。この遺伝子は、種間で保存されている。無傷のプラスミド DNA 送達を促進するため、操作した免疫刺激性細菌の *e n d A* 遺伝子は、エンドヌクレアーゼ活性を阻害するため欠失または変異される。このような変異の例は、E 208 K アミノ酸置換 (Durfee, et al. (2008) J. Bacteriol. 190(7):2597-2606) または目的の種における対応する変異である。E 208 を含む *e n d A* は、サルモネラを含む細菌種間で保存されている(例えば、配列番号 251 参照)。それ故に、E 208 K 変異を使用して、サルモネラ種を含む他の種のエンドヌクレアーゼ活性を排除し得る。当業者は、*e n d A* 活性を排除するための他の変異または欠失を導入できる。サルモネラにおけるようなここでの免疫刺激性細菌における *e n d A* 活性を排除するための遺伝子のこの変異または欠失または破壊の実施は、無傷のプラスミド DNA 送達の効率を増加し、それによりコード化治療産物の発現を増加し、抗腫瘍有効性を増強する。

#### 【0338】

##### i. R I G - I 結合配列

上記のとおり、I 型インターフェロン (*I F N* - 、 *I F N* - ) は、異なる T L R 依存性および T L R 非依存性シグナル伝達経路により誘導されるシグネチャーサイトカインである。T L R 非依存的 I 型 *I F N* 経路で、一つは、サイトゾルにおける一本鎖 (*s s*) および二本鎖 (*d s*) RNA の宿主認識が介在する。これらは、レチノイン酸誘導性遺伝子 I (*R I G - I*)、黒色腫分化関連遺伝子 5 (*M D A - 5*) を含む RNA ヘリカーゼおよび *I R F - 3* 転写因子の *I F N* - プロモータ刺激因子 1 (*I P S - 1*) アダプタータンパク質介在リン酸化を介して感知され、I 型 *I F N* の誘導に至る (Ireton and Gale (2011) *Viruses* 3(6):906-919)。R I G - I は、5' - 三リン酸を担持する *d s* RNA および *s s* RNA を認識する。この部分は R I G - I に直接結合できまたはポリ DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ III (*P o l III*) によりポリ (*d A - d T*) 鋳型から合成され得る (Chiu, Y. H. et al. (2009) *Cell* 138(3):576-91)。2 つの A A ジヌクレオチド配列を含むポリ (*d A - d T*) 鋳型は、一般的レンチウイルス *s h* RNA クローニングベクターの U 6 プロモーター転写開始部位で生ずる。プラスミドにおけるその後の欠失が I 型 *I F N* 活性化を阻害する (Pebernard et al. (2004) *Differentiation*. 72:103-111)。R I G - I 結合配列は、ここに提供されるプラスミドに包含され得る；この包含は、ここに記載する免疫刺激性細菌の抗腫瘍活性を増加する I 型 *I F N* 産生の誘導により、免疫刺激を増加することができる。

#### 【0339】

##### j. D N a s e II 阻害

外来および自己 DNA の分解を担う他のヌクレアーゼは、エンドソーム区画に存在し、アポトーシス後 DNA を分解するエンドヌクレアーゼである D N a s e II である。D N a s e II (マウスにおける *D n a s e 2 a*) の欠失は、サイトゾルに回避し、*c G A S / S T I N G* シグナル伝達を活性化するエンドソーム DNA の蓄積をもたらす (Lan Y. Y. et al. (2014) *Cell Rep.* 9(1):180-192)。ヒトにおける D N a s e II 欠失は、自己免疫性 I 型インターフェロン症を伴う。癌で、腫瘍常在マクロファージにより貪食される瀕死の腫瘍細胞は、エンドソーム区画内での DNA の D N a s e II 消化を介して、*c G A S / S T I N G* 活性化および潜在的自己免疫を阻害する (Ahn et al. (2018) *Cancer Cell* 33:862-873)。それ故に、腫瘍微小環境で D N a s e II を阻害できる産物をコードするここで提供する免疫刺激性細菌株の実施態様は、強力な *c G A S / S T I N G* アゴニストとして作用できる場所である、サイトゾルにおける細胞内に取り込まれたアポト

10

20

30

40

50

ーシス腫瘍DNAの蓄積を誘導できる。

【0340】

k. RNase H2 阻害

TREX1(3プライム修復エキソヌクレアーゼ1)およびRNase IIは、異常DNA蓄積の浄化に機能し、RNase H2は、同様にサイトゾルでRNA:DNAハイブリッドの病原性蓄積の排除に機能する。RNase H2の欠失はまたエカルディ・グティエール症候群の自己免疫性表現型に寄与する(Rabe, B. (2013) J. Mol. Med. 91:1235-1240)。RNase H2およびその後のRNA:DNAハイブリッドまたはゲノム包埋リボヌクレオチド基質の蓄積欠失は、cGAS/STINGシグナル伝達を活性化することが示されている(MacKenzie et al. (2016) EMBO J. Apr. 15;35(8):831-44)。それ故に、RNase H2の発現を阻害または低減する産物をコードし、それによりRNase H2を阻害する免疫刺激性細菌株の実施態様は、cGAS/STINGシグナル伝達を活性化し、抗腫瘍免疫を増強する腫瘍由来RNA:DNAハイブリッドおよびその誘導体をもたらす。

10

【0341】

l. スタビリン - 1 / CLEVER - 1 阻害

主に単球で発現され、免疫制御に関与する他の分子は、スタビリン - 1である(遺伝子名STAB1、CLEVER - 1、FEEL - 1としても知られる)。スタビリン - 1は、炎症後、内皮細胞およびマクロファージで、特に、腫瘍関連マクロファージで上方制御されるI型膜貫通タンパク質である(Kzhyshkowska et al. (2006) J. Cell. Mol. Med. 10(3):635-649)。炎症性活性化により、スタビリン - 1はスカベンジャーとして働き、創傷治癒およびアポトーシス小体排除を助け、肝線維症などの組織傷害を予防できる(Rantakari et al. (2016) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113(33):9298-9303)。スタビリン - 1の上方制御は抗原特異的T細胞応答を直接阻害し、単球におけるsiRNAによるノックダウンは、炎症促進性機能を増強することが示された(Palani, S. et al. (2016) J. Immunol. 196:115-123)。それ故に、腫瘍微小環境におけるスタビリン - 1 / CLEVER - 1の発現を阻害または低減する産物をコードする免疫刺激性細菌株の実施態様は、腫瘍常在マクロファージの炎症促進性機能を増強する。

20

【0342】

m. CpGモチーフおよびCpG島

非メチル化シチジン - ホスフェート - グアノシン(CpG)モチーフは、細菌ゲノムDNAで優勢であるが、脊椎動物では違う。病原性DNAおよび合成オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)含有CpGモチーフは宿主防御機構を活性化し、自然および後天的免疫応答を導く。非メチル化CpGモチーフは、中央非メチル化CGジヌクレオチドと隣接領域を含む。ヒトにおいて、構造および誘導する免疫応答の性質の差異に基づいて、4つの異なるクラスのCpG ODNが、同定されている。K型ODN(B型とも称される)は、一般にホスホロチオエート主鎖に、1~5個のCpGモチーフを含む。D型ODN(A型とも称される)は、混合ホスホジエステル/ホスホロチオエート主鎖を含み、-CpGモチーフを有し、ステムループ構造の形成を可能にするパ lindローム配列ならびに3'および5'末端にポリGモチーフが隣接する。C型ODNは、ホスホロチオエート主鎖を有し、ステムループ構造または二量体を形成できる複数のパ lindロームCpGモチーフを含む。P-クラスCpG ODNは、ホスホロチオエート主鎖を有し、GCリッチ3'末端でヘアピンを形成できる二重パ lindロームを伴う複数のCpGモチーフを含む(Scheierman and Klinman (2014) Vaccine 32(48):6377-6389)。ここでの目的のために、CpGは、プラスミドDNAにコード化される;モチーフとしてまたは遺伝子に導入され得る。

30

40

【0343】

トール様受容体(TLR)は、病原体関連分子パターン(PAMP)感作および病原体に対する自然免疫活性化のためのカギとなる受容体である(Akira et al. (2001) Nat. Immunol. 2(8):675-680)。TLR9は、哺乳動物DNAに天然に存在しない原核生物のD

50

NAにおける低メチル化 CpG モチーフである (McKelvey et al. (2011) J. Autoimmunity 36:76-86)。免疫細胞サブセットのエンドソームへの病原体の食作用による CpG モチーフの認識は、IRF7 依存性 I 型インターフェロンシグナル伝達を誘導し、自然免疫および適応免疫を活性化する。

#### 【0344】

CpG 島 / モチーフを含むプラスミドを担持するサルモネラ種などのネズミチフス菌などの免疫刺激性細菌株が、ここで提供される。これらの細菌は、TLR9 を活性化し、I 型 IFN 介在自然免疫および適応免疫を誘導できる。ここに例示するとおり、低メチル化 CpG 島を含む細菌プラスミドは、自然および適応抗腫瘍免疫応答を誘導でき、機能獲得型バリエーション STING タンパク質などのコード化産物と組み合わせ、相乗的なまたは増強された抗腫瘍活性を有し得る。例えば、asd 遺伝子 (例えば、配列番号 48 参照) は、高頻度の低メチル化 CpG 島をコードする。CpG モチーフは、ここに記載するまたは本記載から明らかな STING タンパク質およびその変異体などの治療産物の何れかと組み合わせ、免疫刺激性細菌に包含され得て、それにより TLR9 などの TLR の調節により、抗腫瘍免疫応答を増強または改善する。

10

#### 【0345】

免疫刺激性 CpG は、一般に細菌遺伝子 (例えば、asd) からの遺伝子産物をコードする核酸を包含させ、CpG モチーフを含む核酸を加えることにより、プラスミドに包含させ得る。ここでのプラスミドは、CpG モチーフを含み得る。CpG モチーフの例は知られる (例えば、米国特許 8,232,259、8,426,375 および 8,241,844 参照)。

20

これらは、例えば、10 ~ 100、10 ~ 20、10 ~ 30、10 ~ 40、10 ~ 50

または 10 ~ 75 塩基対長の、一般式：

$(CpG)_n$  (ここで、n は反復数である)

を有する、合成免疫刺激性オリゴヌクレオチドを含む。

#### 【0346】

一般に、少なくとも 1 または 2 反復が使用される；非 CG 塩基が組み入れられてよい。

当業者は、TLR、特に TLR9 調節による免疫応答誘導のための、CpG モチーフの一般的使用を極めて熟知している。

#### 【0347】

5. 免疫細胞によるサルモネラなどのグラム陰性細菌の取り込みを増加させかつ免疫細胞

30

死を低減する修飾

ネズミチフス菌の株例などのここに提供される免疫刺激性細菌を、腫瘍常在免疫細胞などの免疫細胞による取り込みを増加させ、上皮細胞などの非免疫細胞による取り込みを減少するよう修飾し得る。細菌はまたマクロファージパイロトーシス低減によるなど、免疫細胞死を低減するために修飾し得る。多数の細菌ゲノムの修飾は、免疫細胞の感染増加およびパイロトーシスの減少の一方または両方をなし得る。ここに提供される免疫刺激性細菌は、hilA、棒状タンパク質および / または針状タンパク質の破壊または欠失などの、例えば、SPI-1 T3SS 経路に關与する遺伝子の欠失および / または破壊および / またはフラジェリンをコードする他の細菌遺伝子の破壊 / 欠失などの修飾を含む。これらの修飾は、細菌が、コード化治療産物を発現でき、腫瘍微小環境に直接それを放出する場所である腫瘍常在免疫細胞に蓄積することを可能とし、治療有効性を増加する。さらに、例えば、パイロトーシスの減少により、腫瘍常在マクロファージの寿命を延長し、コード化治療産物の効率的な産生および腫瘍微小環境における免疫応答の活性化を可能とし、さらに細菌の抗腫瘍治療有効性を増強する。

40

#### 【0348】

a. 免疫細胞による細菌取り込み

ここに提供される免疫刺激性細菌のゲノムは、食細胞などの免疫細胞、特に腫瘍微小環境における免疫細胞の感染を増加または促進するよう修飾され得る。これは、上皮細胞などの非免疫細胞の感染低減または免疫細胞の感染増加を含む。サルモネラなどのグラム陰性細菌の侵襲性表現型は、宿主細胞の侵襲を促進する経路におけるコード化遺伝子の活性に

50

由来し得る。サルモネラの侵襲関連サルモネラ病原性島 1 (S P I - 1) は一例である。S P I - 1 は、宿主細胞のサイトゾルへのエフェクタータンパク質の転座を担う 3 型分泌装置 (T 3 S S) である。これらのタンパク質は、サルモネラの取り込みに至るアクチン再配置を引き起こし得る。T 3 S S エフェクターは、上皮細胞などの非食作用性宿主細胞へのネズミチフス菌の取り込みに介在する。S P I - 1 T 3 S S は、腸の上皮層の横断に必須であるが、例えば、細菌が非経腸的に注入されたとき、感染に重要でない。S P I - 1 変異体は、上皮細胞侵襲に欠損を有し、経口病原性は劇的に低減するが、マクロファージなどの食細胞に通常どおり取り込まれる (Kong et al. (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109(47):19414-19419)。

#### 【0349】

ここに提供されるネズミチフス菌などの免疫刺激性細菌株は、S P I - 1 T 3 S S 遺伝子に変異を有するよう操作し得る。上皮細胞による取り込みを阻止し、腫瘍関連マクロファージなどの免疫細胞に収束させ、抗腫瘍免疫応答を増強する。さらに、ここに示すとおり (例えば、実施例 6 参照)、鞭毛の排除は、上皮細胞での感染を不可能とし、細菌の取り込みを腫瘍常在免疫 / 骨髄細胞に制限する。それ故に、ここでの実施態様において、免疫刺激性細菌は、S P I - 1 T 3 S S における遺伝子の欠失または破壊および / または鞭毛をコードする遺伝子の欠失または破壊により修飾でき、非食細胞 (例えば、上皮細胞) による感染を阻止または低減し、腫瘍常在骨髄細胞への感染を増加するまたはそれに限定させる。このような細菌はまた I 型 I F N および免疫刺激性サイトカインを誘導するなどの治療産物をコードするプラスミドで修飾でき、さらに腫瘍常在免疫細胞における治療産物の発現により、抗腫瘍免疫応答および治療有効性を増強する。

#### 【0350】

##### b. マクロファージパイロトーシス

自然免疫および抗微生物応答に役割を有するマクロファージ N L R C 4 インフラマソームは、サイトゾル病原体を認識し、カスパーゼ - 1 の自己触媒的活性化を提供する、大きな多タンパク質複合体である。カスパーゼ - 1 の活性化は、炎症促進性サイトカイン I L - 1 および I L - 1 8 の成熟および放出を誘導し、マクロファージ細胞死の迅速な炎症形態であるパイロトーシスを誘導する。この炎症促進性細胞死は、抗原提示細胞 (A P C) の死により直接誘導される強い適応免疫応答の開始を制限し、記憶 T 細胞の産生を阻止しようとするサイトカイン環境を修飾し得る。

#### 【0351】

ネズミチフス菌および緑膿菌などのあるグラム陰性細菌コード化 3 型または 4 型分泌系による感染は、サルモネラ病原性島 - 1 III 型分泌装置 (S P I - 1 T 3 S S) による宿主細胞サイトゾルへの転座後、針状タンパク質、棒状タンパク質およびフラジェリンなどの細菌リガンドの認識により N L R C 4 インフラマソームの活性化を誘導する。パイロトーシスは、マクロファージに限定されない ; カスパーゼ - 1 依存死は、サルモネラでの感染後樹状細胞で観察されている (Li et al. (2016) Scientific Reports 6:37447; Chen et al. (2014) Cell Reports 8:570-582; Fink and Cookson (2007) Cellular Microbiology 9(11):2562-2570)。ここに示すとおり、パイロトーシスの誘導に関するサルモネラゲノムにおける遺伝子のノックアウトは、抗腫瘍免疫応答を増強する。これは、細菌感染後のマクロファージを含む免疫細胞の喪失を阻止する。例えば、H i l A、棒状タンパク質 (P r g J)、針状タンパク質 (P r g I)、フラジェリンおよび / または Q s e C をコードする遺伝子が、ここに提供される免疫刺激性細菌においてノックアウト / 破壊され得る。

#### 【0352】

##### i. フラジェリン

上記のとおり、サルモネラなどの一部細菌種について、S P I - 1 T 3 S S に加えて、フラジェリンが、マクロファージにおけるパイロトーシスの誘導に必要であり、マクロファージ N L R C 4 インフラマソームにより検出され、活性化する。鞭毛の主要成分であるフラジェリンは、T L R 5 により認識される。サルモネラは、f l i C および f l j B の

10

20

30

40

50

2つのフラジェリン遺伝子をコードする；フラジェリンサブユニットの排除は、マクロファージにおけるパイロトーシスを低減する。例えば、*fliC*および*fliJ*が欠失したネズミチフス菌は、野生型株と比較してIL-1分泌が有意に減少するが、細菌の細胞取り込みおよび細胞内複製は影響されないままである。これは、フラジェリンがインフラマソーム活性化に顕著な役割を有することを示す。さらに、*FliC*を構成的に発現するよう操作したネズミチフス菌株は、マクロファージパイロトーシスを誘導することが判明した(例えば、Li et al. (2016) *Scientific Reports* 6:37447; Fink and Cookson (2007) *Cellular Microbiology* 9(11):2562-2570;およびWinter et al. (2015) *Infect. Immun.* 83(4):1546-1555参照)。

#### 【0353】

10

ここでの免疫刺激性細菌のゲノムを、ネズミチフス菌におけるフラジェリン遺伝子*fliC*および*fliJ*を欠失、破壊または変異するよう修飾でき、マクロファージなどの腫瘍常在免疫細胞の細胞死を低減し、免疫刺激性細菌の抗腫瘍免疫応答を増強する。

#### 【0354】

##### ii. SPI-1タンパク質

SPI-1タンパク質はまたマクロファージにおけるNLR C4インフラマソームも活性化し、カスパーゼ-1を活性化し、パイロトーシスを経る細胞死に至る。これらのエフェクターは、棒状タンパク質(*PrgJ*)および針状タンパク質(*PrgI*)、例えばを含むが、これらに限定されない。

#### 【0355】

20

##### 棒状タンパク質(*PrgJ*)

NLR C4インフラマソームはまた脱鞭毛ネズミチフス菌でも検出される。フラジェリン非依存的応答は、ネズミチフス菌におけるSPI-1 T3SS棒状タンパク質である*PrgJ*の検出による。精製*PrgJ*タンパク質のマクロファージサイトゾルへの送達は、フラジェリンにより誘導される効果に類似して、迅速なNLR C4依存性カスパーゼ-1活性化およびIL-1の分泌に至る(Miao et al. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107(7):3076-3080)。それ故に、ネズミチフス菌における*PrgJ*コード遺伝子の変異またはノックアウトは、マクロファージパイロトーシスを低減でき、これは、該細菌による死滅に感受性である免疫細胞の保存により、免疫刺激性細菌の抗腫瘍免疫効果を増強する。

30

#### 【0356】

##### 針状タンパク質(*PrgI*)

ネズミチフス菌におけるSPI-1 T3SS針状タンパク質である*PrgI*も、NLR C4インフラマソームにより認識され、活性化される。ヒト初代単球由来マクロファージのサイトゾルへのネズミチフス菌*PrgI*の送達は、IL-1分泌およびその後の細胞死をもたらす。*PrgI*を発現するが、フラジェリンはしないサルモネラ変異体は、フラジェリン発現株より後の時点まで、一次単球由来マクロファージにおけるインフラマソームの活性化を示した(Kortmann et al. (2015) *J. Immunol.* 195:815-819)。そうして、ここに提供される免疫刺激性細菌は、ネズミチフス菌における針状タンパク質をコードする遺伝子を変異または欠失するよう修飾でき、免疫細胞パイロトーシスを阻害し、抗腫瘍免疫効果を増強する。

40

#### 【0357】

##### iii. QseC

センサータンパク質QseCは、多くのグラム陰性細菌で見られ、環境に応答し、数種の病原性因子の発現を制御する、高度に保存された膜ヒスチジンセンサーキナーゼである。これらの病原性因子は、例えば、ネズミチフス菌における鞭毛生合成のマスターレギュレーターをコードする*fliHDC*遺伝子；非食細胞の侵襲、サルモネラ含有液胞(SCV)の早期成熟および輸送制御ならびにSCV-リソソーム融合の阻止に役割を有するタンパク質をコードする*sopB*遺伝子；およびSCV維持および膜完全性に必要な*sifA*遺伝子を含む。

50

## 【0358】

LED209によるQseCの選択的阻害は、病原性関連遺伝子発現(例えば、flhD C、sifAおよびsopB)のQseC介在活性化の阻害により、ネズミチフス菌増殖を抑制することなく細菌病原性を阻止し、ネズミチフス菌または野兔病菌での感染後、マウスを死から部分的に保護することが示されている。QseC遮断は、感染マクロファージにおける過剰なインフラマソーム活性化阻害により、マクロファージのカスパーゼ-1活性化、IL-1放出およびネズミチフス菌誘導パイロトーシスを阻害することが判明した。QseCの阻害はまた鞭毛遺伝子発現および運動性を抑制し、上皮細胞におけるネズミチフス菌の侵襲および複製能を抑制する(Li et al. (2016) Scientific Reports 6:37447)。それ故に、QseCをコードする遺伝子を変異またはノックアウトするこ

10

## 【0359】

## 6. 細菌培養条件

細菌の培養条件は、遺伝子発現に影響し得る。ネズミチフス菌は、SPI-1およびその関連T3SS-1が関与する機構により、感染30~60分以内に、マクロファージの迅速な炎症促進性カスパーゼ依存性細胞死を誘導できるが、上皮細胞ではできないことが示されている(Lundberg et al (1999) Journal of Bacteriology 181(11):3433-3437)。この細胞死は、インフラマソームの活性化が介在し、その後のカスパーゼ-1

を活性化し、これはIL-1およびIL-18の成熟および放出を促進し、パイロトーシスと称される新規形態の細胞死を開始させることが現在知られる(Broz and Monack (2011) Immunol. Rev. 243(1):174-190)。このパイロトーシス活性は、対数期細菌を使用して誘導でき、一方静止期細菌は、マクロファージにこの迅速な細胞死を誘導しない。SPI-1遺伝子は、細菌対数増殖期間に誘導される。それ故に、静止期に治療に使用するネズミチフス菌を採取することにより、マクロファージの迅速なパイロトーシスは阻止され得る。マクロファージは、自然免疫系の重要なメディエーターであり、適切な抗腫瘍応答の確立に重要であるサイトカインを分泌するよう作用する。さらに、IL-1およびIL-18などの炎症促進性サイトカインの分泌の制限は、投与されたネズミチフス菌治療剤の忍容性を改善する。静止期に採取されたここで提供する免疫刺激性ネズミチフス菌は、抗腫瘍応答の誘導に使用される。

20

30

## 【0360】

## 7. 腫瘍コロニー形成増加

VNP20009は、癌の処置のために開発された弱毒化ネズミチフス菌ベースの微生物癌治療剤である。VNP20009は、遺伝子msbBおよびpurI(purM)の欠失を介して弱毒化される。purI欠失は、微生物をプリンまたはアデノシンに対して栄養要求性とする。msbB遺伝子の欠失は、リポドAドメインの末端ミリスチル基の付加の阻止により細菌リポ多糖(LPS)と関連する毒性を低減し、リポドAからの毒性をあまり生じない(Khan et al. (1998) Mol. Microbiol. 29:571-579)。

## 【0361】

VNP20009が腫瘍にコロニー形成する能力は、マウスとヒトで差がある。VNP20009の全身投与は、マウス腫瘍のコロニー形成をもたらした；一方ヒト患者へのVNP20009の全身投与は腫瘍コロニー形成をほとんどもたらさなかった。マウスにおいて、VNP20009は、全身投与後高度の腫瘍コロニー形成を示すことが判明した(例えば、Clairmont et al. (2000) J. Infect. Dis. 181:1996-2002；およびBermudes et al. (2001) Biotechnol Genet Eng Rev. 18:219-33参照)。しかしながら、進行型黒色腫患者のフェーズ1試験において、30分静脈内点滴後、ヒト腫瘍でVNP20009はほとんど検出されなかった(Toso et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20:142-52参照)。VNP20009の長い4時間点滴を評価するフォローアップ試験に入った患者も、腫瘍生検後、検出可能なVNP20009がないことが示された(Heimann

40

50

et al. (2003) J. Immunother. 26:179-180)。腫瘍内投与後、VNP20009の誘導体のコロニー形成は検出された(Nemunaitis et al. (2003) Cancer Gene Ther. 10:737-44)。ヒト腫瘍へのVNP20009の直接腫瘍内投与は腫瘍コロニー形成をもたらし、ヒト腫瘍が高レベルでコロニー形成され得て、マウスとヒトの間の腫瘍コロニー形成差異は全身投与後のみ生じることを示す。

【0362】

VNP20009などの株は、低腫瘍コロニー形成に至る、ヒト補体により不活性化される。補体に対する抵抗性が改善した株がここに提供される。これらの株は、細菌ゲノムにおける修飾を含み、本明細書の他の箇所に記載するとおり、所望により複製について提供される遺伝子(真核生物プロモーター制御下のasd)をコードする、一般に低または中コピー数のプラスミドおよびサイトカイン、I型インターフェロン産生および他のこのような治療遺伝子/産物を刺激するタンパク質の機能獲得型変異体を含むが、これらに限定されない治療産物をコードする核酸も担持し得る。

10

【0363】

下表は、細菌遺伝子型/修飾、その機能的効果および効果/利益を要約する。

【表4】

| 遺伝子型/修飾    | 機能的効果                | 効果/利益   |
|------------|----------------------|---|
| ΔpurI      | プリン/アデニン栄養要求性        | 腫瘍特異的富化<br>健全組織における複製制限   |
| ΔmsbB      | LPS表面コート修飾           | TLR4認識低減<br>免疫抑制性サイトカインプロファイル(TNF-α)低減<br>安全性改善   |
| ΔFLG       | 鞭毛ノックアウト             | 主要炎症性および免疫抑制要素除去<br>TLR5認識低減<br>免疫抑制性サイトカインプロファイル低減<br>安全性改善<br>非食細胞への侵入能力低減  |
| ΔpagP      | LPS表面コート修飾           | 主要炎症性および免疫抑制要素除去<br>TLR4認識低減<br>IL-6プロファイル低減<br>安全性改善   |
| Δasd(ゲノム内) | プラスミド維持              | プラスミド送達改善<br>プラスミド維持  |
| プラスミド      | 宿主認識プロモーター制御下遺伝子産物発現 | 真核生物プロモータープラスミド含有細胞への発現制限<br>TMEにおける長期発現(すなわち、宿主認識プロモーター制御したプラスミドにコードされるasd)<br>治療産物発現<br>I型IFN介在自然免疫および適応免疫を誘導するためのCpG |

20

30

40

【0364】

ここに提供される株は、鞭毛を有さないようにFLGおよび/またはpagPである。さらに、株は、purI(purM)、msbBおよびasd(細菌ゲノムにお

50

ける)の1以上であり得る。プラスミドは、宿主認識プロモーター(例えば、真核生物および動物ウイルス由来のものを含む、RNAポリメラーゼIIプロモーターなどの真核生物プロモーター)制御下に産物をコードするよう修飾される。プラスミドは、所望によりインピボでの複製を可能とするための *asd* ならびに本明細書の他の箇所に記載する他の有益な機能を有する核酸(例えば、*CpG*)および遺伝子産物をコードできる。

#### 【0365】

免疫刺激性細菌は、弱毒化および野生型または他の非弱毒株を含む適当な細菌株由来である。細菌株は、弱毒株でよくまたは標準的方法により弱毒化されたもしくは、ここに提供される修飾により、コロニー形成する能力が主に免疫特権組織および臓器、特に免疫および固形腫瘍を含む腫瘍細胞に制限された点で弱毒化されている株であり得る。細菌は、例えば、サルモネラ、シゲラ、リステリア、大腸菌およびビフィドバクテリアの株を含むが、これらに限定されない。例えば、種は、ソンネ赤痢菌、フレクスナー赤痢菌、志賀赤痢菌、リステリア・モノサイトゲネス、チフス菌、ネズミチフス菌、トリチフス菌およびゲルトネル菌を含む。他の適当な細菌種は、リケッチア、クレブシエラ、ボルデテラ、ナイセリア、エロモナス、フランシセラ、コリネバクテリウム、サイトロバクター、クラミジア、ヘモフィルス、ブルセラ、マイコバクテリウム、マイコプラズマ、レジオネラ、ロドコッカス、シュードモナス、ヘリコバクター、ビブリオ、バシラスおよびエリジペロスリックス。例えば、斑点熱リケッチア、発疹チフスリケッチア、ツツガムシ病リケッチア、発疹熱リケッチア、リケッチア・シビリカ、気管支敗血症菌、髄膜炎菌、淋菌、エロモナス・オイクレノフィラ、エロモナス・サルモニシダ、野兎病菌、ヒツジ偽結核菌、サイトロバクター・フレウンディイ、肺炎クラミジア、ヘモフィルス・ソムナス、ウシ流産菌、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ、在郷軍人病菌、ロドコッカス・エクイ、緑膿菌、ヘリコバクター・ムステラエ、コレラ菌、枯草菌、ブタ丹毒菌、エルシニア・エンテロコリチカ、ロシャリメア・クインターナおよびアグロバクテリウム・ツメルファシウムを含む。

10

20

#### 【0366】

ここに提供される免疫刺激性細菌の例は、サルモネラ種である。ここに記載される修飾のための細菌の例は、寄託番号14028としてATCCに寄託された株の全ての同定された特徴を有する株などの、野生型サルモネラの株である。*asd* 遺伝子ノックアウトを補完するためおよび無抗生物質プラスミド維持のためにプラスミドで操作された株YS1646(ATCC Catalog # 202165; VNP20009とも称する、国際PCT出願公開WO99/13053も参照)などの操作したネズミチフス菌の株が提供される。次いで、株は、フラジェリン遺伝子欠失および/または *pagP* 欠失のために修飾される。株は、またプリン、特にアデノシン栄養要求性とされ、*asd* および *msbB* である。*asd* 遺伝子は、真核生物宿主での複製のためにプラスミドに提供され得る。これらの欠失およびプラスミドは、本明細書の他の箇所に記載される。本明細書の他の箇所に記載されるおよび/または当業者に知られる治療産物および免疫刺激性タンパク質および他の産物をコードする核酸の何れかをプラスミドに包含させ得る。プラスミドは、一般に本明細書の他の箇所に記載されるとおり、低乃至中コピー数で存在する。治療産物は、I型IFN発現および他のサイトカインなどの免疫刺激性タンパク質を構成的に誘起/誘導できる、腫瘍微小環境における抗腫瘍免疫応答を促進するサイトゾルDNA/RNAセンサーの機能獲得型変異体およびここに記載する他のこのような産物を含む。

30

40

#### 【0367】

E. 非ヒトSTINGタンパク質および腫瘍微小環境において免疫応答を刺激するためのタンパク質における機能獲得型変異

抗腫瘍または抗ウイルス免疫応答を促進または刺激する産物を含む、治療産物、特に抗癌産物である遺伝子産物をコードするヌクレオチドの配列を含む免疫刺激性細菌が提供される。治療産物に含まれるのは、細胞のサイトゾルでRNA、DNA、ヌクレオチド、ジヌクレオチド、環状ヌクレオチド、環状ジヌクレオチドおよび他のこのような分子などの核酸に曝されたとき、免疫応答を誘起する、サイトゾルDNA/RNAセンサーと称される

50



産物である。ここでの免疫刺激性細菌は、活性が増加したまたは構成的に免疫応答を誘起し、サイトゾルにおけるDNA/RNA産物の存在を必要としない、修飾産物である。例えば、腫瘍微小環境で免疫応答を増加させる、機能獲得型変異を含むコード化タンパク質である。免疫刺激性細菌が提供されるだけでなく、他の送達媒体がこのような免疫刺激性タンパク質またはコード化タンパク質の送達に使用され得る。これらの送達媒体は、エクソソーム、ベクターおよびウイルスを含む。例えば、腫瘍溶解性ウイルス、特にサイトゾルウイルスであるワクシニアウイルスなどの腫瘍溶解性ウイルスは、機能獲得型産物を発現するようにも修飾され得る。コード化機能獲得型産物は、エクソソーム、リポソームおよび一般に腫瘍に標的化された他の適当な媒体に送達され得る。

#### 【0368】

機能獲得型産物(および/または他の治療産物)をコードする免疫刺激性細菌は、優先的に腫瘍常在免疫細胞を含む腫瘍に感染する免疫刺激性細菌および/またはゲノムが細菌が腫瘍常在免疫細胞の低細胞死を誘導し、それにより免疫刺激性細菌が腫瘍細胞および腫瘍常在免疫細胞に蓄積し、それにより腫瘍に対する免疫応答を刺激するために、構成的活性型タンパク質および/または他の治療産物を細胞および腫瘍微小環境に送達するように修飾された免疫刺激性細菌を含む。免疫刺激性細菌は、さらに特定の腫瘍に対する応答を増強するように対象における腫瘍抗原をコードできる。ここに提供され、かつ上記および下記の免疫刺激性細菌の何れも、このような機能獲得型産物をコードするよう修飾され得る。産物は、プロモーターおよびヒトまたは他の動物または哺乳動物などの真核生物対象において認識されている何らかの他の所望の制御配列の制御下、プラスミドにコード化される。一般に、機能獲得型産物をコードする核酸は、RNAポリメラーゼIIプロモーターの制御下にある。

#### 【0369】

STINGタンパク質およびここに記載するI型インターフェロンシグナル伝達経路における他のタンパク質および他の抗癌産物を含む機能獲得型バリエーションを含む治療産物は、真核生物プロモーターの制御下発現される。プロモーターは、例えば、EF-1アルファプロモーター、CMV、SV40、PGK、EIF4A1、CAG、CD68および合成MNDプロモーター；O、MSCVおよびTLRプロモーターおよび呼吸器多核体ウイルス(RSV)プロモーターなどのウイルスプロモーター；EIF-1aなどの細胞プロモーター；tet-CMVなどの誘導型キメラプロモーター；および組織特異的プロモーターを含む(Chang et al. (2013) Cold Spring Harb Protoc;doi:10.1101/pdb.prot075853)。

#### 【0370】

さらに、サルモネラの株、シゲラ、大腸菌、ビフィドバクテリア、リケッチア、ビブリオ、リステリア、クレブシエラ、ボルデテラ、ナイセリア、エロモナス、フランシセラ、コレラ、コリネバクテリウム、サイトロバクター、クラミジア、ヘモフィルス、ブルセラ、マイコバクテリウム、マイコプラズマ、レジオネラ、ロドコッカス、シュードモナス、ヘリコバクター、パシラスおよびエリジペロスリックスまたはその弱毒株またはその修飾株の何れかなどの、ここに修飾について記載する細菌の何れか、エクソソーム、リポソームおよび腫瘍溶解性ウイルスを、宿主により認識されるRNAポリメラーゼプロモーターの制御下機能獲得型産物をコードする核酸を含むプラスミドまたは細菌におけるプラスミド上にコード化することにより、修飾し得る。機能獲得型産物は、感染対象の細胞で発現される。免疫刺激性細菌は、ここに記載するとおり、腫瘍および腫瘍常在免疫細胞に蓄積または優先的に感染するよう修飾されたものを含む。例えば、インターフェロン(IFN)-ベータなどのI型IFNの発現または構成的発現をもたらす機能獲得型産物をコードする免疫刺激性細菌を、さらに、上皮細胞に感染する能力を低減させるかまたは排除するが、腫瘍常在免疫細胞を含む食細胞に感染できるように修飾するおよび/または細菌を、感染食細胞を死滅させないように修飾する。

#### 【0371】

ここでの免疫刺激性細菌は、細胞のサイトゾルにおいて、RNA、DNA、ヌクレオチド

10

20

30

40

50

、ジヌクレオチド、環状ヌクレオチド、環状ジヌクレオチドおよび他のこのような分子などの核酸に曝されたとき、免疫応答を誘起するサイトゾルDNA/RNAセンサーと称する産物をコードし得る。ここでの免疫刺激性細菌は、構成的に免疫応答を誘起し、サイトゾルにおけるDNA/RNAおよび他のヌクレオチドの存在を必要としない修飾産物をコードする。このような例は、I型インターフェロン発現を誘導する経路の成分である。ここで意図される産物は、I型インターフェロンが細胞のサイトゾルにおけるヌクレオチド、ジヌクレオチド、環状ヌクレオチド、環状ジヌクレオチドおよび他のこのようなりガンドの非存在下で発現または産生されるように、構成的活性または増加した活性(機能獲得型産物)を有するこれらDNA/RNAセンサーの修飾携帯である。細胞、特に腫瘍細胞および腫瘍常在免疫細胞におけるこれら修飾産物の発現は、腫瘍微小環境におけるインターフェロン-を含むI型インターフェロンの構成的発現をもたらす。これらの機能獲得型産物を発現する免疫刺激性細菌およびまた腫瘍溶解性ウイルス(および他の送達媒体ここに記載するとおり)が腫瘍細胞および腫瘍常在免疫細胞に蓄積するまたは優先的に感染するため、産物は腫瘍微小環境で発現され、腫瘍微小環境における免疫応答増加および治療有効性増強をもたらす。

10

#### 【0372】

免疫刺激性細菌および他の媒体でコード化され得る遺伝子産物の例は、サイトゾルDNA/RNAを認識する先天性経路を感知または含まれ、I型インターフェロン産生を活性化するタンパク質を含むが、これらに限定されない。I型インターフェロンを活性化する先天性DNA/RNA認識に關与するタンパク質は、STING、RIG-I、MDA-5、IRF-3、IRF-7、TRIM56、RIP1/RIPK1、Sec5/EXO2、TRAF2、TRAF3、TRAF6、STAT1、LGP2/DHX58、DDX3/DDX3X、DHX9/DDX9、DDX1、DDX21、DHX15/DDX15、DHX33/DDX33、DHX36/DDX36、DDX60およびSNRNP200を含むが、これらに限定されない。構成的I型インターフェロン発現をもたらすこれらのタンパク質の何れかの機能獲得型変異は知られまたは同定でき、細胞の感染または腫瘍細胞のターゲティングおよび結合によるなど、腫瘍微小環境に、免疫刺激性細菌または他のベクターおよびエクソソームまたはリポソームなどの送達媒体により送達され得る。機能獲得型変異は、構成的I型インターフェロン発現に起因する障害を有する個体から同定されたものを含む。機能獲得型産物の例は、インターフェロン症を有する対象で生じるものである。上記のとおり、変異は、同様に機能獲得型産物を産生するスクリーニングにより同定され得る。

20

30

#### 【0373】

ここでの免疫刺激性細菌は、ヒトSTINGのNF- $\kappa$ Bシグナル伝達活性より低いNF- $\kappa$ Bシグナル伝達活性を有する非ヒトSTINGタンパク質およびSTINGタンパク質のバリエーションおよび構成的に免疫応答を誘起およびサイトゾルにおけるDNA/RNAまたは他のヌクレオチドリガンドの存在を必要としない他のDNA/RNAセンサーを含む、STINGなどのこのようなタンパク質をコードする。この例は、I型インターフェロン発現を誘導する経路の成分である。

#### 【0374】

同定された機能獲得型変異体産物をコードする核酸をさらに修飾して、発現に関する性質を改善し得る。修飾は、例えば、哺乳動物、特にヒト対象における転写効率を増加させるGC含量またはCpGジヌクレオチド含量低減、潜在的スプライシング部位除去、陰性CpG島、シャイン・ダルガノ(SD)配列置換およびTATAボックスおよび/または末端シグナル置換など、転写効率を増加させるコドン最適化を含む。また、コドンを、コドン使用バイアスの改変、GC含量低減、mRNA二次構造低減、中途ポリA部位除去、RNA不安定性モチーフ(ARE)除去、mRNAの安定な自由エネルギー除去、内部カイ部位およびリポソーム結合部位修飾およびRNA二次構造低減により、翻訳効率を増加するために最適化し得る。

40

#### 【0375】

50

## 1. I型インターフェロンおよび経路

一本鎖および二本鎖RNAおよび環状ジ-ヌクレオチドおよび核酸の他のこのような形態などの核酸の宿主認識により介在されるI型インターフェロン誘導経路は、I型IFNを誘導することが知られる。サイトゾルにおける一本鎖(ss)および二本鎖(ds)RNAの宿主認識が介在するトール様受容体(TLR)非依存的I型IFN経路もある。これらの核酸は、レチノイン酸誘導性遺伝子I(RIG-I)、黒色腫分化関連遺伝子5(MDA-5)を含むRNAヘリカーゼおよびIRF-3転写因子のIFN-βプロモータ刺激因子1(IPs-1)アダプタータンパク質介在リン酸化を介して感知され、IFN-βの誘導をもたらす(Iretton and Gale (2011) *Viruses* 3(6):906-919)。ここに記載する  
10  
とあり、これらの経路におけるタンパク質は修飾され得るかまたはバリエーションとして存在でき、IFN-βおよびIFN-αを含むI型インターフェロン(インターフェロン1型とも称される)の構成的発現をもたらす。ここに提供されるのは、バリエーションタンパク質をコードする、免疫刺激性細菌およびエクソソーム、リポソームおよび腫瘍溶解性ウイルスを含む他の送達媒体である。これらの送達媒体を使用して、対象に直接投与することによりおよび/または細胞治療プロトコールにおける使用のために細胞、同種または自己に投与することにより、癌を処置し得る。

### 【0376】

I型インターフェロン(IFN; インターフェロン1型とも称される)はIFN-βおよびIFN-αを含み、抗ウイルス、抗腫瘍および免疫制御活性を有する多面的サイトカインである。IFN-βは大部分の細胞型により産生される; IFN-αは、主に造血細胞、  
20  
特に形質細胞様樹状細胞により産生される。I型IFNは、パターン認識受容体(PRR)およびサイトカインによる、微生物およびウイルス核酸およびLPS(リポ多糖)を含む病原体関連分子パターン(PAMP)の感知後産生される。ウイルスを含む病原性感染に対する自然免疫応答に含まれ、抗原提示を促進し、DC成熟に介在し、細胞毒性Tリンパ球(CTLs)、ナチュラルキラー(NK)細胞およびマクロファージを活性化し、高親和性抗原特異的TおよびB細胞応答および免疫学的記憶の発展を促進により、適応免疫系を活性化する、強力な免疫調節因子である。

### 【0377】

I型IFNは、腫瘍に抗増殖性およびアポトーシス促進効果を示し、腫瘍血管新生に抗血管形成効果を有する。腫瘍細胞表面にMHCクラスI分子の発現を誘導し、腫瘍細胞の免疫原性を増加させ、それに対する細胞毒性を活性化する。I型IFNは、癌およびウイルス感染の処置のための治療剤として使用されている。例えば、IFN-β(商品名Intron(登録商標)/Roferon(登録商標)-Aで販売)は、ヘアリー細胞白血病、悪性黒色腫、AIDS関連カポジ肉腫および濾胞性非ホジキンリンパ腫の処置に対して承認されている; 慢性骨髄性白血病(CML)、腎臓細胞癌腫、神経内分泌腫瘍、多発性骨髄腫、非濾胞性非ホジキンリンパ腫、類腱腫および皮膚T細胞リンパ腫の処置にも使用されている(Ivashkiv and Donlin (2014) *Nat. Rev. Immunol.* 14(1):36-49; Kallioliias and Ivashkiv (2010) *Arthritis Research & Therapy* 12(Suppl 1):S1; Lee, S. and Margolin, K. (2011) *Cancers* 3:3856-3893)。  
30

### 【0378】

腫瘍および腫瘍微小環境におけるI型インターフェロンの発現は、とりわけ免疫刺激性細菌およびここでの他の送達媒体が誘起するよう設計された免疫応答である。I型インターフェロンの誘導または誘起は、癌処置のための抗腫瘍免疫を提供する。  
40

### 【0379】

## 2. I型インターフェロン症および機能獲得型変異体

I型インターフェロン(IFN)、炎症促進性サイトカインおよびケモカインの誘導は、病原体感染を予防または阻止する免疫応答の具備に必要である。この応答はまた抗腫瘍剤として有効であり得る。ここに提供する免疫刺激性細菌および他の送達媒体は、I型IFNを構成的に誘導するタンパク質をコードする。特にこれらのタンパク質で、免疫応答モジュレーター  
50  
の過産生が関与する種々の疾患または障害を有する個体で生ずるものである。

例えば、I型IFNおよび炎症促進性サイトカインの過産生または過剰な産生または不完全な負の制御は、炎症疾患および自己免疫疾患など望ましくない効果をもたらす。I型IFNおよび炎症促進性サイトカインの、一般に慢性の、過産生に關与する障害は、インターフェロン症と称される(例えば、Lu and MacDougall (2017) *Front. Genet.* 8:118; and Konno et al. (2018) *Cell Reports* 23:1112-1123参照)。I型インターフェロン症と關連する障害および臨床的表現型は、エカルディ・グティエール症候群(AGS)、乳児期発症STING關連脈管障害(SAVI)、シングルトン・メルテン症候群(SMS)、非定型SMS、家族性凍瘡様ループス(FCL)、全身エリテマトーデス(SLE)、両側線条体壊死(BSN)、脳血管疾患(CVD)、遺伝性対側性色素異常症(DSH)、痙性対麻痺(SP)、X連鎖網状色素性障害(XLPDR)、プロテアソーム關連自己炎症症候群(PRAAS)、頭蓋内石灰化(ICC)、メンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症(MSMD)および脊椎内軟骨異形成症(SPENCED)を含む(例えば、Rodero et al. (2016) *J. Exp. Med.* 213(12):2527-2538参照)。これらの表現型は、I型IFNの誘導に關与する産物の構成的活性に至る遺伝子変異が關与する特定の遺伝子型と關連する。

10

20

30

#### 【0380】

インターフェロンシグナル伝達の持続的活性化は、1)サイトゾルDNA増加(例えば、TREX1およびSAMHD1の変異)またはサイトゾルRNA/DNAハイブリッド増加(例えば、RNASEH2A、RNASEH2B、RNASEH2CおよびPOLA1の変異)に至る機能喪失型変異; 2)RNA編集の欠損およびサイトゾルにおける自己核酸RNA種の異常感知をもたらす機能喪失型変異(例えば、ADAR1の変異); 3)サイトゾルIFNシグナル伝達経路構成的活性化/サイトゾル核酸リガンドに対する感受性増加に至る機能獲得型変異(例えば、RIG-I、MDA5およびSTINGの変異); 4)折り畳まれていないタンパク質の応答の妨害により引き起こされるMAVSを介する異常RNAシグナル伝達に至る機能喪失型変異(例えば、SKIV2Lの変異); 5)未制御IFN刺激遺伝子(ISG)産生に至るIFN受容体(IFNAR1/2)シグナル伝達の制限を担う分子の機能喪失型変異(例えば、USP18およびISG15変異); 6)未知機構を介するIFNシグナル伝達増加に至るプロテアソーム機能不全(例えば、PSMA3、PSMB4およびPSMB8の変異); および7)I型IFNシグナル伝達に至る機構が不明なままであるTRAP/ACP5およびC1qにおける機能喪失型変異によるものであり得る(Rodero et al. (2016) *J. Exp. Med.* 213(12):2527-2538)。

#### 【0381】

ここで興味深いのは、機能獲得型に至る変異である。STING、MDA5およびRIG-Iにおける、コード化タンパク質の構成的活性化および/または感受性増強または内因性リガンドへの親和性もしくは結合の増加をもたらす、機能獲得型(GOF)と關連する変異が知られている。例えば、STINGにおけるGOF変異はSAVIおよびFCLと關連する; MDA5におけるGOF変異はAGSおよびSMSと關連する; そしてRIG-IにおけるGOF変異は非定型SMSと關連する。

#### 【0382】

機能獲得型変異を有するこれらのタンパク質をコードするここに提供する免疫刺激性細菌および腫瘍溶解性ウイルスは、I型IFNおよび炎症促進性サイトカイン産生増加のために、これらのタンパク質の構成的活性化を利用する。機能獲得型変異を有するSTING、MDA5および/またはRIG-Iをコードする腫瘍ターゲティング免疫刺激性細菌ならびに腫瘍溶解性ウイルスおよび他の送達媒体が、ここで提供される。このような免疫刺激性細菌および他の送達媒体は、腫瘍微小環境におけるI型IFNおよび炎症促進性サイトカインの産生を増加し、免疫刺激性細菌の抗腫瘍免疫応答を増強し、治療有効性を改善する。STINGをコードする遺伝子はTMM173、MDA5をコードする遺伝子はIFIH1、そしてRIG-Iをコードする遺伝子はDDX58と称される。各遺伝子に多数のアレルがあり、機能獲得型をもたらすアレルの何れかを有する遺伝子で生じ得る変異が知られる。下に挙げる変異は単独で生じ得てまたは何らかの組み合わせで使用され得

40

50

る。機能獲得型をもたらす他の変異は、日常的スクリーニング/変異プロトコールにより同定され得る。下表は、STING/TMEM173(配列番号305~309)、MDA5/IFIH1(配列番号310)およびRIG-I/DDX58(配列番号311)の各々の機能獲得型変異例を挙げる。STINGにおける324-326 SLS ALAなどの1以上のリン酸化部位の欠失または置換およびSTINGにおけるまたは核因子- $\beta$ (NF- $\beta$ )シグナル伝達を使用する他のタンパク質におけるこのようなシグナル伝達を低減するためのリン酸化部位を排除する他の置き換えなどの他の変異も導入され得る。

【0383】

得られたタンパク質は、ここに提供される免疫刺激性細菌をコードし得る。タンパク質は免疫刺激性細菌においてプラスミドにコード化され、または腫瘍溶解性ウイルスのゲノムにコード化されまたはエクソソームまたはリポソームなどの送達媒体を介して送達され得る。

10

【0384】

20

30

40

50

【表 5】

## 機能獲得型変異体の表

| 変異が導入される正常機能タンパク質の例            | 機能獲得型変異                     |
|--------------------------------|-----------------------------|
| STING/TMEM173<br>(配列番号305~309) | S102P                       |
|                                | V147L                       |
|                                | V147M                       |
|                                | N154S                       |
|                                | V155M                       |
|                                | G166E                       |
|                                | C206Y                       |
|                                | G207E                       |
|                                | S102P/F279L                 |
|                                | F279L                       |
|                                | R281Q                       |
|                                | R284G                       |
|                                | R284S                       |
|                                | R284M                       |
|                                | R284K                       |
|                                | R284T                       |
|                                | R197A                       |
|                                | D205A                       |
|                                | R310A                       |
|                                | R293A                       |
|                                | T294A                       |
|                                | E296A                       |
|                                | R197A/D205A                 |
|                                | S272A/Q273A                 |
|                                | R310A/E316A                 |
|                                | E316A                       |
|                                | E316N                       |
|                                | E316Q                       |
|                                | S272A                       |
|                                | R293A/T294A/E296A           |
|                                | D231A                       |
|                                | R232A                       |
|                                | K236A                       |
|                                | Q273A                       |
|                                | S358A/E360A/S366A           |
|                                | D231A/R232A/K236A/<br>R238A |
|                                | S358A                       |
|                                | E360A                       |
|                                | S366A                       |
|                                | R238A                       |
|                                | R375A                       |
|                                | S324A/S326A                 |

10

20

30

40

50

【表 5】

|                            |       |
|----------------------------|-------|
| MDA5 / IFIH1<br>(配列番号 310) | T331I |
|                            | T331R |
|                            | A489T |
|                            | R822Q |
|                            | G821S |
|                            | A946T |
|                            | R337G |
|                            | D393V |
|                            | G495R |
|                            | R720Q |
|                            | R779H |
|                            | R779C |
|                            | L372F |
| A452T                      |       |
| RIG-I<br>(配列番号 311)        | E373A |
|                            | C268F |

10

20

## 【0385】

配列番号 305 ~ 309 に示すヒト STING の配列を対照とするアミノ酸残基 R197、D205、R310、R293、T294、E296、S272、Q273、E316、D231、R232、K236、S358、E360、S366 および R238 は、それぞれ、配列番号 351 に示すマウス STING の配列を対照とするアミノ酸残基 R196、D204、R309、R292、T293、E295、S271、Q272、E315、D230、R231、K235、S357、E359、S365 および R237 に対応する。

## 【0386】

## 3. STING 介在免疫活性化

STING (インターフェロン遺伝子刺激物質)、膜貫通タンパク質 173 (TMEM173 としても知られる)、IRF3 活性化のメディエーター (MITA)、メチオニン - プロリン - チロシン - セリン (MPYS) および小胞体 (ER) IFN ステイミュレーター (ERIS) は、小胞体に生じる 379 アミノ酸タンパク質であり、シグナル伝達アダプタータンパク質として機能し、I 型 IFN および炎症促進性サイトカインなどの免疫応答遺伝子の転写を制御する。STING 経路の刺激は内皮細胞を活性化し、培養においてインターフェロン - 応答遺伝子、アポトーシス経路遺伝子の上方制御および凝固カスケードの強力なイニシエーターである組織 - 因子発現における内皮細胞死を誘導する (Liu et al. (2014) N. Engl. J. Med. 371:507-518)。

30

## 【0387】

IFN 産生および炎症促進におけるその役割により、ヒト STING は、癌および感染症の免疫療法標的である。例えば、試験は、リガンド環状ジヌクレオチド (CDN) による STING の直接活性化が腫瘍死を誘導できることを示す。その結果、STING 発現が増加した腫瘍は、STING 介在細胞死経路の活性化により直接死滅される。樹状細胞 (DC) における STING 経路の活性化は DC 成熟を促進し、これは、CD8<sup>+</sup>T 細胞介在細胞毒性応答を介し、癌再発を防止する記憶応答を産生する。STING はまた処置に由来する放出された DNA により、放射線療法および化学療法の治療有効性も増強できる。マウスにおいて、Pneumovax23 (登録商標) ワクチンの有効性は、該ワクチンがヒト HAQ 機能喪失型アレルのマウスモデルで無効であるため、STING に依存する。CDN は HAQ マウスでアジュバント活性を失い、感染における STING の役割を示す。

40

50

## 【0388】

STINGシグナル伝達は、腫瘍抗原の宿主免疫認識をブーストし、強力な抗腫瘍応答をもたらす。STING発現およびシグナル伝達が結腸直腸癌を含む多くの癌で抑制され、このSTINGシグナル伝達抑制がDNA損傷応答および抗腫瘍T細胞プライミングを抑制することを示す研究がある。STING発現はまた多くの原発および転移黒色腫およびパーキットリンパ腫、乳癌、白血病、リンパ腫、HPV+癌、HCVまたはHBV関連肝細胞癌およびヘルペスウイルス関連癌でも喪失/脱制御される。細胞内DNAシグナル伝達が欠損している293TおよびMCF7などの癌細胞株へのSTINGの再構築は細胞内経路を奪還し、I型IFNおよび他のシグナル伝達経路を誘導できる(例えば、米国特許出願公開2018/0085432参照)。その結果、STINGアゴニストが癌免疫療法のために開発されている。米国特許出願公開2018/0085432は、細菌、真菌、寄生虫およびウイルスによる感染などの外来因子により引き起こされるものなどの疾患の処置およびまた抗腫瘍応答誘導のための免疫系の調節のための野生型STINGをコードする核酸配列の使用を記載する。STINGは、STING、抗体などを発現するベクターにおける、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチドとして癌の処置のために患者に投与され得る。ベクターは、ウイルスベクター(アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、VSVおよびレトロウイルス)、リポソーム、他の脂質含有複合体および宿主細胞へのポリヌクレオチドの送達に介在できる他の巨大分子複合体を含む(米国公開2018/0085432)。米国公開2018/0311343は、構成的活性型ヒトSTINGポリペプチドをコードするmRNAと腫瘍、ウイルスまたは細菌抗原などの目的の抗原をコードするmRNAの、該抗原に対する免疫応答をもたらすための投与を記載する。

10

20

## 【0389】

STINGは、サイトゾルDNA/RNAセンサーとして自然免疫に重要な役割を有する。STINGは、サイトゾルdsDNAからの産物との相互作用により、感染性病原体または異常宿主細胞損傷のサイトゾルdsDNAを「感知」する。STINGを介するサイトゾルdsDNAの感知は、宿主細胞ヌクレオチジルトランスフェラーゼである環状GMP-AMPシンターゼ(cGAS)を必要とし、これは、dsDNAに直接結合し、応答して、環状GMP-AMP(cGAMP)である環状ジヌクレオチド(CDN)第二メッセンジャーを合成し、これはSTINGに結合し、活性化する(例えば、Barber (2011) *Imm* 30 *unol. Rev.* 243(1):99-108; Sun et al. (2013) *Science* 339(6121):786-791; and Wu et al. (2013) *Science* 339(6121):826-830)。STINGはまた環状ジ-GMPおよび環状ジ-AAMPを含むサイトゾルにおいて細菌により合成されるCDNにより活性化される。CDNに結合後STINGは二量体化し、TANK結合キナーゼ(TBK1)を活性化し、次いで、それがIRF-3およびNF- $\kappa$ B転写因子をリン酸化する。IRF3-、IRF7-およびNF- $\kappa$ B依存性シグナル伝達経路の活性化は、自然免疫および適応免疫を強力に活性化するIFN- $\gamma$ およびTNF- $\alpha$ 、IL-12p40およびIFN- $\beta$ などの他の炎症促進性サイトカインの産生を誘導する(Burdette et al. (2011) *Nature* 478(7370):515-518)。CDNと結合することなく構成的に作用する異常またはバリエーションSTINGは、インターフェロン症を有する対象で生ずる。40 それにより、I型IFNの産生が構成的に誘導され得る。STINGは、TMEM173によりコードされる。

30

40

## 【0390】

## 4. TMEM173 アレル

インターフェロン遺伝子刺激物質(STING)は、約7kb長遺伝子である膜貫通タンパク質173(TMEM173)遺伝子によりコードされる。ヒトTMEM173遺伝子はアレルの相当な不均一性および集団の構造化により特徴づけられる。最も一般的なヒトTMEM173アレルはR232と称される(残基232のアミノ酸を参照; 種々のヒトTMEM173アレル配列を示す配列番号305~309参照)。アメリカ人集団の半数以上がR232/R232ではない。二番目に一般的なアレルは、R71H-G230A-R 50



293Q(HAQ)である。他の一般的アレルは、AQ(G230A-R293Q)、Q293およびH232を含む。HAQ/HAQ細胞は、ごく低い程度でSTINGタンパク質を発現し、R232/R232細胞と比較して、TMEM173転写物のレベルが低いことが判明した。R232/R232はヨーロッパ人で最も一般的な遺伝子型であり、一方HAQ/R232は東アジア人で最も一般的な遺伝子型である。アフリカ人はHAQ/HAQ遺伝子型を有さず、Q293アレルを有し、アフリカ人の約4%がAQ/AQであり、これは他の民族集団では存在しない。HAQおよびH232は、機能喪失型アレルである可能性があり、東アジア人の約30%およびヨーロッパ人の約10%がHAQ/HAQ、HAQ/H232またはH232/H232である(Patel and Jin (2018) Genes & Immunity, doi:10.1038/s41435-018-0029-9)。

10

## 【0391】

## 5. 構成的STING発現および機能獲得型変異

TMEM173の、遺伝性およびデノボの数種の活性化または機能獲得型(GOF)変異が、SAVI(乳児期発症STING関連脈管障害)として知られる稀な自己炎症性疾患と結びつけられている。SAVIは、常染色体優性疾患であり、全身性炎症、間質性肺疾患、皮膚脈管炎および反復性細菌感染により特徴づけられる。デノボTMEM173変異を有するSAVIは、一般に早期発症(<8週)であり、重度表現型であるが、家族性変異は後期発症(10代から成人)であり、軽度臨床症状である。遺伝性TMEM173活性化変異はG166EおよびV155Mを含み、一方デノボ変異はN154S、V155M、V147M、V147L、C206Y、R284G、R281QおよびS102P/F279Lを含む(Patel and Jin (2018) Genes & Immunity, doi:10.1038/s41435-018-0029-9)。同定されている他の活性化TMEM173変異は、R284M、R284K、R284TおよびR375Aを含む(米国特許公開2018/0311343)。TMEM173における他の機能獲得型変異は、高度に構成的活性型STINGをもたらす、活性化CDN非存在下で自然免疫シグナル伝達を誘導し、炎症促進性サイトカインの慢性産生に至ることが判明した、R284Sである(Konno et al. (2018) Cell Reports 23:1112-1123)。

20

## 【0392】

N154S、V155MおよびV147Lおよび/または上記表に挙げる変異の何れかなどのTMEM173変異は、単独でまたは何らかの組み合わせで、構成的活性型であり、リガンド刺激に超感受性であり、STINGインターフェロン経路の慢性活性化に至る、機能獲得型STINGをもたらす。これは、示されている(Liu et al. (2014) N. Engl. J. Med. 371:507-518)。変異TMEM173(置換V147L、N154S、V155Mおよび機能喪失型変異体V155Rの各々を伴う)および非変異TMEM173の構築物をSTING陰性HEK293T細胞にトランスフェクトし、STINGリガンド、cGAMPで刺激した。N154S、V155MおよびV147L変異体でトランスフェクトした細胞のIFNB1(IFN- $\beta$ をコードする遺伝子)レポーター活性が高度に上昇し、これは、STINGリガンドcGAMPの刺激で顕著にブーストされなかった。機能喪失型変異体(V155R)、非変異TMEM173または対照プラスミドでトランスフェクトした細胞は、顕著なベースライン活性化がなかった。cGAMPでの刺激は、非変異TMEM173を有する細胞の用量依存的様式での応答をもたらす、機能喪失型変異体を発現する細胞で最高cGAMP濃度でのみ最小応答をもたらした(Liu et al. (2014) N. Engl. J. Med. 371:507-518)。これらの結果は、cGAMPによる刺激がなくても、活性化TMEM173変異がSTINGの構成的活性化をもたらすことを示す。

30

40

## 【0393】

G207Eは、脱毛症、光線過敏症、甲状腺機能不全およびSAVI特性を引き起こす他の機能獲得型STING変異である。G207E変異は、HEK細胞における炎症関連経路の構成的活性化ならびに患者末梢血単核細胞(PBMC)における異常インターフェロンシグネチャーおよびインフラマソーム活性化をもたらす。R232またはH232アレルおよびGOF変異G207Eを有するSTINGバリエーションを使用して、CDNでの刺激

50

後、R 2 3 2 + G 2 0 7 E バリエーションは I F N - および S T A T 1 / 2 経路の活性をわずかに増加させ、一方、H 2 3 2 + G 2 0 7 E バリエーションでは、I F N - レベルは一定のままであり、S T A T 1 / 2 は活性低下を示した。両バリエーションは、刺激後類似の S T A T 3 および N F - B 経路活性化を示した。これらの結果は、2 3 2 位の R が c G A M P 結合および I F N 誘導に重要であることを示し、G 2 0 7 E 変異体が S T I N G シグナル伝達経路の構成的活性化および N F - B 経路のリガンド依存性超活性化をもたらすことを示す。R 2 3 2 アレルおよび G 2 0 7 E を有する患者は、疾患がより重度である；この多型は、変異体 S T I N G の構成的活性化を強め、I F N、I L 1 - および I L - 1 8 などの下流標的の過発現に至る(例えば、doi.org/10.1101/394353 で入手可能な K eskitalo et al. (2018) 参照)。

10

## 【0394】

マウス S T I N G における 6 7 アミノ酸(例えば、配列番号 3 5 1 参照)は、環状ジ - G M P (c - ジ - G M P) 結合および/または I F N 誘導に関与するアミノ酸を同定するために、個々にまたは群で変異されている(Burdette et al. (2011) Nature 478(7370): 515-518)。とりわけ同定された変異体は、低レベルのトランスフェクションで I F N を自発的に誘導し、c - ジ - G M P に応答しない、過活動変異体 R 1 9 6 A / D 2 0 4 A、S 2 7 1 A / Q 2 7 2 A、R 3 0 9 A / E 3 1 5 A、E 3 1 5 A、E 3 1 5 N、E 3 1 5 Q および S 2 7 1 A (配列番号 3 0 5 ~ 3 0 9 に示すヒト S T I N G の配列を基準として、それぞれ R 1 9 7 A / D 2 0 5 A、S 2 7 2 A / Q 2 7 3 A、R 3 1 0 A / E 3 1 6 A、E 3 1 6 A、E 3 1 6 N、E 3 1 6 Q および S 2 7 2 A に対応)、および過発現したとき I F N を誘導するが、c - ジ - G M P に応答しない変異体 R 3 7 4 A、R 2 9 2 A / T 2 9 3 A / E 2 9 5 A / E 2 9 9 A、D 2 3 0 A、R 2 3 1 A、K 2 3 5 A、Q 2 7 2 A、S 3 5 7 A / E 3 5 9 A / S 3 6 5 A、D 2 3 0 A / R 2 3 1 A / K 2 3 5 A / R 2 3 7 A および R 2 3 7 A (配列番号 3 0 5 ~ 3 0 9 に示すヒト S T I N G を基準として、それぞれ R 3 7 5 A、R 2 9 3 A / T 2 9 4 A / E 2 9 6 A (ヒト S T I N G に E 2 9 9 A の等価物はない)、D 2 3 1 A、R 2 3 2 A、K 2 3 6 A、Q 2 7 3 A、S 3 5 8 A / E 3 6 0 A / S 3 6 6 A、D 2 3 1 A / R 2 3 2 A / K 2 3 6 A / R 2 3 8 A および R 2 3 8 A に対応)であった。

20

## 【0395】

野生型 S T I N G をコードする核酸の投与は、免疫応答を誘導できる；腫瘍標的化送達媒体におけるここで提供する構成的活性を有する機能獲得型 S T I N G 変異体の投与は、より強力な免疫応答およびより有効な抗癌治療をもたらす。構成的活性型 S T I N G またはここで提供する M D A 5 または R I G - I の機能獲得型変異体などの他のこのような修飾 D N A / R N A センサーの腫瘍標的化投与による免疫応答増強は、治療的により有効な抗癌処置を提供する。例えば、ここに記載するとおり、上皮細胞に感染しないが、腫瘍常在免疫細胞を含む食細胞に感染する能力を保持するような免疫刺激性細菌の修飾は、免疫刺激性細菌を腫瘍微小環境に効率的に標的化し、治療効率を改善し、望ましくない全身免疫応答を防止する。これらの腫瘍標的化細菌は、機能獲得型 S T I N G、M D A 5 または R I G - I 変異体をコードするよう操作され、これは、例えば、リガンド刺激非存在下でも、構成的活性型であり、腫瘍微小環境における抗癌免疫応答の改善のために強力な I 型 I F N 応答を提供する。

30

40

## 【0396】

故に、例えば、構成的活性型化された S T I N G の投与は、免疫療法癌の処置のための S T I N G シグナル伝達のブーストの代替的手段を提供する。ある実施態様において、ここに提供される腫瘍ターゲティング免疫刺激性細菌およびまた腫瘍溶解性ウイルスは、S 1 0 2 P、V 1 4 7 L、V 1 4 7 M、N 1 5 4 S、V 1 5 5 M、G 1 6 6 E、R 1 9 7 A、D 2 0 5 A、R 1 9 7 A / D 2 0 5 A、C 2 0 6 Y、G 2 0 7 E、D 2 3 1 A、R 2 3 2 A、K 2 3 6 A、R 2 3 8 A、D 2 3 1 A / R 2 3 2 A / K 2 3 6 A / R 2 3 8 A、S 2 7 2 A、Q 2 7 3 A、S 2 7 2 A / Q 2 7 3 A、F 2 7 9 L、S 1 0 2 P / F 2 7 9 L、R 2 8 1 Q、R 2 8 4 G、R 2 8 4 S、R 2 8 4 M、R 2 8 4 K、R 2 8 4 T、R 2 9 3

50

A、T294A、E296A、R293A/T294A/E296A、R310A、E316A、E316N、E316Q、R310A/E316A、S324A/S326A、S358A、E360A、S366A、S358A/E360A/S366AおよびR375Aから選択される機能獲得型変異を有するSTING/TMEM731(配列番号305~309)をコードするよう修飾され得る。

【0397】

6. 非ヒトSTINGタンパク質および活性が増加したまたは構成的であるそのバリエーションおよびSTINGキメラおよび活性が増加したまたは構成的であるそのバリエーション  
上記のとおり、サイトゾル二本鎖DNA(dsDNA)は、転写因子インターフェロン制御  
因子3(IRF3)を活性化する小胞体(ER)常在アダプタータンパク質STING(IFN  
N遺伝子のステミュレーター)を介する、I型インターフェロン(IFN)産生を刺激す  
る。TANK結合キナーゼ(TBK1)/IRF3軸は、樹状細胞(DC)のI型IFNの誘  
導および活性化およびCD8+T細胞介在抗腫瘍免疫を活性化するための腫瘍抗原の交差  
提示をもたらす。STINGシグナル伝達はまた活性化B細胞の核因子カッパ軽鎖エンハ  
ンサー(NF- $\kappa$ B)シグナル伝達軸を活性化し、炎症促進性応答をもたらすが、抗腫瘍免  
疫に必要なDCおよびCD8+T細胞の活性化をもたらさない。

10

【0398】

2'3'cGAMPの認識により、ゴルジ体を介する小胞体からのSTING転座により  
、TANK結合キナーゼ1(TBK1)の動員および転写因子IRF3およびNF- $\kappa$ Bの  
活性化が可能となる。STINGのカルボキシル末端テイル(C末端テイルまたはCTT)  
領域は、TBK1活性化およびIRF3リン酸化刺激に必要な十分である；NF- $\kappa$ B  
シグナル伝達にも関与する。CTTは、STINGリン酸化およびIRF3の動員に必要な  
配列モチーフを含む、約40アミノ酸の非構造化ストレッチである。IRF3およびNF- $\kappa$ B  
下流シグナル伝達は、脊椎動物種間で保存的なSTINGのC末端テイル(CTT)  
内の特異的配列モチーフに帰する。IRF3、TBK1およびTRAF6結合モジュ  
ールを含むCTTにおけるモジュールモチーフは、細胞シグナル伝達および免疫応答の強  
度および特異性を制御する。

20

【0399】

種およびSTING CTT個別要素の各性質により、IRF-3およびNF- $\kappa$ B下流  
応答は影響を受け得て、正反対となることがある。STING CTT要素は、2つのシ  
グナル伝達経路を区別し、微調整し、異なる生物学的応答をもたらす。ヒトおよびマウス  
免疫細胞において、例えば、STING依存性IRF-3活性化は、優勢にI型インター  
フェロン応答をもたらす。ヒト細胞におけるSTINGシグナル伝達はまたTRAF6動  
員を介する標準的およびおそらく非標準的NF- $\kappa$ B経路を介して、炎症促進性応答も駆  
動する。ヒトSTING残基366(例えば、配列番号305~309参照)は、IRF3  
結合に必要なCTTにおけるLxISモチーフの一部である一次TBK1リン酸化部位で  
あり、一方、残基L374を含む第二PxPLRモチーフは、TBK1結合に必要な  
。LxISおよびPxPLRモチーフは、全脊椎動物STINGアレルに高度に保存され  
る。他の種において、STINGシグナル伝達は、優勢にNF- $\kappa$ Bシグナル伝達軸の活  
性化をもたらす。例えば、NF- $\kappa$ Bシグナル伝達の超活性化を担うゼブラフィッシュC  
TTは、極C末端に、ヒトおよび哺乳動物STINGアレルに存在しない高度に保存され  
たPxExxDモチーフの拡張を有する；このモチーフは、腫瘍壊死因子受容体関連因子  
6(TRAF6)結合部位と類似性を共有する。ヒトSTINGシグナル伝達におけるTR  
AF6の役割は必須ではないが、TRAF6動員はゼブラフィッシュSTING誘導NF- $\kappa$ B  
活性化に必須である。ヒトSTINGを、ゼブラフィッシュSTING CTTモ  
ジュールDPVETTDYを含むように操作したヒト-ゼブラフィッシュSTINGキメ  
ラは、NF- $\kappa$ B活性化の100倍を超える活性化を誘導し、この領域が直接NF- $\kappa$ B  
シグナル活性化増強に必要な十分であることを示す。ゼブラフィッシュCTTの付加は  
またSTINGインターフェロン応答増加ももたらす(de Oliveira Mann et al. (20  
19) Cell Reports 27:1165-1175参照)。

30

40

50

## 【0400】

IRF3シグナル伝達とNF- $\kappa$ Bシグナル伝達のバランスの種間の差異は、STINGタンパク質がTMEに送達され発現されたとき、非修飾STINGタンパク質として得られた応答が抗腫瘍/抗ウイルス応答が増加するように、ここで、NF- $\kappa$ Bシグナル伝達低減および/または所望により、IRF3シグナル伝達増加を有する修飾STINGタンパク質の産生のために利用される。

## 【0401】

ある実施態様において、NF- $\kappa$ Bシグナル伝達活性が低いまたはない種由来のSTINGタンパク質を、ここに記載するまたは当業者に知られる免疫刺激性細菌の何れかならびに他の送達媒体、例えば、腫瘍溶解性ベクターを含むウイルスベクター、ミニ細胞、エクソソーム、リボソームを含む送達媒体ならびに細胞、例えば、細胞治療に使用されるおよび細菌および腫瘍溶解性ベクターなどの媒体送達に使用されるT細胞に提供する。

10

## 【0402】

非ヒトSTINGタンパク質は、タスマニアンデビル(*Sarcophilus harrisii*; 配列番号331)、マーモセット(*Callithrix jacchus*; 配列番号341)、ウシ(*Bos taurus*; 配列番号342)、ネコ(*Felis catus*; 配列番号338)、ダチョウ(*Struthio camelus australis*; 配列番号343)、トキ(*Nipponia nippon*; 配列番号344)、シーラカンス(*Latimeria chalumnae*; 配列番号345~346)、イノシシ(*Sus scrofa*; 配列番号347)、コウモリ(*Rousettus aegyptiacus*; 配列番号348)、マナティ(*Trichechus manatus latirostris*; 配列番号349)、ゾウギンザメ(*Callorhynchus milii*; 配列番号350)およびマウス(*Mus musculus*; 配列番号351)の種由来のSTINGタンパク質を含むが、これらに限定されない。これらの脊椎動物STINGタンパク質はヒト細胞で容易に免疫シグナル伝達を活性化し、STINGシグナル伝達の分子機構が脊椎動物間で共有されることを示す(de Oliveira Mann et al. (2019) Cell Reports 27:1165-1175参照)。

20

## 【0403】

他の実施態様において、非ヒトSTINGタンパク質は、上のセクション5に記載するヒトSTINGに対する、非ヒトSTINGに対応する座位に、構成的STING発現および機能獲得型変異の何れかを含む(アライメント例を提供する図1~13および種々の種における対応する変異を提供する実施例28参照)。

30

## 【0404】

他の実施態様において、STINGタンパク質のキメラが提供される。キメラにおいて、第一種STINGタンパク質のNF- $\kappa$ Bシグナル伝達/活性を付与するまたは参加するCTT領域またはその一部を、STINGタンパク質がヒトNF- $\kappa$ Bシグナル伝達活性より低いまたはごくわずかである第二種からの対応するCTTまたは部分と置き換える。第二種からのCTTは同様にまたは代替的に、I型IFNシグナル伝達が増加する。一般に、第一種はヒトであり、CTTまたはその部分は、NF- $\kappa$ B活性がはるかに低いタスマニアンデビル、マーモセット、ウシ、ネコ、ダチョウ、イノシシ、コウモリ、マナティ、トキ、シーラカンスおよびゾウギンザメなどの種のSTING由来である。それにより、抗腫瘍活性に重要であるI型インターフェロンを誘導し、抗腫瘍治療で望ましくないNF- $\kappa$ B活性が限定的またはないSTINGタンパク質をもたらす。キメラは、さらに構成的STING発現およびI型インターフェロン活性を増加するかまたは構成的とするために対応する座位における機能獲得型変異を含む。全実施態様において、TRAF6結合モチーフは、抗腫瘍治療で望ましくない活性をさらに低減または排除するために、欠失され得る。

40

## 【0405】

これらの非ヒトSTINGタンパク質、キメラおよび変異体は、腫瘍溶解性ウイルスベクター、細胞治療に使用される幹細胞およびT細胞などの細胞、エクソソーム、ミニ細胞、リボソームおよび腫瘍常在免疫細胞に蓄積し、コード化タンパク質を腫瘍微小環境および腫瘍に送達するここに提供される免疫刺激性細菌を含む、ここに記載するまたは当業者に

50

知られる何れかなどの送達媒体に提供される。非ヒト S T I N G タンパク質、修飾 S T I N G タンパク質およびキメラは、ここに記載するとおり腫瘍の処置のための治療剤としてまたは当業者に知られる他の方法で使用される。S T I N G タンパク質、送達媒体およびコード化核酸を含む医薬組成物もまた提供される。

【 0 4 0 6 】

7. サイトゾル DNA / RNA センサーとして作用する他の遺伝子産物および構成的バリエーション

a. レチノイン酸誘導性遺伝子 I ( R I G - I ) 様受容体 ( R L R )

サイトゾル核酸を感知または相互作用する他の遺伝子産物は、レチノイン酸誘導性遺伝子 I ( R I G - I ) 様受容体 ( R L R ) であり、これは、 R I G - I および M D A 5 ( 黒色腫分化関連タンパク質 5 ) を含む。 R L R は、ウイルス d s R N A のサイトゾルセンサーであり、細菌により分泌される核酸であり、 R I G - I 、 M D A 5 および L G P 2 ( ラボラトリー・オブ・ジェネティクス・アンド・フィジオロジー 2 ) を含む。ウイルス d s R N A などのリガンドの結合により、 R I G - I および M D A 5 はミトコンドリア抗ウイルス - シグナル伝達アダプタータンパク質または M A V S を活性化し、ミトコンドリアの外膜にシグナル伝達複合体を組み立てるために、腫瘍壊死因子 ( T N F ) 受容体関連因子 ( T R A F ) を動員する。下流シグナル伝達成分は、さらに T R A F により動員され、 I R F - 3 ( インターフェロン制御因子 3 ) 、 I R F - 7 、 N F - B ( 活性化 B 細胞の核因子カッパ軽鎖エンハンサー ) および A P - 1 ( アクティベータータンパク質 1 ) のリン酸化および活性化をもたらす。その結果、炎症促進性サイトカインである I F N および病原体排除に関する他の遺伝子の発現が誘導される ( 例えば、Lu and MacDougall ( 2017 ) Front. Genet. 8:118 参照 ) 。

10

20

【 0 4 0 7 】

S T I N G と同様、機能獲得型変異による M D A 5 および R I G - I の構成的活性化は I 型 I F N の誘導をもたらす、これは、免疫刺激性細菌および腫瘍溶解性ウイルスにおける抗腫瘍免疫応答の増強に影響し得る。

【 0 4 0 8 】

b. M D A 5 / I F I H 1

他のインターフェロン症遺伝子は、サイトゾル D E x D / H ボックス R N A 受容体の R I G - I 様ファミリーのメンバーである、黒色腫分化関連タンパク質 5 ( M D A 5 ) としても知られるヘリカーゼ C ドメイン含有タンパク質 1 ( I F I H 1 ) を伴う I F N 誘導型である。 I F I H 1 によりコードされる M D A 5 は、ウイルス二本鎖 R N A ( d s R N A ) を感知し、サイトゾルにおける細菌核酸を分泌し、アダプター分子、 M A V S ( ミトコンドリア抗ウイルスシグナル伝達タンパク質 ) を介する I 型 I F N シグナル伝達を活性化する、 1 0 2 5 アミノ酸サイトゾルパターン認識受容体である。 M A V S は、腫瘍壊死因子 ( T N F ) 受容体関連因子 ( T R A F ) を動員し、これが、その後下流シグナル伝達成分を動員し、 I R F - 3 ( インターフェロン制御因子 3 ) 、 I R F - 7 、 N F - B ( 活性化 B 細胞の核因子カッパ軽鎖エンハンサー ) および A P - 1 ( アクティベータータンパク質 1 ) のリン酸化および活性化をもたらす。これは、炎症促進性サイトカインである I F N および病原体排除に関する他の遺伝子の発現をもたらす ( Rutsch et al. ( 2015 ) Am. J. Hum. Genet. 96:275-282; Rice et al. ( 2014 ) Nat. Genet. 46(5):503-509; Lu and MacDougall ( 2017 ) Front. Genet. 8:118 ) 。

30

40

【 0 4 0 9 】

機能獲得型 ( G O F ) I F I H 1 バリエーションは、顕著な血管炎症により特徴づけられる、エカルディ・グティエール症候群 ( A G S ) およびシングルトン・メルテン症候群 ( S M S ) を含む自己免疫障害を有する対象で生ずる。 A G S は、特に脳および皮膚に影響する炎症性疾患であり、インターフェロン誘導転写物の上方制御により特徴づけられる。 A G S は、一般に R N a s e H 2 エンドヌクレアーゼ複合体の 3 非アレル成分である D N A エクソヌクレアーゼ T R E X 1 をコードする遺伝子、デオキシヌクレオシド三リン酸トリホスホヒドロラーゼ A M H D 1 および二本鎖 R N A 編集酵素 A D A R 1 の何れかの変異により

50

生ずる。AGSを有する一部患者は、これら6遺伝子の何れにも変異を有しないが、IFIH1にGOF変異を有し、この遺伝子がAGSにも関与することを示唆する。シングルトン・メルテン症候群(SMS)は、血管(例えば、石灰化)、歯(例えば、早期発症歯周炎、歯根吸収)および骨(例えば、骨減少症、先端骨溶解、骨粗鬆症)における異常により特徴づけられる常染色体優性障害である。インターフェロンシグネチャー遺伝子は、SMS患者で上方制御され、IFIH1におけるGOF変異と関連づけられている(Rice et al. (2014) Nat. Genet. 46(5):503-509; Rutsch et al. (2015) Am. J. Hum. Genet. 96:275-282)。

#### 【0410】

野生型IFIH1およびAGS患者で同定される6つのIFIH1 GOF変異体(R720Q、R779H、R337G、R779C、G495R、D393V)のIFN-レポーター刺激活性を、低レベルの内因性ウイルスRNA受容体を発現するHEK293T細胞と比較した。野生型IFIH1は、長(>1kb)dsRNAアナログポリイノシン・ポリシチジン酸(poly I:C)の結合により誘導されるが、短162bp dsRNAではされず、外来性RNAの非存在下で、最小活性を有する。IFIH1変異体は、poly I:Cに応答した強いシグナル伝達に加えて、短162bp dsRNAに応答したIFNシグナル伝達の顕著な誘導を提示した。変異体はまた外来性リガンド非存在下で、4~10倍高いレベルのベースラインシグナル伝達活性も提示した(Rice et al. (2014) Nat. Genet. 46(5):503-509)。

#### 【0411】

他の機能獲得型IFIH1変異、R822Qは、I型IFN産生を誘導することによりSMSを引き起こし、早期動脈性石灰化および歯炎症および吸収に至るとして同定された。HEK293T細胞(最低内因性IFIH1発現レベルを有する)を使用して、野生型およびR822Q MDA5を過発現させた。野生型IFIH1発現は、用量依存的様式でIFNB1(インターフェロン、ベータ1、線維芽細胞)発現増加をもたらし、一方変異IFIH1は、約20倍多いIFNB1発現をもたらした。DsRNAアナログポリ(I:C)での刺激後、R822Q IFIH1は、野生型IFIH1より高いレベルのIFNB1発現をもたらし、R822Q IFIH1が非自己dsRNAに過活動であることを示す。SMS患者からの全血サンプルでIFI27、IFI44L、IFIT1、ISG15、RSG15、RSAD2およびSIGLEC1などのインターフェロンシグネチャー遺伝子の発現も高く、これは、R822Q IFIH1によるIFNB1の高い発現レベルに一致した(Rutsch et al. (2015) Am. J. Hum. Genet. 96:275-282)。

#### 【0412】

他のIFIH1 GOF変異を有する患者で観察されるインターフェロンシグネチャー、A489Tは、I型インターフェロン症の指標である; IFIH1 A489Tは、インターフェロン産生増加ならびに凍瘡状ループス、AGSおよびSMSを模倣する表現型と関連する(Bursztejn et al. (2015) Br. J. Dermatol. 173(6):1505-1513)。A489Tバリエーションは、長dsRNAアナログポリ(I:C)だけでなく、短dsRNAでの刺激後IFN誘導をもたらす。IFIH1における2つの付加的機能獲得型変異、T331IおよびT331Rは、IFN誘導転写物の顕著な上方制御を提示するSMS表現型を有する患者で同定された。T331IおよびT331Rバリエーションは、MDA5の構成的活性化の観察に一致して、外来性dsRNAリガンドがなくても、IFN-の発現を増加させた(Lu and MacDougall (2017) Front. Genet. 8:118)。

#### 【0413】

A946Tは、I型IFNの産生増加に至る他のIFIH1 GOF変異であり、炎症を促進し、自己免疫のリスクを高める。IFIH1のA946T変異は、TMEM173R232アレルおよびG207E GOF変異と組み合わせたとき相加効果をもたらし、SAVIに類すると特性を有する重度早期発症表現型をもたらす(doi.org/10.1101/394353から入手可能な印刷前Keskitalo et al. (2018))。G821Sは、マウスモデルでループス様自己免疫性症状の自然発症性進展に至ることが示されているIFIH1

における G O F 変異であり(Rutsch et al. (2015) Am. J. Hum. Genet. 96:275-282)、一方 A G S の個体で同定された I F I H 1 ミスセンス変異 A 4 5 2 T、R 7 7 9 H および L 3 7 2 F は、I 型インターフェロン過産生を引き起こすことが示された(Oda et al. (2014) Am. J. Hum. Genet. 95:121-125)。

【0414】

ここに提供される腫瘍ターゲティング免疫刺激性細菌およびまた腫瘍溶解性ウイルスは、単独でまたは何らかの組み合わせで、T 3 3 1 I、T 3 3 1 R、R 3 3 7 G、L 3 7 2 F、D 3 9 3 V、A 4 5 2 T、A 4 8 9 T、G 4 9 5 R、R 7 2 0 Q、R 7 7 9 H、R 7 7 9 C、G 8 2 1 S、R 8 2 2 Q および A 9 4 6 T から選択される機能獲得型変異を有する M D A 5 / I F I H 1 (配列番号 3 1 0) をコードするよう修飾され得る。

10

【0415】

c. R I G - I

レチノイン酸誘導性遺伝子 I (R I G - I)、D D X 5 8 (D E X D / H ボックスヘリカーゼ 5 8 としても知られる) は、構成的活性化が非定型 S M S などのインターフェロン症の進展と結びつけられている他のタンパク質である。R I G - I は、M D A 5 / I F I H 1 と同様、R I G - I 様受容体 (R L R) ファミリーのメンバーであり、ウイルス d s R N A の検出に機能する 9 2 5 残基サイトゾルパターン認識受容体である。R I G - I は、I 型および III 型 I F N および炎症促進性サイトカインの発現を促進する非依存的経路を介して、ウイルス R N A に対する自然免疫応答を介しする(Jang et al. (2015) Am. J. Hum. Genet. 96:266-274; Lu and MacDougall (2017) Front. Genet. 8:118)。

20

【0416】

ホールマークの歯異常がないが、緑内障、大動脈石灰化および骨格異常を含む種々の表現型を有する非定型 S M S は、レチノイン酸誘導性遺伝子 I (R I G - I) をコードする D E X D / H ボックスヘリカーゼ 5 8 遺伝子 (D D X 5 8) の変異により引き起こされることが判明している。特に、D D X 5 8 における変異 E 3 7 3 A および C 2 6 8 F は、R I G - I における機能獲得型を引き起こすとして同定された。変異 D D X 5 8 の量の増加は、N F - B レポーター遺伝子活性の基底レベルの顕著な増加と関連し、この活性がさらに d s R N A アナログポリ (I : C) での刺激により増加された。R I G - I 変異はまた基底レベルで I R F - 3 リン酸化および二量体化を誘導し、基底およびポリ (I : C) トランスフェクト H E K 2 9 3 F T 細胞両者で、I F N B 1、インターフェロン刺激遺伝子 1 5 (I S G 1 5) およびケモカイン (C - C モチーフ) リガンド 5 (C C L 5) の発現増加をもたらした。これらの結果は、変異 D D X 5 8 / R I G - I が構成的活性化をもたらし、I F N 活性および I F N 刺激遺伝子発現増加に至ることを示す(Jang et al. (2015) Am. J. Hum. Genet. 96:266-274; Lu and MacDougall (2017) Front. Genet. 8:118)。

30

【0417】

ここに提供する腫瘍ターゲティング免疫刺激性細菌および腫瘍溶解性ウイルスは、単独でまたは組み合わせで、E 3 7 3 A および C 2 6 8 F などであるが、これらに限定されない機能獲得型変異を有する R I G - I / D D X 5 8 (配列番号 3 1 1) をコードするよう修飾され得る。

【0418】

d. I R F - 3 および I R F - 7

病原体関連分子パターン (P A M P) は、R I G - I 様受容体、R I G - I および M D A 5 などの宿主パターン認識受容体 (P R R) により認識され、転写因子 I R F - 3、I R F - 7 および N F - B を介して下流シグナル伝達をもたらし、I 型 I F N 産生に至る。

40

【0419】

I R F - 3 (インターフェロン制御因子 3) および I R F - 7 は、I 型 I F N 遺伝子のカギとなるアクティベーターである。ウイルス誘導 C 末端リン酸化 (T B K 1 による) 後、活性化 I R F - 3 および I R F - 7 はホモ二量体を形成し、サイトゾルから核に転座し、I F N 刺激応答要素 (I S R E) と結合して、I 型 I F N 応答を誘導する。I R F - 3 は、非刺激細胞で構成的に発現され、不活性サイトゾル形態として存在し、一方 I R F - 7 は細胞

50

で構成的に発現せず、IFN、リポ多糖およびウイルス感染により誘導される。IRF-3の過発現は、I型IFN遺伝子のウイルス介在発現を顕著に増加させ、抗ウイルス状態の誘導をもたらす。IRF-3活性化はまたウイルス感染後CC-ケモカインRANTES(CCL5)転写を上方制御することが示されている(Lin et al. (1999) Mol. Cell Biol. 19(4):2465-2474)。

#### 【0420】

IRF-3のC末端ドメインにおける残基S385、S386、S396、S398、S402、T404およびS405は、ウイルス感染後リン酸化され、IRF-3の活性化もたらす立体構造変化を誘導する。IRF-3活性化は、ウイルス感染だけでなく、リポ多糖(LPS)およびポリ(I:C)によっても誘導される。IRF-3のC末端クラスターでリン酸化され得る7残基のうち、単一点突然変異、S396DがIRF-3の構成的活性形態の産生に十分である。IRF-3(S396D)は、野生型IRF-3と比較して、IFN-1、IFN- $\gamma$  およびRANTESプロモーターのトランス活性化をそれぞれ1.3倍、1.4倍および1.1倍増強する。他の変異体、IRF-3(S396D/S398D)は、野生型IRF-3よりIFN-1、IFN- $\gamma$  およびRANTESプロモーターのトランス活性化をそれぞれ1.3倍、1.2倍および1.2倍増強する。IRF-3の他の構成的活性型変異体は、396位、398位、402位、404位および405位のセリンまたはスレオニン残基がリン酸化模倣体アスパラギン酸残基(IRF-3(S396D/S398D/S402D/T404D/S405D))で置き換わっているIRF-3(5D)である。I型インターフェロン誘導などの免疫応答メディエーターの構成的活性に至る類似の機能獲得型変異は、免疫応答シグナル伝達経路にある、RIG-I、MDA5およびSTINGなどの他のタンパク質におけるセリン残基のリン酸化模倣体アスパラギン酸への変異により達成され得る。

#### 【0421】

IRF-3(5D)は、構成的DNA結合およびトランス活性化活性、二量体形成、転写コアクティベーターp300(EP300またはE1A結合タンパク質p300とも称される)/CBP(CREB結合タンパク質またはCREBBPとしても知られる)との会合および核局在化を提示する。そのトランス活性化活性は、さらにウイルス感染によっては誘導されない。IRF-3(5D)は、IFN- $\gamma$  およびISG15遺伝子発現の極めて強いアクティベーターである；IRF-3(5D)単独は、ウイルス感染と同程度の強度でIFN- $\gamma$  発現を刺激し、IFN-1、IFN- $\gamma$  およびRANTESプロモーターのトランス活性化をそれぞれ野生型IRF-3の9倍、5.5倍および8倍増強する(例えば、Lin et al. (2000) J. Biol. Chem. 275(44):34320-34327; Lin et al. (1998) Mol. Cell Biol. 18(5):2986-2996; Servant et al. (2003) J. Biol. Chem. 278(11):9441-9447参照)。位置S385、S386、S396、S398、S402、T404およびS405の何れも、単独でまたは組み合わせて変異して、ここに提供する免疫刺激性細菌、腫瘍溶解性ウイルスおよびエクソソームなどの他の送達剤において、構成的活性型IRF-3変異体を産生し得る。

#### 【0422】

IRF-7の構成的活性形態は、IRF-7(S477D/S479D)、IRF-7(S475D/S477D/S479D)およびIRF-7(S475D/S476D/S477D/S479D/S483D/S487D)を含む種々のC末端セリンがリン酸化模倣体Aspで置換された変異体を含む。IRF-7(S477D/S479D)は、IFNAおよびRANTES遺伝子発現の強いトランスアクティベーターであり、ウイルス感染がなくても、遺伝子発現を刺激する。IRF-7(S475D/S477D/S479D)およびIRF-7(S475D/S476D/S477D/S479D/S483D/S487D)は、IRF-7(S477D/S479D)のトランス活性化活性をさらに増強しないが、全3変異体のトランス活性化活性は、ウイルス感染によりさらに刺激される。非感染細胞における核に局在化する変異体IRF-7(247-467)は、IRF-7の極めて強い構成的形態である；非刺激およびウイルス感染細胞において、野生型IRF-



7より1500倍高く転写を活性化する(Lin et al. (2000) J. Biol. Chem. 275(44):34320-34327)。ここに提供される免疫刺激性細菌、ウイルスおよびエクソソームなどの他の送達剤は、残基475~477、479、483および487で置き換えおよびアミノ酸欠失を含む、構成的活性型IRF-7変異体をコード化および発現できる。免疫刺激性細菌は、ヒトを含む哺乳動物宿主により認識されるプロモーターおよび何らかの他の所望の制御シグナルの制御下、プラスミドにこれらのタンパク質をコードする。

【0423】

8. 他のI型IFN制御タンパク質

I型IFN応答を活性化するDNA/RNAの認識に關与する他のタンパク質を、構成的I型IFN発現を産生するよう変異し得る。非修飾および/または修飾タンパク質を、ここに提供する免疫刺激性細菌、腫瘍溶解性ウイルスならびにエクソソームおよびリポソームなどの他の送達媒体においてコード化でき、I型IFN発現を増加させるために、腫瘍常在免疫細胞などの腫瘍微小環境にタンパク質を送達するのに使用し得る。

10

【0424】

これらのタンパク質は、TRIM56、RIP1、Sec5、TRAF2、TRAF3、TRAF6、STAT1、LGP2、DDX3、DHX9、DDX1、DDX21、DHX15、DHX33、DHX36、DDX60およびSNRNP200を命名されるタンパク質を含むが、これらに限定されない。

【0425】

20

30

40

50

【表 6】

| 遺伝子         | コード化タンパク質                               | 活性/機能  |
|-------------|---|--|
| TRIM56      | 三分裂モチーフ含有タンパク質56/E3ユビキチンタンパク質リガーゼTRIM56 | DsDNA刺激に応答したSTING二量体化を促進し、IFN-βの産生をもたらす；IFNB1およびIFN刺激遺伝子ISG15、IFIT1/ISG56、CXCL10、OASLおよびCCL5の細胞外dsRNA誘導発現を増強する；TL3シグナル伝達の正のレギュレーター |
| RIP1/RIPK1  | 受容体相互作用セリン/スレオニンタンパク質(キナーゼ)1            | 死受容体ライゲーシオン、病原体認識受容体活性化およびDNA損傷後、炎症性および細胞死シグナル(計画壊死)を伝達する；NF-κBを間接的に活性化する；マウスにおけるLPS誘導IFN-β合成を指示する                                 |
| Sec5(EXOC2) | エクソシスト複合体成分2                            | 開口分泌小胞と原形質膜の融合部位の連結に関与するエクソシスト複合体の成分；細胞内DNA刺激後STINGおよびTBK1と共局在化し、I型IFN産生を誘導する  |
| TRAF2       | TNF受容体関連因子2                             | NF-κBおよびJNK/MAPK8の活性化を制御する；I型IFN誘導に介在する  |
| TRAF3       | TNF受容体関連因子3                             | NF-κBおよびMAPキナーゼの活性化を制御する；IRF-3の活性化に介在する；I型IFN誘導に介在する；サイトカイン産生に介在する   |
| TRAF6       | TNF受容体関連因子6                             | NF-κB、JUNおよびAP-1を活性化する；ウイルス感染および細胞内dsRNAに応答してI型IFN産生を誘導する；炎症促進性サイトカイン産生を誘導する   |

10

20

30

40

50

【表 7】

|             |   |   |    |
|-------------|---|---|----|
| STAT1       | シグナル伝達性転写因子1  | IFN刺激応答要素(ISRE)を活性化するためにIFN刺激応答要素(ISRE)に結合するISGF3転写因子の一部を形成する   |    |
| LGP2(DHX58) | ラボラトリー・オブ・ジェネティクス・アンド・フィジオロジー2/ほぼ確実なATP依存性RNAヘリカーゼDHX58 | RIG-I/DDX58およびIFIH1/MDA5介在抗ウイルスシグナル伝達を制御する  |    |
| DDX3(DDX3X) | ATP依存性RNAヘリカーゼDDX3X                                     | I型IFN産生を促進する；ウイルスRNAセンサーとして作用する；IFNB誘導に至るTBK1およびIKBKE依存性IRF-3活性化に関与する；IFNBプロモーターと関連する；感染初期段階でシグナル伝達を誘導するためにMAVSおよびRIG-Iと関連する；dsRNA認識を増強するためにMDA5と結合する | 10 |
| DHX9/DX9    | DEXD/Hボックスヘリカーゼ9/ATP依存性RNAヘリカーゼA                        | ウイルス核酸を感知する；MyD88依存的様式で非自己DNAに対する宿主応答を誘導する；ウイルス感染に対するNF-κB介在自然免疫刺激ならびにIRF-3およびMAPK経路活性化のためにMAVSと相互作用する；IL-6およびIFN-βのウイルス有負圧誘導を増強する                    | 20 |
| DDX1        | ATP依存性RNAヘリカーゼDDX1                                      | ウイルス二本鎖RNA(dsRNA)を感知し、NF-κBシグナル伝達経路を活性化し、I型IFNおよび炎症促進性サイトカインの産生を誘導する多ヘリカーゼTRIF複合体の成分である   | 30 |
| DDX21       | 核小体RNAヘリカーゼ2  | ウイルス二本鎖RNA(dsRNA)を感知し、NF-κBシグナル伝達経路を活性化し、I型IFNおよび炎症促進性サイトカインの産生を誘導する多ヘリカーゼTRIF複合体の成分である   | 30 |
| DHX15(DX15) | プレmRNA-スプライシング因子ATP依存性RNAヘリカーゼDHX15                     | I型IFNおよび炎症促進性サイトカイン産生を誘導するようにMAVSと相互作用するウイルスRNAセンサーである；IRF-3、NF-κBおよびMAPKシグナル伝達を活性化する   | 40 |

10

20

30

40

50

【表 8】

|             |                            |  |
|-------------|----------------------------|--|
| DHX33(DX33) | ATP依存性RNAヘリカーゼDHX33        | MAVSと相互作用し、I型IFN応答を誘導するウイルスdsRNAセンサーである；NF-κB、IRF-3およびMAPKシグナル伝達経路を活性化する；NLRP3インフラマソームを活性化し、炎症促進性サイトカインの分泌をもたらす  |
| DHX36(DX36) | ATP依存性DNA/RNAヘリカーゼDHX36    | ウイルス二本鎖RNA(dsRNA)を感知し、NF-κBシグナル伝達経路を活性化し、I型IFNおよび炎症促進性サイトカインの産生を誘導する多ヘリカーゼ-TRIF複合体の成分である   |
| DDX60       | ほぼ確実なATP依存性RNAヘリカーゼDDX60   | ウイルスRNAおよびDNAを感知する；抗ウイルス活性を促進するためにRIG-I様受容体を複合体を形成する；ウイルス感染に反応して、RIG-IおよびMDA5依存性I型IFNおよびIFN誘導性遺伝子発現を正に制御する；ssRNA、dsRNAおよびdsDNAに結合する；RIG-IのdsRNAへの結合を促進する |
| SNRNP200    | U5小核リボヌクレオタンパク質200kDaヘリカーゼ | IRF-3活性化およびI型IFN産生を促進するために、ウイルスRNAを感知/結合し、TBK1と相互作用する  |

10

20

## 【0426】

部位特異的変異誘発を、インビトロで実施して、高レベルおよび/または構成的I型IFN発現をもたらす活性が増強した変異を同定し得る。インタクトなゲノムDNAを、自己免疫および自己炎症性症状を経験した無関係の患者および健常個体から得て、発現がI型IFN発現を増加または構成的とする他の産物をスクリーニングおよび同定し得る。全エクソームシーケンスを実施でき、イントロンおよびエクソンを、I型インターフェロンの発現増加または構成的発現と関連する経路における変異を有するタンパク質が同定されるよう、分析できる。変異の同定後、同定された変異を伴うおよび伴わない完全長遺伝子をコードするcDNA分子を、I型インターフェロンの発現を測定するレポーター細胞株にトランスフェクトする。例えば、ルシフェラーゼの発現がIFN- $\gamma$ のプロモーター下に配置されるレポーター細胞株が産生され得る。構成的活性である機能獲得型変異体はIFN- $\gamma$ 発現を促進するが、非刺激野生型タンパク質はしない。刺激は、ウイルス感染、細菌感染、細菌核酸、LPS、dsRNA、ポリ(I:C)またはタンパク質のリガンド(例えば、CDN)の外來性レベル増加により得る。同定されたタンパク質はまた対象における目的の抗原に対する免疫応答を増強するものを含む。免疫応答は、(i)I型インターフェロン経路シグナル伝達刺激；(ii)NF- $\kappa$ B経路シグナル伝達刺激；(iii)炎症性応答刺激；(iv)サイトカイン産生刺激；(v)樹状細胞開発、活性または動員刺激；(vi)発現が免疫応答を増強する産物の指標である何らかの他の応答；および(vii)(i)~(vi)の何れかの組み合わせの1以上により特徴づけられる細胞または液性免疫応答を含む。

30

40

## 【0427】

9. 他の治療産物  
免疫刺激性タンパク質

50

免疫刺激性細菌はまた、特に腫瘍、腫瘍微小環境および/または腫瘍常在免疫細胞で発現したとき、抗腫瘍免疫応答を増強または刺激または誘起するケモカインを含むサイトカインなどの免疫刺激性タンパク質もコードし得る。ここでの免疫刺激性細菌は、抗腫瘍応答を促進または誘導または誘起する免疫刺激性タンパク質をコードするよう修飾され得る。免疫刺激性タンパク質は、ヒトなどの、真核生物対象、特に免疫刺激性細菌が投与される対象における発現のために、RNAポリメラーゼIIにより認識されるプロモーターなどの真核生物プロモーターの制御下、細菌のプラスミド上にコード化され得る。免疫刺激性タンパク質をコードする核酸は、真核生物プロモーターに加えて、細胞の分泌または表面での発現などの細胞における発現または輸送のための他の制御シグナルを含み得る。

【0428】

10

ここでの免疫刺激性細菌は、抗腫瘍応答を促進または誘導または誘起する免疫刺激性タンパク質をコードするよう修飾され得る。免疫刺激性タンパク質は、ヒトなどの、真核生物対象、特に免疫刺激性細菌が投与される対象における発現のために、RNAポリメラーゼIIにより認識されるプロモーターなどの真核生物プロモーターの制御下、細菌のプラスミド上にコード化され得る。免疫刺激性タンパク質をコードする核酸は、真核生物プロモーターに加えて、細胞の分泌または表面での発現などの細胞における発現または輸送のための他の制御シグナルを含み得る。

【0429】

免疫刺激性タンパク質は、腫瘍微小環境(TME)などの適切な環境で、免疫刺激性細菌が投与される対象における抗腫瘍応答を促進または参加または増強できるものである。免疫刺激性タンパク質は、サイトカイン、ケモカインおよび共刺激分子を含むが、これらに限定されない。これらは、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15およびIL-18などの、しかしこれらに限定されないサイトカイン；CCL3、CCL4、CCL5、CXCL9、CXCL10およびCXCL11などの、しかしこれらに限定されないケモカイン；および/またはCD40、CD40L、OX40、OX40L、4-1BB、4-1BBL、TNF/TNFRスーパーファミリーメンバーおよびB7-CD28ファミリーメンバーなどの、しかしこれらに限定されない共刺激分子を含む。当業者に知られる、腫瘍処置に使用されるまたは抗腫瘍応答を促進、増強または他に増加もしくは誘起できる他のこのような免疫刺激性タンパク質は、ここに提供される免疫刺激性細菌におけるコード化のために意図される。

20

30

【0430】

ある実施態様において、ここでの免疫刺激性細菌は、IL-2、IL-7、IL-12(IL-12p70(IL-12p40+IL-12p35))、IL-15(およびIL-15:IL-15Rアルファ鎖複合体)およびIL-18を含むが、これらに限定されない免疫系を刺激するサイトカインを発現するよう操作される。サイトカインは腫瘍部位で免疫エフェクター細胞および間質細胞を刺激し、細胞毒性細胞による腫瘍細胞認識を増強する。ある実施態様において、免疫刺激性細菌は、例えば、CCL3、CCL4、CCL5、CXCL9、CXCL10およびCXCL11などのケモカインを発現するよう操作される。これらの修飾およびそれをコードする細菌は、上に記載され、下に例示される。

【0431】

40

免疫刺激性細菌コード化サイトカインおよびケモカイン

ある実施態様において、ここでの免疫刺激性細菌は、IL-2、IL-7、IL-12(IL-12p70(IL-12p40+IL-12p35))、IL-15(およびIL-15:IL-15Rアルファ鎖複合体)およびIL-18を含むが、これらに限定されない免疫系を刺激するサイトカインを発現するよう操作される。サイトカインは腫瘍部位で免疫エフェクター細胞および間質細胞を刺激し、細胞毒性細胞による腫瘍細胞認識を増強する。ある実施態様において、免疫刺激性細菌は、例えば、CCL3、CCL4、CCL5、CXCL9、CXCL10およびCXCL11などのケモカインを発現するよう操作される。

【0432】

50

免疫刺激性タンパク質は、腫瘍微小環境(TME)などの適切な環境で、免疫刺激性細菌が投与される対象における抗腫瘍応答を促進または参加または増強できるものである。免疫刺激性タンパク質は、サイトカイン、ケモカインおよび共刺激分子を含むが、これらに限定されない。これらは、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15およびIL-18などの、しかしこれらに限定されないサイトカイン；CCL3、CCL4、CCL5、CXCL9、CXCL10およびCXCL11などの、しかしこれらに限定されないケモカイン；および/またはCD40、CD40L、OX40、OX40L、4-1BB、4-1BBL、TNF/TNFRスーパーファミリーメンバーおよびB7-CD28ファミリーメンバーなどの、しかしこれらに限定されない共刺激分子を含む。当業者に知られる、腫瘍処置に使用されるまたは抗腫瘍応答を促進、増強または他に増加もしくは誘起できる他のこのような免疫刺激性タンパク質は、ここに提供される免疫刺激性細菌におけるコード化のために意図される。

10

#### 【0433】

ここに提供される免疫刺激性細菌のゲノムはまた食細胞などの免疫細胞、特に腫瘍微小環境における免疫細胞の感染を増加または促進するようにも修飾され得る。細菌はまた免疫細胞でのパイロトーシスを低減するようにも修飾され得る。免疫刺激性細菌は、本明細書に記載し、他の箇所に例示するとおり、例えば、hilAの破壊または欠失などのSPI-1経路を破壊/阻害するおよび/またはフラジェリン遺伝子、棒状タンパク質、針状タンパク質および/またはpagPを欠失および/または破壊する修飾を有するものを含む。

20

#### 【0434】

##### IL-2

癌の処置に初めて承認されたサイトカインであるインターロイキン-2(IL-2)は、CTL増殖の活性化および促進、リンホカイン-活性化キラー(LAK)細胞産生、Treg細胞成長および増殖促進、TIL刺激ならびにT細胞、B細胞およびNK細胞増殖および分化促進を含む、数機構により、免疫系の活性化と関連付けられる。組み換えIL-2(rIL-2)は、転移腎臓細胞癌腫(RCC)および転移黒色腫の処置に対してFDAが承認した(Sheikhi et al. (2016) Iran J. Immunol. 13(3):148-166)。

#### 【0435】

##### IL-7

IL-2スーパーファミリーメンバーであるIL-7は、T細胞の生存、増殖および恒常性に関連付けられる。IL-7受容体における変異は、T細胞の喪失および重症複合免疫不全(SCID)の発症をもたらすことが示されており、T細胞進展におけるIL-7が果たす重要な役割が強調される。IL-7は、ナイーブおよび記憶T細胞を休息させる連続的シグナルを提供する恒常性サイトカインであり、リンパ球減少症の状態の間に蓄積され、T細胞増殖およびT細胞レパートリー多様性両者の増加をもたらす。IL-2と比較して、IL-7は、CD4<sup>+</sup>FOXp3<sup>+</sup>制御T細胞より拡張CD8<sup>+</sup>T細胞に選択的である。組み換えIL-7は、マウスでワクチン接種および養子細胞治療後抗原特異的T細胞応答を増強することが示されている。IL-7はまた造血幹細胞移植の化学療法後、T細胞回復の促進にも役割を有し得る。進行型悪性腫瘍を有する患者の初期臨床試験は、組み換えIL-7は忍容性が良好であり、生物学的活性用量(すなわち、循環CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞数が3~4倍増加する)で毒性は限定的であることを示す(Lee, S. and Margolin, K. (2011) Cancers 3:3856-3893)。IL-7は、神経膠腫、黒色腫、リンパ腫、白血病、前立腺癌および神経膠芽腫などの腫瘍で抗腫瘍効果を有し、マウスモデルにおけるIL-7のインビゴ投与は、癌細胞増殖の低減をもたらしたことが示されている。IL-7はまたラット神経膠腫腫瘍でIFN- $\gamma$ の抗腫瘍効果を増強し、黒色腫増殖阻害をもたらす、単球によるIL-1 $\beta$ 、IL-1 $\alpha$ およびTNF- $\alpha$ 産生を誘導することも示されている。さらに、小児肉腫処置後の組み換えIL-7投与は、免疫回復の促進をもたらす(Lin et al. (2017) Anticancer Research 37:963-968)。

30

40

#### 【0436】

50

IL - 12 (IL - 12 p 70 (IL - 12 p 40 + IL - 12 p 35))

細胞介在免疫を促進する生理活性IL - 12 (IL - 12 p 70)は、p 35およびp 40サブユニットからなるヘテロ二量体であり、一方IL - 12 p 40単量体およびホモ二量体はIL - 12アンタゴニストとして作用する。抗原提示細胞により分泌されるIL - 12は、NKおよびT細胞からのIFN - 分泌を促進し、腫瘍血管形成を阻害し、NK細胞、CD 8 + T細胞およびCD 4 + T細胞の活性化および増殖をもたらし、CD 4 + Th 0細胞のTh 1細胞への分化を増強し、腫瘍細胞に対する抗体依存性細胞傷害(ADCC)を促進する。IL - 12は、黒色腫、結腸癌、乳癌および肉腫のマウスモデルで抗腫瘍効果を示すことが示されている(Kalinski et al. (2001) Blood 97:3466-3469; She ikhi et al. (2016) Iran J. Immunol. 13(3):148-166; Lee, S. and Margoli n, K. (2011) Cancers 3:3856-3893)。

10

#### 【0437】

IL - 15およびIL - 15 : IL - 15 R T細胞

IL - 15は、IL - 2と構造的に類似し、IL - 2およびIL - 15両者は、増殖および活性化の早期刺激を提供するが、IL - 15はIL - 2誘導アポトーシスを遮断し、これは、刺激T細胞排除およびT細胞耐性の誘導に至る過程であり、記憶T細胞応答を制限し、おそらくIL - 2単独の治療有効性を制限する。IL - 15はまた長期抗腫瘍免疫維持のための記憶CD 8 + T細胞の残留も指示し、前臨床マウスモデルで、抗原非依存的方法でのCD 8 + エフェクターT細胞の直接活性化を介して、顕著な抗腫瘍活性が示されている。CD 8 + T細胞に加えて、IL - 15は、エフェクターナチュラルキラー(NK)細胞の進展、増殖および活性化を担う(Lee, S. and Margolin, K. (2011) Cancers 3:3856-3893; Han et al. (2011) Cytokine 56(3):804-810)。

20

#### 【0438】

IL - 15およびIL - 15受容体アルファ(IL - 15 R )は、単球および樹状細胞などの抗原提示細胞により協調して発現され、IL - 15はCD 8 + T細胞およびNK細胞の表面に発現されるIL - 15 R c受容体複合体に対して、IL - 15 R によりトランスで提示される。可溶性IL - 15 : IL 15 - R 複合体は、IL - 15 R c複合体を介して免疫応答を調節することが示されており、IL - 15の生物学的活性は、IL - 15単独と比較して、半減期が延長したIL - 15と可溶性IL - 15 R の予形成した複合体の投与により50倍増加することが示されている。IL - 15 R との前会 30  
合によるIL - 15治療有効性のこの顕著な増加は、マウス腫瘍モデルで示されている(Han et al. (2011) Cytokine 56(3):804-810)。

#### 【0439】

IL - 18

IL - 18は、NKおよびCD 8 + T細胞によるIFN - の分泌を誘導し、毒性を増強する。IL - 18はまたマクロファージを活性化し、Th 1ヘルパーCD 4 + T細胞の進展を刺激する。IL - 18は、数前臨床マウスモデルにおいて、有望な抗腫瘍活性が示されている。例えば、組み換えIL - 18(r IL - 18)投与は、CD 4 + T細胞活性化および/またはNK細胞介在応答を介して、同系マウスにおける黒色腫または肉腫退縮をもたらす。IL - 18抗腫瘍効果がIFN - により介在され、抗血管新生機構が関与する 40  
ことを示す研究もある。IL - 18とIL - 12などの他のサイトカインまたはCD 8 0などの共刺激分子の組み合わせは、IL - 18介在抗腫瘍効果を増強する。進行型固形腫瘍およびリンパ腫を有する患者におけるフェーズI臨床試験は、IL - 18投与が安全であり、患者における免疫調節性活性ならびに血清IFN - およびGM - CSFレベル増加および中程度の臨床応答をもたらすことを示した。臨床試験は、IL - 18をモノクローナル抗体、細胞毒性薬物またはワクチンなどの他の抗癌治療剤と組み合わせ得ることを示した(Fabbi et al. (2015) J. Leukoc. Biol. 97:665-675; Lee, S. and Margolin, K. (2011) Cancers 3:3856-3893)。

#### 【0440】

IL - 18を発現するよう操作したネズミチフス菌の弱毒化株は、全身投与後、何ら毒性 50

効果なく、同系マウスにおける皮下 (s.c.) 腫瘍または肺転移増殖を阻害した。この操作した細菌での処置は、腫瘍における T 細胞、NK 細胞および顆粒球の蓄積を誘導し、サイトカインの腫瘍内産生をもたらした (Fabbi et al. (2015) *J. Leukoc. Biol.* 97:665-675)。

#### 【0441】

##### ケモカイン

ケモカインは、傷害または炎症領域への白血球遊走に介在し、免疫および炎症性応答介在に関与する、小サイトカインのファミリーである。ケモカインは、配列のシステイン残基に基づき、4 サブファミリー、すなわち XC -、CC -、CXC - および CX<sub>3</sub>C - ケモカインリガンドまたは XCL、CCL、CXC L および CX<sub>3</sub>CL に分類される。ケモカインリガンドは同族受容体に結合し、免疫細胞の循環、ホーミングおよび保持を制御し、各ケモカインリガンド - 受容体対は、選択的に特定タイプの免疫細胞を制御する。異なるケモカインは、異なる白血球集団を誘引し、インビボで濃度勾配を形成し、誘引免疫細胞は、高濃度のケモカインに向かう勾配を介して移動する (Argyle D. and Kitamura, T. (2018) *Front. Immunol.* 9:2629; Dubinett et al. (2010) *Cancer J.* 16(4):325-335)。ケモカインは、ナイーブ T 細胞および B 細胞を誘導する免疫細胞の腫瘍への浸潤の増加および腫瘍排出リンパ節への抗原提示細胞 (APC) の移動促進により抗腫瘍免疫応答を改善できる (Lechner et al. (2011) *Immunotherapy* 3(11):1317-1340)。ここでの免疫刺激性細菌は、CCL<sub>3</sub>、CCL<sub>4</sub>、CCL<sub>5</sub>、CXC L<sub>9</sub>、CXC L<sub>10</sub> および CXC L<sub>11</sub> を含むが、これらに限定されないケモカインをコードするよう操作され得る。

10

20

#### 【0442】

##### CCL<sub>3</sub>、CCL<sub>4</sub>、CCL<sub>5</sub>

CCL<sub>3</sub>、CCL<sub>4</sub> および CCL<sub>5</sub> は高度の相同性を共有し、ヒトおよびマウス両者で、未成熟 DC および T 細胞を含む数細胞型で CCR<sub>5</sub> (CCL<sub>3</sub>、CCL<sub>4</sub> および CCL<sub>5</sub>) および CCR<sub>1</sub> (CCL<sub>3</sub> および CCL<sub>5</sub>) と結合する。治療 T 細胞は、CCL<sub>3</sub>、CCL<sub>4</sub> および CCL<sub>5</sub> の腫瘍特異的分泌を介して、自然免疫細胞の腫瘍部位への走化性を誘導することが示されている (Dubinett et al. (2010) *Cancer J.* 16(4):325-335)。

#### 【0443】

T ヘルパー細胞型 1 (Th<sub>1</sub>) 応答の誘導は、CCL<sub>3</sub> を放出させる。マウスのインビボおよびインビトロ試験により、CCL<sub>3</sub> が好中球および単球両者に走化性であることが示されている；具体的に、CCL<sub>3</sub> は骨髄からの骨髄前駆体細胞 (MPC) 動員に介在でき、MPC 制御および刺激効果を有する。CCL<sub>3</sub> をトランスフェクトしたヒト卵巣癌腫細胞は、抗腫瘍応答改善をもたらす腫瘍内の T 細胞浸潤およびマクロファージ増強を示し、好中球の CCL<sub>3</sub> 介在走化性が、腫瘍増殖を抑制したことが示された。CCL<sub>3</sub> により動員された腫瘍抗原ヒト黒色腫関連遺伝子 (MAGE) - 1 でトランスフェクトした DC は、黒色腫のマウスモデルでリンパ球増殖増加、細胞溶解能、生存および腫瘍増殖低減を含む、優れた抗腫瘍効果を示した。CCL<sub>3</sub> と MAGE - 1 に関する抗原特異的プラットフォームの組み合わせ使用も胃癌処置において使用された。高度に免疫原性のマウス結腸腫瘍である CT<sub>26</sub> により産生される CCL<sub>3</sub> は、インビボ腫瘍増殖を減速させた；この過程は、CXC L<sub>9</sub> および CXC L<sub>10</sub> の産生に至る、ナチュラルキラー (NK) 細胞、故に、IFN の CCL<sub>3</sub> 依存性蓄積により駆動されることが示された (Allen et al. (2017) *Oncoimmunology* 7(3):e1393598; Schaller et al. (2017) *Expert Rev. Clin. Immunol.* 13(11):1049-1060)。

30

40

#### 【0444】

CCL<sub>3</sub> は、癌の処置のアジュバントとして使用されている。マウス肝細胞癌における高周波アブレーション後の CCL<sub>3</sub> 活性バリエーション、ECI<sub>301</sub> 投与は、腫瘍特異的応答を増加させ、この機構はさらに CCR<sub>1</sub> 発現に依存的であることが示された。CCL<sub>3</sub> はまた全身性癌におけるアジュバントとしての成功が示されており、それにより白血病 / リンパ腫のモデルにおける CCL<sub>3</sub> および IL - 2 または顆粒球 - マクロファージコロニー

50



刺激因子(GM-CSF)をワクチン接種したマウスは、生存延長を示した(Schaller et al. (2017) Expert Rev. Clin. Immunol. 13(11):1049-1060)。

【0445】

CCL3およびCCL4は、CD8<sup>+</sup>T細胞浸潤を、黒色腫および結腸癌における原発腫瘍部位に向ける役割を有する。CCL4の腫瘍産生は、CD103<sup>+</sup>DCの蓄積に至る；WNT/ $\beta$ -カテニン依存性経路を介するCCL4の抑制は、黒色腫腫瘍のCD103<sup>+</sup>DC浸潤を阻止した(Spranger et al. (2015) Nature 523(7559):231-235)。CCL3はまた結腸癌のマウスモデルで原発腫瘍部位へのCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞浸潤を増強することも示された(Allen et al. (2017) Oncoimmunology 7(3):e1393598)。

10

【0446】

CCL3またはCCL5のその受容体(それぞれCCR1およびCCR5)への結合は、循環から未成熟DC、単球および記憶およびTエフェクター細胞を炎症または感染の部位に移動させる。例えば、結腸直腸腫瘍におけるCCL5発現は、Tリンパ球化学誘引および生存に寄与する。CCL3およびCCL5は、いくつかの前臨床モデルで、腫瘍退縮および免疫を誘導するために、単独でまたは組み合わせ治療に使用されている。例えば、CCL3を発現するよう遺伝子修飾したチャニーズハムスター卵巣細胞の皮下注射は、腫瘍阻害および好中球浸潤をもたらすことが研究で示された。他の研究で、CCL5を発現する組み換え腫瘍溶解性アデノウイルス(Ad-RANTES-E1A)は、乳癌マウスモデルで原発腫瘍退縮をもたらし、転移を遮断した(Lechner et al. (2011) Immunotherapy 3(11):1317-1340)。

20

【0447】

結腸直腸癌のトランスレーショナル研究において、CCL5は、マクロファージで「抗ウイルス応答パターン」を誘導した。結腸直腸癌における肝臓転移の侵襲性周縁部でのリンパ球のCXCR3介在遊走の結果として、CCL5は産生される。CCR5、CCL5受容体の遮断は、IFNを産生するマクロファージおよび活性酸素種により駆動される腫瘍死をもたらした。マクロファージは腫瘍微小環境に存在するが、CCR5阻害は、M2からM1表現型への表現型シフトを誘導する。CCR5遮断はまた結腸直腸癌患者における臨床応答ももたらす(Halama et al. (2016) Cancer Cell 29(4):587-601)。

【0448】

CCL3、CCL4およびCCL5は、リンパ性腫瘍、膀胱癌、結腸直腸癌、肺癌、黒色腫、膵臓癌、卵巣癌、子宮頸癌または肝臓癌を含む状態の処置に使用され得る(米国特許公開US2015/0232880；国際特許公開WO2015/059303、WO2017/043815、WO2017/156349およびWO2018/191654)。

30

【0449】

CXCL9、CXCL10、CXCL11

CXCL9(MIG)、CXCL10(IP10)およびCXCL11(ITAC)は、IFN $\gamma$ の産生により誘導される。これらのケモカインは、優先的に活性化T細胞に発現され、血管新生抑制ならびに白血球の動員および活性化両方で機能する、CXCR3に結合する。結腸直腸癌の予後は、腫瘍浸潤T細胞、特にTh1およびCD8<sup>+</sup>エフェクターT細胞と強く相関する；CXCL9、CXCL10およびCXCL11の高腫瘍内発現は、予後良好の指標である。例えば、結腸癌を有する163名の患者のサンプルで、高レベルのCXCL9またはCXCL11は、術後生存の延長を示し、高CXCL発現を有する患者は、CD3<sup>+</sup>T細胞、CD4<sup>+</sup>Tヘルパー細胞およびCD8<sup>+</sup>細胞毒性T細胞数が有意に高かった。結腸直腸癌患者の肝臓転移で、CXCL9およびCXCL10レベルは侵襲性周縁部で増加し、エフェクターT細胞密度と相関した。CXCR3に対するCXCL9およびCXCL10の作用を介するリンパ球遊走の刺激は、侵襲性周縁部でのCCL5産生に至る(Halama et al. (2016) Cancer Cell 29(4):587-601；Kistner et al. (2017) Oncotarget 8(52):89998-90012)。

40

50

## 【0450】

インビボで、CXCL9は、腫瘍浸潤リンパ球、活性化末梢血リンパ球、ナチュラルキラー(NK)細胞およびTh1リンパ球の化学誘引物質として機能する。CXCL9は、皮膚腫瘍のT細胞介在抑制にも重要である。例えば、全身性IL-2と組み合わせたとき、CXCL9は、CXCR3+単核細胞の腫瘍内浸潤増加により腫瘍増殖を阻害することが示されている。結腸癌のマウスモデルで、hUKS1/4-IL-2融合タンパク質とCXCL9遺伝子治療の組み合わせは、CD8+およびCD4+Tリンパ球化学誘引および活性化を介して、優れた抗腫瘍効果および寿命延長を達成した(Dubinett et al. (2010) Cancer J. 16(4):325-335; Ruehlmann et al. (2001) Cancer Res. 61(23):8498-8503)。

10

## 【0451】

活性化単球、線維芽細胞、内皮細胞およびケラチン生成細胞により産生されるCXCL10は、活性化T細胞に走化性であり、インビボで血管形成の阻害剤として作用し得る。結腸直腸腫瘍でのCXCL10発現は、細胞毒性Tリンパ球化学誘引および生存延長に貢献することが示されている。IL-12などの免疫刺激性サイトカインの投与は、CXCL10により産生される抗腫瘍効果を増強することが示されている。腫瘍細胞可溶化物でブライムされ、CXCL10でトランスフェクトされたDCワクチンは、マウスで免疫学的防御および有効性が増加した；動物は、腫瘍負荷に抵抗性を示し、腫瘍増殖が遅延し、生存時間が延長した。CXCL10-ムチン-GPI融合タンパク質を使用したマウスでのインビボおよびインビトロ試験は、融合タンパク質で処理しなかった腫瘍と比較して、腫瘍におけるNK細胞動員のレベルが高かった。インターフェロン(形質細胞様樹状細胞により産生され得る；これらの細胞は、原発黒色腫病変と関連し、CCL20により腫瘍部位に動員され得る)は、腫瘍DCサブセット、例えば、CD103+DCに働き、これは、マウス黒色腫モデルでCXCL9/10を産生することが示されており、ヒト疾患におけるCXCL9/10と関連した。CXCL10はまた原発黒色腫サンプルと比較して、ヒト転移黒色腫サンプルで高い発現を示した。治療的、アジュバントIFN-黒色腫治療はCXCL10産生を上方制御し、一方化学療法剤シスプラチンは、CXCL9およびCXCL10を誘導する(Dubinett et al. (2010) Cancer J. 16(4):325-335; Kuo et al. (2018) Front. Med. (Lausanne) 5:271; Li et al. (2007) Scand. J. Immunol. 65(1):8-13; Muenchmeier et al. (2013) PLoS One 8(8):e72749)。

20

30

## 【0452】

CXCL10/11およびCXCR3発現は、基底細胞癌腫(BCC)由来ヒトケラチン生成細胞で確立されている。CXCL11はまたヒト基底細胞癌腫で免疫抑制性インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)発現を促進でき、何らかの浸潤CXCR3+エフェクターT細胞の抗腫瘍活性を低減し得るケラチン生成細胞増殖を増強できる(Kuo et al. (2018) Front. Med. (Lausanne) 5:271)。

## 【0453】

CXCL9、CXCL10およびCXCL11は、癌処置のために、腫瘍溶解性ウイルスでコード化され得る(米国特許公開US2015/0232880；国際特許公開WO2015/059303)。CXCL10の遺伝子をコードするシュードタイプ腫瘍溶解性ウイルスまたは遺伝子操作細菌も、癌処置に使用され得る(国際出願公開WO2018/006005およびWO2018/129404)。

40

## 【0454】

共刺激分子

共刺激分子は、腫瘍細胞に対する免疫応答を増強し、共刺激経路は、腫瘍形成を促進するために瘍細胞により阻止される。ここでの免疫刺激性細菌を、例えば、CD40、CD40L、4-1BB、4-1BBL、OX40(CD134)、OX40L(CD252)、他のTNFRスーパーファミリーメンバー(例えば、CD27、GITR、CD30、Fas受容体、TRAIL-R、TNF-R、HVEM、RANK)、B7およびCD28などの共刺激分子を発現するようにも操作し得る。ここでの免疫刺激性細菌はまた抗腫瘍免

50

疫応答を増強するよう共刺激分子に対するアゴニスト抗体を発現するようにも操作され得る。

#### 【0455】

TNF受容体スーパーファミリー

リガンドのTNFスーパーファミリー(TNFSF)およびその受容体(TNFRSF)は、腫瘍および免疫エフェクター細胞の増殖、分化、活性化および生存に關与する。このファミリーのメンバーは、アポトーシスを誘導するCD30、Fas-L、TRAIL-RおよびTNF-RならびにBおよびT細胞免疫応答を制御するCD27、OX40L、CD40L、GITR-Lおよび4-1BBLを含む。他のメンバーは、ヘルペスウイルス侵入メディエーター(HVEM)を含む。ここに記載する免疫刺激性細菌によるTNFSFおよびTNFRSF発現は、抗腫瘍免疫応答を増強し得る。例えば、マウス腫瘍における4-1BBL発現が免疫原性を増強し、OX40L発現が増加した樹状細胞(DC)の腫瘍内注射がマウスモデルで腫瘍拒絶をもたらし得ることが示されている。研究により、B16黒色腫細胞への組み換えGITRを発現するアデノウイルスの注射がT細胞浸潤を促進し、腫瘍体積を低減させることが示されている。4-1BB、OX40およびGITRなどの分子に対する刺激抗体も、免疫系を刺激するために免疫刺激性細菌によりコード化され得る。例えば、アゴニスト抗4-1BBモノクローナル抗体は抗腫瘍CTL応答を増強することが示されており、アゴニスト抗OX40抗体は移植可能腫瘍モデルで抗腫瘍活性を増加させることが示されている。さらに、アゴニスト抗GITR抗体は、抗腫瘍応答および免疫を増強することが示されている(Lechner et al. (2011) Immunotherapy 3(11):1317-1340; Peggs et al. (2009) Clinical and Experimental Immunology 157:9-19)。

10

20

#### 【0456】

CD40およびCD40L

TNF受容体スーパーファミリーメンバーであるCD40はAPCおよびB細胞により発現され、一方、そのリガンド、CD40L(CD154)は、活性化T細胞により発現される。CD40とCD40Lの相互作用は、B細胞を刺激して、サイトカインを産生させ、T細胞活性化および腫瘍細胞死をもたらす。研究により、抗腫瘍免疫応答は、T細胞のCD40Lまたは樹状細胞のCD40発現を伴い障害されることが示されている。CD40は、濾胞性リンパ腫、パーキットリンパ腫、リンパ芽球性白血病および慢性リンパ球性白血病などの数種のB細胞腫瘍の表面に発現され、CD40Lとのその相互作用は、CD40+腫瘍細胞におけるB7.1/CD80、B7.2/CD86およびHLAクラスII分子の発現を増加させ、抗原提示能を増強することが示されている。多発性骨髄腫のマウスモデルにおけるCD40Lのトランスジェニック発現は、CD4+およびCD8+T細胞、局所および全身抗腫瘍免疫応答の誘導および腫瘍増殖低減をもたらす。抗CD40アゴニスト抗体も抗腫瘍T細胞応答を誘導した(Marin-Acevedo et al. (2018) Journal of Hematology & Oncology 11:39; Dotti et al. (2002) Blood 100(1):200-207; Murugaiyan et al. (2007) J. Immunol. 178:2047-2055)。

30

#### 【0457】

4-1BBおよび4-1BBL

4-1BB(CD137)は、T細胞、NK細胞ならびにDC、B細胞および単球を含むAPCにより発現される誘導型共刺激受容体であり、そのリガンド、4-1BBLへの結合により、免疫細胞増殖および活性化が誘導される。4-1BBは、より長く、より広く広がった活性化T細胞の応答をもたらす。抗4-1BBアゴニストおよび4-1BBL融合タンパク質は、例えば、CD4+およびCD+T細胞および腫瘍特異的CTL活性が介在する肉腫および肥胖細胞腫腫瘍に対する免疫介在抗腫瘍活性が増加することが示されている(Lechner et al. (2011) Immunotherapy 3(11):1317-1340; Marin-Acevedo et al. (2018) Journal of Hematology & Oncology 11:39)。

40

#### 【0458】

OX40およびOX40L

50

O X 4 0 ( C D 1 3 4 ) は、活性化エフェクター T 細胞に発現される T N F 受容体スーパーファミリーメンバーであり、一方、そのリガンド、O X 4 0 L は、T L R アゴニストによる活性化および C D 4 0 - C D 4 0 L シグナル伝達後、D C、B 細胞およびマクロファージを含む A P C に発現される。O X 4 0 - O X 4 0 L シグナル伝達は、T 細胞の活性化、増強、増殖および生存ならびに N K 細胞機能調節および T r e g の抑制活性の阻害をもたらす。O X 4 0 を介するシグナル伝達は、T h 1 および T h 2 細胞応答をブーストするサイトカイン ( I L - 2、I L - 4、I L - 5 および I F N - ) の分泌ももたらす。T I L による腫瘍抗原認識は、T I L による O X 4 0 の発現増加をもたらし、これは、予後改善と相関する。抗 O X 4 0 アゴニスト抗体または F c - O X 4 0 L 融合タンパク質での処置は、黒色腫、肉腫、結腸癌および乳癌のマウスモデルで腫瘍特異的 C D 4 + T 細胞応答および生存延長をもたらし、一方腫瘍細胞ワクチンに取り込まれた F c - O X 4 0 L は、乳癌細胞でのその後の負荷からマウスを保護したことが研究により示された (Lechner et al. (2011) Immunotherapy 3(11):1317-1340; Marin-Acevedo et al. (2018) Journal of Hematology & Oncology 11:39)。

10

## 【 0 4 5 9 】

## B 7 - C D 2 8 ファミリー

C D 2 8 は、T 細胞表面に共刺激分子として発現され、抗原提示細胞に発現する共刺激分子である B 7 - 1 ( C D 8 0 ) および B 7 - 2 ( C D 8 6 ) の受容体として作用する。C D 2 8 - B 7 シグナル伝達は T 細胞活性化および生存に必要であり、T 細胞アネルギーを防止し、I L - 6 などのインターロイキンの産生をもたらす。

20

## 【 0 4 6 0 】

最適 T 細胞プライミングは、( 1 ) M H C 提示抗原の T 細胞受容体 ( T C R ) 認識および ( 2 ) T 細胞 C D 2 8 と A P C で発現される B 7 - 1 ( C D 8 0 ) または B 7 - 2 ( C D 8 6 ) のライゲーションに起因する共刺激シグナルの 2 つのシグナルを必要とする。T 細胞活性化後、C T L A - 4 受容体が誘導され、次いで、それは C D 2 8 の B 7 - 1 および B 7 - 2 リガンドへの結合を打ち負かす。腫瘍細胞による抗原提示は、B 7 - 1 / C D 8 0 および B 7 - 2 / C D 8 6 などの共刺激分子の発現を欠くため不十分であり、T 細胞受容体複合体の活性化ができない。その結果、腫瘍細胞表面のこれら分子の上方制御は、免疫原性を増強できる。固形腫瘍および血液系腫瘍の免疫療法は、例えば、B 7 または可溶性 B 7 - 免疫グロブリン融合タンパク質の腫瘍細胞発現により、B 7 での誘導が成功している。I C A M - 3 および L F A - 3 などの他の共刺激リガンドと組み合わせた B 7 のウイルス介在腫瘍発現は、前臨床ならびに慢性リンパ球性白血病および転移黒色腫の処置の臨床試験で成功している。さらに、可溶性 B 7 融合タンパク質は、単剤免疫療法として、固形腫瘍の免疫療法をもたらす有望性が示されている (Lechner et al. (2011) Immunotherapy 3(11):1317-1340; Dotti et al. (2002) Blood 100(1):200-207)。

30

## 【 0 4 6 1 】

F. タンパク質をコードする免疫刺激性細菌および例示的プラスミドおよび送達媒体の構築

上記のものを含む治療産物は、プラスミド上でここに提供される免疫刺激性細菌にコード化され、一般に宿主認識制御シグナルの制御下にある。ここに提供される免疫刺激性細菌は、腫瘍常在免疫細胞および腫瘍微小環境における蓄積増加のために修飾される。上記のとおり、細菌ゲノム、細菌発現および宿主細胞侵襲の修飾を含み、例えば、腫瘍、腫瘍常在免疫細胞および腫瘍微小環境へのターゲティングまたは蓄積が改善または増加され、また、細菌プロモーターを含む細菌でならびに適宜適切な真核生物プロモーターおよび他の制御領域を含むことにより、宿主で発現される産物をコードするプラスミドを含む。免疫刺激性細菌は、細菌が a s d -、m s b B - および p a g P - の 1 以上であり、アデノシン栄養要求株であるように、鞭毛の欠失および他の修飾によるなど、上記のとおり修飾される。

40

## 【 0 4 6 2 】

プラスミドを導入するために、細菌は、日常的分子生物学ツールおよび方法 ( D N A 合成

50

、PCR増幅、DNA制限酵素消化およびリガーゼでの適合性突出末端フラグメントライゲーション)で構築された精製DNAプラスミドのエレクトロポレーションなど、標準的方法を使用して形質転換される。下記および本明細書の他の箇所に記載するとおり、プラスミドは、インターロイキンおよび/または修飾機能獲得型タンパク質などの免疫刺激性タンパク質などのタンパク質を、宿主認識プロモーター制御下コードする。これらのコード化タンパク質は、特に腫瘍微小環境で免疫系を刺激する。

#### 【0463】

細菌は、一般に、RNAポリメラーゼ(RNAP)IIまたはIIIプロモーターなどの真核生物プロモーターの制御下発現される、プラスミドに他の産物をコードし得る。一般に、RNAP III(POL IIIとも称される)プロモーターは構成的であり、RNAP II(POL IIとも称される)は制御され得る。ここで提供するネズミチフス菌を含むサルモネラの株などの細菌株は、腫瘍微小環境でアデノシンに対して栄養要求性であり、治療タンパク質、例えばSTINGおよびI型IFNの発現をもたらすサイトゾルDNA/RNAセンサー経路の一部である他の免疫刺激性タンパク質およびまたI型IFNの発現を増加させるもしくはI型IFNの構成的発現をもたらすこれらのタンパク質のバリエーションをコードするプラスミドを担持するよう修飾されまたは同定される。

10

#### 【0464】

ここに提供される免疫刺激性細菌における、例えば、プラスミド上のコード化治療産物は、I型IFNを誘導するサイトゾルDNA/RNAセンサーおよびその構成的活性型バリエーションを含む。これらは、例えばSTING、RIG-I、MDA5、IRF-3およびIRF-7ならびに構成的にI型IFNを誘導するおよび/またはCDNを含むサイトゾル核酸などリガンドによる刺激の非存在下で活性化され、I型IFNを誘導するそのGOFバリエーションを含む。コード化STINGタンパク質は、野生型およびヒトSTINGのGOFバリエーション(アレルバリエーションを含む)ならびに低NF- $\kappa$ B活性を示し得て、所望により、IRF3/I型IFNシグナル伝達が増加したタスマニアンデビル、マーモセット、ウシ、ネコ、ダチョウ、イノシシ、コウモリ、マナティ、トキ、シーラカンス、マウスおよびゾウギンザメなどの他の種からの野生型または修飾STING(例えば、GOFバリエーション)を含む。他の治療産物は、サイトカイン、ケモカインおよび共刺激分子などの免疫刺激性タンパク質を含む。

20

#### 【0465】

ネズミチフス菌などの細菌は、腫瘍細胞およびマクロファージを含む複数の細胞型に感染できる。ネズミチフス菌などの免疫刺激性細菌での細胞感染について、プラスミドが放出され、コード化タンパク質が宿主RNAポリメラーゼにより転写され、腫瘍微小環境および腫瘍に分泌される。

30

#### 【0466】

##### 1. 複製起点およびプラスミドコピー数

プラスミドは、複製起源の手段により細菌内に維持される、自律複製染色体外環状二本鎖DNA分子である。コピー数は、プラスミド安定性に影響する。高コピー数は、細胞分裂でランダム分割が生じたとき、一般にプラスミドの高い安定性をもたらす。プラスミドの数が多いと、一般に増殖速度が低減し、故に、おそらく細胞は、速く増殖するため、少ないプラスミドで培養を支配することが可能となる。複製起点もプラスミドの適合性(同じ細菌細胞内の他のプラスミドと合わせたその複製能)を決定する。同じ複製系を利用するプラスミドは、同じ細菌細胞に共存できない。同じ適合性群に属すると言える。同じ適合性群からの第二プラスミドの形態での新規起源の導入は、常在プラスミドの複製の結果を模倣する。それ故に、2つのプラスミドが正しい複製前コピー数を作るよう異なる細胞に分離される後まで、さらなる何らかの複製が阻止される。

40

#### 【0467】

50

【表 9】

| 複製起点        | コピー数    | 配列番号 |
|-------------|---------|------|
| pMB1        | 15~20   | 254  |
| p15A        | 10~12   | 255  |
| pSC101      | 約5      | 256  |
| pBR322      | 15~20   | 243  |
| ColE1       | 15~20   | 257  |
| pPS10       | 15~20   | 258  |
| RK2         | 約5      | 259  |
| R6K(アルファ起源) | 15~20   | 260  |
| R6K(ベータ起源)  | 15~20   | 261  |
| R6K(ガンマ起源)  | 15~20   | 262  |
| P1(oriR)    | 低       | 263  |
| R1          | 低       | 264  |
| pWSK        | 低       | 265  |
| ColE2       | 10~15   | 266  |
| pUC(pMB1)   | 500~700 | 267  |
| F1          | 300~500 | 268  |

10

20

上記表に挙げるものを含む、多数の細菌複製起点が当業者に知られる。起源は、所望のコピー数が達せ得られるよう選択され得る。複製起点は、DNA依存的DNAポリメラーゼを介するプラスミド複製の開始部位として認識されている配列を含む(de Solar et al. (1998) Microbiology And Molecular Biology Reviews 62(2):434-464)。異なる複製起点は、各細胞内で種々のプラスミドコピーレベルを提供し、細胞あたり1~数百コピーの範囲であり得る。一般に使用される細菌プラスミド複製起点は、極めて高いコピー誘導体を有するpMB1由来起源、低コピー数を有するColE1起源、p15A、pSC101、pBR322およびその他を含むが、これらに限定されない。このような起源は当業者に周知である。pUC19起源は、細胞あたり500~700コピーのコピー数をもたらす。pBR322起源は、15~20のコピー数を有することが知られる。これらの起源は、一塩基対によってのみ異なる。ColE1起源コピー数は15~20であり、pBluescriptなどの誘導体は、300~500の範囲のコピー数を有する。pACYC184であるp15A起源は、例えば、約10のコピー数をもたらす。pSC101起源は、約5のコピー数を付与する。起源が得られ得る他の低コピー数ベクターは、例えば、pWSK29、pWKS30、pWKS129およびpWKS130を含む(Wang et al. (1991) Gene 100:195-199参照)。中乃至低コピー数は150未満または100未満である。低コピー数は、20、25または30未満である。当業者は、低または高コピー数のプラスミドを同定できる。例えば、コピー数が高または低であるかを実験的に決定する方法の一つは、ミニプレップである。高コピープラスミドは、1ml LB培養あたり3~5 µg DNAを生じ；低コピープラスミドはLB培養1mlあたり0.2~1 µg DNAを生じる。

30

40

## 【0468】

複製起点の同定および配列決定を含む細菌プラスミドの配列は、周知である(例えば、[snapgene.com/resources/plasmid\\_files/basic\\_cloning\\_vectors/pBR322/](http://snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pBR322/)参照)。高コピープラスミドは、インビトロでタンパク質の異種発現について、遺伝子投与量が染色体遺伝子に比例して増加し、タンパク質の高い比産出率をもたらすため、治療細菌について、コード化治療剤の高治療投与量のために、選択される。しかしながら、ここで、ここに提供される免疫刺激性細菌による治療産物をコードするプラスミドの送達について、低コピー数がより有効であることが示されている。

50

## 【0469】

細菌が高コピープラスミドを維持するための要求は、発現された分子が生物に毒性であるならば、問題であり得る。これらのプラスミドの維持のための代謝要求は、インビボでの複製適応度の費用に降りかかる。治療産物をコードするプラスミドの送達のための最適プラスミドコピー数は、プラスミドの送達のために操作した株の弱毒化の機構に依存し得る。必要であれば、当業者は、本明細書の開示に鑑み、特定の免疫刺激性種および細菌の株に適切なコピー数を選択し得る。ここで、低コピー数が有利であり得ることが示されている。

## 【0470】

## 2. プラスミド維持 / 選択成分

10

実験室でのプラスミド維持は、通常プラスミドへの抗生物質抵抗性遺伝子の包含および増殖培地における抗生物質の使用により確実にされる。上記のとおり、プラスミドでの機能的 *asd* 遺伝子で補われた *asd* 欠失変異体の使用は、インビトロでの抗生物質を用いないプラスミド選択を可能とし、インビボでのプラスミド選択を可能とする。*asd* 遺伝子補完系は、このような選択のために提供される (Galan et al. (1990) Gene 94(1):29-35)。腫瘍微小環境でプラスミドを維持するための *asd* 遺伝子補完系の使用は、プラスミドコード化治療タンパク質または干渉RNAの送達のために操作したネズミチフス菌の効力を増加させる。

## 【0471】

## 3. RNAポリメラーゼプロモーター

20

真核生物細胞において、DNAは、RNA Pol I、IIおよびIIIの3タイプのRNAポリメラーゼにより転写される。RNA Pol IはリボソームRNA (rRNA) 遺伝子のみを転写し、RNA Pol IIはDNAをmRNAおよび小核RNA (snRNA) に転写し、RNA Pol IIIはDNAをリボソーム5S rRNA (I型)、導入RNA (tRNA) (II型) およびU6 snRNA (III型) などの他の小RNAに転写する。T7、pBADおよびpepTプロモーターを含む原核生物プロモーターは、転写が細菌細胞で生じるとき、利用され得る (Guo et al. (2011) Gene therapy 18:95-105; 米国特許公開2012/0009153、2016/0369282; 国際出願公開WO2015/032165、WO2016/025582)。ここに提供される細菌が宿主細胞転写 / 翻訳機構による発現のためにプラスミドを腫瘍常在免疫細胞に送達するよう設計されるため、治療タンパク質 / 産物をコードする核酸は、RNA Pol IIおよびRNA Pol IIIプロモーターなどの真核生物プロモーターに操作可能に連結される。

30

## 【0472】

RNA pol IIIプロモーターは、一般に構成的発現に使用される。誘導型発現のために、RNA pol IIプロモーターが使用される。例は、L-アラビノースにより誘導可能なpBADプロモーター; TRE-tight、IPT、TRE-CMV、Tet-ONおよびTet-OFFなどのテトラサイクリン誘導性プロモーター; レトロウイルスLTR; LacI、Lac-O応答性プロモーターなどのIPTG誘導性プロモーター; LoxP-stop-LoxP系プロモーター (米国特許8,426,675; 国際出願公開WO2016/025582); および低酸素状態誘導プロモーターであるpepTを含む (Yu et al. (2012) Scientific Reports 2:436)。これらのプロモーターは周知である。これらのプロモーターの例は、ヒトU6 (配列番号73) およびヒトH1 (配列番号74) である。

40

【表 10】

| 配列番号 | 名称                          | 配列  |
|------|-----------------------------|---|
| 73   | ヒトU6 RNA<br>p o l IIIプロモーター | aa ggtcgggcag gaagaggcc<br>721 tatttccat gattcctca tatttgcata tacgatataa ggctgtaga gagataatta<br>781 gaattaattt gactgtaaac acaaagatat tagtacaataa tacgtgacgt agaaagtaat<br>841 aatttcttgg gtagtttga gttttaaataat tatgttttaa aatggactat catatgctta<br>901 ccgtaacttg aaagtatttc gatttcttgg ctttatataat cttgtggaataa ggacgaaact<br>961 ag |
| 74   | ヒトH1 RNA<br>p o l IIIプロモーター | atatttga tgcgctatg<br>721 ttttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat ttgggaatct tataagttct<br>781 gtagagacc actccctagg   |

10

## 【0473】

組織特異的プロモーターは、黒色腫細胞およびメラニン形成細胞のTRP2プロモーター；乳房および乳癌細胞のMMTVプロモーターまたはWAPプロモーター、腸細胞のピリンプロモーターまたはFABPプロモーター、膵臓ベータ細胞のRIPプロモーター、ケラチン生成細胞のケラチンプロモーター、前立腺上皮のプロバシンプロモーター、CNS細胞/癌のネスチンプロモーターまたはGFAPプロモーター、ニューロンのチロシンヒドロキシラーゼ100プロモーターまたは神経細線維プロモーター、肺癌のクララ細胞分泌タンパク質プロモーターおよび心臓細胞のアルファミオシンプロモーターを含む(米国特許8,426,675)。I型インターフェロンを発現を増加させるか構成的とすることにより誘導するタンパク質の機能獲得型バリエーションなどのコード化治療産物の発現を制御する他のプロモーターは、例えば、EF-1アルファプロモーター、CMV、SV40、PGK、EIF4A1、CAGおよびCD68プロモーターを含む。

20

## 【0474】

## 4. DNA核ターゲティング配列

SV40 DTSなどのDNA核ターゲティング配列(DTS)は、核孔複合体を介してDNA配列の転座に介在する。この輸送の機構は、核局在化配列を含むDNA結合タンパク質の結合に依存的であることが報告されている。プラスミドへの核輸送増加および発現のためのDTSの包含は、示されており(例えば、Dean, D.A. et al. (1999) Exp. Cell Res. 253(2):713-722参照)、ネズミチフス菌により送達されるプラスミドからの遺伝子発現増加に使用されている(例えば、Kong et al. (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109(47):19414-19419参照)。

30

## 【0475】

大腸菌のrrnB遺伝子のT1ターミネーターなどのRho非依存的またはクラスI転写ターミネーターは、転写伸長複合体の解離を引き起こす二次構造を形成するDNAの配列を含む。転写ターミネーターは、ネズミチフス菌転写機構によるコード化治療産物の発現を防止するために、プラスミドに含まれ得る。これにより、コード化産物の発現が、宿主細胞転写機構に局限されることを確実にする。

40

## 【0476】

ここに記載する癌治療剤として、ネズミチフス菌などのサルモネラの形質転換に使用するプラスミドは、次の性状の全てまたは一部を含む：1) CpG島、2) 細菌複製起点、3) プラスミド維持のためのasd遺伝子選択可能マーカー、4) 1以上発現カセット、5) DNA核ターゲティング配列および6) 転写ターミネーター。

## 【0477】

50



## 5. CRISPR

CRISPRカセットをコードする免疫刺激性細菌を使用して、目的の標的遺伝子を部位特異的にノックアウトするために、ヒト免疫、骨髄または造血細胞に感染させ得る。使用する株は *asd*- であってよく、相補的 *asd* カセットを欠くプラスミドを含んでよく、*kan* カセットを含む。液体培地でインビトロで株を増殖するために、*asd*- 遺伝子欠乏を補うための DAP を加える。ヒト細胞の感染後、株はもはや複製できず、CRISPRカセットコード化プラスミドが送達される。株はまた、食細胞のパイロトーシス(炎症性介在細胞死)を低減または防止する *hilA*- であるかまたは SPI-1 の 1 以上の部分を欠くかまたはフラジェリンまたはそれらの何らかの組み合わせを欠いてよい。

### 【0478】

G. 非ヒト STING タンパク質および I 型インターフェロンおよび他の治療産物を構成的に誘導する機能獲得型修飾タンパク質をコードする他の送達媒体

ここに記載するとおり、インターフェロン- およびインターフェロン- を含む I 型インターフェロン (IFN) を、直接的にまたは経路を介して間接的に誘導する、タンパク質などの治療産物をコードする核酸を含む、免疫刺激性細菌、腫瘍溶解性ウイルスおよびエクソソーム、リポソームおよびナノ粒子などの他の送達媒体が提供される。このようなタンパク質は、ヒトおよび非ヒト STING およびその他、例えば、RIG-1 および MDA5 タンパク質および I 型インターフェロンが構成的に発現されるように、活性を構造的とする変異を含むその GOF 変異体を含む。サイトカインおよび他の免疫刺激性タンパク質などの他の治療産物もこれら送達媒体にコード化されるおよび/またはこれらにより送達されることができる。媒体は、腫瘍常在免疫細胞などの腫瘍細胞または腫瘍微小環境に蓄積する。

### 【0479】

1. エクソソーム、細胞外小胞および他の小胞送達媒体

エクソソームおよびナノ粒子を製造および使用およびターゲティングする多数の方法が当業者に知られる(例えば、公開米国出願 2013/0337066、2014/0093557、2018/0104187、2018/0193266 および 2018/0236104 参照)。エクソソームは、種々の細胞型により分泌される、小さな、30~100 nm 小胞である。核酸送達の媒体として適応されている。腫瘍に標的化され得る。例えば、表面に腫瘍ターゲティングリガンドを発現するよう操作され得る。

### 【0480】

エクソソームは、多胞体と原形質膜の融合後細胞外環境に放出されるエンドサイトーシス起源の小膜小胞である。エクソソームのサイズは、直径 30~100 nm の範囲である。その表面は、ドナー細胞の細胞膜からの脂質二重層からなり、エクソソームを産生した細胞からのサイトゾルを含み、表面に親細胞からの膜タンパク質を示す。

### 【0481】

エクソソームは、インビトロおよびインビボで多くのタイプの細胞により内因性に分泌されるナノ粒子であり、通常血液、尿および悪性腹水などの体液から単離され得る。エクソソームは、小胞からエンドソーム内腔への内向き出芽および限定的膜切断により形成され得る、cup 様多胞体 (MVB) である。MVB 形成中、膜貫通および末梢膜タンパク質は、小胞膜に吸収され、同時に、サイトゾル成分は小胞に包埋される。この過程が進行するに連れ、MVB は最終的に細胞膜と融合し、細胞からのエクソソームの放出が誘導される。

### 【0482】

エクソソームは、由来する細胞型により、種々の組成および機能を示す。エクソソームは、上皮細胞、B および T リンパ球、肥満細胞 (MC) および樹状細胞 (DC) を含む多くの細胞により産生される。ヒトにおいて、エクソソームは血漿、尿、気管支肺胞洗浄液、腸上皮細胞および腫瘍組織で生じる。エクソソームは、細胞への核酸導入に使用されており、免疫系の細胞を含む体のあらゆる細胞に標的化され得る。エクソソームは、インビトロで増殖する細胞および人体からを含む、種々の起源の細胞から単離され得る。それらは、そ

10

20

30

40

50

れ自体の遺伝子材料を欠くように産生され得る。遺伝子材料を欠くエクソソームを産生する方法は当業者に知られる。UV暴露、エクソソームにRNAを運搬するタンパク質の変異、エレクトロポレーションおよびエクソソーム膜を開孔する化学処理を含む。方法は、何らかの核酸のエクソソームへの充填を修飾する何らかのタンパク質の変異/欠失を含む。RNAまたはDNAの遺伝的構築物は、インビトロ形質転換、トランスフェクションおよびマイクロインジェクションなどの慣用の分子生物学技術の使用により、エクソソームに導入され得る。

【0483】

ここに提供されるのは、機能獲得型修飾タンパク質をコードするまたはサイトゾルIFNシグナル伝達経路の構成的活性化/サイトゾル核酸リガンドへの感受性増加に至る、コード化タンパク質(例えば、ここに記載するとおり、機能獲得型RIG-I、MDA5およびSTINGの変異)を細胞に含む、核酸、DNAまたはRNAを含む、エクソソームおよび他の細胞外小胞および他のこのような媒体である。これらの媒体は、例えば、サイトカインを含む免疫応答を増強する免疫刺激性タンパク質などの付加的タンパク質をコードし得る。エクソソームおよび他の媒体は、腫瘍常在免疫細胞および腫瘍細胞を含む、腫瘍微小環境における細胞を標的とするまたは蓄積するよう設計され得る。

10

【0484】

2. 腫瘍溶解性ウイルス

腫瘍溶解性ウイルスは腫瘍で蓄積および複製し、腫瘍退縮をもたらす、腫瘍細胞融解ならびに放出された腫瘍抗原およびウイルス産物への免疫応答を導き得る。腫瘍溶解性ウイルスは、循環腫瘍細胞などの転移腫瘍細胞を含む腫瘍細胞にコロニー形成または蓄積することにより、処置を発揮する。腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍細胞で発現される治療産物をコードするよう操作され得る。

20

【0485】

腫瘍溶解性ウイルスは、とりわけ、ポックスウイルス、例えば、ワクシニアウイルス、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、麻疹ウイルス、レオウイルス、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、コクサッキーウイルス、セムリキ森林熱ウイルス、セネカバレーウイルス、ニューカッスル病ウイルス、センダイウイルス、デングウイルス、ピコルナウイルス、ポリオウイルス、パルボウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、アルファウイルス、フラビウイルス、ラブドウイルス、パピローマウイルス、インフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、テナガザル白血病ウイルスおよびシンドビスウイルスを含むが、これらに限定されない、天然に存在するおよび操作した組み換えウイルスを含む。多くの場合、腫瘍選択性は、ワクシニアウイルスおよび他の腫瘍溶解性ウイルスなどのウイルスの固有の性質である。腫瘍溶解性ウイルスは、当業者に知られるものを含むが、これらに限定されず、例えば、水疱性口内炎ウイルス(例えば、米国特許7,731,974、7,153,510および6,653,103;米国特許公開2010/0178684、2010/0172877、2010/0113567、2007/0098743、2005/0260601および2005/0220818;および欧州特許1385466、1606411および1520175参照);単純ヘルペスウイルス(例えば、米国特許7,897,146、7,731,952、7,550,296、7,537,924、6,723,316および6,428,968;および米国特許公開2011/0177032、2011/0158948、2010/0092515、2009/0274728、2009/0285860、2009/0215147、2009/0010889、2007/0110720、2006/0039894および2004/0009604参照);レトロウイルス(例えば、米国特許6,689,871、6,635,472、6,639,139、5,851,529、5,716,826および5,716,613;および米国特許公開2011/0212530参照);およびアデノ随伴ウイルス(例えば、米国特許8,007,780、7,968,340、7,943,374、7,906,111、7,927,585、7,811,814、7,662,627、7,241,447、7,238,526、7,172,893、7,033,826、7,001,765、6,897,045および6,63

30

40

50

2,670参照)を含む。当業者は、治療のために腫瘍溶解性ウイルスを増殖、選択および修飾する方法を知っている。

【0486】

ここに提供される腫瘍溶解性ウイルスは、I型インターフェロン経路シグナル伝達および/またはNF- $\kappa$ Bシグナル伝達を活性化するポリペプチドなどI型インターフェロンの発現を誘導する産物をコードするよう修飾される。これらのタンパク質は、ヒトおよび非ヒトSTINGおよびSTINGの機能獲得型変異体およびここに記載するものを含む、RIG-IおよびMDA5およびその機能獲得型変異体を含む、他のこのようなタンパク質を含む。腫瘍溶解性ウイルスはまた、インターロイキン2(IL-2)を含むサイトカインなどの免疫刺激性タンパク質をコードし得る。これらのタンパク質はウイルスプロモーターの制御下にあるまたは他のRNAポリメラーゼIIプロモーターの制御下にあり得る。腫瘍溶解性ウイルスはまたTREX1などの免疫応答を抑制する受容体または他の標的を標的とする、shRNAまたはマイクロRNAなどのRNAiなどの他の治療産物もコードし得る。ウイルスは、静脈内、腫瘍内および腹腔内投与などの非経腸投与を含むが、これらに限定されない、何らかの適当な方法で投与される。ウイルスは当業者に知られるだけでもよく、付加的治療産物をコードし得る。ウイルスを、卵巣腫瘍のためのシスプラチンまたは膵臓腫瘍のためのゲムシタビンなど腫瘍に適する他の治療剤と組み合わせ得る。腫瘍溶解性ウイルスの例は、下記のものである。

10

【0487】

a. アデノウイルス

アデノウイルス(Ad)は、線形ゲノムを有する非エンベロープ型ds-DNAウイルスである。ヒトAdは、交差感受性に基つき57血清型(Ad1~Ad57)にならびに病原性および組織向性に基つき7サブグループ(A~G)に分類されている。アデノウイルス血清型5(Ad5)は、腫瘍溶解性ウイルス療法に最も一般に使用されるアデノウイルスである。ヒトへの感染は穏やかであり、風邪様症状をもたらす(Yokoda et al. (2018) *Biomedicines* 6, 33)、全身投与は肝臓向性をもたらす、肝毒性に至り得るが(Yamamoto et al. (2017) *Cancer Sci.* 108:831-837)、Adは治療目的では安全と考えられる。Adは、コクサッキーウイルスおよびアデノウイルス受容体(CAR)に結合し、その後細胞表面のv3およびv5インテグリンおよびアデノウイルスペントン塩基のArg-Gly-Aspトリペプチドモチーフ(RGD)と相互作用して、細胞に侵入する(Jiang et al. (2015) *Curr. Opin. Virol.* 13:33-39)。CARは大部分の正常細胞表面に発現されるが、発現は癌細胞型にわたり高度に可変である。他方で、RGD関連インテグリンは癌細胞により高度に発現されるが、正常細胞にはるかに低レベルで発現される(Jiang et al. (2015))。その結果、アデノウイルスは、RGDモチーフを介して癌細胞に標的化され得る。

20

30

【0488】

Adは、形質転換細胞における高形質導入効率、宿主ゲノムへの組込み欠如/挿入変異欠如、ゲノム安定性、大治療遺伝子をそのゲノムに挿入する能力およびのウイルスプロモーターの癌組織選択的プロモーターへの置換など遺伝子操作により腫瘍選択性とする能力により腫瘍溶解性ウイルスとして誘引性である(Yokoda et al. (2018) *Biomedicines* 6, 33; Choi et al. (2015) *J. Control. Release* 10(219):181-191)。

40

【0489】

腫瘍特異的プロモーターを有する腫瘍溶解性Adの例は、前立腺特異的抗原プロモーター制御下にアデノウイルス早期領域1A(E1A)遺伝子を有する前立腺癌処置のCV706およびE1A遺伝子発現制御のためにテロメラーゼ逆転写酵素(TERT)プロモーターを利用するOBP-301を含む(Yamamoto et al. (2017) *Cancer Sci.* 108:831-837)。腫瘍選択性を誘導する他の方法は、網膜芽細胞腫(Rb)経路における異常またはp53変異など、欠損遺伝子が腫瘍細胞で通常みられる遺伝的変異により機能的に補完される場所である、AdゲノムのE1領域における変異の導入である(Yamamoto et al. (2017) *Cancer Sci.* 108:831-837)。例えば、腫瘍溶解性Ad ONYX-015

50

およびH101は、E1B55K遺伝子に欠失を有し、これは、p53を不活性化する。これらの変異体は、正常アポトーシス防御経路を遮断できず、p53腫瘍抑制経路が欠損した新生物細胞の感染により、腫瘍選択性をもたらす(Yamamoto et al. (2017) Cancer Sci. 108:831-837; Uusi-Kerttula et al. (2015) Viruses 7:6009-6042)。E1A24は、E1A遺伝子に24bp変異を含む腫瘍溶解性Adであり、Rb結合ドメインを破壊し、Rb経路変異を有する癌細胞でのウイルス複製を促進する。ICOVIR-5は、E2Fプロモーターにより制御されるE1A転写、E1Aの24変異およびアデノウイルス繊維へのRGD-4C挿入の組み合わせを含む、腫瘍溶解性Adである(Yamamoto et al. (2017) Cancer Sci. 108:831-837; Uusi-Kerttula et al. (2015))。デルタ-24-RGDまたはDNX-2401は、24主鎖がRGDモチーフの挿入により修飾された腫瘍溶解性Adであり、インビトロおよびインビボで腫瘍溶解性効果を示す(Jiang et al. (2015))。

10

## 【0490】

腫瘍選択性を改善する代替的戦略は、細胞外マトリクス(ECM)のターゲティングによる、固形腫瘍の物理的障壁の克服である。例えば、VCN-01などのヒアルロニダーゼを発現する腫瘍溶解性Adを使用して、腫瘍中へのコード化産物およびウイルスの送達を促進し得る。AdはまたECMを破壊するためのレキサシンを発現するよう操作もされ得る(Yamamoto et al. (2017) Cancer Sci. 108:831-837; Shaw and Suzuki (2016) Curr. Opin. Virol. 21:9-15)。シトシンデアミナーゼ(CD)およびHSV-1チミジンキナーゼ(TK)などの自殺遺伝子を発現するAdは、AdがGM-CSFを発現するONCOS-102などの免疫刺激性サイトカインを発現するとして、インビボで抗腫瘍有効性増強が示されている(Yamamoto et al. (2017) Cancer Sci. 108:831-837; Shaw and Suzuki (2016) Curr. Opin. Virol. 21:9-15)。抗CTLA4抗体を発現する24ベースの腫瘍溶解性Adは、前臨床試験で有望性が示されている(Jiang et al. (2015))。

20

## 【0491】

アデノウイルスH101(商品名Oncorine(登録商標)で入手可能)は、2005年、進行型鼻咽頭癌患者処置のために、化学療法との組み合わせで中国で臨床使用が承認された初めての腫瘍溶解性Adであった。臨床試験は、広範な癌の処置に対する腫瘍溶解性アデノウイルスの使用を示している。例えば、転移膵臓癌を有する患者におけるIL-12をコードする腫瘍溶解性Ad(NCT03281382);膵臓腺癌、卵巣癌、胆道癌および結腸直腸癌を有する患者におけるTMX-CD40Lおよび41BBLを発現する免疫刺激性Ad5(LOAd703)(NCT03225989);膵臓癌を有する患者におけるゲムシタピンおよびnab-パクリタキセルと組み合わせたLOAd703(NCT02705196);膵臓腺癌を含む進行型固形腫瘍を有する患者におけるゲムシタピンおよびアブラキサン(登録商標)と組み合わせたヒトPH20ヒアルロニダーゼ(VCN-01)をコードする腫瘍溶解性アデノウイルス(NCT02045602;NCT02045589);肝細胞癌を有する患者におけるヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)プロモーターを含む腫瘍選択性を有する腫瘍溶解性AdであるTelomelysin(登録商標)(OBP-301)(NCT02293850);肝細胞癌を有する患者における経カテーテル肝動脈化学塞栓療法(TACE)と組み合わせたE1B遺伝子欠失Ad5(NCT01869088);膀胱癌患者におけるGM-CSFを発現し、E1Aの発現を駆動する癌特異的E2F-1プロモーターを含む腫瘍溶解性AdであるCG0070(NCT02365818;NCT01438112);結腸癌、非小細胞肺癌、膀胱癌および腎臓細胞癌腫を有する患者におけるAd11p/Ad3キメラグループB腫瘍溶解性ウイルスであるEnadenotucirev(Colo-Ad1)(NCT02053220);および神経膠芽腫を有する患者におけるテモゾロミドと組み合わせた(NCT01956734)またはIFNと組み合わせた(NCT02197169)DNX-2401(Ad5 E1A 24RGD)が臨床試験されているおよび治験中である。

30

40

## 【0492】

50

## b. 単純ヘルペスウイルス

単純ヘルペスウイルス(HSV)は、ヘルペスウイルス科に属し、遺伝子操作の理想的候補となる、ウイルス複製に必須でない多くの遺伝子を含む大線形二本鎖DNAゲノムを有する。他の利点は、広範囲の細胞型に感染する能力、アシクロビルおよびガンシクロビルなどの抗ウイルス剤への感受性および挿入変異の欠如を含む(Sokolowski et al. (2015) *Oncolytic Virotherapy* 4:207-219; Yin et al. (2017) *Front. Oncol.* 7:136)。HSV I型(HSV-1)およびII型(HSV-2)の2タイプのHSVがあり、腫瘍溶解性HSVの大部分はHSV-1由来である。ヒトにおいて、HSV-1は、熱性疱疹疾患をもたらす、細胞表面のネクチン、糖タンパク質およびヘルペスウイルス侵入メディエーター(HVEM)への結合により上皮細胞、ニューロンおよび免疫細胞に感染する(Kohlhapp and Kaufman (2016) *Clin. Cancer Res.* 22(5):1048-1054)。

### 【0493】

多くの種々の腫瘍溶解性HSV-1ウイルスが今日までに産生されている。何れも、ここに記載するとおり、修飾DNA/RNA機能獲得型タンパク質をコードするようさらに修飾でき、その結果、腫瘍および腫瘍微小環境への蓄積により、そのように修飾されたHSVは、I型インターフェロンなどの免疫応答メディエーターを構成的にするようコード化タンパク質を発現する。例えば、HSV-1は、乳癌および卵巣癌、胃癌および神経膠芽腫などのHER-2過発現腫瘍をターゲティングする、抗HER-2抗体トラスツズマブを発現するよう操作され得る。トラスツズマブをコードする遺伝子は、HSV-1 gD糖タンパク質遺伝子内の2つの領域に挿入され、2つの腫瘍溶解性HSV、R-LM113およびR-LM249を産生する。R-LM113およびR-LM249は、ヒト乳癌および卵巣癌ならびにHER2+神経膠芽腫のマウスモデルに対する前臨床活性を示している。他の腫瘍溶解性HSV-1、dlspstk HSV-1は、チミジンキナーゼ(TK)のウイルスホモログをコードするユニーク長23(UL23)遺伝子の欠失を含み、一方、hrR3 HSV-1変異体は、遺伝子UL39によりコードされるICP6としても知られるリボヌクレオチドレダクターゼ(RR)の大サブユニットのLacZ挿入変異を含む。その結果、dlspstkおよびhrR3 HSV-1変異体は、それぞれ、TKおよびRRを過発現する癌細胞でのみ複製できる(Sokolowski et al. (2015) *Oncolytic Virotherapy* 4:207-219)。

### 【0494】

HF10は、UL43、UL49.5、UL55、UL56および潜伏性転写物をコードする遺伝子を欠き、UL53およびUL54を過発現する自然発生変異腫瘍溶解性HSV-1である。HF10は、前臨床試験で有望な結果が示され、高腫瘍選択性、高ウイルス複製、強力な抗腫瘍活性および好都合な安全性プロファイルが示された(Eissa et al. (2017) *Front. Oncol.* 7:149)。HF10を調査する臨床試験は、難治性頭頸部癌、皮膚扁平上皮細胞癌、乳癌および悪性黒色腫を有する患者におけるフェーズI治験(NCT01017185)および切除不能膵臓癌を有する患者における化学療法(ゲムシタピン、Nab-パクリタキセル、TS-1)と組み合わせたHF10のフェーズI治験(NCT03252808)を含む。HF10は抗CTLA-4抗体イピリムマブとも組み合わせられ、ステージIIIb、IIIcまたはIV切除不能または転移黒色腫を有する患者で治療有効性改善が示された(NCT03153085)。フェーズII臨床試験は、切除可能ステージIIIb、IIIcおよびIV黒色腫を有する患者における抗PD-1抗体ニボルマブとHF10の組み合わせ(NCT03259425)および切除不能または転移黒色腫を有する患者におけるイピリムマブとの組み合わせ(NCT02272855)が調査されている。パクリタキセルおよびHF10の組み合わせ治療は、何れかの処置単独と比較して、腹膜結腸直腸癌モデルで優れた生存率をもたらす、HF10およびエルロチニブの組み合わせ処置は、インビトロおよびインビボでHF10またはエルロチニブ単独より膵臓異種移植片に対して活性が改善した(Eissa et al. (2017) *Front. Oncol.* 7:149)。

### 【0495】

OncoVEXGM-CSFとして以前は知られたタリモジンラヘルパレブベク(Imlygic(登録商

10

20

30

40

50

標)、T-VEC)は、HSV-1のJS1株から産生され、顆粒球マクロファージ刺激因子(GM-CSF)を発現するよう遺伝子操作された、進行型黒色腫の処置にFDAが承認した腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルスである(Aref et al. (2016) *Viruses* 8:294)。T-VECで、GM-CSF発現は抗腫瘍細胞毒性免疫応答を増強し、感染細胞タンパク質3.4.5(ICP3.4.5)遺伝子両者のコピーの欠失は、正常組織での複製を抑制し、ICP4.7遺伝子欠失は、MHCクラスI分子の発現を増加し、感染細胞への抗原提示が可能となる(Eissa et al. (2017))。T-VECは、癌細胞表面のネクチンとの結合により腫瘍選択性を示し、破壊された発癌性および抗ウイルスシグナル伝達経路、特にタンパク質キナーゼR(PKR)およびI型IFN経路を利用して、腫瘍細胞で優先的に複製する。正常細胞で、PKRはウイルス感染により活性化され、次いで、真核生物開始因子-2Aタンパク質(eIF-2A)をリン酸化し、不活性化し、次に、細胞性タンパク質合成を阻害し、細胞増殖を阻止し、ウイルス複製を抑制する。野生型HSVは、eIF-2Aを脱リン酸化し、感染細胞におけるタンパク質合成を回復するホスファターゼを活性化するICP3.4.5タンパク質の発現により、抗ウイルス応答を回避する。それ故に、ICP3.4.5の欠失は、正常細胞におけるT-VECのウイルス複製を不可能とする。しかしながら、癌細胞でPKR-eIF-2A経路は破壊され、連続的細胞増殖および無抑制ウイルス複製が可能となる(Kohlhapp and Kaufman (2016) *Clin. Cancer Res.* 22(5):1048-1054; Yin et al. (2017) *Front. Oncol.* 7:136)。GM-CSFの発現は、樹状細胞蓄積を引き起こし、抗原提示を促進し、T細胞応答をプライミングすることにより、T-VECの免疫原性を改善する(Kohlhapp and Kaufman (2016) *Clin. Cancer Res.* 22(5):1048-1054)。

#### 【0496】

T-VECは、乳癌、結腸直腸腺癌、黒色腫、前立腺癌および神経膠芽腫を含む多様な異なる癌細胞株で優先的に複製することが示されている。臨床試験は、例えば、T-VECを膵臓癌(NCT03086642、NCT00402025)、反復性乳癌(NCT02658812)、小児進行型非CNS腫瘍(NCT02756845)、非黒色腫皮膚癌(NCT03458117)、非筋肉侵襲性膀胱移行細胞癌腫(NCT03430687)および悪性黒色腫(NCT03064763)におけるならびにT-VECを転移トリプルネガティブ乳癌および肝転移を有する転移結腸直腸癌(NCT03256344)の患者でアテゾリズマブとの組み合わせ、トリプルネガティブ乳癌を有する患者でパクリタキセルとの組み合わせ(NCT02779855)、難治性リンパ腫または進行型/難治性非黒色腫皮膚癌を有する患者でパニボルマブとの組み合わせ(NCT02978625)、進行型頭頸部癌を有する患者でシスプラチンおよび放射線療法との組み合わせ(NCT01161498)ならびに肝臓腫瘍(NCT02509507)、頭頸部癌(NCT02626000)、肉腫(NCT03069378)および黒色腫(NCT02965716、NCT02263508)を有する患者でペムプロリズマブとの組み合わせで調査している。

#### 【0497】

GM-CSFに加えて、治療有効性増加をもたらす、IL-12、IL-15、IL-18、TNF、IFN $\gamma$ およびfms様チロシンキナーゼ3リガンドをコードするものを含む、多数の他の免疫刺激遺伝子が腫瘍溶解性HSVに導入されている(Sokolowski et al. (2015); Yin et al. (2017))。

#### 【0498】

他の腫瘍溶解性HSV-1、R3616は、破壊されたPKR経路を有する癌細胞にターゲティングするICP3.4.5をコードする、RL1(13.4.5としても知られる)遺伝子の両コピーに欠失を有する。NV1020(またはR7020)は、神経病原性低減および癌選択性をもち、UL55、UL56、ICP4、RL1およびRL2遺伝子に欠失を含むHSV-1変異体である。NV1020は、頭頸部扁平上皮細胞癌、類表皮癌腫および前立腺腺癌のマウスモデルで有望な結果を示した(Sokolowski et al. (2015))。さらに、臨床試験は、肝臓に転移した結腸直腸癌におけるNV1020の安全性および有効性を調査している(NCT00149396およびNCT00012155)。

## 【0499】

G207(またはMGH-1)は、UL39神経病原性遺伝子にRL1(134.5)欠失およびLacZ不活性化挿入を有する他のHSV-1変異体である。G207を利用する臨床試験は、進行性または反復性テント上脳腫瘍の小児におけるG207投与単独または単回放射線投与の調査(NCT02457845)、反復性脳癌(神経膠腫、星状細胞腫、神経膠芽腫)を有する患者におけるG207の安全性および有効性の調査(NCT00028158)および悪性神経膠腫を有する患者におけるG207投与と続く放射線療法の効果の調査(NCT00157703)を含む。

## 【0500】

G207は、さらにICP47をコードする遺伝子に欠失を含む、G47の産生に使用された。他のHSV-1由来腫瘍溶解性ウイルスは、RL1に欠失を含むが、インタクテナUL39遺伝子を有し、活発に分裂している細胞で選択的に複製するHSV1716および最初期ウイルス遺伝子発現の喪失および癌細胞選択性をもたらすUL48およびRL2遺伝子に挿入を有するKM100変異体である(Sokolowski et al. (2015); Yin et al. (2017) Front. Oncol. 7:136)。

## 【0501】

腫瘍溶解性ウイルスはまたHSV-2にも由来している。例えば、FusOn-H2は、セリン/スレオニンタンパク質キナーゼ(PK)ドメインをコードするICP10遺伝子のN末端領域に欠失を有するHSV-2腫瘍溶解性ウイルスである。このPKは、GTPase活性化タンパク質Ras-FAPのリン酸化を担い、Ras/MEK/MAPK分裂促進的経路を活性化し、効率的HSV-2複製に必要なc-Fosを誘導および安定化する。正常細胞は、通常不活性化Rasシグナル伝達経路を有する。それ故に、FusOn-H2は、活性化Rasシグナル伝達経路を有する腫瘍細胞でのみ複製することにより、腫瘍選択性を示す(Fu et al. (2006) Clin. Cancer Res. 12(10):3152-3157)。FusOn-H2は、膵臓癌異種移植片(Fu et al. (2006) Clin. Cancer Res. 12(10):3152-3157)、シクロホスファミドと組み合わせてルイス肺癌異種移植ならびに同系マウス乳房腫瘍および神経芽腫(Li et al. (2007) Cancer Res. 67:7850-7855)に対する活性が示されている。

## 【0502】

## c. ポックスウイルス

ワクシニアウイルスは、ポックスウイルスの例である。ワクシニアは、サイトゾルウイルスであり、そうして、ライフサイクル中そのゲノムを宿主ゲノムに挿入しない。ワクシニアウイルスは、単一連続的ポリヌクレオチド鎖からなる約180,000塩基対長の線形、二本鎖DNAゲノムを有する(Baroudy et al. (1982) Cell 28:315-324)。構造は、10,000塩基対逆方向反復配列(ITR)の存在による。ITRはゲノム複製に関与する。ゲノム複製は、自己プライミングに関与し、高分子量コンカテマー(感染細胞から単離)の形成をもたらす、それは、その後開裂され、修復されて、ウイルスゲノムとなる(例えば、Traktman, P., Chapter 27, Poxvirus DNA Replication, pp. 775-798, in DNA Replication in Eukaryotic Cells, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)参照)。ゲノムは約250遺伝子を含む。一般に、非セグメント化、非感染性ゲノムが、中心に位置する遺伝子がウイルス複製(および故に、保存)に必須であり、2つの末端近辺の遺伝子は、宿主範囲および病原性などのより末端の機能を発揮するように配置される。ワクシニアウイルスは、一般的原則として、重複しないように、セットで配置されたオープンリーディングフレーム(ORF)を利用することにより、示差的遺伝子発現を実行する。

## 【0503】

ワクシニアウイルスは、広い宿主および細胞型範囲および低毒性を含む、癌遺伝子治療およびワクチン接種に使用するための多様な特性を有する。例えば、大部分の腫瘍溶解性ウイルスは天然病原体であるが、ワクシニアウイルスは、ヒトにおける安全性の確立された実績がある天然痘ワクチンとしてその利用が広まった特有の来歴がある。ワクシニア投与

10

20

30

40

50

に関連する毒性は、症例の0.1%未満で生じ、免疫グロブリン投与で効率的に対処できる。さらに、ワクシニアウイルスは、外来遺伝子を運搬する大きなキャパシティ(外来性DNAフラグメント最大25kb、ワクシニアゲノムサイズの約12%がワクシニアゲノムに挿入され得る)および他の株で修飾ウイルスを設計および産生するための種々の株間の高配列相同性を有する。遺伝子操作により修飾ワクシニア株を産生する技術は確立されている(Moss (1993) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3: 86-90; Broder and Earl (1999) *Mol. Biotechnol.* 13: 223-245; Timiryasova et al. (2001) *Biotechniques* 31: 534-540)。ワクシニアウイルス株は、固形腫瘍に特異的にコロニー形成し、他の臓器に感染しないことが示されている(例えば、Zhang et al. (2007) *Cancer Res.* 67:10038-10046; Yu et al. (2004) *Nat. Biotech.* 22:313-320; Heo et al. (2011) *Mol. Ther.* 19:1170-1179; Liu et al. (2008) *Mol. Ther.* 16:1637-1642; Park et al. (2008) *Lancet Oncol.* 9:533-542参照)。

10

#### 【0504】

ワクシニアウイルスの例は、リスター(Elstreeとしても知られる)、ニューヨーク市衛生局(NYCBH)、大連、池田、LC16M8、ウェスタン・リザーブ(WR)、コペンハーゲン(Cop)、タシケント、天壇、ワイス、Dryvax、IHD-J、IHD-W、ブライトン、アンカラ、修飾ワクシニアアンカラ(MVA)、大連I、LIPV、LC16M0、LIPV、WR 65-16、EM63、ベルン、パリ、CVA382、NYVAC、ACAM2000およびコノート株を含むが、これらに限定されない。ワクシニアウイルスは、創傷および癌遺伝子治療における使用に特に適当とする多様な特性を有する腫瘍溶解性ウイルスである。例えば、ワクシニアは、サイトゾルウイルスであり、そうして、ライフサイクル中そのゲノムを宿主ゲノムに挿入しない。宿主の転写機構を必要とする多くの他のウイルスと異なり、ワクシニアウイルスは、ウイルスゲノムでコードされる酵素を使用して、宿主細胞サイトゾルで自身の遺伝子発現を支持できる。ワクシニアウイルスはまた広い宿主および細胞型範囲を有する。特に、ワクシニアウイルスは、腫瘍および/または転移を含み、損傷された組織および細胞もまた含む免疫特権細胞または免疫特権組織に蓄積される。さらに、他の腫瘍溶解性ウイルスと異なり、ワクシニアウイルスは一般に対象の免疫系の活性により、ウイルスが投与された対象から排除され得て、故に、アデノウイルスなどの他のウイルスより低毒性である。それ故に、ウイルスは一般に対象の免疫系の活性により、ウイルスが投与された対象から排除され得るが、それにも変わらず、ウイルスは、腫瘍などの疫特権細胞および組織で、このような免疫特権領域が宿主の免疫系から単離されるため、蓄積、生存および増殖できる。

20

30

#### 【0505】

ワクシニアウイルスはまた異種遺伝子挿入による修飾が容易であり得る。これは、ウイルスの弱毒化をもたらすおよび/または治療タンパク質の送達を可能とし得る。例えば、ワクシニアウイルスゲノムには、25kbの外来性DNAフラグメント(ワクシニアゲノムサイズの約12%)が挿入できる、外来遺伝子の大きな運搬キャパシティを有する。ワクシニア株のいくつかのゲノムは、完全に配列決定され、多くの必須および非必須遺伝子が同定されている。種々の株間での高配列相同性により、一つのワクシニア株のゲノム情報を使用して、他の株の修飾ウイルスの設計および産生ができる。最後に、遺伝子操作により修飾ワクシニア株を産生する技術は十分に確立されている(Moss (1993) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:86-90; Broder and Earl (1999) *Mol. Biotechnol.* 13:223-245; Timiryasova et al. (2001) *Biotechniques* 31:534-540)。

40

#### 【0506】

種々のワクシニアウイルスは、抗腫瘍活性を示すことが示されている。ある試験で、例えば、非転移結腸腺癌細胞担持ヌードマウスに、ワクシニア増殖因子欠失を有し、チミジンキナーゼ座位に挿入した増強緑色蛍光タンパク質により修飾されたワクシニアウイルスのWR株を全身性に注射した。ウイルスは、修飾ウイルスにおける外来性治療遺伝子がないにも関わらず、1匹の完全奏効を含み、抗腫瘍効果を有することが観察された(McCart et al. (2001) *Cancer Res.* 1:8751-8757)。他の試験で、ワクシニア黒色腫瘍融

50



解物(VMO)を、黒色腫患者のフェーズIII臨床試験で黒色腫陽性リンパ節に近位の部位に注射した。対照として、ニューヨーク市衛生局株ワクシニアウイルス(VV)を黒色腫患者に投与した。VMOで処置した黒色腫患者の生存率は未処置患者より良好であったが、VV対照で処置した患者と同等であった(Kim et al. (2001) *Surgical Oncol.* 10:53-59)。

#### 【0507】

ワクシニアウイルスのLIVP株も、腫瘍の診断および治療ならびに傷つき、炎症した組織および細胞の処置にも使用されている(例えば、Lin et al. (2007) *Surgery* 142:976-983; Lin et al. (2008) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93:4403-7; Kelly et al. (2008) *Hum. Gene Ther.* 19:774-782; Yu et al. (2009) *Mol. Cancer Ther.* 8:141-151; Yu et al. (2009) *Mol. Cancer* 8:45; 米国特許7,588,767; 米国特許8,052,968; および米国公開2004/0234455参照)。例えば、静脈内投与したとき、LIVP株は、インビボで内部腫瘍の種々の部位に蓄積することが示されており、乳房腫瘍、甲状腺腫瘍、膵臓腫瘍、胸膜中皮腫の転移腫瘍、扁平上皮細胞癌、肺癌および卵巣腫瘍を含むが、これらに限定されない種々の組織起源のヒト腫瘍を効率的に処置することが示されている。ワクシニアのLIVP株は、その弱毒化形態を含み、ワクシニアウイルスのWR株より低毒性であり、処置した腫瘍担持動物モデルにおける生存増加および延長をもたらす(例えば、米国公開2011/0293527参照)。

10

#### 【0508】

##### d. 麻疹ウイルス

麻疹ウイルス(MV)は、パラミクソウイルス科に属する、マイナス鎖ゲノムを有するエンベロープ型、一本鎖RNAウイルスである。その非セグメント化ゲノムは安定であり、病原性形態への変異および復帰のリスクが低く、そのサイトゾルでの複製により、感染細胞における挿入DNA変異原性のリスクがない。MVは、Edmonstonと称される患者から1954年に最初に単離され、優れた安全性プロファイルを有する生存ワクチンへと展開され、複数のインビトロ継代後の弱毒化により、50年にわたり世界で10億を超える人の保護に成功している(Aref et al. (2016) *Viruses* 8:294; Hutzen et al. (2015) *Oncolytic Virotherapy* 4:109-118)。MV-Edmと名付けられたこの株の誘導体は、腫瘍溶解性治療試験における最も一般に利用されるMV株である。Schwarz/Moraten麻疹ワクチン株は、Edm誘導体よりも弱毒化され、免疫原性であり、より安かつより免疫調節性である(Veinalde et al. (2017) *Oncoimmunology* 6(4):e1285992)。野生型MVの腫瘍溶解性効果は1970年代に、急性リンパ芽球性白血病、パーキットリンパ腫およびホジキンリンパ腫を有する患者の改善を報告する文献が出された(Aref et al. (2016))。

20

30

#### 【0509】

MVは、標的細胞に侵入するためのCD46、ネクチン-4およびシグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAM)の3つの主要受容体を使用する(Aref et al. (2016); Hutzen et al. (2015))。活性化BおよびT細胞、未成熟胸腺細胞、単球および樹状細胞で発現されるSLAMは、野生型株の主受容体であるが、弱毒化および腫瘍選択的MV-Edm株は、多くの腫瘍細胞で過発現される補体活性化のレギュレーターであるCD46受容体を主に標的とする(Aref et al. (2016); Hutzen et al. (2015); Jacobson et al. (2017) *Oncotarget* 8(38):63096-63109; Msaouel et al. (2013) *Expert Opin. Biol. Ther.* 13(4):483-502)。呼吸器上皮で優勢に発現されるネクチン-4は、野生型および弱毒化MV株両者により利用される(Aref et al. (2016); Msaouel et al. (2013) *Expert Opin. Biol. Ther.* 13(4):483-502)。他の腫瘍溶解性ウイルスと同様、腫瘍細胞のIFN抗ウイルス応答の欠損もまたMVの腫瘍選択性を促進する(Aref et al. (2016); Jacobson et al. (2017) *Oncotarget* 8(38):63096-63109)。多発性骨髄腫(NCT02192775、NCT00450814)、頭頸部癌(NCT01846091)、中皮腫(NCT01503177)および卵巣癌(NCT00408

40

50

590、NCT02364713)を含む、数種の癌の処置におけるMVを調査する臨床試験が実施されている。

【0510】

MVは、例えば、IL-13、IFN-ベータ、GM-CSFおよびヘルペスウイルス・ピロリ好中球活性化タンパク質(NAP)をコードするものを含む、免疫刺激および免疫調節性遺伝子を発現するよう遺伝子操作されている(Aref et al. (2016)、Hutzen et al. (2015); Msaouel et al. (2013) Expert Opin. Biol. Ther. 13(4):483-502)。腫瘍溶解性MVと抗CTLA-4および抗PD-L1抗体を利用する組み合わせ治療は、黒色腫マウスモデルで有効である(Aref et al. (2016); Hutzen et al. (2015))。

【0511】

腫瘍マーカー癌胎児性抗原(CEA)を発現するよう遺伝子操作されたMV-CEAは、癌細胞の感染後患者の血流へのCEAの放出をもたらし、CEAレベルの検出および故にインビボでのウイルス感染の追跡を可能とする(Aref et al. (2016); Hutzen et al. (2015))。MV-CEAの治療使用は前臨床および卵巣癌の処置のフェーズI臨床試験(NCT00408590)で示されている。

【0512】

e. レオウイルス

通常レオウイルスとして知られる呼吸器腸病原性孤児ウイルスは、ヒトに非病原性であるレオウイルス科の非エンベロープ型二本鎖RNAウイルスである。野生型レオウイルスは、環境に遍在性であり、一般集団の70~100%血清反応陽性をもたらす(Gong et al. (2016) World J. Methodol. 6(1):25-42)。1型Lang、2型Jones、3型Abneyおよび3型Dearing(T3D)を含むレオウイルスの3つの血清型がある。T3Dが前臨床および臨床試験で最も一般に使用される天然に存在する腫瘍溶解性レオウイルス血清型である。

【0513】

腫瘍溶解性レオウイルスは、癌細胞に特徴的である活性化Rasシグナル伝達により腫瘍選択的である(Gong et al. (2016)); Zhao et al. (2016) Mol. Cancer Ther. 15(5):767-773)。Rasシグナル伝達経路の活性化は、通常ウイルスタンパク質合成阻害を担うタンパク質であるdsRNA依存性タンパク質キナーゼ(PKR)のリン酸化阻害により、細胞の抗ウイルス応答を破壊する(Zhao et al. (2016))。Ras活性化はまたウイルス脱コートおよび脱集合も増強し、ウイルス子孫産生および感染性の増強をもたらす、アポトーシスの増強を介して子孫の放出を加速する(Zhao et al. (2016))。全ヒト腫瘍の約30%が異常Rasシグナル伝達を提示すると推定される(Zhao et al. (2016))。例えば、悪性神経膠腫の大部分は活性化Rasシグナル伝達経路を有し、レオウイルスは、インビトロで悪性神経膠腫細胞およびインビボでヒト悪性神経膠腫モデルの83%ならびにエクスピボで神経膠腫検体の100%に抗腫瘍活性を示す(Gong et al. (2016) World J. Methodol. 6(1):25-42)。さらに、膵臓腺癌は、極めて高いRas変異率(約90%)を示し、レオウイルスはインビトロで試験した膵臓細胞株の100%に強力な細胞毒性を示し、インビボで皮下腫瘍マウスモデルの100%に退縮を誘導した(Gong et al. (2016))。

【0514】

レオウイルスは、結腸、乳房、卵巣、肺、皮膚(黒色腫)、神経学、血液、前立腺、膀胱および頭頸部癌を含む、一連の悪性腫瘍にわたり広い抗癌活性が前臨床で示されている(Gong et al. (2016))。レオウイルス治療は、放射線療法、化学療法、免疫療法および手術と組み合わせて試験されている。レオウイルスと放射線療法の組み合わせは、インビトロで頭頸部、結腸直腸および乳癌細胞株ならびにインビボで結腸直腸癌および黒色腫モデルの処置に有益性が示されている(Gong et al. (2016))。レオウイルスとゲムシタビンならびにレオウイルス、パクリタキセルおよびシスプラチンの組み合わせは、マウス腫瘍モデルで成功が示されている(Zhao et al. (2016))。B16黒色腫マウスモデルでの前臨床試験は、腫瘍溶解性レオウイルスと抗PD-1治療の組み合わせが、レオウイルス

10

20

30

40

50

単独と比較して抗癌有効性を改善することを示している(Gong et al. (2016); Zhao et al. (2016); Kemp et al. (2015) *Viruses* 8, 4)。

【0515】

レオウイルスにより示されている有望な前臨床結果により、多くの臨床試験に至っている。カナダの会社であるOncolytics Biotech Inc.により開発されたReolysin(登録商標)レオウイルスは、臨床開発にある唯一の治療野生型レオウイルスであり、単独および他の治療との組み合わせで多くの悪性腫瘍に抗癌活性を示している。例えば、反復性悪性神経腫瘍処置におけるReolysin(登録商標)レオウイルスのフェーズI臨床試験(NCT00528684)により、レオウイルスが忍容性良好であることが判明し、フェーズI/II試験により、Reolysin(登録商標)レオウイルスが白金化学療法に应答しなかった卵巣上皮性癌、原発腹膜癌または卵管癌患者において正常細胞を損傷することなく、腫瘍細胞を死滅させることが判明した(NCT00602277)。Reolysin(登録商標)レオウイルスのフェーズII臨床試験は、骨および肺への軟組織肉腫転移を有する患者の処置の安全性および有効性を示した(NCT00503295)。転移結腸直腸癌を有する患者におけるFOLFIRIおよびペバシズマブと組み合わせたReolysin(登録商標)レオウイルスのフェーズI臨床試験(NCT01274624)が実施されている。化学療法ゲムシタピンと組み合わせたReolysin(登録商標)レオウイルスのフェーズII臨床試験が進行型膵臓腺癌を有する患者で(NCT00998322)で実施され、フェーズII臨床試験で転移去勢抵抗性前立腺癌におけるドセタキセルと組み合わせたReolysin(登録商標)の治療能が調査され(NCT01619813)、フェーズII臨床試験で進行型/転移乳癌を有する患者におけるReolysin(登録商標)レオウイルスとパクリタキセルの組み合わせが調査された(NCT01656538)。フェーズIII臨床試験は、白金難治性頭頸部癌におけるパクリタキセルおよびカルボプラチンと組み合わせたReolysin(登録商標)の有効性を調査し(NCT01166542)、この組み合わせ治療を用いるフェーズII臨床試験が、非小細胞肺癌(NCT00861627)および転移黒色腫(NCT00984464)を有する患者で実施された。再発または難治性多発性骨髄腫を有する患者におけるカルフィルゾミブおよびデキサメサゾンと組み合わせたReolysin(登録商標)のフェーズI臨床試験が継続中である(NCT02101944)。

【0516】

f. 水疱性口内炎ウイルス(VSV)

水疱性口内炎ウイルス(VSV)は、ラブドウイルス科内のベジクロウイルス属のメンバーである。マイナス鎖極性を有する一本鎖RNAからなるそのゲノムは、11,161ヌクレオチドからなり、ヌクレオカプシドタンパク質(N)、ホスホタンパク質(P)、マトリクスタンパク質(M)、糖タンパク質(G)および大ポリメラーゼタンパク質の5つの遺伝子をコードする(Bishnoi et al. (2018) *Viruses* 10(2), 90)。VSVは、昆虫ベクターにより媒介され、疾患は、ウマ、ウシおよびブタを含むその天然宿主に限定され、ヒトでは軽度および無症候性感染である(Bishnoi et al. (2018) *Viruses* 10(2), 90)。VSVは、感染細胞のアポトーシスの強力かつ迅速なインデューサーであり、化学療法耐性腫瘍細胞を感作することが示されている。VSVは、腫瘍脈管構造に感染し、腫瘍への血流の喪失、凝血および血管新生の融解をもたらす。このウイルスはまた低酸素組織で複製し、細胞傷害性効果および細胞融解を誘導できる。さらに、WT VSVは多様な組織培養細胞株で高力価まで増殖し、大規模ウイルス産生を促進し、小さくかつ操作が容易であるゲノムを有し、宿主細胞形質転換のリスクなくサイトゾルで複製する(Bishnoi et al. (2018); Felt and Grdzlishvili (2017) *Journal of General Virology* 98:2895-2911)。これらの因子は、ヒトに病原性ではなく、一般にVSVに対する免疫をヒトが有していないとの事実と共に、ウイルス腫瘍治療に対する良好な候補とする。

【0517】

VSVは、遍在性に発現される細胞表面分子と結合し、「汎親和性」とし得るが、WT VSVはI型IFN応答に感受性であり、故に、腫瘍のI型IFNシグナル伝達の欠損または阻害に基づき、腫瘍親和性とし得る(Felt and Grdzlishvili (2017))。正常細

胞への感染性により、VSVは神経病原性を引き起こし得るが、マトリクスタンパク質および/または糖タンパク質の修飾により弱毒化し得る。例えば、マトリクスタンパク質は欠失させ得るかまたはマトリクスタンパク質の51位のメチオニン残基を欠失またはアルギニンで置換させ得る(Bishnoi et al. (2018); Felt and Grdzlishvili (2017))。他のアプローチは、VSVの糖タンパク質を、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)(rVSV-GP)のものと置換する(Bishnoi et al. (2018); Felt and Grdzlishvili (2017))。VSVを、腫瘍溶解性活性を増強するために、ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(TK)などの自殺遺伝子を含むようまたはIL-4、IL-12およびIFNなどの免疫刺激サイトカインまたは顆粒球-マクロファージ-コロニー刺激因子1(GM-CSF1)などの共刺激剤を発現するよう遺伝子修飾し得る(Bishnoi et al. (2018))。NISおよびIFNをコードするVSV-IFN-ヨウ化ナトリウム共輸送体(VSV-IFN-NIS)は、米国で、いくつかのフェーズI臨床試験で試験されている(詳細はClinicalTrials.govの治験NCT02923466、NCT03120624およびNCT03017820を参照のこと)。

10

#### 【0518】

水疱性口内炎ウイルス(VSV)は、多様なマウス癌モデルに静脈内(IV)投与したとき、有効な腫瘍溶解性治療である。ある試験で、rVSV-GPは、免疫不全マウスモデルで、皮下移植G62ヒト神経膠芽腫細胞の腫瘍内処置および同所性U87ヒト神経膠腫細胞の静脈内処置に成功した。rVSV-GPの腫瘍内注射は、頭蓋内CT2Aマウス神経膠腫細胞に対しても有効であった(Muik et al. (2014) Cancer Res. 74(13):3567-3578)。rVSV-GPは検出可能な中和抗体応答を誘発せず、この遺伝子修飾腫瘍溶解性ウイルスがヒト補体に非感受性であり、実験の期間にわたり安定なままであることが判明した(Muik et al. (2014))。他の例において、rVSV-GPの腫瘍内投与は、マウスモデルに移植したヒトA375悪性黒色腫細胞およびマウスB16黒色腫細胞株に効率的に感染し、殺すことが判明した(Kimpel et al. (2018) Viruses 10, 108)。腫瘍溶解性ウイルスの静脈内注射は成功せず、腫瘍内投与群でも、全腫瘍は、I型IFN応答により最終的に増殖した(Kimpel et al. (2018))。他の研究で、A2780ヒト卵巣癌細胞の皮下異種移植マウスモデルをrVSV-GPの腫瘍内注射で処置し、腫瘍寛解が神経毒性なく初期には観察されたもの、寛解は一過性であり、腫瘍は再発した。これは、I型IFN応答によるものであることが判明し、rVSV-GPとJAK1/2阻害剤ルキソリチニブの組み合わせによる抗ウイルス状態の回復が観察された(Dold et al. (2016) Molecular Therapy - Oncolytics 3, 16021)。

20

30

#### 【0519】

##### g. ニューカッスル病ウイルス

ニューカッスル病ウイルス(NDV)は、家禽に感染し、ヒトには一般に非病原性であるが、インフルエンザ様症状を引き起こすこともある、陰性極性の一本鎖RNAゲノムを有するトリパラミクソウイルスである(Tayeb et al. (2015) Oncolytic Virotherapy 4:49-62; Cheng et al. (2016) J. Virol. 90:5343-5352)。サイトゾル複製、宿主ゲノム組み込みおよび組み換え欠失ならびに高ゲノム安定性により、NDVおよび他のパラミクソウイルスは、レトロウイルスまた一部DNAウイルスなどの他の腫瘍溶解性ウイルスのより安全かつより魅力的な代替を提供する(Matveeva et al. (2015) Molecular Therapy - Oncolytics 2, 150017)。NDVは腫瘍選択性を示すことが示されており、正常細胞より腫瘍細胞で10,000倍複製が多く、直接細胞傷害性効果および免疫応答の誘導により、腫瘍溶解をもたらす(Tayeb et al. (2015); Lam et al. (2011) Journal of Biomedicine and Biotechnology, Article ID: 718710)。NDVの腫瘍選択性の機構は全部が明らかではないが、腫瘍細胞におけるインターフェロン産生およびIFNシグナル伝達への応答の欠損により、ウイルスが複製および拡散可能となる(Cheng et al. (2016); Ginting et al. (2017) Oncolytic Virotherapy 6:21-30)。癌細胞に対するパラミクソウイルスの高親和性は、シアル酸を含む、癌細胞表面へのウイルス受容体の過発現にもより得る(Cheng et al. (2016); Matveeva et al. (

40

50

2015); Tayeb et al. (2015)).

#### 【0520】

操作していないNDV株は、ニワトリにおける病原性にに基づき、長潜伏期性(非毒性)、亜病原性(中間)または短潜伏期性(病原性)と分類され、短潜伏期性および亜病原性株は、複数のヒト癌細胞株で複製(および融解)可能であるが、長潜伏期性株は不可能である(Cheng et al. (2016); Matveeva et al. (2015)). NDV株はまた溶解性または非溶解性としても分類され、溶解性株のみが生存可能かつ感染性の子孫を産生できる(Ginting et al. (2017); Matveeva et al. (2015)). 他方で、非溶解性株の腫瘍溶解性効果は、主に抗腫瘍活性をもたらす免疫応答を刺激する能力に由来する(Ginting et al. (2017) *Oncolytic Virotherapy* 6:21-30)。通常腫瘍治療に利用される亜病原性溶解性株はPV701(MK107)、MTH-68/Hおよび73-Tを含み、通常利用される長潜伏期性非溶解性株は、HUJ、UlsterおよびHitchner-B1を含む(Tayeb et al. (2015); Lam et al. (2011); Freeman et al. (2006) *Mol. Ther.* 13(1):221-228)。

10

#### 【0521】

NDV株PV701は、フェーズ1試験で結腸直腸癌に対する活性を示し(Laurie et al. (2006) *Clin. Cancer Res.* 12(8):2555-2562)、NDV株73-Tは、線維肉腫、骨肉腫、神経芽腫および子宮頸癌を含む種々のヒト癌細胞株に対するインビトロ腫瘍溶解性活性ならびにヒト神経芽腫、線維肉腫異種移植片および結腸、肺、乳房および前立腺癌異種移植片を含む、数癌腫異種移植片を担持するマウスでのインビボ治療効果を示している(Lam et al. (2011))。NDV株MTH-68/Hは、PC12、MCF7、HCT116、DU-145、HT-29、A431、HELAおよびPC3細胞を含む腫瘍細胞株の顕著な退縮をもたらし、吸入により投与したとき、進行型癌を有する患者で好都合な応答を示した(Lam et al. (2011))。非溶解性株Ulsterは、結腸癌に対する細胞毒性効果を示し、一方溶解性株Italienは、ヒト黒色腫を効率的に死滅させた(Lam et al. (2011))。長潜伏期性NDV株HUJは、患者に静脈内投与したとき、再発性多形性膠芽腫に対する腫瘍溶解性活性を示し、一方長潜伏期性株LaSotaは、結腸直腸癌患者の生存を延長し(Lam et al. (2011); Freeman et al. (2006) *Mol. Ther.* 13(1):221-228)、非小細胞肺癌(A549)、神経膠芽腫(U87MGおよびT98G)、乳腺腺癌(MCF7およびMDA-MB-453)および肝細胞癌(Huh7)細胞株に感染し、これらの癌細胞を殺すことができた(Ginting et al. (2017) *Oncolytic Virotherapy* 6:21-30)。

20

30

#### 【0522】

遺伝子操作NDV株はまた腫瘍溶解性治療についても評価された。例えば、インフルエンザNS1遺伝子、IFNアンタゴニストは、NDV株Hitchner-B1のゲノムに導入され、多様なヒト腫瘍細胞株およびB16黒色腫のマウスモデルで腫瘍溶解性効果増強をもたらした(Tayeb et al. (2015))。NDVの抗腫瘍/免疫刺激性効果は、ウイルスゲノムへのIL-2またはGM-CSF遺伝子導入により増強されている(Lam et al. (2011))。腫瘍内NDV注射と全身性CTLA-4抗体投与を利用する組み合わせ治療は、予め締め確立された遠位腫瘍の効率的拒絶をもたらした(Matveeva et al. (2015))。

#### 【0523】

40

#### h. パルボウイルス

H-1パルボウイルス(H-1PV)は、パルボウイルス科に属する小さな、非エンベロープ型一本鎖DNAウイルスであり、その天然宿主はラットである(Angelova et al. (2017) *Front. Oncol.* 7:93; Angelova et al. (2015) *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 3:55)。H-1PVはヒトに非病原性であり、好都合な安全性プロファイル、ヒトにおける既存のH-1PV免疫がないことおよび宿主細胞ゲノム組込み欠如により、腫瘍溶解性ウイルスとして魅力的である(Angelova et al. (2015))。H-1PVは、乳房、胃、頸部、脳、膵臓および結腸直腸癌の前臨床モデルを含む固形腫瘍ならびにリンパ腫および白血病を含む血液系腫瘍に対する広い腫瘍抑制活性が示されている(Angelova et al. (2017))。H-1PVは、腫瘍関連抗原提示増加、樹状細

50

胞成熟および炎症促進性サイトカイン放出を介して、抗腫瘍応答を刺激する(Moehler et al. (2014) *Frontiers in Oncology* 4:92)。H - 1 P V はまた腫瘍選択性示し、これは、細胞複製および転写因子の利用性、腫瘍細胞でNS1の機能的制御に参与するが、正常細胞ではない代謝経路のNS1パルボウイルスタンパク質および活性化と相互作用する細胞タンパク質の過発現によると考えられる。H - 1 P V の無毒の性質により、野生型株がしばしば利用され、遺伝子操作による弱毒化の必要性が否定される(Angelova et al. (2015))。

#### 【0524】

ヒト神経膠腫細胞の腫瘍溶解性H - 1 P V 感染は、効率的な殺細胞をもたらし、高悪性度神経膠腫幹細胞モデルも、溶解性H - 1 P V 感染に許容的であったことが研究により示された。殺神経膠腫細胞増強は、ウイルスが腫瘍細胞照射直後に適用されたとき観察され、このプロトコルが切除不可能反復性神経膠芽腫に有用であり得ることが示される(Angelova et al. (2017))。脳内または全身H - 1 P V 注射は、同所性RG - 2腫瘍を有する免疫適格性ラットおよびヒトU87神経膠腫を移植した免疫不全動物で、毒性副作用なく、神経膠腫の退縮をもたらした(Angelova et al. (2015))。高感染性を有し、ヒト形質転換細胞株で拡散している適応度バリエーションであるDel H - 1 P V は、膵臓癌および子宮頸癌異種移植モデルでインビボで腫瘍溶解性効果を示した(Geiss et al. (2017) *Viruses* 9, 301)。H - 1 P V はまた5つのヒト骨肉腫細胞株(CAL 72、H - OS、MG - 63、SaOS - 2、U - 2OS)のパネル(Geiss et al. (2017) *Viruses* 9, 301)およびヒト黒色腫細胞(SK29 - Mel - 1、SK29 - Mel - 1.22) (Moehler et al. (2014) *Frontiers in Oncology* 4:92)に対して、腫瘍溶解性活性を示した。他の研究で、子宮頸癌異種移植片担持ヌードラットは、H - 1 P V での処置後用量依存的腫瘍増殖停止および退縮を示した(Angelova et al. (2015))。H - 1 P V の腫瘍内および静脈内投与はまた免疫不全マウスにおけるヒト乳癌異種移植片の顕著な増殖抑制も示した(Angelova et al. (2015))。ヒト胃癌またはヒトパーキットリンパ腫担持マウスの腫瘍内H - 1 P V 注射は、腫瘍退縮および増殖抑制をもたらした(Angelova et al. (2015))。

#### 【0525】

反復性多形神経膠芽腫患者における腫瘍溶解性H - 1 P V (ParvOryx01)のフェーズI / IIa臨床試験(臨床試験NCT01301430)は、腫瘍内または静脈内注射で無進行生存、臨床的安全性および患者忍容性を示した(Angelova et al. (2017); Geiss et al. (2017) *Viruses* 9, 301; Geletneky et al. (2017) *Mol. Ther.* 25(12):2620-2634)。この治験は、H - 1 P V が用量依存的様式で血液 - 脳障壁を通過し、優勢に、CD8<sup>+</sup>およびCD4<sup>+</sup>Tリンパ球による白血球浸潤ならびに局所処置腫瘍におけるパーフォリン、グランザイムB、IFN $\gamma$ 、IL - 2、CD25およびCD40Lを含む免疫細胞活性化の数種のマーカーの検出により特徴づけられる免疫原性抗腫瘍応答を確立したことを示した(Geletneky et al. (2017) *Mol. Ther.* 25(12):2620-2634)。

#### 【0526】

H - 1 P V はまたゲムシタピンに耐性のものを含む、インビトロでの高度に攻撃的膵管腺癌(PDAC)細胞の効率的殺滅を示し、H - 1 P V の腫瘍内注射は、PDACの同所性ラットモデルの腫瘍退縮および動物生存延長をもたらした(Angelova et al. (2017); Angelova et al. (2015))。選択的腫瘍ターゲティングおよび毒性欠如を含む類似の結果は、免疫不全ヌードラットPDACモデルで示された(Angelova et al. (2015))。H - 1 P V と細胞増殖抑制剤(シスプラチン、ピンクリスチン)または標的化剤(スニチニブ)の組み合わせは、ヒト黒色腫細胞のアポトーシスの相乗的誘導をもたらした(Moehler et al. (2014))。H - 1 P V とHDAC阻害剤であるバルプロ酸の組み合わせは、頸部および膵臓癌細胞に対する相乗的細胞毒性を示し(Angelova et al. (2017))、一方ゲムシタピンの治療効率は、2段階プロトコルでH - 1 P V と組み合わせたとき、改善した(Angelova et al. (2015))。他のウイルスと同様、H - 1 P V を、抗癌分子を発現するよう操作し得る。例えば、研究により、Apoptinを発現するパルボウイルス - H

1由来ベクターは、野生型H-1PVよりアポトーシス誘導能が大きいことが示されている(Geiss et al. (2017))。

【0527】

i. コクサッキーウイルス

コクサッキーウイルス(CV)は、エンテロウイルス属およびピコルナウイルス科に属し、宿主細胞ゲノムに統合されないプラス鎖一本鎖RNAゲノムである。CVは、マウスにおける効果に基づきA群およびB群に分類され、ヒトで軽度上部呼吸器感染をもたらす得る(Bradley et al. (2014) *Oncolytic Virotherapy* 3:47-55)。腫瘍溶解性ウイルス療法について一般に調査されているコクサッキーウイルスは、弱毒化コクサッキーウイルスB3(CV-B3)、CV-B4、CV-A9およびCV-A21を含む(Yla-Pelto et al. (2016) *Viruses* 8, 57)。CV-A21は、黒色腫、乳房、結腸、子宮内膜、頭頸部、膵臓および肺癌ならびに多発性骨髄腫および悪性神経膠腫を含む腫瘍細胞ではるかに高レベルで発現される、ICAM-1(またはCD54)およびDAF(またはCD55)受容体を介して細胞に感染する。CV-A21は、悪性骨髄腫、黒色腫および前立腺、肺、頭頸部および乳癌細胞株に対するインビトロでの前臨床抗癌活性およびインビボでヒト黒色腫異種移植片担持マウスならびにマウスにおける原発乳癌腫瘍およびその転移に対する有望性が示された(Yla-Pelto et al. (2016); Bradley et al. (2014))。CAVATAK™としても知られるCV-A21の誘導体、CV-A21-DAFvが、DAF発現、ICAM-1陰性横紋筋肉腫(RD)細胞でCV-A21の連続継代により野生型Kuykendall株で産生され、親株と比較して腫瘍溶解性が増強されたことが示された。CAVATAK™はDAF受容体にのみ結合し、これが、癌細胞に対する向性増強に貢献し得る(Yla-Pelto et al. (2016))。

【0528】

CV-A21はまた塩酸ドキシソルピシンの組み合わせでも研究されており、ヒト乳房、結腸直腸および膵臓癌細胞株ならびにヒト乳癌の異種移植マウスモデルに対する何れかの単独処置と比較して増強された腫瘍溶解性効率を示した(Yla-Pelto et al. (2016))。集団の相当部分がCVに対する中和抗体を既に獲得していたため、CV-A21治療を、シクロホスファミドなどの免疫抑制剤と組み合わせ(Bradley et al. (2014))、媒体細胞を介する送達の良好な候補である。

【0529】

臨床試験は、ステージIIIcまたはIV悪性黒色腫の患者におけるCAVATAK™(NCT01636882; NCT00438009; NCT01227551)および非筋肉侵襲性膀胱癌を有する患者にけるCAVATAK™単独または低用量マイトマイシンCと組み合わせ(NCT02316171)の使用を調査している。臨床試験はまた黒色腫、乳房および前立腺癌を含む固形腫瘍の処置におけるCV-A21の静脈内投与の効果も試験している(NCT00636558)。継続中の臨床試験は、非小細胞肺癌を有する患者の処置のためのCAVATAK™単独またはペムプロリズマブとの組み合わせ(NCT02824965、NCT02043665)および膀胱癌(NCT02043665); ぶどう膜黒色腫および肝臓転移患者(NCT03408587)および進行型黒色腫を有する患者(NCT02307149)におけるイピリムマブと組み合わせたCAVATAK™; および進行型黒色腫を有する患者におけるペムプロリズマブと組み合わせたCAVATAK™(NCT02565992)の調査を含む。

【0530】

j. セネカバレーウイルス

セネカバレーウイルス(SVV)は、ピコルナウイルス科内のセネカウイルス属のメンバーであり、プラス鎖一本鎖RNAゲノムを有し、神経芽腫、横紋筋肉腫、髄芽腫、ウィルムス腫瘍、神経膠芽腫および小細胞肺癌を含む神経内分泌癌に選択的である(Miles et al. (2017) *J. Clin. Invest.* 127(8):2957-2967; Qian et al. (2017) *J. Virol.* 91(16):e00823-17; Burke, M.J. (2016) *Oncolytic Virotherapy* 5:81-89)。研究により、しばしば正常細胞と比較して腫瘍細胞の表面に発現される炭疽毒素受容体1

10

20

30

40

50

(ANTXR1)がSVVの受容体として同定されているが、先の研究はまたシアル酸が小児科神経腫瘍モデルにおけるSVV受容体の成分であり得ることも示している(Miles et al. (2017))。SVV単離株001(SVV-001)は、静脈内投与後固形腫瘍を標的および浸透できる、強力な腫瘍溶解性ウイルスであり、挿入変異欠如ならびに癌細胞に対する選択的向性およびヒトおよび動物における非病原性により、魅力的である。さらに、ヒトにおける先の暴露は稀であり、免疫が先在する割合は低い(Burke, M. J. (2016) *Oncolytic Virotherapy* 5:81-89)。

#### 【0531】

SVV-001は、小細胞肺癌、副腎皮質癌、神経芽腫、横紋筋肉腫およびユーイング肉腫細胞株に対して有望なインビトロ活性を示し、小児科GBM、髄芽腫、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫および神経芽腫の同所性異種移植マウスモデルにおける有望なインビボ活性を示す(Burke (2016))。Neotropix(登録商標)により開発された腫瘍溶解性SVV-001であるNTX-010は、再発/難治性固形腫瘍を有する小児患者の、単独でまたはシクロホスファミドと組み合わせたの処置に対するが、中和抗体獲得により、その治療有効性が制限された(Burke et al. (2015) *Pediatr. Blood Cancer* 62(5):743-750)。臨床試験は、神経内分泌特性を有する固形腫瘍におけるSV-001(NCT00314925)、再発または難治性神経芽腫、横紋筋肉腫、ウィルムス腫瘍、網膜芽細胞腫、副腎皮質癌腫またはカルチノイド腫瘍を有する患者におけるシクロホスファミドと組み合わせたNTX-010/SVV-001(NCT01048892)および小細胞肺癌を有する患者における化学療法後のNTX-010/SVV-001(NCT01017601)の使用の試験を含む。

10

20

#### 【0532】

##### H. 医薬品、組成物および製剤

ここに提供されるのは、ここに提供される免疫刺激性細菌の何れかおよび薬学的に許容される賦形剤または添加物を含む、医薬組成物および製剤を製造する方法である。医薬組成物は、腫瘍または癌などの過増殖性疾患または状態などの疾患の処置に使用され得る。免疫刺激性細菌は、単剤療法で投与しても、さらなる薬剤または処置との組み合わせ治療で投与してもよい。組成物は、単回投与または複数回投与のために製剤化され得る。薬剤は、直接投与のために製剤化され得る。組成物は、液体または乾燥製剤として提供され得る。

30

#### 【0533】

##### 1. 製造

##### a. 細胞バンク製造

ここに記載する免疫療法の活性成分が操作した自己複製細菌からなるため、選択組成物は、長期保存のためおよび原薬製造のための出発物質として維持される、一連の細胞バンクに拡張される。細胞バンクは、連邦規制基準(CFR)21パート211または他の関連規制当局に従う適切な製造施設における医薬品適正製造基準(cGMP)下実施される。免疫療法の活性剤が生存細菌であるため、ここに記載される製品は、定義により、非無菌であり、末期的に滅菌されてはならない。汚染を防止するために、製造過程をとおして無菌方法が確実に使用されるよう、注意を払うべきである。すなわち、全ての原材料および溶液は、製造過程での使用前に滅菌されなければならない。

40

#### 【0534】

マスター細胞バンク(MCB)が、汚染物が出発物質に存在しないことを確実にするため、選択した細菌株の一連の連続単一コロニー単離により産生される。無菌培地(複合培地、例えば、LBまたはMSBBまたは定義された培地、例えば、適切な栄養素が添加されたM9であり得る)を含む無菌培養容器に、単一の十分に単離された細菌コロニーを接種し、細菌を、例えば、37℃で振盪しながらのインキュベーションにより、複製させる。次いで、細菌を1以上の凍結防止剤を含む溶液中の懸濁液により凍結保存する。

#### 【0535】

凍結防止剤の例は、ヒトまたはウシ血清アルブミン、ゼラチンおよび免疫グロブリンなど

50



のタンパク質；単糖(ガラクトース、D-マンノース、ソルボースなど)およびその非還元誘導体(例えば、メチルグルコシド)、二糖(トレハロース、スクロースなど)、シクロデキストリンおよび多糖(ラフィノース、マルトデキストリン、デキストランなど)を含む炭水化物；アミノ酸(グルタミン酸、グリシン、アラニン、アルギニンまたはヒスチジン、トリプトファン、チロシン、ロイシン、フェニルアラニンなど)；ベタインなどのメチルアミン；3価または高級糖アルコール、例えば、グリセリン、エリスリトール、グリセロール、アラビトール、キシリトール、ソルビトールおよびマンニトールなどのポリオール；プロピレングリコール；ポリエチレングリコール；界面活性剤、例えば、プルロニック；またはジメチルスルホキシド(DMSO)などの有機硫黄化合物およびこれらの組み合わせを含む。凍結保存溶液は、塩(例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム)および/またはリン酸ナトリウム、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(TRIS)、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸(HEPES)および当業者に知られる他のこのような緩衝剤などの緩衝剤も含み得る溶液に、1以上の凍結防止剤を含み得る。

10

#### 【0536】

凍結保存溶液における細菌の懸濁液は、1以上の濃縮凍結防止剤を、凍結および解凍過程中細菌の生存能を保持する最終濃度を達成するために培養物質に加えることにより(例えば、最終濃度0.5%~20%のグリセロール)または細菌を(例えば、遠心分離により)採取し、適切な最終濃度の凍結防止剤を含む凍結保護溶液に懸濁することにより達成される。次いで、凍結保存溶液における細菌の懸濁液を、凍結条件下、閉鎖完全性の維持ができる容器閉鎖系(例えば、ブチルストッパーおよびクrimpシール)を備えた適切な無菌バイアル(プラスチックまたはガラス)に充填する。次いで、マスター細胞バンクのバイアルを凍結させ得る(速度制御フリーザーの手段によりゆっくりまたは直接フリーザーに入れることにより急速に)。次いで、MCBを、長期生存能を維持する温度で凍結させる(例えば、-60以下)。解凍マスター細胞バンク物質は、適切な当局の規制に従い、同一性、純度および活性を確認するために徹底的に特徴づけされる。

20

#### 【0537】

作業細胞バンク(WCB)は、マスター細胞バンクとほぼ同じ方法で産生されるが、出発物質はMCB由来である。MCB物質を、上記のとおり、無菌培地含有発酵容器に直接導入し、拡張させ得る。次いで、細菌を凍結保存溶液に懸濁し、容器に充填し、密封し、-20以下で凍結する。複数のWCBをMCB物質から製造でき、WCB物質を使用して、付加的細胞バンク(例えば、製造業者の作業細胞バンクMWCB)を製造し得る。WCBは凍結保存され、同一性、純度および活性を確認するために特徴づけされる。WCB物質は、一般に操作した細菌などのバイオ医薬品の原薬の産生に使用される出発物質である。

30

#### 【0538】

##### b. 原薬製造

原薬は、上記のとおりcGMP下の無菌過程を使用して、製造される。作業細胞バンク物質は、一般にcGMP下の原薬の製造のための出発物質として使用されるが、しかしながら、他の細胞バンク(例えば、MCBまたはMWCB)も使用され得る。無菌処理は、細菌細胞ベースの治療剤を含む、全細胞治療剤の産生に使用される。細胞バンクからの細菌は、発酵により拡張される；これは、前培養(例えば、シェーカーフラスコ)の産生または発酵槽の直接接種により達成され得る。発酵は、一回用使い捨てまたは再使用可能であり得る無菌バイオリアクターまたはフラスコで達成される。細菌を、濃縮(例えば、遠心分離、連続的遠心分離またはタンジェント流濾過)により採取する。濃縮細菌を、培地の緩衝液への交換(例えば、ダイアフィルトレーションによる)により、培地成分および細菌代謝物から精製する。バルク製剤を、中間体(例えば、凍結または乾燥により)として製剤化および保存しまたは製剤に直接加工する。原薬を、同一性、強度、純度、効力および品質について試験する。

40

#### 【0539】

##### c. 製剤製造

50

製剤は、最終容器に含まれる活性物質の最終製剤として定義される。製剤は、c G M P 下、無菌過程を使用して製造される。製剤は原薬から産生される。原薬を必要に応じて解凍または再構成し、次いで適切な標的強度で製剤化する。製剤の活性成分が生存する操作した細菌であるため、強度は、懸濁液内に含まれるCFU数により決定される。バルク製品を、下記保存および使用に適切な最終製剤に記載する。容器を充填し、容器閉鎖系で密封し、製剤をラベルする。製剤を、安定性の保持に適切な温度で保存し、同一性、強度、純度、効力および品質について試験し、特定の合否基準を満たせば、ヒト使用のために発売される。

#### 【0540】

### 2. 組成物

薬学的に許容される組成物は、動物およびヒトにおける使用のために一般に認識されている薬局方に従い、調製される、規制当局または他の当局の承認の観点で調製される。組成物は、溶液、懸濁液、粉末または持続的放出製剤として調製され得る。一般に、化合物は、当分野で周知の技術および方法を使用して、医薬組成物に製剤化される(例えば、Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Fourth Edition, 1985, 126参照)。製剤は、投与方法に適すべきである。

#### 【0541】

組成物を、筋肉内、静脈内、皮内、病巣内、腹腔内注射、皮下、腫瘍内、硬膜外、経鼻、経口、膣、直腸、局所、局所、耳、吸入、パッカル(例えば、舌下)および経皮投与または何らかの投与経路を含む、当業者に知られるあらゆる経路による投与のために製剤化され得る。他の投与方法も考慮される。投与は、処置部位に応じて局所、局所または全身であり得る。処置を必要とする領域への局所投与は、例えば、手術中の局所点滴、例えば、手術後の創傷包帯材と関連した局所適用、注射、カテーテルの手段、坐薬の手段またはインプラントの手段を含むが、これらに限定されない。組成物はまた他の生物学的活性剤と、逐次的に、間欠的にまたは同じ組成物でも投与され得る。投与はまた制御放出製剤およびポンプの手段によるなどデバイス制御放出を含む、制御放出系を含み得る。

#### 【0542】

ある症例の最も適当な経路は、疾患の性質、疾患の進行、疾患の重症度および使用される特定の組成物などの多様な因子に依存する。医薬組成物は、各投与経路に適する剤形に製剤され得る。特に、組成物は、全身、局所腹腔内、経口または直接投与のための何らかの適当な医薬製剤に製剤化され得る。例えば、組成物は、皮下、筋肉内、腫瘍内、静脈内または皮内投与のために製剤化され得る。投与方法は、活性剤が、抗原性および免疫原性応答を介する免疫学的介入などの分解過程に曝されるのを低減するために用い得る。このような方法の例は、処置部位への局所投与または連続的点滴を含む。

#### 【0543】

免疫刺激性細菌は、経口投与用溶液、懸濁液、錠剤、分散可能錠剤、丸剤、カプセル、粉末、持続的放出製剤またはエリキシルならびに経皮パッチ製剤乾燥粉末吸入器などの適当な医薬製剤に製剤化され得る。一般に、化合物は、当分野で周知の技術および方法を使用して、医薬組成物に製剤化される(例えば、Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Fourth Edition, 1985, 126参照)。一般に、製剤の方法は、投与経路による。組成物を、乾燥(凍結乾燥または他のガラス化の形態)または液体形態に製剤化し得る。組成物が乾燥形態で提供されるならば、適切な緩衝液、例えば、無菌食塩水溶液の添加により、使用直前に再構成され得る。

#### 【0544】

### 3. 製剤

#### a. 液体、注射、エマルジョン

製剤は、一般に投与経路に適するものとされる。一般に皮下、筋肉内、腫瘍内、静脈内または皮内への注射または点滴により特徴づけられる非経腸投与は、ここで考慮される。非経腸投与のための細菌の調製物は、すぐに注射できる懸濁液(直接投与)または使用前解凍する凍結懸濁液、使用直前再懸濁溶液に加えるための、凍結乾燥粉末などの乾燥可溶性製

10

20

30

40

50

品およびエマルジョンを含む。凍結乾燥製剤などの乾燥させた熱安定性製剤は、後の使用のために単位用量を保存するために使用され得る。

【0545】

医薬製剤は、凍結液体形態、例えば懸濁液であり得る。凍結液体形態で提供されるならば、製剤は、使用前解凍し、治療有効濃度まで希釈する濃縮製剤として提供され得る。

【0546】

医薬製剤はまた使用のための解凍または希釈を必要としない剤形でも提供され得る。このような液体製剤は、必要に応じて、懸濁化剤(例えば、ソルビトール、セルロース誘導体または水素化食用脂)；乳化剤(例えば、レシチンまたはアカシア)；非水性媒体(例えば、アーモンド油、油性エステルまたは分画植物油)；および微生物治療剤での使用に適する防腐剤などの薬学的に許容される添加物と共に、慣用の手段により調製され得る。医薬製剤は、使用前水または他の無菌適当な媒体での再構築のための、凍結乾燥または噴霧乾燥などの乾燥形態で提示され得る。

10

【0547】

適当な賦形剤は、例えば、水、食塩水、デキストロースまたはグリセロールである。溶液は、水性でも非水性でもよい。静脈内投与するならば、適当な担体は、生理食塩水またはリン酸緩衝化食塩水(PBS)および静脈内水和に使用される他の緩衝化溶液を含む。グルコース、ポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコールなどの濃化剤を含む腫瘍内投与溶液について、油性エマルジョンおよびそれらの混合物が、注入物質の局在化維持に適切であり得る。

20

【0548】

医薬組成物は、担体または他の賦形剤を含み得る。例えば、ここに提供される医薬組成物は、希釈剤、アジュバント、抗接着剤、結合剤、コーティング、増量剤、風味剤、着色剤、滑沢剤、流動促進剤、防腐剤、界面活性剤または吸着剤およびそれらの組み合わせまたは修飾治療細菌の投与に用いる媒体の何れか1以上を含み得る。例えば、非経腸製剤に使用される薬学的に許容される担体または賦形剤は、水性媒体、非水性媒体、等張剤、緩衝液、抗酸化剤、局所麻酔剤、懸濁および分散剤、乳化剤、封鎖またはキレート剤および他の薬学的に許容される物質を含む。液体製剤を含む製剤は、薬学的に許容される添加物または賦形剤を用いて、慣用の手段により調製され得る。

【0549】

医薬組成物は、組成物の投与に用いる希釈剤、アジュバント、賦形剤または媒体などの担体を含み得る。適当な医薬担体の例は、"Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martinに記載される。このような組成物は、一般に精製形態または部分的精製形態の、治療有効量の化合物または薬剤を、患者への適切な投与のための形態を提供するために、適当な量の担体と共に含む。このような医薬担体は、水および石油、動物、植物または合成起源のもの、例えばピーナツ油、ダイズ油、鉱油およびゴマ油を含む油などの無菌液体であり得る。水は典型的担体である。食塩水溶液および水性デキストロースおよびグリセロール溶液も、特に注射用溶液の液体担体として用い得る。組成物は、活性成分と共に、ラクトース、スクロース、リン酸水素カルシウムまたはカルボキシメチルセルロースなどの希釈剤；ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウムおよびタルクなどの滑沢剤；およびデンプン、アカシアガムなどの天然ガム、ゼラチン、グルコース、糖蜜、ポリビニルピロリジン、セルロースおよびその誘導体、ポビドン、クロスポビドンおよび当業者に知られる他のこのような結合剤などの結合剤を含み得る。適当な医薬賦形剤は、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水およびエタノールを含む。例えば、適当な賦形剤は、例えば、水、食塩水、デキストロース、グリセロールまたはエタノールである。組成物は、所望であれば、湿潤または乳化剤、pH緩衝剤、安定化剤、溶解度エンハンサーおよび例えば、酢酸ナトリウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンオレートおよびシクロデキストリンなどの他の

30

40

50

このような薬剤など、他の少量の非毒性補助物質も含み得る。

【0550】

非経腸製剤で使用される薬学的に許容される担体は、水性媒体、非水性媒体、抗微生物剤、等張剤、緩衝液、抗酸化剤、局所麻酔剤、懸濁および分散剤、乳化剤、封鎖またはキレート剤および他の薬学的に許容される物質を含む。水性媒体の例は、塩化ナトリウム注射、リンゲル注射、等張デキストロース注射、無菌水注射、デキストロースおよび乳酸加リンゲル注射を含む。非水性非経腸媒体は、植物起源、綿実油、トウモロコシ油、ゴマ油およびピーナツ油の固定油を含む。等張剤は、塩化ナトリウムおよびデキストロースを含む。緩衝液は、リン酸およびクエン酸を含む。抗酸化剤は、重硫酸ナトリウムを含む。局所麻酔剤は、塩酸プロカインを含む。懸濁および分散剤は、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースおよびポリビニルピロリドンを含む。乳化剤は、例えば、ポリソルベート80(TWEEN 80)などのポリソルベートを含む。EDTAなどの金属イオンの封鎖またはキレート剤を包含させ得る。医薬担体はまた水混和性媒体のためのポリエチレングリコールおよびプロピレングリコールおよびpH調節のための水酸化ナトリウム、塩酸、クエン酸または乳酸も含む。抗微生物ではない防腐剤を包含させ得る。

10

【0551】

医薬組成物はまた湿潤または乳化剤、pH緩衝剤、安定化剤、溶解度エンハンサーおよび例えば、酢酸ナトリウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンオレアートおよびシクロデキストリンなどの他のこのような薬剤などの他の微量の非毒性補助物質も含み得る。一定レベルの投与量が維持される(例えば、米国特許3,710,795参照)のような徐放または持続的放出系のインプラントもまた、ここで考慮される。このような非経腸組成物に含まれる活性化化合物のパーセンテージは、その特定の性質ならびに化合物の活性および対象の必要性に高度に依存する。

20

【0552】

b. 乾燥させた熱安定性製剤

細菌は、乾燥させ得る。凍結乾燥または噴霧乾燥粉末およびガラス固化体などの乾燥させた熱安定性製剤を、溶液、エマルジョンおよび他の混合物としての投与のために再構成し得る。乾燥させた熱安定性製剤は、上記懸濁液などの液体製剤の何れかから調製し得る。医薬製剤は、使用前に水または他の適当な媒体で再構築するための凍結乾燥またはガラス

30

【0553】

熱安定な製剤を、乾燥化合物を無菌溶液で再構成することにより、投与用に調製し得る。溶液は、活性物質または粉末から調製した再構成溶液の安定性または他の薬理学的特質を改善する賦形剤を含み得る。熱安定な製剤は、クエン酸、リン酸ナトリウムまたはカリウムなどの適当な緩衝液または当業者に知られる他のこのような緩衝液に、デキストロース、ソルビトール、フルクトース、コーンシロップ、キシリトール、グリセリン、グルコース、スクロースまたは他の適当な薬剤などの賦形剤を溶解することにより、調製する。次いで、原薬を得られた混合物に加え、混合されるまで攪拌する。得られた混合物を、乾燥用バイアルに配分する。各バイアルは、バイアルあたり $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{11}$  CFUを含む単回投与量を含む。乾燥後、製品バイアルを、密封バイアルに湿気または汚染物が入るのを阻止する容器閉鎖系で密封する。乾燥製品を、 $-20$ 、 $4$  または室温などの適切な条件下に保存できる。水または緩衝溶液でのこの乾燥製剤の再構築により、非経腸投与に使用するための製剤が提供される。厳密な量は、処置適応症および選択化合物による。このような量は、経験的に決定され得る。

40

【0554】

4. 他の投与経路用組成物

処置される状態に依存して、非経腸に加えて、局所適用、経皮パッチ、経口および直腸投与などの他の投与経路も、ここで考慮される。上記懸濁液および粉末は経口投与できまたは経口投与のために再構成され得る。直腸投与のための医薬剤形は、全身作用のための直

50

腸坐薬、カプセルおよび錠剤およびゲルカプセルである。直腸坐薬は、体温で融解または軟化し、1以上の薬理的または治療活性成分を放出する、直腸への挿入のための固体である。直腸坐薬における薬学的に許容される物質は、基剤または媒体および融点を上げる薬剤である。基剤の例は、カカオバター(カカオオイル)、グリセリン-ゼラチン、カーボワックス(ポリオキシエチレングリコール)および脂肪酸のモノ、ジおよびトリグリセリドの適切な混合物を含む。種々の基剤の組み合わせが使用され得る。坐薬の融点を上げる薬剤は、鯨蠟および蠟を含む。直腸坐薬は、圧縮方法または鑄造により調製され得る。直腸坐薬の典型的重量は、約2~3 gmである。直腸投与用錠剤およびカプセルは、経口投与用製剤と同じ薬学的に許容される物質および同じ方法を使用して、製造される。直腸投与に適する製剤は、単位用量坐薬として提供され得る。これらを、原薬と1以上の慣用の固体担体、例えば、カカオバターを混合し、次いで、得られた混合物を成型することにより調製し得る。

10

## 【0555】

経口投与のために、医薬組成物は、例えば、結合剤(例えば、アルファ化メイズデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース); 充填剤(例えば、ラクトース、微結晶セルロースまたはリン酸水素カルシウム); 滑沢剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルクまたはシリカ); 崩壊剤(例えば、ジャガイモデンプンまたはデンプングリコール酸ナトリウム); または湿潤剤(例えば、ラウリル硫酸ナトリウム)などの薬学的に許容される賦形剤と、慣用の手段により調製された錠剤またはカプセルの形をとり得る。錠剤は、当分野で周知の方法によりコーティングされ得る。

20

## 【0556】

バツカル(舌下)投与に適する製剤は、例えば、風味付けされた基剤、通常スクロースおよびアカシアまたはトラガカントに活性化化合物を含むロゼンジ; およびゼラチンおよびグリセリンまたはスクロースおよびアカシアなどの不活性基剤に化合物を含むトローチを含む。

## 【0557】

局所混合物は、局所および全身投与について記載したとおり調製される。得られた混合物は、溶液、懸濁液、エマルジョンなどであってよく、クリーム、ゲル、軟膏、エマルジョン、溶液、エリキシル、ローション、懸濁液、チンキ、ペースト、フォーム、エアロゾル、灌注、スプレー、坐薬、バンデージ、経皮パッチまたは局所投与に適する何らかの他の製剤として製剤され得る。

30

## 【0558】

組成物は、吸入によるなど局所適用のためのエアロゾルとして製剤化され得る(例えば、肺疾患処置に有用なステロイドの送達のためのエアロゾルを記載する米国特許4,044,126; 4,414,209および4,364,923参照)。呼吸管への投与のためのこれらの製剤は、単独でまたはラクトースなどの不活性担体と組み合わせて、エアロゾルまたはネブライザー用溶液または吹送法のための超微粒子粉末の形であり得る。このような場合、製剤の粒子は、一般に50ミクロン未満または10ミクロン未満の直径を有する。

## 【0559】

化合物は、ゲル、クリームおよびローションの形で、皮膚および眼におけるなどの粘膜への局所適用および眼適用または大槽内もしくは髄腔内適用のためなどに、局所または外用適用のために製剤化され得る。局所投与は、経皮送達および眼もしくは粘膜への投与または吸入治療が意図される。活性化化合物単独または他の薬学的に許容される賦形剤との組み合わせの経鼻溶液も投与され得る。

40

## 【0560】

経皮投与に適する製剤が提供される。レシピエントの表皮と長期にわたり密接な接触の維持に適合する別個のパッチなどの何らかの適当な形態で提供され得る。このようなパッチは、活性化化合物に関して、例えば、0.1~0.2 M濃度の所望により緩衝化された水溶液に活性化化合物を含む。経皮投与に適する製剤は、イオン泳動によっても送達でき(例えば、Tyle, P, (1986) Pharmaceutical Research 3(6):318-326)、一般に活性化化合物

50

物所望により緩衝化された水溶液の形をとる。

【0561】

医薬組成物はまた制御放出製剤および/または送達デバイスによっても投与され得る(例えば、米国特許3,536,809; 3,598,123; 3,630,200; 3,845,770; 3,916,899; 4,008,719; 4,769,027; 5,059,595; 5,073,543; 5,120,548; 5,591,767; 5,639,476; 5,674,533および5,733,566参照)。

【0562】

5. 用法・用量

組成物は、単回投与または複数回投与のための医薬組成物として製剤化され得る。免疫刺激性細菌は、処置する患者に望ましくない副作用なく、治療上有益な効果を発揮するのに十分な量で含まれ得る。例えば、薬学的活性化合物の濃度は、注射が所望の薬理学的効果を生じるための有効量を提供するように調節される。治療有効濃度は、ここに記載するまたは当分野で知られるアッセイの使用によるなど、既知インビトロおよびインビボ系における免疫刺激性細菌の試験により、経験的に決定され得る。例えば、標準的臨床的技術が用いられ得る。インビトロアッセイおよび動物モデルを、最適投与量範囲の決定の補助に用い得る。経験的に決定され得る厳密な用量は、患者または動物の年齢、体重、体表面積および状態、特定の免疫刺激性細菌投与、投与経路、処置する疾患のタイプおよび疾患の重症度に依存し得る。

10

【0563】

それ故に、厳密な投与量および処置期間は、処置する疾患の関数であり、既知試験プロトコールを使用して、またはインビボまたはインビトロ試験データの外挿により経験的に決定され得ることは理解される。濃度および投与量の値はまた軽減すべき状態の重症度により変わり得る。ある特定の対象について、具体的投与量レジメンは個々の必要性により時間とともにおよび組成物を投与するまたは投与を監督する者の専門的判断により調節されるべきであり、ここに示す濃度範囲は単なる例示であり、それを含む組成物および組み合わせの範囲または使用を限定する意図はないことはさらに理解されるべきである。組成物は、時間毎に、毎日、毎週、毎日、または毎年1回投与され得る。一般に、投与量レジメンは、毒性が制限されるよう選択される。担当医は、毒性または骨髄、肝臓または腎臓または他の組織機能不全により治療をやめる、中断するまたは低用量に調節する方法および時機を知っていることは注意すべきである。逆に、担当医は、臨床応答が適正でないならば、処置を高レベルにする方法および時機を知っているべきである(毒性副作用を起こさないようにして)。

20

30

【0564】

免疫刺激性細菌は、治療上有益な効果を発揮するのに十分な量で組成物に包含される。例えば、量は、癌などの過増殖性疾患または状態の処置に治療効果を達成するものである。

【0565】

薬学的および治療活性化合物およびその誘導体は、一般に複数の単位剤形または複数の剤形に製剤され、投与される。各単位用量は、必要な医薬担体、媒体または希釈剤と共に、所望の治療効果を生ずるのに十分な予定された量の治療活性化合物を含む。単位剤形は、適当な量の化合物または薬学的に許容されるその誘導体を含む錠剤、カプセル、丸剤、粉末、顆粒、非経腸懸濁液および経口溶液または懸濁液および水中油型エマルジョンを含むが、これらに限定されない。単位剤形は、バイアル、アンプルおよびシリンジに入れられまたは個々に包装された錠剤またはカプセルであり得る。単位剤形は、その一部または複数回を投与され得る。複数の剤形は、分離された単位剤形で投与される単一容器に包装された複数の同一単位剤形である。複数の剤形の例は、バイアル、錠剤もしくはカプセルのボトルまたはポイントもしくはガロンのボトルを含む。それ故に、複数の剤形は、包装で分けられていない複数の単位用量を含む。一般に、0.005%~100%の範囲の活性成分を含み、残りは非毒性担体である剤形または組成物が調製され得る。医薬組成物は、各投与経路に適する剤形に製剤され得る。

40

50

## 【0566】

単位用量非経腸製剤は、アンプル、バイアルまたは針付きシリンジに包装される。薬学的活性化合物を含む液体溶液または再構成粉末製剤の体積は、処置する疾患および包装に選択される特定の製品の関数である。非経腸投与のための全製剤は、当分野で知られ、実施されているとおり、無菌でなければならない。

## 【0567】

記載するとおり、ここで提供される組成物は、皮下、筋肉内、静脈内、皮内、病巣内、腹腔内注射、硬膜外、腔、直腸、局所、耳、経皮投与または何らかの投与経路を含むが、これらに限定されない当業者に知られるあらゆる経路のために製剤化され得る。このような経路に適する製剤は当業者に知られる。組成物はまた他の生物学的活性剤と、逐次的に、間欠的にまたは同じ組成物で投与され得る。

10

## 【0568】

医薬組成物は、制御放出製剤および/または送達デバイスにより投与され得る(例えば、米国特許3,536,809; 3,598,123; 3,630,200; 3,845,770; 3,847,770; 3,916,899; 4,008,719; 4,687,660; 4,769,027; 5,059,595; 5,073,543; 5,120,548; 5,354,556; 5,591,767; 5,639,476; 5,674,533および5,733,566参照)。種々の送達系が知られ、選択組成物の投与に使用でき、ここでの使用に意図され、このような粒子は容易に製造され得る。

## 【0569】

20

## 6. 包装および製品

包装材料、何らかのここに提供される医薬組成物および組成物がここに記載する疾患または状態の処置に使用されるものであることを示すラベルを含む製品もまた提供される。例えば、ラベルは、処置が腫瘍または癌に対することを示し得る。

## 【0570】

ここに記載する免疫刺激性細菌および他の治療剤の組み合わせも、製品に包装され得る。一例として、製品は、免疫刺激性細菌を含む医薬組成物組成物を含み、さらなる薬剤または処置剤を含まない。他の例として、製品は、異なる抗癌剤などの他のさらなる治療剤を含み得る。この例では、これら薬剤は、製品として包装するために、一括してまたは個別に提供され得る。

30

## 【0571】

ここに提供される製品は、包装材料を含む。医薬製品の包装に使用される包装材料は、当業者に周知である。例えば、各々全体として本明細書に包含させる、米国特許5,323,907、5,052,558および5,033,252参照。医薬包装材料の例は、プリスターパック、ボトル、チューブ、吸入器、ポンプ、バッグ、バイアル、コンテナ、シリンジ、ボトルおよび選択した製剤および意図される投与方法および処置に適するあらゆる包装材料を含むが、これらに限定されない。製品の例は、一チャンバーおよびデュアルチャンバー容器を含む容器である。コンテナは、チューブ、ボトルおよびシリンジを含むが、これらに限定されない。コンテナは、さらに静脈内投与用の針を含み得る。

## 【0572】

40

パッケージの選択は、薬剤およびこのような組成物を一緒にまたは別々に包装するかによる。一般に、包装は、その中に含まれる組成物と非反応性である。他の例として、成分の一部を、混合物として包装し得る。他の例として、全成分を個別に包装し得る。故に、例えば、成分を、投与直前に混合することにより、直接一括して投与され得る個別の組成物として包装し得る。あるいは、成分は、個別に投与するための個別の組成物として包装され得る。

## 【0573】

製品を含む選択組成物は、キットとしても提要され得る。キットは、ここに記載する医薬組成物および製品として提供される投与用物品を含み得る。組成物は、投与のための物品に含まれてよくまたは後に加えるため個別に提供されてよい。キットは、所望により、投

50

与量、投与レジメンおよび投与方法の指示を含む、適用の指示を含む。キットはまたここに記載する医薬組成物および診断用の物品も含み得る。

【0574】

I. 処置方法および使用

ここに提供される方法は、免疫刺激性細菌を投与または使用する方法であって、癌などのこのような細菌の投与により症状が好転または軽減され得る疾患または状態を有する対象を処置するための方法を提供する。具体的例において、疾患または状態は腫瘍または癌である。さらに、抗癌剤または抗ヒアルロン薬剤などの処置のための1以上の付加的薬剤との組み合わせ治療の方法もまた提供される。細菌は、腫瘍内、静脈内、直腸、経口、筋肉内、粘膜および他の経路などの、非経腸、全身、外用および局所を含むが、これらに限定され、これらに限定されないあらゆる適当な経路において投与され得る。それぞれに適する製剤が提供される。当業者は、適当なレジメンおよび用量を確立でき、経路を選択できる。

10

【0575】

1. 腫瘍

ここに提供される免疫刺激性細菌、組み合わせ、使用および方法は、癌を含む全タイプの腫瘍、特に肺癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、胃癌、頭頸部癌、卵巣癌、肝臓癌、膵臓癌、腎臓癌、乳癌、結腸直腸癌および前立腺癌を含む固形腫瘍の処置に適用可能である。方法はまたは血液癌にも使用され得る。

【0576】

ここに提供される使用および方法による処置に付される腫瘍および癌は、免疫系、骨格系、筋肉および心臓、乳房、膵臓、消化管、中枢および末梢神経系、腎臓系、生殖器系、呼吸器系、皮膚、関節を含む結合組織系、脂肪組織および血管壁を含む循環系起源のものを、これらに限定されない。ここに提供される免疫刺激性細菌で処置され得る腫瘍の例は、癌腫、神経膠腫、肉腫(脂肪肉腫を含む)、腺癌、腺肉腫および腺腫を含む。このような腫瘍は、例えば、乳房、心臓、肺、小腸、結腸、膵臓、腎臓、膀胱、頭頸部、卵巣、前立腺、脳、膵臓、皮膚、骨、骨髄、血液、胸腺、子宮、精巣、頸または肝臓を含む、事実上体の全部分で生じ得る。

20

【0577】

骨格系の腫瘍は、例えば、肉腫および芽腫、例えば骨肉腫、軟骨肉腫および軟骨芽細胞腫を含む。筋肉および心臓腫瘍は、骨格筋および平滑筋両者の腫瘍、例えば、平滑筋腫(平滑筋の良性腫瘍)、平滑筋肉腫、横紋筋腫(骨格筋の良性腫瘍)、横紋筋肉腫および心臓肉腫を含む。消化管の腫瘍は、例えば、口腔、食道、胃、小腸、結腸の腫瘍および結腸直腸腫瘍ならびに唾液腺、肝臓、膵臓および胆管などの消化器分泌臓器の腫瘍を含む。中枢神経系の腫瘍は、脳、網膜および脊髄の腫瘍を含み、また関連結合組織、骨、血管または神経組織に由来し得る。末梢神経系の腫瘍の処置も意図される。末梢神経系の腫瘍は、悪性末梢神経鞘腫瘍を含む。腎臓系の腫瘍は、腎臓のもの、例えば、腎臓細胞癌腫ならびに輸尿管および膀胱の腫瘍を含む。生殖器系の腫瘍は、子宮頸、子宮、卵巣、前立腺、精巣および関連分泌腺の腫瘍を含む。免疫系の腫瘍はリンパ腫、例えば、ホジキンおよび非ホジキンを含む、血液ベースのおよび固形腫瘍両者を含む。呼吸器系の腫瘍は、鼻孔、気管支および肺の腫瘍を含む。乳房の腫瘍は、例えば、小葉癌および腺管癌両者を含む。

30

40

【0578】

ここに提供される免疫刺激性細菌および方法で処理され得る腫瘍の他の例は、カポジ肉腫、CNS新生物、神経芽腫、毛細血管芽腫、髄膜腫および脳転移、黒色腫、消化器および腎臓癌腫および肉腫、横紋筋肉腫、神経膠芽腫(例えば多形神経膠芽腫)および平滑筋肉腫を含む。ここに提供するとおり処置され得る他の癌の例は、リンパ腫、芽腫、神経内分泌腫瘍、中皮腫、シュワン腫、髄膜腫、黒色腫および白血病またはリンパ系悪性腫瘍を含むが、これらに限定されない。このような癌の例は、血液系腫瘍、例えばホジキンリンパ腫;非ホジキンリンパ腫(パーキットリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫/慢性リンパ球性白血病、菌状息肉、マントル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、汎発性大B細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、ヘアリー細胞白血病およびリンパ形質細胞性白血病)、B細胞急性リンパ

50



芽球性白血病／リンパ腫およびT細胞急性リンパ芽球性白血病／リンパ腫を含むリンパ球前駆体細胞の腫瘍、胸腺腫、末梢T細胞白血病、成人T細胞白血病／T細胞リンパ腫および大顆粒リンパ球性白血病を含む成熟TおよびNK細胞の腫瘍、ランゲルハンス細胞組織球増殖症、成熟を伴うAML、未分化AML、急性前骨髄球性白血病、急性骨髄単球性白血病および急性単球性白血病を含む、急性骨髄性白血病などの骨髄腫瘍、骨髄異形成症候群および慢性骨髄性白血病を含む慢性骨髄増殖性障害；神経膠腫、神経膠芽腫、神経芽腫、星状細胞腫、髄芽腫、上衣腫および網膜芽細胞腫などの中枢神経系の腫瘍；頭頸部(例えば、鼻咽頭癌、唾液腺癌および食道癌)、肺(例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺癌および肺扁平上皮癌)、消化器系(例えば、消化器癌を含む胃癌または胃の癌、胆管または胆道癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌および肛門部癌)、生殖器系(例えば、精巣、陰茎または前立腺癌、子宮、膣、外陰、子宮頸、卵巣および子宮内膜癌)、皮膚(例えば、黒色腫、基底細胞癌腫、扁平上皮細胞癌、光線性角化症、皮膚黒色腫)、肝臓(例えば、肝臓癌、肝臓癌腫、肝細胞癌および肝細胞癌)、骨(例えば、骨巨細胞腫および溶骨性骨癌)、付加的組織および臓器(例えば、膵臓癌、膀胱癌、腎臓または腎臓癌、甲状腺癌、乳癌、腹膜癌およびカボジ肉腫)の固形腫瘍、血管系腫瘍(例えば、血管肉腫および血管外皮腫)、ウィルス腫瘍、網膜芽細胞腫、骨肉腫およびユーイング肉腫を含む。

10

【0579】

## 2. 投与

ここでの使用および方法の実施に際し、ここに提供される免疫刺激性細菌を、腫瘍を有するもしくは新生物細胞を有する対象または免疫化すべき対象を含む対象に投与し得る。免疫刺激性細菌の投与に適する状態を有するとの対象の診断、対象の免疫能の決定、対象の免疫化、化学療法剤での対象の処置、放射線での対象の処置または対象の外科的処置を含むが、これらに限定されない1以上の段階を、免疫刺激性細菌の対象への投与の前、同時または後に実施できる。

20

【0580】

治療目的での免疫刺激性細菌の腫瘍担持対象を含む実施態様について、対象は、一般に先に新生物状態を有すると診断されている。診断方法はまた新生物状態のタイプの決定、新生物状態のステージの決定、対象における1以上の腫瘍のサイズ決定、対象のリンパ節における転移または新生物細胞の存在または非存在の決定または対象の転移の存在の決定も含み得る。

30

【0581】

対象に免疫刺激性細菌を投与するための治療方法ある実施態様は、原発腫瘍のサイズまたは新生物疾患のステージを決定する段階を含み、原発腫瘍のサイズが閾値以上であるかまたは新生物疾患のステージが閾値ステージ以上であるならば、免疫刺激性細菌を対象に投与する。類似の実施態様において、原発腫瘍のサイズが閾値体積以下であるかまたは新生物疾患のステージが閾値ステージ以下であるならば、免疫刺激性細菌をまだ対象に投与しない；このような方法は、対象を腫瘍サイズまたは新生物疾患ステージが閾値量に達するまでモニタリングし、次いで免疫刺激性細菌を対象に投与することを含む。閾値サイズは、腫瘍の増殖速度、免疫刺激性細菌が腫瘍に感染する能力および対象の免疫能を含む、いくつかの因子により変わり得る。一般に、閾値サイズは、免疫刺激性細菌が、宿主の免疫系により完全に除去されずに、腫瘍またはその近位で蓄積および複製するのに十分なサイズであり、一般にまた宿主が腫瘍細胞に対する免疫応答を具備するのに十分に長い時間、一般に約1週間以上、約10日以上または約2週間以上、細菌感染を維持するのに十分なサイズである。閾値ステージの例は、最低ステージ(例えば、ステージIまたは同等)を超えるあらゆるステージまたは原発腫瘍が閾値サイズより大きいあらゆるステージまたは転移細胞が検出されるあらゆるステージである。

40

【0582】

投与方法が免疫刺激性細菌が腫瘍または転移に入ることを可能とする限り、微生物を対象に投与するあらゆる方法が使用できる。投与方法は、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、局所、腫瘍内、多穿刺、吸入、鼻腔内、経口、腔内(例えば、カテーテルを介する膀胱への

50

投与、坐薬または浣腸による消化管への投与)、耳、直腸および眼投与を含み得るが、これらに限定されない。

【0583】

当業者は、対象および細菌と適合する、細菌を腫瘍および/または転移に到達させる可能性も高い何れかの投与方法を選択できる。投与経路は、疾患の性質、腫瘍の種類および医薬組成物に含まれる特定の細菌を含む、多様な因子の何れかにより当業者により選択され得る。標的部位への投与は、例えば、コロイド分散系として、弾道送達により実施できまたは全身投与は動脈への注射により実施できる。

【0584】

投与量レジメンは、多様な方法および量の何れでもよく、既知臨床因子により当業者により決定され得る。1回量は、免疫刺激が処置をもたらす疾患または障害の処置に治療的に有効であり得る。このような刺激の例は、特異的免疫応答および非特異的免疫応答の一方または両方、特異的および非特異的両者の応答、先天性応答、一次免疫応答、適応免疫、二次免疫応答、記憶免疫応答、免疫細胞活性化、免疫細胞増殖、免疫細胞分化およびサイトカイン発現を含むが、これらに限定されない免疫応答である。

【0585】

医学分野で知られるとおり、対象に対する投与量は、対象の種、サイズ、体表面積、年齢、性別、免疫能および一般的健康、投与する特定の細菌、期間および投与経路、疾患の種類およびステージ、例えば、腫瘍サイズおよび同時投与される薬物などの他の化合物を含む、多くの因子に依存し得る。上記因子に加えて、このようなレベルは、当業者により決定され得るとおり、細菌の感染性および細菌の性質により影響を受け得る。本方法において、適切な細菌の最小投与量レベルは、腫瘍または転移において細菌が生存、増殖および複製するのに十分なレベルであり得る。65 kgヒトに細菌を投与する最小レベルの例は、少なくとも約  $5 \times 10^6$  コロニー形成単位(CFU)、少なくとも約  $1 \times 10^7$  CFU、少なくとも約  $5 \times 10^7$  CFU、少なくとも約  $1 \times 10^8$  CFUまたは少なくとも約  $1 \times 10^9$  CFUを含み得る。本方法において、適切な細菌の最大投与量レベルは、約1日後または約3日後または約7日後、宿主に毒性ではないレベル、3倍以上の脾腫を引き起こさないレベルおよび/または正常組織または臓器にコロニーまたはプラークをもたらさないレベルであり得る。65 kgヒトに細菌を投与する最大レベルの例は、約  $5 \times 10^{11}$  CFU未満、約  $1 \times 10^{11}$  CFU未満、約  $5 \times 10^{10}$  CFU未満、約  $1 \times 10^{10}$  CFU未満または約  $1 \times 10^9$  CFU未満を含み得る。

【0586】

ここに提供される方法および使用は、免疫刺激性細菌の細菌への1回投与または免疫刺激性細菌の細菌への複数回投与または他の抗腫瘍治療および/または処置との組み合わせ治療を含む、多様なレジメンのその他を含み得る。これらは、修飾免疫細胞投与などの細胞療法、CAR-T治療、CRISPR治療、抗体(例えば、抗PD-1、抗PD-L1または抗CTLA-4抗体)などの免疫チェックポイント阻害剤、ヌクレオシドアナログなどの化学療法/化学療法化合物、手術および放射線療法を含む。

【0587】

ある実施態様において、細菌がコロニー形成でき、対象における抗腫瘍応答を引き起こすまたは増強することができる場所である、腫瘍における免疫刺激性細菌の確立に、単回投与が十分である。他の実施態様において、ここでの方法における使用のために提供される免疫刺激性細菌は、種々の機会に、一般に少なくとも1日離れて、投与され得る。別々の投与は、先の投与が細菌を腫瘍または転移に送達することができなかった可能性のある場所である、腫瘍または転移への細菌の送達の可能性を増加させ得る。ある実施態様において、別々の投与は、細菌コロニー形成/増殖が生じ得るまたは他に腫瘍の細菌蓄積の力価が増加し得る場所である、腫瘍または転移の位置で増加され得て、宿主の抗腫瘍免疫応答の誘導または増強を増加する。

【0588】

別々の投与が実施されるとき、各投与は、別の回の投与量と同一または異なる投与量であ

り得る。ある実施態様において、全ての回の投与量は同一である。他の実施態様において、最初の投与量は、1以上のその後の投与量より多い、例えば、その後の投与量より少なくとも10倍多い、少なくとも100倍多いまたは少なくとも1000倍多いものであり得る。最初の投与量が1以上のその後の投与量より多い個別々の投与の方法ある例において、その後の全投与量は、同じ、最初の投与より少ない量であり得る。

【0589】

別々の投与は、2回、3回、4回、5回または6回投与を含む、2回以上のあらゆる数の投与を含み得る。当業者は、治療方法をモニタリングする既知方法およびここに提供される他のモニタリング方法により、実施すべき投与回数または1以上の付加的投与を実施する望ましさを容易に決定できる。従って、ここに提供される方法は、投与回数が対象のモニタリングにより決定され、モニタリングの結果に基づき、1以上の付加的投与を提供するか否かを決定する、免疫刺激性細菌の1以上の投与を対象に提供する方法を含む。1以上の付加的投与を提供するか否かの決定は、腫瘍増殖の指標または腫瘍増殖阻害、新規転移出現または転移阻害、対象の抗細菌抗体力価、対象の抗腫瘍抗体力価、対象の全体的健康および対象の体重を含むが、これらに限定されない多様なモニタリング結果に基づき得る。

10

【0590】

投与の間の時間は、多様な時間の何れかであり得る。投与間の時間は、投与回数に関連して記載したモニタリング工程、対象が免疫応答を具備する時間、対象が細菌を正常組織から浄化する時間または細菌が腫瘍または転移にコロニー形成/増殖する時間を含む多様な因子の何れかの関数であり得る。一例として、時間は、対象が免疫応答を具備する時間の関数であり得る；例えば、時間は、約1週間を超える、約10日を超える、約2週間を超えるまたは約1か月を超えるなど、対象が免疫応答を具備する時間を超えるものであり得る；他の例において、時間は、約1週間未満、約10日未満、約2週間未満または約1か月未満など対象が免疫応答を具備する時間未満であり得る。他の例において、時間は、細菌が腫瘍または転移にコロニー形成/増殖する時間の関数であり得る；例えば、時間は、約3日、約5日、約1週間、約10日、約2週間または約1か月など、検出可能マーカーを発現する微生物の投与後、腫瘍または転移で検出可能なシグナルが生じる時間を超えるものであり得る。

20

【0591】

ここで使用される方法は、またここに提供される免疫刺激性細菌を含む懸濁液および他の製剤などの組成物の投与によっても実施され得る。このような組成物は、ここに提供するまたは当業者に知られるとおり、細菌および薬学的に許容される賦形剤または媒体を含む。

30

【0592】

上記のとおり、ここに提供される使用および方法はまた対象への免疫刺激性細菌の投与に加えて、対象への抗腫瘍化合物または他の癌治療などの1以上の治療化合物の投与も含み得る。治療化合物は、腫瘍治療効果について、免疫刺激性細菌と無関係にまたは連動して作用し得る。無関係に作用し得る治療化合物は、免疫刺激性細菌が腫瘍に蓄積する、腫瘍で複製するおよび対象における抗腫瘍免疫応答を引き起こすまたは増強する能力を低減することなく、腫瘍増殖阻害、転移増殖および/または形成阻害、腫瘍または転移のサイズ減少または腫瘍または転移排除ができる、あらゆる多様な既知化学療法化合物を含み得る。このような化学療法剤の例は、アルキル化剤、例えばチオテパおよびシクロホスファミド；アルキルスルホネート、例えばブスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファン；アンドロゲン、例えばカルステロン、ドロモスタノロンプロピオネート、エピチオスタノール、メピチオスタンおよびテストラクトン；抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタンおよびトリロスタン；抗アンドロゲン、例えばフルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、リユープロリドおよびゴセレリン；抗生物質、例えばアクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアミシン、カルピシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン

40

50

、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチンおよびゾルピシン；例えばタモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害4(5) - イミダゾール、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY 117018、オナプリストンおよびトレミフェン(フェアストン)を含む抗エストロゲン；代謝拮抗剤、例えばメトトレキサートおよび5 - フルオロウラシル(5 - F U)；葉酸アナログ、例えばデノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリンおよびトリメトレキサート；アジリジン、例えばベンゾデパ、カルボコン、メツレデパおよびウレデパ；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホロアミドおよびトリメチロールメラミンを含むエチレンイミンおよびメチルメラミン；葉酸補充薬、例えばフォリン酸；窒素マスタード、例えばクロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロライド、メルファラン、ノベンピチン、フェネステリン、ブレドニムスチン、トロホスファミドおよびウラシルマスタード；ニトロソウレア、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチンおよびラニムスチン；白金アナログ、例えばシスプラチンおよびカルボプラチン；ピンブラスチン；白金；タンパク質、例えばアルギニンデイミナーゼおよびアスパラギナーゼ；プリンアナログ、例えばフルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリンおよびチオグアニン；ピリミジンアナログ、例えばアンシタピン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジンおよび5 - F U；タキサン、例えばパクリタキセルおよびドセタキセルおよびそのアルブミン化形態(すなわち、n a b - パクリタキセルおよびn a b - ドセタキセル)、トポイソメラーゼ阻害剤R F S 2000；チミジル酸シンターゼ阻害剤(例えばトムデックス)；およびアセグラトンを含む付加的化学療法；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ビスアントレン；エダトレキサート；デフォスファミド；デメコルチン；ジアジクオン；ジフルオロメチルオルニチン(D M F O)；エフロルニチン；エリプチニウムアセテート；エトグルシド；ガリウムニトレート；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ポドフィリン酸；2 - エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K(登録商標)；ラゾキサソ；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2', 2'' - トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ピンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン；アラビノシド(「A r a - C」)；シクロホスファミド；チオテパ；クロラムブシル；ゲムシタピン；6 - チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；エトポシド(V P - 16)；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ナベルピン；ノバントロン；テニボシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロン酸；C P T - 11；レチノイン酸；エスペラミシン；カペシタピン；およびトポイソメラーゼ阻害剤、例えばイリノテカンを含むが、これらに限定されない。上記お何れかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体も使用され得る。

### 【0593】

免疫刺激性細菌と連動して作用する治療化合物は、例えば、細菌の免疫応答誘導性を増加させる化合物を含む。例えば、遺伝子発現を変える化合物は、S T I N Gタンパク質などの外来性遺伝子などの細菌における遺伝子の転写を誘導または増加し得る。I P T GおよびR U 486を含む、遺伝子発現を変えることができる何らかの広範な化合物が当分野で知られる。発現が上方制御され得る遺伝子の例は、毒素、プロドラッグを抗腫瘍薬物に変換し得る酵素、サイトカイン、転写制御タンパク質、s h R N A、s i R N Aおよびリ

ボザイムを含む、タンパク質およびRNA分子を含む。他の実施態様において、細菌のコロニー形成/増殖または免疫応答誘導性を増加するよう免疫刺激性細菌と連動して作用し得る治療化合物は、細菌発現遺伝子産物と相互作用でき、そのような相互作用が腫瘍細胞死滅増加または対象における抗腫瘍免疫応答増加をもたらし得る、化合物である。細菌発現遺伝子産物と相互作用できる治療化合物は、例えば投与形態で対象に毒性または他の生物学的活性がわずかであるかまたはないプロドラッグまたは他の化合物であるが、細菌発現遺伝子産物との相互作用後、化合物は、細胞毒性、アポトーシスを誘導する能力または免疫応答を誘導する能力を含むが、これらに限定されない腫瘍細胞死をもたらす性質を獲得し得る。ガンシクロビル、5-フルオロウラシル、6-メチルプリンデオキシリボシド、セファロsporin-ドキシソルピシン、4-[(2-クロロエチル)(2-メスロキシエチル)アミノ]ベンゾイル-L-グルタミン酸、アセトアミノフェン、インドール-3-酢酸、CB1954、7-エチル-10-[4-(1-ピペリジノ)-1-ピペリジノ]カルボニルオキシカンプトテシン、ビス-(2-クロロエチル)アミノ-4-ヒドロキシフェニルアミノメタノン28、1-クロロメチル-5-ヒドロキシ-1,2-ジヒドロ-3H-ベンズ[e]インドール、エピルピシン-グルクロニド、5'-デオキシ5-フルオロウリジン、シトシンアラビノシドおよびリナマリンを含む、多様なプロドラッグ様物質が当分野で知られる。

10

【0594】

### 3. モニタリング

ここに提供される方法は、さらに対象のモニタリング、腫瘍のモニタリングおよび/または対象への免疫刺激性細菌投与モニタリングの1以上の段階を含み得る。腫瘍サイズのモニタリング、転移の存在および/またはサイズのモニタリング、対象のリンパ節のモニタリング、対象の体重または血液もしくは尿マーカを含む他の健康指標のモニタリング、抗細菌抗体力価のモニタリング、検出可能な遺伝子産物の細菌発現のモニタリングおよび対象の腫瘍、組織または臓器における細菌力価の直接モニタリングを含むが、これらに限定されない多様なモニタリング段階の何れもここに提供される方法に包含できる。

20

【0595】

モニタリングの目的は、対象の健康状態または対象の治療処置の進行を単に評価するためによくまたは同一または異なる免疫刺激性細菌のさらなる投与が保証されるか否かの決定または治療方法の有効性の増加に作用し得るまたは対象に投与した細菌の病原性で低減し得る化合物を対象にいつ投与するか投与すべきか否かをさらに決定するためでよい。

30

【0596】

ある実施態様において、ここに提供される方法は、1以上の細菌により発現された遺伝子のモニタリングを含み得る。ここに提供するまたは他に当分野で知られるような細菌は、検出可能タンパク質を含むが、これに限定されない、1以上の検出可能遺伝子産物を発現できる。

【0597】

ここで提供する細菌で発現される検出可能な遺伝子産物の測定は、対象に存在する細菌のレベルの正確な決定を提供し得る。ここにさらに提供されるとおり、例えば、断層撮影方法を含む造影方法による、検出可能遺伝子産物の位置の測定は、対象における細菌の局在化を決定し得る。従って、検出可能な細菌遺伝子産物のモニタリングを含むここに提供される方法は、対象の1以上の臓器または組織における細菌の存在または非存在および/または対象の腫瘍または転移における細菌の存在または非存在の決定に使用され得る。さらに、検出可能な細菌遺伝子産物のモニタリングを含むここに提供される方法は、1以上の臓器、組織、腫瘍または転移に存在する細菌の力価の決定に使用され得る。対象における細菌の局在化および/または力価のモニタリングを含む方法は、正常組織および臓器の細菌感染および特に感染のレベルが細菌の病原性を示し得るため、細菌の病原の決定に使用され得る。対象における免疫刺激性細菌の局在化および/または力価のモニタリングを含む方法は、複数の時点で実施でき、従って、対象の1以上の臓器または組織における細菌複製を速度を含む、対象における細菌複製速度を決定し得る；従って、細菌遺伝子産物の

40

50

モニタリングを含む方法は、細菌の複製能の決定に使用され得る。ここに提供される方法はまた多様な臓器または組織および腫瘍または転移に存在する免疫刺激性細菌の量の定量化に使用でき、それにより対象における細菌の優先的蓄積の程度を示し得る；従って、細菌遺伝子産物モニタリングは、細菌が正常組織または臓器に優先して腫瘍または転移に蓄積する能力を決定する方法において使用され得る。ここに提供される方法で使用される免疫刺激性細菌が腫瘍全体に蓄積できるかまたは腫瘍の複数の部位に蓄積できかつ転移にも蓄積できるため、ここに提供される細菌遺伝子産物をモニタリングする方法は、対象に存在する腫瘍のサイズまたは転移の数の決定に使用され得る。一定期間にわたる腫瘍または転移におけるこのような細菌遺伝子産物存在のモニタリングは、腫瘍の増殖もしくは縮小または新規転移の出現もしくは転移消失を含む腫瘍または転移の変化の評価に使用できお

よびまた腫瘍の増殖または縮小または新規転移の出現または転移消失の速度または腫瘍の増殖または縮小または新規転移の出現または転移消失の速度の変化の決定にも使用され得る。従って、細菌遺伝子産物のモニタリングは、腫瘍の増殖または縮小または新規転移の出現または転移消失の速度または腫瘍の増殖または縮小または新規転移の出現または転移消失の速度の変化の決定により、対象における新生物疾患のモニタリングまたは新生物疾患の処置有効性の決定に使用できる。

10

## 【0598】

多様な検出可能タンパク質の何れも、モニタリングにより検出でき、その例は、多様な蛍光タンパク質の何れか(例えば、緑色蛍光タンパク質)、多様なルシフェラーゼ、トランスフェリンまたは他の鉄結合タンパク質；または受容体、結合タンパク質および抗体であっ

て、受容体、結合タンパク質または抗体に特異的に結合する化合物が検出可能剤であり得るまたは検出可能物質(例えば、放射性核種または造影剤)で標識され得る。

20

## 【0599】

腫瘍および/または転移サイズは、外部評価方法または断層撮影または磁気造影方法を含む、当分野で知られる多様な方法の何れかによりモニターされ得る、ここに提供される方法、例えば、モニタリング細菌遺伝子発現を、腫瘍および/または転移サイズのモニタリングに使用し得る。

## 【0600】

数時点にわたるサイズのモニタリングは、腫瘍または転移のサイズの増加または減少に関する情報を提供でき、対象における腫瘍の追加および/または転移の存在に関する情報も

提供できる。数時点にわたる腫瘍サイズのモニタリングは、対象における新生物疾患処置の有効性を含む、対象における新生物疾患の進展に関する情報を提供し得る。

30

## 【0601】

ここに提供される方法はまた、対象への免疫刺激性細菌の投与に応答して産生された抗体を含む、対象における抗体力価のモニタリングも含み得る。ここに提供される方法で投与された細菌は、内因性細菌抗原に対する免疫応答を誘導し得る。ここに提供される方法で投与された細菌はまた細菌により発現される外来性遺伝子に対する免疫応答も誘導し得る。ここに提供される方法で投与された細菌はまた腫瘍抗原に対する免疫応答も誘導し得る。細菌抗原、細菌により発現された外来性遺伝子産物または腫瘍抗原に対する抗体力価の

モニタリングは、細菌の毒性、処置方法の有効性または産生および/または収集のための

遺伝子産物または抗体のレベルのモニターに使用され得る。

40

## 【0602】

抗体力価モニタリングは、細菌の毒性のモニターに使用され得る。細菌に対する抗体力価は、対象に細菌を投与後時間と共に変化し得て、ある特定の時点で、低抗(細菌抗原)抗体力価が高い毒性を示し得て、一方他の時点で、高抗(細菌抗原)抗体力価が高い毒性を示し得る。ここに提供される方法で使用される細菌は免疫原性であり得て、それ故に、対象に細菌を投与して間もなく、免疫応答を誘導し得る。一般に、対象の免疫系が強い免疫応答を具備できる免疫刺激性細菌は、対象の免疫系が全正常臓器または組織から細菌を除去し得るとき、低毒性である細菌であり得る。それ故に、ある実施態様において、対象に細菌を投与して間もなくの細菌抗原に対する高抗体力価は、細菌の低毒性を示し得る。

50

## 【0603】

他の実施態様において、抗体力価のモニタリングは、処置方法の有効性のモニターに使用され得る。ここに提供される方法において、抗(腫瘍抗原)抗体力価などの抗体力価は、新生物疾患を処置する治療方法などの治療方法の有効性を示し得る。ここに提供される治療方法は、腫瘍および/または転移に対する免疫応答を引き起こすまたは増強することを含み得る。それ故に、抗(腫瘍抗原)抗体力価のモニタリングにより、腫瘍および/または転移に対する免疫応答を引き起こすまたは増強する治療方法の有効性をモニターすることが可能である。

## 【0604】

他の実施態様において、抗体力価のモニタリングを産生および/または収集のための遺伝子産物または抗体のレベルのモニタリングに使用し得る。ここで提供する方法は、腫瘍に蓄積されている微生物における外来性遺伝子の発現による、タンパク質、shRNAなどのRNA分子または他の化合物の産生に使用され得る。タンパク質、RNA分子または他の化合物に対する抗体力価のモニタリングは、腫瘍蓄積微生物によるタンパク質、RNA分子または他の化合物の産生レベルを示すことができまたこのようなタンパク質、RNA分子または他の化合物に特異的な抗体のレベルを直接示すことができる。

10

## 【0605】

ここに提供される方法はまた対象の健康のモニタリング方法も含み得る。ここに提供される方法の一部は、新生物疾患治療方法を含む治療方法である。対象の健康のモニタリングは、当分野で知られるとおり、治療方法の有効性の決定に使用され得る。ここに提供される方法はまたここに提供するとおり、免疫刺激性細菌を対象に投与する段階を含む。対象の健康のモニタリングは、対象に投与した免疫刺激性細菌の病原性の決定に使用され得る。新生物疾患、感染性疾患または免疫関連疾患などの疾患をモニタリングするための多様な健康診断方法を、当分野で知られるとおり、モニターし得る。例えば、対象の体重、血圧、脈、呼吸、色、体温または他の観察可能な状態が、対象の健康を示し得る。さらに、対象からのサンプルにおける1以上の成分の存在または非存在またはレベルが、対象の健康を示し得る。典型的サンプルは、血液および尿サンプルを含み、1以上の成分の存在または非存在またはレベルは、例えば、血液パネルまたは尿パネル診断試験実施により決定され得る。対象の健康を示す成分の例は、白血球数、ヘマトクリットおよびc-反応性タンパク質濃度を含むが、これらに限定されない。

20

30

## 【0606】

ここに提供される方法は、治療のモニタリングを含み、ここで、治療決定は、モニタリングの結果に基づき得る。ここに提供される治療方法は、対象への免疫刺激性細菌の投与を含み、細菌は腫瘍および/または転移に優先的に蓄積できるおよび細菌は抗腫瘍免疫応答を引き起こすまたは増強することができる。このような治療方法は、特定の免疫刺激性細菌の複数の投与、第二の免疫刺激性細菌の投与または治療化合物の投与を含む、多様な段階を含み得る。対象に投与すべき免疫刺激性細菌または化合物の量、タイミングまたはタイプの決定は、対象のモニタリングの1以上の結果に基づき得る。例えば、対象における抗体力価を、免疫刺激性細菌、そして所望により、化合物の投与が望ましいか否か、投与する細菌および/または化合物の量および投与する細菌および/または化合物のタイプの決定に使用でき、例えば、低抗体力価は付加的免疫刺激性細菌、異なる免疫刺激性細菌および/または細菌遺伝子発現を誘導する化合物などの治療化合物または免疫刺激性細菌と無関係に有効である治療化合物の投与の望ましさを示すことができる。

40

## 【0607】

他の例において、対象の全体的健康状態を、免疫刺激性細菌、そして所望により、化合物の投与が望ましいか否か、投与する細菌および/または化合物の量および投与する細菌および/または化合物のタイプの決定に使用でき、例えば、対象が健康であるとの決定は付加的免疫刺激性細菌、異なる免疫刺激性細菌および/または細菌遺伝子発現を誘導する化合物などの治療化合物または免疫刺激性細菌と無関係に有効である治療化合物の投与の望ましさを示すことができる。他の例において、検出可能な細菌により発現された遺伝子産

50

物のモニタリングを、免疫刺激性細菌、そして所望により、化合物の投与が望ましいか否か、投与する細菌および/または化合物の量および投与する細菌および/または化合物のタイプの決定に使用でき、例えば、対象が健康であるとの決定は付加的免疫刺激性細菌、異なる免疫刺激性細菌および/または細菌遺伝子発現を誘導する化合物などの治療化合物または免疫刺激性細菌と無関係に有効である治療化合物の投与の望ましさを示すことができる。このようなモニタリング方法を、治療方法が有効であるか否か、治療方法が対象に病原性であるか否か、細菌が腫瘍または転移に蓄積されているか否かおよび細菌が正常組織または臓器に蓄積されているか否かの決定に使用できる。このような決定に基づき、さらなる治療方法の望ましさおよび形態が導かれ得る。

【0608】

10

他の例において、モニタリングは、免疫刺激性細菌が対象の腫瘍または転移に蓄積しているか否かを決定できる。このような決定により、さらに付加的細菌、異なる免疫刺激性細菌および、所望により、化合物を対象に投与する決定がなされ得る。

【0609】

#### J. 実施例

次の実施例は、説明の目的でのみ記載され、本発明の範囲を限定する意図はない。

【0610】

操作した免疫刺激性細菌株および命名例の要約：

20

30

40

50



【表 1 1】

| 株番号     | プラスミド      | 株バックグラウンド               | RNAi 標的                          | 別名   |
|---------|------------|-------------------------|----------------------------------|--|
| AST-100 | なし         | YS1646                  | なし                               | VNP20009   |
| AST-101 | なし         | YS1646-ASD              | なし                               | ASD ( <i>asd</i> 遺伝子<br>ノックアウト)                  |
| AST-102 | pEQU6      | YS1646                  | なし                               | YS1646 (pEQU6<br>- プラスミド)                        |
| AST-103 | pEQU6      | YS1646                  | スクランブル (shRNA)                   | YS1646 (pEQU6<br>-shSCR)                         |
| AST-104 | pEQU6      | YS1646                  | muTREX1 (shRNA)<br>ARI-108       | YS1646 (pEQU6<br>-shTREX1)                       |
| AST-105 | pEQU6      | YS1646                  | muPD-L1 (shRNA)<br>ARI-115       | YS1646 (pEQU6<br>-shPDL1)                        |
| AST-106 | pEQU6      | YS1646                  | muTREX1 (マイクロRN<br>A)<br>ARI-203 | YS1646 (pEQU6<br>-miTREX1)                       |
| AST-107 | pATI-U6    | YS1646-ASD              | スクランブル (shRNA)                   | ASD (pATI-shSC<br>R)                             |
| AST-108 | pATI-U6    | YS1646-ASD              | muTREX1 (shRNA)<br>ARI-108       | ASD (pATI-shTR<br>EX1)                           |
| AST-109 | pATIKAN-U6 | YS1646-ASD              | スクランブル (shRNA)                   | ASD (pATIKAN-s<br>hSCR)                          |
| AST-110 | pATIKAN-U6 | YS1646-ASD              | muTREX1 (shRNA)<br>ARI-108       | ASD (pATIKAN-s<br>hTREX1)                        |
| AST-111 | なし         | YS1646-ASD-fljb-fl<br>C | なし                               | ASD/FLG ( <i>asd</i> a<br>nd フラジ エリンノックア<br>ウト)  |
| AST-112 | pATI-U6    | YS1646-ASD-fljb-fl<br>C | muTREX1 (shRNA)<br>ARI-108       | ASD/FLG (pATI<br>-shTREX1)                       |
| AST-113 | pATI-U6    | YS1646-ASD-fljb-fl<br>C | muTREX1 (shRNA)<br>ARI-108       | ASD/FLG (pATI<br>-U6 Kan shTRE<br>X1)            |
| AST-114 | なし         | YS1646-ASD-LLO          | なし                               | ASD/LLO ( <i>asd</i><br>ノックアウト/cytoLLO<br>ノックイン) |

10

20

30

40

50

【表 1 2】

|         |                      |                         |                                  |                                      |    |
|---------|----------------------|-------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|----|
| AST-115 | pATI-U6              | YS1646-ASD-LLO          | muTREX1 (shRNA)<br>ARI-108       | ASD/LLO (pATI<br>Kan-shTREX1)        |    |
| AST-116 | pATIKanpBRori-<br>U6 | YS1646-ASD              | スクランブル                           | ASD (pATIKanL<br>ow-shSCR)           |    |
| AST-117 | pATIKanpBRori-<br>U6 | YS1646-ASD              | muTREX1 (shRNA)<br>ARI-108       | ASD (pATIKanL<br>ow-shTREX1)         |    |
| AST-118 | pATIKanpBRori-<br>U6 | YS1646-ASD-fljB-fl<br>C | muTREX1 (shRNA)<br>ARI-108       | ASD/FLG (pATI<br>KanLow-shTREX<br>1) | 10 |
| AST-119 | pATIKanpBRori-<br>U6 | YS1646-ASD-pMTL<br>-LLO | muTREX1 (shRNA)<br>ARI-108       | ASD/LLO (pATI<br>KanLow-shTREX<br>1) |    |
| AST-120 | pEQU6                | YS1646-ASD-pMTL<br>-LLO | muTREX1 (マイクロRN<br>A)<br>ARI-203 | ASD/LLO(pEQU<br>6-miTREX1) 自<br>殺    |    |
| AST-121 | pEQU6                | YS1646                  | muVISTA<br>ARI-157               | YS1646 (pEQU6<br>-shVISTA)           |    |
| AST-122 | pEQU6                | YS1646                  | muTGF-β-タ<br>ARI-149             | YS1646 (pEQU6<br>-TGF-β-タ)           | 20 |
| AST-123 | pEQU6                | YS1645                  | muβ-カテニン<br>ARI-166              | YS1646 (pEQU6<br>-β-カテニン)            |    |
| AST-100 | なし                   | YS1646                  | なし                               | VNP20009                             |    |
| AST-101 | なし                   | YS1646-ASD              | なし                               | ASD ( <i>asd</i> 遺伝子<br>ノックアウト)      |    |
| AST-102 | pEQU6                | YS1646                  | なし                               | YS1646 (pEQU6<br>- プラスミド)            |    |
| AST-103 | pEQU6                | YS1646                  | スクランブル (shRNA)                   | YS1646 (pEQU6<br>-shSCR)             | 30 |

10

20

30

40

50

【表 1 3】

|         |            |                      |                              |   |
|---------|------------|----------------------|------------------------------|---|
| AST-104 | pEQU6      | YS1646               | muTREX1 (shRNA)<br>ARI-108   | YS1646 (pEQU6<br>-shTREX1)              |
| AST-105 | pEQU6      | YS1646               | muPD-L1 (shRNA)<br>ARI-115   | YS1646 (pEQU6<br>-shPDL1)               |
| AST-106 | pEQU6      | YS1646               | muTREX1 (マイクロRNA)<br>ARI-203 | YS1646 (pEQU6<br>-miTREX1)              |
| AST-107 | pATI-U6    | YS1646-ASD           | スクランブル (shRNA)               | ASD (pATI-shSCR)                        |
| AST-108 | pATI-U6    | YS1646-ASD           | muTREX1 (shRNA)<br>ARI-108   | ASD (pATI-shTREX1)                      |
| AST-109 | pATIKAN-U6 | YS1646-ASD           | スクランブル (shRNA)               | ASD (pATIKan-shSCR)                     |
| AST-110 | pATIKAN-U6 | YS1646-ASD           | muTREX1 (shRNA)<br>ARI-108   | ASD (pATIKan-shTREX1)                   |
| AST-111 | なし         | YS1646-ASD-fljB-fljC | なし                           | ASD/FLG ( <i>asd</i><br>およびフラジエリン/フラグ)  |
| AST-112 | pATI-U6    | YS1646-ASD-fljB-fljC | muTREX1 (shRNA)<br>ARI-108   | ASD/FLG (pATI-shTREX1)                  |
| AST-113 | pATI-U6    | YS1646-ASD-fljB-fljC | muTREX1 (shRNA)<br>ARI-108   | ASD/FLG (pATI-U6 Kan shTREX1)           |
| AST-114 | なし         | YS1646-ASD-LLO       | なし                           | ASD/LLO ( <i>asd</i><br>フラグ/ctoLLO/フラグ) |

10

20

30

## 【0611】

## 実施例 1

## 栄養要求性ネズミチフス菌の株

サルモネラ株 Y S 1 6 4 6 はアデノシンに対して栄養要求性である

ここに提供される株は、アデノシンに対して栄養要求性であるよう操作される。その結果、低アデノシン濃度の正常組織で複製できず、主にアデノシンが高レベルである固形腫瘍微小環境 (TME) にコロニー形成が起こるため、インビボで弱毒化される。サルモネラ株 Y S 1 6 4 6 は野生型株 ATCC #14028 の誘導株であり、p*urI* 遺伝子 (p*urM* と同義) の破壊によりプリンに栄養要求性であるように操作された (Low et al. (2004) *Methods Mol. Med* 90:47-60)。Y S 1 6 4 6 のゲノム全体のその後の分析により p*urI* 遺伝子が実際欠失しておらず、むしろ染色体逆位により破壊され (Broadway et al. (2014) *J. Biotechnol.* 192:177-178)、遺伝子全体は、挿入配列により隣接された、VNP20009 染色体の二つの部分内になお含まれる (その一方はアクティブなトランスポザーゼを有する)。染色体再係合の手段により破壊された p*urI* 遺伝子の完全な遺伝的配列の存在は、野生型遺伝子への復帰の可能性を残す。Y S 1 6 4 6 のプリン栄養要求性がインビトロで > 140 連続継代後安定であったことが先に示されたが、復帰率は未知であった (Clairmont et al. (2000) *J. Infect. Dis.* 181:1996-2002)。

40

## 【0612】

アデノシンと共に提供されたとき、Y S 1 6 4 6 は最小培地で複製でき、一方、野生型親株、ATCC #14028 は、アデノシンを添加していない最小培地で増殖できることがここ

50

で示された。Y S 1 6 4 6 を一夜溶原性ブロス(L B)培地で増殖し、M 9 最小培地で洗浄し、アデノシンを含まないまたは漸増濃度のアデノシンを含むM 9 最小培地で希釈した。増殖SpectraMax(登録商標)M3分光光度計(Molecular Devices)を使用して、3 7 で測定し、1 5 分毎にO D 6 0 0 を読んだ。

#### 【0 6 1 3】

結果は、全濃度のアデノシンで増殖できた野生型株(ATCC #14028)と異なり、Y S 1 6 4 6 株がアデノシンが1 1 ~ 3 0 0 マイクロモル濃度範囲の濃度で提供されたときのみ複製できるが、M 9 単独または1 3 0 ナノモル濃度アデノシン添加M 9 で完全に複製不可能であったことを示す。これらのデータは、p u r I 変異体が腫瘍微小環境で見られるアデノシン濃度で複製できるが、正常組織で見られる濃度ではできないことを示す。ここに例示する操作したアデノシン栄養要求性株の野生型への復帰を防止するために、染色体からp u r I オープンリーディングフレームの全てまたは一部が欠失した株を含む。このような遺伝子欠失は、下記ラムダ・レッド系を含む、当業者に知られる方法の何れかにより達成され得る。

10

#### 【0 6 1 4】

サルモネラ株Y S 1 6 4 6 はA T P に対して栄養要求性である

プリンおよびアデノシン栄養要求性に加えて、p u r I 欠失株がA T P も除去できるか否かが決定された。A T P は、瀕死の腫瘍細胞からの漏出により、腫瘍微小環境に高レベルで蓄積される。A T P を提供したとき、株Y S 1 6 4 6 は最小培地で複製できるが、A T P を添加しないとき増殖できないことがここで示された。これを証明するために、株Y S 1 6 4 6 を一夜L B 培地で増殖し、M 9 最小培地で洗浄し、A T P を含まないまたは漸増濃度のA T P を含むM 9 最小培地で希釈した(Fisher)。増殖SpectraMax(登録商標)M 3 分光光度計(Molecular Devices)を使用して、3 7 で測定し、1 5 分毎にO D 6 0 0 を読んだ。結果は、株Y S 1 6 4 6 はA T P が0.0 1 2 ミリモル濃度の濃度で存在するときまたはM 9 単独で複製できることを示した。

20

#### 【0 6 1 5】

##### 実施例 2

細胞内複製における欠損はm s b B 変異に帰する

Y S 1 6 4 6 株は、複製を高濃度のプリン、アデノシンまたはA T P を含む部位に制限するp u r I およびT L R 4 介在炎症促進性シグナル伝達低減のためにリポ多糖(L P S)表面コートを変えるm s b B に変異を含む。野生型サルモネラと異なり、株Y S 1 6 4 6 はマクロファージで複製できないことも確立された。これら遺伝的変異が野生型株、A T C C 1 4 0 2 8 内にこの表現型を与えることを担うかを決定する実験を実施した。

30

#### 【0 6 1 6】

このアッセイで、マウスR A W マクロファージ細胞(InvivoGen, San Diego, Ca.)を、3 0 分間、細胞あたり約5 細菌の感染効率(M O I)でp u r I、m s b B または両者に欠失を含む野生型サルモネラ株を感染させ、次いで、細胞をP B S で洗浄し、ゲンタマイシン含有培地を、細胞外細菌を死滅させるために加えた。細胞内細菌は、細胞膜を通過できないためゲンタマイシンにより死滅しない。感染後種々の時点で、細胞単層を水との浸透圧ショックにより溶解し、細胞可溶化物を希釈し、生存コロニー形成単位(CFU)を数え上げるためにL B 寒天に播種した。

40

#### 【0 6 1 7】

下表に示すとおり、p u r I 変異のみを含む野生型サルモネラ株は、なお複製できた。これは、p u r I 欠失単独で、腫瘍微小環境への高度の特異性を達成しながら、忍容性の中程度の改善しか観察されないかを説明する。m s b B - 変異のみを含む株ならびにp u r I - およびm s b B - 変異を含む株は複製できず、4 8 時間以内に迅速に細胞から排除された。

【表 1 4】

| 時間  | CFU/ウェル             |        |                           |       |                     |       |
|-----|---------------------|--------|---------------------------|-------|---------------------|-------|
|     | ATCC 14028<br>ΔpurI |        | ATCC 14028<br>ΔpurI/ΔmsbB |       | ATCC 14028<br>ΔmsbB |       |
| 1   | 104000              | 108000 | 68000                     | 68000 | 88000               | 40000 |
| 2.5 | 5600                | 6000   | 760                       | 960   | 3200                | 3200  |
| 5   | 5600                | 4000   | 1120                      | 880   | 800                 | 680   |
| 27  | 11200               | 5600   | 4                         | 4     | 20                  | 4     |

10

## 【0618】

## 実施例 3

サルモネラ *asd* 遺伝子ノックアウト株操作および特徴づけ

株 Y S 1 6 4 6 *asd* を調製した。 *asd* 遺伝子を欠失するように操作されている、株 Y S 1 6 4 6 (ATCC, Catalog # 202165 で購入可能) 由来の弱毒化ネズミチフス菌株である。この実施例では、ネズミチフス菌株 Y S 1 6 4 6 *asd* を、下記 Datsenko and Wanner (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645 (2000)) の方法の変法を使用して操作した。

## 【0619】

ラムダ・レッドヘルパープラスミドの株 Y S 1 6 4 6 への導入

Y S 1 6 4 6 株は、先に記載 (Sambrook J. (1998) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory) のとおり、LB で培養物を増殖させ、100 倍濃縮し、次いで氷冷 10% グリセロールで 3 回洗浄して、エレクトロコンピテントとして調製した。エレクトロコンピテント株を、下記設定で 0.2 cm ギャップキュベットを使用して、ラムダ・レッドヘルパープラスミド p K D 4 6 (配列番号 2 1 8) に電気穿孔した：2.5 kV、186 オーム、50 μF。p K D 4 6 担持形質転換体を、アンピシリンおよび 1 mM L - アラビノース含有 5 mL SOC 培地で 30 で増殖させ、アンピシリン含有 LB 寒天プレートで選択した。ラムダ・レッドヘルパープラスミド p K D 4 6 を含む Y S 1 6 4 6 クローンを、次いで、株 Y S 1 6 4 6 について上記のとおりエレクトロコンピテントとした。

20

30

## 【0620】

*asd* 遺伝子ノックアウトカセットの構築

株 Y S 1 6 4 6 のゲノムからの *asd* 遺伝子 (Broadway et al. (2014) J. Biotechnology 192:177-178) を、*asd* 遺伝子ノックアウトカセットの設計に使用した。それぞれ *asd* 遺伝子の左手側および右手側領域と相同性の 204 bp および 203 bp を含むプラスミドを、DH5 - アルファコンピテント細胞に形質転換した (Thermo Fisher Scientific)。lox P 部位が隣接するカナマイシン遺伝子カセットを、このプラスミドにクローン化した。次いで、*asd* 遺伝子ノックアウトカセットを PCR プライマー *asd* - 1 および *asd* - 2 (表 1) を使用して増幅し、ゲル精製した。

40

## 【0621】

*asd* 遺伝子欠失

プラスミド p K D 4 6 を担持する Y S 1 6 4 6 株を、ゲル精製線形 *asd* 遺伝子ノックアウトカセットで電気穿孔した。電気穿孔細胞を SOC 培地に回収し、カナマイシン (20 μg/mL) およびジアミノピメリン酸 (DAP、50 μg/mL) 添加 LB 寒天プレートに播種した。この工程中、ラムダ・レッドリコンビナーゼは、染色体 *asd* 遺伝子と *kan* カセットの相同組み換えを誘導し (染色体 *asd* 遺伝子上流および下流の相同隣接配列の存在による)、*asd* 遺伝子の染色体コピーのノックアウトが生じた。選択したカナマイシン耐性クローンにおける破壊された *asd* 遺伝子の存在を、破壊部位に隣接する Y S 1 6 4 6 ゲノム (プライマー *asd* - 3) および多クローニング部位 (プライマー *scFv* - 3)

50

からのプライマーを用い、PCR増幅により確認した(表1)。コロニーは、DAP栄養要求性を示す補助的DAPを添加し、してないLBプレートにレプリカ播種した。Asd遺伝子が欠失した全クローンは補助的DAP非存在下で増殖できず、DAP栄養要求性を示した。

【0622】

【表15】

表1. プライマー情報

| プライマー名称 | プライマー配列                                   | 配列番号 |
|---------|---|------|
| asd-1   | ccttctaagcgaattccctg                      | 219  |
| asd-2   | ccaatgctctgcttaactctg                     | 220  |
| asd-3   | gcctcgccatgtttcagtagc                     | 221  |
| asd-4   | ggtctggtgcattccgagtac                     | 222  |
| scFv-3  | cataatctgggtccttggctctgc                  | 223  |
| APR-001 | AAAAAAGCTTGCAGCTCTGGCCCGTG                | 226  |
| APR-002 | AAAAAAGCTTTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAA<br>TGA | 227  |
| APR-003 | ACACTAGAAGgACAGTATTTGGTATCTG              | 228  |
| APR-004 | AGCCGTAGTTAGGCCACC                        | 229  |
| flie-1  | CGTTATCGGCAATCTGGAGGC                     | 232  |
| flie-2  | CCAGCCCTTACAACAGTGGTC                     | 233  |
| flie-3  | GTCTGTCAACAACCTGGTCTAACGG                 | 234  |
| flie-4  | AGACGGTCCCTCATCCAGATAAGG                  | 235  |
| fljb-1  | TTCCAGACGACAAGAGTATCGC                    | 236  |
| fljb-2  | CCTTTAGGTTTATCCGAAGCCAGAATC               | 237  |
| fljb-3  | CACCAGGTTTTTCACGCTGC                      | 238  |
| fljb-4  | ACACGCATTTACGCCTGTCTG                     | 239  |
| pagp-1  | gcgtgacggttctgagtgt                       | 321  |
| pagp-2  | cgtctttgctgcatcttccg                      | 322  |
| pagp-3  | acaataacgacgactccgataagg                  | 323  |
| pagp-4  | ctgctgaatgtgctgattaacctg                  | 324  |
| ansb-1  | accttagaagatagccgcaaagc                   | 372  |
| ansb-2  | cagagacatgacacccacgattatc                 | 373  |
| ansb-3  | gcaaaccgctatccagaacga                     | 374  |
| ansb-4  | agtttaagtatgccgtggtactgc                  | 375  |
| csgd-1  | cacttgctttaagattgtaattgtag                | 317  |
| csgd-2  | ggtgtattcgctttccattgtc                    | 318  |
| csgd-3  | tgtgctgtccaggtaatgcc                      | 319  |
| csgd-4  | gacgacggttttctgaagtctc                    | 320  |

10

20

30

40

【0623】

カナマイシン遺伝子カセット除去

kan選択可能マーカーを、Cre/loxP部位特異的組み換え系の使用により除去した。YS1646 asd遺伝子Kan<sup>R</sup>変異体を、creリコンビナーゼ(配列番号224)を発現する温度感受性プラスミドであるpJW168で形質転換した。Amp<sup>R</sup>コロニーを30で選択した；pJW168を、42での増殖によりその後除去した。選択クローンを、カナマイシン添加および非添加LB寒天プレートへのレプリカ播種により、kan喪失について試験し、破壊部位に隣接するYS1646ゲノムからのプライマー

50

を使用するPCR検証により確認した(プライマー a s d - 3 および a s d - 4、プライマー配列について、表 1 参照)。

【0624】

機能的 a s d 欠失変異株 Y S 1 6 4 6 a s d (A S T - 1 0 1 と同称する)の確認  
a s d 変異体は 37 で L B 寒天プレートで増殖できなかったが、50 μg/mL ジアミノピメリン酸(DAP)含有 L B プレートで増殖できた。a s d 変異体増殖速度を L B 液体培地で評価した; 600 nM の吸光度の測定により決定して、液体 L B で増殖できなかったが、50 μg/mL DAP 添加 L B で増殖できた。

【0625】

a s d 遺伝子欠失後の株 Y S 1 6 4 6 a s d における a s d 座位配列の配列確認 10  
a s d 遺伝子欠失株を、プライマー a s d - 3 および a s d - 4 を使用する DNA 配列決定により決定した。a s d 座位に隣接する領域の配列決定を実施し、配列は、a s d 遺伝子が Y S 1 6 4 6 染色体から欠失したことを確認した。

【0626】

プラスミドからの a s d 発現による a s d 欠失の補完  
プラスミド(pATI U6)を化学的に合成し、組み立てた(配列番号 225)。プラスミドは次の特性を含んだ: 高コピー(pUC 19)複製起点、短ヘアピンの発現を駆動する U6 プロモーター、その後の除去のための H i n d III 制限部位に隣接されたアンピシリン耐性遺伝子および開始コドンの上流 85 塩基対配列を含む a s d 遺伝子(配列番号 246)。このベクターに、マウス T R E X 1 を標的とする s h R N A を S p e I および X h o I での制限消化およびライゲーションにより導入し、大腸菌 D H 5 - アルファ細胞にクローニングした。得られたプラスミドを p A T I - s h T R E X 1 と名付けた。 20

【0627】

免疫刺激性細菌株へのプラスミドのエレクトロポレーション  
免疫刺激性タンパク質および機能的 a s d 遺伝子をコードする発現カセットを含む選択プラスミドを、下記設定で 0.2 cm ギャップキュベット(BTX, San Diego, Calif.)を使用する B T X 6 0 0 エレクトロポレーターで、a s d 遺伝子を欠くネズミチフス菌株に電気穿孔した: 2.5 kV、186 オーム、50 μF。電気穿孔細胞を 50 μM ジアミノピメリン酸(DAP)を添加した 1 mL S O C に加え、1 時間、37 でインキュベートし、次いで D A P を含まない寒天プレートに広げ、機能的 a s d 遺伝子を有するプラスミドを受けた株を選択した。単一コロニー単離後、細胞バンクを、無菌溶原性ブロス(LB)のフラスコにネズミチフス菌の単一の十分に単離されたコロニーを接種し、250 RPM で撹拌しながら 37 でインキュベートして、産生した。培養物が静止期まで増殖したら、細菌を 10% グリセロール含有 P B S で洗浄し、-60 未満の温度で小分けして凍結して保存した。 30

【0628】

プラスミド p A T I - s h T R E X 1 を大腸菌で増殖させ、エレクトロポレーションおよび L B a m p プレートでのクローン選択により Y S 1 6 4 6 a s d 株に形質転換するために精製し、株 Y S 1 6 4 6 a s d - s h T R E X 1 を産生した。p A T I U 6 由来プラスミドで補完させた Y S 1 6 4 6 a s d 変異体は、D A P 非存在下、L B 寒天および液体培地で増殖できた。 40

【0629】

その後のイテレーションで、p A T I - s h T R E X 1 からのアンピシリン耐性遺伝子(AmpR)を、カナマイシン耐性遺伝子に置き換えた。これは、H i n d III での p A T I - s h T R E X 1 プラスミド消化と続く A m p R 遺伝子除去のためのゲル精製により達成された。カナマイシン耐性(KanR)遺伝子を、プライマー A P R - 0 0 1 および A P R - 0 0 2 (それぞれ配列番号 226 および配列番号 227)を使用する PCR で増幅させ、続いて H i n d III で消化させ、ゲル精製、消化 p A T I U 6 プラスミドにライゲーションした。

【0630】

その後のイテレーションで、単一点変異を、Q5(登録商標)部位特異的変異導入キット(New England Biolabs)およびプライマーA PR-003(配列番号228)およびA PR-004(配列番号229)を使用してpUC19複製起点でpATIKanプラスミドに導入し、148位のヌクレオチドTをCに変えた。この変異により、複製起点が、プラスミドコピー数を減らすために、低コピー複製起点であるpBR322複製起点と相同となった。

#### 【0631】

a s d 補完系を使用するインビボで示されたプラスミド維持

この例では、CT26腫瘍担持マウスを、T R E X 1を標的とするs h R N Aを発現するプラスミドを含む株Y S 1 6 4 6 (Y S 1 6 4 6 - s h T R E X 1)または機能的a s d 遺伝子およびT R E X 1を標的とするs h R N Aを含むプラスミドを含むY S 1 6 4 6 のa s d 欠失株(Y S 1 6 4 6 a s d - s h T R E X 1)で処理した。

10

#### 【0632】

CT26(結腸腫瘍#26)は、高悪性度、未分化およびチェックポイント難治性ヒト結腸直腸癌腫を再現する高度に転移性の癌腫をもたらす、BALB/cマウスのN-ニトロ-N-メチルウレタン(NMU)への暴露に由来する腫瘍モデルである(Castle et al. (2014) BMC Genomics 15(1):190)。結腸の同所性と逆の脇腹の皮下に移植したとき、腫瘍免疫表現型は、はるかにより免疫抑制性かつチェックポイント難治性である。T細胞浸潤を大部分欠くが、腫瘍はマクロファージなどの骨髄細胞および骨髄由来サプレッサー細胞(MDSC)に富む(Zhao et al. (2017) Oncotarget 8(33):54775-54787)。このモデルがヒトマイクロサテライト安定(MSS)結腸直腸癌をより模倣するため、ここに提供される治療アプローチを評価する理想的モデルである。

20

#### 【0633】

この実験のために、6~8週齢雌BALB/cマウス(3マウス/群)の右脇腹に、CT26(ATCCから購入)腫瘍細胞(100 $\mu$ L PBS中 $2 \times 10^5$ 細胞)を皮下(SC)接種した。8日齢の確立された脇腹腫瘍を担持するマウスに、8日、15日および23日に $5 \times 10^6$  CFUのY S 1 6 4 6 a s d - s h T R E X 1株または親株Y S 1 6 4 6 の3用量をIV注射した。プラスミドは、治療産物の例としてs h T R E X 1をコードする；あらゆる1以上の治療産物または産物に置き換え得る。

#### 【0634】

体重および腫瘍を週2回測定した。腫瘍測定を、電子ノギス(Fowler, Newton, MA)を使用して実施した。腫瘍体積を、修飾楕円体式、 $1/2$ (長さ $\times$ 幅 $^2$ )を使用して、計算した。マウスを、IACUC規制に従い、腫瘍サイズが体重の $> 20\%$ に達したときまたは壊死性となったとき、殺した。

30

#### 【0635】

最終サルモネラ注射12日後、腫瘍を均質化し、ホモジネートを連続希釈し、存在するコロニー形成単位(CFU)の総数を数え上げるためにLB寒天プレートにまたはカナマイシン耐性コロニーを数え上げるためにカナマイシン含有LBプレートに播種した。

#### 【0636】

結果は、ネズミチフス菌Y S 1 6 4 6 - s h T R E X 1は、s h R N Aプラスミドを維持するための選択圧を有さず、パーセントカナマイシン耐性(KanR)コロニーが10%未満であったため、顕著なプラスミドを示すことを示した。プラスミド維持のためにa s d 遺伝子補完系を使用した株、Y S 1 6 4 6 a s d - s h T R E X 1のカナマイシン耐性およびカナマイシン感受性CFUはほぼ同数であった。これらのデータは、a s d 遺伝子補完系がマウスにおける腫瘍微小環境の状況でのプラスミドの維持に十分であることを示す。

40

#### 【0637】

a s d 補完系を使用する抗腫瘍有効性の増強

a s d 補完系を、インビボでプラスミド喪失を防止し、ネズミチフス菌株による治療産物送達の抗腫瘍有効性を増強するよう設計する。これを試験するために、S h T R E X 1 プ

50



ラスミドを含む Y S 1 6 4 6 a s d 株 ( Y S 1 6 4 6 a s d - s h T R E X 1 ) または機能的 a s d 遺伝子カセットを含むスクランブル対照 ( Y S 1 6 4 6 a s d - s h S C R ) を、マウス結腸癌モデルで抗腫瘍有効性を、a s d 遺伝子カセットを欠き、それ故にラスミド維持の機構を有しないラスミド p E Q U 6 - s h T R E X 1 を含む株 Y S 1 6 4 6 ( Y S 1 6 4 6 - s h T R E X 1 ) と比較した。s h T R E X 1 は、治療産物の例である。

#### 【 0 6 3 8 】

この実験のために、6 ~ 8 週齢雌 B A L B / c マウス ( 8 マウス / 群 ) に、C T 2 6 細胞 ( 1 0 0 μ L P B S 中 2 × 1 0 <sup>5</sup> 細胞 ) を右脇腹に S C 接種した。確立された脇腹腫瘍を担持するマウスに、5 × 1 0 <sup>6</sup> CFU の Y S 1 6 4 6 a s d - s h T R E X 1 または Y S 1 6 4 6 - s h T R E X 1 を 8 日 および 1 8 日 に 2 回 I V 注射し、P B S 対照と比較した。

10

#### 【 0 6 3 9 】

Y S 1 6 4 6 - s h T R E X 1 株 d は、経時的ラスミド喪失が示されたにも関わらず、P B S と比較して腫瘍制御の増強を示した ( 7 0 % 腫瘍増殖阻害 ( T G I ) 、 2 8 日目 ) 。 A s d 遺伝子補完系および s h T R E X 1 を有するラスミドを含む a s d 株 ( Y S 1 6 4 6 a s d - s h T R E X 1 ) は、P B S と比較して優れた腫瘍増殖阻害を示した ( 8 2 % T G I 、 p = 0 . 0 0 2 、 2 5 日目 ) 。これらのデータは、a s d 遺伝子補完系がないラスミドを含む Y S 1 6 4 6 と比較して、a s d 補完系および s h T R E X 1 送達を使用してラスミド喪失を防止することにより効力の改善が達成されることを示す。それ故に、a s d 補完系を有する株は、優れた抗癌治療である。

20

#### 【 0 6 4 0 】

##### 実施例 4

C p G 要素を含むラスミドを有する修飾ネズミチフス菌株は、Y S 1 6 4 6 親株と比較して抗腫瘍活性の増強を示す

トール様受容体 ( T L R ) は、病原体関連分子パターン ( P A M P ) を感知し、病原体に対する自然免疫を活性化する重要な受容体である ( Akira et al. ( 2001 ) Nat. Immunol. 2 ( 8 ) : 675-680 ) 。これらの中で、T L R 9 は、哺乳動物 D N A で天然に生じない病原性 D N A における低メチル化 C p G モチーフの認識を担う ( McKelvey et al. ( 2011 ) J. Autoimmunity 36 : 76 ) 。免疫細胞サブセットにおけるエンドソームへの病原体の食作用による C p G モチーフの認識が I F R 7 依存性 I 型インターフェロンシグナル伝達を誘導し、自然免疫および適応免疫を活性化させる。修飾ネズミチフス菌ラスミド C p G を含むモチーフを担持するネズミチフス菌株 Y S 1 6 4 6 ( Y S 1 6 4 6 p E Q U 6 スクランブル ) が、ラスミドがない Y S 1 6 4 6 株と比較して、同様に T L R 9 を活性化し、I 型 I F N 介在自然免疫および適応免疫を誘導することがここで判明した。

30

#### 【 0 6 4 1 】

ここで使用した操作したラスミドにおける C p G モチーフを表 2 に示す。株 A S T - 1 0 3 における p E Q U 6 s h S C R ( 非同族 s h R N A ) プラスミドは 3 6 2 個の C p G モチーフを有し、サルモネラベースのラスミド送達が免疫刺激であり、このラスミドで形質転換していない同じサルモネラと比較したとき、抗腫瘍効果を有することができることを示す。マウス結腸癌モデルにおける腫瘍増殖阻害を誘導する Y S 1 6 4 6 内の C p G 含有ラスミドの能力を評価するために、6 ~ 8 週齢雌 B A L B / c マウス ( 9 マウス / 群 ) に、C T 2 6 細胞 ( 1 0 0 μ L P B S 中 2 × 1 0 <sup>5</sup> 細胞 ) を右脇腹に S C 接種した。確立された脇腹腫瘍を担持するマウスに、5 × 1 0 <sup>6</sup> CFU の Y S 1 6 4 6 ( A S T - 1 0 0 ) または C p G モチーフを有する s h R N A スクランブルプラスミドを含む Y S 1 6 4 6 ( A S T - 1 0 3 ) を毎週 3 回 I V 注し、P B S 対照と比較した。

40

## 【表 16】

表 2. 操作したプラスミドにおける CpGモチーフ

| 配列名称      | 多数の CpGモチーフ | 配列番号 |
|-----------|-------------|------|
| pBR322起源  | 80          | 243  |
| (shSCR)   | 362         | 244  |
| asd遺伝子ORF | 234         | 242  |
| pATI-2.0  | 538         | 245  |

10

## 【0642】

YS1646 (AST-100)株は、PBSと比較して、中程度の腫瘍制御(32% TGI、 $p = ns$ 、28日目)を示した。非同族スクランブル shRNA をコードする CpG 含有プラスミドの付加のみ YS1646 と異なる AST-103 株は、非形質転換であり、それ故にプラスミドを欠く YS1646 単独と比較して、高度に有意な腫瘍増殖阻害を示した( $p = 0.004$ 、32日目)。

## 【0643】

asd 遺伝子は 234 個の CpG モチーフを有し(表 2 参照)、それを含むプラスミドが免疫刺激性質を有し得ることを示す。AST-109 (スクランブル shRNA を有する YS1646 - ASD)は、PBS 単独と比較して 51% 腫瘍増殖阻害を有し、強い免疫刺激効果を示す。

20

## 【0644】

これらのデータは、ネズミチフス菌の腫瘍を標的とする弱毒化株内の TLR9 活性化 CpG モチーフを含むプラスミド DNA の強力な免疫刺激性質を示す。

## 【0645】

実施例 5

ベクター合成

プラスミドからの asd 発現による asd 欠失の補完

プラスミド(pATIU6)を化学的に合成し、組み立てた(配列番号 225)。プラスミドは、次の特性を含む：高コピー(pUC19)複製起点、短ヘアピンの発現を駆動する U6 プロモーター、その後の除去のための HindIII 制限部位に隣接されたアンピシリン耐性遺伝子および開始コドンの上流 85 塩基対配列を含む asd 遺伝子(配列番号 246)。このベクターに、マウス TREX1 を標的とする shRNA またはスクランブル、非同族 shRNA 配列を SpeI および XhoI での制限消化およびライゲーションにより導入し、大腸菌 DH5 - アルファにクローニングした。それぞれ pATI-shTREX1 および pATI-shSCR と名付けた得られたプラスミドを大腸菌で増幅し、エレクトロポレーションによる asd ノックアウト株 AST-101 への形質転換および LB amp プレートでのクローン選択のために精製して、それぞれ株 AST-108 および AST-107 を産生した。あるいは、ここに記載するサイトゾル DNA/RNA センサーの機能獲得型バリエーションを含む他の治療産物をコードする他の核酸分子をこのベクターに導入する。pATIU6 由来プラスミドで補完した asd - 変異体は、DAP 非存在下、LB 寒天および液体培地で増殖できた。

30

40

## 【0646】

その後のイテレーションで、pATI-shTREX1 からのアンピシリン耐性遺伝子(AmpR)を、カナマイシン耐性遺伝子に置き換えた。これは、HindIII で pATI-shTREX1 プラスミドを消化し、続いて AmpR 遺伝子を除去するためにゲル精製し、プライマー APR-001 および APR-002 (それぞれ配列番号 226 および配列番号 227)を使用してカナマイシン耐性(KanR)遺伝子を PCR 増幅し、HindIII で消化させ、ゲル精製、消化 pATIU6 プラスミドにライゲーションすることにより達

50

成した。

【0647】

その後のイテレーションで、単一点変異を、Q5(登録商標)部位特異的変異導入キット(New England Biolabs)およびプライマーAPR-003(配列番号228)およびAPR-004(配列番号229)を使用してpUC19複製起点でpATIKanプラスミドに導入して148位のヌクレオチドTをCに変えた。この変異により、複製起点が、プラスミドコピー数を減らすために、低コピー複製起点であるpBR322複製起点と相同となった。

【表17】

| プライマーID | 説明              | 配列                                    | 配列番号 |
|---------|-----------------|---------------------------------------|------|
| APR-001 | KanプライマーF       | AAAAAAGCTTGCAGCTCTGGCCCGTG            | 226  |
| APR-002 | KanプライマーR       | AAAAAAGCTTTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGA | 227  |
| APR-003 | pATI ori T148CF | ACACTAGAAGgACAGTATTTGGTATCTG          | 228  |
| APR-004 | pATI ori T148CR | AGCCGTAGTTAGGCCACC                    | 229  |

10

20

【0648】

pATI2.0

次の特性を含むプラスミドを設計し、合成した：pBR322複製起点、SV40 DNA核ターゲティング配列(DTS)、rrnBターミネーター、プロモーターおよびshRNAまたはマイクロRNAをクローニングするための隣接制限部位が続くshRNAの発現を駆動するためのU6プロモーター、asd遺伝子、rrnGターミネーター、除去のためのHindIII部位が隣接するカナマイシン耐性遺伝子および多クローニング部位(配列番号247)。さらに、2つの別々のshRNAまたはマイクロRNAの発現のためのプラスミドを設計し、合成した。このプラスミドは、次の特性を含む：pBR322複製起点、SV40 DNA核ターゲティング配列(DTS)、rrnBターミネーター、プロモーターおよびshRNAまたはマイクロRNAをクローニングするための隣接制限部位が続くshRNAの発現を駆動するためのU6プロモーター、第二のshRNAまたはマイクロRNAの発現を駆動するためのH1プロモーター、H1とU6プロモーター間に配置された450bpの無作為に産生されたスタッパー配列、asd遺伝子、rrnGターミネーター、除去のためのHindIII部位が隣接するカナマイシン耐性遺伝子および多クローニング部位(配列番号245)。

30

【0649】

実施例6

fliCおよびfliB遺伝子の欠失によるネズミチフス菌フラジェリンノックアウト株操作および特徴づけ

40

この例では、asd遺伝子欠失を含む生存弱毒化ネズミチフス菌YS1646株を、両フラジェリンサブユニットを除去するために、fliCおよびfliB遺伝子を欠失するようさらに操作した。これは、炎症促進性シグナル伝達を低減し、抗腫瘍適応免疫を改善するために、炎症促進性TLR5活性化を排除する。

【0650】

fliC遺伝子の欠失

この例では、fliC遺伝子を、上に詳述したDatsenko and Wanner(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645 (2000))の方法の変法を使用して、YS1646asd株の染色体から欠失させた。簡潔には、fliC遺伝子に隣接する相同配列の22

50

4塩基および245塩基を含んだ合成flic遺伝子相同性アーム配列を、pSL0147(配列番号230)と称するプラスミドにクローン化した。次いで、cre/loxP部位が隣接するカナマイシン遺伝子カセットをpSL0147にクローン化し、flic遺伝子ノックアウトカセットを次いでプライマーflic-1(配列番号232)およびflic-2(配列番号233)でPCR増幅し、ゲル精製し、次いでエレクトロポレーションにより温度感受性ラムダ・レッド組み換えプラスミドpKD46を担持するYS1646asd株に導入した。電気穿孔細胞をSOC+DAP培地およびカナマイシン(20μg/mL)に回収し、ジアミノピメリン酸(DAP、50μg/mL)添加LB寒天プレートに播種した。コロニーを、プライマーflic-3(配列番号234)およびflic-4(配列番号235)を使用するPCRにより、ノックアウトフラグメントの挿入のために選

10  
 択し、スクリーニングした。次いで、選択したカナマイシン耐性株を42で培養することによりpKD46を除去し、アンピシリン耐性の喪失についてスクリーニングした。次いで、カナマイシン耐性マーカーをCreリコンビナーゼを発現する温度感受性プラスミド(pJW168)のエレクトロポレーションにより除去し、Amp<sup>R</sup>コロニーを30で選択した；pJW168を、42で増殖培養することにより、その後除去した。次いで、選択flicノックアウトクローンを、破壊の部位(flic-3およびflic-4)に隣接するプライマーを使用するPCRおよびアガロースゲル上での電気泳動移動度の評価により、カナマイシンマーカーの喪失について試験した。

#### 【0651】

fliJB遺伝子の欠失

次いで、fliJBを上記方法の変法を使用して、YS1646asd/flic株で欠失させた。fliJB遺伝子に隣接する、それぞれ、左手側および右手側配列の249塩基および213塩基を含む合成fliJB遺伝子相同性アーム配列を合成し、pSL0148(配列番号231)と称するプラスミドにクローン化した。次いで、cre/loxP部位が隣接するカナマイシン遺伝子カセットをpSL0148にクローン化し、fliJB遺伝子ノックアウトカセットをプライマーflijb-1(配列番号236)およびflijb-2(配列番号237)(表1参照)でPCR増幅し、ゲル精製し、エレクトロポレーションにより温度感受性ラムダ・レッド組み換えプラスミドpKD46を担持する株YS1646asdに導入した。次いで、カナマイシン耐性遺伝子を上記のとおりcre介在組み換えにより除去し、温度感受性プラスミドを、非許容温度での増殖により除去した。flicおよびfliJB遺伝子ノックアウト配列を、それぞれプライマーflic-3およびflic-4またはflijb-3(配列番号238)およびflijb-4(配列番号239)を使用するPCRにより増幅し、DNA配列決定により確認した。YS1646のこの変異誘導体をYS1646asd/flic/fliJBまたは略してYS1646asd/FLGと名付けた。

20  
 30

#### 【0652】

操作したネズミチフス菌フラジェリンノックアウト株のインビトロ特徴づけ

ここでYS1646asd/FLGと称するflicおよびfliJB両者の欠失を有するYS1646由来asd-変異株を、水泳プレート(LB含有0.3%寒天および50mg/mL DAP)に10マイクロリットルの一夜培養物をスポットすることにより、水泳運動性を評価した。YS1646asd株で運動性は観察されたが、YS1646asd/FLG株で運動性は明らかではなかった。次いで、YS1646asd/FLG株をasd遺伝子を含むプラスミドで電気穿孔し、DAP非存在下でのその増殖速度を評価した。asd補完プラスミドを有するYS1646asd/FLG株は、補助的DAPの非存在下でLBで複製でき、asd補完プラスミドを含むYS1646asd株と同等の速度で増殖した。これらのデータは、フラジェリンの除去がインビトロでのネズミチフス菌の適応度を減少させないことを示す。

40

#### 【0653】

鞭毛の排除は、マウスマクロファージにおけるパイロトシスを低減させる

5×10<sup>5</sup>マウスRAWマクロファージ細胞(InvivoGen, San Diego, Ca.)を、ゲン

50

タマイシン防御アッセイにおいて、約100のMOIで何れもasd補完プラスミドを含むYS1646asd/FLG株または親YS1646asd株で感染させた。感染24時間後、培養上清を集め、Pierce™ LDH細胞毒性アッセイキット(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma.)を使用して、細胞死マーカーとして乳酸デヒドロゲナーゼ放出をアッセイした。YS1646asd株は、75%最大LDH放出を誘導し、一方YS1646asd/FLG株は54%最大LDHを誘導し、感染マクロファージのネズミチフス菌誘導パイロトーシスが低減されることを示した。

#### 【0654】

鞭毛欠失変異体は、感染ヒト単球における低パイロトーシスをもたらすYS1646asd/FLG株がマクロファージで細胞死を引き起こす能力が低減していることを示すために、THP-1ヒトマクロファージ細胞(ATCC Catalog # 202165)を、プラスミド維持を確実にするために、機能的asd遺伝子をコードするプラスミドを含むasd株と共にネズミチフス菌株YS1646およびYS1646asd/FLGで感染させた。5×10<sup>4</sup>細胞を、DMEMおよび10%FBSと96ウェル皿に入れた。細胞を、細胞あたり100CFUのMOIで、1時間、洗浄したネズミチフス菌の対数期培養物で感染させ、次いで、細胞をPBSで洗浄し、培地細胞外細菌を死滅させるために50μg/mLゲンタマイシンおよび単球をマクロファージ表現型に変換するための50ng/mLのIFNを含む培地に置き換えた。24時間後、THP-1細胞をCellTiter-Glo(登録商標)試薬(Promega)で染色し、生存可能細胞のパーセンテージを、発光を定量するためのSpectraMax(登録商標)プレートリーダーを使用する発光細胞生存能アッセイを使用して決定した。YS1646株で感染させた細胞は38%生存能しか有さず、一方YS1646asd/FLG株で感染させた細胞は51%生存能を有し、フラジェリン遺伝子の欠失は、極めて高くかつ超生理学的であるMOIにも関わらず、ヒトマクロファージの細胞死をあまり誘導しないことを示した。

#### 【0655】

鞭毛は、全身投与後の腫瘍コロニー形成に必要な結腸癌のマウスモデルに投与されたフラジェリンノックアウト株の影響を評価するために、6~8週齢雌BALB/cマウス(5マウス/群)に、CT26細胞(100μL PBS中2×10<sup>5</sup>細胞)を右脇腹にSC接種した。10日の確立された脇腹腫瘍を担持するマウスに、3×10<sup>5</sup>CFUのYS1646asd/FLG-shTREX1株または親YS1646asd-shTREX1株を1回IV注射した。腫瘍植え込み35日後、マウスを殺し、腫瘍を均質化し、腫瘍組織グラム当たりコロニー形成単位(CFU)数を数え上げるため、LBプレートに播種した。YS1646asd-shTREX1株は、腫瘍組織グラムあたり平均5.9×10<sup>7</sup>CFUで腫瘍にコロニー形成し、一方鞭毛欠失YS1646asd/FLG-shTREX1株は、ほぼ2倍増加した平均1.1×10<sup>8</sup>CFU/腫瘍組織gで腫瘍にコロニー形成した。YS1646asd-shTREX1株の脾臓コロニー形成は、平均1.5×10<sup>3</sup>CFU/脾臓組織gと計算され、一方、鞭毛欠失YS1646asd/FLG-shTREX1株の脾臓コロニー形成はわずかに少なく、平均1.2×10<sup>3</sup>CFU/脾臓組織gであった。

#### 【0656】

これらのデータは、鞭毛の非存在がIV投与後の腫瘍コロニー形成に負の影響を有するだけでなく、鞭毛インタクトな株と比較して腫瘍コロニー形成を増強することを示す。重要なことに、鞭毛の欠失は脾臓コロニー形成をわずかに低減させ、腫瘍対脾臓比を100,000倍とする。これらのデータは、技術からの予想に反し、鞭毛が腫瘍コロニー形成に不要であるだけでなく、その除去が、脾臓コロニー形成を低減させながら腫瘍コロニー形成を増加させることも示す。

#### 【0657】

鞭毛欠失株は、マウスで抗腫瘍活性増強を示す結腸癌のマウスモデルに投与されたフラジェリンノックアウト株の影響を評価するために、6~8週齢雌BALB/cマウス(5マウス/群)に、CT26細胞(100μL PBS

中  $2 \times 10^5$  細胞)を右脇腹にSC接種した。確立された脇腹腫瘍を担持するマウスに、 $3 \times 10^5$  CFUのYS1646 asd / FLG-shTREX1株またはYS1646 asd-shTREX1株を1回IV注射し、PBS対照と比較した。マウスを、腫瘍増殖のノギス測定によりモニターした。

【0658】

結果は、鞭毛を形成できないYS1646 asd / FLG-shTREX1株が親YS1646 asd-shTREX1株と比較して腫瘍制御の増強(27% TGI、24日目)、PBS対照と比較して有意な腫瘍制御(73% TGI、 $p = 0.04$ 、24日目)を示した。これらのデータは、鞭毛が腫瘍コロニー形成に不要であるだけでなく、その喪失が抗腫瘍有効性を増強できることを示す。

10

【0659】

鞭毛欠失株は、マウス腫瘍モデルにおける適応免疫増強を示す

鞭毛の欠失の免疫応答に対する影響およびshRNAのSTINGチェックポイント遺伝子TREX1への腫瘍骨髄細胞送達によるSTING活性化が適応I型IFN免疫シグネチャーを促進するか否かを評価した。結腸癌のCT26マウスモデルを使用し、6~8週齢雌BALB/cマウス(5マウス/群)に、CT26細胞( $100 \mu\text{L}$  PBS中 $2 \times 10^5$ 細胞)を右脇腹にSC接種した。確立された脇腹腫瘍を担持するマウスに、 $5 \times 10^6$  CFUのYS1646 asd / FLG-shTREX1株、親YS1646 asd-shTREX1またはスクランブルプラスミド対照株YS1646 asd-shSCRを、腫瘍植え込み11日後IV注射し、PBS対照と比較した。マウスは、投与7日後、ナトリウムヘパリン被覆チューブ(Beckton Dickinson)に採血した。次いで、非凝固血液を同じ体積のPBSで希釈し、末梢血単核細胞(PBMC)を、Lympholyte(登録商標)-M細胞分離試薬(Cedarlane)を使用して全血の相間層から分離した。単離PBMCを、1300RPMで3分間、室温での遠心分離によりPBS+2%FBSで洗浄し、流動緩衝液に再懸濁した。100万PBMCを、V底96ウェルプレートのウェルあたりに播種した。細胞を1300RPMで3分間、室温(RT)で遠心分離し、 $100 \mu\text{L}$ の蛍光色素コンジュゲートAH1ペプチド:MHCクラスI四量体(MBL International)および細胞表面フローサイトメトリー抗体CD4 FITCクローンRM4-5; CD8a BV421クローン53-6.7; F4/80 APCクローンBM8; CD11b PE-Cy7クローンM1/70; CD45 BV570クローン30-F11; CD3 PEクローン145-2C11; Ly6C BV785クローンHK1.4; I-A/I-E APC-Cy7クローンM5/114.15.2; Ly6G BV605クローン1A8; およびCD24 PercP-Cy5.5クローンM1/69(全てBioLegend)を含む流動緩衝液に、45分間、室温および暗所で再懸濁した。45分後、細胞を、1200RPMで3分間の遠心分離により、PBS+2%FBSで2回洗浄した。次いで、細胞をDAPI(死/生存染色)含有PBS+2%FBSに再懸濁し、データをNovoCyte(登録商標)フローサイトメーター(ACEA Biosciences, Inc.)を使用してすぐに得て、FlowJo™ソフトウェア(Tree Star, Inc.)を使用して分析した。

20

30

【0660】

次の細胞型を、総生存細胞のパーセンテージとして数えた: CD11b+Gr1+好中球(おそらくMDSであるが、エキスピボ機能的アッセイにおけるさらなる表現型決定が必要である)、CD11b+F4/80+マクロファージ、CD8+T細胞および、マウス白血病ウイルス(MuLV)関連細胞表面抗原のエンベロープ遺伝子の産物であるCT26腫瘍拒絶抗原gp70(AH1)を認識するCD8+T細胞(Castle et al. (2014) BMC Genomics 15(1):190)。

40

【0661】

下表に要約する結果は、非特異的スクランブルshRNAをコードするプラスミドを含むYS1646 asd-shSCR株がPBS( $p = 0.02$ )、鞭毛インタクトなYS1646 asd-shTREX1株( $p = 0.02$ )および、最低レベルの循環好中球を有した鞭毛欠失株YS1646 asd / FLG-shTREX1( $p = 0.01$ )と比較

50

して、好中球の有意な増加の典型的抗細菌免疫プロファイルを示した。同様に、細菌性に誘導されるマクロファージも、PBS (p = 0.01)、YS1646 *asd-shTREX1* 株 (p = 0.01) および YS1646 *asd/FLG-shTREX1* 株 (p = 0.01) と比較して、YS1646 *asd-shSCR* 株に応答して有意に増加した。それ故に、I型IFN誘導ペイロードを担持する両株は、好中球およびマクロファージを介して細菌感染を浄化し、適応T細胞介在免疫を誘導しない、正常抗細菌免疫応答を重ね書きできる。しかしながら、CD8<sup>+</sup>T細胞の全体的循環レベルは全群で類似したが、鞭毛欠失YS1646 *asd/FLG-shTREX1* 株は、PBSと比較して、AH1-四量体+CD8<sup>+</sup>T細胞のパーセンテージの有意な増加を示した (p = 0.04)。

【0662】

これらのデータは、ウイルス様I型IFN誘導プラスミドを腫瘍常在骨髄細胞に送達するよう細菌を操作する実現可能性を示す。これは、よりウイルス性であり、低細菌性である、免疫プロファイルに向けた、免疫応答の劇的再プログラム化をもたらした。鞭毛の欠失は、細菌性に動員された好中球およびマクロファージから、腫瘍抗原特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の有意な増加へのシフトをさらに増強させた。それ故に、細菌TLR5介在炎症の排除が、適応免疫を増強し得る。

【表18】

| 免疫細胞                                  | %生存細胞平均±SD |                             |                               |                                    |
|---------------------------------------|------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
|                                       | PBS        | YS1646Δ<br><i>asd-shSCR</i> | YS1646Δ<br><i>asd-shTREX1</i> | YS1646Δ<br><i>asd/ΔFLG-shTREX1</i> |
| 好中球                                   | 6.27±2.62  | 19.21±9.46                  | 5.87±3.94                     | 4.01±1.65                          |
| マクロファージ                               | 10.08±2.11 | 23.14±9.04                  | 9.12±3.84                     | 7.39±2.11                          |
| CD8 <sup>+</sup> T細胞                  | 6.64±0.56  | 7.17±0.60                   | 7.14±2.30                     | 6.44±1.43                          |
| AH1 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T細胞 | 0.83±0.12  | 1.06±1.11                   | 2.27±1.44                     | 4.12±3.08                          |

【0663】

鞭毛欠失株は、インピボで食細胞骨髄免疫細胞区画に制限される文献によると、*fljB/fliC* 株は、非食細胞へのSPI-1介在侵入に関連する多くの下流遺伝子の抑制を示す。YS1646 *asd/FLG* 株も非食細胞取り込みを欠損するか否かを決定するために、細菌*rpsM*プロモーター下で*mCherry*を構成的に発現するYS1646 *asd/FLG* 株を、MC38皮下腫瘍担持マウス脇腹にIV投与した。

【0664】

MC38 (マウス結腸腺癌#38)モデルは、変異誘発を使用するCT26モデルと同様に導かれるが、ジメチルヒドラジンを用い、C57BL/6マウス株である (Corbett et al. (1975) Cancer Res. 35(9):2434-9)。CT26と同様に、皮下植え込みは、結腸に同所性に移植したときよりも、T細胞排除的であり、免疫抑制性である腫瘍微小環境をもたらした (Zhao et al. (2017) Oncotarget 8(33):54775-54787)。MC38は、CT26より高度な遺伝子変異量を有し、類似のウイルス由来gp70抗原 (p15E) はCD8<sup>+</sup>T細胞により検出され得るが、拒絶抗原とは考えられなかった。MC38のバリエーションは、チェックポイント治療に部分的に応答性であるが、ここで使用するMC38細胞を含む、細胞株の大部分のバリエーションは、チェックポイント難治性およびT細胞

10

20

30

40

50

排除的であると考えられる(Mariathasan et al. (2018) Nature 555:544-548)。

【0665】

6~8週齢雌C57BL/6マウス(5マウス/群)の右脇腹に、MC38細胞(100µL PBS中5×10<sup>5</sup>細胞)をSC接種した。大きな確立された脇腹腫瘍を担持するマウスに、34日目に1×10<sup>6</sup>CFUのYS1646 asd/FLG-mCherry株をIV注射した。腫瘍をIV投与7日後に摘出し、2~3mm片に切って、2.5mL 酵素ミックス(1mg/mLコラゲナーゼIVおよび20µg/mL DNase I添加RPMI-1640 10%FBS)を満たしたgentleMACSTM Cチューブ(Miltenyi Biotec)に入れた。腫瘍片をOctoMACSTM(Miltenyi Biotec)特異的解離プログラム(マウス移植腫瘍)を使用して解離し、全細胞調製物を、45分間、37℃で攪拌しながらインキュベートした。45分のインキュベーション後、第二ラウンドの解離をOctoMACSTM(マウス移植腫瘍プログラム)を使用して実施し、得られた単細胞懸濁液を70µMナイロンメッシュで濾過して50mLチューブに入れた。ナイロンメッシュを5mLのRPMI-1640 10%FBSで1回洗浄し、細胞を、新規70µMナイロンメッシュを使用して、新規50mLチューブに2回目の濾過をして入れた。ナイロンメッシュを5mLのRPMI-1640 10%FBSで洗浄し、次いで、濾過細胞を1000RPMで7分間遠心分離した。得られた解離細胞をPBSに再懸濁し、染色過程前は氷上に維持した。

10

【0666】

フローサイトメトリ染色のために、100µLの単細胞懸濁液を、V底96ウェルプレートのウェルに播種した。死/生存染色(Zombie AquaTM, BioLegend)およびFc遮断試薬(BD Biosciences)を含むPBSを100µL/ウェルに加え、氷上で、30分間、暗所でインキュベートした。30分後、細胞を、1300RPMで3分間の遠心分離により、PBS+2%FBSで2回洗浄した。次いで、細胞を、蛍光色素コンジュゲート抗体(CD4 FITCクローンRM4-5; CD8a BV421クローン53-6.7; F4/80 APCクローンBM8; CD11b PE-Cy7クローンM1/70; CD45 BV570クローン30-F11; CD3 PEクローン145-2C11; Ly6C BV785クローンHK1.4; I-A/I-E APC-Cy7クローンM5/114.15.2; Ly6G BV605クローン1A8; およびCD24 PercP-Cy5.5クローンM1/69、全てBioLegendから)を含むPBS+2%FBSに再懸濁し、氷上で、30分間、暗所でインキュベートした。30分後、細胞を、1300RPMで3分間の遠心分離により、PBS+2%FBSで2回洗浄し、フローサイトメトリ固定緩衝液(ThermoFisher Scientific)に再懸濁した。フローサイトメトリデータをNovoCyte(登録商標)フローサイトメーター(ACEA Biosciences, Inc.)を使用して取得し、FlowJoTMソフトウェア(Tree Star, Inc.)を使用して分析した。

20

30

【0667】

結果は、腫瘍微小環境で、7.27%の腫瘍浸潤単球が鞭毛欠失mCherry株を取り込んだことを示す。同様に、8.96%の腫瘍関連マクロファージ(TAM)集団および3.33%の腫瘍浸潤樹状細胞(DC)は鞭毛欠失mCherry株を取り込んだ。対照的に、間質および腫瘍細胞に対応するCD45-集団内で、わずか0.076%がmCherry発現に陽性を示した(0.067%バックグラウンド染色と比較)。これらのデータは、鞭毛およびSPI-1に影響するその下流シグナル伝達が上皮細胞感染性を可能とするのに必要であり、その欠失は、細菌の取り込みを腫瘍微小環境の貪食免疫細胞区画(すなわち、腫瘍常在免疫/骨髄細胞)に限定することを示す。

40

【0668】

鞭毛の欠失は、適応免疫を抑制するTLR5誘導炎症性サイトカインの除去、マクロファージパイロトーシスの低減および、取り込みが腫瘍常在食細胞に限定される、全身投与による腫瘍特異的富化維持(または増強)を含む、複数の利益を免疫刺激性ネズミチフス菌株に与えること。

【0669】

実施例7

50



プラスミド送達増強のために *cytoLLO* を発現するよう操作したネズミチフス菌  
 この例では、実施例 3 に記載の Y S 1 6 4 6 の *asd* 欠失株 (A S T - 1 0 1) を、サルモ  
 ネラのサイトゾル株に蓄積されるシグナル配列を欠くリステリオリシン O (L L O) タンパ  
 ク質 (ここでは *cytoLLO* と称する) を発現するようさらに修飾した。L L O は、リス  
 テリア・モノサイトゲネスから分泌されるコレステロール依存性孔形成細胞溶解素であり  
 、細菌のファゴソーム回避に介在する。コドン 2 ~ 2 4 欠失を有する L L O をコードする  
 遺伝子を、サルモネラでの発現に最適化したコドンで合成した。*cytoLLO* のオーブ  
 ンリーディングフレーム (O R F) の配列を配列番号 2 4 0 に示す。*cytoLLO* 遺伝子  
 を、ネズミチフス菌での転写を誘導するプロモーター制御下に置いた (配列番号 2 4 1、  
 下記複製)。 *cytoLLO* 発現カセットを、上記のとおり、Datsenko and Wanner ( 10  
 Proc Natl Acad Sci USA (2000) 97:6640-6645) の方法の変法を使用して、*asd*  
*asd* 欠失株 A S T - 1 0 1 のノックアウト *asd* 座位に単一コピーで挿入した。

【表 19】

*cytoLLO* の発現を駆動するプロモーターの配列

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| LLOプロモーター | attatgtcttgacatgtagtgagtgggctgggtataatgcagca<br>ag | 配列番号 2 4 1 |
|-----------|--|------------|

【0670】

*asd* 座位に挿入された *cytoLLO* 発現カセットを有する *asd* 欠失株 (ここでは A  
 S D / L L O または A S T - 1 1 4 と称する) を、株が外来性 D A P 非存在下で増殖し、  
 プラスミド維持について選択することを可能とし、また上記のとおり *shTREX1* の発  
 現を駆動する U 6 プロモーターを含む *asd* 遺伝子をコードする p A T I プラスミドのエ  
 レクトロポレーションによりさらに修飾した (ここでは A S D / L L O (p A T I - *shT*  
*REX1*) または A S T - 1 1 5 と称する)。A S D / L L O (p A T I - *shT*  
*REX1*) 株、A S T - 1 1 5 は同じプラスミドを含む *asd* 欠失株 (p A T I - *shT*  
*REX1*)、A S T - 1 1 0 と同様の速度で増殖し、L L O ノックインはインビトロで細菌適応度  
 に影響しないことを示す。 20

【0671】

*cytoLLO* を産生するよう操作したネズミチフス菌は、強力な抗腫瘍活性を示す  
*cytoLLO* 遺伝子ノックインが抗腫瘍有効性を提供するか否かを決定するために、A  
 S D / L L O (p A T I - *shTREX1*) 株 A S T - 1 1 5 を結腸癌のマウスモデルで評  
 価した。この試験について、6 ~ 8 週齢雌 B A L B / c マウス (8 マウス / 群) に、C T 2  
 6 細胞 (1 0 0 μ L P B S 中 2 × 1 0 <sup>5</sup> 細胞) を右脇腹に S C 接種した。確立された脇腹  
 腫瘍を担持するマウスに、5 × 1 0 <sup>6</sup> CFU の A S T - 1 1 5 を 1 回 I V 注射し、P B S  
 対照と比較した。 30

【0672】

株 A S D / L L O (p A T I - *shTREX1*) への *cytoLLO* 遺伝子付加は、P B S  
 対照と比較して高度に有意な腫瘍制御 (7 6 % T G I、p = 0 . 0 0 2、2 8 日目) および  
 1 回投与後、*TREX1 shRNA* プラスミド含有株を複数回与えた先の試験と同等な  
 有効性を提供した。これらのデータは、*cytoLLO* が、大きな遺伝子ノックダウンを  
 もたらず、より多くのプラスミドをサイトゾルに送達する利点をもたらし、それにより  
*TREX1* などの標的に対する R N A i の治療有効性を改善することを示す。 40

【0673】

実施例 8

ネズミチフス菌のアデノシン栄養要求性株

ここに提供される株は、アデノシンに対して栄養要求性であるよう操作される。その結果  
 、低アデノシン濃度の正常組織で複製できず、それ故に、アデノシンレベルが高い固形腫  
 瘍微小環境に主にコロニー形成するために、インビボで弱毒である。サルモネラ株 Y S 1  
 6 4 6 (A S T - 1 0 0) は野生型株 A T C C 1 4 0 2 8 の誘導體であり、*purI* 遺伝 50

子破壊によりプリンに対して栄養要求性であるよう操作された(Low et al., (2004) *Methods Mol. Med.* 90:47-60)。Y S 1 6 4 6 のゲノム全体のその後の分析により、p u r I 遺伝子(p u r M と同義)が実際欠失しているのではなく、染色体逆位により破壊され(Broadway et al. (2014) *J. Biotechnol.* 192:177-178)、遺伝子全体がなお挿入配列(その一方はアクティブなトランスポザーゼを有する)が隣接する Y S 1 6 4 6 染色体の2つの部分内に含まれることを示した。染色体再係合の手段により破壊された p u r I 遺伝子の完全な遺伝的配列の存在は、野生型遺伝子への復帰の可能性を残す。Y S 1 6 4 6 のプリン栄養要求性がインビトロで連続継代後安定であったことが先に示されたが、復帰率は未知であった(Clairmont et al. (2000) *J. Infect. Dis.* 181:1996-2002)。

【0674】

アデノシンと共に提供されたとき、Y S 1 6 4 6 は最小培地で複製できる；一方野生型親株 A T C C 1 4 0 2 8 は、アデノシンを添加していない最小培地で増殖できることがここで示された。Y S 1 6 4 6 を一夜 L B 培地で増殖し、M 9 最小培地で洗浄し、アデノシンを含まないまたは漸増濃度のアデノシンを含む M 9 最小培地で希釈した。増殖 SpectraMax(登録商標)M3分光光度計(Molecular Devices)を使用して、37 °C で測定し、15分毎に O D 6 0 0 を読んだ。

【0675】

Y S 1 6 4 6 は、アデノシンが 1 1 ~ 3 0 0 マイクロモル濃度範囲の濃度で提供されたとき複製できたが、M 9 単独または 1 3 0 ナノモル濃度アデノシン添加 M 9 で完全に複製不可能であった。これらのデータは、p u r I 変異体が腫瘍微小環境でみられるアデノシン濃度で複製できるが、正常組織でみられる濃度ではできないことを示す。ここに例示する操作したアデノシン栄養要求性株は、野生型への復帰を防止するために、染色体から p u r I オープンリーディングフレームの全てまたは一部が欠失した株を含む。このような遺伝子欠失は、上記のとおりラムダ・レッド系を利用して達成され得る。

【0676】

p u r I 破壊を含み、上記のとおり a s d 遺伝子欠失(A S D)を含むようにまたは a s d 遺伝子欠失を含み、f l i C および f l j B (A S D / F L G)の欠失を有するようにさらに操作した(実施例6に記載のとおり)さらに操作したサルモネラ株または c y t o L L O (A S D / L L O)を発現するようさらに操作され(実施例7に記載のとおり)、a s d (それぞれ株 A S T - 1 1 7、A S T - 1 1 8 および A S T - 1 1 9)を発現する低コピー数プラスミド(p A T I L o w)で補完された a s d 変異体も、M 9 最小培地での増殖を評価した。データは、各株が、アデノシンが 1 1 ~ 3 0 0 マイクロモル濃度範囲の濃度で提供されたとき複製可能であるが、M 9 単独または 1 3 0 ナノモル濃度アデノシン添加 M 9 で完全に複製不可能であったことを示した。

【0677】

実施例 9

インビトロでの a s d 遺伝子補完系の特徴づけおよび使用

a s d 遺伝子補完を有する株の増殖

プラスミドを含む細菌株の適応度を評価するために、増殖曲線を SpectraMax(登録商標)プレートリーダーで 37 °C を使用して L B 液体培地で実施し、O D 6 0 0 を 15分毎に読んだ。低コピープラスミド p E Q U 6 - s h T R E X 1 を含む Y S 1 6 4 6 (A S T - 1 0 4)は、プラスミドを含まない Y S 1 6 4 6 (A S T - 1 0 0)と同等に増殖した。a s d 栄養要求性を補完し得る a s d 遺伝子を有する高コピー s h T R E X 1 プラスミドを担持する a s d 変異株(A S T - 1 1 0)は、D A P 非存在下で L B で複製できたが、Y S 1 6 4 6 よりゆっくり増殖した。低コピー数複製起点および a s d 栄養要求性を補完し得る a s d 遺伝子を有する s h T R E X - 1 発現プラスミドを含む a s d 欠失株(p A T I L o w - s h T R E X 1)、株 A S T - 1 1 7 は、A S T - 1 1 0 より速い速度で増殖した。これらのデータは、a s d 遺伝子栄養要求性を補完する低コピー数プラスミドが、インビトロでのネズミチフス菌のより迅速な複製を可能とするため、高コピー数プラスミドよりも優れていることを示す。

10

20

30

40

50

## 【0678】

## a s d 補完株の細胞内増殖

高および低コピー数プラスミドで補完された a s d の a s d 変異体の適応度を測定するために、細菌株がマウス腫瘍細胞株の細胞内で複製する能力を、ゲンタマイシン防御アッセイを使用して評価した。このアッセイで、マウス黒色腫 B 1 6 . F 1 0 細胞またはマウス結腸癌 C T 2 6 細胞を、相補的 a s d 遺伝子を含むプラスミドを含み、高コピー複製起点、A S T - 1 1 0 (A S D p A T I - s h T R E X 1) または低コピー複製起点、A S T - 1 1 7 (A S D p A T I 低コピー - s h T R E X 1) を有する、a s d 変異体サルモネラ株で感染させた。細胞を、細胞あたり約 5 細菌の多重度で感染させ、次いで細胞を P B S で洗浄し、ゲンタマイシン含有培地を、細胞外細菌を死滅させるために加えた。細胞内細菌は、細胞膜を通過できないためゲンタマイシンにより死滅しない。感染後種々の時点で、細胞単層を水との浸透圧ショックにより溶解し、細胞可溶化物を希釈し、生存コロニー形成単位 (CFU) を数え上げるために L B 寒天に播種した。

10

## 【0679】

高コピープラスミドで補完された a s d 変異株、A S T - 1 1 0 は初期に CFU が減少したが、B 1 6 . F 1 0 細胞で増殖でき、C T 2 6 細胞ではできず、a s d 遺伝子補完系が哺乳動物腫瘍細胞内で増殖の支持に十分であることを示す。低コピープラスミドを含む a s d 変異株、A S T - 1 1 7 は、両細胞型に侵入および複製でき、低コピープラスミドの a s d 遺伝子補完が、哺乳動物細胞内で強い a s d 変異体増殖を可能とすることを示す。低コピープラスミドを有する株は、高コピープラスミドを有する株と比較して、両腫瘍細胞型で複製される数が多かった。これは、低コピープラスミドを有するサルモネラ株が、高コピープラスミドを有する株より増強された適応度を有することを示す。

20

## 【0680】

## a s d 補完系を使用する腫瘍におけるプラスミド維持

この例では、C T 2 6 腫瘍担持マウスを、T R E X 1 を標的とする s h R N A (p E Q U 6 - T R E X 1) を発現するプラスミドを含む Y S 1 6 4 6、株 A S T - 1 0 4 または機能的 a s d 遺伝子および T R E X 1 を標的とする s h R N A を含むプラスミドを含む Y S 1 6 4 6 の a s d 欠失株 (p A T I - s h T R E X 1)、株 A S T - 1 1 0 で処理した。最終サルモネラ注射 1 2 日後、腫瘍を均質化し、ホモジネートを連続希釈し、存在する総 CFU を数え上げるために L B 寒天プレートに播種しまたはカナマイシン耐性コロニー数を数え上げるためにカナマイシン含有 L B プレートに播種した。

30

## 【0681】

s h R N A プラスミド、A S T - 1 0 4 を維持する選択圧を有しないネズミチフス菌は、パーセントカナマイシン耐性 (K a n R) コロニーが 1 0 % 未満として、プラスミド喪失を示した。プラスミド維持のために a s d 遺伝子補完系を使用した株、A S T - 1 1 0 のカナマイシン耐性およびカナマイシン感受性 CFU はほぼ同数であった。これらのデータは、a s d 遺伝子補完系がマウスにおける腫瘍微小環境の状況でのプラスミドの維持に十分であることを示す。

## 【0682】

## a s d 補完系を使用する抗腫瘍有効性増強

a s d 補完系を、インビポでプラスミド喪失を防止し、ネズミチフス菌株により送達される阻害性 R N A の抗腫瘍有効性を増強するよう設計する。これを試験するために、s h T R E X 1 プラスミド (A S T - 1 1 0) または機能的 a s d 遺伝子カセットを含むスクランブル対照 (A S T - 1 0 9) を含む a s d 欠失株を、マウス結腸癌モデルにおける抗腫瘍有効性について、p E Q U 6 - s h T R E X 1 (A S T - 1 0 4、a s d 遺伝子カセットを欠き、それ故にプラスミド維持の機構を有しないプラスミド) を含む株 Y S 1 6 4 6 と比較した。この実験のために、6 ~ 8 週齢雌 B A L B / c マウス (8 マウス / 群) に、C T 2 6 細胞 (1 0 0 μ L P B S 中 2 × 1 0 <sup>5</sup> 細胞) を右脇腹に S C 接種した。確立された脇腹腫瘍を担持するマウスに、5 × 1 0 <sup>6</sup> CFU の A S T - 1 0 9 (P A T I - s h スクランブルで形質転換した A S D)、A S T - 1 1 0 (P A T I - s h T R E X 1 で形質転換した A

40

50

S D)またはA S T - 1 0 4 (P E Q U 6 - s h T R E X 1で形質転換したY S 1 6 4 6)を8日目および18日目に2回I V注射し、P B S対照と比較した。

【0683】

Y S 1 6 4 6株A S T - 1 0 4は、経時的プラスミド喪失が示されたにも関わらず、P B Sと比較して、腫瘍制御を示した(70% T G I、28日目)。a s d遺伝子補完系を有するp A T Iプラスミドにスクランブル対照を含むa s d-株(A S T - 1 0 9)は、P B Sと比較して腫瘍制御を示し(51% T G I、25日目)、C p Gプラスミドの送達維持が抗腫瘍応答を刺激することを示した。a s d遺伝子補完系およびs h T R E X 1を有するプラスミドを含むa s d-株(A S T - 1 1 0)は、P B Sと比較して、最高の腫瘍増殖阻害を示した(82% T G I、 $p = 0.002$ 、25日目)。これらのデータは、a s d補完系およびs h T R E X 1送達を使用してプラスミド喪失を防止することにより、遺伝子補完系またはs h T R E X 1(治療産物)がないプラスミドを含むY S 1 6 4 6と比較して、効力の改善を示すことを示す。

10

【0684】

低コピープラスミドを有するネズミチフス菌株は、高コピープラスミドを有する株と比較して、優れた抗腫瘍有効性および腫瘍コロニー形成を示す

高コピーs h T R E X 1プラスミドと比較したa s d補完系を有する低コピーs h T R E X 1プラスミドの抗腫瘍有効性を比較するために、結腸癌のマウスモデルで、6~8週齢雌B A L B / cマウス(10マウス/群)に、C T 2 6細胞(100 $\mu$ L P B S中 $2 \times 10^5$ 細胞)を右脇腹にS C接種した。確立された脇腹腫瘍を担持するマウスに、 $5 \times 10^6$  CFUのA S T - 1 1 7(A S D(p A T I L o w - s h T R E X 1))またはA S T - 1 1 0(A S D(p A T I - s h T R E X 1))を2回の毎週I V注射し、陰性対照としてのP B S注射と比較した。低コピープラスミドを有する株、A S T - 1 1 7は、高コピープラスミドを有する株、A S T - 1 1 0と比較して、優れた抗腫瘍有効性を示した(高、59% T G I；低79% T G I、 $p = 0.042$ 、25日目)。

20

【0685】

この腫瘍増殖阻害試験の最後に、各群からの4匹のマウスを殺し、腫瘍および脾臓を上記のとおり均質化して、腫瘍コロニー形成および腫瘍対脾臓コロニー形成比を評価した。低コピープラスミドを含む株、A S T - 1 1 7は、高コピープラスミドを有する株、A S T - 1 1 0より100倍を超える高いレベルで腫瘍にコロニー形成した。腫瘍および脾臓から回収されたコロニー比を計算したとき、A S T - 1 1 7は、A S T - 1 1 0と比較して10倍を超える高い腫瘍対脾臓コロニー形成比を有し、低コピープラスミドを有する株が高コピープラスミドを有する株より腫瘍コロニー形成の特異性が大きいことが示された。

30

【0686】

これらのデータは、プラスミドを送達するよう操作したネズミチフス菌が、改善された腫瘍コロニー形成能および抗腫瘍活性を有する以前には未知であった特性を示す。

【0687】

実施例10

忍容性増加のために操作した株の例

40

a d r Aまたはc s g D欠失

この例では、p u r I欠失、m s b B欠失、a s d遺伝子欠失を含み、干渉R N Aをコードするプラスミドを送達するよう操作した生存ネズミチフス菌の弱毒化株を、さらに修飾して、ネズミチフス菌バイオフィーム形成に必要な遺伝子であるa d r Aを欠失させた。バイオフィームを形成できないサルモネラは宿主食細胞により迅速に取り込まれ、かつより迅速に浄化される。細胞内局在化のこの増加は、プラスミド送達およびR N A干渉による遺伝子ノックダウンの有効性を増強する。腫瘍/組織からの排除速度増加は、治療の忍容性を増加させ、バイオフィーム形成の欠失は、患者の補装具および胆嚢のコロニー形成を阻止する。

【0688】

50

他の例において、*pur I* 欠失、*msb B* 欠失、*asd* 遺伝子欠失を含み、治療産物をコードするプラスミドを送達するよう操作した生存ネズミチフス菌の弱毒化株を、*cs g D* を欠失するようにも修飾した(を有する株の操作は下記)。この遺伝子は、*adr A* の活性化を担い、TLR2 アゴニストであるクルリ線毛の発現も誘導する。*cs g D* の喪失はまたバイオフィーム形成も阻止し、TLR2 活性化阻害、それによりさらに細菌病原性低減およびコード化治療産物の送達増強の利益を加える。

#### 【0689】

*pag P* 欠失

この例では、*pur I* 欠失、*msb B* 欠失および *asd* 遺伝子欠失を含み、干渉RNAをコードするプラスミドを送達するよう操作した生存ネズミチフス菌の弱毒化株を、*pag P* を欠失するようさらに修飾した。*pag P* 遺伝子は、ネズミチフス菌の感染性ライフサイクル中に誘導され、リピドAをパルミトイル化する酵素をコードする。野生型ネズミチフス菌で、*pag P* の発現は、ヘプタ-アシル化であるリピドAをもたらす。リピドAの末端アシル鎖が付加され得ない *msb B* - 変異体で、*pag P* の発現はヘキサアシル化 LPS をもたらす。ヘキサアシル化 LPS は、最も炎症促進性であることが示されている。この例では、*pag P* および *msb B* 欠失株がペンタアシル化 LPS しか産生できず、細菌を、干渉RNAまたは他の治療産物を送達するよう操作したとき、低炎症促進性サイトカイン、忍容性増強および適応免疫増加を可能とする。

10

#### 【0690】

実施例 11

20

*pag P* 欠失変異体はペンタアシル化 LPS を誘導し、炎症性サイトカイン低減を誘導する

サルモネラ *pag P* 遺伝子ノックアウト株操作および特徴づけ

*pag P* 遺伝子を、先の実施例に記載する方法の変法を使用して、YS1646 *asd* / FLG 株から欠失させた。*pag P* 遺伝子は、ネズミチフス菌の感染性ライフサイクル中に誘導され、リピドAをパルミチン酸で修飾する酵素(リピドAパルミトイルトランスフェラーゼ)をコードする。野生型ネズミチフス菌で、*pag P* の発現は、ヘプタ-アシル化であるリピドAをもたらす。リピドAの末端アシル鎖が付加され得ない *msb B* - 変異体で、*pag P* の発現はヘキサアシル化 LPS をもたらす。ヘキサアシル化 LPS は高度に炎症促進性であり、TLR4 (野生型でみられるヘプタアシル化 LPS は、TLR4 に最高親和性を有する)に高親和性であることが示されている。この例では、*pag P* および *msb B* 欠失株がペンタアシル化 LPS しか産生できず、細菌を免疫調節性タンパク質をコードするプラスミドを送達するよう操作したとき、TLR4 への低親和性により低炎症促進性サイトカイン、忍容性増強および適応免疫増加を可能とする。

30

#### 【0691】

*pag P* 株構築

*pag P* 遺伝子に隣接する、それぞれ左手側および右手側配列の203塩基および279塩基を含む合成 *pag P* 遺伝子相同性アーム配列を合成し、pSL0191(配列番号315)と称するプラスミドにクローン化した。次いで、*cre/lox P* 部位が隣接するカナマイシン遺伝子カセットを pSL0191 にクローン化し、*pag P* 遺伝子ノックアウトカセットをプライマー *pag p* - 1(配列番号321)および *pag p* - 2(配列番号322)(表1参照)でPCR増幅し、ゲル精製し、エレクトロポレーションにより温度感受性ラムダ・レッド組み換えプラスミド pKD46 を担持する株 YS1646 *asd* に導入した。次いで、カナマイシン耐性遺伝子を上記のとおり *cre* 介在組み換えにより除去し、温度感受性プラスミドを、非許容温度での増殖により除去した。*pag P* 遺伝子ノックアウト配列を、プライマー *pag p* - 3(配列番号323)および *pag p* - 4(配列番号324)を使用するPCRで増幅し、DNA配列決定により確認した。YS1646 の得られた変異誘導体を YS1646 *asd* / FLG / *pag P* と名付けた。

40

#### 【0692】

*pag P* 欠失変異体はペンタアシル化 LPS を有し、低減された炎症性サイトカインを誘

50

導する

p a g P 遺伝子をまた Datsenko and Wanner (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645 (2000)) および上記のとおりラムダ由来 Red 組み換え系を使用して Y S 1646 a s d 株から欠失させ、株 Y S 1646 a s d / p a g P を産生した。次いで、この株を機能的 a s d 遺伝子を含むプラスミドで電気穿孔し、欠失 a s d 遺伝子を補い、インピボでのプラスミド維持を確実とした。次いで、リポド A をこの株から抽出し、マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化マスマスペクトロメトリー (MALDI MS) により評価し、野生型ネズミチフス菌株 ATCC 14028、Y S 1646 株 (m s b B および p u r I を欠失) および Y S 1646 a s d 株のリポド A と比較した。野生型サルモネラは、機能的 m s b B 遺伝子の存在により、質量数 2034 のマイナーなリポド A ピークおよび質量数 1796 のにメジャーなピークを有し、それぞれ、ヘプタ - アシル化およびヘキサアシル化種に対応する。m s b B 欠失株 Y S 1646 および Y S 1646 a s d は、ヘキサ - アシル化およびペンタアシル化 L P S の混合物に対応する、1828 および 1585 にメジャーなピークを有した。m s b B および p a g P 欠失株、Y S 1646 a s d / p a g P は、ペンタアシル化 L P S に対応する 1585 の質量の単一ピークのみ有した。これらのデータは、p a g P の欠失が L P S のパルミトイル化を防止し、それにより単一ペンタアシル化種に限定することを示す。

【0693】

p a g P 変異株からのペンタアシル化 L P S が T L R 4 シグナル伝達を低減することを示すために、野生型株、Y S 1646 株または Y S 1646 a s d / p a g P 株からの 4 μg の精製 L P S を T H P - 1 ヒト単球性細胞に加え、24 時間後、上清を、Cytometric Bead Array (C B A) キット (BD Biosciences) を使用して炎症性サイトカインの存在について評価した。結果は、Y S 1646 a s d / p a g P 株からの L P S は、野生型 L P S と比較 25% の量の T N F を誘導し、野生型 L P S より 7 倍少ない I L - 6 を誘導することを示す。Y S 1646 a s d / p a g P 株からの L P S は、株 Y S 1646 より 2.2 倍少ない I L - 6 を誘導し、p a g P 変異体からのペンタアシル化 L P S 種は、ヒト細胞に顕著に低炎症性であることを示し、p a g P 変異体がヒトでより忍容性が高いことを示す。

【0694】

P a g P の欠失は、初代ヒト M 2 マクロファージで顕著に低 I L - 6 を誘導する Y S 1646 a s d / F L G / p a g P 株も初代ヒト M 2 マクロファージから低炎症性および用量規制 I L - 6 を誘導することを示すために、株を評価し、Y S 1646 a s d / F L G および親 Y S 1646 株と比較した。ヒトドナー由来 M 2 マクロファージは、T 細胞排除的固形腫瘍に高度に富む免疫抑制性表現型の代表である。健常ヒトドナーから単離した凍結ヒト P B M C を、完全培地 (R P M I - 1640 + 1 X 非必須アミノ酸 + 5% ヒト A B 血清) で解凍し、10 分間、800 RPM で室温で遠心分離して洗浄した。P B M C を P B S + 2% F B S に再懸濁し、単球を C D 16 枯渴キット (StemCell Technologies) を使用して負に単離した。次いで、単離した未利用単球を P B S + 2% F B S での遠心分離により洗浄し、100 ng / mL ヒトマクロファージコロニー刺激因子 (M - C S F) および 10 ng / mL ヒト I L - 4 を含む完全培地に再懸濁した。次いで、単離単球 (3 e 5 / ウェル) を、750 μL の最終体積で 24 ウェルプレートに播種した。播種 2 日後、細胞培養培地を完全に吸引し、100 ng / mL ヒト M - C S F および 10 ng / mL ヒト I L - 4 を含む新鮮な完全培地と置き換えた。2 日後 (4 日目)、500 μL のサイトカイン含有完全培地を、48 時間ウェルあたりに加えた。6 日目、細胞培養培地を完全に吸引し、サイトカイン単独の新鮮完全培地に、20 の M O I でネズミチフス菌株の対数期培養物を含む培地を伴わずにまたは伴い、置き換えた。細胞を 1 時間感染させ、次いで P B S で洗浄し、培地を 50 μg / mL ゲンタマイシンを含む新鮮培地に置き換えて、細胞外細菌を死滅させた。次いで、ウェルを洗浄し、新鮮培地で置き換え、37 および 5% C O 2 でインキュベートした。48 時間後、上清を回収し、製造業者の指示 (BD Biosciences) に従い、ヒト I L - 6 サイトメトリックビーズアレイ (C B A) を使用して

サイトカインについてアッセイした。

【0695】

結果は、親株 Y S 1 6 4 6 で感染させたヒト初代 M 2 マクロファージから分泌される I L - 6 レベルは、平均  $14839 \pm 926$  pg / mL であり、一方、Y S 1 6 4 6 a s d / F L G 株からの I L - 6 レベルは、 $2075 \pm 723$  pg / mL で有意に低い ( $p = 0.004$ ) ことを示す。これは、さらに鞭毛の欠失および T L R 5 シグナル伝達の排除が I L - 6 の誘導に影響することを確認する。株 Y S 1 6 4 6 a s d / F L G / p a g P は、 $332 \pm 100$  pg / mL で最低 I L - 6 レベルを誘導し、この修飾 L P S コーティングが T L R 4 を誘導刺激する能力の低減と、得られた劇的に低減した炎症性 I L - 6 産生を示す。

10

【0696】

鞭毛および p a g P 欠失組み合わせは、マウスにおける忍容性を顕著に増強する  
上記修飾株が親株 Y S 1 6 4 6 より弱毒化されていることを示すため、中央致死用量 (L D 5 0) 試験を実施した。6 ~ 8 週齢 B A L B / c マウス (5 マウス / 群) に、株 Y S 1 6 4 6 または誘導株 Y S 1 6 4 6 a s d / F L G、Y S 1 6 4 6 a s d / p a g P および Y S 1 6 4 6 a s d / F L G / p a g P を  $3 \times 10^5 \sim 3 \times 10^7$  CFU の用量範囲で静脈内注射した。株 Y S 1 6 4 6 と異なり、誘導株は、全身投与したとき顕著な毒性を示す、F D A が承認したサイトカインであるマウス I L - 2 をコードするプラスミドも担持する。株 Y S 1 6 4 6 の L D 5 0 は  $4.4 \times 10^6$  CFU (2 試験の平均) であることが判明し、Y S 1 6 4 6 の先に公開された L D 5 0 報告および野生型ネズミチフス菌と比較した  $> 1000$  倍改善に一致した (Clairmont et al. (2000) J. Infect. Dis. 181:1996-2002)。Y S 1 6 4 6 a s d / F L G 株の L D 5 0 は  $2.07 \times 10^7$  CFU であることが決定され、株 Y S 1 6 4 6 と比較して、病原性の 4.5 倍を超える低減が示された。Y S 1 6 4 6 a s d / p a g P 株の L D 5 0 は  $1.39 \times 10^6$  CFU であることが決定され、株がなお高度に炎症性の鞭毛を有することから、予想通りである、病原性の 3.2 倍低減を示した。Y S 1 6 4 6 a s d / F L G / p a g P 株の L D 5 0 は、投与した最高用量で全てのマウスが死ななかったため確率されなかったが、 $> 6.2 \times 10^7$  CFU であった。それ故に、Y S 1 6 4 6 a s d / F L G / p a g P 株は、親株 Y S 1 6 4 6 と比較して、病原性の  $> 14$  倍低減を示す。これらのデータは、上記遺伝子修飾が臨床的ネズミチフス菌株 Y S 1 6 4 6 の病原性を低減し、それ故に、ヒトにおける忍容性増加に至ることを示す。

20

30

【0697】

V N P 2 0 0 0 9 のフェーズ I 臨床試験で (Toso et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20 (1):142-152)、細菌の患者の腫瘍への僅かな部分的存在が試験した 2 つの最高用量、 $3 \times 10^8$  CFU / m<sup>2</sup> (33% 存在) および  $1 \times 10^9$  CFU / m<sup>2</sup> (50% 存在) で観察され、V N P 2 0 0 0 9 の容認できる用量が腫瘍コロニー形成の達成に低すぎることが示された。上記修飾を介する株の忍容性改善により、必要であれば、 $> 14$  倍高用量が投与でき、腫瘍にコロニー形成される患者のパーセンテージを改善し、腫瘍あたりの治療コロニー形成レベルを増加させ、それにより V N P 2 0 0 0 9 で観察された問題を解決する。

【0698】

鞭毛および p a g P 欠失組み合わせは、マウスにおける抗ネズミチフス菌抗体の産生を顕著に制限する  
 $3 \times 10^6$  CFU 投与群 (Y S 1 6 4 6 投与群での N = 4 以外、N = 5) からの生存マウスを、I V 投与 40 日後まで維持し、その時点で血清を採血し、ネズミチフス菌に対する抗体力価を、修飾フローベースの抗体力価測定系で評価した。株 Y S 1 6 4 6 a s d / F L G - m C h e r r y の一夜培養物を洗浄し、フローサイトメトリー固定緩衝液で固定した。先に処置したマウスおよびナープ対照マウスからの血清を 96 ウェルプレートに播種し、P B S で連続希釈した。次に、 $25 \mu$ L の  $1 \times 10^6$  CFU を含む Y S 1 6 4 6 a s d / F L G - m C h e r r y 培養物を血清に加え、25 分間、R T でインキュベートした。次いで、細菌を 4000 RPM で 5 分間回転させることにより、P B S で 2 回洗

40

50

浄した。最後の洗浄後、細菌を、二次ヤギ抗マウスFc AF488 Ab含有PBS(原液から1/400希釈)に再懸濁し、25分間、RTで暗所でインキュベートした。次いで、細菌を4000RPMで5分間回転させることにより、PBSで3回洗浄した。最後の洗浄後、細菌をPBSに再懸濁し、データをNovoCyte(登録商標)フローサイトメーター(ACEA Biosciences, Inc.)を使用して取得し、MFI FlowJo™ソフトウェア(Tree Star, Inc.)を使用して分析した。

#### 【0699】

フローサイトメトリーによる結果評価のために、全群のシグナルがある最高の希釈を選択し(1250×血清希釈)、対応する平均蛍光強度(MFI)値をプロットした。検出限界(LOD)を、染色なしおよびヤギ抗マウスFc AF488 Abのみでのバックグラウンド染色で得られたMFIであるため、1000のMFIと選択した。それ故に、1000を超えるMFIは陽性シグナルとみなされ、この値以下の全ては、MFI値を有するにも関わらず、陰性結果とみなされた。

10

#### 【0700】

このアッセイの結果は、YS1646が血清抗体(非中和である)を産生できる先に公開されたデータに一致して、 $3 \times 10^6$  CFUのYS1646株( $29196.3 \pm 20730$ )処置マウスからの抗ネズミチフス菌血清抗体の高MFI力価を確認する。YS1646asd/FLG株( $11257 \pm 9290$ )処置マウスで検出された抗体は少なく、これは、鞭毛からのアジュバント活性の欠如により得る。YS1646asd/pagP株処置マウスで、株YS164と比較して6( $p = 0.033$ )、有意に少ない抗体が産生され( $4494 \pm 3861$ )、これは、改変されたLPS表面コーティングにより得る。血清抗体の最も有意な低減は、YS1646asd/FLG/pagP処置群( $1930 \pm 2445$ )で示され、数匹のマウスが1000未満のMFI力価を有し、故に、血清抗体陰性とみなされた( $p = 0.021$ 、対株YS1646)。それ故に、鞭毛の欠失およびpagP遺伝子の組み合わせは、安全性改善および免疫原性の顕著な低減を可能とし、ヒトでの高CFUの反復投与を可能とする。

20

#### 【0701】

pagPおよび鞭毛欠失株およびその組み合わせは、YS1646と比較してヒト血清で顕著に高い生存能を示す

株YS1646(VNP20009)は、ヒトにおいて全身投与後限定的な腫瘍コロニー形成を示す。株YS1646がヒト血液における補体因子により不活性化されることがここで示された。これを証明するために、株YS1646および大腸菌D10Bを、細菌の表面を変える付加の変異を有するここに提供される例示的免疫刺激性細菌と比較した。これらの例示的修飾株は、YS1646asd/pagP、YS1646asd/FLGおよびYS1646asd/FLG/pagPであった。これらの3株を、YS1646および大腸菌D10B培養物に加えて、貯蔵マウス血液または貯蔵健常ヒトドナー( $n = 3$ )からの血清または熱不活性化(HI)血清と、3時間、37°Cでインキュベートした。血清とインキュベーション後、細菌を連続希釈し、LB寒天プレートに播種し、コロニー形成単位(CFU)を培養した。

30

#### 【0702】

マウス血清で、全ての株は100%生存可能なままであり、補体不活性化に完全に耐性であった。ヒト血清で、全ての株は、熱不活性化血清で100%生存可能なままであった。大腸菌D10B株は、全ヒト血清から3時間後完全に排除された。全ヒト血清で、YS1646株はわずか6.37%の生存コロニーを示し、YS1646臨床的株の腫瘍コロニー形成が、ヒト血液における補体不活性化のために、限定的であることを示した。YS1646asd/FLG株について、3時間ヒト血清とインキュベーション後、31.47%の生存コロニーが残り、YS1646asd/pagP株について、72.9%の生存コロニーが残った。組み合わせYS1646asd/FLG/pagP株は、ヒト血清における補体に完全に耐性であった。

40

#### 【0703】

50



これらのデータは、全身投与したとき、株 Y S 1 6 4 6 ( V N P 2 0 0 0 9 ) の腫瘍コロニー形成が極めて低い理由を説明する。株 Y S 1 6 4 6 は、ヒト血清における補体不活性化に高度に感受性であるが、マウス血清では違うことがここで示された。これらのデータは、ヒトにおいて限定的腫瘍コロニー形成が観察され、マウス腫瘍が高レベルでコロニー形成するかを説明する。 f l j B / f l i C または p a g P 欠失またはこれらの変異の組み合わせは、部分的にまたは完全にこの表現型奪還を奪還する。それ故に、 Y S 1 6 4 6 a s d / p a g P、 Y S 1 6 4 6 a s d / F L G および Y S 1 6 4 6 a s d / F L G / p a g P 株でヒト血清で観察される安定性増強は、ヒト腫瘍コロニー形成増加を提供する。

#### 【 0 7 0 4 】

これらのデータおよびここに提供されるその他の知見は、鞭毛および / または p a g P の欠失が免疫刺激性細菌の腫瘍コロニー形成を増加させ、忍容性を改善し、抗腫瘍活性を増加させることを示す。例えば、 p a g P - である免疫刺激性細菌からの L P S は、 Y S 1 6 4 6 からの L P S より 2 2 倍低い I L - 6 を誘導し、それ故にヒト細胞で低炎症性であることを示す。さらに、 F L G、 h i l A および p a g P 欠失変異体の各々および全ては、 Y S 1 6 4 6 より弱毒化されている(下記実施例 1 2 参照)。フラジェリン - および p a g P - の一方または両方である、野生型株を含むサルモネラ株などの免疫刺激性細菌は、腫瘍 / 腫瘍微小環境コロニー形成増加および抗腫瘍活性増加の性質を示す。このような株を使用して、免疫療法産物および / または他の抗腫瘍産物などの治療ペイロードを送達でき、また h i l A および / または m s b B 欠失、アデノシン栄養要求性および本明細書の他の箇所に記載する他の性質などの治療性質を改善する修飾を含み得る。得られた株は、ある細胞への感染性、毒性細胞および腫瘍環境に提供されるプリンへの栄養要求性などの栄養要求を変える修飾により、腫瘍 / 腫瘍微小環境により効率的に標的化される。

#### 【 0 7 0 5 】

##### 実施例 1 2

F L G および P a g P 欠失変異体は、マウスにおいて Y S 1 6 4 6 より弱毒化されている上記修飾株が Y S 1 6 4 6 より弱毒化されているか否かを確認するため、中央致死用量 ( L D 5 0 ) 試験を実施した。 C 5 7 B L / 6 マウスに、漸増濃度の Y S 1 6 4 6、 F L G / A S D ( p A T I - T R E X 1 )、 H i l A / A S D ( p A T I - T R E X 1 ) または P a g P / A S D ( p A T I - T R E X 1 ) を静脈内注射した。 Y S 1 6 4 6 の L D 5 0 はこの株の公開された報告に一致して、  $1.6 \times 10^6$  cfu であることが判明した。 H i l A / A S D ( p A T I - T R E X 1 ) 株の L D 5 0 は  $5.3 \times 10^6$  cfu であることが判明し、病原性の 3 倍低減を示した。 P a g P / A S D ( p A T I - T R E X 1 ) 株の L D 5 0 は  $6.9 \times 10^6$  cfu であることが判明し、病原性の 4 倍低減を示した。 F L G / A S D ( p A T I - T R E X 1 ) 株の L D 5 0 は  $> 7 \times 10^6$  cfu であることが判明し、 Y S 1 6 4 6 と比較した病原性の  $> 4.4$  倍低減を示す。これらのデータは、上記遺伝子修飾がネズミチフス菌治療の病原性を低減し、ヒトにおける忍容性増加に至ることを示す。 V N P 2 0 0 0 9 のフェーズ I 臨床試験で ( Toso et al. ( 2002 ) J. Clin. Oncol. 20 ( 1 ) : 142 - 152 )、患者の腫瘍における細菌の存在は、試験した 2 つの最高用量、  $3 E 8$  CFU /  $m^2$  ( 33 % 存在 ) および  $1 E 9$  CFU /  $m^2$  ( 50 % 存在 ) で部分的にしか観察されないことが示され、 V N P 2 0 0 0 9 の容認できる用量は、コロニー形成の達成に低すぎることを示された。上記修飾を介する株の忍容性改善により、 V N P 2 0 0 0 9 より高用量で投与され得る。これは、腫瘍コロニー形成した患者のパーセンテージおよび腫瘍あたりの治療コロニー形成のレベルを改善する。

#### 【 0 7 0 6 】

##### 実施例 1 3

ネズミチフス菌免疫モジュレーター株は、ヒト単球における異種タンパク質の発現を示す上記のとおり、 h i l A 遺伝子およびフラジェリン遺伝子 f l j B および f l i C を、 a s d 遺伝子欠失と共にネズミチフス菌の Y S 1 6 4 6 株から欠失させ、それぞれ株 H i l A / A S D および F L G / A S D 株を得た。さらに、 F L G / A S D 株を、サルモネラの

10

20

30

40

50

サイトゾル株に蓄積されるシグナル配列を欠くりステリオリシンO(LLO)タンパク質(FLG/ASD/cLLO)を発現するようさらに修飾した。これらの株を、EF-1プロモーターおよびマウスサイトカインIL-2の発現カセットを含むプラスミドで電気穿孔した。さらに、FLG/ASD株を、非同族サイトカイン対照としてIL-15の発現プラスミドで電気穿孔した。付加的構築物を、CMVプロモーターを使用して作った。

#### 【0707】

発現プラスミドを含むこれらの株がヒト単球に感染し、マウスIL-2の産生を誘導するか否かを決定するために、THP-1ヒト単球性細胞を50,000細胞/ウェルでRPMI(Corning)+10%Nu血清(Gibco)に、感染1日前播種した。細胞を、RPMI 10

で1時間、50のMOIで感染させ、次いでPBSで3回洗浄し、RPMI+100µg/mlゲンタマイシン(Sigma)に再懸濁した。上清を48時間後96ウェルプレートから回収し、ELISA(R&D Systems)によりマウスIL-2の濃度を評価した。FLG/ASD-IL15対照ウェルで検出されたIL-2濃度は予想通り極めて低く、内因性ヒトIL-2とのある程度の交差反応性を反映する可能性がある(6.52pg/ml)。対照的に、FLG/ASD-IL-2株は、平均35.1pg/mlを誘導し、FLG/ASD/cLLO株でさらに高く、59.8pg/mlであった。最高のレベルがHilA/ASD-IL-2株で検出され、103.4pg/mlであった。これらのデータは、ネズミチフス菌免疫モジュレータープラットフォーム株からのIL-2などの機能的異種タンパク質の発現および分泌の実現可能性を示す。

10

20

#### 【0708】

##### 実施例14

hilA変異体での細胞感染は、低ヒト上皮細胞感染をもたらすhilA欠失ネズミチフス菌株の上皮細胞に感染する能力が低減されていることを示すために、HeLa子宮頸癌細胞を次のネズミチフス菌株で感染させた：プラスミド維持のために機能的asd遺伝子をコードするプラスミドを含むYS1646およびYS1646asdおよびYS1646asd/hilA。1×10<sup>6</sup> HeLa細胞を、DMEMおよび10%FBSを含む24ウェル皿に入れた。細胞を、ネズミチフス菌の対数期培養物で1時間感染させ、次いで、細胞をPBSで洗浄し、培地を、細胞外細菌を死滅させるために50µg/mlゲンタマイシン含有培地に置き換えた。4時間後、HeLa細胞単層をPBSで洗浄し、1%Triton×100融解緩衝液で溶解して、細胞内細菌を放出させた。溶解物を連続希釈し、LB寒天プレートに播種して、細胞内細菌数を定量した。hilA欠失を有する株は、機能的hilA遺伝子を有する株と比較して回収CFUの90%低減を示し、hilAの欠失が、上皮性由来細胞のネズミチフス菌感染を顕著に減少させることを示す。

30

#### 【0709】

##### 実施例15

hilAまたはfljB/fliC変異体での細胞感染は、ヒトマクロファージにおける低パイロトシスに至る

hilAまたはfljB/fliCネズミチフス菌株のマクロファージの細胞死を引き起こす能力の低減を示すために、THP-1ヒトマクロファージ細胞を次のネズミチフス菌株で感染させた：プラスミド維持を確実にするために機能的asd遺伝子をコードするプラスミドを含むYS1646およびYS1646asd、YS1646asd/fljB/fliCおよびYS1646asd/hilA。5×10<sup>4</sup>細胞を、DMEMおよび10%FBSを含む96ウェル皿に入れた。細胞を、細胞あたり100CFUのMOIで、1時間、ネズミチフス菌の洗浄対数期培養物で感染させた、次いで、細胞をPBSで洗浄し、培地細胞外細菌を死滅させるために50µg/mlゲンタマイシンおよび50ng/mlのインターフェロンガンマを含む培地に置き換えた。24時間後、THP-1細胞をCellTiter-Glo(登録商標)試薬(Promega)で染色し、生存可能細胞のパーセンテージを、発光を定量するためのSpectraMax(登録商標)プレートリーダー

40

50

を使用する発光細胞生存能アッセイを使用して決定した。hilA欠失株で感染させた細胞は約72%生存可能細胞を有し、一方YS1646感染細胞はわずか38%生存能を有し、hilAの欠失がヒトマクロファージの細胞死を防止することを示す。株YS1646 asd、YS1646 asd/fljB/fliCを含むプラスミドで感染させた細胞はそれぞれ40%および51%生存能を有し、フラジェリン遺伝子の欠失もヒトマクロファージの細胞死を防止することを示す。

【0710】

実施例16

IL-2発現カセットをコードするプラスミドを含む免疫刺激性ネズミチフス菌株でのヒトマクロファージ感染はIL-2の分泌に至る

10

ヒトTHP-1マクロファージを次のネズミチフス菌株で感染させた：真核生物プロモーター制御下にマウスIL-2の発現カセットおよびプラスミド維持を確実にするために機能的asd遺伝子をコードするプラスミドを含むYS1646 asd/fljB/fliC、YS1646 asd-cytoLLOおよびYS1646 asd/hilA。5×10<sup>4</sup>細胞を、DMEMおよび10%FBSを含む96ウェル皿に入れた。細胞を、細胞あたり50CFUのMOIで、1時間、ネズミチフス菌の洗浄対数期培養物で感染させ、次いで、細胞をPBSで洗浄し、培地を、細胞外細菌を死滅させるために50μg/mL ゲンタマイシン含有培地に置き換えた。48時間後、細胞上清を取り、R&D Systems<sup>TM</sup> Mouse IL-2 Quantikine(登録商標)ELISAキットを使用してマウスIL-2について試験した。残存細胞をCellTiter-Glo(登録商標)試薬(Promega)で染色し、生存可能細胞のパーセンテージを、発光を定量するためのSpectraMax(登録商標)プレートリーダーを使用する発光細胞生存能アッセイを使用して決定した。マウスIL-2の発現カセットをコードするプラスミドを含む、YS1646 asd/fljB/fliC、YS1646 asd-cytoLLOおよびYS1646 asd/hilA株は、それぞれ35pg/mL、60pg/mLおよび103pg/mLのIL-2を発現した。

20

【0711】

実施例17

マウスIL-2を発現するネズミチフス菌株は、インビボで強力な腫瘍増殖阻害を示すネズミチフス菌のYS1646株のhilAまたはフラジェリン遺伝子fljBおよびfliCに欠失を含む免疫刺激性ネズミチフス菌株をasd遺伝子欠失と合わせて、それぞれ、株 asd/hilAおよび asd/fljB/fliCを形成した。これらの株を、EF1プロモーターおよびマウスサイトカインIL-2のための発現カセットを含むプラスミドで電気穿孔した。

30

【0712】

IL-2発現プラスミドを含むネズミチフス菌株が抗腫瘍有効性を誘導することを示すために、muIL-2プラスミドを含む asd/hilA株またはmuIL-2プラスミドを含む asd/fljB/fliC株を、媒体対照と比較した。6~8週齢雌C57BL/6マウス(5マウス/群)の右脇腹に、MC38細胞(100μL PBS中5×10<sup>5</sup>細胞)をSC接種した。確立された脇腹腫瘍を担持するマウスに、5×10<sup>5</sup>CFUの asd/hilA(pATI-muIL-2)、 asd/fljB/fliC(pATI-muIL-2)またはPBS媒体対照を8日目にIV注射した。体重および腫瘍を週2回測定した。腫瘍測定を、電子ノギス(Fowler, Newton, MA)を使用して実施した。腫瘍体積を、修飾楕円体式、1/2(長さ×幅<sup>2</sup>)を使用して、計算した。マウスを、IACUC規制に従い、腫瘍サイズが体重の>20%に達したときまたは壊死性となったとき、殺した。

40

【0713】

実験は、 asd/hilA(pATI-muIL-2)株が、PBSと比較して有意な腫瘍制御を誘導することを示した(P=0.003、D21)。これらのデータは、 asd/fljB/fliC(pATI-muIL-2)株で観察されたものと同様であり

50

、これも、PBSと比較して有意な腫瘍増殖阻害を示した( $P = 0.005$ 、 $D21$ )。それ故に、両株は、結腸直腸癌のモデルで腫瘍増殖を強力に阻害するために、IL-2を発現する能力を示した。

【0714】

実施例18

サルモネラ *csgD* 遺伝子ノックアウト株操作および特徴づけ

*ansB* 株構築

L-アスパラギナーゼIIをコードする *ansB* 遺伝子を、先の実施例に記載する方法の変法を使用して、*YS1646 asd / FLG / pagP* 株から欠失させた。*ansB* 遺伝子が隣接する、それぞれ左手側および右手側配列の236塩基および251塩基を含む合成 *ansB* 遺伝子相同性アーム配列を合成し、*pSL0230* (配列番号377)と称するプラスミドにクローン化した。次いで、*cre / loxP* 部位が隣接するカナマイシン遺伝子カセットを *pSL0230* にクローン化し、*ansB* 遺伝子ノックアウトカセットをプライマー *ansb-1* (配列番号372)および *ansb-2* (配列番号373)でPCR増幅し、ゲル精製し、エレクトロポレーションにより温度感受性ラムダ・レッド組み換えプラスミド *pKD46* を担持する株 *YS1646 asd* に導入した。次いで、カナマイシン耐性遺伝子を上記のとおり *cre* 介在組み換えにより除去し、温度感受性プラスミドを、非許容温度での増殖により除去した。*ansB* 遺伝子ノックアウト配列を、プライマー *ansb-3* (配列番号374)および *ansb-4* (配列番号375) (表1参照)を使用するPCRで増幅し、DNA配列決定により確認した。*YS1646* の得られた変異誘導体を *YS1646 asd / FLG / pagP / ansB* と名付けた。

10

20

【0715】

株 *YS1646 asd / FLG / pagP / ansB* を、ネズミチフス菌クルリ線毛形成、セルロース産生および *c-ジ-GMP* 産生を制御するマスター遺伝子である *csgD* を欠失するようさらに修飾した。*csgD* 欠失は、セルロース介在バイオフィルム形成の可能性を排除し、炎症促進性シグナル伝達を低減し、宿主食細胞による取り込みを増強する。細胞内局在化のこの増加は、それによりプラスミド送達および免疫調節性タンパク質産生の有効性を増強する。

【0716】

*csgD* 株構築

*csgD* 遺伝子を、先の実施例に記載する方法の変法を使用して、*YS1646 asd / FLG / pagP / ansB* 株から欠失させた。*csgD* 遺伝子に隣接して、それぞれ左手側および右手側配列の207塩基および209塩基を含む合成 *csgD* 遺伝子相同性アーム配列を合成し、*pSL0196* (配列番号316)と称するプラスミドにクローン化した。次いで、*cre / loxP* 部位が隣接するカナマイシン遺伝子カセットを *pSL0196* にクローン化し、*csgD* 遺伝子ノックアウトカセットをプライマー *csgd-1* (配列番号317)および *csgd-2* (配列番号318)でPCR増幅し、ゲル精製し、エレクトロポレーションにより温度感受性ラムダ・レッド組み換えプラスミド *pKD46* を担持する株 *YS1646 asd* に導入した。次いで、カナマイシン耐性遺伝子を上記のとおり *cre* 介在組み換えにより除去し、温度感受性プラスミドを、非許容温度での増殖により除去した。*csgD* 遺伝子ノックアウト配列を、プライマー *csgd-3* (配列番号319)および *csgd-4* (配列番号320)を使用するPCRで増幅し、DNA配列決定により確認した。得られた親株 *YS1646* の変異誘導体を、*YS1646 asd / FLG / pagP / ansB / csgD* と名付けた。

30

40

50

【表 20】

## プライマー配列情報

| プライマー名称     | プライマー配列                     | 配列番号  |
|-------------|-----------------------------|-------|
| c s g d - 1 | cacttgctttaagatttgaatggctag | 3 1 7 |
| c s g d - 2 | ggtgtattcgctttcccatttgtc    | 3 1 8 |
| c s g d - 3 | tgtgctgtccaggtaatgcc        | 3 1 9 |
| c s g d - 4 | gacgacggttttctcgaagtctc     | 3 2 0 |

10

## 【0717】

c s g D 欠失株はコンゴレッドプレートで R D A R コロニーを形成できない  
 コンゴレッドプレートで増殖後にラフ・ドライ・アンド・レッド(R D A R)コロニーを  
 形成する能力は、細菌バイオフィーム形成について十分に検証されたアッセイである。粗  
 くかつ乾燥した質感は、セルロース産生に由来し、赤色は、クルリ線毛表面構造による色  
 素蓄積による。このアッセイについて、Y S 1 6 4 6 a s d / F L G / p a g P /  
 a n s B 株を、コンゴレッド寒天プレートでインキュベーション後、R D A R 表現型  
 を形成する能力について、Y S 1 6 4 6 a s d / F L G / p a g P / a n s B /  
 c s g D 株と比較した。コンゴレッド寒天プレートを、ソイトン(10 g / L)および  
 酵母抽出物(5 g / L)(N a C l 不含修飾 L B)を用い、コンゴレッド(40 mg / L)お  
 よびクマシーブリリアントブルー G - 2 5 0 (20 mg / L)を補って調製した。5マイク  
 ロリットルの静止期細菌培養物をコンゴレッドプレートにスポットし、37 で16時  
 間インキュベートし、次いで30 に移し、さらに120時間インキュベートした。コロ  
 ニー形態および色の目視による分析を実施し、R D A R コロニー形態型の存在または非存  
 在を確認するため連日記録した。

20

## 【0718】

2つの株のコロニー形態型を比較すると、Y S 1 6 4 6 a s d / F L G / p a g P /  
 a n s B / c s g D 株は、平滑な表現型を有し、コロニーは色が無い。比較して、  
 c s g D 遺伝子をなお含む Y S 1 6 4 6 a s d / F L G / p a g P / a n s B 株  
 は、古典的な粗野かつ乾燥した見掛けおよび色素取り込みの明確な証拠を示した。それ故  
 に、機能的アッセイは、クルリ線毛およびセルロース産生を欠くため、c s g D 株がバ  
 イオフィームを形成できないことを確認する。

30

## 【0719】

c s g D 欠失株は、トリプルネガティブ乳癌の高度難治性マウスモデルで優れた抗腫瘍有  
 効性を示す  
 免疫刺激性細菌治療が腫瘍にコロニー形成するが、有効性が限定的であるモデルにおける  
 、c s g D 欠失の影響を評価した。これは、腫瘍常在骨髄細胞への取り込みを限定し得て  
 、それにより治療利益を制限する、細菌産生セルロースの存在を示し得る(Crull et al.  
 (2011) Cellular Microbiology 13(8):1223-1233)。ヒトトリプルネガティブ乳  
 癌の代表的モデルである処置困難 E M T 6 モデルを利用した(Yu et al. (2018) PLoS  
 ONE 13(11):e0206223)。E M T 6 腫瘍細胞を乳房脂肪体に同所性に投与したとき、  
 脇腹への皮下とは逆に、モデルは、T細胞排除性、高度に転移性かつ、全ての承認された  
 チェックポイント抗体を含む免疫療法に高度に難治性である(Mariathasan et al. (20  
 18) Nature 554: 544-548)。

40

## 【0720】

この実験のために、6 ~ 8 週齢雌 B A L B / c マウス(5マウス/群)に、E M T 6 腫瘍細胞  
 (100 μL P B S 中 2 × 10<sup>5</sup> 細胞)を左乳房脂肪体に接種した。13日齢の確立さ  
 れた乳房腫瘍(約 5.5 mm<sup>3</sup>)を担持するマウスに、1 × 10<sup>7</sup> CFU の c s g D 欠失株 Y S  
 1 6 4 6 a s d / F L G / p a g P / a n s B / c s g D または親 Y S 1 6 4  
 6 a s d / F L G / p a g P / a n s B 株を1回 I V 注射し、P B S 対照と比較

50

した。細菌株は、構成的活性型マウス S T I N G を発現するプラスミドを含んだ (E F 1 a m u S T I N G R 2 8 3 G、詳細について下記実施例参照)。

#### 【0721】

P B S 処置マウスの腫瘍は一定に増殖し続け、35日目に最大腫瘍体積に達した ( $1199.0 \pm 298.1 \text{ mm}^3$ )。c s g D インタクトな株、Y S 1 6 4 6 a s d / F L G / p a g P / a n s B で処置したマウスは、このモデルで抗腫瘍有効性を示さず、同様に35日目に最大腫瘍体積に達した ( $1689.1 \pm 537.0$ )。これらの腫瘍のエキスビボ L B 播種は、全腫瘍のコロニー形成を示した。しかしながら、c s g D 欠失株、Y S 1 6 4 6 a s d / F L G / p a g P / a n s B / c s g D は、5匹のマウス中3匹の原発およびあらゆる転移疾患両者の完全治癒をもたらした (60 + 日目)。T G I 全体は45.7%であり、残り2匹のうち1匹の腫瘍は部分的応答し、その後最終的に増殖した。2つの細菌株は同じプラスミドペイロードを含んだが、一方のみが顕著な有効性を示した。それ故に、最も難治性かつ高度に転移性の同系腫瘍モデルの一つである同所性 E M T 6 で、c s g D 欠失を有する株は全身抗腫瘍有効性を誘導し、60%の完全奏効をもたらすことができた。

#### 【0722】

c s g D 欠失株は、インビボ細胞内取り込み増強を示す  
c s g D 欠失株が腫瘍常在骨髄細胞への大きな細菌取り込みにより有効性改善を示すか否かを決定するために、エキスビボゲンタマイシン防御アッセイを実施した (s e e、Crull et al. (2011) Cellular Microbiology 13(8):1223-1233)。この実験のために、6 ~ 8 週齢雌 C 5 7 B L / 6 マウス (4 マウス / 群) の右脇腹に、M C 3 8 細胞 ( $100 \mu\text{L}$  P B S 中  $5 \times 10^5$  細胞) を S C 接種した。大きな確立された脇腹腫瘍を担持するマウスに、17日目に  $1 \times 10^7$  CFU の c s g D 欠失 Y S 1 6 4 6 a s d / F L G / p a g P / a n s B / c s g D 株 (N = 12) または親 Y S 1 6 4 6 株 (N = 4) を I V 注射した。腫瘍を I V 投与7日後摘除し、重さを量り、1 mg / mL コラゲナーゼ I V および 20 mg / mL D N a s e I 添加 R P M I 中で刻み、振盪しながら37°C で30分間インキュベートして、単一細胞懸濁液を得た。30分後、懸濁液を70 mm フィルターを通し、回収した体積を2つの別の、同一サンプルに分割した。ゲンタマイシン (Thermo Fisher Scientific) を、対のサンプルの各々の一方に200 mg / mL で加え、細胞外細菌を死滅させ、サンプルを振盪しながら37°C で90分間インキュベートした。次いで細胞懸濁液サンプルを洗浄し、0.05% T r i t o n X で溶解し、C F U のために播種した。

#### 【0723】

結果は、ゲンタマイシン処置を伴わない Y S 1 6 4 6 処置腫瘍の C F U と比較して ( $11925 \pm 19859$  CFU)、ゲンタマイシン処置は、腫瘍で検出される C F U をほとんどなくした ( $51 \pm 45$  CFU)。これは、細菌が大部分これら腫瘍の細胞外に常在し、故に、ゲンタマイシン排除に感受性であったことを示す。c s g D 欠失 Y S 1 6 4 6 a s d / F L G / p a g P / a n s B / c s g D 処置群において、非ゲンタマイシン処置腫瘍は、十分にコロニー形成した腫瘍からの予想どおり高 C F U をもたらし、ゲンタマイシンでの処置は、低 C F U ( $1276 \pm 2410$  CFU) をもたらし、親 Y S 1 6 4 6 株 処置腫瘍よりはるかに多かった。これは、c s g D 欠失細菌の大部分が細胞内に常在し、故にゲンタマイシンから保護されるためである。これらのデータは、c s g D 欠失が細胞内細菌の取り込みを改善し、これはインビボで免疫調節性タンパク質のプラスミド送達を増強し得ることを示す。

#### 【0724】

実施例 19

プラスミド構築

p A T I - 1.75 と名付けたプラスミドを設計し、合成した；それはは、次の特性を含む：p B R 3 2 2 複製起点、a s d 遺伝子、除去のための H i n d III 部位が隣接するカナマイシン耐性遺伝子および発現カセット挿入のための多クローニング部位。ベクターを

p A T I - 1 . 7 5 と名付けた。発現カセットは、種々の配置で組み立てられる、真核生物プロモーター、オープンリーディングフレーム、転写後制御要素およびポリアデニル化シグナルを含む、複数の要素からなる。

【 0 7 2 5 】

プロモーターの例は、サイトメガロウイルス(CMV)最初期エンハンサー配列のすぐ下流でコード化されるヒトCMV最初期コアプロモーターおよびヒト伸長因子-1アルファ(EF-1)のコアプロモーターを含む。オープンリーディングフレーム(ORF)は、各々タンパク質に翻訳され得て、2A配列の挿入により別々のポリペプチドに分離され、それにより真核生物リボソームが2A配列内のGly残基とPro残基間のペプチド結合の挿入ができなくなる、1以上の配列を含み得る。2A配列の例は、Thomomys talpoides ウイルス(TaV)カプシドタンパク質からのT2Aペプチドおよび豚テシオウイルス(PTV)からのP2Aペプチドである。上流フーリン開裂部位(RRKR)および他のエンハンサー要素は発現タンパク質の開裂を促進するために上流に配置される。

10

【 0 7 2 6 】

転写後制御要素(PRE)の例は、ウッドチャック肝炎ウイルスPRE(WPRE)およびB型肝炎ウイルスPRE(HPRE)を含み、これは、サイトゾルへのmRNA核輸出を促進し、3'末端処理および安定性を増強することにより、遺伝子のサイトゾルmRNAの蓄積を増加させる。ポリアデニル化シグナル配列の例は、SV40ポリアデニル化シグナルおよびウシ増殖ホルモンポリアデニル化シグナルを含み、この何れも、転写停止促進に働き、RNA開裂複合体により認識される配列モチーフを含む、3'制御要素である。

20

【 0 7 2 7 】

実施例 20

インターフェロン症を促進する遺伝子における機能獲得型変異の同定

未知病因の重度自己炎症状態および血管障害を提示する対象の症例が起こり、しばしば変異に由来する。これら状態の原因は同定され得る。このような病理の変異的背景を同定するための過程は次のとおりである。第一段階で、インタクトなゲノムDNAを、症状を示す患者および健常個体から得る。全エクソームシーケンスを実施し、次いでイントロンおよびエクソンを分析する。遺伝子分析およびI型インターフェロン(IFN)の発現と関連する経路における産物の変異の同定を実施する。下表(および詳細な記載において)は、コード化タンパク質の構成的機能的活性化およびその後のI型IFNの永続性発現をもたらすことが知られる遺伝子の変異を挙げる。変異の同定後、同定された変異を有するまたは有しない完全長遺伝子をコードするcDNAを、I型IFNの発現の指標であるレポーター細胞株にトランスフェクトする。例えば、ルシフェラーゼの発現がIFN- $\alpha$ のためのプロモーターの制御下にあるレポーター細胞株が産生され得る。構成的活性である機能獲得型変異体はIFN- $\alpha$ の発現を促進し、一方非刺激野生型(WT)タンパク質はしない。

30

既知STING SAVI(乳児期発症STING関連脈管障害)変異体の場合、IFN- $\alpha$ のWT-STING刺激は、直接WT-STINGを活性化するために増加させた外の付加を必要とする。構成的活性変異は、cGAMP非依存的様式でIFN- $\alpha$ の発現を刺激する。STING、RIG-I、MDA5、IRF3およびIRF7の各々の機能獲得型変異の例を下に示す。機能獲得型変異が対象で同定されるかインビトロ変異およびスクリーニングにより産生されることができると他のこのような遺伝子は、STING、RIG-I、MDA-5、IRF-3、IRF-5、IRF-7、TRIM56、RIP1、Sec5、TRAF3、TRAF2、TRAF6、STAT1、LGP2、DDX3、DHX9、DDX1、DDX9、DDX21、DHX15、DHX33、DHX36、DDX60およびSNRNP200を含むが、これらに限定されない。

40

【表 2 1】

I 型 I F N の永続性発現をもたらす機能獲得型変異

| STING                             | RIG-I     | MDA5  | IRF3         | IRF7  |
|-----------------------------------|-----------|-------|--------------|---|
| V147L                             | E373A     | T331I | S396D        | S477D/S479D                                 |
| N154S                             | C268F     | T331R | S396D/S398D  | S475D/S476D/<br>S477D/S479D/<br>S483D/S487D |
| V155M                             |           | A489T | S396D/S398D/ |   |
| S402D/T404D/                      |           |       |              |   |
| S405D                             | Δ 247-467 |       |              |   |
| G166E                             |           | R822Q |              | S475D/S477D/<br>S479D                       |
| C206Y                             |           | G821S |              |   |
| G207E                             |           | A452T |              |   |
| R281Q                             |           | A946T |              |   |
| R284G                             |           | R337G |              |   |
| R284S                             |           | D393V |              |   |
| R284M                             |           | G495R |              |   |
| R284K                             |           | R720Q |              |   |
| R284T                             |           | R779H |              |   |
| S102P, F279L                      |           | R779C |              |   |
| R197A, D205A                      |           | L372F |              |   |
| S272A, Q273A                      |           |       |              |   |
| R310A, E316A                      |           |       |              |   |
| E316A                             |           |       |              |   |
| E316N                             |           |       |              |   |
| E316Q                             |           |       |              |   |
| S272A                             |           |       |              |   |
| R375A                             |           |       |              |   |
| R293A, T294A,<br>E296A,           |           |       |              |   |
| D231A                             |           |       |              |   |
| R232A                             |           |       |              |   |
| K236A                             |           |       |              |   |
| Q273A                             |           |       |              |   |
| S358A, E360A,<br>S366A            |           |       |              |   |
| D231A, R232A,<br>K236A, R238<br>A |           |       |              |   |
| R238A                             |           |       |              |   |
| V147M                             |           |       |              |   |
| S324A, S326A                      |           |       |              |   |

10

20

30

40

## 【 0 7 2 8 】

配列番号 305 ~ 309 に示すヒト STING の配列を基準として、アミノ酸残基 R197、D205、R310、R293、T294、E296、S272、Q273、E316、D231、R232、K236、S358、E360、S366 および R238 は、それぞれ、配列番号 351 に示すマウス STING の配列を基準として、アミノ酸残基 R196、D204、R309、R292、T293、E295、S271、Q272、E315、D230、R231、K235、S357、E359、S365 および R237 に対応する。

## 【 0 7 2 9 】

50



置換の各々の保存的置換も含まれる(各アミノ酸について保存的変異の例を挙げる、定義セクションにおける表参照、すなわち、野生型がSerではないSerについてAla)。

#### 【0730】

変異の同定後、同定された変異を有するまたは有しない完全長遺伝子をコードするcDNAを、I型IFNの発現の指標であるレポーター細胞株にトランスフェクトする。例えば、ルシフェラーゼの発現がIFN- $\alpha$ のためのプロモーターの制御下にあるレポーター細胞株が産生され得る。構成的活性である機能獲得型(GOF)変異体はIFN- $\alpha$ の発現を促進し、一方非刺激野生型(WT)タンパク質はしない。既知STING SAVI(乳児期発症STING関連脈管障害)変異体の場合、IFN- $\alpha$ のWT-STING刺激は、直接WT-STINGを活性化するためにcGAMPの漸増外因性レベルの付加を必要とする。構成的活性変異は、cGAMP非依存的様式でIFN- $\alpha$ の発現を刺激する。STING、RIG-I、MDA5、IRF3およびIRF7の各々の機能獲得型変異の例を上にし、本明細書の他の箇所に記載する。機能獲得型変異が対象で同定されるかインビトロ変異およびスクリーニングにより産生されることができ他のこのような遺伝子は、STING、RIG-I、MDA-5、IRF-3、IRF-5、IRF-7、TRIM56、RIP1、Sec5、TRAF3、TRAF2、TRAF6、STAT1、LGP2、DDX3、DHX9、DDX1、DDX9、DDX21、DHX15、DHX33、DHX36、DDX60およびSNRNP200を含むが、これらに限定されない。機能獲得型変異は、I型INFの発現を増加させるかまたは発現を構成的とする。

10

20

#### 【0731】

ヒト細胞における機能的構成的I型IFN変異体の発現

特異的ヒトSTING(アレルR232)およびIRF3機能獲得型(GOF)変異体をpATI-1.75ベクターにクローン化し、配列をPCRにより確認した。STINGおよびIRF3 GOF発現プラスミドがヒト細胞で機能的I型IFNを誘導できるか否かを決定するために、プラスミドを内因性STINGを含まないHEK293T STINGヌルレポーター細胞(InvivoGen)を使用して評価した。これらの細胞は、内因性IFN刺激応答要素(ISRE)プロモーターの制御下に置かれた分泌型胚アルカリホスファターゼ(SEAP)を発現し、ISREのコード配列は、ノックイン技術を使用してSEAPORFに置き換えられている。I型インターフェロン活性を、細胞上清におけるI型IFN刺激SEAP産生のモニタリングにより評価し得る。

30

#### 【0732】

GOF変異体によるI型IFNの相対的産生を試験するために、 $1 \times 10^5$  293T-Dual<sup>TM</sup>ヌル細胞を1日前にポリ-L-リシンで被覆されたプレートに播種し、24ウェルプレートで80%コンフルエンスを達成した。トランスフェクション当日、200ngのSTING野生型(WT)およびIRF3 WT対照およびヒト細胞で非機能的であることが文献で報告されている(V155R、STINGにおいて)陰性対照(NC)変異を含む、一団のSTINGおよびIRF3 GOF変異体をコードするプラスミドを無血清培地で希釈し、適切な試薬:DNA比でFuGENE(登録商標)トランスフェクション試薬(Promega)に加えた。一夜インキュベーション後各サンプルからの細胞培養上清を集め、100 $\mu$ Lの細胞培養上清を50 $\mu$ L QUANTI-Blue<sup>TM</sup>試薬(InvivoGen)(SEAP測定のために使用)に加えた。I型インターフェロン活性化を、650nmの吸光度でSpectra Max(登録商標)M3分光光度計(Molecular Devices)でのISRE誘導SEAP活性の測定により決定した。

40

#### 【0733】

下表に示すとおり、全GOF変異体は、I型IFN活性を誘導しなかった野生型および陰性対照と比較して、ヒト細胞においてSTINGリガンド非依存的様式でI型IFN活性を誘導できた。最高のレベルのI型IFN誘導は、ヒトSTING R284GおよびIRF3 S396Dリン酸化模倣体バリエーションで得られた。これらのデータは、GOF変異体をコードするプラスミドが、cGAMP非依存的様式でI型IFNを誘導できる機能

50

的、構成的 S T I N G および構成的リン酸化模倣体 I R F 3 を産生する能力を支持する。

【表 2 2】

| GOF変異体                  | 平均吸光度<br>(650nm) | 標準偏差  |
|-------------------------|------------------|-------|
| プラスミド対照                 | 0.049            | 0.002 |
| h u S T I N G WT        | 0.144            | 0.004 |
| h u S T I N G V147L     | 1.399            | 0.015 |
| h u S T I N G N154S     | 1.382            | 0.008 |
| h u S T I N G V155M     | 1.360            | 0.048 |
| h u S T I N G C206Y     | 1.566            | 0.121 |
| h u S T I N G R281Q     | 1.546            | 0.132 |
| h u S T I N G R284G     | 1.831            | 0.039 |
| h u S T I N G V155R(NC) | 0.181            | 0.014 |
| h u I R F 3 WT          | 0.781            | 0.073 |
| h u I R F 3 S396D       | 1.922            | 0.131 |

10

【0734】

構成的 I 型 I F N 変異体をコードするプラスミドを含む鞭毛欠失株の感染は、ヒト M 2 マクロファージを I 型 I F N 産生 M 1 マクロファージに変換する

20

構成的 I 型 I F N G O F バリエーションをコードするプラスミドを含む鞭毛欠失株で感染させた初代ヒト M 2 マクロファージが、I 型 I F N および C X C L 1 0 ( I P - 1 0 としても知られる)などの下流ケモカインのプロデューサーに変換されるか否かを決定した。

【0735】

健常ヒトドナーから単離した凍結ヒト P B M C を、完全培地 ( R P M I - 1 6 4 0 + 1 X 非必須アミノ酸 + 5 % ヒト A B 血清) で解凍し、10 分間、800 RPM で室温で遠心分離して洗浄した。P B M C を P B S + 2 % F B S に再懸濁し、単球を C D 1 6 枯渴キット ( StemCell Technologies) を使用して負に単離した。次いで、単離した未利用単球を P B S + 2 % F B S での遠心分離により洗浄し、100 ng / mL ヒト M - C S F および 10

30

ng / mL ヒト I L - 4 を含む完全培地に再懸濁した。次いで、単離単球 ( 3 e 5 / ウェル) を 7 5 0 マイクロリットルの最終体積で 2 4 ウェルプレートに播種した。播種 2 日後、細胞培養培地を完全に吸引し、100 ng / mL ヒト M - C S F および 10 ng / mL ヒト I L - 4 を含む新鮮な完全培地と置き換えた。2 日後 ( 4 日目)、ウェルあたりサイトカインを含む 5 0 0 μ L の完全培地を加え、4 8 時間インキュベートした。6 日目、細胞培養培地を完全に吸引し、サイトカインがない新鮮完全培地に置き換えた。デュプリケートウェルを、次の株で 1 時間、4 5 0 の M O I で感染させた：野生型 ( W T ) ヒト ( h u ) S T I N G

40

をコードするプラスミドを含む Y S 1 6 4 6 a s d / F L G ; H u S T I N G R 2 8 4 G バリエーションをコードするプラスミドを含む Y S 1 6 4 6 a s d / F L G ; W T

40

h u I R F 3 をコードするプラスミドを含む Y S 1 6 4 6 a s d / F L G ; H u I R F 3 S 3 9 6 D バリエーションをコードするプラスミドを含む Y S 1 6 4 6 a s d / F L G ; またはプラスミド対照を含む株。次いで、細胞を P B S で 3 回洗浄し、R P M I + 1 0 0 μ g / mL ゲンタマイシン ( Sigma) に再懸濁した。対照として、臨床的化合物 A D U - S 1 0 0 のアナログである S T I N G アゴニスト 3 ' 5 ' R p R p c - ジ - A M P ( InvivoGen) を、10 μ g / mL で細胞に加えた。

【0736】

2 4 時間後、細胞を - M E 添加 3 5 0 μ L 緩衝液 R L T ( Qiagen) で溶解し、次の修飾をした Qiagen RNeasy Mini キットを使用して R N A 抽出を実施した。RNase-Free DNase キット ( Qiagen) を使用するゲノム D N A 除去段階を、総 R N A からゲノム D N A を除去するために加えた。総 R N A 濃度を NanoDrop™ OneC UV-Vis 分光光度計 ( Th

50

ermo Scientific)を使用して測定した。各サンプルの純度もA260/A230吸収比から評価した。RNAを、逆転写を実施するまで凍結 - 解凍せずに - 80 で保存した。製造業者の指示に従い、30 µL反応でC1000 Touch Thermal Cycler(Bio-Rad)およびSuperScript™ VILO™ Master Mix(Invitrogen)を使用して0.4 ~ 1 µgの鋳型RNAからcDNAの合成を実施した。

【0737】

qPCRをCFX96 Real-Time系(Bio-Rad)で実施した。huCXCL10(qHsaCED0046619)、huIRF3(qHsaCID0013122)、huSTING(qHsaCID0010565)およびhuIFNB1(qHsaCED0046851)SYBR(登録商標)プライマーをBio-Radから購入した。qPCR反応(20 µL)を、iTaq Universal SYBR(登録商標)Green Supermix(Bio-Rad)を使用して、プロトコールに従い実施した。BioRad CFX96 Real-Time系の標準的熱循環プログラムは、95 変性を30秒間、続いて40サイクルの95 で5秒間および60 で30秒間からなった。無鋳型対照との反応を各プレートのプライマーの各セットについて包含させた。全サンプルをデュプリケートで流し、平均Cq値を計算した。標的mRNAの定量を、Gapdh対照mRNA(Bio-Rad、qMmuCED0027497)を使用して正規化した。Cqを、標的遺伝子と対照遺伝子間の差異として計算した。Cqを、処置のCq値を非処置対照のCq値に対して正規化することにより得た。増加倍率を、 $2^{-Cq}$ として計算した。値を、デュプリケートウェルの平均として下表に示す。

【0738】

下表に示すとおり、プラスミド対照の感染と比較して、huSTING WTおよびhuSTING R284Gをコードするプラスミドを含むYS1646 asd / FLG株は、小分子TINGアゴニストと比較して有意に高い、高レベルのSTING発現を誘導した。同様に、huIRF3 WTおよびhuIRF3 - S396Dをコードするプラスミドを含む株は、プラスミド対照または小分子TINGアゴニストより有意に高い、高レベルのIRF3発現を誘導した。huSTING R284Gバリエーションをコードするプラスミドを含む細菌株は、huSTING WTをコードするプラスミドを含む株と比較して、はるかに高いIFN およびCXCL10発現を誘導した。これは、構成的STING GOFバリエーションをコードするプラスミドを含む株が、ヒト初代、免疫抑制性M2マクロファージを、M1 I型IFN産生細胞に変換することを示す。huIRF3 WTおよびhuIRF3 - S396Dをコードするプラスミドを含む株は、huSTING - R284Gバリエーションと比較して、何れもIFN を多く誘導するが、CXCL10の誘導は少ない。

10

20

30

40

50

【表 2 3】

| GOF変異体              | 非トランスフェクト対照を超える発現倍率 |       |             |         |
|---------------------|---------------------|-------|-------------|---------|
|                     | STING               | IRF3  | IFN $\beta$ | CXCL10  |
| プラスミド対照             | 22.3                | 0     | ND          | ND      |
| huSTING WT          | 24017.1             | ND    | 3.4         | 3934.5  |
| huSTING R284G       | 36542.7             | ND    | 20          | 23484.5 |
| huIRF3 WT           | 22.7                | 478.9 | 17.5        | 10766.2 |
| huIRF3-S396D        | 30.8                | 346.4 | 26.3        | 15696.1 |
| 3' 5' R pRp c-ジ-AMP | 244.8               | 1.11  | 1.77        | 594.1   |

ND=データなし

10

20

## 【0739】

これらのデータは、ヒト初代M2マクロファージにおける構成的GOF I型IFNバリエーションの発現およびこれらの細胞のM1様I型IFN産生細胞への変換を示す。

## 【0740】

## 実施例 2 1

STING、RIG-I、MDA5、IRF3、IRF7および他のインターフェロン経路遺伝子における機能獲得型変異改善を同定するためのタンパク質操作スクリーニング構成的活性型であり、インターフェロン症を促進する機能獲得型(GOF)アミノ酸変異体は、実施例20に概説するとおり、ヒトから同定される。多くのGOF変異は、遺伝子の特定の位置のアミノ酸コドンを変える、一塩基対ヌクレオチド変化による。例えば、STINGにおいて、V147L変異は、c.439G Cの変異により起こる；N154Sは、c.461A Gの変異により起こる；そしてV155Mはc.463G Aの変異により起こる。スクリーニングの目的は、高レベルのI型インターフェロン発現に至る構成的活性変異体の同定である。変異したときインターフェロン症を促進することが知られる部位での設計された変異は、多数のアミノ酸置換の試験を可能とする。この例では、設計されたアミノ酸での部位特異的変異誘発を変異が知られる位置で実施し(上記表(実施例20)に概説)、高レベルI型インターフェロン発現に至る活性が増強された変異を同定する。

30

## 【0741】

遺伝子からの相同cDNA配列を有する5'末端および3'末端で隣接する設計された置換を伴うPCRプライマーを産生する。QuikChange(登録商標)部位特異的変異導入キット(Agilent)または他の同等な市販キットを使用して、設計された変異を含むPCR産物を産生する。PCR増幅プラスミドをDpnIで処置し、次いで適格性大腸菌細胞に電気穿孔する。個々のクローンを単離し、プラスミドミニプレップを実施し、所望の変異の配列同一性を確認する。次いで、大規模プラスミドプレップを実施し(Qiagenキットを使用)、DNAを内因性STINGを含まないHEK293T STINGレポーター細胞(InvivoGen)にトランスフェクトする。これらの細胞は、内因性IFN- $\beta$ プロモーターの制御下に置かれた分泌型ルシフェラーゼであるLucia<sup>TM</sup>ルシフェラーゼを発現する；IFN- $\beta$ のコード配列は、ノックイン技術を使用してLucia<sup>TM</sup>ルシフェラーゼORF

40

50

に置き換えられている。次いで、構成的活性型化された変異体を、ルシフェラーゼ活性の I F N - プロモーター誘導発現の測定により同定し、ランク付けする。

【 0 7 4 2 】

実施例 2 2

構成的活性免疫刺激タンパク質をコードするプラスミドの免疫刺激性細菌株への形質転換免疫刺激性タンパク質および機能的 a s d 遺伝子をコードする発現カセットを含む選択プラスミドを、下記設定の 0.2 cm ギャップキュベット(BTX, San Diego, Calif.)を使用して、B T X 6 0 0 エレクトロポレーターを使用して a s d 遺伝子を欠くネズミチフス菌株に電気穿孔する：2.5 kV、186 オーム、50  $\mu$ F。電気穿孔細胞を 50  $\mu$ M ジアミノピメリン酸(D A P)を添加した 1 mL S O C に加え、1 時間、37  $^{\circ}$ C でインキュベートし、次いで D A P を含まない寒天プレートに広げ、機能的 a s d 遺伝子を有するプラスミドを受けた株を選択した。単一コロニー単離後、細胞バンクを、無菌溶原性ブロス(L B)のフラスコにネズミチフス菌の単一の十分に単離されたコロニーを接種し、37  $^{\circ}$ C で 250 RPM で攪拌しながらインキュベートすることにより産生する。培養物が静止期まで増殖した後、細菌を 10% グリセロール含有 P B S で洗浄し、-60  $^{\circ}$ C 未満の温度で小分けして凍結して保存する。

10

【 0 7 4 3 】

実施例 2 3

プラスミドは、ヒト細胞における機能的 S T I N G 機能獲得型変異体の発現を示す免疫刺激性細菌株を、補完 a s d 遺伝子および S T I N G 機能獲得型(G O F)変異体の真核生物プロモーター制御発現をする発現カセットを含むプラスミドで電気穿孔する。

20

【 0 7 4 4 】

S T I N G G O F 発現プラスミドがヒト細胞にトランスフェクトされ、機能的 S T I N G タンパク質を発現するか否かを決定するために、内因性 S T I N G を含まない H E K 2 9 3 T S T I N G レポーター細胞(InvivoGen)、が使用される。これらの細胞は、内因性 I F N - プロモーターの制御下に置かれた分泌型ルシフェラーゼである Lucia<sup>TM</sup> ルシフェラーゼを発現する；I F N - のコード配列は、ノックイン技術を使用して Lucia<sup>TM</sup> ルシフェラーゼ O R F に置き換えられている。環状ジヌクレオチド(C D N)刺激を、I F N 刺激応答要素(I S R E)誘導分泌型胚アルカリホスファターゼ(S E A P)産生および/または Lucia<sup>TM</sup> ルシフェラーゼの I F N - 依存性発現モニタリングにより、29 3 T-Dual<sup>TM</sup> S T I N G(I S G / K I - I F N b)細胞(InvivoGen)で評価し得る。2 種のレポータータンパク質、S E A P および Lucia<sup>TM</sup> ルシフェラーゼを、それぞれ QUANTI-Blue<sup>TM</sup> および QUANTI-Luc<sup>TM</sup> を使用して細胞培養上清で測定する。

30

【 0 7 4 5 】

このために、h u S T I N G(ヒト W T S T I N G)、h u S T I N G - ヌル(ヒトヌル S T I N G)または W T m S T I N G(マウス S T I N G)を含む  $5 \times 10^5$  H E K 2 9 3 T-Dual細胞を、1 日前にポリ-L-リシンで被覆されたプレートに播種し、80% コンフルエンスを達成する。トランスフェクション当日、一団の S T I N G バリエーションをコードするプラスミド(実施例 2 0 または詳細な記載または実施例 2 1 に記載のとおり設計)を無血清培地で希釈し、適切な試薬：D N A 比で FuGENE(登録商標)トランスフェクション試薬(Promega)に加え、細胞を c G A M P 存在下または非存在下でインキュベートして、触接 S T I N G シグナル伝達を活性化させる。各サンプルからの細胞培養上清を、一夜インキュベーション後集め、10  $\mu$ L の細胞培養上清を 50  $\mu$ L QUANTI-Luc<sup>TM</sup> 試薬(InvivoGen)に加える。I 型インターフェロン活性化を、SpectraMax(登録商標)M 3 分光光度計(Molecular Devices)での分泌ルシフェラーゼレベルの測定により決定する。これらのデータは、トランスフェクトプラスミドが、c G A M P 非依存的様式で I 型 I F N を誘導できる機能的、構成的 S T I N G を産生する能力を支持する。

40

【 0 7 4 6 】

実施例 2 4

m S T I N G 機能獲得型(G O F)コード化株は、マウスにおける顕著な抗腫瘍活性を示す

50

サイトゾルDNA/RNAセンサーの構成的変異体をコードし、構成的I型IFN発現に至るmSTING GOF株は、インピボでプラスミド含有標的株の抗腫瘍有効性を増強する。これを証明するために、実施例23で試験したmSTING GOF変異体の発現プラスミドを含むネズミチフス菌株を、マウス結腸癌モデルにおける腫瘍有効性について、ネズミチフス菌プラスミドベクター対照株および媒体対照と比較する。6~8週齢雌C57BL/6マウス(9マウス/群)に、右脇腹にMC38細胞(100μL PBS中5×10<sup>5</sup>細胞)をSC接種する。確立された脇腹腫瘍を担持するマウスに、8日目に5×10<sup>5</sup>CFUのmSTING GOFコード化バリエーション、ネズミチフス菌プラスミド対照またはPBS媒体対照で形質転換したネズミチフス菌をIV注射する。体重および腫瘍を週2回測定する。腫瘍測定を電子ノギス(Fowler, Newton, MA)を使用して実施する。腫瘍体積を修飾楕円体式、1/2(長さ×幅<sup>2</sup>)を使用して計算する。マウスを、IACUC規制に従い、腫瘍サイズが体重の>20%に達したときまたは壊死性となったとき、殺

【0747】

実験は、mSTING機能獲得型産物をコードするネズミチフス菌などのサルモネラなどの免疫刺激性細菌は、mSTING機能獲得型を発現しない対照と比較およびPBSと比較して、強力な腫瘍制御を誘導することを示す。

【0748】

実施例25

全身投与した構成的活性型STINGバリエーションをコードする細菌は、インピボでMC38結腸腫瘍の増殖を阻害する

構成的活性型STINGをコードする発現プラスミドを含む免疫刺激性細菌株が、抗腫瘍有効性を誘導することを示すために、株YS1646-*asd*/FLG(フラジェリン遺伝子*fljB*および*fliC*両者のノックアウト)を、ヒト伸長因子-1アルファ(EF-1アルファ)プロモーター下にアレルR232およびGOF変異V155Mを有するヒトSTING(STING R232-V155M)の発現カセットを含むプラスミドを電気穿孔し、YS1646単独およびPBS媒体対照と比較した。STING R232-V155Mをコードする遺伝子は、DNA合成を使用して産生した。6~8週齢雌C57BL/6マウス(5マウス/群)の右脇腹に、MC38細胞(100μL PBS中5×10<sup>5</sup>細胞)をSC接種した。確立された脇腹腫瘍を担持するマウス(n=5)に、8日目に次のとおりV注射した：(1)PBS；(2)5×10<sup>5</sup>CFUのYS1646；および(3)5×10<sup>5</sup>CFUのYS1646-*asd*/FLG STING R232-V155M。腫瘍測定をノギスを使用して実施し、腫瘍体積を、修飾楕円体式、1/2(長さ×幅<sup>2</sup>)を使用して、計算した。

【0749】

下表に示す結果は、YS1646-*asd*/FLGヒトSTING R232-V155M株が、PBSと比較して有意な腫瘍制御(60% TGI)を誘導し(p<0.05)、20%の即時完全奏効を有した。それ故に、構成的活性型STINGバリエーションを送達する免疫刺激性細菌株は、強力に腫瘍増殖を阻害し、結腸直腸癌のモデルで20%治癒率を示すことができる。

【表24】

|  | 平均腫瘍体積(mm <sup>3</sup> ) | 腫瘍増殖阻害% | p値対照  | %治癒 |
|--|--------------------------|---------|-------|-----|
| PBS  | 188.9                    | 0%      |       | 0%  |
| YS1646                                       | 122.2                    | 35%     | N.S.  | 0%  |
| YS1646-Δ <i>asd</i> /ΔFLG huSTING R232-V155M | 75.5                     | 60%     | <0.05 | 20% |

10

20

30

40

N.S. = 非有意

【0750】

実施例 26

構成的活性型STINGバリエントをコードする免疫刺激性細菌は、インターフェロン制御因子(IRF)プロモーターからの発現増強を刺激する

インターフェロン制御因子(IRF)、例えばIRF-3およびIRF-7は、IFN転写を制御するタンパク質である。構成的活性型STINGをコードする免疫刺激性細菌のIRF活性化に対する効果を示すために、RAW 264.7マウスマクロファージから産生したデュアルIRF-LuciaおよびMIP-2-SEAP(分泌型胚アルカリホスファターゼ)マウスレポーター細胞株(RAW-Dual<sup>TM</sup>; InvivoGen)を使用した。これらのマクロファージは、トール様受容体(TLR)、cGASおよびSTINGを含むいくつかのパターン認識受容体(PRR)を発現する。レポーター細胞は、SEAP(分泌型胚アルカリホスファターゼ)およびLucialシフェラーゼをコードする2つのレポーター遺伝子を安定に発現する。Lucialシフェラーゼレポーター遺伝子は、5つのIFN刺激応答要素(ISRE)と連動して、ISG54(インターフェロン刺激遺伝子54)最小プロモーターの制御下にある。IRF-3およびIRF-7などのIRFが活性化されたとき、ISREに結合して、I型IFN応答を誘導する。それ故に、Lucialシフェラーゼの発現は、IRFの活性化を報告する。

【0751】

RAW-Dual<sup>TM</sup>(IRF-Lucia/KI-[MIP-2]SEAP)レポーター細胞(InvivoGen, Cat. Code: rawd-ismip)を、96ウェル組織培養プレートに、抗生物質不含培地(DMEM含有グルコース、L-グルタミンおよび10%FBS)中2×10<sup>5</sup>細胞/ウェルで播種し、37°Cで5%CO<sub>2</sub>中、一夜インキュベートした。50μg/mLカナマイシンを含む3mLの修飾LB培養物(トリプトンをソイトンに置換)に、グリセロール原液から細菌株を直接接種し、一夜、振盪しながら37°Cでインキュベートした。株YS1646-*asd*/FLGおよびYS1646-*asd*/h11Aを、ヒト伸長因子-1アルファ(EF-1アルファ)プロモーター下、R232アレル(huSTING)またはGOF変異V147L(huSTING V147L)またはV155M(huSTING V155M)を有するSTINGバリエントを有するヒトSTINGをコードするプラスミドで形質転換した。発現カセットをDNA合成により産生した。

【0752】

翌日、一夜培養物をOD600nmで分析し、培養体積を、真核生物細胞培地(グルコース、L-グルタミンおよび10%FBSを含み、抗生物質を含まないDMEM)での希釈により4×10<sup>8</sup>CFU/mL濃度に調節した。細菌株での感染を、100μL希釈培養/ウェルを加えることにより、200のMOIで実施し、5分間、1000rcfで遠心分離し、続いて1時間、37°Cでインキュベーションした。次いで、感染を100μL/ウェル無菌PBSで2回洗浄し、50μg/mLゲンタマイシンを含む新鮮培地を、細胞外細菌を死滅させるために加えた。環状ジヌクレオチド、2'-3'-c-G-AM(PS)2(Rp,Rp)(InvivoGen, Cat. Code: tlrl-nacda2r-01, tlrl-nacda2r)を、インターフェロン制御因子(IRF)誘導の陽性対照として非感染ウェルに加えた(CDN陽性対照)。ウェルあたり1μg環状ジヌクレオチドを、10μLの100μg/mL原液を加えることにより、加えた。感染を48時間、37°Cで続けた。非感染レポーター細胞を、mu-IL-2をコードする株YS1646-*asd*/FLGで感染したレポーター細胞と同様、陰性対照として使用した。

【0753】

IRF経路誘導を、感染48時間後分析した。ウェルあたり20μL上清を採取し、50μLの新たに調製したQUANTI-Luc<sup>TM</sup>検出培地(Lucialシフェラーゼ検出試薬; InvivoGen, Cat. Code: rep-qlc1, rep-qlc2)と、黒色、平透明底96ウェルプレート中で混合し、発光をSpectraMax(登録商標)M5マイクロプレートリーダー(Molecular Devices)で検出した。結果を下表に示す。非感染細胞およびMu-IL-2をコードす

る Y S 1 6 4 6 - a s d / F L G (陰性対照) 感染細胞は、最低量の I R F 発光を示した。C D N を加えた非感染細胞 (C D N 陽性対照) は、最高量の I R F 発光を示した。Y S 1 6 4 6 - a s d / F L G 株で、V 1 4 7 L 変異を有する h u S T I N G は、h u S T I N G と比較して I R F 発光が 2 5 8 % 増加し、V 1 5 5 M 変異を有する h u S T I N G は、h u S T I N G と比較して 2 8 2 % 増加した。Y S 1 6 4 6 - a s d / h i l A 株で、V 1 4 7 L 変異を有する h u S T I N G は、h u S T I N G と比較して I R F 発光が 1 0 8 6 % 増加し、V 1 5 5 M 変異を有する h u S T I N G は、h u S T I N G と比較して 2 0 1 % 増加した。それ故に、構成的活性型 S T I N G バリエントは、下流 I R F 経路シグナル伝達活性化のために、免疫刺激性細菌での感染を介してマクロファージに送達され得る。

10

【表 2 5】

感染 4 8 時間後の生デュアル™細胞 I R F 発光

|      |              |          | Y S 1 6 4 6 株+プラスミド組み合わせ |          |                 |                 |                     |                |                 |
|------|--------------|----------|--------------------------|----------|-----------------|-----------------|---------------------|----------------|-----------------|
|      |              |          | Δ a s d / Δ F L G        |          |                 |                 | Δ a s d / Δ h i l A |                |                 |
| 測定   | 非感染細胞(無 CDN) | CDN 陽性対照 | mu-IL-2                  | Hu-STING | Hu-STING V 147L | Hu-STING V 155M | Hu-STING            | HuSTING V 147L | Hu-STING V 155M |
| 1    | 53           | 1407     | 84                       | 146      | 414             | 473             | 81                  | 1204           | 190             |
| 2    | 31           | 1401     | 84                       | 146      | 364             | 355             | 93                  | 1164           | 187             |
| 3    | 37           | 1537     | 90                       | 121      | 289             | 339             | 134                 | 977            | 243             |
| 平均   | 40.3         | 1448.3   | 86.0                     | 137.7    | 355.7           | 389.0           | 102.7               | 1115.0         | 206.7           |
| 標準偏差 | 11.4         | 76.8     | 3.5                      | 14.4     | 62.9            | 73.2            | 27.8                | 121.2          | 31.5            |

20

【 0 7 5 4】

実施例 2 7

構成的 I 型 I F N バリエントをコードするプラスミドを含む免疫刺激性細菌は、結腸直腸癌のマウスモデルで強力な抗腫瘍免疫を示す

30

ヒト G O F S T I N G 変異体は、マウスモデルで抗腫瘍活性を示す

構成的活性型 S T I N G をコードする発現プラスミドを含む免疫刺激性細菌株バリエントが抗腫瘍有効性を誘導することを示すために、株 Y S 1 6 4 6 a s d / F L G (フラジェリン遺伝子 f l j B および f l i C 両者のノックアウト) を、ヒト伸長因子 - 1 アルファ (E F - 1 ) プロモーター下に、アレレル R 2 3 2 および G O F 変異 V 1 5 5 M を有するヒト S T I N G (h u S T I N G V 1 5 5 M) の発現カセットを含むプラスミドで電気穿孔し、株 Y S 1 6 4 6 単独および P B S 媒体対照と比較した。h u S T I N G V 1 5 5 M をコードする遺伝子は、DNA 合成を使用して産生し、p A T I - 1 . 7 5 ベクターにクローン化した。構成的ヒト S T I N G バリエントがマウスにおける抗腫瘍活性を示すか否かを評価するために、6 ~ 8 週齢雌 C 5 7 B L / 6 マウス (5 マウス / 群) に、M C 3 8 結腸直腸腺癌細胞 (1 0 0 μ L P B S 中 5 × 1 0 5 細胞) を右脇腹に S C 接種した。確立された脇腹腫瘍を担持するマウスに、8 日目に 5 × 1 0 5 C F U の株 Y S 1 6 4 6 a s d / F L G h u S T I N G V 1 5 5 M、株 Y S 1 6 4 6 または P B S 対照を I V 注射した。

40

【 0 7 5 5】

結果は、先に公開されたデータに一致して、Y S 1 6 4 6 親株が抗腫瘍治療として穏やかにしか有効でなく、治癒的ではないことを示した (3 5 % T G I、p = N S、2 8 日目)。しかしながら、構成的活性型ヒト S T I N G、Y S 1 6 4 6 a s d / F L G h u S T I N G V 1 5 5 M をコードするプラスミドを含むより弱毒の株は、P B S と比較して

50



、有意な腫瘍制御を誘導し(60% TGI、 $p < 0.05$ 、28日目)、20%の治癒率であった。それ故に、構成的活性型STINGバリエントを送達する免疫刺激性細菌株は、結腸直腸腺癌モデルで腫瘍増殖を強力に阻害し、治癒的效果を示す。

【0756】

マウスリン酸化模倣体IRF3はインビボで治癒的效果を示す

リン酸化模倣体ヒトIRF3バリエントのマウス型を、設計し、*muIRF3-S388D*と命名し、マウス結腸直腸腺癌モデルで評価した。株*YS1646 asd / FLG*を、ヒト伸長因子-1アルファ(EF-1)プロモーター下にGOF変異*S388D*を有するマウスIRF3(*muIRF3-S388D*)の発現カセットを含むプラスミドで電気穿孔し、PBS媒体対照と比較した。*muIRF3-S388D*をコードする遺伝子は、DNA合成を使用して産生し、*pATI-1.75*ベクターにクローン化した。6~8週齢雌C57BL/6マウス(5マウス/群)に、MC38結腸直腸腺癌細胞(100  $\mu$ L PBS中 $5 \times 10^5$ 細胞)を右脇腹にSC接種した。確立された脇腹腫瘍を担持するマウスに、10日目に $5 \times 10^5$ CFUの株*YS1646 asd / FLG-EF-1-muIRF3-S388D*をIV注射し、PBS媒体対照と比較した。

10

【0757】

治療は忍容性が極めて良好であり、初期体重減少は、最悪僅か0.3%であった。PBSと比較して、*muIRF3-S388D* GOF変異体をコードするプラスミドを含む細菌株は高度に有効かつ治癒的であった(81.8% TGI、60%治癒率、42日目)。これらのデータは、腫瘍特異的様式での構成的I型IFN誘導バリエント送達の効力および安全性を示す。

20

【0758】

マウスSTING GOFバリエントは、強力および治癒的抗腫瘍活性

ヒト患者で発見されたヒトSTINGバリエントの一団のマウスオルソログを設計した。これらのオルソログは、ヒトバリエントと1コドン異なり、EF-1プロモーター制御下*pATI-1.75*ベクターにクローン化し、次の変異体セットを産生した：数あるなかで*muSTING N153S*、*V154M*、*R280Q*、*V146L*、*R283G*および*C205Y*。STINGバリエントを、抗腫瘍有効性についてマウス腺癌MC38モデルで評価した。試験のために、6~8週齢雌C57BL/6マウス(5マウス/群)に、MC38結腸直腸腺癌細胞(100  $\mu$ L PBS中 $5 \times 10^5$ 細胞)を右脇腹にSC接種した。確立された脇腹腫瘍を担持するマウスに、*muSTING N153S*、*V154M*、*R280Q*、*V146L*または*R283G*またはスクランブル*shRNA*プラスミド対照発現を駆動するEF-1と共にプラスミドを含む $5 \times 10^5$ CFUの株*YS1646 asd / FLG*を10日目IV注射し、PBS媒体対照と比較した。

30

【0759】

この実験で、*YS1646 asd / FLG-EF-1*プラスミド対照(*shSCR*)は、PBS対照と比較して抗腫瘍有効性を示し(73% TGI、26日目)、これは、*YS1646*親株が歴史的に示してきたよりはるかに強力であった。これは、*CpG*および*RNAi*刺激要素などのプラスミド上の本質的に免疫刺激性の要素によるものであり得る。この治療は、忍容性が最低の群であり、最悪9.9%の体重減少を示し、治験の最後の最後までしか解消しなかった。対照的に、構成的マウスSTING変異体は、一過性であり、数日以内で解消する低い体重減少を示した。これらのバリエントの相対的抗腫瘍有効性は、活性の興味深い差異を確認し、2つのバリエントのみが治癒的效果を示し、プラスミド対照、*N153S*および*R283G*より有効性が増強された。

40

【表 2 6】

| GOF変異体        | TGI対PBS、26日目 | 完全奏効 | 最悪体重減少および日 |
|---------------|--------------|------|------------|
| プラスミド対照       | 73.0%        | 0/5  | 9.9%、19日目  |
| muSTING N153S | 81.7%        | 1/5  | 6.2%、12日目  |
| muSTING V154M | 69.4%        | 0/5  | 4.3%、12日目  |
| muSTING R280Q | 68.7%        | 0/5  | 5.4%、12日目  |
| muSTING V146L | 63.4%        | 0/5  | 2.8%、12日目  |
| muSTING R283G | 81.2%        | 1/5  | 6.9%、12日目  |

10

## 【0760】

フォローアップ試験で、マウスSTING C205Yバリエントを、抗腫瘍有効性を比較するために、R283GおよびN153Sバリエントと共に試験した。6~8週齢雌C57BL/6マウス(5マウス/群)に、MC38結腸直腸腺癌細胞(100 $\mu$ L PBS中 $5 \times 10^5$ 細胞)を右脇腹にSC接種した。確立された脇腹腫瘍を担持するマウスに、MuSTING N153S、R283GまたはC205Yの発現を駆動するEF-1と共にプラスミドを含む $5 \times 10^5$ CFUの株YS1646 asd/FLGを9日目にIV注射し、PBS媒体対照と比較した。前記のとおり、STINGバリエントは忍容性が良好であり、体重の一過性落ち込みのみが観察され、すぐに解消した。これは、小分子TINGアゴニストでも観察されたため、標的上治療による可能性がある。2つの構成的活性マウスSTINGバリエント、N153SおよびR283Gの有効性は、先の治験とほぼ同一であったが、体重減少ははるかに少なく、その原因は不明である。C205Yバリエントも高度に有効であったが、治癒的ではなかった。

20

【表 2 7】

| GOF変異体        | TGI対PBS、29日目 | 完全奏効(CR) | 最悪体重減少および日 |
|---------------|--------------|----------|------------|
| muSTING C205Y | 79.4%        | 0/5      | 2.6%、13日目  |
| muSTING N153S | 79.3%        | 1/5      | 2.2%、13日目  |
| muSTING R283G | 85.1%        | 1/5      | 1.8%、13日目  |

30

## 【0761】

これら試験からのSTING治癒マウスを、反対の脇腹に、MC38結腸直腸腺癌細胞(100 $\mu$ L PBS中 $5 \times 10^5$ 細胞)をSCで、初期腫瘍植え込み40日後再負荷した。全腫瘍が増殖したナイーブマウス(N=5)と比較して、STING治癒マウスの全て腫瘍を拒絶し、適応免疫の関与を示す。

## 【0762】

これらのデータは、結腸直腸癌のマウスモデルにおけるヒト構成的STINGバリエントのマウス版の安全性および効力を検証し、他のSTINGバリエントと比較して効力が増強した小サブセットを確認する。これらの高度に活性なバリエントはまた保護的免疫も誘導し、腫瘍特異的I型インターフェロン産生の効力を示す。

40

## 【0763】

マウスSTING GOFバリエントは、IV投与後顕著な腫瘍リモデリングを示す次に、構成的STINGバリエントをコードするプラスミドを含む細菌株が、IV投与後腫瘍微小環境(TME)をリモデリングする能力に差異を示すか否かを決定した。これを試験するために、6~8週齢雌C57BL/6マウス(5マウス/群)に、MC38結腸直腸腺癌細胞(100 $\mu$ L PBS中 $5 \times 10^5$ 細胞)を右脇腹にSC接種した。確立された脇

50

腹腫瘍を担持するマウスに、8日目にmuSTING N153S、V154M、R280Q、V146L、R283Gまたはプラスミド対照の発現を駆動するEF-1と共にプラスミドを含む $5 \times 10^5$  CFUの株YS1646 asd / FLGをIV注射し、PBS媒体対照と比較した。

#### 【0764】

腫瘍植え込み28日後、腫瘍を分析のために摘除した。腫瘍を、2~3mm片に切って、2.5mL 酵素ミックス(RPMI-1640+10%FBSと1mg/mLコラゲナーゼI Vおよび20 $\mu$ g/mL DNase I)を充填したgentleMACSTM Cチューブ(Miltenyi Biotec)に入れた。腫瘍片をOctoMACSTM(Miltenyi Biotec)特異的解離プログラム(マウス移植腫瘍)を使用して解離し、全細胞調製物を、45分間、37 で撹拌しながらインキュベートした。インキュベーション45分後、第二ラウンドの解離をOctoMACSTM(マウス移植腫瘍プログラム)を使用して実施し、得られた単細胞懸濁液を70 $\mu$ Mナイロンメッシュで濾過して50mLチューブに入れた。ナイロンメッシュを5mLのRPMI-1640 10%FBSで1回洗浄し、細胞を、新規70 $\mu$ Mナイロンメッシュを使用して、新規50mLチューブに2回目の濾過をして入れた。ナイロンメッシュを5mLの10%FBS含有RPMI-1640で洗浄し、次いで、濾過細胞を1000RPMで7分間遠心分離した。得られた解離細胞をPBSに再懸濁し、染色過程前は氷上に維持した。

#### 【0765】

種々のGOF muSTING変異体をコードするプラスミドを含む株YS1646 asd / FLG投与後の、CD4+Treg、CD4+Th1細胞、CD8+T細胞、好中球、単球、樹状細胞(DC)、M1マクロファージおよびM2マクロファージを含む生存腫瘍浸潤白血球(TIL)パーセンテージをフローサイトメトリーにより決定した。フローサイトメトリー染色のために、100 $\mu$ Lの単細胞懸濁液を、V底96ウェルプレートのウェルに播種した。死/生存染色(Zombie AquaTM, BioLegend)およびFc遮断試薬(BD Biosciences)を含むPBSを100 $\mu$ L/ウェルに加え、氷上で、30分間、暗所でインキュベートした。30分後、細胞を、1300RPMで3分間の遠心分離により、PBS+2%FBSで2回洗浄した。次いで、細胞を、蛍光色素コンジュゲート抗体(CD4 FITCクローンRM4-5; CD8a BV421クローン53-6.7; F4/80 APCクローンBM8; CD11b PE-Cy7クローンM1/70; CD45 BV570クローン30-F11; CD3 PEクローン145-2C11; Ly6C BV785クローンHK1.4; I-A/I-E APC-Cy7クローンM5/114.15.2; Ly6G BV605クローン1A8; およびCD24 PercP-Cy5.5クローンM1/69; 全てBioLegendから)を含むPBS+2%FBSに再懸濁し、氷上で、30分間、暗所でインキュベートした。30分後、細胞を、1300RPMで3分間の遠心分離により、PBS+2%FBSで2回洗浄し、フローサイトメトリー固定緩衝液(Thermo Fisher Scientific)に再懸濁した。フローサイトメトリーデータをACEA NovoCyte(登録商標)フローサイトメーター(ACEA Biosciences, Inc.)により取得し、FlowJoTMソフトウェア(Tree Star, Inc.)を使用して分析した。

#### 【0766】

下表に示すとおり、EF-1 プラスミド対照を有する株YS1646 asd / FLGは、おそらくプラスミド上の免疫刺激性要素により、ある程度のCD8+T細胞動員にも関わらず、優勢に好中球浸潤を示した。対照的に、異なるmuSTINGバリエーションは、特有の腫瘍浸潤免疫細胞シグネチャーを有し、muSTING V146LおよびmuSTING R283Gなど一部は、PBS対照より少ない免疫抑制性好中球をもたらした。最も好都合な免疫プロファイルは、muSTING変異体R283GおよびN153Sを投与されたマウスからの腫瘍で観察され、CD4+Th1細胞およびCD8+T細胞が多く、好中球が少なく、これは、適応免疫応答産生に高度に好都合な条件を示す。これらの傾向は、下記のとおり、総細胞数でも再現された。それ故に、腫瘍常在骨髄細胞への構成的活性型STINGバリエーションの送達は、自然免疫の促進および適応免疫の抑制に

より特徴づけられる、適応抗腫瘍表現型方向で、細菌表現型から離れる免疫抑制性腫瘍微小環境の完全なリモデリングをもたらす。

【 0 7 6 7 】

【表 2 8】

生存腫瘍浸潤白血球(T I L)%

| T I L<br>中%                | I V投与株Y S 1 6 4 6 Δ a s d / Δ F L Gにおけるプラスミドでコード化されるG O F m u S T I N G変異体 |               |                       |                       |                       |                       |                       |
|----------------------------|--|---------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                            | PBS  | プラスミド<br>対照   | muSTIN<br>G N153<br>S | muSTIN<br>G V154<br>M | muSTIN<br>G R280<br>Q | muSTIN<br>G V146<br>L | muSTIN<br>G R283<br>G |
| CD4 <sup>+</sup> Treg      | 2.9±1.7  | 1.8±0.5       | 3.3±2.6               | 1.5±0.5               | 2±0.9                 | 1.8±0.5               | 1.5±0.4               |
| CD4 <sup>+</sup> Th1<br>細胞 | 6.6±3.2  | 13±4.3        | 20.7±10<br>.4         | 13.2±6.<br>1          | 22.6±7.<br>4          | 19.5±4.<br>9          | 25.6±7.<br>8          |
| CD8 <sup>+</sup> T細胞       | 16.2±10<br>.2  | 24.5±11<br>.6 | 25.8±9.<br>2          | 16.5±4.<br>4          | 20.2±7.<br>2          | 20.8±3.<br>6          | 27.8±8.<br>7          |
| 好中球                        | 11.3±14<br>.2  | 30.6±17<br>.4 | 13.5±12<br>.4         | 21.4±12<br>.5         | 15.9±11<br>.6         | 9.1±6.5               | 6.6±5.9               |
| 単球                         | 16.6±3.<br>5   | 12.7±2.<br>7  | 13.7±3.<br>9          | 16.4±5.<br>4          | 15.8±6.<br>5          | 15.6±2.<br>2          | 13.5±1.<br>3          |
| DC                         | 1.4±0.4  | 0.5±0.3       | 0.9±0.7               | 0.4±0.2               | 0.5±0.3               | 0.5±0.2               | 0.5±0.3               |
| M1マクロファ<br>ージ              | 10.2±6.<br>2   | 3.1±2.1       | 4.6±2.1               | 9.4±5                 | 5.6±4.2               | 8.6±3.7               | 5.4±2                 |
| M2マクロファ<br>ージ              | 14.9±10<br>.6  | 4.6±2.6       | 7.3±3.1               | 11.6±5.<br>2          | 8.6±6.3               | 12.8±5                | 9.2±4                 |

10

20

【 0 7 6 8 】

30

40

50

【表 29】

## 総細胞数

|                            | PBS           | プラス<br>ミド対<br>照 | muS<br>TIN<br>GN<br>153<br>S | muS<br>TIN<br>GV<br>154<br>M | muS<br>TIN<br>GR<br>280<br>Q | muS<br>TIN<br>GV<br>146<br>L | muS<br>TIN<br>GR<br>283<br>G |
|----------------------------|---------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| CD4 <sup>+</sup> Treg      | 437±23<br>0   | 148±10<br>2     | 530±11<br>7                  | 310±11<br>4                  | 520±16<br>9                  | 297±20<br>7                  | 438±17<br>6                  |
| CD4 <sup>+</sup> Th1<br>細胞 | 1108±5<br>99  | 1059±7<br>11    | 3765±9<br>17                 | 3349±2<br>869                | 5864±1<br>618                | 2961±1<br>800                | 7463±3<br>240                |
| CD8 <sup>+</sup> T細胞       | 2948±3<br>119 | 1571±6<br>01    | 6152±3<br>820                | 3898±2<br>823                | 5446±2<br>454                | 3266±1<br>277                | 7566±1<br>782                |
| 好中球                        | 1531±1<br>604 | 2604±1<br>975   | 3699±4<br>400                | 4815±3<br>423                | 4301±3<br>502                | 1240±1<br>160                | 1698±1<br>485                |
| 単球                         | 2871±1<br>472 | 912±36<br>9     | 3182±1<br>708                | 3350±1<br>183                | 4132±1<br>595                | 2524±1<br>420                | 3811±9<br>96                 |
| DC                         | 233±97        | 28±18           | 161±45                       | 82±31                        | 130±90                       | 78±48                        | 135±90                       |
| M1マクロファ<br>ージ              | 2163±2<br>025 | 227±21<br>3     | 881±31<br>6                  | 1797±7<br>50                 | 1421±9<br>10                 | 1325±8<br>56                 | 1524±6<br>58                 |
| M2マクロファ<br>ージ              | 3046±2<br>996 | 334±27<br>5     | 1391±3<br>73                 | 2183±6<br>08                 | 2189±1<br>402                | 2043±1<br>237                | 2612±1<br>330                |

10

20

## 【0769】

## 実施例 28

ヒト STING より強い I 型 IFN シグナル伝達および / または弱い NF - B シグナル伝達を誘導する脊椎動物 STING バリエーションを発現するよう修飾した免疫刺激性細菌 STING シグナル伝達は、2つのシグナル伝達経路を活性化する。第一は、TANK 結合キナーゼ (TBK1) / IRF3 軸であり、I 型 IFN の誘導および樹状細胞 (DC) の活性化および腫瘍抗原の交差提示をもたらし、CD8<sup>+</sup>T 細胞介在抗腫瘍免疫を活性化する。第二は、活性化 B 細胞の核因子カッパ軽鎖エンハンサー (NF - B) シグナル伝達軸であり、炎症促進性応答をもたらすが、抗腫瘍免疫に必要な DC および CD8<sup>+</sup>T 細胞の活性化はもたらさない。細菌ベースの癌免疫療法は、腫瘍抗原交差提示および持続性抗腫瘍免疫の促進のために必要な CD8<sup>+</sup>T 細胞を動員および活性化するために I 型 IFN を誘導する能力が限定的である。それ故に、I 型 IFN シグナル伝達を誘導および / または増加し、NF - B シグナル伝達が減少し、それにより CD8<sup>+</sup>T 細胞介在抗腫瘍免疫の誘導が増加し、細菌の治療有効性が增强された、ここでの免疫刺激性細菌が提供される。上記免疫刺激性細菌は、野生型 STING と比較して I 型 IFN の誘導を増加するかまたは I 型 IFN 発現を構成的とすることができる、STING の機能獲得型変異体である修飾 STING タンパク質をコードする。この実施例において(およびまた詳細な記載において)、STING タンパク質は、NF - B シグナル伝達活性を低減または排除し、I 型 IFN を誘導する能力を保持するよう修飾されるおよび / または I 型 IFN 発現の増加または構成的発現のために修飾される。これは、抗腫瘍免疫を誘導し、通常細菌病原体による感染に起因する NF - B シグナル伝達を誘導しない(または誘導が少ない)免疫刺激性細菌をもたらす。

30

40

## 【0770】

異なる種からの STING タンパク質は、異なるレベルの I 型 IFN および NF - B シグナル伝達活性を示す。例えば、ヒトおよびマウス細胞における STING シグナル伝達

50

は、強いI型IFN応答および弱い炎症促進性NF- $\kappa$ B応答をもたらす。サケおよびゼブラフィッシュなどの条鰭類におけるSTINGシグナル伝達は、比較して、主にNF- $\kappa$ B駆動応答の強い活性化を誘導し、これは、IRF3駆動(すなわち、I型IFN誘導)応答と比較して100倍を超えて高い。タスマンアンデビルなどの他の種で、STINGシグナル伝達はI型IFN応答をもたらすが本質的にNF- $\kappa$ B応答はもたらさない。ここに提供される免疫刺激性細菌は、STINGが、NF- $\kappa$ B応答の付随する誘導なく、I型IFN応答を誘導する能力を探索するために、タスマンアンデビルSTINGなどの非ヒト種からのSTINGをコードする。ここに記載するとおり、これらの非ヒトSTINGタンパク質も、I型IFN応答を増加させるためまたは構成的とするための変異により修飾される。ヒトSTINGにおけるこの効果を有する同定された変異を、非ヒトSTINGタンパク質に導入する。対応する残基は、アライメントにより同定される。

10

#### 【0771】

STINGのC末端テイル(CTT)がヒトなどのある種からNF- $\kappa$ Bシグナル伝達活性をほとんどまたは全く示さない第二(例えば、非ヒト)種からのCTTで置き換えた、キメラもまた提供される。CTTは、STINGリン酸化およびIRF3の動員に必要な配列モチーフを含む、約40アミノ酸の非構造化ストレッチである。I型IFNとNF- $\kappa$ Bシグナル伝達のバランスを変えることにより、下流免疫を形作り得る。これは、IRF3、TBK1およびTRAF6結合モジュールを含むCTTにおける非依存的モジュールを介して制御される。例えば、ヒトSTING残基366(例えば、配列番号305~309参照)は、CTTにおけるLxISモチーフの一部である一次TBK1リン酸化部位であり、これはIRF3結合に必要であり、一方、残基L374を含む第二PxPLRモチーフは、TBK1結合に必要である。LxISおよびPxPLRモチーフは、全脊椎動物STINGアレルにおいて高度に保存される。ヒトSTINGのCTTの、例えば、タスマンアンデビルSTINGからのものへの置き換えは、I型IFN応答を誘導するが、NF- $\kappa$ B応答は誘導しないSTINGをもたらす。

20

#### 【0772】

この例では、免疫刺激性細菌を、野生型(WT)ヒトSTING(配列番号305~309)と比較して、I型IFNシグナル伝達が増加および/またはNF- $\kappa$ Bシグナル伝達が低減したSTINGバリエーションを発現するよう操作する。STINGバリエーションは、哺乳動物、トリ、爬虫類、両生類または魚種など非ヒト脊椎動物からであり得る。非ヒトSTINGタンパク質が由来する種は、タスマンアンデビル(*Sarcophilus harrisii*; 配列番号331)、マーモセット(*Callithrix jacchus*; 配列番号341)、ウシ(*Bos taurus*; 配列番号342)、ネコ(*Felis catus*; 配列番号338)、ダチョウ(*Struthio camelus australis*; 配列番号343)、トキ(*Nipponia nippon*; 配列番号344)、シーラカンス(*Latimeria chalumnae*; 配列番号345および346)、イノシシ(*Sus scrofa*; 配列番号347)、コウモリ(*Rousettus aegyptiacus*; 配列番号348)、マナティ(*Trichechus manatus latirostris*; 配列番号349)、ゾウギンザメ(*Callorhynchus milii*; 配列番号350)およびマウス(*Mus musculus*; 配列番号351)を含むが、これらに限定されない。これらの脊椎動物STINGタンパク質はヒト細胞で容易に免疫シグナル伝達を活性化し、STINGシグナル伝達の分子機構が脊椎動物で共有されることを示す(例えば、de Oliveira Mann et al. (2019) Cell Reports 27:1165-1175参照)。これらの種からのSTINGタンパク質は、ヒトSTINGより少ないNF- $\kappa$ Bシグナル活性化および/または多いI型IFNシグナル活性化を誘導する例えば、de Oliveira Mann et al. (2019) Cell Reports 27:1165-1175、図1A参照)。異なる非ヒト種からの野生型または修飾STINGタンパク質は、ヒトおよび非ヒトSTINGタンパク質のキメラであるように、ここでの免疫刺激性細菌により発現され得る。

30

40

#### 【0773】

種々の非ヒトSTINGタンパク質は、非ヒトSTINGがヒトSTINGより低NF- $\kappa$ B活性化を有し、所望により、高I型インターフェロン活性化を有するように修飾され

50

る。これらの非ヒトSTINGタンパク質は、I型IFN活性が増加するか、サイトソル核酸リガンド(例えば、CDN)の非存在下で構成的に作用するように、1以上の変異を含むよう修飾される。変異は、一般にヒトにおけるインターフェロン症と関連する機能獲得型変異などのアミノ酸変異である。対応する変異は、非ヒト種STINGタンパク質に導入され、ここで、対応するアミノ酸残基は、アライメントにより同定される。例えば、変異は、配列番号305~309に示すヒトSTINGの配列を基準として、S102P、V147L、V147M、N154S、V155M、G166E、C206Y、G207E、S102P/F279L、F279L、R281Q、R284G、R284S、R284M、R284K、R284T、R197A、D205A、R310A、R293A、T294A、E296A、R197A/D205A、S272A/Q273A、R310A/E316A、E316A、E316N、E316Q、S272A、R293A/T294A/E296A、D231A、R232A、K236A、Q273A、S358A/E360A/S366A、D231A/R232A/K236A/R238A、S358A、E360A、S366A、R238A、R375AおよびS324A/S326Aを含むが、これらに限定されない。他の種からのSTINGにおける対応する変異は下表に挙げる。非ヒトSTINGタンパク質の得られたバリエーションは、1以上のこれらの変異および所望により、CTT置き換えおよび所望によりTRAF6結合部位欠失を含み得る。

10

## 【0774】

STINGバリエーションは、リン酸化部位のアミノ酸セリン(S)またはスレオニン(T)に、活性の増加または構成的活性をもたらす、リン酸化模倣体であるアスパラギン酸(D)への1以上の置換を含む。他の変異は、STINGにおける324-326 SLS ALAなどの1以上のリン酸化部位の欠失または置換およびSTINGにおけるNF-Bシグナル伝達を低減するためにリン酸化部位を除去する他の置き換えを含む。さらに、ヒトSTINGのC末端テイル(CTT)が低NF-Bシグナル伝達活性および/または高I型IFNシグナル伝達活性を有する他の種からのSTINGのCTTで置き換えられている、ヒトSTINGと他の種からのSTINGのキメラが提供される。バリエーションSTINGタンパク質は、NF-Bシグナル伝達を低減するためCTTのTRAF6結合部位に欠失を含み得る。

20

## 【0775】

30

40

50

【表 3 0】

| ヒトSTING<br>(配列番号305-309) | タスマニアアンテ<br>ロビールSTING(配列番号331) | マーモセットS<br>TING(配列番号341) | ウシSTING<br>(配列番号342) | ネコSTING<br>(配列番号338) | ダチョウSTING(配列番号343) | ヒキSTING<br>(配列番号344) | シーラカンス<br>TING(配列番号345) |
|--------------------------|--------------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|----------------------|-------------------------|
| S102P                    | S102P                          | S102P                    | S102P                | S102P                | C107P              | V106P                | A102P                   |
| V147L                    | V147L                          | V145L                    | I147L                | V146L                | M152L              | M151L                | I147L                   |
| V147M                    | V147M                          | V145M                    | I147M                | V146M                | -                  | -                    | I147M                   |
| N154S                    | N154S                          | N152S                    | N154S                | N153S                | N159S              | N158S                | G154S                   |
| V155M                    | V155M                          | V153M                    | V155M                | V154M                | V160M              | V159M                | V155M                   |
| G166E                    | G166E                          | G164E                    | G166E                | G165E                | G171E              | G170E                | G166E                   |
| C206Y                    | C206Y                          | C204Y                    | C206Y                | C205Y                | C211Y              | C210Y                | C206Y                   |
| G207E                    | S207E                          | G205E                    | G207E                | G206E                | N212E              | D211E                | S207E                   |
| S102P/F<br>279L          | S102P/F<br>279L                | S102P/F<br>277L          | S102P/F<br>279L      | S102P/F<br>278L      | C107P/<br>F283L    | V106P/F<br>283L      | A102P/F<br>279L         |
| F279L                    | F279L                          | F277L                    | F279L                | F278L                | F283L              | F283L                | F279L                   |
| R281Q                    | R281Q                          | R279Q                    | R281Q                | R280Q                | R285Q              | R285Q                | K281Q                   |
| R284G                    | R284G                          | R282G                    | R284G                | R283G                | R288G              | R288G                | R284G                   |
| R284S                    | R284S                          | R282S                    | R284S                | R283S                | R288S              | R288S                | R284S                   |
| R284M                    | R284M                          | R282M                    | R284M                | R283M                | R288M              | R288M                | R284M                   |
| R284K                    | R284K                          | R282K                    | R284K                | R283K                | R288K              | R288K                | R284K                   |
| R284T                    | R284T                          | R282T                    | R284T                | R283T                | R288T              | R288T                | R284T                   |
| R197A                    | R197A                          | R195A                    | R197A                | R196A                | K202A              | K201A                | R197A                   |
| D205A                    | D205A                          | D203A                    | D205A                | D204A                | S210A              | S209A                | S205A                   |
| R310A                    | R310A                          | R308A                    | R310A                | R309A                | R314A              | R314A                | R310A                   |
| R293A                    | R293A                          | R291A                    | R293A                | R292A                | R297A              | R297A                | R293A                   |
| T294A                    | T294A                          | T291A                    | T294A                | I293A                | T298A              | T298A                | T294A                   |
| E296A                    | E296A                          | E294A                    | E296A                | E295A                | E300A              | E300A                | K296A                   |
| R197A/<br>D205A          | R197A/<br>D205A                | R195A/<br>D203A          | R197A/<br>D205A      | R196A/<br>D204A      | K202A/S<br>210A    | K201A/S<br>209A      | R197A/S<br>205A         |
| S272A/<br>Q273A          | S272A/<br>Q273A                | S270A/<br>Q271A          | S272A/<br>Q273A      | S271A/<br>Q272A      | S276A/<br>Q277A    | S276A/<br>Q277A      | S272A/K<br>273A         |
| R310A/<br>E316A          | R310A/<br>E316A                | R308A/<br>E314A          | R310A/<br>E316A      | R309A/<br>E315A      | R314A/<br>E320A    | R314A/<br>E320A      | R310A/<br>E318A         |

10

20

30

40

50



【表 3 1】

|                                     |                                     |                                     |                                     |                                     |                                     |                                     |                                     |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| E316A                               | E316A                               | E314A                               | E316A                               | E315A                               | E320A                               | E320A                               | E318A                               |
| E316N                               | E316N                               | E314N                               | E316N                               | E315N                               | E320N                               | E320N                               | E318N                               |
| E316Q                               | E316Q                               | E314Q                               | E316Q                               | E315Q                               | E320Q                               | E320Q                               | E318Q                               |
| S272A                               | S272A                               | S270A                               | S272A                               | S271A                               | S276A                               | S276A                               | S272A                               |
| R375A                               | R377A                               | R373A                               | R374A                               | R373A                               | R371A                               | R379A                               | K376A                               |
| R293A/<br>T294A/<br>E296A           | R293A/<br>T294A/<br>E296A           | R291A/<br>T292A/<br>E294A           | R293A/<br>T294A/<br>E296A           | R292A/I<br>293A/E2<br>95A           | R297A/<br>T298A/<br>E300A           | R297A/<br>T298A/<br>E300A           | R293A/<br>T294A/<br>K296A           |
| D231A                               | D231A                               | D229A                               | D231A                               | D230A                               | T236A                               | T235A                               | N231A                               |
| R232A                               | R232A                               | R230A                               | R232A                               | R231A                               | R237A                               | R236A                               | R232A                               |
| K236A                               | K236A                               | K234A                               | K236A                               | K235A                               | K241A                               | K240A                               | K236A                               |
| Q273A                               | Q273A                               | Q271A                               | Q273A                               | Q272A                               | Q277A                               | Q277A                               | K273A                               |
| S358A/E<br>360A/S3<br>66A           | S360A/E<br>362A/S3<br>68A           | S356A/E<br>358A/S3<br>64A           | S357A/E<br>359A/S3<br>65A           | S356A/E<br>358A/S3<br>64A           | S354A/<br>D356A/<br>S362A           | S362A/E<br>364A/S3<br>70A           | S359A/E<br>361A/S3<br>67A           |
| D231A/<br>R232A/<br>K236A/<br>R238A | D231A/<br>R232A/<br>K236A/<br>R238A | D229A/<br>R230A/<br>K234A/<br>R236A | D231A/<br>R232A/<br>K236A/<br>R238A | D230A/<br>R231A/<br>K235A/<br>R237A | T236A/<br>R237A/<br>K241A/<br>R243A | T235A/<br>R236A/<br>K240A/<br>R242A | N231A/<br>R232A/<br>K236A/<br>R238A |
| S358A                               | S360A                               | S356A                               | S357A                               | S356A                               | S354A                               | S362A                               | S359A                               |
| E360A                               | E362A                               | E358A                               | E359A                               | E358A                               | D356A                               | E364A                               | E361A                               |
| S366A                               | S368A                               | S364A                               | S365A                               | S364A                               | S362A                               | S370A                               | S367A                               |
| R238A                               | R238A                               | R236A                               | R238A                               | R237A                               | R243A                               | R242A                               | R238A                               |
| S324A/S<br>326A                     | S326A/S<br>328A                     | L322A/S<br>324A                     | S324A/S<br>326A                     | S323A/S<br>325A                     | F328A/S<br>330A                     | S328A/S<br>330A                     | S327A                               |

10

20

30

【 0 7 7 6 】

40

50

【表 3 2】

| ヒトSTING(配<br>列番号305-<br>309) | イノシトSTING(配<br>列番号34<br>7) | コウモリSTING(配<br>列番号34<br>8) | マテイトSTING(配<br>列番号34<br>9) | リノキニンザMS<br>TING(配列<br>番号350) | マウスSTING(配<br>列番号35<br>1) |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| S102P                        | S102P                      | S103P                      | S105P                      | S98P                          | S102P                     |
| V147L                        | I147L                      | V148L                      | I150L                      | I148L                         | V146L                     |
| V147M                        | I147M                      | V148M                      | I150M                      | I148M                         | V146M                     |
| N154S                        | N154S                      | N155S                      | N157S                      | N155S                         | N153S                     |
| V155M                        | V155M                      | V156M                      | V158M                      | V156S                         | V154M                     |
| G166E                        | G166E                      | G167E                      | G169E                      | G167E                         | G165E                     |
| C206Y                        | C206Y                      | C207Y                      | C209Y                      | C206Y                         | C205Y                     |
| G207E                        | G207E                      | G208E                      | G210E                      | K207E                         | G206E                     |
| S102P/F279<br>L              | S102P/F279<br>L            | S103P/F280<br>L            | S105P/F282<br>L            | S98P/F280L                    | S102P/F278<br>L           |
| F279L                        | F279L                      | F280L                      | F282L                      | F280L                         | F278L                     |
| R281Q                        | R281Q                      | -                          | R284Q                      | K282Q                         | R280Q                     |
| R284G                        | R284G                      | R285G                      | R287G                      | R285G                         | R283G                     |
| R284S                        | R284S                      | R285S                      | R287S                      | R285S                         | R283S                     |
| R284M                        | R284M                      | R285M                      | R287M                      | R285M                         | R283M                     |
| R284K                        | R284K                      | R285K                      | R287K                      | R285K                         | R283K                     |
| R284T                        | R284T                      | R285T                      | R284T                      | R285T                         | R283T                     |
| R197A                        | R197A                      | R198A                      | R200A                      | K197A                         | R196A                     |
| D205A                        | D205A                      | D206A                      | D208A                      | S205A                         | D204A                     |
| R310A                        | R310A                      | R311A                      | R313A                      | R311A                         | R309A                     |
| R293A                        | R293A                      | R294A                      | R296A                      | R294A                         | R292A                     |
| T294A                        | T294A                      | T295A                      | T297A                      | T295A                         | T293A                     |
| E296A                        | E296A                      | -                          | E299A                      | K297A                         | E295A                     |
| R197A/D20<br>5A              | R197A/D20<br>5A            | R198A/D20<br>6A            | R200/D208<br>A             | K197A/S205<br>A               | R196A/D20<br>4A           |
| S272A/Q273<br>A              | S272A/Q273<br>A            | S273A/Q274<br>A            | S275A/Q276<br>A            | T273A/N274<br>A               | S271A/Q272<br>A           |

10

20

30

40

50

【表 3 3】

|                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| R310A/E316<br>A                 | R310A/E316<br>A                 | R311A/E317<br>A                 | R313A/E319<br>A                 | R311A/D31<br>7A                 | R309A/E315<br>A                 |
| E316A                           | E316A                           | E317A                           | E319A                           | D317A                           | E315A                           |
| E316N                           | E316N                           | E317N                           | E319N                           | D317N                           | E315N                           |
| E316Q                           | E316Q                           | E317Q                           | E319Q                           | D317Q                           | E315Q                           |
| S272A                           | S272A                           | S273A                           | S275A                           | T273A                           | S271A                           |
| R375A                           | S374A                           | R376A                           | R383A                           | R374A                           | R374A                           |
| R293A/T294<br>A/E296A           | R293A/T294<br>A/E296A           | R294A/T295<br>A                 | R296A/T297<br>A/E299A           | R294A/T295<br>A/K297A           | R292A/T293<br>A/E295A           |
| D231A                           | D231A                           | D232A                           | D234A                           | D231A                           | D230A                           |
| R232A                           | R232A                           | R233A                           | C235A                           | R232A                           | R231A                           |
| K236A                           | K236A                           | K237A                           | K239A                           | K236A                           | K235A                           |
| Q273A                           | Q273A                           | Q274A                           | Q276A                           | N274A                           | Q272A                           |
| S358A/E360<br>A/S366A           | S357A/E359<br>A/S365A           | H359A/E36<br>1A/S367A           | S366A/E368<br>A/S374A           | S359A/E361<br>A/S367A           | S357A/E359<br>A/S365A           |
| D231A/R23<br>2A/K236A/<br>R238A | D231A/R23<br>2A/K236A/<br>R238A | D232A/R23<br>3A/K237A/<br>R239A | D234A/C23<br>5A/K239A/<br>R241A | D231A/R23<br>2A/K236A/<br>R238A | D230A/R23<br>1A/K235A/<br>R237A |
| S358A                           | S357A                           | H359A                           | S366A                           | S359A                           | S357A                           |
| E360A                           | E359A                           | E361A                           | E368A                           | E361A                           | E359A                           |
| S366A                           | S365A                           | S367A                           | S374A                           | S367A                           | S365A                           |
| R238A                           | R238A                           | R239A                           | R241A                           | R238A                           | R237A                           |
| S324A/S326<br>A                 | S324A/S326<br>A                 | S325A/S327<br>A                 | S327A/S329<br>A                 | G325A/S330<br>A                 | S323A/S325<br>A                 |

10

20

## 【0777】

30

例えば、修飾 S T I N G バリエントは、変異 C 2 0 6 Y (配列番号 3 3 2) または R 2 8 4 G (配列番号 3 3 3) を有するタスマニアンデビル S T I N G ; ヒト S T I N G の C T T がタスマニアンデビル S T I N G の C T T (配列番号 3 3 4) で置き換えられたバリエント ; 変異 C 2 0 6 Y (配列番号 3 3 5) または R 2 8 4 G (配列番号 3 3 6) を有し、C T T がタスマニアンデビル S T I N G の C T T で置き換えられたヒト S T I N G ; T R A F 6 結合ドメイン (残基 3 7 7 ~ 3 7 9 に対応、D F S) に欠失を有する野生型ヒト S T I N G (配列番号 3 3 7) ; 変異 C 2 0 5 Y (配列番号 3 3 9) または R 2 8 3 G (配列番号 3 4 0) を有するネコ S T I N G ; および他のこのような修飾 S T I N G バリエントを含む。

## 【0778】

40

S T I N G 変異の対応するアミノ酸残基を決定するために、種々の非ヒト種からの野生型 S T I N G 配列を各々野生型ヒト S T I N G 配列 (配列番号 3 0 5 (R 2 3 2 アレル) または配列番号 3 0 6 (H 2 3 2 アレル) のアレルバリエントの) と整列する。アライメントを、[ebi.ac.uk/Tools/msa/kalign/](http://ebi.ac.uk/Tools/msa/kalign/) で入手可能な Kalign 配列アライメントツールまたは [ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](http://ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) で入手可能な E M B O S S 針配列アライメントツールを使用して実施した。ヒト S T I N G とタスマニアンデビル、マーモセット、ウシ、ネコ、ダチョウ、トキ、シーラカンス、ゼブラフィッシュ、イノシシ、コウモリ、マナティ、ゾウギンザメおよびマウス種からの S T I N G タンパク質の配列アライメント例を図 1 ~ 1 3 に示す。

## 【0779】

50

S T I N G G O F ハイブリッドバリエントは、樹状細胞で顕著に増強された I 型インタ

ーフェロン対NF - B比を示す

マウスにおける最高のレベルのCD8 + T細胞ケモカインCXCL10を誘導する最適STING GOF変異体を決定するために、マウス初代骨髄由来樹状細胞(BMDC)で一団の変異体を試験した。これらは、構成的ヒトGOF変異C206Y(配列番号332)またはR284G(配列番号333)を有するタスマニアンデビルSTING; マウスSTING GOF変異体C205YまたはR283G; ならびにヒトSTINGのCTTがタスマニアンデビルSTINGのCTT(配列番号334)で置き換えられ、野生型ヒトSTINGまたはヒトSTING変異C206Y(配列番号335)またはR284G(配列番号336)を含むバリエーションを含む。変異C205Y(配列番号339)またはR283G(配列番号340)を有するネコSTINGおよび変異C206YまたはR284Gを有するヒトSTINGも含んだ。

10

【0780】

これらを試験するために、マウス骨髄を単離し、1.5 mLエッペンドルフチューブに流し入れ、1200 RPMで5分間回転させて、骨髄細胞を集めた。細胞をRPMI - 1640 + 10% FBSで1回洗浄し、次いで6ウェルTC処置プレートに、20 ng/ml GM - CSF含有RPMI - 1640 + 10% FBS中播種した。2日毎に、50%の培地を新鮮完全培地と置き換えた。6日後、非接着細胞をウェルからピペットで除き、トランスフェクション用96ウェルプレートに、RPMI - 1640 + 10% FBSで1e5細胞/ウェルで再播種した。細胞を、製造業者の指示に従い、Viromer(登録商標)REDを使用してトランスフェクトした。簡潔には、一団のSTING GOF変異体ならびに非トランスフェクト対照からの200 ngのプラスミドDNAを提供された緩衝液で希釈し、0.08 μLのViromer(登録商標)REDと混合し、室温で15分間インキュベートして、Viromer(登録商標)複合体を形成させた。次いで、DNA/Viromer(登録商標)RED複合体を96ウェルプレートの各ウェルにゆっくり加え(デュプリケートで)、プレートを37 °CでCO<sub>2</sub>インキュベーターでインキュベートした。上清を48時間目に採取し、製造業者のプロトコールに従い、フローサイトメトリーベースのサイトカインビーズアレイ(CBA)を使用してマウスCXCL10(IP - 10)についてアッセイした。

20

【0781】

下表に示すとおり、マウスCXCL10の最高の発現を誘導する構築物は、タスマニアンデビルSTINGのCTTに置き換えられたヒトSTINGのCTTを含み、ヒトSTING GOF変異R284G(huSTING R284G tazCTT)を含んだ。次に高いのは、GOF変異C206Yを有するヒトSTING(huSTING C206Y)およびヒトSTING GOF変異R284Gを含むタスマニアンデビルSTING(tazSTING R284G)であった。興味深いことに、ヒトSTING GOF変異体は、初代マウス樹状細胞で、マウスSTING GOF変異体(muSTING C205YおよびmuSTING R283G)より強力であり、それはC205YおよびR283G GOF変異を含むネコSTINGよりはるかに弱かった。

30

40

50

【表 3 4】

| 構築物                   | CXCL10pg/mL |
|-----------------------|-------------|
| 非トランスフェクト             | 11.48±3.889 |
| huSTING C206Y         | 861.0±58.48 |
| huSTING R284G         | 769.7±95.16 |
| mSTING C205Y          | 194±27.15   |
| mSTING R283G          | 230.1±1.018 |
| huSTING C206Y taz CTT | 366.6±42.61 |
| huSTING R284G taz CTT | 1326±137.9  |
| tazSTING C206Y        | 808.8±95.78 |
| tazSTING R284G        | 831.3±30.15 |
| catSTING C205Y        | 480.7±24.94 |
| catSTING R283G        | 376.2±6.682 |

10

## 【0782】

これらのデータは、強力なT細胞動員ケモカインを誘導するための、タスマニアンデビルのような他の種から得たSTINGの利用およびこれらと構成的GOFヒトSTING変異の結合の実現可能性を示す。

20

## 【0783】

STING GOFハイブリッドバリエーションは、ヒト単球において顕著に増強されたI型インターフェロン対NF- $\kappa$ B比を示す

STING誘導I型インターフェロン対NF- $\kappa$ Bシグナル伝達の比が、他の種からのSTING GOFハイブリッドバリエーションを使用して改変され得ることを示すために、ヒト単球細胞株で一団を試験した。一団は、野生型ヒトSTINGまたは構成的GOF変異C206YまたはR284Gを有するヒトSTING；野生型タスマニアンデビルSTINGまたは構成的GOF変異C206YまたはR284Gを有するタスマニアンデビルSTING；ヒトSTINGのCTTがタスマニアンデビルSTINGのCTTで置き換えられ、野生型ヒトSTINGまたはヒトSTING変異C206YまたはR284Gを含むバリエーション；および変異C205YまたはR283Gを有するマウスSTINGを含む。TRAF6結合ドメインに欠失を有する野生型ヒトSTING(残基377~379に対応、DFS)、ネコ野生型STINGおよびゼブラフィッシュ野生型STINGもまた含まれる。

30

## 【0784】

この実験のために、内因性STINGを欠失し、また内因性IFN- $\gamma$ プロモーターの制御下に置かれた分泌型ルシフェラーゼであるLucia<sup>TM</sup>ルシフェラーゼを発現するよう改変されている、THP1-DUAL<sup>TM</sup> KO STING細胞を利用した。次いで、構成的活性型STING GOF変異体を同定し、ルシフェラーゼ活性のIFN- $\gamma$ プロモーター誘導発現の測定によりランク付けした。これらの細胞はまた、内因性NF- $\kappa$ Bプロモーター制御下に置かれた分泌型胚アルカリホスファターゼ(SEAP)を発現し、ここで、NF- $\kappa$ Bのコード配列は、ノックイン技術を使用してSEAP ORFに置き換えられている。STING GOF変異体により誘導されるNF- $\kappa$ B活性を、細胞上清のSEAP産生のモニタリングにより評価し得る。

40

## 【0785】

この実験のために、THP1-DUAL<sup>TM</sup> KO STING細胞を、製造業者の指示に従い、Viromer(登録商標)REDを使用してトランスフェクトした。簡潔には、一団のSTING GOF変異体ならびに非トランスフェクト対照からの200ngのプラスミドDNAを提供された緩衝液で希釈し、0.08 $\mu$ LのViromer(登録商標)REDと混合し、室温で15分間インキュベートして、Viromer(登録商標)複合体を形成させた。DNA/Viromer(

50

登録商標)RED複合体を96ウェルプレートの各ウェルにゆっくり加え(デュプリケートで)、プレートを37℃でCO<sub>2</sub>インキュベーターでインキュベートした。さらに、野生型STINGバリエーションを、インキュベーション24時間後細胞に10 µg/mLで加えた臨床的化合物ADU-S100のアナログであるSTINGアゴニスト3'5' Rppc - ジ - AMP (CDN、InvivoGen)で処置するかまたはしなかった。上清を48時間目に採取し、製造業者のプロトコールに従い、NF-κB-SEAPおよびIFN-γ-Luciaレポーターシグナルについてアッセイした。簡潔には、10 µLの細胞培養上清を50 µL QUANTI-Blue™試薬(InvivoGen)(SEAP測定のために使用)に加えた。NF-κB活性化を、650 nmの吸光度(Abs)でSpectraMax(登録商標)M3分光光度計(Molecular Devices)でのNF-κB誘導SEAP活性測定により決定した。IFN-γ-LuciaからのI型インターフェロン活性を測定するために、10 µLの細胞培養上清を、ルシフェラーゼ反応のためのセレンテラジン基質を含む50 µL QUANTI-Luc™に加え、これは、SpectraMax(登録商標)M3ルミノメーターを使用して定量でき、相対的光単位(RLU)として表される光シグナルを産生する。

10

#### 【0786】

下表に示すとおり、最高のI型IFN応答がヒトSTINGのCTTがタスマニアデビルSTINGのCTTで置き換えられ、ヒトSTING GOF変異R284Gを含む(huSTING R284G tazCTT)バリエーションならびにCDN STINGアゴニストを有する野生型ゼブラフィッシュSTING(zfSTING WT+CDN)で観察された。しかしながら、極めて高いNF-κBシグナル伝達を有した野生型ゼブラフィッシュSTINGと異なり、huSTING R284G tazCTTバリエーションは高I型IFNシグナル伝達と、はるかに低いNF-κBシグナル伝達活性を有した。高I型IFN対低NF-κBシグナル伝達の最良の比が、ヒトSTING GOF変異R284Gを含むタスマニアデビルSTINGバリエーション(tazSTING R284G)で観察された。

20

30

40

50

【表 3 5】

| STINGバリエーション               | ISRE-Lucia (RLU) | ±SD   | NF-κB-SEAP(Abs) | ±SD   |
|----------------------------|------------------|-------|-----------------|-------|
| 非トランスフェクト                  | 47.96            | 33.91 | 0.065           | 0.007 |
| huSTING WT + CDN           | 170.8            | 38.15 | 0.100           | 0.014 |
| huSTING WT delTRAF6 + CDN  | 164.8            | 8.48  | 0.120           | 0.014 |
| huSTING WT tazCTT + CDN    | 31.47            | 10.59 | 0.060           | 0.000 |
| tazSTING WT + CDN          | 143.9            | 4.24  | 0.090           | 0.014 |
| zfSTING WT + CDN           | 310.2            | 23.31 | 0.690           | 0.028 |
| CMV catSTING WT WPRE + CDN | 202.3            | 6.36  | 0.125           | 0.007 |
| huSTING C206Y              | 175.3            | 36.03 | 0.105           | 0.007 |
| huSTING R284G              | 143.9            | 29.67 | 0.100           | 0.000 |
| huSTING C206Y tazCTT       | 137.9            | 21.19 | 0.095           | 0.007 |
| huSTING R284G tazCTT       | 301.2            | 61.46 | 0.250           | 0.127 |
| tazSTING C206Y             | 199.3            | 2.12  | 0.120           | 0.000 |
| tazSTING R284G             | 217.3            | 19.08 | 0.105           | 0.007 |
| muSTING C205Y              | 43.46            | 2.12  | 0.070           | 0.000 |
| muSTING R283G              | 32.97            | 4.24  | 0.070           | 0.000 |
| catSTING C205Y             | 202.3            | 23.31 | 0.135           | 0.007 |
| catSTING R283G             | 157.4            | 10.60 | 0.120           | 0.000 |

10

20

30

## 【0787】

これらのデータは、ヒト単球で免疫抑制性NF-κB活性を最小化しながら、有益なI型インターフェロン活性を増強するために、タスマニアンデビルからのSTINGタンパク質などの非ヒトSTINGタンパク質の使用およびこれらとヒト構成的機能獲得型STING変異の結合の実現可能性をさらに示す。

## 【0788】

修飾が当業者に明らかであるため、本発明は、添付する特許請求の範囲によってのみ限定されることが意図される。

40

50

【 図 面 】

【 図 1 】

ヒトおよびタスマニアデビルSTING:

|        |     |   |     |
|--------|-----|---|-----|
| ヒト     | 1   | MPHSSLHPSIFCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLH  | 50  |
| タスマニアン | 1   | MPHSSLHPSIFCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLH  | 50  |
| ヒト     | 51  | LASLQLGGLLLNGVCSLAEBELRHHSRYRGSYWRTPVACLGCPRLRGALLL | 100 |
| タスマニアン | 51  | FTTVQVGLLLKGAICYLAEBELVHISRHQGSYWAQACIHYFFQRISSLLL  | 100 |
| ヒト     | 101 | LSIYFYYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEK   | 150 |
| タスマニアン | 101 | LSGYFYVTLNKFNFSLTWTFFALLGLSHALSFLGLQNLTSAEISEVCEK   | 150 |
| ヒト     | 151 | GNFNVAHGLAWSYIYGVLRLLELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI    | 200 |
| タスマニアン | 151 | RNFNVAHGLAWSYIYGVLRLLELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI    | 200 |
| ヒト     | 201 | LLPLDCGVPDNLMSADENIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLEN  | 250 |
| タスマニアン | 201 | LLPLDCGVPDNLMSADENIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLEN  | 250 |
| ヒト     | 251 | GQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLQAKLFCRTLEDILA   | 300 |
| タスマニアン | 251 | GQFAGVCLVLEFATPLQTLFAMSQDARAGFSREDRLQAKLFCRTLEDILE  | 300 |
| ヒト     | 301 | DAPESQNNCRLLIAYQEPADDSFSLSQEVLRLHRLQEEKEEVTVGSKLTSA | 348 |
| タスマニアン | 301 | DAPESQNNCRLLIAYQEPADDSFSLSQEVLRLHRLQEEKEEVTVGSKLTSA | 350 |
| ヒト     | 349 | VPSTSTMSQEPPELLISGMEKPLRLTDFE 379                   |     |
| タスマニアン | 351 | MTVTSSTLSQEPPELLISGMEQPLRLTDFE 381                  |     |

FIGURE 1

【 図 2 】

ヒトおよびマーモセットSTING:

|        |     |   |     |
|--------|-----|---|-----|
| ヒト     | 1   | MPHSSLHPSIFCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLH      | 50  |
| マーモセット | 1   | MPHSSLHPSIFCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLH      | 50  |
| ヒト     | 51  | LASLQLGGLLLNGVCSLAEBELRHHSRYRGSYWRTPVACLGCPRLRGALLL     | 100 |
| マーモセット | 51  | LASLQLGGLLLNRLCSLAEBELRHVHTRYQSSYWRVAVRAVACLGCPRLRGALLL | 100 |
| ヒト     | 101 | LSIYFYYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEK       | 150 |
| マーモセット | 101 | LSIYFYCFLPN--GRPTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEK       | 148 |
| ヒト     | 151 | GNFNVAHGLAWSYIYGVLRLLELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI        | 200 |
| マーモセット | 149 | RNFNVAHGLAWSYIYGVLRLLELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI        | 198 |
| ヒト     | 201 | LLPLDCGVPDNLMSADENIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLEN      | 250 |
| マーモセット | 199 | LLPLDCGVPDNLMSADENIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLEN      | 248 |
| ヒト     | 251 | GQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLQAKLFCRTLEDILA       | 300 |
| マーモセット | 249 | GQRAGACVLEYASPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLQAKLFCRTLEDILA       | 298 |
| ヒト     | 301 | DAPESQNNCRLLIAYQEPADDSFSLSQEVLRLHRLQEEKEEVTVGSKLTSA     | 350 |
| マーモセット | 299 | DAPESQNNCRLLIAYQEPADDSFSLSQEVLRLHRLQEEKEEVTVGSKLTSE     | 348 |
| ヒト     | 351 | VPSTSTMSQEPPELLISGMEKPLRLTDFE 379                       |     |
| マーモセット | 349 | VPSTSTMSQEPPELLISGMEKPLRLTDFE 377                       |     |

FIGURE 2

10

【 図 3 】

ヒトおよびウシSTING:

|    |     |   |     |
|----|-----|---|-----|
| ヒト | 1   | MPHSSLHPSIFCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLH      | 50  |
| ウシ | 1   | MPHSSLHPSIFCPRGLRAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLH      | 50  |
| ヒト | 51  | LASLQLGGLLLNGVCSLAEBELRHHSRYRGSYWRTPVACLGCPRLRGALLL     | 100 |
| ウシ | 51  | LASQMGGLLLKIGICSLAEBELCHVHSRYRGSYWRVAVRAVACLGCPRLRGALLL | 100 |
| ヒト | 101 | LSIYFYYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEK       | 150 |
| ウシ | 101 | LSICYFYCSLPNMADEFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEK      | 150 |
| ヒト | 151 | GNFNVAHGLAWSYIYGVLRLLELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI        | 200 |
| ウシ | 151 | RNFNVAHGLAWSYIYGVLRLLELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI        | 200 |
| ヒト | 201 | LLPLDCGVPDNLMSADENIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLEN      | 250 |
| ウシ | 201 | LLPLDCGVPDNLMSADENIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLEN      | 250 |
| ヒト | 251 | GQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLQAKLFCRTLEDILA       | 300 |
| ウシ | 251 | GQRAGVCLVLEATPLQTLFAMSQDGRAGFSREDRLQAKLFCRTLEDILA       | 300 |
| ヒト | 301 | DAPESQNNCRLLIAYQEPADDSFSLSQEVLRLHRLQEEKEEVTVGSKLTSA     | 350 |
| ウシ | 301 | DAPESQNNCRLLIAYQEPADDSFSLSQEVLRLHRLQEEKEEVTVGSKLTSA     | 349 |
| ヒト | 351 | VPSTSTMSQEPPELLISGMEKPLRLTDFE 379                       |     |
| ウシ | 350 | MPGSSVLSQEPPELLISGMEKPLRLTDFE 378                       |     |

FIGURE 3

【 図 4 】

ヒトおよびネコSTING:

|    |     |   |     |
|----|-----|---|-----|
| ヒト | 1   | MPHSSLHPSIFCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLH    | 50  |
| ネコ | 1   | MPRTGLHPSIFPRPRGMGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLH   | 50  |
| ヒト | 51  | LASLQLGGLLLNGVCSLAEBELRHHSRYRGSYWRTPVACLGCPRLRGALLL   | 100 |
| ネコ | 51  | LASLQLGGLLFTGVCHLTELCHLHSRYRGSYWRVAVRAVACLGCPRLRGALLL | 100 |
| ヒト | 101 | LSIYFYYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEK     | 150 |
| ネコ | 101 | LSICYFYSTLP--STDLPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEK  | 149 |
| ヒト | 151 | GNFNVAHGLAWSYIYGVLRLLELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI      | 200 |
| ネコ | 150 | RNFNVAHGLAWSYIYGVLRLLELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI      | 199 |
| ヒト | 201 | LLPLDCGVPDNLMSADENIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLEN    | 250 |
| ネコ | 200 | LLPLDCGVPDNLMSADENIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLEN    | 249 |
| ヒト | 251 | GQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLQAKLFCRTLEDILA     | 300 |
| ネコ | 250 | GQAGICVLEYATPLQTLFAMSQDGRAGFSREDRLQAKLFCRTLEDILA      | 299 |
| ヒト | 301 | DAPESQNNCRLLIAYQEPADDSFSLSQEVLRLHRLQEEKEEVTVGSKLTSA   | 350 |
| ネコ | 300 | DTPESQNNCRLLIAYQEPADDSFSLSQEVLRLHRLQEEKEEVTVGSKLTSM   | 348 |
| ヒト | 351 | VPSTSTMSQEPPELLISGMEKPLRLTDFE 379                     |     |
| ネコ | 349 | VRNPSVLSQEPPELLISGMEKPLRLTDFE 377                     |     |

FIGURE 4

20

30

40

50



【 図 5 】

ヒトおよびダチョウ STING:

|      |     |  |     |
|------|-----|--|-----|
| ヒト   | 1   | MPHSSLHFS-----IPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEHTL   | 44  |
| ダチョウ | 1   | MAHESGTFSNFATPLIPKAREGRAQHAAYVLLALCAALVLAGPEFVHVIA | 50  |
| ヒト   | 45  | RYLVHLHLSLQLGLLLNGVCSLAEELRHHSRYRGSYWRVTRACLGCEPLR | 94  |
| ダチョウ | 51  | RSFTSHFVALQIGALLKGIQYLVVEEIHLETRHRGSRFRALSACL--HLR | 98  |
| ヒト   | 95  | -RGALLLSIYFYYSLPNAVGPPTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAE   | 143 |
| ダチョウ | 99  | WHVTLLVCGSAYVALLDGDEQPLGLHLGLACQLLILALGLHKPSAVE    | 148 |
| ヒト   | 144 | ISAVCEKGNFNVAHGLAWSYIYGLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGA  | 193 |
| ダチョウ | 149 | ISEMSERSKQNVVAHGLAWSYVGYLKVLPRLKESMENIGRTNENMLAHK  | 198 |
| ヒト   | 194 | VSQRLYILLPLDCGVFDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNS | 243 |
| ダチョウ | 199 | ETWKLHLVFLSCNICDDLEKADSNIQYAMDLPFETTLTRAGTKRKYRNT  | 248 |
| ヒト   | 244 | IYELLENGQRAGTCVLEYATPIQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCR | 293 |
| ダチョウ | 249 | LYX-IKDEDKFRFCVWEYATFLQSLVAMSQDECAAFSREDRLEQAKLFYR | 297 |
| ヒト   | 294 | TLEDILADAPESQNNCRLLIAYQEPADDSFSLSQEVLRLHRQEEKEEVTV | 343 |
| ダチョウ | 298 | TLEELIQSAKECAGTYRLLVYVESGAEATHFLSRELRHLQQQQRQEEYTV | 347 |
| ヒト   | 344 | --GLKTSAVFSTSTMSQPELLISGMEKPLPLRDFE 379            |     |
| ダチョウ | 348 | CDGTL-----CSTDLSLQISESDLPQLRSDCL 375               |     |

FIGURE 5

【 図 6 】

ヒトおよびトキ STING:

|    |     |   |     |
|----|-----|---|-----|
| ヒト | 1   | ---MPHSSLHFS---IPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEHTL   | 44  |
| トキ | 1   | MSQEPQWLSHPTALLIPKAREGRAQHAAYVLLALCAAVLYLAGPEFLVPSA | 50  |
| ヒト | 45  | RYLVHLHLSLQLGLLLNGVCSLAEELRHHSRYRGSYWRVTRACLGCEPLR  | 94  |
| トキ | 51  | RSLSHFMALQIGVLLKGTCTYLAEEIFHLQSRHHGSFWRALSACF--PLR  | 98  |
| ヒト | 95  | RGALLLSIYFYYSLPNAVGPPTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEI    | 144 |
| トキ | 99  | WHGLMLLVCGSAYVALLEDGQPLGLHLGLASLQQLLILALGLHKPSAVEM  | 148 |
| ヒト | 145 | SAVCEKGNFNVAHGLAWSYIYGLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAV   | 194 |
| トキ | 149 | SEMSERSKQNVVAHGLAWSYVGYLKVLPVKKSMEEFSTRANPNVLRRE    | 198 |
| ヒト | 195 | SQRLYILLPLDCGVFDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSI  | 244 |
| トキ | 199 | TKWHLHLVFLSCDVYDLEKADSNIQYMDLPFETTLTRAGTKRKYKHSL    | 248 |
| ヒト | 245 | YELLENGQRAGTCVLEYATPIQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCR   | 294 |
| トキ | 249 | YTRDEGNKHLWCAVYATPIQTLQSLYAMSQDEYAFSREDRLEQAKLFYRT  | 298 |
| ヒト | 295 | LEDILADAPESQNNCRLLIAYQEPADDSFSLSQEVLRLHRQEEKEEVTVG  | 344 |
| トキ | 299 | LEELIKGSKECAGTYRLLVYVESGAEATHFLSRELRHLWHLRQQQEEYTV  | 348 |
| ヒト | 345 | SLKTSAVFSTSTMSQPELLISGMEKPLPLRDFE 379               |     |
| トキ | 349 | EGNQPHNPSTTLHSTELNLQISESDLPQLRSDC- 382              |     |

FIGURE 6

10

【 図 7 】

ヒトおよびシーラカンス (配列番号:345のバリエーション) STING:

|        |     |  |     |
|--------|-----|--|-----|
| ヒト     | 1   | MPHSSLHFSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEHTLRYLVHL    | 50  |
| シーラカンス | 1   | FGLQNMSSALIPQPRGNRANQAYFIITVIMLMLWIFRNIMDNVLEVIALH   | 50  |
| ヒト     | 51  | LASLQLGLLLNGVCSLAEELRHHSRYRGSYWRVTRACLGCEPLRRLGALL   | 100 |
| シーラカンス | 51  | ILLILGQAAMKGIUNFAEEVNVHPQRYGGSYWKALRAGLMLSKYDVUMKIV  | 100 |
| ヒト     | 101 | FS--IYFYYSLPNAVGPPTWMLALL--GLSQALNILLGLKGLAPAEISA    | 146 |
| シーラカンス | 101 | LQGVLLWVHFSLSLVF---VWPELHLLVSCICHLLNNVGLVLEKSPVEVSE  | 146 |
| ヒト     | 147 | VCEKGNFNVAHGLAWSYIYGLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQ    | 196 |
| シーラカンス | 147 | IYERNRIGVAHGLAWSYIYGLKLVLEPELEDRISYVNSHGNLLKHKETW    | 196 |
| ヒト     | 197 | RYVILLPLDCGVFDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYE   | 246 |
| シーラカンス | 197 | RHHLILFLSCSIFDNLADVDSNIEPLDNLSELQINRAGIKGRSYKHSLYQ   | 246 |
| ヒト     | 247 | LEENGQRAGTCVLEYATPIQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRPLE   | 296 |
| シーラカンス | 247 | VLEDKRFHYCILEYATPLKSLLEMSKEASAEFTKEDRLEQKLFYRDLK     | 296 |
| ヒト     | 297 | DILADAPESQNNCRLLIAY--QEEPADDSFSLSQEVLRLHRQEEKEEVTVG  | 344 |
| シーラカンス | 297 | DILDNSQECGRFRLLVIYDGRSDSGKSHF--LSKELLRLHNLQQQKEEYFMS | 345 |
| ヒト     | 345 | SLKTSAVFSTSTMSQPELLISGMEKPLPLRDFE 379                |     |
| シーラカンス | 346 | EQYQFNSSTSCLSLSTPEQLMISDYDAPHTLKRQVC 380             |     |

FIGURE 7

【 図 8 】

ヒトおよびゼブラフィッシュ STING:

|          |     |   |     |
|----------|-----|---|-----|
| ヒト       | 1   | -----MPHSSLHFSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPE       | 41  |
| ゼブラフィッシュ | 1   | MSVMGEDALVFRASRLFVMCAAGL----FLTAVAWLLDSKDFSE---     | 43  |
| ヒト       | 42  | HTRLRYLVHLHLSLQLGLLLNGVCSLAEELRHHSRYRGSYWRVTR       | 86  |
| ゼブラフィッシュ | 44  | -----RAGITAPGMLERFTYICILIAELLEHLRSGRQVHGMSYFR       | 85  |
| ヒト       | 87  | ACLGCPLRGA--LILLSIYFYYSLPNAVGPPTWMLALLGLSQAL----    | 130 |
| ゼブラフィッシュ | 86  | ACP----RSGGILGCAIFL-----MLMLGGVSFSVKQWS             | 116 |
| ヒト       | 131 | --NIL-----LGLKGLAPAEISAVCEKGNFNVAHGLAWSYIYGLR       | 169 |
| ゼブラフィッシュ | 117 | HFNLMCAGYMLNLSLGLVGPAPVEISEICEAKRMNVAHGLAWSFYIYGLK  | 166 |
| ヒト       | 170 | LILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRVYILLPLDCGVFDNLSMADPNI  | 219 |
| ゼブラフィッシュ | 167 | FLPLALEVNVREYSRR----ERLSPRLHLLPLNARVPSKPEEEDTV      | 211 |
| ヒト       | 220 | RFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPIQTLF  | 269 |
| ゼブラフィッシュ | 212 | VFHENLPLDKLDRAGVRKRSYVYKITHNNE--TFSCILEYATPLLLTY    | 260 |
| ヒト       | 270 | AMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRPLEDILADAPESQNNCRLLIAYQEPAD | 319 |
| ゼブラフィッシュ | 261 | QMSQESSAGFGERERKQVLLFYRTLQCLDNLSECRNRYRLILNDEHT     | 310 |
| ヒト       | 320 | DSSFSLSQEVLRHLRQEE-----KEEYTVGSLKTSAVFST-           | 354 |
| ゼブラフィッシュ | 311 | GDPHYLSRELPQNLKQDGEI FMDPTNEVHPVEEGPVGNC--NGALQATF  | 359 |
| ヒト       | 355 | --STMSQPELLISGMEKPLPLR-----TDFE----- 379            |     |
| ゼブラフィッシュ | 360 | HEEPMSEDEPTLMS---RPQSLRSEPEVETDYNPSSAMKQN 398       |     |

FIGURE 8

20

30

40

50

【 図 9 】

ヒトおよびイノシシ STING:

|      |     |  |     |
|------|-----|--|-----|
| ヒト   | 1   | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAAALVLLSACLVTIWLGLGEPPEHTLRVYLVL | 50  |
| イノシシ | 1   | MPYSSLHPSIPQPRGLRAQVAALVLLGACLVALWGLGELPEYTLRRLVLM   | 50  |
| ヒト   | 51  | LASLQLGLLLNGVCSLAELERHHSRYRGSYWRTVRACLGCPFRRGALL     | 100 |
| イノシシ | 51  | LASQQIGLLVKGCLSAELERHHSRYRGSYWRVAARACLGCFIRCGALL     | 100 |
| ヒト   | 101 | LSIYFYYSLPNAVGPPTWMLALLGLSQALNILLGLKGLPAEISAVCEK     | 150 |
| イノシシ | 101 | LSQYFYYSIRDKAGLPLFWMLALLGLSQALNILLGLQHLPAEIVSAICEK   | 150 |
| ヒト   | 151 | GNFNVAHGLAWSYYIGYLRLLLPQLQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI   | 200 |
| イノシシ | 151 | RNFNVAHGLAWSYYIGYLRLLLPGLRARIQAYNQRHNNVLLGIGNHLRHH   | 200 |
| ヒト   | 201 | LLPLDCGVPDNLMSADPNIRFLDKLPQQTGDRAGIKDRVYSNSIYELLE    | 250 |
| イノシシ | 201 | LLFPLDCGVDDLSVADPNIRFLHLPQQSADRAGIKGRVYNTSIYELLE     | 250 |
| ヒト   | 251 | QQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILA   | 300 |
| イノシシ | 251 | GQFAGVCVLGYATPLQTLFAMSQDGRAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILA   | 300 |
| ヒト   | 301 | DAPESQNNCRLLIAYQEPADSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSILKTS   | 350 |
| イノシシ | 301 | DAPFAQNNCRLLIYQEPTEGGSFSLSQEILRHLRQEEER-EVTMGSATSV   | 349 |
| ヒト   | 351 | VFSTSTMSQEPPELLISGMKPLPLRTDPS 379                    |     |
| イノシシ | 350 | VFSSTLSQEPPELLISGMQPLPLRSDIF 378                     |     |

FIGURE 9

【 図 10 】

ヒトおよびコウモリ STING:

|      |     |  |     |
|------|-----|--|-----|
| ヒト   | 1   | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAAALVLLSACLVTIWLGLGEPPEHTLRVYLVL | 49  |
| コウモリ | 1   | MSHSSLHPSVPRPRGRARRNIAAVVLLIVCALAALWLSGKFSSEYTLRCLVL | 50  |
| ヒト   | 50  | HLASLQLGLLLNGVCSLAELERHHSRYRGSYWRTVRACLGCPFRRGALL    | 99  |
| コウモリ | 51  | HLASQQIGLLSNRVCVLAELERHHSRYRGSYWRVAARACLGCFIRCGVVL   | 100 |
| ヒト   | 100 | LLSIYFYYSLPNAVGPPTWMLALLGLSQALNILLGLKGLPAEISAVCEK    | 149 |
| コウモリ | 101 | LVSFFFYYSLPNIDDLPLTWMLAHLGLSEALNILLGLRGLTPAEVSTVCE   | 150 |
| ヒト   | 150 | KGNFNVAHGLAWSYYIGYLRLLLPQLQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLY   | 199 |
| コウモリ | 151 | QRHFNVAHGLAWSYYIGYLRLLLPGLRARIHTYNTLQGLNLTQGVGSHRLLY | 200 |
| ヒト   | 200 | LLPLDCGVPDNLMSADPNIRFLDKLPQQTGDRAGIKDRVYSNSIYELLE    | 249 |
| コウモリ | 201 | ILFPLDCGVLLDLSAADPNIRFLHLPQQSADRAGIKRNVYNTSIYELLE    | 250 |
| ヒト   | 250 | NGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDIL   | 299 |
| コウモリ | 251 | GKGFVGTVCVLEYATPLQTLFAMSQDARAGFSQEDRLEQAKLFCRTLEDIL  | 300 |
| ヒト   | 300 | DAPESQNNCRLLIAYQEPADSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSILKTS   | 349 |
| コウモリ | 301 | ADDEPESQNNCRLLIYQEPTEESDFSLSQAILKHLRQEEKEEVTVGVGY    | 350 |
| ヒト   | 350 | AVPSTSTMSQEPPELLISGMKPLPLRTDPS 379                   |     |
| コウモリ | 351 | EAPGSSTLRQEPPELLISGMQPLPLRTDIF 380                   |     |

FIGURE 10

10

【 図 11 】

ヒトおよびマナティ STING:

|      |     |   |     |
|------|-----|---|-----|
| ヒト   | 1   | ---MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAAALVLLSACLVTIWLGLGEPPEHTLRVYL | 47  |
| マナティ | 1   | MVMPHSSLHPSIPFRHGHGIGKAAVLLVACLVALWELGEPGHPQLQWL      | 50  |
| ヒト   | 48  | VHLASLQLGLLLNGVCSLAELERHHSRYRGSYWRTVRACLGCPFRRGA      | 97  |
| マナティ | 51  | VCQLASLQLGLLLKVICSLAELERHHSRYRGSYWRVAARACMGCPFRRGA    | 100 |
| ヒト   | 98  | LLLLSIYFYYSLPNAVGPPTWMLALLGLSQALNILLGLKGLPAEISAV      | 147 |
| マナティ | 101 | LLLLSCYFYFCFPNMADLPLTWMLALLGLSQALNILLGLQHLPAEISAI     | 150 |
| ヒト   | 148 | CEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRLLLPQLQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQR    | 197 |
| マナティ | 151 | CEKRNFNVAHGLAWSYYIGYLRLLLPGLQDRIRTYNQLHNNLLRGAVSQR    | 200 |
| ヒト   | 198 | LYILLPLDCGVPDNLMSADPNIRFLDKLPQQTGDRAGIKDRVYSNSIYEL    | 247 |
| マナティ | 201 | LHILFPLDCGVFNDLSVADANIRFLQKLFQQSADGAGIKGRVYNTSNVYQL   | 250 |
| ヒト   | 248 | LENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLED    | 297 |
| マナティ | 251 | LEHQQPAGTCVLEYATPLQTLFAMSQDGRAGFSREDRLEQAKLFCRTLED    | 300 |
| ヒト   | 298 | ILADAPESQNNCRLLIAYQEPADSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSILK   | 347 |
| マナティ | 301 | ILADAPFYQNNCRLLIYQESAEAGSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSV    | 350 |
| ヒト   | 348 | TSAV----PSTSTMSQEPPELLISGMKPLPLRTDPS 379              |     |
| マナティ | 351 | TSVFSBSSPSTSTLSQEPKLLISGMQPLPLRTDVF 387               |     |

FIGURE 11

【 図 12 】

ヒトおよびゾウギンザメ STING:

|        |     |  |     |
|--------|-----|--|-----|
| ヒト     | 1   | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAAALVLLS--ACLVTIWLGLGEPPEHTLRVYL | 48  |
| ゾウギンザメ | 1   | -----MSBSIFPRFGKVAIYVGLLIMSGLACLTYPL-----TFDYHIKTFV  | 41  |
| ヒト     | 49  | LHLASLQL-----GLLLNGVCSLAELERHHSRYRGSYWRTVRACLGCPF    | 93  |
| ゾウギンザメ | 42  | QQVAQ-QLIVSFFALCLRLCEFVEELGHKQTRYQNSWRVRLNALSLDWK-   | 89  |
| ヒト     | 94  | RRGALLLSIYFYYSLPNAVGPPTWMLALLGLSQALNILL-----LL       | 134 |
| ゾウギンザメ | 90  | KYGFCLLSLLENVWVLPYEKHMYSY----AVPTVGGTISLTCFCVFLVKVF  | 135 |
| ヒト     | 135 | GLKGLPAEISAVCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRLLLPQLQARIRTYNQ    | 184 |
| ゾウギンザメ | 136 | QLDVLSPAQISEISETNKNFNVAHGLAWSYYLGLYKLVKPLKEKINQYHR   | 185 |
| ヒト     | 185 | HYNNLLRGAVSQRLYLLPLDCGVPDNLMSADPNIRFLDKLPQQTGDRAG    | 234 |
| ゾウギンザメ | 186 | EYGNVLQ-QKGGKLYLILPFSCRVLDRLEKVDNIVFYQNLPELLVDR      | 234 |
| ヒト     | 235 | IKDRVYSNSIYELL-ENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSRED   | 283 |
| ゾウギンザメ | 235 | IKRSYKHSIYLYDYQKQKQPHHCILEYATPLRSLFEMTNSAAAFSKEQ     | 284 |
| ヒト     | 284 | RLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLLIAYQEPADSSFS--LSQEV     | 330 |
| ゾウギンザメ | 285 | RLDQAKLFYRTLKSILNNVPEVTGSYRLIYVDDLEAGALGPHFVSEIL     | 334 |
| ヒト     | 331 | RHLRQEEKEEVTVGSILKTSVAVPSTSTMSQEPPELLISGMKPLPLRTDPS  | 379 |
| ゾウギンザメ | 335 | KHMRQELTEYFVA---EPSNANETDCMSSEPHLMIS--DDPKPLRSYCF    | 378 |

FIGURE 12

20

30

40

50

【 図 13 】

ヒトおよびマウス STING:

|     |     |   |     |
|-----|-----|---|-----|
| ヒト  | 1   | MPHSSLHPSIFCPRGHGAQKAAVLVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLH     | 50  |
| マウス | 1   | MPYSNLHPAIFRFRGHRSKYVALIFLVAASLMLLWVAKDPNNHTLKYLAIH     | 50  |
| ヒト  | 51  | LASLQLGLLLNGVCSLAEEELRHHSRYRGSYVNRITVFRACLGCPLRRGALLL   | 100 |
| マウス | 51  | LASHHELGLLLKNLCCLAEEELCHVQSRVYQGSYVWGAVFRACLGCPIHGMAMIL | 100 |
| ヒト  | 101 | LSIYFYYSLEPNAVGGPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEK     | 150 |
| マウス | 101 | LSYFYFF-LQNTADIYLSWMEGLLVLYKSLSMLLGLQSLTPAEVSAVCEE      | 149 |
| ヒト  | 151 | GNENVAHGLAWSYYIGYLRLLPELQARIRITYNQHYNMLLRGAVSQRLYI      | 200 |
| マウス | 150 | KKLNVAHGLAWSYYIGYLRLLPELQARIRIMFNQLHNNMLSGAGSRRLYI      | 199 |
| ヒト  | 201 | LEFLDCGVEDNLSMADENIRELDKLPQQTGDRAGIKDRVYSNSIYEILEN      | 250 |
| マウス | 200 | LEFLDCGVEDNLSVVDENIRFRDMLPQQNIDRAGIKNRVYSNSVYEILEN      | 249 |
| ヒト  | 251 | GQFAGTCVLEVATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLQAKLFCRTLEDILA       | 300 |
| マウス | 250 | GQFAGVCILEVATPLQTLFAMSQDAKAGFSREDRLQAKLFCRTLEEILE       | 299 |
| ヒト  | 301 | DAPESQNNCRLLAYQEFADDSFSLSQEVLRRHRQEEKEEVTVGSLKTSA       | 350 |
| マウス | 300 | DVPESRNNCRLLIVYQEFDTGNSFSLSQEVLRRHRQEEKEEVVIMNAPMTSV    | 349 |
| ヒト  | 351 | VPSTTMSQEPPELLISGMKPLPLRTDPS                            | 379 |
| マウス | 350 | APPFSVLSQEPRELLISGMDQPLPLRTDLI                          | 378 |

FIGURE 13

10

【 配列表 】

2022524951000001.app

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2020/020240

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
- 2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
- 3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

- 1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
- 3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
  
6(completely); 1-5, 7-136, 148-175, 189-223(partially)
  
- 4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

30

40

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|   |
|---|
| International application No<br>PCT/US2020/020240 |
|---|

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>INV. C07K14/47 C07K14/46 C07K14/465 C12N1/36 A61P37/04<br>A61P35/00<br>ADD.<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |  |  |
|---|--|--|
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C07K C12N A61P<br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, EMBL   |  |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>   |  |  |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.                              |
| Y   | JIAZHENG XIE ET AL: "Dampened STING-Dependent Interferon Activation in Bats", CELL HOST & MICROBE, vol. 23, no. 3, 22 February 2018 (2018-02-22), pages 297-301.e4, XP55691340, NL ISSN: 1931-3128, DOI: 10.1016/j.chom.2018.01.006 abstract; figure 2 page e3 | 1-5,<br>7-136,<br>148-175,<br>189-223              |
| Y   | -----<br>WO 2019/014398 A1 (ACTYM THERAPEUTICS INC [US]) 17 January 2019 (2019-01-17)  | 30-136,<br>148-175,<br>189-223                     |
| A   | pages 36,62,63; claims 1-72, 114, 151<br>page 69 - page 70; example 4<br>-----<br>-/--   | 1-5,7-29   |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.  |  |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.  |  |  |
| * Special categories of cited documents :<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |  |  |
| Date of the actual completion of the international search   |  | Date of mailing of the international search report |
| 3 November 2020   |  | 11/11/2020   |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016  |  | Authorized officer<br><br>Bucka, Alexander         |

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

page 1 of 5

10

20

30

40

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|   |
|---|
| International application No<br>PCT/US2020/020240 |
|---|

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |   |      |
|--|---|---|------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.                           |      |
| Y  | <p>KR 2018 0066296 A (SEOUL NAT UNIV R&amp;DB FOUNDATION [KR]; GWANGJU INST SCIENCE &amp; TECH [KR]) 19 June 2018 (2018-06-19)</p> <p>figures 7-12</p> <p>-----</p>   | <p>1-5,<br/>7-136,<br/>148-175,<br/>189-223</p> | 10   |
| A  | <p>XIE L ET AL: "Molecular cloning and functional characterization of porcine stimulator of interferon genes (STING)", DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY, PERGAMON PRESS, US, vol. 34, no. 8, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 847-854, XP027048685, ISSN: 0145-305X [retrieved on 2010-05-13] page 848, right-hand column; figure 4</p> <p>-----</p>  | <p>1-5,<br/>7-136,<br/>148-175,<br/>189-223</p> |      |
| A  | <p>DARA L. BURDETTE ET AL: "STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP", NATURE, vol. 478, no. 7370, 25 September 2011 (2011-09-25), XP55453217, London ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature10429 table S1</p> <p>-----</p>  | <p>1-5,<br/>7-136,<br/>148-175,<br/>189-223</p> | 20   |
| A  | <p>WO 2017/156349 A1 (COLD GENESYS INC [US]) 14 September 2017 (2017-09-14)</p> <p>claims 1,5</p> <p>-----</p>  | <p>1-5,<br/>7-136,<br/>148-175,<br/>189-223</p> | 30   |
| Y  | <p>SEO JIEUN ET AL: "Tofacitinib relieves symptoms of stimulator of interferon genes (STING)-associated vasculopathy with onset in infancy caused by 2 de novo variants in TMEM173", JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 139, no. 4, 29 December 2016 (2016-12-29), pages 1396-1399, XP029967965, ISSN: 0091-6749, DOI: 10.1016/J.JACI.2016.10.030 figures 1,2</p> <p>-----</p> | <p>1-5,<br/>7-136,<br/>148-175,<br/>189-223</p> | 40   |
|  | -----   |   | -/-- |

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2020/020240

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                                       |
|--|--|---------------------------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.                 |
| A  | SHIFENG WANG ET AL: "New technologies in developing recombinant attenuated Salmonella vaccine vectors", MICROBIAL PATHOGENESIS, vol. 58, 8 November 2012 (2012-11-08), pages 17-28, XP55455625, US<br>ISSN: 0882-4010, DOI: 10.1016/j.micpath.2012.10.006<br>table 1   | 1-5,<br>7-136,<br>148-175,<br>189-223 |
|  | -----  |                                       |
| A  | PATEL SEEMA ET AL: "TMEM173 variants and potential importance to human biology and disease", GENES AND IMMUNITY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 20, no. 1, 1 May 2018 (2018-05-01), pages 82-89, XP036822907, ISSN: 1466-4879, DOI: 10.1038/S41435-018-0029-9 [retrieved on 2018-05-01]<br>figure 1                             | 1-5,<br>7-136,<br>148-175,<br>189-223 |
|  | -----  |                                       |
| X  | J. CONLON ET AL: "Mouse, but not Human STING, Binds and Signals in Response to the Vascular Disrupting Agent 5,6-Dimethylxanthenone-4-Acetic Acid", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 190, no. 10, 3 May 2013 (2013-05-03), pages 5216-5225, XP55367377, US<br>ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1300097<br>page 5217; figure 5 | 6                                     |
|  | -----  |                                       |
| A  |  | 1-5,<br>7-136,<br>148-175,<br>189-223 |
|  | -----  |                                       |
| A  | YANG LI ET AL: "Regulating STING in health and disease", JOURNAL OF INFLAMMATION, vol. 14, no. 1, 7 June 2017 (2017-06-07), XP55691379, DOI: 10.1186/s12950-017-0159-2<br>table 2  | 1-5,<br>7-136,<br>148-175,<br>189-223 |
|  | -----  |                                       |
|  | -/--   |                                       |

10

20

30

40

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2020/020240

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                               |
|--|--|-------------------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.         |
| X,P  | CARINA C. DE OLIVEIRA MANN ET AL:<br>"Modular Architecture of the STING<br>C-Terminal Tail Allows Interferon and<br>NF-[kappa]B Signaling Adaptation",<br>CELL REPORTS,<br>vol. 27, no. 4, 23 April 2019 (2019-04-23)<br>, pages 1165-1175.e5, XP55690349,<br>US<br>ISSN: 2211-1247, DOI:<br>10.1016/j.celrep.2019.03.098<br>figures 1-3   | 6-136,<br>148-175,<br>189-223 |
| A,P  | -& Carina C De Oliveira Mann ET AL:<br>"Supplemental Information: Modular<br>Architecture of the STING C-Terminal Tail<br>Allows Interferon and NF-kB Signaling<br>Adaptation",<br>Cell Reports,<br>23 April 2019 (2019-04-23), XP55742954,<br>Retrieved from the Internet:<br>URL:https://ars.els-cdn.com/content/image/<br>1-s2.0-S2211124719304371-mmc1.pdf<br>[retrieved on 2020-10-22]<br>figure S1 | 1-5                           |
| A  | -----<br>ESTEFANÍA RODRÍGUEZ-GARCÍA ET AL:<br>"TMEM173 Alternative Spliced Isoforms<br>Modulate Viral Replication through the<br>STING Pathway",<br>IMMUNOHORIZONS,<br>vol. 2, no. 11,<br>11 December 2018 (2018-12-11), pages<br>363-376, XP55691383,<br>DOI: 10.4049/immunohorizons.1800068<br>figures 1,2   | 6-136,<br>148-175,<br>189-223 |
| A  | -----<br>PU GAO ET AL: "Binding-Pocket and<br>Lid-Region Substitutions Render Human<br>STING Sensitive to the Species-Specific<br>Drug DMXAA",<br>CELL REPORTS,<br>vol. 8, no. 6,<br>4 September 2014 (2014-09-04), pages<br>1668-1676, XP55738389,<br>US<br>ISSN: 2211-1247, DOI:<br>10.1016/j.celrep.2014.08.010<br>figure 1   | 6-136,<br>148-175,<br>189-223 |
|  | -----<br>-/--  |                               |

2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2020/020240

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |  |
|--|---|--|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.                  |
| A,P  | <p>ERGUN SABRINA L ET AL: "STING Polymer Structure Reveals Mechanisms for Activation, Hyperactivation, and Inhibition",<br/>CELL, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL,<br/>vol. 178, no. 2, 20 June 2019 (2019-06-20)<br/>, page 290, XP085739925,<br/>ISSN: 0092-8674, DOI:<br/>10.1016/J.CELL.2019.05.036<br/>[retrieved on 2019-06-20]<br/>figure 3</p> <p style="text-align: center;">-----</p> | <p>6-136,<br/>148-175,<br/>189-223</p> |

10

20

30

40

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/US2020/020240

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 2019014398 A1                       | 17-01-2019       | CA 3069523 A1           | 17-01-2019       |
|  |                  | EP 3652318 A1           | 20-05-2020       |
|  |                  | US 2019017050 A1        | 17-01-2019       |
|  |                  | WO 2019014398 A1        | 17-01-2019       |
| -----                                  |                  |                         |                  |
| KR 20180066296 A                       | 19-06-2018       | NONE                    |                  |
| -----                                  |                  |                         |                  |
| WO 2017156349 A1                       | 14-09-2017       | CN 108778301 A          | 09-11-2018       |
|  |                  | EP 3426271 A1           | 16-01-2019       |
|  |                  | JP 2019507761 A         | 22-03-2019       |
|  |                  | US 2019070233 A1        | 07-03-2019       |
|  |                  | WO 2017156349 A1        | 14-09-2017       |
| -----                                  |                  |                         |                  |

10

20

30

40

50

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

10

1. claims: 1-5, 7-136, 148-175, 189-223(all partially)

A modified Stimulator of Interferon Genes (STING) protein from a non-human species, where the non-human STING is one that has lower NF-K B signaling activity compared to the NF-K B signaling activity of human STING, and, optionally, higher type I interferon (IFN) pathway signaling activity compared to human STING, wherein: the non-human STING protein is modified to include a mutation or mutations so that it has increased activity or acts constitutively in the absence of cytosolic nucleic acids;the mutations are insertions, deletions, and/or replacements of amino acids; and the STING protein optionally has a deletion of the TRAF6 binding site, wherein the mutation is an amino acid replacement S102P; bacteria comprising said protein.

20

---

2-42. claims: 1-5, 7-136, 148-175, 189-223(all partially)

A modified Stimulator of Interferon Genes (STING) protein from a non-human species, where the non-human STING is one that has lower NF-K B signaling activity compared to the NF-K B signaling activity of human STING, and, optionally, higher type I interferon (IFN) pathway signaling activity compared to human STING, wherein: the non-human STING protein is modified to include a mutation or mutations so that it has increased activity or acts constitutively in the absence of cytosolic nucleic acids;the mutations are insertions, deletions, and/or replacements of amino acids; and the STING protein optionally has a deletion of the TRAF6 binding site, wherein in each separate invention the mutation is an amino acid replacement selected from one of the replacements recited in claim 25; bacteria comprising said protein.

30

---

43. claims: 6(completely); 7-136, 148-175, 189-223(partially)

A modified Stimulator of Interferon Genes (STING) protein that is a chimera, comprising replacement of the CTT (C-terminal tail) region in a STING from a first species with the CTT of STING from a second species, wherein: the STING protein of the second species has lower NF-kB signaling activity than the NF-K B signaling activity of human STING; and the TRAF6 binding site in the CTT is deleted.

40

---

44-47. claims: 32-57, 62-135, 189-223(all partially)

50

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

An immunostimulatory bacterium, comprising a plasmid encoding a gain-of-function variant of an immunostimulatory protein that, in unmodified form, is part of a cytosolic DNA/RNA sensor pathway that leads to expression of type I interferon (IFN), wherein in each separate invention the protein is selected from RIG-I, IRF-3, IRF-7 or MDA5.

10

---

48. claims: 137-141(completely); 189-223(partially)

A delivery vehicle, comprising nucleic acids encoding a STING protein from a non-human species, wherein the STING protein has type I IFN signaling activity, and attenuated NF-K B signaling activity compared to the NF-K B signaling activity of human STING.

20

---

49. claims: 142-147(completely); 148-175, 189-223(partially)

A delivery vehicle, comprising nucleic acids encoding an immunostimulatory protein that, when expressed in a subject, leads to constitutive expression of type I IFN, wherein the delivery vehicle is selected from among a nanoparticle, a liposome, an exosome, a bacterium, a virus, a cell, and a microvesicle, wherein the proteins are selected from the proteins recited in claim 145 (RIG-I, MDA-5, IRF-3, etc.)

---

50. claims: 176-188(completely); 189-223(partially)

An isolated cell, comprising an immunostimulatory bacterium, wherein: the immunostimulatory bacterium is modified so that it preferentially infects tumor-resident immune cells, and/or the genome of the immunostimulatory bacterium is modified so that it induces less cell death in tumor-resident immune cells; and the cell is an immune cell, a stem cell, a cell from a primary cell line, or a tumor cell.

30

---

51. claim: 224

A method of producing an immunostimulatory bacterium or oncolytic virus for treating cancer, comprising: identifying a mutated gain-of-function, constitutively active immunostimulatory protein that promotes interferonopathies in human patients; and introducing nucleic acid encoding the identified protein into a tumor-targeting bacterium or virus, whereby the resulting bacterium or virus, when introduced into a subject, promotes immunostimulation of the tumor microenvironment.

40

---

## フロントページの続き

| (51)国際特許分類               | F I            | テーマコード (参考) |
|--------------------------|----------------|-------------|
| C 0 7 K 14/46 (2006.01)  | C 0 7 K 14/46  | 4 H 0 4 5   |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01)  | A 6 1 P 35/00  |             |
| A 6 1 P 35/04 (2006.01)  | A 6 1 P 35/04  |             |
| A 6 1 P 35/02 (2006.01)  | A 6 1 P 35/02  |             |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01)  | A 6 1 P 43/00  | 1 2 1       |
| A 6 1 P 37/04 (2006.01)  | A 6 1 P 37/04  |             |
| A 6 1 K 45/00 (2006.01)  | A 6 1 K 45/00  |             |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | G           |
| A 6 1 K 48/00 (2006.01)  | A 6 1 K 39/395 | U           |
| A 6 1 K 9/127 (2006.01)  | A 6 1 K 39/395 | E           |
| A 6 1 K 9/14 (2006.01)   | A 6 1 K 39/395 | T           |
| A 6 1 K 47/46 (2006.01)  | A 6 1 K 48/00  |             |
| A 6 1 K 35/76 (2015.01)  | A 6 1 K 9/127  |             |
| A 6 1 K 35/768 (2015.01) | A 6 1 K 9/14   |             |
| A 6 1 K 35/741 (2015.01) | A 6 1 K 47/46  |             |
| A 6 1 K 35/12 (2015.01)  | A 6 1 K 35/76  |             |
| A 6 1 K 35/13 (2015.01)  | A 6 1 K 35/768 |             |
| A 6 1 K 35/15 (2015.01)  | A 6 1 K 35/741 |             |
| A 6 1 K 35/17 (2015.01)  | A 6 1 K 35/12  |             |
| A 6 1 K 38/17 (2006.01)  | A 6 1 K 35/13  |             |
| A 6 1 K 47/55 (2017.01)  | A 6 1 K 35/15  | Z           |
|                          | A 6 1 K 35/17  | Z           |
|                          | A 6 1 K 38/17  |             |
|                          | A 6 1 K 47/55  |             |

(32)優先日 平成31年2月27日(2019.2.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/828,990

(32)優先日 平成31年4月3日(2019.4.3)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . プルロニック

2 . T R I T O N

3 . T W E E N

弁理士 笹倉 真奈美

(74)代理人 100221545

弁理士 白江 雄介

(72)発明者 サノス, クリストファー ディ

アメリカ合衆国 9 4 9 2 0 カリフォルニア州ティブロン、メドウ・ヒル・ドライブ 3 8

(72)発明者 グリックマン, ローラ ヒックス

アメリカ合衆国 9 4 6 1 1 カリフォルニア州オークランド、ライダル・コート 3 6

- (72)発明者 スコーブル, ジャスティン  
アメリカ合衆国 9 4 7 0 3 カリフォルニア州バークリー、ルーズベルト・アベニュー 2 4 2 3
- (72)発明者 イアネッロ, アレクサンドル チャールズ ミシェル  
アメリカ合衆国 9 4 6 1 8 カリフォルニア州オークランド、トレジャー・ヒル 9
- (72)発明者 キーオ, ハイシン  
アメリカ合衆国 9 4 7 0 9 カリフォルニア州バークリー、フランシスコ・ストリート 1 9 2 0、アパートメント 3 0 6
- F ターム (参考) 4B065 AA01X AA90X AB01 BA01 BA02 BA05 CA24 CA44  
4C076 AA19 AA30 AA95 BB01 BB11 BB13 BB15 BB16 BB27 CC07  
CC27 EE56 EE57  
4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 AA19 BA41 BA44 CA17 CA18 CA20  
CA23 CA53 DC50 MA02 MA24 MA43 MA52 MA56 MA60 MA66 NA05  
NA13 NA14 ZB021 ZB091 ZB261 ZB262 ZB271 ZC751  
4C085 AA13 AA14 BB11 BB12 CC23 EE03 GG01 GG02 GG03 GG04  
GG08 GG10  
4C087 AA01 AA02 BB37 BB63 BB64 BC32 BC83 CA12 MA02 MA24  
MA43 MA52 MA56 MA60 MA66 NA05 NA13 ZB02 ZB09 ZB26 ZB27  
ZC75  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 EA20 FA72 FA74

【要約の続き】

飾インターフェロン遺伝子刺激物質(S T I N G)タンパク質をコードし得る。細菌は、優先的に腫瘍微小環境における免疫細胞または腫瘍常在免疫細胞に感染するおよび/または他の細胞より免疫細胞で細胞死を誘導しない。免疫刺激性細菌の投与による固形腫瘍の増殖を阻害するまたは体積を低減する方法もまた提供される。