

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6612619号
(P6612619)

(45) 発行日 令和1年11月27日(2019.11.27)

(24) 登録日 令和1年11月8日(2019.11.8)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 7/04	(2006.01) C 12 N 7/04 Z N A
A 61 P 43/00	(2006.01) A 61 P 43/00 1 O 5
A 61 P 35/00	(2006.01) A 61 P 43/00 1 1 1
A 61 K 35/766	(2015.01) A 61 P 35/00
C 07 K 14/705	(2006.01) A 61 K 35/766

請求項の数 3 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-548131 (P2015-548131)	(73) 特許権者	516046905 セルベルム インコーポレイテッド C e l l e r u m I n c . カナダ国, ケー1ピー 1シー3, オンタ リオ, オタワ, スイート 2600, エル ジン ストリート 160 160 E l g i n S t r e e t, S u i t e 2600, O t t a w a, O n t a r i o, K1P 1C3, C a n a d a
(86) (22) 出願日	平成25年12月20日 (2013.12.20)		
(65) 公表番号	特表2016-501538 (P2016-501538A)		
(43) 公表日	平成28年1月21日 (2016.1.21)		
(86) 國際出願番号	PCT/CA2013/051009		
(87) 國際公開番号	W02014/094182		
(87) 國際公開日	平成26年6月26日 (2014.6.26)		
審査請求日	平成28年12月15日 (2016.12.15)		
(31) 優先権主張番号	61/740,856		
(32) 優先日	平成24年12月21日 (2012.12.21)	(74) 代理人	100092901 弁理士 岩橋 祐司
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(72) 発明者	コンラッド, デイビッド カナダ国, ケー1ワイ 1シー7 オンタ リオ, オタワ, ハミルトン アベニュー サウス 378
(31) 優先権主張番号	61/835,310		
(32) 優先日	平成25年6月14日 (2013.6.14)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非複製型ウイルス由来粒子及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞に内部移行する非複製型ラブドウイルス由来粒子を含む、癌性細胞の治療用組成物であって、

前記ラブドウイルス由来粒子は、生ラブドウイルスを 250 mJ/cm^2 の UVC 線照射に暴露、または 4 mJ/cm^2 で 6 mg/mL のブスルファンで 24 時間処理して製造される粒子であって、架橋された RNA、又は、少なくとも二つ以上の不連続な RNA ポリヌクレオチドに切断された RNA を有する粒子であり、

1 細胞あたり 100 粒子の感染多重度でのインビトロ細胞毒性試験において、不死化細胞の生存率を 20 % 未満にし、非癌性細胞の生存率を 80 % より高くする、前記治療用組成物。

【請求項 2】

第二の薬剤と組み合わせて使用する、請求項 1 に記載の治療用組成物。

【請求項 3】

生ラブドウイルスを、 250 mJ/cm^2 の UVC 線照射に暴露、または 4 mJ/cm^2 で 6 mg/mL のブスルファンで 24 時間処理して該ウイルスの RNA を架橋及び / 又は切断し、細胞に内部移行する非複製型ラブドウイルス由来粒子を製造する工程を含む、請求項 1 に記載の治療用組成物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

【0001】

本開示は、概して、非複製型ウイルス由来粒子と、抗癌剤としてのその使用に関する。

【背景技術】**【0002】**

以下の背景技術の考察は、以下に述べたことが、先行技術、又は、いずれの国における当業者の知識の一部であることと認めるものではない。

【0003】

腫瘍溶解性ウイルス(OV)は、腫瘍形成における二つの重要な特徴である、損なわれた免疫応答及び増強した代謝活性を備えた細胞においてのみウイルスが複製できるように、突然変異又は欠失を減弱させることによって操作されてきた。現在の高度な腫瘍溶解性治療の例としては、単純ヘルペスウイルス O n c o V E X G M - C S F 及びワクシニアウイルス(J X 5 9 4)などが挙げられる。現在までの OV 分野の主たる焦点は、生ウイルスが局所腫瘍環境内における優先的な複製 / 拡散能力を有するプラットフォームの発展であった。10

【0004】

水疱性口内炎ウイルス(V S V)及びマラバ(M a r a b a)などの、ラブドウイルス(R V)が、抗癌治療として現在探究されている。腫瘍において、ウイルスの増殖は、抑制されない代謝活性及び損なわれた抗ウイルスプログラムによって可能となっている。 R V 治療への腫瘍感受性は、ウイルスによって媒介されるアポトーシスの素因によって、さらに増強される。20

【0005】

ラブドウイルスの分野において、現在までに発展してきた腫瘍溶解性のプラットフォームは、腫瘍細胞の間で拡散する複製可能なウイルスを利用する。事実、癌に対する直接的なウイルス療法としての生の複製 / 発現可能なラブドウイルスの使用を詳述したレポートでは、測定可能な有効性が観測されない非複製 / 非発現ウイルスと有効性を比較している。これらのレポートにおいて、ラブドウイルスゲノム複製及び / 又は発現は、腫瘍細胞毒性及び治療有効性の必要不可欠な構成要素であると結論付けている。

【0006】

これらの従来の研究における腫瘍溶解性効果の欠如は、使用されるウイルス粒子の数においてだけでなく、ウイルスゲノム複製及び / 又は発現を妨害するために使用される方法においても反映されている。実際に、これらの従来の方法がウイルスゲノム複製及び / 又は発現を妨害するために使用された場合、ウイルスの生物活性は観測されなかった。さらに、これらの研究において、非複製型ウイルスコントロールは、各細胞が非複製型粒子と遭遇することを保証するため、それに対応する生ウイルスよりも高い用量ではない同用量で用いられる。30

【0007】

ほとんどの形態の癌を治すため、その代わりとなる、好ましくはより効果的なアプローチが望まれる。例えば、急性リンパ芽球性白血病又は急性骨髓性白血病を患う成人患者の大多数の転帰は、悲惨なままである。この一因として、疾病的顕著な免疫不全を伴うことが挙げられる。少数の患者において、抗腫瘍免疫応答は、骨髓破壊的移植前治療の後の同種幹細胞移植を通じて部分的に回復する。この治療は潜在的に効果があるが、頻繁な有害現象と著しい治療関連死亡率を伴う。慢性期の慢性骨髓性白血病(C M L)の多くの患者にとって、標的チロシンキナーゼ阻害薬(T K I)治療は良好な病害防除を提供する。しかしながら、急性白血病急性転化への進行が発生すると、多剤耐性、及び、この種の難治性白血病の急激なキネティクスのため、治療の選択肢は非常に限られる。40

【0008】

したがって、特に免疫不全状態の患者のための代替となる抗癌剤が必要となる。前記抗癌剤は、その設計と構成要素によって、現在の未だ治療法がない臨床ニーズに取り組み、及び / 又は、上述の問題点のうち少なくともいくつかを解決するであろう。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】**【0009】**

次の概要は、本願に詳述される一つ以上の発明を読者に紹介するためのものであり、いずれの発明を規定するものではない。これらの発明は、本明細書に記載されている特徴のどんな組み合わせにも属することができる。

【0010】

様々な腫瘍の種類を治療する生O V 戦略が追求される中、特に造血気腫瘍においてそれらを適応することは、様々な要因のために複雑となる。白血病細胞間の限られたビリオン産生及び減少された拡散は、これらの無効性を克服するため高用量のウイルス療法を必要とする。しかしながら、特に免疫抑制状態の患者において、正常組織における非制御の生ウイルスの拡散及びオフターゲット効果は、このアプローチの安全性を損なう。

10

【0011】

生ウイルスの使用に関連する問題は以下を含む。1) 安全性。健康な組織に影響を与える、腫瘍細胞においてのみ拡散する生ラブドウイルスの能力に依存する。2) 低用量投与。患者への生の拡散性ウイルスの導入は、安全性を保証するため、これらの生ウイルス剤の比較的低用量の投与が必要となる。3) 抗腫瘍免疫応答の有効性を効果的に減少させる、生ウイルスに対する腫瘍からの免疫転換 (immune diversion)。4) 腫瘍を好むように設計された生ウイルスは、野生型ウイルスと比べて生産能力が損なわれているため、処方効率及び生産コストが産生の観点からみて準最適である。

【0012】

20

以前より示されているように、最終的なビリオンアセンブリー及び拡散を防ぐ、糖蛋白質遺伝子 (VSV-G) を欠失するように操作された VSV の腫瘍内投与は、抗腫瘍免疫応答を誘発する。しかしながら、VSV-G を用いた治療は、治療上有効な用量の産生及び送達ができないこともあり、播種性の腫瘍量を著しく減少させることができない。

【課題を解決するための手段】**【0013】**

著者らは、抗癌治療としての非複製型及び非発現型ラブドウイルス由来プラットフォームの使用について詳述しているレポートを認識していない。本開示の非複製型ウイルス由来粒子 (NVRP) 、及び、特に非複製型ラブドウイルス由来粒子 (NRRP) は、細胞の間を拡散する能力を欠くように改変された野生型ウイルスである。一度改変されると、非複製型ウイルス由来粒子 (NVRP) は、ビリオン複製を継続できなくなる。

30

【0014】

NVRP は、指向性などの向性を不死化細胞に対して保持するという点で独特である。これは、NVRP が、腫瘍又は癌細胞などの不死化細胞、及び、癌化した不死化細胞において、細胞死を優先的に誘導することを意味する。NVRP の具体例は、不死化細胞に対して、自然及び / 又は適応的な免疫刺激特性を有する。

【0015】

一つの態様において、本開示は、不死化細胞に対する向性を有しながら、細胞の間を拡散する能力を欠く、非複製型ラブドウイルス由来粒子について詳述する。前記向性は、細胞溶解の指向性であってもいい。前記非複製型ラブドウイルス由来粒子は、不死化細胞に対して、自然又は適応的な免疫刺激特性を有してもいい。

40

【0016】

別の態様において、本開示は、高増殖性細胞又は癌細胞の集団を処理するための非複製型ラブドウイルス由来粒子の使用を提供する。前記高増殖性細胞の集団は、好ましくは造血性であり、好ましくは白血病細胞である。前記高増殖性細胞の集団は、固形の腫瘍細胞であってもよい。

【0017】

さらに別の態様において、本開示は、高増殖性細胞又は癌細胞の集団を有する患者の治療方法について詳述する。前記方法は、患者に非複製型ラブドウイルス由来粒子を投与することを含む。前記高増殖性細胞の集団は、好ましくは造血性であり、好ましくは白血病

50

細胞である。前記高増殖性細胞の集団は、固体の腫瘍細胞であってもいい。

【0018】

本開示のその他の態様及び特徴は、付隨する図面とあわせて、特定の実施形態に関する以下の明細書見直すことで、当業者にとって明らかとなるだろう。

【発明の効果】

【0019】

概して、本開示は非複製型ウイルス由来粒子と抗癌剤としてのその使用を提供する。非複製型ウイルス由来粒子（N R V P）は、細胞へ結合し、内部移行できるウイルス由来粒子であるが、前記N R V Pが細胞内にある場合に、新生ウイルス粒子の形成を防ぐため、又は実質的に形成を減少させるために改変されてきた。N R V Pの一つの例として、非複製型ラブドウイルス由来粒子（N R R P）が挙げられる。

10

【図面の簡単な説明】

【0020】

本開示の実施形態は、添付の図面を参照し、例としてここに詳述される。

【0021】

【図1A】Vero細胞及びHDFN細胞におけるN R R P細胞毒性に対するUV線量の効果を示すグラフである。UVによるN R R P産生後は、GFPシグナルは検出されなかった。感染から72時間後に、レサズリン試験を用いて生存率を定量化した。この実験におけるMOIは、1細胞あたり100粒子に設定した。エラーバーは三重試験結果における標準偏差を表す。

20

【図1B】Vero細胞及びHDFN細胞において、N R R Pによって誘導される細胞毒性に対するMOIの効果を示すグラフである。当該グラフは、生存率対MOIとして表した。生存率は、感染から72時間後にレサズリン試験を用いて定量化した。エラーバーは三重試験における標準偏差を表す。

【図2A】Vero不死化細胞に対するN R R Pの細胞毒性を示す一連のイメージである。当該イメージは、PBS処理、生VSV-GFP感染、又はN R R P感染から24及び72時間後のVero細胞の蛍光顕微鏡及び明視野顕微鏡イメージのセットである。これらの実験では、感染多度（MOI）を1細胞あたり100粒子に設定した。

【図2B】処理から72時間後にレサズリン試験を用いて定量した生存率であり、N R R Pの細胞毒性を示すグラフである。エラーバーは三重試験における標準偏差を表す。

30

【図2C】生産されるウイルス力価を示すグラフである。NANは、ビリオンが検出されなかったこと、すなわち“数値ではない（not as a number）”ことの意である。

【図3A】PBS、生マラバウイルス、及びマラバウイルス由来N R R Pで処理した白血病細胞（L1210）及びVero細胞の、処理から24時間後に撮影した一連の蛍光顕微鏡イメージ（4X）である。

【図3B】腫瘍細胞から得られたウイルス力価を示すグラフである。

【図3C】感染から72時間後のL1210白血病細胞及びHDF正常細胞の細胞生存率を、レサズリン試験を用いて定量化したグラフである。

【図4A】PBS、生VSV-GFP、又はN R R Pで処理したL1210白血病細胞及びVero細胞の蛍光イメージである。

40

【図4B】L1210急性白血病細胞及びVero不死化細胞から得られたウイルス力価を示すグラフである。

【図5】細胞毒性の喪失が認められる、20,000mJ/cm²のUV線量を照射したウイルスのゲノム発現と比較した、N R R Pのゲノム発現のウエスタンプロットイメージである。コントロールには生ウイルスを用いた。1x又は2xは、ゲルにロードした蛋白量を表す。蛋白質は感染から15時間後に抽出した。

【図6A】化学的に產生したN R R P、又はブスルファンによって產生したN R R Pで処理したVero細胞の蛍光及び明視野イメージのセットである。

【図6B】図6AにおいてN R R P產生に用いた用量と同じ用量のブスルファンのみで15時間処理したVero細胞の明視野イメージである。

50

【図6C】生VSV-GFPで処理したVero細胞の蛍光及び明視野イメージセットである。

【図7A】1E10の凍結野生型VSVを15kGyのコバルト60で照射して產生したNRRPで処理したVero細胞の明視野及び蛍光イメージセットである。

【図7B】生の野生型VSV-GFPで処理したVero細胞の明視野及び蛍光イメージセットである。

【図7C】PBS中のVero細胞の明視野及び蛍光イメージセットである。

【図8A】PBS又はMOI=100でNRRP処理したL1210及びHDF細胞の明視野イメージである。

【図8B】白血病細胞株及び正常細胞株の生存率をレサズリン試験を用いて定量化したグラフである。マウス細胞株を*で示す。

【図8C】PBS、生VSV-GFP、又はNRRPで処理したヒトJurkat T細胞急性白血病、マウスA20 B細胞リンパ芽球性白血病、A301 T細胞リンパ芽球性白血病、HL60急性前骨髓球性白血病、及び、GM38及びHDF正常細胞株の蛍光顕微鏡イメージである。

【図9】PBS又はNRRPで処理したL1210細胞を、アネキシンV-APC及び7-AAD染色によるフローサイトメトリーで解析した結果を示すグラフである。

【図10】L1210急性白血病細胞株を、UV-産生NRRPで処理、及びUV-産生NRRPとベンダムスチン(300μM)を組み合わせて処理してから72時間後に、レサズリン試験を行って生存率を定量化したグラフである。

【図11】L1210急性白血病細胞株を、UV-産生NRRPで処理、及びUV-産生NRRPとデキサメサゾン(45μM)を組み合わせて処理してから72時間後に、レサズリン試験を行って生存率を定量化したグラフである。

【図12】L1210急性白血病細胞株を、UV-産生NRRPで処理、及びUV-産生NRRPとドキソルビシン(0.025μM)を組み合わせて処理してから72時間後に、レサズリン試験を行って生存率を定量化したグラフである。

【図13】L1210急性白血病細胞株を、UV-産生NRRPで処理、及びUV-産生NRRPとビンクリスチン(0.0125μM)を組み合わせて処理してから72時間後に、レサズリン試験を行って生存率を定量化したグラフである。

【図14】K562Ph-陽性骨髓性白血病細胞株を、UV-産生NRRPで処理、及びUV-産生NRRPとイダルビシン(0.05μM)を組み合わせて処理してから15時間後に、レサズリン試験を行って生存率を定量化したグラフである。

【図15A】LeBoeufらによって提唱された、正常細胞及び抗ウイルスシグナル伝達経路が障害された腫瘍細胞におけるNRRPの細胞毒性をシミュレートしたモデル図である。NRRPのキネティクスを説明するために、オリジナルモデルからウイルス増殖(X)を削除する改変を行った。破線は腫瘍細胞と関連したIFN-欠損を表す。

【図15B】抗ウイルスシグナル伝達経路の障害と、NRRPで処理してから72時間後の生存率との関係をシミュレートしたグラフである。

【図15C】正常HDF細胞において、MOIと、IFNの存在下又は非存在下でNRRPをインビトロで感染させてから72時間後の生存率との関係を示すグラフである。

【図15D】L1210白血病細胞において、MOIと、IFNの存在下又は非存在下でNRRPをインビトロで感染させてから72時間後の生存率との関係を示すグラフである。

【図16A】急性転化した慢性白血病患者に由来する2種類のサンプルを、PBS又はNRRPで処理した明視野顕微鏡イメージである。

【図16B】急性白血病患者(CML急性転化)の末梢血サンプルの蛍光性顕微鏡イメージ(4X)である。当該サンプルは、PBS、生VSV-GFP、又はGFPをコードするNRRPで処理した末梢血サンプルを濃縮して調製した。イメージはMOI=100で感染させてから24時間後のものである。

【図16C】図16A及び図16Bに示したデータを補足する、フローサイトメトリーの

10

20

30

40

50

ダイアグラムである。急性転化CML患者に由来する2種類のサンプルを、PBS又はNRRP(MOI=100)で処理してから48時間後に、アネキシンV及びCD33染色によるフローサイトメトリーを行った。当該CD33陽性の芽球細胞集団は、前記細胞を長期培養することで濃縮した。

【図16D】前記PBS又はNRRPで処理した2種類のCML急性転化患者サンプルに対し、CD33染色によるフローサイトメトリーで解析した結果を表すグラフである。

【図17A】PBS又はNRRPで18時間処理した健康な骨髄サンプルの明視野顕微鏡イメージである。

【図17B】PBS又はNRRPで65時間処理した健康な骨髄サンプルにおける、アネキシンV染色の定量結果を示すグラフである。

【図18A】マウスの急性転化処理モデルにおける生存曲線を示すグラフである。1日目にマウスにL1210を曝露した後、NRRP又はPBSを1日3回投与した。

【図18B】L1210を有するマウスにおいて、急性転化期に、NRRPによって誘導されたサイトカインをルミネックスに基づいて定量化したグラフである。同定されたサイトカインは全て、NRRP処理したマウスでは2倍以上誘導されており、統計的に有意であった(non-paired t-test pV<0.05)。pVは多重仮説検定を考慮して補正した(Benjamini & Hochberg法)。

【図19】免疫原性アポトーシスモデルであるイミューノコンピテントな(immunocompetent)マウスの生存曲線を示すグラフである。1日目のL1210曝露に先立って、NRRP存在下又は非存在下で培養し且つガンマ線照射したL1210細胞を、週1回、計3回マウスに投与した。

【図20】骨髄腫細胞株MPC-11及びRPMI-8226を、PBS又はNRRPで処理してから15時間後の明視野顕微鏡イメージである。NRRPはMOI=250で投与した。これは、正常細胞に対し、生存率に影響しないことが確認されている用量である。

【図21】骨髄腫細胞株MPC-11及びRPMI-8226をMOI=250でNRRP処理してから15時間後に、レサズリン試験を用いて生存率を定量化したグラフである。SR4987は正常な骨髄間質細胞株である。

【図22】多発性骨髄腫細胞株MPC-11を、UV-産生NRRPで処理、及びUV-産生NRRPとメルファラン(20μM)を組み合わせて処理してから72時間後に、レサズリン試験を行って生存率を定量化したグラフである。

【図23】多発性骨髄腫細胞株MPC-11を、UV-産生NRRPで処理、及びUV-産生NRRPとSecond mitochondria-derived activator of caspase(SMAC)類似物質であるLCL161(15μM)を組み合わせて処理してから72時間後に、レサズリン試験を行って生存率を定量化したグラフである。

【図24】多発性骨髄腫細胞株RPMI-8226を、UV-産生NRRPで処理、及びUV-産生NRRPとカルフィルゾミブ(5nM)を組み合わせて処理してから72時間後に、レサズリン試験を行って生存率を定量化したグラフである。

【図25A】PBS又はNRRPで処理してから24時間後のマウス遅発性(delayed)脳腫瘍グリオblastoma細胞株(DBT)の明視野顕微鏡イメージである。

【図25B】PBS又はNRRPで処理してから24時間後の星状細胞腫細胞株(K1491)の明視野顕微鏡イメージである。

【図25C】PBS又はNRRPで処理してから24時間後のマウスグリオーマ細胞株(GL261)の明視野顕微鏡イメージである。

【図26】正常コントロールHDFNに対する脳癌細胞株DBT、K1491、K1492、CT2A及びGL261の細胞生存率を、レサズリン試験を用いて定量化したグラフである。

【図27】CT2Aグリオblastoma細胞株を、UV-産生NRRPで処理、及びUV-産生NRRPとHDAC阻害剤であるSAHA(10μM)を組み合わせて処理してか

10

20

30

40

50

ら 72 時間後に、レサズリン試験を行って生存率を定量化したグラフである。

【図 28 A】抵抗性固体腫瘍細胞株における、N R R P による腫瘍細胞毒性を示す蛍光性顕微鏡イメージセット (4 X) である。このイメージセットは、P B S、生 V S V、及び N R R P で処理してから 24 時間後の、マウス乳癌細胞 (4 T 1) 及びヒト腎臓癌細胞 (786-0) を表す。

【図 28 B】P B S、生 V S V、及び N R R P で処理 (感染) してから 72 時間後の抵抗性固体腫瘍細胞株、乳癌 (4 T 1) 及び腎臓癌 (786-0) 細胞における、N R R P の腫瘍細胞毒性を示す明視野顕微鏡イメージである。

【図 28 C】P B S、生 V S V、及び N R R P で処理 (感染) してから 72 時間後の抵抗性固体腫瘍細胞株、乳癌 (4 T 1) 及び腎臓癌 (786-0) 細胞の細胞生存率を、レサズリン試験を用いて定量化したグラフである。 10

【図 29】皮下 C T - 26 大腸癌の埋め込みから 16 日、18 日、及び 21 日後に、2 E 9 UV - 產生 N R R P で処理したマウスにおける延命効果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0022】

前記 N R V P は、ウイルス由来粒子が細胞の表面に結合して内部移行するのに十分な数の機能的 G 蛋白質を表面に有するエンベロープを有する。前記 N R V P は、新生ウイルス粒子のアセンブリーに必要な全タンパク質をコードする配列を有する R N A ポリヌクレオチド、及び、前記 R N A ポリヌクレオチドを取り囲む構造体を形成する蛋白質混合物をも有する。しかしながら、前記 N R V P ゲノムが新生ウイルスの形成に必要な前記蛋白質を產生できないように、前記 N R V P の R N A 構造は、十分に架橋されるか、あるいは、R N A の不連続なセグメントを形成するよう切断される。例えば、前記粒子が細胞内にありの場合、前記 R N A 配列は、m R N A への転写、蛋白質への翻訳、あるいはその両方が行われないかもしれない。転写及び / 又は翻訳が損なわれる又は欠如するということは、細胞において不十分な蛋白質が產生され、新生ウイルス粒子のアセンブリーができないということを意味する。 20

【0023】

機能的 G 蛋白質は、下記に示される配列番号 1 (S E Q I D N O : 1) を含む配列を含んでもよい。前記配列は、水疱性口内炎インディアナウイルスの成熟糖蛋白質ペプチドの配列である。この機能的 G 蛋白質の N C B I アクセッション番号は N P 95554 8 . 1 である。 30

kftivfphnq kgnwknvpsn yhycpsssdI nwhndlita iqvkmpkshk aqadgwmch askwvttcdf rwygpkyitq sirsftpsve qckesieqtk qgtwlngfp pqscgyatvt daeavivqvt phhvivdeyt gewvdsqfin gkcsnyicpt vhnsttwhsd ykvkglcnsn lismditffs edgelsslgk egtgfrsnyf ayetggkack mqyckhwgvr lpsgvwfema dkdlfaaarf pecpegssis apsqtsvdvs liqdverild yslcqetwsk iraglpispv dlsylapknP gtgpaftiin gtlkyfetry irvdiaapil srmvgmisgt tterelwddw apyedveigp ngvlrtssgy kfplymighg mldsdlhss kaqvfephfi qdaasqlpdd eslffgdtgl sknpielveg wfsswkssia sffffiiglii glflvlrvgi hlciklkhtk kriytdiem nrIgk (SEQ ID NO: 1) 40

【0024】

代わりに、前記機能的 G 蛋白質は、細胞表面に結合して当該粒子の内部移行が可能な限り、配列番号 1 の配列と少なくとも 75 % 同一の配列を含んでもよい。例えば、細胞の表面へ結合し、前記粒子の内部移行を効する前記蛋白質の能力を阻害することなく、アミノ酸の保存的置換を行うことができる。保存的置換の例は、下記の表 1 に示される。

【0025】

【表1】

保存的アミノ酸置換 (Conservative Amino Acid Substitution)

元の残基	代表的な置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4-ジアミノ酪酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

【0026】

膜貫通ドメインなどの細胞表面結合に参加しない前記G蛋白質の一部において行われる保存的置換は少ないが、一方で、G蛋白質受容体と相互作用する前記蛋白質の一部においてはより多くの保存的置換が必要となり得る。G蛋白質は、当該技術分野において既知であり、当業者は、細胞の表面に結合して、前記粒子が内部移行する前記蛋白質の能力を阻害しないアミノ酸置換を見出すことができる。

【0027】

前記RNAを取り囲む構造体を形成する蛋白質混合物が、少なくともN、P、M、及びL蛋白質を含んでもよい。N、P、M、G及びL蛋白質を有するN R V Pは、ラブドウイルス由来N R V Pを含んでもよい。ラブドウイルス由来N R V Pは、非複製型ラブドウイルス由来粒子(N R R P)として規定されてもよい。本開示の目的のため、“ラブドウイルス(Rhabdovirus)”(NCBIタクソノミーID:11270)という用語は、次のウイルス及びそれらの変異体の属のいずれか一つを含んでもよい：サイトラブドウイルス(Cytorhabdovirus)(NCBIタクソノミーID:11305)、エフェメロウイルス(Ephemerovirus)(NCBIタクソノミーID:32613)、ベシクロウイルス(Vesiculovirus)(NCBIタクソノミーID:11271)、未分類ジマラブドウイルススーパーグループ(unclassified Dimarhabdovirussupergroup)(NCBIタクソノミーID:349166)、リッサウイルス(Lyssavirus)(NCBIタクソノミーID:11286)、ノビラブドウイルス(Novirhabdovirus)(NCBIタクソノミーID:186778)、ヌクレオラブドウイルス(Nucleorhabdovirus)(NCBIタクソノミーID:11306)、アサインされていないラブドウイルス(unassigned rhabdovirus)(NCBIタクソノミーID:686606)、及び、未分類ラブドウイルス(unclassified rhabdovirus)(NCBIタクソノミーID:35303)。ラブドウイルスファミリーにおける種は、マラバウイ

10

20

30

40

50

ルス、水疱性口内炎ウイルス (V S V) 及びファーミントンウイルス (F a r m i n g t o n v i r u s) を含むが、これらに限定されない。

【 0 0 2 8 】

前記 N 蛋白質は、以下に示される配列番号 2 (S E Q I D N O : 2) を含む配列を含んでもよい。前記配列は、水疱性口内炎インディアナウイルスのスクレオカプシド蛋白質の配列である。この N 蛋白質の N C B I アクセッション番号は N C 0 4 1 7 1 2 . 1 である。

msvtvkriid ntvivpkipa nedpveypad yfrkskeipl yinttkslsd lrgyvyqglk
sgnvsiihvn slygalkdi rgkldkdwss fginigkagd tigifdlvsl kalgvlpdg
vsdasrtsad dkwlplyllg lyrvgrtqmp eyrkklmdgl tnqckmineq feplvpegrd
ifdvwgndsn ytkivaavdm ffhmfkkhec asfrygtivs rfdcaalat fghlckitgm
stedvttwil nrevadenvq mmlpgqeidak adsympyliid fglasskspys svknpafhfw
gqltalrrs trarnarqpd dieytsltta gillyayavgs sadlaqqfcv gdnkytpdds
tgglttnapp qgrdvvwelg wfedqnrkpt pdmmqyakra vmslqglrek tigkyaksef
dk (SEQ ID NO: 2)

【 0 0 2 9 】

代わりに、前記 N 蛋白質は、前記蛋白質構造体の形成に参加できる限り、配列番号 2 の配列と少なくとも 80 % 同一の配列を含んでもよい。例えば、前記蛋白質構造体の形成に参加する蛋白質の能力を阻害することなく、アミノ酸の保存的置換を行うことができる。保存的置換の例は、表 1 に示される。

【 0 0 3 0 】

前記 P 蛋白質は、以下に示される配列番号 3 (S E Q I D N O : 3) を含む配列を含んでもよい。前記配列は、水疱性口内炎インディアナウイルスの N S 蛋白質の配列である。この P 蛋白質の N C B I アクセッション番号は N C 0 4 1 7 1 3 . 1 である。

mdnltkvrey lksysrlqda vgeideieaq raeksnyelf qedgveehk psyfqaadds
dtesepeied nqglyaqdpe aeqvegfiqg plddyadeev dvvftsdwkp pelesdehgk
tirltspegl sgeqksqwl s tikavvqsak ywnlaectfe asgegvimke rqitpdvkyv
tpvmnthspsq seavsdvwsl sktsmtfqpk kaslqpltlis ldefssrge fisvggdgrm
shkeailgl rykklynqar vkyisl (SEQ ID NO: 3)

【 0 0 3 1 】

代わりに、前記 P 蛋白質は、前記蛋白質構造体の形成に参加できる限り、配列番号 3 の配列と少なくとも 80 % 同一の配列を含んでもよい。例えば、前記蛋白質構造体の形成に参加する蛋白質の能力を阻害することなく、アミノ酸の保存的置換を行うことができる。保存的置換の例は、表 1 に示される。

【 0 0 3 2 】

前記 M 蛋白質は、以下に示される配列番号 4 (S E Q I D N O : 4) を含む配列を含んでもよい。前記配列は、水疱性口内炎インディアナウイルスのマトリックス蛋白質の配列である。この M 蛋白質の N C B I アクセッション番号は N C 0 4 1 7 1 4 . 1 である。

msslkkilgl kgkgkkskkl giapppyeed tsmeyapsap idksyfgvde mdtydpnqlr
yekfffftvkm tvrsnrfprt ysdvaaavsh wdhmyigmag krpfykilaf lgssnlkatp
avladqgqpe yhthcegray lphrmgktpw mlnvpehfrp pfniqlykgt ieltmtiydd
esleaapmiw dhfnsskfsd frekalmfgl ikekkasgaw vldishfk (SEQ ID NO: 4)

【 0 0 3 3 】

代わりに、前記 M 蛋白質は、前記蛋白質構造体の形成に参加できる限り、配列番号 4 の配列と少なくとも 80 % 同一の配列を含んでもよい。例えば、前記蛋白質構造体の形成に参加する蛋白質の能力を阻害することなく、アミノ酸の保存的置換を行うことができる。保存的置換の例は、表 1 に示される。

【 0 0 3 4 】

前記 L 蛋白質は、以下に示される配列番号 5 (S E Q I D N O : 5) を含む配列を

10

20

30

40

50

含んでもよい。前記配列は水疱性口内炎インディアナウイルスのポリメラーゼ蛋白質の配列である。前記L蛋白質のNCBIAクセッション番号はNC 041716.1である。

mevhdfetde fnfdneddyt treflnpder mtylnhadyn lnsplisddi dnlirkfnsl
 pipsmwdskn wdgvlemlts cqanpistsq mhkwmgswlm sdnhdasqgy sflhevdkea
 eitfdvvetf irgwgnkpie yikkerwtds fkilaylcqk fldlhkltli lnavsevelli
 nlartfkgvrrsshgtnic rirvpslgpt fisegwayfk kldilmdrnf llmvkdviig
 rmqtvlsmvc ridnlfseqd ifsllniyri gdkiverqgn fsydlirkmve picnlklmkl
 aresrplvpq fphfenhikt svdegakidr girflhdqim svktvdltlv iygsfrhwgh
 pfidyytgle klhsqvtmkk didvsysakal asdlarivlf qqfndhkkwf vngdlli phd
 pfkshvkent wptaaqvqdf gdkwhelpli kcfeipdld psiydsdksh smnrsevlkh
 vrmpnptpip skkvlqtmld tkatnwkefl keidegldd ddliiglkgk erelklagrf
 fsimswklre yfviteylik thfvpmfkgl tmaddltavi kkmldsssgq glksyeaici
 anhidyekwn nhqrklisnpg vfrvmqgflg ypslierthe ffeksllynn grpdlmrh
 ntlinstsqr vcvwqgqeggli eglrqkgwti lnlviqrea kirntavkvl aqgdnqvict
 qyktkksrnv velqgalnqm vsnnekimta ikigtgkgl linddetmqs adylnykgip
 ifrgvirgle tkrwsrvtcv tndqiptcan imssvstnal tvahfaenpi namiqnyfg
 tfarllmmh dpalrqslve vqdkipglhs stfkyamlyl dpsiggvsgm slsrfliraf
 pdpvteslsf wrfihvhrs ehlkemsavf gnpeiakfri thidklvedp tslniamgms
 panllktevk kcliesrqtir rnqvikdati ylyheedrlr sflwsinplf prflsefksg
 tflgvadgli slfqnsrtir nsfkkyhre lddlivrsev ssihlglkh lrrgsckmwt
 csathadtir ykswgrtvig ttvphpleml gpqhrketpc apcntsgfny vsvhcpdih
 dvfssrgplp aylgsktses tsilqpwere skvplikrat rlrdaiswfv epdsklamti
 lsnihsltge ewtkrqhgfk rtgsalhrfs tsrmshggfa sqstaaltrl mattdtmrdl
 gdqnfdflfq atllyaqitt tvardgwits ctdhyhiack sclrpieeit ldssmdytpp
 dvshvlktwr ngegswgqei kqiypregnw knlapaeqsy qvgrcigfly gdlayrkst
 aedsslfpls iqgrirgrf lkglldgimr asccqvihrr slahlkrpan avyggliyli
 dklsvsppfl sltrsgpird eletiphkip tsysptsnrdm gvivrnyfky qcrliekgky
 rshysqlwf sdvlsidfig pfsistllq ilykpflsgk dknelrelan lsslrsgeg
 wedihvkfft kdillcpeei rhackfgiak dnnkdmssypp wgresrgtit tipvyytpp
 ypkmllemprr iqnpplsgir lqqlptgahy kirsilhmg ihyrdflscg dgsggmaal
 lrenvhsgri fnsllelsgs vrrgaspepp saletlggdk srcvngetcw eypsdlcdpr
 twdyflrlka glglqidliv mdmevrdsst slkietnvrn yvhrldeqg vliyktgty
 iceseknavt ilgpmfktd lqtefsssq tsevymvckg lkklidepnp dwssineswk
 nlyafqsseq efarakkst yftltgipsq fipdpfvnie tmlqifgvpt gvshaaalks
 sdrrpadllti slfymaiisy yninhirvgp ippnppsdgi aqnvgiaitg isfwlslmek
 diplyqqcla viqqsfpirl eavsvkggyk qkwstrgdgl pkdtrtsdsi apignwirls
 elvrnqvrln pfneilfnql crtvdnhlkw snlrrntgmi ewinrriske drsilmksd
 lheenswrd (SEQ ID NO: 5)

【0035】

代わりに、前記L蛋白質は、前記蛋白質構造体の形成に参加できる限り、配列番号5と少なくとも70%同一の配列を含んでもよい。例えば、前記蛋白質構造体の形成に参加する蛋白質の能力を阻害することなく、アミノ酸の保存的置換を行うことができる。保存的置換の例は、表1に示される。

【0036】

いくつかの実施例において、前記N R V Pが結合し、細胞に内部移行した後、前記N R V Pは機能的N、P、M及びG蛋白質を產生し得る。しかしながら、前記N R V Pは機能的L蛋白質を產生する能力を欠く、又は、その能力が低い。機能的L蛋白質なしで、あるいは、正確な量の機能的L蛋白質なしでは、新生ウイルス粒子をアセンブルさせることができない。

10

20

30

40

50

【0037】

その他の例において、前記N R V P が結合し、細胞に内部移行した後、前記N R V P は機能的N、P 及びM 蛋白質を產生し得る。しかしながら、前記N R V P は機能的G 及びL 蛋白質を產生する能力を欠く、又は、その能力が低い。機能的G 及びL 蛋白質なしで、あるいは、正確な量又は比率の機能的G 及びL 蛋白質なしでは、新生ウイルス粒子をアセンブルさせることができない。

【0038】

その他の例において、前記N R V P が結合し、細胞に内部移行した後、前記N R V P は機能的N 及びP 蛋白質を產生し得る。しかしながら、前記N R V P は機能的M、G 及びL 蛋白質を產生する能力を欠く、又は、その能力が低い。機能的M、G 及びL 蛋白質なしで、あるいは、正確な量又は比率の機能的M、G 及びL 蛋白質なしでは、新生ウイルス粒子をアセンブルさせることができない。10

【0039】

その他の例において、前記N R V P が結合し、細胞に内部移行した後、前記N R V P は機能的N 蛋白質を產生し得る。しかしながら、前記N R V P は機能的P、M、G 及びL 蛋白質を產生する能力を欠く、又は、その能力が低い。機能的P、M、G 及びL 蛋白質なしで、あるいは、正確な量又は比率の機能的P、M、G 及びL 蛋白質なしでは、新生ウイルス粒子をアセンブルさせることができない。

【0040】

その他の例において、前記N R V P は機能的N、P、M、G 及びL 蛋白質を產生する能力を欠く、又は、その能力が低い。機能的N、P、M、G 及びL 蛋白質なしで、あるいは、正確な量又は比率の機能的N、P、M、G 及びL 蛋白質なしでは、新生ウイルス粒子はアセンブルさせることができない。20

【0041】

前記非複製型ウイルス由来粒子が細胞の表面へ結合し、内部移行できるようになるために、前記N R V P はウイルス粒子のエンベロープに十分な数の機能的G 蛋白質を有さなければならぬ。前記野生型ウイルス粒子上に見い出されるG 蛋白質の少なくとも5 %のG 蛋白質を有する前記N R V P は、細胞へ結合し、内部移行することが可能になると期待される。前記N R V P が前記野生型ウイルス粒子で発見されたG 蛋白質の少なくとも50 %のG 蛋白質を有することが好ましく、前記N R V P が前記野生型ウイルス粒子で発見されたG 蛋白質の少なくとも100 %のG 蛋白質を有することがより好ましい。具体的な例において、前記N R V P は1粒子あたり少なくとも60の機能的G 蛋白質、1粒子あたり少なくとも600の機能的G 蛋白質、又は、1粒子あたり少なくとも1200の機能的G 蛋白質を有する。30

【0042】

上述の通り、前記N V R P は、新生ウイルス粒子アセンブリーに必要な全ての蛋白質をコードする配列を有するRNAを含む。前記N V R P が細胞内にある場合、前記RNA配列がこれらの蛋白質を产生できなくなる原因の一つは、前記RNAがそのような程度まで架橋されると蛋白質の产生が減少する、又は、止まってしまうからである。いくつかの例において、前記RNA配列から蛋白質の产生を減少させる、又は、止めるためには、少なくとも0.05 %の架橋されたヌクレオチドで十分である。その他の例において、前記架橋されたRNAは架橋されたヌクレオチドを少なくとも0.5 %含んでもよい。少なくとも1 %のヌクレオチドを架橋させることが好ましく、少なくとも10 %又は少なくとも20 %のヌクレオチドを架橋させることがより好ましい。40

【0043】

前記ヌクレオチドの架橋は、G蛋白質が細胞表面へ結合できなくなる可能性を増加させ得る。したがって、80 %より少ない前記ヌクレオチドを架橋させることが好ましい。

【0044】

前記RNA構造のヌクレオチドは、他のRNAヌクレオチド、RNAを取り囲む蛋白質構造体の蛋白質におけるアミノ酸、あるいは、その両方へ架橋されてもよい。50

【0045】

前記架橋されたRNA構造に加えて、RNAを取り囲む蛋白質構造体はアミノ酸を有してもよい。前記アミノ酸は、前記蛋白質構造体の別の蛋白質に架橋される、又は、同一の蛋白質の別のアミノ酸に架橋される、又は、前記RNA構造に架橋される、あるいは、その組み合わせのいずれかである。

【0046】

さらに、前記NRP RNA構造は、前記P及びL蛋白質によってコードされる前記NRP RNAポリメラーゼ活性機能を喪失させることによって複製ができなくなつてもよい。これは、RNA構造にP及びL蛋白質を十分に架橋させることによって、又は、その他の蛋白質へP及びL蛋白質を架橋させることによって、あるいは、P及びL蛋白質の機能が損なわれるようNRP蛋白質構造体を損傷することによって、達成できる。

10

【0047】

前記NRPが細胞内にある場合、前記RNA配列がこれらの蛋白質を産生できなくなる別の原因是、前記RNA構造がRNAの不連続なセグメントを形成するよう切断されるからである。ラブドウイルスなどのRNAウイルスは、ウイルス複製に必要な蛋白質をコードする全ての遺伝子の配列を含む一つの連続するRNAポリヌクレオチドを有する。一つの連続するポリヌクレオチドを二つ以上の不連続なRNAポリヌクレオチドに切断することは、不完全なゲノム転写、翻訳、あるいはその両方につながる。転写開始点のないポリヌクレオチド上にコードされた蛋白質は、転写することができない。さらに、ゲノムは、全長複製すること、及び、新生ウイルス粒子に適切に取り込まれることができなくなり、ウイルス粒子産生を阻害する。

20

【0048】

NRPは、少なくとも2の不連続なRNAポリヌクレオチドを含んでもよく、それらは転写開始点を有するものに限る。しかしながら、前記RNAは2以上のセグメントに切断することが好ましい。したがって、NRPは、少なくとも5、より好ましくは少なくとも10、さらに好ましくはすくなくとも100の不連続なRNAポリヌクレオチドを含むことが好ましい。

【0049】

RNAウイルスは、約11,000のヌクレオチドを持つRNA配列を有してもよい。11,000又はそれ以上のヌクレオチドを持つRNA配列を有するRNAウイルスにおいて、10,000より少ないヌクレオチドを持つセグメントになるように前記RNAを切断することが望ましい。11,000のヌクレオチドを持つRNAウイルスの切断によって生じるNRPは、10,000より少ないヌクレオチドを持つRNAセグメントを少なくとも一つ有し、1,000より少ないヌクレオチドを持つ別のRNAセグメントを有することができるようになる。一つのセグメントのみが転写開始点を有するため、又は、配列をコードする蛋白質が不連続であるため、他のセグメントは転写又は翻訳することができず、そのセグメントにコードされたいずれの蛋白質も産生されない。

30

【0050】

前記RNAをより小さく切断することが好ましい。例えば、前記の不連続なRNAポリヌクレオチドは、7000より少ない、5000より少ない、3000より少ない、又は、1000より少なくてよい。

40

【0051】

非複製型ウイルス由来粒子は、N、P、M、G及びL蛋白質をコードする配列を有するRNAを含む生ウイルスから産生される。前記非複製型ウイルス由来粒子は、前記ウイルス由来粒子をUV吸収化合物から任意で分離して、前記生ウイルスをRNA構造に架橋するため、又は、RNA構造を切断するためにRNA傷害剤に曝露して、前記RNAが新生ウイルス粒子のアセンブリーに必要な蛋白質を産生することを阻害することによって産生される。

【0052】

前記ウイルス由来粒子が細胞内にある場合、前記RNAポリヌクレオチドからmRNA

50

への転写が減少する、及び／又は、当該mRNAから蛋白質への翻訳が減少するように、前記生ウイルスのRNA構造は十分に架橋される。同様に、前記ウイルス由来粒子が細胞内にある場合、前記RNAポリヌクレオチドからmRNAへの転写が減少、及び／又は、当該mRNAから蛋白質への翻訳が減少するように、前記生ウイルスのRNA構造は十分に不連続なRNAセグメントへ切断される。

【0053】

前記RNAの架橋は、前記生ウイルスを電磁放射に曝露することで達成され得る。前記電磁放射は、約1mmより短い波長であってもよい。電磁放射に係るエネルギーは、前記波長が短くなるにつれて増加する。増加したエネルギーはDNAへの傷害と関連する。これは、UV線、X線及びガンマ線への曝露による発癌率の増加によって証明される。したがって、前記電磁放射は、約500mmより短い波長であることが好ましく、約280mmより短い波長であることがより好ましい。具体的な例において、前記波長は約0.1ピコメートルから280nmの間である。

【0054】

蛋白質の架橋よりヌクレオチドの架橋を優先的に誘導するような波長である、約100から約280nmの間の波長を有する電磁放射を使用することが望ましい。前記電磁放射がUVスペクトル内にある場合、つまり約100nmと約400nmの間の波長である時、前記生ウイルスを含む溶液は約100mJ/cm²と8,000mJ/cm²の間の線量の電磁放射線に曝露されてもよい。好ましくは、前記線量は約150mJ/cm²と約5,000mJ/cm²の間である。より好ましくは、前記線量は約150mJ/cm²と約1,000mJ/cm²の間である。さらに好ましくは、前記線量は約150mJ/cm²と約500mJ/cm²の間である。最も好ましくは、前記線量は約150mJ/cm²と約300mJ/cm²の間である。

【0055】

実際の線量は、前記溶液の特性に依存してもよい。例えば、もし前記溶液がUV線を吸収する色素を含む場合、より多くの線量が必要となる。同様に、もし前記溶液が一点から放射され、その容器が大きい場合、UV線の最大強度に曝露されない生ウイルスが存在するかもしれない。このような状況において、より多くの線量、又は、前記溶液の攪拌が有益となり得る。当業者は、適切な線量を提供するために必要なパラメータを決定することができるであろう。

【0056】

前記生ウイルスを保持する媒体が濁っている、色素を含んでいる、あるいは、UV線を吸収する場合、X線（すなわち、0.01と10nmの間の波長を有する電磁放射）、又は、ガンマ線（すなわち、10ピコメートルより短い波長を有する電磁放射）で前記生ウイルスを電磁放射することが望ましい。前記電磁放射がガンマ線照射である場合、前記生ウイルスは約1kGyと約50kGyの間の線量に曝露されてもよい。より好ましくは、前記線量は約5kGyと約20kGyの間である。前記ガンマ線は、コバルト60から產生されてもよい。

【0057】

前記生ウイルスは4又はそれ以下の温度で前記電磁放射に曝露されてもよい。例えば、前記生ウイルスは、約4でUV線照射に曝露されてもよい。他の例において、前記生ウイルスは、約-80でガンマ線照射に曝露されてもよい。さらに他の例において、前記生ウイルスは、約-130でガンマ線照射に曝露されてもよい。

【0058】

上述の通り、RNAのmRNAへの転写、又は、mRNAの蛋白質への翻訳、あるいはその両方を減少させる又は阻害するため、前記RNA構造は架橋される、又は、十分に不連続なRNAセグメントに切断されてもよい。上述した前記電磁照射に加えて、RNA架橋能を有するアルキル化剤、又は、RNA切断能を有するフリーラジカル発生剤などの、化学薬剤に前記生ウイルスを曝露することでも達成できる。このような架橋剤の例としては、ブスルファン、シクロフォスファミド、メルファラン、ホルムアルデヒド、カルボジ

10

20

30

40

50

イミド及びビスルホスクシンイミジルスペラートが挙げられる。フリーラジカル発生剤の例としては、パーオキサイド、臭化水素、過酸化アンモニウム及びヒドロキシルラジカルが挙げられる。

【0059】

前記ウイルス粒子を産生するために使用される増殖培地を分画することによって、前記生ウイルスをUV吸収化合物から分離させてもよい。前記増殖培地は、例えばスクロース密度勾配中で分画されてもよい。前記N R V Pの調製後、前記ウイルス由来粒子を含む希釈液を分画又は濾過することで、前記N R V Pを分離させることができる。前記希釈液は、例えばスクロース密度勾配中で分画、又は、タングエンシャルフローフィルトレーション(*tangential flow filtration*)によって濾過されてもよい。

10

【0060】

本開示は、上述の非複製型ウイルス由来粒子を患者に投与することで、免疫応答を刺激する方法も含む。前記N R V Pの投与は、患者内にサイトカインの発現及び放出を誘導する。患者内に放出され得る代表的なサイトカインの例として、インターロイキン、インターフェロン、炎症性サイトカイン、C X Cケモカインファミリーメンバー、腫瘍壊死因子ファミリーメンバー、又はこれらのあらゆる組み合わせが挙げられる。これらのファクターが、腫瘍抗原を提示又は認識させる。

【0061】

本開示は、患者内の癌性細胞の細胞死を誘導する方法を含む。前記方法は、上述の非複製型ウイルス由来粒子を患者に投与することを含む。

20

【0062】

本開示は、癌性細胞又は非癌性細胞の細胞死を好ましく誘導する方法も含む。前記方法は、上述の非複製型ウイルス由来粒子を患者に投与することを含む。

【0063】

前記細胞死は、例えば前記N R V P、又は、前記N R V Pの構成物の存在によって細胞内で起こるアポトーシスによるものであってもよい。また、細胞死は自然免疫エフェクター細胞、適応免疫エフェクター細胞、又はこれらのあらゆる組み合わせのリクルートによるものであり、例えば細胞によって放出されたサイトカインによって引き起こされてもよい。前記適応免疫エフェクター細胞は、T細胞、B細胞、あるいはその両方であってもよい。前記自然免疫エフェクター細胞は、マスト細胞、食細胞(マクロファージ、好中球、又は樹状細胞など)、好塩基球、好酸球、ナチュラルキラー細胞、T細胞、又はこれらのあらゆる組み合わせであってもよい。

30

【0064】

免疫応答を刺激するため、又は、癌性細胞の細胞死を誘導するため、患者は十分な数のN R V Pで治療される。前記N R V Pは生ウイルス粒子を形成しないため、複製可能なウイルスを用いた治療よりも多い量で前記N R V Pを投与することが望ましい。前記患者は、1E10から1E15の非複製型ウイルス由来粒子を投与されてもよい。好ましい例において、前記患者は、1E11から1E13の非複製型ウイルス由来粒子を投与されてもよい。

40

【0065】

N R V Pを用いた患者の治療及び化学療法剤を用いた治療を組み合わせる時、相乗効果が生まれることもある。前記化学療法は、例えば、ベンダムスチン、デキサメタゾン、ドキソルビシン、ビンクリスチン、イマチニブ、ダサチニブ、又は、イダルビシンであってもよい。これらの薬剤は、N R V Pによって媒介されるアポトーシスの感受性の向上、サイトカイン分泌の増強、抗腫瘍免疫応答の向上、血管遮断の促進、又はこれらのあらゆる組み合わせを行うことが期待できる。

【0066】

N R V Pは、固形腫瘍又は白血病などの非固形腫瘍を治療するために使用されてもよい。しかしながら、N R V Pは細胞内で生ウイルスを形成しないため、注入されたN R V P

50

に全ての癌細胞を曝露することが特に望ましい。これは、複製可能なウイルスが投与された場合には、癌細胞の一部が注入されたウイルスに曝露されると新たなウイルスが產生され、残りの癌細胞が該ウイルス粒子にさらに曝露される結果となることとは対照的である。

【0067】

ウイルス粒子の產生の欠如を考慮すると、前記N R V P の静脈内投与は白血病細胞が実質的に前記粒子に曝露される結果になるため、白血病の治療にN R V P を使用することが好ましい。対照的に、 固形腫瘍では、前記 固形腫瘍の細胞の一部は注入されたN R V P に曝露されない。前記 非複製型ウイルス由来粒子の投与の様式は、治療される癌によって決定されてもよい。前記N R V P は患者に、腫瘍内投与、鼻腔内投与、筋肉内投与、皮内投与、腹腔内投与、動脈内投与、静脈内投与、皮下投与、又は頭蓋内投与されてもよい。

10

【0068】

本開示の非複製型ウイルス由来粒子 (N R V P) は、細胞間で拡散する能力を欠くよう に改変された野生型ラブドウイルス粒子から形成されてもよい。前記非複製型ラブドウイルス由来粒子は複製可能な野生型ラブドウイルス粒子から由来するものであってもよい。一度改変されると、前記N R R P はビリオン複製を継続できなくなる。N R R P は、不死化細胞に対して指向性を保持してもよい。N R R P の具体的な例は、不死化細胞に対して、自然及び / 又は適応免疫刺激特性を有する。

【0069】

本開示の目的のため、 “不死化細胞 (immortalized cell)” という表現は、細胞分裂が抑制されない細胞であり、高増殖性細胞、腫瘍又は癌細胞、及び癌化した不死化細胞を含むが、これらに限定されない。高増殖性細胞はいかなる新生物、又は、いかなる慢性感染細胞又は組織であってもよい。前記新生物は、例えば、良性新生物、囊胞性新生物、上皮内がん、悪性新生物、転移性新生物、又は、続発性新生物であってもよい。前記高増殖性細胞は、造血性癌細胞又は 固形腫瘍からの細胞であってもよい。

20

【0070】

本開示に係るN R R P は、不死化細胞に対する指向性を保持してもよい。これは、N R R P が、腫瘍細胞又は癌細胞、及び、癌化した不死化細胞などの不死化細胞において、優先的に細胞死を誘導することを意味する。

【0071】

30

前記野生型ラブドウイルスは、そのゲノム複製及び / 又は発現を妨害する手段によって、前記N R R P を產生するために改変されてもよい。これは、ゲノム複製及び / 又は発現が親株の発現量よりも減少していることを意味する。ゲノム発現は喪失されてもよい。

【0072】

前記野生型ラブドウイルスのゲノム発現を妨害するために、電磁 (EM) 放射が使用されてもよい。電磁放射は、UV、赤外線、X線、ガンマ線、及び、UVC (200 - 280 ナノメートル) などのEMスペクトルにおけるその他の放射を含んでもよい。化学的に誘導した妨害は、前記野生型ラブドウイルスのゲノム発現を妨害するために使用されてもよい。例えば、ブルファンなどのゲノム傷害剤が使用されてもよい。

【0073】

40

前記野生型ラブドウイルスのゲノム発現を十分に妨害するために必要な前記EM放射線量は、方法に依存し、ウイルス濃度、ウイルスストック調製の濁度、使用された用量、ウイルスストック調製の夾雑物の存在又は純度、使用された希釈剤、及び、この工程のために保存されたウイルス調製の容器 (プラスチック、ガラス、など) などのパラメータによって異なる。化学的投与も様々なパラメータから影響を受ける。

【0074】

一つの実施例において、スクロースクッショング法で精製された、50 μ l の前記野生型ラブドウイルスの 1 E 10 PFU / ml ストックが、250 mJ / cm² で (約 40 秒間) 放射された。

【0075】

50

本開示は、さらに、野生型ラブドウイルス由来粒子から作られた非複製型ウイルス由来粒子を提供する。前記野生型ウイルスは、細胞間で拡散する能力を欠くように改変されるが、自然及び/又は適応免疫刺激特性は保持するように改変される。

【0076】

本開示は、N R V P の使用を提供し、特に不死化細胞の集団を処理するためのN R R P を提供する。

【0077】

本開示の目的のため、“治療する (t r e a t)”とは、放射線療法、化学療法、免疫療法、外科手術、腫瘍溶解性ウイルスベース療法、又は、その他のウイルスベース療法で、前記N R V P 又はN R R P が単体又は組み合わせで使用される適応のことを意味する。

【0078】

当業者は、“化学療法 (c h e m o t h e r a p i e s)”を、有糸分裂阻害剤、レナリドミド又はポマリドミドなどのI M i D S 、クロマチン改変剤、S A H A などのH D A C 阻害剤、脱メチル化剤、アルキル化剤、m T O R 阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、プロテアソーム阻害剤、代謝拮抗剤、D N A 傷害剤又はD N A 制御剤、ホスホジエストラーゼ阻害剤、L C L 1 6 1 などのS M A C 類似物質、コルチコステロイド、及び、サイトカイン/ケモカインの使用を伴う治療を含むが、これらに限定されないと理解するであろう。

【0079】

例えば、化学療法は、アルキル化剤、D N A 傷害剤又はD N A 制御剤、有糸分裂阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、プロテアソーム阻害剤、I M i D S 、代謝拮抗剤、m T O R 阻害剤、クロマチン改変剤、H D A C 阻害剤、脱メチル化剤、ホスホジエストラーゼ阻害剤、コルチコステロイド及びサイトカイン/ケモカインを使用する療法を含む。特定の化学療法は、ベンダムスチン、ブスルファン、カルボプラチニン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチニン、シクロフォスファミド、ダカルバジン、ロムスチン、メルファラン、テモゾロミド、チオテバ、オキサリプラチニン、プロカルバジン、ペントスタチニン、クラドリビン、クロファラビン、シタラビン、フルダラビン、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、メルカブトプリン、ネララビン、フルオロウラシル、ブレオマイシン、アクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ドキソルビシンリポソーム、イダルビシン、ミトキサントロン、カペシタビン、トポテカン、イリノテカン、エトポシド、パクリタキセル、テニポシド、チオグアニン、オマセタキシン、アルトレタミン、アスパラギナーゼ、アスパラギナーゼ、ペグアスパラガーゼ、イソトレチノイン、レチノイン酸、ヒ素、ビンプラスチニン、ビンクリスチニン、ビンクリスチニンリポソーム、ボスチニブ、ダサチニブ、イマチニブ、ニロチニブ、スニチニブ、ベムラフェニブ、レゴラフェニブ、ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ、サリドマイド、レナリドミド、ポマリドミド、メトトレキサート、ブララトレキサート、エベロリムス、テムシロリムス、ボリノスタット、ロミデプシン、バルプロ酸、デシタビン、アザシチジン、アナグレリド、コルチゾン、デキサメタゾン、ブレドニゾン及びトリアムシノロン、インターフェロン アルファ2a、インターフェロン アルファ2b、ペグインターフェロン アルファ2b、インターフェロン ベータ1b、アルデスロイキン/IL-2、デニロイキンジフチトクス、顆粒球コロニー刺激因子、及び、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子を含むが、これらに限定されない。

【0080】

本開示の目的のため、“免疫療法 (i mm u n o t h e r a p i e s)”という用語は、C D 2 0 (リツキシマブ、イブリツモマブチウキセタン及びトシツモマブなど)、C D 4 7 、C D 3 3 、C D 3 8 、C D 1 3 8 、C S 1 、C D 5 2 (アレムツズマブなど)、V E G F (ベバシズマブなど)、H e r 2 / N e u (トラスツズマブなど)、E G F R (セツキシマブ及びニモツズマブなど)、C T L A 4 (イピリムマブなど)、又は、I G F - 1 (ガニツマブなど)を標的とする免疫療法を意味する。当業者にとって周知のその他の免疫療法も、“免疫療法”という用語の範囲内に含まれてもよい。

【0081】

10

20

30

40

50

“腫瘍溶解性ウイルスベース療法 (oncolytic virus-derived therapies)”という用語は、ポックスウイルスベース療法 (ワクチニアベースウイルス)、単純ヘルペスウイルスベース療法 (OncovEX GM-CSF)、ラブドウイルスベース療法 (MG1、VSV-IFNb、VSVD51)、レオウイルス (Reolysin)、アデノウイルスベース療法 (ONYX015)、麻疹ウイルスベース療法、ニューカッスル病ウイルスベース療法、アルファウイルスベース療法、及び、バルボウイルス種ベース療法を含む当該技術分野において既知のものを含む。

【0082】

NRVP及びNRRPは腫瘍内投与、鼻腔内投与、筋肉内投与、皮内投与、腹腔内投与、動脈内投与、静脈内投与、皮下投与、又は頭蓋内投与されてもよい。

10

【0083】

二種類の異なるラブドウイルス由来株、及び、患者サンプルを含むいくつかの異なる細胞型を使用したいくつかの異なるインビトロ及びインビボモデルにおけるNRRPの腫瘍溶解性が、以下に詳述される。

【0084】

腫瘍特異的細胞毒性は、細胞表現型顕微鏡観察、レザズリンによる細胞毒性の定量化、及び、傷害された腫瘍細胞のフローサイトメトリーを含むいくつかの分析方法によって調べられる。

【0085】

L1210に対する免疫防御モデルを使用することは、プログラム細胞死経路のNRRPの活性化が、腫瘍に対する自然及び適応免疫応答を発生させることにつながることを示唆する。したがって、NRRPを使用した治療は、有効性を維持するために各細胞が感染しなくてもよいため、単体の治療として、又は、抗癌療法レジメンのアジュバントとして使用されてもよい。

20

【0086】

L1210を有するマウスにおいて、急性転化期に、NRRPによって誘発されたサイトカインをルミネックスに基づいて定量化を行った。同定されたサイトカインは全て、NRRP処理したマウスでは2倍以上誘導されており、統計的に有意であった (non-paired t-test pV < 0.05)。pVは多重仮説検定を考慮して補正した (Benjamini & Hochberg法)

30

【0087】

この実験は、高いNRRP対細胞比 (すなわち、>1) で投与した時に、NRRPが最も有効となることを示す。このようなより高い用量で投与された場合には、大部分の細胞が細胞毒性NRRPと遭遇することを保証される。これは、ウイルス拡散に依存して治療効率が向上し、低いOV対細胞比でレシピエントへ安全に送達できる、生ウイルスを用いた治療と対照的である。

【0088】

図1Aを除く全ての図面において、NRRPは、1E10 PFU/mlの生VSV-GFP、50 μlサンプルを250mJ/cm²のUVC照射し、該ウイルス溶液を水の中で20%のスクロースクッショング (5ml) 法を用いて148,000×gで120分間遠心して精製することにより調製した。

40

【実施例1】

【0089】

実施例1：電磁放射によって產生したVSVベースNRRP

【0090】

ラブドウイルスにUVフォトニックダメージを与えることで、生物活性を保持した非複製型ウイルス由来粒子を產生してもよい。高線量のUV照射を行うと、前記ラブドウイルスのゲノムが切断され、該ウイルスは生物学的に不活性になる。しかしながら、当該ウイ

50

ルスは依然として細胞に結合して内部移行するが、該細胞内で新しいウイルス粒子を産生する能力を失う、又は該能力が大幅に減少するような線量でUV照射を行えることが、既に明らかにされている。すなわち、ウイルスの複製能は失われるが、生物学的活性は保持される。

【0091】

GFP蛋白質を発現する精製したVSV(ラブドウイルス)に約100-約1000mJ/cm²のUVフルエンスを照射すると、不死化細胞に対する指向性は保持しているが(図1A及び1B)、細胞間伝播能力を欠いた(図2A)NRRPが得られることが明らかとなった。

【0092】

本開示に従い、VSVベースNRRPを得るために、VSV野生株に250mJ/cm²のUVを照射した。図1A中、1E2のUV照射量は100mJ/cm²に相当する。250mJ/cm²で照射されると、VSV-eGFPの発現能力は失われたが、不死化された増殖性細胞株(Vero)に対する強い細胞毒性は保持されていた(図2B)。生ウイルスを感染させた場合とは極めて対照的に、前記ウイルス粒子は前記細胞中で複製できなかったことが、感染後のウイルス力価測定によって確認された(図2C)。当該効果は、ラブドウイルス科に属する他のメンバーを用いた場合にも同様に観察された(図3A、3B、及び3C)。

【0093】

図1Aに示される線量効果曲線により、細胞毒性はUV線量が1000mJ/cm²を超えると減少し、10、000mJ/cm²で完全に消失することが示される。当該線量で細胞毒性が消失するのは、前記処理されたウイルスが前記細胞表面に結合できない、及び/又は前記細胞に内部移行できない程、G蛋白質が架橋されるためと考えられている。正常ヒト新生児皮膚線維芽細胞(Human dermal fibroblasts; HDF)と比べると該細胞とは異なり、細胞毒性は、非癌性細胞よりも癌性細胞に優先的なようである(図1A及び1B)。実際に、非癌性細胞がNRRPによって媒介される細胞毒性に感受性になるには、約10倍ものウイルスを要するようである(図1B)。

【0094】

急性白血病細胞においてNRRPの複製と伝播が起こらないことを確認するために、マウスの中悪性度リンパ芽球性白血病細胞株(L1210)とVeroコントロール細胞株(正常腎臓上皮細胞)をインビトロでともに処理したのち、GFP産生とウイルス力価を定量化した。当該処理を施した両細胞株において、検出できるレベルの生ウイルスは認められなかった(図4A及び4B)。

【0095】

ウイルスゲノムのウェスタンプロット解析により、NRRPsではゲノム発現が全体的に減少していることが示された(図5)。ビリオン産生を阻止してゲノム発現を減少させるUV線量は、明瞭な腫瘍溶解活性と相關している。これらの実験では、各腫瘍細胞がNRRPに遭遇して至る所で激しい細胞死を確実に起こすように、(1以上の)高い感染多重度(MOI)、すなわち粒子対細胞比(図1B)を用いてもよい。

【実施例2】

【0096】

実施例2: RNAアルキル化剤への曝露によって産生したVSVベースNRRP

【0097】

別の例において、NRRPは、4で6mg/mLのブスルファンでVSVを24時間処理することで化学的に産生され、24時間、Vero細胞に加えられた。処理後、4%より少ないVero細胞が生存可能な状態を維持した(図6A)。ブスルファンのみで24時間処理した場合にVero細胞が約82%生存可能な状態を維持したため、前記効果はNRRPに起因し得る(図6B)。図6Cは、24時間、生VSV-GFPに感染したVero細胞の細胞変性効果を示し、前記NRRPが由来する当該生ウイルス(図6C)は、GFP発現により実際に複製可能であることが証明された。

10

20

30

40

50

【実施例3】

【0098】

実施例3：ガンマ線への曝露によって產生されたVSVベースNRP

【0099】

他の実施例において、NRPは、1E10の凍結野生型VSVを-80で15kGyのコバルト60で照射して產生され、48時間、Vero細胞に1細胞あたり1000の粒子が加えられた。同様に、これらの不死化細胞に対しても細胞変性効果は明白であった（図7A）。細胞アポトーシス及び細胞死のNRPによって誘導された形態変化は、同じく48時間にわたって生VSV-GFPで同じ細胞を処理した時の細胞変性効果と比べられる（図7B）。PBSのみで処理されたVero細胞は、細胞変性効果を示すことなく生存可能な状態を維持し、蛍光性を示さなかった（図7C）。

【実施例4】

【0100】

実施例4：NRPはインビトロで白血病細胞に対して効果的な処置である。

【0101】

白血病細胞がNRPによって媒介される細胞死に対する感受性を有するかどうかを、UV法によって產生されたVSVベースNRPと共に試験した。第一に、L1210細胞株に誘導された細胞毒性、及び、正常なヒト皮膚纖維芽細胞（HDF）において観測されたものが決定された。両方の細胞株が生ウイルス感染に対する感受性を有していたが、NRPは白血病L1210細胞においてのみ死を誘導した（図8A）。細胞の長径の減少、“しわのよった（shriveled）”外観を持つ多数のアポトーシス小体、及び断片化されたDNAを特徴とする典型的なアポトーシス様相が、急性白血病L1210細胞において観測された。様々なヒト及びマウスの細胞株において、細胞毒性が標準的なレザズリン試験を用いて定量化された。これらの実験において、急性白血病細胞は、正常細胞の生存率を保ちながら、NRPによって媒介される細胞死に対する高い感受性を有していた（図8B）。代わりのラブドウイルス株であるマラバベースNRPを用いても、同様の結果が得られた（図3A及び図3B）。ゲノム発現がなかったことが、蛍光顕微鏡イメージによって確認された（図8C）。

【0102】

L1210細胞株におけるアポトーシスのレベルは、フローサイトメトリーによって定量化された。処理してから30時間後、NRPは広範な（集団の84%）早期/晚期（early/late）アポトーシスを誘導した（図9）。VSVに誘導されたアポトーシスは、小胞体（ER）ストレスのレベルと直接相關するように示されている（10）。興味深いことに、細胞のERストレスを緩和する細胞能力が破綻した時、免疫原性アポトーシスが誘導され得る（16）。NRPは、後述される通り、細胞死の独特な形態を誘導する。

【0103】

その他の実施例において、L1210白血病細胞は、NRPと、300μMのベンダムスチン（図10）、45μMのデキサメサゾン（図11）、0.025μMのドキソルビシン（図12）、又は、0.0125μMのビンクリスチン（図13）と組み合わせて72時間処理された。NRPは通常の様式でNRP自身に細胞毒性効果を誘導するが、上述の薬剤と組み合わせることで、付加及び/又は相乗細胞毒性効果が観測された。つまり、NRP療法をその他の化学療法/薬理学と組み合わせた場合、独特な治療増強効果をもたらすことを意味する。

【0104】

その他の実施例において、K562Ph-陽性骨髄性白血病細胞株がUV-製造NRPと0.05μMのイダルビシンを組み合わせて72時間処理された（図14）。この実施例においても、NRPとこの種類の化学療法を組み合わせて用いた場合、骨髄性白血病細胞株はNRPによって媒介される細胞死に対する感受性を有し、増強効果が再度観測された。これらの観測は、NRP療法が付加治療を用いることで増強され得ることを

示す。このことは、とりわけ、高められた有効性を得るために独特な組み合わせのアプローチを用いる必要がある難治性の癌などに対する代替の戦略を示している。

【実施例 5】

【0105】

実施例 5：N R R P 抗腫瘍特異性を示すモデリング

【0106】

抗ウイルスシグナル経路が障害された細胞に対する N R R P 特異性を説明するために用いられたモデルは、Le Bouef らによって詳述された我々の先行研究から適応された（図 15 A）。簡潔にいえば、当該モデルは 6 つの常微分方程式のサブセットによって表される。前記常微分方程式は、環境における N R R P (N) 及びインターフェロン (I F N) の濃度に依存する細胞集団 (U P, I P, A P 及び P P) の推移を表す。これらの方程式は以下の通りである。
10

【0107】

【数 1】

$$\frac{dU P}{d t} = -K_{V I} \times [N] \times [U P] - \left(\frac{-K_{I P N \text{ on }}}{1 + \frac{[I P N]}{E C 50}} + K_{I F N \text{ on }} \right) \times [U P] + K_{I F N \text{ off }} \times [P P],$$

$$\frac{dI P}{d t} = K_{V I} \times [N] \times [U P] - \left(\frac{-K_{I P N \text{ on }}}{1 + \frac{[I P N]}{E C 50}} + K_{I F N \text{ on }} \right) \times [I P] - \gamma_c \times [I P], \quad 20$$

$$\frac{dA P}{d t} = \left(\frac{-K_{I P N \text{ on }}}{1 + \frac{[I P N]}{E C 50}} + K_{I F N \text{ on }} \right) [I P] - K_{V C} \times [A P] - \gamma_c \times [A P],$$

$$\frac{dP P}{d t} = \left(\frac{-K_{I P N \text{ on }}}{1 + \frac{[I P N]}{E C 50}} + K_{I F N \text{ on }} \right) [U P] + K_{V C} \times [A P] - K_{I F N \text{ off }} \times [P P].$$

【0108】

30

上記方程式に使用されるパラメータは、N R R P 内部移行率 (K_{N I})、I F N シグナル伝達活性化の比率 (K_{I F N o n})、I F N - シグナル伝達不活性化の比率 (K_{I F N o f f})、I F N の E C₅₀ (E C₅₀)、細胞死の比率 (c) 及び N R R P 排除の比率 (K_{N C}) を表す。

【0109】

次の方程式のサブセットは N V R P (N) 及びインターフェロン (I F N) のダイナミクスを表す。

【0110】

【数 2】

$$\frac{dN}{d t} = -K_{V I} \times [V] \times [U P] - \gamma_v \times [V], \quad 40$$

$$\frac{dI F N}{d t} = K_{I F N 1} \times [I P] + K_{I F N 2,1} \times [A P] + K_{I F N 2,2} \times [P P] - \gamma_{I F N} \times I F N.$$

【0111】

上記方程式において使用されるパラメータは、N R R P 内部移行の比率 (K_{N I})、N R R P 分解 (N)、I P、A P 及び P P からの I F N 产生 (K_{I F N 1}、K_{I F N 2,1} 及び K_{I F N 2,2}) 及び I F N 分解 (γ_{I F N}) を表す。
50

【0112】

Monte Carloシミュレーションは、文献及び実験証拠(18)から由来する生理学的パラメータに隣接する1ログウィンドウ(log window)(表2)の範囲内で、上記パラメータを無作為に変えて行われた。シミュレーションは、非負の制約を課すODE15sを用いたMatlabで行われた。図15Bにおいて示されるトレンドは、1000を超えるシミュレーションの中央値を示す。これらのシミュレーションにおいて使用された細胞の数は2.5E5であり、媒体の容積は1m1にセットされ、PFU対細胞比は1つの細胞あたり100粒子にセットされた。これらのシミュレーションにおいて、IFN-シグナル伝達経路の障害は、それらの元の値の100%から1%に減少する K_{IFN1} 、 $K_{IFN2.1}$ 、 $K_{IFN2.2}$ 、 K_{vc} 及び K_{IFN_on} によってシミュレートされた。

10

【0113】

腫瘍細胞に対する特異性が達成されたメカニズムを調査するため、本開示の著者らは正常及び腫瘍細胞におけるNRRPによって誘導される細胞毒性をシミュレートした。近年、本開示の著者らは、正常及び腫瘍細胞における細胞毒性と生腫瘍溶解性ウイルス複製ダイナミクス(live oncolytic virus replication dynamics)の関係を示す集団ベースのモデルを開発した。このモデルによれば、細胞の非感染集団(UP)がビリオンに遭遇することで、感染サイクルが始まる。これによってUP集団が感染し、生ウイルスの上で、ビリオン及びインターフェロン(IFN)として知られるサイトカインが環境へ放出される。

20

【0114】

IFNが次第に増えることで、細胞集団は抗ウイルスシグナル伝達(AP)を活性化させる。これによって、細胞集団はウイルス感染を排除し、更なる傷害から保護される(PP)。NRRPにこのモデルを適応するために、本開示の著者らは前記モデルからウイルス複製ダイナミクスを除き、NRRPによって媒介される細胞毒性と、80%の癌に発生する工程であるIFN-シグナル伝達経路における障害の範囲の関係をシミュレートした。これらの障害は、IFN産生の比率、IFNシグナル伝達の活性化の比率、及び、腫瘍細胞と正常細胞の間のNRRP排除の比率を減少させることでシミュレートした。この観測が系統的となることを保証するため、Monte Carloシミュレーションプラットフォームが利用された。ここで、すべてのキネティックパラメータは、文献的及び実験証拠から由来する推定値に隣接する1ログウィンドウの範囲内で変更された(表2)。

30

【0115】

1000の無作為なパラメータのペアリングに及ぶ次のシミュレーションにおいて(図15B)、本開示の著者らは、癌細胞が、IFNにシグナルを送る又は応答する能力を失うにつれて、これらの細胞がNRRPによって媒介される細胞毒性に対してより敏感になると決定づけた。この観測を確証するために、本開示の著者らは、正常細胞(HDF)及び白血病細胞(L1210)におけるNRRPによって媒介される細胞毒性へのIFNのインパクトを調査した。興味深いことに、イントロンA(遺伝子組み換え型IFN)がNRRP傷害に対する正常細胞の保護をさらに増やす一方で(図15C)、イントロンAの白血病細胞に対するインパクトは検出されなかった(図15D)。

40

【0116】

表2:Le Bouefら(2013)によって提唱された実験的及び文献的証拠を含む推定値を示すパラメータのリスト。

【0117】

【表2】

パラメータ	使用できる範囲	
K_{yy}	7.5E-5 to 7.5E-4 ($V^{-1}h^{-1}$)	
$EC50$	0.25e-12 to 2.5e-12 (M)	
$K_{yy on}$	$\ln(2) / (0.2 \text{ to } 2.0)$ (h^{-1})	
$K_{yy off}$	$\ln(2) / (5 \text{ to } 50)$ (h^{-1})	10
γ_c	$\ln(2) / (2.5 \text{ to } 25)$ (h^{-1})	
K_{nc}	$\ln(2) / (0.25 \text{ to } 2.5)$ (h^{-1})	
K_{yy1}	$K_{yy2} \times 10 \text{ to } 100\%$ (M/h)	
$K_{yy2.1} \& K_{yy2.2}$	8.3e-18 to 8.3e-17 (M/細胞/h) (ie 5000-50000 分子/細胞/h)	20
γ_{yy}	$\ln(2) / (5 \text{ to } 50)$ (h^{-1})	
γ_n	$\ln(2) / (2.5 \text{ to } 25)$ (h^{-1})	

【実施例6】

【0118】

実施例6：AML急性転化におけるNRRP活性

【0119】

臨床サンプルにおいて、NRRPプラットフォームの翻訳能が調べられた。重度の急性転化期の二名のヒト患者より末梢血単核細胞を採取し、NRRPによって媒介される細胞死に対する感受性を試験した。前記患者らは、CD33陽性表現型の循環型芽細胞を有していた。両患者は慢性骨髄性白血病(CML)の治療を受け、チロシンキナーゼ阻害薬(TKI)治療に対する耐性を有していた。L1210芽細胞における観測と同様に、患者サンプルは、典型的な形態を表すと共にNRRPに誘導された明白なアポトーシスを起こした(図16A)。蛍光顕微鏡イメージは、NRRPゲノム発現の不在を確認した(図16B)。NRRP処理後、これらのCD33+白血病細胞は、アポトシスマーカーであるアネキシンVで強く染色された(図16C)。非培養の患者サンプルが、この応答の特異性を評価するために用いられた。両患者ともに、NRRP処理後には優勢だった白血病CD33+集団が消失し、前記サンプル中で正常細胞が優位になった(図16D)。

【0120】

NRRPが正常な白血球細胞に影響を及ぼさないように、健常ドナーより単離された骨髄単核細胞は、PBS又はNRRPで処理された。18時間後、及び、65時間後の時点で、これらのサンプルにおいてNRRPはアポトーシスを誘導しなかった(図17A及び図17B)。

【実施例7】

【0121】

実施例7：インビボのNRRP抗白血病活性

【0122】

治療剤としてのNRRPの能力を評価するために、白血病急性転化期のマウスモデルが

30

40

50

使用された。1日目、D B A / 2マウスは、 1×10^6 の用量のL 1 2 1 0芽細胞でチャレンジされた。次の日から3日連続で 3×10^9 のN R R Pの静脈投与のレジメンが開始され、生存が確認できた。並行して、別のマウスのコホートは1回の注入あたりM T Dの 2×10^6 のウイルスで生V S V処理(19)、又は、同様の治療スケジュールでP B S処理された。N R R P処理されたマウスは40日目まで80%生存し、P B S(P 0.0045)又は生ウイルス(P 0.044)で処理されたマウスと比較して著しい優位性を示した(図18A)。N R R Pは十分な耐容性を示し、特にこの実験では、生ウイルスのM T Dより1500倍高い用量を示した、投与可能な最大用量で投与された。急性白血病が頻繁に中枢神経系へ播種し、野生型V S Vの神経毒性が高いことから、N R R P及び生ウイルスの頭蓋内投与が行われた。マウスが最大産生用量 1×10^8 粒子投与の頭蓋内投与を耐えることができる一方で、全てのマウスが 1×10^4 の生ウイルス投与で急死了。

【0123】

N R R P処理による有効性と差次的なM T Dによって促され、免疫系が次の処理で活性化されるかを知ることは興味深い。P B S又はN R R P処理してから20時間後のL 1 2 1 0腫瘍を有するマウスから、マウス血清を採取した(図18B)。この分析において、T細胞をリクルートし分化することで知られるサイトカインが、次のN R R P処理で誘導される。N R R P処理によって誘導されたこれらの免疫調節サイトカインの例としては、白血病抑制因子L I F、I L - 2、I L - 4、C C L - 2、R A N T E S及びM I P - 1が挙げられる(図18B)。

【0124】

特にT細胞活性化などの免疫系刺激を確認するため、本開示の著者らは先の公開に記載されているワクチン戦略を採用した。実験的に、このプラットフォームはイミューノコンピテントな動物へのアポトーシス細胞の注入、及び、次の腫瘍チャレンジに対する保護的な適応免疫の測定からなる。実際に、N R R Pで処理されたL 1 2 1 0細胞は、アネキシンV染色の増加によって、図16Cに見られるような著しいアポトーシスを示した。したがって、この典型的な実験的アプローチは、N R R Pが免疫原性アポトーシスの引き金を引くかどうかを探究するために採用された。

【0125】

D B A / 2マウス(L 1 2 1 0と同系)の二つのコホートが、N R R Pで前処理され 1×10^6 ガンマ照射されたL 1 2 1 0細胞の静脈投与を、週1回、計3回受けた。別のコホートはガンマ照射されたL 1 2 1 0細胞を同じ量受けた。このレジメンの1週間後、L 1 2 1 0白血病チャレンジ(1×10^6 細胞)が尾静脈を介して投与され、生存が記録された。N R R P処理されたL 1 2 1 0細胞の投与を受けたコホートは、白血病チャレンジの後80%生存したが、未処理のL 1 2 1 0投与を受けたコホートにおいては一様に致死的であった(図19)。マウスの生存は150日後まで維持され、継続的な生存が保証された。これは、N R R Pで処理された急性白血病細胞が免疫原性アポトーシスを起こすということと矛盾しない。

【0126】

急性リンパ芽球性白血病細胞株及び急性骨髓性白血病株の使用、及び、重度の前治療を施した急性転化期のC M L患者の一次白血病細胞の使用も同様に、N R R Pが少なくとも白血病特定の細胞溶解剤であることを示す。上述のインビトロ及びインビボ実験において、N R R Pは、多様式の治療プラットフォームを提供することが確認された。

【実施例8】

【0127】

実施例8：多発性骨髓腫、脳腫瘍及び大腸癌細胞株におけるN R R P活性

【0128】

上述の実験に加えて、細胞株がP B S又はV S V由来N R R Pで15時間処理された場合、N R R Pは多発性骨髓腫細胞株M C P - 1 1及びR P M I - 8 2 2 6において細胞変性を有することが示される(図20)。特に、図21は、M O I = 2 0 5で投与されたN

10

20

30

40

50

R R P で処理してから 72 時間後に採取された骨髄腫細胞株の、アラマーブルー (A 1 a m a r b l u e) 細胞毒性又はレザズリン試験を用いた細胞生存率を示している。当該実験において、S R 4 9 8 7 は正常な骨髄基質細胞株である。図 2 1 に見られるように、S R 4 9 8 7 は非悪性細胞であるため、N R R P に対し耐性を示す。ウイルスにコードされた G F P が産生されなかったため、N R R P が産生された時、N R R P 又は V S V ゲノム複製は発見されなかった (データ未記載)。

【 0 1 2 9 】

他の実施例において、M C P - 1 1 多発性骨髄腫細胞株は、N R R P と組み合わせて、20 μ M のメルファラン (図 2 2) 又は 15 μ M の S M A C 類似物質である L C L 1 6 1 (図 2 3) で処理された。併用療法は、両方の場合において N R R P の細胞変性効果を増加させた。S M A C 類似物質と N R R P の間の相乗活性は、有望なアプローチを表す。S M A C 類似の抗腫瘍活性が著しく強化される、又は、場合によっては N R R P の同時投与に本質的に依存することが観測された。

【 0 1 3 0 】

その他の実施例において、R P M I - 8 2 2 6 多発性骨髄腫細胞株は増強細胞毒性効果を有する 5 nM のカルフィルゾミブで処理された (図 2 4)。アルキル化剤 (メルファランなど)、プロテアソーム阻害剤 (カルフィルゾミブなど) 又は S M A C 類似物質 (L C L 1 6 1) と N R R P の同時投与は、様々な癌に対する代替の治療戦略を示し、特に多発性骨髄腫などの造血性の癌において有望である。

【 0 1 3 1 】

抗癌治療としての N R R P の有用性は、脳腫瘍細胞株への影響によってさらに示される。N R R P によって媒介される細胞毒性は、これらの細胞が P B S 又は N R R P で 24 時間処理された場合、H D F N 正常細胞と比べて、グリオblastoma細胞株 C T 2 A、遅発性 (d e l a y e d) 脳腫瘍グリオblastoma細胞株 (D B T) (図 2 5 A)、星状細胞腫細胞株 K 1 4 9 1 (図 2 5 B) 及び K 1 4 9 2、及び、マウスグリオーマ細胞株 (G L 2 6 1) (図 2 5 C) において決定された (図 2 6)。

【 0 1 3 2 】

また、その他の実施例において、グリオblastoma細胞株 C T 2 A は N R R P と組み合わせて 10 μ M の H D A C 阻害剤である S A H A で処理され、P B S で処理した N R R P と比べて、増強細胞変性効果が観測された (図 2 7)。H D A C 阻害は、抗癌剤としての見込みを少しだけ示した。しかしながら、N R R P を組み合わせることで有意な活性が記録され、未だ治療法がない臨床ニーズであるグリオblastomaベースの悪性腫瘍の治療に対するとても有望なアプローチを示す。

【 0 1 3 3 】

腎臓癌 (7 8 6 - 0) 及び乳癌 (4 T 1) 細胞株は、N R R P の細胞変性効果に対し等しい感受性を有する (図 2 8 A、図 2 8 B 及び図 2 8 C)。この一連の実験において、細胞株は M O I = 2 5 0 で N R R P 処理され、72 時間後にレザズリン試験を用いて生存率を定量化した。実験を通して撮られた蛍光顕微鏡イメージはゲノム発現の不存在を確認した。

【 0 1 3 4 】

他の実施例において、皮下 C T - 2 6 大腸癌がマウスに埋め込まれた。マウスは腫瘍の埋め込みから 16 日、18 日、及び 21 日後に 2 E 9 N R R P で処理された (図 2 9)。N R R P 処理の前の大きな腫瘍量にもかかわらず、腫瘍内又は静脈内経路で N R R P が投与された場合、延長された生存及び治癒が得られた。P B S 処理されたコントロールマウスは全て急激にエンドポイントに達した。このモデルは、固形腫瘍が N R R P ベースのレジメンに受け入れられ得ることの付加証拠を示す。

【 0 1 3 5 】

上記の実施例はインシリコ及びインビトロ試験を通して、ほとんどの腫瘍に共通する自然免疫経路における欠損を活用するとすれば、生ウイルスと類似する N R R P は腫瘍選択

10

20

30

40

50

的であることを示す。しかしながら、N R R P プラットフォームによって提供された安全域は、高力価頭蓋内N R R P 投与がマウスレシピエントによって十分に耐えられたという観測によって例証された。

【 0 1 3 6 】

急性リンパ芽球性性白血病又は急性骨髓性白血病を患う大多数の成人患者の転帰は、悲惨なままである。少数の患者にとって、骨髓破壊的前処置に続く同種幹細胞移植は潜在的に効果があるが、この方法は頻繁な有害現象と著しい治療関連死亡率を伴う。慢性期の慢性骨髓性白血病（C M L）の多くの患者にとって、標的チロシンキナーゼ阻害剤療法は良好な病害防除を提供する。急性白血病急性転化への進行が発生すると、多剤耐性、及び、この種の難治性白血病の急激なキネティクスのため、治療の選択肢は非常に限られる。

10

【 0 1 3 7 】

N R R P は、多発性急性白血病マウスモデルにおいて、直接的な細胞溶解性及び免疫原性の特性を共に表す。特異なプログラム細胞死では、死んで行く細胞に対する免疫応答の誘導を伴う。一般に免疫原性アポトーシスと呼ばれるこの工程は、様々な現在の化学療法の有効性において必須であり、生R Vを含むウイルス感染に対する宿主防御においても必要である。上記のインビボの結果は、同様の工程がN R R P によって誘導され、治療有効性を推進する要因であることを示す。

【 0 1 3 8 】

より関連することとして、C M L 急性転化期の患者に由来する多剤耐性の一次骨髓芽球は、N R R P 処理によって、アポトーシスへと向かわされ、最終的に根絶するということが観測された。加えて、健常な骨髓から採取した非白血病白血球は悪影響を受けなかった。この観測は、N R R P が強力な殺腫瘍性活性を有するにもかかわらず、標準的な誘導及び強化化学療法の後によく見られる白血球減少症が回避できることを示唆する。このことは、治療関連の有害現象を著しく減少させることができるであろう。さらに、N R R P による白血病細胞切除中に正常白血球が保存できるとすれば、効果的な抗白血病免疫応答の同時誘導は、同種幹細胞移植に続く高用量の放射線化学療法の対象とならない患者の大多数において達成できるであろう。N R R P による免疫原性アポトーシスの誘導に続いて、耐久性のある治療反応を達成するための重要な要素である、免疫調節性サイトカインの幅広い種類が放出され、効果的な適応免疫活性の発達に役立つとみられる。

20

【 0 1 3 9 】

前記実施例は、高力価N R R P の產生を実証する。主にプログラム細胞死経路を介した細胞溶解の誘導、ナチュラルキラー細胞活性化及び樹状細胞活性化を含む系統的腫瘍内免疫応答、又は、腫瘍内の血管遮断を通じて、N R R P はいくつもの抗癌特性を有する。これらの特徴は、N R R P 単独での使用、又は、放射線療法、化学療法、免疫療法、外科的手術、腫瘍溶解性ウイルス由来又はその他のウイルス由来療法プラットフォームと組み合わせたアジュバントとして、利用できる。

30

【 0 1 4 0 】

前述の記載において、実施例をよく理解するために数多くの詳細が明記されている。しかしながら、当業者にとってこれらの特定の詳細は必要ないことが明らかとなるであろう。

40

【 0 1 4 1 】

上述の実施例は代表的なもののみである。当業者は、ここに付随する請求の範囲によって規定される範囲から逸脱せずに、特定の実施例に変更や修正を加えることができる。

【 0 1 4 2 】

参考文献

1 . Hanahan D , Weinberg R A . The hallmarks of cancer . Cell 2000 ; 100 : 57 - 70 .

2 . Hanahan D , Weinberg R A . Hallmarks of cancer : The next generation . Cell 2011 ; 144 : 64

50

6 - 6 7 4

3 . Liu BL , Robinson M , Han Z - , Branston RH , English C , Reay P , et al . ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic , immune stimulating , and anti - tumor properties . Gene Ther 2003 ; 10 : 292 - 303 .

4 . Senzer N , Bedell C , Nemunaitis J . OncovEX GM - CSF . Armed oncolytic virus . Drugs of the Future 2010 ; 35 : 449 - 455 . 10

5 . Park B - , Hwang T , Liu T - , Sze DY , Kim J - , Kwon H - , et al . Use of a targeted oncolytic poxvirus , JX - 594 , in patients with refractory primary or metastatic liver cancer : a phase I trial . The Lancet Oncology 2008 ; 9 : 533 - 542 .

6 . Breitbach CJ , Thorne SH , Bell JC , Kirn DH . Targeted and armed oncolytic poxviruses for cancer : The lead example of JX - 594 . Curr Pharm Biotechnol 2012 ; 13 : 1768 - 1772 . 20

7 . Breitbach CJ , Burke J , Jonker D , Stephenson J , Haas AR , Chow LQM , et al . Intravenous delivery of a multi - mechanistic cancer - targeted oncolytic poxvirus in humans . Nature 2011 ; 477 : 99 - 104 .

30
8 . Barber GN . VSV - tumor selective replication and protein translation . Oncogene 2005 ; 24 : 7710 - 7719 .

9 . Stojdl DF , Litchy BD , TenOever BR , Patterson JM , Power AT , Knowles S , et al . VSV strains with defects in their ability to shut down innate immunity are potent systemic anti - cancer agents . Cancer cell 2003 ; 4 : 263 - 275 . 40

10 . Mahoney DJ , Lefebvre C , Allan K , Brun J , Sanaei C , Baird S , et al . Virus - Tumor Interaction Screen Reveals ER Stress Response Can Reprogram Resistant Cancers for Oncolytic Virus - Triggered Caspase - 2 Cell Death . Cancer Cell 2011 ; 20 : 443 - 456 .

11 . Saloura V , Wang L - S , Fridlender ZG , Sun J , Cheng G , Kapoor V , et al . Evaluation of a 50

n attenuated vesicular stomatitis virus vector expressing interferon- for use in malignant pleural mesothelioma: Heterogeneity in interferon responsiveness defines potential efficacy. *Hum Gene Ther* 2010; 21: 51 - 64.

12. Brun J, McManus D, Lefebvre C, Hu K, Fallis T, Atkins H, et al. Identification of genetically modified maraba virus as an oncolytic rhabdovirus. *Molecular Therapy* 2010; 18: 1440 - 1449. 10

13. Willmon CL, Saloura V, Fridlender ZG, Wongthida P, Diaz RM, Thompson J, et al. Expression of IFN- enhances both efficacy and safety of oncolytic vesicular stomatitis virus for therapy of mesothelioma. *Cancer Res* 2009; 69: 7713 - 7720. 20

14. Galivo F, Diaz RM, Wongthida P, Thompson J, Kottke T, Barber G, et al. Single-cycle viral gene expression, rather than progressive replication and oncolytic, is required for VSV therapy of B16 melanoma. *Gene Ther* 2010; 17: 158 - 170.

15. Swarna Bais, Eric Bartee, Marmudur M. Rahman, Grant McFadden, Christopher R. Cogle. Oncolytic Virotherapy for Hematological Malignancies. *Advances in Virology* 2012; 8. 30

16. Zitvogel L, Kepp O, Senovilla L, Menger L, Chaput N, Kroemer G. Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: The calreticulin exposure pathway. *Clinical Cancer Research* 2010; 16: 3100 - 3104.

17. Ebert O, Harbaran S, Shinozaki K, Woo SL C. Systemic therapy of experimental breast cancer metastases by mutant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 350 - 358. 40

18. Finke J, Nagler A. Viewpoint: What is the role of allogeneic haematopoietic cell transplantation in the era of reduced-intensity conditioning - Is there still an upper age limit? A focus on myeloid neoplasms. 50

plasia. Leukemia 2007; 21: 1357 - 1362.

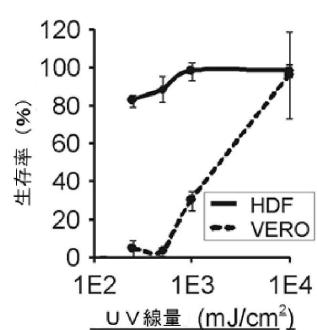
19. Daenen S, Van Der Holt B, Dekker AW, Willemze R, Rijnneveld AW, Biemond BJ, et al. Intensive chemotherapy to improve outcome in patients with acute lymphoblastic leukemia over the age of 40: A phase II study for efficacy and feasibility by HOVON. Leukemia 2012; 26: 1726 - 1729.

10

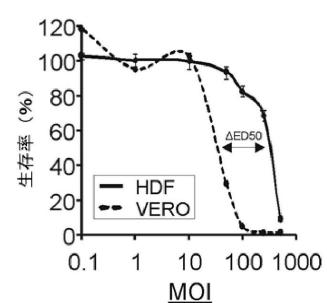
20. Giles FJ, O'Dwyer M, Swords R. Class effects of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia. Leukemia 2009; 23: 1698 - 1707.

21. Hehlmann R. How I treat CML blast crisis. Blood 2012; 120: 737 - 747.

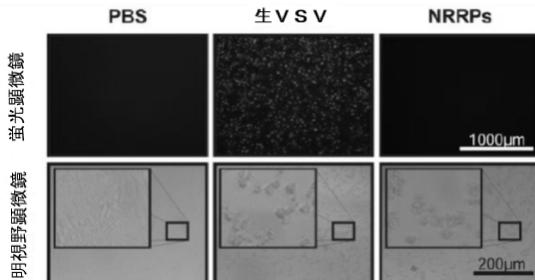
【図1A】



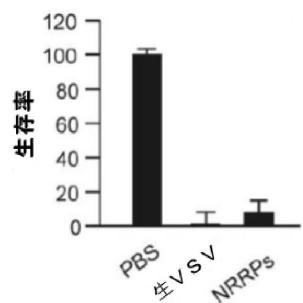
【図1B】



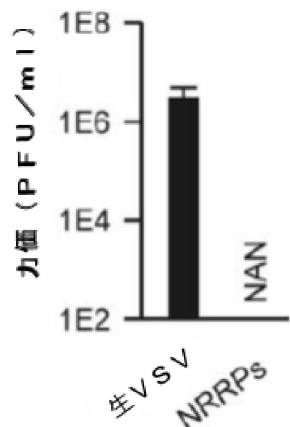
【図2A】



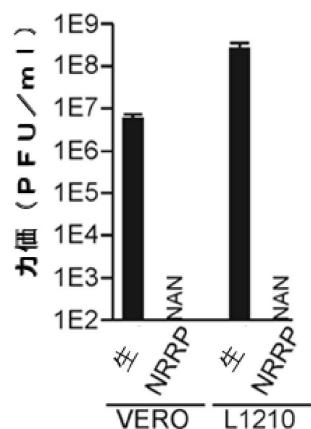
【図2B】



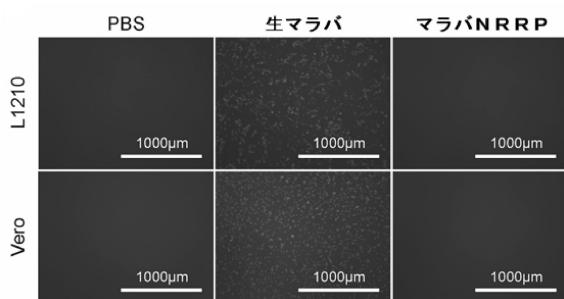
【図2C】



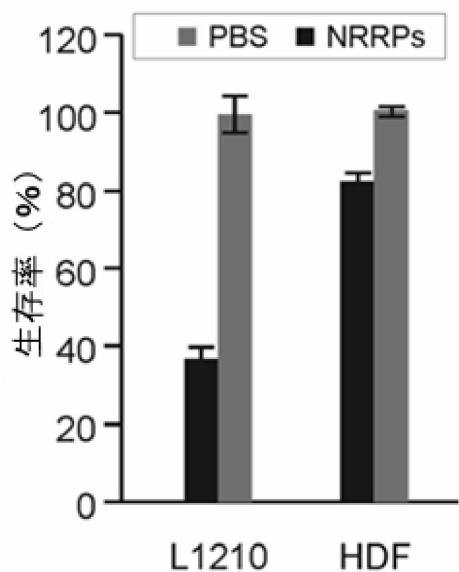
【図3B】



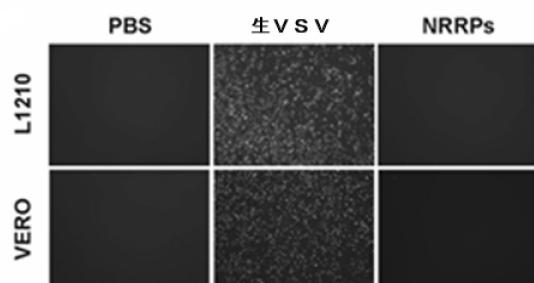
【図3A】



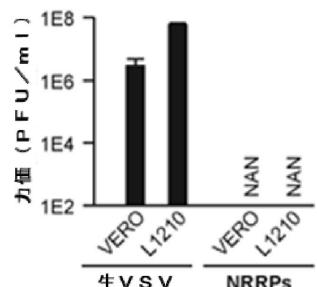
【図3C】



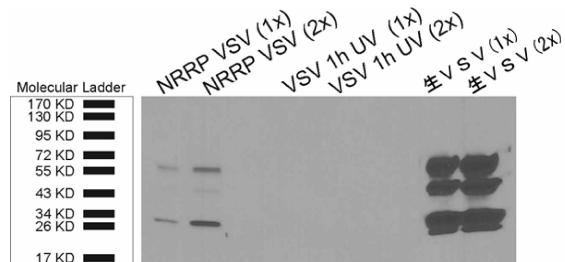
【図4A】



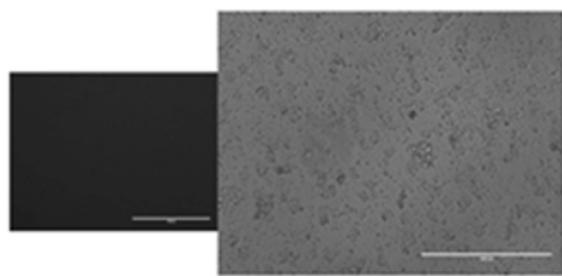
【図4B】



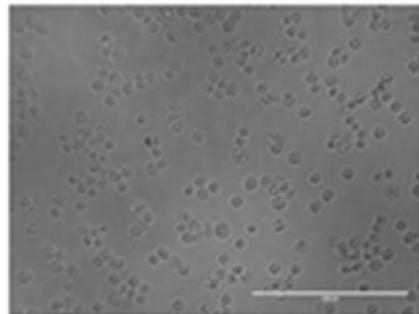
【図5】



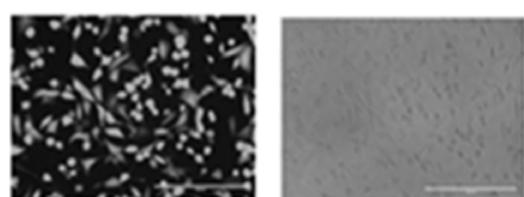
【図6 A】



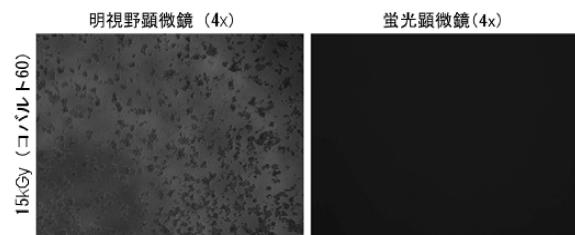
【図6 B】



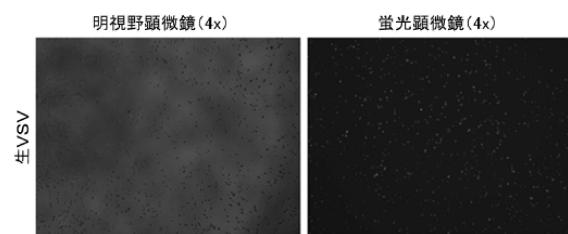
【図6 C】



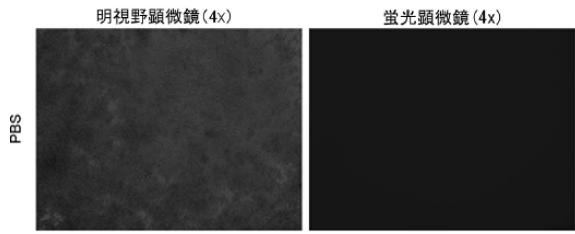
【図7 A】



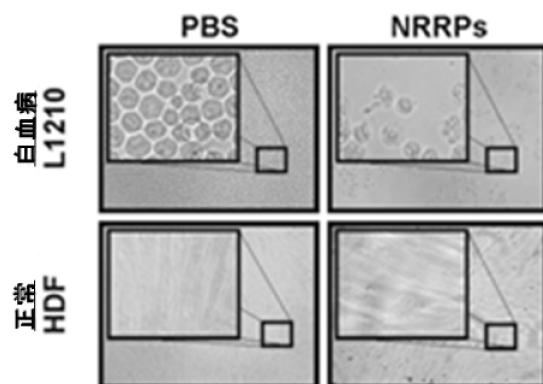
【図7 B】



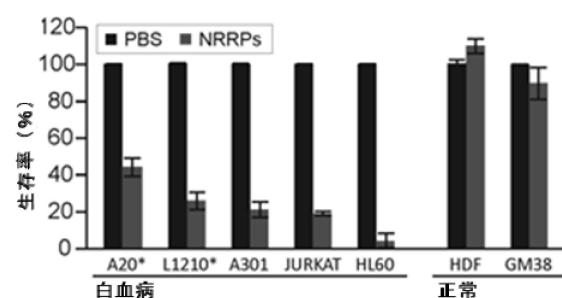
【図7 C】



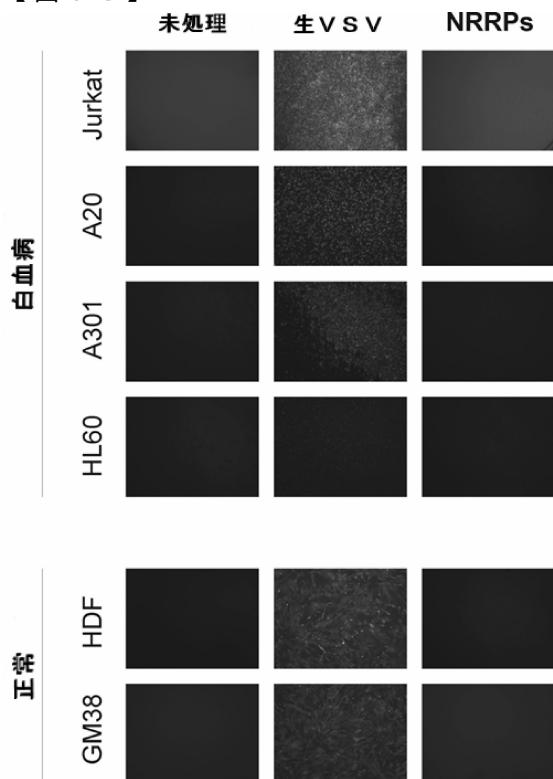
【図8 A】



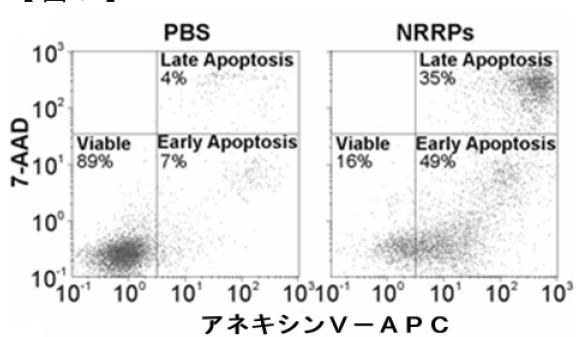
【図8 B】



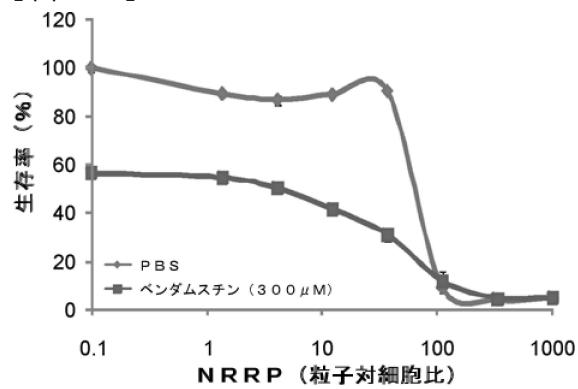
【図 8 C】



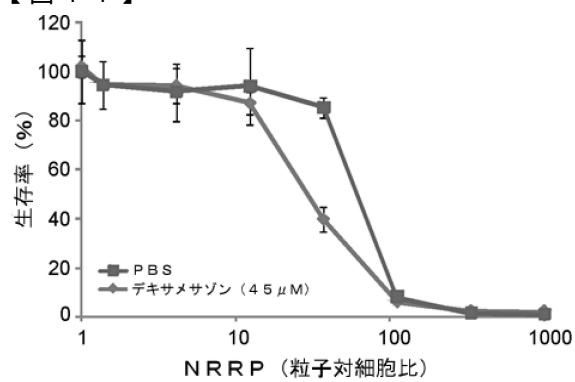
【図 9】



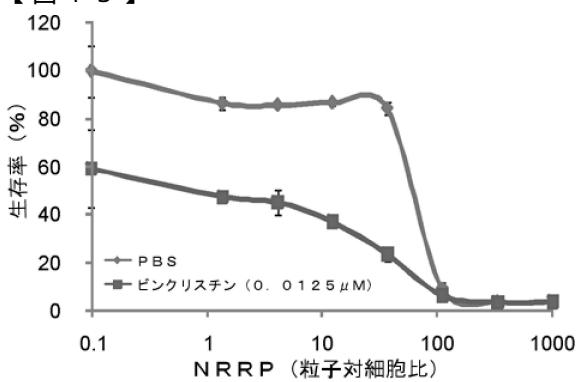
【図 10】



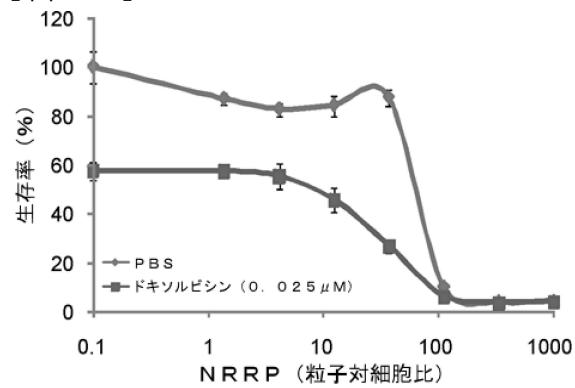
【図 11】



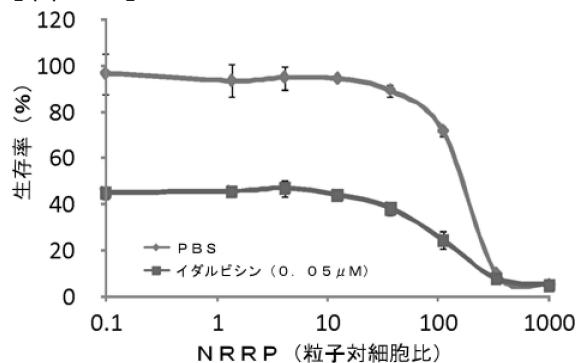
【図 13】



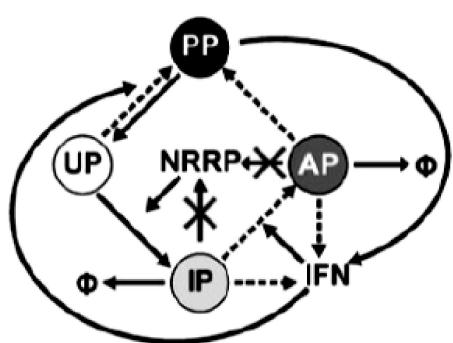
【図 12】



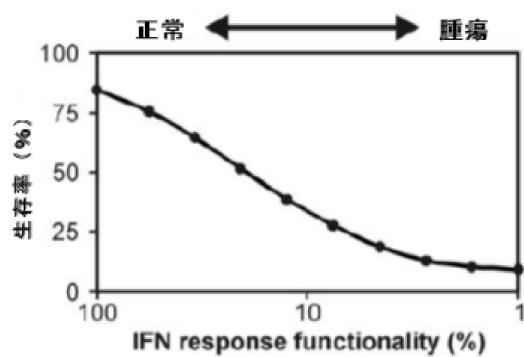
【図 14】



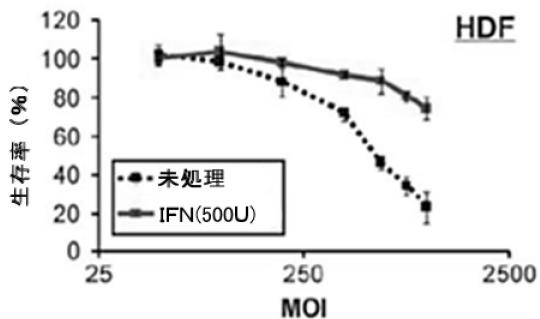
【図 15 A】



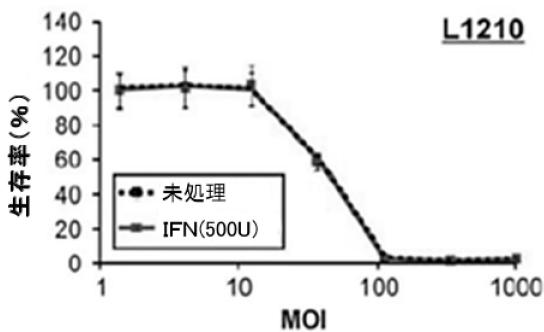
【図 15 B】



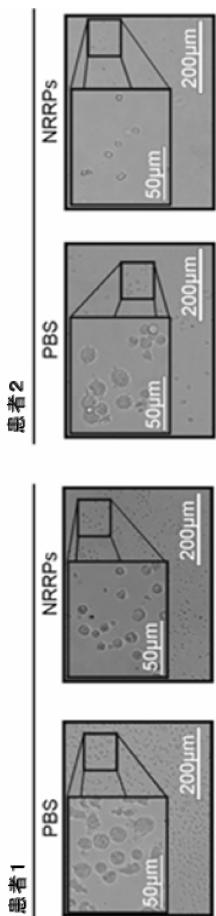
【図 15 C】



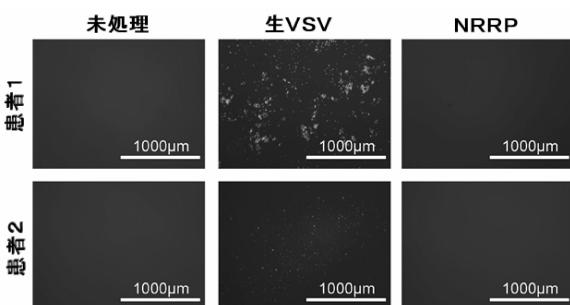
【図 15 D】



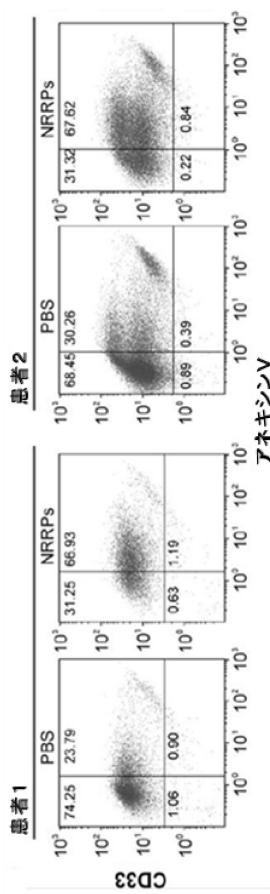
【図 16 A】



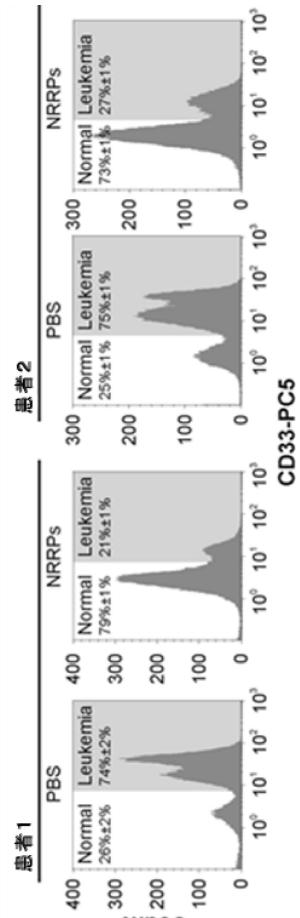
【図 16 B】



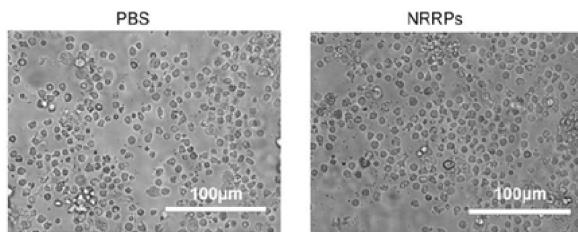
【図 16 C】



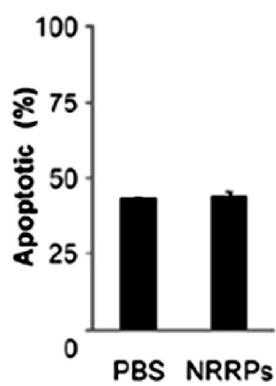
【図 16 D】



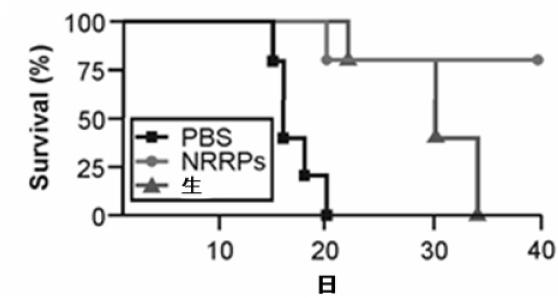
【図 17 A】



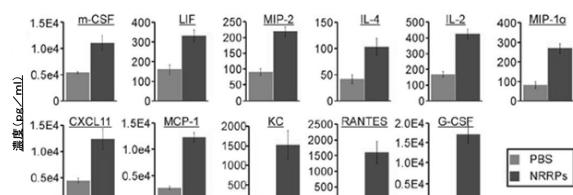
【図 17 B】



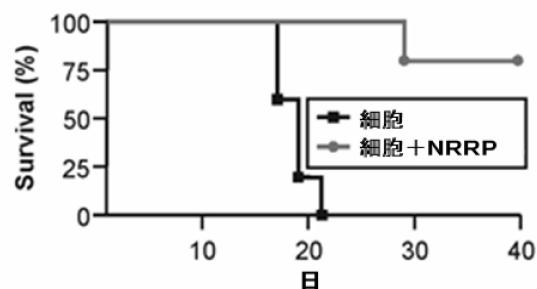
【図 18 A】



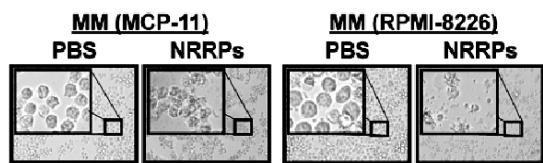
【図 18 B】



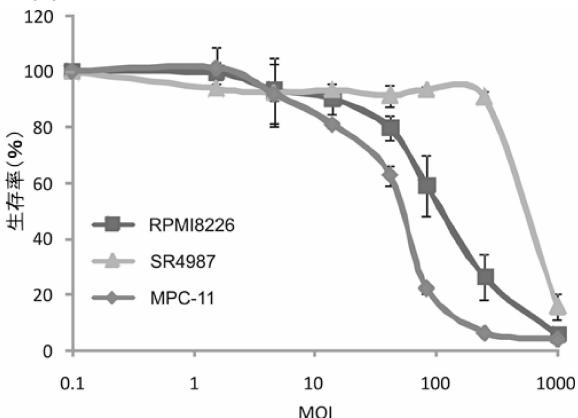
【図19】



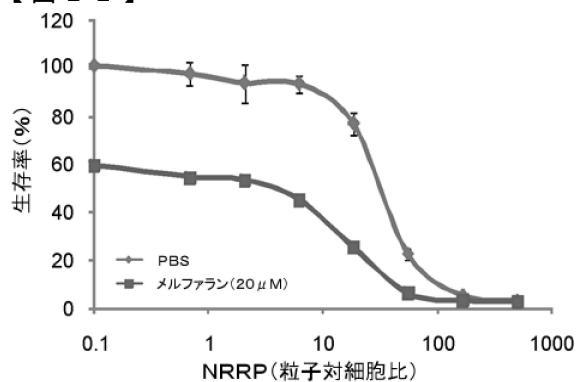
【図20】



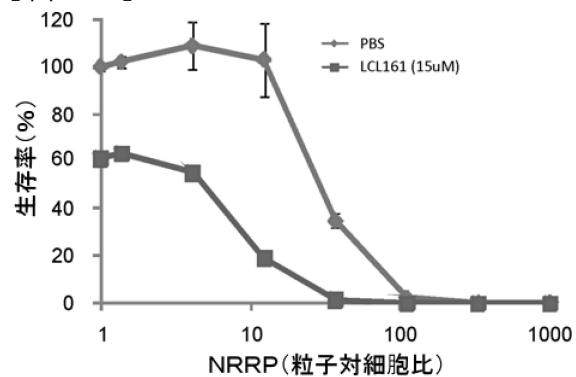
【図21】



【図22】

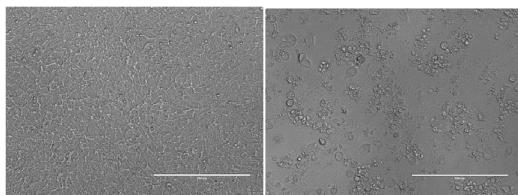


【図23】

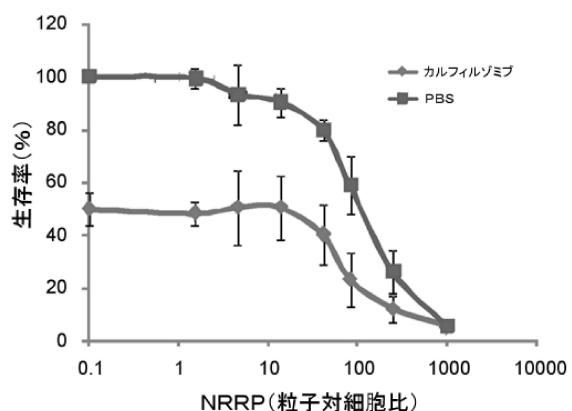


【図25 A】

DBT

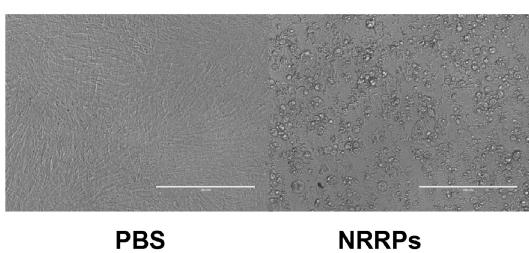


【図24】



【図25 B】

K1491

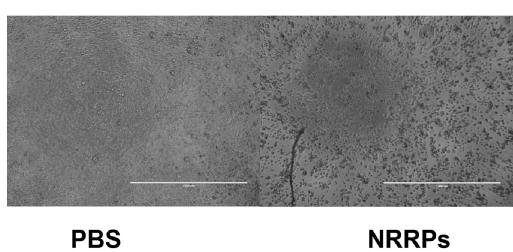


PBS

NRRPs

【図25C】

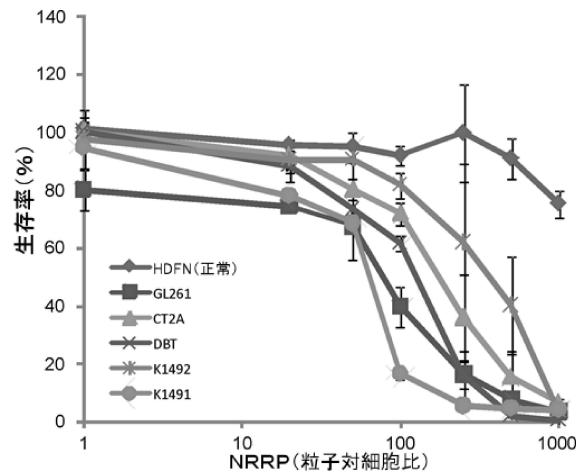
GL261



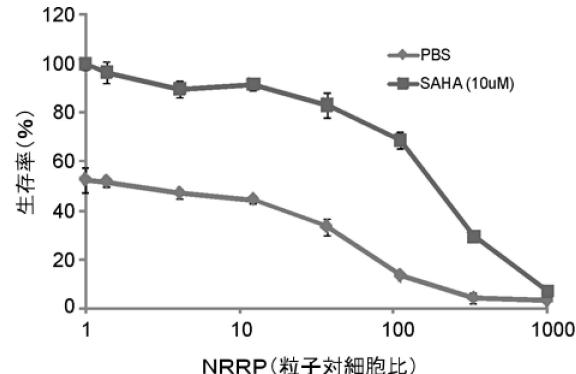
PBS

NRRPs

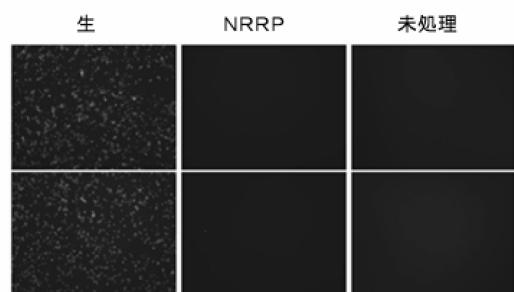
【図26】



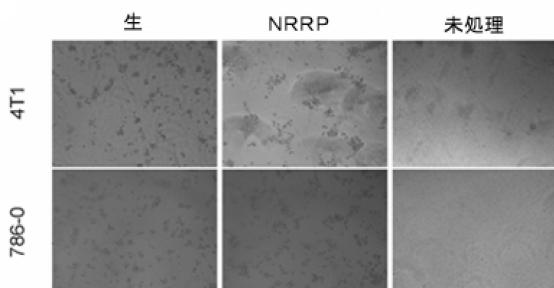
【図27】



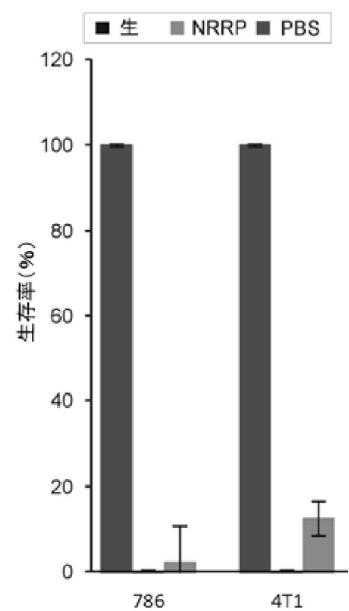
【図28A】



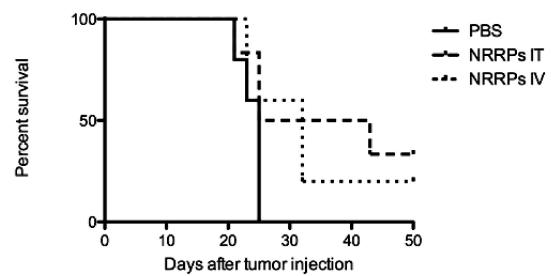
【図28B】



【図28C】



【図29】



【配列表】

0006612619000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I
C 12N 15/09 (2006.01)	C 07K 14/705
C 12N 15/47 (2006.01)	C 12N 15/09 Z
	C 12N 15/47

前置審査

(72)発明者 バテンチュク, コーリー
カナダ国, ジェイ8アール 2エ-6 ケベック, ガティノー, リュー ド カンディック 4
3
(72)発明者 ルブーフ, フアブリス
カナダ国, ジェイ9ジェイ 1ジ-1 ケベック, ガティノー, リュー ド モンタニエ 27
(72)発明者 ベル, ジヨン キャメロン
カナダ国, ケ-1ジー 0ケ-8 オンタリオ, オタワ, ノックス クレセント 248

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 国際公開第2010/032764 (WO, A1)
特表2006-517184 (JP, A)
特表2010-503660 (JP, A)
国際公開第2012/106510 (WO, A1)
国際公開第2012/122649 (WO, A1)
国際公開第2011/070440 (WO, A1)
Human Gene Therapy, 2003, Vol.14, pp.1497-1510
Cancer Research, 2007, Vol.67, No.1, pp.227-236
Virology, 2004, Vol.330, pp.24-33
Molecular Therapy, 2010, Vol.18, No.8, pp.1440-1449
Gene Therapy, 2010, Vol.17, No.2, pp.158-170

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12N 7 / 00
C 12N 15 / 00
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
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)
P u b M e d