

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7699838号
(P7699838)

(45)発行日 令和7年6月30日(2025.6.30)

(24)登録日 令和7年6月20日(2025.6.20)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01 Z N A
C 1 2 N 15/863 (2006.01)	C 1 2 N 15/863 Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z
C 1 2 N 15/24 (2006.01)	C 1 2 N 15/24
請求項の数 24 (全49頁) 最終頁に続く	

(21)出願番号	特願2022-566097(P2022-566097)	(73)特許権者	519232611
(86)(22)出願日	令和3年4月23日(2021.4.23)		ハンジョウ・コンバード・カンパニー、
(65)公表番号	特表2023-526905(P2023-526905 A)		リミテッド
(43)公表日	令和5年6月26日(2023.6.26)		HANGZHOU CONVERD CO
(86)国際出願番号	PCT/CN2021/089255		., LTD
(87)国際公開番号	WO2021/218802		中華人民共和国、311121 ジェジ
(87)国際公開日	令和3年11月4日(2021.11.4)		アン・プロビンス、ハンジョウ、ユハン
審査請求日	令和6年2月14日(2024.2.14)		・ディストリクト、ユハントン・ロード
(31)優先権主張番号	202010363270.4		2959、ビルディング・ナンバー4、
(32)優先日	令和2年4月30日(2020.4.30)		セブンス・フロア
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		7th Floor, Building
			#4, 2959 Yuhangtang
			Road, Yuhang Distri
			ct, Hangzhou, Zhejia
			ng Province 311121,
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 マイクロRNAで調節及び制御可能な単離された組換え腫瘍溶解性ポックスウイルス及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

単離された組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスであって、前記組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、哺乳動物の腫瘍細胞における発現レベルが同じ哺乳動物の正常細胞における発現レベルよりも低いマイクロRNAによって調節可能で、前記組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスゲノムのE10R遺伝子の3'UTR領域に前記マイクロRNAの標的配列が組み込まれている、単離された組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス。

【請求項2】

前記マイクロRNAは、miR-9、miR-15a、miR-16、miR-26a、miR-27b、miR-29b、miR-30a、miR-32、miR-33、miR-34、miR-95、miR-101、miR-122、miR-124、miR-125a、miR-125b、miR-126、miR-127、miR-128、miR-133b、miR-139、miR-140、miR-142、miR-143、miR-145、miR-181、miR-192、miR-195、miR-198、miR-199a、miR-199b、miR-200、miR-203、miR-204、miR-205、miR-218、miR-219、miR-220、miR-224、miR-345及びmiR-375からなる群から選択される、請求項1に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス。

【請求項3】

前記組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、TK遺伝子及び/又はVGF遺伝子が機

能的に欠損している、請求項 1 に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス。

【請求項 4】

前記マイクロRNAの標的配列は反復しており、2～8の反復を含む、請求項 1 に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス。

【請求項 5】

前記組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスのゲノムに外因性IL-21遺伝子が組み込まれており、前記IL-21遺伝子は腫瘍細胞で発現可能である、請求項 3 に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス。

【請求項 6】

前記TK遺伝子は、外因性ヌクレオチド配列のTK遺伝子座への挿入により機能的に欠損している、請求項 3 に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス。

10

【請求項 7】

前記外因性IL-21遺伝子がTK遺伝子座に挿入され、それにより、前記TK遺伝子の機能的欠損が引き起こされている、請求項 5 に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス。

【請求項 8】

前記VGF遺伝子は、ロックアウトにより、又は外因性ヌクレオチド配列のVGF遺伝子座への挿入により、機能的に欠損している、請求項 3 に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス。

【請求項 9】

前記組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスはWR株又はWyeth株である、請求項 1 に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス。

20

【請求項 10】

前記組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスのゲノムに、gpt遺伝子及び/又はlacZ遺伝子を含む外因性スクリーニング遺伝子が更に組み込まれている、請求項 1 に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス。

【請求項 11】

前記外因性IL-21遺伝子はマウス又はヒトに由来する、請求項 5 に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス。

【請求項 12】

前記マイクロRNAは、miR-199a及びmiR-199bから選択される、請求項 2 に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス。

30

【請求項 13】

活性成分として請求項 1～12のいずれか一項に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 14】

前記医薬組成物は、前記組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを用量 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^9$ pfuで含む、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

前記組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、腫瘍内投与又は静脈内投与される、請求項 13 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 16】

請求項 1～12のいずれか一項に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを調製するためのベクター。

【請求項 17】

前記ベクターはプロモーターによって制御される外因性IL-21遺伝子を含む、請求項 16 に記載のベクター。

【請求項 18】

請求項 16 又は 17 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 19】

50

腫瘍及び/又はがんを治療する薬物の製造における、請求項 1 ~ 1.2 のいずれか一項に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの使用。

【請求項 2 0】

前記腫瘍及び/又はがんは、肺がん、黒色腫、頭頸部がん、肝がん、頭蓋内腫瘍、結腸直腸がん、膀胱がん、乳がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、胃がん、食道がん、腎がん、前立腺がん、膵がん、リンパ性がん、白血病、骨がん、精巣がん及び骨肉腫を含む、請求項 1.9 に記載の使用。

【請求項 2 1】

請求項 1 ~ 1.2 のいずれか一項に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを、腫瘍及び/又はがん患者に投与することを含む、腫瘍及び/又はがんを治療するための単離された組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス。

10

【請求項 2 2】

前記組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを、用量 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^9$ p f u で、1日に1回、1~6日間連続して、又は2日に1回、1~6回連続して投与する、請求項 2.1 に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス。

【請求項 2 3】

前記組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを、腫瘍内投与又は静脈内投与する、請求項 2.1 に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス。

【請求項 2 4】

前記腫瘍及び/又はがんは、肺がん、黒色腫、頭頸部がん、肝がん、頭蓋内腫瘍、結腸直腸がん、膀胱がん、乳がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、胃がん、食道がん、腎がん、前立腺がん、膵がん、リンパ管がん、白血病、骨がん、精巣がん及び骨肉腫を含む、請求項 2.1 に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、バイオテクノロジーの分野に属し、具体的には、マイクロRNAによって調節可能な単離された組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、医薬組成物並びに腫瘍及び/又はがんを治療する薬物のためのその使用に関する。

【背景技術】

30

【0002】

19世紀の終わりには、複数のウイルスが腫瘍発達の進行を緩和することが見いだされており、これは、腫瘍治療の分野におけるウイルスの潜在性を示すものである。ワクシニアウイルスは二本鎖DNAウイルスである。ワクシニアウイルスは、それらの良好な安全性、安定性、強力な免疫応答、効率的な腫瘍溶解効果及び腫瘍内への効果的な拡散に基づいて、腫瘍免疫療法の分野でますます注目を集めている。ワクシニアウイルスは天然で腫瘍を標的とするが、それでも遺伝子改変を伴わない野生型ウイルスは正常細胞に感染する可能性があり、それにより、予測されていないリスクが引き起こされる。Western Reserve、Wyeth、Copenhagen、Listerなどを含めた腫瘍溶解性ワクシニアウイルスのいくつかの株が、変異体を構築するために使用されることが報告されている。これらの変異体の中で、ワクシニアウイルスの胸腺キナーゼ(TK)遺伝子は、最も頻繁に使用されている変異領域の1つである。TK遺伝子は、ウイルス複製工程に関与する重要な遺伝子の1つである。腫瘍組織におけるTK遺伝子の高発現により、腫瘍ではTK欠損変異体の複製が可能になる一方で、正常組織における複製能は限定される。第2に、宿主細胞におけるワクシニアウイルスの腫瘍溶解効果は、上皮増殖因子受容体(EGFR)シグナル伝達経路の活性化と密接に関連する。細胞へのワクシニアウイルスの感染後に分泌されるVGFは、感染細胞又は隣接する非感染細胞の表面のEGFRに結合し、EGFR/Rasシグナル伝達経路を活性化し、それにより、ワクシニアウイルスが隣接する細胞に感染するために好都合な環境がもたらされる。したがって、VGF欠損ワクシニアウイルスは正常細胞におけるEGFR/Ras経路を活性化することはできないが、一方、腫瘍細胞における

40

50

E G F Rシグナル伝達経路は活性化され、したがって、V G F 遺伝子欠損ワクシニアウイルスの腫瘍細胞への感染は影響を受けない、すなわち、腫瘍特異性が比較的増大する。しかし、臨床使用では、V G F 欠損及び/又はT K 欠損腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを全身投与した場合の安全性がなお懸念されている。

【 0 0 0 3 】

2005年に、The China Food and Drug Administration (C F D A) により、Shanghai Sunway Biotech Co., Ltd.の遺伝子改変された腫瘍溶解性アデノウイルスH 1 0 1 が頭頸部腫瘍の治療に関して承認された；2015年には、U S F D A 及びE U E M A により、Amgenの遺伝子改変された腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルスT - V e c が進行した悪性黒色腫の治療に関して承認された。しかし、現在のところ、腫瘍溶解性ワクシニアウイルス製品は市場に存在しない。

10

【 0 0 0 4 】

したがって、腫瘍及び/又はがんの免疫療法において、腫瘍溶解性ウイルスによる改善された薬効、より高い腫瘍特異性及び安全性を有する製品の開発が依然として必要とされている。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 5 】

先行技術の問題を解決するために、本発明は、単離された組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、医薬組成物並びに腫瘍及び/又はがんを治療する薬物におけるその使用を提供する。

20

【 0 0 0 6 】

特に、本発明は、

(1) 単離された組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスであって、前記組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、哺乳動物の腫瘍細胞における発現レベルが同じ哺乳動物の正常細胞における発現レベルよりも低いマイクロRNAによって調節可能で、前記組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスゲノムのE 1 0 R 遺伝子の3 ' U T R 領域に前記マイクロRNAの標的配列が組み込まれている、単離された組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、

(2) 前記マイクロRNAは、mi R - 9、mi R - 1 5 a、mi R - 1 6、mi R - 2 6 a、mi R - 2 7 b、mi R - 2 9 b、mi R - 3 0 a、mi R - 3 2、mi R - 3 3、mi R - 3 4、mi R - 9 5、mi R - 1 0 1、mi R - 1 2 2、mi R - 1 2 4、mi R - 1 2 5 a、mi R - 1 2 5 b、mi R - 1 2 6、mi R - 1 2 7、mi R - 1 2 8、mi R - 1 3 3 b、mi R - 1 3 9、mi R - 1 4 0、mi R - 1 4 2、mi R - 1 4 3、mi R - 1 4 5、mi R - 1 8 1、mi R - 1 9 2、mi R - 1 9 5、mi R - 1 9 8、mi R - 1 9 9 a、mi R - 1 9 9 b、mi R - 2 0 0、mi R - 2 0 3、mi R - 2 0 4、mi R - 2 0 5、mi R - 2 1 8、mi R - 2 1 9、mi R - 2 2 0、mi R - 2 2 4、mi R - 3 4 5 及びmi R - 3 7 5 からなる群から；好ましくはmi R - 1 9 9 a 及びmi R - 1 9 9 b からなる群から選択される、(1) に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、

30

(3) 前記組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、T K 遺伝子及び/又はV G F 遺伝子が機能的に欠損している、(1) に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、

40

(4) 前記マイクロRNAの標的配列は反復しており、2 ~ 8 の反復を含む、(1) に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、

(5) 前記組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスのゲノムに外因性I L - 2 1 遺伝子が組み込まれており、前記I L - 2 1 遺伝子は腫瘍細胞で発現可能である、(3) に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、

(6) 前記T K 遺伝子は、外因性ヌクレオチド配列のT K 遺伝子座への挿入により機能的に欠損している、(3) に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、

(7) 前記外因性I L - 2 1 遺伝子がT K 遺伝子座に挿入され、それにより、前記T K 遺伝子の機能的欠損が引き起こされている、(5) に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、

50

(8) 前記 V G F 遺伝子は、ノックアウトにより、又は外因性ヌクレオチド配列の V G F 遺伝子座への挿入により、機能的に欠損している、(3) に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、

(9) 前記組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは W R 株又は W y e t h 株である、(1) に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、

(1 0) 前記組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスのゲノムに、g p t 遺伝子及び / 又は L a c Z 遺伝子を含む外因性スクリーニング遺伝子が更に組み込まれている、(1) に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、

(1 1) 前記外因性 I L - 2 1 遺伝子はマウス又はヒトに由来する、(5) に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、

(1 2) 活性成分として (1) ~ (1 1) のいずれかに記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物、

(1 3) 前記医薬組成物は、前記組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを用量 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^9$ p f u で含む、(1 2) に記載の医薬組成物、

(1 4) 前記組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、腫瘍内投与又は静脈内投与される、(1 2) に記載の医薬組成物、

(1 5) (1) ~ (1 1) のいずれかに記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを調製するためのベクター、

(1 6) 前記ベクターはプロモーターによって制御される外因性 I L - 2 1 遺伝子を含む、(1 5) に記載のベクター、

(1 7) (1 5) 又は (1 6) に記載のベクターを含む宿主細胞、

(1 8) 腫瘍及び / 又はがんを治療する薬物の製造における、(1) ~ (1 1) のいずれかに記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの使用、

(1 9) 前記腫瘍及び / 又はがんは、肺がん、黒色腫、頭頸部がん、肝がん、頭蓋内腫瘍、結腸直腸がん、膀胱がん、乳がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、胃がん、食道がん、腎がん、前立腺がん、膵がん、リンパ性がん、白血病、骨がん、精巣がん及び骨肉腫を含む、(1 8) に記載の使用、

(2 0) 腫瘍及び / 又はがんの治療方法であって、(1) ~ (1 1) のいずれかに記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを、腫瘍及び / 又はがん患者に投与することを含む方法、

(2 1) 前記組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを、用量 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^9$ p f u で、1日に1回、1~6日間連続して、又は2日に1回、1~6回連続して投与する、(2 0) に記載の方法、

(2 2) 前記腫瘍溶解性ウイルスを腫瘍内投与又は静脈内投与する、(2 0) に記載の方法、

(2 3) 前記腫瘍及び / 又はがんは、肺がん、黒色腫、頭頸部がん、肝がん、頭蓋内腫瘍、結腸直腸がん、膀胱がん、乳がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、胃がん、食道がん、腎がん、前立腺がん、膵がん、リンパ性のがん、白血病、骨がん、精巣がん及び骨肉腫を含む、(2 0) に記載の方法、

を提供する。

【 0 0 0 7 】

先行技術と比較して、本発明には、以下の利点及びプラスの効果がある。

【 0 0 0 8 】

本発明は、集中的な研究及び実験を通じて、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスのゲノムから特定の必須遺伝子である E 1 0 R を選択し、外因性ヌクレオチド配列を E 1 0 R の 3 ' U T R 領域 (3 ' 非翻訳領域) に挿入することを提案するものであり、ここで、外因性ヌクレオチド配列は、特定のマイクロ R N A の標的配列を有し、マイクロ R N A の腫瘍細胞における発現レベルは、正常細胞における発現レベルよりも低い。したがって、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスが感染した正常細胞では、高発現のマイクロ R N A が、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスにおける E 1 0 R の 3 ' U T R 領域の対応する m R N A を標的とし、m R N

10

20

30

40

50

Aを分解するか又はその翻訳を妨害し、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの複製を阻害することによってE10Rの発現を遮断し得る。対照的に、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは腫瘍細胞に感染し、腫瘍細胞ではマイクロRNAは低発現であるか又は発現しないので、E10Rの発現は阻害されず、それにより、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの複製能が維持される。したがって、正常組織における特定のマイクロRNAの発現レベルと腫瘍組織における特定のマイクロRNAの発現レベルが、in vivoで異なる場合があるという特徴により、本発明は、腫瘍細胞に対して著しい選択性を有する新規の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを提供する。本発明者らは、驚いたことに、本発明の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスが、正常細胞と比較して種々の腫瘍細胞で著しく高度に複製し、それにより、優れた腫瘍特異性及び安全性を有し、腫瘍細胞の成長を著しく阻害し得ることを見いだした。

10

【0009】

さらに、本発明においてマイクロRNAの型が更に選択され、種々のマイクロRNA（好ましくはmiR-199）が本発明の目的を効果的に実現することが見いだされ、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスがより強力な腫瘍選択性及び安全性を示す。

【0010】

本発明の新規の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、不活性TK遺伝子及び/又はVGF遺伝子を更に含んでいてもよく、それにより、さらなる優れた腫瘍選択性が実現され、既存の腫瘍溶解性ワクシニアウイルス（例えばTK欠損及び/又はVGF欠損ワクシニアウイルス）と比較して、正常細胞における複製が著しく減少し、正常細胞に対する死滅効果が著しく低減する。

20

【0011】

さらに、本発明では、新規の腫瘍溶解性ワクシニアウイルスに免疫修飾物質であるIL-21の遺伝子を保持させることが更に可能になり、したがって、得られた組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは腫瘍細胞において選択的に複製され、かつ、免疫修飾物質であるIL-21を発現する。このようにして、本発明は、新規の腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの、腫瘍細胞において選択的に複製され、腫瘍細胞を死滅させ、体内でのその後の免疫応答を引き起こすという役割が十分に果たされるようにし、また、同時に、外因性IL-21の抗腫瘍免疫効果も十分に発揮させることができるものである。本発明は、IL-21遺伝子を腫瘍溶解性ワクシニアウイルスに組み込むことにより、腫瘍溶解性ウイルスの腫瘍溶解性死滅効果とIL-21の抗腫瘍免疫賦活効果を相乗させることが可能であることを見いだすものである。

30

【0012】

したがって、本発明は、がん治療の効率がより高い豊富な製品を提供し、優れた効果、腫瘍標的特異性及び安全性を有する製品を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、調製例1におけるプラスミドpZB-E10R-miR199Tの構築のスキームを示す。

【図2】図2は、調製例1におけるpZB-E10R-miR199Tプラスミドの同定結果を示す；レーンMはDNA Marker III（DNA分子量マーカーIII）であり、レーン1は制限酵素で消化されたpZB-E10R-miR199Tプラスミドである。

40

【図3】図3は、調製例2において構築された骨格ウイルスVSC20-mT/mCherryの組換え腫瘍溶解性ウイルスの単クローンのPCRにより評価された同定結果を示す；レーンMはDNA分子量マーカーであり、レーン1はVSC20-mT/mCherryであり、レーン2はVSC20であり、レーン3は陰性対照（DNA試料を伴わないもの）である。

【図4】図4は、調製例2において構築された腫瘍溶解性ウイルスベクターVSC20-mT/mCherryの構造を示す。

【図5】図5は、調製例3において構築された骨格ウイルスMiTDvv-mCherry

50

yの組換え腫瘍溶解性ウイルスの単一クローンのPCRにより評価された同定結果を示す；レーンMはDNA分子量マーカーであり、レーン1はMiTDvv-mCherryであり、レーン2はVSC20-mT/mCherryであり、レーン3は陰性対照(DNA試料を伴わないもの)である。

【図6】図6は、調製例3において構築された腫瘍溶解性ウイルスベクターMiTDvv-mCherryの構造を示す。

【図7】図7は、調製例4において構築された腫瘍溶解性ウイルスMiTDvv-hIL21-mCherryの組換え腫瘍溶解性ウイルスの単一クローンのPCRにより評価された同定結果を示す；レーンMはDNA分子量マーカーであり、レーン1はMiTDvv-hIL21-mCherryであり、レーン2はDDvv-hIL21であり、レーン3は陰性対照(DNA試料を伴わないもの)である。

10

【図8】図8は、調製例4において構築された腫瘍溶解性ウイルスMiTDvv-hIL21-mCherryの構造を示す。

【図9】図9Aは、調製例5においてPCR法により評価された、mCherry配列を欠くMiTDvv骨格ウイルス及びMiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ウイルスにおけるmiR199T配列の確認を示す；レーンMはDNA分子量マーカーであり、レーン1はMiTDvvであり、レーン2はMiTDvv-mCherryであり、レーン3は陰性対照(DNA試料を伴わないもの)であり、レーン4はDDvv-hIL21であり、レーン5はMiTDvv-hIL21-mCherryである。図9Bは、MiTDvv骨格ウイルスがTK遺伝子を欠くことを示し、これは、調製例5においてPCR法によって確認された；レーンMはDNA分子量マーカーであり、レーン1はMiTDvvであり、レーン2はVSC20であり、レーン3は陰性対照(DNA試料を伴わないもの)である。

20

【図10】図10は、調製例5において構築された骨格ウイルスMiTDvv及び腫瘍溶解性ウイルスMiTDvv-hIL21の構造を示す。

【図11】図11は、実施例1の、正常細胞におけるMiTDvv骨格ウイルスの複製と腫瘍細胞におけるMiTDvv骨格ウイルスの複製の比較を示す。結果から、ヒト正常細胞HUV ECにおけるMiTDvv骨格ウイルスの複製がヒト腫瘍細胞HeLaにおけるMiTDvv骨格ウイルスの複製よりも少なく、それにより、著しい腫瘍に選択的な複製機能が示されることが実証される；図11Aは、それぞれMiTDvv骨格ウイルスの感染の24時間後のHUV EC細胞内のウイルス量(白抜き棒)及びHeLa細胞内のウイルス量(黒塗り棒)を示す；図11Bは、それぞれMiTDvv骨格ウイルスの感染の48時間後のHUV EC細胞内のウイルス量(白抜き棒)及びHeLa細胞内のウイルス量(黒塗り棒)を示す；図11Cは、HUV EC細胞に対するHeLa細胞におけるMiTDvv骨格ウイルスの複製倍率を示す。図11A及び11Bにおいて、X軸は異なる細胞を表し、Y軸は培地1mL当たりのウイルス量を表す；図11Cにおいて、X軸はHUV EC細胞に対するHeLa細胞におけるウイルス複製の倍率を表し、Y軸はウイルス感染時間を表す。

30

【図12】図12は、実施例2の、MiTDvv骨格ウイルス及びDDvv骨格ウイルスの正常細胞株に対するin vitroにおける死滅効果の比較を示す。この図に示すとおり、DDvv骨格ウイルスの正常細胞MRC-5に対する死滅効果はMiTDvv骨格腫瘍溶解性ウイルスの正常細胞MRC-5に対する死滅効果よりも有意に強力であった。X軸は細胞を処理するために使用した種々のウイルス感染の用量(MOI)を表し、Y軸は対応する死滅率(%)を表し、灰色の棒はDDvvウイルス感染を表し、黒棒はMiTDvvウイルス感染を表す。

40

【図13】図13は、実施例3の、正常細胞におけるMiTDvv骨格ウイルスの複製とDDvv骨格ウイルスの複製の比較を示す。この図に示すとおり、正常細胞MRC-5におけるDDvv骨格腫瘍溶解性ウイルスの複製は、正常細胞MRC-5におけるMiTDvv骨格腫瘍溶解性ウイルスの複製よりも有意に高かった。X軸は細胞を処理するために使用したウイルスの種々の用量(MOI)を表し、Y軸は、対応する、培養系1mL当た

50

りのウイルス遺伝子のコピー数を表し、灰色の棒はDDvvウイルス感染を表し、黒棒はMiTDvvウイルス感染を表す。

【図14】図14は、実施例4の、正常細胞に対する腫瘍溶解性ワクシニアウイルスMiTDvv-hIL21の死滅効果とDDvv-hIL21の死滅効果の比較を示す。この図に示すとおり、DDvv-hIL21腫瘍溶解性ウイルスの正常細胞MRC-5に対する死滅効果は、MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ウイルスの正常細胞MRC-5に対する死滅効果よりも有意に強力であった。X軸は細胞を処理するために使用したウイルスの種々の用量(MOI)を表し、Y軸は対応する細胞成長の阻害率(%)を表し、黒棒はMiTDvv-hIL21ウイルス感染を表し、灰色の棒はDDvv-hIL21ウイルス感染を表す。

10

【図15】図15は、実施例5の、正常細胞における腫瘍溶解性ワクシニアウイルスMiTDvv-hIL21の複製とDDvv-hIL21の複製の比較を示す。この図に示すとおり、DDvv-hIL21腫瘍溶解性ウイルスの正常細胞MRC-5における複製は、MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ウイルスの正常細胞MRC-5における複製よりも有意に高度であった。X軸は細胞を処理するために使用したウイルスの種々の用量(MOI)を表し、Y軸は培養系1mL当たりのウイルス遺伝子のコピー数を表し、灰色の棒はDDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルス感染を表し、黒棒はMiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルス感染を表す。

【図16】図16は、実施例6の、MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの正常細胞における複製と腫瘍細胞における複製の比較を示す。この図に示すとおり、MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ウイルスの正常細胞MRC-5における複製は、腫瘍細胞A549における複製よりも有意に低かった。図16Aは、異なる力価のウイルスを感染させた細胞内のウイルス量を表し、X軸は細胞を処理するために使用したウイルスの種々の用量(MOI)を表し、Y軸は、培養系1mL当たりのウイルス遺伝子のコピー数を表し、灰色の棒はMiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスが正常細胞MRC-5に感染することを表し、黒棒はMiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスが腫瘍細胞A549に感染することを表す。図16Bは、MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ウイルスの正常細胞MRC-5における複製倍率に対する腫瘍細胞A549における複製倍率を示し、X軸は腫瘍溶解性ウイルスのMRC-5細胞における複製倍率に対するA549細胞における複製倍率を表し、Y軸は、細胞を処理するために使用したウイルスの種々の用量(MOI)を表す。

20

30

【図17】図17は、実施例7の、MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの異なる腫瘍細胞株に対するin vitro死滅効果を示す。図17A~Gは、それぞれFaDu細胞(A)、A549細胞(B)、LOVO細胞(C)、MNNG/HOS C1細胞(D)、SK-HEP-1細胞(E)、PANC-1細胞(F)及びU251細胞(G)の結果を表す。X軸は細胞を処理するために使用したウイルスのさまざまな用量[MOIの対数値]を表し、Y軸は対応する阻害率(%)を表し、黒塗りの点はMiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの阻害率を表し、白抜きの四角は陽性対照である10mMのパクリタキセルの阻害率を表す。

【図18】図18は、実施例8の、異なる細胞におけるmiR-199の発現レベルを示す。X軸は種々の腫瘍細胞株を表し、Y軸はmiR-199の相対的な発現レベルを表す。黒棒は高発現の細胞株を表し、灰色の棒は中程度の発現の細胞株を表し、白棒は低発現の細胞株を表す。

40

【図19】図19は、実施例8の、MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ウイルスの腫瘍細胞に対する死滅効果とmiR-199の発現レベルとの間の相関を示す。X軸は異なる腫瘍細胞株を表し、Y軸は細胞の生存率(%)を表す。

【図20】図20は、実施例9の、HCT116細胞におけるmiR-199断片の安定発現の検証を示す。図20Aは、フローサイトメトリーによるGFP発現の結果を示し、左側のパネルは、ブランク対照群(HCT116細胞株)の結果であり、中央のパネルは、陰性対照である細胞株HCT116-miRNCの結果であり、右側のパネルは、mi

50

R - 199 を安定に発現する HCT116 - miR199 細胞株の結果である；図 20 B は、定量的 PCR 検出による miR - 199 の発現の結果を示し、X 軸は異なる細胞株を表し、Y 軸は miR - 199 の相対的な発現レベルを表す。

【図 21】図 21 は、実施例 9 の、miR - 199 を高発現する腫瘍細胞への MiTDvv - hIL21 腫瘍溶解性ウイルスの感染の結果を示す。この図に示すとおり、miR - 199 を高発現する腫瘍細胞では、MiTDvv - hIL21 腫瘍溶解性ウイルスの細胞死滅効果が有意に阻害された。X 軸はウイルスの種々の用量 (MOI) を表し、Y 軸は対応する細胞成長の阻害率 (%) を表し、白棒は細胞株 HCT116 - miRNC を表し、黒棒は細胞株 HCT116 - miR199 を表す。

【図 22】図 22 は、実施例 10 の、MiTDvv - hIL21 腫瘍溶解性ウイルスの結腸直腸がんに対する腫瘍抑制効果を示す。図 22 A は、MiTDvv - hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍内投与後の腫瘍体積の時間経過による変化を示す。この図から、MiTDvv - hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスが腫瘍の成長を有効に阻害できることが示される；X 軸は投与後の時間を表し、Y 軸は、腫瘍体積を表し、黒塗りの四角は MiTDvv - hIL21 の腫瘍内投与を示し、白抜き四角は PBS の腫瘍内投与を示す。図 22 B は、MiTDvv - hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍内投与後の相対的な腫瘍成長速度 T/C (%) の時間経過による変化を示す。この図に示すとおり、MiTDvv - hIL21 投与群の相対的な腫瘍成長速度は、投与後 10 日目から 40% を下回った；X 軸は投与後の時間を表し、Y 軸は T/C (%) を表し、黒塗りの四角は MiTDvv - hIL21 の腫瘍内投与を示す。図 22 C は、MiTDvv - hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍内投与後のマウス体重の時間経過による変化を示す。この図に示すとおり、実験全体を通してマウスの体重に著しい減少は認められなかった；X 軸は投与後の時間を表し、Y 軸はマウスの体重を表し、黒塗りの棒は MiTDvv - hIL21 の腫瘍内投与を示し、白抜き四角は PBS の腫瘍内投与を示す。

【図 23】図 23 は、実施例 11 の、MiTDvv - hIL21 腫瘍溶解性ウイルスのヒト骨肉腫に対する腫瘍抑制効果を示す。図 23 A は、MiTDvv - hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍内投与後の腫瘍体積の時間経過による変化を示す。この図から、MiTDvv - hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスが腫瘍成長を有効に阻害できることが示される；X 軸は投与後の時間を表し、Y 軸は、腫瘍体積を表し、黒塗りの四角は MiTDvv - hIL21 の腫瘍内投与を示し、白抜き四角は PBS の腫瘍内投与を示す。図 23 B は、MiTDvv - hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍内投与後の相対的な腫瘍成長速度 T/C (%) の時間経過による変化を示す。この図から、MiTDvv - hIL21 投与群の相対的な腫瘍成長速度が投与後 8 日目から 40% 未満であったことが示される；X 軸は投与後の時間を表し、Y 軸は T/C (%) を表し、黒塗りの四角は MiTDvv - hIL21 の腫瘍内投与を示す。図 23 C は、MiTDvv - hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍内投与後の経時的なマウスの体重の変化を示す。この図に示すとおり、実験全体を通してマウスの体重に著しい減少は認められなかった；X 軸は投与後の時間を表し、Y 軸はマウスの体重を表し、黒塗りの四角は MiTDvv - hIL21 の腫瘍内投与を示し、中空の四角は PBS の腫瘍内投与を示す。

【図 24】図 24 は、実施例 12 の、MiTDvv - hIL21 腫瘍溶解性ウイルスのヒト肝がんに対する腫瘍抑制効果を示す。図 24 A は、MiTDvv - hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍内投与後の腫瘍体積の時間経過による変化を示す。この図から、MiTDvv - hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスが腫瘍成長を有効に阻害できることを確認できる；X 軸は投与後の時間を表し、Y 軸は、腫瘍体積を表し、黒塗りの四角は MiTDvv - hIL21 の腫瘍内投与を示し、白抜き四角は PBS の腫瘍内投与を示す。図 24 B は、MiTDvv - hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍内投与後のマウスの体重の時間経過による変化を示す。この図に示すとおり、実験全体を通してマウスの体重に著しい減少は認められなかった；X 軸は投与後の時間を表し、Y 軸はマウスの体重を表し、黒塗りの四角は MiTDvv - hIL21 の腫瘍内投与を示し、白抜き四角は PBS の腫瘍内投与を示す。

10

20

30

40

50

【図25】図25は、実施例13における、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスMiTDvv-hIL21及びDDvv-hIL21の、miR-199発現レベルが異なる腫瘍細胞に対する死滅効果の評価を示す。X軸は異なる型の腫瘍細胞を表し、Y軸は細胞成長阻害率を表し、黒棒はMiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを表し、灰色の棒はDDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを表す。

【図26】図26は、実施例14における、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスMiTDvv-hIL21及びDDvv-hIL21の、miR-199発現レベルが異なる腫瘍担持マウスに対する腫瘍抑制効果の比較を示す。図26Aは、miR-199を低発現しているヒト結腸直腸がんHCT116細胞の腫瘍担持マウスにおける腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍内投与後の腫瘍体積の時間経過による変化を示す；X軸は投与後の時間を表し、Y軸は腫瘍体積を表し、黒塗りの四角はMiTDvv-hIL21の腫瘍内投与を示し、白抜きの四角はDDvv-hIL21の腫瘍内投与を示す。この図から、MiTDvv-hIL21がDDvv-hIL21よりも強力な腫瘍抑制効果を有することが示される。図26Bは、miR-199を高発現するヒト骨肉腫MNNG/HOSC1細胞腫瘍担持マウスにおける腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍内投与後の腫瘍体積の時間経過による変化を示す；X軸は投与後の時間を表し、Y軸は腫瘍体積を表し、黒塗りの四角はMiTDvv-hIL21の腫瘍内投与を表し、白抜きの四角はDDvv-hIL21の腫瘍内投与を表す。この図から、MiTDvv-hIL21がDDvv-hIL21よりも弱い腫瘍抑制効果を有することが示される。

【図27】図27は、実施例15における、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスMiTDvv-hIL21及びDDvv-hIL21のマウスにおける組織分布を示す。図27A～Fは、それぞれマウスの卵巣、子宮、脾臓、肝臓、肺、末梢血における腫瘍溶解性ワクシニアウイルスMiTDvv-hIL21及びDDvv-hIL21の分布を示す。X軸は投与後の時間を表し、Y軸は組織内のウイルス量を表し、黒棒はMiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを表し、灰色の棒はDDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを表す。図12～15及び22～25において、*はp 0.05を意味し、**はp 0.01を意味し、***はp 0.001を意味する（対応する対照群と比較して、一元配置ANOVA統計解析法によって得たもの）。

【発明を実施するための形態】

【0014】

図を参照して以下の好ましい態様の詳細な説明により本発明を更に説明する。この説明は限定の意味で解釈されるべきではなく、本発明の主旨から逸脱することなく種々の改変又は改善を適宜行うことができること、したがって、それらの改変又は改善が本発明の範囲内に入ることは当業者には明らかになる。

【0015】

本発明において、「腫瘍」、「がん」、「腫瘍細胞」及び「がん細胞」という用語は、当技術分野において一般に理解される意味を包含する。

【0016】

「腫瘍溶解性ウイルス」又は「腫瘍溶解性ワクシニアウイルス」という用語は、本明細書では、腫瘍細胞において選択的に複製し、腫瘍細胞を溶解できるウイルス又はワクシニアウイルスを指す。

【0017】

「治療有効用量」という用語は、本明細書では、検出可能な治療的効果若しくは阻害効果を示す又は抗腫瘍効果をもたらすのに有用な、機能的な薬剤又は医薬組成物の量を指す。これらの効果は、当技術分野で公知のアッセイ方法によって検出できる。

【0018】

「投与する」又は「投与」という用語は、本明細書では、化合物、複合物又は組成物（ウイルス及び細胞を含む）を対象に提供することを指す。

【0019】

「患者」という用語は、本明細書では、ヒト又は非ヒト生物体を指す。したがって、本

10

20

30

40

50

明細書に記載の方法及び組成物は、ヒトの疾患と動物の疾患の両者に適用可能である。ある特定の態様では、患者は腫瘍を有する。一部の場合では、患者は、1種以上の種類のがんに同時に罹患していてもよい。

【0020】

「相乗効果」という用語は、本明細書では、2種以上の薬剤の間に生じる、それらの個々の合計よりも大きな効果を生じさせる効果を指す。

【0021】

「p f u」又は「ブランク形成単位」という用語は、本明細書では、ブランクを形成するウイルスの数を指す。

【0022】

「M O I」又は「感染効率」という用語は、本明細書では、ウイルスの数と細胞の数の比、すなわち、細胞当たりの、ウイルス感染を開始するために使用されるウイルス粒子の数を指す。 $M O I = p f u / \text{細胞}$ 、すなわち、 $\text{細胞の数} \times M O I = \text{総 P F U}$ である。

【0023】

内因性マイクロRNA (miRNA) の使用に基づいてウイルス複製を制御するための戦略は、広く使用されてきた (Yloesmaeki et al., Generation of a conditionally replicating adenovirus based on targeted destruction of E1A mRNA by a cell type-specific MicroRNA. *J Virol* 82: 11009-11015. 2008参照)。miRNAは、20 ~ 24 bpの小さな核酸分子であり、特定の標的遺伝子の非コード配列に結合することによって標的遺伝子の発現又は翻訳後のタンパク質の修飾において重要な生物学的役割を果たす (Ambros et al., The functions of animal microRNAs. *Nature* 431: 350-355 2004参照)。がん研究において、一連のmiRNA小分子の発現が腫瘍増悪の間に著しく変化し (Negrini et al., MicroRNAs in human cancer: from research to therapy. *J Cell Sci* 120: 1833-1840. 2007参照)、mTOR、c-Met、HIF-1及びCD44などのがんに関連する遺伝子の多くの標的を調節することが見いだされた (Fornari et al., miR-199a-3p regulates mTOR and c-Met to influence the doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Res* 70: 5184-5193. 2010; Kim et al., MicroRNA miR-199a regulates the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2). *J Biol Chem* 283:18158-18166. 2008; Jia et al., Lentivirus-Mediated Overexpression of MicroRNA-199a Inhibits Cell Proliferation of Human Hepatocellular Carcinoma. *Cell Biochem Biophys*, 62:237-44. 2011; Henry et al., miR-199a-3p targets CD44 and reduces proliferation of CD44 positive hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 403:120-125. 2010参照)。

【0024】

腫瘍細胞に対して著しい選択性を有する新規の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを提供するために、本発明者らは、集中的な研究及び実験的探求を通じて、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスのゲノムから特定の必須遺伝子であるE1ORを選択し、腫瘍細胞において正常細胞におけるよりも低い発現レベルを有する特定のマイクロRNAの標的配列を含有する外因性ヌクレオチド配列をE1ORの3'UTR領域(3'非翻訳領域)に挿入することを提案した。このようにして、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスが感染した正常細胞では、高発現されているマイクロRNAは、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスのE1ORの3'UTR領域内の対応するmRNAを標的とし、mRNAを分解するか又はその翻訳を妨害し、それにより、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの複製を阻害することによって、E1ORの発現を阻害できる。対照的に、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスが感染した腫瘍細胞では、マイクロRNAは低発現であるか、発現していないので、E1ORの発現は阻害されず、それにより、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの複製能が維持される。したがって、in vivoにおいて正常組織における特定のマイクロRNAの発現レベルと腫瘍組織における特定のマイクロRNAの発現レベルが異なる場合があるという特徴を利用することにより、本発明は、腫瘍細胞に対してより高くより著しい選択性を有する新規の組換え腫瘍溶解性

10

20

30

40

50

ワクシニアウイルスを提供する。本発明者らは、驚いたことに、本発明の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスが、種々の腫瘍細胞において正常細胞におけるよりも著しく高度に複製し、それにより、優れた腫瘍標的特異性及び安全性をもたらし、腫瘍細胞の成長を著しく阻害し得ることを見いだした。さらに、新規の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは特定のマイクロRNAを欠く腫瘍細胞においてのみ複製できるので、より強力な腫瘍細胞選択性を実現し、ウイルスの正常組織に対する効果を低減できる。

【0025】

上記の概念に基づいて、本発明は、哺乳動物の腫瘍細胞における発現レベルが同じ哺乳動物の正常細胞における発現レベルよりも低いマイクロRNAによって調節可能な単離された組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスであって、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスゲノムのE10R遺伝子の3'UTR領域に、マイクロRNAの標的配列が組み込まれている、単離された組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを提供する。

10

【0026】

マイクロRNAは、哺乳動物の腫瘍細胞における発現のレベルが、同じ哺乳動物の正常細胞におけるよりも低く、これは、哺乳動物の少なくとも1種類の腫瘍細胞におけるマイクロRNAの発現レベルが少なくとも1種類の同じ哺乳動物の正常細胞におけるマイクロRNAの発現レベルよりも低いことを意味する。哺乳動物にはヒトが含まれる。

【0027】

腫瘍細胞における組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの複製が正常細胞における複製よりも著しく高度であり、腫瘍細胞の成長を著しく阻害できることが本発明において見いだされる。

20

【0028】

マイクロRNAには、当技術分野で公知の腫瘍細胞では低発現であるか又は発現しないものが含まれ、また、当技術分野で公知の技術によって決定される、腫瘍細胞では低発現であるか又は発現しないものも含まれる。マイクロRNAは、miR-9、miR-15a、miR-16、miR-26a、miR-27b、miR-29b、miR-30a、miR-32、miR-33、miR-34、miR-95、miR-101、miR-122、miR-124、miR-125a、miR-125b、miR-126、miR-127、miR-128、miR-133b、miR-139、miR-140、miR-142、miR-143、miR-145、miR-181、miR-192、miR-195、miR-198、miR-199a、miR-199b、miR-200、miR-203、miR-204、miR-205、miR-218、miR-219、miR-220、miR-224、miR-345及びmiR-375からなる群から；好ましくはmiR-199a及びmiR-199bからなる群から選択できる。これらの中で、miR-199(miR-199a及びmiR-199bを含む)が、本発明の目的を最も有効に実現できるものであり、得られた組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、より強力な腫瘍選択性及び安全性を示す。本発明において、miRNAは、miRNA前駆体及び成熟miRNAのいずれか1つを含むが、別段の指定がない限り、成熟miRNAを指す。

30

【0029】

本明細書では、上記のマイクロRNAの名称及び数は、当技術分野において理解され、周知であり(例えば成熟miRNAはmiRと称され、高度に相同なmiRNAは、それらの番号を有し、その後英語の小文字が続く。例えば、miR-199a及びmiR-199bである)、それぞれが既知の特定のヌクレオチド配列を有し、特定のヌクレオチド配列をmiRBase公共データベースウェブサイト(<http://www.mirbase.org/>)で検索できる。

40

【0030】

成熟miRNA(成熟RNA)又はmiRNAの成熟形態は、一連のヌクレアーゼによって長い一次転写産物が切断されることにより生じる。一次転写産物(primary miRNA)は長さが数百塩基から数千塩基まで変動し、5'末端のキャップ、3'末端のポリA尾

50

部、及び1個～数個のヘアピンステムループ構造を有する。一次転写産物が切断されて、約70塩基の前駆体miRNA、すなわち、pre-miRNAが生じる。前駆体miRNA (pre-miRNA) が更に切断されて、約22塩基長の一本鎖成熟miRNAが形成される。一般に、細胞にはpri-miRNA、pre-miRNA及び成熟miRNAが存在してもよい。本明細書では、miRNAは、前駆体miRNA又は成熟miRNAのいずれかを含むが、別段の指定がない限り、成熟miRNAを指す。

【0031】

好ましくは、マイクロRNAの標的配列は反復しており、好ましくは2～8、より好ましくは3～4の反復を有する。一部の態様では、マイクロRNAの反復標的配列は、2つ以上のヌクレオチドのスペーサー（例、gg、cc及びggcc）によって隔てられている。miRNAの反復標的配列は、miRNAの逆相補物であり得る。

10

【0032】

好ましくは、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、TK遺伝子及び/又はVGF遺伝子が機能的に欠損している。このように構築された腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、公知の腫瘍溶解性ワクシニアウイルス（例、TK/VGF2重欠損ワクシニアウイルス）と比較して、腫瘍細胞選択性の増強を実現し、正常細胞における複製能及び正常細胞に対する死滅効果が大幅に低下させる。

【0033】

本明細書では「機能的に欠損」という用語は、腫瘍溶解性ウイルスの遺伝子について言及する場合、腫瘍溶解性ウイルスが、その遺伝子が本質的に有すべき機能を果たすことができない、すなわち、機能が失われていることを意味する。この目的は、例えば、外因性断片を遺伝子に挿入すること又は遺伝子をノックアウトすることによって実現できる。

20

【0034】

したがって、外因性ヌクレオチド配列をTK遺伝子に挿入してTK遺伝子を機能的に欠損できる。外因性ヌクレオチド配列をVGF遺伝子に挿入し、及び/又はVGF遺伝子をノックアウトして、VGF遺伝子を機能的に欠損することも可能である。

【0035】

好ましくは、外因性IL-21遺伝子を組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスのゲノムに組み込み、腫瘍細胞においてIL-21遺伝子を発現できる。

【0036】

IL-21（すなわち、インターロイキン21）は、多方向I型サイトカインであり、T細胞によって主に産生され、自然免疫応答及び獲得免疫応答を調節し、抗腫瘍免疫応答において重要な役割を果たす。IL-21の種々の免疫細胞及びシグナルトランスダクションに対する効果が文献に報告されている（Leonard, WJ & Wan, C. IL-21 Signaling in Immunity. *F1000Research* 5, 1-10 (2016)参照）。免疫細胞の種々の型として、主に以下が挙げられる：1) CD4⁺T細胞：増殖の促進及びサイトカインの産生；T_{fh}細胞：分化の促進及び中心機能発達の改善；T_{H17}細胞：分化及び増殖の促進；T_{reg}細胞：産生及び生存の阻害；2) NK細胞：増殖及び細胞傷害性の増強；3) CD8⁺T細胞：細胞傷害性、増殖及び/又は生存の改善、抗腫瘍効果；4) NK細胞：細胞の成熟、増殖の促進、細胞傷害効果の増大、及び抗腫瘍活性の増強；5) DC細胞：抗原提示機能の阻害及びアポトーシスの誘導；6) マクロファージ：ファゴサイトーシスの増強；7) B細胞：増殖の促進、並びに/又はアポトーシス、形質細胞分化及び免疫グロブリン産生の促進；8) 加えて、IL-21は、JAK/STAT、MARK/P13K及び他のシグナルチャネルを含めた種々の腫瘍関連シグナルチャネルを活性化し、腫瘍の増悪を調節できる。腫瘍免疫療法では、NK細胞及びCD8⁺T細胞の細胞傷害性の活性化が重要であり、多くの試験により、IL-21がその進行において重要な役割を果たすことが十分に示されている。IL-21は、NK細胞の成熟を促進して、IFN- γ 、グランザイムB及びパーフォリンを産生させ、NK細胞媒介抗腫瘍細胞傷害性を誘導し、また、抗体依存性細胞傷害(ADCC)によってNK細胞の致死性を増大させる（Spolski, R. & Leonard, WJ Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential.

30

40

50

Nat. Rev. Drug Discov. 13, 379-395, 2014.参照)。第2に、IL-21は、CD8⁺T細胞の増殖を誘導し、メモリーT細胞の生成を誘導し、IFN γ /グランザイムBの分泌を促進して、CD8⁺T細胞による腫瘍の死滅を増強し、再発性腫瘍細胞に対する記憶免疫応答に寄与する。重要なことに、IL-21は、IL-2とは異なり、Treg細胞の増大を誘導せず、CD8⁺T細胞の免疫機能応答を更に増強する(Spolski, R. & Leonard, WJ Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. Nat. Rev. Drug Discov. 13, 379-395, 2014.参照)。IL-21の免疫細胞に対する多様な効果に基づいて、腫瘍微小環境においてIL-21が種々のエフェクター細胞を「再活性化」し得ることが示されている。

【0037】

本発明は、免疫の調節が可能なIL-21遺伝子を腫瘍溶解性ワクシニアウイルスのゲノムに挿入することにより、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの抗腫瘍効果を更に強化するものである。このようにして、腫瘍溶解性ウイルスを腫瘍細胞において選択的に複製させ、腫瘍細胞を死滅させ、その後の体の免疫応答を更に誘導でき、一方で、外因性IL-21の抗腫瘍免疫効果を十分に発揮できる。本発明により、IL-21遺伝子を腫瘍溶解性ワクシニアウイルスに組み込むことにより、腫瘍溶解性ウイルスの腫瘍溶解性死滅効果とIL-21の抗腫瘍免疫賦活効果の相乗効果を生み出せることが見いだされた。

【0038】

好ましくは、外因性IL-21遺伝子をTK遺伝子座に挿入し、したがって、TK遺伝子を機能的に欠損でき、また、腫瘍細胞への感染後にIL-21遺伝子を発現できる。

【0039】

本発明で使用できるワクシニアウイルスとしては、Wyeth株又はWR株が挙げられ、WR株の例はVSC20である。

【0040】

好ましい態様では、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを、LacZ遺伝子がC11R遺伝子座に挿入された、VGF遺伝子を欠くワクシニアウイルスであるVSC20ワクシニアウイルスの遺伝子改変によって得る。その調製方法は、McCart, JA, et al. Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. Cancer Res (2001) 61: 8751-8757に見いだすことができる。遺伝子改変は、特定のマイクロRNAの反復標的配列、例えばmiR-199(miR-199a-3p又はmiR-199b-3p)の標的配列をVSC20ワクシニアウイルスのE10R遺伝子の3'UTR領域に挿入することを含む。

【0041】

一部の態様では、本発明は、遺伝子操作により、E10R遺伝子の左右相同アーム及び特定のマイクロRNAの反復標的配列を含有するシャトルプラスミドを構築し、次いで、シャトルプラスミドをVSC20ワクシニアウイルスに導入する。特定のマイクロRNAの反復標的配列がE10R遺伝子の3'UTR領域に挿入された組換えウイルスを組換え機構によって得た。シャトルプラスミドの構築の特定の態様のフローチャートを図1に示す。

【0042】

遺伝子改変はまた、外因性配列(例、IL-21遺伝子)をVSC20ワクシニアウイルスのTK遺伝子に挿入し、それにより、TK遺伝子を機能的に欠損させることも含む。その特定の方法は、調製例3又は4に記載のとおりであってもよく、又は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる中国特許公開第109554353(A)号に記載のとおりであってもよい。

【0043】

組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスのゲノムに外因性スクリーニング遺伝子を組み込むこともできる。外因性スクリーニング遺伝子としては、gpt(グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ)遺伝子、LacZ遺伝子及び蛍光タンパク質遺伝子(例、赤色蛍光タンパク質遺伝子)が挙げられる。好ましくは、患者において発現される蛍光タンパク

10

20

30

40

50

質の潜在的な安全上の問題を回避するために、蛍光タンパク質遺伝子は含まれない。

【0044】

組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスのゲノムに、外因性スクリーニング遺伝子も含めなくてもよい。

【0045】

一部の態様では、本発明は、g p t 遺伝子をワクシニアウイルスプロモーター p 7 . 5 を使用して制御し、外因性 I L - 2 1 遺伝子を合成ワクシニアウイルス初期 / 後期プロモーター p S E L を使用して制御し、その場合、g p t 及び I L - 2 1 遺伝子は、ワクシニアウイルス V S C 2 0 株の T K 遺伝子領域に、in vitro 細胞内組換え技術を使用して挿入され、腫瘍溶解性ウイルスを構築される。2 種のプロモーターは、それぞれの調節される遺伝子の発現を背中合わせの様式で活性化する。

10

【0046】

好ましくは、外因性 I L - 2 1 遺伝子はマウス又はヒトに由来する。

【0047】

本発明の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、生物工学の分野の関連する公知の方法によって得てもよい。

【0048】

本発明によって開発された組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスに基づいて、本発明は、活性成分として本発明による組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物も提供する。

20

【0049】

好ましくは、医薬組成物は、治療有効量の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを含む。ある特定の態様では、医薬組成物の活性成分は、本発明による組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^9$ p f u / 日 (例 . $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^9$ p f u / 日、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ p f u / 日) 含む。

【0050】

腫瘍溶解性ウイルスは、当技術分野で一般に使用される投与方法、例えば腫瘍内投与又は静脈内投与により投与してもよい。

【0051】

本発明の医薬組成物は、当技術分野で公知の他の活性成分、例えばインターロイキン 2 (I L - 2)、I L - 1 5、I L - 1 7、I L - 1 8、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F)、インターフェロン - (I F N -)、腫瘍壊死因子 - (T N F -) なども含有してもよく、それらの投与量及び投与経路は、それらの従来の様式でなされてもよい。他の活性成分が含まれる場合、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、医薬組成物中に、他の活性成分と混合されずに独立に存在すべきである。例えば、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを別々の容器内に個別にパッケージングする。

30

【0052】

本発明の医薬組成物は、適切な薬学的に許容される賦形剤を更に含んでもよいことが当業者には理解される。

【0053】

一部の態様では、本発明の医薬組成物は、1 種以上の薬学的に許容される担体を含む。医薬製剤は、当技術分野で公知の手順によって調製されてもよい。例えば、活性成分を含む化合物などは、一般的な賦形剤、希釈剤 (例 . リン酸緩衝剤又は生理食塩水)、組織培地及び担体 (例 . 自己血漿又はヒト血清アルブミン) を用いて製剤化され、懸濁剤として投与してもよい。他の担体としては、リポソーム、ミセル、ナノカプセル、ポリマーナノ粒子、固体脂質粒子を挙げることができる (例えば、E. Koren and V. Torchilin, Life, 63:586-595, 2011 参照)。この明細書で開示する医薬組成物を製剤化する技術に関する詳細は、科学文献及び特許文献に十分記載されている (例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Maack Publishing Co., Easton PA の最新版 (Remington's) 参照)。

40

50

【 0 0 5 4 】

本発明の別の側面は、本発明による組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを調製するためのベクターも提供する。

【 0 0 5 5 】

ベクターにより、ワクシニアウイルス内の E 1 0 R 遺伝子を組換え機構によって改変できる。例えば、特定の態様では、図 4 に示すとおり、組換えベクターは、E 1 0 R 遺伝子の左右相同アーム、m i R - 1 9 9 (h s a - m i R - 1 9 9 a - 3 p 又は h s a - m i R - 1 9 9 b - 3 p) の反復標的配列及び外因性スクリーニング遺伝子 m C h e r r y / Z e o c i n の発現を開始する発現フレームを含む。好ましくは、ベクターにより、ワクシニアウイルスにおいて、組換え機構により、機能的に欠損した T K 遺伝子を引き起こすことができる。別の特定の

10

態様では、図 6 に示すとおり、組換えベクターは、E 1 0 R 遺伝子の左右相同アーム、m i R - 1 9 9 (h s a - m i R - 1 9 9 a - 3 p 又は h s a - m i R - 1 9 9 b - 3 p) の反復標的配列、外因性スクリーニング遺伝子 m C h e r r y / Z e o c i n の発現を開始する発現フレーム、並びに T K 相同断片 T K - L 及び T K - R を含む。ワクシニアウイルスが W R 株である場合、T K 遺伝子の配列は、N C B I (National Center for Biotechnology Information, URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) の GenBank において NC_006998 の番号が付されたワクシニアウイルス遺伝子の 8 0 7 2 4 ~ 8 1 2 5 7 b p の配列であり、T K - L の配列は、例えば、8 0 7 2 4 ~ 8 0 9 6 1 b p の配列断片であってもよく、T K - R の配列は、例えば、8 1 0 3 3 ~ 8 1 2 5 7 b p の配列断片であってもよい。m i R - 1 9 9 (h s a - m i R - 1 9 9 a - 3 p 又は h s a - m i R - 1 9 9 b - 3 p) の反復標的配列の挿入部位は、例えば、

20

E 1 0 R 遺伝子の左相同アームの 5 6 9 7 4 b p であってもよい。別の特定の態様では、図 8 に示すとおり、組換えベクターは、E 1 0 R 遺伝子の左右相同アーム、m i R - 1 9 9 (h s a - m i R - 1 9 9 a - 3 p 又は h s a - m i R - 1 9 9 b - 3 p) の反復標的配列、外因性スクリーニング遺伝子 m C h e r r y / Z e o c i n の発現を開始する発現フレーム、T K 相同断片 T K - L、T K - R 並びに I L - 2 1 遺伝子及び外因性スクリーニング遺伝子 g p t の発現を開始する発現フレームを含む。ベクターにより、I L - 2 1 遺伝子発現フレーム及び g p t 遺伝子発現フレームをワクシニアウイルスの T K 遺伝子領域に細胞内組換え機構によって挿入でき (例えば GenBank において NC_006998 の番号が付されたワクシニアウイルス遺伝子内の 8 0 9 6 2 ~ 8 1 0 3 2 b p の配列断片を欠失させる)、その結果、組換え

30

ワクシニアウイルスは T K 遺伝子の機能を失う。m i R - 1 9 9 (h s a - m i R - 1 9 9 a - 3 p 又は h s a - m i R - 1 9 9 b - 3 p) の反復標的配列の挿入部位は、例えば、E 1 0 R 遺伝子の左相同アームの 5 6 9 7 4 b p であってもよい。

【 0 0 5 6 】

本発明の別の側面は、本発明のベクターを含有する宿主細胞も提供する。

【 0 0 5 7 】

本発明の別の側面は、腫瘍及び / 又はがんを治療する薬物の製造における、本発明による組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの使用も提供する。

【 0 0 5 8 】

腫瘍及び / 又はがんは、限定されるものではないが、肺がん、黒色腫、頭頸部がん、肝がん、頭蓋内腫瘍 (例 . 神経膠腫)、結腸直腸がん、膀胱がん、乳がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、胃がん、食道がん、腎がん、前立腺がん、膵がん、リンパ管がん、白血病、骨がん、精巣がん及び骨肉腫を含む。

40

【 0 0 5 9 】

本発明の別の側面は、腫瘍及び / 又はがんを治療するための方法であって、腫瘍及び / 又はがん患者に、本発明による組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを投与することを含む方法も提供する。

【 0 0 6 0 】

腫瘍及び / 又はがんは、限定されるものではないが、肺がん、黒色腫、頭頸部がん、肝がん、頭蓋内腫瘍 (例 . 神経膠腫)、結腸直腸がん、膀胱がん、乳がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、胃がん、食道がん、腎がん、前立腺がん、膵がん、リンパ管がん、白

50

血病、骨がん、精巣がん及び骨肉腫を含む。

【0061】

本発明の好ましい態様では、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの投与される用量は、治療有効量であり、1日1回、1～6日間連続して投与する；又は2日に1回、1～6回連続して投与する。治療有効量は、好ましくは、 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^9$ pfu/日（例． $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^9$ pfu/日、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ pfu/日）である。

【0062】

必要であれば、本発明の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを他の薬物、例えばインターロイキン2（IL-2）、IL-15、IL-17、IL-18、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターフェロン-（IFN-）、腫瘍壊死因子-（TNF-）などと組み合わせて使用することもでき、それらの投薬量及び投与経路は、それらの従来の様式でなされてもよい。

10

【0063】

特定の状況及び必要に基づいて、本発明による腫瘍及び/又はがんを治療するための方法を患者に1回又は複数回、適用できる。

【0064】

腫瘍溶解性ウイルスは、当技術分野で一般に使用される投与方法、例えば腫瘍内投与又は静脈内投与により投与してもよい。

【0065】

本発明は、

(A) 第1の医薬組成物であって、第1の薬学的に許容される担体中に本発明の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを含む第1の医薬組成物；及び

(B) 第2の医薬組成物であって、第2の薬学的に許容される担体中にNK細胞を含む第2の医薬組成物を含む治療剤も提供する。

20

【0066】

一部の態様では、第1の薬学的に許容される担体と第2の薬学的に許容される担体は同じである。他の態様では、第1の薬学的に許容される担体と第2の薬学的に許容される担体は異なる。

【0067】

一部の場合では、治療剤を薬物の組合せと理解することもできる。

30

【0068】

腫瘍溶解性ウイルスが腫瘍細胞を死滅させる機構は、一般に同様である。種々の態様では、腫瘍溶解性ウイルスを腫瘍内投与するか又は静脈内投与し、腫瘍溶解性ウイルスが腫瘍細胞と接触すると、腫瘍溶解性ウイルスは腫瘍細胞に感染し、侵入する。腫瘍溶解性ウイルスは、主に腫瘍細胞において複製及び増殖し、正常細胞ではほとんど～全く複製しないので、感染した腫瘍細胞において大量の後代腫瘍溶解性ウイルスを産生させ、それにより、腫瘍細胞の溶解及び死亡を導くことができる。腫瘍細胞が溶解すると、多数の腫瘍関連抗原及び後代腫瘍溶解性ウイルスが放出され得、次いで、抗原により免疫系がin vivoで更に活性化され得、それにより、NK細胞及びT細胞がin vivoで刺激されて、残りの腫瘍細胞を攻撃し続ける。その間に、後代腫瘍溶解性ウイルスはまだ感染していない腫瘍細胞に感染し得る。

40

【0069】

NK細胞は、広域の腫瘍細胞を死滅できる免疫細胞であり、また、NK細胞は、腫瘍細胞と正常細胞を区別できる。NK細胞は、腫瘍細胞と接触すると、腫瘍細胞を異常な細胞と認識し、複数の補助的方法、例えば受容体認識、抗体による標的認識（ADCC）、並びに腫瘍細胞を間接的に死滅できるグランザイム、パーフォリン及びインターフェロンの放出により、腫瘍細胞を死滅させる。in vitro試験では、健康なNK細胞は、その一生で27種までの腫瘍細胞を死滅できることが示されている。

【0070】

50

NK細胞は抗ウイルス機能も有する。正常細胞にウイルスが感染すると、ウイルスが大量に複製し、感染細胞が老化し、その細胞膜上のタンパク質クラスターの組成が変化する。この過程の間、NK細胞は、感染細胞を感度よく、かつ有効に認識でき、これらの細胞を、上述した腫瘍細胞を死滅させるために使用する方法と同様の手法で死滅させ、したがって、ウイルスの複製及び増殖を阻害する。その後、抗原が活性化され、免疫因子、例えばインターフェロンが関与すると、他の型の免疫細胞がウイルスと戦い続ける。

【0071】

本発明では、腫瘍溶解性ウイルス及びNK細胞の個々の特色を考慮しており、したがって、それらを巧みに組み合わせることができる。組み合わせる場合、NK細胞の抗ウイルス機構が、腫瘍溶解性ウイルスが感染した腫瘍細胞にも適用可能であり、これは、NK細胞の抗腫瘍機構を補うものになる。さらに、組合せ療法により、腫瘍溶解性ウイルスが感染した腫瘍細胞をNK細胞の特異的な標的にすることが可能になり、それらの腫瘍死滅効果が改善される。腫瘍溶解性ウイルスは、がん細胞において選択的に複製し、がん細胞を内側から死滅させるのみならず、細胞膜上のタンパク質受容体クラスターの変化も引き起こして、NK細胞によるがん細胞の認識を容易にし、その結果、NK細胞ががん細胞を外側から攻撃できる。したがって、腫瘍溶解性ウイルスとNK細胞はがん細胞を相乗的に死滅させ、改善された有効性が実現される。さらに好ましくは、本発明の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは外因性IL-21も発現し、発現された外因性IL-21によりNK細胞の死滅力を増強し、NK細胞の死滅効果を更に増強できる。本発明に記載の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスとNK細胞を組み合わせる使用することにより、驚くべき腫瘍死滅効果を生み出せる。

【0072】

好ましくは、第1の医薬組成物の活性成分は本発明による組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスであり、第2の医薬組成物の活性成分はNK細胞である。

【0073】

好ましくは、第1の医薬組成物及び第2の医薬組成物は、治療剤中に、互いに混合されず、それぞれ独立に存在する。

【0074】

本発明において、NK細胞は、自己NK細胞及び同種NK細胞から選択できる；好ましくは、NK細胞は、*in vitro*増殖によって得られた自己NK細胞又は*in vitro*増殖によって得られた同種NK細胞である。NK細胞の大規模*in vitro*増殖培養技術は公知で、実質的に成熟している（例えば、Somanchi SS, Lee DA. *Ex Vivo Expansion of Human NK Cells Using K562 Engineered to Express Membrane Bound IL21 Methods Mol Biol.* 2016; 1441: 175-93.又はPhan MT, Lee SH, Kim SK, Cho D. *Expansion of NK Cells Using Genetically Engineered K562 Feeder Cells. Methods Mol Biol.* 2016; 1441: 167-74.を参照）。臨床データから、自己NK細胞、半同種NK細胞（同種NK細胞に属する）及び臍帯血から調製されたNK細胞には毒性の副作用がなく、長期依存性がなく、ヒトの体に再循環させた際に安全、かつ効果的であることが確認された。

【0075】

治療のために使用できるNK細胞の純度は以下であってもよい：自己NK細胞の純度は85%以上であってもよく、同種NK細胞の純度は90%以上であってもよく；不純物細胞はNK-T及び/又はT細胞であってもよい。好ましくは、NK細胞活性（生存率）は90%以上であり、NK細胞の死滅活性は80%以上である。

【0076】

本発明の組合せ治療スキームに関して、本発明は、肝要である、腫瘍溶解性ウイルス及びNK細胞のそれぞれの投与量を更に探究し最適化する。好ましくは、第1の医薬組成物は、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^9$ p f u / 日含有し（例 . $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^9$ p f u / 日の組換え腫瘍溶解性ウイルス、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ p f u / 日の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス）、第2の医薬組成物は、NK細胞を $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ 細胞 / 日含有する（好ましくは、第2の医薬組成物はNK細胞

10

20

30

40

50

胞を $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^9$ 細胞/日含む；更に好ましくは、第2の医薬組成物はNK細胞を $1 \times 10^9 \sim 4 \times 10^9$ 細胞/日含む；より好ましくは、第2の医薬組成物はNK細胞を $1 \times 10^9 \sim 3 \times 10^9$ 細胞/日含む）。好ましくは、治療剤の活性成分は、 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^9$ pfu/日の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス（例、 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^9$ pfu/日の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ pfu/日の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス）及び $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ 細胞/日のNK細胞（例、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^9$ 細胞/日、 $1 \times 10^9 \sim 4 \times 10^9$ 細胞/日、 $1 \times 10^9 \sim 3 \times 10^9$ 細胞/日）で構成される。

【0077】

組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、当技術分野で一般に使用される投与方法、例えば腫瘍内投与又は静脈内投与により投与してもよい。

10

【0078】

NK細胞は、当技術分野で一般に使用される投与方法を使用して、例えば、静脈内に投与してもよい。

【0079】

本発明の治療剤は、適切な薬学的に許容される賦形剤を更に含んでもよいことが当業者には理解される。

【0080】

本発明の治療剤は、当技術分野で公知の他の活性成分、例えばインターロイキン2（IL-2）、IL-15、IL-17、IL-18、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターフェロン（IFN-）、腫瘍壊死因子（TNF-）なども含有してもよい。

20

【0081】

一部の態様では、本発明の治療剤は、1種以上の薬学的に許容される担体を含む。医薬製剤は、当技術分野で公知の方法によって調製されてもよい。例えば、活性成分（例、化合物）は、一般的な賦形剤、希釈剤（例、リン酸緩衝剤又は生理食塩水）、組織培養培地及び担体（例、自己血漿又はヒト血清アルブミン）を用いて製剤化されてもよく、懸濁剤として投与してもよい。他の担体は、リポソーム、ミセル、ナノカプセル、ポリマーナノ粒子、固体脂質粒子を含んでもよい（例えば、E. Koren and V. Torchilin, Life, 63: 586-595, 2011を参照）。本発明の治療剤を製剤化する方法は、科学文献及び特許文献に見いだすことができる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Maack Publishing Company, Easton PAの最新版（Remington's）を参照。

30

【0082】

本発明の治療剤を、種々の腫瘍及び/又はがんを治療するために使用でき、腫瘍及び/又はがんには、限定されるものではないが、肺がん、黒色腫、頭頸部がん、肝がん、頭蓋内腫瘍（例、神経膠腫）、結腸直腸がん、膀胱がん、乳がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、胃がん、食道がん、腎がん、前立腺がん、膵がん、リンパ管がん、白血病、骨がん、精巣がん及び骨肉腫が含まれる。

【0083】

本発明の治療剤の投与方法は以下のとおり：まず、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを腫瘍及び/又はがん患者に投与し、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの投与の18～72時間後（例、20～70時間後、22～48時間後、24～48時間後、30～48時間後）に、NK細胞を腫瘍及び/又はがん患者に投与する。「組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの投与の18～72時間後（例、20～70時間後、22～48時間後、24～48時間後、30～48時間後）に、NK細胞を腫瘍及び/又はがん患者に投与する」というフレーズは、NK細胞の最初の投与と組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの最初の投与の間隔が18～72時間（例、20～70時間、22～48時間、24～48時間、30～48時間）、又はNK細胞の最初の投与と組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの直近の投与の間隔が18～72時間（例、20～70時間、22～48時間、24～48時間、30～48時間）であることを意味する。好ましくは、NK細胞の最初の

40

50

投与と組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの直近の投与の間隔は18～72時間(例、20～70時間、22～48時間、24～48時間、30～48時間)である。より好ましくは、NK細胞の最初の投与と組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの直近の投与の間隔は24～48時間である。

【0084】

本発明の好ましい態様では、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを治療有効量で、1日1回、1～6日間連続して投与し；NK細胞を、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ 細胞/日(例、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^9$ 細胞/日、 $1 \times 10^9 \sim 4 \times 10^9$ 細胞/日、 $1 \times 10^9 \sim 3 \times 10^9$ 細胞/日)で、1日1回、1～6日間連続して投与する。本発明の別の好ましい態様では、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの投与量は、治療有効量の、2日に1回、2～6日間連続した投与であり；NK細胞の投与量は、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ 細胞/日(例、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^9$ 細胞/日、 $1 \times 10^9 \sim 4 \times 10^9$ 細胞/日、 $1 \times 10^9 \sim 3 \times 10^9$ 細胞/日)の、2日に1回、2～6日間連続した投与である。組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの投与の18～72時間後に、NK細胞を腫瘍及び/又はがん患者に投与する限り、上記の態様のいずれか1つ、又は、他の態様を本発明に従って使用できる。組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス及びNK細胞は、交互に投与(例えば1日目に組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを投与し、2日目にNK細胞を投与し、3日目に組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを投与し、4日目にNK細胞を投与する、など)してもよく；順次に投与(例えば1日目に組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを投与し、2日目に組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス及びNK細胞を順番に投与する、3日目に組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス及びNK細胞を順番に投与する、及び4日目に組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス及びNK細胞を順番に投与する、など)してもよく；又は他の投薬量レジメン(例えば、まず、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを、1日1回、1～6日間連続して投与し、18～72時間を空けた後、NK細胞を1日1回、1～6日間連続して投与する)で投与してもよい。好ましくは、まず組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを投与し、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの投薬の全ての投与が完了した18～72時間後にNK細胞を投与する。本発明の好ましい態様では、まず、腫瘍及び/又はがん患者に組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを投与し、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを治療有効用量で1回のみ投与し；組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの投与の18～72時間後に、腫瘍及び/又はがん患者にNK細胞を投与し、NK細胞を 1×10^7 細胞/日～ 1×10^{10} /日(例、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^9$ 細胞/日、 $1 \times 10^9 \sim 4 \times 10^9$ 細胞/日、 $1 \times 10^9 \sim 3 \times 10^9$ 細胞/日)で1回のみ投与する。組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの治療有効量は、好ましくは $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^9$ pfu/日(例、 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^9$ pfu/日、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ pfu/日)である。

【0085】

本発明は、腫瘍及び/又はがんを治療する薬物の製造における、本発明の治療剤の使用も提供する。

【0086】

腫瘍及び/又はがんは、限定されるものではないが、肺がん、黒色腫、頭頸部がん、肝がん、頭蓋内腫瘍(例、神経膠腫)、結腸直腸がん、膀胱がん、乳がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、胃がん、食道がん、腎がん、前立腺がん、膵がん、リンパ管がん、白血病、骨がん、精巣がん及び骨肉腫を含む。

【0087】

本発明の別の側面によると、腫瘍及び/又はがんを治療するための相乗効果を有する組合せ薬物のキットであって、本発明の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを含有する第1の容器及び本発明のNK細胞を含有する第2の容器を含み、第1の容器と第2の容器が切り離されているキットも提供する。キットは、投与のタイミング及び投与経路が明示された指示を更に含む。好ましくは、キットは、それぞれ本発明の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス及び本発明のNK細胞を含有する独立した容器、並びに投与のタイミング及

び投与経路が明示された指示からなる。

【0088】

腫瘍及び/又はがんは、限定されるものではないが、肺がん、黒色腫、頭頸部がん、肝がん、頭蓋内腫瘍(例、神経膠腫)、結腸直腸がん、膀胱がん、乳がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、胃がん、食道がん、腎がん、前立腺がん、膵がん、リンパ管がん、白血病、骨がん、精巣がん及び骨肉腫を含む。

【0089】

好ましくは、本発明の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを含有する第1の容器は、治療有効量の組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを含有し、NK細胞を含有する第2の容器は、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ 細胞/日(例、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^9$ 細胞/日、 $1 \times 10^9 \sim 4 \times 10^9$ 細胞/日、 $1 \times 10^9 \sim 3 \times 10^9$ 細胞/日)を提供するために十分なNK細胞を含有する。組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの治療有効量は、好ましくは、 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^9$ p f u /日(例、 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^9$ p f u /日、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ p f u /日)である。

10

【0090】

好ましくは、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを含有する第1の容器は、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ p f u /日含有し、NK細胞を含有する第2の容器は、NK細胞を $1 \times 10^9 \sim 3 \times 10^9$ 細胞/日含有する。

【0091】

本発明において、NK細胞は、自己NK細胞及び同種NK細胞から選択できる；好ましくは、NK細胞は、in vitro増殖によって得られた自己NK細胞又はin vitro増殖によって得られた同種NK細胞である。

20

【0092】

組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、当技術分野で一般に使用される投与方法、例えば腫瘍内投与又は静脈内投与を使用して投与してもよい。

【0093】

NK細胞は、当技術分野で一般に使用される投与方法を使用して、例えば、静脈内に投与してもよい。

【0094】

腫瘍及び/又はがんは、限定されるものではないが、肺がん、黒色腫、頭頸部がん、肝がん、頭蓋内腫瘍(例、神経膠腫)、結腸直腸がん、膀胱がん、乳がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、胃がん、食道がん、腎がん、前立腺がん、膵がん、リンパ管がん、白血病、骨がん、精巣がん及び骨肉腫を含む。

30

【0095】

本発明の別の側面は、腫瘍及び/又はがんを治療するための方法であって、

1) 本発明による組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを腫瘍及び/又はがん患者に投与する工程；

2) 組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの投与の18~72時間後(例、20~70時間後、22~48時間後、24~48時間後、30~48時間後)に、本発明によるNK細胞を腫瘍及び/又はがん患者に投与する工程

40

を順次含む方法も提供する。

【0096】

「組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの投与の18~72時間後(例、20~70時間後、22~48時間後、24~48時間後、30~48時間後)に、本発明によるNK細胞を腫瘍及び/又はがん患者に投与する工程」というフレーズは、NK細胞の最初の投与と組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの最初の投与の間隔が18~72時間(例、20~70時間、22~48時間、24~48時間、30~48時間)、又はNK細胞の最初の投与と組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの直近の投与の間隔が18~72時間(例、20~70時間、22~48時間、24~48時間、30~48時間)であることを意味する。好ましくは、NK細胞の最初の投与と組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの

50

直近の投与の間隔は18～72時間（例、20～70時間、22～48時間、24～48時間、30～48時間）である。より好ましくは、NK細胞の最初の投与と組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの直近の投与の間隔は24～48時間である。

【0097】

腫瘍及び/又はがんは、限定されるものではないが、肺がん、黒色腫、頭頸部がん、肝がん、頭蓋内腫瘍（例、神経膠腫）、結腸直腸がん、膀胱がん、乳がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、胃がん、食道がん、腎がん、前立腺がん、膵がん、リンパ管がん、白血病、骨がん、精巣がん及び骨肉腫を含む。

【0098】

腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍又はがん細胞において選択的に複製でき、ある特定の期間後にピークに達する。本発明者らは、複製期間後、腫瘍細胞における腫瘍溶解性ウイルスはNK細胞による腫瘍細胞の死滅を促進し得ることを見いだした。したがって、本発明によって提案された組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスとNK細胞の投与の順序及び間隔により、2つの効果のピークの2重ピーク重複が実現される。

【0099】

本発明は、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス及びNK細胞のそれぞれの投与量を更に探究及び最適化するものであり、上記投与順序及び間隔でのそれらの協調は極めて重要であり、それにより、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの抗腫瘍有効性、NK細胞の抗腫瘍有効性、及び上記の2つの腫瘍細胞に対する最良の相乗的死滅が決定される。

【0100】

本発明の好ましい態様では、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを治療有効用量で1日1回、1～6日間連続して投与する；及びNK細胞を $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ 細胞/日（例、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^9$ 細胞/日、 $1 \times 10^9 \sim 4 \times 10^9$ 細胞/日、 $1 \times 10^9 \sim 3 \times 10^9$ 細胞/日）で1日1回、1～6日間連続して投与する。本発明の別の好ましい態様では、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを治療有効用量で2日に1回、2～6日間連続して投与する；及びNK細胞を $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ 細胞/日（例、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^9$ 細胞/日、 $1 \times 10^9 \sim 4 \times 10^9$ 細胞/日、 $1 \times 10^9 \sim 3 \times 10^9$ 細胞/日）で2日に1回、2～6日間連続して投与する。組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの投与の18～72時間後に、NK細胞を腫瘍及び/又はがん患者に投与する限り、上記の態様のいずれか1つ、又は、他の態様を本発明に従って使用できる。組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス及びNK細胞は、交互に投与（例えば1日目に組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを投与し、2日目にNK細胞を投与し、3日目に組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを投与し、4日目にNK細胞を投与する、など）してもよく；順次に投与（例えば1日目に組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを投与し、2日目に組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス及びNK細胞を順番に投与する、3日目に組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス及びNK細胞を順番に投与する、及び4日目に組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルス及びNK細胞を順番に投与する、など）してもよく；又は他の投薬量レジメン（例えば、まず、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを、1日1回、1～6日間連続して投与し、18～72時間を空けた後、NK細胞を1日1回、1～6日間連続して投与する）で投与してもよい。好ましくは、まず組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを投与し、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの投薬の全ての投与が完了した18～72時間後にNK細胞を投与する。本発明の好ましい態様では、まず、腫瘍及び/又はがん患者に組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを投与し、組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを治療有効用量で1回のみ投与し；組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの投与の18～72時間後に、腫瘍及び/又はがん患者にNK細胞を投与し、NK細胞を $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ 細胞/日（例、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^9$ 細胞/日、 $1 \times 10^9 \sim 4 \times 10^9$ 細胞/日、 $1 \times 10^9 \sim 3 \times 10^9$ 細胞/日）で1回のみ投与する。組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの治療有効量は、好ましくは $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^9$ pfu/日（例、 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^9$ pfu/日、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ pfu/日）である。

【0101】

特定の状況及び必要に基づいて、本発明による腫瘍及び／又はがんを治療するための方法を患者に1回又は複数回、適用できる。

【0102】

本発明において、NK細胞は、自己NK細胞及び同種NK細胞から選択できる；好ましくは、NK細胞は、in vitro増殖によって得られた自己NK細胞又はin vitro増殖によって得られた同種NK細胞である。

【0103】

腫瘍及び／又はがんは、肺がん、黒色腫、頭頸部がん、肝がん、頭蓋内腫瘍（例、神経膠腫）、結腸直腸がん、膀胱がん、乳がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、胃がん、食道がん、腎がん、前立腺がん、膵がん、リンパ管がん、白血病、骨がん、精巣がん及び骨肉腫を含む。

10

【0104】

組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、当技術分野で一般に使用される投与方法、例えば腫瘍内投与又は静脈内投与により投与してもよい。

【0105】

NK細胞は、当技術分野で一般に使用される投与方法を使用して、例えば、静脈内に投与してもよい。

【0106】

以下に本発明を例として更に説明又は記載するが、これらの例は、本発明の保護の範囲を限定するものではない。

20

【実施例】

【0107】

別段の指定がない限り、以下の例において使用される実験方法は、生物学の分野における従来の実験手順、操作、材料及び条件を使用して実施される。

【0108】

別段の指定がない限り、それぞれの薬剤の濃度（％）は全て体積による割合〔％（v/v）〕を示す。

【0109】

生物材料：

1．CV1アフリカミドリザル腎臓細胞（培地：10％FBS＋MEM＋1％P/S）をATCCから購入する。MRC-5正常ヒト胚肺線維芽細胞（培地：10％FBS＋DMEM＋1％P/S）をChinese Academy of Sciences Shanghai Cell Bankから購入する。HEK-293及びHEK-293Tヒト胎児由来腎臓細胞（培地：10％FBS＋DMEM＋1％P/S）をそれぞれAgilent Technologies及びChinese Academy of Sciences Shanghai Cell Bankから購入する。HUVECヒト正常臍帯静脈内皮細胞（培地：10％FBS＋H-004B＋1％P/S）をAllcells Biotechnology (Shanghai) Co., Ltd.から購入した。

30

【0110】

2．腫瘍細胞：腫瘍細胞株及び培地の供給源を表Aに示す

【0111】

40

【表 A】

表A

細胞株	供給源	培地
HCT116	ATCC	10%FBS + マッコイ5A + 1%P/S
SKOV3	Chinese Academy of Sciences Shanghai Cell Bank	10%FBS + マッコイ5A + 1%P/S
SaoS2	Chinese Academy of Sciences Shanghai Cell Bank	10%FBS + マッコイ5A + 1%P/S
SK-BR-3	ATCC	10%FBS + マッコイ5A + 1%P/S
U251	Chinese Academy of Sciences Shanghai Cell Bank	10%FBS + DMEM + 1%P/S
PANC-1	ATCC	10%FBS + DMEM + 1%P/S
SK-HEP-1	Chinese Academy of Sciences Shanghai Cell Bank	10%FBS + MEM + 1%P/S
FaDu	Hangzhou First People's Hospital (China)	10%FBS + MEM + 1%P/S
MNNG/HOS C1	ATCC	10%FBS + MEM + 1%P/S
Hela	ATCC	10%FBS + MEM + 1%P/S
HepG2	Chinese Academy of Sciences Shanghai Cell Bank	10%FBS + MEM + 1%P/S
MCF-7	ATCC	10%FBS + MEM + 1%P/S
C33A	Wuhan Cell Bank	10%FBS + MEM + 1%P/S
A549	ATCC	10%FBS + F12K + 1%P/S
LOVO	ATCC	10%FBS + F12K + 1%P/S
CFPAC-1	ATCC	10%FBS + IMDM + 1%P/S
CV1	ATCC	10%FBS + MEM + 1%P/S
NCI-H1299	ATCC	10%FBS + RPMI1640
U87MG	ATCC	10%FBS + MEM

マッコイ5A、F12K、IMDM、DMEM、RPMI1640及びMEMIはGIBCOで購入。ウシ胎児血清FBSはSIGMAで購入し、ペニシリン-ストレプトマイシン(P/S)溶液(100X)はBeyotime Biotechnologyで購入した。

【0112】

3. ウイルス：骨格ベクターであるVSC20ワクシニアウイルスは、VGF遺伝子が欠失したワクシニアウイルスであり、調製方法は、McCart, JA, et al. Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Res* (2001) 61: 8751-8757に見いだすことができる。DDVV-hIL21ウイルスは遺伝子改変されたものであり、その改変は、人工合成ワクシニアウイルス初期/後期プロモーターpSELを使用して外因性ヒトIL21遺伝子の発現を調節すること、及び細胞内組換え技術を使用してヒトIL21遺伝子をワクシニアウイルスVSC20株のTK遺伝子領域に挿入し、それにより、2重欠失腫瘍溶解性ワクシニアウイルスDDVV-hIL21を構築することを含むものであった(中国特許出願公開第109554353(A)号を参照)。

【0113】

対照ウイルスとしての腫瘍溶解性ワクシニアウイルスDDVV-RFPは、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスWR株に属する(例えば、X Song, et al. T-cell Engager-armed Oncolytic Vaccinia Virus Significantly Enhances Antitumor Therapy. *Molecular Therapy*. (2014); 221, 102-111を参照)。このウイルスは、TK遺伝子とVGF遺伝子の両者を機能的に欠損しており、外因性赤色蛍光タンパク質(RFP)遺伝子を保持する。RFP遺伝子は単にスクリーニング/レポートの役割を果たすのみであり、腫瘍溶解

性ワクシニアウイルスDDVV-RFPの抗腫瘍機能は、TK遺伝子及びVGF遺伝子を機能的に欠損させた腫瘍溶解性ワクシニアウイルスと実質的に等価である。また、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスDDVV-RFPは、当技術分野における従来技術を使用してVSC20ワクシニアウイルスを遺伝子改変することによって得られる。VSC20ワクシニアウイルスは、VGF遺伝子を欠くワクシニアウイルスである。VSC20ワクシニアウイルスの調製方法は、McCart, JA, et al. Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. Cancer Res (2001) 61: 8751-8757を参照。遺伝子改変には、人工合成ワクシニアウイルス初期/後期プロモーターpSELを使用して外因性RFP遺伝子の発現を調節すること、及びRFP遺伝子をワクシニアウイルスVSC20株のTK遺伝子領域にin vitro細胞内組換え技術を使用して挿入し、それにより、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスDDVV-RFPを構築することを伴う。

10

【0114】

4. C57BL/6マウス及びBalBc-ヌードマウスをBeijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.から購入した。重症免疫不全NCGマウスをJiangsu GemPharmatech Co., Ltd.から購入した。

【0115】

5. 培養プレート：6ウェル細胞培養プレート、24ウェル細胞培養プレート及び96ウェル細胞培養プレートをCorning Co., Ltd.から購入した。

【0116】

6. gpt薬物の調製：10mg/mLのミコフェノール酸(400x)、10mg/mLの40xキサンチン(40x)及び10mg/mLのヒポキサンチン(670x)を、それぞれ0.1NのNaOHを使用して調製し、暗所、-20℃で保管した。1x希釈標準溶液は、400xミコフェノール酸100μL、40xキサンチン40μL及び670xヒポキサンチン60μLをDMEM 40mLに添加し、十分に混合し、0.22μmのフィルターでろ過することによって調製し、使用まで4℃で保管した。

20

【0117】

7. PBSの組成：8mMのNa₂HPO₄、136mMのNaCl、2mMのKH₂PO₄、2.6mMのKCl、pH7.2~7.4。

【0118】

8. ウイルス精製溶液の組成：60%(w/v)、50%(w/v)、40%(w/v)、30%(w/v)スクロース溶液。

30

【0119】

細胞計数方法：

MTTアッセイ：MTT溶液(5mg/mL)10μLを細胞が入った各ウェルに添加し、次いで、細胞を、37℃のインキュベーターで4~6時間インキュベートし、培地を廃棄し、DMSO150μLを各ウェルに添加し、次いで、シェイカーを使用して低スピードで10分間振とうして、結晶物質を完全に溶解させ、490nmにおける吸光度値(OD₄₉₀)をマイクロプレートリーダーで測定した。阻害率の算出式：細胞増殖阻害率(IR%) = 1 - (試験した産物のOD₄₉₀ - ブランクのOD₄₉₀) / (陰性対照のOD₄₉₀ - ブランクのOD₄₉₀) × 100%

40

【0120】

略語：

miR199T：miR199(hsa-miR-199a-3p又はhsa-miR-199b-3p)の標的配列

FBS：ウシ胎仔血清

P/S：ペニシリン - ストレプトマイシン

mCherry/ZsGreen：赤色蛍光タンパク質/プレオマイシン

DMSO：ジメチルスルホキシド。

【0121】

50

調製例1 pZB-E10R-miR199Tプラスミドの構築

4つの反復miR199T配列を保持するpZB-E10R-miR199Tシャトルプラスミドを構築するために、まず、4×miR199T反復断片を遺伝子合成法によって合成し、各断片にGGを連結し、ワクシニアウイルスのE10R遺伝子の3'UTR領域座に挿入した(挿入部位はE10R遺伝子の左相同アームの56974bpである)。次いで、5'末端と3'末端の両者がそれぞれLoxP配列を同じ方向に含む、mH5プロモーターによって駆動されるmCherry/Zeoicin遺伝子を挿入した。miR199TのDNA配列(配列番号1)は以下のとおり: 5'-acagtagtctgcacattggttta-3'(対応するmiRNA成熟形態のmiRBaseデータベースアクセッション番号は、MIMAT0000232(hsa-miR-199a-3p)又はMIMAT0004563(hsa-miR-199b-3p)である)。

10

【0122】

要約すると、pZB-E10R-miR199Tを、酵素による切断、ワクシニアウイルスの遺伝子E10Rの左右相同アーム及びmCherry/Zeoicin遺伝子を含有するpcDNA3.1(+)-E10R-mCherry/Zeoicin、miR199Tの4つの反復を含有するプラスミドpUC-57-miR199T(Beijing Tsingke Biotechnology Co., Ltd.によって構築及び合成されたもの)、及びプラスミドpCB(Yourong FANG et al, Construction of Recombinant Vaccinia Virus Vector with Zeocin and GFP Double Screening Labels, Journal of international epidemiology and infectious diseases, 2012. 39 (3): 148-152.に従って得た)を使用すること

20

による相同組換えによって得た(図1に示すとおり)。

【0123】

具体的な操作は以下のとおり。

【0124】

PCRは、当技術分野の従来技術に属する従来法の温度及びサイクル条件下で、実際の状況に応じて適当な調整を伴って行うことができる。

【0125】

1) pcDNA3.1(+)-E10R-mCherry/Zeoicinプラスミドの構築: ワクシニアウイルスDvv-VSC20ゲノム(ウイルスの供給源は、McCart, JA, et al. Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. Cancer Res (2001) 61: 8751-8757.に記載されている)をPCR増幅の鋳型として使用して(プライマー配列; L-armE10: AGTCCTCGAGCTAATATTGAGAAATTCATC(配列番号2); E10R1: CTGCACATTGGTTATTAAGAAGCATAGTCTGGAAACATCATATGGATATAAAGGGTTAACCTTTGTCTC(配列番号3))、E10R遺伝子及び左相同アームである断片F1を得た。断片F1をPCR増幅の鋳型として使用して(プライマー配列; L-armE10: AGTCCTCGAGCTAATATTGAGAAATTCATC(配列番号2); E10R2: TGGTTAGGACAGTAGTCTGCACATTGGTTAGGACAGTAGTCTGCACATTGGTTATTAAG(配列番号4))、E10Rの左相同アーム断片F2を得た。pCBmCZ-tTFNGRプラスミド(Yourong FANG et al, Construction of Recombinant Vaccinia Virus Vector with Zeocin and GFP Double Screening Labels, Journal of international epidemiology and infectious diseases, 2012. 39 (3): 148-152.に従って得た)をPCR増幅の鋳型として使用して(プライマー配列; 199H5: ATGTGCAGACTACTGTCTTAACCAATGTGCA GACTACTGTCCAAAATTTGAAAATAAATAC(配列番号5); Zeo-rev, GATCAAGATCTTTAGTCTCTCCTCGGCCAC(配列番号6))、mH5プロモーター及びmCherry/Zeoicinを有する断片F3を得た。ワクシニアウイルスDvv-VSC20ゲノムをPCR増幅の鋳型として使用して(プライマー配列; E11UP: GATCAAGATCTTTATAA ACTTAAC

30

40

50

CCATTATAAAAC (配列番号7); R-arm, AGTCGGATCCTTGA
CAGTCTTGAACAATTATAC (配列番号8))、ワクシニアウイルスのE1
0Rの右相同アームを含有するF4を得た。断片F2及びF3をリン酸化し、T4 DNA
リガーゼ (Thermo, E10011) によってライゲーションした。ライゲーションされた断片
をPCR増幅の鋳型として使用して (プライマー配列; L-arm E10, AGTCCT
CGAGCTAATATTGAGAAATTCATC (配列番号2); Zeo-rev,
GATCAAGATCTTTAGTCCTGCTCCTCGGCCAC (配列番号6))
、E10Rの左相同アーム及びmCherry/Zeoцин配列を含有する融合断片F
5を得た。断片F4及びF5をそれぞれ制限エンドヌクレアーゼBglII (Thermo, E
R0082) で消化し、次いで、T4 DNAリガーゼによってライゲーションして、E10
Rの左右相同アーム及びmCherry/Zeoцин配列を含有するE10R-mCh
erry/Zeoцин断片を得た。E10R-mCherry/Zeoцин断片及び
プラスミドpCDNA3.1 (+) (Invitrogen) を、それぞれ制限エンドヌクレアーゼ
BamHI (Thermo, FD0054) 及びXhoI (Thermo, FD0694) で消化し、次いで
、T4 DNAリガーゼによってライゲーションし、E. coli DH5a (TIANGEN, CB10
1) に導入して形質転換した。単一コロニーを選択してpCDNA3.1 (+) - E10
R-mCherry/Zeoцинプラスミドを得、配列決定によって確認した。

10

【0126】

2) pZB-1プラスミドの構築: pCBプラスミドをPCR増幅の鋳型として使用し
て (プライマー配列; zP12-F: CCGCTCGAGGCTGGCGTTTTTCC
ATAGG (配列番号33); zP12-R: CGCggatccCGGTCTGGTT
ATAGGTACATTTGAG (配列番号34))、直線化したL-pCB断片を得た。
pCDNA3.1 (+) - E10R-mCherry/Zeoцин及びL-pCBを制
限エンドヌクレアーゼBamHI及びXhoIで2重消化して、L-E10R-E11L
/D及びL-pCB/D断片を得、次いで、T4 DNAリガーゼによってライゲーション
し、最終的に、E. coli DH5aに導入して形質転換した。単一コロニーを選択してpZ
B-1プラスミドを得、配列決定によって確認した。

20

【0127】

3) pZB-2プラスミドの構築: pZB-1プラスミドをPCR増幅の鋳型として使
用して (プライマー配列; zP13-F: CCCAAGCTTTTAGTCCTGCTC
CTCGGCC (配列番号9); zP11m-R: ATA ACTTCGTATAGCAT
ACATTTATACGAAGTTATCTTTATAAACTTAACCCATTATA
AAAC (配列番号10))、LoxP配列ATA ACTTCGTATAATGTATG
CTATACGAAGTTAT (配列番号11) がmCherry/Zeoцинの3'末
端に挿入されたL-pZB-1断片 (4815bp) を得た。得られたL-pZB-1断
片をT4 DNAリガーゼによって自己ライゲーションし、E. coli DH5aに導入して形
質転換し、単一コロニーを選択してpZB-2プラスミドを得、配列決定によって確認し
た。

30

【0128】

4) pZB-E10R-miR199Tプラスミドの構築: pZB-2プラスミドをP
CR増幅の鋳型として使用して (プライマー配列; zP11-F: CGCGTATTTG
GGATCAGATG (配列番号12); zP11-R: CAAAGGTTCTTGAG
GGTTGTG (配列番号13))、L-E10R-E11L-LoxPを有する断片 (4
689bp) を得た。pUC-57-miR199Tを制限エンドヌクレアーゼKpn
I (Thermo, FD0524) 及びSacI (Thermo, FD1133) で2重消化して、L-mi
R199T断片: CAATTTAACACAACCCTCAAGAACCTTTGTAT
TTATTTTCAATTTTATAACTTTCGTATAATGTATGCTATA
CGAAGTTATGGACAGTAGTCTGCACATTTGGTTAGGACAGT
AGTCTGCACATTTGGTTAGGACAGTAGTCTGCACATTTGGTT
AGGACAGTAGTCTGCACATTTGGTTATTAAGAAGCATAGTC

40

50

T G G A A C A T C A T A T G G A T A T A A A G G G T T A A C C T T T G T C A C A
 T C G A T C G C G T A T T T G G G A T C A G A T G G T A C (配列番号35)を得た。
 これを、一段階クローニング方法 (Trelief™ sosoo cloning kit ver.2, Beijing Tsingke Biotechnology Co., Ltd., TSV-S2) により、L - E 1 0 R - E 1 1 L - L o x P
 を有する断片 (4689bp) とライゲーションし、E. coli DH5 に導入して形質転換し、単一コロニーを選択してpZB - E 1 0 R - m i R 1 9 9 Tプラスミドを得た。プラスミドをBamHI及びSmaI (Thermo, FD0663) による消化により検証した (図2)。プライマーZ10、Z11、Z14及びZ15 (Beijing Tsingke Biotechnology Co., Ltd.) を使用して、配列決定によって正確さを確認した (プライマーの配列を表1に示す)。

10

【0129】

【表1】

表1

プライマー	配列 5'-3'	企業
Z10	GTTGATCGGCACGTAAGAGG (配列番号14)	Beijing Tsingke Biotechnology Co., Ltd.
Z11	GTCACAGAAACCATGCCGTGTAG (配列番号15)	
Z14	GGAGCTTCCAGGGGAAAC (配列番号16)	
Z15	GACCTCAGCGTCGTAGTGG (配列番号17)	
zP19	CCAATTAATGCACCGAACATC (配列番号18)	
zP20	ATGAATTGGAGGAGATGGTGG (配列番号19)	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG (配列番号20)	
P1	ATCGCATTCTTAACGTGATGGAT (配列番号21)	
P2	TATCTAACGACACAACATCCATT (配列番号22)	
P5	GCACGGTAAGGAAGTAGATC (配列番号23)	
P18	CAGTACACGGTCCTCAGCATAA (配列番号24)	

20

30

【0130】

調製例2 VSC20-mT/mCherryウイルスのパッケージング及び同定

1) 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの組換え:

a) CV1細胞を6ウェルプレートに 4×10^5 細胞/ウェルに入れ、翌日に細胞密度が80%~90%に達するようにした。6ウェルプレート中のMEMを廃棄した。Dvv-VSC20ウイルスを 8×10^3 pfuで含有する無血清で抗生物質を含まないMEM培地1mLを、各ウェルに添加し、感染濃度が0.02MOIに達するようにした。37で2時間のインキュベーション後、培地を除去し、2%FBS+1%P/S添加MEM培地と交換し、プラスミド/Lipo3000 (Lipofectamine OR 3000トランスフェクション試薬300µL、Invitrogen (商標)、L3000-015) 混合溶液 (溶液A: pZB-E10R-miR199Tプラスミド2µg及びP3000試薬 (Invitrogen (商標))、L3000-015) 4µLをOpti-MEM I 300µLに添加し、十分に混合し、室温で5分インキュベート; 溶液B: Lipo3000 10µLをOpti-MEM I 300µLに添加し、十分に混合し、室温で5分インキュベート; 溶液Aと溶液Bを混合し、室温で15分インキュベート) を添加し、インキュベーター (37、5%CO₂) で培養を続けた。

40

b) 24~48時間後に細胞の完全な変性が顕微鏡下で観察されたら、上清及び細胞を収集し、凍結/解凍を3回繰り返して細胞を溶解し、300gで5分間遠心分離してウイルスを収集し、P0世代と名付けた。

50

c) ウイルス 200 μ L を、TIANamp ウイルス DNA / RNA キット (TIANGEN, DP315) を使用するウイルスゲノム抽出に適用した。プライマー z P 1 9 / z P 2 0 を用いた PCR により、V S C 2 0 - m T / m C h e r r y の組換えが成功したことを確認した。

【 0 1 3 1 】

2) 組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの単一クローンのスクリーニング:

a) C V 1 細胞を5つの100 mm ペトリ皿に入れ、翌日に細胞密度が80% ~ 90% に達するようにした。MEM 培地を廃棄し、無血清培地に段階希釈した P 0 ウイルス (10^{-1} ~ 10^{-5} の勾配希釈) それぞれ 3 mL を各ペトリ皿に添加した。ペトリ皿を 37、5% CO₂ のインキュベーターに2時間入れ、30分ごとに交差混合した。更に2時間のインキュベーション後、培地を廃棄し、2% (w/v) アガロースゲル (2% FBS を含有する MEM 培地) 10 mL を添加した。凝固後、インキュベーターに入れて、37、5% CO₂ での培養を続けた。

b) 約48時間後、赤色蛍光を伴う単一プラークを選択して滅菌 PBS 200 μ L 中に入れ、凍結解凍を3回繰り返し、ウイルスを放出させた。各プラークからウイルス溶液 100 μ L を取り出し、24ウェルプレートに入れた。C V 1 細胞 (細胞密度が80%に達したものを) を増殖に使用した。約48時間後、細胞が完全に変性したら、ウイルスを収集し、P 1 - X と名付けた (X は、番号 1、2、3、4... であり、異なるウイルスクローンを表す)。各プラークからのウイルス溶液 200 μ L を、TIANamp ウイルス DNA / RNA キットを使用してウイルスゲノムを抽出し、次いで、同定のために PCR を実施した。ウイルス溶液の残りを -80 で保管した。上記スクリーニングを4回繰り返して、P 5 世代ウイルスを得た。プライマー z P 1 9 及び z P 2 0 (プライマーの配列を表1に示す) を PCR に使用して、2310 bp のバンドを得た。これは、V S C 2 0 - m T / m C h e r r y 組換えウイルスの単一クローンが確認されたことを示唆する (図3)。配列の正確さを Z 1 1、Z 1 5、z P 1 9 及び z P 2 0 配列決定によって確認した (プライマーの配列を表1に示す)。V S C 2 0 - m T / m C h e r r y ウイルスベクターは、V G F 遺伝子が機能的に欠損しており、4つの反復 mi R 1 9 9 T 配列及びスクリーニングのための m C h e r r y 赤色マーカー遺伝子が E 1 0 R 遺伝子の 3' U T R 領域に挿入されている (図4)。

【 0 1 3 2 】

調製例3 Mi T D v v - m C h e r r y - 骨格ウイルスのパッケージング及び同定

1) 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの組換え: C V 1 細胞を6ウェルプレートに 4×10^5 細胞/ウェルで入れ、翌日に細胞密度が80% ~ 90% に達するようにした。6ウェルプレート中の MEM 培地を廃棄し、V S C 2 0 - m T / m C h e r r y ウイルスを 8×10^3 p f u で含有する無血清で抗生物質を含まない MEM 培地 1 mL を、各ウェルに添加し、感染濃度が 0.02 MOI に達するようにした。37 で2時間のインキュベーション後、培地を廃棄し、2% FBS + 1% P / S 添加 MEM 培地と交換し、p C B プラスミド / L i p o 3 0 0 0 混合溶液 (調製例2と同様に調製) 300 μ L を添加した。24 ~ 48時間後に細胞の完全な変性が顕微鏡下で観察されたら、上清及び細胞を収集し、凍結解凍を3回繰り返し、300 g で5分間遠心分離し、上清中に放出されたウイルスを収集し、P 0 世代ウイルスと名付けた。ウイルスゲノムを、TIANamp ウイルス DNA / RNA キット (TIANGEN, DP315) を使用して抽出した。プライマー P 5 / P 1 8 を用いた PCR により、M i T D v v - m C h e r r y ウイルスの組換えが成功したことを確認した。

【 0 1 3 3 】

2) g p t 薬物スクリーニング: 60 mm のペトリ皿を使用して C V 1 細胞を培養し、C V 1 細胞が80%に達したら、MEM で希釈したウイルス希釈物 (P 0 世代ウイルス 150 μ L を含有) 1 mL を添加した。感染の2時間後、0.5 x g p t をスクリーニングのために添加した。細胞変性が観察され、ウイルスが収集され、P 1 世代と名付けられた。上記工程を2回繰り返して、P 3 世代ウイルスを得た。

【 0 1 3 4 】

10

20

30

40

50

3) 組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの単一クローンのスクリーニング：具体的な操作は、調製例2におけるものと同じである。段階希釈したP3ウイルスによるCV1細胞の感染の4時間後、2% (w/v) アガロースゲル10mLを添加してウイルスを約48時間にわたって固定及び培養し、赤色蛍光を伴う単一プラークをPCRによる同定のために選択した。PCRの結果に従って、陽性クローンをP4~P5世代の繰り返しスクリーニングのために選択し、MiTDvv-mCherryウイルスの単一クローンを得た。PCRによる同定により、1840bpのバンド(プライマーP5及びP8の配列を表1に示す)が得られ、一方、622bpのバンド(プライマーP1及びP2の配列を表1に示す)は得られなかったことが確認された(図5)。プライマーP5及びP18を配列決定による検出(Beijing Tsingke Biotechnology Co., Ltd.)に使用して、MiTDvv-mCherry骨格ウイルスは、TK遺伝子及びVGF遺伝子が機能的に欠損し、miR199Tの4つの反復配列及びmCherry赤色マーカー遺伝子がE10R遺伝子の3'UTR領域に挿入されており、gptスクリーニング遺伝子をTK遺伝子領域内に有することを確認した(図6)。

【0135】

調製例4 MiTDvv-hIL21-mCherry腫瘍溶解性ウイルスのパッケージング及び同定

1) 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの組換え：CV1細胞を6ウェルプレートに 4×10^5 細胞/ウェルで広げ、翌日に細胞密度が80%~90%に達するようにした。6ウェルプレート中のMEM培地を廃棄し、DDvv-hIL21ウイルス(調製方法は、中国特許出願公開第109554353(A)号(その全内容が参照によりこの明細書に組み込まれる)に記載のとおり)を 8×10^3 pfuで含有する無血清で抗生物質を含まないMEM培地1mLを、各ウェルに添加し、感染濃度が0.02MOIに達するようにした。細胞を37で2時間インキュベートし、培地を廃棄し、2%FBS+1%P/S添加MEM培地と交換した。pZB-E10R-miR199Tプラスミド/Lipo3000混合溶液(調製例2と同様に調製)300 μ Lを添加した。24~48時間後に細胞の完全な変性が顕微鏡下で観察されたら、上清及び細胞を収集し、凍結解凍を3回繰り返し、300gで5分間遠心分離し、上清中に放出されたウイルスを収集し、P0世代と名付けた。ウイルスゲノムを、TIANampウイルスDNA/RNAキット(TIANGEN, DP315)を使用して抽出した。プライマーzP19/zP20を用いたPCRにより、MiTDvv-hIL21-mCherry腫瘍溶解性ウイルスの組換えが成功したことを確認した。

【0136】

2) 組換え腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの単一クローンのスクリーニング：具体的な操作は、調製例2に記載されているものと同じである。CV1細胞に段階希釈したP0世代ウイルスを感染させた4時間後、2% (w/v) アガロースゲル10mLを添加して、ウイルスを約48時間にわたって固定及び培養し、赤色蛍光を伴う単一プラークをPCRによる同定のために選択した。PCRの結果に従って、陽性クローンをP2~P5世代の繰り返しスクリーニングのために選択し、ウイルスの単一クローンを得た。PCRによる同定により、2310bpのバンドが得られたことが確認された(プライマーzP19及びzP20の配列を表1に示す)。配列の正確さを、Z11、Z15、zP19及びzP20を使用した配列決定によって確認した(プライマーの配列を表1に示す) Beijing Tsingke Biotechnology Co., Ltd. MiTDvv-hIL21-mCherry腫瘍溶解性ウイルスは、VGF遺伝子が機能的に欠損しているのとTK遺伝子が機能的に欠損しているとの両者であり、miR199Tの4つの反復及びmCherry赤色マーカー遺伝子がE10R遺伝子の3'UTR領域に挿入されており、IL-21機能的遺伝子をTK遺伝子領域内に保持する(図8)。

【0137】

調製例5 Cre-LoxP切断によるMiTDvv骨格ウイルス及びMiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ウイルスの調製

MiTDvv骨格ウイルス(mCherry/Zeoцин配列が欠失したMiTDv

10

20

30

40

50

v - mCherryウイルス)及びMiTDvv - hIL21腫瘍溶解性ウイルス(mCherry / Zeocin配列が欠失したMiTDvv - hIL21 - mCherryウイルス)を得ること。

【0138】

1) CV1細胞を6ウェルプレートに 4×10^5 細胞/ウェルで入れ、翌日に細胞密度が約70%に達するようにした。培地を5% FBS + 1% P/S添加MEM培地と交換し、pBS185 CMV - Creプラスミド(Cre遺伝子は、哺乳動物細胞においてCre酵素を発現できるCMVプロモーター、Addgeneから購入、cat. No.11916、によって制御される)/Lipo3000混合溶液(調製例2と同様に調製)300 μ Lを各ウェルに添加し、インキュベーター中、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂で24時間インキュベートした。次いで、MiTDvv - mCherry及びMiTDvv - hIL21 - mCherryウイルスを 8×10^5 pfuでウェルに適宜添加し、対照ウェルを、ウイルス単独及びプラスミド単独を用いて準備した。交差混合し、インキュベートを更に24時間継続した。細胞の完全な変性が顕微鏡下で観察された後、凍結/解凍を3回繰り返し、300gで5分間遠心分離することにより、ウイルスを収集した。このウイルスをP0世代と名付けた。

10

【0139】

2) CV1細胞を5つの100mmペトリ皿に入れ、翌日に細胞密度が80%~90%に達するようにした。P0世代ウイルスをMEM培地で 10^{-1} ~ 10^{-5} まで10倍勾配希釈した。ペトリ皿中のMEM培地を廃棄し、段階希釈したウイルス溶液3mlをペトリ皿に適宜添加し、細胞をインキュベーター中、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂で2時間インキュベートした。インキュベーションの際、細胞を30分ごとに交差混合し、インキュベーションを2時間継続した。次いで、培地を廃棄し、2%(w/v)アガロースゲル10mlを添加した。アガロースが固まった後、培養を継続するためにペトリ皿をインキュベーターに戻した。約48時間後、赤色蛍光を伴わない単一の白色プラークを選択して、滅菌PBS 200 μ Lを含有するチューブに入れ、凍結解凍を3回繰り返し、ウイルスを放出させた。各プラークからウイルス溶液100 μ Lを取り出し、増殖のためにCV1細胞(細胞密度が80%に達したもの)と共に24ウェルプレートに入れた。約48時間後、細胞が完全に変性し、ウイルスを収集し、P1-Xと名付けた(Xは、番号1、2、3、4...であり、異なるウイルスクローンを表す)。各プラークからウイルス溶液200 μ LをPCRアッセイ(プライマーzP19及びzP20の配列を表1に示す)のためのゲノムの抽出に適用した。

20

30

【0140】

3) 工程2)を1回繰り返し、P2世代のウイルスの単一クローンMiTDvv及びMiTDvv - hIL21を得、これらをPCRによって同定した(プライマーzP19及びzP20の配列については表1を参照されたい)。プライマーzP19及びzP20(Beijing Tsingke Biotechnology Co., Ltd.)(プライマーの配列を表1に示す)を用いた配列決定によって配列が正しいことを確認した後、-80 $^{\circ}$ Cで保管した。

【0141】

PCR及び配列決定の結果から、MiTDvv骨格ウイルスにおける4つの反復miR199T配列がDvv - VSC20ワクシニアウイルスのE10Rの3'UTR領域内に組み込まれており、mCherry / Zeocin配列は含まず、かつ、gpt遺伝子がTK領域に組み込まれており、したがってTK機能が不活化されていることが示された。MiTDvv - hIL21腫瘍溶解性ウイルスにおける4つの反復miR199T配列はDvv - hIL21ワクシニアウイルスのE10Rの3'UTR領域に組み込まれており、mCherry / Zeocin配列は含まれていなかった。すなわち、この2種類のウイルスの組換えは成功した(図9)。ウイルスの構造を図10に示す。

40

【0142】

調製例6 腫瘍溶解性ウイルスの産生及び精製

1) HeLa細胞を50個の150mm培養皿に入れ、翌日に細胞密度が約80%に達

50

するようにし、それらの細胞に、P2世代のMiTDvv骨格ウイルスの単一クローンのNo.1及びP2世代のMiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ウイルスの単一クローンのNo.1をそれぞれ0.2MOIで感染させた。約2~3日後、顕微鏡下で細胞に連なったビーズ状の細胞変性が観察され、次いで、細胞及び培地を細胞スクレーパーで回収した。

【0143】

2)細胞を4、25,924×gで30分間遠心分離し、上清を廃棄した。ペレットを、10%FBSを含有するMEM 20mL中に再構成した。懸濁液を液体窒素/オートクレーブした水で3回凍結/解凍し、次いで、4、25,924×gで30分間遠心分離した。ペレットをPBS 20mLで洗浄し、4、25924×gで30分間遠心分離した。ペレットを10mMのTris、pH9.0 10mLに再懸濁させ、60W、4で、30秒間の間隔を伴って30秒間、合計3分間の超音波処理を行い、300×gで5分間遠心分離し、次の工程のために上清を収集した。超遠心分離チューブに13.2mLを取り、36%(w/v)スクロース6mLに添加した。ウイルス上清5mLを上から下にゆっくりと添加し、4、32,900×gで80分間遠心分離した。ペレットを、1mMのTris(pH9.0)5mLに再懸濁させ、30秒間の間隔を伴って30秒間、合計3分間の超音波処理を行った。

【0144】

3)スクロース勾配精製チューブの調製及びローディング:スクロース勾配精製チューブを、40%(w/v)、36%(w/v)、32%(w/v)、28%(w/v)及び24%(w/v)スクロース溶液2.2mLをそれぞれ13.2mLの超遠心分離チューブにゆっくりと添加することによって調製した。次いで、工程2)で得たウイルス懸濁液2mLを超遠心分離チューブの壁に沿ってゆっくりと添加し、4、26,000×gで50分間遠心分離した。その後、超遠心分離チューブの中央に乳状の白色ウイルスバンドが肉眼で確認できた。18G-5mLシリンジ針を使用して、超遠心分離チューブに突き刺してウイルスバンドを吸い取り、ウイルスを新しい超遠心分離チューブに入れた(吸い取ったウイルスバンドの体積をV1として記録した)。

【0145】

4)1mMのTris、pH9.0緩衝剤をV1の2倍体積で添加してウイルスを洗浄して残留するスクロースを除去し、4、32,900gで1時間遠心分離した。上清を廃棄し、ペレットを1mMのTris、pH9.0、5mLに再懸濁させ、4で、30秒間の間隔を伴って30秒間、合計3分間の超音波処理を行い、滅菌EPチューブに50µL/チューブで分配し、-80で保管した。同時に、ウイルス力価を従来のブランク法によって検出した。MiTDvv-hIL21の力価検出結果は、 6.4×10^9 pfu/mLであり、MiTDvvの力価検出結果は 1.92×10^9 pfu/mLであった。

【0146】

実施例1 腫瘍細胞におけるMiTDvv骨格ウイルスの選択的複製

正常ヒト臍帯静脈内皮細胞HUV EC及びヒト子宮頸がん細胞HeLaを6ウェルプレートに 3×10^5 細胞/ウェルで入れ、37、5%CO₂で一晩インキュベートし、翌日に細胞密度が70%に達するようにした。上記方法で調製したMiTDvvウイルスを0.1MOIでそれぞれに添加した。2時間にわたって感染させた後、培地を、FBSを5%含有する培地と交換した。24時間及び48時間培養した後、培地及び細胞を収集し、凍結解凍を3回繰り返して細胞を溶解し、従来のブランクアッセイにより溶解物のウイルス量をアッセイした。

【0147】

図11に結果を示す。0.1MOIという感染条件下では、HUV EC正常細胞におけるMiTDvvウイルスの複製は、HeLa腫瘍細胞におけるMiTDvvウイルスの複製よりも低かった。図11Aは、MiTDvv骨格ウイルス感染の24時間後のHUV EC細胞及びHeLa細胞におけるウイルス量を示す;図11Bは、MiTDvv骨格ウイルスのHUV EC細胞及びHeLa細胞への感染の48時間後のウイルス量を示す;図11Cは、HeLa細胞におけるMiTDvv骨格ウイルスの複製能に対するHUV EC

10

20

30

40

50

細胞におけるMiTDvv骨格ウイルスの複製能の比を示し、ウイルス感染の24時間及び48時間後の、HeLa細胞におけるウイルスの複製は、HUVEC細胞におけるウイルスの複製と比較して、それぞれ50.46倍及び60.56倍であった。

【0148】

実施例2 MiTDvv骨格ウイルスとDDvv-RFP骨格ウイルスの正常細胞株に対するin vitro死滅効果の比較

ヒト正常胚肺線維芽細胞MRC-5を96ウェルプレートに1×10⁴細胞/ウェルで入れ、37、5%CO₂で一晩インキュベートし、翌日に細胞密度が80%に達するようにした。DDvv-RFP及び上記方法で調製したMiTDvvウイルスを、それぞれ0.03MOI及び0.1MOIで添加した。2時間にわたって感染させた後、培地を5%FBS含有DMEM培地に交換した。細胞成長チャートを、xCeLLigence Real-time Label-free Cell Analyzer (RTCA) SP (ACEA, xCeLLigence RTCA SP) を使用し、24時間にわたって検出した(n=6、実験は2~3回繰り返した)。本実験では、細胞のみでウイルスを伴わないウェルの群(ウイルス感染なし)を陰性対照群として使用した。対照群に対しても同じことを同時に行い、各群に6つの反復実験ウェルを用いた。細胞死滅率を、ウイルス処理群の陰性対照群に対する比(%)として算出した。

10

【0149】

図12に結果を示す。異なるMOI値の下で、MiTDvvウイルスのMRC-5正常細胞に対する死滅効果は、DDvvウイルスのMRC-5正常細胞に対する死滅効果よりも有意に低かった(p<0.001)。

20

【0150】

実施例3 MiTDvv骨格ウイルスとDDvv-RFP骨格ウイルスの正常細胞における複製の比較

ヒト正常胚肺線維芽細胞MRC-5を24ウェル培養プレートに1×10⁵細胞/ウェルで入れ、DMEM培地中、2%FBSと一緒に、37、5%CO₂で一晩インキュベートし、翌日に細胞密度が80%に達するようにした。上記方法で調製したDDvv-RFPウイルス及びMiTDvvウイルスを、それぞれ0.1MOI及び0.3MOIで添加した。2時間にわたって感染させた後、培地を5%FBS含有DMEM培地と交換した。本実験では、細胞のみでウイルスを伴わないウェルの群を陰性対照群として使用した。対照群にも対応する培地交換を同時に行った。37、5%CO₂で24時間培養した後、培地及び細胞を収集した。TIANampウイルスDNA/RNAキット(TIANGEN, DP315)を使用してウイルスゲノムを抽出し、ウイルスA46R遺伝子をQPCR法で検知し、ウイルス負荷量を検出した。プライマー配列を表2に示す。実験を3回繰り返し、平均値を統計解析に使用した。

30

【0151】

【表2】

表2

プライマー	配列 5'-3'	企業
A46R-F	CAGGGAAACGGATGTATA (配列番号25)	Beijing Tsingke Biotechnology Co., Ltd.
A46R-R	TGTGTTACAGAATCATATAAGG (配列番号26)	

40

結果を図13に示す。異なるMOI値の下で、MRC-5正常細胞におけるMiTDvvウイルスの複製は、MRC-5正常細胞におけるDDvvウイルスの複製よりも有意に低かった(*p<0.01; **p<0.05)。

【0152】

図13に結果を示す。異なるMOI値の下で、MRC-5正常細胞におけるMiTDvvウイルスの複製は、MRC-5正常細胞におけるDDvvウイルスの複製よりも有意に低かった(*p<0.01; **p<0.05)。

【0153】

実施例4 MiTDvv-hIL21及びDDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウ

50

イルスの正常細胞に対する死滅効果の比較

ヒト正常胚肺線維芽細胞 MRC-5 を 96 ウェル培養皿に 1×10^4 細胞/ウェルで入れ、翌日に細胞密度が 80% に達するようにした。上記方法で調製した MiTDvv-hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルス及び DDvv-hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを、それぞれ 0.3 MOI 及び 1 MOI で添加した。2 時間にわたって感染させた後、培地を 5% FBS 含有 DMEM 培地と交換して、培養を 37、5% CO₂ で 12 時間継続した。xCELLigence Real-time Label-free Cell Analyzer (RTCA) SP (ACEA, xCELLigence RTCA SP) を使用して細胞成長チャートを検出した。本実験では、ウイルスを添加していない MRC-5 細胞の群をブランク対照群として使用した。対照群にも対応する培地交換を同時に行い、各群に 6 ウェルを用いた。実験を 3 回以上繰り返し、平均値を統計解析に使用した。

10

【0154】

図 14 に結果を示す。MiTDvv-hIL21 及び DDvv-hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの正常ヒト肺線維芽細胞 MRC-5 に対する死滅効果には、用量依存的な増大傾向が示された。MiTDvv-hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの正常ヒト肺線維芽細胞 MRC-5 に対する死滅効果は、同じ用量での DDvv-hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの MRC-5 に対する死滅効果よりも有意に弱かった (0.3 MOI、p 0.05; 1 MOI、p 0.01)。

【0155】

実施例 5 MiTDvv-hIL21 及び DDvv-hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの正常細胞における複製の比較

20

正常ヒト肺線維芽細胞 MRC-5 を 24 ウェル培養プレートに 1×10^5 細胞/ウェルで入れ、翌日に細胞密度が 80% に達するようにした。上記方法で調製した MiTDvv-hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルス及び DDvv-hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを、それぞれ 0.1 MOI 及び 0.3 MOI で添加した。2 時間にわたって感染させた後、培地を 5% FBS 含有 DMEM 培地に交換し、培養を 37、5% CO₂ で 24 時間継続した。次いで、培地及び細胞を収集し、TIANamp ウイルス DNA/RNA キットを使用してウイルスゲノムを抽出した。ウイルス遺伝子である A46R をリアルタイム蛍光定量的 PCR で検知してウイルス負荷量を検出した。プライマー配列を表 2 に示す。本実験では、ウイルスを添加していない MRC-5 細胞の群をブランク対照群として使用した。対照群にも対応する培地交換を同時に行った。各群に 3 つの反復実験ウェルを用い、平均値を統計解析に使用した。

30

【0156】

図 15 に結果を示す。0.1 MOI 及び 0.3 MOI という感染条件下で、MiTDvv-hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの正常細胞 MRC-5 における複製は、DDvv-hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの MRC-5 における複製よりも有意に低かった。

【0157】

実施例 6 MiTDvv-hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの正常細胞における複製と腫瘍細胞における複製の比較

40

正常ヒト肺線維芽細胞 MRC-5 及びヒト非小細胞肺がん細胞 A549 を 24 ウェル培養皿に 1×10^5 細胞/ウェルで広げ、翌日に細胞密度が 80% に達するようにした。上記方法で調製した MiTDvv-hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを、それぞれ 0.03 MOI、0.3 MOI 及び 3 MOI で添加した。2 時間にわたって感染させた後、培地を 5% FBS 含有 DMEM 培地に交換し、培養を 37、5% CO₂ で 24 時間継続した。次いで、細胞及び培地を収集し、TIANamp ウイルス DNA/RNA キットを使用してウイルスゲノムを抽出した。ウイルス遺伝子である A46R をリアルタイム蛍光定量的 PCR で検知してウイルス負荷量を検出した。プライマー配列を表 2 に示す。本実験では、ウイルスを添加していない細胞の群をブランク対照群として使用した。対照群に対して対応する培地交換を対応する時点で行い、各群に 3 つの反復実験ウェルを用いた。

50

【0158】

図16Aに結果を示す。MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍細胞A549における複製は、正常細胞MRC-5における複製よりも有意に高かった。0.03MOI、0.3MOI及び3MOIでの、MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍細胞A549における複製の正常細胞MRC-5における複製に対する比(A549/MRC-5)は、それぞれ51、23及び16であった(図16B)。X軸は腫瘍溶解性ウイルスのA549細胞における複製のMRC-5細胞における複製に対する比(すなわち、A549/MRC-5)を表し、Y軸はウイルス感染のMOIを表す。

【0159】

実施例7 MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの異なる腫瘍細胞株に対するin vitro死滅効果

種々の型のヒト腫瘍細胞を96ウェルプレートにウェル当たり細胞4000~5000個で添加した。腫瘍細胞には、SK-HEP-1細胞(ヒト肝がん細胞)、A549細胞(ヒト非小細胞肺がん細胞)、FaDu細胞(ヒト頭頸部がん細胞)、PANC-1(ヒト膵がん細胞)、U251細胞(ヒト神経膠腫細胞)、LOVO細胞(ヒト結腸直腸がん細胞)、MNNG/HOSC1細胞(ヒト骨肉腫細胞)を含めた。細胞を37、5%CO₂で一晩、70%に達するまでインキュベートした。各ウェルの培地の半分の体積を吸引して廃棄し、次いで、上記方法で調製したMiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを異なる濃度(0.001MOI、0.003MOI、0.01MOI、0.03MOI、0.1MOI、0.3MOI、1MOI、3MOI、10MOI)で含有する無血清培地を等体積で各ウェルに添加した。感染の4時間後、培地をFBSを5%含有する培地と交換し、37、5%CO₂で48時間(MNNG/HOSC1、A549、LOVO、FaDu)又は72時間(SK-HEP-1、U251、PANC-1)インキュベートした。腫瘍細胞のアポトーシスをMTTアッセイによって検出した(n=6、実験は2~3回繰り返した)。この試験の対照群は、陰性対照群(ウイルス感染なし)及び陽性対照群(10µMのパクリタキセル、Beijing SL Pharmaceutical Co., Ltd.から購入)であり、各実験群及び対照群を6つの2連のウェルで準備した。細胞死滅率(阻害率)は、実験群又は陽性対照群の陰性対照群に対する比(%)であった。

【0160】

結果から、MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍細胞に対する死滅効果が用量依存的であることが示された(図17)。MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスのSK-HEP-1細胞、U251細胞、PANC-1細胞、MNNG/HOSC1細胞、A549細胞、LOVO細胞及びFaDu細胞に対する阻害率中央値(IC₅₀)は、それぞれ0.18、0.79、0.54、0.53、0.66、0.68及び0.29であった(表3)。

【0161】

10

20

30

40

50

【表3】

表3

細胞株	IC ₅₀	
	48時間	72時間
FaDu	0.29	-
A549	0.66	-
LOVO	0.68	-
MNNG/HOS C1	0.53	-
SK-HEP-1	-	0.18
PANC-1	-	0.54
U251	-	0.79

10

【0162】

実施例8 異なる細胞におけるmiR-199成熟形態の発現レベルとMiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの細胞死滅効果の相関の評価

1) 異なる腫瘍細胞におけるmiR-199の発現レベルの評価(注:全ての腫瘍細胞におけるmiR-199の発現レベルがHEK-293T細胞におけるmiR-199の発現レベルに対するものである): HEK-293T細胞、MNNG/HOSC1細胞、Saos2細胞(ヒト骨肉腫細胞)、A549細胞、FaDu細胞、SK-BR-3細胞(ヒト乳がん細胞)、HepG2細胞(ヒト肝がん細胞)、HeLa細胞(子宮頸がん細胞)、SKOV3細胞(ヒト卵巣がん細胞)、MCF-7細胞(ヒト乳がん細胞)、C33A細胞(ヒト子宮頸がん細胞)、LOVO細胞、U251細胞、HCT116細胞(ヒト結腸直腸がん細胞)、SK-HEP-1細胞、CFPAC-1細胞(ヒト膵がん細胞)、PANC-1細胞(ヒト膵がん細胞)、NCI-H1299細胞(ヒト非小細胞肺癌細胞)、及びU87MG細胞(ヒト神経膠腫細胞)をそれぞれ6ウェルプレートに添加した。細胞がウェルを完全に満たした後、培地を廃棄した。Trizol試薬(Invitrogen)1mLを添加してRNAを抽出した。RNA1μgを使用して、逆転写キット(Tiangen cat# KR116-02)でcDNAを合成し、蛍光定量的PCR試薬キットで腫瘍細胞におけるmiR-199成熟形態(hsa-miR-199a-3p又はhsa-miR-199b-3p)の発現レベルを検出した。表4に示すとおり、普遍的なステムループ配列GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC(配列番号36)とmiR-199-3p成熟形態の3'末端における7塩基の逆方向反復配列の組合せから得た逆転写プライマーmiR-199-RTを使用した; qRT-PCRプライマー(Beijing Tsingke Biotechnology Co., Ltd.によって合成されたもの)の配列を表4に示す。同時に、miR-199の相対的な発現量を、内因性遺伝子U6を内部参照として使用して算出した。結果から、MNNG/HOSC1細胞及びSaos2細胞がmiR-199を高発現する(++、10)細胞株であり、FaDu細胞、HepG2細胞及びSK-BR-3細胞がmiR-199を中程度に発現する(+、1かつ<10)細胞株であり、他の腫瘍細胞株は全てmiR-199を低発現する(±、<1)細胞株であることが示された(図18)。

20

30

40

【0163】

50

【表 4】
表4

プライマー	配列 5'-3'
U6-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAAAAT ATG (配列番号27)
U6-F	CTCGCTTCGGCAGCACATA (配列番号28)
U6-R	CGCAGGGTCCGAGGTATTC (配列番号29)
miR199-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTAAC CAA (配列番号30)
miR199-F	GCCGACAGTAGTCTGCACATTGG (配列番号31)
miR199-R	CGCAGGGTCCGAGGTATTC (配列番号32)

注:U6-RT及びmiR199-RTは逆転写プライマー。U6-F及びU6-RはU6のQPCRプライマー。miR199-F及びmiR199-Rは、miR199のQPCRプライマーである。

10

【 0 1 6 4 】

2) 上記方法で調製したMiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの死滅効果を比較するために、図18に示す細胞内miR-199の発現レベルに応じて、低発現する、中程度に発現する及び高発現する腫瘍細胞株としてPANC-1、SK-HEP-1、FaDu及びMNNG/HOS C1細胞を選択した: MNNG/HOS C1、FaDu、SK-HEP-1及びPANC-1細胞を96ウェルプレートに広げ、各ウェル中の細胞の数を細胞成長速度に応じて調整した。一晚培養した後、細胞密度が80%に達した。次いで、培地を廃棄し、MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを0.1MOIで含有する無血清培地100µLを添加した。感染の4時間後、培地を5%FBS含有培地と交換して、インキュベーションを48時間継続した。腫瘍細胞のアポトーシスをMTTアッセイによって検出した(n=6、実験は2~3回繰り返した)。この試験の対照群は、陰性対照群(ウイルス感染なし)であり、各実験群及び対照群を6つの2連のウェルで準備し、細胞生存率を実験群の陰性対照群に対する比(%)とした。結果から、MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの、miR-199を低発現している腫瘍細胞に対する死滅効果は、miR-199を高発現する腫瘍細胞に対する死滅効果よりも有意に高かったことが示された(図19)。

20

30

【 0 1 6 5 】

実施例9 安定なトランスフェクションによってmiR-199を高発現する腫瘍細胞に対するMiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの死滅効果の評価

この実験の目的は、本発明の腫瘍溶解性ウイルスの機構を更に実証することである。TK/VGF2重欠失腫瘍溶解性ワクシニアウイルス自体は異なる型の腫瘍細胞に対して異なる死滅効果を有する。本発明のMiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスをマイクロRNAによって調節できることを更に検証するために、同じ型の腫瘍細胞間での比較のために、miR-199(has-miR-199a-3p及びhas-miR-199b-3pを含む)を高発現する安定にトランスフェクトされた腫瘍細胞を構築した。

40

【 0 1 6 6 】

1) miR-199を有するレンチウイルスの構築: HEK-293細胞(Agilent Technologies)を6ウェルプレートに10%FBS+1%P/S添加DMEEM培地と共に4x10⁵細胞/ウェルに入れ、翌日に細胞密度が約70%に達するようにした。5%FBS+1%P/S添加DMEEM培地と交換した後、プラスミド/Lipo3000混合溶液(調製例2に同じ)300µLを各ウェルに添加した。LV-miR199レンチウイルスを調製するためのプラスミドには: p59-rev、pP60-VSV-G、p61-gag-P01及びLV3-has-miR199-GFPが含まれ、これらはShanghai GenePharma Co., Ltd.から購入した。LV3-has-miR199-GFPプラスミドは、miR199成熟形態hsa-miR-199b-3p: 5'-GATCCGACAGTAGTC

50

T G C A C A T T G G T T A T T C A A G A G A T A A C C A A T G C A G A C T A C T
 G T C T T T T T T G A A T T - 3 ' (配列番号 3 7) を発現可能な DNA 配列、及びスク
 リーニング並びに検出のために使用できる GFP 緑色蛍光タンパク質を発現可能な DNA
 配列を含有する。LV - mi R NC レンチウイルスを調製するためのプラスミドには：p
 5 9 - r e v、p P 6 0 - V S V - G、p 6 1 - g a g - P 0 1 及び L V 3 - s h N C が
 含まれ、これらは Shanghai GenePharma Co., Ltd. から購入した。LV 3 - s h N C は
 、無関係の対照 DNA 配列：5 ' - G A T C C G T T C T C C G A A C G T G T C A C G T
 T T C A A G A G A A C G T G A C A C G T T C G G A G A A C T T T T T T G A A T T
 - 3 ' (配列番号 3 8) を有する対照プラスミドである；「LV 3」は Shanghai GenePh
 arma Co. のレンチウイルスプラスミドベクターのシリアルナンバーであり「h s a」はそ
 れがヒトに由来することを示す。細胞を、インキュベーター中、37、5% CO₂ で 4
 8 時間インキュベートし、次いで、上清を収集し、4、5000 rpm / 分で 30 分間
 遠心分離した。上清を収集し、0.45 μm のろ過膜でろ過し、1つのチューブ当たり 1
 mL に分配し、-80 で保管した。これらは、それぞれ mi R - 199 を有するレンチ
 ウイルス LV - mi R 199 及び骨格レンチウイルス LV - mi R NC である。

【0167】

2) mi R - 199 を高発現する腫瘍細胞の構築：HCT 116 細胞に LV - mi R 1
 99 レンチウイルス及び骨格レンチウイルス LV - mi R NC をそれぞれ感染させ（常套
 手段による）、陽性細胞の単一クローンを選択して、mi R - 199 の安定発現を有する
 HCT 116 - mi R 199 細胞株及び陰性対照である細胞株 HCT 116 - mi R NC
 を構築した。血球計算器の緑色蛍光チャネルを使用して GFP の発現を検出し（図 20 A
 ）、PCR 法を同定のために使用した（図 20 B）（実験条件に応じて調整できる）。Q
 PCR プライマー配列を表 4 に示す。フローサイトメトリーの結果から、HCT 116 -
 mi R 199 細胞株及び HCT 116 - mi R NC 細胞株の陽性トランスフェクション率
 がそれぞれ 99.91% 及び 99.64% であったことが示される。PCR の結果から、
 HCT 116 - mi R 199 細胞株が mi R - 199 (has-miR-199a-3p 及び has-miR-
 199b-3p を含む) を高度に発現することが確認された。

【0168】

3) HCT 116 - mi R 199 細胞株及び HCT 116 - mi R NC 細胞株を、10
 % FBS 培地中、96 ウェルプレートにウェル当たり細胞 5000 個で入れ、一晚インキ
 ュベートし、翌日に細胞密度が 80% に達するようにした。培地を廃棄した後、上記方法
 で調製した MiTDvv - hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスをそれぞれ 0.03
 MOI、0.3 MOI 及び 3 MOI で含有する無血清培地 100 μL を添加した。感染の
 4 時間後、培地を FBS を 5% 含有する培地と交換し、細胞を 37、5% CO₂ で 48
 時間インキュベートした。腫瘍細胞のアポトーシスを MTT アッセイによって検出した（
 n = 6、実験は 2 ~ 3 回繰り返した）。この試験の対照群は、陰性対照群（ウイルス感染
 なし）であり、各実験群及び対照群を 6 つの 2 連のウェルで準備し、細胞死滅率を実験群
 の陰性対照群に対する比（%）とした。結果から、MiTDvv - hIL21 腫瘍溶解性
 ワクシニアウイルスの死滅効果が mi R - 199 を高発現する腫瘍細胞では有意に低下す
 ることが示された（図 21）。

【0169】

実施例 10 MiTDvv - hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの結腸直腸がん
 に対する腫瘍抑制効果

対数成長期にあるヒト結腸直腸がん HCT 116 細胞を使用して、重症免疫不全マウス
 である NCG マウスの腫瘍モデルを樹立した。本実験では、重症免疫不全の NCG マウス
 （Jiangsu GemPharmatech Co., Ltd. から入手）（8 週齢、雌）を使用し、各マウスに
 、HCT 116 細胞 100 万個を後肢の後部に皮下接種した。腫瘍体積がおよそ 100 m
 m³ に達したら、上記方法で調製した MiTDvv - hIL21 腫瘍溶解性ワクシニアウ
 イルスを 5 × 10⁵ pfu / マウスで、投与体積を 50 μL として腫瘍内に注入した。各
 群をマウス 4 匹とし、マウスの腫瘍サイズ及び体重を 3 日ごとに測定した。本実験では、

10

20

30

40

50

PBSを投与する対照群を準備した。結果から、MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスが腫瘍成長を有効に阻害することが示された(図22A)。投与群の相対的な腫瘍成長速度(T/C、すなわち、ウイルス投与群の腫瘍体積の対照群の腫瘍体積に対する比の値、この値が<40%であることにより、効果的であることが示される)は投与後10日目以降、40%未満であった(図22B)。実験全体を通してマウスの体重に著しい減少は認められなかった(図22C)。

【0170】

実施例11 MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスのヒト骨肉腫に対する腫瘍抑制効果

対数成長期にあるヒト骨肉腫MNNG/HOSC1細胞を使用して、重症免疫不全のNCGマウスの腫瘍モデルを構築した。本実験では、重症免疫不全のNCGマウス(Jiangsu GemPharmatech Co., Ltd.から入手)(8週齢、雌)を使用し、各マウスに、MNNG/HOSC1細胞500,000個を後肢の後部に皮下接種した。腫瘍体積が約100mm³になったら、上記方法で調製したMiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを1×10⁶pfu/マウスで、投与体積を50μLとして腫瘍内に注入した。各群をマウス4匹とし、マウスの腫瘍サイズ及び体重を3日ごとに測定した。本実験では、PBSを投与する対照群を準備した。結果から、MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスが、マウスにおけるmiR-199を高発現するMNNG/HOSC1腫瘍の成長も有効に阻害することが示された(図23A)。相対的な腫瘍成長速度(T/C)は投与後8日目以降40%未満であった(図23B)。実験全体を通してマウスの

10

20

【0171】

実施例12 MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスのヒト肝がんに対する腫瘍抑制効果

対数成長期にあるヒトヘパトーマSK-HEP-1細胞を使用して、重症免疫不全のNCGマウスの腫瘍モデルを構築した。本実験では、重症免疫不全のNCGマウス(Jiangsu GemPharmatech Co., Ltd.から入手)(7週齢、雌)を使用し、各マウスに、SK-HEP-1細胞1000万個を後肢の後部に皮下接種した。腫瘍体積が約100mm³になったら、上記方法で調製したMiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを2×10⁵pfu/マウスで、投与体積を50μLとして腫瘍内に注入した。各群のマウスを3~4匹とし、マウスの腫瘍サイズ及び体重を3日ごとに測定した。本実験では、PBSを投与する対照群を準備した。結果から、MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスが腫瘍成長を有効に阻害することが示された(図24A)。実験全体を通してマウスの体重に著しい減少は認められなかった(図24B)。

30

【0172】

実施例13 MiTDvv-hIL21及びDDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスのmiR-199の発現レベルが異なる腫瘍細胞に対する死滅効果の評価

種々のヒト腫瘍細胞を96ウェルプレートにウェル当たり細胞4000~5000個で入れた。腫瘍細胞には、MNNG/HOSC1、Saos2、FaDu、SK-BR-3、HepG2、Hela、SKOV3、C33A、LOVO、U251、HCT116、SK-HEP-1、CFPAC-1及びPANC-1細胞を含めた。細胞を37、5%CO₂で一晩インキュベートし、細胞密度が70%に達するようにした。培地を、上記方法で調製したMiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルス又はDDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを0.3~10MOI(種々の腫瘍細胞のウイルスに対する感受性は異なるので、以前のin vitro実験において探究されたMOIを使用した: MNNG/HOSC1及びFaDuに対しては0.3MOI; LOVO、U251及びSK-HEP-1に対しては1MOI; Saos2、SK-BR-3、HepG2、Hela、SKOV3、C33A、CFPAC-1及びPANC-1に対しては3MOI; 並びにHCT116に対しては10MOI)で伴う無血清培地と交換した。感染の4時間後、培地をFBSを5%含有する培地と交換し、細胞を37、5%CO₂で48時間イ

40

50

ンキュベートした。腫瘍細胞のアポトーシスをMTTアッセイによって検出した ($n = 6$ 、実験は2~3回繰り返した)。この試験の陰性対照群はウイルスを感染させていないものであり、各実験群及び対照群を6つの2連のウェルで準備した。細胞死滅率(細胞成長阻害率)を実験群の陰性対照群に対する比(%)とした。結果から、miR-199を高発現する腫瘍細胞MNNG/HOSC1及びSaoS2では、MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスとDDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの間で細胞死滅効果に差異は認められなかったが、miR-199を中程度に発現する又は低発現する腫瘍細胞Fadu、SK-BR-3、HepG2、Hela、SKOV3、C33A、LOVO、U251、HCT116、SK-HEP-1、CFPAC-1、PANC-1などでは、MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスがより強力な死滅効果を示すことが示された(図25)。

10

【0173】

実施例14 miR-199の発現レベルが異なる腫瘍担持マウスに対するMiTDvv-hIL21及びDDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍抑制効果の評価

対数成長期にあるヒト結腸直腸がんHCT116細胞及び対数成長期にあるヒト骨肉腫MNNG/HOSC1細胞を使用して、重症免疫不全のNCGマウスの腫瘍モデルを樹立した。実施例10及び11に記載されている腫瘍モデルを構築するための方法に従って、miR-199を高発現するヒト骨肉腫MNNG/HOSC1細胞及びmiR-199を低発現するヒト結腸直腸がんHCT116細胞をNCGマウスの後肢の後部に皮下接種した。腫瘍体積が約100mm³に達したら、上記方法で調製したMiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ウイルス及びDDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスを腫瘍内に注入した。MNNG/HOSC1腫瘍担持マウスに対する投与量は 1×10^6 pfu/マウスであり、HCT116腫瘍担持マウスに対する投与量は 5×10^5 pfu/マウスであり、投与体積は50 μ Lであった。各群をマウス3匹とし、マウスの腫瘍サイズ及び体重を3日ごとに測定した。結果から、HCT116腫瘍モデル群とMNNG/HOSC1腫瘍モデル群の両方で比較的良好な腫瘍抑制効果が示されたことが示される。比較して、miR-199を低発現するHCT116腫瘍では、MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍抑制効果の方がDDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍抑制効果よりも強力であった(図26A)。しかし、miR-199を高発現するMNNG/HOSC1腫瘍では、MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍抑制効果はDDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの腫瘍抑制効果よりも弱かった(図26B)。

20

30

【0174】

実施例15 マウスにおけるMiTDvv-hIL21及びDDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの組織分布の評価

8週齢の正常C57BL/6N雌マウスに、上記方法で調製したMiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルス又はDDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスそれぞれを 1×10^9 pfu/kgで含有するPBS200 μ Lを静脈内投与した。各群をマウス5匹とした。マウスの1群(5匹マウス)をそれぞれ投与後1日目(D1)、3日目(D3)、7日目(D7)及び15日目(D15)に殺し、末梢血、心臓、肝臓、脾臓、肺、腎臓、卵巣及び子宮を回収して、ワクシニアウイルスの分布を、ウイルス遺伝子であるA46RのQPCR法で検出した。プライマー配列を表2に示す。結果から、卵巣、子宮、肝臓及び脾臓におけるMiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの複製がDDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスの複製よりも低度であり、肺におけるMiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスのウイルス量はDDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスのウイルス量と同様であったことが示される。末梢血では、MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスのウイルス量はDDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスよりも多かった(図27)。MiTDvv-hIL21腫瘍溶解性ワクシニアウイルスもDDvv-hIL21腫

40

50

瘍溶解性ワクシニアウイルスも心臓及び腎臓では検出されなかった（データは示していない）。

【図面】

【図 1】

【図 2】

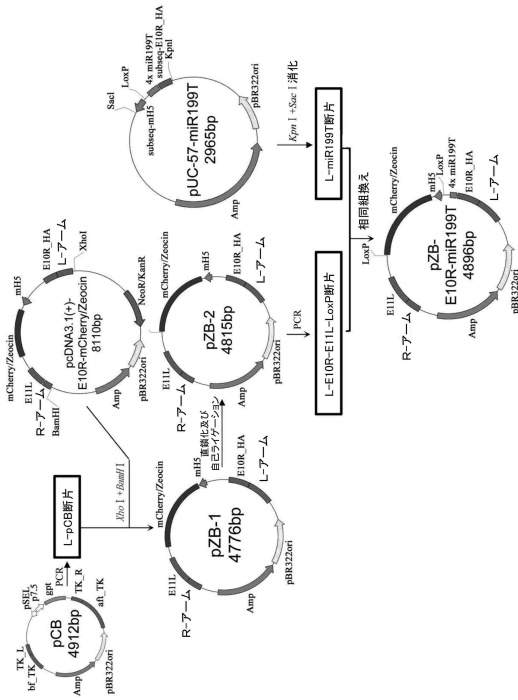


FIG. 1

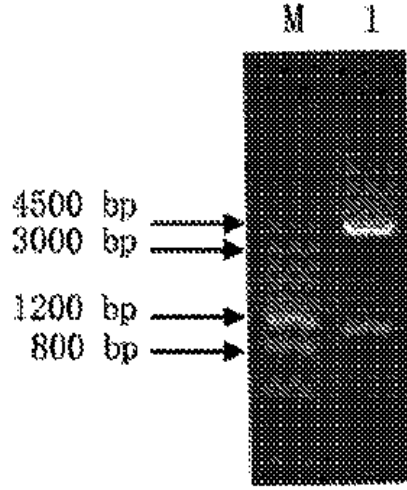


图 2

10

20

30

40

50

【 図 3 】

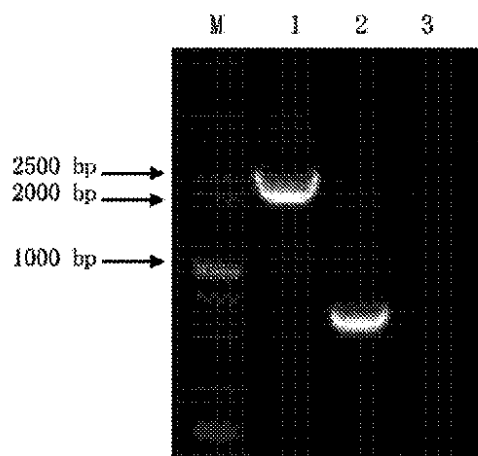


图 3

【 图 4 】

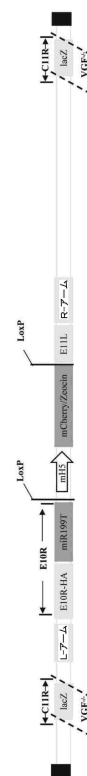


FIG. 4

【 图 5 】

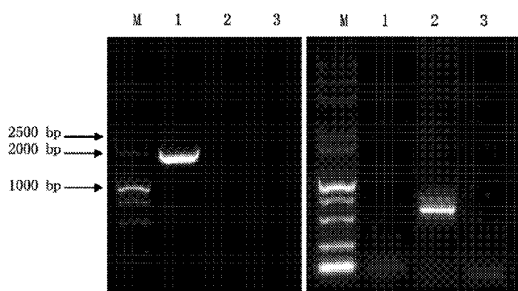


图 5

【 图 6 】

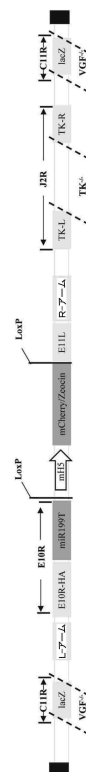


FIG. 6

10

20

30

40

50

【 図 1 0 】

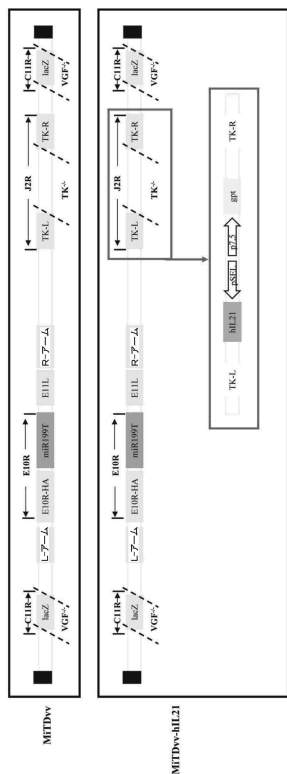


FIG. 10

【 図 1 1 】

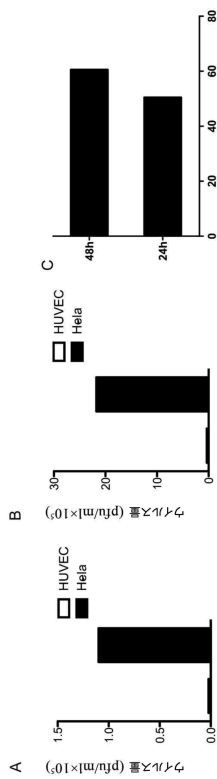


FIG. 11

【 図 1 2 】

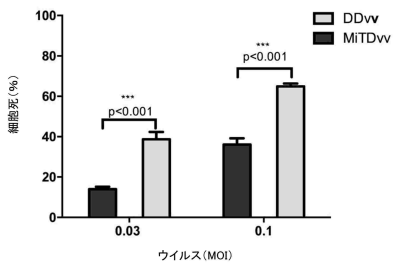


FIG. 12

【 図 1 3 】

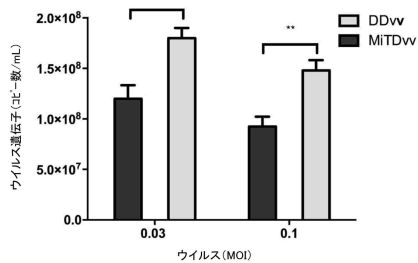


FIG. 13

10

20

30

40

50

【 図 1 4 】

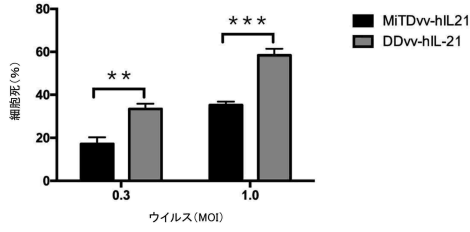


FIG. 14

【 図 1 5 】

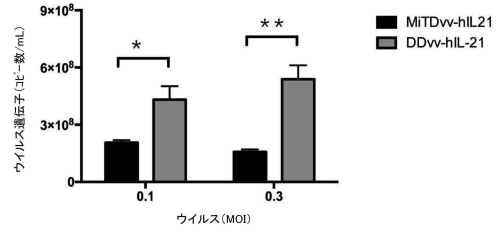


FIG. 15

10

20

【 図 1 6 】

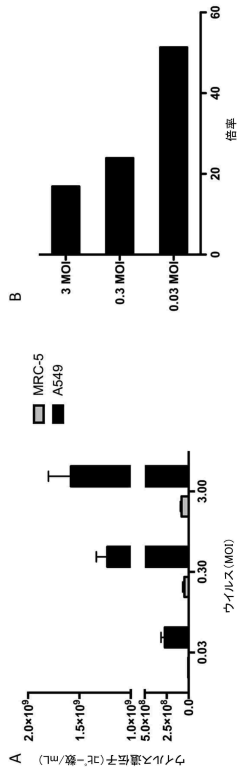


FIG. 16

【 図 1 7 】

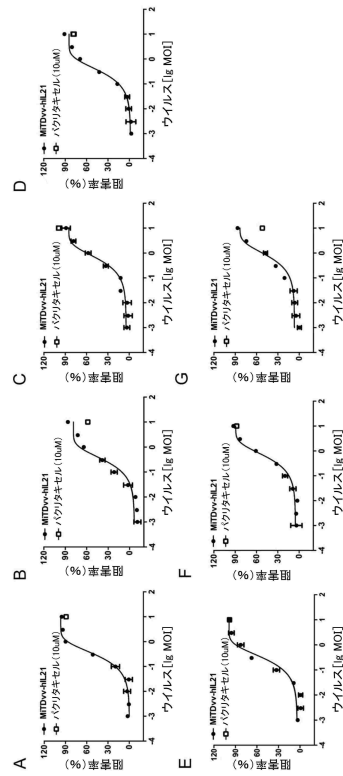


FIG. 17

30

40

50

【 図 18 】

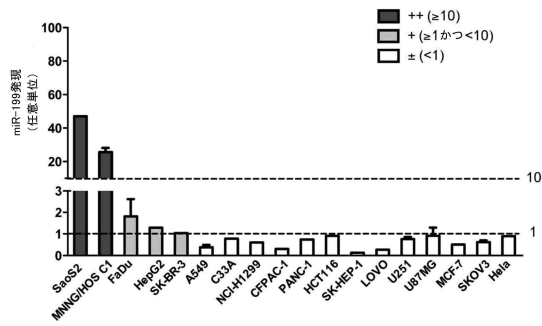


FIG. 18

【 図 19 】

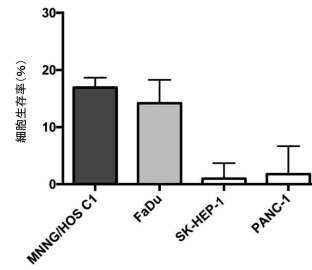


FIG. 19

【 図 20 】

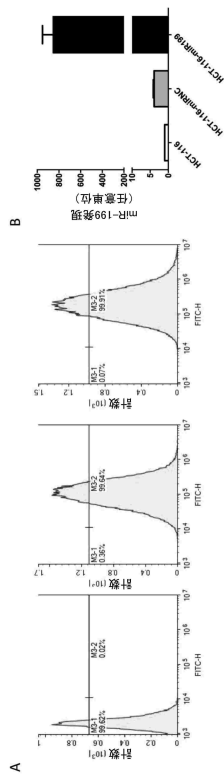


FIG. 20

【 図 21 】

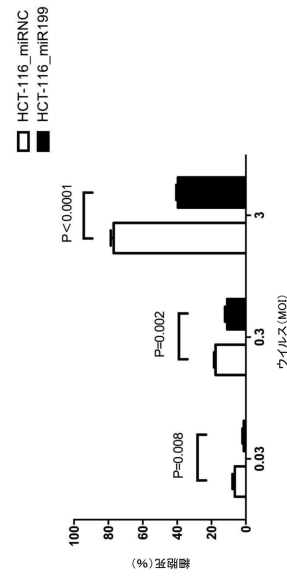


FIG. 21

10

20

30

40

50

【 2 2 】

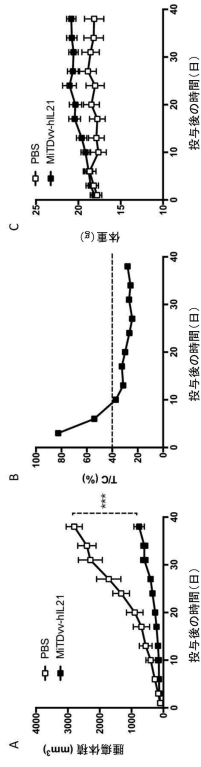


FIG. 22

【 2 3 】

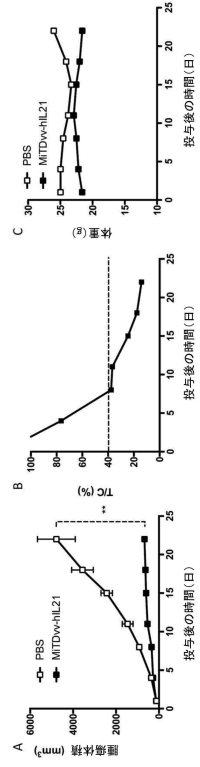


FIG. 23

【 2 4 】

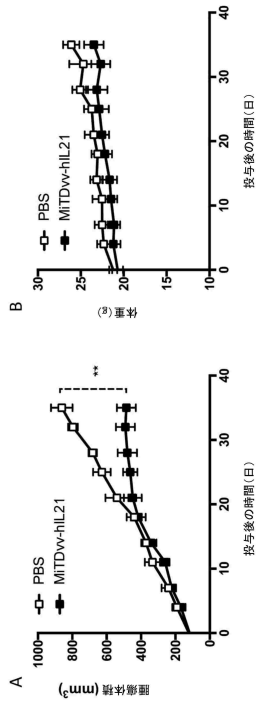


FIG. 24

【 2 5 】

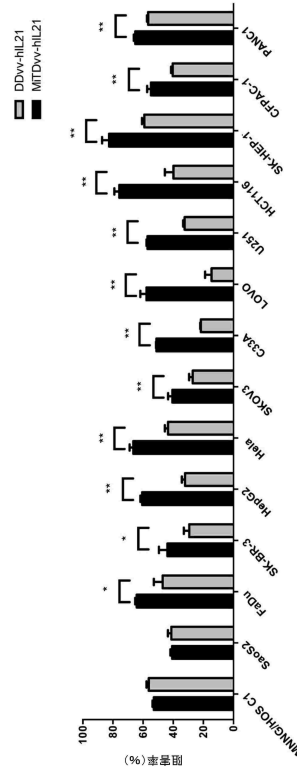


FIG. 25

10

20

30

40

50

【 26 】

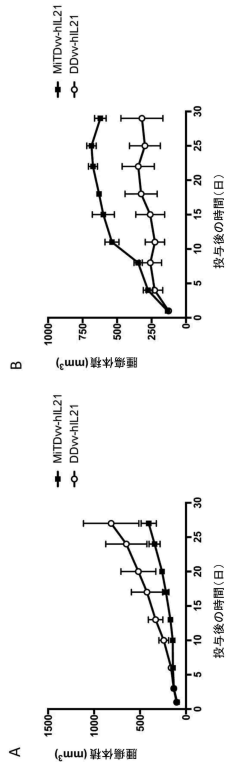


FIG. 26

【 27 】

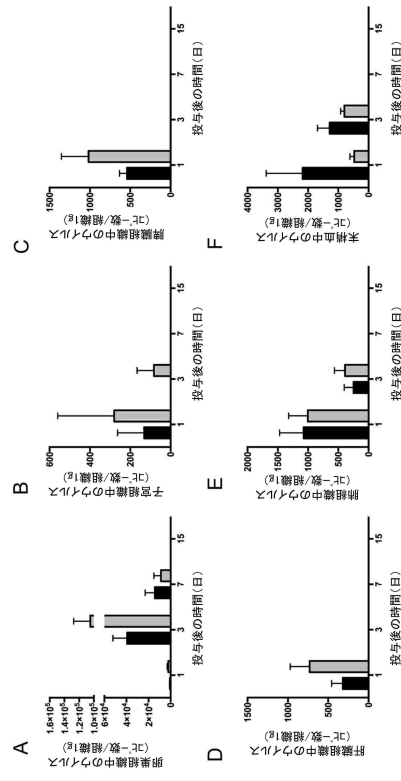


FIG. 27

【 配列表 】

0007699838000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	35/768 (2015.01)	A 6 1 K	35/768
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02

P . R . C h i n a

(74)代理人 110003708

弁理士法人鈴榮特許綜合事務所

(74)代理人 100108855

弁理士 蔵田 昌俊

(74)代理人 100179062

弁理士 井上 正

(74)代理人 100199565

弁理士 飯野 茂

(74)代理人 100212705

弁理士 矢頭 尚之

(74)代理人 100219542

弁理士 大宅 郁治

(74)代理人 100153051

弁理士 河野 直樹

(74)代理人 100162570

弁理士 金子 早苗

(72)発明者 フー、ジン

中華人民共和国、3 1 1 1 2 1 ジェジアン・プロビンス、ハンジョウ、ユハン・ディストリクト、ユハantan・ロード 2 9 5 9、ビルディング・ナンバー 4、セブンス・フロア

(72)発明者 ジャン、ロン

中華人民共和国、3 1 1 1 2 1 ジェジアン・プロビンス、ハンジョウ、ユハン・ディストリクト、ユハantan・ロード 2 9 5 9、ビルディング・ナンバー 4、セブンス・フロア

(72)発明者 ワン、ティンティン

中華人民共和国、3 1 1 1 2 1 ジェジアン・プロビンス、ハンジョウ、ユハン・ディストリクト、ユハantan・ロード 2 9 5 9、ビルディング・ナンバー 4、セブンス・フロア

(72)発明者 フー、ファン

中華人民共和国、3 1 1 1 2 1 ジェジアン・プロビンス、ハンジョウ、ユハン・ディストリクト、ユハantan・ロード 2 9 5 9、ビルディング・ナンバー 4、セブンス・フロア

(72)発明者 イエン、ファイ

中華人民共和国、3 1 1 1 2 1 ジェジアン・プロビンス、ハンジョウ、ユハン・ディストリクト、ユハantan・ロード 2 9 5 9、ビルディング・ナンバー 4、セブンス・フロア

審査官 松村 真里

(56)参考文献 特表2019-508063(JP,A)

中国特許出願公開第104178460(CN,A)

中国特許出願公開第109745343(CN,A)

特表2021-514190(JP,A)

特表2023-514594(JP,A)

Virology, 2000年, Vol.278, No.1, p.244-252

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N

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

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