

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成16年10月21日(2004.10.21)

【公表番号】特表2000-500438(P2000-500438A)

【公表日】平成12年1月18日(2000.1.18)

【出願番号】特願平9-517201

【国際特許分類第7版】

A 6 1 K 39/395

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 31/138

A 6 1 K 31/223

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 38/00

A 6 1 K 38/04

A 6 1 K 38/22

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 51/00

C 1 2 N 15/09

// C 1 2 P 21/08

【F I】

A 6 1 K 39/395 L

A 6 1 K 31/00 6 3 5

A 6 1 K 31/135 6 0 3

A 6 1 K 31/22 6 0 3

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 39/395 T

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 43/00

A 6 1 K 37/02

A 6 1 K 37/24

A 6 1 K 37/43

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 P 21/08

【手続補正書】

【提出日】平成15年10月29日(2003.10.29)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】補正の内容のとおり

【補正方法】変更

【補正の内容】

手 続 補 正 書

平成 15 年 10 月 29 日 **適**

特許庁長官 今井 康夫 殿

1. 事件の表示

平成 9 年特許願第 517201 号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 アメリカ合衆国 35294-0111 アラバマ,
 バーミングハム, サウス 20ス ハーリー
 701 1120-ジイ, ザ ユーナヴァーサティ
 オブ アラバマ アト バーミングハム,
 アドミナストレイシャン ビルディング

名 称 ザ ユーエイビー リサーチ ファウンディシャン

3. 復代理人 **8011**識別番号 ~~100080115~~

住 所 東京都千代田区麹町 4 丁目 5 番地

氏 名 弁理士 五十嵐 和壽

連絡先 03-3263-3861



4. 補正により増加する請求項の数

なし

5. 補正対象書類名

明細書

6. 補正対象項目名

明細書全文

7. 補正の内容

別紙のとおり


 方式
 検
 索

明 紹 書

発明の名称 標的放射線治療用レセプタの遺伝子誘導

発明の背景

発明の分野

本発明は一般的には放射線免疫学および遺伝子治療に関するものである。より具体的には、本発明は標的放射線治療のためのレセプタの遺伝子誘導に関するものである。

先行技術の説明

放射線免疫学（R A I T）のパラダイムは放射性核を担持した標的分子（抗体など）は腫瘍箇所に放射能を選択的に伝達する能力を有しているという前提に基づいている。過去十年間にこうした方針でかなりの臨床経験が達成されてきているが、その成功は悪性リンパ腫に限られていた（1-2）。このように効果が限定されていたのは放射能でラベルした抗体を腫瘍箇所に十分に局所化するまでの基本的な問題点を反映しており、その原因は標的高原の腫瘍内での表現が不十分であるか、あるいは、標的成分としての完全な交代の使用に関連した生物分布問題に関連している可能性がある（3-6）。注入された放射能でラベルされたリガンドの腫瘍局所化をさらに向上させるために、第二世代の高親和性抗体、ヒト化抗体、遺伝的に加工した抗体断片、ペプチドの使用やラベルしていない抗体を予め標的に向かわせ、その後に放射能でラベルした付着体を向かわせるなどの方法を含め、種々の方法が開発されてきている。

「標的」放射線治療は重要な癌研究戦略である。外部ビーム放射線治療はいくつかの腫瘍タイプに対する治療的措置プログラムをつくりだしている。しかしながら、この技術は治療の範囲が限定されていること、通常の組織毒性、及び放射線抵抗メカニズムに関して実際的な制約をもっている。放射性アイソトープを悪性疾患の箇所に『向かわせる』方法に関してかなりの研究努力が行われている。現在、癌細胞上の『腫瘍関連』抗原に向けられたモノクローナル抗体の使用は種々のモデル・システムにおいて成功を収めたこうした問題に対するひとつのアプローチを示しており（5-9）、ヒトにおいて行われているフェーズIおよびフェーズII実験の主題となっている（10-14）。こうした戦略は放射性アイソトープを疾患の複数の箇所に、抗腫瘍効果及び／又は診断目的のための放射免疫画像形成をつくりだすと思われる十分な量の放射能を持って局在化させる能力を提供してくれる。第2の現在急速に発展している戦略はレセプタ陽性腫瘍細胞に結合できる放射能でラベルしたペプチドの使用である（例えば、オクトレオチドを悪性カルシノイド内のソマトスタチン・レセプタに対して使用する）（15, 16）。より良い放射性アイソトープ伝達システム及び／又は向標的戦略を提供してくれる研究努力は標的放射線治療に適用する能力を強化してくれるであろう。

放射能でラベルしたモノクローナル抗体（单一步骤放射線免疫治療）はヒトの癌の措置において重大な制約をもつ

ている。腫瘍の放射線免疫検出および放射線免疫治療に対する単一ステップ手順で放射能でラベルしたモノクローナル抗体をうまく適用するという課題は、ヒトにおいては、腫瘍に注入された放射活性の取り込み率の低さ (0.001-0.1% ID/g) 、比較的大きな (160KD) 完全な抗体を腫瘍に送り込む速度の遅さと不均一な分布、バックグラウンド放射能の高さと骨髄抑制につながる正常な組織内の長い存続時間、そしてヒト抗マウス抗体 (HAMA) 反応の発展などに関連した問題によって種々の制約を受けてきた。これらの問題を克服するために、いくつかのグループは抗体断片と单鎖抗体の使用 (17-22) 、領域的投与 (23-25) 、種々の放射性核種の使用 (5) 、より安定した (26) あるいは酵素的に切断可能なキレート化剤の使用 (27) 、腫瘍関連抗原表現を増強させるためのシトキニンの使用 (28, 29) 、血管透過性を増大させるための腫瘍の照射 (14, 30-33) 、骨髄抑制を防止するためのシトキニンの使用 (33, 34) 、そして自己骨髄移植 (2, 35) の使用などについて検討を加えている。こうした努力にもかかわらず、固体腫瘍の臨床放射線免疫治療の結果は今までのところうまく行っていない。これらの欠陥にもかかわらず、放射線に敏感なリンパ腫タイプの腫瘍の治療に対する臨床実験においては抗腫瘍効果が実証されている。

先行技術は免疫指向放射線治療の治療効果を増強する効果的な手段がなかったという意味で欠陥があった。本発明はこの技術分野での長年のニーズと希望を実現するものである。

発明の要約

本発明は腫瘍を標的とした放射能でラベルしたリガンドの局所化を補強するために腫瘍内抗原表現の低さという問題を取り組むものである。この戦略は標的とされる抗原の腫瘍細胞表現のより高いレベルを実現するための遺伝子伝達方法に重点を置いている。例えば、発癌性胚抗原（C E A）を表現しないヒト・グリオーマ細胞はイン・ビトロでヒトC E Aをコード表現する遺伝子組換え複製欠陥アデノウイルスによって形質導入され、放射能でラベルされた抗C E A抗体による結合に反応し易くなる。同じベクターによる本来の場所での腫瘍形質導入に続いて、イン・ビボで増強された放射能でラベルされた抗体の局在化が達成されたのであろう。この方法は従って腫瘍を表現する独自の、そして新しい抗原／レセプタに対する増強された放射能でラベルされたリガンドの局在化を通じて増強された治療効果を達成する新しいパラダイムを示している。

この戦略は形質導入された腫瘍細胞によって表現された高親和性レセプタに向けられた放射能でラベルされたペプチドを利用するという形でうまく用いられるであろう。IL-4レセプタとガストリン放出ペプチド・レセプタ（C R P r）に対する遺伝子を含むアデノウイルス-ポリリシン-D N A接合体による腫瘍細胞の形質導入はそれぞれ¹²⁵IでラベルされたIL-4および¹²⁵Iでラベルされたボンベシンの特殊な結合をもたらした。本発明はアデノウイルスで媒介され

た遺伝子転送がイン・ビトロおよびイン・ビボで腫瘍に関連したレセプタに結合する放射性リガンドを誘導した。これらの研究はこの方式をレセプタ及び放射能でラベルされたペプチドの使用に適用すると同時に、局所的／領域的腫瘍標的での臨床実験に適用するための基礎を確立する。

従って、本発明による方法のひとつの実施の形態においては、こうした治療を必要とする内の腫瘍に対する放射能でラベルされたリガンドの局在化を増強する方法において、その腫瘍に特有の膜表現蛋白質をコード表現する遺伝子を使って腫瘍を形質導入するステップと、該に対して該蛋白質に特有に結合する放射能でラベルされたリガンドを投入するステップとを含む方法が提供される。

本発明の別の実施の形態においては、こうした措置を必要とする個人における腫瘍細胞を措置する方法において、該腫瘍に特有の膜表現蛋白質をコードする形質導入された遺伝子を該患者に投与するステップと、そして該個人を治療的に有効な量の該蛋白質に特有に結合する放射能でラベルされたリガンドで措置するステップとで構成された方法が提供される。

本発明のさらに別の実施の形態においては、細胞によって受け取られる放射能の量を増大する方法において、該細胞に対してその細胞に特有の膜表現蛋白質をコード表現する形質導入遺伝子を伝達するステップと、そして該細胞を薬学的に有効な量の、該蛋白質と特有に結合する放射能でラベルされたリガンドとを接触させるステップとで構成される方法が提

供される。

本発明のその他の、そしてさらなる特徴及び利点は、開示の目的で提供される本発明の現時点での好ましい実施の形態の説明から明らかになるであろう。

図面の簡単な説明

上に述べた本発明の特徴、利点、および目的、およびこれらから明らかになる特徴や利点が達成され、より詳細に理解されるように、上に簡単に述べた発明のより具体的な説明を添付図面に示したそのいくつかの実施の形態を参照して、以下に詳細に説明する。これらの図面は本明細書の一部を構成するものである。しかしながら、添付図面は本発明の好ましい実施の形態を示すものであって、本発明がその範囲に限定されるものでないことについては留意されたい。

図1は蛍光体接合ヤギ抗マウスIgG抗体を用いたフロー・シトメトリーによって判定された、MAbs COL-1 (CEAと反応する)あるいはCC49 (TAG-72抗原と反応する)の1あるいは10PFU/細胞のAdCMVCEA又はAdCMVLacZによって形質導入されたD54MG細胞との反応性を示している。平均パーセンテージ陽性細胞をバーで示し、群の平均蛍光性をそのバーの上に示してある。比較のために、CEA表現LA174T結腸癌腫細胞も同様に免疫染色して分析した。

図2は抗CEA COL-1 MAbs又はTAG-72CC49 MAbs (陰性コントロール)を用いた、AdCMVC

E A 形質導入 D 54 MG 細胞内での D N A 含有量 (Y 軸) と細胞表面での抗原表現 (X 軸) との輪郭図を示している。Ad CMV Lac Z でトランスフェクトされた D 54 MG 細胞も陰性コントロールとして分析され、L S 174 T (CEA および TAG-72を構成的に表現する) は陽性コントロールである。分析された細胞は：(図 2 A) は未感染 D 54 MG ; (図 2 B) Ad CEA (1 PFU/細胞) D 54 MG ; (図 2 C) Ad Lac Z (1 PHU/細胞) D 54 MG ; (図 2 D) Ad CEA (1 PFU/細胞) D 54 MG ; (図 2 E 及び F) 未感染 L S 174 T。M Ab COL-1 は図 2 A, 2 B, 2 C 及び 2 E で用いられており、M Ab CC49 は図 2 D および 2 F で用いられている。

図 3 は 1 PFU/細胞で Ad CMV CEA または Ad CMV Lac Z でイン・ビトロでトランスフェクトされた、あるいは疑似トランスフェクトされた D 54 MG ヒト・グリオーマ細胞内での CEA 抗原表現に対する免疫染色を示している。細胞はトランスフェクション 48 時間後に評価された。写真は：(図 3 A) D 54 MG 細胞 / Ad CMV CEA、(図 3 B) D 54 MG 細胞 / Ad CMV Lac Z、(図 3 C) D 54 MG 細胞 / 疑似インフェクトされたものをそれぞれ示している。絵はその代表的なフィールドを 100 倍に拡大して示したものである。ヒストグラムは二重に行われた代表的な実験に関する COL-1 結合 / 細胞の分子を示している。 125 I でラベルした COL-1 の非固有結合は過剰にラベルしたラベルし

ていない C O L - 1 抗体の存在下で測定された。

図 4 は、¹²⁵I でラベルした C O L - 1 と D 54 MG 細胞に形質導入された Ad CMV C E A との結合活性の分析を示している。D 54 MG 細胞は 1 P F U - 細胞でトランスフェクトされ 48 時間後にアッセイされた。コントロールウイルス (Ad CMV L a c Z) 及びコントロール抗体 (C C 4 9) 並びに形質導入されていない D 54 細胞も比較として分析された。ヒストグラムは二重の代表的な実験ランに関する C O L - 1 結合 / 細胞の分子を示している。¹²⁵I でラベルした C O L - 1 抗体の非結合はラベルされていない C O L - 1 抗体の過剰な存在下で測定された。

図 5 は 1 - 100 P F U / 細胞の範囲の異なった粒子数でトランスフェクトされた D 54 MG 細胞に対する ¹²⁵I でラベルした C O L - 1 M A b の結合活性の分析を示している。形質導入されない D 54 MG 細胞及び構成的に C E A を表現する L S 174 T 細胞を比較のために分析した。ヒストグラムは二重サンプル内での C O L - 1 結合 / 細胞の分子を示している。¹²⁵I でラベルした C O L - 1 抗体の非結合はラベルされていない C O L - 1 抗体の過剰な存在下で測定された。

図 6 はトランスフェクション後のいろいろな日数で測定された ¹²⁵I でラベルされた C O L - 1 M A b と D 54 MG 細胞で形質導入された Ad CMV C E A との結合活性の分析を示している。ヒストグラムは二重サンプルでの、トランスフェクション後 2, 9 及び 13 日後での C O L - 1 結合 / 細胞

の分子を示している。

図7は(図7A-7E)に示されている壞死(N)の中心領域の異種移植腫瘍(T)の実例を示している。皮膚移植(SA)毛髪小胞を図7Aで曲がった矢印で示す。図7A(倍率100倍)。D54 MG細胞はイン・ビボで1回の腫瘍内注射あたり 1×10^7 PFU Ad CMV CEAの割合でトランسفェクトされ、2日後に解剖された。最も強くCEA染色されたのは長い黒の矢印でマークされた腫瘍の中心領域内である。図7B(倍率200倍)。イン・ビトロでの1PFU Ad CMV CEAによるトランسفェクション後13日目のD54 MG腫瘍の染色はCEAが表現する細胞が分散している状態を示す。いくつかの細胞は強い表現(長い矢印)を示し、その他の細胞は弱い表現(短い矢印)を示しているが、ほとんどの細胞はCEAの表現を示さなかった。図7C(倍率200倍)。1日、1回あたり 1×10^7 PFU Ad CMV CEAを2度イン・ビボでトランسفェクトさせたD54 MG腫瘍の焦点染色。図7D(倍率100倍)。1日、1回あたり 1×10^7 PFU Ad CMV CEAの割合で3度腫瘍内注射によって形質導入され、染色から2日後に分解した皮膚領域にやや近い(短い矢印)D54 MG腫瘍で染色は認められなかった(SA=皮膚移植)。図7E(倍率200倍)。1日一度 1×10^7 PFU Ad CMV CEAで2回腫瘍内注射でイン・ビボでトランسفェクトされ、2日後に解剖された同じD54 MG腫瘍(図7Cに示す)の別の領域に追加的な

焦点染色も認められた。

図8は(図8A-C)AdCMVCEAで形質導入されたD54 MG皮下腫瘍(矢印)、(図8D-F)AdCMVLacZ形質導入D54 MG腫瘍(矢印)、及び(図8G-I)LS174T腫瘍(矢印)をそれぞれ有し、 $300\mu\text{Ci}^{131}\text{I}$ でラベルしたCOL-1 MAbを接種したアシミックなヌード・マウスのシンチグラフィーによる画像を示している。側面画像は腹膜内注射5日後に取られたものである。画像は50,000cpmで得られた。接種5日後の腫瘍の重さは0.3-1.1gの範囲であった。

図9は1及び10PFU/細胞での ^{125}I でラベルしたCOL-1 MAbのAdCMVCEA形質導入Calu-3及びA427ヒト非小細胞肺癌細胞への結合活性の分析を示している。ヒストグラムは3組サンプルにおける細胞1個あたりの結合したCOL-1分子を示している。ラベルされないCOL-1抗体の過剰な存在下で競合的に抑制された形質導入されない細胞及びAdCMVCEA形質導入細胞についても比較のために分析された。

図10は ^{125}I でラベルしたポンベシンの遺伝子伝達のためのAdpL法を用いてマウスGPRを表現するように形質導入されたA427細胞への結合特性を示している。ヒストグラムは3組サンプルにおける細胞1個あたりに結合したポンベシンの分子を示している。冷たいポンベシンの過剰の存在下で競合的に抑制された形質導入されないA427細胞とアデ

ノウイルスをコード表現する L a c Z レポータについても比較のために分析した。

図11は乳癌細胞株 B T 474, M D A - M B - 361, M D A - M B - 231及びS K B R 3 の A d p L トランスフェクション後のルシフェラーゼ遺伝子表現を示しており、S K O V 3 およびH e L a 細胞が陽性コントロールとして用いられた。結果は 1 秒あたりの相対的光単位 (R L U / s) として示された。

図12は 125 I でラベルした C O L - 1 M A b の 10 P F U / 細胞の割合で A d C M V C E A でトランスフェクトされた B T 474, M D A - M B - 361, Z R - 75 - 1 及び M C F - 7 細胞への結合活性の分析を示している。形質導入されなかつた乳癌細胞と構成的に C E A を表現する L S 174 T 細胞を比較のために分析した。ヒストグラムは細胞サンプルに結合した C O L - 1 の分子を示している。

図13は T K 遺伝子の erbB - 2 固有表現の分析を示している。パネル A : psv / H S V - T K によってトランスフェクトされた S K O V 3 細胞；パネル B : erbB - 2 - H S V - T K でトランスフェクトされた S K O V 3 細胞；パネル C : psv / H S V - T K によってトランスフェクトされた H e L a 細胞；パネル D : erbB - 2 - H S V - T K でトランスフェクトされた H e L a 細胞；パネル E : トランスフェクトされない H e L a 細胞。すべてのパネルで、上の 3 つのウェルは 20 mM の G C V を含んでいた。下の 3 つのウェルは培養液だけを含

んでいた。

図14はCMVプロモータの制御下でのシャトル・ベクターpACC MV pLpARS (+)の構造を示している。

図15はDF3プロモータの制御下でのシャトル・ベクターpACDF3pLpARS (+)の構造を示している。

図16はDF3プロモータの制御下でガストリン放出ペプチド・レセプタを表現するシャトル・ベクターpACDF3pGRPrpLpARS (+)の構造を示している。

図17はDF3プロモータ制御下で発癌性胚抗原を表現するシャトル・ベクターpACDF3pCEApLpARS (+)の構造を示している。

図18はDF3プロモータの制御下で表皮成長因子レセプタを表現するシャトル・ベクターpACDF3pEGFrpLpARS (+)の構造を示している。

図19は遺伝子表現を開始させる固有および非固有プロモータを用いてのHeLa (DF3非表現) およびMCF-7 (DF3表現) 細胞でのホタル・ルシフェラーゼ遺伝子表現を示している。細胞はAdpLトランスフェクション法を用いてCMVあるいはDF3プロモータの制御下でルシフェラーゼをコード表現するプラスミドでトランスフェクトされた。疑似的にトランスフェクトされた細胞は陰性コントロールとして使われた。細胞はトランスフェクション前24時間プレートされた。トランスフェクションから48時間後、細胞は溶解され、プロメガ遺伝子表現キットを用いて遺伝子表現について

ての判定が行われた。光放出は蛍光計で測定された。結果は相対光単位 (R L U) で表現され、可溶性蛋白質含有量で補正された。MCF-7細胞と比較して、DF3プロモータの制御下でHeLa細胞でわずかな遺伝子表現が観察された。この数字は許容バックグラウンドでDF3プロモータを用いての組織固有遺伝子表現を示している。エラー・バーはひとつ の実験から得られた3通りの判定の平均値である。

図20はイン・ビトロでAdCEAでトランスフェクトされたSKOV3.ip1で誘導されたCEA表現のレベルを示している。SKOV3細胞はAdCEA1細胞あたり100pfuの割合で感染された。細胞は¹²⁵IでラベルされたCOL-1との結合24, 48及び72時間目に取り出された。

図21はヒト癌性細胞株のAdCMVGRPrによるイン・ビトロでの感染を示している。ヒト非小細胞肺癌性細胞株A427、ふたつのヒト・グリコーマ細胞株D54MGおよびU251MG及び2つのヒト結腸癌性細胞株LS174TおよびWiDrに対する結合結果を図21Aに示す。ヒト卵巣癌性細胞株OVCA-R-3, OV-4及びSKOV3.ip1に対する結合結果を図21Bに示している。図21Aと21Bで、細胞株は10(■)又は100(○)pfu/AdCMVGRPr細胞あるいは100pfu/AdCMVLacZ細胞(△)で感染された。感染後48時間で、[¹²⁵I]-Tyr4-ボンベシンとの生細胞結合アッセイのために取り出され、mG R P rを安定して表現するマウス腺維芽BNR-11細胞と比較された。図21Aおよ

び B で、() は感染されなかった細胞を示しており、() はラベルされていないボンベシン・ペプチドの過剰な存在下で $[^{125}\text{I}] - \text{Tryr}_4$ - ボンベシンによって培養された B N R - 11 細胞を示している。バーは代表的な実験で得られた付加放射能結合 \pm S.E.M. ($n = 2$) を示している。

図 22 は接種 ($r^2 = 0.66 - 0.96$) 後のいろいろな時間での腫瘍 (図 22A) 、血液 (図 22B) 、肝臓 (図 22C) 、及び脾臓 (図 22D) での $[^{125}\text{I}] - \text{Tryr}_4$ - ボンベシンの濃度を示している。マウスに 2×10^7 SK O V 3.ip1 ヒト卵巣癌性細胞を腹膜注射した。細胞接種の 5 日後、マウスに 1×10^9 pfu の M G R P r を表現する遺伝子組換えアデノウイルス・ベクターを腹膜注射した。その後、動物に対して 48 時間後に $2 \mu\text{Ci}$ の $[^{125}\text{I}] - \text{mIP}$ - ボンベシンを接種した。

図 23 は接種 ($r^2 = 0.61 - 0.95$) 後のいろいろな時間後の腫瘍 (図 23A) 、血液 (図 23B) 、肝臓 (図 23C) 、および脾臓 (図 23D) 内での ^{131}I でラベルされた e 21 抗 e r b B - 2 モノクローナル抗体の濃度を示している。マウスには 2×10^7 SK O V 3.ip1 ヒト卵巣癌性細胞を腹膜接種し、その後、5 日後に $5 \mu\text{Ci}$ の $[^{131}\text{I}] - \text{e}21$ を腹膜接種した。

図 24 はアシミックなヌード・マウスにおける $[^{125}\text{I}] - \text{mIP}$ - ボンベシン及び $[^{131}\text{I}] - \text{e}21$ モノクローナル抗体の腫瘍：血液比率を示している。

発明の詳細な説明

本発明はこうした措置を必要としている個人における腫瘍

への放射能でラベルされたリガンドの局在化を増強するための方法において、該腫瘍に固有の膜表現蛋白質をコード表現する遺伝子で該腫瘍を形質導入するステップと、該個人に対して該蛋白質に特有に結合する放射能でラベルされたリガンドを投入するステップとを含む方法に関するものである。

本発明のひとつの実施の形態においては、腫瘍はイン・ビボでの直接の細胞内遺伝子伝達によって形質導入される。本発明によるこの方法で有益に形質導入され得る腫瘍の代表的な例は結腸腫瘍、肺腫瘍、およびグリオーマ腫瘍である。

本発明の別の実施の形態において、腫瘍はイン・ビボでの腹膜内遺伝子伝達によって形質導入される。本発明のこの方法で有益に形質導入され得る腫瘍の代表的な例は卵巣腫瘍及び結腸腫瘍である。

本発明の別の実施の形態において、腫瘍は定位的に直接遺伝子伝達によって形質導入される。本発明のこの方法で有益に形質導入され得る腫瘍の代表的な例は大脳内グリオーマである。

本発明の別の実施の形態において、腫瘍は全身的遺伝子伝達によって形質導入される。本発明のこの方法で有益に形質導入され得る腫瘍の代表的な例は全身的結腸腫瘍及肺腫瘍である。

本発明が教示している種々の実施の形態において、形質導入された遺伝子でコード表現された膜表現蛋白質は一般的には抗原あるいはレセプタのいずれであってもよい。同様に、

本発明が教示している種々の実施の形態においては、蛋白質に特有に結合する放射能でラベルされたリガンドは一般的にはモノクローナル抗体か膜表現蛋白質との十分な親和性を有するペプチドのいずれであってもよい。有益な抗原の代表的な例と、各抗原に結合する代表的なモノクローナル抗体を表Vに詳細に示す。好ましくは、(1) その抗原は癌性胚抗原であり、この抗原と固有に結合する放射能でラベルされたリガンドはM A b 25, M A b 35, B W 494//32 T 84.66、M N - 14およびN P - 4で構成されるグループから選択されか；(2) 抗原は表皮成長因子レセプタであり、この抗原に固有に結合する放射能でラベルされたリガンドはモノクローナル抗体 225, 425, 528, L 8 A 4, R G 83852及びE G F R 1で構成されるグループから選択されるか；(3) 抗原がエストロゲン・レセプタであり、この抗原と固有に結合する放射能でラベルされたリガンドが抗エストリオール-3-スルフェートであるか、(4) 抗原がT A G - 72でこの抗原と固有に結合する放射能でラベルされたリガンドがモノクローナル抗体 C C 49、モノクローナル抗体 B 72.3及びモノクローナル抗体 C Y T - 103であるかのいずれかである。

有益なレセプタと各レセプタに結合するそれぞれの放射能でラベルされたリガンドの代表的な例を表VIに詳細に示す。以下に述べる手法を用いて、腫瘍を自然に発生したレセプタ、つまりその特殊な腫瘍に自然に発生するレセプタに形質導入してもよいし、あるいは腫瘍を雑多なレセプタ、つまりその

特有の腫瘍には通常存在しないレセプタで形質導入してもよい。好ましくは、（1）レセプタは表皮成長因子レセプタであり、該放射能でラベルされたリガンドは表皮成長因子あるいは形質変換成長因子－アルファであるか、（2）レセプタがエストロゲン・レセプタであり、このレセプタに固有に結合する放射能でラベルされたリガンドがタモキシフェン、エストラジオール、エストラジオール誘導物、エストロゲン、及びフルオロアラニンで構成されるグループから選択されるか；（3）レセプタがガストリン放出ペプチド・レセプタであり、該レセプタに固有に結合する放射能でラベルされたリガンドがボンベシン、ボンベシン類似物およびガストリン放出ペプチドで構成されるグループから選択されるか；（4）レセプタがインターロイキン-4レセプタであり、このレセプタと固有に結合する放射能でラベルされたリガンドがインターロイキン-4であるか；（5）レセプタがソマトスタチン・レセプタであり、このレセプタと固有に結合する放射能でラベルされたリガンドがオクトレイチドあるいはその他のソマトスタチン類似物であるか、あるいは（6）レセプタが血管に作用する腸内ペプチド・レセプタで、このレセプタに固有に結合する放射能でラベルされたリガンドが血管作用性腸内ペプチドであるか、のいずれかである。ひとつの実施の形態で、形質導入はアデノウイルスによって媒介された遺伝子伝達によって行われる。好ましくは、本発明の方法で用いられる放射性ラベルは¹²³I、¹²⁵I、¹³¹I、³²P、⁶⁴Cu、

⁶⁷Cu、²¹¹At、¹⁷⁷Lu、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、²¹²Pb、そして²¹²Bi、⁴⁷Sc、¹⁰⁶Rh、¹⁰⁹Pd、¹⁵³Sm、¹⁸⁸Re、¹⁹⁹Au、²¹³Biで構成されるグループから選択される。

本発明の別の実施の形態において、この技術分野の当業者はそうした措置を必要とする個人の腫瘍細胞を措置する方法において、該患者に該腫瘍に固有な膜表現蛋白質をコード表現する形質導入された遺伝子を投与するステップと、そして該個人を治療的に有効な量の、該蛋白質と固有に結合して該放射能でラベルされたリガンドからの放射線が該腫瘍に伝達されるようにする方法が教示される。

本発明の別の実施の形態では、この技術分野の当業者に対して、細胞が受け取る放射線の量を増大する方法において、該細胞に該腫瘍に固有の膜表現蛋白質をコード表現する形質導入遺伝子を投与するステップと、該細胞を薬学的に有効な量のその蛋白質に固有に結合する放射能でラベルされたリガンドを接触させるステップとで構成された方法が教示される。

放射性核種の物理的および化学的特性は、放射線治療のためにそれを選択する場合重要な意味を有する。微粒子放出のタイプを考慮に入れる必要がある(36)。オウガ-及び低エネルギー転換電子の強力な致死性については実証済みである(37-40)。この効果は放射性核種の核内局在化によって最も良く実現することができ、これは放射能でラベルされたMoAbsでは通常は起こらないが、ある種の膜レセプターラジオリガンドの相互作用によって起きる場合はある。もちろん、アル

ファ粒子は細胞を殺すのに、そして一定の範囲の細胞直径、 $40-80\mu\text{m}$ において効果的な高い線形エネルギー伝達 (LET) 特性を有している。ラジオリガンドの配置が不均一であると短い距離は不均一な吸収量を低減させる。それらは微小転移、白血病の治療、及び腔内投与に一定の役割を果すかもしれない (193)。ベータ粒子はイオン化の密度が低く、アルファ粒子エミッタより長い距離を有しているので、腫瘍の分布に関する条件はそれほどきつくなくなる。一方、微小転移に対しては、より高いエネルギーのベータ粒子の吸収されるフラクション (距離 $>$ 腫瘍サイズ) が減少し、好ましい腫瘍吸収量の減少をもたらす。ガンマ線エネルギーとそれが豊富に存在することも重要な物理的特性で、それはガンマ線の存在が外部からの画像形成の可能性を与えてくれるが、全身での放射線量は増大する。

これら物理化学的ファクターは、次に、利用可能な生物学的情報に照らして検討しなければならない (36, 41)。ラジオリガンドの摂取量、マクロ及びミクロ分布、特定のラジオリガンドに依存する運動力学や代謝／異化作用、ラジオリガンドの量、腫瘍における抗原／レセプタ表現の変差、そのサイズや段階など、いろいろな違いがある (42-54)。これは細胞タイプの不均一性、抗原／レセプタ表現の不均一性、不均一は血管および異化透過性、腸内圧力の上昇、結合箇所のバリア、および空間的アクセス不能性などによるものである (14, 36, 42-55)。上に述べたラジオリガンドの予想され

る不均一な分布は固体腫瘍放射線治療のための短距離アルファ線放出放射性核種の魅力を減少させる。アルファ線放出物の役割は結腸内あるいは卵巣癌性腫瘍などある種のタイプの癌の微小転移、あるいは腔内投与に対しては有効かもしれない(36, 56, 57)。ベータ粒子のより長い距離も腫瘍内での放射活性の分布の著しい不均一性にもかかわらず、均一な腫瘍照射を可能にしてくれるかもしれない。イオン化放射線は、中間から高エネルギーべータ粒子の場合と同様、1-数ミリメートルで固体腫瘍に伝達するのが望ましいようと思われる。

ベータ線放出物は粒子範囲および化学的特性に関して幅広い候補を提供してくれる(36)。一定のガンマ放射を伴う放射性核種の使用はまったく同じ製剤を治療に有効な量で投与する前に生物分布を判定するための診断的低量実験を可能にしてくれるであろう。今日までの放射線治療を用いたほとんどの治療実験では¹³¹Iが用いられているが、それはその放射線免疫治療に対する適性についての注意深い分析によるというよりは、適切なコストで容易に入手できることと、蛋白質に対してのラジオヨード化が簡単であること、そして甲状腺悪性腫瘍の措置で長期間用いられていることなどが理由である。¹³¹Iは8.04日の半減期を有しており、最大ベータ・エネルギーは0.8MeV、平均ベータ・エネルギーは0.2MeVで、中間距離ベータ線放出物(平均距離は200μm-1mmの範囲)と考えられ、軟組織内での最大距離は1.5mmである。しか

しながら、¹³¹I（平均エネルギーが0.36MeV）による貫通ガンマ線放射能のイールドはヒトにおけるこの供給源の総吸収量当量の3分の2を構成しており、腫瘍体積とは別に全身での照射量を増大してしまい、それによって骨髄に対する毒性を発生してしまう。また、特定の標的における一層のロス、腫瘍の持続、そして毒性の増大などを引き起こす脱ハロゲン化に関連した問題も存在する。

⁹⁰イットリウムは64時間半減期と中間程度のベータ・エネルギー（最大2.3MeV）を含む放射線免疫治療アイソトープ（5, 14, 55, 58-65）として適している。⁹⁰Yは定量的な画像形成には適していないが、多くのグループは¹¹¹I n生物分布データを利用して、⁹⁰Y投与のための量を予想している（58, 59）。しかしながら、腫瘍摂取、血液クリアランス、及び正常組織摂取においては類似性がある場合でも、持続およびクリアランスにおいては腎臓、骨、そして網膜内皮システムによってその持続やクリアランスにはかなりの違いがある。

¹⁸⁶レニウムは放射線免疫治療のために魅力的な特徴を持っている。¹⁸⁶Reのガンマ線からのエネルギー関与は137KeVであり8.65%だけが余っているだけで、全身に対する照射量は¹³¹Iの場合より低くなる筈である。¹⁸⁶Reからのガンマ放射線は外部画像形成のために効果的に使えるのに十分な程度の高さを持っている。最後に、¹⁸⁶ReからのX線は低エネルギー放射線であり（59-73KeV、9.2%余剰）であり、この放射線源からの全身照射量に対する関与は小さい。

^{186}Re における画像形成陽子は特に治療に有効な量のレベルで用いることができるが (66, 67) 、 ^{99}mTc と ^{186}Re (前者は画像形成用、後者は治療用) を用いた『組み合わせ対』アプローチは非常に魅力的なオプションである (36, 37) 。これらは同様に化学的性質を介して抗体に取りつけること (36, 38) と、一般的に同様の生物分布をつくりだすことの両方が可能である。レニウム-186は十分な特種的活性を達成するための高フラックス反応器を必要とする。

アルファ粒子およびその他の重い微粒子は物質と相互作用してイオン化の濃い軌跡をつくり出す。生物学の領域では高線形エネルギー伝送 (LET) として知られているこの効果は低LET放射線、特に陽子と電子より大きな相対的生物学的効果 (RBE) をつくりだす。細胞は通過するが臨床構造は破壊しないアルファ粒子の可能性は低LET放射線の場合よりおおよそ4-10倍低い (69, 70) 。これはゼロ・オーダーの効果であり、より低い放射線量で同じレベルの腫瘍切除が達成できることを意味している。腫瘍内のレセプタ・サイトの数が限定されていることと、放射線治療で用いることができる放射線量を制約する他の生物学的ファクターを考えれば、これは重要である。

高LET放射線には放射線治療で用いた場合に重要な意味を持つ重要な利点がさらに2つある。第1の利点はその放射線量が提供される速度と細胞毒性とが無関係であることである。高LET放射物の第2の利点は、それらが酸素の不在下

でイオン化をつくりだすことができる点である(73)。これは低酸素症の領域をもつ腫瘍の措置における高LET放射線の重要な利点である。同じ放射線量でこれらの領域の細胞を殺す能力は治療における重要な利点である。

放射線治療のための高LET放射物の利点のひとつは適切な放射性核種の選択の範囲が限られていることである。半減期、陽子放出、そして副産物としての生成物の安定性についての制約を考えれば、治療に用いられる候補の放射性核種はあまり多くない。最も有望な候補のひとつであるアスタチン-211はそれをつくりだすために、He-4イオンを加速できるサイクロトロンを必要とするという欠陥がある。これは、その半減期が7.2時間であることを合わせて、供給上に重大な問題を生じさせる。

鉛-212をつくり出すために発生システムを用いることができ、それが可能である(76)。鉛-212は10.6時間の半減期を有しており、データ放出を行って²¹²Biに変わる。ビスマス-212の半減期は1時間で、ベータおよびアルファ放射を行って安定した²⁰⁸Pbに変わる。このシステムは治療用放射性核種の最も魅力的な側面を組み合わせている。鉛-212は半減期が3.6日の半減期でモリブデン-99に変わるラジウム-224からつくりだされる。これは重大な崩壊ロスを経験せずに簡単に出荷が可能である。²¹²Pbは少量の試薬を接種するのには理想的な基剤を添加しない形態で現場でつくりだすことができるので、高度の特殊な作用を確実に行わせ

ることができる。この半減期は治療には理想的であると同時に、局在化を起こさせるのに十分な長さを有しており、しかもイン・ビボでの残留物分布において重大な問題を引き起こさない程度の短さである。その二代前の親に相当するトリウム-228が大量に利用できるので、いくつかの臨床サイトにフェーズI及びフェーズII研究のための材料を提供することができるであろう。商業的な利用が有望になった場合、²²⁸T_hは多数のルートで十分な量つくりだすことが可能になるであろう。

高LET放射線の利点は治療用にアルファ放出放射性核種を利用して研究を進めているいくつかのグループによって調べられている(77-82)。イン・ビボでアルファ粒子が走れる距離が短いことはその放出を細胞表面か細胞内部で続けさせることを必要とする(83)。その後、Zalutskyとその同僚等による研究は、²¹¹A_tでラベルした抗体を骨髄腫の措置にうまく用いることができる事を示した(79)。²¹¹A_tは固体腫瘍をうまく措置することができることが示されているが、その利用可能性が臨床的な利用に問題を提出する。Gansowとその共同研究者等は抗体を²¹²B_iとその親の²¹²P_bで放射能ラベルするために用いる可能性のあるキレート系について広範な実験を進めている(84-87)。

本発明では、¹²³I、¹²⁵I、¹³¹I、³²P、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、²¹¹A_t、¹⁷⁷Lu、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、²¹²P_b、及び²¹²B_iなどのすべての放射性核種を用いることができる。

異種移植の放射能でラベルされたリガンド・ペプチド／高親和性膜レセプタ・システムは新しい遺伝子を利用した放射性アイソトープを標的に向かわせるやり方である。マウス・ガストリン放出ペプチド・レセプタ (mG R P - R) - ボンベシン／G R P などのいくつかのレセプターリガンド対はこの新しい治療方式に組み込む上で有益な特性を持っている。この応用目的のためのこのクラスのレセプタの有益な特徴は、それらが遺伝子形質導入法によって異常な位置に表現させることができ、そしてそれらはそのリガンドとの高い親和性結合を示すということであろう。加えて、リガンドの内発性表現が暫定的、あるいは空間的なパターンに発生すれば、ラジオリガンドの位置的に異常で、非腫瘍局在化をできるだけ少なくする上で望ましいであろう。両性ボンベシン・ペプチドのヒトにおける対応物のひとつはガストリン放出ペプチド (G R P) である。Batteyら (91-93) はボンベシン／G R P レポータをコード表現する c D N A クローンの単離と特徴付けについて報告している。雑多な細胞において表現された場合、このレセプタはボンベシン／G R P ペプチドと高親和性結合をもたらすので、ソマトスタチン類似物オクトレオチドは放射線画像形成および放射線治療に用いられている (94-97)。ソマトスタチン (S S T) は14のアミノ酸で構成される環式ペプチドである (98, 99)。放射線医薬品としての天然性 S S T の実際的な応用はその短いプラズマ半減期 (数分間) によって制約されている。S S T より長い血清半減期

と有するオクタペプチド S S T 類似物については述べられている (100-102)。最も特徴付けが行われている類似物であるオクトレオチドは¹³¹I, ⁹⁰Y、及び¹⁸⁶Ruなど通常の R A I T で用いられているものを含めいくつかの放射性核種によってラベルすることができる。少なくとも、S S T R の 4 つの異なったサブタイプがヒトの組織で確認されており、クローンされている (103-105)。オクトレオチドは高い親和性をもって S S T R 2 と結合する。レセプタの遺伝子誘導のための S S T R 2 / オクトレオチド・システムは標準的な R A I T の限界を克服できる可能性がある。

マウス I L - 4 レセプタは本発明による方法においても用いることができる。この方式のために有益な異種移植レセプタが選ばれた理由は、誘導されたレセプタがそのリガンドに対する高親和性結合を持っていること、雑多な細胞において高いレベルで表現される可能性をもっており、内発性リガンドとのクロス反応性を示さなかったことである。こうした基準を達成するひとつの化合物はマウス I L - 4 レセプタである。Park 等はこのレセプタ c D N A をクローンし、それをいろいろな C O S - 7 細胞において表現した (106)。C O S - 7 細胞における I L - 4 r の表現はその通常のレベルで天然のレセプタとは区別ができない I L - 4 結合蛋白質をもたらした。これらの形質導入された細胞に対する¹²⁵I - I L - 4 の結合は $10^9 - 10^{10} M^{-1}$ の K_a を示した。重要なことは、マウス・リガンドはヒト・レセプタに結合性を示さず、ヒト

IL-4 はマウス・レセプタに対する結合を示さないことがある。従って、マウス IL-4 レセプタは有益な異種移植レセプタのための上の基準を満たしている。マウス IL-4 は分子重量が約 19KD の分子量を有する糖蛋白質である (107)。

標的放射線治療を評価するために用いることができる動物モデルがある。ラジオリガンドの局在化と前臨床動物モデルにおける治療を分析するために広範囲のヒト腫瘍異種移植システムが用いられてきている (5, 7-9 に検討)。こうした研究 (5, 14, 55, 58, 108-135) のためにヌード・マウスに皮下注射で移植されたヒトの結腸炎、白血病、リンパ腫、卵巣、肝臓、乳房、肺、睾丸、腎臓、神経芽腫、子宮頸、癌性腫瘍、及び脳腫瘍細胞株が広範に使われてきている。本発明の主な効果は腫瘍細胞膜レセプタ表現を誘導するために遺伝子構造物を直接腫瘍内に入れることと関連しているから、臨床的なトランスレーションのためには転移しないが進行的な局所腫瘍成長のために死ぬような腫瘍タイプを必要とするであろう。ヒトのグリオblastoma はこの基準を満たしており、局所直接遺伝子伝送技術に基づく種々の遺伝子治療方式で使われている (136-138)。

従って、ひとつの実施の形態において、本発明によるラジオリガンド局在化と治療研究を行うための方法は以下の 4 つの組み合わせて行うことができる。(1) 結腸、肺、頭部及び首、肝臓、メソセリオーマ、及びグリオーマ腫瘍をイン・ピボで直接腫瘍内遺伝子伝達を行い、その後ラジオリガンド

治療を行う；（2）卵巣および結腸腫瘍をイン・ビボで腹膜内遺伝子伝達し、その後ラジオリガン治療を行う；（3）脳内グリオーマ（glioma）腫瘍を定位的に直接遺伝子伝達を行った後、ラジオリガンド治療。さらに、この技術分野の当業者であればレセプタ cDNA をコード表現するベクターを標的に向かわせるために本発明の方法を利用することができるであろう；そして（4）全身的な結腸、乳房、脳、卵巣、睾丸、胰臓、癌性腫瘍、胃腸、白血病、リンパ腫、及び肺腫瘍を系統的に遺伝子伝達し、その後ラジオリガンド治療を行う。この戦略はヒトの癌の現実をよりよく反映したより複雑なモデルに進行する比較的単純なイン・ビボでのシステムでラジオリガンド設計を行ったり、分析を行ったりすることを可能にしてくれる。

以下の例は本発明の種々の実施の形態を説明する目的で提供されるものであり、いかなる意味でも本発明の範囲を限定することは意味していない。

実施例 1

レポータ遺伝子をコード表現する遺伝子組換えアデノウイルス

H e L a および D 54 MG 細胞における遺伝子伝達効率を評価するためにレポータ遺伝子をコード表現する遺伝子組換えアデノウイルス・ベクターを用いた。AdC M V L uc 及び AdC M V L ac Z は前に説明した E 1 A / B 消去、複製不能アデノウイルスベクターを用いた（139）。Ad C M V L uc はヒト・サイトメガロウイルス（C M V）プロモータ／エンハン

サ（テキサス州ダラスのテキサス大学、サウスウェスタン・メディカル・センター、R. Gerardにより提供）の制御下でホタル・ルシフェラーゼ・レポータ遺伝子をコード表現する。AdCMV LacZはCMVプロモータ／エンハンサ（R. Gerard提供）の制御下でレポータ遺伝子大腸菌β-ガラクトシダーゼ（LacZ）をコード表現する。

実施例 2

レポータ遺伝子表現の分析

アデノウイルス・ベクターの形質導入に続いて、遺伝子伝達の相対的な効果を評価するためのコード表現されたレポータ遺伝子の表現に関して分析を加えた。形質導入性の相対的レベルの研究を行うために、形質導入後48時間後に細胞を取り出して、細胞溶解し、メーク（プロメガ・ルシフェラーゼ・アッセイ・システム、マディソン、WI）によって述べられたスシフェラーゼ表現に関する分析を行った。簡単に言うと、トランسفェクトされた細胞からの細胞溶解物は組織培養培地を取り除いて各ウェルの細胞に150μlのIX細胞培養溶解試薬を加えた後に入手した。細胞を室温で10-15分間かけて溶解し、細胞断片物を13,000×gで3分間遠心分離によって取り除いた。細胞抽出物（20μl）を次に100μlのルシフェラーゼ・アッセイ試薬に加えて、Lumat LB 9501蛍光メータ（Berthold Systems Inc., Aliquipa, PA）における放出光に関する分析を行った。

LacZ レポータ遺伝子表現は形質導入の頻度を調べるため

にも用いられた。この分析のために、LacZ レポータ遺伝子をコード表現するアデノウイルスで感染された細胞は形質導入 48 時間後に取り出されて、FACS (FACSort, Becton-Dickinson, Mountain View, CA) によって分析した。

FACS 分析のために、 1×10^7 個の細胞をトリプシンで処理して 1 ml の染色媒体 (10 mM HEPES 及び 4 % FBS を含む PBS) に懸濁させた。10⁶ 個の細胞を含むアリコットを 6 ml FACS チューブ (Falcon, Franklin Lakes, NJ) に入れて、37°C の温度で 10 分間暖めた。予め暖めた 2 mM のフルオロレスセイン-ジガラクトシダーゼ (100 μ l) を加えて、細胞を 37°C の温度で 1 分間培養した後、1 ml の冷たい染色媒体を加えた。FACS が完了するまで細胞を氷上で暗い場所に保管した。

実施例 3

ヒト癌性胚芽腫抗原 cDNA をコード表現する遺伝子組換えアデノウイルス・ベクターの構成

ヒト CEA cDNA をコード表現するアデノウイルスをイン・ビボ相同遺伝子組換えの標準技術で調製した (140)。第一に、ヒト CEA cDNA (MD, Bethesda, National Cancer Institute, J. Schloemにより提供) をアデノウイルス・シャトル・ベクター pA C CMV pL pA R S (+) (R. Gerard 提供) のポリリンカー内部の対応する箇所にクローンした。このプラスミドはヒト CMV 初期プロモータ／エンハンサ及び SV40 コード化 cDNA の表現を制御する SV40 ポリアデ

ニル化信号を含んでいる。その結果得られる遺伝子組換えアデノウイルス・シャトル・プラスミド、pACCCEAを用いてEIA消去、複製欠陥遺伝子組換えアデノウイルスを誘導した。簡単に言うと、このシャトル・プラスミド+プラスミドpJM17を内包しているアデノウイルス(Graham提供)を市販の陽イオン・リポソーム・ベクターDOTAP(ドイツ、Mannheim, Boehringer-Mannheim)を用いてE1A形質補間細胞株293に共トランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞は細胞病理効果が現れるまで保持された。新たに発生した遺伝子組換えアデノウイルスをその後標準的な方法で斑点精製した(140)。遺伝子組換えアデノウイルスであることの確認はCMVプロモータ及びCEA cDNA構成物に特有のプライマを用いてポリメラーゼ鎖反応で行った(141)。CEAコード表現ウイルス、AdCMVCEAが大量に作成され、精製されたウイルスを標的として293細胞を用いたウイルスPFUの直接の判定のための斑点アッセイ手法で滴定した。

実施例4

CEAコード表現遺伝子組換えアデノウイルスAdCMVCEAを用いたイン・ビトロでの形質導入

D54 MGヒト・グリオーマ(glioma)細胞を最初にT75フラスコあたり 2.5×10^6 個の割合で播種した。細胞が80%の融合度に達した時、それらに1-1,000PFU/細胞の範囲の種々の粒子数でAdCMVCEAアデノウイルスベクタ、あ

るいは比較対象として、1ないし10P FU/細胞の割合でAd CMV LacZベクタのいずれかで感染させた。感染2日後に、間接免疫蛍光アッセイ、放射能ラベル結合アッセイ、あるいは以下に述べるような免疫組織化学でCEA表現について細胞を分析した。陽性コントロールとして、構成的にCEAを表現することが知られているLS174Tヒト・アデノカルシノーマを用いた。

実施例5

モノクローナル抗体

ヒト・アデノカルシノーマ上で表現されたCEAと反応性を示すIgG2aのサブクラスの完全なマウスマAb COL-1(142)と選定したヒト・アデノカルシノーマ上で表現されたTAG-72抗原と反応性を示す完全なマウスマAb CC49(IgG1)とをJ. Schliom(MD, Bethesda, National Cancer Institute)から提供していただいた。

実施例6

フロー・シトメトリー分析

ラベルされていない抗CEA MAb COL-1又はM Ab CC49(陰性コントロール)を用いてAdCMVCEAあるいはAdCMV LacZでD54 MG細胞を遺伝子形質導入してから48時間後にフロー・シトメトリーによる分析を行った。簡単に言うと、単層培養内で成長している細胞はPBS(pH7.2)内に4mM EDTA、0.05%KClを入れたもので分離して、冷たい0.1%BSA/PBS内で遠心分離(300

×g、5分間)で洗浄し、P B S内に再懸濁させてからヘマシトメータを用いてカウントを行った。細胞を分画し(4×10⁶/チューブ)、一度冷たいP B S/E D T A/0.1%アジ化ナトリウムで洗浄してから、50μlのC O L-1又はC C 49(P B S内に25μg/mlを入れたもの+2%F B S)を適当なチューブに加えて、30分毎に攪拌しつつ培養した(4°C、2時間)。その後これらの細胞をP B S/E D T Aアジ化ナトリウムで洗浄してから、50μlのフルオレセインをラベルしたヤギ抗マウスIgG(AL, Birmingham, Southern Biotechnology Associates)を各チューブに加えた。培養(1時間、4°C、暗所で)後、細胞をP B S/E D T A/アジ化ナトリウムで洗浄してから同じ溶液1ml中に再懸濁させた。冷たい70%E t O Hの1mlを各チューブに加えて静かにかき混ぜて、細胞を固定した(1昼夜、4°C、暗所で)。E t O H/P B Sをデカントしてから遠心分離にかけ、その後250μlの50μg/ml沃化プロビジウム(IN, Indianapolis, Boehringer Manheim Corp.)を各チューブに加えて、30分毎に攪拌しながら培養した(1時間、4°C)。その後、細胞を洗浄して、1mlの2%フレッシュ・パラホルムアルデヒドで後固定してから、488nmで励起後に2色分析(UAB Flow Cytometry Core)用に設定されたF A C S can(Becton-Dickinson, Mountain View, CA)を用いて分析した。これらの条件下で、緑色蛍光(530μm±21nm)は膜に関連したC E A表現を示しており、赤色蛍光(560nm)は沃化プロビジウムの細胞内D N Aへの挿入

によるものである。前方角度及び側方分散ドット・プロットから選択した適当なサイズの単一細胞を示す 10^4 イベントから輪郭プロットを作成した。陰性コントロール抗体（CC49）サンプルを用いて、水平軸上にイベントの95%を含むゲートを確定して、緑色蛍光の故に陰性と表示した。定義上、ゲート設定点より高い緑色蛍光強度を有する細胞（ゲートの右側）を陽性を表示した。垂直軸上の沃化プロピジウム（赤色）蛍光のゲート設定点を赤色蛍光強度の低い方のピーク（G₀/G₁）と高い方のピーク（S/G₂/M）との間の中間で同じ（陰性コントロール）群に対して任意に設定した。これらの設定を用いて同じ実験で染色された細胞のすべての群を分析した。結果は陽性染色細胞の平均パーセンテージと平均線形蛍光で示してある。

実施例 7

ラベルされた抗体の放射能ラベリング及び特徴付け

精製したCOL-1及びCC49抗体製剤を、これまでに述べられているようなIodo-Gen法（144）を用いて¹²⁵Iあるいは¹³¹I（New England Nuclear, N. Billerica, MA）でラベルした。遊離放射性沃素をラベルされた製剤をSephadexカラム（PD-10, Pharmacia, Piscataway, NJ）を通過させて取り除いた。放射能でラベルした製剤の比活性について判定した。放射能でラベルした抗体製剤の免疫活性を別の場所で述べたような（146, 147）Luindo法を用いてCC49に関する腫瘍異種移植からつくったCOL-1及びSW1116細胞に

に対する L S 147T 細胞を用いた生細胞結合アッセイによって測定した。

実施例 8

放射能でラベルした抗体の結合活性

C E A 細胞の表面表現を分析するために放射能でラベルした抗体の結合アッセイを行った。 125 I でラベルした C O L - 1 あるいは C C 49 抗体製剤の結合活性をイン・ビトロ・生細胞結合アッセイを用いて測定した。AdCMV C E A 又は AdCMV LacZ でトランスフェクトされた D 54 MG ヒト・グリオーマ (glioma) 細胞を P B S, pH7.2 内に 4 mM EDTA, 0.05% KCl を入れた溶液を用いて取り出し、冷たい P B S, pH7.2 に 1×10^7 細胞 / ml の割合で再懸濁させた。細胞を 2 つ、あるいは 4 つ (1×10^6 細胞 / チューブ) に分画した。放射能でラベルした抗体 (200ng, 2×10^5 cpm) を加えて、震動させながら培養した 8 室温、1 時間)。細胞を 4 ml の P B S で洗浄して、細胞に結合した放射活性をウェル・タイプのガンマー・カウンター (Micromedic 4/200 Plus, ICN, Huntsville, AL) 内で判定した。細胞に結合した放射活性はアボガドロ数と 125 I でラベルした C O L - 1 又は C C 49 比活性および分子量に基づいて結合した C O - 1 又は C C 49 の分子として計算した。放射能でラベルした抗体の非固有結合をラベルしていない抗体 $10 \mu\text{g}$ の存在下で測定した。比較対象としての非形質導入 D 54 MG 細胞に対する結合も測定した。

実施例 9C E A 表現の免疫組織化学分析

さらに C E A 表現を特徴付けを行うために、培地内に保持された AdCMV C E A で形質導入した D 54 MG 細胞 (1 P F U / 細胞) を、2 次検出システムを Biogenex (San Ramon, CA) から得た他は前に述べた (148-150) のと同様のストレプトアビジン-ペロキシダーゼ法を用いて抗 C E A C O L - 1 M A b で免疫染色した。結合した抗体を褐色の不溶性沈殿物を作り出すための基質としてジアミノベンジジン・テトラヒドロクロライドを用いてビオチニル化抗マウス Ig G 2 次抗体とストレプトアビジン-ペロキシダーゼ複合体を用いて検出した。Mayer の水性ヘマトキシリソ用いてカウンター染色を行った。比較のために、AdCMV LacZ で形質導入したか、あるいは疑似感染させた D 54 MG 細胞も陰性コントロールとして免疫染色した。

取り出した後、腫瘍を分けて、その腫瘍の半分を中性緩衝ホルマリン内に 24 時間固定した。固定後、組織を歯類組織に関する標準手順を用いて Shandon Ciade12000Tissue Processor でパラフィンブロックに処理し、それら組織をパラフィン・ブロック内に埋め込んだ。4 ミクロン・パラフィン部分を切断し、58°C の温度下で 1 時間 Superfrost Plus で処理した顕微鏡スライド (Fisher Scientific, Norcross, GA) に熱付着させた。これらのスライドをキシレン内で脱パラフィン化し、トリス緩衝液 (50mM トリス、140mM NaCl、0.01%

Triton X 100, Ph7.6) にエタノールをグレーティングして再水和化させた。

組織分解周辺の領域を P A P ペンで境界設定して、スライドを Optimax Automated Cell Stainer (Biogenex, San Ramon, CA) 上に置いた。これらスライドを内発性ペロキシダーゼ活性を抑えるために 3 % 水性 H₂O₂ で 3 分間、非固有結合を防ぐために 10% カゼインで 10 分間、抗体又は結成デリートで 1 時間、ビオチニル化抗マウス抗体で 20 分間、そしてストレプトアビジン・ペロキシダーゼで 20 分間連続的に培養した。D A B (3, 3-ジアミノベンジジン) を 7 分間用いて、ペロキシダーゼによる褐色の不溶性複合体として沈殿させた。各ステップの間にスライドをトリス緩衝液で洗浄した。カゼイン (HK 085-4 K)、StrAviGen 超過敏マウス H R P キット (Z P 000-UM) 及び D A B (HK 153-5 K) は Biogenex 社から入手した。これらのスライドは Optimax ステイナーから取り出して、ヘマトキシリンで 1 分間軽度にカウンター染色した。その後、それらのスライドをアルコールを通じてキシレンに脱水和化し、パーマウントでカバースリップした。

実施例 10

マウス

生後 4 - 5 週間で、B A L B/c バックグラウンドを有する無胸腺ヌード雌 nu/nu を National Cancer Institute Frederick Research Laboratory (Frederick, MD) から入手した。

マウスはフィルター・ポンネットを有するケージ内でラミナー・フロー室内で無菌状態下で保存され、無菌マウス用餌と無菌タップ水を与えた。こうした手順で動物に対する不快感、圧迫、苦痛を減少させた。

実施例 11

C E A コード表現遺伝子組換えアデノウイルス A d C M V C E A を用いた当該箇所での腫瘍形質導入

検出可能レベルの C E A を表現するための D 54 MG 異種移植を評価するために当該箇所での実験を行った。最初の実験はラベルされていない C O L - 1 結合を評価するための形質導入された異種移植の免疫染色を含んでいた。簡単に言うと、D 54 MG 細胞をイン・ビトロで A d C M V C E A 又は A d C M V L ac Z のいずれかを用いて 1 P F U / 細胞の割合でイン・ビトロでトランスフェクトした。培養 2 日後に、これらの細胞を動物 1 個体あたり 2×10^7 の生きた細胞の割合で無胸腺ヌード・マウスのグループの脇腹に皮下注射した。この腫瘍グループの免疫組織化学分析を腫瘍細胞注入 13 日後に行った。

次に C E A 表現を A d C M V C E A で直接腫瘍内注射（連続 1 - 3 日）によって当該箇所に形質導入された D 54 MG 細胞内で評価し、免疫組織化学的に分析した。D 54 MG 異種移植を動物 1 個体あたり 2×10^7 生細胞の割合で無胸腺ヌード・マウス内に行った。腫瘍が約 5 - 10 mm の直径に達した後、当該箇所での形質導入を 1×10^7 P F U の割合で腫瘍物

質（28G針、50ml/腫瘍）内にAdCMVCEA又はAdCMV LacZを注入することによって行った。このグループの腫瘍の免疫組織化学分析は最後の腫瘍内接種から2日後に行つた。

イン・ビボで放射能でラベルした抗体を標的に向かわせる作用を強化することを実証するために、D54 MG細胞を最初にイン・ビトロでAdCMVCEA又はAdCMVLacZを1PFU/細胞の割合で用いて形質導入した。2日間培養した後、トランスフェクトされたD54 MG細胞が前に述べたように無胸腺ヌード・マウス内に異種移植として確立された。11-15日後、異種移植が直径で5-10mmになった場合、追加的なAdCMVCEA（ 1×10^9 PFU）あるいはAdCMV LacZ（ 1×10^9 PFU）を1又は2日後に腫瘍内接種した（28G針、50ml/腫瘍）。AdCMVCEA又はAdCMV LacZの当該箇所への最後の投与から1日後に、動物に¹³¹IでラベルしたCOL-1抗体を腹膜注射し、生体内分布を以下の方法で調べた。ひとつの実験で、トランスフェクトされなかったD54 MG細胞をヌード・マウス内に皮下注射し、その異種移植に¹³¹IでラベルしたCOL-1の注射より2日前に 2×10^7 PFUのAdCMVCEA又はAdCMVLacZを1回直接接種した。比較対象の調査はCEAを内発的に表現するLS174T異種移植を用いて行った（4, 151, 152）。形質導入されなかったLS174T細胞（ $1 - 1.5 \times 10^7$ ）をヌード・マウスの脇腹に皮下注射した。これらの腫瘍が直

径で約5-10mmになった後（誘導後8-9日後）、動物に対して以下に述べるように¹³¹IでラベルしたCOL-1を腹膜注射した。別の実験で、トランスフェクトされないD54 MG細胞をヌード・マウス内に皮下注射し、異種移植に対してAdCMVCEAを 1×10^9 PFUの割合で、¹³¹IでラベルしたCOL-1の接種1及び2日後2回直接接種した。

実施例12

¹³¹IでラベルしたCOL-1抗体の生体分布

¹³¹IでラベルしたCOL-1抗体のイン・ビボでの画像形成が、放射能でラベルした抗体の腫瘍に集中させることの効率を評価するためにCEA細胞表面表現の遺伝子形質導入を介して行われた。正常および腫瘍組織局在化を調べるためにD54 MG-AdCMVCEAを形質導入された腫瘍の形質導入を受けた無胸腺ヌード・マウス内での¹³¹Iでラベルした抗体のイン・ビボ組織分布を行った。特殊性を比較する対象として、AdCMVLacZで形質導入されたD54 MG腫瘍を有する無胸腺ヌード・マウスを用いた。LS147Tヒト結腸癌細胞株の異種移植を持った無胸腺ヌード・マウスを陽性コントロールとして用いた。放射能でラベルした抗CEA抗体はLS174T腫瘍異種移植内に局在化することがこれまでに示されている（4, 151, 153）。この分析のために、100又は300 μ Ciの¹³¹IでラベルしたCOL-1抗体を直径5-10mmの範囲の定着した腫瘍を有するマウスのグループに接種した。甲状腺摂取はこれらの動物が飲む水にヨウ化カリウ

ムの飽和溶液を付加することによって防いだ。麻痺させた (100mg/kg ナトリウム・ペントバルビアル) マウスの全身走査を放射能でラベルした抗体の接種から 5 日後にマイクロコンピュータに接続された 4 mm ピンホール・コリメータを取り付けた大視野 Sopha D S X カメラ (Sopha Medical, Columbia, MD) を用いて行った。画像形成直後に、マウスの血を抜いて、殺し、解剖した。肝臓、腎臓、脾臓、肺、小腸、大腿骨、皮膚、筋肉、腫瘍、及び血液を乾燥し、重量測定し、そして ¹³¹I でラベルした C O L - 1 の組織分布を判定するためにウエル・タイプのガンマ・カウンター (Minaxiganma 5000 シリーズ、 Packard, Chicago, IL) で放射活性を測定した。放射能でラベルした抗体の生体分布の結果を平均 \pm 組織の 1 gあたりの S D % I D と腫瘍 / 正常組織 (T / N T) 摂取比率で示した。

実施例 13

統計的分析

A d C M V C E A 形質導入された D 54 MG 細胞と L S 17 4 T 細胞に結合した ¹²⁵I でラベルした C O L - 1 の分子数の違いを t - テストを用いて分析した。組織 1 gあたりの % I D と T / N T 摂取比率の生体分布を二方向偏差分析法で分析した (154)。実験間、および組織間の違いについては相互効果と共にテストした。7 回の実験間での組織 1 gあたりの % I D の違いは血液および腫瘍に関して一方向偏差分析法で別個にテストした。T / N T 摂取データに関しては、9 つの

組織のそれぞれに関して3つの実験グループ間の違いを比較すると同時に3つの実験グループのそれぞれに関する9つの組織間の違いを比較するためにテストを行った。

実施例14

アデノウイルスで媒介されたヒト・グリオーマ(glioma)細胞の形質導入

ベクターの効率に関する最初のスクリーンとして、アデノウイルス(AdCMVLuc)をコード表現するホタル・ルシフェラーゼで感染させた標的細胞の形質導入48時間後の遺伝子表現について評価を加えた。D54 MGヒト・グリオーマ(glioma)細胞は感染されなかった細胞と比較して高度に形質導入され、高レベルのルシフェラーゼを表現することが認められた。注意すべき点は、その表現レベルは遺伝子組換えアデノウイルス・ベクターで高度に形質導入されることが知られているHeLaの形質導入で観察されたレベルとほぼ同じであったことである(データ示さず)。

さらにD54 MG細胞の形質導入性を検証するために、 β -ガラクトシダーゼ・レポータ遺伝子をコード表現するアデノウイルス・ベクターを用いて形質導入頻度を定量した。アデノウイルス・ベクターAdCMVLacZをコード表現するLacZでの形質導入に続いて、細胞を48時間後に取り出して、FACS分析で大腸菌 β -ガラクトシダーゼ表現に関して調べた。これらの調査はD54 MG細胞での形質導入の効率の高さを示し、100%の形質導入頻度が観察された。HeLa細胞

についてはアデノウイルス・ベクターを用いた場合に90%以上の形質導入頻度がこれまでに実証されているので陽性コントロールとして用いた。従って、D54 MGヒト・グリオーマ(glioma)細胞は遺伝子組換えアデノウイルス・ベクターを用いて高い効率でうまく形質導入された。

実施例15

CEAをコード表現する遺伝子組換えアデノウイルスAdC

MVCEAを用いたインビトロでの形質導入

細胞表面を表現するためにアデノウイルスで媒介された遺伝子伝達によってどの程度のD54 MG細胞が誘導できるのかをフロー・シトメトリーで調べた。D54 MG細胞を1, 10, 100あるいは1,000P FU/AdCMVCEA細胞でトランスフェクトさせた。1又は10P FU/細胞の割合でAdCMV LacZを陰性コントロールとしてトランスフェクトさせた。トランスフェクション2日後の細胞膜関連CEAを抗CEA MAb COL-1あるいは陰性コントロール抗体としてのCC49を用いて調べた。構成的にCEAを表現するLS174Tヒト・アデノカルシノーマ細胞を陽性コントロール細胞株として用いた。

図1に示されているように、AdCMVCEAの形質導入に続いてCEA陽性D54 MG細胞においてかなりの増大が認められた。FACSでCEAに対して5-11%陽性を示したAdCMVLacZ形質導入細胞と比較して、AdCMVCEA構成物で感染したD54 MG細胞の82-95%は用いられた

(1 P F U /細胞) 最低の感染度 (M O I) でも非常に陽性であった。より低い感染度については調査を行わなかった。より低いウイルス粒子数 (例えば、1 P F U /細胞) では、細胞の成長可能性は高いままであったが (> 90%、データ示さず) 、M O I を 10 P F U /細胞程度に増大させると、細胞の成長性は低下し始めた (< 90%)。細胞の成長性が失われると、細胞サイクル・シフトを検出する能力が不安定になったが、これは死んだ細胞のD N A成分がより低くG₀/G₁群をマスクするからのように思われる。しかしながら、トランスフェクトされなかった細胞と比較して、低いウイルス粒子数でトランスフェクトされた細胞のG₀/G₁およびS/G₂/M群では有意なシフトは認められなかった。この非固有毒性はC C 49陽性細胞における多少の増加にも関与している。ヒト結腸癌性腫瘍細胞株L S 174TでのC E Aの陰性表現と比較して、AdCMV C E Aで形質導入したグリオーマ (glioma) 細胞はより高いレベルのC E A (L S 174Tに対して、平均蛍光強度 = 24.9 vs 17.6、図2参照) を表現し、グリオーマ (GLIOMA 9 細胞群の過半数 (81.8%) はL S 174T細胞と比較して陽性であると判定された (32.8%)。

癌性胚種抗原表現はM A b C O L - 1に対して強力な特殊反応を示した培地中に保持されたAdCMV C E A形質導入D 54 MG細胞の免疫組織化学によってさらに示された (図3)。それと比較して、AdCMV L ac Zで形質導入した (1 P F U /細胞) D 54 MG細胞、あるいは疑似的に感

染された D 54 MG 細胞は C O L - 1 M A b との固有の反応を示さなかった。従って、アデノウイルスで媒介された遺伝子伝達で D 54 MG 細胞の細胞表面上にかなりのレベルの C E A 表現が誘導される可能性がある。

実施例 16

放射能でのラベリングおよびラベルされた抗体の特徴付け

グリオーマ (glioma) モデル・システムでの腫瘍内局在化を調べるために用いることができる放射能でラベルした抗 C E A 抗体をイン・ビトロで発生させた。精製された C O L - 1 と C C 49 抗体のアリコット (500 μ g) を 1 mCi 125 I でラベルしたところ平均ラベリング効率は 70%、そして平均比活性は 1 mCi/mg であった。C O L - 1 抗体 (1 mg) を 10 mCi 131 I でもラベルしたところラベリング効率は 90% 以上、そして比活性は 6.6 mCi/mg であった。遊離 125 I 又は 131 I はラベルされた製剤を Sephadex G - 25 カラムを通過させて除去された。高圧液体クロマトグラフィーでは精製された製剤内で 1 % 以下の遊離 125 I 又は 131 I が 1 % 以下であることを示した。放射能でラベルした抗体製剤の免疫活性は 90% 以上であった。

実施例 17

放射能でラベルした抗体の結合活性

次に、AdCMVCEA 形質導入 D 54 MG 細胞内での C E A 表現のレベルを定量するためにイン・ビトロ生細胞放射能ラベル抗体結合アッセイを用いて行われた。これらの結果

は C E A を表現するように形質導入された D 54 M G 細胞に対する ^{125}I でラベルした C O L - 1 の高結合効率を示した（図 4）。細胞表面膜上で表現された分子の数は 5.8×10^5 分子／細胞と計算された。ラベルされていない抗体は非固有背景結合のレベルまで A d C M V C E A でトランスフェクトされた D 54 M G 細胞に対する ^{125}I ラベル C O L - 1 抗体結合を示した（図 4）。低背景結合は ^{125}I ラベル C C 49 を用いた場合も非トランスフェクト D 54 M G 及び A d C M V L a c Z トランスフェクト D 54 M G コントロールでも認められた。加えて、A d C M V C E A 形質導入 D 54 M G 細胞に対する放射能でラベルした C O L - 1 結合の効率を 1, 5, 10, 50 及び 100 P F U / 細胞で評価した。A d C M V L a c Z で形質導入された D 54 M G 細胞を陰性コントロールとして用い、これらのサンプルを構成的に C E A を表現することが知られている L S 174 T ヒト結腸アデノカルシノーマ細胞と比較した。放射能ラベル結合で測定した C E A の最適表現は 1 又は 5 P F U · 細胞のいずれかでトランスフェクトされた D 54 M G 細胞で認められた（図 5）。さらに、トランスフェクション 48 時間後 ($4.7 \pm 0.5 \times 10^5$, n = 20) に 1 P F U / 細胞の割合で行われた 6 回の実験からトランスフェクトされた D 54 M G 細胞の細胞表面上で表現された C E A の分子数は C E A 陽性 L S 174 T 細胞 ($2.7 \pm 0.5 \times 10^5$, n = 10) ($P < 0.01$) におけるよりかなり高く、前の F A C S によって得られた結果と一致していた。

遺伝子組換えアデノウイルス感染は一過性レベルの不均一な遺伝子表現を可能にするだけであることが知られているので（4）、AdCMVCEA形質導入D54 MG細胞における細胞表面でのCEA表現の存在が判定された。放射能ラベル結合アッセイをAdCMVCEAで1PFU/細胞でトランسفェクションさせてから2、9及び13日後に行われた。CEA形質導入細胞に対する¹³¹IラベルCOL-1結合はトランسفェクション2日後の細胞1日あたり 5.1×10^5 分子であることが認められ、トランسفェクション後13日後の細胞では 1.8×10^5 分子へと3分の1に減少することが認められた（図6）。これらの結果は、トランسفェクション2週間後でもかなりのレベルのCEA表現が検出されることを示した。

実施例18

CEAをコード表現する遺伝子組換えアデノウイルスを用いたイン・ビボ形質導入

これらの研究は腫瘍内接種とCEA表現の免疫組織化学分析を介してD54 MG異種移植のAdCMVCEA形質導入の効率を評価するために行われた。AdCMVCEA形質導入腫瘍のパラフィン固定部分を抗CEA MAb COL-1で染色され、陽性に染色された細胞のエリアが認められた。陽性に染色された腫瘍細胞は各グループ毎、そして各グループ内の個々の腫瘍毎に違っていた（図7）。 1×10^7 PFU AdCMVCEAを1-3回腫瘍内に接種して形質導入さ

れた D 54 MG 腫瘍は多数の CEA 陽性腫瘍細胞を表現したが、 CEA 陽性ではない 大きいエリアの腫瘍も存在した（図 7 A、及び C-D）。加えて、同じ腫瘍標本のいくつかのエリアも CEA に対して陽性に染色された（図 7 C 及び 7 E）。隣接皮膚および基質組織は CEA に関して陽性に染色されなかった（図 7 D）。対象的に、 1 P F U Ad CMV CEA で形質導入された D 54 MG 腫瘍は移植後 13 日後の時点で CEA 陽性腫瘍細胞（1-4 細胞）の少数のクラスターだけをイン・ビトロで表現した（図 7 B）。比較対象の Ad CMV L acZ 形質導入 D 54 MG 腫瘍は CEA に対して陽性に染色されなかった（図示せず）。これらの結果はイン・ビトロで形質導入され、培地で保持された細胞の CEA 定量に関して免疫蛍光及び免疫組織化学を用いて上に観察された結果と一致している。

次に放射能でラベルした抗 CEA MAb が 17 日前から無胸腺ヌード・マウスの脇腹で成長している異所皮下接種異種移植として定着しているイン・ビボ CEA 形質導入 D 54 MG 細胞の表面上で CEA を検出できるかどうかを調べるために行われた。さらに局在化を促進するために、 ¹³¹I でラベルした COL-1 MAb の腹膜内接種より 1 日及び 2 日前に、追加 Ad CMV CEA (1×10^9 P F U) を腫瘍内に注射した。ウィルス粒子数は、腫瘍内での CEA 陽性細胞の割合を増大させるために、上に述べた免疫組織化学調査の場合より 100 倍高くなるように設定された。コントロールとして、

A d C M V L a c Z でイン・ビトロで形質導入された D 54 M G 細胞が他のマウスで皮下腫瘍として同様に定着され、 A d C M V L a c Z (1×10^9) を D 54 M G / A d C M V C E A 腫瘍に関して述べられたように、無胸腺マウスにおける腫瘍に二度接種された。1日後、すべての動物に ^{131}I でラベルされた C O L - 1 抗体の腹膜注射 ($300 \mu\text{Ci}$ /動物) が行われ、各マウスについて5日後に画像形成した。シンチグラフィー画像でも見えるように(図8)、A d C M V C E A で形質導入された D 54 M G 細胞を含んだ異種移植を有するマウスでは放射能でラベルした C O L - 1 抗体が局在化したが、一方、A d C M V L a c Z で形質導入された異種移植は血液プール分布を示しただけであった。C E A 形質導入腫瘍を有する動物での ^{133}I でラベルされた C O L - 1 のシンチグラフィー画像は L S 174 T 腫瘍を有する動物で得られた場合と同様であった(図8)。画像形成後、マウスを分析して、組織をウェル・タイプのガンマ・カウンター内でカウントした。

実施例19

^{131}I でラベルした C O L - 1 抗体の生体分布

腫瘍局在化の程度を調べるために A d C M V C E A で形質導入された D 54 M G 細胞の異種移植を有する無胸腺ヌード・マウス内での ^{131}I でラベルした C O L - 1 抗体のイン・ビボでの組織分布を行った。接種から4-5日後の A d C M V C E A で形質導入された D 54 M G 細胞をもった無胸腺ヌード・マウス内 100 又は $300 \mu\text{Ci}$ ^{131}I ラベル C O L - 1 抗体

の生体分布を表 I および II に示す。 ^{131}I でラベルした C O L - 1 及び抗 C O L - 1 抗体の局在化に関する特性コントロールとして、AdCMV LacZ で形質導入された D 54 MG 腫瘍を有する無胸腺ヌード・マウスが用いられた。L S 174 T ヒト結腸癌の異種移植を有する無胸腺ヌード・マウスを陽性コントロールとして用いた。イン・ビトロと当該箇所の両方で C E A で形質導入された C E A 形質導入 D 54 MG 腫瘍と、陽性コントロール L S 174 T 腫瘍異種移植で放射能でラベルした C O L - 1 腫瘍の局在化が観察された（表 I）。対象的に、LacZ 形質導入 D 54 MG 腫瘍では固有の腫瘍局在化は認められなかった。

（以下余白）

表 I

腫瘍を有する無胸腺ヌード・マウス^a内での¹³¹I COL-1 MAb の生体分布

<u>組 織</u>	<u>接種後4又は5日後の % ID/g (平均±SD)</u>
血 液	5.4±3.0 (n=7)
AdCEA D54 MG (1×10 ⁹ PFU AdCEA/腫瘍)	4.8±5.6 (n=7)
血 液	6.3±1.8 (n=11)
AdLacZ D54 MG (1×10 ⁹ PFU LacZ/腫瘍)	1.8±0.7 (n=11)
血 液	8.4±3.4 (n=4)
AdCEA D54 MG	2.5±0.9 (n=4)
血 液	9.5±0.6 (n=3)
AdLacZ D54 MG	2.1±0.2 (n=3)
血 液	9.3±4.9 (n=5)
D54 MG (2×10 ⁷ PFU AdCEA/腫瘍)	1.5±0.7 (n=5)
血 液	9.9±3.0 (n=4)
D54 MG (2×10 ⁷ PFU AdLacZ/腫瘍)	1.8±0.9 (n=4)
血 液	2.2±1.4 (n=11)
D54 MG	3.7±1.8 (n=11)

a : イン・ビトロ及び／又は当該箇所で形質導入されたD54 MG腫瘍

異種移植あるいはLST4T結腸癌異種移植を有する無胸腺ヌー

ドマウスに100又は300 μ Ci ^{131}I でラベルしたCOL-1を腹膜注射し、接種後4または5日後に致死させた。

b : ^{131}I でラベルしたCOL-1の腹膜内注射後4日後に致死させた。

体重0.1-1.1gで 1×10^9 PFUのAdCMVCEAの腫瘍内接種を1回又は2回受けたイン・ビトロでCEA形質導入されたD54 MG腫瘍内でのCOL-1の濃度は $4.8 \pm 5.6\%$ ID/gで、これは重さが0.1-1.4gのLacZ形質導入D54 MG腫瘍の場合の $1.8 \pm 0.7\%$ ID/gと比較してかなり高かった($P = 0.02$)。重さが0.5-1.5gのLS174Tヒト結腸腫瘍内のCOL-1の濃度は $3.7 \pm 1.8\%$ ID/gでCEAで形質導入されたD54 MG腫瘍($P = 0.35$)の場合と類似していた。3つの動物グループに関して血液中の放射能でラベルしたCOL-1の濃度はそれぞれ 5.2 ± 3.0 , 6.3 ± 1.8 、あるいは $2.2 \pm 1.4\%$ ID/gであった(表I)。CEA形質導入D54 MG腫瘍グループ内の ^{131}I でラベルしたCOL-1の血液レベルはLacZで形質導入したD54 MG腫瘍グループ($P = 0.38$)と同様であったが、CEAで形質導入したD54 MGグループの血液レベルはLS174T腫瘍グループ($P = 0.02$)よりかなり高かった。これはLS174T腫瘍を有する動物(4)内でCEAが循環して、急速にクリアされた ^{131}I でラベルされたCOL-1-CEA錯体の形成がもたらされた結果である。100 μ Ci ^{131}I でラベルしたCOL-1の腹膜内接種の2日前に 2×10^7 PFU AdCM

V C E A を 1 回腫瘍内注射を受けた 0.4-0.6 g の重さの形質導入されない D 54 M G 腫瘍内の C O L - 1 の濃度は抗体接種から 4 日後で $1.5 \pm 0.7\% \text{ I D/g}$ で、これは $2 \times 10^7 \text{ P F U AdCMV LacZ}$ ($P > 0.05$) の腫瘍内接種後に同じ重さ範囲の形質導入されない D 54 M G 腫瘍のものと同様であった（表 I）。従って、C O L - 1 の最も高い摂取は高力価 AdCMV C E A を追加的に当該箇所に接種後にイン・ビトロで C E A 形質導入した D 54 M G 腫瘍内で起きた。

3 つの実験グループで構成される 1 つの実験で得られた T / N T 摂取比は表 II に示しており、C E A 形質導入 D 54 M G 腫瘍 ($P < 0.01$) では 0.9-8.8 の範囲であり、L S 174 T 腫瘍を有する動物 ($P < 0.01$) では 1.9-11.5 であった。筋肉、骨、及び小腸では比率が高かった。対照的に、L ac Z 形質導入 D 54 M G 腫瘍をもった動物における T / N T 摂取比率はより低く、0.3-2.2 の範囲であったが、組織によってかなりの違いが存在した ($P < 0.01$)。個々の組織間での T / N T 比率の違いは 3 つのグループの間でかなり違っていた（表 II）。T / N T 比率の全体的な違いを判定するために、各グループの 9 つの組織に対する実験グループ平均を計算し、それぞれ 4.2, 1.4 及び 5.3 であることが認められた。これら平均調整 T / N T 比（すべてで $P < 0.05$ ）間にかなりの違いが観察された。3 つの実験グループ間での T / N T 比率の組織固有の違いについても比較した。脾臓の場合を除いて、C E A 形質導入 D 54 M G 腫瘍グループあるいは L S 174 T 腫

瘍をもった動物と比較してかなり低い比率が LacZ 形質導入 D 54 MG 腫瘍グループで観察された。また、L S 174 T 腫瘍を持った動物と比較して、CEA 形質導入 D 54 MG 腫瘍を持った動物では腫瘍／血液、腫瘍／肺、及び腫瘍／肝臓の比率も低かった。 ^{131}I でラベルした COL-1 の生体分布の調査でも、CEA 形質導入 D 54 MG 腫瘍異種移植を持った動物では、L S 174 T 腫瘍を持った動物の場合と同様、ほとんどの組織で T/TN 摂取比率は同様の低さを示した。

表 II

腫瘍を有する無胸腺ヌード・マウス^aにおける ^{131}I でラベルした COL-1 MAb の腫瘍 / 正常組織の摂取比率

組織	T / NT 摂取比率 (平均 \pm SD) ; 接種 5 日後		
	AdCEA D54 MG	AdLacZ D54 MG	SL174T
血液	0.9 \pm 0.6	0.3 \pm 0.1	1.9 \pm 0.6
肺	1.6 \pm 1.1	0.6 \pm 0.4	2.8 \pm 0.9
肝臓	3.5 \pm 2.4	1.3 \pm 1.1	5.4 \pm 2.2
小腸	6.4 \pm 4.5*	1.9 \pm 0.6	8.7 \pm 3.8*
脾臓	2.3 \pm 1.8*	1.5 \pm 1.9*	2.0 \pm 1.4*
腎臓	4.8 \pm 3.7*	1.8 \pm 1.8	5.9 \pm 2.1*
皮膚	3.0 \pm 2.0*	0.8 \pm 0.3	2.9 \pm 1.0*
骨	6.9 \pm 5.8*	2.0 \pm 1.0	6.2 \pm 3.4*
筋肉	8.8 \pm 6.2*	2.2 \pm 1.0	11.5 \pm 9.3*

a : イン・ビトロ及び／又は当該箇所で形質導入された D 54 MG 腫瘍異種移植あるいは L S 174 T 結腸癌異種移植を有する無胸腺ヌードマウスに 3

00 μ Ci 131 I ラベル C O L - 1 を腹膜注射し、接種から 5 日後に致死させた。

b : 腫瘍／正常組織摂取比率は腫瘍の% I D / g を正常組織の% I D / g で割った数値である。

c : 各組織の T / N T を 3 つの動物グループ間で比較した。

それらは*をつけたグループを除いてかなり違っていた (p < 0.05)。

C O L - 1 接種 1 及び 2 日前と抗体接種 2 日後に 1×10^9 P F U Ad C M V C E A の腫瘍内接種を 2 回受けた D 54 MG 異種移植を有する動物での 131 I でラベルした C O L - 1 の生体分布を表 III に示す。

表 III

腫瘍を持った無胸腺ヌード・マウス a における 131 I でラベルされた C O L - 1 M A b の生体分布

<u>接種後の組織</u>	<u>2日後の% ID/g (平均±SD)</u>
血 液	6.5±2.2 (n=6)
Ad CEA D54 MG (1×10^9 P F U Ad CEA接種 2 回/腫瘍)	4.4±2.9 (n=6)

a : 当該箇所で形質導入された D 54 MG 腫瘍異種移植を持った無胸腺ヌード・マウスに 300μ Ci 131 I ラベル C O L - 1 を腹膜注射して、接種 2 日後に致死させた。

実施例 20

非小細胞肺癌細胞のアデノウイルス形質導入

ヒト肺癌細胞をアデノウイルス・ベクターで形質導入した。ベクターの効率に関する最初のスクリーンとして、ヒト非小細胞肺癌株をアデノウイルス・ベクター AdCMV LacZ をコード表現する LacZ で感染させた。形質導入の後、細胞を 48 時間目に取り出して、蛍光活性化細胞ソーティング (FACS) で大腸菌 β -ガラクトシダーゼ表現で検査した。これらの研究はテストされた非小細胞肺癌細胞株の高効率形質導入を裏づけた。

実施例 21

C E A cDNA をコード表現するアデノウイルスで形質導入された非小肺癌細胞内での癌性胚芽腫抗原 (C E A) のイン・ビトロ表現

細胞表面 C E A を表現し、放射能でラベルした抗 C E A 抗体を結合するためのアデノウイルスで媒介された遺伝子伝達の方法によってヒト非小肺癌細胞がどの程度誘導されるかを示した。放射能でラベルした抗 C E A 抗体は種々の腫瘍の実験的及び臨床的 R A I T において広く使用されており、最近つくられた C E A cDNA をコード表現するアデノウイルス・ベクターが入手しやすいので原理的な証明がすぐできるので C E A をこの研究に用いた。第 1 のステップとして、2 つのヒト非小細胞肺癌細胞株 (Calu-3, A427) を AdCMV C E A 細胞 1 個あたり 1 及び 10 ウィルス粒子形成単位でトランスフェクトさせた。1 P F U / 細胞の割合で AdCMV LacZ でトランスフェクトさせた同じ細胞を陰性コントロール

ルとして用いた。トランスフェクションから 2 日後の細胞膜関連 CEA を ^{125}I でラベルした抗 CEA MAb でアッセイした。その結果は放射能でラベルした抗 CEA 抗体の CEA を表現するように形質導入された Calu-3 及び A427 ヒト肺癌細胞に対する高い結合活性を示した（図 9）。この細胞表面膜上に表現された CEA の分子の数は Calu-3 と A427 細胞それぞれの 1 個あたり 1.6×10^5 および 4.4×10^5 と計算された。従って、ヒトの非小細胞肺癌細胞は遺伝子組換えアデノウイルス・ベクターと共に高い効率で形質導入され、アデノウイルスで媒介された遺伝子伝達を通じてテストされた非小細胞肺癌細胞株の細胞表面上でかなりのレベルの CEA 表現が誘導された。

実施例 22

ヒト非小細胞肺癌細胞におけるマウスGRP-Rの遺伝子誘導

次に、遺伝子で媒介したレセプタの表現を放射能でラベルしたペプチドで標的に向かわせることができるレセプタの表現を誘導する状況で適用し、従ってペプチド・レセプタを放出するマウス・ガストリン (GRP-R) をコード表現する遺伝子を用いた。第 1 の方法はヒト肺癌細胞内での GRP-R の一過性遺伝子表現を達成するためにアデノウイルス-ポリリシン媒介トランスフェクション (AdpL) の方法を用いた。感染されないコントロールとの比較での形質導入された標的細胞内での GRP-R の表現を ^{125}I でラベルしたボンベシン結合を測定してうまく実証することができた（図 10）。

従って、このレセプタが低分子重量の放射能でラベルしたペプチドによって標的に向かわせることができるレセプタの表現を誘導するために適用できる特性を示した。

実施例23

乳癌に対する遺伝子治療

本発明はグリオーマ (glioma) および乳癌細胞上での癌性胚腫抗原の高レベルの誘導を示している。この方式は治療レベルのイオン化放射線を乳癌に向かわせるための放射線／遺伝子治療戦略として開発することができる。放射能でラベルしたリガンドと共に標的に向かわせることができるレセプタあるいは抗原で細胞をそれぞれ固有に形質導入する能力は乳癌のための臨床放射線／遺伝子治療の誘導を可能にする。

グリオーマ (glioma) および乳癌細胞上での癌性胚腫高原の誘導を実証するために実験が行われた。 ^{125}I 及び ^{131}I で放射線ラベリングしたモノクローナル抗体 (M Ab) の遺伝子的に誘導された CEA 抗原に対する結合が示された。これらの知見に基づいて、遺伝子的に誘導するレセプタ／抗原を治療に必要なレベルのイオン化放射線を腫瘍細胞に向かわせるために用いることができ、この戦略は乳癌に対する実験的放射線／遺伝子治療戦略として開発することができる。

遠隔に分散している可能性が高い患者におけるいろいろな方式にも拘らず、乳癌は1年間に45,000人以上の人の死をもたらしている。乳癌の生物学は診断時に局所疾患よりむしろ全身性疾患を示唆する。RAITは全身性疾患に向かう傾向

が強いので、R A I T は転移性乳癌の措置における利用の可能性が有望である。いくつかの乳癌抗原に対するM A bが転移性乳癌のR A I T 用に開発されている。これらはC E A、ヒト乳脂小球 (H M F G) G 及び表皮膜抗原 (E M A) 、細胞成長 (L 6) 又は形質転換の一体化膜糖蛋白質トリガー、及び成長因子レセプタを含んでいる。しかしながら、R A I T による転移性乳癌措置の臨床結果はこれまでにはかばかしくなかった。乳癌に対する効果的なR A I T の開発における主な制約は放射能でラベルした抗体の十分な腫瘍局在化の達成という基本的な問題に反映している。これは、かなりのところ、標的抗原の表現の低さあるいは向標的剤としての高分子量抗体の使用に関連した生体分布の問題に関連している。さらに、乳癌用のR A I T は骨髄抑制およびH A M A 応答によっても制約を受ける。本発明は放射能でラベルした低分子量ペプチドに対する高親和性細胞表面セゼプタの表現を遺伝子的に誘導することによってこうした制約を克服することを目的としている。従って、この戦略は遠隔転移に対して放射線を照射しようとする努力において腫瘍負荷が顕微鏡的なレベルに達した時点での系統的投与による乳癌の全体的措置である。

実施例 24

通常のR A I T の改善としての遺伝子によるラジオ・アイソトープ向標的戦略 (G R I T S)

R A I T のこうした問題を克服するために、我々は高いレ

ベルのペプチド・リガンドに対する高い親和性を有する新しい膜関連レセプタを遺伝子的に誘導する戦略を考案した。腫瘍で通常表現されない膜関連レセプタを構成的プロモータの制御下でレセプタ遺伝子をコード表現する遺伝子組換えアデノウイルスの直接腫瘍内接種によって形質導入することができる。その場合、そのレセプタは腫瘍細胞の膜上に高いレベルで表現されるであろう。これによって標的とすることができる抗原の不在、あるいは通常の R A I T におけるこれら抗原のレベルの低さという問題を克服するができるであろう。膜関連レセプタはそのレセプタに対する高い親和性を有する小さなペプチド・リガンドによって認識されること、血清半減期が短いので正常な組織に対する放射線量が減ること、そして腫瘍内への貫通力が大きく均一な放射線量をつくりだすことなどの利点を有している。ペプチド・リガンドのこれらの利点は大きな抗体の貫通がゆっくりしていること、血清半減期の長さによる骨髓液抑制、抗体の抗原親和性の低さ、および H A M A 応答の発展という問題の克服を可能にしてくれる。

実施例 25

G R I T S に対するモデルとしてのペプチドレセプタシンチグラフィ (P R S)

P R S は、接種後、放射活性リガンドはこれらのリガンドに対する細胞表面レセプタを有する細胞に結合、あるいは輸送することができるというコンセプトに従っている。腫瘍細

胞上での高親和性レセプタの密度や腫瘍内のこれらのサイトを有する細胞の数が結合後に周辺の組織より高い放射活性信号を与えるのに十分な高さである場合、この信号を γ -放射検出手段を用いて示すことができる。PRSを効果的にするためにには少なくとも4つの必要な要素が存在する。第一に、レセプタに対する結合は高い密度のレセプタが存在している場合に高い親和性で起きる。第2に、レセプタ結合とプラスミドクリアランスとの間の均衡が必要である。血清クリアランスが早過ぎると、リガンド-組織レベルは最適レベル以下になるであろう。第3に、ラジオリガンドの結合はラベルされていないペプチドより高い放射能ラベル・リガンドの結合を達成するためにレセプタ・サイトで高い比活性をもって瞬間的に行われるべきである。第4に、ラジオリガンドの選択がそのラジオリガンドの分布および代謝との関連で重要である。

局所疾患の措置のためのGRITSを開発するために、細胞表面抗原/レセプタの誘導を最初に実証した。放射能でラベルした抗CEA抗体は結腸、肺、及び乳房癌制腫瘍を含む種々の実験的及び臨床的RAIDおよびRAITにおいて広範に使われている。CEA形質導入後のscFvと比較しての放射能でラベルした完全な抗体を用いての治療効果はマウス・モデルでのヒト乳癌細胞異種移植において判定することができた。

実施例26

分散した疾患を措置するためのレセプタあるいは抗原の腫瘍固有表現

この戦略は進んだ局所化乳癌の措置には有益であるが、主要疾患から離れた場所での腫瘍の再発がこれまでの乳癌治療の失敗の原因である。形質導入あるいは転写向標的作用を転移ノジュールでの遺伝子表現の達成に用いることができる。形質導入向標的作用はDNAの伝達を悪性組織に向かわせる。転写向標的作用は組織に固有の方法でレセプタ／抗原遺伝子の表現を調節する調節配列を用いる。この戦略は細胞表面レセプタ又は抗原の表現を発現させる腫瘍及び／又は組織固有プロモータを用いた遺伝子表現の調節に基づいている。この戦略は特定の癌性細胞の大部分と正常な組織の小部分で高度に表現される調節配列の確認を必要とする。いくつかの遺伝子は乳癌細胞で過剰に表現されることが示されている。これらの遺伝子はCEA (10-30%)、erbB-2 (20-30%)、そしてDF3／ムシン1 (70-90%)を含んでいる。これら遺伝子の過剰表現は転写レベルで起きることが示されている。従って、レセプタあるいはコントロール・ゲートに結合したこれら組織固有プロモータは腫瘍細胞上でのみレセプタ又は抗原を表現するであろう。この戦略は転移性疾患の治療のために開発可能であろう。

実施例 27

乳癌治療用のR A I T を補強するための C E A の遺伝子による誘導

G R I T S を評価するために乳房癌性細胞株 (M D A - M B - 361, M D A - M B - 231, M D A - M B - 468, Z R - 7 5 - 1, S K - B R - 3, M C F - 7 及び B T - 474) を用いた。これら乳癌細胞株の多くはホタル・ルシフェラーゼ・レポータ遺伝子を用いたAdpLトランスフェクション法を用いて形質導入可能である。これら乳癌細胞株のいくつかは高度に形質導入可能で、トランスフェクトされていないコントロールと比較して高いレベルのルシフェラーゼを表現することが認められている (図11)。

乳癌細胞株はAdpLトランスフェクションを用いて形質導入させることができる。形成されるこの遺伝子構成物はAdpLトランスフェクション及び遺伝子表現に関する適切なアッセイを用いて検証することができる。G R I T S を開発する次のステップはAdCMVCEAでの感染後のCEA誘導を実証することであった。これは¹²⁵IでラベルしたCOL-1 MAbのトランスフェクトされた乳癌細胞とトランスフェクトされていない乳癌細胞へのイン・ビトロでの結合の分析によって達成された (図12)。いくつかの乳癌細胞株はAdCMVCEAアデノウイルスで形質導入させて、放射能でラベルされたCOL-1 MAb結合によって示されるCEAを表現させた。誘導されたレベルはグリオーマ (glioma) 細胞株に関して観察されたレベルより多少低かった。これらの乳癌細胞株に対する最適MOIを判定することができる。

転移性乳癌をトランスフェクトするためには、望ましい遺

伝子の表現を促進するために、腫瘍固有のプロモータを用いて遺伝子によって誘導されたレセプタあるいは抗原の表現を制御するのが望ましい。これによって特に転移性ノジュール上で高いレベルの細胞表面抗原あるいはレセプタの表現に的を絞ることが可能になるであろう。遺伝子組換えアデノウイルスは腫瘍固有構成物を転移性ノジュールに伝達し、その腫瘍固有プロモータを表現する細胞だけがその抗原あるいはレセプタを表現するであろう。遺伝子組換えアデノウイルスをつくるために、シャトル・ベクターが構成された。これらのシャトル・ベクターは遺伝子組換えアデノウイルス生成の第一のステップである。

実施例28

腫瘍固有遺伝子ラジオアイソトープ標的治療の治療効果の判定

遺伝子組換えアデノウイルスは転移性乳癌に伝達することができる。その後、この措置の利点について直接判定することができる。この目的のために、ヒト乳癌の異種移植をヌード・マウスに定着させ、その腫瘍をかかえたマウスを遺伝子組換えアデノウイルスで措置し、表現されたレセプタ／抗原をラジオリガンド／抗体で標的に向かわせて治療効果を達成する。腫瘍の負荷の減少や生存期間の延長を含む効果のパラメータについて動物を評価する。

実施例29

プラスミド構造

サイトメガロウイルス (C M V) を以下の戦略を用いて p A C C M V p L p A R S (+) (図14) アデノウイルス・シャトル・ベクター (R. Gerardから入手) 内で D F 3 | M U C | 遺伝子からのプロモータ領域と置き換えた： 1) D F 3 プロモータ領域を温度勾配を持った Stratagene Robocycler 内でヒト・ゲノム D N A からのポリメラーゼ鎖反応 (P C R) によって増幅した (ポジション -725 から +31、 Genbank アクセス番号. L 06162)。このプロモータ領域は M C F - 7 乳癌細胞内での C A T アッセイで組織固有表現を有していることが示されている (Abe 及び Kufe, 1993, P N A S 90: 282)。上流プライマー 5' G G C G G C C G C T C C T G G C C A G T G G T G G A G 3' は Not I 制限酵素サイトを有しており、下流プライマーである 5' A G A A T T C A G G C A G G C G C T G G C T G C T T G A G A G 3' は Eco R I 制限サイトを含んでいた (下線は制限サイトを示す)。

P C R 条件は Promega P C R 緩衝液、 1.5 mM M g C l₂、 2 00 mM d N T P, 50 mM 各プライマー、そして 1.5 単位 T aq (Promega)、94°C、1 分間、70-74°C アニーリング 1 分間、72°C 延長 1 分間、35 サイクルである。P C R 生成物サイズはゲル電気泳動で確認された。第 2 に、P C R 生成物は T A クローニング・ベクター内にクローニングされた (Novagen)。このプラスミドを Eco R I 及び Not I で消化して、アデノウイルス・シャトル・ベクター p A C C M V p L p A R S (+) にクローニングするために適当なサイトを有するプロモータを放出させた。次に、シャトル・ベクターを Eco R I 及び Xho I で制限消化

した。発生された 3 Kb フラグメントをゲルから取り出して、生成し、非ホスホリル化した。このシャトル・ベクターを次に *Not* I 及び *Xho* I で消化して、5 Kb フラグメントを単離させた。つくられた 3 つのフラグメントを次に共に結縁させてプラスミド pD F 3 pL A R S (+) を形成した（図 15）。

シャトル・ベクター pA C C M V pL pA R S (+) は pD F 3 pL pA R S (+) プラスミド内に保持された pUC18 プラスミドからのポリクローニング・サイトを含んでいる。pD F 3 pL pA R S (+) にクローンされたすべての遺伝子はこのポリリンカー領域内にクローンされた。これらにはガストリン放出ペプチド・レセプタ (*Xba* I) 、癌性胚腫コントロール・ゲート (*Kpn* I / *Xba* I) 、及び表皮成長因子 (*Kpn* I / *Xba* I) （図 16-18）。

実施例 30

遺伝子表現

用いられた細胞株は HeLa (DF 3 非表現) 及び MCF-7 (DF 3 乳癌細胞株) である。細胞は DMEM (HeLa) あるいは DMEM/F12 (MCF-7) 10% FBS 1% グルタミンに保持された。それぞれ 5×10^5 又は 7.5×10^5 HeLa あるいは MCF-7 細胞を 6-ウェル組織培養皿の各ウェルにプレートした。24 時間後、これらの細胞をアデノウイルス-ポリリシン法 (AdpL, Curiel, 1994, Nat. Immun. 131: 141-164) を用いて CMV あるいは DF 3 プロモータの制御下でホタル・ルシフェラーゼ遺伝子をコード表現するプラスミドを

トランスフェクトした。細胞は陰性コントロールとして疑似トランスフェクトされた。3つのウェルは各条件および細胞株毎にトランスフェクトされた。200mlのヘペス緩衝食塩水(HBS)内にエンドトキシンを除いたプラスミド6mgを入れたものを100mlのポリリシン接合アデノウイルスと混合して、室温で30分間培養した。DNAアデノウイルスを300mlのHBS内に4mgの遊離ポリリシンを入れたものに加えて、さらに30分間培養した。この培養中に、培養液を前にプレートした細胞から取り出して、各ウェルあたり2%FBSの0.5ml培養液と取り替えた。AdpL混合物を各ウェルに付加した。これらのプレートを37°Cの温度で1.5時間培養して、その後、3mlの成長培養液を各ウェルに加えた。培養24時間後に、その培養液を取り出し、新鮮な成長培養液と取り替えた。24時間後、細胞のホタル・ルシフェラーゼ酵素を調べた。ホタル・ルシフェラーゼ・レポータ・アッセイ・キット(Promega)を用いた。細胞は300ml細胞溶解緩衝液内で溶解した。20mlのサンプルをルシフェラーゼ・アッセイ緩衝液100mlに加えた。ルシフェラーゼ表現を光度計で測定して相対光単位(RLU)として判定した(10秒カウント、3組サンプル)。蛋白質定量キット(BioRad)を用いて細胞溶解物の可溶性蛋白質含有量について判定した。RLUはmg可溶性蛋白質で補正してプロットした。

実施例31

結果

C M V プロモータは哺乳動物細胞内でいろいろな形態で遺伝子表現を促進する。D F 3 / M U C 1 遺伝子は乳房癌性腫瘍の大部分で過剰表現される。D F 3 遺伝子からのプロモータ領域はD F 3 遺伝子を表現する細胞内での遺伝子表現を促進するだけである。ホタル・ルシフェラーゼの表現はC M V プロモータ又はD F 3 プロモータの制御下でプラスミドでトランスクレクトされた後、HeLa (D F 3 非表現) 及びM C F - 7 (D F 3 表現) 内で判定された。C M V プロモータで制御されるルシフェラーゼ遺伝子表現はHeLa及びM C F - 7 細胞の両方で観察されたが、表現のレベルはHeLa細胞における方がM C F - 7 細胞の場合と比較して5倍高かった(図19)。D F 3 プロモータの制御下でのM C F - 7 細胞におけるルシフェラーゼの表現はHeLa細胞におけるより37倍高かった。D F 3 プロモータはM C F - 7 細胞におけるC M V プロモータのように効果的ではなかった(21倍低かった)。疑似的にトランスクレクトされた細胞ではルシフェラーゼ表現は観察されなかった。

実施例32

A d C M V C E A による卵巣癌細胞のトランスクレクション

追加的な実施例は卵巣癌性腫瘍を用いて得られたものである。この点で、標的細胞はヒト卵巣癌性腫瘍細胞株であるS K O V 3 . i p l であった。細胞は75cm² フラスコに入れられ(1 - 2 × 10⁶ 細胞/フラスコ)、その後、1 細胞あたり10 P F U の割合でA d C M V C E A あるいはA d C M V L a c Z のいず

れかで感染させた。感染されない SKOV3.ip1細胞についてもテストされた。24-72時間後、細胞を取り出して、非ラベルCOL-1抗CEA抗体結合あるいは¹²⁵IでラベルしたCOL-1結合について間接免疫蛍光及び免疫組織化学で分析した。ヒト結腸癌細胞株LS174TをCOL-1結合について陽性コントロールとして用いられた。COL-1免疫組織化学に関する結果を表4に示す。

表 4

AdCEA感染SKOV3.ip1細胞に関する免疫組織化学

<u>細胞</u>	<u>抗 体</u>	<u>結 果</u>
SKOV3	COL-1	陰性
LS174T	COL-1	陽性
SKOV3/AdCEA	COL-1	陽性
LS174T	なし	陰性
SKOV3/AdCEA	なし	陰性

免疫蛍光での測定結果は95%以上のAdCMVCEA感染SKOV3.ip1細胞がCEAを表現した。放射能でラベルされたCOL-1結合に関する結果を図20に示す。これらの結果は、CEA表現アデノウイルスであるAdCMVCEAがCEA表現を誘導することができ、従ってヒト卵巣癌性腫瘍細胞に¹²⁵IでラベルしたCOL-1抗体を結合させ、この結合はトランスフェクト後少なくとも72時間、構成的にCEAを表現するLS174T細胞より2倍以上のレベルで存続し

た。

本発明は既存の R A I T 方式を改善するために用いることができる遺伝子治療戦略を開発した。この目的のために、C M V プロモータで促進されて C E A c D N A をコード表現する遺伝子組換えアデノウイルス・ベクターが構成され、放射能でラベルされた抗体のための標的として C E A 表現上の C E A 表現の遺伝子による誘導を達成した。この A d C M V C E A ベクター構成物の標的細胞形質導入における有効性は抗 C E A C O L - 1 M A b を用いての間接免疫蛍光測定で明らかである。さらに、免疫組織化学分析は培地中に維持されている A d C M V C E A 形質導入 D 54 M G 細胞に対するラベルされない C O L - I のかなりの結合を示した。さらに、放射能ラベル結合アッセイは、A d C M V C E A 形質導入 D 54 M G 細胞に対する ¹³⁵ I ラベル C O L - 1 結合に関するデータが示しているような A d C M V C E A の D 54 M G を形質導入して C E A を表現する能力を裏づけた。D 54

M G 細胞のイン・ビトロでの形質導入を行い、その後にイン・ビボで定着した D 54 M G 異種移植内に A d C M V C E A を 1 回、あるいは複数回接種することで、免疫組織化学分析により、C E A 陽性腫瘍細胞の存在が実証された。腹膜内に投与された ¹³¹ I でラベルされた C O L - 1 M A b は外部シンチグラフィーによる画像形成で示されるように腫瘍に局在化した。生体分析調査で正常の組織との対比で腫瘍内の放射能でラベルされた C O L - 1 抗体のかなりの摂取が確認

された。従って、本発明はアデノウイルスで媒介された遺伝子伝達がイン・ビトロで D 54 MG 細胞の表面上に高いレベルの CEA 表現をつくりだすことを示している。さらに、本発明は腫瘍異種移植内への放射能でラベルされた抗体の局在化の促進を示すことで、イン・ビボでも成功を収めた。

CEA は現在のところ本発明で述べられた遺伝子治療戦略において誘導可能な腫瘍標的のひとつとして用いられた。この選択は放射能でラベルされた抗 CEA 抗体が結腸腫瘍、肺及び乳房癌性腫瘍の実験的及び臨床的放射線免疫検出 (RADI) 及び RAIT で広範に使われてきているという事実に基づいてなされたものである (155-169)。この点で、CEA は良く特徴が把握された分子量 180,000 の糖蛋白質オンコフェータル抗原であり、形質変換能力をもっていることは確認されていない。最近、Hefta らによつて、cDNA クローン及び全長 CEA をコード表現するゲノム性クローンがひとつの表現ベクターにサブクローンされ、チャイニーズ・ハムスターの卵巣とマウス L 細胞線維芽にサブクローンされた。その後、Robbins らが間接免疫蛍光で測定して、ヒト CDA cDNA をコード表現するレトロウイルス構成物による MC-38 マウス。アデノカルチノーマ細胞株の形質導入の成功例を示した。細胞のクローンは高いレベルの CEA を表現するヒト結腸癌細胞株内に見いだされるのと同様のレベルの細胞表面 CEA を表現する細胞のクローンが得られた。CEA 形質導入 MC-38 は無胸腺ヌード・マウス内で成長して CEA を

表現することが示されており、¹²⁵Iでラベルした抗CEA COL-1抗体はこれらイン・ビトロでトランスフェクトされた腫瘍をイン・ビボで標的に向かわせることが示されている。従って、CEAはRAIDおよびRAIT戦略の分野で適切な腫瘍マーカーとして使われてきている。

本発明はRAITを達成する遺伝子戦略を開示し、この方式に関して指摘されてきた制約の一部を克服する。成功的なRAITに対する制約は主に腫瘍サイトでの標的可能な抗原の表現が不十分さに原因が求められていた。この点で、何人か研究者はヒト腫瘍異種移植内の腫瘍抗原含有量と放射能でラベルされた抗体の局在化との間の直接の関係を実証した(3-6)。この考え方に基づいて、腫瘍細胞上での標的抗原をさらに表現させるための戦略が開発された。この方式とは対照的に、本発明は遺伝子治療戦略を用いて腫瘍細胞内での標的可能細胞表面抗原あるいはレセプタの表現を増大させる方法を教示する。開示されたこの遺伝子による形質導入方式の利点は：(a)腫瘍に関連した抗原の構成的表現は必要とされないこと、(b)腫瘍細胞が放射能でラベルされた抗体あるいはペプチドの腫瘍から正常な組織への向標的作用を大幅に改善する可能性のある新しい標的抗原あるいはあれせふたを表現するするように変性させられる、(c)アデノウイルスに媒介された遺伝子形質導入が効率的に行われ、腫瘍細胞1個あたり1個のウイルスを必要とするだけである、そして(d)領域的投与を通じての複製欠陥アデノウイルス構成物

の腫瘍内接種、及び系統的投与によって遺伝子伝達を行うことができる。

前にも述べたように、生体分析データは AdCMVCEA 形質導入 D54 MG 腫瘍内での COL-1 の高い血液レベルと血液、肺、及び肝臓における LS174T 腫瘍グループにおけるより高い T / N T 摂取比率を示した。この点で、イン・ビボでの結果があまりうまく行かなかつたことの原因と考えられるいくつかの技術的な制約にはこれら最初の実験で腫瘍内に導入された AdCMVCEA の力価の低さがある。加えて、ウイルス接種体が 1 回の注射で投与された。これらの制約を克服するために、移植の前にイン・ビトロでの形質導入が組み合わせて行われ、同時に腫瘍内に注射されるウイルス粒子の数が増大された。さらに、形質導入を促進するために 2 日間連続で接種が行われた。最後に、当該箇所だけでの大きな数のウイルス粒子の 2 回の接種についての評価が行われた。この目的のために、腹膜内に投与された ¹³¹I でラベルされた COL-1 MAb による腫瘍局在化がうまく行われ、LS174T 陽性コントロール異種移植で見られるのと同様の局在化と同程度であることが認められた。

要約すると、本発明は、放射能でラベルされたリガンドで容易に標的とされる新しい膜関連分子を表現するための当該箇所での腫瘍の遺伝子による誘導を通じて RIA を改善する新しい戦略の実際的な応用を示している。ひとつの実施の形態で、この戦略は効率的で急速な形質導入を達成するため

のアデノウイルス・ベクターの直接的な腫瘍内接種に関係している。領域的な投与（例えば、腹膜転移に対する腹膜内注射など）によって十分な形質導入を達成することが可能になる筈である。腫瘍固有向標的剤を系統的に投与することはこの遺伝子治療戦略のもうひとつの課題である。系統的投与後に形質導入される腫瘍細胞で選択的に遺伝子を表現できるようするために腫瘍固有プロモータを表現するアデノウイルス・ベクターを構成することはすでに達成されている。

実施例33

ガストリン放出ペプチド・レセプタのアデノウイルスを媒介とした伝達はポンベシン類似物のイン・ビボでの特殊腫瘍局在化をもたらす

用いられた省略語は：AdCMV GPRrはマウス・ガストリン放出ペプチド・レセプタを表現する遺伝子組換えアデノウイルス・ベクター、AdCMVLacZは大腸菌β-ガラクトシダーゼ遺伝子、AUCは曲線下の領域、CEAは癌性胚腫抗原、CMVはサイトメガロウイルス、i.p.は腹膜内、 $[^{125}\text{I}] - \text{mI} \text{p}$ - ボンベシンは $[^{125}\text{I}] - \text{mI} \text{P} - \text{Des} - \text{Met}^{14} - \text{ポンベシン}$ (7-13) NH₂, moiは感染の多重性、mGPRrはマウス・ガストリン放出ペピチド・レセプタ、MRTで平均残留時間、PBEはpH7.2の0.1Mホスフェート緩衝食塩水に1%仔ウシ血清アルブミン及び0.2Mエチレンジアミンテトラ酢酸を加えたもの、%ID/gは1グラムあたりの%接種量、pfuは斑点形成単位、 $t_{1/2}$ は半減期をそれぞ

れ意味する。

放射線免疫治療はモノクローナル抗体の利用に関連した種々の要因によって阻害される。これらの制約は腫瘍への貫通が制限されていること、腫瘍内抗原表現のレベルが低いことなどを含んでいる。後者の問題を克服するために、放射能でラベルされたペプチドに対する高い結合親和性を有するレセプタの表現レベルを増大するための腫瘍細胞を誘発するために遺伝子治療が用いられた。この点で、マウス・ガストリン放出ペプチド・レセプタ (AdCMVGRPr) をコード表現する遺伝子組換えアデノウイルス・ベクターと組み合わせて放射能でラベルされたポンベシン類似物を用いた。誘導された¹²⁵Iでラベルされたポンベシン・ペプチドの結合を調べるために一連のヒト癌性腫瘍細胞株をAdCMVGRPrでイン・ビトロで感染させた。生細胞結合アッセイで、検査されたすべての細胞株は高いレベルの誘発ペプチド結合を示し、放射能の60-80%程度が細胞に結合した。ヒト卵巣癌性腫瘍細胞株SKOV3.ip1が無胸腺ヌード・マウスでの生体分布および薬力学的研究での放射能でラベルされたポンベシン類似物の腫瘍内局在化のイン・ビボ分析のために選ばれた。イン・ビボでのmG R Prの遺伝子による誘発は放射能でラベルされたペプチドの選択的な腫瘍摂取と高い腫瘍対血液比率を示した。生体分布は内発的にerbB-2を表現する腹膜内SKOV3.ip1腫瘍を持った動物において¹³¹Iでラベルした抗-erbB-2モノクローナル抗体で得られたものより良好な結

果を示した。従って、本発明はさらに放射性薬物をよりうまく腫瘍細胞に向かわせるために遺伝子伝達及び放射線免疫治療を結合する新しい方法を示すものである。

従来の放射線免疫治療は固体腫瘍を通じてのモノクローナル抗体の分布の貧弱さ、投与された抗体に対するホスト抗体の発生、そして放射能が高い濃度で血液中に蓄積されることに関連した骨髄液に対する毒性などを含む多数の因子によつて制約されている。加えて、多くの腫瘍は不均一な及び／又は低いレベルの放射能でラベルされたモノクローナル抗体である腫瘍に関連した抗原の表現の低さなどの傾向を有している。従って、これらの制約を克服することを目的とした新しい方式は非常に重要である。この目的のために、本発明は効率的な当該箇所での遺伝子治療伝達方法と放射能でラベルされたペプチドとの高い親和性を有する細胞表面レセプタを用いる放射線免疫治療との結合の可能性を示す。

癌診断において画像形成のために放射能でラベルされたペプチドが用いられてきており、ソマトスタチン・レセプタ、血管作用性腸内ペプチド・レセプタ及び表皮成長因子レセプタなどの成長因子レセプタを標的に向かわせるために、現在でも開発が進められている。ペプチド類はそのサイズの小さいこと、結合親和性が高いこと、急速に腫瘍内に局在化すること、腫瘍への貫通性が高いこと、血液クリアランスが速いこと、そして腫瘍対組織比率が高いことなどを含め一般的に使われているモノクローナル抗体と比較して多くの利点を有

している。この目的のために、本発明は遺伝子組換えアデノウイルスで媒介されたシロトロピン放出ホルモン・レセプタがイン・ビトロで種々の癌性腫瘍細胞株において表現を誘発することを実証した。これは結果として、細胞が³Hでラベルしたシトロトロピン放出ホルモン・ペプチドに結合することを可能にしている。しかしながら、このレセプタのために3つのアミノ酸ペプチドに¹³¹Iをうまくラベルすることは可能ではなかった。従って、腫瘍細胞は治療目的の核種でラベルできるであろうペプチドに対する高い親和性を有するレセプタを表現するように形質導入された。この点に関して、mG R P rが14アミノ酸ペプチド・ボンベシンに対する高い結合親和性の故に選ばれた。さらに、このレセプタの内発的表現は肺及び胃腸系内の神経内分泌細胞の小さなサブセットに限定されている。従って、究極的な臨床的利用はラジオアイソトープの非腫瘍標的への局在化によって妨げられないであろう。

ボンベシンの修正7アミノ酸類似物はmG R P rへの高親和性結合を行うことができた。重要なことは、この修正類似物をイン・ビトロで用いたところ、[¹²⁵I]-Tyr-ボンベシンと比較しての脱ハロゲン化の程度が低いのでmG R P rを表現するようにトランスフェクトされた細胞内での保持時間がより長くなつたことである。このように、イン・ビトロでのヒト癌性腫瘍細胞株のパネルにおけるmG R P rのアデノウイルス・ベクターによって媒介されたmG R P rの伝達が幅広い

タイプの腫瘍におけるこうした方式を実証するために用いられた。さらに、放射能でラベルされたボンベシン類似物を有する腫瘍に向かわせるためにイン・ビボで^mG R P rを表現するために、よく特徴付けが行われたヒト卵巣癌性腫瘍のマウス・モデルが遺伝子を使って誘発された。放射能でラベルされたボンベシン類似物の生体分布および薬力学が接種後いろいろな時間に腫瘍ノジュールと一連の正常な器官で分析された。この戦略は腫瘍細胞を放射線免疫治療に対する腫瘍細胞の感作性を高めるために遺伝子治療伝達方式を適用する新しい方法を示している。

実施例 34

細胞株

American Type Culture Collection (Rockville, MD) から O V C A R - 3 , U 251 M G , L S 174 T , D 54 M G , A 427 及び W i D r ヒト癌性腫瘍細胞株を入手した。ヒト卵巣癌性腫瘍細胞株 O V - 4 は Timothy Eberline, Brigham and Women's Hospital (Boston, MA) から得た。ヒト卵巣癌性腫瘍細胞株 S K O V 3 . ipl は Janet Price, Baylor University (Houston, TX) から得た。安定的に^mG R P rを表現するマウス線維芽細胞株 B R N - 11 は J. Battey, National Cancer Institute (Bethesda, MD) から入手した。すべての細胞株は 10% 仔ウシ胎仔血清 (PAA Laboratories, New Port Beach, CA) 、 200 μ g/ml L - グルタミン、 100 μ g/ml ベニシリン、及び 25 μ g/ml ストレプトマイシンで補強した適切な培養液内に

保持した。すべての細胞株は 5 % C O₂で加湿した雰囲気内で 37°C の温度で培養した。

実施例 35

マウス・ガストリン放出ペプチド・レセプタをコード表現する遺伝子組換えアデノウイルス・ベクターの構成

アデノウイルスを表現する mG R P r は Graham の標準的な二プラスミド相同遺伝子組換え技術を用いて作成した。簡単にいうと、mG R P r 遺伝子を含んだ D N A フラグメント (NC I, Bethesda, MD の J. Battey 提供) をアデノウイルス・シャトル・ベクター pA C C M V pL pA R S (+) のポリリンカーニ (Katholieke Universiteit Leuven, Belgium の R. Gerard 提供) にサブクローンした。このプラスミドは C M V 初期プロモータ／エンハンサからのプロモータ／開始信号と S V 40 からのポリアデニル化信号を提供する。その結果つくられる遺伝子組換えアデノウイルス・シャトル・プラスミド pA C - mG R P r を用いて標準的な方法で E 1 消去、複製不能、遺伝子組換えアデノウイルスを誘導した。簡単に言うと、このシャトル・プラスミドとアデノウイルス・パッケージング・プラスミド pJ M 17 (McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada の F. Graham 提供) を市販されているリポゾーム・ベクター D O T A P (Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD) を用いて E 1 A トランス相補細胞株 293 内に共感染させた。トランスフェクトされた細胞は細胞病理効果が発現するまで保持された。新しく発生された遺伝子組換えアデノ

ウイルスは3回斑点清浄された。1回の斑点清浄の有効性確認はmG R P rに固有のプライマーを用いた直接ポリメラーゼ鎖反応によって行われた。mG R P r遺伝子であるAdM V G G R P rをコード表現する遺伝子組換えアデノウイルスは293細胞内で拡張され、CsCl傾斜遠心分離で精製された。この遺伝子組換えアデノウイルスから誘導されたゲノム性DNAは種々の制限酵素で消化され、アガロース・ゲル電気泳動で分析された。野生タイプ・アデノウイルスWT300(Princeton University, Princeton, NJのT. Shenk提供)をAdCMV G R P rから誘導されたゲノム性DNAの分析用コントロールとして用いた。アデノウイルス・ベクターは、ウイルス性p fuを直接判定するための斑点アッセイ技術を用いて細胞株293内で滴定した。

実施例36

イン・ビトロ放射能ラベル結合アッセイ

遺伝子組換えアデノウイルスによる感染が上に述べた手順で行われた。放射能ラベル結合アッセイを48時間行ってから、アデノウイルスで媒介された感染を行い、その後、4mM EDTA、0.05%KClで37°Cの温度で除去することで細胞を取り出した。切り離した細胞を一度0.1%BSA/PBS、pH7.2で洗浄して、数を数えてから1mlあたり 1×10^7 個の割合で再懸濁させた。各組の細胞を二重ポリスチレン試験管に100μlサンプルずつ画分し、その後、[125 I]-Tyr-ボンベシン(DuPont NEN Research Products, Boston, MA)100,

000cpm (100 μ l) を加えた。ラベルされていないポンベシンよりモル数10000倍以上多く加えることで非固有結合を判定した。これらの溶液を室温で1時間混合した後、PBEで洗浄して、1700 \times gで10分間遠心分離した。上澄み液を取り出してから細胞をガンマ・カウンターでカウントして、結合した放射能を判定した。次に、結合した放射能をそれら細胞に結合したcpmの付加された細胞の総量に対する割合としてプロットした。ヒト卵巣癌性腫瘍細胞株SKOV3.ip1はerbB-2に対する細胞表面レセプタを表現する。従って、erbB-2の細胞表面エピトープに対する非内部化モノクローナル抗体(e21)が用いられた(Oncologix, Inc., Gaithersburg, MD, C. Richter King提供)。e21抗体はIodogen法を用いて¹²⁵Iでラベルされ、SKOV3.ip1細胞によるイン・ビボ生細胞結合アッセイで用いられた。細胞は上に述べたように取り出して、100 μ lの2 μ g/mの¹²⁵Iでラベルされたe21抗体溶液を用いて1時間培養した。細胞を洗浄して結合した放射能を上に述べた方法で判定した。

実施例37

放射能でラベルされたペプチドのイン・ビボ生体分布

すべての生体分布調査はFrederick Research Laboratory (Frederick, MD) から入手した生後4-5週間の雌Balb/c無胸腺ヌード・マウスで行われた。ペプチドmIP-Des-Met-ポンベシン(7-13)NH₂をUAB Comprehensive Cancer Center Peptide Synthesis and Analysis Shared Fac

ilityで固相ペプチド合成を用いて合成し、別の場所で発表した。マウスに対して 2×10^7 SKOV3.ip1ヒト卵巣癌性腫瘍細胞を腹膜内接種した。細胞接種から5日後に、マウスに対して mG R Prを表現する遺伝子組換えアデノウイルス・ベクターの 1×10^9 pfuの割合で腹膜注射した。動物に対して、48時間後に $2 \mu\text{Ci}$ の $[^{125}\text{I}] - \text{mIP}$ ボンベシンを腹膜内注射した。マウスをペプチド接種後0.5, 2, 5, 15, 30分及び1, 4, 8, 12及び24時間後に致死させ ($n = 4 - 10$ / グループ)、そして以下の器官を解剖した。血液、心臓、肺、肝臓、胃、小腸、脾臓、腎臓、皮膚、骨、筋肉、子宮、腹膜筋及び甲状腺。すべての器官と腫瘍は重量が測定され、活性をガンマ・カウンターでカウントした。% IDだけが判定された甲状腺を除いて、各組織の% ID/gを計算した。

実施例38

放射能でラベルされた抗体のイン・ビボ生体分布

イン・ビボ生体分布分析のために e 21抗体を用いた。マウスに 2×10^7 SKOV3.ip1ヒト卵巣癌性腫瘍細胞を腹膜内に注射して、5日後に $5 \mu\text{Ci}$ の ^{131}I でラベルした e 21を接種した。マウスを抗体接種後5分、1及び12時間、及び1, 2, 4及び6日目に致死させた ($n = 6$ / グループ)。腫瘍及び正常な器官を解剖して、上に述べたように分析した。

実施例39

統計的分析

放射能でラベルされた抗体及びペプチドの分布と時間濃度

の変化、そして組織対血液比率データ（平均および標準偏差）を調べるために、記述的統計を計算した。組織濃度と組織対血液比率の両方に関する複数のマウスのデータから各時点での平均値を計算した。薬力学的モデル化を試みるために一定時間を基準とする平均濃度データ（% ID/g）を用いた。薬力学的パラメータは Statistical Analysis System のプログラムの N L I N 手順を用いて推定した。モデルの選択は Akaike's Information Criterion、モデルの平均平方誤差及び推定モデル・パラメータの標準誤差の最小限化、及びモデルのグラフィック的な診断に基づいて行われた。

2 つの異なった薬力学的モデル、吸収フェーズを有する 2 コンパートメント・エリミネーション・モデルを用いて抗体に対する時間濃度曲線を求めた。骨、腎臓、腹部筋、肝臓、筋肉、小腸、脾臓、胃、腫瘍、及び子宮データに関しては、この 2 コンパートメント・エリミネーション・モデルが最適であると判断された。これらのそれそれに対して、各コンパートメントのエリミネーション $T_{1/2}$ 値を C_{max} および AUC と共に計算した。血液、心臓、肺、及び皮膚データに関しては吸収フェーズを有する 1 コンパートメント・モデルが最良であると判断された。これらのそれそれに対して、エリミネーション $t_{1/2}$ 値を C_{max} 、 T_{max} 、AUC と共に計算した。

ペプチドの濃度曲線を求めるためには、吸収フェーズを有する 1 及び 2 コンパートメント・モデルを伴う 1 及び 2 コンパートメント・エリミネーション・モデルを含む 4 つの異なる

った薬力学モデルが必要であった。

骨、心臓、肝臓、脾臓、及び子宮データに関しては 1 コンパートメント・エリミネーション・モデルが最適であった。これらのそれそれに対して、エリミネーション $t_{1/2}$ を C_{max} 及び AUC と共に計算した。腹部筋、及び筋肉データに関しては吸収フェーズを有する 1 コンパートメント・モデルが最良であると判断された。これらのそれそれに対して、各コンパートメントに関するエリミネーション $t_{1/2}$ を C_{max} 及び AUC と共に計算した。血液、腎臓、及び小腸データに関しては吸収フェーズを有する 2 コンパートメント・モデルが最適と判断された。これらのそれそれに対して、各コンパートメントに対するエリミネーション $t_{1/2}$ を C_{max} 、 T_{max} 及び AUC と共に計算した。

実施例 40

マウス・ガストリン放出ペプチド・レセプタを表現する遺伝子組換えアデノウイルス・ベクターによるヒト癌性腫瘍細胞の感染

癌性腫瘍細胞の表面レセプタを遺伝子的に誘導することの有効性を判定するために、CMV プロモータの制御下で $mgRPr$ をコード表現する遺伝子組換えアデノウイルス・ベクターを構成した。得られたウイルスはポリメラーゼ鎖反応及び制限エンドヌクレアーゼ消化分析（データ示さず）によって構造的に確認した。ウイルスの機能的検証はイン・ビボ遺伝子伝達法を用いて行った。ヒト肺、結腸、及び卵巣癌性腫

癌細胞株と、ヒト・グリオーマ (glioma) 細胞株を 10ないし 100pfu/AdCMVGRPr細胞、あるいは 100pfu/コントロール・ウイルス細胞、adCMVLasZ の割合で感染させた。

生細胞結合アッセイは各感染された細胞株が [^{125}I] - T yr - ボンベシン・ペプチドを結合させる能力を有していることを示している (図21A 及び21B)。非小細胞肺癌細胞株 A 427 及び 2 つのグリオーマ (glioma) 細胞株 D 54MG と U 251 MG は、10又は 100pfu/AdCMVGRPrベクタの細胞のいずれかの割合で感染させると、加えられた放射能の 64.6 - 77.2% が細胞に結合した高いレベルの結合放射能を示した。同様に、2 つのヒト結腸癌性腫瘍細胞株、LS 174T と WiDr は 100pfu/AdCMVGRPr細胞で感染させた後、放射能でラベルされたボンベシン・ペプチドが 60% 結合することを示した。しかしながら、これら結腸癌性腫瘍細胞を 10pfu/AdCMVGRPr細胞でトランスフェクトしても、結合した放射能は 30% 程度に過ぎなかった (図21A)。これらの結果は、いくつかの細胞株は遺伝子組換えアデノウイルス・ベクターの moi 増大に対して容量依存応答性を有していることを示唆している。これらの細胞株に関して得られた値は安定して mG R P r を表現するようにつくられた BNR - 11陽性コントロール細胞株とほぼ同じであった。それと著しい対照を示すのがヒト・グリオーマ (glioma) 細胞株で、これらはすべて放射能でラベルされたペプチドが 3 - 8 % 程度しか結合しなかったが、これは AdCMVGRPr によるこれら細胞の感染がレセプタ表現

と放射能でラベルされたボンベシン・ペプチドによるその後の結合とを選択的に起こしたことを見ている。

この方式の適用可能性をさらに実証するために、一連のヒト卵巣癌性腫瘍細胞株を AdCMVGRPrで感染させた後 [^{125}I] -Tyr-ボンベシンを結合させる能力があるかどうかについて調べた。細胞株 O V C A R - 3 、 O V - 4 及び S K O V . iplを AdCMVGRPr細胞 1 個あたり 10 又は 100 pfu の割合、あるいは AdCMVLacZ 細胞 1 個あたり 100 pfu の割合で感染させ、残りは感染させなかった (図 21B) 。感染されなかった O V C A R - 3 細胞は付加された放射能の 32 % が結合することを示したが、 AdCMVGRPr 1 細胞あたり 10 又は 100 pfu で感染させるとその結合比率がそれぞれ 52.1 % と 80.9 % に増大した。 O V - 4 および S K O V 3 . ipl 細胞は 10 pfu/細胞 の割合ではそれぞれ 20 % 及び 18.4 % と同様の結合率を示した。 moi を 100 に増大させると、両方の例で O V - 4 細胞と結合した放射能の比率が 59.7 % 及び S K O V 3 . ipl と結合した比率が 70.6 % であった。従って、卵巣癌性腫瘍細胞株も AdCMVGRPr 感染後に mG R P r を表現するように誘導され、放射能でラベルされたボンベシンを結合させた。対照的に、コントロール・ウイルスである AdCMVLacZ での卵巣癌性腫瘍細胞の感染は、未知の理由で増大を示した O V - 4 細胞を除いて、未感染細胞で得られた以上の結合率の増大を示さなかった。従って、広い範囲の腫瘍タイプが遺伝子によるラジオアイソトープ向標的这种方式に使える可能性があ

る。

本発明による遺伝子を利用したアイソトープ向標的戦略の有効性を細胞表面レセプタerbB-2に向けられたモノクローナル抗体を用いたより標準的な放射線免疫治療方式と比較された。ヒト卵巣癌性腫瘍細胞株SKOV3.ip1はerbB-2を過剰表現することが知られており、従って生細胞結合アッセイで用いられた。SKOV3.ip1細胞を¹²⁵Iでラベルしたe21と共に培養した結果、それら細胞に結合した放射能は全部で96.3%を示した（データ示さず）。これはこれら癌性腫瘍細胞がe21抗体に対して高い反応性を示すこと、そしてe21抗体がイン・ビボでの分析に適していることを示した。

実施例41

[¹²⁵I] - mIP - ボンベシン及び¹³¹Iでラベルしたe21抗体の生体分布

接種から4時間後の[¹²⁵I] - mIP - ボンベシンの腫瘍局在化は[¹²⁵I] - Thy - ボンベシンよりずっと高いので、このイン・ビボでの研究のために「¹²⁵I] - mIP - ボンベシンを用いた。このボンベシン類似物の生体分布及び薬力学的特徴の特徴付けを行った。加えて、放射能でラベルされたモノクローナル抗体に対する比較を行った。

腫瘍を有する無胸腺ヌード・マウスにおける[¹²⁵I] - mIPボンベシンの生体分布に関する薬力学的パラメータ及び代表的曲線を表5及び図22を示す。これらの研究で、マウスに対してSKOV3.ip1腫瘍細胞を腹膜内注射し、その5日

後に、AdCMVGRPrを腹膜内注射した。[¹²⁵I]-mIP-ボンベシンをAdCMVGRPrの48時間後に投与し、その結果を1コンパートメント・モデルに関して示す。腫瘍内でのmIP-ボンベシンの最も高い濃度は接種30秒後の33.6±18.2%ID/gで、接種24時間後には2.5±2.8%ID/gに低下した(図22A)。放射能でラベルされたボンベシン類似物の腫瘍に対するクリアランス半減期は5.2時間であったが、血液の $t_{1/2\beta}$ は6.7時間であった(図22B)。他の組織のクリアランス半減期は3.7-11.7時間の範囲であった(図22C及び22D)。

(以下余白)

表 5

AdCMV G R Prを表現するように感染されたSKOV3.ip1腫瘍を有する無胸腺ヌード・マウスにおける¹²⁵I-mIPボンベシンの生体分布に関する薬力学的パラメータ

	<u>C_{max}</u>	<u>T_{max}</u>	<u>t_{1/2Aβ}</u>	<u>t_{1/2α}</u>	<u>t_{1/2β}</u>	<u>AUC</u>
腹部筋	47.7	--	--	0.1	6.5	160.9
血液	1.5	0.6	0.07	0.8	6.7	8.0
骨	1.1	--	--	--	7.9	12.8
心臓	0.9	--	--	--	6.6	8.3
腎臓	15.3	0.3	0.1	0.4	4.7	44.8
肝臓	9.8	--	--	--	3.5	49.2
肺	1.3	0.05	0.01	--	4.1	7.6
筋肉	3.6	--	--	0.6	7.7	12.4
皮膚	1.0	0.4	0.07	--	3.7	5.9
小腸	41.7	0.3	0.06	0.6	8.3	112
脾臓	10.9	--	--	--	4.6	71.7
胃	10.2	0.05	0.004	--	11.7	172.3
腫瘍	25.6	--	--	--	5.2	193.1
子宮	29.2	--	--	--	4.3	182.8

C_{max}は% I.D/g ; T_{max}は時間 ; t_{1/2Aβ}は時間 ; t_{1/2α}は時間 ; t_{1/2β}は時間 ; AUCは% I.D × h/g。

AdCMV G R Prを感染していない生後7日目のSKOV3.ip1腫瘍を有する動物に投与された¹³¹Iでラベルし

た e 21 抗 - erbB - 2 モノクローナル抗体の薬力学パラメータ及び代表的な曲線を表 6 と図 23 に示す。腫瘍のクリアランス $t_{1/2\beta}$ (199.5 時間) 及び $t_{1/2}$ 血液 (49.6 時間) は $[^{125}\text{I}]$ - mI P - ボンベシンで得られた値より長かった (図 23A 及び図 23B)。他の組織に関する抗体のクリアランス半減期は放射能でラベルされたボンベシン類似物で得られたものよりかなり長かった (表 6)。腫瘍内での e 21 抗体の最も高い濃度は接種 1 時間後に $100.7 \pm 82.1\% \text{ ID/g}$ であった。この値は 24 時間で $12.8 \pm 5.7\% \text{ ID/g}$ に低下した。放射能でラベルされたボンベシン類似物及び e 21 抗体に関する接種後いろいろな時間での腫瘍対血液比率を図 24 に示す。ボンベシン類似物のピーク腫瘍対血液比率は抗体の場合より 12.6 倍高かった。 $[^{125}\text{I}]$ - mI P - ボンベシンの場合、腫瘍対血液比率は最初のピーク後に低下して、その後 50 程度のレベルに上昇した (図 24A)。e 21 抗体の場合、腹膜内接種から 1 時間後にピーク腫瘍対血液比が発生し、その後、4 以下の比率に低下した (図 24B)。ボンベシン類似物に関する腫瘍対血液比率は 30 秒および 24 時間後にそれぞれ 24.8 及び 15.4 倍高かったが、それは抗体の場合と比較して血液濃度が低かったことと血液からの放射能でラベルされたボンベシン類似物のクリアランスが速かったことが主な原因である。従って、これらの結果は放射能でラベルされたペプチドの理由が血液中で長時間循環する放射能でラベルされたモノクローナル抗体の場合に起きた骨髓液に対する毒性を制限するという考え方を裏づける。

表 6

S K O V 3 . i p l 腫瘍を有する無胸腺ヌード・マウスでの¹³¹I - e 21モノク
ローナル抗体の生体分布に関する薬力学的パラメータ

	<u>C_{max}</u>	<u>T_{max}</u>	<u>t_{1/2Aβ}</u>	<u>t_{1/2α}</u>	<u>t_{1/2β}</u>	<u>A U C</u>
腹部筋	16.4	--	--	6.1	5109.3	3790.1
血 液	5.7	0.7	0.08	--	49.6	413.4
骨	1.6	--	--	8.4	271.2	207.9
心 臓	2.0	1.0	0.1	--	170.3	210.3
腎 臓	3.5	--	--	10.0	190.2	244.9
肝 臓	5.2	--	--	10.4	190.2	244.9
肺	3.5	0.7	0.08	--	36.9	188.4
筋 肉	1.7	--	--	13.5	13.5	693.0
皮 膚	3.7	1.8	0.3	--	28.1	155.3
小 腸	5.3	--	--	6.6	73.1	117.9
脾 臓	12.5	--	--	7.4	633.3	784.1
胃	21.0	--	--	11.1	ND ^a	388.4 ^b
腫瘍	64.6	--	--	9.7	199.5	1413.0
子 宮	13.1	--	--	14.4	ND	329.0

a : ND, 未定義。b : A U Cは第2コンパートメント内のエリミネーションが0になった後の0-144時間でプラズマ時間濃度を積分して計算。

ヒト卵巣癌性腫瘍の場合、米国では婦人科関連の悪性腫瘍では最も死亡率が高い。女性では腹膜内凹部内部に閉じ込められた最終段階の疾患が見つけられる場合が多い。腹膜腫瘍

のマウス・モデルにおいて、Rowlinsonらは、放射能でラベルされたモノクローナル抗体を腹膜内に伝達すると静脈投与と比較して平均50倍程度の腫瘍摂取率を示し、より高い腫瘍／血液比率は領域投与を行った後の早い時点で認められた。さらに、腹膜内伝達は卵巣癌性腫瘍を有する女性においてはより効率的であることが示されている。従って、放射能でラベルされたリガンドの腹膜内伝達による卵巣癌性腫瘍の領域的措置は投与のための好ましい経路である。さらに、卵巣癌性腫瘍の治療のためにいろいろな遺伝子治療戦略が行われており、遺伝子組換えアデノウイルス・ベクターは腹膜卵巣腫瘍の当該改質触媒での形質導入において非常に効果的で、80%以上の腫瘍細胞が導入された遺伝子を表現した。さらに、ヒト卵巣癌性腫瘍のよく特徴づけられたマウス・モデルが開発され、種々の遺伝子治療方式で用いられている。この目的のために、細胞表面レセプタerbB-2に向けられた細胞内单鎖抗体かヘルペス・シンプレックス・ウイルス・チミジン・キナーゼ遺伝子のいずれかをコード表現する種々の遺伝子組換えアデノウイルス・ベクターを用いて腹膜内腫瘍死が達成されている。両方の例で、治療効果が引き出され、生残期間が延長されたので、腫瘍細胞形質導入が達成されたことが示されている。しかしながら、いずれの例でも完全な快癒は求められなかつたので、現在の遺伝子治療戦略をさらに強化する方法が求められる。

遺伝子形質導入の生物学的効果を増強するための戦略は遺

伝子治療法の効果をさらに向上させる可能性を秘めている。腫瘍形質導入を放射能でラベルされたペプチドの誘導結合と組み合わせることで、結合されたリガンドに近接した細胞が局所放射線場に露出される結果として殺されるので、この効果が達成されるであろう。放射線治療と組み合わせて用いると、腫瘍細胞への遺伝子構成物の均一の系統的取り込みは必要ではなくなるであろう。従って、レセプタの遺伝子による誘導の利用と放射能でラベルされたペプチドの目標的作用が組み合わせられた。本発明はこうした方式を用いたイン・ビボでの局在化の薬力学に関する最初の包括的調査である。

従来の放射線免疫治療では、通常、腫瘍に関連した抗原に向けられたモノクローナル抗体が用いられている。この方式の主な制約は腫瘍摂取量が低いこと、骨髄液毒性に関する放射能でラベルされた抗体の血中濃度が高いこと、そして、均一の腫瘍分布が行われないことである。

さらに、患者は投与された抗体に対する免疫反応を示す。抗原表現のレベルが低いという問題を克服するために、動物モデルと患者の両方で放射能でラベルされた抗体の局在化の増大をもたらした腫瘍関連抗原の表現を下方調整するために系統的に投与されたサイトカインを調査した。本発明においては、放射能でラベルされたリガンドの局在化を増大するために特に腫瘍細胞上での細胞表面蛋白質の表現を遺伝子を用いて誘導するために遺伝子伝達法が用いられた。この点で、腫瘍細胞は非内発性表面レセプタを表現するために遺伝子的

に誘導することができる。本発明は CEA を表現するアデノウイルス・ベクターと共に D 54 MG 皮下グリオーマ (glioma) 異種移植の腫瘍内接種を介して CEA を表現することが可能であることを示した。これら感染された腫瘍ノジュールは、抗体摂取を示さなかったコントロールの AdCMV LasZ ウィルスを接種された動物と比較して、自然に CEA を表現するヒト結腸癌異種移植と同じ程度のレベルで ^{131}I でラベルした抗 CEA 抗体を局在化することができた。従って、本発明はイン・ビボでの腫瘍の形質導入が可能であること、そして、この形質導入が放射能でラベルされたモノクローナル抗体によって標的化される非内発性細胞表面レセプタの表現をもたらすことを示した。

しかしながら、モノクローナル抗体の臨床的利用は、依然として上に述べたような腫瘍貫通性の低さ及び骨髓液毒性の問題を引きずっている。さらに、本発明は ^{131}I でラベルした e 21 モノクローナル抗体が放射能でラベルされたボンベシン類似物の場合と比較して血液および組織からのより長いクリアランス半減期をもたらすことを示した。ペプチドは高い親和性結合、高い血管浸透性、急速な腫瘍局在化、そしてより良い腫瘍貫通性を含む多くの利点を提供する。さらに、ペプチドは急速な血液クリアランス、そして低い免疫源性を示す。さらに、 $[^{125}\text{I}] - \text{mIP} - \text{ボンベシン}$ が $[^{125}\text{I}] - \text{Thy} - \text{ボンベシン}$ と比較して mG R P r 表現細胞内での高いレベルの内部化及びより長い腫瘍内保持をもたらすことが示され

た。従って、イン・ビボでのポンベシン類似物のより高い腫瘍摂取はその内部化の程度の高さと細胞内保持時間の長さの結果であると推測できる。効率的な当該箇所でのポンベシン接種は [^{125}I] - Thy-ポンベシンと比較して $\text{mG}\text{R}\text{P}\text{r}$ 表現細胞におけるより高い内部化とより長い細胞内保持時間もたらした。従って、イン・ビボでのポンベシン類似物のより高い腫瘍摂取はその内部化の程度の高さとより長い細胞内保持時間の結果であろう。当該箇所での効率的遺伝子伝達を行ったところ、腹膜内を通じての優先的な形質導入と選択的な摂取、および [^{125}I] - mIP - ボンベシンの保持という結果をもたらした。加えて、ヒト卵巣癌性腫瘍細胞株 SKOV 3 . ipl 上での erbB-2 との反応性を示す ^{131}I でラベルしたモノクローナル抗体との比較は放射能でラベルされたペプチドでより高い腫瘍対血液比率が得られることを示した。従って、本発明は放射能でラベルされたペプチド治療の標的として機能する新しいレセプタとしての腫瘍のイン・ビボでの形質導入の利用性を示した。

本明細書では以下の資料が引用されている。

1. Kaminski, M. S., et al., N. Engl. J. Med., 329 : 459-465, 1993.
2. Press, O. W., et al., N. Engl. J. Med., 329 : 1219-1224, 1993.
3. Goldenberg, D. M., et al., Sem. Cancer Biol., 1 : 217-225, 1990.
4. Blumenthal, R. D., et al., Int. J. Cancer, 52 : 1-7, 1992.
5. Buchsbaum, D. J., et al., Med. Phys., 20 : 551-567, 1993.
6. Buchsbaum, D. J., In : D. M. Goldenberg (ed.) , Cancer Therapy with

- Radiolabeled Antibodies, 115-140, Boca Raton : CRC Press, 1995.
7. Wahl, R. L., Cancer, 73 : 989-992, 1994.
 8. Buchsbaum, D., Antibody, Immunocon. Radioph., 4 : 693-701, 1991.
 9. Scheinberg, D., et al., Cancer Res. (Suppl) 50 : 962s-963s, 1990.
 10. Meredith, R. F., et al., J. Nucl. Med., 35 : 1017-1022, 1994.
 11. Welt, S., et al., J. Clin. Oncol., 12 : 1561-1571, 1994.
 12. Goldenberg, D. M., Am. J. Med., 94 : 297-312, 1993.
 13. Meredith, R. F., et al., J. Nucl. Med. 33 : 23-29, 1992.
 14. Buchsbaum, D. J., et al., Antibody, Immunoconj. Radiopharm. 4 : 245-272, 1991.
 15. Kvols, L. K., et al., N. Engl. J. Med., 315 : 663, 1986.
 16. Fischman, A. J., et al., J. Nucl. Med., 34 : 2253-2263, 1993.
 17. Buchegger, F., et al., J. Nucl. Med., 31, 1035, 1990.
 18. Sharkey, R. M., et al., J. Natl. Cancer Inst., 83, 627, 1991.
 19. Yokota, T., et al., Cancer Res., 52, 3402, 1992.
 20. Bender, H., et al., Cancer Res., 52, 121, 1992.
 21. Colapinto, E. V., et al., Cancer Res., 50, 1822, 1990.
 22. Milenic, D. E., et al., Cancer Res., 51, 6363, 1991.
 23. Rowlinson, G., et al. Cancer Res., 47, 6528, 1987.
 24. Stewart, J. S. W., et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol., 16, 405, 1989.
 25. Zalutsky, M. R., et al., Cancer Res., 50, 4105, 1990.
 26. Kozak, R. W., et al., Cancer Res., 49, 2639, 1989.
 27. Quadri, S. M., et al., J. Nucl. Med., 34 : 938-945, 1993.

28. Greiner, J. W., et al., *Cancer Res.*, 53, 600, 1993.
29. Kuhn, J. A., et al., *Cancer Res.*, 51, 2335, 1991.
30. Shrivastav, S., et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol.*, 16, 721, 1989.
31. Msirikale, J. S., et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol.*, 13, 1839, 1987.
32. Kalofonos, H., et al., *Cancer Res.*, 50, 159, 1990.
33. Blumenthal, R. D., et al., *Cancer Res.*, 48, 5403, 1988.
34. Blumenthal, R. D., et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 84, 399, 1992.
35. Morton, B. A., et al., *Cancer Res. (Suppl.)* 50, 1008s, 1990.
36. Mausner, L. F., et al., *Med. Phys.*, 20:503-509, 1993.
37. Bradley E. W., et al., *Radiat. Res.* 64:555-563, 1975.
38. Chan, P. C., et al., *Radiat. Res.* 67:332-343, 1976.
39. Kassis, A. I., et al., *Radiat Res.* 90:362-373, 1982.
40. Adelstein, S. J., et al., *Nucl. Med. Biol.* 14:165-169, 1987.
41. Wessels, B. W., et al., *Med. Phys.* 11:638-645, 1984.
42. Jain, R. K., et al., *Cancer Res.*, 48, 7022, 1988.
43. Fujimori, K., et al., *Cancer Res.*, 49, 5656, 1989.
44. Jain, R. K., *Cancer Metastasis Rev.*, 9, 253, 1990.
45. Jain, R. K., *Int. J. Radiat. Biol.*, 60, 85, 1991.
46. Andrew, S. M., et al., *Cancer Res.*, 50, 5225, 1990.
47. Sands, H., et al., *Cancer Res.*, 48, 88, 1988.
48. Sung, C., et al., *Cancer Res.*, 52:377-384, 1992.
49. Jones, P. L., et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 22:139-143, 1986.

50. Pervez, A., et al., *Int. J. Cancer* 3 (Suppl.) : 23-29, 1988.
51. Ong, G. K., et al., *Cancer Res.*, 49 : 4264-4273, 1989.
52. Del Vecchio, S., et al., *Cancer Res.*, 49 : 2783-2789, 1989.
53. Blumenthal, R. D., et al., *Cancer Immun. Immunother.*, 33 : 351-358, 1991.
54. Schokley, T. R., et al., *Cancer Res.*, 52 : 367-376, 1992.
55. Buchsbaum, D. J., et al., In : *Targeted Diagnosis and Therapy*, J. Rodwell (ed) , Vol. III, *Targeted Therapeutic System*, P. Tyle and B. P. Ram (eds) , Marcel Dekker, Inc., NY, pp.215-255, 1990.
56. Bigler, R. E. , et al., *NATO ASI Series*, Vol.152, Plenum Press, NY (1987) . pp 409-428.
57. Wilbur, D. S., *Antibody Immunconj. Radiopharm.*, 4 : 85-97, 1990.
58. Buchsbaum, D. J., et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol.*, 25 : 629-638, 1993.
59. Roselli, M., et al., *J. Nucl. Med.*, 30 : 672-682, 1989.
60. Washburn, L. C., et al., *Nucl. Med. Biol.*, 18 : 313-321, 1991.
61. Sharkey, R. M., et al., *Cancer Res.*, 50 : 2330-2336, 1990.
62. Deshpande, S. V., et al., *J. Nucl. Med.*, 31 : 473-479, 1990.
63. Meares, C. F. et al., *Bioconjugate Chem.*, 2 : 187-194, 1991.
64. Vriesendorp, H. M., et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol.*, 17 : 815-821, 1989.
65. Eary, J. F., et al., *Clin. Nucl. Med.*, 15 : 911-916, 1990.
66. Breitz, H. B., et al., *J. Nucl. Med.*, 33 : 1099-1112, 1990.
67. Breitz, H., et al., *J. Nucl. Med.*, 31 : 724-725, 1990.

68. Kassis, A. I., et al., Radiat, Res., 105 : 27-36, 1986.
69. Kurtzman, S. H., et al., J. Natl. Cancer Inst., 80 : 449-452, 1988.
70. Mitchell, J. B., et al., Radiat, Res., 79 : 552-567, 1979.
71. Hall, E., Radiobiology for the Radiologist, 3rd Ed. pp.126-128. Lippincott, Philadelphia, 1988.
72. Hall, E., Radiobiology for the Radiologist, 3rd Ed. pp.162-177. Lippincott, Philadelphia, 1988.
73. Atcher, R. W., et al., Soc. of Nucl Med., meeting, 1987.
74. Williams, J. R., et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 24 : 699-704, 1992.
75. Atcher, R. W., et al., Int. J. Rad. Appl. Instrum. A., 39 : 283-286, 1988.
76. Bloomer, W. D., et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 10 : 341-348, 1984.
77. Link, E. M., et al., Cancer Res., 50 : 2693-2697, 1990.
78. Zalutsky, M. R., et al., Cancer Res., 54 : 4719-4725, 1994.
79. Macklis, R., et al., Science, 240 : 1024-1026, 1988.
80. Kozak, R. W., et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 83 : 474-478, 1986.
81. Brown, I., Appl. Radiat. Isot., 37 : 789-798, 1986.
82. Roeske, J., et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 9 : 1539-1548, 1990.
83. Gansow, O., In Knapp, F. F. (Ed.) New Radionuclide Generator Systems for Use in Nuclear Medicine, Washington, D. C., 1984.
84. Kumar, K., et al., J. Chem. Soc. Chem. Commun., 145, 1989.

85. Clem, R., et al., *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, 1991.
86. Mirzadeh, S., et a., *Radiochim. Acta*, 60 : 1-10, 1993.
87. Ruegg, C. L., et al., *Cancer Res.*, 50 : 4221-4226, 1990.
88. Schally, A. V., et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 47 : 89-128, 1978.
89. Falck-Pedersen. E., et al., *Molecular Pharm.*, 45 : 684-689, 1994.
90. Battey, J. F., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 : 395-399, 1991.
91. Corjay, M. H., et al., *J. Biol. Chem.*, 266 : 18771-18779, 1991.
92. Frankel, A., et al., *Cancer Res.*, 54 : 1613-1616, 1994.
93. Krenning, E. P., et al., *Eur. J. Nucl. Med.*, 20 : 283-292, 1993.
94. Lamberts, S. W. J., et al., *Endoc. Rev.*, 12 : 450-482, 1991.
95. O'Dorisio, T. M., *Regul. Pept. Lett.*, 5 : 52-55, 1994.
96. Schirmer, W. J., et al., *Surgery*, 114 : 745-752, 1993.
97. Brazeau, P., et al., *Science*, 179 : 77-79, 1973.
98. Guillemin, R., *Science*, 202 : 390-402, 1978.
99. Bauer, W. Briner, et al., *Life Sci.*, 31 : 1133-1141, 1982.
100. Cai, R., et al., *Proc, Natl. Acad. Sci., USA*, 83 : 1896-1900, 1986.
101. Vale, W., et al., *Metabolism*, 27 : 1391-1401, 1978 (Suppl.) .
102. Yamada, Y., et al., *Proc, Natl. Acad. Sci., USA*, 89 : 251-255, 1992.
103. Yamada, Y., et al., *Mol. Endocrinol*, 6 : 2136-2142, 1992.
104. Rohrer, I., et al., *Proc, Natl. Acad. Sci., USA*, 90 : 4196-4200, 1993.
105. Mosley, B., et al., *Cell*, 59 : 335-348, 1989.
106. Paul, W., *Blood*, 77 : 1859-1870, 1991.

107. Buchsbaum, D., et al., *Neurology* 40 (Suppl. 1) : 397, 1990.
108. Buchsbaum, D., et al., *Int. J. Radiat. Onc. Biol.*, 18 : 1033-1041, 1990.
109. Buchsbaum, D., et al., *Eur. J. Nucl. Med.* 10 : 398-402, 1985.
110. Buchsbaum, D. J., et al., *Int. J. Nucl. Med. Biol.* 12 : 79-82, 1985.
111. Buchsbaum, D., et al., *Cancer Res.*, 48 : 4324-4333, 1988.
112. Buchsbaum, D. J., et al., *Cancer Res.*, (Suppl) 50 : 993s-999s, 1990.
113. Ram S., et al., *Cancer*, 73 : 769-773, 1994.
114. Ram S., et al., *Cancer*, 73 : 808-815, 1994.
115. Buchsbaum, D. J., et al., *Cancer* 73 : 999-1005, 1994.
116. Muthuswamy M., et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* In Press, 1994.
117. Buchsbaum, D., et al., *Cancer Res.*, Submitted 1994.
118. Buchsbaum, D. J., *Cancer Therapy with Radiolabeled Antibodies*, D.
119. Goldenberg (ed.) CRC Press, Boca Raton, FL, pp.115-140, 1994.
120. Buchsbaum, D., et al., *The Fifth Conf. on Radioimmunodetection and Radioimmunotherapy of Cancer*, Princeton, NJ, October 6-8, 1994.
121. Srivastava P. C., et al., *Nucleosides & Nucleotides* 10 : 235-238, 1991.
122. Wahl R. L., et al., *Cancer*, 67 : 1544-1550, 1991.
123. Hasan A., et al., *J. Heterocyclic Chem.*, 30 : 1351-1355, 1993.
124. Buchsbaum, D. J., et al., *Recent Results in Cancer Research*, M.Wannenmacher, (ed.) , Springer-Verlag, New York, In Press, 1995.

Roberson P. L., et al., The Fifth Conf. on Radioimmunodetection and Radioimmunotherapy of Cancer, Princeton, NJ, Oct. 6-8, 1994.

125. Safavy A., et al., Bioconjugate Chem., 4: 194-198, 1993.
126. Zhou, Y. G., et al., Antibody, Immunoconjugates and Radiopharm., Submitted 1994.
127. Safavy A., et al., J. Nucl. Med. 34: 29P, 1993.
128. Safavy A., et al., Antibody, Immunoconjugates, Radiopharm. 7: 85, 1994.
129. Zhou, Y. G., et al., J. Labelled Compd. Radiopharm., 35: 387-388, 1994.
130. Zhou, Y., et al., J. Labelled Comp. Radiopharm., 35: 318-319, 1994.
131. Safavy A., et al., J. Nucl. Med., 35: 258P-259P, 1994.
132. Roberson, P., et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol., 24: 329-334, 1992.
133. Roberson, P., et al., Antibody, Immunoconjug., and Radiopharm. 5: 397-402, 1992.
134. Roberson, P.L., et al., Cancer 73: 912-918, 1994.
135. Culver, K. W., et al., Science 256: 1550-1552, 1992.
136. Ram, Z., et al., Cancer Res., 53: 83-88, 1993.
137. Nabel, G. J., et al., Human Gene Therapy 5: 57-77, 1994.
138. Herz, J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90: 2812-2816, 1993.
139. Becker, T. C., et al., Meth. Cell Biol., 43: 161-189, 1994.
140. Feng, M., et al., Cancer Res., 55: 2024-2028, 1995.
141. Murano, R., et al., Cancer Res., 45: 5769-5780, 1985.

142. Murano, R., et al., *Cancer Res.*, 48 : 4588-4596, 1988.
143. Fraker, P., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80 : 849-857, 1987.
144. Buchsbaum, D. J., et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol.*, 25 : 629-638, 1993.
145. Lindmo, T., et al., *J. Immunol. Methods*, 72 : 77-89, 1984.
146. Buchsbaum, D., et al., *Cancer Res.*, In Press, 1995.
147. Meredith, R., et al., *Hum. Antibod. Hybrid.* 4 : 190-197, 1993.
148. Myers, R. B., et al., *J. Urol.*, 152 : 243-246, 1994.
149. Myers, R. B., et al., *J. Urol.*, 153 : 1572-1574, 1995.
150. Buchsbaum, D., et al., *Cancer Res.*, 48 : 4324-4333, 1988.
151. Guadagni, F., et al., *Cancer Res.*, 50 : 6248-6255, 1990.
152. Hand, P. H., et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 36 : 65-75, 1993.
153. Snedecor, G. W., et al., *Statistical Methods*. 7 th ed., Ames, IA : The Iowa State University Press, 1980.
154. Goldenberg, D. M., et al., *N. Engl. J. Med.*, 298 : 1384-1388, 1978.
155. Sharkey, R. M., et al., *Cancer Res.*, 48 : 3270-3275, 1988.
156. Bischof-Delaloye, A., et al., *J. Nucl. Med.*, 30 : 1646-1656, 1989.
157. Buchegger, F., et al., *J. Nucl. Med.*, 31 : 1035-1044, 1990.
158. Sharkey, R. M., et al., *Cancer Res.*, 50 : 2330-2336, 1990.
159. Esteban, J. M., et al., *Cancer Res.*, 51 : 3802-3806, 1991.
160. Goldenberg, D. M., *Am. J. Gastroenterol.*, 86 : 1392-1403, 1991.
161. Corbisiero, R. M., et al., *Cancer Res.*, 51 : 5704-5711, 1991.
162. Goldenberg, D. M., et al., *J. Nucl. Med.*, 33 : 803-814, 1992.

163. Blumenthal, R. D., et al., *Cancer Res.*, 52 : 6036-6044, 1992.
164. Goldenberg, D. M., et al., *J. Nucl. Med.*, 34 : 61-70, 1993.
165. Sharkey, R. M., et al., *Cancer*, 71 : 2082-2096, 1993.
166. Blumenthal, R. D., et al., *Cancer Res.*, 54 : 142-151, 1994.
167. Murray, J. L., et al., *Cancer*, 73 : 850-857, 1994.
168. Behr, T. M., et al., *J. Nucl. Med.*, 36 : 430-441, 1995.
169. Gold, P., et al., *J. Exp. Med.*, 121 : 439-462, 1965.
170. Thompson, J. A., et al., *J. Clin. Lab. Anal.*, 5 : 344-366, 1991.
171. Hefta, L. J. F., et al., *Cancer Res.*, 50 : 2397-2403, 1990.
172. Robbins, P. F., et al., *Cancer Res.*, 51 : 3657-3662, 1991.
173. Guadagni, F. , et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 26 : 222-230, 1988.
174. Rosenblum, M. G., et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 80 : 160-165, 1988.
175. Kuhn, J. A., et al., *Cancer Res.*, 51 : 2335-2339, 1991.
176. Greiner, J. W., et al., *J. Clin. Oncol.*, 10 : 735-746, 1992.
177. Greiner, J. W., et al., *Cancer Res.*, 53 : 600-608, 1993.
178. Aaronson, S. A., *Science*, 254 : 1146-1153, 1991.
179. De Santes, K., et al., *Cancer Res.*, 52 : 1916-1923, 1992.
180. Larson S., *J. Nucl. Med.*, 32 : 1189-1191, 1991.
181. Krenning, E. P., et al., *N. Engl. J. Med.*, 331 : 1116-1121, 1994.
182. Weichselbaum, R. R., et al., *Cancer Res.*, 54 : 4266-4269, 1994.
183. Kim, J. H., et al., *Cancer Res.*, 54 : 6053-6056, 1994.
184. Garver, Jr., et al., *GeneTherapy*, 1 : 46-50, 1994.
185. DiMaio, J. M., et al., *Surgery*, 116 : 205-213, 1994.

186. Osaki, T., et al., Cancer Res., 54 : 5258-5261, 1994.
187. Manome, Y., et al., Cancer Res., 54 : 5408-5413, 1994.
188. Vile, R. G., et al., Cancer Res., 54 : 6228-6234, 1994.
189. Richards, C. A., et al., Human Gene Therapy, 6 : 881-893, 1995.
190. Gazit, G., et al., Cancer Res., 55 : 1660-1663, 1995.
191. Humm, J. L., et al., Radiat. Res., 134 : 143-150, 1993.

本明細書内に述べられているすべての患者や出版物は本発明の関連する技術分野での当業者のレベルを示している。これらの特許及び出版物は、各個別出版物を参照することよってそれらが個別的、具体的に組み込まれるのと同じレベルで全体的に本明細書に組み込まれる。

当業者であれば、本発明が上に述べられた目的や利点、及びそれに本質的に付随する目的や利点を実行し獲得するのに良く適合していることはよく理解できるであろう。ここに述べられている実施例は、方法、手順、措置、分子、そして具体的な化合物は現段階での好ましい実施の形態の代表であり、具体例であり、本発明の範囲を限定することは意図していない。権利請求の範囲で定義される本発明の範囲に含まれる技術分野の当業者にはその変更やその他の利用法や容易に想起できるであろう。

特許請求の範囲

1. そうした措置を必要とする個人の腫瘍に対する放射能でラベルしたりガンドの局在化を強化する方法において、該腫瘍を、該腫瘍に固有の膜表現蛋白質をコード表現する遺伝子で形質導入するステップと；そして該個人に該蛋白質に特有に結合する放射能でラベルしたりガンドを投与するステップとで構成された方法。
2. 該腫瘍が結腸腫瘍、肺腫瘍、およびグリオーマ (glioma) 腫瘍で構成されるグループから選択される請求項 1 の方法。
3. 該腫瘍がイン・ビボでの直接腫瘍内遺伝子伝達によって形質導入される請求項 2 の方法。
4. 該腫瘍が腹膜内卵巣腫瘍および結腸腫瘍である請求項 1 の方法。
5. 該腫瘍がイン・ビボでの腹膜内遺伝子伝達によって形質導入される請求項 4 の方法。
6. 該腫瘍が脳内グリオーマ (glioma) 腫瘍である請求項 1 の方法。
7. 該腫瘍が定位的直接遺伝子伝達によって形質導入される請求項 6 の方法。
8. 該腫瘍が全身性結腸腫瘍あるいは肺腫瘍で構成されるグループから選択される請求項 1 の方法。
9. 該腫瘍が系統的遺伝子伝達で形質導入される請求項 8 の方法。

10. 該蛋白質が抗原およびレセプタで構成されるグループから選択される請求項1の方法。
11. 該抗原が癌性胚腫抗原であり、該抗原と固有に結合する放射能でラベルしたリガンドはモノクローナル抗体25、モノクローナル抗体35、モノクローナル抗体B W 494/32 T 84.66、モノクローナル抗体M N - 14、及びモノクローナル抗体N P - 4によって構成される請求項10の方法。
12. 該抗原が表皮成長因子レセプタであり、該抗原に固有に結合する放射能でラベルしたリガンドがモノクローナル抗体225、モノクローナル抗体425、モノクローナル抗体528、モノクローナル抗体L 8 A 4、モノクローナル抗体R G 83852及びモノクローナル抗体E G F R 1で構成されるグループから選択される請求項10の方法。
13. 該抗原はエストロゲン・レセプタであり、該抗原に特有に結合する放射能でラベルしたリガンドは抗エストリル-3-サルフェートである請求項10の方法。
14. 該抗原がT A G - 22であり、該抗原と特有に結合する放射能でラベルしたリガンドがモノクローナル抗体C C 49、モノクローナル抗体B 72.3、及びモノクローナル抗体C Y T - 103で構成されるグループから選択される請求項10の方法。
15. 該レセプタは表皮成長因子レセプタであり、そして該放射能でラベルしたリガンドが表皮成長因子及び形質変

換成長因子アルファで構成されるグループから選択される請求項10の方法。

16. 該レセプタがエストロゲン・レセプタであり、該レセプタに固有に結合する放射能でラベルしたりガンドがタモキシフェン、エストラジオール、エストラジオール誘導物、エストロゲン、及びフルオロアラニンで構成されるグループから選択される請求項10の方法。
17. 該レセプタがガストリン放出ペプチド・レセプタであり、該レセプタに固有に結合する放射能でラベルしたりガンドがボンベシン、ボンベシン類似物、及びガストリン放出ペプチドで構成されるグループから選択される請求項10の方法。
18. 該レセプタがインターライキン-4レセプタであり、該レセプタと固有に結合する放射能でラベルしたりガンドがインターロイキン-4である請求項10の方法。
19. 該レセプタがソマトスタチン・レセプタであり、該レセプタに固有に結合する放射能でラベルしたりガンドがオクトレオチドである請求項10の方法。
20. 該レセプタが血管作用性腸ペプチド・レセプタであり、該レセプタに固有に結合する放射能でラベルしたりガンドが血管作用性腸ペプチドであることを特徴とする請求項10の方法。
21. 該放射能でラベルしたりガンドが抗体である請求項1の方法。

22. 該放射能でラベルしたりガンドがペプチドである請求

項1の方法。

23. 該形質導入がアデノウイルスで媒介された遺伝子伝達によるものである請求項1の方法。

24. 該放射能ラベルが¹²³I、¹²⁵I、¹³¹I、³²P、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、²¹¹At、¹⁷⁷Lu、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、²¹²Pb、及び²¹²Bi、⁴⁷S_c、¹⁰⁵Rh、¹⁰⁹Pd、¹⁵³S_m、¹⁸⁸Re、¹⁹⁹Au、²¹³Biで構成されるグループから選択される請求項1の方法。

25. そうした措置を必要とする個人の腫瘍細胞を措置する方法において、

該患者に該腫瘍に固有の膜表現蛋白質をコード表現する形質導入された遺伝子を投与するステップと、

該放射能でラベルしたりガンドからの放射線が該腫瘍に伝達されるように、該個人を治療的に有効な量の該蛋白質と固有に結合する放射能でラベルしたりガンドで措置するステップ、とで構成される方法。

26. 細胞が受け取る放射線の量を増大させる方法において、該細胞に、該細胞に特有の膜表現蛋白質をコード表現する形質導入された遺伝子を提供するステップと、そして該細胞を薬学的に有効な量の該蛋白質と固有に結合する放射能でラベルしたりガンドと接触させるステップとで構成される方法。