

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-545653  
(P2008-545653A)

(43) 公表日 平成20年12月18日(2008.12.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00 Z N A	4 B O 2 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 I O 5	4 C O 8 4
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	4 C O 8 7
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H O 4 5
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-512428 (P2008-512428)  
 (86) (22) 出願日 平成18年5月16日 (2006.5.16)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年1月16日 (2008.1.16)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/018844  
 (87) 国際公開番号 W02006/124847  
 (87) 国際公開日 平成18年11月23日 (2006.11.23)  
 (31) 優先権主張番号 60/681, 305  
 (32) 優先日 平成17年5月16日 (2005.5.16)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

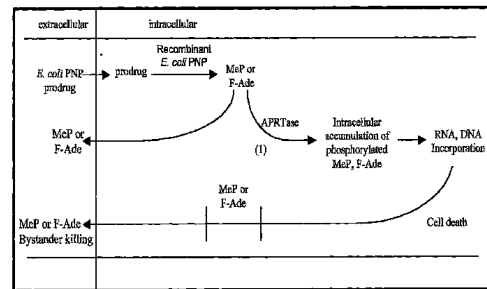
(71) 出願人 507379614  
 ユーエイビー リサーチ ファンデーション  
 アメリカ合衆国 アラバマ州 35294  
 バーミンガム サード アベニュー サ  
 ウス 1530 エイビー-1120ジ  
 (74) 代理人 100082005  
 弁理士 熊倉 禎男  
 (74) 代理人 100084009  
 弁理士 小川 信夫  
 (74) 代理人 100084663  
 弁理士 箱田 篤  
 (74) 代理人 100093300  
 弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗腫瘍組成物及び方法

(57) 【要約】

細胞内で1つ以上の外因性酵素を発現させ、さらに前記酵素の少なくとも1つの基質であるプロドラッグを投与して細胞傷害性化合物を生成させることによって、望ましくない細胞を阻害する方法及び組成物が開示される。本発明の方法及び組成物は、外因性酵素を発現する細胞と同様にバystanダー細胞に対しても阻害活性を有する。腫瘍細胞が、本発明で詳述する方法及び組成物を用いて阻害される他ならぬ標的である。アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (APRT) を過剰に発現させて、APRT過剰発現細胞と同様にバystanダー細胞も阻害する細胞毒素を産生させることによって、抗腫瘍作用が改善された方法及び組成物が提供される。大腸菌PNPの発現及び大腸菌PNP基質の投与と併せてAPRTを過剰発現させることによって、特に有効な抗腫瘍作用が提供される。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを哺乳動物細胞に導入すること、および、

前記哺乳動物細胞を前記アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼの基質の効果的な量と接触させること、を含む哺乳動物細胞を阻害する方法であって、

前記アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼの前記基質の前記アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼによる活性化により前記哺乳動物細胞に対して毒性である化合物が生成され、それによって前記哺乳動物細胞が阻害される、前記方法。

**【請求項 2】**

アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列が哺乳動物アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 3】**

アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列がヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 4】**

アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列が、配列番号 1 のアミノ酸 1-180 を含むヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 5】**

アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼの基質がプリン類似体である、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 6】**

プリン類似体が、6-メチルプリン、2-フルオロアデニンおよびこれらの組合せからなる群より選ばれる、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 7】**

ベクターがプラスミドおよびウイルスからなる群より選ばれる、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 8】**

ウイルスが、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルスおよびレンチウイルスからなる群より選ばれる、請求項 7 記載の方法。

**【請求項 9】**

哺乳動物細胞が腫瘍細胞である、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 10】**

哺乳動物細胞が微生物に感染している、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 11】**

哺乳動物細胞が異常である、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 12】**

原核生物プリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む第一の発現ベクターを哺乳動物細胞に導入すること、および、

アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む第二の発現ベクターを前記哺乳動物細胞に導入すること、および、

前記哺乳動物細胞を前記プリンヌクレオシドホスホリラーゼの基質であるプロドラッグの効果的な量と接触させること、を含む、哺乳動物細胞を阻害する方法であって、

前記プロドラッグの前記プリンヌクレオシドホスホリラーゼによる切断により前記アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼの基質が生成され、前記アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼの前記基質の前記アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼによる活性化により前記哺乳動物に毒性である化合物が生成され、それによって前記哺乳動物細胞が阻害される、前記哺乳動物細胞を阻害する方法。

**【請求項 13】**

プリンヌクレオシドホスホリラーゼが大腸菌プリンヌクレオシドホスホリラーゼである

10

20

30

40

50

、請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 1 4】

原核生物プリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む第一の発現ベクターおよびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む第二の発現ベクターが、それぞれ独立にプラスミドおよびウイルスからなる群より選ばれる、請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 1 5】

第一の発現ベクターと第二の発現ベクターが同一であり、原核生物プリンヌクレオシドホスホリラーゼおよびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼがニシストロン性核酸配列によってコードされている、請求項 1 2 記載の方法。

10

【請求項 1 6】

アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列が哺乳動物アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする、請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 1 7】

プリンヌクレオシドホスホリラーゼの基質がプリンヌクレオシド類似体である、請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 1 8】

プリンヌクレオシド類似体が、9-(2-デオキシ-β-D-リボフラノシル)-6-メチルプリン；9-(β-D-リボフラノシル)-2-アミノ-6-クロロ-1-デアザプリン；7-(β-D-リボフラノシル)-3-デアザグアニン；9-(β-D-アラビノフラノシル)-2-フルオロアデニン；2-フルオロ-2'-デオキシアデノシン；9-(5-デオキシ-β-D-リボフラノシル)-6-メチルプリン；2-フルオロ-5'-デオキシアデノシン；2-クロロ-2'-デオキシアデノシン；5'-アミノ-5'-デオキシ-2-フルオロアデノシン；9-(5-アミノ-5'-デオキシ-β-D-リボフラノシル)-6-メチルプリン；9-(β-D-リボフラノシル)-2-フルオロアデニン；9-(2,3-ジデオキシ-β-D-リボフラノシル)-6-メチルプリン；2',3'-ジデオキシ-2-フルオロアデノシン；9-(3-デオキシ-β-D-リボフラノシル)-6-メチルプリン；2-フルオロ-3'-デオキシアデノシン、及びそれらの組合せ、からなる群から選択される、請求項 1 7 記載の方法。

20

【請求項 1 9】

アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼの基質がプリン類似体である、請求項 1 2 記載の方法。

30

【請求項 2 0】

原核生物プリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードする第一の核酸および哺乳動物アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする第二の核酸を含むニシストロン性発現構築物を含む組成物であって、前記第一および第二の核酸がいずれもプロモーターに機能可能に接続されている、前記組成物。

【請求項 2 1】

ニシストロン性発現構築物がさらに、原核生物プリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードする第一の核酸と哺乳動物アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする第二の核酸の間に配置された内部リボソーム進入部位を含む、請求項 2 0 記載の組成物。

【請求項 2 2】

原核生物プリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードする第一の核酸が大腸菌プリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードする、請求項 2 0 記載の組成物。

40

【請求項 2 3】

大腸菌プリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードする第一の核酸が配列番号 3 に記載の大腸菌プリンヌクレオシドホスホリラーゼと少なくとも 90% 同一であるタンパク質をコードする、請求項 2 2 記載の組成物。

【請求項 2 4】

原核生物プリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードする第一の核酸が配列番号 4 に記載の核酸の大腸菌プリンヌクレオシドホスホリラーゼコード部分と少なくとも 80% 同一である、請求項 2 2 記載の組成物。

50

## 【請求項 25】

哺乳動物アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする第二の核酸がヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする、請求項 20 記載の組成物。

## 【請求項 26】

ヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする第二の核酸が配列番号 1 に記載のヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼと少なくとも 90% 同一であるタンパク質をコードする、請求項 25 記載の組成物。

## 【請求項 27】

ヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする第二の核酸が配列番号 2 に記載の核酸のヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼコード部分と少なくとも 80% 同一である、請求項 25 記載の組成物。

10

## 【請求項 28】

哺乳動物アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする核酸配列を含む発現ベクター。

## 【請求項 29】

哺乳動物アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼがヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼである、請求項 28 記載の発現ベクター。

## 【請求項 30】

ヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする核酸が、配列番号 2 に記載の核酸のヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼコード部分と少なくとも 80% 同一である、請求項 29 記載の発現ベクター。

20

## 【請求項 31】

ヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする核酸が配列番号 1 に記載のヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼと少なくとも 90% 同一であるタンパク質をコードする、請求項 29 記載の発現ベクター。

## 【請求項 32】

アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクター、および製薬的に許容可能な担体、を含む、細胞阻害用医薬組成物。

## 【請求項 33】

原核生物プリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを更に含む、請求項 32 記載の医薬組成物。

30

## 【請求項 34】

アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターと原核生物プリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターとが同一のベクターであり、前記アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列および前記原核生物プリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードするヌクレオチド配列がニシストロン性核酸中で制御配列に機能可能に接続している、請求項 33 記載の医薬組成物。

## 【請求項 35】

原核生物プリンヌクレオシドホスホリラーゼを認識する抗体。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は一般的には抗腫瘍組成物及び方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

従来の化学療法剤の大半は、非分裂細胞と反対に分裂細胞を殺傷する能力から抗腫瘍特異性を導く。多くの化学療法剤は、特に、それらが分裂している細胞に尤も毒性であるので、全身投与に適している。このために、特に骨髄、腸管および毛嚢のような、他の急速に増殖している組織及び細胞に許容可能な程度の損傷を生じさせる。しかしながら多くの

50

難治性腫瘍は、非常に速度の遅い増殖画分割合を有するがために正に難治性である（すなわち、比較的低いパーセンテージの腫瘍細胞がいずれかの時点で分裂している）。例えば、ホルモン抵抗性前立腺癌ではほぼ5%の細胞が分裂していると概算され、この低増殖画部分が治療への低い応答性を説明している（前記は以下の文献に記載されている：C.A. Dionne et al. 1998, Clin Cancer Res 4(8):1887-98；S. Sai et al. 1991, Hinyoukik a Kiyō-Acta Urologica Japonica. 37:881-6；及びM.V. Sadi and E.R. Barrack 1991, Cancer 67:3065-3071）。難治性大腸癌、乳癌、グリオーマ及び非小細胞肺癌では、増殖部分は、それぞれ4%、4%、10 - 30%、10 - 40%及びほぼ40%と概算されている（前記は以下の文献で詳述されている：D.L. Tay et al. 1991, J. Clin Invest 87:519-527；F. Giangaspero et al. 1987, Acta Neuropathologica 74:179-82；G.E. Pierard and C. Pierd-Franchimont 1997, Euro. J. Cancer 33:1888-1892；D.C. Crafts et al. 1977, Bulletin du Cancer 64:115-24；G. Fontanini et al. 1992, Am J Pathology 141:1285-1290；及びR.A. Vescio et al. 1990, Cancer Res 50:6095-6099）。また別の難治性腫瘍では、たとえ75%の細胞が化学療法剤の累積的暴露中に増殖していたとしても、さらにこれらの細胞の全てが処置によって完全に全滅したとしても、腫瘍は、2回のダブリングタイムで処置前の寸法を再度獲得するであろう。結果として、主として分裂細胞を殺傷してこのようなタイプの大きな腫瘍を治癒させることは非現実的であろう。この説明は、従来の化学療法剤が多く腫瘍に対して不成功である理由として一般的に認識されている。

10

したがって、望ましくない細胞（例えば腫瘍細胞）を阻害する改善された組成物及び方法に対する持続的な要求が存在する。

20

#### 【発明の開示】

#### 【0003】

##### 発明の概要

本発明にしたがって哺乳動物細胞を阻害する方法が提供される。前記方法は、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（APRT又はAPRTase）をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを哺乳動物細胞に導入する工程、及び前記哺乳動物細胞をアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼの基質の有効量と接触させる工程を含む。アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼによるこの基質の活性化によって、哺乳動物細胞にとって有害であって前記細胞を阻害する化合物が生成される。さらにまた、本発明の方法にしたがえばバスタンダー細胞が阻害される。

30

コードされるアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼは、好ましくは哺乳動物のアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、例えばヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼである。ある実施態様では、ヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする核酸配列は配列番号:1のアミノ酸1 - 180をコードする。

アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする核酸を含む発現ベクターは種々の型の任意の発現ベクターでよい。一般的な発現ベクタータイプにはプラスミド及びウイルスが含まれる。

例示的なウイルス発現ベクターにはアデノウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルス及びレンチウイルスが含まれる。

アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼのための基質はプリン類似体であり、例示的には6-メチルプリン及び2-フルオロアデニンが含まれる。

40

#### 【0004】

本発明の方法にしたがって阻害される哺乳動物細胞は対象者の腫瘍細胞であり得る。別の実施態様では、本発明の方法は、異常であるか又は疾患若しくは他の病的過程の一因となる、対象者の哺乳動物細胞を阻害する。

さらに別の実施態様では、哺乳動物細胞を阻害する方法は、原核細胞のプリンヌクレオシドホスホリラーゼ（PNP）をコードするヌクレオチド配列を含む第一の発現ベクター及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む第二の発現ベクターを哺乳動物細胞に導入する工程を含む。前記細胞は、プリンヌクレオシドホスホリラーゼの基質であるプロドラッグの有効量と接触させられる。プリンヌクレオシ

50

ドホスホリラーゼによるプロドラッグの切断によってアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼの基質が生成される。APRTの酵素的作用によるアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼのその後の活性化によって、哺乳動物細胞に有害な化合物が生成され、それによって前記細胞が阻害される。さらにまた、バスタンダー細胞が本発明の方法にしたがって阻害される。

好ましい実施態様では、前記原核細胞プリンヌクレオシドホスホリラーゼは大腸菌 (*E. coli*) のプリンヌクレオシドホスホリラーゼである。

原核細胞プリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードするヌクレオチド配列及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターは同じベクター型でも別個のベクター型でもよい。各ベクターはそれぞれ別個に、例えばプラスミド又はウイルスでもよい。好ましい実施態様では、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする発現ベクターは両方ともプラスミド、又は両方ともウイルスである。単一の発現ベクターが、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼの両方をコードする核酸を含んでもよい。例えば、場合によってニシストロン性核酸が1つの発現ベクターに含まれる。2つのタンパク質の発現を目的とするニシストロン性核酸は内部リボソーム進入部位 (IRES) を含むことができ、これにより1つのmRNAから2つのオープンリーディングフレームの翻訳が可能となる。

10

#### 【0005】

前記プリンヌクレオシドホスホリラーゼの基質には、細胞にとって無害であり、プリンヌクレオシドホスホリラーゼによって切断されてアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼのための基質を生成することができるプリンヌクレオシド類似体が含まれる。

20

原核細胞のプリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードする第一の核酸及び哺乳動物のアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする第二の核酸を含み、前記第一の核酸及び第二の核酸が両者ともプロモーターに機能可能に連結されている、ニシストロン性発現構築物を含む組成物が提供される。そのような組成物は、コードされたタンパク質を発現させる方法、特に本発明にしたがって細胞を阻害する方法で有用である。

前記ニシストロン性発現構築物がさらに、原核細胞のプリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードする第一の核酸と哺乳動物のアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする第二の核酸との間に配置された内部リボソーム進入部位を含む実施態様が好ましい。

30

具体的な実施態様では、原核細胞プリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードする第一の核酸は、大腸菌プリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードする。大腸菌プリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードするこの第一の核酸は、好ましくは配列番号:3の大腸菌プリンヌクレオシドホスホリラーゼと少なくとも90%同一であるタンパク質をコードする。さらにまた、原核細胞のプリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードする前記第一の核酸は、一般的には配列番号:4の核酸の大腸菌プリンヌクレオシドホスホリラーゼコード部分と少なくとも80%同一である。

#### 【0006】

哺乳動物のアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする第二の核酸は、場合によって及び好ましくは、ヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする。ヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする前記第二の核酸は、好ましくは、配列番号:1のヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼと少なくとも90%同一であるタンパク質をコードする。さらに場合によって及び好ましくは、ヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする前記第二の核酸は、配列番号:2の核酸のヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼコード部分と少なくとも80%同一である。

40

本発明にしたがって、哺乳動物のアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする核酸を含む発現ベクターが提供される。特に好ましい実施態様 (前記ではヒトの細胞が阻害される) では、ヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼがコードされる。

50

ヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ核酸は、好ましくは配列番号:2の核酸のヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼコード部分と少なくとも80%同一である。さらに別の実施態様では、ヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする核酸は、配列番号:1のヒトアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼと少なくとも90%同一であるタンパク質をコードする。

アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む、細胞の阻害のための医薬組成物が提供される。医薬的に許容できる担体もまたそのような医薬組成物に含まれる。

場合によって、本発明の医薬組成物のある種の実施態様は、原核細胞のプリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。

そのような組成物のさらに別の実施態様が提供される。前記実施態様では、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターと原核細胞のプリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターとは同じベクターであり、前記アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列及び前記原核細胞のプリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードするヌクレオチド配列は、ニシストロン性核酸内で調節配列と機能可能に連結される。

原核細胞のプリンヌクレオシドホスホリラーゼを認識する抗体が本発明にしたがって提供される。そのような抗体にはモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体の両方が含まれ、前記は、免疫蛍光検出、免疫沈降、イムノプロット及び/又はELISAによって大腸菌PNPを特異的に検出することができる。

#### 【0007】

##### 発明の詳細な説明

細胞内で1つ以上の外因性酵素を発現させ、さらに前記酵素に対する少なくとも1つの基質であるプロドラッグを投与して細胞傷害性化合物を生成させることによって、望ましくない細胞を阻害する方法及び組成物が開示される。本発明の方法及び組成物は、外因性酵素を発現する細胞と同様にパイスタンダー細胞に対しても阻害活性を有する。パイスタンダー細胞は、前記外因性酵素が発現されている細胞以外の細胞である。

本発明において“哺乳動物細胞を阻害する”という用語は、細胞性過程（例えば転写、翻訳及びATP依存過程）の破壊を指す。哺乳動物細胞死は阻害から生じる。

低増殖部分を有する腫瘍を阻害するように設計された、分裂細胞及び非分裂細胞の両細胞に対して活性を有する組成物及び方法が本発明にしたがって提供される。低増殖部分をもつ腫瘍を殺傷するための特別な戦略が、従来の治療に対して強い耐性を示す一般的な癌を排除するために要求される。

ある実施態様では、本発明にしたがって哺乳動物細胞を阻害する方法が提供される。前記方法は、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（APRT又はAPRTase）をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを哺乳動物細胞に導入する工程、及び前記哺乳動物細胞をアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼの基質の有効量と接触させる工程を含む。アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼによるこの基質の活性化は、哺乳動物細胞にとって有害である化合物を生じる。

#### 【0008】

APRTは、プリン/ピリミジンホスホリボシルトランスフェラーゼファミリーに属する酵素である。この酵素は、他の反応の中でとりわけ、アデニン及び5-ホスホリボシル-1-ピロリン酸からAMP及び無機ピロリン酸の生成を触媒する。プリン塩基は、細胞のAPRTaseのための基質であり、ATPaseは前記化合物をリン酸化代謝物に変換する。APRTaseは、細胞内アデニン活性化における最初の工程を実施するので、この酵素は、悪性細胞タイプ及び組織とともに大半の細胞で発現される。本発明においては、APRTは活性であり、プリン類似体を細胞傷害性化合物（特に細胞傷害性ヌクレオチド）に変換する。そのような細胞傷害性ヌクレオチド類似体は細胞のRNAに取り込まれ、RNA合成及びタンパク質合成の両合成を破壊する。さらにまた、そのような化合物は、細胞内のATP依存性過程を阻害すること

10

20

30

40

50

ができる。細胞死はそのような破壊から生じ、RNAの分解及び細胞傷害性ヌクレオチド類似体の放出を引き起こし、放出されたヌクレオチド類似体はバースタンダー細胞によって取り込まれる。そのようなプリン類似体の例にはMeP及び2-フルオロアデニンが含まれる。

さらに別の実施態様では、哺乳動物細胞を阻害する方法は、原核細胞のプリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP) をコードするヌクレオチド配列を含む第一の発現ベクター及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む第二の発現ベクターを哺乳動物細胞に導入する工程を含む。前記細胞は、プリンヌクレオシドホスホリラーゼの基質であるプロドラッグの有効量と接触させられる。プリンヌクレオシドホスホリラーゼによるプロドラッグの切断によってアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼの基質が生成される。その後のAPRTの酵素的作用によるアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ基質の活性化によって、哺乳動物細胞に有害な化合物が生成され、それによって前記細胞が阻害される。

#### 【0009】

図1は、組換え大腸菌PNPがデリバリーされ特定のプロドラッグが投与された状況下での腫瘍細胞殺傷におけるAPRTaseの役割を示している。APRTaseは、プロドラッグのPNP切断によって生成されるプリン塩基類似体 (MeP及びF-Ade) のリン酸化型への変換について律速的である。したがって、APRTaseの増加は、(1)で示した反応の平衡を有害塩基の腫瘍内蓄積へとシフトさせることができる。

Parkerら (W.B. Parker et al. 1998, *Biochem Pharmacol* 55:1673-1681) が記載したように、APRTaseはPNP毒素の活性化について律速的工程を示す。図1に示すように、APRTaseはMeP及びF-Adeをリン酸化し、腫瘍細胞内に閉じ込めて抗腫瘍作用を仲介する経路を支配する。腫瘍細胞が死んだ後、MeP及びF-Adeは再生され、放出され、近隣の腫瘍細胞に再循環してさらに新たなバースタンダー殺傷ラウンドを引き出す。

原核細胞PNP及びAPRTの投与は、いずれかの物質の単独投与と比較して細胞阻害作用の改善を可能にする。特に、本明細書に記載するように、APRT活性は投与したプロドラッグ基質から細胞毒素を産生する際の律速工程を表す。原核細胞PNPのデリバリーと併用したAPRTの過剰発現は、毒素産生の増加、細胞阻害の増加及びバースタンダー細胞阻害の増加を提供する。特に、腫瘍を処置して腫瘍細胞を阻害する方法では、原核細胞PNP及びAPRTの両物質の投与により腫瘍の退縮の増加が提供される。そのような方法は、大きな腫瘍塊に対してより短い処置期間及びより良好な効果を可能にする。

プロドラッグの大腸菌PNP切断によって生成される化合物 (例えばMeP及びF-Ade) はAPRTの基質である。大腸菌PNPによって遊離される毒素はAPRTによって細胞傷害性代謝物へと活性化され、前記代謝物は細胞のRNAに取り込まれてRNA及びタンパク質合成を破壊する。細胞死が数日にわたってもたらされ、RNAが分解され、核酸プールから前記毒素が細胞外間隙へ放出される。

#### 【0010】

##### 発現ベクター

アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ及び/又は原核細胞のPNPをコードする核酸を含む発現ベクターは、種々のタイプの発現ベクターのいずれでもよい。本発明においては、適切なベクターを適用して、哺乳動物細胞内でAPRT及び/又はPNPが発現される。そのようなベクターには、細菌のプラスミド由来及びウイルス由来ベクター (例えばアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、パポパウイルス (例えばSV40)、ボックスウイルス、偽性狂犬病ウイルス、レトロウイルス (例えばレンチウイルス)、ヘルペスウイルス及びワクシニアウイルス) が含まれる。ウイルスである発現ベクターは、複製能を有するか、条件的複製能を有するか、又は複製欠損であってもよい。種々のクローニングベクター及び発現ベクターがSambrookらの著書に記載されている (Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)。

一般的な発現ベクタータイプには、コードされる導入遺伝子の発現のために十分な又は

望ましい1つ以上の調節配列要素を含むプラスミド及びウイルスが含まれる。

本明細書で用いられる“発現ベクター”という用語は、APRT及び/又は原核細胞PNPをコードする所望の核酸コード配列を含み、さらに個々の細胞で機能可能に連結されたコード配列の発現に必要な又は所望される適切な調節配列要素を含む組換えDNA分子を指す。

本明細書で用いられる“調節配列要素”という用語は、核酸配列の発現のいくつかの局面を制御するヌクレオチド配列をさす。例示的な調節配列要素には、エンハンサー、内部リボソーム進入部位(“IRES”)、複製起点、ポリアデニル化シグナル、プロモーター、転写終了配列、及び上流調節ドメインが含まれ、これらは、細胞内でのコード配列及び/又はコードされたポリペプチドの複製、転写、転写後プロセッシング及び/又は翻訳に寄与する。

10

#### 【0011】

本明細書で用いられる“機能可能に”という用語は、転写されるべき核酸配列の転写を可能にする2つ以上の核酸分子の連結を指す(前記核酸分子は、所望のペプチド又はタンパク質をコードするmRNAを生成するために転写されるべき核酸配列、及び調節配列要素(例えばプロモーター又はエンハンサー配列)を含む)。

本明細書で用いられる“プロモーター”という用語は、APRT及び/又は原核細胞PNPをコードする所望の核酸配列と機能可能に連結されたDNA配列であって、前記核酸配列の転写を制御することができるDNA配列を指す。プロモーターは、一般的には、APRT及び/又は原核細胞PNPをコードする所望の核酸配列の上流に配置されて転写を指令するが、また別の態様でプロモーターを配置することもできる。プロモーターは、転写に必要な多様な因子(例えばRNAポリメラーゼ及び/又は他の転写因子)の特異的結合のための部位を提供することができる。

20

本発明の発現ベクターに含まれるプロモーターは、APRT又はPNPと自然界で結合しているプロモーターでもよい。また別には、異種プロモーターを用いてもよい。プロモーターは、構成的発現、細胞若しくは組織特異的発現、及び/又は調節性若しくは誘導性発現を駆動することができる。例示的な構成的プロモーターにはウイルス性プロモーター、例えばCMV、SV40及びRSVプロモーターが含まれる。例示的な構成的哺乳動物プロモーターには、ベータ-アクチンプロモーター、ユビキチン-1プロモーター及びグリセルアルデヒドデヒドロゲナーゼプロモーターが含まれる。さらに別のプロモーターが当分野では知られており、いくつかの特別なプロモーターが本明細書の実施例に記載されている。さらに別の適切な調節配列要素には、egr-1プロモーター、EF-1アルファプロモーター、WPRE調節配列要素及び低酸素症応答配列要素が含まれる。

30

#### 【0012】

本発明にしたがって投与されるアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼのための基質はプリン類似体であり、前記はアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼによって細胞傷害性ヌクレオチド類似体に変換される。そのようなプリン類似体を例示すれば、6-メチルプリン及び2-フルオロアデニンが含まれる。

本発明の方法にしたがって阻害される哺乳動物細胞は腫瘍細胞でもよい。

さらに別の実施態様では、異常であるか、又は疾患若しくは他の病的過程の一因となる哺乳動物細胞を阻害することが所望される。例えば、微生物に感染した細胞を本発明の方法にしたがって阻害し、前記細胞および微生物を排除することができる。そのような微生物には細菌、ウイルス及び原生動物が含まれる。さらに別の例では、慢性関節リウマチのように痛み又は変性を引き起こす炎症性過程に關与する細胞を阻害することもできる。

40

本発明の方法にしたがって投与されるベクターは、特定の細胞標的に誘導することができる。標的への誘導は、標的誘導部分とベクターとの結合によって達成することができる。例えば、標的誘導部分は、レセプターリガンド、抗体、レクチン、又は標的細胞(例えば腫瘍細胞)上の補体レセプターに特異的な結合パートナーでもよい。

ベクターは、本発明の実施態様のトランスフェクション又はトランスダクション強化物質と併用して投与することができる。

例えば遺伝子デリバリー化合物をウイルスベクターと一緒に用いることができる。遺伝

50

子デリバリー化合物は、細胞内へのウイルスの取り込みを促進する活性を有する。そのような化合物は米国特許出願公開公報20040204375及び米国特許出願10/520,377に記載されている。

#### 【0013】

PNP及び/又はAPRTをコードするベクターの取り込み及び/又は導入遺伝子発現を促進するためのさらに別の補助化合物を用いてもよい。そのような補助化合物を例示すれば、リボソーム処方物、アルギン酸塩処方物、又はポロキサマインストレーション（例えば以下に記載されている：K. Toyoda et al. 2001, *J Cereb Blood Flow Metab* 21(9):1125-31; Y. Yang et al. 2005, *Cancer Res* 65(17):7541-5; C.M. Varga et al. 2005, *Gene Ther* 12(13):1023-32; P.R. Clark et al. 1999, *Cancer Gene Ther* 6(5):437-46; A. Fasbender et al. 1998, *J Clin Invest* 102(1):184-93; 及びA. Fasbender et al. 1997, *J Biol Chem* 272(10):6479-89)が含まれる。

原核細胞のプリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードするヌクレオチド配列及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターは、同じタイプのベクターでも又は異なるタイプのベクターでもよい。例えば、各ベクターはそれぞれ別個にプラスミドでも又はウイルスでもよい。好ましい実施態様では、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする発現ベクターは両者ともプラスミドであるか、又は両者ともウイルスである。

本発明のある実施態様にしたがって提供される組成物は、原核細胞のプリンヌクレオシドホスホリラーゼ及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼの両方をコードする核酸を含む単一のベクターを含む。例えば、ニシストロン性核酸が1つの発現ベクターに含まれる。2つのタンパク質の発現のためのニシストロン核酸は、内部リボソーム進入部位（IRES）を含み、1つのmRNAから2つのオープンリーディングフレームの翻訳を可能にすることができる。IRESの具体例は、Jangらの論文（Jang et al. 1988, *J Virol* 62:2636-2643）に記載された脳心筋炎ウイルスのIRESである。

#### 【0014】

APRTをコードする核酸配列は好ましくは哺乳動物のAPRTである。哺乳動物のAPRTaseをコードする例示的な核酸配列には以下の文献に記載されたものが含まれる：J.M. Sikelka et al. 1983, *Gene* 22(2-3):219-28; P.J. Stambrook et al. 1984, *Somat Cell Mol Genet* 10(4):359-67; I. Lowy et al. 1980, *Cell* 22(3):817-23; J.M. Wilson et al. 1986, *J Biol Chem* 261:13677-13683; 及びA.M. Murray et al. 1984, *Gene* 31(1-3):233-40。

ヒトAPRTのcDNAは、本明細書に含まれる実施例でさらに詳細に記載するように単離される。クローニングベクター及び発現ベクター（配列番号:1のヒトAPRTをコードする核酸配列を含む）が本発明の実施態様にしたがって提供される。

原核細胞のPNPをコードする核酸配列は、好ましい実施態様では大腸菌PNPをコードする。大腸菌PNPをコードする核酸配列は、そのような配列を含むクローニングベクター及び発現ベクターも同様に、本明細書に含まれる実施例に、米国特許5,552,311号、6,017,896号、6,491,905号、6,958,318号及び7,037,718号で、及び米国特許出願公開公報2005/0214901、20040204375、2003/0228576、2003/0134819及び2003/0077268に詳細に記載されている。さらにまた、変異大腸菌PNPが米国特許7,037,718号に詳細に記載されている（前記は本発明の方法及び組成物での使用に適している）。野生型大腸菌タンパク質は本明細書で配列番号:3として詳細に記載されている。

#### 【0015】

ヒトAPRT又は大腸菌PNPをコードする単離核酸配列は、それぞれ配列番号:2又は配列番号:4に示される配列のコード部分と同一であり得る。或いは、遺伝暗号の重複性又は縮退のために、配列番号:1又は3にそれぞれ示されるヒトAPRT又は大腸菌PNPと実質的に類似する活性を有するタンパク質をコードするまた別の単離核酸を用いることができる。一般的には、ヒトAPRT又は大腸菌PNPをコードする単離核酸配列は、配列番号:2又は配列番号:4の核酸配列と少なくとも80%、85%又は90%同一である。さらに別の実施態様では、ヒト

APRT又は大腸菌PNPをコードする単離核酸配列は、配列番号:2又は配列番号:4の核酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一である。

いくつかの実施態様では、APRT及び/又はPNPをコードする核酸は、野生型タンパク質と比較して酵素活性にほとんど又は全く影響を与えない保存的アミノ酸置換のためのコード配列を含む。変異体APRT及びPNPの酵素活性は、機能アッセイ（例えば本明細書に記載する機能アッセイ）によって評価することができる。保存的に改変されたAPRT又は原核細胞PNPは、野生型タンパク質に存在するアミノ酸が化学的に類似するアミノ酸で置換されたものである。

例えば、各アミノ酸は以下の特徴の1つ以上を有すると記述することができる：電気的陽性、電気的陰性、脂肪族、芳香族、極性、疎水性及び親水性。保存的置換は、特定の構造的又は機能的特徴を有する1つのアミノ酸の、同じ特徴を有する別のアミノ酸による置換である。酸性アミノ酸にはアスパラギン酸、グルタミン酸が含まれ、塩基性アミノ酸にはヒスチジン、リジン、アルギニンが含まれ、脂肪族アミノ酸にはイソロイシン、ロイシン及びバリンが含まれ、芳香族アミノ酸にはフェニルアラニン、グリシン、チロシン及びトリプトファンが含まれ、極性アミノ酸にはアスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、アスパラギン、グルタミン、アルギニン、セリン、スレオニン及びチロシンが含まれ、疎水性アミノ酸にはアラニン、システイン、フェニルアラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、プロリン、スレオニン、バリン、チロシン及びトリプトファンが含まれ、さらに親水性アミノ酸には含まれる。アミノ酸はまた相対的なサイズの関係で記述することができる。アラニン、システイン、アスパラギン酸、グリシン、アスパラギン、プロリン、スレオニン、セリン、バリンはいずれも典型的には小さいと考えられる。

#### 【0016】

一般的には、コードされるタンパク質が保存的置換を含む場合、ヒトAPRT又は大腸菌PNPをコードする単離核酸配列は、配列番号:1又は配列番号:3の核酸配列と少なくとも95%、96%、97%、98%又は99%同一であるタンパク質をコードする。

さらに別の実施態様では、野生型タンパク質と比較して実質的に類似するか又は良好な酵素活性を有する変異体APRT及びPNPが生成され得る。変異体APRT及びPNPの酵素活性は、機能アッセイ（例えば本明細書に記載するアッセイ）によって評価することができる。一般的には、変異体ヒトAPRT又は大腸菌PNPをコードする単離核酸配列は、配列番号:1又は配列番号:3の核酸配列と少なくとも95%、96%、97%、98%又は99%同一であるタンパク質をコードする。とりわけ、使用することができる大腸菌PNPのある特別な変異体は、米国特許7,037,718号に詳細に記載されているように、M65V及びA157Vを含む。

本明細書で用いられる“単離された”という用語は、核酸又はアミノ酸が天然に存在している本来の環境から取り出され、それら分子の天然の供給源に存在している他の核酸から分離されてあることを示すことが意図された核酸又はアミノ酸を指す。

原核細胞のPNPは、高度に有害なプリン塩基へのヌクレオシドプロドラッグのグリコシド切断を仲介する。図2はそのような切断の具体的な例であり、MeP-dRからMePへの変換及び2-F-dAdoからF-Adeへの変換を示している。さらにまた、F-araA（臨床使用が承認された化学療法剤フルダリン酸の生体利用可能型）のF-Adeへの切断が示されている。

表1は、大腸菌PNPを用いたこれらの酵素反応の基礎となるカイネティクス定数を示す。

表1：大腸菌PNPに関するMeP-dR、F-dAdo及びF-araAのカイネティクス定数

プロドラッグ	$K_m$ ( $\mu M$ )	$V_{max}$ (nmol/mg/h)
MeP-dR	125	1,460,000
2-F-dAdo	22	425,000
F-araA	960	5,900

#### 【0017】

10

20

30

40

50

塩基と(2'-デオキシ)リボース-1-ホスフェートを遊離させる、(2'-デオキシ)プリンリボヌクレオシドの可逆的な加燐酸分解は、原核細胞PNPと真核細胞PNPに共通する特性であるが、哺乳動物の酵素は、それら細菌の対応物とは基本的に配列、構造及び機能が相違している(C. Mao et al. 1997, Structure 5(10):1373-1383; S.E. Ealick et al. 1990, J Biol Chem 265(3):1812-20; T.P. Zimmerman et al. 1971, Can J Biochem 49:1050-1054; 及びK.F. Jensen and P. Nygaard, 1975, Eur. J. Biochem 51:253-265)。原核細胞PNPは6量体であり(機能的な2量体セットとして機能すると考えられている)、一方、哺乳動物の酵素は3量体として存在する。さらにまた、哺乳動物の酵素は基質としてグアノシン及びイノシンのみを許容するが、例えば大腸菌PNPのような細菌の酵素はアデノシンもまた許容し、さらにいくつかのリボース改変を許容する。構造的及び機能的な相違もまた酵素遮断剤の活性に影響を及ぼす。例えばフォルマイシンは、大腸菌PNP活性を $k_i = 5 \mu M$ で停止させるが、ヒトの酵素に対しては活性を示さない。

10

プリンヌクレオシドホスホリラーゼの基質には、細胞にとって無害であり、さらにプリンヌクレオシドホスホリラーゼによって切断されてアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼのための基質を生じることができるプリンヌクレオシド類似体が含まれる。そのようなプリンヌクレオシド類似体の例には、9-(2-デオキシ--D-リボフラノシル)-6-メチルプリン; 9-(--D-リボフラノシル)-2-アミノ-6-クロロ-1-デアザプリン; 7-(--D-リボフラノシル)-3-デアザグアニン; 9-(--D-アラビノフラノシル)-2-フルオロアデニン; 2-フルオロ-2'-デオキシアデノシン; 9-(5-デオキシ--D-リボフラノシル)-6-メチルプリン; 2-フルオロ-5'-デオキシアデノシン2-クロロ-2'-デオキシアデノシン; 5'-アミノ-5'-デオキシ-2-フルオロアデノシン; 9-(5-アミノ-5-デオキシ--D-リボフラノシル)-6-メチルプリン; 9-(--D-リボフラノシル)-2-フルオロアデニン; 9-(2,3-ジデオキシ--D-リボフラノシル)-6-メチルプリン; 2',3'-ジデオキシ-2-フルオロアデノシン; 9-(3-デオキシ--D-リボフラノシル)-6-メチルプリン; 2-フルオロ-3'-デオキシアデノシンが含まれる。そのような基質の組合せは2つ以上の基質の混合物を含む。

20

野生型及び変異体大腸菌PNPとの使用に適したその他の基質は米国特許7,037,718号に開示されている。

#### 【0018】

##### 多様式方法及び組成物

細胞の障害、特に腫瘍の障害を目的とする多様式アプローチのための方法及び組成物が提供される。例えば、放射線投与又は通常の化学療法が、抗腫瘍性方法及び組成物(本発明のAPRT及び/又はPNPを含む)を強化するために意図される実施態様である。

30

したがって、ある実施態様では、本発明の方法はさらに治療薬剤の投与を含む。そのような治療薬剤は例示すれば抗腫瘍薬である。抗腫瘍薬は、例えば以下の著書に記載されている: Goodman et al., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th Ed., Macmillan Publishing Co., 1990。

そのような抗腫瘍薬を例示すれば以下が含まれる: アシピシン、アクラルピシン、アコダゾール、アクロニン、アドゼレシン、アルデスロイキン、アリトレチノイン、アロプリノール、アルトレタミン、アンボマイシン、アメタントロン、アミフォスチン、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナストロゾール、アントラマイシン、三酸化ヒ素、アスパラギナーゼ、アスペルリン、アザシチジン、アゼテパ、アゾトマイシン、バチマスタット、ベンゾデパ、ピカルタミド、ピサントレン、ビスナフィドジメシレート、ビゼレシン、ブレオマイシン、ブレキナール、プロピリミン、ブスルファン、カクチノマイシン、カルステロン、カペシタピン、カラセミド、カルベチマー、カルボプラチン、カルムスチン、カルピシン、カルゼレシン、セデフィンゴル、セレコキシブ、クロラムブシル、シロレマイシン、シスプラチン、クラドリピン、クリスナトールメシレート、シクロホスファミド、シタラピン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デシタピン、ドキシソルマプラチン、デアザグアニン、デアザグアニンメシレート、ジアジクオン、ドセタキセル、ドキシソルピシン、ドロロキシフェン、ドロロキシフェン、ドロモスタノロン、ドゥアゾマイシン、エダトレキセート、エフロミチン、エルサミトルシン、エンロプラチン、エン

40

50

プロメート、エピプロピジン、エピルピシン、エルプロゾール、エソルピシン、エストラムスチン、エストラムスチン、エタニダゾール、エトポシド、エトポシド、エトプリン、ファドロゾール、ファザラビン、フェンレチニド、フロクスウリジン、フルダラビン、フルオロウラシル、フルロシタピン、フォスキドン、フォストリエシン、フルベストラント、ゲムシタピン、ゲムシタピン、ヒドロキシウレア、イダルピシン、イフォスファミド、イルモフォシン、インターロイキンII (IL-2、組換えインターロイキンII (又はrIL2) を含む)、インターフェロンアルファ-2a、インターフェロンアルファ-2b、インターフェロンアルファ-n1、インターフェロンアルファ-n3、インターフェロンベータ-1a、インターフェロンガンマ-1b、イプロプラチン、イリノテカン、ランレオチド、レトロゾール、ロイプロリド、リアロゾール、ロメトレキソール、ロムスチン、ロソキサントロン、マスオプロコール、メイタンシン、メクロレタミンヒドロクロリド、メゲストロール、メレンゲストロールアセテート、メルファラン、メノガリル、メルカプトプリン、メトトレキセート、メトトレキセート、メトプリン、メトウレデパ、ミチンドミド、ミトカルシン、ミトクロミン、ミトギリン、ミトマルシン、マイトマイシン、ミトスパー、ミトタン、ミトキサントロン、ミコフェノール酸、ネララビン、ノコダゾール、ノガラマイシン、オルムナプラチン、オキシスラン、パクリタキセル、ペガスパルガーゼ、ペリオマイシン、ペンタムスチン、ペプロマイシン、ペルフォスファミド、ピボプロマン、ピボスルファン、ピロキサントロンヒドロクロリド、プリカマイシン、プロメスタン、ポルフィマー、ポルフィロマイシン、プレドニムスチン、プロカルバジン、ピューロマイシン、ピューロマイシン、ピラゾフリン、リボプリン、ログレチミド、サフィンゴール、サフィンゴール、セムスチン、シムトラゼン、スパルフォセート、スパルソマイシン、スピロゲルマニウム、スピロムスチン、スピロプラチン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、スロフェヌール、タリソマイシン、タモキシフェン、テコガラン、テガフル、テロキサントロン、テモボルフィン、テニポシド、テロキシロン、テストラクトン、チアミプリン、チオグアニン、チオテパ、チアゾフリン、チラパザミン、トポテカン、トレミフェン、トレストロン、トリシリピン、トリメトレキセート、トリプトレリン、ツプロゾール、ウラシルマスタード、ウレデパ、パブレチド、ベルテボルフィン、ピンラスチン、硫酸ピンクリスチン、ピンデシン、ピンデシン、ピネピジン、ピングリシネート、ピンロイロシン、ピノレルピン、ピンロシジン、ピンゾリジン、ポロゾール、ゼニプラチン、ジノスタチン、ゾレドロネート、及びゾルピシン。これらの各々は、これら又は他の細胞毒素のいずれかの医薬的に許容できる塩、エステル、アミド、水和物及び/又はプロドラッグとして、本発明の方法及び/又は組成物と併用してデリバリーすることができる。

第二のタイプの抗腫瘍治療もまたPNP及びAPRTと併用して実施することができる。例えば、PNP及びAPRTの投与前及び/又は投与後に放射線療法を腫瘍に施すことができる。放射線療法のパラメーターは以下の著書に例示されているように公知である：C.M. Washington and D. Leaver (Eds), Principles and Practice of Radiation Therapy, C.V. Mosby; 2<sup>nd</sup> ed., 2003。

さらに別の補助的治療薬を本発明の方法にしたがい、及び本発明の組成物で投与することができる。前記補助的治療薬には鎮痛剤、麻酔薬、抗生物質、抗炎症剤、栄養補助剤、ビタミン及び他の対象者にとって有益な薬剤が含まれる。

#### 【0019】

##### 組成物

細胞を阻害するための医薬組成物が提供される。前記組成物は、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。医薬的に許容できる担体もまたそのような医薬組成物に含まれる。

場合によって、本発明の医薬組成物のある種の実施態様は、原核細胞プリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。

さらに別の実施態様が提供される。この実施態様では、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクター及び原核細胞プリンヌクレオシドホスホリラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターが同じベクタ

10

20

30

40

50

ーであり、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列と原核細胞のプリンヌクレオチドホスホリラーゼをコードするヌクレオチド配列は、ニシストロン性核酸内で調節配列要素に機能可能に連結されている。

本明細書で用いられる“医薬的に許容できる”という用語は、生物学的に又は他の意味で望ましい物質であって、重大な所望されない生物学的作用を引き起こすことなく、又はその物質が含まれている医薬組成物中の他の成分のいずれかと有害な態様で相互作用しないで個体に投与することができる物質を意味する。

意図される投与態様に応じて、前記組成物は、固体、半固体又は液体投薬形（例えば錠剤、座薬、ピル、カプセル、散剤、液体または分散剤）、好ましくは正確な用量のシングル投与に適したユニット投薬形の形態を有する医薬組成物であり得る。効率的投薬処方物として、経時放出調製物が特に意図される。前記組成物は、選択された発現構築物の有効量を医薬的に許容できる担体と一緒に含み、さらに他の医薬、薬剤、担体又は稀釈剤も含むことができる。

10

#### 【0020】

固体組成物の場合、慣用的な無害な固体担体には、例えば医薬等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、シュクロース及び炭酸マグネシウムが含まれる。医薬として投与することができる液体組成物は、例えば、賦形剤（例えば水、食塩水、水性デキストロース、グリセロール、又はエタノール）中で最適な医薬補助剤とともに活性化化合物を溶解又は分散させ、それによって溶液又は分散剤を生成することによって調製することができる。所望される場合は、投与される医薬組成物はまた、少量の無害な補助物質、例えば湿潤又は乳化剤、pH緩衝剤、例えば酢酸ナトリウム又はオレイン酸トリエタノールアミンを含むことができる。

20

経口投与の場合、微細粉末又は顆粒は、稀釈剤、分散剤及び/又は表面活性剤を含むことができ、さらに水若しくはシロップとして、乾燥状態又は非水性溶液若しくは懸濁液（懸濁剤を含むことができる場合）のカプセル若しくはサシェとして、結合剤及び滑沢剤を含むことができる場合は錠剤として、又は水若しくはシロップ中の分散液として提供することができる。所望される場合又は必要な場合には、香料、保存料、分散剤、膨張剤又は乳化剤を含むことができる。錠剤及び顆粒は好ましい経口投与形態であり、これらは被覆することができる。

30

非経口投与は一般的には注射による。注射用薬は、通常の状態（流動溶液又は分散液のいずれか）、溶液又は注射前に適した固体形、又は注射前の液体中の分散液として、又は乳液として調製することができる。

薬剤処方物及び成分に関する更なる例及び詳細は以下の著書で見出される：A.R. Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins, 20th ed. (2003) ; L.V. Allen, Jr. et al., Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 8th Ed. (Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004) ; J.G. Hardman et al., Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill Professional, 10th ed. (2001)。さらにまた、材料、装置及び種々の投薬形を製造する方法に関する詳細な情報を以下の著書で見出すことができる：Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, eds. H.A. Lieberman et al. (New York: Marcel Dekker, Inc., 1989) ; 及びL.V. Allen, Jr. et al., Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 8th Ed. (Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wikins, 2004)。

40

#### 【0021】

##### 組成物及び基質の投与

本発明の医薬組成物及び/又は基質は、当業者によって個々の対象者に適切であると決定されたルートで投与される。例えば、組成物及び/又は基質は、経口的に、非経口的に（例えば静脈内に）、筋肉内注射によって、腹腔内注射によって、腫瘍内に、又は経皮的に投与される。腫瘍内注射は、単回注射、又は好ましくは腫瘍内の複数個所に複数回注射

50

することができる。腫瘍内点滴又は輸液法もまた用いることができる。

組成物及び/又は基質の正確な量は、年齢、体重及び対象者の一般的条件、治療される疾患の重篤度、腫瘍の位置及び大きさ、使用される個々の化合物、その投与態様などに応じて対象者毎に変動するであろう。適切な量は、本明細書の教示によって提供される単なる日常的な実験を用いて当業者が決定することができる。一般的には、投与量は、例えば基質として5'-メチル(talo)MeP-R又は機能的等価物を考えた場合、好ましくは約0.5 - 500 mg/m<sup>2</sup>の範囲であろう。ウイルスベクターについては、投与量は、腫瘍のサイズ及び位置とともにウイルスのタイプに応じて一般的には $5 \times 10^3 - 5 \times 10^{10}$  pfuの範囲である。

Freireichら (Freireich et al., 1996, Cancer Chemother Rep 50:219-244) の式を用いて、ヒト対象者のための基質の最大許容用量を決定することができる。例えば、3日間の200mg/kg/日の5'-メチル(talo)MeP-R (合計3回投与) が良好な耐性を示したというマウスの全身投与応答データを基準にして、600mg 5'-メチル(talo)MeP-R/m<sup>2</sup>のヒトの用量が前記の式にしたがって決定された：200mg/kg  $\times$  3 = 600mg/m<sup>2</sup>。前記の量又は前記よりわずかに少ない量が、副作用が最小に抑えてヒトで許容されるはずである。さらにまた、腫瘍部位に又は部位近くに基質の局在化を維持することができる投与態様は、全身投与される基質よりも低い用量で効果を示すことは理解されよう。

#### 【 0 0 2 2 】

本発明にしたがって阻害されるべき腫瘍細胞を有する対象者は人間又は他の哺乳動物であり、他の哺乳動物は例示すればげっ歯類、ネコ、イヌ、ウサギ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ及び非ヒト霊長類である。

本明細書では、本発明の組成物及び方法は、主として原核細胞のPNPについて、特に大腸菌PNPについて記載されている。しかしながら、プリン含有ヌクレオシド類似体基質を切断してAPRT酵素活性のための基質を生じ、さらに細胞傷害性化合物を生成することができる原核細胞性酵素が本発明の範囲内に包含されると考えられる。そのような原核細胞性酵素には、米国特許6,491,905号に開示された種々の原核細胞性ヒドロラーゼ及びホスホリラーゼが含まれる。さらにまた、本発明の方法及び組成物での使用に適した種々の原核細胞性ヒドロラーゼ及びホスホリラーゼは、腫瘍の阻害に原核細胞性ヒドロラーゼ及びホスホリラーゼ (特に大腸菌PNP) を使用する方法及び組成物とともに以下の文献に記載されている：米国特許5,552,311号、6,017,896号、6,491,905号、6,605,281号、6,958,318号及び7,037,718号に、並びに米国特許出願公開公報20050214901、20040204375、20030228576、20030134819及び20030077268。

本発明の組成物及び方法の実施態様は以下の実施例で例示される。これらの実施例は、説明の目的で提供され、本発明の組成物及び方法の範囲を限定しようとするものではない。

#### 【 0 0 2 3 】

##### 実施例

##### 実施例1：APRTのクローニング

完全長のヒトAPRTをコードするcDNAが単離される (前記cDNAは配列番号:1のAPRTタンパク質をコードする)。本実施例では、cDNAは、キアゲン社 (Qiagen) のRNeasyキットを用いてHeLaの全RNAから合成され、PCR反応で用いてAPRTのcDNAを増幅させる。図3は、完全長のヒトAPRTをコードするPCR生成物である、ゲル上の543bpのバンドを示す。このPCR生成物をpCR4-BluntTopoベクター (Invitrogenから市販されている) 中にクローニングする。得られたクローンはDNA配列決定によって確認する。

プライマーを用いてこの543bpのAPRTコード配列を増幅して、発現ベクターにクローニングするために適切な制限部位 (例えばNcoI及びXhoI) を生成物に導入する。図4は、ヒトAPRTをコードするDNA配列を含む本発明の発現ベクターの例を示す。

#### 【 0 0 2 4 】

##### 実施例2：大腸菌PNPのクローニング

細菌PNPのコード配列を発現ベクターに挿入する。ある実施態様では、大腸菌 (JM101株) の染色体DNA鋳型を文献 (N.J. Gay, 1984, J Bacteriol 158:820-825) に記載された方

法を用いて入手する。2つのPCRプライマー、GATCGCGGCCGCATGGCTACCCACACATTAATGCAGおよびGTACGCGGCCGCTTACTCTTTATCGCCCAGCAGAACGGA-TTCCAGを用いて、大腸菌DeoD遺伝子の完全長のコード配列を特定し、さらに所望の生成物の5'及び3'の両末端にNotI部位を取り込む。30サイクルの増幅(1ngの鋳型、100 µLの各プライマーを用い、2.5単位のtaqプライマー、200 µMの各dNTP、50mMのKCl、10mMのトリスCl (pH8.3)、1.5mMのMgCl<sub>2</sub>及び0.01%ゼラチン(w/v)を含む100 µLの反応混合物中で、94 °Cで1分の変性、50 °Cで2分のアニーリング、及び72 °Cで3分の伸長)の後で、予想したサイズを有する単一のPCR生成物が得られる。この生成物をフェノール/クロロホルムを用いて抽出し、エタノールで沈殿させ、NotIで消化し、ゲル精製する。

増幅した細菌PNP配列を真核細胞発現ベクターに挿入する。大腸菌PNPの真核細胞発現を指令することができるベクターを得るために、NotIで消化することによりLacZ遺伝子をpSVBから切り出し、ベクター骨格を脱リン酸(仔ウシアルカリホスファターゼ、GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)、上述したようにゲル精製する。続いて、上記のように調製したPNP挿入物を前記プラスミド骨格のNotI端に連結して、SV40初期プロモーターによって制御されるPNP発現を有する新たな構築物を生成する。組換え体の実体および挿入物の方向を制限マッピングおよび上述したプライマーを用いた組換え体プラスミドからの完全長挿入物の再増幅により確認する。この手順により発現構築物SV-PNPが生成される。

【0025】

#### 実施例3: ヘルペスウイルス発現ベクターの作製

HSVベクターは、増殖中の腫瘍塊の分裂細胞を選択的に標的とすることによって、*in vivo*で腫瘍特異性を示す。以前にある種のHSVベクターが、グリオーマ(ミクロ転移性疾患)治療試験のために、さらに転移性大腸癌の治療を目的とする肝臓への局所的投与によって臨床的に用いられた(A.C. Shah et al., 2003, J. Neuro-Oncol 65:203-226; J.M. Markert et al., 2000, Gene Therapy 7:867-874; 及びR. Rampling et al., 2000, Gene Therapy 7:859-866)。

PNP及び/又はAPRTをコードする配列をHSVターゲティングプラスミドに挿入する。このターゲティングプラスミドを、単離して制限酵素PacIで消化した(これによりウイルスからGFP発現カセットが除去される)C101ウイルスDNAと共にウサギ皮膚細胞(RSC)に別個に共トランスフェクションする。共トランスフェクション後、前記ウイルスゲノムは相同組換えによって再構成される。ウイルスのブランクを選別して増殖させ、さらにVero細胞で2回のブランク精製を実施する。制限酵素消化ウイルスDNAのサザンブロットハイブリダイゼーションによって、候補ウイルスクローンを確認する。検出は、Gene Images AlkPhos Direct DNA標識システム(Amersham-Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)を用い、アルカリ性ホスファターゼにより実施する。

egr-1プロモーターが、PNP及び/又はAPRTの発現のためにPNP及びAPRT HSV構築物に含まれるプロモーターの一例である。

【0026】

#### 実施例4: 発現強化HSVベクターの作製

APRT及び/又はPNPを発現する134.5-HSVを、Kriskyら(D.M. Krisky et al., 1997, Gene therapy 4:1120-1125)が記載した技術の変法を用いて構築する。

134.5-, tk+ HSV(C101と称される)を用いる。C101は、R3616(文献(R.J. Whitley et al., 1993, J Clin Invest 91(6):2837-43)に詳細に記載されている)に由来するHSVベクターであり、UL3/UL4遺伝子間領域内に導入されたCMV駆動導入遺伝子カセットを含む。このウイルスは、以下の理由から古い世代のHSVよりも実質的な改善を示す: 1)より活性な導入遺伝子調節配列要素をコードしており、2)UL39領域が導入遺伝子挿入を含まない。インタクトなUL39領域は改善された腫瘍内伝搬及び分布を可能にする。

PNPおよびAPRT HSVを構築する。これらにおいて、PNPおよび/又はAPRTコードがシャトルプラスミドからHSV標的化プラスミドへサブクローニングされており、UL3/UL4遺伝子間領域にフランキングする配列と相同な配列を含む。PNPについては、pCA13-wtPNPを用いてPNPコード配列を切り出し、これをHSVターゲティングプラスミド(pCK1037)に挿入す

10

20

30

40

50

る。得られたPNPを含むターゲティングプラスミド (pHN001) を、予め単離して制限酵素PacIで消化してGFP発現カセットを除去しておいたC101ウイルスDNAとともにウサギ皮膚細胞 (RSC) に共トランスフェクトする。同様に、APRTコード配列をHSVターゲティングプラスミドに挿入し、上述したように共トランスフェクションする。

共トランスフェクション後に、ウイルスゲノムを相同組換えにより再構成させ、ウイルスプラークを選別して増殖させ、2回の更なるプラーク精製をVero細胞で実施する。制限酵素消化ウイルスDNAのサザンブロットハイブリダイゼーションによって、候補ウイルスクローンを確認する。検出は、Gene Images AlkPhos Direct DNA標識システム (Amersham-Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) を用い、アルカリ性ホスファターゼにより実施する。これにより、ウイルス構築の際に起こるかもしれない顕著な再編成を排除することができる。これら陽性候補物からウイルスDNAを単離し、PNP又はAPRT遺伝子挿入物の配列を決定して、正しい酵素の産生を妨げる可能性がある微少な変化を排除する。

10

機能的酵素に対するアッセイを行って正確な構築物を確認してもよい。

#### 【0027】

##### 実施例5：アデノウイルス発現ベクターの作製

アデノウイルス (Ad) 構築物は、典型的には下記に記載するように1) Adシャトルプラスミド及び2) ゲノムプラスミドを含む2つのプラスミドのトランスフェクションを必要とする。

##### E1シャトルプラスミド

アデノウイルスE1プロモーターをE2F1応答配列に置換できるようにE1シャトルベクターが提供される。このベクターは商業的に入手可能な、E1の大きな部分を欠くAdベクター (pShuttle、Stratagene) から確立される。E1Aおよび上流領域の第一のセグメントをコードするヌクレオチド (位置191-1339) をpXC1 (Microbix、Canada) からBsrGIとXbaIで切り出し、pShuttleの対応する部位へ連結する。次にpShuttle中のE1Aプロモーターを制限消化により除去し、E2F1制御配列およびJohnson, L., et al., 2002, Cancer Cell, 1(4):325-37に記載されたE1A CR2ドメインの8アミノ酸欠失 (デルタCR2) を含むPCR産物で置換する。デルタCR2改変は正常細胞におけるG1-Sチェックポイントを克服するウイルスの能力を制限し、このウイルスが腫瘍以外において複製および伝搬しにくくする。pXC1からXbaIとBstI 1071で切り出した4426bpのアデノウイルスゲノムDNAを付加することによりシャトルベクターが完成する。デルタCR2、E2F1プロモーターおよびこのシャトルの他の重要な領域の同一性をDNA配列決定により確認する。

20

30

#### 【0028】

##### Adゲノムプラスミド

共トランスフェクション用Adゲノムプラスミドを樹立するために、E3/E4プラスミドを先ず初めに構築し、1) E2F1プロモーターによるアデノウイルスE4発現の調節、及び2) E3領域へのPNP発現カセットの挿入を可能にする。pAdEasy-1アデノウイルスプラスミド (Stratagene) をEcoRIで消化し、大きいフラグメントを自己連結して、Ad5ゲノムのE3及びE4を含む単純化プラスミドを得る。E4発現をE2F1の下に置くため、PCRを行い、E4プロモーターを囲む新たなSpeIおよびXhoI制限部位 (それぞれ、位置35,376および35,816) を有するAd断片 (nt35463-末端) を作製する。これをE3/E4プラスミドの対応する領域に連結する。SpeI及びXhoIによってフランキングされたE2F1プロモーターをPCRによって作製し、E4の直ぐ上流のE4プロモーターと置き換える。全ての重要な領域及びPCR挿入物はDNA配列決定によって確認する。

40

種々の調節配列要素を組み入れて (例示的にCMVおよびE2F1が含まれる)、そのような構築物中のPNP及び/又はAPRT導入遺伝子の発現を駆動させることができる。

例えば、大腸菌PNP又はAPRTをコードする核酸配列がpAB27 (Microbix) のE3領域にクローニングされる。ClaI/BamHI消化を用いてCMVプロモーターを切り出し、PCR増幅E2F1調節配列要素の置換を可能にする。E2F1プロモーターはDNA配列決定によって確認する。PNP及びAPRT遺伝子発現カセット (例えばCMV駆動及びE2F1駆動PNP及びAPRT遺伝子発現カセット) を、EcoRI及びHpaIを用いた消化によってpAB27から切り出し、上記に記載のE3/E4プラ

50

スミドの対応する部位にクローニングされる。続いて、これらの配列を含むDNAフラグメント（E2F1駆動E4も同様に）をSrfI及びPacIでE3/E4プラスミドから切り出し、pAdEasy-1（Stratagene）の対応する部位にクローニングして最終的なゲノムプラスミドを樹立する。

#### 【 0 0 2 9 】

##### 組換えアデノウイルスの生成

pAdEasy-1細菌組換えシステム（Stratagene）を用いて組換えアデノウイルスを単離する。E1シャトルプラスミドをPmeIで直線化し、上記に記載の改変pAdEasyとともにBJ5183を同時形質転換する。形質転換体をカナマイシン耐性によって選別し、組換え体を制限消化によって確認する。組換え体を同定したら、組換え欠損細菌（XL10-Gold(商標)）を用いて前記組換え体を大量に製造する。精製した組換え体AdプラスミドのDNAをPacIで消化して逆方向末端反復（ITR）を露出させ、続いて文献（J.A. Bristol et al., 2003, Mol Ther 7(6):755-64）の記載にしたがい、前記を用いてHEK293細胞をトランスフェクトする。

ウイルスプラークが細胞ローン上に出現したなら、組織培養上清を組換えウイルス供給源として用いる。全ての重要な配列要素又は改変物のDNA配列分析およびPCRによって実体確認が実施される。

#### 【 0 0 3 0 】

##### 実施例6：大腸菌PNP及びヒトAPRT発現用条件複製性アデノウイルスベクター

条件複製性アデノウイルスベクターは、in vivoにおいて腫瘍塊全体でPNP及びAPRT導入遺伝子を発現するウイルスの伝搬を可能にする。正常な、有糸分裂的に静止している組織を傷害しないが癌細胞に選択的な溶解をもたらすアデノウイルスベクターは、McCormick, F., 2003 Cancer Biol Ther., 2(4 Suppl 1):S157-60; Linke, S.P., 1998, Nature 395: 13-15; Rothmann, T., et al., 1998, J. Virol. 72: 9470-9478; Hann, B., and Balmain, A., 2003, J. Virol. 77(21): 11588-95; Wadler S., et al., 2003, Clin Cancer Res. 9(1):33-43; Jakubczak, J.L., et al., 2003, Cancer Res. 63(7): 1490-9; and Post, L.E., 2002, Curr Opin Investig Drugs 3(12):1768-72に詳細に記載されているように、Ad E1B 55K領域に欠失を有する。

さらに別の選択肢では、E1A-CR2領域内に欠失をコードするように構築されたウイルスが用いられる。前記欠失は、正常細胞においてはpRB活性を維持することによってウイルスの存在にもかかわらず複製を妨げ、一方、ヒトの腫瘍細胞タイプ（肺、結腸、膵、前立腺、乳房、子宮頸管の癌、骨癌、並びに頭部及び頸部の癌を含む）ではE2F1の過剰発現に依存する態様で激しく複製する。腫瘍細胞で特異的に複製する、大腸菌PNP及び/又はAPRTをコードする腫瘍溶解性アデノウイルスが提供される。大腸菌PNPおよび/またはAPRTは、その他の点ではJohnson, L., et al., 2002, Cancer Cell, 1(4):325-37に記載されたのと同じであるウイルスのE3領域にクローン化される。

#### 【 0 0 3 1 】

##### 実施例7：レンチウイルス発現構築物

レンチウイルス構築物は、以下の文献の記載にしたがって作製される：E.M. Bennett et al., 2003, Chemistry and Biology 10:1173-1181; J.S. Hong et al., 2004, Cancer Research 64:6610-6615; 及びS. Bharara et al., 2005, Human Gene Therapy 16:339-347。レンチウイルス構築物の作製に用いられるプラスミド、例えばエンベロープコードプラスミドpMD.G; パッケージングプラスミドpCMVDR8.91（Gag、Pol、Tat及びRevを発現する）; トランスファーベクタープラスミド（PNP又はAPRTコード配列をもたない）は、Tironaら（Lausanne, Switzerland）から入手できる。類似のプラスミドは市場で入手するか、又は合成することができる。

略記すれば、大腸菌PNPコード核酸配列をプライマー、5'-ggatccaccatggctacccccacacataaatg-3'（BamHI部位及びATGには下線が付されている）及び5'-cctcgagtcactctttatcgcccagcag-3'（XhoI部位には下線が付されている）によって増幅する。得られた生成物をZeroBluntベクター（Invitrogen, Carlsbad, CA）にサブクローニングする。BamHI及びXh

10

20

30

40

50

olで消化した後、pHR'CMV/Luc W Sin-18レンチウイルスベクターのルシフェラーゼ遺伝子を大腸菌PNPと置き換える。正確な挿入物は、配列決定及び細胞にトランスフェクトした後で活性な大腸菌PNP酵素活性をアッセイすることによって確認される。CMVプロモーターがこの構築物に含まれる。

5 µgのエンベロープコードプラスミドpMD.G ; 15 µgのパッケージングプラスミドpCMVDR 8.91 (Gag、Pol、Tat及びRevを発現する) ; 20 µgのトランスファーベクタープラスミドを含むDNA混合物を、10cm培養皿の293T細胞のリン酸カルシウムトランスフェクションのために用いる。トランスフェクション後の組織培養上清から大腸菌PNPをコードする複製欠損ウイルス粒子を採集し、更なる使用のために濃縮することができる。

同様に、ヒトAPRTレンチウイルス発現ベクターは、本質的に上記の記載にしたがってAPRTコード核酸配列、例えば上記の543bp挿入物(所望にしたがって改変して適切な制限部位を導入する)を用いて作製される。 10

正確な挿入の確認は、配列決定及び細胞にトランスフェクトした後で活性なAPRT酵素活性についてアッセイすることによって評価される。

### 【0032】

#### 実施例8：ニシストロン性構築物

大腸菌PNP及びヒトAPRTは別々の発現構築物にコードされていてもよく、前記タンパク質の発現のために前記構築物を細胞に同時導入することができる。あるいは、ニシストロン性ベクターをそのような同時発現のために構築する。例えば、大腸菌PNP及びヒトAPRT遺伝子を、細菌プラスミド構築物及び/又はウイルスベクターに挿入することができる。 20

ポリシストロン性アデノウイルス導入ベクター、pShuttle-IRES-hrGFP-1 (Stratageneから市販されている)は、アデノウイルスにおいて2つの別個の導入遺伝子からの強力な発現を提供する。APRT遺伝子は、上記のpCR4Blunt-APRT構築物(図4)からNcoI及びEcoRIで消化することによって単離され、続いてIRES含有トランスファーベクターのNcoI及びEcoRI部位にクローニングされる(pTM-APRTと称される)。このプラスミドをKpnI及びSpeIで消化し、pShuttle-IRES-hrGFP-1ベクターのKpnI及びXbaI部位にクローニングする。XbaI及びSpeIは適合オーバーハングを共有する。得られたプラスミドはhrGFPの代わりにAPRT遺伝子を含む。PNPをNotI消化pSV-PNP (E.J. Sorscher et al., 1994, Gene Therapy 1:233-238)から単離することによって、前記のプラスミドのNotI部位にPNPをクローニングする。APRT及びPNPをコードするニシストロン性カセットを用いるその後の構築は上記に記載したとおりであり、さらに腫瘍溶解性アデノウイルスのために改変される。 30

同様な方法がHSVへのクローニングにも応用される。HSV中のEMCV IRES配列は優れたニシストロン性発現を可能にする。HSVは、ウイルス複製に対してほとんど影響を与えずに少なくとも9kbを収容することができる。APRT及びPNP導入遺伝子の両方を含むカセットはUL3/UL4領域に挿入して、各遺伝子の1コピーをウイルスに配置することができる。HSVへのクローニングに関する更なる詳細は以下の文献に記載されている: J.N. Parker et al., 2000, PNAS 97(5):2208-2213。

### 【0033】

#### 実施例9：PNP活性のためのアッセイ

大腸菌PNP活性はHPLCによって測定することができる。例えば、大腸菌PNP発現構築物を感染させた細胞を用い、下記文献に記載されたように粗細胞抽出物を調製する: E.J. Sorscher et al., 1994, Gene Ther 1:233-238; 及びW.B. Parker et al., 2003, Cancer Gene Ther 10:23-29。抽出物を種々の濃度のMeP-dRとともにインキュベートし、文献(V.K. Gadi et al., 2000, Gene Ther 7:1738-1734)の記載にしたがって、生成物の形成を反応混合物のHPLC分析によって測定する。活性はPNP単位として表す(ここで1単位は1mgの細胞抽出物が1時間で1 nmolのMep-dRを変換することを示す)。 40

### 【0034】

#### 実施例10：APRT活性のためのアッセイ

AMP生成において直線的増加が得られる濃度の無細胞抽出物を、50mMのトリス(pH 7.4)、5mMのMgCl<sub>2</sub>、100 µMの[<sup>3</sup>H]アデニンとともに、さらに1mMのホスホリボシルピロホス 50

フェートを時間間隔を増加させながら（例えば30、60、90、120分）加えて、37 でインキュベートする。反応混合物をDE-81ディスク（陰イオン交換ディスクのタイプ）に適用することによって、反応を停止させ、さらにバッファーで洗浄して基質（アデニン）を除去する。反応生成物 $[^3\text{H}]\text{AMP}$ はこのような条件下で前記フィルターに付着する。このディスクをエタノールで洗浄し、乾燥させ、放射能を計測する。或いは、下記に記載するように、反応混合物を強力な陰イオン交換HPLCで生成物を基質から分離することによって分析してもよい。

#### 【0035】

##### 実施例11：酸可溶性ヌクレオチドプールの抽出及び分析

文献（H. Someya et al., 2006, *Cancer Chemother Pharmacol* 57(6):772-80 ; W.B. Parker et al., 2004, 84:327-336 ; W.B. Parker et al., 2000, 60:1925-1932 ; W.B. Parker et al., 1999, *Mol Pharmacol* 55:515-520 ; W.B. Parker et al., 1998, *Biochem Pharmacol* 55:1673-1681 ; W.B. Parker et al., 1993, *Antimicrob Agents Chemother* 37:1004-1009 ; 及びW.B. Parker et al., 1991, *Cancer Res.*, 51:2386-2394）に記載のSAX HPLCを用いて、プロドラッグの細胞内代謝を評価する。略記すれば、放射能標識した類似体とともにインキュベートした細胞を遠心によって採集し、氷冷した0.5Mの過塩素酸に再懸濁する。サンプルを12000xgで20分遠心し、上清を取り出して1Mのリン酸カリウム（pH7.4）及び4MのKOHで中和する。遠心によって $\text{KClO}_4$ を除去し、上清液の一部をPartisil-10 SAXカラム（Keystone Scientific Inc., State College, PA）に注入する。ヌクレオチドの溶出は、5mMの $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ （pH2.8）から750mMの $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ （pH3.7）バッファーへの50分直線勾配（流速2mL/分）により実施される。天然のヌクレオチドは260nmのUV吸収の測定によって検出され、放射能をもつ酸可溶性代謝物は、カラムから溶出する1分分画を計測することによって検出される。

#### 【0036】

##### 実施例12：プロドラッグ及び生成物を測定するための逆相HPLC

酸可溶性抽出物を上記のように調製する。サンプルを5ミクロンのBDS Hypersil C-18カラム（150 x 4.6mm）（Keystone Scientific Inc., State College, PA）に注入し、移動相として50mMのリン酸二水素アンモニウムバッファー（pH4.5）中の5%アセトニトリル（流速1mL/分）を用い、基質と生成物を分離する。Secristら（J.A. Secrist et al., 1999, *Nucleosides and Nucleotides* 18:745-757）の論文に記載されているように、本発明者らはこのシステムを用いて（1から50%のアセトニトリルのパーセンテージのみを変更）、105対の基質と生成物の分離に成功した。

カラムから溶出する画分を採集し、各画分の放射能を決定した。

#### 【0037】

##### 実施例13：抗体による検出

機能的な発現ベクターを確認するための機能的酵素アッセイ及び配列決定による方法の他に、発現ベクターが発現したPNP及びAPRTの検出、分布、性状決定及び定量は、PNP又はAPRTに特異的な抗体を用いて評価することができる。

以前には、分布又は他の研究を目的とした大腸菌PNPに対する抗体を入手することができなかった。精製した機能的な大腸菌PNP及び例えば文献（E.J. Sorscher et al., 1992, *American Journal of Physiology* 262:C136-C147 ; 及びS. Demolombe et al., 1996, *Gene Therapy* 3:685-694）に記載の技術を用い、我々は最近、大腸菌PNPと特異的に結合するモノクローナル及びポリクローナル抗体パネルを開発することができた。

抗体は、精製した組換え大腸菌PNPに対して生成される。Ad-PNP感染HeLa細胞によって発現された大腸菌PNPは、作出したマウスモノクローナル抗体及びウサギポリクローナル抗体の両抗体により検出することができる。

前記作出したマウスモノクローナル抗体及びウサギポリクローナル抗体を用い、発現した大腸菌PNPを免疫沈降、イムノプロット及びELISAによって検出することができる。

Ad-PNP感染HeLa細胞の溶解物の免疫沈降は、図5に示すようにこれらの抗体を用いて検出される。PNPタンパク質は感染後に35S-Metで標識され、プロテインGアガロースビーズ

を用いて免疫沈降される。C：非感染コントロール、M：マウスモノクローナル抗体、P：ウサギポリクローナル抗体。

大腸菌PNPを形質導入したグリオーマ腫瘍のウェスタンブロットは図6に示されている。外側部の腫瘍に大腸菌PNPをコードする複製型レトロウイルス（RCR）を注射した。PNP形質導入腫瘍の溶解物の（6週間の時点での）ウェスタンブロットがレーン2に示されている。同じ日に比較のために採取したコントロール（PNP非導入）の腫瘍溶解物はレーン1に示されている。

#### 【0038】

##### 実施例14：腫瘍モデル - *in vitro*及び*in vitro*

種々の腫瘍モデルを用いて、本発明の組成物及び方法の効果を評価することができる。10  
*in vitro*モデルには腫瘍細胞の増殖及び生存の培養モデルが含まれる。例示的な*in vitro*モデルにはD54ヒトグリオーマ腫瘍細胞の培養が含まれる。

*in vitro*モデルで用いられる細胞に、種々の発現構築物をPNP及び/又はAPRTのための基質の投与と併せてトランスフェクト及び感染させることができる。生存アッセイには、例えばMTTアッセイ又はクリスタルバイオレット染色のようなアッセイが含まれる。細胞抽出物を用いて、全核酸及びタンパク質発現と同様にPNP及び/又はAPRT発現を評価することができる。

バイスタンダー細胞に対する効果を示すために、*in vitro*での細胞もまた用いることができる。

*in vivo*腫瘍モデルには、化学療法評価における種々のモデル標準物の全てが含まれる。20  
例えば、マウスへの腫瘍細胞の導入は抗腫瘍組成物及び方法の評価を可能にする。

例えば、ある*in vivo*腫瘍モデルでは、腫瘍は、6 - 10匹のマウスの腋窩領域に約 $10^7$ 細胞を皮下移植することによって動物内で樹立される。ある種のヒト腫瘍モデル（例えばD54、HCT-15及びSR475頭部/頸部を含む）のために無胸腺（又はscid）マウスが用いられる。同系モデルもまた用いられる。例えば、マウス腫瘍はColon26及びG26グリオーマ細胞を用いて樹立される。

得られた固形腫瘍を週に2回二次元的に測定し、大きさは、以下の長楕円のための式を用いて算出される： $[長さ(mm) \times 幅^2(mm)] / 2 = mg$ （単位密度と仮定する）。前記データによって、腫瘍体積の倍化時間、“非生着”%、自発退縮%の決定が可能になる。

腫瘍の異種移植及びそれらの分析に関する更なる詳細は以下の文献に記載されている：30  
M.C. Alley et al., 2004, Human tumor xenograft models in NCI drug development ; B.A. Teicher (ed), Anticancer Drug Development Guide, 2nd Edition, pp.125-152, Totowa, NJ: Hamana Press.

#### 【0039】

##### 実施例15：グリオーマモデル

頭蓋内グリオーマモデルの場合、 $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ の腫瘍細胞を右前頭葉に以下の座標を用いて注射する：プレグマに対し前方1mm及び側方1.5mm、及び脳内の深さ2.8mm。後の時点で、マウスに定位的に $10 \mu L$ のPBS賦形剤又はPNP及びAPRTコードウイルスを注射する。頭蓋内接種は麻酔下（ケタミン、キシラジン）で実施し、術後にタイレノール水溶液を投与する。頭蓋内腫瘍は、切り出し測定を含む種々の方法で評価することができ、*in situ*判定（例えば画像化を用いる）でも評価することができる。*in situ*画像化は本明細書で述べる。40

#### 【0040】

##### 実施例16：外側部へのウイルスの投与

試験動物の外側部内で樹立された癌に、PNP、APRT又はPNPとAPRTをコードする配列を含む複製型HSV又はAdベクターを注射する。一般的には、ほぼ300mgの重量を有する腫瘍に毎日 $10^7 - 10^{10}$  pfuを1 - 3日間注射する。ウイルスは、典型的には腫瘍内に4本の注射針の軌跡に沿って $50 - 100 \mu L$ の体積で接種される（200 - 300mg腫瘍）。

大腸菌PNP活性、PNPタンパク質の抗体分布、APRT活性、及びAPRTタンパク質の抗体分布を含む測定は、適切な間隔（例えばウイルス投与後1、3、5、9及び15日、又は必要である50

か若しくは所望される場合はさらに延長時期)で実施される。

このモデルには種々のウイルスベクターを用いることができる。前記には、例えば通常の複製型ウイルス(HSV、Ad)及び通常の非複製型構築物(アデノウイルス)が含まれる。

プロドラッグは、ウイルス注射に続いて種々の時点で動物に投与される。

コントロールには、ウイルス又はプロドラッグを含まない処置、プロドラッグを投与しないウイルスによる処置、又はウイルスを投与しないプロドラッグによる処置が含まれる。さらに別のコントロールには、コントロールタンパク質(例えばGFP又はルシフェラーゼ)を発現するウイルスの投与が含まれる。

プロドラッグの作用が最大の相乗性を提供することができるように、PNP活性及びベクター伝搬が最適である時点でプロドラッグを投与することが好ましい。文献に記載されたように(S. Bharana et al., 2005, Human Gene Therapy 16:339-347; 及びM. Puhlmann et al., 1999, Humann Gene Therapy, 10:649-657)、大腸菌PNPの短時間コースで、複製型PNPウイルス(例えばHSV、複製型ワクシニア、及び複製型レトロウイルス)による抗腫瘍作用が仲介される。複製許容型ベクターと自殺遺伝子との間の相乗作用は、腫瘍内ベクター伝搬が最大であるときにプロドラッグが投与される場合に最大であると予想され、その結果、ベクターの更なる腫瘍内及び腫瘍外播種と腫瘍細胞との両方が排除されると期待される。プロドラッグは、上記で述べた発現エンドポイントを基準にして腫瘍組織の徹底的除去に適した時期に投与される。

【0041】

#### 実施例17：大腸癌の肝転移モデル

転移性大腸癌は激しい疾患であり、同系大腸癌モデルは本発明の組成物及び方法について有益な評価を提供する。ネズミcolon26モデルが本実施例で例示され、Balb Cコンジェニックマウスの肝臓への播種に腫瘍細胞門脈接種が用いられる。colon26モデルでは、肝重量、転移数、生存などがエンドポイントとして評価される(以下の文献で詳述されている:M. Nishikawa et al., 2004, Clin Exp Metastasis 21:213-21; 及びS. Hayashi et al., 1999, Cancer Gene Ther 6:380-4)。転移病巣数に対する本発明の組成物及び方法の効果を決定するために、マウスに約 $1 \times 10^5$ のcolon26腫瘍細胞を門脈内注射する。各実験について、コントロール群に20匹のマウス、処置群の各々に6匹のマウスを含むことができる。アデノウイルスPNP及び/又はアデノウイルスAPRT(複製欠損、開始投与量 $5 \times 10^5$ から $5 \times 10^9$ pfu)、複製型Ad-PNP及び/又はAd-APRT( $5 \times 10^6$ から $5 \times 10^8$ pfu)(M.J. Vranken Peeters et al., 1996, Biotechniques 20(2):278-85)又はHSV-PNP及び/又はHSV-APRT(例えば $3 \times 10^5$ から $3 \times 10^6$ pfu)を門脈に注射して、2-4日間おいて大腸菌PNP及びヒトAPRTを発現させる。一般的には、高い投与量はレセプターを飽和させて肝臓区画を直ぐに通過してしまうために、低い投与量のHSVが最適であると考えられる。

ウイルスの接種に続いてプロドラッグを投与する。投与量及び投与スケジュールは、個々の状況で評価される多数の要件(例えば動物の体重、腫瘍重量及び腫瘍タイプ)に左右される。ある実施態様では、F-araAMPが、25-100mg/kg/回で1日に5回、連続して3日間腹腔内(ip)に投与される。他の投与量及び投与選択肢には以下が含まれる:50mg/kg ip q 2hx5, q1dx3; 125-175mg/kg q1Dx3-q4Hx3; 又は200-300mg/kg q1Dx3。コントロールには以下が含まれる:1)ウイルス又はプロドラッグの投与なし、2)プロドラッグのみ、3)PNPウイルスのみ、及び4)APRTウイルスのみ。

ウイルス接種後10日目に開始して、3-4匹のコントロール動物群を2日毎に犠牲にして肝臓の転移巣の拡大を評価する。最適病巣数( $n=100$ から $200$ )が存在するとき(通常は15日頃)、残りのコントロール動物及び処置動物を犠牲にし、全動物の肝臓を切り出して秤量し、導入遺伝子発現、ウイルス回収のためにアッセイするか、又は転移巣を数える前に少なくとも24時間固定液に入れる。腫瘍及び周辺の肝実質をPNP及び/又はAPRT免疫蛍光について分析する。寿命に対する処置の効果を決定するための実験もまた実施する。後者の実験は、コントロールに10匹だけマウスを置き、どの動物も犠牲にせず毎日生存を観察するという点を除いて上記のように実施される。

10

20

30

40

50

この実験計画で述べたベクター系（HSV及び腫瘍溶解性アデノウイルス）は特異的に転移性大腸癌を標的とすると報告されているので（A.C. Shah et al., 2003, J Neuro-Oncol 165:203-226；及びL. Johnson et al., 2002, Cancer Cell 1(4):325-37）、上記記載のモデルでは前記の両方を用いることができる。

#### 【0042】

##### 実施例18：頭蓋内グリオーマ腫瘍のin vivo評価

頭蓋内グリオーマ腫瘍におけるPNP及びAPRT発現の治療的有効性は、ヒト（D54）及びネズミ（G26）グリオーマモデルでHSV及びアデノウイルス構築物を用いて例示することができる。G26グリオーマがコンジェニック（B6D2F1）マウスで調べられる。グリオーマ細胞株にホタルルシフェラーゼ発現構築物を形質導入し、バイオルミネッセンスの画像化によって腫瘍の増殖及び治療への応答をモニターする。

PNP及びAPRTの抗腫瘍活性をin vivoで表示するそのようなモデルでは、scidマウスの頭蓋内に $5 \times 10^5$ から $1 \times 10^6$ のルシフェラーゼ発現ヒトグリオーマ細胞が移植される。明確な特定を可能にするために、動物に電子的バイオタグを移植することができる。その後の10 - 55日にわたって、マウスの画像を得て、ホタルルシフェラーゼの発現を検出し、さらにそれによって腫瘍の増殖をモニターすることができる。特定した時間（例えば10分）に同じ向きにしたマウスで画像を採集し、続いて特定量のルシフェリンを腹腔内に注射する。ある種の実験では、甲虫ルシフェリン2.5mgが注射される。画像化時には、1.5%エンフルラン/酸素ガスによる麻酔下で37℃にてマウスを維持する。画像採取時間は20秒から10分の範囲である。データ採取ソフトは、画像採集中にどのピクセルも飽和されていないことを担保する。腫瘍領域からの発光（相対的光子/秒）はXenogenが提供するソフトを用いて定量することができる。

腫瘍が誘発され、所望のサイズに増殖した後、PNP及びAPRTを（別個に又はニシストロン性に）発現するウイルスを腫瘍内に注射する。例えば大脳内投与は、5 - 10  $\mu$ Lに約 $1 - 5 \times 10^6$  pfuのHSV及び/又は $1 \times 10^6 - 5 \times 10^7$  pfuのアデノウイルスの開始投与量を含む。

ウイルス接種後にプロドラッグが投与される。例えば、F-araAMPは、種々のスケジュールで種々の量を投与することができる：例えば、約25 - 100mg/kg ip q2hx5, q1dx3d；125 - 175mg/kg q1Dx3 - q4Hx3；又は200 - 300mg/kg q1Dx3。プロドラッグは頭蓋内腫瘍に直接注射することによって投与することができる。場合によって、ポンプを移植して、プロドラッグの腫瘍内投与量をデリバリーすることができる。プロドラッグはまた全身的に投与してもよい。

コントロールには、未処置動物、プロドラッグが投与されないベクター処置動物、及びベクターが投与されないプロドラッグ処置動物が含まれる。コントロール及び実験サンプルは種々の時間で、例えば1、3、5、9及び10日で採集することができる。サンプルは、PNP発現細胞の割合及び分布に関する抗体による部位特定及び/又はin situハイブリダイゼーションを含むエンドポイントについてアッセイすることができる。

F-araAMPのようなプロドラッグはウイルス接種後2 - 3日で、又は、PNP発現アッセイによって示唆されるより遅い時点で投与される。全てのマウスの画像を週に2回採取し、腫瘍増殖における変化をバイオルミネッセンスによって追跡する。

#### 【0043】

##### 実施例19：統計解析及び治療実験における考察

腫瘍細胞の頭蓋内（i.c.）接種に関する本発明者らの経験は、適切に移植されたマウス、擬似処理マウスの各群における宿主の死は予測可能な狭いウィンドウ内で生じ、統計的に有意な処置の差を決定するために高度に均質なデータが提供されることを示した。生存分析（対数順位検定）をi.c.接種に続いて実施し、処置群間で観察される重要な差の全てを決定する。死亡が注目する結果因子として用いられる場合、プロセス変量解析は可能ではない。本明細書で述べた外側部及び結腸モデルでは、データは典型的には均質で正規であり、母数法（例えばスチューデントt検定）によって解析することができる。正規分布に適合しないいづれのデータも、標準的な、非母数型解析（例えばMann-Whitney順位和検定）に付される。腫瘍が指定の評価点に到達しない場合は、生存表解析が用いられる

(SYSTATバージョン7.0)。

記述的統計学(平均、中点及び標準偏差)が、*in vitro*の連続データ、HPLC系PNP又はAPRT活性測定(改変PNPを含む)及び相対的APRT mRNAレベルに対して適用される。統計的有意性の検査には、対応のあるt検定(Sigma-stat software)が含まれる。全ての*in vitro*実験は注意深くペアを構成させた態様で(同じ日、同じ細胞継代数)で実施される。0.05に等しいか又はそれ未満のp値( )が統計的に有意と考えられる。

#### 安全性の分析及びエンドポイント

PNP/F-araAMPによる外側部及びCNSモデルにおける腫瘍の退縮は顕著な毒性を示さず(体重低下又は致死性によって判定)、動物を延命させた。

【0044】

#### 実施例20：APRTの過剰発現及び検出

D54ヒトグリオーマ細胞を用いて、PNP発現及びAPRT過剰発現の作用を調べる。この実施例では、細胞を感染させるためにレンチウイルス構築物を用いる。MOI 1-10で達成される形質導入効率は、APRTを同時発現するD54 PNP細胞を選別性マーカーを使用せずにクローン増殖させるために典型的には十分である。特定のクローンのAPRTの組換え発現を、酵素的に及びRT-PCRによりアッセイする。ベクター由来mRNAを内因性APRTメッセージと区別するために、特定のベクターに特異的なプライマーセットを用いて、定量的又は半定量的RT-PCRを実施する。そのようなアッセイは、標準的な装置、例えばABI Prism7500配列検出システム(Assay on Demand, Applied Biosystems)で実施することができる。記載する半定量的RT-PCR分析及び/又は酵素的アッセイは、APRT過剰発現のモニタリングを可能にする。

内因性及びレンチウイルス過剰発現APRTのアッセイ用プライマー配列には以下が含まれる：内因性APRT特異的プライマー；5' TGGCTCTTCGCACGCGCCATGG 3'(フォワード、太字は開始ATGコドン)及び5' CACGCAGCCAGTCCAAGCTCCT 3'(リバース)；レンチウイルス発現APRT特異的プライマー；5' TCTAGCTAGAGGATCCACCATGG 3'(フォワード、下線はレンチウイルスベクター配列)及び5' CGACCACCCTCTGTCTGCTCCA 3'(リバース)。RT-PCR由来の予想されるバンドのサイズはそれぞれ271bp及び392bpである。APRT同時発現を伴う又は伴わないD54-PNP腫瘍をAPRT mRNA及び機能的発現について比較する。

【0045】

#### 実施例21：APRT活性の*in vitro*評価

APRTの酵素活性及びF-araAの代謝を、大腸菌PNP発現及びAPRT過剰発現する一組の細胞株で評価する。放射能標識F-araAが用いられる(前記は例えばMoravek Biochemicalsから市場で入手できる)。細胞中の細胞内リン酸化代謝物量が、以下に記載されている技術を応用した技術を用いて決定される：W.B. Parker et al., 1998, Biochem Pharmacol 55:1673-1681；W.B. Parker et al., 2002, Cancer Gene Therapy 9:1-7；B.W. Hughes et al., 1995, Cancer Research 55:3339-3345；及びV.K. Gadi et al., 2003, J Pharm Exper Therap 304:1280-1284；及び下記実施例21に記載の図7参照。

略記すれば、培養液サンプルを入手し、培養液中の塩基、F-Adeの量を評価する。これらの方法を用いて、腫瘍細胞内のF-Ade蓄積の増加及び細胞外に放出されるプリンの量の減少(全身毒性に対する潜在的寄与因子)をモニターすることができる。

【0046】

#### 実施例22：PNP及びAPRT発現のために単純ヘルペスウイルスを用いる実験

マウスにヒトのグリオーマ腫瘍を樹立させてから16日後に、HSV-PNPを用いて、50 µLに1700万pfuのウイルスを含む組成物を投与する。HSV-PNPは、腫瘍内接種後に単独で腫瘍の増殖を遅らせる(1個の腫瘍の2倍化についてほぼ20日の遅延)。HSV-PNPとともにMeP-dR(1日につき168mg/kgを3日間)の腫瘍内投与は、マウスで腫瘍の退縮及び腫瘍増殖の停止を改善する。

腫瘍にHSV-PNP及びHSV-APRTの両方を感染させると、抗腫瘍応答はさらに改善される。

【0047】

#### 実施例23：F-Adeの*in vivo*生成及びクリアランス並びにF-araAMPの代謝

10

20

30

40

50

以下の3つの別個の *in vivo* パラメーターを、大腸菌PNP及びAPRTを発現する担癌マウスで評価する：1) プロドラッグの血中半減期及びマウスで生成されるF-Adeの血中レベル、2) 腫瘍及び他の組織と関連したF-Ade代謝物の量、及び3) 腫瘍及び腫瘍外組織へのPNP、APRT及びウイルスデリバリーの証拠。

例えば、プロドラッグ活性化の増加及び腫瘍組織内のF-Adeの蓄積増強のためにAPRTの過剰発現が意図され、一方、F-Adeの循環系への放出は最小限に意図される。腫瘍、血液及び組織内のF-Ade及び代謝物の測定はこの効果の生化学的試験を提供する。さらにまた、標的腫瘍及び他の種々の組織内のPNP並びにAPRTのレベル及び活性の測定が、デリバリー及び発現の有効性の確認のために実施される。

循環F-Adeの生成及び除去の測定は例えばHPLCによって実施される。放射能標識プロドラッグはMoravek Biochemicalsから入手され、比較のために有効性実験で用いられたものと同じルート及び同じ投与量でマウスに注射される。プロドラッグの注射後に時間間隔を延ばしながら血漿サンプルを取り出し、親化合物及び塩基について逆相HPLCで分析する。プロドラッグ及びF-Adeの同定は上記に記載したようにHPLCによる。

【0048】

#### 実施例24：プロドラッグ療法に続くF-Adeの血中放出のモニタリング

図7に示す実験は、活性なPNP基質 (F-dAdo) (表1) からF-Adeの生成を示す。

図7に示す実験の場合、16匹のマウスの皮下にPNP非発現D54親細胞、D54/PNP MuLv (ほぼ250PNP単位)、又はD54/lentiPNP (有効性評価についての記載にしたがって~126,000PNP単位の腫瘍細胞) を移植する。腫瘍がほぼ200mgのときに、マウスの腹腔に20mg/kgの3H-F-dAdoを注射する。このF-dAdo用量は、1日5回連続して3日間投与するときのF-dAdoの最大許容用量である。F-dAdo注射後5、15、30及び60分で各群の4匹のマウスを犠牲にし、血漿サンプルを得た。各血漿サンプルのF-Adeの量は記載のように逆相HPLCを用いて決定する。

異なるレベルの大腸菌PNP活性を有する腫瘍をもつマウスのF-Ade血中レベルに相違はなく、このことは、大腸菌PNPを発現する腫瘍をもつマウスでF-dAdoのMTDは低下しないという事実と一致する。大腸菌PNPを発現する多くのベクターに関するF-dAdoの査定は、文献に報告されているように、腫瘍内PNP発現のために毒性の増強を示していない (W.B. Parker et al., 2002, *Cancer Gene Therapy* 9:1-7; W.B. Parker et al., 1997, *Human Gene Therapy* 8:1637-1644)。

同様な実験をF-araAMPに関して実施する。しかしながら、大腸菌PNPを発現する腫瘍をもつマウスに100mg/kgのF-araAMP (このF-araAMP用量は、1日5回連続して3日間投与するときのF-araAMPの最大許容用量である) を注射したとき、F-Adeはこのマウスの血漿中に検出されない。フルダラピンを用いるこれらの実験の検出限界はほぼ1  $\mu\text{mol}$  である。F-dAdoの場合のように、F-araAMPのMTDは、大腸菌PNP (レンチウイルス由来であれ、MuLv由来であれ) を発現する腫瘍をもつマウスで、又は大腸菌PNP発現ベクターと一緒に投与されるときに低下しない。

これらの結果は、F-Adeは、F-araAによる全身的処置後に大腸菌PNP発現腫瘍から血中にほとんど放出されないことを示している。F-dAdo (F-araAよりもはるかに高い効率でF-Adeを放出させる (表1)) を用いた結果は、この設定で放出されるF-Adeの量は有効であるとともに十分に許容されることを示している (W.B. Parker et al., 2002, *Cancer Gene Therapy* 9:1-7)。

【0049】

#### 実施例25：PNPによる治療に続く正常組織の分析

F-Ade細胞内代謝物の量を決定するために、腫瘍及び他の組織を放射能標識プロドラッグの注射後4時間で切り出し放射能の量が決定されるであろう。組織 (例えば肝、肺、腎、心、腸、骨髄、脳、脾、及び性腺) の調査が実施されるであろう。F-araAMPの注射後4時間では血中にはプロドラッグはほとんど存在しない (W.B. Parker et al., 2002, *Cancer Gene Therapy* 9:1-7)。したがって、腫瘍に伴う放射能はプロドラッグの代謝物を表しているはずである。大腸菌PNP発現腫瘍をこの酵素を発現しない腫瘍と比較することに

よって、F-araA又は他のプロドラッグの切断に起因する腫瘍随伴放射エネルギーを決定することができる。PNPプロドラッグのin vivo切断をモニターするこの技術の詳細及び正確さについては以下の文献に記載されている：W.B. Parker et al., 2002, Cancer Gene Therapy 9:1-7；V.K. Gadi et al., 2003, J Pharm Exper Therap 304:1280-1284；及びJ.S. Hong et al., 2004, Cancer Research 64:6610-6615）。

器官及び組織はまた、PNP/F-araAMPに続いて加療後の種々の時点（例えば1、5、14、28日）で組織学的に分析することができる。組織病理学及び血液分析（肝及び腎機能、グルコース、及び抹消血細胞数）もまたモニターすることができる。生化学分析の場合、腫瘍、肝及び他の組織をマウスから取り出し、ドライアイスで瞬間凍結して、分析まで-70

10

【0050】

#### 実施例26：プロドラッグ処置後の活性ウイルスの回収及び検出

腫瘍及び他の組織内の複製型アデノウイルスベクターレベルは、プロドラッグ処置後、腫瘍を採集し、続いてEDTA含有PBSバッファー中で細切/ホモゲナイズし、さらに文献（G. W. Demers et al., 2003, Cancer Res 63:4003-8）の記載にしたがって3回の凍結融解の繰り返しと超音波処理によって種々の時点でモニターすることができる。

20

サンプルを連続希釈し、限界希釈法によってHEK293細胞で力価を測定する（感染後10日の細胞変性効果を評価して50%組織培養感染量（TCID50）を決定する）。全てのサンプルを三つ組で調べる。

同様なアッセイをHSVについても用いる。このプロトコルでは、腫瘍組織は7%FBS及び滅菌ミルクを含むDMEM/F12バッファー中で4にてホモゲナイズされる。続いてサンプルを液体窒素中で凍結し、-80にて15分インキュベートし、続いて3回凍結融解を繰り返す。最後の遠心工程でデブリーを除去した後、標準的技術によりVero細胞で上清の力価を測定する。

異所性ウイルスデリバリーは、ウイルス特異的プライマー及び非腫瘍組織から抽出したゲノムDNAサンプルを用いてPCRによって評価する。各PCR反応について、100ngのDNA（約1700細胞から得られるゲノムDNAと等価、60pgゲノムDNA/細胞）を各プライマー対の50pmolと混合する。HSV tk（チミジンキナーゼ）に特異的なプライマーが用いられる。前記は5'-CTTAACAGCGTCAACAGCG及び5'-CAAAGAGGTGCGGGAGTであり、以下の文献に記載されている：J.N. Parker, 2006, Vaccine 24(10):1644-52。アデノウイルスに特異的プライマーはヘキソンコード領域から誘導される：5'-ACTATATGGACAACGTCAACCCATT-3'（フォワード）及び5'-AACTTCTGAGGCACCTGGATGT-3'（リバーズ）。コントロールPCRには、鑄型無し（陰性コントロール）及び陽性コントロールが含まれ、後者では、コントロール組織サンプルは、可能なPCR阻害物質を評価するために精製ウイルスDNAで“スパイク”されている。別の選択肢として、in situハイブリダイゼーションプロトコル（V.K. Gadi et al., 2000, Gene Therapy 7:1738-1743）を市販のビオチン化ウイルス特異的DNAプローブ（Enzo

30

40

【0051】

#### 実施例27：in vivoでのF-araAMP治療計画の比較研究

治療-スケジュール依存性の研究は、薬剤のin vivo評価過程の初期に実施される。後の比較実験を設計するために最適な治療スケジュールを明らかにすることが必要である。プロドラッグ（例えばF-araAMP）のスケジュール依存性試験でもっとも頻りに用いられるスケジュールには典型的には以下が含まれる：単一ボラス投与、1日1回で5又は9回投与、

50

4日毎に1回で3又は4回投与、及び4日間隔のマルチコースの場合に3時間毎に3又は8回投与のいくつかの変法。用量応答データを提供し、さらに有害な投薬レベルをベンチマークに含める（等毒性用量における種々の治療スケジュールを比較することは重要であるからである）ために、一連の投薬レベルを各スケジュールについて用いる。ある化合物を用いて観察される抗腫瘍活性は、用いた薬剤治療スケジュールに劇的に左右されることがある。例えばF-Adeのような薬剤の場合、強い抗腫瘍活性が、比較的短いF-araAMP治療スケジュール（例えばQ1D×3日；又はQ1D×3日、q4hx3）後に観察された。大腸菌PNPを使用する場合のF-araAMPスケジュールの改変例には以下が含まれる：160mg/kg q1dx3 - q4hx3；100mg/kg q2hx5；q1dx3；167mg/kg q1dx3 - q4hx3；250mg/kg q1dx3；及び25 - 100mg/kg q2hx5, q1dx3。

10

【0052】

実施例28：投与最適化

PNP及びAPRTをコードする複製型ウイルス、複製型ワクシニア、複製型レトロウイルス及びHSVの投与を含む方法に関して、バスタンダーの殺傷は、1)腫瘍がもはやウイルスの腫瘍溶解単独に対しては適切に応答しないとき、及び2)大腸菌PNP活性が強力な腫瘍退縮及びフルダラビンによる無腫瘍生存の仲介に十分であるとき、にベクターを適用することによって最適化させることができる。この時期は、分裂している腫瘍細胞に対する腫瘍溶解性ウイルスによる攻撃及び休止期のバスタンダー細胞に対する大腸菌PNP、APRTとプロドラッグによる攻撃の二股攻撃を可能にし、腫瘍塊を効果的に破壊する。さらにまた、そのようなアプローチは複製型ベクターの排除を可能にする（長期安全性の観点から所望されえる作用である）。

20

種々の調節配列要素をPNP及び/又はAPRT発現ベクター（例えばレンチウイルス、単純ヘルペスウイルス、及びアデノウイルス）に取り込むことができる。CMVプロモーターは、導入遺伝子の強力な発現を可能にする。さらにまた、EF-1プロモーター（Invitrogenから入手できる）、レンチウイルス構築物の関連で記載されたWPRE調節配列要素、及び/又は低酸素症応答配列要素（HRE）も含むことができる。

【0053】

実施例29

本発明の方法及び組成物を用いる場合、ギャップ結合も細胞-細胞接触も不要である。大腸菌PNPを発現するD54ヒトグリオーマ細胞におけるMeP-dRのバスタンダー活性がin vitroで例示される。クローニングリング（取り除かれる）の外側及び内側に播種したD54細胞は、真空グリスの薄い障壁（通過不能）によって分離される。全ての周辺細胞（リングの外側）は、大腸菌PNP発現を有するD54親細胞である。図8のA列及びC列では、リング内の細胞はD54-PNP細胞であり、B列及びD列では、リング内の細胞はD54親細胞である。A及びB列は100µMのMeP-dRで持続的に6日間処理される。毎日一並びの細胞を固定しクリスタルバイオレットで染色して細胞増殖をモニターした。

30

PNPプロドラッグ及びプリン塩基はともに自由に膜を浸透するので、ギャップ結合も細胞-細胞接触も、大腸菌PNPによって仲介されるバスタンダー殺傷には必要でない。本実施例は図8に示され、Hughesら（B.W. Hughes et al., 1998, J Biol Chem 273:2322-2328）が記載したPNPに関するin vitro実験と関連する。

40

【0054】

実施例30：レンチウイルス形質導入に続くバスタンダーin vivo殺傷

大腸菌PNPがMuLvを用いて発現されたときのMeP-dRによるバスタンダー殺傷は図9に示されている。20%のPNP-発現細胞（D54-PNP, MuLv形質導入細胞）及び80%の非発現細胞（D-54, 親細胞）を用いて、腫瘍が樹立される（腫瘍では17日目にPNP活性79±39単位が得られる。1PNP単位は1mgの腫瘍組織当たり1時間で1nMのMeP-dRを切断する）。MeP-dRの存在下又は非存在下での親腫瘍（17日目にPNP活性は0）の結果もまた示されている。これらの処置は、極端な体重減少又は致死性を示さず良好な耐性を示す。各群につき少なくとも6匹の動物を調べる（平均腫瘍重量が示されている）。MuLvのPNP発現はSV40プロモーターによって駆動される。化合物の腸管内切断を最小限にするために、マウスには、高用量

50

のMeP-dR (例えば168mg/kg/日を3日間)で処置する前にそれらの飲水に非吸収性抗体が与えられる(S. Bharara et al., 2005, Human Gene Therapy 16:339-347)。抗生物質は、低用量MeP-dRの場合又は結合活性の低い基質(例えばフルダリン)の場合には同時投与されない。PNP発現腫瘍ではMeP-dR処置群は非処置群に対し有意な差を示す( $p < 0.002$ )。

#### 【0055】

別個の発現方法による大腸菌PNP基質としてのMeP-dRの活性を確認するために、より活性なベクター系(組換えレンチウイルスのクローニング及び精製、D54腫瘍細胞における大腸菌PNPの発現、新規なD54-PNP腫瘍細胞株の単離及び増殖、動物での腫瘍増殖のモニタリングを含む)が用いられる。レンチウイルスベクター内の強力なCMV系プロモーターによって大腸菌PNPを発現する安定な細胞株から、D54グリオーマ腫瘍を樹立させる。図10は結果を示している。白丸:10%PNP発現/90%非発現腫瘍細胞から樹立された腫瘍、PNP活性は14日目で $9600 \pm 1300$ 単位。白三角:5%発現/95%非発現腫瘍細胞、PNP活性は $5500 \pm 1700$ 単位。白四角:2.5%発現/97.5%非発現細胞から樹立された腫瘍(PNP活性は $3600 \pm 530$ 単位)。黒記号は、賦形剤で処理した対応する(10%、5%、2.5%)PNP腫瘍(食塩水コントロール)の増殖を示す。各群につき少なくとも6匹を調べる。同一の処理を施した各実験の動物をMeP-dR療法(14日目)の開始直前に殺して腫瘍内PNP活性を測定する。MeP-dR処置群の抗腫瘍作用は、非処置群と有意な差を示す( $p < 0.05$ (2.5%腫瘍);及び $p < 0.005$ (5%及び10%腫瘍))。これらの実験は、*in vivo*でのバイスタンダー殺傷に対する実質的に高いPNP活性の影響を示す。100%のレンチウイルス形質導入細胞を含む300mgの腫瘍におけるPNP活性はほぼ126,000PNP単位であることが判明した(1単位 = 1 nmolのMeP-dRが1mgの腫瘍組織で1時間に変換される)。レンチウイルス発現を用いて大腸菌PNPレベルを調べたとき、図10に示すようにバイスタンダー殺傷の改善が観察される。

同様な実験を同時発現させた大腸菌PNP及びヒトAPRTを用いて実施し、APRT発現ベクターを加えてAPRTを過剰発現させることによる改善効果を観察する。

#### 【0056】

##### 実施例31

以前の実施例のようにD54腫瘍を樹立する(ただし腫瘍樹立に用いた細胞の1%が大腸菌PNPを発現する点を除く)(99%親細胞、1%非PNP発現細胞)( $p = 0.001$ )。MeP-dR処置の日(17日目)には、2つのコントロール腫瘍でPNP活性は1500及び1740単位である。

腫瘍細胞の一部(2.5 - 10%)が前記遺伝子を発現している場合、PNP活性レベルを増加させると*in vivo*におけるバイスタンダー殺傷が可能になる。より高用量のMeP-dRを用いる、より低いパーセンテージの*in vivo*大腸菌PNP発現による実験もまた実施される。1%のPNP発現細胞を用いた結果は図11に示されている。

血清中のMeP-dRの半減期は短く(15 - 20分程度)(V.K. Gadi et al., 2003, J Pharm Exper Therap 304:1280-1284)、ここで示した腫瘍の倍化時間は10から15日である。したがって、この結果は、分裂細胞及び非分裂細胞の両方が比較的短いプロドラッグ処理過程(MeP-dRの3回投与)の間に殺傷されることを示している。この発見はまた、腫瘍内酵素(MeP-dR)の量又はMeP-dRから細胞毒素への変換量を増加させることによってバイスタンダー殺傷を安全に増強させることができることを示している。

これらの細胞にヒトAPRT発現構築物を添加してバイスタンダー殺傷の改善をもたらす同様な実験が実施される。

#### 【0057】

##### 実施例32: 大腸菌PNP及び/又はヒトAPRT発現構築物及びフルダラビンの投与に対する腫瘍の応答

F-araAは、表1から計算されるように、化合物の $V_{max}/K_m$ を基準にすれば大腸菌PNPの基質としてはMeP-dRよりも活性は低い。しかしながら、F-araAMPは*in vivo*で抗腫瘍作用を仲介することができる。上記で述べたように、第一世代のシステムを用いて樹立した腫瘍(MuLv-PNP形質導入細胞、PNPはSV40のプロモーターの調節制御下にある)は、MeP-dRに続いて縮退を示す(V.K. Gadi et al., 2003, J Pharm Exper Therap 304:1280-1284; 及

び図9)。これら同じ腫瘍におけるF-araAMPは、100%の細胞が大腸菌PNPを発現する場合にほぼ30日間続く退縮を付与するが、その後、腫瘍はF-araAMP療法から逃れて進行する。さらにまた、MuLvによる大腸菌PNPの形質導入に続くF-araAMPではほとんど又は全くバイスタンダー殺傷は観察されない。

図12は、レンチウイルスを用いて100%の細胞が大腸菌PNPを発現する実験を示している。F-araAMPを用いた3日間の治療スケジュールにより、完全な退縮及び腫瘍治癒（12匹のうち12匹）が得られる。より低い割合（10%、5%、2.5%）のPNP発現細胞を含む腫瘍は、コントロール（図15）と比較して、添加されるプロドラッグの量（図13）及び腫瘍内PNP活性（図14）の両方に対して用量依存性を示す。わずか2.5%の腫瘍細胞がin vivoでPNPを発現する場合にF-araAMPによる抗腫瘍作用が観察される。F-araAMPのスケジュールを調節することによってもまたバイスタンダー殺傷がin vivoで改善され得る（図16）。

要約すれば、D54腫瘍は、マウスでゆっくりと増殖し、CNS腫瘍に対し用いられる標準的な抗癌剤に耐性を示すので、前臨床試験のための厳密なin vivoモデルである。例えば、BCNU（臨床承認された抗グリオーマ化学療法）は、最大許容用量でこれらの腫瘍に対する活性は低い。提供した本所見は、難治性腫瘍を本発明の方法及び組成物を用いて治療することができることを示している。F-araAMPは、MeP-dRよりもPNP基質として活性は低いが、前記はより強力な物質（MePに対してF-Ade）を遊離させることができる。F-araAMPの循環半減期はMeP-dRよりも長く（約20分に対して50分）、ピークレベルはMeP-dRよりもF-araAMPで顕著に高い（W.B. Parker et al., 2002, Cancer Gene Therapy 9:1-7）。

#### 【0058】

同様な実験を同時発現させた大腸菌PNP及びヒトAPRTを用いて実施し、APRT発現ベクターを加えてAPRTを過剰発現させることによる改善効果を観察する。

図12は、レンチウイルスを形質導入し、さらにF-araAMPで処置した大腸菌PNP発現腫瘍をもつマウスの治癒を示す。100%の細胞が大腸菌PNPを発現する腫瘍が、最大許容用量（MTD、100mg/kg、白丸）又はMTDの半分（黒三角）で処置される。各処置群に6匹の動物が含まれる。両F-araAMP処置群の全動物でそれらの腫瘍が治癒した。これらの実験では、過剰な体重減少又は望ましくない後遺症を引き起こすことなく腫瘍の退縮が観察される。これらの腫瘍におけるPNP活性は、薬剤処置の日に $126,000 \pm 16,000$ 単位である。F-araAMP処置群は非処置群に対し有意な相違を示す（ $p < 0.0001$ ）。

図13は、F-araAMPの抗腫瘍作用が、投与したプロドラッグレベルに対して用量依存性を示すことを示している。腫瘍は、10%の細胞が大腸菌PNPを発現している接種物から樹立される。薬剤処置の日のPNP発現は $14,200 \pm 681$  PNP単位である。抗腫瘍効率は、標準的な3日間スケジュール（q2h x 5, q1d x 3日間）で与えたとき、50mg/kg（黒三角）又は25mg/kg（白三角）よりも100mg/kgのF-araAMP（白丸）で高い。F-araAMP処置群は非処置群に対し有意な相違を示す（ $p < 0.001$ ）。

図14は、大腸菌PNP及びF-araAMPを用いた腫瘍の退縮はまた自殺遺伝子発現レベルに対し用量依存性を示すことを示している。D54グリオーマ腫瘍は、PNP発現細胞の割合が低い（さらに非発現（親）細胞が多い）ものを用いて樹立される。（白記号：F-araAMP療法、黒記号：プロドラッグの無い治療、丸：2.5%、三角：5%、及び四角：10%PNP形質導入細胞）。F-araAMP投与スケジュールは100mg/kg q2h x 5, q1d x 3であった。F-araAMP処置群は非処置群に対し有意な相違を示す（ $p < 0.001$ ）。

図15は、F-araAMPはコントロール（PNP無発現）D54腫瘍に対し影響を示さないことを示している。コントロール導入遺伝子（緑色蛍光タンパク質、それ以外についてはLenti-PNPと同一のベクターから発現される）を用いたF-araAMPの投与（白丸、標準的3日間スケジュールによる）は、抗腫瘍作用を示さない（PNP発現無し）。

図16は、F-araAMPマルチスケジュールはバイスタンダー殺傷を示すことを示している。腫瘍は5%のPNP発現細胞を含む、さらに2つの異なるフルダラピンスケジュールが示される。F-araAMP処置群は非処置群に対し有意な相違を示す（ $p < 0.001$ ）。

#### 【0059】

実施例33：弱毒アデノウイルスベクターを用いる大腸菌PNP及び/又はAPRTの腫瘍細胞へ

10

20

30

40

50

### のデリバリー

図20にはAd-PNP仲介 *in vitro*細胞殺傷が示されている。コンフルエントなHeLa細胞を種々のMOIでAd-PNPに感染させる。感染後24時間して、MeP-dRを1セットの細胞に40 µg/mLで添加する。感染後6日目に、全ての培養をクリスタルバイオレットで染色し、生細胞を可視化する。

図17は、本明細書に記載した大腸菌PNPをコードするE1a欠失アデノウイルスベクターを用いた結果を示している。このアッセイによれば、*in vitro*ではMeP-dRと併用して癌細胞集団を除去するためにMOI 0.1 - 100のアデノウイルスが十分である。

同様な実験を同時発現させた大腸菌PNPとヒトAPRTを用いて実施し、APRT発現ベクターを加えてAPRTを過剰発現させることによる改善効果を観察する。

10

【 0 0 6 0 】

#### 実施例34

Ad-PNPによる大腸菌PNPのデリバリーに続くF-araAMPの抗腫瘍作用が図18に示されている。D54ヒトグリオーマ腫瘍（およそ250mg）にAd-PNP（ $2 \times 10^9$  PFU、白丸）または生理食塩水（黒丸）を注射する。ベクター投与の2日後に採取した腫瘍抽出物中のPNP活性はおよそ5000PNP単位である。A F-araAMPを伴うAd-PNPは腫瘍増殖を低下させる（黒三角）（ウイルス単独または未処置コントロールに比較して $p < 0.002$ ）。極端な体重減少、動物の死亡又は他の毒性はこの実験では観察されなかった。

本明細書に記載した大腸菌PNPをコードするE1a欠失アデノウイルスベクターの直接接種後のマウスのD54腫瘍内の局在性研究は、ベクター投与に使用した注射針の軌跡に沿ったものと推定される局在化された導入遺伝子発現を示している。図21に示した結果は、固形腫瘍における大腸菌PNPの発現とそれに続くF-araAMP投与のために腫瘍増殖は遅延することを示している。

20

同様な実験を同時発現させた大腸菌PNPとヒトAPRTを用いて実施し、APRT発現ベクターを加えてAPRTを過剰発現させることによる改善効果を観察する。

本明細書で参照したタンパク質及び核酸配列：

配列番号 1

ホモサピエンス アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（APRT）

タンパク質：

MADSELQLVEQR IRSFPDFPTPGVVFRD I SPVLKDPASFRAAI GLLARHLKATHGGR IDY IAGLDSRGLFLGSPSLAQELG  
LGCVL I RKRKGLPGPTLWASYSLEYGKAELE I QKDALEPGQRVVVVDDLLATGGTMNAACELLGRLQAEVLECVSLVELT  
SLKGREKLAPVPPFFSLLQYE

30

【 0 0 6 1 】

配列番号 2

ホモサピエンス アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（APRT）

DNA：コード配列36-578

1 gcgctcgggc tgccgctggc tcttcgcacg cggccatggc cgactccgag ctgcagctgg  
61 ttgagcagcg gatccgcagc ttccccgact tccccacccc aggcgtggta ttcagggaca  
121 tctcgcccgt cctgaaggac cccgcctcct tccgcgccgc catcggcctc ctggcgcgac  
181 acctgaaggc gaccacggg ggccgcatcg actacatcgc aggcctagac tcccagggct  
241 tctctcttgg cccctccctg gccaggagc ttggactggg ctgcgtgctc atccgaaagc  
301 gggggaagct gccaggcccc actctgtggg cctcctattc cctggagtac ggggaaggctg  
361 agctggagat tcagaaagac gccctggagc caggacagag ggtggtcgtc gtggatgatc  
421 tgctggccac tgggtggaacc atgaacgctg cctgtgagct gctgggccgc ctgcaggctg  
481 aggtcctgga gtgcgtgagc ctggtggagc tgacctcgtc taagggcagg gagaagctgg  
541 cacctgtacc ctctctctc ctccctgcagt atgagtgacc acagggcctc ccagcccaac  
601 atctccagct ggatcccagg gaaatatcag ccttgggcaa ctgcagtgac caggggcacc  
661 ggctgccac agggaacaca ttctttgct ggggttcagc gcctctcctg gggctggaag  
721 tgccaaagcc tggggcaaag ctgtgtttca gccacactga acccaattac acacagcggg  
781 agaacgcagt aaacagcttt cccacaa

40

50

## 【 0 0 6 2 】

配列番号 3

大腸菌PNPタンパク質：

Met Ala Thr Pro His Ile Asn Ala Glu Met Gly Asp Phe Ala Asp Val  
 Val Leu Met Pro Gly Asp Pro Leu Arg Ala Lys Tyr Ile Ala Glu Thr  
 Phe Leu Glu Asp Ala Arg Glu Val Asn Asn Val Arg Gly Met Leu Gly  
 Phe Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Arg Lys Ile Ser Val Met Gly His Gly  
 Met Gly Ile Pro Ser Cys Ser Ile Tyr Thr Lys Glu Leu Ile Thr Asp  
 Phe Gly Val Lys Lys Ile Ile Arg Val Gly Ser Cys Gly Ala Val Leu  
 Pro His Val Lys Leu Arg Asp Val Val Ile Gly Met Gly Ala Cys Thr  
 Asp Ser Lys Val Asn Arg Ile Arg Phe Lys Asp His Asp Phe Ala Ala  
 Ile Ala Asp Phe Asp Met Val Arg Asn Ala Val Asp Ala Ala Lys Ala  
 Leu Gly Ile Asp Ala Arg Val Gly Asn Leu Phe Ser Ala Asp Leu Phe  
 Tyr Ser Pro Asp Gly Glu Met Phe Asp Val Met Glu Lys Tyr Gly Ile  
 Leu Gly Val Glu Met Glu Ala Ala Gly Ile Tyr Gly Val Ala Ala Glu  
 Phe Gly Ala Lys Ala Leu Thr Ile Cys Thr Val Ser Asp His Ile Arg  
 Thr His Glu Gln Thr Thr Ala Ala Glu Arg Gln Thr Thr Phe Asn Asp  
 Met Ile Lys Ile Ala Leu Glu Ser Val Leu Leu Gly Asp Lys Glu

10

## 【 0 0 6 3 】

配列番号 4

大腸菌PNP

DNA：

atggctacc cacacattaa tgcagaaatg ggcgatttcg ctgacgtagt ttgatgccca 60  
 ggcgaccgc tgcgtgcgaa gtatatgtct gaaactttcc ttgaagatgc ccgtgaagtg 120  
 aacaacgttc gcggtatgct gggcttcacc ggtacttaca aaggccgcaa aatttccgta 180  
 atgggtcacg gtatgggtat cccgtcctgc tccatctaca ccaaagaact gatcaccgat 240  
 ttcggcgtga agaaaattat ccgctgggt tccgtgtggcg cagttctgcc gcacgtaaaa 300  
 ctgcgcgacg tctgtatcgg tatgggtgcc tgcaccgatt ccaaagttaa ccgcatccgt 360  
 tttaaagacc atgactttgc cgctatcgct gacttcgaca tgggtgcgtaa cgcagtagat 420  
 gcagctaaag cactgggtat tgatgctcgc gtgggtaacc tgttctccgc tgacctgttc 480  
 tactctccgg acggcgaaat gttcgacgtg atggaaaaat acggcattct cggcgtggaa 540  
 atggaagcgg ctggtatcta cggcgtcgtc gcagaatttg gcgcgaaagc cctgaccatc 600  
 tgcaccgtat ctgaccacat ccgcactcac gagcagacca ctgccgctga gcgtcagact 660  
 acctcaacg acatgatcaa aatcgactg gaatccgttc tgcctggcga taaagagtaa 720

30

## 【 0 0 6 4 】

本明細書に記載されたいずれの特許又は刊行物も、あたかも個々の刊行物が具体的及び個々に表示されたかのように同程度に参照により本明細書に含まれる。特に、米国仮特許出願60/681,305(2005年5月16日出願)はその全体が参照により本明細書に含まれる。

本明細書に記載した組成物及び方法は現時点での好ましい、典型的な実施態様であり、本発明の範囲の制限を意図するものではない。それらの変更及び他の使用は当業者には容易であろう。そのような変更及び他の使用は、特許請求の範囲に記載の本発明の範囲から逸脱することなく為され得る。

40

【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 6 5 】

【 図 1 】 組換え大腸菌PNP及びAPRTデリバリー並びに特定のプロドラッグの投与環境下での腫瘍細胞殺傷におけるAPRTaseの役割を示す模式図である。

【 図 2 】 ヌクレオシドプロドラッグのプリン塩基へのグリコシド切断を示す。

【 図 3 】 完全長のヒトAPRTをコードするPCR生成物である543bpバンドを示す、蛍光標識核酸のゲル画像である。

【 図 4 】 ヒトAPRTをコードするDNA配列を含む、本発明の発現ベクターの模式図である。

50

- 【図5】本発明の抗体を用いて検出した大腸菌PNPの免疫沈澱画像である。
- 【図6】本発明の抗体を用いてウェスタンブロットによって検出した大腸菌PNPの画像である。
- 【図7】活性なPNP基質、F-dAdoからF-Adeの生成を示すグラフである。
- 【図8】大腸菌PNPを発現するD54ヒトグリオーマ細胞におけるMeP-dRのin vitroバイスタンダー活性を示す画像である。
- 【図9】MuLV発現ベクターを用いて大腸菌PNPが発現された場合のMeP-dRによるバイスタンダー殺傷を示すグラフである。
- 【図10】プロドラッグ存在下及び非存在下でのD54グリオーマin vivo腫瘍に対する、組換えレンチウイルス発現大腸菌PNPの作用を示すグラフである。
- 【図11】腫瘍細胞の1%のみがPNP発現細胞である、D54グリオーマin vivo腫瘍に対する、組換えレンチウイルス発現大腸菌PNPの作用を示すグラフである。
- 【図12】100%の細胞がレンチウイルスがコードする導入遺伝子を発現する実験を示すグラフである。
- 【図13】添加プロドラッグ量に対する用量依存性を示すグラフである。
- 【図14】PNP-発現細胞の割合が低い(10%、5%、2.5%)腫瘍は、腫瘍内PNP活性に対し用量依存性を示すことを示すグラフである。
- 【図15】図13及び14のグラフと比較されるコントロール処置の作用を示すグラフである。
- 【図16】種々のプロドラッグ投与スケジュールに関するいくつかの影響を示すグラフである。
- 【図17】本発明にしたがって、Ela欠失導入遺伝子コードアデノウイルスベクターを用いた細胞殺傷作用を示す画像である。
- 【図18】本発明のアデノウイルス発現ベクターをデリバーした後のF-araAMPの抗腫瘍作用を示すグラフである。
- 【図1】

10

20

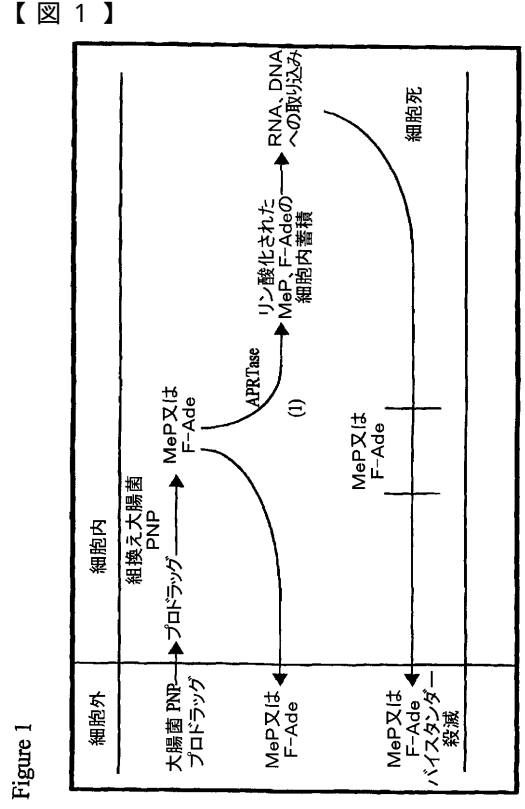
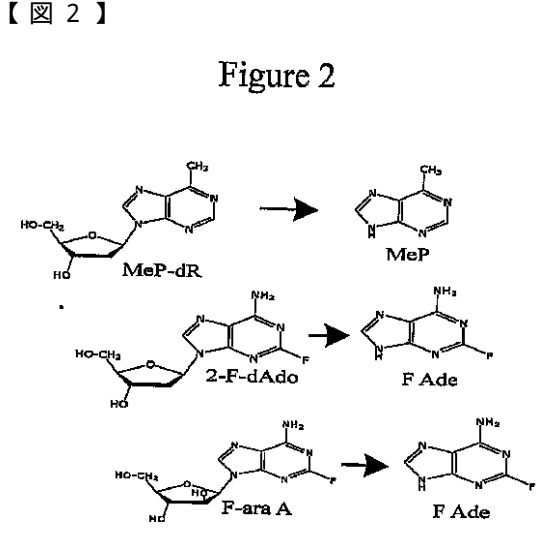


Figure 1



【図3】

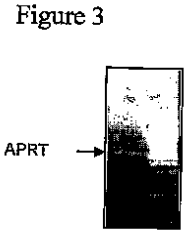
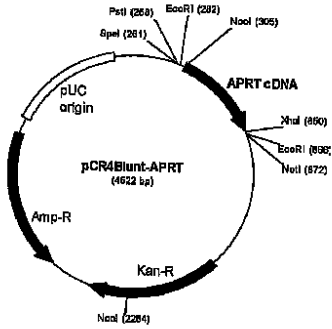


Figure 3

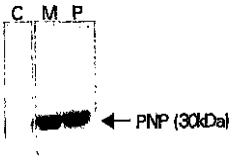
【 図 4 】

Figure 4



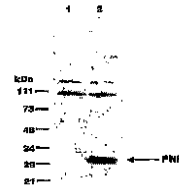
【 図 5 】

Figure 5



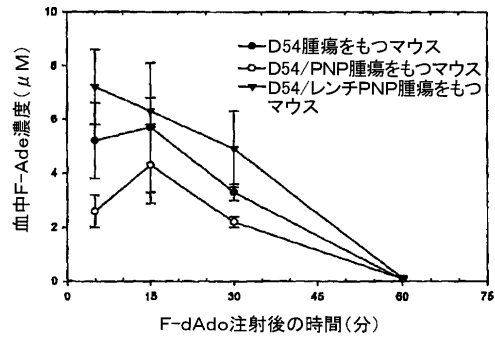
【 図 6 】

Figure 6



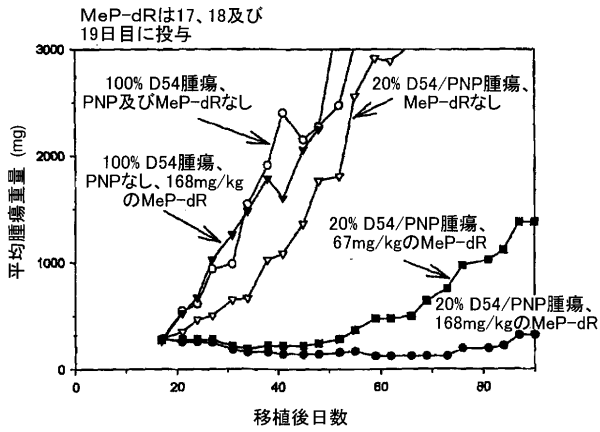
【 図 7 】

Figure 7



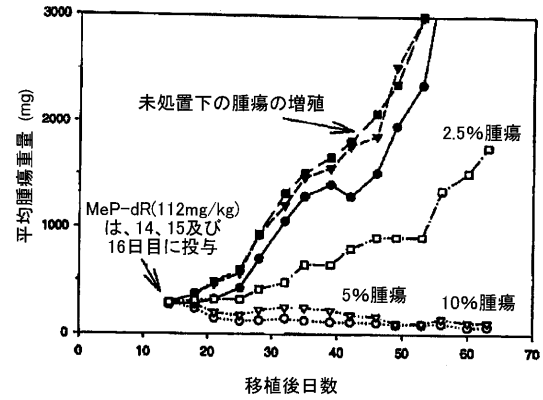
【 図 9 】

Figure 9



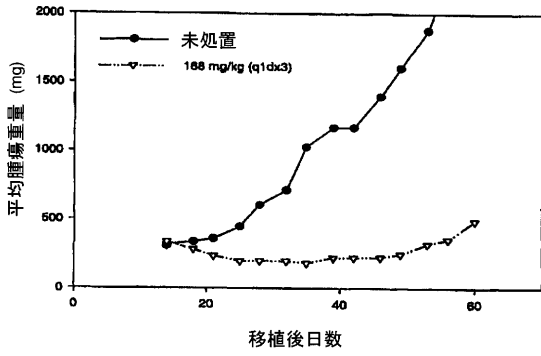
【 図 10 】

Figure 10



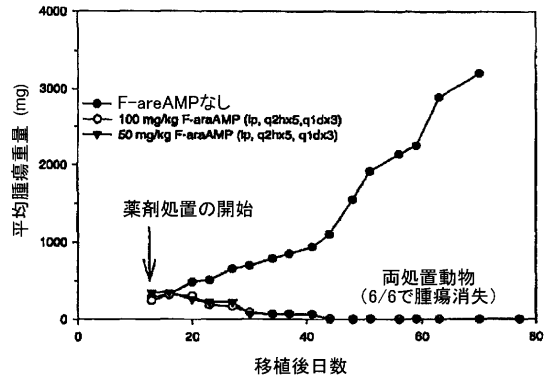
【 図 1 1 】

Figure 11



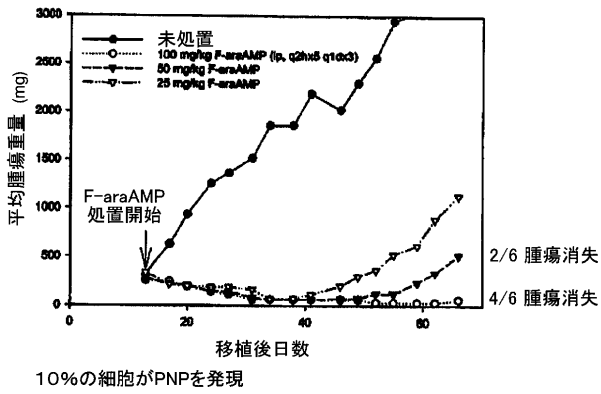
【 図 1 2 】

Figure 12



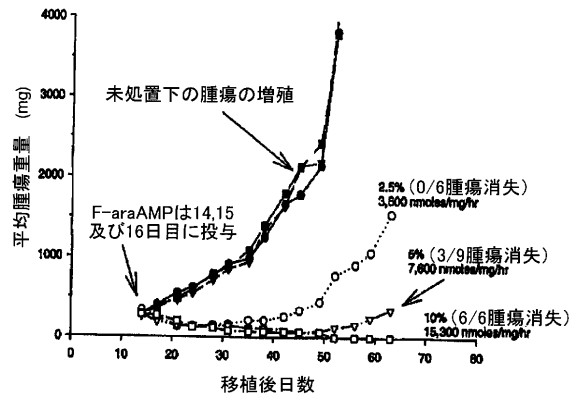
【 図 1 3 】

Figure 13



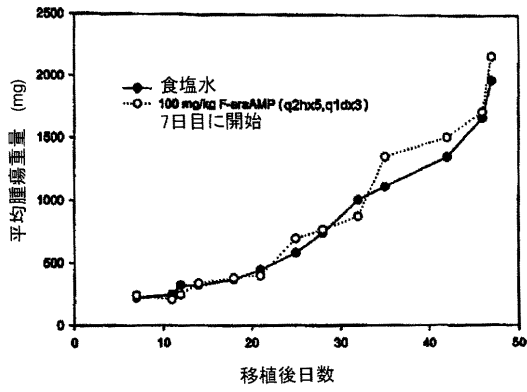
【 図 1 4 】

Figure 14



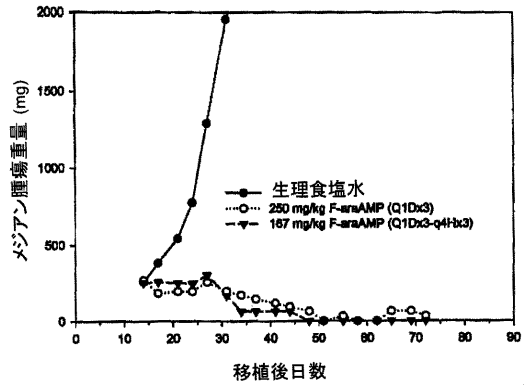
【 図 1 5 】

Figure 15



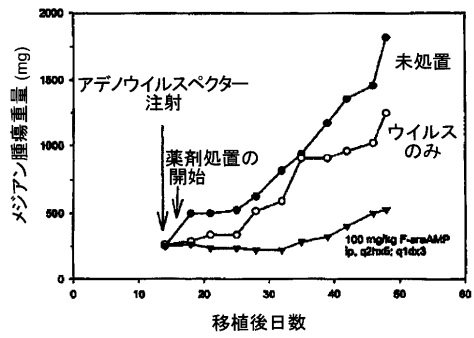
【 図 1 6 】

Figure 16

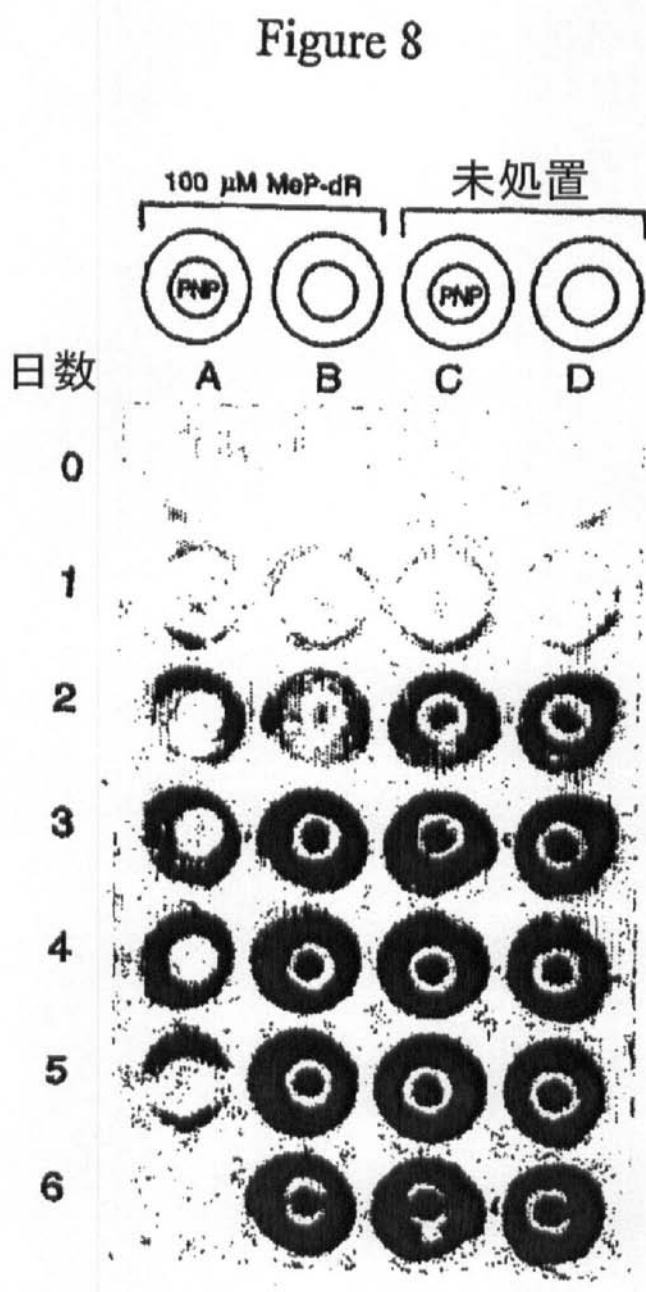


【 図 1 8 】

Figure 18

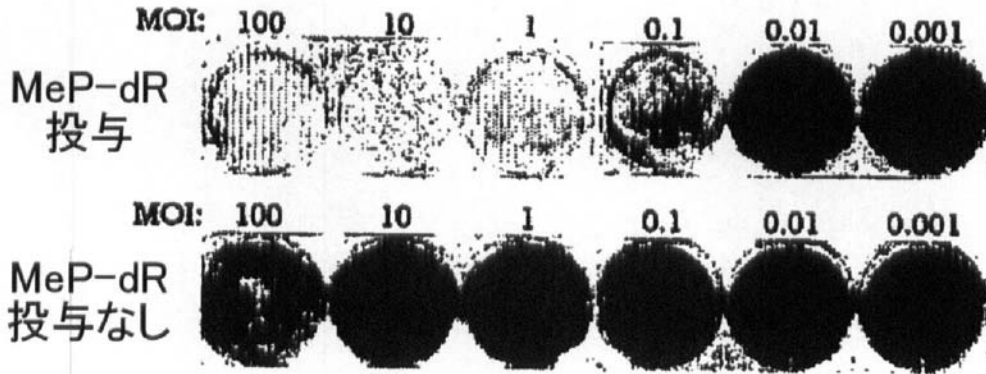


【 図 8 】



【図 17】

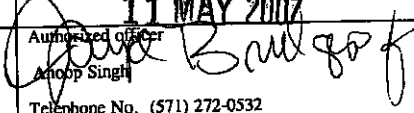
Figure 17



【配列表】

[2008545653000001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US06/18844
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC: <b>A61K 48/00( 2006.01)</b>  USPC: <b>514/44;424/93.21</b> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/44;424/93.21  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) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/0235071 A1 (LIGHTCAP et al. ) 25 November 2004 (25.11.2004), see page 12, para 352, page 79, para 992 and 997 .	28-32
---		1-34
Y	HERSHFIELD, M. S. et al. Use of site-directed mutagenesis to enhance the epitope-shielding effect of covalent modification of proteins with polyethylene glycol. Proc Natl Acad Sci, U S A. August 1991, Vol. 88, No. 16, pages 7185-7189, entire document.	35
X	US 6,958,318 B1 ( SORSCHER et al.) 10 December 2002 (10.12.2005), entire document.	1-34
Y	PARKER, W. B. et al. Metabolism and metabolic actions of 6-methylpurine and 2-fluoroadenine in human cells. Biochemical Pharmacology. May1998, Vol. 55, No. 10, pages 1673-1681, entire document.	1-34
Y		1-34
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 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 <b>10 April 2007 (10.04.2007)</b>		Date of mailing of the international search report <b>11 MAY 2007</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer  Anoop Singh Telephone No. (571) 272-0532

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US06/18844

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LEE, M. et al. Prevention of autoimmune insulinitis by delivery of a chimeric plasmid encoding interleukin-4 and interleukin-10. <i>J Control Release</i> . March 2003, Vol. 88, No. 2, pages 333-342, see figure 1.	20-27 and 34
A	PARKER, W. B. et al. Antitumor activity of 2-fluoro-2'-deoxyadenosine against tumors that express <i>Escherichia coli</i> purine nucleoside phosphorylase. <i>Cancer Gene Therapy</i> . January 2003, Vol. 10, No. 1, pages 23-29.	1-35

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US06/18844

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:  
EAST: USPAT, PG-PUB, JPO, EPO, DERWENT  
STN: CAPLUS, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>			C 1 2 N 15/00			A
<b>C 0 7 K 16/40 (2006.01)</b>			C 0 7 K 16/40			
<b>A 6 1 K 38/45 (2006.01)</b>			A 6 1 K 37/52			

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

(74) 代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72) 発明者 ソーシャー エリック

アメリカ合衆国 アラバマ州 3 5 2 2 2 バーミンガム コンロイ ロード 9 2 4

(72) 発明者 パーカー ウィリアム

アメリカ合衆国 アラバマ州 3 5 2 0 5 バーミンガム サーティセカンド ストリート サウス 1 0 2 2

(72) 発明者 ホン ジョン エス

アメリカ合衆国 アラバマ州 3 5 2 2 6 バーミンガム クロスゲイト ドライヴ 1 6 5 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA10 CA02 DA02 EA02 FA15 HA17

4C084 AA13 NA14 ZB212 ZB261 ZB321

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZB21 ZB26 ZB32

4H045 AA11 DA75 EA28 EA51