(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2022-552287
(P2022-552287A)

(43)公表日　令和4年12月15日(2022.12.15)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	15/33 (2006.01)	Ｃ１２Ｎ	15/33	ＺＮＡ	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	7/01 (2006.01)	Ｃ１２Ｎ	7/01		４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ	15/86 (2006.01)	Ｃ１２Ｎ	15/86	Ｚ	４Ｃ０８６
Ｃ１２Ｎ	15/113 (2010.01)	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ	４Ｃ０８７
Ｃ１２Ｎ	5/09 (2010.01)	Ｃ１２Ｎ	5/09		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全135頁）　最終頁に続く

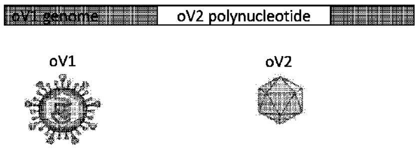
(21)出願番号　特願2022-521308(P2022-521308)
(86)(22)出願日　令和2年10月9日(2020.10.9)
(85)翻訳文提出日　令和4年5月11日(2022.5.11)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/055133
(87)国際公開番号　WO2021/072310
(87)国際公開日　令和3年4月15日(2021.4.15)
(31)優先権主張番号　62/913,514
(32)優先日　令和1年10月10日(2019.10.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　518267757
オンコラス，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３９，ケンブリッジ，ハンプシャー ストリート ５０，スイート ４０１
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田 貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川 大輔
(74)代理人　230113332
弁護士　山本 健策
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　二重ウイルスおよび二重腫瘍溶解性ウイルスならびに治療方法

(57)【要約】
本開示は、一次ウイルスおよび二次ウイルスを産生することができる二重ウイルス、ならびに一次腫瘍溶解性ウイルスおよび二次腫瘍溶解性ウイルスを産生することができる二重腫瘍溶解性ウイルスを提供する。本開示は、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む、組換え一次腫瘍溶解性ウイルスを提供する。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスおよび二次腫瘍溶解性ウイルスは、複製能力を有する。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスおよび／または二次腫瘍溶解性ウイルスは、複製能力を有しない。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドは、調節可能なプロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスは、二次腫瘍溶解性ウイルスに対する抗原特異的免疫を媒介しない抗原特異的免疫応答を発生させる。
【選択図】図１Ａ

Fig. 1A



【特許請求の範囲】
【請求項１】
二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む、組換え一次腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項２】
二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む、組換え一次ウイルス。
【請求項３】
前記一次腫瘍溶解性ウイルスおよび前記二次腫瘍溶解性ウイルスが、複製能力を有する、請求項１に記載のウイルス。
【請求項４】
前記一次ウイルスおよび前記二次ウイルスが、複製能力を有する、請求項２に記載のウイルス。
【請求項５】
前記一次腫瘍溶解性ウイルスおよび／または前記二次腫瘍溶解性ウイルスが、複製能力を有しない、請求項１に記載のウイルス。
【請求項６】
前記一次ウイルスおよび／または前記二次ウイルスが、複製能力を有しない、請求項２に記載のウイルス。
【請求項７】
前記二次腫瘍溶解性ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドが、調節可能なプロモーターに作動可能に連結されている、請求項１、３、および５のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項８】
前記二次ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドが、調節可能なプロモーターに作動可能に連結されている、請求項２、４、および６のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項９】
前記一次腫瘍溶解性ウイルスが、前記二次腫瘍溶解性ウイルスに対する抗原特異的免疫を媒介しない抗原特異的免疫応答を発生させる、請求項１、３、５、および７のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項１０】
前記一次ウイルスが、前記二次ウイルスに対する抗原特異的免疫を媒介しない抗原特異的免疫応答を発生させる、請求項２、４、６、および８のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項１１】
前記一次腫瘍溶解性ウイルスが、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）ウイルスである、請求項１、３、５、７、および９のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項１２】
前記一次ウイルスが、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）ウイルスである、請求項２、４、６、８、および１０のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項１３】
前記ｄｓＤＮＡウイルスが、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）またはアデノウイルスである、請求項１１または１２に記載のウイルス。
【請求項１４】
前記ｄｓＤＮＡウイルスが、Ｐｏｘｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスである、請求項１１または１２に記載のウイルス。
【請求項１５】
前記ｄｓＤＮＡウイルスが、伝染性軟属腫ウイルス、粘液腫ウイルス、ワクシーナ（ｖａｃｃｉｎａ）ウイルス、サル痘ウイルス、またはヤタポックスウイルスである、請求項１４に記載のウイルス。
【請求項１６】

前記一次腫瘍溶解性ウイルスが、ＲＮＡウイルスである、請求項１、３、５、７、および９のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項１７】

前記一次ウイルスが、ＲＮＡウイルスである、請求項２、４、６、８、および１０のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項１８】

前記ＲＮＡウイルスが、パラミクソウイルスまたはラブドウイルスである、請求項１６または１７に記載のウイルス。

【請求項１９】

前記二次腫瘍溶解性ウイルスが、ポジティブセンス一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）ウイルス、ネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルス、またはアンビセンス（ａｍｂｉ－ｓｅｎｓｅ）ｓｓＲＮＡウイルスである、請求項１、３、５、７、９、１１、１３～１６、および１８のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項２０】

前記二次ウイルスが、ポジティブセンス一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）ウイルス、ネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルス、またはアンビセンスｓｓＲＮＡウイルスである、請求項２、４、６、８、１０、１２～１５、および１７～１８のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項２１】

前記二次腫瘍溶解性ウイルスまたは前記二次ウイルスが、Ｒｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅファミリー、Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリー、またはＯｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルスである、請求項１９または２０に記載のウイルス。

【請求項２２】

前記Ｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスが、水胞性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）またはマラバウイルスである、請求項２１に記載のウイルス。

【請求項２３】

前記Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスが、ニューカッスル病ウイルス、センダイウイルス、または麻疹ウイルスである、請求項２１に記載のウイルス。

【請求項２４】

前記Ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスが、インフルエンザウイルスである、請求項２１に記載のウイルス。

【請求項２５】

前記二次腫瘍溶解性ウイルスまたは前記二次ウイルスが、前記ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスであり、前記ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスが、エンテロウイルスである、請求項１９または２０に記載のウイルス。

【請求項２６】

前記エンテロウイルスが、ポリオウイルス、セネカバレーウイルス（ＳＶＶ）、コクサッキーウイルス、またはエコーウイルスである、請求項２５に記載のウイルス。

【請求項２７】

前記コクサキウイルスが、コクサッキーウイルスＡ（ＣＶＡ）またはコクサッキーウイルスＢ（ＣＶＢ）である、請求項２６に記載のウイルス、

【請求項２８】

前記コクサキウイルスが、ＣＶＡ９、ＣＶＡ２１、またはＣＶＢ３である、請求項２７に記載のウイルス。

【請求項２９】

前記二次腫瘍溶解性ウイルスまたは前記二次ウイルスが、前記ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスであり、前記ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスが、脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）である、請求項１９または２０に記載のウイルス。

【請求項３０】

前記二次腫瘍溶解性ウイルスまたは前記二次ウイルスが、前記ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスであり、前記ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスが、メンゴウイルスである、請求項１９または２０に記載のウイルス。
【請求項３１】
前記二次腫瘍溶解性ウイルスまたは前記二次ウイルスが、前記ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスであり、前記ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスが、Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスである、請求項１９または２０に記載のウイルス。
【請求項３２】
前記Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスが、新世界アルファウイルスまたは旧世界アルファウイルスである、請求項３１に記載のウイルス。
【請求項３３】
前記新世界アルファウイルスまたは旧世界アルファウイルスが、ＶＥＥＶ、ＷＥＥＶ、ＥＥＶ、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、ロスリバーウイルス、またはマヤロウイルスである、請求項３２に記載のウイルス。
【請求項３４】
前記一次腫瘍溶解性ウイルスおよび／または前記二次腫瘍溶解性ウイルスが、キメラウイルスである、請求項１、３、５、７、９、１１、１３～１６、１８～１９、および２１～３３のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項３５】
前記一次ウイルスおよび／または前記二次ウイルスが、キメラウイルスである、請求項２、４、６、８、１０、１２～１５、１７～１８、および２０～３３のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項３６】
前記一次腫瘍溶解性ウイルスおよび／または前記二次腫瘍溶解性ウイルスが、シュードタイプウイルスである、請求項１、３、５、７、９、１１、１３～１６、１８～１９、および２１～３４のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項３７】
前記一次ウイルスおよび／または前記二次ウイルスが、シュードタイプウイルスである、請求項２、４、６、８、１０、１２～１５、１７～１８、２０～３３、および３５のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項３８】
前記二次腫瘍溶解性ウイルスが、シュードタイプウイルスであり、前記一次腫瘍溶解性ウイルスが、前記二次腫瘍溶解性ウイルスのコード領域の外側にある前記二次腫瘍溶解性ウイルスのキャプシドタンパク質またはエンベロープタンパク質のコード領域を含む、請求項３６に記載のウイルス。
【請求項３９】
前記二次腫瘍溶解性ウイルスが、アルファウイルス、パラミクソウイルス、またはラブドウイルスである、請求項３８に記載のウイルス。
【請求項４０】
前記二次ウイルスが、シュードタイプウイルスであり、前記一次ウイルスが、前記二次ウイルスのコード領域の外側にある前記二次ウイルスのキャプシドタンパク質またはエンベロープタンパク質のコード領域を含む、請求項３７に記載のウイルス。
【請求項４１】
前記二次ウイルスが、アルファウイルス、パラミクソウイルス、またはラブドウイルスである、請求項４０に記載のウイルス。
【請求項４２】
前記調節可能なプロモーターが、ステロイド誘導性プロモーター、メタロチオニンプロモーター、ＭＸ－１プロモーター、ＧＥＮＥＳＷＩＴＣＨ（商標）ハイブリッドプロモーター、クメート応答性プロモーター、およびテトラサイクリン誘導性プロモーターから選択される、請求項７～４１のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項４３】
前記調節可能なプロモーターが、リコンビナーゼ認識部位に隣接した構成的プロモーターを含む、請求項７～４１のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項４４】
前記調節可能なプロモーターに結合することができるペプチドをコードする第２のポリヌクレオチドをさらに含む、請求項１～４３のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項４５】
前記第２のポリヌクレオチドが、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターに作動可能に連結されている、請求項４４に記載のウイルス。
【請求項４６】
前記構成的プロモーターが、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）プロモーター、モロニーマウス白血病ウイルス（ＭｏＭＬＶ）ＬＴＲプロモーター、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）ＬＴＲプロモーター、伸長因子１α（ＥＦ１ａ）プロモーター、初期増殖応答１（ＥＧＲ１）プロモーター、フェリチンＨ（ＦｅｒＨ）プロモーター、フェリチンＬ（ＦｅｒＬ）プロモーター、グリセルアルデヒド３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）プロモーター、真核生物翻訳開始因子４Ａ１（ＥＩＦ４Ａ１）プロモーター、ユビキチンＣプロモーター（ＵＢＣ）プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ－１（ＰＧＫ）プロモーター、およびサイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリβ－アクチン（ＣＡＧ）プロモーターから選択される、請求項４５に記載のウイルス。
【請求項４７】
前記調節可能なプロモーターが、テトラサイクリン（Ｔｅｔ）依存性プロモーターであり、前記ペプチドが、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｒｔＴＡ）ペプチドである、請求項４４～４６のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項４８】
前記調節可能なプロモーターが、テトラサイクリン（Ｔｅｔ）依存性プロモーターであり、前記ペプチドが、テトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｔＴＡ）ペプチドである、請求項４４～４６のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項４９】
前記一次腫瘍溶解性ウイルスまたは前記一次ウイルスが、１つ以上のＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）分子をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項１～４８のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項５０】
前記１つ以上のＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）分子をコードするポリヌクレオチドが、第２の調節可能なプロモーターに作動可能に連結されている、請求項４９に記載のウイルス。
【請求項５１】
前記１つ以上のＲＮＡｉ分子が、前記二次腫瘍溶解性ウイルスまたは前記二次ウイルスのゲノムの標的配列に結合し、かつ前記二次腫瘍溶解性ウイルスまたは前記二次ウイルスの複製を阻害する、請求項４９または５０に記載のウイルス。
【請求項５２】
前記ＲＮＡｉ分子が、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、またはＡｍｉＲＮＡである、請求項４９～５１のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項５３】
前記二次腫瘍溶解性ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドが、１つ以上のリコンビナーゼ認識部位を含む、請求項１、３、５、７、９、１１、１３～１６、１８～１９、２１～３４、３６、３８～３９、および４２～５２のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項５４】
前記二次ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドが、１つ以上のリコンビナーゼ認識部位を含む、請求項２、４、６、８、１０、１２～１５、１７～１８、２０～３３、３５、３７、および４０～５２のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項５５】
前記二次腫瘍溶解性ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドが、１つ以上のリコンビナーゼ応答性カセットを含み、前記リコンビナーゼ応答性カセットが、前記１つ以上のリコンビナーゼ認識部位を含む、請求項１、３、５、７、９、１１、１３～１６、１８～１９、２１～３４、３６、３８～３９、および４２～５３のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項５６】
前記二次ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドが、１つ以上のリコンビナーゼ応答性カセットを含み、前記リコンビナーゼ応答性カセットが、前記１つ以上のリコンビナーゼ認識部位を含む、請求項２、４、６、８、１０、１２～１５、１７～１８、２０～３３、３５、３７、４０～５２、および５４のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項５７】
前記１つ以上のリコンビナーゼ応答性カセットが、リコンビナーゼ応答性切除カセット（ＲＲＥＣ）を含む、請求項５５または５６に記載のウイルス。
【請求項５８】
前記ＲＲＥＣが、転写／翻訳終結（ＳＴＯＰ）要素を含む、請求項５７に記載のウイルス。
【請求項５９】
前記転写／翻訳終結（ＳＴＯＰ）要素が、配列番号８５４～８５６のうちのいずれか１つに対して８０％の同一性を有する配列を含む、請求項５８に記載のウイルス。
【請求項６０】
前記１つ以上のリコンビナーゼ応答性カセットが、リコンビナーゼ応答性逆位カセット（ＲＲＩＣ）を含む、請求項５５～５９のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項６１】
前記ＲＲＩＣが、中心要素の両側に２つ以上の直交リコンビナーゼ認識部位を含む、請求項６０に記載のウイルス。
【請求項６２】
前記ＲＲＩＣが、プロモーターまたは前記プロモーターの一部を含む、請求項６０または６１に記載のウイルス。
【請求項６３】
前記ＲＲＩＣが、コード領域または前記コード領域の一部を含み、前記コード領域が、前記二次腫瘍溶解性ウイルスまたは前記二次ウイルスのウイルスゲノムをコードする、請求項６０または６１に記載のウイルス。
【請求項６４】
前記ＲＲＩＣが、１つ以上の制御要素を含む、請求項６０～６３のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項６５】
前記制御要素が、転写／翻訳終結（ＳＴＯＰ）要素である、請求項６４に記載のウイルス。
【請求項６６】
前記制御要素が、配列番号８５４～８５６のうちのいずれか１つに対して８０％の同一性を有する配列を有する、請求項６５に記載のウイルス。
【請求項６７】
前記リコンビナーゼ応答性逆位カセット（ＲＲＩＣ）が、イントロンの一部をさらに含む、請求項６０～６６のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項６８】
前記二次腫瘍溶解性ウイルスまたは前記二次ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドが、ｍＲＮＡスプライシングを介して前記イントロンを除去した後、前記リコンビナーゼ認識部位を有しない前記二次腫瘍溶解性ウイルスまたは前記二次ウイルスの成熟ウイルスゲノム転写物をもたらす、請求項６７に記載のウイルス。

【請求項６９】
前記一次腫瘍溶解性ウイルスまたは前記一次ウイルスが、前記リコンビナーゼをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項１～６８のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項７０】
前記リコンビナーゼが、フリッパーゼ（Ｆｌｐ）またはＣｒｅリコンビナーゼ（Ｃｒｅ）である、請求項６９に記載のウイルス。
【請求項７１】
前記リコンビナーゼの前記コード領域が、イントロンを含む、請求項６９または７０に記載のウイルス。
【請求項７２】
前記リコンビナーゼリコンビナーゼの発現カセットが、１つ以上のｍＲＮＡ不安定化要素を含む、請求項６９～７１のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項７３】
前記リコンビナーゼが、追加のポリペプチドを含む融合タンパク質の一部であり、前記追加のポリペプチドが、前記リコンビナーゼの活性および／または細胞局在を調節する、請求項６９～７２のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項７４】
前記リコンビナーゼの活性および／または細胞局在が、リガンドおよび／または小分子の存在によって調節される、請求項７３に記載のウイルス。
【請求項７５】
前記追加のポリペプチドが、エストロゲン受容体タンパク質のリガンド結合ドメインを含む、請求項７３または７４に記載のウイルス。
【請求項７６】
前記１つ以上のリコンビナーゼ認識部位が、フリッパーゼ認識標的（ＦＲＴ）部位である、請求項５３～７５のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項７７】
前記一次腫瘍溶解性ウイルスが、調節ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記調節ポリペプチドが、１つ以上のプロモーターの活性を調節する、請求項１、３、５、７、９、１１、１３～１６、１８～１９、２１～３４、３６、３８～３９、４２～５３、５５、および５７～７６のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項７８】
前記一次ウイルスが、調節ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記調節ポリペプチドが、１つ以上のプロモーターの活性を調節する、請求項２、４、６、８、１０、１２～１５、１７～１８、２０～３３、３５、３７、４０～５２、５４、および５６～７６のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項７９】
二次腫瘍溶解性ウイルスをコードする第１のポリヌクレオチドと、
１つ以上のＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）分子をコードする第２のポリヌクレオチドと、を含む、組換え一次腫瘍溶解性ウイルス。
【請求項８０】
二次ウイルスをコードする第１のポリヌクレオチドと、
１つ以上のＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）分子をコードする第２のポリヌクレオチドと、を含む、組換え一次ウイルス。
【請求項８１】
前記一次腫瘍溶解性ウイルスおよび前記二次腫瘍溶解性ウイルスが、複製能力を有する、請求項７９に記載のウイルス。
【請求項８２】
前記一次ウイルスおよび前記二次ウイルスが、複製能力を有する、請求項８０に記載のウイルス。
【請求項８３】

前記第１のポリヌクレオチドが、第１の調節可能なプロモーターに作動可能に連結され、前記第２のポリヌクレオチドが、第２の調節可能なプロモーターに作動可能に連結されている、請求項７９～８２のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項８４】

前記一次腫瘍溶解性ウイルスが、前記二次腫瘍溶解性ウイルスに対する抗原特異的免疫を媒介しない抗原特異的免疫応答を発生させる、請求項７９、８１、および８３のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項８５】

前記一次ウイルスが、前記二次ウイルスに対する抗原特異的免疫を媒介しない抗原特異的免疫応答を発生させる、請求項８０、８２、および８３のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項８６】

前記一次腫瘍溶解性ウイルスが、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）ウイルスである、請求項７９、８１、８３、および８４のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項８７】

前記一次ウイルスが、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）ウイルスである、請求項８０、８２、８３、および８５のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項８８】

前記ｄｓＤＮＡウイルスが、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、アデノウイルス、またはＰｏｘｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスであり、任意選択的に前記Ｐｏｘｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスのウイルスが、伝染性軟体属腫ウイルス、粘液腫ウイルス、ワクシーナウイルス、サル痘ウイルス、またはヤタポックスウイルスである、請求項８６または８７に記載のウイルス。

【請求項８９】

前記一次腫瘍溶解性ウイルスが、ＲＮＡウイルスである、請求項７９、８１、８３、および８４のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項９０】

前記一次ウイルスが、ＲＮＡウイルスである、請求項８０、８２、８３、および８５のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項９１】

前記ＲＮＡウイルスが、パラミクソウイルスまたはラブドウイルスである、請求項８９または９０に記載のウイルス。

【請求項９２】

前記二次腫瘍溶解性ウイルスが、ポジティブセンス一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）ウイルス、ネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルス、またはアンビセンスｓｓＲＮＡウイルスである、請求項７９、８１、８３、８４、８６、８８、８９、および９１のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項９３】

前記二次ウイルスが、ポジティブセンス一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）ウイルス、ネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルス、またはアンビセンスｓｓＲＮＡウイルスである、請求項８０、８２、８３、８５、８７、８８、および９０～９１のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項９４】

前記二次腫瘍溶解性ウイルスまたは前記二次ウイルスが、前記ネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルスであり、前記ネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルスが、Ｒｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅファミリー、Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリー、またはＯｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスであり、任意選択的に、

前記Ｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスが、水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）もしくはマラバウイルスであり、

前記Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスが、ニューカッスル病ウイ

ルス、センダイウイルス、もしくは麻疹ウイルスであり、または
前記Ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスが、インフルエンザウイルスである、請求項９２または９３に記載のウイルス。
【請求項９５】
前記二次腫瘍溶解性ウイルスまたは前記二次ウイルスが、前記ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスであり、前記ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスが、エンテロウイルスであり、任意選択的に、前記エンテロウイルスが、ポリオウイルス、セネカバレーウイルス（ＳＶＶ）、コクサッキーウイルス、またはエコーウイルスであり、任意選択的に、前記コクサキウイルスが、コクサッキーウイルスＡ（ＣＶＡ）またはコクサッキーウイルスＢ（ＣＶＢ）であり、任意選択的に、前記コクサキウイルスが、ＣＶＡ９、ＣＶＡ２１、またはＣＶＢ３である、請求項９２または９３に記載のウイルス。
【請求項９６】
前記二次腫瘍溶解性ウイルスまたは前記二次ウイルスが、前記ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスであり、前記ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスが、脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）またはメンゴウイルスである、請求項９２または９３に記載のウイルス。
【請求項９７】
前記二次腫瘍溶解性ウイルスまたは前記二次ウイルスが、前記ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスであり、前記ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスが、Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスであり、任意選択的に、前記Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスが、新世界アルファウイルスまたは旧世界アルファウイルスであり、任意選択的に、前記新世界アルファウイルスまたは旧世界アルファウイルスが、ＶＥＥＶ、ＷＥＥＶ、ＥＥＶ、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、ロスリバーウイルス、またはマヤロウイルスである、請求項９２または９３に記載のウイルス。
【請求項９８】
前記一次腫瘍溶解性ウイルスおよび／または前記二次腫瘍溶解性ウイルスが、キメラウイルスである、請求項７９、８１、８３、８４、８６、８８、８９、９１～９２、および９４～９７のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項９９】
前記一次ウイルスおよび／または前記二次ウイルスが、キメラウイルスである、請求項８０、８２、８３、８５、８７、８８、９０～９１、および９３～９７のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項１００】
前記一次腫瘍溶解性ウイルスおよび／または前記二次腫瘍溶解性ウイルスが、シュードタイプウイルスである、請求項７９、８１、８３、８４、８６、８８、８９、９１～９２、および９４～９８のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項１０１】
前記一次ウイルスおよび／または前記二次ウイルスが、シュードタイプウイルスである、請求項８０、８２、８３、８５、８７、８８、９０～９１、９３～９７、および９９のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項１０２】
前記第１および第２の調節可能なプロモーターが、ステロイド誘導性プロモーター、メタロチオニンプロモーター、ＭＸ－１プロモーター、ＧＥＮＥＳＷＩＴＣＨ（商標）ハイブリッドプロモーター、クメート応答性プロモーター、およびテトラサイクリン依存性プロモーターから選択される、請求項７９～１０１のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項１０３】
前記第１の調節可能なプロモーターに結合することができる第１のペプチドおよび前記第２の調節可能なプロモーターに結合することができる第２のペプチドをコードする第３のポリヌクレオチドをさらに含む、請求項７９～１０２のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項１０４】

前記第３のポリヌクレオチドが、構成的プロモーターに作動可能に連結されている、請求項１０３に記載のウイルス。
【請求項１０５】
前記構成的プロモーターが、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）プロモーター、モロニーマウス白血病ウイルス（ＭｏＭＬＶ）ＬＴＲプロモーター、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）ＬＴＲプロモーター、伸長因子１α（ＥＦ１ａ）プロモーター、初期増殖応答１（ＥＧＲ１）プロモーター、フェリチンＨ（ＦｅｒＨ）プロモーター、フェリチンＬ（ＦｅｒＬ）プロモーター、グリセルアルデヒド３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）プロモーター、真核生物翻訳開始因子４Ａ１（ＥＩＦ４Ａ１）プロモーター、ユビキチンＣプロモーター（ＵＢＣ）プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ－１（ＰＧＫ）プロモーター、およびサイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリβ－アクチン（ＣＡＧ）プロモーターから選択される、請求項１０４に記載のウイルス。
【請求項１０６】
前記第１の調節可能なプロモーターが、テトラサイクリン（Ｔｅｔ）誘導性プロモーターであり、前記第１のペプチドが、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｒｔＴＡ）ペプチドである、請求項１０３～１０５のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項１０７】
前記第２の調節可能なプロモーターが、テトラサイクリン（Ｔｅｔ）抑制性プロモーターであり、前記第２のペプチドが、テトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｔＴＡ）ペプチドである、請求項１０３～１０６のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項１０８】
前記第１の調節可能なプロモーターが、テトラサイクリン（Ｔｅｔ）抑制性プロモーターであり、前記第１のペプチドが、テトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｔＴＡ）ペプチドである、請求項１０３～１０６のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項１０９】
前記第２の調節可能なプロモーターが、テトラサイクリン（Ｔｅｔ）誘導性プロモーターであり、前記第２のペプチドが、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｒｔＴＡ）ペプチドである、請求項１０３～１０８のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項１１０】
前記１つ以上のＲＮＡｉ分子が、前記二次腫瘍溶解性ウイルスのゲノム中の標的配列に結合し、かつ前記二次腫瘍溶解性ウイルスの複製を阻害する、請求項７９、８１、８３、８４、８６、８８、８９、９１～９２、９４～９８、１００、および１０２～１０９のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項１１１】
前記１つ以上のＲＮＡｉ分子が、前記二次ウイルスのゲノム中の標的配列に結合し、かつ前記二次ウイルスの複製を阻害する、請求項８０、８２、８３、８５、８７、８８、９０～９１、９３～９７、９９、および１０１～１０９のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項１１２】
前記ＲＮＡｉ分子が、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、またはＡｍｉＲＮＡである、請求項１１０または１１１に記載のウイルス。
【請求項１１３】
前記二次腫瘍溶解性ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドが、第１の３’リボザイムコード配列および第２の５’リボザイム配列を含む、請求項１、３、５、７、９、１１、１３～１６、１８～１９、２１～３４、３６、３８～３９、４２～５３、５５、５７～７７、７９、８１、８３、８４、８６、８８、８９、９１～９２、９４～９８、１００、１０２～１０９、１１０、および１１２のいずれか一項に記載のウイルス。
【請求項１１４】
前記二次ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドが、第１の３’リボザイムコード配列および第２の５’リボザイムコード配列を含む、請求項２、４、６、８、１０、１２

～１５、１７～１８、２０～３３、３５、３７、４０～５２、５４、５６～７６、７８、８０、８２、８３、８５、８７、８８、９０～９１、９３～９７、９９、１０１～１０９、および１１１～１１２のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項１１５】

前記第１および第２のリボザイムコード配列が、ハンマーヘッド型リボザイムまたは肝炎デルタウイルスリボザイムをコードする、請求項１１３または１１４に記載のウイルス。

【請求項１１６】

前記一次腫瘍溶解性ウイルスのゲノムが、複製に必要な１つ以上のウイルス遺伝子に挿入された、またはウイルスゲノムの３’もしくは５’ＵＴＲに挿入された１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含むｍｉＲＮＡ標的配列（ｍｉＲ－ＴＳ）カセットを含む、請求項１、３、５、７、９、１１、１３～１６、１８～１９、２１～３４、３６、３８～３９、４２～５３、５５、５７～７７、７９、８１、８３、８４、８６、８８、８９、９１～９２、９４～９８、１００、１０２～１０９、１１０、１１２～１１３、および１１５のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項１１７】

前記一次ウイルスのゲノムが、複製に必要な１つ以上のウイルス遺伝子に挿入された、またはウイルスゲノムの３’もしくは５’ＵＴＲに挿入された１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含むｍｉＲＮＡ標的配列（ｍｉＲ－ＴＳ）カセットを含む、請求項２、４、６、８、１０、１２～１５、１７～１８、２０～３３、３５、３７、４０～５２、５４、５６～７６、７８、８０、８２、８３、８５、８７、８８、９０～９１、９３～９７、９９、１０１～１０９、１１１～１１２、１１４、および１１５のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項１１８】

前記二次腫瘍溶解性ウイルスのゲノムが、複製に必要な１つ以上のウイルス遺伝子に挿入された、またはウイルスゲノムの３’もしくは５’ＵＴＲに挿入された１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含むｍｉＲＮＡ標的配列（ｍｉＲ－ＴＳ）カセットを含む、請求項１、３、５、７、９、１１、１３～１６、１８～１９、２１～３４、３６、３８～３９、４２～５３、５５、５７～７７、７９、８１、８３、８４、８６、８８、８９、９１～９２、９４～９８、１００、１０２～１０９、１１０、１１２～１１３、および１１５～１１６のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項１１９】

前記二次ウイルスのゲノムが、複製に必要な１つ以上のウイルス遺伝子に挿入された、またはウイルスゲノムの３’もしくは５’ＵＴＲに挿入された１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含むｍｉＲＮＡ標的配列（ｍｉＲ－ＴＳ）カセットを含む、請求項２、４、６、８、１０、１２～１５、１７～１８、２０～３３、３５、３７、４０～５２、５４、５６～７６、７８、８０、８２、８３、８５、８７、８８、９０～９１、９３～９７、９９、１０１～１０９、１１１～１１２、１１４～１１５、および１１７のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項１２０】

前記一次腫瘍溶解性ウイルスおよび前記二次腫瘍溶解性ウイルスが、複製に必要な１つ以上のウイルス遺伝子に挿入された、またはウイルスゲノムの３’もしくは５’ＵＴＲに挿入された１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含むｍｉＲＮＡ標的配列（ｍｉＲ－ＴＳ）カセットをそれぞれ含む、請求項１、３、５、７、９、１１、１３～１６、１８～１９、２１～３４、３６、３８～３９、４２～５３、５５、５７～７７、７９、８１、８３、８４、８６、８８、８９、９１～９２、９４～９８、１００、１０２～１０９、１１０、１１２～１１３、１１５～１１６、および１１８のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項１２１】

前記一次ウイルスおよび前記二次ウイルスが、複製に必要な１つ以上のウイルス遺伝子に挿入された、またはウイルスゲノムの３’もしくは５’ＵＴＲに挿入された１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含むｍｉＲＮＡ標的配列（ｍｉＲ－ＴＳ）カセットをそれぞれ含む、

請求項２、４、６、８、１０、１２～１５、１７～１８、２０～３３、３５、３７、４０～５２、５４、５６～７６、７８、８０、８２、８３、８５、８７、８８、９０～９１、９３～９７、９９、１０１～１０９、１１１～１１２、１１４～１１５、１１７、および１１９のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項１２２】

細胞内の前記１つ以上のｍｉＲＮＡの発現が、前記一次および／または二次腫瘍溶解性ウイルスの複製を阻害する、請求項１１６、１１８、および１２０のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項１２３】

細胞内の前記１つ以上のｍｉＲＮＡの発現が、前記一次および／または二次ウイルスの複製を阻害する、請求項１１７、１１９、および１２１のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項１２４】

少なくとも１つの外因性ペイロードタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列をさらに含む、請求項１～１２３のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項１２５】

前記外因性ペイロードタンパク質が、蛍光タンパク質、酵素、サイトカイン、ケモカイン、または抗原結合分子である、請求項１２４に記載のウイルス。

【請求項１２６】

前記二次腫瘍溶解性ウイルスの発現が、外因性薬剤によって調節される、請求項１、３、５、７、９、１１、１３～１６、１８～１９、２１～３４、３６、３８～３９、４２～５３、５５、５７～７７、７９、８１、８３、８４、８６、８８、８９、９１～９２、９４～９８、１００、１０２～１０９、１１０、１１２～１１３、１１５～１１６、１１８、１２０、１２２、および１２４～１２５のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項１２７】

前記二次ウイルスの発現が、外因性薬剤によって調節される、請求項２、４、６、８、１０、１２～１５、１７～１８、２０～３３、３５、３７、４０～５２、５４、５６～７６、７８、８０、８２、８３、８５、８７、８８、９０～９１、９３～９７、９９、１０１～１０９、１１１～１１２、１１４～１１５、１１７、１１９、１２１、および１２３～１２５のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項１２８】

前記外因性薬剤が、ペプチド、ホルモン、または小分子である、請求項１２６または１２７に記載のウイルス。

【請求項１２９】

請求項１～１２８のいずれか一項に記載のウイルスを含む、組成物。

【請求項１３０】

腫瘍細胞の集団を殺滅する方法であって、請求項１～１２８のいずれか一項に記載のウイルスまたは請求項１２９に記載の組成物を、前記腫瘍細胞の集団に投与することを含む、方法。

【請求項１３１】

前記腫瘍細胞の第１の亜集団が、前記一次腫瘍溶解性ウイルスによって感染および殺滅される、請求項１３０に記載の方法。

【請求項１３２】

前記腫瘍細胞の第２の亜集団が、前記二次腫瘍溶解性ウイルスによって感染および殺滅される、請求項１３０または１３１に記載の方法。

【請求項１３３】

前記腫瘍細胞の亜集団が、前記一次腫瘍溶解性ウイルスおよび前記二次腫瘍溶解性ウイルスの両方によって感染および殺滅される、請求項１３０～１３２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３４】

前記二次腫瘍溶解性ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスまたは前記二次腫瘍溶解性ウイルスのみによって殺滅された腫瘍細胞の数と比較して、前記集団内のより多くの数の腫瘍細胞が、前記一次および二次腫瘍溶解性ウイルスによって殺滅される、請求項１３０～１３３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３５】

前記腫瘍細胞の集団に１つ以上の外因性薬剤を投与することをさらに含み、前記１つ以上の外因性薬剤が、前記二次腫瘍溶解性ウイルスの産生を調節する、請求項１３０～１３４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３６】

前記１つ以上の外因性薬剤が、前記一次腫瘍溶解性ウイルスと同時に投与され、前記外因性薬剤の存在が、前記二次腫瘍溶解性ウイルスの産生を阻害する、請求項１３５に記載の方法。

【請求項１３７】

前記１つ以上の外因性薬剤が、前記一次腫瘍溶解性ウイルスの後に投与され、前記外因性薬剤の存在が、前記二次腫瘍溶解性ウイルスの産生を誘導する、請求項１３５に記載の方法。

【請求項１３８】

前記外因性薬剤が、前記一次腫瘍溶解性ウイルスの投与の少なくとも１日後に、少なくとも１週間後に、または少なくとも１か月後に投与される、請求項１３７に記載の方法。

【請求項１３９】

前記外因性薬剤の投与前に二次腫瘍溶解性ウイルスが不検出である、請求項１３５～１３８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４０】

前記腫瘍細胞の第１の亜集団が、前記一次ウイルスによって感染および殺滅される、請求項１３０に記載の方法。

【請求項１４１】

前記腫瘍細胞の第２の亜集団が、前記二次ウイルスによって感染および殺滅される、請求項１３０または１４０に記載の方法。

【請求項１４２】

前記腫瘍細胞の亜集団が、前記一次ウイルスおよび前記二次ウイルスの両方によって感染および殺滅される、請求項１３０、１４０、および１４１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４３】

前記二次ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスまたは前記二次ウイルスのみによって殺滅された腫瘍細胞の数と比較して、前記集団内のより多くの数の腫瘍細胞が、前記一次および二次ウイルスによって殺滅される、請求項１３０および１４０～１４２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４４】

前記腫瘍細胞の集団に１つ以上の外因性薬剤を投与することをさらに含み、前記１つ以上の外因性薬剤が、前記二次ウイルスの産生を調節する、請求項１３０および１４０～１４３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４５】

前記１つ以上の外因性薬剤が、前記一次ウイルスと同時に投与され、前記外因性薬剤の存在が、前記二次ウイルスの産生を阻害する、請求項１４４に記載の方法。

【請求項１４６】

前記１つ以上の外因性薬剤が、前記一次ウイルスの後に投与され、前記外因性薬剤の存在が、前記二次ウイルスの産生を誘導する、請求項１４５に記載の方法。

【請求項１４７】

前記外因性薬剤が、前記一次腫瘍溶解性ウイルスの投与の少なくとも１日後に、少なくとも１週間後に、または少なくとも１か月後に投与される、請求項１４６に記載の方法。

【請求項１４８】
前記外因性薬剤の投与前に二次ウイルスが不検出である、請求項１４４～１４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４９】
腫瘍の治療を必要とする対象における腫瘍を治療する方法であって、請求項１～１２８のいずれか一項に記載のウイルスまたは請求項１２９に記載の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。
【請求項１５０】
前記二次腫瘍溶解性ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスまたは前記二次腫瘍溶解性ウイルスのみによって殺滅された腫瘍細胞の数と比較して、前記集団内のより多くの数の腫瘍細胞が、前記一次および二次腫瘍溶解性ウイルスによって殺滅される、請求項１４９に記載の方法。
【請求項１５１】
前記方法が、前記二次腫瘍溶解性ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスの投与または前記二次腫瘍溶解性ウイルスのみの投与と比較して、前記対象における腫瘍サイズのより大幅な縮小につながる、請求項１４９または１５０に記載の方法。
【請求項１５２】
前記方法が、前記二次腫瘍溶解性ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスを投与するかまたは前記二次腫瘍溶解性ウイルスのみを投与することと比較して、前記対象における１つ以上の腫瘍抗原に対するより強力な免疫応答を誘導する、請求項１４９～１５１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５３】
前記方法が、前記二次腫瘍溶解性ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスを投与することと比較して、前記対象における前記一次腫瘍溶解性ウイルスに対する免疫応答の減少をもたらす、請求項１４９～１５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５４】
前記方法が、前記二次腫瘍溶解性ウイルスのみを投与することと比較して、前記対象における前記二次腫瘍溶解性ウイルスに対する免疫応答の減少をもたらす、請求項１４９～１５３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５５】
前記方法が、前記二次腫瘍溶解性ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスを投与するかまたは前記二次腫瘍溶解性ウイルスのみを投与することと比較して、前記対象における腫瘍細胞の優先的な／より特異的な殺滅をもたらす、請求項１４９～１５４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５６】
前記方法が、前記二次腫瘍溶解性ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスを投与することと比較して、前記対象における前記一次腫瘍溶解性ウイルスのより持続的な産生をもたらす、請求項１４９～１５５に記載の方法。
【請求項１５７】
前記方法が、前記二次腫瘍溶解性ウイルスのみを投与することと比較して、前記対象における前記二次腫瘍溶解性ウイルスのより持続的な産生をもたらす、請求項１４９～１５６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５８】
前記方法が、前記二次腫瘍溶解性ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスを投与するかまたは前記二次腫瘍溶解性ウイルスのみを投与することと比較して、前記対象における長期間の腫瘍阻止をもたらす、請求項１４９～１５７に記載の方法。
【請求項１５９】

前記方法が、前記二次腫瘍溶解性ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスを投与するかまたは前記二次腫瘍溶解性ウイルスのみを投与することと比較して、より多くの細胞タイプのウイルス感染を可能にする、請求項１４９～１５８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６０】

前記腫瘍細胞の集団に１つ以上の外因性薬剤を投与することをさらに含み、前記１つ以上の外因性薬剤が、前記二次腫瘍溶解性ウイルスの産生を調節する、請求項１４９～１５９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６１】

前記１つ以上の外因性薬剤が、前記一次腫瘍溶解性ウイルスと同時に投与され、前記外因性薬剤の存在が、前記二次腫瘍溶解性ウイルスの産生を阻害する、請求項１６０に記載の方法。

【請求項１６２】

前記１つ以上の外因性薬剤が、前記一次腫瘍溶解性ウイルスの後に投与され、前記外因性薬剤の存在が、前記二次腫瘍溶解性ウイルスの産生を誘導する、請求項１６０に記載の方法。

【請求項１６３】

前記外因性薬剤が、前記一次腫瘍溶解性ウイルスの投与の少なくとも１日後に、少なくとも１週間後に、または少なくとも１か月後に投与される、請求項１６２に記載の方法。

【請求項１６４】

前記外因性薬剤の投与前に二次腫瘍溶解性ウイルスが不検出である、請求項１６０～１６３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６５】

前記二次ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスまたは前記二次ウイルスのみによって殺滅された腫瘍細胞の数と比較して、前記集団内のより多くの数の腫瘍細胞が、前記一次および前記二次ウイルスによって殺滅される、請求項１４９に記載の方法。

【請求項１６６】

前記方法が、前記二次ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスの投与または前記二次ウイルスのみの投与と比較して、前記対象における腫瘍サイズのより大幅な縮小につながる、請求項１４９または１６５に記載の方法。

【請求項１６７】

前記方法が、前記二次ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスを投与するかまたは前記二次ウイルスのみを投与することと比較して、前記対象における１つ以上の腫瘍抗原に対するより強力な免疫応答を誘導する、請求項１４９、１６５、および１６６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６８】

前記方法が、前記二次ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスを投与することと比較して、前記対象における前記一次ウイルスに対する免疫応答の減少をもたらす、請求項１４９、および１６５～１６７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６９】

前記方法が、前記二次ウイルスのみを投与することと比較して、前記対象における前記二次ウイルスに対する免疫応答の減少をもたらす、請求項１４９、および１６５～１６８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１７０】

前記方法が、前記二次ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスを投与するかまたは前記二次ウイルスのみを投与することと比較して、前記対象における腫瘍細胞の優先的な／より特異的な殺滅をもたらす、請求項１４９、および１６５～１６９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１７１】
前記方法が、前記二次ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスを投与することと比較して、前記対象における前記一次ウイルスのより持続的な産生をもたらす、請求項１４９、および１６５～１７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７２】
前記方法が、前記二次ウイルスのみを投与することと比較して、前記対象における前記二次ウイルスのより持続的な産生をもたらす、請求項１４９、および１６５～１７１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７３】
前記方法が、前記二次ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスを投与するかまたは前記二次ウイルスのみを投与することと比較して、前記対象における長期間の腫瘍阻止をもたらす、請求項１４９、および１６５～１７２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７４】
前記方法が、前記二次ウイルスをコードする前記ポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスを投与するかまたは前記二次ウイルスのみを投与することと比較して、より多くの細胞タイプのウイルス感染を可能にする、請求項１４９、および１６５～１７３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７５】
前記腫瘍細胞の集団に１つ以上の外因性薬剤を投与することをさらに含み、前記１つ以上の外因性薬剤が、前記二次ウイルスの産生を調節する、請求項１４９、および１６５～１７４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７６】
前記１つ以上の外因性薬剤が、前記一次ウイルスと同時に投与され、前記外因性薬剤の存在が、前記二次ウイルスの産生を阻害する、請求項１７５に記載の方法。
【請求項１７７】
前記１つ以上の外因性薬剤が、前記一次ウイルスの後に投与され、前記外因性薬剤の存在が、前記二次ウイルスの産生を誘導する、請求項１７５に記載の方法。
【請求項１７８】
前記外因性薬剤が、前記一次ウイルスの投与の少なくとも１日後に、少なくとも１週間後に、または少なくとも１か月後に投与される、請求項１７７に記載の方法。
【請求項１７９】
前記外因性薬剤の投与前に二次ウイルスが不検出である、請求項１７５～１７８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８０】
請求項１～１２８に記載のウイルスをコードするポリヌクレオチド。
【請求項１８１】
請求項１８０に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
【請求項１８２】
請求項１８１に記載のベクターを含む医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１９年１０月１０日に出願された米国仮特許出願第６２／９１３，５１４号の優先権を主張するものであり、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
配列表に関する記述
本出願に関連する配列表は、紙のコピーの代わりにテキスト形式で提供され、参照によ

り本明細書に組み込まれる。配列表のコンピュータ可読形式コピー：ファイル名：ＯＮＣＲ－０１３＿０１ＷＯ＿ＳｅｑＬｉｓｔ＿ＳＴ２５．ｔｘｔ、記録日：２０２０年１０月９日、ファイルサイズ２７１キロバイト。

【背景技術】

【０００３】

腫瘍溶解性ウイルスは、がん細胞に優先的に感染し、破壊するように設計されており（ＭａｃＬｅａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．７２：６３０－６３９（１９９１）、Ｒｏｂｅｒｔｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．７３：９６７－９７０（１９９２）、Ｂｒｏｗｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．７５：３７６７－３６８６（１９９４）、Ｃｈｏｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５０：１２６２－１２６５（１９９０））、がん治療のための複数の前臨床および臨床研究で使用されてきた。直接的な腫瘍細胞溶解は、細胞死だけでなく、局所抗原提示細胞によって取り込まれて提示される腫瘍抗原に対する適応免疫応答の発生ももたらす。しかしながら、強力な抗腫瘍免疫応答は、ウイルス株の効力が低いこと、ならびにウイルス自体を標的とする免疫応答のリダイレクトの可能性によって制限される。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００４】

【非特許文献１】ＭａｃＬｅａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．７２：６３０－６３９（１９９１）

【非特許文献２】Ｒｏｂｅｒｔｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．７３：９６７－９７０（１９９２）

【非特許文献３】Ｂｒｏｗｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．７５：３７６７－３６８６（１９９４）

【非特許文献４】Ｃｈｏｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５０：１２６２－１２６５（１９９０）

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００５】

本開示は、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む、組換え一次腫瘍溶解性ウイルスを提供する。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスおよび二次腫瘍溶解性ウイルスは、複製能力を有する。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスおよび／または二次腫瘍溶解性ウイルスは、複製能力を有しない。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドは、調節可能なプロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスは、二次腫瘍溶解性ウイルスに対する抗原特異的免疫を媒介しない抗原特異的免疫応答を発生させる。

本開示は、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む組換え一次ウイルスを提供する。いくつかの実施形態では、一次ウイルスおよび二次ウイルスは、複製能力を有する。いくつかの実施形態では、一次ウイルスおよび／または二次ウイルスは、複製能力を有しない。いくつかの実施形態では、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドは、調節可能なプロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、一次ウイルスは、二次ウイルスに対する抗原特異的免疫を媒介しない抗原特異的免疫応答を発生させる。

【０００６】

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスは、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）ウイルスである。いくつかの実施形態では、一次ウイルスは、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）ウイルスである。いくつかの実施形態では、ｄｓＤＮＡウイルスは単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）またはアデノウイルスである。いくつかの実施形態では、ｄｓＤＮＡウイルスは、Ｐｏｘｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスである。いくつかの実施形態では、ｄｓ

ＤＮＡウイルスは、伝染性軟属腫ウイルス、粘液腫ウイルス、ワクシーナ（ｖａｃｃｉｎａ）ウイルス、サル痘ウイルス、またはヤタポックスウイルスである。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、ＲＮＡウイルスである。いくつかの実施形態では、ＲＮＡウイルスは、パラミクソウイルスまたはラブドウイルスである。

【０００７】

いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスは、ポジティブセンス一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）ウイルス、ネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルス、またはアンビセンス（ａｍｂｉ－ｓｅｎｓｅ）ｓｓＲＮＡウイルスである。いくつかの実施形態では、二次ウイルスは、ポジティブセンス一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）ウイルス、ネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルス、またはアンビセンスｓｓＲＮＡウイルスである。いくつかの実施形態では、ネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルスは、Ｒｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅファミリー、Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリー、またはＯｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスである。いくつかの実施形態では、Ｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスは、水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）またはマラバウイルスである。いくつかの実施形態では、Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスは、ニューカッスル病ウイルス、センダイウイルス、または麻疹ウイルスである。いくつかの実施形態では、Ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスは、インフルエンザウイルスである。いくつかの実施形態では、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスは、エンテロウイルスである。いくつかの実施形態では、エンテロウイルスは、ポリオウイルス、セネカバレーウイルス（ＳＶＶ）、コクサッキーウイルス、またはエコーウイルスである。いくつかの実施形態では、コクサキウイルスは、コクサッキーウイルスＡ（ＣＶＡ）またはコクサッキーウイルスＢ（ＣＶＢ）であり、いくつかの実施形態では、コクサキウイルスは、ＣＶＡ９、ＣＶＡ２１、またはＣＶＢ３である。いくつかの実施形態では、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスは、脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）である。いくつかの実施形態では、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスは、メンゴウイルスである。いくつかの実施形態では、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスは、Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスである。いくつかの実施形態では、Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスは、新世界アルファウイルスまたは旧世界アルファウイルスである。いくつかの実施形態では、新世界アルファウイルスまたは旧世界アルファウイルスは、ＶＥＥＶ、ＷＥＥＶ、ＥＥＶ、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、ロスリバーウイルス、またはマヤロウイルスである。

【０００８】

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスおよび／または二次腫瘍溶解性ウイルスは、キメラウイルスである。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスおよび／または二次腫瘍溶解性ウイルスは、シュードタイプウイルスである。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスは、シュードタイプウイルスであり、一次腫瘍溶解性ウイルスは、二次腫瘍溶解性ウイルスのコード領域の外側にある二次腫瘍溶解性ウイルスのキャプシドタンパク質またはエンベロープタンパク質のコード領域を含む。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスは、アルファウイルスである。いくつかの実施形態では、二次ウイルスは、パラミクソウイルスまたはラブドウイルスである。

【０００９】

いくつかの実施形態では、一次ウイルスおよび／または二次ウイルスは、キメラウイルスである。いくつかの実施形態では、一次ウイルスおよび／または二次ウイルスは、シュードタイプウイルスである。いくつかの実施形態では、二次ウイルスは、シュードタイプウイルスであり、一次ウイルスは、二次ウイルスのコード領域の外側にある二次ウイルスのキャプシドタンパク質またはエンベロープタンパク質のコード領域を含む。いくつかの実施形態では、二次ウイルスは、アルファウイルスである。いくつかの実施形態では、二次ウイルスは、パラミクソウイルスまたはラブドウイルスである。

【００１０】

いくつかの実施形態では、調節可能なプロモーターが、ステロイド誘導性プロモーター、メタロチオニンプロモーター、ＭＸ－１プロモーター、ＧＥＮＥＳＷＩＴＣＨ（商標）ハイブリッドプロモーター、クメート応答性プロモーター、およびテトラサイクリン誘導性プロモーターから選択される。いくつかの実施形態では、調節可能なプロモーターは、リコンビナーゼ認識部位に隣接した構成的プロモーターを含む。

【００１１】

いくつかの実施形態では、本開示の一次腫瘍溶解性ウイルスは、調節可能なプロモーターに結合することができるペプチドをコードする第２のポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、本開示の一次ウイルスは、制御可能なプロモーターに結合することができるペプチドをコードする第２のポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、第２のポリヌクレオチドが、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、構成的プロモーターは、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）プロモーター、モロニーマウス白血病ウイルス（ＭｏＭＬＶ）ＬＴＲプロモーター、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）ＬＴＲプロモーター、伸長因子１α（ＥＦ１ａ）プロモーター、初期増殖応答１（ＥＧＲ１）プロモーター、フェリチンＨ（ＦｅｒＨ）プロモーター、フェリチンＬ（ＦｅｒＬ）プロモーター、グリセルアルデヒド３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）プロモーター、真核生物翻訳開始因子４Ａ１（ＥＩＦ４Ａ１）プロモーター、ユビキチンＣプロモーター（ＵＢＣ）プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ－１（ＰＧＫ）プロモーター、およびサイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリβ－アクチン（ＣＡＧ）プロモーターから選択される。

【００１２】

いくつかの実施形態では、調節可能なプロモーターは、テトラサイクリン（Ｔｅｔ）依存性プロモーターであり、ペプチドは、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｒｔＴＡ）ペプチドである。いくつかの実施形態では、調節可能なプロモーターは、テトラサイクリン（Ｔｅｔ）依存性プロモーターであり、ペプチドは、テトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｔＴＡ）ペプチドである。

【００１３】

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスは、１つ以上のＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）分子をコードするポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、１つ以上のＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）分子をコードするポリヌクレオチドは、第２の調節可能なプロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、１つ以上のＲＮＡｉ分子は、二次腫瘍溶解性ウイルスのゲノム中の標的配列に結合し、かつ二次腫瘍溶解性ウイルスの複製を阻害する。いくつかの実施形態では、ＲＮＡｉ分子は、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、またはＡｍｉＲＮＡである。

【００１４】

いくつかの実施形態では、一次ウイルスは、１つ以上のＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）分子をコードするポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、１つ以上のＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）分子をコードするポリヌクレオチドは、第２の調節可能なプロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、１つ以上のＲＮＡｉ分子は、二次ウイルスのゲノム中の標的配列に結合し、かつ二次ウイルスの複製を阻害する。いくつかの実施形態では、ＲＮＡｉ分子は、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、またはＡｍｉＲＮＡである。

【００１５】

いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドは、１つ以上のリコンビナーゼ認識部位を含む。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドは、１つ以上のリコンビナーゼ応答性カセットを含み、リコンビナーゼ応答性カセットは、１つ以上のリコンビナーゼ認識部位を含む。

【００１６】

いくつかの実施形態では、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドは、１つ以上の

リコンビナーゼ認識部位を含む。いくつかの実施形態では、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドは、１つ以上のリコンビナーゼ応答性カセットを含み、リコンビナーゼ応答性カセットは、１つ以上のリコンビナーゼ認識部位を含む。

【００１７】

いくつかの実施形態では、１つ以上のリコンビナーゼ応答性カセットは、リコンビナーゼ応答性切除カセット（ＲＲＥＣ）を含む。いくつかの実施形態では、ＲＲＥＣは転写／翻訳終結（ＳＴＯＰ）要素を含む。いくつかの実施形態では、転写／翻訳終結（ＳＴＯＰ）要素は、配列番号８５４～８５６のうちのいずれか１つに対して８０％の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、１つ以上のリコンビナーゼ応答性カセットは、リコンビナーゼ応答性逆位カセット（ＲＲＩＣ）を含む。いくつかの実施形態では、ＲＲＩＣは、中心要素の両側に２つ以上の直交リコンビナーゼ認識部位を含む。いくつかの実施形態では、ＲＲＩＣは、プロモーターまたはプロモーターの一部を含む。いくつかの実施形態では、ＲＲＩＣは、コード領域またはコード領域の一部を含み、コード領域は、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのウイルスゲノムをコードする。いくつかの実施形態では、ＲＲＩＣは、１つ以上の制御要素を含む。いくつかの実施形態では、制御要素は、転写／翻訳終結（ＳＴＯＰ）要素である。いくつかの実施形態では、制御要素は、配列番号８５４～８５６のうちのいずれか１つに対して８０％の同一性を有する配列を有する。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ応答性逆位カセット（ＲＲＩＣ）は、イントロンの一部をさらに含む。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドは、ｍＲＮＡスプライシングを介してイントロンを除去した後、リコンビナーゼ認識部位を有しない二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの成熟ウイルスゲノム転写物をもたらす。

【００１８】

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、リコンビナーゼをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、一次ウイルスは、リコンビナーゼをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、フリッパーゼ（Ｆｌｐ）またはＣｒｅリコンビナーゼ（Ｃｒｅ）である。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼのコード領域は、イントロンを含む。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼリコンビナーゼの発現カセットは、１つ以上のｍＲＮＡ不安定化要素を含む。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、追加のポリペプチドを含む融合タンパク質の一部であり、当該追加のポリペプチドは、リコンビナーゼの活性および／または細胞局在を調節する。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼの活性および／または細胞局在は、リガンドおよび／または小分子の存在によって調節される。いくつかの実施形態では、追加のポリペプチドは、エストロゲン受容体タンパク質のリガンド結合ドメインを含む。

【００１９】

いくつかの実施形態では、１つ以上のリコンビナーゼ認識部位は、フリッパーゼ認識標的（ＦＲＴ）部位である。

【００２０】

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスは、調節ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、調節ポリペプチドは、１つ以上のプロモーターの活性を調節する。

【００２１】

いくつかの実施形態では、一次ウイルスは調節ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、調節ポリペプチドは１つ以上のプロモーターの活性を調節する。

【００２２】

本開示は、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードする第１のポリヌクレオチドと、１つ以上のＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）分子をコードする第２のポリヌクレオチドとを含む、組換え一次腫瘍溶解性ウイルスを提供する。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスおよび二次腫瘍溶解性ウイルスは、複製能力を有する。いくつかの実施形態では、第１のポ

リヌクレオチドは、第１の調節可能なプロモーターに作動可能に連結され、第２のポリヌクレオチドは、第２の調節可能なプロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスは、二次腫瘍溶解性ウイルスに対する抗原特異的免疫を媒介しない抗原特異的免疫応答を発生させる。

【００２３】

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスは、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）ウイルスである。いくつかの実施形態では、ｄｓＤＮＡウイルスは、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、アデノウイルス、またはＰｏｘｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスであり、任意選択的に、Ｐｏｘｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスのウイルスは、伝染性軟体属腫ウイルス、粘液腫ウイルス、ワクシーナウイルス、サル痘ウイルス、またはヤタポックスウイルスである。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスは、ＲＮＡウイルスである。いくつかの実施形態では、ＲＮＡウイルスは、パラミクソウイルスまたはラブドウイルスである。

【００２４】

いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスは、ポジティブセンス一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）ウイルス、ネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルス、またはアンビセンスｓｓＲＮＡウイルスである。いくつかの実施形態では、ネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルスは、Ｒｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅファミリー、Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリー、またはＯｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスであり、任意選択的に、Ｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスは、水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）もしくはマラバウイルスであり、任意選択的に、Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスは、ニューカッスル病ウイルス、センダイウイルス、もしくは麻疹ウイルスであり、またはＯｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスは、インフルエンザウイルスである。いくつかの実施形態では、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスは、エンテロウイルスであり、任意選択的に、エンテロウイルスは、ポリオウイルス、セネカバレーウイルス（ＳＶＶ）、コクサッキーウイルス、またはエコーウイルスであり、任意選択的に、コクサキウイルスは、コクサッキーウイルスＡ（ＣＶＡ）またはコクサッキーウイルスＢ（ＣＶＢ）であり、任意選択的に、コクサキウイルスは、ＣＶＡ９、ＣＶＡ２１またはＣＶＢ３である。いくつかの実施形態では、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスは、脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）またはメンゴウイルスである。いくつかの実施形態では、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスは、Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスであり、任意選択的に、Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスは、新世界アルファウイルスまたは旧世界アルファウイルスであり、任意選択的に、新世界アルファウイルスまたは旧世界アルファウイルスは、ＶＥＥＶ、ＷＥＥＶ、ＥＥＶ、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、ロスリバーウイルス、またはマヤロウイルスである。

【００２５】

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスおよび／または二次腫瘍溶解性ウイルスは、キメラウイルスである。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスおよび／または二次腫瘍溶解性ウイルスは、シュードタイプウイルスである。

【００２６】

本開示は、二次ウイルスをコードする第１のポリヌクレオチドと、１つ以上のＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）分子をコードする第２のポリヌクレオチドとを含む、組換え一次ウイルスを提供する。いくつかの実施形態では、一次ウイルスおよび二次ウイルスは、複製能力を有する。いくつかの実施形態では、第１のポリヌクレオチドは、第１の調節可能なプロモーターに作動可能に連結され、第２のポリヌクレオチドは、第２の調節可能なプロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、一次ウイルスは、二次ウイルスに対する抗原特異的免疫を媒介しない抗原特異的免疫応答を発生させる。

【００２７】

いくつかの実施形態では、一次ウイルスは、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）ウイルスであ

る。いくつかの実施形態では、ｄｓＤＮＡウイルスは、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、アデノウイルス、またはＰｏｘｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスであり、任意選択的に、Ｐｏｘｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスのウイルスは、伝染性軟体属腫ウイルス、粘液腫ウイルス、ワクシーナウイルス、サル痘ウイルス、またはヤタポックスウイルスである。いくつかの実施形態では、一次ウイルスは、ＲＮＡウイルスである。いくつかの実施形態では、ＲＮＡウイルスは、パラミクソウイルスまたはラブドウイルスである。

【００２８】

いくつかの実施形態では、二次ウイルスは、ポジティブセンス一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）ウイルス、ネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルス、またはアンビセンスｓｓＲＮＡウイルスである。いくつかの実施形態では、ネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルスは、Ｒｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅファミリー、Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリー、またはＯｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスであり、任意選択的に、Ｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスは、水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）もしくはマラバウイルスであり、任意選択的に、Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスは、ニューカッスル病ウイルス、センダイウイルス、もしくは麻疹ウイルスであり、またはＯｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスは、インフルエンザウイルスである。いくつかの実施形態では、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスは、エンテロウイルスであり、任意選択的に、エンテロウイルスは、ポリオウイルス、セネカバレーウイルス（ＳＶＶ）、コクサッキーウイルス、またはエコーウイルスであり、任意選択的に、コクサキウイルスは、コクサッキーウイルスＡ（ＣＶＡ）またはコクサッキーウイルスＢ（ＣＶＢ）であり、任意選択的に、コクサキウイルスは、ＣＶＡ９、ＣＶＡ２１またはＣＶＢ３である。いくつかの実施形態では、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスは、脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）またはメンゴウイルスである。いくつかの実施形態では、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスは、Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスであり、任意選択的に、Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスは、新世界アルファウイルスまたは旧世界アルファウイルスであり、任意選択的に、新世界アルファウイルスまたは旧世界アルファウイルスは、ＶＥＥＶ、ＷＥＥＶ、ＥＥＶ、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、ロスリバーウイルス、またはマヤロウイルスである。

【００２９】

いくつかの実施形態では、一次ウイルスおよび／または二次ウイルスは、キメラウイルスである。いくつかの実施形態では、一次ウイルスおよび／または二次ウイルスは、シュードタイプウイルスである。

【００３０】

いくつかの実施形態では、第１および第２の調節可能なプロモーターは、ステロイド誘導性プロモーター、メタロチオニンプロモーター、ＭＸ－１プロモーター、ＧＥＮＥＳＷＩＴＣＨ（商標）ハイブリッドプロモーター、クメート応答性プロモーター、およびテトラサイクリン依存性プロモーターから選択される。

【００３１】

いくつかの実施形態では、本開示の一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、第１の調節可能なプロモーターに結合することができる第１のペプチドおよび第２の調節可能なプロモーターに結合することができる第２のペプチドをコードする第３のポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、第３のポリヌクレオチドは、構成的プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、構成的プロモーターは、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）プロモーター、モロニーマウス白血病ウイルス（ＭｏＭＬＶ）ＬＴＲプロモーター、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）ＬＴＲプロモーター、伸長因子１α（ＥＦ１ａ）プロモーター、初期増殖応答１（ＥＧＲ１）プロモーター、フェリチンＨ（ＦｅｒＨ）プロモーター、フェリチンＬ（ＦｅｒＬ）プロモーター、グリセルアルデヒド３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）プロモーター、真核生物翻訳開始因子４Ａ１（ＥＩＦ４Ａ１）プロモーター、ユビキチンＣプロモーター（ＵＢＣ）プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼー

１（ＰＧＫ）プロモーター、およびサイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリβ－アクチン（ＣＡＧ）プロモーターから選択される。

【００３２】

いくつかの実施形態では、第１の調節可能なプロモーターは、テトラサイクリン（Ｔｅｔ）誘導性プロモーターであり、第１のペプチドは、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｒｔＴＡ）ペプチドである。いくつかの実施形態では、第２の調節可能なプロモーターは、テトラサイクリン（Ｔｅｔ）抑制性プロモーターであり、第２のペプチドは、テトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｔＴＡ）ペプチドである。いくつかの実施形態では、第１の調節可能なプロモーターは、テトラサイクリン（Ｔｅｔ）抑制性プロモーターであり、第１のペプチドは、テトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｔＴＡ）ペプチドである。いくつかの実施形態では、第２の調節可能なプロモーターは、テトラサイクリン（Ｔｅｔ）誘導性プロモーターであり、第２のペプチドは、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｒｔＴＡ）ペプチドである。

【００３３】

いくつかの実施形態では、１つ以上のＲＮＡｉ分子は、二次腫瘍溶解性ウイルスのゲノム中の標的配列に結合し、かつ二次腫瘍溶解性ウイルスの複製を阻害する。いくつかの実施形態では、１つ以上のＲＮＡｉ分子は、二次ウイルスのゲノム中の標的配列に結合し、かつ二次ウイルスの複製を阻害する。いくつかの実施形態では、ＲＮＡｉ分子は、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、またはＡｍｉＲＮＡである。

【００３４】

いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドは、第１の３’リボザイムコード配列および第２の５’リボザイムコード配列を含む。いくつかの実施形態では、第１および第２のリボザイムコード配列は、ハンマーヘッド型リボザイムまたは肝炎デルタウイルスリボザイムをコードする。

【００３５】

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスのゲノムは、複製に必要な１つ以上のウイルス遺伝子に挿入された、またはウイルスゲノムの３’もしくは５’ＵＴＲに挿入された１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含むｍｉＲＮＡ標的配列（ｍｉＲ－ＴＳ）カセットを含む。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスのゲノムは、複製に必要な１つ以上のウイルス遺伝子に挿入された、またはウイルスゲノムの３’もしくは５’ＵＴＲに挿入された１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含むｍｉＲＮＡ標的配列（ｍｉＲ－ＴＳ）カセットを含む。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスおよび二次腫瘍溶解性ウイルスは、複製に必要な１つ以上のウイルス遺伝子に挿入された、またはウイルスゲノムの３’もしくは５’ＵＴＲに挿入された１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含むｍｉＲＮＡ標的配列（ｍｉＲ－ＴＳ）カセットをそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、細胞内の１つ以上のｍｉＲＮＡの発現は、一次および／または二次腫瘍溶解性ウイルスの複製を阻害する。

【００３６】

いくつかの実施形態では、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドは、第１の３’リボザイムコード配列および第２の５’リボザイムコード配列を含む。いくつかの実施形態では、第１および第２のリボザイムコード配列は、ハンマーヘッド型リボザイムまたは肝炎デルタウイルスリボザイムをコードする。

【００３７】

いくつかの実施形態では、一次ウイルスのゲノムは、複製に必要な１つ以上のウイルス遺伝子に挿入された、またはウイルスゲノムの３’もしくは５’ＵＴＲに挿入された１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含むｍｉＲＮＡ標的配列（ｍｉＲ－ＴＳ）カセットを含む。いくつかの実施形態では、二次ウイルスのゲノムは、複製に必要な１つ以上のウイルス遺伝子に挿入された、またはウイルスゲノムの３’もしくは５’ＵＴＲに挿入された１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含むｍｉＲＮＡ標的配列（ｍｉＲ－ＴＳ）カセットを含む。いくつかの実施形態では、一次ウイルスおよび二次ウイルスは、複製に必要な１つ以上のウイル

ス遺伝子に挿入された、またはウイルスゲノムの３’もしくは５’ＵＴＲに挿入された１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含むｍｉＲＮＡ標的配列（ｍｉＲ－ＴＳ）カセットをそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、細胞内の１つ以上のｍｉＲＮＡの発現は、一次ウイルスおよび／または二次ウイルスの複製を阻害する。

【００３８】

いくつかの実施形態では、本開示の一次腫瘍溶解性ウイルスは、少なくとも１つの外因性ペイロードタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、外因性ペイロードタンパク質は、蛍光タンパク質、酵素、サイトカイン、ケモカイン、または抗原結合分子である。

【００３９】

いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスの発現は、外因性薬剤によって調節される。いくつかの実施形態では、外因性薬剤は、ペプチド、ホルモン、または小分子である。

【００４０】

いくつかの実施形態では、本開示の一次ウイルスは、少なくとも１つの外因性ペイロードタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、外因性ペイロードタンパク質は、蛍光タンパク質、酵素、サイトカイン、ケモカイン、または抗原結合分子である。

【００４１】

いくつかの実施形態では、二次ウイルスの発現は、外因性薬剤によって調節される。いくつかの実施形態では、外因性薬剤は、ペプチド、ホルモン、または小分子である。

【００４２】

本開示は、本開示の一次腫瘍溶解性ウイルスを含む組成物を提供する。本開示は、本開示の一次ウイルスを含む組成物を提供する。

【００４３】

本開示は、腫瘍細胞の集団に本開示の一次腫瘍溶解性ウイルスまたはその組成物を投与することを含む、腫瘍細胞の集団を殺滅する方法を提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞の第１の亜集団は、一次腫瘍溶解性ウイルスによって感染および殺滅される。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞の第２の亜集団は、二次腫瘍溶解性ウイルスによって感染および殺滅される。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞の亜集団は、一次腫瘍溶解性ウイルスおよび二次腫瘍溶解性ウイルスの両方によって感染および殺滅される。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次腫瘍溶解性ウイルスのみによって殺滅された腫瘍細胞の数と比較して、集団内のより多くの数の腫瘍細胞が、一次性および二次腫瘍溶解性ウイルスによって殺滅される。

【００４４】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、腫瘍細胞の集団に１つ以上の外因性薬剤を投与することをさらに含み、１つ以上の外因性薬剤は、二次腫瘍溶解性ウイルスの産生を調節する。いくつかの実施形態では、１つ以上の外因性薬剤が、一次腫瘍溶解性ウイルスと同時に投与され、当該外因性薬剤の存在は、二次腫瘍溶解性ウイルスの産生を阻害する。いくつかの実施形態では、１つ以上の外因性薬剤が、一次腫瘍溶解性ウイルスの後に投与され、外因性薬剤の存在は、二次腫瘍溶解性ウイルスの産生を誘導する。いくつかの実施形態では、外因性薬剤は、一次腫瘍溶解性ウイルスの投与の少なくとも１日後に、少なくとも１週間後に、または少なくとも１か月後に投与される。いくつかの実施形態では、外因性薬剤の投与前に、二次腫瘍溶解性ウイルスは不検出である。

【００４５】

本開示は、腫瘍の治療を必要とする対象における腫瘍を治療する方法であって、本開示の一次腫瘍溶解性ウイルスまたはその組成物を対象に投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次腫瘍溶解性ウイルスのみによって殺滅さ

れた腫瘍細胞の数と比較して、集団内のより多くの数の腫瘍細胞が、一次および二次腫瘍溶解性ウイルスによって殺滅される。いくつかの実施形態では、本方法は、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスの投与または二次腫瘍溶解性ウイルスのみの投与と比較して、対象における腫瘍サイズのより大幅な縮小につながる。いくつかの実施形態では、本方法は、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスを投与するかまたは二次腫瘍溶解性ウイルスのみを投与することと比較して、対象における１つ以上の腫瘍抗原に対するより強力な免疫応答を誘導する。いくつかの実施形態では、本方法は、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスを投与することと比較して、対象における一次腫瘍溶解性ウイルスに対する免疫応答の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、本方法は、二次腫瘍溶解性ウイルスのみを投与することと比較して、対象における二次腫瘍溶解性ウイルスに対する免疫応答の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、本方法は、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスを投与することまたは二次腫瘍溶解性ウイルスのみを投与することと比較して、対象における腫瘍細胞の優先的な／より特異的な殺滅をもたらす。いくつかの実施形態では、本方法は、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスを投与することと比較して、対象における一次腫瘍溶解性ウイルスのより持続的な産生をもたらす。いくつかの実施形態では、本方法は、二次腫瘍溶解性ウイルスのみを投与することと比較して、対象における二次腫瘍溶解性ウイルスのより持続的な産生をもたらす。いくつかの実施形態では、本方法は、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスを投与するかまたは二次腫瘍溶解性ウイルスのみを投与することと比較して、対象における長期間の腫瘍阻止をもたらす。いくつかの実施形態では、本方法は、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照の一次腫瘍溶解性ウイルスを投与するかまたは二次腫瘍溶解性ウイルスのみを投与することと比較して、より多くの細胞タイプのウイルス感染を可能にする。いくつかの実施形態では、本方法は、腫瘍細胞の集団に１つ以上の外因性薬剤を投与することをさらに含み、１つ以上の外因性薬剤は、二次腫瘍溶解性ウイルスの産生を調節する。いくつかの実施形態では、１つ以上の外因性薬剤は、一次腫瘍溶解性ウイルスと同時に投与され、外因性薬剤の存在は、二次腫瘍溶解性ウイルスの産生を阻害する。いくつかの実施形態では、１つ以上の外因性薬剤が、一次腫瘍溶解性ウイルスの後に投与され、外因性薬剤の存在は、二次腫瘍溶解性ウイルスの産生を誘導する。いくつかの実施形態では、外因性薬剤は、一次腫瘍溶解性ウイルスの投与の少なくとも１日後に、少なくとも１週間後に、または少なくとも１か月後に投与される。いくつかの実施形態では、外因性薬剤の投与前に、二次腫瘍溶解性ウイルスは不検出である。

【００４６】

本開示は、腫瘍細胞の集団に本開示の一次ウイルスまたはその組成物を投与することを含む、腫瘍細胞の集団を殺滅する方法を提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞の第１の亜集団は、一次ウイルスによって感染および殺滅される。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞の第２の亜集団は、二次ウイルスによって感染および殺滅される。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞の亜集団は、一次ウイルスおよび二次ウイルスの両方によって感染および殺滅される。いくつかの実施形態では、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスまたは二次ウイルスのみによって殺滅された腫瘍細胞の数と比較して、集団内のより多くの数の腫瘍細胞が、一次ウイルスおよび二次ウイルスによって殺滅される。

【００４７】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、腫瘍細胞の集団に１つ以上の外因性薬剤を投与することをさらに含み、１つ以上の外因性薬剤は、二次ウイルスの産生を調節する。いくつかの実施形態では、１つ以上の外因性薬剤は、一次ウイルスと同時に投与され、当該外因性薬剤の存在は二次ウイルスの産生を阻害する。いくつかの実施形態では、１つ以

上の外因性薬剤は、一次ウイルスの後に投与され、外因性薬剤の存在は二次ウイルスの産生を誘導する。いくつかの実施形態では、外因性薬剤は、一次ウイルスの投与の少なくとも１日後に、少なくとも１週間後に、または少なくとも１か月に投与される。いくつかの実施形態では、外因性薬剤の投与前に、二次ウイルスは不検出である。

【００４８】

本開示は、腫瘍の治療を必要とする対象における腫瘍を治療する方法であって、本開示の一次ウイルスまたはその組成物を対象に投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスまたは二次ウイルスのみによって殺滅された腫瘍細胞の数と比較して、集団内のより多くの数の腫瘍細胞が、一次ウイルスおよび二次ウイルスによって殺滅される。いくつかの実施形態では、本方法は、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスの投与または二次ウイルスのみの投与と比較して、対象における腫瘍サイズのより大幅な縮小につながる。いくつかの実施形態では、本方法は、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスを投与するかまたは二次ウイルスのみを投与することと比較して、対象における１つ以上の腫瘍抗原に対してより強力な免疫応答を誘導する。いくつかの実施形態では、本方法は、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスを投与することと比較して、対象における一次ウイルスに対する免疫応答の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、本方法は、二次ウイルスのみを投与することと比較して、対象における二次ウイルスに対する免疫応答の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、本方法は、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスを投与するかまたは二次ウイルス単独を投与することと比較して、対象における腫瘍細胞の優先的／より特異的な殺滅をもたらす。いくつかの実施形態では、本方法は、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスを投与することと比較して、対象における一次ウイルスのより持続的な産生をもたらす。いくつかの実施形態では、本方法は、二次ウイルスのみを投与することと比較して、対象における二次ウイルスのより持続的な産生をもたらす。いくつかの実施形態では、本方法は、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスを投与するかまたは二次ウイルスのみを投与することと比較して、対象における長期間の腫瘍阻止をもたらす。いくつかの実施形態では、本方法は、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照の一次ウイルスを投与するかまたは二次ウイルスのみを投与することと比較して、より多くの細胞タイプのウイルス感染を可能にする。いくつかの実施形態では、方法は、腫瘍細胞の集団に１つ以上の外因性薬剤を投与することをさらに含み、１つ以上の外因性薬剤は二次ウイルスの産生を調節する。いくつかの実施形態では、１つ以上の外因性薬剤は、一次ウイルスと同時に投与され、外因性薬剤の存在は、二次ウイルスの産生を阻害する。いくつかの実施形態では、１つ以上の外因性薬剤は、一次ウイルスの後に投与され、外因性薬剤の存在は二次ウイルスの産生を誘導する。いくつかの実施形態では、外因性薬剤は、一次ウイルスの投与の少なくとも１日後に、少なくとも１週間後に、または少なくとも１か月に投与される。いくつかの実施形態では、外因性薬剤の投与前に、二次ウイルスは不検出である。

【００４９】

本開示は、本開示の一次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを提供する。本開示は、本開示の一次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを提供する。本開示は、本開示のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。本開示は、本開示のベクターを含む医薬組成物を提供する。

【図面の簡単な説明】

【００５０】

【図１Ａ】入れ子状の腫瘍溶解性ウイルスの概略図および経時的な免疫反応を示す。図１Ａは、２つの異なるウイルス（ｏＶ１およびｏＶ２）が同じ構築物から産生されるように、一次腫瘍溶解性ウイルス（ｏＶ１ゲノム、灰色の棒）のゲノムが二次腫瘍溶解性ウイルス（ｏＶ２ポリヌクレオチド、白色の棒）のゲノムをコードするポリヌクレオチドを含む

、入れ子状の腫瘍溶解性ウイルスを図示する。図１Ｂは、ｏＶ２の産生は誘導刺激によってトリガーされる、経時的なｏＶ１およびｏＶ２の相対レベルを図示する。経時的な腫瘍特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞の対応する増殖は、灰色の破線によって示される。これらの手順は、腫瘍溶解性ウイルスではないウイルスを用いて実施されてもよい。

【図１Ｂ】入れ子状の腫瘍溶解性ウイルスの概略図および経時的な免疫反応を示す。図１Ａは、２つの異なるウイルス（ｏＶ１およびｏＶ２）が同じ構築物から産生されるように、一次腫瘍溶解性ウイルス（ｏＶ１ゲノム、灰色の棒）のゲノムが二次腫瘍溶解性ウイルス（ｏＶ２ポリヌクレオチド、白色の棒）のゲノムをコードするポリヌクレオチドを含む、入れ子状の腫瘍溶解性ウイルスを図示する。図１Ｂは、ｏＶ２の産生は誘導刺激によってトリガーされる、経時的なｏＶ１およびｏＶ２の相対レベルを図示する。経時的な腫瘍特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞の対応する増殖は、灰色の破線によって示される。これらの手順は、腫瘍溶解性ウイルスではないウイルスを用いて実施されてもよい。

【図２】一次ウイルスが組換えＨＳＶであり、二次ウイルスがポジティブセンス一本鎖ＲＮＡウイルス（左下）またはネガティブセンス一本鎖ＲＮＡウイルス（右下）である、入れ子状の腫瘍溶解性ウイルス構築物を示す。二次ウイルスゲノムの発現は、テトラサイクリン応答性Ｐｏｌ　ＩＩプロモーター（黒い矢印）およびＲＮＡポリメラーゼＩプロモーター（灰色の矢印）によって調節される。組換えＨＳＶは、その糖タンパク質ＢにおけるＤ２８５ＮおよびＡ５４９Ｔ変異（ｇＢ：Ｎ／Ｔ）、ＩＣＰ２７におけるＴ１２８、Ｔ２１９ａ、およびＴ１２２　ｍｉＲ標的配列、ジョイント領域の欠失、ＵＳ１２変異、ＩＣＰ４におけるＴ１２４、Ｔ１およびＴ１４３　ｍｉＲ標的配列、ならびにＩＣＰ３４．５におけるＴ１２８、Ｔ２０４およびＴ２１９　ｍｉＲ標的配列を含む。

【図３】ウイルス活性化Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼまたはリコンビナーゼの発現および／または機能を調節するための制御要素を示す概略図である。転写制御は、腫瘍特異的プロモーターまたはリガンド誘導性プロモーターを用いて達成することができる。転写後制御要素は、ｍＲＮＡまたはｍＲＮＡコード化タンパク質半減期の調節、ｍｉＲＮＡ標的部位、Ｔｅｔ－ＯＮ　ｍｉＲ－Ｔ要素、Ｔｅｔ－ＯＦＦリボザイム／アプタザイム、およびリガンド依存性または構成的な様式での転写物存在量を制御するそれらの任意の組み合わせが含まれる。追加の制御要素は、その半減期、細胞内局在性および／または活性を制御するために、コードされたポリペプチド（例えば、リコンビナーゼ）内で操作することができる。

【図４Ａ】二次腫瘍溶解性ウイルスの発現を制御する部位特異的組換えシステムの使用を示す。図４Ａは、ＦＬＰまたは別のリコンビナーゼによって切除され得る二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドのフレームシフト／終止コドンを挿入するスキームを示す。図４Ｂは、正しい向きに反転して活性にすることができる、不活性逆位プロモーターを示す。これらの手順は、腫瘍溶解性ウイルスではないウイルスを用いて実行されてもよい。

【図４Ｂ】二次腫瘍溶解性ウイルスの発現を制御する部位特異的組換えシステムの使用を示す。図４Ａは、ＦＬＰまたは別のリコンビナーゼによって切除され得る二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドのフレームシフト／終止コドンを挿入するスキームを示す。図４Ｂは、正しい向きに反転して活性にすることができる、不活性逆位プロモーターを示す。これらの手順は、腫瘍溶解性ウイルスではないウイルスを用いて実行されてもよい。

【図５】例示的な入れ子になった腫瘍溶解性ウイルス構築物を生成するために、一次腫瘍溶解性ウイルスゲノム内に挿入され得る構成要素の例示的な概略図を示す。ｒｔＴＡペプチドの発現は、構成的活性型プロモーターの制御下にあり、二次ウイルスゲノムの発現は、テトラサイクリン応答性（ＴｅｔＯｎ）Ｐｏｌ　ＩＩプロモーターの制御下にあり、その結果、ウイルスゲノムの転写は、ＴｅｔおよびｒｔＴＡペプチドの存在下で起こる。二次腫瘍溶解性ウイルス転写物の発現は、内部ＴｅｔＯｆｆ－リボザイム（ＴｅｔＯｆｆ－Ｒ）によってさらに制御され、その結果、転写物はＴｅｔの非存在下で分解される。さらに、二次ウイルス転写物は、５’および３’ＴｅｔＯｎ－リボザイム（ＴｅｔＯｎ－Ｒ）に

よって活性化され、その結果、ｍＲＮＡ転写物は、Ｔｅｔの存在下で５’および３’末端で処理される。これらの手順は、腫瘍溶解性ウイルスではないウイルスを用いて実行されてもよい。
【図６】例示的な入れ子になった腫瘍溶解性ウイルス構築物を生成するために、一次腫瘍溶解性ウイルスゲノム内に挿入され得る構成要素の例示的な概略図を示す。ｒｔＴＡおよびテトラサイクリントランス活性化因子（ｔＴＡ）ペプチドの発現は、構成的活性型プロモーターの制御下にある。二次ウイルスゲノムの発現は、ＴｅｔＯｎ　Ｐｏｌ　ＩＩプロモーターの制御下にあり、その結果、ウイルスゲノムの転写は、ＴｅｔおよびｒｔＴＡペプチドの存在下で起こる。二次腫瘍溶解性ウイルス転写物の発現は、二次ウイルスのｍＲＮＡ転写物中の標的配列に特異的なｓｈＲＮＡによってさらに調節される。ｓｈＲＮＡの発現は、ＴｅｔＯｆｆプロモーターの制御下にあるため、ｓｈＲＮＡの転写は、Ｔｅｔの非存在下およびｔＴＡペプチドの存在下で起こる。さらに、二次ウイルス転写物は、５’および３’ＴｅｔＯｎ－Ｒによって活性化され、その結果、ｍＲＮＡ転写物は、Ｔｅｔの存在下で５’および３’末端で処理される。これらの手順は、腫瘍溶解性ウイルスではないウイルスを用いて実行されてもよい。
【図７】例示的な入れ子になったウイルス構築物を生成するために、一次腫瘍溶解性ウイルスゲノム内に挿入される構成要素の例示的な概略図を示す。ｒｔＴＡおよびｔＴＡペプチドの発現は、構成的活性型プロモーターの制御下にある。二次ウイルスゲノムの発現は、ＴｅｔＯｎ　Ｐｏｌ　ＩＩプロモーターの制御下にあり、そのためウイルスゲノムの転写は、ＴｅｔおよびｒｔＴＡペプチドの存在下で起こる。二次腫瘍溶解性ウイルス転写物の発現は、二次ウイルスのｍＲＮＡ転写物中の標的配列に特異的なｓｈＲＮＡによってさらに調節される。ｓｈＲＮＡの発現は、ＴｅｔＯｆｆプロモーターの制御下にあるため、ｓｈＲＮＡの転写は、Ｔｅｔの非存在下およびｔＴＡペプチドの存在下で起こる。さらに、二次ウイルス転写物は、ＡｍｉＲＮＡ標的部位および３’ＴｅｔＯｎ－Ｒによる５’末端での切断によって活性化され、その結果、ｍＲＮＡ転写物がＴｅｔの存在下で５’末端で処理される。これらの手順は、腫瘍溶解性ウイルスではないウイルスを用いて実行されてもよい。
【図８】リコンビナーゼシステムの複数のレベルの制御を示す表である。Ｆｌｐは、ここでは非限定的な例示的なリコンビナーゼとして使用される。
【図９】ＳＴＯＰ要素を含む例示的なリコンビナーゼ応答性切除カセット（ＲＲＥＣ）を示す概略図である。
【図１０Ａ】ＳＴＯＰ要素を含む例示的なリコンビナーゼ応答性逆位カセット（ＲＲＩＣ）を示す概略図である。図１０Ａは、プロモーター領域およびＳＴＯＰ要素が、反転したテキストによって示されるように、最初の構築物において逆方向にあるプロモーター逆位設計を示す。図１０Ｂは、ペイロード分子をコードするｃＤＮＡが、反転したテキストによって示されるように、最初の構築物において逆方向にある、ペイロード逆位設計を示す。
【図１０Ｂ】ＳＴＯＰ要素を含む例示的なリコンビナーゼ応答性逆位カセット（ＲＲＩＣ）を示す概略図である。図１０Ａは、プロモーター領域およびＳＴＯＰ要素が、反転したテキストによって示されるように、最初の構築物において逆方向にあるプロモーター逆位設計を示す。図１０Ｂは、ペイロード分子をコードするｃＤＮＡが、反転したテキストによって示されるように、最初の構築物において逆方向にある、ペイロード逆位設計を示す。
【図１１】スプリットイントロン逆位設計と呼ばれる、イントロンを有するリコンビナーゼ応答性逆位カセット（ＲＲＩＣ）の例示的な設計を示す概略図である。逆位要素は、反転したテキストによって示される。
【図１２】ＭＮＤ－ＴｅｔＲ構築物およびＴｅｔ依存性プロモーターに作動可能に連結されたｍＣｈｅｒｒｙ－ＮＬｕｃレポーター遺伝子の構築物でトランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるレポーター遺伝子レベルを示す棒グラフである。
【図１３】様々な構築物でトランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるレポータ

ー遺伝子レベルを示す棒グラフである。
【図１４】示されるような３つの異なる構築物の組み合わせでトランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるレポーター遺伝子レベルを示す棒グラフである。
【図１５Ａ】任意選択のイントロン領域を有するＦｌｐ－ＥＲＴ２融合タンパク質構築物、および任意選択のＳＴＯＰカセットを有するｍＣｈｅｒｒｙ－ＮＬｕｃレポーター構築物でトランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるレポーター遺伝子レベルを示す棒グラフである。
【図１５Ｂ】イントロン領域および任意選択のｍＲＮＡ不安定化要素を有するＦｌｐ－ＥＲＴ２融合タンパク質構築物、ならびに示されるようなその他の構築物でトランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるレポーター遺伝子レベルを示す棒グラフである。
【図１６】指示された発現構築物でトランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるベースラインレポーター遺伝子レベルを示す棒グラフである。逆位要素は、反転したテキストによって示される。
【図１７】ドキシサイクリンおよび／または４ＯＨＴに応答して示された発現構築物でトランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるレポーター遺伝子レベルを示す棒グラフである。
【図１８】複数の制御要素を使用してレポーター遺伝子発現を調節するためのｐＤＥＳＴ１４ベースの発現構築物の設計を示す概略図である。挿入は、左から右に、ａｔｔＢ１、ＳＶ４０　ｐＡ、ＭＮＤ－ＴｅｔＲ（逆方向）、ＨＢＰ１－ＴＯ－ＦＥＸＰｉ２、ＡＣＴＢポリＡ、ａｔｔＢ５、ＧＡＰＤＨポリＡ、ＣＭＶ－ＮＬｕｃＰ（逆方向）、ＨＢＰ２－ＴＯ－ＳＴＯＰ３－ｍＣｈｅｒｒｙ－Ｆｌｕｃ、ｂＧＨポリＡ、ａｔｔＢ２を含む。
【図１９】ＯＮＣＲ２２２ｂベクターベースの二重（ｄｕａｌ）腫瘍溶解性ウイルスベクターの設計を示す概略図である。１４．１ｋｂの挿入は、左から右に、ａｔｔＢ１、ＳＶ４０　ｐＡ、ＭＮＤ－ＴｅｔＲ（逆方向）、ＨＢＰ１－ＴＯ－ＦＥＸＰｉ２、ＡＣＴＢポリＡ、ａｔｔＢ５、ＧＡＰＤＨポリＡ、ＣＭＶ（逆方向）、ＨＢＰ２－ＴＯ－ＳＴＯＰ３－ＳＶＶ－ｍＣｈｅｒｒｙ、ｂＧＨポリＡ、ａｔｔＢ２を含む。組換えＨＳＶは、その糖タンパク質ＢにおけるＤ２８５ＮおよびＡ５４９Ｔ変異（ｇＢ：Ｎ／Ｔ）、ＩＣＰ２７におけるＴ１２８、Ｔ２１９ａ、およびＴ１２２　ｍｉＲ標的配列、ジョイント領域の欠失、ＵＳ１２変異、ＩＣＰ４におけるＴ１２４、Ｔ１およびＴ１４３　ｍｉＲ標的配列、ならびにＩＣＰ３４．５におけるＴ１２８、Ｔ２０４およびＴ２１９　ｍｉＲ標的配列を含む。
【図２０Ａ】指示された二重腫瘍溶解性ウイルスベクターでＮＣＩ－Ｈ１２９９細胞を感染させた後の、経時的なＨＳＶのウイルス力価を示すグラフである。
【図２０Ｂ】示された二重腫瘍溶解性ウイルスベクターでＮＣＩ－Ｈ１２９９細胞を感染させた後の、経時的なＳＶＶのウイルス力価を示すグラフである。
【図２１】ＨＳＶ－１ウイルスゲノムに挿入されたＳＶＶウイルスゲノムを有する二重腫瘍溶解性ウイルスベクターの設計を示す概略図である。組換えＨＳＶは、その糖タンパク質ＢにおけるＤ２８５ＮおよびＡ５４９Ｔ変異（ｇＢ：Ｎ／Ｔ）、ＵＬ３７変異、ジョイント領域の欠失、ＵＳ１２変異、ならびにＩＣＰ４におけるＴ１２４、Ｔ１およびＴ１４３　ｍｉＲ標的配列を含む。
【図２２】Ｖｅｒｏ細胞またはＨ１２９９細胞におけるＯＮＣＲ－１８９ウイルスまたはＯＮＣＲ－１９０ウイルスによるウイルス感染の１０倍段階希釈を示す一連の画像化図である。
【図２３】Ｈ１２９９細胞におけるＯＮＣＲ－１８９ウイルスおよびＯＮＣＲ－１９０ウイルスによるウイルス感染の１０倍段階希釈を示す一連の画像化図である。
【図２４Ａ】Ｈ４４６細胞のＯＮＣＲ－１８９およびＯＮＣＲ－１９０ウイルス感染のＩＣ５０力価アッセイを示す一連のグラフである。
【図２４Ｂ】図２４Ａに示す実験に従って計算されたＩＣ５０値を示す表である。
【図２５】トランスフェクトまたは感染したＨ１２９９細胞におけるＳＶＶ　ＲＮＡコピー数を測定するｑＰＣＲアッセイを示す棒グラフである。

【図２６Ａ】腫瘍溶解性ウイルスで処理されたＮＣＩ－Ｈ１２９９異種移植マウスの経時的な腫瘍体積の変化を示すグラフである。
【図２６Ｂ】同じ実験での体重の変化を示すグラフである。
【図２７】ＨＥＫ２９３細胞における対照ＴｅｔＯｆｆアプタザイムの制御下でのｍＣｈｅｒｒｙの発現レベルを評価するアレイスキャンニングサイトメトリーアッセイを示す棒グラフである。
【図２８】二重ウイルスの様々な構成要素の設計を示す概略図である。いくつかの実施形態では、二重ウイルスは、二重腫瘍溶解性ウイルスである。斜体文字および／または破線はすべて、任意選択の構成要素を示す。例えば、任意選択のＲＮＡｉ標的配列を、図に示されるポリヌクレオチドのコード領域および／または非コード領域に挿入して、ＲＮＡｉを介した対応するＲＮＡ転写物の発現レベルおよび／または安定性を制御してもよく、任意選択のリコンビナーゼ応答性カセットを、図に示されるポリヌクレオチドに挿入して、リコンビナーゼの存在に応答して標的ＲＮＡ発現の制御を可能にすることができる。
【発明を実施するための形態】
【００５１】
本明細書で使用されるセクション見出しは、組織的な目的のみを目的としており、記載された主題を限定するものとして解釈されるべきではない。特許、特許出願、記事、書籍、および論文を含むがこれらに限定されない、本明細書に引用されるすべての文書または文書の一部は、任意の目的のために参照によりその全体が明示的に本明細書に組み込まれる。組み込まれた文書または文書の一部の１つ以上が、本出願におけるその用語の定義と矛盾する用語を定義している場合、本願に記載された定義が優先される。しかしながら、本明細書に引用される任意の参考文献、記事、刊行物、特許、特許公開、および特許出願についての言及は、有効な先行技術を構成する、または世界の任意の国で共通の一般知識の一部を形成するという認識または任意の形態の提案とはみなされず、またはみなされるべきものではない。
【００５２】
定義
本出願で使用される場合、用語「約」および「およそ」は、等価物として使用される。約／およその有無に関わらず、本出願で使用される任意の数字は、当業者によって認識される任意の通常の変動をカバーすることを意味する。特定の実施形態では、用語「およそ」または「約」は、別段の記載がない限り、または文脈から明らかでない限り、記載される参照値のいずれかの方向（より高いまたは低い）で２５％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％またはそれ以下の範囲内に値の範囲を指す（このような値が１００％を超える可能性がある場合を除く）。
【００５３】
「投与」とは、本明細書では、薬剤または組成物を対象に導入することを指す。
【００５４】
「相補的」は、塩基のスタッキングおよび特定の水素結合を介して、天然または非天然の塩基またはその類似体を含む２つの配列間の対合能力を指す。例えば、核酸のある位置の塩基が、標的の対応する位置の塩基と水素結合することができる場合、塩基は、その位置で互いに相補的であるとみなされる。核酸は、ユニバーサル塩基、または水素結合に対するプラスのまたはマイナスの寄与をもたらさない不活性な非塩基性スペーサーを含み得る。塩基対は、標準的なワトソン・クリック塩基対および非ワトソン・クリック塩基対（例えば、ゆらぎ塩基対およびフーグスティーン塩基対）の両方を含み得る。相補的塩基対については、アデノシン型塩基（Ａ）は、チミジン型塩基（Ｔ）またはウラシル型塩基（Ｕ）に対して相補的であり、シトシン型塩基（Ｃ）はグアノシン型塩基（Ｇ）に対して相補的であり、ならびに３－ニトロピロールや５－ニトロインドールなどのユニバーサル塩基は、任意のＡ、Ｃ、Ｕ、またはＴにハイブリダイズでき、相補的であるとみなされることが理解される。Ｎｉｃｈｏｌｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，１９９４；３６９：４

９２－４９３およびＬｏａｋｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，１９９４；２２：４０３９－４０４３。イノシン（Ｉ）はまた、当技術分野では、ユニバーサル塩基であるとみなされており、任意のＡ、Ｃ、Ｕ、またはＴに対し相補的であるとみなされている。Ｗａｔｋｉｎｓ　ａｎｄ　ＳａｎｔａＬｕｃｉａ，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２００５；３３（１９）：６２５８－６２６７を参照されたい。

【００５５】

用語「有効量」は、特定の生理学的効果をもたらす薬剤または組成物の量（例えば、特定の生理学的効果を増加、活性化、および／または増強することができる量）を指す。特定の薬剤の有効量は、薬剤の性質に基づいて様々な方法で表すことができ、例えば、質量／体積、細胞数／体積、粒子／体積、（薬剤の質量）／（対象の質量）、細胞数／（対象の質量）、または粒子／（対象の質量）などである。特定の薬剤の有効量はまた、参照レベルと最大応答レベルの中間である特定の生理学的応答の大きさをもたらす薬剤の濃度を指す、５０％最大有効濃度（$ＥＣ_{５０}$）として表されてもよい。

【００５６】

用語「腫瘍溶解性ウイルス」は、がん細胞に優先的に感染するように改変された、または自然に優先的に感染するウイルスを指す。

【００５７】

用語「薬学的に許容される」は、対象に投与されたときに、アレルギー性反応または類似の有害な反応を生じない分子実体および組成物を指す。

【００５８】

用語「複製能力を有するウイルス」は、宿主細胞中で複製し、感染性ウイルス粒子を産生することができるウイルスを指す。

【００５９】

用語「配列同一性」は、同じであり、かつ同じ相対位置にある２つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の間の塩基またはアミノ酸のパーセンテージを指す。このように、あるポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列は、別のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列と比較して、特定のパーセンテージの配列同一性を有する。配列比較については、通常、１つの配列が参照配列として作用し、それに対して試験配列が比較される。用語「参照配列」は、試験配列が比較される分子を指す。

【００６０】

用語「対象」は、例えば霊長類およびヒトを含む哺乳動物などの動物を含む。この用語は、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ブタなどの家畜、イヌおよびネコなどの飼育動物、齧歯類（例えば、マウス、ラット、ハムスター）、ウサギ、霊長類、または近交系ブタなどのブタなどの研究動物を含む。

【００６１】

本明細書で使用される場合、「治療する」とは、生理学的転帰に影響を及ぼすために、薬剤または組成物を対象に送達することを指す。

【００６２】

用語「ベクター」は、本明細書において、別の核酸分子を移動または輸送することができる核酸分子を指すために使用される。

【００６３】

分子および細胞生化学の一般的な方法は、以下のような標準的な教科書から見出すことができ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，3ｒｄ　Ｅｄ．（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，ＨａＲＢｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ　２００１）、Ｓｈｏｒｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，4ｔｈ　Ｅｄ．（Ａｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．ｅｄｓ．，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ　１９９９）、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｍｅｔｈｏｄｓ（Ｂｏｌｌａｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ　１９９６）、Ｎｏｎｖｉｒａｌ　Ｖｅｃｔｏｒｓ　ｆｏｒ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ（Ｗａｇｎｅｒ　ｅ

ｔ ａｌ．ｅｄｓ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ １９９９）、Ｖｉｒａｌ Ｖｅｃｔｏｒｓ （Ｋａｐｌｉｆｔ ＆ Ｌｏｅｗｙ ｅｄｓ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ １９９５）、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍａｎｕａｌ （Ｉ．Ｌｅｆｋｏｖｉｔｓ ｅｄ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ １９９７）、およびＣｅｌｌ ａｎｄ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ： Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｏｃｅｄｕｒｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｄｏｙｌｅ ＆ Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ １９９８）、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【００６４】

用語「作動可能に連結された」は、目的遺伝子のコード配列またはウイルスゲノムなどの第２の転写可能ポリヌクレオチド分子と接続されたプロモーターなどの第１のポリヌクレオチド分子で、第１のポリヌクレオチド分子が第２のポリヌクレオチド分子の機能に影響を及ぼすようにポリヌクレオチド分子が配置されていることを指す。２つのポリヌクレオチド分子は、単一の連続するポリヌクレオチド分子の一部であってもよく、隣接していてもよい。しかしながら、ポリヌクレオチド分子は、作動可能に連結するために連続的である必要はない。いくつかの実施形態では、用語「作動可能に連結された」はまた、組換え（例えば、リコンビナーゼによって媒介される）後に作動可能に連結されたが、初期配列では作動可能に連結されていない２つのポリヌクレオチド分子を指す。

【００６５】

二重ウイルス

本開示全体を通して、すべての小見出しおよびすべてのセクションを含め、腫瘍溶解性ウイルス（例えば、二重腫瘍溶解性ウイルス）について提供される本開示および実施形態は、腫瘍溶解性ウイルス以外のウイルスに適用され得る。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスではないウイルスは、非腫瘍溶解性ウイルスであってもよい。

【００６６】

本開示のいくつかの実施形態では、一次ウイルスは、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む。こうした実施形態は、ウイルス構築物が、宿主細胞に導入されたときに、同じ構築物から２つの異なる腫瘍溶解性ウイルスを産生することができるため、本明細書では、「二重ウイルス」または「二重ウイルス構築物」と称される。

【００６７】

悪性腫瘍のウイルス治療との関連において、全体的な目的は、腫瘍細胞溶解による腫瘍特異的免疫応答の促進である。効果的なウイルス療法には、宿主における抗腫瘍免疫応答を刺激するのに十分な免疫原性および、腫瘍細胞の溶解を媒介するのに十分な毒性を有するウイルスが必要である。同時に、ウイルスの免疫原性および毒性は、ウイルス自体に対する宿主免疫応答をリダイレクトし、それによって抗腫瘍免疫応答および腫瘍細胞溶解の発生を制限し、代わりにウイルスクリアランスをもたらし得る。そのため、抗腫瘍免疫を促進し、抗ウイルス免疫を抑制することができるウイルスに対する当技術分野での認識されたニーズがある。いくつかの実施形態では、本開示は、悪性がんの治療のための二重ウイルスを提供する。

【００６８】

同様の免疫原性および／または毒性の問題が、ワクチンまたは遺伝子治療などの他の用途におけるウイルスに対しても存在し得る。いくつかの実施形態では、本開示は、本開示の二重ウイルスを含むワクチン組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、遺伝子療法ベクターとして本開示の二重ウイルスを提供する。

【００６９】

本開示のいくつかの実施形態において、一次ウイルスは、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む（すなわち、二重ウイルス）。本明細書に記載される二重ウイルスは、１つのウイルスベクターから２つの異なるウイルス、すなわち一次ウイルスおよび二次ウイルスの産生を可能にする。いくつかの実施形態では、一次および／または二次ウイルスの発現は誘導性であり、一次および／または二次ウイルスの発現を時間的制御するこ

とができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される二重ウイルスは、宿主におけるウイルスの持続性を促進し、腫瘍細胞のウイルス溶解の増加、および腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の発達の増強を可能にする。

【００７０】

二重腫瘍溶解性ウイルス

いくつかの実施形態では、本開示は、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む一次腫瘍溶解性ウイルスを提供する。こうした実施形態は、ウイルス構築物が、宿主細胞に導入されたときに、同じ構築物から２つの異なる腫瘍溶解性ウイルスを産生することができるため、本明細書では、「二重腫瘍溶解性ウイルス」または「二重腫瘍溶解性ウイルス構築物」と称される。

【００７１】

悪性腫瘍のウイルス治療との関連において、全体的な目的は、腫瘍細胞溶解による腫瘍特異的免疫応答の促進である。効果的な腫瘍溶解性ウイルス療法には、宿主における抗腫瘍免疫応答を刺激するのに十分な免疫原性および、腫瘍細胞の溶解を媒介するのに十分な毒性を有するウイルスが必要である。同時に、ウイルスの免疫原性および毒性は、ウイルス自体に対する宿主免疫応答をリダイレクトし、それによって抗腫瘍免疫応答および腫瘍細胞溶解の発生を制限し、代わりにウイルスクリアランスをもたらし得る（Ｉｋｅｄａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ（１９９９）５：８；８８１－８８７）。そのため、抗腫瘍免疫を促進し、抗ウイルス免疫を抑制することができる腫瘍溶解性ウイルスに対する当技術分野での認識されたニーズがある（例えば、Ａｕｒｅｌｉａｎ，Ｏｎｃｏ　Ｔａｒｇｅｔｓ　Ｔｈｅｒ（２０１６）９；２６２７－２６３７を参照されたい）。

【００７２】

いくつかの実施形態では、本開示は、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む、一次腫瘍溶解性ウイルス（すなわち、二重性腫瘍溶解性ウイルス）を提供する。本明細書に記載される二重腫瘍溶解性ウイルスは、１つのウイルスベクターから２つの異なる腫瘍溶解性ウイルス、すなわち一次腫瘍溶解性ウイルスおよび二次腫瘍溶解性ウイルスの産生を可能にする。いくつかの実施形態では、一次および／または二次ウイルスの発現は誘導性であり、一次および／または二次ウイルスの発現を時間的制御することができる。このプロセスの例示的な図を図１に示す。簡潔に述べると、図１Ａに示される二重腫瘍溶解性ウイルスの投与は、一次腫瘍溶解性ウイルス（ｏＶ１）の初期発現および腫瘍細胞のウイルス溶解をもたらす（図１Ｂ、黒線）。ｏＶ１によって媒介される腫瘍細胞溶解は、腫瘍ネオ抗原の放出および腫瘍抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞の発達をもたらし、腫瘍細胞のさらなる免疫細胞介在性溶解をもたらす（図１Ｂ、灰色の破線）。ｏＶ１（図１Ａ）のゲノムに挿入されたポリヌクレオチドからの二次腫瘍溶解性ウイルス（ｏＶ２）の転写は、ｏＶ２の発現をもたらし、ｏＶ２によって媒介される腫瘍細胞溶解は、腫瘍抗原の第２の放出をもたらし、抗腫瘍ＣＤ８＋Ｔ細胞の既存の集団に抗原ブーストをもたらす。ｏＶ２の転写および発現は、任意選択的に、誘導剤の投与または阻害剤の除去によって誘導され得る。ｏＶ１とｏＶ２はウイルスが異なるため、一方に対して生成された抗ウイルス免疫応答は他方に対して効果的ではなく、それによってウイルス抗原に対する免疫応答のリダイレクトを軽減する。したがって、本明細書に記載される二重腫瘍溶解性ウイルスは、宿主におけるウイルスの持続性を促進し、腫瘍細胞のウイルス溶解の増加、および腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の発達の増強を可能にする。

【００７３】

投与

いくつかの実施形態では、二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスの投与は、腫瘍細胞または腫瘍抗原に対する特異的免疫反応を促進する。いくつかの実施形態では、二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスの投与は、一次腫瘍溶解性ウイルスもしくは一次ウイルスのみを投与するか、または二次腫瘍溶解性ウイルスもしくは二次ウイルスのみを投与する場合と比較して、対象における腫瘍細胞のより特異的な殺滅をもたらす。いくつ

かの実施形態では、腫瘍に対する一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスおよび二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの感染は、感染の結果として放出される共通の腫瘍抗原への免疫反応を集中させることにつながる。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルス、および二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの感染は、腫瘍細胞または腫瘍抗原に対する優先的または特異的な宿主免疫につながる。

【００７４】

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスのみまたは二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのみの投与によって殺滅される腫瘍細胞の数と比較して、二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスの投与によってより多くの数の腫瘍細胞が殺滅される。いくつかの実施形態では、同じ量／用量の一次腫瘍溶解性ウイルスもしくは一次ウイルスのみまたは二次腫瘍溶解性ウイルスもしくは二次ウイルスのみの投与によって殺滅される腫瘍細胞の数と比較して、少なくとも１０％多い、少なくとも２０％多い、少なくとも３０％多い、少なくとも５０％多い、少なくとも１００％多い、少なくとも２００％多い、または少なくとも５００％多い腫瘍細胞が、二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスの投与によって殺滅される。いくつかの実施形態では、二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスの投与は、いずれかのウイルスのみの投与と比較して、腫瘍サイズのより大幅な縮小につながる（またはどちらのウイルスのみでも腫瘍サイズを縮小することができない状況で、腫瘍サイズを縮小させる）。いくつかの実施形態では、二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスの投与は、いずれかのウイルスのみの投与と比較して、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％のさらなる腫瘍サイズの縮小につながる。

【００７５】

いくつかの実施形態では、対象における本開示の二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスの投与は、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスのみを投与するか、または二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのみを投与することと比較して、対象における１つ以上の腫瘍抗原に対するより強力な免疫応答をもたらす。いくつかの実施形態では、免疫応答は、１つ以上の腫瘍関連抗原に特異的な免疫細胞（例えば、ＣＤ４＋および／またはＣＤ８＋Ｔ細胞）の数によって測定される。いくつかの実施形態では、対象における二重腫瘍溶解性ウイルスまたは本開示の二重ウイルスの投与は、一次腫瘍溶解性ウイルスもしくは一次ウイルスのみを投与するかまたは二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルス単独のみを投与することと比較して、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも５０％、少なくとも１００％、少なくとも２００％、または少なくとも５００％多い、１つ以上の腫瘍関連抗原に特異的な免疫細胞（例えば、ＣＤ４＋および／またはＣＤ８＋Ｔ細胞）をもたらす。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、ＣＤ４＋Ｔ細胞である。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、ＣＤ８＋Ｔ細胞である。

【００７６】

いくつかの実施形態では、対象における本開示の二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスの投与は、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスのみを投与することと比較して、対象における一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスに対する免疫応答の低下をもたらす。いくつかの実施形態では、免疫応答は、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスの１つ以上の抗原に特異的な免疫細胞（例えば、ＣＤ４＋および／またはＣＤ８＋Ｔ細胞）の数によって測定される。いくつかの実施形態では、免疫応答は、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスの１つ以上の抗原に特異的な抗体のレベルによって測定される。いくつかの実施形態では、免疫応答は、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスのみを投与することと比較して、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％低下する。

【００７７】

いくつかの実施形態では、対象における本開示の二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウ

イルスの投与は、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのみを投与することと比較して、対象における二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスに対する免疫応答の低下をもたらす。いくつかの実施形態では、免疫応答は、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの１つ以上の抗原に特異的な免疫細胞（例えば、ＣＤ４＋および／またはＣＤ８＋Ｔ細胞）の数によって測定される。いくつかの実施形態では、免疫応答は、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの１つ以上の抗原に特異的な抗体のレベルによって測定される。いくつかの実施形態では、免疫応答は、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのみを投与ことと比較して、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％低下する。いくつかの実施形態では、対象における本開示の二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスの投与は、対象における二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスに対する免疫反応を誘導しない。

【００７８】

いくつかの実施形態では、対象における本開示の二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスの投与は、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスのみを投与することと比較して、対象における一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスのより持続的な産生をもたらす。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスの持続的な産生は、血液循環中または腫瘍部位における一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスのレベルによって測定される。いくつかの実施形態では、二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスの投与は、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスのみを投与することと比較して、血液循環または腫瘍部位において、例えば、少なくとも１０％長く、少なくとも２０％長く、少なくとも３０％長く、少なくとも５０％長く、少なくとも１００％長く、少なくとも２００％長く、または少なくとも５００％長く、検出可能なレベルの一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスをもたらす。

【００７９】

いくつかの実施形態では、対象における本開示の二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスの投与は、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのみを投与することと比較して、対象における二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのより持続的な産生をもたらす。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの持続的な産生は、血液循環中または腫瘍部位における二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのレベルによって測定される。いくつかの実施形態では、二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスの投与は、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのみを投与することと比較して、血液循環または腫瘍部位において、例えば、少なくとも１０％長く、少なくとも２０％長く、少なくとも３０％長く、少なくとも５０％長く、少なくとも１００％長く、少なくとも２００％長く、または少なくとも５００％長く、検出可能なレベルの二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをもたらす。

【００８０】

いくつかの実施形態では、対象における本開示の二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスの投与は、一次腫瘍溶解性ウイルスもしくは一次ウイルスのみ、または二次腫瘍溶解性ウイルスもしくは二次ウイルスのみを投与することと比較して、対象における長期間の腫瘍阻止をもたらす。いくつかの実施形態では、腫瘍阻止の期間は、無増悪期間である。いくつかの実施形態では、腫瘍阻止の期間は、腫瘍のない期間である。いくつかの実施形態では、腫瘍阻止の期間は、ウイルス投与の開始からがん寛解までの時間である。いくつかの実施形態では、腫瘍阻止の期間は、無転移期間である。いくつかの実施形態では、腫瘍阻止の期間は、腫瘍が腫瘍溶解性ウイルスまたはウイルスの投与直前（腫瘍溶解性ウイルス治療またはウイルス治療による腫瘍縮小期間の後）にその初期サイズに成長するまでの時間である。いくつかの実施形態では、二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスの投与は、一次腫瘍溶解性ウイルスもしくは一次ウイルスのみまたは二次腫瘍溶解性ウイルスもしくは二次ウイルスのみを投与することと比較して、少なくとも１０％長い、少なくとも２０％長い、少なくとも３０％長い、少なくとも５０％長い、少なくとも１００％

長い、少なくとも２００％長い、少なくとも５００％長い、または少なくとも１０００％長い腫瘍阻止期間をもたらす。

【００８１】

いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの産生は、外因性薬剤によって調節される。いくつかの実施形態では、外因性薬剤による調節は、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの産生の空間的および／または時間的制御を提供する。いくつかの実施形態では、外因性薬剤は、ペプチド、ホルモン、または小分子である。いくつかの実施形態では、外因性薬剤はリガンドである。いくつかの実施形態では、外因性薬剤は、プロモーター、リボザイム、またはＲＮＡｉの活性を調節することによって、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの産生を調節する。例えば、テトラサイクリン／ドキシサイクリンは、Ｔｅｔ－ＯｎもしくはＴｅｔ－ＯＦＦプロモーターおよび／またはリボザイムのための例示的な外因性薬剤である。いくつかの実施形態では、外因性薬剤は、リコンビナーゼの活性を調節することによって、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの産生を調節する。例えば、４－ヒドロキシタモキシフェンは、リコンビナーゼに融合されたエストロゲン受容体（ＥＲ）の改変リガンド結合ドメインを介してリコンビナーゼの活性／細胞内局在を調節できる例示的な外因性である。

【００８２】

いくつかの実施形態では、外因性薬剤は全身的に投与される。いくつかの実施形態では、外因性剤は、局所的に、例えば腫瘍内投与される。いくつかの実施形態では、本開示は、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの産生を調節するために外因性薬剤を投与する方法を提供する。いくつかの実施形態では、外因性薬剤の存在は、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの産生を阻害する。いくつかの実施形態では、外因性薬剤の存在は、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの産生を誘導する。いくつかの実施形態では、外因性薬剤の投与前に、対象において二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、不検出である。いくつかの実施形態では、外因性薬剤は、二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスの投与とほぼ同時に、またはそれ以前に投与される。いくつかの実施形態では、外因性薬剤は、二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスの投与後に投与される。いくつかの実施形態では、外因性薬剤は、二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスの投与の少なくとも１時間後、少なくとも３時間後、少なくとも６時間後、少なくとも１２時間後、または少なくとも２４時間後に投与される。いくつかの実施形態では、外因性薬剤は、二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスの投与の少なくとも２日後、少なくとも３日後、少なくとも４日後、少なくとも５日後、少なくとも６日後、少なくとも１週間後、少なくとも２週間後、少なくとも１か月後、少なくとも２か月後、少なくとも３か月後、または少なくとも６か月後に投与される。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスと二次ウイルスの感染は、時間的に分離される。いくつかの実施形態では、一次および二次腫瘍溶解性ウイルス、または一次および二次ウイルスの時間的に分離された感染は、腫瘍細胞および／または腫瘍抗原への免疫反応の集中をもたらす。

【００８３】

いくつかの実施形態では、本開示の二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスの投与は、一次腫瘍溶解性ウイルスもしくは一次ウイルスのみ、または二次腫瘍溶解性ウイルスもしくは二次ウイルスのみを投与する場合と比較して、より多くの細胞タイプのウイルス感染を可能にする。いくつかの実施形態では、二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスに感染した少なくとも１つの細胞タイプは、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスのみ、または二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのみに対して耐性がある。いくつかの実施形態では、二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスに感染した少なくとも１つの細胞タイプは、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスのみに対して耐性がある。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスもしくは一次ウイルスのみ、または二次腫瘍溶解性ウイルスもしくは二次ウイルスのみに耐性のある細胞タイプは、骨髄細胞、マクロファージ、または線維芽細胞である。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶

解性ウイルスまたは一次ウイルスのみ、または二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのみに耐性のある細胞タイプは、免疫阻害に寄与する。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスのみ、または二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのみに耐性の細胞タイプは、腫瘍阻止に寄与する。

【００８４】

いくつかの実施形態では、本開示の「一次腫瘍溶解性ウイルスのみ」は、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含まない（すなわち、二重腫瘍溶解性ウイルスではない）参照一次腫瘍溶解性ウイルスを指す。いくつかの実施形態では、本開示の「一次ウイルスのみ」は、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含まない（すなわち、二重ウイルスではない）参照一次ウイルスを指す。

【００８５】

改変二重ウイルスおよび改変二重腫瘍溶解性ウイルス

いくつかの実施形態では、本開示は、シュードタイプであるか、または別の方法で操作されたウイルス（例えば、一次ウイルスおよび／または二次ウイルス）を提供する。いくつかの実施形態では、ウイルスは、シュードタイプであるか、または別の方法で操作された、一次腫瘍溶解性ウイルスおよび／または二次腫瘍溶解性ウイルスである。

【００８６】

本開示のいくつかの実施形態では、「シュードタイプウイルス」は、１つ以上のウイルスコートタンパク質（例えば、エンベロープタンパク質）が置換または改変されたウイルスを指す。いくつかの実施形態では、シュードタイプウイルスは、対応する非シュードタイプウイルスが感染することができない細胞または組織型に感染することができる。いくつかの実施形態では、シュードタイプウイルスは、非シュードタイプウイルスと比較して、細胞または組織型に優先的に感染することができる。いくつかの実施形態では、シュードタイプウイルスのウイルス粒子（例えば、エンベロープまたはキャプシド）の一部分は、異種ウイルスに由来するウイルスタンパク質または非ウイルスタンパク質などの異種タンパク質を含む。非ウイルスタンパク質には、抗体およびその抗原結合断片が含まれ得る。いくつかの実施形態では、シュードタイプウイルスは、ｉ）非シュードタイプウイルスと比較して指向性を変化させる能力、および／またはｉｉ）非有益な効果の低減または除去能力を有する。いくつかの実施形態では、シュードタイプウイルスは、非シュードタイプウイルスと比較して、非腫瘍細胞または非腫瘍組織の毒性の低下または感染の低下を示す。

【００８７】

一般的に、ウイルスは、最も効率的に感染する天然の宿主細胞集団を有する。例えば、レトロウイルスは、天然の宿主細胞の範囲が限定されている一方、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルスは、比較的より広範な宿主細胞に効率的に感染することができるが、一部の細胞型は、これらのウイルスによる感染に対して抵抗性がある。ウイルスの表面上のタンパク質（例えば、エンベロープタンパク質またはキャプシドタンパク質）は、感受性宿主細胞への付着および侵入を瞑想し、それによってウイルスの指向性、すなわち、特定の細胞または組織型に感染する特定のウイルスの能力を決定する。いくつかの実施形態では、本開示のウイルスは、ウイルスの表面上に単一のタイプのタンパク質を含む。例えば、レトロウイルスおよびアデノ関連ウイルスは、その膜をコーティングする単一のタンパク質を有する。いくつかの実施形態では、本開示のウイルスは、ウイルスの表面上に複数のタイプのタンパク質を含む。例えば、アデノウイルスは、エンベロープタンパク質と、ウイルスの表面から離れて延びる線維の両方とで被覆される。

【００８８】

いくつかの実施形態では、ウイルスの表面上のタンパク質は、ヘパリン硫酸などの細胞表面分子に結合し、それによってウイルスを潜在的な宿主細胞の表面へ局在化させることができる。ウイルスの表面上のタンパク質はまた、ウイルスの侵入を媒介するために、ウイルスタンパク質の構造変化を誘導する宿主細胞上に発現された特定のタンパク質受容体とウイルスとの間の相互作用を媒介することができる。いくつかの実施形態では、ウイル

ス表面上のタンパク質と細胞受容体との間の相互作用は、エンドソームへのウイルス内部移行を促進し得、エンドソーム内腔の酸性化は、ウイルス被膜のリフォールディングを誘導する。いくつかの実施形態では、潜在的な宿主細胞へのウイルスの侵入は、ウイルスの表面上の少なくとも１つの分子と細胞の表面上の少なくとも１つの分子との間の好ましい相互作用を必要とする。

【００８９】

いくつかの実施形態では、本開示のウイルスは、ウイルスコート（例えば、ウイルスエンベロープまたはウイルスキャプシド）を含み、ウイルスコートの表面上に存在するタンパク質（例えば、ウイルスエンベロープタンパク質またはウイルスキャプシドタンパク質）は、ウイルス侵入のための潜在的標的細胞の認識を調節する。いくつかの実施形態では、ウイルスによる侵入の可能性のある標的細胞を決定するこのプロセスは、宿主指向性と呼ばれる。いくつかの実施形態では、宿主指向性は、受容体のウイルス認識が細胞レベルで発生する、細胞指向性であり、または細胞受容体のウイルス認識が組織レベルで発生する組織指向性である。いくつかの実施形態では、ウイルスのウイルスコートは、単一のタイプの細胞上に存在する受容体を認識する。いくつかの実施形態では、ウイルスのウイルスコートは、複数の細胞型（例えば、２、３、４、５、６またはそれ以上の異なる細胞型）上に存在する受容体を認識する。いくつかの実施形態では、ウイルスのウイルスコートは、単一のタイプの組織上に存在する受容体を認識する。いくつかの実施形態では、ウイルスのウイルスコートは、複数の組織型（例えば、２、３、４、５、６またはそれ以上の異なる組織型）上に存在する細胞受容体を認識する。

【００９０】

いくつかの実施形態では、本開示のシュードタイプウイルスは、特定の細胞または組織型へのウイルスの侵入を促進するために、異なるウイルスからの表面タンパク質を組み込むように改変されたウイルスコートを含む。いくつかの実施形態では、シュードタイプウイルスは、第１のウイルスのウイルスコートが第２のウイルスコートと交換されるウイルスコートを含み、二次ウイルスのウイルスコートがシュードタイプウイルスが特定の細胞または組織型に感染することを可能にする。いくつかの実施形態では、ウイルスコートは、ウイルスエンベロープを含む。いくつかの実施形態では、ウイルスエンベロープは、リン脂質二重層と、宿主膜から得られたタンパク質などのタンパク質とで構成されている。いくつかの実施形態では、ウイルスエンベロープは、宿主細胞によって発現される受容体の認識および付着のための糖タンパク質をさらに含む。いくつかの実施形態では、ウイルスコートはキャプシドを含む。場合によっては、カプシドは、プロトマーと呼ばれるオリゴマータンパク質サブユニットから組み立てられる。いくつかの実施形態では、キャプシドは、１種類のプロトマーまたはタンパク質から組み立てられるか、または２、３、４、もしくはそれ以上の種類のプロトマーまたはタンパク質から組み立てられる。

【００９１】

いくつかの実施形態では、療法（例えば、がん療法）の目的のために、本開示のウイルスによる形質導入に感受性のある細胞の範囲を制限または拡大することが有利である。この目的のために、内在性ウイルスコートタンパク質（例えば、ウイルスエンベロープタンパク質またはキャプシドタンパク質）が、他のウイルス由来のウイルスコートタンパク質またはキメラタンパク質によって置換された、多くのウイルスが開発されてきた。いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、ビリオンへの組み込みに必要なウイルスタンパク質の一部、ならびに標的化部分などの特定の宿主細胞タンパク質と相互作用するよう設計されたタンパク質または核酸からなる。

【００９２】

いくつかの実施形態では、本開示のシュードタイプウイルスは、ウイルス指向性を制限または制御するために（すなわち、シュードタイプウイルスが感染することができる細胞または組織型の数を減少させるために）シュードタイプ化されている。指向性を制限するために採用されたほとんどの戦略は、抗体断片に連結したキメラウイルスコートタンパク質（例えば、エンベロープタンパク質）を使用している。これらのウイルスは、治療法（

例えば、がん療法）の開発に大いに期待できる。いくつかの実施形態では、本開示のシュードタイプウイルスは、ウイルス指向性を拡大するために（すなわち、シュードタイプウイルスが感染することができる細胞または組織型の数を増やすために）シュードタイプ化されている。ウイルス（例えば、エンベロープウイルス）の細胞指向性を拡大する一つの機構は、表現型混合粒子またはシュードタイプの形成によって、２つ以上のウイルスに感染した細胞において、ウイルスの組み立て中に通常に生じるプロセスである。例えば、ヒト免疫不全ウイルス１型（ＨＩＶ－１）である。ＨＩＶ１は、適切な補助受容体とともにＣＣＲ４を発現する細胞に感染する。しかしながら、ＨＩＶ１は、表現型混合を介して異種糖タンパク質（ＧＰ）を組み込むことによってシュードタイプを形成し、その結果、ＣＤ４受容体および／または適切な補助受容体を発現しない細胞にウイルスが感染し、それによってウイルスの指向性が拡大する。いくつかの研究により、異種指向性マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）、両種指向性ＭＬＶ、または単純ヘルペスウイルスに感染した細胞で産生された野生型ＨＩＶ－１は、宿主範囲が拡大した表現型混合ビリオンを生じさせ、シュードタイプビリオンが産生されたことを示すことが示されている。ウイルスＧＰの表現型混合は、同時感染細胞培養においてＨＩＶ－１とＶＳＶの間でも起こることが示されている。これらの初期の観察は、異種ＧＰを有するＨＩＶ－１ベースのレンチウイルスベクターのその後の設計の鍵であった。

【００９３】

レンチウイルスをシュードタイプ化する代替的ＧＰのリストは増え続けており、それぞれに特定の長所と短所がある。シュードタイプレンチウイルスに対するＶＳＶ　Ｇタンパク質（ＶＳＶ－Ｇ）の広範な使用により、このＧＰは、事実上シュードタイプを形成するための他のウイルスＧＰの有用性を比較するための標準となった。レンチウイルスシュードタイプの追加の非限定的な例としては、リッサウイルス由来ＧＰを有するシュードタイプ、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスＧＰを有するシュードタイプレンチウイルス、アルファウイルスＧＰを有するレンチウイルスシュードタイプ（例えば、ＲＲＶおよびＳＦＶ　ＧＰでシュードタイプ化されたレンチウイルスベクター、シンドビスウイルスＧＰでシュードタイプ化されたレンチウイルスベクター）、フィロウイルスＧＰを有するシュードタイプ、およびバキュロウイルスＧＰ６４を含むレンチウイルスベクターシュードタイプが挙げられる。

【００９４】

いくつかの実施形態では、操作された（例えば、シュードタイプ化）ウイルスは、典型的には腫瘍細胞上に発現されるタンパク質、脂質、または炭水化物に結合することによって、腫瘍および／または腫瘍細胞に結合することができる。こうした実施形態では、本明細書に記載の操作されたウイルスは、ウイルスを特定の宿主細胞に向ける標的化部分を含んでもよい。場合によっては、特定の細胞もしくは組織型（例えば、腫瘍もしくは腫瘍細胞、または腫瘍関連間質もしくは間質細胞）上に差次的に発現されるか、またはそうでなければ存在する、当技術分野で公知であるか、またはまだ特定されていない任意の細胞表面生物学的物質を、本開示のウイルスの潜在的な標的として使用してもよい。いくつかの実施形態では、細胞表面物質はタンパク質である。いくつかの実施形態では、上記標的化部分は、例えば、がん（例えば、乳房、肺、卵巣、前立腺、結腸、リンパ腫、白血病、黒色腫など）、自己免疫疾患（例えば、重症筋無力症、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、糖尿病など）、ＨＩＶ、ＨＣＶ、ＨＢＶ、ＣＭＶ、およびＨＰＶによる感染を含む感染症；ならびに、鎌状赤血球貧血、嚢胞性線維症、テイ・サックス病、Ｊ３－サラセミア、神経線維腫症、多発性嚢胞腎、血友病などを含む遺伝性疾患、などの疾患を示す細胞表面抗原に結合する、特定の実施形態では、標的化部分は、特定の細胞または組織タイプに特異的な細胞表面抗原、例えば、神経、肺、腎臓、筋肉、血管、甲状腺、眼、乳房、卵巣、精巣、または前立腺組織に存在する細胞表面抗原を標的とする。

【００９５】

いくつかの実施形態では、本開示のウイルス（一次ウイルスおよび／または二次ウイルス）は、キメラウイルス（例えば、第１のウイルスに由来するキャプシドタンパク質また

はＩＲＥＳなどの一部分を含むウイルス、および第２のウイルスに由来するプロテアーゼまたはポリメラーゼなどの非構造遺伝子などの別の部分を含むウイルスをコードする）である。いくつかの実施形態では、ウイルスは、一次腫瘍溶解性ウイルスおよび／または二次腫瘍溶解性ウイルスである。

【００９６】

二重腫瘍溶解性ウイルス、二重ウイルス、および制御要素の設計

本開示は、図２８に示すように、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチド、任意選択的にリコンビナーゼをコードするポリヌクレオチド、および任意選択的に調節ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、一次腫瘍溶解性ウイルスを提供する。いくつかの実施形態では、調節ポリペプチドは、調節可能なプロモーターに結合することができる。いくつかの実施形態では、調節ポリペプチドは、図２８に示される１つ以上の調節可能なプロモーターの機能を調節する。いくつかの実施形態では、調節ポリペプチドは、ｒｔＴＡタンパク質である。いくつかの実施形態では、調節ポリペプチドは、ｔＴＡタンパク質である。

【００９７】

本開示は、図２８に示すように、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチド、任意選択的にリコンビナーゼをコードするポリヌクレオチド、および任意選択的に調節ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、一次ウイルスを提供する。いくつかの実施形態では、調節ポリペプチドは、調節可能なプロモーターに結合することができる。いくつかの実施形態では、調節ポリペプチドは、図２８に示される１つ以上の制御可能なプロモーターの機能を調節する。いくつかの実施形態では、調節ポリペプチドは、ｒｔＴＡタンパク質である。いくつかの実施形態では、調節ポリペプチドは、ｔＴＡタンパク質である。

【００９８】

いくつかの実施形態では、本開示は、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む一次腫瘍溶解性ウイルスを提供し、二次腫瘍溶解性ウイルスの発現は、調節可能なプロモーターによって制御される。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドは、調節可能なプロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、調節可能なプロモーターは、ステロイド誘導性プロモーター、メタロチオニンプロモーター、ＭＸ－１プロモーター、ＧＥＮＥＳＷＩＴＣＨ（商標）ハイブリッドプロモーター、クメート応答性プロモーター、ホルモン応答性プロモーター（例えば、ポナステロンＡ誘導性プロモーター）、およびテトラサイクリン（Ｔｅｔ）調節性プロモーターから選択される。いくつかの実施形態では、調節可能なプロモーターは、リコンビナーゼ認識部位（ＲＲＳ）に隣接したプロモーターである。

【００９９】

いくつかの実施形態では、本開示は、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む一次ウイルスを提供し、二次ウイルスの発現は、調節可能なプロモーターによって制御される。いくつかの実施形態では、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドは、調節可能なプロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、調節可能なプロモーターは、ステロイド誘導性プロモーター、メタロチオニンプロモーター、ＭＸ－１プロモーター、ＧＥＮＥＳＷＩＴＣＨ（商標）ハイブリッドプロモーター、クメート応答性プロモーター、ホルモン応答性プロモーター（例えば、ポナステロンＡ誘導性プロモーター）、およびテトラサイクリン（Ｔｅｔ）調節性プロモーターから選択される。いくつかの実施形態では、調節可能なプロモーターは、リコンビナーゼ認識部位（ＲＲＳ）に隣接したプロモーターである。

【０１００】

いくつかの実施形態では、調節可能なプロモーターは、Ｔｅｔ調節性プロモーターである。Ｔｅｔ調節性プロモーターは、最小プロモーターの上流にＴｅｔ応答要素（ＴＲＥ）を配置することによって開発される。ＴＲＥは、１９ヌクレオチドのテトラサイクリンオペレーター（ｔｅｔＯ）配列の７つの繰り返しであり、テトラサイクリンリプレッサー（

ｔｅｔＲ）によって認識される。内因性細菌系において、テトラサイクリン、またはドキシサイクリンのような類似体が存在する場合、ｔｅｔＲは、ＴＲＥではなくテトラサイクリンに結合し、それによって転写を可能にする。Ｔｅｔを遺伝子発現の調節因子として使用するために、ｔｅｔＲをビリオンタンパク質１６（ＶＰ１６）の転写活性化ドメインと融合させることによって、テトラサイクリン制御トランス活性化因子（ｔＴＡ）を作製した（Ｇｏｓｓｅｎ　ａｎｄ　Ｂｕｊａｒｄ，ＰＮＡＳ（１９９２）１５：８９（１２）：５５４７－５５５１）。テトラサイクリンの非存在下で、ｔＴＡのｔｅｔＲ部分は、ＴＲＥ中のｔｅｔＯ配列を結合し、ＶＰ１６活性化ドメインは下流遺伝子の転写を促進する。テトラサイクリンの存在下では、テトラサイクリンは、ｔＴＡのｔｅｔＲドメインに結合し、これによりｔｅｔＯ配列へのｔＴＡの結合とＶＰ１６媒介性の下流遺伝子発現の活性化を遮断する。したがって、いくつかの実施形態では、調節可能なプロモーターは、Ｔｅｔ調節性プロモーターであり、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドの転写が、ｔＴＡタンパク質の存在下、およびＴｅｔ（またはそのドキシサイクリン誘導体）の非存在下で活性である。このようなプロモーターは、テトラサイクリンの非存在下で活性であるため、本明細書ではＴｅｔ－ＯＦＦプロモーターと呼ばれる。いくつかの実施形態では、ｔＴＡポリペプチドは、配列番号８５３によってコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【０１０１】

いくつかの実施形態では、調節可能なプロモーターは、Ｔｅｔ調節性プロモーターであり、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドの転写が、Ｔｅｔ（またはそのドキシサイクリン誘導体）およびリバーステトラサイクリン制御トランス活性化因子（ｒｔＴＡ）の存在下で活性である。ｒｔＴＡは、ＶＰ１６転写活性化ドメインと、ｔｅｔＲドメインが、プロモーター内のｔｅｔＯ配列への結合についてＴｅｔの存在に依存するように変異されたｔｅｔＲドメインとを含む融合タンパク質である。したがって、下流遺伝子の転写は、テトラサイクリンの非存在で活性ではない。しかしながら、テトラサイクリンの存在下では、ｒｔＴＡタンパク質の変異型ｔｅｔＲ部分は、ｔｅｔＯ配列に結合し、ＶＰ１６媒介性の転写活性化および下流遺伝子の発現を可能にする。このようなプロモーターは、テトラサイクリンの存在下で活性であるため、本明細書ではＴｅｔ－ＯＮプロモーターと呼ばれる。いくつかの実施形態では、ｒｔＴａタンパク質は、配列番号８５２によってコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性のアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【０１０２】

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、調節可能なプロモーターに作動可能に連結された二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードする第１のポリヌクレオチド、および調節可能なプロモーターに結合することができるタンパク質をコードする第２のポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、調節可能なプロモーターは、Ｔｅｔ－ＯＮプロモーターであり、調節可能なプロモーターに結合することができるタンパク質は、ｒｔＴＡタンパク質である。いくつかの実施形態では、調節可能なプロモーターは、Ｔｅｔ－ＯＦＦプロモーターであり、調節可能なプロモーターに結合することができるタンパク質は、ｔＴＡタンパク質である。いくつかの実施形態では、調節可能なプロモーターに結合することができるタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、構成的プロモーターに作動可能に連結される。構成的プロモーターは、当技術分野で公知であり、限定されるものではないが、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）プロモーター、モロニーマウス白血病ウイルス（ＭｏＭＬＶ）ＬＴＲプロモーター、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）ＬＴＲプロモーター、伸長因子１α（ＥＦ１ａ）プロモーター、初期増殖応答１（ＥＧＲ１）プロモーター、フェリチンＨ（ＦｅｒＨ）プロモーター、フェリチンＬ（ＦｅｒＬ）プロモーター

、グリセルアルデヒド３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）プロモーター、真核生物翻訳開始因子４Ａ１（ＥＩＦ４Ａ１）プロモーター、ユビキチンＣプロモーター（ＵＢＣ）プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ－１（ＰＧＫ）プロモーター、およびサイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリβ－アクチン（ＣＡＧ）プロモーターを含む。

【０１０３】

いくつかの実施形態では、調節可能なプロモーターは、リコンビナーゼ認識部位（ＲＲＳ）に隣接したプロモーターである。ＲＲＳに隣接したプロモーターは、構成的プロモーターをリコンビナーゼ認識部位に隣接させることによって生成される。こうした実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、ＲＲＳに隣接したプロモーターに作動可能に連結された二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードする第１のポリヌクレオチド、およびリコンビナーゼ認識部位間で組換えを媒介することができるリコンビナーゼタンパク質をコードする第２のポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼタンパク質の発現により、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドの転写が可能になる。例えば、いくつかの実施形態では、ＲＲＳに隣接したプロモーターは、逆位プロモーター配列を含む（例えば、図４Ｂを参照）。リコンビナーゼ発現がない場合、プロモーター配列は逆位のままであり、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドの転写は起こらない。リコンビナーゼが発現されると、逆位プロモーター配列が反転され、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドの転写が可能となる。

【０１０４】

いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチド配列、および調節可能なプロモーターに結合することができるタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、同じポリヌクレオチド中に含まれる。例えば、いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチド配列、および調節可能なプロモーターに結合することができるタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、両方向性プロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチド配列、および調節可能なプロモーターに結合することができるタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、一次ウイルスのゲノムの異なる位置に挿入された異なるポリヌクレオチド中に含まれる。

【０１０５】

いくつかの実施形態では、本開示は、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスを提供し、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの発現は、１つ以上の転写後制御要素によって調節される。本明細書では、「転写後制御要素」は、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスｍＲＮＡ転写物の存在量を調節することができるプロモーター以外の任意の要素を指す。転写後制御要素は、様々な転写後機構を介してｍＲＮＡ転写物の存在量を制御する、構成的または誘導的要素であり得る。転写後制御要素の例としては、リボザイム、アプタザイム、ＲＮＡｉ分子の標的部位（例えば、ｓｈＲＮＡ標的部位、マイクロＲＮＡ標的部位、人工マイクロＲＮＡ（ＡｍｉＲＮＡ）標的部位）、およびＲＳＳに隣接したフレームシフトまたは終止コドン挿入が挙げられる。

【０１０６】

いくつかの実施形態では、転写後制御要素は、ｍＲＮＡ転写物の自己切断を媒介するリボザイムコード配列である。例示的なリボザイムとしては、ハンマーヘッド型リボザイム、バークドサテライト（Ｖａｒｋｕｄ　ｓａｔｅｌｌｉｔｅ）（ＶＳ）リボザイム、ヘアピンリボザイム、ＧＩＲ１分岐リボザイム、ｇｌｍＳリボザイム、ツイスターリボザイム、ツイスターシスター（ｔｗｉｓｔｅｒ　ｓｉｓｔｅｒ）リボザイム、ピストルリボザイム、ハチェット（ｈａｔｃｈｅｔ）リボザイム、および肝炎デルタウイルスリボザイムが挙げられる。こうした実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、二

次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードする第１のポリヌクレオチドを含み、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのゲノムは、１つ以上の内部リボザイム配列を含み、ウイルス転写物が内部で切断され、それによって二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの発現を防止する。

【０１０７】

いくつかの実施形態では、転写後制御要素は、アプタザイムコード配列である。「アプタザイム」は、リガンドに特異的な統合されたアプタマードメインを含有し、リガンド誘導性自己切断型リボザイムを生成するリボザイム配列である。アパトマードメインへのリガンド結合は、リボザイムの酵素活性の活性化を引き起こし、それによってＲＮＡ転写物の切断をもたらす。例示的なアプタザイムとしては、テオフィリン依存性アプタザイム（例えば、Ａｕｓｌａｎｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　ＢｉｏＳｙｓｔ．（２０１０）６，８０７－８１４に記載されているテオフィリン依存性アプタマーに連結されたハンマーヘッド型リボザイム）、テトラサイクリン依存性アプタザイム（例えば、Ｚｈｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，ｅＬｉｆｅ　２０１６；５：ｅ１８８５８　ＤＯＩ：１０．７５５４／ｅＬｉｆｅ．１８８５８、Ｗｉｎ　ａｎｄ　Ｓｍｏｌｋｅ，ＰＮＡＳ（２００７）１０４；１４２８３－１４２８８、Ｗｈｉｔｔｍａｎｎ　ａｎｄ　Ｓｕｅｓｓ，Ｍｏｌ　Ｂｉｏｓｙｔ（２０１１）７；２４１９－２４２７、Ｘｉａｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｈｅｍ　＆　Ｂｉｏｌ（２００８）１５；１２５－１１３７、およびＢｅｉｌｓｔｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＡＣＳ　Ｓｙｎ　Ｂｉｏｌ（２０１５）４；５２６－５３４に記載されているＴｅｔ依存性アプタマーに連結されたハンマーヘッド型リボザイム）、グアニン依存性アプタザイム（例えば、Ｎｏｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｈｅｍ　Ｃｏｍｍｕｎ．，（２０１２）４８（５７）；７２１５－７２１７に記載されているグアニン依存性アプタマーに連結されたハンマーヘッド型リボザイム）が含まれる。こうした実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードする第１のポリヌクレオチドを含み、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのゲノムは、１つ以上の内部アプタザイム配列を含み、ウイルス転写物が内部で切断され、それによって二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの発現を防止する。いくつかの実施形態では、本開示のリボザイム／アプタザイムは、ＴｅｔＯｆｆリボザイム／アプタザイムである。いくつかの実施形態では、ＴｅｔＯｆｆアプタザイムは、配列番号９１３に対して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性を有する核酸配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ＴｅｔＯｆｆアプタザイムは、配列番号９１４に対して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性を有する核酸配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、リボザイム／アプタザイムは、３’ＵＴＲ領域に位置する。

【０１０８】

いくつかの実施形態では、転写後制御要素は、ＲＮＡｉ標的配列である。こうした実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードする第１のポリヌクレオチドを含み、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、１つ以上のＲＮＡｉ標的部位を含む。本明細書で使用される場合、「ＲＮＡ干渉分子」または「ＲＮＡｉ分子」は、内因性遺伝子サイレンシング経路（例えば、ダイサー（Ｄｉｃｅｒ）およびＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ））を介して標的ｍＲＮＡ配列の分解を媒介するＲＮＡポリヌクレオチドを指す。例示的なＲＮＡ干渉物質としては、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、人工マイクロＲＮＡ（ＡｍｉＲＮＡ）、ショートヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、および低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）が挙げられる。

【０１０９】

いくつかの実施形態では、転写後制御要素は、ｍｉＲＮＡ標的配列である。ｍｉＲＮＡとは、標的ｍＲＮＡ配列に対して少なくとも部分的に相補的な、長さ約１８～２５ヌクレ

オチドの天然由来の小さな非コードＲＮＡ分子を指す。動物では、ｍｉＲＮＡの遺伝子は、二本鎖であり、ステムループ構造を形成する一次ｍｉＲＮＡ（ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡ）に転写される。次いで、ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡは、クラス２　ＲＮａｓｅ　ＩＩＩであるドローシャ（Ｄｒｏｓｈａ）、およびマイクロプロセッササブユニットであるＤＣＧＲ８を含むマイクロプロセッサ複合体によって核内で切断され、７０～１００ヌクレオチドの前駆体ｍｉＲＮＡ（ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ）を形成する。ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡはヘアピン構造を形成し、細胞質に輸送され、そこでＲＮａｓｅ　ＩＩＩ酵素であるダイサーによって処理されて約１８～２５ヌクレオチドのｍｉＲＮＡ二本鎖になる。二本鎖のいずれかが機能的ｍｉＲＮＡとして作用する可能性もあるが、通常、ｍｉＲＮＡの１つの鎖が分解され、１つの鎖のみがアルゴノート（ＡＧＯ）ヌクレアーゼにロードされて、ｍｉＲＮＡおよびそのｍＲＮＡ標的が相互作用するエフェクターＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）が産生される（Ｗａｈｉｄ　ｅｔ　ａｌ．，１８０３：１１，２０１０，１２３１－１２４３）。

【０１１０】

いくつかの実施形態では、転写後制御要素は、ｓｉＲＮＡ標的配列である。ｓｉＲＮＡは、通常、約２１～２３ヌクレオチド長の二本鎖ＲＮＡ分子を指す。二本鎖ｓｉＲＮＡ分子は、ＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）と呼ばれるマルチタンパク質複合体と会合して細胞質内で処理され、その間に、「パッセンジャー」センス鎖は二本鎖から酵素的に切断される。次いで、活性化ＲＩＳＣに含まれるアンチセンス「ガイド」鎖は、配列相補性により、ＲＩＳＣを対応するｍＲＮＡに誘導し、ＡＧＯヌクレアーゼは標的ｍＲＮＡを切断し、特定の遺伝子サイレンシングをもたらす。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡ分子は、ｓｈＲＮＡ分子に由来する。ｓｈＲＮＡは、ステムループ構造を形成する、約５０～７０ヌクレオチド長の一本鎖人工ＲＮＡ分子である。いくつかの実施形態では、ｓｈＲＮＡは、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡを模倣し、ドローシャ処理をバイパスして、ダイサーによる処理のために直接エクスポートすることができる。いくつかの実施形態では、ｓｈＲＮＡは、ｍｉＲＮＡベースのｓｈＲＮＡである。細胞内のｍｉＲＮＡベースのｓｈＲＮＡの発現は、プラスミドまたはウイルスベクターによってｍｉＲＮＡベースのｓｈＲＮＡをコードするＤＮＡポリヌクレオチドを導入することによって達成される。次に、ｍｉＲＮＡベースのｓｈＲＮＡは、ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡのステムループ構造を模倣する産物に転写され、ドローシャによって核内で同様に処理されて、ヘアピンループ構造を有する一本鎖ＲＮＡを形成する。ヘアピンＲＮＡの細胞質へのエクスポート後、ヘアピンはダイサーによって処理され、二本鎖ｓｉＲＮＡ分子を形成し、その後、ＲＩＳＣによってさらに処理されて標的遺伝子のサイレンシングを媒介する。

【０１１１】

いくつかの実施形態では、転写後制御要素は、人工マイクロＲＮＡ（ＡｍｉＲＮＡ）である。

【０１１２】

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードする第１のポリヌクレオチドを含み、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、１つ以上のＲＮＡｉ標的部位、およびＲＮＡｉ標的部位に結合する１つ以上のＲＮＡｉ分子をコードする第２のポリヌクレオチドを含む。こうした実施形態では、１つ以上のＲＮＡｉ分子は、二次腫瘍溶解性ウイルスのゲノム中の標的配列に結合し、１つ以上のＲＮＡｉ分子の発現が、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスｍＲＮＡ転写物の分解をもたらし、それによって二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの発現を防止する。いくつかの実施形態では、１つ以上のＲＮＡｉ分子をコードするポリヌクレオチドは、調節可能なプロモーターに作動可能に連結されている。こうした実施形態では、１つ以上のＲＮＡｉ分子の調節された発現を使用して、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの異常な発現を防止できる。

【０１１３】

例えば、いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコー

ドする第１のポリヌクレオチドは、第１の調節可能なプロモーターに作動可能に連結され、１つ以上のＲＮＡｉ分子をコードする第２のポリヌクレオチドは、第２の調節可能なプロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、第１の調節可能なプロモーターは、Ｔｅｔ－ＯＮプロモーター（例えば、配列番号８４４）であり、第２の調節可能なプロモーターは、Ｔｅｔ－ＯＦＦプロモーター（例えば、配列番号８４５）である。こうした実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの発現は、Ｔｅｔの存在下で活性化され、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの発現を所望されるときに誘発することを可能にする。Ｔｅｔの投与前に（すなわち、Ｔｅｔの非存在下で）、ＲＮＡｉ分子が発現される。したがって、Ｔｅｔの非存在下で産生される二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの任意のＲＮＡ転写物は、ＲＮＡｉ分子によって標的化され、それによって二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの異常な発現が防止される。いくつかの実施形態では、第１の調節可能なプロモーターは、Ｔｅｔ－ＯＦＦプロモーターであり、第２の調節可能なプロモーターは、Ｔｅｔ－ＯＮプロモーターである。こうした実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、Ｔｅｔと組み合わせて投与することができ、その結果、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの発現がＴｅｔが分解によって除去された後に誘発される。Ｔｅｔは存在している間、ＲＮＡｉ分子が発現し、Ｔｅｔの存在下で産生された二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのＲＮＡ転写物を標的にして分解し、それによって二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの異常な発現が防止される。

【０１１４】

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、第１の調節可能なプロモーターに作動可能に結合された二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードする第１のポリヌクレオチドと、第２の調節可能なプロモーターに作動可能に結合された１つ以上のＲＮＡｉ分子をコードする第２のポリヌクレオチドと、第１の調節可能なプロモーターに結合することができる第１のタンパク質および／または第２の調節可能なプロモーターに結合することができる第２のタンパク質をコードする第３のポリヌクレオチドと、を含む。いくつかの実施形態では、第１の調節可能なプロモーターは、Ｔｅｔ－Ｏｎプロモーターであり、第１のタンパク質は、ｒｔＴＡである。いくつかの実施形態では、第２の調節可能なプロモーターは、Ｔｅｔ－Ｏｎプロモーターであり、第２のタンパク質は、ｒｔＴＡである。いくつかの実施形態では、第１の調節可能なプロモーターは、Ｔｅｔ－ＯＦＦプロモーターであり、第１のタンパク質は、ｔＴＡである。いくつかの実施形態では、第２の調節可能なプロモーターは、Ｔｅｔ－ＯＦＦプロモーターであり、第２のタンパク質は、ｔＴＡである。いくつかの実施形態では、第１の調節可能なプロモーターは、Ｔｅｔ－Ｏｎプロモーターであり、第１のタンパク質は、ｒｔＴＡであり、第２の調節可能なプロモーターは、Ｔｅｔ－ＯＦＦプロモーターであり、第２のタンパク質は、ｔＴＡである。いくつかの実施形態では、第１の調節可能なプロモーターはＴｅｔ－ＯＦＦプロモーターであり、第１のタンパク質はｔＴＡであり、第２の調節可能なプロモーターはＴｅｔ－ＯＮプロモーターであり、第２のタンパク質はｒｔＴＡである。

【０１１５】

二重腫瘍溶解性ウイルス構築物の非限定的な例を図２に示す。ここでは、一次ウイルスは組換えＨＳＶであり、二次ウイルスはポジティブセンス一本鎖ＲＮＡウイルスまたはネガティブセンス一本鎖ＲＮＡウイルスである。いくつかの実施形態では、二次ウイルスは、ＳＶＶおよびＣＶＡ２１から選択されるポジティブセンス一本鎖ＲＮＡウイルスである。いくつかの実施形態では、二次ウイルスは、ＶＳＶ（ネガティブセンスＲＮＡウイルス）である。二次ウイルスのウイルスゲノムは、一次ＨＳＶウイルスをコードするポリヌクレオチドに挿入される。いくつかの実施形態では、挿入部位は、ＨＳＶのＵＬ３７とＵＬ３８との間の遺伝子間領域である。いくつかの実施形態では、二次ウイルスゲノムの発現は、テトラサイクリン応答性Ｐｏｌ　ＩＩプロモーター（黒い矢印）およびＲＮＡポリメラーゼＩプロモーター（灰色の矢印）によって調節される。

【０１１６】

図５～７は、転写制御要素（調節可能なプロモーターなど）および転写後制御要素（リボザイムおよび／またはＲＮＡｉ機構など）の組み合わせを使用して、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのウイルスゲノムの発現、活性化および分解を制御する非限定的な例を提供する。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスゲノムまたは二次ウイルスゲノムをコードするｍＲＮＡの転写は、調節可能なプロモーター（例えば、ＴｅｔＯｎプロモーター）に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスゲノムまたは二次ウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチドは、ウイルスゲノム転写物から非ウイルスＲＮＡを除去し得るＴｅｔＯｎ－リボザイム（ＴｅｔＯｎ－Ｒ）および／またはＲＮＡｉ標的配列（例えば、ＡｍｉＲＮＡ）に隣接している。いくつかの実施形態では、ウイルスゲノム転写物の分解は、同じく調節制御下にある追加の調節機構（例えば、内部ＴｅｔＯｆｆリボザイム、ＲＮＡｉ分子）によって制御され、任意選択的に、調節可能なプロモーターを制御するのと同じ調節機構によって制御される。
【０１１７】
図５は、例示的な入れ子になった腫瘍溶解性ウイルス構築物または入れ子になったウイルス構築物を生成するために、一次腫瘍溶解性ウイルスゲノムまたは一次ウイルスゲノムに挿入され得る構成要素の例示的な概略図を示す。この非限定的な例では、ｒｔＴＡペプチドの発現は、構成的活性型プロモーターの制御下にあり、二次ウイルスゲノムの発現は、テトラサイクリン応答性（ＴｅｔＯｎ）Ｐｏｌ　ＩＩプロモーターの制御下にあり、その結果、ウイルスゲノムの転写は、ＴｅｔおよびｒｔＴＡペプチドの存在下で起こる。二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルス転写物の発現は、内部ＴｅｔＯｆｆ－リボザイム（ＴｅｔＯｆｆ－Ｒ）によってさらに制御され、その結果、転写物はＴｅｔの非存在下で分解される。さらに、二次ウイルス転写物は、５’および３’ＴｅｔＯｎ－リボザイム（ＴｅｔＯｎ－Ｒ）によって活性化され、その結果、ｍＲＮＡ転写物は、Ｔｅｔの存在下で５’および３’末端で処理され、これは余分なヌクレオチドに隣接することなくウイルスゲノムのＲＮＡ転写物を生成する。したがって、この実施例では、Ｔｅｔの存在が、二次腫瘍溶解性ウイルスゲノムまたは二次ウイルスゲノムの転写および活性化をオンにし、同時にその分解を防止する。
【０１１８】
図６は、例示的な入れ子になった腫瘍溶解性ウイルス構築物または入れ子になったウイルス構築物を生成するために、一次腫瘍溶解性ウイルスゲノムまたは一次ウイルスゲノムに挿入され得る構成要素の例示的な概略図を示す。ｒｔＴＡおよびテトラサイクリントランス活性化因子（ｔＴＡ）ペプチドの発現は、構成的活性型プロモーターの制御下にある。二次ウイルスゲノムの発現は、ＴｅｔＯｎ　Ｐｏｌ　ＩＩプロモーターの制御下にあり、その結果、ウイルスゲノムの転写は、ＴｅｔおよびｒｔＴＡペプチドの存在下で起こる。二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルス転写物の発現は、二次ウイルスのｍＲＮＡ転写物中の標的配列に特異的なｓｈＲＮＡによってさらに調節される。ｓｈＲＮＡの発現は、ＴｅｔＯｆｆプロモーターの制御下にあるため、ｓｈＲＮＡの転写は、Ｔｅｔの非存在下およびｔＴＡペプチドの存在下で起こる。さらに、二次ウイルス転写物は、５’および３’のＴｅｔＯｎ－Ｒによって活性化され、その結果、ｍＲＮＡ転写物は、Ｔｅｔの存在下で５’および３’末端で処理され、これは余分なヌクレオチドを隣接することなくウイルスゲノムのＲＮＡ転写物を生成する。したがって、この実施例では、Ｔｅｔの存在が、二次腫瘍溶解性ウイルスゲノムまたは二次ウイルスゲノムの転写および活性化をオンにし、同時にその分解を防止する。
【０１１９】
図７は、例示的な入れ子になった腫瘍溶解性ウイルス構築物を生成するために、一次腫瘍溶解性ウイルスゲノムまたは一次ウイルスゲノムに挿入され得る構成要素の例示的な概略図を示す。ｒｔＴＡおよびｔＴＡペプチドの発現は、構成的活性型プロモーターの制御下にある。二次ウイルスゲノムの発現は、ＴｅｔＯｎ　Ｐｏｌ　ＩＩプロモーターの制御下にあり、その結果、ウイルスゲノムの転写は、ＴｅｔおよびｒｔＴＡペプチドの存在下で起こる。二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルス転写物の発現は、二次ウイルスの

ｍＲＮＡ転写物中の標的配列に特異的なｓｈＲＮＡによってさらに調節される。ｓｈＲＮＡの発現は、ＴｅｔＯｆｆプロモーターの制御下にあるため、ｓｈＲＮＡの転写は、Ｔｅｔの非存在下およびｔＴＡペプチドの存在下で起こる。さらに、二次ウイルス転写物は、ＡｍｉＲＮＡ標的部位および３’ＴｅｔＯｎ－Ｒによる５’末端での切断によって活性化され、その結果、ｍＲＮＡ転写物がＴｅｔの存在下で５’末端で処理される。

【０１２０】

いくつかの実施形態では、部位特異的組換えシステムを使用して、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの発現を制御する。こうした実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、リコンビナーゼ認識部位を含む二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードする第１のポリヌクレオチド、および対応するリコンビナーゼタンパク質をコードする第２のポリヌクレオチドを含む。リコンビナーゼタンパク質をコードする第２のポリヌクレオチドは、リコンビナーゼタンパク質の発現が時間的に制御され得るように、誘導性プロモーターまたは別手段で制御可能なプロモーターの制御下であってもよい。本開示での使用に適した部位特異的組換えシステムは、当技術分野で公知であり、当該システムは、フリッパーゼ（ＦＬＰ）リコンビナーゼによって認識される部位フリッパーゼ認識標的（ＦＲＴ）部位を含むＦＲＴ／ＦＬＰシステムおよび、Ｃｒｅリコンビナーゼによって認識されるｌｏｘＰ部位を含むＣｒｅ／Ｌｏｘシステムを含む。

【０１２１】

いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、Ｆｌｐリコンビナーゼである。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位は、ＦＲＴ部位（例えば、ＦＲＴ－１部位、ＦＲＴ－１４部位）である。いくつかの実施形態では、ＦＲＴ－１部位は、配列番号８５０またはその補体に対して少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性を有する核酸配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位は、ＦＲＴ－１４部位である。いくつかの実施形態では、ＦＲＴ－１４部位は、配列番号８５１またはその補体に対して少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性を有する核酸配列を含むか、またはそれからなる。

【０１２２】

いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、Ｃｒｅリコンビナーゼである。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、Ｄｒｅリコンビナーゼである。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、ΦＣ３１（ファイＣ３１）リコンビナーゼである。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、λインテグラーゼである。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、以下の表１から選択される：

【表１－１】

表１　リコンビナーゼおよび例示的な標的部位／配列のリスト

リコンビナーゼ	起源	例示的標的部位	例示的標的配列	配列番号
Flp	S.cerevisiae	FRT	5’-GAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTC-3’	850

【表１－２】

リコンビナーゼ	起源	例示的標的部位	例示的標的配列	配列番号
KD	K.drosophilarum	KDRT	5’-AAACGATATCAGACATTTGTCTGATAATGCTTCATTATCAGACAAATGTCTGATATCGTTT-3’	875
B2	Z.bailii	B2RT	5’-GAGTTTCATTAAGGAATAACTAATTCCCTAATGAAACTC-3’	876
B3	Z.bisporus	B3RT	5’-GGTTGCTTAAGAATAAGTAATTCTTAAGCAACC-3’	877
R	Z.rouxii	RSRT	5’-TTGATGAAAGAATAACGTATTCTTTCATCAA-3’	878
Cre	ファージP1	loxP	5’-ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT-3’	879
VCre	Vibriosp.	VloxP	5’-TCAATTTCTGAGAACTGTCATTCTCGGAAATTGA-3’	880
SCre	Shewanellasp.	SloxP	5’-CTCGTGTCCGATAACTGTAATTATCGGACATGAT-3’	881
Vika	V.coralliilyticus	vox	5’-AATAGGTCTGAGAACGCCCATTCTCAGACGTATT-3’	882
Dre	バクテリオファージD6	rox	5’-TAACTTTAAATAATGCCAATTATTTAAAGTTA-3’	883
λ-Int	ファージλ	attP	5’-CAGCTTTTTTATACTAAGTTG-3’	884
λ-Int	ファージλ	attB	5’-CTGCTTTTTTATACTAACTTG-3’	885
HK022	ファージHK022	attP	5’-ATCCTTTAGGTGAATAAGTTG-3’	886
HK022	ファージHK022	attB	5’-GCACTTTAGGTGAAAAAGGTT-3’	887

【表１－３】

リコンビナーゼ	起源	例示的標的部位	例示的標的配列	配列番号
φC31	ファージφC31	attP	5’-CCCCAACTGGGGTAACCTTTGAGTTCTCTCAGTTGGGG-3’	888
φC31	ファージφC31	attB	5’-GTGCCAGGGCGTGCCCTTGGGCTCCCCGGGCGCG-3’	889
Bxb1	ファージBxb1	attP	5’-GGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACC-3’	890
Bxb1	ファージBxb1	attB	5’-GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCAT-3’	891
Gin	ファージミュー	gix	5’-TTATCCAAAACCTCGGTTTACAGGAA-3’	892
Tn3	E.coli	res site I	5’-CGTTCGAAATATTATAAATTATCAGACA-3’	893

【０１２３】
　いくつかの実施形態では、リコンビナーゼの発現は、機能的な二次腫瘍溶解性ウイルスまたは機能的な二次ウイルスの発現をもたらす。例えば、いくつかの実施形態では、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドは、リコンビナーゼ認識部位に隣接した１つ以上のフレームシフトまたは終止コドン挿入を含む（例えば、図４Ａを参照されたい）。リコンビナーゼ発現が存在しない場合、転写された二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、フレームシフトまたは終止コドン挿入を含み、これは機能的な二次腫瘍溶解性ウイルスまたは機能的な二次ウイルスの発現を防止する。リコンビナーゼタンパク質の発現が活性化または誘導されると、フレームシフトまたは終止コドン挿入が第２のポリヌクレオチドから切除され、機能的な二次腫瘍溶解性ウイルスまたは機能的な二次ウイルスの発現が可能となる（例えば、図４Ａを参照されたい）。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスもしくは二次ウイルスまたはその一部をコードするポリヌクレオチドは、反転し、リコンビナーゼ認識部位に隣接している。リコンビナーゼ発現が存在しない場合、転写された二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、逆位部分を含み、これは機能的二次腫瘍溶解性ウイルスまたは機能的二次ウイルスの発現を防止する。リコンビナーゼタンパク質の発現が活性化または誘導されると、逆位部分が正しい方向に反転され、機能的な二次腫瘍溶解性ウイルスまたは機能的な二次ウイルスの発現が可能となる（例えば、図４Ｂを参照されたい）。
【０１２４】
　いくつかの実施形態では、リコンビナーゼの発現は、機能的な二次腫瘍溶解性ウイルスまたは機能的な二次ウイルスの発現を防止する。例えば、いくつかの実施形態では、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドは、リコンビナーゼ認識部位に隣接している。リコンビナーゼ発現が存在しない場合、ポリヌクレオチドは転写され、機能的な二次腫瘍溶解性ウイルスまたは機能的な二次ウイルスを産生する。リコンビナーゼタンパク質の発現が活性化または誘導される場合、リコンビナーゼ認識部位間の組換えは、ポリヌクレオチドの逆位をもたらし、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの発現を防止し得る。

いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドの転写を制御するプロモーターは、リコンビナーゼ認識部位に隣接している。リコンビナーゼ発現が存在しない場合、プロモーターは機能性を維持し、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの転写を可能にする。リコンビナーゼタンパク質の発現が活性化または誘導される場合、リコンビナーゼ認識部位間の組換えは、プロモーターの逆位をもたらし、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの発現を防止し得る。

【０１２５】

図８の非限定的な実施例に示すように、少なくとも３つのレベルの制御をリコンビナーゼシステムで操作することができ、これは二次腫瘍溶解性ウイルス（ＯＶ２）または二次ウイルスの発現の厳密な時間的調節を提供することができる。

【０１２６】

第１のレベルは、リコンビナーゼの転写制御である。いくつかの実施形態では、調節可能なプロモーターが、リコンビナーゼのコード領域に作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、調節可能プロモーターは、ＴｅｔＯｎプロモーターである。いくつかの実施形態では、調節可能プロモーターは、細菌ＴｅｔＲリプレッサーによる転写抑制を可能にする。いくつかの実施形態では、プロモーター活性は、ドキシサイクリンの添加により抑制解除され、リコンビナーゼの発現をもたらす。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、Ｆｌｐリコンビナーゼまたはその融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、Ｃｒｅリコンビナーゼまたはその融合タンパク質である。

【０１２７】

図３は、リコンビナーゼをコードするｍＲＮＡの転写を調節するために使用できる例示的な制御要素を示す。この非限定的な例は、ウイルス活性化Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼまたはリコンビナーゼの発現および／または機能を調節するための制御要素を示している。いくつかの実施形態では、転写制御は、腫瘍特異的プロモーターまたは調節可能なプロモーターを用いて達成することができる。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼをコードするポリヌクレオチドは、調節可能なプロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼをコードするポリヌクレオチドは、１つ以上の転写後制御要素を含む。転写後制御要素は、ｍＲＮＡまたはｍＲＮＡコード化タンパク質半減期の調節、ｍｉＲＮＡ標的部位、Ｔｅｔ－ＯＮ　ｍｉＲ－Ｔ要素、Ｔｅｔ－ＯＦＦリボザイム／アプタザイム、およびリガンド依存性、腫瘍細胞特異的または構成的な様式での転写物存在量を制御するそれらの任意の組み合わせが含まれる。いくつかの実施形態では、追加の制御要素は、その半減期、細胞内局在性および／または活性を制御するために、コードされたポリペプチド（例えば、リコンビナーゼ）内で操作することができる。例示的なＴｅｔ－Ｏｎ　ｍｉＲ－Ｔ要素は、Ｍｏｕ　ｅｔ　ａｌ，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ．２０１８　Ｍａｙ　２；２６（５）：１２７７－１２８６に記載されている。例示的なＴｅｔ－Ｏｎリボザイム／アプタザイムは、Ｚｈｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｅｌｉｆｅ．２０１６　Ｎｏｖ　２；５：ｅ１８８５８に記載されている。

【０１２８】

いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡ不安定化要素が、リコンビナーゼ発現カセットに挿入される。いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡ不安定化要素は、リコンビナーゼをコードするｍＲＮＡ転写物を不安定化させ、および／またはｍＲＮＡ代謝回転を増加させることができる。いくつかの実施形態では、１つ以上のｍＲＮＡ不安定化要素の存在は、非誘導状態でのリコンビナーゼｍＲＮＡの漏出性発現を低減または最小化することができ、それにより、システムが誘導された時（例えば、外因性薬剤によって）に、意図される組換え反応を媒介するために利用可能な十分なリコンビナーゼのみがあるようになる。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ不安定化要素は、ｃ－ｆｏｓコード要素を含む。いくつかの実施形態では、ｃ－ｆｏｓコード要素は、配列番号８９４に対して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性を有する核酸配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ不安定化要素は、ｃ－ｆｏｓ遺伝子

の３’ＵＴＲ由来のＡＵリッチ要素を含む。いくつかの実施形態では、ｃ－ｆｏｓ遺伝子の３’ＵＴＲ由来のＡＵリッチ要素は、配列番号８９５に対して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性を有する核酸配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ不安定化要素は、ＦＣＥおよびＡＲＥの両方の組み合わせを、任意選択的にタンデムで含む。いくつかの実施形態では、ＦＣＥおよびＡＲＥの両方の組み合わせは、配列番号８９６に対して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性を有する核酸配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、１つ以上のイントロンが、リコンビナーゼコード領域に挿入される。いくつかの実施形態では、１つ以上のイントロンの存在は、原核生物発現系におけるリコンビナーゼの望ましくない漏出発現を防止または最小限にすることができる（例えば、原核細胞がリコンビナーゼをコードするベクターを生成するために使用される場合）。

【０１２９】

第２のレベルは、リコンビナーゼ活性の翻訳後制御である。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼの活性および／または細胞局在は、調節可能である。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼの活性および／または細胞局在は、外因性薬剤（例えば、リガンドまたは小分子）によって調節される。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、１つ以上の活性制御ドメインに融合される。いくつかの実施形態では、外因性薬剤（例えば、リガンドまたは小分子）は、１つ以上の活性制御ドメインを介してリコンビナーゼの細胞活性および／または細胞局在を調節する。いくつかの実施形態では、活性制御ドメインは、エストロゲン受容体（ＥＲ）の改変リガンド結合ドメインである。リガンドの非存在下では、融合タンパク質（リコンビナーゼ－ＥＲ）は細胞質内に保持され、そこでは組換えを触媒することができないが、対応する小分子（例えば、４－ヒドロキシタモキシフェン）の添加により、融合タンパク質が核に転位して組換えを行うことが可能になる。いくつかの実施形態では、活性制御ドメインは、プロゲステロン受容体（ＰＲ）またはその一部分である。いくつかの実施形態では、対応する融合タンパク質（リコンビナーゼ－ＰＲ）の活性は、プロゲステロン類似体ＲＵ－４８６で誘導される。いくつかの実施形態では、活性制御ドメインは、改変されたＥ．ｃｏｌｉジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）タンパク質である。いくつかの実施形態では、対応する融合タンパク質（リコンビナーゼ－ＤＨＦＲ）は、不安定であり、誘導剤の非存在下でプロテアソーム内で急速に分解される。いくつかの実施形態では、対応する誘導剤は、抗生物質トリメトプリム（ＴＭＰ）であり、融合タンパク質は安定化され、核に転位し、ＴＭＰの存在下で組換えを行う。

【０１３０】

いくつかの実施形態では、リコンビナーゼはＦｌｐであり、活性制御ドメインは、エストロゲン受容体（ＥＲ）の改変リガンド結合ドメインである。いくつかの実施形態では、Ｆｌｐ－ＥＲ融合タンパク質は、配列番号８４６によってコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Ｆｌｐ－ＥＲ融合タンパク質は、配列番号８４７によってコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、ＲＧＳリンカーを含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、ＸＴＥＮリンカーを含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、任意選択的に融合タンパク質のＮ末端に、ＮＬＳおよび／またはＰＥＳＴ配列を含む。いくつかの実施形態では、ＮＬＳ配列は、配列番号８４８に対して、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＰＥＳＴ配列は、配列番号８４９に対して、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性を有するアミノ酸

配列を含む。いくつかの実施形態では、ＦＬＰ－ＲＧＳ－ＥＲ融合ポリペプチドは、配列番号８４６に対して、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＦＬＰ－ＸＴＥＮ－ＥＲＴ２ポリペプチドは、配列番号８４７に対して、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１３１】

第３のレベルは、ＯＶ２発現の転写制御であり、このレベルでは、リコンビナーゼは、ＯＶ２のプロモーターおよびコード領域を含むポリヌクレオチドの一部の切除および／または反転を媒介し、ＯＶ２ウイルスゲノム転写発現の活性化または不活性化をもたらす。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、ポリヌクレオチドの一部の切除を媒介する（例えば、転写終結シグナルを除去するため）。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、ポリヌクレオチドの一部の反転を媒介する（例えば、プロモーターの制御下にＯＶ２のコード領域を配置するため）。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、切除および反転の両方を媒介する。いくつかの実施形態では、１つ以上のイントロン領域がポリヌクレオチドに導入される。いくつかの実施形態では、イントロン領域は、成熟ＯＶ２ウイルスゲノム転写物からリコンビナーゼ認識部位を除去する。

【０１３２】

図４Ａ～図４Ｂは、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの発現を制御するための部位特異的組換えシステムの例示的な使用を示す。図４Ａは、ＦＬＰまたは別のリコンビナーゼによって切除され得る二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドのフレームシフト／終止コドンの挿入するスキームを示す。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのウイルスゲノムは、組換え部位（例えば、ＦＲＴ部位）に隣接するコード領域のフレームシフトを引き起こす終止コドンまたはポリヌクレオチドの挿入によって不活性化される。対応するリコンビナーゼ（ＦＬＰタンパク質）の存在下で、コード領域のフレームシフトを引き起こす終止コドンまたはポリヌクレオチドを除去し、機能的なウイルスゲノムを生成することができる。同様に、図４Ｂは、組換え部位に隣接する不活性逆位プロモーターを示しており、これは、対応するリコンビナーゼの存在下で正しい配向に反転されると、活性化され得る。

【０１３３】

図９～１１は、標的ポリヌクレオチドの発現を制御するために使用できる、例示的なリコンビナーゼ応答性カセットを紹介する。

【０１３４】

リコンビナーゼ応答性切除カセット（ＲＲＥＣ）を使用して、標的ポリヌクレオチド（例えば、ｃＤＮＡ）の発現を制御することができる。いくつかの実施形態では、ＲＲＥＣは、中央に制御要素および制御要素の両側に隣接するリコンビナーゼ認識部位を含む。

【０１３５】

いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ応答性切除カセット（ＲＲＥＣ）は、以下の構成を採用する：

５’－リコンビナーゼ認識部位Ａ１－制御要素－リコンビナーゼ認識部位Ａ２－３’、

ここで、リコンビナーゼ認識部位は、対応するリコンビナーゼの存在下で、制御要素の切除を媒介する。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位Ａ１およびＡ２は、同じ方向にある。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位Ａ１およびＡ２は、同じヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、Ｆｌｐリコンビナーゼである。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位は、ＦＲＴ部位である。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位は、ＦＲＴ－１部位である。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、Ｃｒｅリコンビナーゼである。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位は、Ｌｏｘ部位である。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、制御要素は、転写／翻訳終結要素（ＳＴＯＰ）を含むか、ま

たはそれからなる。いくつかの実施形態では、転写／翻訳終結要素（ＳＴＯＰ）は、任意選択的に各リーディングフレームにおいて、１つ以上の翻訳終止コドンを含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、転写／翻訳終結要素（ＳＴＯＰ）は、１つ以上の転写終結シグナルを含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、転写／翻訳終結要素（ＳＴＯＰ）は、各リーディングフレーム中に複数の翻訳終止コドンをコードするＤＮＡ配列と、それに続く転写終結シグナル（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むか、またはそれらからなる。いくつかの実施形態では、制御要素は、下流のオープンリーディングフレームのフレームシフトを引き起こすＤＮＡ配列からなるフレームシフト要素を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、制御要素と、一方または両方の側のリコンビナーゼ認識部位のうちの１つ以上との間に、追加のヌクレオチドが存在する。いくつかの実施形態では、ＲＲＥＣはプロモーターとコード領域（例えば、オープンリーディングフレーム）との間に配置される。いくつかの実施形態では、ＲＲＥＣは、転写物の５’－ＵＴＲ内に配置される。いくつかの実施形態では、ＲＲＥＣは、プロモーター領域内に配置される。いくつかの実施形態では、ＲＲＥＣは、コード領域（例えば、オープンリーディングフレーム）内に配置される。いくつかの実施形態では、ＳＴＯＰ要素は、配列番号８５４に対して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性を有する核酸配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ＳＴＯＰ要素は、配列番号８５５に対して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性を有する核酸配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ＳＴＯＰ要素は、配列番号８５６に対して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性を有する核酸配列を含むか、またはそれからなる。

【０１３７】

ＲＲＥＣの非限定的な例であるＳＴＯＰカセットが、図９に図示されており、ここでリコンビナーゼはＦｌｐであり、両方のリコンビナーゼ認識部位は、同じ方向のＦＲＴ－１部位であり、制御要素は、転写／翻訳終結要素（ＳＴＯＰ）である。いくつかの実施形態では、ＳＴＯＰカセットは、最小ＦＲＴ要素のタンデムダイレクトリピートに隣接した（ＳＴＯＰ）要素を含むか、またはそれからなってもよい。いくつかの実施形態では、転写／翻訳終結要素は、各リーディングフレーム中に複数の翻訳終止コドンをコードするＤＮＡ配列と、それに続くポリアデニル化シグナルを含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ＳＴＯＰカセットは、プロモーターと、対応する転写物の５’－ＵＴＲに位置するように制御される対象のｃＤＮＡとの間に挿入される。Ｆｌｐリコンビナーゼが存在しない場合、ＳＴＯＰカセットは安定的に組み込まれ、転写を終結し、それにより対象のｃＤＮＡの発現を防止するよう機能する。Ｆｌｐリコンビナーゼが存在する場合、それはタンデムＦＲＴ要素間の組換えを媒介し、ＳＴＯＰ要素を不可逆的に切除し、それにより対象のｃＤＮＡの発現を活性化する。いくつかの実施形態では、ＳＴＯＰ要素は、単一の合成ポリアデニル化シグナルを含有する（例えば、ＳＴＯＰ１、配列番号８５４にあるように）。いくつかの実施形態では、ＳＴＯＰ要素は、ＳＴＯＰ２（配列番号８５５）およびＳＴＯＰ３（配列番号８５６）にあるように、複数のポリアデニル化シグナルを含む。いくつかの実施形態では、複数のポリアデニル化シグナルを有すると、転写終結の効率が増加する。いくつかの実施形態では、ＳＴＯＰカセットは、配列番号８５７に対して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性を有する核酸配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ＳＴＯＰカセットは、配列番号８５８に対して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性を有する核酸配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ＳＴＯＰカセットは、配列番号８５９に対して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５

％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性を有する核酸配列を含むか、またはそれからなる。

【０１３８】

発現制御の追加の層は、リコンビナーゼ応答性逆位カセット（ＲＲＩＣ）を介して達成することができる。いくつかの実施形態では、ＲＲＩＣは、中央に中心要素および制御要素の両側に隣接するリコンビナーゼ認識部位を含む。

【０１３９】

いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ応答性逆位カセット（ＲＲＩＣ）は、以下の構成を採用する：

５’－リコンビナーゼ認識部位Ａ１－中心要素－リコンビナーゼ認識部位Ａ２－３’、

ここで、リコンビナーゼ認識部位Ａ１およびＡ２が、対応するリコンビナーゼの存在下で、中心要素の方向の反転を媒介する。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位Ａ１およびＡ２は、反対方向にある。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位Ａ１およびＡ２は、同じヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、Ｆｌｐリコンビナーゼである。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位は、ＦＲＴ部位である。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位は、ＦＲＴ－１部位である。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、Ｃｒｅリコンビナーゼである。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位は、Ｌｏｘ部位である。

【０１４０】

いくつかの実施形態では、ＲＲＩＣの中心要素は、プロモーターまたはプロモーターの一部を含むか、またはそれからなり、こうしたＲＲＩＣは、任意選択的にコード領域の上流に配置することができる。いくつかの実施形態では、ＲＲＩＣの中心的要素は、コード領域（例えば、オープンリーディングフレーム）またはコード領域の一部を含むかまたはそれからなり、こうしたＲＲＩＣは、任意選択的にプロモーター領域の下流に配置することができる。いくつかの実施形態では、コード領域は、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのウイルスゲノムをコードする。いくつかの実施形態では、中心要素と、一方または両方の側の１つ以上のリコンビナーゼ認識部位との間に、追加ヌクレオチドが存在する。

【０１４１】

いくつかの実施形態では、ＲＲＩＣは、中心要素の両側に２つ以上のリコンビナーゼ認識部位を含む。いくつかの実施形態では、ＲＲＩＣは以下の構成を採用する：

５’－リコンビナーゼ認識部位Ａ１－リコンビナーゼ認識部位Ｂ１－中心要素－リコンビナーゼ認識部位Ａ２－リコンビナーゼ認識部位Ｂ２－３’、

ここで、リコンビナーゼ認識部位Ａ１およびＡ２の対、および／またはリコンビナーゼ認識部位Ｂ１およびＢ２の対が、対応するリコンビナーゼの存在下で中心要素の方向の反転を媒介することができる。いくつかの実施形態では、これら２つの対は、互いに直交する（すなわち、リコンビナーゼ認識部位Ａのうちの１つおよびリコンビナーゼ認識部位Ｂのうちの１つによって媒介される反転はない）。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位Ａ１およびＡ２は、反対方向にある。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位Ａ１およびＡ２は、同じヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位Ｂ１およびＢ２は、反対方向にある。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位Ｂ１およびＢ２は、同じヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、Ｆｌｐリコンビナーゼである。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位は、ＦＲＴ部位である。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位の一方の対（対Ａまたは対Ｂのいずれか）は、ＦＲＴ－１部位を含み、他方の対は、ＦＲＴ－１４部位を含む。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、Ｃｒｅリコンビナーゼである。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位は、Ｌｏｘ部位である。上記の構成では、これらの要素の間に追加のポリヌクレオチドが存在し得る。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位の一方の対（対Ａまたは対Ｂのいずれか）によって媒介される反転は、他方の対を同じ方向にし、その結果、リコンビナーゼ認識部位の他方の対は、ＲＲＩＣの一部の切除を媒介できるようになり、以下の新しいポリヌクレオチド構成をもたらすことができる。
５’－リコンビナーゼ認識部位Ａ－中心要素（逆位）－リコンビナーゼ認識部位Ｂ－３’。
いくつかの実施形態では、切除が行われると、反応は不可逆的である。したがって、このような構成で２対のリコンビナーゼ認識部位を有する利点の１つは、一度リコンビナーゼによって実施される中心要素の反転が、不可逆的であり得ることである。
【０１４３】
追加の要素を、ＲＲＩＣに組み込むことができる。非限定的な例として、１つ以上の制御要素を、ＲＲＩＣに組み込むことができる。いくつかの実施形態では、１つ以上の制御要素は、リコンビナーゼ認識部位間の１つ以上の領域内に組み込まれてもよい。いくつかの実施形態では、制御要素は、本開示のＳＴＯＰ要素または他の転写／翻訳終結シグナルであってもよい。いくつかの実施形態では、転写／翻訳終結シグナルの導入は、コード領域近くの潜在的なプロモーター領域および／または転写開始シグナルによる機能的なペイロードタンパク質またはウイルスゲノムの偶発的または漏出的な発現を防止する。
【０１４４】
したがって、いくつかの実施形態では、ＲＲＩＣは、以下の構成を採用する：
５’－リコンビナーゼ認識部位Ａ１－制御要素１（任意選択）－リコンビナーゼ認識部位Ｂ１－中心要素－リコンビナーゼ認識部位Ａ２－制御要素２（任意選択）－リコンビナーゼ認識部位Ｂ２－３’、
ここで、制御要素の一方または両方が、ＲＲＩＣに存在し得る。いくつかの実施形態では、制御要素は同じである。いくつかの実施形態では、制御要素は異なる。いくつかの実施形態では、制御要素のうちの１つ以上は、ＳＴＯＰ要素である。
【０１４５】
上述のＲＲＩＣの非限定的な例を図１０Ａに図示し、ここで、リコンビナーゼはＦｌｐであり、リコンビナーゼ認識部位はＦＲＴ－１およびＦＲＴ－１４であり、制御要素はＳＴＯＰ３要素であり、中心要素はプロモーターである。プロモーターは、反転が起こる前に対象のｃＤＮＡに対して逆位に配向され、したがって、Ｆｌｐリコンビナーゼの非存在下ではｃＤＮＡ発現を駆動することができない。Ｆｌｐリコンビナーゼが存在しない場合、ＳＴＯＰカセットも安定的に組み込まれ、転写を終結し、それにより逆位のプロモーター要素の配向を維持するよう機能する。Ｆｌｐリコンビナーゼが存在する場合、それは逆位のＦＲＴ要素の１対（ＦＲＴ－１またはＦＲＴ－１４のいずれか）の間で組換えを媒介し、それらの間に位置付けられたすべての要素を反転させる。図１０Ａでは、この反転事象がＦＲＴ－１要素に対して示されているが、ＦＲＴ－１４要素に対して同様の反応が起こり得る。反転事象は、それがｃＤＮＡ発現を潜在的に駆動できるようにプロモーターを配向し、他方のＦＲＴ対の反対向きのＦＲＴ要素も逆位リピートからダイレクトリピート方向へ変換することに留意されたい。十分なＦＬＰが依然として利用可能である場合、図１０ＡのＦＲＴ－１４に示されるように、第１の反応を逆転させ、元の構成を再生成するか、またはダイレクトリピートＦＲＴ要素のセットを組み換えるかのいずれかで、第２の組換え反応を媒介することができる。この第２の反応は、不可逆的にＳＴＯＰ要素を切除し、対象のｃＤＮＡの発現を活性化する。図１０Ａの設計は、本開示では、時には「プロモーター逆位設計」と呼ばれることもある。例示的なプロモーター逆位設計が、配列番号８６０として本明細書に提供される。同様に、図１０Ｂは、プロモーター逆位要素に類似しているが、プロモーターの代わりにｃＤＮＡペイロードの反転を伴うプロセスである、Ｆｌｐリコンビナーゼの存在下で反転される中心要素としてのペイロードコード領域を有するＲＲＩＣの非限定的な例を示す。図１０Ｂの設計は、本開示では、「ペイロード逆位設計」と呼ばれることもある。例示的なペイロード逆位設計が、配列番号８６１として本明細書に提供される。
【０１４６】

いくつかの実施形態では、１つ以上のイントロンおよび／またはスプライシング要素が本開示のカセットに挿入される。いくつかの実施形態では、１つ以上のイントロンは、ＲＲＩＣに挿入され、および／またはＲＲＩＣに隣接している。いくつかの実施形態では、発現カセットは以下の構成を採用する：
５’－リコンビナーゼ認識部位Ａ１－制御要素１（任意選択）－リコンビナーゼ認識部位Ｂ１－イントロンＣ１を有する中心要素－リコンビナーゼ認識部位Ａ２－制御要素２（任意選択）－リコンビナーゼ認識部位Ｂ２－イントロンＣ２－３’コード領域－３’、
ここで、イントロンＣ１を有する中心要素が、以下の構成を含む：
５’－プロモーター－５’コード領域－イントロンＣ１－３’（カセット内逆方向）、
いくつかの実施形態では、カセット内の５’コード領域の最初の方向は、３’コード領域の方向とは反対である。いくつかの実施形態では、追加のヌクレオチドは、これらの要素のいずれかまたはすべての間に存在する。ＲＲＩＣの場合と同様に、リコンビナーゼは、リコンビナーゼ認識部位を介して逆位／切除事象を媒介することができ、最終的な不可逆的組換え産物は以下の構成を採用する：
５’－リコンビナーゼ認識部位Ａ－プロモーター－５’コード領域－イントロンＣ１－リコンビナーゼ認識部位Ｂ－イントロンＣ２－３’コード領域－３’、
ここで、ｍＲＮＡ転写後のイントロンからイントロン領域の除去（イントロンＣ１およびイントロンＣ２要素によって介在される）が、コード領域内に余分なヌクレオチドを含まない完全なコード領域を生成する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される１つ以上のイントロン領域を導入することによって、コード領域の近くに潜在的なプロモーター領域および／または転写開始シグナルが存在することによる、機能的ペイロードタンパク質またはウイルスゲノムの偶発的または漏出的な発現を防止する。

【０１４７】

非限定的な例を図１１に図示する（本開示では、「分割イントロン逆位設計」と呼ばれることもある）。例示的な分割イントロン逆位設計が、配列番号８６２として本明細書に提供される。分割イントロン逆位設計は、プロモーター逆位設計と同様に機能する。しかしながら、主な違いは、ｃＤＮＡが、ＡＣＴＢ遺伝子のイントロン３（配列番号８６３）に基づいて、一対のスプリットイントロンを含有するように操作されており、これはコード領域を破壊する。イントロンは、５’－スプライスドナーおよび３’－スプライスアクセプター断片に分割され、ＢａｍＨＩおよびＥｃｏＲＶ制限部位が分割の位置を示している。ここでの中心要素は、プロモーター、５’ｃＤＮＡ要素、イントロンうちの１つ、および３’ｃＤＮＡ要素に対して反対方向にある５’－スプライスドナー部位を含む。中心要素は、プロモーター逆位設計と同様に、ＳＴＯＰ３要素およびＦＲＴ部位が隣接している。Ｆｌｐリコンビナーゼの非存在下では、ｃＤＮＡの２つの部分が分割され、反対方向に配置されているため、完全なｃＤＮＡの発現を駆動することができず、ＳＴＯＰ要素は安定的に組み込まれ、転写を終結し、それにより逆位プロモーターおよび５’ｃＤＮＡ要素の配向を維持するよう機能する。Ｆｌｐリコンビナーゼが存在する場合、それは１つのセットの反転タンデムＦＲＴ部位の間の組換えを媒介し、それらの間に位置付けられたすべての要素を反転させる。図１１では、この反転事象がＦＲＴ－１部位に対して示されているが、ＦＲＴ－１４部位に対して同様の反応が起こり得る。反転事象は、プロモーターおよび部分ｃＤＮＡ要素を方向付けて、それがｃＤＮＡ発現を潜在的に駆動できるようにし、またＦＲＴ部位の他の対も逆位リピートからダイレクトリピート方向へ変換することに留意されたい。十分なＦＬＰが依然として利用可能である場合、図１１のＦＲＴ－１４に示されるように、第１の反応を逆転させ、元の構成を再生成するか、または他にダイレクトリピートＦＲＴ要素のセットを組み換えるかのいずれかで、第２の組換え反応を媒介することができる。第２の事例では、得られた発現カセットは、内部イントロンを有する完全ｃＤＮＡをコードするポリヌクレオチドを含み、転写されると、ＲＮＡスプライシング後にイントロンまたはＦＲＴ部位のない完全ｃＤＮＡを形成する。したがって、この第２の反応は、対象のｃＤＮＡの発現を不可逆的に活性化し得る。

【０１４８】

ペイロード分子
　いくつかの実施形態では、一次ウイルスは、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチド、およびペイロード分子をコードするポリヌクレオチドを含む。「ペイロード分子」は、一次および／または二次の腫瘍溶解性ウイルス、または一次および／または二次ウイルスの治療有効性をさらに強化することができる任意の分子を指し、これには、サイトカイン、ケモカイン、酵素、抗体、またはその抗原結合断片、可溶性受容体、細胞表面受容体のリガンド、二部分（ｂｉ－ｐａｒｔｉｔｅ）ペプチド、三部分（ｔｒｉ－ｐａｒｔｉｔｅ）ペプチド、および細胞傷害性ペプチドが含まれる。
【０１４９】
　いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、細胞傷害性ペプチドである。「細胞傷害性ペプチド」は、宿主細胞で発現されたときに細胞死を誘導することができ、および／または宿主細胞によって分泌されたときに隣接細胞の細胞死を誘導することができるタンパク質を指す。いくつかの実施形態では、細胞障害性ペプチドは、カスパーゼ、ｐ５３、ジフテリア毒素（ＤＴ）、シュードモナス外毒素Ａ（ＰＥＡ）、リボソーム不活性化タンパク質（ＲＩＰ）Ｉ型（例えば、サポリンおよびジェロニン）、ＲＩＰ　ＩＩ型（例えば、リシン）、志賀様毒素１型（Ｓｌｔ１）、光感受性活性酸素種（例えばキラーレッド）である。いくつかの実施形態では、細胞障害性ペプチドは、例えばカスパーゼ遺伝子などのアポトーシスを介した細胞死をもたらす自殺遺伝子によってコードされる。
【０１５０】
　いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、細胞表面受容体、例えば、免疫チェックポイント受容体（例えば、ＰＤ１、ＰＤＬ１、およびＣＴＬＡ４）、または細胞増殖および活性化に関与する追加の細胞表面受容体（例えば、ＯＸ４０、ＣＤ２００Ｒ、ＳＩＲＰα、ＣＳＦ１Ｒ、４－１ＢＢ、ＣＤ４０、およびＮＫＧ２Ｄ）に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、細胞表面受容体のリガンドである。ペイロードとしての使用に適した例示的なリガンドとしては、以下に限定されないが、ＮＫＧ２Ｄリガンド、ニューロピリンリガンド、Ｆｌｔ３リガンド、４－１ＢＢＬ、ＣＤ４０Ｌ、ＧＩＴＲＬ、ＬＩＧＨＴ、およびＣＤ４７が挙げられる。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、可溶性受容体である。ペイロードとしての使用に適した例示的な可溶性受容体としては、限定されるものではないが、ＩＬ－１３Ｒ、ＴＧＦβＲ１、ＴＧＦβＲｒ２、ＳＩＲＰα、ＰＤ－１、ＩＬ－３５Ｒ、ＩＬ－１５Ｒ、ＩＬ－２Ｒ、ＩＬ－１２Ｒ、およびインターフェロン受容体などの可溶性受容体が挙げられる。
【０１５１】
　いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、サイトカインである。ペイロードとしての使用に適した例示的なサイトカインには、ＩＬ－１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－３６、ＴＮＦα、ＩＦＮα、ＩＦＮβ、およびＩＦＮγが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、ケモカインである。ペイロードとしての使用に適した例示的なケモカインとしては、限定されないが、ＣＸＣＬ１０、ＣＸＣＬ９、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ４、およびＣＣＬ５が挙げられる。
【０１５２】
　いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、酵素である。ペイロードとしての使用に適した例示的な酵素としては、限定されるものではないが、アデノシンデアミナーゼ、１５－ヒドロキシプロスタグランジンデヒドロゲナーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ（例えば、ＭＭＰ９）、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、ゼラチナーゼ、およびエラスターゼが挙げられる。いくつかの実施形態では、酵素は、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ニトロレダクターゼ、カルボキシペプチダーゼＧ２、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、またはチトクロムＰ４５０などの遺伝子指向性酵素プロドラッグ療法（ＧＤＥＰＴ）システムの一部である。いくつかの実施形態では、酵素は、標的細胞における細胞死経路を誘導または活性化することができる（例えば、カスパーゼ）。

【０１５３】
いくつかの実施形態では、ペイロード分子は、非がんエフェクター細胞上に発現される細胞表面抗原を結合することができる第１のドメインと、標的細胞（例えば、がん細胞、腫瘍細胞、または異なるタイプのエフェクター細胞）によって発現される細胞表面抗原を結合することができる第２のドメインとを含む、二部分ペプチドである。いくつかの実施形態では、二部分ポリペプチドの個々のポリペプチドドメインは、抗体またはその結合断片（例えば、単鎖可変領域断片（ｓｃＦｖ）またはＦ（ａｂ））サソリポリペプチド、二重特異性抗体、フレキシボディ（ｆｌｅｘｉｂｏｄｙ）、ＤＯＣＫ－ＡＮＤ－ＬＯＣＫ（商標）抗体、またはモノクローナル抗イディオタイプ抗体（ｍＡｂ２）を含んでもよい。いくつかの実施形態では、二部分ポリペプチドの構造は、二重可変ドメイン抗体（ＤＶＤ－ＩＧ（商標））、ＴＡＮＤＡＢ（登録商標）、二重特異性Ｔ細胞エンゲイジャー（ＢＩＴＥ（商標））、ＤＵＯＢＯＤＹ（登録商標）、または二重親和性再標的化（ｄｕａｌ ａｆｆｉｎｉｔｙ ｒｅｔａｒｇｅｔｉｎｇ）（ＤＡＲＴ）ポリペプチドであってもよい。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞上に発現される細胞表面抗原は、腫瘍抗原である。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、ＣＤ１９、ＥｐＣＡＭ、ＣＥＡ、ＰＳＭＡ、ＣＤ３３、ＥＧＦＲ、Ｈｅｒ２、ＥｐｈＡ２、ＭＣＳＰ、ＡＤＡＭ１７、ＰＳＣＡ、１７－Ａ１、ＮＫＧＤ２リガンド、ＣＳＦ１Ｒ、ＦＡＰ、ＧＤ２、ＤＬＬ３、またはニューロピリンから選択される。

【０１５４】
いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドと、ペイロード分子をコードするポリヌクレオチドとを含み、ＲＮＡｉ分子の標的配列が、ペイロード分子をコードするポリヌクレオチドの１つ以上の位置に挿入される。

【０１５５】
いくつかの実施形態では、ペイロード分子をコードするポリヌクレオチドは、細胞または対象におけるペイロード分子の発現を防止するために、１つ以上の内部ＲＮＡｉ標的配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、内部ＲＮＡｉ標的配列は、ｓｉＲＮＡ分子、ＡｍｉＲＮＡ分子、またはｍｉＲＮＡ分子の標的配列である。いくつかの実施形態では、内部ＲＮＡｉ配列は、ウイルス構築物を細胞に導入した後、または対象に投与した後に、ペイロード分子の発現のさらなる時間的制御を可能にする。こうした実施形態では、内部ＲＮＡｉ標的配列は、細胞によって内因的に発現されるｍｉＲＮＡのｍｉＲＮＡ標的配列である。例えば、いくつかの実施形態では、ペイロード分子をコードするポリヌクレオチドは、非がん細胞によって内因性に発現されるｍｉＲＮＡに対する１つ以上の内部標的配列を含み、その結果、ペイロード分子は、その細胞において発現されない。

【０１５６】
いくつかの実施形態では、内部ＲＮＡｉ配列は、二重ウイルスベクターの産生中のペイロード分子の発現の制御を可能にする。いくつかの実施形態では、内部ＲＮＡｉ標的配列は、ｓｉＲＮＡ分子、ＡｍｉＲＮＡ分子、あるいは産生細胞株によってまたは試料もしくは対象の細胞によって内因性に発現されない人工ｍｉＲＮＡ分子、の標的配列である。

【０１５７】
プロモーター

いくつかの実施形態では、プロモーターはテトラサイクリン（Ｔｅｔ）依存性プロモーターである。いくつかの実施形態では、Ｔｅｔ依存性プロモーターは、プロモーター要素の下流にＴｅｔ－Ｏｎ要素を含む。いくつかの実施形態では、プロモーターは、ＣＭＶプロモーター（配列番号８９７）、ＨＳＶ ｇＢプロモーター（配列番号９００）、ＨＳＶ ｇＣプロモーター（配列番号９０１）、ＨＳＶ ＩＣＰ８プロモーター（配列番号８９９）、ＨＳＶ ＴＫプロモーター（配列番号８９８）、ＨＢＰ１プロモーター（ＨＳＶ－ＩＣＰ８および－ＴＫプロモーターのハイブリッド）、またはＨＢＰ２プロモーター（ＨＳＶ－ＴＫおよび－ＩＣＰ８プロモーターのハイブリッド）である。いくつかの実施形態では、プロモーターはＣＭＶプロモーターである。例示的なＨＢＰ１－ＴｅｔＯｎプロモー

ターは、配列番号８６５として提供される。例示的なＨＢＰ２－ＴｅｔＯｎプロモーターは、配列番号８６６として提供される。いくつかの実施形態では、プロモーターは、配列番号８６５～８６６および８９７～９０１による配列のいずれか一つに対して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％の同一性を有する核酸配列を含む。

【０１５８】

一次ウイルス

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）ウイルスである。例示的なｄｓＤＮＡウイルスとしては、Ｍｙｏｖｉｒｉｄａｅファミリー、Ｐｏｄｏｖｉｒｉｄａｅファミリー、Ｓｉｐｈｏｖｉｒｉｄａｅファミリー、Ａｌｌｏｈｅｒｐｅｓｖｉｒｉｄａｅファミリー、Ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｉｄａｅファミリー（例えば、ＨＳＶ－１、ＨＳＶ－１、ウマヘルペスウイルス）、Ｐｏｘｖｉｒｉｄａｅファミリー（例えば、伝染性軟属腫ウイルス、ワクシーナウイルス、粘液腫ウイルス）、およびＡｄｅｎｏｖｉｒｉｄａｅファミリー（例えば、アデノウイルス）のメンバーが含まれる。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、ＨＳＶ－１またはＨＳＶ－２である。

【０１５９】

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、ＲＮＡウイルスである。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、パラミクソウイルスまたはラブドウイルスである。

【０１６０】

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドの挿入を除いて、野生型ウイルスと比較して改変を含まない。いくつかの実施形態では、一次ウイルスは、ＨＳＶである。ＨＳＶウイルスベクターおよびその構築方法は、例えば、米国特許第７，０７８，０２９号、第６，２６１，５５２号、第５，９９８，１７４号、第５，８７９，９３４号、第５，８４９，５７２号、第５，８４９，５７１号、第５，８３７，５３２号、第５，８０４，４１３号、および第５，６５８，７２４号、ならびに国際特許出願第９１／０２７８８号、第９６／０４３９４号、第９８／１５６３７号、および第９９／０６５８３号に記載されており、これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。ＨＳＶの配列は公開されており（ＮＣＢＩアクセッション番号ＮＣ＿００１８０６号、ＭｃＧｏｅｃｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ，６９（ＰＴ　７），１５３１－１５７４（１９８８）を参照されたい）、追加のＨＳＶウイルスベクターの設計に使用できる。

【０１６１】

いくつかの実施形態では、一次ウイルスは、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドと、野生型ウイルスと比較して１つ以上の追加の改変とを含む。いくつかの実施形態では、一次ウイルスは、野生型ＨＳＶのバリアントである。バリアントＨＳＶベクターおよびその構築方法は、米国特許第９，５９３，３４７号、米国特許出願公開第２０１６－０２５０２６７号、第２０１７－００３６８１９号、第２０１７－０２７４０２５号、第２０１７－０１８９５１４号、および第２０１７－０１０７５３７号、ならびに国際ＰＣＴ公開　第２０１１／０１３０７４９号および第２０１５／０６６０４２号に記載されており、これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、一次ウイルスはバリアントＨＳＶであり、内部反復（ジョイント）領域の欠失を含み、この領域は、ＩＣＰ０、ＩＣＰ３４．５、ＬＡＴ、およびＩＣＰ４のそれぞれの１つのコピーと、ＩＣＰ４７遺伝子のプロモーターとを含む（例えば、米国特許第１０，２１０，５７５号、第１０，１７２，８９３号、および第１０，１８８，６８６号を参照されたい）。

【０１６２】

いくつかの実施形態では、一次ウイルスは、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドと、一次ウイルスの細胞への侵入を強化する１つ以上の

改変とを含む。いくつかの実施形態では、一次ウイルスは、非標準の受容体を介した細胞へのウイルス侵入を促進する、および／またはウイルス横方向の広がりに通常耐性のある細胞での横方向の広がりを強化する、１つ以上の表面糖タンパク質における変異を含む。いくつかの実施形態では、一次ウイルスは、標的細胞の表面受容体に結合するｓｃＦｖまたは他の抗原結合分子などのウイルスの表面上に非天然リガンドを含む。いくつかの実施形態では、標的細胞上の表面受容体は、ＥＧＦ－Ｒである。

【０１６３】

いくつかの実施形態では、一次ウイルスは、バリアントＨＳＶであり、細胞への増強された侵入を示す。いくつかの実施形態では、一次ＨＳＶは、ＨＳＶ感染の典型的なメディエーター以外の細胞タンパク質（例えば、ネクチン１、ＨＶＥＭ、またはヘパラン硫酸／コンドロイチン硫酸プロテオグリカン以外）との相互作用を介して、直接細胞に感染し得る。いくつかの実施形態では、一次ウイルスはバリアントＨＳＶであり、非標準の受容体を介したウイルス侵入を促進するｇＢまたはｇＨ遺伝子の変異を含む。いくつかの実施形態では、一次ウイルスはバリアントＨＳＶであり、例えばｇＤ受容体を欠く細胞など、ＨＳＶの横方向の広がりに通常耐性のある細胞での横方向の広がりを示す変異型ｇＨ糖タンパク質を含む。

【０１６４】

いくつかの実施形態では、一次ウイルスは、バリアントＨＳＶであり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第９，５９３，３４７号に記載される変異型ｇＢまたはｇＨタンパク質のうちの１つ以上を含む。ＨＳＶ　ｇＢまたはｇＨ糖タンパク質の非限定的な変異には、以下の残基のうちの１つ以上における変異が含まれる、ｇＢ：Ｄ２８５、ｇＢ：Ａ５４９、ｇＢ：Ｓ６６８、ｇＨ：Ｎ７５３、およびｇＨ：Ａ７７８。いくつかの実施形態では、一次ＨＳＶは、ｇＢ：Ｄ２８５およびｇＢ：Ａ５４９の両方で、ｇＨ：Ｎ７５３およびｇＨ：Ａ７７８の両方で、ならびに／またはｇＢ：Ｓ６６８、ｇＨ：Ｎ７５３、およびｇＨ：Ａ７７８の各々で、変異を含む。いくつかの実施形態では、一次ＨＳＶは、ｇＢ：２８５、ｇＢ：５４９、ｇＨ：７５３、およびｇＨ：７７８での変異を含む。いくつかの実施形態では、一次ＨＳＶは、以下の変異のうちの１つ以上を含む：ｇＢ：Ｄ２８５Ｎ、ｇＢ：Ａ５４９Ｔ、ｇＢ：Ｓ６６８Ｎ、ｇＨ：Ｎ７５３Ｋ、またはｇＨ：Ａ７７８Ｖ。いくつかの実施形態では、一次ＨＳＶは、ｇＢ：Ｄ２８５Ｎ／ｇＢ：Ａ５４９Ｔ二重変異、ｇＨ：Ｎ７５３Ｋ／ｇＨ：Ａ７７８Ｖ二重変異、またはｇＢ：Ｓ６６８Ｎ／ｇＨ：Ｎ７５３Ｋ／ｇＨ：Ａ７７８Ｖ三重変異を含む。いくつかの実施形態では、一次ＨＳＶは、ｇＢ：Ｄ２８５Ｎ／ｇＢ：Ａ５４９Ｔ／ｇＨ：Ｎ７５３Ｋ／ｇＨ：Ａ７７８Ｖの変異を含む。本明細書では、変異は、ＨＳＶ－１株ＫＯＳ誘導体Ｋ２６ＧＦＰのｇＤ、ｇＢ、およびｇＨ遺伝子のコドン（アミノ酸）ナンバリングと比較して言及される。

【０１６５】

いくつかの実施形態では、一次ウイルスはバリアントＨＳＶであり、ＰＣＴ国際公開第２０１６／１４１３２０号およびＲｉｃｈａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｌｏｓ　Ｐａｔｈｏｇｅｎｓ，２０１７，１３（１２），ｅ１００６７４１に記載されるものなど、神経細胞のＨＳＶ感染を低減させるＵＬ３７遺伝子に１つ以上の変異を含む。

【０１６６】

二次ウイルス

いくつかの実施形態では、本開示は、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスを提供する。いくつかの実施形態では、コードされた二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、複製能力を有し、宿主細胞に感染して殺滅させることができる。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、複製能力を有する。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスおよび二次腫瘍溶解性ウイルスの両方は、複製能力を有する。いくつかの実施形態では、一次ウイルスおよび二次ウイルスの両方は、複製能力を有する。

【０１６７】

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは複製能力を有しない。いくつかの実施形態では、複製能力を有しない一次腫瘍溶解性ウイルスは、ＨＳＶである。

【０１６８】

いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、複製能力を有しない。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、エンベロープタンパク質コード領域における欠失または変異により複製能力を有しない。いくつかの実施形態では、複製能力を有しない二次ウイルスをコードする一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのエンベロープタンパク質のコード領域を、任意選択的に二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのコード領域の外側に、含む。いくつかの実施形態では、複製能力を有しない二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、アルファウイルスである。

【０１６９】

いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、ＲＮＡウイルスである。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）ウイルスである。いくつかの実施形態では、ｓｓＲＮＡウイルスは、ポジティブセンスｓｓＲＮＡ（＋センスｓｓＲＮＡ）ウイルスまたはネガティブセンスｓｓＲＮＡ（－センスｓｓＲＮＡ）ウイルスである。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、ＤＮＡウイルスである。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）ウイルスまたは一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）ウイルスである。

【０１７０】

いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、＋センスｓｓＲＮＡウイルスである。例示的な＋センスｓｓＲＮＡウイルスとしては、Ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅファミリー（例えば、コクサッキーウイルス、ポリオウイルス、およびＳＶＶ－Ａを含むセネカバレーウイルス（ＳＶＶ）、Ｃｏｒｏｎａｖｉｒｉｄａｅファミリー（例えば、ＨＣｏＶ－２２９ＥおよびＨＣｏＶ－ＮＬ６３などのアルファコロナウイルス、ＨＣｏＶ－ＨＫＵ１、ＨＣｏＶ－ＯＣ３およびＭＥＲＳ－ＣｏＶなどのベータコロナウイルス）、Ｒｅｔｒｏｖｉｒｉｄａｅファミリー（例えば、マウス白血病ウイルス）、およびＴｏｇａｖｉｒｉｄａｅファミリー（シンドビスウイルス）のメンバーが含まれる。ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスの追加の例示的な属および種を、以下の表Ａに示す。

【表２－１】

表Ａ：例示的なポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルス

ファミリー/サブファミリー	属	自然宿主	種
Picornaviridae	カルディオウイルス	ヒト	
	コサウイルス (Cosavirs)	ヒト	
	エンテロウイルス	ヒト	コクサッキーウイルス
		ヒト	ポリオウイルス
	ヘパトウイルス	ヒト	
	コブウイルス	ヒト	
	パレコウイルス	ヒト	
	ロザウイルス	ヒト	
	サリウイルス	ヒト	
	パシウイルス	ブタ	
	セネカウイルス	ブタ	セネカバレーウイルスＡ
Caliciviridae	サポウイルス	ヒト	
	ノロウイルス	ヒト	
	ネボウイルス	ウシ	
	ベジウイルス	猫/ブタ	
Hepeviridae	オルソヘペウイルス		
Astroviridae	ママストロウイルス	ヒト	
	アバストロウイルス	鳥類	
Flaviviridae	ヘパシウイルス	ヒト	
	フラビウイルス	節足動物	

【表２－２】

ファミリー/サブファミリー	属	自然宿主	種
	ペギウイルス		
	ペスチウイルス	哺乳類	
Coronaviridae/Coronavirinae	アルファコロナウイルス		HCoV-229E
			HCoV-NL63
	ベータコロナウイルス		HCoV-HKU1
			HCoV-OC3
			MERS-CoV
	デルタコロナウイルス		
	ガンマコロナウイルス		
Coronaviridae/Torovirinae	バフィニウイルス		
	トロウイルス		
Retroviridae	ガンマレトロウイルス		マウス白血病ウイルス
Togaviridae	アルファウイルス		シンドビスウイルス

【０１７１】
いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、セネカバレーウイルス（ＳＶＶ）である。いくつかの実施形態では、ＳＶＶのウイルスゲノムは、配

列番号８４２に対して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９３％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、または１００％の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、配列番号８４２によるヌクレオチド３５０５～７３１０に対して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９３％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、または１００％の配列同一性を有するＳＶＶウイルスゲノムの一部を含む。

【０１７２】

いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、コクサッキーウイルスである。いくつかの実施形態では、コクサッキーウイルスは、ＣＶＢ３、ＣＶＡ２１、およびＣＶＡ９から選択される。例示的なコクサッキーウイルスの核酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋ参照番号Ｍ３３８５４．１（ＣＶＢ３）、ＧｅｎＢａｎｋ参照番号ＫＴ１６１２６６．１（ＣＶＡ２１）、およびＧｅｎＢａｎｋ参照番号Ｄ００６２７．１（ＣＶＡ９）が提供される。いくつかの実施形態では、コクサッキーウイルスのウイルスゲノムは、配列番号８４３に対して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９３％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、または１００％の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、配列番号８４３よるヌクレオチド３７９７～７４３５に対して、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９３％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、または１００％の配列同一性を有するコクサッキーウイルスウイルスウイルスゲノムの一部を含む。

【０１７３】

いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、キメラウイルスである（例えば、第１のウイルスに由来する、キャプシドタンパク質またはＩＲＥＳなどの一部と、第２のウイルス由来のプロテアーゼまたはポリメラーゼなどの非構造遺伝子などの別の部分を含むウイルスをコードする）。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、キメラピコルナウイルスである。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、キメラＳＶＶである。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、キメラコクサッキーウイルスである。

【０１７４】

いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのウイルスゲノムは、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）標的配列（ｍｉＲ－ＴＳ）カセットを含み、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含み、細胞内の１つ以上の対応するｍｉＲＮＡの発現は、細胞内のコードされた腫瘍溶解性ウイルスまたはコードされたウイルスの複製を阻害する。いくつかの実施形態では、１つ以上のｍｉＲＮＡは、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－１、ｍｉＲ－１４３、ｍｉＲ－１２８、ｍｉＲ－２１９、ｍｉＲ－２１９ａ、ｍｉＲ－１２２、ｍｉＲ－２０４、ｍｉＲ－２１７、ｍｉＲ－１３７、およびｍｉＲ－１２６から選択される。いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、ｍｉＲ－１２４標的配列の１つ以上のコピー、ｍｉＲ－１標的配列の１つ以上のコピー、およびｍｉＲ－１４３標的配列の１つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、ｍｉＲ－１２８標的配列の１つ以上のコピー、ｍｉＲ－２１９ａ標的配列の１つ以上のコピー、およびｍｉＲ－１２２標的配列の１つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、ｍｉＲ－１２８標的配列の１つ以上のコピー、ｍｉＲ－２０４標的配列の１つ以上のコピー、およびｍｉＲ－２１９標的配列の１つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、ｍｉＲ－２１

７標的配列の１つ以上のコピー、ｍｉＲ－１３７標的配列の１つ以上のコピー、およびｍｉＲ－１２６標的配列の１つ以上のコピーを含む。

【０１７５】

いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのウイルスゲノムは、１つ以上の必須ウイルス遺伝子の５’非翻訳領域（ＵＴＲ）または３’ＵＴＲに組み込まれた１つ以上のｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのウイルスゲノムは、１つ以上の非必須遺伝子の５’非翻訳領域（ＵＴＲ）または３’ＵＴＲに組み込まれた１つ以上のｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのウイルスゲノムは、１つ以上の必須のウイルス遺伝子の５’または３’に組み込まれた１つ以上のｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。

【０１７６】

＋センスｓｓＲＮＡウイルスのゲノムは、５’→３’方向にｓｓＲＮＡ分子を含み、これは、一次腫瘍溶解性ウイルスゲノムまたは一次ウイルスゲノムに挿入されたポリヌクレオチドから直接転写され、宿主細胞によって直接翻訳されてウイルスタンパク質を産生することができる。したがって、＋センスｓｓＲＮＡウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、挿入されたポリヌクレオチドから直接二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのゲノムを産生することができ、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスを産生するために追加のウイルス複製タンパク質の存在を必要としない。

【０１７７】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、ネガティブセンスの一本鎖ＲＮＡ（－センスｓｓＲＮＡ）ウイルスゲノムをコードする。例示的な－センスｓｓＲＮＡウイルスには、Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリー（例えば、麻疹ウイルスおよびニューカッスル病ウイルス）、Ｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅファミリー（例えば、水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）およびマラバウイルス）、Ａｒｅｎａｖｉｒｉｄａｅファミリー（例えば、ラッサウイルス）、およびＯｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリー（例えば、インフルエンザＡ、インフルエンザＢ、インフルエンザＣ、およびインフルエンザＤなどのインフルエンザウイルス）のメンバーが含まれる。ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスの追加の例示的な属および種を、以下の表Ｂに示す。

【表３－１】

表Ｂ：例示的なネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルス

ファミリー/サブファミリー	自然宿主	属	種	ウイルス
Bornaviridae	ウマ、ヒツジ、ウシ、げっ歯類、鳥類、爬虫類、およびヒト	カルボウイルス		
		オルソボルナウイルス	哺乳類オルソボルナウイルス	
Paramyxoviridae	脊椎動物	アクアパラミクソウイルス		
		エイブラウイルス		
		フェルラウイルス		
		ヘニパウイルス		
		モルビリウイルス		
		レスピロウイルス	ヒトレスピロウイ	HPIV-1

【表３－２】

ファミリー/サブファミリー	自然宿主	属	種	ウイルス
			ルス	HPIV-3
		ルブラウイルス	ヒトルブラウイルス	HPIV-2, HPIV-4a, HPIV-4b
			ムンプスウイルス	
Pneumoviridae	ヒト、ウシ、およびげっ歯類	メタニューモウイルス	ヒトメタニューモウイルス	
		オルソニューモウイルス	ヒトオルソニューモウイルス	HRSV-A2 HRSV-B1
Rhabdoviridae	脊椎動物(哺乳類および魚類)、植物、および昆虫	サイトラブドウイルス		
		ジコルハウイルス		
		エフェメロウイルス		
		リッサウイルス		
		ノビラブドウイルス		
		ヌクレオラブドウイルス		
		ペラブドウイルス		
		シグマウイルス		
		スプリビウイルス		
		チブロウイルス		
		ツパウイルス		
		バリコサウイルス		
		ベシクロウイルス	アラゴアスベシクロウイルス	
			カラジャスベシクロウイルス	
			チャンディプラベシクロウイルス	
			コーカルベシクロウイルス	
			インディアナベシクロウイルス	VSV
			イスファハンベシクロウイルス	
			マラバベシクロウイルス	MARAV
			ニュージャージーベシクロウイルス	
			ピリーベシクロウイルス	
Arenaviridae	げっ歯類、ヒト	ハートマニウイルス		
		アレナウイルス	ラッサウイルス	
		レプトアレナウイルス		

【表３－３】

ファミリー/サブファミリー	自然宿主	属	種	ウイルス
Orthomyxoviridae	ヒト、ブタ、イヌ、鳥類、ウマ、コウモリ	インフルエンザウイルスA	インフルエンザウイルスA	
		インフルエンザウイルスB	インフルエンザウイルスB	
		インフルエンザウイルスC	インフルエンザウイルスC	
		インフルエンザウイルスD	インフルエンザウイルスD	
		イサウイルス		
		トゴトウイルス		
		クアランジャウイルス		
未割り当て		デルタウイルス		

【０１７８】

－センスｓｓＲＮＡウイルスのゲノムは、３’→５’方向にｓｓＲＮＡ分子を含み、これは、一次腫瘍溶解性ウイルスゲノムまたは一次ウイルスゲノムに挿入されたポリヌクレオチドから直接転写することができない。むしろ、－センスｓｓＲＮＡ二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドは、最初に＋センスｍＲＮＡに転写され、その後、１つ以上のウイルスＲＮＡポリメラーゼによって複製されて－センスｓｓＲＮＡゲノムが産生される。このように、いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスに挿入された－センスｓｓＲＮＡウイルスをコードするポリヌクレオチドは、複製に必要なウイルスタンパク質をコードする第１の核酸配列と、－センスｓｓＲＮＡウイルスゲノムのアンチゲノム配列を含む第２の核酸配列とを含む。こうした実施形態では、第１の核酸配列は、宿主細胞によって－センスｓｓＲＮＡゲノムの複製に必要なウイルスタンパク質に直接翻訳され得る５’→３’ｍＲＮＡ転写物をコードし、第２の核酸配列は、－センスｓｓＲＮＡゲノムのアンチゲノム配列の５’→３’ｍＲＮＡ転写物をコードしている。次いで、５’の→３’アンチゲノム転写物は、第１の核酸配列によってコードされるウイルスタンパク質によって複製され、－センスｓｓＲＮＡゲノムが産生される。いくつかの実施形態では、第１および第２の核酸配列は、真核細胞で発現することができるプロモーター、例えば哺乳類プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、第１および第２の核酸配列は、両方向性Ｐｏｌ　ＩＩプロモーターなどの両方向性プロモーターに作動可能に連結されている。

【０１７９】

いくつかの実施形態では、二次＋センスおよび／または－センスｓｓＲＮＡ腫瘍溶解性ウイルスのゲノムは、ウイルスに固有の別個の５’末端および３’末端を必要とする。いくつかの実施形態では、二次＋センスおよび／または－センスｓｓＲＮＡウイルスのゲノムは、ウイルスに固有の別個の５’末端および３’末端を必要とする。哺乳類ＲＮＡ　Ｐｏｌ　ＩＩによって産生されるｍＲＮＡ転写物は、哺乳類５’および３’ＵＴＲを含有し、したがって、感染性ｓｓＲＮＡウイルスの産生に必要な別個の固有の末端を含有しない。したがって、いくつかの実施形態では、＋センスおよび／または－センスｓｓＲＮＡウイルスの産生は、ウイルスｓｓＲＮＡと哺乳類のｍＲＮＡの接合部でＰｏｌ　ＩＩでコードされたウイルスゲノム転写物の切断を可能にする追加の５’および３’配列を必要とし、その結果、ウイルスゲノムの内因性５’および３’の別個の末端を維持するために、非ウイルスＲＮＡが転写物から除去される。このような配列は、本明細書では接合部切断配列と呼称される。例えば、いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドは、以下の構造を含む：

（ａ）５’－Ｐｏｌ　ＩＩ－接合部切断－ウイルスゲノム－接合部切断－３’、

（ｂ）５’－Ｐｏｌ　ＩＩ－接合部切断－ウイルスアンチゲノム－接合部切断－３’。

【０１８０】

接合部切断配列は、様々な方法によって、ウイルスゲノム転写物から非ウイルスＲＮＡを除去することができる。例えば、いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、ＲＮＡｉ分子の標的である。例示的なＲＮＡ干渉物質としては、ｍｉＲＮＡ、ＡｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、およびｓｉＲＮＡが挙げられる。さらに、現在当技術分野で既知であるか、または将来定義される特定の部位でＲＮＡ転写物を切断するための任意のシステムを使用して、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスに固有の別個の末端を生成することができる。

【０１８１】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡｉ分子はｍｉＲＮＡであり、５’および／または３’接合部切断配列はｍｉＲＮＡ標的配列である。いくつかの実施形態では、ＲＮＡｉ分子はｓｉＲＮＡ分子であり、５’および／または３’接合部切断配列はｓｉＲＮＡ標的配列である。いくつかの実施形態では、ＲＮＡｉ分子は、ＡｍｉＲＮＡであり、５’および／または３’接合部切断配列は、ＡｍｉＲＮＡ標的配列である。

【０１８２】

いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）標的配列である。こうした実施形態では、ｇＲＮＡは、ＲＮａｓｅ活性を有するＣａｓエンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ１３）を用いて設計および導入されて、正確な接合部位でウイルスゲノム転写物の切断を媒介することができる。いくつかの実施形態では、５’および／または３’接合部切断配列は、ｇＲＮＡ標的配列である。いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡコード配列である。二次ウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチドが転写されると、これらの配列は、ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡステムループ構造を形成し、次いでドローシャによって核内で切断されて、正確な接合部で転写物を切断する。いくつかの実施形態では、５’および／または３’接合部切断配列は、ｐｒｉ－ｍＲＮＡ標的配列である。

【０１８３】

いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、リボザイムコード配列であり、ウイルス転写物の自己切断を媒介して、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの固有の別個の末端を生成する。いくつかの実施形態では、５’および／または３’接合部切断配列は、リボザイムコード配列である。いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、配列アプタザイムコード配列である。いくつかの実施形態では、５’および／または３’接合部切断配列は、アプタザイムコード配列である。

【０１８４】

いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、ｓｉＲＮＡ分子、ｍｉＲＮＡ分子、ＡｍｉＲＮＡ分子、またはｇＲＮＡ分子の標的配列である。こうした実施形態では、標的ＲＮＡ分子は、ＲＮＡｉ分子またはｇＲＮＡ分子のガイド配列に対し少なくとも部分的に相補的である。配列同一性パーセントおよび相補性パーセントの比較および決定のための配列アラインメントの方法は、当該技術分野で周知である。比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｗｕｎｓｃｈ，（１９７０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Ｐｅａｒｓｏｎ　ａｎｄ　Ｌｉｐｍａｎ，（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８５：２４４４の類似法の検索によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ制御された実施（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　Ｐａｃｋａｇｅ、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒｏｕｐ、５７５　Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｄｒ．，Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩにおけるＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡ、およびＴＦＡＳＴＡ）によって、手動でのアラインメントおよび目視検査（例えば、Ｂｒｅｎｔ　ｅｔ　ａｌ．，（２００３）Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙを参照されたい）によって、Ａｌｔｓｃｈｕｌ　ｅｔ　ａｌ．，（１９７７）　Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２、およびＡｌｔ

ｓｃｈｕｌ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０にそれぞれ記載されるＢＬＡＳＴおよびＢＬＡＳＴ２．０アルゴリズムを含む当該技術分野で既知のアルゴリズムの使用によって、行うことができる。ＢＬＡＳＴ解析を行うためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ）を通じて公開されている。

【０１８５】

いくつかの実施形態では、５’接合部切断配列および３’接合部切断配列は、同じグループ由来である（例えば、両方がＲＮＡｉ標的配列、両方がリボザイムコード配列など）。例えば、いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、ＲＮＡｉ標的配列（例えば、ｓｉＲＮＡ、ＡｍｉＲＮＡ、またはｍｉＲＮＡ標的配列）であり、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドの５’末端および３’末端に組み込まれる。こうした実施形態では、５’および３’のＲＮＡｉ標的配列は、同一であってもよく（すなわち、同じｓｉＲＮＡ、ＡｍｉＲＮＡ、またはｍｉＲＮＡの標的）、または異なっていてもよい（すなわち、５’配列は、あるｓｉＲＮＡ、ＡｍｉＲＮＡ、またはｍｉＲＮＡの標的であり、３’配列は、別のｓｉＲＮＡ、ＡｍｉＲＮＡ、またはｍｉＲＮＡの標的である）。いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、ガイドＲＮＡ標的配列であり、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドの５’末端および３’末端に組み込まれる。こうした実施形態では、５’および３’のｇＲＮＡ標的配列は、同一であってもよく（すなわち、同じｇＲＮＡの標的）、または異なっていてもよい（すなわち、５’配列は、あるｇＲＮＡの標的であり、３’配列は、別のｇＲＮＡの標的である）。いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、ｐｒｉ－ｍＲＮＡコード配列であり、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドの５’末端および３’末端に組み込まれる。いくつかの実施形態では、接合部切断配列は、リボザイムコード配列であり、ウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチド配列の直ぐ５’および３’で二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドに組み込まれる。

【０１８６】

いくつかの実施形態では、５’接合部切断配列および３’接合部切断配列は、同じグループに由来するが、バリアントまたはタイプが異なる。例えば、いくつかの実施形態では、５’および３’接合部切断配列は、ＲＮＡｉ分子の標的配列であって、５’接合部切断配列が、ｓｉＲＮＡ標的配列であり、３’接合部切断配列が、ｍｉＲＮＡ標的配列（またはその逆）である、ＲＮＡｉ分子の標的配列であってもよい。いくつかの実施形態では、５’および３’接合部切断配列は、リボザイムコード配列であって、５’接合部切断配列は、ハンマーヘッド型リボザイムコード配列であり、３’接合部切断配列は、肝炎デルタウイルスリボザイムコード配列である、リボザイムコード配列であってもよい。

【０１８７】

いくつかの実施形態において、５’接合部切断配列と３’接合部切断配列は、異なるタイプである。例えば、いくつかの実施形態では、５’接合部切断配列は、ＲＮＡｉ標的配列（例えば、ｓｉＲＮＡ、ＡｍｉＲＮＡ、またはｍｉＲＮＡ標的配列）であり、３’接合部切断配列は、リボザイム配列、アプタザイム配列、プリｍｉＲＮＡ配列、またはｇＲＮＡ標的配列である。いくつかの実施形態では、５’接合部切断配列は、リボザイム配列であり、３’接合部切断配列は、ＲＮＡｉ標的配列（例えば、ｓｉＲＮＡ、ＡｍｉＲＮＡ、またはｍｉＲＮＡ標的配列）、アプタザイム配列、ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡコード配列、またはｇＲＮＡ標的配列である。いくつかの実施形態では、５’接合部切断配列は、アプタザイム配列であり、３’接合部切断配列は、ＲＮＡｉ標的配列（例えば、ｓｉＲＮＡ、ＡｍｉＲＮＡ、またはｍｉＲＮＡ標的配列）、リボザイム配列、ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡ配列、またはｇＲＮＡ標的配列である。いくつかの実施形態では、５’接合部切断配列は、ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡ配列であり、３’接合部切断配列は、ＲＮＡｉ標的配列（例えば、ｓｉＲＮＡ、ＡｍｉＲＮＡ、またはｍｉＲＮＡ標的配列）、リボザイム配列、アプタザイム配列、ま

たはｇＲＮＡ標的配列である。いくつかの実施形態では、５’接合部切断配列は、ｇＲＮＡ標的配列であり、３’接合部切断配列は、ＲＮＡｉ標的配列（例えば、ｓｉＲＮＡ、ＡｍｉＲＮＡ、またはｍｉＲＮＡ標的配列）、リボザイム配列、ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡ配列、またはアプタザイム配列である。

【０１８８】

ｓｓＲＮＡ二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドに対する接合部切断配列の例示的な配置を表Ｃ１およびＣ２に示す。

【表４】

表Ｃ１：対称接合部切断配列（ＪＳＣ）配置

5’ JCS		JCS 3’
siRNA TS	2°oV ポリヌクレオチド	siRNA TS
miR TS	2°oV ポリヌクレオチド	miR TS
AmiR TS	2°oV ポリヌクレオチド	AmiR TS
gRNA TS	2°oV ポリヌクレオチド	gRNA TS
pri-miR	2°oV ポリヌクレオチド	pri-miR
リボザイム	2°oV ポリヌクレオチド	リボザイム
アプタザイム	2°oV ポリヌクレオチド	アプタザイム

【表５－１】

表Ｃ２：非対称ＪＣＳ配置

5’ JCS		JCS 3’
siRNA TS	2°oV ポリヌクレオチド	miR TS
siRNA TS	2°oV ポリヌクレオチド	AmiR TS
siRNA TS	2°oV ポリヌクレオチド	gRNA TS
siRNA TS	2°oV ポリヌクレオチド	pri-miR
siRNA TS	2°oV ポリヌクレオチド	リボザイム
siRNA TS	2°oV ポリヌクレオチド	アプタザイム
miR TS	2°oV ポリヌクレオチド	siRNA TS
miR TS	2°oV ポリヌクレオチド	AmiR TS
miR TS	2°oV ポリヌクレオチド	gRNA TS
miR TS	2°oV ポリヌクレオチド	pri-miR
miR TS	2°oV ポリヌクレオチド	リボザイム
miR TS	2°oV ポリヌクレオチド	アプタザイム
AmiR TS	2°oV ポリヌクレオチド	siRNA TS
AmiR TS	2°oV ポリヌクレオチド	miR TS
AmiR TS	2°oV ポリヌクレオチド	gRNA TS
AmiR TS	2°oV ポリヌクレオチド	pri-miR
AmiR TS	2°oV ポリヌクレオチド	リボザイム

【表５－２】

5’	JCS		JCS	3’
	AmiR TS	2°oV ポリヌクレオチド	アプタザイム	
	gRNA TS	2°oV ポリヌクレオチド	siRNA TS	
	gRNA TS	2°oV ポリヌクレオチド	miR TS	
	gRNA TS	2°oV ポリヌクレオチド	AmiR TS	
	gRNA TS	2°oV ポリヌクレオチド	pri-miR	
	gRNA TS	2°oV ポリヌクレオチド	リボザイム	
	gRNA TS	2°oV ポリヌクレオチド	アプタザイム	
	pri-miR	2°oV ポリヌクレオチド	siRNA TS	
	pri-miR	2°oV ポリヌクレオチド	miR TS	
	pri-miR	2°oV ポリヌクレオチド	AmiR TS	
	pri-miR	2°oV ポリヌクレオチド	gRNA TS	
	pri-miR	2°oV ポリヌクレオチド	リボザイム	
	pri-miR	2°oV ポリヌクレオチド	アプタザイム	
	リボザイム	2°oV ポリヌクレオチド	siRNA TS	
	リボザイム	2°oV ポリヌクレオチド	miR TS	
	リボザイム	2°oV ポリヌクレオチド	AmiR TS	
	リボザイム	2°oV ポリヌクレオチド	gRNA TS	
	リボザイム	2°oV ポリヌクレオチド	pri-miR	
	リボザイム	2°oV ポリヌクレオチド	アプタザイム	
	アプタザイム	2°oV ポリヌクレオチド	siRNA TS	
	アプタザイム	2°oV ポリヌクレオチド	miR TS	
	アプタザイム	2°oV ポリヌクレオチド	AmiR TS	
	アプタザイム	2°oV ポリヌクレオチド	gRNA TS	
	アプタザイム	2°oV ポリヌクレオチド	pri-miR	
	アプタザイム	2°oV ポリヌクレオチド	リボザイム	

【０１８９】

いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、細胞または対象における二次ウイルスゲノムの発現を防止するために、１つ以上の内部ＲＮＡｉ標的配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、内部ＲＮＡｉ標的配列は、ｓｉＲＮＡ分子、ＡｍｉＲＮＡ分子、またはｍｉＲＮＡ分子の標的配列である。いくつかの実施形態では、内部ＲＮＡｉ配列は、細胞にウイルス構築物を導入した後、または対象に投与した後に、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの発現に対するさらなる時間的制御を可能にする。こうした実施形態では、内部ＲＮＡｉ標的配列は、細胞によって内因的に発現されるｍｉＲＮＡのｍｉＲＮＡ標的配列である。こうした実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスは、ｍｉＲＮＡで弱毒化される。

【０１９０】

いくつかの実施形態では、内部ＲＮＡｉ配列は、二重ウイルスベクターの産生中の二次

腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの発現の制御を可能にする。いくつかの実施形態では、内部ＲＮＡｉ標的配列は、ｓｉＲＮＡ分子、ＡｍｉＲＮＡ分子、あるいは産生細胞株によってまたは試料もしくは対象の細胞によって内因性に発現されない人工ｍｉＲＮＡ分子、の標的配列である。

【０１９１】

ｍｉＲＮＡ弱毒化

いくつかの実施形態では、一次および／または二次ウイルスは、１つ以上の必須ウイルス遺伝子の遺伝子座に挿入されたｍｉＲＮＡ標的配列のコピーのうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、一次および／または二次腫瘍溶解性ウイルスは、１つ以上の必須ウイルス遺伝子の遺伝子座に挿入されたｍｉＲＮＡ標的配列のコピーのうちの１つ以上を含む。ｍｉＲは、複数のタイプのがんを含む広範な病態で差次的に発現される。重要なことに、ｍｉＲＮＡは、正常な組織と比較してがん組織で差次的に発現し、それらが幅広く様々ながんにおける標的化機構としての役割を果たすことを可能にする。（ポジティブまたはネガティブのいずれかで）発がん、悪性形質転換、または転移と関連するｍｉＲＮＡは、「ｏｎｃｏｍｉＲ」として知られている。ｏｎｃｏｍｉＲの例、および異なるがんに対するそれらの関係は、当技術分野で公知である（例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際ＰＣＴ公開第２０１７／１３２５５２号を参照されたい）。

【０１９２】

いくつかの実施形態では、一次ウイルスおよび／または二次ウイルス、または一次および／もしくは二次腫瘍溶解性ウイルスは、少なくとも１つの、少なくとも２つの、少なくとも３つの、少なくとも４つの、少なくとも５つの、少なくとも６つの、少なくとも７つの、少なくとも８つの、少なくとも９つの、または少なくとも１０個の必須ウイルス遺伝子の遺伝子座に挿入されたｍｉＲＮＡ標的配列を含み得る。正常（非がん性）細胞で発現されたｍｉＲＮＡは、そのような標的配列に結合し、ｍｉＲＮＡ標的配列を含有するウイルス遺伝子の発現を抑制することができる。ウイルス複製に必要な重要な遺伝子にｍｉＲＮＡ標的配列を組み込むことにより、ｍｉＲＮＡを発現する正常な二倍体細胞ではウイルス複製を条件付きで抑制することができ、ｍｉＲＮＡを発現しない細胞では正常に進行することができる。こうした実施形態では、健康な非がん性細胞は、組換えウイルスベクターによる感染の溶解効果から正常細胞から保護される。そのような組換えウイルスまたは腫瘍溶解性ウイルスは、ｍｉＲＮＡを発現しない、または発現が低下した細胞と比較して、組み込まれたｍｉＲＮＡ標的配列に結合できる１つ以上のｍｉＲＮＡを発現する細胞において、ウイルス複製が減少または減弱していることを示すため、本明細書では「ｍｉＲ弱毒化」と称される。

【０１９３】

いくつかの態様では、特定のｏｎｃｏｍｉＲの発現レベルは、特定のがんの発生または維持と正の関連を示す。そのようなｍｉＲは、本明細書では「発がん性ｍｉＲ」と呼称される。いくつかの実施形態では、発がん性ｍｉＲの発現は、非がん性対照細胞（すなわち、正常または健康な対照）で観察される発現レベルと比較してがん細胞もしくは組織で増加するか、または異なるがんタイプに由来するがん細胞で観察される発現レベルと比較して増加する。

【０１９４】

いくつかの実施形態では、特定のｏｎｃｏｍｉＲの発現は、特定のがんおよび／または転移の発生または維持と負の関連を示す。そのようなｏｎｃｏｍｉＲは、それらの発現が、がんの発症を阻害または抑制するため、本明細書では「腫瘍抑制因子ｍｉＲ」または「腫瘍抑制ｍｉＲ」と称する。いくつかの実施形態では、腫瘍抑制因子ｍｉＲＮＡの発現は、非がん対照細胞（すなわち、正常または健康な対照）で観察される発現レベルと比較して、がん細胞もしくは組織で減少するか、または異なるがんタイプに由来するがん細胞で観察される腫瘍抑制因子ｍｉＲＮＡの発現レベルと比較して減少する。

【０１９５】

いくつかの実施形態では、一次および／もしくは二次ウイルス、または一次および／も

しくは二次腫瘍溶解性ウイルスは、配列番号１～８０３から選択される配列の逆相補体に対して、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含む。いくつかの実施形態では、一次および／もしくは二次ウイルス、または一次および／もしくは二次腫瘍溶解性ウイルスは、配列番号１～８０３から選択される配列の逆相補体を含むか、またはそれからなる１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含む。

【０１９６】

いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡ標的配列は、「ｍｉＲ標的配列カセット」または「ｍｉＲ－ＴＳカセット」の形態で、１つ以上の必須ウイルス遺伝子の遺伝子座内に挿入される。ｍｉＲ－ＴＳカセットは、１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含み、ウイルス遺伝子の特定の遺伝子座内に挿入することができるポリヌクレオチド配列を指す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のｍｉＲ－ＴＳカセットは、少なくとも１つのｍｉＲＮＡ標的配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のｍｉＲ－ＴＳカセットは、複数のｍｉＲＮＡ標的配列を含む。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるｍｉＲ－ＴＳカセットは、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個またはそれ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含む。

【０１９７】

いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、複数のｍｉＲＮＡ標的配列を含み、複数の各ｍｉＲＮＡ標的配列は、同じｍｉＲＮＡの標的配列である。例えば、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、同じｍｉＲＮＡ標的配列の２、３、４、５、６、７、８、９、１０コピーまたはそれ以上のコピーを含んでもよい。いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、同じｍｉＲＮＡ標的配列の２～６コピーを含む。いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、同じｍｉＲＮＡ標的配列の３コピーを含む。いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、同じｍｉＲＮＡ標的配列の４コピーを含む。

【０１９８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のｍｉＲ－ＴＳカセットは、複数のｍｉＲＮＡ標的配列を含み、当該複数は、少なくとも２つの異なるｍｉＲＮＡに特異的である標的配列を含む。例えば、いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、第１のｍｉＲＮＡ標的配列の１つ以上のコピーおよび第２のｍｉＲＮＡ標的配列の１つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、第１のｍｉＲＮＡ標的配列の１つ以上のコピー、第２のｍｉＲＮＡ標的配列の１つ以上のコピー、および第３のｍｉＲＮＡ標的配列の１つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、第１のｍｉＲＮＡ標的配列の少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０コピーまたはそれ以上のコピー、第２のｍｉＲＮＡ標的配列の少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０コピーまたはそれ以上のコピー、および第３のｍｉＲＮＡ標的配列の少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０コピーまたはそれ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、第１のｍｉＲＮＡ標的配列の３コピーまたは４コピー、第２のｍｉＲＮＡ標的配列の３コピーまたは４コピー、および第３のｍｉＲＮＡ標的配列の３コピーまたは４コピーを含む。いくつかの実施形態では、複数のｍｉＲＮＡ標的配列は、少なくとも４つの異なるｍｉＲＮＡ標的配列を含む。例えば、いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、第１のｍｉＲＮＡ標的配列の１つ以上のコピー、第２のｍｉＲＮＡ標的配列の１つ以上のコピー、第３のｍｉＲＮＡ標的配列の１つ以上のコピー、および第４のｍｉＲＮＡ標的配列の１つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、第１のｍｉＲＮＡ標的配列の少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上のコピー、第２のｍｉＲ標的配列の少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上のコピー、第３のｍｉＲ標的配列の少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上のコピー、および第４のｍｉＲ標的配列の少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセッ

トは、第１のｍｉＲ標的配列の３コピーまたは４コピー、第２のｍｉＲ標的配列の３コピーまたは４コピー、第３のｍｉＲ標的配列の３コピーまたは４コピー、および第４のｍｉＲ標的配列の３コピーまたは４コピーを含む。

【０１９９】

いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセット内の複数のｍｉＲＮＡ標的配列は、互いにタンデムではなく、インターリーブされている。いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセット内の複数のｍｉＲＮＡ標的配列は、短い（例えば、４～１５ｎｔの長さ）スペーサーによって分離されており、よりコンパクトなカセットになる。いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、複数のｍｉＲＮＡ標的配列の活性を阻害するＲＮＡ二次構造を含まない（または低減されている）。いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、発がん、悪性形質転換、または転移に関連するｍｉＲＮＡのシード配列を含まない（または低減されている）。いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、ポリアデニル化部位を含まない（または低減されている）。

【０２００】

いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、一次および／または二次ウイルスゲノムの遺伝子座内にカセットを挿入することを可能にする１つ以上の追加のポリヌクレオチド配列を含む。例えば、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、ウイルスゲノム中の所望の位置で核酸配列に相補的な、５’末端および３’末端の短いポリヌクレオチド配列をさらに含み得る。こうした配列は本明細書では「相同アーム」と呼ばれ、ｍｉＲ－ＴＳカセットを一次および／または二次ウイルスゲノムの特定の位置に挿入することを容易にする。

【０２０１】

いくつかの実施形態では、一次ウイルスゲノムは、少なくとも１つのｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、一次ウイルスゲノムは、２つ以上のｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、一次ウイルスゲノムは、３つ以上のｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、一次ウイルスゲノムは、４つ以上のｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、一次ウイルスゲノムは、５個、６個、７個、８個、９個、１０個またはそれ以上のｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、二次ウイルスゲノムは、少なくとも１つのｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、二次ウイルスゲノムは、２つ以上のｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、二次ウイルスゲノムは、３つ以上のｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、二次ウイルスゲノムは、４つ以上のｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、二次ウイルスゲノムは、５個、６個、７個、８個、９個、１０個またはそれ以上のｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。

【０２０２】

いくつかの実施形態では、一次ウイルスゲノムは、少なくとも１つのｍｉＲ－ＴＳカセットを含み、二次ウイルスゲノムは、少なくとも１つのｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、一次ウイルスゲノムは、少なくとも１つのｍｉＲ－ＴＳカセットを含み、二次ウイルスゲノムは、２つ以上のｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、一次ウイルスゲノムは、少なくとも１つのｍｉＲ－ＴＳカセットを含み、二次ウイルスゲノムは、３つ以上のｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、一次ウイルスゲノムは、少なくとも１つのｍｉＲ－ＴＳカセットを含み、二次ウイルスゲノムは、４つ以上のｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、一次ウイルスゲノムは、少なくとも１つのｍｉＲ－ＴＳカセットを含み、二次ウイルスゲノムは、５個、６個、７個、８個、９個、１０個またはそれ以上のｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、一次ウイルスゲノムは、２つ以上のｍｉＲ－ＴＳカセットを含み、二次ウイルスゲノムは、少なくとも１つのｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、一次ウイルスゲノムは、３つ以上のｍｉＲ－ＴＳカセットを含み、二次ウイルスゲノムは、少なくとも１つのｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、一次ウイルスゲノムは、４つ以上のｍｉＲ－ＴＳカセットを含み、二次ウイルスゲノムは、少なくとも１つのｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、一次ウ

イルスゲノムは、５個、６個、７個、８個、９個、１０個またはそれ以上のｍｉＲ－ＴＳカセットを含み、二次ウイルスゲノムは、少なくとも１つのｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。

【０２０３】

いくつかの実施形態では、一次ウイルスゲノムは、少なくとも２つのｍｉＲ－ＴＳカセットを含み、二次ウイルスゲノムは、少なくとも２つのｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、一次ウイルスゲノムは、少なくとも３つのｍｉＲ－ＴＳカセットを含み、二次ウイルスゲノムは、少なくとも２つのｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、一次ウイルスゲノムは、少なくとも４つのｍｉＲ－ＴＳカセットを含み、二次ウイルスゲノムは、少なくとも２つのｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、一次ウイルスゲノムは、５個、６個、７個、８個、９個、１０個またはそれ以上のｍｉＲ－ＴＳカセットを含み、二次ウイルスゲノムは、少なくとも２つのｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。

【０２０４】

以下の表Ｄは、一次および／または二次ウイルス、または一次および／または二次腫瘍溶解ウイルスのｍｉＲＮＡ標的配列に結合することができる例示的なｍｉＲＮＡの配列を提示する。追加のｍｉＲＮＡ配列は、配列番号３３～８０３で提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるｍｉＲ－ＴＳカセットは、配列番号１～８０３から選択される配列の逆相補体に対して、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるｍｉＲ－ＴＳカセットは、配列番号１～８０３から選択される配列の逆相補体を含むか、またはそれらからなる１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含む。

【表６】

表D：例示的なｍｉＲＮＡおよび標的配列

miRNA	miRNA 配列	配列番号	miR-TS	配列番号
122-5p	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	1	CAAACACCATTGTCACACTCCA	804
124-3p	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC	2	GGCATTCACCGCGTGCCTTA	805
125a-5p	UCCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA	3	TCACAGGTTAAAGGGTCTCAGGGA	806
126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	4	CGCATTATTACTCACGGTACGA	807
			CAACATTATTACTCACGGTACGA	808
127a-3p	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU	5	AGCCAAGCTCAGACGGATCCGA	809
128-3p	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	6	AAAGAGACCGGTTCACTGTGA	810
			AAAGAGACCGGTTCACTGTGG	811
129-3p	AAGCCCUUACCCCAAAAAGUAU	7	ATACTTTTTGGGGTAAGGGCTT	812
129-5p	CUUUUUGCGGUCUGGGCUUGC	8	GCAAGCCCAGACCGCAAAAAG	813
130b-3p	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU	9	ATGCCCTTTCATCATTGCACTG	814
130b-5p	ACUCUUUCCCUGUUGCACUAC	10	GTAGTGCAACAGGGAAAGAGT	815
133a-3p	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG	11	CAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA	816
133b-3p	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUA	12	TAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA	817
134-3p	CCUGUGGGCCACCUAGUCACCAA	13	TTGGTGACTAGGTGGCCCACAGG	818
137-3p	UUAUUGCUUAAGAAUACGCGUAG	14	CTACGCGTATTCTTAAGCAATAA	819
1-3p	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	15	ATACATACTTCTTTACATTCCA	820
143-3p	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	16	GAGCTACAGTGCTTCATCTCA	821
145-3p	GGAUUCCUGGAAAUACUGUUCU	17	AGAACAGTATTTCCAGGAATCC	822
145-5p	GUCCAGUUUUCCCAGGAAUCCCU	18	AGGGATTCCTGGGAAAACTGGAC	823
184-3p	UGGACGGAGAACUGAUAAGGGU	19	ACCCTTATCAGTTCTCCGTCCA	824
199a-3p	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	20	TAACCAATGTGCAGACTACTGT	825
199a-5p	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	21	GAACAGGTAGTCTGAACACTGGG	826
204-5p	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU	22	AGGCATAGGATGACAAAGGGAA	827
208b-3p	AUAAGACGAACAAAAGGUUUGU	23	ACAAACCTTTTGTTCGTCTTAT	828
214-3p	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	24	ACTGCCTGTCTGTGCCTGCTGT	829
217-5p	UACUGCAUCAGGAACUGAUUGGA	25	TCCAATCAGTTCCTGATGCAGTA	830
219a-5p	UGAUUGUCCAAACGCAAUUCU	26	AGAATTGCGTTTGGACAATCA	831
223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	27	TGGGGTATTTGACAAACTGACA	832
34a-5p	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	28	ACAACCAGCTAAGACACTGCCA	833
451a	AAACCGUUACCAUUACUGAGUU	29	AACTCAGTAATGGTAACGGTTT	834
559-5p	UAAAGUAAAUAUGCACCAAAA	30	TTTTGGTGCATATTTACTTTA	835
Let7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	31	AACTATACAACCTACTACCTCA	836
9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	32	TCATACAGCTAGATAACCAAAGA	837

【０２０５】

いくつかの実施形態では、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、複数のｍｉＲＮＡ標的配列を含み、当該複数の標的配列は、少なくとも２つの異なるｍｉＲＮＡに特異的であり、ウイルス媒介細胞死から多様な細胞型または器官を保護するために選択される、標的配列を含む。例えば、いくつかの実施形態では、様々なタイプの正常な非がん細胞で高度に発現され、かつがん細胞で発現されないかまたは低レベルで発現されるｍｉＲＮＡの標的配列は、ｍｉＲ－ＴＳカセット（ならびに一次および／または二次ウイルスゲノム）内に組み込まれ、がん細胞でウイルス複製を可能にしながら、正常細胞でのウイルス複製を防止する。

【０２０６】

いくつかの実施形態では、一次および／または二次ウイルスは、各々が複数のｍｉＲＮＡ標的配列を含む、第１および第２のｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、第１のｍｉＲ－ＴＳカセットは、ｍｉＲ－１２４－３ｐ、ｍｉＲ－１－３ｐおよび／またはｍｉＲ－１４３－３ｐの標的配列の１つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、第２のｍｉＲ－ＴＳカセットは、ｍｉＲ－１－３ｐ、ｍｉＲ－１４５－５ｐ、ｍｉＲ－１９９－５ｐおよび／またはｍｉＲ－５５９の標的配列の１つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、第２のｍｉＲ－ＴＳカセットは、ｍｉＲ－２１９ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１２２－５ｐおよび／またはｍｉＲ－１２８－３ｐの標的配列の１つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、第２のｍｉＲ－ＴＳカセットは、ｍｉＲ－１２２－５ｐの標的配列の１つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、第２のｍｉＲ－ＴＳカセットは、ｍｉＲ－１３７－３ｐ、ｍｉＲ－２０８ｂ－３ｐおよび／またはｍｉＲ－１２６－３ｐの標的配列の１つ以上のコピーを含む。

【０２０７】

いくつかの実施形態では、一次および／または二次ウイルスは、各々が複数のｍｉＲＮＡ標的配列を含む、第１、第２、および第３のｍｉＲ－ＴＳカセットを含む。いくつかの実施形態では、第１のｍｉＲ－ＴＳカセットは、ｍｉＲ－１２４－３ｐ、ｍｉＲ－１－３ｐおよび／またはｍｉＲ－１４３－３ｐの標的配列の１つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、第２のｍｉＲ－ＴＳカセットは、ｍｉＲ－１２２－３ｐの標的配列の１つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、第２のｍｉＲ－ＴＳカセットは、ｍｉＲ－２１９ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１２２－５ｐおよび／またはｍｉＲ－１２８－３ｐの標的配列の１つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、第３のｍｉＲ－ＴＳカセットは、ｍｉＲ－１２５－５ｐの標的配列の１つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、第３のｍｉＲ－ＴＳカセットは、ｍｉＲ－１３７－３ｐ、ｍｉＲ－２０８ｂ－３ｐおよび／またはｍｉＲ－１２６－３ｐの標的配列の１つ以上のコピーを含む。

【０２０８】

例示的なｍｉＲ－ＴＳカセットを、以下の表Ｅに提示する。＊ＮまたはＮ$_{１－２０}$は、長さが１ヌクレオチドから２０ヌクレオチドの間で変化し得るリンカー配列を示し、ここで、「Ｎ」は任意の核酸であり得る。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、１～２０個の核酸である。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、１～８個の核酸である。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、１、２、３、４、５、６、７、または８個の核酸である。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、４個の核酸である、ｍｉＲ－ＴＳカセットは、表Ｅに示される１つ以上の配列との同一性の間に、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、１００％または任意のパーセンテージを有するｍｉＲＮＡ　ＴＳ配列を含み得る。ｍｉＲ－ＴＳカセットは、表Ｅに示される１つ以上の配列との同一性の間に、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、１００％または任意のパーセンテージを有するｍｉＲＮＡ　ＴＳ配列を含み得、ここで、シード領域内の同一性パーセンテージは１００％である。いくつかの実施形態では、シード領域は、ｍｉＲＮＡ　ＴＳ配列またはその相補体もしくは逆相補体の１～８位にヌクレオチドを含んでもよい。

【表７－１】

表Ｅ：例示的ｍｉＲＮＡ　ＴＳ設計

miRNA TS	配置	配列	配列番号
124-3p (4x)	(124-3p)−(124-3p)−(124-3p)−(124-3p)		該当なし
1-3p (4x) 143-3p (4x)	(1-3p)−(143-3p)−(1-3p)−(143-3p)−(1-3p)−(143-3p)−(1-3p)−(143-3p)	CCATATACATACTTCTTTACATTCCATCCTGAGCTACAGTGCTTCATCTCATTGCATACATACTTCTTTACATTCCAACGTGAGCTACAGTGCTTCATCTCATCCGATACATACTTCTTTACATTCCACGGCGAGCTACAGTGCTTCATCTCACCTTATACATACTTCTTTACATTCCAAAAAGAGCTACAGTGCTTCATCTCACCAT	838
1-3p (4x) 124-3p (4x) 143-3p (4x)	(124-3p)−(124-3p)−(124-3p)−(124-3p)−(1-3p)−(143-3p)−(1-3p)−(143-3p)−(1-3p)−(143-3p)−(1-3p)−(143-3p)		該当なし
122-5p (4x) 128-3p (4x) 219a-5p (4x)	(219a-5p)-(122-5p)-(128-3p)-(122-5p)-(219a-5p)-(128-3p)-(122-5p)-(128-3p)-(219a-5p)-(128-3p)-(122-5p)-(219a-5p)	CACGAGAATTGCGTTTGGACAATCAGACACAAACACCATTGTCACACTCCATCTTAAAGAGACCGGTTCACTGTGGATGTCAAACACCATTGTCACACTCCAACTTAGAATTGCGTTTGGACAATCAAGGGAAAGAGACCGGTTCACTGTGGCCAGCAAACACCATTGTCACACTCCAAAACAAAGAGACCGGTTCACTGTGGTACGAGAATTGCGTTTGGACAATCAGAAAAAAGAGACCGGTTCACTGTGGAATACAAACACCATTGTCACACTCCAACAAAGAATTGCGTTTGGACAATCAGGTT	839
128-3p (4x) 204-5p (4x) 219a-5p (4x)	(128-3p)-(219a-5p)-(204-5p)-(128-3p)-(219a-5p)-(204-5p)-(128-3p)-(219a-5p)-(204-5p)-(128-3p)-	AAGTAAAGAGACCGGTTCACTGTGGAATAAGAATTGCGTTTGGACAATCAAGGTAGGCATAGGATGACAAAGGGAACAGCAAAGAGACCGGTTCACTGT	840

【表７－２】

miRNA TS	配置	配列	配列番号
	(219a-5p)-(204-5p)	GGGGCTAGAATTGCGTTTGGACAATCACGTAAGGCATAGGATGACAAAGGGAACGAGAAAGAGACCGGTTCACTGTGGGGGAAGAATTGCGTTTGGACAATCATACTAGGCATAGGATGACAAAGGGAATTAGAAAGAGACCGGTTCACTGTGGATTTAGAATTGCGTTTGGACAATCATAGAAGGCATAGGATGACAAAGGGAATTGT	
126-3p (4x) 137-3p (4x) 208b-3p (4x)	(208b-3p)-(126-3p)-(137-3p)-(208b-3p)-(137-3p)-(126-3p)-(208b-3p)-(137-3p)-(126-3p)-(137-3p)-(126-3p)-(208b-3p)	TATGCTACGCGTATTCTTAAGCAATAAGACTTCCAATCAGTTCCTGATGCAGTACGACCACATTATTACTCACGGTACGAAAGCCTACGCGTATTCTTAAGCAATAACCGCCACATTATTACTCACGGTACGATAAATCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAATTACTACGCGTATTCTTAAGCAATAACTATTCCAATCAGTTCCTGATGCAGTACCCCCACATTATTACTCACGGTACGAGAATTCCAATCAGTTCCTGATGCAGTACAGTCACATTATTACTCACGGTACGATCAACTACGCGTATTCTTAAGCAATAACCAA	841
126-3p (4x) 137-3p (4x) 217-5p (4x)	(137-3p)-(126-3p)-(217-5p)-(126-3p)-(217-5p)-(137-3p)-(217-5p)-(126-3p)-(137-3p)-(126-3p)-(217-5p)-(137-3p)		該当なし
127-3p (4x) 137-3p (4x) 217-5p (4x)	(137-3p)-(127-3p)-(217-5p)-(127-3p)-(217-5p)-(137-3p)-(217-5p)-(127-3p)-(137-3p)-(127-3p)-(217-5p)-(137-3p)		該当なし
128-3p (4x) 137-3p (4x) 217-5p (4x)	(137-3p)-(128-3p)-(217-5p)-(128-3p)-(217-5p)-(137-3p)-(217-5p)-(128-3p)-(137-3p)-(128-3p)-(217-5p)-(137-3p)		該当なし
129-3p (4x) 137-3p (4x) 217-5p (4x)	(137-3p)-(129-3p)-(217-5p)-(129-3p)-(217-5p)-(137-3p)-(217-5p)-(129-3p)-(137-3p)-(129-3p)-(217-5p)-(137-3p)		該当なし
130-3p (4x) 137-3p (4x) 217-5p (4x)	(137-3p)-(130-3p)-(217-5p)-(130-3p)-(217-5p)-(137-3p)-(130-3p)-(217-5p)-(127-3p)-(137-3p)-(130-3p)-(217-5p)-(137-3p)		該当なし
124-3p (4x)	(124-3p)−(124-3p)−(124-3p)−(124-3p)	GGCATTCACCGCGTGCCTTAN_{1-20}GGCATTCACCGCGTGCCTTAN_{1-20}GGCATTCACCGCGTGCCTTAN_{1-20}GGCATTCACCGCGTGCCTTA	902
1-3p (4x)	(1-3p)−(143-3p)−(1-3p)−	ATACATACTTCTTTACATTCCAN_{1-}	903

【表７－３】

miRNA TS	配置	配列	配列番号
143-3p (4x)	(143-3p)−(1-3p)−(143-3p)−(1-3p)−(143-3p)	$_{20}$GAGCTACAGTGCTTCATCTCAN$_{1-}$ $_{20}$ATACATACTTCTTTACATTCCAN$_{1-}$ $_{20}$GAGCTACAGTGCTTCATCTCAN$_{1-}$ $_{20}$ATACATACTTCTTTACATTCCAN$_{1-}$ $_{20}$GAGCTACAGTGCTTCATCTCAN$_{1-}$ $_{20}$ATACATACTTCTTTACATTCCAN$_{1-}$ $_{20}$GAGCTACAGTGCTTCATCTCA	
1-3p (4x) 124-3p (4x) 143-3p (4x)	(124-3p)−(124-3p)−(124-3p)−(124-3p)−(1-3p)−(143-3p)−(1-3p)−(143-3p)−(1-3p)−(143-3p)−(1-3p)−(143-3p)	GGCATTCACCGCGTGCCTTAN$_{1-}$ $_{20}$GGCATTCACCGCGTGCCTTAN$_{1-}$ $_{20}$GGCATTCACCGCGTGCCTTAN$_{1-}$ $_{20}$GGCATTCACCGCGTGCCTTAN$_{1-}$ $_{20}$ATACATACTTCTTTACATTCCAN$_{1-}$ $_{20}$GAGCTACAGTGCTTCATCTCAN$_{1-}$ $_{20}$ATACATACTTCTTTACATTCCAN$_{1-}$ $_{20}$GAGCTACAGTGCTTCATCTCAN$_{1-}$ $_{20}$ATACATACTTCTTTACATTCCAN$_{1-}$ $_{20}$GAGCTACAGTGCTTCATCTCAN$_{1-}$ $_{20}$ATACATACTTCTTTACATTCCAN$_{1-}$ $_{20}$GAGCTACAGTGCTTCATCTCA	904
122-5p (4x) 128-3p (4x) 219a-5p (4x)	(219a-5p)-(122-5p)-(128-3p)-(122-5p)-(219a-5p)-(128-3p)-(122-5p)-(128-3p)-(219a-5p)-(128-3p)-(122-5p)-(219a-5p)	AGAATTGCGTTTGGACAATCAN$_{1-}$ $_{20}$CAAACACCATTGTCACACTCCAN$_{1-}$ $_{20}$AAAGAGACCGGTTCACTGTGRN$_{1-}$ $_{20}$CAAACACCATTGTCACACTCCAN$_{1-}$ $_{20}$AGAATTGCGTTTGGACAATCAN$_{1-}$ $_{20}$AAAGAGACCGGTTCACTGTGRN$_{1-}$ $_{20}$CAAACACCATTGTCACACTCCAN$_{1-}$ $_{20}$AAAGAGACCGGTTCACTGTGRN$_{1-}$ $_{20}$AGAATTGCGTTTGGACAATCAN$_{1-}$ $_{20}$AAAGAGACCGGTTCACTGTGRN$_{1-}$ $_{20}$CAAACACCATTGTCACACTCCAN$_{1-}$ $_{20}$AGAATTGCGTTTGGACAATCA	905
128-3p (4x) 204-5p (4x) 219a-5p (4x)	(128-3p)-(219a-5p)-(204-5p)-(128-3p)-(219a-5p)-(204-5p)-(128-3p)-(219a-5p)-(204-5p)-(128-3p)-(219a-5p)-(204-5p)	AAAGAGACCGGTTCACTGTGRN$_{1-}$ $_{20}$AGAATTGCGTTTGGACAATCAN$_{1-}$ $_{20}$AGGCATAGGATGACAAAGGGAAN$_{1}$ $_{-20}$AAAGAGACCGGTTCACTGTGRN$_{1-}$ $_{20}$AGAATTGCGTTTGGACAATCAN$_{1-}$ $_{20}$AGGCATAGGATGACAAAGGGAAN$_{1}$ $_{-20}$AAAGAGACCGGTTCACTGTGRN$_{1-}$ $_{20}$AGAATTGCGTTTGGACAATCAN$_{1-}$ $_{20}$AGGCATAGGATGACAAAGGGAAN$_{1}$ $_{-20}$AAAGAGACCGGTTCACTGTGRN$_{1-}$ $_{20}$AGAATTGCGTTTGGACAATCAN$_{1-}$ $_{20}$AGGCATAGGATGACAAAGGGAA	906
126-3p (4x) 137-3p (4x) 208b-3p (4x)	(208b-3p)-(126-3p)-(137-3p)-(208b-3p)-(137-3p)-(126-3p)-(208b-3p)-(137-3p)-(126-3p)-(137-3p)-(126-3p)-(208b-3p)	ACAAACCTTTTGTTCGTCTTATN$_{1-}$ $_{20}$CRCATTATTACTCACGGTACGAN$_{1-}$ $_{20}$CTACGCGTATTCTTAAGCAATAAN$_{1}$ $_{-20}$ACAAACCTTTTGTTCGTCTTATN$_{1-}$ $_{20}$CTACGCGTATTCTTAAGCAATAAN$_{1}$ $_{-20}$CRCATTATTACTCACGGTACGAN$_{1-}$ $_{20}$ACAAACCTTTTGTTCGTCTTATN$_{1-}$ $_{20}$CTACGCGTATTCTTAAGCAATAAN$_{1}$ $_{-20}$CRCATTATTACTCACGGTACGAN$_{1-}$ $_{20}$CTACGCGTATTCTTAAGCAATAAN$_{1}$	907

【表７－４】

miRNA TS	配置	配列	配列番号
		$_{-20}$CRCATTATTACTCACGGTACGAN$_{1-20}$ACAAACCTTTTGTTCGTCTTAT	
126-3p (4x) 137-3p (4x) 217-5p (4x)	(137-3p)-(126-3p)-(217-5p)-(126-3p)-(217-5p)-(137-3p)-(217-5p)-(126-3p)-(137-3p)-(126-3p)-(217-5p)-(137-3p)	CTACGCGTATTCTTAAGCAATAAN$_{1-20}$CRCATTATTACTCACGGTACGAN$_{1-20}$TCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAN$_{1-20}$CRCATTATTACTCACGGTACGAN$_{1-20}$TCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAN$_{1-20}$CTACGCGTATTCTTAAGCAATAAN$_{1-20}$TCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAN$_{1-20}$CRCATTATTACTCACGGTACGAN$_{1-20}$CTACGCGTATTCTTAAGCAATAAN$_{1-20}$CRCATTATTACTCACGGTACGAN$_{1-20}$TCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAN$_{1-20}$CTACGCGTATTCTTAAGCAATAA	908
127-3p (4x) 137-3p (4x) 217-5p (4x)	(137-3p)-(127-3p)-(217-5p)-(127-3p)-(217-5p)-(137-3p)-(217-5p)-(127-3p)-(137-3p)-(127-3p)-(217-5p)-(137-3p)	CTACGCGTATTCTTAAGCAATAAN$_{1-20}$(AGCCAAGCTCAGACGGATCCGA)N$_{1-20}$TCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAN$_{1-20}$(AGCCAAGCTCAGACGGATCCGA)N$_{1-20}$TCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAN$_{1-20}$CTACGCGTATTCTTAAGCAATAAN$_{1-20}$TCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAN$_{1-20}$(AGCCAAGCTCAGACGGATCCGA)N$_{1-20}$CTACGCGTATTCTTAAGCAATAAN$_{1-20}$(AGCCAAGCTCAGACGGATCCGA)N$_{1-20}$TCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAN$_{1-20}$CTACGCGTATTCTTAAGCAATAA	909
128-3p (4x) 137-3p (4x) 217-5p (4x)	(137-3p)-(128-3p)-(217-5p)-(128-3p)-(217-5p)-(137-3p)-(217-5p)-(128-3p)-(137-3p)-(128-3p)-(217-5p)-(137-3p)	CTACGCGTATTCTTAAGCAATAAN$_{1-20}$AAAGAGACCGGTTCACTGTGRN$_{1-20}$TCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAN$_{1-20}$AAAGAGACCGGTTCACTGTGRN$_{1-20}$TCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAN$_{1-20}$CTACGCGTATTCTTAAGCAATAAN$_{1-20}$TCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAN$_{1-20}$AAAGAGACCGGTTCACTGTGRN$_{1-20}$CTACGCGTATTCTTAAGCAATAAN$_{1-20}$AAAGAGACCGGTTCACTGTGRN$_{1-20}$TCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAN$_{1-20}$CTACGCGTATTCTTAAGCAATAA	910
129-3p (4x) 137-3p (4x)	(137-3p)-(129-3p)-(217-5p)-(129-3p)-(217-5p)-	CTACGCGTATTCTTAAGCAATAAN$_{1-20}$ATACTTTTTGGGGTAAGGGCTTN$_{1-}$	911

【表７－５】

miRNA TS	配置	配列	配列番号
217-5p (4x)	(137-3p)-(217-5p)-(129-3p)-(137-3p)-(129-3p)-(217-5p)-(137-3p)	$_{20}$TCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAN$_{1}$-$_{20}$ATACTTTTTGGGGTAAGGGCTTN$_{1}$-$_{20}$TCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAN$_{1}$-$_{20}$CTACGCGTATTCTTAAGCAATAAN$_{1}$-$_{20}$TCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAN$_{1}$-$_{20}$ATACTTTTTGGGGTAAGGGCTTN$_{1}$-$_{20}$CTACGCGTATTCTTAAGCAATAAN$_{1}$-$_{20}$ATACTTTTTGGGGTAAGGGCTTN$_{1}$-$_{20}$TCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAN$_{1}$-$_{20}$CTACGCGTATTCTTAAGCAATAA	
130-3p (4x) 137-3p (4x) 217-5p (4x)	(137-3p)-(130-3p)-(217-5p)-(130-3p)-(217-5p)-(130-3p)-(217-5p)-(127-3p)-(137-3p)-(130-3p)-(217-5p)-(137-3p)	CTACGCGTATTCTTAAGCAATAAN$_{1}$-$_{20}$ATGCCCTTTCATCATTGCACTGN$_{1}$-$_{20}$TCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAN$_{1}$-$_{20}$ATGCCCTTTCATCATTGCACTGN$_{1}$-$_{20}$TCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAN$_{1}$-$_{20}$ATGCCCTTTCATCATTGCACTGN$_{1}$-$_{20}$TCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAN$_{1}$-$_{20}$(AGCCAAGCTCAGACGGATCCGA)N$_{1}$-$_{20}$CTACGCGTATTCTTAAGCAATAAN$_{1}$-$_{20}$ATGCCCTTTCATCATTGCACTGN$_{1}$-$_{20}$TCCAATCAGTTCCTGATGCAGTAN$_{1}$-$_{20}$CTACGCGTATTCTTAAGCAATAA	912

【０２０９】

例示的なｍｉＲＮＡおよび関連配列を以下の表Ｆに提示する。

【表８－１】

表Ｆ：例示的なｍｉＲＮＡ関連配列

配列の参照	配列番号		配列の参照	配列番号		配列の参照	配列番号
hsa-miR-122-5p	1		hsa-miR-299-5p	282		hsa-miR-518e-3p	563
hsa-miR-124-3p	2		hsa-miR-29a-3p	283		hsa-miR-518f-3p	564
hsa-miR-125a-5p	3		hsa-miR-29b-3p	284		hsa-miR-5196-3p	565
hsa-miR-126-3p	4		hsa-miR-29c-3p	285		hsa-miR-5196-5p	566
hsa-miR-127-3p	5		hsa-miR-300	286		hsa-miR-519b-3p	567
hsa-miR-128-3p	6		hsa-miR-301a-3p	287		hsa-miR-519b-5p	568
hsa-miR-129-3p	7		hsa-miR-301a-5p	288		hsa-miR-519c-3p	569
hsa-miR-129-5p	8		hsa-miR-301b-3p	289		hsa-miR-519d-3p	570
hsa-miR-130b-3p	9		hsa-miR-301b-5p	290		hsa-miR-519e-3p	571
hsa-miR-130b-5p	10		hsa-miR-302a-3p	291		hsa-miR-520a-3p	572
hsa-miR-133a-3p	11		hsa-miR-302a-5p	292		hsa-miR-520a-5p	573
hsa-miR-133b	12		hsa-miR-302b-3p	293		hsa-miR-520b	574

【表８－２】

hsa-miR-134-3p	13		hsa-miR-302c-3p	294		hsa-miR-520c-3p	575
hsa-miR-137	14		hsa-miR-302d-3p	295		hsa-miR-520d-3p	576
hsa-miR-1-3p	15		hsa-miR-302e	296		hsa-miR-520d-5p	577
hsa-miR-143-3p	16		hsa-miR-302f	297		hsa-miR-520e	578
hsa-miR-145-3p	17		hsa-miR-3065-3p	298		hsa-miR-520f-3p	579
hsa-miR-145-5p	18		hsa-miR-3065-5p	299		hsa-miR-520g-3p	580
hsa-miR-184	19		hsa-miR-3074-3p	300		hsa-miR-520h	581
hsa-miR-199a-3p	20		hsa-miR-30a-3p	301		hsa-miR-521	582
hsa-miR-199a-5p	21		hsa-miR-30a-5p	302		hsa-miR-522-3p	583
hsa-miR-204-5p	22		hsa-miR-30b-5p	303		hsa-miR-523-3p	584
hsa-miR-208b-3p	23		hsa-miR-30c-5p	304		hsa-miR-524-3p	585
hsa-miR-214-3p	24		hsa-miR-30d-5p	305		hsa-miR-525-3p	586
hsa-miR-217	25		hsa-miR-30e-3p	306		hsa-miR-525-5p	587
hsa-miR-219a-5p	26		hsa-miR-30e-5p	307		hsa-miR-526a	588
hsa-miR-223-3p	27		hsa-miR-3127-5p	308		hsa-miR-526b-5p	589
hsa-miR-34a-5p	28		hsa-miR-3130-3p	309		hsa-miR-532-3p	590
hsa-miR-451a	29		hsa-miR-3131	310		hsa-miR-532-5p	591
hsa-miR-559-5p	30		hsa-miR-3136-5p	311		hsa-miR-539-3p	592
hsa-let-7a-5p	31		hsa-miR-3140-3p	312		hsa-miR-539-5p	593
hsa-miR-9-5p	32		hsa-miR-3140-5p	313		hsa-miR-541-3p	594
hsa-let-7b-5p	33		hsa-miR-3144-3p	314		hsa-miR-542-3p	595
hsa-let-7c-5p	34		hsa-miR-3144-5p	315		hsa-miR-542-5p	596
hsa-let-7d-5p	35		hsa-miR-3147	316		hsa-miR-543	597
hsa-let-7e-5p	36		hsa-miR-3150b-3p	317		hsa-miR-544a	598
hsa-let-7f-5p	37		hsa-miR-3151-5p	318		hsa-miR-545-3p	599
hsa-let-7g-5p	38		hsa-miR-3158-3p	319		hsa-miR-548a-3p	600
hsa-let-7i-5p	39		hsa-miR-31-5p	320		hsa-miR-548a-5p	601
hsa-miR-100-5p	40		hsa-miR-3161	321		hsa-miR-548aa	602
hsa-miR-101-3p	41		hsa-miR-3164	322		hsa-miR-548ad-3p	603
hsa-miR-103a-3p	42		hsa-miR-3168	323		hsa-miR-548ah-5p	604
hsa-miR-105-5p	43		hsa-miR-3179	324		hsa-miR-548ai	605
hsa-miR-106a-5p	44		hsa-miR-3180	325		hsa-miR-548ak	606
hsa-miR-106b-5p	45		hsa-miR-3180-3p	326		hsa-miR-548al	607
hsa-miR-107	46		hsa-miR-3180-5p	327		hsa-miR-548ar-3p	608
hsa-miR-10a-5p	47		hsa-miR-3182	328		hsa-miR-548ar-5p	609
hsa-miR-10b-5p	48		hsa-miR-3185	329		hsa-miR-548b-3p	610
hsa-miR-1178-3p	49		hsa-miR-3190-3p	330		hsa-miR-548c-5p	611
hsa-miR-1180-3p	50		hsa-miR-3192-5p	331		hsa-miR-548d-3p	612
hsa-miR-1183	51		hsa-miR-3195	332		hsa-miR-548d-5p	613

【表８－３】

hsa-miR-1185-1-3p	52		hsa-miR-3196	333		hsa-miR-548e-3p	614
hsa-miR-1185-2-3p	53		hsa-miR-3202	334		hsa-miR-548e-5p	615
hsa-miR-1185-5p	54		hsa-miR-320a	335		hsa-miR-548g-3p	616
hsa-miR-1193	55		hsa-miR-320b	336		hsa-miR-548h-5p	617
hsa-miR-1197	56		hsa-miR-320c	337		hsa-miR-548i	618
hsa-miR-1200	57		hsa-miR-320d	338		hsa-miR-548j-3p	619
hsa-miR-1202	58		hsa-miR-320e	339		hsa-miR-548j-5p	620
hsa-miR-1203	59		hsa-miR-323a-3p	340		hsa-miR-548k	621
hsa-miR-1204	60		hsa-miR-323a-5p	341		hsa-miR-548l	622
hsa-miR-1205	61		hsa-miR-323b-3p	342		hsa-miR-548m	623
hsa-miR-1206	62		hsa-miR-323b-5p	343		hsa-miR-548n	624
hsa-miR-1224-3p	63		hsa-miR-324-3p	344		hsa-miR-548o-3p	625
hsa-miR-1224-5p	64		hsa-miR-324-5p	345		hsa-miR-548q	626
hsa-miR-1226-3p	65		hsa-miR-325	346		hsa-miR-548v	627
hsa-miR-1228-3p	66		hsa-miR-32-5p	347		hsa-miR-548y	628
hsa-miR-1233-3p	67		hsa-miR-326	348		hsa-miR-548z	629
hsa-miR-1234-3p	68		hsa-miR-328-3p	349		hsa-miR-549a	630
hsa-miR-1236-3p	69		hsa-miR-328-5p	350		hsa-miR-550a-5p	631
hsa-miR-1244	70		hsa-miR-329-3p	351		hsa-miR-551a	632
hsa-miR-1245a	71		hsa-miR-329-5p	352		hsa-miR-551b-3p	633
hsa-miR-1245b-3p	72		hsa-miR-330-3p	353		hsa-miR-552-3p	634
hsa-miR-1245b-5p	73		hsa-miR-330-5p	354		hsa-miR-553	635
hsa-miR-1246	74		hsa-miR-331-3p	355		hsa-miR-554	636
hsa-miR-1247-5p	75		hsa-miR-331-5p	356		hsa-miR-555	637
hsa-miR-1248	76		hsa-miR-335-5p	357		hsa-miR-556-3p	638
hsa-miR-1249-3p	77		hsa-miR-337-3p	358		hsa-miR-556-5p	639
hsa-miR-1249-5p	78		hsa-miR-337-5p	359		hsa-miR-561-3p	640
hsa-miR-1250-5p	79		hsa-miR-338-5p	360		hsa-miR-561-5p	641
hsa-miR-1252-5p	80		hsa-miR-339-3p	361		hsa-miR-562	642
hsa-miR-1253	81		hsa-miR-339-5p	362		hsa-miR-563	643
hsa-miR-1254	82		hsa-miR-33a-5p	363		hsa-miR-564	644
hsa-miR-1255a	83		hsa-miR-33b-5p	364		hsa-miR-566	645
hsa-miR-1255b-5p	84		hsa-miR-340-5p	365		hsa-miR-567	646
hsa-miR-1257	85		hsa-miR-342-3p	366		hsa-miR-568	647
hsa-miR-1258	86		hsa-miR-342-5p	367		hsa-miR-570-3p	648
hsa-miR-125a-3p	87		hsa-miR-345-3p	368		hsa-miR-571	649
hsa-miR-125b-5p	88		hsa-miR-345-5p	369		hsa-miR-572	650
hsa-miR-1260a	89		hsa-miR-346	370		hsa-miR-573	651
hsa-miR-1260b	90		hsa-miR-34b-3p	371		hsa-miR-574-3p	652

【表８－４】

hsa-miR-1261	91		hsa-miR-34c-3p	372		hsa-miR-574-5p	653
hsa-miR-1262	92		hsa-miR-34c-5p	373		hsa-miR-575	654
hsa-miR-1264	93		hsa-miR-3605-3p	374		hsa-miR-576-3p	655
hsa-miR-1266-5p	94		hsa-miR-3605-5p	375		hsa-miR-576-5p	656
hsa-miR-1268a	95		hsa-miR-3613-3p	376		hsa-miR-577	657
hsa-miR-1268b	96		hsa-miR-3613-5p	377		hsa-miR-578	658
hsa-miR-1269a	97		hsa-miR-361-3p	378		hsa-miR-579-3p	659
hsa-miR-1269b	98		hsa-miR-3614-3p	379		hsa-miR-579-5p	660
hsa-miR-1270	99		hsa-miR-3614-5p	380		hsa-miR-580-3p	661
hsa-miR-1271-3p	100		hsa-miR-3615	381		hsa-miR-582-3p	662
hsa-miR-1271-5p	101		hsa-miR-361-5p	382		hsa-miR-582-5p	663
hsa-miR-1272	102		hsa-miR-362-3p	383		hsa-miR-584-3p	664
hsa-miR-1273c	103		hsa-miR-362-5p	384		hsa-miR-584-5p	665
hsa-miR-1275	104		hsa-miR-363-3p	385		hsa-miR-585-3p	666
hsa-miR-127-5p	105		hsa-miR-363-5p	386		hsa-miR-587	667
hsa-miR-1276	106		hsa-miR-365a-3p	387		hsa-miR-589-5p	668
hsa-miR-1277-3p	107		hsa-miR-365b-5p	388		hsa-miR-590-3p	669
hsa-miR-1278	108		hsa-miR-367-3p	389		hsa-miR-590-5p	670
hsa-miR-1279	109		hsa-miR-3690	390		hsa-miR-591	671
hsa-miR-1281	110		hsa-miR-369-3p	391		hsa-miR-592	672
hsa-miR-128-1-5p	111		hsa-miR-369-5p	392		hsa-miR-593-3p	673
hsa-miR-128-2-5p	112		hsa-miR-370-3p	393		hsa-miR-595	674
hsa-miR-1283	113		hsa-miR-370-5p	394		hsa-miR-596	675
hsa-miR-1285-3p	114		hsa-miR-371a-5p	395		hsa-miR-597-5p	676
hsa-miR-1285-5p	115		hsa-miR-371b-5p	396		hsa-miR-598-3p	677
hsa-miR-1286	116		hsa-miR-372-3p	397		hsa-miR-599	678
hsa-miR-1287-3p	117		hsa-miR-373-3p	398		hsa-miR-600	679
hsa-miR-1287-5p	118		hsa-miR-374a-3p	399		hsa-miR-601	680
hsa-miR-1288-3p	119		hsa-miR-374a-5p	400		hsa-miR-603	681
hsa-miR-1289	120		hsa-miR-374b-5p	401		hsa-miR-604	682
hsa-miR-1290	121		hsa-miR-374c-5p	402		hsa-miR-605-5p	683
hsa-miR-1291	122		hsa-miR-375	403		hsa-miR-606	684
hsa-miR-129-2-3p	123		hsa-miR-376a-2-5p	404		hsa-miR-607	685
hsa-miR-1293	124		hsa-miR-376a-3p	405		hsa-miR-608	686
hsa-miR-1295a	125		hsa-miR-376b-3p	406		hsa-miR-610	687
hsa-miR-1296-3p	126		hsa-miR-376c-3p	407		hsa-miR-612	688
hsa-miR-1296-5p	127		hsa-miR-376c-5p	408		hsa-miR-613	689
hsa-miR-1297	128		hsa-miR-377-3p	409		hsa-miR-614	690
hsa-miR-1298-5p	129		hsa-miR-378b	410		hsa-miR-615-3p	691

【表８－５】

hsa-miR-1299	130		hsa-miR-378c	411		hsa-miR-615-5p	692
hsa-miR-1301-3p	131		hsa-miR-378d	412		hsa-miR-616-3p	693
hsa-miR-1302	132		hsa-miR-378e	413		hsa-miR-617	694
hsa-miR-1303	133		hsa-miR-378f	414		hsa-miR-619-3p	695
hsa-miR-1304-3p	134		hsa-miR-378g	415		hsa-miR-620	696
hsa-miR-1304-5p	135		hsa-miR-378h	416		hsa-miR-624-3p	697
hsa-miR-1305	136		hsa-miR-378i	417		hsa-miR-625-5p	698
hsa-miR-1306-3p	137		hsa-miR-379-5p	418		hsa-miR-626	699
hsa-miR-1306-5p	138		hsa-miR-380-3p	419		hsa-miR-627-3p	700
hsa-miR-1307-3p	139		hsa-miR-381-3p	420		hsa-miR-627-5p	701
hsa-miR-1307-5p	140		hsa-miR-381-5p	421		hsa-miR-628-3p	702
hsa-miR-130a-3p	141		hsa-miR-382-3p	422		hsa-miR-628-5p	703
hsa-miR-130b-3p	142		hsa-miR-382-5p	423		hsa-miR-629-5p	704
hsa-miR-1322	143		hsa-miR-383-5p	424		hsa-miR-630	705
hsa-miR-1323	144		hsa-miR-384	425		hsa-miR-631	706
hsa-miR-132-3p	145		hsa-miR-3916	426		hsa-miR-637	707
hsa-miR-133a-5p	146		hsa-miR-3918	427		hsa-miR-638	708
hsa-miR-134-5p	147		hsa-miR-3928-3p	428		hsa-miR-639	709
hsa-miR-135a-5p	148		hsa-miR-3934-5p	429		hsa-miR-640	710
hsa-miR-135b-5p	149		hsa-miR-409-3p	430		hsa-miR-641	711
hsa-miR-136-5p	150		hsa-miR-409-5p	431		hsa-miR-642a-3p	712
hsa-miR-138-5p	151		hsa-miR-410-3p	432		hsa-miR-642a-5p	713
hsa-miR-139-3p	152		hsa-miR-411-5p	433		hsa-miR-643	714
hsa-miR-139-5p	153		hsa-miR-412-3p	434		hsa-miR-644a	715
hsa-miR-140-3p	154		hsa-miR-421	435		hsa-miR-648	716
hsa-miR-140-5p	155		hsa-miR-422a	436		hsa-miR-649	717
hsa-miR-141-3p	156		hsa-miR-423-3p	437		hsa-miR-650	718
hsa-miR-142-3p	157		hsa-miR-423-5p	438		hsa-miR-6503-3p	719
hsa-miR-142-5p	158		hsa-miR-424-5p	439		hsa-miR-6503-5p	720
hsa-miR-144-3p	159		hsa-miR-425-5p	440		hsa-miR-6511a-3p	721
hsa-miR-1469	160		hsa-miR-4284	441		hsa-miR-6511a-5p	722
hsa-miR-146a-5p	161		hsa-miR-4286	442		hsa-miR-651-3p	723
hsa-miR-146b-3p	162		hsa-miR-429	443		hsa-miR-651-5p	724
hsa-miR-146b-5p	163		hsa-miR-431-5p	444		hsa-miR-652-3p	725
hsa-miR-147a	164		hsa-miR-432-5p	445		hsa-miR-652-5p	726
hsa-miR-147b	165		hsa-miR-433-3p	446		hsa-miR-654-3p	727
hsa-miR-148a-3p	166		hsa-miR-433-5p	447		hsa-miR-654-5p	728
hsa-miR-148b-3p	167		hsa-miR-4421	448		hsa-miR-655-3p	729
hsa-miR-149-5p	168		hsa-miR-4425	449		hsa-miR-656-3p	730

【表８－６】

hsa-miR-150-5p	169		hsa-miR-4431	450		hsa-miR-660-3p	731
hsa-miR-151a-3p	170		hsa-miR-4435	451		hsa-miR-660-5p	732
hsa-miR-151a-5p	171		hsa-miR-4443	452		hsa-miR-661	733
hsa-miR-151b	172		hsa-miR-4448	453		hsa-miR-663a	734
hsa-miR-152-3p	173		hsa-miR-4451	454		hsa-miR-664a-3p	735
hsa-miR-152-5p	174		hsa-miR-4454	455		hsa-miR-664b-3p	736
hsa-miR-153-3p	175		hsa-miR-4455	456		hsa-miR-664b-5p	737
hsa-miR-1537-3p	176		hsa-miR-4458	457		hsa-miR-665	738
hsa-miR-154-5p	177		hsa-miR-4461	458		hsa-miR-671-3p	739
hsa-miR-155-5p	178		hsa-miR-448	459		hsa-miR-671-5p	740
hsa-miR-15a-5p	179		hsa-miR-4485-3p	460		hsa-miR-6720-3p	741
hsa-miR-15b-5p	180		hsa-miR-4488	461		hsa-miR-6721-5p	742
hsa-miR-1-5p	181		hsa-miR-449a	462		hsa-miR-6724-5p	743
hsa-miR-16-5p	182		hsa-miR-449b-5p	463		hsa-miR-675-5p	744
hsa-miR-181a-2-3p	183		hsa-miR-449c-5p	464		hsa-miR-708-5p	745
hsa-miR-181a-3p	184		hsa-miR-450a-1-3p	465		hsa-miR-744-5p	746
hsa-miR-181a-5p	185		hsa-miR-450a-2-3p	466		hsa-miR-758-3p	747
hsa-miR-181b-2-3p	186		hsa-miR-450a-5p	467		hsa-miR-758-5p	748
hsa-miR-181b-5p	187		hsa-miR-450b-3p	468		hsa-miR-7-5p	749
hsa-miR-181c-5p	188		hsa-miR-450b-5p	469		hsa-miR-760	750
hsa-miR-181d-3p	189		hsa-miR-4516	470		hsa-miR-761	751
hsa-miR-182-3p	190		hsa-miR-4521	471		hsa-miR-764	752
hsa-miR-182-5p	191		hsa-miR-4524a-5p	472		hsa-miR-765	753
hsa-miR-1827	192		hsa-miR-452-5p	473		hsa-miR-766-3p	754
hsa-miR-183-5p	193		hsa-miR-4531	474		hsa-miR-766-5p	755
hsa-miR-185-5p	194		hsa-miR-4532	475		hsa-miR-767-3p	756
hsa-miR-186-5p	195		hsa-miR-4536-3p	476		hsa-miR-767-5p	757
hsa-miR-187-3p	196		hsa-miR-4536-5p	477		hsa-miR-769-3p	758
hsa-miR-188-3p	197		hsa-miR-454-3p	478		hsa-miR-769-5p	759
hsa-miR-188-5p	198		hsa-miR-455-3p	479		hsa-miR-770-5p	760
hsa-miR-18a-5p	199		hsa-miR-455-5p	480		hsa-miR-802	761
hsa-miR-18b-5p	200		hsa-miR-4647	481		hsa-miR-873-3p	762
hsa-miR-1908-3p	201		hsa-miR-4707-3p	482		hsa-miR-873-5p	763
hsa-miR-1908-5p	202		hsa-miR-4707-5p	483		hsa-miR-874-3p	764
hsa-miR-1909-3p	203		hsa-miR-4741	484		hsa-miR-874-5p	765
hsa-miR-190a-3p	204		hsa-miR-4755-5p	485		hsa-miR-875-3p	766
hsa-miR-190a-5p	205		hsa-miR-4787-3p	486		hsa-miR-876-3p	767
hsa-miR-190b	206		hsa-miR-4787-5p	487		hsa-miR-876-5p	768
hsa-miR-1910-3p	207		hsa-miR-4792	488		hsa-miR-877-5p	769

【表８－７】

hsa-miR-1910-5p	208		hsa-miR-483-3p	489		hsa-miR-885-3p	770
hsa-miR-1915-3p	209		hsa-miR-483-5p	490		hsa-miR-885-5p	771
hsa-miR-191-5p	210		hsa-miR-484	491		hsa-miR-887-3p	772
hsa-miR-192-5p	211		hsa-miR-485-3p	492		hsa-miR-887-5p	773
hsa-miR-193a-3p	212		hsa-miR-485-5p	493		hsa-miR-888-5p	774
hsa-miR-193a-5p	213		hsa-miR-486-3p	494		hsa-miR-889-3p	775
hsa-miR-193b-3p	214		hsa-miR-487a-3p	495		hsa-miR-890	776
hsa-miR-194-5p	215		hsa-miR-487b-3p	496		hsa-miR-891a-5p	777
hsa-miR-195-5p	216		hsa-miR-487b-5p	497		hsa-miR-891b	778
hsa-miR-196a-3p	217		hsa-miR-488-3p	498		hsa-miR-892a	779
hsa-miR-196a-5p	218		hsa-miR-489-3p	499		hsa-miR-892b	780
hsa-miR-196b-5p	219		hsa-miR-490-3p	500		hsa-miR-922	781
hsa-miR-1972	220		hsa-miR-490-5p	501		hsa-miR-924	782
hsa-miR-1973	221		hsa-miR-491-3p	502		hsa-miR-92a-1-5p	783
hsa-miR-197-3p	222		hsa-miR-491-5p	503		hsa-miR-92a-3p	784
hsa-miR-197-5p	223		hsa-miR-492	504		hsa-miR-92b-3p	785
hsa-miR-1976	224		hsa-miR-493-3p	505		hsa-miR-933	786
hsa-miR-198	225		hsa-miR-494-3p	506		hsa-miR-934	787
hsa-miR-199b-5p	226		hsa-miR-494-5p	507		hsa-miR-935	788
hsa-miR-19a-3p	227		hsa-miR-495-3p	508		hsa-miR-93-5p	789
hsa-miR-19b-3p	228		hsa-miR-495-5p	509		hsa-miR-936	790
hsa-miR-200a-3p	229		hsa-miR-496	510		hsa-miR-937-3p	791
hsa-miR-200b-3p	230		hsa-miR-497-5p	511		hsa-miR-939-5p	792
hsa-miR-200c-3p	231		hsa-miR-498	512		hsa-miR-940	793
hsa-miR-202-3p	232		hsa-miR-499a-3p	513		hsa-miR-941	794
hsa-miR-203a-3p	233		hsa-miR-499a-5p	514		hsa-miR-942-3p	795
hsa-miR-203a-5p	234		hsa-miR-499b-3p	515		hsa-miR-942-5p	796
hsa-miR-2053	235		hsa-miR-499b-5p	516		hsa-miR-944	797
hsa-miR-205-5p	236		hsa-miR-5001-3p	517		hsa-miR-95-3p	798
hsa-miR-206	237		hsa-miR-5001-5p	518		hsa-miR-96-5p	799
hsa-miR-208a-3p	238		hsa-miR-500a-5p	519		hsa-miR-98-3p	800
hsa-miR-208b-5p	239		hsa-miR-5010-3p	520		hsa-miR-98-5p	801
hsa-miR-20a-5p	240		hsa-miR-5010-5p	521		hsa-miR-99a-5p	802
hsa-miR-210-3p	241		hsa-miR-501-3p	522		hsa-miR-99b-5p	803
hsa-miR-210-5p	242		hsa-miR-502-3p	523		hsa-miR-122-5p-TS	804
hsa-miR-2110	243		hsa-miR-502-5p	524		hsa-miR-124-3p-TS	805
hsa-miR-2113	244		hsa-miR-503-3p	525		hsa-miR-125a-5p-TS	806
hsa-miR-211-3p	245		hsa-miR-503-5p	526		hsa-miR-126-3p-TS	807
hsa-miR-211-5p	246		hsa-miR-504-3p	527		hsa-miR-126-3p-TSM	808

【表８－８】

hsa-miR-2116-5p	247		hsa-miR-504-5p	528		hsa-miR-127-3p-TS	809
hsa-miR-2117	248		hsa-miR-505-3p	529		hsa-miR-128-3p-TS	810
hsa-miR-212-3p	249		hsa-miR-506-3p	530		hsa-miR-128-3p-TSM	811
hsa-miR-215-5p	250		hsa-miR-506-5p	531		hsa-miR-129-3p-TS	812
hsa-miR-21-5p	251		hsa-miR-507	532		hsa-miR-129-5p-TS	813
hsa-miR-216a-5p	252		hsa-miR-508-3p	533		hsa-miR-130b-3p-TS	814
hsa-miR-216b-5p	253		hsa-miR-508-5p	534		hsa-miR-130b-5p-TS	815
hsa-miR-218-5p	254		hsa-miR-509-3-5p	535		hsa-miR-133a-3p-TS	816
hsa-miR-219a-1-3p	255		hsa-miR-509-3p	536		hsa-miR-133b-TS	817
hsa-miR-219a-2-3p	256		hsa-miR-509-5p	537		hsa-miR-134-3p-TS	818
hsa-miR-219b-3p	257		hsa-miR-510-3p	538		hsa-miR-137-TS	819
hsa-miR-221-3p	258		hsa-miR-510-5p	539		hsa-miR-1-3p-TS	820
hsa-miR-221-5p	259		hsa-miR-511-5p	540		hsa-miR-143-3p-TS	821
hsa-miR-222-3p	260		hsa-miR-512-3p	541		hsa-miR-145-3p-TS	822
hsa-miR-22-3p	261		hsa-miR-512-5p	542		hsa-miR-145-5p-TS	823
hsa-miR-224-5p	262		hsa-miR-513a-3p	543		hsa-miR-184-TS	824
hsa-miR-2278	263		hsa-miR-513a-5p	544		hsa-miR-199a-3p-TS	825
hsa-miR-23a-3p	264		hsa-miR-513b-5p	545		hsa-miR-199a-5p-TS	826
hsa-miR-23b-3p	265		hsa-miR-513c-3p	546		hsa-miR-204-5p-TS	827
hsa-miR-23c	266		hsa-miR-513c-5p	547		hsa-miR-208b-3p-TS	828
hsa-miR-24-3p	267		hsa-miR-514a-3p	548		hsa-miR-214-3p-TS	829
hsa-miR-25-3p	268		hsa-miR-514a-5p	549		hsa-miR-217-TS	830
hsa-miR-25-5p	269		hsa-miR-514b-3p	550		hsa-miR-219a-5p-TS	831
hsa-miR-2682-5p	270		hsa-miR-514b-5p	551		hsa-miR-223-3p-TS	832
hsa-miR-26a-5p	271		hsa-miR-515-3p	552		hsa-miR-34a-5p-TS	833
hsa-miR-26b-5p	272		hsa-miR-515-5p	553		hsa-miR-451a-TS	834
hsa-miR-27a-3p	273		hsa-miR-516a-3p	554		hsa-miR-559-5p-TS	835
hsa-miR-27b-3p	274		hsa-miR-516a-5p	555		hsa-let-7a-5p-TS	836
hsa-miR-28-3p	275		hsa-miR-516b-5p	556		hsa-miR-9-5p-TS	837
hsa-miR-28-5p	276		hsa-miR-517a-3p	557		miRT-1-143_1736	838
hsa-miR-296-3p	277		hsa-miR-517b-3p	558		miRT-128m-122-219_6793	839
hsa-miR-296-5p	278		hsa-miR-517c-3p	559		miRT-128m-204-219_9304	840
hsa-miR-297	279		hsa-miR-518b	560		miRT-217-137-126m_3163	841
hsa-miR-298	280		hsa-miR-518c-3p	561			
hsa-miR-299-3p	281		hsa-miR-518d-3p	562			

【０２１０】

例示的な二重腫瘍溶解性ウイルス構築物または二重ウイルス構築物

いくつかの実施形態では、本開示は、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスを提供する。いくつかの実施形態では、一次ウイルスおよび二次ウイルスまたは腫瘍溶解性ウイルスは、複製能力を有する。いくつかの実施形態では、本開示は、（ｉ）調節可能なプロモーターに作動可能に連結されており、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードする第１のポリヌクレオチドと、（ｉｉ）調節可能なプロモーターに結合することができるタンパク質をコードし、構成的プロモーターに作動可能に連結されている第２のポリヌ

クレオチドとを含む、一次的腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスを提供する。

【０２１１】

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、（ｉ）Ｔｅｔ－ＯＦＦプロモーターに作動可能に連結されており、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードする第１のポリヌクレオチドと、（ｉｉ）構成的プロモーターに作動可能に連結されており、Ｔｅｔ－ＯＦＦプロモーターに結合して二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドの転写を調節することができるｔＴＡタンパク質をコードする第２のポリヌクレオチドと、を含む。こうした実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、テトラサイクリンの存在下または非存在下で細胞内で発現され、一方で二次ウイルスは、テトラサイクリンの非存在下でのみ発現される。こうした実施形態では、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドに隣接する５’および３’接合部切断配列は、リボザイム、非テトラサイクリン活性化アプタザイム、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ配列、ｍｉＲＮＡ標的配列、ｇＲＮＡ標的配列、またはＡｍｉＲＮＡ標的配列のいずれかであってもよい。一次ウイルスおよび二次ウイルスは、上述のようにさらにｍｉＲ弱毒化することができる。

【０２１２】

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、（ｉ）Ｔｅｔ－ＯＦＦプロモーターに作動可能に連結されており、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードする第１のポリヌクレオチドと、（ｉｉ）Ｔｅｔ－ＯＮプロモーターに作動可能に結合されており、二次ウイルスゲノム中の配列を標的とするＲＮＡｉ分子をコードする第２のポリヌクレオチドと、（ｉｉ）構成的プロモーターに作動可能に連結されており、Ｔｅｔ－ＯＦＦプロモーターに結合して二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドの転写を調節することができるｔＴＡタンパク質、およびＴｅｔ－ＯＮプロモーターに結合してＲＮＡｉ分子をコードするポリヌクレオチドの転写を調節することができるｒｔＴＡタンパク質をコードする、第３のポリヌクレオチドと、を含む。こうした実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、テトラサイクリンの存在下または非存在下で細胞内で発現され、一方で二次ウイルスは、テトラサイクリンの非存在下でのみ発現される。テトラサイクリンの存在下での二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの異常な発現は、テトラサイクリンの存在下での安全ＲＮＡｉ分子の発現によって防止され、これは二次ウイルスゲノム中の標的配列を認識して二次ウイルス転写物の分解を媒介する。こうした実施形態では、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドに隣接する５’および３’接合部切断配列は、リボザイム、非テトラサイクリン活性化アプタザイム、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ配列、ｍｉＲＮＡ標的配列、ｇＲＮＡ標的配列、またはＡｍｉＲＮＡ標的配列のいずれかであってもよい。一次ウイルスおよび二次ウイルスは、上述のようにさらにｍｉＲ弱毒化することができる。

【０２１３】

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、（ｉ）Ｔｅｔ－ＯＮプロモーターに作動可能に連結されており、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードする第１のポリヌクレオチドと、（ｉｉ）構成的プロモーターに作動可能に連結されており、Ｔｅｔ－ＯＮプロモーターに結合して二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドの転写を調節することができるｒｔＴＡタンパク質をコードする第２のポリヌクレオチドと、を含む。こうした実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、テトラサイクリンの存在下または非存在下で細胞内で発現され、一方で二次ウイルスは、テトラサイクリンの存在下でのみ発現される。こうした実施形態では、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドに隣接する５’および３’接合部切断配列は、リボザイム、アプタザイム（テトラサイクリン活性化アプタザイムを含む）、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ配列、ｍｉＲＮＡ標的配列、ｇＲＮＡ標的配列、またはＡｍｉＲＮＡ標的配列のいずれかであってもよい。一次ウイルスおよび二次ウイルスは、上述のようにさらにｍｉＲ弱毒化することができる。

【０２１４】

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、（ｉ）Ｔｅｔ－ＯＮプロモーターに作動可能に連結されており、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードする第１のポリヌクレオチドと、（ｉｉ）Ｔｅｔ－ＯＦＦプロモーターに作動可能に結合されており、二次ウイルスゲノム中の配列を標的とするＲＮＡｉ分子をコードする第２のポリヌクレオチドと、（ｉｉ）構成的プロモーターに作動可能に連結されており、Ｔｅｔ－ＯＮプロモーターに結合して二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドの転写を調節することができるｒｔＴＡタンパク質、およびＴｅｔ－ＯＦＦプロモーターに結合してＲＮＡｉ分子をコードするポリヌクレオチドの転写を調節することができるｔＴＡタンパク質をコードする、第３のポリヌクレオチドと、を含む。こうした実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、テトラサイクリンの存在下または非存在下で細胞内で発現され、一方で二次ウイルスは、テトラサイクリンの存在下でのみ発現される。テトラサイクリンの非存在下での二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの異常な発現は、テトラサイクリンの非存在下での安全ＲＮＡｉ分子の発現によって防止され、これは二次ウイルスゲノム中の標的配列を認識して二次ウイルス転写物の分解を媒介する。こうした実施形態では、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドに隣接する５’および３’接合部切断配列は、リボザイム、アプタザイム（テトラサイクリン活性化アプタザイムを含む）、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ配列、ｍｉＲＮＡ標的配列、ｇＲＮＡ標的配列、またはＡｍｉＲＮＡ標的配列のいずれかであってもよい。一次ウイルスおよび二次ウイルスは、上述のようにさらにｍｉＲ弱毒化することができる。

【０２１５】

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドは、１つ以上のリコンビナーゼ認識部位を含む。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドは、１つ以上のリコンビナーゼ応答性カセットを含む。例示的なリコンビナーゼ応答性カセットには、本開示のＲＲＥＣおよびＲＲＩＣ（任意選択的にイントロンの一部を含む）が含まれる。いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスは、リコンビナーゼをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼをコードするポリヌクレオチドは、イントロン（またはその一部）を含む。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼをコードするポリヌクレオチドは、調節可能なプロモーターに作動可能に連結されている。

【０２１６】

いくつかの実施形態では、一次腫瘍溶解性ウイルスは、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含み、一次腫瘍溶解性ウイルスはＨＳＶであり、二次腫瘍溶解性ウイルスはピコルナウイルスである。いくつかの実施形態では、二重腫瘍溶解性ウイルスは、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む一次腫瘍溶解性ウイルスを含み、一次腫瘍溶解性ウイルスはＨＳＶであり、二次腫瘍溶解性ウイルスはＳＶＶである。いくつかの実施形態では、二重腫瘍溶解性ウイルスは、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む一次的腫瘍溶解性ウイルスを含み、一次的腫瘍溶解性ウイルスはＨＳＶであり、二次腫瘍溶解性ウイルスはＣＶＡである。いくつかの実施形態では、一次ウイルスは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含み、一次ウイルスはＨＳＶであり、二次ウイルスはピコルナウイルスである。いくつかの実施形態では、二重ウイルスは、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む一次ウイルスを含み、一次ウイルスはＨＳＶであり、二次ウイルスはＳＶＶである。いくつかの実施形態では、二重ウイルスは、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む一次ウイルスを含み、一次ウイルスはＨＳＶであり、二次ウイルスはＣＶＡである。

【０２１７】

二重腫瘍溶解性ウイルス構築物または二重ウイルス構築物の産生

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載される二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスを産生する方法を提供する。

【０２１８】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載される二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスのウイルスストックを提供する。いくつかの実施形態では、ウイルスストックは均質ストックである。ウイルスストックの調製および分析は、当該技術分野で周知である。例えば、ウイルスストックは、ウイルスベクターで形質導入された細胞を含有するローラーボトルで製造することができる。次いで、ウイルスストックを、連続的なナイコデンツ（ｎｙｃｏｄｅｎｚｅ）勾配で精製し、必要になるまでアリコートして保存することができる。ウイルスストックは、ウイルス遺伝子型、ならびにそれらを調製するために使用されるプロトコルおよび細胞株に大きく依存して、力価がかなり異なる。いくつかの実施形態では、本明細書に企図されるウイルスストックの力価は、少なくとも約10^5プラーク形成単位（ｐｆｕ）、例えば少なくとも約10^6ｐｆｕまたは少なくとも約10^7ｐｆｕである。特定の実施形態では、力価は、少なくとも約10^8ｐｆｕ、または少なくとも約10^9ｐｆｕ、少なくとも約10^{10}ｐｆｕ、または少なくとも約10^{11}ｐｆｕであり得る。

【０２１９】

治療用組成物

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載される二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、薬学的に許容可能な担体をさらに含む。本明細書で使用される場合、用語「組成物」は、対象および／または細胞に投与または送達することができる、本明細書に記述された１つ以上の二重腫瘍溶解性ウイルスまたは二重ウイルスの製剤を指す。典型的には、製剤は、任意の生理学的に許容可能な担体、希釈剤、および／または賦形剤を有する、それらの誘導体および／またはプロドラッグ、溶媒和物、立体異性体、ラセミ体、または互変異性体を含む、すべての生理学的に許容可能な組成物を含む。「治療用組成物」は、特定の疾患または障害の治療のために、患者および／または対象および／または細胞に投与または送達することができる１つ以上の薬剤の組成物である。

【０２２０】

本明細書で使用される場合、「担体」は、生理学的に適合性のある、あらゆる溶媒、分散媒、ビヒクル、コーティング、希釈剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、緩衝剤、担体溶液、懸濁液、コロイドなどが含まれ、ヒトおよび／または家畜での使用に許容可能なものとして米国食品医薬品局によって承認されている、薬学的に許容可能な細胞培養培地および／または乳化剤を含む。医薬活性物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野で周知である。任意の従来的な媒体または薬剤が有効成分と適合しない場合を除いて、治療用組成物におけるその使用が企図される。サプリメント

【０２２１】

一実施形態では、担体を含む組成物は、非経口投与、例えば、血管内（静脈内または動脈内）、腹腔内または筋肉内投与に適している。薬学的に許容可能な担体には、滅菌注射可能な溶液または分散液の即時調製のための滅菌水溶液または分散液および滅菌粉末が含まれる。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野で周知である。任意の従来的な培地または薬剤がウイルスベクターまたは核酸分子と適合しない場合を除いて、本開示の医薬組成物におけるその使用が企図される。

【０２２２】

本開示の組成物は、単独で、または１つ以上の他の療法様式と組み合わせて、細胞もしくは動物に投与するための薬学的に許容可能なまたは生理学的に許容可能な溶液中に製剤化された、本明細書に記載されるような、１つ以上のポリペプチド、ポリヌクレオチド、それを含むベクター、感染細胞などを含み得る。必要に応じて、本開示の組成物は、例えば、サイトカイン、成長因子、ホルモン、小分子、または様々な医薬活性剤などの他の薬剤と組み合わせて投与されてもよいことも理解されよう。追加の薬剤が意図される療法を

送達する組成物の能力に悪影響を及ぼさないことを条件に、組成物に含まれ得る他の成分にも実質的に制限はない。

【０２２３】

本開示の医薬組成物では、薬学的に許容可能な賦形剤および担体溶液での製剤化は、当業者に周知であり、様々な治療レジメンにおいて本明細書に記載される特定の組成物を使用するための適切な投与および治療レジメンの開発も同様である。製剤化に伴い、溶液が、投与製剤と適合性のある方式で、かつ症状の改善または修復をもたらすために治療的に有効な量で投与される。製剤は、摂取可能な溶液、薬物放出カプセルなどの様々な剤形で容易に投与される。投与量のいくらかの変動は、治療される対象の状態に応じて発生し得る。投与の責任者は、いずれにしても、個々の対象に対する適切な用量を決定することができる。さらに、ヒトへの投与については、製剤は、ＦＤＡ生物学的製剤評価研究センターの基準で要求される無菌性、一般安全性および純度基準を満たす。投与経路は、治療される疾患の位置および性質によって、当然のことながら異なり、例えば、皮内、経皮（ｔｒａｎｓｄｅｒｍａｌ）、真皮下、非経口、経鼻、静脈内、筋肉内、鼻腔内、皮下、経皮的（ｐｅｒｃｕｔａｎｅｏｕｓ）、気管内、腹腔内、腫瘍内、灌流、洗浄、直接注射、および経口投与を含み得る。

【０２２４】

特定の状況では、例えば、米国特許第５，５４３，１５８号、米国特許第５，６４１，５１５号、および米国特許第５，３９９，３６３号（それぞれ、参照によりその全体が本明細書に具体的に組み込まれる）に記載されるように、本明細書に開示される組成物、組換えウイルスベクター、および核酸分子を非経口的に、静脈内に、筋肉内に、または腹腔内に送達することが望ましい。遊離塩基または薬理学的に許容可能な塩としての活性化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と好適に混合された水で調製され得る。分散液はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物、ならびに油中で調製されてもよい。通常の保存および使用の条件下で、これらの調製物は、微生物の増殖を防止するための防腐剤を含有する。

【０２２５】

注射可能な使用に適した医薬品形態には、滅菌注射溶液または分散液の即時調製のための滅菌水溶液または分散液、および滅菌粉末が含まれる（参照によりその全体が本明細書に具体的に組み込まれる、米国特許第５，４６６，４６８号）。すべての場合において、形態は、滅菌される必要があり、容易な注射可能性（ｓｙｒｉｎｇａｂｉｌｉｔｙ）が存在する程度まで流動的である必要がある。製造および保管の条件下で安定である必要があり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保存される必要がある。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、それらの好適な混合物、および／または植物油を含有する溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散の場合に必要な粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサールなどによって促進され得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射可能な組成物の長期間の吸収は、吸収を遅らせる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの組成物における使用によってもたらされ得る。有効成分としてタンパク質を含有する水性組成物の調製は、当技術分野ではよく理解されている。典型的には、こうした組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかとして注射剤として調製され、注射前の液体への溶解または液体への懸濁に適した固体形態も調製することができる。調製物はまた、乳化することができる。

【０２２６】

水溶液での非経口投与の場合、例えば、溶液は、必要に応じて適切に緩衝され、液体希釈剤は、最初に十分な生理食塩水またはグルコースを用いて等張にする必要がある。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内投与に特に好適である。これに

関連して、用いることができる滅菌水性媒体は、本開示に照らして当業者に公知である。例えば、１ｍｌの等張性ＮａＣｌ溶液に１回の投与量を溶解し、１０００ｍｌの皮下点滴液に添加するか、または提案された注入部位に注射してもよい（例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，２０ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ．Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，ＭＤ：Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ，２０００を参照されたい）。投与量のいくらかの変動は、治療される対象の状態に応じて必然的に発生し得る。投与の責任者は、いずれにしても、個々の対象に対する適切な用量を決定する。さらに、ヒトへの投与については、製剤は、無菌性、発熱性、およびＦＤＡ生物学的製剤局基準で要求される一般安全性および純度基準を満たす必要がある。

【０２２７】

滅菌注射可能な溶液は、必要量の活性化合物を、必要に応じて上記で列挙された様々な他の成分とともに適切な溶媒中に組み込み、続いて濾過滅菌することによって調製することができる。一般的に、分散液は、様々な滅菌有効成分を、基本的な分散媒および上記で列挙したものから必要とされる他の成分を含有する滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌注射可能な溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、その事前に滅菌濾過した溶液から有効成分と任意の追加の所望の成分の粉末を生じる、真空乾燥および凍結乾燥技術である。

【０２２８】

特定の実施形態では、組成物は、鼻腔内スプレー、吸入、および／または他のエアロゾル送達ビヒクルによって送達されてもよい。鼻腔エアロゾルスプレーを介して、ポリヌクレオチドおよびペプチド組成物を直接肺に送達するための方法は、例えば、米国特許第５，７５６，３５３号および米国特許第５，８０４，２１２号（それぞれ、参照によりその全体が具体的に本明細書に組み込まれる）に記載されている。同様に、鼻腔内微粒子樹脂（Ｔａｋｅｎａｇａ ｅｔ ａｌ．，１９９８）およびリゾホスファチジル－グリセロール化合物（参照によりその全体が具体的に本明細書に組み込まれる、米国特許第５，７２５，８７１号）を使用する薬剤の送達も、医薬技術分野で周知である。同様に、ポリテトラフルオロエチレン支持マトリックスの形態の経粘膜的薬物送達が、米国特許第５，７８０，０４５号（その全体で参照により具体的に本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０２２９】

使用方法

いくつかの実施形態では、本開示は、がん細胞を、本明細書に記載される二重腫瘍溶解性ウイルスまたは組成物に曝露することを含む、がん細胞を殺滅する方法を提供する。いくつかの実施形態では、二重腫瘍溶解性ウイルスは、がん細胞内で複製し、二次腫瘍溶解性ウイルスを産生する。いくつかの実施形態では、二次腫瘍溶解性ウイルスは、別のがん細胞内に感染して複製する。したがって、いくつかの実施形態では、本開示の二重腫瘍溶解性ウイルスは、複数のがん細胞を殺滅することができる。こうした実施形態では、複数のがん細胞の第１のサブセットは、第１の腫瘍溶解性ウイルスによって殺滅させてもよく、複数のがん細胞の第２のサブセットは、二次腫瘍溶解性ウイルスによって殺滅させてもよい。いくつかの実施形態では、がん細胞はインビボにある。特定の実施形態では、がん細胞は腫瘍内にある。

【０２３０】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載される二重ウイルスまたは組成物にがん細胞を曝露することを含む、がん細胞を殺滅する方法を提供する。いくつかの実施形態では、二重ウイルスは、がん細胞内で複製し、二次ウイルスを産生する。いくつかの実施形態では、二次ウイルスは、別のがん細胞内に感染して複製する。したがって、いくつかの実施形態では、本開示の二重ウイルスは、複数のがん細胞を殺滅することができる。こうした実施形態では、複数のがん細胞の第１のサブセットは、第１のウイルスによって殺滅させてもよく、複数のがん細胞の第２のサブセットは、二次ウイルスによって殺滅

させてもよい。いくつかの実施形態では、がん細胞はインビボにある。特定の実施形態では、がん性細胞は腫瘍内にある。

【０２３１】

二重腫瘍溶解性ウイルスベクターからの一次および二次腫瘍溶解性ウイルスの産生、または二重ウイルスベクターからの一次および二次ウイルスの産生は、ウイルスＲＮＡおよび／またはＤＮＡ配列に対するＲＴ－ＰＣＲを含む当分野に公知の手段によって測定することができる。例えば、図２５は、二次腫瘍溶解性ＳＶＶの産生のａＰＣＲアッセイを示す。Ｈ１２９９細胞は、インビトロで転写されたＳＶＶ－ｎｅｇもしくはＳＶＶ－野生型（ＷＴ）ポジティブ鎖ＲＮＡでトランスフェクトさせるか、または複製能力を有するＳＶＶ（ＯＮＣＲ－１８９）もしくは複製能力を有しない（ＯＮＣＲ－１９０）ＳＶＶウイルスゲノムのいずれかをコードするポリヌクレオチドを含む腫瘍溶解性ＨＳＶ－１ウイルスに感染させた。ＲＮＡを抽出し、ポジティブセンスおよびネガティブセンスの両方のＳＶＶ　ＲＮＡ鎖についてｑＲＴ－ＰＣＲを行った。示されるように、ＯＮＣＲ－１８９およびＳＶＶ野生型ＲＮＡ（ＳＶＶ　ＷＴ）による対照トランスフェクションの両方で、同等のレベルのポジティブセンスＲＮＡおよびネガティブセンスＲＮＡが検出され、ここで、ＳＶＶ　ＲＮＡレベルはＯＮＣＲ－１９０対照でははるかに低いため、複製能力を有するＳＶＶをコードするポリヌクレオチドを含むＨＳＶ－１の感染から、ＳＶＶウイルス複製が開始されることを示している。高レベルの両方の鎖は、腫瘍溶解性ＨＳＶによって誘導または発現される活性ＳＶＶ感染を示しており、これは、ｏＨＳＶ感染からのポジティブセンスＲＮＡウイルスの感染の開始を例示している。

【０２３２】

いくつかの実施形態では、本開示は、がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、本明細書に記載される二重腫瘍溶解性ウイルスもしくは二重ウイルスまたはその組成物を対象に投与することを含む、方法を提供する。本明細書で使用される場合、「対象」は、本明細書に開示される組換えウイルスベクター、組成物、および方法で治療され得る疾患、障害、または状態の症状を呈する任意の動物を含む。好適な対象（例えば、患者）には、実験動物（マウス、ラット、ウサギ、またはモルモットなど）、家畜（ウマまたはウシなど）、および飼育動物またはペット（ネコまたはイヌなど）が含まれる。非ヒト霊長類、および好ましくはヒト患者が含まれる。

【０２３３】

「投与」とは、本明細書に記載された二重腫瘍溶解性ウイルスもしくは二重ウイルスまたはその組成物を対象に導入すること、または本明細書に記載された二重腫瘍溶解性ウイルスもしくは二重ウイルスまたはその組成物を細胞および／または組織と接触させることを指す。投与は、注射、灌注、吸入、消費、電気浸透、血液透析、イオンフォレーシス、および当分野に公知の他の方法によって発生し得る。投与経路は、当然のことながら治療される疾患の場所と性質によって異なり、例えば耳、頬側、結膜、皮膚、歯、子宮頸管内、洞内、気管内、経腸内、硬膜外、間質性、関節内、動脈内、腹腔内（ｉｎｔｒａ－ａｂｄｏｍｉｎａｌ）、心房内（ｉｎｔｒａａｕｒｉｃｕｌａｒ）、胆管内、気管支内、嚢内、海綿体内、脳内、槽内、角膜内、歯冠内、冠動脈内、頭蓋内、皮内、脊髄内、腺管内、十二指腸内、十二指腸内、硬膜内、心外膜内、表皮内、食道内、胃内、歯肉内、肝内、回腸内、病巣内、舌内、管腔内、リンパ腺内、乳腺内、骨髄内、髄膜内、筋肉内、鼻腔内、節内、眼内、網内、卵巣内、腹腔内（ｉｎｔｒａｐｅｒｉｔｏｎｅａｌ）、心内膜、胸膜内、前立腺内、肺内、反芻胃内、副鼻腔内、髄腔内、滑膜内、腱内、精巣内、気管内、くも膜下腔内、胸腔内、小管内、腫瘍内、鼓室内、子宮内、腹腔内、血管内、脳室内、膀胱内、前庭内、静脈内、硝子体内、咽頭部、経鼻、経鼻胃、経口、眼、口腔咽頭、非経口、経皮的（ｐｅｒｃｕｔａｎｅｏｕｓ）、関節周囲、硬膜周囲、神経周囲、歯周、呼吸器、尿細管後（ｒｅｔｒｏｔｕｂｕｌａｒ）、直腸、脊髄、くも膜下、結膜下、皮下、真皮下、歯肉下、舌下、粘膜下、網膜下、局所的、経皮（ｔｒａｎｓｄｅｒｍａｌ）、経心内膜、経粘膜、経胎盤、経気管、経鼓膜、尿管、尿道、および／または膣灌流、洗浄、直接注射、および経口投与を含み得る。

【０２３４】
本明細書で使用される場合、「治療する」および「治療」という用語は、対象が疾患もしくは状態、または疾患もしくは状態の症状の改善を有するように、治療有効量の本明細書に記載される二重腫瘍性ウイルスもしくは二重ウイルスまたはその組成物を対象に投与することを指す。改善は、疾患もしくは状態、または疾患もしくは状態の症状の任意の改善または修復である。改善は、観察可能または測定可能な改善であるか、または対象の全身の健康感の改善であり得る。したがって、当業者は、治療が疾患状態を改善し得るが、疾患の完全な治癒ではない場合があることを認識している。「予防的有効量」は、所望の予防的結果を達成するために有効な、本明細書に記載される二重腫瘍溶解性ウイルスもしくは二重ウイルスまたはそれらの組成物の量を指す。本明細書で使用される場合、「予防」は、疾患の症状の完全な予防、疾患の症状の発症の遅延、またはその後に発症する疾患の症状の重症度の軽減を意味することができる。必ずしもそうではないが、典型的には、予防用量は、疾患の前または初期段階の対象において使用されるため、予防的有効量は、治療有効量よりも少ない。

【０２３５】
本明細書の「がん」は、典型的には制御不能な細胞増殖を特徴とする哺乳類の生理学的状態を指すか、または説明するものである。がんの例としては、がん腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫（脂肪肉腫、骨肉腫、血管肉腫、内皮肉腫、平滑筋肉腫、脊索腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮細胞肉腫、横紋筋肉腫、線維肉腫、粘液肉腫、軟骨肉腫）、神経内分泌腫瘍、中皮腫、滑膜腫、シュワン腫、髄膜腫、腺がん、黒色腫、および白血病またはリンパ系悪性腫瘍が挙げられるがこれらに限定されない。こうしたがんのより具体的な例には、扁平上皮がん（例えば、上皮扁平細胞がん）、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺腺がんおよび肺扁平上皮がん、小細胞肺がん腫を含む肺がん、腹膜がん、肝細胞がん、胃腸がんを含む胃（ｇａｓｔｒｉｃまたはｓｔｏｍａｃｈ）がん、膵がん、神経膠芽腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝がん、膀胱がん、ヘパトーマ、乳がん、結腸がん、直腸がん、大腸がん、子宮内膜がんまたは子宮がん、唾液腺がん、腎臓（ｋｉｄｎｅｙまたはｒｅｎａｌ）がん、前立腺がん、外陰がん、甲状腺がん、肝がん、肛門がん、陰茎がん、精巣がん、食道がん、胆道腫瘍、ユーイング腫瘍、基底細胞がん、腺がん、汗腺がん、皮脂腺がん、乳頭状がん、乳頭状腺がん、嚢胞腺がん、髄様がん、気管支原性がん、腎細胞がん、ヘパトーマ、胆管がん、絨毛がん、精上皮腫、胚性がん腫、ウィルムス腫瘍、精巣腫瘍、肺がん腫、膀胱がん腫、上皮がん腫、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、ワルデンストレーム高ガンマクログロブリン血症、骨髄異形成疾患、重鎖疾患、神経内分泌腫瘍、シュワン腫および他のがん腫、ならびに頭頸部がんが挙げられる。

【０２３６】
特定の実施形態では、本明細書に記載の二重腫瘍溶解性ウイルスもしくは二重ウイルスまたはそれらの組成物は、肺がん（例えば、小細胞肺がんまたは非小細胞肺がん）、乳がん、卵巣がん、子宮頸がん、前立腺がん、精巣がん、大腸がん、結腸がん、膵がん、肝がん（例えば、肝細胞がん（ＨＣＣ））、胃がん、頭頸部がん、甲状腺がん、悪性神経膠腫、神経膠芽腫、黒色腫、Ｂ細胞性慢性リンパ性白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、および辺縁帯リンパ腫（ＭＺＬ）から選択されるがんを治療するために使用される。

【実施例】

【０２３７】
実施例１：ドキシサイクリン応答性プロモーターの特性評価
我々は、様々なテトラサイクリン（Ｔｅｔ）依存性プロモーターのレポート遺伝子の発現を誘導する能力を試験した。プロモーターの下流にあるＴｅｔ－Ｏｎ要素を含む各Ｔｅｔ依存性プロモーターは、レポート構築物中のｍＣｈｅｒｒｙ－ＮＬｕｃレポーター遺伝子に作動可能に連結されていた（図１２、右パネル）。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、標準的な

方法に従って、ＬｉｐｏｆｅｃｔＡＭＩＮＥ　２０００（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、ＭＮＤ－ＴｅｔＲ構築物およびレポート構築物の１つでトランスフェクトした。一晩増殖させた後、ドキシサイクリン２００ｎＭを、複製ウェルの１セットに添加することによって、遺伝子発現を誘導した。細胞を一晩インキュベートし、ナノルシフェラーゼ活性（ＮａｎｏＧｌｏ、Ｐｒｏｍｅｇａ）の均一アッセイを使用して相対的なレポーター遺伝子活性を決定した（図１２の棒グラフ、各棒上の数値は、ドキシサイクリンの添加後のＲＬＵの倍率変化を示す）。結果は、ドキシサイクリンの添加がレポーター遺伝子の発現を有意に増加させたことを示した。試験されたＴｅｔ依存性プロモーターの中で、ＣＭＶプロモーターは、ドキシサイクリンの添加時に最大の倍率変化を示した。

【０２３８】

実施例２：Ｆｌｐ応答性ＳＴＯＰカセットの特性評価

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、

ａ）ＭＮＤ－ＴｅｔＲ構築物（ＮＬＳ－ＴｅｔＲ－ＮＬＳポリペプチドは配列番号８６４によってコードされる）、

ｂ）任意選択的に、ＣＭＶ－ＴｅｔＯｎ（ＴＯ）－Ｆｌｐリコンビナーゼ構築物（＋Ｆｌｐ）（陰性対照は（－Ｆｌｐ）として示される）、および

ｃ）ＣＭＶ－ＴＯ－ｍＣｈｅｒｒｙ－ＮＬｕｃ、ＳＴＯＰカセットなし（ＮＬｕｃ）、またはＦｌｐ応答性ＳＴＯＰカセット（ＦＳＦ－ＮＬｕｃ）を伴うＣＭＶ－ＴＯ－ｍＣｈｅｒｒｙ－ＮＬｕｃ構築物、のいずれか、を用いて、

ＬｉｐｏｆｅｃｔＡＭＩＮＥ　２０００（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を標準的な方法に従って使用して、コトランスフェクトした。一晩増殖させた後、ドキシサイクリン２００ｎＭを、複製ウェルの１セットに添加することによって、遺伝子発現を誘導した。細胞を一晩インキュベートし、ナノルシフェラーゼ活性（ＮａｎｏＧｌｏ、Ｐｒｏｍｅｇａ）の均一アッセイを使用して相対的なレポーター遺伝子活性を決定した。

【０２３９】

結果（図１３）は、Ｆｌｐ応答性ＳＴＯＰカセット（ＦＳＦ－ＮＬｕｃ）の組み込みが、ドキシサイクリンによるレポーター遺伝子発現のより大きな制御をもたらしたことを示す。ドキシサイクリンの非存在下では、レポーター遺伝子のベースライン発現は、ＦＳＦ－ＮＬｕｃ群において減少する（棒グラフの図１３の右側）。Ｔｅｔ－Ｏｎ要素によっても制御されるＦｌｐリコンビナーゼ発現構築物の追加は、Ｆｌｐリコンビナーゼを有しないＦＳＦ－ＮＬｕｃ群と比較して、ＦＳＦ－ＮＬｕｃ構築物の全体的な報告遺伝子発現を増加させる。それどころか、Ｆｌｐ応答性ＳＴＯＰカセットを有しないレポーター遺伝子構築物（ＮＬｕｃ、図１３の棒グラフの左側）では、ドキシサイクリンの非存在下でレポーター遺伝子のより高いベースライン発現があり、発現レベルは、Ｆｌｐリコンビナーゼ発現構築物の存在または非存在による影響を受けなかった。

【０２４０】

実施例３：Ｆｌｐ活性の翻訳後制御のためのＦｌｐ－ＥＲＴ２融合タンパク質の設計

タモキシフェンを使用して、多くのＦｌｐ－ＥＲＴ２融合タンパク質のＦｌｐ活性を制御する能力について試験した（図１４）。

【０２４１】

各Ｆｌｐ－ＥＲＴ２融合タンパク質は、リンカー領域を介して変異エストロゲン受容体（ＥＲＴ２）に融合されたＦｌｐを含有する。ＥＲＴ２は、活性タモキシフェン代謝物４－ヒドロキシタモキシフェン（４ＯＨＴ）の結合時にのみ、活性化され、次いで核内に移動する。したがって、核における融合タンパク質のＦｌｐ活性は、４ＯＨＴによって制御され得る。

【０２４２】

多くのＦｌｐ－ＥＲＴ２融合タンパク質を構築した。ＲＧＳリンカー領域を含有する融合タンパク質は、「ＦＥＲ」と表示され、一方、ＸＴＥＮリンカー領域を含有する融合タ

ンパク質は、「ＦＥＸ」と表示される。ＦＥＲおよびＦＥＸ構築物のＮ、Ｐ、およびＮＰバリアントは、示されたＮＬＳ（Ｎ）およびＰＥＳＴ（Ｐ）ドメインが各組換えタンパク質のＮ末端に設計されているバリアントを指す。Ｆｌｐ－ＥＲＴ２融合タンパク質の各発現構築物は、Ｆｌｐ－ＥＲＴ２融合タンパク質のコード領域に作動可能に連結された「ＨＢＰ１プロモーター－ＴｅｔＯｎ」領域を含む。

【０２４３】

図１４に示される例示的なＦＬＰ－ＲＧＳ－ＥＲＴ２ポリペプチドは、配列番号８４６によってコードされるアミノ酸配列を有する。図１４に示される例示的なＦＬＰ－ＸＴＥＮ－ＥＲＴ２ポリペプチドは、配列番号８４７によってコードされるアミノ酸配列を有する。例示的なＮＬＳ配列は、配列番号８４８によってコードされるアミノ酸配列を有する。例示的なＰＥＳＴ配列は、配列番号８４９によってコードされるアミノ酸配列を有する。

【０２４４】

我々は、遺伝子発現を制御する各融合タンパク質構築物の能力を試験した。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を

ａ）ＭＮＤ－ＴｅｔＲ構築物、

ｂ）ＣＭＶ－ＴＯ－ｍＣｈｅｒｒｙ－ＮＬｕｃまたはＣＭＶ－ＴＯ－ＦＳＦ－ｍＣｈｅｒｒｙ－ＮＬｕｃ構築物のいずれか、および

ｃ）ＨＢＰ１－ＴＯ－ＦＥＲまたはＨＢＰ１－ＴＯ－ＦＥＸ発現構築物のいずれか、を用いて

ＬｉｐｏｆｅｃｔＡＭＩＮＥ　２０００（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を標準的な方法に従って使用して、コトランスフェクトした。一晩増殖させた後、２００ｎＭドキシサイクリンおよび／または１ｕＭの４－ヒドロキシタモキシフェンを複製ウェルのセットに添加することによって、遺伝子発現を誘導した。細胞を一晩インキュベートし、ナノルシフェラーゼ活性（ＮａｎｏＧｌｏ、Ｐｒｏｍｅｇａ）の均一アッセイを使用して相対的なレポーター遺伝子活性を決定した。

【０２４５】

結果（図１４）によると、ＦＥＲＰ、ＦＥＲＮＰＡ、ＦＥＸＰ、およびＦＥＸＮＰを含む、いくつかのＦｌｐ－ＥＲＴ２融合タンパク質構築物は、４ＯＨＴ依存性Ｆｌｐ活性を示した。

【０２４６】

実施例４：ＳＴＯＰカセット、Ｆｌｐコード領域におけるイントロン、およびｍＲＮＡ不安定化要素の発現制御に及ぼす影響

Ｆｌｐ活性をさらに制御するために、イントロン要素を挿入したＦｌｐ発現構築物の追加の設計を試験した（図１５Ａ）。

【０２４７】

前述の例のＦＥＸＰ構築物（配列番号８６７）をテンプレートとして使用し、イントロン領域（ＡＣＴＢ遺伝子のイントロン２、必要なスプライスドナー／アクセプター要素）をＦｌｐコード領域に挿入した。得られた構築物は、「ＦＥＸＰｉ２」（配列番号８６８）と示される。したがって、ＦＥＸＰとＦＥＸＰｉ２構築物は、ＡＣＴＢ遺伝子のイントロン２がＦＬＰコード領域に挿入されている点で異なっている。

【０２４８】

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、

ａ）ＭＮＤ－ＴｅｔＲ構築物、

ｂ）ＨＢＰ２－ＴＯ－ｍＣｈｅｒｒｙ－ＮＬｕｃまたはＨＢＰ２－ＴＯ－ＦＳＦ－ｍＣｈｅｒｒｙ－ＮＬｕｃ構築物のいずれか、および

ｃ）ＨＢＰ１－ＴＯ－ＦＥＸＰまたはＨＢＰ１－ＴＯ－ＦＥＸＰｉ２（配列番号８６９）構築物のいずれか、を用いて、

ＬｉｐｏｆｅｃｔＡＭＩＮＥ　２０００（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を標準的な方法に従って使用して、トランスフェクトした。ＨＢＰ２－ＴＯ－ＦＳ

Ｆ－ｍＣｈｅｒｒｙ－ＮＬｕｃの３つのバージョンが使用され、それぞれＦｌｐ応答性ＳＴＯＰカセットのＳＴＯＰ１（配列番号８５４）、ＳＴＯＰ２（配列番号８５５）、またはＳＴＯＰ３（配列番号８５６）バリアントを含有する。ＳＴＯＰ１、ＳＴＯＰ２、およびＳＴＯＰ３のバリアントは、カセット内のタンデムポリアデニル化シグナルの数によって異なる。一晩増殖させた後、２００ｎＭドキシサイクリンおよび／または１ｕＭの４－ヒドロキシタモキシフェンを複製ウェルのセットに添加することによって、遺伝子発現を誘導した。細胞を一晩インキュベートし、ナノルシフェラーゼ活性（ＮａｎｏＧｌｏ、Ｐｒｏｍｅｇａ）の均一アッセイを使用して相対的なレポーター遺伝子活性を決定した。

【０２４９】

結果（図１５Ａ）によると、Ｆｌｐ応答性ＳＴＯＰカセットの中で、より長いタンデムポリアデニル化シグナルを有するＳＴＯＰ３カセットが、ベースライン発現を抑制するのに効果的であったが、一方でＦｌｐコード領域におけるイントロンの存在は、ＳＴＯＰ３カセットを含む発現構築物と組み合わせた場合、ドキシサイクリンおよび４ＯＨＴの両方の存在下でのＦｌｐの最大活性およびレポーター遺伝子の発現レベルを維持するのに役立った。

【０２５０】

我々はまた、ｍＲＮＡ不安定化要素の挿入を伴うＦｌｐ発現構築物の追加設計も試験した（図１５Ｂ）。異なるｍＲＮＡ不安定化要素をＦＥＸＰｉ２構築物に挿入した。使用したｍＲＮＡ不安定化要素は、ｃ－ｆｏｓコード要素（ＦＣＥ、配列番号８９４）、ｃ－ｆｏｓ遺伝子の３’ＵＴＲ由来のＡＵリッチ要素（ＡＲＥ、配列番号８９５）、およびタンデムでのＦＣＥとＡＲＥの両方の組み合わせ（配列番号８９６）であった。ＦＣＥが挿入されたＦＥＸＰｉ２構築物は、ＦＥＸＰｉ２－Ｆと表記され、ＡＲＥが挿入されたＦＥＸＰｉ２構築物は、ＦＥＸＰｉ２－Ａと表記され、ＦＣＥおよびＡＲＥの両方が挿入されたＦＥＸＰｉ２構築物は、ＦＥＸＰｉ２－ＦＡと表記されている。

【０２５１】

ＬｉｐｏｆｅｃｔＡＭＩＮＥ　２０００（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を標準的な方法に従って使用して、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、ＭＮＤ－ＴｅｔＲおよびＨＢＰ２－ＴＯ－ＦＳＦ－ｍＣｈｅｒｒｙ－ＮＬｕｃ構築物とＨＢＰ１－ＴＯ－ＦＥＸＰｉ２発現構築物のバリアントを用いてトランスフェクトした。一晩増殖させた後、２００ｎＭドキシサイクリンおよび／または１ｕＭの４－ヒドロキシタモキシフェンを複製ウェルのセットに添加することによって、遺伝子発現を誘導した。細胞を一晩インキュベートし、ナノルシフェラーゼ活性（ＮａｎｏＧｌｏ、Ｐｒｏｍｅｇａ）の均一アッセイを使用して相対的なレポーター遺伝子活性を決定した。結果（図１５Ｂ）は、ｍＲＮＡ不安定化要素の組み込みが、Ｆｌｐリコンビナーゼの発現に影響を与える可能性があることを示した。

【０２５２】

実施例５：様々な発現構築物設計による標的遺伝子発現の制御

様々な発現構築物設計を、遺伝子発現の制御に対するそれらの影響について試験した。

【０２５３】

図１６に示すように、設計は以下を含む。

１）ＳＴＯＰカセット：プロモーター－ＴｅｔＯｎ領域とレポーター遺伝子コード領域の間に挿入されたＳＴＯＰカセットを含む構築物、

２）ペイロード逆位：２つのＳＴＯＰカセットを含む構築物であり、レポーター遺伝子コード領域が反転され、直交するＦｌｐ認識部位（配列番号８６１）の制御下に置かれる、

３）プロモーター逆位：２つのＳＴＯＰカセットを含む構築物であり、プロモーター領域が反転され、直交するＦｌｐ認識部位（配列番号８６０）の制御下に置かれる、

４）分割イントロン逆位：２つのＳＴＯＰカセットを含む構築物であり、プロモーター領域およびレポーター遺伝子コード領域の一部が反転され、直交Ｆｌｐ認識部位の制御下に置かれ、イントロン領域はレポーター遺伝子コード領域（配列番号８６２）に作動可能に連結されている。

【０２５４】
　ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、ＬｉｐｏｆｅｃｔＡＭＩＮＥ　２０００（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を標準的な方法に従って使用して、指示された発現構築物を用いてトランスフェクトした。細胞を２日間インキュベートし、ホタルルシフェラーゼ活性（ＯＮＥ－Ｇｌｏ、Ｐｒｏｍｅｇａ）の均一アッセイを使用して、相対的レポーター遺伝子活性を決定した。結果（図１６）は、これらの設計がレポーター遺伝子のベースライン発現の減少をもたらし、その中で分割イントロン逆位設計が最低のベースライン（漏出性）発現を達成したことを示した。
【０２５５】
　これらすべての設計は、ドキシサイクリンおよび４ＯＨＴに対する応答性についても試験された。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、ＬｉｐｏｆｅｃｔＡＭＩＮＥ　２０００（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を標準的な方法に従って使用して、指示された発現構築物を用いてトランスフェクトした。一晩増殖させた後、２００ｎＭドキシサイクリンおよび／または１ｕＭの４－ヒドロキシタモキシフェンを複製ウェルのセットに添加することによって、遺伝子発現を誘導した。細胞を一晩インキュベートし、ホタルルシフェラーゼ活性（ＯＮＥ－Ｇｌｏ、Ｐｒｏｍｅｇａ）の均一アッセイを使用して、相対的レポーター遺伝子活性を決定した。結果（図１７）は、これらすべての設計がドキシサイクリンおよび４ＯＨに対する応答性を示し、最大発現には両方の薬剤が必要であることを示した。
【０２５６】
実施例６：単一の構築物における転写制御、翻訳制御、およびペイロード構成要素の操作
　転写制御、翻訳制御、およびペイロード構成要素を組み込むベクターを構築するために、ＭｕｌｔｉＳｉｔｅ　Ｇａｔｅｗａｙシステム（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、Ｇａｔｅｗａｙ　ａｔｔＬ部位を様々な構築物に設計し、各構成要素のｐＤＥＳＴ１４ベクターへのＬＲクロナーゼ介在アセンブリを容易にした。図１８に示す構築物は、前述の実施例（ＨＢＰ２－ＴＯ－ＳＴＯＰ３－ｍＣｈｅｒｒｙ－ｆＬｕｃ、配列番号８７０）で示されるように、ＳＴＯＰ３カセットを利用する。前述の実施例によるペイロード逆位設計、プロモーター逆位設計、および分割イントロン逆位設計を利用する追加の構築物も生成した。
【０２５７】
実施例７：転写制御、翻訳制御、およびＯＶ２ペイロード成分のＨＳＶベクターへの操作
　我々は、転写制御、翻訳制御、および二次腫瘍溶解ウイルスゲノム構成要素を、単一のＨＳＶベースの腫瘍溶解ウイルスベクターに組み込む、様々な二重腫瘍溶解ウイルスベクターを構築する。ＭｕｌｔｉＳｉｔｅ　Ｇａｔｅｗａｙシステム（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、ゲートウェイａｔｔＬ部位を様々な構築物に設計し、ＯＮＣＲ２２２ｂベクターへの各構成要素のＬＲクロナーゼ介在アセンブリを容易にした。１つの例示的な構築物を図１９に示し、それは、Ｆｌｐリコンビナーゼ発現のためのＨＢＰ１＿プロモーター－ＴｅｔＯｎ－ＦＥＸＰｉ２カセット（配列番号８６９）と、一旦ＳＴＯＰ３要素がＦｌｐリコンビナーゼによって切除されると、ＳＶＶウイルスゲノムおよびｍＣｈｅｒｒｙレポーター遺伝子の転写および翻訳を可能にするＨＢＰ２＿プロモーター－ＴｅｔＯｎ－ＳＴＯＰ３－ＳＶＶ－ｍＣｈｅｒｒｙ（配列番号８７１）カセットを組み込む。完全な１４．１ｋｂの挿入配列は、配列番号８７２に提示される。リコンビナーゼ応答性ＳＴＯＰ３カセットは、図１９の二次腫瘍溶解性ウイルスを制御するために使用されるが、我々はまた、二次腫瘍溶解性ウイルスを制御するために、ペイロード逆位設計、プロモーター逆位設計、および分割イントロン逆位設計をそれぞれ使用する、同様の二重性腫瘍溶解性ウイルスベクターを構築した。ＨＳＶベースの二重腫瘍溶解性ウイルスベクターの各々を、Ｆｕｇｅｎｅ　ＨＤ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用したＶｅｒｏ－ＳＦ細胞へのトランスフェクションにより再構成し、ウイルスストックを標準的な方法に従って増殖させ、力価測定した。
【０２５８】

ＮＣＩ－Ｈ１２９９細胞は、０．１ｐｆｕ／細胞の感染多重度で、指示されたＯＮＣＲ－２２２ベースの二重腫瘍溶解性ウイルスベクターで感染され、ＳＶＶ－ｍＣｈｅｒｒｙ複製は、２００ｎＭのドキシサイクリンおよび１ｕＭの４－ヒドロキシタモキシフェンを複製ウェルに添加することによって誘導された。ウイルス複製を、自動化倒立蛍光顕微鏡（ＩｎｃｕＣｙｔｅ　Ｓ３）を使用して３日間、２時間ごとにアッセイし、ＨＳＶからのＧＦＰ発現およびＳＶＶからのｍＣｈｅｒｒｙ発現についてスクリーニングした。データは、ＨＳＶ（図２０Ａ）またはＳＶＶ（図２０Ｂ）に対するウイルス力価の指標として、ＧＦＰおよびｍＣｈｅｒｒｙ細胞／顕微鏡視野の総数としてプロットされた。結果は、試験されたすべての二重の腫瘍溶解性ウイルスベクターについて、ＨＳＶのウイルス力価が、ドキシサイクリンおよび４－ヒドロキシタモキシフェンの存在によって有意な影響を受けないことが示された（図２０Ａ）。一方で、ＳＴＯＰ３切除カセット設計またはプロモーター逆位設計を有する二重腫瘍溶解性ベクターについては、ＳＶＶのウイルス力価は、ドキシサイクリンおよび４－ヒドロキシタモキシフェンの存在下で有意に増加した（図２０Ｂ）。特に、ＳＶＶ二次腫瘍溶解性ウイルス（ＳＶＶ）発現カセットでプロモーター逆位デザインを使用した二重性腫瘍溶解性ウイルスベクターについては、ドキシサイクリンおよび４－ヒドロキシタモキシフェンの非存在下でのＳＶＶの基底産生は最小限であったが、これらの小分子で誘導された後のＳＶＶ産生は高かった。

【０２５９】

実施例８：二重腫瘍溶解性ウイルスは、インビボにおいてより強力な抗腫瘍効果を示す

我々は、ＳＶＶウイルスゲノムを腫瘍溶解性ＨＳＶ骨格ベクターＯＮＣＲ－１４２に挿入することによって、二重腫瘍溶解性ウイルスベクターを構築した（図２１）。ＳＶＶ＋ｓｓＲＮＡの発現は、ゲートウェイカセット内のＣＭＶプロモーターによって制御される。ＯＮＣＲ－１８９（配列番号８７３）では、ＳＶＶウイルスゲノムをコードするＲＮＡの転写後、ＳＶＶウイルスゲノムに隣接する自己切断リボザイムが接合部切断配列として機能し、非ウイルスＲＮＡが転写物から除去され、その結果、ＳＶＶ　ＲＮＡが解放されて感染性ＳＶＶウイルスの産生が可能になる。対照ベクターＯＮＣＲ－１９０（配列番号８７４）では、このようなリボザイムは存在せず、したがって感染性ＳＶＶウイルスＲＮＡは産生されない。したがって、ＯＮＣＲ－１８９はＳＶＶ複製能力を有し、一方、ＯＮＣＲ－１９０はＳＶＶ複製能力を有しない。

【０２６０】

ＯＮＣＲ－１８９およびＯＮＣＲ－１９０からのウイルスストックを産生し、Ｖｅｒｏ細胞で力価測定した。ＯＮＣＲ－１８９またはＯＮＣＲ－１９０ウイルスストックの溶解活性を、ＶｅｒｏまたはＨ１２９９細胞に感染させることによって試験した（図２２）。各ウイルスストックの１０倍段階希釈を使用して、ＶｅｒｏまたはＨ１２９９細胞を感染させ、細胞をクリスタルバイオレットで染色して、溶解性細胞死および単層クリアランスを視覚化した。ＯＮＣＲ－１８９およびＯＮＣＲ－１９０は、ＨＳＶに感受性であるがＳＶＶ感染に耐性であるＶｅｒｏ細胞において同等の細胞殺滅を示した。一方、Ｈ１２９９細胞はＨＳＶおよびＳＶＶ感染の両方に感受性であり、ＯＮＣＲ－１８９はＯＮＣＲ－１９０よりも高い希釈率でＨ１２９９細胞の単層を消去した。さらに、ヒト血清はＨＳＶを中和するが、ＳＶＶは中和せず、また、２％ヒト血清の存在下でウイルス感染を行った場合、細胞溶解は、ＯＮＣＲ－１９０対照では阻害されるが、ＯＮＣＲ－１８９感染では阻害されない。これらの実験は、ＯＮＣＲ－１８９が機能的ＳＶＶ二次腫瘍溶解性ウイルスを効果的に産生できることを示した。

【０２６１】

次に、１％のトリトンが、ＯＮＣＲ－１８９またはＯＮＣＲ－１９０ウイルスストックのＨ１２９９細胞に感染する能力に影響を及ぼすかどうかを試験した（図２３）。各ウイルスストックの１０倍段階希釈を使用してＨ１２９９細胞を感染させ、細胞をクリスタルバイオレットで染色して、溶解性細胞死および単層クリアランスを視覚化した。Ｈ１２９９細胞は、細胞溶解誘導のＨＳＶおよびＳＶＶの両方に感受性である。ＯＮＣＲ－１８９は、同じＨＳＶ－１　ＭＯＩで感染した場合（ストック中にＨＳＶおよびＳＶＶビリオン

が存在するため）、ＯＮＣＲ－１９０と比較して高い希釈率で単層を除去する。１％トリトンは、ＨＳＶのエンベロープを破壊し感染性ＨＳＶビリオンを不活化するが、エンベロープを持たないＳＶＶには影響しない。したがって、細胞溶解は、ＯＮＣＲ－１９０では、１％トリトンの存在下で阻害されるが、ＯＮＣＲ－１８９ストックでは阻害されない（ＨＳＶ感染のみが不活化されたが、ＯＮＣＲ－１８９ウイルスストックにはＨＳＶおよびＳＶＶビリオンが含有されていたため、ＳＶＶは１％トリトンによって不活性化されないので、ＳＶＶビリオンはＨ１２９９細胞を溶解した）。

【０２６２】

Ｈ４４６細胞のＯＮＣＲ－１８９およびＯＮＣＲ－１９０ウイルス感染について、ＩＣ５０力価アッセイを実施した（図２４Ａ）。Ｈ４４６細胞は、ＨＳＶ感染とＳＶＶ感染の両方に感受性がある。結果は、ＯＮＣＲ－１８９のＩＣ５０力価が、ＯＮＣＲ－１９０と比較して低いことを示した。すなわち、ＯＮＣＲ－１８９は、Ｈ４４６細胞を殺滅するのにより強力である。１％トリトンの存在下での感染は、ＨＳＶのエンベロープを破壊し、感染性ＨＳＶビリオンを不活化するが、ＳＶＶには影響せず、したがって、１％トリトンを添加した場合、ＯＮＣＲ－１９０では細胞溶解は阻害されたがＯＮＣＲ－１８９感染では阻害されなかった。ＩＣ５０値を図２４Ｂに要約する。

【０２６３】

別の実験セットでは、Ｈ１２９９細胞を、インビトロで転写されたＳＶＶ－ｎｅｇまたはＳＶＶ－ｗｔポジティブ鎖ＲＮＡでトランスフェクトするか、またはＯＮＣＲ－１８９およびＯＮＣＲ－１９０ｏＨＳＶで感染させた。各試験群からのＲＮＡ試料を抽出し、ＲＴ　ｑＰＣＲアッセイに供した（図２５）。結果は、ＳＶＶ－ＷＴポジティブ鎖ＲＮＡのトランスフェクションが、ウイルス複製を示すポジティブ鎖ＲＮＡとネガティブ鎖ＲＮＡの両方の高コピーをもたらすことを示した。ＯＮＣＲ－１８９感染細胞におけるＳＶＶポジティブおよびネガティブ鎖ＲＮＡのレベルは、ＳＶＶ－ＷＴトランスフェクト細胞と同様であり、ＯＮＣＲ－１９０感染細胞におけるＳＶＶ　ＲＮＡレベルよりもはるかに高く、ＯＮＣＲ－１８９ｏＨＳＶ感染細胞におけるＳＶＶウイルス複製が成功したことを示す。

【０２６４】

実施例９：二重腫瘍溶解性ウイルスは、インビボで抗腫瘍効果を示す

二重腫瘍溶解性ウイルスのインビボ有効性の評価は、皮下異種移植片腫瘍（ＮＣＩ－Ｈ１２９９）を有するヌードマウスにおいて実施された。各ｏＨＳＶは、$１×１０^{７}$ＰＦＵのＩＶ用量で静脈内（ＩＶ）に投与され、ＳＶＶは、$１×１０^{４}$ＰＦＵのＩＶ用量で投与された。ＮＣＩ－Ｈ１２９９を有するマウスは、腫瘍が$１５０ｍｍ^{３}$（１群当たりｎ＝７）に達したときにコホート化され、１、４、および７日目に静脈内投与を受けた。腫瘍増殖（図２６Ａ）および体重（図２６Ｂ）を週に２回測定した。

【０２６５】

図２６Ａに示すように、ｏＨＳＶ骨格ベクター（ＯＮＣＲ－１４２）およびリボザイムなしでＳＶＶをコードするｏＨＳＶ（ＯＮＣＲ－１９０）は、この腫瘍モデルでは抗腫瘍効果を有しなかった。一方で、ＳＶＶビリオンまたはＳＶＶビリオンと組み合わせたＯＮＣＲ－１９０で処置したマウスは、有意な腫瘍増殖阻害を示した。ＯＮＣＲ－１８９をＩＶ投与したマウスでも同様の腫瘍増殖阻害が観察され、ＯＮＣＲ－１８９は、それがインビボで送達されると、腫瘍増殖を阻害することができる機能的なＳＶＶビリオンを効果的に産生できることを示唆する。本試験で試験したいずれの処置においても、動物体重に対する有害作用は観察されなかった（図２６Ｂ）。群統計比較については、二元配置分散分析（ボンフェローニの多重比較検定）を使用した。Ｐ値はＰＢＳ対照に対するものであり、＊はＰ＜０．０５を示す。

【０２６６】

実施例１０：ＴｅｔＯＦＦリボザイムを使用した遺伝子発現の制御

ＨＥＫ２９３細胞を、３’ＵＴＲ中のＫ４アプタザイム（配列番号９１３）またはＫ７アプタザイム（配列番号９１４）を含有する転写物を発現するｍＣｈｅｒｒｙレポーター

ベクタープラスミドで一過性にトランスフェクトした。ｍＣｈｅｒｒｙの発現レベルは、示された濃度を添加したテトラサイクリンのトランスフェクション４８時間後に、Ｓｐｅｃｔｒａｍａｘ　Ｍｉｎｉｍａｘでアレイスキャンニングサイトメトリーによって評価された。結果（図２７）は、テトラサイクリンが転写物のアプタザイム切断を抑制して遺伝子発現を誘導することを示した。

【０２６７】

実施例１１：二重腫瘍溶解性ウイルスは、インビボで持続的な抗腫瘍効果を示す

二重腫瘍溶解性ウイルスのインビボ有効性の評価は、一次腫瘍溶解性ウイルスに部分的に感受性のある皮下異種移植片腫瘍を有するヌードマウスにおいて実施される。ウイルスは、ＩＶで静脈内（ＩＶ）投与される。腫瘍を有するマウスは、腫瘍が１５０ｍｍ^3（１群当たりｎ＝７～１０）に達したときにコホート化され、静脈内に３回投与を受けた。腫瘍増殖は、週に２回測定される。

【０２６８】

複製能力を有しない二次腫瘍溶解性ウイルスをコードする一次腫瘍溶解性ウイルスは、この腫瘍モデルにおいて部分的な抗腫瘍効果を有し、腫瘍は一定時間後に再発する。他方、機能的な二次ビリオンを効果的に産生できる複製能力を有する二次腫瘍溶解性ウイルスをコードする一次腫瘍溶解性ウイルスを処置したマウスは、腫瘍増殖をより大幅に、より長期間阻害する。

【０２６９】

さらなる番号付けされた実施形態

本開示のさらなる実施形態は、以下の番号付けされた実施形態で提供される。

【０２７０】

実施形態１．二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む、組換え一次腫瘍溶解性ウイルス。

【０２７１】

実施形態２．二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを含む、組換え一次ウイルス。

【０２７２】

実施形態３．一次腫瘍溶解性ウイルスおよび二次腫瘍溶解性ウイルスが、複製能力を有する、実施形態１に記載のウイルス。

【０２７３】

実施形態４．一次ウイルスおよび二次ウイルスが、複製能力を有する、実施形態２に記載のウイルス。

【０２７４】

実施形態５．一次腫瘍溶解性ウイルスおよび／または二次腫瘍溶解性ウイルスが、複製能力を有しない、実施形態１に記載のウイルス。

【０２７５】

実施形態６．一次ウイルスおよび／または二次ウイルスが、複製能力を有しない、実施形態２に記載のウイルス。

【０２７６】

実施形態７．二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドが、調節可能なプロモーターに作動可能に連結されている、実施形態１、３、および５のいずれか１つに記載のウイルス。

【０２７７】

実施形態８．二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドが、調節可能なプロモーターに作動可能に連結されている、実施形態２、４、および６のいずれか１つに記載のウイルス。

【０２７８】

実施形態９．一次腫瘍溶解性ウイルスが、二次腫瘍溶解性ウイルスに対する抗原特異的免疫を媒介しない抗原特異的免疫応答を発生させる、実施形態１、３、５、および７のい

ずれか１つに記載のウイルス。

【０２７９】

実施形態１０．一次ウイルスが、二次ウイルスに対する抗原特異的免疫を媒介しない抗原特異的免疫応答を発生させる、実施形態２、４、６、および８のいずれか１つに記載のウイルス。

【０２８０】

実施形態１１．一次腫瘍溶解性ウイルスが、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）ウイルスである、実施形態１、３、５、７、および９のいずれか１つに記載のウイルス。

【０２８１】

実施形態１２．一次ウイルスが、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）ウイルスである、実施形態２、４、６、８、および１０のいずれか１つに記載のウイルス。

【０２８２】

実施形態１３．ｄｓＤＮＡウイルスが、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）またはアデノウイルスである、実施形態１１または１２に記載のウイルス。

【０２８３】

実施形態１４．ｄｓＤＮＡウイルスが、Ｐｏｘｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスである、実施形態１１または１２に記載のウイルス。

【０２８４】

実施形態１５．ｄｓＤＮＡウイルスが、伝染性軟属腫ウイルス、粘液腫ウイルス、ワクシーナ（ｖａｃｃｉｎａ）ウイルス、サル痘ウイルス、またはヤタポックスウイルスである、実施形態１４に記載のウイルス。

【０２８５】

実施形態１６．一次腫瘍溶解性ウイルスが、ＲＮＡウイルスである、実施形態１、３、５、７、および９のいずれか１つに記載のウイルス。

【０２８６】

実施形態１７．一次ウイルスが、ＲＮＡウイルスである、実施形態２、４、６、８、および１０のいずれか１つに記載のウイルス。

【０２８７】

実施形態１８．ＲＮＡウイルスが、パラミクソウイルスまたはラブドウイルスである、実施形態１６または１７に記載のウイルス。

【０２８８】

実施形態１９．二次腫瘍溶解性ウイルスが、ポジティブセンス一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）ウイルス、ネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルス、またはアンビセンスｓｓＲＮＡウイルスである、実施形態１、３、５、７、９、１１、１３～１６、および１８のいずれか１つに記載のウイルス。

【０２８９】

実施形態２０．二次ウイルスが、ポジティブセンス一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）ウイルス、ネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルス、またはアンビセンスｓｓＲＮＡウイルスである、実施形態２、４、６、８、１０、１２～１５、および１７～１８のいずれか１つに記載のウイルス。

【０２９０】

実施形態２１．二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスが、Ｒｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅファミリー、Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリー、またはＯｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルスである、実施形態１９または２０に記載のウイルス。

【０２９１】

実施形態２２．Ｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスが、水胞性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）またはマラバウイルスである、実施形態２１に記載のウイルス。

【０２９２】

実施形態２３．Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスが、ニューカッ

スル病ウイルス、センダイウイルス、または麻疹ウイルスである、実施形態２１に記載のウイルス。

【０２９３】

実施形態２４．Ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスが、インフルエンザウイルスである、実施形態２１に記載のウイルス。

【０２９４】

実施形態２５．二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスが、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスであり、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスが、エンテロウイルスである、実施形態１９または２０に記載のウイルス。

【０２９５】

実施形態２６．エンテロウイルスが、ポリオウイルス、セネカバレーウイルス（ＳＶＶ）、コクサッキーウイルス、またはエコーウイルスである、実施形態２５に記載のウイルス。

【０２９６】

実施形態２７．コクサキウイルスが、コクサッキーウイルスＡ（ＣＶＡ）またはコクサッキーウイルスＢ（ＣＶＢ）である、実施形態２６に記載のウイルス、

【０２９７】

実施形態２８．コクサキウイルスが、ＣＶＡ９、ＣＶＡ２１、またはＣＶＢ３である、実施形態２７に記載のウイルス。

【０２９８】

実施形態２９．二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスが、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスであり、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスが、脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）である、実施形態１９または２０に記載のウイルス。

【０２９９】

実施形態３０．二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスが、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスであり、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスが、メンゴウイルスである、実施形態１９または２０に記載のウイルス。

【０３００】

実施形態３１．二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスが、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスであり、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスが、Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスである、実施形態１９または２０に記載のウイルス。

【０３０１】

実施形態３２．Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスが、新世界アルファウイルスまたは旧世界アルファウイルスである、実施形態３１に記載のウイルス。

【０３０２】

実施形態３３．新世界アルファウイルスまたは旧世界アルファウイルスが、ＶＥＥＶ、ＷＥＥＶ、ＥＥＶ、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、ロスリバーウイルス、またはマヤロウイルスである、実施形態３２に記載のウイルス。

【０３０３】

実施形態３４．一次腫瘍溶解性ウイルスおよび／または二次腫瘍溶解性ウイルスが、キメラウイルスである、実施形態１、３、５、７、９、１１、１３～１６、１８～１９、および２１～３３のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３０４】

実施形態３５．一次ウイルスおよび／または二次ウイルスが、キメラウイルスである、実施形態２、４、６、８、１０、１２～１５、１７～１８、および２０～３３のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３０５】

実施形態３６．一次腫瘍溶解性ウイルスおよび／または二次腫瘍溶解性ウイルスが、シュードタイプウイルスである、実施形態１、３、５、７、９、１１、１３～１６、１８～１９、および２１～３４のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３０６】
実施形態３７．一次ウイルスおよび／または二次ウイルスが、シュードタイプウイルスである、実施形態２、４、６、８、１０、１２～１５、１７～１８、２０～３３、および３５のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３０７】
実施形態３８．二次腫瘍溶解性ウイルスが、シュードタイプウイルスであり、一次腫瘍溶解性ウイルスが、二次腫瘍溶解性ウイルスのコード領域の外側にある二次腫瘍溶解性ウイルスのキャプシドタンパク質またはエンベロープタンパク質のコード領域を含む、実施形態３６に記載のウイルス。
【０３０８】
実施形態３９．二次腫瘍溶解性ウイルスが、アルファウイルス、パラミクソウイルス、またはラブドウイルスである、実施形態３８に記載のウイルス。
【０３０９】
実施形態４０．二次ウイルスが、シュードタイプウイルスであり、一次ウイルスが、二次ウイルスのコード領域の外側にある二次ウイルスのキャプシドタンパク質またはエンベロープタンパク質のコード領域を含む、実施形態３７に記載のウイルス。
【０３１０】
実施形態４１．二次ウイルスが、アルファウイルス、パラミクソウイルス、またはラブドウイルスである、実施形態４０に記載のウイルス。
【０３１１】
実施形態４２．調節可能なプロモーターが、ステロイド誘導性プロモーター、メタロチオニンプロモーター、ＭＸ－１プロモーター、ＧＥＮＥＳＷＩＴＣＨ（商標）ハイブリッドプロモーター、クメート応答性プロモーター、およびテトラサイクリン誘導性プロモーターから選択される、実施形態７～４１のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３１２】
実施形態４３．調節可能なプロモーターが、リコンビナーゼ認識部位に隣接した構成的プロモーターを含む、実施形態７～４１のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３１３】
実施形態４４．調節可能なプロモーターに結合することができるペプチドをコードする第２のポリヌクレオチドをさらに含む、実施形態１～４３のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３１４】
実施形態４５．第２のポリヌクレオチドが、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態４４に記載のウイルス。
【０３１５】
実施形態４６．構成的プロモーターが、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）プロモーター、モロニーマウス白血病ウイルス（ＭｏＭＬＶ）ＬＴＲプロモーター、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）ＬＴＲプロモーター、伸長因子１α（ＥＦ１ａ）プロモーター、初期増殖応答１（ＥＧＲ１）プロモーター、フェリチンＨ（ＦｅｒＨ）プロモーター、フェリチンＬ（ＦｅｒＬ）プロモーター、グリセルアルデヒド３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）プロモーター、真核生物翻訳開始因子４Ａ１（ＥＩＦ４Ａ１）プロモーター、ユビキチンＣプロモーター（ＵＢＣ）プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ－１（ＰＧＫ）プロモーター、およびサイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリβ－アクチン（ＣＡＧ）プロモーターから選択される、実施形態４５に記載のウイルス。
【０３１６】
実施形態４７．調節可能なプロモーターが、テトラサイクリン（Ｔｅｔ）依存性プロモーターであり、ペプチドが、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｒｔＴＡ）ペプチドである、実施形態４４～４６のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３１７】

実施形態４８．調節可能なプロモーターが、テトラサイクリン（Ｔｅｔ）依存性プロモーターであり、ペプチドが、テトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｔＴＡ）ペプチドである、実施形態４４～４６のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３１８】

実施形態４９．一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスが、１つ以上のＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）分子をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、実施形態１～４８のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３１９】

実施形態５０．１つ以上のＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）分子をコードするポリヌクレオチドが、第２の調節可能なプロモーターに作動可能に連結されている、実施形態４９に記載のウイルス。

【０３２０】

実施形態５１．１つ以上のＲＮＡｉ分子が、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのゲノムの標的配列に結合し、かつ二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの複製を阻害する、実施形態４９または５０に記載のウイルス。

【０３２１】

実施形態５２．ＲＮＡｉ分子が、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、またはＡｍｉＲＮＡである、実施形態４９～５１のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３２２】

実施形態５３．二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドが、１つ以上のリコンビナーゼ認識部位を含む、実施形態１、３、５、７、９、１１、１３～１６、１８～１９、２１～３４、３６、３８～３９、および４２～５２のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３２３】

実施形態５４．二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドが、１つ以上のリコンビナーゼ認識部位を含む、実施形態２、４、６、８、１０、１２～１５、１７～１８、２０～３３、３５、３７、および４０～５２のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３２４】

実施形態５５．二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドが、１つ以上のリコンビナーゼ応答性カセットを含み、リコンビナーゼ応答性カセットが、１つ以上のリコンビナーゼ認識部位を含む、実施形態１、３、５、７、９、１１、１３～１６、１８～１９、２１～３４、３６、３８～３９、および４２～５３のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３２５】

実施形態５６．二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドが、１つ以上のリコンビナーゼ応答性カセットを含み、リコンビナーゼ応答性カセットが、１つ以上のリコンビナーゼ認識部位を含む、実施形態２、４、６、８、１０、１２～１５、１７～１８、２０～３３、３５、３７、４０～５２、および５４のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３２６】

実施形態５７．１つ以上のリコンビナーゼ応答性カセットが、リコンビナーゼ応答性切除カセット（ＲＲＥＣ）を含む、実施形態５５または５６に記載のウイルス。

【０３２７】

実施形態５８．ＲＲＥＣが、転写／翻訳終結（ＳＴＯＰ）要素を含む、実施形態５７に記載のウイルス。

【０３２８】

実施形態５９．転写／翻訳終結（ＳＴＯＰ）要素が、配列番号８５４～８５６のうちのいずれか１つに対して８０％の同一性を有する配列を含む、実施形態５８に記載のウイルス。

【０３２９】

実施形態６０．１つ以上のリコンビナーゼ応答性カセットが、リコンビナーゼ応答性逆

位カセット（ＲＲＩＣ）を含む、実施形態５５～５９のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３３０】
実施形態６１．ＲＲＩＣが、中心要素の両側に２つ以上の直交リコンビナーゼ認識部位を含む、実施形態６０に記載のウイルス。
【０３３１】
実施形態６２．ＲＲＩＣが、プロモーターまたはプロモーターの一部を含む、実施形態６０または６１に記載のウイルス。
【０３３２】
実施形態６３．ＲＲＩＣが、コード領域またはコード領域の一部を含み、コード領域が、二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスのウイルスゲノムをコードする、実施形態６０または６１に記載のウイルス。
【０３３３】
実施形態６４．ＲＲＩＣが、１つ以上の制御要素を含む、実施形態６０～６３のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３３４】
実施形態６５．制御要素が、転写／翻訳終結（ＳＴＯＰ）要素である、実施形態６４に記載のウイルス。
【０３３５】
実施形態６６．制御要素が、配列番号８５４～８５６のうちのいずれか１つに対して８０％の同一性を有する配列を有する、実施形態６５に記載のウイルス。
【０３３６】
実施形態６７．リコンビナーゼ応答性逆位カセット（ＲＲＩＣ）が、イントロンの一部をさらに含む、実施形態６０～６６のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３３７】
実施形態６８．二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドが、ｍＲＮＡスプライシングを介してイントロンを除去した後、リコンビナーゼ認識部位を有しない二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスの成熟ウイルスゲノム転写物をもたらす、実施形態６７に記載のウイルス。
【０３３８】
実施形態６９．一次腫瘍溶解性ウイルスまたは一次ウイルスが、リコンビナーゼをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、実施形態１～６８のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３３９】
実施形態７０．リコンビナーゼが、フリッパーゼ（Ｆｌｐ）またはＣｒｅリコンビナーゼ（Ｃｒｅ）である、実施形態６９に記載のウイルス。
【０３４０】
実施形態７１．リコンビナーゼのコード領域が、イントロンを含む、実施形態６９または７０に記載のウイルス。
【０３４１】
実施形態７２．リコンビナーゼリコンビナーゼの発現カセットが、１つ以上のｍＲＮＡ不安定化要素を含む、実施形態６９～７１のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３４２】
実施形態７３．リコンビナーゼが、追加のポリペプチドを含む融合タンパク質の一部であり、追加のポリペプチドが、リコンビナーゼの活性および／または細胞局在を調節する、実施形態６９～７２のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３４３】
実施形態７４．リコンビナーゼの活性および／または細胞局在が、リガンドおよび／または小分子の存在によって調節される、実施形態７３に記載のウイルス。
【０３４４】
実施形態７５．追加のポリペプチドが、エストロゲン受容体タンパク質のリガンド結合

ドメインを含む、実施形態７３または７４に記載のウイルス。
【０３４５】
実施形態７６．１つ以上のリコンビナーゼ認識部位が、フリッパーゼ認識標的（ＦＲＴ）部位である、実施形態５３～７５のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３４６】
実施形態７７．一次腫瘍溶解性ウイルスが、調節ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、調節ポリペプチドが、１つ以上のプロモーターの活性を調節する、実施形態１、３、５、７、９、１１、１３～１６、１８～１９、２１～３４、３６、３８～３９、４２～５３、５５、および５７～７６のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３４７】
実施形態７８．一次ウイルスが、調節ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、調節ポリペプチドが、１つ以上のプロモーターの活性を調節する、実施形態２、４、６、８、１０、１２～１５、１７～１８、２０～３３、３５、３７、４０～５２、５４、および５６～７６のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３４８】
実施形態７９．
二次腫瘍溶解性ウイルスをコードする第１のポリヌクレオチドと、
１つ以上のＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）分子をコードする第２のポリヌクレオチドと、を含む、組換え一次腫瘍溶解性ウイルス。
【０３４９】
実施形態８０．
二次ウイルスをコードする第１のポリヌクレオチドと、
１つ以上のＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）分子をコードする第２のポリヌクレオチドと、を含む、組換え一次ウイルス。
【０３５０】
実施形態８１．一次腫瘍溶解性ウイルスおよび二次腫瘍溶解性ウイルスが、複製能力を有する、実施形態７９に記載のウイルス。
【０３５１】
実施形態８２．一次ウイルスおよび二次ウイルスが、複製能力を有する、実施形態８０に記載のウイルス。
【０３５２】
実施形態８３．第１のポリヌクレオチドが、第１の調節可能なプロモーターに作動可能に連結され、第２のポリヌクレオチドが、第２の調節可能なプロモーターに作動可能に連結されている、実施形態７９～８２のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３５３】
実施形態８４．一次腫瘍溶解性ウイルスが、二次腫瘍溶解性ウイルスに対する抗原特異的免疫を媒介しない抗原特異的免疫応答を発生させる、実施形態７９、８１、ａおよび８３のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３５４】
実施形態８５．一次ウイルスが、二次ウイルスに対する抗原特異的免疫を媒介しない抗原特異的免疫応答を発生させる、実施形態８０、８２、および８３のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３５５】
実施形態８６．一次腫瘍溶解性ウイルスが、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）ウイルスである、実施形態７９、８１、８３、および８４のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３５６】
実施形態８７．一次ウイルスが、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）ウイルスである、実施形態８０、８２、８３、および８５のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３５７】
実施形態８８．ｄｓＤＮＡウイルスが、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、アデノウイ

ルス、またはＰｏｘｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスであり、任意選択的にＰｏｘｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスのウイルスが、伝染性軟体属腫ウイルス、粘液腫ウイルス、ワクシーナウイルス、サル痘ウイルス、またはヤタポックスウイルスである、実施形態８６または８７に記載のウイルス。

【０３５８】

実施形態８９．一次腫瘍溶解性ウイルスが、ＲＮＡウイルスである、実施形態７９、８１、８３、および８４のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３５９】

実施形態９０．一次ウイルスが、ＲＮＡウイルスである、実施形態８０、８２、８３、および８５のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３６０】

実施形態９１．ＲＮＡウイルスが、パラミクソウイルスまたはラブドウイルスである、実施形態８９または９０に記載のウイルス。

【０３６１】

実施形態９２．二次腫瘍溶解性ウイルスが、ポジティブセンス一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）ウイルス、ネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルス、またはアンビセンスｓｓＲＮＡウイルスである、実施形態７９、８１、８３、８４、８６、８８、８９、および９１のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３６２】

実施形態９３．二次ウイルスが、ポジティブセンス一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）ウイルス、ネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルス、またはアンビセンスｓｓＲＮＡウイルスである、実施形態８０、８２、８３、８５、８７、８８、および９０～９１のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３６３】

実施形態９４．二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスが、ネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルスであり、ネガティブセンスｓｓＲＮＡウイルスが、Ｒｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅファミリー、Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリー、またはＯｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスであり、任意選択的に、
Ｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスが、水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）もしくはマラバウイルスであり、
Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスが、ニューカッスル病ウイルス、センダイウイルス、もしくは麻疹ウイルスであり、または
Ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスが、インフルエンザウイルスである、実施形態９２または９３に記載のウイルス。

【０３６４】

実施形態９５．二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスがポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスであり、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスがエンテロウイルスであり、任意選択的にエンテロウイルスがポリオウイルス、セネカバレーウイルス（ＳＶＶ）、コクサッキーウイルス、またはエコーウイルスであり、任意選択的に、コクサキウイルスが、コクサッキーウイルスＡ（ＣＶＡ）またはコクサッキーウイルスＢ（ＣＶＢ）であり、任意選択的に、コクサキウイルスが、ＣＶＡ９、ＣＶＡ２１、またはＣＶＢ３である、実施形態９２または９３に記載のウイルス。

【０３６５】

実施形態９６．二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスが、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスであり、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスが、脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）またはメンゴウイルスである、実施形態９２または９３に記載のウイルス。

【０３６６】

実施形態９７．二次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次ウイルスが、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスであり、ポジティブセンスｓｓＲＮＡウイルスが、Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅファミリーのウイルスであり、任意選択的に、Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅファミリーのウ

イルスが、新世界アルファウイルスまたは旧世界アルファウイルスであり、任意選択的に、新世界アルファウイルスまたは旧世界アルファウイルスが、ＶＥＥＶ、ＷＥＥＶ、ＥＥＶ、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、ロスリバーウイルス、またはマヤロウイルスである、実施形態９２または９３に記載のウイルス。

【０３６７】

実施形態９８．一次腫瘍溶解性ウイルスおよび／または二次腫瘍溶解性ウイルスが、キメラウイルスである、実施形態７９、８１、８３、８４、８６、８８、８９、９１～９２、および９４～９７のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３６８】

実施形態９９．一次ウイルスおよび／または二次ウイルスが、キメラウイルスである、実施形態８０、８２、８３、８５、８７、８８、９０～９１、および９３～９７のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３６９】

実施形態１００．一次腫瘍溶解性ウイルスおよび／または二次腫瘍溶解性ウイルスが、シュードタイプウイルスである、実施形態７９、８１、８３、８４、８６、８８、８９、９１～９２、および９４～９８のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３７０】

実施形態１０１．一次ウイルスおよび／または二次ウイルスが、シュードタイプウイルスである、実施形態８０、８２、８３、８５、８７、８８、９０～９１、９３～９７、および９９のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３７１】

実施形態１０２．第１および第２の調節可能なプロモーターが、ステロイド誘導性プロモーター、メタロチオニンプロモーター、ＭＸ－１プロモーター、ＧＥＮＥＳＷＩＴＣＨ（商標）ハイブリッドプロモーター、クメート応答性プロモーター、およびテトラサイクリン依存性プロモーターから選択される、実施形態７９～１０１のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３７２】

実施形態１０３．第１の調節可能なプロモーターに結合することができる第１のペプチドおよび第２の調節可能なプロモーターに結合することができる第２のペプチドをコードする第３のポリヌクレオチドをさらに含む、実施形態７９～１０２のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３７３】

実施形態１０４．第３のポリヌクレオチドが、構成的プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態１０３に記載のウイルス。

【０３７４】

実施形態１０５．構成的プロモーターが、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）プロモーター、モロニーマウス白血病ウイルス（ＭｏＭＬＶ）ＬＴＲプロモーター、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）ＬＴＲプロモーター、伸長因子１α（ＥＦ１ａ）プロモーター、初期増殖応答１（ＥＧＲ１）プロモーター、フェリチンＨ（ＦｅｒＨ）プロモーター、フェリチンＬ（ＦｅｒＬ）プロモーター、グリセルアルデヒド３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）プロモーター、真核生物翻訳開始因子４Ａ１（ＥＩＦ４Ａ１）プロモーター、ユビキチンＣプロモーター（ＵＢＣ）プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ－１（ＰＧＫ）プロモーター、およびサイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリβ－アクチン（ＣＡＧ）プロモーターから選択される、実施形態１０４に記載のウイルス。

【０３７５】

実施形態１０６．第１の調節可能なプロモーターが、テトラサイクリン（Ｔｅｔ）誘導性プロモーターであり、第１のペプチドが、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｒｔＴＡ）ペプチドである、実施形態１０３～１０５のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３７６】
　実施形態１０７．第２の調節可能なプロモーターが、テトラサイクリン（Ｔｅｔ）抑制性プロモーターであり、第２のペプチドが、テトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｔＴＡ）ペプチドである、実施形態１０３～１０６のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３７７】
　実施形態１０８．第１の調節可能なプロモーターが、テトラサイクリン（Ｔｅｔ）抑制性プロモーターであり、第１のペプチドが、テトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｔＴＡ）ペプチドである、実施形態１０３～１０６のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３７８】
　実施形態１０９．第２の調節可能なプロモーターが、テトラサイクリン（Ｔｅｔ）誘導性プロモーターであり、第２のペプチドが、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｒｔＴＡ）ペプチドである、実施形態１０３～１０８のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３７９】
　実施形態１１０．１つ以上のＲＮＡｉ分子が、二次腫瘍溶解性ウイルスのゲノム中の標的配列に結合し、かつ二次腫瘍溶解性ウイルスの複製を阻害する、実施形態７９、８１、８３、８４、８６、８８、８９、９１～９２、９４～９８、１００、および１０２～１０９のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３８０】
　実施形態１１１．１つ以上のＲＮＡｉ分子が、二次ウイルスのゲノム中の標的配列に結合し、かつ二次ウイルスの複製を阻害する、実施形態８０、８２、８３、８５、８７、８８、９０～９１、９３～９７、９９、および１０１～１０９のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３８１】
　実施形態１１２．ＲＮＡｉ分子が、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、またはＡｍｉＲＮＡである、実施形態１１０または１１１に記載のウイルス。
【０３８２】
　実施形態１１３．二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドが、第１の３’リボザイムコード配列および第２の５’リボザイム配列を含む、実施形態１、３、５、７、９、１１、１３～１６、１８～１９、２１～３４、３６、３８～３９、４２～５３、５５、５７～７７、７９、８１、８３、８４、８６、８８、８９、９１～９２、９４～９８、１００、１０２～１０９、１１０、および１１２のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３８３】
　実施形態１１４．二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドが、第１の３’リボザイムコード配列および第２の５’リボザイムコード配列を含む、実施形態２、４、６、８、１０、１２～１５、１７～１８、２０～３３、３５、３７、４０～５２、５４、５６～７６、７８、８０、８２、８３、８５、８７、８８、９０～９１、９３～９７、９９、１０１～１０９、および１１１～１１２のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３８４】
　実施形態１１５．第１および第２のリボザイムコード配列が、ハンマーヘッド型リボザイムまたは肝炎デルタウイルスリボザイムをコードする、実施形態１１３または１１４に記載のウイルス。
【０３８５】
　実施形態１１６．一次腫瘍溶解性ウイルスのゲノムが、複製に必要な１つ以上のウイルス遺伝子に挿入された、またはウイルスゲノムの３’もしくは５’ＵＴＲに挿入された１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含むｍｉＲＮＡ標的配列（ｍｉＲ－ＴＳ）カセットを含む、実施形態１、３、５、７、９、１１、１３～１６、１８～１９、２１～３４、３６、３８～３９、４２～５３、５５、５７～７７、７９、８１、８３、８４、８６、８８、８９、９１～９２、９４～９８、１００、１０２～１０９、１１０、１１２～１１３、および１１５のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３８６】
実施形態１１７．一次ウイルスのゲノムが、複製に必要な１つ以上のウイルス遺伝子に挿入された、またはウイルスゲノムの３’もしくは５’ＵＴＲに挿入された１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含むｍｉＲＮＡ標的配列（ｍｉＲ－ＴＳ）カセットを含む、実施形態２、４、６、８、１０、１２～１５、１７～１８、２０～３３、３５、３７、４０～５２、５４、５６～７６、７８、８０、８２、８３、８５、８７、８８、９０～９１、９３～９７、９９、１０１～１０９、１１１～１１２、１１４、および１１５のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３８７】
実施形態１１８．二次腫瘍溶解性ウイルスのゲノムが、複製に必要な１つ以上のウイルス遺伝子に挿入された、またはウイルスゲノムの３’もしくは５’ＵＴＲに挿入された１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含むｍｉＲＮＡ標的配列（ｍｉＲ－ＴＳ）カセットを含む、実施形態１、３、５、７、９、１１、１３～１６、１８～１９、２１～３４、３６、３８～３９、４２～５３、５５、５７～７７、７９、８１、８３、８４、８６、８８、８９、９１～９２、９４～９８、１００、１０２～１０９、１１０、１１２～１１３、および１１５～１１６のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３８８】
実施形態１１９．二次ウイルスのゲノムが、複製に必要な１つ以上のウイルス遺伝子に挿入された、またはウイルスゲノムの３’もしくは５’ＵＴＲに挿入された１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含むｍｉＲＮＡ標的配列（ｍｉＲ－ＴＳ）カセットを含む、実施形態２、４、６、８、１０、１２～１５、１７～１８、２０～３３、３５、３７、４０～５２、５４、５６～７６、７８、８０、８２、８３、８５、８７、８８、９０～９１、９３～９７、９９、１０１～１０９、１１１～１１２、１１４～１１５、および１１７のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３８９】
実施形態１２０．一次腫瘍溶解性ウイルスおよび二次腫瘍溶解性ウイルスが、複製に必要な１つ以上のウイルス遺伝子に挿入された、またはウイルスゲノムの３’もしくは５’ＵＴＲに挿入された１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含むｍｉＲＮＡ標的配列（ｍｉＲ－ＴＳ）カセットをそれぞれ含む、実施形態１、３、５、７、９、１１、１３～１６、１８～１９、２１～３４、３６、３８～３９、４２～５３、５５、５７～７７、７９、８１、８３、８４、８６、８８、８９、９１～９２、９４～９８、１００、１０２～１０９、１１０、１１２～１１３、１１５～１１６、および１１８のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３９０】
実施形態１２１．一次ウイルスおよび二次ウイルスが、複製に必要な１つ以上のウイルス遺伝子に挿入された、またはウイルスゲノムの３’もしくは５’ＵＴＲに挿入された１つ以上のｍｉＲＮＡ標的配列を含むｍｉＲＮＡ標的配列（ｍｉＲ－ＴＳ）カセットをそれぞれ含む、実施形態２、４、６、８、１０、１２～１５、１７～１８、２０～３３、３５、３７、４０～５２、５４、５６～７６、７８、８０、８２、８３、８５、８７、８８、９０～９１、９３～９７、９９、１０１～１０９、１１１～１１２、１１４～１１５、１１７、および１１９のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３９１】
実施形態１２２．細胞内の１つ以上のｍｉＲＮＡの発現が、一次および／または二次腫瘍溶解性ウイルスの複製を阻害する、実施形態１１６、１１８、および１２０のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３９２】
実施形態１２３．細胞内の１つ以上のｍｉＲＮＡの発現が、一次および／または二次ウイルスの複製を阻害する、実施形態１１７、１１９、および１２１のいずれか１つに記載のウイルス。
【０３９３】
実施形態１２４．少なくとも１つの外因性ペイロードタンパク質をコードするポリヌク

レオチド配列をさらに含む、実施形態１～１２３のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３９４】

実施形態１２５．外因性ペイロードタンパク質が、蛍光タンパク質、酵素、サイトカイン、ケモカイン、または抗原結合分子である、実施形態１２４に記載のウイルス。

【０３９５】

実施形態１２６．二次腫瘍溶解性ウイルスの発現が、外因性薬剤によって調節される、実施形態１、３、５、７、９、１１、１３～１６、１８～１９、２１～３４、３６、３８～３９、４２～５３、５５、５７～７７、７９、８１、８３、８４、８６、８８、８９、９１～９２、９４～９８、１００、１０２～１０９、１１０、１１２～１１３、１１５～１１６、１１８、１２０、１２２、および１２４～１２５のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３９６】

実施形態１２７．二次ウイルスの発現が、外因性薬剤によって調節される、実施形態２、４、６、８、１０、１２～１５、１７～１８、２０～３３、３５、３７、４０～５２、５４、５６～７６、７８、８０、８２、８３、８５、８７、８８、９０～９１、９３～９７、９９、１０１～１０９、１１１～１１２、１１４～１１５、１１７、１１９、１２１、および１２３～１２５のいずれか１つに記載のウイルス。

【０３９７】

実施形態１２８．外因性薬剤が、ペプチド、ホルモン、または小分子である、実施形態１２６または１２７に記載のウイルス。

【０３９８】

実施形態１２９．実施形態１～１２８のいずれか１つに記載のウイルスを含む、組成物。

【０３９９】

実施形態１３０．腫瘍細胞の集団を殺滅する方法であって、実施形態１～１２８のいずれか１つに記載のウイルスまたは実施形態１２９に記載の組成物を、腫瘍細胞の集団に投与することを含む、方法。

【０４００】

実施形態１３１．腫瘍細胞の第１の亜集団が、一次腫瘍溶解性ウイルスによって感染および殺滅される、実施形態１３０に記載の方法。

【０４０１】

実施形態１３２．腫瘍細胞の第２の亜集団が、二次腫瘍溶解性ウイルスによって感染および殺滅される、実施形態１３０または１３１に記載の方法。

【０４０２】

実施形態１３３．腫瘍細胞の亜集団が、一次腫瘍溶解性ウイルスおよび二次腫瘍溶解性ウイルスの両方によって感染および殺滅される、実施形態１３０～１３２のいずれか１つに記載の方法。

【０４０３】

実施形態１３４．二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次腫瘍溶解性ウイルスのみによって殺滅された腫瘍細胞の数と比較して、集団内のより多くの数の腫瘍細胞が、一次および二次腫瘍溶解性ウイルスによって殺滅される、実施形態１３０～１３３のいずれか１つに記載の方法。

【０４０４】

実施形態１３５．腫瘍細胞の集団に１つ以上の外因性薬剤を投与することをさらに含み、１つ以上の外因性薬剤が、二次腫瘍溶解性ウイルスの産生を調節する、実施形態１３０～１３４のいずれか１つに記載の方法。

【０４０５】

実施形態１３６．１つ以上の外因性薬剤が、一次腫瘍溶解性ウイルスと同時に投与され、外因性薬剤の存在が、二次腫瘍溶解性ウイルスの産生を阻害する、実施形態１３５に記載の方法。

【０４０６】
実施形態１３７．１つ以上の外因性薬剤が、一次腫瘍溶解性ウイルスの後に投与され、外因性薬剤の存在が、二次腫瘍溶解性ウイルスの産生を誘導する、実施形態１３５に記載の方法。
【０４０７】
実施形態１３８．外因性薬剤が、一次腫瘍溶解性ウイルスの投与の少なくとも１日後に、少なくとも１週間後に、または少なくとも１か月後に投与される、実施形態１３７に記載の方法。
【０４０８】
実施形態１３９．外因性薬剤の投与前に二次腫瘍溶解性ウイルスが不検出である、実施形態１３５～１３８のいずれか１つに記載の方法。
【０４０９】
実施形態１４０．腫瘍細胞の第１の亜集団が、一次ウイルスによって感染および殺滅される、実施形態１３０に記載の方法。
【０４１０】
実施形態１４１．腫瘍細胞の第２の亜集団が、二次ウイルスによって感染および殺滅される、実施形態１３０または１４０に記載の方法。
【０４１１】
実施形態１４２．腫瘍細胞の亜集団が、一次ウイルスおよび二次ウイルスの両方によって感染および殺滅される、実施形態１３０、１４０、および１４１のいずれか１つに記載の方法。
【０４１２】
実施形態１４３．二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスまたは二次ウイルスのみによって殺滅された腫瘍細胞の数と比較して、集団内のより多くの数の腫瘍細胞が、一次および二次ウイルスによって殺滅される、実施形態１３０および１４０～１４２のいずれか１つに記載の方法。
【０４１３】
実施形態１４４．腫瘍細胞の集団に１つ以上の外因性薬剤を投与することをさらに含み、１つ以上の外因性薬剤が、二次ウイルスの産生を調節する、実施形態１３０および１４０～１４３のいずれか１つに記載の方法。
【０４１４】
実施形態１４５．１つ以上の外因性薬剤が、一次ウイルスと同時に投与され、外因性薬剤の存在が、二次ウイルスの産生を阻害する、実施形態１４４に記載の方法。
【０４１５】
実施形態１４６．１つ以上の外因性薬剤が、一次ウイルスの後に投与され、外因性薬剤の存在が、二次ウイルスの産生を誘導する、実施形態１４５に記載の方法。
【０４１６】
実施形態１４７．外因性薬剤が、一次腫瘍溶解性ウイルスの投与の少なくとも１日後に、少なくとも１週間後に、または少なくとも１か月後に投与される、実施形態１４６に記載の方法。
【０４１７】
実施形態１４８．外因性薬剤の投与前に二次ウイルスが不検出である、実施形態１４４～１４７のいずれか１つに記載の方法。
【０４１８】
実施形態１４９．腫瘍の治療を必要とする対象における腫瘍を治療する方法であって、実施形態１～１２８のいずれか１つに記載のウイルスまたは実施形態１２９に記載の組成物を対象に投与することを含む、方法。
【０４１９】
実施形態１５０．二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスまたは二次腫瘍溶解性ウイルスのみによって殺滅された腫瘍細

胞の数と比較して、集団内のより多くの数の腫瘍細胞が、一次および二次腫瘍溶解性ウイルスによって殺滅される、実施形態１４９に記載の方法。

【０４２０】

実施形態１５１．方法が、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスの投与または二次腫瘍溶解性ウイルスのみの投与と比較して、対象における腫瘍サイズのより大幅な縮小につながる、実施形態１４９または１５０に記載の方法。

【０４２１】

実施形態１５２．方法が、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスを投与するかまたは二次腫瘍溶解性ウイルスのみを投与することと比較して、対象における１つ以上の腫瘍抗原に対するより強力な免疫応答を誘導する、実施形態１４９～１５１のいずれか１つに記載の方法。

【０４２２】

実施形態１５３．方法が、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスを投与することと比較して、対象における一次腫瘍溶解性ウイルスに対する免疫応答の減少をもたらす、実施形態１４９～１５２のいずれか１つに記載の方法。

【０４２３】

実施形態１５４．方法が、二次腫瘍溶解性ウイルスのみを投与することと比較して、対象における二次腫瘍溶解性ウイルスに対する免疫応答の減少をもたらす、実施形態１４９～１５３のいずれか１つに記載の方法。

【０４２４】

実施形態１５５．方法が、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスを投与するかまたは二次腫瘍溶解性ウイルスのみを投与することと比較して、対象における腫瘍細胞の優先的な／より特異的な殺滅をもたらす、実施形態１４９～１５４のいずれか１つに記載の方法。

【０４２５】

実施形態１５６．方法が、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスを投与することと比較して、対象における一次腫瘍溶解性ウイルスのより持続的な産生をもたらす、実施形態１４９～１５５に記載の方法。

【０４２６】

実施形態１５７．方法が、二次腫瘍溶解性ウイルスのみを投与することと比較して、対象における二次腫瘍溶解性ウイルスのより持続的な産生をもたらす、実施形態１４９～１５６のいずれか１つに記載の方法。

【０４２７】

実施形態１５８．方法が、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスを投与するかまたは二次腫瘍溶解性ウイルスのみを投与することと比較して、対象における長期間の腫瘍阻止をもたらす、実施形態１４９～１５７のいずれか１つに記載の方法。

【０４２８】

実施形態１５９．方法が、二次腫瘍溶解性ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次腫瘍溶解性ウイルスを投与するかまたは二次腫瘍溶解性ウイルスのみを投与することと比較して、より多くの細胞タイプのウイルス感染を可能にする、実施形態１４９～１５８のいずれか１つに記載の方法。

【０４２９】

実施形態１６０．腫瘍細胞の集団に１つ以上の外因性薬剤を投与することをさらに含み、１つ以上の外因性薬剤が、二次腫瘍溶解性ウイルスの産生を調節する、実施形態１４９～１５９のいずれか１つに記載の方法。

【０４３０】

実施形態１６１．１つ以上の外因性薬剤が、一次腫瘍溶解性ウイルスと同時に投与され

、外因性薬剤の存在が、二次腫瘍溶解性ウイルスの産生を阻害する、実施形態１６０に記載の方法。

【０４３１】

実施形態１６２．１つ以上の外因性薬剤が、一次腫瘍溶解性ウイルスの後に投与され、外因性薬剤の存在が、二次腫瘍溶解性ウイルスの産生を誘導する、実施形態１６０に記載の方法。

【０４３２】

実施形態１６３．外因性薬剤が、一次腫瘍溶解性ウイルスの投与の少なくとも１日後に、少なくとも１週間後に、または少なくとも１か月後に投与される、実施形態１６２に記載の方法。

【０４３３】

実施形態１６４．外因性薬剤の投与前に二次腫瘍溶解性ウイルスが不検出である、実施形態１６０～１６３のいずれか１つに記載の方法。

【０４３４】

実施形態１６５．二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスまたは二次ウイルスのみによって殺滅された腫瘍細胞の数と比較して、集団内のより多くの数の腫瘍細胞が、一次および二次ウイルスによって殺滅される、実施形態１４９に記載の方法。

【０４３５】

実施形態１６６．方法が、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスの投与または二次ウイルスのみの投与と比較して、対象における腫瘍サイズのより大幅な縮小につながる、実施形態１４９または１６５に記載の方法。

【０４３６】

実施形態１６７．方法が、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスを投与するかまたは二次ウイルスのみを投与することと比較して、対象における１つ以上の腫瘍抗原に対するより強力な免疫応答を誘導する、実施形態１４９、１６５、および１６６のいずれか１つに記載の方法。

【０４３７】

実施形態１６８．方法が、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスを投与することと比較して、対象における一次ウイルスに対する免疫応答の減少をもたらす、実施形態１４９、および１６５～１６７のいずれか１つに記載の方法。

【０４３８】

実施形態１６９．方法が、二次ウイルスのみを投与することと比較して、対象における二次ウイルスに対する免疫応答の減少をもたらす、実施形態１４９、および１６５～１６８のいずれか１つに記載の方法。

【０４３９】

実施形態１７０．方法が、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスを投与するかまたは二次ウイルスのみを投与することと比較して、対象における腫瘍細胞の優先的な／より特異的な殺滅をもたらす、実施形態１４９、および１６５～１６９のいずれか１つに記載の方法。

【０４４０】

実施形態１７１．方法が、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスを投与することと比較して、対象における一次ウイルスのより持続的な産生をもたらす、実施形態１４９、および１６５～１７０のいずれか１つの方法。

【０４４１】

実施形態１７２．方法が、二次ウイルスのみを投与することと比較して、対象における二次ウイルスのより持続的な産生をもたらす、実施形態１４９、および１６５～１７１のいずれか１つに記載の方法。

【０４４２】

実施形態１７３．方法が、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照

一次ウイルスを投与するかまたは二次ウイルスのみを投与することと比較して、対象における長期間の腫瘍阻止をもたらす、実施形態１４９、および１６５～１７２のいずれか１つの方法。

【０４４３】

実施形態１７４．方法が、二次ウイルスをコードするポリヌクレオチドを有しない参照一次ウイルスを投与するかまたは二次ウイルスのみを投与することと比較して、より多くの細胞タイプのウイルス感染を可能にする、実施形態１４９、および１６５～１７３のいずれか１つに記載の方法。

【０４４４】

実施形態１７５．腫瘍細胞の集団に１つ以上の外因性薬剤を投与することをさらに含み、１つ以上の外因性薬剤が、二次ウイルスの産生を調節する、実施形態１４９、および１６５～１７４のいずれか１つに記載の方法。

【０４４５】

実施形態１７６．１つ以上の外因性薬剤が、一次ウイルスと同時に投与され、外因性薬剤の存在が、二次ウイルスの産生を阻害する、実施形態１７５に記載の方法。

【０４４６】

実施形態１７７．１つ以上の外因性薬剤が、一次ウイルスの後に投与され、外因性薬剤の存在が、二次ウイルスの産生を誘導する、実施形態１７５に記載の方法。

【０４４７】

実施形態１７８．外因性薬剤が、一次ウイルスの投与の少なくとも１日後に、少なくとも１週間後に、または少なくとも１か月後に投与される、実施形態１７７に記載の方法。

【０４４８】

実施形態１７９．外因性薬剤の投与前に二次ウイルスが不検出である、実施形態１７５～１７８のいずれか１つに記載の方法。

【０４４９】

実施形態１８０．実施形態１～１２８に記載のウイルスをコードするポリヌクレオチド。

【０４５０】

実施形態１８１．実施形態１８０に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【０４５１】

実施形態１８２．実施形態１８１に記載のベクターを含む医薬組成物。

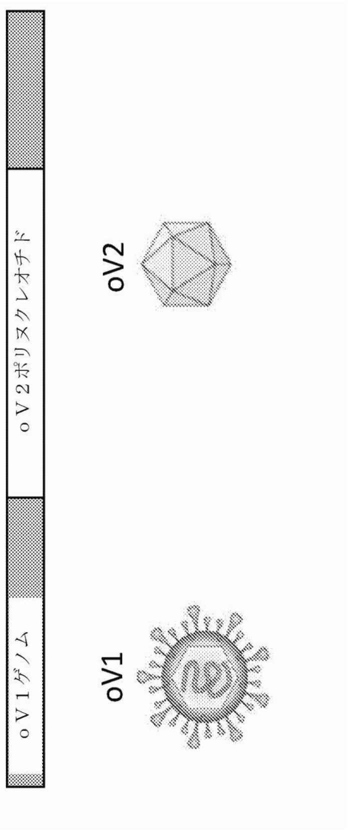
【０４５２】

参照による組み込み

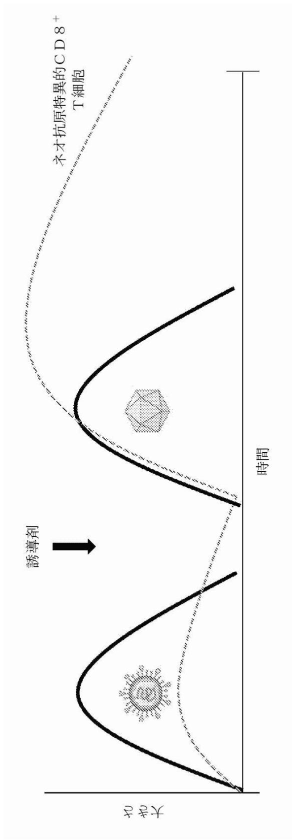
本明細書に引用されるすべての参考文献、記事、刊行物、特許、特許公開、および特許出願は、すべての目的に対してその全体が参照により組み込まれる。しかしながら、本明細書に引用される任意の参考文献、記事、刊行物、特許、特許公開、および特許出願についての言及は、それらが有効な先行技術を構成するか、または世界のどの国においても共通の一般知識の一部を形成していると認めるものではなく、またはいかなる形式の示唆を与えるものでもない。

【図面】

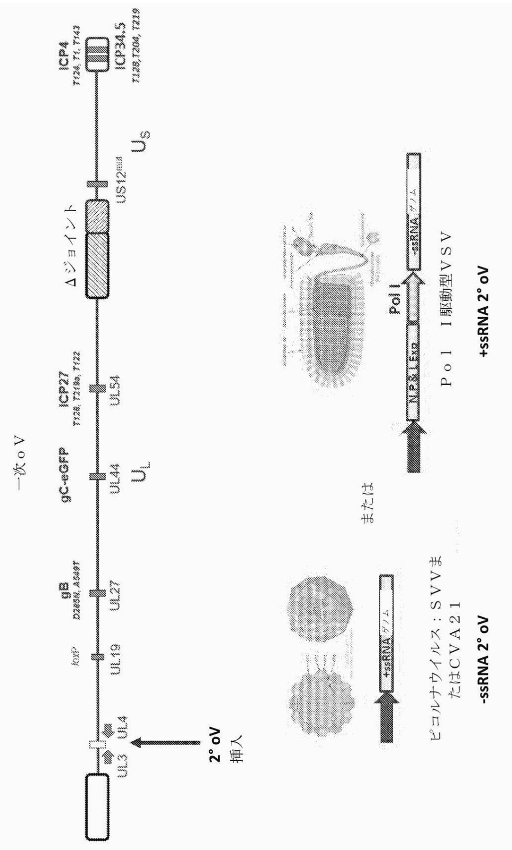
【図１Ａ】



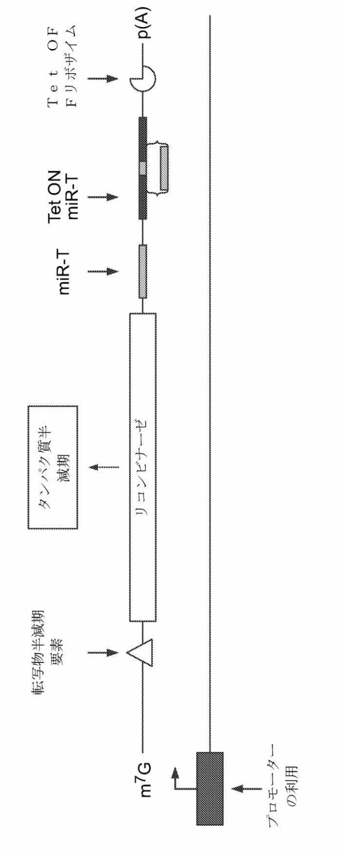
【図１Ｂ】



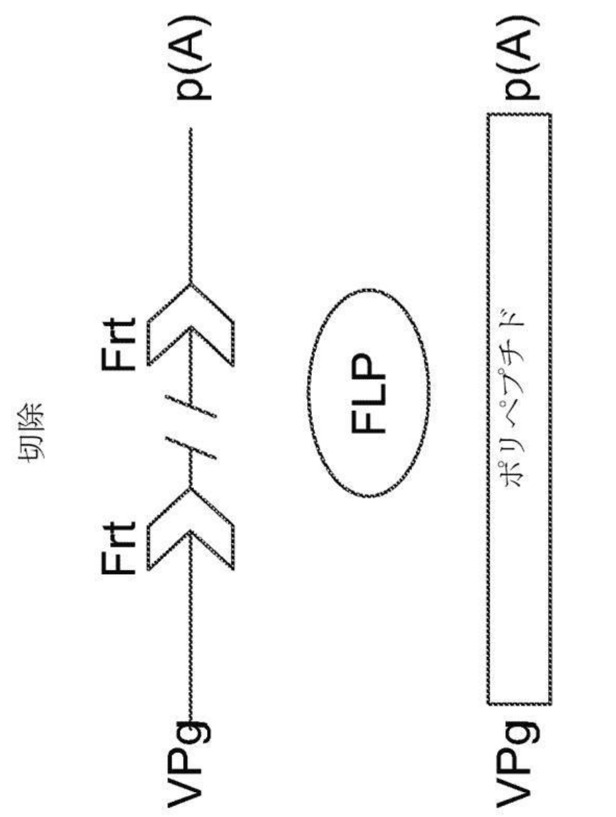
【図２】



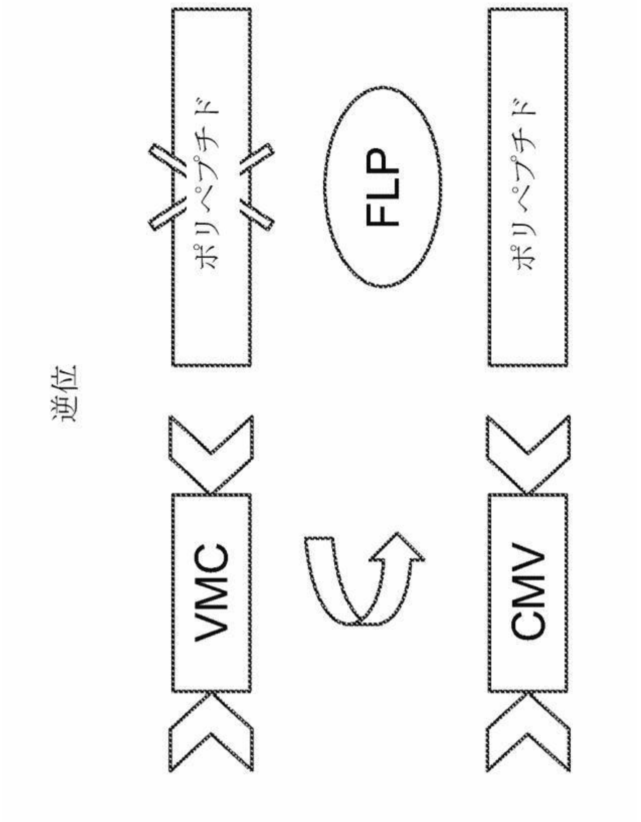
【図３】



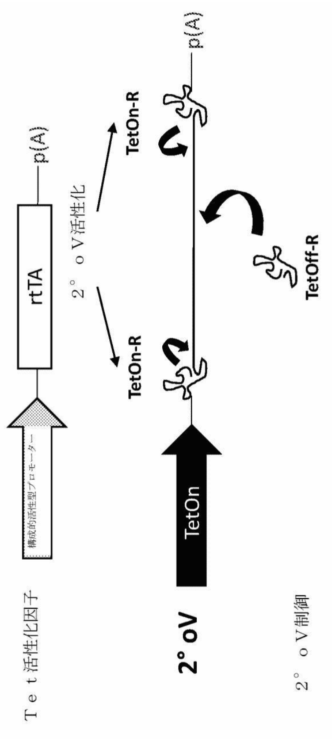
【図４Ａ】



【図４Ｂ】

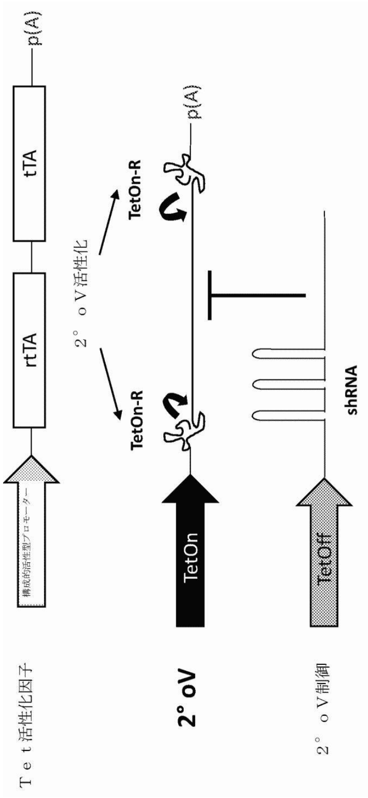


【図５】



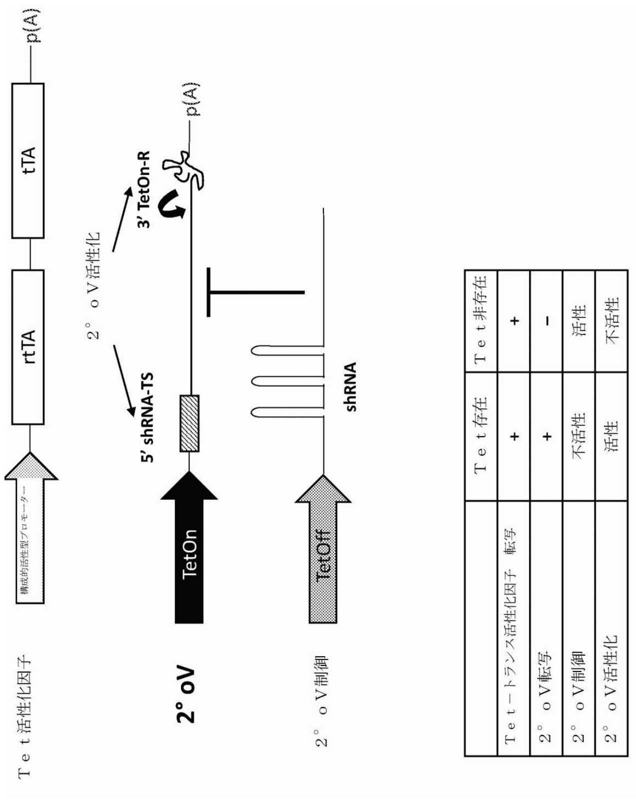
	Ｔｅｔ存在	Ｔｅｔ非存在
Ｔｅｔ－トランス活性化因子　転写	+	+
２° ｏＶ転写	+	−
２° ｏＶ制御	不活性	活性
２° ｏＶ活性化	活性	不活性

【図６】



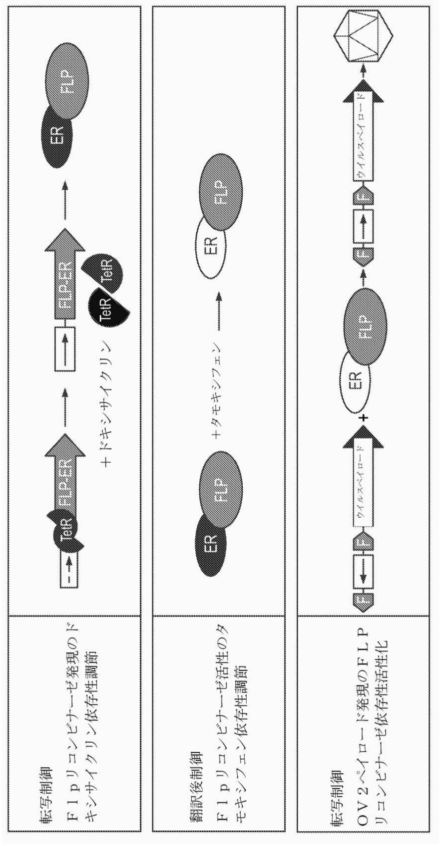
	Ｔｅｔ存在	Ｔｅｔ非存在
Ｔｅｔ－トランス活性化因子　転写	+	+
２° ｏＶ転写	+	−
２° ｏＶ制御	不活性	活性
２° ｏＶ活性化	活性	不活性

【図７】

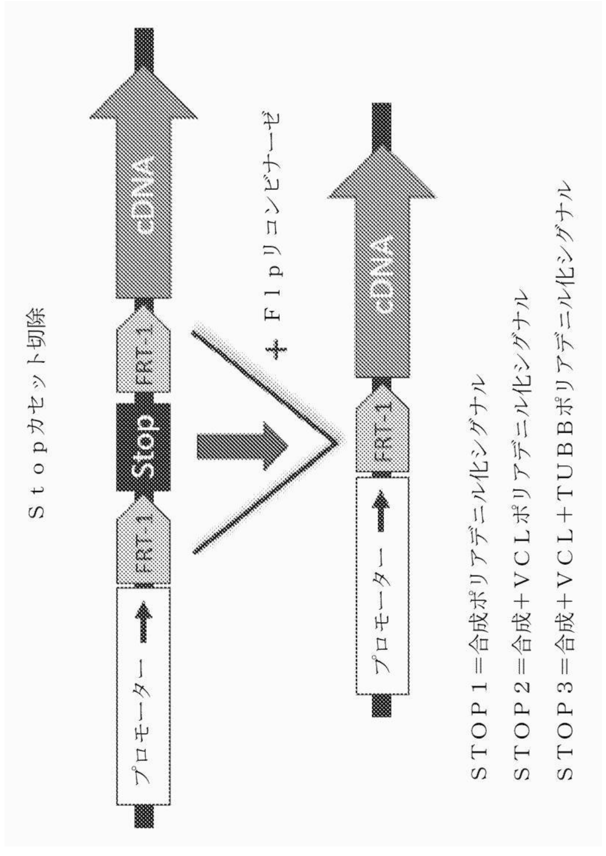


	Ｔｅｔ存在	Ｔｅｔ非存在
Ｔｅｔ－トランス活性化因子　転写	＋	＋
２° ｏＶ転写	＋	－
２° ｏＶ制御	不活性	活性
２° ｏＶ活性化	活性	不活性

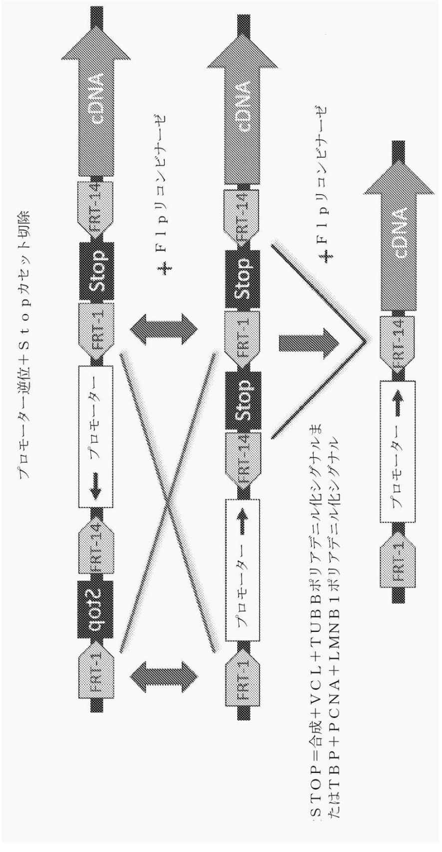
【図８】



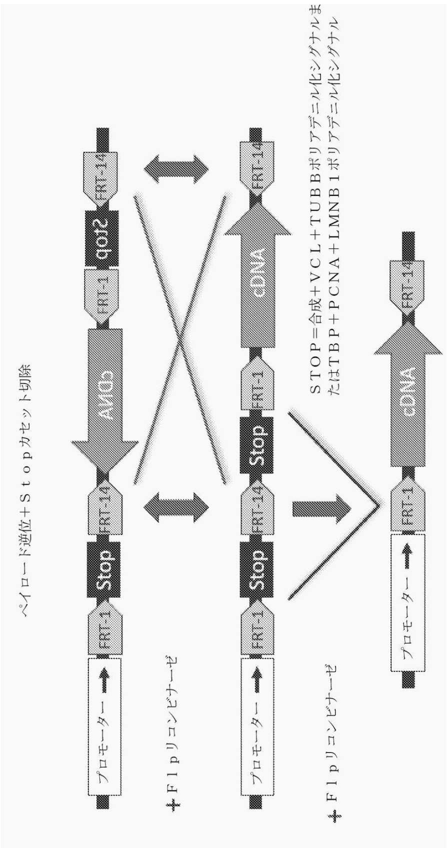
【図９】



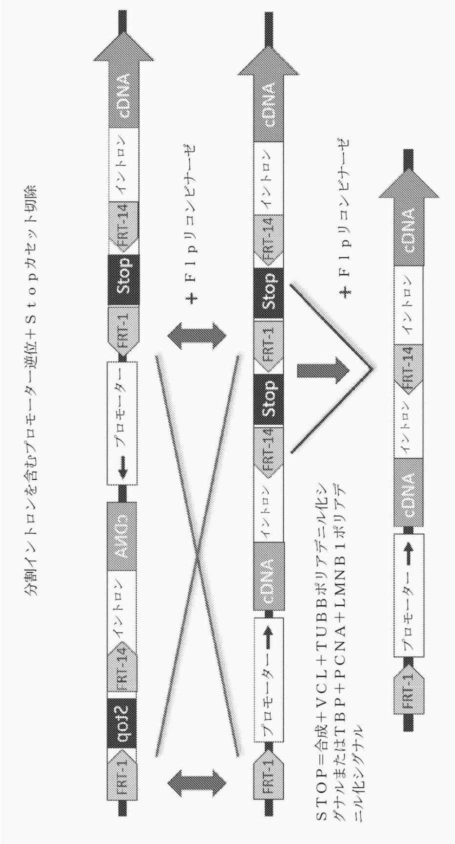
【図１０Ａ】



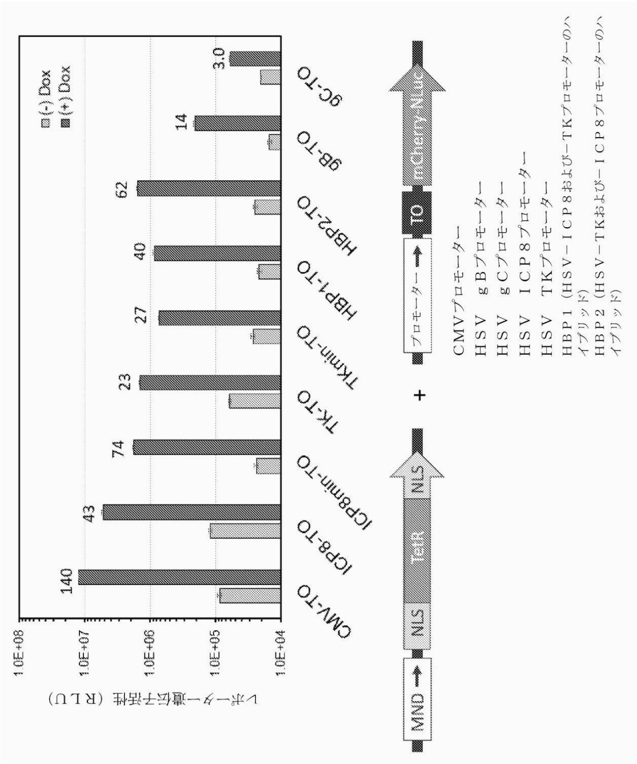
【図１０Ｂ】



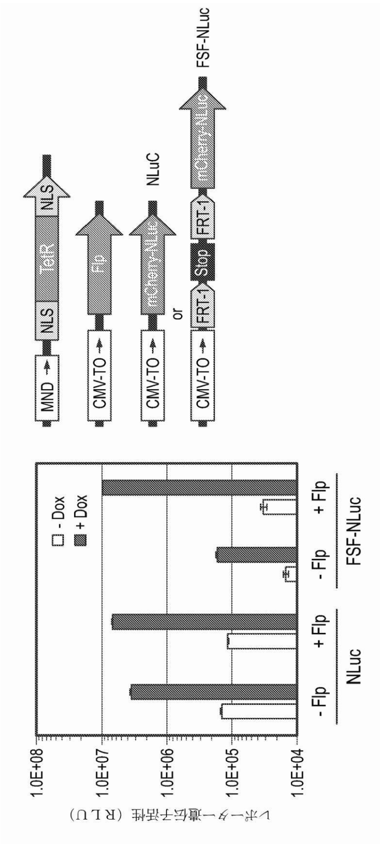
【図１１】



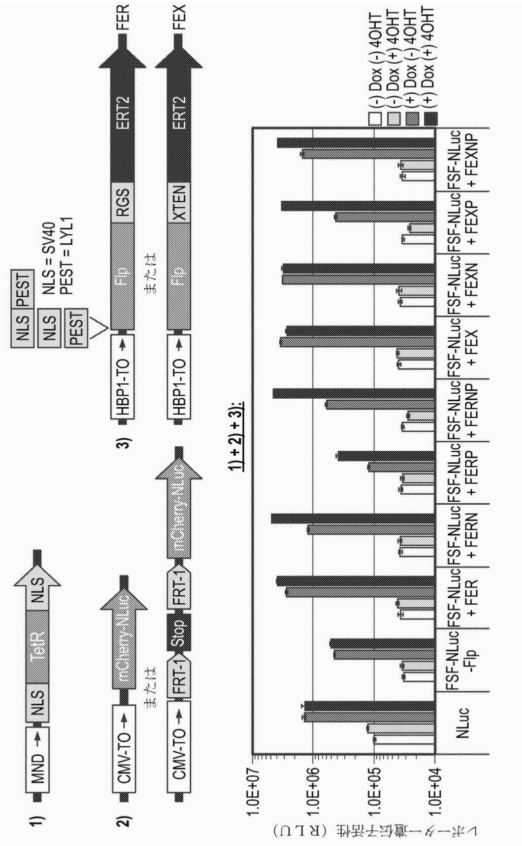
【図１２】



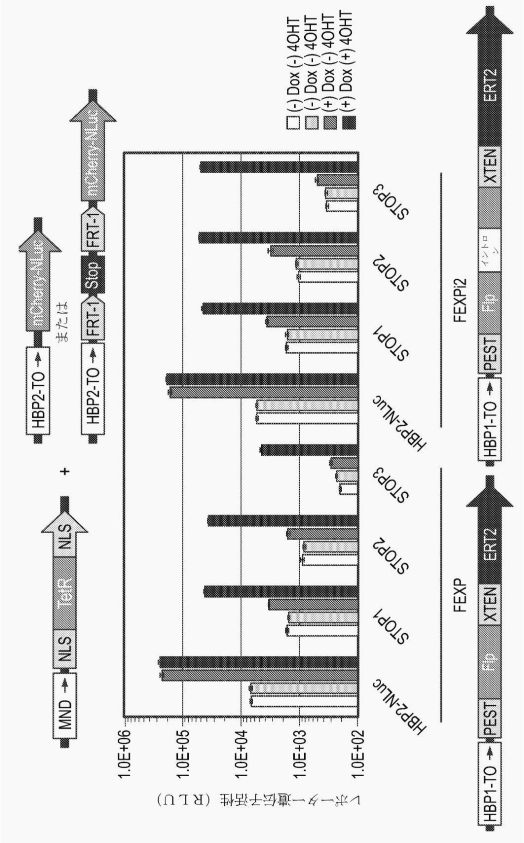
【図１３】



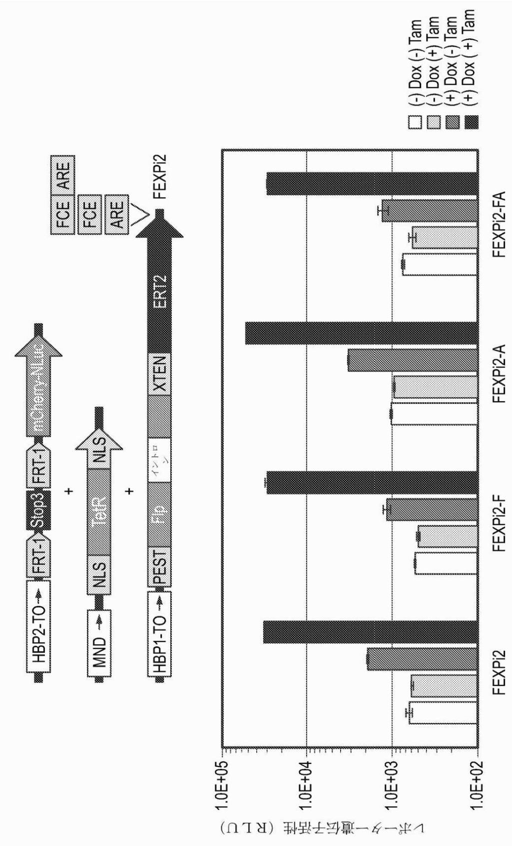
【図１４】



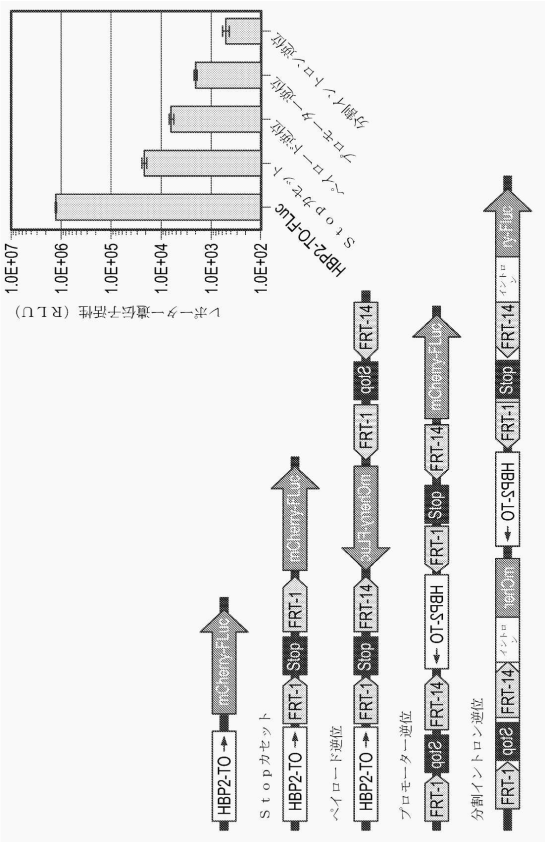
【図１５Ａ】



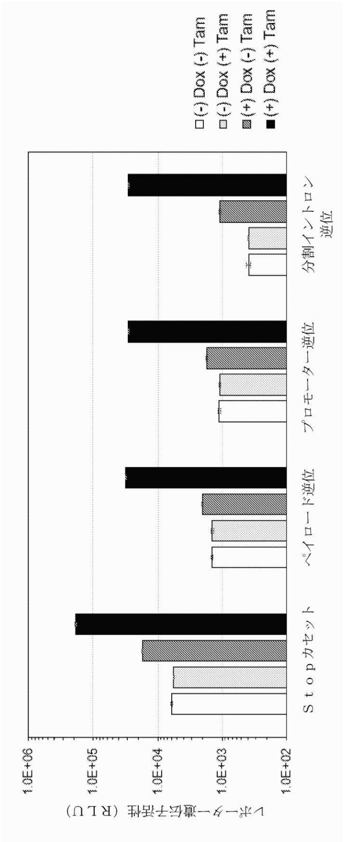
【図１５Ｂ】



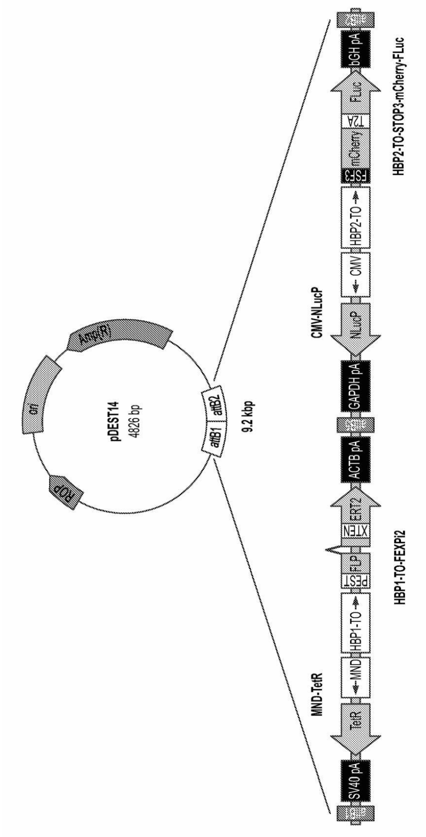
【図１６】



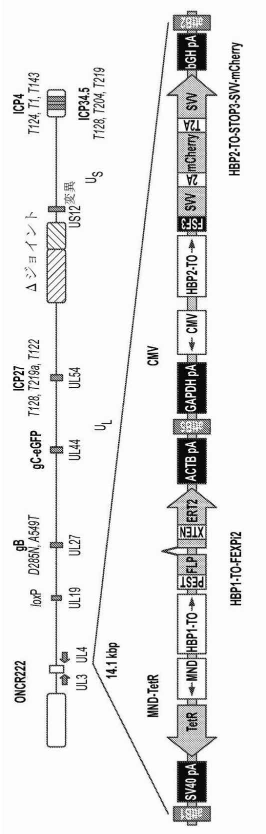
【図１７】



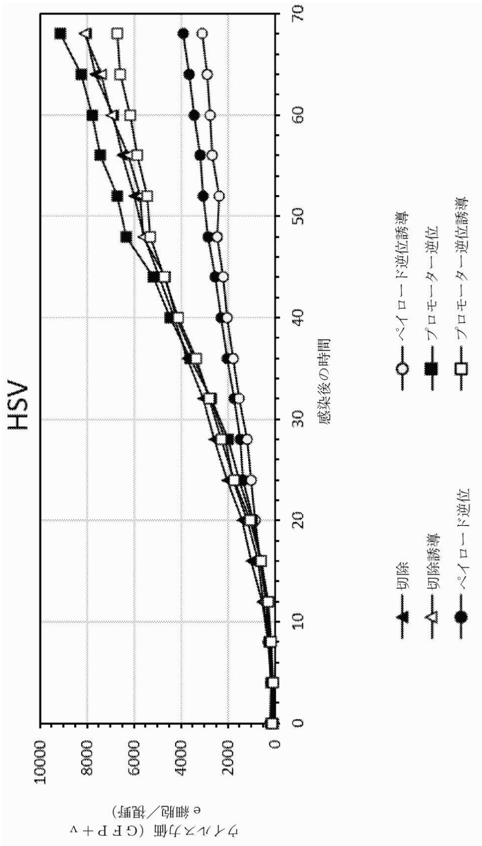
【図１８】



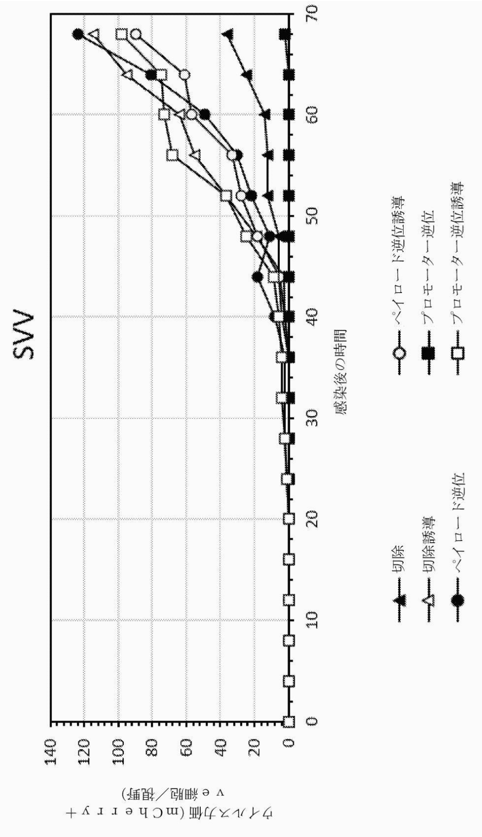
【図１９】



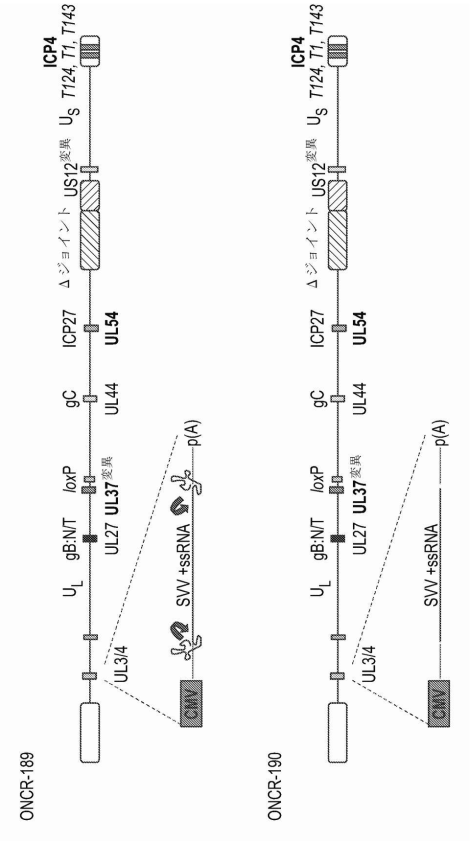
【図２０Ａ】



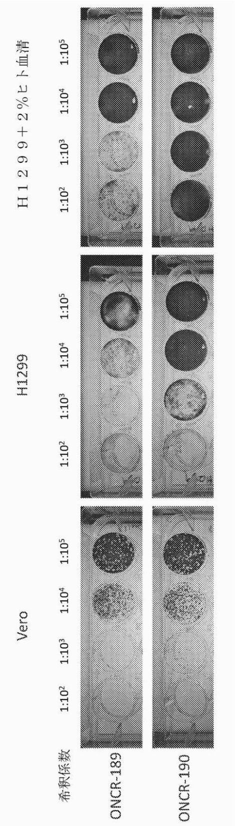
【図２０Ｂ】



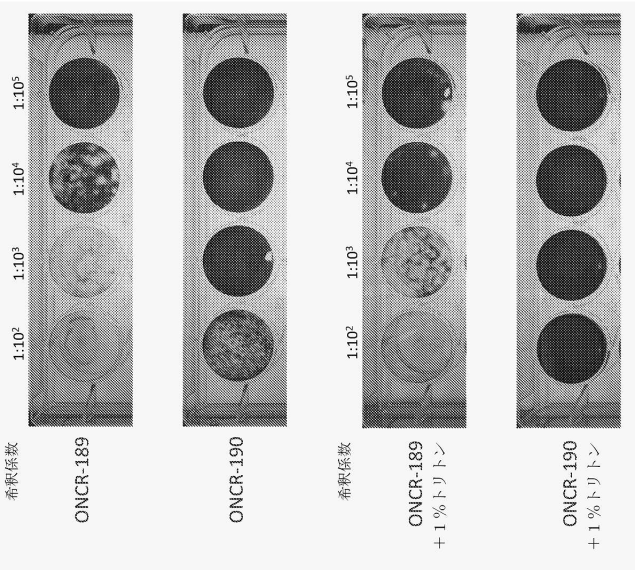
【図２１】



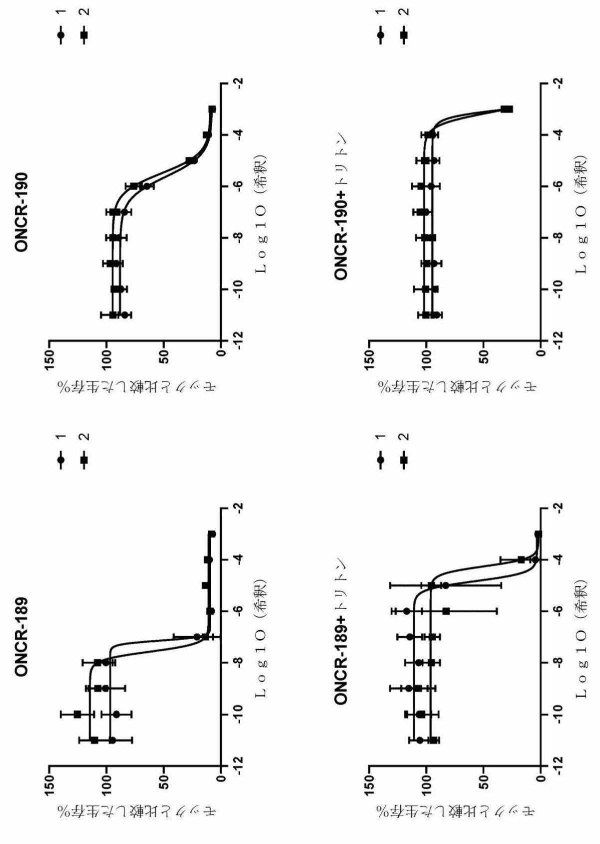
【図２２】



【図２３】



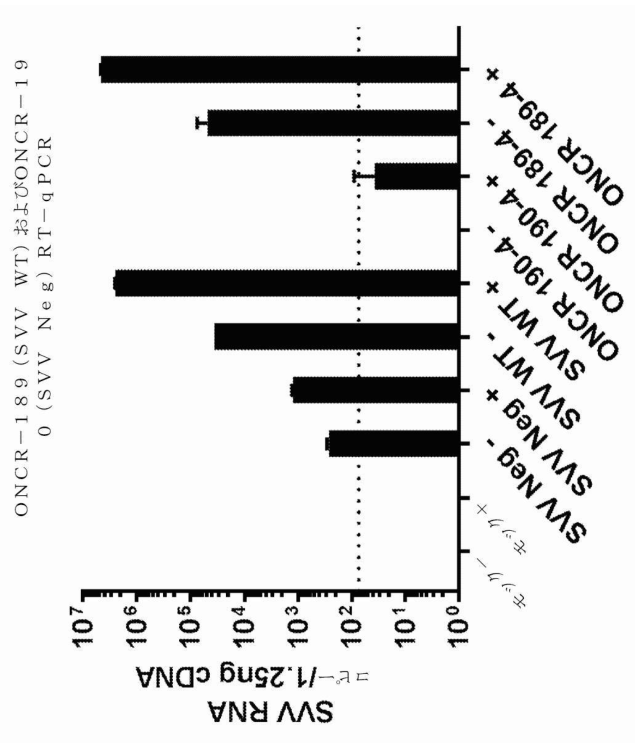
【図２４Ａ】



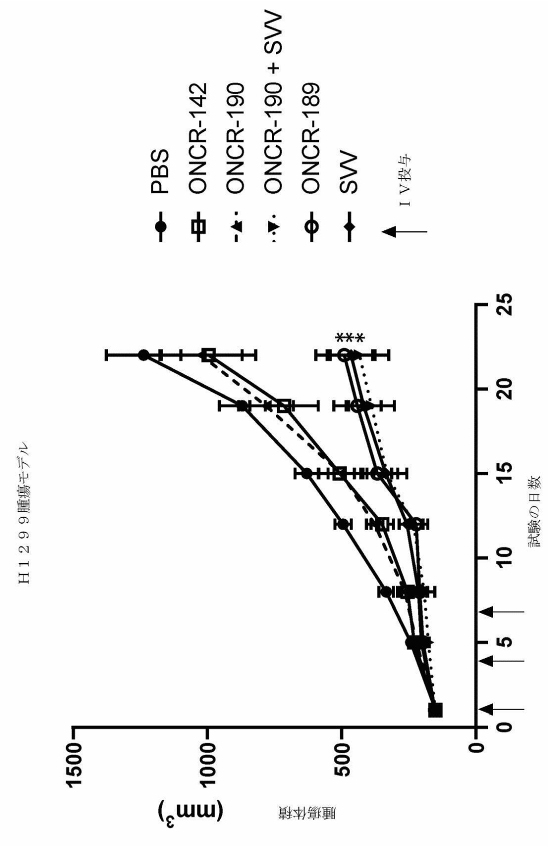
【図２４Ｂ】

試料	IC50	平均	%CV
ONCR-189	7.32E-08	5.07E-08	63%
	2.82E-08		
ONCR-189+トリトン	1.49E-05	3.56E-05	82%
	5.64E-05		
ONCR-190	2.51E-06	2.94E-06	21%
	3.37E-06		
ONCR-190+トリトン	1.06E-03	8.94E-04	27%
	7.25E-04		

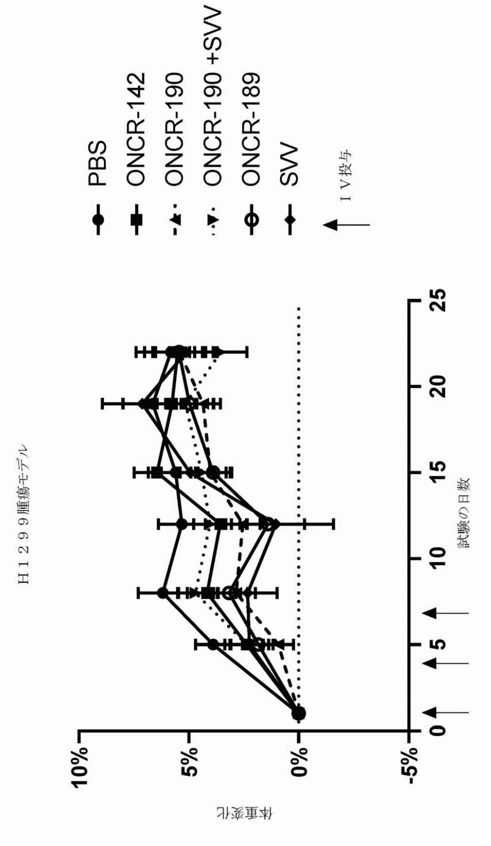
【図２５】



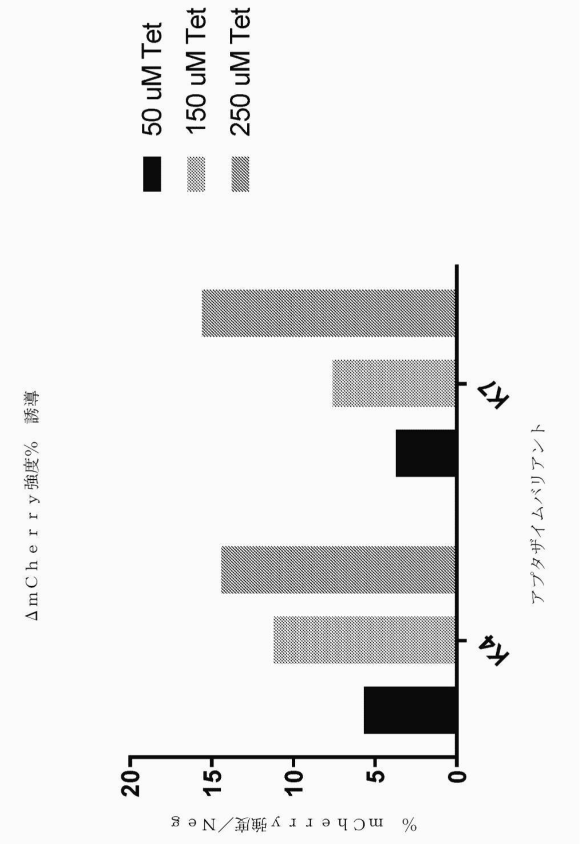
【図２６Ａ】



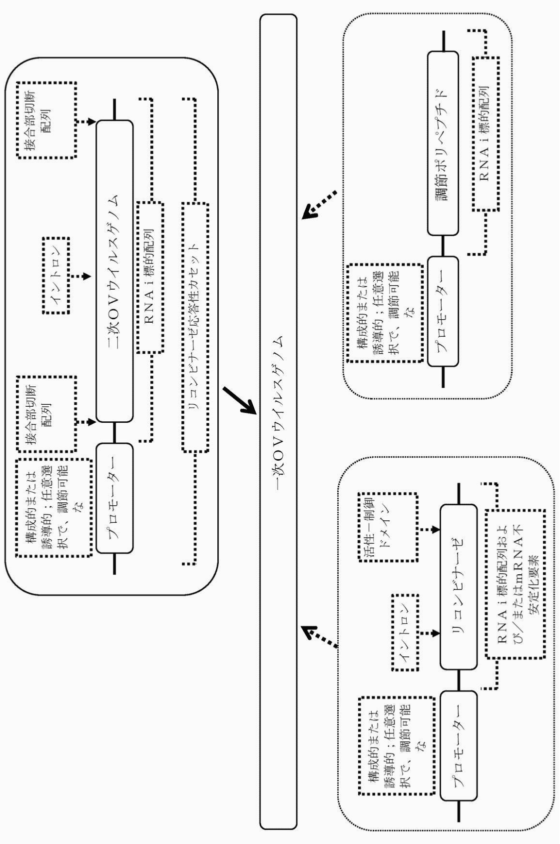
【図２６Ｂ】


Ｈ１２９９腫瘍モデル
体重変化
10%
5%
0%
-5%
0
5
10
15
20
25
試験の日数
PBS
ONCR-142
ONCR-190
ONCR-190 +SVV
ONCR-189
SVV
ＩＶ投与

【図２７】


ΔｍＣｈｅｒｒｙ強度％ 誘導
50 uM Tet
150 uM Tet
250 uM Tet
20
15
10
5
0
％ ｍＣｈｅｒｒｙ強度／Ｎｅｇ
K4
K7
アプタザイムバリアント

【図２８】


構成的または誘導的；任意選択で、調節可能な
プロモーター
接合部切断配列
二次ＯＶウイルスゲノム
イントロン
接合部切断配列
ＲＮＡｉ標的配列
リコンビナーゼ応答性カセット
一次ＯＶウイルスゲノム
構成的または誘導的；任意選択で、調節可能な
プロモーター
調節ポリペプチド
ＲＮＡｉ標的配列
構成的または誘導的；任意選択で、調節可能な
プロモーター
イントロン
リコンビナーゼ
活性－制御ドメイン
ＲＮＡｉ標的配列および／またはｍＲＮＡ不安定化要素

【配列表】
2022552287000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/055133

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/86 A61K35/763 A61K35/76
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/004396 A2 (DEUTSCHES KREBSFORSCH [DE]; EL-ANDALOUSSI NAZIM [DE] ET AL.) 10 January 2013 (2013-01-10) abstract page 6, paragraph 3 - page 7, paragraph 3; claims 1,7-13,19-22; examples 1-7	1-13, 19-88, 92-182
X	-& EL-ANDALOUSSI NAZIM ET AL: "Generation of an Adenovirus-Parvovirus Chimera with Enhanced Oncolytic Potential", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 86, no. 19, 1 October 2012 (2012-10-01), pages 10418-10431, XP009166082, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.00848-12 the whole document ----- -/--	1-13, 19-88, 92-182

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"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)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 January 2021	26/03/2021

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Mossier, Birgit

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/055133

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019/014623 A1 (ONCORUS INC [US]) 17 January 2019 (2019-01-17) cited in the application paragraph [0009] - paragraph [0021]; claims 1,18,22,42; examples 4-16	1-13, 19-88, 92-182
A	WO 2017/096201 A1 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER [US]) 8 June 2017 (2017-06-08) abstract; claims 8,10	1-13, 19-88, 92-182
A	KRISKY D M ET AL: "Rapid method for construction of recombinant HSV gene transfer vectors", GENE THERAPY, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 10, no. 4, 1 October 1997 (1997-10-01), pages 1120-1125, XP002079298, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/SJ.GT.3300497 abstract	1-13, 19-88, 92-182
A	BURTON E A ET AL: "USE OF THE HERPES SIMPLEX VIRAL GENOME TO CONSTRUCT GENE THERAPY VECTORS", METHODS IN MOLECULAR MEDICINE, HUMANA PRESS, vol. 76, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 1-31, XP008050320, ISSN: 1543-1894 abstract	1-13, 19-88, 92-182
A	WO 99/60142 A2 (CANCER RES CAMPAIGN TECH [GB]; MARGISON GEOFFREY PAUL [GB] ET AL.) 25 November 1999 (1999-11-25) abstract; claims 1,6,7	1-13, 19-88, 92-182
A	US 2007/161110 A1 (IIDA AKIHIRO [JP] ET AL) 12 July 2007 (2007-07-12) abstract paragraph [0013] - paragraph [0044]	1-13, 19-88, 92-182

-/--

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/055133

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SOEREN TURAN ET AL: "Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) - A rapidly-expanding toolbox for targeted genomic modifications", GENE., vol. 515, no. 1, 1 February 2013 (2013-02-01), pages 1-27, XP055383251, NL ISSN: 0378-1119, DOI: 10.1016/j.gene.2012.11.016 abstract -----	1-13, 19-88, 92-182
A	A T POWER ET AL: "Taming the Trojan horse: optimizing dynamic carrier cell/oncolytic virus systems for cancer biotherapy", GENE THERAPY, vol. 15, no. 10, 27 March 2008 (2008-03-27), pages 772-779, XP055768559, GB ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/gt.2008.40 abstract -----	1-13, 19-88, 92-182
A	NIKOLAS TIM MARTIN ET AL: "Oncolytic Virus Combination Therapy: Killing One Bird with Two Stones", MOLECULAR THERAPY, vol. 26, no. 6, 1 June 2018 (2018-06-01), pages 1414-1422, XP055768585, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.04.001 abstract -----	1-13, 19-88, 92-182

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US2020/055133

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

International application No.
PCT/US2020/055133

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Box No. 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:

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 6.4(a).

Box No. 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:

see additional sheet

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 fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

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.:

1-13, 19-88, 92-182(all partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2020/ 055133

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-13, 19-88, 92-182(all partially)

   A recombinant primary (oncolytic) virus comprising a polynucleotide sequence encoding a secondary (oncolytic) virus wherein the primary (oncolytic) virus is a dsDNA virus and wherein said dsDNA virus is HSV and the subject-matter relating thereto.

   ---

2. claims: 1-13, 19-88, 92-182(all partially)

   A recombinant primary (oncolytic) virus comprising a polynucleotide sequence encoding a secondary (oncolytic) virus wherein the primary (oncolytic) virus is a dsDNA virus and wherein said dsDNA virus is an adenovirus and the subject-matter relating thereto.

   ---

3. claims: 14, 15(completely); 1-12, 19-88, 92-182(partially)

   A recombinant primary (oncolytic) virus comprising a polynucleotide sequence encoding a secondary (oncolytic) virus wherein the primary (oncolytic) virus is a dsDNA virus and wherein said dsDNA virus is a virus of the Poxviridae family and the subject-matter relating thereto.

   ---

4. claims: 16-18, 89-91(completely); 1-10, 19-85, 92-182(partially)

   A recombinant primary (oncolytic) virus comprising a polynucleotide sequence encoding a secondary (oncolytic) virus wherein the primary oncolytic virus is a RNA virus and the subject-matter relating thereto.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2020/055133

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013004396 A2	10-01-2013	AU 2012280629 A1	19-09-2013
		CA 2832369 A1	10-01-2013
		DK 2729574 T3	18-12-2017
		EP 2543734 A1	09-01-2013
		EP 2729574 A2	14-05-2014
		ES 2651513 T3	26-01-2018
		JP 5895051 B2	30-03-2016
		JP 2014523242 A	11-09-2014
		US 2014235699 A1	21-08-2014
		WO 2013004396 A2	10-01-2013
WO 2019014623 A1	17-01-2019	AU 2018301701 A1	27-02-2020
		BR 112020000839 A2	21-07-2020
		CA 3069821 A1	17-01-2019
		CN 111212914 A	29-05-2020
		EP 3652325 A1	20-05-2020
		JP 2020530778 A	29-10-2020
		KR 20200036873 A	07-04-2020
		SG 11202000312U A	27-02-2020
		US 2020224220 A1	16-07-2020
		WO 2019014623 A1	17-01-2019
WO 2017096201 A1	08-06-2017	AU 2016362495 A1	21-06-2018
		CA 3045771 A1	08-06-2017
		CN 108601802 A	28-09-2018
		EP 3383496 A1	10-10-2018
		US 2019030099 A1	31-01-2019
		US 2020222480 A1	16-07-2020
		WO 2017096201 A1	08-06-2017
WO 9960142 A2	25-11-1999	AU 763714 B2	31-07-2003
		CA 2374248 A1	25-11-1999
		EP 1078091 A2	28-02-2001
		NZ 508671 A	30-05-2003
		WO 9960142 A2	25-11-1999
US 2007161110 A1	12-07-2007	AU 2005206410 A1	04-08-2005
		CA 2553976 A1	04-08-2005
		CN 1934260 A	21-03-2007
		EP 1717317 A1	02-11-2006
		EP 2434020 A2	28-03-2012
		JP 4999330 B2	15-08-2012
		JP 5438149 B2	12-03-2014
		JP 2012130346 A	12-07-2012
		JP WO2005071092 A1	06-09-2007
		KR 20070004636 A	09-01-2007
		US 2007161110 A1	12-07-2007
		WO 2005071092 A1	04-08-2005

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		ＦＩ			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*35/76 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76		
Ａ６１Ｋ	*31/7088(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088		
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｋ	*45/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者　ケネディ，　エドワード　エム．
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１３９，　ケンブリッジ，　ハンプシャー　ストリート　５０，　スイート　４０１，　オンコラス，　インコーポレイテッド　気付

(72)発明者　ラーナー，　ロレーナ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１３９，　ケンブリッジ，　ハンプシャー　ストリート　５０，　スイート　４０１，　オンコラス，　インコーポレイテッド　気付

(72)発明者　クエバ，　クリストフ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１３９，　ケンブリッジ，　ハンプシャー　ストリート　５０，　スイート　４０１，　オンコラス，　インコーポレイテッド　気付

(72)発明者　ストラスディー，　クレイグ　エー．
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１３９，　ケンブリッジ，　ハンプシャー　ストリート　５０，　スイート　４０１，　オンコラス，　インコーポレイテッド　気付

(72)発明者　リー，　ジェニファー　エス．
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１３９，　ケンブリッジ，　ハンプシャー　ストリート　５０，　スイート　４０１，　オンコラス，　インコーポレイテッド　気付

Ｆターム（参考）　4B065　AA90X AA95X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA23 CA24 CA44
4C084　AA13 AA19 NA14 ZB26 ZC75
4C086　AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZC75
4C087　AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZB26 ZC75