

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-511216

(P2007-511216A)

(43) 公表日 平成19年5月10日(2007.5.10)

| (51) Int.C1.                    | F 1                          | テーマコード (参考)                         |
|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| <b>C 1 2 N 7/00</b> (2006.01)   | C 1 2 N 7/00                 | Z N A 4 B 0 2 4                     |
| <b>A 6 1 P 35/00</b> (2006.01)  | C 1 2 N 7/00                 | 4 B 0 6 5                           |
| <b>A 6 1 K 35/76</b> (2006.01)  | A 6 1 P 35/00                | 4 C 0 8 4                           |
| <b>A 6 1 K 39/00</b> (2006.01)  | A 6 1 K 35/76                | 4 C 0 8 5                           |
| <b>A 6 1 K 39/245</b> (2006.01) | A 6 1 K 39/00                | Z 4 C 0 8 6                         |
|                                 |                              | 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 56 頁) 最終頁に続く |
| (21) 出願番号                       | 特願2006-538967 (P2006-538967) | (71) 出願人 506164453                  |
| (86) (22) 出願日                   | 平成16年11月17日 (2004.11.17)     | クルセイド ラボラトリーズ リミテッド                 |
| (85) 翻訳文提出日                     | 平成18年7月14日 (2006.7.14)       | イギリス国 ジー51 4ダブリュエフ                  |
| (86) 國際出願番号                     | PCT/GB2004/004908            | グラスゴー ストラスクライド, ピーオー                |
| (87) 國際公開番号                     | W02005/049846                | ボックス 1716                           |
| (87) 國際公開日                      | 平成17年6月2日 (2005.6.2)         |                                     |
| (31) 優先権主張番号                    | 0326798.6                    | (71) 出願人 399026731                  |
| (32) 優先日                        | 平成15年11月17日 (2003.11.17)     | スローン - ケタリング・インスティテ                 |
| (33) 優先権主張国                     | 英国(GB)                       | ュート・フォー・キャンサー・リサーチ                  |
| (31) 優先権主張番号                    | 60/541,308                   | アメリカ合衆国、ニューヨーク州 100                 |
| (32) 優先日                        | 平成16年2月3日 (2004.2.3)         | 21、ニューヨーク、ヨーク・アベニュー                 |
| (33) 優先権主張国                     | 米国(US)                       | 1275                                |

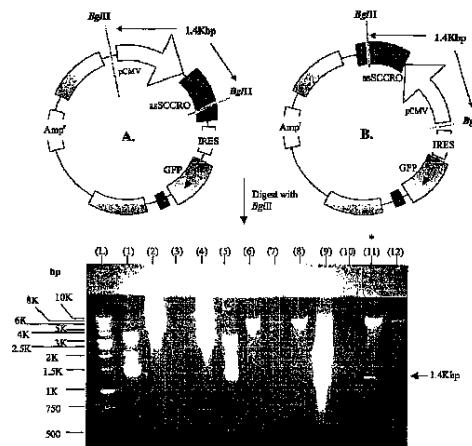
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】変異ウイルス

## (57) 【要約】

そのゲノムが扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCRO)をコードする核酸を含む単純ヘルペスウイルス、ならびに、そのゲノムが扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることが可能である小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子をコードする核酸を含む単純ヘルペスウイルスを、そのようなウイルスの製造方法および用途と共に開示する。

【選択図】図 1 1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

単純ヘルペスウイルスであって、該単純ヘルペスウイルスのゲノムが、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCRO)をコードする核酸を含む、上記単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 2】**

前記核酸が、哺乳動物asSCCROをコードする、請求項1に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 3】**

前記核酸が、ヒトasSCCROをコードする、請求項1に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 4】**

前記核酸が：

(i)配列番号1もしくは3のポリヌクレオチド配列またはそれらの相補体；

(ii)配列番号1もしくは3のmRNA転写物；あるいは

(iii)該ポリヌクレオチド配列またはmRNA転写物の断片、

に対して相補的なヌクレオチド配列をコードする、請求項1に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 5】**

前記核酸が：

(i)配列番号1もしくは3のポリヌクレオチド配列またはそれらの相補体；

(ii)配列番号1もしくは3のmRNA転写物；あるいは

(iii)該ポリヌクレオチド配列またはmRNA転写物の断片、

に対して相補的なヌクレオチド配列と少なくとも60%の配列同一性を有するヌクレオチド配列をコードする、請求項1に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 6】**

前記配列同一性の程度が、少なくとも70%である、請求項5に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 7】**

前記断片が、少なくとも20ヌクレオチドであって、かつ900ヌクレオチド以下である、請求項4～6のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 8】**

前記核酸が：

(i)配列番号1もしくは3のポリヌクレオチド配列またはそれらの相補体；

(ii)配列番号1もしくは3のmRNA転写物；あるいは

(iii)該ポリヌクレオチド配列またはmRNA転写物の断片、

と高ストリングエントな条件下にてハイブリダイズする、請求項1に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 9】**

前記単純ヘルペスウイルスのゲノムが、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCRO)をコードする前記核酸に機能的に連結されている調節配列をさらに含み、該調節配列が、該asSCCROの転写を制御する役割を有する、請求項1～8のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 10】**

前記核酸が、単純ヘルペスウイルスのゲノムの少なくとも1つのRL1遺伝子座に配置されている、請求項1～9のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 11】**

前記核酸が、単純ヘルペスウイルスのゲノムの少なくとも1つのICP34.5タンパク質コード配列に配置されているか、または該配列と重複している、請求項1～10のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 12】**

10

20

30

40

50

前記単純ヘルペスウイルスが、HSV-1 17株もしくはHSV-1 F株またはHSV-2 HG52株の1つの変異体である、請求項1～11のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項13】

前記単純ヘルペスウイルスが、HSV-1 17株変異体1716の変異体である、請求項1～11のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項14】

遺伝子特異的ヌル変異体である、請求項1～13のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項15】

ICP34.5ヌル変異体である、請求項1～14のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。 10

【請求項16】

少なくとも1つの発現可能なICP34.5遺伝子を欠いている、請求項1～13のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項17】

発現可能なICP34.5遺伝子を1つだけ欠いている、請求項1～12のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項18】

非神経毒性である、請求項1～17のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項19】

asSCCROをコードする前記核酸が、単純ヘルペスウイルスのゲノムに組み込まれている核酸カセットの一部を形成しており、該カセットが：

- (a)該asSCCRO；ならびに
- (b)リボソーム結合部位；および
- (c)マーカー、

をコードする核酸を含み、該asSCCROをコードする核酸が、該リボソーム結合部位の5'側上流に配置されており、かつ該リボソーム結合部位が、該マーカーの5'側上流に配置されている、請求項1～18のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項20】

調節ヌクレオチド配列が、asSCCROをコードする前記核酸の5'側上流に配置されており、該調節ヌクレオチド配列が、該asSCCROをコードする核酸の転写を調節する役割を有する、請求項19に記載の単純ヘルペスウイルス。 30

【請求項21】

前記カセットがタンパク質コード配列を破壊して、各遺伝子産物の不活性化を生じさせる、請求項19または20に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項22】

前記カセットの転写産物が、前記asSCCROをコードする第1シストロンおよび前記マーカー核酸をコードする第2シストロンを含むバイシストロン転写物またはポリシストロン転写物であり、前記リボソーム結合部位が、該第1シストロンと該第2シストロンとの間に配置されている、請求項19～21のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。 40

【請求項23】

前記リボソーム結合部位が、インターナルリボソームエントリー部位(IRES)を含む、請求項19～22のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項24】

前記マーカーが、ポリペプチドをコードしている所定のヌクレオチド配列である、請求項19～22のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項25】

前記マーカーが、緑色蛍光タンパク質(GFP)のタンパク質コード配列または増強された緑色蛍光タンパク質(EGFP)のタンパク質コード配列を含む、請求項24に記載の単純ヘルペスウイルス。 50

**【請求項 26】**

前記マークーが、高ストリンジエントな条件下にて、標識された対応する核酸プローブを用いたハイブリダイゼーションによって検出可能である所定のヌクレオチド配列を含む、請求項19～23のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 27】**

前記カセットが、マークーをコードしている前記核酸の3'側下流に配置されているポリアデニル化配列をコードする核酸をさらに含む、請求項19～26のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 28】**

前記ポリアデニル化配列が、サルウイルス40(SV40)ポリアデニル化配列を含む、請求項27に記載の単純ヘルペスウイルス。 10

**【請求項 29】**

医療の治療方法に使用するための、請求項1～28のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 30】**

癌治療に使用するための、請求項1～28のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。 20

**【請求項 31】**

腫瘍の腫瘍崩壊性治療に使用するための、請求項1～28のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 32】**

癌治療のための医薬品の製造における、請求項1～28のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルスの使用。

**【請求項 33】**

*in vitro*または*in vivo*において腫瘍細胞を溶解または殺すための方法であって、該方法は、請求項1～28のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルスを治療を必要としている患者に投与する段階を包含する、上記方法。 30

**【請求項 34】**

請求項1～28のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルスを含む、医薬品、医薬組成物またはワクチン。

**【請求項 35】**

製薬上許容される担体、アジュバントまたは希釈剤をさらに含む、請求項34に記載の医薬品、医薬組成物またはワクチン。

**【請求項 36】**

単純ヘルペスウイルスであって、該ウイルスのゲノムが、少なくとも1つの長反復領域( $R_L$ )内に扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCRO)をコードする核酸配列を含む、上記単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 37】**

非神経毒性である単純ヘルペスウイルスであって、該ウイルスのゲノムが、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCRO)をコードする核酸配列を含む、上記単純ヘルペスウイルス。 40

**【請求項 38】**

腫瘍の治療に使用するための単純ヘルペスウイルスであって、該ウイルスのゲノムが、少なくとも1つの長反復領域( $R_L$ )内に扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCRO)をコードしている核酸配列を含む、上記単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 39】**

腫瘍の治療に使用するための、非神経毒性である単純ヘルペスウイルスであって、該ウイルスのゲノムが、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCRO)をコードしている核酸配列を含む、上記単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 40】**

50

癌治療のための医薬品の製造における、単純ヘルペスウイルスの使用であって、該ウイルスのゲノムが少なくとも1つの長反復領域( $R_L$ )内に、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCRO)をコードしている核酸配列を含む、上記使用。

【請求項41】

癌治療のための医薬品の製造における、非神経毒性である単純ヘルペスウイルスの使用であって、該ウイルスのゲノムが、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCRO)をコードしている核酸配列を含む、上記使用。

【請求項42】

腫瘍治療のための方法であって、該方法が治療を必要としている患者に単純ヘルペスウイルスを投与する段階を包含し、該ウイルスのゲノムが少なくとも1つの長反復領域( $R_L$ )内に扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCRO)をコードしている核酸配列を含む、上記方法。

【請求項43】

腫瘍治療のための方法であって、該方法が治療を必要としている患者に非神経毒性である単純ヘルペスウイルスを投与する段階を包含し、該ウイルスのゲノムが、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCRO)をコードしている核酸配列を含む、上記方法。

【請求項44】

前記単純ヘルペスウイルスが、腫瘍細胞を殺すことができる、請求項42または43に記載の方法。

【請求項45】

in vitroまたはin vivoにおいて、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCRO)を発現させる方法であって、該方法が少なくとも1つの目的の細胞または組織に単純ヘルペスウイルスを感染させる段階を包含し、該ウイルスのゲノムが少なくとも1つの長反復領域( $R_L$ )内に、転写調節配列に機能的に連結されているasSCCROをコードしている核酸配列を含む、上記方法。

【請求項46】

in vitroまたはin vivoにおいて、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCRO)を発現させる方法であって、該方法が少なくとも1つの目的の細胞または組織に非神経毒性の単純ヘルペスウイルスを感染させる段階を包含し、該ウイルスのゲノムが、転写調節配列に機能的に連結されているasSCCROをコードしている核酸配列を含む、上記方法。

【請求項47】

HSV1716asSCCRO(ECACC受託番号04051901)。

【請求項48】

単純ヘルペスウイルスであって、該単純ヘルペスウイルスのゲノムが、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることができる小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子をコードしている核酸を含む、上記単純ヘルペスウイルス。

【請求項49】

前記siRNAが、哺乳動物SCCROの発現を抑制またはサイレンシングすることができる、請求項48に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項50】

前記siRNAが、ヒトSCCROの発現を抑制またはサイレンシングすることができる、請求項48に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項51】

前記siRNAが、10~70ヌクレオチドの長さで、かつ配列番号5の配列を有する核酸またはその相補体を含む、請求項48に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項52】

前記siRNAが、10~70ヌクレオチドの長さで、かつ配列番号5と少なくとも70%の同一性

10

20

30

40

50

を有する核酸、またはその相補体を含む、請求項4～8に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項5～3】

前記配列同一性の程度が少なくとも80%である、請求項5～2に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項5～4】

前記単純ヘルペスウイルスのゲノムが、前記siRNAに機能的に連結されている調節配列をさらに含み、該調節配列が該siRNAの転写を制御する役割を有する、請求項4～5～3のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項5～5】

前記核酸が、単純ヘルペスウイルスのゲノムの少なくとも1つのRL1遺伝子座に配置されている、請求項4～5～4のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項5～6】

前記核酸が、単純ヘルペスウイルスのゲノムの少なくとも1つのICP34.5タンパク質コード配列に配置されているか、または該配列と重複している、請求項4～5～5のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項5～7】

前記単純ヘルペスウイルスが、HSV-1 17株もしくはHSV-1 F株またはHSV-2 HG52株の1つの変異体である、請求項4～5～6のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項5～8】

前記単純ヘルペスウイルスが、HSV-1 17株変異体 1716の変異体である、請求項4～5～6のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項5～9】

遺伝子特異的ヌル変異体である、請求項4～5～8のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項6～0】

ICP34.5ヌル変異体である、請求項4～5～9のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項6～1】

少なくとも1つの発現可能なICP34.5遺伝子を欠く、請求項4～5～8のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項6～2】

発現可能なICP34.5遺伝子を1つだけ欠く、請求項4～5～7のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項6～3】

非神経毒性である、請求項4～6～2のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項6～4】

前記siRNAをコードしている前記核酸が、前記単純ヘルペスウイルスのゲノムに組み込まれている核酸カセットの一部を形成し、該カセットが：

(a)該siRNA；ならびに以下をコードしている核酸：

(b)第1調節ヌクレオチド配列；および

(c)マーカー、

をコードしている核酸を含み、

siRNAをコードしている核酸が、該第1調節ヌクレオチド配列の5'側上流に配置されており、該第1調節ヌクレオチド配列が、該マーカーの5'側上流に配置されており、該第1調節配列が、該マーカーの転写を制御する役割を有する、請求項4～6～3のいずれか1項に記載の単純ヘルペスウイルス。

【請求項6～5】

第2調節ヌクレオチド配列が、前記siRNAをコードしている核酸の5'側上流に配置されており、該第2調節ヌクレオチド配列が、該siRNAをコードしている核酸の転写を制御する役割を有する、請求項6～4に記載の単純ヘルペスウイルス。

10

20

30

40

50

**【請求項 6 6】**

前記カセットがタンパク質コード配列を破壊して、各遺伝子産物の不活性化を生じさせる、請求項 6 4 または 6 5 に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 6 7】**

前記マークーが、ポリペプチドをコードしている所定のヌクレオチド配列である、請求項 6 4 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 6 8】**

前記マークーが、緑色蛍光タンパク質(GFP)のタンパク質コード配列または増強された緑色蛍光タンパク質(EGFP)のタンパク質コード配列を含む、請求項 6 7 に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 6 9】**

前記マークーが、高ストリンジエントな条件下にて、標識された対応する核酸プローブを用いたハイブリダイゼーションによって検出可能である所定のヌクレオチド配列を含む、請求項 6 4 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 7 0】**

前記カセットが、前記マークーをコードしている核酸の 3' 側下流に配置されているポリアデニル化配列をコードしている核酸をさらに含む、請求項 6 4 ~ 6 9 のいずれか 1 項に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 7 1】**

前記ポリアデニル化配列が、サルウイルス 40 (SV40) ポリアデニル化配列を含む、請求項 7 0 に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 7 2】**

医療の治療方法に使用するための、請求項 4 8 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 7 3】**

癌治療に使用するための、請求項 4 8 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 7 4】**

腫瘍の腫瘍崩壊性治療に使用するための、請求項 4 8 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載の単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 7 5】**

癌治療のための医薬品の製造における、請求項 4 8 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載の単純ヘルペスウイルスの使用。

**【請求項 7 6】**

*in vitro* または *in vivo* において腫瘍細胞を溶解または殺す方法であって、該方法が、治療を必要としている患者に請求項 4 8 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載の単純ヘルペスウイルスを投与する段階を包含する、上記方法。

**【請求項 7 7】**

請求項 4 8 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載の単純ヘルペスウイルスを含む、医薬品、医薬組成物またはワクチン

**【請求項 7 8】**

製薬上許容される担体、アジュバントまたは希釈剤をさらに含む、請求項 7 7 に記載の医薬品、医薬組成物またはワクチン。

**【請求項 7 9】**

単純ヘルペスウイルスであって、該ウイルスのゲノムが、少なくとも 1 つの長反復領域( $R_L$ )内に扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることが可能である小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子をコードしている核酸配列を含む、上記単純ヘルペスウイルス。

**【請求項 8 0】**

非神経毒性である単純ヘルペスウイルスであって、該ウイルスのゲノムが、扁平上皮細

10

20

30

40

50

胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることが可能である小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子をコードしている核酸配列を含む、上記単純ヘルペスウイルス。

【請求項 8 1】

腫瘍の治療に使用するための単純ヘルペスウイルスであって、該ウイルスのゲノムが、少なくとも1つの長反復領域( $R_L$ )内に扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることが可能である小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子をコードしている核酸配列を含む、上記単純ヘルペスウイルス。

【請求項 8 2】

腫瘍の治療に使用するための、非神経毒性である単純ヘルペスウイルスであって、該ウイルスのゲノムが、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることが可能である小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子をコードする核酸配列を含む、上記単純ヘルペスウイルス。

【請求項 8 3】

癌治療のための医薬品の製造における、単純ヘルペスウイルスの使用であって、該ウイルスのゲノムが、少なくとも1つの長反復領域( $R_L$ )内に扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることが可能である小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子をコードしている核酸配列を含む、上記使用。

【請求項 8 4】

癌治療のための医薬品の製造における、非神経毒性である単純ヘルペスウイルスの使用であって、該ウイルスのゲノムが、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることが可能である小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子をコードしている核酸配列を含む、上記使用。

【請求項 8 5】

腫瘍治療のための方法であって、該方法が、治療を必要としている患者に単純ヘルペスウイルスを投与する段階を含み、該ウイルスのゲノムが少なくとも1つの長反復領域( $R_L$ )内に、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることが可能である小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子をコードしている核酸配列を含む、上記方法。

【請求項 8 6】

腫瘍治療のための方法であって、該方法が、治療を必要としている患者に非神経毒性である単純ヘルペスウイルスを投与する段階を包含し、該ウイルスのゲノムが扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることが可能である小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子をコードしている核酸配列を含む、上記方法。

【請求項 8 7】

前記単純ヘルペスウイルスが腫瘍細胞を殺すことができる、請求項8 5または8 6に記載の方法。

【請求項 8 8】

*in vitro*または*in vivo*において扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることが可能である小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子を発現する方法であって、該方法が、少なくとも1つの目的の細胞または組織に単純ヘルペスウイルスを感染させる段階を包含し、該方法において、該ウイルスのゲノムが、少なくとも1つの長反復領域( $R_L$ )内に、転写調節配列に機能的に連結されている該siRNAをコードしている核酸配列を含む、上記方法。

【請求項 8 9】

*in vitro*または*in vivo*において扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることが可能である小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子を発現する方法であって、該方法が、少なくとも1つの目的の細胞または組織に非神経毒性の単純ヘルペスウイルスを感染させる段階を包含し、該ウイルスのゲノムが

10

20

30

40

50

、転写調節配列に機能的に連結されている該siRNAをコードしている核酸配列を含む、上記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)および変異単純ヘルペスウイルスに関する物質および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

単純ヘルペスウイルス(HSV)ゲノムは、共有結合した2つのセグメント(長い(L)および短い(S)と示される)を含む。各セグメントは、1対の逆方向の末端反復配列に隣接して配置されている特有の配列を含む。長い反復配列(RLまたはRL)と短い反復配列(RSまたはRS)とは明確に異なる。

【0003】

広く研究されているHSV ICP34.5(または34.5)遺伝子<sup>1,6,7,8</sup>は、HSV-1 F株<sup>9</sup>およびHSV-1 syn17+株<sup>3</sup>ならびにHSV-2 HG52株<sup>4</sup>で配列決定された。ICP34.5遺伝子の1つのコピーは、各RL反復領域内に配置されている。ICP34.5遺伝子の両コピーが不活性である変異体(すなわち、ヌル変異体)である、HSV-1 17株変異体 1716<sup>2</sup>(HSV1716)またはHSV-1 F株<sup>5</sup>の変異体R3616もしくはR4009などは神経毒性を欠く、すなわち、無毒性であることが知られており、遺伝子送達ベクターとしてまたは腫瘍崩壊による腫瘍治療に有用性を有する。HSV-1 17株変異体 1716は、各RL反復のBamHI s制限断片内に配置されているICP34.5遺伝子の各コピーに759bpの欠失を有する。

【0004】

ICP34.5ヌル変異体である1716などは、事実上、第1世代の腫瘍崩壊性(oncolytic)ウイルスである。ほとんどの腫瘍は個々別々の特性を示し、広域型の第1世代腫瘍崩壊性ウイルスの、すべての腫瘍型に対する有効な治療における複製能または該有効な治療を提供する能力は保証されていない。

【0005】

HSV 1716は、EP 0571410およびWO 92/13943に記載されており、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約(本明細書中では「ブタペスト条約」という)に従って、the European Collection of Animal Cell Cultures, Vaccine Research and Production Laboratories, Public Health Laboratory Services, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, United Kingdomに受託番号V92012803のもと、1992年1月28日に寄託されている。

【0006】

頭頸部の扁平上皮細胞癌は、欧洲、北米および極東において毎年、推定125,000人の患者を苦しめている。局所的疾患の初期治療は、外科手術およびアジュバント放射線治療である。腫瘍は、およそ3分の1の患者において再発する。一度、癌が再発および/または転移すると、患者は治療しがたいものとみなされる。併用化学療法が、30~50%の患者において応答を誘導するが、生存に明確に影響を与えるものではない。未だに、より効果的な治療法<sup>12,13</sup>に対する切迫した要求が存在する。

【0007】

この疾患に対して新規の治療法を用いることに非常に关心がもたれており、とりわけ、直接的に腫瘍内に注射する腫瘍崩壊性ウイルスが注目されている。正常細胞に影響を及ぼさないで、腫瘍を選択的に殺していく腫瘍崩壊性ウイルスを用いることは非常に魅力的な考えである。それは、従来の様式で生じる毒性を制限する可能性を有するためである。近年の研究では再発性疾患の局所的抑制のために、選択的に複製するアデノウイルス(Onyx-015)を腫瘍内に注射して行っている。ウイルスのみおよびウイルスと化学療法との組合せ

10

20

30

40

50

を含むフェーズI/II臨床試験が有望な結果を示している<sup>14, 15, 16</sup>。

【0008】

選択的に複製する単純ヘルペスウイルス HSVは、そのより強力な複製および腫瘍崩壊能力により、より良い効能を有しているかもしれない。HSV1716<sup>17</sup>は、単純ヘルペスウイルスの欠失変異体であり、病原性タンパク質であるICP34.5を合成することができない。HSV1716は、活発に分裂する細胞においては複製するが、休止細胞または分化を終えた細胞においては複製しないことが示されている<sup>18, 19</sup>。In vivoにおけるHSV1716投与は、黒色腫、奇形癌、神経膠腫、髓芽腫および中皮腫を含むある範囲の癌のマウスモデルで行われた。HSV1716投与の後、動物は改善された生存および腫瘍退縮を示した<sup>20, 21, 22, 23, 24, 25</sup>。このHSV1716については、正常組織における複製の証拠も毒性もなかった。HSV1716は、神経膠芽腫多形 (glioblastoma multiforme: GBM)<sup>26</sup>、黒色腫および頭頸部癌を有する患者におけるフェーズ1臨床試験で用いられた。毒性を経験することなく、患者は前HSV1716血清変換され血清反応陽性であり、腫瘍内にウイルス複製が含まれた証拠が得られた。

【0009】

新規癌遺伝子 SCCRO(扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(Oncoseqとも、しばしばSCROとも称される))が、30%の粘膜扁平上皮細胞癌において増幅されており、そしてその過剰発現が、頭頸部の癌患者における悪い予後と関連があることが示されている。

【0010】

Oncoseq核酸配列が、US 10/361,725(公開番号US 2004/0009541、2004年1月15日公開)に記載されている。この書類は、その全体が参照として本明細書中に援用されている。Oncoseqの780個のヌクレオチドのオープン・リーディング・フレームを含むポリヌクレオチド配列およびそれによってコードされる259残基ポリペプチドのアミノ酸配列が報告された。

【0011】

US 2004/0009541によって、原発性扁平上皮細胞癌組織で同定された癌遺伝子であるOncoseq対立遺伝子が記載されている。このOncoseqは、3q26.3遺伝子座内の最も高い遺伝子複製ピークと共に局在しており、これら癌において大いに複製されているOncoseqを用いたポジショナル・クローニング法を用いて同定される。Oncoseqの過剰発現が、遺伝子複製、進行性の臨床動態 (aggressive clinical behaviour)、およびin vitroにおける悪性のトランスフォーメーション、と関連することが記載されている。これらのことからOncoseqが3q増幅標的の有力な候補となる。この遺伝子は、まさに癌遺伝子であり、塩基性領域-ヘリックス-ループ-ヘリックス-ロイシン・ジッパー・モチーフを有することが記載されている。これはこの遺伝子が転写因子として機能しうることを示唆している。

【0012】

RNAi

RNAiは、標的メッセンジャーRNA(mRNA)に対して小さな二本鎖RNA分子(dsRNA)を用いる。この標的メッセンジャーRNA(mRNA)は、細胞がその遺伝子コードを機能的タンパク質に翻訳するために用いる前駆体分子である。RNAiの天然の過程では、dsRNAは、21ヌクレオチドの長さの短い干渉RNA(siRNA)二重鎖に切断され、これらの分子は、(相補的な塩基対の結合による)酵素的分解のために、相同の(内在性)mRNA配列を認識し、該配列を標的とし、その結果、遺伝子サイレンシングが生じる。

【0013】

アンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他の遺伝子ターゲッティング・ストラテジーよりもRNAiの有利な点には、その相対的な特異性、その増強された効能(わずかnM量のsiRNAが、効率的な遺伝子サイレンシングに必要とされる)、およびsiRNA処理はすべての細胞に備わっている天然RNAi経路に入るという事実、が含まれる。

【0014】

siRNAによる遺伝子サイレンシングがうまくいかかどうかは、遺伝子標的および標的とされる細胞型によって非常に変化しうる。

【発明の開示】

10

20

30

40

50

**【課題を解決するための手段】****【0015】****発明の概要**

本発明者らは、プラスミド RL1.dIRES-GFPを用いてシャトルベクターを作製した。このシャトルベクターは、RL1.dCMV-asSCCRO-GFPと称され、CMV IE プロモータの下流の方向に配置されたヒトアンチセンス扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)を含み、アンチセンス療法に使用するためのアンチセンス RNA転写物を生成する。

**【0016】**

このシャトルベクターを用いて、本発明者らは新規の第2世代変異体 HSVを提供する。この第2世代変異体 HSVは、HSV1716/CMV-asSCCRO/GFPと称する(HSV1716asSCCROとも称される)。この変異体 HSVのゲノムは、1つのまたは各ICP34.5遺伝子座に挿入されている異種の(すなわち、HSV由来のものではない)アンチセンス SCCROをコードする核酸を含む。この異種のアンチセンス SCCROは、ICP34.5タンパク質コード配列を破壊し、その結果、ICP34.5遺伝子は機能せず、機能的ICP34.5遺伝子産物を発現することができない。生じたHSVは、アンチセンス RNA転写物をCMV IE プロモータの制御下で発現することが可能である。このアンチセンス RNA転写物は、センスSCCROヌクレオチド配列(例えば、SCCRO mRNAまたはゲノムSCCRO)に結合することによって、SCCRO遺伝子の作用を抑制することが可能である。このウイルスは、HSV-1 17株変異体1716の腫瘍崩壊性(oncolytic)活性を保持し、標的アンチセンスヌクレオチド送達ストラテジーおよび治療方法に用いることが可能である。

**【0017】**

代替的な実施形態において、アンチセンスをコードする核酸を組み込む代わりに、本発明者らは単純ヘルペスウイルスのゲノムにsiRNAを組み込んだ。このsiRNAは好ましくは、単純ヘルペスウイルスに異種性であり、単純ヘルペスウイルスのゲノムから発現することが可能である。1つの好ましい実施形態において、組み込まれている核酸は、機能的SCCRO遺伝子産物を標的としその発現を抑制または阻害することが可能であるsiRNAをコードする。このsiRNAが発現された場合、機能的SCCRO遺伝子産物の発現を完全にまたは部分的にサイレンシングするように作用する。

**【0018】**

本発明により単純ヘルペスウイルスによって発現された異種のasSCCROは、SCCRO遺伝子産物またはその発現された機能を抑制またはサイレンシングするRNAベースのアンチセンス治療方法に有用で有りうる。

**【0019】**

本発明による単純ヘルペスウイルスによって発現されたsiRNAは、SCCRO遺伝子産物またはその発現された機能を組織特異的に抑制またはサイレンシングするsiRNAベースの治療方法に有用で有りうる。

**【0020】**

最も一般的には、本発明は、(i)扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に関する物質および方法；ならびに(ii)変異単純ヘルペスウイルスに関する。

**【0021】**

本発明の1つの実施形態において、アンチセンスSCCROを発現する弱毒化複製コンピメントHSV(すなわち、HSV1716asSCCRO)を提供する。これは扁平上皮細胞癌、特に頭頸部扁平上皮細胞癌の治療に用いることができる。

**【0022】**

従って、本発明はHSV1716asSCCROを含有する医薬組成物、ならびに癌治療におけるこのようなウイルスおよび/または組成物の使用をさらに提供する。

**【0023】**

本発明の1つの態様により、単純ヘルペスウイルスが提供される。この単純ヘルペスウイルスのゲノムは、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCRO)をコードしている核酸を含む。

10

20

30

40

50

## 【0024】

この核酸は、哺乳動物扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス、より好ましくはヒト扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンスをコードし得る。

## 【0025】

1つの実施形態において、この核酸は：

- (i)配列番号1もしくは3のポリヌクレオチド配列またはそれらの相補体；
- (ii)配列番号1もしくは3のmRNA転写物；または
- (iii)上記ポリヌクレオチド配列、相補体もしくはmRNA転写物の断片、  
に対して相補的であるヌクレオチド配列をコードし得る。

## 【0026】

別の実施形態において、上記核酸は：

- (i)配列番号1もしくは3のポリヌクレオチド配列またはそれらの相補体；
- (ii)配列番号1もしくは3のmRNA転写物；または
- (iii)上記ポリヌクレオチド配列もしくはmRNA転写物の断片、  
に相補的なヌクレオチド配列と少なくとも60%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を  
コードし得る。

## 【0027】

より好ましくは上記配列同一性の程度は、少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、  
97%、98%または99%でありうる。(iii)で言及される断片は、少なくとも20ヌクレオチ  
ドを含み、かつ900ヌクレオチド以下に限定できる。配列同一性は、所与のヌクレオチド  
配列の全長にわたって決定される。配列の長さが異なる場合に、短い方の配列の配列同一性を、長い方の配列の全長にわたって決定する。

20

## 【0028】

別の実施形態において、上記核酸は：

- (i)配列番号1もしくは3のポリヌクレオチド配列またはそれらの相補体；
- (ii)配列番号1もしくは3のmRNA転写物；または
- (iii)上記ポリヌクレオチド配列またはmRNA転写物の断片、  
と高ストリンジエントな条件または非常に高ストリンジエントな条件下にて、ハイブリダ  
イズする核酸として選択できる。

30

## 【0029】

本発明による単純ヘルペスウイルスのゲノムは、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンスをコードしている上記核酸に機能的に連結された調節配列をさらに含むことができる。この調節配列は、上記siRNAの転写を制御する役割を有する。

## 【0030】

本発明のさらなる態様において、小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子をコードする核酸を含むゲノムを有する単純ヘルペスウイルスを提供する。この小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子は、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることができる。

## 【0031】

このsiRNAは、哺乳動物SCCRO、より好ましくはヒトSCCROの発現を抑制またはサイレン  
シングすることができる。

40

## 【0032】

siRNAをコードする上記核酸は、10~50ヌクレオチドの長さの核酸を含むことができ、  
配列番号5またはその相補体の配列を含むことができる。

## 【0033】

別の実施形態において、siRNAをコードする上記核酸は、10~50ヌクレオチドの長さの  
核酸を含むことができ、配列番号5またはその相補体と少なくとも70%、80%、90%、95%、  
96%、97%、98%または99%の同一性を有することができる。配列同一性は、所与の  
ヌクレオチド配列の全長にわたって決定する。配列の長さが異なる場合に、短い方の配列  
の配列同一性を、長い方の配列の全長にわたって決定する。

50

## 【0034】

別の実施形態において、siRNAをコードする上記核酸は、高ストリンジエントな条件または非常に高ストリンジエントな条件下にて、配列番号5またはその相補体の核酸に対してハイブリダイズする核酸として選択することができる。

## 【0035】

上記単純ヘルペスウイルスのゲノムはさらに、上記siRNAに機能的に連結されている調節配列を含むことができる。この調節配列は、上記siRNAの転写を制御する役割を有する。

## 【0036】

asSCCROまたは上記siRNAをコードする核酸は、単純ヘルペスウイルスのゲノムの少なくとも1つのRL1遺伝子座に配置できる。好適には、単純ヘルペスウイルスのゲノムの少なくとも1つのICP34.5タンパク質コード配列に配置または重複させることができる。この核酸は、RL1遺伝子座またはICP34.5タンパク質コード配列の両方(たいていはこれが全てである)のコピーに配置できる。

## 【0037】

単純ヘルペスウイルスは好ましくは変異体であり、HSV-1またはHSV-2の変異体、より好ましくは、HSV-1 17株、HSV-1 F株またはHSV-2 HG52株の1つの変異体でありうる。この単純ヘルペスウイルスは、HSV-1 17株変異体 1716のさらなる変異体でありうる。

## 【0038】

特定の実施形態において、単純ヘルペスウイルスはICP34.5ヌル変異体のような遺伝子特異的ヌル変異体でありうる。

## 【0039】

他の実施形態において、単純ヘルペスウイルスは少なくとも1つの発現可能なICP34.5遺伝子を欠くことができる。

## 【0040】

さらに別の実施形態において、単純ヘルペスウイルスは発現可能なICP34.5遺伝子を1つだけ欠くことができる。

## 【0041】

さらに別の実施形態において、単純ヘルペスウイルスは非神経毒性でありうる。

## 【0042】

本発明の単純ヘルペスウイルスにおいて、asSCCROまたは上記siRNAをコードする核酸は、単純ヘルペスウイルスのゲノムに永久に組み込まれている核酸カセットの一部分を形成しうる。このカセットは：

(a)上記asSCCROまたは上記siRNA；ならびに以下をコードする核酸：

(b)リボソーム結合部位または第1調節ヌクレオチド配列；および

(c)マーカー、

をコードしている核酸を含む。

## 【0043】

このカセットにおいて、上記asSCCROまたはsiRNAをコードする核酸は、リボソーム結合部位または第1調節ヌクレオチド配列の5'側上流に配置されており、そしてリボソーム結合部位または第1調節ヌクレオチド配列は、マーカーの5'側上流に配置されている。この第1調節配列は上記マーカーの転写を制御する役割を有しうる。

## 【0044】

第2調節ヌクレオチド配列は、asSCCROまたは上記siRNAをコードする核酸の5'側上流に配置できる。この第2調節ヌクレオチド配列は、asSCCROまたはsiRNAをコードする核酸の転写を制御および調節し、したがって生じた転写物の発現を制御および調節する役割を有する。調節配列は当業者に公知である選択されたプロモータまたはエンハンサー要素(例えば、サイトメガロウイルス(CytoMegalovirus: CMV)プロモータまたはホスホリセロキナーゼ(phosphoglycerokinase: PGK)プロモータ)を含みうる。

## 【0045】

10

20

30

40

50

カセットの構成要素は、所定の順序で好適に配置される。

【0046】

1つの好ましい実施形態において、asSCCROをコードする核酸は、リボソーム結合部位の上流(すなわち、5'側)に配置されており、そしてリボソーム結合部位は、マーカーの上流(すなわち、5'側)に配置されている。転写の間に、单一の転写物がasSCCROを含む第1シストロンとマーカーをコードする第2シストロンとを含むカセットから產生されうる。ここで、リボソーム結合部位はシストロンの間に配置される。

【0047】

このカセットの転写産物は、asSCCROをコードする核酸によってコードされている第1シストロンとマーカー核酸をコードする第2シストロンとを含むバイシストロンまたはポリシストロンの転写物でありうる。ここで、リボソーム結合部位は第1および第2シストロンの間に配置される。

【0048】

別の好ましい実施形態において、siRNAをコードする核酸は、第1調節ヌクレオチド配列の上流(すなわち、5'側)に配置されており、そして第1調節ヌクレオチド配列は、マーカーの上流(すなわち、5'側)に配置される。

【0049】

このカセットは、単純ヘルペスウイルスのゲノムのタンパク質コード配列を破壊し、各遺伝子産物の不活性化を生じさせうる。

【0050】

遺伝子構成要素(例えば、調節配列、5'UTR、3'UTRもしくはタンパク質コード配列)または遺伝子構成要素の断片に対応したDNAである選択したアンチセンスDNAをコードする核酸は、転写の際にアンチセンスRNAが得られるような向きでカセットに挿入されている。従って、カセットの発現産物は最終的にアンチセンス核酸、好ましくはアンチセンスRNAでありうる。

【0051】

1つの好適なリボソーム結合部位はリボソーム進入部位を含む。これによって、カセットの核酸にコードされ転写されたmRNAにリボソームが進入し、そしてこのリボソームが翻訳開始シグナルに結合することを可能とする。好ましくは、このリボソーム進入部位は、キャップ非依存的翻訳開始を可能とするインターナルリボソームエントリー部位(internal ribosome entry site: IRES)、より好ましくは脳心筋炎ウイルスのIRESである。従ってIRESは、バイシストロンまたはポリシストロンのmRNA、すなわち、单一転写物上に隣接するシストロンの下流に配置されているシストロンの内部に配置されているコード配列の翻訳を可能とする。

【0052】

好ましくは上記マーカーは、ポリペプチドをコードする所定のヌクレオチド配列である。このポリペプチドは変異単純ヘルペスウイルスに感染し、そのカセットが組換えられている細胞系(例えば、BHK細胞)で発現することが可能である。マーカーの機能は、カセットで形質転換された変異体ウイルスを含むウイルスブラークの同定を可能にすることである。

【0053】

マーカーは好ましくは検出可能なものであり、より好ましくは、選択したポリペプチドまたはタンパク質の少なくともコード配列を含む発現可能なマーカーポリペプチドまたはマーカータンパク質である。マーカーをコードする核酸はさらに、マーカーmRNAの転写を制御する役割を有する、コード配列の上流および/または下流の調節配列を含むことができる。好ましいマーカーは、緑色蛍光タンパク質(GFP)のタンパク質コード配列または遺伝子、好ましくは増強された緑色蛍光タンパク質(EGFP)のタンパク質コード配列または遺伝子を含む。

【0054】

他の実施形態において、マーカーは所定のヌクレオチド配列を含むことができる。この

10

20

30

40

50

ヌクレオチド配列は、高ストリンジエントな条件下にて、例えば蛍光標識または放射性標識を用いて標識した対応する核酸プローブを用いたハイブリダイゼーションによって検出することが可能である。

#### 【0055】

カセットはまた、ポリアデニル化(「ポリA」)配列をコードする核酸を含むことができる。このポリA配列は、好ましくはマーカーをコードする核酸の3'側下流に配置されている。1つの好ましいポリA配列は、サルウイルス40(Simian Virus 40: SV40)のポリアデニル化配列である。カセット内におけるポリA配列の好ましい位置は、マーカーのすぐ下流(すなわち、3'側)である。

#### 【0056】

アンチセンス核酸とは:

(i) 1本鎖の標的核酸に相補的な塩基配列によって形成されている核酸と実質的に配列同一性を有する核酸; および/または、  
 (ii) 中程度のストリンジエントな条件、高ストリンジエントな条件または非常に高ストリンジエントな条件下にて標的核酸にハイブリダイズする核酸、  
 を意味する。

#### 【0057】

本発明の1つの態様によると、標的核酸はSCCROポリヌクレオチド配列(例えば、遺伝子配列)、SCCROポリペプチドもしくはタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列、またはその遺伝子もしくはポリペプチドコード配列の一部/断片であります。従って、アンチセンス核酸は標的核酸(例えば、SCCROゲノムコード配列またはmRNA転写物)への結合に有用でありえ、インヒビターとして用いられて、標的核酸の正常な発現、活性、折りたたみ、または結合を妨げるかまたは破壊することが可能である。実質的な配列同一性は好ましくは、少なくとも50%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも60、70、75、80、85、90、92、94、95、96、97、98、99または100%の同一性のいずれかである。配列同一性は、所与のヌクレオチド配列の全長にわたって決定する。配列の長さが異なる場合に、短い方の配列の配列同一性を、長い方の配列の全長にわたって決定する。

#### 【0058】

アンチセンス核酸は、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCRO)のすべてまたは断片を含むことができ、好ましくはヒトSCCROに対するアンチセンスである。

#### 【0059】

挿入されているカセットの一部を形成することができる、asSCCROをコードする核酸は、SCCROに対するアンチセンスヌクレオチド配列の全長転写物をコードすることができる。全長アンチセンス転写物は、配列番号1もしくは配列番号3のポリヌクレオチド配列またはそれらの相補配列の1つに相補的な配列であります。あるいは、核酸は全長アンチセンス転写物の1以上の断片をコードすることができる。

#### 【0060】

断片は、対応する全長配列の少なくとも10%をコードするヌクレオチド配列を含むことができ、より好ましくはこの断片は、対応する全長配列の少なくとも20、30、40、50、60、70、80、85、90、95、96、97、98または99%を含む。好ましくは、断片は、少なくとも(すなわち、最小の長さで)20ヌクレオチド、より好ましくは、少なくとも30、40、50、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900または4000ヌクレオチドを含む。断片は、最長で(すなわち、以下の長さまたはそれよりも短い長さで)20ヌクレオチド、より好ましくは、30、40、50、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900または4000ヌクレオチドでありうる。断片の長さ

は、最小と最大の長さの間の任意の長さでありうる。

【0061】

SCCROに対するアンチセンスの場合、全長転写物はSCCRO遺伝子産物の全アミノ酸配列をコードする対応する完全なヌクレオチド配列に対するアンチセンス鎖を形成するヌクレオチドの最小連続配列を含むか、または相補体である。SCCRO遺伝子産物の完全なヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号2または配列番号4のポリペプチドをコードする配列番号1または配列番号3の領域を含むことができる。

【0062】

好みしいアンチセンス核酸は、1本鎖でありえ、DNAまたはRNAでありうる。

【0063】

好みしいsiRNAは1本鎖または2本鎖でありえ、相補的なヌクレオチドのステムループ形成および自己結合によって二重鎖構造を形成することが可能である1本鎖核酸を含みうる。好みしいsiRNAは、配列番号5にコードされる配列またはその相補体を有するRNA分子および配列番号5と少なくとも60%の配列同一性、より好みしくは少なくとも70、80、85、90、95%または100%の配列同一性を有する核酸またはその相補配列を含むことができる。配列同一性を、所与のヌクレオチド配列の全長にわたって決定する。配列の長さが異なる場合、短い方の配列同一性を、長い方の配列の全長にわたって決定する。

【0064】

好みしいsiRNAまたは好みしいsiRNAをコードする核酸は、選択した改変HSV株とは異種のヌクレオチド配列、すなわち、siRNAまたはsiRNAをコードする核酸配列は、親の非改変野生型ウイルスには生じず、またはそれを起源としないヌクレオチド配列を含むことができる。

【0065】

さらに、本発明の態様による単純ヘルペスウイルスは、siRNA分子をコードする核酸を含むことができる。この核酸は、配列番号5またはその相補体と、非常に高ストリンジェンシーな条件、高ストリンジェンシーな条件または中程度のストリンジェンシーな条件下にてハイブリダイズする。

【0066】

本発明による単純ヘルペスウイルスのゲノムに組み込まれている核酸分子にコードされているsiRNA分子は任意の長さでありうるが、好みしいsiRNA分子は小さく、少なくとも10ヌクレオチドでかつ50ヌクレオチド以下を含むことができる。本発明による単純ヘルペスウイルスは、配列番号5にコードされているsiRNAの断片をコードすることが可能である。特に好みしいsiRNAは、10~30ヌクレオチドの範囲、より好みしくは15~25ヌクレオチドの範囲の長さの1本鎖を有しうる。選択したsiRNA分子は、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25ヌクレオチドのいずれかの長さでありうる。siRNA分子は、例えばステム-ループ形成によって折りたたまれ、それ自体が二重鎖を形成する。従って、siRNA分子は、上記の数または範囲の約2倍の長さの折りたたまれていない1本鎖を有する。このようなsiRNAをコードするsiRNAおよび核酸が特に好みしくありうる。

【0067】

本発明の態様による単純ヘルペスウイルスは、1つ以上のsiRNA分子の配列を有するsiRNA分子をコードする核酸を含むことができる。

【0068】

本発明の変異体単純ヘルペスウイルスはウイルスゲノムへの核酸カセットの挿入が意図される部位によって、より好みしくは、相同組換えによって作製できる。しかし、本発明のウイルスは、このようにして得られた単純ヘルペスウイルスに限定されない。

【0069】

本発明の他の態様において、本発明による単純ヘルペスウイルスは、医療の治療方法に使用するために提供される。好みにはこれらの単純ヘルペスウイルスは、疾患の治療に使用するために提供される。好みしくは、これらのウイルスは癌治療に使用するために提供される。好みには、これらのウイルスは、癌/腫瘍の腫瘍崩壊性(oncolytic)治療に使用す

10

20

30

40

50

るために提供されうる。癌治療のための医薬品の製造にもまた、本発明による単純ヘルペスウイルスの使用が用いられる。

【0070】

本発明の別の態様において、本発明による単純ヘルペスウイルス変異体を含む医薬品またはHSVを含むかもしくはHSVから誘導される医薬品もまた提供される。これは、有効量の変異体 HSVを癌治療および治療を必要としている患者に投与することを含む腫瘍の治療方法に使用する。in vitroまたはin vivoにおいて腫瘍細胞を溶解または殺す方法もまた提供される。この方法は、有効量の本発明による単純ヘルペスウイルスを治療を必要としている患者に投与する段階を含む。

【0071】

本発明による単純ヘルペスウイルスを含む医薬品、医薬組成物またはワクチンもまた提供される。医薬品、医薬組成物またはワクチンはさらに、製薬上許容される担体、アジュバントまたは希釈剤を含むことができる。

【0072】

本発明はまた、記載した他の態様および特性のいずれかと組合せて提供できる以下の態様を含むこともできる。

【0073】

本発明の別の態様において、単純ヘルペスウイルスが提供され、この単純ヘルペスウイルスのゲノムは、少なくとも1つの長い反復領域( $R_L$ )に扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCR0)をコードしている核酸配列を含む。

【0074】

本発明の別の態様において、非神経毒性である単純ヘルペスウイルスが提供され、この単純ヘルペスウイルスのゲノムは、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCR0)をコードしている核酸配列を含む。

【0075】

本発明の別の態様において、腫瘍治療に使用するための単純ヘルペスウイルスが提供され、この単純ヘルペスウイルスのゲノムは、少なくとも1つの長反復領域( $R_L$ )内に扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCR0)をコードしている核酸配列を含む。

【0076】

本発明の別の態様において、腫瘍治療に使用するための、非神経毒性である単純ヘルペスウイルスが提供され、この単純ヘルペスウイルスのゲノムは、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCR0)をコードしている核酸配列を含む。

【0077】

本発明の別の態様において、癌治療のための医薬品の製造における、単純ヘルペスウイルスの使用が提供される。この単純ヘルペスウイルスのゲノムは、少なくとも1つの長反復領域( $R_L$ )内に扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCR0)をコードしている核酸配列を含む。

【0078】

本発明の別の態様において、癌治療のための医薬品の製造における、非神経毒性である単純ヘルペスウイルスの使用が提供される。この単純ヘルペスウイルスのゲノムは、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCR0)をコードしている核酸配列を含む。

【0079】

本発明の別の態様において、有効量の単純ヘルペスウイルスを治療を必要としている患者に投与する段階を包含する腫瘍治療のための方法が提供される。この単純ヘルペスウイルスのゲノムは、少なくとも1つの長反復領域( $R_L$ )内に扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCR0)をコードしている核酸配列を含む。

【0080】

本発明の別の態様において、有効量の非神経毒性の単純ヘルペスウイルスを治療を必要

10

20

30

40

50

としている患者に投与する段階を包含する腫瘍の治療方法が提供される。この単純ヘルペスウイルスのゲノムは、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCRO)をコードしている核酸配列を含む。

【0081】

好適には、腫瘍の治療方法においてこの単純ヘルペスウイルスは腫瘍細胞を殺すことが可能である。

【0082】

本発明の別の態様において、in vitroまたはin vivoにおいて、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCRO)を発現させる方法が提供される。この方法は、少なくとも1つの目的の細胞または組織を単純ヘルペスウイルスに感染させる段階を包含する。この単純ヘルペスウイルスのゲノムは、少なくとも1つの長反復領域( $R_L$ )内に転写調節配列に機能的に連結されているasSCCROをコードしている核酸配列を含む。

10

【0083】

本発明の別の態様において、in vitroまたはin vivoにおいて、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子に対するアンチセンス(asSCCRO)を発現させる方法が提供される。この方法は、少なくとも1つの目的の細胞または組織に非神経毒性の単純ヘルペスウイルスで感染させる段階を包含する。この単純ヘルペスウイルスのゲノムは、転写調節配列に機能的に連結されているasSCCROをコードしている核酸配列を含む。

20

【0084】

本発明の別の態様において、単純ヘルペスウイルスが提供される。この単純ヘルペスウイルスのゲノムは、少なくとも1つの長反復領域( $R_L$ )内に扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることが可能である小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子をコードしている核酸配列を含む。

20

【0085】

本発明の別の態様において、非神経毒性である単純ヘルペスウイルスが提供される。この単純ヘルペスウイルスのゲノムは、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることが可能である小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子をコードしている核酸配列を含む。

30

【0086】

本発明の別の態様において、腫瘍治療に使用するための単純ヘルペスウイルスが提供される。この単純ヘルペスウイルスのゲノムは、少なくとも1つの長反復領域( $R_L$ )内に扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることが可能である小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子をコードしている核酸配列を含む。

30

【0087】

本発明の別の態様において、腫瘍治療に使用するための、非神経毒性である単純ヘルペスウイルスが提供される。この単純ヘルペスウイルスのゲノムは、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることが可能である小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子をコードしている核酸配列を含む。

40

【0088】

本発明の別の態様において、癌治療のための医薬品の製造における単純ヘルペスウイルスの使用が提供される。この単純ヘルペスウイルスのゲノムは、少なくとも1つの長反復領域( $R_L$ )内に扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることが可能である小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子をコードしている核酸配列を含む。

40

【0089】

本発明の別の態様において、癌治療のための医薬品の製造における、非神経毒性である単純ヘルペスウイルスの使用が提供される。この単純ヘルペスウイルスのゲノムは、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることが可能である小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子をコードしている核酸配列

50

を含む。

【0090】

本発明の別の態様において、腫瘍治療のための方法が提供される。この方法は、有効量の単純ヘルペスウイルスを治療を必要としている患者に投与する段階を包含する。この単純ヘルペスウイルスのゲノムは、少なくとも1つの長い反復領域( $R_L$ )に扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることが可能である小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子をコードしている核酸配列を含む。

【0091】

本発明の別の態様において、腫瘍治療のための方法を提供する。この方法は、有効量の非神経毒性の単純ヘルペスウイルスを治療を必要としている患者に投与する段階を包含する。この単純ヘルペスウイルスのゲノムは、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることが可能である小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子をコードしている核酸配列を含む。

【0092】

好適には、腫瘍の治療方法において、この単純ヘルペスウイルスは腫瘍細胞を殺すことが可能である。

【0093】

本発明の別の態様において、in vitroまたはin vivoにおいて、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることが可能である小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子を発現する方法が提供される。この方法は、少なくとも1つの目的の細胞または組織に単純ヘルペスウイルスを感染させる段階を包含する。この単純ヘルペスウイルスのゲノムは、少なくとも1つの長反復領域( $R_L$ )内に上記siRNAをコードする核酸配列を含む。このsiRNAをコードする核酸配列は、転写調節配列に機能的に連結されている。

【0094】

本発明の別の態様において、in vitroまたはin vivoにおいて、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の核酸またはポリペプチドの発現を抑制またはサイレンシングすることが可能である小さな干渉リボ核酸(siRNA)分子を発現する方法が提供される。この方法は、少なくとも1つの目的の細胞または組織に非神経毒性の単純ヘルペスウイルスを感染させる段階を包含する。この単純ヘルペスウイルスのゲノムは、上記siRNAをコードする核酸配列を含む。このsiRNAをコードする核酸配列は、転写調節配列に機能的に連結されている。

【0095】

本発明によるsiRNAは好ましくは、扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)タンパク質の機能を抑制する。

【0096】

本発明の別の態様において、ある方法が、in vitroでの細胞における扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)の発現を抑制するために提供される。この方法は、本発明の単純ヘルペスウイルスまたはそのようなウイルスを含む医薬組成物を細胞と接触させる段階を包含する。

【0097】

本発明の1つの好ましい態様において、単純ヘルペスウイルスはHSV1716/CMV-assSCCRO/GFPであり、「HSV1716assSCCRO」と称され、Department of Neurology Southern General Hospital 1345 Govan Road Govan Glasgow G51 5TF Scotlandに住所を有するCrusade Laboratories Limitedの名のもとに、2004年5月19日に、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約(本明細書において「ブタペスト条約」として称される)の規定に従って受託番号第04051901号のもとthe European Collection of Cell Cultures(ECACC), Health Protection Agency, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, United Kingdomに寄託された。

【0098】

10

20

30

40

50

本発明のさらに別の態様において、*in vitro*において扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(SCCRO)のタンパク質または核酸の発現を抑制またはサイレンシングした細胞が提供される。この細胞は哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞でありうる。

【0099】

好適には、上記単純ヘルペスウイルスの投与は、非経口的投与を含むことができる。好ましくは単純ヘルペスウイルスの投与は注射であり、より好ましくは、治療されるべき腫瘍への注射である。あるいは、静脈注射でありうる。

【0100】

本発明のさらなる態様において、*in vitro*または*in vivo*において、asSCCROまたはsiRNAをコードする核酸を少なくとも1つの目的の細胞または組織に送達するための方法が提供される。この方法は、この細胞または組織に本発明による単純ヘルペスウイルスを感染させる段階を包含する。

10

【0101】

本発明の別の態様において、本発明の改変単純ヘルペスウイルスを作製または製造する方法が提供される。この方法は、選択した単純ヘルペスウイルスのゲノム中の選択したまたは所定の挿入部位にasSCCROまたはsiRNAをコードしている核酸配列を導入する段階を包含する。

【0102】

記載したように、asSCCROまたはsiRNAをコードしている核酸は、選択した単純ヘルペスウイルスのゲノムに相同組換えによって挿入されている核酸カセットの一部を形成することができる。カセットの一部であろうとなからうと、挿入部位は選択した任意のゲノム位置でありうる。ある好ましい挿入部位は長反復領域( $R_L$ )の1つまたは両方にあり、そしてカセットの1コピーは好ましくは長反復領域( $R_L$ )のコピーそれぞれに挿入されている。より好ましくは、挿入部位は少なくとも1つの(好ましくは両方の)RL1遺伝子座にあり、そして最も好ましくは、HSVゲノムDNAの少なくとも1つの(好ましくは両方の)ICP34.5タンパク質コード配列に挿入されている。挿入が2つの反復領域、すなわちRL1遺伝子座またはICP34.5タンパク質コード配列の各々において同一または実質的に類似している位置に生じることが好ましい。

20

【0103】

挿入は改変ウイルスを作製するようなものでありうる。この改変ウイルスは、*in vivo*および*in vitro*において、哺乳動物鎖細胞、より好ましくはヒト細胞にトランスフェクトされた際に、コードされたasSCCROまたはsiRNAを発現することが可能である非神経毒性変異体である。この非神経毒性変異体はICP34.5ヌル変異体でありうる。

30

【0104】

この核酸カセットは任意の大きさでありえ、例えば、5、10、15、20、25、30、35、40、45または50Kbpまでの長さでありうる。

【0105】

好ましくは、単純ヘルペスウイルスは、長反復領域( $R_L$ )の各々、すなわち、末端および内部の長い反復( $TR_L$ および $IR_L$ )領域にasSCCROまたはsiRNAをコードする核酸の少なくとも1つのコピーを含む。好ましい実施形態において、外因性の配列またはカセットの各々は、単純ヘルペスウイルスのゲノムのRL1遺伝子座、より好ましくは、ICP34.5遺伝子またはタンパク質コード配列をコードする単純ヘルペスウイルスのゲノムのDNAに配置されている。それによって、この単純ヘルペスウイルスは神経毒性を欠く。

40

【0106】

本発明のウイルスが由来とする親の単純ヘルペスウイルスは、任意の種類でありえ、例えばHSV-1またはHSV-2でありうる。1つの好ましい実施形態において、単純ヘルペスウイルスはHSV-1 17株の変異体であり、17株のゲノムDNAの改変によって得ることができる。好適な改変としては、外因性のasSCCROもしくはsiRNA核酸配列またはこの配列を含む外因性/異種性カセットを単純ヘルペスウイルスのゲノムDNAに挿入することが挙げられる。この挿入は、外因性核酸配列を、選択した単純ヘルペスウイルスのゲノムに相同組換えする

50

ことによって実施することができる。

【0107】

本発明の単純ヘルペスウイルスのもつ非神経毒性の表現型は、RL1遺伝子座への外因性核酸配列の挿入によって生じることが可能であるが、本発明による単純ヘルペスウイルスは非神経毒性の親株（例えば、ブタベスト条約のもとthe European Collection of Animal Cell Cultures(ECACC), Health Protection Agency, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, United Kingdomに受託番号V92012803で寄託されたHSV1716）を利用して、外因性核酸配列をゲノムの別の位置に標準的な遺伝子工学的手法、例えば相同組換えによって挿入することによって得ることができる。この態様において、asSCCROもしくはsiRNAの核酸配列またはこの配列を含むカセットの挿入のために選択された単純ヘルペスウイルスのゲノムの位置は中間(neutral)の位置でありうる。

10

【0108】

本発明の単純ヘルペスウイルスは、このウイルスが由来とする公知の「親」株の変異体でありうる。特に好ましい親株はHSV-1 17株である。他の親株として、HSV-1 F株またはHSV-2 HG52株を挙げることができる。変異体は、そのゲノムが実質的に親のゲノムと似ているHSVを含む。このゲノムはasSCCROもしくはsiRNAをコードする核酸配列またはこの配列を含むカセットを含み、限られた数の他の改変、例えば1、2または3つの他の特定の変異を含むことができる。この特定の変異は、単純ヘルペスウイルスの病原性を不能にするために導入されてもよく、例えばリボヌクレオチド還元酵素(RR)遺伝子における変異、65Kトランス誘導因子(TIF)における変異、および/または天然の変異から生じる少数の突然変異であり、このような変異は、in vitroまたはin vivoにおいて複製および選択の間に自然に取り込まれることができる。変異がなければ、変異体のゲノムは親株のゲノムそのものであろう。

20

【0109】

本発明の単純ヘルペスウイルスは医療の治療方法に用いることができる。この医療の治療方法は、細胞の増殖または任意の種類の癌もしくは腫瘍に関連するか、これらを含む疾患の治療を含みうる。治療には分裂細胞の選択的な溶解を含むことができる。この治療は、腫瘍崩壊、すなわち、腫瘍細胞の溶解でありうる。治療されるべき腫瘍は、癌、腫瘍または新生物組織を含みうる任意の種類であり、任意の動物またはヒト患者におけるものでありうる。

30

本発明の単純ヘルペスウイルスは、in vitroまたはin vivoにおける「遺伝子送達」方法に用いることができる。本発明の非神経毒性である単純ヘルペスウイルスは発現ベクターであり、これは単純ヘルペスウイルスのゲノムにコードされているasSCCROまたはsiRNAを発現させるために、選択した細胞または組織に感染させるために用いることができる。

【0110】

1つの実施形態において、細胞を患者、供与体または任意の他の源から得て、本発明の単純ヘルペスウイルスを用いて感染させ、必要に応じてコードされているasSCCROもしくはsiRNAの発現および/または機能についてスクリーニングし、そして必要に応じて患者の身体に、例えば注射によって戻すか/導入することができる。

30

【0111】

選択した細胞への本発明の単純ヘルペスウイルスの送達は、裸の(naked)ウイルスを用いるか、または担体（例えば、ナノ粒子、リポソームもしくは他のベシクル）に包んだウイルスカプセルによって行うことができる。

40

【0112】

好ましくはヒトまたは哺乳動物細胞であって、本発明のウイルスを用いて形質転換したin vitroにおける培養細胞および好ましくはasSCCROまたはsiRNAを発現する細胞ならびに上記ウイルスを用いて上記細胞をin vitroで形質転換する方法が本発明のさらなる態様を構成する。

【0113】

治療されるべき癌/腫瘍型は、原発性および/または2次(転移)腫瘍を含みうる。これ

50

らは頭頸部の癌でありうる。これらの癌は扁平上皮細胞癌でありうる。扁平上皮細胞癌は粘膜を起源とするものでありえ、3q遺伝子座の複製に偏向しうる。治療すべき好ましい扁平上皮細胞癌は頭頸部の扁平上皮細胞癌である。治療すべき扁平上皮細胞癌には、肺、頭頸部、食道および頸部を起源とするものを含みうる。

【0114】

治療しうる他の腫瘍型は、原発性または2次(転移)腫瘍でありうる。治療すべき腫瘍は神経系腫瘍または非神経系腫瘍でありうる。神経系腫瘍は中枢神経系または末梢神経系のいずれかを起源としうる(例えば、神経膠腫、髄芽腫、髄膜腫、神経線維腫、上衣細胞腫、シュワン細胞腫、神経線維肉腫、星細胞腫および乏突起細胞腫)。非神経系腫瘍は任意の他の非神経系組織を起源としうる(例えば黒色腫、中皮腫、リンパ腫、肝細胞腫、類表皮癌、前立腺癌、乳癌細胞、肺癌細胞または大腸癌細胞を含む)。本発明のHSV変異体は非神経系組織を起源とする中枢または末梢神経系の転移腫瘍の治療に用いることができる。

【0115】

本明細書中において、変異単純ヘルペスウイルスは非野生型の単純ヘルペスウイルスであり、組換え単純ヘルペスウイルスでありうる。変異単純ヘルペスウイルスは野生型に対して改変を含むゲノムを有することができる。改変は、少なくとも1つの欠失、挿入、付加または置換を含むことができる。

【0116】

本発明の態様による医薬品および医薬組成物は、複数の経路(非経口、静脈内、筋肉内、腫瘍内、経口および経鼻経路を含むがこれらに限定されない)によって投与するように製剤化できる。医薬品および組成物は液体または固体(例えば、錠剤)形態に製剤化できる。液体製剤はヒトまたは動物の身体の選択した領域へ注射によって投与するように製剤化することができる。

【0117】

本明細書中において、非神経毒性とは致死性脳炎を引き起こすことなく動物または患者に、ウイルスの高い力価(およそ $10^6$  プラーク形成単位(pfu))を導入し、その結果、動物(例えばマウスまたはヒト患者)におけるLD<sub>50</sub>がおよそ $10^6$  pfu以上の範囲<sup>21</sup>となるという能力によって定義される<sup>22, 23</sup>。

【0118】

単純ヘルペスウイルスのゲノムに存在するICP34.5遺伝子の全てのコピー(普通2つのコピーが存在する)が破壊され、その結果、単純ヘルペスウイルスが機能的ICP34.5遺伝子産物を産生することができない場合、このウイルスはICP34.5ヌル変異体であると考えられる。

【0119】

ヌクレオチド配列に機能的(operably)に連結されている調節配列(例えば、プロモータ)は、そのヌクレオチド配列に隣接してまたは近接して配置されており、その結果、ヌクレオチド配列産物の発現に影響をもたらすか、および/またはその発現を制御することができる。従って、ヌクレオチド配列のコード産物はその調節配列により発現可能でありうる。

【0120】

SCCR0

配列番号1のポリヌクレオチド配列(位置43~918)および配列番号2のポリヌクレオチドは2002年2月19日に一般に分与されているGenBank登録番号AF456425(GI:18700655)に開示されている。

【0121】

第2のOncoseq2ポリペプチドは、配列番号3のポリヌクレオチド配列によってコードされている。この配列番号3のポリヌクレオチド配列はそれによってコードされるポリペプチド(配列番号4)と共に2002年2月19日に一般に分与されているGenBank登録番号AF456426(GI:18700657)に開示されている。

10

20

30

40

50

## 【0122】

GenBankデータベースは以下のアドレスよりアクセスすることが可能である。

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

## 【0123】

治療ストラテジー

以下の治療ストラテジーは一例としてのみ提供される。本発明は所与のアンチセンスまたはsiRNAの操作理論に限定されない。

## 【0124】

アンチセンス

本発明による単純ヘルペスウイルスはアンチセンス核酸、例えば1本鎖RNAを発現できる。このアンチセンス核酸は標的mRNAを標的とし、相補配列結合によって結合する。それによってmRNAの翻訳および遺伝子産物の発現をブロックする。 10

## 【0125】

発現されたアンチセンス核酸はまた、センスゲノム核酸に結合し、そして標的ヌクレオチド配列の転写を阻害するように配置することも可能である。

## 【0126】

siRNA

本発明による単純ヘルペスウイルスは、転写時に内部相補配列を有するRNAを提供するように設計された核酸をコードしてもよく、該RNAは、ステム-ループ構造を有する短いヘアピンsiRNA二重鎖を形成するように結合してもよい。好ましくは、ヘアピンsiRNAはRNA干渉によって遺伝子発現の特異的抑制および/またはサイレンシングを仲介する。 20

## 【0127】

あるいは、2つのsiRNA分子をコードすることができる。これらのsiRNA分子は相補的な配列結合によって結合し、そして機能的に活性な二重鎖分子を形成するように設計されている。

## 【0128】

抑制およびサイレンシング

本発明において提供されるsiRNAおよびアンチセンス分子は、標的核酸、ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質の発現を抑制もしくはサイレンシングするか、または標的核酸、ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質の機能を抑制するように設計されている。 30

## 【0129】

発現の抑制によって、標的の量または発現された機能の減少を生じる。例えば所与の細胞におけるsiRNAまたはアンチセンスの発現によるSCCROの抑制によって、未処理の細胞と比較してSCCRO遺伝子産物の量またはSCCRO遺伝子産物の発現された機能の減少を生じることが可能である。

## 【0130】

機能抑制には、mRNAの転写またはペプチドもしくはポリペプチドの翻訳の減少を含むことができる。

## 【0131】

抑制は部分的なものでありうる。抑制の好ましい程度は、少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60、70、80、85または90%のうちの1つである。90%~100%の間の抑制レベルは、発現または機能の「サイレンシング」とみなされる。 40

## 【0132】

ハイブリダイゼーション・ストリンジエンシー

本発明により、核酸配列を適切なストリンジエンシーのハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を用いることによって同定することが可能である。

## 【0133】

相補的な核酸配列は、ワトソン・クリック結合相互作用を介して互いにハイブリダイズしうる。100%相補的ではない配列もハイブリダイズすることが可能である。しかしハイ 50

ブリダイゼーションの強さは一般に相補性が減少するにつれて減少する。そのためハイブリダイゼーションの強さは、互いに結合することが可能である配列の相補性の程度を区別するために用いることができる。

【0134】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジエンシー」は当業者によって容易に決定できる。

【0135】

所与の反応のストリンジエンシーは、プローブの長さ、洗浄温度、および塩濃度などの要因に依存しうる。一般により高い温度が長いプローブの適切なアニーリングに必要であり、一方、より短いプローブは低い温度でアニーリングすることができる。プローブとハイブリダイゼーション可能である配列との間の所望される相補性の程度が高いほど、用いることができる相対温度も高くなる。結果として、より高い相対温度が反応条件をよりストリンジエントなものとし、一方より低い相対温度が反応条件を緩やかにする傾向があるということがわかる。

【0136】

例えば、ハイブリダイゼーションはSambrookらの方法(「Molecular Cloning, A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に従って行うことができる。この方法は、5×SSC、5×デンハルト試薬、0.5~1.0% SDS、100 μg/ml 変性し断片化したサケ精子DNA、0.05% ピロリン酸ナトリウムおよび50%以下のホルムアミドを含有するハイブリダイゼーション溶液を用いる。ハイブリダイゼーションは37~42にて、少なくとも6時間行う。ハイブリダイゼーションに続いて、フィルターを以下のように洗浄する：(1)2×SSCおよび1% SDS中室温にて5分間；(2)2×SSCおよび0.1% SDS中室温にて15分間；(3)1×SSCおよび1% SDS中37にて30分間~1時間；(4)1×SSCおよび1% SDS中42~65にて2時間、30分間ごとに溶液を変える。

【0137】

核酸分子間のハイブリダイゼーションを達成するのに必要とされるストリンジエンシー条件を算出するための1つの一般式は、融解温度  $T_m$  値を算出するためのものである(Sambrookら, 1989)：

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log [Na^+] + 0.41(\% G+C) - 0.63(\% ホルムアミド) - 600/n$$

[式中nはオリゴヌクレオチドの塩基数である]。

【0138】

上記式に示したように、 $[Na^+] = [0.368]$ および50%ホルムアミドを使用し、GC含有量が42%であり平均プローブサイズが200塩基である場合、 $T_m$  値は57である。DNA二重鎖の $T_m$  値は、配列相補性が1%減少するごとに1~1.5ずつ減少する。

【0139】

従って、ヌクレオチド配列はハイブリダイゼーションおよび洗浄の異なるストリンジエンシー条件下にて標的配列にハイブリダイズする能力によって分類することができる。このストリンジエンシー条件は上記の式を用いて選択することができる。 $T_m$  値はハイブリダイゼーションの強さの指標を提供するために用いることができる。

【0140】

条件のストリンジエンシーに基づいて配列を区別する概念は当業者に十分に理解されており、容易に適用することができる。

【0141】

95~100%の配列相補性を示す配列は非常に高ストリンジエントな条件下にてハイブリダイズすると考えることができ、85~95%の相補性を示す配列は高ストリンジエントな条件下にてハイブリダイズすると考えることができ、70~85%の相補性を示す配列は中程度にストリンジエンシーな条件下にてハイブリダイズすると考えことができ、60~70%の相補性を示す配列は低ストリンジエンシー条件下にてハイブリダイズすると考えことができ、そして50~60%の相補性を示す配列は、非常に低ストリンジエンシー条件下にてハイブリダイズすると考えることができる。

10

20

30

40

50

## 【0142】

本発明は記載した態様と好ましい特性との組合せを含む。ただし、この組合せは、明らかに容認できないおよび明らかに望ましくない場合は除く。

## 【0143】

本発明の態様および実施形態の一例を今回、添付の図面を参照しながら例示する。さらなる態様および実施形態が当業者に明らかであろう。関連して言及されるすべての書類は参考として本明細書中に援用される。

## 【0144】

発明の最良の形態の詳細な説明

本発明者らが意図する、本発明を実施するための最良の形態の具体的な詳細を具体例によって以下に説明する。当業者には、本発明がこれらの具体的な詳細に限定されることはなく実施できることは明らかであろう。

## 【0145】

単純ヘルペスウイルス変異体の作製に有用なベクター

本発明の変異単純ヘルペスウイルスは、核酸ベクターの使用によって作製することができる。

## 【0146】

本発明の変異単純ヘルペスウイルスの作製に有用なベクターの1つは、選択した単純ヘルペスウイルスのゲノム中の挿入部位に隣接(又は、フランкиング)するヌクレオチド配列に対応する第1のヌクレオチド配列及び第2のヌクレオチド配列と、

- a) 1つ又は複数の挿入部位、及び
- b) リボソーム結合部位、及び
- c) マーカー

をコードする核酸を含む前記第1のヌクレオチド配列及び第2のヌクレオチド配列の間に位置するカセットとを含む、又はそれらからなる、又は本質的にそれらからなる、核酸ベクターである。

## 【0147】

本発明の変異単純ヘルペスウイルスの作製に有用な別のベクターは、選択した単純ヘルペスウイルスのゲノム中の挿入部位に隣接するヌクレオチド配列に対応する第1のヌクレオチド配列及び第2のヌクレオチド配列と、

- a) 1つ又は複数の挿入部位、及び
- b) 第1の調節ヌクレオチド配列、及び
- c) マーカー

をコードする核酸を含む前記第1のヌクレオチド配列及び第2のヌクレオチド配列の間に位置するカセットとを含む、又はそれらからなる、又は本質的にそれらからなる核酸ベクターである。

## 【0148】

第1のヌクレオチド配列及び第2のヌクレオチド配列は、選択した単純ヘルペスウイルスのゲノムのICP34.5タンパク質コード配列中に形成された、又はその全て若しくは一部分を含む、挿入部位に隣接するヌクレオチド配列に対応し得る。

## 【0149】

前記カセットは、複数の挿入部位を含むことが可能であり、各挿入部位は好ましくは特定の制限エンドヌクレアーゼ部位(「制限部位」)をコードする核酸によって形成される。同時に、この制限部位は、一連の重複する又は異なる制限部位、好ましくはC<sub>1</sub>aI、B<sub>gl</sub>I、N<sub>r</sub>uI、X<sub>ba</sub>I制限部位を1以上含む一連の異なる制限部位を含む、マルチクローニングサイト(MCS)を形成することができる。

## 【0150】

コードされた前記カセットの構成要素は、所定の順番に配置することができる。1つの配置においては、1つ又は複数の挿入部位がリボソーム結合部位/第1調節配列の上流(すなわち5')に配置され、このリボソーム結合部位/第1調節配列はマーカーの上流(すなわち5

10

20

30

40

50

')に配置される。

【0151】

第1のヌクレオチド配列及び第2のヌクレオチド配列は、選択した単純ヘルペスウイルス中の挿入部位(ウイルス挿入部位)の周囲のゲノム領域と同一性を有するヌクレオチド配列を含むことができる。これらの配列は、ウイルスゲノムにおける第1のヌクレオチド配列及び第2のヌクレオチド配列とその各々の対応配列との間の相同組換えによってカセットがウイルス挿入部位に組み込まれることを可能とする。

【0152】

従って、第1のヌクレオチド配列及び第2のヌクレオチド配列は、選択したウイルスゲノムの対応配列との相同組換えのための配列に隣接しており、このような相同組換えは前記カセットのウイルス挿入部位への挿入を生じる。

【0153】

この第1のヌクレオチド配列及び第2のヌクレオチド配列は、HSVゲノムのRL1遺伝子座中、さらに好ましくはHSVゲノムのICP34.5タンパク質コード配列中の挿入部位に隣接するヌクレオチド配列に対応することが可能である。

【0154】

この第1のヌクレオチド配列及び第2のヌクレオチド配列は各々、少なくとも長さ50bp、さらに好ましくは少なくとも長さ100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900又は4000bpでありうる。この第1のヌクレオチド配列及び第2のヌクレオチド配列は各々、前記ウイルスゲノム中のこれらの対応配列に対して少なくとも50%の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも60%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の同一性を有しうる。配列の同一性は、所定のヌクレオチド配列の全長にわたって決定される。配列が異なる長さである場合、長い方の配列の全長にわたって、短い方の配列の配列同一性を決定する。

【0155】

第1のヌクレオチド配列及び第2のヌクレオチド配列は、所定の配列の1本の鎖が、ハイブリダイゼーションの変化するストリンジエンシー条件下で、HSVゲノムの対応する一本鎖相補体とハイブリダイズする能力によって特徴付けることができる。適切には、第1のヌクレオチド配列及び第2のヌクレオチド配列は、非常に低ストリンジエンシー条件、低ストリンジエンシー条件または中程度のストリンジエンシー条件下で、さらに好ましくは高ストリンジエンシー条件、又は非常に高ストリンジエンシー条件下でそれらの対応する相補体とハイブリダイズするであろう。

【0156】

ウイルス挿入部位は、ベクターの第1のヌクレオチド配列及び第2のヌクレオチド配列(各々「ゲノム」及び「ベクター隣接配列(vector flanking sequence)」)に対応するゲノムヌクレオチド配列の間の位置にあり、この位置において相同組換えが起こり、この位置をベクター隣接配列の選択によって予め定めることができる。ゲノム隣接配列が直接隣接している場合、この挿入部位は、カセットの挿入がゲノム隣接配列を隔てるよう、2つのゲノム隣接配列の周辺塩基と直接隣接塩基との間の位置にある。ウイルスゲノム中でゲノム隣接配列が1つ又は複数の塩基によって隔てられる場合、挿入部位は前記の1つ又は複数の塩基によって形成され、この塩基は相同組換え事象によってゲノムから切除される。

【0157】

ウイルス挿入部位の位置は、ベクター隣接配列の注意深い選択及び構築によって的確に選択することができる。従って、このベクターを、カセットの相同意挿入が、選択されたタンパク質コード配列の破壊及び各々の遺伝子産物の不活性化を生じるように、又はこのカセットがウイルスゲノムの非タンパク質コード領域に挿入されるように構築することができる。幾つかの単純ヘルペスウイルス株の全ゲノム配列が報告されており、公に入手可能である。HSV-1株17syn+の全ゲノム配列は、Dolanら<sup>3</sup> (参考として本明細書中に援用さ

れる)によって報告されており、HSV-2株HG52の全ゲノム配列は、Dolanら<sup>4</sup>(参考として本明細書中に援用される)によって報告されており、EMBLデータベースから登録番号Z86099で入手可能である。この情報を利用して、本発明のベクターを変異HSV-1(例えば、株17もしくは株F)又は変異HSV-2(例えば、株HG52)の作製における使用のために好適に設計することができる。

【0158】

第1のヌクレオチド配列及び第2のヌクレオチド配列(ベクターフランキング配列)は各々、選択したHSV(例えば、HSV-1株17もしくは株F又はHSV-2株HG52)のゲノムのRL末端反復領域に対応する配列を含みうる。このベクターフランキング配列は、ICP34.5タンパク質コード配列に隣接するRL反復領域のヌクレオチド配列を含み、このヌクレオチド配列からなり又は本質的にこのヌクレオチド配列からなり得る。ICP34.5コード配列へのフランキングにおいて、1つ又は両方の選択配列が対応のHSVゲノム中で重なる、すなわちICP34.5タンパク質コード配列まで伸びることが可能であり、又はICP34.5タンパク質コード配列と重ならないように1つ又は両方の配列を選択することが可能である。同様に、選択配列を他の重要なコード化されたシグナル、例えば転写開始部位、ポリアデニル化部位、確定されたプロモーター又はエンハンサーに完全に又は部分的に重なるように選ぶことができる。この好適な配置においては、挿入部位がこのようにしてICP34.5タンパク質コード配列の全て又は一部分を含み、及び/又は挿入カセットがICP34.5タンパク質コード配列を破壊するものとなるであろう。

【0159】

ICP34.5タンパク質コード配列に隣接し及び/又は重なっているRL反復領域の領域に対応する第1のヌクレオチド配列及び第2のヌクレオチド配列を含む、記載されているベクターは、ICP34.5ヌル変異体の作製に用いることが可能であり、ここでICP34.5タンパク質コード配列の全て又は一部分は、相同組換え事象の間にICP34.5コード配列の両方のコピーが破壊されるように切除され、置換される。この組換えは、ICP34.5タンパク質コード配列内に核酸の挿入を生じ、これによってこの配列を破壊することができる。この場合、成功裏に形質転換されたウイルスは、従ってICP34.5遺伝子の少なくとも1つのコピーから、好ましくは両方のコピーからICP34.5活性遺伝子産物を作製する能力のない変異体である。

【0160】

従って、成功裏に形質転換されたウイルスは、このようにしてICP34.5活性遺伝子産物を作製する能力のない変異体である。

【0161】

このカセットの各構成要素は、目的のヌクレオチド配列、リボソーム結合部位及びマーカーをコードするmRNAを含む又は本質的にこのmRNAからなる、単一のバイリストロン性転写物が得られるように、実質的に隣接する構成要素に隣り合って位置することができる。

【0162】

記載されているベクターは更に、選択可能マーカー、例えばカナマイシン耐性又はアンピシリン耐性などの抗生物質耐性を与えるポリペプチド又はタンパク質をコードする核酸を含む、この核酸からなる、又は本質的にこの核酸からなることができる。

【0163】

記載されているベクターは、好ましくはDNAベクター、特に二本鎖DNAベクターである。ベクターは線状又は環状(プラスミド)DNAベクターとして提供され得る。このベクターは、好ましくはヌクレオチド配列、例えば制限エンドヌクレアーゼ部位を含み、DNAライゲーション及び制限物質(例えば酵素)の使用並びに当業者に公知の技術によって2つの形態間の転移を可能とする。選択したHSVを用いた相同組換えを達成するために、ベクターは好ましくは線状形態で提供される。

【0164】

本発明者らが提供するこのベクターの1つは、プラスミドRL1.diRES-GFPであり、このプラスミドは特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するプラベスト条約(本明細書中では「プラベスト条約」という)の規定に従って、Department of Neurology Southern

10

20

30

40

50

General Hospital 1345 Govan Road Govan Glasgow G51 5TF Scotlandに住所を有するCrusade Laboratories Limitedの名義で、the European Collection of Cell Cultures (ECC), Health Protection Agency, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, United Kingdomに登録番号03090303のもと2003年9月3日に寄託されている。

【0165】

RL1.diRES-GFPは、複数の、目的のヌクレオチド配列（選択プロモーターの下流）をHSV-1の無力化RL1遺伝子座へ転移するために相同組換えの工程を利用することができます「シャトルベクター」の作製、目的のヌクレオチド配列の産物、例えばRNA転写物又はポリペプチド及びGFPを発現する、容易に同定可能な腫瘍崩壊性のICP34.5ヌルHSV-1変異体作製のためのプラットフォームを提供する。RL1.diRES-GFPはこのようにして、ICP34.5ヌルHSVの作製及び精製の容易さを提供する。 10

【0166】

RL1.diRES-GFPは、増強された細胞傷害性潜在力を有し、投与されたウイルスの腫瘍崩壊及び/又は治療効果を増強するために選択された遺伝子の産物を発現することができる、第2世代腫瘍崩壊性ウイルスを作るために有用なベクターである。

【0167】

RL1.diRES-GFPプラスミドは、インターナルリボソームエントリー部位(IRES)、GFP遺伝子、及びHSV-1 RL1配列に隣接したSV40ポリアデニル化配列の上流にマルチクローニングサイト(MCS)を組み込む。脳心筋炎ウイルスIRES(EMCV IRES)の組み込みは、単一の転写 mRNAからの、2つのオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする。 20

【0168】

目的のヌクレオチド配列（及び選択したプロモーター）の、RL1.diRES-GFP内へのクローニングによる特定のシャトルベクターの作製の後、望ましい核酸転写物又はタンパク質を発現する組換えHSV-1を作製し、2週間以内に精製することが可能である。この期間は、従来技術のプロトコルを用いる場合の2~3ヶ月に匹敵する。

【0169】

本発明者らが提供したRL1.diRES-GFPプラスミドを用いて作製したICP34.5ヌルHSVにおいて、目的のヌクレオチド配列と、単一の転写物としてのGFPの両方の転写物は、目的のヌクレオチド配列の上流にある同一のプロモーターによって制御され、転写されたIRESはGFPのキャップ-非依存的翻訳を導く。作製されたICP34.5ヌルHSVは、非神経毒性である。カセットの周囲に適当なフランкиング配列を組み込むようにRL1.diRES-GFPプラスミドを改変することによって、GFPを発現する他の遺伝子特異的なHSVヌル変異体を作製することができる。 30

【0170】

RL1.diRES-GFPにはプロモーターがないため、挿入カセットからの目的のヌクレオチド配列の発現を制御するために、選択したプロモーターを相同組換えしたシャトルベクター中に組み込むことが可能となる。

【0171】

目的の核酸転写物又はポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を更に含む、プラスミドRL1.diRES-GFP又はその改変プラスミドシャトルベクターは、単離した又は精製した形態で提供され得る。 40

【0172】

このベクターは、プラスミドRL1.diRES-GFPの変異型でありうる。

【0173】

同様にプラスミドRL1.diRES-GFPは、目的の配列と、緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードするマーカー遺伝子とのタンデム発現のために設計されている。目的の配列は、プロモーター（例えばCMV）が目的の配列のmRNAと共にIRES-GFPの転写を駆動するように、このプロモーターと共にRL1.diRES-GFP中にクローン化される。翻訳は、インターナルリボソームエントリー部位からのGFPの発現をもたらし、これを達成するには、目的遺伝子及びプロモーターがRL1.diRES-GFP中に正しい方向でクローン化されなければならない。こ 50

のタンデム発現配置が不適当であるかもしれない多数の例が存在し、カセット設計のバリエーションは有利である。

【0174】

1つの例は、H1又はU6などのRNA polIIIプロモーターを用いた短いヘアピンRNAとしてのsiRNAの発現である。これらのプロモーターは、RNA polIII発現カセットが短い転写物を产生するためだけに設計されているので、IRES-GFPの付加的なタンデム発現を駆動することができない。さらに、3'非翻訳領域に強いmRNA遮断シグナルを有するゲノムDNAに由来する目的の配列は、IRES-GFP発現を支持することができない。

【0175】

従って、幾つかの場合において、カセットは別個のプロモーターから目的の配列及びマークーが別々に発現されるように提供され得る。

【0176】

1つの変異型は、プラスミドRL1.dIRES-GFPのリボソーム結合部位が調節ヌクレオチド配列、好ましくはホスホグリセロキナーゼプロモーターなどの強く構成的なプロモーターで置換されている1つのカセットを含む。マークーはこれによって、この（「第1の」）調節配列の制御下で発現する。目的のヌクレオチド配列（例えばアンチセンス又はsiRNA）は、目的のヌクレオチド配列の上流（5'）にある第2の調節配列、例えばCMVプロモーターの制御下で発現する。このベクター変異型は、siRNA分子の発現に弱いプロモーターを用いることが可能な場合、又はsiRNAをコードする核酸が転写されたsiRNA及びマークー配列を含む単一のバイ-又はポリ-リストロン性転写物の产生を困難にする強い終結シグナルを有することが可能な場合、siRNAの発現に特に適している。この配置において、ウイルスゲノムに組み込まれたカセットを含む形質転換されたウイルスは、第1のプロモーター及び第2のプロモーターの制御下で2つの別々の転写物を产生する。

【0177】

このカセットは、下記の方法で構築される。制限消化とそれに続くKlenow処理によって、PGKプロモーター/GFP遺伝子を含む1.3kbpの平滑末端化EcoRI/AfIII断片をベクターpSNR Gから得て、平滑末端を生じる制限酵素NruIで切断したRL1-delベクター中にクローン化した。PGK/GFP DNAの成功した挿入をBamHI消化によって確認し、挿入したDNAの方向をRL1-del中の唯一のXbaI部位及びPGK/GFPの3'末端におけるBsrGI部位を利用して同定した。PGK/GFPが順方向のプラスミド及び逆方向のプラスミドの両方が得られ、これらのプラスミドをRL1-dPGK/GFPfor及びRL1-dPGK/GFPrevと名付けた。GFPの発現は、順方向のプラスミド及び逆方向のプラスミドでトランスフェクトしたBHK細胞中で確認した。

【0178】

このようにして、目的の配列はそれ自身のプロモーターと共に（PGKプロモーターもまたこの目的に用いられないことが好ましいが）、その後、残っている唯一のBglII、XbaI又はHpaI制限酵素サイトを用いてRL1-dPGK/GFPfor又はRL1-dPGK/GFPrevのいずれかの中にも、いずれかの向きにクローン化することができる。生じたプラスミドは、マークーGFP遺伝子及び目的遺伝子が各々自身のプロモーターから非依存的に発現する組換えHSVを得るために用いることができる。

【0179】

記載されているベクターは、カセットに隣接するヌクレオチド配列と、選択した単純ヘルペスウイルス中の対応する配列との間の相同組換えの機構を介する核酸カセットの挿入によって操作されたHSV-1又はHSV-2の作製における使用のために構築することができる。

【0180】

記載されているベクターは、

- i) 選択したヌクレオチド配列、例えばアンチセンス核酸又はsiRNAの、HSVゲノムの特定の遺伝子座への送達用の遺伝子送達（遺伝子治療）ベクター、及び/又は
- ii) 選択した調節エレメントの制御下における、HSVゲノムからのi)の送達されたヌクレオチド配列の発現のための発現ベクター、

10

20

30

40

50

及び/又は

iii) HSV遺伝子特異的ヌル変異体作製のためのベクターであって、遺伝子産物が結果として生じる変異ウイルス中で不活性であるように、カセットが選択したゲノム位置に挿入され、選択したHSV遺伝子のタンパク質コード配列を破壊する、前記ベクターを含むことが可能であり、且つこれらベクターとしての用途を有し得る。

【0181】

記載されているベクターは、改変遺伝子特異的HSVヌル変異体、すなわち選択した遺伝子の活性遺伝子産物を発現する能力のないHSV変異体の製造において用いることができる。これらは、選択したタンパク質を1つの遺伝子コピーのみから発現し、他方の遺伝子コピーは機能遺伝子産物を発現することができないように破壊され又は改変されている、改変ウイルスの製造において用いることができる。このようなベクターは、癌及び腫瘍の治療、好ましくは腫瘍の殺腫瘍性治療による治療において使用するための医薬品、好ましくは前記遺伝子特異的HSVヌル変異体を含む医薬品、の製造においてもまた用いることができる。

【0182】

記載されているベクターはまた、改変HSV変異体の製造において用いることも可能であり、ここで変異体HSVのゲノムは、調節エレメント、例えばプロモーター、好ましくは挿入カセットの一部を形成する調節エレメントの制御下でHSVゲノムから転写され、アンチセンス転写物又はsiRNAを产生するようヌクレオチド配列が配置されるように、カセットの相同組換えによってHSVゲノムに挿入されているヌクレオチド配列を含む。好ましくは、このアンチセンスヌクレオチド配列は、外因性の/異種の(すなわち、非HSV起源)配列である。このようなベクターは、疾患の治療、例えば腫瘍の腫瘍崩壊性治療のための医薬品、好ましくは操作されたHSV変異体を含む医薬品、の製造に用いることができる。

【0183】

記載されているベクターはまた、操作されたHSV変異体の製造において用いることも可能であり、ここで変異体HSVのゲノムは、この変異体HSVが前記タンパク質コード配列によってコードされる活性遺伝子を発現することができないようにカセットの相同組換えによってHSVゲノムのタンパク質コード配列に挿入されているヌクレオチド配列を含み、挿入されたヌクレオチド配列は調節エレメントの制御下で発現し、アンチセンス転写物又はsiRNAを产生する。好ましくは、この調節エレメントはカセットの一部分を形成する。このようなベクターは、疾患の治療、例えば腫瘍の腫瘍崩壊性治療のための医薬品、好ましくは操作されたHSV変異体を含む医薬品、の製造に用いることができる。

【0184】

記載されているベクターは、カセットを、選択したHSVのゲノムへと挿入することによって、変異体HSVを作製するために用いることが可能であり、この作製方法は、上述のベクターを準備する工程、ベクターがプラスミドである場合にこのベクターを線状化する工程、並びにこの線状化したベクターと前記HSVに由来するゲノムDNAとを用いて細胞培養物を共トランスフェクトする工程、を含むことができる。

【0185】

この共トランスフェクションは、前記カセットの、ウイルスゲノムの挿入部位への相同組換えに効果的な条件下で行うことができる。

【0186】

この方法は更に、1つ以上の下記のステップ:

- 1) 前記マーカーを発現している変異体HSVを検出するために、前記の共トランスフェクトした細胞培養物をスクリーニングするステップ、及び/又は
- 2) 前記変異体HSVを単離するステップ、及び/又は
- 3) 目的のヌクレオチド配列又はそのRNA又はそれによってコードされるポリペプチドの発現について、前記変異体HSVをスクリーニングするステップ、及び/又は
- 4) 活性遺伝子産物の欠損について、前記変異体HSVをスクリーニングするステップ、及び/又は

10

20

30

30

40

50

5) *in vitro*で腫瘍細胞を殺すための、前記変異体HSVの腫瘍崩壊能力を試験するステップ、  
を含むことができる。

【実施例】

【0187】

実施例1

プラスミドRL1.dIRES-GFPの構築

一般的方法

プラスミドRL1.dIRES-GFPを、図1に示す3つの段階で作製した。

【0188】

1. CMV IEプロモーター(pCMV)、NAT遺伝子、インターナルリボソームエントリー部位(IRES)、GFPレポーター遺伝子及びSV40ポリアデニル化配列を含むDNA配列を、*Nsi*I及び*Ssp*Iを用いてpNAT-IRES-GFPから切除し、精製した。

【0189】

2. 精製したpCMV-NAT-IRES-GFP-ポリアDNA断片をRL1.delの中にクローン化し、新たなプラスミドを形成してRL1.dCMV-NAT-GFPと名付けた。

【0190】

3. RL1.dCMV-NAT-GFPのpCMV-NAT DNA配列を*Xba*Iを用いて切除し、プラスミドの残部を再連結して新規なプラスミドを形成し、RL1.dIRES-GFPと名付けた。この新規なプラスミドは、全てがHSV-1 RL1フランкиング配列内にある、IRES、GFP遺伝子及びSV40ポリア配列の上流に、マルチクローニングサイト(示されている全てのサイトは唯一)を含んでいた。RL1遺伝子座において目的遺伝子を発現している組換えICP34.5ヌルHSV-1は、目的遺伝子(適切なプロモーターの下流)をマルチクローニングサイト中にクローニングし、BHK細胞をこのプラスミドとHSV-1 DNAとを用いて共トランスフェクトすることによって作製することができる。標的遺伝子を発現している組換えウイルスは、GFP蛍光を用いて同定することができる。

【0191】

CMVプロモーター及びノルアドレナリントランスポーター遺伝子(pCMV-NAT)をRL1.dCMV-NAT-GFPから除去し、その後プラスミドの残部を再連結して、全てがRL1フランкиング配列内にある、脳心筋炎ウイルスインターナルリボソームエントリー部位(EMCV IRES)、GFPレポーター遺伝子及びSV40ポリア配列の上流にマルチクローニングサイト(MCS)を含んでいる、新規なプラスミド(RL1.dIRES-GFP)を生じた。このDNA配列の新規な配置、すなわち「スマート カセット」は、望ましい導入遺伝子(適切なプロモーターの下流)をMCSに挿入し、BHK細胞をこのプラスミド及びHSV-1 DNAで共トランスフェクトするだけで、RL1遺伝子座において目的遺伝子を発現しているICP34.5ヌルHSV-1が容易に作製されることを可能とする。GFP遺伝子とMCSとの間に位置しているこのIRESは同一のプロモーターからの2つの遺伝子の発現を可能とし、そのようにして目的遺伝子を発現している組換えウイルスがGFPも発現して、その結果蛍光顕微鏡の下で容易に同定し、精製することができる。

【0192】

材料及び方法

1 μgのRL1.del\*を、10ユニットの*Hpa*I(Promega)を用いて、適当な量の10xバッファー(Promega)及びヌクレアーゼ無含有水(Promega)中で、37℃で16時間消化した。その後消化したプラスミドをQIAquick PCR精製キット(Qiagen)を用いて精製し、10ユニットの子ウシ腸ホスファターゼ(Promega)を用いて、適当な量の10x CIPバッファー(Promega)及びヌクレアーゼ無含有水中で、37℃で4時間処理し、その後QIAquick PCR精製キットを用いて再び精製した。5 μlの精製したDNAを1%アガロースゲル上で電気泳動し、その濃度を確認した(図2)。

【0193】

4 × 1 μgのpNAT-IRES-GFP\*\*を、10ユニットの*Nsi*I及び10ユニットの*Ssp*Iを用いて、適当な量の10xバッファー(Promega)及びヌクレアーゼ無含有水(Promega)中で、37℃で16時

10

20

30

40

50

間消化した。反応混合物を1%アガロースゲル中で、110ボルトで1時間電気泳動した。ノルアドレナリントランスポーター遺伝子(NAT)、脳心筋炎ウイルスインターナルリボソームエントリーパーティー部位(IRES)、緑色蛍光タンパク質(GFP)の遺伝子及びSV40ポリアデニル化配列(SV40ポリA)の上流にあるCMV IEプロモーター(pCMV)からなる5.4KbpのDNA断片を、滅菌メスを用いて切除し、このDNAをQIAquick Gel Extraction kit(Qiagen)を用いてゲルから精製した。製造者の使用説明書に従って、3ユニットのKlenowポリメラーゼ(Promega)を用いて溶出したDNAを平滑末端化し、このDNAをQIAquick PCR精製キット(Qiagen)を用いて精製した。5μlの精製したDNA断片を1%アガロースゲル上で電気泳動し、その濃度を確認した(図3)。

## 【0194】

10

小さなエッペンドルフチューブ中で、16℃で一晩ライゲーション反応を行った。このチューブは5ユニットのT4 DNAリガーゼ(Promega)、適当な量の10X DNAリガーゼバッファー(Promega)、ヌクレアーゼ無含有水(Promega)及び様々な量のHpaI消化/CIP処理したRL1.del及び平滑末端化したpCMV-NAT-IRES-GFP-SV40ポリA DNAを含んでいた。その後コンピテンントJM109細菌細胞(Promega)を、様々な分量のライゲーション反応物\*\*\*を用いて形質転換した。プレート上に形成されたコロニーを選び、Qiagen Plasmid Mini kitを用いてそのプラスミドDNAを抽出し、インサートについて、AflIII(New England Biolabs)制限酵素解析を用いてスクリーニングした。インサートを含むプラスミドDNAは、AflIIIを用いた消化後4.8Kbp及び9.2Kbpの2つの断片を产生したであろう。2つのクローン(クローン5及び8)がインサートを含んでいた(図4)。クローン5(RL1.dCMV-NAT-GFP)におけるインサートの方向を、Xhol制限酵素解析(図5)を用いて決定した。

## 【0195】

20

クローン5からRL1.dIRES-GFPを作製するために、10ユニットのXholを用いて4×500ngのクローン5を適当な量のバッファー及び水(Promega)中で37℃で一晩消化することによって、CMV-NAT-IRES-GFP-SV40ポリAインサートのCMV-NAT部分を除去した。消化したDNAを、1%のアガロースゲル上で、110ボルトで1時間電気泳動した(図6A)。pGEM3zf(-)(Promega)バックボーン中のIRES、GFP遺伝子、SV40ポリA配列及びRL1フランкиング配列からなる10.2Kbpの断片を、滅菌メスを用いて切除し、QIAquick Gel Extraction kitを用いてDNAをゲルから精製した。

## 【0196】

30

小さなエッペンドルフチューブ中で、16℃で一晩ライゲーション反応を行った。このチューブは100ng~500ngの精製したDNA、3ユニットのT4 DNAリガーゼ(Promega)、適当な量の10X DNAリガーゼバッファー(Promega)及びヌクレアーゼ無含有水(Promega)を含んでいた。その後コンピテンントJM109細菌細胞(Promega)を、様々な分量のライゲーション反応物\*\*\*を用いて形質転換した。プレート上に形成されたコロニーを選び、QiagenプラスミドMini kitを用いてそのプラスミドDNAを抽出し、Xhol(Promega)制限酵素解析を用いてスクリーニングした。CMV-NATが除去されているプラスミドDNAを含むコロニーは、Xholで消化した場合10.2Kbpの1つの断片を产生したであろう。幾つかのポジティブクローンを発見し、1つを単離し、PromegaのWizard Plus Maxipreps kitを用いてプラスミドの大量調製を行った。このプラスミドの大量調製を、Xholを用いた消化によって確認した(図6B)。このプラスミドDNAを、その後「RL1.dIRES-GFP」と名付けた。

## 【0197】

40

プラスミドRL1.dIRES-GFPは、ブタペスト条約の規定に従って、Department of Neurology Southern General Hospital 1345 Govan Road Govan Glasgow G51 5TF Scotlandに住所を有するCrusade Laboratories Limitedの名義で、the European Collection of Cell Cultures(ECACC), Health Protection Agency, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, United Kingdomに登録番号03090303のもと、2003年9月3日に寄託されている。

## 【0198】

RL1.del

\*RL1.delはE.Mckie博士によって提供され、RL1遺伝子及びそのフランкиング配列からな

50

るHSV-1断片(123459-129403)が中にクローン化されているpGEM-3Zf(-)プラスミド(Promega)である。RL1遺伝子(125292-125769)の477bpのPfIM1-BstEII断片は除去されており、マルチクローニングサイト(MCS)と置換されてRL1.delを形成している。

【0199】

pNAT-IRES-GFP

\*\*pNAT-IRES-GFPは、Marie Boyd博士(CRUK Beatson Laboratories)によって提供され、その中のNheI及びXhoIサイトに彼女がウシノルアドレナリントランスポーター(NAT)遺伝子(3.2Kbp)をクローン化したpIRES2-EGFPプラスミド(BD Biosciences Clontech)である。

【0200】

\*\*\*細菌細胞の形質転換

10  
10μlの大腸菌グリセロールストックを20ml grienerチューブ中の10mlの2YT培地に添加した。このチューブを飽和培養液が得られるまで37℃の振盪培養器中に16時間～24時間置いた。その後1mlのこの培養液を、500ml滅菌ガラスボトル中の100mlの2YTに添加し、37℃の振盪培養器中に3時間置いた。細菌細胞を2,000rpmで10分間の遠心分離(Beckman)によってペレット化した。その後この細胞を1/10量の形質転換及び保存バッファー(10mM MgCl<sub>2</sub>、10mM Mg(SO)<sub>4</sub>、10% (w/v) PEG 3,500、5% (v/v) DMSO)中に再懸濁した。この細胞を、10分間から2時間の間、氷上に置き、その後、細胞は形質転換にコンピテントになったと考えられた。

【0201】

1~10μlのDNAをエッペンドルフチューブ中で100μlのコンピテント細菌と混ぜ、このチューブを氷上に30分間置いた。その後、このサンプルを、チューブを42℃のウォーターバス中で正確に45秒間インキュベートすることによって「ヒートショック」し、その後これらをさらに2分間氷上に置いた。1mlのL-Brothを添加し、このチューブを2~3回混転し、細菌を37℃で1時間インキュベートした。100μlの形質転換細菌を、100μg/mlの適当な抗生物質(通常、アンピシリン又はカナマイシン)を含有するL-broth寒天プレート上に播種した。プレートを室温で乾燥し、伏せた位置で37℃で一晩インキュベートした。

【0202】

実施例2

プラスミドRL1.diRES-GFPを用いた、目的遺伝子産物及びGFPを発現しているICP34.5ヌルHSV-1の作製

一般的な方法

目的遺伝子産物を発現しているICP34.5ヌルHSV-1の作製は、目的遺伝子産物(ポリペプチド)及び望ましいプロモーターをコードしているヌクレオチド配列の、RL1.diRES.GFPのMCSへの挿入、それに続く目的遺伝子及びHSV DNAを含む線状化プラスミドを用いたBHK細胞の共トランスフェクションを必要とする。相同組換えの後、GFPを発現しているウイルスプラークを同定する。図7は、関連の方法ステップを示す。

【0203】

目的遺伝子及び望ましいプロモーター(X)を含む図7AのプラスミドDNAについては、プロモーター/遺伝子断片を放出するために制限エンドヌクレアーゼで消化する。

【0204】

40  
プロモーター/遺伝子断片を、精製してRL1.diRES.GFPのマルチクローニングサイト(MCS)中にクローン化し、腫瘍崩壊性HSV-1の作製に適したシャトルベクターを形成する(図7B)。このベクターは、必須のRL1遺伝子に隣接するHSV-1配列を含むが、このRL1遺伝子を含まない。このプラスミドはまた、インターナルリボソームエントリー部位(IRES)の下流に緑色蛍光タンパク質(GFP)の遺伝子を含む。IRESは、目的遺伝子及びGFP遺伝子の両方が同一の上流プロモーターから発現することを可能とする。

【0205】

その後BHK細胞を線状化RL1.diRES.GFPで共トランスフェクトし、ここで目的遺伝子及びHSV-1 DNAを含む(図7C)。相同組換えに続いて、目的遺伝子及びGFPを発現しているデザイナーウィルスを作製し、蛍光顕微鏡の下で野生型ウイルス(同様に作製したウイルスだ

10

20

30

40

50

が、GFPは発現していない)と区別することができる。

【0206】

GFPを発現している(従って目的遺伝子も発現している)ウイルス plaque を蛍光顕微鏡の下で選び、全ての野生型HSV-1が除去されるまで精製した。組換えHSV-1は、全てのウイルス plaque がGFPを発現している場合に100%純粋と考えられる(図7D)。

【0207】

組換えウイルスが完全に純粋になった時点で、単離した plaque を選び、高濃縮のストックを増殖させ、適定する(図7E)。この結果選択したプロモーターから目的の遺伝子産物を発現している腫瘍崩壊性HSV-1は、その腫瘍殺傷能力の特徴付け及びin vitro試験に対する準備が整う。

10

【0208】

材料及び方法

目的遺伝子及びGFPを発現している組換えICP34.5ヌルHSV-1を作製するためには、RL1.d IRES-GFPのMCS中に、このプラスミド中のGFP遺伝子に対して順方向にクローニングされる目的遺伝子及び適切なプロモーターを必要とする。このことが達成された時点で、無関係な領域中でプラスミドを線状化する(すなわち、1回だけ切断する制限酵素、通常はSspI又はScaIで消化する)。その後、60mmペトリ皿中の80%コンフルエントなBHK細胞を、下に記載のとおりHSV-1 DNA及び線状化プラスミドDNAで共トランスフェクトする。

【0209】

目的の遺伝子及びGFPを発現する、複製が制限されたHSV-1を作製するためには、目的の遺伝子を、RL1dIRES-GFP中で適切なプロモーター(例えば、CMV IE)の下流にクローニングしなければならない。このプロモーターは、バイシストロン性mRNA転写物の産生のため、目的遺伝子の上流にあることが必要である。転写物中の、2つのオープンリーディングフレームの間のIRES配列は、効率的なキャップ非依存的内部翻訳開始のために、リボソーム結合部位として機能する。この設計は、目的遺伝子及びGFP両方の連関した転写、その後の第1遺伝子(目的遺伝子)のキャップ依存的翻訳開始、及びIRES-指令の、GFPのキャップ非依存的翻訳を可能とする。こうして同調的遺伝子発現は、この構造において保証される。

20

【0210】

CaPO<sub>4</sub> 及びDMSOのブーストによるウイルス及びプラスミドDNAの共トランスフェクション

30

:

目的遺伝子及び目的プロモーターを含むHSV-1 (17<sup>+</sup>)DNA 及び0.1~1μgの線状化SMARTカセットを1μlの子ウシ胸腺DNA (10μg/ml)及び適量の蒸留水を含む1.5ml エッペンドルフチューブ中にピペットし、最終量165μlを生じる。200μlのピペットチップを用いてこの溶液を極めて穏やかに混ぜる。388μlのHEBS、pH 7.5、(130mM NaCl、4.9mM KCl、1.6mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、5.5mM D-グルコース、21mM HEPES)をその後添加し、この溶液を混ぜ、26.5μlの2M CaCl<sub>2</sub>液滴を添加し、エッペンドルフチューブを2又は3回はじく。このサンプルを室温に10~15分置き、その後液滴を60mmペトリ皿中の、培地が除去されている80%コンフルエントなBHK細胞に添加する。37、45分間のインキュベーション後、細胞を5mlのETC10で覆い、37でインキュベートする。3~4時間後、培地を除去してプレートをETC10で洗浄する。室温で正確に4分間、1mlの、HEBS中の25% (v/v) DMSOで細胞を覆う。4分後、速やかに細胞を5mlのETC10で3回洗浄し、5mlのETC10で覆い、インキュベーターに戻す。翌日、新鮮な培地を細胞に添加する。cpeが明らかな2日後、細胞を培地中にこすり落とし、小さなビジュ (bijoux) に移して徹底的に超音波処理する。その後このサンプルを、必要になるまで-70で保存する(ブラーク精製に関する下節を参照)。

40

【0211】

注意 添加するウイルスDNAの量は、プラスミドDNAを入れずにある範囲のウイルスDNA量を用いて上記の手順を行い、2~3日後にBHK単層上に最大数のウイルス plaque を生じる量を選択することによって決定する。

【0212】

50

### マーク精製：

共トランスフェクションプレートから得た超音波処理したサンプルを解凍し、連続的に ETC10中に10倍希釈する。原液から得た100μlを10<sup>5</sup>希釈したものを、培地が除去されている60 mm ペトリ皿中のコンフルエントなBHK細胞に播種する。37 で45分のインキュベーション後、細胞を5mlの EMC10で覆い、37 で48時間インキュベートする。その後プレートをウイルスマークの存在について確認し、最もマークが少なく、最もマークが分離している皿を蛍光立体顕微鏡の下に置く。目的遺伝子に加えて緑色蛍光タンパク質 (GFP)を発現するように設計されている組換えウイルスは、GFPフィルターを用いて野生型ウイルスとはっきり区別することができる。20μlピペットを用いて蛍光を発するマークを選び、1mlのETC10を含むエッペンドルフチューブ中に入れる(チップを含む)。サンプルを徹底的に超音波処理し、ETC10中で10倍段階希釈を作製し、上記の精製手順を繰り返す。この工程を、BHK単層上の全てのマークが蛍光を発するまで典型的には3~4回繰り返す。これが達成された時点で、50μlのこのサンプルを、ローラーボトル中にある50ml ETC10中のBHK細胞を感染させるために用い、ウイルス株を増殖させる。

10

### 【0213】

#### 組織培養培地：

BHK21/C13 細胞をEagle's 培地(Gibco)中で増殖させ、10%の新生子ウシ血清(Gibco)及び10% (v/v)のトリプトースホスフェートプロスを補充する。これをETC10と呼ぶ。ウイルス滴定及びマーク精製の目的で、EMC10 (1.5%のメチルセルロースを含有するEagles培地及び10%の新生子ウシ血清)を、細胞を覆うために用いる。

20

### 【0214】

#### 実施例3

##### HSV1716/CMV-asSCCRO/GFPの構築

###### 一般的方法

HSV1716/CMV-asSCCRO/GFPは、まずpUSEamp-asSCCROをSspI及びXholで消化し、この消化で作製した1.96Kbpの断片を精製することによって作製した。1.96kbpのSspI/Xhol断片は扁平上皮細胞癌関連抗原(asSCCRO)に対するDNAアンチセンスをCMV IE プロモーター(pCMV)の下流に含む。この断片をRL1.dIRES-GFPスマートカセットのMCS中に、RL1.dIRES-GFP中のGFP 遺伝子について順方向にクローニングした(図 8)。RL1.dCMV-asSCCRO-GFPと呼ばれる、結果として生じるプラスミドをその後線状化し、実施例2に記載のとおりに組換えウイルスを作製し、精製した。プラスミドpUSEamp-asSCCROは、Bhuvanesh Singh, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York から得た。

30

### 【0215】

#### 材料及び方法

その後2μgのRL1.dIRES-GFP プラスミドを、15 ユニットのBglII(Promega)を用いて、適当な量の10x バッファー (Promega)及びヌクレアーゼ無含有水(Promega)中で37 で16時間消化した。その後消化したプラスミドをQIAquick PCR精製キット(Qiagen)を用いて精製し、5ユニットのKlenow ポリメラーゼ(Promega)を用いて室温で20分間処理し、その後再び精製した。その後精製したDNAを、10ユニットの子ウシ腸ホスファターゼ(Promega)に、適当な量の10x CIPバッファー (Promega)及びヌクレアーゼ無含有水(Promega)中で37 で4時間添加し、QIAquick PCR精製キット(Qiagen)を用いて再び精製した。5μlの精製したDNAを1%アガロースゲル上で電気泳動し、その濃度を確認した(図 9)。

40

### 【0216】

4 × 1μgのpUSEamp-asSCCROを、10 ユニットのSspI及び10 ユニットのXhol(Promega)を用いて、適当な量の10x バッファー (Promega)及びヌクレアーゼ無含有水(Promega)中で37 で16時間消化した。反応混合物を、1%アガロースゲル中で110ボルトで1時間電気泳動した。本質的に、SCCRO (pCMV-asSCCRO)に対するDNAアンチセンスの上流のCMV プロモーターからなる1.96KbpのDNA 断片を滅菌メスを用いて切除し、QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen)を用いてDNAをゲルから精製した。精製したDNAを、5ユニットのKlenowポリメラーゼ(Promega)を用いて、20分間室温で平滑末端化し、その後再び精製した。5μlの精

50

製したDNA断片を1%のアガロースゲル上で電気泳動し、その濃度を確認した(図10)。

【0217】

ライゲーション反応を、小さなエッペンドルフチューブ中で、16で一晩行った。このチューブは5ユニットのT4 DNAリガーゼ(Promega)、適当な量の10X DNAリガーゼバッファー-(Promega)、ヌクレアーゼ無含有水(Promega)及び様々な量のBgIII消化/平滑末端化/CI P処理したRL1.dIRES-GFPプラスミド及び平滑末端化したpCMV-asSCCROを含んでいた。その後コンピテントJM109細菌細胞(Promega)を様々な分量のライゲーション反応物で形質転換した。プレート上に形成したコロニーを選び、それらのプラスミドDNAをQiagen Plasmid Mini kitを用いて抽出し、インサートについて、BgIII (Promega)制限酵素解析を用いてスクリーニングした。pCMV-asSCCROインサートを含有するRL1.dIRES-GFPプラスミドDNAは、BgIII消化後、10.8Kbp及び1.4Kbpの2つの断片を产生したであろう。1つのクローン(クローン11)がインサートを含むことを発見した(図11)。このpCMV-asSCCROインサートは、RL1.dIRES-GFP中で二方向にクローン化された可能性があった。pCMV-asSCCRO断片がRL1.dIRES-GFP中で望ましい方向にクローン化されたことを確認するために、クローン11を、10ユニットのNruI(Promega)を用いて、適当な量の10xバッファー(Promega)及びヌクレアーゼ無含有水(Promega)中で37で16時間消化した。インサートが正しい方向を向いていた場合、1.64Kbpの断片が作製されるであろう。NruI消化の後、1.64Kbpの断片が作製されたので(図12)、pCMV-asSCCROが望ましい方向にクローン化されたことが確認された。このプラスミド(クローン11)を「RL1.dCMV-asSCCRO-GFP」と名付けた。

【0218】

10ユニットのScaI(Promega)を用いて、適当な量の10xバッファー(Promega)及びヌクレアーゼ無含有水(Promega)中で37で16時間消化することによって0.1~1μgのRL1.dCMV-asSCCRO-GFPを線状化した。消化したDNAの1つのサンプル(5μl)を、1%のアガロースゲル上で、110ボルトで1時間電気泳動し、サンプルが線状化しているのを確認した。その後80%コンフルエントなBHK細胞を、適当な量の残りの線状化DNA及びHSV-1 DNAを用いて共トランスフェクトした。GFPを発現している組換えHSV-1(従ってasSCCROも発現している)を蛍光顕微鏡を用いて同定及び精製し、且つHSV1716/CMV-asSCCRO/GFPと名付けたウイルス株を増殖し、BHK細胞上で滴定した(図13)。

【0219】

HSV1716/CMV-asSCCRO/GFPは、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタベスト条約(本明細書中では「ブタベスト条約」という)の規定に従って、Department of Neurology Southern General Hospital 1345 Govan Road Govan Glasgow G51 5TF Scotlandに住所を有するCrusade Laboratories Limitedの名義で、the European Collection of Cell Cultures (ECACC), Health Protection Agency, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, United Kingdomに登録番号04051901のもと、2004年5月19日に「HSV1716 asSCCRO」として寄託されている。

【0220】

実施例4

頭頸部扁平上皮細胞癌用の新規な治療薬としてのHSV1716asSCCROの使用

発明者らは、SCCROに対するアンチセンスの単純ヘルペスウイルスHSV1716中への挿入が、細胞殺傷の二重の打撃機構を有するウイルスを提供し得ると考える。この考えは、内因性SCCRO発現のダウンレギュレーションによる細胞死に加えて、細胞溶解によるウイルス誘導性細胞死に関与するであろう。

【0221】

HSV1716asSCCROウイルスを本発明に従って構築し、増幅し、精製した。これに続いて、一連の頭頸部扁平上皮細胞癌(HNSCC)株上でin vitro及びin vivo解析を行った。調査したHNSCC細胞株は、SCC15、1483、1186、1386、1986及び584であった。これらの細胞株におけるSCCROタンパク質発現の相対発現を、ウエスタンプロットティングによって最初に測定した。ウエスタンプロットティングは、細胞株SCC15、1483及び1186がSCCROの高い発現レベルを有し、1386が中間レベルの発現を有し、1986、584が低い発現レベルを有することを

10

20

30

40

50

示した。その後全ての細胞株をHSV1716又はHSV1716asSCCROウイルスを用いて感染させ、細胞毒性を、MOI (multiplicity of infection:感染の多重度) 1及び5pfu/細胞におけるLDH放出細胞毒性アッセイによって測定した(図14、15及び16)。ウイルス増殖を、MOI 1pfu/細胞における連続ブラークアッセイによって測定し(図17)、感染力を、HSV1716gtpウイルスを用いた緑色蛍光タンパク質(gfp)によって測定した(図18)。低い又は中間の発現の細胞株(1986、584、1386)においては、細胞毒性は両方のウイルスを用いて用量依存的に増大したが、2つのウイルスの間に細胞毒性における顕著な差異はなかった。ウイルス増殖アッセイ(図17)は、ウイルス産生における $10^2$ から $10^4$ の範囲にわたる増大と共に、両ウイルスの同等な増殖を示した。SCCROを高発現する細胞株において、本発明者らは細胞株SCC15がHSV1716asSCCROウイルスで増強された細胞毒性を示すことを発見した。この観察は、細胞溶解機構によるウイルス誘導性細胞死について早期のウイルス感染後12時間で起こった。さらに、2つのウイルスのウイルス増殖は、両方のウイルスについて、 $10^4$ のウイルス産生における増大と同等であった。これらの結果は、12時間の時点における増強された細胞殺傷が、おそらくアンチセンスSCCRO発現によるSCCROの内因性高発現のダウンレギュレーションによる、代替機構によるものであることを示唆した。この仮説を詳しく調べるため、発明者らは36時間を超える連続タンパク質発現によってウイルス感染後に細胞株SCC15(高発現)及び細胞株584(低発現)を分析した。細胞を、MOI 1pfu/細胞においてHSV1716又はHSV1716asSCCROを用いて感染させ、感染後12時間、24時間及び36時間後に細胞を回収し、タンパク質を求めて溶解させた。細胞株SCC15のウエスタンプロットティングは、HSV1716asSCCROを用いた場合の12時間の時点におけるSCCROタンパク質のダウンレギュレーションを示したが、細胞株584においてはダウンレギュレーションは示されなかった(図19参照)。この結果は、この機構によってHSV1716asSCCROが細胞株SCC15において効力を増強させたことを示唆した。

10

20

30

40

### 【0222】

その後細胞株SCC15及び細胞株584においてin vivo調査を行った。皮下腫瘍を胸腺欠損ヌードマウス中で増殖させ、HSV1716、HSV1716asSCCRO又はPBS対照を単独注射で腫瘍内に注射し、腫瘍サイズを連続的な時点でモニターした(図20及び21)。SCC15においては、HSV1716asSCCROを用いた場合に、HSV1716を用いた場合と比べて効力が増強した。HSV1716asSCCROを注射した6匹のマウス全てが、感染後21日までに完全な応答を示した。HSV1716を用いた場合、48日の経過観察期間にわたって完全な応答を示す3/6マウスのみに腫瘍増殖の阻害が生じた。細胞株584については、両方のウイルスが腫瘍増殖を阻害することができたが、どちらのウイルスも、異種移植片を注射したいずれかのマウスにおいて完全な応答は生じなかった。このin vivoデータは、高SCCRO発現している細胞株SCC15において、HSV1716asSCCROがHSV1716より強力な抗腫瘍剤であることの更なる証拠となつた。

### 【0223】

これらの結果は、HSV1716及びHSV1716asSCCROが再発性又は局所的に進行した頭頸部癌の治療における直接腫瘍内注射による有用な治療薬として大きな可能性を有することを示す。しかし、このデータはまたHSV1716asSCCROが、SCCROを過剰発現している腫瘍において抗腫瘍活性を増強することができることを示す。SCCROは、かなりの数の頭頸部の扁平上皮細胞癌において過剰発現しているので、この改変ウイルスはこの疾患において特に有効であり得る。従って、本発明者らはHSV1716asSCCROが、局所的に進行した又は再発性の頭頸部癌を患う頭頸部癌患者において、特にこれらの癌が直接腫瘍内注射に適している時に重要な治療薬となるだろうと考える。

### 【0224】

#### 実施例5

siRNAを発現するHSV1716変異体の構築

一般的な方法

SCCRO遺伝子(配列番号5)の発現を標的とするように設計したsiRNA構築物を含み、339iと名付けられたプラスミドは、MSKCC, New YorkのBhuv Singh博士によって提供された。

対照siRNA(配列番号6)をコードしている、Coniと名付けられたプラスミドもまた提供さ

50

れた。

#### 【0225】

双方のsiRNA構築物はベクターpSNRG中にあり、その発現はRNA polIII H1プロモーターによって駆動される。RNA polIIIは、短いRNA分子のみを転写し、このH1プロモーターは、シャトルベクターRL1-del.IRES.gfpを産生している通常の組換えウイルスからIRES-gfpの発現を駆動するには不十分であるだろう。従って別のクローニングストラテジーを採用した。

#### 【0226】

下記の方法でカセットを構築した。制限消化によってPGKプロモーター/GFP遺伝子を含む1.3kbpの平滑末端化したEcoRI/AfIII断片を得て、その後ベクターpSNRGからKlenow処理し、平滑末端を生じる制限酵素NruIで切断したRL1-delベクター中にクローン化した。PGK/GFP DNAの成功した挿入を、BamHI消化によって確認し、挿入したDNAの方向を、RL1-del中の唯一のXholサイト及びPGK/GFPの3'末端にあるBsrGIサイトを用いて同定した。PGK/GFPが順方向に入っているプラスミド及び逆方向に入っているプラスミドの両方を得て、このプラスミドをRL1-dPGK/GFPfor及びRL1-dPGK/GFPRevと名付けた。順方向プラスミド及び逆方向プラスミドを用いてトランスフェクトしたBHK細胞中でGFPの発現を確認した。

#### 【0227】

従って、目的の配列は、それら自身のプロモーターと共に（この配置においては目的のスクレオチド配列及びマーカーの転写を駆動するために異なるプロモーターを用いることが好ましい）その後、残っている唯一のBgIII、Xhol又はHpaI制限酵素サイトを用いてRL1-dPGK/GFPfor又はRL1-dPGK/GFPRevのいずれかの中に、いずれかの向きでクローン化し得る。結果として生じるプラスミドは、マーカーGFP遺伝子及び目的遺伝子がそれら自身のプロモーターから非依存的に発現する組換えHSVを導き出すために用いることができる。

#### 【0228】

##### 材料及び方法

pSNRGプラスミド中に、H1/siRNAコード配列に隣接して、ホスホグリセロキナーゼ(PGK)プロモーターを伴うgfp遺伝子を含む緑色蛍光タンパク質(gfp)発現カセットがある。制限酵素HindIII及びAfIIIを連続的に用いて、H1/siRNA及びPGK/EGFP発現カセットを含む1.6kbpのDNA断片を、それらのConiプラスミド及び339iプラスミドから切除した。この1.6kbpのDNA断片を1%アガロースゲルから精製し、Klenow DNAポリメラーゼを用いた30で30分間のインキュベーションによって平滑末端化した。平滑末端化した断片を、平滑末端切片を生じる制限酵素NruIで消化されているRL1-delシャトルベクター中に連結した。ライゲーションの前に、NruI-切断したRL1-delをゲル精製し、子ウシ腸アルカリホスファターゼを用いてホスファターゼ処理した。平滑末端化した339i又はConi DNA断片のいずれかを平滑末端化したRL1-delプラスミドと共に用いた一晩のライゲーションの後、反応混合物をDH5アルファ細胞の形質転換に使用し、LB ampプレート上に播種した。37で一晩のインキュベーション後、各々のLB ampプレートから得た個々のクローンを、3mlのLB broth中で一晩増殖させ、プラスミドDNAを抽出した。

#### 【0229】

組換体についてスクリーニングするために、最初にBamHIを用いてプラスミドを消化し、H1/siRNA及びPGK/gfpカセットの挿入がプラスミド中のRL1 BamHI断片の大きさを5.4kbpから7.0kbpまで増大させるようにした。Coni及び339i両方のライゲーション反応物に関して、スクリーニングした1/24クローンは7.0kbpのBamHI断片を示し、これらのプラスミド中のH1/siRNA及びPGK/EGFPカセットの存在をEcoR1、EcoR1/HindIII及びEcoR1/SalI消化によって確認した。挿入されたH1/siRNA及びPGK/EGFPカセットは、RL1-delベクター中に新規なEcoR1サイトを導入する。

#### 【0230】

陽性の339iクローン及びConiクローンのグリセロールストックから、追加のプラスミドを作製し、BHK細胞をトランスフェクトするために用いた。50マイクロリットル(μl)のプラスミドを最終量100μlの無血清培地中で6μlのリポフェクタミン2000と混ぜ、24穴

10

20

30

40

50

プレート中で13mmのガラスカバースリップ上に播種されたBHK細胞をトランスフェクトするためには用いた。48時間のトランスフェクション後、PBS中で細胞を1回洗浄し、4%のパラホルムアルデヒド中で2時間インキュベートし、もう1度PBS中で洗浄し、Vectashieldを用いて顕微鏡用スライド上に固定した。RL1-del/339i及びRL1-del/Coni プラスミドを用いたトランスフェクション後のc5% gfp-陽性細胞の存在は、PGK/GFPカセットの存在を裏付けた。

#### 【0231】

制限酵素Scal及びXmnIのいずれかを用いてRL1-del/339iプラスミド及びRL1-del/Coniプラスミドを線状化し、線状化プラスミドをウイルスDNAと共に用いて、60mm皿中でc80%コンフルエンシーになるように播種したBHK細胞をトランスフェクトした。100μlの線状化プラスミド又は未消化の環状プラスミドに、50μlのHSV-1株17+ DNAを、20μlのリポフェクタミン2000と共に最終量が500μlの無血清培地で添加し、この混合物をBHK細胞に添加した。4時間のトランスフェクション後、正確に4分間HBSS中で25%DMSOを用いて細胞に衝撃を与え、培地で3回洗浄し、5mlの培地で、37、48時間のインキュベーションに戻した。ウイルスのcpeは48時間後に明らかとなり、細胞及び培地を共に回収し、超音波処理して-80で保存した。無希釈の培地/細胞及び4x 10倍希釈液をBHK細胞上に播種し、48時間後、蛍光顕微鏡によりgfp発現についてウイルスpla-queを調べた。無希釈のプレート上では、XmnI-線状化したプラスミドでトランスフェクトした細胞から、Coni及び339iの両方について100を超えるgfp陽性pla-queが観察され、高度の組換え率を示していた。興味深いことに、組換えは、低い頻度 (c50pla-que/プレート) ではあるが、トランスフェクトされた環状プラスミドについては観察されたが、Scal-線状化したプラスミドを用いた組換えは非常に低かった (5以下のpla-que/プレート)。

10

20

30

40

#### 【0232】

gfp-陽性のpla-queがはっきりと目に見える最高の希釈 (PGK/GFPカセットが非常に強い蛍光シグナルを発した) を用いて、Coniウイルス及び339iウイルス各々の2つのpla-queを、滅菌ピベットチップを用いて選び、1mlの培地に入れ、1分間超音波処理して-80で保存した。その後pla-queを6ラウンドのpla-que精製に供し、第6ラウンドの後、野生型のpla-que、gfpを発現しているpla-queは見えず、Coniウイルス又は339iウイルスの各々について6pla-queをササンプロッティングのために選んだ。

#### 【0233】

Coniウイルス及び339iウイルスの各6つのpla-queを、T175フラスコのベロ細胞を感染させるために用い、72時間の感染後、ウイルスを回収して滴定した。最高の力値を与えた各3つのConiウイルス及び339iウイルスに関して、0.5mlを用いて第2のT175フラスコを24時間感染させた。その後ウイルスDNAを各6つのフラスコから回収した。BamHI-消化したウイルスDNAをAlu/Rsa RL1プローブを用いてササンプロッティングし、そのバンドパターンを野生型と比較して、HSV1716 DNAもBamHIで消化した。RL1遺伝子座中の1.6kbp H1/siRNA及びPGK/GFPカセットの挿入と一致する新規なc6kbpバンドを、6つ全てのウイルス分離株においてはっきりと目で見ることが可能であり、野生型のバンドは検出されなかった。ササンプロッティング上で最も強いシグナルを発したConiウイルス及び339iウイルスの株を作製した。

#### 【0234】

##### 参考文献

1. BL Liu, M Robinson, Z-Q Han, RH Branston, C English, Preay, Y McGrath, SK Thomas, M Thornton, P Bullock, CA Love and RS Coffin; Gene Therapy (2003) 10, 292-303.
2. WO 92/13943
3. A Dolan, E Mckie, AR Maclean, DJ McGeoch; Journal of General Virology (1992) 73 971-973.
4. Aidan Dolan, Fiona E Jamieson, Charles Cunningham, Barbara C Barnett Duncan J McGeoch; Journal of Virology Mar 1998 2010-2021.

50

5. Joany Chou, Earl R Kern, Richard J Whitley, Bernard Roizman; *Science* (1990) 250 1262-1265.
6. Coffin RS, MacLean AR, Latchman DS, Brown SM; *gene therapy* (1996) Oct 3(10) 886-91.
7. McKie EA, Hope RG, Brown SM, MacLean AR; *Journal of General Virology*, (1994) Apr 75(Pt4) 733-41.
8. McKay EM, McVey B, Marsden HS, Brown SM, MacLean AR; *Journal of general Virology*, (1993) Nov 74(Pt11) 2493-7.
9. Joany Chou, Bernard Roizman; *Journal of Virology*; (1990) Mar 1014-1020.
10. Green, N.K., Youngs, D.J., J.P. Neoptolemos, F. Friedlos, R.J. Knox, C.J. Sp ringer, G.M. Anlezark, N.P. Michael, R.G. Melton, M.J. Ford, L.S. Young, D.J. Ker r, and P.F. Searle; *Cancer Gene Therapy* (1997) 4:229-238. 10
11. Cherry L. Estilo, Pornchai O-charoenrat, Ivan Nagai, Snehal G. Patel, Pabba thi G. Reddy, Su Dao, Ashok R. Shaha, Dennis H. Kraus, Jay O. Boyle, Richard J. Wong, David G. Pfister, Joseph M. Huryn, Ian M. Zlotolow, Jatin P. Shah and Bhuv anesh Singh; *Clinical Cancer Research* (June 2003) Vol. 9 2300-2306.
12. Ganly I, Kaye SB. Recurrent head and neck cancer-current therapy and future prospects. *Annals of Oncology* (2000), 11:1-6.
13. Ganly I, Soutar DS, Kaye SB. Current role of gene therapy in head and neck c ancer. *European J of Surgical Oncology* (2000), 26:338-343. 20
14. Ganly I, Kirn D, Soutar D, Eckardt G, Otto R, Robertson AG, Park O, Heise C , Von Hoff DD, Kaye SB. A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenoviru s, administered intratumourally in patients with recurrent tumours of the head a nd neck. *Clinical Cancer Research* (2000), 6:798-806.
15. Khuri F, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock I, Romel L, Gore M, Ironside J, Heise C, Randle B, Gillenwater A, Bruso P, Kaye SB, Hong WK, Kirn DH. Controlled trial of intratumoural ONYX-015, a selectively replicating adenoviru s, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent h ead and neck cancer. *Nature Medicine* (2000) 6(8): 879-885.
16. Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, McCormick F, Von Hoff D and Kirn D H. Onyx -015 an E1B gene attenuated adenovirus causes tumour specific cytolysis and antitumoural dfficacy that canb e augmented by standard chemotherapeutic age nts. *Nature Medicine* 3, 639-645. 30
17. MacLean AR, Fareed MU, Robertson L, Harland J, and Brown SM. (1991). Herpe s simplex virus type 1 deletion variants 1714 and 1716 pinpoint neurovirulence r elated sequences in Glasgow strain 17<sup>+</sup> between immediate early gene 1 and the 'a' sequence. *Journal of General Virology* 72, 631-639.
18. Brown SM, Harland J, MacLean AR, Podlech J. and Clements JB. (1994). Cell t ype and cell state determine differentiated in vitro growth of non-neurovirulent ICP34.5 negative herpes simplex virus. *Journal of General Virology* 75, 2367-23 77. 40
19. McKie EA, MacLean AR, Lewis AD, Cruickshank G, Rampling R, Barnett SC, Kenn edy PGE and Brown SM. (1996) Selective in vitro replication of herpes simplex vi rus type 1 (HSV1), ICP34.5 null mutants in primary human CNS tumours-evaluation of a potentially effective clinical therapy. *British Journal of Cancer* 74, 745-752.
20. Randazzo B, Kesari S, MacLean AR, Brown SM. and Fraser NW. (1995). Treatme nt of experimental intracranial murine melanoma with the neuroattenuated HSV1 mu tant 1716. *Virology* 211, 94-101.
21. Kesari S, Randazzo BP, Valyi-Nagy T, Huang QS, Brown SM, MacLean AR, Lee VM 50

- Y, Trojanowski JQ. and Fraser NW. (1995). A mutant herpes simplex virus replicates in brain tumours but not in neurons derived from a human embryonal carcinoma cell line. *Laboratory Investigation* 73, 636-648.
22. Randazzo BP, Kucharczuk JC, Litzky LA, Kaiser LR, Brown SM, MacLean AR, Albelada SM. and Fraser NW. (1996). Herpes simplex 1716 - an ICP34.5 mutant is severely replication restricted in human skin xenografts in vivo. *Virology* 223, 392-396.
23. Lasner TM, Kesari S, Brown SM, Lee VM-Y, Fraser NW. and Trojanowski JQ. (1996). Herpes simplex virus type 1 (HSV1) mutants for the treatment of childhood brain tumours. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 55, 1259-1269 10
24. Kucharczuk JC, Randazzo B, Chang MY, Amin KM, Elshami AA, Sterman DH, Rizk NP, Molnar-Kimber KL, Brown SM, MacLean AR, Litzky LA, Fraser NW, Albelada SM. and Kaiser LR. (1997). Use of a "replication restricted" herpes virus to treat experimental human malignant mesothelioma. *Cancer Research*, 57, 466-471.
25. Randazzo BP, Bhat MG, Kesari S, Fraser NW. and Brown SM. (1997). Treatment of experimental subcutaneous human melanoma with a replication restricted herpes simplex virus mutant. *Journal of Investigative Dermatology*, 108, 933-937.
26. Rampling R, Cruickshank G, Papanastassiou V, Nicoll J, Hadley D, Petty R, Maclean A, Harland J, McKie E, Mabbs R. & Brown SM. (2000). Toxicity evaluation of replication competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene Therapy* 7, 859-866. 20

## 【図面の簡単な説明】

## 【0235】

## 【図1】プラスミドpNAT-IRES-GFP及びRL1.delからの、プラスミドRL1.dIRES-GFPの作製。

【図2】HpaI消化し、CIP処理したRL1.delのアガロースゲル電気泳動。RL1.delをHpaIで消化した。消化したDNAをその後子ウシ腸ホスファターゼ(CIP)で処理し、その後に続くライゲーション反応においてベクターがそれ自身に再アニーリングするのを妨げた。消化/CIP処理したDNAのサンプルを、1%アガロースゲル上で1KbpのDNAラダー(Promega)の隣に電気泳動した。HpaIはベクターを8.6 Kbpに線状化した。 30

【図3】NsiI/SspI消化したpNAT-IRES-GFP(A)及び精製/平滑末端化したpCMV-NAT-IRES-GFP-ポリ(B)のアガロースゲル電気泳動。pNAT-IRES-GFPの4つのNsiI/SspI消化を、1%アガロースゲル上で1KbpのDNAラダー(Promega)の隣に電気泳動した。このゲルから5.4Kbpの断片(pCMV-NAT-IRES-GFP-ポリA)を精製した。Klenowポリメラーゼを用いて精製したDNAを平滑末端化し、サンプルをアガロースゲル上で電気泳動してその濃度を確認した。

【図4】pCMV-NAT-IRES-GFP-ポリAインサートを含んでいるRL1.delクローニングの同定。精製し、平滑末端化したpCMV-NAT-IRES-GFP-ポリA断片及びHpaI消化し、CIP処理したRL1.delを用いてライゲーション反応を起こした。細菌をライゲーション反応から得たサンプルで形質転換し、LBA (Amp<sup>r</sup>)プレート上に播種した。コロニーを選び、プラスミドDNAを抽出し、AflIIで消化した。消化したサンプルを、1%アガロースゲル上で1KbpのDNAラダー(L)(Promega)の隣に電気泳動した。\*: pCMV-NAT-IRES-GFP-ポリAインサートを推定サイズ4.8 Kbp及び9.2Kbpの2つの断片として含んだクローニング5及び8をAflII消化から作製した。RL1.del中にはAflIIサイトがないので、インサートのないクローニングはAflIIで消化されなかつたであろう。注意：インサートは2つの方向にクローニング化されることが可能であつて、両方とも許容され得た。 40

【図5】クローニング5(RL1.dCMV-NAT-GFPb)におけるpCMV-NAT-IRES-GFP-ポリAの方向の決定。pCMV-NAT-IRES-GFP-ポリA(平滑末端化)はRL1.delのHpaIサイト中で2つの方向にクローニング化されることが可能であった。クローニング5におけるインサートの方向を決定するため、プラスミドをXbaIで消化し、消化したDNAを、1%アガロースゲル上で1KbpのDNAラダー(Promega)の隣に電気泳動した。インサートがAに示す方向にクローニング化されていた場合、X 50

hol消化で10.2Kbp及び3.8Kbpの2つの断片が作製されるであろう。インサートが逆の方向(B)にクローン化されていた場合、12.4Kbp及び1.6Kbpの2つの断片が作製されるであろう。ゲル中の10.2Kbp及び3.8Kbpの2つの断片の存在は、インサートがAに示す方向にクローン化されていることを裏付けた。<sup>\*</sup>：このXholサイトは、最初のクローニングベクター(RL1.de1)中の、pCMV-NAT-IRES-GFP-ポリAをクローン化したHpaIサイトの上流に存在した。

【図6】クローン5からのpCMV-NATの除去(A)及びRL1.diRES-GFPのプラスミドの大量調製(B)。クローン5の4つのサンプルをXholで消化し、1%アガロースゲル上で1KbpのDNAラダー(L)(Promega)の隣に電気泳動した(A)。この消化で產生されたより大きいDNA断片(10.2Kbp)をゲルから精製し、Xholサイトにおける元の位置へ連結し、新たなプラスミドにおいて共に単一のXholサイトを形成し、RL1.diRES-GFPと名付けた。プラスミドの大量調製物が生じ、この調製物をXhol消化によって確認した。1μl及び4μlの消化したDNAを、1%アガロースゲル上で1KbpのDNAラダー(L)(Promega)の隣に電気泳動した(B)。このDNAはXholで消化した場合に10.2Kbpの単一の断片を产生するはずである。RL1.diRES-GFPのC1aI、BglI、NruI及びXholサイトは、全て唯一のサイトである。<sup>\*</sup>：クローン5は、pNAT-IRES-GFPに由来する5.4KbpのpCMV-NAT-IRES-GFP-ポリA断片をその中にクローン化しているRL1.de1プラスミドである。

【図7】目的遺伝子産物を発現しているICP34.5ヌルHSV-1の作製、検出及び精製。

【図8】pUSEamp-asSCCROからRL1.diRES-GFP中への、pCMV-asSCCROのクローン化に用いたストラテジー。(1) SspI及びXholでpUSEamp-asSCCROを消化し、1.96KbpのpCMV-asSCCRO断片を精製し、(2)BglIIIでRL1.diRES-GFPを消化し、Klenowポリメラーゼを用いて平滑末端化し、子ウシ腸ホスファターゼ(CIP)で処理した。(3)平滑末端化したpCMV-asSCCRO断片(1.96Kbp)を、BglIII消化/平滑末端化/CIP処理したRL1.diRES-GFPの中にクローン化した。<sup>\*</sup>：pUSEamp-asSCCROは、Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre, New Yorkによって提供された。)

【図9】BglIII消化し、平滑末端化し、CIP処理したRL1.diRES-GFPのアガロースゲル電気泳動。RL1.diRES.GFPをBglIIIで消化した。その後消化したプラスミドをKlenowポリメラーゼを用いて平滑末端化し、子ウシ腸ホスファターゼ(CIP)で処理して、ベクターが、後に続くライゲーション反応においてそれ自身に再アニーリングするのを妨げた。消化/平滑末端化/CIP処理したDNAのサンプルを、1%アガロースゲル上で1KbpのDNAラダー(Promega)の隣に電気泳動し、その濃度を確認した。続いてpCMV-asSCCROをこの消化/CIP処理したベクター中にクローン化した。

【図10】SspI/Xhol消化したpUSEamp-asSCCROのアガロースゲル電気泳動(A)及び精製したpCMV-asSCCRO断片(B)。pUSEamp-asSCCROの4つのサンプルをSspI及びXholで消化し、その後1%アガロースゲル上で1KbpのDNAラダー(L)(Promega)の隣に電気泳動した。CMV IEプロモーター(pCMV)の下流の扁平上皮細胞癌関連癌遺伝子(asSCCRO)に対するDNAアンチセンスからなる1.96Kbpの断片をゲルから精製し、Klenowポリメラーゼを用いて平滑末端化し、再度精製し、この精製DNAのサンプルをアガロースゲル上で電気泳動してその濃度を確認した。

【図11】pCMV-asSCCROインサートを含むRL1.diRES-GFPクローンの同定。精製し、平滑末端化したpCMV-asSCCRO断片及びBglIII消化し、平滑末端化し、CIP処理したRL1.diRES-GFPを用いてライゲーション反応を起こした。このライゲーション反応物から得たサンプルを用いて細菌を形質転換し、LBA (Amp<sup>r</sup>)プレート上に播種した。コロニーを選び、プラスミドDNAを抽出してBglIIIで消化した。消化したサンプルを、1%アガロースゲル上で1KbpのDNAラダー(L)(Promega)の隣に電気泳動した。<sup>\*</sup>：pCMV-asSCCROインサートを推定サイズ1.4Kbp及び10.8Kbpの2つの断片として含んだクローン11を、BglIII消化で作製した。インサートのないクローンは、BglIIIで消化した場合に1.4Kbpの断片を产生しなかったであろう。

【図12】クローン11におけるpCMV-asSCCROの方向の決定。クローン化されたpCMV-asSCCRO断片中の、約320bpのNruIサイトの存在を、pCMV-asSCCROの方向を決定するために利用した。クローン11をNruIで消化し、1%アガロースゲル上で1KbpのDNAラダー(L)(Promega)

10

20

30

40

50

の隣に電気泳動した。pCMV-asSCCROが望ましい方向を向いていた場合(A)、NruI消化は1.6 4Kbpの断片を産生するであろう。逆方向を向いていた場合(B)、この消化で1.64Kbpの断片は作製されないであろう。ゲル中の1.64Kbpにおける断片の存在は、pCMV-asSCCROが望ましい方向を向いていることを裏付けた。(\* : このNruIサイトは、最初のクローニングベクター(すなわちRL1.dIRES-GFP)中に既に存在していた)。

【図13】Scal消化したクローン11のアガロースゲル電気泳動(A)及びHSV1716/CMV-asSCCRO/GFPウイルス力価(B)。クローン11(RL1.dCMV-asSCCRO-GFP)をScalで消化し、消化したDNAを精製し、5μlを、1%アガロースゲル上で1KbpのDNAラダー(Promega)の隣に電気泳動してその濃度を確認した。その後80%コンフルエントなBHK細胞を、10μlのHSV17<sup>+</sup> DNA及び適当な量の残りの消化クローン11を用いて共トランスフェクトした。この細胞を、cpeが明らかになるまで37℃で3日間インキュベートした。組換えウイルスブラークを蛍光顕微鏡の下で選び、精製して、HSV1716/CMV-asSCCRO/GFPと名付けたウイルスストックを増殖した。HSV1716/CMV-asSCCRO/GFPをBHK細胞上で滴定した。

【図14】MOI 1pfu/細胞及び5pfu/細胞におけるHSV1716又はHSV1716asSCCROを用いた感染後の、細胞株SCC15及び細胞株584に関する細胞毒性アッセイ。

【図15】MOI 1pfu/細胞及び5pfu/細胞におけるHSV1716又はHSV1716asSCCROを用いた感染後の、細胞株1483及び細胞株1986に関する細胞毒性アッセイ。

【図16】MOI 1pfu/細胞及び5pfu/細胞におけるHSV1716又はHSV1716asSCCROを用いた感染後の、細胞株1186及び細胞株1386に関する細胞毒性アッセイ。

【図17】MOI 1pfu/細胞におけるHSV1716又はHSV1716asSCCROを用いた感染後の、頭頸部扁平上皮細胞癌細胞株に関するウイルス増殖アッセイ。

【図18】感染性アッセイ-1716gfpウイルスを用いた感染後6時間のgfp発現。

【図19】HSV1716asSCCROを用いた場合、12時間でSCCROタンパク質のダウンレギュレーションを示す細胞株SCC15のウエスタンプロット法の結果。細胞株584においてはSCCROタンパク質のダウンレギュレーションは示されていない。

【図20】HSV1716又はHSV1716asSCCRO単独の腫瘍内注射後のSCC15及び584におけるヌードマウス異種移植片成長曲線。

【図21】PBS、HSV1716又はHSV1716asSCCRO単独の腫瘍内注射後のSCC15におけるヌードマウス異種移植片成長曲線。

【図22a】配列番号1 - ヒトSCCRO核酸配列。コードされたポリペプチド(SCCRO遺伝子産物)のアミノ酸配列も示す。

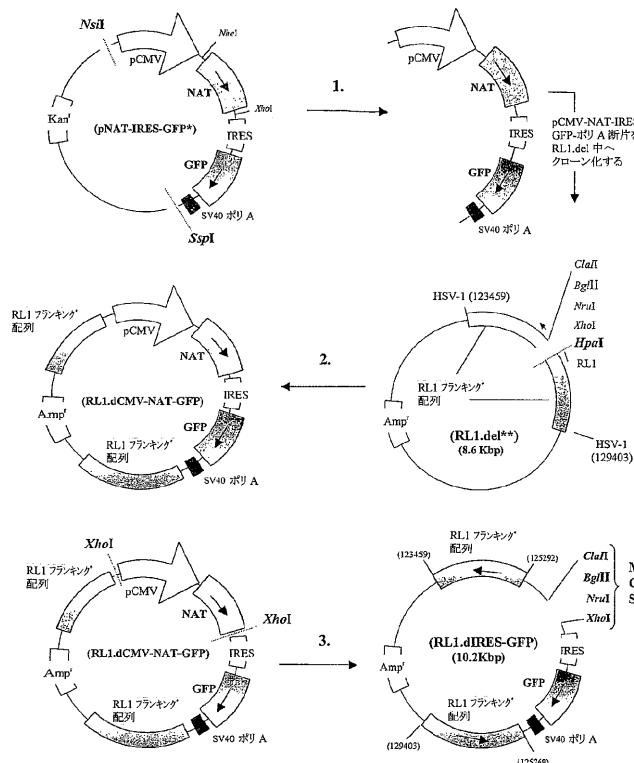
【図22b】配列番号2 - 配列番号1によってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列。

【図22c】配列番号3 - ヒトSCCRO核酸配列。コードされたポリペプチド(SCCRO遺伝子産物)のアミノ酸配列も示す。

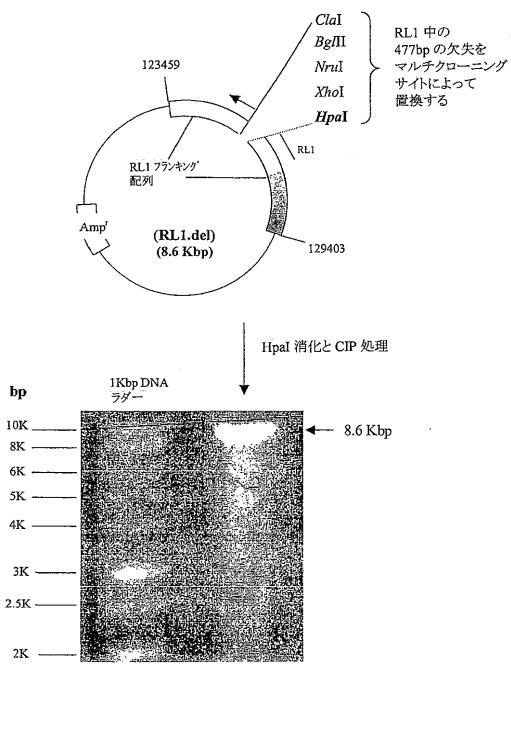
【図22d】配列番号4 - 配列番号3によってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列。

【図23】(A) SCCRO遺伝子の発現を標的とするように設計されたsiRNA構築物をコードするDNAスクレオチド配列(配列番号5)、及び(B)対照siRNAをコードするスクレオチド配列(配列番号6)。中央のスクレオチドの両側の配列は各々、相補的スクレオチドが結合することによって転写されたRNAがヘアピン構造(ステムループ)を形成することを可能とし相補的である。

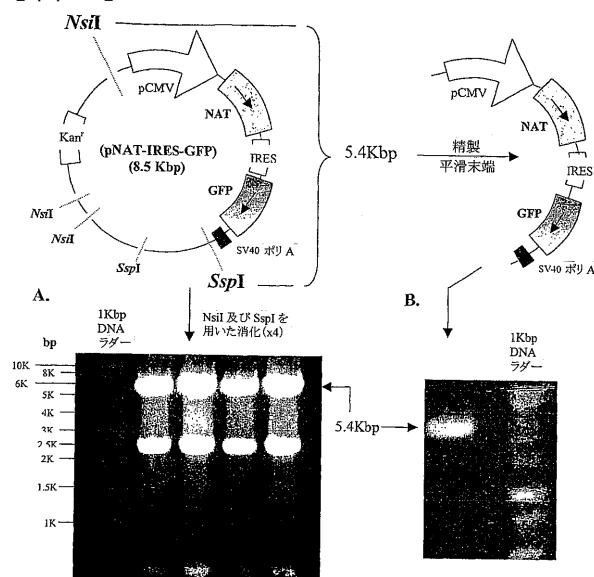
【図1】



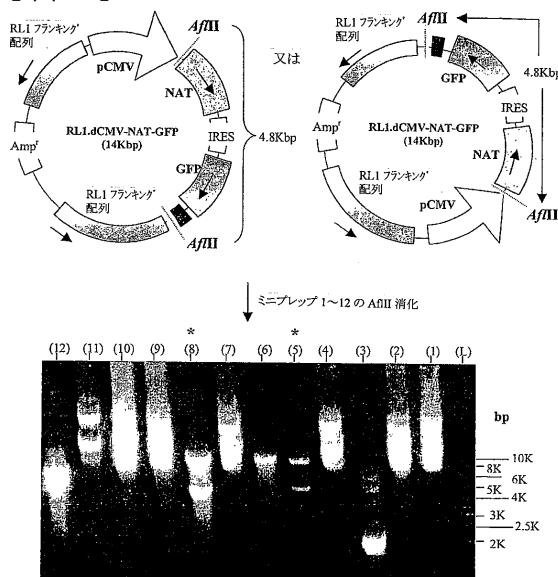
【図2】



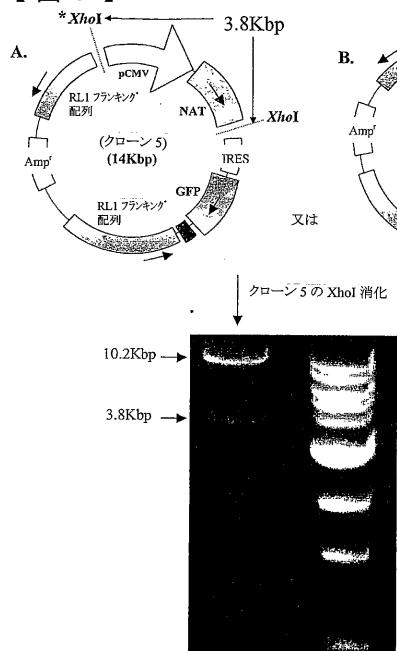
【図3】



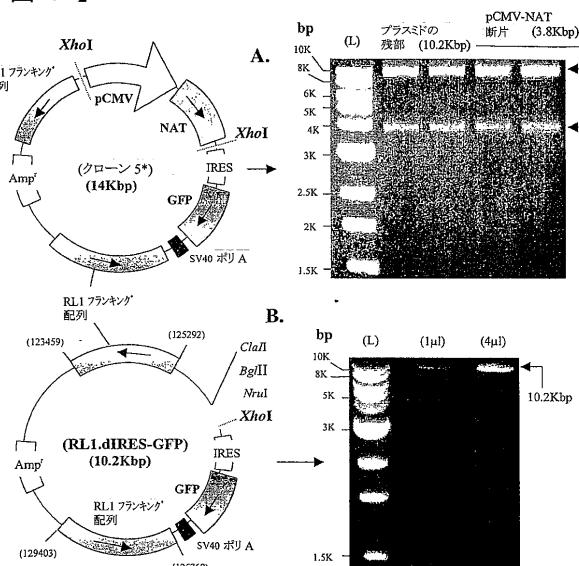
【図4】



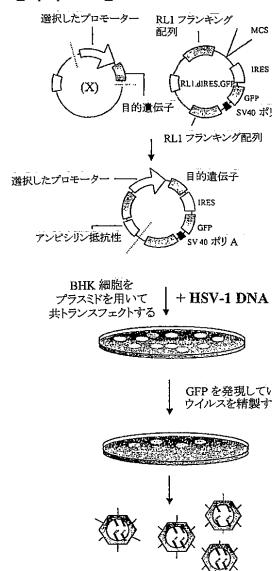
【図5】



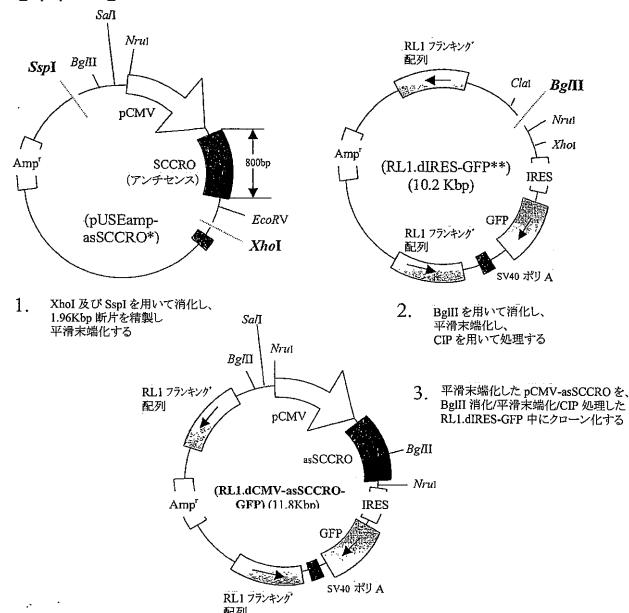
【図6】



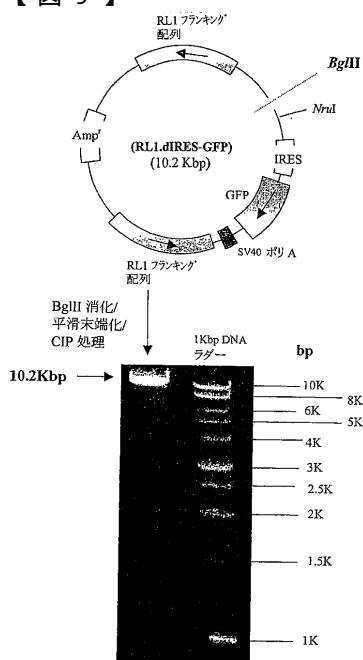
【図7】



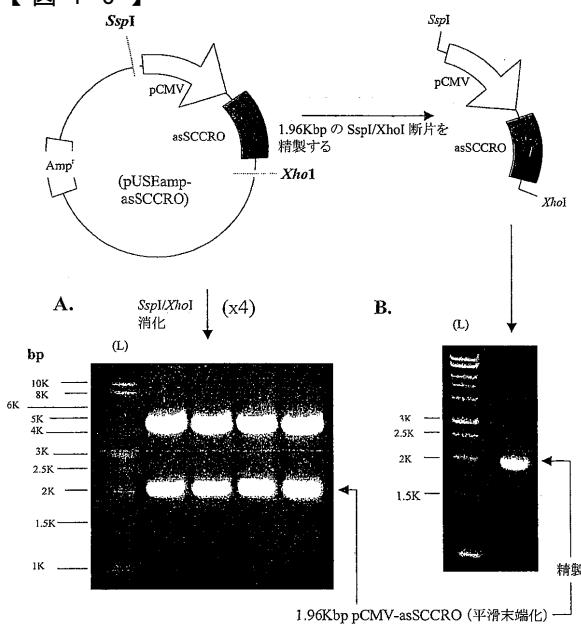
【図8】



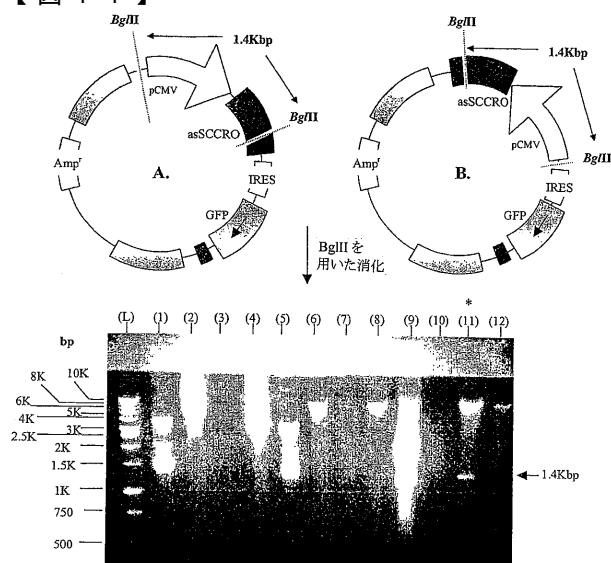
【図9】



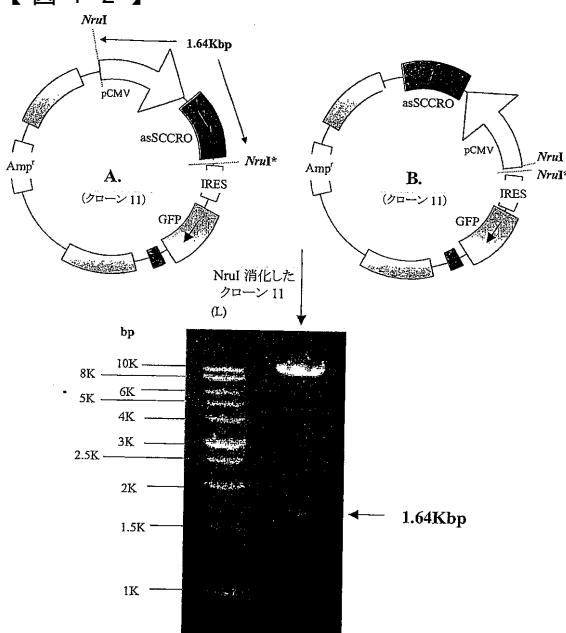
【図10】



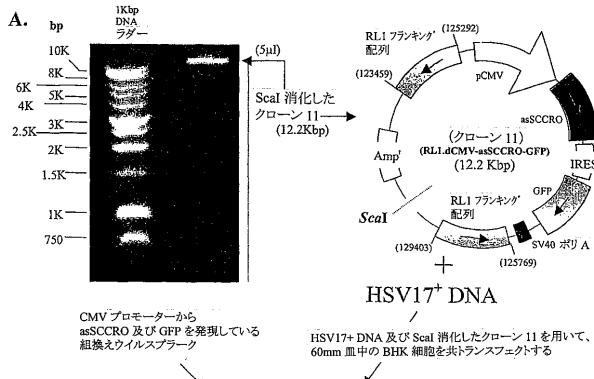
【図11】



【図12】

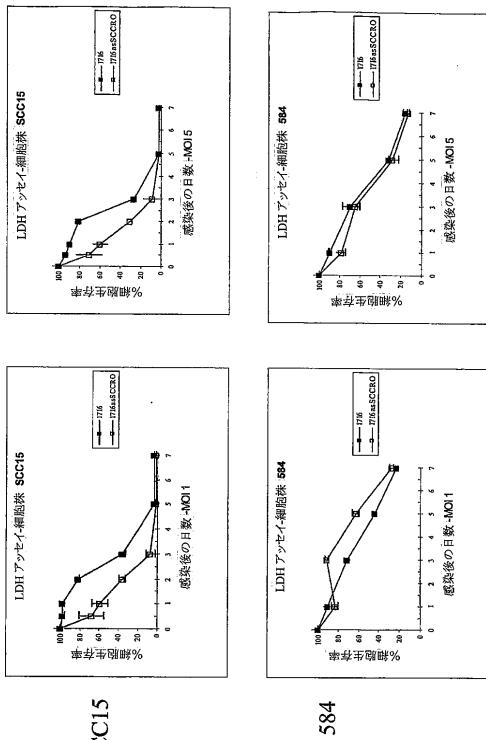


【図13】

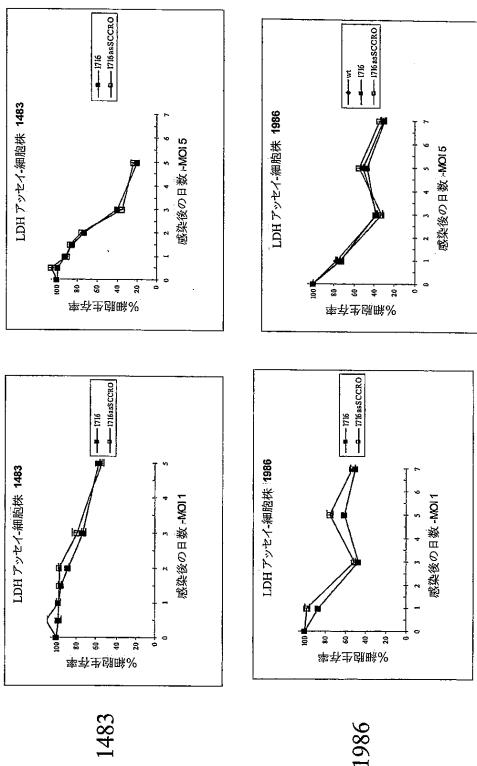


| HSV17 <sup>+</sup> /CMV-asSCCRO/GFP 両分 | 力値                          |
|--|-----------------------------|
| 組合せ                                    | $1.2 \times 10^{10}$ pfu/ml |

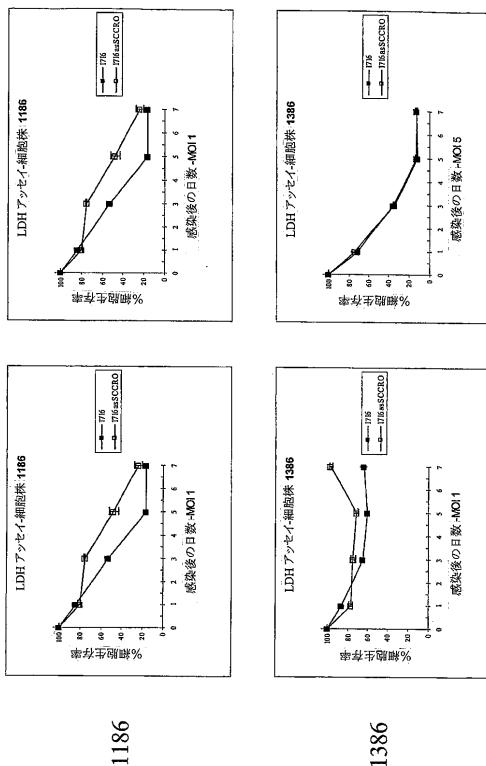
【図14】



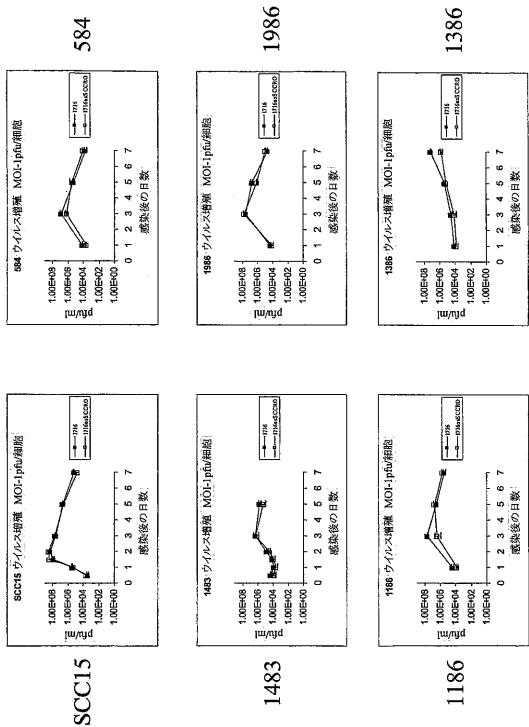
【図15】



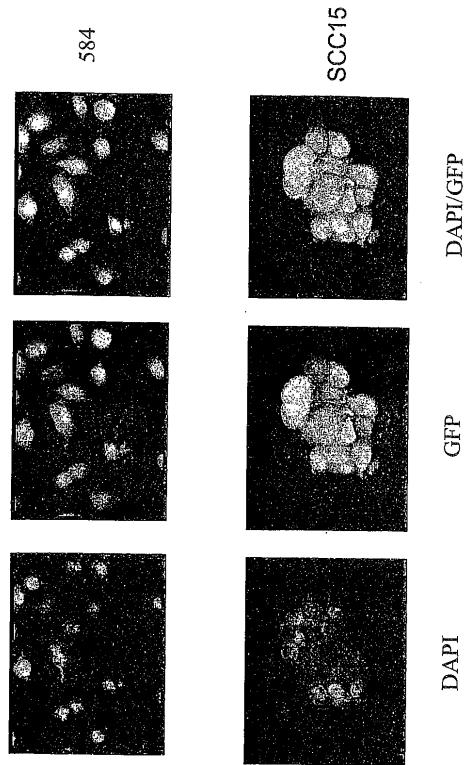
【図16】



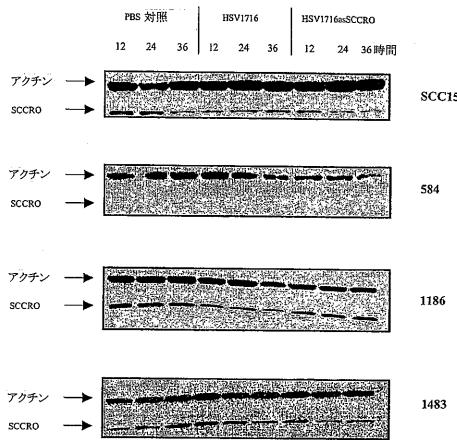
【図 17】



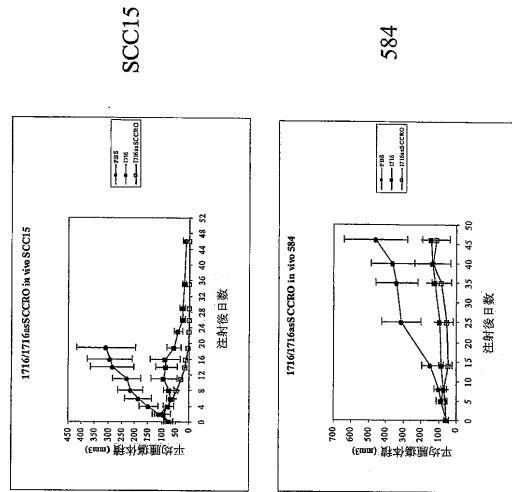
【図 18】



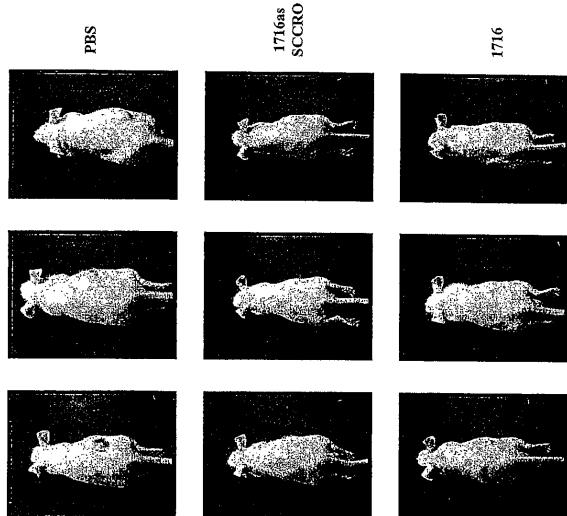
【図 19】



【図 20】



【 図 2 1 】



【 図 2 2 a 】

配列番号 01

## 【図22d】

(配列番号04)

Met Asn Lys Leu Lys Ser Ser Gln Lys Asp Lys Val Arg Gln Thr Met  
 1 5 10 15  
 Ile Thr Thr Gln Ser Ser Gln Lys Thr Ala Val Ser Cys Leu Ser Gln  
 20 25 30  
 Asn Asp Thr Lys Leu Asp Val Ala Thr Asp Asn Phe Asp Gln Asn Pro  
 35 40 45  
 Glu Leu Tyr Ile Arg Glu Ser Val Iys Gly Ser Ile Asp Arg Lys Iys  
 50 55 60  
 Leu Gln Gln Leu Tyr Asn Arg Tyr Lys Asp Ser Gln Asp Glu Asn Lys  
 65 70 75 80  
 Ile Gly Ile Asp Gly Ile Gln Gln Ser Cys Asp Asp Leu Ala Leu Asp  
 85 90 95  
 Pro Ala Ser Ile Ser Val Leu Ile Ile Ala Thr Lys Phe Arg Ala Ala  
 100 105 110  
 Thr Gln Cys Glu Phe Ser Lys Gln Glu Phe Met Asp Gly Met Thr Glu  
 115 120 125  
 Leu Gly Cys Asp Ser Thr Gln Lys Leu Iys Ala Gln Ile Pro Lys Met  
 130 135 140  
 Glu Gln Gln Ile Lys Gln Pro Gly Arg Phe Lys Asp Met Tyr Gln Phe  
 145 150 155 160  
 Thr Phe Asn Phe Ile Asp Pro Gly Ile Iys Gln Lys Asp Leu Glu  
 165 170 175  
 Met Ala Ile Ala Tyr Trp Asn Leu Val Leu Asn Gly Arg Phe Arg Leu  
 185 190 195  
 Leu Asp Asn Trp Asn Phe Phe Leu Gln His His Asp Ser Ile Ile  
 205 210 215 220  
 Asp Asp Met Ser Asn Tyr Asp Glu Gln Gly Ala Thr Pro Val Leu Ile  
 225 230 235 240  
 Asp Asp Ser Val Gln Phe Ala Arg Phe Gln Ile Ala Gly Thr Lys Ser  
 245 250 255  
 Thr Met Val

## 【図23】

(A) 339isRNA (配列番号05)

gatcCCCGTTAGAGCAGCAACACAGTTCAAGAGACTGTGTTGCTGCTCTGAA  
CTTTTGGAAA

(B) ConisRNA (配列番号06)

gatcCCCCGTCTACCTACACTCCCTCTTCAAGAGAGAGGGAGTAGGTAGAC  
GTTTTIA

## 【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT   |   | International Application No<br>PCT/GB2004/004908                              |          |  |                       |   |   |      |   |              |       |
|---|---|--|----------|--|-----------------------|---|---|------|---|--------------|-------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC 7 C12N15/869 A61K35/76 C12N7/01 C07K14/82 C12N15/11<br>A61K48/00  |   |  |          |  |                       |   |   |      |   |              |       |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |   |  |          |  |                       |   |   |      |   |              |       |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC 7 C12N  |   |  |          |  |                       |   |   |      |   |              |       |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched   |   |  |          |  |                       |   |   |      |   |              |       |
| Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)<br>EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS, EMBASE   |   |  |          |  |                       |   |   |      |   |              |       |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%;">Category</th> <th style="width: 80%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 10%;">Relevant to claim No.</th> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>           WONG R J ET AL: "Oncolytic herpesvirus effectively treats murine squamous cell carcinoma and spreads by natural lymphatics to treat sites of lymphatic metastases"<br/>           HUMAN GENE THERAPY,<br/>           vol. 13, 1 July 2002 (2002-07-01), pages<br/>           1213-1223, XP002971610<br/>           ISSN: 1043-0342<br/>           the whole document<br/>           -----         </td> <td>1-46</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>-----<br/>           -/-</td> <td>47-89</td> </tr> </table> |   |  | Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | Y | WONG R J ET AL: "Oncolytic herpesvirus effectively treats murine squamous cell carcinoma and spreads by natural lymphatics to treat sites of lymphatic metastases"<br>HUMAN GENE THERAPY,<br>vol. 13, 1 July 2002 (2002-07-01), pages<br>1213-1223, XP002971610<br>ISSN: 1043-0342<br>the whole document<br>----- | 1-46 | A | -----<br>-/- | 47-89 |
| Category  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.  |          |  |                       |   |   |      |   |              |       |
| Y   | WONG R J ET AL: "Oncolytic herpesvirus effectively treats murine squamous cell carcinoma and spreads by natural lymphatics to treat sites of lymphatic metastases"<br>HUMAN GENE THERAPY,<br>vol. 13, 1 July 2002 (2002-07-01), pages<br>1213-1223, XP002971610<br>ISSN: 1043-0342<br>the whole document<br>----- | 1-46   |          |  |                       |   |   |      |   |              |       |
| A   | -----<br>-/-  | 47-89  |          |  |                       |   |   |      |   |              |       |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.  |   | <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. |          |  |                       |   |   |      |   |              |       |
| * Special categories of cited documents :<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document but published on or after the International filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed  |   |  |          |  |                       |   |   |      |   |              |       |
| Date of the actual completion of the International search<br><b>18 July 2005</b>  |   | Date of mailing of the International search report<br><b>08/08/2005</b>        |          |  |                       |   |   |      |   |              |       |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentstaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016   |   | Authorized officer<br><b>Huber, A</b>  |          |  |                       |   |   |      |   |              |       |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/GB2004/004908

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                       |
|--|---|-----------------------|
| Category <sup>a</sup>                                | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| Y  | ESTILO CHERRY L ET AL: "The role of novel oncogenes squamous cell carcinoma-related oncogene and phosphatidylinositol 3-kinase p110alpha in squamous cell carcinoma of the oral tongue."<br>CLINICAL CANCER RESEARCH : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. JUN 2003, vol. 9, no. 6, June 2003 (2003-06), pages 2300-2306, XP002335918<br>ISSN: 1078-0432<br>page 2305, left-hand column, paragraph 3 | 1-46<br>47-89         |
| Y  | DATABASE EMBL 'Online'<br>22 February 2002 (2002-02-22), "Homo sapiens leucine zipper protein (SCRO) mRNA, complete cds."<br>XP002335921<br>retrieved from EBI accession no.<br>EM_HUM:AF456425<br>Database accession no. AF456425<br>the whole document  | 1-46<br>47-89         |
| A  | WO 03/008573 A (MILNER, ANNE, JOSEPHINE)<br>30 January 2003 (2003-01-30)<br>page 13, lines 1-5  | 48-89                 |
| P,Y  | US 2004/009541 A1 (SINGH BHUVANESH 'US! ET AL) 15 January 2004 (2004-01-15)<br>page 15, paragraph 148 - page 18,<br>paragraph 173<br>page 33, paragraph 318<br>page 28, paragraph 280   | 1-46                  |
| P,X  | WO 2004/096142 A (NEW YORK UNIVERSITY; INGHIRAMI, GIORGIO; CHIARLE, ROBERTO)<br>11 November 2004 (2004-11-11)<br>page 30, paragraph 110; sequence 4   | 48-50,52              |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/GB2004/004908

## Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 33, 42-44, 76, 85-87 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).

## Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

## Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

## Information on patent family members

Int'l Application No  
PCT/GB2004/004908

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) |               | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|---------------|------------------|
| WO 03008573                            | A 30-01-2003     | CA 2452653              | A1 30-01-2003 |                  |
|  |                  | EP 1432799              | A2 30-06-2004 |                  |
|  |                  | WO 03008573             | A2 30-01-2003 |                  |
|  |                  | JP 2004535813           | T 02-12-2004  |                  |
|  |                  | US 2004235171           | A1 25-11-2004 |                  |
| US 2004009541                          | A1 15-01-2004    | NONE                    |               |                  |
| WO 2004096142                          | A 11-11-2004     | US 2005005314           | A1 06-01-2005 |                  |
|  |                  | WO 2004096142           | A2 11-11-2004 |                  |

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl.                      | F I             | テーマコード(参考) |
|----------------------------------|-----------------|------------|
| <b>A 6 1 K 39/39 (2006.01)</b>   | A 6 1 K 39/245  | 4 C 0 8 7  |
| <b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>   | A 6 1 K 39/39   |            |
| <b>A 6 1 K 31/7088 (2006.01)</b> | A 6 1 K 48/00   |            |
| <b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>   | A 6 1 K 31/7088 |            |
| <b>C 1 2 R 1/93 (2006.01)</b>    | C 1 2 N 15/00   | A          |
|                                  | C 1 2 N 7/00    |            |
|                                  | C 1 2 R 1:93    |            |

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

- (71)出願人 307000514  
 ブラウン,スザンヌ,モイラ  
 イギリス国 ジー 5 1 4ダブリュエフ グラスゴー ストラスクライド,ピーオー ポックス  
 1 7 1 6 , クルセイド ラボラトリーズ リミテッド
- (71)出願人 307000525  
 ダン,ポール  
 イギリス国 ジー 5 1 4ダブリュエフ グラスゴー ストラスクライド,ピーオー ポックス  
 1 7 1 6 , クルセイド ラボラトリーズ リミテッド
- (71)出願人 307000536  
 シング,ブヴァネシュ  
 アメリカ合衆国 1 1 4 2 3 ニューヨーク州,ニューヨーク,ホリスウッド,サンチョ ストリート 8 6 - 7 9
- (71)出願人 307000547  
 ガンリー,イアン  
 アメリカ合衆国 1 0 0 2 1 ニューヨーク州,ニューヨーク,イースト 6 3 アールディー ストリート 5 0 4 , アパートメント 2 6 エス
- (74)代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔
- (74)代理人 100096183  
 弁理士 石井 貞次
- (74)代理人 100118773  
 弁理士 藤田 節
- (72)発明者 ブラウン,スザンヌ,モイラ  
 イギリス国 ジー 5 1 4ダブリュエフ グラスゴー ストラスクライド,ピーオー ポックス  
 1 7 1 6 , クルセイド ラボラトリーズ リミテッド
- (72)発明者 ダン,ポール  
 イギリス国 ジー 5 1 4ダブリュエフ グラスゴー ストラスクライド,ピーオー ポックス  
 1 7 1 6 , クルセイド ラボラトリーズ リミテッド
- (72)発明者 シング,ブヴァネシュ  
 アメリカ合衆国 1 1 4 2 3 ニューヨーク州,ニューヨーク,ホリスウッド,サンチョ ストリート 8 6 - 7 9
- (72)発明者 ガンリー,イアン

アメリカ合衆国 10021 ニューヨーク州, ニューヨーク, イースト 63アールディー ス  
トリート 504, アパートメント 26エス

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA36 BA80 CA04 CA05 DA02 EA02 HA17  
4B065 AA90Y AA95X AA99Y AB01 AC20 BA02 CA44  
4C084 AA13 NA14 ZB26  
4C085 AA03 BA78 CC08 DD62 DD86 EE01 EE03 EE06  
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26  
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZB26