

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7373168号

(P7373168)

(45)発行日 令和5年11月2日(2023.11.2)

(24)登録日 令和5年10月25日(2023.10.25)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 35/768 (2015.01)

A 6 1 K 35/768

C 1 2 N 15/86 (2006.01)

C 1 2 N 15/86

Z Z N A

C 1 2 N 7/01 (2006.01)

C 1 2 N 7/01

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00

1 2 1

請求項の数 17 (全50頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-531804(P2020-531804)

(86)(22)出願日 平成30年8月15日(2018.8.15)

(65)公表番号 特表2020-537534(P2020-537534
A)

(43)公表日 令和2年12月24日(2020.12.24)

(86)国際出願番号 PCT/CN2018/100708

(87)国際公開番号 WO2019/037642

(87)国際公開日 平成31年2月28日(2019.2.28)

審査請求日 令和3年7月19日(2021.7.19)

(31)優先権主張番号 201710734483.1

(32)優先日 平成29年8月24日(2017.8.24)

(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)

(73)特許権者 519326323

シャメン・ユニヴァーシティ

中華人民共和国、フジアン 3 6 1 0 0

5、シャメン、シミン・ディストリクト

、シミンナン・ロード、ナンバー 4 2 2

(73)特許権者 517173983

ヤン シェン ターン カンパニー リミテ

ッド

中華人民共和国、チョーチャン、ハンジ

ョウ、シーフー ディストリクト、シュ

アンプー タウン、ルンドゥ ロード ナ

ンバー 1 7、ルーム 2 0 5

(74)代理人 100110423

弁理士 曾我 道治

(74)代理人 100111648

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 腫瘍を治療するためのエコーウイルス

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体における腫瘍を治療するための医薬の製造における、野生型エコーウイルス 2 5 (E C H O 2 5) 若しくは改変 E C H O 2 5 、又は単離された核酸分子の使用であって、前記単離された核酸分子は、以下の：

(1) 野生型 E C H O 2 5 又は改変 E C H O のゲノム配列又は c D N A 配列と、

(2) 前記ゲノム配列又は前記 c D N A 配列の相補的配列と、

から選択される配列を含み、

前記野生型 E C H O 2 5 は、配列番号 1 2 に規定されるゲノム配列を有するか、若しくは配列番号 1 2 に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列を有し、及び / 又は、配列番号 1 に規定される c D N A 配列を有するか、若しくは配列番号 1 に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列を有し、

前記改変 E C H O 2 5 はそのゲノムが野生型 E C H O 2 5 と比較して、以下の：

(1) 5'非翻訳領域 (5' U T R) における内部リボソーム進入部位 (I R E S) 配列の、外因性 I R E S 配列との置換と、

(2) サイトカインをコードする核酸配列、抗腫瘍タンパク質若しくはポリペプチドをコードする核酸配列から選択される、及び / 若しくはマイクロ R N A の標的配列である、外因性核酸の挿入と

から選択される 1 つ以上の改変を有する、使用。

【請求項 2】

10

20

以下の 1 以上：

前記サイトカインは、GM-CSF である；

前記抗腫瘍タンパク質若しくはポリペプチドは、PD-1 又は PD-L1 に対する scFv である；

前記マイクロRNA は、miR-133 及び / 又は miR-206 から選択される；
により特徴付けられる、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記外因性 IRES 配列は、ヒトライノウイルス 2 (HRV2) の内部リボソーム進入部位配列である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 4】

前記改変 ECHO25 は、以下の特徴：

(1) 前記改変 ECHO25 は、配列番号 13 ~ 配列番号 16 のいずれか 1 つに規定されるゲノム配列を有するか、若しくは、配列番号 13 ~ 配列番号 16 のいずれか 1 つに対して少なくとも 95% の配列同一性を有する配列を有すること、及び、

(2) 前記改変 ECHO25 は、配列番号 8 ~ 配列番号 11 のいずれか 1 つに規定される cDNA 配列を有するか、若しくは、配列番号 8 ~ 配列番号 11 のいずれか 1 つに対して少なくとも 95% の配列同一性を有する配列を有すること、

の 1 つを有する、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 5】

以下の、

(1) 前記単離された核酸分子は、前記野生型 ECHO25 若しくは改変 ECHO25 のゲノム配列からなること、又は

(2) 前記単離された核酸分子は、前記野生型 ECHO25 若しくは改変 ECHO25 の cDNA 配列、又は前記 cDNA 配列の相補的配列を含むベクターであること、

の 1 つによって特徴づけられる、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 6】

前記単離された核酸分子は、配列番号 12 ~ 配列番号 16 のいずれか 1 つに示されるヌクレオチド配列を有する、又は、配列番号 1、配列番号 8 ~ 配列番号 11 のいずれか 1 つに示されるヌクレオチド配列もしくはその相補的配列を含むベクターである、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

前記野生型 ECHO25 若しくは改変 ECHO25、又は前記単離された核酸分子は、抗腫瘍活性を有する追加の薬学的活性剤と組み合わせて投与される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 8】

前記追加の薬学的活性剤は、追加の腫瘍溶解性ウイルス、化学療法剤又は免疫療法剤から選択される、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

前記追加の薬学的活性剤は、以下；、

(1) 前記追加の腫瘍溶解性ウイルスは、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス、レオウイルス、ニューカッスル病ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、麻疹ウイルス又はそれらの任意の組み合わせからなる群から選択されること、

(2) 前記化学療法剤は、5-フルオロウラシル、マイトマイシン、メトトレキサート、ヒドロキシ尿素、シクロホスファミド、ダカルバジン、ミトキサントロン、アントラサイクリン類、エトポシド、白金化合物、タキサン類又はそれらの任意の組み合わせから選択されること、

(3) 前記免疫療法剤は、免疫チェックポイント阻害薬、腫瘍特異的標的化抗体又はそれらの任意の組み合わせからなる群から選択されること、

の 1 つ以上によって特徴づけられる、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

10

20

30

40

50

以下の特徴：

(1) 前記腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌、子宮内膜癌、黒色腫、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫、白血病、横紋筋肉腫、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、子宮頸癌、乳癌、腎臓癌及び膵臓癌からなる群から選択されること、

(2) 前記被験体はヒトであること、

の少なくとも1つを有する、請求項1～6のいずれか一項に記載の使用。

【請求項11】

野生型ECHO25と比較して、5'UTRにおける内部リボソーム進入部位(IRES)配列の、ヒトライノウイルス2(HRV2)の内部リボソーム進入部位配列との置換を有する改変ECHO25であって、

前記野生型ECHO25は、配列番号12に規定されるゲノム配列を有する、及び/又は、配列番号1に規定されるcDNA配列を有する、改変ECHO25。

【請求項12】

前記ヒトライノウイルス2(HRV2)の内部リボソーム進入部位配列は、配列番号2に示されている、請求項11に記載の改変ECHO25。

【請求項13】

前記改変ECHO25は、サイトカインをコードする核酸配列、抗腫瘍タンパク質若しくはポリペプチドをコードする核酸配列及びマイクロRNAの標的配列から選択される外因性核酸を更に含む、請求項11に記載の改変ECHO25。

【請求項14】

以下の：

(1) 前記サイトカインはGM-CSFであること；

(2) 前記抗腫瘍タンパク質若しくはポリペプチドは、PD-1又はPD-L1に対するscFvであること；

(3) 前記マイクロRNAは、miR-133及び/又はmiR-206から選択されること；

の1以上により特徴付けられる、請求項13に記載の改変ECHO25。

【請求項15】

前記改変ECHO25は、以下の特徴：

(1) 前記改変ECHO25は、配列番号13に規定されるゲノム配列を有すること、

(2) 前記改変ECHO25は、配列番号8に規定されるcDNA配列を有すること

の1つを有する、請求項11に記載の改変ECHO25。

【請求項16】

単離された核酸分子であって、

(1) 請求項11～15のいずれか一項に記載の改変ECHO25のゲノム配列又はcDNA配列と、

(2) 前記ゲノム配列又は前記cDNA配列の相補的配列と、

からなる群から選択される配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項17】

以下の特徴

(1) 前記単離された核酸分子は、前記改変されたECHO25のゲノム配列からなること；又は

(2) 前記単離された核酸分子は、前記改変されたECHO25のcDNA配列、又前記cDNA配列の相補的配列を含むベクターであること；

の1つによって特徴づけられる、請求項16に記載の単離された核酸分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ウイルスの分野及び腫瘍治療の分野に関する。特に、本発明は、被験体（例えば、ヒト）における腫瘍の治療における、及び被験体（例えば、ヒト）における腫瘍の

10

20

30

40

50

治療のための医薬の製造における、エコーウイルス 25 (ECHO 25) 若しくはその改変形、又は ECHO 25 若しくはその改変形のゲノム配列若しくは cDNA 配列、若しくは上記ゲノム配列若しくは上記 cDNA 配列の相補的配列を含む核酸分子の使用に関する。本発明はまた、腫瘍を治療する方法であって、治療を必要とする被験体に ECHO 25 若しくはその改変形、又は ECHO 25 若しくはその改変形のゲノム配列若しくは cDNA 配列、若しくは上記ゲノム配列若しくは上記 cDNA 配列の相補的配列を含む核酸分子を投与する工程を含む、方法に関する。

【背景技術】

【0002】

悪性腫瘍の現在の治療方法には、主として外科手術、化学療法及び放射線療法が含まれる。これらの従来の療法は転移性腫瘍の治療には満足いくものではなく、患者の健康に大きな害を及ぼす場合もある。これに対して、新しい種類の治療法として、腫瘍治療法における腫瘍溶解性ウイルスの使用は、特異性が高く、効果が良好であり、副作用が少ないため、現在では有望な腫瘍治療法とみなされている。

【0003】

腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍細胞内で自己複製することで、腫瘍細胞を死滅させ、溶解させ、又は腫瘍細胞の成長を停止させることができるウイルスである。in vivo で治療のために使用される場合に、腫瘍溶解性ウイルスは腫瘍細胞に対して特異性を示し、直接的に腫瘍細胞死を誘導することができるが、正常細胞にはほとんど効果を有しないか又は全く効果を有しない。一方で、腫瘍溶解性ウイルスは免疫系で細胞傷害性 T リンパ球応答を誘導することにより、間接的に腫瘍細胞を死滅させることもできる。

【0004】

エンテロウイルスはピコルナウイルス科に属し、それらのゲノムは一本鎖プラス鎖 RNA である。腫瘍溶解性ウイルスとしてエンテロウイルスを使用することについて、以下の利点がある。第一に、一本鎖 RNA ウイルスであるので、それらのゲノムは宿主内で DNA の段階を一切経ないため、宿主 DNA へのウイルスゲノムの挿入により引き起こされる遺伝毒性がなく、エンテロウイルスはより良好な安全性を有することができ、第二に、エンテロウイルスのゲノムは比較的小さいため、多数のウイルスが短期間で複製されて他の腫瘍細胞に更に感染し、それにより強い細胞変性効果を引き起こすことができ、さらに、エンテロウイルスは癌遺伝子を含まないため、それらが腫瘍を誘発せず、そして最後にエンテロウイルスのゲノムを逆遺伝学技術により改変させて、ウイルスの弱毒化を達成し、それらの副作用を減らすことができる。

【0005】

腫瘍溶解活性を有する現在報告されるエンテロウイルスには、悪性神経膠腫等のヒト固形腫瘍の治療のためのキメラポリオウイルス (非特許文献 1)、ヒト黒色腫細胞を死滅させるコクサッキーウイルス A13、A15、A18 及び A21 (非特許文献 2) 等が含まれる。しかしながら、依然として、腫瘍特異的活性と腫瘍死滅活性との両方を有するウイルスを得ることが必要とされる。

【0006】

エコーウイルス (ECHO) は、腸内細胞変性ヒトオーファンウイルスという省略しない正式名を有する。1950 年代初めに、そのウイルスは健康な小児と無菌性髄膜炎の小児の糞便から分離され、組織培養により同定された。エコーウイルス 25 は、ヒトエンテロウイルス B の種に属し、その感染は主に 5 歳未満の小児で発生し、主に斑点状丘疹、下痢及び呼吸器疾患を含む臨床症状を示し、重症な症例では、無菌性髄膜炎、新生児敗血症、心筋炎等が発生する場合がある。現在、当該技術分野においてエコーウイルス 25 に関して腫瘍溶解活性は報告されていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【文献】 Dobrikova et al., Mol Ther 2008, 16 (11): 1865-1872

10

20

30

40

50

【文献】Au et al., Virol J 2011, 8: 22

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

集中的な実験を行うとともに探求を繰り返した末に、本出願の発明者らは、予想外にも、エコーウイルス25が具体的な腫瘍に関して顕著な腫瘍細胞死滅能力とを有することを見出した。この知見に基づいて、本発明者らは、腫瘍を治療するための新しい腫瘍溶解性ウイルス及び該ウイルスに基づく腫瘍治療法を開発した。

【0009】

医療的用途

10

それゆえ、第1の態様では、本発明は、被験体における腫瘍の治療における又は被験体における腫瘍を治療するための医薬の製造における、エコーウイルス25 (ECHO25) 若しくはその改変形、又は単離された核酸分子の使用であって、

前記単離された核酸分子は、以下の：

(1) ECHO25又はその改変形のゲノム配列又はcDNA配列と、

(2) 前記ゲノム配列又は前記cDNA配列の相補的配列と、

から選択される配列を含む、使用を提供する。

【0010】

或る特定の好ましい実施の形態では、ECHO25は野生型ECHO25である。或る特定の好ましい実施の形態では、ECHO25は、エコーウイルス25に感染した個体から分離された臨床分離株であり得る。

20

【0011】

或る特定の好ましい実施の形態では、ECHO25又はその改変形のゲノム配列は、配列番号12に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する。或る特定の好ましい実施の形態では、ECHO25又はその改変形のゲノム配列は、配列番号12に示されるヌクレオチド配列である。

【0012】

30

或る特定の好ましい実施の形態では、ECHO25又はその改変形のcDNA配列は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する。或る特定の好ましい実施の形態では、ECHO25又はその改変形のcDNA配列は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列である。

【0013】

或る特定の好ましい実施の形態では、前記改変形は、野生型ECHO25と比較してゲノム中に1つ以上のヌクレオチドの置換、挿入又は欠失を有する改変ECHO25である。

40

【0014】

或る特定の好ましい実施の形態では、野生型ECHO25と比較して、前記改変ECHO25は、以下の：

(1) 非翻訳領域 (例えば、5' UTR又は3' UTR) における1つ以上の突然変異と、

(2) 1つ以上の外因性核酸の挿入と、

(3) 1つ以上の内因性遺伝子の欠失又は突然変異と、

(4) 前記3つの項目の任意の組み合わせと、

から選択される1つ以上の改変を有する。

【0015】

或る特定の好ましい実施の形態では、改変ECHO25は、5' 非翻訳領域 (5' UTR

50

）における１つ以上の突然変異を含む。

【 0 0 1 6 】

或る特定の好ましい実施の形態では、改変 E C H O 2 5 は、5' U T R 配列の全て又は部分の置換を有する。或る特定の好ましい実施の形態では、改変 E C H O 2 5 は、5' U T R における内部リボソーム進入部位 (I R E S) 配列の、外因性 I R E S 配列、例えばヒトライノウイルス 2 (H R V 2) の内部リボソーム進入部位配列との置換を有する。或る特定の好ましい実施の形態では、ヒトライノウイルス 2 (H R V 2) の内部リボソーム進入部位配列は、配列番号 2 に示されている。

【 0 0 1 7 】

ヒトライノウイルス 2 (H R V 2) の内部リボソーム進入部位配列の使用は、幾つかの場合、例えば腫瘍溶解性ウイルスの腫瘍特異性を改善するために有利である。正常なヒト神経細胞では、ヒトライノウイルス 2 の内部リボソーム進入部位配列に宿主 R N A 結合タンパク質 (D R B P 7 6 及び N F 4 5) が特異的に結合し、それにより e l f 4 G 等の因子の動員が妨げられ (Merrill et al. J Virol 2006,80 (7): 3147-3156, Merrill and Gromeier, J Virol 2006,80 (14): 6936-6942, Neplioueva et al., PLoS One 2010,5 (7): e11710)、一方で、R a f / E r k 1 / 2 / M A P K 及び他のシグナル伝達経路の支援なしに、リボソームはヒトライノウイルス 2 の内部リボソーム進入部位配列に殆ど結合することができないため、ウイルスタンパク質の翻訳は開始し得ない (Dobrikov et al., Mol Cell Biol 2011, 31(14): 2947-2959, Dobrikov et al., Mol Cell Biol 2013, 33(5): 937-946) ことが以前に報告されている。ヒト神経膠腫細胞においては、ヒトライノウイルス 2 の内部リボソーム進入部位は上記の 2 つの要因により影響されないため、ウイルスタンパク質の転写及び翻訳を正常に開始することができる。したがって、幾つかの場合には、E C H O 2 5 の内部リボソーム進入部位配列をヒトライノウイルス 2 の内部リボソーム進入部位配列で置き換えることは、正常なヒト神経細胞に対する本発明のウイルスの毒性作用及び副作用を、ヒト神経膠腫の治療でのそのウイルスの使用に影響を与えることなく回避又は低減するのに有益である。

【 0 0 1 8 】

或る特定の好ましい実施の形態では、改変 E C H O 2 5 は外因性核酸を含む。

【 0 0 1 9 】

或る特定の好ましい実施の形態では、外因性核酸は、サイトカイン (例えば、G M - C S F、好ましくはヒト G M - C S F) 又は抗腫瘍タンパク質若しくはポリペプチド (例えば、P D - 1 又は P D - L 1 に対する s c F v、好ましくはヒト P D - 1 又は P D - L 1 に対する s c F v) をコードする。或る特定の好ましい実施の形態では、外因性核酸は、改変 E C H O 2 5 のゲノムの 5' U T R と V P 4 遺伝子との間、又は V P 1 遺伝子と 2 A 遺伝子との間に挿入される。

【 0 0 2 0 】

或る特定の好ましい実施の形態では、外因性核酸は、マイクロ R N A (m i R N A) (例えば、m i R - 1 3 3 又は m i R - 2 0 6) の標的配列を含む。或る特定の好ましい実施の形態では、マイクロ R N A の標的配列は、改変 E C H O 2 5 のゲノムの 3' 非翻訳領域 (3' U T R) に挿入される。

【 0 0 2 1 】

腫瘍細胞における或る特定のマイクロ R N A の発現レベルが正常細胞における発現レベルよりも大幅に低いこと、及び / 又は明らかな組織特異性を有することが以前に報告されている。このように、幾つかの場合には、本発明の改変 E C H O 2 5 が、そのようなマイクロ R N A の標的配列を含むことが有利である。それというのも、正常な細胞又は組織で高度に発現されるそのようなマイクロ R N A は、対応する標的配列を介して正常な細胞又は組織における改変 E C H O 2 5 の複製を低減し得るか、又は更には遮断し得るため、非腫瘍細胞に対する改変 E C H O 2 5 の毒性作用及び副作用は減少、又は更には回避されるからである。そのようなマイクロ R N A には、限定されるものではないが、m i R - 1 3 3、m i R - 2 0 6、m i R - 1、m i R - 1 4 3、m i R - 1 4 5、m i R - 2 1 7、

10

20

30

40

50

let - 7、mi R - 15、mi R - 16等が含まれる（例えば、国際公開第2008103755号、米国特許出願公開第20160143969号、又はBaohong Zhang et al., Developmental Biology, Volume 302, Issue 1, 1 February 2007, Pages 1-12を参照；これらの全ては、引用することによりその全体が本明細書の一部をなす）。

【0022】

或る特定の好ましい実施の形態では、外因性核酸は、上記の1つ以上（例えば、2つ、3つ又は4つ）のマイクロRNAの標的配列を含む。或る特定の好ましい実施の形態では、外因性核酸は、mi R - 133及び/又はmi R - 206の標的配列を含む。或る特定の好ましい実施の形態では、mi R - 133の標的配列は、配列番号3に示されている。或る特定の好ましい実施の形態では、mi R - 206の標的配列は、配列番号4に示されている。幾つかの場合には、mi R - 133及び/又はmi R - 206の標的配列の挿入が有利である。これは、mi R - 133及びmi R - 206が筋肉組織で特異的に発現されるため、mi R - 133及び/又はmi R - 206の標的配列を改変ECHO25へと挿入することで、腫瘍溶解性ウイルスの組織向性が変化し得るため、正常な筋肉組織への損傷が減少する又は回避されるからである。

10

【0023】

或る特定の好ましい実施の形態では、改変ECHO25は、上記の外因性核酸の少なくとも1つの挿入及び/又は上記の非翻訳領域における少なくとも1つの突然変異を含む。

【0024】

或る特定の好ましい実施の形態では、前記改変ECHO25のゲノム配列は、配列番号13～配列番号16に示されるヌクレオチド配列から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する。或る特定の好ましい実施の形態では、前記改変ECHO25のゲノム配列は、配列番号13～配列番号16のいずれか1つに示されるヌクレオチド配列である。

20

【0025】

或る特定の好ましい実施の形態では、前記改変ECHO25のcDNA配列は、配列番号8～配列番号11に示されるヌクレオチド配列から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する。或る特定の好ましい実施の形態では、前記改変ECHO25のcDNA配列は、配列番号8～配列番号11のいずれか1つに示されるヌクレオチド配列である。

30

【0026】

本発明において、上記の改変ECHO25は逆遺伝学技術により得ることができ、逆遺伝学技術は当該技術分野において知られており、例えば、Yang LS, Li SX, Liu YJ, et al., Virus Res, 2015, 210: 165-168、Hou WH, Yang LS, Li SX, et al., Virus Res, 2015, 205: 41-44を参照のこと（これらの全ては、引用することによりその全体が本明細書の一部をなす）。そのような実施の形態では、野生型ECHO25のcDNAは、典型的には改変ECHO25を得るために（例えば、外因性核酸の挿入、内因性遺伝子の欠失若しくは突然変異、又は非翻訳領域における突然変異によって）改変される。

40

【0027】

本発明において、上記のECHO25又はその改変形を前処理に供することで、被験体におけるウイルスに対する免疫応答を低減させる又は排除することができ、ここで、上記前処理は、リボソーム若しくはミセル中にECHO25をパッケージングすること、及び/又はプロテアーゼ（例えば、キモトリプシン又はトリプシン）を使用してウイルスのキャプシドタンパク質を除去し、宿主のウイルスに対する体液性免疫及び/又は細胞性免疫

50

を低下させることを含み得る。

【 0 0 2 8 】

本発明において、上記の E C H O 2 5 又はその改変形は、腫瘍細胞における馴化のために連続継代され得る。或る特定の好ましい実施の形態では、腫瘍細胞は、当該技術分野において知られる腫瘍細胞系統若しくは腫瘍細胞株であり得る、又は腫瘍を有する個体（例えば、被験体）からの *in vivo* 外科的切除若しくは臨床的分離によって得られた腫瘍細胞であり得る。或る特定の好ましい実施の形態では、E C H O 2 5 又はその改変形は、腫瘍を有する個体（例えば、被験体）から得られた腫瘍細胞における馴化のために連続継代される。或る特定の好ましい実施の形態では、腫瘍細胞は、腫瘍を有する個体（例えば、被験体）からの外科的切除又は臨床的分離によって得られる。或る特定の好ましい実施の形態では、馴化のための連続継代法は、以下の過程、すなわち 1) 標的腫瘍細胞にウイルスを感染させる過程と、2) 上清中のウイルスを採取する過程と、3) 新たな標的腫瘍細胞に得られたウイルスを再感染させる過程とからなる複数のサイクル（例えば、少なくとも 5 サイクル、少なくとも 10 サイクル、少なくとも 15 サイクル、少なくとも 20 サイクル）を含む。

10

【 0 0 2 9 】

或る特定の好ましい実施の形態では、上記の E C H O 2 5 及びその改変形は、組み合わせて使用することができる。したがって、医薬は、E C H O 2 5 及びその改変形の 1 つ以上を含み得る。

【 0 0 3 0 】

或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、上記の E C H O 2 5 若しくはその改変形のゲノム配列若しくは c D N A 配列、又は上記ゲノム配列若しくは上記 c D N A 配列の相補的配列からなる。或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、上記の E C H O 2 5 又はその改変形のゲノム配列を有する。或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は R N A である。或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、配列番号 1 2 ~ 配列番号 1 6 のいずれか 1 つに示されるヌクレオチド配列を有する。

20

【 0 0 3 1 】

或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、上記の E C H O 2 5 若しくはその改変形のゲノム配列若しくは c D N A 配列、又は上記ゲノム配列若しくは上記 c D N A 配列の相補的配列を含むベクター（例えば、クローニングベクター又は発現ベクター）である。或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、上記の E C H O 2 5 若しくはその改変形の c D N A 配列、又は上記 c D N A 配列の相補的配列を含むベクター（例えば、クローニングベクター又は発現ベクター）である。

30

【 0 0 3 2 】

或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、上記の E C H O 2 5 又はその改変形のゲノム配列の相補的配列を含む。或る特定の好ましい実施の形態では、相補的配列は、

(1) 配列番号 1 2 に示されるヌクレオチド配列と、

(2) 配列番号 1 2 に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列と、

40

(3) 配列番号 1 3 ~ 配列番号 1 6 のいずれか 1 つに示されるヌクレオチド配列と、

(4) 配列番号 1 3 ~ 配列番号 1 6 のいずれかに示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列と、

50

からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して相補的である。

【0033】

或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、上記の E C H O 2 5 又はその改変形の c D N A の配列の相補的配列を含む。或る特定の好ましい実施の形態では、相補的配列は、

(1) 配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列と、

(2) 配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有するヌクレオチド配列と、

(3) 配列番号 8 ~ 配列番号 11 のいずれか 1 つに示されるヌクレオチド配列と、

(4) 配列番号 8 ~ 配列番号 11 のいずれか 1 つに示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有するヌクレオチド配列と、

からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して相補的である。

【0034】

本発明において、単離された核酸分子は、当該技術分野において知られる任意の手段によって送達することができ、例えば、ネイキッド核酸分子（例えば、ネイキッド RNA）を直接的に注入することができる又は非ウイルス送達システムを使用することができる。非ウイルス送達システムは、限定されるものではないが、"Yin H, et al. Nat Rev Genet. 2014 Aug; 15(8): 541-55." 及び "Riley MK, Vermerris W. Nanomaterials (Basel). 2017 Apr 28; 7(5). Pii: E94."（これらは、引用することによりその全体が本明細書の一部をなす）に詳細に記載される材料、例えばリポソーム、無機ナノ粒子（例えば、金ナノ粒子）、ポリマー（例えば、PEG）等を含む当該技術分野においてよく知られる様々な材料から得ることができる。

【0035】

或る特定の好ましい実施の形態では、医薬は、治療的有效量の上記の E C H O 2 5 及び / 又はその改変形、又は治療的有效量の上記の単離された核酸分子を含む。或る特定の好ましい実施の形態では、医薬は、医療技術分野で知られる任意の形で存在し得る。例えば、医薬は、錠剤、丸剤、懸濁剤、乳剤、液剤、ゲル剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、エリキシル剤、ロゼンジ剤、坐剤又は注射剤（注射液、凍結乾燥粉末を含む）等の形で存在し得る。幾つかの実施の形態では、医薬は、注射液又は凍結乾燥粉末である。

【0036】

或る特定の好ましい実施の形態では、医薬は、薬学的に許容可能な担体又は賦形剤を更を含む。或る特定の好ましい実施の形態では、医薬は安定剤を含む。

【0037】

或る特定の好ましい実施の形態では、医薬は、任意に、追加の薬学的活性剤を更を含む。好ましい実施の形態では、追加の薬学的活性剤は、追加の腫瘍溶解性ウイルス、化学療法剤又は免疫療法剤等の抗腫瘍活性を有する医薬である。

【0038】

本発明において、追加の腫瘍溶解性ウイルスには、限定されるものではないが、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス、レオウイルス、ニューカッスル病ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、麻疹ウイルス又はそれらの任意の組み合わせが含まれる。化学療法剤には、限定されるものではないが、5 - フルオロウラシル、マイトマイシン、メトトレキサート、ヒドロキシ尿素、シクロホスファミド、ダカルバジン、ミトキサントロン、アントラサイクリン類（例えば、エピルピシン又はドキソルピシン）、エトポシド、白金化合物（例えば、カルボプラチン又はシスプラチン）、タキサン類（例えば、パクリ

10

20

30

40

50

タキセル又はタキソテール)又はそれらの任意の組み合わせが含まれる。免疫療法剤には、限定されるものではないが、免疫チェックポイント阻害薬(例えば、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体又は抗CTLA-4抗体)、腫瘍特異的標的化抗体(例えば、リツキシマブ又はハーセプチン)又はそれらの任意の組み合わせが含まれる。

【0039】

或る特定の好ましい実施の形態では、医薬は、例えば少なくとも 1×10^2 pfu、少なくとも 1×10^3 pfu、少なくとも 1×10^4 pfu、 1×10^5 pfu、 1×10^6 pfu、少なくとも 1×10^7 pfu、少なくとも 1×10^8 pfu、少なくとも 1×10^9 pfu、少なくとも 1×10^{10} pfu、少なくとも 1×10^{11} pfu、少なくとも 1×10^{12} pfu、少なくとも 1×10^{13} pfu、少なくとも 1×10^{14} pfu又は少なくとも 1×10^{16} pfuのECHO25及び/又はその改変形を含む、上記のECHO25及び/又はその改変形の単位用量を含む。或る特定の好ましい実施の形態では、医薬は、 1×10^2 pfu ~ 1×10^{17} pfuの上記のECHO25及び/又はその改変形を含む。

10

【0040】

或る特定の好ましい実施の形態では、医薬は、上記の単離された核酸分子の単位用量、例えば 3×10^{10} ~ 3×10^{14} のウイルスゲノムコピーを含む核酸分子を含有する。

【0041】

或る特定の好ましい実施の形態では、医薬は、追加療法と組み合わせて投与され得る。この追加療法は、外科手術、化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法又は遺伝子療法等の腫瘍に関して知られている任意の療法であり得る。この追加療法は医薬の投与前に、その投与と同時に又はその投与後に施すことができる。

20

【0042】

或る特定の好ましい実施の形態では、腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌(例えば、卵巣非明細胞癌(ovarian non-clear cell carcinoma))、子宮内膜癌、黒色腫、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫(例えば、組織球性リンパ腫)、白血病(例えば、慢性骨髄性白血病)、横紋筋肉腫、結腸直腸癌、非小細胞肺癌(例えば、非小細胞肺腺癌)、子宮頸癌(例えば、HPV陰性子宮頸癌)、乳癌(例えば、乳房髓様癌)、腎臓癌(例えば、明細胞腎臓癌)及び膵臓癌からなる群から選択される。

【0043】

30

或る特定の好ましい実施の形態では、腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌(例えば、卵巣非明細胞癌)、子宮内膜癌、子宮頸癌(例えば、HPV陰性子宮頸癌)、黒色腫、乳癌(例えば、乳房髓様癌)、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫(例えば、組織球性リンパ腫)又は白血病(例えば、慢性骨髄性白血病)である。

【0044】

或る特定の好ましい実施の形態では、被験体は、ヒト等の哺乳動物である。

【0045】

治療法

第2の態様では、本発明は、腫瘍を治療する方法であって、治療を必要とする被験体に、有効量のECHO25若しくはその改変形、又は有効量の単離された核酸分子を投与する工程を含み、ここで、前記単離された核酸分子は、

40

(1)前記ECHO25又はその改変形のゲノム配列又はcDNA配列と、

(2)前記ゲノム配列又は前記cDNA配列の相補的配列と、

からなる群から選択される配列を含む、方法を提供する。

【0046】

或る特定の好ましい実施の形態では、ECHO25は被験体に投与される。或る特定の好ましい実施の形態では、ECHO25は野生型ECHO25である。或る特定の好ましい実施の形態では、ECHO25は、エコーウイルス25に感染した個体から分離された臨床分離株であり得る。

【0047】

50

或る特定の好ましい実施の形態では、ECHO25又はその改変形のゲノム配列は、配列番号12に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する。或る特定の好ましい実施の形態では、ECHO25又はその改変形のゲノム配列は、配列番号12に示されるヌクレオチド配列である。

【0048】

或る特定の好ましい実施の形態では、ECHO25又はその改変形のcDNA配列は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する。或る特定の好ましい実施の形態では、ECHO25又はその改変形のcDNA配列は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列である。

【0049】

或る特定の好ましい実施の形態では、ECHO25の改変形が被験体に投与される。或る特定の好ましい実施の形態では、改変形は、野生型ECHO25と比較して、ゲノム中の1つ以上のヌクレオチドの置換、挿入又は欠失を有する改変ECHO25である。

【0050】

或る特定の好ましい実施の形態では、野生型ECHO25と比較して、前記改変ECHO25は、以下の：

- (1) 非翻訳領域（例えば、5' UTR又は3' UTR）における1つ以上の突然変異と、
 - (2) 1つ以上の外因性核酸の挿入と、
 - (3) 1つ以上の内因性遺伝子の欠失又は突然変異と、
 - (4) 前記3つの項目の任意の組み合わせと、
- から選択される1つ以上の改変を有する。

【0051】

或る特定の好ましい実施の形態では、改変ECHO25は、5' 非翻訳領域（5' UTR）における1つ以上の突然変異を含む。

【0052】

或る特定の好ましい実施の形態では、改変ECHO25は、5' UTR配列の全て又は部分の置換を有する。或る特定の好ましい実施の形態では、改変ECHO25は、5' UTRにおける内部リボソーム進入部位（IRES）配列の、外因性IRES配列、例えばヒトライノウイルス2（HRV2）の内部リボソーム進入部位配列との置換を有する。或る特定の好ましい実施の形態では、ヒトライノウイルス2（HRV2）の内部リボソーム進入部位配列は、配列番号2に示されている。

【0053】

或る特定の好ましい実施の形態では、改変ECHO25は外因性核酸を含む。

【0054】

或る特定の好ましい実施の形態では、外因性核酸は、サイトカイン（例えば、GM-CSF、好ましくはヒトGM-CSF）又は抗腫瘍タンパク質若しくはポリペプチド（例えば、PD-1又はPD-L1に対するscFv、好ましくはヒトPD-1又はPD-L1に対するscFv）をコードする。或る特定の好ましい実施の形態では、外因性核酸は、改変ECHO25のゲノムの5' UTRとVP4遺伝子との間、又はVP1遺伝子と2A遺伝子との間に挿入される。

【0055】

或る特定の好ましい実施の形態では、外因性核酸は、マイクロRNA（miRNA）（例えば、miR-133又はmiR-206）の標的配列を含む。或る特定の好ましい実施の形態では、マイクロRNAの標的配列は、改変ECHO25のゲノムの3' 非翻訳領域

10

20

30

40

50

(3 ' U T R) に挿入される。

【 0 0 5 6 】

或る特定の好ましい実施の形態では、外因性核酸は、上記の 1 つ以上（例えば、2 つ、3 つ又は 4 つ）のマイクロ R N A の標的配列を含む。或る特定の好ましい実施の形態では、外因性核酸は、m i R - 1 3 3 及び / 又は m i R - 2 0 6 の標的配列を含む。或る特定の好ましい実施の形態では、m i R - 1 3 3 の標的配列は、配列番号 3 に示されている。或る特定の好ましい実施の形態では、m i R - 2 0 6 の標的配列は、配列番号 4 に示されている。

【 0 0 5 7 】

或る特定の好ましい実施の形態では、改変 E C H O 2 5 は、上記の外因性核酸の少なくとも 1 つの挿入及び / 又は上記の非翻訳領域における少なくとも 1 つの突然変異を含む。

10

【 0 0 5 8 】

或る特定の好ましい実施の形態では、前記改変 E C H O 2 5 のゲノム配列は、配列番号 1 3 ~ 配列番号 1 6 に示されるヌクレオチド配列から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する。或る特定の好ましい実施の形態では、前記改変 E C H O 2 5 のゲノム配列は、配列番号 1 3 ~ 配列番号 1 6 のいずれか 1 つに示されるヌクレオチド配列である。

20

【 0 0 5 9 】

或る特定の好ましい実施の形態では、前記改変 E C H O 2 5 の c D N A 配列は、配列番号 8 ~ 配列番号 1 1 に示されるヌクレオチド配列から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する。或る特定の好ましい実施の形態では、前記改変 E C H O 2 5 の c D N A 配列は、配列番号 8 ~ 配列番号 1 1 のいずれか 1 つに示されるヌクレオチド配列である。

【 0 0 6 0 】

或る特定の好ましい実施の形態では、上記の E C H O 2 5 及びその改変形は、組み合わせて使用することができる。したがって、E C H O 2 5 及びその改変形の 1 つ以上を被験体に投与することができる。

30

【 0 0 6 1 】

或る特定の好ましい実施の形態では、上記の単離された核酸分子が被験体に投与される。

【 0 0 6 2 】

或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、上記の E C H O 2 5 若しくはその改変形のゲノム配列若しくは c D N A 配列、又は上記ゲノム配列若しくは上記 c D N A 配列の相補的配列からなる。或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、上記の E C H O 2 5 又はその改変形のゲノム配列を有する。或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は R N A である。或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、配列番号 1 2 ~ 配列番号 1 6 のいずれか 1 つに示されるヌクレオチド配列を有する。

40

【 0 0 6 3 】

或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、上記の E C H O 2 5 若しくはその改変形のゲノム配列若しくは c D N A 配列、又は上記ゲノム配列若しくは上記 c D N A 配列の相補的配列を含むベクター（例えば、クローニングベクター又は発現ベクター）である。或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、上記の E C H O 2 5 若しくはその改変形の c D N A 配列、又は上記 c D N A 配列の相補的配列を含むベクター（例えば、クローニングベクター又は発現ベクター）である。

50

【 0 0 6 4 】

或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、上記の E C H O 2 5 又はその改変形のゲノム配列の相補的配列を含む。或る特定の好ましい実施の形態では、相補的配列は、

(1) 配列番号 1 2 に示されるヌクレオチド配列と、

(2) 配列番号 1 2 に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列と、

(3) 配列番号 1 3 ~ 配列番号 1 6 のいずれか 1 つに示されるヌクレオチド配列と、

(4) 配列番号 1 3 ~ 配列番号 1 6 のいずれかに示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列と、

から選択されるヌクレオチド配列に対して相補的である。

【 0 0 6 5 】

或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、上記の E C H O 2 5 又はその改変形の c D N A 配列の相補的配列を含む。或る特定の好ましい実施の形態では、相補的配列は、

(1) 配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列と、

(2) 配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列と、

(3) 配列番号 8 ~ 配列番号 1 1 のいずれか 1 つに示されるヌクレオチド配列と、

(4) 配列番号 8 ~ 配列番号 1 1 のいずれか 1 つに示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列と、

から選択されるヌクレオチド配列に対して相補的である。

【 0 0 6 6 】

本発明において、単離された核酸分子は、当該技術分野において知られる任意の手段によって送達することができ、例えば、ネイキッド核酸分子（例えば、ネイキッド R N A ）を直接的に注入することができる又は非ウイルス送達システムを使用することができる。非ウイルス送達システムは、限定されるものではないが、"Yin H, et al. Nat Rev Genet. 2014 Aug; 15(8): 541-55." 及び "Riley MK, Vermerris W. Nanomaterials (Basel). 2017 Apr 28; 7(5). Pii: E94."（これらは、引用することによりその全体が本明細書の一部をなす）に詳細に記載される材料、例えばリポソーム、無機ナノ粒子（例えば、金ナノ粒子）、ポリマー（例えば、P E G）等を含む当該技術分野においてよく知られる様々な材料から得ることができる。

【 0 0 6 7 】

或る特定の好ましい実施の形態では、上記の E C H O 2 5 及び / 又はその改変形、又は上記の単離された核酸分子は、医薬組成物として製剤化して投与することができる。そのような医薬組成物は、治療的有効量の上記の E C H O 2 5 及び / 又はその改変形、又は治療的有効量の上記の単離された核酸分子を含み得る。或る特定の好ましい実施の形態では、医薬組成物は、医療技術分野で知られる任意の形で存在し得る。例えば、医薬組成物は

10

20

30

40

50

、錠剤、丸剤、懸濁剤、乳剤、液剤、ゲル剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、エリキシル剤、ロゼンジ剤、坐剤又は注射剤（注射液、凍結乾燥粉末を含む）等の形で存在し得る。幾つかの実施の形態では、医薬は、注射液又は凍結乾燥粉末である。

【0068】

或る特定の好ましい実施の形態では、医薬組成物は、薬学的に許容可能な担体又は賦形剤を更に含む。或る特定の好ましい実施の形態では、医薬組成物は安定剤を含む。

【0069】

本発明において、ECHO25及び/又はその改変形、又は上記の単離された核酸分子は、任意の適切な投与経路により被験体に投与され得る。幾つかの場合には、ECHO25及び/又はその改変形、又は上記の単離された核酸分子の投与経路は、腫瘍の位置及び種類に依存する。例えば、容易にアクセス可能な固形腫瘍の場合に、ウイルス又は核酸分子は任意に腫瘍への直接注射（例えば、腫瘍内注射）により投与され、造血系の腫瘍の場合に、ウイルス又は核酸分子は静脈内又は他の血管内経路で投与することができ、体内の容易にアクセス可能でない腫瘍（例えば、転移）の場合に、ウイルス又は核酸分子は全身を駆け巡ることで腫瘍に到達することができるように全身投与することができる（例えば、静脈内注射又は筋肉内注射）。任意に、本発明のウイルス又は核酸分子は、皮下経路、腹腔内経路、くも膜下経路（例えば、脳腫瘍用）、局所経路（例えば、黒色腫瘍用）、経口経路（例えば、口腔癌用又は食道癌用）、鼻腔内経路又は吸入スプレー経路（例えば、肺癌用）等を介して投与され得る。或る特定の好ましい実施の形態では、上記のECHO25及び/又はその改変形、又は上記の単離された核酸は、皮内経路、皮下経路、筋肉内経路、静脈内経路、経口経路等を介して投与され得る。

【0070】

或る特定の好ましい実施の形態では、上記方法は、抗腫瘍活性を有する追加の薬学的活性剤を投与することを更に含む。この追加の薬学的活性剤は、ECHO25及び/又はその改変形、又は上記の単離された核酸分子の投与の前に、その投与と同時に又はその投与の後に投与され得る。

【0071】

或る特定の好ましい実施の形態では、追加の薬学的活性剤には、追加の腫瘍溶解性ウイルス、化学療法剤又は免疫療法剤が含まれる。

【0072】

本発明において、追加の腫瘍溶解性ウイルスには、限定されるものではないが、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス、レオウイルス、ニューカッスル病ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、麻疹ウイルス又はそれらの任意の組み合わせが含まれる。化学療法剤には、限定されるものではないが、5-フルオロウラシル、マイトマイシン、メトトレキサート、ヒドロキシ尿素、シクロホスファミド、ダカルバジン、ミトキサントロン、アントラサイクリン類（例えば、エピルピシン又はドキソルピシン）、エトポシド、白金化合物（例えば、カルボプラチン又はシスプラチン）、タキサン類（例えば、パクリタキセル又はタキソテール）又はそれらの任意の組み合わせが含まれる。免疫療法剤には、限定されるものではないが、免疫チェックポイント阻害薬（例えば、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体又は抗CTLA-4抗体）、腫瘍特異的標的化抗体（例えば、リツキシマブ又はハーセプチン）又はそれらの任意の組み合わせが含まれる。

【0073】

或る特定の好ましい実施の形態では、ECHO25及び/又はその改変形は、被験体の体重1kg当たり1pfu~ 1×10^{15} pfuの任意の量で投与することができ、例えば、ECHO25及び/又はその改変形は、被験体の体重1kg当たり少なくとも 1×10^3 pfu、少なくとも 1×10^4 pfu、 1×10^5 pfu、 1×10^6 pfu、少なくとも 1×10^7 pfu、少なくとも 1×10^8 pfu、少なくとも 1×10^9 pfu、少なくとも 1×10^{10} pfu、少なくとも 1×10^{11} pfu、又は少なくとも 1×10^{12} pfuの量で投与される。或る特定の好ましい実施の形態では、上記の単離された核酸分子は、被験体の体重1kg当たり 3×10^{10} ~ 3×10^{14} のウイルスゲノムコピーのい

ずれかの量で投与され得る。或る特定の好ましい実施の形態では、ECHO25及び/又はその改変形、又は上記の単離された核酸分子は、1日3回、1日2回、1日1回、2日毎に1回又は週に1回投与することができ、任意に上記投与計画は、必要に応じて毎週又は毎月繰り返すことができる。

【0074】

或る特定の好ましい実施の形態では、上記方法は、追加療法を施すことを更に含む。この追加療法は、外科手術、化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法又は遺伝子療法等の腫瘍に関して知られている任意の療法であり得る。この追加療法は上記方法を施す前に、それと同時に又はその後に施すことができる。

【0075】

或る特定の好ましい実施の形態では、被験体は、ヒト等の哺乳動物である。

【0076】

或る特定の好ましい実施の形態では、腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌（例えば、卵巣非明細胞癌）、子宮内膜癌、黒色腫、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫（例えば、組織球性リンパ腫）、白血病（例えば、慢性骨髄性白血病）、横紋筋肉腫、結腸直腸癌、非小細胞肺癌（例えば、非小細胞肺腺癌）、子宮頸癌（例えば、HPV陰性子宮頸癌）、乳癌（例えば、乳房髄様癌）、腎臓癌（例えば、明細胞腎臓癌）及び膵臓癌からなる群から選択される。

【0077】

或る特定の好ましい実施の形態では、腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌（例えば、卵巣非明細胞癌）、子宮内膜癌、子宮頸癌（例えば、HPV陰性子宮頸癌）、黒色腫、乳癌（例えば、乳房髄様癌）、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫（例えば、組織球性リンパ腫）又は白血病（例えば、慢性骨髄性白血病）である。

【0078】

医薬組成物

第3の態様では、本発明は、第1の態様若しくは第2の態様で規定されるECHO25及び/又はその改変形、又は第1の態様若しくは第2の態様で規定される単離された核酸分子を含む医薬組成物を提供する。

【0079】

或る特定の好ましい実施の形態では、医薬組成物は、医療技術分野で知られる任意の形で存在し得る。例えば、医薬組成物は、錠剤、丸剤、懸濁剤、乳剤、液剤、ゲル剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、エリキシル剤、ロゼンジ剤、坐剤又は注射剤（注射液、凍結乾燥粉末を含む）等の形で存在し得る。幾つかの実施の形態では、医薬は、注射液又は凍結乾燥粉末である。

【0080】

或る特定の好ましい実施の形態では、医薬組成物は、薬学的に許容可能な担体又は賦形剤を更に含む。或る特定の好ましい実施の形態では、医薬組成物は安定剤を含む。

【0081】

或る特定の好ましい実施の形態では、医薬組成物は、任意に、追加の薬学的活性剤を更に含む。好ましい実施の形態では、追加の薬学的活性剤は、追加の腫瘍溶解性ウイルス、化学療法剤又は免疫療法剤等の抗腫瘍活性を有する医薬である。

【0082】

或る特定の好ましい実施の形態では、医薬組成物は、被験体における腫瘍の治療に使用される。

【0083】

或る特定の好ましい実施の形態では、被験体は、ヒト等の哺乳動物である。

【0084】

或る特定の好ましい実施の形態では、腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌（例えば、卵巣非明細胞癌）、子宮内膜癌、黒色腫、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫（例えば、組織球性リンパ腫）、白血病（例えば、慢性骨髄性白血病）、横紋筋肉腫、結腸直

10

20

30

40

50

腸癌、非小細胞肺癌（例えば、非小細胞肺腺癌）、子宮頸癌（例えば、H P V 陰性子宮頸癌）、乳癌（例えば、乳房髓様癌）、腎臓癌（例えば、明細胞腎臓癌）及び脾臓癌からなる群から選択される。

【 0 0 8 5 】

或る特定の好ましい実施の形態では、腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌（例えば、卵巣非明細胞癌）、子宮内膜癌、子宮頸癌（例えば、H P V 陰性子宮頸癌）、黒色腫、乳癌（例えば、乳房髓様癌）、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫（例えば、組織球性リンパ腫）又は白血病（例えば、慢性骨髄性白血病）である。

【 0 0 8 6 】

改変 E C H O 2 5

10

第 4 の態様では、本発明は、野生型 E C H O 2 5 と比較して、5 ' U T R 中の内部リボソーム進入部位（I R E S）配列の、ヒトライノウイルス 2（H R V 2）の内部リボソーム進入部位配列との置換を有する改変 E C H O 2 5 を提供する。

【 0 0 8 7 】

或る特定の好ましい実施の形態では、ヒトライノウイルス 2（H R V 2）の内部リボソーム進入部位配列は、配列番号 2 に示されている。

【 0 0 8 8 】

或る特定の好ましい実施の形態では、野生型 E C H O 2 5 のゲノム配列は、配列番号 1 2 に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する。或る特定の好ましい実施の形態では、野生型 E C H O 2 5 のゲノム配列は、配列番号 1 2 に示されるヌクレオチド配列である。

20

【 0 0 8 9 】

或る特定の好ましい実施の形態では、野生型 E C H O 2 5 の c D N A 配列は、配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する。或る特定の好ましい実施の形態では、野生型 E C H O 2 5 の c D N A 配列は、配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列である。

30

【 0 0 9 0 】

或る特定の好ましい実施の形態では、改変 E C H O 2 5 は外因性核酸を含む。

【 0 0 9 1 】

或る特定の好ましい実施の形態では、外因性核酸は、サイトカイン（例えば、G M - C S F、好ましくはヒト G M - C S F）又は抗腫瘍タンパク質若しくはポリペプチド（例えば、P D - 1 又は P D - L 1 に対する s c F v、好ましくはヒト P D - 1 又は P D - L 1 に対する s c F v）をコードする。或る特定の好ましい実施の形態では、外因性核酸は、改変 E C H O 2 5 のゲノムの 5 ' U T R と V P 4 遺伝子との間、又は V P 1 遺伝子と 2 A 遺伝子との間に挿入される。

40

【 0 0 9 2 】

或る特定の好ましい実施の形態では、外因性核酸は、マイクロ R N A（m i R N A）（例えば、m i R - 1 3 3 又は m i R - 2 0 6）の標的配列を含む。或る特定の好ましい実施の形態では、マイクロ R N A の標的配列は、改変 E C H O 2 5 のゲノムの 3 ' 非翻訳領域（3 ' U T R）に挿入される。

【 0 0 9 3 】

或る特定の好ましい実施の形態では、外因性核酸は、上記の 1 つ以上（例えば、2 つ、3 つ又は 4 つ）のマイクロ R N A の標的配列を含む。或る特定の好ましい実施の形態では、外因性核酸は、m i R - 1 3 3 及び / 又は m i R - 2 0 6 の標的配列を含む。或る特定

50

の好ましい実施の形態では、miR-133の標的配列は、配列番号3に示されている。或る特定の好ましい実施の形態では、miR-206の標的配列は、配列番号4に示されている。

【0094】

或る特定の好ましい実施の形態では、改変ECHO25は、上記の少なくとも1つの外因性核酸の挿入を含む。

【0095】

或る特定の好ましい実施の形態では、前記改変ECHO25のゲノム配列は、配列番号13に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する。或る特定の好ましい実施の形態では、前記改変ECHO25のゲノム配列は、配列番号13に示されるヌクレオチド配列である。

10

【0096】

或る特定の好ましい実施の形態では、前記改変ECHO25のcDNA配列は、配列番号8に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する。或る特定の好ましい実施の形態では、前記改変ECHO25のcDNA配列は、配列番号8に示されるヌクレオチド配列である。

20

【0097】

本発明において、改変ECHO25は逆遺伝学技術により得ることができ、逆遺伝学技術は当該技術分野において知られており、例えば、Yang LS, Li SX, Liu YJ, et al Virus Res, 2015, 210: 165-168、Hou WH, Yang LS, Li SX, et al. Virus Res, 2015, 205: 41-44を参照のこと（これらは、引用することによりその全体が本明細書の一部をなす）。そのような実施の形態では、改変ECHO25は、典型的には、野生型ECHO25のcDNAを改変することにより（例えば、外因性核酸の挿入、内因性遺伝子の欠失若しくは突然変異、又は非翻訳領域における突然変異により）得られる。

30

【0098】

本発明において、改変ECHO25を前処理に供することで、被験体におけるウイルスに対する免疫応答を低減させる又は排除することができ、ここで、上記前処理は、リボソーム又はミセル中にECHO25をパッケージングすること、及び/又はプロテアーゼ（例えば、キモトリプシン又はトリプシン）を使用してウイルスのキャプシドタンパク質を除去し、宿主のウイルスに対する体液性免疫及び/又は細胞性免疫を低下させることを含む得る。

【0099】

本発明において、改変ECHO25は、腫瘍細胞における馴化のために連続継代され得る。或る特定の好ましい実施の形態では、腫瘍細胞は、当該技術分野において知られる腫瘍細胞系統若しくは腫瘍細胞株であり得る、又は腫瘍を有する個体（例えば、被験体）からの外科的切除若しくは臨床的分離によって得られた腫瘍細胞であり得る。或る特定の好ましい実施の形態では、改変ECHO25は、腫瘍を有する個体（例えば、被験体）から得られた腫瘍細胞における馴化のために連続継代される。或る特定の好ましい実施の形態では、腫瘍細胞は、腫瘍を有する個体（例えば、被験体）からの外科的切除又は臨床的分離によって得られる。或る特定の好ましい実施の形態では、馴化のための連続継代法は、以下の過程、すなわち1) 標的腫瘍細胞にウイルスを感染させる過程と、2) 上清中のウイルスを採取する過程と、3) 新たな標的腫瘍細胞に得られたウイルスを再感染させる過程とからなる複数のサイクル（例えば、少なくとも5サイクル、少なくとも10サイクル、少なくとも15サイクル、少なくとも20サイクル）を含む。

40

50

【 0 1 0 0 】

或る特定の好ましい実施の形態では、改変 E C H O 2 5 は、被験体における腫瘍の治療において又は被験体における腫瘍を治療するための医薬の製造において使用される。

【 0 1 0 1 】

或る特定の好ましい実施の形態では、腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌（例えば、卵巣非明細胞癌）、子宮内膜癌、黒色腫、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫（例えば、組織球性リンパ腫）、白血病（例えば、慢性骨髄性白血病）、咽頭扁平上皮癌、甲状腺癌、横紋筋肉腫、結腸直腸癌、非小細胞肺癌（例えば、非小細胞肺腺癌）、子宮頸癌（例えば、H P V 陰性子宮頸癌）、乳癌（例えば、乳房髄様癌）、腎臓癌（例えば、明細胞腎臓癌）及び膵臓癌からなる群から選択される。

10

【 0 1 0 2 】

或る特定の好ましい実施の形態では、腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌（例えば、卵巣非明細胞癌）、子宮内膜癌、子宮頸癌（例えば、H P V 陰性子宮頸癌）、黒色腫、乳癌（例えば、乳房髄様癌）、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫（例えば、組織球性リンパ腫）、白血病（例えば、慢性骨髄性白血病）、咽頭扁平上皮癌又は甲状腺癌である。

【 0 1 0 3 】

或る特定の好ましい実施の形態では、改変 E C H O 2 5 は、被験体における腫瘍の治療において又は被験体における腫瘍を治療するための医薬の製造において使用され、ここで、上記腫瘍は、咽頭扁平上皮癌又は甲状腺癌である。

20

【 0 1 0 4 】

或る特定の好ましい実施の形態では、被験体は、ヒト等の哺乳動物である。

【 0 1 0 5 】

第 5 の態様において、本発明は、

（ 1 ）第 4 の態様による改変 E C H O 2 5 のゲノム配列又は c D N A 配列と、

（ 2 ）前記ゲノム配列又は前記 c D N A 配列の相補的配列と、

から選択される配列を含む、単離された核酸分子を提供する。

【 0 1 0 6 】

或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、上記の改変 E C H O 2 5 のゲノム配列若しくは c D N A 配列、又は上記ゲノム配列若しくは上記 c D N A 配列の相補的配列からなる。

30

【 0 1 0 7 】

或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、上記の改変 E C H O 2 5 のゲノム配列を有する。或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は R N A である。或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、配列番号 1 3 に示されるヌクレオチド配列を有する。

【 0 1 0 8 】

或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、上記の E C H O 2 5 若しくはその改変形のゲノム配列若しくは c D N A 配列、又は上記ゲノム配列若しくは上記 c D N A 配列の相補的配列を含むベクター（例えば、クローニングベクター又は発現ベクター）である。或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、上記の E C H O 2 5 若しくはその改変形の c D N A 配列、又は上記 c D N A 配列の相補的配列を含むベクター（例えば、クローニングベクター又は発現ベクター）である。

40

【 0 1 0 9 】

或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、上記の改変 E C H O 2 5 のゲノム配列の相補的配列を含む。或る特定の好ましい実施の形態では、相補的配列は、

（ 1 ）配列番号 1 3 に示されるヌクレオチド配列と、

（ 2 ）配列番号 1 3 に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくと

50

も 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有するヌクレオチド配列と、

から選択されるヌクレオチド配列に対して相補的である。

【0110】

或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、上記の改変 E C H O 2 5 の c D N A 配列の相補的配列を含む。或る特定の好ましい実施の形態では、相補的配列は、(1) 配列番号 8 に示されるヌクレオチド配列と、

(2) 配列番号 8 に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有するヌクレオチド配列と、

10

から選択されるヌクレオチド配列に対して相補的である。

【0111】

或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、配列番号 13 に示されるヌクレオチド配列を有する、又は単離された核酸分子は、配列番号 8 に示されるヌクレオチド配列若しくはその相補的配列を含むベクター（例えば、クローニングベクター又は発現ベクター）である。

【0112】

本発明において、単離された核酸分子は、当該技術分野において知られる任意の手段によって送達することができ、例えば、ネイキッド核酸分子（例えば、ネイキッド R N A ）を直接的に注入することができる又は非ウイルス送達システムを使用することができる。非ウイルス送達システムは、限定されるものではないが、"Yin H, et al. Nat Rev Genet. 2014 Aug; 15(8): 541-55." 及び "Riley MK, Vermerris W. Nanomaterials (Basel). 2017 Apr 28; 7(5). Pii: E94."（これらは、引用することによりその全体が本明細書の一部をなす）に詳細に記載される材料、例えばリポソーム、無機ナノ粒子（例えば、金ナノ粒子）、ポリマー（例えば、P E G）等を含む当該技術分野においてよく知られる様々な材料から得ることができる。

20

【0113】

或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、被験体における腫瘍の治療において又は被験体における腫瘍を治療するための医薬の製造において使用される。

30

【0114】

或る特定の好ましい実施の形態では、腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌（例えば、卵巣非明細胞癌）、子宮内膜癌、黒色腫、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫（例えば、組織球性リンパ腫）、白血病（例えば、慢性骨髄性白血病）、咽頭扁平上皮癌、甲状腺癌、横紋筋肉腫、結腸直腸癌、非小細胞肺癌（例えば、非小細胞肺腺癌）、子宮頸癌（例えば、H P V 陰性子宮頸癌）、乳癌（例えば、乳房髄様癌）、腎臓癌（例えば、明細胞腎臓癌）及び膵臓癌からなる群から選択される。

【0115】

或る特定の好ましい実施の形態では、腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌（例えば、卵巣非明細胞癌）、子宮内膜癌、子宮頸癌（例えば、H P V 陰性子宮頸癌）、黒色腫、乳癌（例えば、乳房髄様癌）、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫（例えば、組織球性リンパ腫）、白血病（例えば、慢性骨髄性白血病）、咽頭扁平上皮癌又は甲状腺癌である。

40

【0116】

或る特定の好ましい実施の形態では、単離された核酸分子は、被験体における腫瘍の治療において又は被験体における腫瘍を治療するための医薬の製造において使用され、ここで、上記腫瘍は、咽頭扁平上皮癌又は甲状腺癌である。

【0117】

或る特定の好ましい実施の形態では、被験体は、ヒト等の哺乳動物である。

50

【 0 1 1 8 】

別の態様では、本発明はまた、第 4 の態様による改変 E C H O 2 5、又は第 5 の態様による単離された核酸分子を含む医薬組成物に関する。

【 0 1 1 9 】

或る特定の好ましい実施の形態では、医薬組成物は、医療技術分野で知られる任意の形で存在し得る。例えば、医薬組成物は、錠剤、丸剤、懸濁剤、乳剤、液剤、ゲル剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、エリキシル剤、ロゼンジ剤、坐剤又は注射剤（注射液、凍結乾燥粉末を含む）等であり得る。幾つかの実施の形態では、医薬は、注射液又は凍結乾燥粉末である。

【 0 1 2 0 】

或る特定の好ましい実施の形態では、医薬組成物は、薬学的に許容可能な担体又は賦形剤を更に含む。或る特定の好ましい実施の形態では、医薬組成物は安定剤を含む。

【 0 1 2 1 】

或る特定の好ましい実施の形態では、医薬組成物は、任意に、追加の薬学的活性剤を更に含む。好ましい実施の形態では、追加の薬学的活性剤は、追加の腫瘍溶解性ウイルス、化学療法剤又は免疫療法剤等の抗腫瘍活性を有する医薬である。

【 0 1 2 2 】

別の態様では、本発明はまた、被験体における腫瘍の治療における、又は被験体における腫瘍を治療するための医薬の製造における、第 4 の態様による改変 E C H O 2 5、又は第 5 の態様による単離された核酸分子の使用に関する。

【 0 1 2 3 】

或る特定の好ましい実施の形態では、腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌（例えば、卵巣非明細胞癌）、子宮内膜癌、黒色腫、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫（例えば、組織球性リンパ腫）、白血病（例えば、慢性骨髄性白血病）、咽頭扁平上皮癌、甲状腺癌、横紋筋肉腫、結腸直腸癌、非小細胞肺癌（例えば、非小細胞肺腺癌）、子宮頸癌（例えば、H P V 陰性子宮頸癌）、乳癌（例えば、乳房髄様癌）、腎臓癌（例えば、明細胞腎臓癌）及び膵臓癌からなる群から選択される。

【 0 1 2 4 】

或る特定の好ましい実施の形態では、腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌（例えば、卵巣非明細胞癌）、子宮内膜癌、子宮頸癌（例えば、H P V 陰性子宮頸癌）、黒色腫、乳癌（例えば、乳房髄様癌）、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫（例えば、組織球性リンパ腫）、白血病（例えば、慢性骨髄性白血病）、咽頭扁平上皮癌又は甲状腺癌である。

【 0 1 2 5 】

或る特定の好ましい実施の形態では、単離されたヌクレオチド配列分子は、被験体における腫瘍の治療において又は被験体における腫瘍を治療するための医薬の製造において使用され、ここで、上記腫瘍は、咽頭扁平上皮癌又は甲状腺癌である。

【 0 1 2 6 】

或る特定の好ましい実施の形態では、被験体は、ヒト等の哺乳動物である。

【 0 1 2 7 】

別の態様では、本発明はまた、腫瘍を治療する方法であって、治療を必要とする被験体に、第 4 の態様に記載される改変 E C H O 2 5、又は第 5 の態様による単離された核酸分子を有効量投与する工程を含む、方法に関する。

【 0 1 2 8 】

或る特定の好ましい実施の形態では、腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌（例えば、卵巣非明細胞癌）、子宮内膜癌、黒色腫、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫（例えば、組織球性リンパ腫）、白血病（例えば、慢性骨髄性白血病）、咽頭扁平上皮癌、甲状腺癌、横紋筋肉腫、結腸直腸癌、非小細胞肺癌（例えば、非小細胞肺腺癌）、子宮頸癌（例えば、H P V 陰性子宮頸癌）、乳癌（例えば、乳房髄様癌）、腎臓癌（例えば、明細胞腎臓癌）及び膵臓癌からなる群から選択される。

10

20

30

40

50

【0129】

或る特定の好ましい実施の形態では、腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌（例えば、卵巣非明細胞癌）、子宮内膜癌、子宮頸癌（例えば、HPV陰性子宮頸癌）、黒色腫、乳癌（例えば、乳房髄様癌）、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫（例えば、組織球性リンパ腫）、白血病（例えば、慢性骨髄性白血病）、咽頭扁平上皮癌又は甲状腺癌である。

【0130】

或る特定の好ましい実施の形態では、腫瘍は、咽頭扁平上皮癌又は甲状腺癌である。

【0131】

或る特定の好ましい実施の形態では、被験体は、ヒト等の哺乳動物である。

10

【0132】

用語の定義

本発明においては、特段の定めがない限り、本明細書で使用される科学用語及び技術用語は、当業者により一般的に理解される意味を有する。さらに、本明細書で使用される細胞培養、生化学、細胞生物学、核酸化学等の実験室法は全て、対応する分野で広く使用されている常用の工程である。一方で、本発明をより良く理解するために、関連する用語の定義及び説明を以下に示す。

【0133】

本明細書で使用される場合に、「エコーウイルス25（ECHO25）」という用語は、ピコルナウイルス科のエンテロウイルス属のエンテロウイルスBの一種を指し、そのゲノムは5'非コーディング領域（5'UTR）、オープンリーディングフレーム（ORF）、3'非コーディング領域（3'UTR）及びポリ（A）テールからなる一本鎖プラス鎖RNAであり、ここで、そのORFは前駆体ポリタンパク質をコードし、この前駆体ポリタンパク質は、そのプロテアーゼによって加水分解され切断されて、構造タンパク質VP1～VP4及び非構造タンパク質2A、2B、2C、3A、3B、3C及び3Dが生成し得る。本発明をより明確に記載するために、上記タンパク質に対応するECHO25ゲノム内の核酸配列は、それぞれVP1遺伝子、VP2遺伝子、VP3遺伝子、VP4遺伝子、2A遺伝子、2B遺伝子、2C遺伝子、3A遺伝子、3B遺伝子、3C遺伝子及び3D遺伝子と呼ばれる。本発明において、「エコーウイルス25（ECHO25）」という表現は、天然源から分離することができ、意図的に人工的に改変されていない野生型ECHO25を指し、その例には、限定されるものではないが、原型株AY302549（JFV-4）及び様々な臨床分離株（例えば、本発明の実施例1に記載される臨床分離株）が含まれる。野生型ECHO25のゲノム配列又はcDNA配列は、当該技術分野においてよく知られており、様々な公共データベース（例えば、GenBankアクセス番号KP099941.1）において見出すことができる。

20

30

【0134】

本明細書で使用される場合に、ウイルスの「改変形」という用語は、野生型ウイルスを改変することにより得られる、野生型ウイルスの所望の活性（例えば、腫瘍溶解活性）を保持する改変ウイルスを指す。本発明において、ECHO25の「改変形」には、限定されるものではないが、野生型ECHO25のゲノム配列と比較して、ゲノム配列が1つ以上のヌクレオチドの置換、挿入又は欠失を有し、少なくともECHO25の腫瘍溶解活性を保持する改変ECHO25ウイルスが含まれる。

40

【0135】

本明細書で使用される場合に、「腫瘍溶解性ウイルス」という用語は、腫瘍細胞に感染し、腫瘍細胞内で複製し、腫瘍細胞死、溶解を引き起こし、又は腫瘍細胞成長を遮断することが可能なウイルスを指す。このウイルスは、非腫瘍細胞に対して最小限の毒性効果を有することが好ましい。

【0136】

本明細書で使用される場合に、「腫瘍特異的」という用語は、腫瘍細胞内で生物学的機能又は生物学的活性を選択的に示すことを指す。例えば、本発明において「腫瘍特異性」

50

という用語がウイルスの死滅選択性を説明するために使用される場合に、そのウイルスは非腫瘍細胞を死滅させることなく若しくは実質的に死滅させることなく腫瘍細胞を選択的に死滅させることができ、又はそのウイルスは、非腫瘍細胞を死滅させるよりも腫瘍細胞を死滅させることにおいて有効であることを意味する。

【 0 1 3 7 】

本明細書で使用される場合に、「腫瘍溶解活性」という用語は、主に腫瘍死滅活性を含む。ウイルスの腫瘍溶解活性を記載する場合に、ウイルスの腫瘍溶解活性は、典型的には、ウイルスが腫瘍細胞に感染する能力、腫瘍細胞内で複製する能力、及び／又は腫瘍細胞を死滅させる能力等の指標によって測定することができる。ウイルスの腫瘍溶解活性は、当該技術分野において知られる任意の方法を用いて測定され得る。例えば、ウイルスが腫瘍細胞に感染する能力は、所与の割合の腫瘍細胞（例えば、50%の細胞）に感染するのに必要なウイルス量を測定することによって評価することができ、腫瘍細胞内で複製する能力は、腫瘍細胞内でのウイルスの増殖を測定することにより評価することができ、腫瘍細胞を死滅させる能力は、細胞変性効果（CPE）を観察する又は腫瘍細胞活性を測定することにより評価することができる。

10

【 0 1 3 8 】

本明細書で使用される場合に、「ECHO25のcDNA配列」という表現は、RNA配列中のリボヌクレオチドが、対応するデオキシリボヌクレオチドにより置き換えられていること、例えばウラシルリボヌクレオチド（UMP）がチミンデオキシリボヌクレオチド（dTMP）により置き換えられている点のみがウイルスゲノムRNA配列と異なるウイルスゲノムRNA配列のDNA形を意味する。

20

【 0 1 3 9 】

本明細書で使用される場合に、「外因性核酸」という用語は、元の配列に対して外来である人工的に導入されたヌクレオチド配列を指す。外因性核酸には、限定されるものではないが、ウイルスゲノムには見られない任意の遺伝子又はヌクレオチド配列が含まれる。しかしながら、本発明において、外因性核酸は、最大1500ヌクレオチド、例えば最大1200ヌクレオチド、及び最大1000ヌクレオチドから構成されていることが特に好ましい。幾つかの場合には、好ましくは、外因性核酸は、サイトカイン等の抗腫瘍死滅活性を有するタンパク質若しくはポリペプチド若しくは抗腫瘍タンパク質若しくはポリペプチドをコードする、又は外因性核酸は、マイクロRNA（miRNA）の標的配列を含む。本発明において、マイクロRNAは、好ましくは、腫瘍細胞における発現レベルが正常細胞における発現レベルより大幅に低く、及び／又は明らかな組織特異性を有するマイクロRNAである。マイクロRNAの例には、限定されるものではないが、肝臓組織で特異的に発現されるmiR-122、miR-192、miR-483等、心臓で特異的に発現されるmiR-1、miR-133a/b、miR-208等、腎臓組織で特異的に発現されるmiR-192、miR-196a/b、miR-204、miR-215等、筋肉組織で特異的に発現されるmiR-133a/b、miR-206等、脳組織で特異的に発現されるmiR-124a、miR-125a/b、miR-128a/b、miR-138等、及び肝臓腫瘍組織で過少発現されるmiR-34、miR-122a、miR-26a、腎臓腫瘍組織で過少発現されるmiR-34、膀胱腫瘍組織で過少発現されるmiR-143、miR-133a/b、肺腫瘍組織で過少発現されるmiR-Let-7、miR-29等が含まれる（例えば、Ruiz AJ and Russell S J. MicroRNAs and oncolytic viruses. [J]. Curr Opin Virol, 2015, 13: 40-48を参照；これは、引用することによりその全体が本明細書の一部をなす）。

30

40

【 0 1 4 0 】

本発明においては、改変ECHO25が上記のマイクロRNAの標的配列を含む場合に、その改変ECHO25は、該マイクロRNAが高度に発現される又は特異的に発現される細胞／組織において該マイクロRNAによって調節されるので、腫瘍溶解性ウイルスの複製は弱まり、更にはその死滅活性が失われ、その一方で、マイクロRNAが過少発現される又は発現すらされない腫瘍細胞／組織では、腫瘍溶解性ウイルスは正常に複製するた

50

め、腫瘍細胞を死滅させることができる。

【 0 1 4 1 】

本明細書で使用される場合に、「サイトカイン」という用語は、当業者によく知られる意味を有する。しかしながら、本発明において、本発明の腫瘍溶解性ウイルスを腫瘍の治療に使用する場合に、サイトカインは腫瘍治療のために使用することができるサイトカインであることが特に好ましい。「サイトカイン」の例には、限定されるものではないが、インターロイキン類（例えば、IL - 2、IL - 12 及び IL - 15）、インターフェロン類（例えば、IFN α 、IFN β 、IFN γ ）、腫瘍壊死因子（例えば、TNF α ）及びコロニー刺激因子（例えば、GM - CSF）並びにそれらの任意の組み合わせが含まれる（例えば、Ardolino M, Hsu J, Raulet D H. Cytokine treatment in cancer immunotherapy [J]. Oncotarget, 2015, 6 (23): 19346-19347を参照）。

10

【 0 1 4 2 】

本明細書で使用される場合に、「抗腫瘍タンパク質又はポリペプチド」という用語は、限定されるものではないが、（１）細胞に対して毒性を有し、細胞増殖を阻害する又はアポトーシスを誘導することができるタンパク質又はポリペプチド（それらの例には、限定されるものではないが、チミジンキナーゼ TK（TK / GCV）、TRAIL 及び FasL が含まれる）（例えば、Candolfi M, King GD, Muhammad AG, et al. Evaluation of proapoptotic transgenes to use in combination with Flt3L in an immune-stimulatory gene therapy approach for Glioblastoma multiforme (GBM) [J]. FASEB J, 2008, 22: 1077.13を参照）、（２）免疫療法効果を有するタンパク質又はポリペプチド（それらの例には、限定されるものではないが、細胞傷害性Tリンパ球関連抗原 4（抗CTLA - 4）、プログラム死受容体 1（抗PD - 1）及びプログラム死リガンド 1（抗PDL - 1）に対する一本鎖抗体（scFv）が含まれる）（例えば、Nolan E, Savas P, Policheni AN, et al. Combined immune checkpoint blockade as a therapeutic strategy for BRCA1-mutated breast cancer [J]. Science Trans Med, 2017, 9: eaal 4922を参照；これは、引用することによりその全体が本明細書の一部をなす）、（３）腫瘍血管新生を阻害するタンパク質又はポリペプチド（それらの例には、限定されるものではないが、血管内皮成長因子（抗VEGF）、VEGF由来ポリペプチド（例えば、D（LPR）、KSVRGKGKGQKRKRKKSRYK等）及びATN - 161 に対する一本鎖抗体（scFv）が含まれる）（例えば、Rosca EV, Koskimaki JE, Rivera CG, et al. Anti-angiogenic peptides for cancer therapeutics [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2011, 12 (8): 1101-1116を参照；これは、引用することによりその全体が本明細書の一部をなす）を含む抗新生物活性を有するタンパク質又はポリペプチドを指す。

20

30

【 0 1 4 3 】

本明細書で使用される場合に、「scFv」という用語は、重鎖可変領域（VH）及び軽鎖可変領域（VL）を含み、VLとVHとがリンカーによって連結されている単一ポリペプチド鎖を指す（例えば、Bird et al., Science 242: 423-426 (1988)、Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988)、及びPluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, No. Volume 113, edited by Roseburg and Moore, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照）。そのような scFv 分子は、一般構造：NH₂ - VL - リンカー - VH - COOH 又は NH₂ - VH - リンカー - VL - COOH を有し得る。

40

【 0 1 4 4 】

本明細書で使用される場合に、「同一性」という用語は、２つのポリペプチド間又は２つの核酸間の一致度を指す。比較される２つの配列が或る特定の部位に同じ単量体サブユニットの塩基又はアミノ酸を有する（例えば、２つのDNAの各々が或る特定の部位にアデニンを有する、又は２つのタンパク質／ポリペプチドの各々が或る特定の部位にリジンを有する）場合に、２つの分子はその部位で同一である。２つの配列間の同一性のパーセントは、比較される部位の総数に対する、２つの配列が共有する同一の部位の数に 100

50

を掛けた関数である。例えば、2つの配列の10個の部位の6個が一致している場合に、これらの2つの配列は60%の同一性を有する。例えば、DNA配列：CTGACTとCAGGTTとは、50%の同一性を共有する（6個の部位の3個が一致している）。一般的に、2つの配列の比較は、最大の同一性が得られるように行われる。そのようなアラインメントは、例えばNeedlemanらの方法（J. Mol. Biol. 48:443-453, 1970）に基づくAlignプログラム（DNAstar, Inc.社）等のコンピュータプログラムを使用することにより実施することができる。2つのアミノ酸配列間の同一性のパーセントはまた、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれているE. Meyers及びW. Millerのアルゴリズム（Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)）を使用して、PAM120残基重み付け表を使用して、12のギャップ長ペナルティー及び4のギャップペナルティーで決定することもできる。さらに、2つのアミノ酸配列間の同一性のパーセントは、GCGソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>で入手可能）内のGAPプログラムに組み込まれているNeedleman及びWunschのアルゴリズム（J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)）によって、Blossum 62行列又はPAM250行列のいずれかを使用して、16、14、12、10、8、6又は4のギャップ重み付け及び1、2、3、4、5、又は6の長さ重み付けで決定することができる。

【0145】

本明細書で使用される場合に、「ベクター」という用語は、ポリヌクレオチドがその中に挿入され得る核酸の運搬体を指す。ベクターが、挿入されたポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の発現を可能にする場合に、そのベクターは発現ベクターと呼ばれる。ベクターを形質転換、形質導入又はトランスフェクションによって宿主細胞へと導入することができるので、ベクターによって運ばれる遺伝物質エレメントは宿主細胞において発現され得る。ベクターは当業者によく知られており、限定されるものではないが、プラスミド、ファージミド、コスミド、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）又はP1由来人工染色体（PAC）等の人工染色体、ファージ又はM13ファージ等のバクテリオファージ及び動物ウイルスが含まれる。ベクターとして使用され得る動物ウイルスには、限定されるものではないが、レトロウイルス（レンチウイルスを含む）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス）、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス及びパポバウイルス（例えば、SV40）が含まれる。ベクターは、限定されるものではないが、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、選択用のエレメント及びレポーター遺伝子を含む発現を制御する様々なエレメントを含み得る。さらに、ベクターは複製開始部位を含み得る。

【0146】

本明細書で使用される場合に、「内部リボソーム進入部位（IRES）」という用語は、5'キャップ構造を必要とせずに翻訳を開始することができるメッセンジャーRNA（mRNA）配列中に位置するヌクレオチド配列を指す。IRESは、通常は5'非翻訳領域（5'UTR）内に位置しているが、mRNA内の別の場所に位置する場合もある。

【0147】

本明細書で使用される場合に、「ヒトライノウイルス2（HRV2）」という用語は、ピコルナウイルス科のウイルスであって、そのゲノム配列又はcDNA配列が当該技術分野においてよく知られており、様々な公的データベース（例えば、GenBankアクセス番号X02316.1）に見出すことができるウイルスを指す。

【0148】

本明細書で使用される場合に、「ECHO25又はその改変形のゲノム配列を含む核酸分子」又は「核酸分子がECHO25又はその改変形のゲノム配列を含む」という表現は、当業者によって一般的に理解される意味を有する。すなわち、核酸分子がDNAである場合に、その核酸分子は、ECHO25又はその改変形のDNAの形のゲノム配列を含み、核酸分子がRNAである場合に、その核酸分子は、ECHO25又はその改変形のゲノム配列を含む。

【 0 1 4 9 】

本明細書で使用される場合に、「薬学的に許容可能な担体及び／又は賦形剤」という用語は、被験体及び活性成分と薬理学的及び／又は生理学的に適合可能な担体及び／又は賦形剤を指し、その担体及び／又は賦形剤は、当該技術分野においてよく知られており（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995を参照）、限定されるものではないが、pH調整剤、界面活性剤、イオン強度増強剤、浸透圧維持剤、吸収遅延剤、希釈剤、アジュバント、防腐剤、安定剤等が含まれる。例えば、pH調整剤には、限定されるものではないが、リン酸緩衝生理食塩水が含まれる。界面活性剤には、限定されるものではないが、カチオン界面活性剤、アニオン界面活性剤又は非イオン界面活性剤、例えばTween-80が含まれる。イオン強度増強剤には、限定されるものではないが、塩化ナトリウムが含まれる。浸透圧維持剤には、限定されるものではないが、糖、NaCl等が含まれる。吸収遅延剤には、限定されるものではないが、モノステアレート及びゼラチンが含まれる。希釈剤には、限定されるものではないが、水、水性緩衝液（例えば、緩衝生理食塩水）、アルコール類及びポリオール類（例えば、グリセロール）等が含まれる。アジュバントには、限定されるものではないが、アルミニウムアジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）、フロイントアジュバント（例えば、フロイント完全アジュバント）等が含まれる。防腐剤には、限定されるものではないが、様々な抗細菌剤及び抗真菌剤、例えば、チメロサル、2-フェノキシエタノール、パラベン類、トリクロロ-t-ブタノール、フェノール、ソルビン酸等が含まれる。安定剤は、当業者により一般的に理解される意味を有し、薬物中の活性成分の所望の活性（例えば、腫瘍溶解活性）を安定化することができ、限定されるものではないが、グルタミン酸ナトリウム、ゼラチン、SPGA、糖類（例えば、ソルビトール、マンニトール、デンプン、スクロース、ラクトース、デキストラン又はグルコース）、アミノ酸（例えば、グルタミン酸、グリシン）、タンパク質（例えば、乾燥ホエー、アルブミン又はカゼイン）又はそれらの分解産物（例えば、ラクトアルブミン加水分解物）が含まれる。

10

20

【 0 1 5 0 】

本明細書で使用される場合に、「治療する」という用語は、疾患（例えば、腫瘍）の治療若しくは治癒、疾患（例えば、腫瘍）の症状の発症の遅延、及び／又は疾患（例えば、腫瘍）の進行の遅延を指す。

30

【 0 1 5 1 】

本明細書で使用される場合に、「有効量」という用語は、意図される目的を有効的に達成することができる量を指す。例えば、治療的有效量は、疾患（例えば、腫瘍）を治療若しくは治癒する、疾患（例えば、腫瘍）の症状の発症を遅延させる、及び／又は疾患（例えば、腫瘍）の進行を遅延させるのに有効な又は十分な量であり得る。そのような有効量は、当業者又は医師によって容易に決定することができ、意図される目的（例えば、治療）、一般的な健康状態、年齢、性別、被験者の体重、治療されるべき疾患の重症度、合併症、投与経路に関連し得る。そのような有効量の決定は、十分に当業者の能力の範囲内である。

【 0 1 5 2 】

40

本明細書で使用される場合に、「被験体」という用語は、哺乳動物、例えば霊長類哺乳動物、例えばヒトを指す。或る特定の実施の形態では、被験体（例えば、ヒト）は腫瘍を有する、又は腫瘍を有するリスクがある。

【 0 1 5 3 】

本発明の有益な効果

従来技術と比較して、本発明の技術的解決策は少なくとも以下の有益な効果を有する。

【 0 1 5 4 】

本出願の発明者らは、エコーウイルス25（ECHO25）が特定の腫瘍に対して良好な死滅活性を有することを初めて見出した。この知見に基づき、本発明は、より良好な腫瘍死滅活性及びより高い腫瘍特異性を有するため、腫瘍の治療のために単独で使用するこ

50

とができ、また従来の腫瘍治療のための補助的方法として又は他の治療方法が存在しない場合の療法として使用することもできる、ECHO25ベースの腫瘍溶解性ウイルスを更に提供する。

【0155】

本発明のECHO25又はその改変形は、正常細胞に対してほとんど又は全く効果を有さず、被験体（例えば、ヒト）においてウイルスに対する免疫原性応答を誘発しないため、被験体（例えば、ヒト）に安全に投与することができる。したがって、本発明のECHO25又はその改変形は、大きな臨床的価値を有する。

【0156】

本発明の実施形態を以下で図面及び実施例を参照して詳細に説明するが、当業者であれば、以下の図面及び実施例は、本発明の範囲を限定するのではなく、本発明を例示するためにのみ使用されることを理解するであろう。本発明の様々な対象及び有利な態様は、当業者には以下の図面の詳細な説明及び好ましい実施形態から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0157】

【図1】実施例2におけるヒト臍静脈内皮細胞系統HUEC、ヒト食道癌細胞系統TE-1、ヒト子宮内膜癌細胞系統HEC-1-A及びHEC-1-Bに対する野生型ECHO25の*in vitro*死滅試験の顕微鏡写真を示す図であり、ここで、MOCKは、ウイルスに感染していない細胞を表す。これらの結果は、ECHO25が、感染多重度(MOI)1で感染の72時間後にヒト腫瘍細胞系統TE-1、HEC-1-A及びHEC-1-Bに対して顕著な腫瘍溶解性効果を有するが、ヒト非腫瘍細胞としてのHUECに対しては効果を有しないことを示した。

【図2】実施例2におけるヒト非小細胞肺癌細胞系統A549及びNCI-H661、ヒト卵巣癌細胞系統Caov3、ヒト膵臓癌細胞系統HPAF-2、ヒト胃癌細胞系統AGS、SGC7901及びBGC823、ヒト包皮線維芽細胞系統HFF-1及びヒト皮膚ケラチノサイト細胞系統HaCatに対する野生型ECHO25の*in vitro*死滅試験のクリスタルバイオレット染色の写真を示す図であり、ここで、MOCKは、ウイルスに感染していない細胞を表す。これらの結果は、ECHO25が10、1及び0.1のMOIでの感染の72時間後にA549、NCI-H661、Caov3、HPAF-2、AGS、SGC7901及びBGC823に対して顕著な腫瘍溶解効果を有するが、ヒト非腫瘍細胞のHFF-1及びHaCatに対しては効果を有しないことを示した。

【図3】実施例2における*in vitro*転写法により得られた同じバッチの野生型ECHO25ウイルスゲノムRNAの2つの試料の電気泳動画像を示す図である。

【図4】実施例2におけるヒト結腸直腸癌細胞系統SW480に対する野生型ECHO25ウイルスゲノムRNAの死滅効果を示す図である。これらの結果は、SW480細胞がECHO25ゲノムRNAでのトランスフェクションの24時間後に明らかなCPEを示し、48時間までにほとんど全てが溶解されて死に至ることを示した。

【図5】図5A～図5Dは、実施例3におけるヒト神経膠腫細胞系統GBM(A)、ヒト子宮内膜癌細胞系統Ishikawa(B)、ヒト前立腺癌細胞系統PC-3(C)及びヒト乳癌細胞系統Bcap37(D)に対する野生型ECHO25の*in vivo*抗腫瘍実験の結果を示す図である。これらの結果は、チャレンジ実験群では、腫瘍量当たり10⁶のTCID₅₀のECHO25が、3日毎に腫瘍内注射されることを示した。合計5回の処理後に、SCIDマウスにおけるGBM細胞、Ishikawa細胞、PC-3細胞又はBcap37細胞の皮下接種によって形成された腫瘍の成長は大幅に遅くなって停止し、腫瘍は更には溶解されて消失した。それに対して、腫瘍溶解性ウイルスの処理をしていないネガティブ群(CTRL)の腫瘍は通常の成長を維持し、その腫瘍体積はチャレンジ群の腫瘍よりも有意に大きかった。

【図6】実施例3におけるヒト神経膠腫細胞系統GBMに対するECHO25-WT、ECHO25-HRV2、ECHO25-miR133&206T、ECHO25-GM-CSF及びECHO25-Anti-PD-1の*in vivo*抗腫瘍実験の結果を示す

10

20

30

40

50

。これらの結果は、チャレンジ実験群では、腫瘍量当たり 10^6 の TCID₅₀ の ECHO25 が、3 日毎に腫瘍内注射されることを示した。10 日間にわたる合計 5 回の処理後に、SCID マウスにおける GBM 細胞の皮下接種によって形成された腫瘍の成長は停止し、腫瘍は更には溶解されて消失した。それに対して、腫瘍溶解性ウイルスの処理をしていないネガティブ群 (CTRL) の腫瘍は通常の成長を維持し、その腫瘍体積はチャレンジ群の腫瘍よりも有意に大きかった。

【図 7】実施例 4 における BALB/c マウスでの ECHO25-WT の毒性検出の結果を示す図である。1 日齢の BALB/c マウスに種々の用量 (10^4 、 10^5 、 10^6 及び 10^7 の TCID₅₀/マウス) で ECHO25 を腹腔内注射し、次いでチャレンジ後のマウスの生存率及び健康スコアを得た。これらの結果は、ECHO25 が BALB/c マウスに対して非常に限られた毒性しか有さず、高用量で疾患又は死亡を引き起こさないことを示し、こうして ECHO25 は *in vivo* で良好な安全性を有することが指摘される。

【発明を実施するための形態】

【0158】

配列情報

本発明に係る配列の一部の情報を以下の表 1 に示す。

【0159】

【表 1】

表 1：配列の説明

配列番号	説明
1	野生型 ECHO25 (ECHO25-WT) の cDNA 配列
2	ヒトラノウイルス 2 (HRV2) の内部リボソーム進入部位の RNA 配列
3	miR-133 標的配列の RNA 配列
4	miR-206 標的配列の RNA 配列
5	miR-133 標的配列及び miR-206 標的配列のタンデム配列の RNA 配列
6	ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 遺伝子の DNA 配列
7	ヒトプログラム死受容体 1 に対する一本鎖抗体 (Anti-PD-1 scFv) の DNA 配列
8	ECHO25 の 1 つの改変形 (ECHO25-HRV2) の cDNA 配列
9	ECHO25 の 1 つの改変形 (ECHO25-miR133&206T) の cDNA 配列
10	ECHO25 の 1 つの改変形 (ECHO25-GM-CSF) の cDNA 配列
11	ECHO25 の 1 つの改変形 (ECHO25-Anti-PD1) の cDNA 配列
12	野生型 ECHO25 (ECHO25-WT) のゲノム配列
13	ECHO25 の 1 つの改変形 (ECHO25-HRV2) のゲノム配列
14	ECHO25 の 1 つの改変形 (ECHO25-miR133&206T) のゲノム配列
15	ECHO25 の 1 つの改変形 (ECHO25-GM-CSF) のゲノム配列
16	ECHO25 の 1 つの改変形 (ECHO25-Anti-PD1) のゲノム配列
17	miR-133 標的配列の DNA 配列
18	miR-206 標的配列の DNA 配列
19	miR-133 標的配列及び miR-206 標的配列のタンデム配列の DNA 配列
20	ヒトラノウイルス 2 (HRV2) の内部リボソーム進入部位配列の DNA 配列

【0160】

本発明を実施するための具体的なモデル

ここで、以下の実施例を参照して本発明を説明するが、これらの実施例は、本発明を例示することを意図するものである（本発明を限定することを意図するものではない）。

【0161】

特段の指示がない限り、本発明で使用される分子生物学実験方法及びイムノアッセイは、実質的にJ. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989及びF. M. Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Edition, John Wiley & Sons, Inc., 1995の方法を参照することにより実施され、制限酵素は、製品の製造業者により推奨される条件下で使用した。実施例に具体的な条件が示されていない場合には、従来の条件又は製造業者により推奨される条件を使用した。使用される試薬又は機器が製造業者により特定されていない場合に、それらは全て市販される慣用の製品であった。当業者は、実施例が本発明を例として説明し、本発明によって請求される保護範囲を限定することを意図しないことを理解するであろう。本明細書で挙げられる全ての刊行物及び他の参考文献は、引用することによりその全体が本明細書の一部をなす。

【実施例】

【0162】

実施例1：ECHO25及びその改変形の取得及び準備

1.1 患者の臨床試料からのECHO25の分離

(1) 患者の咽頭スワブ及び肛門スワブは、中国廈門市の疾病管理予防センター（Center for Disease Control and Prevention）から得られ、アフリカミドリザル腎臓細胞（Vero細胞；ATCC（商標）番号：CCL-81（商標））は、中国国立感染症診断ワクチン開発研究所（National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases）（廈門大学、中国）によって維持され、10%ウシ胎児血清と、グルタミン、ペニシリン及びストレプトマイシンとを含有するMEM培地中で培養された。

【0163】

(2) 試料処理：患者の咽頭スワブ及び肛門スワブを、試料保存溶液中で十分に撹拌して、スワブに付着したウイルス及びウイルス含有細胞を洗い流した後に、試料保存溶液を4000rpm及び4℃で30分間にわたり高速遠心分離にかけた。

【0164】

(3) 接種及び観察：

A) Vero細胞を、24ウェルプレートに 1×10^5 細胞/ウェルで播種した。成長培地（10%ウシ胎児血清と、グルタミン、ペニシリン及びストレプトマイシンとを含有するMEM培地）を吸引し、1mLの維持培地（2%ウシ胎児血清と、グルタミン、ペニシリン及びストレプトマイシンとを含有するMEM培地）を各ウェル中に加えた。次いで、ネガティブコントロールウェルを除き、各ウェルに50µLの試料上清を接種し、各ウェルをインキュベーターにおいて37℃、5%CO₂で培養した。

【0165】

B) 細胞を顕微鏡下で1週間にわたり毎日観察し、接種されたウェルにおける特異的な細胞変性効果（CPE）の発生を記録した。

【0166】

C) 接種されたウェル中の細胞にエンテロウイルス特異的な細胞変性効果が7日以内に現れたら、細胞及び上清を回収して-80℃で凍結させた。CPEが7日後に現れなかったら、それらの細胞を盲継代した。

【0167】

D) CPEが6回の盲継代の間に現れたら、細胞及び上清を回収して-80℃で凍結させた。6回の盲継代後にCPEが現れなかったら、それらの細胞は陰性と決定した。

【0168】

(4) ウイルスの分離及びクローニング：

R T - P C R (Hou et al., Virus Res 2015, 205: 41-44) 及び特異的抗体に基づく酵素結合免疫スポット法 (E L I S P O T) (Li Shuxuan et al., Biotechnology News (2016) 27 (1): 52 -57) を使用して、臨床試料から分離されたウイルスを特定し、エコーウイルス 25 陽性培養物を選択して、少なくとも 3 回のクローニング実験を行った。各実験で限界希釈法によって得られたウイルスクローンもまた、R T - P C R 及び E L I S P O T によって特定し、E C H O 25 陽性クローンを後続回のクローニングのために選択した。増殖生存性の強い単一の E C H O 25 株を、腫瘍溶解性ウイルスの候補株として選択した。

【 0 1 6 9 】

1 . 2 感染性クローニング及び逆遺伝学技術による E C H O 25 及びその改変形のレスキュー株の取得

10

この実施例では、逆遺伝学技術により本発明のための E C H O 25 及びその改変形をどのようにして得るかを示すために、一例として野生型 E C H O 25 (配列番号 1) を使用した。具体的な方法は以下の通りである。

【 0 1 7 0 】

(1) ウイルス感染性クローンの構築：野生型 E C H O 25 (E C H O 25 - W T と呼称される) の c D N A 配列は配列番号 1 に示されており、そのゲノム R N A 配列は配列番号 1 2 であり、又は E C H O 25 の c D N A (配列番号 1) に基づく遺伝子挿入若しくは置換を行った。以下の改変形が含まれる。

【 0 1 7 1 】

20

改変形 1：野生型 E C H O 25 の内部リボソーム進入部位配列をヒトライノウイルス 2 の内部リボソーム進入部位配列 (配列番号 20 に示される D N A 配列を有する) に置き換えることで、配列番号 13 として示されるゲノム R N A 配列を有する組み換えウイルス (E C H O 25 - H R V 2 と呼称される) の c D N A (配列番号 8) を得た。

【 0 1 7 2 】

改変形 2：m i R - 133 標的配列 (配列番号 17 に示される D N A 配列を有する) 及び m i R - 206 標的配列 (配列番号 18 に示される D N A 配列を有する) のタンデム配列 (配列番号 19 に示される D N A 配列を有する) を野生型 E C H O 25 の c D N A (配列番号 1) の 3' 非翻訳領域の 7337 b p から 7338 b p の間に挿入することで、配列番号 14 として示されるゲノム R N A 配列を有する組み換えウイルス (E C H O 25 - m i R 133 & 206 T と呼称される) の c D N A (配列番号 9) を得た。

30

【 0 1 7 3 】

改変形 3：ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F) 遺伝子 (配列番号 6) を野生型 E C H O 25 の c D N A (配列番号 1) の V P 1 遺伝子と 2 A 遺伝子との間に挿入することで、配列番号 15 として示されるゲノム R N A 配列を有する組み換えウイルス (E C H O 25 - G M - C S F と呼称される) の c D N A (配列番号 10) を得た。

【 0 1 7 4 】

改変形 4：ヒトプログラム死受容体 1 に対する一本鎖抗体 (A n t i - P D - 1 s c F v) をコードする配列 (配列番号 7) を野生型 E C H O 25 の c D N A (配列番号 1) の V P 1 遺伝子と 2 A 遺伝子との間に挿入することで、配列番号 16 として示されるゲノム R N A 配列を有する組み換えウイルス (E C H O 25 - A n t i - P D - 1 と呼称される) の c D N A (配列番号 11) を得た。

40

【 0 1 7 5 】

次いで、上記 5 つの腫瘍溶解性ウイルスの c D N A 配列 (配列番号 1、配列番号 8 ~ 配列番号 11) を、全遺伝子合成のために遺伝子合成会社 (Shanghai Biotech Engineering Co., Ltd. 社) に送り、p S V A プラスミド (Hou et al. Virus Res 2015, 205: 41-44) へとライゲーションすることで、E C H O 25 又はその改変形 (すなわち、E C H O 25 - W T、E C H O 25 - H R V 2、E C H O 25 - m i R 133 & 206 T、E C H O 25 - G M - C S F 及び E C H O 25 - A n t i - P D - 1) の感染性クローニングブ

50

ラスミドを得た。

【0176】

(2) プラスミドミニキット及び大腸菌DH5 コンピテント細胞は、Beijing Tiangen Biochemical Technology Co., Ltd.社から購入し、293T細胞(ATCC(商標)番号:CRL-3216(商標))及びヒト横紋筋肉腫細胞(RD細胞; ATCC(商標)番号:CCL-136(商標))は、中国国立感染症診断ワクチン開発研究所(廈門大学、中国)によって維持され、それぞれ10%ウシ胎児血清並びにグルタミン、ペニシリン及びストレプトマイシンが添加されたDMEM培地及びMEM培地を用いて培養され、トランスフェクション試薬Lipofectamine 2000及びOpti-MEMは、Thermo Fisher Scientific Company社から購入した。

10

【0177】

(3) 上記5つの腫瘍溶解性ウイルスのcDNA配列を含む感染性クローニングプラスミドを、大腸菌DH5 コンピテント細胞へと形質転換し、単クローン株をクローンの成長後に採取して振盪し、プラスミドミニキットを使用してそれらのプラスミドを抽出した後に、シーケンシング分析のために会社(Shanghai Biotech Engineering Co., Ltd.社)に送った。

【0178】

(4) 正しい配列を有する感染性クローニングプラスミドとヘルパープラスミドpAR3126とを細胞へと同時トランスフェクションさせることで、ウイルスをレスキューした(Hou et al. Virus Res 2015, 205: 41-44)。293T細胞をまずはトランスフェクション試薬の使用説明書に従ってトランスフェクションさせた後に、顕微鏡下で観察した。293T細胞においてCPEが現れたら、細胞及び培養上清を採取し、RD細胞を接種した後に継代培養することにより、腫瘍溶解性ウイルスの候補株を得た。

20

【0179】

実施例2: ECHO25及びその改変形のin vitro抗腫瘍実験

2.1 使用されるウイルス及び細胞系統

(1) ウイルス: この実施例は、実施例1に示されるECHO25-WT(配列番号12)、ECHO25-HRV2(配列番号13)、ECHO25-miR133&206T(配列番号14)、ECHO25-GM-CSF(配列番号15)及びECHO25-Anti-PD-1(配列番号16)を使用した。

30

【0180】

(2) 細胞系統: ヒト横紋筋肉腫細胞RD(ATCC(商標)番号:CCL-136(商標))、ヒト結腸直腸癌細胞系統SW480(ATCC(商標)番号:CCL-228(商標))及びHT-29(ATCC(商標)番号:HTB-38(商標))、ヒト胃癌細胞系統AGS(ATCC(商標)番号:CRL-1739(商標))、SGC7901(CCTCC寄託番号:GDC150)、BGC823(CCTCC寄託番号:GDC151)及びNCI-N87(ATCC(商標)番号:CRL-5822(商標))、ヒト小細胞肺癌細胞系統NCI-H1417(ATCC(商標)番号:CRL-5869(商標))、ヒト非小細胞肺癌細胞系統SPC-A-1(CCTCC寄託番号:GDC050)、NCI-H1299(ATCC(商標)番号:CRL-5803(商標))、NCI-H1975(ATCC(商標)番号:CRL-5908(商標))、A549(ATCC(商標)番号:CCL-185(商標))、NCI-H661(ATCC番号:HTB-183(商標))、EBC-1(Thermo Fisher Scientific社、カタログ番号:11875101)及びNCI-H1703(ATCC(商標)番号:CRL-5889(商標))、ヒト肝臓癌細胞系統C3A(ATCC(商標)番号:CRL-10741(商標))、Hep3B(ATCC(商標)番号:HB-8064(商標))、Huh7(CCTCC寄託番号:GDC134)及びPLC/PRF/5(ATCC(商標)番号:CRL-8024(商標))、ヒト卵巣癌細胞系統ES-2(ATCC(商標)番号:CRL-1978(商標))及びCaov3(ATCC(商標)番号:HTB-75(商標))、ヒト子宮内膜癌細胞系統Hec-1-A(ATCC(商標)番号:HTB-112(商標))

40

50

))、Hec - 1 - B (ATCC (商標) 番号 : HTB - 113 (商標)) 及び Ishikawa (ECACC 番号 99040201)、ヒト子宮頸癌細胞系統 HeLa (ATCC (商標) 番号 : CCL - 2 (商標))、Caski (ATCC (商標) 番号 : CRL - 1550 (商標)) 及び C - 33A (ATCC (商標) 番号 : HTB - 31 (商標))、ヒト黒色腫細胞系統 A - 375 (ATCC (商標) 番号 : CRL - 1619 (商標)) 及び SK - MEL - 1 (ATCC (商標) 番号 : HTB - 67 (商標))、ヒト乳癌細胞系統 BT - 474 (ATCC (商標) 番号 : HTB - 20 (商標))、MDA - MB - 231 (ATCC (商標) 番号 : HTB - 26 (商標))、MDA - MB - 453 (ATCC (商標) 番号 : HTB - 131 (商標))、MCF - 7 (ATCC (商標) 番号 : HTB - 22 (商標))、ZR - 75 - 30 (ATCC (商標) 番号 : CRL - 1504 (商標))、SK - BR - 3 (ATCC (商標) 番号 : HTB - 30 (商標)) 及び Bcap37 (CCTCC 寄託番号 : GDC206)、ヒト腎臓癌細胞系統 A - 498 (ATCC (商標) 番号 : HTB - 44 (商標))、786 - O (ATCC (商標) 番号 : CRL - 1932 (商標)) 及び Caki - 1 (ATCC (商標) 番号 : HTB - 46 (商標))、ヒト膵臓癌細胞系統 HP AF - 2 (ATCC (商標) 番号 : CRL - 1997 (商標))、ヒト前立腺癌細胞系統 PC - 3 (ATCC (商標) 番号 : CRL - 1435 (商標)) 及び DU145 (ATCC (商標) 番号 : HTB - 81 (商標))、ヒト神経膠腫細胞系統 GBM (患者の腫瘍組織から分離された初代腫瘍細胞系統) 及び U118 - MG (ATCC (商標) 番号 : HTB - 15 (商標))、ヒト咽頭扁平上皮癌細胞系統 FaDu (ATCC (商標) 番号 : HTB - 43 (商標))、ヒト舌扁平上皮癌細胞系統 CAL 27 (ATCC (商標) 番号 : CRL - 2095 (商標))、ヒト鼻咽頭癌細胞系統 CNE (中国医学科学院基礎医学研究所基礎医学細胞センター (Cell Center of Basic Medicine, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences) から購入、番号 3131C0001000700013)、ヒト鼻中隔扁平上皮癌細胞系統 RPMI 2650 (ATCC (商標) 番号 : CCL - 30 (商標))、ヒト喉頭癌細胞系統 HEp - 2 (ATCC (商標) 番号 : CCL - 23 (商標))、ヒト咽頭癌の胸水由来の転移細胞 Detroit 562 (ATCC (商標) 番号 : CCL - 138 (商標))、ヒト顎下腺癌細胞系統 A - 235 (中国国立感染症診断ワクチン開発研究所 (National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases) によって保存されている)、ヒト甲状腺癌細胞系統 SW579 (中国国立感染症診断ワクチン開発研究所によって保存されている) 及び TT (ATCC (商標) 番号 : CRL - 1803 (商標))、ヒト食道癌細胞系統 TE - 1 (中国科学院上海生物科学研究所細胞資源センター (Cell Resource Center, Shanghai Institutes of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences) から購入、番号 3131C0001000700089)、ヒト膀胱癌細胞系統 J82 (ATCC (商標) 番号 : HTB - 1 (商標)) 及び 5637 (ATCC (商標) 番号 : HTB - 9 (商標))、ヒト白血病細胞系統 Jurkat (ATCC (商標) 番号 : TIB - 152 (商標))、THP - 1 (ATCC (商標) 番号 : TIB - 202 (商標))、CCRF - CEM (ATCC (商標) 番号 : CCL - 119 (商標))、MOLT - 4 (ATCC (商標) 番号 : CRL - 1582 (商標))、K562 (ATCC (商標) 番号 : CCL - 243 (商標))、ヒトリンパ腫細胞系統 Daudi (ATCC (商標) 番号 : CCL - 213 (商標))、Raji (ATCC (商標) 番号 : CCL - 86 (商標)) 並びに U937 (ATCC (商標) 番号 : CRL - 1593.2 (商標))、ヒト包皮線維芽細胞系統 HFF - 1 (ATCC (商標) 番号 : SCRC - 1041 (商標))、ヒト皮膚ケラチノサイト細胞系統 HaCat (CCTCC 寄託番号 : GDC106)、ヒト前立腺間質細胞系統 WPMY - 1 (ATCC (商標) 番号 : CRL - 2854 (商標)) 及びヒト臍静脈内皮細胞系統 HUVEC (Thermo Fisher Scientific 社、カタログ番号 : C01510C) を含むヒト正常細胞系統。上記の細胞は全て、中国国立感染症診断ワクチン開発研究所 (中国、廈門大学) によって保存された。AGS 及び TT は、F - 12K 培地を用いて培養され、RD、C - 33A、SK - MEL - 1、J82、FaDu、EBC - 1、RPMI 2650、Detroit 562

10

20

30

40

50

及びDU145は、MEM培地を用いて培養され、NCI-H1417、NCI-H1703、Caski、BT-474、ZR-75-30、SK-BR-3、786-O、Jurkat、THP-1、CCRF-CEM、MOLT-4、Daudi、Raji、K562、U937、5637、TE-1、Caski、NCI-H1975、NCI-H661、SGC7901及びBGC823は、RPMI-1640培地を用いて培養され、ES-2、A-235は、マッコイ5A培地を用いて培養され、MDA-MB-231及びMDA-MB-453は、ライボピッツL-15培地を用いて培養され、その他の細胞は、DMEM培地を用いて培養された。上記の全ての培地には、10%ウシ胎児血清、グルタミン及びペニシリン-ストレプトマイシンを補充した。上記の全ての細胞は37及び5%CO₂の標準条件下で培養した。

10

【0181】

2.2 ウイルス培養

RD細胞を10cmの細胞培養プレート上に均等に播種した。培養条件は10%ウシ胎児血清とグルタミン、ペニシリン及びストレプトマイシンとを含有するMEM培地、37、5%のCO₂、並びに飽和湿度を含むものであった。細胞コンフルエンスが90%以上に達したら、細胞培養培地を無血清MEM培地と交換し、各プレートに10⁷のTCID₅₀のECHO25-WT、ECHO25-HRV2、ECHO25-miR133&206T、ECHO25-GM-CSF又はECHO25-Anti-PD-1を接種した。24時間の連続培養後にECHO25又はその改変形はRD細胞内で増殖し、細胞内でCPEを生じた。90%を超える細胞が収縮して丸くなり、粒状性の増加を示し、剥離して溶解されたら、細胞及びその培養上清を採取した。3回のサイクルの凍結融解後に、培養上清を回収して遠心分離をすることで、細胞片を除去した。その際、遠心分離条件は4000rpm、10分、4であった。最後に上清を0.22µmの使い捨てフィルター(Millipore社)で濾過して、細胞片等の不純物を除去した。

20

【0182】

2.3 ウイルス力価の決定

RD細胞を、96ウェルプレートに10⁴細胞/ウェルの細胞密度で播種した。細胞が接着した後に、実施例2.2で得られたウイルス溶液を、最初の10倍希釈から無血清MEM培地で10倍希釈した。50µlのウイルスの希釈液を細胞が入ったウェルに加えた。7日後に、CPEが現れたウェルを観察して記録し、引き続きKarber法を使用して計算した。ここで、計算式は、 $1g^{TCID_{50}} = L - D(S - 0.5)$ (式中、L：最高希釈の対数、D：希釈の対数間の差、S：陽性のウェルの割合の合計)であった。このように計算されたTCID₅₀の単位はTCID₅₀/50µlであり、これはTCID₅₀/mlに変換されるべきである。

30

【0183】

2.4 ウイルスのin vitro抗腫瘍実験

ヒト腫瘍細胞及び正常細胞を96ウェルプレートへと10⁴細胞/ウェルで接種した。細胞が接着した後に、各ウェル中の培地を対応する無血清の細胞培養培地と置き換え、ウイルスを0.1、1、10又は100のMOIで接種した。引き続き、細胞のCPEを顕微鏡により毎日観察した。

40

【0184】

図1は、ウイルスに感染させていない(ネガティブコントロール群、Mock)又はMOI=1でECHO25-WTにより72時間処理された、ヒト臍静脈内皮細胞系統HUVEC、ヒト食道癌細胞系統TE-1、ヒト子宮内膜癌細胞系統HEC-1-A及びHEC-1-Bの顕微鏡写真を示す。これらの結果は、感染多重度(MOI)1での感染の72時間後に、ウイルス感染群において腫瘍細胞数の大幅な減少、顕著な収縮及び溶解等が検出されるが、Mock群の非腫瘍細胞と比較すると、ウイルスに感染した非腫瘍細胞は細胞形態にほとんど変化を示さないことを示した。上記結果により、ECHO25がヒト食道癌細胞系統TE-1、ヒト子宮内膜癌細胞系統HEC-1-A及びHEC-1-Bに対して大きな腫瘍溶解効果を示すが、非腫瘍細胞HUVECに対しては一切効果を有しな

50

いことが裏付けられた。

【 0 1 8 5 】

ウイルス感染及び培養の72時間後に、Cell Counting Kit - 8 (CCK - 8キット; Shanghai Biyuntian Biotechnology Co., Ltd.社) 及びクリスタルバイオレット染色法 (接着細胞についてのみ) を使用して、細胞生存率を検出した。その具体的な方法は以下の通りであった。

【 0 1 8 6 】

(1) C C K 8 法により検出された細胞生存率

接着細胞については、96ウェル細胞培養プレート中の元の培地を直接廃棄し、懸濁細胞については、96ウェル細胞培養プレートの元の培地は遠心分離後に慎重に廃棄し、その後、ウェル毎に100µlの新鮮な無血清培地を加えた。10µlのCCK - 8溶液を、細胞が接種された各ウェルに添加し、また等量のCCK - 8溶液をネガティブコントロールとしてblank培養培地に添加し、引き続き細胞培養インキュベーター中、37で0.5時間～3時間インキュベートした。吸光度を、マイクロプレートリーダーを使用して450nmで、それぞれ0.5時間、1時間、2時間、3時間で検出し、吸光度が適切な範囲内であった時点を経過率のための参照として選択した。各種の細胞についてのECHO25 - WTのCCK - 8試験結果を表2に示した。ここで、「-」は、ウイルス処理後の細胞生存率がMOC群の細胞生存率と有意に異なることを示し、「+」は、ウイルス処理後に、細胞数が減少し、生存率が依然として50%を超えているが、MOC群の生存率とは有意に異なることを示し、「++」は、ウイルス処理後の細胞生存率が50%未満であり、MOC群の細胞生存率とは有意に異なることを示した。

【 0 1 8 7 】

細胞生存率の計算は、

細胞生存率 (%) = (試験群の読取値 - ネガティブ群の読取値) / (ポジティブ群の読取値 - ネガティブ群の読取値) × 100 %

であった。

【 0 1 8 8 】

(2) クリスタルバイオレット染色法により検出された細胞生存率 (接着細胞についてのみ)

細胞にウイルスを3日間にわたり感染させた後に、96ウェル細胞培養プレート中の培養上清を廃棄し、各ウェルに100µlのメタノールを加え、その後15分間暗所で固定した。クリスタルバイオレット粉末 (Shanghai Biotech Biotechnology Co., Ltd.社) を秤量し、2% (重量 / 容量) のクリスタルバイオレットのメタノール溶液として調合し、それを4で貯蔵した。適切な量の2%のクリスタルバイオレットのメタノール溶液を取り、PBS溶液を用いて調合して、0.2%のクリスタルバイオレット作業溶液を調製した。15分間固定した後に、96ウェル細胞培養プレート中のメタノール固定溶液を廃棄し、そのプレートに100µlのクリスタルバイオレット作業溶液を加え、30分間染色を行った。クリスタルバイオレット染色溶液を廃棄した後に、PBS溶液を使用して過剰な染色溶液を洗い流すまで3回～5回洗浄し、風乾を行った。ImmunSpot@S5 UV Analyzer (Cellular Technology Limited社、米国) を使用して写真を撮影した。図2に、コントロール群 (MOC) 及び実験群 (それぞれ0.1、1及び10のMOIでECHO25 - WTを72時間わたり感染させた) におけるヒト非小細胞肺癌細胞系統A549及びNCI - H661、ヒト卵巣癌細胞系統Caov3、ヒト膵臓癌細胞系統HPAF - 2、ヒト胃癌細胞系統AGS、SGC7901及びBGC823、ヒト包皮線維芽細胞系統HFF - 1及びヒト正常細胞系統のヒト皮膚ケラチノサイト系統HaCatのクリスタルバイオレット染色結果を示した。結果に示されるように、10、1及び0.1のMOIでの感染の72時間後に、ウイルスを加えていないコントロール群 (MOC) と比較して、実験群における腫瘍細胞は顕著に減少したが、非腫瘍細胞の数は顕著な変化を示さなかった。上記結果は、ECHO25 - WTがヒト腫瘍細胞系統A549、NCI - H661、Caov3、HPAF - 2、AGS、SGC7901及び

B G C 8 2 3 に対して顕著な腫瘍溶解効果を有するが、非腫瘍細胞系統 H F F - 1 及び H a C a t に対しては顕著な効果を有しないことを示した。

【 0 1 8 9 】

【表 2 - 1】

表 2：野生型エンテロウイルス ECHO 25 の *in vitro* 抗腫瘍実験の結果

細胞系統 \ MOI	0.1	1	10	100
RD	++	++	++	++
SW480	++	++	++	++
HT-29	++	++	++	++
AGS	++	++	++	++
SGC7901	++	++	++	++
BGC823	++	++	++	++
NCI-N87	+	+	++	++
SPC-A-1	++	++	++	++
NCI-H1299	++	++	++	++
NCI-H1975	-	+	++	++
A549	++	++	++	++
C3A	+	++	++	++
Hep3B	-	+	++	++
Huh7	-	+	++	++
PLC/PRF/5	-	-	++	++
Caov3	++	++	++	++
Hec-1-A	++	++	++	++
Hec-1-B	++	++	++	++
Ishikawa	++	++	++	++
C-33A	++	++	++	++
A-375	-	-	+	++
SK-MEL-1	+	+	++	++
BcaP37	++	++	++	++
Caki-1	++	++	++	++
HPAF-2	++	++	++	++
PC-3	++	++	++	++
DU145	-	++	++	++
GBM	++	++	++	++

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

U118-MG	++	++	++	++
FaDu	-	-	+	+
CAL27	-	-	+	+
CNE	-	-	+	+
Hep2	-	-	+	+
TE-1	-	++	++	++
J82	-	+	+	++
5637	-	++	++	++
K562	+	+	++	++
U937	-	+	++	++
EBC-1	-	-	-	-
NCI-H1417	-	-	+	+
NCI-H1703	-	-	-	-
ES-2	-	-	-	-
HeLa	-	-	-	-
CaSki	-	-	-	-
MCF-7	-	-	-	-
BT-474	-	-	-	-
MDA-MB-231	-	-	-	-
MDA-MB-453	-	-	-	-
ZR-75-30	-	-	-	-
SK-BR-3	-	-	-	-
A498	-	-	-	-
786-0	-	-	-	-
Jurkat	-	-	-	-
Daudi	-	-	-	-
Raji	-	-	-	-
THP-1	-	-	-	-
MOLT-4	-	-	-	-
CCRF-CEM	-	-	-	-
RPMI2650	-	-	-	-
Detroit 562	-	-	-	-
A-235	-	-	-	-

10

20

30

40

【表 2 - 3】

TT	-	-	-	-
HFF-1	-	-	-	-
HaCat	-	-	-	-
WPMY-1	-	-	-	-
HUVEC	-	-	-	+

50

備考：「 - 」は、ウイルス処理群と M O C K 群との間の細胞生存率に有意差がないことを示し、「 + 」は、ウイルス処理後に、細胞数が減少し、生存率が 5 0 % を超えているが、M O C K 群の生存率とは有意に異なることを示し、「 + + 」は、ウイルス処理後の細胞生存率が 5 0 % 未満であり、M O C K 群の細胞生存率とは有意に異なることを示した。

【 0 1 9 0 】

表 2 から分かるように、E C H O 2 5 - W T は、特定の腫瘍細胞型に対して良好な死滅効果を有した。特に、このウイルスは、結腸直腸癌細胞系統、胃癌細胞系統、非小細胞肺腺癌細胞系統、卵巣癌細胞系統、明細胞腎臓癌細胞系統、子宮内膜癌細胞系統、H P V 陰性子宮頸癌細胞系統、乳房髓様癌細胞系統、前立腺癌細胞系統、神経膠腫細胞系統、食道癌細胞系統等に対して有意な死滅効果を示し、肝臓癌細胞系統、膵臓癌細胞系統、膀胱癌細胞系統、組織球性リンパ腫細胞系統及び慢性骨髄性白血病細胞系統に対して良好な死滅効果を有し、一方で、E C H O 2 5 - W T は、非小細胞肺扁平上皮癌細胞系統、小細胞肺癌細胞系統、H P V 陽性子宮頸癌細胞系統、乳房非髓様癌細胞系統、腎臓癌細胞系統、B 細胞リンパ腫細胞系統、T 細胞白血病細胞系統、鼻中隔扁平上皮癌細胞系統、顎下腺癌細胞系統、甲状腺癌細胞系統等に対して有意な死滅活性を示さなかった。さらに、このウイルスは、ヒト包皮線維芽細胞系統 H F F - 1、ヒト皮膚ケラチノサイト細胞系統 H a C a t 及びヒト前立腺間質細胞系統 W P M Y - 1 を含む非腫瘍細胞系統に対して実質的に毒性を有しないが、ただし、M O I = 1 0 0 でヒト臍静脈内皮細胞系統 H U V E C に対して或る程度の毒性を示した。

【 0 1 9 1 】

さらに、E C H O 2 5 - H R V 2、E C H O 2 5 - m i R 1 3 3 & 2 0 6 T、E C H O 2 5 - G M - C S F 及び E C H O 2 5 - A n t i - P D - 1 の i n v i t r o 抗腫瘍実験により、4 種の E C H O 2 5 改変形の全てが、特定の腫瘍細胞に対して親野生型 E C H O 2 5 の死滅効果を保持していることが示され、結腸直腸癌細胞系統、胃癌細胞系統、卵巣癌細胞系統、明細胞腎臓癌細胞系統、子宮内膜癌細胞系統、H P V 陰性子宮頸癌細胞系統、乳房髓様癌細胞系統、前立腺癌細胞系統、神経膠腫細胞系統、食道癌細胞系統等に対して有意な死滅効果が示された。ヒト結腸直腸癌細胞系統 S W 4 8 0、ヒト胃癌細胞系統 A G S、ヒト子宮内膜癌細胞系統 I s h i k a w a 及びヒト神経膠腫細胞系統 U 1 1 8 - M G に対する腫瘍溶解活性の C C K - 8 検出結果を表 3 に示した。さらに、4 種の E C H O 2 5 改変形は、非小細胞肺扁平上皮癌細胞系統、小細胞肺癌細胞系統、H P V 陽性子宮頸癌細胞系統、乳房非髓様癌細胞系統、腎臓癌細胞系統、B 細胞リンパ腫細胞系統、T 細胞白血病細胞系統、鼻中隔扁平上皮癌細胞系統、顎下腺癌細胞系統等に対して有意な死滅活性を示さなかった。注目すべき点は、E C H O 2 5 - H R V 2 は幾つかの腫瘍細胞に対して有意な死滅活性を示したが、それに対して、E C H O 2 5 - W T はほとんど死滅活性を示さなかったことである。ヒト咽頭扁平上皮癌細胞系統 F a D u 及びヒト甲状腺癌細胞系統 S W 5 7 9 に対する腫瘍溶解活性の C C K - 8 検出結果を表 4 に示した。

【 0 1 9 2 】

10

20

30

40

50

【表 3】

表3：ECHO25-HRV2、ECHO25-miR133&206T、ECHO25-GM-CSF、及びECHO25-Anti-PD-1の*in vitro*抗腫瘍実験の結果

MOI		0.1	1	10	100
細胞系統	ECHO25-HRV2	++	++	++	++
	SW480	++	++	++	++
	AGS	++	++	++	++
	Ishikawa	++	++	++	++
ECHO25-miR133&206T	U118-MG	++	++	++	++
	SW480	++	++	++	++
	AGS	++	++	++	++
	Ishikawa	++	++	++	++
ECHO25-GM-CSF	U118-MG	++	++	++	++
	SW480	++	++	++	++
	AGS	++	++	++	++
	Ishikawa	++	++	++	++
ECHO25-Anti-PD-1	U118-MG	++	++	++	++
	SW480	++	++	++	++
	AGS	++	++	++	++
	Ishikawa	++	++	++	++

備考：「-」は、ウイルス処理群とMOCK群との間の細胞生存率に有意差がないことを示し、「+」は、ウイルス処理後に、細胞数が減少し、生存率が50%を超えているが、MOCK群の生存率とは有意に異なることを示し、「++」は、ウイルス処理後の細胞生存率が50%未満であり、MOCK群の細胞生存率とは有意に異なることを示した。

【0193】

【表 4】

表4：ヒト咽頭扁平上皮癌細胞系統FaDu及びヒト甲状腺癌細胞系統SW579に対するECHO25-WT及びECHO25-HRV2の*in vitro*腫瘍溶解実験結果の比較

MOI		0.1	1	10	100
細胞系統	ECHO25-WT	-	-	+	+
	FaDu	-	-	-	-
ECHO25-HRV2	SW579	++	++	++	++
	FaDu	+	++	++	++

備考：「-」は、ウイルス処理群とMOCK群との間の細胞生存率に有意差がないことを示し、「+」は、ウイルス処理後に、細胞数が減少し、生存率が50%を超えているが、MOCK群の生存率とは有意に異なることを示し、「++」は、ウイルス処理後の細胞生存率が50%未満であり、MOCK群の細胞生存率とは有意に異なることを示した。

【0194】

2.5 馴化のためのECHO25の連続継代

この実施例では、或る特定の種類の腫瘍細胞における馴化のためにECHO25を連続

継代することで、腫瘍細胞に対する死滅活性が高められたウイルス株を得た。

【 0 1 9 5 】

野生型 E C H O 2 5 を、野生型 E C H O 2 5 の腫瘍溶解効果があまり大きくなかったヒト肝臓癌細胞系統 P L C / P R F / 5、ヒト黒色腫細胞系統 A - 3 7 5 又はヒト膀胱癌細胞系統 J 8 2 における馴化のために連続継代した。具体的な方法は、以下の通りであった。

【 0 1 9 6 】

上記腫瘍細胞の 1 種類を 1 0 c m の細胞培養プレート上に均等に播種した。培養条件は 1 0 % ウシ胎児血清と、グルタミン、ペニシリン及びストレプトマイシンとを含有する対応する細胞培養培地、3 7 °C、5 % の C O 2、並びに飽和湿度を含むものであった。細胞コンフルエンスが 9 0 % 以上に達したら、細胞培養培地を無血清細胞培養培地と置き換え、各プレートに 1 0 ⁷ の T C I D 5 0 の E C H O 2 5 を接種し、培養環境を 3 3 °C、5 % の C O 2、飽和湿度に変更した。E C H O 2 5 が腫瘍細胞内で増殖し、細胞内に C P E が引き起こされたら（最長 3 日間の感染後）、細胞及びそれらの培養上清を採取した。3 回のサイクルの凍結融解後に、遠心分離を 4 °C、4 0 0 0 r p m で 1 0 分間行った。遠心上清を採取し、9 0 % より高い細胞コンフルエンスの新しい腫瘍細胞上に加えることで、1 回のウイルスの継代が完了した。継代を 1 1 回以上繰り返し、各回の継代で R D 細胞におけるウイルス力価を検出するためにウイルス溶液の一部を採取した。具体的な方法は実施例 2 . 3 を参照した。一般的に、ウイルス複製能力は世代とともに増加すると考えられる。比較的高い感染力価に達し、ウイルス複製が腫瘍細胞において安定した場合に、その腫瘍細胞に馴化された E C H O 2 5 株が得られた。

【 0 1 9 7 】

引き続き、実施例 2 . 4 に記載される *in vitro* 抗腫瘍実験法により、ヒト腫瘍細胞 P L C / P R F / 5、A - 3 7 5 又は J 8 2 を 9 6 ウェルプレートに 1 0 ⁴ 細胞 / ウェルで接種した。細胞が接着した後に、各ウェル中の培地を対応する無血清の培養培地と置き換え、その後に 3 7 °C で 3 0 分間インキュベートし、次いで、上記種類の細胞の各々について馴化された連続継代された E C H O 2 5 ウイルス株（そのウイルス力価は R D 細胞で検出された）を、0 . 1、1、1 0 及び 1 0 0 の M O I で接種した。引き続き、細胞の C P E を顕微鏡で毎日観察し、ウイルスの感染及び培養の 7 2 時間後に C C K - 8 法を使用して細胞生存率を検出した。

【 0 1 9 8 】

これらの結果を表 5 に示した。ここで、E C H O 2 5 が不十分な腫瘍溶解効果を有する或る特定の種類の腫瘍細胞における野生型エンテロウイルス E C H O 2 5 の連続継代後に、腫瘍細胞に対するその死滅活性は大幅に高められ、こうして連続継代法を使用することで、腫瘍細胞に対する腫瘍溶解効果が高められた E C H O 2 5 馴化株を得ることができることが指摘される。

【 0 1 9 9 】

【表 5】

表 5：腫瘍細胞における馴化のための連続継代後の腫瘍細胞に対する E C H O 2 5 の *in vitro* 死滅実験の結果

細胞系統 \ M O I	0.1	1	10	100
PLC/PRF/5	+	++	++	++
A-375	-	+	++	++
J82	+	++	++	++

備考：「 - 」は、ウイルス処理群と M O C K 群との間の細胞生存率に有意差がないことを示し、「 + 」は、ウイルス処理後に、細胞数が減少し、生存率が 5 0 % を超えているが、

M O C K 群の生存率とは有意に異なることを示し、「++」は、ウイルス処理後の細胞生存率が50%未満であり、M O C K 群の細胞生存率とは有意に異なることを示した。

【0200】

2.6 ECHO25のゲノムRNAの腫瘍溶解効果の評価

この実施例では、ECHO25の精製されたゲノムRNAを或る特定の種類の腫瘍細胞にトランスフェクションさせることにより、大量のECHO25の感染性の生ウイルスが産生されるため、該腫瘍細胞を死滅させることができる。

【0201】

ウイルスのゲノムRNAを、まずは*in vitro*転写によって得た。この方法は、例えばHadac E M, Kelly E J and Russell S J. Mol Ther, 2011, 19(6): 1041-1047に見出すことができる。具体的には、実施例1で得られた野生型ECHO25の感染性クローニングプラスミドを線状化し、線状化されたプラスミドを、MEGAscript (商標) T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific社、AM1333)を用いる*in vitro*転写のための鋳型として使用することで、大量のウイルスRNAを産生させた。そして得られたウイルスRNAを、MEGAclean (商標) Transcription Clean-Up Kit (Thermo Fisher Scientific社、AM1908)を使用して後続使用のために精製した。2つの並列試料のRNA電気泳動図を図3に示した。

【0202】

引き続き、実施例2.4に記載される*in vitro*抗腫瘍実験の方法に従って、ヒト結腸直腸癌腫瘍細胞系統SW480を、24ウェルプレートに 10^5 細胞/ウェルで接種した。細胞が接着した後に、各ウェル中の培地を、対応する無血清の細胞培養培地と置き換え、その後に37℃で30分間インキュベートした。次いで、トランスフェクション試薬Lipofectamine (商標) 2000 (Thermo Fisher Scientific社、11668019)を使用して、SW480細胞に1ウェル当たり1μgで精製されたウイルスRNAをトランスフェクションさせた。ネガティブコントロール群には、無関係のRNA核酸分子をトランスフェクションさせた。引き続き、細胞のCPEを顕微鏡により毎日観察した。

【0203】

これらの結果は、トランスフェクションの約8時間後にECHO25のゲノムRNAがトランスフェクションされたSW480細胞にCPEが現れ始め、その後に、細胞変性が徐々に増加することを示した。48時間後に、CCK8法を使用して生存率を測定した。SW480細胞は、ほとんど全てが死滅して溶解され、感染の0時間後、24時間後及び48時間後のSW480細胞の顕微鏡写真を図4に示した。培養上清を新しいSW480細胞へと接種すると、CPEが素早く生じた。これらの結果は、ECHO25の核酸による直接投与も良好な死滅活性を有し、腫瘍の治療に使用することができることを示した。

【0204】

実施例3：ECHO25及びその改変形の*in vivo*抗腫瘍実験

3.1 ウイルス、細胞系統及び実験動物

(1) ウイルス：この実施例では、実施例1に示されるECHO25-WT (配列番号12)、ECHO25-HRV2 (配列番号13)、ECHO25-miR133&206T (配列番号14)、ECHO25-GM-CSF (配列番号15)及びECHO25-Anti-PD-1 (配列番号16)を使用した。ウイルス培養及びウイルス力価測定の方法は、それぞれ実施例2.2及び実施例2.3において理解することができる。

【0205】

(2) 細胞系統：ヒト神経膠腫細胞系統GBM (患者の腫瘍組織から分離された初代腫瘍細胞系統)、ヒト子宮内膜癌細胞系統Ishikawa (ECACC番号99040201)、ヒト前立腺癌細胞系統PC-3 (ATCC (商標) 番号：CRL-1435 (商標))及びヒト乳癌細胞系統Bcap37 (CCTCC寄託番号：GDC206)。上記細胞は全てDMEM培地中で培養され、これらの培地には10%ウシ胎児血清、グルタミン

10

20

30

40

50

及びペニシリン - ストレプトマイシンを添加した。上記の全ての細胞は、37℃及び5% CO₂の標準条件下で培養した。

【0206】

(3) 実験動物：6週齢～8週齢の雌のC57BL/6Jマウスは、Shanghai Slark Experimental Animal Co., Ltd.社から得られ、廈門大学の実験動物センター及び倫理委員会により承認されたプロトコルに従って、これらのマウスをSPF条件下で飼育した。

【0207】

3.2 ウイルスのin vivo抗腫瘍実験

SCIDマウスにおける皮下腫瘍形成のために使用された腫瘍細胞を0.01%のトリプシンで消化し、次いで10%のウシ胎児血清を含む細胞培養培地を使用して再懸濁して、単一細胞懸濁液にした。その懸濁液の細胞密度を計数した。細胞を1000gで3分間の遠心分離により沈殿させた後に、細胞を適切な容量のPBSで再懸濁して、約10⁶細胞/100μl(PBS)～10⁷細胞/100μl(PBS)の濃度に到達させた。腫瘍細胞を注射器でSCIDマウスの背部に10⁶細胞/100μl(PBS)/部位～10⁷細胞/100μl(PBS)/部位で皮下接種した。腫瘍細胞が約14日～21日後にSCIDマウスの皮下で約100mm³の腫瘍量に成長したら、担癌のSCIDマウスを実験群(ECHO25-WT、ECHO25-HRV2、ECHO25-miR133&206T、ECHO25-GM-CSF又はECHO25-Anti-PD-1)及びネガティブコントロール群に無作為に分けた。ここで各群には4匹のマウス(n=4)が含まれる。10⁶のTCID50/100μl(無血清培地)/腫瘍量での腫瘍溶解性ウイルス(ECHO25-WT、ECHO25-HRV2、ECHO25-miR133&206T、ECHO25-GM-CSF又はECHO25-Anti-PD-1)又は同等量の無血清培地を、合計5回の処理につき2日毎に腫瘍内注射した。腫瘍サイズをノギスで計測し、2日毎に記録した。腫瘍サイズの計算方法は以下の通りであった。

腫瘍サイズ(mm³) = 腫瘍の長さの値 × (腫瘍の幅の値)² / 2

【0208】

上記の4種の腫瘍についてのECHO25-WTの治療結果を、図5A～図5Dに示した。これらの結果は、ECHO25-WTのチャレンジ後に、GBM(A)、Ishikawa(B)、PC-3(C)及びBcap37(D)の4種の検出腫瘍の成長が徐々に遅くなって停止し、更に腫瘍は溶解して消失するが、それに対して、ネガティブ群(CTRL)の腫瘍は正常な成長を維持し、その腫瘍サイズは実験群の腫瘍サイズよりも有意に大きいことを示した。

【0209】

図6は、GBM腫瘍モデルを10日間にわたりECHO25-WT、ECHO25-HRV2、ECHO25-miR133&206T、ECHO25-GM-CSF又はECHO25-Anti-PD-1で処理した後に得られた結果を示した。これらの結果は、ECHO25-WT、ECHO25-HRV2、ECHO25-miR133&206T、ECHO25-GM-CSF及びECHO25-Anti-PDで処理した後に、腫瘍溶解性ウイルスで処理されていないネガティブコントロール群と比較して、腫瘍体積が有意に減少し、5種の腫瘍溶解性ウイルスECHO25-WT、ECHO25-HRV2、ECHO25-miR133&206T、ECHO25-GM-CSF及びECHO25-Anti-PD-1で処理した後にも腫瘍体積の同様の減少が検出されたことを示した。上記の結果は、ECHO25-WT、ECHO25-HRV2、ECHO25-miR133&206T、ECHO25-GM-CSF及びECHO25-Anti-PD-1の全てがin vivoで顕著で好ましい抗腫瘍活性を示すことを示した。

【0210】

実施例4：腫瘍溶解性ウイルスの安全性評価

4.1 使用されるウイルス及び実験動物

(1) ウイルス：実施例1に示されるECHO25-WT(配列番号12)を、この実施例で使用した。ウイルス培養及びウイルス力価測定の方法は、それぞれ実施例2.2及び

実施例 2、3 を参照することができる。

【0211】

(2) 実験動物：BALB/c 妊娠マウスは、Shanghai Slark Experimental Animal Co., Ltd. 社から得られ、廈門大学の実験動物センター及び倫理委員会により承認されたプロトコルに従って、マウスを清浄条件下で飼育し、次いで BALB/c 妊娠マウスから産まれた 1 日齢のマウスを、ECHO25 の *in vivo* 病毒性評価のために使用した。

【0212】

4.2 マウスにおけるウイルスの *in vivo* 安全性の評価

1 日齢の BALB/c 授乳マウスを、腹腔内注射により ECHO25 - WT でチャレンジするために選択し、チャレンジのための力価用量は、 10^4 、 10^5 、 10^6 又は 10^7 の TCID₅₀/マウスであった。次いで、種々の用量でチャレンジされた BALB/c マウスについての生存率及び健康スコアを毎日記録した。ここで、健康スコアの評価基準は以下の通りであった。スコア 5 は瀕死又は死亡を表し、スコア 4 は重度の四肢麻痺を表し、スコア 3 は、四肢の脱力又は軽度の変形を表し、スコア 2 は衰弱を表し、スコア 1 は不活発、起毛及び震えを表し、スコア 0 は健康を表す。

【0213】

これらの結果を図 7 に示した。チャレンジ後 14 日以内に、チャレンジ群の全てのマウスにおいて疾患又は死亡が起こらなかったことから、ECHO25 - WT は、BALB/c マウスに限定的な毒性しか有さず、チャレンジのために非常に高用量であってもマウスの状態に影響を及ぼさなかったことが示される。上記の結果は、ECHO25 - WT が *in vivo* で良好な安全性を有したことを示している。

【0214】

本発明の具体的な実施形態を詳細に説明したが、当業者は、公開されているあらゆる教示に従って、その詳細に対して様々な変更及び変化を加えることができ、これらの変化が全て本発明の保護範囲内であることを理解するであろう。本発明の保護範囲は、添付の特許請求の範囲及びそれらのあらゆる均等物によって与えられる。

本明細書は以下の発明を開示する。

A. 被験体における腫瘍の治療における又は被験体における腫瘍を治療するための医薬の製造における、エコーウイルス 25 (ECHO25) 若しくはその改変形、又は単離された核酸分子の使用であって、

前記単離された核酸分子は、以下の：

(1) ECHO25 又はその改変形のゲノム配列又は cDNA 配列と、

(2) 前記ゲノム配列又は前記 cDNA 配列の相補的配列と、

から選択される配列を含む、使用。

B. 前記 ECHO25 は、野生型 ECHO25 であり、

好ましくは、前記 ECHO25 は、エコーウイルス 25 に感染した個体から分離された臨床分離株であり、

好ましくは、前記 ECHO25 又はその改変形は、配列番号 12 に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有するゲノム配列を有し、好ましくは、前記 ECHO25 又はその改変形のゲノム配列は、配列番号 12 に示されるヌクレオチド配列であり、好ましくは、前記 ECHO25 又はその改変形は、配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する cDNA 配列を有し、好ましくは、前記 ECHO25 又はその改変形の cDNA 配列は、配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列である、A に記載の使用。

10

20

30

40

50

C. 前記改変形は、野生型 E C H O 2 5 と比較してゲノム中に 1 つ以上のヌクレオチドの置換、挿入又は欠失を有する改変 E C H O 2 5 であり、

好ましくは、野生型 E C H O 2 5 と比較して、前記改変 E C H O 2 5 は、以下の：

- (1) 非翻訳領域（例えば、5 ' U T R 又は 3 ' U T R ）における 1 つ以上の突然変異と、
- (2) 1 つ以上の外因性核酸の挿入と、
- (3) 1 つ以上の内因性遺伝子の欠失又は突然変異と、
- (4) 前記 3 つの項目の任意の組み合わせと、

から選択される 1 つ以上の改変を有する、A 又は B に記載の使用。

D. 前記改変 E C H O 2 5 は、外因性核酸を含み、

好ましくは、前記外因性核酸は、サイトカイン（例えば、G M - C S F、好ましくはヒト G M - C S F ）又は抗腫瘍タンパク質若しくはポリペプチド（例えば、P D - 1 又は P D - L 1 に対する s c F v、好ましくはヒト P D - 1 又は P D - L 1 に対する s c F v ）をコードし、

好ましくは、前記外因性核酸は、前記改変 E C H O 2 5 のゲノムの 5 ' U T R と V P 4 遺伝子との間、又は V P 1 遺伝子と 2 A 遺伝子との間に挿入され、

好ましくは、前記外因性核酸は、1 つ以上（例えば、2 つ、3 つ又は 4 つ）のマイクロ R N A の標的配列を含み、

好ましくは、前記マイクロ R N A の標的配列は、前記改変 E C H O 2 5 のゲノムの 3 ' 非翻訳領域（3 ' U T R ）に挿入され、

好ましくは、前記外因性核酸は、m i R - 1 3 3 及び / 又は m i R - 2 0 6 の標的配列を含み、

好ましくは、前記 m i R - 1 3 3 の標的配列は、配列番号 3 に示されており、

好ましくは、前記 m i R - 2 0 6 の標的配列は、配列番号 4 に示されている、C に記載の使用。

E. 前記改変 E C H O 2 5 は、前記 5 ' 非翻訳領域（5 ' U T R ）における 1 つ以上の突然変異を含み、

好ましくは、前記改変 E C H O 2 5 は、前記 5 ' U T R における内部リボソーム進入部位（I R E S ）配列の、外因性 I R E S 配列、例えばヒトライノウイルス 2（H R V 2 ）の内部リボソーム進入部位配列との置換を有し、

好ましくは、前記ヒトライノウイルス 2（H R V 2 ）の内部リボソーム進入部位配列は、配列番号 2 に示されている、C 又は D に記載の使用。

F. 前記改変 E C H O 2 5 は、D に規定される外因性核酸の少なくとも 1 つの挿入及び / 又は E に規定される非翻訳領域における少なくとも 1 つの突然変異を含む、C ~ E のいずれかに記載の使用。

G. 前記改変 E C H O 2 5 は、以下の特徴：

(1) 前記改変 E C H O 2 5 のゲノム配列は、配列番号 1 3 ~ 配列番号 1 6 に示されるヌクレオチド配列から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有し、好ましくは、前記改変 E C H O 2 5 のゲノム配列は、配列番号 1 3 ~ 配列番号 1 6 のいずれか 1 つに示されるヌクレオチド配列から選択されること、及び、

(2) 前記改変 E C H O 2 5 の c D N A 配列は、配列番号 8 ~ 配列番号 1 1 に示されるヌクレオチド配列から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有し、好ましくは、前記改変 E C H O 2 5 の c D N A 配列は、配列番号 8 ~ 配列番号 1 1 のいずれか 1 つに示されるヌクレオチド配列から選択されること、

の 1 つを有する、C ~ F のいずれかに記載の使用。

10

20

30

40

50

H. 前記単離された核酸分子は、前記 E C H O 2 5 若しくはその改変形のゲノム配列若しくは c D N A 配列、又は前記ゲノム配列若しくは前記 c D N A 配列の相補的配列からなり、好ましくは、前記単離された核酸分子は、前記 E C H O 2 5 又はその改変形のゲノム配列を有し、

好ましくは、前記単離された核酸分子は、配列番号 1 2 ~ 配列番号 1 6 のいずれか 1 つに示されるヌクレオチド配列を有する、A ~ G のいずれかに記載の使用。

I. 前記単離された核酸分子は、前記 E C H O 2 5 若しくはその改変形のゲノム配列若しくは c D N A 配列、又は前記ゲノム配列若しくは前記 c D N A 配列の相補的配列を含むベクター（例えば、クローニングベクター又は発現ベクター）であり、

好ましくは、前記単離された核酸分子は、前記 E C H O 2 5 若しくはその改変形の c D N A 配列、又は前記 c D N A 配列の相補的配列を含むベクター（例えば、クローニングベクター又は発現ベクター）であり、

好ましくは、前記単離された核酸分子は、配列番号 1、配列番号 8 ~ 配列番号 1 1 のいずれか 1 つに示されるヌクレオチド配列又はその相補的配列を含むベクターである、A ~ G のいずれかに記載の使用。

J. 前記 E C H O 2 5 若しくはその改変形、又は前記単離された核酸分子は、追加の薬学的活性剤と組み合わせて使用され、

好ましくは、前記追加の薬学的活性剤は、抗腫瘍活性を有し、

好ましくは、前記追加の薬学的活性剤は、追加の腫瘍溶解性ウイルス、化学療法剤又は免疫療法剤から選択され、

好ましくは、前記追加の腫瘍溶解性ウイルスは、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス、レオウイルス、ニューカッスル病ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、麻疹ウイルス又はそれらの任意の組み合わせからなる群から選択され、

好ましくは、前記化学療法剤は、5 - フルオロウラシル、マイトマイシン、メトトレキサート、ヒドロキシ尿素、シクロホスファミド、ダカルバジン、ミトキサントロン、アントラサイクリン類（例えば、エピルピシン又はドキソルピシン）、エトポシド、白金化合物（例えば、カルボプラチン又はシスプラチン）、タキサン類（例えば、パクリタキセル又はタキソテール）又はそれらの任意の組み合わせから選択され、

好ましくは、前記免疫療法剤は、免疫チェックポイント阻害薬（例えば、抗 P D - 1 抗体、抗 P D - L 1 抗体又は抗 C T L A - 4 抗体）、腫瘍特異的標的化抗体（例えば、リツキシマブ又はハーセプチン）又はそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、A ~ I のいずれかに記載の使用。

K. 前記腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌（例えば、卵巣非明細胞癌）、子宮内膜癌、黒色腫、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫（例えば、組織球性リンパ腫）、白血病（例えば、慢性骨髄性白血病）、横紋筋肉腫、結腸直腸癌、非小細胞肺癌（例えば、非小細胞肺腺癌）、子宮頸癌（例えば、H P V 陰性子宮頸癌）、乳癌（例えば、乳房髄様癌）、腎臓癌（例えば、明細胞腎臓癌）及び膵臓癌からなる群から選択され、

好ましくは、前記腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌（例えば、卵巣非明細胞癌）、子宮内膜癌、子宮頸癌（例えば、H P V 陰性子宮頸癌）、黒色腫、乳癌（例えば、乳房髄様癌）、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫（例えば、組織球性リンパ腫）又は白血病（例えば、慢性骨髄性白血病）である、A ~ J のいずれかに記載の使用。

L. 前記被験体は、ヒト等の哺乳動物である、A ~ K のいずれかに記載の使用。

M. 腫瘍を治療する方法であって、治療を必要とする被験体に、有効量の E C H O 2 5 若しくはその改変形、又は有効量の単離された核酸分子を投与する工程を含み、ここで、前記単離された核酸分子は、

(1) 前記 E C H O 2 5 又はその改変形のゲノム配列又は c D N A 配列と、

(2) 前記ゲノム配列又は前記 c D N A 配列の相補的配列と、

から選択される配列を含み、

好ましくは、前記 E C H O 2 5 若しくはその改変形、又は前記単離された核酸分子は、B ~ L のいずれかに規定される通りであり、

10

20

30

40

50

好ましくは、前記腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌（例えば、卵巣非明細胞癌）、子宮内膜癌、黒色腫、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫（例えば、組織球性リンパ腫）、白血病（例えば、慢性骨髄性白血病）、横紋筋肉腫、結腸直腸癌、非小細胞肺癌（例えば、非小細胞肺腺癌）、子宮頸癌（例えば、HPV陰性子宮頸癌）、乳癌（例えば、乳房髄様癌）、腎臓癌（例えば、明細胞腎臓癌）及び膵臓癌からなる群から選択され、
好ましくは、前記腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌（例えば、卵巣非明細胞癌）、子宮内膜癌、子宮頸癌（例えば、HPV陰性子宮頸癌）、黒色腫、乳癌（例えば、乳房髄様癌）、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫（例えば、組織球性リンパ腫）又は白血病（例えば、慢性骨髄性白血病）であり、

好ましくは、前記被験体は、ヒト等の哺乳動物である、方法。

10

N、野生型ECHO25と比較して、5'UTRにおける内部リボソーム進入部位（IRES）配列の、ヒトライノウイルス2（HRV2）の内部リボソーム進入部位配列との置換を有する改変ECHO25であって、

好ましくは、前記改変ECHO25は、以下の特徴：

1）前記ヒトライノウイルス2（HRV2）の内部リボソーム進入部位配列は、配列番号2に示されていること、

2）前記野生型ECHO25のゲノム配列は、配列番号12に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有し、好ましくは、前記野生型ECHO25のゲノム配列は、配列番号12に示されるヌクレオチド配列であること、

20

3）前記野生型ECHO25のcDNA配列は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有し、好ましくは、前記野生型ECHO25のcDNA配列は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列であること、

の少なくとも1つを有する、改変ECHO25。

O、前記改変ECHO25は、外因性核酸を更に含み、

30

好ましくは、前記外因性核酸は、サイトカイン（例えば、GM-CSF、好ましくはヒトGM-CSF）又は抗腫瘍タンパク質若しくはポリペプチド（例えば、PD-1又はPD-L1に対するscFv、好ましくはヒトPD-1又はPD-L1に対するscFv）をコードし、

好ましくは、前記外因性核酸は、前記改変ECHO25のゲノムの5'UTRとVP4遺伝子との間、又はVP1遺伝子と2A遺伝子との間に挿入され、

好ましくは、前記外因性核酸は、1つ以上（例えば、2つ、3つ又は4つ）のマイクロRNAの標的配列を含み、

好ましくは、前記マイクロRNAの標的配列は、前記改変ECHO25のゲノムの3'非翻訳領域に挿入され、

40

好ましくは、前記外因性核酸は、miR-133及び/又はmiR-206の標的配列を含み、

好ましくは、前記miR-133の標的配列は、配列番号3に示されており、

好ましくは、前記miR-206の標的配列は、配列番号4に示されている、Nに記載の改変ECHO25。

P、前記改変ECHO25は、以下の特徴：

（1）前記改変ECHO25のゲノム配列は、配列番号13に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%

50

、又は100%の配列同一性を有し、好ましくは、前記改変ECHO25のゲノム配列は、配列番号13に示されるヌクレオチド配列であること、

(2) 前記改変ECHO25のcDNA配列は、配列番号8に示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有し、好ましくは、前記改変ECHO25のcDNA配列は、配列番号8に示されるヌクレオチド配列であること、
の1つを有する、N又はOに記載の改変ECHO25。

Q、単離された核酸分子であって、

(1) N～Pのいずれかに記載の改変ECHO25のゲノム配列又はcDNA配列と、

(2) 前記ゲノム配列又は前記cDNA配列の相補的配列と、

からなる群から選択される配列を含む、単離された核酸分子。

R、前記単離された核酸分子は、前記改変されたECHO25のゲノム配列若しくはcDNA配列、又は前記ゲノム配列若しくは前記cDNA配列の相補的配列からなり、

好ましくは、前記単離された核酸分子は、前記改変されたECHO25のゲノム配列を有し、

好ましくは、前記単離された核酸分子は、配列番号13に示されるヌクレオチド配列を有する、Qに記載の単離された核酸分子。

S、前記単離された核酸分子は、前記改変ECHO25のゲノム配列若しくはcDNA配列、又は前記ゲノム配列若しくは前記cDNA配列の相補的配列を含むベクター（例えば、クローニングベクター又は発現ベクター）であり、

好ましくは、前記単離された核酸分子は、前記改変ECHO25のcDNA配列、又は前記cDNA配列の相補的配列を含むベクター（例えば、クローニングベクター又は発現ベクター）であり、

好ましくは、前記単離された核酸分子は、配列番号8に示されるヌクレオチド配列又はその相補的配列を含むベクターである、Qに記載の単離された核酸分子。

T、被験体における腫瘍の治療における、又は被験体における腫瘍の治療のための医薬の製造における、N～Pのいずれかに記載の改変ECHO25又はQ～Sのいずれかに記載の単離された核酸分子の使用であって、

好ましくは、前記腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌（例えば、卵巣非明細胞癌）、子宮内膜癌、黒色腫、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫（例えば、組織球性リンパ腫）、白血病（例えば、慢性骨髄性白血病）、咽頭扁平上皮癌、甲状腺癌、横紋筋肉腫、結腸直腸癌、非小細胞肺癌（例えば、非小細胞肺腺癌）、子宮頸癌（例えば、HPV陰性子宮頸癌）、乳癌（例えば、乳房髄様癌）、腎臓癌（例えば、明細胞腎臓癌）及び膵臓癌からなる群から選択され、

好ましくは、前記腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌（例えば、卵巣非明細胞癌）、子宮内膜癌、子宮頸癌（例えば、HPV陰性子宮頸癌）、黒色腫、乳癌（例えば、乳房髄様癌）、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫（例えば、組織球性リンパ腫）、白血病（例えば、慢性骨髄性白血病）、咽頭扁平上皮癌又は甲状腺癌であり、

好ましくは、前記腫瘍は、咽頭扁平上皮癌又は甲状腺癌であり、

好ましくは、前記被験体は、ヒト等の哺乳動物である、使用。

U、腫瘍を治療する方法であって、治療を必要とする被験体に、有効量のN～Pのいずれかに記載の改変ECHO25又はQ～Sのいずれかに記載の単離された核酸分子を投与する工程を含み、

好ましくは、前記腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌（例えば、卵巣非明細胞癌）、子宮内膜癌、黒色腫、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫（例えば、組織球性リンパ腫）、白血病（例えば、慢性骨髄性白血病）、咽頭扁平上皮癌、甲状腺癌、横紋筋肉腫、結腸直腸癌、非小細胞肺癌（例えば、非小細胞肺腺癌）、子宮頸癌（例えば、HPV陰性子宮頸癌）、乳癌（例えば、乳房髄様癌）、腎臓癌（例えば、明細胞腎臓癌）及び膵臓癌

10

20

30

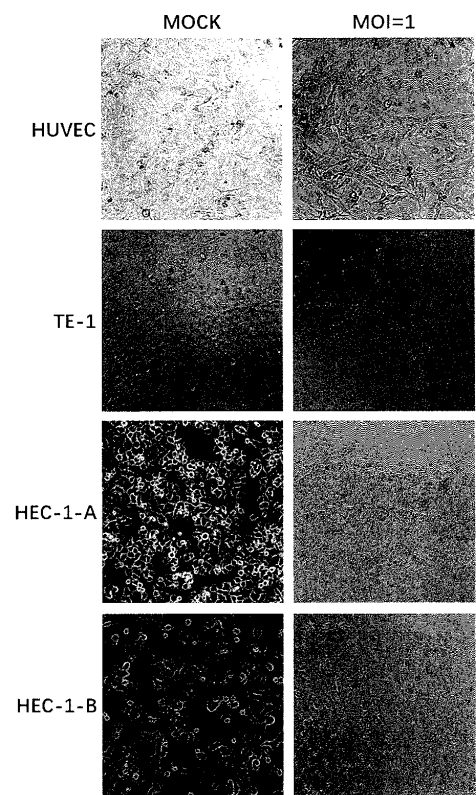
40

50

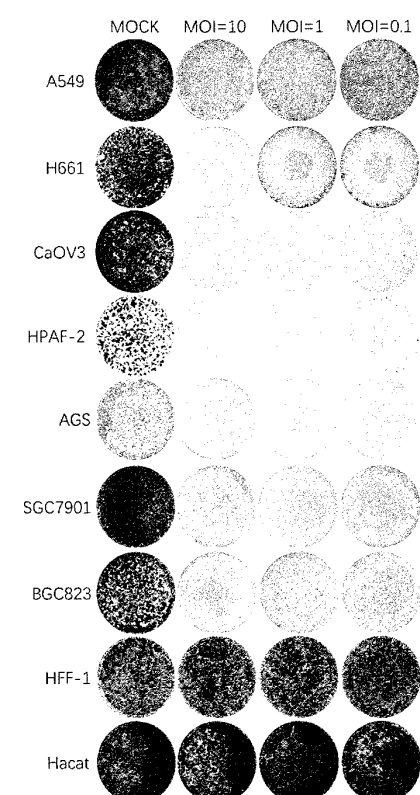
からなる群から選択され、
好ましくは、前記腫瘍は、胃癌、肝臓癌、卵巣癌（例えば、卵巣非明細胞癌）、子宮内膜癌、子宮頸癌（例えば、H P V 陰性子宮頸癌）、黒色腫、乳癌（例えば、乳房髄様癌）、前立腺癌、神経膠腫、食道癌、膀胱癌、リンパ腫（例えば、組織球性リンパ腫）、白血病（例えば、慢性骨髄性白血病）、咽頭扁平上皮癌又は甲状腺癌であり、
好ましくは、前記腫瘍は、咽頭扁平上皮癌又は甲状腺癌であり、
好ましくは、前記被験体は、ヒト等の哺乳動物である、方法。

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

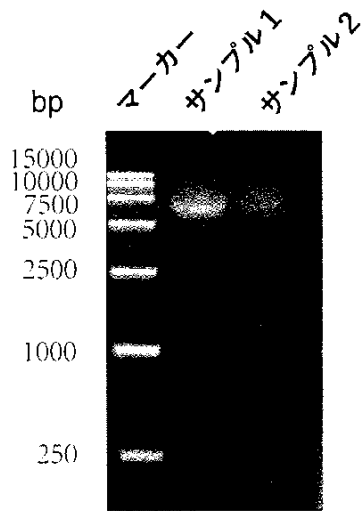
20

30

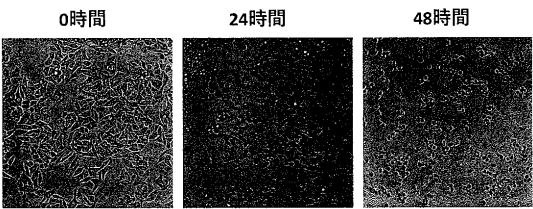
40

50

【図 3】

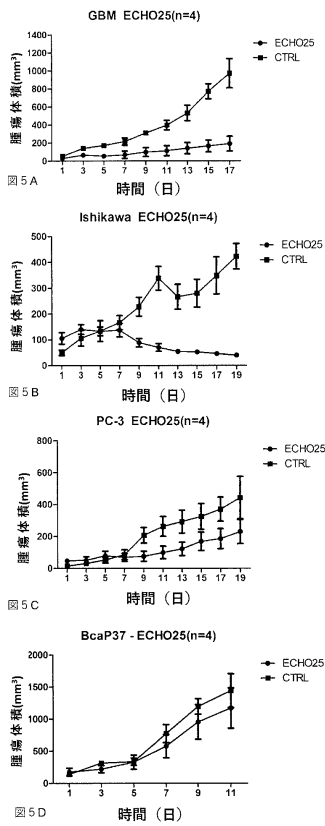


【図 4】

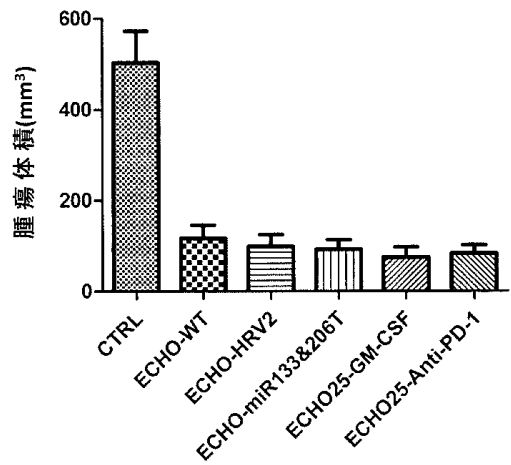


10

【図 5】



【図 6】



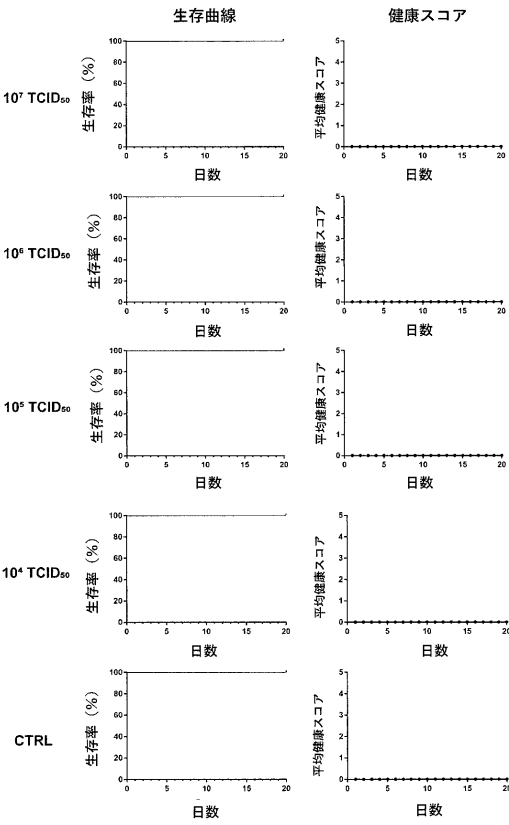
20

30

40

50

【図 7】



10

20

【配列表】

0007373168000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	35/763 (2015.01)	A 6 1 K	35/763	
A 6 1 K	35/761 (2015.01)	A 6 1 K	35/761	
A 6 1 K	35/765 (2015.01)	A 6 1 K	35/765	
A 6 1 K	35/766 (2015.01)	A 6 1 K	35/766	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	31/513 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 K	31/407 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	E
A 6 1 K	31/519 (2006.01)	A 6 1 K	31/513	
A 6 1 K	31/675 (2006.01)	A 6 1 K	31/407	
A 6 1 K	31/4164 (2006.01)	A 6 1 K	31/519	
A 6 1 K	31/36 (2006.01)	A 6 1 K	31/675	
A 6 1 K	31/17 (2006.01)	A 6 1 K	31/4164	
A 6 1 K	31/136 (2006.01)	A 6 1 K	31/36	
A 6 1 K	31/282 (2006.01)	A 6 1 K	31/17	
A 6 1 K	31/704 (2006.01)	A 6 1 K	31/136	
A 6 1 K	33/243 (2019.01)	A 6 1 K	31/282	
A 6 1 K	31/337 (2006.01)	A 6 1 K	31/704	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	A 6 1 K	33/243	
		A 6 1 K	31/337	
		C 1 2 N	15/113	1 0 0 Z

弁理士 梶並 順

(74)代理人 100122437

弁理士 大宅 一宏

(74)代理人 100209495

弁理士 佐藤 さおり

(72)発明者 チェン、トン

中華人民共和国、フジアン 3 6 1 1 0 2、シャメン、シャンアン・ディストリクト、シャメン・ユニヴァーシティ (シャンアン・キャンパス)、ナショナル・インスティテュート・オブ・ディアグノスティクス・アンド・ヴァクシーン・ディヴェロップメント・イン・インフェクシャス・ディジーズ

(72)発明者 ワン、ウェイ

中華人民共和国、フジアン 3 6 1 1 0 2、シャメン、シャンアン・ディストリクト、シャメン・ユニヴァーシティ (シャンアン・キャンパス)、ナショナル・インスティテュート・オブ・ディアグノスティクス・アンド・ヴァクシーン・ディヴェロップメント・イン・インフェクシャス・ディジーズ

(72)発明者 ワン、ジュンカイ

中華人民共和国、フジアン 3 6 1 1 0 2、シャメン、シャンアン・ディストリクト、シャメン・ユニヴァーシティ (シャンアン・キャンパス)、ナショナル・インスティテュート・オブ・ディアグノスティクス・アンド・ヴァクシーン・ディヴェロップメント・イン・インフェクシャス・ディジーズ

(72)発明者 シュ、ロンファ

中華人民共和国、フジアン 3 6 1 1 0 2、シャメン、シャンアン・ディストリクト、シャメン・ユニヴァーシティ (シャンアン・キャンパス)、ナショナル・インスティテュート・オブ・ディアグノスティクス・アンド・ヴァクシーン・ディヴェロップメント・イン・インフェクシャス・ディジーズ

(72)発明者 イェ、シャンツォン

中華人民共和国、 베이징 1 0 2 2 0 6、チャンピン・ディストリクト、ケシュエユアン・ロード、ナンバー 3 1

(72)発明者 チャン、ジュン

中華人民共和国、フujian 361102、シャメン、シャナン・ディストリクト、シャメン・ユニヴァーシティ (シャナン・キャンパス)、ナショナル・インスティテュート・オブ・ディアグノスティクス・アンド・ヴァクシーン・ディヴェロップメント・イン・インフェクシャス・ディーズス

(72)発明者 シア、ニンシャオ

中華人民共和国、フujian 361102、シャメン、シャナン・ディストリクト、シャメン・ユニヴァーシティ (シャナン・キャンパス)、ナショナル・インスティテュート・オブ・ディアグノスティクス・アンド・ヴァクシーン・ディヴェロップメント・イン・インフェクシャス・ディーズス

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 特表2014-502970 (JP, A)

国際公開第2006/074526 (WO, A1)

Arch Virol, 2017年08月01日, Vol.162, pp.3355-3362

Journal of Medical Virology, 2008年, Vol.80, pp.352-359

ONCOIMMUNOLOGY, 2016年, Vol.5, No.10, e1220467, pp.1-14

Molecular Therapy, 2009年, Vol.17, No.3, pp.409-416

Virus Research, 2015年, Vol.205, pp.41-44

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K 35/00 - 35/768

C12N 7/00 - 7/08

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

GenBank/EMBL/DBJ/GenSeq