

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6382223号
(P6382223)

(45) 発行日 平成30年8月29日 (2018. 8. 29)

(24) 登録日 平成30年8月10日 (2018. 8. 10)

(51) Int. Cl.

F 1

A 6 1 K 35/76 (2015. 01)

A 6 1 K 35/76

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00 (2006. 01)

A 6 1 P 43/00 1 0 7

A 6 1 K 39/155 (2006. 01)

A 6 1 K 39/155

C 1 2 N 7/04 (2006. 01)

C 1 2 N 7/04 Z N A

請求項の数 17 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-554120 (P2015-554120)
 (86) (22) 出願日 平成26年1月20日 (2014. 1. 20)
 (65) 公表番号 特表2016-506722 (P2016-506722A)
 (43) 公表日 平成28年3月7日 (2016. 3. 7)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/051063
 (87) 国際公開番号 W02014/114605
 (87) 国際公開日 平成26年7月31日 (2014. 7. 31)
 審査請求日 平成28年9月2日 (2016. 9. 2)
 (31) 優先権主張番号 13305086. 4
 (32) 優先日 平成25年1月24日 (2013. 1. 24)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 508029653
 アンスティテュ・パストゥール
 フランス・F-75724・パリ・セデッ
 クス・15・リュ・デュ・ドクトゥール・
 ルー・25-28
 (73) 特許権者 598118019
 セントレ・ナショナル・デ・ラ・レシエル
 シュ・サイエンティフィック
 フランス・75794・パリ・セデックス
 ・16・リュ・ミッシェル・アンジュ・3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌治療における、遺伝的に改変された、増強されたアポトーシス促進性を有する感染性麻疹ウイルス (MV-DELTA Cウイルス) の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ウイルスアクセサリ-Cタンパク質をコードする遺伝子がノックアウトされた生弱毒化MV (MV-deltaC) 株由来の遺伝的に改変された感染性MVである、侵襲性の強い悪性腫瘍または侵襲性の強い癌の状態であると診断された個体に投与した場合における、そのような悪性腫瘍または癌の治療のための医薬組成物。

【請求項 2】

前記侵襲性の強い悪性腫瘍または侵襲性の強い癌が、悪性中皮腫である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記悪性中皮腫が悪性胸膜中皮腫である、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記侵襲性の強い悪性腫瘍または侵襲性の強い癌が、メラノーマまたは肺腺癌の状態である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

悪性腫瘍または癌状態と診断された個体に投与された場合における、ウイルスアクセサリ-Cタンパク質をコードする機能的な遺伝子を含む生弱毒化MV株由来の感染性のMVに対して抵抗性である悪性腫瘍または癌細胞の治療のための、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

生弱毒化MV株がシュワルツ株またはモラテン（Moraten）株である、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記MV-deltaCが、MV-deltaCに感染した悪性腫瘍または癌細胞においてアポトーシス活性を示す、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記MV-deltaCが、MV-deltaCに感染した悪性腫瘍または癌細胞においてカスパーゼ-3の活性化を誘導する、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記MV-deltaCが、MV-deltaCに感染した悪性腫瘍または癌細胞における細胞膜の外層へのHsp70タンパク質の暴露を誘導する、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

【請求項 10】

MV-deltaCに感染した悪性腫瘍または癌細胞の表面へのカルレティキュリンの移行を誘導する、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

MV-deltaCに感染した悪性腫瘍または癌細胞の細胞外の培地中のHMGB-1の解放を誘導する、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

以下の工程：

- 事前に個体から採取した悪性腫瘍または癌細胞を、インビトロで、ウイルスアクセサリーCタンパク質をコードする遺伝子がノックアウトされた、生弱毒化麻疹ウイルス（MV）株由来の遺伝的に改変された感染性麻疹ウイルス（MV-deltaC）で感染させて細胞溶解物を得るステップ；
 - 細胞溶解物と形質細胞様樹状細胞（pDC）を接触させてワクチンのpDCを得るステップ；
 - ロードされたpDCを回収するステップ；
- を含む、悪性腫瘍または癌状態と診断された個体の悪性腫瘍または癌を治療するためのワクチンの形質細胞様樹状細胞（pDC）を調製するための方法。

20

【請求項 13】

pDCが、治療される個体に由来する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

pDCが白血球搬出（leukapheresis）から得られる、請求項 12 または 13 に記載の方法。

30

【請求項 15】

前記悪性腫瘍または癌が、侵襲性の強い悪性腫瘍または侵襲性の強い癌である、請求項 12 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記悪性腫瘍または癌が、悪性中皮腫、メラノーマまたは肺腺癌である、請求項 12 から 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記生弱毒化MV株が、シュワルツ株またはモラテン株である、請求項 12 から 16 のいずれか一項に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ウイルスアクセサリーCタンパク質をコードする遺伝子がノックアウトされた弱毒化麻疹ウイルス株（MV-deltaC）由来の遺伝的に改変された感染性麻疹ウイルスに関する。特に、悪性腫瘍または癌の状態の治療における、前記遺伝学的に改変された感染性MV-deltaCの使用、およびそのような治療のための薬剤または組成物の調製のための使用に関する。

【背景技術】

50

【 0 0 0 2 】

悪性中皮腫は、通常の根治治療に抵抗性の、非常に攻撃的で稀な癌である。悪性胸膜中皮腫の発生は主にアスベスト繊維や粉塵への長期暴露に関連している (Kazan-Allen ら, Lung cancer, 2005, 49S1:S3-S8; Robinson ら, Lancet, 2005, 366:397-408)。メラノーマは、メラノサイト中で発生し、それが処理されないと体全体に広がる可能性がある悪性腫瘍である。それは皮膚癌の最も少ない頻度のタイプの一つを表しているが、それはほとんどの皮膚癌関連死の原因である。肺腺癌は肺がんの最も一般的な種類であり、喫煙者とは非喫煙者の両方で、癌による死亡の最も一般的な原因の一つである (Travis, W. D. ら, J Thorac Oncol., 2011, 6(2), 244-285)。

【 0 0 0 3 】

悪性中皮腫、メラノーマおよび肺腺癌などのいくつかの積極的な癌については、重要な治癒の機会を提供する戦略は現在ない。

【 0 0 0 4 】

それらの予後は非常に不良であり、それらはそのような化学療法、放射線療法および/または外科手術などの、すべての従来の治療法に対して比較的難治性である。このように、新たな臨床的アプローチの開発のための差し迫った必要性が存在する。

【 0 0 0 5 】

癌ウイルス療法は、従来の抗癌療法に対して抵抗性である癌の治療のための新規の代替と広くみなされている (Boisgerault N ら., Immunotherapy, 2010, march 2(2), 185-199)。腫瘍溶解性ウイルス療法は、前臨床およびいくつかのフェーズ I の臨床抗癌治療 (Lech, PJ and Russell, SJ; Expert Review of Vaccines, 2010, 9(11): 1275-1302; Galanis ら, Cancer Research, 2010, 70(3):875-882)、およびインビトロ研究でも (Gauvrit, A ら., Cancer Research, 2008, 68 (12), 4882-4892)、多モデルの抗腫瘍メカニズムを実証した。細胞伝達免疫療法と比較して、ウイルスワクチンは、パーソナライズされた製造を必要とせずに細胞減少と同時にパーソナライズされた抗癌免疫を与えるという利点を有する。また、ウイルスワクチンは、免疫抑制ウイルス成分を削除し、抗腫瘍細胞毒性および免疫を強化する導入遺伝子を挿入するように操作することができる (A. Gauvrit ら., Cancer Research, 2008, 68 (12), 4882-4892)。

【 0 0 0 6 】

麻疹ウイルス (MV) はパラミクソウイルス科のファミリー内属 Morbillivirus の非セグメント化一本鎖ネガティブセンス RNA エンベロープウイルスである。MV の非セグメント化ゲノムは、インビボまたはインビトロでも翻訳もされず感染もしないゲノム RNA になるアンチメッセージ・ポラリティ (antimessage polarity) を有する。このウイルスは、1954 年に単離されている (Enders, J. F. and Peebles, T.C, 1954, Proc Soc Exp Biol Med, 86 (2): 277-286)、そして弱毒化ワクチンは、ワクチン株を提供するために、それ以来、このウイルス、特に Schwarz/Moraten 株に由来している。

【 0 0 0 7 】

非セグメント化された (-) 鎖 RNA ウイルスの転写および複製とそのウイルス粒子としての組立は、特に「フィールドウイルス学」 (Fields virology (3rd edition, vol 1, 1996, Lippincott-Raven publishers-Fields BN et al.)) で研究され、報告されている。転写および MV の複製は、感染した細胞の核を伴うのではなく、前記感染した細胞の細胞質で行われる。MV のゲノムは、6 つの遺伝子 (N、P、M、F、H および L で示す) と、P 遺伝子、C および V タンパク質からのさらなる 2 つの非構造タンパク質からの 6 つの主要な構造タンパク質をコードする遺伝子を含む。遺伝子の順序は、以下: 3'、N、P (C および V を含む)、M、F、H、および 5' 末端における L ラージポリメラーゼタンパク質 (図 1A) である。ゲノムはさらに、遺伝子間領域 M / F 中に非コード領域を含む。この非コード領域は、未翻訳 RNA の約 1000 個のヌクレオチドを含む。記載された遺伝子は、それぞれ、リーダーペプチド (I 遺伝子)、ウイルスのヌクレオキャプシドのタンパク質をコードする、すなわち、ゲノム RNA の周りに組み立てられてヌクレオキャプシドを提供する、核タンパク質 (N)、リン (P)、および大型タンパク質 (L) である。他の遺伝子は、赤血球凝集素 (H)、融合

10

20

30

40

50

(F) およびマトリックス(M) タンパク質を含むウイルスエンベロープのタンパク質をコードする。MVタンパク質はポリシストロニックP遺伝子によってコードされ、それは細胞質および核の両方に局在化する、小さい(186アミノ酸)塩基性タンパク質である(Bellini, W.J. ら, J. Virol, 1985, 53:908-919)。MV毒性因子として記載される、このウイルスタンパク質の役割は、まだよく理解されていない。MV Cタンパク質の役割を決定するために、逆遺伝学系を使用して、病原性の高いIC-B株に基づいて生成された、Cタンパク質の発現を欠く組換え野生型MV株が、使用されている。MV Cタンパク質はウイルスタンパク質の発現において、および長期のMV感染を確立するために、感染細胞のアポトーシスの遅延において、ウイルス粒子のアセンブリに関与することが示唆された。(Takeuchi, K. ら, J. Virol, June 2005, 7838- 7844)。MV Cタンパク質は、インターフェロンの抗ウイルス応答を阻害することが報告されているが(Shaffer, J.A. ら, Virology, 2003, 315:389-397)、別の研究では、反対の結論に達しており(Takeuchi, K. ら, J. Virol, June 2005, 7838- 7844)、それによって、MV Cタンパク質の機能はまだ十分に確立されていないことが確認される。

【 0 0 0 8 】

腫瘍溶解剤としてテストされるに値するヒトウイルスの中では、弱毒MVワクチンは多くの利点を提供する。30年の間に子供の数百万に投与され、最も安全で最も広く使用されているヒトの小児用ワクチンである。MVの弱毒株は、大多数の細胞型および優先的に形質転換された癌細胞に感染する。これは、野生型MVはSLAM (CD 150) を用いるのに対し(Tatsu o, H. ら, Nature, 2000, 406(6798):893-897; Anderson, B. D. ら, Cancer Res., 2004, 64: 4919-4926; Schneider, U. ら, J Virol, 2002, 76: 7460-7467)、ナチュラルキラー細胞による補体依存死滅に抵抗するために、MVによる、癌細胞で頻繁に過剰発現される受容体としてのCD46の使用に起因する(Naniche, D. ら, J Virol, 1993, 67(10): 6025-6032; Dhiman, N. ら, Rev Med Virol, 2004, 14(4): 217-229)。興味深いことに、MVは、具体的には健全なものに感染することなく、癌細胞を標的とすることによって、天然の抗腫瘍性を示す。このように、MVは将来の治療プロトコルでの適用のために問題ない安全性プロファイルを示す。

【 0 0 0 9 】

野生型MVの腫瘍溶解特性は、当技術分野の当業者に知られている(Mayo Foundation for Medical Education and Research, US07854928)。最近、卵巣癌、膠芽細胞腫、非小細胞肺癌および多発性骨髄腫を治療するためにエドモントンMV株の能力を調査するために臨床試験が開始された(measles および cancer のキーワードで<http://clinicaltrials.gov> 参照)。ワクチンベクターとしての組換えまたはキメラのいずれかとしてのMVワクチンの使用もまた記載されている(WO2004/000876、WO2004/076619、WO2006/136697およびWO2008/078198)。

【 0 0 1 0 】

この技術は、中皮腫の免疫腫瘍溶解処理にも提案されている(Gauvrit, A. ら, Cancer Research, 2008, 68 (12), 4882-4892)。このように、国際特許出願WO2009/047331は、類上皮中皮腫腫瘍細胞のパネル上でのMVワクチンの弱毒化シュワルツ株の腫瘍溶解性および免疫アジュバント特性の両方を記載している。感染性cDNAクローンから産生されたMVワクチンの回復されたシュワルツ株を使用すると、MV感染した中皮腫細胞は、自発的な単球由来樹状細胞(Mo-DC)の成熟および腫瘍抗原特異的応答を誘導することが示された。

【 0 0 1 1 】

従来の治療を超える腫瘍ウイルス治療の潜在的な利点は、このように癌抗原(腫瘍関連抗原)に対するより正確な特異性、それゆえの、より良好な安全マージンだけでなく、免疫記憶による持続的効果、それゆえの再発および転移の予防を含む免疫応答を誘導する性質を含むことである。実際に、特定の免疫応答および記憶は、抗原提示細胞の存在下での、癌細胞の部位でのMVの投与後に発生することが実証されている(Masse, D. ら, Int. J. Cancer, 2004, 111(4), 575-580); Liu ら, Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy, 2010, 18(6): 1155-1162)。シュワルツMV株の抗腫瘍

活性は、腫瘍崩壊、腫瘍免疫原性アポトーシス（細胞死に関連した危険信号表現）およびウイルス媒介合胞体形成の誘導を含む複数のメカニズムを介して作用することが実証された(Gauvrit, A. ら, Cancer Res, 2008, 68(12), 4882-4892)。また、放出された腫瘍関連抗原、およびウイルス複製に起因する炎症は、腫瘍への免疫寛容を破壊し、抗癌免疫を誘導することが示唆されている。

【 0 0 1 2 】

効率的な感染にもかかわらず、いくつかのMV感染した悪性腫瘍または癌細胞は細胞死の誘導に抵抗する。したがって、抵抗のこのタイプを克服し、従って、悪性腫瘍または癌細胞の特異的細胞死誘導を改善し、延長するために役立つであろうウイルスの開発が必要である。

10

【 0 0 1 3 】

樹状細胞（DC）の前駆体は、異なる機能的特性を示す単球由来樹状細胞（Mo-DCS）と形質細胞様樹状細胞（pDC）に分けられる。pDCは、ウイルス核酸（TLR7、TLR9）の認識に特化されたToll様受容体（TLR）の発現による抗ウイルス免疫応答に関与するDCのサブセットである(Gilliet, M. ら, Nat Rev Immunol, 2008, 8:594-606)。これらは、I型インターフェロン（IFN- α 、 β 、 γ ）を大量に生成することによる活性化および成熟という点で、ウイルス（特に、インフルエンザAウイルス、単純ヘルペスウイルス、HIV）の広い範囲に応答する。それらは、ウイルスに感染しているときにも、CD8+およびCD4+ T細胞にウイルス抗原を提示することができ(Fonteneau, J. F. ら, Blood, 2003, 101:3520-3526)、およびウイルス感染細胞からのウイルス抗原をCD8+ Tリンパ球にクロス提示することができる(Di Pucchio, T. ら, Nat Immunol, 2008, 9:551-557; Lui, G. ら, PLoS One, 2009, 4:e7111)。pDCは腫瘍に対する免疫応答に有益な役割を果たし得ることも示されている(Drobits, B. ら, J Clin Invest., 2012, 122:575-585; Liu, C. ら, J Clin Invest., 2008, 118: 1165-1175)。例として、マウスメラノーマモデルでは、pDCの活性化および抗腫瘍免疫応答は、TLR7リガンド、イミキモドでの局所治療後に腫瘍内部に認められた(Drobits, B. ら, J Clin Invest., 2012, 122:575-585)。MVが一本鎖RNA（ssRNA）であるので、本発明者らは、一本鎖RNAを認識するpDCの液胞内TLR7発現によって、pDCは、腫瘍細胞のMV感染を検出できると仮定している。

20

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

30

【 0 0 1 4 】

【 特許文献 1 】 US07854928

【 特許文献 2 】 WO2004/000876

【 特許文献 3 】 WO2004/076619

【 特許文献 4 】 WO2006/136697

【 特許文献 5 】 WO2008/078198

【 特許文献 6 】 WO2009/047331

【 非特許文献 】

【 0 0 1 5 】

【 非特許文献 1 】 Kazan-Allen ら, Lung cancer, 2005, 49S1:S3-S8

40

【 非特許文献 2 】 Robinson ら, Lancet, 2005, 366:397-408

【 非特許文献 3 】 Travis, W. D. ら, J Thorac Oncol., 2011, 6(2), 244-285

【 非特許文献 4 】 Boisgerault N ら., Immunotherapy, 2010, march 2(2), 185-199

【 非特許文献 5 】 Lech, PJ and Russell, SJ; Expert Review of Vaccines, 2010, 9(11): 1275-1302

【 非特許文献 6 】 Galanis ら, Cancer Research, 2010, 70(3):875-882

【 非特許文献 7 】 Gauvrit, A ら., Cancer Research, 2008, 68 (12), 4882-4892

【 非特許文献 8 】 A. Gauvrit ら., Cancer Research, 2008, 68 (12), 4882-4892

【 非特許文献 9 】 Enders, J. F. and Peebles, T.C, 1954, Proc Soc Exp Biol Med, 86(2): 277-286

50

【非特許文献 1 0】Fields virology (3rd edition, vol 1, 1996, Lippincott-Raven publishers-Fields BN et al

【非特許文献 1 1】Bellini, W.J. ら, J. Virol, 1985, 53:908-919

【非特許文献 1 2】Takeuchi, K. ら, J. Virol, June 2005, 7838- 7844

【非特許文献 1 3】Shaffer, J.A. ら, Virology, 2003, 315:389-397

【非特許文献 1 4】Takeuchi, K. ら, J. Virol, June 2005, 7838- 7844

【非特許文献 1 5】Tatsuo, H. ら. Nature, 2000, 406(6798):893-897

【非特許文献 1 6】Anderson, B. D. ら, Cancer Res., 2004, 64: 4919-4926; Schneider, U. ら, J Virol, 2002, 76: 7460-7467

【非特許文献 1 7】Naniche, D. ら, J Virol, 1993, 67(10): 6025-6032

【非特許文献 1 8】Dhiman, N. ら, Rev Med Virol, 2004, 14(4): 217-229

【非特許文献 1 9】Gauvrit, A. ら, Cancer Research, 2008, 68 (12), 4882-4892

【非特許文献 2 0】Masse, D. ら, Int. J. Cancer, 2004, 111(4), 575-580

【非特許文献 2 1】Liu ら, Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy, 2010, 18(6): 1155-1162

【非特許文献 2 2】Gauvrit, A. ら, Cancer Res, 2008, 68(12), 4882-4892

【非特許文献 2 3】Gilliet, M. ら, Nat Rev Immunol, 2008, 8:594-606

【非特許文献 2 4】Fonteneau, J. F. ら, Blood, 2003, 101:3520-3526

【非特許文献 2 5】Di Pucchio, T. ら, Nat Immunol, 2008, 9:551-557

【非特許文献 2 6】Lui, G. ら, PLoS One, 2009, 4:e7111

【非特許文献 2 7】Drobits, B. ら, J Clin Invest., 2012, 122:575-585

【非特許文献 2 8】Liu, C. ら, J Clin Invest., 2008, 118: 1165-1175

【非特許文献 2 9】Drobits, B. ら, J Clin Invest., 2012, 122:575-585

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

本発明者らは、驚くべきことに、ウイルスアクセサリーCタンパク質をコードする遺伝子(MV-deltaC)がノックアウトされた弱毒化MV株に由来する遺伝的に改変された感染性麻疹ウイルスは、悪性腫瘍または癌細胞とに対する増強された、特に、改変されていないMVに比べてアポトーシス促進性が増強された応答を誘導することを発見した。従って、本発明は、MV-deltaCを提供し、それが効率的に感染することができ、悪性中皮腫、メラノーマおよび肺腺癌細胞のような悪性腫瘍または癌細胞を殺すことができることを示す。本発明者らは、MVが感染した悪性中皮腫、メラノーマおよび肺腺癌細胞からの溶解物と接触させた形質細胞様樹状細胞は、抗中皮腫、抗メラノーマおよび抗肺腺癌CD8 T細胞を活性化することができることを示している。本発明者らは、このように、MV-deltaCがpDCを活性化させる場合に、悪性腫瘍または癌細胞に対する活性化化合物として使用する場合、MV-deltaCの観察された特性は関心があり得ることを提案する。

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明は、侵襲性の強い悪性腫瘍または侵襲性の強い癌の状態であると診断された個体に投与した場合に、形質細胞様樹状細胞(pDC)を活性化することによる、そのような腫瘍または癌の治療で使用するための生弱毒化麻疹ウイルス株由来の感染性の麻疹ウイルスに関連する。

【0018】

本発明はまた、侵襲性の強い悪性腫瘍または侵襲性の強い癌の状態であると診断された個体に投与した場合に、形質細胞様樹状細胞(pDC)を活性化することによって、そのような悪性腫瘍または癌の治療に使用するための、ウイルスアクセサリーCタンパク質をコードする遺伝子がノックアウトされた生弱毒化麻疹ウイルス株(MV-deltaC)由来の遺伝的に改変された感染性麻疹ウイルスに関する。

【0019】

用語「麻疹ウイルス」は、MVと略記され、表現「ウイルスアクセサリ－Cタンパク質をコードする遺伝子がノックアウトされた弱毒生麻疹ウイルス株由来の麻疹ウイルス」は、MV-deltaCと略記される。

【 0 0 2 0 】

本出願で使用される用語「コードする」は、転写され、および適切な場合には、選択された細胞または細胞株に産物の発現のために翻訳される核酸分子の能力と定義される。

【 0 0 2 1 】

本発明では、個体は好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。

【 0 0 2 2 】

本明細書で定義される、表現「遺伝的に改変された」は、麻疹ウイルスのCタンパク質合成が、産生された感染性MV-deltaCにおいて、特に回復され、遺伝的に改変された感染性MV-deltaCにおいては廃止されるという事実を包含する。

10

【 0 0 2 3 】

本明細書で定義されるように、「ウイルスアクセサリ－Cタンパク質をコードする遺伝子がノックアウトされた」という表現は、Cタンパク質をコードする遺伝子の発現がサイレンシングされることを意味する。

【 0 0 2 4 】

Cタンパク質合成の障害は、特に、P遺伝子に含まれ、Cタンパク質をコードするCタンパク質のオープンリーディングフレーム（ORF）の発現をサイレンシングすることにより達成される。Cタンパク質のORFは、+1フレームでP ORFの一部と重なる。C蛋白質ORFのサイレンシングは、特に、前記ORFの配列の適切な突然変異によって、P遺伝子のN末端領域における第二の「ATG」開始コドンの突然変異により、達成される。この最初の突然変異に加えて、第二の突然変異は、Cオープンリーディングフレーム下流の一ヌクレオチドの置換の結果として、停止コドンが付加することによって導入することができる（図1B）（Patterson, J. B. et al, Virology, 2000, 267(1): 80-89）。

20

【 0 0 2 5 】

パラミクソウイルス科に使用される慣例に従って、用語「遺伝子」は、mRNAをコードするゲノムRNA核酸を示すために使用されてもよい。本発明の文脈では、当該mRNAの中にORFが含まれていることも意味してもよい。

【 0 0 2 6 】

30

Cタンパク質の発現をサイレンシングするための当該突然変異は、Pタンパク質を発現する能力についてP遺伝子の発現を保存していなければならない。

【 0 0 2 7 】

好ましい実施形態では、MVの突然変異したRNA核酸は、さらに、いわゆる「6のルール」を満たしている。「6の法則」は、全長MV（+）鎖RNAゲノムをコードする核酸に存在するヌクレオチドの総数が、6の倍数であるという事実において表現される。特定の実施形態では、核酸構築物は、それを含ままたは突然変異MV-deltaCゲノムを含む、または当該突然変異MV-deltaCゲノムからなり、および場合によっては追加的な、特にコードする、配列が6の倍数である。「6の法則」は、ヌクレオカプシドを形成するために、ゲノム上の6リボヌクレオチドをカプシド化している各MVタンパク質サブユニットとの相互作用の結果としての、MVゲノムRNAの効率的または最適化された複製を可能にする、MVのゲノム中のヌクレオチドの総数に関する要求として最先端の技術で認められている。

40

【 0 0 2 8 】

高病原性IC-B株(Takeuchi, K. et al, J. Virol, June 2005, 7838-7844)またはエドモンストンBワクチン株(Radecke, F. et al, Virology, 1996, 217:418-421; Patterson, J. B. et al, Virology, 2000, 267(1): 80-89)等の、異なるMV株におけるノックアウトされたCタンパク質の発現を開示するプロセスが、逆遺伝学系を使用することによって従来技術で提案されており、本発明の文脈において適用されてもよい。

【 0 0 2 9 】

ここで定義されるように、維持しながら、表現「生弱毒化麻疹ウイルス株由来の感染性

50

麻疹ウイルス」は、無毒であるかまたは、同じホストで、特にヒトで、決定された親株よりも弱い病原性である株から生じている一方で、ホスト、特にヒトに投与された場合に、感染の性質および免疫原性、および恐らくアジュバント性を維持しており、すなわちMVに対する免疫優性TおよびB細胞応答、ならびに恐らくT細胞共刺激タンパク質またはサイトカインIL-12の誘導などのアジュバント性を維持している。病原性の主要株が強く造血を中断させ(Arneborn, P. et al, Clin Exp Immunol, 1983, 51 : 165-172; Kim, E.A. et al, Radiographics, 2002, 22 Spec No: SI 37-149; Okada, H. et al, Arch Virol, 2000, 145:905-920)、途上国において麻疹感染によって最も死亡の原因となる一過性の免疫抑制を生じさせている。主要株とはコントロール的に、生弱毒株は、免疫抑制を誘導しない(Okada, H. et al, Arch Virol, 2001, 146:859-874)。

10

【0030】

したがって、生弱毒化MV株とは、選択された細胞上で連続的に継代され、好ましくは、IFN / 応答とともに初代細胞などの他の細胞、すなわち病原性の復帰もせず、宿主染色体、特定ヒト宿主染色体に統合もしないであろう安定したゲノムを保有する、ワクチン株の調製に適した種子株を産生するためのCEF細胞に適合している。本発明の特定の実施形態では、生弱毒化MVは、CEF細胞のような初代細胞上で選択されたものである。

【0031】

特定の「生弱毒株」として、ヒトに使用するワクチンのために承認された株は、FDA (米国食品医薬品局) によって定義された基準を満たす場合、すなわち、それが研究室の厳格なレビューおよび臨床データの後に安全性、有効性、品質、再現性の基準 (www.fda.gov/cber/vaccine/vacappr.htm) を満たす場合、本発明に適した弱毒株である。

20

【発明を実施するための形態】

【0032】

本発明では、MVウイルスを提供する特定の生弱毒MV株はシュワルツ株やMoraten株であり、特にRouvax (登録商標) ワクチン (アベンティス) からである。シュワルツ株はMoraten株と配列の完全な同一性を有することが実証されている(Parks, C. L. et al, 2001, J Virol, 75(2): 910-920; Schwarz, A. J., 1962, Am J Dis Child, 103, 386-389)。シュワルツ/Moraten株は、長期的な細胞性および体液性免疫応答を誘導し、病原型への復帰がこれまで観察されておらず、重要な遺伝的安定性を提示するので、現在広く使用されている(Hilleman, M., 2002, Vaccine, 20:651-665)。

30

【0033】

より好ましくは、本発明の遺伝的に改変された感染性MVは、2002年6月12日に番号I-2889の下でCNCM (パリ、フランス) にパスツール研究所によって寄託されたプラスミドpTM-MV SchwにクローニングされたMVシュワルツ株のcDNAを用いて製造され、その配列はCombredetによって記載されており(Combredet, C. et al, 2003, J Virol, 77(21): 11546-11554)、また、WO2004/000876および本発明の実施例1に開示されている。プラスミドpTM-MV Schwはブルースクリプトプラスミドから得られ、完全長のT7 RNAポリメラーゼのプロモーターの制御下に置かれたシュワルツ株のMV (+) RNA鎖をコードするポリヌクレオチドを含み、18967ヌクレオチドを有する。他のMV株からのcDNAは同様に生弱毒化MVのウイルス粒子から精製された核酸から出発して得ることができる。MV-deltaCゲノムをコードする適切なcDNAを調製するために、プラスミドpTM-MV SchwのP遺伝子における第2の「ATG」開始コドン置換によって改変してプラスミドpTM-MV Schw-deltaC-ATU (eGFP) (配列番号1) を得た。具体的には、「ATG」コドンは、TヌクレオチドのCヌクレオチドへの突然変異によって「ACG」コドンで置換されている。

40

【0034】

特定の実施態様では、配列番号1のプラスミドpTM-MV Schw-deltaC-ATU1 (eGFP) プラスミドはさらに、位置2803のGヌクレオチドの、Aヌクレオチドへの置換により変異して停止コドンが提供されている。pTM-MV Schw-deltaC-ATU1 (eGFP) 変異体は、配列番号2のヌクレオチド配列を有する。

【0035】

50

本発明の好ましい実施形態では、遺伝的に改変された感染性MV-deltaCがレスキューによって得られる。シュワルツMV株の未修飾MVのレスキューは、WO2004 / 000876に広く記載されており、同様の処理を遺伝的に改変された感染性MV-deltaCの調製に適用することができる。

【0036】

本発明の特定の実施形態では、遺伝的に改変された感染性MV-deltaCは、GM-CSF（顆粒球マクロファージコロニー刺激因子）を発現するので（Guse, K. et al, 2011, Oncolytic vaccinia virus for the treatment of cancer, Vol. 11, No. 5, Pages 595-608）、MV-deltaC-GM-CSFである。

【0037】

本明細書で定義される、「治療において使用するための」という表現は、遺伝的に改変された感染性MV-deltaCが、特にヒトにおいて、悪性腫瘍または個体において診断される癌の症状を完全に根絶する、または腫瘍の大きさを減少させる、またはそのような悪性腫瘍または癌状態の症状を緩和するために、個体に投与する方法に用いることができることを意味する。特定の実施形態では、本発明によるMV-deltaCを含むウイルス療法は、他の治療、特に化学療法を伴ってもよい。従って、MV-deltaCを含むウイルス療法は組み合わせにおいて使用されてもよいし、治療レジメンに付加されてもよい。

【0038】

本明細書で定義される、表現「侵襲性の強い悪性腫瘍または侵襲性の強い癌」は、化学療法、放射線療法および/または外科手術などの現在知られている従来の治療法に抵抗性であり、結果としてそのような従来の治療にもかかわらず進行する悪性腫瘍または癌を意味する。

【0039】

本明細書で定義される、「形質細胞様樹状細胞（pDC）を活性化することによって」とは、大量のIFN- γ を産生する、および/または腫瘍特異的CD8 + Tリンパ球に対して、MVまたはMV-deltaCに感染した腫瘍細胞からTAAをクロス提示する、能力を活性化することにより抗腫瘍免疫応答においてpDCを用いる、MVまたはMV-deltaCに感染した腫瘍細胞をいう。

【0040】

本明細書で定義される、用語「形質細胞様樹状細胞（pDC）」は、ウイルス性および細菌性の刺激に応答して、 γ インターフェロン（IFN- γ ）を大量に産生し、本発明において、抗原提示細胞を包含し、それらは腫瘍感染細胞を貪食することができると認識される。

【0041】

特定の実施形態では、MV-deltaCは、悪性中皮腫、特に悪性胸膜中皮腫の治療に使用することができる。

【0042】

別の特定の実施形態において、本発明は、メラノーマまたは肺腺癌の治療に使用するための、このような状態であると診断された個体に投与した場合に、ウイルスアクセサリCタンパク質をコードする遺伝子がノックアウトされた、生弱毒化麻疹ウイルス株（MV-deltaC）由来の遺伝的に改変された感染性麻疹ウイルスに関する。

【0043】

本発明の他の特定の実施形態において、本発明は、悪性腫瘍または癌状態と診断された個体に投与された場合に、未改変のMVに対して抵抗性である悪性腫瘍または癌細胞の治療に使用することができる、遺伝的に改変された感染性MV-deltaCを提供する。

【0044】

表現「未改変のMV」は、シュワルツ株またはモラテン（Moraten）株のウイルスのような、遺伝的に改変されていないMVの感染性生弱毒株をいう。

【0045】

本明細書で定義される、表現「未改変MVに抵抗性である悪性腫瘍または癌細胞」とは、

10

20

30

40

50

未変換MVの十分な感染にもかかわらず、細胞死の誘導に抵抗すること、またはMV-deltaCよりも未変換MVによる細胞死誘導に対してより弱い応答を起こすことが知られている、悪性腫瘍または癌細胞をいう。

【0046】

本発明者らは、MV-deltaCを様々な悪性腫瘍または癌細胞に投与すると、未変換MVを投与したときの応答に関して改善された応答が提供または誘導され、特に、より低い濃度レベルで、短い応答時間と改善された免疫原性特性で(Kroemer, G. et al, Annu. Immunol, 2012, 31:51-72)、改善されたアポトーシス活性を誘導させることを示している。

【0047】

本発明の特定の実施形態によれば、遺伝的に改変された感染性MV-deltaCは、MV-deltaCに感染した悪性腫瘍または癌細胞においてアポトーシス活性を示す。

10

【0048】

本明細書で定義される、表現「アポトーシス活性」とは、細胞においてアポトーシスを誘導または誘導する能力を意味し、それは悪性腫瘍または癌細胞における、特に実施例の悪性中皮腫、メラノーマおよび肺腺癌細胞における、インビトロアポトーシスで実証することができる。

【0049】

本発明のMV-deltaCウイルスが示す活性は、免疫応答の分子の産生によって、または細胞ストレスまたは細胞死において、特徴づけることができる。これらの分子は、HMGB-1(ハイモビリティグループボックス-1)、免疫応答の活性化に関与する危険信号として記載されたカルレチキュリンおよび熱ショックタンパク質(Hsp70の)を包含する(Zitvogel, L et al Cell, 2012, 140: 798-804)。

20

【0050】

カスパーゼ-3は、アポトーシスプログラムの後期のイベントに関与することが知られている(Duprez, L. et al, Microbes Infect, 2009, 11(13): 1050-1062)。

【0051】

本発明の特定の実施形態によれば、遺伝的に改変された感染性MV-deltaCはMV-deltaCに感染した悪性腫瘍または癌細胞におけるカスパーゼ-3の活性化を誘導する。

【0052】

感染細胞の原形質膜の外層上のHsp70タンパク質の存在は、免疫応答、特に抗原提示細胞および先天性細胞免疫エフェクターによる認識、に関与している(Oglesbee et al, Viral Immunol, 2002, 15(3): 399-416)

30

【0053】

本発明の特定の実施形態によれば、遺伝的に改変された感染性MV-deltaCはMV-deltaCに感染した悪性腫瘍または癌細胞における形質膜の外層へのHsp70タンパク質の暴露を誘導する。

【0054】

カルレチキュリンは、細胞ストレスの間に、原形質膜の外側の層に再局在化することができる小胞体の必須のタンパク質である(Heal et al, Biochem J 1998, 329(2), 389-394)。特に、細胞表面へのこの暴露により、抗原提示細胞によるアポトーシス細胞の貪食が可能になる(Ogden et al, J Exp Med, 2001, 194(6): 781-795)。最近、いくつかの研究では、細胞表面におけるカルレチキュリンの暴露は、その死の免疫原性を規定すると仮定されている(Obeid et al, Nat Med, 2007, 13(1): 54-61)。

40

【0055】

本発明の特定の実施形態によれば、遺伝的に改変された感染性MV-deltaCはMV-deltaCに感染した悪性腫瘍または癌細胞の表面へのカルレチキュリンの移行を誘導する。

【0056】

免疫原性細胞死の際に環境中に放出されたHMGB-1(高移動度グループボックス-1)タンパク質は、TLR4(Apetoh et al, Nat Med, 2007, 13(9): 1050-1059)およびTLR9のような異なる受容体に結合することにより、樹状細胞の成熟に作用する(Tian et al, Nat Immu

50

nol, 2007, 8(5): 487-496)。

【 0 0 5 7 】

本発明の特定の実施形態によれば、遺伝的に改変された感染性MV-deltaCは、MV-deltaCに感染した悪性腫瘍または癌細胞の細胞外の培地中のHMGB-1の解放を誘導する。

【 0 0 5 8 】

本発明者らは、ヒト癌細胞株 (A549ヒト肺腺癌細胞およびHeLa子宮頸癌細胞) および非癌細胞 (HEK 293ヒト胚性腎臓細胞およびヴェラアフリカミドリザル腎臓細胞) における細胞死の誘導を比較した。本発明者らは、MV-deltaCは、低いMOIでも (図23A)、A549およびHeLaヒト癌細胞の両方で未改変MVよりもはるかに高く早期に細胞死を誘導することを実証した。本発明者らはまた、感染の68時間後 (図23B) にHEK 293細胞ではいかなる細胞死も観察されなかったのに対し、ペロ細胞における細胞死の誘導は、未改変のMVおよびMV-deltaC両方について同様であったことを観察した。このように、本発明者らは、MV-deltaCはヒト癌細胞に特異的であることを証明した; 実際、ヒト癌細胞に接触させたときに、MV-deltaCは、未改変MVよりも高いアポトーシス活性を示したが、実験室細胞株、すなわちVero細胞に接触させたときには、未改変MVと同様のアポトーシス活性しか示さなかった。

【 0 0 5 9 】

本発明はまた、以下の工程:

- 事前に個体から採取した悪性腫瘍または癌細胞をインビトロで生弱毒化麻疹ウイルス株由来の感染性麻疹ウイルスに感染させて、細胞溶解物を生成するステップ;
- 細胞溶解物とpDCを接触させてワクチンのpDCを得るステップ;
- ロードされたpDCを回収するステップ;

を含む、悪性腫瘍または癌状態と診断された個体の悪性腫瘍または癌を治療するためのワクチンの形質細胞様樹状細胞 (pDC) を調製するための方法に関する。

【 0 0 6 0 】

本発明はまた、以下の工程:

- 事前に個体から採取した悪性腫瘍または癌細胞を、インビトロで、ウイルスアクセサリ-Cタンパク質をコードする遺伝子がノックアウトされた、生弱毒化麻疹ウイルス株由来の遺伝的に改変された感染性麻疹ウイルス (MV-deltaC) で感染させて細胞溶解物を得るステップ;
- 細胞溶解物とpDCを接触させてワクチンのpDCを得るステップ;
- ロードされたpDCを回収するステップ;

を含む、悪性腫瘍または癌状態と診断された個体の悪性腫瘍または癌を治療するためのワクチンの形質細胞様樹状細胞 (pDC) を調製するための方法に関する。

【 0 0 6 1 】

本発明では、上記定義された方法の悪性腫瘍または癌は、侵襲性の強い悪性腫瘍または侵襲性の強い癌であり、特に悪性中皮腫、メラノーマまたは肺腺癌である。

【 0 0 6 2 】

本発明では、上述に規定された方法の生弱毒化麻疹ウイルス株は、シュワルツ株またはMoraten株である。

【 0 0 6 3 】

MV-deltaCが個体に投与される場合、それは、胸膜腔を介して、または鼻腔内、筋肉内、静脈内または皮下の経路によって投与することができる。MV-deltaCが胸膜腔を介して投与される場合、好ましくは近接してまたは直接に、治療される悪性腫瘍または癌細胞に投与される。

【 0 0 6 4 】

投与されるMV-deltaCの治療有効量は、好ましくは $10^3 \sim 10^9$ 50%組織培養感染用量 (TCID50) の範囲である。TCID50の測定は、当業者に知られており、特にカーバーによって記述されている (Karber, Arch. Exp. Pharmacol., 1931, 162:840-483)。

【 0 0 6 5 】

ワクチンのpDCのex vivoでの準備を有効にするために個体から悪性腫瘍または癌細胞を採取するステップは、好ましくはワクチンのpDCの製造方法には含まれない。このステップは、生検および滲出（すなわち、胸膜滲出）のような当業者に知られている細胞の任意の採取またはサンプリング技術に従って行うことができる。例えば、採取された後、悪性腫瘍または癌細胞は、古典的な技法に従って培養で維持、または凍結（すなわち、-80で）することができる。悪性腫瘍または癌細胞がワクチンのpDCによって治療される個体に由来していない場合、それらは、特に同種悪性中皮腫、メラノーマと肺腺癌細胞株に由来していてもよい。

【0066】

上記に定義された調製物のインビトロの方法で、悪性腫瘍または癌細胞のMV-deltaCでの感染は、直接の接触、例えば感染多重度（MOI）1での37℃2時間のインキュベーションによって行うことができる。感染後、感染細胞の死はウイルスの作用によって自然に進む。合胞体（syncytia）は、通常、最初に、細胞の溶解に引き続いて形成され、それによってワクチン製剤に適した細胞溶解物が提供される。この現象は、感染細胞を直接顕微鏡観察によって証明することができる。

【0067】

本明細書で定義されるように、用語「細胞溶解物」は、本明細書に開示されているようにして得られる細胞溶解物の全体（または合計）、または膜画分（すなわち、細胞質内封入体またはアポボディ（apobodies））等の細胞溶解物の画分を包含する。

【0068】

pDCは、当業者に周知の多数の方法によって得ることができる。本発明の特定の実施形態では、pDCは、好ましくは、治療される個体に由来する。現在は、pDCは白血球搬出（leukapheresis）に由来することが好ましい。pDCを得ることは、特に、当業者によく知られている。好ましくは、pDCはCoulaisにより記載された一般的な方法に従って得ることができる（Coulais, D et al., Cytotherapy, 2012, 14(7): 887-896）。pDCが、治療される個体に由来する場合には、pDCは、前記個体の白血球搬出法から得ることができる。

【0069】

当業者には明らかであろうように、pDCおよび細胞溶解物の接触は、細胞溶解物中に存在する抗原によってpDCの効果的なローディングを可能にするのに十分な時間維持されるべきである。一度ロード（またはパルス）されれば、本発明のワクチンのpDCが得られる。ローディング（充填）は、Gauvrit (Gauvrit, A et al, Cancer Res, 2008, 68(12), 4882-4892)によって記載された一般的な方法論に従うことによって進行させることができる。pDCの効率的なローディングを可能にするのに十分な、pDCおよび細胞溶解物との間の典型的な接触時間は約24時間である。通常、pDCがロードされた後に、pDCのための活性化状態が到来する。pDCの活性化状態（または成熟した状態）は、膜またはサイトカインマーカーとして当業者に周知の多数のマーカーによって証明することができる。活性化された樹状細胞のこのようなマーカーは、特にBarchet (Barchet, W et al., Seminars in Immunology, 2005, 17(4):253-261) とMarafioti (Marafioti, T et al, Blood, 2008, 111(7):3778-3792)によって記載されている。

【0070】

このように、本発明の製造方法に従って得ることができるワクチンのpDCは、それらが抗腫瘍CD8 T細胞の強力な刺激物質であるので、特に有利である。同様に有利なことに、本発明の調製方法は、活性化状態のワクチンpDCの製造を可能にする。

【0071】

本発明は、特に上記定義の調製方法によって得られるワクチン樹状細胞に関する。本発明の特定の実施形態によれば、悪性腫瘍または癌状態と診断された個体に投与したときに、ワクチンのpDCは、侵襲性の強い悪性腫瘍または侵襲性の強い癌の治療に用いることができる。

【0072】

より詳細には、そのような状態であると診断された個体に投与した場合に、悪性中皮腫

10

20

30

40

50

、メラノーマ、または肺腺癌の治療に使用することができる。MV-deltaCの適用に関連して本明細書に開示された実施形態は、本明細書に記載されているとおりのpDCの使用に、同様に関連する。

【0073】

本発明者らは、インビトロでの、活性化された状態のヒトのpDCと特異的CD8 + T細胞クローンに対する腫瘍抗原を交差提示する能力に及ぼす、MVシュワルツによる腫瘍細胞の感染の影響に取り組んだ。本発明者らは、CD46の発現にもかかわらず、pDCは、MV感染に感受性ではなかったことを示した。しかし、pDCは、IL-3が培養物に添加されると、より高い感度で、IFN- γ を産生することによって、インビトロでMVに応答することができた。本発明者らはまた、紫外線照射腫瘍細胞では見られなかったのに対し、MV感染腫瘍細胞は、特にpDCの活性化、特にIFN- γ の産生を引き起こしたことを実証した。pDCの活性化は、おそらく、MVの一本鎖RNAによって引き起こされ、それはMV感染腫瘍細胞の貪食に続くpDCエンドサイトーシスコンパートメントにおけるTLR7を引き起こした。興味深いことに、本発明者らは、MV感染腫瘍細胞と共培養されたヒトpDCは、特定のCD8 + T細胞クローンに対してNYESO-1腫瘍抗原を交差提示することができたことを、初めて、説明として示した。これらの結果は、直接的な腫瘍溶解効果に加えて、MVベースの抗腫瘍ウイルス療法は、pDCを活性化することにより抗腫瘍免疫応答を誘導することができる、ということを示唆している。変異したウイルスによる腫瘍細胞の感染では、同様のことが起こるので、MV-deltaCを使用しても同様の結果が期待されている。MV-deltaCは、腫瘍細胞の感染後に危険信号（カルレチキュリンとHsp70）がより高く発現されることにつながり、感染細胞もMV-deltaCの一本鎖RNAを発現するので、より高い応答が期待される。

【0074】

本発明はまた、悪性腫瘍または癌状態と診断された個体に投与した場合に、pDCを活性化することによる、侵襲性の強い悪性腫瘍または侵襲性の強い癌の治療に使用するための、薬学的に許容されるビヒクルと一緒に、活性成分として、上記で定義された方法により得ることができる遺伝的に改変された感染性MV-deltaCまたはワクチンのpDCを含む医薬組成物も対象とする。

【0075】

本明細書で定義されるように、薬学的に許容されるビヒクルは、組成物中のMV-deltaCの処方を可能にする任意の物質を包含する。ビヒクルは、生理学的に許容される任意の物質または物質の組み合わせであり、すなわち、ホスト、特にヒトと接触する組成物中での使用に適したものであり、従って非毒性である。このようなビヒクルの例としては、リン酸緩衝生理食塩水、蒸留水、油/水エマルジョンなどのエマルジョン、様々な種類の湿潤剤滅菌溶液などである。

【0076】

本発明はまた、侵襲性の強い悪性腫瘍または癌状態と診断された個体に投与された場合に、侵襲性の強い悪性腫瘍または癌の治療に用いるための、上記で定義された方法により得ることができる遺伝的に改変された感染性MV-deltaCまたはワクチンのpDCを含む医薬組成物または活性成分のアセンブリであって、さらに化学療法薬および薬学的に許容されるビヒクルを含む医薬組成物または活性成分のアセンブリにも関する。

【0077】

本明細書で定義されるように、化学療法剤は、悪性腫瘍または癌の治療に使用することができる分子である。化学療法剤の性質は、悪性腫瘍または癌の種類に依存するであろう。化学療法剤の例は、当業者に知られている。

【0078】

また、本発明は、悪性腫瘍または癌状態と診断された個体に投与された場合に、侵襲性の強い悪性腫瘍または侵襲性の強い癌の治療において同時のまたは別々の投与に使用するための、(i) 生弱毒化MVまたは遺伝的に改変された感染性MV-deltaCおよび(ii) 上記で定義された方法により得ることができるワクチンのpDCを含む活性成分のアセンブリにも向けられている。

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1】MVとMV-deltaCを示す図である。A) MVゲノムの概略図と遺伝子順序は、P遺伝子はP、VおよびCタンパク質をコードしていることを示す（P、VおよびCのORFが示されている）。B) プラスミドpTM-MV Schw（配列番号3）およびpTM-MV Schw-deltaC-ATU1 (eGFP) のヌクレオチド配列の一部である。位置2788でのネイティブMV SchwゲノムcDNAのTヌクレオチドは、Cヌクレオチドによって置換されている（配列番号4）。この最初の変異に加えて、第二の突然変異は、Cオープンリーディングフレームの下流の停止コドンすなわち、「TAG」終止コドンをつ加することによって導入することができ、これはネイティブMV SchwゲノムcDNAの位置2803のGヌクレオチドをAヌクレオチドによって置換することにより得られる（配列番号5）（導入されたヌクレオチド変異は下線が引かれている）。

10

【図2】MV、MV-deltaV、MV-deltaCおよびMV-P_{G954}による、P、VおよびCタンパク質の発現を示す図である。異なるウイルスに感染したペロ細胞の溶解物をSDS-PAGEゲル上で分画した後、P、V、Cタンパク質は、特異的なモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットにより検出した。

【図3】MV、MV-P_{G954}、MV-deltaVとMV-deltaCの複製動態を示す図である。ペロ細胞（A）、HeLa細胞（B）、ジャーカット細胞（C）およびU937細胞（D）を1のMOIで異なるウイルスに感染させた。細胞関連ウイルス力価をTCID₅₀値として測定した。

【図4】ペロおよびHeLa細胞上でのMVおよびMV-deltaCの細胞変性効果を示す図である。上のパネル：MVまたはMV-deltaC（0.1のMOI）を感染させた24時間後のVero細胞上に誘導された細胞変性効果。下のパネル：MVまたはMV-deltaC（0.1のMOI）での感染24時間後のHeLa細胞の免疫蛍光。細胞を固定し、MVのモノクローナル抗ヘマグルチニン（H）で染色した。

20

【図5】MVまたはMV-deltaCで感染させたVero細胞におけるウイルスタンパク質の発現の速度論を示す図である。細胞を、1のMOIで感染させ、その後、種々の時点で溶解した。細胞溶解物をウェスタンブロットによって分析し、ウイルスタンパク質NおよびVは、特異的なモノクローナル抗体（抗Nクローン120, Naniche, D. et al., J Gen Virol, 1992, 73(10):2617-2624; 抗V, Takeuchi, K. Et al, FEBS Letters, 2003, 545 (2), 177-182)を用いて同定した。

【図6】MV-P_{G954}、MV-deltaVまたはMV-deltaCで免疫したCD46/IFNARマウスで誘導される抗MV体液性応答を示す図である。抗体価は、単一の接種2ヶ月後に採取した血清のELISAにより測定した。（A）マウスの異なる群からプールした血清の制限希釈解析。（B）マウスあたりの個々の力価。（C）グループごとの平均力価。抗体価は、非免疫化マウスからの血清のに対して計算された吸光度値の2倍を与える、試験された血清の限界希釈と定義した。

30

【図7】MV-deltaCによる感染と細胞死誘導を示す図である。A) 腫瘍細胞は、MVまたはMV-deltaCで感染させ（MOIは1、2 h）、感染後72時間で、FITCアネキシンVおよびヨウ化プロピジウムで二重染色した後、フローサイトメトリーにより分析した。データは、アネキシンVの細胞の割合を表す。B) ウイルス（MVまたはMV-deltaC）感染および非感染腫瘍細胞は、感染後72時間目に抗活性カスパーゼ-3抗体（BD Biosciences社）で染色した後、フローサイトメトリーによって分析した。パーセンテージは、MV-deltaC感染後の「活性化カスパーゼ3陽性」細胞の割合を示す。

40

【図8】細胞表面へのHsp70タンパク質の暴露を示す図である。膜のHsp70タンパク質の発現は、細胞外染色により、Mesol3とMeso56類上皮中皮腫細胞で感染後48時間またはA549肺腺癌およびML 7メラノーマ細胞で感染後72時間の時点で決定され、フローサイトメトリーで解析した。データは、Hsp70の細胞の割合を表す。

【図9】MV-deltaC感染後のカルレチキュリンの膜移行を示す図である。未感染腫瘍細胞および感染腫瘍細胞（MVまたはMV-deltaCで、MOIは1）は、Mesol3とMeso56類上皮中皮腫細胞について感染後48時間で、またはA549肺腺癌細胞およびML 7メラノーマ細胞について感染後72時間で、抗カルレチキュリン抗体およびCy5結合抗マウス二次抗体で染色し

50

た。次いで、細胞をフローサイトメトリーによって分析した。データは、カルレティキュリンの細胞の割合を表す。

【図10】細胞外環境におけるHMGB-1の放出を示す図である。未感染または感染（MVまたはMV-deltaC、MOI = 1）腫瘍細胞の上清を感染後24、48または72時間後に回収し、-20で保存した。これらの上清中のHMGB-1の量をELISAにより決定した。

【図11】MV受容体の発現、MV感染感受性と腫瘍細胞およびpDCの生存を示す図である。（A）腫瘍細胞株（M18、Mesol3およびA549）の表面およびpDC(mAb 染色：グレーのヒストグラム；アイソタイプコントロール：白のヒストグラム；ヒストグラム上の値は、相対的平均蛍光強度R-MFIであり、mAb染色のMFIをアイソタイプコントロールのMFIで割ったものとして定義される）。（B）腫瘍細胞株の感染（ML 8、Mesol3およびA549）およびMV-eGFP(MOI=1)によるpDC。（C）IL-3の存在下または非存在下でのMV-eGFPによるpDCの感染(MOI=1)。（D）IL-3の存在下または非存在下での、MOIを増加させながらのMV-eGFPによるpDCの感染。（E）MV感染またはUV照射後の腫瘍細胞株の生存。感染またはUV照射の3日後、細胞は死細胞を染色するTO-PRO(登録商標)3と一緒にインキュベートした。フローサイトメトリーで蛍光を分析した。図1A、1Cおよび1Eの結果は3回の独立した実験を表す。図1Bおよび1Eの結果は3回の独立した実験の平均を反映している。エラーバーは標準偏差を表す。

【図12】MV-EGFPまたはUV照射MV-EGFPによるpDCの感染を示す図である。IL-3またはMesol3細胞の存在下でのpDCは、そのみで培養（NI）またはMV-EGFP（MV）もしくはUV照射（312nm - 100kJ/m²）したMV-eGFP（MV*）と一緒にMOI = 50で、72時間（上パネル）または2時間の間培養した後70時間の間培養した（下のパネル）。蛍光をフローサイトメトリーによって分析した。

【図13】MV感染腫瘍細胞がpDCの成熟を誘導することを示す図である。pDCは、IL-3、MV（MOI = 1）、MVと一緒に、またはIL-3、R848、UV-照射-もしくはMV感染のいずれかの腫瘍細胞と一緒に、18時間培養した。（A）pDCによるCD83、CD86およびCD40の発現は、CD123⁺/BDCA-4⁺細胞上のゲートとのフローサイトメトリーで測定した。（B）ヒストグラムは、3つの独立した実験から得た。ノンパラメトリックマンホイットニー比較試験はサンプルの結果をIL-3pDCの結果と比較することにより得られるP値を決定するために使用した（* p < 0.05、** P < 0.01、*** p < 0.001）

【図14】MV感染腫瘍細胞に応答したpDCの活性化は、pDCにおけるMVの複製およびCD46による感染から独立していることを示す図である。（A）pDCは、IL-3のみ、R848、培養したIL-3/MV-eGFP（MV）、10mg/mlの抗CD46と一緒にIL-3/MV-eGFP、またはIL-3/UV照射MV-eGFP（MV*）とMOI = 1で、18時間の間培養した。pDCによるCD83、CD80およびCD86の発現をフローサイトメトリーによって決定した。pDC（BDCA-4⁺/HLA-DR⁺細胞上のゲート）によるCD83、CD80およびCD86の発現をフローサイトメトリーによって決定した。（C）pDCによるIFN- γ 生産はELISAによって測定した。（D）ELISAによって測定したpDCによるIFN- γ 生産。（D）培養72時間後の10mg/mLの抗CD46モノクローナル抗体によるM18のMV-eGFP感染阻害。

【図15】(A) pDCによるMV感染またはUV照射腫瘍細胞の貪食。(A) MV感染またはUV照射腫瘍細胞をPKH-67で染色し、(1 DC : 1腫瘍細胞)で18時間培養した。細胞は、HLA-DR-特異的mAbで染色した。蛍光をフローサイトメトリーによって分析した。この実験は、4回の実験の代表である。エラーバーは標準偏差を表す。（C）MV感染腫瘍細胞をPKH-67（緑色）で染色し、pDCと18時間共培養した。細胞は、HLA-DR特異的mAb（赤）で染色した。蛍光は、共焦点顕微鏡法により分析した。

【図16】MVに応じた、pDCによるIFN- γ の産生は、TLR7に依存していることを示す図である。（A）pDCは、IL-3、MV（MOI=1）、MVおよびIL-3、R848、UV-照射またはMV感染のM18またはA549腫瘍細胞と一緒に18時間培養した。IFN- γ の産生を、培養上清中でELISAによって測定した。（B）pDCをIL-3ありまたはなしで、MVの量を増加させて18時間培養した。IFN- γ の産生を、培養上清中でELISAによって測定した。（C）pDCを、IRS661（TLR7阻害剤）の異なる濃度の非存在下または存在下で、IL-3およびMV（MOI=1）、CpG-AまたはMV感染のM18とともに18時間培養した。IFN- γ 産生を、培養上清中でELISAによって測定した。

結果は、3回の独立した実験から得た。

【図 1 7】MVに感染したNYESO-1+/HLA-A*0201- M18腫瘍細胞との共培養後の、HLA-A*0201 + pDCによるNYESO-1の交差提示を示す図である。(A)リアルタイムPCR (n=3) によって決定されたM18およびA549腫瘍細胞株によるNYESO-1の発現。(B) pDCは、IL-3、R848、またはUV-照射もしくはMV感染のM18腫瘍細胞と一緒に18時間培養した。R848と一緒に培養した一部のpDCは1時間NYESO-L (157-165) ペプチドでパルスし、洗浄した。pDCは、その後、プレフェルジンAの存在下で、HLA-A*0201/NYESO-1 (157-165) に特異的なM117.167 CD8 + T細胞クローン (LTと定義される) と一緒に6時間培養した。M117.167 T細胞クローンによるIFN- γ の産生は、CD8およびIFN- γ 特異的mAbで染色した後、フローサイトメトリーによって分析した。(C) pDCは、R848、またはUV-照射もしくはMVに感染したM18 (NYESO-1+/HLA-A*0201-) またはA549 (NYESO-1-/HLA-A* 0201) 腫瘍細胞と一緒に18時間培養した。R848と一緒に培養した一部のpDCは1時間NYESO-L (157-165) ペプチドでパルスし、洗浄した。pDCは、その後、プレフェルジンAの存在下で、HLA-A*0201/NYESO-1 (157-165) に特異的なM117.167 CD8+ T細胞クローン (LTと定義される) と一緒に6時間培養した。T細胞クローンは、CD8-およびIFN- γ 特異的mAbで染色した後、フローサイトメトリーによって分析した。(D) 散布しているプロットは交差提示実験を表す。「n」は、行った実験の回数を表す。利用できるpDCの量が限られているため、本発明者らは各実験のすべての制御を行うことができなかったため、「n」は一つの状態から他の状態へ異なる。

【図 1 8】交差提示の実験で使用した培養条件の概略図を示す図である。

【図 1 9】(A) および (B) 未改変MVまたはMV-del taCによるメラノーマ細胞の感染および細胞死を示す図である。MOI = 1で未改変MVまたはMV-del taCで感染後24時間、48時間および72時間で誘導された感染のレベルと細胞死のフローサイトメトリーによる試料分析。MV-del taCワクチン株は、改変されていないMVワクチン株による感染に対して抵抗性であった腫瘍細胞を効率的に感染させた。メラノーマ腫瘍細胞は異なるMOIで2時間、改変されていないMV-eGFPまたはMV-del taC eGFPで感染させた。

【図 2 0】未改変のMVまたはMV-del taCによるメラノーマ細胞の細胞死を示す図である。メラノーマ腫瘍細胞は異なるMOIで2時間、改変されていないMV-eGFPまたはMV-del taC eGFPで感染させた。各細胞株の誘導された細胞死の割合 (非感染細胞におけるTopro+細胞の% - 感染細胞におけるTopro+細胞の%) は、感染の24時間、48時間および72時間後に、フローサイトメトリーによって決定した。

【図 2 1】未改変のMVまたはMV-del taCによるメラノーマ細胞の感染後の「危険信号」の発現を示す図である。(A) 改変されていないMVまたはMV-del taCによる感染後24時間、48時間および72時間でのHSP70とカルレチキュリン (CRT) の発現のフローサイトメトリー分析の例。(B) 未改変のMVおよびMV-del taCに感染 (MOI=0.5) させた腫瘍細胞と、感染していない腫瘍細胞とにおけるHSP70タンパク質およびCRTの膜発現は、感染後72時間で細胞外マーキングおよびフローサイトメトリーによって測定した。

【図 2 2】MV-del taCでの腫瘍内注射後の生体内メラノーマ腫瘍増殖を示す図である。移植した腫瘍は、コントロールとして正常な腫瘍の成長を視覚化するためにPBSを注射した。これらのコントロールマウスでは、腫瘍体積が13日以内に45mm³から150mm³に増加した。MV-del taCで処置した群では、腫瘍容積のより大きな減少は注射後10日で観察され、25mm³に達し、腫瘍は注射後14日で除去された。

【図 2 3】MV-del taCまたは未改変のMVでの感染後の癌および非癌細胞の生存を示す図である。ヒトA549およびHeLa癌細胞 (A) およびHEK293とベロ非癌細胞 (B) は、異なるMOI (三重) でMV-del taC (グラフ中の黒いバー) または未改変MV (グラフの白いバー) に感染した。培養の24、46および68時間後、生存細胞の数を、CellTiter-GLO試薬、ATP定量によって培養ウェルにおける代謝活性細胞の数を評価し、ルシフェラーゼに基づくアッセイを用いて決定した。

【図 2 4】癌と非癌細胞での未改変のMVおよびMV-del taCの複製動態を示す図である。ヒトA549、HeLa癌細胞、HEK 293およびヴェラ非癌細胞は、MV-del taCまたはMOI 1 (三重) で未改変MVに感染した。ウイルス力価は、TCID₅₀として決定した。

【実施例】

【0080】

実施例 1

未変換のMVおよびMV-deltaCの比較研究

未変換のMVを用いたインビトロ感染。未変換のMVを用いたインビトロ感染で、生弱毒化MVシュワルツ株はF. Tangy (パスツール研究所、フランス) から入手した。シュワルツMVがRadeckeによって記載されパークス (Parks et al, J. Virol, 1999, 73:3560-3566) により改変された (Radecke et al., EMBO J., 1995, 14:5773- 5784) ヘルパー細胞ベースのレスキューシステムの使用によりcDNA、PTM-MV Schw (2002年6月12日に番号I-2889の下でCNC M (パリ、フランス) にパスツール研究所によって寄託された) から救出された。簡単に言えば、293-3-46ヘルパー細胞は、PTM-MV Schwを5 µgとシュワルツMV-L遺伝子を発現するpEMC-Lschw0.02 µgでトランスフェクトした (Combredet et al, J. Virol., 2003, 77: 11546-11554)。37 °Cで一晩インキュベートした後、熱ショックを43 °Cで2時間適用し、そしてトランスフェクトされた細胞を、ベロ細胞単層上に移した。共培養15日に登場した合胞体を35 mmのウェルに移し、その後5% FCS DMEM中でのベロ細胞培養物の75cm²および150 cm²のフラスコに展開された。合胞体が80~90%コンフルエンスに達したとき、細胞を少量のOptiMEM中に掻き取り、一度凍結融解した。低速遠心分離で細胞破片にペレット化した後、ウイルス含有上清を-80 °Cで保存した。組換えMVストックの力価はベロ細胞上のエンドポイントの限界希釈アッセイによって決定した。TCID₅₀はカーバー法 (Karber, Arch. Exp. Path. Pharmacol., 1931, 162:480-483) を用いて算出した。

【0081】

MV-deltaCを用いたインビトロ感染。改変されていないMVについての、W02004/000876に記載のものと同様のプロセスによって、MV-deltaCもHEK293-T7-MVヘルパー細胞上の逆遺伝学によって救出しヴェラ細胞で増幅した。MV-deltaCゲノムをコードする適切なcDNAクローンは、前記出願に開示されているようにMVの精製ウイルス粒子からか、またはP遺伝子のN末端領域の (+1) ORF中に存在する第二の開始コドン「ATG」の突然変異によって改変されたプラスミドpTM- MV Schwから調製してプラスミドpTM- MV Schw-deltaC-ATU1 (eGFP) を得た。具体的には、「ATG」コドンはTからCへの突然変異によって「ACG」コドンで置換した (配列番号1) (図1B)。同様に、MV-deltaCの変異体はまた、位置2803でAヌクレオチドによってGヌクレオチドを置換する追加の置換が行われた、配列番号2のヌクレオチド配列を有する変異プラスミドPTM-MV Schw-deltaC-ATU1 (eGFP) を用いた逆遺伝学によって救出された。

【0082】

MV-deltaCの特徴づけ。Cタンパク質をコードする遺伝子がノックアウトされ、PおよびVタンパク質が依然として発現されることを確認するため、特異的モノクローナル抗体を用いて感染したベロ細胞の溶解物でのウエスタンブロット法を行った (anti-P; anti-V and anti-C, Takeuchi, K. Et al., FEBS Letters, 2003, 545 (2), 177-182) (図2)。

【0083】

したがって、MVdelta-CでのP、VおよびCタンパク質の発現を、MV、MV-deltaV (Vタンパク質がノックアウトされているMV) およびMV-P_{G954} (P遺伝子が野生株 (すなわちG954) のP遺伝子によって置換されているMV) で得られた結果と比較した。図2は、MV-deltaCは、VおよびPタンパク質は正しく発現しているのに対し、もはやCタンパク質を発現しなかったことを示している。MV-deltaCに存在する突然変異安定性は、ベラ細胞上のウイルスの10継代後にゲノム配列決定により制御した：何らの復帰も認められなかった。

【0084】

MV-deltaCの増殖速度論。MV-deltaCの増殖速度論は、I型IFN応答の能力を有するか否かのいずれかの異なる細胞株で分析した (図3)。ベロ細胞 (アフリカミドリザル上皮細胞) が、IFN-γ遺伝子に欠失を有する (モスカ、JD、Pitha、PMモルセルBIOL, 1986, 6 (6)、2279年から2283年)、したがって、ウイルス感染時にこれらの細胞中ではI型IFN応答を開始することができない。これに対し、HeLa細胞 (ヒト癌上皮細胞)、Jurkat細胞 (

ヒトTリンパ球)およびU937(ヒト単球)応答はI型IFNを開始する能力がある。ペロ細胞で試験した他のMVウイルスと比較すると、MV-deltaCは最初の24時間の間に急速に増殖し、その増殖が急に減少した。増殖停止は、I型IFN応答の能力がある、試験した他の細胞型(HeLa細胞、ジャーカットおよびU-937)で確認された。このように、他の研究(Takeuchi, K. Et al., J. Virol., June 2005, 7838-7844; Patterson, J. B. et al, Virology, 2000, 267(1):80-89)とはコントロール的に、MV-deltaCの増殖不足は、IFNの存在または非存在に関連していないようである。

【0085】

MV-deltaCの細胞変性効果。いくつかの説明は、MV-deltaCの急激な増殖停止を説明することができる。実際、MV感染ペロ細胞は、CD46受容体を発現し、隣接する非感染細胞とMV糖タンパク質を発現する感染細胞の融合から生じる巨大シンシチウム(多核細胞)の形成によって特徴づけられる。本発明者らは、MV-deltaCで誘導されるシンシチウム形成はペロ細胞での(図4)および試験した他のすべての細胞型での未改変のMVよりもはるかに高速であることを観察した。MOI=1での感染の24時間後から、ペロ細胞は、実質的にすべて巨大なシンシチウムにマージし、それは数時間後に突発した。これは、感染後24時間で観察された増殖の低下を説明する。生産的な感染をサポートするための、これ以上のナイーブ細胞は、培地の中で生き残っていなかったのである。感染細胞の早期アポトーシスが、観察されたウイルスの増殖停止の原因である可能性が高い。MVの病原性株(Ichinose)由来のMV-deltaCは、以前に親ウイルスよりも高い細胞変性効果を発揮することが示されている(Takeuchi, K. Et al, J. Virol, June 2005, 7838-7844)。

【0086】

MV-deltaCにより誘導される、悪化される細胞融合は、迅速かつ大量の細胞融合を促進する感染細胞の表面上の原因ウイルスタンパク質、特にHおよびF糖タンパク質、の大量の早期の産生のためである可能性がある。MV-deltaCまたは未改変MVに感染(MOI=1)したHeLa細胞でのウイルスヘマグルチニン(H)の発現の動態を、免疫蛍光法を用いて分析した。細胞を、FITCに結合したモノクローナル抗MV-H抗体で染色した(図4)。結果は、感染後24時間で、MV-deltaCは、より大規模な感染を引き起こし、未改変のMVよりもはるかに大量のHの発現を誘導することを示している。

【0087】

MVおよびMV-deltaCで感染させたペロ細胞におけるウイルスタンパク質の発現の動態。Cタンパク質の発現の非存在下でのウイルスタンパク質の産生の増加を確認するために、MOI=1でMV-deltaCまたは未改変MVを感染させたペロ細胞の溶解物中のウイルスタンパク質NおよびVの含有量を経時的に分析した(図5)。感染の6時間後から、核タンパク質Nは、MV-deltaCに感染した細胞で検出可能であった一方で、改変されていないMVの感染では21時間後にのみ検出可能であった。同じことがVタンパク質についても観察された。この結果は、MV-deltaCによる場合は、ウイルスタンパク質が未改変のMVによる場合よりもはるかに早く、より多くの量で、発現していることを示している。

【0088】

MV-deltaCの免疫原性。Cタンパク質発現のサイレンシングがMVワクチンベクターの免疫原性に及ぼす影響を評価するために、MV感染に感受性のCD46+/-IFNAR-/-マウスを免疫した(Combredet, C. et al, 2003, J Virol, 77(21): 11546-11554; Mrkic B. et al, J Virol, 2000, 74(3):1364- 1372)。これらのマウスは、MVワクチン株のヒトCD46受容体を発現するように遺伝的に操作し、I型IFN受容体(IFNAR)の発現を無効にした。これらは、一般的にMVベクターの免疫原性を評価するために使用されている(Brandler, S. et al., PLoS Neglected Tropical Diseases, 2007, 1(3):e96; Combredet, C. et al, 2003, J Virol, 77(21): 11546-11554)。IFN / は、これらのマウスにおいては無効であるが、このモデルは、まずインビボCタンパク質発現のサイレンシングの影響を評価するために用いた。MV-deltaCを、改変されていないMV、MV-deltaVおよびMV-P_{G954}と比較した。各ウイルスの10⁵ TCID₅₀の単回投与を、6匹のマウスの4つの群に腹腔内接種した。接種2ヶ月後に血清を回収し、抗MV抗体をELISA(トリニティ・バイオテック社)によって定量した(

図6)。

【0089】

I型IFN応答の能力のないこれらのマウスの中では、改変麻疹ベクターにより誘導される抗体のレベルが、改変されていないベクターにより誘導されるものに匹敵した。この結果は、未改変のMVと同様のインビトロ増殖速度を有するMV-deltaVおよびMV-P_{G954}ベクターについては驚くべきことではない。驚くべきことに、インビトロでの増殖低下を有するMV-deltaCベクターが、未改変のMVにより誘導されたものよりかろうじて低い抗体価を誘導したことである。この結果は、接種された投与量が観察される差よりも多すぎるか、または最小のウイルス複製が、体液性応答の飽和を引き起こすのに十分であったことを示している。以前サルで、MVの病原性株 (Ichinose) 由来のMV-deltaCの拡散が、野生型に比べて減少したことが示された (Takeuchi, K. Et al, J. Virol, June 2005, 7838-7844)。これらの予備的データは、I型のIFN応答の非存在下で、Cタンパク質のサイレンシングは、抗ウイルス体液性応答の確立に影響を与えないことを示している。

【0090】

実施例2

MVおよびMV-deltaCによる細胞死の誘導

細胞培養。インフォームドコンセントを得た癌患者から胸腔穿刺によって収集した胸水から、類上皮中皮腫細胞株 (Meso11、Meso13およびMeso56) と肺腺癌細胞株 (A549およびADK117) が確立され、特徴付けられた (Gueugnon F et al, Am J Pathol, 2011, 178: 1033-1042)。メラノーマ細胞株 (M17およびM18) はDrenoおよびN. Labarriere (癌研究センター、ナント、フランス) により合成された。肺腺癌細胞株 (A549) は、ATCCから購入した。類上皮中皮腫細胞株 (Meso11、Meso13およびMeso56) および肺腺癌細胞株 (ADK117) が単離され、F.Tangy (パスツール研究所、フランス) によって特徴付けられた。すべての細胞株は、10% (v/v) の熱不活性化ウシ胎児血清 (PAA Laboratories社、レミュロー、フランス)、2mMのL-グルタミン、100U/mLのペニシリンおよび100μg/mLのストレプトマイシン (すべてGibcoから購入) を補充したRPMI-1640培地 (Gibco-Invitrogen社、セルジ - ポントワーズ、フランス) 中で維持した。細胞を、加湿した5%CO₂雰囲気中で37℃で培養し、PCRによってマイコプラズマ汚染について通常のようにチェックした。

【0091】

細胞死分析。細胞死は、アポトーシス検出キット (BD Biosciences) を用いて感染3日後に測定した。簡単に述べると、細胞を15分間、FITC-アネキシンVおよびヨウ化プロピジウムで二重染色し、1時間以内にフローサイトメトリーによって分析した。MV-およびMV-deltaC特異的な細胞死は、その後決定した。細胞は、細胞外染色のために、以下の実施例に記載される特異的な抗体と共にインキュベートした。次いで、細胞をPBSで3回洗浄した後、フローサイトメトリー (FACSCalibur, BD Biosciences社) によって分析した。

【0092】

MVおよびMV-deltaCの感染および細胞死誘導能力を比較するため、3つの上皮中皮腫細胞株 (Meso11、Meso13およびMeso56)、2つのメラノーマ細胞株 (M17およびM18) と2つの肺腺癌細胞株A549およびADK117) の大パネルを改変されていないMVまたはMV-deltaCで、1.0の感染多重度 (MOI) で、2時間、37℃でのインキュベーションして感染させた。コントロール細胞株はMVまたはMV-deltaCで感染させなかった (図7)。腫瘍細胞を、感染の3日後にFITC-アネキシンVおよびヨウ化プロピジウムでの二重染色した後、フローサイトメトリーによって分析した。

【0093】

Meso11およびMeso13類上皮中皮腫細胞、M18メラノーマ細胞またはA549肺腺癌細胞は未改変のMVに効率的に感染した一方、Meso56類上皮中皮腫細胞およびADK117肺腺癌細胞は未改変のMVに弱く感染し、M17メラノーマ細胞は、非感染であった。たとえばアネキシンVの細胞の中等度または重要な割合が、改変されていないMVで効率的に感染した細胞 (Meso11およびMeso13類上皮中皮腫細胞、M18メラノーマ細胞およびA549肺腺癌細胞) で認められたとしても、MV-deltaCはより一層効果的にこれらの腫瘍細胞の死を誘導するができたこと

が分かった。未改変のMVが弱く感染した（Meso56上皮中皮腫細胞およびADK117肺腺癌細胞）、あるいは感染していない（M17メラノーマ細胞）腫瘍細胞がアネキシンVの細胞の非常に低い割合を示した一方、を感染させ、本発明者らは、驚くべきことに、MV-deltaCで感染させたこれら2つの細胞株については非常に高い細胞死の誘導が誘導されたことを発見した（図7A）。

【0094】

したがって、これらのインビトロの結果によれば、MV-deltaCは、未改変MVよりも、感染した腫瘍細胞においてより高いアポトーシスを誘導した。

【0095】

実施例 3

MVまたはMV-deltaC感染後のカスパーゼ3活性化

2つの上皮中皮腫細胞株（Meso13とMeso56）と、1つのメラノーマ細胞株（M17）と1つの肺腺癌細胞株（A549）のパネルを37℃で2時間インキュベーションして、未改変のMVまたはMV-deltaCを感染（1.0のMOIで）させた。コントロール細胞株はMVやMV-deltaCに感染させなかった。ウイルス（MVまたはMV-deltaC）感染および非感染腫瘍細胞を感染の3日後に、抗カスパーゼ-3抗体（BD Biosciences社）で染色した後、フローサイトメトリーによって分析した。

【0096】

試験した二つの異なる細胞株についてMV-deltaCの感染でカスパーゼ3の活性化が誘導された：Meso13類上皮中皮腫細胞：38.2パーセント、M17メラノーマ細胞：30.2パーセント、A549肺腺癌細胞：21.8パーセント、およびMeso56類上皮中皮腫細胞：8.4%。逆に、未改変MVの感染後には、このカスパーゼ3活性化はなかったか、部分的に観察された。これらの結果は、未改変のMVとMV-deltaCウイルスは、2つの異なる経路に応じて、腫瘍細胞死を誘導し得ることを示唆した。

【0097】

実施例 4

MVまたはMV-deltaC感染後の細胞表面へのHsp70タンパク質の暴露

腫瘍溶解性ウイルスの腫瘍細胞の感染は、細胞ストレスを引き起こす可能性がある（Fabian et al, J Virol, 2007, 81(6): 2817-2830）。これらのウイルスによって誘導される、感染だけでない細胞死は、免疫原性を有する分子の生産および環境中での解放につながる（Wang et al., Viral Immunol, 2006, 19(1): 3-9）。感染細胞から発信されたこれらの内因性危険シグナルは、実際に防御細胞によって認識され、適応した応答がトリガされる。単球に由来する、形質細胞様樹状細胞は、異なる受容体の発現のおかげでこれらの危険信号を認識している。免疫系は、このように腫瘍抗原の特定のリンパ応答を活性化することによって、ウイルスの直接的な腫瘍溶解活性と相乗的に働くことができる。

【0098】

腫瘍溶解性MVウイルスのワクチン株による腫瘍細胞の感染は、DCおよび自己Tリンパ球の活性化の成熟を可能にする（W02009/047331）。感染した細胞の免疫系の活性化が誘導されるメカニズムを特徴づけるために、細胞死の免疫原性におけるその関与が知られている、異なる細胞因子の発現、改変および/または放出が、本発明者らによって研究されている。例えば、HSP70ファミリータンパク質またはカルレチキュリンは、抗腫瘍免疫応答の活性化に関与することができる。

【0099】

未改変のMVとMV-deltaCに感染した腫瘍細胞の表面へのHsp70タンパク質の発現を分析した（図8）。2つの上皮中皮腫細胞株（Meso13とMeso56）と、1つのメラノーマ細胞株（M17）と1つの肺腺癌細胞株（A549）のパネルを37℃で2時間インキュベーションして、未改変のMVまたはMV-deltaCを感染（1.0のMOIで）させた。コントロール細胞株はMVやMV-deltaCに感染させなかった。ウイルス（MVまたはMV-deltaC）感染および非感染腫瘍細胞を感染の3日後に、抗カスパーゼ-3抗体（BD Biosciences社）で染色した後、フローサイトメトリーによって分析した。膜のHsp70タンパク質の発現は、感染二日後にMeso13とMeso56類

10

20

30

40

50

上皮中皮腫細胞または感染三日後にA549肺腺癌およびM17メラノーマ細胞について、細胞外染色およびフローサイトメトリーで測定した。

【0100】

細胞表面へのHsp70タンパク質の非常に小さい転位は、未改変MVに効率的に感染させた細胞（Meso13上皮中皮腫細胞およびA549肺腺癌細胞）およびMV抵抗性細胞（Meso56上皮中皮腫細胞およびML7メラノーマ細胞）の両方について観察された。逆に、MV-deltaCは、驚くべきことに、全ての細胞株について、細胞膜の外層へのHsp70タンパク質の強力な露出を誘導した。これらの結果は、MV-deltaCにより誘導される細胞死が、免疫原性の特性を示したことを示唆した。

【0101】

実施例5

MVまたはMV-deltaC感染後のカルレティキュリンの膜移転

細胞表面へのカルレティキュリンの移行への、未改変MVおよびMV-deltaCによる腫瘍細胞の感染の影響を調べた。これを行うため、感染した腫瘍細胞表面へのカルレティキュリンの存在を、細胞外染色（図9）により分析した。2つの上皮中皮腫細胞株（Meso13とMeso56）と、1つのメラノーマ細胞株（M17）と1つの肺腺癌細胞株（A549）のパネルを37℃で2時間インキュベーションして、未改変のMVまたはMV-deltaCを感染（1.0のMOIで）させた。コントロール細胞株はMVやMV-deltaCに感染させなかった。未改変のMVおよびはMV-deltaCは、Meso13とMeso56類上皮中皮腫細胞については感染二日後に、A549肺腺癌およびM17メラノーマ細胞については感染三日後に、抗カルレティキュリン抗体およびCy5結合抗マウス二次抗体で染色した。細胞はその後フローサイトメトリーで分析した。

【0102】

Hsp70のタンパク質と同様に、MV-deltaCでの感染は、驚くべきことに、未改変MVに効率的に感染した細胞（Meso13類上皮中皮腫細胞およびA549肺腺癌細胞）およびMV抵抗性細胞（Meso56類上皮中皮腫細胞およびML7メラノーマ細胞）の両方について、未改変のMVよりも細胞表面へのカルレティキュリンの強い転座につながった。これらの結果も、MV-deltaCにより誘導される細胞死が、免疫原性の特性を示したことを示唆している。

【0103】

実施例6

MVまたはMV-deltaC感染後の細胞外環境におけるHMGB-1の放出

未改変のMVまたはMV-deltaCによる腫瘍細胞の感染後の細胞外培地中のHMGB-1タンパク質の放出を検討した（図10）。2つの上皮中皮腫細胞株（Meso13とMeso56）を37℃で2時間インキュベーションして、未改変のMVまたはMV-deltaCを感染（1.0のMOIで）させた。コントロール細胞株はMVまたはMV-deltaCに感染していない。未感染または感染した（MVまたはMV-deltaC）腫瘍細胞の上清を感染一日、二日、三日後、回収し、-20℃で保存した。これらの上清中のHMGB-1の量をELISAにより決定した。

【0104】

MV-deltaCは、感染腫瘍細胞によるHMGB-1の効果的な放出を誘導した。MV-deltaCでの感染は、培養中の腫瘍細胞のより迅速な細胞死を誘導した。結果として、Meso13類上皮中皮腫細胞の結果により示されるように、MV-deltaCは、未改変のMVに比べHMGB-1の早期のリリースを誘導した。

【0105】

実施例7

形質細胞様樹状細胞

細胞培養

細胞株を、先に実施例2に記載したように培養した。

MV感染およびUV照射

生弱毒化シュワルツ株MVおよび組換えMV-強化緑色蛍光タンパク質（MV-EGFP）は前述のようにして生成した（Gauvrit, A. et al, Cancer Res., 2008, 68: 4882-4892）。特に断らない限り、腫瘍細胞のMV感染は感染多重度（MOI）1で37℃で2時間行った。ウイルス

10

20

30

40

50

接種物は、次いで、72時間、新鮮な細胞培地で置き換えた。pDCの感染と成熟の実験では、MVを洗浄しておらず、培養を通して培地にとどめた。感染率の測定は、感染24、48、および72時間後にMV-eGFPを用いたフローサイトメトリーによって行った。他のすべての実験は、MVを用いて行った。腫瘍細胞は、UV-Bを照射した ($312\text{nm} - 100\text{kJ}/\text{m}^2$ 、ストラタリンカー、ストラタジーン社)。

【0106】

DCの単離および培養

前述のように、pDCは、健康なドナーのPBMC(Etablissement Francais du Sang, Nantes, France)を、から入手した(Coulais, D. et al., Cytotherapy, 2012, 14:887-896)。簡単に言えば、pDCは、まず向流遠心分離によって濃縮し、製造業者のプロトコル (STEMCELL Technologies社、グルノーブル、フランス) で推奨されているように、次に磁気ビーズネガティブ選択により精製した。手つかずのpDCの純度は、常に96%よりも大きかった。pDC ($3 \times 10^5/\text{mL}$) は20ng/mlのrhIL-3 (シグマ、サンカンタンファラヴィエ、フランス) との培養で維持するか、またはTLR-7アゴニスト、R848 (InvivoGen社、サンディエゴ、米国) ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$) を用いてインビトロで活性化した。pDCは、MV単独、MVおよびIL-3 (MOI=1) またはMV感染またはUV照射腫瘍細胞 (PDC/腫瘍細胞: 1/1) と一緒に、rhIL-3または成熟剤なしで、共培養した。18時間後、培養上清とpDCを、使用のために回収した。TLR-7阻害アッセイのために、 $0.1 \mu\text{m}$ から $1 \mu\text{m}$ の範囲の濃度でTLR-7 [IRS 661] (ユーロフィン、ミュンヘン、ドイツ) を経由するシグナルを特異的に阻害する免疫調節DNA配列を用いた。pDCによるTLR-9依存性IFN- γ 分泌を誘導するために、コントロールとして、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のCpG-Aを使用した (InvivoGen, San Diego, USA)。

【0107】

免疫蛍光およびフローサイトメトリー

pDCの表現型はフローサイトメトリーに続いて免疫蛍光によって決定した。pDCは、CD40、CD86、HLA-DR (BD Biosciences社、サンノゼ、CA、USA)、CD83 (BioLegend、サンディエゴ、CA-USA) およびBDCA-4 (ミルテニオバイオテック社) に特異的なモノクローナル抗体で染色した。pDCを、腫瘍細胞と区別するために、BDCA-4+/HLA-DR+細胞としてゲートした。腫瘍細胞死は、製造業者によって推奨されるように染色TO-PRO (登録商標) 3 (Invitrogen社、サンオーバン、フランス) により測定した。TO-PRO (登録商標) 3は、死細胞のみに入ってDNAを染色する、遠赤色蛍光を有するカルボシアニンモノマー核酸である。蛍光は、フロージョーソフトウェアを用いてFACSCantoII (ベクトン・ディッキンソン、ニュージャージー州、USA) で分析した。

【0108】

食作用アッセイ

MV感染およびUV照射腫瘍細胞を製造業者のプロトコル (Sigma社、サンカンタンファラヴィエ、フランス) に従ってPKH-67で染色し、 4°C または 37°C (1 DC: 1腫瘍細胞) で18時間、pDCと共培養した。共培養物を、細胞複合体を解離させるためにPBS-EDTAで洗浄した。pDCはホライゾンV450コンジュゲート、抗HLA-DR抗体 (BD Biosciences社、San Jose側、CA、USA) により染色し、フローサイトメトリー (FACSCantoII、BD) によって分析した。pDCの食作用は、共焦点顕微鏡 (ニコン) で観察した。MV感染およびUV照射腫瘍細胞をPKH-67で染色し、その後、18時間、ポリリシンスライドガラスを含む24ウェルプレート中でpDCと共培養した (PDC: 腫瘍細胞比1:1)。pDCは、非結合抗HLA-DR (BD Biosciences社) で染色した。HLA-DR染色はAlexaFluor 568に結合された二次抗マウスIgG抗体を用いて明らかにした。

【0109】

サイトカイン検出

IFN- γ (MABTECH、シンシナティ、オハイオ州、USA) 産生は、製造業者の指示に従ってpDCの培養上清でELISAによって測定した。

【0110】

交差提示アッセイ

10

20

30

40

50

NYESO-1^{pos}/HLA-A*0201^{neg}メラノーマ (M18) と NYESO-1^{neg}/HLA-A*0201^{neg}肺腺癌 (A549) 細胞株はMV感染またはUV-Bは照射し、72時間培養した後、HLA-A*0201^{pos}pDCと共培養した (pDC: 1腫瘍細胞の比率1: 1)。18時間後、pDCは、ブレフェルディンA (シグマ、サンカンタンファラヴィエ、フランス) の存在下で6時間、HLA-A*0201/ NYESO-1 (156-165) 特異的CD8⁺T細胞クローンM117.167と共培養した。M117.167クローンはメラノーマ患者からの腫瘍浸潤リンパ球の限界希釈でクローン化することにより得た。前述のようにクローンを培養した (Fonteneau, J. F. et al, J Immunol Methods, 2001, 258: 111-126)。コントロールとして、本発明者らは、0.1または1 μ の NYESO-1 (156-165) ペプチドで1時間パルスし、洗浄したpDCを用いた。次いで、細胞を4%パラホルムアルデヒド含有PBSで室温で10分間固定し、透過性化し、前述のようにIFN- γ およびCD8特異的抗体 (BD Biosciences社、SanJose側、CA、USA) で染色した (Schlender, J. et al, J Virol, 2005, 79: 5507-5515)。IFN- γ 産生は、CD8⁺T細胞上のゲートで、フローサイトメトリーによって分析した。

【0111】

リアルタイムRT-PCR

トータルRNAの1マイクログラムを、モロニーネズミ白血病ウイルス逆転写酵素 (Invitrogen社、Saint Aubin、フランス) を用いて逆転写した。PCR反応は、製造業者の説明に従って、RT²リアルタイムSYBRグリーン/ROXのPCRマスターミックス (Tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, France) およびQuantiTectプライマー (キアゲン、フォスターシティ、米国) を用いて実施した。

【0112】

統計

グラフパッドプリズム (社、サンディエゴ、CA、USA) ノンパラメトリックマンホイットニーの比較テストを使用するソフトウェアを使用した。P値<0.05を統計的に有意であるとみなした。

【0113】

実施例8

MV感染に対する腫瘍細胞とpDCの感受性

感染の間、MVは主にCD46を介して、CD150/SLAMについてはより少ない程度で細胞に入る (Anderson, B. D. et al, Cancer Res., 2004, 64: 4919-4926; Schneider, U. et al, J Virol, 2002, 76: 7460-7467)。最初の実験で、本発明者らは、メラノーマ (M18)、中皮腫 (Meso13) および肺腺癌 (A549) 細胞株でのpDC上での2つの主要なMV受容体CD46およびCD150/SLAM、の発現を検討した (図11A)。CD46の発現はMeso13およびA549細胞株で高い発現で、全ての細胞型で観察された。CD150/SLAMの発現に関しては、M18メラノーマ細胞株の陽性発現が認められた。これらの結果は、それら全てがCD46を発現するので、すべてのこれらの細胞型は、MV感染に対して感受性であり得ることを示唆している。

【0114】

本発明者らは、次に、緑色蛍光タンパク質 (MV-GFP) をコードする組換えMVを使用して、これらの4つの細胞型のMV感染に対する感受性を調べた。MOI=1でのMVへの曝露72時間後に、3の腫瘍細胞株は生産的にGFPに対して陽性であり、A549細胞の50%からMeso13細胞の90%の範囲で、MV感染した (図11B)。さらに、3つの腫瘍細胞株で合胞体形成が観察され、pDCはMOI=1では許容しなかった。IL-3のような生存シグナルがなければ、pDCは、72時間の培養中に死亡した。このように、pDCがMVに曝露された場合にはIL-3を添加した実験を行った (図11C)。IL-3の存在下では、pDCには、72時間生存したが、生産的にMVに感染していなかった。この結果を確認するために、MOIを、IL-3の存在下で50まで増加したが、本発明者らは、感染したpDCを検出することができなかった (図11D)。しかし、MOI=50で蛍光の小さなシフトが観察され、これはおそらく72時間培養中に可溶性GFPが取り込まれたことによるものであり、MV-GFP調製物を汚染した。同様に、本発明者らが複製不可能なUV照射MV-GFPを使用した場合にも、このわずかな蛍光シフトはまだ観察された (図12)。ついに、MV-GFPをpDCとともにMOI=50で2時間インキュベートして洗浄したときには、本

発明者らは、70時間後に蛍光の小さなシフトを検出することができなかった（図12）。

【0115】

本発明者らはその後、感染72時間後に腫瘍細胞死を測定し、MV感染腫瘍細胞のほぼ半分が72時間後にT0-PRO+であることがわかった（図11E）。細胞死の同様のレベルは、UV-Bで腫瘍細胞を照射して観察された。従って、MV感染は感染72時間後の腫瘍細胞の約半分で、腫瘍細胞死を誘導する。

【0116】

実施例9

MV感染腫瘍細胞のpDCの成熟の誘導

本発明者らは、次に、pDC成熟へのMV単独およびMV感染細胞の効果を調査した（図13）。これらの実験では、彼らは、腫瘍細胞死の他の誘導物であるUV照射と比較して、MV感染感染が、pDCの成熟にどのように影響を与えるかを評価した。成熟のためのコントロールとして、pDCを、TLR7/8アゴニスト、R848に曝露した（図13Aおよび13B）。

【0117】

MV感染した悪性胸膜中皮腫（MPM）腫瘍細胞株、Meso13は、さらなるアジュバントなしで単球由来DCの成熟が誘導されることが以前に実証されているのに対し、ウイルス単独またはUV照射Meso13はしなかった（Gauvrit, A. et al, Cancer Res., 2008, 68:4882-4892）。本発明者らは、MV単独、MV-感染またはUV照射腫瘍細胞のpDC成熟状態への影響を測定するための、pDC上での一連の実験を行った。MV感染およびUV照射腫瘍細胞の影響を、pDCの成熟状態に比較した（図13）。UV照射腫瘍細胞はpDCを活性化しなかったのに対し、MV感染腫瘍細胞と共培養のpDCでは成熟が観察された。実際、MV感染細胞によって、CD83成熟マーカーの発現は、pDCがR848に曝露したときに観察されたものと同様のレベルまで誘導された。この誘導は、R848単独によるトリガレベルと比較して低かったが、本発明者らは、MV感染腫瘍細胞に暴露されたpDCにおいて、共刺激分子、CD40およびCD86の発現の誘導を観察した。

【0118】

二つの研究では、pDCの成熟を誘導するMV単独の能力に矛盾する結果を説明する報告がされている（Duhén, T. et al, Virus Res., 2010, 152: 115-125; Schlender, J. et al, J Virol, 2005, 79: 5507-5515）。しかし、IL-3なしで行われたSchlenderらの研究では、MVと共に培養したpDCがpDCの成熟を誘導しないことが観察されているのに対し、MVがpDCを活性化することを報告しているDuhénらの研究は、pDCの生存因子であるIL-3の存在下で行われている。したがって、本発明者らは、が実施され、二つの条件を比較し、これらの2人の著者によって記載されたものと同様の結果を発見したのである。実際、MOI = 1におけるMVは、IL-3の存在下でのみpDC成熟を誘導した（図13）。単独のR848で観察されたように、IL-3の存在下でのMVはpDC成熟を誘導し、これは主に顕著なCD83の増加と、より少ない程度の、CD40およびCD86の発現によって特徴付けられる。本発明者らはまた、MVの高い量にさらされた場合にのみ（MOI=50）、IL-3の非存在下でのpDCの生存および成熟を観察した。IL-3の非存在下において低いウイルス濃度では、pDCは死亡した。

【0119】

実験の最後のセットでは、本発明者らは、pDC中でのMV感染および複製が、それらの活性化を誘導するために必要であったかどうかを試験した。pDCは、複製することができないUV照射MV（MV*）に暴露され、非照射MVと同様のレベルの成熟（CD83、CD80およびCD86発現）およびIFN- γ 産生が観察された（図14Aおよび14C）。IL-3およびMVにさらされたpDCの培養の中でのブロックする抗CD46特異的抗体の存在は、pDCの成熟に影響を与えなかった（図14A）。同様の実験をMV感染腫瘍細胞に曝露したpDCを用いて行った。MV感染腫瘍細胞が、pDCへの曝露の前にUV照射された場合に、成熟およびIFN- γ 生産は依然として観察された（図14Bおよび14C）。最後に、本発明者らは、CD46特異的モノクローナル抗体が、MV感染腫瘍細胞に応答したpDC成熟を阻害することができるかどうかを試験した（図14Bおよび14C）。抗CD46抗体はコントロールとしてのMeso13の感染を完全に阻害したのに対し、阻害は観察されなかった（図14D）。要するに、これらの結果は、pDCにおけるMV感染およ

び複製が、MVに応じたpDCの活性化に必要ではないことを示唆している。

【0120】

実施例10

PDCは、MV感染腫瘍細胞から細胞成分を捕捉する

TLR-7およびTLR-9のエンド/リソソーム発現のために、pDCは、ウイルス核酸検出に特化される(Gilliet, M. et al, Nat Rev Immunol, 2008, 8: 594-606)。これら2つの受容体は、pDCを活性化する主要な先天性の受容体である(Reizis, B. et al, Nat Rev Immunol, 2011, 11: 558-565)。MVは、IL-3またはMV感染腫瘍細胞の存在下ではpDC成熟を誘導することができるので、エンド/リソソームコンパートメントにおいてTLR7を活性化する成熟刺激は、MV ssRNAである可能性がある。この仮説は、これらの細胞がヒトにおいてTLR7を
10 発現しないように、MV単独では、DCの成熟を誘導しないという事実によって強化される。これは、一部のMV粒子は、MVおよびIL-3と一緒に、MV感染腫瘍細胞と一緒に培養した場合、pDCによってエンドサイトーシスされることを意味する。そこで本発明者らは、MV感染およびUV照射腫瘍細胞からの細胞物質を、pDCが効率的に取り込んだかどうかを調べた(図15)。発明者らは、pDCはUV照射腫瘍細胞は低い効率で取り込む一方、MV感染腫瘍細胞を37で効率的に取り上げたことを観察した(図15Aおよび15B)。二つの追加実験では、本発明者らは、培養物中のCD46モノクローナル抗体の存在は、MV-感染腫瘍細胞の食作用を阻害しなかったことを観察した。

【0121】

これらの結果は、共焦点顕微鏡(図15C)により確認した。pDCはPKH-67で標識し、M
20 V感染腫瘍細胞と18時間共培養した。光学切片は、pDCの内部にMV感染腫瘍細胞の蛍光フラグメントを示し、pDCによるMV感染腫瘍細胞片の内部移行が確認された。興味深いことに、本発明者らは、pDCと腫瘍細胞との間にシンシチウム形成を観察することはなかった。要するに、これらの結果は、感染した腫瘍細胞に含まれるいくつかのMV粒子は、TLR7が配置されているコンパートメントにアクセスできることを示唆している。

【0122】

実施例11

MV感染腫瘍細胞がTLR7をトリガすることによって、強力なI型IFNの分泌を誘導する

pDCは、TLR-7またはTLR-9の活性化について、特にウイルスに対して、I型IFNの最強のプロデューサーであることが知られている(Gilliet, M. et al, Nat Rev Immunol. 2008,
30 8:594-606)。したがって、本発明者らは、ELISAによって、MV、MV感染したまたはUV照射した腫瘍細胞への曝露後のpDCによるIFN産生を測定した(図16A)。図13で早期に観察された細胞の成熟と一致して、IL-3の存在下でのみ、MVへの直接の暴露によってpDCによるI
FN-分泌が誘導された。IL-3の存在下でのMVに反応して産生されたIFN-の量は、強力なTLR
7/8アゴニストであるR848単独によって誘導される量と同等であった。驚くべきことに、
本発明者らは、MV感染腫瘍細胞へのpDCの曝露後の共培養上清中のIFN- の量が非常に多いこと(IL-3、またはR848単独の存在下でのMVに反応して観察されたものよりも20~40倍
以上)を見出した。腫瘍細胞はMV感染後に、IFN- を産生しなかったか、または非常に低い量(pg/mlの範囲)であったので、IFN- のこれらの高量は、pDCによって産生されたものである。UV照射A549またはM18腫瘍細胞は、pDCによるIFN- 産生を誘導しなかった。
40 これらの結果は、MV感染腫瘍細胞が、IL-3またはR848単独の存在下でMVに曝露したpDCによって産生されるレベルよりもかなり高レベルのpDCによるIFN- の産生を誘導することができることを示している。

【0123】

本発明者らは、Meso13腫瘍細胞株の感染三日後、ウイルスの開始用量 1×10^6 TCID₅₀/mLから100よりも大きなMOIに対応する 1×10^8 TCID₅₀/mL到達する大量のウイルスが生成されたことを以前に示している(Gauvrit, A. et al, Cancer Res., 2008, 68: 4882-4892)。従って、MV感染腫瘍細胞に反応してpDCによって産生されるIFN- の膨大な量は、これらの腫瘍細胞における激しいMV複製の結果であった可能性がある。この仮説を試験するために、pDCを、IL-3ありまたはなしで、1~50の範囲でMOIを増加させた存在下で培養した(

50

図16B)。IL-3の存在下で、本発明者により、pDCによるIFN- γ の生産がMOIと一緒に増加することが観察された。逆に、pDCには、最高のMOI (MOI = 50)を除いて、IL-3の非存在下ではIFN- γ は産生されなかった。これらの結果は、pDCによるIFN- γ の産生レベルは、MVの量とIL-3または他の生存シグナルのいずれかの存在に依存することを示唆しており、腫瘍細胞の感染後のウイルスの高力価に応じて産生される膨大な量のIFN- γ を説明している。

【0124】

MVおよびMV感染腫瘍細胞にはウイルスのssRNAが含まれているので、pDCによるIFN- γ 産生は、主にTLR-7のトリガーによる可能性がある。したがって、TLR7の阻害を行った。TLR-7 (IRS661)によって媒介されるIFN- γ 発現を阻害する具体的な免疫調節DNA配列 (IRS) を使用した (Barrat, F. J. et al, J Exp Med., 2005, 202: 1131-1139)。本発明者らは、IRS661を添加した場合にMVおよびIL-3の存在下で培養されたpDCによるIFN- γ 産生が抑制されたことを示した (図16C)。MV感染腫瘍細胞に曝露したpDCにIRS661を添加した場合にも同様のIFN- γ 阻害が観察された。コントロールとして、TLR9に依存する、pDCによるCpG-A-誘導のIFN- γ 産生は、IRS661によって阻害されなかったことを示した。要するに、これらの結果は、MVまたはMV感染細胞によって誘導されるIFN- γ 産生がTLR7依存性であることを実証している。

【0125】

実施例12

pDCは、MV感染腫瘍細胞からの腫瘍関連抗原を交差提示することができる

pDCのウイルス抗原を交差提示する能力は既に報告されている (Di Pucchio, T. et al., Nat Immunol., 2008, 9: 551-557; Hoeffel, G. et al. Immunity, 2007, 27:481-492; Lui, G. et al, PLoS One, 2009, 4: e7111)、しかし、腫瘍関連抗原 (TAA) の交差提示はまだ記載されていない。本発明者らは、MV感染腫瘍細胞に曝露したヒトpDCは、自発的に腫瘍細胞によって発現されるヒトTAAを交差提示することができるかどうかを疑問に思った。HLA-A*0201^{neg} M18メラノーマ細胞株は、癌精巢抗原、NYESO-1を発現したのに対し、A549肺腺癌細胞株はしなかったことがRT-PCRにより示された (図17A)。

【0126】

HLA-A*0201^{pos} pDCは、MV感染またはUV照射HLA-A*0201^{neg}/NYESO-1 M18腫瘍細胞株に暴露した後、このTAAを交差提示することができたかどうかを決定するために、HLA-A*0201/NYESO-1 (157-165) 複合体に特異的なCD8+T細胞クローン、M117.167を使用した (図17B-D)。この実験の概略図を図18に示す。M117.167 T細胞クローンは、単独で、またはIL-3のpDCの存在下では、IFN- γ を産生しなかったが、NYESO-1 [157-161]ペプチドでパルスしたpDCの存在下では活性化した (図17B)。クローンは、0.1 μ g のペプチド (16.3%のIFN- γ +細胞) がpDCにロードされるとすぐに活性化し、1 μ g ペプチド (77.5%) でパルスしたpDCによってより激しく活性化した。MV感染のM18腫瘍細胞と培養したpDCの存在下では、11.5%のクローン集団が活性化されたが、UV照射のM18腫瘍細胞と培養したpDCに応答しては、IFN- γ は産生されなかった (図17B)。MV感染のM18と共培養したpDCに応じて、クローンは、0.1 μ g NYESO-1 (157-165) ペプチドでパルスしたpDCに反応して観察されたものと同等のIFN- γ 産生のプロフィールを有していた。

【0127】

コントロールとして、本発明者らは、MV感染またはUV照射のM18腫瘍細胞単独に反応した場合については、M117.167T細胞クローンの活性化を検出することができなかった (図17C)。この結果は、M18腫瘍細胞株がHLA-A*0201^{neg}だったので、クローンに直接存在NYESO-1 (157-165) ペプチドを提示することができなかったものと予想された。これは、MV感染のM18腫瘍細胞と共培養されたHLA-A*0201^{pos} pDCに反応したクローンによるIFN- γ 産生が交差提示によって引き起こされることを示している。本発明者らはまた、MV感染したNYESO-1^{neg} A549腫瘍細胞と共培養したpDCに反応したIFN- γ 産生は観察されなかった。この代表的な実験では、クローンは、MV感染のM18 (6.5%のIFN- γ +細胞) と共培養されたpDCに反応してIFN- γ を生産し、生産速度は0.1 μ g のNYESO-1 (157-165) ペプチド (10.8

%のIFN- γ 細胞)でパルスしたpDCに応答して観察されたものに近かった。

【0128】

要するに、これらの結果は、pDCは、UV照射の腫瘍細胞からではなく、MV感染のものからのNYESO-1のような腫瘍抗原を交差提示することができることを示している。このように、MVベースの抗腫瘍ウイルス療法では、IFN- γ を大量に産生する能力および腫瘍特異的CD8+Tリンパ球へのMV-感染腫瘍細胞からのTAAを交差提示する能力を活性化することにより、抗腫瘍免疫応答においてpDCを用いることができるはずである。

【0129】

本発明者らは、インビトロで、人間のpDC機能についてのMVベースの抗腫瘍ウイルス療法の結果を特徴づけた。第一に、彼らはpDCは、CD46の発現にもかかわらず、MV感染に対して感受性ではないことを示した。しかし、pDCは、生存シグナルの非存在下では高いウイルス量に、そしてIL-3のような生存シグナルが培養物に添加された場合には低ウイルス量に応答して、IFN- γ を産生することによって、ウイルスを検出することができた。第二に、pDCがMV-感染腫瘍細胞と共培養された場合、pDCは、CD83の発現とIFN- γ の強力な生産の誘導、および共刺激分子のわずかに増加した発現によって特徴付けられる成熟を経た。逆に、UV照射腫瘍細胞と共培養したpDCは、それらがIL-3単独と共培養したときに観察されるものと同様の未成熟表現型を維持した。本発明者らは次に、おそらくMV感染腫瘍細胞フラグメントの内在化に続くpDCのエンドサイトーシスコンパートメントにおける一本鎖ウイルスRNAの存在によって、それらの活性化に関与するpDC受容体としてのTLR7を同定した。最後に、HLA-A*0201/NYESO-1(157-165)特異的CD8+T細胞クローンを用いて、本発明者らは、HLA-A*0201⁺pDCは、UV照射のものからではなくNYESO-1⁺HLA-A*0201⁺MV-感染腫瘍細胞からの腫瘍関連抗原(TAA)の交差提示をすることができることを示した。最初に、本発明者らは、ヒトのpDCの、死んだ腫瘍細胞からのTAAをCD8+T細胞に交差提示する能力を示した。要するに、これらの結果は、感染腫瘍細胞のその直接溶解に加えて、MVベースの抗腫瘍ウイルス療法は、I型IFNを高レベルで生成し、TAAを交差提示する能力を活性化するために、抗腫瘍免疫応答においてpDCを募集することができたことを示唆している。

【0130】

まず、本発明者らは、MOI=1でMVにインビトロで暴露したヒトpDCは、IL-3なしで成熟を経なかったことを示した。この状態では、生存シグナルなしで、pDCはアポトーシスを受け、TLR7へのウイルスのssRNAの結合によって成熟過程に関与するエンドソームコンパートメントにおけるMVの取得に失敗した。pIL-3の存在下でMVに曝露した場合、DCは生き延び、成熟(低いIFN γ 産生およびCD83発現の誘導)が観察された。本発明者らは、大量のMV(MOI=50)を使用した場合にのみ、IL-3の非存在下で、MVによるpDCの活性化を観察した。本発明者らは、この高MV濃度では、アポトーシスプログラムが始まる前に、生存/成熟シグナルを提供するためのpDCのエンドサイトーシスコンパートメントに十分なMVが達したと考えた。このように、IL-3の存在下でpDCをMVに曝露した場合、pDCは生存し、MVを内在化し、ウイルスssRNAによるTLR7のトリガが可能になった。IL-3の非存在下でpDCをMVに曝露した場合、十分なMVが、それらを活性化し、成熟するエンドサイトーシスコンパートメントに達しない限り、アポトーシスを受ける。これらの結果は、実験の設定の違いにより、文献に相反する報告を説明するものとなった。実際、本発明者らは、低量のMVシュワルツでは、IL-3の非存在下で培養したpDCはIFN- γ を誘導することができなかったことを報告したSchlenderら(Schlender, J. et al, J Virol, 2005, 79:5507-5515)と、およびIL-3の存在下で、pDCによる大量のIFN- γ 産生が誘導されたと主張するDuhénら(Duhén et al, Virus Res., 2010, 152:115-125)と同様の結果を得た。しかし、pDCは、IL-3の存在下でIFN- γ を産生し、本発明者らは、MVシュワルツがpDCによるIFN- γ の産生を阻害(31)することは観察しなかった。最後に、両方のグループとも、MVのヘマグルチニン(H)に対するモノクローナル抗体によるpDCの染色を説明しているが、結果の解釈は異なる。一方のグループは、pDCは感染し、ウイルスを増幅したと主張し(Schlender, J. et al, J Virol, 2005, 79:5507-5515)、他のグループは、pDCのHタンパク質の染色にかかわら

10

20

30

40

50

ず、MV複製は低かったと結論付けている(Duhen et al, Virus Res., 2010, 152:115-125)。本発明者らはIL-3の非存在下でも存在下でも高いMOIで、MV-eGFPを使用しても生産的感染が観察されなかったため、本発明の結果は、この後者の結論を支持する。

【0131】

本発明者らは、MVまたはMV感染腫瘍細胞の存在下で、pDCは、細胞表面でのCD83分子の発現のアップレギュレーションにより特徴付けられる成熟を受けたことを示した。MVまたはMV感染腫瘍細胞の存在下では、pDCは、R848単独で刺激したpDCよりも高ウイルス量に応じて、より大量のIFN- γ を生産した。しかし、これらの細胞は、CD40およびCD86共刺激分子の多くを発現しなかった。このように、この成熟表現型は、HIV感染により誘導される成熟表現型(Fonteneau, J.F. et al, J Virol, 2004, 78:5223-5232; O'Brien, M. et al, J Clin Invest., 2011, 121:1088-1101)に類似しており、MVがしたように(Beignon, A.S. et al, J Clin Invest., 2005, 115:3265-3275)、TLR7によってpDCを活性化した。実際に、使用されるTLRアゴニストの性質に依存して、活性化の二つの主要な経路は、ヒトのpDCにおいてトリガされ得ることが明らかになった。この二分法は、最初に、二つのTLR9アゴニスト、CpG-AおよびCpG-Bは、二つの異なる経路を使用してpDC成熟を活性化することを示したKerkmannらによって報告された(Kerkmann, M. et al, J Immunol., 2003, 170:4465-4474)。最近、同じ二分法が、TLR7アゴニストで観察された(O'Brien, M. et al, J Clin Invest., 2011, 121:1088-1101)。実際、HIVはpDCの早期エンドソームにおいてTLR7およびIRF7シグナル伝達経路をトリガすること、およびIFN- γ の強い産生を誘導することによって、CpG-Aのように振る舞った。本発明者らは、MV+IL-3またはMV感染細胞によって誘導される成熟は、HIVによって誘導される活性化に類似しており、MVのssRNAによるTLR7の早期エンドソームでのトリガーを示唆することを示した。感染細胞からのウイルス抗原の交差提示が実証されているように、この初期のエンドソーム活性化経路は、ウイルス感染細胞によって発現される抗原の交差提示と、および本明細書に記載のとおり、MV感染細胞からのTAAの交差提示と互換性がある。逆に、Schnurrらは、インビトロで、pDCは、骨髓DCとは逆に、単独または免疫複合体の形で、全長タンパク質からのTAAを交差提示することができなかったと報告している(Schnurr, M. et al, Blood, 2005, 105:2465-2472)。しかし、これらの著者は、抗原供給源として可溶性タンパク質を使用し、NYESO-1発現腫瘍細胞を使用していない。インビボでは、pDCによる抗原の交差提示も論争になった。Salioらは、pGで刺激したネズミのpDCは、内因性抗原に対するT細胞の応答をマウントすることができたが、抗原を交差提示することはできなかったことを報告している(Salio, M. et al, J Exp Med., 2004, 199:567-579)。Mouriesらは、インビボおよびインビトロで、ネズミモデルにおいても、可溶性OVAタンパク質とTLRアゴニスト(CpGまたはR848)が特異的CD8+T細胞に対してpDCをクロスプライムOVAに活性化することを示した(Mouries, J. et al, Blood, 2008, 112:3713-3722)。同様に、最近、クールらによって、CpGによるTLR9刺激後、またはOVAエпитープを含むインフルエンザウイルスでの感染によって、可溶性OVAペプチドまたは全タンパク質の交差提示が、インビトロで、確認された(Kool et al, J Leukoc Biol, 2011, 90:1177-1190)。最後に、Liuらは、B16メラノーマを有するマウスへのCpG-A-刺激したpDCの腫瘍内注射は、腫瘍抗原のクロスプライミングを誘導したが、このクロスプライミングはpDCではなく、CD11c+DCによって行われたことを報告している(Liu et al, J Clin Invest., 2008, 118:1165-1175)。本発明者らは、インビトロで、MV感染腫瘍細胞に曝露したヒトpDCは、このTAAに特異的なCD8+T細胞クローンにNYESO-1を交差提示することができたことを示している。本発明者らは、MV感染腫瘍細胞が細胞死を受け、その後pDCによって貪食されたことを実証した。これらのMV感染細胞は、アジュバントまたはTLRアゴニストの添加なしでpDCを活性化することができた。MVベースの抗腫瘍ウイルス療法の効率は、免疫不全マウスにおける異なるヒト腫瘍異種移植片のモデルにおいてインビボで実証されている(Peng, K. W. et al., Cancer Res., 2002, 62:4656-4662; McDonald, C.J. et al., Breast Cancer Res Treat., 2006, 99:177-184; Blechacz, B. et al, Hepatology, 2006, 44:1465-1477)。MVベースのウイルス療法の最初の臨床試験は有望な結果を示した(Heinzerling, L. et al, Blood, 2005, 106:2287-22

10

20

30

40

50

94; Galanis, E. et al, Cancer Res., 2010, 70:875- 882)。MVベースのウイルス療法の効率はウイルスによる腫瘍細胞の溶解によるであろう。しかし、その効率の一部はまた、免疫系の細胞、特にpDCを活性化するMV感染腫瘍細胞の能力に起因し得る。実際、担癌マウスにおけるTLRアゴニストによるpDCの活性化が抗腫瘍免疫応答および腫瘍退縮を誘導することが示されている(Drobits, B; et al, J Clin Invest., 2012, 122:575-585; Liu, C. et al, J Clin Invest., 2008, 118:1165- 1175; Palamara, F. et al, J Immunol, 2004, 173:3051-3061)。Liuらは、CD11c+DCによる腫瘍抗原の交差提示を誘導する、TLR9アゴニストによって刺激されたネズミのpDCは、NK細胞の活性化と腫瘍への動員を誘導したことを示した(Liu, C. et al, J Clin Invest., 2008, 118:1165-1175)。Drobitsらは、マウスにおけるメラノーマ腫瘍のTLR7アゴニスト、イミキモドでの局所治療は、pDCの活性化と腫瘍への動員を誘導し、腫瘍退縮を引き起こしたことを示した(Drobits, B; et al, J Clin Invest., 2012, 122:575-585)。Drobitsらは、pDCが、IFNAR1依存性メカニズムにおいて、TRAILおよびグランザイムBを分泌することにより、腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を獲得したことを実証した。pDCによるIFN- γ の分泌は、自己分泌ループによるpDCでの抗腫瘍細胞傷害活性を誘導しただけでなく、腫瘍細胞に直接作用してアポトーシスを誘導することもできた(Thyrell, L. et al, Oncogene, 2002, 21:1251-1262)。I型IFNもNK活性化に役割を果たし、NK細胞依存性腫瘍拒絶のマウスモデルにおいて必要とされた(Swann, J.B. et al, J Immunol, 2007, 178:7540-7549)。IFNAR1-およびSTAT 1欠損マウスにおいて抗腫瘍T細胞応答は進行されなかったため、最終的に、これらのNK細胞は、おそらくまた、骨髄DCを刺激することによる抗腫瘍応答の開始にも関連している(Diamond, M.S. et al, J Exp Med., 2011, 208:1989-2003; Fuertes, M.B. et al, J Exp Med., 2011, 208:2005-2016)。したがって、本発明者らは、MV感染腫瘍細胞がpDCによって大量のIFN- γ を誘導したことは、抗腫瘍免疫応答に関与するマルチセルサブセットの進行のために有利であるかもしれないことを示した。さらに、ワクシニア(Kim, J.H. et al, Mol Ther., 2006, 14:361-370)、単純ヘルペスウイルス(Kaufman, H.L. et al, Future Oncol, 2010, 6:941-949)およびアデノウイルス(Ramesh, N. et al, Clin Cancer Res., 2006, 12:305-313)等の、pDCを活性化することが知られている他の腫瘍溶解性ウイルスが、抗腫瘍ウイルス療法の臨床試験で使用されている。これらのウイルスに感染した腫瘍細胞は、pDCによるIFN- γ 産生および腫瘍抗原の交差提示を誘導することができてよい。

【 0 1 3 2 】

MVベースの抗腫瘍ウイルス療法は、ウイルスの腫瘍溶解活動を通じて、癌を治療するための有望なアプローチである。さらに、本発明者らは、MV感染腫瘍細胞がヒトのpDCの成熟および腫瘍抗原の交差提示能力を活性化することを示した。このように、MVベースの抗腫瘍ウイルス療法は、抗腫瘍免疫応答におけるpDCの動員に興味深いアプローチを表すことができる。

【 0 1 3 3 】

実施例13

別のメラノーマ細胞株を用いた、未改変のMVとMV-deltaC間の比較研究

材料および方法

細胞培養 試験した細胞株は、メラノーマM6、M17、M117、M88およびM113由来の細胞株であった。細胞を、10%ウシ胎児血清(FCS)、1%L-グルタミンおよび1%ペニシリンG/ストレプトマイシンを補充したRPMI1640培地中で培養した。細胞を75 cmフラスコ中で 3×10^6 細胞の初期濃度で培養し、37℃、5%CO₂中で維持した。細胞は、通常のように試験し、マイコプラズマ感染症の陰性を確認した。

【 0 1 3 4 】

腫瘍細胞の感染 細胞は、それらが付着することを可能にするために、結果的に10%FCS RPMI培地1ml中でウェルあたり 200×10^3 細胞になるように、12ウェルプレート中に、感染の24時間前に播種した。2つのウイルスを、腫瘍細胞を感染させるために使用した：(I) MV-eGFP：腫瘍細胞の感染を調べるための蛍光タンパク質GFPをコードする遺伝子を含む組換え生弱毒化麻疹ウイルス(MVシュワルツ)。(II) MV-deltaC-eGFP：GFPをコードする

遺伝子を含むMVの組換え改変ワクチン株。

【0135】

感染の効率は、未改変MV対MV-deltaC、および異なるメラノーマ細胞株の間で、2つのウイルスについて異なっていた。本発明者らは、感染24時間後に、MV-deltaCは未改変のMVよりも効率的に腫瘍細胞に感染することができたことを観察した（図19および20）。

【0136】

加えて、未改変のMVと比較して、MV-deltaCによる感染の後に、腫瘍細胞は膜に、HSP 70およびCRTのような、「危険信号」をより発現していることが示された（図21）。これは、アポトーシス細胞の食の後の樹状細胞の活性化と成熟化を介して、免疫応答を誘導する、より高い効率を示唆している。

【0137】

メラノーマ腫瘍内部のMV-deltaCワクチンのインピボ注入により、コントロールと比較して、MV-deltaCの効果が増強され、迅速な応答が誘導されたことが証明された（図22）。

【0138】

結論として、MV-deltaCワクチン株は、従来の未改変のMVワクチン株と比較して、興味深く良好なプロアポトーシス特性を示した。

【0139】

実施例14

未改変のMVおよびMV-deltaCによる癌細胞および非癌細胞における細胞死誘導の比較

未改変のMVに比べてMV-deltaCにより、より強力な細胞死が誘導されるのか否かを評価するため、発明者らは、それらの活性をヒト癌細胞株（A549ヒト肺腺癌およびHeLa子宮頸がん）、非癌由来の不死化細胞（HEK 293ヒト胚性腎臓細胞およびヴェアラフリカミドリザル腎臓細胞）でその活性を比較した。A549およびHeLaは、一般的に使用されるプロトタイプヒト癌細胞である。それに対し、実験的にAd5で形質転換されているため、HEK293細胞は癌細胞ではない。ベロ細胞系統は連続的で異数性であり、すなわち分裂の多くのサイクルを通して複製され、老化しないことができる。

【0140】

細胞（96ウェルプレート中のウェルあたり40,000個）は、MV-deltaCまたは未改変のMVウイルスと、異なるMOI（0.1、1、5、10）で培養した。感染は、DMEM中の非接着細胞（0.2 ml）で行った。培養の0、24、46および68時間後、生細胞数をCellTiter-GLO試薬（Promega）を用いて決定した。このルシフェラーゼベースのアッセイは、ATP定量によって培養ウェルにおける代謝活性のある細胞の数を評価した。

【0141】

この分析により、低いMOIでも、MV-deltaCは、A549およびHeLaヒト癌細胞の両方で未改変のMVよりもはるかに高い早期の細胞死を誘導したことが確認された（図23A）。このように、MV-deltaCの良好な腫瘍溶解能力が、中皮腫、メラノーマおよび肺から子宮頸がん細胞にもたらされた。逆に、ベロ細胞で細胞死誘導に2つのウイルスの間で差異は観察されず、そして、HEK293細胞では感染の68時間後にいかなる細胞死も観察されなかった（図23B）。これは、未改変のMVと比較してMV-deltaCが細胞死を加速する、または老化経路を再活性化するメカニズムは、ヒト癌細胞に特異的であることを示唆した。MVは、一般的に、この細胞株で産生されているので、ベロ細胞が、未改変のMVよりもMV-deltaCに敏感ではなかったという観測は重要であった。

【0142】

両ウイルスのウイルス増殖速度を、同じ細胞株（図24）上で同時に評価した。ベロ、HEK293、HeLa細胞およびA549細胞を35mmの培養ウェルで、未改変のMVまたはMV-deltaCとMOI 1で感染させた。ウイルス力価は、感染後の異なる時点でTCID50として決定した。複製の高い割合は、非癌細胞のベロおよびHEK293の両ウイルスについて観察された。逆に、複製力価は、HeLaおよびA549癌細胞では低く、MV-deltaCはA549細胞において非常に低いレベルで複製された。これは、癌細胞における細胞死の誘導が、ウイルス子孫の低い生産をも

10

20

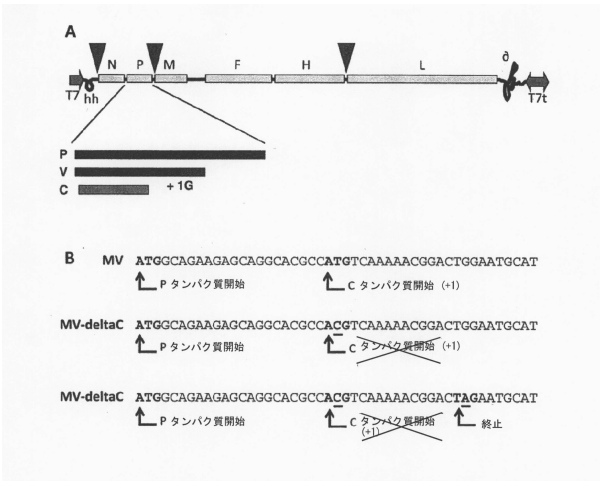
30

40

50

たらししたことを示し、これは腫瘍溶解性ウイルスの安全上の利点である。

【 図 1 】



【 図 2 】

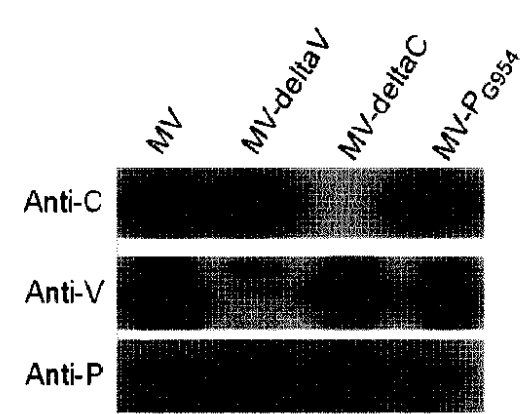
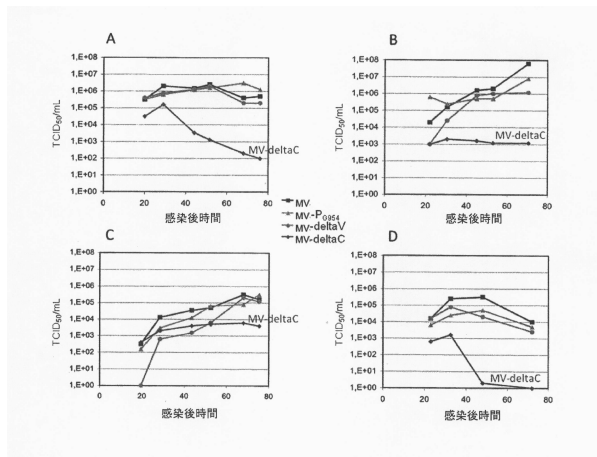


Figure 2

【図 3】



【図 4】

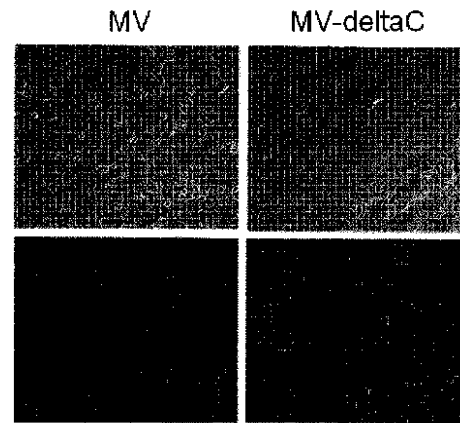


Figure 4

【図 5】

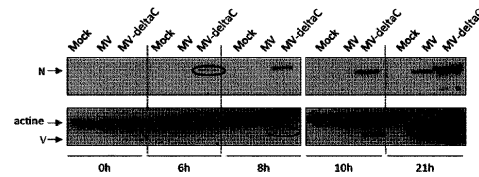
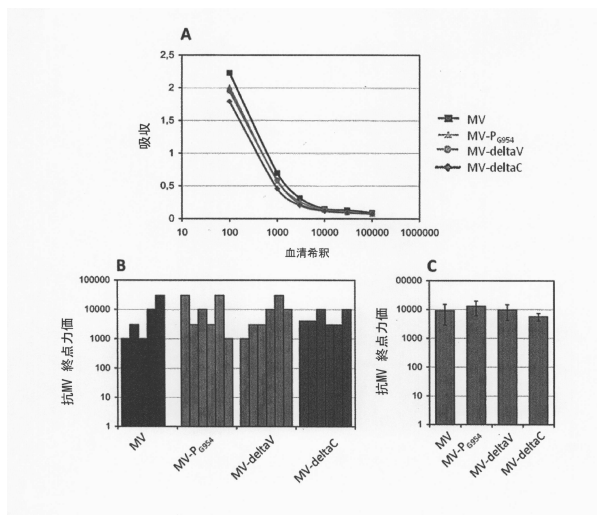
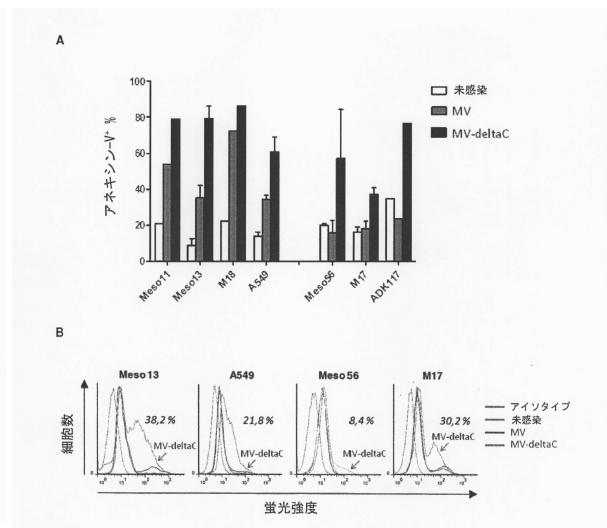


Figure 5

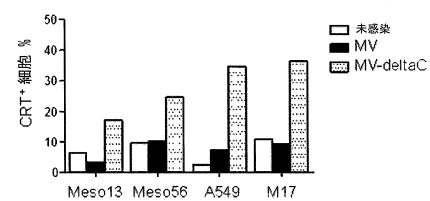
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【 9 】

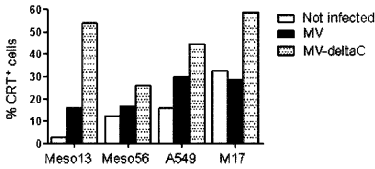


Figure 9

【 10 】

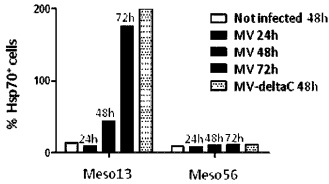


Figure 10

【 11 B 】

B

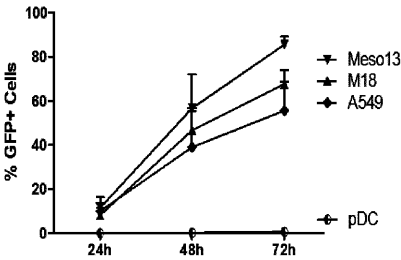


Figure 11B

【 11 A 】

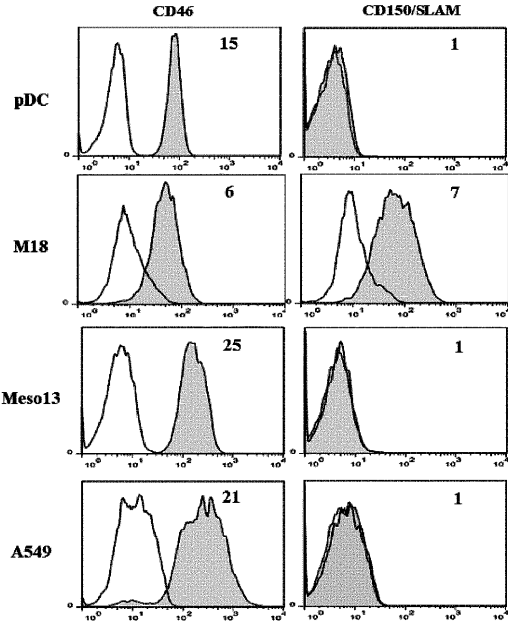


Figure 11A

【 11 C 】

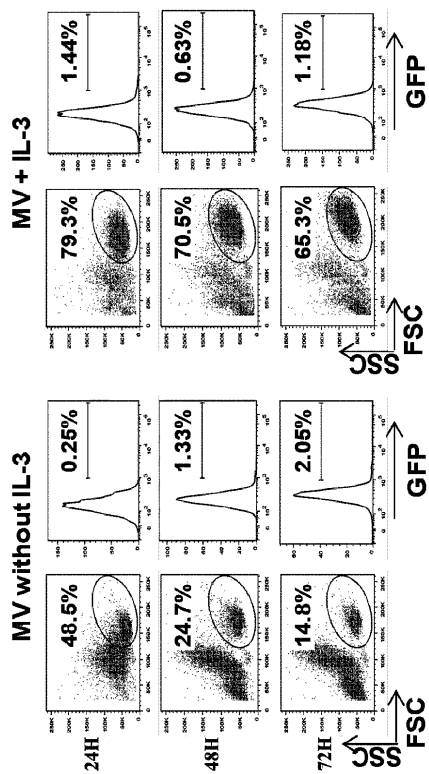
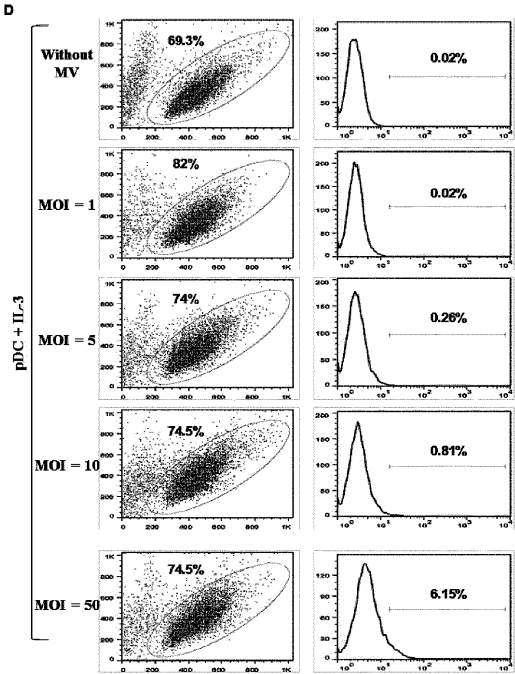
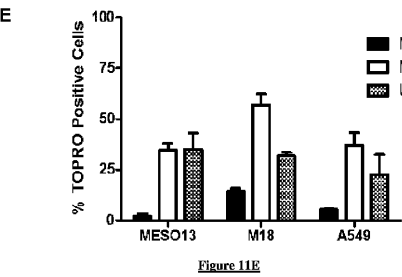


Figure 11C

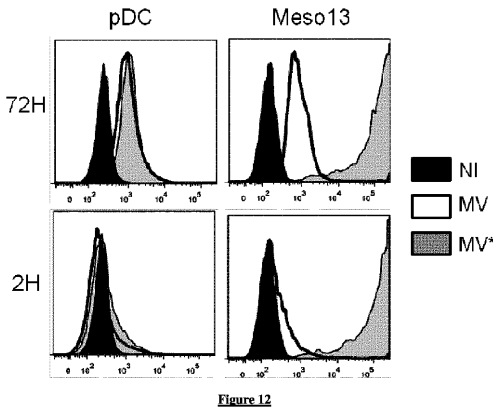
【 1 1 D 】



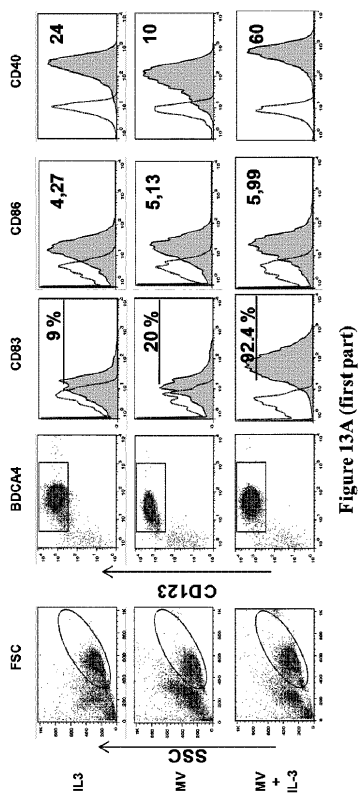
【 1 1 E 】



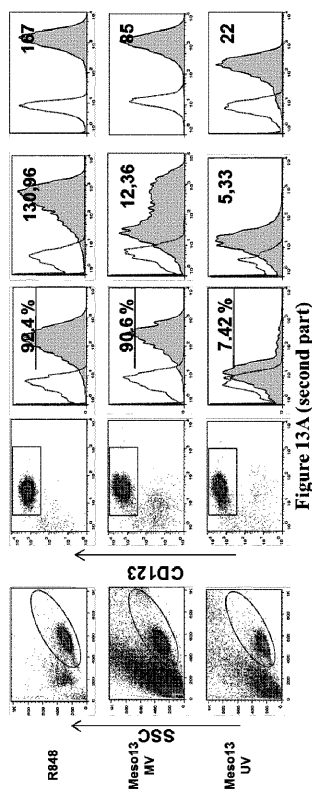
【 1 2 】



【 1 3 A - 1 】



【 1 3 A - 2 】



【 図 1 4 A 】

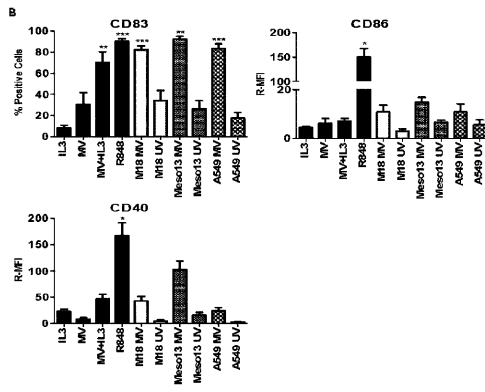


Figure 13B

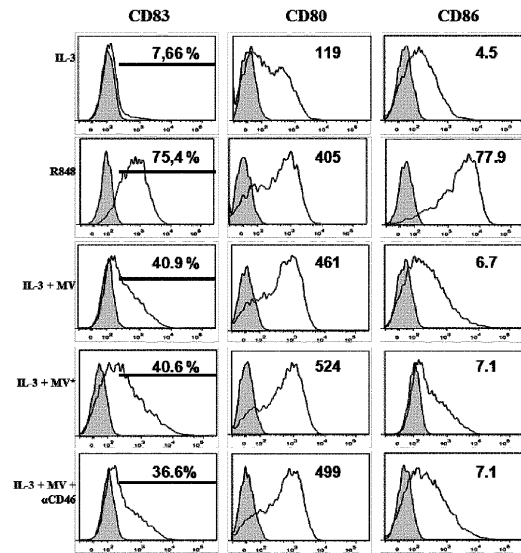


Figure 14A

【 図 1 4 B 】

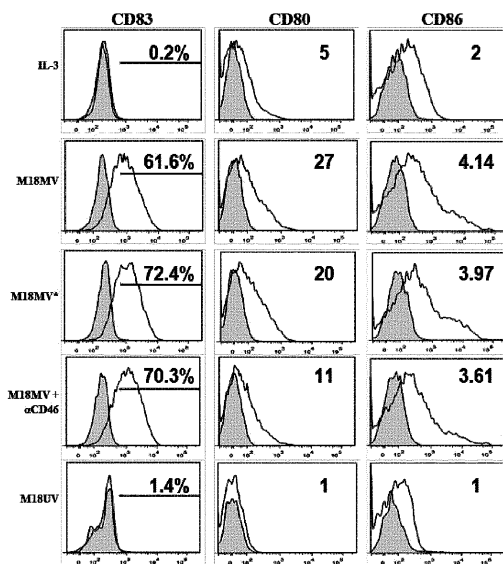


Figure 14B

【 ㊦ 1 4 C 】

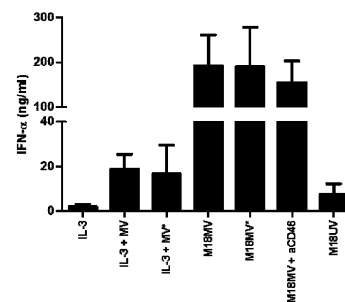


Figure 14C

【 ㊦ 1 4 D 】

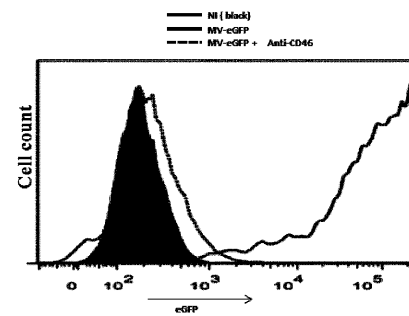


Figure 14D

【 1 5 A 】

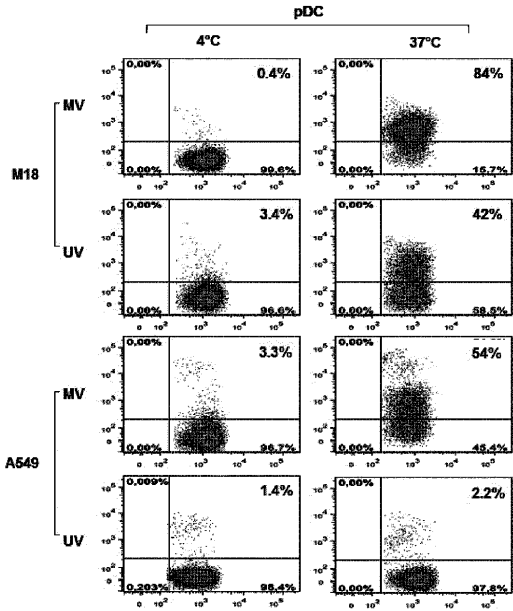


Figure 15A

【 1 5 B 】

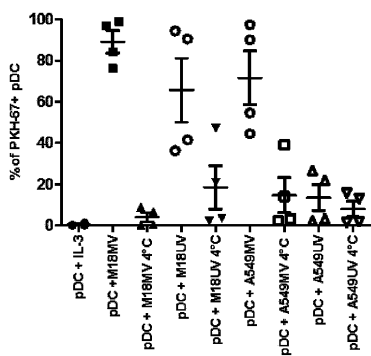


Figure 15B

【 1 5 C 】

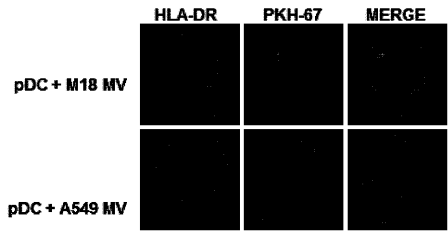
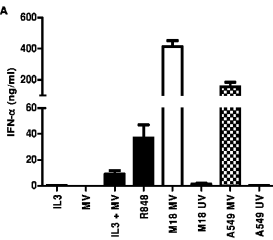
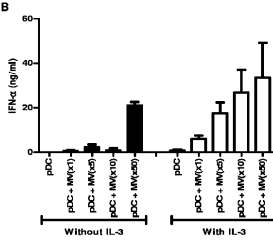


Figure 15C

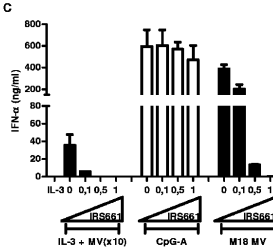
【 1 6 A 】



【 1 6 B 】



【 1 6 C 】



【 1 7 A 】

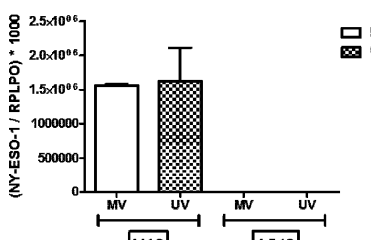


Figure 17A

【図 17B】

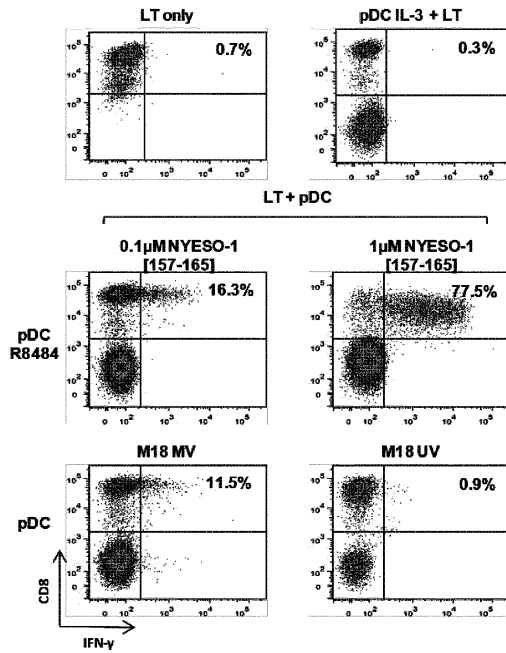


Figure 17B

【図 17C】

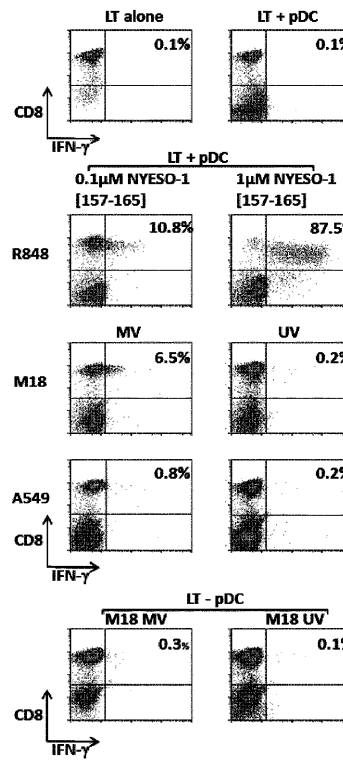


Figure 17C

【図 17D】

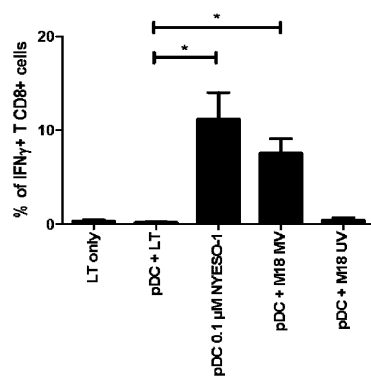
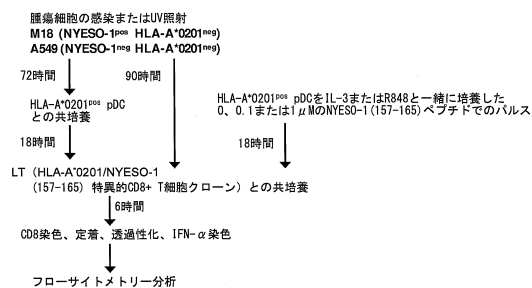


Figure 17D

【図 18】



【図 19A】

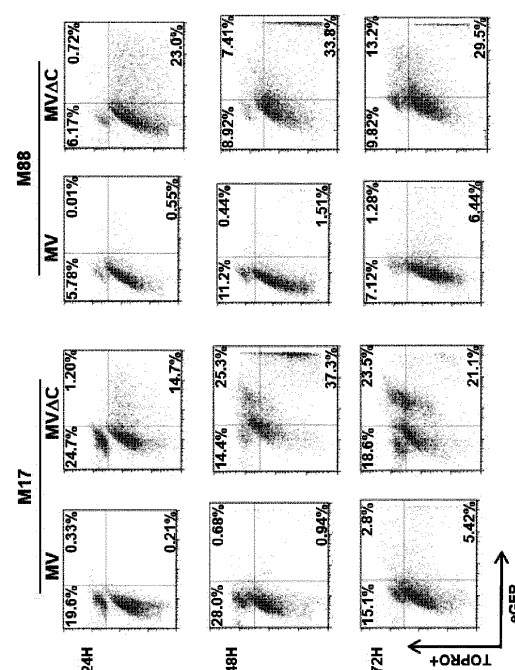


Figure 19A

【図 19 B】

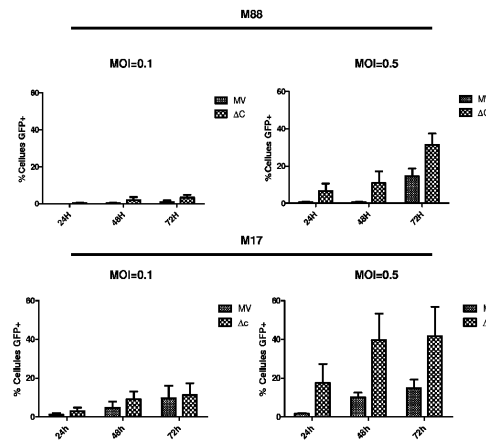


Figure 19B

【図 20】

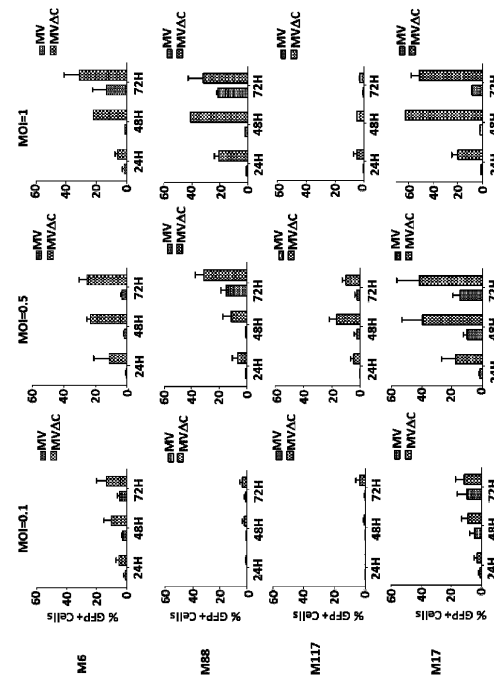


Figure 20

【図 21 A】

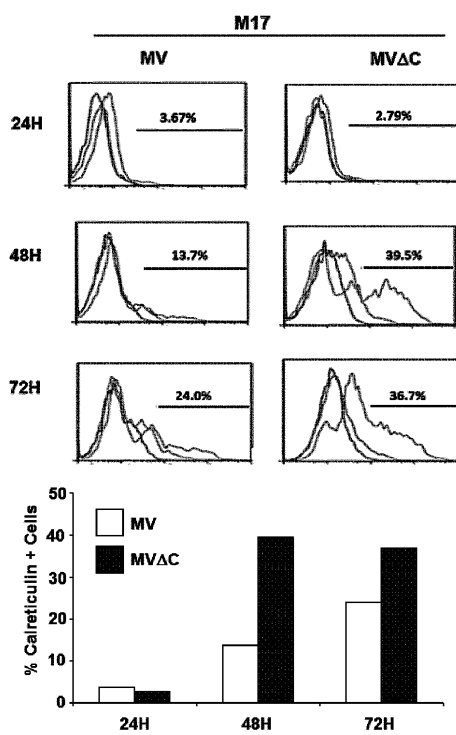


Figure 21A

【図 21 B】

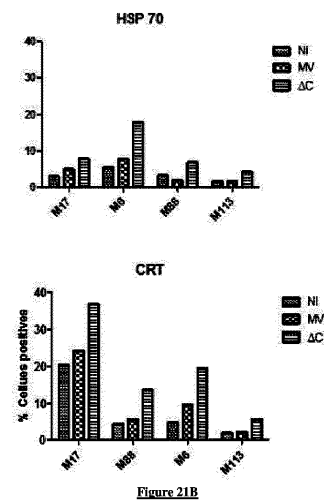
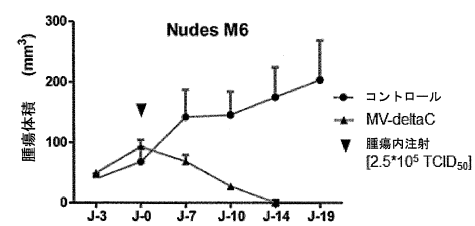
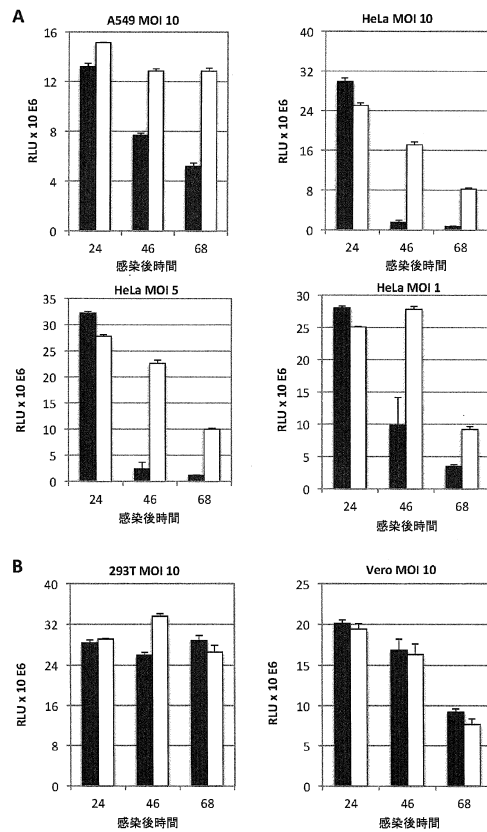


Figure 21B

【図 22】



【図 23】



【図 24】

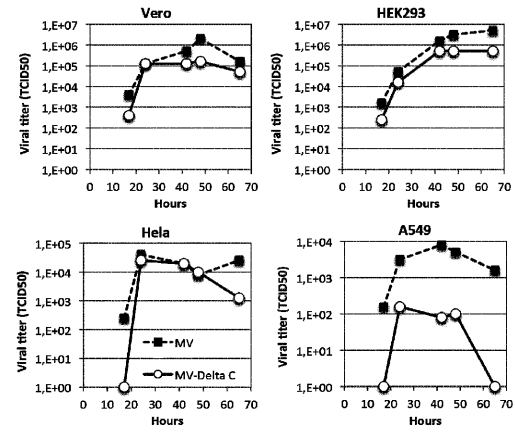


Figure 24

【配列表】

0006382223000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/09 Z
 C 1 2 N 5/0784 (2010.01) C 1 2 N 5/0784

(73)特許権者 591282995

アンスティテュ ナスィヨナル ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ルシェルシュ メディカル
 INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHE
 RCHE MEDICALE
 フランス国・75654 パリ セデ 13・リュ ドゥ トルビヤック, 101
 101, rue de Tolbiac/75654 PARIS CEDEX 13/FR
 ANCE

(73)特許権者 507421289

ユニヴェルシテ・ドゥ・ナント
 フランス国, 44000 ナント、ケ・ドゥ・トゥルヴィル 1

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 フレデリック・タンギー

フランス・F - 93260・レ・リラ・リュ・デュ・ガルド・シャス・60

(72)発明者 マルク・グレゴワール

フランス・F - 44300・ナント・リュ・ドゥ・ラ・ゴディニエール・40

(72)発明者 ジャン・フランソワ・フォンテノー

フランス・F - 44000・ナント・リュ・ピエール・オーディージュ・2

(72)発明者 ジャン・バティスト・ギエルム

フランス・F - 44100・ナント・リュ・ニコロ・アペール・50

(72)発明者 シャンタル・コンブレデ

フランス・F - 75017・パリ・アヴニユ・ドゥ・ヴィリエール・124

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 国際公開第2012/022495(WO, A1)

Jean-Baptiste Guillerme, Clinical Cancer Research, 2013年 1月21日, Vol.19, No.
 5, pp.1147-1158, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2733

中村貴史, Drug Delivery System, 2009年, Vol.24, pp.599-607

Kah-Whye Peng, Cancer Research, 2002年, Vol.62, pp.4656-4662

Frank Radecke, Virology, 1996年, Vol.217, pp.418-421

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 7 / 0 4

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(Jdream III)