(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4916641号
(P4916641)
(45)発行日　平成24年4月18日(2012.4.18)　(24)登録日　平成24年2月3日(2012.2.3)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 35/76	(2006.01)	A61K	35/76	
A61K 35/14	(2006.01)	A61K	35/14	Z
A61K 47/00	(2006.01)	A61K	47/00	
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00	

請求項の数 42　(全 18 頁)

(21)出願番号　特願2002-588916(P2002-588916)
(86)(22)出願日　平成14年5月9日(2002.5.9)
(65)公表番号　特表2004-521938(P2004-521938A)
(43)公表日　平成16年7月22日(2004.7.22)
(86)国際出願番号　PCT/US2002/014642
(87)国際公開番号　WO2002/091997
(87)国際公開日　平成14年11月21日(2002.11.21)
審査請求日　平成17年4月27日(2005.4.27)
(31)優先権主張番号　60/290,051
(32)優先日　平成13年5月11日(2001.5.11)
(33)優先権主張国　米国(US)

前置審査

(73)特許権者　504397480
ウェルスタット　バイオロジクス　コーポレイション
アメリカ合衆国　メリーランド　２０８７８，　ゲイサースバーグ，　クロッパーロード　９３０
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】腫瘍崩壊性ウイルス治療

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
癌を有するヒト被験体を処置するための薬学的組成物であって、該薬学的組成物は、以下：
（ａ）生理学的に受容可能な溶液中の懸濁物中のヒト細胞および複製コンピテントな腫瘍崩壊性ウイルスであって、ここで、該細胞は白血球であり、該ウイルスは、該白血球に特異的に結合し、かつ該組成物中の該ウイルスのプラーク形成単位：白血球の数の比率が、少なくとも１：１００である、ヒト細胞および複製コンピテントな腫瘍崩壊性ウイルス；あるいは、
（ｂ）生理学的に受容可能な溶液中の懸濁物中の腫瘍崩壊性ウイルスを感染させたヒト細胞であって、ここで、該細胞は、白血球である、ヒト細胞、
を含む、薬学的組成物。
【請求項２】
請求項１に記載の薬学的組成物であって、該薬学的組成物が、全血中に懸濁された前記腫瘍崩壊性ウイルスを含む、薬学的組成物。
【請求項３】
請求項１～２のいずれか１項に記載の薬学的組成物であって、該組成物中の前記ウイルスのプラーク形成単位：白血球の数の比率が、少なくとも１：１である、薬学的組成物。
【請求項４】
請求項３に記載の薬学的組成物であって、該組成物中の前記ウイルスのプラーク形成単

位：白血球の数の比率が、１：１から２００：１である、薬学的組成物。
【請求項５】
請求項４に記載の薬学的組成物であって、前記比率が、２００：１である、薬学的組成物。
【請求項６】
前記細胞が前記被験体の細胞である、請求項１～５のいずれか１項に記載の薬学的組成物。
【請求項７】
前記細胞が前記被験体以外のドナーの細胞である、請求項１～５のいずれか１項に記載の薬学的組成物。
【請求項８】
前記細胞が培養細胞である、請求項１～７のいずれか１項に記載の薬学的組成物。
【請求項９】
前記培養細胞が、不死化細胞株を含む、請求項８に記載の薬学的組成物。
【請求項１０】
前記不死化細胞株が、Ｕ－９３７またはＫＧ－１である、請求項９に記載の薬学的組成物。
【請求項１１】
前記細胞が、白血球である、請求項１～１０のいずれか１項に記載の薬学的組成物。
【請求項１２】
前記白血球が、白血球搬出法によって単離された白血球である、請求項１１に記載の薬学的組成物。
【請求項１３】
前記白血球が、活性である、請求項１１～１２のいずれか１項に記載の薬学的組成物。
【請求項１４】
前記白血球が、不活性である、請求項１１～１２のいずれか１項に記載の薬学的組成物。
【請求項１５】
前記白血球が、単球、好中球またはリンパ球である、請求項１１～１４のいずれか１項に記載の薬学的組成物。
【請求項１６】
前記白血球が、腫瘍浸潤性リンパ球である、請求項１５に記載の薬学的組成物。
【請求項１７】
前記薬学的組成物が、前記ウイルスに感染した白血球を含む全血を含む、請求項１および６～１６のいずれか１項に記載の薬学的組成物。
【請求項１８】
前記ウイルスが、ニューカッスル病ウイルスであり、レントジェニック毒性～メソジェニック毒性である、請求項１～１７のいずれか１項に記載の薬学的組成物。
【請求項１９】
前記ウイルスがクローンウイルスである、請求項１～１８のいずれか１項に記載の薬学的組成物。
【請求項２０】
前記感染した細胞が、前記組成物中の白血球の総数の少なくとも０．１％である、請求項１～１９のいずれか１項に記載の薬学的組成物。
【請求項２１】
前記感染した細胞が、前記組成物中の白血球の総数の少なくとも３０％である、請求項２０に記載の薬学的組成物。
【請求項２２】
請求項１～２１のいずれか１項に記載の薬学的組成物であって、前記ウイルスが、ニューカッスル病ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、水疱性口内炎ウイルス

、パラインフルエンザウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、Ｉ型ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルスおよびレオウイルスからなる群より選択される、薬学的組成物。

【請求項２３】

前記ウイルスが、メソジェニック毒性のニューカッスル病ウイルスである、請求項２２に記載の薬学的組成物。

【請求項２４】

前記薬学的組成物が、患者の表面領域の平方メートルあたり6×10^{6}～6×10^{10}の白血球を含む１日投薬量として投与されるように処方される、請求項１～２３のいずれか１項に記載の薬学的組成物。

【請求項２５】

前記１日投薬量が、患者の表面領域の平方メートルあたり6×10^{7}の白血球を含む、請求項２４に記載の薬学的組成物。

【請求項２６】

前記１日投薬量が、単回投与で投与されるように処方される、請求項２４～２５のいずれか１項に記載の薬学的組成物。

【請求項２７】

前記１日投薬量が、１週間のうちに１～７回の頻度で投与されるように処方される、請求項２４～２６のいずれか１項に記載の薬学的組成物。

【請求項２８】

前記組成物が静脈内投与されるように処方される、請求項１～２７のいずれか１項に記載の薬学的組成物。

【請求項２９】

前記投与されるべき組成物の容積が２５ミリリットル～１リットルである、請求項２８に記載の薬学的組成物。

【請求項３０】

前記組成物が腫瘍内投与されるように処方される、請求項１～２７のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

【請求項３１】

前記投与されるべき組成物の容積が、腫瘍塊あたり１００マイクロリットル～１０ミリリットルである、請求項３０に記載の薬学的組成物。

【請求項３２】

前記癌が固形癌であり、かつ前記組成物が静脈内投与または腫瘍内投与されるように処方される、請求項１～３１のいずれか１項に記載の薬学的組成物。

【請求項３３】

前記癌が固形癌以外であり、かつ前記組成物が静脈内投与されるように処方される、請求項１～３１のいずれか１項に記載の薬学的組成物。

【請求項３４】

前記癌が白血病である、請求項３３に記載の薬学的組成物。

【請求項３５】

前記組成物が、腹腔内投与されるように処方される、請求項１～２７のいずれか１項に記載の薬学的組成物。

【請求項３６】

前記投与されるべき組成物の容積が、２リットルまでである、請求項３５に記載の薬学的組成物。

【請求項３７】

前記組成物が小胞内投与されるように処方される、請求項１～２７のいずれか１項に記載の薬学的組成物。

【請求項３８】

前記投与されるべき組成物の容積が、７５ミリリットルまでである、請求項３７に記載

の薬学的組成物。
【請求項３９】
前記投与されるべき組成物の容積が、５０～６０ミリリットルである、請求項３８に記載の薬学的組成物。
【請求項４０】
前記ウイルスが複製コンピテントである、請求項１～１３および１５～３９のいずれか１項に記載の薬学的組成物。
【請求項４１】
癌を有するヒト被験体の処置のための医薬の製造における薬学的組成物の使用であって、該薬学的組成物は、以下：
（ａ）生理学的に受容可能な溶液中の懸濁物中のヒト細胞および複製コンピテントな腫瘍崩壊性ウイルスであって、ここで、該細胞は白血球であり、該ウイルスは、該白血球に特異的に結合し、かつ該組成物中の該ウイルスのプラーク形成単位：白血球の数の比率が、少なくとも１：１００である、ヒト細胞および複製コンピテントな腫瘍崩壊性ウイルス；あるいは、
（ｂ）生理学的に受容可能な溶液中の懸濁物中の腫瘍崩壊性ウイルスを感染させたヒト細胞であって、ここで、該細胞は、白血球である、ヒト細胞、
を含む、薬学的組成物の使用。
【請求項４２】
癌を有するヒト被験体の処置のためのキットであって、該キットは、以下：
（ａ）生理学的に受容可能な溶液中の懸濁物中のヒト細胞および複製コンピテントな腫瘍崩壊性ウイルスであって、ここで、該細胞は白血球であり、該ウイルスは、該白血球に特異的に結合し、かつ該組成物中のウイルスのプラーク形成単位：白血球の数の比率が、少なくとも１：１００である、ヒト細胞および複製コンピテントな腫瘍崩壊性ウイルス；あるいは、
（ｂ）生理学的に受容可能な溶液中の懸濁物中の腫瘍崩壊性ウイルスを感染させたヒト細胞であって、ここで、該細胞は、白血球である、ヒト細胞、
を備える、キット。
【発明の詳細な説明】
【背景技術】
【０００１】
（発明の背景）
「Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｎｅｏｐｌａｓｍｓ ｗｉｔｈ Ｖｉｒｕｓｅｓ」（ＷＯ ００／６２７３５）は、複製可能であり、そしてＩＦＮ媒介性抗ウイルス応答の機能障害を有する新生物細胞を死滅させ得るウイルスを投与する方法に関する。この特許の１つの特定の局面は、このようなウイルスの「全身」への投与に関する。
【０００２】
パラミクソウイルスは、赤血球と相互作用し、それらを凝集させることが知られている。それらは、インフルエンザウイルスよりも低効率で赤血球から溶出することが報告されている。Ｈｏｗｅ，Ｃ．およびＬｅｅ，Ｌ．Ｔ．（Ａｄｖ．Ｖｉｒｕｓ Ｒｅｓ．１７：１－５０，１９７２）。さらに、ウイルスコートタンパク質に特異的な抗体による中和を通じてパラミクソウイルスにより引き起こされる赤血球の血球凝集の特異的な阻害は、十分に理解されている現象である。
【０００３】
Ｓｃｈｉｒｒｍａｃｈｅｒら（Ｉｎｔ．Ｊ ｏｆ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ １６：３６３－３７３，２０００）は、ＮＤＶが、マウスマクロファージの抗腫瘍活性を活性化することを示した。以下に示される実験結果は、ＮＤＶが、マウス全血に添加された場合にマウス白血球と優先的に結合しないことを実証する。
【０００４】
Ｂｏｎｉｎａら（Ｇｉｏｒｎ．Ｂａｔｔ．Ｖｉｒｏｌ．Ｉｍｍｕｎ．，ＬＸＸＶＩＩＩ

，２５４－２６１，１９８５）は、ヒトマクロファージがＮＤＶの増殖を支持し得ることを示す。

【０００５】

Ｗｏｏｄｒｕｆｆら（Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ５：２９６－３０６，１９７２）ならびにＷｏｏｄｒｕｆｆおよびＷｏｏｄｒｕｆｆ（Ｊ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １１２（６）；２１７６－２１８３，１９７４）は、ＮＤＶが、ラット、マウス、およびヒトリンパ球をインビトロで凝集させることを見出した。

【０００６】

Ｆａｄｅｎら（Ｂｌｏｏｄ，５８：２２１－７，１９８１）は、ＮＤＶがヒト好中球にインビトロで結合することを示した。

【０００７】

上記のいずれも、ＮＤＶが赤血球よりも白血球に優先的に結合することを示していない。

【０００８】

文献には、ＮＤＶの赤血球細胞（通常は、ニワトリ）への結合が記載されている。ＮＤＶは、ヒトにおいて病原性ではないので、ＮＤＶがヒト血液の成分である白血球に優先的に結合することを見出したことは、驚くべき結果である。

【０００９】

文献は、ＮＤＶの細胞への結合が、細胞表面タンパク質に結合したシアル酸残基と、ウイルスＨＮタンパク質のニューラミニダーゼとの相互作用を通じて起こることを示している。ヒト赤血球は、表面タンパク質に結合した非常に高密度のシアル酸残基を有する。ヒト血液における赤血球：白血球の比は、約１０００：１である。従って、ＮＤＶが、ずっと多量にある赤血球の代わりに白血球画分に結合することは、特に驚くべきことである。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【００１０】

（発明の要旨）

本発明は、癌を有するヒト被験体を処置する方法を提供する。この方法は、被験体を処置するのに有効な量の薬学的組成物を被験体に投与する工程を包含し、それによって被験体を処置する。この薬学的組成物は、生理学的に受容可能な溶液中の懸濁物中にヒト白血球および複製コンピテントな腫瘍崩壊性ウイルスを含む。ここで、このウイルスは、白血球に特異的に結合し；そしてこの組成物中のウイルスのプラーク形成単位：白血球数の比は、少なくとも１：１００である。

【００１１】

本発明は、癌を有するヒト被験体を処置する方法を提供する。この方法は、被験体を処置するのに有効な量の薬学的組成物を被験体に投与する工程を包含し、それによって被験体を処置する。この薬学的組成物は、生理学的に受容可能な溶液中の懸濁物中に腫瘍崩壊性ウイルスを感染させたヒト細胞を含む。ここで、この細胞は、白血球または血小板である。

【００１２】

本発明は、癌を有するヒト被験体を処置するための薬学的組成物の使用、または癌を処置するための医薬の製造における使用を提供する。この薬学的組成物は、以下を含む：（ａ）生理学的に受容可能な溶液中の懸濁物中のヒト白血球および複製コンピテントな腫瘍崩壊性ウイルス（ここで、このウイルスは、白血球に特異的に結合し、そしてこの組成物中のウイルスのプラーク形成単位：白血球数の比は、少なくとも１：１００である）；または（ｂ）生理学的に受容可能な溶液中の懸濁物中の腫瘍崩壊性ウイルスを感染させたヒト細胞（ここで、この細胞は、白血球または血小板である）。複製コンピテントな腫瘍崩壊性ウイルスは、一般的に、白血球に感染するので、使用（ａ）および使用（ｂ）は、使用（ａ）を実施することが、使用（ｂ）を実施することを一般的に包含するという点で関連している。

【００１３】
本発明は、腫瘍崩壊性ウイルス（例えば、ＮＤＶ）が白血球および血小板に結合するという発見に一部基づく。ＮＤＶは、赤血球と比較して優先的に白血球に結合する。腫瘍は、炎症プロセスを伴う。従って、腫瘍崩壊性ウイルスに結合するかまたは腫瘍崩壊性ウイルスの感染した白血球は、腫瘍崩壊ウイルスを送達する特に有効な手段である。
【００１４】
（発明の詳細な説明）
本明細書中で使用する場合、用語「ヒト細胞」は、ヒトから単離された細胞、またはヒトから単離された細胞から誘導され、そして／またはその核酸成分が、例えば、不死化、照射、または組換え手段により変更されている培養細胞を意味する。「ヒト白血球」および「ヒト血小板」は、それぞれ、白血球および血小板であるヒト細胞である。文脈からそうでないことが示されるかまたは必要とされる場合を除いて、用語「細胞」または「ヒト細胞」は、白血球および／または血小板をいう。
【００１５】
本明細書中で使用する場合、用語「プラーク形成単位」（ｐｆｕ）は、１個の感染性ウイルス粒子を意味する。
【００１６】
本明細書中で使用する場合、用語「感染多重度」（ＭＯＩ）は、１個の細胞当たりに添加される感染性ウイルスの数を意味する。
【００１７】
本明細書中で使用する場合、用語「クローン性ウイルス」は、単一の感染性ウイルス粒子から獲得され、個々の分子クローンが有意な核酸配列の相同性を有するウイルスを意味する。例えば、配列相同性は、ビリオンの集団からの少なくとも８つの個々の分子クローンが、３００連続ヌクレオチドにわたり、９５％より高い配列相同性を有することである。
【００１８】
本明細書中で使用する場合、用語「白血球ウイルス複合体」（ＬＶＣ）は、腫瘍崩壊性ウイルスが白血球細胞集団と混合され、そしてウイルスがこれらの細胞に結合した場合に形成される複合体を意味する。この用語は、ウイルスが細胞の外側に結合した場合の細胞およびこのウイルスにより感染された細胞の両方を含む。
【００１９】
本明細書中で使用する場合、ウイルスは、このようなウイルスが、赤血球に結合するよりも高い特異性で所定の細胞に結合する場合、このような細胞に「特異的に結合する」といわれる。用語、特異的に結合する（ｂｉｎｄ（ｓ）　ｓｐｅｃｉｆｉｃａｌｌｙおよびｓｐｅｃｉｆｉｃａｌｌｙ　ｂｉｎｄ（ｓ））は、交換可能に使用される。
【００２０】
本明細書中で使用する場合、「ＮＤＶ」は、ニューカッスル病ウイルスの略称である。
【００２１】
本明細書中で使用する場合、用語「複製コンピテント」ウイルスは、癌細胞において感染性の子孫を生成するウイルスをいう。
【００２２】
本明細書中で使用する場合、移行用語「～を含む、包含する」は、制限が決められていない（ｏｐｅｎ－ｅｎｄｅｄ）。この用語を使用する請求項は、そのような請求項に列挙されるエレメントに加えてエレメントを含み得る。
【００２３】
本発明に従って、ヒト細胞が、任意の供給源から獲得され得る。それらは、被験体以外の者によって寄贈され得る。しかし、可能な場合、安全性の理由から、被験体により寄贈される細胞を使用することが、一般的に、好ましい。必要に応じて、ドナーから単離された細胞は、最初に培養物中で増殖され得、そして培養細胞はまた、それらが得られたドナーの細胞であるとみなされる。本発明に従って使用される培養細胞の例として、不死化さ

れたヒト白血球細胞株が挙げられる。適切な細胞株は、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎのような供給源から公的に入手可能である（例えば、Ｕ－９３７（ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ－１５９３．２）およびＫＧ－１（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－２４６））。

【００２４】

本発明に従って使用される白血球（例えば、単球、好中球、およびリンパ球（腫瘍浸潤リンパ球を含む））は、活性または不活性であり得る。白血球を不活性化するための技術としては、照射が挙げられる。

【００２５】

本発明に従って使用される細胞は、単離され得る（例えば、白血球の場合、白血球搬出によって）。しかし、細胞を単離することが必要でなく、薬学的組成物が、全血に懸濁された腫瘍崩壊性ウイルスまたはこのウイルスが感染した白血球および／もしくは血小板を含む全血を含む場合、全血が代わりに使用され得る。必要に応じて、白血球または血小板は、全血から最初に単離されるか、混合されるか、またはウイルスで感染され、次いで、他の血液成分が戻し添加される。

【００２６】

本発明の異なる実施形態において、白血球は、単球、好中球、およびリンパ球から選択される。本発明のより特定の実施形態において、白血球は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）である。ＴＩＬは、例えば、Ｒａｂｉｎｏｗｉｃｈ，Ｈ．ら（Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．４７：１７３－７，１９８７）に記載される方法により調製され得る。

【００２７】

本発明に従って、使用される腫瘍崩壊性ウイルスは、低い（レントジェニック（ｌｅｎｔｏｇｅｎｉｃ））毒性、中程度の（メソジェニック（ｍｅｓｏｇｅｎｉｃ））毒性、または高い（ヴェロジェニック（ｖｅｌｏｇｅｎｉｃ））毒性であり得る。このレベルの病原性は、卵における平均死滅時間（Ｍｅａｎ　Ｄｅａｔｈ　Ｔｉｍｅ　ｉｎ　Ｅｇｇｓ）（ＭＤＴ）試験に従って決定される（Ａｌｅｘａｎｄｅｒ，「Ｃａｐｔｅｒ２７：Ｎｅｗｃａｓｔｅｌ　Ｄｉｓｅａｓｅ」，Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ａｖｉａｎ　Ｐａｔｈｏｇｅｎｓ，第３版，Ｐｕｒｃｈａｓｅら編（Ｋｅｎｄａｌｌ／Ｈｕｎｔ，Ｉｏｗａ），１１７頁）。ウイルスは、ＭＤＴ試験により、レントジェニック（ｌｅｎｔｏｇｅｎｉｃ）（ＭＤＴ＞９０時間）；メソジェニック（ｍｅｓｏｇｅｎｉｃ）（ＭＤＴ　６０～９０時間）；およびヴェロジェニック（ｖｅｌｏｇｅｎｉｃ）（ＭＤＴ＜６０時間）として分類される。

【００２８】

本発明の１つの実施形態において、このウイルスはクローン性ウイルスである。

【００２９】

使用される薬学的組成物が懸濁物中に白血球および腫瘍崩壊性ウイルスを含む方法および使用を参照して、そのような方法の１つの実施形態において、その組成物中でのウイルスプラーク形成単位　対　白血球数の比率は、少なくとも１：１である。一般的に、白血球が活性なウイルス粒子で飽和されることが好ましい。ＮＤＶの場合、飽和は、２００：１のウイルスプラーク形成単位　対　白血球数の比率で達成される。本発明の１つの実施形態に従って、ウイルスはＮＤＶであり、そして組成物中でのウイルスプラーク形成単位　対　白血球数の比率は、約１：１～約２００：１であり、好ましくは約２００：１である。

【００３０】

使用される薬学的組成物が腫瘍崩壊性ウイルスで感染された細胞を含む上記の方法および使用において、そのような方法の１つの実施形態において、その感染細胞は、その組成物中の白血球および血小板の総数が少なくとも０．１％であり、より好ましくは少なくとも３０％、最も好ましくは約１００％である。使用されるウイルスは、複製不能であり得るが、好ましくは使用されるウイルスは、複製可能である。

【００３１】
本発明の１つの実施形態において、腫瘍崩壊性ウイルスは、ニューカッスル病ウイルス（ＮＤＶ）、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、パラーインフルエンザウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、Ｉ型疱疹ウイルス、ワクシニアウイルス、およびレオウイルスからなる群より選択される。より特定の実施形態において、中程度の毒力であるニューカッスル病ウイルス系統が、使用され得る。
【００３２】
熟練した臨床医は、各場合に投与されるべき最適な組成物量を決定し得る。代表的に、細胞が白血球である場合、有効量は、患者の表面積１平方メートルあたり6×10^{6}～6×10^{10}個の白血球（例えば、患者の表面積１平方メートルあたり約6×10^{7}個の白血球）を含む日用量の組成物である。細胞が血小板である場合、有効量は、代表的に、患者の表面積１平方メートルあたり10^{9}～10^{11}個の血小板（例えば、患者の表面積１平方メートルあたり約10^{11}個の血小板）を含む日用量の組成物である。
【００３３】
日用量の組成物は、一回の２４時間の期間に複数の投与で被験体に投与され得、この期間の間に、日用量の一部が、各投与で投与される。より好ましくは、日用量は、単回投与で投与される。本発明の１つの実施形態において、日用量の組成物は、１週間の期間に１回～７回の頻度で（すなわち、１日目～７日目の各日に）被験体に投与される。
【００３４】
本発明に従って、任意の従来の投与経路が、この薬学的組成物の投与に適切である。例えば、この組成物は、静脈内投与、腫瘍内投与、腹腔内投与または小胞内（腎臓）投与され得る。静脈内投与の場合、投与される組成物の容量が、２５ｍＬ～１Ｌであるのが好都合である。腫瘍内投与の場合、投与される組成物の容量が、１腫瘍塊あたり１００μＬ～１０ｍＬであるのが好都合である。腹腔内投与の場合、投与される組成物の容量が、２Ｌまででであるのが好都合である。小胞内投与の場合、投与される組成物の容量が、７５ｍＬまで、好ましくは５０～６０ｍＬであるのが好都合である。ウイルスのｐｆｕの量および投与される細胞に依存して、組成物の濃度は、所望の容量を達成するために変動され得る。癌が固形腫瘍である場合、組成物は、上記に提供した任意の経路（例えば、静脈内または腫瘍内）によって投与され得る。癌が固形腫瘍以外（例えば、白血病）である場合、組成物は、腫瘍内には投与されず、その代わり、上記に提供した他の経路（例えば、静脈内）によって投与され得る。
【００３５】
本発明は、以下の実施例を参照することによってより良く理解される。以下の実施例は、本明細書中に記載される本発明を例示するが、限定はしない。以下の実施例において、使用したＮＤＶは、ニューカッスル病ウイルスのＭＫ１０７系統の、３つのプラークを精製した（ｔｒｉｐｌｅ－ｐｌａｑｕｅ　ｐｕｒｉｆｉｅｄ）弱毒化（中程度の毒性）バージョンであり、これは、国際特許出願ＷＯ　００／６２７３５（２０００年１０月２６日公開）（Ｐｒｏ－Ｖｉｒｕｓ，Ｉｎｃ．）に、より完全に記載される。
【００３６】
（実施例）
（実施例１：ヒト血球へのＮＤＶの結合）
目的：どの細胞型がウイルスに結合するかを決定するために、ヒト血球へのＮＤＶの結合を調べる。
【００３７】
材料：ＮＤＶ；抗体　Ｍａｂ２Ｆ１２（３．５ｍｇ／ｍｌ）を、ＮＤＶ　ＨＮタンパク質に対して惹起する；２％　ウシ胎仔血清および０．０２％　アジ化ナトリウムを含む、ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ　Ｓｔａｉｎ　Ｂｕｆｆｅｒ（ＰＢＳ）、カタログ＃５５４６５６、ロットＭ０５９３９４；Ｒｏｃｋｌａｎｄヤギ抗マウスポリクローナル抗体－フィコエリトリン結合体化、カタログ＃７１０－１８３２、ロット７３６７；Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｃｙｔｏｍｅｔｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　１０×ＦＡ

ＣＳ Ｌｙｓｉｎｇ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ、Ｃａｔ３４９２０２、ロット＃８２０２６。

【００３８】

方法：ヒト全血を、シトレートチューブ（３．２％、０．１０５Ｍ、Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ＃３６６４１５）中に収集した。各２本のチューブからの約４ｍｌをプールし、使用するまで室温で維持した。トリパンブルー排除法および血球計算板を用いて細胞を計数した。ＮＤＶ（１．３Ｅ＋１０ＰＦＵ／ｍｌ）を使用して、０．２、０．０５および０．０２のＭＯＩ（感染多重度、ＰＦＵ／細胞として表現）で細胞を感染した（ウイルスを添加しないネイティブコントロールと共に）。ウイルスを添加した後、チューブを３７℃で３０分間インキュベートした。細胞を懸濁状態で維持するためのチューブの穏やかな混合を、インキュベーション期間の間、３インターバルで実施した。

【００３９】

２ｍｌの冷ＰＢＳを添加し、５分間４℃で２０００ｒｐｍにて遠心分離し、溶液を細胞ペレットから吸引することによって、サンプルを２回洗浄した。ＰＢＳを各時点で吸引によって除去した。各サンプルの容量を、冷ＰＢＳを添加することによって１ｍｌに調整した。モノクローナル抗体ＭａｂＦ１２を、９．１μｇのこの抗体を含む２０μｌの溶液を添加することによって、各サンプルに添加した。サンプルを３０分間氷上でインキュベートし、前に記載したように２回再度洗浄した。ヤギ抗マウスＰＥレポーター抗体を、１２μｇ／ｍｌのこの抗体の溶液の１ｍｌを添加することによって、各サンプルに添加した。サンプルを氷上で３０分間再度インキュベートし、上記のように洗浄した。白血球画分の分析のために、１００μｌの各サンプルを３ｍｌの１×ＦＡＣＳ Ｌｙｓｉｎｇ Ｓｏｌｕｔｉｏｎを用いて室温で６分間インキュベートした。サンプルを、上記のように遠心分離し、吸引した。細胞ペレットを、０．５ｍｌのＰＢＳに再懸濁した。赤血球分析のために、１．５μｌの各サンプルを、２．０ｍｌのＰＳＢに添加した。サンプル分析を、Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒフローサイトメーターを用いて実施した。前方散乱パラメーターおよび側方散乱パラメーターは、線形設定を使用し、そしてフィコエリトリンのＦＬ２検出は、対数設定を使用した。

【００４０】

結果：表１に示される実験結果は、ＮＤＶが、ヒト全血の白血球画分に優先的に結合することを示す。０．０５のＭＯＩにおいて（全血に対して）、０％の赤血球と比較して、４６％の白血球がＮＤＶに対して陽性である。０．２のＭＯＩにおいて、ＮＤＶが８９％の白血球に存在するが、１５％の赤血球しか結合しなかった。０．０５および０．２のＭＯＩは、赤血球の存在を割り引いて考えると、白血球に対して約５０および約２００である。より高いＭＯＩにおける赤血球へのＮＤＶの少ない量の結合は、これらの細胞の表面上に存在するタンパク質上のシアル残基に対する低い親和性結合を反映し得る。

【００４１】

【表１】

表 1: NDV結合に対して陽性の細胞（%）

MOI	赤血球	白血球
0.05	0	46
0.2	15	89

パラミクソウイルスが赤血球と相互作用し、赤血球の赤血球凝集反応を生成することは、

一般的に認識されている（Ｈｏｗ，Ｃ．およびＬｅｅ，Ｌ．Ｔ．，「Ｖｉｒｕｓ－Ｅｒｙｔｈｒｏｃｙｔｅ　Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ」を参照のこと）。従って、これらのウイルス（ＮＤＶを含む）の結合に関与する主要な細胞型は、赤血球であると、一般的に考えられている。細胞へのＮＤＶの結合は、細胞表面タンパク質に結合したシアル酸残基に対するウイルスＨＮタンパク質のノイラミニダーゼ活性の相互作用を介して生じると考えられる。ヒト赤血球は、血液中で細胞を溶液状態に維持するための、表面タンパク質に結合した非常に高い密度のシアル酸残基を有する。ヒト血液中での赤血球　対　白血球の比率は約１０００　対　１であるので、ＮＤＶが、広範によりたくさんある赤血球の代わりに白血球画分に結合することは、驚くべきことである。

【００４２】

（実施例２：ＮＤＶは、ＮＤＶ中和抗体の存在下で白血球と関連する）

（導入／背景）：この実験の目的は、ＮＤＶ中和抗体の存在下または非存在下で、白血球に結合するＮＤＶの能力を評価することであった。ヒト臨床患者５２１人には、この実験のために全血を引き出す前に、約２７処理過程のＮＤＶ治療を与えた。患者５２１人は、プラーク中和アッセイおよび微小中和アッセイによって検出されるように、有意なレベルのＮＤＶ中和抗体を示した。

【００４３】

（方法）：ナイーブなドナーおよび患者５２１人からのヒト全血をシトレートチチューブ（３．２％、０．１０５Ｍ、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ　＃３６６４１５）中に収集した。各ドナーからのチューブを室温で維持した。全血をアリコートに分け、そしてＮＤＶ（ロット番号ＲＬ－００５）を用いてスパイクした（ｓｐｉｋｅ）。ＮＤＶを０．２、０．０２、および０．００２のＭＯＩ（感染多重度、ＰＦＵ／細胞として表現）でスパイクした（ウイルスを添加しないネイティブコントロールと共に）。ウイルスを添加した後、チューブを室温で３０分間インキュベートした。血漿および白血球を、ポリモルホプレップ（ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｐｒｅｐ）（Ｎｙｃｏｍｅｄ，Ｉｎｃ．）を使用した勾配遠心分離によって、スパイクしたサンプルから単離した。血漿を、この勾配の頂部から注意深く取り除いた。２つの白血球バンド（多形核球性細胞のバンドおよび単核細胞のバンド）を収集し、そして０．５×ＤＭＥＭに配置した。細胞をペレットにし、完全な強度のＤＭＥＭ中に再懸濁した。細胞を数回洗浄して、分離培地を除去した。各アリコート中の白血球を、Ｃｏｕｌｔｅｒ　Ｃｏｕｎｔｅｒを用いて数えた。既知の数の白血球または既知の容量の血漿を、２５ｃｍ^{2}組織培養フラスコ（Ｃｏｒｎｉｎｇ）中でＨＴ１０８０ヒト線維肉腫細胞（ＡＴＣＣ、ＣＣＬ－１２１）の単層上で、共培養するか、または接種した。ＨＴ１０８０細胞は、ＮＤＶによる細胞溶解に高度に感受性である。単層を、数日にわたってＣＰＥ（細胞変性効果）の存在について定性的に評価した。ＣＰＥを示したフラスコを、陽性であるとみなした。

【００４４】

（結果）

表２に示されるように、未処置ドナーおよび患者５２１の両方について、３つすべてのＭＯＩスパイクについて１フラスコ当たり３００，０００白血球にて、試験したフラスコ両方が、ＮＤＶによる感染性についてポジティブであった。未処置ドナーについて、すべてのフラスコが、３０００細胞レベルにてポジティブであり、３０細胞レベルでは、すべてであるが最低のＭＯＩスパイクが、ポジティブであった。患者５２１について３０００細胞レベルで、２つのフラスコのうち１つが、０．０２ＭＯＩでポジティブであり、０．００２ＭＯＩで２つのフラスコのうちどちらもポジティブではなかった。患者５２１について３０細胞レベルで、２つのフラスコのうち１つが、０．２ＭＯＩでポジティブであり、この細胞レベルでは、他のすべてのフラスコが、ネガティブであった。

【００４５】

血漿データは、未処置患者において、ウイルスが、試験したＭＯＩすべてで血漿から回収され得ることを示す（表３を参照のこと）。しかし、中和抗体を含むいかなる感染性ウイルスも、患者５２１から回収されなかった。

【００４６】
（考察）
これらの結果は、感染性ウイルスに関連する白血球の数が、未処置ドナーと比較して患者５２１において減少されたことを示す。しかし、ウイルスは、中和抗体の存在下で、白血球になお結合可能であった。この結合は、低いＭＯＩ（０．００２）でさえ生じることが示された。このことは、患者投与のためのＭＯＩと同様である。
【００４７】
ＮＤＶは、中和抗体の生成をもたらす体液性免疫応答を惹起する。白血球へのウイルスの結合は、その中和抗体からそのウイルスを防御することを可能にし得る。このことは、遊離ウイルスよりも有利である。遊離ウイルスは、中和抗体に曝され、そして非感染性にされる。
【００４８】
腫瘍にウイルスを送達するためのビヒクルとして白血球を使用することは、免疫応答を生じた患者（すなわち、複数用量のＮＤＶを受けた患者）中の中和抗体によって非感染性にされる遊離の循環ウイルスよりも有利であることが、これらのデータから結論付けられ得る。
【００４９】
（表２：結合した感染性ＮＤＶの存在についての白血球の評価）
【００５０】
【表２】
（未処置ドナー）

	T25フラスコ中にHT1080細胞単層との共培養中に白血球を配置した後の、ポジティブ培養物の数		
NDV スパイク (MOI)	300,000 細胞	3000 細胞	30 細胞
0.2	2*	2	2
0.02	2	2	2
0.002	2	2	0
スパイクなし（コントロール）	0	0	0

（患者521）

	T25フラスコ中にHT1080細胞単の共培養中に白血球を配置した後のポジティブ培養物の数		
NDV スパイク (MOI)	300,000 細胞	3000 細胞	30 細胞
0.2	2*	2	1
0.02	2	1	0
0.002	2	0	0
スパイクなし（コントロール）	0	0	0

【００５１】
＊試験した２つのフラスコ当たりのポジティブの数。

【００５２】
（表３：感染性ＮＤＶの存在についての血漿の評価）
【００５３】
【表３】

サンプル	未処置ドナー	患者　521
0.2 MOI スパイク	1	0
0.02 MOI スパイク	1	0
0.002 MOI スパイク	1	0
スパイクなし (コントロール)	0	0

Ｎ＝１フラスコ。
【００５４】
ＮＤＶは、ヒトにおいて病原性ではないので、ＮＤＶが、ヒト血液の白血球成分に優先的に結合することを見出すことは、驚くべき結果である。
【００５５】
（実施例３：ヒト白血球／ＮＤＶ複合体の調製）
ヒト白血球（５×１０^{8}細胞）を、白血球搬出法によってか、またはＰＯＬＹＭＯＲＰＨＰＲＥＰ（Ｎｙｃｏｍｅｄ，Ｉｎｃ．）を製造業者の指示書を使用して使用する勾配遠心分離によって、調製する。それらの細胞を、室温にて、滅菌１×ＰＢＳで２回洗浄し、そして同じ緩衝液中で１０ｍｌの容積にする。これらの細胞を、（無菌的に添加した）１×１０^{10}ｐｆｕのＮＤＶと混合し、そして３０分間静置する（そして１０分間および２０分間、短くさらに混合する）。これらの細胞を、１５００ｒｐｍで５分間遠心分離し、そしてＰＢＳを除去する。これらの細胞を、２０ｍｌの１×ＰＢＳで洗浄し、そして再び遠心分離する。この細胞ペレットを、注射用に１０ｍｌまで希釈する。
【００５６】
（実施例４：ヒト白血球／ＮＤＶ複合体による、無胸腺マウス中のヒト腫瘍異種移植片（＜１０ｍｍかつ＞５ｍｍ）の処理）
無胸腺マウスに、１，０００万個のヒト腫瘍細胞を皮内注射する。腫瘍が５ｍｍと１０ｍｍとの間のサイズ範囲に達した後に、実施例３に記載される８×１０^{6}細胞の白血球／ＮＤＶ複合体の単回注射を行う。腫瘍増殖に対するＬＶＣの効果を、完全後退および部分的後退について試験する。
【００５７】
（実施例５：患者における、ヒト白血球／ＮＤＶ複合体によるヒト腫瘍の全身処置）
ヒト白血球を、患者からの白血球搬出法により得る。白血球／ＮＤＶ複合体（ＬＶＣ）を、実施例３に記載されるように調製する。この複合体（５×１０^{8}細胞）を、静脈内注射によってその患者に戻す。ＬＶＣの注射を、３日間隔で２１日間行う。
【００５８】
（実施例６：患者における、ヒトドナー白血球／ＮＤＶ複合体によるヒト腫瘍の全身処置）
ヒト白血球を、未処置ドナーからの白血球搬出法により得る。白血球／ＮＤＶ複合体（ＬＶＣ）を、実施例３に記載されるように調製する。この複合体（５×１０^{8}細胞）を、静脈内注射によってその患者に戻す。ＬＶＣの注射を、３日間隔で２１日間行う。
【００５９】
（実施例７：マウス血球へのＮＤＶの結合）
（目的）
どの細胞型がＮＤＶに結合するのかを決定するために、マウス血球へのＮＤＶの結合を調査する。
【００６０】

（材料）
ＮＤＶ；抗体Ｍａｂ２Ｆ１２（３．５ｍｇ／ｍｌ）を、ＮＤＶ　ＨＮタンパク質に対して惹起する；２％ウシ胎仔血清および０．０２％アジ化ナトリウムを含む、ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ　Ｓｔａｉｎ　Ｂｕｆｆｅｒ（ＰＳＢ）（カタログ番号５５４６５６、ロットＭ０５９３９４）；Ｒｏｃｋｌａｎｄヤギ抗マウスポリクローナル抗体－フィコエリトリン結合体（カタログ番号７１０－１８３２、ロット７３６７）；Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｃｙｔｏｍｅｔｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　１０×ＦＡＣＳ　Ｌｙｓｉｎｇ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（カタログ番号３４９２０２、ロット番号８２０２６）。

【００６１】
（方法）
マウス全血を、クエン酸チューブ（３．２％、０．１０５Ｍ、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ番号３６６４１５）中に収集した。細胞を、トリパンブルー排出法および血球計を使用して、計数した。これらの細胞を、ＭＯＩ（ＰＦＵ／細胞として表される、感染多重度）０．２、１、および３で感染させるために、ＮＤＶロット番号ＲＬ－００５（４．２Ｅ＋１０　ＰＦＵ／ｍｌ）を使用した（ネガティブコントロールはウイルスを添加しなかった）。ウイルスを添加した後、チューブを、３７℃にて３０分間インキュベートした。細胞を懸濁状態にて維持するためにこれらのチューブを穏やかに混合することを、このインキュベーション期間の間に３分間間隔で実施した。

【００６２】
それらのサンプルを、２ｍｌの冷ＰＳＢを添加すること、４℃で２０００ｒｐｍで５分間遠心分離すること、そしてその細胞ペレットから溶液を吸引することによって、２回洗浄した。そのＰＳＢを、吸引によって毎回除去した。各サンプルの量を、冷ＰＳＢを添加することによって１ｍｌに調整した。９．１μｇのモノクローナル抗体Ｍａｂ２Ｆ１２を含む溶液２０μｌを添加することによって、この抗体を各サンプルに添加した。これらのサンプルを、氷上で３０分間インキュベートし、そして以前に記載した通りにまた２回洗浄した。ヤギ抗マウスＰＥレポーター抗体の１２μｇ／ｍｌ溶液１ｍｌを添加することによって、この抗体を各サンプルに添加した。このサンプルを、氷上で３０分間またインキュベートし、そして記載されたように洗浄した。白血球画分の分析のために、各サンプル１００μｌを、３ｍｌの１×ＦＡＣＳ　Ｌｙｓｉｎｇ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎとともに、室温で６分間インキュベートした。このサンプルを、上記のように遠心分離した。この細胞ペレットを、０．５ｍｌのＰＳＢ中に再懸濁した。赤血球分析のために、各サンプル１．５μｌを、２．０ｍｌのＰＳＢに添加した。サンプル分析を、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ＦＡＣＳａｌｉｂｕｒフローサイトメーターを用いて実施した。前方散乱パラメーターおよび側方散乱パラメーターは、線形設定を使用し、フィコエリトリンのＦＬ２検出は、対数設定を使用した。

【００６３】
（結果）
表４に示される実験の結果は、ＮＤＶが白血球に優先的に結合するヒト血球へのＮＤＶの結合（実施例１）とは異なり、ＮＤＶは、マウス全血の赤血球画分に優先的に結合し、白血球には結合しない。

【００６４】
（表４：ＮＤＶ結合についてポジティブの細胞％）

【００６５】

【表４】

MOI	赤血球	白血球
0.2	30	1
1	80	1
3	92	1

ヒト白血球がＮＤＶの結合についてほとんどポジティブであるＭＯＩ０．２にて、マウス白血球はネガティブである。

【００６６】

（実施例８：ＮＤＶのＲａｔ血球への結合）

目的：どの細胞型がＮＤＶを結合するかを決定するために、このウイルスのマウスＲａｔ血球への結合を調査すること。

【００６７】

材料：ＮＤＶ；ＮＤＶ　ＨＮタンパク質に対して惹起された抗体　Ｍａｂ　２Ｆ１２（３．５ｍｇ／ｍｌ）；２％ウシ胎仔血清および０．０２％アジ化ナトリウムを含有するＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ　Ｓｔａｉｎ　Ｂｕｆｆｅｒ（ＰＳＢ）（カタログ番号５５４６５６、ロットＭ０５９３９４）；Ｒｏｃｋｌａｎｄヤギ抗マウスポリクローナル抗体－フィコエリトリン結合体（カタログ番号７１０－１８３２、ロット７３６７）；Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｃｙｔｏｍｅｔｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　１０Ｘ　ＦＡＣＳ　Ｌｙｓｉｎｇ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｃａｔ３４９２０２、ロット番号８２０２６）。

【００６８】

方法：全血（１．８ｍｌ）を、Ｓｐｒａｇｕｅ　Ｄａｗｌｅｙラットからクエン酸チューブ（３．２％、０．１０５Ｍ、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　＃３６６４１５）に採取し、使用時まで室温に保った。細胞を、トリパンブルー排除法および血球計算盤を使用して計数した。ＮＤＶロット番号ＲＬ－００５（４．２Ｅ＋１０　ＰＦＵ／ｍｌ）を使用して、（ウイルス添加なしのネガティブコントロールとともに）０．０５、０．２、０．５、１および３のＭＯＩ（感染効率、ＰＦＵ／細胞として表される）にて細胞に感染させた。ウイルスを添加した後、チューブを、３７℃にて３０分間インキュベートした。懸濁物中の細胞を維持するためのチューブの穏やかな混合を、インキュベーション期間の間に３回行った。

【００６９】

サンプルを、冷ＰＳＢを２ｍｌ添加し、５分間、４℃、２０００ｒｐｍにて遠心分離し、細胞ペレットから溶液を吸引することにより２回洗浄した。ＰＳＢを、各時間に吸引により除去した。各サンプルの容積を、冷ＰＳＢを添加することにより１ｍｌに調節した。モノクローナル抗体Ｍａｂ２Ｆ１２を、９．１μｇの抗体を含む２０μｌの溶液を添加することにより、各サンプルに添加した。このサンプルを、氷上で３０分間インキュベートし、上記のように、再び２回洗浄した。ヤギ抗マウスＰＥレポーター抗体を、この抗体の１２μｇ／ｍｌ溶液を１ｍｌ添加することにより、各サンプルに添加した。このサンプルを氷上で３０分間再びインキュベートし、上記のように洗浄した。白血球画分の分析のために、各サンプルの１００μｌを、３ｍｌの１×ＦＡＣＳ　Ｌｙｓｉｎｇ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎとともに室温にて６分間インキュベートした。このサンプルを、先のように遠心分離した。細胞ペレットを、０．５ｍｌのＰＳＢ中で再懸濁した。前方散乱パラメーターおよび側方散乱パラメーターは線形設定を採用し、フィコエリトリンのＦＬ２検出は、対数設定を採用した。

【００７０】

結果：表５に示す実験の結果は、ＮＤＶが低いＭＯＩ（０．０２および０．０５）にて

ラット白血球に結合するが、これらのＭＯＩで赤血球には十分に結合しないことを示す。このパターンは、ウイルスのヒト白血球（これにウイルスが優先的に結合する）への結合とマウス白血球（これにはウイルスが結合しない）への結合との間の中間であるようである。

【００７１】

【表５】

表5：NDV結合について陽性の細胞％

MOI	赤血球	白血球
0.02	3	7
0.05	12	21
0.2	30	29
1	63	58
3	90	66

（実施例９：ＮＤＶのヒト血小板への結合）

目的：ＮＤＶのヒト血小板への結合を調査すること。

【００７２】

材料：ＮＤＶ；ＮＤＶ　ＨＮタンパク質に対して惹起された抗体　Ｍａｂ２Ｆ１２（３．５ｍｇ／ｍｌ）；２％ウシ胎仔血清および０．０２％アジ化ナトリウムを含有するＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ　Ｓｔａｉｎ　Ｂｕｆｆｅｒ（ＰＳＢ）（カタログ番号５５４６５６、ロットＭ０５９３９４）；Ｒｏｃｋｌａｎｄヤギ抗マウスポリクローナル抗体－フィコエリトリン結合体（カタログ番号７１０－１８３２、ロット７３６７）；Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｃｙｔｏｍｅｔｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　１０Ｘ　ＦＡＣＳ　Ｌｙｓｉｎｇ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｃａｔ３４９２０２、ロット番号８２０２６）。

【００７３】

方法：

（血小板の単離）

ヒト全血を、クエン酸チューブ（３．２％、０．１０５Ｍクエン酸、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　＃３６６４１５）に採取した。７ｍｌの全血を、１５ｍｌポリプロピレン遠心チューブ中に入れた。このチューブを８００ｇにて５分間室温で遠心分離した。約１．５ｍｌの血小板富化血漿（ＰＲＰ）を遠心管の頂部から採取した。発表された回収率の値に基づいて、サンプルを、８．０Ｅ＋８　細胞／ｍｌを含むと決定した。１００μｌのＰＲＰに、０．１、１０および１００のＭＯＩにて室温で３０分間、ＮＤＶ（ＲＬ－００５）を感染させた。

【００７４】

サンプルに、冷ＰＳＢを２ｍｌ添加し、５分間、４℃、２０００ｒｐｍにて遠心分離し、細胞ペレットから溶液を吸引することにより２回洗浄した。ＰＳＢを、各時間に吸引により除去した。各サンプルの容積を、冷ＰＳＢを添加することにより１ｍｌに調節した。モノクローナル抗体Ｍａｂ２Ｆ１２を、９．１μｇの抗体を含む２０μｌの溶液を添加することにより、各サンプルに添加した。このサンプルを氷上で３０分間再びインキュベートし、再び上記のように２回洗浄した。ヤギ抗マウス－ＰＥレポーター抗体を、この抗体の１２μｇ／ｍｌ溶液を０．１ｍｌ添加することにより、各サンプルに添加した。このサンプルを氷上で３０分間再びインキュベートし、上記のように洗浄した。サンプル分析を、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ　フローサイトメーターを使用して行った。前方散乱パラメーターおよび側方散乱パラメーターは、線形設定を採

用し、フィコエリトリンのＦＬ２検出は、対数設定を採用した。

【００７５】

結果：表６に示す実験の結果は、ＮＤＶがヒト血小板に結合することを示す。ＮＤＶ結合についてポジティブである血小板数は、試験したＭＯＩの範囲にて大きく増大しないが、平均蛍光は、確かに増大した。このことは、より多くのＮＤＶが、ＭＯＩが増大するにつれて、血小板のポジティブ部分に結合することを示す。

【００７６】

【表６】

表6:ヒト血小板に対するNDV結合

MOI	陽性血小板の%	平均蛍光
0	0	10
1	67	258
10	81	616
100	73	1005

（実施例１０：ＮＤＶのヒト白血球への結合階層）

材料：ＮＤＶ　ＨＮタンパク質に対して惹起された抗体　Ｍａｂ２Ｆ１２（３．５ｍｇ／ｍｌ）；２％ウシ胎仔血清および０．０２％アジ化ナトリウムを含有するＢＤ　ＰｈａｒｍＭｉｎｇｅｎ™　Ｓｔａｉｎ　Ｂｕｆｆｅｒ（ＰＳＢ）（カタログ番号５４４６５６、ロットＭ０５９３９４）；Ｒｏｃｋｌａｎｄヤギ抗マウスポリクローナル抗体－フィコエリトリン結合体（カタログ番号７１０－１８３２、ロット７３６７）；Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｃｙｔｏｍｅｔｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍｓ™　１０Ｘ　ＦＡＣＳ　Ｌｙｓｉｎｇ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｃａｔ３４９２０２、ロット番号８２０２６）。

【００７７】

方法：ヒト全血を、クエン酸チューブ（３．２％、０．１０５Ｍ、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ™　＃３６６４１５）に採取した。２本のチューブの各々から約４ｍｌをプールし、使用時まで室温にて維持した。細胞を、トリパンブルー排除法および血球計算盤を使用して計数した。ＮＤＶ（１．３Ｅ＋１０　ＰＦＵ／ｍｌ）を使用して、０、０．００５、０．０１、０．０２、０．０５、０．１および０．２のＭＯＩ（感染効率、ＰＦＵ／細胞として表される）にて全血の１００μｌサンプルに感染させた。ウイルスを添加した後、サンプルを、３７℃にて３０分間インキュベートした。

【００７８】

サンプルに、冷ＰＳＢを２ｍｌ添加し、５分間、４℃、２０００ｒｐｍにて遠心分離し、ペレットから溶液を吸引することにより２回洗浄した。ＰＳＢを、各時間に吸引により除去した。各サンプルの容積を、冷ＰＳＢを添加することにより１００μｌに調節した。モノクローナル抗体Ｍａｂ２Ｆ１２を、ＰＳＢ中にて作製した１μｇの抗体を含む２μｌの溶液を添加することにより、各サンプルに添加した。このサンプルを氷上で３０分間再びインキュベートし、再び上記のように２回洗浄した。ヤギ抗マウス－ＰＥレポーター抗体を、ＰＳＢ中で２．４：１希釈したこの抗体の１２μｇ／ｍｌ溶液を１００μｌ添加することにより、各サンプルに添加した。このサンプルを氷上で３０分間再びインキュベートし、上記のように洗浄した。白血球細胞分析のためのサンプルを調製するために、各サンプルを、３ｍｌの１×ＦＡＣＳ　Ｌｙｓｉｎｇ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎとともに室温にて６分間インキュベートし、次いで遠心分離し、上記のように吸引した。細胞ペレットを、０．５ｍｌのＰＳＢ中に再懸濁した。サンプル分析を、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ™フローサイトメーターを使用して行った。顆粒球、リンパ球および単球の集団を、各サンプルについて前方散乱パラメーターおよび側方散乱パラメ

ーターを比較することによりゲートをかけた。これを使用して、ウイルス結合についてポジティブな細胞数および各サンプルについてのこれら集団の各々の平均蛍光値を決定した。

【００７９】

結果（表７）は、ＮＤＶが３つの細胞集団に優先的に結合することを示す。優先順位は、以下のようである：単球＞顆粒球＞＞リンパ球。さらに、平均蛍光データから示されるように、単球集団は、顆粒球集団より実質的により多くのＮＤＶを結合し、かつリンパ球細胞集団よりはるかにより多くのウイルスを結合する。

【００８０】

【表７】

表7

	陽性細胞の%			平均蛍光		
MOI	単球	顆粒球	リンパ球	単球	顆粒球	リンパ球
0	2	2	2	13	19	7
0.005	80	68	19	65	20	9
0.01	92	97	39	134	35	11
0.02	99	100	54	219	66	16
0.05	98	100	72	314	113	22
0.10	99	100	84	448	154	31
0.20	100	100	96	692	251	69

フロントページの続き

(72)発明者 グローン, ウイリアム エス.
アメリカ合衆国 メリーランド ２１７７４, ニュー マーケット, ウィンドソング コート ５７４６
(72)発明者 ミラー, ジェフリー エイ.
アメリカ合衆国 ペンシルベニア １９３５２, リンカーン ユニバーシティ, クリアフィールド ドライブ ３１６
(72)発明者 ミューラー, スティーブン エヌ.
アメリカ合衆国 メリーランド ２１７７３, マイヤーズビル, アシュリー コート ９５

審査官 遠藤 広介

(56)参考文献 国際公開第００／０６２７３５（WO, Ａ１）
国際公開第９９／０１８７９９（WO, Ａ１）
国際公開第９８／０１６２３８（WO, Ａ１）
SCHIRRMACHER,V. et al, Newcastle disease virus activates macrophages for anti-tumor activity, Int J Oncol, ２０００年, Vol.16, No.2, p.363-373
SCHIRRMACHER,V. et al, Tumor stimulator cell modification by infection with Newcastle Disease Virus: analysis of effects and mechanism in MLTC-CML cultures, Int J Oncol, １９９９年, Vol.14, No.2, p.205-215

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
A61K 35/76
A61K 35/14
A61K 47/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
BIOSIS(STN)
CAplus(STN)
EMBASE(STN)
MEDLINE(STN)