

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6616319号
(P6616319)

(45) 発行日 令和1年12月4日(2019.12.4)

(24) 登録日 令和1年11月15日(2019.11.15)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/863	(2006.01)
C 12 N 7/01	(2006.01)
A 61 K 35/768	(2015.01)
A 61 P 35/00	(2006.01)
C 12 N	15/863
C 12 N	7/01
A 61 K	35/768
A 61 P	35/00

請求項の数 10 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2016-559868 (P2016-559868)
(86) (22) 出願日	平成27年4月1日(2015.4.1)
(65) 公表番号	特表2017-511136 (P2017-511136A)
(43) 公表日	平成29年4月20日(2017.4.20)
(86) 国際出願番号	PCT/GB2015/051023
(87) 国際公開番号	W02015/150809
(87) 国際公開日	平成27年10月8日(2015.10.8)
審査請求日	平成30年2月21日(2018.2.21)
(31) 優先権主張番号	1405834.1
(32) 優先日	平成26年4月1日(2014.4.1)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英國(GB)

(73) 特許権者	512316611 クイーン マリー ユニバーシティ オブ ロンドン 英國, イー1 4エヌエス ロンドン, マ イル エンド ロード
(74) 代理人	100101281 弁理士 辻永 和徳
(72) 発明者	ワン ヤオビー 英國 イーシー1エム 6ビーキュー ロ ンドン、ジョン バン サイエンス セン ター、グランド フロア、クイーン マ リー ユニバーシティ オブ ロンドン、 バーツ キャンサー インスティテュート 、モレキュラー オンコロジー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】腫瘍崩壊ワクシニアウィルス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

不活性化されたN 1 L 遺伝子を含むT K - 欠乏ワクシニアウィルスであって、異種のポリペプチドをコード化する核酸配列の挿入によってN 1 L 遺伝子が不活性化され、該核酸配列が少なくとも3つのワクシニアウィルスのプロモータを含み、該ワクシニアウィルスのプロモータがL 0 2 4 の完全なリーディングフレームに反対の方向で、同じオリエンテーションに配置される、T K - 欠乏ワクシニアウィルス。

【請求項 2】

m H 5、H 5、P 7 . 5 およびP E / L から成る群からプロモータが選ばれることを特徴とする請求項1に記載のT K - 欠乏ワクシニアウィルス。

10

【請求項 3】

ポリペプチドがサイトカインであることを特徴とする請求項1または2に記載のT K - 欠乏ワクシニアウィルス。

【請求項 4】

G M - C S F、I L - 1 2 およびI L - 2 1 から成る群からポリペプチドが選ばれることを特徴とする請求項3に記載のT K - 欠乏ワクシニアウィルス。

【請求項 5】

癌治療で使用される請求項1から4のいずれか1項記載のT K - 欠乏ワクシニアウィルス。

【請求項 6】

20

TK - 欠乏ワクシニアウィルスを含む組成物であって、ウィルスは不活性化されたN1L遺伝子を含み、該N1L遺伝子は異種のポリペプチドをコードする核酸配列の挿入によって不活性化され、該核酸配列が少なくとも3つのワクシニアウィルスのプロモータを含み、該ワクシニアウィルスのプロモータがL024の完全なリーディングフレームに反対の方向で、同じオリエンテーションに配置される組成物。

【請求項7】

薬学的に受理可能なキャリアーあるいは補形薬をさらに含む請求項6記載の組成物。

【請求項8】

ポリペプチドがGM-CSF、IL-12およびIL-21から成る群から選ばれたサイトカインであることを特徴とする請求項6または7に記載の組成物。

10

【請求項9】

癌治療で使用するための、請求項6から8のいずれか1項記載の組成物。

【請求項10】

癌治療で使用される医薬品の製造における、請求項1から4のいずれか1項記載のワクシニアウィルの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は癌治療に関する。特に、本発明は、癌治療用の腫瘍崩壊のワクシニアウィルスおよびウイルスのベクターに関する。

20

【背景技術】

【0002】

低侵襲性手術、超分割された放射線療法および化学療法剤の新しい組合せの進歩にもかかわらず、多くの固形腫瘍タイプを持った患者の生存率は変わらなかった。腫瘍崩壊ウイルスは伝統的療法に抵抗性の癌の治療用の魅力的な治療学である。腫瘍崩壊ウイルス(oncolytic viruses)は特異的に癌細胞をターゲットとし殺すことができるウイルスである。さらに、腫瘍崩壊ウイルスはさらに宿主自身の抗癌性反応を増加させるのに必要な免疫賦活性の信号を提供することができる。

【0003】

ワクシニアウィルス(vaccinia virus)は、それを腫瘍崩壊の療法に対する魅力的な候補にする多くの特徴を備えた二本鎖DNAウイルスである。それは迅速な複製、腫瘍への効率的な拡散および強い細胞溶解能力を示す。さらに、ワクシニアは広範囲に研究されており、十分に定義された分子生物学と大きなクローニング・キャパシティーを有し、様々な市販される天然または合成のプロモータは、異種の核酸配列を有するベクターとして理想的である。ワクシニアはよく確立された安全性プロフィールを有し、抑制されていない感染の治療法は容易に利用可能である。更に、固形腫瘍で一般に見つかる低酸素性の微環境は、多くのタイプの腫瘍崩壊ウイルスの複製および効能に有害であるが、ワクシニアウィルスには有害ではない。

30

【0004】

例えば、Western Reserve株、Wyeth株、およびLister株のような腫瘍崩壊のワクシニアウィルスのいくつかの菌種が報告されている。これらの菌株の各々の様々な欠損変異株が作成された。McCart et al (Cancer Res. 2001, 61; 8751-8757)は、チミジンキナーゼ(TK)遺伝子およびウイルス成長因子(VGF)遺伝子の欠失を備えたWestern Reserve(WR)株のバージョンについて記述する。これらの欠損変異株は、腫瘍抗原に対する免疫系を効率的にクロスプライミング(cross-priming)することができる。しかしながら、生物分散研究は、ワクシニアウィルス治療に続く不妊と骨髄抑制の見通しを上げて、正常な卵巣の組織での著しいウイルス力価、および骨髄中でのより少ないウイルス力価を実証した。Hung et al (Gene Therapy, 2007, 14; 20-29)は、TK-欠乏ワクシニアLister株について記述する。しかしながら

40

50

ら、この株は、さらに卵巣の腫瘍に加えて正常な卵巣の中で局在化を示した。

【0005】

異種遺伝子の挿入、例えば、ウイルスへのサイトカインをコード化する遺伝子の挿入は免疫反応を促進することができる。しかしながら、サイトカインの挿入は、早いウイルスのクリアランスを通じてウイルス複製の効能を減少させる場合がある。これは、いくつかの免疫修飾遺伝子（IL-2、IL-15、TNFおよびCD40リガンド）を備えるワクシニアで確かに生体内で観察された。

【0006】

腫瘍崩壊ウイルスの分野で得られた進歩にもかかわらず、ワクシニアに基づいた治療薬はまだ市場に出ていない。したがって、癌の治療のためのより有効な腫瘍崩壊のワクシニアの満たされていない必要がある。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

発明の要約

本発明は改善された腫瘍崩壊ワクシニアウイルスを提供する。発明者は、腫瘍組織では、先行技術と比較して、不活性化されたN1L遺伝子を備えたTK-欠乏ワクシニアウイルス株が、高められた選択性および反腫瘍効能を示すを見いだした。本発明はさらにワクシニアウイルス・ベクターを提供する。

【課題を解決するための手段】

20

【0008】

発明の詳細な記述

本発明の最初の態様によれば、少なくとも3つのワクシニアウイルス・プロモータを含む核酸配列であって、該少なくとも3つのプロモータが核酸配列内で同じオリエンテーションに配置されるものが提供される。線形のDNAは2つの可能なオリエンテーション、5'から3'方向と、3'から5'方向を有している。例えば、同じポリヌクレオチド分子/鎖内で第1のプロモータが5'から3'方向に配置され、第2のプロモータも5'から3'方向に配置される場合、2つのプロモータは同じオリエンテーションに配置されている。

【0009】

30

核酸配列は天然、合成、または組み換えたものであることができる。それはたとえばcDNA、PCR産物あるいはゲノムシーケンスであることができる。それは単離されてもよい、あるいはプラスミド、ベクターあるいは宿主細胞の一部であってもよい。プラスミドは、染色体DNAと無関係に複写する能力を備えた環状の細胞質DNA分子である。

【0010】

プラスミドは宿主細胞へ発現カセット（expression cassette）を導入するために使用されてもよい。プラスミドは宿主細胞中にポリペプチドを発現するために使用されてもよい。例えば、バクテリアの宿主細胞はそのポリペプチドを発現するために特定のポリペプチドをコード化することができるプラスミドでトランスフェクトされてもよい。

40

用語は、さらにDNAのより長い部分を格納することができる酵母人工染色体およびバクテリア人工染色体を含んでいる。

【0011】

プロモータは、一つまたは複数の特定の遺伝子の転写を始める特異的配列を備えたDNAの領域である。ワクシニアの中で異種遺伝子の発現に使用されたプロモータは、初期および後期の転写活性をコントロールするプロモータ（例えばmH5、H5、P7.5、PE/L）を含んでいる。異種遺伝子は、本明細書で使用される時、ウイルスで通常見つからない遺伝子である。変性されたH5プロモータ、mH5は、主に初期の活性を持っており、自然発生のH5より大きな安定を示す。好ましくは、少なくとも3つのプロモータはmH5である。

50

【0012】

本発明の好ましい実施態様では、プロモータは、図1に記載されたシーケンスと本質的に一致するヌクレオチド配列を含む。20%を超える同一性(identity)(例えば25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%あるいは99%)を備えた核酸配列は、相同シーケンス(homologous sequence)であると考えられる。本質的に相同であるとは、本明細書で使用される時、少なくとも60%あるいは70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、また最も好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%、99%以上の相同性を示すシーケンスを意味する。本発明の実施態様では、シーケンスは図1に記載されたシーケンスと、少なくとも80%あるいはより多く(例えば85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%など)の相同性を有する。本明細書では、相同(homology)および同一性という用語は交換可能に使用される。
10

【0013】

相同性を決定するシーケンス比較は容易に利用可能なシーケンス比較ソフトウェアを使用して行なうことができる。非制限的例として、BLAST(Ausubel et al., 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed - Chapter 18を参照)、およびFASTA(Altenschul et al., 1990 J. Mol. Biol. 403 - 410)が挙げられる。BLASTとFASTAの両方はオフラインでまたオンラインサーチに利用可能である(Ausubel et al., 1999, Short Protocols in Molecular Biology, 7 - 58から7 - 60ページを参照)。
20

【0014】

最初の態様の実施態様では、核酸配列はベクターの中にある。本明細書で使用される時、ベクターは、発現または複製のために細胞あるいはウイルスへ核酸配列を導入するための構成物を指す。それは組み換えの構成物、例えばプラスミド、ウイルス、あるいは細胞またはウイルスの中へ導入した際に核酸配列を発現または複製する事ができる他の任意の構成物を指す。

【0015】

最初の態様の核酸配列は発現カセットの一部であることができる。発現カセットはベクターの一部である。それはプロモータ、オープン・リーディング・フレームおよび3'の翻訳されていない領域を含む。
30

【0016】

本発明の1つの実施態様では、ワクシニアウィルス・ベクターは、図2に記載されたシーケンスと、少なくとも80%あるいはより多く(例えば85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%など)の相同性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0017】

本発明の別の実施態様では、核酸配列は異種のポリペプチドをコードする。本明細書で使用されるポリペプチドは、ペプチド結合によって連結された複数のアミノ酸残基を指す。タンパク質、ペプチド、オリゴペプチドの用語は交換可能に使用され、糖タンパク質とその誘導体を含んでいる。用語「ポリペプチド」も、オリジナルのポリペプチドと同じ生体機能あるいは活性を保持するポリペプチドのアナログおよび誘導体を包含するように意図される。
40

【0018】

本明細書で使用される異種のポリペプチドは、自然界においてウイルスによって通常発現されないあらゆるポリペプチドを指す。異種のポリペプチドは生物学上活性になりえる。本明細書で使用される生物学上活性なポリペプチドは、生体機能または活性を有しているポリペプチドを指す。

【0019】

本発明の実施態様では、生物学上活性なポリペプチドは治療薬である。治療薬ポリペプ
50

チドは、治療での使用のために開発されているポリペプチドである。治療薬ポリペプチドの非制限的例としては、サイトカイン、ケモキネスおよび成長因子が挙げられる。

【0020】

サイトカインは、免疫修飾剤、たとえばインターロイキン（例えばIL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、IL-34、IL-35およびIL-36）、インターフェロン（INF-、INF-、INF-、およびINF-）、腫瘍壞死要因（TNF）、および/または顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）であることができる。

【0021】

本発明の実施態様では、ポリペプチドはインターロイキンである。本発明の好ましい実施態様では、ポリペプチドはIL-12である。IL-12は、任意の動物、例えば人間（hIL-12）、マウス（mIL-12）、馬、雌牛、豚などに由来してもよい。それは天然、あるいは組み換えることができる。好ましくは、ヌクレオチド配列コード化IL-12は、全長IL-12遺伝子である。他の実施態様では、ヌクレオチド配列は、全長遺伝子の30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%あるいは99%をコード化する。本発明の別の実施態様では、ポリペプチドはGM-CSFであるか、またはポリペプチドはIL-21であることができる。上に記述されるIL-12を指すすべての特徴は、GM-CSFおよびIL-21に準用して当てはまるものとする。

【0022】

IL-12への言及は、IL-12A（例えば、GenBank Accession no. AF404773.1 GI:15128214）および/またはIL-12B（例えば、GenBank Accession no. AY008847.1 GI:11192034）を含んでいる。成熟したIL-12タンパク質は両方のサブユニットを含んでいる。IL-21への言及は、アイソフォーム1（例えば、GenBank Accession no. NP_068575.1 GI:11141875）および/またはアイソフォーム2（GenBank Accession no. NP_001193935.1 GI:333033767）を含んでいる。GM-CSFへの言及は、GenBank Accession no. AF373868.2 GI:14278709を含んでいる。一般に、シーケンスは人間のシーケンスである。

【0023】

異種のポリペプチドはさらにリポーター・ポリペプチドであることができる。本明細書で使用されるリポーター・ポリペプチドは、その発現が宿主細胞またはウイルス中の核酸配列、発現力セットあるいはベクターの存在を示すポリペプチドを指す。リポーター・ポリペプチドの非制限的例としては、蛍光性ポリペプチド、化学発光ポリペプチド、生物発光ポリペプチド、燐光性ポリペプチド、および酵素が挙げられる。

【0024】

本発明の実施態様では、リポーター・ポリペプチドは蛍光性ポリペプチドである。蛍光性ポリペプチドの非制限的例としては、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光蛋白質、黄色蛍光蛋白質、シアン蛍光蛋白質およびそれらの誘導体が挙げられる。

【0025】

制限部位は制限酵素によって認識され開裂される特定のヌクレオチド配列である。制限酵素の例は、SalI、BglII、HindIII、SmaI、BamHIおよびMluIである。BamHI制限部位はBamHIによって認識される制限部位である。他の酵素用の制限部位も同様に指定される。

【0026】

10

20

30

40

50

本発明の実施態様では、核酸配列またはベクターは1つ以上の制限部位を含む。本発明の好ましい実施態様は、Sal I、Bgl II、Hind III、Sma I、Bam HIおよびMlu I制限部位を含む核酸配列またはベクターである。

【0027】

本発明の実施態様では、核酸配列またはベクターはワクシニアウィルス内に含まれる。本発明の特定の実施態様では、核酸配列は図3に示される配列を有する。

【0028】

ワクシニアは、宿主免疫系を回避するために多くの戦略を発展させた。例えば、ウイルスは、宿主の抗ウイルス性反応に関するサイトカインおよびケモキネスを阻害する多くのタンパク質を分泌する。そのような1つのタンパク質は、NF-kB活性化と同様に感染細胞のアポトーシスを禁じると考えられるN1遺伝子産物(N1L)である。NF-kBは、ウイルスのクリアランスに関する多くのサイトカインの生産をコントロールする転写因子である。N1L遺伝子欠失はNF-kB、たとえばIL1、TNFおよびIFN/によってコントロールされた炎症促進性の抗ウイルス性サイトカインの増加に結びつくと示された。N1Lもナチュラルキラー(NK)細胞応答を調整することが示された。ナチュラルキラー細胞は一般にウィルス感染への宿主側防御の最初のラインである。N1Lの欠失は増加したナチュラルキラー細胞のローカルの活動を引き起こすことが示された。これらの発見と一致して、Bartlett et al (J General Virology, 2002, 83: 1965-1976)は、野生型のVV株と比較して、N1L-欠乏のWestern Reserveワクシニア株が、宿主免疫反応によってより急速に取り除かれることを示した。本明細書で使用されるように、免疫反応は、異物に対する免疫系の反応を意味する。

【0029】

本発明の第2の態様では、核酸配列がN1L遺伝子に挿入された、ワクシニアウィルスまたは第1の態様のベクターが提供される。

【0030】

標的配列の中への核酸配列の挿入は当業者に公知の方法によって行うことができる。例えば、その方法は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, by J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis (2003), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Virology Methods Manual, edited by Brian W J Mahy and Hillar O Kangro (1996) Academic Press and Expression of genes by Vaccinia virus vectorsに述べられている。分子生物学の現在のプロトコルは、Molecular Biology, published by John Wiley and Son (1998), Chapter 16に述べられている。

【0031】

本発明の実施態様では、核酸配列は相同組換え(homologous recombination)によってN1L遺伝子に挿入される。

【0032】

本発明の第3の態様では、不活性化されたN1L遺伝子を含むTK-欠乏ワクシニアウィルスが提供される。

【0033】

人間と動物に対してレベルの変わる毒性を備えた多数のワクシニアの菌株がある。ウイルスの多くの菌種は1950年代に天然痘根絶プログラムの一部として世界中で使用された。異なる菌株が世界の異なるエリアで使用された。たとえばニューヨーク市衛生局(NYCBOH)株およびその誘導体(Wyeth)は米国でポピュラーだった。一方、Copenhagen(CPN)およびLister菌株はヨーロッパにおいて優勢だった。第3の態様の好ましい実施態様では、ワクシニア株はListerである。

【0034】

本明細書で使用されるTK-欠乏ワクシニアウィルスは、内因的なチミジンキナーゼ(TK)の不足と一致する表現型を示すワクシニアウィルスを指す。TK-欠乏ワクシニアウィルスは宿主細胞によって生産されたチミジンキナーゼに依存する。チミジンキナーゼは、正常細胞中ではなく腫瘍細胞の中で本質的に生産される。したがって、TK-欠乏ワクシニアウィルスは、特にEGFR/Ras/ERK経路の活性化と共に、腫瘍細胞の中で選択的に生存することができる。宿主細胞はウイルスが感染できるあらゆる細胞である。

【0035】

本発明の実施態様では、TK-欠乏ワクシニアウィルスは不活性化されたN1L遺伝子を含む。本明細書に記載された不活性化とは、核酸配列の挿入あるいはウイルスを完全に機能遺伝子生成物を作成することができなくする他の方法により、転写またはカポスト転写レベル、遺伝子の欠失、遺伝子中の突然変異、遺伝子の崩壊のレベルで遺伝子を沈黙させることをいう。遺伝子の不活性化は部分的あるいは完全であることができる。本発明の実施態様では、N1Lの不活性化は、核酸配列の挿入による。その挿入は相同組換えによって促進することができる。

10

【0036】

挿入された核酸配列は、ベクターまたは発現カセットに含まれることができる。本発明の実施態様では、核酸配列は異種のポリペプチドをコードする。異種のポリペプチドは生物学上活性になることができる。本発明の実施態様では、生物学上活性なポリペプチドは治療薬である。

20

【0037】

本発明の実施態様では、核酸配列はRNAi誘発剤、RNAi作用薬、siRNA、shRNA、miRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、触媒DNAおよびその他同種のものをコードする。別の実施態様では、核酸配列は放射線および/または化学療法感作物質をコードする。

【0038】

第4の態様では、本発明は、本発明の第3の態様によるTK-欠乏ワクシニアウィルスを含む組成物を提供する。第4の態様による本発明の実施態様では、組成物は任意に薬学的に受理可能なキャリアー、希釈剤あるいは補形薬を含む。

30

【0039】

組成物は、たとえば経口(バッカルまたは舌下腺を含む)、局所的(舌下、経皮的またはバッカルを含む)、非経口投与(皮下、筋肉内、静脈内、動脈内、包膜内、胸膜内、眼科的、心臓内、腹腔内、皮内)などの任意の適切なルートにより適用することができる。

【0040】

非経口投与に適した医薬品組成物は、水性・非水性の無菌の注入溶液を包含し、酸化防止剤、バッファー、静菌剤および配合物が患者の血液と本質的に等張にする溶質を含むことができる。また水性・非水性の無菌の懸濁液は沈澱防止剤と粘稠化剤を含むことができる。

【0041】

40

注入剤に使用されてもよい添加剤としては、例えば水、アルコール、多価アルコール、グリセリンおよび植物油が挙げられる。組成物は、ユニット投与量あるいは複数投与量容器、例えば密封したアンプル、ガラス瓶中に存在し、凍結乾燥された状態で貯蔵され、例えば使用の直前に、注入のために水などの無菌の液体の追加だけを要求するようにすることができる。注入溶液および懸濁液は無菌の散剤、顆粒およびタブレットから調製されていてもよい。

【0042】

医薬品組成物は保存剤、可溶性化剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、甘味料、着色剤、香料、塩類(本発明の物質はそれら自身薬学的に受理可能な塩の形で提供されてもよい)、バッファー、コーティング剤または酸化防止剤を含むことができる。さらに、それらは本発

50

明の物質に加えて治療上活性な作用薬を含んでもよい。

【0043】

第5の態様では、本発明は、被検者に異種のポリペプチドをコードするベクターまたは核酸配列を含む治療上有効な量のTK-欠乏ワクシニアウィルスであって、不活性化されたN1L遺伝子をさらに含むウィルスを投与することを含む、癌を治療する方法を提供する。

【0044】

本明細書で使用される時、被検者は人間を含む動物を意味する。動物としては、ハツカネズミ、ネズミ、家禽、たとえば鶏、反芻動物、たとえば雌牛、ヤギ、鹿、羊および他の動物、たとえばブタ、猫、犬および靈長類、たとえば人間、チンパンジー、ゴリラおよび猿を含む。

10

【0045】

治療上有効な量は、腫瘍崩壊を引き起こすのに十分な量である。デリバリーと適用のための投与量は経験的に決定されて、家畜病モデルあるいは人間の臨床試験の結果を使用して、現在の既存のプロトコルに基づいて決定することができる。例えば、最初の研究投与量はマウスの動物研究に基づくことができる。投与量は治療が予防的か治療かどうか、タイプ、発症しているか否か、進行度、厳しさ、頻度、期間、あるいはその病気の進行の可能性、希望の臨床の終了点、前の治療あるいは同時の治療、健康状態、年齢、ジェンダー、被検者の人種あるいは免疫学的能力、および他の要因に応じて変わる場合があり、それは当業者によって評価されるだろう。任意の悪い副作用、合併症あるいは治療または療法、および被検者のステータスの他の危険要因に応じて、投与量、数、度数あるいは期間は比例して増加されるか低減されることができる。当業者は、治療または予防的な利点を提供するために十分な量を提供するのに必要な量およびタイミングに影響を及ぼす要因を理解するだろう。

20

【0046】

第5の態様の実施態様では、本発明の方法は被検者に補足の癌治療を適用することをさらに含む。本明細書で使用される癌治療は、任意の医学または物理的手段での癌の治療をいう。補足の癌治療は、化学療法、生物学的療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法、反血管療法、寒冷療法、毒素療法および/または外科、およびその組み合わせを含む。

30

【0047】

本明細書で開示される本発明の方法および使用は、被検者に治療すべき疾病が発見されて直ちに、または数日、数か月あるいは数年の後に行うことができる。

【0048】

本発明の方法は異なるスケジュールでウィルスを適用することを含んでいる。ウィルスの1回量は、1、2、5、10、15、20、あるいは24時間の期間にわたって、被検者あるいは腫瘍に適用されてもよい。ウィルスは、1、2、3、4、5、6あるいは7日以上あるいは数週間適用されてもよい。注射剤の間隔は、1、2、3、4、5、6、7日あるいは数週でありえる。典型的には、複数回投与は、腫瘍の近くに、あるいは静脈内投与の場合では被検者の血流またはリンパ系中の特定の注入口から、一般的な標的部位に適用される。ワクシニアウィルス・ベクターは、2、3、4あるいは5回以上適用されてもよい。異なるスケジュールおよび投与量で腫瘍の切除の前にワクシニアウィルス・ベクターを与えることができる。

40

【0049】

方法は異なるウイルスの濃度でウイルスを適用することを含んでいる。ある態様では、被検者、少なくとも 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 、 5×10^{11} 、 1×10^{12} あるいはより多くのウイルス粒子または、plaques形成単位(pfu)で処理され、この間の様々な値も採用できる。ウイルスの投与量は0.1mL、1mL、2mL、3mL、4mL、5mL、6mL、7mL、8mL、9mLあるいは10mL以上であり、この間の様々な値も採用できる。投与は連続的に、あるいは個別の注入によってもよ

50

い。

【0050】

ある実施態様では、被検者は癌および/または腫瘍を持った人間である。癌は、消化器癌、呼吸器官癌、尿生殖路癌、造血器癌、肉腫、腺癌、扁平上皮癌あるいは悪性ではない腫瘍/過形成であることができる。腫瘍は治療前には切除不可能で、治療の後に切除可能かもしれない。腫瘍は、再発性、原発性、転移のおよび/または多重薬耐性の腫瘍であることができる。ある態様では、腫瘍は臍臓の上、あるいは臍臓内にある。他の態様では、腫瘍は、神経内分泌腫瘍、内分泌腺腫瘍、辺縁中枢神経系腫瘍、脳腫瘍腫物、頭頸部癌腫物、食道癌腫瘍、皮膚癌腫瘍、肺癌腫瘍、肝腫瘍、胸腺腫瘍、胃癌腫瘍、結腸癌腫瘍、卵巣癌腫瘍、子宮癌腫瘍、膀胱癌腫瘍、精巣癌腫瘍、膀胱腫瘍、直腸癌腫瘍、黒色腫あるいは乳癌腫瘍であることができる。本発明中で開示した組成物と方法は、異なるタイプの遺伝子療法、例えばがん抑制遺伝子療法、自殺遺伝子療法、ウイルス・ベクター免疫戦略、抗血管新生療法、プロ-アポトーシス遺伝子療法、遺伝子組み換え療法の中で使用されてもよい。"Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Overcoming the Obstacles" (Wong et al. Viruses 2010, 2, 78-106))はその全体が参照され本明細書に組み入れられる。

【0051】

本発明中で開示した組成物と方法は、癌の治療、例えば外科、化学療法、放射線治療、分子癌治療、さらなる遺伝子療法の中で追加の治療の手段あるいは方法と組み合わされて使用されてもよい。それは、本発明の本明細書に記述された核酸とは異なる遺伝子を適用するために使用されてもよい。第2およびそれ以降の好ましい態様は、第1の態様に準ずるものである。

【発明を実施するための形態】

【0052】

細胞株：

使用される腫瘍細胞株はすべて、発明者の研究所、ATCCまたは癌研究英国細胞株サービスユニットのいずれか、あるいは共同研究者の研究所に貯蔵されている。ヒト癌細胞株はすべてSTR分析によって遺伝子型が決定された。この研究の中で使用されるネズミ科の腫瘍細胞株は次のものを含んでいる：CMT93(結腸直腸)、LLC(ルイス肺癌)およびB16-F10(転移性黒色腫)が、C57BL/6株に由来する一方、結腸直腸癌細胞株CT26はBALB/c株に由来した。SCC7はC3H/Henハツカネズミからの頭頸部癌を派生した扁平上皮癌で、Dr Osam Mazda (Department of Microbiology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Japan)によって寄贈された。MOSCはネズミ科の卵巣癌細胞株である。Panc02は化学的に引き起こされたネズミ科の臍癌細胞株である；DT6606(臍癌)は、K-Rasでコンディショニングされた臍臓の中の突然変異を有するC57BL/6株トランスジェニックマウスに由来する。これは、David Tuveson (CRUK, Cambridge Research Institute, Cambridge, UK)教授の親切な贈り物だった。さらに、我々のグループは、若いオバルブミン遺伝子(DT6606-ova)を含むプラスミドを備えたDT6606細胞株を安定してトランスフェクトした。最後に、CV1はATCC、VA、アメリカから得られたアフリカ緑ザルの「正常な」腎臓細胞株であり、ウイルスの滴定分析およびウイルスの大量製造を促進するために在庫の細胞株として使用された。本発明の中で使用されるヒト癌細胞株は次のものを含んでいる：人間の臍癌細胞株SUIT-2、MIAPACA2、PANC1、PT-45およびCapan-2；人間の結腸直腸癌細胞株HT29、HCT116およびSW620、胃の腺癌MKN45および人間の卵巣癌細胞株A2780。

【0053】

ウイルス：

10

20

30

40

50

VVL15は、Timiryasova TM et al. Biotechniques. 2001; 31: 534, 6, 8-40に記載されている、生体外の細胞内の組換え技術をそれぞれ使用して、合成初期/後期とp7.5プロモータの管理の下で、ワクシニアウィルスのLister株のTK領域の中へのlacZリポーターおよびホタルルシフェラーゼ遺伝子の挿入によって構築された。VVL15はTK-欠乏である。

【0054】

WRLuc、TK欠失およびWRDD、ダブル欠失(TKとVGF)ウイルスは、Steve Thorne博士(University of Pittsburgh, USA)およびA. McCourt博士(University of Toronto, Canada)によりそれぞれ提供された。

10

【0055】

多量のウイルスの生産：

原性のウイルスのエクスパンジョンは、急速に2度凍結融解され、CV1細胞(80-90%のコンフリュエンス)を含むフラスコに、36-40のT175を感染させるのに必要な、5%のFCS CMの必要な体積へ薄められた。48時間後に、感染されたCV1細胞を収穫し、そして5分(4)間、2,000毎分回転数の速度で遠心分離を繰り返し、単一のペレットに集められた。ペレットはPBSの中で洗われ、10mMのトリス-HCl(pH9)バッファーの12mlに懸濁され、後日の浄化のために-80で貯蔵された。

【0056】

20

ウイルスの浄化：

上記で得られた濃縮ウイルスの溶解物懸濁液は2度凍結融解され、ダウンス型ホモジナイザー(Thermofisher)に移され、60ストロークで均質化された。その後、それは30秒間超音波処理に供された。5分間4で2,000毎分回転数での遠心分離に続いて、上澄み(リリースされたビリオン粒子状物質を含む)は集められ、10mMトリス-HClバッファーで30mlの全容積に薄められた。その溶液は4つのアリコートに分割された；それぞれは、36mlのBeckman超遠心分離機チューブ中の36%グルコース溶液の17mlの上に優しく層にされ、4で80分間13,500毎分回転数で遠心分離機にかけられた。結果として生じるペレット剤は、10mMトリス-HClの中に合計16mlまで再懸濁され、再び4つに分割され、各チューブの表面近傍で25%w/mから底部で40%に勾配形成され、4つのグルコース勾配上に注意深く層にされた。第2ラウンドの超遠心分離が行なわれた。これはハツカネズミへ静脈内に投与された時それは有毒になりえる微粒子の細胞残屑を削除するのに必要である。最終ペレット剤は、ウイルスの再懸濁液バッファー(PBS; 10%グリセロール; 138mM NaCl; pH7.4)の1-4ml中に再懸濁された。清浄化されたウイルスのサンプルは下記に述べられるようにTCID50分析によって滴定された。

30

【0057】

ウイルス複製：

細胞は2~4×10⁵細胞/ウェルでシードされ、成長速度によって、10%FCSを有するミディアム中の6-ウェルプレートの3つのウェルに、1PFU/細胞のワクシニアウィルスを16-18時間後に感染させた。サンプルは、72時間まで24時間の間隔で3回繰り返して収穫された。

40

ウイルス複製は、Wang et al (J Clin Invest, 2009, 119: 1604-1615)に述べられているようにTCID50(50%組織培養感染量)によって測定された。

【0058】

統計分析：

もし、言及されない場合には、Graphpad Prism 5が相対的な統計分析に使用された。2重の条件比較はアンペアードスチュードントt検定を使用してなされた。1つを超える条件、あるいは補足変数、たとえば時間については、1あるいは2ウェイ分散

50

分析(ANOVA)がそれぞれ行なわれた。ポストホックテスト(1ウエイ分散分析用のNewman-Keulsおよび2ウエイ分散分析用のBonferroni)は、実験内の特定の組の条件を比較した。生存データは、ログランクのKaplan-Meierプロットとして示され、グループ間のすべての違いも統計的に有意だったか否かを示した。

【0059】

本発明は、以下の例を参照して背誂めてされるが、これらは例示の目的のみで示され、本発明を限定するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図1】図1は、変性されたワクシニア・プロモータmH5のシーケンスを示す。

【図2】図2は、3つのmH5プロモータを含む発現カセットのシーケンスを示す。

【図3】図3は、本発明の核酸配列を含むベクターの構成を示す。

【図4】図4は、VV L15 N1 Lベクターおよび、新しいVV L15 N1 Lベクターを作成するために使用されるN1 L pShuttleプラスミドを示す。ベクターは示されたように命名される。長い水平の棒は、VV、L024、N1 L(L025)、L026の二本鎖DNAゲノムを表し、TKは転写単位を指す。

【図5】図5は、VV L15 N1 Lベクターの中でのN1 L欠失の確認を示す。

【図6】図6は、腫瘍組織(図6a)およびオフサイト位置(図6bおよび6c)でのVV L15とVV L15 N1 Lのベクターの生物学的分布を示す。

【図7】図7は、異なる細胞株の中でのVV L15 N1 Lの複製を示す。左側のグラフは、VV L15 - N1 L(破線)とVV L15(実線)の複製カーブの比較を表わす;右側のグラフは、VV L15 - N1 L(破線)とVV L15 - RFP(実線)に関する。

【図8】図8は、VV L15 - RFPの異なる細胞株(黒)に対するVV L15 N1 L(ハッシュ)の細胞毒性の潜在能を示す。

【図9】図9は、mIL-12あるいはmGM-CSFアームドVV L15 N1 LとVV L15 N1 L(VV L15 N1 L armed with mIL-12 or mGM-CSF.)の細胞毒性の潜在能を示す。

【図10】図10は、成長が阻止されたSCC7細胞(図10a)、および加熱不活性化したVV L15(図10b)と共に培養され、VV L15、VV L15 N1 LあるいはPBSで処理された脾細胞中のIFN- 生産を示す。

【図11】図11は、DT6606-ova細胞(図11a)、オバルブミン抗原(図11b)およびB8Rペプチド(図11c)と共に培養され、VV L15、VV L15 N1 LあるいはPBSで処理された脾細胞中のIFN- 生産を示す。

【図12】図12は、成長が阻止されたLLC細胞(図12a)およびB8Rペプチド(図12b)と共に培養され、VV L15、VV L15 N1 LあるいはPBSで処理された脾細胞中のIFN- 生産を示す。

【図13】図13は、膵臓癌マウス・モデル中のVV L15 N1 Lの効能、DT6606(図13a)およびCMT-93(図13c)の、VV L15、VV L15 N1 LあるいはPBSによる処理の後の腫瘍成長速度、およびDT6606(図13b)およびCMT-93(図13d)の、VV L15、VV L15 N1 LあるいはPBSによる処理の後の脇腹腫瘍モデル(flank tumour models)の生存率を示す。

【図14】図14は、同所性の肺癌マウス・モデルの中でのVV L15 N1 Lの効能を示す。図14aは、PBS処理されたハツカネズミの個々の重量プロフィールを示す。図14bは、時間の関数として各グループ中のハツカネズミの平均重量を示す。図14cおよび14dは、対応するKaplan-Meier生存曲線および平均生存プロットをそれぞれ示す。

【図15】図15は、VV L15 RFP、VV L15 N1 LあるいはPBSのIT適用に続くLLC腫瘍モデル中の腫瘍体積(図15a)、および犠牲の各治療グループ中の転移(図15b)を示す。

10

20

30

40

50

【図16】図16は、VV L 15 N 1 L、VV L 15 N 1 L - m I L - 12、VV L 15 N 1 L - m G M - C S FあるいはP B Sによる処理の後のD T 6 6 0 6 脳腹モデル中の腫瘍増殖(図16a)、および対応するK a p l a n M e i r 生存曲線(図16b)を示す。

【図17】図17は、WアームドI L - 21の生体外での評価を示す。

【図18】図18は、VV - T k N 1 L - m I L - 21、VV - T k N 1 L - h I L - 21およびコントロール・ウイルスVV - T k N 1 Lの反腫瘍効能を示す。

【図19】図19は、ヒトのI L - 12 A、I L - 12 B、I L - 21アイソフォーム1、I L - 21アイソフォーム2およびG M - C S Fのシーケンスを示す。

【実施例】

10

【0061】

実施例

例1：p U C 19 - N 1 L シャトルベクターの構築

発明者は、L 1024とL 025の31bp(左アーム)を含むフラグメント、およびL 026とL 025の22bp(右アーム)を含むフラグメントによりフランクされた特定の発現力セットを含む図3に示されたp U C 19 - N 1 L シャトルベクターを構築した。発現力セットは次の特徴を有する：

(1) 3つのワクシニアウィルスm H 5 プロモータがある。また、各プロモータには、任意の興味のある遺伝子の容易な挿入のためのクローニング制限酵素サイトがある；

(2) レポーター遺伝子R F Pは組換えウイルスの正の淘汰のために1つのm H 5 プロモータによって進行される；

(3) m H 5 プロモータは、左から右に挿入された遺伝子の発現のみを進行する。

本発明の中で使用される相同組換え戦略は、L 025(N 1 L)座のコード配列の全体をほとんど交換することを目指した。

L 024 / 25とL 025 / 26の交点の配列分析は、L 025のO R F s 上流(22bp)および下流(31bp)が完全なままであることを確認した。

【0062】

20

m - G M - C S F、h - G M - C S F、m - I L 12 およびh - I L 12 のc D N Aは、標準技法を使用してベクター内にクローンされ、p U C 19 スーパーシャトルベクターを合成するために適切な制限酵素を使用して、m H 5 プロモータの制御の下で発現された。

30

【0063】

例2：VV L 15 N 1 L の構築

図4は、発明者によって作成されたワクシニアウィルス・L i s t e r 株および様々なワクシニアウィルス構成物を表す。p U C 19 スーパーシャトルベクターはそれぞれ、VV L 15(1個の細胞当たり0.1 P F U)にあらかじめ感染した(2時間早く)C V 1 細胞へ(E f f e c t e n e - b a s e d プロトコル-Q i a g e n を使用して)トランスフェクトされ。48時間後に、蛍光顕微鏡の下の、細胞質のプラスミドあるいは相同組換えが成功した比較的わずかのウイルスからの赤い蛍光の存在により、適切なカセットの発現を確認した。これらの後者は以下のように選択された。細胞と上澄みは皿から細胞をこすり落とし、2度凍結融解されることにより収穫された。この溶解物の1μlは、80-90%のコンフルエンスに成長したC V 1 細胞を有する6つのウェルプレートのすべてに感染させるために使用された。この低いウイルス負荷は、よく分離されたブラークの発生を保証するだろう。

40

【0064】

さらに48時間の後、各々のウエルは、赤く蛍光を発するウイルスにより引き起こされたブラークを探索するため蛍光顕微鏡の下で注意深く観察された。陽性のコロニーの同定に際して、それらの位置はマジックインキで、プレートの下表面にマークされた。コロニーは、ウェルからミディアムを真空除去した後に、5μlの5% F C S C Mで満たされた、20μlのチップで注意深く取られた。その後、チップは、5%のF C S C Mの

50

250 μ l を含むクライオチューブの中に沈められた。さらに凍結融解され、このウイルス溶液の 5 - 20 μ l が、CV 1 細胞を含む新たに 6 ウエルプレートの各ウエルに前記のように加えられた。すべてのブラークが赤色の蛍光を発するまで、このプロセスは繰り返された。つまり、すべてのウイルスのコロニーは組み替えウイルスによった。一般に、純粋な一組の組み替えウイルスを得るために、ブラーク浄化の 4 - 8 回が必要だった。このポイントでは、ウイルスの溶解物はこすり取られて収穫された。また、ウイルス DNA は、カラム・ベースのシステム (つまり Q i a g e n からの B l o o d M i n i K i t) によって抽出された。上澄みのサンプルも E L I S A によって適切なサイトカインの存在に関してテストされた。ウイルスの清浄化は、抽出されたウイルス DNA からの N 1 L 遺伝子の P C R 増幅によって確認された。その存在は、親のウイルス、V V L 15 による汚染を示すだろう。 10

【 0 0 6 5 】

一旦予備調査が適切な遺伝子組み換えを発現する純粋な組み替えウイルスの生成を確認したならば、ウイルス溶解物の 50 μ l は CV 1 細胞を含む T 175 フラスコに加えられ、5% F C S C M のおよそ 30 m l 中で 80 - 90% のコンフルエンスに再び成長する細胞とメディアは 48 時間後にこすり取られて収穫され、「原性のウイルスのエクスパンジョン (p r i m a r y v i r a l e x p a n s i o n) 」として維持された。

例 3 : 組み換えの V V L s の中の N 1 L の欠失の確認 :

N 1 L 遺伝子はすべての新規な V V L 組み換え個体の中で削除された (図 5 a)。センスおよびアンチセンス N 1 L 遺伝子プライマーは、感染した CV 1 細胞から抽出された P C R ウィルス DNA を介して増幅するために使用された。V V L 15 ウィルスだけがこの遺伝子を含んでいた。プライマー対にわたるセグメントを含む N 1 L 遺伝子が、およそ 750 b p にわたると予想された。A 5 2 R 遺伝子はすべての V V L 組み換え個体の中にあった。センスおよびアンチセンス A 5 2 R 遺伝子プライマーは、感染した CV 1 細胞から抽出された DNA からのこの座を P C R 増幅に使用された。プライマー対にわたる A 5 2 R 遺伝子セグメントがおよそ 880 b p にわたると予想された (図 5 b)。 20

【 0 0 6 6 】

例 4 : N 1 L 遺伝子欠損組み換え V V L s からの遺伝子組み換え発現の確認 :

各遺伝子組み換えアームド組み替えウイルス (t r a n s g e n e - a r m e d r e c o m b i n a n t v i r u s) の最終のブラーク浄化ラウンドからの上澄みのサンプルは、メーカーのプロトコル (e b i o s c i e n c e, B i o l e g e n d) に従って、適切なサイトカインに特有の E L I S A キットを使用して分析された。腫瘍細胞感染の際に適切な組み替えウイルスによってサイトカイン遺伝子組み換えが発現したかどうか評価するために、上記のウイルス複製分析に述べられているものと同じ実験がセット・アップされた。ウイルス感染の後 24、48 および 72 時間で、上澄みはウェルの個々の複製のセットから集められた。また、サイトカインの濃度はメーカーの指示にしたがって E L I S A によって決定された。対照試料は V V L 15 - N 1 L 感染したウェルから集められた上澄みだった。 30

【 0 0 6 7 】

例 5 : V V L 15 N 1 L ベクターのウイルスの生物学的分布の事前評価

血清を含まない D M E M の 100 μ l の中の 2×10^6 C T 26 細胞が、7 週齢の雌の B A L B / c ハツカネズミの剃毛された右わき腹へ皮下注射された。腫瘍がおよそ 100 mm³ の時、それらは 2 つのグループへ無作為に分けられた。V V L 15 あるいは V V L 15 - N 1 L のいずれかの 1×10^8 P F U の I V 投与量は、尾静脈に注射された。ウイルス注射の 1、3、7 および 10 日後に、CO₂ 吸入によって各グループからの 3 匹のハツカネズミを殺した。血液はあらかじめヘパリン処理された 1.5 m l のエッペンドルフチューブの中へ、心臓の穴あけによって集められた。収穫された腫瘍、脳、肺、肝臓、ひ臓、腎臓および卵巣は、冷やされた (-80 に) イソベンタンに浮かぶベトリ皿上で直ちにスナップ凝固 (s n a p - f r o z e n) された。融解された日の後に、それらは血清非含有 D M E M の中に計量され、均質化された (あるいは血液の場合には攪拌され 40

た）。サンプルは、1 mg当たり5 μ l（あるいは血液の1 μ l当たり5 μ l）で薄められた。さらなる凍結融解サイクルに続き、組織ホモジエネートは、T C I D 5 0 分析を使用して、生存ウイルス P F Uについて滴定された。生物学的分布実験は、I V - デリバードウイルスが腫瘍に播種されたか否かを決定し、オフターゲット複製（off-target replication）の決定（つまり腫瘍選択性およびしたがって安全性の程度の決定）をするために行われた。C T 2 6 の皮下のひ腹モデルは方法セクションに述べられているようにして、このセクションのために利用された。尾静脈注入に続いて、注入の後少なくとも10日まで、腫瘍組織から両方のウイルスを回収した。ピーク・タイマーは3～7日である。予想外に、V V L 1 5 N 1 Lのウイルスの回収はV V L 1 5 と比較して、腫瘍組織で低減されなかった（図6a）。

10

【0068】

オフ・ターゲット複製に関して、肺組織を例外として、ウイルスは注射後の24時間以内の他の器官あるいは血液から回収されなかった。24時間の後に、V V L 1 5 - N 1 Lのウイルスの回収は、肝臓およびひ臓組織からのV V L 1 5 より著しく少なく、腎臓組織には完全に不在だった。どちらのウイルスも、この実験中の任意の時間ポイントで脳、心臓、卵巣あるいは循環器から検知できるレベルでは検出されなかった（図6b）。対照的に、ウイルスは少なくとも3日まで肺で存在し続けた。この器官でさえ、V V L 1 5 - N 1 Lの回収は、V V L 1 5 と比較して著しく少なかった。したがって、新規のバックボーンV V L 1 5 N 1 Lは、V V L 1 5 より腫瘍組織についてさらに大きな選択性を持つよう見えた。

20

【0069】

例6：異なる細胞株中のV V L 1 5 N 1 Lの複製

腫瘍細胞がワクシニアウイルスによって殺すことができる多数の機構がある。これらは、生得の宿主側防御機構により引き起こされた、アポトーシス、ウイルスを媒介とした細胞のバーストからの死、免疫的生体防御反応を含む。ウイルスが細胞へ過度に細胞毒性の場合、それは腫瘍の全体にわたって自分で繁殖するのに十分な後代を生成しないかもしれない。更に、ウイルスのより多くのコピーが存在するので、模写するその能力がその治療の遺伝子組み換えの発現と関連すると予想されることがある。

【0070】

細胞株はすべてV V L 1 5 とV V L 1 5 N 1 Lによる感染に寛大だった。最も寛大な腫瘍細胞株はS C C 7 だった。1 P F U / 細胞で最初に感染された3日後に、1,000 P F U / 細胞以上のウイルス力価に帰着した。この結果は、S C C 7 が最も強い耐性細胞株だった細胞毒性分析（M T S）の結果と対照をなす。複製に最も寛大でない細胞株はC M T 9 3 だった。ウイルス力価はC M T 9 3 とD T 6 6 0 6 の細胞株中では3日目までに安定水準に達した。これは、非感染細胞（有效地に細胞に感染させるビリオンを備えた）の複製と比較したウイルス複製のアウトパフォーマンスを反映するだろう；これは溶解された細胞から放されたプロテアーゼからの可能なウイルスの低下と結び付けられる。V V L 1 5 N 1 Lの複製の統計的に著しい減衰はC M T - 9 3 でのみ見られた（図7）。

30

【0071】

例7：V V L 1 5 N 1 Lの細胞毒性の潜在能

40

V V L 1 5 - N 1 Lは、一連のネズミ科の癌細胞株の細胞毒性についてV V L 1 5 - R F Pと生体外で比較された。細胞は成長速度によって、96 - ウエルプレート内で、1ウエルあたり 1×10^3 または 1×10^4 の細胞で接種され、16 - 18時間後にウイルスに感染させた。ウイルス感染の後の6日目の細胞生存はM T S分析によって決定された。また、Wang et al (J Clin Invest, 2009, 119: 1604 - 1615)に述べられている方法により、E C 5 0 値（腫瘍細胞の50%を殺すウイルスの投与量）が計算された。分析はすべて、少なくとも3回行なわれた。E C 5 0 値（つまり細胞の50%を殺すのに必要なP F U）に基づいて、C T 2 6 とD T 6 6 0 6 の細胞には2つのウイルス間の細胞毒性に有意差はなかった。対照的に、C M T 9 3 、L L C およびS C C 7 細胞を殺すことでV V L 1 5 と比較して、V V L 1 5 - N 1 Lは著しくよ

50

り有力だった(図8)。

【0072】

アームドVV_L15N1L (armed VV_L15N1L) の細胞毒性の潜在能も比較された。EC₅₀値は、LLCとCMT93以外のすべての細胞株中でVV_L15-N1Lよりも著しく高かった(つまり、それらは、適切な細胞株を殺すことにおいてVV_L15-N1Lほど有力ではなかった)。VV_L15-N1L-mIL12組み換え体は、すべての細胞株においてVV_L15-N1L-mGMCsFより有力に見え、SCC7およびDT6606細胞において統計的有意差に達した特徴を示す(図9)。

【0073】

例8: VV_L15N1Lは、腫瘍抗原に対する宿主免疫反応の高いレベルを引き起こす。

10

3つの共通遺伝子の生体内の腫瘍モデルが使用された:

C3H/HeN株ハツカネズミ中のSCC7細胞;

C57BL/6株ハツカネズミの中のDT6606-ova細胞、および

C57BL/6株ハツカネズミの中のLLC細胞。

【0074】

皮下のひ腹腫瘍モデルが確立され、表2に示されるようにウイルスあるいはPBSの1回量で処理された。

ウイルスおよび腫瘍特異性のT細胞の適時の生成を保証するために、ひ臓は感染の14日後に収穫された。IFN- γ 放出分析が続いて生成された脾細胞懸濁液について行なわれた。

20

【0075】

収穫された脾細胞の単個細胞浮遊液の調製

(1) 皮下のひ腹腫瘍ひ臓共通遺伝子(syngeneic subcutaneous flank tumours)からは、下記に述べられる(さらに表2を参照)適切な腫瘍細胞株について確立された。腫瘍が体積でおよそ100mm³だった時、ハツカネズミは3つのグループへ無作為に分類された。PBSの50μl中のVV_L15あるいはVV_L15-N1Lウイルスのいずれかの1×10⁸PFUは、29ゲージ針を付けられた1mlのインスリン用注射筒を使用して腫瘍内(ITT)に注射された。針は、広い普及のためにウイルス配置中に腫瘍の全体にわたり異なる方向で多数回を刺された。第3のグループは、ビヒクリバッファー(つまりPBSの50μl)の等価な体積を注射された。感染の14日後に、動物はCO₂吸入によって安楽死させられた。ひ臓は無菌条件の下で収穫され、2mlの注射器のプランジャーの平面端部を使用して、70μm細胞ストレーナ(Becton Dickinson Falcon)によってつぶされて、50mlの三角フラスコの中へT細胞培地(TCM)(RPMI-1640、10%のFCS、1%のストレプトマイシン/ペニシリン、1%のナトリウム・ピルベート)とともに注入した。小球になった脾細胞は、5mlのRBC細胞融解バッファー(シグマ-Adrich)中に再懸濁され、1,200毎分回転数で遠心分離され、5分間氷の上に置かれた。洗浄遠心分離サイクルの後、それらは、5×10⁶細胞/mlの終末濃度へTCMで再懸濁された。

30

【0076】

(2) 成長阻止された腫瘍刺激物細胞全体の調製:

細胞培養培地(CM)中の刺激物細胞(つまり適切な目標またはコントロール腫瘍細胞株-SCC7、LLCあるいはDT6606-ova)の5×10⁶/mlの単個細胞浮遊液は、50mlの三角フラスコ中で調製された。100μg/mlの終末濃度を達成するために、マイトマイシンC(MMC)(Roche)の1mg/mlの溶液がこの懸濁液に加えられ、1時間、37℃で、5%のCO₂空気中で、湿潤インキュベータ中でインキュベートされた。細胞は、40mlのPBSで続いて2度洗われ、40mlのCMの中で再懸濁され、接種の準備ができるまで培養された(30-60分以内)。5×10⁵細胞/mlの終末濃度を達成するために、成長阻止された刺激物細胞は、TCMの中で再懸濁された。

40

50

【0077】

(3) 腫瘍 / 抗原特異性の T 細胞活性化のための代理マーカーとしての IFN- γ の放出分析 :

この分析は、記憶 T 細胞がそれらの同系統のエピトープ - MHC 複合体によって活性化される時の IFN- γ の放出に基づく。脾細胞プールは CD8+ T 細胞の刺激に必要な細胞型 (例えば APCs 、 Th 細胞) のすべてを含んでいるべきである。 (1) からの脾細胞懸濁液の各々の 100 μ l は、丸底の 96 ウエルプレートの三つのウェルの中で目標腫瘍刺激物細胞懸濁液の 100 μ l と共に培養された (つまり、 5 \times 10⁵ 脾細胞と 5 \times 10⁴ 成長阻止腫瘍細胞) 。脾細胞のみのコントロールは、 200 μ l TCM の中の 5 \times 10⁵ 脾細胞を含んでいた。適切な場合、脾細胞も、 TCM (5 μ g / ml の終末濃度を達成) の中の卵子ペプチド (H - 2 K b / S I I N F E K L 、 Pro immune) の 100 μ l と共に培養されるか、あるいは 5 \times 10⁴ MHC 相容性、成長阻止コントロール腫瘍細胞 (C 56 BL / 6 マウス由来腫瘍モデルが使用された時 B 16 - F 10) を含む TCM の 100 μ l で培養された。

【0078】

更に、ウイルスが適用されたことを証明するために、そして重要なことには、動物は免疫反応をそれ自身マウントすることができるるために、脾細胞はさらに上記のように、加熱不活性化した VVL 15 (1 個の細胞当たり 100 PFU で、 2 時間の 56[°] に熱した) あるいは VV B 8 R ペプチド (H - 2 K b / T S Y K F E S V 、 Pro Immune) 、強い抗原のワクシニアウイルスのエピトープ (5 μ g / ml の終末濃度を達成) のいずれかと共に培養された。この実験は、さらに分析自体の陽性対照として役立つだろう。プレートは空気および 5 % の CO₂ 中の 37[°] で 3 日間インキュベートされ、その後 5 分間 1,200 每分回転数で遠心分離機にかけられた。ウェルの各々から得られた上澄みの中の IFN- γ の濃度は、ネズミ科特異性の IFN- γ 用の ELISA キット (Biolog end) を使用して測定された。 IFN- γ の終末濃度の 2 つのウェルの平均が、脾細胞のみを含むウェルから得られた、対応する値を差し引いた後に決定された。 SCC モデルは積極的なネズミ科の頭部および首の鱗状の癌モデルであり、これは人間の頭部および頸部癌に相当し、免疫抗原性が低い。図 10 a - b に示されるように、 VVL 15 - N 1 L - 処理されたグループからの脾細胞は、成長阻止 SCC 7 細胞との共培養からの VVL 15 グループより著しく高いレベルの IFN- γ を生産した。低いが IFN- γ の有意水準が PBS 处理された脾細胞から生産された。これは、恐らく宿主の腫瘍に対する自然な免疫反応を反映している。予想通りに、 PBS グループ中の加熱不活性化した VVL 15 との共培養では、脾細胞による IFN- γ 生産はなかった。驚くべきことに、非活性ウイルスとの共培養されたときの IFN- γ レベルと、他の 2 つのグループ間に有意差はなかった (図 10 b) 。不活性化された VVL 15 との共培養による IFN- γ の絶対水準は、成長阻止された腫瘍細胞との共培養と比較してより少なかった。これは、恐らく示された免疫原の腫瘍あるいはウイルスのエピトープにおける変化に起因する。後の実験では、エピトープ標準化を保証するために、免疫原の VV B 8 R エピトープが不活性化された VVL 15 の代わりに使用された。

【0079】

脾臓癌モデル中の VV によって引き起こされた宿主免疫も調査された。 DT 6606 細胞株の抗原 (TAA) プロフィールに関連する腫瘍が定義されていなかったので、抗原特異性免疫反応 (この場合反オバルブミン反応) の推定上の生成を実証するために、異種抗原オバルブミンを安定して発現した細胞株 DT 6606 - ova を作成した。この細胞株は表 2 に述べられている共通遺伝子の皮下のひ腹モデルを作成するために使用された。ウイルスの IT 注入の 14 日後に、成長阻止された DT 6606 - ova 細胞 (growth arrested DT 6606 - ova cells) と共に培養された際に、 VV L - N 1 L - 処理されたグループは、 VVL 15 または PBS 处理グループと比較して、収穫された脾細胞からの IFN- γ 応答が著しく高かった (図 11 a) 。 PBS グループ中では比較的高い IFN- γ 生産を示し、実際 VVL 15 处理グループと全く異なる

かった。オバルブミンは異種抗原であり、強健な反卵子レスポンスを刺激する傾向があり、したがってこの結果は驚くべきものではない。脾細胞がオバルブミン抗原と共に培養された時、N1L処理グループも最高水準（これは統計的有意差に達しなかったが）のIFN- α を生産した（図11b）。

【0080】

IFN- α 反応の大きさは腫瘍/腫瘍抗原共培養分析と比較してほとんど10倍高かったが、ウイルスのグループ間のIFN- α 反応は、B8Rエピトープとの共培養の後では統計的に異なるものではなかった。

【0081】

異種選択マーカー、たとえばRFPは免疫原と同様で、ここまで得られた生体内の結果を恐らく引き起こしたかもしれない。この可能性をコントロールするために、VV15-RFPは皮下の共通遺伝子のLLCひ腹モデルの中でコントロール・ウイルス（VV15の代わりに）として使用された（表2を参照）。実験のセットアップは、SSCVIとDT6606の実験のものと同一だった。

10

【0082】

前の結果はこのモデルの中で模写され、最も高いIFN- α 生成は、成長阻止されたLLC細胞と共に培養されたVV15-N1L処理アームからの脾細胞によって実証された（図12a）。VV15-RFPおよびPBSアームと比較して、これは統計的に有意だった。B8Rペプチドと共に培養された脾細胞上のウイルス処理アーム（viral treatment arms）間に有意差はなかった（図12b）。VV15-N1Lグループについては、成長阻止されたB16-F10細胞（MHCのハプロタイプ特異性のコントロール刺激物細胞集団）との脾細胞の共培養でのIFN- α は、成長阻止されたLLC細胞との共培養と比較してより低いが、統計的に有意差はなかった（p=0.0594）。多くの腫瘍エピトープはこれらと他の固形腫瘍細胞株の間で共有されるだろう。これらに対して生成されたCTLsは、B16-F10グループの中で得られたIFN- α 量の原因だったかもしれない。

20

【0083】

例9：膵臓癌モデル中のVV15N1Lの効能

5 \times 10⁶ CMT93細胞あるいは3 \times 10⁶ DT6606細胞は、C57BL/6オスのハツカネズミの剃毛された右ひ腹の皮下に上記のように注入された。一旦腫瘍体積がほぼ100mm³に達したならば、それらは、3つのグループに無作為に分けられ、50 μ lのPBS中のウイルスの1 \times 10⁸PFUの投与、または50 μ l PBSビヒクルバッファコントロールが、表3（スケジュール1および2）に概説された治療スケジュールごとに注射された。腫瘍体積は毎週2度のカリパス測定によってモニターされた。また、ハツカネズミは毎週計量された。腫瘍増殖は毎週2度追跡された。また、腫瘍体積が1000mm³に接近した時、ホームオフィス・ガイドラインによって管理され、動物は安楽死させられた。DT6606ひ腹腫瘍モデルの処理の際のVV15-N1L作用薬は、腫瘍成長速度の減少および延長された生存について統計的に有意であった（図13a-b）が、CMT93モデルではウイルス剤のIT適用に続く腫瘍成長速度間の違いはなかった。ただし両方ともPBSグループより著しく遅い成長であった（図13c-d）。

30

【0084】

例10：VV15N1L適用に続く同所性の肺癌における生存

静脈内に投与された時、ウイルスが効果的かどうか評価するために、同所性の肺癌モデルが利用された。100 μ l PBSの中の5 \times 10⁶LLC細胞は、7週齢の雌のC57BL/6ハツカネズミの尾静脈に注射された。

40

【0085】

肺の非濃淡強調CT走査は3週間の間、個々のハツカネズミの肺容量を評価するために使用された。また、どんな減少も腫瘍負担が推定された。CT上の腫瘍の最初の存在によって決定された時、表3（スケジュール5）に概説されるように、IVウイルス/PBSの3回分が投与された。ハツカネズミは毎週2度計量され、それらが苦痛のサインを示し

50

た場合あるいは減量がそれらの最大の重量の 20 % を超過した場合、殺された。

【 0 0 8 6 】

腫瘍が発現したハツカネズミはすべて、14 ~ 21 日の間に死に、開胸術は広範囲な肺腫瘍を確認した。腫瘍は、LLC 細胞の注射後の 4 ~ 7 日の間の CT の上で最初に明白になり、注射後 5 日目に、治療が開始された。

【 0 0 8 7 】

21 匹のハツカネズミが、100 μ l の血清を含まない D M E M 中の 0.5×10^6 LLC 細胞が尾静脈注射で適用された。それらは 3 つのグループに無作為に分けられ、5 日目から処理（表 3、スケジュール 5）を始めた。PBS 処理グループ中のハツカネズミはすべて、LLC 細胞の注射後の 10 日後に減量の徴候を示し、すべては 21 日までに死んだ（図 14）。PBS グループと比較して、VV L 15 では 5 日、VV L 15 - N 1 L では 6.5 日、ウイルスの処理により生存期間はそれぞれ延びたが、ウイルスのグループ間の生存に統計的有意差はなかった。

10

【 0 0 8 8 】

例 11 : V V L 15 N 1 L 適用に続く肺癌モデルの転移の普及

LLC の皮下のひ腹注射に続く肺に転移する傾向を備えた非常に積極的な腫瘍モデルである。確かに、皮下に成長した LLC 腫瘍の外科的切除が、肺転移の割合を高めたことは報告された。これは恐らく切除によって、血管形成阻害剤の分泌の回避が主原因であろう。

20

【 0 0 8 9 】

VV 組み換え個体の IT 注入がこの転移の速度を低減することができるかどうか調査するために、 1×10^6 LLC 細胞は、7 週齢の雌の C 57 BL / 6 ハツカネズミのひ腹へ皮下注射された。腫瘍体積がおよそ 100 mm^3 だった時、それらは 3 つのグループへ無作為に分けられた。ウイルス / PBS の注射剤は表 3（スケジュール 3）の中の治療スケジュールのように IT 処理された。グループが犠牲（およそ注入後 17 - 20 日）を要求するエンドポイントに達するまで、腫瘍はカリパス測定によってモニターされた。動物はすべて同時に安樂死させられた。それらの肺は収穫された。また、すべての目視可能な腫瘍が記録された。肺葉は分離され、4 % のホルマリン中に固定され、パラフィンに埋め込まれ、ヘマトキシリンとエオシンで染色され、最大の横断面の寸法によって区分された。各葉についても、スライスが最大の断面の上下で行なわれた。3 つのセクションはすべて治療スケジュールを知らされていなかった病理学者によって腫瘍について吟味された。

30

【 0 0 9 0 】

犠牲とされた時点で腫瘍体積についてグループ間に有意差はなかった（図 15 a）。しかしながら、実験のエンドポイントの肺転移を備えたハツカネズミのパーセンテージは、N 1 L、VV L 15 および PBS グループについてそれぞれ 14、43 および 57 % だった（図 15 b）。これらの様子は、互いに統計的に異なっていた。しかしながら、1 つのグループ当たりのハツカネズミのそのような少数（n = 7）では推論を行うのは難しい。また、実験はより大きな標本数で繰り返される必要があるだろう。しかしながら、この結果は、VV L 15 N 1 L が主要な腫瘍の成長に積極的な影響を及ぼさなくてもウイルス性治療が内転移を最小限にする可能性を示唆する。

40

それはよい合併療法であるかもしれない。

【 0 0 9 1 】

例 12 : IL - 12 - および GM - CSF - アームド VV 15 N 1 L の効能

VV L 15 N 1 L の反腫瘍効能を高めるために、GM - CSF および IL - 12 が VV L 15 N 1 L ベクターの N 1 L 領域に挿入された。これらの組み換え個体の各々の潜在能は、共通遺伝子の DT 6606 の皮下のひ腹モデルに対して生体内でテストされた（表 3、スケジュール 1）を参照）。腫瘍体積が 100 mm^3 の平均に達した時、ウイルス（VV L 15 - N 1 L、VV L 15 - N 1 L - mGMC SF あるいは VV L 15 - N 1 L - mIL 12）の 1×10^8 PFU 1 日用量（合計 5 日）あるいはビヒクル・バッファコントロール（PBS の $50 \mu\text{l}$ ）の等価なボリュームが IT 注射された（1 つのグループ当た

50

り $n = 7$)。毎週 2 度のカリパス測定によって腫瘍増殖がフォローされた(図 16 a)。腫瘍体積が $1,000 \text{ mm}^3$ を超過した時、対応する Kaplan Meier 生存曲線(図 16 b)は人道的な動物犠牲の必要に基づいた。図 16 a - b は、GMCSF の遺伝子組み換えアームドウイルスだけが VVL15-N1L よりも著しくよくはなかったことを実証する。しかし、IL12-アームドウイルスは実験の終わりに 6 / 7 匹のハツカネズミの治癒および 100% の生存を導き、重要な潜在能を実証した。この結果の普遍性を確立するために、これらのアームドウイルスは、他のモデルの中でテストされるだろう。

【0092】

例 13 および 14 :

IL-21 の構築

10

物質と方法 :

ネズミ科の臍臓癌モデル :

DT6606 の皮下の共通遺伝子の腫瘍はオスの C57BL / 6 ハツカネズミの中で確立された。腫瘍が直径で 5 - 6 mm に達した時、PBS、VV-Tk-N1L-mIL-21、VV-Tk-N1L-hIL-21 あるいはコントロール・ウイルス VV-Tk-N1L は、1、3、7、9 および 11 日目に腫瘍内に ($5 \times 10^7 \text{ p.f.u. / 注入}$) 適用された。腫瘍増殖は毎週 2 度測定された。また、動物生存がモニターされた。生存データはプリズム(登録商標)(GraphPad Software, CA, USA)を使用して、比較された。また、ログランク(Mantel Cox)テストは生存差の有意性を決定するために使用された。有意性はアンペアードスチューデント T テスト(unpaired students T test) (* $p < 0.05$; ** $p > 0.01$; *** $p < 0.001$) を使用して決定された。

20

【0093】

シリアンハムスター癌モデル :

HPD-1NR 腫瘍を有するシリアンハムスター - 1×10^6 HPD-1NR 細胞は、HPD-1NR 腫瘍を有するシリアンハムスターの右ひ腹の中への皮下注射によって接種された。腫瘍が 313 mm^3 に達した時、PBS、VV-Tk-N1L-mIL-21、VV-Tk-N1L-hIL-21 あるいはコントロール・ウイルス VV-Tk-N1L は、1、3、7、9 および 11 日目に腫瘍内に ($5 \times 10^7 \text{ p.f.u. / 注入}$) 適用された。腫瘍は毎週 2 度測定された。また、動物生存がモニターされた。生存データはプリズム(登録商標)(GraphPad Software, CA, USA)を使用して、比較された。また、ログランク(Mantel Cox)テストは生存差の有意性を決定するために使用された。有意性はアンペアードスチューデント T テスト (* $p < 0.05$; ** $p > 0.01$; *** $p < 0.001$) を使用して決定された。

30

【0094】

シリアンハムスター腹膜腔転移臍臓癌モデル -

1×10^7 SHPC6 細胞はシリアンハムスターの右下の腹膜腔へ接種された。4 日後に、1 つのグループ当たり 10 のハムスターに各々 $500 \mu\text{l}$ PBS、および異なる VVs の 2×10^7 PFU を、4、6 および 8 日に腹膜内(IP)に注射した。ハムスターの生存率がモニターされた。生存データはプリズム(登録商標)(GraphPad Software, CA, USA)を使用して、比較された。また、ログランク(Mantel Cox)テストは生存差の有意性を決定するために使用された (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

40

【0095】

例 13 : IL-21 アームド VV の生成、および生体外の反腫瘍潜在能の評価 :

人間とマウスの IL-21 cDNA シーケンスが、puc19N1L シャトルベクター(図 3 に示されたように)に挿入された。標準の相同組換えは、結果として生ずるプラスミド pShuttleN1LmIL-21 または pShuttleN1L-hIL-21 を、 0.05 P.F.U. / 細胞 の VVL15 にあらかじめ感染した CV-1(アフリカ緑ザル腎臓)細胞と共同トランスフェクトすることにより、Lister 株ワクシニアウイ

50

ルス (V V L 1 5) の T K - 欠乏バックボーンの中で行なわれた。トランスフェクトされた C V - 1 細胞溶解物は、ブラーク検定に供された。5 つのブラーク浄化ラウンドが単一のクローンのウイルスを繁殖させるために行なわれた。また変性は N 1 L g e n e 欠失について P C R によって再確認された。結果として生ずるウイルスは V V - T K N 1 L - m I L - 2 1 および V V - T K N 1 L - h I L - 2 1 と命名された。これらのウイルスの潜在能をテストするために、細胞死分析 (M T S 分析) がネズミ科の腎癌細胞株 (D T 6 6 0 6) 内の 3 つのワクシニアウイルスの細胞毒性を発見するために使用された。それは突然変異体の R a s - p 5 3 の遺伝子組み換えの腎臓癌モデルに由来する。

【 0 0 9 6 】

図 1 7 は、 I L - 2 1 アームド V V の生体外での事前評価を示す。図 1 7 A および B は、ネズミ科の腎癌細胞株での異なる腫瘍崩壊ワクシニアウイルスの細胞毒性を示す。 R a s - p 5 3 の遺伝子組み換えの腎臓癌ハツカネズミに由來したネズミ科の腎癌細胞ライン D T 6 6 0 6 の培養は、異なるウイルスにより感染され、ウイルス感染の 6 日後に M T S によって細胞致死が分析された。ウイルスによって引き起こされた細胞死のカーブは図 1 7 A に示される； E C 5 0 値 (癌細胞の 5 0 % を殺すウイルスの投与量) が計算された (図 1 7 B) 。ウイルスにあるより高い E C 5 0 値はより少ない潜在能を意味する。図 1 7 C および D は、 I L - 2 1 発現および生体外の腎癌細胞中のワクシニアウイルスの新しい世代の異なる突然変異体のウイルス複製を示す。 R a s - p 5 3 の遺伝子組み換えの腎臓癌ハツカネズミに由來したネズミ科の腎癌細胞ライン D T 6 6 0 6 の培養は、異なるウイルスに感染され、 I L - 2 1 発現がウイルス感染の 2 4 時間後の E L I S A 分析によって検知された (図 1 7 C) 。ウイルス複製は T C I D 5 0 分析によって検知され、図 1 7 D に示される。

実験は 3 回行われた。

【 0 0 9 7 】

図 1 7 A および B の中で示されるように、腫瘍崩壊のワクシニアウイルス (V V - T K N 1 L) の新しい世代は癌細胞を殺すのに非常に有効である；ウイルスにサイトカイン I L - 2 1 をアームすることはウイルスを弱毒化しなかった。代わりにまだ未知の機構によって癌細胞に対する細胞毒性を増加させた (p < 0 . 0 1) 。

【 0 0 9 8 】

治療遺伝子 I L - 2 1 がウイルスに感染した癌細胞中で発現されることがあるかどうか、およびそのレベルをチェックするために、 E L I S A は腎癌細胞に感染させた (D T 6 6 0 6) V V - T K N 1 L - m I L - 2 1 、 V V - T K N 1 L - h I L - 2 1 およびコントロール・ウイルス V V - T K N 1 L からの I L - 2 1 タンパク質の発現を検知するために使用された。図 1 7 C で示されるように、 V V - T K N 1 L - m I L - 2 1 、および V V - T K N 1 L - h I L - 2 1 感染では I L - 2 1 タンパク質を非常に高いレベルで発現したが、コントロール・ウイルス V V - T K N 1 による感染は I L - 2 1 タンパク質を生産しなかった。 I L - 2 1 アームドウイルスの複製は、バックボーンウイルスと比較して弱毒化されなかった (図 1 7 D) 。

【 0 0 9 9 】

例 1 4 : I L - 2 1 アームド V V 1 5 N 1 L の反腫瘍効能

I L 2 1 が V V - T K N 1 L の反腫瘍効能を高めることができるかどうかテストするため、これらのウイルス (マウス I L 2 1 あるいはヒト I L 2 1) の各々の潜在能が、共通遺伝子の D T 6 6 0 6 の皮下のひ腹モデルに対して生体内でテストされた。

【 0 1 0 0 】

図 1 8 は、 V V - T K N 1 L - m I L - 2 1 、 V V - T K N 1 L - h I L - 2 1 およびコントロール・ウイルス V V - T K N 1 L の反腫瘍効能を示す。ネズミ科の腎臓癌モデル - 腫瘍成長曲線 (図 1 8 A) 、および異なる作用薬で治療されたハツカネズミの生存 (図 1 8 B) が示される (n = 7 / グループ) 。 H P D - 1 N R 腫瘍を有するシリアンハムスター - 腫瘍成長曲線 (図 1 8 C) 、および異なる作用薬で治療されたハツカネズミの生存 (図 1 8 D) が示される (n = 7 / グループ) 。それぞれの場合に、平

10

20

50

30

40

50

均の腫瘍サイズ \pm SEM は、各グループ中の最初のハムスターの死まで表示され、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) によってポスト-ホックボンフェロンニ試験 (post-hoc Bonferroni testing) で比較される。図 18E は、免疫適格のシリアンハムスター腹膜腔に転移した膵臓癌モデル中でウイルス株の反腫瘍効能を示す。

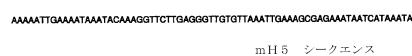
【 0 1 0 1 】

IL-21アームドウイルスは顕著な潜在能を実証し、脾臓癌を有するハツカネズミの回帰推定された腫瘍増殖（図18A）、および生存（図18B）を驚異的に延長した。人間のサイトカインがマウスよりシリアンハムスター中でよりよく機能するとして、皮下のシリアンハムスター脾臓癌モデルはIL-21アームドウイルスの反腫瘍効能を評価するため使用された。著しく、IL-21アームドウイルスは顕著な潜在能を実証し、実験の終わりに7匹の動物のうちの6匹を治癒し、86%の生存を示した（図18CおよびD）。皮下のモデル中の反腫瘍効能に基づいて、IL-12あるいはIL-21アームドVVは、コントロールウイルスと比較して有望な効能を実証する。

【 0 1 0 2 】

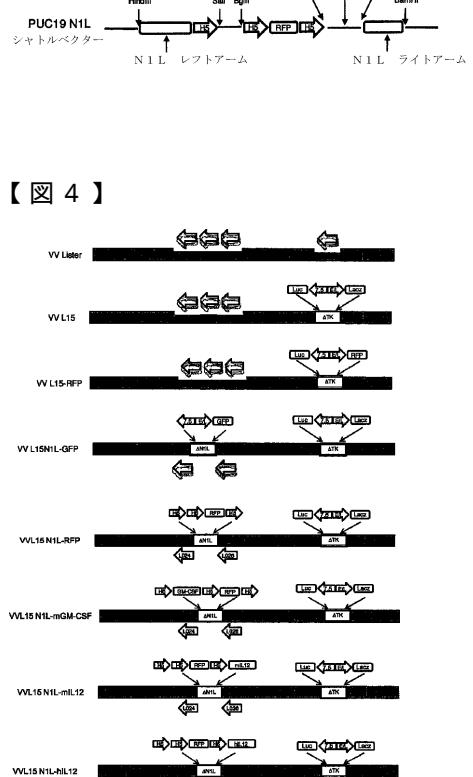
膵臓癌の患者の生存を改善するための主な障壁は、重度の膵臓癌用の有効な治療薬がないことである。この目的のために、よく特徴づけられたシリアンハムスターの腹膜に播種した膵臓癌モデルが、IL 12 および IL 21 アームドVVの実現可能性、効能および安全性の事前評価に使用された。IL-12-アームドVV TK N1Lは、全身性のデリバリーの後に引き起こされた厳しい毒性を示した(図18E)。著しく、VV TK N1L-IL 21は、腹膜播種性の膵臓癌の治療用の最も高い治療指数を示し、シリアンハムスターの70%が治癒された。

〔 义 1 〕

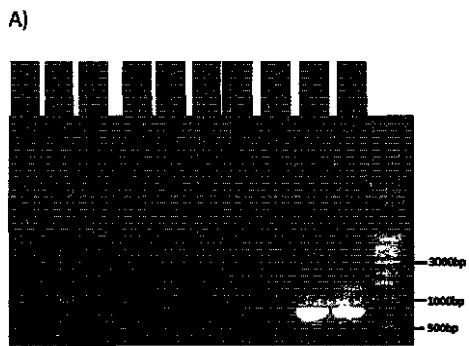


〔 义 2 〕

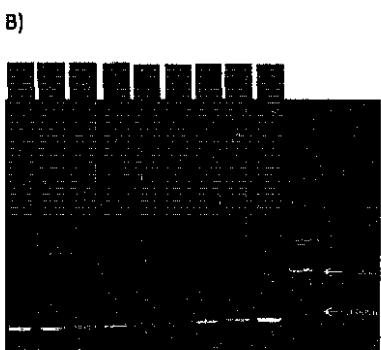
(3)



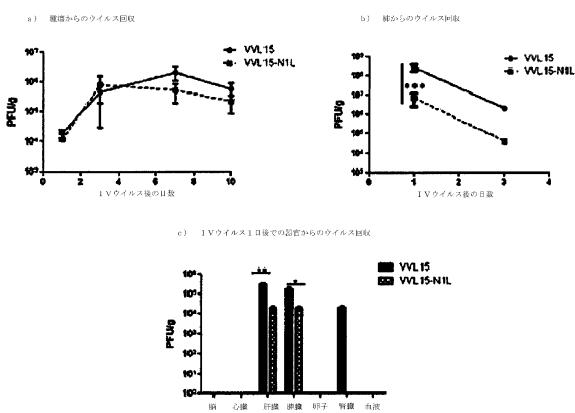
【図5A】



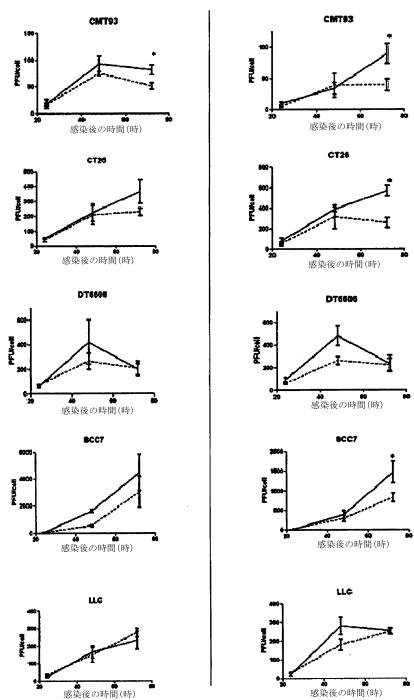
【図5B】



【図6】



【図7】



【図8】

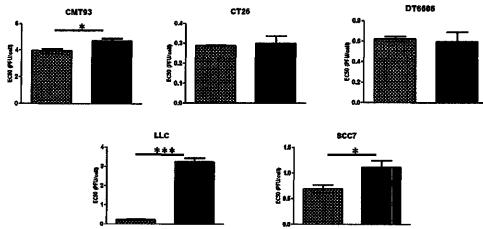
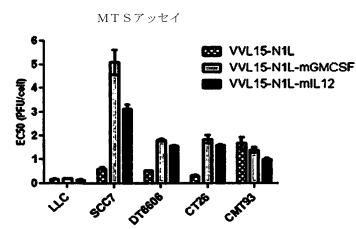
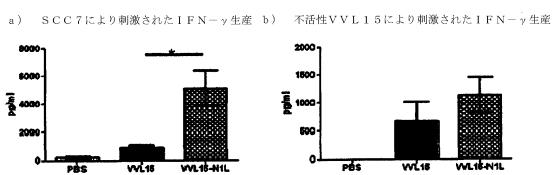


Fig 8

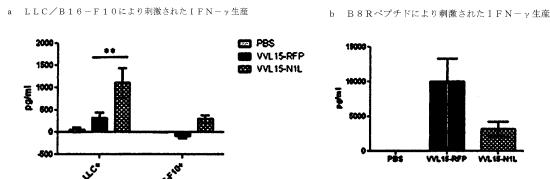
【図9】



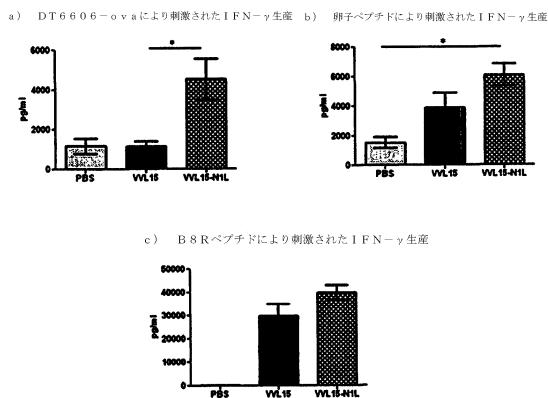
【図10】



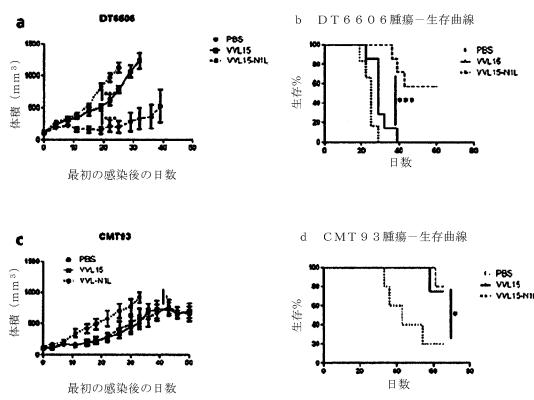
【図12】



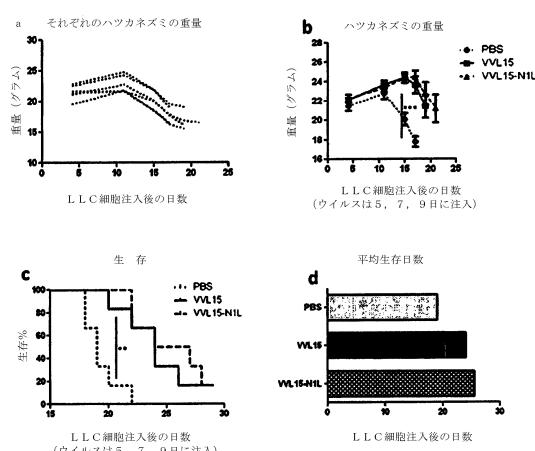
【図11】



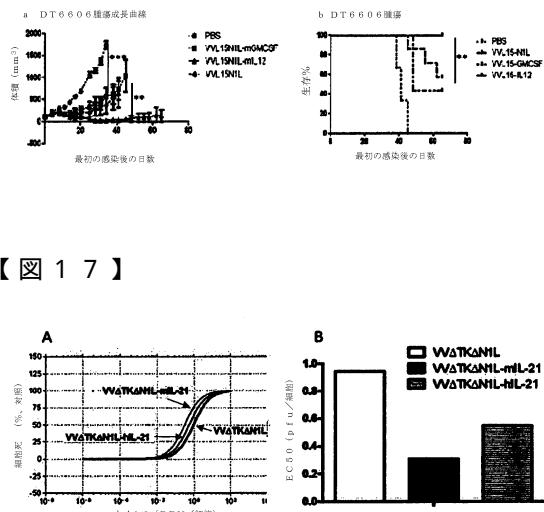
【図13】



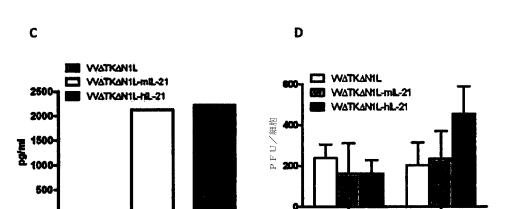
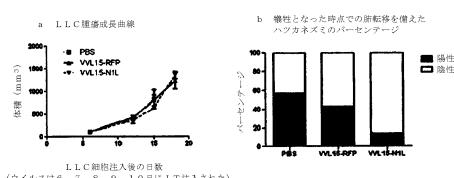
【図14】



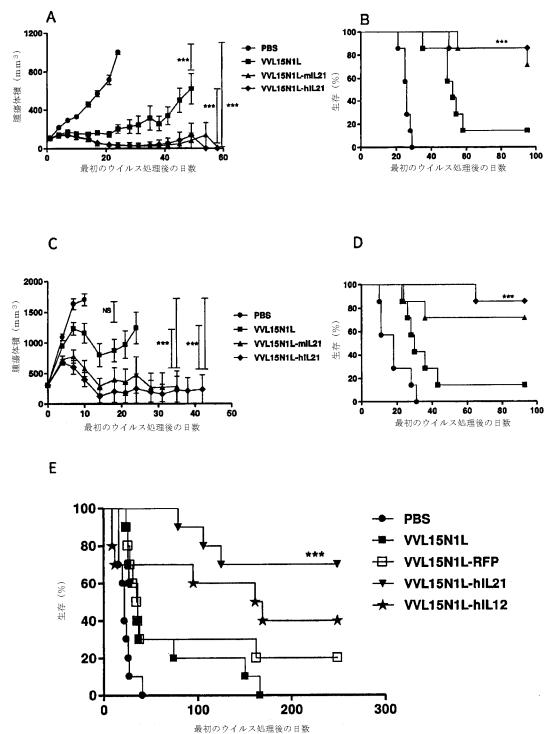
【図16】



【図15】



【図18】



【図19】

インターロイキン-21(アイソフォーム1)

```

MERIVICLNVIFLGLTLVHKSSSGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPFLPAPEDVETNCEWSA
FSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPKFELERFKSL
LQKMIHQHLSRTHGSEDS

```

インターロイキン-21(アイソフォーム2)

```

MERIVICLNVIFLGLTLVHKSSSGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPFLPAPEDVETNCEWSA
FSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPKFELERFKSL
LQKVSTLSFI

```

インターロイキン-12(サブユニット アルファ)

```

MCPPARSLLLVATLVLDDHLSLARNLPPVATPDPGMPCCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLFYPCTSEE
IDHEDITDKTISTVACPLPLETKNESCLNSRETSTFINGSCASRKTFSFMMALCLSSIYEDLKMVQV
EFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMALAVIDELMQLANFNSETVPQKSSLEEPDFYTKIKLCILLHAFRI
RAVITIDRVMVSYLNAS

```

インターロイキン-12(サブユニット ベータ)

```

MCHQQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVVVVLDWYPDAPGEMVVLTCDFPEEDGIFTWLDQGSSEV
LGSGKILTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKEDGIWSTDILKDKQEPKKNKTFLRCEAKNY
SGRFTCWLTTTISTDLTFSVKSSRGSDPQGVTCGAATLSAERVGRGDNKYEYESVCEQEDSACPAEE
SLP1EVVMVDAVHKLKVENYNTSSFFIRD1IKPDPKNLQQLKPLKNSRQVEVSWEPDTWSTPHYSFLT
ELYKQGLRGSLTKLGPLTMASHYKQHCPPTPETSCATQITFESPKENLKDPLLVIPFDCWEPVQE

```

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)

```

MWLQSLLLGTVACISAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRL
ELYKQGLRGSLTKLGPLTMASHYKQHCPPTPETSCATQITFESPKENLKDPLLVIPFDCWEPVQE

```

フロントページの続き

(72)発明者 ヤン ミン

英国 イーシー1エム 6ビーキュー ロンドン、ジョン バン サイエンス センター、グランド フロア、クイーン マリー ユニバーシティ オブ ロンドン、バーツ キャンサー イン スティテュート、モレキュラー オンコロジー

(72)発明者 アハムド ヤハンジャー

英国 イーシー1エム 6ビーキュー ロンドン、ジョン バン サイエンス センター、グランド フロア、クイーン マリー ユニバーシティ オブ ロンドン、バーツ キャンサー イン スティテュート、モレキュラー オンコロジー

(72)発明者 レモイン ニコラス ロバート

英国 イーシー1エム 6ビーキュー ロンドン、ジョン バン サイエンス センター、グランド フロア、クイーン マリー ユニバーシティ オブ ロンドン、バーツ キャンサー イン スティテュート、モレキュラー オンコロジー

審査官 西 賢二

(56)参考文献 特表2012-513208 (JP, A)

国際公開第2011/125469 (WO, A1)

米国特許出願公開第2009/0098529 (US, A1)

中国特許出願公開第101658670 (CN, A)

中国特許出願公開第103110939 (CN, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12N 1/00 - 7/08

A61K 35/00 - 35/768

Capplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN)

JSTPplus / JMEDplus / JST7580 (JDreamIII)

GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq