

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7522426号
(P7522426)

(45)発行日 令和6年7月25日(2024.7.25)

(24)登録日 令和6年7月17日(2024.7.17)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01 Z N A
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62 Z
C 1 2 N	15/44 (2006.01)	C 1 2 N	15/44
C 1 2 N	15/24 (2006.01)	C 1 2 N	15/24
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13
請求項の数 25 (全33頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2019-564782(P2019-564782)	(73)特許権者	510170730
(86)(22)出願日	平成30年5月25日(2018.5.25)		ユニバーシティ オブ セントラル フロ
(65)公表番号	特表2020-521447(P2020-521447 A)		リダ リサーチ ファウンデーション, イ
(43)公表日	令和2年7月27日(2020.7.27)		ンコーポレイテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2018/034655		アメリカ合衆国 フロリダ 3 2 8 1 6 ,
(87)国際公開番号	WO2018/218151		オーランド, ルーム 3 6 0 , ミリカン
(87)国際公開日	平成30年11月29日(2018.11.29)		ホール, セントラル フロリダ ブール
審査請求日	令和3年5月25日(2021.5.25)	(74)代理人	パール 4 0 0 0
(31)優先権主張番号	62/511,010		100092783
(32)優先日	平成29年5月25日(2017.5.25)	(74)代理人	弁理士 小林 浩
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		100120134
		(74)代理人	弁理士 大森 規雄
			100104282
		(74)代理人	弁理士 鈴木 康仁
		(72)発明者	パークス, グリフ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 天然キラー細胞による殺傷に対する腫瘍細胞の感受性を高めるための新規な腫瘍溶解性ウイルス

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非切断シグナルアンカーを含む 1 つまたは複数の外因性膜結合ナチュラルキラー (N K) 細胞標的化リガンドを発現し、前記 1 つまたは複数の外因性膜結合 N K 細胞標的化リガンドが、操作された免疫グロブリン F c ドメインであって、感染した腫瘍細胞の膜上で発現されたときに アミノ末端が細胞外ではなく細胞内に面するように 改変されているものを含む、操作された融合性の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 2】

前記融合性の腫瘍溶解性ウイルスが改変または操作されたパラインフルエンザウイルス 5 型である、請求項 1 に記載の操作された融合性の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 3】

前記非切断シグナルアンカーがノイラミニダーゼ膜貫通セグメントである、請求項 1 に記載の操作された融合性の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 4】

前記操作された免疫グロブリン F c ドメインの N 末端が 2 ~ 2 0 アミノ酸長のペプチドリンカーによりノイラミニダーゼ膜貫通セグメントに融合している、請求項 3 に記載の操作された融合性の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 5】

前記免疫グロブリン F c ドメインが I g G 1 F c ドメインを含む、請求項 4 に記載の操作された融合性の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 6】

前記 I g G 1 F c ドメインが F c R 結合または A D C C を増加させるための変更をさらに含む、請求項 5 に記載の操作された融合性の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 7】

前記腫瘍溶解性ウイルスが、I L - 1 2、I L - 2 1 または I L - 1 5 のうちの 1 つまたは複数を発現するように操作されている、請求項 1 に記載の操作された融合性の腫瘍溶解性ウイルス。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の操作された融合性の腫瘍溶解性ウイルスおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の操作された融合性の腫瘍溶解性ウイルスを含む、癌の治療のための医薬組成物であって、前記医薬組成物は、N K 細胞、または前記 1 つまたは複数の外因性膜結合 N K 細胞標的化リガンドの 1 つもしくは複数を標的とする抗体の対象への養子移入と組み合わせて前記対象に投与される、医薬組成物。

【請求項 10】

前記 N K 細胞は、1 つまたは複数の N K 細胞刺激剤で刺激および増殖される、請求項 9 に記載の医薬組成物

【請求項 11】

前記 1 つまたは複数の N K 細胞刺激剤は、サイトカイン、成長因子、合成リガンド、N K 細胞刺激粒子、N K 細胞刺激エキソソーム、または N K 細胞刺激フィーダー細胞である、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記 1 つまたは複数の N K 細胞刺激剤は、N K 細胞刺激粒子、N K 細胞刺激エキソソーム、または N K 細胞刺激フィーダー細胞であり、

前記 1 つまたは複数の N K 細胞刺激剤は、I L - 2 1、4 - 1 B B L、またはその断片を含む、請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

前記 1 つまたは複数の N K 細胞刺激剤は、I L - 2、I L - 1 2、I L - 1 8、I L - 1 5 またはそれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも 1 つのサイトカインを含む、請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

前記 N K 細胞が、C D 1 9 標的化抗 C D 1 9 キメラ抗原受容体または C D 2 0 標的化抗 C D 2 0 キメラ抗原受容体を発現するように操作されている、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

前記癌は、白血病、リンパ腫、骨髄腫、黒色腫、結腸直腸癌、乳癌、卵巣癌、腎細胞癌、悪性黒色腫、悪性神経膠腫、神経芽細胞腫、非小細胞肺癌、腎細胞癌、メルケル細胞癌、皮膚癌、脳癌、膵臓腺癌、悪性中皮腫、肺腺癌、肺小細胞癌、肺扁平上皮癌、甲状腺未分化癌、または頭頸部扁平上皮癌からなる群から選択される、請求項 9 ~ 14 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

細胞質尾部領域、膜貫通領域、および細胞外ストーク領域を含む非切断シグナルアンカードメイン；並びに前記細胞外ストーク領域の C 末端に融合した N 末端を含む N K 細胞標的化リガンド、を含み、腫瘍細胞の融合を可能にする、融合タンパク質であって、前記 N K 細胞標的化リガンドが、操作された免疫グロブリン F c ドメインであって、細胞において発現されたときに アミノ末端が細胞外ではなく細胞内に面するように 改変されているものを含む、融合タンパク質。

【請求項 17】

前記免疫グロブリン F c ドメインが、I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4

10

20

30

40

50

からなる群より選択される免疫グロブリンFcドメインを含む、請求項16に記載の融合タンパク質。

【請求項18】

前記Fcドメインが、256A/K290A/S298A/E333A/K334AまたはL235V/F243L/R292P/Y300L/P396Lからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸修飾をさらに含む、請求項17に記載の融合タンパク質。

【請求項19】

前記非切断シグナルアンカードメインは、ノイラミニダーゼ、パラインフルエンザウイルス血球凝集素-ノイラミニダーゼ、トランスフェリン受容体、MHCクラスII不変鎖、P糖タンパク質、アシアロ糖タンパク質受容体、および中性エンドペプチダーゼのシグナルアンカードメインから選択されるシグナルアンカードメインを含む、請求項16に記載の融合タンパク質。

10

【請求項20】

前記非切断シグナルアンカードメインがノイラミニダーゼシグナルアンカードメインを含む、請求項16に記載の融合タンパク質。

【請求項21】

配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項16に記載の融合タンパク質。

【請求項22】

請求項21に記載の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

20

【請求項23】

請求項22に記載のポリヌクレオチドを含む改変ウイルスゲノムを含む腫瘍溶解性宿主ウイルス。

【請求項24】

パラインフルエンザウイルス5型、CPIパラインフルエンザ、野生型パラインフルエンザ、CPIおよびWTパラインフルエンザ由来のP/Vをコードするウイルス骨格を有するCPI-WTパラインフルエンザキメラウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、レオウイルス、ピコルナウイルス、トガウイルス、コロナウイルス、フラビウイルス、フィロウイルス、アレナウイルス、ブニヤウイルス、パラミクソウイルス、ラブドウイルス、ニューモウイルス、オルソミクソウイルス、デルタウイルス、レトロウイルス、ヘパドナウイルス、オルソヘペウイルス、ヒトパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、HSV-1腫瘍溶解性ウイルスHSV1716、タリモジーン・ラハーパーレブベック、アデノウイルス腫瘍溶解性ウイルスH101、ポリオウイルス腫瘍溶解性ウイルスPVSRIPO、レオウイルス腫瘍崩壊性ウイルスレオシリン、セネカバレーウイルスSVV-001、コクサッキーウイルス腫瘍溶解性ウイルスコクサッキーウイルスA21、エンテロウイルス腫瘍溶解性ウイルスリガウイルス、およびワクシニアウイルス腫瘍溶解性ウイルスGL-ONC1、またはJX-594、から選択される、請求項23に記載の腫瘍溶解性宿主ウイルス。

30

【請求項25】

前記宿主ウイルスが細胞融合性の腫瘍溶解性ウイルスである、請求項23に記載の腫瘍溶解性宿主ウイルス。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

腫瘍溶解性ウイルス(OV)は、癌治療として非常に有望である。OVは癌細胞に選択的に広がり、大規模な細胞変性効果を引き起こす。これらのウイルスに感染した死にかけている癌細胞は、NK細胞や細胞傷害性T細胞などの免疫細胞をさらに動員して、ウイルス死滅を免れた感染癌細胞を「クリーンアップ」する。

【背景技術】

【0002】

50

しかしながら、癌患者は、感染した標的癌細胞を死滅および／または除去する仕事をすることに失敗する免疫系に妥協している場合がある。したがって、必要なのは、新しい腫瘍溶解性ウイルスおよび改善された結果を提供できる当該細胞の使用方法である。

【発明の概要】

【0003】

操作されたまたは改変された腫瘍溶解性ウイルスに関連する方法および組成物が開示されている。

【0004】

一態様において、本明細書に開示されるのは、腫瘍溶解性ウイルスが非切断シグナルアンカーを含む1つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドを発現する、操作された腫瘍溶解性ウイルスである。

10

【0005】

本明細書には、細胞質尾部領域、膜貫通領域および細胞外ストーク（外茎）領域；細胞外ストーク領域のC末端に融合したN末端を含む免疫細胞標的化リガンドを含む非切断シグナルアンカードメインを含む融合タンパク質も開示される。

【0006】

一態様において、本明細書に開示されるのは、前述のいずれかの態様の腫瘍溶解性ウイルスおよび／または融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質であり、1つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドは、操作された免疫グロブリンFcドメイン、NK細胞受容体NKGD2のタンパク質アゴニスト（例えば、RAET1、RAET1E、RAET1G、RAET1H、RAET1L、RAET1N、MICA、MICBなど）、抗CD19（CD19など）に反応するタンパク質エピトープ、および／または抗CD20（CD20など）に反応するタンパク質エピトープを含む。

20

【0007】

腫瘍溶解性ウイルスおよび／または任意の前述の態様の融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質も開示され、外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドは免疫グロブリンFcドメインであり、免疫グロブリンFcドメイン（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4Fcドメインなど）は、細胞内に面するアミノ末端に対して逆向きになるように改変されている（すなわち、Fcは細胞表面の細胞外側で発現し、そのN末端側は細胞表面から最大距離にあるのではなく、細胞膜の表面近くの膜アンカーペプチドに付着している）。一態様において、本明細書に開示されるのは、前述のいずれかの態様の腫瘍溶解性ウイルスおよび／または融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質であり、FcドメインのN末端は、非切断シグナルアンカーの細胞外ストーク領域のC末端に融合している。

30

【0008】

一態様において、本明細書に開示されるのは、操作された腫瘍溶解性ウイルスであり、操作された腫瘍溶解性ウイルスは、融合性の腫瘍溶解性ウイルスである。いくつかの態様では、融合性の腫瘍溶解性ウイルスが改変または操作されたパラインフルエンザウイルス5型であり得る。融合性の腫瘍溶解性ウイルスが腫瘍細胞の融合を可能にする高融合性特性を可能にするペプチドをコードする遺伝子を含む、前述のいずれかの態様の融合性の腫瘍溶解性ウイルスも開示される。一態様では、腫瘍溶解性ウイルスは、前述のいずれかの態様の融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を含むように改変または操作される。

40

【0009】

腫瘍溶解性ウイルスがIL-2、IL-12、IL-18、IL-21つまたはIL-15のうちの1つまたは複数を発現するように操作されている、前述のいずれかの態様の腫瘍溶解性ウイルスも開示される。

【0010】

一態様において、本明細書に開示されるのは、前述のいずれかの態様の、操作された腫瘍溶解性ウイルスおよび／または融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を対象に投与することを含む、癌の治療方法である。

50

【 0 0 1 1 】

抗体または免疫細胞（例えば、NK細胞、遺伝子改変NK細胞、および／またはCAR T細胞）を養子移入することをさらに含む、前述のいずれかの態様の癌を治療する方法も開示される。

【 0 0 1 2 】

一態様において、本明細書に開示されるのは、前述のいずれかの態様の癌を治療する方法であり、ここで、NK細胞は、1つまたは複数のNK細胞刺激剤、例えば、サイトカイン、成長因子、合成リガンド、NK細胞刺激粒子、NK細胞刺激エキソソーム、またはNK細胞刺激フィーダー細胞などで刺激および増殖される。

【 図面の簡単な説明 】

10

【 0 0 1 3 】

本明細書に組み込まれ、その一部を構成する添付図面は、いくつかの実施形態を示しており、説明とともに開示された組成物および方法を示している。

【 0 0 1 4 】

【 図 1 】 図 1 は、標的化可能抗原を欠く腫瘍の治療の概略図であり、抗体の膜結合Fc領域（MB__Fc）または膜結合標的化可能リガンド（MB__TL）を送達するように操作された腫瘍標的化腫瘍溶解性ウイルスで処理されて感染される；（例えば、RAET1、RAET1E、RAET1G、RAET1H、RAET1L、RAET1N、MICA、MICB、CD19、および／またはCD20）。NK細胞受容体アゴニストではないMB__TLを使用すると、TLに対する治療抗体で腫瘍を治療できる（例えば、抗-CD20-リツキシマブ、オフアツムマブ、オブチヌツズマブ、ベルツズマブ、オクレリズマブ、または抗CD19MDX1342、MEDI-551、AFM11、XmAb5871、MOR-208、SGN-19A、SAR3419、プリナツモマブ、またはタブリツモマブ）。次に、Fcまたは抗TL抗体でマークされた腫瘍を、例えばCD16+NK細胞などの抗体依存性細胞傷害（ADCC）が可能な養子移入細胞で治療することができる。

20

【 0 0 1 5 】

【 図 2 】 図 2 A および 2 B は、非切断シグナルアンカーを含む膜結合免疫細胞標的化リガンドの構築を示す。図 2 A は、I 型およびII型の内在性膜タンパク質の構造とそれぞれのシグナルアンカーを示す。図 2 B は、膜結合免疫細胞標的化リガンドで使用される非切断シグナルアンカーの構造を示す。

30

【 0 0 1 6 】

【 図 3 】 図 3 A は、膜結合免疫細胞標的化リガンドの挿入点と融合性突然変異の部位を含む、操作された腫瘍溶解性ウイルスの遺伝子の概略図を示す。

【 0 0 1 7 】

図 3 B は、腫瘍溶解性ウイルスによる感染後のペロ細胞の顕微鏡写真を示す。

【 0 0 1 8 】

図 3 C は、模擬（偽）治療された腫瘍標的と比較して、操作された腫瘍溶解性ウイルスを治療した場合、PM21活性化NK細胞が腫瘍細胞をより効果的に認識して殺すことを示す。

40

【 0 0 1 9 】

図 3 D は、ノイラミニダーゼシグナルアンカーを含むFcドメインを含み、ノイラミニダーゼのストーク長さを増加させる膜結合免疫細胞標的化リガンドの代替構造を示す。

【 0 0 2 0 】

【 図 4 】 図 4 は、膜結合免疫細胞標的化リガンド配列の例を示す。ここで、ノイラミニダーゼシグナルアンカーは、RSリンカー（すなわち、制限部位リンカー）によってIgGFcドメインに融合されている。

【 0 0 2 1 】

【 図 5 】 図 5 は、NA-Fc構築物を運ぶプラスミドによってトランスフェクトされたときに感染細胞の表面に膜結合Fc標的化リガンドを正しく発現するNA-Fc融合構築物

50

の能力に関するフローサイトメトリー分析を示す。

【0022】

【図6】図6は、P/V/FウイルスがA549細胞をNK細胞殺傷に対して感作することを示す。A549肺癌細胞株は偽感染またはP/V/Fウイルスに感染させた。感染後、NK細胞を示された比率で細胞に加え、4時間インキュベートした。細胞死は、Cytotox Glow Assayを使用して測定された。NKのみとターゲット（模擬感染（偽感染）またはP/V/Fに感染）のみのウェルを対照として含めた。

【0023】

【図7】図7は、ゼオシン選択下でNA1-Fc構築物をトランスフェクトしたA549肺癌細胞が細胞表面にFcを発現することを示す。A549肺癌細胞株にNA1-Fcの発現をコードする構築物をトランスフェクトし、ゼオシンの存在下で培養した。細胞を抗ヒトFc-APC抗体で染色し、フローサイトメトリーで分析した。親細胞を対照として使用した。

【0024】

【図8】図8は、腫瘍におけるFcの発現とP/V/Fの感染がNK細胞によるA549細胞の殺傷を増加させることを示す。表面にFcを安定的に発現しているA549細胞またはA549細胞（A549-Fc）にモックまたはP/V/Fを感染させ、NK細胞と標的が1:1つまたは1:3の割合でNK細胞とインキュベートした。細胞死は、それぞれの標的のみの細胞を含む対照を参照して、標的ゲート内の生細胞イベントを測定するフローサイトメトリーによって決定された。

【0025】

【図9】図9は、NA1-Fc-NA4-FcコンストラクトをトランスフェクトしたSKOV-3卵巣癌細胞が、FACSソーティング後に細胞表面にFcを発現することを示す。SKOV-3卵巣癌細胞株に、NA1-Fc、NA2-Fc、NA3-FcまたはNA4-Fcの発現をコードする構築物をトランスフェクトした。数日後、細胞を抗ヒトFc-APC抗体で染色し、FACSで選別してFc発現細胞集団サイトメトリーを濃縮した。選別された細胞は、テストされたすべての構築物について、安定であるが可変レベルのFcの発現を示す。親細胞を対照として使用した。

【0026】

【図10】図10は、NAストークの長さが増加すると、表面に発現したFcドメインの認識を介してNK細胞の殺傷が改善されることを示す。（NA1-NA4）-Fcの安定発現を伴うまたは伴わないSKOV-3細胞を、NK:標的の3:1比でNK細胞と混合した。細胞死は、それぞれの標的のみの細胞を含む対照を参照して、標的ゲート内の生細胞イベントを測定するフローサイトメトリーによって決定された。死滅は、SKOV-3の細胞表面のFcの密度ではなく、NAストークの長さで相関する（図9）。

【0027】

【図11】図11は、腫瘍でのFcの発現とP/V/Fの感染により、NK細胞によるSKOV-3細胞の死滅が増加することを示す。表面にNA1-Fcを安定して発現するSKOV-3細胞（SKOV-3-Fc）またはSKOV-3細胞に模擬感染またはP/V/Fを感染させ、標的対NKセル比が1:1つまたは1:3でNK細胞とインキュベートした。細胞死は、それぞれの標的のみの細胞を含む対照を参照して、標的ゲート内の生細胞イベントを測定するフローサイトメトリーによって測定された。両方とも、表面でのFcの発現とP/V/Fの感染は、NK細胞によるSKOV-3細胞の死滅の増加につながり、この効果は相加的である。

【発明を実施するための形態】

【0028】

本化合物、組成物、物品、デバイス、および/または方法が開示および説明される前に、それらは、特に明記しない限り、特定の合成方法または特定の組換えバイオテクノロジー方法に限定されるものではなく、他に特定しない限り特定の試薬に限定されないため、当然、変化する可能性があることを理解されたい。また、本明細書で使用される用語は、

10

20

30

40

50

特定の実施形態のみを説明するためのものであり、限定することを意図するものではないことも理解されたい。

【0029】

A. 定義

明細書および添付の特許請求の範囲で使用されているように、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈がそうでないことを明確に示さない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「医薬担体」への言及には、2つ以上のそのような担体の混合物などが含まれる。

【0030】

本明細書では、範囲は、「約」ある特定の値から、および/または「約」別の特定の値までとして表すことができる。そのような範囲が表現される場合、別の実施形態は、1つの特定の値からおよび/または他の特定の値までを含む。同様に、先行詞「約」を使用して値が近似値として表される場合、特定の値が別の実施形態を形成することが理解されよう。さらに、各範囲のエンドポイントは、他のエンドポイントに関連して、および他のエンドポイントとは無関係に重要であることがさらに理解される。また、本明細書に開示されているいくつかの値があり、各値は、値自体に加えて「約」その特定の値としても本明細書に開示されていることも理解される。例えば、値「10」が開示されている場合、「約10」も開示されている。当業者によって適切に理解されるように、値が開示される場合、値以下、値以上、および値間の可能な範囲も開示されることも理解される。例えば、値「10」が開示されている場合、「10以下」および「10以上」も開示されている。また、出願全体で、データはさまざまな形式で提供され、このデータはエンドポイントと開始点、およびデータポイントの任意の組み合わせの範囲を表すことも理解されている。例えば、特定のデータポイント「10」および特定のデータポイント15が開示されている場合、10および15に等しい、より大きい、以上、より少ない、以下、とみなされ、同様に10から15とみなされることが理解される。また、2つの特定のユニットの間の各ユニットも開示されることが理解される。例えば、10と15が開示されている場合、11、12、13、14も開示されている。

【0031】

本明細書および添付の特許請求の範囲では、以下の意味を有すると定義されるいくつかの用語を参照する。

【0032】

「任意」または「任意に」とは、後に説明するイベントまたは状況が発生する場合と発生しない場合があり、説明にはそのイベントまたは状況が発生する場合と発生しない場合が含まれることを意味する。

【0033】

本明細書で使用される「N末端側」または「アミノ末端」は、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の方向性を指し、N末端を意味しない場合がある。いくつかの態様では、キメラまたは融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質が議論される場合、N末端側は、構造全体ではなく、キメラまたは融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の成分のみを指してもよい。例えば、非切断シグナルアンカーを含むFcドメインが議論されており、Fcドメインが細胞内に面するアミノ末端に対して逆向きになると記載されている場合、本明細書で企図されるのは、シグナルアンカーがキメラまたは融合構築物のN末端にあり、実際に細胞膜に及ぶキメラまたは融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質である。したがって、このようなキメラでは、アンカーはFcドメインよりもアミノ末端に近く、しかし、Fcドメインの方向性は、細胞に面したN末端側を持っており、これは、典型的には細胞膜に及ぶカルボキシ末端および細胞外マトリックスに伸びるアミノ末端を有する典型的なB細胞のFcドメインの配向に対して反転している。

【0034】

この出願全体で、さまざまな出版物が参照されている。これらが関連する最新技術をより完全に説明するために、これらの出版物の開示は、その全体が参照により本出願に組み

10

20

30

40

50

込まれる。開示された参考文献は、参考文献が依拠する文で議論されている資料に含まれる資料について、個別におよび具体的に参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 0 3 5 】

B . 組成物

開示される組成物を調製するために使用される成分、ならびに本明細書に開示される方法内で使用される組成物自体が開示される。これらの資料およびその他の資料は、本書で開示され、これらの材料の組み合わせ、サブセット、相互作用、グループなどが開示されている場合、これらの化合物のさまざまな個々のおよび集合的な組み合わせおよび順列の具体的な参照は明示的に開示されていない可能性があるが、それぞれが本明細書で特に企図され、説明されていることが理解される。例えば、特定の腫瘍溶解性ウイルスまたは融合タンパク質が開示および議論され、腫瘍溶解性ウイルスおよび/または融合タンパク質を含む多数の分子に対して行うことができる多数の修飾が議論されている場合、特に意図されるのは、腫瘍溶解性ウイルスおよび/または融合タンパク質のありとあらゆる組み合わせおよび順列、および特に反対の指示がない限り可能な修飾である。したがって、分子のクラス A、B、および C が開示されている場合、分子のクラス D、E、および F と組み合わせ分子の例が開示されている場合、A - D が開示され、その場合、それぞれが個別に列挙されていなくても、それぞれが個々におよび集合的に意味の組み合わせを意図している場合でも、A - E、A - F、B - D、B - E、B - F、C - D、C - E、および C - F は開示されているとみなされる。同様に、これらのサブセットまたは組み合わせも開示されている。したがって、例えば、A - E、B - F、および C - E のサブグループは開示されていると見なされる。この概念は、開示された組成物を作成および使用方法のステップを含むがこれに限定されない、本出願のすべての態様に適用される。したがって、実行可能なさまざまな追加のステップがある場合、これらの追加のステップのそれぞれは、開示された方法の特定の実施形態または実施形態の組み合わせで実行できることが理解される。

10

20

【 0 0 3 6 】

癌細胞に優先的に感染して死滅させる腫瘍溶解性ウイルス (OV) は、癌治療として有望である。OV は癌細胞に選択的に広がり、大規模な細胞変性効果を引き起こす。これらのウイルスに感染した死にかけている癌細胞は、NK 細胞や細胞傷害性 T 細胞などの免疫細胞をさらに動員して、ウイルスによる死を免れた感染癌細胞を「クリーンアップ」する。癌患者では、免疫系が頻繁に損なわれ、仕事をするのができないため、養子免疫細胞移植との併用により、結果が改善される可能性がある。

30

【 0 0 3 7 】

NK 細胞などの免疫細胞は、感染細胞の破壊を直接標的にする。例えば、NK 細胞は、さまざまな方法で腫瘍細胞、ストレスを受けた細胞、ウイルス感染した細胞を効率的に破壊する。1 つ目は、標的細胞に直接関与し、膜に浸透し、次にいくつかのアポトーシスタンパク質を切断および活性化するタンパク質を注入することにより、標的細胞のプログラム細胞死 (アポトーシス) を開始することである。NK 細胞の表面には、アポトーシスのプログラム細胞死についての内部信号をオンにする標的細胞上の腫瘍壊死因子 (TNF) 関連アポトーシス誘導リガンド (TRAIL) の受容体などの受容体に結合して活性化できるタンパク質リガンドも含まれている。刺激されると、NK 細胞はウイルスや腫瘍を阻害するだけでなく、他の免疫細胞への侵入を知らせる INF や TNF などのサイトカインも分泌する。

40

【 0 0 3 8 】

組換え核酸修飾の使用により、腫瘍細胞における融合ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の発現が、癌細胞を標的とする NK 細胞の動員を改善するように、腫瘍溶解性ウイルスおよび/または融合ペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質を操作または改変することができると理解されおよび本明細書で意図される。本明細書で互換的に使用される場合、「融合ペプチド」、「融合ポリペプチド」、および「融合タンパク質」という用語は、2 つ以上の無関係のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質からのドメインを

50

含むように設計された（遺伝子操作された）ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を指す。いくつかの態様では、融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質は、構成要素 2 つ以上のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質のそれぞれのすべてまたは一部を含み、結合して融合物を形成する。

【0039】

したがって、本発明の一態様は、本明細書に開示されるように、操作された融合タンパク質、すなわち、操作された腫瘍溶解性ウイルスによって発現される外因性膜結合標的化リガンドに関する。ここで使用されているように、「融合タンパク質」という用語は「キメラタンパク質」と同義語であり、以下でさらに詳細に説明するように、細胞質尾部領域、膜貫通領域および細胞外ストーク領域を含む第 1 の非切断シグナルアンカーポリペプチドを指し、第 1 のポリペプチドは、免疫細胞標的化リガンドポリペプチドに機能的に連結されている。「作動可能に連結された」という用語は、2 つのポリペプチドの融合、すなわち、各領域の他方へのインフレーションの融合を指す。融合は、2、3、4、5、6、7、8、9、20、11、12、13、14、15、16、17、18、19 または 20 以上のアミノ酸からなる短いポリペプチドリinkerを使用して、または使用せずに達成できる。例えば、標的化リガンドポリペプチドは、その N 末端で第 1 のポリペプチドの C 末端に融合され得る。

【0040】

一態様では、融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質は、本明細書に開示される外因性膜結合標的化リガンドである。したがって、融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質は、以下を含む非切断シグナルアンカードメインを含むことができる：細胞質尾部領域、膜貫通領域および細胞外ストーク領域；免疫細胞標的化リガンドであって、免疫細胞標的化リガンドの N 末端が細胞外ストーク領域の C 末端に融合している（例えば、図 2 B を参照）。言い換えれば、融合タンパク質が細胞内で発現される場合、免疫細胞標的化リガンドは、免疫細胞標的化リガンドの自然発生の配向と比較して、細胞に対して逆向きで細胞膜に結合される。

【0041】

一態様では、非切断シグナルアンカードメインは、図 2 A の下側パネルに概略的に示されている II 型内在性膜タンパク質に由来する。II 型内在性膜タンパク質は一般に、細胞内の N 末端、すなわち、細胞質尾部領域、膜貫通領域、細胞外ストーク領域、および C 末端を有する球状頭部領域を含む。本明細書に開示されるように、非切断シグナルアンカードメインは、細胞質尾部領域、膜貫通領域、および細胞外ストーク領域を含むが、球状頭部領域を欠いている。非切断シグナルアンカードメインは、例えば、ノイラミニダーゼ、パラインフルエンザウイルス血球凝集素 - ノイラミニダーゼ、トランスフェリン受容体、MHC クラス II 不変鎖、P 糖タンパク質、アシアロ糖タンパク質受容体、または中性エンドペプチダーゼなどの II 型内在性膜タンパク質の関連部分を含むことができる。例示的な態様において、図 2 B に示すように、非切断シグナルアンカードメインはノイラミニダーゼシグナルアンカードメインを含む。

【0042】

免疫細胞標的化リガンドは、例えば、結合することができ、例えば、免疫細胞に選択的に結合することができ、アミノ酸修飾を含むリガンドであって、リガンドの N 末端は、非切断シグナルアンカードメインの細胞外ストークドメインの C 末端に（ペプチドリinkerを介して）融合しまたは融合される。リガンドは、NK 細胞、B 細胞、T 細胞および / または CAR - T 細胞などの免疫細胞に結合することができる既知のリガンドから選択することができる。そのようなリガンドには、例えば、IgG1（図 2 B に示す）、あるいは IgG2、IgG3、または IgG4 などの免疫グロブリン Fc ドメインが含まれる。本明細書に記載の逆方向を達成するのに適した Fc ドメインへのアミノ酸修飾には、256A / K290A / S298A / E333A / K334A または L235V / F243L / R292P / Y300L / P396L が含まれる。あるいは、標的化リガンドは、例えば、RAET1、RAET1E、RAET1G、RAET1H、RAET1L、RAET1

10

20

30

40

50

N、MICA、およびMICBなどのNK2GDリガンド、またはCD19やCD20などの抗リガンドドメインから選択される。

【0043】

非限定的な例として、本明細書に開示される融合タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列と十分に同一または由来するアミノ酸配列を含むポリペプチドを包含する。本明細書に開示される融合タンパク質は、配列番号1の完全長配列よりも少ないかまたは多いアミノ酸を有するポリペプチドを包含し、配列番号1の配列を有する融合タンパク質によって示される標的化リガンドと同じ膜固定機能を示す。本開示による有用な融合タンパク質の例は、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも約45%、好ましくは55%、65%、75%、85%、95%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質を含み、配列番号1の融合タンパク質の機能的活性を保持する。より具体的には、本開示による融合タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも約50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

10

【0044】

2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列のパーセント同一性は、2つの配列を端から端まで並べて、2つの配列間のアミノ酸またはヌクレオチドの一致数を最適化することにより決定でき、例えば、ギャップを第1のアミノ酸または核酸配列の配列に導入して、第2のアミノ酸または核酸配列との最適なアライメントを得ることができる。次に、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。最初の配列の位置が、2番目の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められている場合、分子はその位置で同一である。2つの配列間のパーセント配列同一性は、配列が共有する同一の位置の数の関数である（すなわち、%配列同一性は、同一の位置の数 / 位置の総数 × 100である）。

20

【0045】

2つの配列間のパーセント配列同一性の決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。当該分野で公知であり、2つの配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの非限定的な例は、Karlin and Altschul (1990) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modified as in Karlin and Altschul (1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:5873-5877のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれている。BLASTヌクレオチド検索は、NBLASTプログラム、スコア = 100、ワード長 = 12で実施して、本発明のアドヘンシ核酸分子に類似または相同のヌクレオチド配列を得ることができる。比較のためにギャップのあるアライメントを取得するには、Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に説明するように、ギャップのあるBLASTを利用できる。BLASTおよびギャップ付きBLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラムのデフォルトパラメータ（例えば、XBLASTおよびNBLAST）を使用することができる。

30

40

【0046】

融合タンパク質およびそれらをコードするポリヌクレオチドは、当該分野で公知の標準的な組換えDNA技術により産生され得る。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNA断片は、従来の技術を適用してインフレームで連結される。適切な技術には、ライゲーシオンに平滑末端またはスタグガー末端を使用すること、適切な末端を提供する制限酵素消化、必要に応じて粘着末端の充填、望ましくない結合を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素ライゲーシオンが含まれる。あるいは、融合遺伝子は、自動化DNA合成装置を含む従来の技術により合成され得る。あるいは、遺伝子断片のPCR増幅は、2つの連続した遺伝子断片間に相補的なオーバーハングを生じさせるアンカー

50

プライマーを使用して実行され、その後、アニールおよび再増幅してキメラ遺伝子配列を生成することができる（例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons: 1992を参照）。

【0047】

本明細書に開示される融合タンパク質をコードする融合遺伝子は、第1のポリペプチドをコードするcDNA配列から停止コドン除去し、次にライゲーションまたはオーバーラップ伸長PCRによりフレーム内で第2のポリペプチドタンパク質をコードするcDNAを加えることにより作成できる。場合により、アミノ酸の短い配列（例えば、約2～約20アミノ酸の配列）を、第1のポリペプチドと第2のポリペプチド間のリンカーとして操作することができる。次いで、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含む得られた融合遺伝子を、例えば、本明細書に開示されるように操作された腫瘍溶解性ウイルスを含む宿主ウイルスのゲノムに導入することができる。宿主ウイルスが宿主細胞に接触し、その改変された遺伝子パッケージを細胞の細胞質に送達すると、融合遺伝子は単一の融合タンパク質として宿主細胞によって発現される。

10

【0048】

上記のように、開示されている腫瘍溶解性ウイルスは、標的癌部位の免疫細胞（NK細胞、T細胞、CAR T細胞、先天性リンパ系細胞、マクロファージ、B細胞（形質細胞を含む））の数を最大化するように改変または操作でき、したがって、免疫細胞活性（例えば、NK細胞活性、T細胞活性、CAR T細胞活性、および/またはB細胞活性（形質細胞および抗体活性を含む）を増加させて、非修飾腫瘍溶解性ウイルスが行うよりも多くの癌を排除する。本明細書で使用される「腫瘍溶解性ウイルス」は、癌細胞に対して向性であり、癌細胞を死滅させるウイルスを指す。腫瘍溶解性ウイルスは、癌細胞を選択的に攻撃するように操作できる。したがって、一態様では、本明細書で開示されるのは、腫瘍溶解性ウイルスが非切断シグナルアンカーを含む1つまたは複数の膜結合免疫細胞標的化リガンドを発現する操作された腫瘍溶解性ウイルスである。いくつかの態様では、操作された腫瘍溶解性ウイルスは、本明細書に開示される融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の1つまたは複数を発現する。

20

【0049】

一態様では、開示された腫瘍溶解性ウイルスおよび/または融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質は、NK細胞に対する親和性を高めるために1つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞標的化リガンド（例えば、NK細胞標的化リガンドなど）を発現または含むように修飾されている。本明細書で使用される場合、外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドは、免疫細胞活性の標的として役立ち得る任意の外因性ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を指し、NK細胞活性、B細胞活性、T細胞活性、CAR T細胞活性などが含まれるが、これらに限定されない。したがって、態様において、腫瘍溶解性ウイルスは、外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドを含む融合タンパク質を含む外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドを含む1つまたは複数のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を含むことができる。開示された腫瘍溶解性ウイルスおよび/または融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の膜結合免疫細胞標的化リガンドは、NK細胞、B細胞、T細胞、またはCAR T細胞によって結合され得る。一態様では、免疫細胞標的化リガンドは、シグナル伝達アンカーを含むように修飾を介して膜結合している。免疫細胞標的化リガンドは、例えば、NK細胞上のCD16のリガンドである免疫グロブリンFcドメイン、NK細胞上のNKGD2受容体のリガンド、または抗体またはCAR T細胞の標的を含むことができる。一態様では、外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドは、例えばFcドメイン（例えばIgG1、IgG2、IgG3、および/またはIgG4）などのNK細胞受容体によって直接結合できることが理解され、本明細書で企図され、NKGD2リガンド（例えば、RAET1、RAET1E、RAET1G、RAET1H、RAET1L、RAET1N、MICA、および/またはMICB）、または、抗リガンド抗体（例えば、抗CD19または抗CD20抗体が結合できるCD19またはCD20）を使用して、NK細胞が間接的に結合でき、または、抗リガンドCAR T細胞（例えば、抗CD19

30

40

50

C A R T細胞など)によって直接標的とすることができる。したがって、一態様では、本明細書に開示されるのは、免疫細胞標的化リガンドを含む融合タンパク質および1つまたは複数の免疫細胞標的化リガンドを含む腫瘍溶解性ウイルスであり、免疫細胞標的化リガンドは、I g G 1、I g G 2、I g G 3、および/またはI g G 4 からなる群より選択されるF cドメインである。

【0050】

F cドメインは、NK細胞の表面にあるC D 1 6 (F c R I I I) が結合するリガンドである。C D 1 6 はNK細胞の主要な受容体の1つであり、C D 1 6 が抗体のF c部分 (I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4 F cドメインなど) に結合する場合、これにより、NK細胞の抗体依存性細胞性細胞傷害 (A D C C) が活性化される。ただし、抗体のF c部分は通常、分泌された場合にのみ利用可能である。B細胞に見られる膜結合抗体受容体が存在する場合、F c部分は通常、細胞のサイトゾルに向けられる。したがって、本明細書に開示される改変腫瘍溶解性ウイルスでは、F cドメインは、感染した腫瘍標的の膜上で発現されると細胞内に面するアミノ末端に対して逆向きになるように改変され、したがって細胞の表面に結合した細胞外抗体の向きを模倣する。一態様において、本明細書に開示されるのは、非切断シグナルアンカーを含む1つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドを発現する改変または操作された腫瘍溶解性ウイルスであり、1つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドは、細胞内に面するアミノ末端に対して逆向きになるように改変された免疫グロブリンF cドメイン (例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、および/またはI g G 4 F cドメイン) である (すなわち、F cは細胞表面の細胞外側で発現し、そのN末端側は細胞表面から最大距離にあるのではなく、細胞膜の表面近くの膜アンカーペプチドに付着している)。

【0051】

F cドメインは、単量体、二量体、または多量体の構築物として提示できることが理解され、本明細書で企図される。一態様において、F cドメインをさらに修飾して、抗体媒介性殺傷、NK細胞認識を強化し、活性化F c受容体の拡大を制御することができる。例えば、F cドメインを変更して、C D 1 6 の親和性を高めることができる。したがって、例えば、F cドメインは、例えばT 2 5 6 A、K 2 9 0 A、S 2 9 8 A、E 3 3 3 A、K 3 3 4 A、L 2 3 5 V、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L、および/またはP 3 9 6 Lなどの1つまたは複数の突然変異を含むこととしてもよい。同様に、F cドメインをさらに修飾して、活性化 (I I I a) 受容体と阻害性F c (I I I b) 受容体の結合の選択性を高めることができる。したがって、例えば、F cドメインは、例えばS 2 3 9 D、I 3 3 2 E、A 3 3 0 L、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、V 3 0 5 I、および/またはP 3 9 6 Lなどの1つまたは複数の突然変異を含むこととしてもよい。

【0052】

N K G 2 Dは、NK細胞上の受容体を活性化して、標的細胞のアクチン再編成 (細胞分極) と脱顆粒を引き起こす。N K G 2 Dは、通常は完全に存在しないか、正常細胞の表面に低レベルでしか存在しないが、感染、形質転換、老化、ストレスを受けた細胞によって過剰発現される誘導自己タンパク質を認識する。N K G 2 Dのリガンドは、M H CクラスIポリペプチド関連配列 (M I C) およびレテン酸初期転写物 1 (R A E T 1) / U L B Pファミリーに由来し、ストレスを受けた悪性形質転換細胞および感染細胞の表面に現れる。M I Cは表面糖タンパク質である。M I Cファミリーのタンパク質 (M I C AおよびM I C B) は構造的にM H Cと類似しているが、2 - ミクログロブリンまたはM H Cのようなペプチドとは関連していない。M I Cファミリータンパク質は、細胞外ドメイン (1 2 3ドメイン)、膜貫通ドメイン、およびC末端細胞質尾部で構成されている。R A E T 1ファミリーは、細胞外ドメイン (1 2ドメイン)、膜貫通ドメイン、およびC末端細胞質尾部を含む表面糖タンパク質である。R A E T 1ファミリーは、N K G 2 Dのストレス誘発性リガンドとして機能し、M H Cクラス1分子に関連している。一態様では、本明細書に開示されるのは、非切断シグナルアンカーを含む1つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドを含む操作された腫瘍溶解性ウイルスおよび/または融

10

20

30

40

50

合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質であって、1つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドはNK G 2 Dリガンド（例えば、RAET 1、RAET 1 E、RAET 1 G、RAET 1 H、RAET 1 L、RAET 1 N、MICA、および/またはMICB）である。

【0053】

外因性膜結合免疫細胞標的化リガンド、すなわち、本明細書に開示されるように操作された腫瘍溶解性ウイルスによってコードされる融合タンパク質は、感染した癌細胞の表面に存在するように改変される。一態様では、この膜結合提示は、非切断シグナルアンカーの使用により達成され得る。シグナルアンカーは、コードされたペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を細胞表面膜に保持するシグナル配列を含むことができる。例えば、シグナルアンカーは、ノイラミニダーゼの膜貫通ドメイン、パラインフルエンザウイルス血球凝集素 - ノイラミニダーゼからのシグナルアンカー、トランスフェリン受容体からのシグナルアンカー、MHCクラスII不変鎖からのシグナルアンカー、P糖タンパク質からのシグナルアンカー、アシアロ糖タンパク質受容体からのシグナルアンカー、または中性エンドペプチダーゼからのシグナルアンカーであり得る。あるいは、外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドは、アミノ末端に追加の正荷電アミノ酸を含むアミノ酸置換をコードするように改変することができる。一態様では、外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドは、RSリンカーなどのリンカーの使用によりシグナルアンカーが標的化リガンドに結合または融合された融合タンパク質であり得る。したがって、一態様では、1つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドを含む腫瘍溶解性ウイルス並びに/または融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質であり、膜結合免疫細胞標的化リガンドは非切断シグナルアンカーを含む。一態様では、免疫細胞標的化リガンドは、アミノ酸修飾を含む免疫グロブリンFcドメインを含み、FcドメインのN末端がシグナルアンカードメインの細胞外ストロームドメインのC末端に融合する。一態様では、本明細書に開示されるのは、操作された腫瘍溶解性ウイルスおよび/または融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質であり、腫瘍溶解性ウイルスおよび/または融合ペプチド、ポリペプチド、または1つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドおよび非切断シグナルアンカーを含むタンパク質であり、ここで、非切断シグナルアンカーは、ノイラミニダーゼ、パラインフルエンザウイルスヘماغルチニン - ノイラミニダーゼ、トランスフェリン受容体、MHCクラスII不変鎖、P糖タンパク質、アシアロ糖タンパク質受容体、または中性エンドペプチダーゼである。例えば、操作された腫瘍溶解性ウイルスは、免疫グロブリンFcドメイン（例えば、IgG 1、IgG 2、IgG 3、および/またはIgG 4 Fcドメイン）およびノイラミニダーゼシグナルアンカードメインを含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むことができ、ここで、Fcドメインは、細胞に関してFcドメインの天然に生じる配向と比較して、細胞内に面するアミノ末端に対して逆向きになるように改変されている。言い換えれば、免疫細胞標的化リガンドが免疫グロブリンFcドメインを含む本明細書に記載の融合ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質において、Fcドメインは細胞表面の細胞外に発現し、そのN末端側は細胞表面から最大距離にあるのではなく、細胞膜の表面近くの膜アンカーペプチドに付着する。あるいは、本明細書に記載され、操作された腫瘍溶解性ウイルスにコードされる融合タンパク質は、NK G 2 Dリガンド（例えば、RAET 1、RAET 1 E、RAET 1 G、RAET 1 H、RAET 1 L、RAET 1 N、MICA、および/またはMICB）およびノイラミニダーゼシグナルアンカードメイン；またはCD 20とノイラミニダーゼシグナルアンカードメイン；および/またはCD 19およびノイラミニダーゼシグナルアンカードメインを含むことができる。

【0054】

膜結合免疫細胞標的化リガンドおよび非切断シグナルアンカーを含む融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の一実施形態は、配列番号1：MNPNQKITIGSICLVVGLISLILQIGNIISIWISHSIQTGSQNHTGICNRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL

10

20

30

40

50

HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGKに示され、図4に示されている。

【0055】

本明細書で議論されるように、融合ペプチド、ポリペプチド、および/またはタンパク質；外因性膜結合免疫細胞標的化リガンド；および/または既知であり本明細書で企図されるシグナルアンカードメインの多数の変異体がある。タンパク質変異体および誘導体は、当業者によく理解されており、アミノ酸配列の改変を伴い得る。例えば、アミノ酸配列の改変は、通常、置換、挿入、または欠失の3つのクラスの1つ以上に分類される。挿入には、アミノおよび/またはカルボキシル末端融合、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。通常、挿入は、アミノまたはカルボキシル末端融合の挿入よりも小さな挿入であり、例えば、1～4残基のオーダーである。実施例に記載されているような免疫原性融合タンパク質誘導体は、*in vitro*での架橋または融合をコードするDNAで形質転換された組換え細胞培養により、標的配列に免疫原性を付与するのに十分な大きさのポリペプチドを融合することにより作製される。欠失は、タンパク質配列からの1つまたは複数のアミノ酸残基の除去によって特徴付けられる。典型的には、タンパク質分子内のいずれか1つの部位で約2～6個以下の残基が削除される。これらの変異体は通常、タンパク質をコードするDNA中のヌクレオチドの部位特異的変異誘発により調製され、それにより変異体をコードするDNAを産生し、その後組換え細胞培養でDNAを発現する。既知の配列を有するDNAの所定の部位で置換突然変異を行う技術、例えばM13プライマー突然変異誘発およびPCR突然変異誘発はよく知られており；アミノ酸置換は、通常、単一の残基からなるが、一度に多くの異なる場所で発生する可能性があり；挿入は通常、約1～10アミノ酸残基のオーダーであり；削除は約1～30残基の範囲である。削除または挿入は、隣接するペアで行われることが好ましい。すなわち、2残基の削除または2残基の挿入である。置換、削除、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを組み合わせ、最終的な構造に到達することができる。突然変異は、配列をリーディングフレームの外に配置してはならず、できれば二次mRNA構造を生成する可能性のある相補的領域を作成しないことが望ましい。置換バリエーションとは、少なくとも1つの残基が削除され、その場所に別の残基が挿入されているバリエーションである。そのような置換は一般に、以下の表1および2に従って行われ、保存的置換と呼ばれる。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1:アミノ酸略語		
アミノ酸	略語	
アラニン	Ala	A
アロソロイシン	AlIe	
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン酸	Glu	E
グルタミン	Gln	Q
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン (Isoleucine)	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リジン	Lys	K
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
ピログルタミン酸	pGlu	
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T
チロシン	Tyr	Y
トリプトファン	Trp	W
バリン	Val	V

10

20

【表 2】

表 2:アミノ酸置換
元の残基の例示的な保存的置換、他のものは当技術分野で知られている。

Ala	Ser
Arg	Lys; Gln
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn, Lys
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn;Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

30

40

【 0 0 5 6 】

機能または免疫学的同一性の大幅な変更は、表 2 にあるものよりも保守的ではない置換を選択することによって行われ、すなわち、(a) 例えばシートまたはらせん構造としての置換領域のポリペプチド骨格の構造、(b) 標的部位での分子の電荷または疎水性、ま

50

たは (c) 側鎖の大部分、を維持することへの影響がより大きく異なる残基を選択する。一般にタンパク質の特性に最大の変化をもたらすと予想される置換は、(a) 親水性残基、例えば、セリルまたはトレオニルは、疎水性残基、例えばロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリルまたはアラニルと置換される (すなわち、それらによって置換される) ; (b) シス테인またはプロリンは、他の残基と置換される (すなわち、それらによって置換される) ; (c) 電氣的に陽性の側鎖を有する残基、例えば、リシル、アルギニル、またはヒスチジルは、電氣的に陰性の残基、例えば、グルタミルまたはアスパルチルと置換される (すなわち、それらによって置換される) ; または (d) かさ高い側鎖を有する残基、例えば、フェニルアラニンは、側鎖を持たないもの、例えば、この場合グリシン、と置換される (すなわち、それによって置換される) ; (e) 硫酸化および / またはグリコシル化の部位の数を増やすことによる、ものである。

10

【 0 0 5 7 】

例えば、生物学的および / または化学的に類似する別のアミノ酸残基による 1 つのアミノ酸残基の置換は、保存的置換として当業者に知られている。例えば、保存的置換は、1 つの疎水性残基を別の疎水性残基に、または 1 つの極性残基を別の極性残基に置き換えることである。置換には、例えば、G l y , A l a ; V a l , I l e , L e u ; A s p , G l u ; A s n , G l n ; S e r , T h r ; L y s , A r g ; および P h e , T y r 、などの組み合わせが含まれる。明示的に開示された各配列のそのような保存的に置換されたバリエーションは、本明細書で提供されるモザイクポリペプチド内に含まれる。

【 0 0 5 8 】

20

N - グリコシル化 (A s n - X - T h r / S e r) または O - グリコシル化 (S e r または T h r) の部位を挿入するために、置換または欠失変異誘発を使用できる。シス테인または他の不安定な残基の削除も望ましい場合がある。潜在的なタンパク質分解部位、例えば A r g の欠失または置換は、例えば、塩基性残基の 1 つを削除するか、グルタミニルまたはヒスチジル残基で 1 つを置換することにより達成される。

【 0 0 5 9 】

特定の翻訳後誘導体化は、発現したポリペプチドに対する組換え宿主細胞の作用の結果である。グルタミニルおよびアスパラギニル残基は、翻訳後、対応するグルタミルおよびアスパリル残基にしばしば脱アミド化される。あるいは、これらの残基は、弱酸性条件下で脱アミド化される。他の翻訳後修飾には、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリルまたはトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖の o - アミノ基のメチル化 (T.E. Creighton、Proteins : Structure and Molecular Properties、W.H. Freeman & Co.、San Francisco pp 79-86 [1983]) 、 N 末端アミンのアセチル化、場合によっては C 末端カルボキシルのアミド化が含まれる。

30

【 0 0 6 0 】

本明細書で開示されるタンパク質の変異体および誘導体を定義するための 1 つの方法は、特定の既知の配列に対する相同性 / 同一性に関して変異体および誘導体を定義することによると理解される。例えば、配列番号 1 は、融合タンパク質の特定の配列を示す。具体的に開示されているのは、記載された配列に対して少なくとも、70 % または 75 % または 80 % または 85 % または 90 % または 95 % 、 96 % 、 97 % 、 98 % または 99 % の配列同一性を有するこれらおよび本明細書に開示された他のタンパク質の変異体である。当業者は、2 つのタンパク質の配列同一性を決定する方法を容易に理解する。例えば、相同性が最高レベルになるように、2 つの配列を並べた後に配列同一性を計算できる。

40

【 0 0 6 1 】

本明細書は様々なタンパク質およびタンパク質配列について議論するので、それらのタンパク質配列、すなわちポリヌクレオチドをコードできる核酸も開示されていることが理解される。これには、特定のタンパク質配列に関連するすべての縮重配列、すなわち、特定のタンパク質配列をコードする配列を有するすべての核酸、ならびにタンパク質配列の開示された変異体および誘導体をコードする縮重核酸を含むすべての核酸が含まれる。したがって、各特定の核酸配列は本明細書に記載されていない可能性があるが、各配列はす

50

べて、開示されたタンパク質配列を通じて実際に本明細書に開示および記載されていることが理解される。したがって、開示された融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質のアミノ酸配列を有する当業者は、前述の融合ペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質をコードするポリヌクレオチドを構想および構築できることが理解され、本明細書で企図される。一態様において、本明細書に開示される融合タンパク質（例えば、配列番号 1 に記載される融合タンパク質）をコードするポリヌクレオチド配列が本明細書に開示される。

【0062】

一態様では、本明細書に開示される操作された操作された腫瘍溶解細胞および/または融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質により誘導されるNK細胞活性は、NK細胞とIL-2、IL-12、IL-18、IL-21またはIL-15などの活性化サイトカインとの接触によりNK細胞を活性化することにより増加し得ることが本明細書で企図される。一態様において、活性化サイトカインは腫瘍溶解性ウイルスにより発現され得ることが認識されている。したがって、一態様では、腫瘍溶解性ウイルスは、非切断シグナルアンカードメインを含む1つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドを発現する、操作された腫瘍溶解性ウイルスであり、ここで、腫瘍溶解性ウイルスは、IL-2、IL-12、IL-18、IL-21、またはIL-15のうちの1つまたは複数を発現するようにさらに操作されている。

【0063】

本明細書に開示される腫瘍溶解性ウイルスは、任意のウイルス骨格から構築され得る。一態様では、ウイルスは、改変または操作された、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-1、単純ヘルペスウイルス-2、水痘帯状疱疹ウイルス、エプスタイン-バーウイルス、サイトメガロウイルス、および/またはヒトヘルペスウイルス-6）、ポックスウイルス（例えば、痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、伝染性軟属腫ウイルス、および/またはオルフウイルス）、レオウイルス（ロタウイルスなど）、ピコルナウイルス（例えば、エンテロウイルス、セネカウイルス、ポリオウイルス、コクサッキーウイルス、ライノウイルス、A型肝炎ウイルス、および/または口蹄疫ウイルス）、トガウイルス（アルファウイルス、セムリキフォレストウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、シンドビスウイルス、風疹ウイルスなど）、コロナウイルス、フラビウイルス（C型肝炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マレーバレー熱ウイルス、黄熱ウイルス、西ナイルウイルス、ジカウイルス、デング熱ウイルスなど）、フィロウイルス（例えば、エボラウイルスやマールブルグウイルス）、アレナウイルス（例えば、ラッサ熱ウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、ピチネウイルス、フニンウイルス、および/またはマチュポウイルス）、ブニヤウイルス（例えば、ハンタンウイルス、および/またはリフトバレー熱ウイルス）、パラミクソウイルス（例えば、ヒトパラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、サルウイルス5、および/または麻疹ウイルス）、ラブドウイルス（例えば、水疱性口内炎ウイルスおよび/または狂犬病ウイルス）、ニューモウイルス（例えば、呼吸器合胞体ウイルス）、オルソミクソウイルス（例えば、インフルエンザウイルスA、インフルエンザウイルスB、および/またはインフルエンザCウイルス）、デルタウイルス（D型肝炎ウイルスなど）、レトロウイルス（例えば、サル免疫不全ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス1型、およびヒト免疫不全ウイルス2型、ラウス肉腫ウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルス1型および/またはサル泡沫状ウイルス）、ヘパドナウイルス（B型肝炎ウイルスなど）、オルソヘペウイルス（E型肝炎ウイルスなど）、ヒトパピローマウイルス、またはポリオーマウイルスである。例えば、腫瘍崩壊性ウイルスは、HSV-1腫瘍崩壊性ウイルスHSV1716またはタリモジーン・ラハーパレブベック（Talimogene laherparepvec）、改変アデノウイルス腫瘍崩壊性ウイルスH101、ポリオウイルス腫瘍崩壊性ウイルスPVSRIPO、レオウイルス腫瘍崩壊性ウイルスレオシリン、セネカバレーウイルスSVV-001、コクサッキーウイルス腫瘍溶解性ウイルスコクサッキーウイルスA21、エンテロウイルス腫瘍溶解性ウイルスリガウイルス、またはワクシニアウイルス腫瘍溶解性ウイルスG

10

20

30

40

50

L - O N C 1、または J X - 5 9 4 であり得る。一態様において、本明細書に開示されるのは、改変または操作された腫瘍溶解性ウイルスであって、ここで、腫瘍溶解性ウイルスは、非切断シグナルアンカードメインを含む外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドを発現し；ここで、改変または操作された腫瘍溶解性ウイルスは、例えば改変または操作されたパラインフルエンザウイルス 5 型などのパラインフルエンザウイルス、例えば C P I パラインフルエンザ、野生型パラインフルエンザ、または C P I から P / V をコードする C P I - W T パラインフルエンザキメラウイルスであり、ウイルス骨格の残りは W T パラインフルエンザである）。

【 0 0 6 4 】

一態様では、癌細胞などの標的細胞へのウイルスの膜融合を促進すると、腫瘍溶解性ウイルスから標的細胞への遺伝物質の送達速度および効率を高めることができると認識されている。腫瘍溶解性ウイルスの標的細胞への融合を促進できる 1 つの方法は、融合性のペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質の使用によるものである。融合性のペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質には、ウイルス融合性のペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質、例えば、インフルエンザ血球凝集素ペプチド (H A)、デング熱融合ペプチド、H I V エンベロープ (E n v)、パラミクソウイルス (例えば、パラインフルエンザウイルスと S V 5) 融合タンパク質 (F) およびパラミクソウイルスヘマグルチニン - ノイラミニダーゼ (H N) などが含まれるが、これらに限定されない。したがって、一態様において、本明細書に開示されるのは、1 つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドおよび非切断シグナルアンカードメインを含む腫瘍溶解性ウイルスであり、操作された腫瘍溶解性ウイルスは融合性の腫瘍溶解性ウイルスである。一態様において、融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質は、腫瘍溶解性ウイルスにとって内因性であり得るか、またはウイルスは、外因性融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を発現するように操作され得る。言い換えれば、腫瘍溶解性ウイルスは、天然のものでも、融合性になるように操作 / 改変されたものでもよい。例えば、骨格腫瘍溶解性ウイルスはレオウイルス、ポリオウイルス、またはアデノウイルスであり得、これらは、融合性ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を含むように改変 / 操作され得、したがって融合性である。したがって、一態様において、本明細書に開示されるのは、非切断シグナルアンカードメインを含む外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドを発現する改変または操作された腫瘍溶解性ウイルスであり、改変または操作された腫瘍溶解性ウイルスは、例えば改変または操作されたパラインフルエンザウイルス 5 型などのパラインフルエンザウイルスであり、腫瘍溶解性ウイルスはパラミクソウイルス F および / または H N を発現する。一態様では、天然の融合性の腫瘍溶解性ウイルスは、さらなる融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を含むように操作することもできる。そのような操作された融合性の腫瘍溶解性ウイルスは、高融合性である。したがって、一態様において、本明細書に開示されるのは、腫瘍細胞の融合を可能にする高融合性を可能にするペプチドをコードする遺伝子を含む融合性の腫瘍溶解性ウイルスである。

【 0 0 6 5 】

上記のように、開示された融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質および / または修飾された腫瘍溶解性ウイルスは、標的癌部位での免疫細胞 (例えば、N K 細胞、T 細胞、C A R T 細胞、先天性リンパ系細胞、マクロファージ、B 細胞 (形質細胞を含む)) の数を最大にし、したがって免疫細胞活性 (例えば、N K 細胞活性、T 細胞活性、C A R T 細胞活性、および / または B 細胞活性 (形質細胞および抗体活性を含む)) を高めるように設計されている。したがって、一態様では、本明細書に開示されるのは、癌免疫療法のために免疫細胞を癌細胞に標的化する方法であって、融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質；外因性膜結合免疫細胞標的化リガンド、および / または腫瘍溶解性ウイルスゲノムへ本明細書に開示されるシグナルアンカードメインを挿入することにより腫瘍溶解性ウイルスを改変することと、細胞を改変腫瘍溶解性ウイルスと接触させることと、を含む方法である。

【 0 0 6 6 】

10

20

30

40

50

1. 薬学的担体 / 医薬品の送達

上述のように、組成物は、薬学的に許容される担体とともに *in vivo* で投与することもできる。「薬学的に許容される」とは、望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく、有害な態様でそれが含まれる医薬組成物の他の成分と相互作用することのない、生物学的ではなく、またはその他の点で望ましくない点はない材料を意味する。すなわち、材料は、核酸またはベクターとともに対象に投与されてもよい。担体は、当業者によく知られているように、当然のことながら、活性成分の分解を最小限に抑え、対象における有害な副作用を最小限に抑えるように選択される。

【0067】

組成物は、経口、非経口（例えば、静脈内）、筋肉内注射、腹腔内注射、経皮、体外、局所など、局所鼻腔内投与または吸入による投与を含めて投与することができる。本明細書で使用される「局所鼻腔内投与」は、鼻孔の一方または両方を介した鼻および鼻道への組成物の送達を意味し、噴霧機構または液滴機構による送達、または核酸またはベクターのエアロゾル化による送達を含むことができる。吸入剤による組成物の投与は、噴霧または液滴機構による送達を介して鼻または口を通して行うことができる。挿管を介して呼吸器系の任意の領域（肺など）に直接送達することもできる。必要な組成物の正確な量は、対象の種、年齢、体重、および一般的な状態、治療されるアレルギー性疾患の重症度、使用される特定の核酸またはベクター、その投与方法などに応じて、対象ごとに異なる。したがって、すべての成分に対して正確な量を指定することはできない。しかしながら、適切な量は、本明細書の教示が与えられた通常の実験のみを使用して、当業者によって決定され得る。

【0068】

組成物の非経口投与は、使用される場合、一般的に注射によって特徴付けられる。注射剤は、液体溶液または懸濁液、注射前の液体の懸濁液の溶液に適した固体形態、またはエマルジョンのいずれかとして、従来の形態で調製することができる。非経口投与のより最近改訂されたアプローチは、一定の投与量が維持されるように、徐放または持続放出システムの使用を伴う。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 3,610,795 号を参照されたい。

【0069】

材料は、溶液、懸濁液（例えば、微粒子、リボソーム、または細胞に組み込まれた）であってもよい。これらは、抗体、受容体、または受容体リガンドを介して特定の細胞型を標的とする場合がある。以下の参考文献は、特定のタンパク質を腫瘍組織に標的化することの技術の使用例ある（Senter, et al., Bioconjugate Chem., 2:447-451, (1991); Bagshawe, K.D., Br. J. Cancer, 60:275-281, (1989); Bagshawe, et al., Br. J. Cancer, 58:700-703, (1988); Senter, et al., Bioconjugate Chem., 4:3-9, (1993); Battelli, et al., Cancer Immunol. Immunother., 35:421-425, (1992); Pietersz and McKenzie, Immunolog. Reviews, 129:57-80, (1992); および Roffler, et al., Biochem. Pharmacol., 42:2062-2065, (1991)）。「ステルス」および他の抗体コンジュゲートリボソーム（結腸癌を標的とする脂質媒介薬物を含む）、細胞特異的リガンドを介した DNA の受容体媒介標的、リンパ球指向腫瘍標的、および *in vivo* でのマウス神経膠腫細胞の高度に特異的な治療レトロウイルス標的などの媒体（ビヒクル）。以下の参考文献は、特定のタンパク質を腫瘍組織に標的化することの技術の使用例である（Hughes et al., Cancer Research, 49:6214-6220, (1989); and Litzinger および Huang, Biochimica et Biophysica Acta, 1104:179-187, (1992)）。概して、受容体は、構成的またはリガンド誘導性のエンドサイトーシスの経路に関与している。これらの受容体はクラスリンでコーティングされたピットに集まり、クラスリンでコーティングされた小胞を介して細胞に入り、受容体が分類された酸性化エンドソームを通過してから、細胞表面にリサイクルされ、細胞内に保存されるか、リソソームで分解される。内在化経路は、栄養素の取り込み、活性化タンパク質の除去、高分子の除去、ウイルスと毒素の日和見侵入、リガンドの解離と分解、受容体レベルの調節など、さまざまな機能を果たす。多くの受容

体は、細胞の種類、受容体の濃度、リガンドの種類、リガンドの価数、およびリガンドの濃度に応じて、複数の細胞内経路をたどる。受容体を介したエンドサイトーシスの分子および細胞メカニズムがレビューされている (Brown and Greene, DNA and Cell Biology 10:6, 399-409 (1991))。

【0070】

a) 薬学的に許容される担体

抗体を含む組成物は、薬学的に許容される担体と組み合わせて治療的に使用することができる。したがって、一態様において、本明細書に開示されるのは、1つまたは複数の操作された腫瘍溶解性ウイルスおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物であり、腫瘍溶解性ウイルスは、例えば、細胞内に面するアミノ末端に対して逆向きになるように改変された免疫グロブリンFcドメイン (例えば、IgG1、IgG2、IgG3、および/またはIgG4Fcドメイン) ; から選択される外因性膜結合免疫細胞標的化リガンド ; 非切断シグナルアンカードメイン (例えば、ノイラミニダーゼ膜貫通セグメント) を含むNKGD2Dリガンド (例えば、RAET1、RAET1E、RAET1G、RAET1H、RAET1L、RAET1N、MICA、および/またはMICB) および/またはCD19) を発現する。

【0071】

適切な担体とその製剤は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19th ed.) ed. A.R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995に記載される。典型的には、製剤を等張にするために、製剤に適切な量の薬学的に許容される塩が使用される。薬学的に許容される担体の例には、生理食塩水、リンゲル液およびデキストロース溶液が含まれるが、これらに限定されない。溶液のpHは、好ましくは約5~約8、より好ましくは約7~約7.5である。さらなる担体には、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスなどの徐放性調製物が含まれ、このマトリックスは、成形品、例えばフィルム、リポソームまたは微粒子の形態である。例えば、腫瘍溶解性ウイルスベクターのタイプ (すなわち、腫瘍溶解性ウイルスのウイルス骨格)、投与経路および投与される組成物の濃度に応じて、特定の担体がより好ましい場合があることは、当業者には明らかであろう。

【0072】

薬学的担体は当業者に知られている。これらは、典型的には、滅菌水、生理食塩水、生理的pHの緩衝液などの溶液を含む、薬物をヒトに投与するための標準的な担体である。組成物は筋肉内または皮下に投与することができる。他の化合物は、当業者によって使用される標準的な手順に従って投与されるであろう。

【0073】

医薬組成物は、選択された分子に加えて、担体、増粘剤、希釈剤、緩衝液、防腐剤、界面活性剤などを含んでもよい。医薬組成物はまた、抗菌剤、抗炎症剤、麻酔薬などの1つまたは複数の活性成分を含んでもよい。

【0074】

医薬組成物は、局所または全身治療が望ましいかどうか、および治療される領域に応じて、いくつかの方法で投与され得る。投与は、局所的 (眼科的、腔内、直腸内、鼻腔内を含む)、経口的、吸入による、または非経口的、例えば静脈内点滴、皮下、腹腔内または筋肉内注射であり得る。開示された抗体は、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、腔内、または経皮的に投与することができる。

【0075】

非経口投与用の製剤には、滅菌水溶液または非水溶液、懸濁液、およびエマルジョンが含まれる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性担体には、水、アルコール/水溶液、乳液または懸濁液が含まれ、生理食塩水および緩衝媒体が含まれる。非経口ピヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル液、または固定油が含まれる。静

10

20

30

40

50

脈内ビヒクルには、液体および栄養補給剤、電解質補給剤（リンガーのデキストロースに基づくものなど）などが含まれる。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、および不活性ガスなどの防腐剤および他の添加物も存在し得る。

【 0 0 7 6 】

局所投与用の製剤には、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロップ、坐剤、スプレー、液体、および粉末が含まれてもよい。従来の医薬担体、水性、粉末または油性基剤、増粘剤などが必要または望ましい場合がある。

【 0 0 7 7 】

経口投与用の組成物には、粉末または顆粒、水または非水性媒体中の懸濁液または溶液、カプセル、サシェ、または錠剤が含まれる。増粘剤、香料、希釈剤、乳化剤、分散助剤または結合剤が望ましい場合がある。

【 0 0 7 8 】

一部の組成物は、塩酸、臭化水素酸、過塩素酸、硝酸、チオシアン酸、硫酸、リン酸などの無機酸、および、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、ピルビン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸などの有機酸との反応によって、または、水酸化ナトリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カリウムなどの無機塩基、モノ - 、ジ - 、トリアルキル、アリアルアミン、置換エタノールアミンなどの有機塩基との反応によって、形成される、薬学的に許容される酸または塩基付加塩として投与される可能性がある。

【 0 0 7 9 】

b) 治療的使用

組成物を投与するための有効な投与量およびスケジュールは経験的に決定することができ、そのような決定を行うことは当業者の範囲内である。

一態様では、本明細書に開示される腫瘍溶解性ウイルス（または当該ウイルスを含む組成物）は、養子移入されたNK細胞の投与の前に投与することができる。例えば、腫瘍溶解性ウイルスは、NK細胞の養子移入の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18時間前、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、または30日前に投与し得、NK細胞が投与される前に、宿主免疫系が本明細書に開示される腫瘍溶解性ウイルスに応答することを可能にする。別の態様では、腫瘍溶解性ウイルスおよび養子移入されたNK細胞は、同じまたは異なる部位に同時に、または同時に投与することができる。別の態様では、NK細胞は、本明細書に開示される腫瘍溶解性ウイルスまたは当該ウイルスを含む任意の組成物の投与の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18時間、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、21、28、または30日前に投与され得る。腫瘍溶解性ウイルスの前または後に投与する場合、NK細胞は同じ部位または異なる部位に投与することができる。

【 0 0 8 0 】

組成物の投与のための用量範囲は、障害の症状が影響を受ける所望の効果を生み出すのに十分な範囲である。用量は、望ましくない交差反応、アナフィラキシー反応などの有害な副作用を引き起こすほど大きくすべきではない。概して、投与量は、患者の年齢、状態、性別および疾患の程度、投与経路、またはレジメンに他の薬物が含まれるかどうかによって異なり、当業者が決定できる。投与量は、対抗適応症が発生した場合に個々の医師が調整できる。投与量は様々であり、1日または数日間、毎日1回または複数回の投与により投与することができる。医薬品の特定のクラスの適切な投与量に関するガイダンスは、文献に記載されている。例えば、抗体の適切な用量を選択する際のガイダンスは、抗体の治療的使用に関する文献、例えば、Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone et al., eds., Noyes Publications, Park Ridge, N.J., (1985) ch. 22 and pp. 303-357; Smith et al., Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber et al., eds., Raven Press, New York (1977) pp. 365-389に記載されている。単独で使用される抗体の典型的な1日投与量は、上記の要因に応じて、1日あたり約1 μ g / kg から最大1

10

20

30

40

50

0.0 mg / kg 体重またはそれ以上の範囲である。

【0081】

C. 癌の治療方法

腫瘍溶解性ウイルスは、癌の治療のための効果的な治療薬であることが当技術分野で示されている。ウイルスは、出口で感染した癌細胞を溶解し、癌細胞の感染も宿主の免疫応答を刺激して感染細胞を殺す。開示された操作されたウイルスおよび/または融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質は同様に癌の治療に有用であり、そのような腫瘍溶解性ウイルスの効力を改善してNK細胞を感染癌細胞に補充することが理解され、本明細書で企図される。したがって、一態様では、膜結合免疫細胞標的化リガンド（例えば、免疫グロブリンFcドメイン（例えば、細胞内に面したアミノ末端に対して逆方向を有するIgG1、IgG2、IgG3、および/またはIgG4Fcドメイン）を含む1つまたは複数のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を発現する開示された腫瘍溶解性ウイルス；NKG2Dリガンド（例えば、RAET1、RAET1E、RAET1G、RAET1H、RAET1L、RAET1N、MICA、および/またはMICB）、および/またはCD19）および非切断シグナルアンカードメインおよび/または融合ペプチド、ポリペプチド、または膜結合免疫細胞標的化リガンドと非切断シグナルアンカードメインを含むタンパク質が、癌の治療に使用できる。一態様において、操作された腫瘍溶解性ウイルスは、融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を含むように改変され得る。1つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドが免疫グロブリンFcドメインである場合、Fcドメインは、そのN末端側が細胞膜の表面近くの膜アンカーペプチドに付着した状態で、細胞表面の細胞外側に発現するように改変できることが理解される。

【0082】

本明細書に開示される腫瘍溶解性ウイルスの1つを対象に投与することにより治療することができる異なるタイプの癌の非限定的なリストは以下の通りである：リンパ腫（ホジキンおよび非ホジキン）、白血病、癌腫、固形組織の癌、扁平上皮癌、腺癌、肉腫、神経膠腫、高悪性度神経膠腫、芽細胞腫、神経芽細胞腫、形質細胞腫、組織球腫、黒色腫、腺腫、低酸素腫瘍、骨髄腫、エイズ関連リンパ腫または肉腫、転移癌、または一般的な癌。開示された腫瘍溶解性ウイルスおよびそれを含む組成物が治療に使用できる癌の代表的だが非限定的なリストは次のとおりである：リンパ腫、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、菌状息肉腫、ホジキン病、骨髄性白血病、膀胱癌、脳癌、神経系癌、頭頸部癌、頭頸部扁平上皮癌、腎臓癌、小細胞肺癌および非小細胞肺癌などの肺癌、神経芽細胞腫/膠芽腫、メルケル細胞癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、皮膚癌、肝臓癌、黒色腫、口、喉、喉頭、肺の扁平上皮癌、大腸癌、子宮頸癌、子宮頸癌、乳癌、上皮癌腎癌、泌尿生殖器癌、肺癌、食道癌、頭頸部癌、大腸癌、造血器癌；精巣癌；結腸癌および直腸癌、前立腺癌、または膵臓癌。

【0083】

したがって、一態様では、本明細書に開示されるのは、癌を治療する方法であって、1つまたは複数の操作された腫瘍溶解性ウイルスおよび/または融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質（開示された融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を発現する腫瘍溶解性ウイルスを含む）を含む組成物を対象に投与することを含み、ここで、1つまたは複数の腫瘍溶解性ウイルスは、外因性の膜結合免疫細胞標的化リガンドを含む1つまたは複数の融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を発現する。一態様では、外因性の膜結合免疫細胞標的化リガンドを含む、本明細書に開示される融合ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、細胞質尾部領域、膜貫通領域および細胞外ストーク領域；および細胞外ストーク領域のC末端に融合したN末端を含む免疫細胞標的化リガンドを含む非切断シグナルアンカードメインを含む。したがって、融合ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、膜結合免疫細胞標的化リガンドを提供する（例えば、免疫グロブリンFcドメイン（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、および/またはIgG4Fcドメイン）は、NKG2Dリガンド（例えば、RAET1、RAET1E、RAET1G、RAET1H、RAET1L、RAET1N、MICA、および/またはMICB

）；および／または別の標的化可能なリガンド（例えば、CD19またはCD20）の自然な向きのリガンドと比較して、細胞に対して逆向きに配向し、アミノ末端は細胞外ではなく細胞内に面するように改変される。）。

【0084】

治療方法は、標的癌細胞に対するNK細胞活性を増加させるために改変および／または融合されたペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質である腫瘍溶解性ウイルスを使用することが理解され、本明細書で企図される。したがって、本明細書に開示される腫瘍溶解性ウイルスおよび／または融合ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の治療活性は、本明細書に開示される腫瘍溶解性ウイルスのいずれかによる腫瘍溶解性ウイルス治療中の対象への免疫細胞（例えば、これには、遺伝子組み換えナチュラルキラー（NK）細胞が含まれるが、これに限定されない、NK細胞。）またはその任意の組み合わせの養子移入を通じて増強することができる。したがって、一態様では、本明細書に開示されるのは、例えばNK細胞（例えば、遺伝子改変NK細胞を含む）および／またはCD19標的化抗CD19 CAR T細胞などの免疫細胞を対象に養子免疫伝達することをさらに含む、癌を治療する方法である。一態様では、NK細胞は、CD19標的化抗CD19キメラ抗原受容体を発現するように改変され得る。

【0085】

一態様では、開示された腫瘍溶解性ウイルスで使用されるいくつかの標的化リガンドは、NK細胞上の受容体に対する直接リガンドではないことが理解され、本明細書で企図される。一態様は、本明細書に開示されるのは、非切断シグナルアンカードメインを含む1つまたは複数の膜結合免疫細胞標的化リガンドを含む腫瘍溶解性ウイルスを対象に投与することを含む、癌を治療する方法であって、当該方法は、標的化リガンド（例えば、抗CD19抗体（例えば、MDX1342、MEDI-551、AFM11、XmAb 5871、MOR-208、SGN-19A、SAR3419、プリナツモマブ、またはタブリツモマブ））または抗CD-20抗体（例えば、リツキシマブ、オファツムマブ、オブチヌツズマブ、ベルツズマブ、またはオクレリズマブ）を認識する1つまたは複数の抗体を対象に投与することをさらに含む。癌を治療する開示された方法は、非切断シグナルアンカードメインを含む1つまたは複数の膜結合免疫細胞標的化リガンドを含む腫瘍溶解性ウイルスおよび標的リガンドを認識する抗体を対象に投与することを含み、当該方法は、上記に開示された免疫細胞のいずれかの投与をさらに含むことができることが理解される。加えて、開示された方法は、当業者に知られている抗癌治療薬の投与をさらに含むことができる。

【0086】

開示された癌治療方法では、有効な治療用量に達するある程度のNK細胞の活性化および／または増殖を達成することが望ましい場合がある。サイトカイン（IL-15やIL-21など）と、刺激細胞の表面に発現した受容体を活性化するリガンド（4-1BBLなど）で刺激されると、NK細胞は、*in vitro*培養で、末梢血単核細胞（PBMC）の混合物内で指数関数的かつ優先的に増殖する。膜結合IL-21による刺激は、培養に新鮮な刺激細胞が定期的に補充されることを条件として、無数の世代にわたってNK細胞の連続増殖を刺激し、NK細胞の連続的な拡大を可能にすることがわかった。これらの方法は効率的な*in vitro* NK細胞の増殖を可能にするが、生きたフィーダー細胞の必要性は、大きなGMP施設と能力を持たない臨床設定への移行を困難にする。また、患者に注入されたNK細胞は、フィーダーによる継続的な刺激の欠如のために分裂を停止する場合がある。原形質膜（PM）粒子、エキソソーム（EX）、または1つ以上の活性化剤、刺激ペプチド、サイトカイン、および／または接着分子を含むフィーダー細胞を使用して、NK細胞と接触、活性化、および／または増殖することにより、これらのハードルが克服される。NK細胞活性化剤および刺激ペプチドの例には、4-1BBL、IL-2、IL-12、IL-21、IL-18、MICA、LFA-1、2B4、BCM/SLAMF2、CCR7および／または他のホーミング受容体が含まれるが、これらに限定されない。サイトカインの例には、IL-2、IL-12、IL-21、およびIL-18

が含まれるが、これらに限定されない。接着分子の例には、L F A - 1、M I C A、B C M / S L A M F 2 が含まれるが、これらに限定されない。例えば、フィーダー細胞または原形質膜粒子（P M 粒子）またはエキソソーム（E X）は、膜結合 I L - 2 1（それぞれ F C 2 1 フィーダー細胞、P M 2 1 粒子、および E X 2 1 エキソソーム）を発現するフィーダー細胞から調製される。膜結合 I L 2 1 発現 F C 2 1 細胞、P M 2 1 粒子、および E X 2 1 エキソソームは、追加の 1 つまたは複数の活性化剤、刺激ペプチド、サイトカイン、および / または 4 1 B B L、I L - 2、I L - 1 2、I L - 1 8、M I C A、L F A - 1、2 B 4、B C M / S L A M F 2、C C R 7 を含むがこれらに限定されない接着分子をさらに含むことができる（例えば、4 1 B B L および膜結合インターロイキン 2 1 を発現する P M 2 1 粒子、E X 2 1 エキソソーム、または F C 2 1 フィーダー細胞）。したがって、一態様では、本明細書に開示されるのは、非切断シグナルアンカードメインを含む 1 つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞標的化リガンド（例えば、細胞に対して逆向きを有するように改変された免疫グロブリン F c ドメイン（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、および / または I g G 4 F c ドメイン）であり、リガンド、N K G 2 D リガンド（例えば、R A E T 1、R A E T 1 E、R A E T 1 G、R A E T 1 H、R A E T 1 L、R A E T 1 N、M I C A、および / または M I C B）および / または C D 1 9）の自然に生じる向きと比較して、アミノ末端が細胞外ではなく細胞内に面している、を発現する 1 つまたは複数の操作された腫瘍溶解性ウイルスを含む組成物を対象に投与することを含む、癌を治療する方法であり；さらに、例えば、N K 細胞（例えば、遺伝子組み換え N K 細胞など）または C D 1 9 標的化抗 C D 1 9 C A R T 細胞などの免疫細胞を対象に養子的に移入することを含み、ここで、免疫細胞は N K 細胞であり、N K 細胞は、サイトカイン（例えば、I L - 1 2、I L - 1 5、I L - 1 8、およびそれらの任意の組み合わせ、例えば、I L - 1 2 と I L - 1 5；I L - 1 2 と I L - 1 8；I L - 1 5 と I L - 1 8；および I L - 1 2 と I L - 1 5 と I L 1 8 を含む。）、成長因子、合成リガンド、N K 細胞刺激粒子、N K 細胞刺激エキソソーム、および / または N K 細胞刺激粒子、エキソソーム、および / または I L - 2 1、4 - 1 B B L、I L - 2 1 と 4 - 1 B B L を含む N K 細胞刺激フィーダー細胞；またはサイトカインまたは N K 細胞刺激粒子、エキソソーム、またはそれらのフィーダー細胞の任意の組み合わせなどの 1 つまたは複数の N K 細胞刺激剤で刺激および増殖される。

【 0 0 8 7 】

一態様では、原形質膜粒子またはエキソソームは、N K 細胞フィーダー細胞から精製することができる。クレームされた発明で使用され、本明細書で開示される原形質膜粒子およびエキソソームの作製で使用される N K 細胞フィーダー細胞は、照射された自己または同種末梢血単核細胞（P B M C）または非照射自己または同種 P B M C、R P M I 8 8 6 6、H F W T、K 5 6 2、膜結合 I L - 1 5 および 4 1 B B L をトランスフェクトした K 5 6 2 細胞、膜結合 I L - 2 1 および 4 1 B B L をトランスフェクトした K 5 6 2 細胞、または E B V - L C L のいずれかであり得る。いくつかの態様において、N K 細胞フィーダー細胞は、膜結合 I L - 2 1 および 4 1 B B L でトランスフェクトされた K 5 6 2 細胞または膜結合 I L - 1 5 および 4 1 B B L でトランスフェクトされた K 5 6 2 細胞であり得る。

【 0 0 8 8 】

D . 実施例

以下の実施例は、本明細書で特許請求される化合物、組成物、物品、デバイスおよび / または方法の完全な開示および説明を当業者に提供するために提示されるものであり、また、純粋に例示的なものであり、本開示を限定するものではありません。数値（例えば、量、温度など）に関して正確性を確保するための努力がなされてきたが、いくつかの誤差と偏差は考慮されるべきである。特に指定のない限り、部は重量部であり、温度は または周囲温度であり、圧力は大気圧または大気圧に近い。

【 0 0 8 9 】

ここで、腫瘍溶解性ウイルスは、強化された免疫刺激のためにさらに改善され、免疫標

10

20

30

40

50

的化可能リガンド、特に抗体の膜結合Fcドメイン(MB-Fc)などの外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドを送達するために使用され、養子移入されたNK細胞の効力を強化する(図1)。抗体のFcドメインは、NK細胞上のCD16(FcγRIII受容体)によって認識され、それが抗体依存性細胞毒性(ADCC)を誘発する。ADCCを介したNK細胞の標的細胞の殺傷は、腫瘍によって展開される免疫抑制メカニズムの影響を受けにくいため、抗体由来のFcで腫瘍表面をマークすると、ADCCを介したより効果的な殺傷が得られ、効率的な腫瘍除去が可能になる。膜結合免疫細胞標的化リガンドを構築するために、II型内在性膜タンパク質からの非切断シグナルアンカーを標的化リガンドに融合させることができる。事実上、タイプII内在性膜タンパク質に通常存在する球状頭部は、標的化リガンドに置き換えられる(図2)。

10

【0090】

2つのNK細胞耐性細胞株-A549非小肺癌およびSKOV-3卵巣癌細胞株を使用して、概念実証研究を収集し、その腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍標的をNK細胞殺傷に感作させることができ(図6、8、11)、したがって、「ユニバーサル標的化可能リガンド」を腫瘍細胞に送達する送達媒体としても使用できることを示した。P/V/Fを含む多くのウイルスは、感染した細胞にDNAを送達し、宿主細胞でウイルスによってコードされたタンパク質の発現をもたらすことが知られている。NK細胞上のCD16受容体に関与する抗体のFcドメインは、上記の「ユニバーサルターゲティング可能リガンド」の一例である。Fcドメインのノイラミダーゼ(NA)ストークへの付着により、細胞表面でのFcの発現が可能になります(図7および9)。予想通り、SKOV-3細胞またはA549細胞のいずれかでのNA1-Fcの安定した発現は、NK細胞による殺傷の増加をもたらし、この効果はP/V/F感染と相加的であった(図3および6)。さらに、ノイラミダーゼのストークドメインの長さを増やすことにより、Fc認識を介した殺傷がさらに強化された(図10)。したがって、OVを使用の使用を組み合わせ、殺傷性を強化し、「ユニバーサルリガンド」を送達すると、最もNK細胞耐性の癌細胞株でさえNK細胞感受性に感作させることができる。

20

また、本発明は以下を提供する。

[1]

非切断シグナルアンカーを含む1つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドを発現する、操作された腫瘍溶解性ウイルス。

30

[2]

前記腫瘍溶解性ウイルスが融合性の腫瘍溶解性ウイルスである、[1]に記載の操作された腫瘍溶解性ウイルス。

[3]

前記融合性の腫瘍溶解性ウイルスが改変または操作されたパラインフルエンザウイルス5型である、[2]に記載の操作された腫瘍溶解性ウイルス。

[4]

前記融合性の腫瘍溶解性ウイルスが腫瘍細胞の融合を可能にする高融合性特性を可能にするペプチドをコードする遺伝子を含む、[2]に記載の操作された腫瘍溶解性ウイルス。

[5]

前記非切断シグナルアンカーがノイラミニダーゼ膜貫通セグメントである、[1]に記載の操作された腫瘍溶解性ウイルス。

40

[6]

前記1つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドが操作された免疫グロブリンFcドメインを含み、

前記免疫グロブリンFcドメインは、細胞内に面するアミノ末端に対して逆向きになるように改変されている、[1]に記載の操作された腫瘍溶解性ウイルス。

[7]

前記免疫グロブリンFcドメインがIgG1Fcドメインを含む、[6]に記載の操作された腫瘍溶解性ウイルス。

50

[8]

前記 I g G 1 F c ドメインが F c R 結合または A D C C を増加させるための変更をさらに含む、[6] に記載の操作された腫瘍溶解性ウイルス。

[9]

前記 1 つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドは、N K 細胞受容体 N K G 2 D のタンパク質アゴニストを含む、[1] に記載の操作された腫瘍溶解性ウイルス。

[10]

前記 1 つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドは、抗 C D 19 に反応性のタンパク質エピトープ領域を含む、[1] に記載の操作された腫瘍溶解性ウイルス。

[11]

前記 1 つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドが C D 19 または C D 20 である、[1] に記載の操作された腫瘍溶解性ウイルス。

[12]

前記腫瘍溶解性ウイルスが、I L - 12、I L - 21 または I L - 15 のうちの 1 つまたは複数の発現するように操作されている、[1] に記載の操作された腫瘍溶解性ウイルス。

[13]

[1] に記載の操作された腫瘍溶解性ウイルスおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

[14]

[1] に記載の操作された腫瘍溶解性ウイルスを対象に投与することを含む、癌の治療方法。

[15]

前記対象に、ナチュラルキラー (N K) 細胞、前記 1 つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドの 1 つもしくは複数の標的とする抗体、または、前記 1 つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞の 1 つもしくは複数の標的とするように設計された C A R T 細胞を養子移入することをさらに含む、[14] に記載の方法。

[16]

対象に、操作された腫瘍溶解性ウイルスを投与することを含む、癌の治療方法であって、前記腫瘍溶解性ウイルスが非切断シグナルアンカーを含む 1 つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドを発現する、方法。

[17]

前記 1 つまたは複数の膜結合免疫細胞標的化リガンドは、操作された免疫グロブリン F c ドメインを含み、

前記免疫グロブリン F c ドメインが、細胞内に面するアミノ末端に対して逆向きになるように改変されている、[16] に記載の方法。

[18]

前記 1 つまたは複数の膜結合免疫細胞標的化リガンドは、N K 細胞受容体 N K G 2 D のタンパク質アゴニストを含む、[16] に記載の方法。

[19]

前記方法が免疫細胞を養子移入することをさらに含む、[16] に記載の方法。

[20]

前記養子移入された免疫細胞がナチュラルキラー (N K) 細胞である、[19] に記載の方法。

[21]

前記 N K 細胞は、1 つまたは複数の N K 細胞刺激剤で刺激および増殖される、[20] に記載の方法。

[22]

前記 1 つまたは複数の N K 細胞刺激剤は、サイトカイン、成長因子、合成リガンド、N K 細胞刺激粒子、N K 細胞刺激エキソソーム、または N K 細胞刺激フィーダー細胞である

10

20

30

40

50

、[2 1] に記載の方法。

[2 3]

前記 1 つまたは複数の N K 細胞刺激剤は、N K 細胞刺激粒子、N K 細胞刺激エキソソーム、または N K 細胞刺激フィーダー細胞であり、

前記 1 つまたは複数の剤は、I L - 2 1、4 - 1 B B L、またはその断片を含む、[2 2] に記載の方法。

[2 4]

前記 1 つまたは複数の N K 細胞刺激剤は、I L - 2、I L - 1 2、I L - 1 8、I L - 1 5 またはそれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも 1 つのサイトカインを含む、[2 2] に記載の方法。

[2 5]

前記 N K 細胞が、C D 1 9 標的化抗 C D 1 9 キメラ抗原受容体または C D 2 0 標的化抗 C D 2 0 キメラ抗原受容体を発現するように操作される、[2 0] に記載の方法。

[2 6]

前記免疫細胞が、操作された C D 1 9 標的化抗 C D 1 9 C A R - T 細胞または操作された C D 2 0 標的化抗 C D 2 0 C A R - T 細胞である、[1 9] に記載の方法。

[2 7]

前記免疫細胞が、前記 1 つまたは複数の外因性膜結合免疫細胞標的化リガンドに特異的な抗体である、[1 9] に記載の方法。

[2 8]

前記癌は、白血病、リンパ腫、骨髄腫、黒色腫、結腸直腸癌、乳癌、卵巣癌、腎細胞癌、悪性黒色腫、悪性神経膠腫、神経芽細胞腫、非小細胞肺癌、腎細胞癌、メルケル細胞癌、皮膚癌、脳癌、膵臓腺癌、悪性中皮腫、肺腺癌、肺小細胞癌、肺扁平上皮癌、甲状腺未分化癌、または頭頸部扁平上皮癌からなる群から選択される、[1 6] に記載の方法。

[2 9]

前記 N K 細胞が遺伝子改変されている、[2 0] に記載の方法。

[3 0]

細胞質尾部領域、膜貫通領域、および細胞外ストーク領域；並びに前記細胞外ストーク領域の C 末端に融合した N 末端を含む免疫細胞標的化リガンド、を含む非切断シグナルアンカードメインを含む、融合タンパク質。

[3 1]

前記免疫細胞標的化リガンドは、N K 細胞、B 細胞、T 細胞および C A R - T 細胞からなる群から選択される免疫細胞に結合することができる、[3 0] に記載の融合タンパク質。

[3 2]

前記免疫細胞標的化リガンドが、アミノ酸修飾を含む免疫グロブリン F c ドメインを含み、前記 F c ドメインの前記 N 末端が前記細胞外ストークドメインの前記 C 末端に融合する、[3 0] に記載の融合タンパク質。

[3 3]

前記免疫細胞標的化リガンドが、I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4 からなる群より選択される免疫グロブリン F c ドメインを含む、[3 0] に記載の融合タンパク質。

[3 4]

前記 F c ドメインが、2 5 6 A / K 2 9 0 A / S 2 9 8 A / E 3 3 3 A / K 3 3 4 A または L 2 3 5 V / F 2 4 3 L / R 2 9 2 P / Y 3 0 0 L / P 3 9 6 L からなる群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸修飾をさらに含む、[3 3] に記載の融合タンパク質。

[3 5]

前記非切断シグナルアンカードメインは、ノイラミニダーゼ、パラインフルエンザウイルス血球凝集素 - ノイラミニダーゼ、トランスフェリン受容体、M H C クラス I I 不変鎖、P 糖タンパク質、アシアロ糖タンパク質受容体、および中性エンドペプチダーゼのシグ

10

20

30

40

50

ナルアンカードメインから選択されるシグナルアンカードメインを含む、[3 0]に記載の融合タンパク質。

[3 6]

前記非切断シグナルアンカードメインがノイラミニダーゼシグナルアンカードメインを含む、[3 0]に記載の融合タンパク質。

[3 7]

前記標的化リガンドが、免疫グロブリンFcドメイン、NK2GDリガンド、および抗リガンドドメインからなる群から選択される、[3 0]に記載の融合タンパク質。

[3 8]

前記標的化リガンドが、RAET1、RAET1E、RAET1G、RAET1H、RAET1L、RAET1N、MICA、およびMICBから選択されるNK2GDリガンドである、[3 0]に記載の融合タンパク質。

[3 9]

前記標的化リガンドが、CD19およびCD20から選択される抗リガンドドメインである、[3 0]に記載の融合タンパク質。

[4 0]

配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、[3 0]に記載の融合タンパク質。

[4 1]

[4 0]に記載の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列。

[4 2]

[4 0]に記載のポリヌクレオチドを含む改変ウイルスゲノムを含む宿主ウイルス。

[4 3]

前記宿主ウイルスが腫瘍溶解性ウイルスである、[4 2]に記載の宿主ウイルス。

[4 4]

前記宿主ウイルスが、パラインフルエンザウイルス5型、CPIパラインフルエンザ、野生型パラインフルエンザ、CPIおよびWTパラインフルエンザ由来のP/Vをコードするウイルス骨格を有するCPI-WTパラインフルエンザキメラウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、レオウイルス、ピコルナウイルス、トガウイルス、コロナウイルス、フラビウイルス、フィロウイルス、アレナウイルス、ブニヤウイルス、パラミクソウイルス、ラブドウイルス、ニューモウイルス、オルソミクソウイルス、デルタウイルス、レトロウイルス、ヘパドナウイルス、オルソヘペウイルス、ヒトパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、HSV-1腫瘍溶解性ウイルスHSV1716、タリモジーン・ラハーバレブベック、アデノウイルス腫瘍溶解性ウイルスH101、ポリオウイルス腫瘍溶解性ウイルスPVSRIP0、レオウイルス腫瘍崩壊性ウイルスレオシリン、セネカバレーウイルスSVV-001、コクサッキーウイルス腫瘍溶解性ウイルスコクサッキーウイルスA21、エンテロウイルス腫瘍溶解性ウイルスリガウイルス、およびワクシニアウイルス腫瘍溶解性ウイルスGL-ONC1、またはJX-594、から選択される、[4 2]に記載の宿主ウイルス。

[4 5]

前記宿主ウイルスが細胞融合性の腫瘍溶解性ウイルスである、[4 2]に記載の宿主ウイルス。

[4 6]

癌免疫療法のために免疫細胞を癌細胞に標的化する方法であって、[4 1]のポリヌクレオチドを含む改変腫瘍溶解性ウイルスを得て、前記細胞を前記改変腫瘍溶解性ウイルスと接触させることを含む、方法。

[4 7]

[4 1]のポリヌクレオチドをウイルスゲノムに挿入することにより前記腫瘍溶解性ウイルスを改変することをさらに含む、[4 6]に記載の方法。

【 0 0 9 1 】

10

20

30

40

50

2つのNK細胞耐性細胞株 - A549非小肺癌およびSKOV-3卵巣癌細胞株を使用して、概念実証研究を収集し、その腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍標的をNK細胞殺傷に感作させることができ(図6、8、11)、したがって、「ユニバーサル標的化可能リガンド」を腫瘍細胞に送達する送達媒体としても使用できることを示した。P/V/Fを含む多くのウイルスは、感染した細胞にDNAを送達し、宿主細胞でウイルスによってコードされたタンパク質の発現をもたらすことが知られている。NK細胞上のCD16受容体に関与する抗体のFcドメインは、上記の「ユニバーサルターゲティング可能リガンド」の一例である。Fcドメインのノイラミダーゼ(NA)ストークへの付着により、細胞表面でのFcの発現が可能になります(図7および9)。予想通り、SKOV-3細胞またはA549細胞のいずれかでのNA1-Fcの安定した発現は、NK細胞による殺傷の増加をもたらし、この効果はP/V/F感染と相加的であった(図3および6)。さらに、ノイラミダーゼのストークドメインの長さを増やすことにより、Fc認識を介した殺傷がさらに強化された(図10)。したがって、OVを使用の使用を組み合わせ、殺傷性を強化し、「ユニバーサルリガンド」を送達すると、最もNK細胞耐性の癌細胞株でさえNK細胞感受性に感作させることができる。

10

【図面】

【図1】

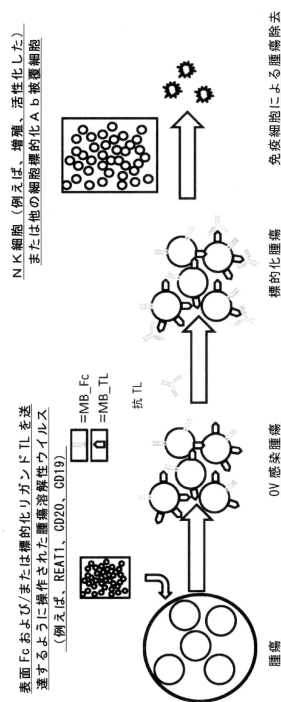


図 1

【図2】

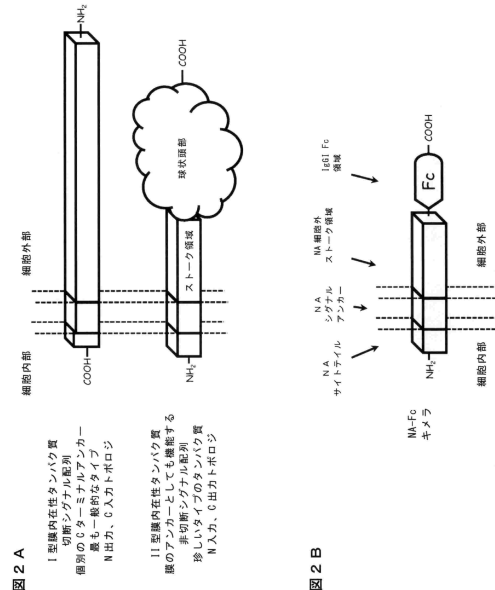


図 2 A

図 2 B

20

30

40

50

【図 3】

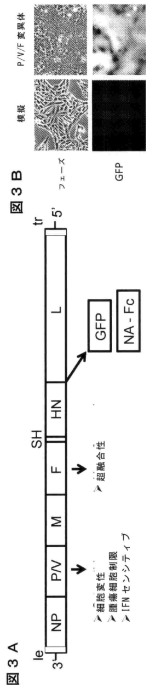


図 3 C

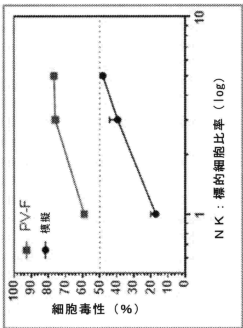
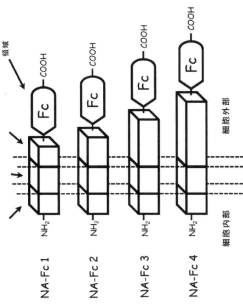
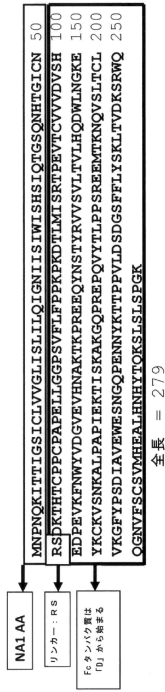


図 3 D



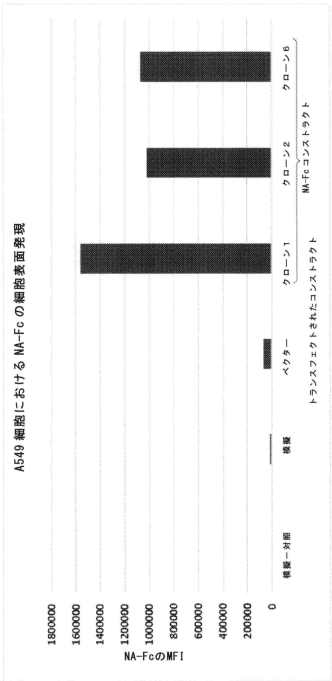
【図 4】

図 4



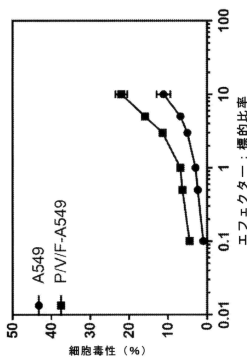
【図 5】

図 5



【図 6】

図 6



【図 7】

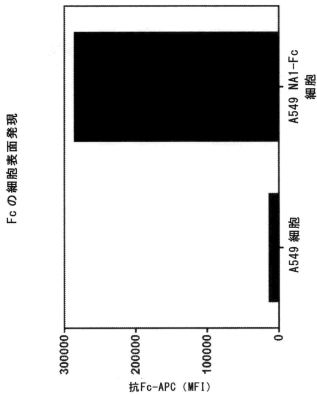


図 7

【図 8】

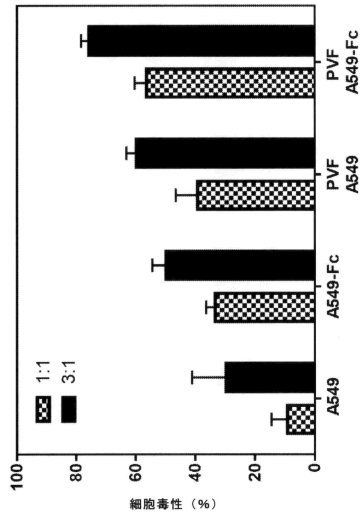


図 8

【図 9】

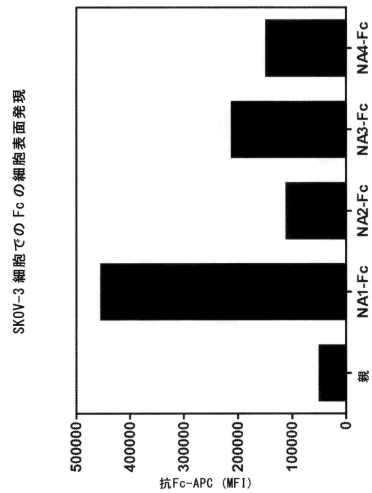


図 9

【図 10】

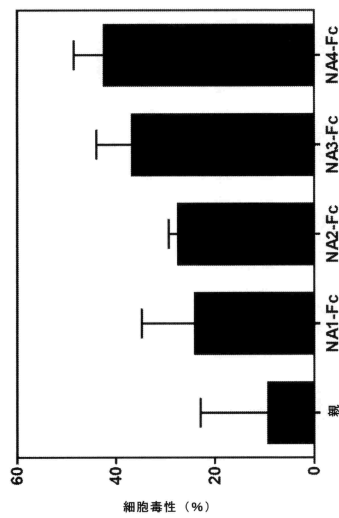


図 10

10

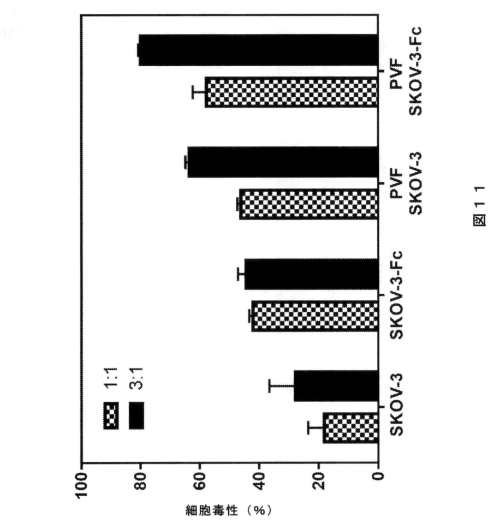
20

30

40

50

【図 11】



【配列表】

0007522426000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/12 (2006.01)
C 0 7 K 14/54 (2006.01)
C 0 7 K 14/705 (2006.01)
C 0 7 K 14/11 (2006.01)
C 0 7 K 16/00 (2006.01)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)
A 6 1 K 35/768 (2015.01)
A 6 1 P 35/02 (2006.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)
A 6 1 K 35/17 (2015.01)
A 6 1 K 35/761 (2015.01)
A 6 1 K 35/763 (2015.01)
A 6 1 K 35/765 (2015.01)
A 6 1 K 35/766 (2015.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/12
C 0 7 K 14/54
C 0 7 K 14/705
C 0 7 K 14/11
C 0 7 K 16/00
C 0 7 K 19/00
A 6 1 K 35/768
A 6 1 P 35/02
A 6 1 P 35/00
A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 35/17
A 6 1 K 35/761
A 6 1 K 35/763
A 6 1 K 35/765
A 6 1 K 35/766
A 6 1 K 39/395

V

アメリカ合衆国 フロリダ州 3 2 8 2 7 , オーランド , ローリアット ブルヴァード 8 4 9 5

(72)発明者

コピク , アリシャ

アメリカ合衆国 フロリダ州 3 2 8 1 6 , キャッセルベリー , ポール マクルーア コート . 1 9 6

審査官

松村 真里

(56)参考文献

米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 0 6 7 0 8 0 (U S , A 1)
米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 0 0 7 6 8 5 (U S , A 1)
米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 3 6 2 4 7 2 (U S , A 1)
米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 1 3 4 1 6 2 (U S , A 1)
米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 3 1 8 3 5 5 (U S , A 1)
米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 2 1 4 5 9 0 (U S , A 1)
国際公開第 2 0 1 6 / 1 0 9 6 6 8 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 1 6 / 0 6 9 6 0 7 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 1 6 / 0 4 6 3 5 7 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 1 4 / 0 3 7 1 2 4 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 1 6 / 1 7 4 2 0 0 (W O , A 1)
Nature Biotechnology , 1998年 , Vol.16, No.13 , p.1357-1360
Vaccine , 2005年 , Vol.23, No.29 , p.3775-3782

(58)調査した分野

(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)