

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-530249

(P2021-530249A)

(43) 公表日 令和3年11月11日(2021.11.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/20 (2006.01)	C 1 2 N 15/20	4 B 0 6 5
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	Z N A 4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 40 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2021-523582 (P2021-523582)	(71) 出願人	504318142
(86) (22) 出願日	令和1年7月12日 (2019.7.12)		アリゾナ ボード オブ リージェンツ
(85) 翻訳文提出日	令和3年3月8日 (2021.3.8)		オン ビハーフ オブ アリゾナ ステート ユニバーシティ
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/041700		アメリカ合衆国, アリゾナ 85257, スコットデール, ノース スコットデール
(87) 国際公開番号	W02020/014670		ロード 1475, スカイソングススイート 200
(87) 国際公開日	令和2年1月16日 (2020.1.16)	(74) 代理人	100082072
(31) 優先権主張番号	62/697, 581		弁理士 清原 義博
(32) 優先日	平成30年7月13日 (2018.7.13)	(72) 発明者	マクファデン, グラント
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		アメリカ合衆国 85257 アリゾナ州 スコットデール ノース・スコットデール・ロード 1475 スイート 200
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 T N F 発現粘液腫ウイルスで癌を処置する方法

(57) 【要約】

ある実施形態で、T N F 発現粘液腫ウイルスを使用して、癌を阻害するまたは処置する方法が、本明細書で開示される。T N F 発現粘液腫ウイルスで処置された、単核末梢血細胞および／または骨髄細胞を使用して、癌を阻害するまたは処置する方法も、本明細書で開示される。いくつかの態様は、本明細書で説明される方法の1以上と共に使用するための、操作された粘液腫ウイルスおよび医薬組成物に関係する。

【選択図】 図3

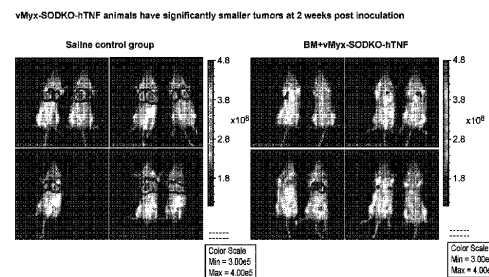


FIG. 3

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腫瘍壊死因子（TNF）タンパク質を発現するように操作された粘液腫ウイルス（MYXV）であって、前記MYXVが、ウサギ細胞指向性に関連する 1 以上の遺伝子における、またはそれに隣接する修飾を含む、粘液腫ウイルス。

【請求項 2】

前記TNFタンパク質は、TNF α タンパク質である、請求項 1 に記載の粘液腫ウイルス。

【請求項 3】

前記TNFタンパク質は、表面のTNFタンパク質である、請求項 2 に記載の粘液腫ウイルス。 10

【請求項 4】

前記TNFタンパク質は、可溶性TNFタンパク質である、請求項 2 に記載の粘液腫ウイルス。

【請求項 5】

前記TNFタンパク質は、ヒトTNFタンパク質である、請求項 1 に記載の粘液腫ウイルス。

【請求項 6】

前記ウサギ細胞指向性に関連する 1 以上の遺伝子は、M11L、M063、M135R、M136R、M-T2、M-T4、M-T5、またはM-T7を含む、請求項 1 に記載の粘液腫ウイルス。 20

【請求項 7】

前記MYXVは、M135R遺伝子の部分欠失または完全欠失を含む、請求項 1 に記載の粘液腫ウイルス。

【請求項 8】

前記MYXVは、M135R遺伝子の機能を害するM135R遺伝子の修飾を含む、請求項 1 に記載の粘液腫ウイルス。

【請求項 9】

前記TNFタンパク質は、前記MYXVゲノム内のM135R遺伝子と置き換わる、請求項 1 に記載の粘液腫ウイルス。 30

【請求項 10】

前記TNFタンパク質は、前記MYXVゲノム内の、M135R遺伝子とM136R遺伝子との間に挿入される、請求項 1 に記載の粘液腫ウイルス。

【請求項 11】

前記MYXVはさらに、蛍光タンパク質を含む、請求項 1 に記載の粘液腫ウイルス。

【請求項 12】

前記MYXVは、ローザンス株である、請求項 1 に記載の粘液腫ウイルス。

【請求項 13】

前記MYXVは、vMyx-M135KO-hTNFである、請求項 1 に記載の粘液腫ウイルス。 40

【請求項 14】

前記MYXVは、vMyx-hTNF-M135-136である、請求項 1 に記載の粘液腫ウイルス。

【請求項 15】

請求項 1-14 の粘液腫ウイルス、および薬学的に許容可能な賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 16】

前記医薬組成物は、全身投与のために製剤化される、請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記医薬組成物は、局所投与のために製剤化される、請求項 15 に記載の医薬組成物。 50

【請求項 18】

前記医薬組成物は、非経口的投与のために製剤化される、請求項 15－17 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

腫瘍壊死因子（TNF）タンパク質を発現するように操作された粘液腫ウイルス（MYXV）によって、エクスピボで処置された末梢血単核細胞（PBMC）、骨髓（BM）細胞、またはその組み合わせを含む組成物。

【請求項 20】

前記 MYXV は、請求項 1－14 の粘液腫ウイルスである、請求項 19 に記載の組成物。

10

【請求項 21】

前記 MYXV は、vMYX-SODKO-hTNF である、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 22】

前記 PBMC、BM 細胞、またはその組み合わせは、自己細胞を含む、請求項 19－21 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 23】

前記 PBMC、BM 細胞、またはその組み合わせは、異種ドナーから得られる、請求項 19－21 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 24】

被験体の癌を阻害するまたは処置する方法であって、被験体に、腫瘍壊死因子（TNF）タンパク質を発現するように操作された粘液腫ウイルス（MYXV）を投与する工程を含む、方法。

20

【請求項 25】

前記 MYXV は、請求項 1－14 の粘液腫ウイルスである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記 MYXV は、vMYX-SODKO-hTNF である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

被験体の癌を阻害するまたは処置する方法であって、被験体に請求項 15－23 の組成物を投与する工程を含む、方法。

30

【請求項 28】

前記 PBMC、BM 細胞、またはその組み合わせの表面上に、前記粘液腫ウイルスをエクスピボで吸着させる工程をさらに含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記 PBMC、BM 細胞、またはその組み合わせの表面上に前記粘液腫ウイルスを吸着させる前記工程は、前記粘液腫ウイルスの、前記 PBMC、BM 細胞、またはその組み合わせの表面への結合が可能な条件下で、前記 PBMC、BM 細胞、またはその組み合わせを、前記粘液腫ウイルスに曝露することを含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記条件は、約 4 °C から約 37 °C の温度を含む、請求項 29 に記載の方法。

40

【請求項 31】

前記条件は、約 20 °C から約 37 °C、約 20 °C から約 28 °、約 24 °C から約 26 °C、約 30 °C から約 37 °C、または約 35 °C から約 37 °C の温度を含む、請求項 29 または 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記条件は、少なくとも 5 分、10 分、15 分、20 分、30 分、1 時間、1.5 時間、2 時間、3 時間、4 時間、6 時間、8 時間、10 時間、12 時間、またはそれ以上のインキュベーション時間を含む、請求項 29－31 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 33】

前記 PBMC、BM 細胞、またはその組み合わせは、前記被験体または HLA 関連ドナ

50

一から得られる、請求項 2 7 - 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 4】

ウイルス吸着 P B M C、B M 細胞またはその組み合わせは、被験体に全身に投与される、請求項 2 7 - 3 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記癌は、固形腫瘍である、請求項 2 4 - 3 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記癌は、前記被験体の第 2 の部位へ転移している、請求項 2 4 - 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記第 2 の部位は、前記被験体の肺、脳、肝臓、および／またはリンパ節を含む、請求項 2 4 - 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記癌は、骨肉腫、トリプルネガティブ乳癌、または黒色腫を含む、請求項 2 4 - 3 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記被験体に、追加的治療剤を投与する工程をさらに含む、請求項 2 4 - 3 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記追加的治療剤は、免疫チェックポイントモジュレータである、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記追加的治療剤は、前記 M Y X V または前記組成物を投与する前に、前記被験体に投与される、請求項 3 9 または 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記追加的治療剤は、前記 M Y X V または前記組成物を投与した後に、前記被験体に投与される、請求項 3 9 または 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記追加的治療剤は、前記 M Y X V または前記組成物との組み合わせとして、前記被験体に投与される、請求項 3 9 - 4 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記被験体は、ヒトである、請求項 2 4 - 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記方法は、癌を患っている、または癌を患っていると疑われる被験体を選択する工程をさらに含む、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記粘液腫ウイルスは、欠陥がある先天的抗ウイルス反応を有する細胞に感染することができる、請求項 2 4 - 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記欠陥がある先天的抗ウイルス反応を有する細胞は、癌細胞を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記粘液腫ウイルスに感染した細胞は、T N F を発現する、請求項 2 4 - 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 9】

請求項 1 - 1 4 の粘液腫ウイルス、請求項 1 5 - 1 8 の医薬組成物、または請求項 1 9 - 2 3 の組成物を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

10

20

30

40

50

関連出願の相互参照

相互参照本出願は、本明細書で参照によって組み込まれる、2018年7月13日出願の米国仮特許出願第62/697,581号の利益を主張する。

【0002】

連邦政府後援研究に関する声明

本発明は、国立衛生研究所によって与えられたP50 CA186781に従って、政府支援によってなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

様々な型の癌を処置するために使用される現行の処置は、癌細胞を毒するまたは死滅させることによって機能する傾向がある。不運にも、癌細胞にとって有毒な処置は通常、正常細胞にとっても有毒である傾向がある。さらに、腫瘍の不均一な特質は、癌の有効な処置が、あてにならないままであることの主要な理由の1つである。化学療法や放射線療法などの、現行の主流療法は、毒性に関して狭い治療域内で使用される傾向がある。これらのタイプの治療法は、腫瘍細胞の型が異なるため、およびこれらの処置を投与し得る域が限定的であるために、適用範囲が限定的である鈍いツールであるとみなされている。

【発明の概要】

【0004】

ある実施形態で、TNFタンパク質を発現するように操作された粘液腫ウイルス(MYXV)を使用して、癌を阻害するまたは処置する方法が、本明細書で開示される。いくつかの実施形態で、TNF発現粘液腫ウイルスで処置された、単核末梢血細胞および/または骨髄細胞を使用して、癌を阻害するまたは処置する方法も、本明細書で説明される。追加的な実施形態で、本明細書で説明される方法の1以上と共に使用するための、操作された粘液腫ウイルスおよび医薬組成物が、本明細書に含まれ説明される。

【0005】

ある実施形態で、腫瘍壊死因子(TNF)タンパク質を発現するように操作された粘液腫ウイルス(MYXV)が開示され、ここでMYXVは、ウサギ細胞指向性(rabbit cell tropism)に関連する1以上の遺伝子における、またはそれに隣接する修飾を含む。いくつかの実施形態では、TNFタンパク質はTNF α タンパク質である。いくつかの実施形態では、TNFタンパク質は表面のTNFタンパク質である。いくつかの実施形態では、TNFタンパク質は可溶性TNFタンパク質である。いくつかの実施形態では、TNFタンパク質はヒトTNFタンパク質である。いくつかの実施形態では、ウサギ細胞指向性に関連する1以上の遺伝子は、M11L、M063、M135R、M136R、M-T2、M-T4、M-T5、またはM-T7を含む。いくつかの実施形態では、MYXVは、M135R遺伝子の部分欠失または完全欠失を含む。いくつかの実施形態では、MYXVは、M135R遺伝子の機能を害するM135R遺伝子の修飾を含む。いくつかの実施形態では、TNFタンパク質は、MYXVゲノム内のM135R遺伝子と置き換わる。いくつかの実施形態では、TNFタンパク質は、MYXVゲノム内のM135R遺伝子とM136R遺伝子との間に挿入される。いくつかの実施形態では、MYXVはさらに、蛍光タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、MYXVは、ローザンヌ株(Lausanne strain)である。いくつかの実施形態では、MYXVは、vMyx-M135KO-hTNFである。いくつかの実施形態では、MYXVは、vMyx-hTNF-M135-136である。

【0006】

ある実施形態で、本明細書に説明される粘液腫ウイルスを含む医薬組成物、および薬学的に許容可能な賦形剤が、本明細書で開示される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、全身投与のために製剤化される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、局所投与のために製剤化される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、非経口適用のために製剤化される。

【0007】

ある実施形態で、腫瘍壊死因子（TNF）タンパク質を発現するように操作された粘液腫ウイルス（MYXV）によって、エクスビボ（ex vivo）で処置された末梢血単核細胞（PBMC）、骨髄（BM）細胞、またはその組み合わせを含む組成物が、本明細書で開示される。いくつかの実施形態では、MYXVは、本明細書で説明される粘液腫ウイルスである。いくつかの実施形態では、MYXVは、vMYX-SODKO-hTNFである。いくつかの実施形態では、PBMC、BMセルまたはその組み合わせは、自己細胞を含む。いくつかの実施形態では、PBMC、BMセルまたはその組み合わせは、異種ドナーから得られる。

【0008】

ある実施形態で、被験体の癌を阻害するまたは処置する方法が、本明細書で開示され、当該方法は、被験体に、腫瘍壊死因子（TNF）タンパク質を発現するように操作された粘液腫ウイルス（MYXV）を投与する工程を含む。いくつかの実施形態では、MYXVは、本明細書で説明される粘液腫ウイルスである。いくつかの実施形態では、MYXVは、vMYX-SODKO-hTNFである。いくつかの実施形態では、癌は固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、癌は被験体の第2の部位へ転移している。いくつかの実施形態では、第2の部位は、被験体の肺、脳、肝臓、および／またはリンパ節を含む。いくつかの実施形態では、癌は、骨肉腫、トリプルネガティブ乳癌（triple negative breast cancer）、または黒色腫を含む。いくつかの実施形態では、方法はさらに、被験体に追加的治療剤を投与する工程を含む。いくつかの実施形態では、追加的治療剤は、免疫チェックポイントモジュレーター（immune checkpoint modulator）である。いくつかの実施形態では、追加的治療剤は、MYXVまたは組成物を投与する前に、被験体に投与される。いくつかの実施形態では、追加的治療剤は、MYXVまたは組成物を投与した後に、被験体に投与される。いくつかの実施形態では、追加的治療剤は、MYXVまたは組成物との組み合わせとして、被験体に投与される。いくつかの実施形態では、被験体はヒトである。いくつかの実施形態では、方法はさらに、癌を患っている、または癌患っていると疑われる被験体を選択する工程を含む。いくつかの実施形態では、粘液腫ウイルスは、欠陥がある先天的抗ウイルス反応を有する細胞に感染することができる。いくつかの実施形態では、欠陥がある先天的抗ウイルス反応を有する細胞は、癌細胞を含む。いくつかの実施形態では、粘液腫ウイルスに感染した細胞は、TNFを発現する。

【0009】

ある実施形態で、被験体の癌を阻害するまたは処置する方法が、本明細書で開示され、当該方法は、被験体に、本明細書で説明される組成物を投与する工程を含む。いくつかの実施形態では、方法はさらに、PBMC、BM細胞、またはその組み合わせの表面上に、粘液腫ウイルスをエクスビボで吸着させる工程を含む。いくつかの実施形態では、PBMC、BM細胞、あるいはその組み合わせの表面上に粘液腫ウイルスを吸着させる工程は、粘液腫ウイルスの、PBMC、BM細胞、あるいはその組み合わせの表面への結合が可能な条件下で、PBMC、BM細胞、あるいはその組み合わせを、粘液腫ウイルスに曝露することを含む。いくつかの実施形態では、条件として、約4°Cから約37°Cの温度が挙げられる。いくつかの実施形態では、条件として、約20°Cから約37°C、約20°Cから約28°C、約24°Cから約26°C、約30°Cから約37°C、または約35°Cから約37°Cの温度が挙げられる。いくつかの実施形態では、条件として、少なくとも5分、10分、15分、20分、30分、1時間、1.5時間、2時間、3時間、4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、またはそれ以上のインキュベーション時間が挙げられる。いくつかの実施形態では、PBMC、BM細胞、またはその組み合わせは、被験体またはHLA関連ドナーから得られる。いくつかの実施形態では、ウイルス吸着PBMC、BM細胞、またはその組み合わせは、被験体に全身に投与される。いくつかの実施形態では、癌は固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、癌は被験体の第2の部位へ転移している。いくつかの実施形態では、第2の部位は、被験体の肺、脳、肝臓、および／またはリンパ節を含む。いくつかの実施形態では、癌は、骨肉腫、トリプルネガテ

ィブ乳癌、または黒色腫を含む。いくつかの実施形態では、方法はさらに、被験体に追加的治療剤を投与する工程を含む。いくつかの実施形態では、追加的治療剤は、免疫チェックポイントモジュレータである。いくつかの実施形態では、追加的治療剤は、MYXVまたは組成物を投与する前に、被験体に投与される。いくつかの実施形態では、追加的治療剤は、MYXVまたは組成物を投与した後に、被験体に投与される。いくつかの実施形態では、追加的治療剤は、MYXVまたは組成物との組み合わせとして、被験体に投与される。いくつかの実施形態では、被験体はヒトである。いくつかの実施形態では、方法はさらに、癌を患っている、または癌を患っていると疑われる被験体を選択する工程を含む。いくつかの実施形態では、粘液腫ウイルスは、欠陥がある先天的抗ウイルス反応を有する細胞に感染することができる。いくつかの実施形態では、欠陥がある先天的抗ウイルス反応を有する細胞は、癌細胞を含む。いくつかの実施形態では、粘液腫ウイルスに感染した細胞は、TNFを発現する。

10

【0010】

ある実施形態で、本明細書で説明される粘液腫ウイルス、本明細書で説明される医薬組成物、または本明細書で説明される組成物を含むキットが、本明細書に開示される、

【図面の簡単な説明】

【0011】

本発明のある実施形態の新規的特徴は、添付の特許請求の範囲に詳細に明記される。本発明の特徴および利点のより良い理解は、本発明の原理が活用される例示の実施形態を明記する以下の詳述と、添付図面とを参照することによって得られるであろう。

20

【0012】

【図1】vMyx-SODKO-hTNF挿入プラスミドの遺伝子マップ、およびウイルスの構成の要旨を示す。このプラスミドは、vMyx-SODKO-hTNFウイルスの構成用にvMyx-LacZウイルスに感染させられる前に、RK-13細胞の遺伝子導入のために使用された。

【図2A】図2Aと図2Bは、2つの異なる操作されたMYXVの遺伝子マップを示す。図2Aは、vMyx-135KO-hTNF挿入プラスミドの遺伝子マップ、および組み換え粘液腫ウイルスの遺伝子マップの要旨を示す。このウイルスが、ウイルス性M135R遺伝子ノックアウト(knockout)を有することに、注意が必要である。各プラスミドは、vMyx-M135KO-hTNF(図2A)およびvMyx-hTNF-(M135-136)(図2B)それぞれの構成のための、親の野生型vMyx-Lauによる感染前に、RK-13細胞のトランスフェクションのために使用された。

30

【図2B】図2Aと図2Bは、2つの異なる操作されたMYXVの遺伝子マップを示す。図2Bは、vMyx-hTNF-(M135-136)挿入プラスミドの遺伝子マップ、およびこの組み換え粘液腫ウイルスの構成の要旨を示す。このウイルスは、TNF導入遺伝子がウイルス性M135RとM136R遺伝子との間の遺伝子間遺伝子座に挿入されているので、野生型MYXVバックボーンを有し、それゆえ、遺伝子ノックアウトを有していないことに、注意が必要である。各プラスミドは、vMyx-M135KO-hTNF(図2A)およびvMyx-hTNF-(M135-136)(図2B)それぞれの構成のための、親の野生型vMyx-Lauによる感染前に、RK-13細胞のトランスフェクションのために使用された。

40

【図3】K7M2-Luc腫瘍植え付け後2週間の、Balb/cマウスの画像のセットである。未処置の動物は、肺に進行した腫瘍を示す(左)が、一方でvMyx-SODKO-hTNFで処置された動物は、著しくより小さな腫瘍を示す(右)。動物は、0日目に、 2×10^6 K7M2-Luc細胞を植え付けられ、処置前にvMyx-SODKO-hTNFに1時間感染させられた 4×10^6 エクスビボBMで処置された。動物はその後、2週目に、ルシフェリンIPの接種を受け、IVIS撮像システムを使用して画像撮影された。腫瘍発光が、すべての動物について計算されそして標準化された。

【図4】hTNFを発現する粘液腫ウイルス(MYXV)が負荷された骨髄が、他のMYXV構築物と比較して、優れた腫瘍溶解能力を有することを示すグラフである。カプラン

50

ーマイアー生存率曲線は、 $vMyx-SODKO-hTNF$ が、対照コホートと比較して平均生存率を著しく上げることが試験で確認された、唯一のMYXV構築物であることを示す。動物は、0日目に、 2×10^6 K7M2-luc細胞を植え付けられ、処置前にそれぞれのMYXV構築物に1時間感染させられたエクスピボ骨髓で処置された。動物はその後、安楽死基準が満たされるまで、疾患の進行についてモニタリングされた。植え付け後8週目に、全ての生存動物は安楽死させられた。

【図5】2週間の間隔をあけて撮影された、未処置の対照群（左画像）と $vMyx-SODKO-hTNF$ ウイルスで処置された動物（右画像）との間の腫瘍の進行の違いを示す、画像の2セットである。動物は、0日目に、 2×10^6 K7M2-luc細胞を植え付けられ、処置前に $vMyx-SODKO-hTNF$ に1時間感染させられた 4×10^6 エクスピボPBMCで処置された。動物はその後、3週目と5週目に、ルシフェリンIPの接種を受け、IVIS撮像システムを使用して画像撮影された。腫瘍発光が、すべての動物について計算されそして標準化された。

【図6】エクスピボで $vMyx-SODKO-hTNF$ が負荷されたPBMCの用量反応生存率を示すグラフである。 $vMyx-SODKO-hTNF$ が負荷されたBalb/c PBMCの漸次的に増加する用量で処置されたBalb/cマウスは、未処置の対照群よりも著しく長命である。動物は、0日目に、 2×10^6 K7M2-luc細胞を植え付けられ、処置前にそれぞれのMYXV構築物に1時間感染させられたエクスピボPBMCで処置された。動物はその後、安楽死基準が満たされるまで、疾患の進行についてモニタリングされた。

【図7】 $vMyx-SODKO-hTNF$ で感染させられた細胞が、48hpiで、細胞表面でhTNFを発現する（灰色と緑色）一方で、対照細胞がhTNFについては陰性（ピンク色と紫色）であることを示すフローサイトメトリーデータのセットである。細胞は、実験的に、 $vMyx-SODKO-hTNF$ に48時間感染させられた。48hpiで、細胞は非酵素分離バッファを使用して持ち上げられ、そして数えられた。細胞はその後、マウス抗ヒトhTNF PEコンジュゲート抗体を使用して染色され、そしてフローサイトメーターを使用して分析された。

【図8】 $vMyx-SODKO-hTNF$ からのTNF発現が、hTNFを発現しない対照 $vMyx-M135KO$ ウイルスと比較して、K7M2-luc骨肉腫細胞株における細胞死の増加を引き起こさないことを確認する、SYTOXオレンジを用いた、細胞死分析のグラフのセットである。細胞は、実験的に、 $vMyx-M135KO$ ウイルス、または $vMyx-SODKO-hTNF$ ウイルスに感染させられたか、あるいはTNFで処置された。細胞はその後、感染後および処置後、24時間および48時間インキュベートされることが許可された。細胞はその後、SYTOXオレンジで染色され、そして蛍光性細胞のパーセントについて数えられた。各ウェル（well）細胞の平均数も、各時点および処置について数えられた。

【図9】フローサイトメトリーを使用した、感染したヒトAML（THP1）細胞の細胞死の定量化を、例示する。MYXV媒介の総THP1細胞の死滅は、生/死染色（Live/Dead staining）を用いた細胞上のゲーティングによってAPC/Cy7⁺であったと定義される、細胞の固形群から判定された。重要性（* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$ ）は、多重比較用のHolm-Sidak t検定（Holm-Sidak's t test）を使用して判定された。結果は、THP-1細胞の $vMyx-SODKO-hTNF-GFP$ への感染が、感染後の両時間（24時間および48時間）で、3検定による感染の多重性（multiplicities of infection）（MOI = 10、1、または0.1）で、ゲートされた死細胞の数の全面的な増加を引き起こしたことを示す。

【図10】フローサイトメトリーを使用して、ウイルス感染したヒトAML（THP1）細胞の、MYXV媒介性のON標的（ON-Target）死滅の定量化を、例示する。THP1細胞のMYXV媒介性の「ON標的」は、GFP陽性のウイルス感染した細胞の固形群からゲートされた、APC/Cy7⁺であった細胞の割合から判定された。重要性

10

20

30

40

50

($* = p < 0.05$; $** = p < 0.01$; $*** = p < 0.001$) は、多重比較用の Holm-Sidak t 検定を使用して判定された。

【図 1 1】フローサイトメトリーを使用して、MYXV 誘導の OFF 標的 (OFF-Target) が死滅させるウイルス感染していないヒト AML (THP1) 細胞の定量化を、例示する。MYXV 媒介の OFF 標的 (OFF-Target) が死滅させる THP1 細胞は、GFP 陰性の細胞の固形群からゲート化された、APC/Cy7⁺であった細胞の割合から判定された。重要性 ($* = p < 0.05$; $** = p < 0.01$; $*** = p < 0.001$) は、多重比較用の Holm-Sidak t 検定を使用して判定された。

【図 1 2】フローサイトメトリーを使用した、感染したヒト多発性骨髄腫 (Multiple Myeloma) (U266) 細胞の細胞死の定量化を、例示する。MYXV 媒介の総 U266 の死滅は、APC/Cy7⁺だった細胞の固形群から判定された。重要性 ($* = p < 0.05$; $** = p < 0.01$; $*** = p < 0.001$) は、多重比較用の Holm-Sidak t 検定を使用して判定された。

【図 1 3 A】免疫適格のマウスにあらかじめ植え付けられたマウス多発性骨髄腫を除去するために、エクスピボで負荷された同系のマウス骨髄白血球を介して送達された vMyx-SODKO-hTNF の、試験を示す。図 1 3 A は、耐ボルテゾミブ VK*12598 骨髄腫細胞を使用するインビボデータを示し、ここで、細胞はほとんどが骨髄と脾臓に遊走する。生存率曲線は、癌移植後 100 日後に作成された (図 1 3 B)。図 1 3 C は、生存率のパーセントに相当する。

【図 1 3 B】免疫適格のマウスにあらかじめ植え付けられたマウス多発性骨髄腫を除去するために、エクスピボで負荷された同系のマウス骨髄白血球を介して送達された vMyx-SODKO-hTNF の、試験を示す。図 1 3 A は、耐ボルテゾミブ VK*12598 骨髄腫細胞を使用するインビボデータを示し、ここで、細胞はほとんどが骨髄と脾臓に遊走する。生存率曲線は、癌移植後 100 日後に作成された (図 1 3 B)。図 1 3 C は、生存率のパーセントに相当する。

【図 1 3 C】免疫適格のマウスにあらかじめ植え付けられたマウス多発性骨髄腫を除去するために、エクスピボで負荷された同系のマウス骨髄白血球を介して送達された vMyx-SODKO-hTNF の、試験を示す。図 1 3 A は、耐ボルテゾミブ VK*12598 骨髄腫細胞を使用するインビボデータを示し、ここで、細胞はほとんどが骨髄と脾臓に遊走する。生存率曲線は、癌移植後 100 日後に作成された (図 1 3 B)。図 1 3 C は、生存率のパーセントに相当する。

【図 1 4 A】SMAc 擬態または免疫チェックポイント阻害剤のいずれかと、BM 白血球にエクスピボで事前負荷された vMyx-hTNF-(M135-M136) との併用療法を示す。併用療法は、SMAc 擬態化合物 LCL161 (50 mg/kg)、またはチェックポイント阻害剤の単クローン性抗体 (mAb) α -muPD-1 で、エクスピボで事前負荷された自己のマウス骨髄白血球を介して送達された vMyx-hTNF-(M135-M136) と組み合わせられて、試験された (図 1 4 A)。図 1 4 B は、生存率曲線を含むインビボデータを示す。図 1 4 C は、生存率のパーセントを記載する。

【図 1 4 B】SMAc 擬態または免疫チェックポイント阻害剤のいずれかと、BM 白血球にエクスピボで事前負荷された vMyx-hTNF-(M135-M136) との併用療法を示す。併用療法は、SMAc 擬態化合物 LCL161 (50 mg/kg)、またはチェックポイント阻害剤の単クローン性抗体 (mAb) α -muPD-1 で、エクスピボで事前負荷された自己のマウス骨髄白血球を介して送達された vMyx-hTNF-(M135-M136) と組み合わせられて、試験された (図 1 4 A)。図 1 4 B は、生存率曲線を含むインビボデータを示す。図 1 4 C は、生存率のパーセントを記載する。

【図 1 4 C】SMAc 擬態または免疫チェックポイント阻害剤のいずれかと、BM 白血球にエクスピボで事前負荷された vMyx-hTNF-(M135-M136) との併用療法を示す。併用療法は、SMAc 擬態化合物 LCL161 (50 mg/kg)、またはチェックポイント阻害剤の単クローン性抗体 (mAb) α -muPD-1 で、エクスピボで事前負荷された自己のマウス骨髄白血球を介して送達された vMyx-hTNF-(M1

10

20

30

40

50

35-M136)と組み合わされて、試験された(図14A)。図14Bは、生存率曲線を含むインビボデータを示す。図14Cは、生存率のパーセントを記載する。

【図15】vMyx-hTNF-(M135-136)に感染したヒト細胞からの、ヒトTNFタンパク質発現および部分的分泌を示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

特定の術語彙

【0014】

他に明記がない限り、技術用語は従来の使用法に従って使用される。分子生物学の一般用語の定義は、Benjamin Lewin, Genes V, Oxford University Press 発刊, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd. 発刊, 1994 (ISBN 0-632-02182-9); および、Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, VCR Publishers, Inc. 発刊, 1995 (ISBN 1-56081-569-8)、に見つけら得る。

【0015】

他に説明が無いかぎり、本明細書に使用される技術的および科学的用語はすべて、本開示が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を持つ。本明細書に説明されるものに類似する、または、等価である方法および材料が、本開示の実施または試験において使用され得るが、適切な方法および材料が以下に説明される。加えて、材料、方法および例は例示のみであり、限定的であることを意図されていない。

【0016】

本明細書における「いくつかの実施形態」、「ある実施形態」、「一実施形態」、または「他の実施形態」の言及は、実施形態に関連して説明される、特定の特徵、構造、または特性が、本発明の、少なくともいくつかの実施形態に含まれるが、必ずしもすべての実施形態に含まれないことを意味する。

【0017】

本明細書に使用されるセクションの見出しは、構成上の目的のためのものに過ぎず、記載される主題を限定するものと解釈されてはならない。

【0018】

以下の用語および方法の説明は、本発明の化合物、組成物および方法をよりよく説明し、そして本開示の実践において当業者を導くために提供される。また、本開示で使用される用語は、特定の実施形態および例を説明することのみを目的としており、限定的であることが意図されていないことも、理解されたい。

【0019】

本明細書で使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈が明らかにそうでない旨を示さない限り、複数形も含むことが意図されている。

【0020】

本明細書で使用される場合、範囲および量は、特定の値または範囲の「約(about)」として表されることが可能である。「約」には丁度の量も含まれる。したがって、「約5 μ L」は、「約5 μ L」と、さらに「5 μ L」を意味する。一般に、「約」という用語には、実験誤差内であると予期される量が含まれる。

【0021】

本明細書で使用される場合、「および/または(and/or)」という用語は、関連する列挙された項目の1以上の、任意のおよびすべての可能な組み合わせ、ならびに代替的な(「または」)で解釈される場合の組み合わせの不在を指し、そして包含する。

【0022】

本明細書で使用される場合、「1以上(one or more)」または少なくとも1つは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上で任意の数までを意味し得る。

【0023】

本明細書で使用される場合、「含む(comprises)」という用語は、「含む(includes)」を意味する。したがって、「AまたはBを含む(comprising A or B)」は、A、B、またはAとBを含むことを意味する。

【0024】

「有効な量」または「治療上有効な量」は、望ましい効果を生み出すのに十分な、本発明の化合物または組成物の量を指し、望ましい効果とは治療的効果および／または有益な効果であり得る。有効な量は、当業者の知識および専門技能の範囲内において、被験体の年齢、常態、処置されている疾患の重症度、投与される特定の薬剤、処置の期間、任意の同時処置の性質、使用される薬学的に許容可能な担体、および同様の要因によって変化するだろう。必要に応じて、任意の個々の場合における有効な量または治療的に有効な量は、関連するテキストおよび文献を参照することによって、および／または日常の実験を使用することによって、当業者によって決定され得る。(例えば、Remington、The Science and Practice of Pharmacy (最新版)を参照)。

【0025】

本明細書で使用される場合、「被験体(subject)」および「患者(patient)」という用語は、本明細書で交換可能に使用され、ヒトおよび非ヒト動物の両方を指す。本開示の「非ヒト動物(nonhuman animals)」という用語は、すべての脊椎動物を含み、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、げっ歯類(例えば、マウス、ラット等)などの、哺乳類と非哺乳類である。好ましくは、被験体はヒトの患者である。特別の実施形態では、この開示の被験体は、ヒト被験体である。

【0026】

本明細書で使用される「細胞(cell)」という用語は、単一の細胞、ならびに細胞の複数または固形群を含む。薬剤を細胞に投与または曝露する工程は、インビトロ投与とインビボ投与の両方を含み得る。

【0027】

「それを必要とする被験体(subject in need thereof)」または「必要とする被験体(a subject in need of)」は、固形腫瘍などの癌を有することが知られている、またはその疑いがある被験体である。

【0028】

本明細書で使用される場合、「癌」という用語は、分化の喪失、増殖の速度上昇、周囲組織の浸潤を伴う特徴的な癌形成を経て、かつ転移することができる、悪性新生物を指す。

【0029】

残存癌は、癌を小さくするまたは根絶するために被験体に与えられた任意の形態の処置の後に、被験体に残る癌である。転移性癌は、転移性癌が由来する元の(原発性)癌の起源の部位とは別の、例えば第2の部位である、身体の1以上の部位にある癌である。局所再発は、元の癌と(同じ組織内などの)同じ部位またはその近くでの、癌の再発である。

【0030】

肉腫と癌などの固形癌の例としては、繊維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、骨原性肉腫および他の肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、リンパ性悪性疾患、膵臓癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、肝細胞癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、髄様癌、気管支原生癌、腎細胞癌、肝臓癌、胆管癌、絨毛癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、膀胱癌、およびCNS腫瘍(神経膠腫、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、

10

20

30

40

50

神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫など）が挙げられる。

【0031】

血液の癌の例としては、骨髄腫、リンパ腫、および白血病が挙げられる。いくつかの例では、例示的な血液の癌は、B細胞またはT細胞の血液の癌を含む。いくつかの場合では、例示的な血液の癌は、ホジキンリンパ腫（Hodgkin's lymphoma）または非ホジキンリンパ腫（non-Hodgkin's lymphoma）を含む。

【0032】

本明細書に使用される場合、「化学療法剤」という用語は、異常な細胞増殖によって特徴付けられる疾患の処置において治療的有用性を有する、任意の化学剤を指す。そのような疾患としては、腫瘍、新生物、および癌、ならびに、乾癬などの肥厚増殖によって特徴付けられる疾患が挙げられる。一実施形態では、化学療法薬剤は、抗新生物剤などの、癌を処置する際に役立つ薬剤である。一実施形態では、化学療法薬剤は、放射性化合物である。当業者は、役立つ化学療法薬剤を容易に特定することができる（例えば、Slapak and Kufe, Principles of Cancer Therapy, Chapter 86 in Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th edition; Perry et al., Chemotherapy, Ch. 17 in Abeloff, Clinical Oncology 2nd ed., 2000 Churchill Livingstone, Inc; Baltzer and Berkery. (eds): Oncology Pocket Guide to Chemotherapy, 2nd ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer Knobf, and Durivage (eds): The Cancer Chemotherapy Handbook, 4th ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993. を参照。）併用化学療法は、癌を処置するための1を超える薬剤の投与である。TNFを発現する粘液腫ウイルスや、1以上の他の化学療法薬剤などで、同時に、または時間内に任意の順序で投与され得る。

【0033】

本明細書で使用される場合、癌などの「疾患を阻害するまたは処置する（inhibiting or treating a disease）」という用語は、疾患または疾病の完全な発症を阻害することを指す。「処置（treatment）」は、疾患または病的状態の徴候または症状を、それが発症し始めた後に改善する、治療的介入を指す。疾患または病的状態に関連する「改善すること（ameliorating）」という用語は、処置に関する、任意の観察可能な有益な効果を指す。有益な効果は、例えば、感受性のある被験体における疾患の臨床症状の発症の遅延、疾患の一部またはすべての臨床症状の重症度の低下、例えば転移などの疾患のより遅い進行、被験体の全体的な健康または健康性の改善、あるいは特定の疾患に特有である当該技術分野で周知の他のパラメータによって、証明され得る。「予防的」処置は、例えば転移性癌などの、病状を発症するリスクを低減する目的で、疾患の兆候を示さない、または初期の兆候のみを示す被験体に投与される処置である。

【0034】

本明細書で使用される場合、本明細書で開示される治療用化合物と併用して有益である「薬学的に許容可能な担体」は、従来のものである。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 19th Edition (1995) は、治療剤の薬学的送達に適している組成物および製剤を説明する。

【0035】

一般に、担体の性質は、採用されている投与の特定の様式によって決まるであろう。例えば、非経口製剤は、通常、ビヒクルとして、水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水性デキ

10

20

30

40

50

ストロース、グリセロールなどの薬学および生理学的に許容可能な流体を含む、注入可能な流体を含有する。固形組成物（例えば、粉末、ピル、錠剤、またはカプセルの形態）については、従来の無毒の固形担体は、例えば医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、またはマグネシウムステアレートを含み得る。生物学的に中性の担体に加えて、投与されるべき医薬組成物は、湿潤剤または乳化剤、保存料、pH緩衝剤、および、例えばソジウムアセテート（sodium acetate）またはソルビタンモノラウレート（sorbitan monolaurate）などの同様物などの、少量の非毒性補助物質を含み得る。

【0036】

本明細書で使用される場合、「医薬品」および「治療剤」という用語は、被験体または細胞に適切に投与されたときに、望ましい治療的または予防的効果を誘発することができる化合物または組成物を指す。

【0037】

本明細書で使用される場合、「腫瘍」という用語は新生物の生成を指し、それは過剰な細胞分裂に起因する組織の異常増殖である。周囲の組織に浸潤する、および／または転移し得る腫瘍は、「悪性」と呼ばれる。新生物は増殖性障害の一例である。

【0038】

本明細書で使用される場合、「複製能力のある」という用語は、特定の宿主細胞内で感染および複製することができるウイルスを指す。

【0039】

序論

肺および他の器官に転移する癌は、基礎的および臨床的な癌研究において、大きな挑戦を意味する。肺転移を処置するこれまでの能力は困難を極めており、骨肉腫、黒色腫、および乳癌などの癌は全て、5年生存率は現行の治療で25%に満たない。現行の治療パラダイムは、古典的な放射線療法、化学療法、および標的治療の混和であるが、すべての腫瘍に有効な処置は1つも無い。癌処置のための潜在的な「特効薬」として以前に売り込まれた1つの療法は、腫瘍壊死因子（TNF）である。1世紀以上前のWilliam Coleyによる最初の発見、および数十年後の分子的特性化以来、TNFは、興味を引くが、謎に満ちた抗癌試薬および免疫調節因子であることが示されて来た。TNFの、局所的に処置された腫瘍と遠位に単離された腫瘍の両方における使用、および全身処置としての使用に関する研究は、深刻な毒性と低い抗腫瘍反応率を明らかにした。実際に、いくつかの研究では、TNF単独の全身投与が、ある癌では腫瘍の増殖を促進し得ることも分かった。

【0040】

TNF（TNF α 、cachexinまたはカケクチンとも呼ばれる）は、炎症性の免疫反応の不可欠な部分であるサイトカインである（（Coley, WB. 2015 The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. Am. J. Med. Sci. 105, 487-511（1893））。TNFは主に細胞表面免疫リガンドとして発現するが、可溶性リガンドの切断と放出を促進する変換酵素を発現する細胞、例えば骨髓細胞系列で発現すると、可溶性サイトカインとして分泌され得る。文書に記録されている1つのTNFエフェクター経路は、TNF受容体-1（TNFR1）経路による細胞死の誘導であり、具体的な標的細胞内の下流の効果によってアポトーシスまたはネクロトーシスにつながる（Moriwaki K, Bertin J, Gough P, Orłowski G, Chan FK. 2016. Differential roles of RIPK1 and RIPK3 in TNF-induced necroptosis and chemotherapeutic agent-induced cell death. Cell death & disease 6:e1636）。TNFはまた、例えば、抗腫瘍のCD8+T細胞

とNK細胞を活性化させることによって、先天的および適応的免疫反応の活性剤にもなる (Kashii, Y, Giorda, R, Herberman, R. B., Whiteside, T. L. Vujanovic, N. L. Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J. Immunol.* 163, 5358–5366; Prevost-Blondel, A, Roth, E., Rosenthal, F. Pircher, H. 2000 Crucial role of TNF- α in CD8 cell-mediated elimination of 3LL-A9 Lewis lung carcinoma cells in vivo. *J. Immunol.* 164, 3645–3651)。TNFは、もともとは、潜在的な抗腫瘍特効薬として考えられていた。マウス内にTNFを全身注射する予備試験が、この楽観論を裏付けられると思われたが、研究室から臨床現場へ移行すると、TNFは、免疫系の活性化因子であるだけでなく、可溶性リガンドで全身に処置された患者に、深刻な全身性毒性を引き起こし得ることが示された。研究は、この全身性TNF処置が、マウスモデルで観察された同等の抗腫瘍効果を患者において引き起こさなかったことをも示した (Balkwill, F. Tumor necrosis factor and cancer. 2009 *Nature Reviews Cancer* 9, 361)。

【0041】

腫瘍可溶性のウイルス療法は、実行可能な処置戦略として再出現した。(Russell SJ, Peng K-W, Bell JC. 2012. Oncolytic virotherapy. *Nature biotechnology* 30:658–670)。癌を処置するために腫瘍溶解性のウイルス療法を利用することは、アイデアとしては1世紀以上前から存在するが、それが、標準治療が効かないヒトの腫瘍の処置のためのより実現可能な手法に徐々になってきたのは、ここ20年程にすぎない。(Kelly E, Russell SJ. 2007. History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Molecular Therapy* 15:651–659)。

【0042】

腫瘍溶解性ウイルスは、形質転換された癌細胞を、選択的に感染および死滅させるそれらの能力のために、そしてウイルスだけでなく腫瘍抗原に対する宿主免疫系を活性化するそれらの能力によって、設計および／または選択される哺乳類のウイルスである。(Lichty BD, Breitbach CJ, Stojdl DF, Bell JC. 2014. Going viral with cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 14:559–567)。粘液腫ウイルス(MYXV)は、ポックスウイルスファミリーおよびレポリポックスウイルス属のメンバーである。(Chan WM, Rahman MM, McFadden G. 2013. Oncolytic Myxoma virus: the path to clinic. *Vaccine* 31:4252–4258; Chan WM, McFadden G. 2014. Oncolytic poxviruses. *Annual review of virology* 1:191–214)。自然界において、MYXVはウサギに特異的であり、ヒトまたはマウスに感染または疾患を引き起こさない。しかし、発癌に関連する癌経路の突然変異という性質が原因で、マウスおよびヒトからの、すべてでは無いにしてもほとんどの癌細胞は常に、MYXVを含む多くのウイルスによる感染に抵抗するという先天的能力の要素を失う。(Chan WM, McFadden G. 2014. Oncolytic poxviruses. *Annual review of virology* 1:191–214; Sypula J, Wang F, Ma Y, Bell J, McFadden G. 2004. Myxoma virus tropism in h

uman tumor cells. Gene Ther Mol Biol 8:103-114)。この系における生態の別の特徴は、複数の治療用の導入遺伝子による遺伝子操作を可能にする、大きく、かつ遺伝学的に安定したボックスウイルスゲノムである。(Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA. 2012. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. Advanced biomedical research 1)。本明細書に開示される場合、免疫調節および／または細胞死の異なる形態を調節するMYXV遺伝子は、随意に除去され、治療的抗癌導入遺伝子が導入され、免疫原性の増加を誘発し、および／または癌細胞死の好ましい形態を誘発する。

【0043】

10

操作された粘液腫ウイルスおよび使用の方法

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、外因性TNFタンパク質をコードする操作された粘液腫ウイルスを含む。いくつかの例では、粘液腫ウイルスは、ウサギ細胞指向性に関連する1以上の遺伝子における、またはそれに隣接する修飾を含む。いくつかの例では、ウサギ細胞指向性に関連する1以上の遺伝子は、M11L、M063、M135R、M136R、M-T2、M-T4、M-T5、またはM-T7を含む。いくつかの例では、ウサギ細胞指向性に関連する1以上の遺伝子は、M135R、M136R、またはその組み合わせを含む。

【0044】

20

いくつかの例では、本明細書に開示されるのは、TNFタンパク質を発現するように操作された、操作された粘液腫ウイルス(MYXV)を含み、ここでMYXVはM135R遺伝子の修飾を含む。いくつかの例では、修飾は、M135R遺伝子によってコードされたタンパク質の機能を害する欠失である。いくつかの場合では、修飾は、M135R遺伝子の部分欠失(例えば10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%の欠失)である。他の場合では、修飾は、M135R遺伝子の完全欠失である。追加的な場合では、修飾は、M135R遺伝子のTNFタンパク質による置換である。さらなる場合では、操作されたMYXVは、vMyx-M135KO-hTNFである。別のさらなる場合では、操作されたMYXVは、図2Aで示されるようなvMyx-M135KO-hTNFである。

【0045】

30

いくつかの例では、本明細書に開示されるのは、TNFタンパク質を発現するように操作された、操作された粘液腫ウイルス(MYXV)を含み、ここでTNFタンパク質は、MYXVゲノム内のM135R遺伝子とM136R遺伝子との間に挿入される。いくつかの例では、操作されたMYXVは、vMyx-hTNF-M135-136である。いくつかの例では、操作されたMYXVは、図2Bに示されるような、vMyx-hTNF-M135-136である。

【0046】

40

いくつかの例では、TNFタンパク質は、少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%、例えば95%と98%の間、95%と99%の間、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を含む、配列の同一性を含み、あるいは、UniProtKB-P01375に示されるような配列を含み、それは2019年7月3日(エントリーバージョン247)に公表され、そして参照によって本明細書に組み込まれる。いくつかの例では、TNFタンパク質は、UniProtKB-P01375の残基77-233と、少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%、例えば95%と98%の間、95%と99%の間、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を含む、配列の同一性を含む可溶性TNFである。いくつかの場合では、可溶性TNFは、UniProtKB-P01375の残基77-233を含む。

【0047】

50

いくつかの場合では、TNFタンパク質を含む操作されたMYXVは、蛍光タンパク質

をさらに含む。例示的な蛍光タンパク質は、TagBFP、アジュライト (Azurite)、Sirius、またはサファイア (Sapphire) などのブルー／UVタンパク質；ECFP、セルリアン (cerulean)、またはmTurquoiseなどのシアンタンパク質；緑色蛍光タンパク質 (GFP)、エメラルド (Emerald)、mUKG、mWasabi、またはクローバ (Clover) などのグリーンタンパク質；EYFP、レモン色 (citrine)、ビーナス (venus)、またはSYFP2などのイエロータンパク質；monomeric Kusabira-Orange、mKO2、またはmOrangeなどのオレンジタンパク質；mRaspberrym mCherry、mStrawberry、mTangerine、tdTomato、mApple、またはmRubyなどのレッドタンパク質；PA-GFP、PAmCherry1、またはPATagRFPなどの、光活性可能タンパク質 (photoactivatable proteins)；およびDropnaなどの、光スイッチ可能タンパク質 (photoswitchable proteins)、を含む。

【0048】

ある実施形態では、さらに本明細書に説明されるのは、誘発されたTNF発現（例えば膜貫通TNFタンパク質または可溶性TNFタンパク質）を、腫瘍溶解性粘液腫ウイルス (MYXV) と組み合わせて使用する癌処置の方法である。上に議論されるように、分泌されたTNFは、抗腫瘍分子であることが示されているが、それは、その小さな治療域と深刻な副作用によって、全身への使用には向かない。さらに、腫瘍溶解性MYXVは、幅広い種類の腫瘍型に対して広範な指向性を有する、腫瘍に特異的な抗腫瘍薬剤であることが示されている。いくつかの場合では、本明細書に開示されるのは、例えばウイルス感染の腫瘍細胞表面で、つまり感染細胞の表面で、または分泌バージョンとして、hTNFを発現するように修飾されたMYXVである。本明細書に開示される結果を達成するために、腫瘍溶解性MYXVは、強力なウイルスに特異的なプロモータの下で、ウイルス感染細胞において発現される免疫リガンドとして、組み換えMYXV構築物からのヒトTNF（一般にvMyx-hTNFと呼ばれる）を発現するように操作されても良い。TNFのMYXVベースの発現の利点は、リガンドが、ウイルス感染腫瘍組織でのみ、かつ、可溶性TNFリガンドの全身送達で観察された深刻な副作用を除去する低量で、発現されることである。

【0049】

いくつかの例では、粘液腫ウイルスゲノムは、当業者に周知の標準分子生物技術を使用して、1以上の治療用導入遺伝子を発現するように容易に修飾され、例えば、Sambrook et al. ((2001) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press) に説明される。当業者であれば、ウイルスが、例えば複製可能なウイルスを提供するために、生産的な感染を継続できるようにするためには、粘液腫ウイルスゲノムのどの部分を除去したら良いのかを、容易に判定できるであろう。例えば、除去できるウイルスゲノムの非本質的な領域は、公開されているウイルスゲノム配列を、他の十分に特徴付けられたウイルスのゲノムと比較することで、推定することができる。（例えば、C. Cameron, S. Hota-Mitchell, L. Chen, J. Barrett, J.-X. Cao, C. Macaulay, D. Willer, D. Evans, and G. McFadden, Virology (1999) 264: 298-318) を参照）。そのため、本開示の態様は、被験体の癌を阻害するおよび／または処置するための方法に関する。ある実施形態では、方法は、ヒト被験体などの被験体に、腫瘍壊死因子 (TNF)（例えば膜貫通TNFタンパク質または可溶性TNFタンパク質）を発現させるMYXVを投与する工程を含み、それによって被験体の癌を処置するおよび／または阻害する。ある実施形態では、MYXVは、vMyx-M135KO-hTNFを含む。ある実施形態では、MYXVは、Myx-hTNF-M135-136を含む。ある実施形態では、MYXVは、vMYX-SODKO-hTNFを含む。ある実施形態では、被

10

20

30

40

50

験体はヒト被験体である。ある実施形態では、方法は、癌を患っている、または癌を患っていると疑われる、ヒト被験体などの、被験体を選択する工程をさらに含む。ある実施形態では、MYXVは、全身に投与される。ある実施形態では、MYXVは、腫瘍および／または転移の部位で投与される。MYXVは、欠陥がある先天的抗ウイルス反応を有する細胞を感染させることが、示されている。本明細書に使用される場合、「欠陥がある先天的抗ウイルス反応」とは、ウイルスに曝露された時、またはウイルスによる侵入を受けた時に、抗ウイルス防御メカニズムを誘発しない細胞を指し、抗ウイルス防御メカニズムとは、ウイルス複製の阻害、インターフェロンの生成、インターフェロン反応経路の誘導、およびアポトーシスを含む。当該用語は、例えば非感染細胞または非癌細胞などの正常細胞と比較して、ウイルスへの曝露、またはウイルスによる感染時に、先天的抗ウイルス反応が少ない、またはそれに欠陥がある、癌細胞などの細胞を含む。これは、インターフェロンに反応しない細胞、および、アポトーシスに関連する反応またはアポトーシス経路の誘導が少ない、またはそれらに欠陥がある細胞を含む。当該欠陥は、感染、遺伝的欠陥、または環境ストレスを含む様々な原因によって引き起こされ得る。しかし、当該欠陥が存在する感染によって引き起こされる場合には、MYXVによる重複感染が除外され得ることが理解され、そして、当業者はそのような例を容易に識別することができる。当業者は、任意の所与の細胞型が、欠陥がある先天的抗ウイルス反応を有し、それゆえにMYXVに感染しているのか否かを、過度の実験無しに、容易に判定することができる。そのため、方法のある実施形態では、MYXVは、欠陥がある先天的抗ウイルス反応を有する細胞を感染させることができる。一実施形態では、細胞は、インターフェロンに反応しない。具体的な実施形態では、細胞は、哺乳類の癌細胞である。一実施形態では、細胞は、ヒトの固形腫瘍細胞を含むヒト癌細胞である。

10

20

【0050】

MYXVは、複製能力を有する、ボックスウイルスのレポリボックスウイルス種に属する任意のウイルスであっても良い。MYXVは、MYXVの野生型株であっても良く、または、MYXVの遺伝子的に修飾された株であっても良い。いくつかの例では、MYXVは、ローザンヌ株である。いくつかの例では、MYXVは、*Sylvilagus brasiliensis*において広く知られている、南アメリカMYXV株（South American MYXV strain）である。いくつかの例では、MYXVは、*Sylvilagus bachmani*において広く知られている、カリフォルニアMYXV株（Californian MYXV strain）である。いくつかの例では、MYXVは6918で、遺伝子M009L、M036L、M135R、およびM148R中に修飾を含む、減衰されたスペインフィールド株（Spanish field strain）である。（GenBank登録番号EU552530で、参照によって、2019年7月11日にGenBankによって提供された通りに、本明細書に組み込まれる）。いくつかの例では、MYXVは、6918VP60-T2である。（GenBank登録番号EU552531で、参照によって、2019年7月11日にGenBankによって提供された通りに、本明細書に組み込まれる）。いくつかの例では、MYXVは、標準臨床株（SLS）と命名された株である。

30

【0051】

いくつかの例では、MYXVは、Cameron, et al., "The complete DNA sequence of Myxoma Virus," *Virology* 264: 298-318 (1999)（この全体は参照によって本明細書に組み込まれる）に開示される配列と、少なくとも90%、95%、または99%の配列の同一性を含む。いくつかの場合では、MYXVは、Cameron, et al., "The complete DNA sequence of Myxoma Virus," *Virology* 264: 298-318 (1999)に開示される配列を含む。

40

【0052】

ある実施形態では、欠陥がある先天的抗ウイルス反応を有する細胞は、癌細胞を含む。

50

ある実施形態では、MYXVに感染した細胞は、TNFを発現する。いくつかの例では、TNFは表面に発現される。いくつかの場合では、TNFは可溶性TNFである。本明細書に開示される場合、肺転移に対して実証された有効性の結果は、延長線上で、原発および転移性の両方の、他の固形癌に適用可能である。TNFは、癌細胞の強力なキラー、および、さらに腫瘍細胞に対する先天的および適応的免疫反応の活性因子の両方であり得る。ウイルスおよびTNFの生態に関して周知のものに基づいて、このウイルスを腫瘍型の広範なスペクトルに適用することは、多様な癌型の処置のための理想的な候補を提供する。癌は、悪性腫瘍の存在を含む、当該技術分野で一般に容認されている基準を使用して診断され得る。

【0053】

開示される方法によって処置され得る癌の型としては、固形腫瘍、例えば、繊維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、骨原性肉腫、およびその他の肉腫が含まれるがこれらに限定されない、瘍肉腫および癌、滑膜腫、中皮腫、ユーイング肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、リンパ性悪性疾患、膵臓癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、肝細胞癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、髄様癌、気管支原生癌、腎細胞癌、肝臓癌、胆管癌、絨毛癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、膀胱癌、およびCNS腫瘍（神経膠腫、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫など）が挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態では、癌は固形腫瘍である。ある実施形態では、癌は被験体の第2の部位へ転移している。ある実施形態では、第2の部位は、被験体の肺、脳、肝臓、および／またはリンパ節を含む。ある実施形態では、癌は、骨肉腫、トリプルネガティブ乳癌、または黒色腫を含む。

【0054】

いくつかの実施形態では、癌の型は、ホジキンリンパ腫、または非ホジキンリンパ腫などの血液の癌をさらに含む。

【0055】

被験体に投与される時、細胞表面で発現されるTNF、または可溶性の形態であるなどの、TNFを発現するMYXVの有効な量は、服用時および十分な期間の間、ウイルスが、癌などの、疾患の拡張を緩和、改善、軽減、良化、安定、防止する、疾患の進行を遅らせるまたは遅延させる、あるいは疾患を治癒するのに必要な量であり、当該疾患は例えば、肺、脳、肝臓、または他の器官に転移した固形腫瘍である。例えば、癌性細胞または新生物細胞の数を減らすか破壊する、または慢性的にウイルスに感染している細胞の数を減らすか破壊する、またはそのような細胞の増殖および／または拡張を阻害する効果、および／または転移の数および／または部位の減少を達成するのに十分な量であり得る。

【0056】

被験体に投与される有効な量は、MYXVの薬物動態的特性、投与の方法、被験体の年齢、健康、および体重、疾患状態の性質および範囲、処置の頻度、およびもしあれば併用処置のタイプ、そしてウイルスの毒性および滴定濃度によって、変化し得る。

【0057】

MYXVは、被験体の臨床反応によって必要に応じて調節されて良い適切な量で、最初に投与され得る。有効な量のウイルスは経験的に決定され得、また、安全に投与することができるMYXVの最大量、および望ましい結果をもたらすウイルスの最低量によって決まる。

【0058】

MYXVは、投与の標準方法を使用して被験体に投与され得、一実施形態で、ウイルスは全身に投与される。他の実施形態では、ウイルスは、疾患部位に注射によって投与される、様々な実施形態では、ウイルスは、経口でまたは非経口で、あるいは当該技術分野で周知の任意の標準方法によって投与され得る。

【0059】

ウイルスを全身に投与する時と同一の臨床結果を、疾患部位におけるウイルスの注射を通じて達成される結果で生み出そうとすると、大幅に多い量のウイルスの投与が必要となり得る。しかし、適切な用量レベルは、望ましい結果を達成する最低量であるべきである。

【0060】

投与されるウイルスの濃度は、投与されるべきMYXVの特定の株の毒性、および目標とされている細胞の性質によって変化するだろう。一実施形態では、約 3×10^{10} フォーカス形成単位（「ffu」）（「感染単位」とも呼ばれる）未満の用量が、ヒト被験体に投与され、様々な実施形態では、約 10^2 から約 10^9 pfuの間、約 10^2 から約 10^7 pfuの間、約 10^3 から約 10^6 pfuの間、または約 10^4 から約 10^5 pfuの間が、単一用量で投与され得る。

10

【0061】

細胞表面発現TNFまたは可溶形態などの、TNFを発現するMYXVは、単独の治療として投与されても良く、あるいは、化学療法、免疫療法、および／または放射線治療を含む、他の治療との組み合わせで投与されても良い。例えば、TNFを発現するMYXVは、原発腫瘍の外科的切除の前または後、あるいは、放射線治療または従来の化学療法薬剤の投与の前に、あるいはそれと同時に、あるいはその後に、投与されて良い。

【0062】

いくつかの実施形態では、免疫療法は免疫モジュレータを含む。例示的な免疫チェックポイントモジュレータは、AstraZenecaからのデュルバルマブ（durvalumab）（Imfinzi）、Genentechからのアテゾリズマブ（atezolizumab）（MPDL3280A）、EMD Serono/Pfizerからのアベルマブ（avelumab）、CytomX TherapeuticsからのCX-072、Novartis PharmaceuticalsからのFAZ053、3D Medicine/AlphamabからのKN035、Eli LillyからのLY3300054、またはEMD SeronoからのM7824（抗PD-L1/TGFβトラップ）などの、PD-L1阻害剤；GlaxoSmithKlineのAMP-224（Amplimmune）およびrHlgM12B7などの、PD-L2阻害剤；Bristol-Myers Squibbからのニボルマブ（nivolumab）（Opdivo）、Merckからのペンブロリズマブ（pembrolizumab）（Keytruda）、AgenusからのAGEN 2034、BeiGeneからのBGB-A317、Boehringer-Ingelheim PharmaceuticalsからのBL-754091、CBT PharmaceuticalsからのCBT-501（genolimzumab）、IncyteからのINCSHR1210、Janssen Research & DevelopmentからのJNJ-63723283、MedImmuneからのMEDI0680、MacroGenicsからのMGA 012、Novartis PharmaceuticalsからのPDRO01、PfizerからのPF-06801591、Regeneron Pharmaceuticals/SanofiからのREGN2810（SAR439684）、またはTESAROからのTSR-042などの、PD-1阻害剤；Bristol Myers Squibbからのイピリムマブipilimumab（Yervoy（登録商標）、MDX-010、BMS-734016、およびMDX-101としても知られる）、Pfizerからのトレメリムマブ（tremelimumab）（CP-675, 206、チシリムマブ（ticilimumab））、またはAgenusからのAGEN 1884などの、CTLA-4阻害剤；Bristol-Myers SquibbからのBMS-986016、Novartis PharmaceuticalsからのIMP701、Novartis PharmaceuticalsからのLAG525、またはRegeneron PharmaceuticalsからのREGN3767などの、LAG3阻害剤；MacroGenicsからのエノブリツズマブ（enoblituzumab）（MGA271）などの、B7-H3阻害剤；Innat

20

30

40

50

e PharmaからのLirilumab (IPH2101; BMS-986015) などのKIR阻害剤; urelumab (BMS-663513、Bristol-Myers Squibb)、PF-05082566 (anti-4-1BB、PF-2566、Pfizer)、またはXmAb-5592 (Xencor) などの、CD137 阻害剤; バビツキシマブ (Baviximab) などの、PS阻害剤; および、抗体 またはそのフラグメント (例えば、単クローン抗体、ヒト、ヒト化、またはキメラ抗体)、RNAi分子、あるいはTIM3、CD52、CD30、CD20、CD33、CD27、OX40、GITR、ICOS、BTLA (CD272)、CD160、2B4、LAIR1、TIGHT、LIGHT、DR3、CD226、CD2、またはSLAMまでの小分子などの、阻害剤、を含むが、それらに限定されない。

10

【0063】

いくつかの実施形態では、TNFを発現するMYXVは、医薬組成物中の成分として製剤化される。したがって、さらなる実施形態では、TNFを発現する粘液腫ウイルスを含む医薬組成物、および薬学的に許容可能な賦形剤、または希釈剤が提供される。組成物は、日常的に塩、緩衝剤、保存料、および様々な相溶性のある担体 (compatible carrier) の、薬学的に許容可能な濃度を含み得る。

【0064】

医薬組成物は、追加的な抗癌剤などの追加的な治療剤を、さらに含み得る。一実施形態では、組成は化学療法薬剤を含む。化学療法薬剤は例えば、被験体の癌細胞、または新生細胞に対する腫瘍溶解効果を示す、実質的に任意の薬剤であって良く、そしてそれは、TNFを発現するMYXVの腫瘍死滅効果を阻害、または弱めない。例えば、化学療法薬剤は、アントラサイクリン、アルキル化剤、スルホン酸アルキル、アジリジン、エチレンイミン、メチルメラミン (methylnelamine)、ナイトロジェンマスタード、ニトロソ尿素、抗生物質、代謝拮抗剤、葉酸アナログ、プリンアナログ、ピリミジンアナログ、酵素、ポドフィロトキシン (podophyllotoxin)、プラチナ含有剤、またはサイトカニンであり得るが、それらに限定されない。好ましくは、化学療法薬剤は、癌または新生物である特定の細胞型に対して、有効であることが知られているものである。

20

【0065】

いくつかの場合には、追加的な治療剤は、上述されたものなどの、免疫のチェックポイントモジュレータを含む。

30

【0066】

薬学的に許容可能な賦形剤、または希釈剤の割合および同一性は、選択される投与ルート、生ウイルスとの適合性、および標準的な薬学的実践によって決定される。一般に、医薬組成物は、TNFを発現するMYXVの、生物学的特性を著しく害さない成分と共に製剤化されるであろう。医薬組成物は、被験体への投与に適している薬学的に許容可能な組成の調製のための、既知の方法によって調製することができ、その結果、作用物質 (複数可) の有効な量が、混合物中で薬学的に許容可能なビヒクルと組み合わせられる。適切なビヒクルは、例えば、RemingtonのPharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA 1995) で説明されている。これに基づき、組成物は、これらだけでは無いが、1以上の薬学的に許容可能な賦形剤、ビヒクル、または希釈剤に関連する、TNFを発現するMYXVの溶液を含み、そして、適切なpHで等浸透圧の、生理液を含む緩衝溶液に含有される。

40

【0067】

医薬組成物は、当業者によって理解されるであろう、投与の選択された経路に応じた様々な形態で、被験体に投与され得る。いくつかの例では、医薬組成物は全身に投与される。他の例では、医薬組成物は局所的に投与される。いくつかの場合では、医薬組成物は経口で投与される。追加的な場合では、医薬組成物は非経口で投与される。非経口投与とし

50

ては、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、経上皮、鼻、肺内、くも膜下、鞘内、直腸、および局所での投与モードが挙げられる。非経口的投与は、選択された期間にわたる持続注入によるものであっても良い。

【0068】

医薬組成物は、例えば不活性の希釈剤または担体で、経口で投与されても良く、あるいは、固いまたは柔らかいシェルゼラチンカプセルに含有されていても良く、あるいは錠剤中に圧縮されていても良い。経口医薬組成物については、TNFを発現するMYXVは賦形剤に組み込まれていても良く、また、摂取可能な錠剤、パッカル錠剤、トローチ、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁液、シロップ剤、ウエハー、などの形態で使用されても良い。

10

【0069】

TNFを発現するMYXVの溶液は、生理学上適切なバッファで調製され得る。保存および使用の通常の条件下では、これらの調製は、微生物の増殖を防ぐために保存料を含むが、しかし、それが生体ウイルスを不活性化することはないだろう。当業者であれば、適切な製剤を調製する方法を知っているだろう。適切な製剤の選択および調製のための従来の手順および成分は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、および、The United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 24 NF19) 1999年発刊、に説明される。使用されることになっている医薬組成物の用量は、処置されている特定の疾病、疾病の重症度、年齢、身体状態、サイズ、および体重を含む個々の被験体パラメータ、処置の期間、(該当する場合は)併用療法の性質、具体的な投与経路、および医療関係者の知識と専門技能内における類似の要因によって決まる。ある実施形態では、治療用ウイルスは、室温での保存用に冷凍乾燥されても良い。

20

【0070】

TNFを発現するMYXV、またはTNFを発現するMYXVを含む医薬組成物はまた、癌を処置するためのTNFを発現する粘液腫ウイルスの使用のための指示を含む、キットとしてパッケージ化されていても良い。

【0071】

TNFの発現に加えて、MYXVは、MYXV処置の抗癌効果を増強するであろう任意の他の遺伝子を運ぶように修飾され得る。そのような遺伝子は、アポトーシスを引き起こすこと、または免疫破壊に関する感染細胞を標的にすることに関与しているかもしれず、例えばインターフェロンに対する反応の不足を修復する、または抗体反応を刺激する細胞表面マーカー、例えば細菌性細胞表面抗原など、の発現をもたらす遺伝子である。MYXVはまた、新生物または癌の細胞の拡張と増殖を止めることに関与する遺伝子を発現するように修飾されていても良く、それによって細胞が分裂することを妨げる。また、ウイルスは、化学療法薬剤の合成に関与する遺伝子などの、治療用遺伝子を含むように修飾されても良く、あるいは、阻害または死滅される細胞が由来する、例えばヒト細胞などの、特定の種の細胞における複製レベルが増加するように修飾されても良い。

30

【0072】

上に議論されるように、MYXVは、欠陥のある先天的抗ウイルス反応を有する細胞を選択的に感染させることが可能で、また、細胞におけるそのような欠陥の指標として使用され得る。そのため、被験体から取り除かれた細胞は、本発明の方法を使用して、先天的抗ウイルス反応における欠陥について分析され得る。そのような判定は、他の指標と組み合わせられると、被験体が特定の疾患状態、例えば癌を患っているかもしれない事を示し得る。細胞は、周知の生体組織検査法を使用して、ヒト被験体を含む被験体から取り除かれ得る。生体組織検査法は、試験される細胞の位置および型に依存するだろう。細胞は周知の培養技術に従って培養され、生MYXVを培養培地に追加することによって、MYXVに曝露される。感染多重度(「MOI」)は、MYXVへの曝露時に感染することが知られている陽性対照細胞培養を使用して、所与の細胞型、密度、および培養技術に最適なMOIを決定するために、変更され得る。

40

50

【0073】

培養細胞に追加されるMYXVの量は、細胞型、培養方法、およびウイルスの株によって変更され得る。そのようなパラメータは、常法を使用して、最小限の試験で容易に試験および調節することができる。

【0074】

MYXVによる培養細胞の感染力は、細胞死を引き起こすMYXVの能力を含み、当業者に周知の様々な方法によって判定され得る。方法は、ウイルス発現産物との酵素反応または化学反応を完了するために、細胞培養への試薬の添加をも含み得る。ウイルス発現産物は、MYXVゲノムに挿入されたレポーター遺伝子から発現され得る。

【0075】

一実施形態では、MYXVは感染状態の検出をより容易にするように修正され得る。例えば、MYXVは、位相差顕微鏡法、蛍光顕微鏡検査法、または放射性撮像によって、容易に検出され得るマーカーを発現するように遺伝子修飾されても良い。マーカーは、比色反応または放射性標識反応に含まれ得る、発現された蛍光タンパク質または発現された酵素であり得る。別の実施形態では、マーカーは、試験されている細胞の特定の機能を中断または阻害する、遺伝子産物であり得る。

【0076】

MYXVは、当該技術分野で周知の標準技法を使用して調製され得る。例えば、ウイルスは、培養ウサギ細胞、または不死化許容ヒトまたは霊長類細胞を、使用されるMYXV株に感染させることによって調製されて良く、ウイルスが培養細胞内で複製し、そして細胞表面を破壊して、それによって採取のためのウイルス粒子を放出する、当該技術分野で周知の標準的方法によって放出され得るように、感染を進行させる。一旦採取されると、ウイルス力価は、ウサギ細胞のコンフルエントなローン (confluent lawn) を感染させ、かつプラーク分析を実施することによって判定され得る (Mossman et al. (1996) *Virology* 215:17-30を参照、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。方法

【0077】

治療用MYXVウイルスが、最初にエクスピボで、骨髄または末梢血単核細胞のいずれかからの混合白血球に吸着され、その後、癌患者への再注入などの注入が続く送達戦略が、さらに開示される。この戦略では、ヒトTNFを発現するMYXVは、エクスピボでウイルスに事前感染した白血球の遊走を介して、転移性癌部位に送達される。この全身送達方法は、ウイルスが患者への注入前に、単離された白血球にまず送達されるので、「エクスピボウイルス療法」、またはEVV (別名EV2) と呼ばれることがある。MYXV構築物およびこの新しい送達戦略は、腫瘍量を著しく下げ、かつマウス肺転移モデルにおける生存率を上げる能力を示した (実施例1を参照)。本明細書に開示される通り、細胞表面ヒトTNFを発現する粘液腫ウイルス (MYXV) 構築物の投与は、ウイルス保有「担体」を介して、MYXVウイルスを転移性肺疾患部位へ効果的に送達した。さらに、本明細書に開示される通り、本発明者らは、TNF発現ウイルス (一般にvMyx-hTNFとして指定される) のこの細胞支援送達が、腫瘍量を下げ、肺転移を有するマウスの生存率を上げる能力を有することを実証した (実施例1を参照)。これらの結果は、TNF発現MYXVの細胞媒介送達が、標的肺転移性腫瘍細胞の直接死滅のレベルを上げるが、(理論に縛られてはいないが) 宿主免疫系の活性化因子として作用することを実証し、このことは癌の長期退行を導き得る。このことは、現行の処置では困難であることが証明されている、肺、肝臓、脳、骨、および/またはリンパ節に転移した固形癌の処置の、新しい方法を提供する。そのため、ある実施形態では、方法は、被験体に単核末梢血細胞および/または骨髄細胞を投与する工程を含み、ここで単核末梢血細胞および/または骨髄細胞は、細胞表面腫瘍壊死因子 (TNF) を発現するMYXVを含み、それにより、被験体の癌を処置するおよび/または阻害する。併用される「白血球/vMyx-hTNF」療法は、腫瘍床の細胞死を増加させて抗腫瘍免疫原性を増強するが、TNFを肺腫瘍組織などのウイルス感染転移性腫瘍組織のインサイチュでのみ産生し、off標的の全身性の有毒

10

20

30

40

50

な副作用を制限する。マウス骨肉腫肺転移モデルにおける以下の実施例 1 に提示された試験の結果は、この戦略が腫瘍量を下げ、生存期間の中央値を上げるのに効果的であることを示す。さらに、白血球／v M y x－h T N F 戦略は、癌組織に限定的な方法で細胞表面 T N F を選択的に発現させることにより、元の腫瘍型に関係なく、たとえば肺に転移するような、すべての固形癌に対する新しい潜在的治療レジメンを意味する。理論に拘束されないが、この白血球／v M y x－h T N F 戦略は、たとえば高頻度で肺に転移する固形癌に対する、他の確立された癌治療と相乗的に機能すると考えられている。ある実施形態では、方法は、M Y X V を単核末梢血細胞および／または骨髄細胞の表面に、吸着させる工程を含む。単核末梢血細胞および／または骨髄細胞の一部が感染している可能性もある；しかし、このことが本明細書に開示される方法において重要となる可能性は低いだろう。ある実施形態では、単核末梢血細胞および／または骨髄細胞の表面に、粘液腫ウイルスを吸着させる工程は、粘液腫ウイルスの単核末梢血細胞および／または骨髄細胞の表面への結合が可能な条件下で、単核末梢血細胞および／または骨髄細胞を粘液腫ウイルスに曝露することを含む。

10

【0078】

本開示の態様は、あらゆる種類の腫瘍溶解性 M Y X V 構築物を、転移性肺疾患に送達するための新しい方法に向けられ、すなわち、上述のように、治療用 M Y X V 構築物を、骨髄 (B M) または末梢血単核細胞 (P B M C) のいずれかに由来する混合白血球に、事前負荷することによる方法である。そのような方法は、例えば癌細胞などの、欠陥のある先天性抗ウイルス反応を有する細胞の存在によって特徴付けられる任意の疾患状態を処置するために使用され得る。M Y X V 構築物は、任意の治療用遺伝子、または「治療用導入遺伝子を含むように修飾され得る。本明細書に使用される場合、「治療用遺伝子」または「治療用導入遺伝子」という用語は、発現が、例えば抗癌効果などの望まれる結果をもたらす任意の遺伝子を、広範に説明するものと意図されている。例えば、ウイルスは、ウイルス処置の抗癌効果を増強するであろう遺伝子を運ぶように修飾され得る。そのような遺伝子は、アポトーシスを引き起こすこと、または免疫破壊に関する感染細胞を標的にすることに関与しているかもしれない、例えばインターフェロンに対する反応の不足を修復する、または抗体反応を刺激する、細菌性細胞表面抗原などの細胞表面マーカーの発現をもたらす遺伝子である。ウイルスはまた、新生物または癌の細胞の拡張と増殖を止めることに関与する遺伝子を発現するように修飾されていても良く、それによって細胞が分裂することを妨げる。また、ウイルスは、化学療法薬剤の合成に関与する遺伝子などの、治療用遺伝子を含むように修飾されても良く、あるいは、阻害または死滅される細胞が由来する、例えばヒト細胞などの、特定の種の細胞における複製レベルが増加するように修飾されても良い。し戻す

20

30

【0079】

ある実施形態では、B M または P B M C の細胞は、エキスピボで 1 時間 M Y X V 構築物と吸着させられ、その後、M Y X V 負荷の白血球が、レシピエントに注入し戻される。ある実施形態では、単核末梢血細胞および／または骨髄細胞は、例えば自己細胞として、被験体から得られる。他の実施形態では、単核末梢血細胞および／または骨髄細胞は、1 以上の異種ドナーから得られる。骨髄細胞および単核末梢血細胞を得る方法は、当該技術分野で周知である。

40

【0080】

本開示の態様は、たとえば表面の T N F または可溶性 T N F などの腫瘍壊死因子 (T N F) を発現する M Y X V、および同様物を含有するキットに関する。ある実施形態では、T N F を発現する M Y X V は、v M y x－M 1 3 5 K O－h T N F を含む。ある実施形態では、T N F を発現する M Y X V は、v M y x－h T N F－M 1 3 5－1 3 6 を含む。T N F を発現する粘液腫ウイルス、または T N F を発現する M Y X V を含む医薬組成物はまた、癌を処置するための、欠陥がある免疫反応を有する細胞を阻害するための、T N F を発現する M Y X V の使用のための指示を含む、キットとしてパッケージ化されていても良い。

50

【実施例】

【0081】

これらの例は、説明のみを目的として提供されており、本明細書で提供される特許請求の範囲を限定するものではない。

【0082】

実施例 1

この実施例は、TNFを発現するMYXVの構成と試験を説明する。

【0083】

ウイルスの設計

vMyx-hTNFウイルスの第1バージョン（ここではvMyx-SODKO-hTNFと呼ばれる）は、もともと、Wang et al 2008によって設計および説明された（Wang F, Gao X, Barrett JW, Shao Q, Bartee E, Mohamed MR, Rahman M, Werden S, Irvine T, Cao J, Dekaban, GA, McFadden, G. 2008）。RIG-Iは、初代ヒトマクロファージにおいて粘液腫ウイルスによって引き出される腫瘍壊死因子およびI型インターフェロンの同時誘導を媒介する。PLoS病原体4:e1000099であり、これは参照により本明細書に具体的に組み込まれる）。要するに、このウイルスは、腫瘍溶解性ウイルス療法と関係ない目的のために、または癌の任意の処置のために、MYXVローザンヌ親株を使用して作られた。挿入ベクターは、pブルースクリプトファージミド（pBluescript phagemid）に基づき、個別の合成ワクシニア前期後期プロモータによって制御されて、eGFPとともに131R ORF（SODと呼ばれる）にクローン化された（マップ図1を参照）。第2のhTNF発現ウイルス（vMyx-M135KO-hTNFと呼ばれる）は、ヒトの臨床試験用に開発されている、腫瘍溶解性MYXV構築物のための標準的な減衰された遺伝的背景である、M135R遺伝子ノックアウトウイルスプラットフォームに基づいて生成された。M135Rノックアウト構成のための戦略は、Bartee et al 2009によって完全に説明されている。（Bartee E, Mohamed MR, Lopez MC, Baker HV, McFadden G. 2009. The addition of tumor necrosis factor plus beta interferon induces a novel synergistic antiviral state against poxviruses in primary human fibroblasts. Journal of virology 83:498-511 および Barrett JW, Sypula J, Wang F, Alston LR, Shao Z, Gao X, Irvine TS, McFadden G. 2007 M135R Is a Novel Cell Surface Virulence Factor of Myxoma Virus. Journal of Virology. 81(1):106-114,。その両方は、参照によりその全体が具体的に本明細書に組み込まれる。）簡潔に言うと、このvMyx-M135KO-hTNFウイルスは、マルチサイトゲートウェイスリーフラグメントクローニング手法（Multisite gateway three fragment cloning procedure）を使用して生成された。要素1は、M134 ORFの3'フラグメントを、合成前期／後期プロモータによって制御されたeGFPと共に含む。要素2は、さらに合成前期／後期プロモータの制御下にあった、完全なhTNFコード配列を含んでいた。最後に、要素3は、5' M136遺伝子のフラグメントを含んでいた。これらの3つフラグメントは、eGFP-hTNFのタンデムカセット（tandem cassette）を任意のMYXVゲノムのバックボーンのM135R遺伝子座に挿入するために使用された、シングルエンタリーのビヒクルプラスミドへ組み合わされた。これはその後、トランスフェクション／感染に使用され、そして、組み換えウイルスは、少なくとも3回のプラーク精製（plaque purification）を使用して精製された（最終プラスミドは、図2Aに

示されるトランスフェクションに使用された)。

【0084】

動物研究

エキスピボでウイルスが事前負荷された白血球を介して送達された $vMyx-hTNF$ ウイルスの、肺転移性骨肉腫に対する有効性を、免疫適格の $Balb/c$ マウスで、同系のマウス骨肉腫モデルを使用して確認した。動物には、0日目に、 2×10^6 $K7M2-FLuc$ マウス骨肉腫細胞を、外側尾静脈を介して接種した。接種後4日で、対照の $Balb/c$ マウスから骨髓 (BM) を採取し、数を確認し、1有核細胞あたり $2-10$ の感染性ウイルスユニット単位の MOI (感染多重度) でウイルスに感染させた。細胞とウイルスを、 $37^\circ C$ で1時間吸着させた。エキスピボでウイルス負荷した BM を、その後、1動物あたり 4×10^6 細胞で眼窩後方に注射した。その後動物を、腫瘍接種後7日目から毎週、腫瘍量のリアルタイム測定として、ルシフェラーゼ発光のために IVIS インビボ撮像システムを使用して画像撮影し、そのほとんどがレシピエントの肺で観察された。動物を、進行性疾患の既定の臨床症状への到達、または感染後8週間のどちらかが最初に生じるまでモニタリングした。結果は、 $vMyx-hTNF$ 構築物の注目すべき例外を除き、試験したすべてのウイルス構築物で処置された動物が、対照と同等の腫瘍量を示したことを明らかにした。単一の長期生存者を誘発した $vMyx-M135KO$ ウイルスを除くと、他の試験ウイルスも、対照と統計的に区別可能な平均生存率を示さなかった。対照的に、 $vMyx-hTNF$ 構築物コホートでは、腫瘍細胞からの発光によって測定されるように、腫瘍は、対照および他の構築物の両方よりも、すべての撮像時点で統計的に小さかった (図3)。 $vMyx-hTNF$ も、対照と比較して平均生存時間がほぼ2倍になり (図4)、また、このコホートにおいてのみ、実証できる腫瘍量が明らかに存在しない顕著な数の動物が観察された。

【0085】

これらの結果の後、ウイルス「キャリア細胞」としての BM 白血球を、治療用 $MYXV$ 構築物の転移性肺腫瘍部位への送達のためのキャリア細胞としての塊の $PBMC$ の利用と比較した。 $PBMC$ が、ほとんどの固形癌に対して、臨床的により適切なキャリア白血球の供給源であることが推論された。動物に、上術のように $K7M2-FLuc$ 細胞を接種した。腫瘍接種の4日後、対照 $Balb/c$ マウスからの $PBMC$ を採取し、そして上術のようにエキスピボで1時間、 $vMyx-hTNF$ (MOI = 2) に吸着させた。動物をその後、 1×10^6 、 2×10^6 、および 4×10^6 の $PBMC$ の (それぞれ、入力ウイルスの同一の MOI で事前に吸着されている) 3つの用量群に分け、それぞれの $PBMC$ /ウイルス用量を注射した。動物はその後、7日目から画像撮影を行った。ルシフェラーゼ撮像の結果は、動物が用量に依存して処置に反応し、 1×10^6 では最も反応が少なく、 4×10^6 では対照動物と比較して、腫瘍発光の最も有意な低下を示した (図5および図6)。

【0086】

$vMyx-hTNF$ に感染した細胞の TNF 発現の確認

$vMyx-hTNF$ 構築物による $hTNF$ の発現を確認するために、予防対策されていない $RK-13$ 細胞を、 10 の MOI で実験的にウイルスに感染させた。感染は48時間進行し、その後、膜結合タンパク質の完全性を確保するために、非酵素細胞解離バッファを使用して細胞を回収した。その後、細胞表面に発現する分子のみを染色する非透過条件下で、フローサイトメトリー用の PE 蛍光体 (PE fluorophore) にコンジュゲートされたマウス抗ヒト TNF 抗体を使用して、細胞を染色した。その後、細胞を、非感染の染色対照および非感染の非染色対照に対して比較 (run) した。この分析の結果では、感染後48時間で、 $vMYX-hTNF$ 感染細胞の表面に TNF が発現し、また非感染対照細胞による TNF 発現の兆候がないことが確認された (図7)。ウェスタンブロッティングでは分泌 TNF は検出されず (図示せず)、このことは、感染細胞が、理論的には TNF の分泌形態を生成できるはずの、必要な変換/切断酵素を発現しなかったことを示す。

10

20

30

40

50

【0087】

インビトロでの細胞死分析

白血球／vMyxv-hTNFウイルス療法を受けている担癌動物で観察される、生存率の改善と腫瘍量の低下を引き起こすメカニズムをよりよく理解するために、細胞死分析を実施して、異なる試験ウイルスに対する骨肉腫細胞の反応を測定した。これは、腫瘍量の低下が、ウイルスによって発現されたTNFによって引き起こされた、直接的な腫瘍細胞死の増加によってもたらされたか否かを判断するためであった。フローサイトメトリーを使用して、TNFR1およびTNFR2の細胞表面発現について、K7M2-FLuc細胞を分析した。これらの細胞は、TNFR1とTNFR2の両方の発現に対して陽性であることが示され、つまり、TNFが腫瘍細胞上の同族受容体と直接的に相互作用し、TNF誘導の細胞死を引き起こし得ることが可能であったことを意味した。これらの細胞が直接TNFによって死滅され得るのか否かを確認するために、TNFを実験的に増殖させ、vMyx-M135KO、vMyx-SODKO-hTNFのいずれかに感染させる、あるいは精製したマウスTNFとインキュベートする、のいずれかを行った。次に、SYTOXオレンジを使用して生存率について細胞を測定し、SYTOXオレンジは、さまざまな形態の細胞死に関連して、細胞膜の完全性が失われた後でのみ、細胞に入り、細胞を染色する。感染／接種後24時間または48時間で、細胞をSYTOXオレンジで10分間インキュベートし、トリプシンを使用して持ち上げ、そして、細胞と上清を一体的に組み合わせ、遠心分離で過剰なSYTOXを洗浄した。その後、細胞を100マイクロリットルのDMEMで再懸濁し、セルカウンターを使用して読み取りを行った。この分析の結果は、48時間までには、マウスTNFが対照と比較して20%の細胞死の増加のみを引き起こしたが、しかしTNF後24時間では、有意差がなかったことを示した。逆に、vMyx-SODKO-hTNF感染は、対照と比較して24時間で20%、48時間で50%生存率を低下させた。この細胞生存率の低下は、hTNFを発現しない対照vMyx-135KOウイルスの感染後に観察されたものと、実質的に同一である。このことは、これらの骨肉腫細胞が、hTNFによる死滅に対してさらに敏感であるというわけではなく、動物研究で観察された腫瘍縮小の増加が、ウイルス発現TNFの、骨肉腫におけるTNFR1またはTNFR2との直接的な相互作用とは別の免疫関連メカニズムによって引き起こされた可能性が高いことを示す（図8）。

10

20

【0088】

30

実施例2

この例では、エキスピボでウイルスが事前負荷された白血球を介して送達された、vMyx-M135KO-hTNFウイルスの、トリプルネガティブ乳癌に対する有効性の判定について説明する。

【0089】

免疫適格のBalb/cマウスにおける同系のマウストリプルネガティブ乳癌を使用する。動物には、0日目に、トリプルネガティブ乳癌細胞を、外側尾静脈を介して接種した。接種後、対照Balb/cマウスから骨髓（BM）を採取し、数を確認し、vMyx-M135KO-hTNFおよび／または対照ウイルスに感染させる。細胞とウイルスを、37℃で1時間吸着させる。その後、エキスピボでウイルスを負荷したBMを、眼窩後方に注射する。その後動物を、腫瘍接種後毎週、腫瘍量のリアルタイム測定として、ルシフェラーゼ発光のためにIVI-Sインビボ撮像システムを使用して画像撮影し、そのほとんどがレシピエントの肺で観察される。動物を、進行性の疾患の既定の臨床症状に達するまでモニタリングする。

40

【0090】

実施例3

この例では、エキスピボでウイルスが事前負荷された白血球を介して送達された、vMyx-M135KO-hTNFウイルスの、転移性黒色腫に対する有効性の判定について説明する。

【0091】

50

免疫適格の B a l b / c マウスにおける同系のマウストリプルネガティブ乳癌を使用する。動物には、0 日目に、転移性黒色腫細胞を、外側尾静脈を介して接種した。接種後、対照 B a l b / c マウスから骨髓 (B M) を採取し、数を確認し、v M y x - M 1 3 5 K O - h T N F および / または対照ウイルスに感染させる。細胞とウイルスを、3 7 °C で 1 時間吸着させる。その後、エクスピボでウイルスを負荷した B M を、眼窩後方に注射する。その後動物を、腫瘍接種後毎週、腫瘍量のリアルタイム測定として、ルシフェラーゼ発光のために I V I S インビボ撮像システムを使用して画像撮影し、そのほとんどがレシピエントの肺で観察される。動物を、進行性の疾患の既定の臨床症状に達するまでモニタリングする。

【0092】

実施例 4

図 9 は、フローサイトメトリーを使用した、感染したヒト A M L (T H P 1) 細胞の細胞死の定量化を、例示する。M Y X V 媒介の総 T H P 1 細胞の死滅は、生 / 死染色を用いた細胞上のゲーティングによって A P C / C y 7 + であったと定義される、細胞の固形群から判定された。重要性 (* = p < 0 . 0 5 ; ** = p < 0 . 0 1 ; *** = p < 0 . 0 0 1) は、多重比較用の H o l m - S i d a k t 検定を使用して判定された。結果は、T H P - 1 細胞の v M y x - S O D K O - h T N F - G F P への感染が、感染後の両時間 (2 4 時間および 4 8 時間) で、3 検定による感染の多重性 (M O I = 1 0 、 1 、または 0 . 1) で、ゲートされた死細胞の数の全面的な増加を引き起こしたことを示す。

【0093】

図 1 0 は、フローサイトメトリーを使用して、M Y X V 媒介の O N 標的 (O N - T a r g e t) が死滅させるウイルス感染したヒト A M L (T H P 1) 細胞の定量化を、例示する。M Y X V 媒介の O N 標的が死滅させる T H P 1 細胞は、G F P 陽性のウイルス感染した細胞の固形群からゲートされた、A P C / C y 7 + であった細胞の割合から判定された。重要性 (* = p < 0 . 0 5 ; ** = p < 0 . 0 1 ; *** = p < 0 . 0 0 1) は、多重比較用の H o l m - S i d a k t 検定を使用して判定された。結果は、T H P 1 細胞がいずれかの試験ウイルスに感染した場合、ウイルス感染死細胞の検出は、対照ウイルスまたは T N F 発現構築物のいずれかについて、非常に類似していたことを示す。この結果は、M Y X V が感染細胞を死滅させる能力が主にウイルスプラットフォームの結果であり、T N F を含むほとんどの導入遺伝子によっては比較的影響を受けないという、一般的な観察結果と一致する。

【0094】

図 1 1 は、フローサイトメトリーを使用して、M Y X V 誘導の O F F 標的 (O F F - T a r g e t) が死滅させるウイルス感染していないヒト A M L (T H P 1) 細胞の定量化を、例示する。M Y X V 媒介の O F F 標的 (O F F - T a r g e t) が死滅させる T H P 1 細胞は、G F P 陰性の細胞の固形群からゲートされた、A P C / C y 7 + であった細胞の割合から判定された。重要性 (* = p < 0 . 0 5 ; ** = p < 0 . 0 1 ; *** = p < 0 . 0 0 1) は、多重比較用の H o l m - S i d a k t 検定を使用して判定された。結果は、h T N F 導入遺伝子の発現が、非武装型 M Y X V 対照感染と比較して、非感染 T H P 1 細胞の相当な死滅を誘発したことを示す。

【0095】

図 1 2 は、フローサイトメトリーを使用した、感染したヒト多発性骨髄腫 (M u l t i p l e M y e l o m a) (U 2 6 6) 細胞の細胞死の定量化を、例示する。M Y X V 媒介の総 U 2 6 6 死滅は、A P C / C y 7 + だった細胞の固形群から判定された。重要性 (* = p < 0 . 0 5 ; ** = p < 0 . 0 1 ; *** = p < 0 . 0 0 1) は、多重比較用の H o l m - S i d a k t 検定を使用して判定された。結果は、v M y x - S O D K O - h T N F - G F P による U 2 6 6 細胞の感染が、感染後の両時点 (2 4 時間および 4 8 時間) で、3 つの試験された感染多重度 (M O I = 1 0 、 1 、または 0 . 1) で、ゲートされた死細胞の数の全体的な増加を引き起こしたことを示す。

【0096】

図13は、免疫適格のマウスにあらかじめ植え付けられたマウス多発性骨髄腫を除去するために、エキスピボで負荷された同系のマウス骨髄白血球を介して送達されたvMyx-SODKO-hTNFの、試験を示す。多発性骨髄腫の遺伝子組み換えマウスVK*MYCモデルは、非常に攻撃的で薬剤耐性のあるモデルであるため、無癌生存率を改善するために、MYXVウイルスによるウイルス療法を、骨髄白血球を用いる自己幹細胞移植(ASCT)と組み合わせて使用した。図13Aは、耐ボルテゾミブVK*12598骨髄腫細胞を使用するインビボデータを示し、ここで、細胞はほとんどが骨髄と脾臓に遊走する。簡潔に言うと、 1×10^6 のVK*12598の骨髄腫細胞を、免疫適格のC57BL/6マウスへ、尾静脈を介して静脈内(i.v.)送達した。癌送達後4日で、マウスを以下のように処置した：骨髄(BM)移植を受けていない対照； 2×10^6 BM細胞のみ；vMyx-M135KOの非武装型粘液腫ウイルス(MOI=10)でエキスピボで事前処置された 2×10^6 BM細胞；眼窩後方(RO)注射を介してvMyx-SODKO-hTNF(MOI=10)でエキスピボで処置された、 2×10^6 BM。生存率曲線は、癌移植後100日後に作成された(図13B)。図13Cは、生存率のパーセントに相当する。

10

【0097】

図14は、SMAC擬態または免疫チェックポイント阻害剤のいずれかと、BM白血球にエキスピボで事前負荷されたvMyx-hTNF-(M135-M136)との併用療法を示す。併用療法は、SMAC擬態化合物LCL161(50mg/kg)、またはチェックポイント阻害剤の単クローン性抗体(mAb) α -mupD-1で、エキスピボで事前負荷された自己のマウス骨髄白血球を介して送達されたvMyx-hTNF-(M135-M136)と組み合わされて、試験された。簡潔に言うと、 1×10^6 のVK*12598マウス骨髄腫細胞を、免疫適格のC57BL/6マウスへ、尾静脈を介して静脈内(i.v.)送達した。4週後に、血清蛋白質電気泳動(SPEP)を使用して、血清内の骨髄腫タンパクマーカー(例えばM-スパイク)のレベルを定量化した。その後、1、4、8、および11日目に、MOI=10でvMyx-hTNF-(M135-M136)でエキスピボで事前処置した 2×10^6 BM細胞で、マウスを処置する。各自己移植後、2、5、9、12日目に注射を介して、経口強制栄養補給を介して送達された50mg/kgのLCL161による化学療法、または腹腔内(ip)10mg/kgのmAb α -mupD-1による免疫療法のいずれかが続いた。図14Bは、生存率曲線を含むインビボデータを示す。図14Cは、生存率のパーセントを記載する。

20

30

【0098】

図15は、vMyx-hTNF-(M135-136)に感染したヒト細胞からの、ヒトTNFタンパク質発現および部分的分泌を示す。2つのヒト細胞系：THP1(ヒト単球)とA549(ヒト肺癌)を、3つの異なる感染多重度(MOI)で、vMYX-hTNF-(M135-136)と対照vMyx-GFPに感染させた。感染後48時間後に、上清を採取し、そしてウイルス感染細胞から分泌された可溶性ヒトTNFのレベルをELISA(Biolegend)で分析した。

【0099】

実施例5

vMyx-hTNF-M135-M136ウイルスを、MYXVローザンヌ親株を使用して作成した。簡潔に言うと、このvMyx-hTNF-M135-M136ウイルスは、マルチサイトゲートウェイスリーフラグメントクロニング手法を使用して生成された。要素1は、M134の一部とM135R ORFの3'フラグメントを、合成前期/後期プロモータによって制御されたeGFPと共に含む。要素2は、さらに合成前期/後期プロモータの制御下にあった、完全なhTNFコード配列を含んでいた。要素3は、5' M136R遺伝子のフラグメントを含んでいた。これらの3つフラグメントは、eGFP-hTNFのタンデムカセットを任意のMYXVゲノムのバックボーンのM135RとM136Rとの間の遺伝子間の位置に挿入するために使用された、シングルエンタリーのビヒクルプラスミドへ組み合わされた。これはその後、トランスフェクション/感染に使用

40

50

され、そして、組み換えウイルスは、少なくとも 3 回のブランク精製を使用して精製された（最終プラスミドは、図 2 B に示されるトランスフェクションに使用された）。

【0100】

本明細書に説明される組成物および方法に対応する例示的配列は、表 1 に示される。

【0101】

【表 1 - 1】

表 1

SEQ ID NO	名前	配列
1	M134R - 一部分 および M135R (vMyx-hTNF-M135-136 に利用される)	ATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAAGCAGGCT CCAGGATTACCTGGTCTATATAGATAACAAAACCTACGTAC GTATAAACGAGACCGTTGTACCGGAGAACGAGTATCTGGC AGCGAAGGCCCCGCGAGTGACCTGTTCCACACGGACTTGA TCCCCATTACGGACGAAGAGACACAACGACGTTTTGAGAA AATGATTGTACAGGCGGCGTTAGAGGACGCCCTAACGAGC ATCTTTGAGGAGCACGACAATAACGTAACCGATTACTTCGC GGAATACATGCGATCCCTCCAAATGGCGAATAAAAGTCAT ACGAATAATATTATCGCGGTGCTTTAGCGGGGATAATCGT CATTGTAACGACCTACGTGTTTACTAGATTACGCTAAGC AAAAAAAGGAAATTATAACGTACGTAATAAGATAGATAA TTCCATACAGAAAGAGATTTCAGTTGGACGGTGTATATACTA CTGACAACGTTTTTATATAAACATGGTGTATATTTATTAT CACCTGNGTATGTTTGGTGACGAGATCCTGTGGGGGTGGGT TAGAAGACGATATAGATCGCATATTTCAAAAACGATACAA CGAACTGAGCCAGCCGATTAAAGCGCAATATGCGTACACTGT GCAAGTTTAGAGGAATTACCGCGACTATGTTTACGGAAGG AGAATCTTACCTTATTCAATGTCCCATAATTACGATTACGT GTACGGGCGCTGTATGACTTAGTGGAAGGAAGTTACACG GTACGCTGGGAACGCGAAACGGAAGACGATGTTGAGTCGG TAGATCCGAAGTTAGTCAAAGGGACGCTATTATACCTCCAA CCTAACGCGTCCAGTATAGGAACGTATCTATGTACCTTACA CGATAACCGAGGTATGTGTTATCAATCTGTCGCGCACGTCA TCCGACGTCCGAAGATGCAATGCGTGAAACATGCACATAC GACATCGGACAGCAACCTGTGGATATACCTCGCCATTTTAG CAGTTTTTGATATCcttagcgctcgtgtaa
2	M136R	acgacgtaactccgaacTatgaagtaacatttttaaaacaatttcggtatgttaaattATGGAA CGGTCGCCCCACTTACACGGTACACGATAAACGCTTTTCTAT CGTCGCACTAAACGGACAATACGACATGGTGGACGATTTTG GTCTTAGTTTTTCTTACACAGCGATCGACGATTTTCTAAAA ATCATTCCATCAAACACGTTTTTAGAAGAATACTTTTCATGG CGCGCGTATATAGGCCGGGTATGTATCATACCGAATCACGT GGGAAAGCTCTACATCAAACCTTACAAAGTTGGACACCACG GCGAAGAACAACACTAGGCAATCTAGATATATTGTTATGCG ACGTGTTAAAAATAGACGAGGACGGAGGCAACGAGAACT GTTTCAATTCATACGGTCGCTGAACCTACACAAGAATAAAG AGAACACGTTGACGTTGATAGGATTACTAGCCTACGCGTGC AACTTCTGGGGCAGTCAAAAAATAAATAAATACATTCTTC CATCATGCCGTTTTTCTTAAAAACAAACGACCGAGTCTATAC TTTCCGAACCTGTGTGTTATTTTGAACATAACAAATTGTATT AA
3	合成前記/後期 プロモータ	TTAAAAATTGAAATTTTATTTTTTTTTTTTTTGGAAATATAAATA
4	hTNF	ATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCTGGCCG AGGAGGCGCTCCCCAAGAAGACAGGGGGGCCCCAGGGCTC CAGGCGGTGCTTGTTCCTCAGCCTCTTCTCCTTCTGATCGT GGCAGGCGCCACCACGCTCTTCTGCCTGCTGCACTTTGGAG TGATCGGCCCCCAGAGGGAAGAGTTCCCCAGGGACCTCTCT CTAATCAGCCCTCTGGCCAGGCAGTCAGATCATCTTCTCG AACCCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAGCAAACC CTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGGGC CAATGCCCTCCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAAC CAGCTGGTGGTGCCATCAGAGGGCCTGTACCTCATCTACTC

10

20

30

40

【表 1 - 2】

		CCAGGTCCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCCCTCCACCCATG TGCTCCTCACCCACACCATCAGCCGCATCGCCGTCTCCTAC CAGACCAAGGTCAACCTCCTCTCTGCCATCAAGAGCCCCTG CCAGAGGGAGACCCAGAGGGGGCTGAGGCCAAGCCCTGG TATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCTGGAGAA GGGTGACCGACTCAGCGCTGAGATCAATCGGCCCGACTATC TCGACTTTGCCGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGGGATCATT GCCCTGTGA
5	eGFP	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGC CCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAA GTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCT GCCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACG GCGTGCACTGCTTACGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAG CACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCA GGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAG ACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGA ACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGG CAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATAACAGC CACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCA TCAAGGTGAAGTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGG CAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCC ATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCT GAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAG CGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGG GATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA
6	M134—一部分 および M135R 一部分 (vMyx-M135KO- hTNF に利用され る)	CGAGGATTACCTGGTCTATATAGATAACAAAACCTACGTAC GTATAAACGAGACCGTTGTACCGGAGAACGAGTATCTGGC AGCGAAGGCCCGCGAGTGACCTGTTTCCACACGGACTTGA TCCCCATTACGGACGAAGAGACACAACGACGTTTTGAGAA AATGATTGTACAGGCGGCGTTAGAGGACGCCCTAACGAGC ATCTTTGAGGAGCAGCACAATAACGTAACCGATTACTTCGC GGAATACATGCGATCCCTCCAAATGGCGAATAAAAAGTCAT ACGAATAATATTATCGCGGTCGCTTTAGCGGGGATAATCGT CATTGTAACGACCTACGTGTTTACTAGATTACGCACTAAGC AAAAAAAAGGAAATTATAACGTACGTAATAAGATAGATAA TTCCATACAGAAAGAGATTCAGTTGGACGGTGTATATACTA CTGACAACGTTTTTATATAAACATGGTGTTTATATTTATTAT CACCTGTGTATGTTTGGTGACGAGATCCTGTGGGGGTGGGT TAGAAGACGATATAGATCGC

【0103】

いくつかの例では、MYXV（ローザンヌ株）は、（2019年7月11日に GenBank によって提供された通りに、参照によって本明細書に組み込まれる）GenBank：AF170726.2で示される通りの配列を含む。

【0104】

いくつかの例では、vMyx-hTNF-M135-136は、図2Bで示される通りに配置される、SEQ ID NO：1-5を含む。いくつかの場合では、vMyx-hTNF-M135-136は、GenBank：AF170726.2によって示される通りの配列を随意に含む、ローザンヌ株バックボーンを含む。

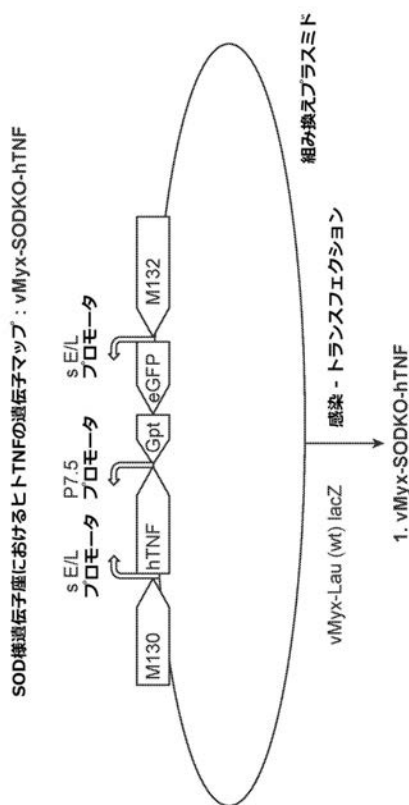
【0105】

いくつかの例では、vMyx-M135KO-hTNFは、図2Aで示される通りに配置される、SEQ ID NO：6、2、4、および5を含む。いくつかの場合では、vMyx-M135KO-hTNFは、GenBank：AF170726.2によって示される通りの配列を随意に含む、ローザンヌ株バックボーンを含む。

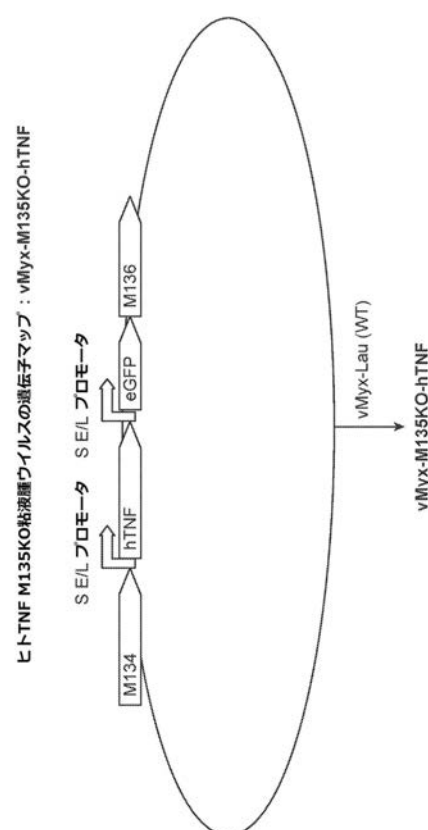
【0106】

本発明の好ましい実施形態が本明細書中に示され、記載されてきたが、このような実施形態はほんの例示として提供されているに過ぎないことが当業者には明らかであろう。当業者であれば、多くの変更、変形、および置換が、本発明から逸脱することなく思いつくであろう。本明細書に記載される本発明の実施形態の様々な代替案が、本発明の実施に際して利用され得ることを理解されたい。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定義すること、そして、これらの特許請求の範囲の範囲内の方法と構造体、およびその同等物が、それによって包含されることが意図されている。

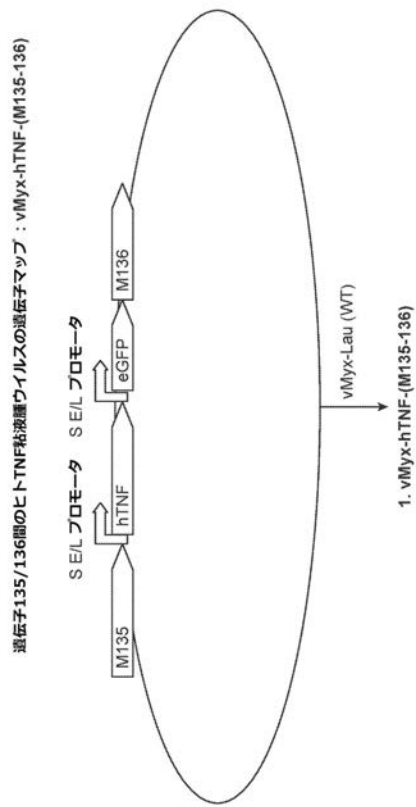
【図1】



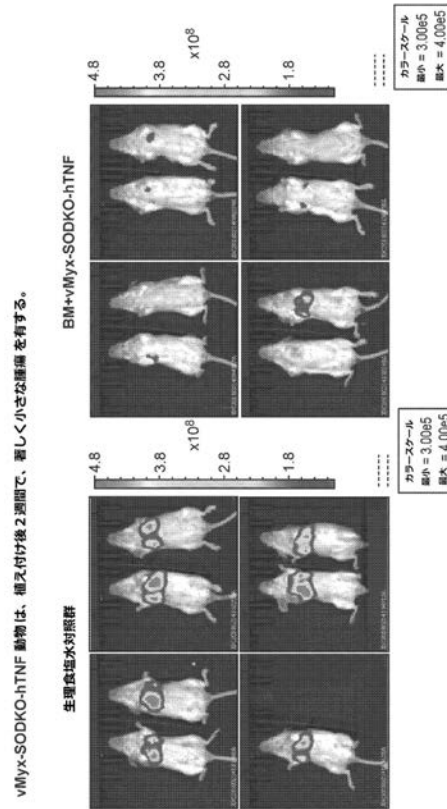
【図2A】



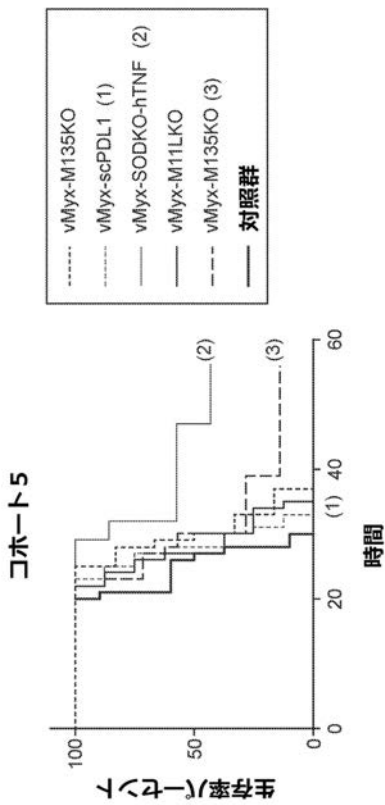
【図 2 B】



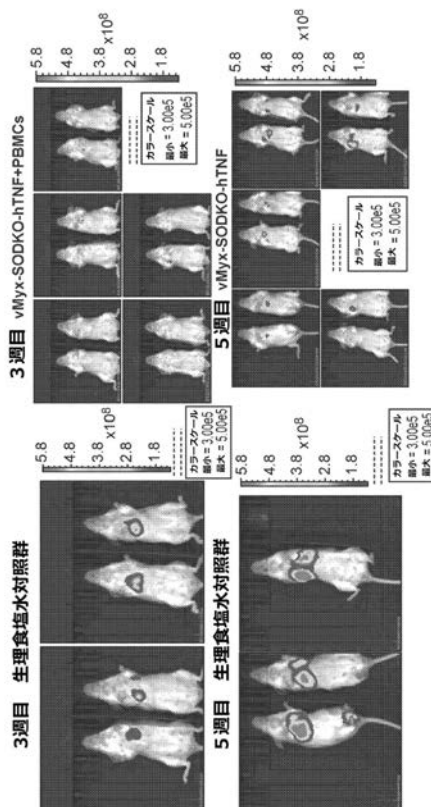
【図 3】



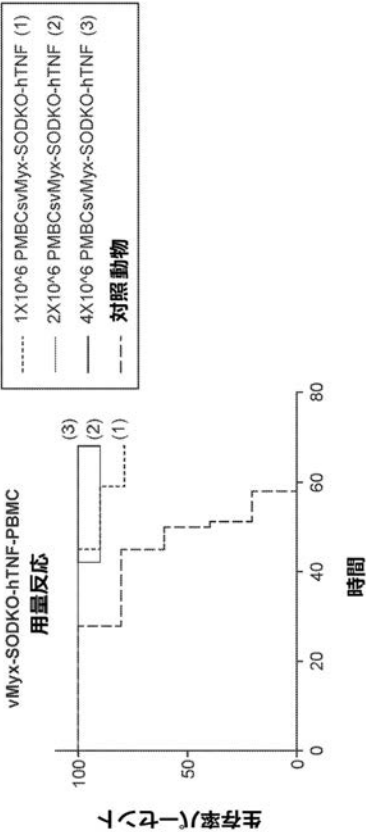
【図 4】



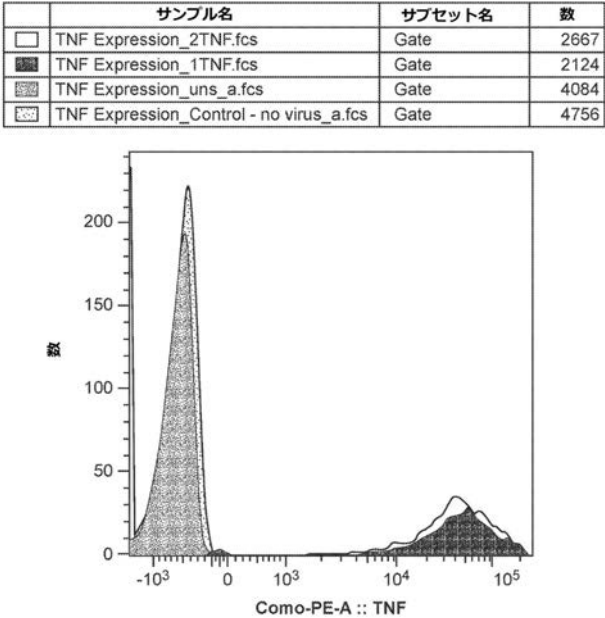
【図 5】



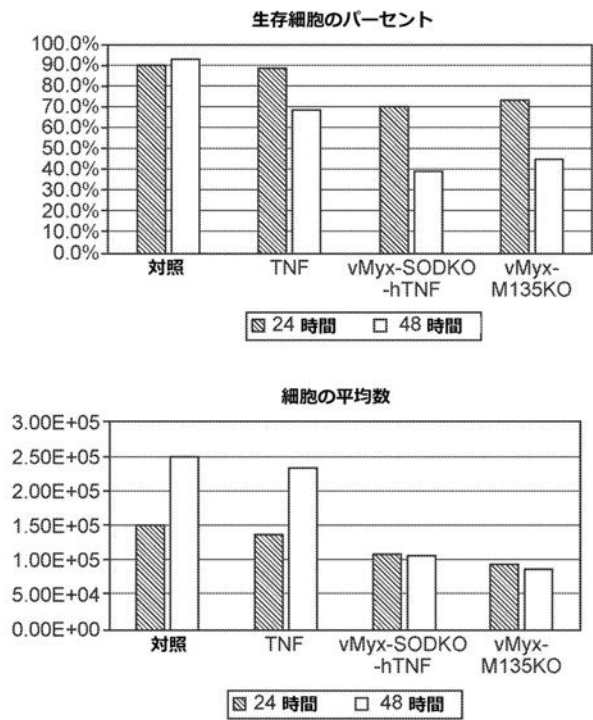
【 図 6 】



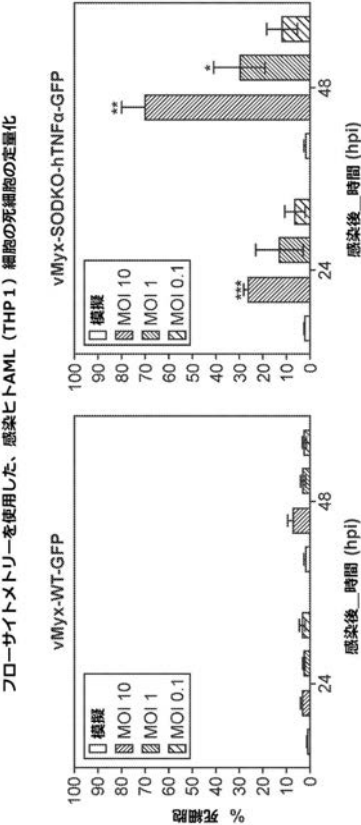
【 図 7 】



【 図 8 】

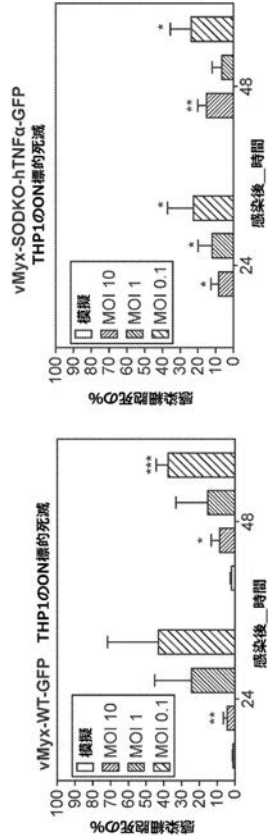


【 図 9 】



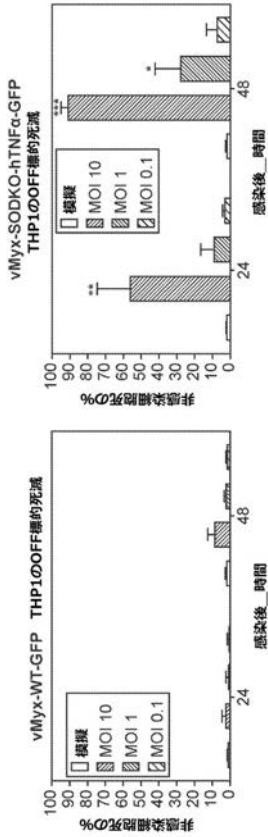
【図 1 0】

フローサイトメトリーを使用した、感染ヒトAML (THP1) 細胞のON標的の死滅の定量化



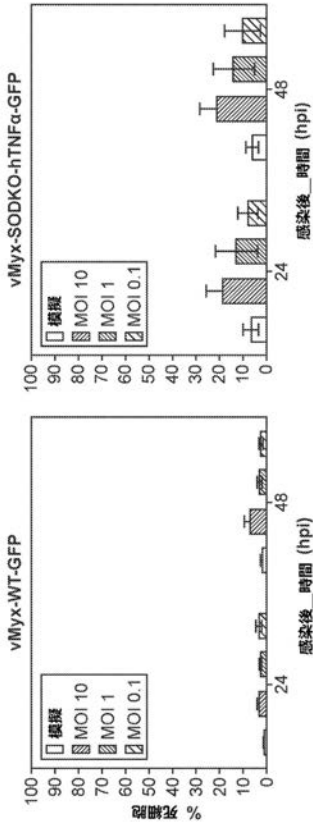
【図 1 1】

フローサイトメトリーを使用した、非感染ヒトAML (THP1) 細胞のOFF標的の死滅の定量化

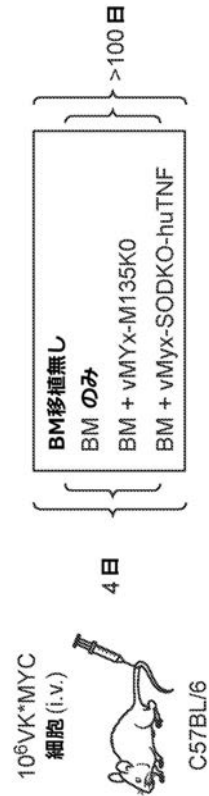


【図 1 2】

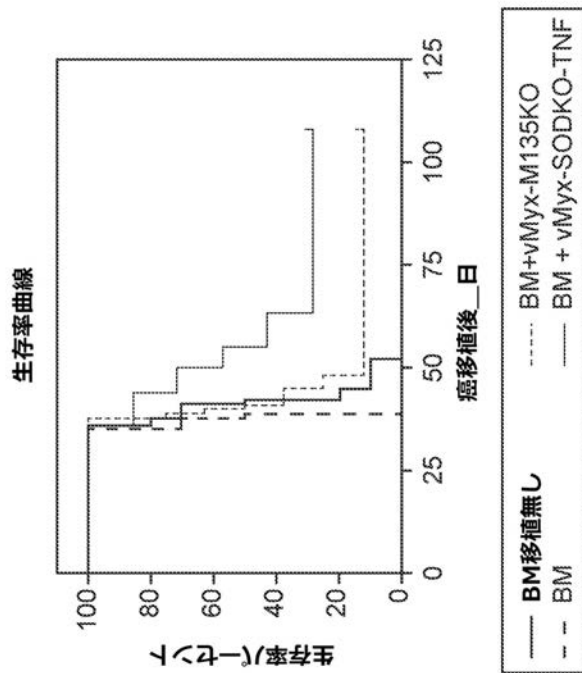
フローサイトメトリーを使用した、感染ヒトMM (U266) 細胞の細胞死の定量化



【図 1 3 A】



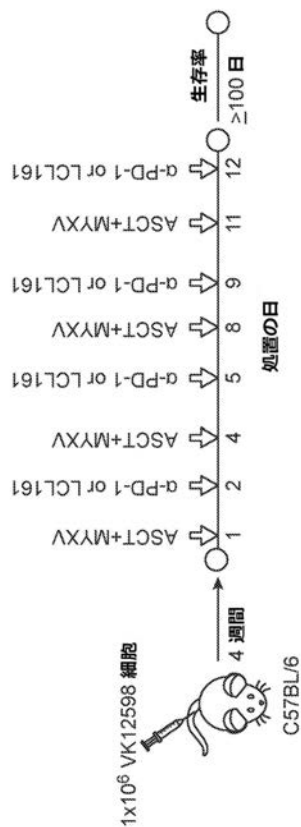
【 図 1 3 B 】



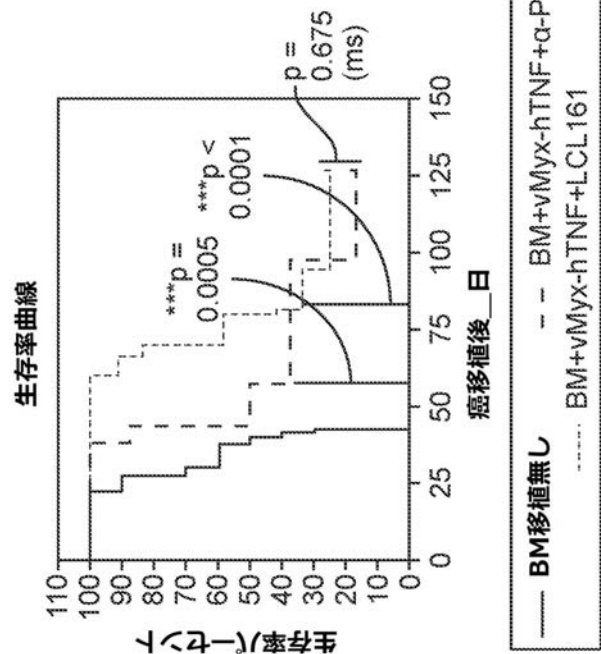
【図 1 3 C】

無疾患生存率		
コホート	無疾患 ／総数	生存率 パーセント(%)
BM移植無し	0/10	0
BMのみ	0/10	0
BM+vMyx - M135KO	1/8	13
BM + vMyx - SODKO-hTNF	2/7	29

【図 1 4 A】



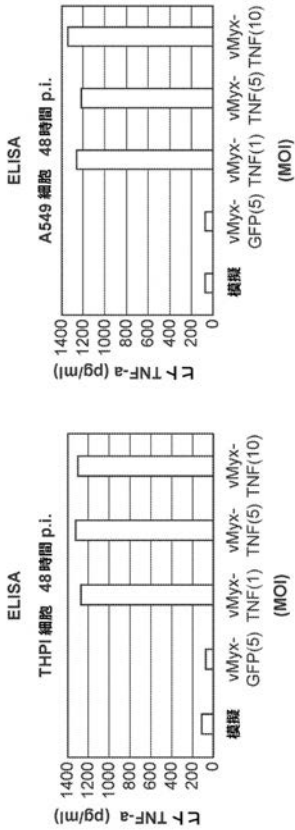
【図 1 4 B】



【図 1 4 C】

コホート	無疾患 ／総数	生存率 パーセント (%)
BM移植無し		
BM + MYXV + α-PD-1	0/10	0
BM + MYXV + LCL161	2/8	25
	2/12	17

【図 1 5】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/41700

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 35/76, 35/768; C12N 7/00; C12Q 1/70 (2019.01)

CPC - A61K 35/76, 35/768; C12N 7/00; C12Q 1/68, 1/70, 1/6883

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	WO 2007/143545 A2 (ROBARTS RESEARCH INSTITUTE, et al.) 13 December 2007; abstract; page 2, third paragraph; claims 4, 9, 12; Figure 4	1-2, 5-8, 24 --- 3-4, 9-14, 15/1-2, 15/5-8, 16/15/1-2, 16/15/5-8, 17/15/1-2, 17/15/5-8, 19, 26
Y	YU et al. Targeting Transmembrane TNF- α Suppresses Breast Cancer Growth. Cancer Res; 73 (13) July 1, 2013; pp. 4061-4075; page 4061, first column, first paragraph, second column, first paragraph, second paragraph. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3946	3-4
Y	BARRETT et al. M135R Is a Novel Cell Surface Virulence Factor of Myxoma Virus. Journal Of Virology, Jan. 2007, Vol. 81, No. 1, pp. 106-114; page 107, first column, second paragraph, fourth paragraph; page 109, second column, third paragraph. DOI:10.1128/JVI.01633-06	9-14
Y	WO 2015/078856 A1 (BAVARIAN NORDIC A/S) 4 June 2015; paragraphs [089], [094], [0106], [0125], [0134]	15/1-2, 15/5-8, 16/15/1-2, 16/15/5-8, 17/15/1-2, 17/15/5-8
Y	US 2014/0328804 A1 (MCFADDEN et al.) 06 November 2014; paragraph [0056]	19
Y	WANG et al. RIG-I Mediates the Co-Induction of Tumor Necrosis Factor and Type I Interferon Elicited by Myxoma Virus in Primary Human Macrophages. PLoS Pathog, 11 July 2008, 4(7): e1000099, pp. 1-13; page 10, second column, fourth paragraph. DOI:10.1371/journal.ppat.1000099	26

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 October 2019 (22.10.2019)

Date of mailing of the international search report

12 NOV 2019

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/41700

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 18, 20-23, 25, 27-49
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	C 1 2 N 15/86	Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 5/078 (2010.01)	C 1 2 N 5/078	
C 1 2 N 5/077 (2010.01)	C 1 2 N 5/077	
A 6 1 K 38/19 (2006.01)	A 6 1 K 38/19	

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(72)発明者 クリスティ, ジョン
アメリカ合衆国 8 5 2 5 7 アリゾナ州 スコッツデイル ノース・スコッツデイル・ロード
1 4 7 5 スイート 2 0 0

(72)発明者 ブラットマン, ジョセフ
アメリカ合衆国 8 5 2 5 7 アリゾナ州 スコッツデイル ノース・スコッツデイル・ロード
1 4 7 5 スイート 2 0 0

(72)発明者 ラフマーン, モハメド マスムズール
アメリカ合衆国 8 5 2 5 7 アリゾナ州 スコッツデイル ノース・スコッツデイル・ロード
1 4 7 5 スイート 2 0 0

(72)発明者 ヴィラ, ナンシー ヤネス
アメリカ合衆国 8 5 2 5 7 アリゾナ州 スコッツデイル ノース・スコッツデイル・ロード
1 4 7 5 スイート 2 0 0

F ターム(参考) 4B065 AA94X AA94Y AA95X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4C084 AA02 AA13 BA44 DA25 MA17 MA55 NA14 ZB261 ZB262
4C087 AA01 AA02 BB64 BB65 BC83 MA55 MA66 NA14 ZB26