

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4810042号
(P4810042)

(45) 発行日 平成23年11月9日(2011.11.9)

(24) 登録日 平成23年8月26日(2011.8.26)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/00 (2006.01)
C 1 2 N 7/04 (2006.01)
A 6 1 K 35/76 (2006.01)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/00
 C 1 2 N 7/04
 A 6 1 K 35/76
 A 6 1 K 37/02
 A 6 1 P 35/00

請求項の数 13 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2001-553367 (P2001-553367)
 (86) (22) 出願日 平成13年1月22日(2001.1.22)
 (65) 公表番号 特表2003-520044 (P2003-520044A)
 (43) 公表日 平成15年7月2日(2003.7.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2001/000225
 (87) 国際公開番号 W02001/053505
 (87) 国際公開日 平成13年7月26日(2001.7.26)
 審査請求日 平成19年12月20日(2007.12.20)
 (31) 優先権主張番号 0001475.3
 (32) 優先日 平成12年1月21日(2000.1.21)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 0002854.8
 (32) 優先日 平成12年2月8日(2000.2.8)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 500354883
 バイオヴェックス リミテッド
 イギリス国 オーエックス 1 4 4 アール
 エックス オックスフォード アビンドン
 ミルトン パーク 7 O
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘルペスウイルス株

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

GM-CSFをコードする遺伝子を含み、機能的ICP34.5をコードする遺伝子及び機能的ICP47をコードする遺伝子を欠失し、かつ腫瘍細胞中で複製能力のあるヘルペスウイルス。

【請求項 2】

ICP6、グリコプロテインH又はチミジンキナーゼをコードする機能的遺伝子をさらに欠失した、請求項 1 に記載のウイルス。

【請求項 3】

樹状細胞の機能を阻害する能力のあるタンパク質の機能的コピーをコードする遺伝子をさらに欠失した、請求項 1 又は 2 に記載のウイルス。

【請求項 4】

樹状細胞の機能を阻害する能力のある前記タンパク質がUL43又はvhsである、請求項 3 に記載のウイルス。

【請求項 5】

単純ヘルペスウイルスI型又はII型の株である、請求項 1 又は 2 に記載のウイルス。

【請求項 6】

非実験室ウイルス株である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のウイルス。

【請求項 7】

前記非実験室株が、

(a) 改変されていない前駆株をその宿主から単離してからの培養期間が1年以下のもの

であるか；又は

(b) 改変されていない前駆株をその宿主から単離してからの連続継代のサイクルが100サイクル以下のものであるか；又は

(c) 腫瘍細胞に感染するかもしくは腫瘍細胞内で複製する能力、腫瘍細胞を死滅させる能力、又は組織内の細胞間で伝染する能力が、等価な改変を有する参照の実験室株よりも優れているものである

ことを特徴とする、請求項6に記載のウイルス。

【請求項 8】

前記(c)に記載のより優れている能力が、統計的に有意に優れた能力であることを特徴とする、請求項7に記載のウイルス。

【請求項 9】

非実験室株がHSV株であり、請求項7に記載の参照株が非実験室株に等価な改変を施したHSV1 17⁺株、HSV1 F株、又はHSV1 KOS株である、請求項7又は8に記載のウイルス。

【請求項 10】

European Collection of Cell Cultures(ECACC)に受託番号01010209として寄託されているHSV1 JS1株に由来する、請求項1～9のいずれか1項に記載のウイルス。

【請求項 11】

請求項1～10のいずれか1項に記載のヘルペスウイルスを含む癌を治療するための薬剤。

【請求項 12】

腫瘍内直接接種用である、請求項11に記載の薬剤。

【請求項 13】

有効成分としての請求項1～10のいずれか1項に記載のウイルス及び製薬上許容しうる担体又は希釈剤を含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、従来の公知の株と比較して改善された抗腫瘍活性を有するヘルペスウイルス株に関する。

【0002】

発明の背景

ウイルスは、多くの事象に関してバイオテクノロジー及び医学における種々の用途に有用性を有することが示されている。各々の有用性は、高い効率で細胞に侵入するウイルス特有の能力に起因する。このことにより、ウイルス遺伝子の発現と複製及び/又は挿入された異種遺伝子の発現による適用が行われる。このようにウイルスは細胞に遺伝子(ウイルス遺伝子又は他の遺伝子のいずれか)を送達すること、及び細胞において遺伝子を発現させることのどちらも可能であり、このことは例えば遺伝子治療もしくはワクチンの開発に有用であり、又は例えば癌において、溶菌性複製によって細胞を選択的に死滅させることもしくは送達された遺伝子を作用させることに有用であり得る。

【0003】

単純ヘルペスウイルス(HSV)は、癌の腫瘍崩壊性治療に有用であることが示唆されている。しかしながらこの場合、ウイルスを無能化して、病原性はなくなったが(すなわち、非腫瘍細胞において複製せず、これを死滅させない)、腫瘍細胞には侵入でき、これを死滅できるようにする必要がある。癌の腫瘍崩壊性治療については、この治療は治療効果を増強する遺伝子の送達を含むことができ、依然としてウイルスは培養においてもしくはin vivoの活性のある分裂細胞において複製できるが、正常組織での有意な複製が阻止される、HSVに対する多くの突然変異が同定されている。このような突然変異には、ICP34.5、ICP6及びチミジンキナーゼをコードする遺伝子の破壊が含まれる。これらの中で、ICP34.5に対する突然変異を有するウイルス、又は例えばICP6の突然変異とともにICP34.5に対する突然変異を有するウイルスによって、今までのところ最も良好な安全プロファイルが示

10

20

30

40

50

されている。ICP34.5だけが欠失したウイルスは、*in vitro*で多くの腫瘍細胞型で複製すること、及びマウスにおいて周辺組織を残して人工的に誘導した脳腫瘍において選択的に複製することが示されている。

【0004】

しかしながら、HSVを含む様々なウイルスについて、癌の腫瘍崩壊性治療に対する有望性が示されているが、この研究のほとんどで使用されているウイルス株は、抗腫瘍効果を増大しうる異種遺伝子を担持していないものである。本発明者らは、特に、通常ウイルスにおけるHSV感染細胞に対する免疫応答を低減させる機能も不活化されている場合に、ICP34.5をコードする遺伝子を不活化する変異を有するHSVと無能化されたウイルスゲノムにおいてコードされる免疫調節タンパク質（顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）など）をコードする遺伝子の送達とを組み合わせることにより、治療すべき腫瘍に対する最適な免疫刺激特性をもたらすことを提案する。例えば、HSV ICP47タンパク質はHSV感染細胞における抗原提示を特異的に阻害し（Hillら、1995）、UL43遺伝子産物及びvhsタンパク質はHSVに感染した樹状細胞の免疫刺激能力を低減させる。従って、特に免疫効果をGM-CSF又はその他の免疫刺激性サイトカイン若しくはケモカインによって増強させようとする場合、ICP47及び/又は樹状細胞を不活化する遺伝子を、癌の治療に使用される腫瘍崩壊性HSV変異ウイルスから欠失させるのが有効である。GM-CSFは、全身に投与された場合よりもむしろ腫瘍細胞内から発現された場合に、増強された抗腫瘍免疫効果をもたらすことが最近示された（Shiら、1999）。従って、このような用途においては、腫瘍崩壊性HSV変異体を、複製及び腫瘍の崩壊が起こる1次腫瘍又は2次腫瘍に接種させることになる。免疫応答はHSV感染細胞に対して刺激され、そして1次腫瘍部位から拡散したその他の腫瘍細胞に対しても刺激される。

【0005】

発明の概要

本発明は、*in vivo*における腫瘍細胞の細胞溶解による破壊について改善された能力を有するウイルスを提供する。本発明において単純ヘルペスウイルス株は、HSV 1又はHSV2株を用いて構築される。これらの株においては、ICP34.5及びICP47をコードする遺伝子は、機能的ICP34.5又はICP47タンパク質が発現できないように不活化されており、また、免疫調節タンパク質をコードする遺伝子を担持する。該ウイルスはまた、UL43遺伝子及び/又はvhsをコードする遺伝子などの樹状細胞の機能阻害に関与しうるさらなる遺伝子について、変異を有していてもよい。従って本発明は、腫瘍細胞の崩壊が可能で、抗腫瘍免疫効果が最大化されるウイルスを提供する。

【0006】

従って本発明は、免疫調節タンパク質をコードする遺伝子を含み、機能的ICP34.5をコードする遺伝子及び機能的ICP47をコードする遺伝子を欠失したヘルペスウイルス、人体又は動物体の治療方法において使用するための本発明のヘルペスウイルス、癌の治療のための医薬品の製造における本発明のウイルスの使用、有効成分としての本発明のウイルス及び製薬上許容しうる担体又は希釈剤を含む医薬組成物、治療を必要とする個体に、本発明のウイルスの有効量を投与することによって、該個体の腫瘍を治療する方法、を提供する。

【0007】

詳細な説明

A. ウイルス

本発明のヘルペスウイルスは、標的腫瘍細胞に効率的に感染することができ、そしてICP34.5及びICP47をコードする遺伝子が該ウイルスにおいて不活化されているものである。ICP34.5の突然変異により、選択的腫瘍崩壊活性が可能になる。このような突然変異は、Chouら、1990及びMacleanら、1991に記載されているが、ICP34.5を非機能的なものとする

任意の突然変異を使用しうる。ICP6及び/又はチミジンキナーゼをコードする遺伝子は、その不活化が腫瘍崩壊能を有意に低減させるか又はその欠失がウィルスの腫瘍崩壊特性又はその他の望ましい特性を増強する場合、さらにこれらを不活化してもよい。その他の遺伝子についても同様である。ICP47は通常HSVに感染した細胞における抗原提示をブロックするように機能するため、これが破壊されると、HSVに感染したときの宿主の免疫系から腫瘍細胞を保護する特性を、感染した腫瘍細胞に与えないウイルスがもたらされる。本発明のウイルスはさらに、免疫調節タンパク質、好ましくはGM-CSFをコードするが、その他のサイトカイン、ケモカイン（例えば、RANTES）又はその他の免疫調節タンパク質（例えば、B7.1, B7.2 又はCD40L）をもコードしうる。免疫調節タンパク質をコードする遺伝子は、個別に又は組み合わせて含まれうる。

10

【0008】

上記の目的で変換されたウイルス領域は、抹消でき（完全に又は部分的に）又は非機能的なものにすることもでき、あるいはその他の配列、特にGM-CSFのような免疫調節タンパク質に対する遺伝子で置換することもできる。

【0009】

本発明のウイルスは、HSV1株もしくはHSV2株又はそれらの誘導株から誘導することができ、好ましくはHSV1から誘導することができる。誘導株としては、HSV1及びHSV2株に由来するDNAを含むタイプ間組換え株（inter-type recombinant）が挙げられる。このようなタイプ間組換え株については当技術分野で記載されており、例えばThompsonら、(1998)及びMeignierら(1988)に記載されている。誘導株は、HSV1又はHSV2ゲノムに対して少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90又は95%の配列相同性を有する。より好ましくは誘導株は、HSV1又はHSV2ゲノムに対して少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは少なくとも80%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも90%、95%又は98%の同一性を有する。

20

【0010】

例えば、UWGCGパッケージは、（例えばそのデフォルト設定で使用される）相同性を計算するために使用することができるBESTFITプログラムを提供する（Devereuxら、(1984) *Nucleic Acids Research* 12, p387-395）。PILEUP及びBLASTアルゴリズムは、（典型的にはこれらのデフォルト設定で）相同性を計算するため、又は配列を並べるために使用することができる（例えばAltschul (1993) *J. Mol. Evol.* 36:290-300; Altschulら(1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10に記載されている）。

30

【0011】

BLAST分析を実行するためのソフトウェアは、National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) により公に入手可能である。このアルゴリズムは、まず、データベース配列の中にある同じ長さのワードにアラインメントさせたときに、ある正の値の閾値スコアTに一致する又はこれを満たす、クエリー配列の中の長さWの短いワードを同定することにより、スコアの高い配列ペア（High scoring sequence pair, HSPs）を同定する工程を含む。Tは、近傍ワードスコア閾値（neighbourhood word score threshold）と呼ばれる（Altschulら、1990）。これらの最初の近傍ワードのヒットは、これらを含むHSPを見つけるために検索を開始するためのシードとして機能する。該ワードヒットを各配列に沿って両方向に、累積アラインメントスコアができる限り高くなるまで長く伸長させる。各方向へのワードヒットの伸長は、以下の時に停止する：累積アラインメントスコアがその最大達成値よりも量Xだけ低下したとき；1つ以上の負のスコアの残基アラインメント（negative-scoring residue alignment）の累積により累積スコアがゼロ以下になるとき；又はいずれかの配列の端部に到達したとき。BLASTアルゴリズムのパラメーターW、T及びXは、アラインメントの感度及び速度を決定する。BLASTプログラムは、ワード長(W)=11、BLOSUM62スコアリングマトリックス（Henikoff及びHenikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919を参照されたい）アラインメント(B)=50、期待値(E)=10、M=5、N=4及び両鎖の比較をデフォルトとして使用する。

40

【0012】

50

BLASTアルゴリズムは、2つの配列間で類似性の統計的分析を行う。例えばKarlin及びAltschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787を参照されたい。BLASTアルゴリズムにより提供される類似性の1つの基準は、2つのヌクレオチド配列又はアミノ酸配列間で一致が偶然起こる確率を示す最小合計確率 (the smallest sum probability) $P(N)$ である。例えば、第1の配列を第2の配列と比較したときの最小合計確率が約1未満、好ましくは約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満である場合、該配列は他方の配列に類似しているとみなされる。

【0013】

誘導株は、例えば1、2又は3~10、25、50又は100個のヌクレオチド置換により改変されたHSV1又はHSV2ゲノムの配列を有するものとすることができる。あるいは、又はこれに加えて、HSV1又はHSV2ゲノムは、1以上の挿入及び/もしくは欠失により、ならびに/又は一方もしくは両側の末端部の伸長により、改変することができる。

10

【0014】

本発明のウイルス株は、「非実験室」株である。またこれらを、「臨床」株と呼ぶこともできる。当業者であれば、実験室株と非実験室株(又は臨床株)とを容易に区別することができるだろう。ウイルス株によって提示されると考えられる特性に関するさらなるガイドランスを下記に記載する。

【0015】

実験室株と非実験室株との主要な差異は、現在一般に使用される実験室株は長い期間、幾つかの場合には長年、培養されて維持されているということである。HSVのようなウイルスの培養法には、連続継代として知られている技術が含まれる。ウイルスを増殖し維持するためには、好適な細胞にウイルスを感染させ、ウイルスを細胞内で複製させ、次いでウイルスを回収し、さらに新しい細胞に再感染させる。この工程は、連続継代の1サイクルを構成する。このような各サイクルは、例えばHSVの場合には2、3日間かかりうる。上記で考察したように、実際の用途に有用な特性(例えばHSVの場合には、軸索に沿って移動するという能力又はヒト細胞に感染する能力の維持)とは対照的な培養増殖に好都合である特性(例えば迅速な複製)に対する選択が生じるという点で、このような連続継代はウイルス株の特性を変化させる可能性がある。

20

【0016】

本発明のウイルス株は、感染した個体から最近単離した株から誘導するものであるという点で非実験室株でありうる。これらは、元の臨床単離株と比較して改変されており、培養に時間を費やし得るが、培養に費やす時間は比較的短い。本発明の株は、それらが誘導される元の臨床単離株の所望の特性を実質的に維持するような方法で調製される。

30

【0017】

本発明のウイルス株は、親ウイルス株を突然変異させて該ウイルスを産生した場合に、親ウイルス株に由来することとなる。例えば、本発明のウイルスは臨床単離株JSIに由来しうる。このようなJSI由来ウイルスの親株は、JSIであるか又はJSIに由来するその他のHSV1株でありうる。従って本発明のウイルスは、免疫調節タンパク質をコードする遺伝子を含み、機能的ICP34.5をコードする遺伝子及び機能的ICP47をコードする遺伝子を欠失するJSIウイルスでありうる。さらに、このようなウイルスは本明細書において記載するその他の突然変異を含みうる。

40

【0018】

本発明のウイルスは、標的ヒト癌細胞に効果的に感染する能力を有する。このようなウイルスが非実験室株又臨床株である場合、該ウイルスは、HSV感染個体から新たに単離され、標準的実験室株と比較してin vivo及び/又はin vitroにおいて増強された所望の複製能力、感染能力又は腫瘍細胞及び/又はその他の細胞の殺傷能力についてスクリーニングされたものである。続いて、実験室ウイルス株と比較して改善された特性を有する本発明のウイルスは、機能的ICP34.5及びICP47遺伝子を欠失させ、そして好適なプロモーターの調節下でGM-CSFなどの免疫調節タンパク質に対する遺伝子をコードするように遺伝子操作する。樹状細胞の機能を妨害するタンパク質、例えば、UL43及び/又はvhsをコードするその

50

他の遺伝子を不活化することもできる。

【0019】

好ましくは、本発明の非実験室ウイルス株は、その非改変臨床前駆体株をその宿主から単離した後の培養期間が3年以下のものである。より好ましくは、この株は、その非改変前駆体株をその宿主から単離した後の培養期間が1年以下、例えば9ヶ月以下、6ヶ月以下、3ヶ月以下、又は2ヶ月以下、1ヶ月以下、2週間以下、又は1週間以下のものである。これらの培養時間の定義は、実際に培養に費やした時間を意味する。従って、例えば、これらのウイルス株を保存するためにウイルス株を凍結することは、一般的な操作である。凍結することによって又は等価な方法で保存することは、ウイルス株を培養で維持することとはみなされないことは明らかである。従って、凍結ないしは他の方法で保存に費やされた時間は、培養に費やされた時間としての上記定義には含まれない。培養に費やされた時間は、典型的には連続継代を経るのに実際に費やされた時間、すなわち、望ましくない特徴に対する選択が起こり得る期間の時間である。

10

【0020】

好ましくは、非実験室ウイルス株は、その非改変前駆体株をその宿主から単離した後の連続継代のサイクルが1000サイクル以下のものである。より好ましくは本発明のウイルス株は、そのようなサイクルが500サイクル以下、100サイクル以下、90サイクル以下、80サイクル以下、70サイクル以下、60サイクル以下、50サイクル以下、40サイクル以下、30サイクル以下、20サイクル以下、10サイクル以下のものである。

20

【0021】

好ましくは、非実験室ウイルスは、標準的な統計的試験によって測定したところ、将来の用途に有用な特定の機能を達成するための等価な改変を有する参照実験室株よりも優れた能力を有する。腫瘍治療用の腫瘍崩壊性ウイルスの場合には、本発明の非実験室ウイルス株は、腫瘍細胞に感染し、又は腫瘍細胞において複製し、腫瘍細胞を死滅させ、又は組織中の細胞間を伝染するための等価な改変を有する参照実験室株よりも優れた能力を有することが好ましい。より好ましくは、そのような優れた能力は統計的に有意な優れた能力である。例えば、本発明に従えば、本発明の非実験室株は、試験した特性に関して参照株の能力の1.1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍又は100倍までの能力を有し得る。

30

【0022】

本明細書に記載した特性の統計分析は、標準的な検定、例えばt-検定、ANOVA、又はカイ2乗検定によって行うことができる。典型的には、統計的な有意性は、 $p=0.05(5\%)$ 、より好ましくは $p=0.01$ 、 $p=0.001$ 、 $p=0.0001$ 、 $p=0.000001$ のレベルまで測定される。

【0023】

本発明のウイルスは腫瘍細胞に感染し、該細胞において複製し、続いて腫瘍細胞を死滅させる。このような場合ウイルスは複製可能である。ウイルスが腫瘍細胞において選択的に複製可能であることが好ましい。このことは、ウイルスが腫瘍細胞において複製するが、非腫瘍細胞において複製しないこと、又はウイルスが非腫瘍細胞よりも腫瘍細胞において効果的に複製することのいずれかを意味する。その中でウイルスが複製可能な細胞は許容細胞である。選択的複製能力の測定は、複製及び腫瘍細胞死滅能力の測定について本明細書で記載した試験によって行うことができ、所望される場合には本明細書で記載した統計技術によって分析することができる。

40

【0024】

好ましくは、本発明のウイルスは、腫瘍細胞に感染し、又は腫瘍細胞において複製し、腫瘍細胞を死滅させ、又は組織中の細胞間を伝染する能力において、未改変親株よりも優れた能力を有する。好ましくは、この能力は統計的に有意な優れた能力である。例えば、本発明のウイルスは、試験した特性に関し、未改変親株の能力よりも、1.1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍又は100倍までの能力を有しうる。

【0025】

腫瘍細胞に関するウイルス株の特性は、当技術分野で公知の任意の方法で測定できる。例

50

えば、ウイルスの腫瘍細胞に感染する能力は、所定の割合の細胞、例えば50%又は80%の細胞を測定するために必要とされるウイルス量を測定することによって定量化することができる。腫瘍細胞における複製能力は、実施例において行われているような増殖測定法、例えば6時間、12時間、24時間、36時間、48時間又は72時間以上の時間にわたる細胞中のウイルス増殖を測定することによって測定することができる。

【0026】

ウイルスの腫瘍細胞を死滅させる能力は、目視によっておおまかに定量化することも、又は所定の時点での時間かつ所定の細胞型に対するMOIで生き残る生細胞数を数えることによってより正確に定量化することができる。例えば24時間、48時間又は72時間にわたって比較を行うことができ、また公知な腫瘍細胞型のいずれも用いることができる。特にHT29 結腸直腸腺癌細胞、LNCaP.FGC前立腺癌細胞、MDA-MB231 乳腺癌細胞、SK-MEL-28悪性黒色腫細胞又はU-87 MG神経グリア芽細胞腫・神経膠星状細胞腫(glioblastoma astrocytoma)細胞を用いることができる。これらの細胞型のいずれか1種又はこれらの細胞型のいずれかの組合せを用いることができ、その他の腫瘍細胞型も同様でありうる。この目的のために腫瘍細胞型の標準的なパネルを構築することが望ましい場合がある。所定の時点で、生き残っている生細胞数を数えるために、トリパンブルー排除細胞数(すなわち、生細胞)を数えることができる。また定量化は、蛍光活性化細胞選別(FACS)又はMTTアッセイによって行うことができる。また腫瘍細胞死滅能力は、in vivoで、例えば特定のウイルスによって生じる腫瘍体積の低減を測定することによって、測定することができる。

【0027】

本発明のウイルスの特性を決定するためには、一般的に比較として標準的な実験室参照株を用いることが望ましい。好適で標準的な実験室参照株のいずれも用いることができる。HSVの場合には、HSV1 17+株、HSV1 F株又はHSV1 KOS株から選択される1種以上のHSV1株を用いることが好ましい。参照株は、典型的には試験される本発明の株と等価な改変を有する。従って、参照株は、典型的には遺伝子欠失及び/又は異種遺伝子挿入などの等価な改変を有する。本発明のウイルスの場合において、ICP34.5及びICP47コード遺伝子が非機能的にされている場合には、それらは参照株でも非機能的にされている。参照株に対して行われる改変は、本発明の株に対して行われる改変と同一であってよい。このことは、参照株における遺伝子破壊が、本発明の株における遺伝子破壊の位置と正確に等価な位置にあること、例えば同じサイズで同じ場所で欠失されることを意味する。同様に、これらの実施形態において、異種遺伝子は同じ場所に挿入され、同じプロモーターなどによって駆動される。しかし同一の改変が行われることは必須ではない。重要なことは、参照遺伝子が機能的に等価な改変を有することであり、例えば、同じ遺伝子が非機能的にされていること及び/又は1以上の同じ異種遺伝子が挿入されていることである。

【0028】

B. 突然変異の方法

言及した様々な遺伝子を、当技術分野で周知な幾つかの技法によって機能的に不活性化ものとすることができる。例えば、1以上の欠失、置換又は挿入(好ましくは欠失)によって、これらを機能的に不活性化ものとすることができる。欠失は、その遺伝子の一以上の部分又はその遺伝子全体を除去するものでありうる。例えば、たった1個のヌクレオチドを欠失させて、フレームシフトを起こさせることができる。しかし好ましくは、より大きな欠失、例えば全コード配列及び非コード配列の少なくとも25%、より好ましくは少なくとも50%(あるいは、絶対的単位でいうと、少なくとも10ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも100ヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも1000ヌクレオチド)が欠失される。遺伝子全体とその隣接配列の一部とを除去することが特に好ましい。遺伝子の2以上のコピーがウイルスゲノムに存在する場合、該遺伝子の双方のコピーが機能的に不活性化ものとされていることが好ましい。

【0029】

当業者に周知な相同的組換え法によりヘルペスウイルスに突然変異を行う。例えば、相同なHSV配列により挟まれる突然変異配列を含むベクター(好ましくはプラスミドベクター)

を用いてHSVゲノムDNAをトランスフェクトする。該突然変異配列は、1以上の欠失、1以上の挿入又は1以上の置換を含んでもよく、これらは全て、慣例な技法によって構築することができる。挿入は、例えば -ガラクトシダーゼ活性又は蛍光によって組換えウイルスをスクリーニングするための選択マーカー遺伝子（例えばlacZ又は緑色蛍光タンパク質（GFP））を含むものとすることができる。

【0030】

C. 異種遺伝子及びプロモーター

本発明のウイルスを改変して、免疫調節タンパク質をコードする異種遺伝子を担持させることができる。好ましくは、免疫調節タンパク質は、ウイルスの抗腫瘍活性を増強する。より好ましくは、該タンパク質はGM-CSF であるか、又はその他のサイトカイン、ケモカイン（例えばRANTES）、あるいはB7.1、B7.2又はCD40Lなどの免疫調節分子である。最も好ましくは、免疫調節分子は、GM-CSFである。免疫調節遺伝子は、野生型遺伝子の任意の対立遺伝子変異体であるか又は突然変異遺伝子でありうる。免疫調節遺伝子は、哺乳動物に由来し、好ましくは齧歯動物又は霊長類、より好ましくはヒトに由来する。免疫調節遺伝子は、好ましくは、in vivoでの細胞における該遺伝子の発現を可能にする制御配列に機能的に連結される。従って本発明のウイルスを使用して、免疫調節遺伝子をin vivoで細胞に送達し、そこで発現させることができる。

【0031】

免疫調節遺伝子は任意の好適な技術によってウイルスゲノムに挿入することができる。このような技術としては、例えば、HSV株と、例えばHSV配列に隣接する遺伝子を担持するプラスミドベクターとの相同組み換えなどがある。GM-CSF遺伝子又はその他の免疫調節遺伝子は、当技術分野で公知のクローニング技法を用いて、ヘルペスウイルス配列を含む好適なプラスミドベクターに導入することができる。該遺伝子は、腫瘍崩壊特性が保持される限り、ウイルスゲノムの任意の位置に挿入できる。免疫調節遺伝子は、ウイルスゲノム内の複数の部位に挿入できる。例えば、2～5個の遺伝子をゲノムに挿入できる。

【0032】

免疫調節遺伝子の転写される配列は、好ましくは、腫瘍細胞内でのその遺伝子の発現を可能とする制御配列と機能的に連結されている。「機能的に連結される」という用語は、記載された構成要素が、その意図する機能を果たすことができるような関係にある並置を意味する。コード配列に「機能的に連結された」制御配列は、そのコード配列の発現がその制御配列に適合した条件下で達成されるように連結されている。

【0033】

制御配列は、免疫調節遺伝子の発現を可能とするプロモーター及び転写終結シグナルを含む。プロモーターは、哺乳動物（好ましくはヒト）の腫瘍細胞において機能するプロモーターから選択される。プロモーターは、真核生物の遺伝子のプロモーター配列に由来するものであってもよい。例えば、プロモーターは、異種遺伝子の発現が起こる細胞（好ましくは哺乳動物、好ましくはヒトの腫瘍細胞）のゲノムに由来するものであってもよい。真核生物プロモーターの場合、これらは、遍在に機能するプロモーター（例えば -アクチン、チューブリンのプロモーターなど）であってよいし、あるいは腫瘍特異的に機能するプロモーターであってよい。またこれらは、特定の刺激に応答するプロモーター、例えばステロイドホルモン受容体に結合するプロモーターであってよい。また、例えばモロニー Maus 白血病ウイルスの長い末端反復配列（MLLV）LTRプロモーター又は他のレトロウイルスプロモーター、ヒトもしくはマウスサイトメガロウイルス（CMV）IEプロモーター、又はヘルペスウイルス遺伝子のプロモーター（潜伏期関連転写産物の発現を駆動するものを含む）などのウイルスプロモーターを使用することもできる。

【0034】

免疫調節遺伝子と制御配列を含む発現カセット及び他の好適な構築物は、当業者に公知である慣例なクローニング技法を用いて作製することができる（例えばSambrookら、1989、Molecular Cloning-A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Pressを参照されたい）。

【0035】

また腫瘍細胞の生存期間中に免疫調節遺伝子の発現レベルを調節することができるようにプロモーターが誘導性であることも有利であり得る。誘導性とは、プロモーターを利用して得られる発現レベルが調節可能なことを意味する。例えば、本発明のウイルスは、強力なプロモーター（例えばCMV IEプロモーター）の調節下にtetリプレッサー/VP16転写アクチベーター融合タンパク質をコードする異種遺伝子をさらに含み、免疫調節遺伝子はすでに報告されている（Gossen及びBujard, 1992, Grossenら, 1995）tetリプレッサー/VP16転写アクチベーター融合タンパク質に応答性のプロモーターの調節下に存在しうる。したがって、この例においては、免疫調節遺伝子の発現は、テトラサイクリンの存在又は不在に依存することになる。

10

【0036】

複数の異種遺伝子が、ヘルペスウイルスゲノム中に適合できる。従って、本発明のウイルスは2個以上の免疫調節遺伝子、例えば2～3、4又は5個の免疫調節遺伝子を含みうる。1個以上の遺伝子及びこれに結合した制御配列を、特定のHSV株中、ウイルスゲノムの単一部位に又は複数の部位に、導入することができた。あるいは、互いに離れて向かい合った反対方向のプロモーターのペア（同一又は異なるプロモーター）であってそれぞれが免疫調節遺伝子の発現を駆動するものを使用できる。

【0037】

D. 治療的用途

本発明のウイルスは、人体又は動物体の癌の治療方法において使用することができる。特に、本発明のウイルスを、追加のプロドラッグ治療又は抗腫瘍免疫応答の刺激をともなつて又はこれらをともなわずに、癌の腫瘍崩壊性治療に用いることができる。本発明のウイルスを、哺乳動物（好ましくはヒト）の充実性腫瘍の治療的処置に使用することができる。例えば、本発明のウイルスを、前立腺癌、乳癌、肺癌、肝臓癌、子宮内膜癌、膀胱癌、大腸癌もしくは子宮頸部癌、腺癌、黒色腫、リンパ腫、神経膠腫又は肉腫（軟組織肉腫及び骨肉腫）を患う被験者に投与することができる。

20

【0038】

E 投与

本発明のウイルスを、治療を必要とする患者（好ましくはヒト患者）に用いることができる。治療を必要とする患者は、癌を患う個体、好ましくは充実性腫瘍を患う個体である。治療的処置の目的は、患者の症状を改善することである。典型的な本発明のウイルスを用いた治療的処置により、癌の病状が軽減される。本発明の癌の治療方法は、本発明のウイルスの治療上有効な量を、癌を患う患者に投与することを含む。本発明の腫瘍崩壊性ウイルスを腫瘍を患う患者に投与することは、典型的には腫瘍細胞を死滅させ、従って腫瘍のサイズを低減し、及び/又は腫瘍に由来する悪性細胞の広がりを阻止する。

30

【0039】

治療薬を投与する1つの方法としては、ウイルスと、製薬上許容される担体又は希釈剤とを組み合わせ、医薬組成物を製造することが挙げられる。好適な担体及び希釈剤としては、等張生理食塩水溶液（例えばリン酸緩衝生理食塩水）が挙げられる。

【0040】

治療的処置は、ウイルス組成物の標的組織への直接注射に続いて行うことができる。標的組織は、腫瘍でもよく、又は腫瘍につながる血管でもよい。投与されるウイルスの量は、HSVの場合には $10^4 \sim 10^{10}$ pfu、好ましくは $10^5 \sim 10^8$ pfu、より好ましくは約 $10^6 \sim 10^8$ pfuの範囲内である。本質的に、ウイルスと製薬上許容される好適な担体又は希釈剤とからなる医薬組成物は、典型的には500 μ lまで、典型的には1～200 μ l、好ましくは1～10 μ lが注射に使用される。しかしながら、幾つかの腫瘍崩壊性治療用途では、また10mlまでのより大きな容量を、腫瘍及び接種部位に応じて用いることができる。

40

【0041】

記載した投与経路及び用量は、単なる指針であり、専門医は最適な投与経路及び用量を容易に決めることができるだろう。用量は、様々なパラメーター、特に、腫瘍の位置、腫瘍

50

のサイズ、治療しようとする患者の年齢、体重及び症状、ならびに投与経路に応じて決定することができる。好ましくは、ウイルスは、腫瘍への直接注射によって投与される。該ウイルスは全身的に投与することもでき、又は腫瘍へとつながる血管に注射することにより投与することもできる。最適な投与経路は腫瘍の位置及びサイズに依存することになる。

【 0 0 4 2 】

以下の実施例は本発明を説明するものである。

実施例

神経毒性因子(neurovirulence factor)ICP34.5が不活化されている単純ヘルペスウイルスI型(HSV1)は、in vitro及びin vivoの双方で腫瘍モデルにおいて腫瘍特異的細胞溶解を指令することが既に示されている。またこのようなウイルスは、神経膠腫末期患者に直接脳内注射することによる第1段階臨床試験において安全であることも示されている。

【 0 0 4 3 】

先行の研究には、連続継代したHSV1の実験室単離株(HSV1 17+株又はHSV1 F株に由来するウイルス)が用いられており、より最近の臨床単離株と比較してヒト腫瘍細胞における溶解能力が弱められていると予測される。

【 0 0 4 4 】

腫瘍崩壊性及び抗腫瘍潜在能力が増強されたICP34.5欠失HSVを産生することに向けられた研究において、本発明者らは、HSV1 JS1株からICP47及びICP34.5を欠失させ、GM-CSFに対する免疫調節遺伝子を挿入した。

【 0 0 4 5 】

ウイルス構築(図1を参照されたい)

用いるウイルスは、HSV1 17+株(標準的な実験室株)又はHSV1を頻繁に再発する個体(re-activator)からの口辺ヘルペスに由来する2種の臨床単離株に基づいた。これらの臨床株又は「非実験室株」は、JS1と名付けられた。ICP34.5を17+株及びJS1株から完全に欠失させるとともにCMV-GFPカセットを挿入した。また次ぎにJS1をさらに操作して、ICP34.5遺伝子と置き換わるようにヒトGM-CSF(hGM-CSF)又はマウスGM-CSF(mGM-CSF)を挿入し、ICP47を欠失させた。本明細書で考察したJS1の誘導株もまた非実験室株、すなわち本発明の改変された非実験室株である。

【 0 0 4 6 】

ウイルスの溶解能力

溶解(細胞死滅)能力は、17+由来株と比較した場合、試験した全ての腫瘍細胞系において、JS1に由来する(非実験室株に由来する)ウイルスで増強されていた。より詳細には、JS1/34.5-ウイルス(すなわち、ICP34.5が欠失によって除去されたJS1)により、HT29結腸直腸腺癌細胞、LNCaP.FGC前立腺腺癌細胞、MDA-MB-231乳腺腺癌細胞、SK-MEL-28悪性黒色腫細胞及びU-87 MG神経グリア芽細胞腫・神経膠星状細胞腫細胞における溶解能力の増強が示された。

【 0 0 4 7 】

このように、腫瘍崩壊活性の増大をもたらすためには、ヒト患者の癌治療に用いる場合に最近の臨床ウイルス株を用いることにより、このようなウイルスの抗腫瘍能力を増強することができる。

【 0 0 4 8 】

さらに増強された抗腫瘍活性

またこれらのウイルスを用いて抗腫瘍活性を有する遺伝子を送達する場合には、さらに増強された活性を期待することができる。このような遺伝子としては、プロドラッグアクチベーター又は免疫刺激タンパク質をコードするものが挙げられる。

【 0 0 4 9 】

本発明者らは、ICP34.5を欠失し、ヒトもしくはマウスGM-CSFを発現するHSV1の臨床単離株を、JS1から産生した。GM-CSFは、強力な免疫刺激因子である。このウイルスは、腫瘍内注射に続く抗腫瘍免疫応答を増強するために設計される。これらのウイルスは、培地中

のBHK細胞において産生された場合に、ヒト又はマウスGM-CSFを発現することがELISAアッセイキット (Biotrak, Amersham) を用いて示された。6 ウェルプレートの個々のウェルにおいて、MOI=0.5でコンフルエントなBHK細胞に感染させて24時間経過後に、それぞれ0.56又は0.54 μg のヒト又はマウスGM-CSFが産生された。

【 0 0 5 0 】

寄託情報

HSV1 JS1株は、2001年1月2日に仮登録番号01010209として、European Collection of Cell Cultures (ECACC), CAMR, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, United Kingdom)へ寄託された。

【 0 0 5 1 】

10

参考文献

- Hillら、1995, Nature 375 ; 411-415
 Shiら、1999, Cancer-Gene-Ther 6: 81-88
 Chouら、1990, Science 250: 1262-1266
 Macleanら、1991, J. Gen. Virol. 72: 631-639
 Gossen M & Bujard H, 1992, PNAS 89: 5547-5551
 Gossen Mら、1995, Science 268: 1766-1769
 Thompsonら、1998, Virus Genes 1 (3) ; 275-286
 Meignierら、1988, Infect. Dis. 159 ; 602-614

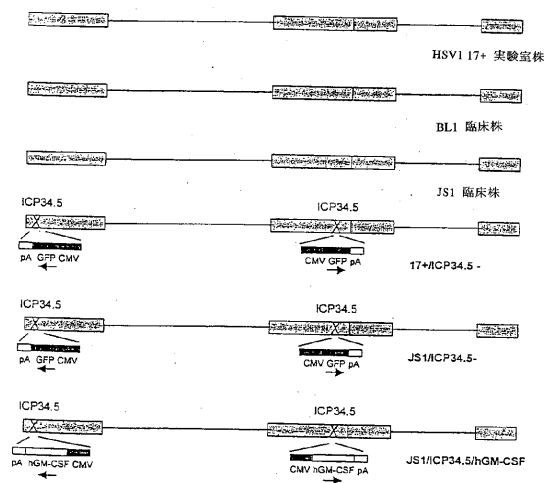
【図面の簡単な説明】

20

【図 1】 図 1 は、ウイルスを示す。

上から下の順に、HSV1 17+実験室株、HSV1 JS1臨床株、17+/ICP34.5-株、JS1/ICP34.5-株、JS1/ICP34.5-/ICP47-/hGMCSF株、JS1/ICP34.5-/ICP47-/mGMCSF株の略図を示す。

【図 1】



フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 0100288.0
(32)優先日 平成13年1月5日(2001.1.5)
(33)優先権主張国 英国(GB)
(31)優先権主張番号 0100430.8
(32)優先日 平成13年1月6日(2001.1.6)
(33)優先権主張国 英国(GB)

微生物の受託番号 ECACC 01010209

- (72)発明者 コフィン, ロバート, ステュワート
イギリス国 ダブリュ1ピー 6ディービー ロンドン, クリーブランド ストリート 46, ザ
ウィンデイヤー インスティテュート

審査官 戸来 幸男

- (56)参考文献 国際公開第99/007394(WO, A1)
国際公開第98/051809(WO, A1)
国際公開第98/004726(WO, A1)
特表2003-520789(JP, A)
Gene Ther., 1998年, vol.5, no.1, pp.121-130
N. Engl. J. Med., 1991年, vol.325, no.15, pp.1082-1085

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C12N 7/00-7/08
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed