

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7643739号  
(P7643739)

(45)発行日 令和7年3月11日(2025.3.11)

(24)登録日 令和7年3月3日(2025.3.3)

(51)国際特許分類	F I		
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	Z N A	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1	
A 6 1 K 31/513(2006.01)	A 6 1 K 31/513		
A 6 1 K 31/519(2006.01)	A 6 1 K 31/519		
請求項の数 23 (全35頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2022-502030(P2022-502030)	(73)特許権者	522012477
(86)(22)出願日	令和2年7月13日(2020.7.13)		シェンチェン ホア ヤオ カン ミン バイオファーマシューティカル カンパニー リミテッド
(65)公表番号	特表2022-540868(P2022-540868 A)		中華人民共和国 5 1 8 1 2 2 グワンドン シェンチェン ピンシャン ディストリクト ケンズー ストリート ジンシャ コミュニティー ジンファイ ロード ナンバー 1 4 シェンチェン バイオメディクス イノベーションズ インドストリアル パーク ビルディング 1 0 ナンバー 2 0 0 1
(43)公表日	令和4年9月20日(2022.9.20)	(74)代理人	110000796
(86)国際出願番号	PCT/CN2020/101727		弁理士法人三枝国際特許事務所
(87)国際公開番号	WO2021/008501	(72)発明者	ユエン ミン
(87)国際公開日	令和3年1月21日(2021.1.21)		
審査請求日	令和5年4月28日(2023.4.28)		
(31)優先権主張番号	62/873,221		
(32)優先日	令和1年7月12日(2019.7.12)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
微生物の受託番号	CCTCC CCTCC V201937		
	CCTCC CCTCC V201938		
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 遺伝子組換えワクシニアウイルス

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腫瘍細胞における選択的複製及び/または免疫細胞の活性化のための変異ウイルス配列、及び

免疫共刺激経路活性化分子、及び免疫調節因子遺伝子をコードする異種配列を含む遺伝子組み換えワクシニアウイルスであって、

前記変異ウイルス配列はL025、TK、及びA46Rの欠失を含み、

前記免疫共刺激経路活性化分子は4-1BBリガンドまたはその改変体であり、

前記免疫調節因子はIL-21またはその改変体であり、

前記異種配列は、遺伝子組み換えワクシニアウイルスのゲノムに安定的に組み込まれている、

前記遺伝子組み換えワクシニアウイルス。

【請求項 2】

異種配列が、以下の少なくとも1つを含む、請求項1に記載の遺伝子組み換えワクシニアウイルス：

(a) 配列番号：6に記載の配列；

(b) 配列番号：8に記載の配列；

(c) 配列番号：10に記載の配列；または

(d) 配列番号：12に記載の配列。

【請求項 3】

異種配列が、以下のうちの少なくとも1つをコードする、請求項1に記載の遺伝子組み換えワクシニアウイルス：

- (a) 配列番号：5に記載の配列；
- (b) 配列番号：7に記載の配列；
- (c) 配列番号：9に記載の配列；または
- (d) 配列番号：11に記載の配列。

【請求項4】

前記遺伝子組み換えワクシニアウイルスが下記式の配列を含む、請求項1に記載の遺伝子組み換えワクシニアウイルス：

5' -A1-X-A2-B1-Y-B2-C1-Z-C2-3'

(式中、A1及びA2はそれぞれ第1のウイルス遺伝子の左アーム及び右アームであり、B1及びB2はそれぞれ第2のウイルス遺伝子の左アーム及び右アームであり、C1及びC2はそれぞれ第3のウイルス遺伝子の左アーム及び右アームであり、X、Y及びZは、それぞれ免疫調節遺伝子、サイトカイン、治療遺伝子、切断ウイルスエンベロップ遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、治療抗体をコードする遺伝子、及び治療抗体のリガンドをコードする遺伝子の1つから選択される異種の遺伝子である。)

【請求項5】

第1のウイルス遺伝子がL025であり、第2のウイルス遺伝子がTKであり、第3のウイルス遺伝子がA46Rである、請求項4に記載の遺伝子組み換えワクシニアウイルス。

【請求項6】

前記変異ウイルス配列がL025、TK、及びA46Rの欠失の変異を有し、  
前記異種配列がIL-21及び4-1BBLを有する、請求項1に記載の遺伝子組み換えワクシニアウイルス。

【請求項7】

前記異種配列がさらに切断ウイルスエンベロップ遺伝子、及び/または、腫瘍抑制遺伝子をコードし、  
当該切断ウイルスエンベロップ遺伝子が、ショートコンセンサスリピート(SCR)2、SCR3、及びSCR4ドメインの欠失を含むB5Rである、  
請求項1に記載の遺伝子組み換えワクシニアウイルス。

【請求項8】

前記変異ウイルス配列がL025、TK、及びA46Rにおける欠失の変異を有し、  
前記異種配列がIL-21と改変B5Rとのハイブリッド遺伝子、及び4-1BBLを含む、  
請求項7に記載の遺伝子組み換えワクシニアウイルス。

【請求項9】

前記腫瘍抑制遺伝子がHIC1である、請求項7に記載の遺伝子組み換えワクシニアウイルス。

【請求項10】

遺伝子組み換えワクシニアウイルスが、Lister、Western Reserve(WR)、Copenhagen(Cop)、Bern、Paris、Tashkent、Tian Tan、Wyeth(DRYVAX)、IHD-J、IHD-W、Brighton、Ankara、CVA 382、改変ワクシニアウツカラ(MVA)、Dairen I、LC16m8、LC16M0、LIVP、ACAM2000、WR 65-16、Connaught、New York City Board of Health(NYCBH)、EM-63及びNYVAC株からなる群より選択される、請求項1に記載の遺伝子組み換えワクシニアウイルス。

【請求項11】

請求項1に記載の遺伝子組み換えワクシニアウイルスを含む医薬組成物。

【請求項12】

医薬組成物が、経口、局所、非経口送達、または介入療法用に製剤化されている、請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項13】

医薬組成物が、局所的な腫瘍内注射、局所的な動脈内(腫瘍に供給する血管)注射、腹

10

20

30

40

50

腔内注射、胸腔内注射、全身的な静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射、髄腔内注射、直接脳室内注射、心臓内注射、鼻腔内注射のために製剤化されている、請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項14】

遺伝子組み換えワクシニアウイルスが、単独療法として；または抗癌剤、免疫抑制剤、及び/または腫瘍溶解性ウイルス増強剤と組み合わせて使用される、請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項15】

遺伝子組み換えワクシニアウイルスが、5-フルオロウラシル(FU)、フォリン酸(FA)、メトトレキサート、カペシタビン、オキサリプラチン、ペバシズマブ、セツキシマブ、免疫チェックポイント阻害剤、他の種類の腫瘍溶解性ウイルス、またはそれらの任意の組み合わせと組み合わせて使用される、請求項11に記載の医薬組成物。

10

【請求項16】

それを必要とする対象における癌の治療に使用するための医薬組成物であって、該医薬組成物の有効量を対象に投与することを含む、請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項17】

癌が、肺癌、メラノーマ、膵臓癌、肝臓癌、結腸癌、乳癌、グリオブラストーマ、肉腫、胃癌、卵巣癌、中皮腫、及び白血病からなる群から選択される、請求項16に記載の医薬組成物。

【請求項18】

請求項1に記載の遺伝子組み換えワクシニアウイルスの有効量を、癌組織または癌細胞のスクリーニングに使用する方法。

20

【請求項19】

ワクシニアウイルスの腫瘍特異的感染性を高めるための医薬組成物であって、該医薬組成物は対象に抗腫瘍免疫反応を引き起こすのに有効な量で投与される、請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項20】

それを必要とする対象において腫瘍再発に対する持続的な免疫を付与するための、請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項21】

患者の癌細胞を感染させてから48時間後のGFP陽性細胞の割合に基づき、患者をスクリーニングするための、請求項11に記載の医薬組成物。

30

【請求項22】

癌細胞の増殖抑制、癌細胞の死滅誘導、癌細胞の生物学的活性の調節、免疫応答の調節、T細胞の増殖の増強、及び/またはT細胞の細胞傷害に使用するための、請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項23】

癌細胞の生物学的活性の調節が癌細胞複製の阻害、癌細胞分裂の阻害、癌細胞細胞の移動阻害または癌死の促進を含む、請求項22に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年7月12日に出願された米国仮特許出願第62/873,221号の優先権の利益を主張し、その内容全体を参照により本明細書に組み込む。

発明の分野

【0002】

本開示は、癌の治療のための遺伝子組み換えワクシニアウイルスに関する。

発明の背景

【0003】

50

がんは深刻かつ危険な病気である。中国では毎年500万人近くが新たに癌を発症しており、癌で死亡する患者数は300万人に近い。これらの数字は年々増加している。これは、手術、化学療法、放射線療法などの従来のがん治療が、ほとんどのがん患者を救うのに有効でないことを示している。従って、癌患者はより効果的な治療を強く必要としている。新しいがん免疫療法はある程度進歩しているが、固形がんの患者さんをいかに効果的に治療するかは、依然として最大の課題の一つである。近年、癌免疫療法の一つである腫瘍溶解性ウイルスが業界で注目を集めている。

#### 【0004】

腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍細胞に選択的に感染するか、または腫瘍細胞内で選択的に複製することによって腫瘍細胞を標的化して死滅させるウイルスである。さらに、腫瘍溶解性ウイルスは、宿主の抗腫瘍免疫応答を誘導及び増幅するために必要なリスクシグナルを効果的に提供することができ、それによって、身体の免疫系が強力かつ特異的な抗腫瘍免疫応答を生成することを可能にする。

10

#### 【0005】

ワクシニアウイルス (VV) は二本鎖DNAウイルスであり、そのユニークな性質は腫瘍溶解性ウイルスの中で有利な選択となっている。1) VVは、感染症ワクチンとして天然痘を予防する過程で良好な安全性を実証しており、腫瘍溶解性ウイルスとしての安全性は保証されている。また、VVは腫瘍崩壊性ウイルスとして安全に使用できることが多くの臨床試験で確認されている。2) 細胞内で速やかに自己複製し、6~8時間程度で新しいウイルス粒子を産生するため、感染細胞を速やかに溶解することができる。3) VVのゲノムは約200Kbpであり、この大きなゲノムは外来遺伝子を運ぶ能力が大きい。4) ワクシニアウイルスは、細胞への感染に特定の受容体を必要としないため、様々な種類の腫瘍に対して広い親和性を有する。5) 局所的な腫瘍内注射、腹腔内注射、胸腔内注射、全身的な静脈内注射など、様々な方法で投与することができる。この投与方法の多様性により、体のあらゆる部位の腫瘍を治療することが可能となった。6) また、固形癌に通常見られる低酸素の微小環境は、多くの種類の腫瘍溶解性ウイルスの複製と効力にマイナスの影響を与える。しかしながら、VVは低酸素環境下でも効率的に複製することができる(Hiley et al, Gene Therapy 17, 281-287). (2010).7) VVに適用できるプロモーターは、天然及び合成の様々なものがあり、導入遺伝子を運ぶのに適している。近年、ワクシニアウイルスを用いた臨床結果から、VVが良好な抗腫瘍効果を有し、安全であることが実証されている(Haddad et al, Annals of Surgical Oncology 19 Suppl 3, S665-674 (2012); Park et al, Lancet Oncol 9: 533-542, (2008); Breitbach et al, Nature 477: 99-102, (2011))。

20

30

#### 【0006】

これまで、ワクシニアウイルスの様々な欠失変異体が報告されている。チミジンキナーゼ(TK)遺伝子とウイルス増殖因子(VGF)遺伝子欠損を有するWestern Reserve株変異体は、腫瘍抗原に対する免疫反応を効率的に惹起することができる(McCart et al, Cancer Res 61, 8751-8757 (2001))。さらに、サイトカインをコードする遺伝子などの異種遺伝子を挿入したウイルスは、抗腫瘍免疫反応をさらに活性化することができる。

#### 【0007】

VVは腫瘍細胞に感染した後、感染細胞の溶解によってVVが放出されるため、ウイルスが局在する腫瘍細胞に感染したり、循環血液を介して感染部位から離れた腫瘍細胞に感染したりすることができる。ワクシニアウイルスは、主に細胞内成熟ウイルス(IMV)と細胞外エンベロープドウイルス(EEV)の2種類の感染性ウイルス粒子の形態を有している(Appleyard et al., J. Gen.Virology 13, 9-17 (1971))。IMVは、ウイルス粒子の主要な感染型である。EEVは、宿主細胞膜に包まれているため、宿主全身の自然免疫(補体)及び適応免疫(中和抗体)攻撃に拮抗することができ、VVは宿主内で広範囲かつ長距離に伝播する(Smith, GL & Vanderplasschen, A and Law, M J. Gen.Virol.83, 2915-2931 (2002); Payne, LG & Kristensson, K, J. Gen.Virol.66 (c), 643-646 (1985))。しかし、ほとんどのVV株は少量のEEVしか産生しない(全感染性ウイルスの1%未満に過ぎない)。

40

50

## 【 0 0 0 8 】

VVには、EEVに特異的なタンパク質をコードする遺伝子を有する。それらは、A33R、A34R、A36R、F13L、B5R及びA56Rである。B5R遺伝子は、ショートコンセンサスリピート(SCR)と呼ばれる50-70アミノ酸の繰り返しを4コピー含む42kDaの糖タンパク質をコードする。B5R遺伝子を欠損させるとプラークが小さくなり、EEV形成が有意に減少する(10倍)(Blasco, R. & Moss, B., J. Virol.65, 5910-5920 (1991); Engelstad, M. & Smith, GL, Virology 194, 627-637 (1993))。B5Rの膜貫通部及び細胞質尾部配列は、ウイルスタンパク質の標的パッケージング細胞に重要である(Katz et al, J. Virol. 71, 3178-3187 (1997))。SCR4、SCR3、4またはSCR2、3、4を欠失するB5R遺伝子変異体を運ぶVVは、より小さなプラークを生じるが、野生型ウイルスの数十倍の感染性E EVを生じ、コメットテールプラーク分布を形成する(Sanderson et al, J. Gen Virol.79 (f), 1415-1425 (1998); Mathew et al, J. Virol.72, 2429-2438 (1998))。

10

## 【 0 0 0 9 】

この10年ほどの間、腫瘍溶解性ウイルス研究の分野では進歩が見られるものの、ワクシニアウイルスを用いた治療薬はまだ臨床に出ておらず、ワクシニアウイルスをいかに科学的に改変して抗腫瘍効果を高めるかが難題となっている。そのため、がん治療のニーズに応えるため、より優れた腫瘍溶解性ワクチニアウイルス製剤の開発が急務となっている。

## 【 0 0 1 0 】

ヒト及び動物に対して様々な程度の毒性を有する様々なワクシニア株が存在する。1970年代の天然痘撲滅計画では、世界中で多くの異なる株が使用された。例えば、米国ではニューヨーク市衛生局(NYCBOH)株とその派生株であるWyeth株が、欧州ではコペンハーゲン(CPN)株とLister株が主流である。これまでの研究で、Lister株には優れた抗腫瘍効果があることが分かっている。本プロジェクトでは、腫瘍溶解性ウイルスとしてLister株を開発用に選択した。

20

発明の概要

## 【 0 0 1 1 】

本開示は、腫瘍溶解性ウイルスに関し、より詳細には、遺伝子組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスに関する。本開示の遺伝子組換え腫瘍溶解ワクシニアウイルスは、がん細胞に選択的に感染することができ、がんの治療では有益に使用することができる。

## 【 0 0 1 2 】

本開示は、変異ウイルス配列及び異種配列を含む遺伝子組換えワクシニアウイルスを提供し、ここで、変異ウイルス配列は、腫瘍細胞における選択的複製、及び/又は免疫細胞の活性化を促進し、異種配列は、免疫共刺激経路活性化分子、免疫調節因子遺伝子、切断ウイルスエンベロープ遺伝子、及び/又は腫瘍抑制因子をコードし、異種配列は、遺伝子組換えワクシニアウイルスのゲノムに安定的に組み込まれる。

30

## 【 0 0 1 3 】

遺伝子組換えワクシニアウイルスの実施形態では、異種配列は、遺伝子組換えワクシニアウイルスの変異ウイルス配列に安定的に組み込まれる。

## 【 0 0 1 4 】

遺伝子組換えワクシニアウイルスの一実施形態では、変異ウイルス配列は、以下のうちの少なくとも1つを含む：

40

## 【 0 0 1 5 】

(a) L025、TK、A46R、またはそれらの任意の組み合わせにおける変異；

## 【 0 0 1 6 】

(b) 部分的に欠失したL025、TK、A46R、またはそれらの任意の組み合わせ；

## 【 0 0 1 7 】

(c) 欠失したL025、TK、A46R、またはそれらの任意の組み合わせ；

## 【 0 0 1 8 】

(d) L025、TK、またはA46Rの一部または全部が、配列番号：2、4、6、8、10、12、または14に記載の配列のうちの1つによって置換されている；

50

【 0 0 1 9 】

(e) L025、TK、またはA46Rの一部または全部が、腫瘍標的遺伝子によって置換されている。

【 0 0 2 0 】

(f) L025、TK、またはA46Rの一部または全部が、T細胞を標的とするリガンドまたは抗体によって置換されている。

【 0 0 2 1 】

(g) L025、TK、またはA46Rの一部または全部が、治療用遺伝子またはその改変体によって置換されている。あるいは

【 0 0 2 2 】

(h) L025、TK、またはA46Rの一部または全部が、治療用抗体によって置換されている。

【 0 0 2 3 】

遺伝子組換えワクシニアウイルスの一実施形態では、異種配列は、以下のうちの少なくとも1つを含む：

【 0 0 2 4 】

(a) 配列番号：2に記載の配列；

【 0 0 2 5 】

(b) 配列番号：4に記載の配列；

【 0 0 2 6 】

(c) 配列番号：6に記載の配列；

【 0 0 2 7 】

(d) 配列番号：8に記載の配列；

【 0 0 2 8 】

(e) 配列番号：10に記載の配列；

【 0 0 2 9 】

(f) 配列番号：12に記載の配列；または

【 0 0 3 0 】

(g) 配列番号：14に記載の配列。

【 0 0 3 1 】

遺伝子組換えワクシニアウイルスの一実施形態では、異種配列は、以下のうちの少なくとも1つをコードする：

【 0 0 3 2 】

(a) 配列番号：1に記載の配列；

【 0 0 3 3 】

(b) 配列番号：3に記載の配列；

【 0 0 3 4 】

(c) 配列番号：5に記載の配列；

【 0 0 3 5 】

(d) 配列番号：7に記載の配列；

【 0 0 3 6 】

(e) 配列番号：9に記載の配列；

【 0 0 3 7 】

(f) 配列番号：11に記載の配列；または

【 0 0 3 8 】

(g) 配列番号：13に記載の配列。

【 0 0 3 9 】

遺伝子組換えワクシニアウイルスの一実施形態では、遺伝子組換えワクシニアウイルスは、以下の式の配列を含む：

5' -A1-X-A2-B1-Y-B2-C1-Z-C2-3'

(式中、A1及びA2はそれぞれ第1のウイルス遺伝子の左アーム及び右アームであり、B1

10

20

30

40

50

及びB2はそれぞれ第2のウイルス遺伝子の左アーム及び右アームであり、C1及びC2はそれぞれ第3のウイルス遺伝子の左アーム及び右アームであり、C1及びC2は第3のウイルス遺伝子の左アームであり、ここで、X、Y及びZは、それぞれ免疫調節遺伝子、サイトカイン、治療遺伝子、切断ウイルスエンベロープ遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、治療抗体をコードする遺伝子、及び治療抗体のリガンドをコードする遺伝子の1つから選択される異種の遺伝子である。) )

【0040】

遺伝子組み換えワクシニアウイルスの一実施形態では、第1のウイルス遺伝子はL025であり、第2のウイルス遺伝子はTKであり、第3のウイルス遺伝子はA46Rである。

【0041】

遺伝子組み換えワクシニアウイルスの一実施形態では、XはIL-21と改変B5Rのハイブリッド遺伝子であり、Yは4-1BBLであり、ZはHIC1である。

【0042】

遺伝子組換えワクシニアウイルスの一実施形態では、変異ウイルス配列はL025、TK及びA46Rにおける欠失の変異を含み、異種配列はIL-21及び4-1BBLを含む。

【0043】

遺伝子組換えワクシニアウイルスの実施形態では、変異ウイルス配列は、L025、TK及びA46Rにおける欠失の変異を含み、異種配列は、IL-21と改変B5Rとのハイブリッド遺伝子、及び4-1BBLを含む。

【0044】

遺伝子組み換えワクシニアウイルスの一実施形態では、免疫調節因子遺伝子は、IL-12、IL-21、IL-2、IL-15、IL-8、またはそれらの改変体をコードするサイトカイン遺伝子である。

【0045】

遺伝子組み換えワクシニアウイルスの一実施形態では、免疫共刺激経路活性化分子は、CD40リガンド(CD40L)、ICOSリガンド、GITRリガンド、4-1BBリガンド、OX40リガンド、TL1A、CD30リガンド、CD27、Flt3リガンド、またはそれらの改変体から構成される。

【0046】

遺伝子組み換えワクシニアウイルスの一実施形態では、腫瘍抑制遺伝子は、HIC1である。

【0047】

遺伝子組換えワクシニアウイルスの一実施形態では、遺伝子組換えワクシニアウイルスは、Lister、Western Reserve (WR)、Copenhagen (Cop)、Bern、Paris、Tashkent、Tian Tan、Wyeth (DRYVAX)、IHD-J、IHD-W、Brighton、Ankara、CVA 382、改変ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)、Dairen I、LC16m8、LC16M0、LIVP、ACA M 2000、WR65 ~ 16、Connaught、ニューヨーク市衛生局(NYCBH)、EM-63およびNYVAC株からなる群から選択される。

【0048】

遺伝子組み換えワクシニアウイルスの一実施形態では、切断ウイルスエンベロープ遺伝子は、ショートコンセンサスリピート(SCR)2、SCR3、及びSCR4ドメインの欠失を含むB5Rである。

【0049】

遺伝子組み換えワクシニアウイルスの一実施形態では、腫瘍抑制因子はHIC1である。

【0050】

本開示はさらに、本開示の実施形態のいずれか1つの遺伝子組み換えワクシニアウイルスの有効量と、医薬として許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。

【0051】

医薬組成物の一実施形態では、医薬組成物は、経口、局所、非経口送達、又は介入治療のために製剤化される。

【0052】

10

20

30

40

50

医薬組成物の一実施形態では、医薬組成物は、局所的な腫瘍内注射、腹腔内注射、胸腔内注射、全身静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射、髄腔内注射、直接脳室内注射、心内注射、鼻腔内注射のために製剤化される。

【0053】

医薬組成物の一実施形態では、遺伝子組み換えワクシニアウイルスは、単独療法として；または1つ以上の抗癌剤、免疫抑制剤、及び/もしくは腫瘍溶解性ウイルス増強剤と組み合わせて使用される。

【0054】

医薬組成物の一実施形態では、遺伝子組み換えワクシニアウイルスは、5-フルオロウラシル(FU)、フォリン酸(FA)、メトトレキサート、カペシタビン、オキサリプラチン、ペバシズマブ、セツキシマブと併用して使用される。免疫チェックポイント阻害剤（抗PD1剤、抗PDL1剤、抗CTLA4剤など）、他の種類の腫瘍溶解性ウイルス、ペムプロリズマブ、ニボルマブ、イピリムマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、アデノウイルス、またはそれらの組み合わせなどである。

10

【0055】

本開示は、それを必要とする対象における癌の治療に使用するための方法であって、本開示の実施形態のいずれか1つに記載の遺伝子組み換えワクシニアウイルスまたは本開示の実施形態のいずれか1つに記載の医薬組成物の有効量を対象に投与することをさらに含む、方法を提供する。

【0056】

本方法の一実施形態では、HIC1は、癌において不活性化されるか、低発現されるか、または消失する。

20

【0057】

本方法の一実施形態では、がんは、肺がん、メラノーマ、膵臓がん、肝臓がん、結腸がん、乳がん、グリオブラストーマ、肉腫、胃がん、卵巣がん、中皮腫、及び白血病からなる群から選択される。

【0058】

ワクシニアウイルスの腫瘍特異的感染性を高める方法であって、本開示の実施形態のいずれか1つに記載の遺伝子組み換えワクシニアウイルスを対象に投与することを含み、遺伝子組み換えワクシニアウイルスが、対象では抗腫瘍免疫応答を呼び出すのに有効な量で投与される、方法。

30

【0059】

本開示の実施形態のいずれか1つの遺伝子組み換えワクシニアウイルスを対象に投与することを含む、それを必要とする対象における腫瘍再発に対する持続的な免疫を付与方法であって、本開示の実施形態のいずれか1つの遺伝子組み換えワクシニアウイルスを対象に投与することを含む。

【0060】

本開示の実施形態のいずれか1つに記載の遺伝子組み換えワクシニアウイルスによる患者の癌細胞の感染48時間後のGFP陽性細胞の割合に基づいて、患者をスクリーニングする方法。

40

【0061】

癌細胞の死を誘導すること、癌細胞の生物学的活性を調節すること、免疫応答を調節すること、T細胞の増殖、及び/又はT細胞の細胞毒性を増強するために使用するための遺伝子組み換えワクシニアウイルスであって、組換え腫瘍溶解性は、本開示の実施形態のいずれか1つに提供される通りである、遺伝子組み換えワクシニアウイルス。

【0062】

癌細胞死を誘導すること、癌細胞の生物学的活性を調節すること、免疫応答を調節すること、T細胞の増殖を増強すること、及び/またはT細胞の細胞毒性を高めることに使用するための遺伝子組み換えワクシニアウイルスであって、癌細胞の生物学的活性が、癌細胞の複製の阻害、癌細胞の分裂の阻害、癌細胞のDNA修復の阻害、癌細胞の遊走の阻害、また

50

は癌細胞死の促進を含んでなり、組換え腫瘍溶解性は、本開示の任意の1の実施の形態で提供される通りである、遺伝子組み換えワクシニアウイルス。

【0063】

肺癌、メラノーマ、膵臓癌、肝臓癌、結腸癌、乳癌、グリオブラストーマ、肉腫、胃癌、卵巣癌、中皮腫、及び白血病を治療するための医薬品の製造に使用するための遺伝子組み換えワクシニアウイルスであって、組換え腫瘍溶解性が、本開示の実施態様のいずれか1つで提供されるとおりである、遺伝子組み換えワクシニアウイルス。

【0064】

癌細胞の増殖を抑制し、癌細胞の死を誘導し、及び/又は癌細胞の生物学的活性を調節するための医薬品の製造に使用するための、遺伝子組み換えワクシニアウイルスであって、組換え腫瘍溶解性が、本開示の実施形態のいずれか1つで提供される通りである、遺伝子組み換えワクシニアウイルス。

10

【図面の簡単な説明】

【0065】

以下、本願発明の実施形態または従来技術における技術的解決策をより明確に説明するために、実施形態では必要とされる添付図面を簡単に紹介する。なお、以下の説明における添付図面は、本願発明の実施の形態の一部に過ぎない。添付図面に基づいて、当業者は、独創的な努力をすることなく他の図面を得ることができる。

【0066】

図1Aは、mB5Rを担持する製品の模式図である。

20

【0067】

図1Bは、sB5Rを担持する製品の模式図である。

【0068】

図2Aは、TK遺伝子欠失マウス4-1BBLを担持するシャトルベクターの模式図である。

【0069】

図2Bは、TK遺伝子欠失ヒト4-1BBLを担持するシャトルベクターの模式図である。

【0070】

図3Aは、マウスIL-21及びL025遺伝子欠失の改変B5R (mB5R/sB5R) を担持するシャトルベクターを示す図である。

【0071】

図3Bは、ヒトIL-21及びL025遺伝子欠失の改変B5R (mB5R/sB5R) を担持するシャトルベクターを示す図である。

30

【0072】

図4は、A46R遺伝子欠失のHIC1遺伝子を担持したシャトルベクターを示す図である。

【0073】

図5は、mB5R/sB5R遺伝子の構造図である。

【0074】

図6は、L025遺伝子欠失を有する組換えウイルスを示す図である。

【0075】

図7は、TK遺伝子が欠失し、hSPD-41BBL遺伝子が挿入された組換えウイルスを示す図である。

40

【0076】

図8は、A46R遺伝子を欠失させ、挿入した遺伝子HIC1をウイルス発現させた組換えウイルスを示す図である。

【0077】

図9A-9Bは、6ウェルプレートで2日間、ウイルスの投与量を漸増させた固形腫瘍細胞株のパネルのKM1による殺傷を示す図である。個々のウェルに感染させるために使用したウイルス量は、0.01pfu/cell、0.1pfu/cell、及び1pfu/cellであった。実験終了時にウェル内の残りの細胞をクリスタルバイオレットで染色した。

【0078】

50

図10A-10Cは、17の細胞株におけるEC50アッセイの例である。

【0079】

図11に、異なる細胞株に対するEC50値を示す図である。

【0080】

図12は、ワクシニアウイルスによる白血病細胞株の死滅を示し、2つの細胞株におけるEC50アッセイの例である。

【0081】

図13は、KM1によって感染した白血病患者の白血球の例を示す図である。

【0082】

図14は、KM1感染後3日目の生細胞/死細胞を示す図である。

10

【0083】

図15は、シリアンハムスター臍臓癌HPD 1NRモデルにおけるKM1の抗腫瘍効果を示す図である。

【0084】

図16は、HIC1武装ワクシニアウイルス及びその対応する対照HY3を用いた、ヒト乳癌細胞MDA MB-231の治療を示す図である。

好ましい実施形態の詳細な説明

【0085】

添付の図面を参照して、同じ参照数字は同じ構成要素を表している。以下の説明は、例示した本開示の詳細な実施形態に基づいており、本明細書で詳細に説明されていない本願の他の実施形態に対する制限として解釈されるべきではない。

20

【0086】

図1A-1Bをご参照ください。図1Aは、mB5Rを担持する生成物の模式図であり、1Bは、sB5Rを担持する製品の模式図である。

【0087】

本開示のワクシニアウイルス及びウイルスベクターは、以下の式の配列を含む：

5'-A1-X-A2-B1-Y-B2-C1-Z-C2-3'

(式中、A1及びA2はそれぞれ第1のウイルス遺伝子の左アーム及び右アームであり、B1及びB2はそれぞれ第2のウイルス遺伝子の左アーム及び右アームであり、C1及びC2はそれぞれ第3のウイルス遺伝子の左アーム及び右アームであり、ここで、X、Y、及びZはそれぞれ、免疫調節遺伝子、サイトカイン、治療遺伝子、及び治療抗体、治療抗体のリガンドから選択される)。得られた生成物の例示的な構造を図1A及び1Bに示す。第1のウイルス遺伝子はL025、第2のウイルス遺伝子はTK、第3のウイルス遺伝子はA46Rである。XはIL-21と改変B5Rのハイブリッド遺伝子、Yは4-1BBL、ZはHIC1である。

30

【0088】

「A1-X-A2」と「B1-Y-B2」の間、「B1-Y-B2」と「C1-Z-C2」の間のギャップには、ワクシニアウイルスで知られている他のウイルス遺伝子を含むことができる。

【0089】

製品の設計・構造：

【0090】

1.TK遺伝子の欠失と4-1BBL遺伝子のTK遺伝子部位への組み込み

40

【0091】

図2A-2Bをご参照ください。図2Aは、TK遺伝子欠失マウス4-1BBLを担持するシャトルベクターの模式図である。図2Bは、TK遺伝子欠失ヒト4-1BBLを担持するシャトルベクターの模式図である。

【0092】

図2Aでは、TKの左アームはTK遺伝子の左側(L089)を標的としており、TKの右アームはTK遺伝子の右側(L091)を標的とする。Loxpサイトは、H5プロモーターと赤色蛍光タンパク質RFPに挟まれ、TK左アームとマウス4-1BBL遺伝子のプロモーターH5との間に位置する。

50

## 【 0 0 9 3 】

図2Bでは、TKの左アームがTK遺伝子の左側(L089)を標的とし、TKの右アームがTK遺伝子の右側(L091)を標的とする。Loxpサイトは、H5プロモーターと赤色蛍光タンパク質RFPに挟まれ、TK左アームとヒト4-1BBL遺伝子のプロモーターH5との間に位置している。

## 【 0 0 9 4 】

発現カセットは以下のように設計されている（模式図は図2A及び図2Bを参照）。

## 【 0 0 9 5 】

TK左アーム--loxp-H5-RFP-loxp-H5-m / h4-1BBL-TK右アーム

## 【 0 0 9 6 】

同じレポータータンパク質(RFP)を用いて2つ以上の遺伝子を削除するためには、Cre-Loxなどの適切な相同組換えシステム、またはFlp/FRTシステムを用いてレポーター遺伝子を削除することが重要である。遺伝子挿入エレメントは、タンパク質をコードする核酸配列の周囲、およびタンパク質の発現を駆動するプロモーター領域の上流で、発現カセットに追加することができる。

## 【 0 0 9 7 】

LoxpサイトはそれぞれH5の上流とRFPの下流に位置しており、C5リコンビナーゼはFRETサイトに作用することによって新しい組換えウイルス中のH5-RFPを切り出すのに用いることができる。

## 【 0 0 9 8 】

H5プロモーターは、4-1BBL遺伝子の発現を駆動する。SPD-m4-1BBLのアミノ酸配列は、配列番号：5に記載され、SPD-m4-1BBLのSPD-m4-1BBLのヌクレオチド配列は配列番号：6に記載されている。SPD-h4-1BBLのアミノ酸配列は、配列番号：7に記載され、SPD-h4-1BBLのSPD-h4-1BBLのヌクレオチド配列は配列番号：8に記載されている。

## 【 0 0 9 9 】

ワクシニアウイルスのTK遺伝子(L090)部位で標的相同組換えを行うためには、本開示のベクターを製造するために用いる組換え領域に対して、TK遺伝子及び/又はTK遺伝子に隣接する遺伝子に相補的な配列を追加で提供する必要がある。TK左アーム(Lアーム)はTK遺伝子の左側を標的とし(L089),TKの右アーム(Rアーム)はTK遺伝子の右側を標的とした(L091)。次いで、4-1BBL遺伝子およびレポーター遺伝子RFPを含む実際の発現カセットをTK-LアームとTK-Rアームとの間に配置することができ、それらをワクシニアウイルスの標的TK領域に挿入することができる。発現カセットは、ワクシニアウイルスベクターを形質転換する前に、組換えベクターに挿入することができる。

## 【 0 1 0 0 】

2. L025遺伝子を欠失させ、インターロイキン21(IL-21)及びmB5R（またはsB5R）をL025領域に組み込む。

## 【 0 1 0 1 】

図3A-3Bをご参照ください。図3Aは、マウスIL-21及びL025遺伝子欠失の改変B5R (mB5R/sB5R) を担持するシャトルベクターを示す図である。図3Bは、ヒトIL-21及びL025遺伝子欠失の改変B5R (mB5R/sB5R) を担持するシャトルベクターを示す図である。

## 【 0 1 0 2 】

図3Aでは、L025の左アームはL025遺伝子の左側(L024)を標的としており、L025の右アームはL025遺伝子の右側(L026)を標的とする。FRTサイトは、H5プロモーターと赤色蛍光タンパク質RFPの両側にあり、L025の左アームとL025の右アームの間に位置する。

## 【 0 1 0 3 】

図3Bでは、L025の左アームはL025遺伝子(L024)の左側を標的とし、L025の右アームはL025遺伝子(L026)の右側を標的とする。FRTサイトは、H5プロモーターと赤色蛍光タンパク質RFPの両側にあり、L025の左アームとL025の右アームの間に位置する。

## 【 0 1 0 4 】

発現カセットは以下のように設計されている（模式図は図3A、図3B参照）。

## 【 0 1 0 5 】

10

20

30

40

50

L025左アーム-FRT-H5-RFP-FRT-H5-m/sB5R-H5-m/hIL-21-L025右アーム

【0106】

赤色蛍光タンパク質(RFP)は、新しい組換えウイルスのスクリーニングを容易にするために、レポータータンパク質として使用される。プロモーターは、レポータータンパク質の発現を駆動するためにレポータータンパク質の上流に提供され、ここではH5プロモーターを使用する。FRTはFlipaseの認識部位であり、RFPを切り出すことができる。

【0107】

マウスIL-21のアミノ酸配列は配列番号：9に、マウスIL-21のヌクレオチド配列は配列番号：10に記載されている。ヒトIL-21のアミノ酸配列を配列番号：11に記載され、ヒトIL-21のヌクレオチド配列は配列番号：12に記載されている。

10

【0108】

図5をご参照ください。図5は、mB5R/sB5R遺伝子の構造図である。mB5Rはシグナルペプチド、ストーク、膜貫通領域(TM)、細胞内テールセグメント(CT)遺伝子断片から構成され、sB5Rはシグナルペプチド、ショートコンセンサスリピート1(SCR1)、ストーク、膜貫通領域(TM)、細胞内テールセグメント(CT)遺伝子断片から構成される。

【0109】

H5プロモーターは、免疫治療遺伝子IL21の発現と、mB5RまたはsB5Rの発現を駆動する。mB5R及びsB5Rの概略構造図は、図5を参照されたい。mB5Rのアミノ酸配列は、配列番号：1に記載され、mB5Rのヌクレオチド配列は、配列番号：2に記載されている。sB5Rのアミノ酸配列は、配列番号：3に記載され、sB5Rのヌクレオチド配列は配列番号：4に記載されている。

20

【0110】

上記組換え領域は、ワクシニアウイルスのL025遺伝子に挿入される必要がある。ここでは、相同組換えの方法を用いて挿入を行い、統合部位はL025の左アームと右アームの間である。

【0111】

ワクシニアウイルスのL025遺伝子部位で標的相同組換えを行うためには、本開示のベクターを製造するために用いる組換え領域に、L025遺伝子及び/又はL025遺伝子に隣接する遺伝子に相補的な配列を追加で設けることが必要である。L025左アーム(Lアーム)はL025遺伝子(L024)の左側を標的とし、L025右アーム(Rアーム)はL025遺伝子(L026)の右側を標的とした。次いで、HIC1遺伝子およびレポーター遺伝子GFPを含む実際の発現カセットをL025-LアームとL025-Rアームとの間に配置し、それらをワクシニアウイルスの標的L025領域に挿入することができる。発現カセットは、ワクシニアウイルスベクターを形質転換する前に、組換えベクターに挿入することができる。

30

【0112】

3.HIC1遺伝子は、A46R領域に挿入される。

【0113】

図4をご参照ください。図4は、A46R遺伝子欠失のHIC1遺伝子を担持したシャトルベクターを示す図である。A46Rの左アームはA46R遺伝子の左側(L163)を標的とし、A46Rの右アームはA46R遺伝子の右側(L165)を標的とする。H5プロモーターは、緑色蛍光タンパク質GFPの発現を駆動する。H5プロモーターは、HIC1遺伝子の発現を駆動する。

40

【0114】

発現カセットは以下のように設計されている(模式図は図4参照)：

【0115】

A46R左アーム-H5-GFP-H5-HIC1-A46R右アーム

【0116】

ワクシニアウイルスのA46R遺伝子(L164)部位で標的相同組換えを行うためには、本開示のベクターの製造に用いる組換え領域に対して、A46R遺伝子および/またはA46R遺伝子に隣接する遺伝子に相補的な配列を追加で提供する必要がある。A46R左アーム(Lアーム)はA46R遺伝子(L163)の左側を標的とし、A46R右アーム(Rアーム)はA46R遺伝子(L1

50

65)の右側を標的とした。次いで、HIC1遺伝子およびレポーター遺伝子GFPを含む実際の発現カセットをA46R-LアームとA46R-Rアームとの間に配置し、それらをワクシニアウイルスの標的A46R領域に挿入することができる。発現カセットは、ワクシニアウイルスベクターを形質転換する前に、組換えベクターに挿入することができる。

【0117】

材料と方法

【0118】

細胞株：使用したすべての腫瘍細胞株はATCC由来であった。すべてのヒト癌細胞株は、STRアッセイにより遺伝子型を決定した。本研究で使用したマウス腫瘍細胞株は以下の通り：大腸癌細胞株MC38はC57B/6マウス由来であった。CV1は、米国バージニア州のATCCから入手したアフリカミドリザル「正常」腎臓細胞株であり、ウイルスの大規模生産及びすべてのウイルス滴定アッセイを容易にするためのストック細胞株として使用される。

10

【0119】

ウイルス：野生型VV Listerは、ATCC受託番号VR-1549<sup>TM</sup>でAmerican type culture collection (ATCC) から市販されている。野生型VV Listerは、CCTCC受託番号：V201937下で中国典型培養物保蔵センター(CCTCC)にも寄託されている。寄託日は2019年7月4日で、指定株はLister vaccinia virus 01(VV 01)である。ATCC VR-1549<sup>TM</sup>の製品シートからも詳細情報を入手できる。組換えVV Listerは、CCTCC受託番号V201938でCCTCCに寄託されている。寄託日は、2019年7月4日で、指定株は、ワクシニアウイルスLister KM1株である。野生型VV Lister及び組換えVV Listerの両方は、ブダペスト条約に基づき寄託されている。野生型VV Lister及び組換えVV Listerは、〒430072、中国武漢大学生命科学院、中国典型培養物保蔵センター(CCTCC)に寄託されている。野生型VV Lister及び組換えVV Listerの寄託者は、Shenzhen Hua Yao Kang Ming Biopharmaceutical Co. Ltd., 14 Jinhui road, Pingshan District, Shenzhen, China (the Applicant) である。

20

【0120】

TKシャトルベクターの構築：

【0121】

TKシャトルベクターは、TK遺伝子を標的とする左側(L089)及びTK遺伝子の右側を標的とする右アーム(L091)を含む。Loxpサイトは、H5プロモーターと赤色蛍光タンパク質RFPに挟まれ、TK左アームと4-1BBL遺伝子のプロモーターH5との間に位置している。上記の配列は全て弊社でまとめ、某社で合成し、PUC57ベクターにクローニングした。

30

【0122】

L025シャトルベクターの構築：L025シャトルベクターの模式図を図3A及び3Bに示す。

【0123】

L025シャトルベクターは、L025遺伝子の左側を標的とするL025左アーム(L024)及びL025遺伝子の右側を標的とするL025右アーム(L026)を含む。FRT部位はH5プロモーターと赤色蛍光タンパク質RFPの両側にあり、L025の左アームとmB5R/sB5R遺伝子のプロモーターH5の間に位置する。上記配列を全てスプライシングして当社で合成し、PUC57ベクターにクローニングした。

40

【0124】

A46Rシャトルベクターの構築：

【0125】

A46Rシャトルベクターの模式図は図4に示す。A46Rシャトルベクターは、A46R遺伝子の左側を標的とするA46R左アーム(L163)とA46R遺伝子の右側を標的とするA46R右アーム(L165)を含む。H5プロモーターは、緑色蛍光タンパク質GFPの発現を駆動する。H5プロモーターは、HIC1遺伝子の発現を駆動する。上記の配列は全て弊社でまとめ、某社で合成し、PUC57ベクターにクローニングした。

【0126】

mB5R遺伝子の取得：

50

## 【0127】

mB5Rは、シグナルペプチド、ストーク、膜貫通部(TM)、細胞内テール(CT)遺伝子セグメントから構成される。H5プロモーターは、sB5R遺伝子の発現を駆動する。

## 【0128】

sB5R遺伝子の取得：

## 【0129】

sB5Rは、シグナルペプチド、SCR1、stalk、膜貫通型(TM)、細胞内尾部(CT)遺伝子セグメントから構成される。

## 【0130】

Cas9を介した相同組換え：

## 【0131】

トランスフェクションの1日前に、 $3 \times 10^5$ 個のCV-1細胞を6ウェルプレートの1つのウェルに播種した。gRNAベクター（L025領域を標的とするL025gRNA、TK領域を標的とするTKgRNA、A46R領域を標的とするA46RgRNA）をCas9と共導入し、6ウェルプレート内のCV-1細胞へ導入した。翌日、gRNAベクターとCas9遺伝子をトランスフェクトしたウェルに、0.01PFU/cellのバックボーンウイルスを感染させた。相同組換え用シャトルベクターは、ウイルス感染2時間後に感染ウェルにトランスフェクションした。24時間後に細胞を採取し、-80℃で凍結して組換えウイルスの精製を行った。

## 【0132】

組換えウイルスの精製：

## 【0133】

Cas9を介した相同組換えで回収した細胞ライセートを解凍し、このライセートの0.5 μlを用いて、80～90%コンフルエンスに増殖したCV1細胞を含む6ウェルプレートの全ウェルに感染させた。感染48時間後、各ウェルを蛍光顕微鏡で観察し、赤色または緑色の蛍光を発するウイルスがあるかどうかを確認した。陽性の感染スポットを確認した後、プレート下面にマーカーで印をつける。次に、細胞を培養するためのヒュームフード内でウェルから培地を吸引した後、20 μlのチップでブラックを注意深く選択した。その後、200 μlの細胞培養液の入ったクライオチューブにチップを浸した。1回の凍結融解サイクルの後、このウイルス溶液を、CV1細胞を含む新しい6ウェルプレートの各ウェルに5～20 μlずつ添加した。このプロセスを、各ブラックが赤色または緑色の蛍光を発現するまで、すなわち、すべてのブラックが組換えウイルスによって形成されるまで、反復する。通常、純粋な組換えウイルスを得るためには、3～5回のブラック精製が必要である。ウイルスが精製されたことを確認した後、感染細胞を掻き取り、遠心分離して細胞ペレットを得る。その後、一部の細胞を採取し、ウイルスDNAを抽出する。抽出したウイルスDNAから標的遺伝子をPCRで増幅し、ウイルスの純度を確認した。

## 【0134】

ウイルスの増幅

## 【0135】

目的の組換えウイルスであることが確認できたら、ウイルス溶解液50 μlをCV1細胞の入ったT175フラスコに加え、約30mlの細胞培養液で80～90%コンフルエンスまで増殖させた。48時間後、細胞及び培地を掻き取り、「一次ウイルス増幅」を保存した。

## 【0136】

L025遺伝子を欠失させた組換えウイルスを検証

## 【0137】

CV-1細胞に精製ウイルスを感染させた。感染後2日目に感染細胞を採取し、VV DNAを抽出した。L025遺伝子の欠失を確認するため、フォワードプライマー（配列番号：15: 5'-TATCTAGCAATGACCGT-3'）（L025遺伝子内）とリバースプライマー（配列番号：16: 5'-CCGAAGGTAGTAGCATGGA-3'）（L026遺伝子内）を用いてL025遺伝子とL026遺伝子にわたるDNA断片をPCRにより増幅させた。コントロール遺伝子の増幅フォワードプライマー（配列番号：17: 5'-TTGGCTATTAAACAGTATGGA-3'）とリバースプライマー

10

20

30

40

50

(配列番号：18: 5'-GATCCCGATAACAAATG-3')を用いたPCR増幅により、A46RとA47L遺伝子に渡るDNA断片を得た。PCR産物を1%アガロースゲル電気泳動で分析した。

【0138】

mB5RまたはsB5R遺伝子を発現する組換えウイルスの検証：

【0139】

組換えウイルスへのmB5R遺伝子の取り込みを検証するため、mB5Rをフォワードプライマー（配列番号19: 5'-ATGAAAACGATTCCGTTTTTTACGT-3'）とリバースプライマー（配列番号20: 5'-TCACGGT AGCAATTTATGGAAGCTT-3'）を用いてPCRにより増幅させた。

【0140】

組換えウイルスへのsB5R遺伝子の組み込みを検証するため、フォワードプライマー（配列番号：21: 5'-ATGAAAACGATTTCCGTTGTTACGT-3'）とリバースプライマー（配列番号：22: 5'-TCACGGTAGCAATTTATGGAAGCTT-3'）を用いてPCRによりsB5R遺伝子を増幅させた。

【0141】

Flpリコンビナーゼを用いたRFPの切り出し：

【0142】

pCAG-Flpe（Addgeneから）を、CV-1細胞の6ウェルプレートの1ウェルにトランスフェクトした。CV-1細胞は、pCAG-Flpeのトランスフェクションの24時間後に100~200個の組換えウイルスFlp-RFP VVに感染させた。2日後、RFP陰性ブランクを摘出し、6ウェルプレートでCV-1細胞に感染させ、RFP陰性ブランクを精製するのに使用した。その後、2日おきにRFP陰性ブランクを摘出し、蛍光顕微鏡でRFP陽性ブランクが観察されなくなるまでCV-1細胞に感染させた。

【0143】

TK遺伝子を欠失した組換えウイルスの検証：

【0144】

CV-1細胞に精製ウイルスを感染させた。感染後2日目に感染細胞を採取し、VV DNAを抽出した。TK遺伝子の欠失を検証するため、フォワードプライマー（配列番号：23: 5'-GT TATAGTAGCCGCACTCGA-3'）（TK遺伝子内）とリバースプライマー（配列番号：24: 5'-ATTTTCAGCTGAATGAAGGA-3'）（L091遺伝子内）を用いてPCRにより増幅させた。TK遺伝子とL091遺伝子にまたがるDNA断片：コントロール遺伝子の増幅フォワードプライマー（配列番号：17: 5'-TTGGCTATTAACAGTATGGA-3'）とリバースプライマー（配列番号：18: 5'-GATCCCGATAACAAATG-3'）を用いたPCR増幅により、A46RとA47L遺伝子に渡るDNA断片を得た。PCR産物を1%アガロースゲル電気泳動で分析した。PD1抗体遺伝子は、その遺伝子断片をPCRで増幅することにより確認した。使用したプライマーは：（配列番号：25: 5'-TCATAAATACCCGAGCCACC-3'）及び（配列番号：26: 5'-ACCCATTCAAGACCCTTTCC-3'）であった。

【0145】

Creリコンビナーゼを用いたRFPの切り出し：

【0146】

pCAG-Cre（Addgeneから）を、6ウェルプレートの1つのウェルでCV-1細胞にトランスフェクトした。CV-1細胞は、pCAG-Creのトランスフェクションから24時間後に100-200個のCre-RFPウイルスに感染させた。2日後、RFP陰性ブランクを選択し、6ウェルプレートでCV-1細胞に感染させ、RFP陰性ブランクを精製するのに使用した。その後、2日おきにRFP陰性ブランクを摘出し、蛍光顕微鏡でRFP陽性ブランクが観察されなくなるまでCV-1細胞に感染させた。

【0147】

A46R遺伝子を欠失させた組換えウイルスの検証：

【0148】

CV-1細胞に精製ウイルスを感染させた。感染後2日目に感染細胞を採取し、VV DNAを抽

10

20

30

40

50

出した。A46R遺伝子の欠失を検証するため、フォワードプライマー（配列番号：17: 5'-TTGGCTATTAACAGTATGGA-3'）（A46R遺伝子内）とリバースプライマー（配列番号：18: 5'-GGATCCCGATAACAAATG-3'）（A47R遺伝子内）を用いたPCRにより増幅させた。A46R遺伝子とA47R遺伝子にまたがるDNA断片：コントロール遺伝子は、フォワードプライマー（配列番号：27: 5'-TGTTGTTGCTGCTATGA-3'）とリバースプライマー（配列番号：28: 5'-TGGCACAACCATATCTTGTGA-3'）を用いたPCRにより、L09遺伝子のDNA断片を増幅させた。PCR産物を1%アガロースゲル電気泳動で分析した。HIC1の発現の検出は、組換えウイルスを感染させた細胞から抽出したタンパク質を得て、ウェスタンブロッティングにより確認した。

【0149】

酵素結合免疫吸着測定法(Enzyme-linked immunosorbent assay)

【0150】

mIL-21及びhIL-21の発現は、試薬メーカーの説明書に従って、酵素結合免疫吸着測定法ELISAにより検出した。

【0151】

大規模なウイルス生産：

【0152】

上記からの一次ウイルス増幅物を急速凍結し、一度解凍して、CV1細胞を含む36本のT175フラスコ（80～90%コンフルエンス）に感染させるために必要な細胞培養に必要な容量に希釈した。48時間後、感染したCV1細胞を掻き取り、2,000rpm(4)で数回遠心分離を繰り返すことにより回収した。沈殿物をPBSで洗浄し、12 mlの10 mM Tris-HCl (pH 9) バッファーに再懸濁し、後の精製のために-80 で保存した。

【0153】

ウイルス精製：

【0154】

上記からの濃縮されたウイルス溶解液懸濁液を一度解凍し、数秒間ボルテックスした。2,000 rpmで5分間、4 で遠心分離した後、上清（放出されたビリオンを含む）を集め、10 mM Tris-HCl緩衝液で総容量30 mlに希釈した。30 mlの平均を4本のベックマン超遠心管に入れ、その後、36%スクロース溶液17 mlをウイルス溶液に静かに加え、13,500 rpmで80分間、4 で遠心分離をした。最終ペレットを1-4 mlのウイルス再懸濁バッファー（PBS；10%グリセロール；138 mM NaCl；pH 7.4）に再懸濁した。そして-80 で保存した。

【0155】

ウイルス複製の決定：

【0156】

増殖速度に応じて、細胞培養液を含む6ウェルプレートの3ウェルに2～4×10<sup>5</sup>個/ウェルで播種し、翌日1PFU/セルのワクシニアウイルスで感染させた。感染後24時間、48時間、72時間にそれぞれ感染細胞及びその培養液を回収した。その後、ウイルス濃度を測定した。

【0157】

in vitroにおけるウイルスの細胞毒性評価：

【0158】

96ウェルプレートに細胞を増殖速度に応じて1×10<sup>3</sup>個及び1×10<sup>4</sup>個/ウェルで播種し、16～18時間後にウイルスを感染させた。ウイルス感染後6日目の細胞生存率をMTSアッセイで測定し、EC50値を既述のように算出した（ウイルス投与により腫瘍細胞の50%が死滅）。すべてのアッセイは少なくとも3回実施した。

【0159】

in vitroにおけるウイルス感染に対する固形腫瘍細胞の感受性評価：

【0160】

6ウェルプレートに3×10<sup>5</sup>個/ウェルの細胞を増殖速度に応じて播種し、16～18時間後に

10

20

30

40

50

ウイルスを感染させた。ウイルス感染後2日目の細胞生存率をクリスタルバイオレット染色で測定し、結果は既述のようにスキャンした。

【0161】

in vitroにおけるウイルス感染に対する白血病細胞株の感受性評価：

【0162】

6ウェルプレートに $3 \times 10^5$  cells/well で細胞を増殖速度に応じて3枚ずつ播種し、播種後にウイルスを感染させた。ウイルス感染後1,2,3日目の細胞生存率は、トリパンブルー染色による生細胞と死細胞の区別を行い、細胞計数により測定した。

【0163】

in vitroにおける白血病患者検体のウイルス感染に対する感受性評価：

10

【0164】

白血病患者の同意を得て、抗凝固チューブに5ミリリットルの血液を採取した。2000rpmで5分間スパンし、血漿を除去した後、5ミリリットルの赤血球溶解バッファーを加え、室温で10分間インキュベートした。赤血球溶解後、8mlの滅菌PBSを含む15mlのチューブに移し、2000rpmで5分間反応させた。遠心分離後、上清を除去し、10%FBSと抗生物質を含む5mlsのRPMI1640を使用して細胞ペレットを再懸濁した。24ウェルプレートに $1 \times 10^6$  cells/wellで2ウェル分播き、1ウェルは細胞播種後に1pfu KM1ウイルス/cellを感染させ、もう1ウェルをコントロールとした。ウイルス感染3日後、感染細胞を蛍光顕微鏡で観察・撮影した後、感染細胞とコントロール細胞を10mlのPBSを含む15mlチューブに回収し、2000rpmで5分間スパンした。L/D、CD14、CD16、CD33の各抗体をPBSに溶かした抗体混合液100mLを細胞ペレットに加え、室温、暗所で15分間染色した。染色後の細胞をPBSで1回洗浄し、300pulsのPBSで再懸濁した後、FACで解析した。

20

【0165】

KM1を用いた癌治療のためのin vivo有効性実験

【0166】

$5 \times 10^6$ 個のがん細胞を皮下注射することにより、1治療群あたり10匹のマウスに背部の皮下腫瘍を形成し、直径0.4-0.5cmとした。その後、腫瘍サイズにより再グループ化し、 $1 \times 10^8$  PFU (免疫不全マウス) またはPBSを1、2、3、4及び5日目に投与した。腫瘍面積が1.69cm<sup>2</sup>に達した時点でマウスを犠牲にするまで、腫瘍体積(体積 = (長さ × 幅<sup>2</sup> × ) / 6) を週2回測定した。使用した動物は、4-5週齢の雄のシリアンハムスターである。

30

【0167】

統計解析

【0168】

比較統計解析は、特に断りのない限り、Graphpad Prism 5を用いて行った。二重条件比較は、独立t-検定を用いて行った。2つ以上の条件の追加変数については、1または2ANOVAを別々に実行する。生存データは、群間の差が統計的に有意な差を有するかどうかをプロットするために、ログランク分析を用いたKaplan-Meierプロットとして表される。

【0169】

腫瘍溶解性ワクシニアウイルス及びそのウイルスベクターが提供され、以下の特徴のうちの1つ以上を含む。

40

【0170】

(a) ウイルス遺伝子の組み合わせの欠失を生じさせ、免疫調節遺伝子(例えば、IL21及び4-1BBL)、腫瘍抑制遺伝子(例えば、HIC1)及び新規ウイルス拡散遺伝子mB5R/sB5Rを感染標的細胞へ導入する。

【0171】

(b) TK遺伝子の欠失により、ワクシニアウイルスは腫瘍細胞での複製を目標とすることができる。ワクシニアウイルスのチミジンキナーゼ(TK)は、静止細胞(体内の正常細胞の大部分など)が複製のためにチミジンを産生することを可能にする。TKを欠損したワクシニアウイルスは、宿主細胞が産生するチミジンキナーゼに依存する。チミジンキナーゼは、腫瘍細胞では天然に産生されるが、正常細胞では産生されないか、産生量が少ない。した

50

がって、TK欠損ワクシニアウイルスは、腫瘍細胞、特にEGFR / Ras / ERK経路を活性化した腫瘍細胞で選択的に複製することができる。

【0172】

(c) L025遺伝子の欠失

L025遺伝子にコードされるタンパク質は、免疫細胞におけるNF Kappa Bシグナル伝達経路の活性化を阻害することにより、免疫応答を抑制することができる。L025遺伝子を欠損させることにより、前記遺伝子産物による免疫系阻害を消失させ、抗腫瘍免疫反応を向上させることができる。

【0173】

(d) A46R遺伝子の欠失

A46R遺伝子にコードされるタンパク質は、NF Kappa Bシグナル伝達経路の上流に作用して、免疫細胞の活性化を抑制する。この遺伝子を欠失させると、抗腫瘍免疫反応が改善される。

【0174】

(e) ウイルスは、ワクシニアウイルスのB5R-部分領域欠失遺伝子 (mB5RまたはsB5R) を追加で有する。

【0175】

(f) ウイルスは、インターロイキン21(IL-21)遺伝子を有する。 インターロイキン21は、NK細胞やキラーT細胞も活性化する。インターロイキン21を有するウイルスは、腫瘍に対する免疫反応を促進させることができる。治療用遺伝子は、L025領域に挿入される。

【0176】

(g) ウイルスは4-1BBL遺伝子を有する。 4-1BBは活性化T細胞に発現し、4-1BBはそのリガンドである4-1BBLに結合してT細胞の増殖と細胞傷害性を高める。本製品をより効果的にするために、4-1BBL遺伝子がウイルスに組み込まれる。治療用遺伝子は、TK領域に挿入される。

【0177】

(h) ウイルスは腫瘍抑制遺伝子HIC1遺伝子を有する。HIC1は多くの腫瘍で不活性化または消失する。In vivoの実験では、この遺伝子を失った腫瘍で発現させると、腫瘍の進行を抑制できることが示されている。この遺伝子は、A46R遺伝子領域に挿入される。

【0178】

(i) ウイルスはインターロイキン12(IL-12)遺伝子を有する。 インターロイキン12は、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)やキラーT細胞を制御及び活性化することが知られている。本剤に含まれるインターロイキン12は、NK細胞及びT細胞を活性化することが有効性予備試験で示されている。治療用遺伝子は、A46R領域に挿入される。

【0179】

(j) 複数のウイルス遺伝子を欠失させる新しいストラテジーを提供する。本発明者らは、ウイルスを構築する過程において、CRISPR Cas 9システムを初めて導入し、遺伝子スクリーニング用蛍光タンパク質を欠失させた。CRISPR Cas 9システムのために設計された種々のgRNA配列は、蛍光タンパク質を繰り返し欠失させるために使用することができ、その結果、遺伝子の任意の組み合わせを有するワクシニアウイルスを欠失させることができる。

【0180】

本開示の特徴(e)によれば、ドメインが欠失したB5R遺伝子をコードする核酸配列を含むワクシニアウイルスベクターが提供される。この配列は、ワクシニアウイルスのL025遺伝子に組み込まれ、置換されたものである。本品は、mB5R/sB5Rを有し、ウイルスがよりよく拡散することを可能にし、それによって腫瘍細胞を殺す能力を増加させる。

【0181】

ワクシニアウイルスのB5R遺伝子は、EEVの形成に必須な膜蛋白質をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)を有する。B5R ORFを欠損させると、EEVの産生が著しく低下するため、ウイルスはin vitroで小細胞感染斑を形成し、in vivoでの拡散能力は著し

10

20

30

40

50

く低下する。B5Rの細胞外部分は、主に補体制御タンパク質に存在するショートコンセンサスリピート(SCR)に類似した4つのドメインから構成されている。

【0182】

上記部分的なmB5R遺伝子またはsB5Rは、その上流プロモーターによって発現するように駆動することができる。従って、プロモーターの核酸配列は、発現カセットの一部とすることができる。発現カセットは、プロモーター、オープンリーディングフレーム（及び3'非翻訳領域）を含むベクターの一部とすることができる。プロモーターは、その下流の遺伝子の転写を開始させる特定の配列を有するDNAの領域である。ワクシニアで異種遺伝子を発現させるためのプロモーターとしては、mH5、H5、P7.5、pE/Lなどの初期及び後期の転写活性を制御するプロモーターがある。異種遺伝子とは、通常ウイルスには存在しない遺伝子のことである。

10

【0183】

本開示の一実施形態は、以下のうちの少なくとも1つを含む、配列を提供する。

【0184】

(a) 配列番号：1に記載の配列；

【0185】

(b) 配列番号：3に記載の配列；

【0186】

(c) 配列番号：5に記載の配列；

【0187】

(d) 配列番号：7に記載の配列；

【0188】

(e) 配列番号：9に記載の配列；

【0189】

(f) 配列番号：11に記載の配列；

【0190】

(g) 配列番号：13に記載の配列；

【0191】

(h) 治療用遺伝子またはその改変体

【0192】

(i) 4-1BBL遺伝子またはその改変体；または

【0193】

(j) T細胞を標的とするリガンドまたは抗体

【0194】

本開示の一実施形態では、以下のうちの少なくとも1つを含む、ウイルスを提供する。

【0195】

(a) 配列番号：1に記載の配列；

【0196】

(b) 配列番号：3に記載の配列；

【0197】

(c) 配列番号：5に記載の配列；

【0198】

(d) 配列番号：7に記載の配列；

【0199】

(e) 配列番号：9に記載の配列；

【0200】

(f) 配列番号：11に記載の配列；

【0201】

(g) 配列番号：13に記載の配列；

【0202】

20

30

40

50

(h) 治療用遺伝子またはその改変体

【0203】

(i) 4-1BBL遺伝子またはその改変体；または

【0204】

(j) T細胞を標的とするリガンドまたは抗体

【0205】

配列は、免疫調節因子遺伝子、免疫共刺激経路活性化分子、チェックポイント阻害剤、細胞障害性遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、抗血管新生遺伝子などを含む治療用遺伝子をさらに含んでいてもよい。

【0206】

免疫調節因子遺伝子は、サイトカイン遺伝子を含んでもよい。このようなサイトカインの例としては、リンパカイン、モノカイン、成長因子、及び従来のポリペプチドホルモンが挙げられる。サイトカインには、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、ウシ成長ホルモンなどの成長ホルモン、副甲状腺ホルモン、サイロキシン、インスリン、プロインスリン、リラクシン、プロレラクシン、卵胞刺激ホルモン(FSH)や甲状腺刺激ホルモン(TSH)、黄体形成ホルモン(LH)などの糖タンパク性ホルモン、肝成長因子；プロスタグランジン、線維芽細胞成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン、OBタンパク質；腫瘍壊死因子- および- ；ミューラー阻害物質；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒピン；アクチピン；血管内皮成長因子；インテグリン。トロンボポエチン(TPO)；NGF- などの神経成長因子；血小板成長因子；TGF- 、TGF- などのトランスフォーミング成長因子(TGF)；インスリン様成長因子-I、-II；エリスロポエチン(EPO)；骨誘導因子；インターフェロン- 、 - 、 - などのインターフェース；マクロファージ-CSFなどのコロニー刺激因子(CSFs)。顆粒球-マクロファージ-CSF(GM-CSF)；および顆粒球-CSF(G-CSF)；IL-1、IL-1 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10 IL-11、IL-12等のインターロイキン(ILs)；。IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-24、LIF、G-CSF、GM-CSF、M-CSF、EPO、キットリガンド、またはFLT-3などが含まれる。最も好ましくは、IL-12、IL-21、IL-2、IL-15、IL-8、またはこれらのいずれかの改変体である。

【0207】

免疫共刺激経路活性化分子は、CD40リガンド(CD40L)、ICOSリガンド、GITRリガンド、4-1BBLリガンド、OX40リガンド、TL1A、CD30リガンド、CD27もしくはFit3リガンドまたはこれらのいずれかの改変体をコードする遺伝子を含んでもよい。

【0208】

チェックポイント阻害剤は、PD-1阻害剤、PD-L1阻害剤、CTLA-4阻害剤、またはこれらのいずれかの改変体を含んでもよい。

【0209】

腫瘍抑制遺伝子は、HIC1等、またはこれらのいずれかの改変体を含んでもよい。

【0210】

本開示の一実施形態は、以下のうちの少なくとも1つを含む、配列を提供する。

【0211】

(a) L025、TK、A46R、またはそれらの任意の組み合わせにおける変異；

【0212】

(b) 部分的に欠失したL025、TK、A46R、またはそれらの任意の組み合わせ；

【0213】

(c) 欠失したL025、TK、A46R、またはそれらの任意の組み合わせ；

【0214】

(d) L025、TK、またはA46Rの一部または全部が、配列番号：1-2に記載された配列の1つに置換される；

【0215】

(e) L025、TK、またはA46Rの一部または全部が、配列番号：3-4に記載された配列の1

10

20

30

40

50

つに置換される；

【 0 2 1 6 】

(f) L025、TK、またはA46Rの一部または全部が、4-1BBLまたはその改変体により置換される；

【 0 2 1 7 】

(g) L025、TK、またはA46Rの一部または全部が、HIC1またはその改変体によって置換される；

【 0 2 1 8 】

(h) L025、TK、またはA46Rの一部または全部が、腫瘍標的遺伝子によって置換される；

【 0 2 1 9 】

(i) L025、TK、またはA46Rの一部または全部が、T細胞を標的とするリガンドまたは抗体によって置換される；

【 0 2 2 0 】

(j) L025、TK、またはA46Rの一部または全部が、治療用遺伝子またはその改変体によって置換される；及び

【 0 2 2 1 】

(k) L025、TK、またはA46Rの一部または全部が、治療用抗体で置換される；

【 0 2 2 2 】

本開示の一実施形態では、以下のうちの少なくとも1つを含む、ウイルスを提供する。

【 0 2 2 3 】

(a) L025、TK、またはA46Rの変異；

【 0 2 2 4 】

(b) 部分的に欠失したL025、TK、またはA46R；

【 0 2 2 5 】

(c) L025、TK、またはA46Rの欠失；

【 0 2 2 6 】

(d) L025、TK、またはA46Rの一部または全部が、配列番号：1-2に記載された配列の1つに置換される；

【 0 2 2 7 】

(e) L025、TK、またはA46Rの一部または全部が、配列番号：3-4に記載された配列の1つに置換される；

【 0 2 2 8 】

(f) L025、TK、またはA46Rの一部または全部が、4-1BBLまたはその改変体により置換される；

【 0 2 2 9 】

(g) L025、TK、またはA46Rの一部または全部が、HIC1またはその改変体によって置換される；

【 0 2 3 0 】

(h) L025、TK、またはA46Rの一部または全部が、腫瘍標的遺伝子によって置換される；

【 0 2 3 1 】

(i) L025、TK、またはA46Rの一部または全部が、T細胞を標的とするリガンドまたは抗体によって置換される；

【 0 2 3 2 】

(j) L025、TK、またはA46Rの一部または全部が、治療用遺伝子またはその改変体によって置換される；及び

【 0 2 3 3 】

(k) L025、TK、またはA46Rの一部または全部が、治療用抗体で置換される；

【 0 2 3 4 】

本開示の一実施形態では、上記の任意の配列を含む発現ベクターまたは宿主細胞を提供する。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 3 5 】

本開示の一実施形態では、以下の少なくとも1つを含む、ヒトまたは動物の身体を治療する方法に使用されるウイルスを提供する。

## 【 0 2 3 6 】

(a) 単剤療法として単独で使用される；及び

## 【 0 2 3 7 】

(b) 1つ以上の抗癌剤と組み合わせて使用される。

## 【 0 2 3 8 】

本開示の一実施形態では、ヒトまたは動物の体を治療するための薬剤の製造に使用されるウイルスが提供される。

10

## 【 0 2 3 9 】

本開示の一実施形態では、癌細胞の死を誘導すること、癌細胞の生物学的活性を調節すること、免疫反応を調節すること、T細胞の増殖及び/または細胞毒性を増強することにおける使用のために使用されるウイルスを提供する。

## 【 0 2 4 0 】

本開示の一実施形態では、癌細胞の成長を抑制する、癌細胞の死を誘導する、及び/又は癌細胞の生物学的活性を調節するための医薬品の製造に使用されるウイルスを提供する。

## 【 0 2 4 1 】

癌細胞の生物学的活性は、癌細胞の複製の阻害、癌細胞の分裂の阻害、癌細胞のDNA修復の阻害、癌細胞の遊走の阻害、または癌細胞死の促進を含む。

20

## 【 0 2 4 2 】

本開示の一実施形態では、無菌バイアル、アンプル、またはシリンジ中のウイルスを含む製造製品を提供する。

## 【 0 2 4 3 】

本開示の一実施形態では、本開示の実施形態に係るウイルスを含む医薬組成物を提供する。

## 【 0 2 4 4 】

本開示の一実施形態では、医薬組成物は、抗癌剤及び/又は抗体をさらに含む。

## 【 0 2 4 5 】

本開示の一実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容される担体、希釈剤、及び/又は賦形剤をさらに含む。

30

## 【 0 2 4 6 】

本開示の一実施形態では、配列、発現ベクター、宿主細胞、ウイルス、医薬組成物、又は医薬の有効量を投与することを含む、疾患の治療方法を提供する。

## 【 0 2 4 7 】

本明細書で使用される「医薬組成物」は、本明細書に記載される1つ以上の活性成分と、生理学的に適切な担体及び賦形剤等の他の化学成分との調製物を指す。医薬組成物の目的は、生物への化合物の投与を容易にすることである。

## 【 0 2 4 8 】

ここで、「賦形剤」という用語は、活性成分の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性物質を意味する。賦形剤の例としては、限定されないが、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、各種糖類及びデンプンの種類、セルロース誘導體、ゼラチン、植物油、及びポリエチレングリコールが挙げられる。

40

## 【 0 2 4 9 】

以下、「生理学的に許容される担体」及び「薬学的に許容される担体」という語句は、互換的に使用することができ、生体に著しい刺激を与えず、投与化合物の生物活性及び特性を損なわない担体又は希釈剤を意味する。

## 【 0 2 5 0 】

薬物の製剤化及び投与のための技術は、参照により本明細書に完全に組み込まれる「Remington's Pharmaceutical Sciences」, Mack Publishing Co., Easton, PA, の最新版( Remington. The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro, A., Lippincott, Wi

50

lliams & Wilkins, Philadelphia, Pa., 20th ed, 2000)に記載されている。

【0251】

本発明の医薬組成物は、当技術分野で周知のプロセス、例えば、従来の混合、溶解、造粒、ドラジェ化、賦形、乳化、カプセル化、封入、または凍結乾燥プロセスにより製造することができる。

【0252】

したがって、本発明に従って使用するための医薬組成物は、賦形剤及び助剤を含む1つ以上の生理学的に許容される担体を用いて従来の方法で処方することができ、これにより活性成分を薬学的に使用できる製剤に加工することが容易になる。適切な製剤化は、選択された投与経路に依存する。

【0253】

本開示の実施形態では、医薬組成物は、細胞または高分子（例えば、多糖類）を酸化ストレス（フリーラジカルによる酸化的損傷）から保護することができる抗酸化剤をさらに含む。したがって、抗酸化剤は、高分子の酸化的な解重合を防止することによって、高分子の生存期間を延長することができる。好適な抗酸化剤の非限定的な例としては、グルタチオン、ビタミンC（アスコルビン酸ナトリウム）、ビタミンE（トコフェロール及びトコトリエノール）、N-Ac-L-システイン、ヒドロキノン、グルタミン酸などの分子、またはカタラーゼ、スーパーオキシドディスムターゼ、グルタチオンパーオキシダーゼなどの酵素、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PD)（オスマンI.参照。Naziroglu M., Okutan R. Comparative study of antioxidant enzymes in tissues surrounding implant in rabbits. Cell. Biochem. Funct. 24:275-281, 2006）。

【0254】

潜在的な投与のための医薬組成物には、水溶性の形態の活性製剤の水溶液が含まれる。さらに、活性成分の懸濁液は、適切な油性または水性注射用懸濁液として調製することができる。適切な親油性溶媒またはビヒクルには、ゴマ油などの脂肪油、またはオレイン酸エチルなどの合成脂肪酸エステル、トリグリセリド、またはリポソームが含まれる。水性注射用懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランなどの懸濁液の粘度を増加させる物質を含んでもよい。任意に、懸濁液は、高濃度溶液の調製を可能にするために、活性成分の溶解度を高める適切な安定剤または薬剤を含んでもよい。

【0255】

組成物は、典型的には、1つ以上の適切な希釈剤、充填剤、塩、崩壊剤、結合剤、潤滑剤、滑沢剤、湿潤剤、放出制御マトリクス、着色料、香料、担体、賦形剤、緩衝剤、安定剤、可溶化剤、市販アジュバント、及び/又は当該技術分野で既知の他の添加物を含有する。

【0256】

あるいは、活性成分は、使用前に、適切なビヒクル、例えば、無菌、パイロジェンフリー、水性溶液で構成するための粉末形態であってよい。

【0257】

本開示の組成物、医薬組成物は、所望により、FDA承認キットなどのパックまたはディスペンサー装置、または活性成分を含む1つ以上の単位剤形を含むことができる製造品（包装材料を含む）中に提示されてもよい。パックは、例えば、プリスターパックのような金属箔又はプラスチック箔から構成されてもよい。パック又はディスペンサー装置には、対象への投与、移植及び/又は治療に関する説明書が添付されていてもよい。パック又はディスペンサーは、医薬品の製造、使用又は販売を規制する政府機関によって規定された形式の容器に関連する通知によって収容することもでき、この通知は、組成物の形態又はヒト若しくは獣医の投与に対する政府機関による承認を反映したものである。このような通知は、例えば、処方薬について米国食品医薬品局によって承認された表示、または承認された製品挿入物のものであってよい。適合性のある医薬担体中に配合された本発明の組成物、マトリックスまたはヒドロゲルはまた、上記にさらに詳述されているように、示された状態の処置のために調製され、適切な容器に入れられ、ラベル表示されてもよい。

10

20

30

40

50

【 0 2 5 8 】

適切な投与経路は、例えば、経口、直腸、経粘膜、特に経鼻、腸または非経口送達を含み、筋肉内、皮下及び髄内注射ならびに髄腔内、直接脳室内、心臓内、例えば右または左心室腔内、総冠動脈内、静脈内、腹膜内、鼻内または眼内注射を含むことができる。

【 0 2 5 9 】

本明細書で使用される場合、フレーズ「化学療法剤」は、癌の治療では治療的有用性を有する任意の化学薬剤を指す。本明細書で使用される化学療法剤には、化学的及び生物学的薬剤が含まれる。これらの薬剤は、癌細胞が生存し続けるために依存する細胞活性を阻害するように機能する。化学療法剤のカテゴリーには、アルキル化剤/アルカロイド剤、代謝拮抗剤、ホルモンまたはホルモンアナログ、及びその他の抗悪性腫瘍剤が含まれる。これらの薬剤の全てではないにせよ、ほとんどは癌細胞に対して直接的に毒性があり、免疫刺激を必要としない。適切な化学療法剤は、例えば、Slapak and Kufe, Principles of Cancer Therapy, Chapter 86 in Harrison's Principles of Internal medicine, 14th edition; Perry et al., Chemotherapeutic, Ch 17 in Abeloff, Clinical Oncology 2nd ed., 2000 ChurchillLivingstone, Inc.; Baltzer L. and Berkery R. (eds): Oncology Pocket Guide to Chemotherapeutic, 2nd ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer D. S., Knobf M. F., Durivage H.J. (eds): がん化学療法ハンドブック、第4版。St. Louis, Mosby-Year Handbook.に記載されている。

10

【 0 2 6 0 】

本発明の化学療法剤には、シタラビン(シトシンアラビノシド、Ara-C、Cytosar-U)、アスプリン、スリンダック、クルクミン、アルキル化剤を含むが、これらに限定されるものではない。メクロルエタミン、シクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシルなどのナイトロジェンマスタード、カルムスチン(BCNU)、ロムスチン(CCNU)、セムスチン(メチル-CCNU)などのニトロソウレア類。トリエチレンアミン(TEM)、トリエチレン、チオホスホラミド(チオテパ)、ヘキサメチルメラミン(HMM、アルトレタミン)などのチレンイミン/メチルメラミン; プスルファンなどのアルキルスルホネート; ダカルバジン(DTIC)などのトリアジン類。メトトレキサートやトリメトトレキサートなどの葉酸アナログ、5-フルオロウラシル、フルオロデオキシウリジン、ゲムシタビン、シトシンアラビノシド(Arac、シタラビン)、5-アザシチジン、2などのピリミジンアナログなどの抗代謝産物。2-ジフルオロデオキシシチジン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、アザチオプリンなどのプリンアナログ、2'-デオキシコフォルマイシン(ペントスタチン)、エリスロヒドロキシニルアデニン(EHNA)、フルダラビンリン酸、2-クロロデオキシシアデノシン(クラドリピン、2-CdA)など、パクリタキセル、ビンブラスチン(VLB)、ピンクリスチン、ビノレルピンなどのピンカアルカロイド、タキソテール、エストラムスチン、エストラムスチンリン酸などの抗力剤などの天然物。エトポシド及びテニポシドなどのエピポドフィロトキシン; アクチノマイシンD、ダウノマイシン(ルビドマイシン)、ドキシソルピシン、ミトキサントロン、イダルビシン、プレオマイシン、プリカマイシン(ミトラマイシン)、マイトマイシンC、及びアクチノマイシンなどといった抗生物質。L-アスパラギナーゼなどの酵素、インターフェロン(IFN)-、腫瘍壊死因子(TNF)-、TNF-、GM-CSFなどのサイトカイン、アンジオスタチン、エンドスタチンなどの抗血管新生因子、可溶性VEGF/VEGF受容体などの血管新生因子用受容体の可溶性などFGFまたはVEGFの阻害剤など。シスプラチン、カルボプラチンなどの白金錯体、ミトキサントロンなどのアントラセンジオン、ヒドロキシウレアなどの置換尿素、N-methylhydrazine(MIH)やプロカルバジンなどのメチルヒドラジン誘導体、マイトタン(、'-DDD)、アミノグルテチミドなどの副腎皮質系抑制剤など。プレドニゾン及び等価物、デキサメタゾン及びアミノグルテチミドなどの副腎皮質ステロイド拮抗薬などのホルモン及び拮抗薬; カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン及び酢酸メゲストロールなどのプロゲステン。ジエチルスチルベストロール及びエチニルエストラジオール相当物などのエストロゲン; タモキシフェンなどの抗エストロゲン; プロピオン酸テストステロン及びフルオキシメステロン/相当物などのアンドロゲン; フルタミド、ゴナドトロ

20

30

40

50

ピン放出ホルモンアナログ及びリュープロリドなどの抗アンドロゲン；フルタミドなどの非ステロイド性抗アンドロゲン。キナーゼ阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、メチル化阻害剤、プロテアソーム阻害剤、モノクローナル抗体、酸化剤、抗酸化剤、テロメラゼ阻害剤、BH3模倣剤、ユビキチンリガーゼ阻害剤、スタット阻害剤及び受容体チロシンキナーゼ阻害剤（イマチニブメシレート（グリバックまたはグリバックとして販売）及びエルロチニブ（現在タルベッカとして販売））；など。抗ウイルス剤（リン酸オセルタミビル、アムホテリシンB、パリビズマブなど）が含まれる。

【0261】

いくつかの実施形態では、本発明の化学療法剤（例えば、シタラピン）またはそれを含む医薬組成物の1日の投与量は、体積1平方メートル当たり1～10gの間、体積1平方メートル当たり1.5～5gの間、または体積1平方メートル当たり2～4gの間の範囲である。

10

【0262】

本明細書に画定され、以下の特許請求の範囲に記載された本発明の様々な実施形態および態様は、以下の実施例において実験的裏付けを見出すことができる。

【0263】

ここで、上記の説明と共に、本発明を非限定的に説明する以下の実施例を参照されたい。

【0264】

実施例1：L025遺伝子欠失を取得するウイルス。

【0265】

図6をご参照ください。図6は、L025遺伝子を欠失させた組換えウイルスを示す図である。M：は分子量マーカー、1：はコントロールウイルス、2はL025遺伝子を欠失させた組換えウイルスである。A46Rは増幅されたコントロール遺伝子断片である。L025は、L025遺伝子の欠失が検出された断片である。

20

【0266】

VVListerウイルスを雌親とし、L025遺伝子を欠失させるためのシャトルベクターを用いて相同組換えを行い、L025遺伝子を欠失させたウイルスを得た。赤色蛍光スクリーニングにより純粋な蛍光感染スポットを得た後、小規模なウイルス増幅を行い、ウイルスDNAを抽出してPCRによりL025遺伝子の欠失を同定した。図6に示すような、L025遺伝子が欠失した新規ウイルスを得た。

【0267】

実施例2：L025遺伝子欠失とTK遺伝子欠失を取得したウイルス。

【0268】

実施例1で得られたL025遺伝子欠失型新規ウイルスは、赤色蛍光タンパク質RFPの両脇にFRTサイトを含む。このFRTサイトをFlipaseで切断してRFP遺伝子を欠失させ、L025遺伝子を欠失させたRFP陰性新型VVを得た。このウイルスをバックボーンウイルスとし、TK遺伝子欠失型シャトルベクターを用いて相同組換えを行い、TK遺伝子欠失と同時にこの領域にPD1抗体遺伝子が挿入されたウイルスを取得した。蛍光スクリーニング後に小規模なウイルス増幅を行い、純粋なウイルス感染プラークを得た後、ウイルスDNAを抽出してPCRによりTK遺伝子欠失を同定した。L025遺伝子とTK遺伝子の両方が欠失した新規ウイルスが得られ、PD1抗体遺伝子がTK領域に挿入された（図7）。

40

【0269】

実施例3：L025遺伝子の欠失、TK遺伝子の欠失、及びA46R遺伝子の欠失を有するウイルス。

【0270】

実施例2で得られたL025遺伝子欠失及びTK遺伝子欠失を有する新規ウイルスは、赤色蛍光タンパク質RFPの両側にLoxpサイトを含んでいる。このLoxpサイトをCreリコンビナーゼにより削除してRFP遺伝子を欠失させ、L025遺伝子欠失及びTK遺伝子欠失のRFP陰性の新型ウイルスを得た。このウイルスをバックボーンウイルスとし、A46R遺伝子欠失型シャトルベクターを相同組換えすることにより、A46R遺伝子欠失と同時にこの領域にHIC1遺伝子が挿入されたウイルスを取得した。緑色蛍光スクリーニング後に小規模なウイル

50

ス増幅を行い、純粋なウイルス感染ブランクを得た後、ウイルスDNAを抽出し、PCRによりA46R遺伝子欠失を同定した。L025遺伝子、TK遺伝子、A46R遺伝子欠失を有する新規ウイルスを得、TK領域にPD1抗体遺伝子を、A46R領域にHIC1遺伝子を挿入し、緑色蛍光タンパク質GFPを発現するウイルスを得た。

【0271】

実施例4：L025遺伝子欠失でこの領域にIL21とmB5R/sB5Rが挿入されているウイルス；TK遺伝子欠失でこの領域に4-1BBL遺伝子が挿入されているウイルス；A46R遺伝子欠失でこの領域にHIC1遺伝子が挿入されているウイルスを得た。

【0272】

図14-15をご参照ください。図7は、TK遺伝子欠失及びhSPD-41BBL遺伝子挿入の組換えウイルスを示す。mV：改変ウイルス、V：野生型ウイルス、TK：増幅TK遺伝子（陰性は、検出した組換えウイルスのゲノム中に当該遺伝子が欠失したことを示す）、hSPD-41BBL：挿入ヒトSPD-41BBL増幅陽性は、検査中の組換えウイルスのゲノム中に当該遺伝子が挿入したことを示す）、L09：増幅対照遺伝子断片である。

10

【0273】

図8 A46R遺伝子を欠失させ、挿入した遺伝子HIC1をウイルス発現させた組換えウイルスを示す図である。A：A46R遺伝子の欠失を確認するためにPCRを用いた。M：分子量マーカー、1：コントロールウイルス、2：A46R遺伝子を欠失させた組換えウイルスである。L09は増幅されたコントロール遺伝子断片である。B：ウェスタンプロット分析により、HIC1タンパク質の発現を確認した。Cはコントロールウイルス、TはHIC1遺伝子を搭載し、A46R遺伝子を欠失させた新規組換えウイルスである。HIC1は抗体検出の結果であり、-actinはタンパク質ローディングコントロールである。

20

【0274】

実施例3で得られたL025遺伝子、TK遺伝子、A46R遺伝子欠失の新規ウイルスをバックボーンウイルスとし、L025遺伝子欠失のシャトルベクターを相同組換えし、この領域にIL21とmB5R/sB5R遺伝子を同時に挿入したL025遺伝子欠失のウイルスを取得した。蛍光スクリーニングにより純粋な組換えウイルスを得た後、小スケールウイルスを増幅し、ウイルスDNAを抽出した後、PCRによりL025遺伝子欠損を同定した。L025遺伝子、TK遺伝子、A46R遺伝子を欠失させた新規ウイルスを得、TK領域に4-1BBL遺伝子、A46R領域にHIC1遺伝子（図8）、L025領域にIL21、mB5R/sB5R遺伝子を挿入し、L025遺伝子欠失ウイルスを得た。

30

【0275】

実施例5：KM1ウイルスを感染させた固形腫瘍細胞のパネル。

【0276】

図9A-9Bをご参照ください。図9A-9Bは、6ウェルプレートで2日間、ウイルスの投与量を漸増させた固形腫瘍細胞株のパネルのKM1による殺傷を示す図である。個々のウェルに感染させるために使用したウイルス量は、0.01pfu/cell、0.1pfu/cell、及び1pfu/cellであった。実験終了時にウェル内の残りの細胞をクリスタルバイオレットで染色した。

【0277】

0.01pfu、0.1pfu、1pfu/cellでウイルス感染させた2日後に、細胞をクリスタルバイオレットで染色した。図9A-9Bに示すように、染色後のプレートをスキャンした。

40

【0278】

実施例6：KM1に対する固形癌細胞の感受性EC50アッセイにおけるKM1ウイルスに感染した固形腫瘍細胞のパネルである。

【0279】

図10A-11をご参照ください。図10A-10Cは、17の細胞株におけるEC50アッセイの例を示し、ここで、EC50は、個々の細胞株において3回実施された。図11に、異なる細胞株に対するEC50値を示す図である。

【0280】

ウイルス感染から6日後の細胞生存率をMTSで測定した。MTSでインキュベートした後、

50

プレートを読み取った(図10A-10C及び図11)。

【0281】

実施例7: KM1に対する白血病細胞株の感受性。白血病細胞株のパネルにKM1を感染させた。

【0282】

図12に示す。図12は、ワクシニアウイルスによる白血病細胞株の死滅を示す。3つの細胞株(K562、C8166、THP-1)に対して行ったEC50アッセイを例示的な例として提供する。

【0283】

図A、B、Cは、コントロールウェル(ウイルス感染なし、実線)及びウイルス感染ウェル(寄付行為)における、播種時点、ウイルス感染後48時間及び72時間での細胞計数を示す。サブ図Dは、感染後48時間の感染THP1細胞の画像である。緑色の蛍光で光る細胞は、細胞内でウイルスが複製/増殖していることを表している。

10

【0284】

本開示のワクシニアウイルスは、72時間で白血病細胞の大部分に感染し、死滅した。ウイルス感染後24時間、48時間、73時間後に生細胞/死細胞を計数した。選択的感受性細胞の結果を提示した(図12)。

【0285】

実施例8: KM1に対する白血病患者の細胞の感受性。

【0286】

図13-14をご参照ください。図13は、KM1によって感染した白血病患者の白血球の例を示す図である。図14は、KM1感染後3日目の生細胞/死細胞を示す図である。

20

【0287】

図13A: CMMLの患者からのサンプル; 図13B: M5bの患者からのサンプル; 及び図13C: M4の患者からのサンプル。

【0288】

図14(上): 白血病患者0518#、6#、7#、8#及び2#のコントロールウェル(KM1感染なし、上部パネル)及びKM1感染ウェルにおける生細胞/死細胞のFACsプロファイル。図14B: 白血病患者0518#、6#、7#、8#及び2#のコントロールウェル(KM1感染なし、上部パネル)及びKM1感染ウェルにおける死細胞パーセンテージ。

30

【0289】

白血病患者の白血球を感染させた。ウイルス感染後72時間経過した細胞を蛍光顕微鏡とFACで確認した。(図13-14)。

【0290】

実施例9. シリアンゴールデンハムスターの脾臓癌のKM1治療。

【0291】

図15をご参照ください。図15は、シリアンハムスター脾臓癌HPD 1NRモデルにおけるKM1の抗腫瘍効果を示す図である。左側のパネルは、KM1による処理後及びKM1を処理しない対照群における腫瘍体積の変化を示す。右図は、KM1投与群の動物個体における腫瘍体積変化を示す。

40

【0292】

実施例10. ヒト乳癌細胞MDA MB-231のHIC1武装ワクシニアウイルス処理。

【0293】

図16をご参照ください。図16は、HIC1武装ワクシニアウイルス及びその対応する対照HY3を用いた、ヒト乳癌細胞MDA MB-231の治療を示す図である。上部パネルは、6ウェルプレートにおける、HIC1武装ワクシニアウイルス(HIC1)及びその対応する対照HY3を用いた、用量漸増によるヒト乳癌細胞MDA MB-231の処理を示す。下部パネルは、上部パネルの実験から計算されたEC50を示す。

【0294】

したがって、本開示は、遺伝子組み換えワクシニアウイルス、それを含む医薬組成物、及

50

びそれを用いて必要とする対象を治療するために使用する方法を提供する。遺伝子組み換えワクシニアウイルスは、ウイルス遺伝子の組み合わせの欠失と、免疫共刺激経路活性化分子、免疫調節因子遺伝子、切断ウイルスエンベロープ遺伝子、及び/又は腫瘍抑制因子の感染標的細胞への導入とを含む。本開示の腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、癌細胞に選択的に感染し、腫瘍細胞において選択的に複製し、活性化されたEGFR/Ras/ERK経路で腫瘍細胞を選択的に標的化することができる。また、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、腫瘍による免疫抑制を抑制し、免疫細胞におけるNFカッパBシグナル伝達経路を活性化することができる。また、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、抗腫瘍免疫反応を引き起こし、T細胞の増殖及び細胞傷害性を増強することができる。また、腫瘍の進行を抑制することができる。腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、腫瘍抑制遺伝子を、腫瘍抑制遺伝子を発現しない又は欠損している癌細胞のゲノムに組み込むことができる。

10

## 【0295】

本明細書では、用語「約」は、 $\pm 10\%$ を意味する。

## 【0296】

本明細書で使用される場合、用語「方法」は、化学、薬学、生物学、生化学及び医学の専門家に知られている、または知られている方法、手段、技術及び手順から容易に開発される方法を含むが、これらに限定されない所定のタスクを達成するための方法、手段、技術及び手順を指す。

## 【0297】

「治療する」という用語は、病理（疾患、障害または状態）の発生を阻止すること、及び/または病理を軽減、寛解、または退行させることを意味する。当業者であれば、様々な方法論及びアッセイを使用して、病理学の減少、寛解、または退行を評価できることを理解するであろう。治療が単独で、または他の治療と組み合わせて実施され得ることが理解されよう。

20

## 【0298】

本明細書で使用される場合、「予防する」という用語は、疾患のリスクがあり得るが、疾患障害又は状態の症状をまだ示していない、又は疾患障害又は状態を有するとまだ診断されていない対象では、疾患、障害又は状態が発生しないようにすることを指す。当業者であれば、病態の発生を評価するために、様々な方法論及びアッセイを用いることができることを理解するであろう。

30

## 【0299】

本明細書で使用されるように、用語「対象」又は「それを必要とする対象」は、哺乳動物、好ましくは任意の年齢又は性別のヒトを含む。対象は、病理学、例えば、変異体または非機能性HIC1タンパク質に関連する疾患、障害または状態、例えば、過増殖性疾患の予備的徴候を示すことがある。

## 【0300】

一般に、本明細書で使用される命名法及び本発明で利用される実験手順は、分子生物学的、生化学的、微生物学的及び組換えDNA技術を含む。このような技術は、文献で十分に説明されている。例えば、"Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al.(eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); methodologies as set forth in U.S. Pat.Nos. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 and 5,272,057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al.(eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT

40

50

(1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); available immunoassays are extensively described in the patent and scientific literature, see, for example, U.S. Pat. Nos. 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 and 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); これらは全て、参照によりここに完全に規定されているかのように組み込まれる。他の一般的な参考文献は、この文書全体を通して提供される。その中の手順は、当該技術分野では周知であると考えられ、読者の便宜のために提供される。そこに含まれるすべての情報は、参照することにより本明細書に組み込まれる。

10

**【0301】**

即席出願に開示された任意の配列番号(SEQ ID NO)は、そのSEQ ID NOが言及される文脈に応じて、そのSEQ ID NOがDNA配列形式またはRNA配列形式でのみ発現される場合でも、DNA配列またはRNA配列のいずれかを指すことができることが理解されよう。例えば、配列番号：3は、DNA配列形式（例えば、チミンのTをreciting）で表されるが、WN T3A核酸配列に対応するDNA配列、またはRNA分子核酸配列のRNA配列のいずれかを言及することができる。同様に、一部の配列はRNA配列の形式で表現されているが（例えば、ウラシルのためにUと記載）、記載される実際の分子の種類に応じて、dsRNAを構成するRNA分子の配列、または示されたRNA配列に対応するDNA分子の配列のいずれかを参照することができる。いずれにせよ、任意の置換基を有する開示された配列を有するDNA分子及びRNA分子の両方が想定される。

20

**【0302】**

明確化のために、別々の実施形態の文脈で記載されている本発明の特定の特徴も、単一の実施形態では組み合わせ提供され得ることが理解される。逆に、簡潔さのために、単一の実施形態の文脈で説明されている本発明の様々な特徴はまた、別々に、または任意の適切な下位組合せで、または本発明の任意の他の説明された実施形態では好適に提供されてもよい。様々な実施形態の文脈で説明される特定の特徴は、その実施形態がそれらの要素なしでは動作しない場合を除き、それらの実施形態の本質的な特徴とみなされるべきではない。

30

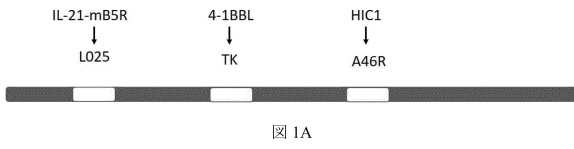
**【0303】**

要約すると、当業者であれば、本願の技術的解決策及び技術的概念に従って様々な変更及び修正を行うことができ、そのようなすべての変更及び修正は、本願に添付された請求項の保護範囲に含まれる。

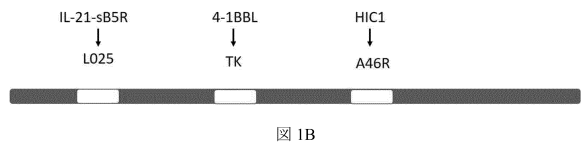
40

【図面】

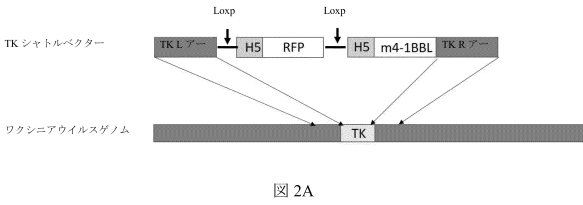
【図 1 A】



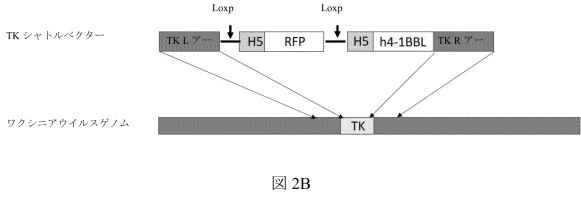
【図 1 B】



【図 2 A】

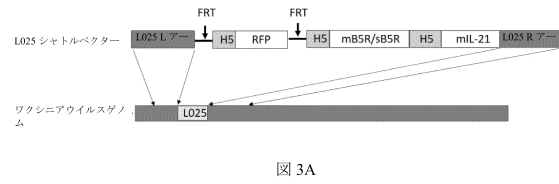


【図 2 B】

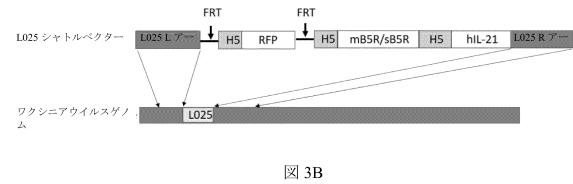


10

【図 3 A】

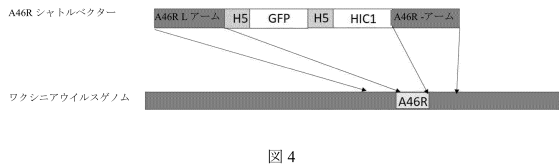


【図 3 B】

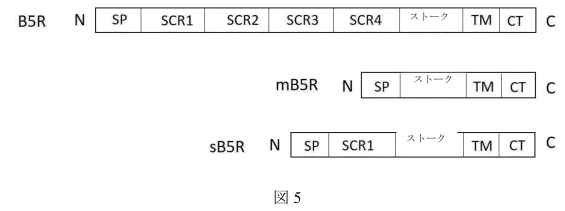


20

【図 4】



【図 5】



30

40

50

【 図 6 】

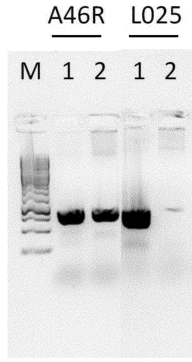


図 6

【 図 7 】

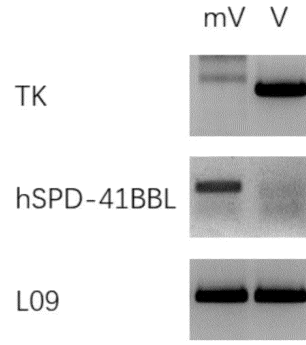


図 7

10

【 図 8 】

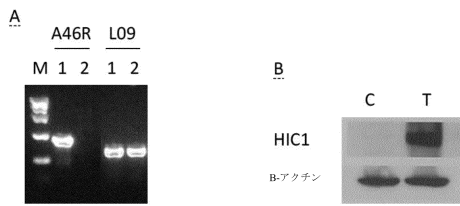


図 8

【 図 9 A 】

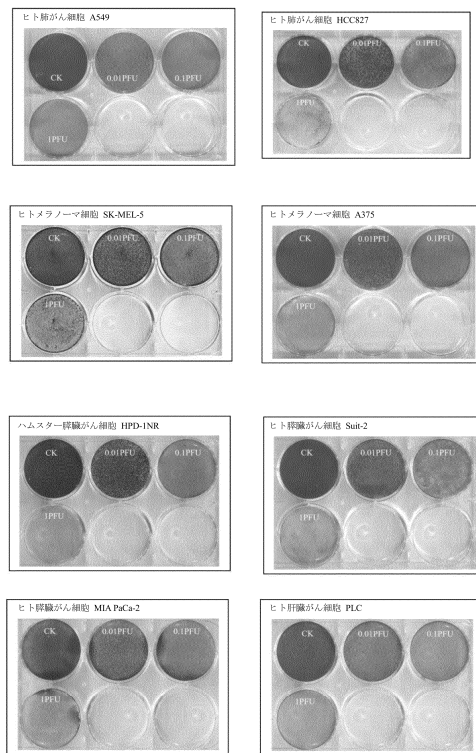


図 9A

20


30

40

50





【 15】

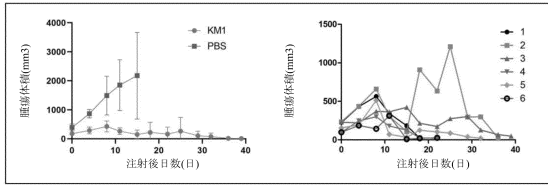



図 15

【 16】

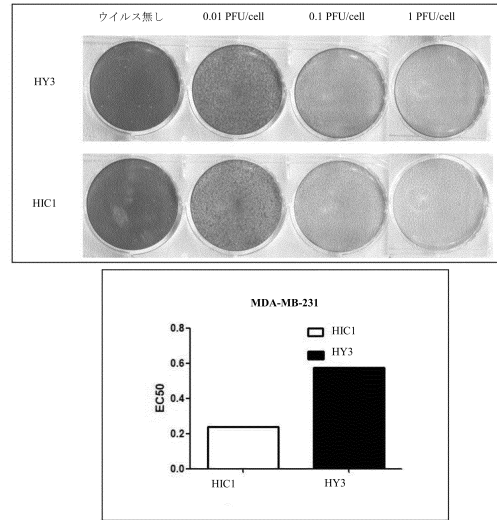


図 16

10

【配列表】

[0007643739000001.app](http://0007643739000001.app)

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

		F I		
A 6 1 K	31/7068(2006.01)	A 6 1 K	31/7068	
A 6 1 K	31/282(2006.01)	A 6 1 K	31/282	
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	35/00(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
C 1 2 N	15/12(2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/39(2006.01)	C 1 2 N	15/39	

中華人民共和国 5 1 8 1 2 2 グワンドン シェンチェン ピンジャン ディストリクト ケンズー  
ストリート ジンシャ コミュニティー ジンファイ ロード ナンバー 14 シェンチェン バイオメ  
ディスン イノベーションズ インダストリアル パーク ビルディング 10 ナンバー 2001

審査官 松村 真里

## (56)参考文献

国際公開第2017/209053(WO, A1)  
特表2017-511136(JP, A)  
米国特許出願公開第2005/0163805(US, A1)  
米国特許出願公開第2006/0275794(US, A1)  
国際公開第03/103589(WO, A2)  
Molecular Therapy, 2010年, Vol.18, No.2, p.264-274  
Cytokine and Growth Factor Reviews, 2018年, Vol.41, p.28-39

## (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N  
A 6 1 K  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)