

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7184337号

(P7184337)

(45)発行日 令和4年12月6日(2022.12.6)

(24)登録日 令和4年11月28日(2022.11.28)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/869 (2006.01)

C 1 2 N 15/869

Z

C 1 2 N 15/867 (2006.01)

C 1 2 N 15/867

Z Z N A

C 1 2 N 15/864 (2006.01)

C 1 2 N 15/864

1 0 0 Z

C 1 2 N 7/01 (2006.01)

C 1 2 N 7/01

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

請求項の数 35 (全31頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-566257(P2018-566257)

(86)(22)出願日 平成29年6月14日(2017.6.14)

(65)公表番号 特表2019-517815(P2019-517815
A)

(43)公表日 令和1年6月27日(2019.6.27)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/037531

(87)国際公開番号 WO2017/218689

(87)国際公開日 平成29年12月21日(2017.12.21)

審査請求日 令和2年6月12日(2020.6.12)

(31)優先権主張番号 62/350,095

(32)優先日 平成28年6月14日(2016.6.14)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 501102988

ユニバーシティ オブ ピッツバーグ -
オブ ザ コモンウェルス システム オブ
ハイヤー エデュケーション
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 15
260、ピッツバーグ、サッカレイ ア
ベニュー 130、ガードナー スティール
カンファレンス センター ファースト
フロア
1st Floor Gardner S
teel Conference Cen
ter, 130 Thackeray A
venue, Pittsburgh PA
15260, United States
of America

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞傷害性免疫細胞による攻撃に対してがん細胞を増感させるためのNK G 2 D活性化リ
ガンドタンパク質の発現

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ベクターをがん細胞中に導入した場合に、少なくとも1つのNK G 2 Dリガンドタンパク質を発現する、外来遺伝子を含む組換えウイルスベクターであって、該ベクターがアデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター及び単純ヘルペスウイルス(HSV)ベクターからなるウイルスベクターのグループから選択され、該NK G 2 Dリガンドタンパク質が、UL 16結合タンパク質(ULBP) 1、ULBP 2、ULBP 3、ULBP 4、ULBP 5若しくはULBP 6から選択されるか、又はULBP 1、ULBP 2、ULBP 3、ULBP 4、ULBP 5若しくはULBP 6のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するタンパク質を含み、

該ベクターによってコードされる1つ以上の必須なウイルス遺伝子及び/又は該外来遺伝子が、miRNAの標的配列を含み、

該miRNAが、がん細胞中よりも非がん性細胞中において、より高い濃度で存在し、並びに

該NK G 2 Dリガンドタンパク質の発現が、がん細胞中における発現と比較して非がん性細胞中において下方制御されるものである、ベクター。

【請求項2】

リガンドタンパク質の発現が、がん細胞をNK媒介性細胞傷害に対して感受性にする、請求項1に記載のベクター。

【請求項3】

NKG2Dリガンドタンパク質がULBP3であるか、又はULBP3のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有する配列を含む、請求項1に記載のベクター。

【請求項4】

ベクターをがん細胞中に導入した場合に、該ベクターがULBP1、ULBP3、又はULBP1とULBP3の両方を発現する、請求項1に記載のベクター。

【請求項5】

ベクターがHSVベクターである、請求項1～4のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項6】

1つ以上の必須なウイルス遺伝子が、miRNAの標的配列を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項7】

前記HSVベクターによってコードされる前記1つ以上の必須なウイルス遺伝子が、ICP0、ICP4、ICP22、ICP27及びICP47から選択される、請求項5又は6に記載のベクター。

【請求項8】

前記ベクターが、2、3、4、5又は6つのmiRNA標的配列を含む、請求項1～7のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項9】

1つ以上のmiRNA標的配列が、miRNAの逆相補体を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項10】

前記miRNAがmir122、mir124、mir128、mir137及び/又はmir199を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項11】

前記miRNA標的配列（複数可）が、NKG2Dリガンドタンパク質を発現する外来遺伝子の3'UTR中に挿入されている、請求項1～10のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項12】

1つ以上の遺伝子のノックアウト、ノックダウン、欠失、挿入、又はベクターの複製及び/若しくは毒性遺伝子の発現を阻害又はブロックするその他の変異を更に含む、請求項1～11のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項13】

HSVベクターであり、ICP0、ICP4、ICP22、ICP27及びICP47の1つ以上に、1つ以上の遺伝子のノックアウト、ノックダウン、欠失、挿入又はその他の変異がある、請求項12に記載のベクター。

【請求項14】

前記ベクターがin vivoで複製能力がない、請求項12又は13に記載のベクター。

【請求項15】

前記細胞がIDHmut細胞である、請求項1～14のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項16】

前記細胞が神経膠芽細胞腫細胞である、請求項1～14のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項17】

前記ベクターが腫瘍溶解性である、請求項1～16のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項18】

前記ベクターが、腫瘍溶解性因子をコードする外来遺伝子を更に含む、請求項17に記載のベクター。

【請求項19】

前記腫瘍溶解性因子が、メタロプロテイナーゼ、プロドラッグ変換酵素、シトシンデア

10

20

30

40

50

ミナーゼ、チミジンキナーゼ又はプリンヌクレオシドホスホリラーゼの1つである、請求項 1 8 に記載のベクター。

【請求項 2 0】

マトリクス・メタロプロテアーゼ 9 (M M P 9) をコードする導入遺伝子を含む、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 2 1】

P D - L 1 に対する抗体をコードする導入遺伝子を含む、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 2 2】

M M P 9、並びに U L B P 1 及び U L B P 3 の1つ又は両方をコードする導入遺伝子を含む、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載のベクター。

10

【請求項 2 3】

U L B P 1 及び U L B P 3 の1つ又は両方をコードする導入遺伝子 (複数可) が、m i R N A の調節下にある、請求項 2 2 に記載のベクター。

【請求項 2 4】

前記 m i R N A が m i r 1 2 4 である、請求項 2 3 に記載のベクター。

【請求項 2 5】

請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のベクターをコードする核酸。

【請求項 2 6】

請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のベクター、及び医薬的に許容される担体を含む、医薬組成物。

20

【請求項 2 7】

請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のベクターを含む、ウイルスストック。

【請求項 2 8】

請求項 1 ~ 2 4 のいずれかに記載のベクター、請求項 2 6 に記載の医薬組成物、又は請求項 2 7 に記載のウイルスストックを含む、がん細胞中において N K G 2 D リガンドタンパク質を発現させるための剤であって、前記ベクターが、がん細胞をインフェクトし、N K G 2 D リガンドタンパク質を発現させるために十分な条件下で、該がん細胞に投与される、剤。

【請求項 2 9】

前記がん細胞が神経膠芽細胞腫細胞である、請求項 2 8 に記載の剤。

30

【請求項 3 0】

哺乳動物におけるがんの治療剤であって、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 2 6 に記載の医薬組成物、又は請求項 2 7 に記載のストックを含む、剤。

【請求項 3 1】

前記がんが神経膠腫である、請求項 3 0 に記載の剤。

【請求項 3 2】

腫瘍に対して直接投与される、請求項 3 0 又は 3 1 に記載の剤。

【請求項 3 3】

前記投与が頭蓋内注射によるものである、請求項 3 2 に記載の剤。

40

【請求項 3 4】

哺乳動物がヒトである、請求項 3 0 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の剤。

【請求項 3 5】

i n v i t r o で、がん細胞中において N K G 2 D リガンドタンパク質を発現させるための方法であって、該方法が、前記ベクターが、がん細胞をインフェクトし、N K G 2 D リガンドタンパク質を発現させるために十分な条件下で、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 2 6 に記載の医薬組成物、又は請求項 2 7 に記載のウイルスストックを投与することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【 0 0 0 1 】

関連出願の相互参照

本特許出願は、米国仮特許出願番号第62/350,095号（参照によりその全体が本明細書に取り込まれる）についての利益を主張する。

【 0 0 0 2 】

連邦支援研究開発に関連する陳述

本発明は、国立衛生研究所による補助金番号AI175052及びCA163205の下での政府の支援を受けて為された。政府は、本発明について一定の権利を有する。

【 0 0 0 3 】

電子的に提出された資料の参照による取り込み

本明細書と同時に提出され、以下の通り識別される、コンピュータで読み取り可能なヌクレオチド/アミノ酸の配列表は、参照により、その全体が本明細書に取り込まれる：2017年6月14日付けの「728947_ST25.txt」という名前の3,118バイトのASCII（テキスト）ファイル1件。

【 背景技術 】

【 0 0 0 4 】

発明の背景

メチル化が関連するエピジェネティック抑制は、ヒト悪性腫瘍の発症に関連している。特に、ナチュラルキラー（NK）細胞リガンドのエピジェネティック抑制は、がんの発症と共に、共進化する、頻繁におこっていることである。NK細胞リガンドの抑制を乗り越えるための新技術は、がんの治療において使用し得る。

【 0 0 0 5 】

国際PCT出願公開番号第2015/066042号（参照によりその全体が本明細書に取り込まれる）は、HSV複製遺伝子座に挿入された、細胞表面分子に特異的なトランスジェニックナリガンド及びマイクロRNA標的配列の1コピー以上を発現している組換え腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス（ α HSV）を開示している。また、参照により本明細書に取り込まれる、Varghese and Rabkin、Cancer Gene Therapy（2002）9、967-978においては、腫瘍溶解性HSV及びその使用方法についての総説が開示されている。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 6 】

本発明は、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ（IDH）変異体（IDH^{Mut}）神経膠腫における、NKG2D活性化リガンド（NKG2DL）の転写抑制が、例えば、IDH野生型（WT、IDH^{WT}）細胞と比較して、*in vitro*及び*ex vivo*で、ナチュラルキラー（NK）細胞媒介性細胞溶解に対するIDH^{Mut}細胞の感受性の低下と相関していることの発見に基づいている。本発明は、幾つかの実施形態においては、がん細胞のNK細胞及びT細胞認識を促進し得る、例えばUL16-結合タンパク質（ULBP）（例、ULBP1-ULBP6、特にULBP1及びULBP3）等のヒトNKG2Dリガンドを発現している、HSVベースのベクターを提供する。ULBPのウイルス媒介性発現は、NKG2D受容体（NKG2DR）によってULBPを認識するNK細胞及び/又はT細胞の活性化をもたらすことができ、続いて、標的の腫瘍細胞を破壊することが出来る。この戦略は、がんの治療に対する、ベクター媒介性の遺伝子治療の新規なアプローチを代表する。

【 0 0 0 7 】

幾つかの実施形態においては、本発明はベクターをがん細胞に導入した場合、少なくとも1つのNKG2D活性化リガンドタンパク質を発現する1つ以上の外来遺伝子（例、導入遺伝子）を含む、組換えウイルスベクターを提供する。該ベクターは、例えば、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス、又は単純ヘルペスウイルス（HSV）のベクターであり得る。リガンドタンパク質の発現は、エフェクター細胞媒介性細胞傷害（例、NK細胞媒介性細胞傷害）に対してがん細胞を増感させ得る。NKG2Dリガンドタンパク質は、例えばULBP1-ULBP6、MIC-A又はMIB-Bのいずれか等のUL16結合タンパク質（ULBP）であり得る。特定の実施形態においては、ベクターをがん細胞に導入した場合、本発明のベ

10

20

30

40

50

クターがULPB1、ULBP3、又はULBP1とULBP3の両方を発現するように、ULBPはULBP1及びULBP3の一方又は両方である。

【0008】

幾つかの実施形態においては、NKG2Dリガンドの発現は細胞性生体分子の制御調節下にある。幾つかの実施形態においては、NKG2Dリガンドの発現が、がん細胞における発現と比較して、非がん性細胞において下方制御されるように、細胞性生体分子が、がん性細胞においてよりも非がん性細胞において、より高濃度で存在する。幾つかの実施形態においては、細胞性生体分子はマイクロRNA (miRNA又はmiR)である。幾つかの実施形態においては、miRはmiR122、miR124、miR128、miR137及び/又はmiR199の1つ以上である。幾つかの実施形態においては、本明細書に記載されたベクターは、1つ以上のウイルス遺伝子及び/又は1つ以上の外来遺伝子に挿入された1つ以上の(one or) miRNA標的配列を含む。幾つかの実施形態においては、該ベクターは1つ以上の外来遺伝子に挿入された、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ以上の標的配列を含む。幾つかの実施形態においては、miR標的配列はタンデムである。幾つかの実施形態においては、miR標的配列は、4ヌクレオチド以上のスペーサーによって隔てられている。1つ以上のmiRNA標的配列は、miRNAの逆相補体であり得る。幾つかの実施形態においては、1つ以上のmiRNA標的配列は、NKG2Dリガンドを発現する、1つ以上のウイルス遺伝子及び/又は外来遺伝子の3' 非翻訳領域(UTR)に挿入されている。

10

【0009】

幾つかの実施形態においては、ベクターは、ベクターの複製及び/又は毒性遺伝子の発現を阻害又はブロックする、遺伝子ノックアウト、ノックダウン、欠失、挿入又は他の変異の1つ以上を含んでも良い。例えば、非限定的に記載された一実施形態においては、HSVベクターは、ICP0、ICP4、ICP22、ICP27及び/又はICP47遺伝子の1つ以上において、遺伝子ノックアウト、ノックダウン、欠失、挿入又は他の変異の1つ以上を含んでも良い。更なる実施形態においては、HSVベクターは、ICP0、ICP4、ICP22、ICP27及びICP47遺伝子の全てにおいて、遺伝子ノックアウト、ノックダウン、欠失、挿入又は他の変異の1つ以上を含んでも良い。幾つかの実施形態においては、ベクターは複製能力がない(即ち、補完的でない細胞内及び/又はin vivoで複製しない)。

20

【0010】

幾つかの実施形態においては、本明細書に記載された組換えウイルスベクターは、細胞内に導入される。幾つかの実施形態においては、該細胞は、エフェクター免疫細胞によるNKG2D依存性細胞溶解に対して感受性である、IDH^{Mut}及びIDH^{WT}がん細胞を含む、任意のがん細胞であり得る。

30

【0011】

幾つかの実施形態においては、ベクターは、少なくとも1つのNKG2D活性化リガンドタンパク質をコードする第一の外来遺伝子、及び腫瘍溶解性因子をコードする第二の外来遺伝子を含む。腫瘍溶解性因子の非限定的な例としては、酵素(例、プロテイナーゼ)、サイトカイン、ケモカイン、抗体、又は他の生物学的に活性なポリペプチドが挙げられる。ある実施形態においては、腫瘍溶解性因子は、例えば、メタロプロテイナーゼ(例、マトリクス・メタロプロテアーゼ9(MMP-9))、プロドラッグ変換酵素、シトシンデアミナーゼ、チミジンキナーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、又は表1に列記したものから選択される酵素等の酵素である。

40

【0012】

幾つかの実施形態においては、本発明は本明細書に記載されたベクターのいずれかをコードする核酸を提供する。幾つかの実施形態においては、該核酸は、細菌人工染色体(BAC)である場合がある。幾つかの実施形態においては、本発明は本明細書に記載されたベクターのいずれかのウイルスストックを提供する。幾つかの実施形態においては、本発明は本明細書に記載されたベクターのいずれかを含む医薬組成物を提供する。更なる実施形態においては、該医薬組成物は医薬的に許容される担体を含む。

【0013】

50

幾つかの実施形態においては、本発明は、がん細胞においてNKG2Dリガンドタンパク質を発現させる方法であって、ベクターをがん細胞にインフェクトし、NKG2Dリガンドタンパク質を発現させるために十分な条件下で、がん細胞に本明細書に記載されたベクター、医薬組成物又はウイルスストックのいずれかを導入することを含む、方法を提供する。幾つかの実施形態においては、該細胞は、がんを患っている対象に由来する場合がある（例、例えば生検等の原発性の細胞試料）。幾つかの実施形態においては、該がん細胞は、例えば多形膠芽細胞腫（GBM）細胞等の神経膠腫細胞であっても良いが、それに限定されない。そのような実施形態においては、NKG2Dリガンドタンパク質の発現は、NK媒介性細胞傷害に対するがん細胞（例、神経膠芽細胞腫細胞）の感受性を増大させる。

【0014】

幾つかの実施形態においては、本発明は、がんの治療を、それを必要とする哺乳動物対象において施す方法であって、本明細書に記載されたベクター、医薬組成物又はウイルスストックのいずれかを該対象に投与することを含み、それによりがんを治療する、方法を提供する。幾つかの実施形態においては、該ベクター、医薬組成物又はストックは、例、腫瘍内注射、頭蓋内注射によって（腫瘍の型に応じて）、腫瘍に直接投与、又は全身的に投与しても良い。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1-1】図1は、NKG2DリガンドがIDH^{Mut}神経膠腫において差次的に発現していることを実証する。RNAseq分析：286人の個人のびまん性神経膠腫試料に由来するTCGAデータベースから公的に入手可能なRNAseqデータを使用して、IDH^{Mut}及びIDH^{WT}びまん性神経膠腫において、1639個の免疫関連遺伝子（遺伝子オントロジーカテゴリー0050776）を比較した。図1A：62個の差次的に発現している遺伝子（ p 値 $<1e^{-7}$ で、遺伝子発現における絶対的な差が3超）の教師なしでの（unsupervised）階層的クラスタリング。距離の指標としてピアソン相関を使用して、それらの発現値によって、マーカーをクラスター化した。図1B：図1Aに記載された通り、同じコホートに由来する他の公知のNKG2Dリガンドの遺伝子発現分析。ULBP1及びULBP3は、IDH^{WT}と比較して、IDH^{Mut}において、有意により低い発現を示した。図1C：TCGAの低グレート神経膠腫データベースに由来する152人の低グレート神経膠腫患者（130 IDH^{Mut}；32 IDH^{WT}）についての平均メチル化値（ $*$ = $p < 0.05$ ； $***$ = $p < 0.001$ ）。

【図1-2】図1は、NKG2DリガンドがIDH^{Mut}神経膠腫において差次的に発現していることを実証する。RNAseq分析：286人の個人のびまん性神経膠腫試料に由来するTCGAデータベースから公的に入手可能なRNAseqデータを使用して、IDH^{Mut}及びIDH^{WT}びまん性神経膠腫において、1639個の免疫関連遺伝子（遺伝子オントロジーカテゴリー0050776）を比較した。図1A：62個の差次的に発現している遺伝子（ p 値 $<1e^{-7}$ で、遺伝子発現における絶対的な差が3超）の教師なしでの（unsupervised）階層的クラスタリング。距離の指標としてピアソン相関を使用して、それらの発現値によって、マーカーをクラスター化した。図1B：図1Aに記載された通り、同じコホートに由来する他の公知のNKG2Dリガンドの遺伝子発現分析。ULBP1及びULBP3は、IDH^{WT}と比較して、IDH^{Mut}において、有意により低い発現を示した。図1C：TCGAの低グレート神経膠腫データベースに由来する152人の低グレート神経膠腫患者（130 IDH^{Mut}；32 IDH^{WT}）についての平均メチル化値（ $*$ = $p < 0.05$ ； $***$ = $p < 0.001$ ）。

【図2-1】図2は、IDH^{Mut}神経膠腫における、ULBP1、ULBP2及びULBP3の低下した発現を実証する。図2A：IDH^{Mut}又はIDH^{WT}の不死化ヒト星状細胞の細胞株におけるNKG2DLの発現を比較している（comparing expression）RT-PCR発現値。示したデータは、18s RNAに対する発現レベルを表す。示した結果は、独立した3つの実験の代表である。図2B：リアルタイムPCR（NKG2DLの発現）を、患者由来のIDH^{Mut}又はIDH^{WT}の原発性の神経膠腫の幹細胞において行った。各データの点は、個別の患者の腫瘍に由来する原発性の神経膠腫細胞を表す。示したデータは、18s RNAに対する発現レベルを表す。図2A及び2Bについては、全試料についてトリプリケートで行い、エラーバーは複製間の標

10

20

30

40

50

準偏差を示す (* = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$)。

【図2 - 2】図2は、IDH^{Mut}神経膠腫における、ULBP1、ULBP2及びULBP3の低下した発現を実証する。図2A：IDH^{Mut}又はIDH^{WT}の不死化ヒト星状細胞の細胞株におけるNKG2DLの発現を比較している (comparing expression) RT-PCR発現値。示したデータは、18s RNAに対する発現レベルを表す。示した結果は、独立した3つの実験の代表である。図2B：リアルタイムPCR (NKG2DLの発現) を、患者由来のIDH^{Mut}又はIDH^{WT}の原発性の神経膠腫の幹様細胞において行った。各データの点は、個別の患者の腫瘍に由来する原発性の神経膠腫細胞を表す。示したデータは、18s RNAに対する発現レベルを表す。図2A及び2Bについては、全試料についてトリプリケートで行い、エラーバーは複製間の標準偏差を示す (* = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$)。

10

【図3】図3は、IDH^{Mut}神経膠腫細胞がNK媒介性細胞傷害に対して抵抗性であることを実証する。NK細胞媒介性細胞傷害は、星状細胞又は患者由来のGSCにおいて、7-AADベースのフローサイトメトリー法を使用して測定した。上清中のIFN- γ の分泌を、NK細胞活性化に対する相関として測定した。図3A：3つの異なるエフェクター標的比 (1:5、1:10及び1:20) で測定した、IDH^{Mut}及び親星状細胞 (PA) のNK媒介性の特異的な溶解。IDH^{Mut}星状細胞 (灰色の線、四角) 及びPA星状細胞 (黒色の線、丸) の特異的な溶解における統計的な差異を、対応のあるスチューデントのT検定を使用して測定した。図3B：エフェクター細胞 (NK-92細胞) による患者由来のIDH^{Mut} (黒丸) 又はIDH^{WT} (黒四角) GSCオリジンの特異的な溶解。図3C及び3D：図3A及び3Bの実験の上清中において、それぞれ、ELISAによって測定されたIFN- γ の生成 (Elaboration)。対応のあるスチューデントのT検定によって、IFN- γ 濃度の差異を決定した (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$)。

20

【図4】図4は、星状細胞におけるNK媒介性の死滅がNKG2D依存性であることを実証する。図4A：NKG2Dブロッキング抗体の存在下又は非存在下において、IDH^{Mut}又はIDH^{WT}星状細胞のドナーに由来するNK媒介性細胞溶解を行った。7-AADフローサイトメトリーによって、特異的な溶解を決定した。IDH^{WT}星状細胞のNK溶解は、NKG2Dブロッキング抗体の存在下において顕著に低下したが (10.2%に対して3.03% ; $p = 0.04$)、アイソタイプの対照抗体では差異は見られなかった。IDH^{Mut}星状細胞は、低レベルのNK媒介性の特異的な溶解を示し (<2%)、NKG2Dをブロック (blockade) すれば統計的に有意な変化は見られなかった。図4B：ELISAによってIFN- γ レベルを評価するために、図4Aの実験に由来する細胞フリーの上清を抽出した。示したデータは、独立した3つの実験の代表である。エラーバーは、各試料間のSDを表す (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$ 、*** = $p < 0.001$)。

30

【図5】図5は、形質導入した原発性ヒト星状細胞中のNKG2DLの発現を示す。IDH^{WT} (WT) 又はIDH^{Mut} (Mut) のいずれかを安定して形質導入した原発性星状細胞において、RT-qPCR分析を行った。IDH^{WT}と比較して、IDH^{Mut}においては、ULBPが有意に低かった。

【図6】図6は、デシタピン (decitabine) (DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤) 処理によってULBP3発現が回復することを実証する。5、7又は13日間、IDH^{Mut}星状細胞 (Mut) をデシタピン (100 nM若しくは200 nM)、ビヒクル (DMSO) を用いて処理するか、又は処理せず (un)、ULBP3発現をRT-qPCRによって定量した。デシタピン (200nM) を用いて7日間処理したIDH^{Mut}星状細胞は、IDH^{WT} (WT) 星状細胞と同程度のULBP3発現を示したことから、IDHの変異によってNKリガンド高メチル化が誘発されることが示唆される。

40

【図7】図7Aは、HSV欠損ベクターJ NI7の模式図を示す。ウイルスの複製及び毒性のある即時早期 (immediate-early) (IE) 遺伝子の発現をブロックするために、ICP0、ICP4、ICP22、ICP27及びICP47遺伝子を欠失又は改変した (黒色のボックス)。インフェクション効率を改善するために、糖タンパク質B (gB) を変異させた (Uchidaら、J. Virol. 84(23)、12200-09 (2010)、参照によりその全体が本明細書に取り込まれる)。ベクターの転写活性を観察するために、ユビキチンCプロモーター (UbCp) を使用したmCherry発現カセットが挿入される。J NI7-GFPはLAT遺伝子座内に、CAGプロモーター駆動型のEGFPカセットを有する一方で、J NI7-ULBP3は、CAGプロモーター駆動型のULBP3

50

カセットを有する。図7Bは、J NI7-FlagULBP3を用いてインフェクトした星状細胞及びU2OS細胞がタグ付きのULBP3タンパク質を発現することを実証する。

【図8】図8は、J NI7-FlagULBP3を用いてインフェクトしたU2OS細胞が、期待された通りに細胞膜に局在する、タグ付きのタンパク質を発現することを実証する。U2OS細胞は、5のMOIでJ NI7-ULBP3ベクターを用いてインフェクトし、画像化した時間はインフェクション後48時間 (h.p.i.)であった。

【図9 - 1】図9は、J NI7によってIDH^{Mut}細胞中で発現されるULBP3が、NK細胞の活性化を誘導し、動物の生存を改善したことを実証する。J NI7-EGFP (対照ベクター)又はJ NI7-ULBP3のいずれかを用いて、IDH^{WT}星状細胞 (図9A)及びIDH^{Mut}星状細胞 (図9B)を、10のMOIで5日間インフェクトし、NK細胞を48時間重層した (10:1)。トリパ
ンブルーによって、細胞死滅を測定した。(図9C)カプラン・マイヤー生存プロット。トリ
チュレートした (trituated) 原発性の神経膠腫GBM30細胞株を頭蓋内に移植し、PBS又
はJ NI7-ULBP3ウイルス (2.5 µl中2×10⁹ゲノムコピー)を7日後、同じ座標に注射し
た。生存中央値: PBS = 18.5日、ULBP3 = 24.5日。

10

【図9 - 2】図9は、J NI7によってIDH^{Mut}細胞中で発現されるULBP3が、NK細胞の活性化を誘導し、動物の生存を改善したことを実証する。J NI7-EGFP (対照ベクター)又はJ NI7-ULBP3のいずれかを用いて、IDH^{WT}星状細胞 (図9A)及びIDH^{Mut}星状細胞 (図9B)を、10のMOIで5日間インフェクトし、NK細胞を48時間重層した (10:1)。トリパ
ンブルーによって、細胞死滅を測定した。(図9C)カプラン・マイヤー生存プロット。トリ
チュレートした (trituated) 原発性の神経膠腫GBM30細胞株を頭蓋内に移植し、PBS又
はJ NI7-ULBP3ウイルス (2.5 µl中2×10⁹ゲノムコピー)を7日後、同じ座標に注射し
た。生存中央値: PBS = 18.5日、ULBP3 = 24.5日。

20

【図9 - 3】図9は、J NI7によってIDH^{Mut}細胞中で発現されるULBP3が、NK細胞の活性化を誘導し、動物の生存を改善したことを実証する。J NI7-EGFP (対照ベクター)又はJ NI7-ULBP3のいずれかを用いて、IDH^{WT}星状細胞 (図9A)及びIDH^{Mut}星状細胞 (図9B)を、10のMOIで5日間インフェクトし、NK細胞を48時間重層した (10:1)。トリパ
ンブルーによって、細胞死滅を測定した。(図9C)カプラン・マイヤー生存プロット。トリ
チュレートした (trituated) 原発性の神経膠腫GBM30細胞株を頭蓋内に移植し、PBS又
はJ NI7-ULBP3ウイルス (2.5 µl中2×10⁹ゲノムコピー)を7日後、同じ座標に注射し
た。生存中央値: PBS = 18.5日、ULBP3 = 24.5日。

30

【図10】図10A及び図10Bは、miR124によって、それぞれULBP1及びULBP3が枯渇していることを示す。miR124はULBP1及びULBP3の発現を阻害し、それにより健常な神経中においてタンパク質の発現をブロックするために、このアプローチを使用し得ることが示唆される。

【図11】図11は、宿主細胞にULBP3を送達するための組換えHSVのベクターの略図を示す。

【図12】図12A及び図12Bは、ULBP及びULBPmir124RE (RE = 応答エレメント)を過剰発現する腫瘍溶解性HSVベクターのベクターの略図を示す。ここでは、「USBP」は例えばULBP1、ULBP3又はその他等の任意のULBPを指す。腫瘍溶解性ベクターは組換えによって作製され、2A5BGw (2A5B = gD wt; gB-NT = gB中で二重変異を促進しているウ
イルスエンター; gC-EGFP = T2A配列を介して、EGFPに完全なgC ORFを融合; join
t = 1コピーのICP4を含む、完全な内在繰り返し領域の欠失; ICP4: mir124 = 残りのICP
4遺伝子の3' UTR内へのT124の挿入)中、又は14Gw (ヒトEGFR又はEGFRvIIIによ
ってインフェクションするためにgDが操作されており、2A5B中に列記されたものと同じ改
変を有する)中で、ULBP発現カセットを用いてゲートウェイカセットを置換している。

40

【図13】図13Aは、プライマー: UL4f及びpENTRcagULBPfを使用して、mir124RE配列の組換えのPCRによる検証を示す (PCR番号1)。図13Bは、プライマー: gDF及びgDR2を使用して、gD / トロピズムのPCRによる検証を示す (PCR番号2)。レーンは、U2OSにおいてトランスフェクトしたBAC-DNAを表す: 2A5B ULBP1、クローン番号2; 2A5B ULBP1mir124RE、クローン番号2 (図12B); 2A5B ULBP3、クローン番号1; 2A5B UL

50

BP3mir124RE、クローン番号2 (図12B);14 ULBP1、クローン番号1;14 ULBP1mir124RE、クローン番号1 (図12A);14 ULBP3、クローン番号3;14 ULBP3mir124RE、クローン番号8 (図12A)、2A5B ULBP1コンストラクト及び2A5B ULBP3コンストラクトは、ICP4-miR123REの改変なしで、図12B中で表された通りであり、14 ULBP1コンストラクト及び14 ULBP3コンストラクトは、ICP4-miR123REの改変なしで、図12B中で表された通りである。

【図14】図14～17は、本発明のトロピズムベクターに関するデータを記載する。KMM P9、KGW、又はWT gDを有する親ウイルスKG4:T124を用いて、6時間、J/A、J/C及びJ/EGFR細胞をインフェクトし、ウイルスのエントリーを検出するために、ICP4に対する抗体を用いて免疫染色した。ヒトEGFR受容体 (J-EGFR)、HSV天然受容体HveA及びHveC (J/A及びJ/C細胞)のいずれかを発現している細胞をインフェクトすることによって、ヒトEGFRによってEGFRを再標的化した14-ULBPコンストラクトのエントリーを確認した;反対に (on the other end) 再標的化していないベクター (2A5Bバックボーン)は、J/A又はJ/C細胞のみに注入できた (gDに対する天然の受容体の発現のために形質導入した)。

10

【図15】図14～17は、本発明のトロピズムベクターに関するデータを記載する。KMM P9、KGW、又はWT gDを有する親ウイルスKG4:T124を用いて、6時間、J/A、J/C及びJ/EGFR細胞をインフェクトし、ウイルスのエントリーを検出するために、ICP4に対する抗体を用いて免疫染色した。ヒトEGFR受容体 (J-EGFR)、HSV天然受容体HveA及びHveC (J/A及びJ/C細胞)のいずれかを発現している細胞をインフェクトすることによって、ヒトEGFRによってEGFRを再標的化した14-ULBPコンストラクトのエントリーを確認した;反対に (on the other end) 再標的化していないベクター (2A5Bバックボーン)は、J/A又はJ/C細胞のみに注入できた (gDに対する天然の受容体の発現のために形質導入した)。

20

【図16】図14～17は、本発明のトロピズムベクターに関するデータを記載する。KMM P9、KGW、又はWT gDを有する親ウイルスKG4:T124を用いて、6時間、J/A、J/C及びJ/EGFR細胞をインフェクトし、ウイルスのエントリーを検出するために、ICP4に対する抗体を用いて免疫染色した。ヒトEGFR受容体 (J-EGFR)、HSV天然受容体HveA及びHveC (J/A及びJ/C細胞)のいずれかを発現している細胞をインフェクトすることによって、ヒトEGFRによってEGFRを再標的化した14-ULBPコンストラクトのエントリーを確認した;反対に (on the other end) 再標的化していないベクター (2A5Bバックボーン)は、J/A又はJ/C細胞のみに注入できた (gDに対する天然の受容体の発現のために形質導入した)。

30

【図17】図14～17は、本発明のトロピズムベクターに関するデータを記載する。KMM P9、KGW、又はWT gDを有する親ウイルスKG4:T124を用いて、6時間、J/A、J/C及びJ/EGFR細胞をインフェクトし、ウイルスのエントリーを検出するために、ICP4に対する抗体を用いて免疫染色した。ヒトEGFR受容体 (J-EGFR)、HSV天然受容体HveA及びHveC (J/A及びJ/C細胞)のいずれかを発現している細胞をインフェクトすることによって、ヒトEGFRによってEGFRを再標的化した14-ULBPコンストラクトのエントリーを確認した;反対に (on the other end) 再標的化していないベクター (2A5Bバックボーン)は、J/A又はJ/C細胞のみに注入できた (gDに対する天然の受容体の発現のために形質導入した)。

40

【図18】図18は、miR124による、Flagタグ付のULBP1の発現の下方制御を示す。miR124又はスクランブル対照を約100 pmol (20 µMストックから5 µl)用いて、293T細胞をトランスフェクトした。24時間後、腫瘍溶解性ベクター2A5BULBP1mir124RE (図12B中のコンストラクトを参照)又は欠損ウイルスJ7ULBP1mir124のいずれかを、0.1のMOIで用いて、細胞をインフェクトした。インフェクト後24時間 (h.p.i.) で、細胞をWB用に回収した (合計100 µL/試料 - ロード2 µL)。

【図19】図19は、miR124による、ULBP1の下方制御について記載する。miR124又はスクランブル対照を約100 pmol (20 µMストックから5 µl)用いて、293T細胞をトラ

50

ンスフェクトした。24時間後、腫瘍溶解性ベクター2A5BULBP3mir124RE (図12B中のコンストラクトを参照)又は欠損ウイルスJ7ULBP3mir124のいずれかを、0.1のMOIで用いて、細胞をインフェクトした。インフェクト後24時間 (h.p.i.) で、細胞をWB用に回収した(合計100 μ L / 試料 - ロード2 μ L)。

【図20】図20は、ULBP3が2A5Bの治療効果を改善することを実証する実験の実験設計について記載する。図20中の時間軸は日を表す；記載された通り、4日毎にアシアロGM1 Ab又はアイソタイプ対照のいずれかを注射した。

【図21】図21は、ULBP3が、NK細胞存在下 (左のパネル)及びNK細胞枯渇下 (右のパネル)の両方で、2A5Bの治療効果を改善することを実証するデータを図示する。

【図22-1】図22Aは、各々NK細胞の非存在下で、バックボーンベクター (2A5B)(中央のパネル)、及びまた疑似 (PBS)処理した動物 (左の列)に対する、腫瘍溶解性HSVベクター (2A5B ULBP3) (右のパネル)の腫瘍抑制能力を比較したデータを表す。

【図22-2】図22Bは、各々NK細胞の存在下で、バックボーンベクター (2A5B)(中央のパネル)、及びまた疑似 (PBS)処理した動物(左の列)に対する、腫瘍溶解性HSVベクター (2A5B ULBP3) (右のパネル)の腫瘍抑制能力を比較したデータを表す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

発明の詳細な説明

本発明は、ウイルスベクターを用いてインフェクトした宿主細胞において、NKG2D活性化リガンドをコードし、その発現を引き起こす、1つ以上の外来遺伝子 (即ち、ベクター中において通常又は天然では見られない遺伝子)を含む、組換えウイルスベクターを提供する。NKG2D活性化リガンドは、該ウイルスベクターを用いて細胞をインフェクトした後に発現する。本明細書で用いられる用語「ベクター」は、別の核酸分子を伝達する (transferring) 又は輸送する (transporting) ことが出来る核酸分子を指す。一般的に、伝達される核酸は、ベクターの核酸分子に連結、例、挿入される。ベクターは、細胞中で自律複製を指示する配列を含んでも良く、又は宿主細胞DNA中にインテグレーションできるよう十分な配列を含んでも良い。ウイルスベクターは時には、「組換えウイルス」又は「ウイルス」として言及される場合がある。用語「腫瘍溶解性ウイルス」及び「腫瘍溶解性ベクター」は、本明細書において交換可能に使用される。幾つかの実施形態においては、本発明は選択的にがん細胞にインフェクトするように改変されたか、又は自然にインフェクトするウイルスを指す、組換え腫瘍溶解性ウイルスを提供する。当該分野において公知である、腫瘍溶解性ウイルスの例としては、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、ポリオウイルス、ワクシニアウイルス、麻疹ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、オルトミクソウイルス、パルボウイルス、マラバウイルス又はコクサッキーウイルスが挙げられるが、それらに限定されない。

【0017】

複製能力があるベクター及び複製能力のないベクターの両方を使用し得る。参照によりその全体が本明細書に取り込まれる、国際PCT出願公開番号第2015/066042号に記載された一般的な方法を、HSVベクターを操作する (HSV複製遺伝子のノックアウト及び/又は制御を含む) ために適用し得る。

【0018】

複製能力のないベクターは、1つ以上の必須なウイルス遺伝子の欠失、変異又はその他の改変 (例、挿入)によって生成し得る。本明細書で用いられる場合、「必須なウイルス遺伝子」は、ウイルスの複製に必要であるウイルス遺伝子を指す。様々なウイルスの複製のために必要な遺伝子は、当該分野において公知である。本発明の幾つかの実施形態においては、ベクターはHSVベクターであり、ICP0、ICP4、ICP22、ICP27及びICP47遺伝子座の1つ以上において、欠失、変異又はその他の改変 (例、挿入)の1つ以上を含む。幾つかの実施形態においては、ウイルスベクターは、ICP0、ICP4、ICP22、ICP27及びICP47遺伝子座の全てにおいて欠失、変異又はその他の改変 (例、挿入)を含む。ある実施形態においては、本明細書に記載されたHSVベクターは、ICP47遺伝子のプロモーターと共に、

10

20

30

40

50

2倍体の遺伝子 (ICP0、ICP34.5、LAT及びICP4) を各々1コピー含む、内在反復 (joint) 領域の1つ以上の欠失を含む。幾つかの実施形態においては、jointを欠失させる代わりに、joint領域の遺伝子、特にICP0及び/又はICP47の発現を、これらの遺伝子の欠失又はその他の不活性化する方法によってサイレンシングし得る。

【0019】

幾つかの実施形態においては、本発明のウイルスベクターは1つ以上の外来遺伝子を含む。用語「外来遺伝子」は、ベクター中において通常又は天然で見られない遺伝子 (例、導入遺伝子) を指す。一般的に、外来遺伝子は、ウイルスベクターを用いた細胞のインフュクション後に、細胞によって発現される。幾つかの実施形態においては、外来遺伝子はNKG2Dリガンドをコードする。幾つかの実施形態においては、NKG2Dリガンドは、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5又はULBP6を含む、例えばUL-16結合タンパク質 (ULBP) 等のNKG2D活性化リガンドである。幾つかの実施形態においては、NKG2D活性化リガンドはMHCクラスI関連のA鎖 (MicA) 又はMHCクラスI関連のB鎖 (MicB) のタンパク質である。理論に拘束されることなく、がん細胞に導入した場合、ベクターはNKG2D活性化リガンドの発現を引き起こし、それにより、がん細胞のエフェクター細胞媒介性の死が促進されると考えられる。

【0020】

幾つかの実施形態においては、本明細書に記載されたウイルスベクターは、NKG2Dリガンドをコードする第一の外来遺伝子及び腫瘍溶解性因子をコードする第二の外来遺伝子を含む。本明細書で用いられる場合、用語「腫瘍溶解性因子」は、本明細書に記載されたベクターの腫瘍溶解能力を促進する、任意のタンパク質又は核酸を指す。NKG2Dリガンド単独で腫瘍細胞を溶解するために、エフェクター細胞を動員/活性化し得る一方で、追加的な腫瘍溶解性因子の発現によって本明細書に記載されたベクターの治療効果を増加し得る。例示的な腫瘍溶解性因子としては、例えばメタロプロテイナーゼ (例えば、限定されない例として、マトリクス・メタロプロテアーゼ (MMP)-9 (MMP9)、プロドラッグ変換酵素、シトシンデアミナーゼ、チミジンキナーゼ又はプリンヌクレオシドホスホリラーゼ) 等のプロテアーゼが挙げられる。表1は、腫瘍溶解性因子として本発明のベクター中に包含するのに好適である、好適な細胞外マトリクス (ECM) 酵素 (MMP、ADAMTS及びヒアルロニダーゼ) 並びにそれらの標的を表す。

【0021】

ベクターはまた、宿主細胞によって腫瘍溶解性因子の発現を起こし得る。医薬組成物に製剤化し、患者に投与する場合、該ベクターは、がんを治療するために使用し得る。該がんは、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (IDH) 変異 (IDH^{Mut}) を有するものを含む、神経膠芽細胞腫であり得る。例示的な神経膠芽細胞腫は多形膠芽細胞腫 (GBM) である。

【0022】

本開示の目的のために、単純ヘルペスウイルス (HSV) ベクターは、IDH^{Mut} 神経膠芽細胞腫を含む神経膠芽細胞腫を治療する用途と共に例示される。それにもかかわらず、他の細胞標的及び他のウイルスベクターは、当該分野において周知であるように、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルスベクターを含み、NKG2Dリガンドを発現することが期待される。そのようなベクターは、当業者に公知な方法を使用して構築し得る。

【0023】

以下で検討するように、野生型IDH (WT、IDH^{WT}) 神経膠腫と比較して、IDH^{Mut} (イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (IDH) 変異を有する) 神経膠腫においては、ULBP1及びULBP3が有意に下方制御されていることが見出された。従って、がん細胞中での、ウイルスベクターを介したULBP1及びULBP3の一方又は両方の発現は有利であり得る。様々な実施形態においては、WT ULBP配列由来の幾つかの変異は許容可能であり得る (即ち、NK細胞に対する感作をまだ生成する)。例えば、ULBPタンパク質は、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5又はULBP6のいずれかの成熟ULBPタンパク質と70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100%の配列一致性を有し得る。

配列一致性は、例えば、手動でのアライメント又はNeedleman-Wunsch法を使用して決定し得る。ベクターをコードする核酸はまた、遺伝子コードの縮重 (degeneracy) のために、ベクターの機能を保持する配列中の変異を含むことが期待される。

【 0 0 2 4 】

ベクターは、がん細胞及び非がん性細胞の両方にインフェクトする場合があるので、幾つかの実施形態においては、1つ以上の外来遺伝子 (例、NKG2D活性化リガンド及び/又はECMプロテアーゼ)の発現は、細胞性生体分子 (例、小分子、巨大分子又は複合体)によって調節される。ある実施形態においては、細胞性生体分子は、ウイルスベクター内に含まれる、例えばNKG2D lig又はECMプロテアーゼ等の1つ以上の外来遺伝子の発現を制御する。本明細書で用いられる場合、細胞性生体分子は、ベクター内に含まれる1つ以上の核酸配列に結合することができる、細胞によって内在的に発現される分子であり、それによりベクターによってコードされた1つ以上の遺伝子の発現を制御することができる。細胞性生体分子は、小分子 (例、ホルモン)、タンパク質、核酸、又は巨大分子であっても良い。ある実施形態においては、細胞性生体分子は、ウイルスベクター内に含まれる、例えばNKG2D lig又はECMプロテアーゼ等の1つ以上の外来遺伝子の発現を制御する。幾つかの実施形態においては、細胞性生体分子は、例えばmiR122、miR124、miR128、miR137及び/又はmiR199等のマイクロRNA (miRNA又はmiR)である。

10

【 0 0 2 5 】

細胞性生体分子は、ベクターによってコードされる1つ以上の遺伝子の発現を負に制御する場合がある (例、細胞性生体分子の発現が、1つ以上の遺伝子の発現を低下させる)。例えば、幾つかの実施形態においては、ウイルスベクター内に含まれる1つ以上の遺伝子 (例、外来遺伝子及び/又は必須遺伝子)の発現は、がん性細胞と比較して非がん性細胞中において、より高い濃度で存在する細胞性生体分子によって調節される。そのような実施形態においては、非がん性細胞中において細胞性生体分子の発現の増加は、非がん性細胞中における外来遺伝子及び/又は必須遺伝子の発現を低下し得る一方で、がん性細胞中における外来遺伝子及び/又は必須遺伝子の発現を許容する。そのような実施形態においては、細胞性生体分子の差別的な発現は、非がん性細胞に対する細胞傷害性 (例、NK細胞媒介性細胞傷害)を低下させる。

20

【 0 0 2 6 】

細胞性生体分子は、がん細胞中よりも非がん性細胞中において、より高濃度に生じる分子であり得る。生体分子の負の調節下で遺伝子を置換することによって、NKG2D活性化リガンドは、ベクターによってインフェクトし得る非がん性細胞に比較して、がん細胞中で選択的に発現する。理論に拘束されることなく、このことによって、非がん性細胞に対する細胞傷害性を低下し得、それにより安全性が増すか、又は効能を付与するために用量を増加する (即ち、治療濃度域を増加する) ことができる。相対的なNK動員は、本明細書の図を使用して記載されたアッセイ、及びそうでなければ当業者に公知であるアッセイに従って測定され得る。生体分子は、NKG2D活性化リガンド遺伝子に作動可能に連結されたプロモーター、NKG2D活性化リガンドに干渉するRNAの翻訳を調節する制御エレメント、NKG2D活性化リガンドmRNAの分解を誘発するエレメント、又は当該分野において公知であるその他の制御スキームを介して作用し得る。代替的又は追加的には、対応するポジティブな制御スキームは、非がん性細胞と比較して、がん細胞中においてより高い濃度で生じる細胞性生体分子について使用し得る。相対的なNK動員は、本明細書の図を使用して説明されるアッセイ、及びそうでなければ当業者に公知であるアッセイに従って測定され得る。

30

40

【 0 0 2 7 】

幾つかの実施形態においては、細胞性生体分子は、1つ以上の遺伝子の発現を正に制御する (例、細胞性生体分子の存在によって、1つ以上の遺伝子の発現が増加する)。例えば、幾つかの実施形態においては、ウイルスベクターに含まれる1つ以上の遺伝子 (例、外来遺伝子及び/又は必須遺伝子)の発現は、非がん性細胞と比較してがん性細胞中においてより高濃度で存在している細胞性生体分子によって調節される。そのような実施形態

50

においては、がん性細胞中における細胞性生体分子の増加した発現は、がん性細胞中における外来遺伝子及び／又は必須遺伝子の発現を増加する場合がある一方で、非がん性細胞中における外来遺伝子及び／又は必須遺伝子の発現を抑制する。そのような実施形態においては、細胞性生体分子の差次的な発現によって、非がん性細胞に対する細胞傷害性（例、NK細胞媒介性細胞傷害）が低減する。該生体分子は、NKG2D活性化リガンドmRNAの分解、又は当該分野において公知である他の制御スキームを誘導するエレメントである、NKG2D活性化リガンド干渉RNAの翻訳を調節する制御エレメントのNKG2D活性化リガンド遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターを介して作用し得る。

【 0 0 2 8 】

幾つかの実施形態においては、細胞性生体分子はマイクロRNA (miRNA又はmiR)であり、miRNA調節ポリヌクレオチドはベクター中に含まれる。miRNA調節ポリヌクレオチドは、1つ以上のmiRNA標的配列、又はmiRNAの逆相補体を含む応答エレメント (RE)を含む。幾つかの実施形態においては、miRNAは、mir122、mir124、mir128、mir137又はmir199であり得る。複数の調節ポリヌクレオチド (例、miRNA標的配列)は、1超のmiRNAを認識するためにも使用し得るウイルスベクター内に含まれる1つ以上の遺伝子中に含まれ得る。例えば、以下に例示される通り、miRNAはmir124であり得、がん細胞は神経膠芽細胞腫細胞であり得る。mir124は、少なくとも幾つかの神経膠芽細胞腫細胞中におけるよりも、通常の (例、非がん性)細胞中において、より多い量で (即ち、非がん性細胞と比較して、10%超で、20%超で、30%超で、40%超で、50%超で、60%超で、70%超で、80%超で、90%超で、95%超で、99%超で又は100%超で) 発現されることが知られている。

【 0 0 2 9 】

幾つかの実施形態においては、miRNA調節ポリヌクレオチドは1つ以上のmiRNA標的配列を含み得る。例えば、miRNA調節ポリヌクレオチドは、1つ、2つ、4つ、5つ、6つ以上のmiRNA標的配列を含み得る。幾つかの実施形態においては、配列はタンデムで挿入され得、4ヌクレオチド以上のスペーサーによって隔てられ得る。そのような応答エレメント及び使用方法は、参照により本明細書に取り込まれる、国際PCT出願公開番号第2015/066042号において開示されている。

【 0 0 3 0 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1: 例示的な ECM 酵素

ECM 酵素	ECM 標的	他の標的
MMP1*	コラーゲン I、II、III、VII 及び X; ゼラチン; アグリカン; エンタクチン; テネイシン; パールカン	IGFBP-2、-3、-5; プロ IL-1b; CTGF; MMP-2、-9
MMP2***	ゼラチン; コラーゲン IV、V、VII、X 及び XI; フィブロネクチン; ラミニン; エラスチン; アグリカン	プロ TGF- β ; FGF 受容体 I; MCP-3; IGFBP-5; プロ IL-1b; ガレクチン 3; プラスミノゲン
MMP-3*	アグリカン; デコリン; ゼラチン; フィブロネクチン; ラミニン; コラーゲン III、IV、IX 及び X; テネイシン; パールカン	IGFBP-3; プロ IL-1b; HB-EGF; プロ TGF- β ; CTGF; E カドヘリン; プラスミノゲン; uPA; プロ MMP-1、-7、-8、-9、-1
MMP-7**	アグリカン; ゼラチン; フィブロネクチン; ラミニン; エラスチン; エンタクチン; コラーゲン IV; テネイシン; デコリン	b4 インテグリン; E カドヘリン; プロ TNF α ; CTGF; HB-EGF; RANKL; IGFBP-3; プラスミノゲン、MMP-1、-2、-9
MMP-8*	コラーゲン I、II 及び III; ゼラチン; アグリカン;	
MMP9***	ゼラチン; コラーゲン III、IV 及び V; アグリカン; エラスチン; エンタクチン; ビトロネクチン; コラーゲン I の N テロペプチド	プロ TGF- β ; IL-2 受容体 α ; キット L; IGFBP-3; プロ IL-1b; ICAM-1; ガレクチン 3; プラスミノゲン
MMP-10*	アグリカン; フィブロネクチン; ラミニン; コラーゲン III、IV 及び V	プロ MMP-1、-8、-10
MMP-11*	フィブロネクチン; ラミニン; アグリカン; ゼラチン	IGFBP-1

【 0 0 3 1 】

40

50

【表 1 - 2】

MMP-12*	エラスチン；アグリカン；フィブ ロネクチン；オステオネクチン； ラミニン；ニドゲン	プラスミノゲン
MMP-13*	コラーゲン I、II、III、IV、IX、 X 及び XIV；アグリカン；フィブ ロネクチン；テネイシン；SPARC／オ ステオネクチン；ラミニン；パー ールカン	CTGF；プロ TGF- β ；MCP-3
MMP14****	コラーゲン I、II 及び III；ゼラ チン；アグリカン；フィブロネク チン；ラミニン；フィブリン；	プロ MMP-2；プロ MMP-13； CD44；MCP-3；組織トランスグ ルタミナーゼ
MMP15****	フィブロネクチン；ラミニン；テ ネイシン；ニドゲン；アグリカ ン；パーールカン	プロ MMP-2；組織トランスグ ルタミナーゼ
MMP16****	コラーゲン III；フィブロネクチ ン；ゼラチン	プロ MMP-2；組織トランスグ ルタミナーゼ
MMP17****	ゼラチン；フィブリノーゲン	
MMP-21*	未知	
MMP24****	フィブリン、ゼラチン	プロ MMP-2
MMP25****	ゼラチン；コラーゲン IV；フィブ リン；フィブロネクチン；ラミニ ン	プロ MMP-2
MMP-26**	ゼラチン；コラーゲン IV；フィブ ロネクチン；フィブリノーゲン； ビトロネクチン	プロ MMP-9
MMP-27*	未知	
ADAMTS-1	アグリカン、バーシカン	

【 0 0 3 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

ADAMTS-2	プロコラーゲン I、II 及び III の N-プロペプチドのプロセッシング	
ADAMTS-3	プロコラーゲン II の N-プロペ プチドのプロセッシング	
ADAMTS-4	アグリカン、プレビカン、バーシ カン、フィブロネクチン、デコリ ン	
ADAMTS-5	アグリカン、バーシカン、プレビ カン	
ADAMTS-6	未知	
ADAMTS-7	軟骨オリゴマータンパク質	
ADAMTS-8	アグリカン	
ADAMTS-9	アグリカン	
ADAMTS-10	未知	
ADAMTS-12	未知	
ADAMTS-13	フォン・ヴィレブランド因子	
ADAMTS-14	プロコラーゲン I の N-プロペプチ ドのプロセッシング	
ADAMTS-15	アグリカン	
ADAMTS-16	アグリカン	
ADAMTS-17	未知	
ADAMTS-18	アグリカン	
ADAMTS-19	未知	

【 0 0 3 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

ADAMTS-20	アグリカン	
HYAL1	未知	
HYAL2	高分子量 HA (CD44 リガンド)	
HYAL3	未知	
HYAL4	未知	
HYAL5	未知	

10

*=塩基性ドメイン (プロドメイン・ソーン (thorn) 触媒ドメイン・ソーン (thorn) ヘモペキシン含有補助ドメイン)

**=最小ドメイン (プロドメイン・ソーン (thorn) 触媒ドメイン)

***=フィブロネクチンドメインのインサートを有する MMP

****=GPI 又は膜貫通ドメイン (TM)によってアンカーされた膜結合 MMP

【 0 0 3 4 】

20

PCT出願公開番号第2015/066042号は、それが選択的に神経膠芽細胞腫細胞を死滅させるように、複製遺伝子がmir124の調節下にある腫瘍溶解性HSV (oHSV)を開示しており、そのような戦略は、本発明の文脈においても同様に利用し得る。ベクターのトロピズムはまた、例えばPCT出願公開番号第2015/066042号において開示されたように、表面の細胞結合タンパク質を発現することによっても改変し得る。

【 0 0 3 5 】

NKG2D活性化リガンドをコードするポリヌクレオチドは、外来の発現カセットの部分であり得る。本明細書に記載されたベクターの幾つかの実施形態においては、外来の発現カセット (複数可) 内にコードされている配列は、例えば構成的プロモーター、又は誘導性若しくは組織特異的なプロモーター、当該分野において公知である多くの例等の任意の望ましい遺伝子制御配列を有する、作動可能な連結におけるものであり得る。例えば、一般的に利用される構成的プロモーターは、ヒトサイトメガロウイルス (hCMV)プロモーターであり、その他のプロモーター、例、CMV早期エンハンサー/チキンベータアクチン (CAG) プロモーター及びHSV即時早期プロモーター (例、ICP4プロモーター) 等も使用し得る。

30

【 0 0 3 6 】

本発明による好ましいベクターは、MMP9、ULPB1及び/又はULPB3、任意選択で、PD-L1に対する抗体の1つ又は両方 (one or both or) をコードする導入遺伝子を含むHSVベクターである。図12A及び12Bにおいて記載されるように、好ましくは、ULPB1、ULPB3 (又は他のULPB)は、例えばmiR124等のmiRNA配列の発現調節下にある。ULPB1 (配列番号1)及びULPB3 (配列番号2)の配列は、以下に記載されるmiR124調節エレメントをそれぞれ含む：

40

【 0 0 3 7 】

50

【表 2】

表 2. 例示的な ULBP 核酸配列

ULBP	核酸配列	配列番号
ULBP1	ATGTCTGCACTTCTGATCCTAGCTCTTGTGGAGCTGCAGTTGCTGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAA GATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGCTTGGCTGGTCCCGGCAGGATGGTGCACACACTGT CTTTGTATGACTTCAATCACTCCTAAGTCCAGACCTGAACCACAGTGGTGTGAAGTTCAGGCCCTGGTGGAT GAAAGGCCTTTTCTTCACTATGACTGTGTTAACCACAAGGCCAAAGCCTTGTCTCTGGGGAAGAAAGTCAAT GTCACAAAAOCTGGGAAGAACAACTGAAACACTAAGAGACGTGGTGGATTTCCTTAAAGGCCAACGCTTGAC ATTCAAGTGGAGAATTTAATACCCATTGAGCCCTCAOCCCTGCAGGCCAGGATGTCTTGTGAGCATGAAGCCAT GGACACGGCAGAGGATCTTGGCAGTTCCCTTCAATGGACAGAAGTTCCCTCTTTGACTCAAACAACAGAAAG TGGACAGCACCTTATCCTGGAGCCAGAAGATGACAGAGAAGTGGGAGAAGAACAGGGATGTGAOCCATGTCTTC CAGAAGATTTCACTGGGGGATTGTAAGAATGTGGCTTGAAGAATTTTGTGACTGGGAACAAATGCTGGATCCA ACAAACCACCTCTCTGGCCCCAGGCACAACCCAAAGGCCATGGCCACCACCTCAGTCCCTGGAGCCTT CTCATCATCTTCCCTGCTTCAATCTAGCTGGCAGATGAGAATTCGGCATTCACCGCGTGCCTTATAGTACCAGG GCATTCAOCCGGTGCCCTTAAGGATCCTGGCATTCAOCCGGTGCCCTTAATGACTGCGGCATTCAOCCGGTGCCCTTA agatcT	1
ULBP3	ATGTCTGCACTTCTGATCCTAGCTCTTGTGGAGCTGCAGTTGCTGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAA GATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGCTTTTCGACTGGTCCGGGACGGGGCGGGCCGACgCTCAC TCTCTCTGGTATAACTTCAOCCATCTTCAATTTGCCAGACATGGGCACAGTGGTGTGAGGTCCAGAGCCAGGTG GATCAGAAGAATTTCTCTOCTATGACTGTGGCAGTGACAAGGTCTTATCTATGGGTCACTAGAAGAGCAGCTG TATGCCACAGATGCCGGGGAACAACTGGAATGCTGAGAGAGGTGGGGCAGAGGCTCAGACTGGAACGGCT GACACTGAGCTGGAGgATTTCACACCCAGTGGACCCCTCAOCCCTGCAGGTCAAGATGTCTTGTGAGTGTGAAGCC GATGGATACATCCGTGGATCTTGGCAGTTCACTTCGATGGACGGAAGTTCCCTCTTTGACTCAAACAACAGA AAGTGGACAGTGGTTCACGCTGGAGCCAGGCGGATGAAGAGAGAAGTGGGAGAAGGATACCGGACGTGAOCCCTC TTCAAGATGGTCTCAATGAGAGACTGCAAGAGCTGGCTTAGGGACTTCCGTATGACACAGGAAGAAGAGCTGGAA CCCACAGCACCACCAOCCATGGCCCCAGGCTTAGCTCAACCCAAAGCCATAGCCACCACCTCAGTCCCTGGAGC TTCCCTCATCTCTGCTTCACTCTCCCTGGCATCTGAGAATTCGGCATTCACCGCGTGCCTTATAGTACCAGG GCATTCAOCCGGTGCCCTTAAGGATCCTGGCATTCAOCCGGTGCCCTTAATGACTGCGGCATTCAOCCGGTGCCCTTA	2

【0038】

本発明のベクターは、ウイルス学の当業者に公知である標準的な方法によって作製し得る。しかしながら、ゲノムの操作及び本明細書に記載されたベクターの作製を容易にするために、本発明はまた本発明のベクターをコードする核酸も提供する。任意選択で、該核酸は本発明のベクターをコードする細菌人工染色体 (BAC) であり、それによって細菌システムにおける、ベクターの操作が、特にそれが HSV である場合に、容易になる。

【0039】

本明細書に記載されたベクターは、in vivo又はin vitroであるかに関わらず、がん性細胞を標的とし、死滅させるために使用し得ることが認識されるべきである。幾つかの実施形態においては、本明細書に記載されたベクターは、がんを治療するために、ヒト腫瘍細胞に対するヒト患者の治療において、治療に利用される。しかしながら、該方法はまた、例えばコンパニオンアニマル (例、ネコ及びイヌ)、又は農業的な重要性がある動物 (例、ウシ、ヒツジ、ウマ等)、又は動物学的若しくは実験における重要性がある動物 (例、ラッ

ト、マウス等)等の他の哺乳動物においても利用され得る。幾つかの実施形態においては、本発明は、がんの治療を、それを必要とする哺乳動物対象において施す方法であって、予防有効量又は治療有効量の腫瘍溶解性ウイルス、ウイルスストック、又は本明細書に記載された組成物を、対象に投与することを含む、方法に関する。本明細書で用いられる場合、「対象」としては、本明細書において開示された組換えウイルスベクター、組成物及び方法を用いて治療し得る、疾患、障害又は状態の症状を呈している任意の動物が挙げられる。好適な対象(例、患者)としては、実験動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ又はモルモット等)、畜産動物(例えば、ウマ又はウシ等)、及び家畜又はペット(例えば、ネコ又はイヌ等)が挙げられる。非ヒト霊長類、及び好ましくは、ヒト患者が挙げられる。好適な対象が選択され得る。例えば、IDH^{Mut}神経膠芽細胞腫を患っているヒト患者が診断され得、NKG2D活性化リガンドを、任意選択で、mir124応答エレメントの調節下で、生成する発現カセットを含む、ベクターを含む、医薬組成物の投与(例、頭蓋内及び腫瘍内)のために選択され得る。従って、NK及び/又はT細胞ベースの免疫応答は、対象の免疫システムによって、神経膠芽細胞腫に対して開始し得る。

【0040】

一般的に、本明細書に記載されたベクターは、細胞が好適な数のウイルス(ベクター粒子)と直面することを保証するために、十分なウイルス(ベクター)が細胞集団に送達され得る場合に、最も有用である。従って、本発明は本明細書に記載されたベクターを含む、ストック、好ましくは、同種のストックを提供する。ウイルスストックの調製及び分析は、当該分野において周知である。例えば、ウイルスストックは、ベクターを用いて形質導入した細胞を含む、ローラーボトル中において操作され得る。次いで、該ウイルスストックは、連続ニコデント(nycodenze)勾配において精製し得、等分し得、必要になるまで保存し得る。ウイルスストックは、ウイルスの遺伝子型、並びにそれらを調製するために使用したプロトコール及び細胞株に大きく依存して、タイター中でかなり変動する。好ましくは、そのようなストックは、例えば、少なくとも約 10^6 pfu/mL、又は更により好ましくは、少なくとも約 10^7 pfu/mL、 10^8 pfu/mL、 10^9 pfu/mL、 10^{10} pfu/mL若しくは 10^{11} pfu/mL等の少なくとも約 10^5 プラーク形成単位(pfu)/mLのウイルスタイターを有する。そのようなタイターは、例えばベクターが標的とする受容体を発現する細胞を使用して、確立され得る。

【0041】

追加的に、本発明は、本発明のベクター、及び担体、好ましくは、生理学的に許容される担体を含む組成物を提供する。組成物の担体は、ベクターにとって好適な任意の担体であり得る。典型的には、担体は液体であるが、個体、又は液体及び個体の成分の組合せでもあり得る。望ましくは、担体は医薬的に許容される(例、生理学的に又は薬理的に許容される)担体(例、賦形剤又は希釈剤)である。医薬的に許容される担体は周知であり、容易に入手可能である。担体の選択は、少なくとも一部においては、該組成物を投与するために使用する特定のベクター及び特定の方法によって決定される。該組成物は、特に組成物及び/又はその最終用途の安定性を増強するために、任意の他の好適な構成要素を更に含み得る。従って、本発明の組成物の幅広い好適な製剤が存在する。以下の製剤及び方法は、単なる例示的なものであり、如何なるようにも限定されるものではない。

【0042】

非経口投与のために好適な製剤としては、抗酸化剤、緩衝剤、静菌薬及び意図されるレシピエントの血液と等張な製剤とする溶質を含み得る、水性及び非水性の等張な滅菌注射溶液、並びに懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤及び防腐剤を含み得る、水性及び非水性の滅菌懸濁液が挙げられる。該製剤は、例えばアンプル及びバイアル等の単一用量又は複数用量を封入した容器中で存在し得、注射用として使用する直前に、例えば、水といった滅菌した液体の賦形剤を添加することのみを必要とする凍結乾燥(凍結乾燥)状態で保存し得る。即時注射溶液及び懸濁液は、既に記載された種類の滅菌粉末、顆粒及び錠剤から調製し得る。

【0043】

10

20

30

40

50

本明細書に記載された組成物及びベクターは、それを必要とする対象に、適切な用量又は治療有効量で送達され得る。本明細書で用いられる場合、「適切な用量」及び「治療有効量」は、望まれる生理学的及び／又は生物学的な転帰を達成するために必要とされる、本明細書に記載された組成物又は組換えベクターの量を指す。ウイルス、ウイルスストック又は組成物の「治療有効量」は、例えば、疾患の状態、年齢、性別、及び個人の体重、並びに個人において望まれる応答を誘発するための幹細胞及び前駆細胞の能力等の要因により、変動する場合がある。治療有効量はまた、ウイルス又は形質導入された治療細胞の何らかの有毒又は有害な影響を、利益のある治療効果が上回る量でもある。用語「治療有効量」としては、対象（例、患者）を「治療する」ために有効である量が挙げられる。当業者は、治療有効量が、投与されるウイルスの種類、製剤の性質、投与経路、治療される疾患の性質及び／若しくは重篤度、並びに／又は対象の一般的な健康及び生活状態に基づいて変動することを理解する。幾つかの実施形態においては、適切な用量は、 $10^2 \sim 10^{11}$ pfu又は $10^4 \sim 10^{10}$ pfuの範囲である。本明細書で用いられる場合、用語「治療する」及び「治療」は、対象が疾患若しくは状態、又は疾患若しくは状態の症状において改善するように、本明細書に記載された通りに、治療有効量の組換えウイルス又はその組成物を対象に投与することを指す。改善は、疾患若しくは状態、又は疾患若しくは状態の症状の何らかの改善又は修復である。改善は、観察可能であるか若しくは測定可能な改善であり、又は対象の一般的な幸福感における改善であり得る。従って、当業者は、治療が疾患の状態を改善しても良いが、疾患が完全に治癒しなくても良いことを認識する。

10

【0044】

20

本発明の幾つかの態様は、がん性細胞を死滅させる方法であって、腫瘍溶解性ウイルスを前記がん性細胞にインフェクトし、細胞内で複製させるのに十分な条件下で、がん性細胞を、本明細書に記載された腫瘍溶解性ウイルス、又はその組成物に曝露することを含み、がん性細胞内での腫瘍溶解性ウイルスの複製が細胞死をもたらす、方法を包含する。好適な対象を選択し得る。例えば、IDH^{mut}神経膠芽細胞腫を患っているヒト患者を診断し得、NKG2D活性化リガンドを、任意選択で、mir124応答エレメントの調節下で、生成する発現カセットを含むベクターを含む、医薬組成物の投与（例、頭蓋内及び腫瘍内）のために選択し得る。従って、NK及び／又はT細胞ベースの免疫応答は、対象の免疫システムによって、神経膠芽細胞腫に対して開始し得る。

【0045】

30

「投与」は、本明細書では、腫瘍溶解性ウイルス、ウイルスストック若しくはその組成物を対象に導入すること、又は腫瘍溶解性ウイルス、ウイルスストック若しくはその組成物を細胞及び／若しくは組織と接触させることを指す。投与は、注射、灌注、吸入、食物摂取、電気浸透、血液透析、イオン導入、及び当該分野において公知であるその他の方法によって行い得る。投与経路は、治療される疾患の位置及び性質により、必然的に変動する。幾つかの実施形態においては、医薬組成物は、腫瘍に直接投与（腫瘍内送達）し得る；例、注射、カテーテル注入等による。代替的には、組成物は静脈内、動脈内、鼻腔内、リンパ内、腹腔内、頭蓋内、髄腔内、又は局所血管かん流を介して、送達し得る。従って、投与は局所又は全身であり得る。

【0046】

40

更に、組成物は、追加で治療的に又は生物学的に活性な剤を含み得る。例えば、特定の症状の治療において有用な治療因子が存在し得る。例えば、イブプロフェン又はステロイド等の、炎症を調節する因子が、in vivoでのベクターの投与と関連した腫脹及び炎症、並びに生理的苦痛を低減するための組成物の一部であり得る。ベクターそのものに対する何らかの免疫応答、又は障害と関連する何らかの免疫応答を低減するために、免疫系の抑制剤が該組成物や方法と共に投与され得る。代替的には、免疫増強剤が、疾患に対する、特に本発明のベクターが使用されるがん又は腫瘍に対する身体の自然防御を上方制御するために、組成物中に含まれ得る。遺伝子導入手順及びその他の障害と関連する感染のリスクを低減するために、抗生物質、即ち、殺菌剤及び防かび剤が存在し得る。

【0047】

50

以下の実施例は、本発明の様々な実施形態を記載する目的のためのものであり、本発明を如何なるようにも限定することを意図していない。本明細書に記載された方法に沿った本願実施例は例示的であり、本発明の範囲において限定的なものであることを意図しない。請求項の範囲によって定義される通り、発明の精神の範囲内に包含される、記載された実施形態に対する改変、修正及びその他の変更が、具体的に企図される。

【実施例】

【0048】

実施例1

本実施例は、本発明のベクターに関してなされた観察について記載する（図12A及び12Bに開示されている）。

IDHmut星状細胞及び原発性の神経膠腫株は、IDHwt星状細胞と比較して、NKG2DLの相対的な発現における低下を示す。

IDHmut細胞中において低下したNKG2Dレベルは、NK媒介性細胞傷害の低下と相関し、IDH変異を有する腫瘍におけるNK細胞抵抗性についての役割を示唆している。

IDHmut及びIDHwtにおける、ULBP3の過剰発現によって、これらの細胞がNK細胞媒介性細胞傷害に対して感受性になり、著しい増殖の阻止を起こすようである。

【0049】

実施例2

本実施例は、miR124によるULBP1及びULBP3枯渇に関する本発明のベクターに関してなされた観察について記載する。

miR124RE配列をULBP1及びULBP3の3'UTR領域にクローニングし、pENTRcagFlagULBP1及びpENTRcagFlagULBP3という名称のプラスミドを生成した。293T細胞を6ウェルプレートに播種した(5×10^5 / ウェル)。次の日、Lipo2000試薬を使用して、300ngのULBP1又はULBP3プラスミド(pENTRcagFlagULBP1及びpENTRcagFlagULBP3)、及び100pmolのmiR124を用いて、細胞を共トランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後、細胞を回収し、冷PBS中で2回洗浄し、氷上で20分間、RIPA 1×バッファ（1ウェル当たり100 μ l）中で溶解した。遠心分離によって細胞溶解液を清澄にし、SDS-Page、並びに抗Flag及び抗チューブリン抗体を使用したWBによって分析した。

結果（図10）は、miR124がULBP1及びULBP3の発現を阻害することを明らかにしており、それにより通常のニューロン中におけるタンパク質の発現をブロックするためにこのアプローチを使用し得ることが示唆される。

【0050】

実施例3

本実施例は、ULBP3がHSVベクター2A5Bの治療効果を改善することを実証する。

図20中に記載された通り、30匹のヌードマウスを2つのコホートに分けた実験が考案された。そのようなマウスは、T細胞を欠いているが、NK細胞及びマクロファージを有している。マウスからNK細胞を枯渇させるために、アシアロGM1 Abを用いて、1つのコホート（n=15）を4日毎に処理した（実験を通じて）；他のコホート（n=15）には、アイソタイプ対照を与えた。30匹の動物全ての右脇腹に、ルシフェラーゼを発現している 10^6 ヒト神経膠腫細胞GBM30を注射した。腫瘍が形成されると、各コホートを3群に分け、各群に以下の処置：(1)ULBP3（2A5B-ULBP3）を発現している腫瘍溶解性HSVベクター（ 2×10^6 pfu）を単一回注射、(2)アーム化していないHSVベクター（2A5B）（ 2×10^6 pfu）を単一回注射、又は(3)陰性対照としてPBSを注射、の1つを施した。

本実験の結果は、図21、22A及び22B、並びに以下の表3に記載されている。図21においては、左のパネルは、NK細胞活性がoHSV治療の利益を促進することを示す。2A5B、2A5B-ULBP3又はPBSで処理した、(A)NKが機能している（competent）マウス及び(B)NK欠損マウスにおける、脇腹のGBM30腫瘍の腫瘍増殖曲線。キャリパーを用いて垂直直径を測定することによって、腫瘍サイズを評価した。腫瘍の増殖における差異をANOVAによって決定した。

図22Aにおいてプロットされたデータは、NK細胞の非存在下、2A5BULBP3 腫瘍溶解

10

20

30

40

50

性HSVベクターが、バックボーン2A5Bベクター（対照）と比較した場合に、腫瘍の増殖を顕著に抑制する能力を示したことが、及びこの2A5Bでさえ、全く処理しなかった時よりも腫瘍の増殖の抑制における効能を示したことを明らかにしている。図22Bにおいてプロットされたデータは、NK細胞の存在下、2A5BULBP3腫瘍溶解性HSVを使用した場合に、5匹の動物のうち4匹で、腫瘍の増殖がより更に深く抑制される（測定可能な腫瘍サイズが全くない）ことを実証している。図22Aと同様に、未処置の（又は疑似処置した）動物と比較した場合に、バックボーン2A5Bベクターを用いて、腫瘍の増殖における幾らかの抑制が観察された。2A5B-ULBP3腫瘍溶解性HSVベクターを用いて処理したコホートの中で、5匹の動物のうち1匹で腫瘍の増殖が観察されたことを示している図22Bの単一のデータは、それが外れ値であることを示唆している。

10

簡潔には、結果は、2A5B-ULBP3腫瘍溶解性HSVベクターを用いて処理した5匹の動物のうち4匹が、僅か単一用量で完全な腫瘍の退縮を示したことを示す。これらの結果は、予期されなかったものであり、驚くべきものであった。更に、NK細胞のアブレーション（ablation）は、治療の治療プロファイルを低減した。しかしながら、NK細胞の非存在下であっても、ULBP3発現ベクターは有意な治療の利益を示した。

【 0 0 5 1 】

【表 3】

NK細胞が存在	日 1-13	日 17	日 20	日 25	日 30	日 33	日 37
PBS 対 2A5B	ns	ns	ns	****p<0.0001	****p<0.0001	****p<0.0001	****p<0.0001
PBS 対 2A5B-ULBP3	ns	ns	* p=0.033	****p<0.0001	****p<0.0001	****p<0.0001	****p<0.0001
2A5B 対 2A5B-ULBP3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NK枯渇(Ab処理)	日 1-13	日 17	日 20	日 25	日 30	日 33	日 37
PBS 対 2A5B	ns	ns	ns	*** p=0.0007	****p<0.0001	****p<0.0001	****p<0.0001
PBS 対 2A5B-ULBP3	ns	* p=0.015	** p=0.005	****p<0.0001	****p<0.0001	****p<0.0001	****p<0.0001
2A5B 対 2A5B-ULBP3	ns	ns	ns	ns	* p=0.024	ns p=0.073	ns p=0.063

20

【 0 0 5 2 】

本明細書中で引用された刊行物、特許出願及び特許を含む全ての参考文献は、各参考文献が個別にかつ具体的に参照により本明細書中に組み入れられることが示され、本明細書中にその全体が記載されている場合と同程度に、参照により本明細書に取り込まれる。

【 0 0 5 3 】

本発明を記載する文脈（特に、以下の特許請求の範囲の文脈）における用語「a」及び「an」及び「the」及び「少なくとも1つ」並びに同様の指示対象の使用は、本明細書中で別段の指示がない限り、又は文脈によって明確に矛盾しない限り、単数及び複数形の両方を含むものとして解釈されるべきである。1つ以上の項目の列記が続く、用語「少なくとも1つ」の使用（例えば、「A及びBの少なくとも1つ」）は、本明細書に別段の記載がない限り、又は文脈によって明確に矛盾しない限り、列記された項目（A又はB）から選択された1つの項目、又は列記された項目（A及びB）の2以上の任意の組合せを意味するものとして解釈されるべきである。「含む（comprising）」、「有する（having）」、「含む（including）」及び「含有する（containing）」という用語は、別段の記載がない限り、制限のない用語（open-ended terms）（即ち、「含むが、これに限定されない（including, but not limited to）」を意味する）として解釈されるべきである。本明細書中の値の範囲の列挙は、本明細書中に別段の指示がない限り、単に範囲内の各別個の値を個別に指す簡略方法として役立つことを意図しており、本明細書において個々の値はそれぞれ個別に列挙されているかのように、個々の値は明細書に取り込まれる。本明細書中に記載された全ての方法は、本明細書中で別段の指示がない限り、又は特に文脈によって明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施し得る。本明細書で提供される任意の及び全ての例、又は例示的な言語（例えば「例えば～等（such as）」）の使用は、単に本発明をよりよく説明することを意図しており、特段特許請求されない限り、本発明の範囲に限定を課すものではない。本明細書中のいかなる言葉も、本発明の実施に不可欠であるとして、特許請求されていない任意の要素を示すものと解釈されるべきではない。

30

40

【 0 0 5 4 】

50

本発明を実施するための発明者が知るベストモードを含む、本発明の好ましい実施形態は、本明細書に記載される。これらの好ましい実施形態の変形は、前述の記載を読むことで当業者に明らかになり得る。本発明者らは、当業者がこのような変形を適宜使用することを予測し、本発明者らは本発明が本明細書に具体的に記載されたものとは別の方法で実施されることを意図する。従って、本発明は適用法によって許容されるように、本明細書に添付した特許請求の範囲に記載された主題の全ての改変及び均等物を含む。更に、本明細書中で別段の指示がない限り、又は特に文脈によって明らかに矛盾しない限り、それらの全ての可能な変形における上記要素の任意の組合せが本発明に包含される。

【図面】

【図 1 - 1】

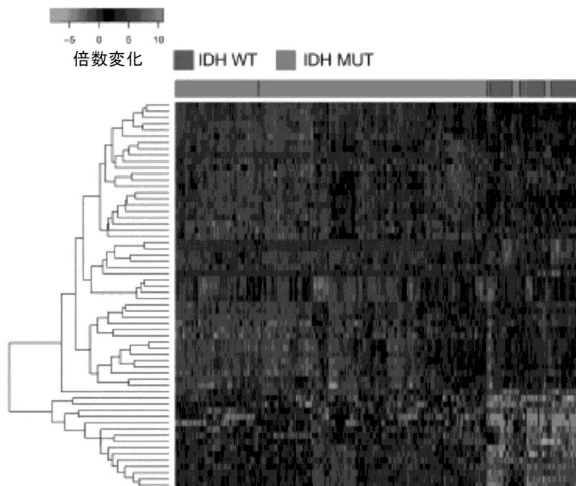


図 1 A

【図 1 - 2】

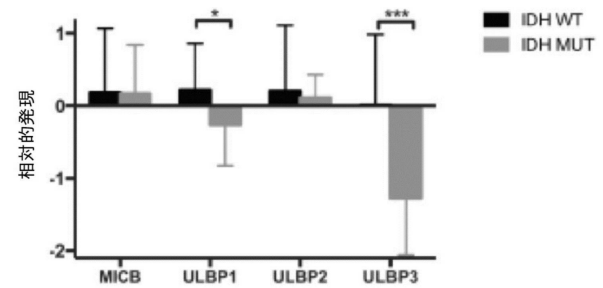


図1B

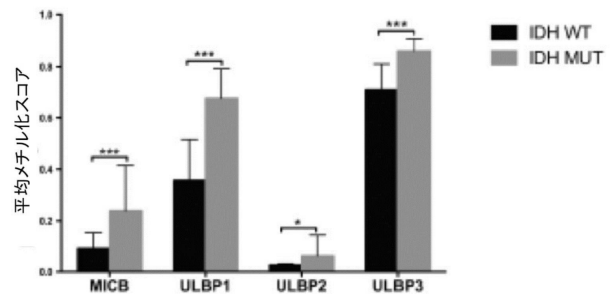


図1C

10

20

30

40

50

【 図 2 - 1 】

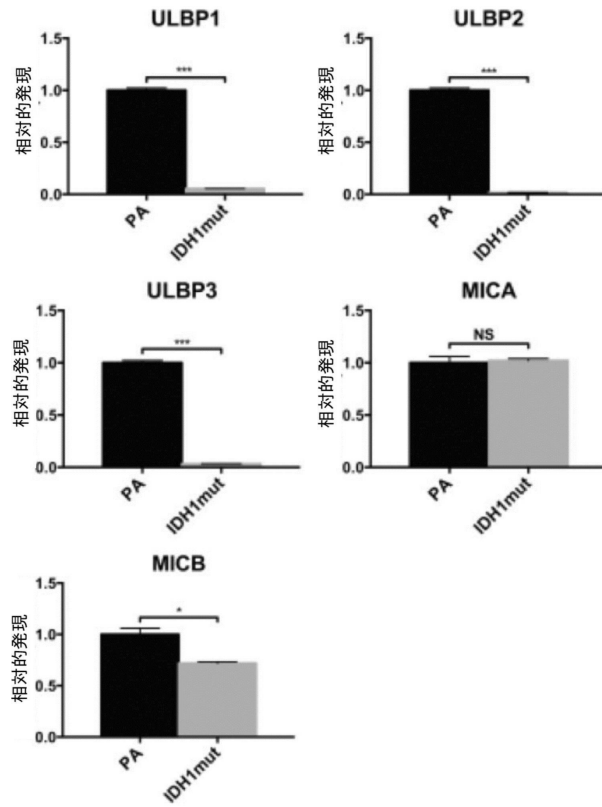


図2A

【 図 2 - 2 】

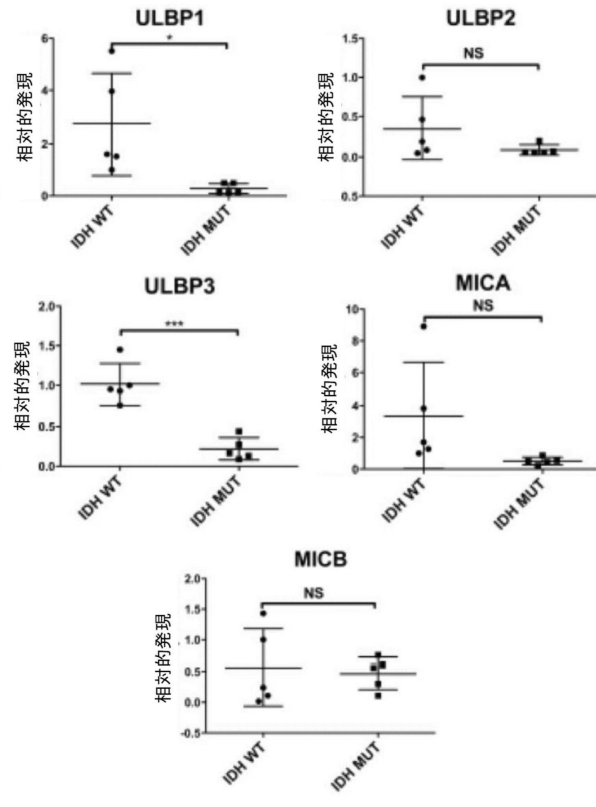
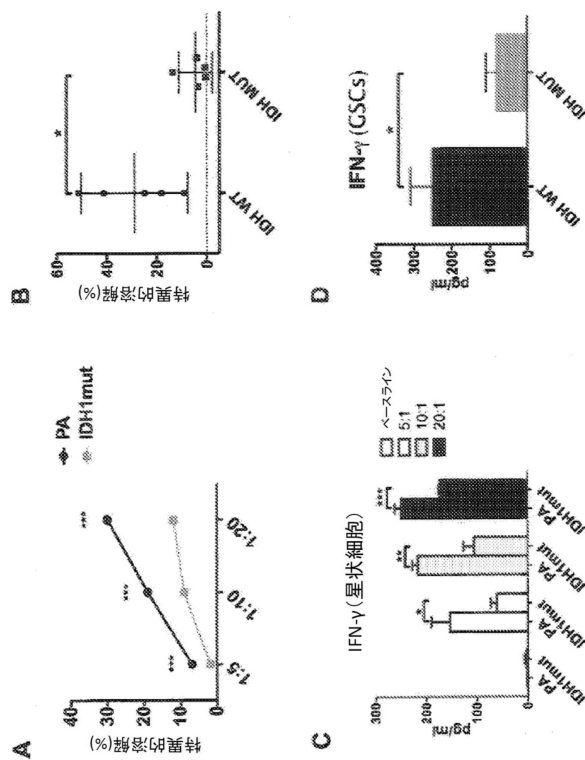
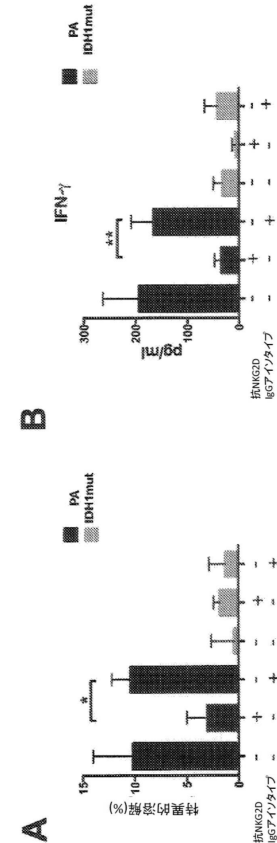


図2B

【 図 3 】



【 図 4 】



10

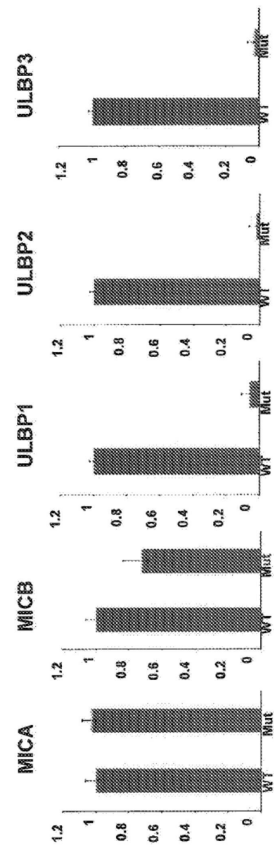
20

30

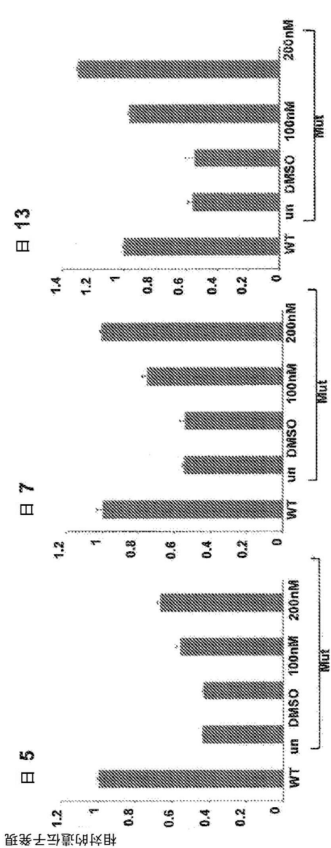
40

50

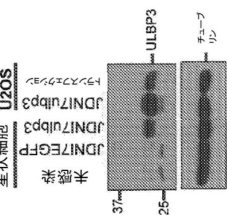
【図 5】



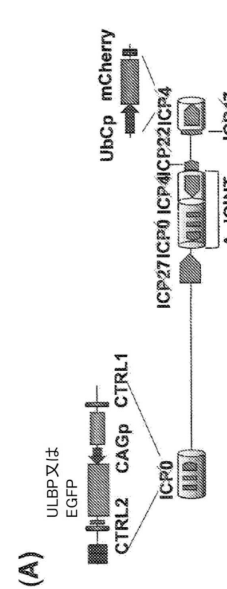
【図 6】



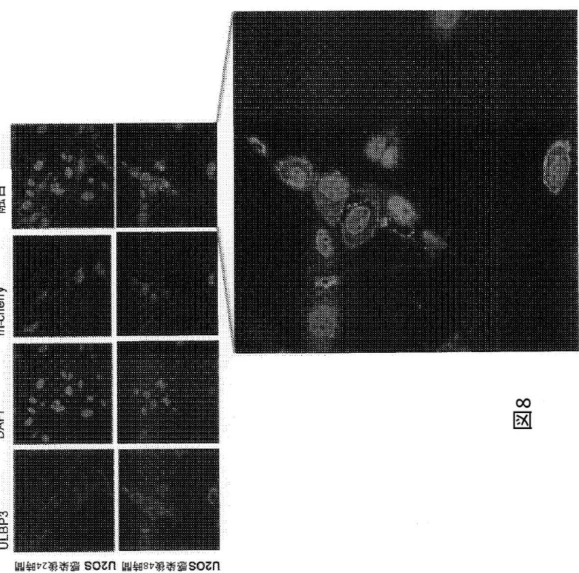
【図 7】



(B)



【図 8】



10

20

30

40

50

【図 9 - 1】

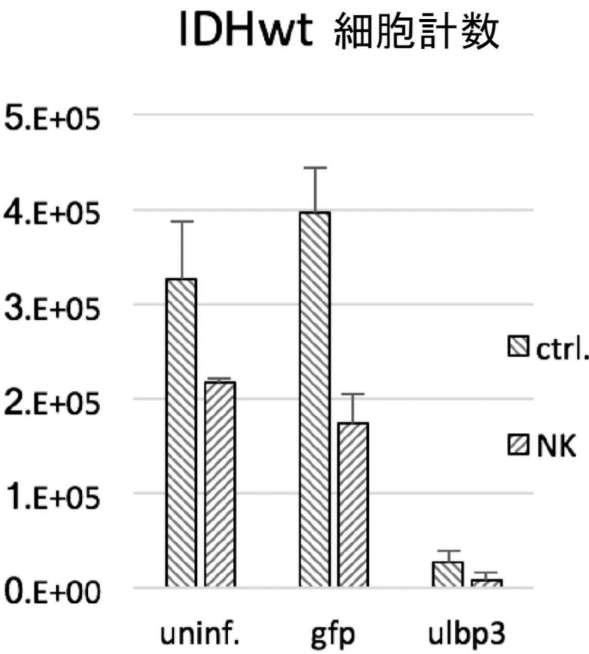


図9A

【図 9 - 2】

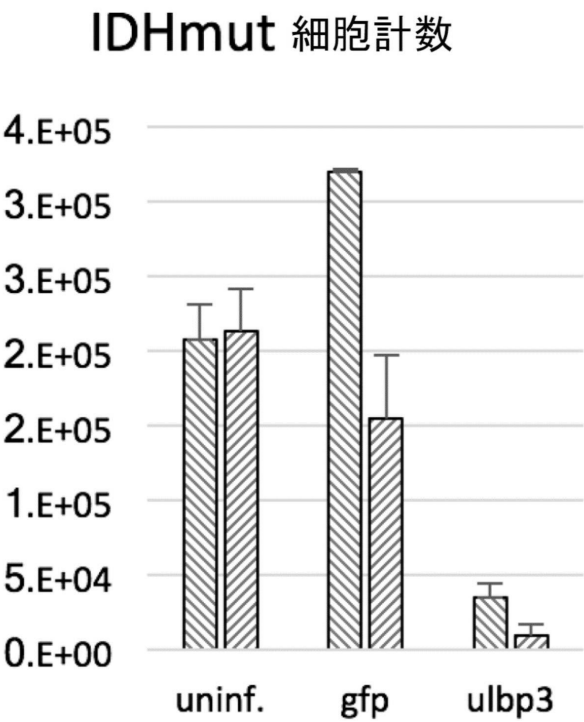


図9B

【図 9 - 3】

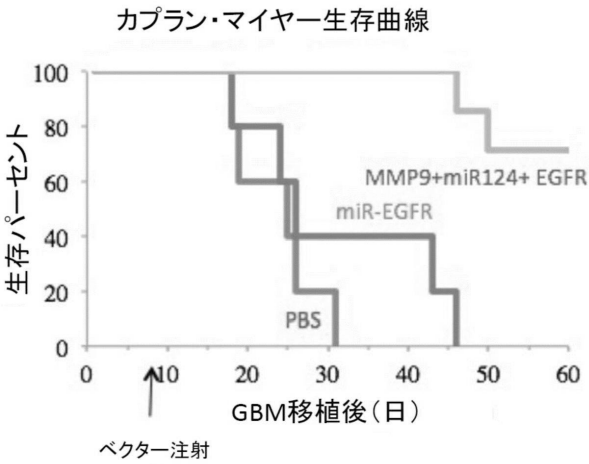
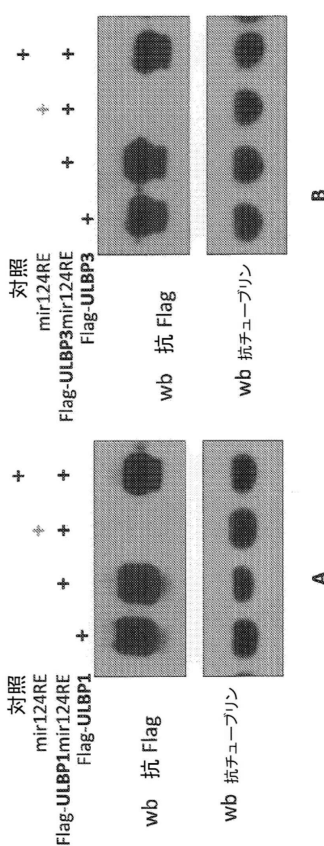


図9C

【図 10】



10

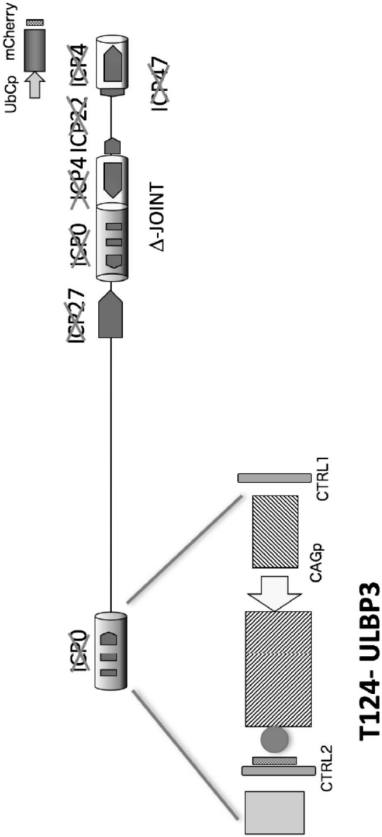
20

30

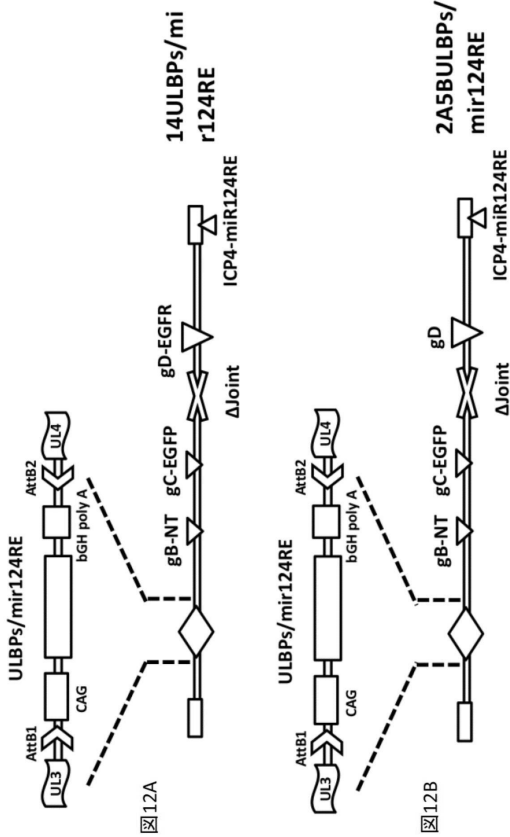
40

50

【図 1 1】



【図 1 2】



【図 1 3】

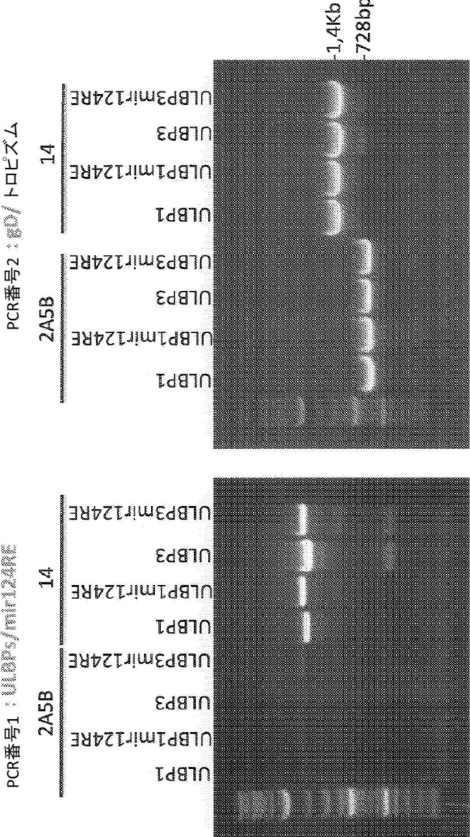
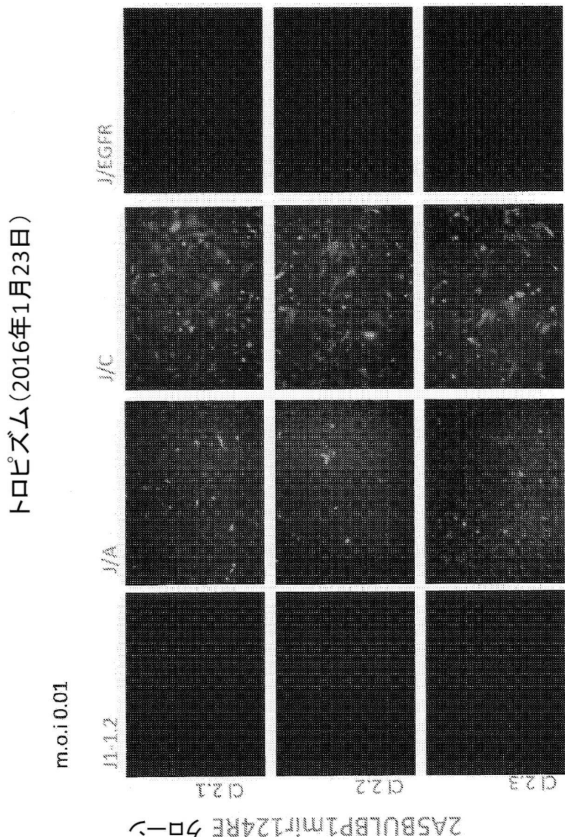


図13B

図13A

【図 1 4】



10

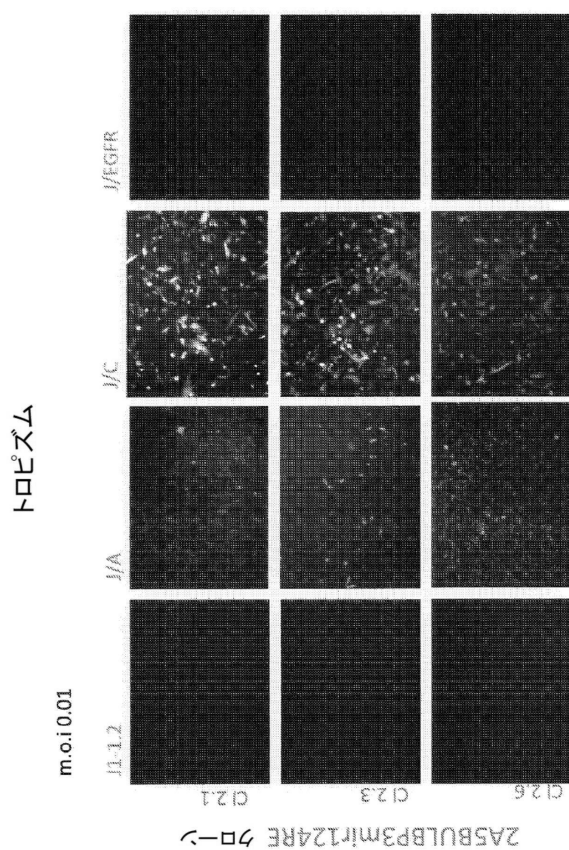
20

30

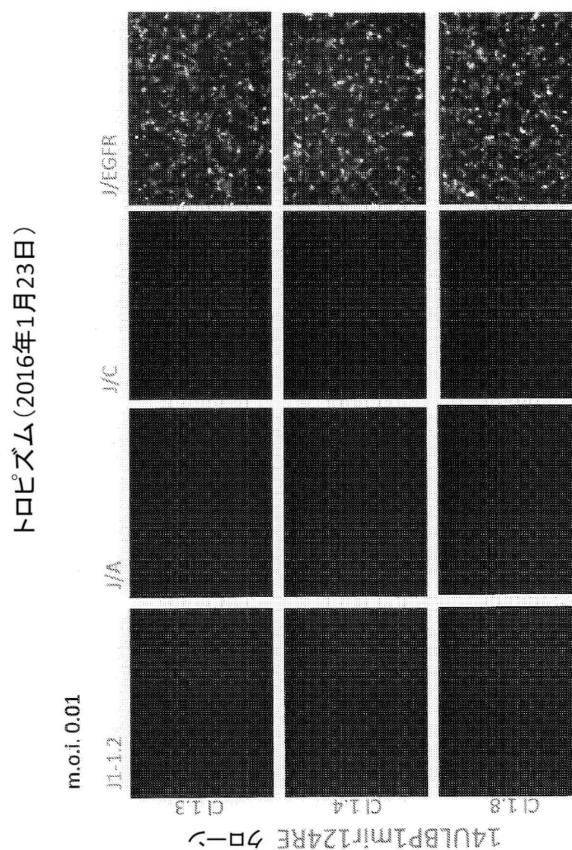
40

50

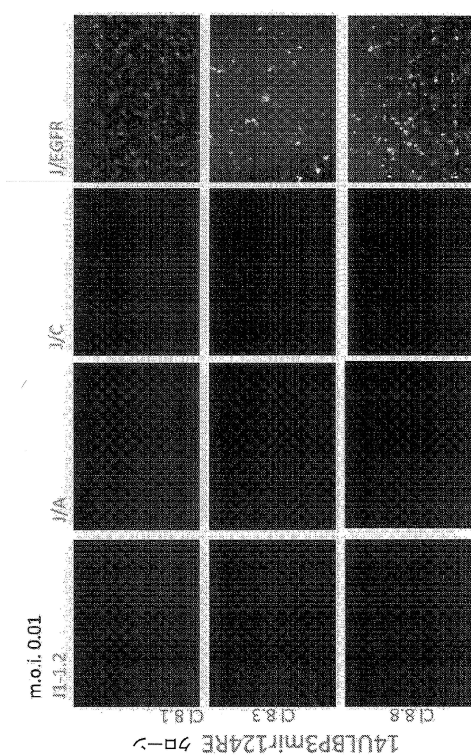
【 図 1 5 】



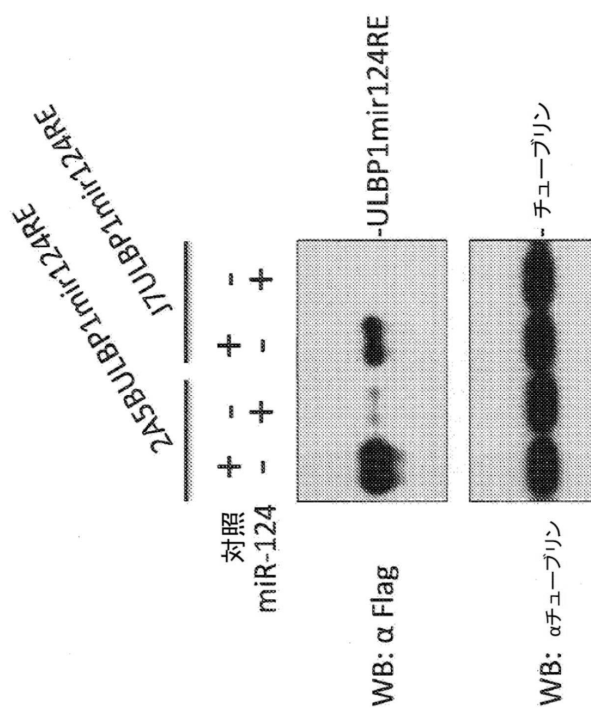
【 図 1 6 】



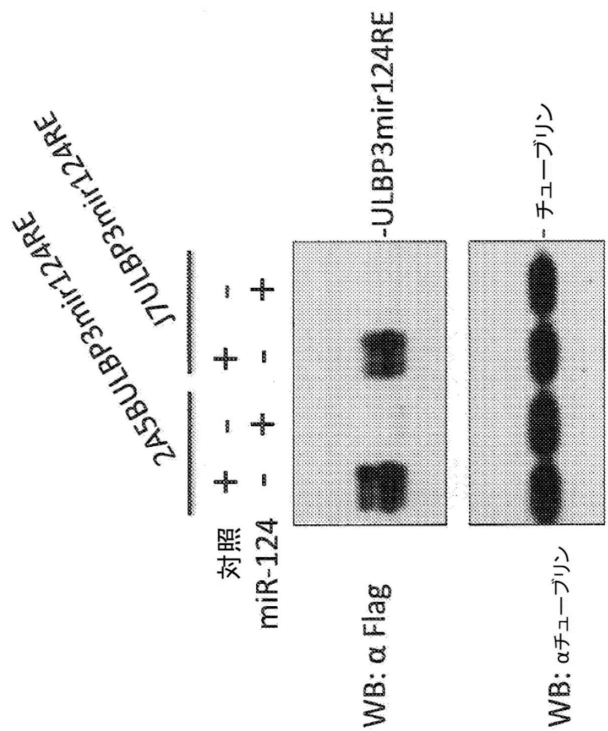
【圖 17】



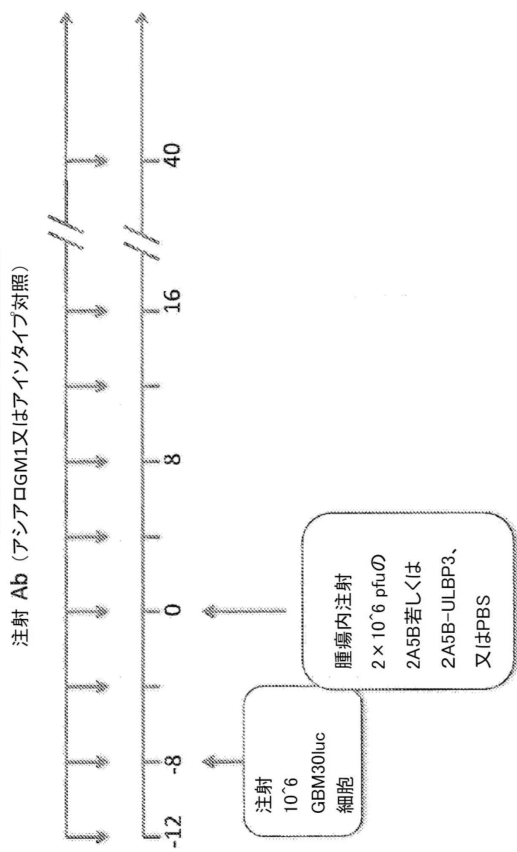
【圖 18】



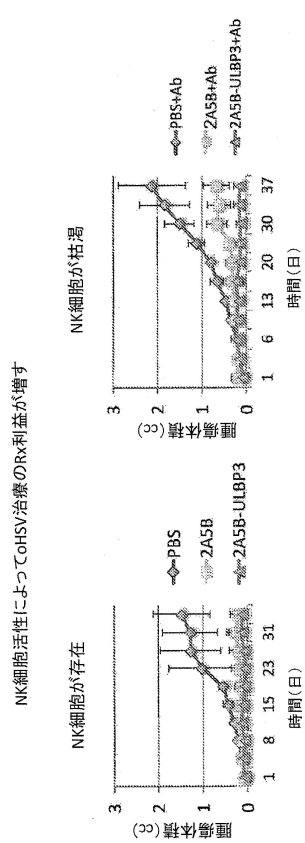
【図 19】



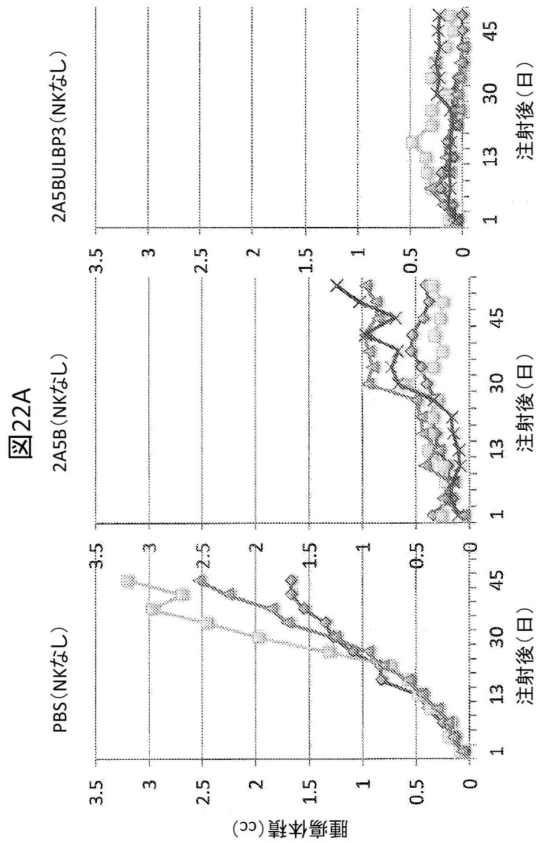
【図 20】



【図 21】



【図 22 - 1】



10

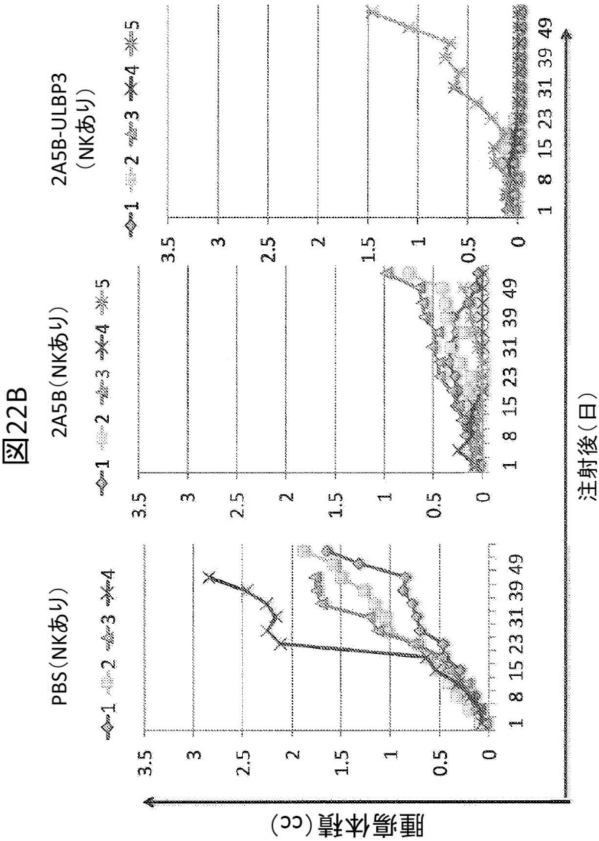
20

30

40

50

【図 22 - 2】



【配列表】

0007184337000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/57 (2006.01)	C 1 2 N	15/57	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	35/763 (2015.01)	A 6 1 K	35/763	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
C 1 2 N	15/861 (2006.01)	C 1 2 N	15/861	Z

(74)代理人 100080791
弁理士 高島 一

(74)代理人 100125070
弁理士 土井 京子

(74)代理人 100136629
弁理士 鎌田 光宣

(74)代理人 100121212
弁理士 田村 弥栄子

(74)代理人 100174296
弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729
弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301
弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 グランディ、パオラ
アメリカ合衆国、ペンシルヴァニア州 ピッツバーグ

(72)発明者 アマンカラー、ヌドカク ムグベキネア
アメリカ合衆国、ペンシルヴァニア州 ピッツバーグ

(72)発明者 グロリオッソ ザ サード、ジョセフ シー .
アメリカ合衆国、ペンシルヴァニア州 ピッツバーグ

審査官 原 大樹

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 5 6 8 0 8 (U S , A 1)
国際公開第 2 0 1 2 / 0 0 6 1 8 1 (W O , A 2)
SCIENCE , 2015年 , Vol.348, Issue6230 , p.136-139, Supplementary Material
World Journal of Experimental Medicine , 2016年05月 , Vol.6, Issue2

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N
C 0 7 K
A 6 1 K
MEDLINE / BIOSIS / EMBASE / CAPLUS (STN)
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)