

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6162818号
(P6162818)

(45) 発行日 平成29年7月12日(2017.7.12)

(24) 登録日 平成29年6月23日(2017.6.23)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/09	(2006.01)
C 12 N 7/00	(2006.01)
A 61 K 35/76	(2015.01)
A 61 P 35/00	(2006.01)
A 61 P 25/00	(2006.01)
	C 12 N 15/00
	C 12 N 7/00
	A 61 K 35/76
	A 61 P 35/00
	A 61 P 25/00
	Z N A A
	A 61 P
	25/00
	1 O 1

請求項の数 36 (全 51 頁)

(21) 出願番号	特願2015-546782 (P2015-546782)
(86) (22) 出願日	平成24年12月12日 (2012.12.12)
(65) 公表番号	特表2016-501528 (P2016-501528A)
(43) 公表日	平成28年1月21日 (2016.1.21)
(86) 国際出願番号	PCT/CA2012/050893
(87) 国際公開番号	W02014/089668
(87) 国際公開日	平成26年6月19日 (2014.6.19)
審査請求日	平成27年12月11日 (2015.12.11)

(73) 特許権者	512151573 チルドレンズ ホスピタル オブ イース タン オンタリオ リサーチ インスティ チュート インコーポレイテッド カナダ, ケ-1エイチ 8エル1, オ ンタリオ州, オタワ, スマイス ロード 5 O 1
(73) 特許権者	505357317 オタワ ホスピタル リサーチ インスティ チュート カナダ, ケ-1エイチ 8エル6, オ ンタリオ, オタワ, スマイス ロード 5 O 1
(74) 代理人	100107456 弁理士 池田 成人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】脳癌の治療のための組成物及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 を含む配列を有するタンパク質又は配列番号 1 の配列と少なくとも 90 % 同一である配列を有する変異型タンパク質、

配列番号 2 を含む配列を有するタンパク質又は配列番号 2 の配列と少なくとも 90 % 同一である配列を有する変異型タンパク質、

配列番号 3 を含む配列を有するタンパク質又は配列番号 3 の配列と少なくとも 90 % 同一である配列を有する変異型タンパク質、

配列番号 4 若しくは 5 を含む配列を有するタンパク質又は配列番号 4 若しくは 5 の配列と少なくとも 90 % 同一である配列を有する変異型タンパク質、及び

配列番号 6、7 若しくは 8 を含む配列を有するタンパク質

をコードするオープンンリーディングフレーム (ORF) を含むゲノムを有する単離されたウイルス粒子であって、

少なくとも 1 つの前記変異型タンパク質をコードする ORF を含むゲノムを有する単離されたウイルス粒子が、対応する変異型ではないタンパク質をコードする ORF を含むゲノムを有するウイルス粒子と少なくとも同様に細胞傷害性及び神経毒性である、
ウイルス粒子。

【請求項 2】

配列番号 1 に対する変異型タンパク質が、配列番号 1 の配列と少なくとも 95 % 同一である配列を有するタンパク質であり、

10

20

配列番号 2 に対する変異型タンパク質が、配列番号 2 の配列と少なくとも 95 % 同一である配列を有するタンパク質であり、

配列番号 3 に対する変異型タンパク質が、配列番号 3 の配列と少なくとも 95 % 同一である配列を有するタンパク質であり、

配列番号 4 に対する変異型タンパク質が、配列番号 4 の配列と少なくとも 95 % 同一である配列を有するタンパク質であり、

配列番号 5 に対する変異型タンパク質が、配列番号 5 の配列と少なくとも 95 % 同一である配列を有するタンパク質である、請求項 1 に記載の単離されたウイルス粒子。

【請求項 3】

前記ゲノムが、配列番号 6 を含む配列を有するタンパク質をコードするオーブンリーディングフレームを含む、請求項 1 に記載の単離されたウイルス粒子。 10

【請求項 4】

前記ゲノムが、配列番号 7 を含む配列を有するタンパク質をコードするオーブンリーディングフレームを含む、請求項 1 に記載の単離されたウイルス粒子。

【請求項 5】

前記ゲノムが、配列番号 8 を含む配列を有するタンパク質をコードするオーブンリーディングフレームを含む、請求項 1 に記載の単離されたウイルス粒子。

【請求項 6】

前記ゲノムが、
配列番号 1 を含む配列を有するタンパク質、
配列番号 2 を含む配列を有するタンパク質、
配列番号 3 を含む配列を有するタンパク質、
配列番号 5 を含む配列を有するタンパク質、及び
配列番号 7 を含む配列を有するタンパク質
をコードするオーブンリーディングフレームを含む、請求項 1 に記載の単離されたウイルス粒子。 20

【請求項 7】

配列番号 10 の 64 ~ 1332 位によって定義される配列の逆相補配列又は配列番号 10 の 64 ~ 1332 位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも 90 % 同一である変異型配列。 30

配列番号 10 の 1393 ~ 2190 位によって定義される配列の逆相補配列又は配列番号 10 の 1393 ~ 2190 位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも 90 % 同一である変異型配列、

配列番号 10 の 4943 ~ 11272 位によって定義される配列の逆相補配列又は配列番号 10 の 4943 ~ 11272 位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも 90 % 同一である変異型配列、

配列番号 10 の 2256 ~ 2945 位によって定義される配列の逆相補配列又は配列番号 10 の 2256 ~ 2945 位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも 90 % 同一である変異型配列、

配列番号 10 の 3041 ~ 4816 位によって定義される配列の逆相補配列、及び
それらのプロモータの逆相補配列
を含む配列を有する RNA ポリヌクレオチドを備える、単離されたウイルス粒子であって、

少なくとも 1 つの前記変異型配列を含む配列を有する RNA ポリヌクレオチドを含む単離されたウイルス粒子が、対応する変異型ではない配列を含む配列を有する RNA ポリヌクレオチドを含むウイルス粒子と少なくとも同様に細胞傷害性及び神経毒性である、
ウイルス粒子。

【請求項 8】

RNA ポリヌクレオチドが、
配列番号 10 の 64 ~ 1332 位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも 90 % 50

5 % 同一である変異型配列、

配列番号 10 の 1 3 9 3 ~ 2 1 9 0 位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも 9 5 % 同一である変異型配列、

配列番号 10 の 4 9 4 3 ~ 1 1 2 7 2 位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも 9 5 % 同一である変異型配列、及び / 又は

配列番号 10 の 2 2 5 6 ~ 2 9 4 5 位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも 9 5 % 同一である変異型配列

を含む配列を有する、請求項 7 に記載の単離されたウイルス粒子。

【請求項 9】

変異型配列が、1つ又は複数のサイレント置換を含む、請求項 8 に記載の単離されたウ 10
イルス粒子。

【請求項 10】

ウイルスが宿主細胞内にあるとき、配列番号 9 に係る配列を含む cDNA ポリヌクレオチドを産生することが可能な単離されたウイルス粒子。

【請求項 11】

配列番号 10 に係る配列を含む RNA ポリヌクレオチドを含む、単離されたウイルス粒子。

【請求項 12】

配列番号 12 の 6 4 ~ 1 3 3 2 位によって定義される配列の逆相補配列又は配列番号 1 20
の 6 4 ~ 1 3 3 2 位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも 9 0 % 同一である変異型配列、

配列番号 12 の 1 3 9 3 ~ 2 1 9 0 位によって定義される配列の逆相補配列又は配列番号 12 の 1 3 9 3 ~ 2 1 9 0 位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも 9 0 % 同一である変異型配列、

配列番号 12 の 4 6 6 4 ~ 1 0 9 9 3 位によって定義される配列の逆相補配列又は配列番号 12 の 4 6 6 4 ~ 1 0 9 9 3 位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも 9 0 % 同一である変異型配列、

配列番号 12 の 2 2 5 6 ~ 2 9 4 5 位によって定義される配列の逆相補配列又は配列番号 12 の 2 2 5 6 ~ 2 9 4 5 位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも 9 0 % 同一である変異型配列、

配列番号 12 の 3 0 4 1 ~ 4 5 3 7 位によって定義される配列の逆相補配列、及びそれらのプロモータの逆相補配列

を含む配列を有する RNA ポリヌクレオチドを備える、単離されたウイルス粒子であって、

少なくとも 1 つの前記変異型配列を含む配列を有する RNA ポリヌクレオチドを含む単離されたウイルス粒子が、対応する変異型ではない配列を含む配列を有する RNA ポリヌクレオチドを含むウイルス粒子と少なくとも同様に細胞傷害性及び神経毒性である、ウイルス粒子。

【請求項 13】

RNA ポリヌクレオチドが、

配列番号 12 の 6 4 ~ 1 3 3 2 位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも 9 5 % 同一である変異型配列、

配列番号 12 の 1 3 9 3 ~ 2 1 9 0 位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも 9 5 % 同一である変異型配列、

配列番号 12 の 4 6 6 4 ~ 1 0 9 9 3 位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも 9 5 % 同一である変異型配列、及び / 又は

配列番号 12 の 2 2 5 6 ~ 2 9 4 5 位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも 9 5 % 同一である変異型配列

を含む配列を有する、請求項 12 に記載の単離されたウイルス粒子。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

変異型配列が、1つ又は複数のサイレント置換を含む、請求項12に記載の単離されたウイルス粒子。

【請求項15】

ウイルスが宿主細胞内にあるとき、配列番号11に係る配列を含むcDNAポリヌクレオチドを产生することが可能な単離されたウイルス粒子。

【請求項16】

配列番号12に係る配列を含むRNAポリヌクレオチドを含む、単離されたウイルス粒子。

【請求項17】

配列番号14の64～1332位によって定義される配列の逆相補配列又は配列番号14の64～1332位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも90%同一である変異型配列、10

配列番号14の1393～2190位によって定義される配列の逆相補配列又は配列番号14の1393～2190位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも90%同一である変異型配列、

配列番号14の5195～11524位によって定義される配列の逆相補配列又は配列番号14の5195～11524位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも90%同一である変異型配列、

配列番号14の2256～2942位によって定義される配列の逆相補配列又は配列番号14の2256～2942位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも90%同一である変異型配列、20

配列番号14の3038～5068位によって定義される配列の逆相補配列、及びそれらのプロモータの逆相補配列

を含む配列を有するRNAポリヌクレオチドを備える、単離されたウイルス粒子であって

少なくとも1つの前記変異型配列を含む配列を有するRNAポリヌクレオチドを含む単離されたウイルス粒子が、対応する変異型ではない配列を含む配列を有するRNAポリヌクレオチドを含むウイルス粒子と少なくとも同様に細胞傷害性及び神経毒性である、ウイルス粒子。

【請求項18】

RNAポリヌクレオチドが、
配列番号14の64～1332位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも95%同一である変異型配列、

配列番号14の1393～2190位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも95%同一である変異型配列、

配列番号14の5195～11524位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも95%同一である変異型配列、及び/又は

配列番号14の2256～2942位によって定義される配列の逆相補配列と少なくとも95%同一である変異型配列

を含む配列を有する、請求項17に記載の単離されたウイルス粒子。40

【請求項19】

変異型配列が、1つ又は複数のサイレント置換を含む、請求項17に記載の単離されたウイルス粒子。

【請求項20】

ウイルスが宿主細胞内にあるとき、配列番号13に係る配列を含むcDNAポリヌクレオチドを产生することが可能な単離されたウイルス粒子。

【請求項21】

配列番号14に係る配列を含むRNAポリヌクレオチドを含む、単離されたウイルス粒子。

【請求項22】

10

20

30

40

50

癌の治療のための薬物の製造における、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の単離されたウイルス粒子の使用であって、癌が、好ましくは膠芽腫などの脳癌である使用。

【請求項 2 3】

前記薬物が、前記単離されたウイルス粒子に感染した細胞を含む、請求項 2 2 に記載の使用。

【請求項 2 4】

ウイルスが投与されたヒトにおいて細胞傷害反応を誘導するための薬物の製造における、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の単離されたウイルス粒子の使用。

【請求項 2 5】

前記細胞傷害反応が、抗癌反応である、請求項 2 4 に記載の使用。 10

【請求項 2 6】

前記薬物が、前記単離されたウイルス粒子に感染した細胞を含む、請求項 2 4 又は 2 5 に記載の使用。

【請求項 2 7】

前記薬物が、中枢神経系に、血液 / 脳関門の外部に、血液 / 脳関門の内部に、又はそれらの任意の組み合わせに直接送達するために製剤化されている、請求項 2 2 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 2 8】

前記薬物が、髄腔内注入、静脈内注入、頭蓋内注入、又はそれらの任意の組み合わせを介した投与のために製剤化されている、請求項 2 7 に記載の使用。 20

【請求項 2 9】

前記薬物が、中枢神経系に、血液 / 脳関門の外部に、血液 / 脳関門の内部に、又はそれらの任意の組み合わせに直接送達するために製剤化されている、請求項 2 3 又は 2 6 に記載の使用。

【請求項 3 0】

前記薬物が、髄腔内注入、静脈内注入、頭蓋内注入、又はそれらの任意の組み合わせを介した投与のために製剤化されている、請求項 2 9 に記載の使用。

【請求項 3 1】

患者における癌を治療するためのキットであって、
請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の単離されたウイルス粒子と、
前記単離されたウイルス粒子を前記患者に投与するための指示書と
を含む、キット。 30

【請求項 3 2】

前記癌が、膠芽腫などの脳癌である、請求項 3 1 に記載のキット。

【請求項 3 3】

前記単離されたウイルス粒子が、中枢神経系に、血液 / 脳関門の外部に、血液 / 脳関門の内部に、又はそれらの任意の組み合わせに直接送達するために製剤化されている、請求項 3 1 又は 3 2 に記載のキット。

【請求項 3 4】

前記単離されたウイルス粒子が、髄腔内注入、静脈内注入、頭蓋内注入、又はそれらの任意の組み合わせを介した同時的若しくは連続的な投与のために製剤化されている、請求項 3 3 に記載のキット。 40

【請求項 3 5】

前記単離されたウイルス粒子が、細胞に感染するように製剤化されており、前記細胞は中枢神経系に、血液 / 脳関門の外部に、血液 / 脳関門の内部に、又はそれらの任意の組み合わせに送達されるためのものである、請求項 3 1 又は 3 2 に記載のキット。

【請求項 3 6】

前記細胞が、髄腔内注入、静脈内注入、頭蓋内注入、又はそれらの任意の組み合わせを介した同時的若しくは連続的に投与されるためのものである、請求項 3 5 に記載のキット。 50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[0001]本開示は、ラブドウイルスキメラ、及び腫瘍溶解による治療としてのその使用に関する。より詳細には、本開示はマラバ (M a r a b a) ラブドウイルスキメラ、並びに原発性及び二次性脳癌の治療のためのその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

[0002]脳腫瘍は、脳内で無制限の増殖を示す細胞で構成される。それらは良性（つまり、非癌性）の場合もあるし、又は悪性（つまり、癌性）の場合もある。癌性脳腫瘍は、原発性腫瘍又は二次性腫瘍としてさらに分類される。 10

【0003】

[0003]原発性腫瘍は脳内で発生するが、二次性腫瘍は乳又は肺などの別の部位から脳へ広がったものである。二次性腫瘍は転移性と称されることもある。二次性（つまり、転移性）脳腫瘍は、癌細胞が、身体の別の部位の原発性癌から脳内に広がったときに生じる。二次性腫瘍は、脳で生じる原発性腫瘍よりも3倍よくみられる。転移性の脳腫瘍は全て悪性である。

【0004】

[0004]脳腫瘍は、一般的に、癌の元となる脳細胞の種類、又は癌が発生する部位に従つて呼称又は分類される。これらの腫瘍の生物学的多様性のために、分類は複雑である。悪性原発性脳腫瘍の約80%は、集約的に膠腫（つまり、膠細胞で発生する腫瘍）として知られており、悪性度を反映して4つの等級に分類される。 20

【0005】

[0005]脳癌は、35歳未満の患者における癌関連死の原因の第1位であり、北米で診断された全ての癌のおよそ10%を占める。脳腫瘍の治療は、脳腫瘍に120を超える様々な種類があり、低悪性度の星状細胞腫からグレード4の多形性膠芽腫（G B M）まで及ぶために、複雑である。

【0006】

[0006]悪性膠腫、例えばG B Mは、成人で最も高頻度の脳癌であるが、最も増殖が速く、最も悪性度の高い原発性脳腫瘍であることから、最も治療が困難である。積極的な単一様式及び複数様式の治療、例えば、手術、化学療法、放射線及び小分子阻害剤を行っても、生存率は過去30年にわたり変わらず、平均的な生存期間は診断から1年未満である。 30

【0007】

[0007]従来の治療が成功しなかった理由としては、複数の要因があり、例えば、G B Mの高い浸潤性/侵襲性、血液脳関門及び神経柔組織を介する薬物送達の限界、利用可能な治療に対する内在的な抵抗性を引き起こす遺伝子異質性、及び攻撃耐性クローニングの発生が挙げられる。従って、新たな治療の選択肢に対して切迫した必要性があることから、脳癌一般、特にG B Mに対する腫瘍溶解性ウイルス療法が再び注目されることとなった。

【0008】

[0008]水疱性口内炎ウイルス（V S V）は、広範囲の種類の腫瘍細胞に感染して殺傷する強力な腫瘍溶解性ラブドウイルスである（B r u n l a 、 M o l T h e r 1 8 : 1 4 4 0 - 1 4 4 9 、 2 0 1 0 ）。他のラブドウイルスと同様に、神経向性及び続いての神経毒性並びに非常に強いn A b 応答が難点である（D i a l l o l a 、 M e t h o d s M o l B i o l 7 9 7 : 1 2 7 - 1 4 0 、 2 0 1 1 ）。V S Vは神経学的腫瘍モデルにおいて全身送達による効果があることが知られているが（C a r y l a 、 J V i r o l 8 5 : 5 7 0 8 - 5 7 1 7 、 2 0 1 1 ；L u n l a 、 J N a t l C a n c e r I n s t 9 8 : 1 5 4 6 - 1 5 4 7 、 2 0 0 6 ；W o l l m a n n l a 、 J V i r o l 8 4 : 1 5 6 3 - 1 5 7 3 、 2 0 1 0 ）、V S Vの本來的な神経毒性により、臨床的薬物候補としての検討は進められていない（H o f f m a n n l a 、 J G e n V i r o l 9 1 : 2 7 8 2 - 2 7 9 3 、 2 0 1 0 ；S u r l a 、 V e t P a t h o l 4 0 : 5 1 2 - 5 2 50

0、2003)。

【0009】

[0009]マラバは、最近特徴づけられた腫瘍溶解性ラブドウイルスであり、VSVといくらかの配列類似性を有しており、VSVに対して類似でより強力な腫瘍溶解性スペクトルと同様の神経毒性プロファイルとを有している(Bruna, Mol Ther 18: 1440-1449, 2010)。ラブドウイルスのVSVとマラバは、前臨床試験を受けている最も有効なウイルスの一部である。しかしながら、脳癌のためのウイルス投与に望ましい経路が大脳内送達である一方で、VSVとマラバはいずれも本来の神経毒性のために、現在、大脳内経路による送達が可能となっていない。

【0010】

[0010]癌の治療、より詳細には脳癌の治療のために、従来の腫瘍溶解性ウイルス療法における少なくとも1つの欠点を除去又は軽減する腫瘍溶解性ウイルス療法を提供することが所望される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

[0011]本開示の目的は、従来の腫瘍溶解性ウイルス療法における少なくとも1つの欠点を除去又は軽減することである。いくつかの例において、腫瘍溶解性ウイルス療法は、神経毒性レベルの低下を示すことができる。

【課題を解決するための手段】

【0012】

[0012]本開示の一態様によれば、配列番号1を含む配列を有するタンパク質又はその変異型；配列番号2を含む配列を有するタンパク質又はその変異型；配列番号3を含む配列を有するタンパク質又はその変異型；配列番号4若しくは5を含む配列を有するタンパク質又はその変異型；及び配列番号6、7若しくは8を含む配列を有するタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含むゲノムを有する単離されたウイルス粒子が提供される。

【0013】

[0013]参照されたタンパク質の変異型は、参照されたタンパク質の配列と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%又は少なくとも95%同一である配列を有するタンパク質であってもよく、このような変異型のタンパク質は、参照されたタンパク質と同じ生物学的機能を維持している。

【0014】

[0014]ゲノムは、配列番号6を含む配列を有するタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含んでもよい。代替的にゲノムは配列番号7を含む配列を有するタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含んでもよい。代替的にゲノムは配列番号8を含む配列を有するタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含んでもよい。

【0015】

[0015]ウイルスゲノムは、配列番号1を含む配列を有するタンパク質；配列番号2を含む配列を有するタンパク質；配列番号3を含む配列を有するタンパク質；配列番号5を含む配列を有するタンパク質；及び配列番号7を含む配列を有するタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含んでもよい。

【0016】

[0016]本開示の別の態様によれば、配列番号10の64～1332位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号10の1393～2190位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号10の4943～11272位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号10の2256～2945位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号10の3041～4816位によって定義される配列の逆相補配列；及びそれらのプロモ

10

20

30

40

50

ータの逆相補配列を含む配列を有する R N A ポリヌクレオチドを備える単離されたウイルス粒子が提供される。

【 0 0 1 7 】

[0017] ヌクレオチド配列の保存的変異型は、参照されたヌクレオチド配列と少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90% 又は少なくとも 95% 同一の配列であってもよい。保存的変異型は、1つ又は複数のサイレント置換を含む配列であってもよい。

【 0 0 1 8 】

[0018] 単離されたウイルス粒子は、ウイルスが宿主細胞内にあるとき、配列番号 9 に係る配列を含む c D N A ポリヌクレオチドを產生することが可能な単離されたウイルス粒子であってもよい。 10

【 0 0 1 9 】

[0019] 単離されたウイルス粒子は、配列番号 10 に係る配列を含む R N A ポリヌクレオチドを含む単離されたウイルス粒子であってもよい。

【 0 0 2 0 】

[0020] 本開示のさらに別の態様によれば、配列番号 12 の 64 ~ 1332 位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号 12 の 1393 ~ 2190 位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号 12 の 4664 ~ 10993 位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号 12 の 2256 ~ 2945 位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号 12 の 3041 ~ 4537 位によって定義される配列の逆相補配列；及びそれらのプロモータの逆相補配列を含む配列を有する R N A ポリヌクレオチドを備える単離されたウイルス粒子が提供される。 20

【 0 0 2 1 】

[0021] ヌクレオチド配列の保存的変異型は、参照されたヌクレオチド配列と少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90% 又は少なくとも 95% 同一の配列であってもよい。保存的変異型は、1つ又は複数のサイレント置換を含む配列であってもよい。

【 0 0 2 2 】

[0022] 単離されたウイルス粒子は、ウイルスが宿主細胞内にあるとき、配列番号 11 に係る配列を含む c D N A ポリヌクレオチドを產生することが可能な単離されたウイルス粒子であってもよい。 30

【 0 0 2 3 】

[0023] 単離されたウイルス粒子は、配列番号 12 に係る配列を含む R N A ポリヌクレオチドを含む単離されたウイルス粒子であってもよい。

【 0 0 2 4 】

[0024] 本開示のさらに別の態様によれば、配列番号 14 の 64 ~ 1332 位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号 14 の 1393 ~ 2190 位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号 14 の 5195 ~ 11524 位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号 14 の 2256 ~ 2942 位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号 14 の 3038 ~ 5068 位によって定義される配列の逆相補配列；及びそれらのプロモータの逆相補配列を含む配列を有する R N A ポリヌクレオチドを備える単離されたウイルス粒子が提供される。 40

【 0 0 2 5 】

[0025] ヌクレオチド配列の保存的変異型は、参照されたヌクレオチド配列と少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90% 又は少なくとも 95% 同一の配列であってもよい。保存的変異型は、1つ又は複数のサイレント置換を含む配列であってもよい。

【 0 0 2 6 】

10

20

30

40

50

[0026] 単離されたウイルス粒子は、ウイルスが宿主細胞内にあるとき、配列番号13に係る配列を含むcDNAポリヌクレオチドを產生することが可能な単離されたウイルス粒子であってもよい。

【0027】

[0027] 単離されたウイルス粒子は、配列番号14に係る配列を含むRNAポリヌクレオチドを含む単離されたウイルス粒子であってもよい。

【0028】

[0028] 本開示のさらなる態様によれば、癌の治療のための、本開示による単離されたウイルス粒子の使用が提供される。癌は脳癌であってもよい。脳癌は膠芽腫であってもよい。

10

【0029】

[0029] 単離されたウイルス粒子は、細胞に感染させ、感染した細胞を使用して癌を治療するために、使用してもよい。

【0030】

[0030] 本開示のさらなる態様によれば、ウイルスが投与された患者において細胞傷害反応を誘導するための、本開示による単離されたウイルス粒子の使用が提供される。細胞傷害反応は、抗癌反応であってもよい。

【0031】

[0031] 単離されたウイルス粒子は、中枢神経系に、血液／脳関門の外部に、血液／脳関門の内部に、又はそれらの任意の組み合わせに直接送達されるために製剤化されていてもよい。単離されたウイルス粒子は、髄腔内注入、静脈内注入、頭蓋内注入、又はそれらの任意の組み合わせを介した連続的若しくは同時的な投与のために製剤化されていてもよい。

20

【0032】

[0032] 単離されたウイルス粒子は、細胞に感染させ、感染した細胞を使用して細胞傷害反応を引き起こすために使用してもよい。感染した細胞は、中枢神経系に、血液／脳関門の外部に、血液／脳関門の内部に、又はそれらの任意の組み合わせに直接送達されるために製剤化されていてもよい。感染した細胞は、髄腔内注入、静脈内注入、頭蓋内注入、又はそれらの任意の組み合わせを介した連続的若しくは同時的な投与のために製剤化されていてもよい。

30

【0033】

[0033] 本開示の別の態様によれば、癌を治療するための方法が提供される。方法は、本開示による単離されたウイルス粒子を、癌を有する患者に投与するステップを含む。癌は脳癌であってもよい。脳癌は膠芽腫であってもよい。

【0034】

[0034] 単離されたウイルス粒子は、患者に直接投与されてもよい。単離されたウイルス粒子は、中枢神経系に、血液／脳関門の外部に、血液／脳関門の内部に、又はそれらの任意の組み合わせに直接投与されてもよい。単離されたウイルス粒子は、髄腔内注入、静脈内注入、頭蓋内注入、又はそれらの任意の組み合わせを介して連続的若しくは同時的に患者に投与されてもよい。

40

【0035】

[0035] 方法は、単離されたウイルス粒子で細胞を感染させるステップ、及び感染した細胞を患者に投与するステップを含んでもよい。感染した細胞は、中枢神経系に、血液／脳関門の外部に、血液／脳関門の内部に、又はそれらの任意の組み合わせに直接投与されてもよい。感染した細胞は、髄腔内に、静脈内に、頭蓋内注入を介して、又はそれらの任意の組み合わせによって連続的若しくは同時的に患者に投与されてもよい。

【0036】

[0036] 本開示のさらに別の態様によれば、患者において細胞傷害反応を誘導するための方法が提供される。方法は、本開示による単離されたウイルス粒子を、患者に投与するステップを含む。

50

【0037】

[0037] 単離されたウイルス粒子は、患者に直接投与されてもよい。単離されたウイルス粒子は、中枢神経系に、血液／脳関門の外部に、血液／脳関門の内部に、又はそれらの任意の組み合わせに直接投与されてもよい。単離されたウイルス粒子は、髄腔内に、静脈内に、頭蓋内注入を介して、又はそれらの任意の組み合わせによって連続的若しくは同時的に患者に投与されてもよい。

【0038】

[0038] 方法は、単離されたウイルス粒子で細胞を感染させるステップ、及び感染した細胞を患者に投与するステップを含んでもよい。感染した細胞は、中枢神経系に、血液／脳関門の外部に、血液／脳関門の内部に、又はそれらの任意の組み合わせに直接投与されてもよい。感染した細胞は、髄腔内に、静脈内に、頭蓋内注入を介して、又はそれらの任意の組み合わせによって連続的若しくは同時的に患者に投与されてもよい。

10

【0039】

[0039] 本開示のさらに別の態様によれば、患者における癌を治療するためのキットが提供される。キットは、本開示による単離されたウイルス粒子と、単離されたウイルス粒子を患者に投与するための指示書とを含む。

【0040】

[0040] 癌は脳癌であってもよい。脳癌は膠芽腫であってもよい。

【0041】

[0041] 単離されたウイルス粒子は、中枢神経系に、血液／脳関門の外部に、血液／脳関門の内部に、又はそれらの任意の組み合わせに直接送達されるために製剤化されていてもよい。単離されたウイルス粒子は、髄腔内注入、静脈内注入、頭蓋内注入、又はそれらの任意の組み合わせを介した連続的若しくは同時的な投与のために製剤化されていてもよい。

20

【0042】

[0042] 単離されたウイルス粒子は、細胞に感染するように製剤化されていてもよく、感染された細胞は、中枢神経系に、血液／脳関門の外部に、血液／脳関門の内部に、又はそれらの任意の組み合わせに送達されるために製剤化されていてもよい。細胞は、髄腔内注入、静脈内注入、頭蓋内注入、又はそれらの任意の組み合わせを介して連続的若しくは同時的に投与されるものであってもよい。

30

【0043】

[0043] 本開示の他の態様及び特徴は、以下の本発明の具体的な例の記載を添付の図面と組み合わせて参照することで、当業者に明らかとなるであろう。

【0044】

[0044] 本開示の実施形態を、例示にすぎない方法で、添付された図面を参照しながら、以下に説明する。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】提示のウイルスの単回大脳内投与 (1e7 p.f.u) 後のBalb/Cマウスの生存に基づく非神経毒性ラブドウイルスの同定を図示するグラフである。動物を、体重減少、立毛、後脚麻痺、病的状態及び死亡率について観察した。

40

【図2A】MRBのGをBGG又はEBGと交換したGの模式図である。

【図2B】正常ヒト星状細胞(NHA)及びGM38皮膚線維芽細胞におけるウイルス減弱化を実証する生存性アッセイの結果を示すグラフである。エラーバーは、4つの生物学的複製物の平均標準誤差(SEM)を表す。

【図2C】正常ヒト星状細胞(NHA)及びGM38皮膚線維芽細胞におけるウイルス減弱化を実証する生存性アッセイの結果を示すグラフである。エラーバーは、4つの生物学的複製物の平均標準誤差(SEM)を表す。

【図2D】MRBGGがヒト脳癌細胞株において細胞溶解性であることを実証する生存性アッセイの結果を示すグラフである。生存性は、処理72時間後にアラマーブルーを使用

50

して評価した。エラーバーは、4つの生物学的複製物のSEMを表す。

【図2E】MRBGGがヒト脳癌細胞株において細胞溶解性であることを実証する生存性アッセイの結果を示すグラフである。生存性は、処理72時間後にアラマーブルーを使用して評価した。エラーバーは、4つの生物学的複製物のSEMを表す。

【図2F】MRBGGがヒト脳癌細胞株において細胞溶解性であることを実証する生存性アッセイの結果を示すグラフである。生存性は、処理72時間後にアラマーブルーを使用して評価した。エラーバーは、4つの生物学的複製物のSEMを表す。

【図2G】MRBGGがヒト脳癌細胞株において細胞溶解性であることを実証する生存性アッセイの結果を示すグラフである。生存性は、処理72時間後にアラマーブルーを使用して評価した。エラーバーは、4つの生物学的複製物のSEMを表す。

【図2H】MRBGGがヒト脳癌細胞株において細胞溶解性であることを実証する生存性アッセイの結果を示すグラフである。生存性は、処理72時間後にアラマーブルーを使用して評価した。エラーバーは、4つの生物学的複製物のSEMを表す。

【図2I】MRBGGがヒト脳癌細胞株において細胞溶解性であることを実証する生存性アッセイの結果を示すグラフである。生存性は、処理72時間後にアラマーブルーを使用して評価した。エラーバーは、4つの生物学的複製物のSEMを表す。

【図2J】MRBGGがヒト脳癌細胞株において細胞溶解性であることを実証する生存性アッセイの結果を示すグラフである。生存性は、処理72時間後にアラマーブルーを使用して評価した。エラーバーは、4つの生物学的複製物のSEMを表す。

【図2K】MRBGGがヒト脳癌細胞株において細胞溶解性であることを実証する生存性アッセイの結果を示すグラフである。生存性は、処理72時間後にアラマーブルーを使用して評価した。エラーバーは、4つの生物学的複製物のSEMを表す。

【図3A】野生型FMT、BG、MS、MRB並びにVSV及びMRBベクター骨格のいくつかの設計されたラブドウイルス株の大脳内毒性の概要図である。MRBGG及びマラバEbG 51は本開示によるウイルスである。

【図3B】大脳内接種後3か月で屠殺した動物の脳ホモジネートにおけるウイルス負荷の概要図である。検出限界は 10^1 である。

【図3C】病理学的写真を示す図である。FMT及びMRBGG急性感染Balb/Cマウスの病理学的写真は、食塩水を注入された動物の写真と区別がつかない。Balb/Cマウスに提示のウイルスを大脳内接種し($1e7$ pfu)、接種から48時間後で屠殺した。

【図3D】非神経毒性ラブドウイルスで処理したマウス及び対照マウスの運動機能を説明するグラフである。運動機能は、非神経毒性ラブドウイルスの大脳内接種後に機能低下していない。運動機能は、加速するロッドから落ちるまでのレイテンシを測定するロトロッド分析によって評価した。

【図3E】様々な用量でFMT又はMRBGGキメラのいずれかを単回IV注入した後の毒性プロファイルを図示するグラフである。最大耐用量(MTD)は、拳動と重量によって測定するときの永続的病的状態に帰着しない最高用量と等しい。

【図4A】PBSによる対照処理に対するMRBGG又はEbG IV処理(3用量、 $1e9$ pfu)後のU87MG腫瘍のIVIS画像である。これらのウイルスの全身送達により、ヒトU87MG異種移植モデルにおける有効性は増強する。

【図4B】MRBGG又はEbGの3回IV投与($1e9$ pfu)に応答する顕著な腫瘍退縮を実証する流動プロットを図示するグラフである。エラーバーはSEMを表す。

【図4C】MRBGG(ログランク検定P=0.01)及びEbG(ログランク検定P=0.01)IV処理動物のカプラン・マイヤー生存プロットである。

【図5】一群のヒト膠芽腫細胞上の様々なウイルスの腫瘍溶解活性を図示するグラフである。

【図6A】対照ウイルスに対する本開示によるマラバキメラウイルスのインビオ神経毒性を図示するグラフである。グラフは、提示のウイルスの大脳内単回投与($1e6$ pfu)後のBalb/Cマウスのカプラン・マイヤー生存プロットを示す。

10

20

30

40

50

【図6B】図6Aの動物の体重の変動を示すグラフである。

【図7A】対照ウイルスに対する本開示によるマラバキメラのインビボ有効性を図示するグラフである。グラフは、処理後のU87MG腫瘍を有するCD-1ヌードマウスのカブラン・マイヤー生存プロットを示す。

【図7B】図7Aの動物の体重の変動を示すグラフである。

【図8A】ヒトU87MG異種移植モデルにおけるPBS対照のインビボ有効性を説明するU87MG腫瘍のIVIS画像である。画像は、処理前及び処理後（1週、2週、3週、4週）の腫瘍を示す。

【図8B】未処理の対照動物における経時的な腫瘍負荷の著しい増加を図示する流動プロットである。

【図9A】ヒトU87MG異種移植モデルにおけるBG野生型（BG-WT）ウイルス処理のインビボ有効性を図示するU87MG腫瘍のIVIS画像である。画像はBG処理（1用量、1e7pfu：IC）の後（1週、2週、3週、4週）のU87MG腫瘍を示す。

【図9B】BGのIC投与（1e7pfu）に応答する初期の中程度の腫瘍退縮とその後の腫瘍負荷の再発を説明する流動プロットである。

【図10A】ヒトU87MG異種移植モデルにおけるFMT野生型（FMT-WT）ウイルス処理のインビボ有効性を図示するU87MG腫瘍のIVIS画像である。画像は、FMT-WT処理（1用量、1e7pfu：IC）の後（1週、2週、3週、4週）のU87MG腫瘍を示す。

【図10B】FMT-WTのIC投与（1e7pfu）に応答する顕著な腫瘍退縮を実証する流動プロットである。

【図11A】ヒトU87MG異種移植モデルにおけるMRB-BG（G）処理のインビボ有効性を図示するU87MG腫瘍のIVIS画像である。画像は、MRB-BG（G）処理（1用量、1e7pfu：IC）の後（1週、2週、3週、4週）のU87MG腫瘍を示す。

【図11B】MRB-BGGのIC投与（1e7pfu）に応答する中程度の腫瘍退縮を図示する流動プロットである。

【図12A】ヒトU87MG異種移植モデルにおけるMRB-FMT（G）処理のインビボ有効性を図示するU87MG腫瘍のIVIS画像である。画像は、MRB-FMT（G）処理（1用量、1e7pfu）の後（1週、2週、3週）のU87MG腫瘍を示す。

【図12B】MRB-FMT（G）のIC投与（1e7pfu）に応答する顕著な腫瘍退縮を実証する流動プロットである。但し、動物は全て処理から4週間経過する前にMRB-FMT（G）処理の神経毒性作用により死亡した。

【図13A】ヒトU87MG異種移植モデルにおけるFMT-MRB（G）処理のインビボ有効性を説明するU87MG腫瘍のIVIS画像である。画像は、FMT-MRB（G）処理（1用量、1e7pfu：IC）の後（1週、2週、3週）のU87MG腫瘍を示す。

【図13B】FMT-MRB（G）のIC投与（1e7pfu）に応答する顕著な腫瘍退縮を図示する流動プロットである。但し、動物は全て処理から4週間経過する前にFMT-MRB（G）の神経毒性作用により死亡した。

【図14A】ヒトU87MG異種移植モデルにおけるVSV-LCMV（G）処理のインビボ有効性を図示するU87MG腫瘍のIVIS画像である。画像は、VSV-LCMV（G）処理（1用量、1e7pfu：IC）の後（1週、2週、3週、4週）のU87MG腫瘍を示す。

【図14B】VS V-LCMV（G）のIC投与（1e7pfu）に応答する顕著な腫瘍退縮を図示する流動プロットである。

【図15A】ヒトU87MG異種移植モデルにおけるMRB-LCMV（G）処理のインビボ有効性を説明するU87MG腫瘍のIVIS画像である。画像は、MRB-LCMV（G）処理（1用量、1e7pfu：IC）の後（1週、2週、3週、4週）のU87MG腫瘍を示す。

10

20

30

40

50

腫瘍を示す。

【図15B】M R B - L C M V (G) の I C 投与 (1 e 7 p f u) に応答する顕著な腫瘍退縮を説明する流動プロットである。

【図16】野生型マラバウイルス、減弱化 V S V (V S V - 51) 、マラバ L C M V (G) キメラ、又は V S V - L C M V (G) キメラで処理した B a l b / C マウスにおける中和抗体力値を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0046】

[0079] 定義

[0080] 本開示を通して、以下の段落で定義するいくつかの用語を用いる。

10

【0047】

[0081] 用語「所望する」又は「所望の」は、本明細書で使用される場合、所定の状況下で所定の利点をもたらす技術の実施形態を指す。但し、他の実施形態が同じ又は他の状況下で望ましいことがあってもよい。さらに1つ又は複数の望ましい実施形態の記載は、他の実施形態が有用でないことを示唆するものではなく、技術範囲から他の実施形態を排除することを意図するものではない。

【0048】

[0082] 用語「含む (i n c l u d e) 」及びその変形は、本明細書で使用される場合、非制限的であることを意図し、列挙での事柄の記載は、本技術の材料、組成物、装置及び方法で有用でありうる他の同様の事柄を排除しないことを意図している。同様に、用語「できる (c a n) 」及び「でもよい (m a y) 」又はそれらの変形は、非制限的であることを意図し、例えば、実施形態が特定の要素又は特徴を含むことができる又は含んでもよいとの記載は、本技術の他の実施形態がそれらの要素又は特徴を有しないことを排除しないことを意図している。

20

【0049】

[0083] 開放形の用語「含む (c o m p r i s i n g) 」は、含む (i n c l u d e) 、含有する、又は有するなどの非制限的用語の同意語として、本発明の技術の実施形態を記載及び主張するために本明細書で使用されるが、代替的に実施形態を「から成る (c o n s i s t i n g o f) 」又は「から本質的に成る (c o n s i s t i n g e s s e n t i a l l y o f) 」などのより限定的な用語を使用して記載する場合もある。従って、材料、成分又はプロセスの工程を記載する任意の所与の実施形態について、本発明の技術は、本出願において追加の材料、成分又はプロセスに関する明確な言及がない場合であっても、記載された材料、成分、プロセスから成る又はから本質的に成り、追加の材料、成分又はプロセスを含まない実施形態 (~から成る場合) 、及び実施形態の重要な特性に影響を与えるさらなる材料、成分又はプロセスを含まない実施形態 (~から本質的に成る場合) も具体的に含む。例えば、要素 A 、 B 及び C を列挙する組成物又は方法が言及される場合、本明細書において要素 D を排除するとの明確な記載がない場合であっても、当該分野で記載される可能性のある要素 D を排除した、 A 、 B 及び C から成る、及び A 、 B 及び C から本質的に成る実施形態を具体的に想定する。

30

【0050】

[0084] 本明細書で参照するとき、全ての組成のパーセンテージは、別段の定めがない限り、全組成物の重量に対する値である。範囲の開示は、別段の定めがない限り、終点を含み、全ての個別の値及び全範囲をさらに分割した範囲も含む。従って、例えば、「 A ~ B 」又は「約 A ~ 約 B 」の範囲は、 A 及び B を含む。具体的なパラメータ (温度、分子量、重量パーセンテージなど) についての値の開示及び値の範囲は、本明細書で有用な他の値及び値の範囲を排除するものではない。所与のパラメータに対する 2 つ以上の例示された具体的な値は、パラメータに対して主張される可能性がある一連の値の範囲の終点を定義する場合があることも想定される。例えば、パラメータ X が本明細書において値 A を有すると例示され、また値 Z を有するとも例示されている場合には、パラメータ X は約 A ~ 約 Z の値の範囲を有する可能性があると想定される。同様に、パラメータについて 2 つ以上

40

50

の値の範囲（範囲は、入れ子関係であっても、重複していても、別個であってもよい）の開示は、開示された範囲の終点を使用して主張される可能性がある値の全ての可能な組み合わせの範囲を含むことが想定される。例えば、本明細書においてパラメータXが1～10、2～9又は3～8の範囲の値を有すると例示される場合、パラメータXは、1～9、1～8、1～3、1～2、2～10、2～8、2～3、3～10及び3～9を含む他の範囲の値を有する場合があることも想定される。

【0051】

[0085]「1つの(a)」及び「1つの(a n)」は、本明細書で使用される場合、「少なくとも1つの」事柄が存在しており、可能な場合には複数の事柄が存在していてよいことを示す。

10

【0052】

[0086]「約」は、値に適用されるとき、計算又は測定において値に多少の不正確さが許容される（その値の正確さにある程度迫っている；概ね又は合理的にその値に近接している；ほぼその値である）ことを示す。もし何らかの理由で「約」によってもたらされる不正確さが当該分野の通常の意味で理解されない場合、本明細書で使用される「約」は、少なくとも、このようなパラメータの測定又は使用における通常の方法から発生しうる変動を示す。

【0053】

[0087]用語「及び／又は」は、本明細書で使用される場合、関連する列挙された事柄の1つ又は複数の任意及び全ての組合せを含む。

20

【0054】

[0088]「低下したレベルの神経毒性」又は「低下した神経毒性」を有するウイルスは、本明細書で使用される場合、マウス脳の右の線条体に所定用量で注入されたとき、対応する野生型ウイルスを注入されたマウスより、神経毒性（例えば、体重減少、立毛、後脚麻痺、病的状態及び死）の徴候が少ないマウスを生じるウイルスを指すと理解されるものとする。

【0055】

[0089]「実質的なレベルの神経毒性のない」又は「実質的に神経毒性のない」ウイルスは、本明細書で使用される場合、患者に対する標準プロトコルを使用して有効量を投与したとき、ウイルス注入前の患者と比較して、検出可能な運動機能低下の徴候を示さない結果をもたらすウイルスを指すと理解されるものとする。例えば、「実質的に神経毒性のない」ウイルスは、1e7pfuでマウスに注入されたとき、ウイルス注入前のマウスと比較して、ロトロッド上の時間で測定される運動機能の低下の徴候が検出されないマウスを生じさせるウイルスを指すと理解されるものとする。

30

【0056】

[0090] 詳細な説明

[0091]本開示の著者は、現在識別されている250種を超えるラブドウイルスのうち、いくつかの野生型ラブドウイルスを試験し、CNS腫瘍細胞株の殺傷に有効な複数のウイルスを明らかにした。強力なウイルス単離株のいくつかが顕著な減弱化を実証し、大脳内接種後に100%生存をもたらすことも明らかにした。従前の試験で示されたマラバ及びVSVウイルスとは全く対照的なウイルスである。それに続いて本開示の著者は配列決定を行い、公知の非神経毒性野生型単離株と共に試験するためのキメラウイルスを設計した。

40

【0057】

[0092]一般的に、本開示は、設計されたキメラマラバラブドウイルス、並びにそれに関連するヌクレオチド及びタンパク質の配列に関連する、システム、方法、使用、プロセス、物品、及び組成物を提供する。例えば、本開示は、キメラマラバラブドウイルスの腫瘍溶解性治療、例えば原発性又は二次性脳癌の治療における使用を提供する。

【0058】

[0093]企図される腫瘍溶解性ウイルスは、患者にウイルスを直接投与して癌を治療する

50

ように使用してもよく、又はウイルスで細胞を感染させ、感染した細胞を患者に投与してウイルスを送達させることにより癌を治療するように使用してもよい。ウイルスによって感染される細胞は、患者由来の癌細胞、正常な免疫細胞、又は幹細胞であってもよい。いくつかの例において、治療される癌は、脳癌、例えば、悪性膠腫である。悪性膠腫の一例は、膠芽腫である。

【0059】

[0094]本開示によるウイルス粒子は、野生型プラスミドを含んでいなくてもよいし、野生型マラバGタンパク質をコードする配列を含んでいなくてもよいし、又はその両方を含んでいなくてもよい。

【0060】

[0095]本開示によるウイルス粒子の一例において、マラバタンパク質N、P及びL又はそれらの任意の変異型；並びにマラバタンパク質M若しくはタンパク質51M又はそれらの任意の変異型；及びバイア・グランデ(Bahia Grande)Gタンパク質、LCMV Gタンパク質又はエボラGタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含むゲノムを有する単離されたウイルス粒子が提供される。

【0061】

[0096]マラバタンパク質Nは配列番号1を含む配列を有してもよい。マラバタンパク質Pは配列番号2を含む配列を有してもよい。マラバタンパク質Lは配列番号3を含む配列を有してもよい。マラバタンパク質M及び51Mはそれぞれ配列番号4及び5を含む配列を有してもよい。バイア・グランデGタンパク質は配列番号6を含む配列を有してもよい。LCMV Gタンパク質は配列番号7を含む配列を有してもよい。エボラGタンパク質は配列番号8を含む配列を有してもよい。

【0062】

[0097]参照されたタンパク質の変異型は、参照されたタンパク質の配列と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%又は少なくとも95%同一である配列を有するタンパク質であってもよく、このような変異型のタンパク質は、参照されたタンパク質と同じ生物学的機能を維持している。例えば、変異型のタンパク質で修飾されたウイルス粒子が、参照されたタンパク質を有するウイルス粒子と同じ細胞傷害性及び神経毒性を有している場合には、変異型のタンパク質は、参照されたタンパク質と同じ生物学的機能を維持していると考えられるものとする。

【0063】

[0098]特定の例において、単離されたウイルス粒子は、配列番号1、2、3、4及び6を含む配列を有するタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含むゲノムを有する。

【0064】

[0099]別の例において、単離されたウイルス粒子は、配列番号1、2、3、4及び7を含む配列を有するタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含むゲノムを有する。

【0065】

[0100]さらに別の例において、単離されたウイルス粒子は、配列番号1、2、3、4及び8を含む配列を有するタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含むゲノムを有する。

【0066】

[0101]さらなる例において、単離されたウイルス粒子は、配列番号1、2、3、5及び6を含む配列を有するタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含むゲノムを有する。

【0067】

[0102]さらに別の例において、単離されたウイルス粒子は、配列番号1、2、3、5及び7を含む配列を有するタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含むゲノムを有する。

10

20

30

40

50

【0068】

[00103]またさらなる例において、単離されたウイルス粒子は、配列番号1、2、3、5及び8を含む配列を有するタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含むゲノムを有する。

【0069】

[00104]本開示によるウイルス粒子の別の例において、配列番号10の64～1332位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号10の1393～2190位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号10の4943～11272位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号10の2256～2945位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号10の3041～4816位によって定義される配列の逆相補配列；及びそれらのプロモータの逆相補配列を含む配列を有するRNAポリヌクレオチドを備える単離されたウイルス粒子が提供される。

10

【0070】

[00105]保存的変異型は、参照されたヌクレオチド配列と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%又は少なくとも95%同一の配列であってもよい。保存的変異型は、1つ又は複数のサイレント置換を含む配列であってもよい。

【0071】

[00106]本開示によるウイルス粒子の特定の例は、ウイルスが宿主細胞内にあるとき、配列番号9に係る配列を含むcDNAポリヌクレオチドを產生することが可能な単離されたウイルス粒子である。

20

【0072】

[00107]本開示によるウイルス粒子の特定の例は、配列番号10に係る配列を含むRNAポリヌクレオチドを含む単離されたウイルス粒子である。

【0073】

[00108]本開示によるウイルス粒子の別の例において、配列番号12の64～1332位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号12の1393～2190位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号12の4664～10993位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号12の2256～2945位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号12の3041～4537位によって定義される配列の逆相補配列；及びそれらのプロモータの逆相補配列を含む配列を有するRNAポリヌクレオチドを備える単離されたウイルス粒子が提供される

30

【0074】

[00109]保存的変異型は、参照されたヌクレオチド配列と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%又は少なくとも95%同一の配列であってもよい。保存的変異型は、1つ又は複数のサイレント置換を含む配列であってもよい。

【0075】

[00110]本開示によるウイルス粒子の特定の例は、ウイルスが宿主細胞内にあるとき、配列番号11に係る配列を含むcDNAポリヌクレオチドを產生することが可能な単離されたウイルス粒子である。

40

【0076】

[00111]本開示によるウイルス粒子の特定の例は、配列番号12に係る配列を含むRNAポリヌクレオチドを含む単離されたウイルス粒子である。

【0077】

[00112]本開示によるウイルス粒子の別の例において、配列番号14の64～1332位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号14の1393～2190位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号14の5195～11524位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存的変異型；配列番号14の2256～2942位によって定義される配列の逆相補配列又はその保存

50

的変異型；配列番号 14 の 3038 ~ 5068 位によって定義される配列の逆相補配列；及びそれらのプロモータの逆相補配列を含む配列を有する RNA ポリヌクレオチドを備える単離されたウイルス粒子が提供される。

【 0078 】

[00113] 保存的変異型は、参照されたヌクレオチド配列と少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90% 又は少なくとも 95% 同一の配列であってもよい。保存的変異型は、1 つ又は複数のサイレント置換を含む配列であってもよい。

【 0079 】

[00114] 本開示によるウイルス粒子の特定の例は、ウイルスが宿主細胞内にあるとき、配列番号 13 に係る配列を含む cDNA ポリヌクレオチドを產生することが可能な単離されたウイルス粒子である。 10

【 0080 】

[00115] 本開示によるウイルス粒子の特定の例は、配列番号 14 に係る配列を含む RNA ポリヌクレオチドを含む単離されたウイルス粒子である。

【 0081 】

[00116] 本開示の別の態様によれば、本開示による単離されたウイルス粒子を、癌の治療のために使用することができる。癌は、脳癌、例えば膠芽腫であってもよい。

【 0082 】

[00117] 単離されたウイルス粒子を使用して細胞に感染させ、感染した細胞を癌の治療のために使用してもよい。 20

【 0083 】

[00118] 本開示の別の態様によれば、本開示による単離されたウイルス粒子を、ウイルスが投与されたヒトにおいて細胞傷害反応を誘導するために使用してもよい。細胞傷害反応は抗癌反応であってもよい。単離されたウイルス粒子を細胞に感染させてもよいし、感染した細胞を使用して細胞傷害反応を引き起こしてもよい。

【 0084 】

[00119] 単離されたウイルス粒子は、中枢神経系に、血液／脳関門の外部に、血液／脳関門の内部に、又はそれらの任意の組み合わせに直接送達されるために製剤化されていてもよい。単離されたウイルス粒子は、髄腔内注入、静脈内注入、頭蓋内注入、又はそれらの任意の組み合わせを介した連続的若しくは同時的な投与のために製剤化されていてもよい。 30

【 0085 】

[00120] 感染した細胞は、中枢神経系に、血液／脳関門の外部に、血液／脳関門の内部に、又はそれらの任意の組み合わせに直接送達されるために製剤化されていてもよい。感染した細胞は、髄腔内注入、静脈内注入、頭蓋内注入、又はそれらの任意の組み合わせを介した連続的若しくは同時的な投与のために製剤化されていてもよい。

【 0086 】

[00121] 本開示のさらなる態様によれば、癌を有する患者に本開示による単離されたウイルス粒子を投与するステップを含む、癌の治療のための方法が提供される。癌は、脳癌、例えば膠芽腫であってもよい。 40

【 0087 】

[00122] 単離されたウイルス粒子は、患者に直接投与されてもよい。単離されたウイルス粒子は、中枢神経系に、血液／脳関門の外部に、血液／脳関門の内部に、又はそれらの任意の組み合わせに直接投与されてもよい。単離されたウイルス粒子は、髄腔内に、静脈内に、頭蓋内注入を介して、又はそれらの任意の組み合わせによって連続的若しくは同時に患者に投与されてもよい。

【 0088 】

[00123] 方法は、単離されたウイルス粒子で細胞を感染させるステップ、及び感染した細胞を患者に投与するステップを含んでもよい。感染した細胞は、中枢神経系に、血液／脳関門の外部に、血液／脳関門の内部に、又はそれらの任意の組み合わせに直接投与され 50

てもよい。感染した細胞は、患者に髄腔内に、静脈内に、頭蓋内注入を介して、又はそれらの任意の組み合わせによって連続的若しくは同時的に投与されてもよい。

【0089】

[00124]本開示の別の態様によれば、患者に本開示による単離されたウイルス粒子を投与するステップを含む、患者において細胞傷害反応を誘導するための方法が提供される。

【0090】

[00125]単離されたウイルス粒子は、患者に直接投与されてもよい。単離されたウイルス粒子は、中枢神経系に、血液／脳関門の外部に、血液／脳関門の内部に、又はそれらの任意の組み合わせに直接投与されてもよい。単離されたウイルス粒子は、髄腔内に、静脈内に、頭蓋内注入を介して、又はそれらの任意の組み合わせによって同時的若しくは連続的に患者に投与されてもよい。

10

【0091】

[00126]方法は、単離されたウイルス粒子で細胞を感染させるステップ、及び感染した細胞を患者に投与するステップを含んでもよい。感染した細胞は、中枢神経系に、血液／脳関門の外部に、血液／脳関門の内部に、又はそれらの任意の組み合わせに直接投与されてもよい。感染した細胞は、患者に髄腔内に、静脈内に、頭蓋内注入を介して、又はそれらの任意の組み合わせによって連続的若しくは同時的に投与されてもよい。

【0092】

[00127]本開示の別の態様によれば、患者における癌の治療のためのキットが提供される。キットは、本開示による単離されたウイルス粒子と、患者に単離されたウイルス粒子を投与するための指示書とを含む。

20

【0093】

[00128]癌は、脳癌、例えば膠芽腫であってもよい。

【0094】

[00129]単離されたウイルス粒子は、中枢神経系に、血液／脳関門の外部に、血液／脳関門の内部に、又はそれらの任意の組み合わせに直接送達するために製剤化されていてもよい。単離されたウイルス粒子は、髄腔内注入、静脈内注入、頭蓋内注入、又はそれらの任意の組み合わせを介した連続的若しくは同時的な投与のために製剤化されていてもよい。

30

【0095】

[00130]単離されたウイルス粒子は、細胞に感染させるために製剤化されるが、該細胞は、中枢神経系に、当該細胞は血液／脳関門の外部に、血液／脳関門の内部に、又はそれらの任意の組み合わせに送達させるためのものである。該細胞は、髄腔内注入、静脈内注入、頭蓋内注入、又はそれらの任意の組み合わせを介した連続的若しくは同時的な投与のために製剤化されていてもよい。

【0096】

[00131]上記の任意の態様において、1つの経路を介する投与を、1つ又は複数の他の投与経路と組み合わせてもよい。様々な経路を介するウイルス粒子の投与は、連続的及び／又は同時であってもよい。本開示によるウイルスの投与経路又は投与様式は、ウイルスを患者に直接投与しても、又は細胞に先ず感染させてその細胞を患者に投与しても、ウイルスの癌性細胞に対する感染及び殺傷能力に影響を与えるないと予測される。本開示によるウイルスは、血液／脳の内部又は外部のいずれかに投与されたとき、血液／脳関門を通過して、血液／脳関門の向こう側で癌細胞に感染することが可能であると予測される。

40

【0097】

[00132]ウイルスを細胞に感染させるための技術、及びウイルスを送達させるために感染した細胞を使用する技術は、例えば、Power AT&T、Carrier cell-based delivery of an oncolytic virus circumvents antiviral immunity. Mol Ther. 2007年1月；15(1):123-30、及びTyler MAら、Neural stem cells target intracranial glioma to d

50

eliver an oncolytic adenovirus in vivo. Gene Ther. 2009年2月; 16(2): 262-78で検討されている。

【0098】

[00133] ポリヌクレオチド及びアミノ酸配列

[00134] 分子生物学分野の当業者に公知の様々な方法及び技術で使用できる核酸配列を含むポリヌクレオチド（例えば、DNA及びRNA）並びにアミノ酸（例えば、タンパク質）の配列が提供される。このような配列には、例えば、列挙された配列の単離した形態、精製した形態、及び組換えの形態が含まれ、さらに列挙された配列の完全な形態又は部分的な形態も含まれる。アミノ酸配列に関する非限定的な使用としては、開示されたアミノ酸配列を含むタンパク質又はペプチドに対する抗体を作製することを含む。ポリヌクレオチド配列に関する非限定的な用途としては、ハイブリダイゼーションプローブの作製、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）で使用するためのプライマーとして、染色体用途及びジーンマッピング用途などが挙げられる。完全又は部分アミノ酸又はポリヌクレオチド配列を、そのような方法及び技術において使用してもよい。 10

【0099】

[00135] 本開示は、遺伝子配列及びコーディング核酸配列を含むポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の同定を特徴として有する。添付の配列表で明示的に提供されている配列に加えて、構造的及び/又は機能的に関連しているポリヌクレオチド配列も含まれる。配列表におけるポリヌクレオチド配列のいずれかにストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列又はその部分配列（例えば、少なくとも100個の連続するヌクレオチドを含む配列）もさらに含まれる。ポリヌクレオチド配列にはRNA産生及び/又は翻訳のために形成された配列及び/又は部分配列、例えばmRNA、アンチセンスRNA、センスRNA、RNAサイレンシング及び干渉構造などもさらに含まれる。 20

【0100】

[00136] 配列表で提供されるポリヌクレオチド配列と実質的に同一のポリヌクレオチド配列は、本明細書に開示の組成物及び方法で使用することができる。実質的に同一又は実質的に類似のポリヌクレオチド配列は、少なくとも参照ポリヌクレオチドの部分配列とヌクレオチドごとに同一のポリヌクレオチド配列として定義される。ポリヌクレオチドは、配列表に列挙されたいずれかのポリヌクレオチドと比べて、例えば挿入、欠失、及び置換を含んだものであってもよい。例えば、ポリヌクレオチドは、典型的に、配列表に記載されているもの又はその部分配列から選択される参照ポリヌクレオチドと少なくとも約70%同一である。例えば、比較ウインドウ内の10個のヌクレオチドのうちの少なくとも7個のヌクレオチドが、選択された参照配列と同一である。さらに配列は、参照配列と、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%又は少なくとも約99.5%同一でありうる。ポリヌクレオチドの部分配列としては、少なくとも約5、少なくとも約10、少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約25、少なくとも約50、少なくとも約75、少なくとも約100、少なくとも約500、約1000若しくはより多数の連続的ヌクレオチド又は相補的部分配列を挙げることができる。部分配列は、例えばオリゴヌクレオチド、例えば合成オリゴヌクレオチド、単離されたオリゴヌクレオチド、又は完全長遺伝子若しくはcDNAであってもよい。記載された配列のいずれかに相補的なポリヌクレオチド配列も含まれる。 30

【0101】

[00137] アミノ酸配列としては、配列表に示されるアミノ酸配列及びその部分配列が挙げられる。構造的及び/又は機能的に高度に関連づけられるアミノ酸配列も含まれる。例えば、配列表のアミノ酸配列に加えて、実質的に同一のアミノ酸配列も、開示された組成物及び方法で使用することができる。実質的に同一又は実質的に類似のアミノ酸配列は、アミノ酸ごとの比較に基づいて、少なくとも参照アミノ酸配列の部分配列と同一のアミノ酸配列として定義される。アミノ酸配列は、配列表のいずれかのアミノ酸配列と比べて、例えば挿入、欠失、及び置換を含んでいてもよい。例えば、アミノ酸は、典型的に、参照 40

アミノ酸配列又はその部分配列と少なくとも約70%同一である。例えば、比較ウインドウ内の10個のアミノ酸のうちの少なくとも7個のアミノ酸が、選択された参照アミノ酸配列と同一である。しばしばアミノ酸配列は、参照配列と、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%又は少なくとも約99.5%同一である。アミノ酸の部分配列としては、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約100%、少なくとも約500%、約1000%又はより多くの連続的アミノ酸を挙げることができる。また、アミノ酸配列又は部分配列の保存的変異型が存在していてもよい。アミノ酸配列は、例えば細胞傷害性、酵素的に活性、又は酵素的に不活性であつてもよい。

10

【0102】

[00138]ポリヌクレオチド配列がポリペプチド又はポリペプチドの部分配列を形成するように翻訳される場合、ヌクレオチドの変化は、保存的又は非保存的アミノ酸置換を生じるものであってもよい。保存的アミノ酸置換は、機能的に類似の側鎖を有する残基の互換性を指す。機能的に類似のアミノ酸を示す保存的置換表は、当該分野において周知である。表1に、相互に「保存的置換」であるアミノ酸を含む6つのグループの例を示している。他の保存的置換表も当該分野において利用可能であり、同様に使用することができる。

【表1】

保存的置換グループ			
1	アラニン(A)	セリン(S)	トレオニン(T)
2	アスパラギン酸(D)	グルタミン酸(E)	
3	アスパラギン(N)	グルタミン(Q)	
4	アルギニン(R)	リジン(K)	
5	イソロイシン(I)	ロイシン(L)	メチオニン(M)
6	フェニルアラニン(F)	チロシン(Y)	バリン(V)
			トリプトファン(W)

20

【0103】

[00139]当業者は、多数の保存的置換から機能的に同一の構築物が生じることを認識しているであろう。例えば、上述のように、遺伝子コードの縮重のために、「サイレント置換」(つまり、コードされるポリペプチドにおいて変化を生じさせないポリヌクレオチド配列の置換)は、アミノ酸をコードする全てのポリヌクレオチド配列に必然的に包含される特徴である。同様に、「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸配列における1又は数個のアミノ酸(例えば、約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%以上)において、極めて類似した特性を有する異なるアミノ酸で置換されており、開示された構築物と極めて類似していることも容易に確認される。開示された各配列のこのような保存的変異型も想定される。

30

【0104】

[00140]保存的変異型並びにポリヌクレオチド及びアミノ酸配列のより多様な変異型を取得する方法は、当該技術分野において広く知られている。例えばAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology(2004年にかけて補遺)John Wiley & Sons、New York(「Ausubel」); Sambrookら、Molecular Cloning - A Laboratory Manual(第2版)、1-3巻、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、N.Y.、1989(「Sambrook」)及びBerger and Kimmel Guide to Molecular Cloning Techniques、Methods in Enzymology、152巻、Academic Press, Inc.、San Diego、Calif.(「Berger」)に参照されるような十分に確立された様々なプロトコルのいずれかによってゲノム又は発現ライブラリを例えばスクリーニングすることによって取得可能な天然に存在する同族体に加えて、様々な突然変異誘発手

40

50

順を用いてさらなる変異型を作製することもできる。多くの突然変異誘発手法が当該分野において公知であり、例えば、部位特異的突然変異誘発、オリゴヌクレオチド指定突然変異誘発、及び他の多くの手法が挙げられる。例えば、部位特異的突然変異誘発は、例えば Smith (1985) 「*In vitro mutagenesis*」 Ann. Rev. Genet. 19: 423 - 462 及び文献中の参考文献 Botstein & Shorle (1985) 「*Strategies and applications of in vitro mutagenesis*」 Science 229: 1193 - 1201 及び Carter (1986) 「*Site-directed mutagenesis*」 Biochem. J. 237: 1 - 7 に記載されている。オリゴヌクレオチド指定突然変異誘発は、例えば Zoller & Smith (1982) 「*Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment*」 Nucleic Acids Res. 10: 6487 - 6500 に記載されている。修飾塩基を用いる突然変異誘発は、例えば Kunkel (1985) 「*Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection*」 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4888 - 492 及び Taylorら (1985) 「*The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA*」 Nucl. Acids Res. 13: 8765 - 8787 に記載されている。ギャップ二重鎖DNA (gapped duplex DNA) を用いる突然変異誘発は、例えば、Kramerら (1984) 「*The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction*」 Nucl. Acids Res. 12: 9441 - 9460 に記載されている。点ミスマッチ突然変異誘発は、例えば、Kramerら (1984) 「*Point Mismatch Repair*」 Cell 38: 879 - 887 に記載されている。二本鎖切断突然変異誘発は、Mandecki (1986) 「*Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of Escherichia coli: a method for site-specific mutagenesis*」 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 7177 - 7181 及び Arnold (1993) 「*Protein engineering for unusual environments*」 Current Opinion in Biotechnology 4: 450 - 455 に記載されている。修復 - 欠損宿主株を用いる突然変異誘発は、Carterら (1985) 「*Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors*」 Nucl. Acids Res. 13: 4431 - 4443 に記載されている。全遺伝子合成による突然変異誘発は、例えば、Nambiarら (1984) 「*Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein*」 Science 223: 1299 - 1301 に記載されている。DNA シャフリングは、例えば、Stemmer (1994) 「*Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling*」 Nature 370: 389 - 391 及び Stemmer (1994) 「*DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution*」 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747 - 10751 に記載されている。

【0105】

[00141] 上記の方法の多くは、さらにMethods in Enzymology 154巻にも記載されており、ここでは様々な突然変異誘発法における問題解決のために有用な制御も記載されている。突然変異誘発、ライプラリ構築及び他の多様性生成法のためのキットも市販されている。例えば、キットは、Amersham International pic (Piscataway, N. J.) (例えば、上記のEckstein法を用いて)、Bio/Can Scientific (Mississauga, Ontario, CANADA)、Bio-Rad (Hercules, Calif.) (例えば、上記のKunkel法を用いて)、Boehringer Mannheim Corp. (Ridgefield, Conn.)、Clonetech Laboratories of BD Biosciences (Palo Alto, Calif.)、DNA Technologies (Gaithersburg, Md.)、Epicentre Technologies (Madison, Wis.) (例えば、5プライム3プライムキット)；Genpak Inc. (Stony Brook, N. Y.)、Lemargo Inc (Toronto, CANADA)、Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, Calif.)、New England Biolabs (Beverly, Mass.)、Pharmacia Biotech (Peapack, N. J.)、Promega Corp. (Madison, Wis.)、QBiogene (Carlsbad, Calif.)、並びにStratagene (La Jolla, Calif.) (例えば、QuickChange (商標) 部位特異的突然変異誘発キット及びChameleon (商標) 二重鎖部位特異的突然変異誘発キット) などから入手可能である。10 20

【0106】

[00142] 配列関係の決定

[00143] 類似した配列は、いくつかの方法によって、例えば、パーセント同一性、ハイブリダイゼーション、免疫学的方法などによって客観的に決定することができる。2つ以上の配列間の関係を決定するための種々の方法（例えば、同一性、類似性及び／又は相同性）が当該分野で利用可能であり、周知である。例えば、手動アラインメント、コンピュータ支援配列アラインメント及びそれらの組合せなどの方法が挙げられる。配列アラインメントを実行するための多くのアルゴリズム（一般的にコンピュータで実行）が広く利用可能であり、又は当業者によって作製可能である。これらの方 30 法としては、例えば、Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482；the homology alignment algorithm of Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443の局地的相同性アルゴリズム、Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 2444の類似性検索法、及び／又はコンピュータによるこれらのアルゴリズムの実行（例えば、Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0、Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis. におけるGAP、BESTFIT、FASTA及びTFASTA）によるものが挙げられる。40

【0107】

[00144] 例えば、BLASTアルゴリズムを使用して、配列同一性（及び配列類似性）分析を行うためのソフトウェアは、Altschulら (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410に記載されている。このソフトウェアは公的に利用可能であり、例えば、インターネット上のncbi.nlm.nih.gov. で国立生物工学情報センターを通して利用できる。このソフトウェアのアルゴリズムは、最初に検索配列において長さWの短いワードを同定し、データベース配列の同じ長さのワードと整列させたときにいくつかの正の値のスコアTに一致するか又はスコアTを充足させる高得点配列ペア (HSP) を識別することを含んでいる。Tは隣接ワードスコア閾値と呼ばれる。50

最初の隣接ワードヒットは、それらのワードを含むより長いH S Pを見出すための検索を開始するためのシードとして機能する。次いでワードヒットを、累積アライメントスコアが増加しうるかぎり、各配列に沿って両方向に伸長させる。累積スコアは、ヌクレオチド配列については、パラメータM(1ペアの一致する残基についての報酬スコア；常に>0)及びN(ミスマッチの残基についてのペナルティスコア；常に<0)を使用して計算する。アミノ酸配列については、得点マトリックスを使用して累積スコアを計算する。各方向におけるワードヒットの伸長は、累積アライメントスコアがその最大の達成値から量Xだけ減少するとき、累積スコアが1つ又は複数のネガティブスコアの残基アライメントの蓄積に起因してゼロ以下になると、又は配列のいずれかの末端に達したときに停止する。BLASTアルゴリズムのパラメータW、T及びXは、アライメントの感度及び速度を決定する。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列について)は、デフォルトとして、ワード長(W)11、期待値(E)10、カットオフ値100、M=5、N=-4を使用して、両鎖を比較する。アミノ酸配列について、BLASTP(BLASTタンパク質)プログラムは、デフォルトとして、ワード長(W)3、期待値(E)10、及びBLOSUM62スコア行列(Henikoff & Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915参照)を使用する。

【0108】

[00145]さらに、BLASTアルゴリズムは、2つの配列間の類似性について統計学的分析を実行する(例えば、Karlin & Altschul (1993) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787参照)。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の1つの尺度は、2つのヌクレオチド配列又はアミノ酸配列間の一致が偶然生じる確率を示す確率の最小和(p(N))である。例えば、試験核酸の参照核酸への比較において、確率の最小和が約0.1未満、又は約0.01未満、さらには約0.001未満の場合、核酸は参照配列と類似(従ってこの状況では相同)と考えられる。

【0109】

[00146]配列アライメントアルゴリズムの別の例は、PILEUPであり、これはプログレッシブ、ペアワイズのアライメントを使用して、一群の関連する配列から複数の配列アライメントを作成する。アライメントを作成するために使用するクラスタの関連を示すツリーもプロットすることができる。PILEUPは、プログレッシブ・アライメント法のFeng & Doolittle (1987) J. Mol. Evol. 35: 351-360の単純化を使用する。使用される方法は、Higgins & Sharp (1989) CABIOS 5: 151-153で記載されている方法と類似している。プログラムは、例えば、最大5,000個の文字の長さの配列を最大300配列まで整列させることができる。複数のアライメント手順では、2つの最も類似する配列のペアワイズアライメントから開始して、2つの整列した配列のクラスタを作成する。次いで、このクラスタを、次に最も関連する配列又は整列させた配列のクラスタに整列させることができる。2つの配列クラスタは2つの別個の配列のペアワイズアライメントの単純な伸長によって整列させることができる。最終アライメントは、一連の進行性のペアワイズアライメントによって達成される。プログラムを使用してクラスタ関係を示す樹状図又はツリーをプロットするために使用することもできる。プログラムは、特定の配列を設計し、配列比較の領域のためのアミノ酸若しくはヌクレオチド座標を設計して実行させる。

【0110】

[00147]複数のDNA、又はアミノ酸、配列アライメントに適したアルゴリズムのさらなる例は、CLUSTALWプログラム(Thompson, J. D.ら(1994) Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680)である。CLUSTALWは、グループ配列間の複数のペアワイズ比較を行い、相同性に基づいてそれらを複数のアライメントへ組み立てる。ギャップオーブンペナルティ及びギャップ延長ペナルティは、例えば、それぞれ10及び0.05であってもよい。アミノ酸アライメントについて、BLOSUMアルゴリズムはタンパク質重量マトリックスとして使用することができる

。例えば、Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919を参照。

【0111】

[00148]ポリヌクレオチドハイブリダイゼーション類似性は、相補的又は部分相補的ポリヌクレオチド配列を有する一本鎖（又は一本鎖領域の）核酸間のハイブリダイゼーションによって評価することもできる。ハイブリダイゼーションは、核酸間の、典型的には、溶液中における、又は、固体支持体、例えば膜、ビーズ、チップ、フィルタなどの上に固定された核酸鎖の1つとの物理的関係の尺度である。核酸ハイブリダイゼーションは、十分に特徴付けられた様々な物理化学的な力、例えば、水素結合、溶媒排除、塩基スタッキングなどに基づいて生じる。核酸ハイブリダイゼーションのための多数のプロトコルが当該技術分野において周知である。核酸ハイブリダイゼーションについての詳細な解説は、Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes*、第I部、第2章、「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays」、(Elsevier, N.Y.)、並びにAusubelらCurrent Protocols in Molecular Biology (2004年にかけて補遺) John Wiley & Sons, New York (「Ausubel」) ; Sambrookら *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (第2版)、1-3巻、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.、1989 (「Sambrook」) 及びBerger and Kimmel Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology 152巻 Academic Press, Inc.、San Diego, Calif. (「Berger」)において見出される。Hames and Higgins (1995) *Gene Probes 1*、IRL Press at Oxford University Press, Oxford, England (Hames and Higgins 1) 並びにHames and Higgins (1995) *Gene Probes 2*、IRL Press at Oxford University Press, Oxford, England (Hames and Higgins 2) には、DNA及びRNAの合成、標識化、検出及び定量が、オリゴヌクレオチドに関するものを含め、詳細に記載されている。

【0112】

[00149]ハイブリダイゼーション、例えばディファレンシャルハイブリダイゼーションを得るために適切な条件は、相補及び部分相補核酸間の理論的な融解温度（T_m）によって選択される。所与の一群の条件、例えば、溶媒組成、イオン強度などの下で、T_mはハイブリダイズしている核酸鎖間の二重鎖が50%変性する温度である。つまり、T_mは、ヘリックスからランダムコイルまでの推移の中間点に対応する温度に相当する；T_mは、長いストレッチのヌクレオチドについて、ポリヌクレオチドの長さ、ヌクレオチド組成及びイオン強度に依存する。

【0113】

[00150]ハイブリダイゼーション後、ハイブリダイズしていない核酸は一連の洗浄によって除去しがき、洗浄のストリンジエンシーは、所望の結果に依存して調節することができる。低ストリンジエンシーの洗浄条件（例えば、より高い塩濃度及びより低い温度の使用）により感度は増加するが、非特異的なハイブリダイゼーションシグナルと高いバックグラウンドシグナルが生じることがある。ストリンジエンシー条件が高くなる（例えば、より低い塩濃度及びT_mに近いより高い温度を使用する）ほど、通常は主要な特異的シグナルは維持されたままで、バックグラウンドシグナルが低くなる。Rapley, R. 及びWalker, J. M. 編.、*Molecular Biomethods* H 50

and book (Humana Press, Inc. 1998) も参照されたい。

【0114】

[00151]核酸ハイブリダイゼーション実験、例えば、サザン及びノザンハイブリダイゼーションの環境において「ストリンジェントなハイブリダイゼーション洗浄条件」又は「ストリンジェントな条件」は、配列に依存し、様々な環境パラメータの下で異なる。核酸のハイブリダイゼーションについての詳細な解説は、前述の Tijssen (1993) 並びに前述の Hames and Higgins 1 及び Hames and Higgins 2 に見出せる。

【0115】

[00152]サザンプロット又はノザンプロットにおけるフィルタ上の 100 を超える相補性残基を有する相補的核酸のハイブリダイゼーションのストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の一例は、2 × SSC、50% ホルムアミド、42° でのハイブリダイゼーションの一晩 (例えば、およそ 20 時間) の実施である。ストリンジェントな洗浄条件の一例は、0.2 × SSC 洗浄、65°、15 分間である (前述の Sambrook の SSC 緩衝液に関する説明を参照)。ストリンジェンシーを決定する洗浄では、残りのハイブリダイズしていないプローブによるシグナルを除去するための低いストリンジェンシーによる洗浄を先に行ってもよい。低いストリンジェンシー洗浄の一例は、2 × SSC、室温 (例えば、20° で 15 分間) である。

10

【0116】

[00153]一般的には、特定のハイブリダイゼーションアッセイにおいて非関連のプローブに対して観察されるより少なくとも 2.5 倍 ~ 5 倍の (通常はより高い) シグナルノイズ比は、特異的なハイブリダイゼーションの検出を示す。2 つの配列間の少なくともストリンジェントなハイブリダイゼーションの検出は、本明細書の配列表で提供される配列に対する比較的強い構造類似性を示す。

20

【0117】

[00154]一般的に、「高ストリンジェント」のハイブリダイゼーション及び洗浄条件は、規定されたイオン強度及び pH での特定の配列に対する熱融解温度 (Tm) よりも約 5° 以内で低い温度になるように選択される (下記のように、高ストリンジェント条件は比較形で延べられる場合もある)。対象ヌクレオチド配列に密接に関連する又は同一の標的配列 (例えば、「プローブ」) は、ストリンジェント又は高ストリンジェント条件下で同定することができる。より低いストリンジェンシー条件は、より相補性の低い配列に適している。

30

【0118】

[00155]例えば、ストリンジェント又は高ストリンジェントなハイブリダイゼーション (又はよりいっそう高ストリンジェントなハイブリダイゼーション) 及び洗浄条件の決定において、ハイブリダイゼーション及び洗浄条件のストリンジェンシーは、選択された一組の基準に合致するまで徐々に増加させる (例えば、ハイブリダイゼーション又は洗浄において、温度を上昇、塩濃度を低下、界面活性剤濃度を増加、及び / 又は有機溶媒、例えばホルムアミドの濃度の増加)。例えば、ハイブリダイゼーション及び洗浄条件のストリンジェンシーを、本発明のポリヌクレオチド配列又はその部分配列の 1 つ又は複数を含むプローブ、及び / 又はその相補ポリヌクレオチド配列が、所望により一致しない標的に対するプローブのハイブリダイゼーションに対して観察される高さの少なくとも 2.5 ×、場合により 5 ×、又は 10 ×、又は 100 × 又はそれ以上のシグナルノイズ比で、完全に一致する相補標的に結合するまで徐々に増加させる。

40

【0119】

[00156]配列表に列挙される核酸に由来する部分配列を使用して標的核酸を取得することができ、そのような標的核酸も本開示の特徴でありうる。例えば、そのような標的核酸としては、配列表のいずれかのポリヌクレオチドの固有の部分配列に相当するオリゴヌクレオチドプローブにストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列又はその相補配列、場合により配列表のいずれかのアミノ酸配列の固有の部分配列をコードするプローブ

50

が含まれる。

【0120】

[00157] 例えば、オリゴヌクレオチドプローブに完全に相補的な標的オリゴヌクレオチドが、そのプローブと、陰性対照非相補的核酸に対する標的オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションよりも少なくとも約5～10倍高いシグナルノイズ比でハイブリダイズする、ハイブリダイゼーション条件が選択される。より高いシグナルノイズ比は、ハイブリダイゼーション条件のストリングエンシーを、約15×、20×、30×、50×、又はより高い比が得られるように増加させることによって達成することができる。特定のシグナルは、関連アッセイで使用される標識、例えば、蛍光標識、熱量標識、放射性標識などに依存すると予想される。

10

【0121】

[00158] ベクター、プロモータ及び発現系

[00159] 本開示のポリヌクレオチド配列は、任意の様々な形態、例えば発現カセット、ベクター、プラスミド、ウイルス粒子又は直鎖状核酸配列であることができる。例えば、ベクター、プラスミド、コスミド、細菌人工染色体（BAC）、YAC（酵母人工染色体）、ファージ、ウイルス及び核酸セグメントが、本発明の核酸配列又はその部分配列を含んでもよい。これらの核酸構築物は、プロモータ、エンハンサ、ポリリンカー、制御調節遺伝子などをさらに含んでもよい。従って、本開示は、例えば本明細書に開示のポリヌクレオチドを含むベクター、これらのベクターが組み込まれた宿主細胞、及び組み換え技術による様々な開示ポリペプチド（配列表のものを含む）の産生物にも関する。

20

【0122】

[00160] これらの態様において、ベクターは、例えばプラスミドベクター、一本鎖若しくは二本鎖のファージベクター、又は一本鎖若しくは二本鎖のRNA若しくはDNAウイルスベクターであってもよい。そのようなベクターは、ポリヌクレオチドとして、好ましくはDNAとして、細胞へDNA及びRNAを導入するために周知の技術によって、細胞へ導入することができる。ファージベクター及びウイルスベクターの場合、ベクターは、感染又は形質導入で周知の技術によって、パッケージされた又はキャプシド形成されたウイルスとして細胞に導入されてもよく、好ましくは導入される。ウイルスベクターは複製能を有していてもよいし、又は複製不能であってもよい。後者の場合、ウイルスの増殖は、一般的に宿主細胞が補足されたときにのみ生じると予想される。

30

【0123】

[00161] いくつかの例において、ベクターには、本開示のポリヌクレオチド及びポリペプチドの発現に有用なベクターが含まれる。一般的にそのようなベクターは、宿主での発現に有効なシス作用制御領域を含み、発現するポリヌクレオチドに操作可能に連結されている。適切なトランス作用因子は、宿主によって、補足ベクターによって、又は宿主への導入の際にベクター自身によって供給される。

【0124】

[00162] 上記ベクターに関する特定の例において、ベクターは、タンパク質発現をもたらす。そのような好ましい発現は、誘導可能な発現、一時的に制限された発現、又は特定の細胞種に主に限定された発現、又は上記の任意の組合せであってもよい。誘導可能なベクターのいくつかの実施形態は、操作が容易な環境因子、例えば、温度及び栄養性添加物質などによって発現を誘導するものであってもよい。この態様に適した種々のベクター、例えば原核生物及び真核生物宿主で使用するための構成性及び誘導可能な発現ベクターが当該分野で周知であり、当業者によって常套的に用いられている。そのようなベクターとしては、特に、クロモソーム、エピソーム及びウイルス由来ベクター、例えば、細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入因子由来、酵母クロモソーム由来、ウイルス由来、例えばラブドウイルス、バキュロウイルス、SV40などのパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、フォウルポックスウイルス、シードラビスウイルス及びレトロウイルス由来のベクター、並びにこれらの組合せに由来するベクター、例えばプラスミド及びバクテリオファージ遺伝要素

40

50

由来のベクター、例えばコスミド及びファージミド由来のベクター、及びアグロバクテリウム媒介形質転換に使用されるバイナリーなどが挙げられる。

【0125】

[00163]ベクターは選択可能なマーカー及びレポーター遺伝子を含んでもよい。十分な量のベクターの取得を容易にするために、大腸菌における複製を可能にする細菌起源のベクターを使用してもよい。例として以下に市販のベクターを示す。細菌で使用するためには、Qiagenから入手可能なpQE70、pQE60及びpQE-9；Stratageneから入手可能なpBSベクター、Phagescriptベクター、Bluescriptベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A；及びPharmaciaから入手可能なpTrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5が挙げられる。好ましい真核生物ベクターとしては、Stratageneから入手可能なpWLN EO、pSV2CAT、pOG44、pXT1及びpSG、並びにPharmaciaから入手可能なpSVK3、pBPV、pMSG、及びpSVLが挙げられる。有用な植物バイナリーベクターとしては、Clontechから利用可能なBIN19及びその誘導体が挙げられる。これらのベクターは単に例示のために列挙しているにすぎず、多くの市販の及び周知のベクターが当業者にとって利用可能である。本発明の配列表に提供される1つ又は複数のポリヌクレオチド及び/又はポリペプチド並びにそれらの変異型に対して適切な、例えば導入、維持、増殖又は発現に適切な、任意の他のプラスミド又はベクターを宿主において使用できることが理解されるものとする。

10

20

【0126】

[00164]一般的に、発現構築物は、転写開始領域及び転写終結領域を含むと予想され、構築物がポリペプチドをコードする場合、転写領域に翻訳のためのリボソーム結合部位を含むと予想される。構築物によって発現される成熟転写物のコーディング部分は、翻訳されるポリペプチドの初めの部分には翻訳を開始するAUGを、終わりの部分には適切に配置された終止コドンを含む。さらに、構築物は、発現を制御し、発現を生じさせる制御領域を含んでもよい。一般的に制御領域は、多くの通常の実施手順に従って、特に転写因子、リプレッサ結合領域及び終止シグナルなどを制御することによって転写を制御するよう30に操作されると予想される。小胞体の内腔への、細胞膜周辺腔への、又は細胞外環境への翻訳されたタンパク質の分泌のために適切な分泌シグナルを発現ポリペプチドに組み込んでもよい。これらのシグナルはポリペプチドにとって内因的なものであってもよく、又は異種起源のシグナルであってもよい。

30

【0127】

[00165]より高等の真核生物による本開示のDNA（例えば、ポリペプチドをコードしているDNA）の転写は、ベクターにエンハンサ配列を挿入して増加させることができる。エンハンサはDNAのシス作用エレメントであり、通常約10～300bpであり、所与の宿主細胞型のプロモータの転写活性を増加するように作用する。エンハンサの例としては、複製起点の後方側部にbp100～270で配置されるSV40エンハンサ、サイトメガロウイルス初期プロモータエンハンサ、複製起点の後方側部のポリオーマエンハンサ、及びアデノウイルスエンハンサが挙げられる。導入されたDNAセグメントの転写を増強させるための本開示で有用なさらなるエンハンサとしては、特にOde11ら、Plant Mol. Biol. 10: 263-72 (1988)によって示される35Sプロモータ内にあるもののようなウイルスエンハンサ、及びFrommら、Plant Cell 1: 977 (1989)に記載のopine遺伝子由来のエンハンサなどが挙げられる。エンハンサは、ベクターに含まれる配列の発現における組織的特異性及び/又は一時的特異性に影響を与えることがある。

40

【0128】

[00166]終結領域も適切な点で転写を終結することにより効率的な発現を促進する。有用なターミネータとしては、限定するものではないが、アグロバクテリウム由来のpin II (Anら、Plant Cell 1 (1): 115-122 (1989) 参照)

50

、g1b1 (Genbank登録番号L22345参照)、gz (gzw64aターミネータ、Genbank登録番号S78780参照)、及びnosターミネータが挙げられる。終結領域は、プロモータ又クレオチド配列にとって野生型のものであってもよく、対象DNA配列にとって野生型のものであってもよく、別の供給源に由来するものであってもよい。例えば、他の好都合な終結領域は、A.tumefaciensのTiプラスミドから利用可能であり、例えば、オクトピン合成酵素及びノパリン合成酵素終結領域が挙げられる。Guerineauら(1991)Mol.Gen.Genet.262:141-144; Proudfoot(1991)Cell 64:671-674; Sanfaconら(1991)Genes Dev.5:141-149; Mogenら(1990)Plant Cell 2:1261-1272; Munroeら(1990)Gene 91:151-158; Ballasら(1989)Nucleic Acids Res.17:7891-7903; 及びJoshiら(1987)Nucleic Acid Res.15:9627-9639も参照されたい。
10

【0129】

[00167]一般的な発現に適した既知の真核生物プロモータとしては、CMV最初期プロモータ、HSVチミジンキナーゼプロモータ、初期及び後期SV40プロモータ、レトロウイルスLTRのプロモータ、例えば、ラウス肉腫ウイルス(「RSV」)のLTRプロモータ、メタロチオネインプロモータ、例えばマウスマタロチオネイン-Iプロモータ、及び様々な植物プロモータ、例えばグロブリン-1が挙げられる。配列表に列挙されるポリヌクレオチド配列にとって野生型のプロモータが使用されてもよい。原核生物のプロモータの例としては、周知のプロモータからいくつか例を挙げると、ファージラムダPLプロモータ、大腸菌lac、trp及びtacプロモータが挙げられる。
20

【0130】

[00168]単離若しくは組み換えウイルス、ウイルス感染した細胞、又は本開示のポリヌクレオチド配列の1つ又は複数の部分を含む及び/又は本開示のアミノ酸配列の1つ又は複数の部分を発現する細胞も企図される。

【0131】

[00169]ポリヌクレオチドは、開示されるアミノ酸配列と異種起源の構造配列を場合によりコードしており、一般的に、標準的技術を使用して、発現のためのプロモータに操作可能に連結されるようにベクターに挿入される。操作可能に連結とは、本明細書で使用される場合、プロモータと二次配列との間の機能的連結への言及を含んでおり、機能的連結において、プロモータ配列は二次配列に対応するDNAの転写を開始し、媒介する。一般的に、操作可能に連結されるとは、連結されているポリヌクレオチド配列が接近しており、必要に応じて2つのタンパク質のコーディング領域を接近させて同じリーディングフレーム内で合体させることを意味する。ポリヌクレオチドがポリペプチドの発現を意図するものであるとき、転写開始部位がリボソーム結合部位の5'側に適切に位置するようにポリヌクレオチドは配置される。リボソーム結合部位は、発現するポリペプチドの翻訳を開示するAUGの5'側にあると予想される。一般的には、開始コドン、通常AUGから始まり、リボソーム結合部位と開始コドンとの間に位置するオープンリーディングフレームのみが存在すると予想される。また一般的には、ポリペプチドの最後に翻訳終止コドンが存在し、構築物内に真核生物宿主で使用するためのポリアデニル化シグナルが存在すると予想される。転写領域の3'末端に適切に配置された転写終止シグナルを、ポリヌクレオチド構築物に含めてよい。
30
40

【0132】

[00170]ポリペプチドを発現するように設計した核酸構築物については、発現カセットにさらに5'リーダー配列を含めてもよい。そのようなリーダー配列は翻訳を増強するよう作用しうる。翻訳リーダーは当該分野で公知であり、ピコルナウイルスリーダー、例えばEMCVリーダー(脳心筋炎5'非コーディング領域)、Elroy-Steinら(1989)Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.86:6126-6130; ポティウイルスリーダー、例えば、TEVリーダー(Tobacco Etch Vi
50

rus)、Allisonら(1986)；MDMVリーダー(Maize Dwarf Mosaic Virus)、Virology 154:9-20；ヒト免疫グロブリン重鎖結合タンパク質(BiP)、Macejakら(1991)Nature 353:90-94；アルファルファモザイクウイルスのコートタンパク質mRNA(AMV RNA 4)由来の非翻訳リーダー、Joblingら(1987)Nature 325:622-625；タバコモザイクウイルスリーダー(TMV)、Gallieら(1989)Molecular Biology of RNA、237-256頁；及びトウモロコシ退緑斑紋ウイルスリーダー(MCMV)Lommelら(1987)Virology 81:382-385が挙げられる。Deilla-Cioppaら(1987)Plant Physiology 84:965-968も参照されたい。力セットは、翻訳及び／又はmRNA安定性を増強する配列、例えばイントロンを含んでもよい。発現力セットはさらに単離された対象ヌクレオチド配列の3'末端に、翻訳終結領域を含んでもよい。10

【0133】

[00171]特別の細胞器官に向けられた、又は細胞表面で分泌されたポリヌクレオチド配列の発現産物を得ることが所望される場合には、発現力セットにさらに輸送ペプチドのためのコーディング配列を含めてもよい。輸送ペプチドは当該分野において周知であり、例えば、限定されないが、アシルキャリアタンパク質の一過性ペプチド、RUBISCOの小サブユニット、植物EPPSシンターゼなどが挙げられる。20

【0134】

[00172]発現力セットを作製する際には、ポリヌクレオチド配列が適切な配向にあるように、及び必要に応じて適切なリーディングフレームにあるように、様々なDNA断片を操作することができる。この目的のために、アダプター又はリンカーを用いてDNA断片を連結することができ、又は他の操作手法を、好都合な制限部位、余剰DNAの除去、制限部位の除去などのために含めることができる。この目的のために、インビトロ突然変異誘発、プライマー修復、制限消化、アニーリング、及び再置換、例えば、転位、塩基置換などを利用してもよい。20

【0135】

[00173]宿主細胞内への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、顕微鏡下注射、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、電気穿孔、形質導入、スクレープ負荷、遺伝子銃導入(ballistic introduction)、感染又は他の方法によって実行することができる。そのような導入方法は、多くの標準実験マニュアル、例えば、Davisら、Basic Methods in Molecular Biology、(1986)及びSambrookら、Molecular Cloning - A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.(1989)に記載されている。30

【0136】

[00174]適切な宿主の代表的な例としては、連鎖球菌、ブドウ球菌、大腸菌、ストレプトマイセス及びサルモネラ・ティフィムリウム細胞などの細菌細胞；酵母菌及びアスペルギルス細胞のような菌細胞、ショウジョウバエS2細胞及びスポットテラSf9細胞のような昆虫細胞、CHO、COS及びBowesメラノーマ細胞などの動物細胞、及び植物細胞が挙げられる。40

【0137】

[00175]宿主細胞を従来の栄養培地で培養することができ、培地には、特にプロモータの活性化、形質転換体の選択、又は遺伝子増幅の目的で適切な改変を行ってもよい。当業者には明らかであると予想されるが、これまでに発現のために選択された宿主細胞で使用されていた例えば、温度、pHなどの培養条件が、一般的に核酸及び／又はポリペプチドの発現にとって適切であると予想される。成熟タンパク質は、適切なプロモータの制御下50

で、哺乳類細胞、酵母、細菌、又は他の細胞において発現させることができる。無細胞翻訳系も、本明細書に開示されたポリヌクレオチドに由来するRNAを使用してこのようなタンパク質を産生するために利用することができる。

【0138】

[00176]適切な宿主株を形質転換し、宿主株を選択されたプロモータが誘導可能な適切な細胞密度に成長させた後、適切な手段（例えば、温度変化又は化学誘導剤への曝露）で誘導を行い、細胞をさらなる期間、培養させる。次いで細胞を、典型的には、遠心分離によって回収し、物理的又は化学的手段によって破碎し、得られた粗抽出物をさらなる精製のために保持する。タンパク質の発現で使用する微生物細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破碎、又は細胞溶解剤を含む、任意の好都合な方法の使用によって破碎することができ、そのような破碎方法は当業者にとって周知である。 10

【0139】

[00177]本開示の組成物及び方法には、本明細書で提供されるポリヌクレオチド及び／又はアミノ酸の投与を含むことができる。例えば、膠芽腫の治療には、1つ又は複数のポリヌクレオチド及び／又はアミノ酸の投与を含むことができる。1つ又は複数のポリヌクレオチド及び／又はアミノ酸は、単離された形態であってもよく、又は組成物、例えばウイルス粒子の一部であってもよい。様々な実施形態において、投与は、皮内、経皮、腸管外、血管内、静脈内、筋肉内、鼻腔内、皮下、局所、経皮的、気管内、腹腔内、動脈内、膀胱内、腫瘍内、吸入、灌流、洗浄、直接注入、食事による、経口、又は頭蓋内投与の形態をとることができる。投与の形式は、依存しうる。 20

【実施例】

【0140】

[00178]実施例

[00179]実施例1：非神経毒性ラブドウイルス及びインビトロ細胞傷害性の同定

[00180]インビトロ神経毒性の測定：6～8週齢の雌BALB/cマウスのグループ（n=3/グループ）に、提示のウイルスを1e7pfuで単回頭蓋内（IC）注入した。IC注入後、マウスを、体重減少、立毛、後足麻痺及び呼吸困難を含む苦痛の徴候について毎日モニターした。

【0141】

[00181]図1は、提示のウイルスのIC単回投与（1e7pfu）後のBALB/cマウスの生存を示す。VSV、マラバウイルス（MR）又はカラジャス（Carajas）ウイルス（CRJ）をIC注入処理したマウスは、10日未満しか生存しなかったが、対照マウス（PBS）並びにファーミントン（Farmington）（FMT）、バイア・グランデ（BG）及びミュア・スプリングス（Muir Springs）（MS）をIC注入した他の全てのマウスはIC注入後、30日より長く100%生存したことが示され、後者のウイルスが非神経毒能を有することを示した。カプラン・マイヤー生存プロットは、マンテル・コックス（Mantel-Cox）ログランク分析（Graphpad Prism）を用いて比較した。 30

【0142】

[00182]本開示の著者は、野生型のFMT、BG及びMSの腫瘍溶解性を調査することに加えて、マラバウイルス（MRB）と非神経毒性のウイルス（例えば、BG）とのキメラウイルスの生成により、両方の望ましい特性を有するウイルスが得られるであろうと推論した。BG由来の糖タンパク質をMRBに置換して、BG糖タンパク質を有し、「マラバBGG」又は「MRBGG」又は「MRB-BG（G）」と称されるキメラマラバウイルス又はその変異型を作製し、配列番号10の逆相補配列であるRNA配列を含めた。マラバウイルスなどのラブドウイルスは、その遺伝物質をネガティブセンス一本鎖RNAの形態で保有する。本明細書に開示するRNA配列は、ウイルス遺伝物質をコードするRNA鎖に相当し、従って、ラブドウイルスによって運ばれる遺伝的RNAの逆相補配列である。

【0143】

10

20

30

40

50

[00183]マラバM G Gウイルス粒子のゲノムは、マラバタンパク質N、P及びL並びにマラバタンパク質M及びバイア・グランデGタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを有する。マラバタンパク質Nは、配列番号1に相当する配列を有する。マラバタンパク質Pは、配列番号2に相当する配列を有する。マラバタンパク質Lは、配列番号3に相当する配列を有する。マラバタンパク質Mは、配列番号4に相当する配列を有する。バイア・グランデGタンパク質は、配列番号6に相当する配列を有する。

【0144】

[00184]別のキメラウイルスは、M R B G糖タンパク質をエボラ糖タンパク質と置換し、今度はより減弱化したマラバベクター(51M R B)に組み入れて、「マラバE b G」又は「E b G」と称されるキメラウイルス又はその変異型を作製し、配列番号14の逆相補配列であるRNA配列を含めることにより生成した(図2A参照)。マラバE b Gウイルス粒子のゲノムは、マラバタンパク質N、P及びL並びにマラバタンパク質51M及びエボラGタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを有している。マラバタンパク質Nは、配列番号1に相当する配列を有する。マラバタンパク質Pは、配列番号2に相当する配列を有する。マラバタンパク質Lは、配列番号3に相当する配列を有する。マラバタンパク質51Mは、配列番号5に相当する配列を有する。エボラGタンパク質は、配列番号8に相当する配列を有する。

【0145】

[00185]本開示の著者は、マラバE b G変異型が、複製腫瘍溶解性ラブドウイルスにおけるキメラウイルスの治療範囲を増加させるだろうと仮定した(図2A)。その理由は、エボラ-ザイール糖タンパク質で偽性したレンチウイルスベクターは、マウスCNSにウイルス形質導入をもたらさなかつたが、293T癌細胞株に形質導入する能力は保持していることが従前に実証されていたためである(Watson, D. J., Kobinger, G. P., Passini, M. A., Wilson, J. M. & Wolfe, J. H. Targeted transduction patterns in the mouse brain by lentivirus vectors pseudotyped with VSV, Ebola, Mokola, LCMV, or MuLV envelope proteins. Mol Ther 5, 528-537 (2002); 及び Watson, D. J., Passini, M. A. & Wolfe, J. H. Transduction of the choroid plexus and ependyma in neonatal mouse brain by vesicular stomatitis virus glycoprotein-pseudotyped lentivirus and adeno-associated virus type 5 vectors. Hum Gene Ther 16, 49-56 (2005)参照)。

【0146】

[00186]これらのキメラウイルスの殺傷能力を試験するために、野生型ウイルス単離株と比較して、細胞殺傷分析を、2つの正常なヒト2倍体細胞株の一次正常ヒト星状細胞(NHA)及び一次線維芽細胞(GM38)(図2B及び2C)、並びに一群の8つのCNS腫瘍細胞株SF268、SNB19、U118、U343、SF295、SNB75、SF539及びU373(図2D~2K)に対して行った。

【0147】

[00187]細胞を、国立一般医科学研究所の変異細胞集積部門(National Institute of General Medical Science Mutaant Cell Repository)(Camden, NJ)から取得し、10%ウシ胎仔血清(Cansera、Etobicoke、Ontario、Canada)を補足したダルベッコ変形イーグル培地(Hyclone、Logan、UT)中で増殖させた。生存性アッセイは、提示の細胞株を用いて以下のように行った:細胞を、10000細胞/ウェルの密度で96ウェルプレートに播種し、翌日、野生型マラバ、野生型FMT、野生型BG、減弱化マラバ、マラバE b G又はマラバB G Gのいずれかを様々な多重感

10

20

30

40

50

染度 (0 . 0 0 0 1 ~ 1 0 p f u / 細胞) で感染させた。

【 0 1 4 8 】

[00188] 4 8 時間インキュベーションした後、アラマーブルー (レサズリンナトリウム 塩 (S i g m a - A l d r i c h)) を最終濃度が 2 0 μ g / m l となるように添加した。6 時間インキュベーションした後、吸光度を 5 7 3 n m の波長で読み取った。野生型マラバは G B M 細胞株の全てに対して非常に有効であったが、N H A と G M 3 8 の両方に対しても高い溶解性があった。対照的に、マラバ E b G 及び野生型 B G は、M O I (1 0 p f u) で正常細胞 (N H A と G M 3 8) には無害であり、腫瘍細胞株に対しては顕著に選択的な殺傷を実証した。キメラウイルス「 M R B G G 」は、大半の G B M 細胞株に対してマラバ E b G 又は野生型 B G よりも非常に強い効力を実証した一方で、正常線維芽細胞において良好な安全性を維持していた。野生型 F M T は、最高の治療指數を実証し、大半の G B M 株において M R B に匹敵する効力を有したが、一方で N H A と G M 3 8 原発性細胞株で著しく減弱した。この結果は、野生型 F M T 、並びに B G 又はエボラの糖タンパク質に対してキメラとなるように設計されたマラバウイルスが、脳癌細胞株に対して試験されたときに、強力で選択的な腫瘍溶解活性を示すことを実証する。
10

【 0 1 4 9 】

[00189] 実施例 2 : 2 つのマラバウイルスキメラのインピボでの安全性

[00190] 野生型単離株 (F M T 、 B G 及び M S) 並びにインピトロの非形質転換細胞中で減弱化を実証した 2 つのキメラウイルス (E b G 及び M R B G G) (実施例 1 参照) を用いて、観察された減弱化によりインピボでの安全性が説明されるかどうかを確認する試験を行った。これらのウイルスを動物に、低用量 (1 e 3 p f u) 及び高用量 (1 e 7 p f u) の 2 つの用量で大脳内投与した (図 3 A)。
20

【 0 1 5 0 】

[00191] 5 つのウイルスは全て持続感染がなく、処理から 1 0 0 日後に 1 0 0 % の動物が生存し、安全であることが見出された。これらの 2 つの用量で、動物は、ウイルス感染に相応する一時的な体重減少と立毛を示したが、これらの症状は接種後 5 ~ 7 日以内に解消された。対照的に、野生型又は減弱化したマラバ及び V S V 株で同様の I C 用量を受けた動物は全て一週間以内に感染により死亡した (図 3 A)。これらの動物は、急速及び進行性の体重減少並びに後脚麻痺を伴う C N S 感染の臨床的徴候を示し、死亡直前に脳内で顕著なウイルス力価を有していた (データ示さず)。
30

【 0 1 5 1 】

[00192] ウイルス力価を、野生型 F M T (I C 及び I V) 及びキメラマラバウイルス (E b G 及び M R B G G) による処理から 3 か月後の動物脳においてプラークアッセイにより測定した。プラークアッセイは、6 ウェルの皿に 5 e 5 細胞 / ウェルの密度で播種したベロ細胞を用いて実施した。翌日、1 0 0 μ l の連続ウイルス希釈液を調製し、1 時間かけてベロ細胞に添加した。ウイルス吸着後、2 m l のアガロースオーバーレイを添加し (1 : 1 の 1 % アガロース : 2 × D M E M 及び 2 0 % F C S) 、翌日、プラークを計数した。ウイルスは I C 感染から 3 ヶ月後において動物脳内で検出されなかった (図 3 B)。

【 0 1 5 2 】

[00193] さらに、脳内に高用量の F M T (1 e 7 p f u) 及び M R B G G (1 e 7 p f u) を投与後、細胞死又は炎症反応の徴候は見られず、生理食塩水が注入された対照マウスと同等の結果であった (図 3 C)。この結果は、炎症細胞、縮合核及び穿孔形態の著しい増加を示した野生型 M R B 注入マウスと劇的に異なっていた。
40

【 0 1 5 3 】

[00194] F M T 、 B G 又は M S を用いた I C 処理に起因する急性神経毒性は生じなかつたが、認知及び運動機能の評価をウイルス感染から数日後に実施した。運動機能をこれらの 3 つの野生型ウイルスによる処理の前後に評価した (図 3 D)。 B a l b / C マウスに、ウイルス I C 投与に先立って、運動機能 / 回転ロッド装置上の行動に関して試験した。マウスを、ロトロッド上に配置して 1 日当たり 3 回の試行を 4 日間連続して行った。動物を装置に 0 . 5 分間慣れさせた後、ロッドを直線的に 0 . 1 r p m / s で加速した。落下 50

するまでのレイテンシを数分間測定して、動物を3つのグループに分類した。運動機能を、未処理(注入せず)、P B S、F M T、マラバE b G、B G、M R B G G及びM S I C処理動物において、注入後1週間、評価した。平均標準誤差を計算した。詳細には、落下までのレイテンシに、偽感染マウスとウイルス感染マウスとの間で注入1週間前及び1週間後において顕著な差異はない(図3D)。

【0154】

[00195]頭蓋内毒性に加えて、F M TとM R B G Gの毒性を、免疫不全マウスにウイルス量を増加させながら静脈内(IV)投与して評価した(図3E)。M R B G Gは、最大3e8 p f uの用量まで耐容性があり、野生型マラバの公開された結果よりも1桁高いIVの安全性を有することを実証している。F M TはIVで十分な忍容性があり、以前記述されたマラバの減弱型ウイルス(Brun, J.ら、Identification of Genetically Modified Maraba Virus as an Oncolytic Rhabdovirus. Mol Ther 18, 1440 (2010))に匹敵する最も高用量の3e9 p f uでさえ、決してLD50に達しない。3e8 p f uより高用量でIV投与したF M T動物は、一過性の体重減少と中程度の立毛を示したが、処理後5~7日間で解消した(図示せず)。

10

【0155】

[00196]実施例3:マラバウイルスキメラのインピボ有効性

[00197]キメラマラバウイルスのインピボ有効性を膠芽腫マウスモデルにおいても測定した。ヒト膠芽腫細胞株U87 MGのインピトロでのウイルス感染に対する感受性を測定した。F M T及び野生型マラバは、U87 MG細胞殺傷において同等の効力を有し、E C 50スコアは多重感染度0.001未満であった(データ示さず)。さらに、マラバウイルスキメラ(マラバE b G、マラバB G G)及びB G野生型は、インピトロにおいてU87 MG細胞殺傷においても効力を有し、E C 50スコアは多重感染度0.1未満であった(データ示さず)。

20

【0156】

[00198]ヒトU87 MG膠芽腫細胞を生物発光イメージング用に適合させた後で、無胸腺マウスで大脳内U87 MG膠芽腫モデルを確立し、本開示によるマラバウイルスキメラのIV有効性をこのモデルで調べた(図4A~C)。ヒト膠芽腫異種移植片モデルにおいて、膠芽腫U87 MG細胞を、ホタルルシフェラーゼ(F L U C)を含有し、F L U Cプラスミドをトランスフェクトするレンチウイルスでそれぞれ形質移入することによって生物発光イメージング用に適合させた。U87 MG F L U C細胞をC D 1ヌードマウスにI C注入した。未処理C D - 1動物では、約15~21日目で腫瘍が発生する。

30

【0157】

[00199]F L U C発現腫瘍を有する動物を、ルシフェリン(G o l d B i o t e c h n o l o g y I n c)のI P注入後、I V I S X e n o g e n 2 0 0システムのライブ画像を使用して腫瘍進行をモニターした。動物を生存、体重減少、病的状態、立毛、後足麻痺及び呼吸困難を含む苦痛の徵候に関してモニターした。最初の処理から3日後に、腫瘍負荷の著しい減少が観察され、最大効果が7日目に観察された(図4A及びB)。しかしながら14日までに腫瘍が再発し始めた。さらに、マラバウイルスキメラで静脈内処理した後、死までの時間が延びることが観察された(図4C)。興味深いことに、このモデルのマラバウイルスキメラ処理動物における脊椎転移は、全ての腫瘍担持動物において完全に消失している。対照的にU V不活化ウイルスで処理した動物は7日までに腫瘍負荷が顕著に増加し、この7日目から脳腫瘍による神経学的症状が現れ始めた。I V処理した動物は全て処理に反応し、8匹のうち3匹は永続的に治癒し、処理後100日を超えて生存した。

40

【0158】

[00200]実施例4:他のマラバウイルスキメラの調査

[00201]水疱性口内炎ウイルス(V S V)は強力な腫瘍溶解性ラブドウイルスである。しかしながら、神経向性及び続いての神経毒性並びに非常に有力なn A b反応がV S V治

50

療に関連して問題となる。この本来的な神経毒性により、臨床用の候補としての検討は進まなかった。

【0159】

[00202] 本来的な神経毒性は糖タンパク質 (V S V - G) によって媒介されると考えられている。しかしながら、典型的に V S V - G を使用するレンチウイルスペクターはリンパ球性脈絡膜炎ウイルス G タンパク質 (L C M V - G) でのシードタイピングを介して減弱化した神経毒性を示した (B e y e r ら、 J V i r o l 7 6 : 1 4 8 8 - 1 4 9 5, 2 0 0 2 ; 及び V o n L a e r の米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 5 0 1 8 8 号)。 L C M V は、エンベロープ型ネガティブセンス R N A ウイルスのアレナウイルスファミリーのプロトタイプの一員である。本開示の著者は、マラバウイルスの神経毒性が、糖タンパク質 (マラバ - G タンパク質) を L C M V - G タンパク質で置換することで減弱化しうるかもしれないと仮定した。 L C M V - G タンパク質を有するキメラマラバウイルスは、 M R B - G 糖タンパク質を L C M V 糖タンパク質に置換して、「マラバ L C M V - G 」又は「マラバ L C M V (G) 」と称されるキメラウイルスを作製し、配列番号 1 2 の逆相補配列である R N A 配列を含めることにより生成した (図 2 A 参照)。

【0160】

[00203] マラバ L C M V - G ウイルス粒子のゲノムは、マラバタンパク質 N 、 P 及び L 並びにマラバタンパク質 M 及び L C M V - G タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを有している。マラバタンパク質 N は、配列番号 1 に相当する配列を有する。マラバタンパク質 P は、配列番号 2 に相当する配列を有する。マラバタンパク質 L は、配列番号 3 に相当する配列を有する。マラバタンパク質 M は、配列番号 4 に相当する配列を有する。 L C M V - G タンパク質は、配列番号 7 に相当する配列を有する。

【0161】

[00204] マラバキメラウイルスの作製と回収を以下のようにして行った。野生型組み換えマラバウイルスゲノムをコードするプラスミド (B r u n ら、 2 0 1 0) を、標準的 D N A クローニング方法によって、マラバ糖タンパク質配列がバイア・グランデウイルス、リンパ球性脈絡膜炎ウイルス (L C M V) 又はファーミントンウイルス由来の糖タンパク質配列によって置換されるように、改変した。簡潔には、 N o t 1 制限部位を、マラバ G 配列の終止コドンの直後に、 P C R に基づく突然変異誘発によって導入した。この新しく導入された N o t 1 部位と、 M と G タンパク質配列間の既存の K p n 1 サイトを使用して、マラバ G を制限消化によって除去し、 p M R B (- G) - K p n 1 / N o t 1 を生成した。ファーミントン及びバイア・グランデの両方の糖タンパク質配列を増幅するプライマーに 5 ' K p n 1 及び 3 ' N o t 1 制限部位を導入するように設計した。これらの配列を P C R によって増幅し、 p M R B (- G) - K p n 1 / N o t 1 に連結した。 L C M V 糖タンパク質前駆配列 (G e n B a n k E F 1 6 4 9 2 3 . 1) は 5 ' K p n 1 及び 3 ' N o t 1 部位を導入して合成した (I n t e g r a t e d D N A T e c h n o l o g i e s 、 C o r a l v i l l e 、 I A)。この D N A 断片を上記 p M R B (- G) - K p n 1 / N o t 1 に連結したところ、 p M R B - L C M V - G 、 p M R B - B G - G 及び p M R B - F M T - G になった。

【0162】

[00205] さらに、ファーミントンウイルスの組み換えゲノムを、国際出願 P C T / C A 2 0 1 2 / 0 5 0 3 8 5 号に記載されているように、野生型ファーミントン糖タンパク質をマラバ糖タンパク質に置換することによって改変し、同様の方法で上記のマラバ糖タンパク質変異型を作製した。

【0163】

[00206] 組み換えマラバウイルス粒子 [M R B G G 、 M R B - F M T G 、 M R B - L C M V G] を、従前に記載された技術 (B r u n ら、 2 0 1 0) を使用して、上述の改変マラバゲノムプラスミドから生成した。簡潔には、 A 5 4 9 細胞に、 T 7 R N A ポリメラーゼ発現ワクシニアウイルスを、 M O I が 1 0 で 1 . 5 時間感染した。続いて細胞に、リポフェクタミン 2 0 0 0 により、マラバ N 、 P 及び L タンパク質をコードする p C I - N

10

20

30

40

50

e o 構築物と共に上述の改変組み換えマラバゲノムプラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクションから48時間後、培地を除去し、0.2 μmフィルタを通して濾過し、濾液を使用してSNB19細胞に感染させた。48時間後にうまく回収されたもので細胞変性作用が観察され、次いでウイルスをベロ細胞で3回ブラーク精製した。初期トランスフェクションにファーミントンN、P及びLタンパク質をコードするpFMT-MRB-G及びPCI-Ne o構築物を含有させたことを除いては、上記と同様の方式でFMT-MRB-Gウイルスを生成した。

【0164】

[00207]組み換えウイルスに、ブラーク精製を3回(SNB19細胞で)実施して、次いでスケールを上げ、ショ糖クッショングで精製し、15%グルコースを含有するPBSで再懸濁した。 10

【0165】

[00208]ヒト膠芽腫(星状細胞腫)細胞(U87MG、SF268、U118、U373、U343、SNB19、2種の原発性患者GBM細胞試料)のパネルで様々なウイルスの相対的細胞傷害性を測定した。提示の細胞株を、96ウェルプレート中に播種した(1e4細胞/ウェル)。翌日、細胞を様々なMOI(0.0001~10pfu/細胞)で、以下に提示のウイルスにより感染させた:野生型BG、野生型FMT、VSV-LCMV(G)、「VSV(LCMV G)」)、MRB-BGG(「MRB(BGG)」)、又はMRB-LCMVG(「MRB(LCMV G)」)。96時間インキュベーションした後、アラマーブルー(レサズリンナトリウム塩((Sigma-Aldrich))を最終濃度が20μg/mlとなるように添加した。6時間のインキュベーション後、吸光度を573nmの波長で読み取った。細胞代謝活性(Cell metabolic viability)をプロットし、多重感染度(multiplicity of infection、MOI)EC50値を測定し、以下のような範囲で評定した:1=MOI<0.01;2=MOI<0.1;3=MOI<1;4=MOI<10;5=MOI>10;6=耐性。8個全ての膠腫株についてEC50スコアの平均を、各ウイルスについてプロットした(図5)。MRB-LCMVGキメラは、MRB-BG及びVSV-LCMV(G)キメラ又は野生型非神経毒性BG及びFMTウイルスと比較して、最小のEC50値(従って、脳癌細胞株に対する腫瘍溶解活性に関して最高効力)を示した。 20

【0166】

[00209]実施例5:他のラブドウイルスキメラのインビボでの安全性 30

[00210]インビボでの神経毒性を測定するために、6~8週齢の雌BALB/cマウスグループ(n=2~10/グループ)に、提示のウイルスを1e7pfuで単回頭蓋内(IC)注入した。全身麻酔薬(イソフルラン)の投与後、マウスを手術のために頭を剃って準備し、クロルヘキシジン消毒剤を頭皮に塗布し、抗菌性軟膏で目を覆い、耳に局所麻酔薬を塗布した。次いで、マウスを定位でマウント上に置き、耳棒を使用して固定した。メスで頭皮の中線に0.5cmの切り込みを入れ、頭の頂部を露出させた。使い捨て23G針を使用して、頭の右側、冠状縫合のおよそ0.5mm上及び矢状縫合から2mmのところに穴を設けた。10μLの硝子製ハミルトン注射器に、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で希釈したウイルスを充填し、固定したシリングポンプ上にマウントした。針を4mmの深さで挿入し、30秒後に0.5mm引き戻した。次いで、ウイルス(1e7pfuの用量)を、5μL/分の速度で脳へ注入した。30秒の待機期間後、針を引き出し、頭皮を獣医学用接着剤で合わせ、マウスを保育器中で全身麻酔から回復させた。マウスに、手術後72時間、術後の疼痛制御(ブレノルフィン)を行い、その間12時間毎に体質量を測定し、健康評価を行った。 40

【0167】

[00211]図6Aは、提示のウイルス(1e7pfu)を単回IC投与した後のBALB/cマウスのカプラン・マイヤー生存プロットを示す。生存プロットを、マンテル・コックスログランク分析(Graphpad Prism)を用いて比較した。野生型マラバウイルス(MRB-WT)又はマラバ-Gタンパク質を有するキメラファーミントンウイ 50

ルス (F M T - M R B (G)) の I C 注入で処理した動物は 10 日未満しか生存しなかつたが、野生型ファーミントン (F M T - W T) 、マラバ L C M V - G 及びマラバ B G G の I C 注入で処理したマウスは、 I C 注入後 30 日で 100 % 生存を示し、それらのウイルスの非神経毒性能を示した。ファーミントン G タンパク質を有するキメラマラバウイルス (M R B - F M T (G)) は、 I C 注入後 30 日での生存は 100 % に満たなかったことが示されたが、対照と比較して生存性は増加した。キメラ M R B - F M T (G) で処理した動物は、体質量の喪失により初期に安樂死させられた 2 匹のマウスのために中間的な生存率を示した。

【 0168 】

[00212] M R B - F M T (G) ウィルス粒子は、ウイルスが宿主細胞内にあるとき、配列番号 15 を含む c D N A ポリヌクレオチドを産生する。 M R B - F M T (G) ウィルス粒子は、配列番号 16 の逆相補配列である R N A 配列を含んでいる。 M R B - F M T (G) ウィルスのゲノムは、マラバタンパク質 N 、 P 及び L 並びにマラバタンパク質 M 及びファーミントン G タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを有している。マラバタンパク質 N は、配列番号 1 に相当する配列を有する。マラバタンパク質 P は、配列番号 2 に相当する配列を有する。マラバタンパク質 L は、配列番号 3 に相当する配列を有する。マラバタンパク質 M は、配列番号 4 に相当する配列を有する。ファーミントン - G タンパク質は、配列番号 17 に相当する配列を有する。

【 0169 】

[00213] F M T - M R B (G) ウィルス粒子は、ウイルスが宿主細胞内にあるとき、配列番号 18 を含む c D N A ポリヌクレオチドを産生する。 F M T - M R B (G) ウィルス粒子は、配列番号 19 の逆相補配列である R N A 配列を含んでいる。 F M T - M R B (G) ウィルスのゲノムは、ファーミントンタンパク質 N 、 P 及び L 並びにファーミントンタンパク質 M 及びマラバ G タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを有している。ファーミントンタンパク質 N は、配列番号 20 に相当する配列を有する。ファーミントンタンパク質 P は、配列番号 21 に相当する配列を有する。ファーミントンタンパク質 L は、配列番号 22 に相当する配列を有する。ファーミントンタンパク質 M は、配列番号 23 に相当する配列を有する。マラバ - G タンパク質は、配列番号 24 に相当する配列を有する。

【 0170 】

[00214] 図 6 B は対応する体質量の変化を示す。動物は全て処理後 3 ~ 5 日で体質量の初期減少を示した。野生型 F M T 又はキメラ M R B G G 若しくは M R B L C M V G の I C 注入で処理した動物において、体質量の低下は一時的であり、処理後 20 ~ 25 日の間で初期体質量を回復した。キメラ M R B F M T G で処理したグループで生存していた 3 匹の動物は、同時期に体質量の中程度の回復を示した。

【 0171 】

[00215] 図 6 A 及び 6 B は、 (i) 非神経毒性的ウイルスのファーミントンウイルスが、 G タンパク質を神経毒性的ウイルスのマラバウイルス由来の野生型 G タンパク質で置換することで神経毒性となりうること、及び (i i) 神経毒性的ウイルスのマラバウイルスは、 G タンパク質を、任意の非神経毒性的ウイルス由来の G タンパク質で置換することでは非神経毒性とはならないこと、その理由としてファーミントンウイルス由来の G タンパク質を用いて置換しても非神経毒性は付与されないこと (明確にいえば、マラバウイルスは、 G タンパク質を、特定の非神経毒性的 G タンパク質で置換すると非神経毒性となること) を示している。

【 0172 】

[00216] 実施例 6 : 本開示によるマラバキメラウイルス及び対照ウイルスのインビボ有効性

[00217] キメラウイルスのインビボ有効性を膠芽腫マウスモデルでも測定した。 6 ~ 8 週齢の C D - 1 ヌードマウスに、 1 e 6 で、 U 8 7 M G - F l u c 細胞 (ホタルルシフェラーゼを発現するようにレンチウイルスを形質導入したヒト膠芽腫細胞) を、上記のよう

10

20

30

40

50

に頭蓋内注入した。1週間後に、マウスをインビボ画像化システム(Xenogen IVIS 200画像システム、Caliper Life Sciences)を使用して画像化し、5つのグループが脳内で確立されている腫瘍からのホタルルシフェラーゼ発現レベルが同様であるように分けた。簡潔には、マウスにイソフルランを使用して麻酔をかけ、ルシフェリン溶液を注入し(2mg/マウス)、IVIS装置に配置した。画像を撮り、発光を製造業者のソフトウェア(Living Image(登録商標)、Caliper Life Sciences)を使用して定量した。各マウスからの腫瘍シグナルは、曝露からのバックグラウンドシグナルに対して標準化した。この処理前の値に100%の値を割り当て、それに続く全ての値はこの開始点と比較した。翌日、提示のウイルスをマウスに前述のように定位で注入した(1e7pfuの用量、又は対照としてのリン酸緩衝生理食塩水)。マウスを1週間隔で5週間、IVISによって画像化し、この5週間の間に、認可されている腫瘍関連健康指標により、マウスを規制ガイドラインに従って安樂死させた。

【0173】

[00218]図7Aは、対照ウイルスと比較した本開示によるマラバキメラのインビボ有効性を説明するグラフである。グラフは、処理後のU87MG腫瘍を有するCD-1ヌードマウスのカプラン・マイヤー生存プロットを示している。FMT-MRB(G)及びMRB-FMT(G)で処理した動物は、IC注入後20日より長いが30日未満しか生存しなかった。PBSで処理した動物は、IS注入後、腫瘍で死ぬまで、約30日間生存した。MRB-BGGで処理した動物は、IC注入後30日で50%以上の生存を示した。野生型BGを用いた処理は、IC注入後30日で75%を超える生存を示した。MRB-LCMV(G)、VSV-LCMV(G)及びFMT-WTを用いた処理は、IC注入後30日で100%生存を示した。図7Bは、図7Aの動物の体重の変動を示すグラフである。動物は全て処理後3~5日で体質量の初期減少を示した。野生型FMT、BG又はキメラMRB-LCMVG若しくはVSV-LCMVGのIC注入で処理した動物において、体質量の低下は一時的であり、処理後20日までに初期体質量を回復した。キメラMRB-FMTG若しくはFMT-MRBG、又はPBS対照で処理した動物は、同時期で体質量の回復を示さなかった。詳細な結果を図8~15に示す。

【0174】

[00219]図8Aは、ヒトU87MG異種移植モデルにおけるPBS対照のインビボ有効性を説明するU87MG腫瘍のIVIS画像である。画像は、処理前及び処理後(1週、2週、3週、4週)の腫瘍を示す。図8Bは、未処理の対照動物における経時的な腫瘍負荷の著しい増加を説明する流動プロットである。

【0175】

[00220]図9Aは、ヒトU87MG異種移植モデルにおけるBG野生型(BG-WT)ウイルス処理のインビボ有効性を説明するU87MG腫瘍のIVIS画像である。画像は、BG処理(1用量、1e7pfu:IC)の後(1週、2週、3週、4週)のU87MG腫瘍を示す。図9Bは、BGのIC投与(1e7pfu)に応答する初期の中程度の腫瘍退縮と後の腫瘍負荷の再発を図示する流動プロットである。

【0176】

[00221]図10Aは、ヒトU87MG異種移植モデルにおけるFMT野生型(FMT-WT)ウイルス処理のインビボ有効性を説明するU87MG腫瘍のIVIS画像である。画像は、FMT-WT処理(1用量、1e7pfu:IC)の後(1週、2週、3週、4週)のU87MG腫瘍を示す。図10Bは、FMT-WTのIC投与(1e7pfu)に応答する顕著な腫瘍退縮を実証する流動プロットである。

【0177】

[00222]図11Aは、ヒトU87MG異種移植モデルにおけるMRB-BG(G)処理のインビボ有効性を説明するU87MG腫瘍のIVIS画像である。画像は、MRB-BG(G)処理(1用量、1e7pfu:IC)の後(1週、2週、3週、4週)のU87MG腫瘍を示す。図11Bは、MRB-BGGのIC投与(1e7pfu)に応答する中

程度の腫瘍退縮を図示する流動プロットである。

【0178】

[00223]図12Aは、ヒトU87MG異種移植モデルにおけるMRB-FMT(G)処理のインビボ有効性を説明するU87MG腫瘍のIVIS画像である。画像は、MRB-FMT(G)処理(1用量、1e7pfu:IC)の後(1週、2週、3週)のU87MG腫瘍を示す。図12Bは、MRB-FMT-GのIC投与(1e7pfu:IC)に応答する顕著な腫瘍退縮を実証する流動プロットである。しかしながら、動物は全て、処理後4週間経過する前にMRB-FMT(G)の神経毒性作用により死亡した。

【0179】

[00224]図13Aは、ヒトU87MG異種移植モデルにおけるFMT-MRB(G)処理のインビボ有効性を説明するU87MG腫瘍のIVIS画像である。画像は、FMT-MRB(G)処理(1用量、1e7pfu:IC)の後(1週、2週、3週)のU87MG腫瘍を示す。図13Bは、FMT-MRB(G)のIC投与(1e7pfu)に応答する顕著な腫瘍退縮を図示する流動プロットである。しかしながら、動物は全て、処理後4週間経過する前に、FMT-MRB-Gの神経毒性作用により死亡した。

【0180】

[00225]図14Aは、ヒトU87MG異種移植モデルにおけるVSV-LCMV(G)処理のインビボ有効性を説明するU87MG腫瘍のIVIS画像である。画像は、VSV-LCMV-G処理(1用量、1e7pfu:IC)後(1週、2週、3週、4週)のU87MG腫瘍を示す。図14Bは、VSV-LCMV(G)のIC投与(1e7pfu)に応答する顕著な腫瘍退縮を図示する流動プロットである。

【0181】

[00226]図15Aは、ヒトU87MG異種移植モデルにおけるMRB-LCMV(G)処理のインビボ有効性を説明するU87MG腫瘍のIVIS画像である。画像は、MRB-LCMV-G処理(1用量、1e7pfu:IC)後(1週、2週、3週、4週)のU87MG腫瘍を示す。図15Bは、MRB-LCMV(G)のIC投与(1e7pfu)に応答する顕著な腫瘍退縮を図示する流動プロットである。

【0182】

[00227]実施例7：マラバキメラウイルスに対する中和抗体反応

[00228]提示のウイルスに対する中和抗体の存在を定量するためのアッセイは、従前に記述された方法(Propagation, Purification, and In Vivo Testing of Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus Strains, J-S Dialloら、Oncolytic Viruses: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology Vol 797 (2012))に従って実施した。

【0183】

[00229]簡潔には、0日目に、6～8週齢の雌Balb/cマウスから50μlの伏在静脈血液をヘパリン被覆チューブへと回収し、遠心分離し、血清を取り出した。続いて、1グループ当たり3匹の動物に1e7pfuの提示のウイルスの尾静脈への注入により静脈内注入した。マウスを再び出血させ、次いで7日目に、0日目と同様にして注入した。マウスを最終時間の14日目に、末端心穿刺によって出血させた。動物由来の3時間点(0、7、14日目)それぞれからの血清を、初期希釈1/50として96ウェルプレートにわたって1:2で段階希釈した。各血清含有ウェルに、2.5e4pfu/ウェルでウイルスを注入して1時間インキュベートすることにより、1/100の初期血清希釈液を得た。次いで、血清とウイルスとの混合物を、前日に1.25e4ペロ細胞/ウェルを播種した96ウェルプレートに加えた。2日後、細胞変性作用(CPE)の証拠に関して顕微鏡検査によって単層を評価した。50パーセントCPEでの最も低い希釈液により、特定のサンプルに対する中和抗体力値が明確に決定された。

【0184】

10

20

30

40

50

[00230]図16は、VSV-LCMV(G)若しくはマラバ-LCMV(G)キメラウイルスと比較した減弱化VSV(VSV-51)又は野生型マラバウイルス(MRB-WT)で処理したBalb/Cマウスにおける中和抗体力価を図示するグラフである。野生型MRB及びVSV-51(減弱化)は著しい中和抗体力価を引き起こしたが、一方、対応するキメラVSV-LCMV(G)及びMRB-LCMV(G)は中和抗体応答を引き起こさなかった。14日目のマウス由来血清にもレシプロカル負荷を行った。野生型MRB、VSV-51(減弱化)(VSV-LCMV(G))、MRB-LCMV(G)のそれぞれから回収した血清に、それぞれMRB-LCMV(G)、VSV-LCMV(G)、VSV-51(減弱化)及び野生型MRBを負荷した。全ての場合で中和抗体応答は顕在化しなかった。

10

【0185】

[00231]実施例8：產生細胞中のキメラウイルス力価

[00232]提示のウイルスを作製するために、各ウイルスを、ベロ細胞のサブコンフルエントな単層を備えた40枚の15cmのプラスチック組織培養プレートに多重感染度0.01で接種した。20時間後に、培地を回収し、ウイルスを精製し、Dialloら、2012に従って滴定した。収率を計算し、それぞれのLCMV(G)キメラを親野生型と比較した。親株と比較したとき、MRB-LCMV(G)ウイルスは、VSV-LCMV(G)より2倍多く産出された(VSV-LCMVGの野生型VSVに対する力価比率は0.028；それと比べて、MRB-LCMV(G)の野生型MRBに対する力価比率は0.067)。

20

【0186】

[00233]上述の記載においては、説明の目的で、多数の詳細を実施例の完全な理解を提供するために明らかにした。しかしながら、当業者には、これらの特別な詳細が必須ではないことが明らかであろう。上記実施例は例示を意図するものにすぎない。本明細書に添付の特許請求の範囲によってのみ定義される本発明の範囲を逸脱することなく、当業者によって変更、修正及び変化を特定の実施形態になすことができる。

【図1】

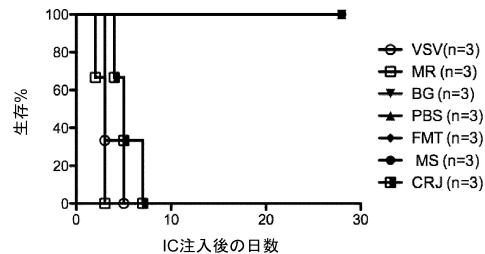


Figure 1

【図2 A】

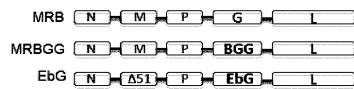


Figure 2A

【図2 C】

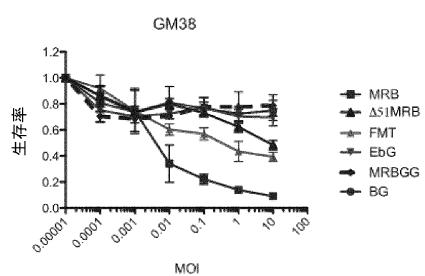


Figure 2C

Figure 2B

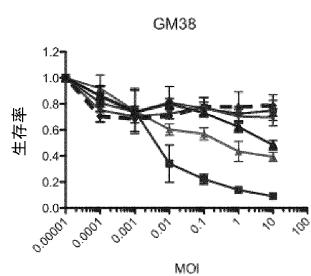
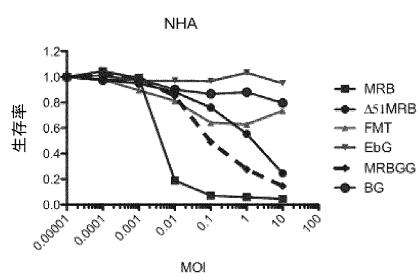


Figure 2B

【図2 B】

【図2D】

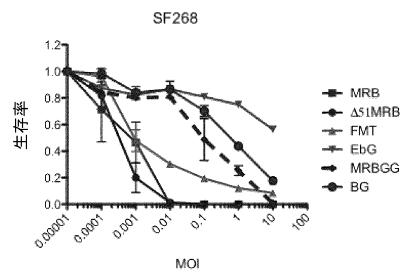


Figure 2D

【図2E】

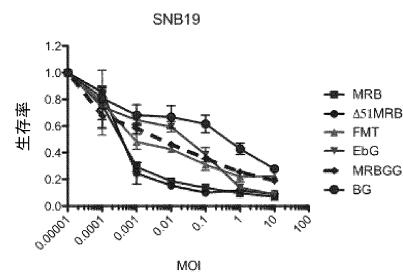


Figure 2E

【図2F】

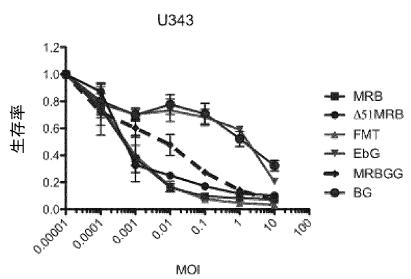


Figure 2F

【図2G】

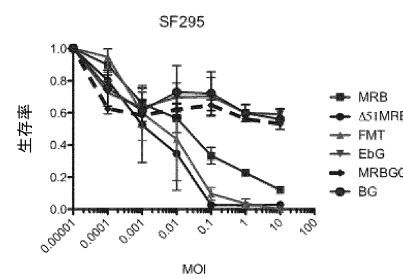


Figure 2G

【図2H】

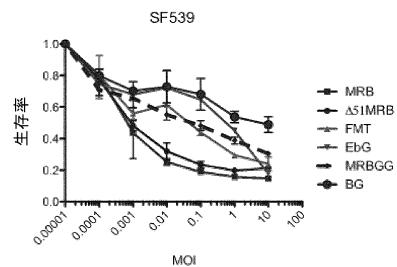


Figure 2H

【図2I】

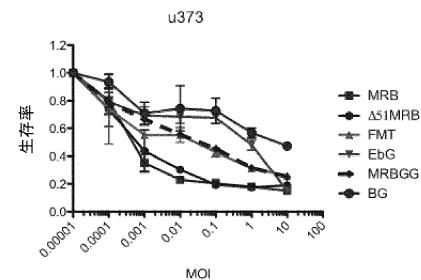


Figure 2I

【図2J】

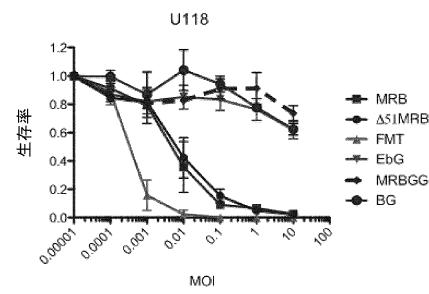


Figure 2J

【図2K】

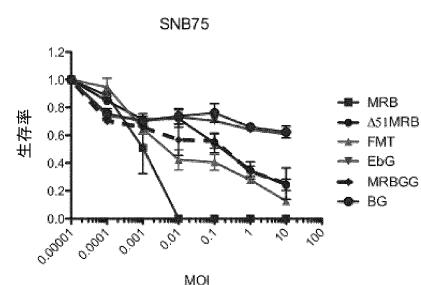


Figure 2K

【図3A】

ウイルス	1e3 pfu	1e7 pfu
VSV HR	0 (8/8)	0 (8/8)
VSV Δ51	0 (8/8)	0 (8/8)
VSV DM	0 (2/2)	0 (3/3)
MRB	0 (2/2)	0 (3/3)
MRB DM	0 (2/2)	0 (3/3)
MRB Δ51	0 (2/2)	0 (3/3)
MRB L123W	0 (2/2)	0 (3/3)
MRB Q242R	0 (2/2)	0 (3/3)
MRB V221Y	0 (2/2)	0 (3/3)
MRB V221W	0 (2/2)	0 (3/3)
CRJ	0 (2/2)	0 (3/3)
FMT	100 (4/4)	100 (10/10)
BG	100 (2/2)	100 (3/3)
MRBGG	100 (2/2)	100 (5/5)
EBG Δ51	100 (2/2)	100 (5/5)
MS	100 (2/2)	100 (5/5)

Figure 3A

【図3B】

ウイルス	3 M
FMT (IC)	0 (10/10)
FMT (IV)	0 (10/10)
MRBGG	0 (3/3)
EBG Δ51	0 (3/3)

Figure 3B

【図3C】

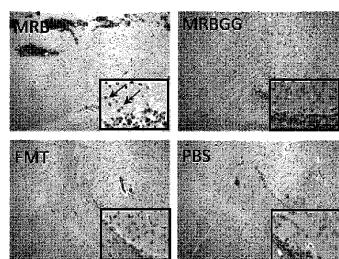


Figure 3C

【図3D】

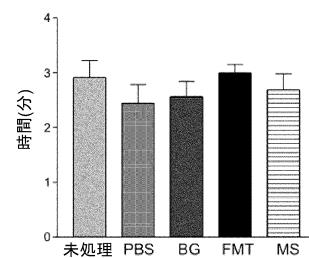


Figure 3D

【図3E】

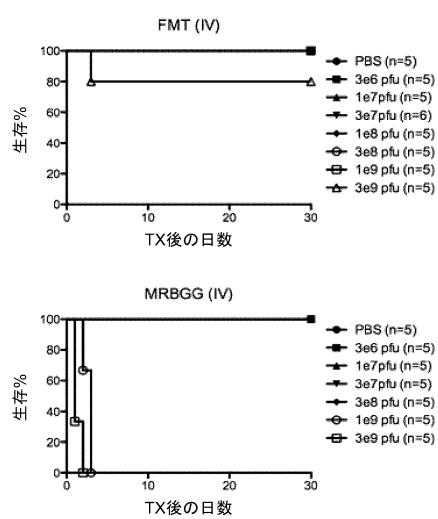


Figure 3E

【図4A】

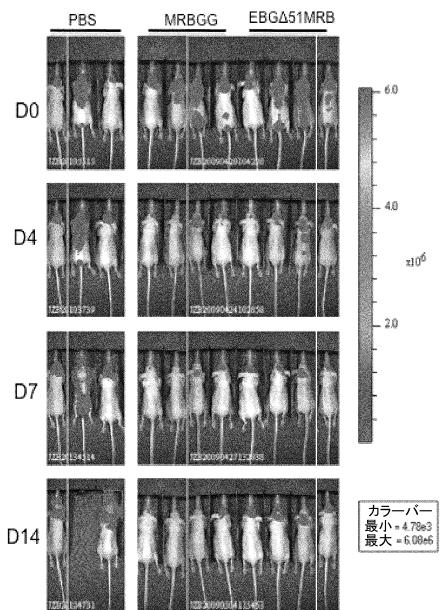


Figure 4A

【図4B】

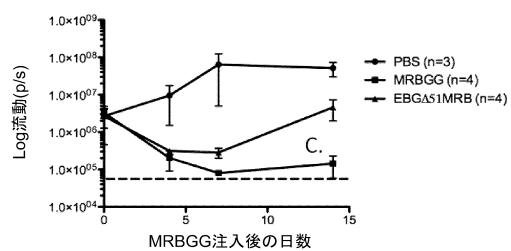


Figure 4B

【図4C】

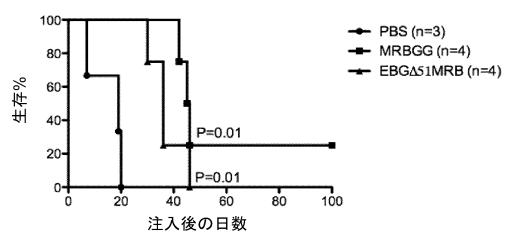


Figure 4C

【図5】

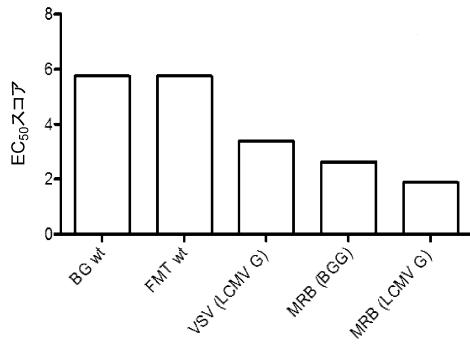


Figure 5

【図6 A】

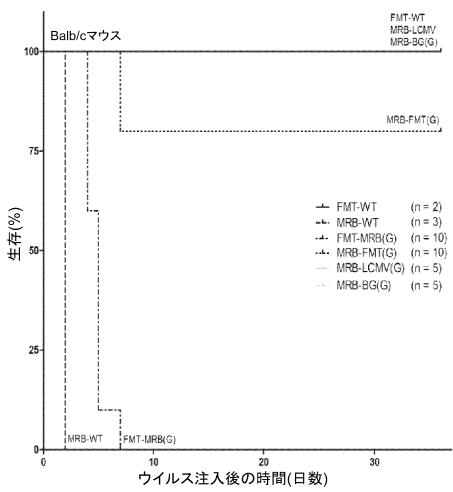


Figure 6A

【図6 B】

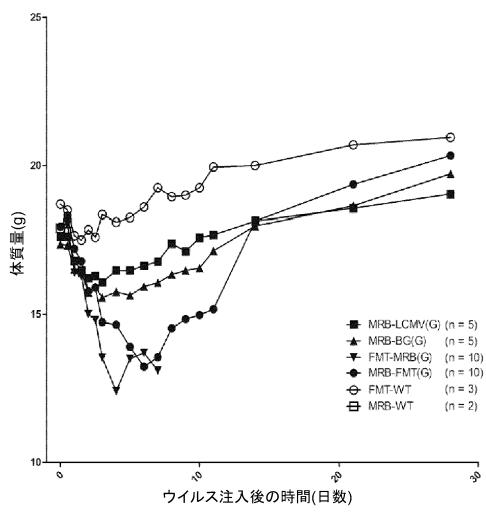


Figure 6B

【図7 A】

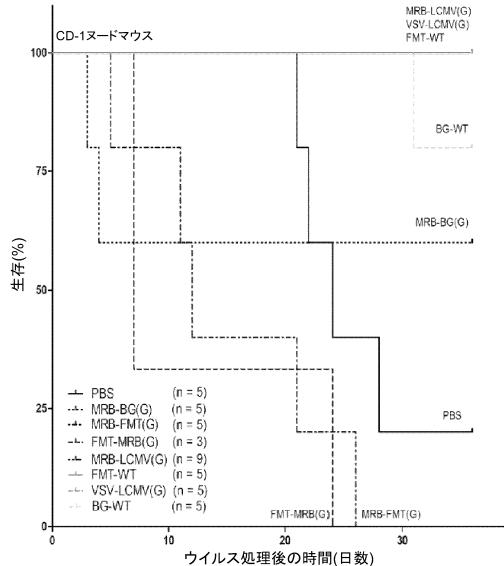


Figure 7A

【図7B】

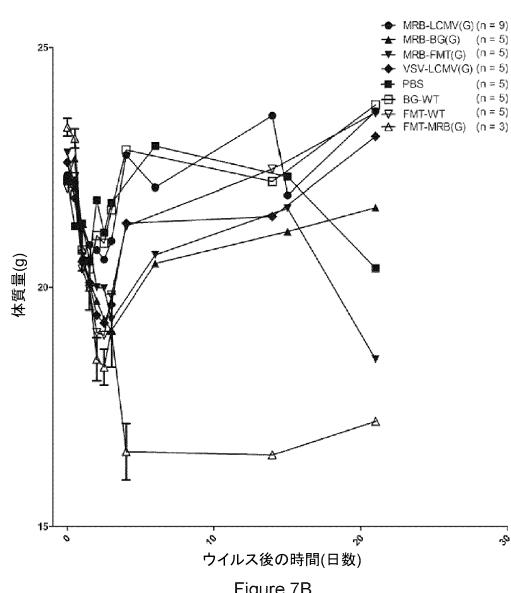


Figure 7B

【図8A】

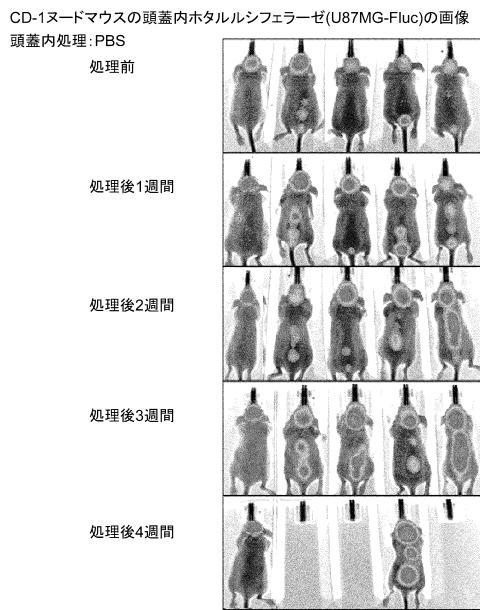


Figure 8A

【図8B】

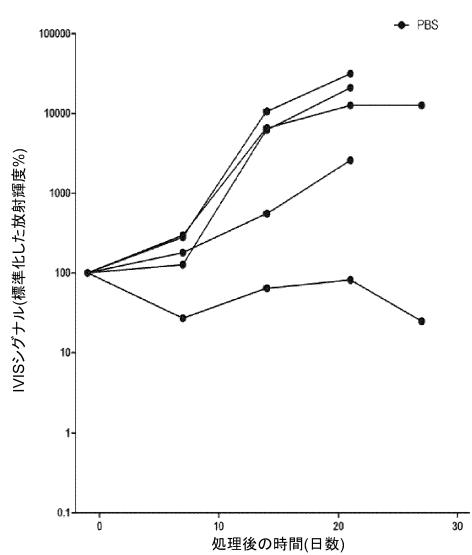


Figure 8B

【図9A】

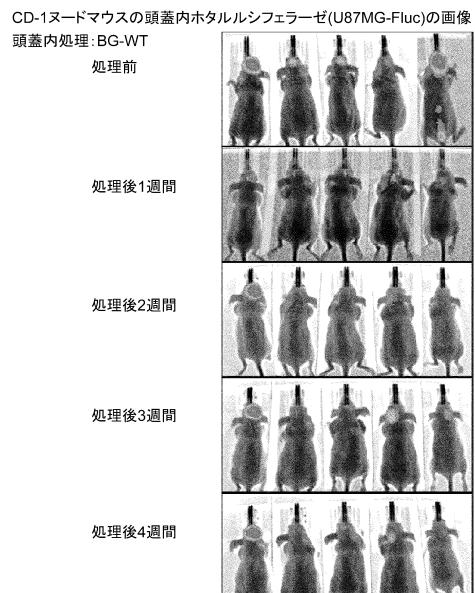
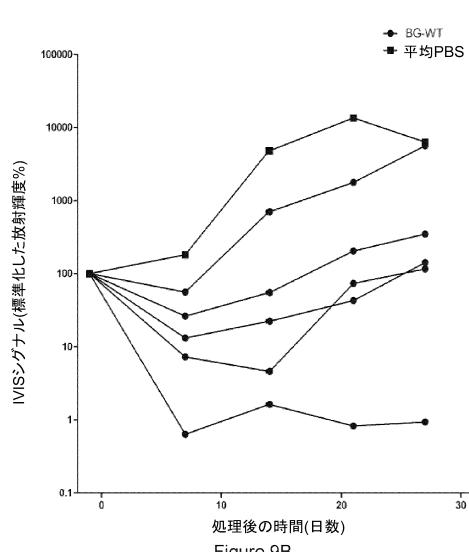
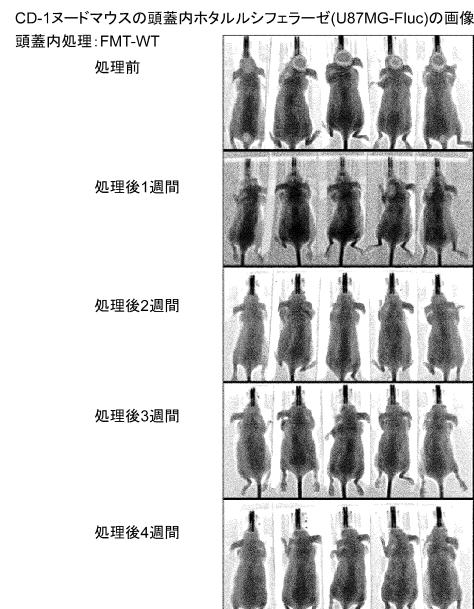


Figure 9A

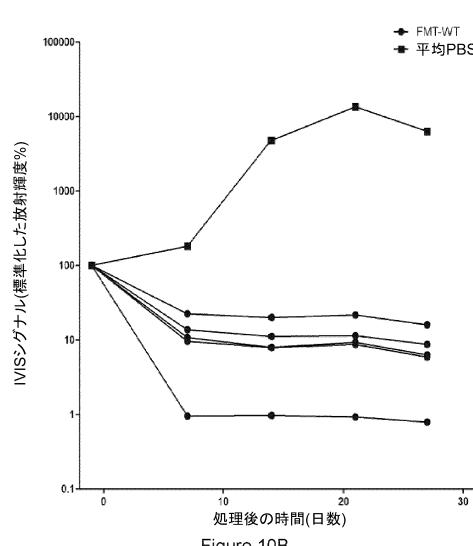
【図 9 B】



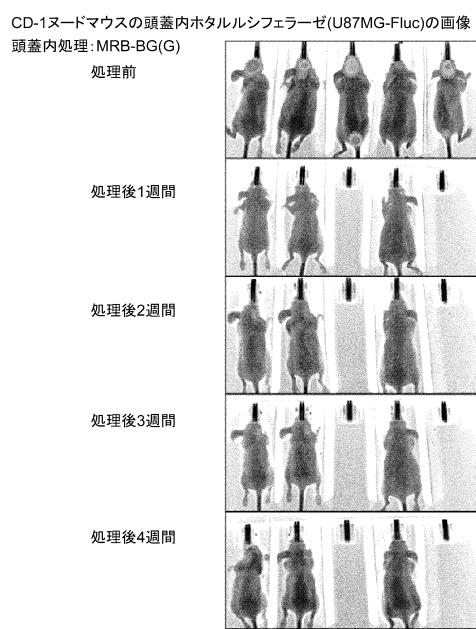
【図 10 A】



【図 10 B】



【図 11 A】



【図 1 1 B】

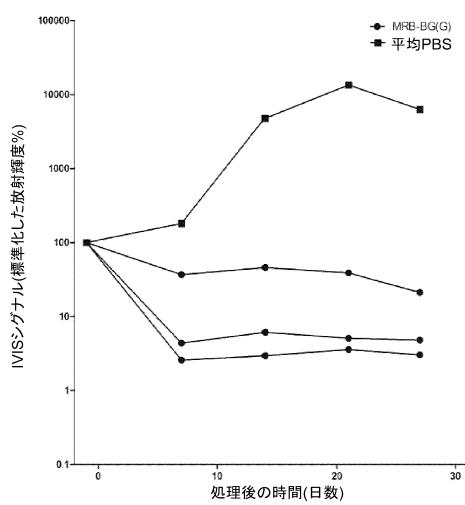


Figure 11B

【図 1 2 A】

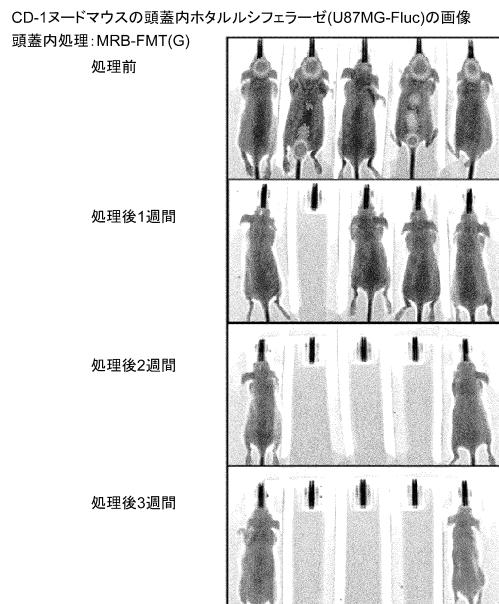


Figure 12A

【図 1 2 B】

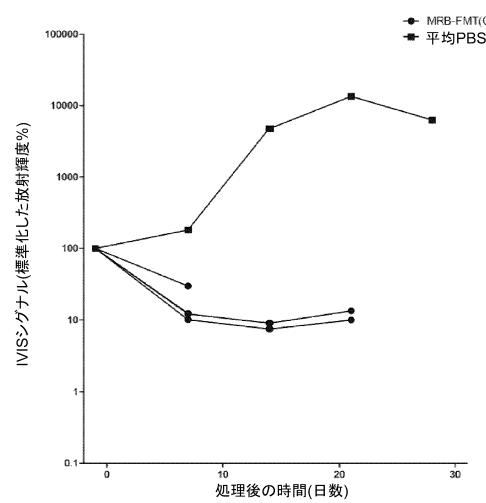


Figure 12B

【図 1 3 A】

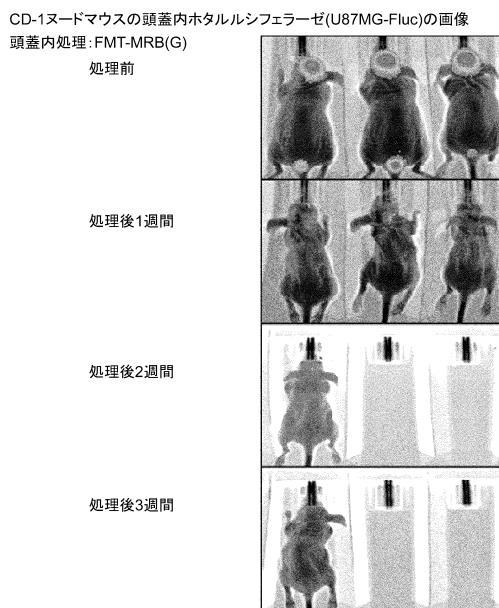


Figure 13A

【図 1 3 B】

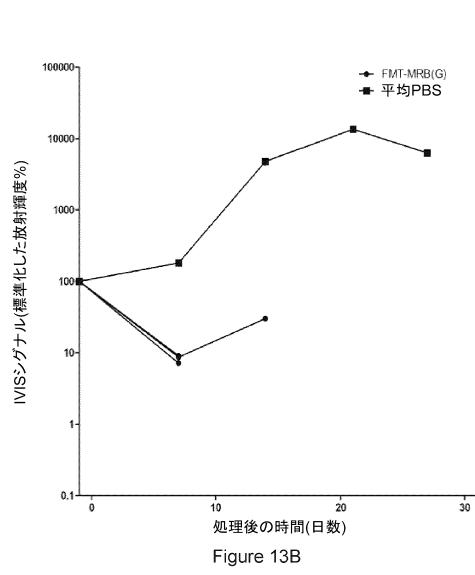


Figure 13B

【図 1 4 A】

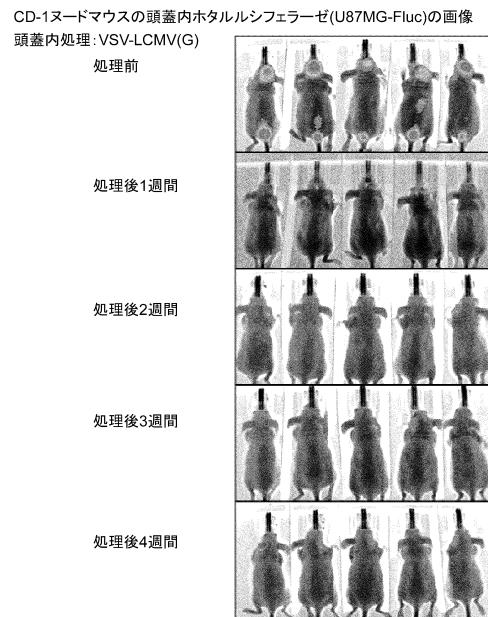


Figure 14A

【図 1 4 B】

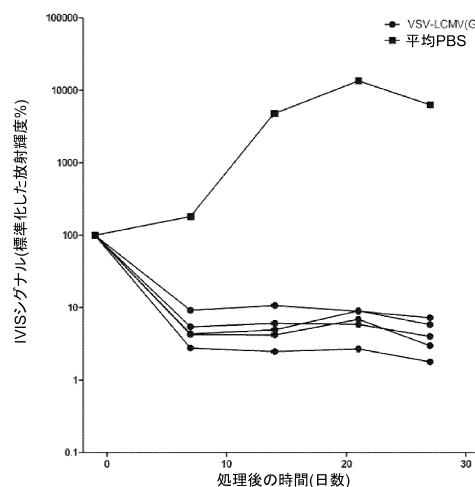


Figure 14B

【図 1 5 A】

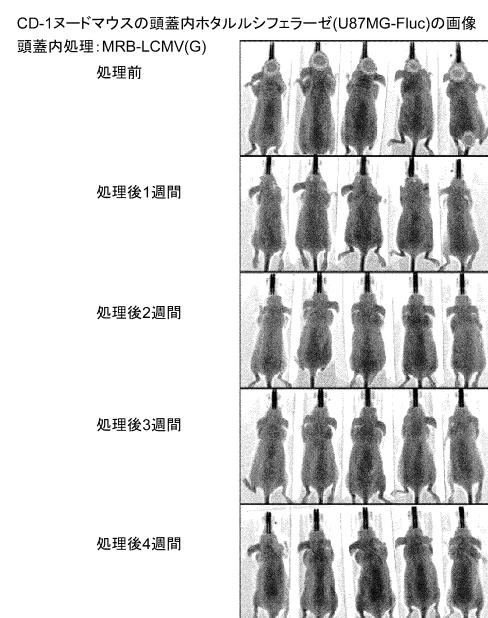


Figure 15A

【図 15B】

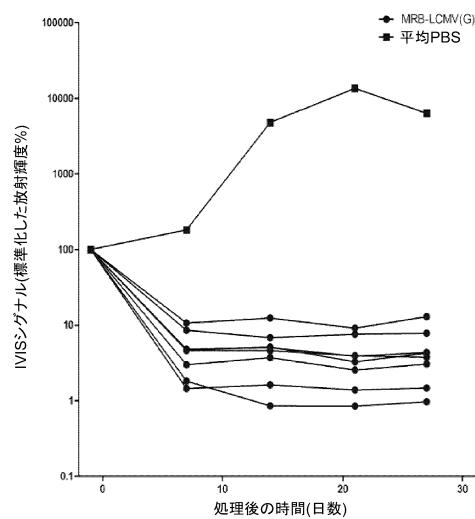


Figure 15B

【図 16】

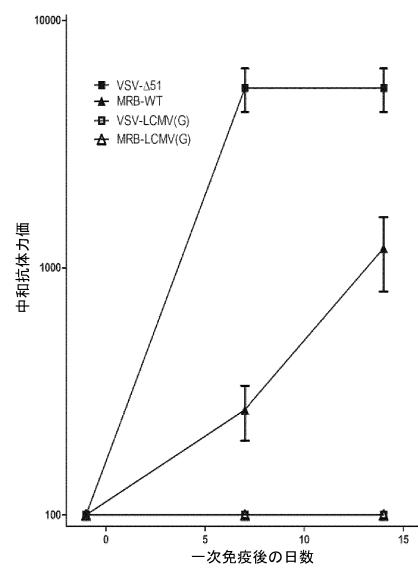


Figure 16

【配列表】

0006162818000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100162352

弁理士 酒巻 順一郎

(74)代理人 100123995

弁理士 野田 雅一

(74)代理人 100148596

弁理士 山口 和弘

(72)発明者 ストジデル, デイビッド

カナダ, オンタリオ州 ケ-1ジー 6ピ-7, オタワ, グレート オーク プライベート
17

(72)発明者 ベル, ジョン, キャメロン

カナダ, オンタリオ州 ケ-1ジー 0ケ-8, オタワ, ノックス クレセント 248

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 Journal of Virology, 2011, Vol.85, p.5679-5684

Cancer J., 2012, Vol.18, p.69-81

Journal of Virology, 2002, Vol.76, p.1488-1495

Molecular Therapy, 2002, Vol.5, p.528-537

Molecular Therapy, 2010, Vol.18, p.1440-1449

Neuro-oncology, 2011, Vol.13, iii107-iii120, ET-10

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 15 / 0 0

C 12 N 7 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

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