

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7161940号
(P7161940)

(45)発行日 令和4年10月27日(2022.10.27)

(24)登録日 令和4年10月19日(2022.10.19)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/62 (2006.01)	F I	C 1 2 N	15/62	Z Z N A
C 1 2 N	15/63 (2006.01)		C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	15/12 (2006.01)		C 1 2 N	15/12	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)		C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)		C 1 2 N	5/10	

請求項の数 19 (全13頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-564966(P2018-564966)

(86)(22)出願日 平成30年5月10日(2018.5.10)

(65)公表番号 特表2020-519230(P2020-519230)

A)

(43)公表日 令和2年7月2日(2020.7.2)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/032018

(87)国際公開番号 WO2018/209052

(87)国際公開日 平成30年11月15日(2018.11.15)

審査請求日 令和3年4月9日(2021.4.9)

(31)優先権主張番号 62/504,120

(32)優先日 平成29年5月10日(2017.5.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(73)特許権者 518434876

ウェルスタッフ イミューノ セラピュー

ティクス , エルエルシー

W E L L S T A T I M M U N O T H E

R A P E U T I C S , L L C

アメリカ国 メリーランド 2 0 8 5 0 口

ックビル スイート 6 0 0 シェイディグ

ローブロード 1 4 2 0 0

100107984

弁理士 廣田 雅紀

100102255

弁理士 小澤 誠次

100096482

弁理士 東海 裕作

100188352

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 がんの治療のための、補体不活性化に耐性のエンベロープウイルス

(57)【特許請求の範囲】**【請求項1】**

腫瘍溶解性エンベロープウイルスに組み込むための融合タンパク質であって、(a) C D 5 5 の 4 個のショートコンセンサスリピート (S C R) を含む、C D 5 5 ペプチド配列、(b) 前記 C D 5 5 ペプチド配列の C 末端側にリンカー配列、(c) 前記リンカー配列の C 末端側に C D 8 膜貫通ドメイン、及び(d) 前記膜貫通ドメインの C 末端側に、トランケートした C D 8 細胞内ドメインを含み、G P I アンカーを含有せず、配列番号 2 又は配列番号 3 の配列を有する、前記融合タンパク質。

【請求項2】

配列番号 2 の配列を有する、請求項1に記載の融合タンパク質。

10

【請求項3】

配列番号 3 の配列を有する、請求項1に記載の融合タンパク質。

【請求項4】

請求項1～3のいずれかに記載の融合タンパク質をコードする核酸。

【請求項5】

D N A である、請求項4に記載の核酸。

【請求項6】

1 又は 2 以上のイントロンをさらに含む、請求項4又は5に記載の核酸。

【請求項7】

配列番号 2 の配列を有するタンパク質をコードする、請求項4～6のいずれかに記載の

20

核酸。

【請求項 8】

配列番号 1 の配列を有する、請求項 7 に記載の核酸。

【請求項 9】

制御配列に作動可能に連結された、請求項 4 ~ 8 のいずれかに記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の融合タンパク質を細胞表面に安定に発現する細胞株。

【請求項 11】

哺乳動物細胞株である、請求項 10 に記載の細胞株。

10

【請求項 12】

D F - 1 ニワトリ胚線維芽細胞株である、請求項 10 に記載の細胞株。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の融合タンパク質をウイルス膜上に組み込んでいるエンベロープウイルス。

【請求項 14】

腫瘍溶解性ウイルスである、請求項 13 に記載のウイルス。

【請求項 15】

腫瘍溶解性ウイルスがニューカッスル病ウイルスである、請求項 14 に記載のウイルス。

20

【請求項 16】

請求項 13 ~ 15 のいずれかに記載のウイルスと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項 17】

請求項 13 ~ 15 のいずれかに記載のウイルスを含む、哺乳動物対象における新生物状態の治療剤。

【請求項 18】

ウイルスが腫瘍内投与用に製剤化された、請求項 17 に記載の治療剤。

【請求項 19】

ウイルスが静脈内投与用に製剤化された、請求項 17 に記載の治療剤。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表の参照

Annex C / S T . 25 テキストファイルの形式で電子出願された配列表及び関連ファイル参照 21003 - PCT は、本開示の一部である。

【背景技術】

【0002】

腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍細胞に感染しそれを破壊することによるがんの治療剤として試験されている。これらの腫瘍溶解性ウイルスとして、ニューカッスル病ウイルス、アデノウイルス、シンドビスウイルス、ワクチニアウイルス、ヘルペスウイルスなどが挙げられる。ニューカッスル病ウイルス (NDV、Newcastle Disease Virus) は、大部分の腫瘍細胞でインターフェロン経路が欠損しているという要因によると推定される、腫瘍細胞において優先的に複製し溶解するという固有の特性により、がん患者において腫瘍を収縮する大きな可能性を示した (Pecora, A.L., Rizvi, N., Cohen, G.I., Meropol, N.J., Sterman, D., Marshall, J.L., Goldberg, S., Gross, P., O'Neil, J.D., Groene, W.S., Roberts, M.S., Rabin, H., Bamat, M.K., and R.M. Lorence. 2002. Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. J. Clin. Oncol. 20:2251、Laurie, S.A., Bell, J.C., Atkins, H.L., Roach, J., Bamat, M.K., O'Neil, J.D., Roberts, M.S., Groene, W.S., and R.M. Lorence. 2006. A phase 1 clinical study of intravenous administration of PV7

40

50

01, an oncolytic virus, using two-step desensitization. Clin. Cancer Res. 12:2 555、Lorenz, R.M., Roberts, M.S., O'Neil, J.D., Groene, W.S., Miller, J.A., Mueller, S.N., and M.K. Bamat. 2007. Phase 1 clinical experience using intravenous administration of PV701, an oncolytic Newcastle disease virus. 7:157)。予備的な有望な臨床結果にもかかわらず、がん治療剤としてのNDVは、ウイルスが患者の体内に侵入すると、必然的に大部分のNDV粒子が患者の自然免疫系、補体副経路によって破壊されるという欠点がある。

【0003】

補体系は、自然及び適応免疫系の一部である (Volanakis, J.E., 1998. Chapter 2. In The Human Complement System in Health and Disease. Edited by J. E. Volanakis, and M.M. Frank. Marcel Dekker, Inc., New York pp 9-32) によって概説されている)。補体は、微生物の殺滅並びに免疫複合体の輸送及びクリアランスにおいて重要な役割を果たしている。補体系の活性化産生物の多くは、炎症誘発又は免疫調節機能にも関連している。補体系は、3種の酵素活性化カスケード：古典的経路、レクチン経路及び副経路に体系化される血漿及び膜関連タンパク質からなる。3種すべての経路は、終末補体複合体 / 膜侵襲複合体 (TCC / MAC, terminal complement complex/membrane attack complex) 及び一連の生物学的に活性な産物の形成をもたらすことができる。

【0004】

ヒト細胞及び器官は、相同性補体媒介溶解からそれらを保護する膜結合補体調節タンパク質のファミリーを有する。これらの補体調節タンパク質として、CD55 (崩壊促進因子、DAF、decay-accelerating factor)、CD46 (膜補因子タンパク質、MCP、membrane cofactor protein)、CD35 (補体受容体1、CR1、complement receptor 1) 及びCD59 (反応性溶解の膜阻害剤) が挙げられる (Carroll, M. C., E. M. Alicot, P. J. Katzman, L. B. Klickstein, J. A. Smith, and D. T. Fearon. 1988. Organization of the genes encoding complement receptors type 1 and 2, decay-accelerating factor, and C4-binding protein in the RCA locus on human chromosome 1. J. Exp. Med. 167:1271、Rey-Campos, J., P. Rubinstein, and S. Rodriguez de Cordoba. 1988. A physical map of the human regulator of complement activation gene cluster linking the complement genes CR1, CR2, DAF, and C4B P. J. Exp. Med. 167:664、Lublin, D. M., and J. P. Atkinson. 1989. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. Annu. Rev. Immunol. 7:35. 5. Nakano, Y., K. Sumida, N. Kikuta, N. H. Miura, T. Tobe, and M. Tomita. 1992. Complete determination of disulfide bonds localized within the short consensus repeat units of decay accelerating factor (CD55 antigen). Biochim. Biophys. Acta 1116:235、Morgan, B. P., and S. Meri. 1994. Membrane proteins that protect against complement lysis. Springer Semin. Immunopathol. 15:369、Kim D.D., and W.C. Song. 2006. Membrane complement regulatory proteins. Clin. Immunol. 118:127)。

【0005】

CD55は、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI, glycosylphosphatidylinositol) アンカータンパク質であり、そのC末端の糖脂質成分 (GPIアンカー) を通じて細胞原形質膜に付着する。CD55などのGPIアンカータンパク質は、取り込まれ、分解又は切断され、細胞原形質膜から放出される場合がある (Censullo, P., and M.A. Davitz. 1994a. How GPI-anchored proteins turnover: or where do they go after arrival at the plasma membrane. Semin Immunol. 6:81、Censullo, P., and M. A. Davitz. 1994b. The fate of GPI-anchored molecules. Braz J. Med. Biol. Res. 27:289、Turner A.J. 1994. PIG-tailed membrane proteins. Essays Biochem. 28:113)。例えばCD55を含むGPIアンカータンパク質は、GPI特異的ホスホリバーゼC及びDの作用によって細胞表面から放出される場合がある (Turner A.J. 1994. PIG-tailed membrane proteins. Essays Biochem. 28:113)。これらの酵素活性は、G

10

20

30

40

50

P I アンカータンパク質の異化反応を調節し、これらのタンパク質の細胞表面発現を制御している可能性がある (Censullo, P., and M.A. Davitz. 1994b. The fate of GPI-anchored molecules. *Braz J. Med. Biol. Res.* 27:289)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

- 【文献】Pecora, A.L., Rizvi, N., Cohen, G.I., Meropol, N.J., Sterman, D., Marsha II, J.L., Goldberg, S., Gross, P., O'Neil, J.D., Groene, W.S., Roberts, M.S., Rabin, H., Bamat, M.K., and R.M. Lorence. 2002. Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. *J. Clin. Oncol.* 20:2251
Laurie, S.A., Bell, J.C., Atkins, H.L., Roach, J., Bamat, M.K., O'Neil, J.D., Roberts, M.S., Groene, W.S., and R.M. Lorence. 2006. A phase 1 clinical study of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, using two-step desensitization. *Clin. Cancer Res.* 12:2555
Lorence, R.M., Roberts, M.S., O'Neil, J.D., Groene, W.S., Miller, J.A., Mueller, S.N., and M.K. Bamat. 2007. Phase 1 clinical experience using intravenous administration of PV701, an oncolytic Newcastle disease virus. 7:157
Volanakis, J.E., 1998. Chapter 2. In *The Human Complement System in Health and Disease*. Edited by J. E. Volanakis, and M.M. Frank. Marcel Dekker, Inc., New York pp 9-32
Carroll, M. C., E. M. Alicot, P. J. Katzman, L. B. Klickstein, J. A. Smith, and D. T. Fearon. 1988. Organization of the genes encoding complement receptors type 1 and 2, decay-accelerating factor, and C4-binding protein in the RCA locus on human chromosome 1. *J. Exp. Med.* 167:1271
Rey-Campos, J., P. Rubinstein, and S. Rodriguez de Cordoba. 1988. A physical map of the human regulator of complement activation gene cluster linking the complement genes CR1, CR2, DAF, and C4BP. *J. Exp. Med.* 167:664
Lublin, D. M., and J. P. Atkinson. 1989. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu. Rev. Immunol.* 7:35. 5. Nakano, Y., K. Sumida, N. Kikuta, N. H. Miura, T. Tobe, and M. Tomita. 1992. Complete determination of disulfide bonds localized within the short consensus repeat units of decay accelerating factor (CD55 antigen). *Biochim. Biophys. Acta* 1116:235
Morgan, B. P., and S. Meri. 1994. Membrane proteins that protect against complement lysis. *Springer Semin. Immunopathol.* 15:369
Kim D.D., and W.C. Song. 2006. Membrane complement regulatory proteins. *Clin. Immunol.* 118:127
Censullo, P., and M.A. Davitz. 1994a. How GPI-anchored proteins turnover: or where do they go after arrival at the plasma membrane. *Semin Immunol.* 6:81
Censullo, P., and M.A. Davitz. 1994b. The fate of GPI-anchored molecules. *Braz J. Med. Biol. Res.* 27:289
Turner A.J. 1994. PIG-tailed membrane proteins. *Essays Biochem.* 28:113
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【0007】
本発明は、(a) CD55ペプチド配列、(b)前記CD55配列のC末端側にリンカー配列、(c)前記リンカー配列のC末端側に膜貫通ドメイン、及び(d)前記膜貫通ドメインのC末端側に細胞内ドメインを含む組換え融合タンパク質であって、GPIアンカーを含有しない融合タンパク質を提供する。本発明は、前記タンパク質をコードする核酸及び発現ベクター、前記タンパク質を発現する細胞、前記タンパク質をウイルス膜上に組み込む方法である。
JP 7161940 B2 2022.10.27 50

み込んでいるエンベロープウイルス、前記タンパク質を組み込んでいる本発明のウイルスを含む医薬組成物、並びに治療方法及びウイルスの使用も提供する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、融合タンパク質を発現しないウイルスと比較して回収率が高いことによって証明されるとおり、本発明による融合タンパク質を発現するウイルスが正常ヒト血清による不活性化に耐性であったという発見に一部基づいている。ウイルス膜上の組換え融合タンパク質の形態で補体阻害剤を組み込んでいる本発明の改変された細胞によって産生された腫瘍溶解性エンベロープウイルスは、ウイルス膜上の補体阻害剤を欠いている対応するウイルスと比較して、良好ながん治療剤であり、腫瘍に入る前のヒト血清循環におけるその生存能力によってがん患者に良好な臨床転帰を提供する。利益は、以下の3つからなる：1)腫瘍溶解性ウイルスをバイオリアクターでの細胞培養系において産生することができる；2)ニワトリ卵において産生される親腫瘍溶解性ウイルスと比較して、同じ治療有効性を達成するために必要なウイルス性粒子が少ない；3)より少ないウイルス性粒子のがん患者への注入により、サイトカインストームなどの多量のウイルス粒子に伴う副作用又は不純物に関連する影響を低減できる。

【0009】

ニューカッスル病ウイルス（N D V）の防御における補体調節タンパク質C D 5 5の効果を研究した他の人々は（Biswas, M., Johnson, J.B., Kumar, S.R.P. Parks, G.D., and E. Subbiah. 2012. Incorporation of host complement regulatory proteins into Newcastle disease virus enhances complement evasion. *J. Virol.* 86:12708、Rangaswamy, U.S., Cotter, C.R., Chang, X., Jin, H., and Z. Chen. 2016. CD55 is a key complement regulatory protein that counteracts complement-mediated inactivation of Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* 97:1765）、グリコシルホスファチジルイノシトール（G P I）アンカーを含む天然の未改変C D 5 5を使用した。対照的に本発明の融合タンパク質は、G P Iアンカーを除く。理論に束縛されることなく、G P Iアンカーの除去が細胞表面でのC D 5 5の異化動態を変化させたと考えられる。本発明の融合タンパク質は、Biswas及びRangaswamyによって利用されたものよりもさらにストリンジエントな不活性化条件に抵抗することができた。不活性化アッセイにおいて Biswasは5～10%正常ヒト血清を使用し、Rangaswamyは0.3～5%正常ヒト血清を使用した。下記の実施例は、組換え融合タンパク質を組み込んだN D Vで不活性化アッセイを実施するために40%正常ヒト血清を使用した。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】分泌シグナルペプチド、C D 5 5の4個のショートコンセンサスリピート（S C R、short consensus repeat）、可動性リンカー、C D 8膜貫通ドメイン、及びトランケートしたC D 8細胞内ドメインからなる組換え補体阻害性融合タンパク質に続いてI R E S - n e o選択可能マーカー及び合成ポリアデニル化シグナル（poly A）をコードする哺乳動物細胞発現コンストラクトマップ配列を示す図である。

【図2】改変されたD F 1細胞膜又は改変N D V膜の成熟補体阻害性融合タンパク質の向きを例示する図である。

【図3】組換え補体阻害性融合タンパク質の細胞表面発現を示すグラフである。C D 5 5特異的抗体による融合タンパク質発現についてのフローサイトメトリー分析。左側のヒストグラムは、陰性対照としての未処置D F 1細胞を示している。右側のヒストグラムは、配列番号2を安定に発現するD F 1細胞（細胞クローニング番号8）を示している。

【図4】腫瘍細胞株において補体阻害性融合タンパク質を組み込まれた改変されたD F 1細胞（クローニング番号8）によって産生されたN D Vの細胞毒性アッセイを示すグラフである。

【図5】分泌シグナルペプチド、C D 5 5の4個のショートコンセンサスリピート（S C R）、可動性リンカー、C D 8膜貫通ドメイン、及びトランケートしたC D 8細胞内ドメ

10

20

30

40

50

インからなる組換え補体阻害性融合タンパク質のアミノ酸配列（配列番号2）を示す図である。二重下線は、分泌シグナルペプチドを示す。標準書体は、CD55のSCRを示す。下線は、(G4S1)3リンカーを示す。太字は、CD8膜貫通ドメインを示す。斜字体は、トランケートしたCD8細胞内ドメインを示す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の融合タンパク質によれば、配列(a)には、任意のCD55ペプチド配列を利用することができます。一実施形態では、CD55ペプチド配列はヒトCD55ペプチド配列である。CD55ペプチド配列は、CD55の4個のショートコンセンサスリピート(SCR)を含むことが好ましい。配列(b)には、任意の可動性リンカー、例えば当技術分野において周知の従来法の可動性リンカーを利用することができます。一実施形態では、G4S1リンカー、好ましくは(G4S1)3リンカーが利用される。配列(c)には、任意の膜貫通ドメイン、例えば当技術分野において周知の従来の膜貫通ドメインを利用することができる。一実施形態では、膜貫通ドメインはCD8膜貫通ドメインである。配列(d)には、任意の細胞内ドメイン、例えば従来の細胞内ドメインを利用することができる。一実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8膜貫通ドメイン、好ましくはトランケートしたCD8膜貫通ドメインである。

10

【0012】

本発明の融合タンパク質は、配列(a)のN末端側に分泌シグナルペプチドをさらに含んでよい。本発明の好ましいプロセスによれば、融合タンパク質は、最初にシグナルペプチドと共に発現される。シグナルペプチドは、新たに合成された融合タンパク質を小胞体(ER)に誘導し、そこでシグナルペプチダーゼによってシグナルペプチドが切断される。配列番号2は、N末端シグナルペプチドを有する本発明の例示的融合タンパク質である。配列番号3は、N末端シグナルペプチドを有さない本発明の例示的融合タンパク質である。

20

【0013】

本発明の融合タンパク質によれば、N末端シグナルペプチドと配列(a)の間、配列(a)と配列(b)の間、配列(b)と配列(c)の間、配列(c)と配列(d)の間、これらの任意の2個の間、これら任意の3個の間又は4個すべての間に1又は2以上のアミノ酸のスペーサーがあつてよい。本発明の一実施形態では、N末端(terminal)シグナルペプチドと配列(a)の間にスペーサーはないか、又は言い換えると、N末端シグナルペプチドは、単一のペプチド結合によって配列(a)と共有結合している。別の実施形態では、N末端シグナルペプチドと配列(a)の間にスペーサーがある。

30

【0014】

本発明の一実施形態では、配列(a)と配列(b)の間にスペーサーはないか、又は言い換えると配列(a)は単一のペプチド結合によって配列(b)と共有結合している。別の実施形態では、配列(a)と配列(b)の間にスペーサーがある。本発明の一実施形態では、配列(b)と配列(c)の間にスペーサーはないか、又は言い換えると配列(b)は単一のペプチド結合によって配列(c)と共有結合している。別の実施形態では、配列(b)と配列(c)の間にスペーサーがある。本発明の一実施形態では、配列(c)と配列(d)の間にスペーサーはないか、又は言い換えると配列(c)は単一のペプチド結合によって配列(d)と共有結合している。別の実施形態では、配列(c)と配列(d)の間にスペーサーがある。原則として、スペーサーのサイズに制限はない。

40

【0015】

CD55は、4個の細胞外ショートコンセンサスリピート(SCR)、Ser/Thr/Pro(STP、Ser/Thr/Pro)リッチ領域及びGPIアンカードメインを含有する。本発明の融合タンパク質によれば、GPIアンカードメインは除かれている。STPリッチ領域は、存在しても存在しなくてもよい。本発明の融合タンパク質コード配列の一実施形態は、第3のペプチド配列コード配列のC末端側にポリアデニル化シグナルをさらに含む。ポリアデニル化シグナル(Poly A)は、任意のPoly Aであつてよい。

50

【0016】

本発明は、上記のタンパク質をコードする核酸を提供する。一実施形態では、核酸はDNAである。シグナルペプチドをコードする配列と配列(a)の間、配列(a)と配列(b)の間、配列(b)と配列(c)の間、配列(c)と配列(d)の間、又は他所のいずれかに1又は2以上のイントロンを含有してよい。本発明の一実施形態では、核酸は、配列番号2又は配列番号3の配列を有するタンパク質をコードする。配列番号1は、配列番号2の配列を有するタンパク質をコードする核酸の一例である。同一のアミノ酸についての異なる核酸コドントリプレットコード、遺伝暗号の縮重として周知である関係のために、配列番号2の配列を有するタンパク質をコードする多数の他の核酸配列は容易に想定でき、本発明に含まれる。

10

【0017】

本発明の実施形態は、制御配列、例えばプロモーターに作動可能に連結された上記の核酸を含む発現ベクターである。融合タンパク質を駆動するプロモーターは、任意のプロモーターであってよく、CMVプロモーターに限定されない。プロモーターと融合タンパク質コード配列の間にイントロンがある場合、任意の適切な従来のイントロンを利用することができる。例えば グロビンイントロンは適切である。

【0018】

本発明は、本発明の融合タンパク質をその細胞表面に安定に発現する細胞株を提供する。本発明によれば、タンパク質発現のための任意の従来の細胞株を使用することができる。一実施形態では、細胞株は哺乳動物細胞株である。別の実施形態では、細胞株は、非哺乳動物細胞株、例えばDF-1ニワトリ胚線維芽細胞株である。

20

【0019】

本発明は、上記の融合タンパク質をウイルス膜上に組み込んでいるエンベロープウイルスを提供する。本発明によれば、任意のエンベロープウイルスを利用することができます。一実施形態では、ウイルスは、腫瘍溶解性ウイルス、例えばニューカッスル病ウイルス(NDV)などのパラミクソウイルスである。実施例では、組換え融合タンパク質の形態にある補体阻害剤が、NDV粒子エンベロープに組み込まれた。本発明の組換え融合タンパク質は、NDV以外の腫瘍溶解性ウイルスのために使用して、宿主補体不活性化にさらに耐性である腫瘍溶解性ウイルス性粒子の生成をもたらすことができる。融合タンパク質の形態の新規の組換え補体阻害剤を使用して、HeLa細胞などの任意の他の哺乳動物細胞を変更することにより、腫瘍溶解性ウイルスを產生することもできる。腫瘍溶解性ウイルスは、その内容が参照により組み込まれる国際公開第WO2000/062735号パンフレットに記載されている。その結果が下に示される実験において利用されたNDVは、国際公開第WO2000/062735号パンフレットに記載されたPPMK107であった。

30

【0020】

ウイルスは、ウイルス及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物に組み込むことができる。本発明は、哺乳動物対象において新生物状態(neoplastic condition)を治療するための方法であって、対象に、新生物状態を治療するのに有効な量の上記のウイルスを投与することを含む方法を提供する。がん治療のために、ウイルスは、患者に任意の従来法の経路を介して、例えば1回又は2回以上の腫瘍内又は静脈内注射によって投与することができる。腫瘍内投与の場合、用量範囲は腫瘍あたり $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^{12}$ p.f.u.であってもよい。静脈内投与の場合、用量範囲は $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{13}$ p.f.u./m²であってもよい(「p.f.u.」は、「ブラーク形成単位」(plaque forming unit)の略称である)。

40

【0021】

本発明による腫瘍溶解性ウイルスを、GMCSFなどの他の分子を組み込むように改変して、腫瘍溶解性ウイルスの有効性を増強することもできる。さらに、腫瘍溶解性ウイルスは、抗PD1又は抗PDL1分子などのチェックポイント阻害剤との併用がん療法の一部とすることもできる。さらに腫瘍溶解性ウイルスは、他の化学療法薬との併用がん療法の一部とすることもできる。化学療法薬は、これだけに限らないがカンプトテシン化合物

50

、例えばイリノテカン又はトポテカンであってもよい。

【 0 0 2 2 】

本明細書において述べるすべての刊行物、特許及び特許出願は、それぞれ個々の刊行物、特許及び特許出願が具体的かつ個別に参照により本明細書に組み込まれると示されたのと同様に、本明細書にその全体が参照により組み込まれる。前述の刊行物、特許及び特許出願のいずれかを含んで公表された任意の追加的情報は、同様に参照により組み込まれる。例えば一部の学術論文は、典型的にはオンラインで入手可能である追加的情報を含んで公表される。

【 0 0 2 3 】

本発明は、本明細書に記載の本発明を例示するが限定しない次の実施例を参照することによってさらに理解される。

10

[実施例]

【 実施例 1 】

【 0 0 2 4 】

分泌シグナルペプチドの下流に C D 5 5 の 4 個のショートコンセンサスリピート (S C R) に続いて可動性リンカー (3 × G 4 S 1) 並びに C D 8 膜貫通及びトランケートした C D 8 細胞内ドメインを含む組換え C D 5 5 の改変体を作製した (図 1) 。コード配列を、 C M V プロモーター、組換えタンパク質発現を駆動する合成イントロンを有する哺乳動物発現コンストラクトにクローニングした。発現カセットは、 I R E S の下流に薬物選択可能マーカー、ネオマイシンホスホトランスクレオチドも含有した。遺伝子発現カセットは、合成ポリアデニル化シグナルで終わった。配列番号 1 は、哺乳動物細胞発現コンストラクトのヌクレオチド配列である。配列番号 2 は、発現されるタンパク質のアミノ酸配列を表す。ニワトリ胚線維芽細胞 D F 1 細胞表面で発現される又はウイルス膜に組み込まれる場合、 C D 5 5 S C R が細胞又はウイルス膜の外側にあり、細胞又はウイルス膜に隣接する可動性リンカーが C D 5 5 の S C R にその生物学的機能を発揮するような最大の可動性を提供する、すなわち補体経路の中心的調節因子である C 3 転換酵素を無効にするような立体配置 / 方向を有する成熟組換え融合タンパク質 (配列番号 3) をもたらすよう、シグナルペプチドは切断される。可動性リンカーには、 C D 8 膜貫通ドメイン及びトランケートした C D 8 細胞内ドメインが続く。

20

【 実施例 2 】

30

【 0 0 2 5 】

哺乳動物発現コンストラクトをニワトリ胚線維芽細胞 D F 1 細胞に P E I 2 5 K (ポリエチレンイミン、直鎖 2 5 k D a 、 Polysciences 社、カタログ番号 23966) 媒介トランスクレクションを介してトランスクレクションした。トランスクレクション 7 2 時間後、トランスクレクションした細胞を、配列番号 2 を恒常的に発現する安定細胞株を作製するために 3 0 0 μ g / m L G 4 1 8 (Geneticin (登録商標) 、アミノグリコシド抗生物質) において選択した。安定細胞株は、成熟ヒト C D 5 5 に特異的であるモノクローナル抗体 (R & D Systems 社、カタログ番号 MAB20091) によって検出されるとおり、配列番号 3 をその細胞表面に恒常的に発現した。図 3 に示すとおり組換え融合タンパク質は、フローサイトメトリーによって分析されたとおり (図 3 、右側のヒストグラム) 組換え融合タンパク質をコードするコンストラクトを安定にトランスクレクションされた D F 1 細胞上に発現された。未処置 D F 1 細胞を陰性対照とした (図 3 、左側のヒストグラム) 。

40

【 実施例 3 】

【 0 0 2 6 】

細胞表面に配列番号 3 を発現する安定細胞株を、胚形成ニワトリ卵から産生された野生型 N D V に感染させた。次いでウイルスの力値をヒト腫瘍細胞株 H T 1 0 8 0 上で決定した。等量のウイルス (P F U によって測定) を 4 0 % 正常ヒト血清 (N H S 、 normal human serum) 及び 4 0 % 热不活性化正常ヒト血清 (i N H S 、 inactivated normal human serum) をそれぞれ用いたインキュベーションに供した。ヒト血清を用いたインキュベーション後に生存していたウイルスを、次にプランクアッセイによって H T 1 0 8 0 細

50

胞上でスコア化した。NHS対iNHSを用いたインキュベーション後に回収されたウイルスの割合を算出した。表1に示すとおり、胚形成ニワトリ卵において産生されたウイルスについての回収率は0.5%であり、ニワトリ卵によって産生されたNDV粒子の大部分がヒト補体副経路によって不活性化される可能性が高いことを示唆していた。同様に親ニワトリ胚線維芽細胞DF1細胞によって産生されたウイルスについての回収率も0.5%であった。驚くべきことに、細胞表面に配列番号3を安定に発現するバルク非クローニングDF1細胞から産生されたウイルスについての回収率は5.8%であり、野生型ウイルスより10倍を超えて高かった。配列番号3を発現するDF1細胞の合計11個のクローニング集団を検討した場合、5個のクローニングがバルク非クローニング細胞株より低い回収率を記録し、6個のクローニングが高い回収率を記録して回収率は0.8~20%の範囲であった(表1)。クローニング番号8によって生成されたウイルスは、胚形成ニワトリ卵又は親DF1細胞のいずれかによって産生されたウイルスより20倍高い10%の回収率を有した。クローニング番号40によって生成されたウイルスは、胚形成ニワトリ卵又は親DF1細胞のいずれかによって産生されたウイルスより40倍高い20%の回収率を有した。これらのデータは、正常ヒト血清中に存在する補体活性が、胚形成ニワトリ卵又は親ニワトリ胚線維芽細胞DF1細胞によって産生されたNDV粒子を急速に破壊したことを強く示唆している。しかし、細胞表面に組換え補体阻害剤を安定に発現するDF-1細胞によって産生された新規NDV粒子は、同一の実験条件下で40%正常ヒト血清を用いたインキュベーション後にニワトリ卵又は親DF1細胞のいずれかによって産生されたウイルスと比較して、最大40倍という顕著に高い回収率を示した。

10

20

【0027】

【表1】

表1.40%正常ヒト血清(NHS)対40%熱不活性化ヒト血清(iNHS)を用いたインキュベーション後に回収されたウイルスの割合によって測定されたウイルス回収率

産生された腫瘍溶解性NDVの由来	ヒト血清を用いたインキュベーション後の回収率%
胚形成ニワトリ卵	0.5
親DF1細胞	0.5
配列番号3を発現する非クローニングDF1細胞	5.8
配列番号3を発現するクローニング#1 DF1	4.3
配列番号3を発現するクローニング#2 DF1	5.2
配列番号3を発現するクローニング#3 DF1	0.8
配列番号3を発現するクローニング#4 DF1	6.8
配列番号3を発現するクローニング#5 DF1	3.6
配列番号3を発現するクローニング#6 DF1	1.5
配列番号3を発現するクローニング#7 DF1	7.1
配列番号3を発現するクローニング#8 DF1	10.0
配列番号3を発現するクローニング#10 DF1	6.1
配列番号3を発現するクローニング#11 DF1	6.0
配列番号3を発現するクローニング#40 DF1	20.0

30

40

【実施例4】

【0028】

細胞表面に補体阻害性融合タンパク質を安定に発現するDF1細胞(クローニング番号8)から産生されたNDVの広域スペクトル腫瘍溶解性活性をCellTiter96(登録商標)AQueous One Solutionを使用して評価した。この溶液は、代謝的に活性な細胞が試薬中のMTSテトラゾリウム(すなわち、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリ

50

ウム)を可溶性発色ホルマザンに生体還元(bio-reduce)できる、MTT(すなわち、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド)アッセイと同様に機能する。簡潔には、3種の異なる腫瘍細胞株であるHT1080(線維肉腫)、PANC-1(膵臓上皮癌)及びOV-CAR3(卵巣腺癌)を(where grown)別々の96ウェルプレートで増殖させた。翌日、NDVウイルスの系列希釈物をそれぞれのウェルに加え、プレートを6日間、5%CO₂を含む37℃インキュベーターでインキュベートした。6日目に、各プレートのすべてのウェルの吸光度を490nmで分光光度計を使用して測定した。IC₅₀を各細胞株について4パラメーターロジスティック非線形回帰分析を使用して算出した。これは、HT1080、OV-CAR-3及びPANC-1細胞株についてそれぞれ255、120及び47pfu/ウェルの最終IC₅₀値をもたらした(図4)。これらの結果は、その細胞表面に組換え補体阻害剤を安定に発現したDF-1細胞によって産生されたNDV粒子が用量依存的様式で種々の腫瘍細胞株を溶解する能力を保持していることを示している。

【0029】

(参考文献)

- Carroll, M. C., E. M. Alicot, P. J. Katzman, L. B. Klickstein, J. A. Smith, and D. T. Fearon. 1988. Organization of the genes encoding complement receptors type 1 and 2, decay-accelerating factor, and C4-binding protein in the RCA locus on human chromosome 1. *J. Exp. Med.* 167:1271
- Rey-Campos, J., P. Rubinstein, and S. Rodriguez de Cordoba. 1988. A physical map of the human regulator of complement activation gene cluster linking the complement genes CR1, CR2, DAF, and C4BP. *J. Exp. Med.* 167:664
- Lublin, D. M., and J. P. Atkinson. 1989. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu. Rev. Immunol.* 7:35. 5. Nakano, Y., K. Sumida, N. Kikuta, N. H. Miura, T. Tobe, and M. Tomita. 1992. Complete determination of disulfide bonds localized within the short consensus repeat units of decay accelerating factor (CD55 antigen). *Biochim. Biophys. Acta* 1116:235
- Censullo, P., and M.A. Davitz. 1994a. How GPI-anchored proteins turnover: or where do they go after arrival at the plasma membrane. *Semin Immunol.* 6:81
- Censullo, P., and M.A. Davitz. 1994b. The fate of GPI-anchored molecules. *Br J. Med. Biol. Res.* 27:289
- Morgan, B. P., and S. Meri. 1994. Membrane proteins that protect against complement lysis. *Springer Semin. Immunopathol.* 15:369
- Turner A.J. 1994. PIG-tailed membrane proteins. *Essays Biochem.* 28:113
- Kim D.D., and W.C. Song. 2006. Membrane complement regulatory proteins. *Clin. Immunol.* 118:127
- Pecora, A.L., Rizvi, N., Cohen, G.I., Meropol, N.J., Sterman, D., Marshall, J.L., Goldberg, S., Gross, P., O'Neil, J.D., Groene, W.S., Roberts, M.S., Rabin, H., Bamat, M.K., and R.M. Lorence. 2002. Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. *J. Clin. Oncol.* 20:2251
- Laurie, S.A., Bell, J.C., Atkins, H.L., Roach, J., Bamat, M.K., O'Neil, J.D., Roberts, M.S., Groene, W.S., and R.M. Lorence. 2006. A phase 1 clinical study of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, using two-step desensitization. *Clin. Cancer Res.* 12:2555
- Lorence, R.M., Roberts, M.S., O'Neil, J.D., Groene, W.S., Miller, J.A., Mueller, S.N., and M.K. Bamat. 2007. Phase 1 clinical experience using intravenous administration of PV701, an oncolytic Newcastle disease virus. 7:157
- Biswas, M., Johnson, J.B., Kumar, S.R.P. Parks, G.D., and E. Subbiah. 2012. Incorporation of host complement regulatory proteins into Newcastle disease v

irus enhances complement evasion. J. Virol. 86:12708

Rangaswamy, U.S., Cotter, C.R., Chang, X., Jin, H., and Z. Chen. 2016. CD55 is a key complement regulatory protein that counteracts complement-mediated inactivation of Newcastle disease virus. J. Gen. Virol. 97:1765

【図面】

【図 1】

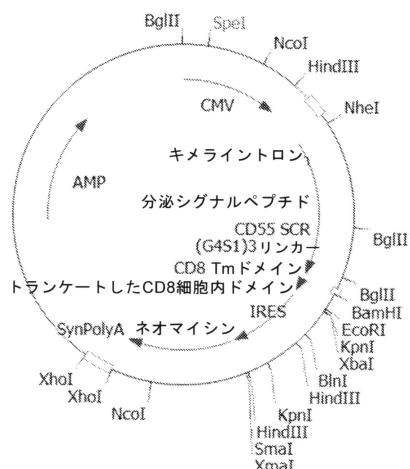


Figure 1

【図 2】

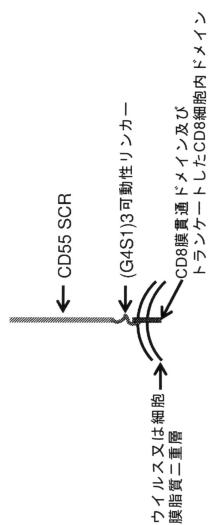


Figure 2

10

20

【図 3】

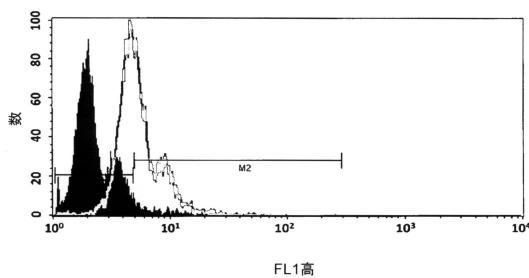


Figure 3

【図 4】

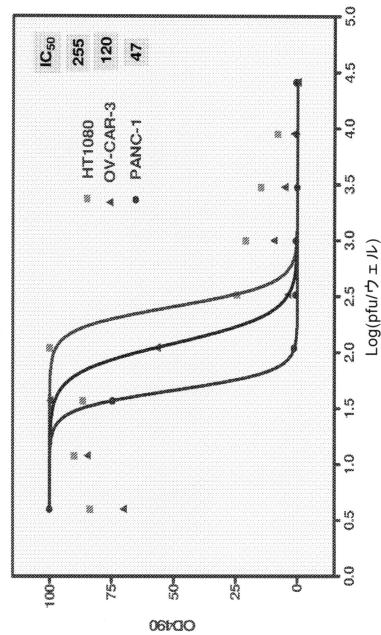


Figure 4

30

40

50

【図 5】

MTVARPSVPAALP~~L~~LGELPRLLLLC~~L~~PAVWGDGLPPDV~~P~~NAQPALEGRTSFPEDTV
 ITYKCEESFVKIPGEKDSVICLKGSQWSDIEEF~~C~~NRSCEVPTLNSASLKQPYITQNYFP
 VGT~~V~~VEYECPGYREPSLSPKLTCQNLLKMSTAEFCKKKSCPNPEIRNGQIDVPGGI
 LFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISSSSVQWSDPECRELYCPAPPQIDNGLIQER
 DHYGYROSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDGEWSGPPECRGKSLSLTSKVPPPTVQRT
 TVNVPTTEVSPTSQKTTTTPNAQATRSTPVSRTKHFHETTPNKGSGTTGGGGSGGG
GSGGGGS**IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRNRRV**(配列番号2)

Figure 5

10

20

30

40

50

【配列表】

0007161940000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N	7/01 (2006.01)	F I	C 1 2 N	7/01
A 6 1 K	35/768 (2015.01)		A 6 1 K	35/768
A 6 1 P	35/00 (2006.01)		A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	43/00 (2006.01)		A 6 1 P	43/00 1 1 1

弁理士 松田 一弘

(74)代理人 100113860

弁理士 松橋 泰典

(74)代理人 100131093

弁理士 堀内 真

(74)代理人 100150902

弁理士 山内 正子

(74)代理人 100141391

弁理士 園元 修一

(74)代理人 100198074

弁理士 山村 昭裕

(74)代理人 100096013

富田 博行

(72)発明者 ルオ ティアンチ

アメリカ国 メリーランド 20759 フルトン プレザベーションコート 7229

(72)発明者 モリーナ ルネ

アメリカ国 メリーランド 21740 ヘイガーズタウン ナイツブリッジドライブ 658

(72)発明者 カスティーユ ガブリエル

アメリカ国 メリーランド 20874 ジャーマンタウン クライミングアイヴィードライブ 128
01

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 特開平10-313865 (JP, A)

国際公開第2016/174407 (WO, A1)

特表2002-509695 (JP, A)

特開2008-061539 (JP, A)

特表2008-507272 (JP, A)

Molecular therapy, 2005年, 11(4), 645-651

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 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)

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d