

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-503188
(P2025-503188A)

(43)公表日 令和7年1月30日(2025.1.30)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01	Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K	14/01 (2006.01)	C 0 7 K	14/01		4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/34 (2006.01)	C 1 2 N	15/34		4 H 0 4 5
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		
		審査請求 有	予備審査請求 未請求	(全72頁)	最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-544471(P2024-544471)			(71)出願人	522429103
(86)(22)出願日	令和5年1月9日(2023.1.9)				上海栄瑞医薬科技有限公司
(85)翻訳文提出日	令和6年8月26日(2024.8.26)				JOINT BIOSCIENCES (
(86)国際出願番号	PCT/CN2023/071375				SH) LTD.
(87)国際公開番号	WO2023/143023				中国上海市浦东新区半夏路100弄41
(87)国際公開日	令和5年8月3日(2023.8.3)				号楼5層
(31)優先権主張番号	202210094869.1				Floor 5, Building 4
(32)優先日	令和4年1月26日(2022.1.26)				1, Lane 100, Banxia
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)				Rd, Pudong New Area,
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,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				Shanghai 201318, Ch
					ina.
				(74)代理人	110001139
					S K弁理士法人
				(74)代理人	100130328
		弁理士 奥野 彰彦			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 腫瘍溶解性ウイルス及びその用途

(57)【要約】

【課題】本出願は、生物医薬の技術分野に関し、具体的に、腫瘍溶解性ウイルス及びその用途を公開する。

【解決手段】該腫瘍溶解性ウイルスは、Mタンパク質を含み、前記Mタンパク質は、配列番号1に示されるアミノ酸配列に比べて、第32部位、第33部位、第49部位、第54部位、第133部位、第225部位のうちの一つまたは複数の部位のアミノ酸置換を含む。及び該腫瘍溶解性ウイルスの発現ベクター、該腫瘍溶解性ウイルスを産生するウイルス産生細胞、該腫瘍溶解性ウイルスを含む医薬組成物、及び上記腫瘍溶解性ウイルス、腫瘍溶解性ウイルス発現ベクター、ウイルス産生細胞及び／又は医薬組成物の調製方法及び用途。本出願は、腫瘍溶解性ウイルスの安全性と治癒率を効果的に向上させることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腫瘍溶解性ウイルスであって、

前記腫瘍溶解性ウイルスは、Mタンパク質を含み、前記Mタンパク質は、配列番号1に示されるアミノ酸配列に比べて、第32部位、第33部位、第49部位、第54部位、第133部位、第225部位のうちの一つまたは複数の部位のアミノ酸置換を含むことを特徴とする腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 2】

前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、第32部位にあるアスパラギンからセリンへの変異（N32S）、及び／又は、第33部位にあるメチオニンからアラニンへの変異（M33A）、及び／又は、第49部位にあるアスパラギンからアスパラギン酸への変異（N49D）、及び／又は、第54部位にあるヒスチジンからチロシンへの変異（H54Y）、及び／又は、第133部位にあるアラニンからトレオニンへの変異（A133T）、及び／又は、第225部位にあるバリンからイソロイシンへの変異（V225I）を含むことを特徴とする請求項1に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 3】

前記Mタンパク質は、第21部位、第51部位、第111部位、第221部位及び第226部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換をさらに含むことを特徴とする請求項2に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 4】

前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、第21部位にあるグリシンからグルタミン酸への変異（G21E）をさらに含み、及び／又は、前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、第51部位にあるメチオニンからアルギニンへの変異（M51R）、及び／又は、第51部位にあるメチオニンからアラニンへの変異（M51A）、及び／又は、第111部位にあるロイシンからアラニンへの変異（L111A）、及び／又は、第221部位にあるバリンからフェニルアラニンへの変異（V221F）、及び／又は、第226部位にあるセリンからアルギニンへの変異（S226R）を含むことを特徴とする請求項3に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 5】

前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、下記のいずれか一つとして選択され、

- 1) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換はG21E、N32Sを含み、
- 2) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G21E、N32S、M33Aを含み、
- 3) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G21E、N32S、M33A、N49Dを含み、
- 4) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G21E、N32S、M33A、N49D、H54Yを含み、
- 5) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G21E、N32S、M33A、N49D、H54Y、L111Aを含み、
- 6) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G21E、N32S、M33A、N49D、H54Y、L111A、A133T；
- 7) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G21E、N32S、M33A、N49D、H54Y、L111A、A133T、V225Iを含み、
- 8) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G21E、N32S、M33A、N49D、M51R、H54Y、L111A、A133T、V225Iを含み、
- 9) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G21E、N32S、M33A、N49D、M51R、H54Y、L111A、A133T、V221F、V225Iを含み、
- 10) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G21E、N32S、M33A、N49D、M51R、H54Y、L111A、A133T、V221F、V225I、S226Rを含み、
- 11) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、N32S、M33A、N49D、M51R、

H 5 4 Y、L 1 1 1 A、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

1 2) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、M 3 3 A、N 4 9 D、M 5 1 R、H 5 4 Y、L 1 1 1 A、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

1 3) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、N 4 9 D、M 5 1 R、H 5 4 Y、L 1 1 1 A、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

1 4) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、M 5 1 R、H 5 4 Y、L 1 1 1 A、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

1 5) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、H 5 4 Y、L 1 1 1 A、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

1 6) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、L 1 1 1 A、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

1 7) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

1 8) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

1 9) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

2 0) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、S 2 2 6 Rを含み、

2 1) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、N 3 2 S、N 4 9 D、H 5 4 Y、V 2 2 5 Iを含み、

2 2) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、N 3 2 S、N 4 9 D、H 5 4 Y、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Gを含み、

2 3) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、N 3 2 S、N 4 9 D、M 5 1 R、H 5 4 Y、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

2 4) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、N 3 2 S、M 3 3 A、N 4 9 D、M 5 1 R、H 5 4 Y、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

2 5) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、N 3 2 S、N 4 9 D、M 5 1 R、H 5 4 Y、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

2 6) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、N 3 2 S、M 3 3 A、N 4 9 D、M 5 1 R、H 5 4 Y、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

2 7) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G 2 1 E、N 3 2 S、N 4 9 D、M 5 1 A、H 5 4 Y、L 1 1 1 A、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含む

ことを特徴とする請求項1乃至4のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項6】

前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G 2 1 E、N 3 2 S、M 3 3 A、N 4 9 D、M 5 1 R、H 5 4 Y、L 1 1 1 A、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含む

ことを特徴とする請求項5に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項7】

前記Mタンパク質は、配列番号12に示されるアミノ酸配列を含む

ことを特徴とする請求項5に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項8】

腫瘍溶解性ウイルスであって、

請求項1乃至7のいずれか一項に記載のMタンパク質を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスはGタンパク質をさらに含み、前記Gタンパク質は、配列番号31に示されるアミノ酸配列に比べて、第438部位、第453部位、第471部位及び第487部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含む

ことを特徴とする腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項9】

前記Gタンパク質は、第53部位、第141部位、第172部位、第217部位、第232部位、第331部位、第371部位、第436部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換をさらに含む

10

20

30

40

50

ことを特徴とする請求項 8 に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 10】

前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、第 53 部位にあるバリンからイソロイシンへの変異 (V 53 I)、及び／又は、第 141 部位にあるアラニンからバリンへの変異 (A 141 V)、及び／又は、第 172 部位にあるアスパラギン酸からチロシンへの変異 (D 172 Y)、及び／又は、第 217 部位のリジンからグルタミン酸への変異 (K 217 E)、及び／又は、第 232 部位にあるアスパラギン酸からグリシンへの変異 (D 232 G)、及び／又は、第 331 部位にあるバリンからアラニンへの変異 (V 331 A)、及び／又は、第 371 部位にあるバリンからグルタミン酸への変異 (V 371 E)、及び／又は、第 436 部位にあるグリシンからアスパラギン酸への変異 (G 436 D)、及び／又は、第 438 部位にあるトレオニンからセリンへの変異 (T 438 S)、及び／又は、第 453 部位にあるフェニルアラニンからロイシンへの変異 (F 453 L)、及び／又は、第 471 部位にあるトレオニンからイソロイシンへの変異 (T 471 I)、及び／又は、第 487 部位にあるチロシンからヒスチジンへの変異 (Y 487 H) を含む

10

ことを特徴とする請求項 8 または 9 に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 11】

前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、下記のいずれか一つとして選択され、

- 1) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 53 I を含む、
- 2) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 53 I、A 141 V を含む、
- 3) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 53 I、A 141 V、D 172 Y を含む、
- 4) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 53 I、A 141 V、D 172 Y、K 217 E を含む、
- 5) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 53 I、A 141 V、D 172 Y、K 217 E、D 232 G を含む、
- 6) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 53 I、A 141 V、D 172 Y、K 217 E、D 232 G、V 331 A を含む、
- 7) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 53 I、A 141 V、D 172 Y、K 217 E、D 232 G、V 331 A、V 371 E を含む、
- 8) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 53 I、A 141 V、D 172 Y、K 217 E、D 232 G、V 331 A、V 371 E、G 436 D を含む、
- 9) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 53 I、A 141 V、D 172 Y、K 217 E、D 232 G、V 331 A、V 371 E、G 436 D、T 438 S を含む、
- 10) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 53 I、A 141 V、D 172 Y、K 217 E、D 232 G、V 331 A、V 371 E、G 436 D、T 438 S、F 453 L を含む、
- 11) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 53 I、A 141 V、D 172 Y、K 217 E、D 232 G、V 331 A、V 371 E、G 436 D、T 438 S、F 453 L、T 471 I を含む、
- 12) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 53 I、A 141 V、D 172 Y、K 217 E、D 232 G、V 331 A、V 371 E、G 436 D、T 438 S、F 453 L、T 471 I、Y 487 H を含む、
- 13) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、A 141 V、D 172 Y、K 217 E、D 232 G、V 331 A、V 371 E、G 436 D、T 438 S、F 453 L、T 471 I、Y 487 H を含む、
- 14) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、D 172 Y、K 217 E、D 232 G、V 331 A、V 371 E、G 436 D、T 438 S、F 453 L、T 471 I、Y 487 H を含む、
- 15) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、K 217 E、D 232 G、V 331 A、V 371 E、G 436 D、T 438 S、F 453 L、T 471 I、Y 487 H を含む、
- 16) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、D 232 G、V 331 A、V 371 E、G 4

20

30

40

50

- 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 Hを含み、
1 7) 前記Gタンパク質のアミノ酸置換は、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 Hを含み、
1 8) 前記Gタンパク質のアミノ酸置換は、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 Hを含み、
1 9) 前記Gタンパク質のアミノ酸置換は、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 Hを含み、
2 0) 前記Gタンパク質のアミノ酸置換は、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 Hを含み、
2 1) 前記Gタンパク質のアミノ酸置換は、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 Hを含み、
2 2) 前記Gタンパク質のアミノ酸置換は、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 Hを含み、
2 3) 前記Gタンパク質のアミノ酸置換は、Y 4 8 7 Hを含む
ことを特徴とする請求項10に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項12】
前記Gタンパク質のアミノ酸置換は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I及びY 4 8 7 Hを含む
ことを特徴とする請求項11に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項13】
前記Gタンパク質は、配列番号43に示されるアミノ酸配列を含む
ことを特徴とする請求項11に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項14】
腫瘍溶解性ウイルスであって、
請求項1乃至7のいずれか一項に記載のMタンパク質又は請求項8乃至13のいずれか一項に記載のMタンパク質及びGタンパク質を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスはNタンパク質をさらに含み、前記Nタンパク質は、配列番号55に示されるアミノ酸配列に比べて、第14部位、第155部位、第353部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含む
ことを特徴とする腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項15】
前記Nタンパク質のアミノ酸置換は、第14部位にあるイソロイシンからバリンへの変異(I 1 4 V)、及び／又は、第155部位にあるアルギニンからリジンへの変異(R 1 5 5 K)、及び／又は、第353部位にあるセリンからアスパラギンへの変異(S 3 5 3 N)を含む
ことを特徴とする請求項14に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項16】
前記Nタンパク質のアミノ酸置換は、下記のいずれか一つとして選択され、
1) 前記Nタンパク質のアミノ酸置換は、I 1 4 Vを含み、
2) 前記Nタンパク質のアミノ酸置換は、I 1 4 V、R 1 5 5 Kを含み、
3) 前記Nタンパク質のアミノ酸置換は、I 1 4 V、R 1 5 5 K、S 3 5 3 Nを含み、
4) 前記Nタンパク質のアミノ酸置換は、R 1 5 5 K、S 3 5 3 Nを含み、
5) 前記Nタンパク質のアミノ酸置換は、S 3 5 3 Nを含む
ことを特徴とする請求項14または15に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項17】
前記Nタンパク質のアミノ酸置換は、I 1 4 V、R 1 5 5 K、S 3 5 3 Nを含む
ことを特徴とする請求項16に記載の腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項18】
前記Nタンパク質は、配列番号58に示されるアミノ酸配列を含む
ことを特徴とする請求項16に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 19】

腫瘍溶解性ウイルスであって、

請求項 1 乃至 7 のいずれか一項に記載の M タンパク質、または請求項 8 乃至 13 のいずれか一項に記載の M タンパク質及び G タンパク質、または請求項 14 乃至 18 のいずれか一項に記載の M タンパク質、G タンパク質及び N タンパク質を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスは P タンパク質をさらに含み、前記 P タンパク質は、配列番号 61 に示されるアミノ酸配列に比べて、第 50 部位、第 76 部位、第 99 部位、第 126 部位、第 140 部位、第 151 部位、第 168 部位、第 170 部位、第 189 部位、第 237 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含むことを特徴とする腫瘍溶解性ウイルス。

10

【請求項 20】

前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、第 50 部位にあるアルギニンからリジンへの変異 (R 50 K)、及び／又は、第 76 部位にあるバリンからアラニンへの変異 (V 76 A)、及び／又は、第 99 部位にあるアスパラギンからグルタミン酸への変異 (D 99 E)、及び／又は、第 126 部位にあるロイシンからセリンへの変異 (L 126 S)、及び／又は、第 140 部位にあるロイシンからセリンへの変異 (L 140 S)、及び／又は、第 151 部位にあるヒスチジンからチロシンへの変異 (H 151 Y)、及び／又は、第 168 部位にあるイソロイシンからメチオニンへの変異 (I 168 M)、及び／又は、第 170 部位にあるリジンからグルタミン酸への変異 (K 170 E)、及び／又は、第 189 部位にあるチロシンからセリンへの変異 (Y 189 S)、及び／又は、第 237 部位にあるアスパラギンからアスパラギン酸への変異 (N 237 D) を含むことを特徴とする請求項 19 に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

20

【請求項 21】

前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、下記のいずれか一つとして選択され、

- 1) 前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、R 50 K を含み、
- 2) 前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、R 50 K、V 76 A を含み、
- 3) 前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、R 50 K、V 76 A、D 99 E を含み、
- 4) 前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、R 50 K、V 76 A、D 99 E、L 126 S を含み、
- 5) 前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、R 50 K、V 76 A、D 99 E、L 126 S、L 140 S を含み、
- 6) 前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、R 50 K、V 76 A、D 99 E、L 126 S、L 140 S、H 151 Y を含み、
- 7) 前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、R 50 K、V 76 A、D 99 E、L 126 S、L 140 S、H 151 Y、I 168 M を含み、
- 8) 前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、R 50 K、V 76 A、D 99 E、L 126 S、L 140 S、H 151 Y、I 168 M、K 170 E を含み、
- 9) 前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、R 50 K、V 76 A、D 99 E、L 126 S、L 140 S、H 151 Y、I 168 M、K 170 E、Y 189 S を含み、
- 10) 前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、R 50 K、V 76 A、D 99 E、L 126 S、L 140 S、H 151 Y、I 168 M、K 170 E、Y 189 S、N 237 D を含み、
- 11) 前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、V 76 A、D 99 E、L 126 S、L 140 S、H 151 Y、I 168 M、K 170 E、Y 189 S、N 237 D を含み、
- 12) 前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、D 99 E、L 126 S、L 140 S、H 151 Y、I 168 M、K 170 E、Y 189 S、N 237 D を含み、
- 13) 前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、L 126 S、L 140 S、H 151 Y、I 168 M、K 170 E、Y 189 S、N 237 D を含み、
- 14) 前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、L 140 S、H 151 Y、I 168 M、K 170 E、Y 189 S、N 237 D を含み、
- 15) 前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、H 151 Y、I 168 M、K 170 E、Y 1

30

40

50

８９Ｓ、Ｎ２３７Ｄを含み、

１６）前記Ｐタンパク質のアミノ酸置換は、Ｉ１６８Ｍ、Ｋ１７０Ｅ、Ｙ１８９Ｓ、Ｎ２３７Ｄを含み、

１７）前記Ｐタンパク質のアミノ酸置換は、Ｋ１７０Ｅ、Ｙ１８９Ｓ、Ｎ２３７Ｄを含み、

１８）前記Ｐタンパク質のアミノ酸置換は、Ｙ１８９Ｓ、Ｎ２３７Ｄを含み、

１９）前記Ｐタンパク質のアミノ酸置換は、Ｎ２３７Ｄを含む

ことを特徴とする請求項１９または２０に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項２２】

前記Ｐタンパク質のアミノ酸置換は、Ｒ５０Ｋ、Ｖ７６Ａ、Ｄ９９Ｅ、Ｌ１２６Ｓ、Ｌ１４０Ｓ、Ｈ１５１Ｙ、Ｉ１６８Ｍ、Ｋ１７０Ｅ、Ｙ１８９Ｓ、Ｎ２３７Ｄを含む

ことを特徴とする請求項２１に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項２３】

前記Ｐタンパク質は、配列番号７１に示されるアミノ酸配列を含む

ことを特徴とする請求項２１に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項２４】

腫瘍溶解性ウイルスであって、

請求項１乃至７のいずれか一項に記載のＭタンパク質、または請求項８乃至１３のいずれか一項に記載のＭタンパク質及びＧタンパク質、または請求項１４乃至１８のいずれか一項に記載のＭタンパク質、Ｇタンパク質及びＮタンパク質、または請求項１９乃至２３のいずれか一項に記載のＭタンパク質、Ｇタンパク質、Ｎタンパク質及びＰタンパク質を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスは、Ｌタンパク質をさらに含み、前記Ｌタンパク質は、配列番号８１に示されるアミノ酸配列に比べて、第８７部位、第４８７部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含む

ことを特徴とする腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項２５】

前記Ｌタンパク質のアミノ酸置換は、第８７部位にあるセリンからプロリンへの変異（Ｓ８７Ｐ）、及び／又は、第４８７部位にあるイソロイシンからトレオニンへの変異（Ｉ４８７Ｔ）を含む

ことを特徴とする請求項２４に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項２６】

前記Ｌタンパク質のアミノ酸置換は、下記のいずれか一つとして選択され、

１）前記Ｌタンパク質のアミノ酸置換は、Ｓ８７Ｐを含み、

２）前記Ｌタンパク質のアミノ酸置換は、Ｓ８７Ｐ、Ｉ４８７Ｔを含み、

３）前記Ｌタンパク質のアミノ酸置換は、Ｉ４８７Ｔを含む

ことを特徴とする請求項２４または２５に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項２７】

前記Ｌタンパク質のアミノ酸置換は、Ｓ８７Ｐ、Ｉ４８７Ｔを含む

ことを特徴とする請求項２６に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項２８】

前記Ｎタンパク質は、配列番号８３に示されるアミノ酸配列を含む

ことを特徴とする請求項２６に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項２９】

前記腫瘍溶解性ウイルスは、バキュロウイルスを含む

ことを特徴とする請求項１乃至２８のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項３０】

前記腫瘍溶解性ウイルスは、水疱性口内炎ウイルスを含む

ことを特徴とする請求項１乃至２９のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項３１】

前記腫瘍溶解性ウイルスは、ＶＳＶウイルスIndiana Mudd Summerサブ

10

20

30

40

50

タイプを含む

ことを特徴とする請求項 1 乃至 3 0 のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 3 2】

前記腫瘍溶解性ウイルスは、外因性標的タンパク質を含み、或いは発現する

ことを特徴とする請求項 1 乃至 3 1 のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 3 3】

前記腫瘍溶解性ウイルスは核酸分子を含み、前記核酸分子は、前記アミノ酸置換を有する M タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する G タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する N タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する P タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する L タンパク質をコードする核酸配列を含む

10

ことを特徴とする請求項 1 乃至 3 2 のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 3 4】

前記核酸分子は、前記外因性標的タンパク質をコードする核酸配列を含む

ことを特徴とする請求項 3 3 に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 3 5】

前記核酸分子のうち、前記外因性標的タンパク質をコードする核酸配列は、前記アミノ酸置換を有する M タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する G タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する N タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する P タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する L タンパク質をコードする核酸配列の間にある

20

ことを特徴とする請求項 3 4 に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 3 6】

腫瘍溶解性ウイルスの発現ベクターであって、

前記腫瘍溶解性ウイルスの発現ベクターは、請求項 1 乃至 3 5 のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルスを発現することができる

ことを特徴とする腫瘍溶解性ウイルスの発現ベクター。

【請求項 3 7】

ウイルス産生細胞であって、

30

前記ウイルス産生細胞は、請求項 1 乃至 3 5 のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルスを産生することができる

ことを特徴とするウイルス産生細胞。

【請求項 3 8】

医薬組成物であって、

前記医薬組成物は、請求項 1 乃至 3 5 のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルスと、任意選択で薬学的に許容される担体と、を含む

ことを特徴とする医薬組成物。

【請求項 3 9】

請求項 1 乃至 3 5 のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス、請求項 3 6 に記載の腫瘍溶解性ウイルス発現ベクター、請求項 3 7 に記載のウイルス産生細胞及び／又は請求項 3 8 に記載の医薬組成物の調製方法。

40

【請求項 4 0】

疾患及び／又は病気を予防及び／又は治療するための薬剤の調製における請求項 1 乃至 3 5 のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス、請求項 3 6 に記載の腫瘍溶解性ウイルス発現ベクター、請求項 3 7 に記載のウイルス産生細胞及び／又は請求項 3 8 に記載の医薬組成物の用途。

【請求項 4 1】

前記腫瘍溶解性ウイルス、前記腫瘍溶解性ウイルス発現ベクター、前記ウイルス産生細胞及び／又は前記医薬組成物は、異常増殖細胞を継続的に殺傷させる方法に用いられる

50

ことを特徴とする請求項 40 に記載の用途。

【請求項 42】

前記異常増殖細胞は、腫瘍細胞または腫瘍組織関連細胞から選択される

ことを特徴とする請求項 41 に記載の用途。

【請求項 43】

前記腫瘍は、固形腫瘍または血腫瘍を含む

ことを特徴とする請求項 42 に記載の用途。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、生物医薬の技術分野に関し、より具体的に、腫瘍溶解性ウイルス及びその用途に関する。

【背景技術】

【0002】

腫瘍溶解性ウイルスは、複製能力を持つ腫瘍殺傷性ウイルスであり、現在、腫瘍免疫治療の重要な分野として大衆に受け入れられる。腫瘍溶解性ウイルスは、感染した腫瘍細胞を特異的に標的とし、例えば、腫瘍細胞中の腫瘍抑制遺伝子の不活化または欠損により、腫瘍細胞を選択的に感染し、腫瘍溶解性ウイルスは腫瘍細胞を感染した後、腫瘍細胞内で大量に複製し、最終的に腫瘍細胞を破壊し、よって腫瘍細胞を殺す。同時に、腫瘍溶解性ウイルスは、宿主自身の抗がん反応を強化するために必要な免疫刺激信号を提供して、より多くの免疫細胞を引き寄せて、残りの腫瘍細胞を殺し続けることもできる。

【0003】

腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍免疫治療分野でよい応用の可能性を秘めているが、野生型腫瘍溶解性ウイルスは、常に体の神経系の炎症などの問題を引き起こすことがあり、野生型ウイルスを用いて腫瘍細胞を感染するプロセスにおいて、まだ大きな病原リスクが存在する。従って、腫瘍溶解性ウイルスの臨床応用をさらに推進するために、野生型腫瘍溶解性ウイルスを改変して、弱毒化された腫瘍溶解性ウイルスを取得する必要がある。弱毒化された腫瘍溶解性ウイルスを臨床応用に用い、よって腫瘍溶解性ウイルスの病原リスクを低減させ、腫瘍溶解性ウイルスの安全性を向上させる。

【0004】

しかし、腫瘍溶解性ウイルスを改変するプロセスにおいて、野生型腫瘍溶解性ウイルスに対して遺伝子修飾をランダムに行い、その毒性を低減させることができるが、改変された腫瘍溶解性ウイルスは、治癒率が低い可能性があり、改変された腫瘍溶解性ウイルスであってもパッケージングされることができないため、腫瘍溶解性ウイルスの臨床応用を推進することに不利である。従って、安全性能がよく、同時に治癒率が高い、改変された腫瘍溶解性ウイルスを提供し、腫瘍免疫治療分野において重要な科学研究価値及び応用的意義を持っている。

【発明の概要】

【0005】

腫瘍溶解性ウイルスの安全性と治癒率を向上させるために、本出願は、腫瘍溶解性ウイルス及びその用途が提供される。

【0006】

第1態様で、本願は、腫瘍溶解性ウイルスが提供され、下記の技術案を採用する。

【0007】

腫瘍溶解性ウイルスであって、前記腫瘍溶解性ウイルスは、Mタンパク質を含み、前記Mタンパク質は、配列番号1に示されるアミノ酸配列に比べて、第32部位、第33部位、第49部位、第54部位、第133部位、第225部位のうちの一つまたは複数の部位のアミノ酸置換を含む。

【0008】

いくつかの具体的な実施形態において、前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、第32部位

10

20

30

40

50

にあるアスパラギンからセリンへの変異（N 3 2 S）、及び／又は、第 3 3 部位にあるメチオニンからアラニンへの変異（M 3 3 A）、及び／又は、第 4 9 部位にあるアスパラギンからアスパラギン酸への変異（N 4 9 D）、及び／又は、第 5 4 部位にあるヒスチジンからチロシンへの変異（H 5 4 Y）、及び／又は、第 1 3 3 部位にあるアラニンからトレオニンへの変異（A 1 3 3 T）、及び／又は、第 2 2 5 部位にあるバリンからイソロイシンへの変異（V 2 2 5 I）を含む。

【0 0 0 9】

更には、前記 M タンパク質は、第 2 1 部位、第 5 1 部位、第 1 1 1 部位、第 2 2 1 部位及び第 2 2 6 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換をさらに含む。

【0 0 1 0】

いくつかの具体的な実施形態において、前記 M タンパク質のアミノ酸置換は、第 2 1 部位にあるグリシンからグルタミン酸への変異（G 2 1 E）をさらに含み、及び／又は、前記 M タンパク質のアミノ酸置換は、第 5 1 部位にあるメチオニンからアルギニンへの変異（M 5 1 R）、及び／又は、第 5 1 部位にあるメチオニンからアラニンへの変異（M 5 1 A）、及び／又は、第 1 1 1 部位にあるロイシンからアラニンへの変異（L 1 1 1 A）、及び／又は、第 2 2 1 部位にあるバリンからフェニルアラニンへの変異（V 2 2 1 F）、及び／又は、第 2 2 6 部位にあるセリンからアルギニンへの変異（S 2 2 6 R）を含む。

【0 0 1 1】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質のアミノ酸置換は、第 2 1 部位にあるグリシンからグルタミン酸への変異（G 2 1 E）を含む。

【0 0 1 2】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質のアミノ酸置換は、第 3 2 部位にあるアスパラギンからセリンへの変異（N 3 2 S）を含む。

【0 0 1 3】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質のアミノ酸置換は、第 3 3 部位にあるメチオニンからアラニンへの変異（M 3 3 A）を含む。

【0 0 1 4】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質のアミノ酸置換は、第 4 9 部位にあるアスパラギンからアスパラギン酸への変異（N 4 9 D）を含む。

【0 0 1 5】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質のアミノ酸置換は、第 5 4 部位にあるヒスチジンからチロシンへの変異（H 5 4 Y）を含む。

【0 0 1 6】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質のアミノ酸置換は、第 1 1 1 部位にあるロイシンからアラニンへの変異（L 1 1 1 A）を含む。

【0 0 1 7】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質のアミノ酸置換は、第 1 3 3 部位にあるアラニンからトレオニンへの変異（A 1 3 3 T）を含む。

【0 0 1 8】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質のアミノ酸置換は、第 2 2 5 部位にあるバリンからイソロイシンへの変異（V 2 2 5 I）を含む。

【0 0 1 9】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質のアミノ酸置換は、第 5 1 部位にあるメチオニンからアルギニンへの変異（M 5 1 R）を含む。

【0 0 2 0】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質のアミノ酸置換は、第 5 1 部位にあるメチオニンからアラニンへの変異（M 5 1 A）を含む。

【0 0 2 1】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質のアミノ酸置換は、第 2 2 1 部位にあるバリンからフェニルアラニンへの変異（V 2 2 1 F）を含む。

10

20

30

40

50

【0022】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、第226部位のセリンからアルギニンへの変異（S226R）を含む。

【0023】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、第226部位にあるセリンからグリシンへの変異（S226G）を含む。

【0024】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、G21Eのアミノ酸置換を有する。

【0025】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、G21E、N32Sのアミノ酸置換を有する。

10

【0026】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、G21E、N32S、M33Aのアミノ酸置換を有する。

【0027】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、G21E、N32S、M33A、N49Dのアミノ酸置換を有する。

【0028】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、G21E、N32S、M33A、N49D、H54Yのアミノ酸置換を有する。

20

【0029】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、G21E、N32S、M33A、N49D、H54Y、L111Aのアミノ酸置換を有する。

【0030】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、G21E、N32S、M33A、N49D、H54Y、L111A、A133Tのアミノ酸置換を有する。

【0031】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、G21E、N32S、M33A、N49D、H54Y、L111A、A133T、V225Iのアミノ酸置換を有する。

【0032】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、G21E、N32S、M33A、N49D、M51R、H54Y、L111A、A133T、V225Iのアミノ酸置換を有する。

30

【0033】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、G21E、N32S、M33A、N49D、M51R、H54Y、L111A、A133T、V221F、V225Iのアミノ酸置換を有する。

【0034】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、G21E、N32S、M33A、N49D、M51R、H54Y、L111A、A133T、V221F、V225I、S226Rのアミノ酸置換を有する。

40

【0035】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、N32S、M33A、N49D、M51R、H54Y、L111A、A133T、V221F、V225I、S226Rのアミノ酸置換を有する。

【0036】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、M33A、N49D、M51R、H54Y、L111A、A133T、V221F、V225I、S226Rのアミノ酸置換を有する。

【0037】

50

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、N49D、M51R、H54Y、L111A、A133T、V221F、V225I、S226Rのアミノ酸置換を有する。

【0038】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、M51R、H54Y、L111A、A133T、V221F、V225I、S226Rのアミノ酸置換を有する。

【0039】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、H54Y、L111A、A133T、V221F、V225I、S226Rのアミノ酸置換を有する。

【0040】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、L111A、A133T、V221F、V225I、S226Rのアミノ酸置換を有する。

10

【0041】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、A133T、V221F、V225I、S226Rのアミノ酸置換を有する。

【0042】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、V221F、V225I、S226Rのアミノ酸置換を有する。

【0043】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、V225I、S226Rのアミノ酸置換を有する。

20

【0044】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、S226Rのアミノ酸置換を有する。

【0045】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、N32S、N49D、H54Y、V225Iのアミノ酸置換を有する。

【0046】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、N32S、N49D、H54Y、V225I、S226Gのアミノ酸置換を有する。

【0047】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、N32S、N49D、M51R、H54Y、V221F、V225I、S226Rのアミノ酸置換を有する。

30

【0048】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、N32S、M33A、N49D、M51R、H54Y、V221F、V225I、S226Rのアミノ酸置換を有する。

【0049】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、N32S、N49D、M51R、H54Y、A133T、V221F、V225I、S226Rのアミノ酸置換を有する。

【0050】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、N32S、M33A、N49D、M51R、H54Y、A133T、V221F、V225I、S226Rのアミノ酸置換を有する。

40

【0051】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、G21E、N32S、N49D、M51A、H54Y、L111A、V225I、S226Rのアミノ酸置換を有する。

【0052】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む。

【0053】

具体的な一実施形態において、前記Mタンパク質は、配列番号3に示されるアミノ酸配列

50

を含む。

【 0 0 5 4 】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 5 5 】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 5 6 】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 5 7 】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 5 8 】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 5 9 】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 6 0 】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 6 1 】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 1 1 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 6 2 】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 6 3 】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 1 3 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 6 4 】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 6 5 】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 6 6 】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 1 6 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 6 7 】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 1 7 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 6 8 】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 6 9 】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 1 9 に示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 7 0 】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 20 に示されるアミノ酸配列を含む。

【0071】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 21 に示されるアミノ酸配列を含む。

【0072】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 22 に示されるアミノ酸配列を含む。

【0073】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 23 に示されるアミノ酸配列を含む。

10

【0074】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 24 に示されるアミノ酸配列を含む。

【0075】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 25 に示されるアミノ酸配列を含む。

【0076】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 26 に示されるアミノ酸配列を含む。

20

【0077】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 27 に示されるアミノ酸配列を含む。

【0078】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 28 に示されるアミノ酸配列を含む。

【0079】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 29 に示されるアミノ酸配列を含む。

【0080】

具体的な一実施形態において、前記 M タンパク質は、配列番号 30 に示されるアミノ酸配列を含む。

30

【0081】

腫瘍溶解性ウイルスであって、上記 M タンパク質を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスは G タンパク質をさらに含み、前記 G タンパク質は、配列番号 31 に示されるアミノ酸配列に比べて、第 438 部位、第 453 部位、第 471 部位及び第 487 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含む。

【0082】

いくつかの具体的な実施形態において、前記 G タンパク質は、第 53 部位、第 141 部位、第 172 部位、第 217 部位、第 232 部位、第 331 部位、第 371 部位、第 436 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換をさらに含む。

40

【0083】

いくつかの具体的な実施形態において、前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、第 53 部位にあるバリンからイソロイシンへの変異 (V53I)、及び／又は、第 141 部位にあるアラニンからバリンへの変異 (A141V)、及び／又は、第 172 部位にあるアスパラギン酸からチロシンへの変異 (D172Y)、及び／又は、第 217 部位のリジンからグルタミン酸への変異 (K217E)、及び／又は、第 232 部位にあるアスパラギン酸からグリシンへの変異 (D232G)、及び／又は、第 331 部位にあるバリンからアラニンへの変異 (V331A)、及び／又は、第 371 部位にあるバリンからグルタミン酸への変異 (V371E)、及び／又は、第 436 部位にあるグリシンからアスパラギン酸へ

50

の変異（G 4 3 6 D）、及び／又は、第 4 3 8 部位にあるトレオニンからセリンへの変異（T 4 3 8 S）、及び／又は、第 4 5 3 部位にあるフェニルアラニンからロイシンへの変異（F 4 5 3 L）、及び／又は、第 4 7 1 部位にあるトレオニンからイソロイシンへの変異（T 4 7 1 I）、及び／又は、第 4 8 7 部位にあるチロシンからヒスチジンへの変異（Y 4 8 7 H）を含む。

【0084】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、第 5 3 部位にあるバリンからイソロイシンへの変異（V 5 3 I）を含む。

【0085】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、第 1 4 1 部位にあるアラニンからバリンへの変異（A 1 4 1 V）を含む。

10

【0086】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、第 1 7 2 部位にあるアスパラギン酸からチロシンへの変異（D 1 7 2 Y）を含む。

【0087】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、第 2 1 7 部位にあるリジンからグルタミン酸への変異（K 2 1 7 E）を含む。

【0088】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、第 2 3 2 部位にあるアスパラギン酸からグリシンへの変異（D 2 3 2 G）を含む。

20

【0089】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、第 3 3 1 部位にあるバリンからアラニンへの変異（V 3 3 1 A）を含む。

【0090】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、第 3 7 1 部位にあるバリンからグルタミン酸への変異（V 3 7 1 E）を含む。

【0091】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、第 4 3 6 部位にあるグリシンからアスパラギン酸への変異（G 4 3 6 D）を含む。

【0092】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、第 4 3 8 部位にあるトレオニンからセリンへの変異（T 4 3 8 S）を含む。

30

【0093】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、第 4 5 3 部位にあるフェニルアラニンからロイシンへの変異（F 4 5 3 L）を含む。

【0094】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、第 4 7 1 部位にあるトレオニンからイソロイシンへの変異（T 4 7 1 I）を含む。

【0095】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、第 4 8 7 部位にあるチロシンからヒスチジンへの変異（Y 4 8 7 H）を含む。

40

【0096】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質は、V 5 3 I のアミノ酸置換を有する。

【0097】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質は、V 5 3 I、A 1 4 1 V のアミノ酸置換を有する。

【0098】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y のアミノ酸置換を有する。

【0099】

50

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E のアミノ酸置換を有する。

【0100】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G のアミノ酸置換を有する。

【0101】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A のアミノ酸置換を有する。

【0102】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E のアミノ酸置換を有する。

10

【0103】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D のアミノ酸置換を有する。

【0104】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S のアミノ酸置換を有する。

【0105】

20

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L のアミノ酸置換を有する。

【0106】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I のアミノ酸置換を有する。

【0107】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 H のアミノ酸置換を有する。

30

【0108】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質は、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 H のアミノ酸置換を有する。

【0109】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質は、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 H のアミノ酸置換を有する。

【0110】

40

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質は、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 H のアミノ酸置換を有する。

【0111】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質は、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 H のアミノ酸置換を有する。

【0112】

具体的な一実施形態において、前記 G タンパク質は、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 H のアミノ酸置換を有する。

50

【0113】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、V371E、G436D、T438S、F453L、T471I、Y487Hのアミノ酸置換を有する。

【0114】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、G436D、T438S、F453L、T471I、Y487Hのアミノ酸置換を有する。

【0115】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、T438S、F453L、T471I、Y487Hのアミノ酸置換を有する。

【0116】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、F453L、T471I、Y487Hのアミノ酸置換を有する。

【0117】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、T471I、Y487Hのアミノ酸置換を有する。

【0118】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、Y487Hのアミノ酸置換を有する。

【0119】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号32に示されるアミノ酸配列を含む。

【0120】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号33に示されるアミノ酸配列を含む。

【0121】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号34に示されるアミノ酸配列を含む。

【0122】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号35に示されるアミノ酸配列を含む。

【0123】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号36に示されるアミノ酸配列を含む。

【0124】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号37に示されるアミノ酸配列を含む。

【0125】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号38に示されるアミノ酸配列を含む。

【0126】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号39に示されるアミノ酸配列を含む。

【0127】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号40に示されるアミノ酸配列を含む。

【0128】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号41に示されるアミノ酸配列を含む。

【0129】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号42に示されるアミノ酸配

10

20

30

40

50

列を含む。

【0130】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号43に示されるアミノ酸配列を含む。

【0131】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号44に示されるアミノ酸配列を含む。

【0132】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号45に示されるアミノ酸配列を含む。

【0133】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号46に示されるアミノ酸配列を含む。

【0134】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号47に示されるアミノ酸配列を含む。

【0135】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号48に示されるアミノ酸配列を含む。

【0136】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号49に示されるアミノ酸配列を含む。

【0137】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号50に示されるアミノ酸配列を含む。

【0138】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号51に示されるアミノ酸配列を含む。

【0139】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号52に示されるアミノ酸配列を含む。

【0140】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号53に示されるアミノ酸配列を含む。

【0141】

具体的な一実施形態において、前記Gタンパク質は、配列番号54に示されるアミノ酸配列を含む。

【0142】

腫瘍溶解性ウイルスであって、上記Mタンパク質、またはMタンパク質及びGタンパク質を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスは、Nタンパク質をさらに含み、前記Nタンパク質は、配列番号55に示されるアミノ酸配列に比べて、第14部位、第155部位、第353部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含む。

【0143】

いくつかの具体的な実施形態において、前記Nタンパク質のアミノ酸置換は、第14部位にあるイソロイシンからバリンへの変異(I14V)、及び／又は、第155部位にあるアルギニンからリジンへの変異(R155K)、及び／又は、第353部位にあるセリンからアスパラギンへの変異(S353N)を含む。

【0144】

具体的な一実施形態において、前記Nタンパク質のアミノ酸置換は、第14部位にあるイソロイシンからバリンへの変異(I14V)を含む。

10

20

30

40

50

【0145】

具体的な一実施形態において、前記Nタンパク質のアミノ酸置換は、第155部位にあるアルギニンからリジンへの変異（R155K）を含む。

【0146】

具体的な一実施形態において、前記Nタンパク質のアミノ酸置換は、第353部位にあるセリンからアスパラギンへの変異（S353N）を含む。

【0147】

具体的な一実施形態において、前記Nタンパク質は、I14Vのアミノ酸置換を有する。

【0148】

具体的な一実施形態において、前記Nタンパク質は、I14V、R155Kのアミノ酸置換を有する。

【0149】

具体的な一実施形態において、前記Nタンパク質は、I14V、R155K、S353Nのアミノ酸置換を有する。

【0150】

具体的な一実施形態において、前記Nタンパク質は、R155K、S353Nのアミノ酸置換を有する。

【0151】

具体的な一実施形態において、前記Nタンパク質は、S353Nのアミノ酸置換を有する。

【0152】

具体的な一実施形態において、前記Nタンパク質は、配列番号56に示されるアミノ酸配列を含む。

【0153】

具体的な一実施形態において、前記Nタンパク質は、配列番号57に示されるアミノ酸配列を含む。

【0154】

具体的な一実施形態において、前記Nタンパク質は、配列番号58に示されるアミノ酸配列を含む。

【0155】

具体的な一実施形態において、前記Nタンパク質は、配列番号59に示されるアミノ酸配列を含む。

【0156】

具体的な一実施形態において、前記Nタンパク質は、配列番号60に示されるアミノ酸配列を含む。

【0157】

腫瘍溶解性ウイルスであって、上記Mタンパク質、またはMタンパク質及びGタンパク質、又はMタンパク質、Gタンパク質及びNタンパク質、又はMタンパク質及びNタンパク質を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスはPタンパク質をさらに含み、前記Pタンパク質は、配列番号61に示されるアミノ酸配列に比べて、第50部位、第76部位、第99部位、第126部位、第140部位、第151部位、第168部位、第170部位、第189部位、第237部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含む。

【0158】

いくつかの具体的な実施形態において、前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、第50部位にあるアルギニンからリジンへの変異（R50K）、及び／又は、第76部位にあるバリンからアラニンへの変異（V76A）、及び／又は、第99部位にあるアスパラギンからグルタミン酸への変異（D99E）、及び／又は、第126部位にあるロイシンからセリンへの変異（L126S）、及び／又は、第140部位にあるロイシンからセリンへの変異（L140S）、及び／又は、第151部位にあるヒスチジンからチロシンへの変異（H151Y）、及び／又は、第168部位にあるイソロイシンからメチオニンへの変異（

10

20

30

40

50

I 1 6 8 M)、及び／又は、第 1 7 0 部位にあるリジンからグルタミン酸への変異 (K 1 7 0 E)、及び／又は、第 1 8 9 部位にあるチロシンからセリンへの変異 (Y 1 8 9 S)、及び／又は、第 2 3 7 部位にあるアスパラギンからアスパラギン酸への変異 (N 2 3 7 D) を含む。

【0 1 5 9】

具体的な一実施形態において、前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、第 5 0 部位にあるアルギニンからリジンへの変異 (R 5 0 K) を含む。

【0 1 6 0】

具体的な一実施形態において、前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、第 7 6 部位にあるバリンからアラニンへの変異 (V 7 6 A) を含む。

【0 1 6 1】

具体的な一実施形態において、前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、第 9 9 部位にあるアスパラギンからグルタミン酸への変異 (D 9 9 E) を含む。

【0 1 6 2】

具体的な一実施形態において、前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、第 1 2 6 部位にあるロイシンからセリンへの変異 (L 1 2 6 S) を含む。

【0 1 6 3】

具体的な一実施形態において、前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、第 1 4 0 部位にあるロイシンからセリンへの変異 (L 1 4 0 S) を含む。

【0 1 6 4】

具体的な一実施形態において、前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、第 1 5 1 部位にあるヒスチジンからチロシンへの変異 (H 1 5 1 Y) を含む。

【0 1 6 5】

具体的な一実施形態において、前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、第 1 6 8 部位にあるイソロイシンからメチオニンへの変異 (I 1 6 8 M) を含む。

【0 1 6 6】

具体的な一実施形態において、前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、第 1 7 0 部位にあるリジンからグルタミン酸への変異 (K 1 7 0 E) を含む。

【0 1 6 7】

具体的な一実施形態において、前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、第 1 8 9 部位にあるチロシンからセリンへの変異 (Y 1 8 9 S) を含む。

【0 1 6 8】

具体的な一実施形態において、前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、第 2 3 7 部位にあるアスパラギンからアスパラギン酸への変異 (N 2 3 7 D) を含む。

【0 1 6 9】

具体的な一実施形態において、前記 P タンパク質は、R 5 0 K のアミノ酸置換を有する。

【0 1 7 0】

具体的な一実施形態において、前記 P タンパク質は、R 5 0 K、V 7 6 A のアミノ酸置換を有する。

【0 1 7 1】

具体的な一実施形態において、前記 P タンパク質は、R 5 0 K、V 7 6 A、D 9 9 E のアミノ酸置換を有する。

【0 1 7 2】

具体的な一実施形態において、前記 P タンパク質は、R 5 0 K、V 7 6 A、D 9 9 E、L 1 2 6 S のアミノ酸置換を有する。

【0 1 7 3】

具体的な一実施形態において、前記 P タンパク質は、R 5 0 K、V 7 6 A、D 9 9 E、L 1 2 6 S、L 1 4 0 S のアミノ酸置換を有する。

【0 1 7 4】

具体的な一実施形態において、前記 P タンパク質は、R 5 0 K、V 7 6 A、D 9 9 E、L

10

20

30

40

50

1 2 6 S、L 1 4 0 S、H 1 5 1 Yのアミノ酸置換を有する。

【0 1 7 5】

具体的な一実施形態において、前記Pタンパク質は、R 5 0 K、V 7 6 A、D 9 9 E、L 1 2 6 S、L 1 4 0 S、H 1 5 1 Y、I 1 6 8 Mのアミノ酸置換を有する。

【0 1 7 6】

具体的な一実施形態において、前記Pタンパク質は、R 5 0 K、V 7 6 A、D 9 9 E、L 1 2 6 S、L 1 4 0 S、H 1 5 1 Y、I 1 6 8 M、K 1 7 0 Eのアミノ酸置換を有する。

【0 1 7 7】

具体的な一実施形態において、前記Pタンパク質は、R 5 0 K、V 7 6 A、D 9 9 E、L 1 2 6 S、L 1 4 0 S、H 1 5 1 Y、I 1 6 8 M、K 1 7 0 E、Y 1 8 9 Sのアミノ酸置換を有する。

10

【0 1 7 8】

具体的な一実施形態において、前記Pタンパク質は、R 5 0 K、V 7 6 A、D 9 9 E、L 1 2 6 S、L 1 4 0 S、H 1 5 1 Y、I 1 6 8 M、K 1 7 0 E、Y 1 8 9 S、N 2 3 7 Dのアミノ酸置換を有する。

【0 1 7 9】

具体的な一実施形態において、前記Pタンパク質は、V 7 6 A、D 9 9 E、L 1 2 6 S、L 1 4 0 S、H 1 5 1 Y、I 1 6 8 M、K 1 7 0 E、Y 1 8 9 S、N 2 3 7 Dのアミノ酸置換を有する。

【0 1 8 0】

具体的な一実施形態において、前記Pタンパク質は、D 9 9 E、L 1 2 6 S、L 1 4 0 S、H 1 5 1 Y、I 1 6 8 M、K 1 7 0 E、Y 1 8 9 S、N 2 3 7 Dのアミノ酸置換を有する。

20

【0 1 8 1】

具体的な一実施形態において、前記Pタンパク質は、L 1 2 6 S、L 1 4 0 S、H 1 5 1 Y、I 1 6 8 M、K 1 7 0 E、Y 1 8 9 S、N 2 3 7 Dのアミノ酸置換を有する。

【0 1 8 2】

具体的な一実施形態において、前記Pタンパク質は、L 1 4 0 S、H 1 5 1 Y、I 1 6 8 M、K 1 7 0 E、Y 1 8 9 S、N 2 3 7 Dのアミノ酸置換を有する。

【0 1 8 3】

具体的な一実施形態において、前記Pタンパク質は、H 1 5 1 Y、I 1 6 8 M、K 1 7 0 E、Y 1 8 9 S、N 2 3 7 Dのアミノ酸置換を有する。

30

【0 1 8 4】

具体的な一実施形態において、前記Pタンパク質は、I 1 6 8 M、K 1 7 0 E、Y 1 8 9 S、N 2 3 7 Dのアミノ酸置換を有する。

【0 1 8 5】

具体的な一実施形態において、前記Pタンパク質は、K 1 7 0 E、Y 1 8 9 S、N 2 3 7 Dのアミノ酸置換を有する。

【0 1 8 6】

具体的な一実施形態において、前記Pタンパク質は、Y 1 8 9 S、N 2 3 7 Dのアミノ酸置換を有する。

40

【0 1 8 7】

具体的な一実施形態において、前記Pタンパク質は、N 2 3 7 Dのアミノ酸置換を有する。

【0 1 8 8】

具体的な一実施形態において、前記Pタンパク質は、配列番号62に示されるアミノ酸配列を含む。

【0 1 8 9】

具体的な一実施形態において、前記Pタンパク質は、配列番号63に示されるアミノ酸配列を含む。

50

【0190】

具体的な一実施形態において、前記Ｐタンパク質は、配列番号６４に示されるアミノ酸配列を含む。

【0191】

具体的な一実施形態において、前記Ｐタンパク質は、配列番号６５に示されるアミノ酸配列を含む。

【0192】

具体的な一実施形態において、前記Ｐタンパク質は、配列番号６６に示されるアミノ酸配列を含む。

【0193】

具体的な一実施形態において、前記Ｐタンパク質は、配列番号６７に示されるアミノ酸配列を含む。

【0194】

具体的な一実施形態において、前記Ｐタンパク質は、配列番号６８に示されるアミノ酸配列を含む。

【0195】

具体的な一実施形態において、前記Ｐタンパク質は、配列番号６９に示されるアミノ酸配列を含む。

【0196】

具体的な一実施形態において、前記Ｐタンパク質は、配列番号７０に示されるアミノ酸配列を含む。

【0197】

具体的な一実施形態において、前記Ｐタンパク質は、配列番号７１に示されるアミノ酸配列を含む。

【0198】

具体的な一実施形態において、前記Ｐタンパク質は、配列番号７２に示されるアミノ酸配列を含む。

【0199】

具体的な一実施形態において、前記Ｐタンパク質は、配列番号７３に示されるアミノ酸配列を含む。

【0200】

具体的な一実施形態において、前記Ｐタンパク質は、配列番号７４に示されるアミノ酸配列を含む。

【0201】

具体的な一実施形態において、前記Ｐタンパク質は、配列番号７５に示されるアミノ酸配列を含む。

【0202】

具体的な一実施形態において、前記Ｐタンパク質は、配列番号７６に示されるアミノ酸配列を含む。

【0203】

具体的な一実施形態において、前記Ｐタンパク質は、配列番号７７に示されるアミノ酸配列を含む。

【0204】

具体的な一実施形態において、前記Ｐタンパク質は、配列番号７８に示されるアミノ酸配列を含む。

【0205】

具体的な一実施形態において、前記Ｐタンパク質は、配列番号７９に示されるアミノ酸配列を含む。

【0206】

具体的な一実施形態において、前記Ｐタンパク質は、配列番号８０に示されるアミノ酸配

10

20

30

40

50

列を含む。

【0207】

腫瘍溶解性ウイルスであって、上記Mタンパク質、又はMタンパク質及びGタンパク質、又はMタンパク質、Gタンパク質及びNタンパク質、又はMタンパク質、Gタンパク質、Nタンパク質及びPタンパク質、又はMタンパク質及びNタンパク質、又はMタンパク質及びPタンパク質、又はMタンパク質、Gタンパク質及びPタンパク質、又はMタンパク質、Nタンパク質及びPタンパク質を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスはLタンパク質をさらに含み、前記Lタンパク質は、配列番号81に示されるアミノ酸配列に比べて、第87部位、第487部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含む。

【0208】

いくつかの具体的な実施形態において、前記Lタンパク質のアミノ酸置換は、第87部位にあるセリンからプロリンへの変異(S87P)、及び／又は、第487部位にあるイソロイシンからトレオニンへの変異(I487T)を含む。

【0209】

具体的な一実施形態において、前記Lタンパク質のアミノ酸置換は、第87部位にあるセリンからプロリンへの変異(S87P)を含む。

【0210】

具体的な一実施形態において、前記Lタンパク質のアミノ酸置換は、第487部位にあるイソロイシンからトレオニンへの変異(I487T)を含む。

【0211】

具体的な一実施形態において、前記Lタンパク質は、S87Pのアミノ酸置換を有する。

【0212】

具体的な一実施形態において、前記Lタンパク質は、S87P、I487Tのアミノ酸置換を有する。

【0213】

具体的な一実施形態において、前記Lタンパク質は、I487Tのアミノ酸置換を有する。

【0214】

具体的な一実施形態において、前記Lタンパク質は、配列番号82に示されるアミノ酸配列を含む。

【0215】

具体的な一実施形態において、前記Lタンパク質は、配列番号83に示されるアミノ酸配列を含む。

【0216】

具体的な一実施形態において、前記Lタンパク質は、配列番号84に示されるアミノ酸配列を含む。

【0217】

いくつかの具体的な実施形態において、前記腫瘍溶解性ウイルスは、バキュロウイルスを基に、部位特異的変異が行われて取得されたものである。

【0218】

いくつかの具体的な実施形態において、前記腫瘍溶解性ウイルスは、Vesicular Stomatitis Virus(「VSV」と略称する)ウイルスを基に、部位特異的変異が行われて取得されたものである。

【0219】

いくつかの具体的な実施形態において、前記腫瘍溶解性ウイルスは、VSVウイルスIndiana Mudd Summerサブタイプを基に、部位特異的変異が行われて取得されたものである。

【0220】

いくつかの具体的な実施形態において、前記腫瘍溶解性ウイルスは、外因性標的タンパク質を含み、又は発現する。

10

20

30

40

50

【0221】

いくつかの具体的な実施形態において、前記腫瘍溶解性ウイルスは核酸分子を含み、前記核酸分子は、前記アミノ酸置換を有するMタンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有するGタンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有するNタンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有するPタンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有するLタンパク質をコードする核酸配列を含む。

【0222】

いくつかの具体的な実施形態において、前記核酸分子は、前記外因性標的タンパク質をコードする核酸配列を含む。

10

【0223】

いくつかの具体的な実施形態において、前記核酸分子のうち、前記外因性標的タンパク質をコードする核酸配列は、前記アミノ酸置換を有するMタンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有するGタンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有するNタンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有するPタンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有するLタンパク質をコードする核酸配列の間にある。

【0224】

第2態様で、本出願は、腫瘍溶解性ウイルス発現ベクターが提供され、下記の技術案を採用する。

20

【0225】

腫瘍溶解性ウイルス発現ベクターであって、前記腫瘍溶解性ウイルス発現ベクターは、本出願に記載のいずれか一項の腫瘍溶解性ウイルスを産生することができる。

【0226】

第3態様で、本出願は、ウイルス産生細胞が提供され、下記の技術案を採用する。

【0227】

ウイルス産生細胞であって、前記ウイルス産生細胞は、本出願に記載のいずれか一項の腫瘍溶解性ウイルスを産生することができる。

【0228】

第4態様で、本出願は、医薬組成物が提供され、下記の技術案を採用する。

30

【0229】

医薬組成物であって、前記医薬組成物は、本出願に記載のいずれか一項の腫瘍溶解性ウイルスと、任意選択で薬学的に許容される担体と、を含む。

【0230】

第5態様で、本出願は、上記した腫瘍溶解性ウイルス、腫瘍溶解性ウイルス発現ベクター、ウイルス産生細胞及び／又は医薬組成物の調製方法が提供される。

【0231】

第6態様で、本出願は、疾患及び／又は病気を予防及び／又は治療するための薬剤の調製における上記した腫瘍溶解性ウイルス、腫瘍溶解性ウイルス発現ベクター、ウイルス産生細胞及び／又は医薬組成物の用途が提供される。

40

【0232】

いくつかの具体的な実施形態において、前記腫瘍溶解性ウイルス、腫瘍溶解性ウイルス発現ベクター、ウイルス産生細胞及び／又は医薬組成物は、異常増殖細胞をゆっくりとした継続的に殺傷させる方法に用いられる。

【0233】

いくつかの具体的な実施形態において、前記疾患及び／又は病気は、腫瘍細胞または腫瘍組織関連細胞から異常増殖細胞を含み、好ましくは、前記腫瘍細胞が癌細胞であり、より好ましくは、前記癌細胞が転移性癌細胞である。

【0234】

いくつかの具体的な実施形態において、前記腫瘍は、固形腫瘍及び／又は血腫瘍を含む。

50

【0235】

要するに、本出願は下記の有益効果を有する。

【0236】

本出願で提供される腫瘍溶解性ウイルスは、いずれも異常増殖（腫瘍）LLC細胞、4T1細胞、MC38細胞及びHela細胞は、よい感染能力、インビトロ殺傷能力を持ち、且つLLC細胞、4T1細胞、MC38細胞及びHela細胞内でいずれも除去され難い。そして、本出願で提供される腫瘍溶解性ウイルスは、いずれも正常MEF細胞への感染能力が低く、インビトロ殺傷能力が低く、且つ本出願で提供される腫瘍溶解性ウイルスの正常MEF細胞内でいずれも除去されやすい。従って、本出願で提供される腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍、癌症等の細胞の感染及び殺傷によく用いられ、且つ腫瘍、癌症等の細胞内で除去され易く、腫瘍溶解性ウイルスの腫瘍、癌症等の細胞での治癒率をさらに向上させると同時に、上記提供される腫瘍溶解性ウイルスは、正常細胞を損傷することがなく、且つ正常細胞内にある場合に、さらに除去され易くなり、正常細胞の安全性をさらに保証する。

10

【図面の簡単な説明】

【0237】

【図1】図1は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスのLLC細胞への感染能力の検出結果である。

【図2】図2は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスの4T1細胞への感染能力の検出結果である。

20

【図3】図3は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスのMC38細胞への感染能力の検出結果である。

【図4】図4は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスのHela細胞への感染能力の検出結果である。

【図5】図5は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスのMEF細胞への感染能力の検出結果である。

【図6】図6は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスのLLC細胞へのインビトロ殺傷能力の検出結果である。

【図7】図7は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスの4T1細胞へのインビトロ殺傷能力の検出結果である。

30

【図8】図8は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスのMC38細胞へのインビトロ殺傷能力の検出結果である。

【図9】図9は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスのHela細胞へのインビトロ殺傷能力の検出結果である。

【図10】図10は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスのMEF細胞へのインビトロ殺傷能力の検出結果である。

【図11】図11は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスがLLC細胞内でIFN- β の発現を誘導する状況である。

【図12】図12は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスが4T1細胞内でIFN- β の発現を誘導する状況である。

40

【図13】図13は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスがMC38細胞内でIFN- β の発現を誘導する状況である。

【図14】図14は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスがHela細胞内でIFN- β の発現を誘導する状況である。

【図15】図15は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスがMEF細胞内でIFN- β の発現を誘導する状況である。

【0238】

上記附図で、横軸上の0号は野生型腫瘍溶解性ウイルスを表し、横軸1～79号は、調製例1～79で調製される腫瘍溶解性ウイルスをそれぞれ表す。

【0239】

50

縦軸 $\text{Log}_{10} \text{TCID}_{50}$ は、Karber 法により算出された TCID_{50} 値を表し、 $\text{Log}_{10} \text{TCID}_{50}$ の値が大きいほど、腫瘍溶解性ウイルスの該細胞への感染能力が良くなることが表され、 $\text{Log}_{10} \text{TCID}_{50}$ の値が小さいほど、腫瘍溶解性ウイルスの該細胞への感染能力が低くなることが表される。

【0240】

縦軸 OD_{570} は細胞の OD 値を表し、 OD_{570} の値が大きいほど、腫瘍溶解性ウイルスの該細胞への殺傷能力が低くなることが表され、 OD_{570} の値が小さいほど、腫瘍溶解性ウイルスの該細胞への殺傷能力が良くなることが表される。

【0241】

縦軸 $\text{IFN}-\beta$ レベルは、 $\text{IFN}-\beta$ 遺伝子の発現状況を表し、 $\text{IFN}-\beta$ レベルの値が大きいほど、腫瘍溶解性ウイルスの該細胞での生殖能力が弱くなり、除去されやすくなることが表され、 $\text{IFN}-\beta$ レベルの値が小さいほど、腫瘍溶解性ウイルスの該細胞での生殖能力が強くなり、除去されやすくなることが表される。

10

【0242】

当業者は、以下の詳細な説明から本出願の他の側面及び利点を容易に理解することができる。以下の詳細な説明では、本出願の例示的な実施形態のみ記載され、説明される。当業者が理解するように、本出願の内容によっては、当業者が、本出願に係る発明の精神および範囲から逸脱することなく、公開される具体的な実施形態を変更することができる。対応に、本出願の図面および明細書の説明は例示にすぎず、限定的なものではない。

【発明を実施するための形態】

20

【0243】

以下、本出願発明の実施形態について具体的な実施例を挙げて説明するが、当業者であれば、本明細書に公開される内容から本出願発明のその他の利点及び効果を容易に理解することができる。

用語定義

【0244】

本出願では、「腫瘍溶解性ウイルス」という用語とは、通常、腫瘍細胞で腫瘍細胞を複製して殺すことができるウイルスを意味する。腫瘍溶解性ウイルスは、水疱性口内炎ウイルス (Vesicular Stomatitis Virus, 「VSVウイルス」と略称する)、ボックスウイルス、単純ヘルペスウイルス、麻疹ウイルス、セムリキ森林ウイルス、ポリオウイルス、レオウイルス、セネカバレーウイルス、エコータイプエンテロウイルス、コクサッキーウイルス、ニューカッスル病ウイルス及びマラバールウイルスを含むが、これらに限定されない。ある実施形態において、前記腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍細胞に対する選択性を向上させるように、改変される。ある実施形態において、前記腫瘍溶解性ウイルスは、免疫原性を低下させるように、改変される。いくつかの実施形態において、本出願の前記腫瘍溶解性ウイルスは、VSVウイルスである。いくつかの実施形態において、VSVウイルスは、VSVウイルス Indiana Mudd Summer サブタイプ株の変異体である。いくつかの実施形態において、VSVウイルスのMタンパク質、及び／又はGタンパク質、及び／又はNタンパク質、及び／又はPタンパク質、及び／又はLタンパク質に対して、部位特異的遺伝子変異を行ってもよい。

30

40

【0245】

ある実施形態において、本出願に記載の腫瘍溶解性ウイルスは、遺伝子レベルの改変された腫瘍溶解性ウイルス、例えば1つ又は複数の遺伝子の改変によって、その腫瘍選択性を向上させ、及び／又は分裂中の細胞で優先的に複製される。前記遺伝子レベルの改変は、DNA複製、核酸代謝、宿主指向性、表面付着、毒性、溶解および拡散のプロセスに参加する遺伝子の修飾であってもよいし、外因性遺伝子を組み込む改変であってもよい。前記外源遺伝子は、外因性免疫調節遺伝子、外因性スクリーニング遺伝子、外因性レポーター遺伝子等を含んでもよい。前記改変された腫瘍溶解性ウイルスは、アミノ酸レベルで改変された腫瘍溶解性ウイルス、例えば1つ又は複数のアミノ酸の挿入、欠失、置換である。

【0246】

50

本出願では、「Mタンパク質」という用語とは、通常、V S V ウイルスマトリックスタンパク質という意味である。Mタンパク質は、V S V ウイルスの重要な毒性因子であり、V S V ウイルスにおいてマウスの自然免疫反応を妨げることが知られているタンパク質でもある。「Mタンパク質」という用語は、そのホモログ、オルソログス、バリエーション、機能的に活性な断片等をさらに含む。本出願では、野生型V S V ウイルスIndiana Mudd Summer サブタイプMタンパク質は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。本出願では、前記腫瘍溶解性ウイルスのMタンパク質は、配列番号2～29に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【0247】

本出願では、「Gタンパク質」という用語は、通常、水V S V ウイルスの糖タンパク質を意味し、エンベロープタンパク質とも称する。「Gタンパク質」という用語は、そのホモログ、オルソログス、バリエーション、機能的に活性な断片等をさらに含む。本出願では、野生型V S V ウイルスIndiana Mudd Summer サブタイプGタンパク質は、配列番号31に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。本出願では、前記腫瘍溶解性ウイルスのGタンパク質は、配列番号32～54に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

10

【0248】

本出願では、「Nタンパク質」という用語とは、通常、V S V ウイルスのヌクレオカプシドタンパク質を意味する。「Nタンパク質」という用語は、そのホモログ、オルソログス、バリエーション、機能的に活性な断片等をさらに含む。本出願では、野生型V S V ウイルスIndiana Mudd Summer サブタイプNタンパク質は、配列番号55に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。本出願では、前記腫瘍溶解性ウイルスのNタンパク質は、配列番号56～60に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

20

【0249】

本出願では、「Pタンパク質」という用語とは、通常、V S V ウイルスのリンタンパク質を意味する。「Pタンパク質」という用語は、そのホモログ、オルソログス、バリエーション、機能的に活性な断片等をさらに含む。本出願では、野生型V S V ウイルスIndiana Mudd Summer サブタイプPタンパク質は、配列番号61に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。本出願では、前記腫瘍溶解性ウイルスのPタンパク質は、配列番号62～80に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

30

本出願では、「Lタンパク質」という用語は、通常、V S V ウイルスRNAポリメラーゼタンパク質を意味する。V S V ウイルスのL遺伝子は、RNA poly Eタンパク質をコードする。「Lタンパク質」という用語は、そのホモログ、オルソログス、バリエーション、機能的に活性な断片等をさらに含む。本出願では、野生型V S V ウイルスIndiana Mudd Summer サブタイプLタンパク質は、配列番号81に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。本出願では、前記腫瘍溶解性ウイルスのLタンパク質は、配列番号82～84に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

【0250】

本出願では、タンパク質変異部位の表現は、通常、「アミノ酸+アミノ酸部位数+（変異したアミノ酸）」で表現される。本出願では、前記変異は、アミノ酸の追加、置換、欠失及び／又は削除を含むが、これらに限定されない。例えば、「M51R」という用語とは、通常、第51部位のメチオニンMからアルギニンRへの変異を意味する。

40

【0251】

本出願では、「アミノ酸置換」という用語とは、通常、親配列に存在する一つのアミノ酸残基を別のアミノ酸残基に置換することを意味する。親配列におけるアミノ酸は、例えば、化学的ペプチド合成または当業者で知られている組換え方法によって置換されてもよい。従って、「xx位置で置換する」とは、通常、xx位置で存在するアミノ酸を代替アミノ酸残基に置換することを意味する。本出願では、前記アミノ酸置換は、アミノ酸変異を含んでもよい。

【0252】

50

本出願では、「変異」という用語とは、通常、野生型分子のヌクレオチドまたはアミノ酸配列を変更することを意味する。アミノ酸変化は、アミノ酸の置換え、削除、欠失、挿入、付加、切断、或いはタンパク質の加工やカットを含んでもよい。

【0253】

本出願では、「核酸分子」という用語とは、通常、任意長さのヌクレオチドを意味する。本出願では、「核酸分子」という用語は、前記腫瘍溶解性ウイルスに含まれるタンパク質をコードすることができる。本出願では、前記核酸分子は、DNA及び／又はRNAを含んでもよい。ある場合には、前記RNAは、一本鎖RNA (ssRNA) を含んでもよいし、二本鎖RNA (dsRNA) を含んでもよく、一本鎖RNAは、センスRNAを含んでもよいし、アンチセンスRNA (anti-sense RNA) を含んでもよいし、アンビセンスRNAを含んでもよい。

10

【0254】

本出願では、「発現ベクター」という用語とは、通常、核酸担体を意味する。適当な条件では、通常に標的遺伝子及び／又は標的タンパク質を発現することができる。本出願のある実施形態において、前記発現ベクターは、ウイルス（例えば、腫瘍溶解性ウイルス）を発現するための一つ又は複数の成分の核酸分子を含む。例えば、前記発現ベクターは、少なくとも一つのウイルスゲノム要素を含み、ウイルスにパッケージ化され、或いはウイルス粒子としてパッケージ化されることができる。

【0255】

本出願では、「ウイルス産生細胞」という用語とは、通常、本出願に記載の核酸分子または発現ベクターを含んでもよく、またはすでに含み、或いは、本出願に記載の腫瘍溶解性ウイルスを発現することができる細胞、細胞株または細胞培養物を意味する。前記細胞は、単一の宿主細胞の子孫を含んでもよい。前記細胞は、本出願に記載の発現ベクターインビトロトランスフェクションを用いることによって得られてもよい。

20

【0256】

本出願では、「医薬組成物」という用語とは、有効成分の生物学的活性を有効にするように許容する形態で、投与される被験者に対して許容できないほど有毒となる別の成分を含まない製剤を意味する。ある実施形態において、これらの製剤は、薬剤の有効成分及び薬学的に許容される担体を含んでもよい。ある実施形態において、前記薬剤製品は、非経口、経皮、管腔内、動脈内、くも膜下腔内および／または鼻腔内投与または組織への直接注射用の薬剤製品を含む。前記薬剤製品は、例えば、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、局所または皮内投与等の異なる方式で投与されてもよい。

30

【0257】

本出願では、「予防」という用語とは、通常、事前に一定の措置を講じることにより、病気またはその一つ又は複数の症状の発生、発症、再発、および／または蔓延を防ぐことを意味する。本出願では、「治療」という用語とは、通常、疾患、又は疾患に関連する一つ又は複数の症状を解消し、改善することを意味する。ある実施形態において、治療とは、通常、この疾患を患っている患者に一つ又は複数の薬剤を投与して疾患を解消し、又は寛解することを意味する。ある実施形態において、「治療」は、特定の疾患の症状の発症後に、他の薬剤の存在または非存在で投与される前記医薬組成物及び／又は薬剤製品であってもよい。例えば、本出願に記載の医薬組成物及び／又は薬剤製品を用いて腫瘍の発生、発展、再発及び／又は遷移を防止する。

40

【0258】

本出願では、「腫瘍」という用語とは、通常、任意の新たな病理学的組織の増殖を意味する。腫瘍には良性の場合と悪性の場合がある。本出願では、前記腫瘍は、固形腫瘍及び／又は血腫瘍であってもよい。研究のために、これらの組織を、当業者が周知する方法によって容易に入手可能な供給源から単離することができる。

【発明の内容】

【0259】

本出願は、野生型VSVウイルスを基に、具体的にVSVウイルスインディアナ株、V S

50

VウイルスIndiana Mudd Summer サブタイプ株を基に、そのMタンパク質、Gタンパク質、Nタンパク質、Pタンパク質、Lタンパク質のアミノ酸配列における部位を変異して取得された腫瘍溶解性ウイルスが提供される。そのMタンパク質のアミノ酸配列は配列番号1に示され、そのGタンパク質のアミノ酸配列は配列番号31に示され、そのNタンパク質のアミノ酸配列は配列番号55に示され、そのPタンパク質のアミノ酸配列は配列番号61に示され、そのLタンパク質のアミノ酸配列は配列番号81に示される。本出願では、前記Mタンパク質、Gタンパク質、Nタンパク質、Pタンパク質、Lタンパク質は、いずれも改変されることができる。

本出願は、腫瘍溶解性ウイルスを取得するように、前記VSVウイルスを下記のとおり修飾する。

10

【0260】

腫瘍溶解性ウイルスであって、腫瘍溶解性ウイルスは、Mタンパク質を含み、前記Mタンパク質は、配列番号1に示されるアミノ酸配列に比べて、第32部位、第33部位、第49部位、第54部位、第133部位、第225部位のうちの一つまたは複数の部位のアミノ酸置換を含む。前記Mタンパク質は、第21部位、第51部位、第111部位、第221部位及び第226部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換をさらに含む。

【0261】

前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、第32部位にあるアスパラギンからセリンへの変異(N32S)、及び／又は、第33部位にあるメチオニンからアラニンへの変異(M33A)、及び／又は、第49部位にあるアスパラギンからアスパラギン酸への変異(N49D)、及び／又は、第54部位にあるヒスチジンからチロシンへの変異(H54Y)、及び／又は、第133部位にあるアラニンからトレオニンへの変異(A133T)、及び／又は、第225部位にあるバリンからイソロイシンへの変異(V225I)を含み、前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、第21部位にあるグリシンからグルタミン酸への変異(G21E)をさらに含み、及び／又は、前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、第51部位にあるメチオニンからアルギニンへの変異(M51R)、及び／又は、第51部位にあるメチオニンからアラニンへの変異(M51A)、及び／又は、第111部位にあるロイシンからアラニンへの変異(L111A)、及び／又は、第221部位にあるバリンからフェニルアラニンへの変異(V221F)、及び／又は、第226部位にあるセリンからアルギニンへの変異(S226R)を含む。

20

30

【0262】

本出願では、前記Mタンパク質は、第21部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0263】

本出願では、前記Mタンパク質は、第21部位、第32部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0264】

本出願では、前記Mタンパク質は、第21部位、第32部位及び第33部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0265】

本出願では、前記Mタンパク質は、第21部位、第32部位、第33部位及び第49部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

40

【0266】

本出願では、前記Mタンパク質は、第21部位、第32部位、第33部位、第49部位及び第54部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0267】

本出願では、前記Mタンパク質は、第21部位、第32部位、第33部位、第49部位、第54部位及び第111部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0268】

本出願では、前記Mタンパク質は、第21部位、第32部位、第33部位、第49部位、第54部位、第111部位及び第133部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

50

【0269】

本出願では、前記Mタンパク質は、第21部位、第32部位、第33部位、第49部位、第54部位、第111部位、第133部位及び第225部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0270】

本出願では、前記Mタンパク質は、第21部位、第32部位、第33部位、第49部位、第51部位、第54部位、第111部位、第133部位及び第225部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0271】

本出願では、前記Mタンパク質は、第21部位、第32部位、第33部位、第49部位、第51部位、第54部位、第111部位、第133部位、第221部位及び第225部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

10

【0272】

本出願では、前記Mタンパク質は、第21部位、第32部位、第33部位、第49部位、第51部位、第54部位、第111部位、第133部位、第221部位、第225部位及び第226部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0273】

本出願では、前記Mタンパク質は、第32部位、第33部位、第49部位、第51部位、第54部位、第111部位、第133部位、第221部位、第225部位及び第226部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

20

【0274】

本出願では、前記Mタンパク質は、第33部位、第49部位、第51部位、第54部位、第111部位、第133部位、第221部位、第225部位及び第226部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0275】

本出願では、前記Mタンパク質は、第49部位、第51部位、第54部位、第111部位、第133部位、第221部位、第225部位及び第226部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0276】

本出願では、前記Mタンパク質は、第51部位、第54部位、第111部位、第133部位、第221部位、第225部位及び第226部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

30

【0277】

本出願では、前記Mタンパク質は、第54部位、第111部位、第133部位、第221部位、第225部位及び第226部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0278】

本出願では、前記Mタンパク質は、第111部位、第133部位、第221部位、第225部位及び第226部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0279】

本出願では、前記Mタンパク質は、第133部位、第221部位、第225部位及び第226部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

40

【0280】

本出願では、前記Mタンパク質は、第221部位、第225部位及び第226部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0281】

本出願では、前記Mタンパク質は、第225部位及び第226部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0282】

本出願では、前記Mタンパク質は、第226部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0283】

本出願では、前記Mタンパク質は、第32部位、第49部位、第54部位及び第225部

50

位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0284】

本出願では、前記Mタンパク質は、第32部位、第49部位、第54部位、第225部位及び第226部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0285】

本出願では、前記Mタンパク質は、第32部位、第49部位、第51部位、第54部位、第221部位、第225部位及び第226部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0286】

本出願では、前記Mタンパク質は、第32部位、第33部位、第49部位、第51部位、第54部位、第221部位、第225部位及び第226部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

10

【0287】

本出願では、前記Mタンパク質は、第32部位、第49部位、第51部位、第54部位、第133部位、第221部位、第225部位及び第226部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0288】

本出願では、前記Mタンパク質は、第32部位、第33部位、第49部位、第51部位、第54部位、第133部位、第221部位、第225部位及び第226部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0289】

本出願では、前記Mタンパク質は、第21部位、第32部位、第49部位、第51部位、第54部位、第111部位、第225部位及び第226部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

20

【0290】

本出願では、前記Mタンパク質は、他位置のアミノ酸置換を含んでもよい。

【0291】

前記腫瘍溶解性ウイルスはGタンパク質をさらに含み、前記Gタンパク質は、配列番号31に示されるアミノ酸配列に比べて、第438部位、第453部位、第471部位及び第487部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含む。

【0292】

本出願では、前記Gタンパク質のアミノ酸置換は、第53部位にあるバリンからイソロイシンへの変異(V53I)、及び／又は、第141部位にあるアラニンからバリンへの変異(A141V)、及び／又は、第172部位にあるアスパラギン酸からチロシンへの変異(D172Y)、及び／又は、第217部位のリジンからグルタミン酸への変異(K217E)、及び／又は、第232部位にあるアスパラギン酸からグリシンへの変異(D232G)、及び／又は、第331部位にあるバリンからアラニンへの変異(V331A)、及び／又は、第371部位にあるバリンからグルタミン酸への変異(V371E)、及び／又は、第436部位にあるグリシンからアスパラギン酸への変異(G436D)、及び／又は、第438部位にあるトレオニンからセリンへの変異(T438S)、及び／又は、第453部位にあるフェニルアラニンからロイシンへの変異(F453L)、及び／又は、第471部位にあるトレオニンからイソロイシンへの変異(T471I)、及び／又は、第487部位にあるチロシンからヒスチジンへの変異(Y487H)を含む。例えば、前記Gタンパク質は、配列番号43に示されるアミノ酸配列を含む。

30

40

【0293】

本出願では、前記Gタンパク質は、第53部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0294】

本出願では、前記Gタンパク質は、第53部位及び第141部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0295】

本出願では、前記Gタンパク質は、第53部位、第141部位及び第172部位のアミノ

50

酸変異を含んでもよい。

【0296】

本出願では、前記Gタンパク質は、第53部位、第141部位、第172部位及び第217部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0297】

本出願では、前記Gタンパク質は、第53部位、第141部位、第172部位、第217部位及び第232部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0298】

本出願では、前記Gタンパク質は、第53部位、第141部位、第172部位、第217部位、第232部位及び第331部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

10

【0299】

本出願では、前記Gタンパク質は、第53部位、第141部位、第172部位、第217部位、第232部位、第331部位及び第371部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0300】

本出願では、前記Gタンパク質は、第53部位、第141部位、第172部位、第217部位、第232部位、第331部位、第371部位及び第436部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0301】

本出願では、前記Gタンパク質は、第53部位、第141部位、第172部位、第217部位、第232部位、第331部位、第371部位、第436部位及び第438部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

20

【0302】

本出願では、前記Gタンパク質は、第53部位、第141部位、第172部位、第217部位、第232部位、第331部位、第371部位、第436部位、第438部位及び第453部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0303】

本出願では、前記Gタンパク質は、第53部位、第141部位、第172部位、第217部位、第232部位、第331部位、第371部位、第436部位、第438部位、第453部位及び第471部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0304】

本出願では、前記Gタンパク質は、第53部位、第141部位、第172部位、第217部位、第232部位、第331部位、第371部位、第436部位、第438部位、第453部位、第471部位及び第487部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

30

【0305】

本出願では、前記Gタンパク質は、第141部位、第172部位、第217部位、第232部位、第331部位、第371部位、第436部位、第438部位、第453部位、第471部位及び第487部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0306】

本出願では、前記Gタンパク質は、第172部位、第217部位、第232部位、第331部位、第371部位、第436部位、第438部位、第453部位、第471部位及び第487部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

40

【0307】

本出願では、前記Gタンパク質は、第217部位、第232部位、第331部位、第371部位、第436部位、第438部位、第453部位、第471部位及び第487部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0308】

本出願では、前記Gタンパク質は、第232部位、第331部位、第371部位、第436部位、第438部位、第453部位、第471部位及び第487部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0309】

50

本出願では、前記 G タンパク質は、第 3 3 1 部位、第 3 7 1 部位、第 4 3 6 部位、第 4 3 8 部位、第 4 5 3 部位、第 4 7 1 部位及び第 4 8 7 部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0310】

本出願では、前記 G タンパク質は、第 3 7 1 部位、第 4 3 6 部位、第 4 3 8 部位、第 4 5 3 部位、第 4 7 1 部位及び第 4 8 7 部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0311】

本出願では、前記 G タンパク質は、第 4 3 6 部位、第 4 3 8 部位、第 4 5 3 部位、第 4 7 1 部位及び第 4 8 7 部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0312】

本出願では、前記 G タンパク質は、第 4 3 8 部位、第 4 5 3 部位、第 4 7 1 部位及び第 4 8 7 部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

10

【0313】

本出願では、前記 G タンパク質は、第 4 5 3 部位、第 4 7 1 部位及び第 4 8 7 部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0314】

本出願では、前記 G タンパク質は、第 4 7 1 部位、第 4 8 7 部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0315】

本出願では、前記 G タンパク質は、第 4 8 7 部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0316】

20

本出願では、前記 G タンパク質は、他位置のアミノ酸置換を含んでもよい。

【0317】

ある実施形態において、前記 G タンパク質は、保守エリアにある一つ又は複数のアミノ酸置換を少なくとも含む。例えば、前記保守エリアは、G タンパク質の第 4 3 7 ~ 4 6 1 部位のアミノ酸を含んでもよい。ある実施形態において、前記 G タンパク質は、細胞質ドメインの切断エリアにある一つ又は複数のアミノ酸置換を少なくとも含む。例えば、前記細胞質ドメインの切断エリアは、G タンパク質の第 4 8 3 ~ 5 1 1 部位のアミノ酸を含んでもよい。

【0318】

本出願では、前記 G タンパク質は、第 4 3 8 部位、第 4 5 3 部位、第 4 7 1 部位及び第 4 8 7 部位にあるアミノ酸置換を少なくとも含んでもよい。

30

【0319】

前記腫瘍溶解性ウイルスは、N タンパク質をさらに含み、前記 N タンパク質は配列番号 5 5 に示されるアミノ酸配列に比べて、第 1 4 部位、第 1 5 5 部位、第 3 5 3 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含む。

【0320】

本出願では、前記 N タンパク質のアミノ酸置換は、第 1 4 部位にあるイソロイシンからバリンへの変異 (I 1 4 V)、及び／又は、第 1 5 5 部位にあるアルギニンからリジンへの変異 (R 1 5 5 K)、及び／又は、第 3 5 3 部位にあるセリンからアスパラギンへの変異 (S 3 5 3 N) を含む。例えば、前記 N タンパク質は、配列番号 5 8 に示されるアミノ酸配列を含む。

40

【0321】

本出願では、前記 N タンパク質は、第 1 4 部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0322】

本出願では、前記 N タンパク質は、第 1 4 部位及び第 1 5 5 部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0323】

本出願では、前記 N タンパク質は、第 1 4 部位、第 1 5 5 部位及び第 3 5 3 部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0324】

50

本出願では、前記 N タンパク質は、第 1 5 5 部位及び第 3 5 3 部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0325】

本出願では、前記 N タンパク質は、第 3 5 3 部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0326】

本出願では、前記 N タンパク質は、他位置のアミノ酸置換を含んでもよい。

【0327】

前記腫瘍溶解性ウイルスは P タンパク質をさらに含み、前記 P タンパク質は配列番号 6 1 に示されるアミノ酸配列に比べて、第 5 0 部位、第 7 6 部位、第 9 9 部位、第 1 2 6 部位、第 1 4 0 部位、第 1 5 1 部位、第 1 6 8 部位、第 1 7 0 部位、第 1 8 9 部位、第 2 3 7 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含む。

10

【0328】

本出願では、前記 P タンパク質のアミノ酸置換は、第 5 0 部位にあるアルギニンからリジンへの変異 (R 5 0 K)、及び／又は、第 7 6 部位にあるバリンからアラニンへの変異 (V 7 6 A)、及び／又は、第 9 9 部位にあるアスパラギンからグルタミン酸への変異 (D 9 9 E)、及び／又は、第 1 2 6 部位にあるロイシンからセリンへの変異 (L 1 2 6 S)、及び／又は、第 1 4 0 部位にあるロイシンからセリンへの変異 (L 1 4 0 S)、及び／又は、第 1 5 1 部位にあるヒスチジンからチロシンへの変異 (H 1 5 1 Y)、及び／又は、第 1 6 8 部位にあるイソロイシンからメチオニンへの変異 (I 1 6 8 M)、及び／又は、第 1 7 0 部位にあるリジンからグルタミン酸への変異 (K 1 7 0 E)、及び／又は、第 1 8 9 部位にあるチロシンからセリンへの変異 (Y 1 8 9 S)、及び／又は、第 2 3 7 部位にあるアスパラギンからアスパラギン酸への変異 (N 2 3 7 D) を含む。例えば、前記 P タンパク質は、配列番号 7 1 に示されるアミノ酸配列を含む。

20

【0329】

本出願では、前記 P タンパク質は、第 5 0 部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0330】

本出願では、前記 P タンパク質は、第 5 0 部位及び第 7 6 部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0331】

本出願では、前記 P タンパク質は、第 5 0 部位、第 7 6 部位及び第 9 9 部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

30

【0332】

本出願では、前記 P タンパク質は、第 5 0 部位、第 7 6 部位、第 9 9 部位及び第 1 2 6 部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0333】

本出願では、前記 P タンパク質は、第 5 0 部位、第 7 6 部位、第 9 9 部位、第 1 2 6 部位及び第 1 4 0 部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0334】

本出願では、前記 P タンパク質は、第 5 0 部位、第 7 6 部位、第 9 9 部位、第 1 2 6 部位、第 1 4 0 部位及び第 1 5 1 部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

40

【0335】

本出願では、前記 P タンパク質は、第 5 0 部位、第 7 6 部位、第 9 9 部位、第 1 2 6 部位、第 1 4 0 部位、第 1 5 1 部位及び第 1 6 8 部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0336】

本出願では、前記 P タンパク質は、第 5 0 部位、第 7 6 部位、第 9 9 部位、第 1 2 6 部位、第 1 4 0 部位、第 1 5 1 部位、第 1 6 8 部位及び第 1 7 0 部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0337】

本出願では、前記 P タンパク質は、第 5 0 部位、第 7 6 部位、第 9 9 部位、第 1 2 6 部位、第 1 4 0 部位、第 1 5 1 部位、第 1 6 8 部位、第 1 7 0 部位及び第 1 8 9 部位のアミノ

50

酸変異を含んでもよい。

【0338】

本出願では、前記Pタンパク質は、第50部位、第76部位、第99部位、第126部位、第140部位、第151部位、第168部位、第170部位、第189部位及び第237部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0339】

本出願では、前記Pタンパク質は、第76部位、第99部位、第126部位、第140部位、第151部位、第168部位、第170部位、第189部位及び第237部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0340】

本出願では、前記Pタンパク質は、第99部位、第126部位、第140部位、第151部位、第168部位、第170部位、第189部位及び第237部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0341】

本出願では、前記Pタンパク質は、第126部位、第140部位、第151部位、第168部位、第170部位、第189部位及び第237部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0342】

本出願では、前記Pタンパク質は、第140部位、第151部位、第168部位、第170部位、第189部位及び第237部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0343】

本出願では、前記Pタンパク質は、第151部位、第168部位、第170部位、第189部位及び第237部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0344】

本出願では、前記Pタンパク質は、第168部位、第170部位、第189部位及び第237部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0345】

本出願では、前記Pタンパク質は、第170部位、第189部位及び第237部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0346】

本出願では、前記Pタンパク質は、第189部位及び第237部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0347】

本出願では、前記Pタンパク質は、第237部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0348】

本出願では、前記Pタンパク質は、他位置のアミノ酸置換を含んでもよい。

【0349】

前記腫瘍溶解性ウイルスはLタンパク質をさらに含み、前記Lタンパク質は配列番号81に示されるアミノ酸配列に比べて、第87部位、第487部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含む。例えば、前記Lタンパク質は、配列番号83に示されるアミノ酸配列を含む。

【0350】

本出願では、前記Lタンパク質のアミノ酸置換は、第87部位にあるセリンからプロリンへの変異(S87P)、及び／又は、第487部位にあるイソロイシンからトレオニンへの変異(I487T)を含む。

【0351】

本出願では、前記Pタンパク質は、第87部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0352】

本出願では、前記Pタンパク質は、第87部位及び第487部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0353】

10

20

30

40

50

本出願では、前記 P タンパク質は、第 4 8 7 部位のアミノ酸変異を含んでもよい。

【0354】

本出願では、前記 P タンパク質は、他位置のアミノ酸置換を含んでもよい。

【0355】

前記腫瘍溶解性ウイルスは、核酸分子及び外因性標的タンパク質を含んでもよい。核酸分子は、前記アミノ酸置換を有する M タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する G タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する N タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する P タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する L タンパク質をコードする核酸配列を含む。

10

【0356】

更には、該核酸分子は、前記外因性標的タンパク質をコードする核酸配列を含む。前記外因性標的タンパク質をコードする核酸配列は、前記アミノ酸置換を有する M タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する G タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する N タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する P タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する L タンパク質をコードする核酸配列の間にある。

【0357】

本出願では、ウイルスパッケージングプロセスとウイルスレスキュープロセスによって本出願に記載の腫瘍溶解性ウイルスを取得することができる。具体的なプロセスは、T7 RNA ポリメラーゼを発現するボックスウイルス vTF7-3 を用いて BSR-T7 細胞を感染し接種し、VSV-N、VSV-P、VSV-L 遺伝子をそれぞれクローンする発現プラスミドとバックボーンプラスミドを用いて lipofectamine トランスフェクションを行い、標的腫瘍溶解性ウイルスを取得することを含んでもよい。

20

【0358】

本出願は、腫瘍溶解性ウイルス発現ベクター、ウイルス産生細胞及び医薬組成物がさらに提供される。

【0359】

前記腫瘍溶解性ウイルス発現ベクターは、前記腫瘍溶解性ウイルスの M タンパク質及び G タンパク質をコードする核酸配列を含んでもよく、前記腫瘍溶解性ウイルス発現ベクターは、前記腫瘍溶解性ウイルスの N タンパク質、P タンパク質及び L タンパク質をコードする核酸配列をさらに含んでもよい。

30

【0360】

前記ウイルス産生細胞は、上記した腫瘍溶解性ウイルスを産生することができ、前記ウイルス産生細胞は、BSR-T7 細胞、Vero 細胞、293 細胞、MRC-5 細胞、WI38 細胞を含んでもよい。

【0361】

前記医薬組成物は、上記した腫瘍溶解性ウイルスと、任意選択で薬学的に許容される担体と、を含む。

【0362】

ある実施形態において、前記医薬組成物は、一つ又は複数の（薬学的に有効な）アジュバント、安定剤、賦形剤、希釈剤、可溶化剤、界面活性剤、乳化剤及び／又は防腐剤の適切な製剤を含んでもよい。医薬組成物の許容される成分は、使用される用量および濃度で被験者に対して非毒性であることが好ましい。本出願の医薬組成物は、液体、冷凍および凍結乾燥組成物を含むが、これらに限定されない。

40

【0363】

ある実施形態において、前記薬学的に許容される担体は、薬剤投与に適合する任意、あらゆる溶剤、分散媒体、コーティング、等張剤及び吸収遅延剤を含み、通常、安全で無毒である。

【0364】

50

前記医薬組成物は、上記した腫瘍溶解性ウイルスと、任意選択で薬学的に許容される他の薬剤と、を含む。

【0365】

上記医薬組成物は、腫瘍の治療を含むが、これに限定されない疾患の併用治療に用いられてもよい。

【0366】

ある実施形態において、前記医薬組成物は、非経口、経皮、管腔内、動脈内、静脈内、くも膜下腔内および／または鼻腔内投与または組織への直接注射用の薬剤製品を含む。例えば、前記医薬組成物は、患者または被験者への投与が、注入または注射によって行われることができる。ある実施形態において、前記医薬組成物は、例えば、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、局所または皮内投与等の異なる方式で投与されてもよい。ある実施形態において、前記医薬組成物は、中断せずに投与されることができる。前記中断のない（または連続的な）投与は、国際公開第2015／036583号に記載されているように、患者が装着する小型ポンプシステムによって患者体内への治療薬の流れを測定することによって達成されることができる。

10

【0367】

また、本出願は、上記した腫瘍溶解性ウイルスの調製方法がさらに提供され、該調製方法は、腫瘍溶解性ウイルス発現ベクター、ウイルス産生細胞及び／又は医薬組成物の調製方法を含んでもよい。腫瘍溶解性ウイルスを産生するのに適した任意の方法は、いずれも本出願の腫瘍溶解性ウイルスの産生に用いられることができる。例えば、細胞にT7 RNAポリメラーゼを発現するボックスウイルスを加入してトランスフェクションを行い、前記腫瘍溶解性ウイルスNタンパク質、Lタンパク質及びPタンパク質を発現するプラスミド及び骨格プラスミドを加入してトランスフェクションを行い、ウイルスレスキュープロセスによって、本出願の腫瘍溶解性ウイルスを取得する。

20

【0368】

本出願は、疾患及び／又は病気を予防及び／又は治療するための薬剤の調製における上記した腫瘍溶解性ウイルス、腫瘍溶解性ウイルス発現ベクター、ウイルス産生細胞及び／又は医薬組成物の用途がさらに提供される。

【0369】

本出願で提供される腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍溶解性ウイルスのMタンパク質、Gタンパク質、Nタンパク質、Pタンパク質、Lタンパク質上のアミノ酸部位に対してそれぞれ特異的変異を行い、よって腫瘍溶解性ウイルスの異常増殖（腫瘍）LLC細胞、4T1細胞、MC38細胞及びHela細胞への感染能力をさらに向上させる。同時に、上記調製された腫瘍溶解性ウイルスは、正常細胞、正常MEF細胞への感染能力がいずれも低く、本出願で調製された腫瘍溶解性ウイルスが腫瘍、癌症等の細胞の感染によく用いられることができると同時に、正常細胞を損傷することなく、幅広い応用の可能性を秘めていることが表される。

30

【0370】

本出願で提供される腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍溶解性ウイルスのMタンパク質、Gタンパク質、Nタンパク質、Pタンパク質、Lタンパク質上のアミノ酸部位に対してそれぞれ特異的変異を行い、よって腫瘍溶解性ウイルスの異常増殖（腫瘍）LLC細胞、4T1細胞、MC38細胞及びHela細胞への感染能力をさらに向上させる。腫瘍溶解性ウイルスのLLC細胞、4T1細胞、MC38細胞及びHela細胞へのインビトロ殺傷能力をさらに向上させる。同時に、上記調製された腫瘍溶解性ウイルスは、正常MEF細胞へ影響がほとんどなく、本出願で調製された腫瘍溶解性ウイルスが腫瘍、癌症等の非正常細胞の損傷及び致死によく用いられることができると同時に、正常細胞を損傷することがないことが表される。

40

【0371】

本出願で提供される腫瘍溶解性ウイルスは、異常増殖（腫瘍）LLC細胞、4T1細胞、MC38細胞及びHela細胞内でいずれも除去され難い。相対的に言えば、野生型腫瘍

50

溶解性ウイルスは、L L C細胞、M C 3 8細胞及びH e l a細胞内でさらに除去されやすくなる。本出願で提供される腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍溶解性ウイルスのMタンパク質、Gタンパク質、Nタンパク質、Pタンパク質、Lタンパク質上のアミノ酸に対して部位特異的変異をそれぞれ行い、腫瘍溶解性ウイルスが、L L C細胞、4 T 1細胞、M C 3 8細胞及びH e l a細胞内でさらに除去されにくくなるようにし、腫瘍溶解性ウイルスがL L C細胞、4 T 1細胞、M C 3 8細胞及びH e l a細胞内で感染及び殺傷能力をさらに発揮させるようにさらに保証し、同時に、本出願で提供される腫瘍溶解性ウイルスは、正常M E F細胞内でさらに除去されやすくなり、正常M E F細胞の安全性をさらに保証し、よって腫瘍溶解性ウイルスの安全性を向上させる。

【0372】

以下、調製例1～80、実施例1～3及び図1～15を参照しながら、本出願をさらに詳しく説明する。

調製例

調製例1～29

【0373】

調製例1～29は、それぞれ腫瘍溶解性ウイルスが提供され、その相違としては、主に、野生型腫瘍溶解性ウイルスのMタンパク質上のアミノ酸部位特異的変異の部位である。各調製例が対応する腫瘍溶解性ウイルスの構築方法は、具体的に下記の通りである。

(1) プラスミド構築

【0374】

p R V - c o r e プラスミド (B i o V e c t o r N T C C プラスミド担体細菌細胞遺伝子保存センター) をテンプレートとし、P C R 技術により表1に示される変異部位を導入する。p R V - c o r e プラスミドを、各変異部材を担持するプライマーとそれぞれP C R を行い、その後P C R 産物に対して1 % アガロースゲル電気泳動を行い、ゲル回収キットにより、アゴジェル回収を行い、よってMタンパク質の異なる変異部位を有するプラスミドを取得し、構築されたプラスミドp R V - c o r e M u t を取得する。

【0375】

表1 調製例1～29における腫瘍溶解性ウイルスのMタンパク質の変異テーブル

10

20

30

40

50

調製例	変異部位及び変異したアミノ酸	変異部位数	アミノ酸配列
1	G21E	1	配列番号 2
2	G21E、N32S	2	配列番号 3
3	G21E、N32S、M33A	3	配列番号 4
4	G21E、N32S、M33A、N49D	4	配列番号 5
5	G21E、N32S、M33A、N49D、H54Y	5	配列番号 6
6	G21E、N32S、M33A、N49D、H54Y、L111A	6	配列番号 7
7	G21E、N32S、M33A、N49D、H54Y、L111A、A133T	7	配列番号 8
8	G21E、N32S、M33A、N49D、H54Y、L111A、A133T、V225I	8	配列番号 9
9	G21E、N32S、M33A、N49D、M51R、H54Y、L111A、A133T、V225I	9	配列番号 10
10	G21E、N32S、M33A、N49D、M51R、H54Y、L111A、A133T、V221F、V225I	10	配列番号 11
11	G21E、N32S、M33A、N49D、M51R、H54Y、L111A、A133T、V221F、V225I、S226R	11	配列番号 12
12	N32S、M33A、N49D、M51R、H54Y、L111A、A133T、V221F、V225I、S226R	10	配列番号 13
13	M33A、N49D、M51R、H54Y、L111A、A133T、V221F、V225I、S226R	9	配列番号 14
14	N49D、M51R、H54Y、L111A、A133T、V221F、V225I、S226R	8	配列番号 15
15	M51R、H54Y、L111A、A133T、V221F、V225I、S226R	7	配列番号 16
16	H54Y、L111A、A133T、V221F、V225I、S226R	6	配列番号 17
17	L111A、A133T、V221F、V225I、S226R	5	配列番号 18
18	A133T、V221F、V225I、S226R	4	配列番号 19
19	V221F、V225I、S226R	3	配列番号 20
20	V225I、S226R	2	配列番号 21
21	S226R	1	配列番号 22
22	N32S、N49D、H54Y、V225I	4	配列番号 23
23	N32S、N49D、H54Y、V225I、S226G	5	配列番号 24
24	N32S、N49D、M51R、H54Y、V221F、V225I、S226R	7	配列番号 25
25	N32S、M33A、N49D、M51R、H54Y、V221F、V225I、S226R	8	配列番号 26
26	N32S、N49D、M51R、H54Y、A133T、V221F、V225I、S226R	8	配列番号 27
27	N32S、M33A、N49D、M51R、H54Y、A133T、V221F、V225I、S226R	9	配列番号 28
28	G21E、N32S、N49D、M51A、H54Y、L111A、V225I、S226R	8	配列番号 29
29	M51R、V221F、S226R	3	配列番号 30

10

20

30

40

(2) ウイルスレスキュー

【0376】

リン酸カルシウムトランスフェクションキット (Thermo Fisher Scientific) により、細胞トランスフェクション技術によって、構築されたプラスミド pRV-core Mut を BSR-T7 細胞 (ATCC (米国細菌保存センター, アメリカンタイプカルチャーコレクションとも称する) から購買された) までトランスフェクションする。

【0377】

pRV-core Mut、pP、pN、pL の質量比例 10 : 5 : 4 : 1 に従って、4

50

つのプラスミドを混合させ、プラスミド総量が $5\mu\text{g}$ であり、 $200\mu\text{l}$ opti-MEM 培地 (Thermo Fisher Scientific) を用いてプラスミドを希釈し $7.5\mu\text{l}$ のトランスフェクション試薬 Plus Reagent (Life Technologies) を加入し、トランスフェクションプラスミドプレミックス液を取得し、ここで、pP (バキュロウイルスリンタンパク質遺伝子を担持するプラスミド)、pN (バキュロウイルス核タンパク質遺伝子を担持するプラスミド)、pL (バキュロウイルスポリメラーゼタンパク質遺伝子を担持するプラスミド) であり、pN、pP、pL の3つのプラスミドが対応する母体担体はいずれも pCAGGS (ATCC から購買された) であり、

$200\mu\text{l}$ の opti-MEM 培地を用いて $10\mu\text{l}$ の Lipofectamine LTX (Thermo Fisher Scientific) を希釈し、LTX 混合液を取得し、

Lipofectamine LTX 使用説明書に記載の方法に従ってプラスミドトランスフェクションを行い、6 時間後、PBS を用いて BSR-T7 細胞を 2 回洗浄し、さらに 10% ウシ胎児血清の DMEM 培地 (Thermo Fisher Scientific) に接種し 3 日間培養し、

BSR-T7 細胞を培養して取得した細胞上澄みを Vero 細胞 (Thermo Fisher Scientific) に遷移し、Vero 細胞を 37°C の環境条件で置いて 3 日間培養し、蛍光顕微鏡で細胞内の緑色蛍光を観察しウイルスレスキューの状況を特定し、さらにレスキューした変異バキュロウイルスライブラリを、Vero 細胞を介して継代し、構築されたブラックスクリーニングシステムからモノクローナルウイルス株をピックアップする。

【0378】

(3) Mタンパク質遺伝子配列決定 Trizol キットを用いてウイルスゲノム RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行い、Mタンパク質遺伝子配列に対して設計したプライマーを用いて逆転写された cDNA に対して PCR を行い、プライマー配列としては、下記の通りである。

PF: ATGAGTTCCTTAAAGAA ;

PR: TCATTTGAAGTGG。

【0379】

産物を 1% アガロースゲル電気泳動で回収し、配列決定会社にとって配列決定会社を行う。配列決定結果を表 1 に示す。

調製例 30 ~ 52

【0380】

調製例 30 ~ 52 は、それぞれ腫瘍溶解性ウイルスが提供され、その相違としては、主に、野生型腫瘍溶解性ウイルスの Mタンパク質及び Gタンパク質上のアミノ酸部位特異的変異の部位である。ここで、Mタンパク質の変異部位は、調製例 24 において対応する変異部位と同じであり、Gタンパク質の変異部位を表 2 に示す。

【0381】

上述調製例で提供される腫瘍溶解性ウイルスの構築方法は、調製例 11 の構築方法に比べて、相違として、

工程 (1) の構築プラスミドにおいて PCR 技術を用いて表 2 に示される変異部位を導入すること、

工程 (3) が Gタンパク質遺伝子配列決定であることにある。Trizol キットを用いてウイルスゲノム RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行い、Gタンパク質遺伝子配列に対して設計したプライマーを用いて逆転写された cDNA に対して PCR を行い、

プライマー配列としては、下記の通りである。

PF: ATGAAGTGCCTTTTGTACTTAG ;

PR: TTACTTTCCAAGTCGGTTCATCT。

10

20

30

40

50

【 0 3 8 2 】

産物を 1 % アガロースゲル電気泳動で回収し、配列決定会社へ送って配列決定会社を行う。
配列決定結果を表 2 に示す。

【 0 3 8 3 】

表 2 調製例 3 0 ～ 5 2 における腫瘍溶解性ウイルスの G タンパク質の変異テーブル

調製例	変異部位及び変異したアミノ酸	変異部位数	アミノ酸配列
30	V53I	1	配列番号 32
31	V53I、A141V	2	配列番号 33
32	V53I、A141V、D172Y	3	配列番号 34
33	V53I、A141V、D172Y、K217E	4	配列番号 35
34	V53I、A141V、D172Y、K217E、D232G	5	配列番号 36
35	V53I、A141V、D172Y、K217E、D232G、V331A	6	配列番号 37
36	V53I、A141V、D172Y、K217E、D232G、V331A、V371E	7	配列番号 38
37	V53I、A141V、D172Y、K217E、D232G、V331A、V371E、G436D	8	配列番号 39
38	V53I、A141V、D172Y、K217E、D232G、V331A、V371E、G436D、T438S	9	配列番号 40
39	V53I、A141V、D172Y、K217E、D232G、V331A、V371E、G436D、T438S、F453L	10	配列番号 41
40	V53I、A141V、D172Y、K217E、D232G、V331A、V371E、G436D、T438S、F453L、T471I	11	配列番号 42
41	V53I、A141V、D172Y、K217E、D232G、V331A、V371E、G436D、T438S、F453L、T471I、Y487H	12	配列番号 43
42	A141V、D172Y、K217E、D232G、V331A、V371E、G436D、T438S、F453L、T471I、Y487H	11	配列番号 44
43	D172Y、K217E、D232G、V331A、V371E、G436D、T438S、F453L、T471I、Y487H	10	配列番号 45
44	K217E、D232G、V331A、V371E、G436D、T438S、F453L、T471I、Y487H	9	配列番号 46
45	D232G、V331A、V371E、G436D、T438S、F453L、T471I、Y487H	8	配列番号 47
46	V331A、V371E、G436D、T438S、F453L、T471I、Y487H	7	配列番号 48
47	V371E、G436D、T438S、F453L、T471I、Y487H	6	配列番号 49
48	G436D、T438S、F453L、T471I、Y487H	5	配列番号 50
49	T438S、F453L、T471I、Y487H	4	配列番号 51
50	F453L、T471I、Y487H	3	配列番号 52
51	T471I、Y487H	2	配列番号 53
52	Y487H	1	配列番号 54

調製例 5 3 ～ 5 7

【 0 3 8 4 】

調製例 5 3 ～ 5 7 は、それぞれ腫瘍溶解性ウイルスが提供され、その相違としては、主に、野生型腫瘍溶解性ウイルスの M タンパク質、G タンパク質、N タンパク質上のアミノ酸部位特異的変異の部位である。ここで、M タンパク質、G タンパク質の変異部位は、調製例 4 1 において対応する変異部位と同じであり、N タンパク質の変異部位を表 3 に示す。

【0385】

上述調製例で提供される腫瘍溶解性ウイルスの構築方法は、調製例41の構築方法に比べて、相違として、

工程(1)の構築プラスミドにおいてPCR技術を用いて表3に示される変異部位を導入すること、

工程(3)がNタンパク質遺伝子配列決定であることにある。Trizolキットを用いてウイルスゲノムRNAを抽出し、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行い、Nタンパク質遺伝子配列に対して設計したプライマーを用いて逆転写されたcDNAに対してPCRを行い、

プライマー配列としては、下記の通りである。

PF: ATGTCTGTTACAGTCAAGAG ;

PR: TCATTTGTCAAATTCTGACTT。

【0386】

産物を1%アガロースゲル電気泳動で回収し、配列決定会社にとって配列決定会社を行う。配列決定結果を表3に示す。

【0387】

表3 調製例53～57における腫瘍溶解性ウイルスのNタンパク質の変異テーブル

調製例	変異部位及び変異したアミノ酸	変異部位数	アミノ酸配列
53	I14V	1	配列番号 56
54	I14V、R155K	2	配列番号 57
55	I14V、R155K、S353N	3	配列番号 58
56	R155K、S353N	2	配列番号 59
57	S353N	1	配列番号 60

調製例58～76

【0388】

調製例58～76は、それぞれ腫瘍溶解性ウイルスが提供され、その相違としては、主に、野生型腫瘍溶解性ウイルスのMタンパク質、Gタンパク質、Nタンパク質、Pタンパク質上のアミノ酸部位特異的変異の部位である。ここで、Mタンパク質、Gタンパク質、Nタンパク質の変異部位は、調製例55において対応する変異部位と同じであり、Pタンパク質の変異部位を表3に示す。

【0389】

上述調製例で提供される腫瘍溶解性ウイルスの構築方法は、調製例55の構築方法に比べて、相違として、

工程(1)の構築プラスミドにおいてPCR技術を用いて表4に示される変異部位を導入すること、

工程(3)がPタンパク質遺伝子配列決定であることにある。Trizolキットを用いてウイルスゲノムRNAを抽出し、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行い、Pタンパク質遺伝子配列に対して設計したプライマーを用いて逆転写されたcDNAに対してPCRを行い、

プライマー配列としては、下記の通りである。

PF: ATGGATAATCTCACAAAAGTTTCG ;

PR: CTACAGAGAATATTTGACTCTCG。

【0390】

産物を1%アガロースゲル電気泳動で回収し、配列決定会社にとって配列決定会社を行う。配列決定結果を表4に示す。

【0391】

表4 調製例58～76における腫瘍溶解性ウイルスのPタンパク質の変異テーブル

10

20

30

40

50

調製例	変異部位及び変異したアミノ酸	変異部位数	アミノ酸配列
58	R50K	1	配列番号 62
59	R50K、V76A	2	配列番号 63
60	R50K、V76A、D99E	3	配列番号 64
61	R50K、V76A、D99E、L126S	4	配列番号 65
62	R50K、V76A、D99E、L126S、L140S	5	配列番号 66
63	R50K、V76A、D99E、L126S、L140S、H151Y	6	配列番号 67
64	R50K、V76A、D99E、L126S、L140S、H151Y、I168M	7	配列番号 68
65	R50K、V76A、D99E、L126S、L140S、H151Y、I168M、K170E	8	配列番号 69
66	R50K、V76A、D99E、L126S、L140S、H151Y、I168M、K170E、Y189S	9	配列番号 70
67	R50K、V76A、D99E、L126S、L140S、H151Y、I168M、K170E、Y189S、N237D	10	配列番号 71
68	V76A、D99E、L126S、L140S、H151Y、I168M、K170E、Y189S、N237D	9	配列番号 72
69	D99E、L126S、L140S、H151Y、I168M、K170E、Y189S、N237D	8	配列番号 73
70	L126S、L140S、H151Y、I168M、K170E、Y189S、N237D	7	配列番号 74
71	L140S、H151Y、I168M、K170E、Y189S、N237D	6	配列番号 75
72	H151Y、I168M、K170E、Y189S、N237D	5	配列番号 76
73	I168M、K170E、Y189S、N237D	4	配列番号 77
74	K170E、Y189S、N237D	3	配列番号 78
75	Y189S、N237D	2	配列番号 79
76	N237D	1	配列番号 80

調製例 77～79

【0392】

調製例 77～79 は、それぞれ腫瘍溶解性ウイルスが提供され、その相違としては、主に、野生型腫瘍溶解性ウイルスの M タンパク質、G タンパク質、N タンパク質、P タンパク質、L タンパク質上のアミノ酸部位特異的変異の部位である。ここで、M タンパク質、G タンパク質、N タンパク質、P タンパク質の変異部位は、調製例 67 において対応する変異部位と同じであり、L タンパク質の変異部位を表 5 に示す。

【0393】

上述調製例で提供される腫瘍溶解性ウイルスの構築方法は、調製例 67 の構築方法に比べて、相違として、

工程（1）の構築プラスミドにおいて PCR 技術を用いて表 5 に示される変異部位を導入すること、

工程（3）が L タンパク質遺伝子配列決定であることにある。Trizol キットを用いてウイルスゲノム RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行い、L タンパク質遺伝子配列に対して設計したプライマーを用いて逆転写された cDNA に対して PCR を行い、

プライマー配列としては、下記の通りである。

PF: ATGGAAGTCCACGATTTTGA ;

PR: TTAATCTCTCCAAGAGTTTTCCT。

【0394】

産物を1%アガロースゲル電気泳動で回収し、配列決定会社によって配列決定会社を行う。配列決定結果を表5に示す。

【0395】

表5 調製例77～79における腫瘍溶解性ウイルスのLタンパク質の変異データ

調製例	変異部位及び変異したアミノ酸	変異部位数	アミノ酸配列
77	S87P	1	配列番号 82
78	S87P、I487T	2	配列番号 83
79	I487T	1	配列番号 84

10

調製例80

【0396】

本調製例は、上記調製例1～79のいずれか一項の調製例により調製された腫瘍溶解性ウイルスのパッケージングプロセスが提供され、具体的に、下記の工程を含み、

1) T7 RNAポリメラーゼを発現するボックスウイルスvTF7-3 (Bio Vector NTCCプラスミド担体菌種細胞遺伝子保蔵中心)を用いて、BSR-T7細胞(ATCCから購買された)を感染し接種する。

【0397】

具体的なプロセス: BSR-T7細胞を6ウェルプレートに敷設し、ウェルあたりの細胞数を 3×10^5 に達するように制御し、敷設の14～16時間後にT7 RNAポリメラーゼを発現するボックスウイルスvTF7-3を加入し、ボックスウイルスvTF7-3によるBSR-T7細胞への感染を行い、6時間感染した後、DPBS緩衝液(Thermo Fisher Scientific)を用いてBSR-T7細胞を一回すすぎ、トランスフェクションを行う。

20

2) トランスフェクションプロセス

【0398】

具体的に下記の工程を含む。pRV-core Mut、pP、pN、pLの質量比例10:5:4:1に従って、4つのプラスミドを混合させ、プラスミド総量が5μgであり、200μl opti-MEM培地(Thermo Fisher Scientific)を用いてプラスミドを希釈し7.5μlのトランスフェクション試薬Plus Reagent (Life Technologies)を加入し、トランスフェクションプラスミドプレミックス液を取得し、ここで、pP(バキュロウイルスリンタンパク質遺伝子を担持するプラスミド)、pN(バキュロウイルス核タンパク質遺伝子を担持するプラスミド)、pL(バキュロウイルスポリメラーゼタンパク質遺伝子を担持するプラスミド)であり、pN、pP、pLの3つのプラスミドが対応する母体担体はいずれもpCAGGS(ATCCから購買された)であり、

30

200μlのopti-MEM培地を用いて10μlのLipofectamine LTX(Thermo Fisher Scientific)を希釈し、LTX混合液を取得し、

200μlのLTX混合液と200μlのトランスフェクションプラスミドプレミックス液を混合させ、室温で15分間孵化させ、LTX-DNA混合液を取得し、

40

工程1)の6ウェルプレート中のDPBS緩衝液をOpti-MEM培地に切り替え、LTX-DNA混合液をBSR-T7細胞を培養する6ウェルプレート中に加入し、6ウェルプレートを優しく振り、LTX-DNA混合液を6ウェルプレート内に均一に分布し、6～8時間トランスフェクションを行った後、トランスフェクション試薬を吸い、3mlの新鮮な完全培地(Thermo Fisher Scientific)を加入し、72時間の後に、BSR-T7細胞の細胞上澄みを取得し、0.22μmフィルターを用いて濾過し、調製例1～79のそれぞれ対応する腫瘍溶解性ウイルスを取得する。

実施例

実施例1

50

【0399】

本実施例は、調製例1～79で調製された腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスをそれぞれ用いて、異なる細胞の感染能力について試験検出を行う。

【0400】

検出方法はTCID₅₀検出法であり、即ち異なる細胞の培養液で、調製例1～79及び野生型腫瘍溶解性ウイルスをそれぞれ200pfu加入し、各腫瘍溶解性ウイルスによって産生された組織培養感染量の半分（Tissue culture infective dose, TCID₅₀）を検出する。

【0401】

検出された細胞は、LLC細胞（マウス肺がん細胞株）、4T1細胞（マウス乳がん細胞株）、MC38細胞（マウス結腸がん細胞株）、Hela細胞（ヒト子宮頸がん細胞株）、MEF細胞（ヒト線維芽細胞株）を含む。

【0402】

具体的な検出方法としては、

（1）6ウェル培養プレートに3mLのVero（LLC／4T1／MC38／Hela／MEF）細胞懸濁液を加入し、細胞量を 4×10^5 細胞／ウェルに達するようにし、合計6つのウェルがあり、そのうち、MEF細胞の場合に2つのウェルがあり、6ウェル培養プレートを37℃、5% CO₂の環境条件で16時間培養し、

（2）6ウェル培養プレートのそれぞれのウェルに、調製例で調製された腫瘍溶解性ウイルスをそれぞれ200pfu加入し、24時間後にMEF細胞及び各Vero細胞の上澄みを100μL取得し、取得した上澄みを96ウェル培養プレートのウェルに加入し、各細胞の細胞量を 1×10^4 細胞／mLに達するようにし、96ウェル培養プレートを37℃、5% CO₂の環境条件で16時間培養し、

（3）1.5mLのEP管において、工程（2）で取得した上澄みを連続10倍希釈し、 10^{-1} から 10^{-11} まで、合計11の力価があり、希釈された上澄みを96ウェル培養プレートに接種し、各希釈度ごとに1列、合計8ウェルに接種し、ウェルごとに100μL接種し、

（4）48時間の後、各ウェル細胞の蛍光状況を観察し、蛍光があると、該ウェルが感染されたと記し、Karber法に従ってTCID₅₀を算出する。

【0403】

検出結果を図1～図5に示す。ここで、横軸0は、野生型腫瘍溶解性ウイルスを表し、横軸1～79は、調製例1～79で調製された腫瘍溶解性ウイルスをそれぞれ表し、縦軸Log₁₀ TCID₅₀は、Karber法により算出されたTCID₅₀値を表し、Log₁₀ TCID₅₀の値が大きいほど、腫瘍溶解性ウイルスの該細胞への感染能力が良くなることが表され、Log₁₀ TCID₅₀の値が小さいほど、腫瘍溶解性ウイルスの該細胞への感染能力が低くなることが表される。

【0404】

図1は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスのLLC細胞への感染能力の検出結果である。

図2は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスの4T1細胞への感染能力の検出結果である。

図3は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスのMC38細胞への感染能力の検出結果である。

図4は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスのHela細胞への感染能力の検出結果である。

図5は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスのMEF細胞への感染能力の検出結果である。

【0405】

上記図面から分かるように、本出願の調製例1～79で調製された腫瘍溶解性ウイルスは、いずれもLLC細胞、4T1細胞、MC38細胞及びHela細胞に対してよい感染能

10

20

30

40

50

力を有し、特に調製例 77～79 で提供される腫瘍溶解性ウイルスの LLC 細胞、4T1 細胞、MC38 細胞及び HeLa 細胞への感染能力は、野生型腫瘍溶解性ウイルスの感染能力に達する。同時に、上記調製された腫瘍溶解性ウイルス、特に調製例 77～79 で提供される腫瘍溶解性ウイルスは、いずれも MEF 細胞への感染能力が低く、本出願で調製された腫瘍溶解性ウイルスが腫瘍、癌等の細胞の感染によく用いられることができると同時に、正常細胞を損傷することなく、幅広い応用の可能性を秘めていることが表される。

実施例 2

【0406】

本実施例は、調製例 1～79 で調製された腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスをそれぞれ用いて、異なる細胞に対してインビトロ殺傷試験検出を行う。

【0407】

検出方法は MTT 検出法であり、即ち異なる細胞の培養液に、調製例 1～79 及び野生型腫瘍溶解性ウイルスをそれぞれ 200 p f u 加入し、24 時間の後、MTT 検出法により細胞活性を検出する。

【0408】

検出された細胞は、LLC 細胞、4T1 細胞、MC38 細胞、HeLa 細胞、MEF 細胞を含む。

【0409】

具体的な検出方法としては、

(1) 96 ウェル培養プレートに 100 μ l の V e r o (L L C / 4 T 1 / M C 3 8 / H e l a / M E F) 細胞懸濁液を加入し、細胞量を 1×10^4 細胞 / ウェルに達するようにし、96 ウェル培養プレートを 37℃、5% CO₂ の環境条件で 16 時間培養し、

(2) 調製例で調製された腫瘍溶解性ウイルスを MOI (感染多重度) がそれぞれ 0.001、0.01、0.1、1.0 になるまで希釈し、それぞれの希釈勾配の腫瘍溶解性ウイルスを工程 (1) の 96 ウェル培養プレートにそれぞれ接種し、希釈勾配ごとに 4 ウェルに接種し、ウェルごとに 100 μ l 接種し、96 ウェル培養プレートを 37℃、5% CO₂ の環状条件で 40 時間培養し、

(3) 工程 (2) の 96 ウェル培養プレート中の細胞上澄みを取り出し、96 ウェル培養プレートに新鮮な培地及び MTT 溶液を加入し、加入量を 20 μ L / ウェルとし、96 ウェル培養プレートを 37℃、5% CO₂ の環境条件で 4 時間培養し、

(4) 96 ウェル培養プレートを室温で 5 分間遠心分離し、回転速度を 2500 r p m / m i n に設定し、1 m L 使い捨て滅菌注射器を用いて上澄みを優しく吸い取り、そして 96 ウェル培養プレートの各ウェルに DMSO を加入し、加入量を 100 μ l / ウェルとし、37℃の環境条件で 10 分間置く。多機能マイクロプレートリーダーを用いて、2 分間振り、570 nm 又は 490 nm の波長で 96 ウェル培養プレート上の各ウェルの OD 値を測定する。

【0410】

検出結果を図 6～図 10 に示す。ここで、横軸 0 は、野生型腫瘍溶解性ウイルスを表し、横軸 1～79 は、調製例 1～79 で調製された腫瘍溶解性ウイルスをそれぞれ表し、縦軸 OD₅₇₀ は細胞の OD 値を表し、OD₅₇₀ の値が大きいほど、腫瘍溶解性ウイルスの該細胞への殺傷能力が低くなることが表され、OD₅₇₀ の値が小さいほど、腫瘍溶解性ウイルスの該細胞への殺傷能力が良くなることが表される。

【0411】

図 6 は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスの LLC 細胞へのインビトロ殺傷能力の検出結果である。

図 7 は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスの 4T1 細胞へのインビトロ殺傷能力の検出結果である。

図 8 は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスの MC38 細胞へのインビトロ殺傷能力の検出結果である。

10

20

30

40

50

図 9 は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスの H e l a 細胞へのインビトロ殺傷能力の検出結果である。

図 10 は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスの M E F 細胞へのインビトロ殺傷能力の検出結果である。

【0412】

上記図面から分かるように、本出願の調製例 1～79 で調製された腫瘍溶解性ウイルスは、いずれも L L C 細胞、4 T 1 細胞、M C 3 8 細胞及び H e l a 細胞に対してよいインビトロ殺傷能力を有し、特に、調製例 77～79 で提供される腫瘍溶解性ウイルスは、L L C 細胞、4 T 1 細胞、M C 3 8 細胞及び H e l a 細胞へのインビトロ殺傷能力が、野生型腫瘍溶解性ウイルスのインビトロ殺傷能力を超える。同時に、上記調製された腫瘍溶解性ウイルスは、M E F 細胞へ殺傷作用がほとんどなく、本出願で調製された腫瘍溶解性ウイルスが腫瘍、癌等の非正常細胞の損傷及び致死によく用いられることができると同時に、正常細胞を損傷することがないことが表される。

野生型腫瘍溶解性ウイルスは、L L C 細胞、M C 3 8 細胞及び 4 T 1 細胞に対してよいインビトロ殺傷能力を有するが、それが上記細胞を損傷、致死すると同時に、M E F 細胞を大幅に損傷、致死し、野生型腫瘍溶解性ウイルスの臨床応用を制限する。従って、本出願による野生型腫瘍溶解性ウイルスの改変は、腫瘍溶解性ウイルスによる正常細胞の安全性を保証すると同時に、腫瘍溶解性ウイルスの腫瘍、癌細胞への殺傷能力をも保証し、幅広い臨床応用の可能性を秘めている。

実施例 3

【0413】

本実施例は、調製例 1～79 で調製された腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスの異なる細胞内で I F N - β の発現を誘導する状況に対して試験検出を行う。

【0414】

検出インジケータは、遺伝子 I F N - β の異なる細胞内での発現状況である。遺伝子 I F N - β は、細胞が産生した、幅広い抗ウイルス、抗腫瘍、免疫調節効果がある可溶性糖タンパク質遺伝子であり、遺伝子 I F N - β の発現状況から、細胞による腫瘍溶解性ウイルスへの除去能力を判断することができ、遺伝子 I F N - β の発現が高い場合に、腫瘍溶解性ウイルスが細胞内で除去されやすいことが表され、遺伝子 I F N - β の発現が低い場合に、腫瘍溶解性ウイルスが細胞内で除去され難いことが表される。

【0415】

検出された細胞は、L L C 細胞、4 T 1 細胞、M C 3 8 細胞、H e l a 細胞、M E F 細胞を含む。

【0416】

具体的な検出方法としては、

(1) 96 ウェル培養プレートに 100 μ l の V e r o (L L C / 4 T 1 / M C 3 8 / H e l a / M E F) 細胞懸濁液を加入し、細胞量を 1×10^4 細胞 / ウェルに達するようにし、96 ウェル培養プレートを 37 $^{\circ}$ C、5 % C O ₂ の環境条件で 16 時間培養し、

(2) 調製例で調製された腫瘍溶解性ウイルスを M O I (感染多重度) がそれぞれ 0.001、0.01、0.1、1.0 になるまで希釈し、それぞれの希釈勾配の腫瘍溶解性ウイルスを工程 (1) の 96 ウェル培養プレートにそれぞれ接種し、希釈勾配ごとに 4 ウェルに接種し、ウェルごとに 100 μ l 接種し、96 ウェル培養プレートを 37 $^{\circ}$ C、5 % C O ₂ の環状条件で 40 時間培養し、

(3) 工程 (2) で培養し取得された各セットの細胞を破碎し、T R I z o l (I n v i t r o g e n) を用いて各細胞から総 RNA を抽出し、P r i m e S c r i p t R T R e a g e n t K i t w i t h D N A E r a s e r (T a k a r a) 逆転写キットを用いて c D N A として逆転写し、L i g h t C y c l e r 4 8 0 S Y B R G r e e n I M a s t e r (R o c h e) 染料を用いて染色し、L i g h t C y c l e r 4 8 0 定量 P C R 機器で各遺伝子の C t 値を検出する。 $\Delta \Delta C t$ 法により標的遺伝子 I F N - β の相対的発現量を算出する。

10

20

30

40

50

【0417】

検出結果を図11～図15に示す。ここで、横軸0は野生型腫瘍溶解性ウイルスを表し、横軸1～79は、調製例1～79で調製された腫瘍溶解性ウイルスをそれぞれ表し、縦軸IFN-βレベルは、IFN-β遺伝子の発現状況を表し、IFN-βレベルの値が大きいほど、腫瘍溶解性ウイルスの該細胞内での生殖能力が弱くなり、除去されやすくなることが表され、IFN-βレベルの値が小さいほど、腫瘍溶解性ウイルスの該細胞内での生殖能力が強くなり、除去され難くなることが表される。

【0418】

図11は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスがLLC細胞内でIFN-βの発現を誘導する状況である。

10

図12は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスが4T1細胞内でIFN-βの発現を誘導する状況である。

図13は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスがMC38細胞内でIFN-βの発現を誘導する状況である。

図14は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスがHela細胞内でIFN-βの発現を誘導する状況である。

図15は、本出願で調製される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスがMEF細胞内でIFN-βの発現を誘導する状況である。

【0419】

上記図面から分かるように、本出願の調製例1及び調製例21で提供される腫瘍溶解性ウイルス及び野生型腫瘍溶解性ウイルスは、LLC細胞、4T1細胞、MC38細胞及びHela細胞内での生殖能力が弱く、いずれも除去されやすい。相対的に言えば、調製例2～20、22～79で提供される腫瘍溶解性ウイルスは、LLC細胞、4T1細胞、MC38細胞及びHela細胞内でさらに除去されにくくなる。特に、調製例77～79で提供される腫瘍溶解性ウイルスは、LLC細胞、4T1細胞、MC38細胞及びHela細胞内でさらに除去されにくくなり、腫瘍溶解性ウイルスがLLC細胞、4T1細胞、MC38細胞及びHela細胞内で感染及び殺傷の能力をよりよく発揮させるようにさらに保証する。同時に、本出願で提供される腫瘍溶解性ウイルスは、MEF細胞内でさらに除去されやすくなり、MEF細胞の安全性をさらに保証し、よって腫瘍溶解性ウイルスの安全性を向上させる。

20

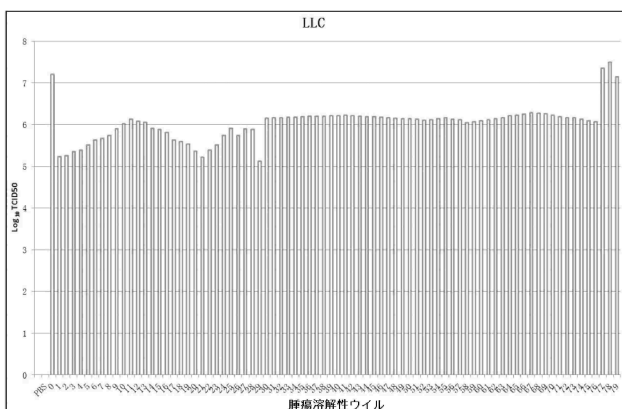
30

【0420】

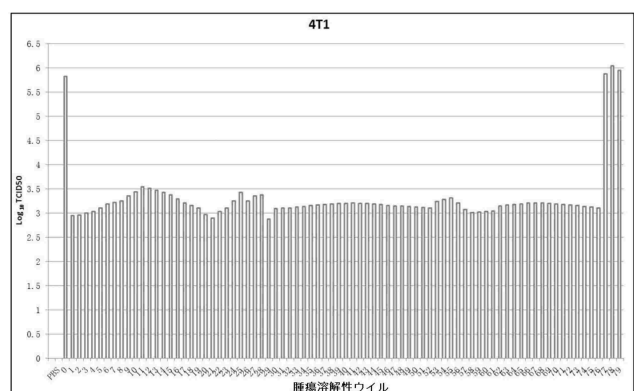
本具体的な実施例は本出願の説明にすぎず、本出願を制限するものではなく、当業者は本明細書を読んだ後、必要に応じて本実施例に対して創造的な貢献を伴わない補正を行うことができるが、本出願の特許請求の範囲内であれば、すべて専利法によって保護される。

【図面】

【図1】



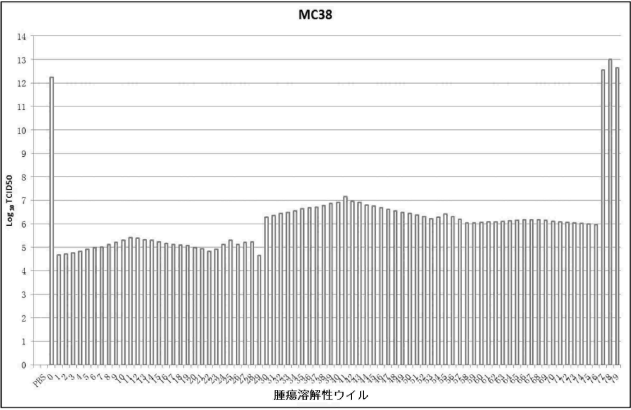
【図2】



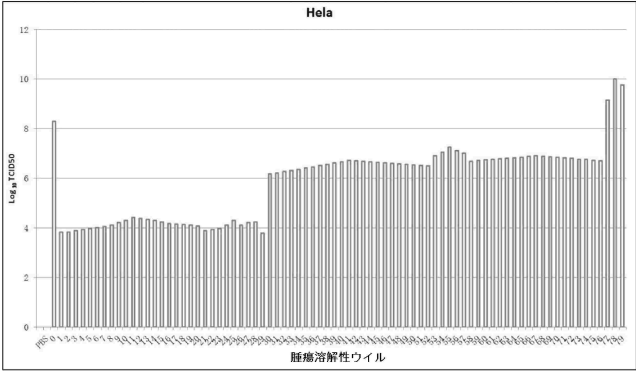
40

50

【図 3】

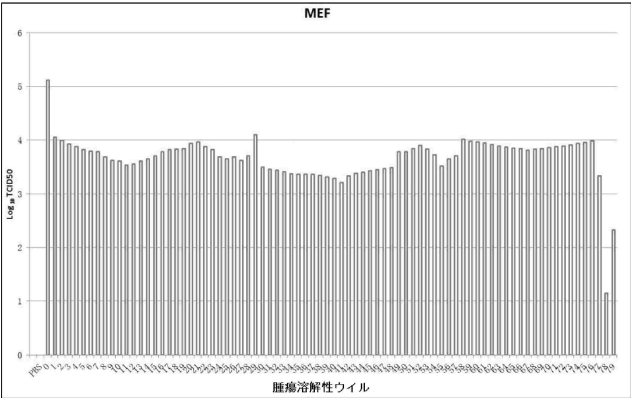


【図 4】

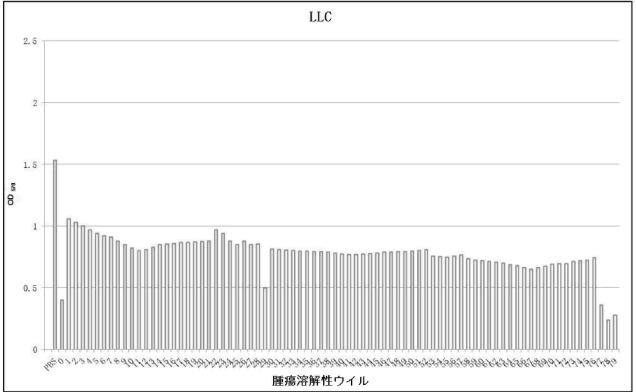


10

【図 5】

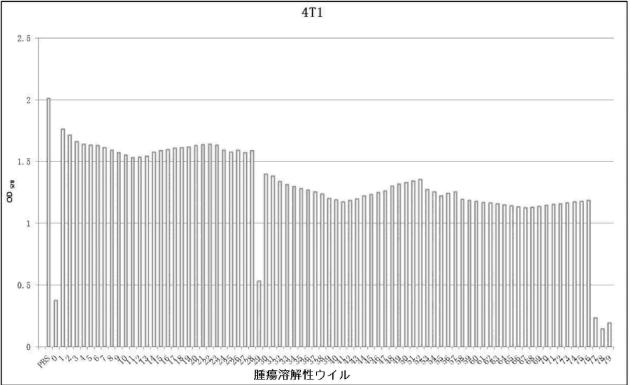


【図 6】

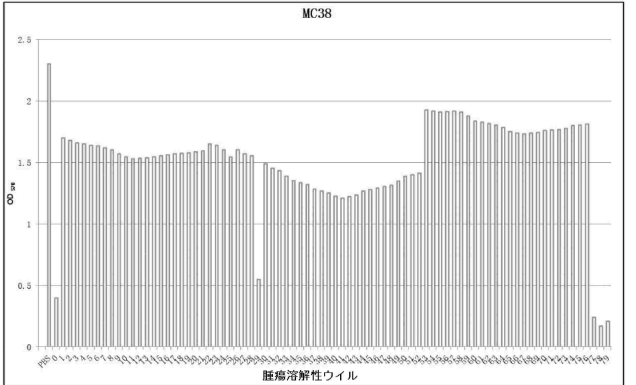


20

【図 7】



【図 8】

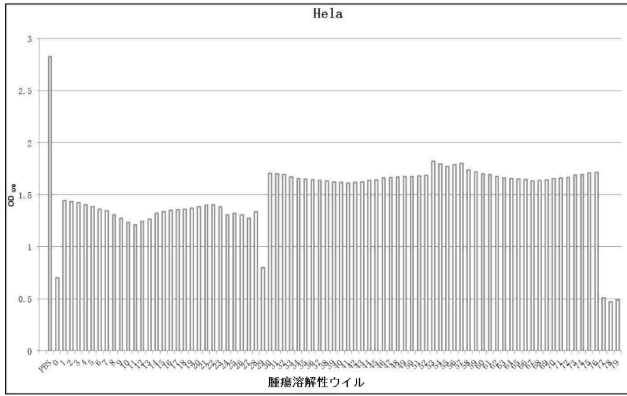


30

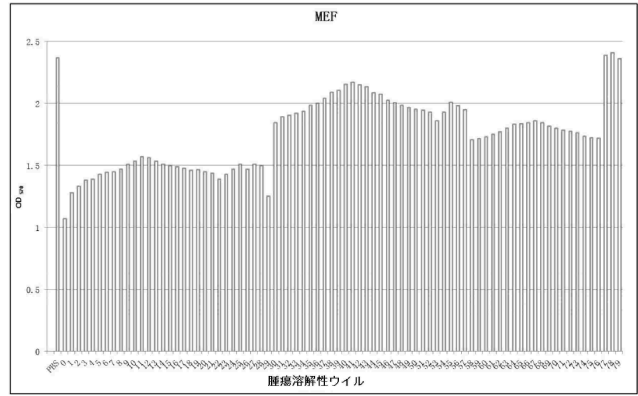
40

50

【図 9】

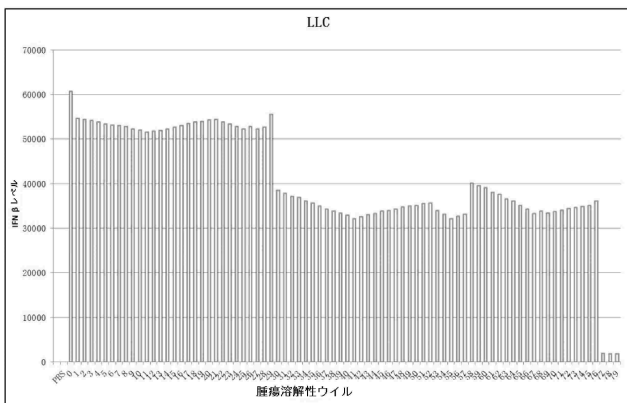


【図 10】

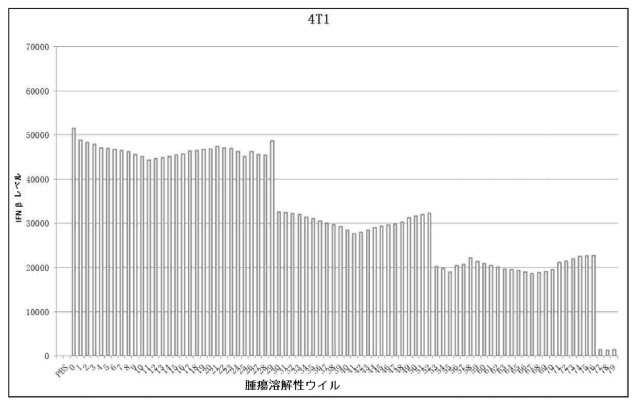


10

【図 11】

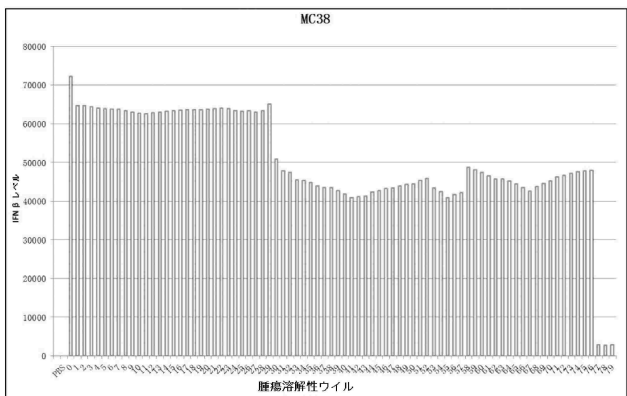


【図 12】

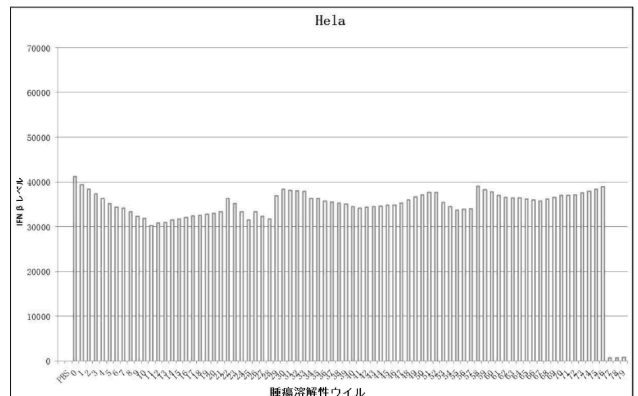


20

【図 13】



【図 14】

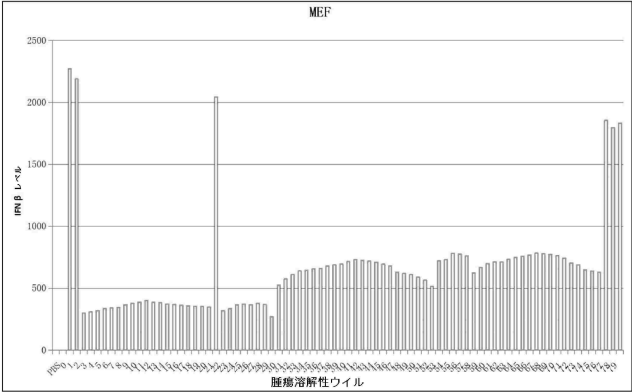


30

40

50

【図 15】



10

【配列表】

202550318800001.xml

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和6年8月26日(2024.8.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

腫瘍溶解性ウイルスであって、

10

前記腫瘍溶解性ウイルスは、Mタンパク質を含み、前記Mタンパク質は、配列番号1に示されるアミノ酸配列に比べて、第32部位、第33部位、第49部位、第54部位、第133部位、第225部位のうちの一つまたは複数の部位のアミノ酸置換を含むことを特徴とする腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項2】

前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、第32部位にあるアスパラギンからセリンへの変異(N32S)、及び／又は、第33部位にあるメチオニンからアラニンへの変異(M33A)、及び／又は、第49部位にあるアスパラギンからアスパラギン酸への変異(N49D)、及び／又は、第54部位にあるヒスチジンからチロシンへの変異(H54Y)、及び／又は、第133部位にあるアラニンからトレオニンへの変異(A133T)、及び／又は、第225部位にあるバリンからイソロイシンへの変異(V225I)を含むことを特徴とする請求項1に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

20

【請求項3】

腫瘍溶解性ウイルスであって、

前記Mタンパク質は、第21部位、第51部位、第111部位、第221部位及び第226部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含むことを特徴とする請求項2に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項4】

前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、第21部位にあるグリシンからグルタミン酸への変異(G21E)をさらに含み、及び／又は、前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、第51部位にあるメチオニンからアルギニンへの変異(M51R)、及び／又は、第51部位にあるメチオニンからアラニンへの変異(M51A)、及び／又は、第111部位にあるロイシンからアラニンへの変異(L111A)、及び／又は、第221部位にあるバリンからフェニルアラニンへの変異(V221F)、及び／又は、第226部位にあるセリンからアルギニンへの変異(S226R)を含むことを特徴とする請求項3に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

30

【請求項5】

前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、下記のいずれか一つとして選択され、

- 1) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換はG21E、N32Sを含み、
- 2) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G21E、N32S、M33Aを含み、
- 3) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G21E、N32S、M33A、N49Dを含み、
- 4) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G21E、N32S、M33A、N49D、H54Yを含み、
- 5) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G21E、N32S、M33A、N49D、H54Y、L111Aを含み、
- 6) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G21E、N32S、M33A、N49D、H54Y、L111A、A133T；
- 7) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G21E、N32S、M33A、N49D、H54Y、L111A、A133T、V225Iを含み、

40

50

8) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G 2 1 E、N 3 2 S、M 3 3 A、N 4 9 D、M 5 1 R、H 5 4 Y、L 1 1 1 A、A 1 3 3 T、V 2 2 5 Iを含み、

9) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G 2 1 E、N 3 2 S、M 3 3 A、N 4 9 D、M 5 1 R、H 5 4 Y、L 1 1 1 A、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 Iを含み、

10) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G 2 1 E、N 3 2 S、M 3 3 A、N 4 9 D、M 5 1 R、H 5 4 Y、L 1 1 1 A、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

11) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、N 3 2 S、M 3 3 A、N 4 9 D、M 5 1 R、H 5 4 Y、L 1 1 1 A、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

12) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、M 3 3 A、N 4 9 D、M 5 1 R、H 5 4 Y、L 1 1 1 A、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

13) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、N 4 9 D、M 5 1 R、H 5 4 Y、L 1 1 1 A、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

14) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、M 5 1 R、H 5 4 Y、L 1 1 1 A、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

15) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、H 5 4 Y、L 1 1 1 A、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

16) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、L 1 1 1 A、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

17) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

18) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

19) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

20) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、S 2 2 6 Rを含み、

21) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、N 3 2 S、N 4 9 D、H 5 4 Y、V 2 2 5 Iを含み、

22) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、N 3 2 S、N 4 9 D、H 5 4 Y、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Gを含み、

23) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、N 3 2 S、N 4 9 D、M 5 1 R、H 5 4 Y、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

24) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、N 3 2 S、M 3 3 A、N 4 9 D、M 5 1 R、H 5 4 Y、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

25) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、N 3 2 S、N 4 9 D、M 5 1 R、H 5 4 Y、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

26) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、N 3 2 S、M 3 3 A、N 4 9 D、M 5 1 R、H 5 4 Y、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含み、

27) 前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G 2 1 E、N 3 2 S、N 4 9 D、M 5 1 A、H 5 4 Y、L 1 1 1 A、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含む

ことを特徴とする請求項1に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項6】

前記Mタンパク質のアミノ酸置換は、G 2 1 E、N 3 2 S、M 3 3 A、N 4 9 D、M 5 1 R、H 5 4 Y、L 1 1 1 A、A 1 3 3 T、V 2 2 1 F、V 2 2 5 I、S 2 2 6 Rを含むことを特徴とする請求項5に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項7】

前記Mタンパク質は、配列番号12に示されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項5に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項8】

腫瘍溶解性ウイルスであって、

Mタンパク質を含み、前記Mタンパク質は、配列番号1に示されるアミノ酸配列に比べて

第 3 2 部位、第 3 3 部位、第 4 9 部位、第 5 4 部位、第 1 3 3 部位、第 2 2 5 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、或いは、第 2 1 部位、第 5 1 部位、第 1 1 1 部位、第 2 2 1 部位及び第 2 2 6 部位のうちの一つまたは複数の部位のアミノ酸置換を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスは G タンパク質をさらに含み、前記 G タンパク質は、配列番号 3 1 に示されるアミノ酸配列に比べて、第 4 3 8 部位、第 4 5 3 部位、第 4 7 1 部位及び第 4 8 7 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含む
ことを特徴とする腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 9】

前記 G タンパク質は、第 5 3 部位、第 1 4 1 部位、第 1 7 2 部位、第 2 1 7 部位、第 2 3 2 部位、第 3 3 1 部位、第 3 7 1 部位、第 4 3 6 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換をさらに含む
ことを特徴とする請求項 8 に記載の腫瘍溶解性ウイルス。 10

【請求項 10】

前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、第 5 3 部位にあるバリンからイソロイシンへの変異 (V 5 3 I)、及び／又は、第 1 4 1 部位にあるアラニンからバリンへの変異 (A 1 4 1 V)、及び／又は、第 1 7 2 部位にあるアスパラギン酸からチロシンへの変異 (D 1 7 2 Y)、及び／又は、第 2 1 7 部位のリジンからグルタミン酸への変異 (K 2 1 7 E)、及び／又は、第 2 3 2 部位にあるアスパラギン酸からグリシンへの変異 (D 2 3 2 G)、及び／又は、第 3 3 1 部位にあるバリンからアラニンへの変異 (V 3 3 1 A)、及び／又は、第 3 7 1 部位にあるバリンからグルタミン酸への変異 (V 3 7 1 E)、及び／又は、第 4 3 6 部位にあるグリシンからアスパラギン酸への変異 (G 4 3 6 D)、及び／又は、第 4 3 8 部位にあるトレオニンからセリンへの変異 (T 4 3 8 S)、及び／又は、第 4 5 3 部位にあるフェニルアラニンからロイシンへの変異 (F 4 5 3 L)、及び／又は、第 4 7 1 部位にあるトレオニンからイソロイシンへの変異 (T 4 7 1 I)、及び／又は、第 4 8 7 部位にあるチロシンからヒスチジンへの変異 (Y 4 8 7 H) を含む
ことを特徴とする請求項 8 または 9 に記載の腫瘍溶解性ウイルス。 20

【請求項 11】

前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、下記のいずれか一つとして選択され、

- 1) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 5 3 I を含み、
- 2) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 5 3 I、A 1 4 1 V を含み、 30
- 3) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y を含み、
- 4) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E を含み、
- 5) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G を含み、
- 6) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A を含み、
- 7) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E を含み、
- 8) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D を含み、 40
- 9) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S を含み、
- 10) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L を含み、
- 11) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I を含み、
- 12) 前記 G タンパク質のアミノ酸置換は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 H を含み、 50

7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 Hを含み、

1 3) 前記Gタンパク質のアミノ酸置換は、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 Hを含み、

1 4) 前記Gタンパク質のアミノ酸置換は、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 Hを含み、

1 5) 前記Gタンパク質のアミノ酸置換は、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 Hを含み、

1 6) 前記Gタンパク質のアミノ酸置換は、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 Hを含み、

1 7) 前記Gタンパク質のアミノ酸置換は、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 Hを含み、

1 8) 前記Gタンパク質のアミノ酸置換は、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 Hを含み、

1 9) 前記Gタンパク質のアミノ酸置換は、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 Hを含み、

2 0) 前記Gタンパク質のアミノ酸置換は、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 Hを含み、

2 1) 前記Gタンパク質のアミノ酸置換は、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 Hを含み、

2 2) 前記Gタンパク質のアミノ酸置換は、T 4 7 1 I、Y 4 8 7 Hを含み、

2 3) 前記Gタンパク質のアミノ酸置換は、Y 4 8 7 Hを含む

ことを特徴とする請求項 1 0 に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 1 2】

前記Gタンパク質のアミノ酸置換は、V 5 3 I、A 1 4 1 V、D 1 7 2 Y、K 2 1 7 E、D 2 3 2 G、V 3 3 1 A、V 3 7 1 E、G 4 3 6 D、T 4 3 8 S、F 4 5 3 L、T 4 7 1 I及びY 4 8 7 Hを含む

ことを特徴とする請求項 1 1 に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 1 3】

前記Gタンパク質は、配列番号 4 3 に示されるアミノ酸配列を含む

ことを特徴とする請求項 1 1 に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 1 4】

腫瘍溶解性ウイルスであって、

Mタンパク質を含み、前記Mタンパク質は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列に比べて、第 3 2 部位、第 3 3 部位、第 4 9 部位、第 5 4 部位、第 1 3 3 部位、第 2 2 5 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、或いは、第 2 1 部位、第 5 1 部位、第 1 1 1 部位、第 2 2 1 部位及び第 2 2 6 部位のうちの一つまたは複数の部位のアミノ酸置換を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスはNタンパク質をさらに含み、前記Nタンパク質は、配列番号 5 5 に示されるアミノ酸配列に比べて、第 1 4 部位、第 1 5 5 部位、第 3 5 3 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含む

ことを特徴とする腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 1 5】

腫瘍溶解性ウイルスであって、

Mタンパク質を含み、前記Mタンパク質は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列に比べて、第 3 2 部位、第 3 3 部位、第 4 9 部位、第 5 4 部位、第 1 3 3 部位、第 2 2 5 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、或いは、第 2 1 部位、第 5 1 部位、第 1 1 1 部位、第 2 2 1 部位及び第 2 2 6 部位のうちの一つまたは複数の部位のアミノ酸置換を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスはGタンパク質をさらに含み、前記Gタンパク質は、配

列番号 3 1 に示されるアミノ酸配列に比べて、第 4 3 8 部位、第 4 5 3 部位、第 4 7 1 部位及び第 4 8 7 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、或いは、第 5 3 部位、第 1 4 1 部位、第 1 7 2 部位、第 2 1 7 部位、第 2 3 2 部位、第 3 3 1 部位、第 3 7 1 部位、第 4 3 6 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスは N タンパク質をさらに含み、前記 N タンパク質は、配列番号 5 5 に示されるアミノ酸配列に比べて、第 1 4 部位、第 1 5 5 部位、第 3 5 3 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含む

ことを特徴とする腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 1 6】

前記 N タンパク質のアミノ酸置換は、第 1 4 部位にあるイソロイシンからバリンへの変異（I 1 4 V）、及び／又は、第 1 5 5 部位にあるアルギニンからリジンへの変異（R 1 5 5 K）、及び／又は、第 3 5 3 部位にあるセリンからアスパラギンへの変異（S 3 5 3 N）を含む

10

ことを特徴とする請求項 1 4 又は 1 5 に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 1 7】

前記 N タンパク質のアミノ酸置換は、下記のいずれか一つとして選択され、

- 1) 前記 N タンパク質のアミノ酸置換は、I 1 4 V を含み、
- 2) 前記 N タンパク質のアミノ酸置換は、I 1 4 V、R 1 5 5 K を含み、
- 3) 前記 N タンパク質のアミノ酸置換は、I 1 4 V、R 1 5 5 K、S 3 5 3 N を含み、
- 4) 前記 N タンパク質のアミノ酸置換は、R 1 5 5 K、S 3 5 3 N を含み、
- 5) 前記 N タンパク質のアミノ酸置換は、S 3 5 3 N を含む

20

ことを特徴とする請求項 1 4 または 1 5 に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 1 8】

前記 N タンパク質のアミノ酸置換は、I 1 4 V、R 1 5 5 K、S 3 5 3 N を含む

ことを特徴とする請求項 1 7 に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 1 9】

前記 N タンパク質は、配列番号 5 8 に示されるアミノ酸配列を含む

ことを特徴とする請求項 1 7 に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 2 0】

腫瘍溶解性ウイルスであって、

30

M タンパク質を含み、前記 M タンパク質は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列に比べて、第 3 2 部位、第 3 3 部位、第 4 9 部位、第 5 4 部位、第 1 3 3 部位、第 2 2 5 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、或いは、第 2 1 部位、第 5 1 部位、第 1 1 1 部位、第 2 2 1 部位及び第 2 2 6 部位のうちの一つまたは複数の部位のアミノ酸置換を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスは P タンパク質をさらに含み、前記 P タンパク質は、配列番号 6 1 に示されるアミノ酸配列に比べて、第 5 0 部位、第 7 6 部位、第 9 9 部位、第 1 2 6 部位、第 1 4 0 部位、第 1 5 1 部位、第 1 6 8 部位、第 1 7 0 部位、第 1 8 9 部位、第 2 3 7 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含む

ことを特徴とする腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 2 1】

40

腫瘍溶解性ウイルスであって、

M タンパク質を含み、前記 M タンパク質は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列に比べて、第 3 2 部位、第 3 3 部位、第 4 9 部位、第 5 4 部位、第 1 3 3 部位、第 2 2 5 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、或いは、第 2 1 部位、第 5 1 部位、第 1 1 1 部位、第 2 2 1 部位及び第 2 2 6 部位のうちの一つまたは複数の部位のアミノ酸置換を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスは G タンパク質をさらに含み、前記 G タンパク質は、配列番号 3 1 に示されるアミノ酸配列に比べて、第 4 3 8 部位、第 4 5 3 部位、第 4 7 1 部位及び第 4 8 7 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、或いは、第 5 3 部位、第 1 4 1 部位、第 1 7 2 部位、第 2 1 7 部位、第 2 3 2 部位、第 3 3 1 部位、第 3 7 1 部位、第 4 3 6 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、前記腫瘍溶

50

解性ウイルスはPタンパク質をさらに含み、前記Pタンパク質は、配列番号61に示されるアミノ酸配列に比べて、第50部位、第76部位、第99部位、第126部位、第140部位、第151部位、第168部位、第170部位、第189部位、第237部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含むことを特徴とする腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項22】

腫瘍溶解性ウイルスであって、

Mタンパク質を含み、前記Mタンパク質は、配列番号1に示されるアミノ酸配列に比べて、第32部位、第33部位、第49部位、第54部位、第133部位、第225部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、或いは、第21部位、第51部位、第111部位、第221部位及び第226部位のうちの一つまたは複数の部位のアミノ酸置換を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスはGタンパク質をさらに含み、前記Gタンパク質は、配列番号31に示されるアミノ酸配列に比べて、第438部位、第453部位、第471部位及び第487部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、或いは、第53部位、第141部位、第172部位、第217部位、第232部位、第331部位、第371部位、第436部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスはNタンパク質をさらに含み、前記Nタンパク質は、配列番号55に示されるアミノ酸配列に比べて、第14部位、第155部位、第353部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスはPタンパク質をさらに含み、前記Pタンパク質は、配列番号61に示されるアミノ酸配列に比べて、第50部位、第76部位、第99部位、第126部位、第140部位、第151部位、第168部位、第170部位、第189部位、第237部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含む

10

20

ことを特徴とする腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項23】

前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、第50部位にあるアルギニンからリジンへの変異(R50K)、及び／又は、第76部位にあるバリンからアラニンへの変異(V76A)、及び／又は、第99部位にあるアスパラギンからグルタミン酸への変異(D99E)、及び／又は、第126部位にあるロイシンからセリンへの変異(L126S)、及び／又は、第140部位にあるロイシンからセリンへの変異(L140S)、及び／又は、第151部位にあるヒスチジンからチロシンへの変異(H151Y)、及び／又は、第168部位にあるイソロイシンからメチオニンへの変異(I168M)、及び／又は、第170部位にあるリジンからグルタミン酸への変異(K170E)、及び／又は、第189部位にあるチロシンからセリンへの変異(Y189S)、及び／又は、第237部位にあるアスパラギンからアスパラギン酸への変異(N237D)を含む

30

ことを特徴とする請求項20乃至22のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項24】

前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、下記のいずれか一つとして選択され、

- 1) 前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、R50Kを含み、
- 2) 前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、R50K、V76Aを含み、
- 3) 前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、R50K、V76A、D99Eを含み、
- 4) 前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、R50K、V76A、D99E、L126Sを含み、
- 5) 前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、R50K、V76A、D99E、L126S、L140Sを含み、
- 6) 前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、R50K、V76A、D99E、L126S、L140S、H151Yを含み、
- 7) 前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、R50K、V76A、D99E、L126S、L140S、H151Y、I168Mを含み、
- 8) 前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、R50K、V76A、D99E、L126S、

40

50

L 1 4 0 S、H 1 5 1 Y、I 1 6 8 M、K 1 7 0 Eを含み、

9) 前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、R 5 0 K、V 7 6 A、D 9 9 E、L 1 2 6 S、L 1 4 0 S、H 1 5 1 Y、I 1 6 8 M、K 1 7 0 E、Y 1 8 9 Sを含み、

10) 前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、R 5 0 K、V 7 6 A、D 9 9 E、L 1 2 6 S、L 1 4 0 S、H 1 5 1 Y、I 1 6 8 M、K 1 7 0 E、Y 1 8 9 S、N 2 3 7 Dを含み、

11) 前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、V 7 6 A、D 9 9 E、L 1 2 6 S、L 1 4 0 S、H 1 5 1 Y、I 1 6 8 M、K 1 7 0 E、Y 1 8 9 S、N 2 3 7 Dを含み、

12) 前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、D 9 9 E、L 1 2 6 S、L 1 4 0 S、H 1 5 1 Y、I 1 6 8 M、K 1 7 0 E、Y 1 8 9 S、N 2 3 7 Dを含み、

13) 前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、L 1 2 6 S、L 1 4 0 S、H 1 5 1 Y、I 1 6 8 M、K 1 7 0 E、Y 1 8 9 S、N 2 3 7 Dを含み、

14) 前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、L 1 4 0 S、H 1 5 1 Y、I 1 6 8 M、K 1 7 0 E、Y 1 8 9 S、N 2 3 7 Dを含み、

15) 前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、H 1 5 1 Y、I 1 6 8 M、K 1 7 0 E、Y 1 8 9 S、N 2 3 7 Dを含み、

16) 前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、I 1 6 8 M、K 1 7 0 E、Y 1 8 9 S、N 2 3 7 Dを含み、

17) 前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、K 1 7 0 E、Y 1 8 9 S、N 2 3 7 Dを含み、

18) 前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、Y 1 8 9 S、N 2 3 7 Dを含み、

19) 前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、N 2 3 7 Dを含む

ことを特徴とする請求項 2 0 乃至 2 2 のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 2 5】

前記Pタンパク質のアミノ酸置換は、R 5 0 K、V 7 6 A、D 9 9 E、L 1 2 6 S、L 1 4 0 S、H 1 5 1 Y、I 1 6 8 M、K 1 7 0 E、Y 1 8 9 S、N 2 3 7 Dを含む

ことを特徴とする請求項 2 4 に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 2 6】

前記Pタンパク質は、配列番号 7 1 に示されるアミノ酸配列を含む

ことを特徴とする請求項 2 4 に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 2 7】

腫瘍溶解性ウイルスであって、

Mタンパク質を含み、前記Mタンパク質は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列に比べて、第 3 2 部位、第 3 3 部位、第 4 9 部位、第 5 4 部位、第 1 3 3 部位、第 2 2 5 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、或いは、第 2 1 部位、第 5 1 部位、第 1 1 1 部位、第 2 2 1 部位及び第 2 2 6 部位のうちの一つまたは複数の部位のアミノ酸置換を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスは、Lタンパク質をさらに含み、前記Lタンパク質は、配列番号 8 1 に示されるアミノ酸配列に比べて、第 8 7 部位、第 4 8 7 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含む

ことを特徴とする腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 2 8】

Mタンパク質を含み、前記Mタンパク質は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列に比べて、第 3 2 部位、第 3 3 部位、第 4 9 部位、第 5 4 部位、第 1 3 3 部位、第 2 2 5 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、或いは、第 2 1 部位、第 5 1 部位、第 1 1 1 部位、第 2 2 1 部位及び第 2 2 6 部位のうちの一つまたは複数の部位のアミノ酸置換を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスはGタンパク質をさらに含み、前記Gタンパク質は、配列番号 3 1 に示されるアミノ酸配列に比べて、第 4 3 8 部位、第 4 5 3 部位、第 4 7 1 部位及び第 4 8 7 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、或いは、第 5 3 部位、第 1 4 1 部位、第 1 7 2 部位、第 2 1 7 部位、第 2 3 2 部位、第 3 3 1 部位、第 3 7 1 部位、第 4 3 6 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスは、Lタンパク質をさらに含み、前記Lタンパク質は、配列番号 8 1 に示さ

10

20

30

40

50

れるアミノ酸配列に比べて、第 87 部位、第 487 部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含む

ことを特徴とする腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 29】

Mタンパク質を含み、前記Mタンパク質は、配列番号1に示されるアミノ酸配列に比べて、第32部位、第33部位、第49部位、第54部位、第133部位、第225部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、或いは、第21部位、第51部位、第111部位、第221部位及び第226部位のうちの一つまたは複数の部位のアミノ酸置換を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスはGタンパク質をさらに含み、前記Gタンパク質は、配列番号31に示されるアミノ酸配列に比べて、第438部位、第453部位、第471部位及び第487部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、或いは、第53部位、第141部位、第172部位、第217部位、第232部位、第331部位、第371部位、第436部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスはNタンパク質をさらに含み、前記Nタンパク質は、配列番号55に示されるアミノ酸配列に比べて、第14部位、第155部位、第353部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスは、Lタンパク質をさらに含み、前記Lタンパク質は、配列番号81に示されるアミノ酸配列に比べて、第87部位、第487部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含む

ことを特徴とする腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 30】

Mタンパク質を含み、前記Mタンパク質は、配列番号1に示されるアミノ酸配列に比べて、第32部位、第33部位、第49部位、第54部位、第133部位、第225部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、或いは、第21部位、第51部位、第111部位、第221部位及び第226部位のうちの一つまたは複数の部位のアミノ酸置換を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスはGタンパク質をさらに含み、前記Gタンパク質は、配列番号31に示されるアミノ酸配列に比べて、第438部位、第453部位、第471部位及び第487部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、或いは、第53部位、第141部位、第172部位、第217部位、第232部位、第331部位、第371部位、第436部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスはNタンパク質をさらに含み、前記Nタンパク質は、配列番号55に示されるアミノ酸配列に比べて、第14部位、第155部位、第353部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスはPタンパク質をさらに含み、前記Pタンパク質は、配列番号61に示されるアミノ酸配列に比べて、第50部位、第76部位、第99部位、第126部位、第140部位、第151部位、第168部位、第170部位、第189部位、第237部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含み、前記腫瘍溶解性ウイルスは、Lタンパク質をさらに含み、前記Lタンパク質は、配列番号81に示されるアミノ酸配列に比べて、第87部位、第487部位のうちの一つ又は複数の部位のアミノ酸置換を含む

ことを特徴とする腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 31】

前記Lタンパク質のアミノ酸置換は、第87部位にあるセリンからプロリンへの変異（S87P）、及び／又は、第487部位にあるイソロイシンからトレオニンへの変異（I487T）を含む

ことを特徴とする請求項27乃至30のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 32】

前記Lタンパク質のアミノ酸置換は、下記のいずれか一つとして選択され、

- 1) 前記Lタンパク質のアミノ酸置換は、S87Pを含み、
- 2) 前記Lタンパク質のアミノ酸置換は、S87P、I487Tを含み、
- 3) 前記Lタンパク質のアミノ酸置換は、I487Tを含む

ことを特徴とする請求項27乃至30のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 33】

前記 L タンパク質のアミノ酸置換は、S 87P、I 487Tを含むことを特徴とする請求項 32 に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 34】

前記 N タンパク質は、配列番号 83 に示されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項 32 に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 35】

前記腫瘍溶解性ウイルスは、バキュロウイルスを含むことを特徴とする請求項 1 乃至 9、14 乃至 15、20 乃至 22、27 乃至 30 のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 36】

前記腫瘍溶解性ウイルスは、水疱性口内炎ウイルスを含むことを特徴とする請求項 1 乃至 9、14 乃至 15、20 乃至 22、27 乃至 30 のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 37】

前記腫瘍溶解性ウイルスは、水疱性口内炎ウイルス Indiana Mudd Summer サブタイプを含むことを特徴とする請求項 1 乃至 9、14 乃至 15、20 乃至 22、27 乃至 30 のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 38】

前記腫瘍溶解性ウイルスは、外因性核酸、標的遺伝子またはタンパク質を含み、或いは発現することを特徴とする請求項 1 乃至 9、14 乃至 15、20 乃至 22、27 乃至 30 のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 39】

前記腫瘍溶解性ウイルスは核酸分子を含み、前記核酸分子は、前記アミノ酸置換を有する M タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する G タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する N タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する P タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する L タンパク質をコードする核酸配列を含むことを特徴とする請求項 1 乃至 9、14 乃至 15、20 乃至 22、27 乃至 30 のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 40】

前記核酸分子は、前記外因性核酸、標的遺伝子またはタンパク質をコードする核酸配列を含むことを特徴とする請求項 39 に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 41】

前記核酸分子のうち、前記外因性核酸、標的遺伝子またはタンパク質をコードする核酸配列は、前記アミノ酸置換を有する M タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する G タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する N タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する P タンパク質をコードする核酸配列、及び／又は前記アミノ酸置換を有する L タンパク質をコードする核酸配列の間にあることを特徴とする請求項 40 に記載の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 42】

腫瘍溶解性ウイルスの発現ベクターであって、前記腫瘍溶解性ウイルスの発現ベクターは、請求項 1 に記載の腫瘍溶解性ウイルスを発現することができることを特徴とする腫瘍溶解性ウイルスの発現ベクター。

【請求項 43】

ウイルス産生細胞であって、

前記ウイルス産生細胞は、請求項 1 に記載の腫瘍溶解性ウイルスを産生することができることを特徴とするウイルス産生細胞。

【請求項 4 4】

医薬組成物であって、

前記医薬組成物は、請求項 1 に記載の腫瘍溶解性ウイルスと、任意選択で薬学的に許容される担体と、を含む

ことを特徴とする医薬組成物。

【請求項 4 5】

請求項 1 乃至 9、1 4 乃至 1 5、2 0 乃至 2 2、2 7 乃至 3 0 のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス、請求項 4 2 に記載の腫瘍溶解性ウイルス発現ベクター、請求項 4 3 に記載のウイルス産生細胞及び／又は請求項 4 4 に記載の医薬組成物の調製方法。

10

【請求項 4 6】

疾患及び／又は病気を予防及び／又は治療するための薬剤の調製における請求項 1 乃至 9、1 4 乃至 1 5、2 0 乃至 2 2、2 7 乃至 3 0 のいずれか一項に記載の腫瘍溶解性ウイルス、請求項 4 2 に記載の腫瘍溶解性ウイルス発現ベクター、請求項 4 3 に記載のウイルス産生細胞及び／又は請求項 4 4 に記載の医薬組成物の用途。

【請求項 4 7】

前記腫瘍溶解性ウイルス、前記腫瘍溶解性ウイルス発現ベクター、前記ウイルス産生細胞及び／又は前記医薬組成物は、異常増殖細胞を継続的に殺傷させる方法に用いられることを特徴とする請求項 4 6 に記載の用途。

20

【請求項 4 8】

前記異常増殖細胞は、腫瘍細胞または腫瘍組織関連細胞から選択されることを特徴とする請求項 4 7 に記載の用途。

【請求項 4 9】

腫瘍は、固形腫瘍または血腫瘍を含む

ことを特徴とする請求項 4 8 に記載の用途。

30

40

50

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2023/071375
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 7/01(2006.01)i; C07K 14/145(2006.01)i; A61K 35/766(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C12R 1/93(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N,C07K,A61K,A61P,C12R Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Data base: CNABS, CNKI, DWPI, WPABS, VEN, CNTXT, WOTXT, USTXT, ENTXT, ENTXTC, PubMed, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, 必应, Bing, EMBL+GenBank+DDBJ, 中国专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Search System; search terms: 溶瘤病毒, 水泡性口炎病毒, vesicular stomatitis virus, VSV, oncolytic virus, M蛋白, 基质蛋白, matrix protein, N32, M33, N49, H54, A133, V225, G21, M51, L111, V221, S226, 对SEQ ID No.1以及各单位点突变体的序列检索, search for SEQ ID No.1 and unit point mutants, 对SEQ ID NOs.43, 58, 71和83的序列检索, search for SEQ ID NOs.43, 58, 71 and 83		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 114540316 A (SHANGHAI RONGRUI MEDICINE TECHNOLOGY CO., LTD.) 27 May 2022 (2022-05-27) see abstract, claims 1-43 and sequence table	1-43
X	CN 109312366 A (KLINIKUM RECHTS DER ISAR DER TECHNISCHEN UNIVERSITAT MUNCHEN) 05 February 2019 (2019-02-05) see description abstract and SEQ ID NOs.3, 14-17	1-5, 8-11, 14-16, 19-22, 24-26 and 29-43
Y	CN 109312366 A (KLINIKUM RECHTS DER ISAR DER TECHNISCHEN UNIVERSITAT MUNCHEN) 05 February 2019 (2019-02-05) see description abstract and SEQ ID NOs.3, 14-17	6-7, 8-28
X	CN 111467489 A (SHANGHAI RONGRUI PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 31 July 2020 (2020-07-31) see claims 1-9 and SEQ ID No.4	1-5, 29-43
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 May 2023		Date of mailing of the international search report 07 June 2023
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/071375

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 111467489 A (SHANGHAI RONGRUI PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 31 July 2020 (2020-07-31) see claims 1-9 and SEQ ID No.4	6-7
X	CN 110305198 A (SUZHOU ULTRAimmune CO., LTD.) 08 October 2019 (2019-10-08) see claims 1-25 and SEQ ID No.3	1-5, 29-43
Y	CN 110305198 A (SUZHOU ULTRAimmune CO., LTD.) 08 October 2019 (2019-10-08) see claims 1-25 and SEQ ID No.3	6-7
X	JAYAKAR, H.R. et al. "Identification of Two Additional Translation Products from the Matrix (M) Gene That Contribute to Vesicular Stomatitis Virus Cytopathology" <i>J Virol</i> , Vol. 76, No. (16), 31 August 2002 (2002-08-31), 8011-8018 ISSN: 1098-5514, see "Material and Method" sections	1-5, 29-43
Y	JAYAKAR, H.R. et al. "Identification of Two Additional Translation Products from the Matrix (M) Gene That Contribute to Vesicular Stomatitis Virus Cytopathology" <i>J Virol</i> , Vol. 76, No. (16), 31 August 2002 (2002-08-31), 8011-8018 ISSN: 1098-5514, see "Material and Method" sections	6-7
X	ROSE, J.K. et al. "'Matrix (M) Protein [Vesicular Stomatitis Indiana Virus]", NCBI Reference Sequence: NP_041714.1" <i>GenBank</i> , 13 August 2018 (2018-08-13), see sequence table and related description	1-5
Y	VAN DEN POL, A.N. et al. "'G Protein/GFP Fusion Protein [Recombinant Vesicular Stomatitis Indiana Virus rVSV-G/GFP]", <i>GenBank</i> : ACK77584.1" <i>GenBank</i> , 28 December 2012 (2012-12-28), see sequence table and related description	8-13
Y	VAN DEN POL, A.N. et al. "'Nucleocapsid Protein [Recombinant Vesicular Stomatitis Indiana Virus rVSV-G/GFP]", <i>GenBank</i> : ACK77580.1" <i>GenBank</i> , 28 December 2012 (2012-12-28), see sequence table and related description	14-18
Y	VAN DEN POL, A.N. et al. "'Phosphoprotein [Recombinant Vesicular Stomatitis Indiana Virus rVSV-G/GFP]", <i>GenBank</i> : ACK77581.1" <i>GenBank</i> , 28 December 2012 (2012-12-28), see sequence table and related description	19-23
Y	VAN DEN POL, A.N. et al. "'Polymerase [Recombinant Vesicular Stomatitis Indiana Virus rVSV-G/GFP]", <i>GenBank</i> : ACK77585.1" <i>GenBank</i> , 28 December 2012 (2012-12-28), see sequence table and related description	24-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2023/071375
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13^{ter}.1(a)), ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/071375

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:

Claim 1 relates to a plurality of oncolytic virus M protein mutants subjected to amino acid substitution on the basis of SEQ ID NO. 1. However, an M protein shown in SEQ ID NO. 1 belongs to the prior art ("matrix protein [Vesiculovirus indiana]", GenBank: QID 41591.1, publication date: 01 March 2020). Therefore, the multiple inventions, which relate to different M protein mutants, do not have a same or corresponding special technical feature, do not belong to a single general inventive concept, and thus do not meet the requirement of unity of invention and do not comply with PCT Rule 13.1.

10

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 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.:
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.:

20

- 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.

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/071375

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	114540316	A	27 May 2022	None			
CN	109312366	A	05 February 2019	US	2021221851	A1	22 July 2021
				ES	2865420	T3	15 October 2021
				EP	3458594	A1	27 March 2019
				EP	3458594	B1	03 March 2021
				WO	2017198779	A1	23 November 2017
				EP	3246410	A1	22 November 2017
				PT	3458594	T	03 June 2021
				SI	3458594	T1	31 August 2021
				DK	3458594	T3	31 May 2021
				HRP	20210867	T1	23 July 2021
				LT	3458594	T	25 June 2021
				CA	3019621	A1	23 November 2017
				PL	3458594	T3	20 September 2021
				US	2019153039	A1	23 May 2019
				US	10906942	B2	02 February 2021
				JP	2019516374	A	20 June 2019
				JP	6996756	B2	04 February 2022
				HUE	054799	T2	28 October 2021
CN	111467489	A	31 July 2020	WO	2021228106	A1	18 November 2021
				EP	4140502	A1	01 March 2023
				CA	3178632	A1	18 November 2021
				KR	20230004561	A	06 January 2023
				AU	2021270266	A1	15 December 2022
				TW	202144382	A	01 December 2021
CN	110305198	A	08 October 2019	WO	2019184459	A1	03 October 2019

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2023/071375
A. 主题的分类 C12N 7/01(2006.01)i; C07K 14/145(2006.01)i; A61K 35/766(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C12R 1/93(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N, C07K, A61K, A61P, C12R 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) 数据库: CNABS, CNKI, DWPI, WPABS, VEN, CNTXT, WOTXT, USTXT, ENTXT, ENTXTC, PubMed, 百度学术, 必应, EMBL+GenBank+DDBJ, 中国专利生物序列检索系统; 关键词: 溶瘤病毒, 水泡性口炎病毒, vesicular stomatitis virus, VSV, oncolytic virus, M蛋白, 基质蛋白, matrix protein, N32, M33, N49, H54, A133, V225, G21, M51, L111, V221, S226, 对SEQ ID No.1以及各单位点突变体的序列检索, 对SEQ ID Nos.43、58、71和83的序列检索		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 114540316 A (上海荣瑞医药科技有限公司) 2022年5月27日 (2022 - 05 - 27) 参见摘要, 权利要求1-43和序列表	1-43
X	CN 109312366 A (慕尼黑工业大学附属伊萨右岸医院) 2019年2月5日 (2019 - 02 - 05) 参见说明书摘要和SEQ ID Nos. 3、14-17	1-5, 8-11, 14-16, 19-22, 24-26和29-43
Y	CN 109312366 A (慕尼黑工业大学附属伊萨右岸医院) 2019年2月5日 (2019 - 02 - 05) 参见说明书摘要和SEQ ID Nos. 3、14-17	6-7和8-28
X	CN 111467489 A (上海荣瑞医药科技有限公司) 2020年7月31日 (2020 - 07 - 31) 参见权利要求1-9和SEQ ID No. 4	1-5和29-43
Y	CN 111467489 A (上海荣瑞医药科技有限公司) 2020年7月31日 (2020 - 07 - 31) 参见权利要求1-9和SEQ ID No. 4	6-7
X	CN 110305198 A (苏州奥特铭医药科技有限公司) 2019年10月8日 (2019 - 10 - 08) 参见权利要求1-25和SEQ ID No. 3	1-5和29-43
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2023年5月31日		国际检索报告邮寄日期 2023年6月7日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		受权官员 罗霄 电话号码 (+86) 010-62089158

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/071375

C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 110305198 A (苏州奥特铭医药科技有限公司) 2019年10月8日 (2019 - 10 - 08) 参见权利要求1-25和SEQ ID No. 3	6-7
X	Himangi R. Jayakar 等. "Identification of Two Additional Translation Products from the Matrix (M) Gene That Contribute to Vesicular Stomatitis Virus Cytopathology" J Virol, 第76卷, 第16期, 2002年8月31日 (2002 - 08 - 31), 8011-8018 ISSN: 1098-5514, 参见“材料与方法”部分	1-5和29-43
Y	Himangi R. Jayakar 等. "Identification of Two Additional Translation Products from the Matrix (M) Gene That Contribute to Vesicular Stomatitis Virus Cytopathology" J Virol, 第76卷, 第16期, 2002年8月31日 (2002 - 08 - 31), 8011-8018 ISSN: 1098-5514, 参见“材料与方法”部分	6-7
X	Rose, J.K. 等. "matrix (M) protein [Vesicular stomatitis Indiana virus]", NCBI Reference Sequence: NP_041714.1" GenBank, 2018年8月13日 (2018 - 08 - 13), 参见序列表和相关说明	1-5
Y	van den Pol, A.N. 等. "G protein/GFP fusion protein [Recombinant vesicular stomatitis Indiana virus rVSV-G/GFP]", GenBank: ACK77584.1" Genbank, 2012年12月28日 (2012 - 12 - 28), 参见序列表和相关说明	8-13
Y	van den Pol, A.N. 等. "nucleocapsid protein [Recombinant vesicular stomatitis Indiana virus rVSV-G/GFP]", GenBank: ACK77580.1" BenBank, 2012年12月28日 (2012 - 12 - 28), 参见序列表和相关说明	14-18
Y	van den Pol, A.N. 等. "phosphoprotein [Recombinant vesicular stomatitis Indiana virus rVSV-G/GFP]", GenBank: ACK77581.1" BenBank, 2012年12月28日 (2012 - 12 - 28), 参见序列表和相关说明	19-23
Y	van den Pol, A.N. 等. "polymerase [Recombinant vesicular stomatitis Indiana virus rVSV-G/GFP]", GenBank: ACK77585.1" Genbank, 2012年12月28日 (2012 - 12 - 28), 参见序列表和相关说明	24-28

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

10

20

30

40

50

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2023/071375
第I栏	核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)	
1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的: a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的: b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)), ☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。 2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。 3. 补充意见:		

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2023/071375
第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第I页第3项)		
本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即： 权利要求1涉及多个在SEQ ID NO.1 基础上发生氨基酸取代的溶瘤病毒M蛋白突变体，但SEQ ID NO.1所示的M蛋白属于现有技术（“matrix protein [Vesiculovirus indiana]”，GenBank: QID41591.1，公开日期：2020年03月01日）。因此，上述涉及不同M蛋白突变体的多项发明之间不存在相同或相应的特定技术特征，不属于一个总的发明构思，因而不满足发明单一性的要求，不符合细则13.1的规定。		
1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。		
2. ☒ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。		
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：		
4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：		
对异议的意见 ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。 ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。 ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。		

国际检索报告 关于同族专利的信息				国际申请号 PCT/CN2023/071375			
检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	114540316	A	2022年5月27日	无			
CN	109312366	A	2019年2月5日	US	2021221851	A1	2021年7月22日
				ES	2865420	T3	2021年10月15日
				EP	3458594	A1	2019年3月27日
				EP	3458594	B1	2021年3月3日
				WO	2017198779	A1	2017年11月23日
				EP	3246410	A1	2017年11月22日
				PT	3458594	T	2021年6月3日
				SI	3458594	T1	2021年8月31日
				DK	3458594	T3	2021年5月31日
				HRP	20210867	T1	2021年7月23日
				LT	3458594	T	2021年6月25日
				CA	3019621	A1	2017年11月23日
				PL	3458594	T3	2021年9月20日
				US	2019153039	A1	2019年5月23日
				US	10906942	B2	2021年2月2日
				JP	2019516374	A	2019年6月20日
				JP	6996756	B2	2022年2月4日
				HUE	054799	T2	2021年10月28日
CN	111467489	A	2020年7月31日	WO	2021228106	A1	2021年11月18日
				EP	4140502	A1	2023年3月1日
				CA	3178632	A1	2021年11月18日
				KR	20230004561	A	2023年1月6日
				AU	2021270266	A1	2022年12月15日
				TW	202144382	A	2021年12月1日
CN	110305198	A	2019年10月8日	WO	2019184459	A1	2019年10月3日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)**C 1 2 N 1/21****C 1 2 N 1/19 (2006.01)****C 1 2 N 1/19****C 1 2 N 1/15 (2006.01)****C 1 2 N 1/15****A 6 1 K 35/766 (2015.01)****A 6 1 K 35/766****A 6 1 P 35/00 (2006.01)****A 6 1 P 35/00**

,MC,ME,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT, JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,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

(74)代理人 100130672

弁理士 伊藤 寛之

(72)発明者 周国慶

中国上海市浦東新区半夏路 1 0 0 弄 4 1 号楼 5 層

(72)発明者 張凡

中国上海市浦東新区半夏路 1 0 0 弄 4 1 号楼 5 層

(72)発明者 馬良

中国上海市浦東新区半夏路 1 0 0 弄 4 1 号楼 5 層

(72)発明者 田▲ティン▼

中国上海市浦東新区半夏路 1 0 0 弄 4 1 号楼 5 層

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA44 CA45

4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 NA14 ZB26

4H045 AA10 AA30 BA09 CA01 DA50 EA20 FA74