

(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2004-529888

(P2004-529888A)

(43) 公表日 平成16年9月30日(2004.9.30)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/12	A 6 1 K 35/12	4 B O 6 5
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 C O 8 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00 H	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00 K	4 C O 8 6
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 105 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-568710 (P2002-568710)	(71) 出願人	592249566
(86) (22) 出願日	平成14年2月26日 (2002.2.26)		ゲゼルシャフト フェア ビオテヒノロジ
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月25日 (2003.8.25)		ッシェ フォルシュング エムペーハー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/002036		(ゲーペーエフ)
(87) 国際公開番号	W02002/068614		ドイツ連邦共和国 D-3300 ブラウ
(87) 国際公開日	平成14年9月6日 (2002.9.6)		ンシュバイグ マッセルオーデル ベッ
(31) 優先権主張番号	01104423.7		グ 1
(32) 優先日	平成13年2月26日 (2001.2.26)	(74) 代理人	100076439
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 飯田 敏三

(72) 発明者 クローガー, アンドレア
ドイツ連邦共和国 D-38124 ブラ
ウンシュバイグ マッセルオーデル ベ
ッグ 1

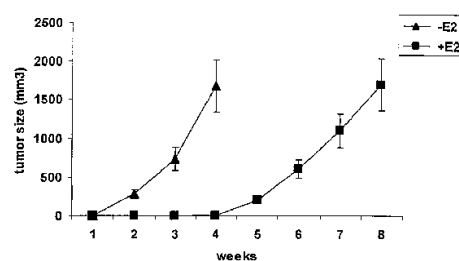
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インターフェロン調節因子-1/ヒトエストロゲン受容体融合タンパク質および癌を治療するためのその使用

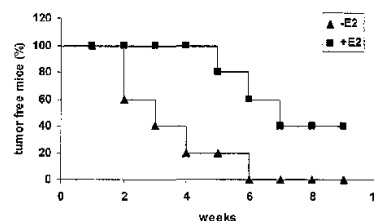
(57) 【要約】

本発明は、 β -エストラジオールにより可逆的に活性化可能であるインターフェロン調節因子-1/ヒトエストロゲン受容体融合タンパク質に、ならびに癌を治療するための、特に肝細胞癌を治療するためのその使用に関する。

A



B



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

遺伝子構築物またはポリヌクレオチドの使用であって、それにより I R F ファミリーのメンバーである該遺伝子構築物またはポリヌクレオチドの遺伝子産物の活性が、腫瘍性、感染性および／または免疫疾患に対する治療、予防、防御的治療および／または予防免疫接種のために活性化される使用。

【請求項 2】

遺伝子産物としての I R F ファミリーの前記メンバーは、野生型 I R F - 1 , 合成 I R F - 1 、免疫学的活性 I R F - 1 変異体、I R F - 1 以外の I R F ファミリーの野生型メンバー、I R F - 1 以外の I R F ファミリーの合成メンバー、I R F - 1 以外の I R F ファミリーのメンバーの免疫学的活性変異体、およびそれらの融合タンパク質から成る群から選択される請求項 1 記載の使用。

【請求項 3】

哺乳類、特にヒトの治療のための請求項 1 および／または 2 記載の使用。

【請求項 4】

前記遺伝子構築物は、融合タンパク質のドメインの 1 つとしての前記 I R F ファミリーのメンバーおよび該融合タンパク質の別のドメインとしての外来タンパク質を含む融合タンパク質としての前記 I R F ファミリーのメンバーをコードし、前記融合タンパク質の活性は、化学的または物理的手段によりスイッチを切り換えられ得る 1 つまたは複数の先行の請求項で特定された使用。

【請求項 5】

前記遺伝子構築物は、I R F - 1 / h E R 融合タンパク質の前記発現をコードし、該融合タンパク質の活性は、エストロゲンまたは抗エストロゲン活性を有する化合物により制御され得る 1 つまたは複数の先行の請求項で特定された使用。

【請求項 6】

前記遺伝子構築物または前記ポリヌクレオチドは、哺乳類細胞中への移入のための生成物として、特にウイルスベクター、好ましくはアデノウイルスベクターとして提供される 1 つまたは複数の先行の請求項で特定された使用。

【請求項 7】

前記発現は、化学的または物理的活性化によりスイッチを入れられ得る 1 つまたは複数の先行の請求項で特定された使用。

【請求項 8】

前記発現は、加熱によりまたは放射線照射によりスイッチを入れられ得る請求項 7 記載の使用。

【請求項 9】

前記発現は、調節可能プロモーターによりスイッチを入れられ得る請求項 7 および／または 8 記載の使用。

【請求項 10】

前記発現は、外的刺激により、特にテトラサイクリンによりスイッチを切り換えられ得る請求項 9 記載の使用。

【請求項 11】

1 つまたは複数の先行の請求項で特定された遺伝子構築物またはポリヌクレオチドを、ウイルス、細菌、真菌および寄生生物起源、あるいは腫瘍細胞由来の 1 つまたは複数の抗原コード遺伝子からなる群から選択される 1 つまたは複数の抗原と一緒に含むワクチン。

【請求項 12】

前記遺伝子構築物またはポリヌクレオチドおよび前記抗原コード配列(単数または複数)は、複数の別個のベクター、すべての構成成分を提供するベクター、またはポリシストロン発現ユニットを用いて提供される請求項 11 記載のワクチン。

【請求項 13】

前記遺伝子構築物またはポリヌクレオチドおよび前記抗原コード配列(単数または複数)は

、ウイルスまたは細菌担体として提供される請求項 1 1 および／または 1 2 記載のワクチン。

【請求項 1 4】

腫瘍性、感染性および／または免疫疾患の治療、予防、防御的治療および／または予防免疫接種のための調製物の製造のための 1 つまたは複数の先行の請求項で特定された使用。

【請求項 1 5】

腫瘍性、感染性および／または免疫疾患の治療、予防、防御的治療および／または予防免疫接種のための、I R F ファミリーのメンバーあるいは融合タンパク質の構成成分の 1 つとしての前記メンバーおよび該融合タンパク質の別の構成成分としての治療的に許容可能なタンパク質を有するかまたはそれらから成る融合タンパク質。

10

【請求項 1 6】

I R F - 1 が前記融合タンパク質の構成成分の 1 つであり、および／または h E R が前記融合タンパク質の他の構成成分である請求項 1 5 記載の融合タンパク質。

【請求項 1 7】

腫瘍性、感染性および／または免疫疾患の治療、予防、防御的治療および／または予防免疫接種のための、I R F ファミリーのメンバーあるいは融合タンパク質の構成成分の 1 つとしての前記メンバーおよび該融合タンパク質の別の構成成分としての治療的に許容可能なタンパク質を有するかまたはそれらからなる融合タンパク質からなるかあるいは含む予防的および／または治療的組成物。

【請求項 1 8】

I R F - 1 が融合タンパク質の構成成分の 1 つであり、および／または h E R が前記構成成分の他の構成成分である請求項 1 7 記載の組成物。

20

【請求項 1 9】

前記 I R F ファミリーのメンバーの発現のための請求項 1 ないし 1 0 のうちの 1 つまたは複数に規定される遺伝子構築物またはポリヌクレオチドが e x v i v o でチャージされたヒト細胞。

【請求項 2 0】

遺伝子移入、物理的形質導入、特に電気穿孔、化学的形質導入またはウイルス形質導入によりチャージされた請求項 1 9 記載のヒト細胞。

【請求項 2 1】

自系または同種異系細胞である請求項 1 9 および／または 2 0 記載のヒト細胞。

30

【請求項 2 2】

腫瘍細胞、特に癌細胞、好ましくは肝細胞癌細胞、肉腫細胞または造血系由来の腫瘍である請求項 1 9 ないし 2 1 のうちの 1 つまたは複数に記載のヒト細胞。

【請求項 2 3】

腫瘍性、感染性および／または免疫疾患に対する治療、予防、防御的治療および／または予防免疫接種のための請求項 1 9 ないし 2 2 のうちの 1 つまたは複数に記載のヒト細胞。

【請求項 2 4】

請求項 1 1 ないし 1 3 のうちの 1 つまたは複数に記載の遺伝子を用いて請求項 2 0 記載の遺伝子移入を施されたヒト抗原提示細胞 (A P C)。

40

【請求項 2 5】

I R F ファミリーの前記メンバーの活性レベルは、インターフェロン β により誘起される I R F - 1 のレベルより高い請求項 1 9 ないし 2 4 のうちの 1 つまたは複数に記載のヒト細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、腫瘍を治療する方法の開発に関する。本方法は、I R F - 1、特に β - エストラジオールにより不可逆的に活性化可能である I R F - 1 / ヒトエストロゲン受容体融合タンパク質の活性化に基づいている。

50

【0002】

本明細書中で用いられる略語：

A F P = α フェトプロテイン

c - H a - r a s = r a s 癌遺伝子

c - m y c = m y c 癌遺伝子

C T L = 細胞傷害性 T リンパ球

E 2 = β - エストラジオール

F C S = ウシ胎児血清

f o s B = 転写因子 f o s B

H C C = 肝細胞癌細胞

H E R 1 = E G F 受容体

I C E = カスパーゼ

I L - 1 5 = インターロイキン - 1 5

i N O S = 誘導 N O シンターゼ

I S G = インターフェロン刺激遺伝子

I S G F 3 = I R F - 1 関連サブユニット

I S R E = インターフェロン刺激応答要素

L M P 2 = タンパク質プロセッシング因子

m A F P = ネズミ α フェトプロテイン

M E C L 1 = 多触媒性エンドペプチダーゼ複合体 1

M H C = 主要組織適合性複合体

N K 細胞 = ナチュラルキラー細胞

O A S E = 2' , 5' - オリゴ (A) シンターゼ

P K R = プロテインキナーゼ R

r a s 誘導 = r a s タンパク質の誘導

T A P - 1 = タンパク質プロセッシング因子

T H 1 = 1 型 T ヘルパー細胞

【0003】

詳細な書誌情報を有する引用参考文献の完全一覧を、本明細書の末尾に示す。

【0004】

肝細胞癌 (H C C) は、世界中の全ての悪性疾患の中で第五位の発生頻度であって、1990 年の新症例数は 437, 000 と概算されている (1)。種々の非外科的治療法が開発され、外科技法は大いに改良されてきたが、これらの療法の中で、H C C 患者の非常に不十分な予後を有意に改善したものはない。全体的な 5 年生存率は全世界で 2 % に過ぎず (2)、したがって H C C のための新規の遺伝子および免疫療法戦略が開発されつつある。当該発明者等は、腫瘍の治療のための腫瘍サプレッサーおよび免疫モジュレーターとしてのインターフェロン調節因子 - 1 (I R F - 1) の広範な役割を用いようと試みた (3)。本発明者等は、マウスにおける免疫応答性同系 H C C 腫瘍モデルおよび免疫不全マウスにおける試験のための別の腫瘍細胞系を用いた。

【0005】

I R F - 1 発現は多数のインターフェロン刺激遺伝子 (I S G) の誘導をもたらす (4 ~ 6)、それにより組織適合性抗原 (7) および抗ウイルス状態 (5、8) の誘導を含めた通常の I F N - 機能を誘導する。I R F - 1 遺伝子はそれ自体、I F N により誘導可能であるため、それは I F N 媒介性細胞応答に関与され得ることが示唆された (5、9、10)。しかしながら機能的 I R F - 1 遺伝子を欠くマウスおよび細胞では、典型的 I S G (例えば 9 ~ 27、1 ~ 8、P K R) の I F N 誘導性誘導は影響を受けない (8、11 ~ 13)。したがって I R F - 1 は、I S G - プロモーターを I R F - 1 関連サブユニット I S G F 3 で結合する I S G F - 3 により I S G の I F N 特異的誘導を刺激すると思われる (14)。これらのマウスにおける特異的変更は、I F N - β に対する応答において i N O S (誘導可能 N O シンターゼ) 誘導を欠くことである (15)。

【0006】

I R F-1 は、DNA 結合およびトランス活性化により抗増殖作用を発揮する(4)。成長抑制作用を発揮する複数の遺伝子を誘導することが既知である。それらの例としては、リシルオキシダーゼ(16)、PKR(17)、2'-5' OASE(18)、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(19)およびII型アンギオテンシン受容体(20)がある。繊維芽細胞および上皮起源の確立された細胞系では、I R F-1 はアポトーシスの兆候を伴わずに細胞増殖停止をもたらす(21)。しかしながらras誘導性アポトーシスに必要とされる腫瘍サプレッサーp53の活性(22、23)と同様に、I R F-1 は癌遺伝子依存性アポトーシスを発揮し得る。当該発明者等は、I R F-1 により成長抑制される3T3細胞が条件付HER1癌遺伝子活性化後にアポトーシスを受けることを示した(24)。実際、ICEのようなある種のカスパーゼ遺伝子のプロモーター領域はISRE様配列を含有する(25)。これらの遺伝子は、I R F-1 の標的であり得る(26)。

【0007】

I R F-1 は、腫瘍サプレッサーとして確認された(4、17、24、27)。ヒトにおけるI R F-1 遺伝子座の染色体欠失は、脊髄形成異常および)ある種の白血病に関連する(28)。I R F-1 遺伝子における突然変異を有さない一次胚繊維芽細胞は、単一癌遺伝子(c-Ha-ras)の発現による形質転換を受け易い。これらのI R F-1^{-/-}細胞は、c-Ha-ras癌遺伝子発現および血清飢餓時にアポトーシスを受けないが、一方、I R F-1 遺伝子を保有する野生型細胞はプログラムされた細胞死を受ける(21)。(29)。I R F-1 発現はまた、c-mycおよびfosB癌遺伝子により発揮される腫瘍原性表現型を復帰させる(29)。c-Ha-rasおよびI R F-1 を欠くマウスはより高率の腫瘍原性を示すことをさらなるデータは示した(30)。

【0008】

腫瘍サプレッサーとしてのI R F-1 のin vivoでの作用は、複雑である。細胞の種類によって、I R F-1 は成長阻害、アポトーシスを誘導し、細胞外マトリクスならびに免疫調節機能に影響を及ぼす。I R F-1 は、多数の免疫調節作用、例えばMHCクラスI(31、32)、iNOS(15)、IFN-β(11)転写を誘導し、IL-15の適切な発現にも必要である(33)。I R F-1 の一過性発現は、IFN-β遺伝子の活性化をもたらす(9、34、35)。I R F-1 ノックアウト細胞を用いた試験は、I R F-1 がNK細胞の分化および機能に関与し(33、36)、TH1型のTヘルパー細胞の生成、ならびにDNA損傷に関与することを実証する(26、37)。I R F-1 はさらに、LMP2、TAP-1およびMECL1の転写的誘導(38、39)ならびにMHCクラスIIの誘導(7、40)による抗原提示の上向き調節に関与する。これらの事実は、I R F-1 が抗原の提示のための補刺激因子として作用し得ることを示唆する。

【発明の開示】

【0009】

本発明の目的は、腫瘍に対する療法的アプローチに関するI R F-1 の効能を実証することであった。本報告は、β-エストラジオール(E2)の存在下で活性になるI R F-1 /ヒトエストロゲン受容体融合タンパク質をコードするプラスミドおよびネズミ細胞系の構築(4)、およびこれらの細胞系のin vitroでの表現型の詳細な特徴付けを詳述する。さらに本発明者等は、免疫応答性および非応答性マウスを用いたin vivoでの腫瘍増殖に対するこの活性化可能I R F-1 系の防御的および治療的能力を記載し、腫瘍に対するT細胞応答を特徴付け、かつ、HCC特異的自己分化抗原マウスα-フェトプロテイン(AFP)に対する免疫学的耐性(41)がこのアプローチにより破壊され得ることを実証する。最後に、本発明者等の結果は、I R F-1 が、直接的抗腫瘍成長作用および腫瘍の免疫細胞認識強化の両方によりその抗腫瘍作用を媒介することを実証する。

【0010】

本発明の問題は、腫瘍性、感染性および/または免疫疾患に対する治療、予防、防御的治療および/または予防免疫接種のための、遺伝子構築物またはポリヌクレオチドの使用で

あり、それにより I R F ファミリーのメンバーであるその遺伝子産物の活性が活性化されるようになり得る使用によって解決される。本発明の特徴的な実施形態は、上述した使用であって、遺伝子産物としての I R F ファミリーのメンバーは、野生型 I R F - 1 , 合成 I R F - 1、免疫学的活性 I R F - 1 変異体、I R F - 1 以外の I R F ファミリーの野生型メンバー、I R F - 1 以外の I R F ファミリーの合成メンバー、I R F - 1 以外の I R F ファミリーのメンバーの免疫学的活性変異体、およびそれらの融合タンパク質から成る群から選択される使用を含む。本発明は、哺乳類、特にヒトの治療のための上述した使用に関する。

【0011】

さらなる実施形態は、上述した使用であって、遺伝子構築物は、融合タンパク質のドメインの1つとしてのメンバーおよび融合タンパク質の別のドメインとしての外来タンパク質を含む融合タンパク質としての I R F ファミリーのメンバーをコードし、融合タンパク質の活性は、化学的または物理的手段によりスイッチを切り換えられ得、特に、遺伝子構築物は、I R F - 1 / h E R 融合タンパク質の発現をコードし、その活性がエストロゲンまたは抗エストロゲン活性を有する化合物により制御され得る使用を含む。

【0012】

さらなる実施形態は、上述した使用であって、遺伝子構築物またはポリヌクレオチドは、哺乳類細胞中への移入のための生成物として、特にウイルスベクター、好ましくはアデノウイルスベクターとして提供される使用を含む。

【0013】

本発明の特徴的な態様は、化学的または物理的活性化により、例えば、加熱または放射線照射により、スイッチを入れられ得る上述したタンパク質の発現より成る。さらなる特徴的な態様は、上記タンパク質の発現であって、発現は、調節可能プロモーターにより、例えば、外的刺激、特にテトラサイクリンにより、スイッチを切り替えられ得る発現により成る。

【0014】

本発明の有利な実施形態は、先行の請求項のうちの1つまたは複数に記載される遺伝子構築物またはポリヌクレオチドを、ウイルス、細菌、真菌および寄生生物起源、あるいは腫瘍細胞由来の1つまたは複数の抗原コード遺伝子からなる群から選択される1つまたは複数の抗原と一緒に含むワクチンから成る。本実施形態の利点は、腫瘍細胞の使用を避けることによって実行することができ、抗原コード配列(単数または複数)は別個のベクターを用いて提供され、またワクチン接種は、すべての構成成分を提供するベクターを施すことにより、またはポリシストロン発現ユニットを施すことにより実行することができる。さらなる有利な実施形態は、上述したワクチンであって、遺伝子構築物またはポリヌクレオチドおよび抗原コード配列(単数または複数)がウイルスまたは細菌担体として提供されるワクチンを含む。

【0015】

本発明の他の実施形態は、腫瘍性、感染性および／または免疫疾患の治療、予防、防御的治療および／または予防免疫接種のための調製物の製造のための上述した使用から成る。

【0016】

さらに、他の実施形態は、腫瘍性、感染性および／または免疫疾患の治療、予防、防御的治療および／または予防免疫接種のための I R F ファミリーのメンバーあるいは融合タンパク質の構成成分の1つとしての上記メンバーおよび融合タンパク質の別の構成成分としての治療的に許容可能なタンパク質を有するかまたはそれらから成る融合タンパク質であって、特に、I R F - 1 がその構成成分の1つであり、および／または h E R が融合タンパク質の他の構成成分である融合タンパク質に関する。

【0017】

本発明は、腫瘍性、感染性および／または免疫疾患の治療、予防、防御的治療および／または予防免疫接種のための I R F ファミリーのメンバーあるいは融合タンパク質の構成成

分の1つとしての上記メンバーおよび融合タンパク質の別の構成成分としての治療的に許容可能なタンパク質を有するかまたはそれらからなる融合タンパク質からなるかまたは含む予防的および／または治療的組成物であって、特に、IRF-1が融合タンパク質の構成成分の1つであり、および／またはHERがその構成成分のその他の構成成分である、予防的および／または治療的組成物をさらに含む。

【0018】

さらに、本発明は、IRFファミリーのメンバーの発現のための上述した遺伝子構築物またはポリヌクレオチドがex vivoでチャージ(charge)されたヒト細胞、好ましくは、遺伝子移入、物理的形質導入、より好ましくは電気穿孔、化学的形質導入またはウイルス形質導入によりチャージされたヒト細胞に関する。上述したヒト細胞は、自系または同種異系細胞であり得る。さらに、上述したヒト細胞は、腫瘍細胞、特に癌細胞、より好ましくは肝細胞癌細胞、肉腫細胞または造血系由来の腫瘍であり得る。付加的に、上述したヒト細胞は、腫瘍性、感染性および／または免疫疾患に対する治療、予防、防御的治療および／または予防免疫接種に適する。 10

【0019】

本発明の好ましい有益な実施形態は、予防接種の実施形態に記述された1つまたは複数の遺伝子を用いて、遺伝子移入、物理的形質導入、特に電気穿孔、化学的形質導入またはウイルス形質導入を施されたヒト抗原提示細胞(APC)に関する。

【0020】

最後に本発明は、IRFファミリーのメンバーの活性レベルがインターフェロン- β により誘導されるIRF-1のレベルより高い上記のようなヒト細胞の実施形態を含有する。 20

【0021】

本発明の目的、その種々の特徴ならびに本発明それ自体は、添付の図／図面を参照しながら読むと、以下の説明からさらに十分に理解され得る。

【0022】

以下において、実施例および図面を参照しながら本発明をより詳細に開示する。しかしながら記載される特定の形態または好ましい実施形態は、すべての点で、本発明を説明するためであって、本発明を制限するものではなく、本発明の範囲は以下の説明ではなく添付の特許請求の範囲により指示され、したがって特許請求の範囲と均等の意味および範囲内であるすべての変更がその中に包含されるよう意図される。 30

【0023】

材料および方法

ベクター構築：

pBTTHis：ヒスチジノール遺伝子を含有するBbrPI/NotI断片をpDAF2HISから単離し(Spitzer et al., 1998)、対応する制限プラスミドpRBTTA中に挿入した(Unsinger et al., 2001)。その結果生じたプラスミドをpBTTHisと呼ぶ。Hepa1～6細胞の安定的トランスフェクションのために、発現構築物IRF-1-HER(4)(pMT7RF-1-HER)およびプロマイシン耐性付与プラスミド(42)を本発明者等は用いた。pHBTMRS：三シストロン発現カセットとしてc-myc、c-Ha-rasおよびSEAP遺伝子を含有するEcoRI/NotI断片を、pRBTTからの二方向性テトラサイクリン応答可能プロモーターの3'末端上に挿入した(Unsinger et al., 2001)。ヒロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼをPCR増幅し、pRBTMRS中の二方向性テトラサイクリン応答可能プロモーターからのPmeI 5'を介して挿入し、pHBTMRSを生じた(Kroger, 1999)。 40

【0024】

pCMVIEHG：IRF-1HER融合タンパク質遺伝子およびポリオIRES配列を含有するSpeI/EcoRI断片をCMVプロモーターおよびeGFP遺伝子間に挿入して、二シストロンmRNA上のIRF-1HERおよびeGEPを発現するプラスミドを生じた。pCMVIH：ポリオIRESおよびeGFPをコードする配列を、PmaCI/HpaIを用いたpCMVIEHGの消化および再連結により排除した。pLTR- 50

T B T I H E G : I R F - 1 - h E R および e G F P に関する二シストロン発現カセットを含有する P m e I / N o t I 断片を、対応して制限された L T R - T H T G 中に挿入し (Unsinger et al., 2002)、p L T R - T B T I H E G を生じた。

【0025】

アデノウイルスコスミドの調製：

A d - I H、A d - I H E G、A d - I H E G i n v、A d - L T R - T B T I H E G、A d - L T R - T B T I H E G i n v：組換えアデノウイルスを、大腸菌 (E. coli) 中のクローニングにより組換えアデノウイルスゲノムの直接アセンブリーを可能にするコスミドクローニング手順を用いて構築した。コスミドベクター p A d c o s 4 5 (Unsinger et al., 2002) を E 1 領域の単一クローニング部位で X b a I を用いて消化し、充填した。以下のカセットをこの部位に挿入した：P m e I / S w a I 断片としての p C M V I H E G の C M V I H E G カセット、B s r B I / F s p I 断片としての p L T R - T B T I H E G の L T R - T B T I H E G および P m e I / S w a I 断片としての p C M V I H からの C M V I H カセット。D N A を連結し、パッケージング抽出物を用いて i n v i t r o でパッケージングした。大腸菌 D H 5 α 中への形質導入後に、アンピシリン耐性クローンを単離した。大腸菌中での i n v i t r o パッケージングおよび増殖後に、A d - I H、A d - I H E G、A d - I H E G i n v、A d - L T R - T B T I H E G、A d - L T R - T B T I H E G i n v のためのコスミド調製物を得た。制限分析は、予測された構造を確認した。

10

20

【0026】

細胞培養および遺伝子形質導入：

ネズミ繊維芽細胞 N I H 3 T 3 細胞 (A T C C C R L - 1 6 5 8) をダルベッコの変法イーグル培地 (D M E M) 中に保持し、H e p a 1 ~ 6 細胞 (ネズミ H - 2 b - 制限 H C C 細胞系；9 2 1 1 0 3 0 5；動物細胞培養の欧州コレクション (European Collection of Animal Cell Cultures)) を R P M I 1 6 4 0 培地中で成長させ、2 9 3 細胞 (低継代でのヒト胚腎細胞；ミクロビックス (Microbix) P D - 0 2 - 0 1) を最少必須培地 (M E M) 中で培養した。培地に、1 0 % エストロゲン無含有熱不活性化ウシ胎児血清、2 m M の L - グルタミンペニシリン (1 0 U / m l) およびストレプトマイシン (1 0 0 μ g / m l) を補充した。トランスフェクト N I H 3 T 3 細胞を 1 2 8 U / m l のハイグロマイシン B、8 0 0 μ g / m l のヒスチジノールまたは 8 0 0 μ g / m l の G 4 1 8 を用いて選択した。H e p a 1 ~ 6 細胞の選択のためには、1 μ g / m l プロマイシンを用いた。

30

【0027】

p B T T A H i s、p H B T M R S、p M T 7 I R H - 1 - h E R およびネオマイシン耐性付与プラスミド p A G 6 0 を用いて、N I H 3 T 3 細胞を安定的に同時トランスフェクトした (Colbere et al., 1981)。H e p a 1 ~ 6 細胞は、I R F - 1 - h E R をコードする発現構築物 (4) およびプロマイシン耐性付与プラスミド (4 2) を用いて安定的に同時トランスフェクトした。トランスフェクタントを選択し、単一クローンを採取し展開させた。その後、ウエスタンブロットによりタンパク質発現に関してクローンをスクリーニングした。

【0028】

組換えアデノウイルスの産生

組換えアデノウイルスの産生のために、リン酸カルシウム共沈殿を用いて、環状アデノウイルスコスミド D N A 2 0 μ g を 2 9 3 ヘルパー細胞中にトランスフェクトした。トランスフェクション後 1 0 ~ 1 4 日目に、この時点でアデノウイルスプラークの形成が明白になった。ウイルスを収集し、2 9 3 細胞を再感染させた。細胞変性作用が観察された後、ウイルス粒子を収集し、2 9 3 細胞の感染により力価を確定した。D N A (Graham et al., 1991) は、予期された構造を確認するものであった。すなわち、コスミド D N A からのウイルス配列の精確な切除を制限分析により制御した。アデノウイルス感染のために、細胞を M E M 培地中に播種した。翌日、1 0 0 (H e p a 1 ~ 6 細胞) または 2 (2 9 3 細胞) の M O I を用いて、細胞を感染させた。2 % F C S を補充した P B S 1 m l 中で組

40

50

換えアデノウイルスを希釈した。アデノウイルス感染の1時間後に、5% FCSを補充した培地中で細胞をさらに培養した。

【0029】

IRF-1-hER融合タンパク質中のIRF-1の活性化のために、最終濃度が1 μ Mに達するまでE2 (SERVA, Frankfurt, Germany)を細胞培地に添加した。

【0030】

ウエスタンブロッティング。 全細胞抽出物から得られるイムノブロットを、ヒトエストロゲン受容体 (HC-30, Santa Cruz Biotechnology, USA) のホルモン結合ドメインに対して誘導される抗体を用いてプローブし、メーカーの使用説明書に従ってECL (Amersham, Arlington Heights, IL, USA) により可視化した。

10

【0031】

IFN試験。 マウスL929細胞 (43) を用いた抗ウイルスアッセイにより、細胞培養上清中のインターフェロン濃度を確定した。抗ウイルス活性の特異性を確認するために、試験細胞への添加前に、マウスIFN- β に対して向けられる中和モノクローナル抗体を上清に添加した。

【0032】

細胞成長の測定。 細胞増殖の確定のために、 2×10^3 細胞/ウェルをマイクロタイタープレート中に播種して、段階希釈 (1:1) を実施し、数個の別々の測定点を可能にした。細胞を指示濃度の β -エストラジオールで処置した。メーカーの指示に従ってWSTキット (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて、細胞成長を測定した。10%未満の偏差を生じる三重反復試験の平均値をプロットした。

20

【0033】

足場非依存性成長に関するアッセイ。 軟寒天中に懸濁した細胞のコロニー形成効率を評価することにより、足場非依存性増殖能力を確定した。0.6%下張り寒天 (underlay agar) 50 μ lで被覆したマイクロタイタープレート中の0.3%上塗り寒天 (overlay agar) 50 μ l中に、 1×10^3 細胞を播種した。誘導培地を上部に添加した (50 μ l/ウェル)。平板培養後3週間目に、コロニーを計数した。

【0034】

マウス。 雄C57L/J (H-2b) マウスをフライブルク大学病院 (University Hospital Freiburg) の動物施設で飼育して、10~25週齢で使用した。

30

【0035】

ヌードマウス実験

雄6~8週齢NMRIヌードマウス (Harlan Winkelmann, Borcheln, Germany) を、ドイツバイオテクノロジー研究センター (German Research Centre for Biotechnology) の動物施設のSPFユニットで飼育した。マウスを各群5匹の2つの実験群に分けた。0.2 mlのPBS NIH3T3TA/MR/1H細胞中の 1×10^6 細胞をマウスの側腹部に皮下注射した。群を以下のように処置した：群1：未処置 (n=5)；群2：1.5 mgのE2を2日毎にi.p. (n=4)。腫瘍容積を、カリパスを用いて週3回測定し、記録した。データは腫瘍容積の平均値として示す。

【0036】

腫瘍モデル。 同系ホスト中で確実な成長を示すので、C57L/JマウスにおけるHepa1~6腫瘍モデル (44) を選択した。Hepa1~6細胞は、C57Lマウスに生じたBW7756マウス肝癌の派生物である。MHCクラスIおよびII発現は、C57LおよびC57L/Jマウス間で同一であり、Hepa1~6HCCはAFP発現により特徴付けられる。マウスの右側腹部に100 μ lの血清無含有MEM培地中で注射される 1×10^7 または 5×10^6 個のHepa1~6細胞を用いて、100%のマウスにおけるHepa1~6ネズミHCC細胞の確実な腫瘍成長が達成されることが実証され得た。6日後、腫瘍が可視的になり、平均で18日後に約2000 mm³ のサイズに達した。この腫瘍サイズを本発明における終点として用いて、その後、マウスを屠殺した。腫瘍発生率および容積を、カリパスを用いて2日毎に評価した。データは、平均容積+/-SEとし

40

50

て示す。

【0037】

フローサイトメトリー。 抗マウスH-2Kb/H-2Dbおよび抗マウスCD80特異的抗体（それぞれクローン28-8-6および01940B）を、およびその後のFITC-標識抗マウス（クローン02014D）またはFITC-標識抗ラット（クローン10094D）抗体それぞれを用いたFACS分析により、Hepa1~6およびHepaIRF-1hER細胞中でのMHCクラスIおよびCD80発現を調べた。さらに、PE-またはFITC-標識抗体（抗体はすべて、PharMingen, San Diego, CA, USAから得られた）により、CD54（クローン01544D）、I-A/I-E（クローン06355A）およびCD86（クローン09274）の発現を確定した。

10

【0038】

組換えワクシニアウイルスの生成。 CTL応答を試験するために、AFP発現およびpSc11（空ベクター陰性対照）組換えワクシニアウイルスを前に記載された（44）ように生成した。

【0039】

細胞傷害性アッセイ。 腫瘍攻撃または対照マウスから得られた脾臓細胞を懸濁し、24ウェルプレート中でのin vitro刺激の6日後に、細胞傷害活性に関して脾臓細胞を分析した。 1×10^7 の野生型Hepa1~6細胞を用いて、または特異性に関する陰性対照として、同系ルイス肺癌細胞（3LL）を用いて（ともに8000radで照射）、 4×10^7 の腫瘍で初回抗原刺激した脾臓細胞をインキュベートすることにより、in vitro刺激を実施した。AFP特異的免疫応答を評価するために、未処置同系ドナーマウスの脾臓細胞を用いて、腫瘍攻撃または対照マウス由来の脾臓細胞をin vitroで刺激した。未処置同系ドナーマウスの脾臓細胞は、感染多重度（MOI）5で、UV-不活性化（300mJ）rVV-AFPにより、または特異性に関する陰性対照として、rVV-pSc11を感染させ、次に20Gy（2000rad）で照射して刺激細胞の増殖を防止した。その後、6時間51Cr放出アッセイを実施した。標的細胞として、AFP発現同系Hepa1~6細胞およびAFP陰性同系ルイス肺癌細胞を用いた。結果は、次式により表した：溶解% = (実験的放出 - 自発性放出) / (最大放出 - 自発性放出)。実験的放出は、エフェクター細胞の存在下で標的細胞により放出される平均数/分を表す。総放出は、5%トリトンX-100による標的細胞の全体的溶解後に放出された放射能を表す。自発性放出は、標的細胞のみに由来する培地中に存在する放射能を表す。Hepa1~6腫瘍またはmAFP特異的溶解は、Hepa1~6標的に対する溶解値から3LLに対する溶解値を差し引くことにより示された。

20

30

【0040】

IFN- γ およびIL-4ELISPOTアッセイ。 多重スクリーン-HA96ウェルフィルタープレートを、4℃で一晩、4 μ g/mlのラット抗マウスIFN- γ またはラット抗マウスIL-4抗体（PharMingen, San Diego, CA, USA。それぞれクローンR46A2または18191A）で被覆した。腫瘍攻撃または非攻撃マウス由来の脾臓細胞（ 1×10^5 /ウェル）を、200 μ lの培地中の 1×10^4 照射刺激細胞（Hepa1~6、3LLまたはrVV-AFP感染脾臓細胞）/ウェルを用いて20時間、三重反復試験で培養した。培養後、細胞を洗浄し、2 μ g/mlのビオチン化ラット抗マウスIFN- γ またはIL-4抗体（PharMingen, San Diego, CA, USA。それぞれクローンXMG1.2または18042D）を添加し、プレートを室温で3時間インキュベートした。プレートを再び洗浄し、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼポリマー（Mabtech, Koln, Germany）の1:1000希釈液を用いて室温で30分間インキュベートし、次に、ALP接合基質溶液（BCIP/NBT, BioRad, Richmond, USA）で展開した。各ウェル中のスポットを顕微鏡下で計数し、その値を、培養開始時に各ウェルに添加された脾臓細胞数と比較したスポット形成細胞の数として表される。特異性に関する対照として、腫瘍攻撃マウスの脾臓細胞および異なる照射刺激細胞を単独で培養した。

40

【0041】

50

i n v i v o 腫瘍実験の実験計画

腫瘍防御試験。 C 5 7 L / J マウスの右側腹部に 1×10^7 H e p a 1 ~ 6 (群 1 および 2) または H e p a I R F - 1 h E R (群 3 および 4) 細胞を接種した。群 5 にはいかなる腫瘍も接種しなかった。それぞれの群を以下のように処置した：

【 0 0 4 2 】

【表 1】

群 1 : 未処置 (n = 3)
群 2 : 1. 5 mg の β -エストラジオールを 2 日毎に i. p. (n = 3)
群 3 : 未処置 (n = 8)
群 4 : 1. 5 mg の β -エストラジオールを 2 日毎に i. p. (n = 8)
群 5 : 1. 5 mg の β -エストラジオールを 2 日毎に i. p. (n = 2)

10

【 0 0 4 3 】

再攻撃に対する防御。 ナイーブ C 5 7 L / J マウスまたは H e p a I R F - 1 h E R 腫瘍成長に対して防御されたことのある E 2 処置動物を、E 2 処置停止後 11 日目 (初期腫瘍接種後 28 日目) に、 1×10^7 個の野生型 H e p a 1 ~ 6 (n = 3) または H e p a I R F - 1 h E R (n = 3) 腫瘍細胞を用いて再攻撃した。これらのマウスが任意のさらなる E 2 処置を受けなかったことは重要である。

【 0 0 4 4 】

腫瘍療法。 C 5 7 L / J マウスの右側腹部に 1×10^7 個の H e p a I R F - 1 h E R (群 1 および 2) 細胞を接種した。両群とも、いかなる E 2 処置も受けなかった。19 日目に、腫瘍は両群において約 2000 mm^3 のサイズに達した。19 日目に開始して、群 2 (n = 6) には、2 日毎に 28 日目まで、1. 5 mg の β -エストラジオールを i. p. 注射した。その後、E 2 処置を 2 匹のマウスにおいては再び中止したが、一方、残りの 4 匹は E 2 療法を維持した。群 1 (n = 3) のマウスは E 2 処置を受けなかったが、その後、腫瘍が $10,000 \text{ mm}^3$ に達した場合に屠殺した。

【 0 0 4 5 】

i n v i v o モノクローナル抗体除去。 精製ハイブリドーマ上清の i. p. 注射により、C D 4 および C D 8 T 細胞亜集団を枯渇させた。総量 1 mg / マウス / 注射の抗 C D 8 (クローン Y T S 1 6 9) または抗 C D 4 (クローン Y T S 1 9 1. 1) (45、46) を、H e p a I R F - 1 h E R 腫瘍接種の 5 日前、3 日前および 1 日前、ならびにその後 5 日毎に注射した。種々の群を以下のように処置した：

【 0 0 4 6 】

【表 2】

1.	1. 5 mg の β -エストラジオールを 2 日毎に i. p. 。枯渇なし (n = 2)
2.	1. 5 mg の β -エストラジオールを 2 日毎に i. p. 。C D 8 枯渇 (n = 2)
3.	1. 5 mg の 4 β -エストラジオールを 2 日毎に i. p. 。C D 4 枯渇 (n = 2)
4.	未処置。枯渇なし (n = 2)

40

【 0 0 4 7 】

統計学的分析。 データはすべて、ウィルコクソンの符号付順位検定により分析した。0.05 未満の両面 p 値は、統計学的に有意であると考えられた。腫瘍出現および 2500 mm^3 への成長をカプラン-マイヤー法により算定し、各群に関する平均の標準偏差として示して、免疫接種マウスと対照マウス間の差異をマンテル-ヘンツェル検定により算定した。

【 0 0 4 8 】

結果i n v i t r o 分析

I R F - 1 は H C C 細胞系 H e p a 1 ~ 6 の細胞成長を阻害する

I R F - 1 の構成的発現は、いくつかの細胞系に強力な細胞増殖阻害を強いる (4、24 50

、40)。これは、異種IRF-1の非常に低い、しばしば不安定な発現に関して選択される安定トランスフェクタントを生じる。HCC細胞系Hepa1～6の成長阻害剤としてのIRF-1の活性を確定するために、本発明者等は、したがって、条件付活性IRF-1hER融合タンパク質を用いた。ホルモン刺激の非存在下で、構成的発現キメラタンパク質は不活性であるが、タンパク質のhER部分とのE2の結合時に、活性配座に変わり得ることが実証された。IRF-1-hERは、Hepa1～6細胞中で安定的にトランスフェクトされた。異なるレベルのIRF-1hER発現がトランスフェクタントで観察され(図1A、上パネル)、アクチン発現(図1A、下パネル)に正規化された。異なる強度のIRF-1hER発現を有する3つの細胞クローンを選択した(c4、c9、c22)。これらのクローンの細胞成長を、IRF-1活性化後7日目に確定した。図1Bに示したように、3つの細胞クローン由来の細胞は、増殖阻害に関してIRF-1活性に感受性であった。増殖阻害の程度は、異なる細胞クローン間で40～80%変化し、異なる発現量のIRF-1と相関した。IRF-1-hERを発現しない野生型Hepa1～6細胞を、対照として用いた。非トランスフェクト細胞系は細胞成長の変更を伴ってβ-エストラジオールに対して応答しなかった。これは、3つの細胞クローンすべてが活性化可能IRF-1を発現し、IRF-1表現型の典型的成長阻害特性に応答したことを示す。しかしながらHepa1～6細胞の増殖阻害は、他の細胞系と比較した場合、非常に強力であるというわけではない(24)ことに留意すべきである。細胞増殖の低減にもかかわらず、細胞はこの状態でかなりの時間培養され得た。さらにこれらの細胞は、β-エストラジオールによるIRF-1活性化時にアポトーシスのいかなる兆候も示さなかった。これは、亜二倍体DNA((47)、データは示されていない)およびアネキシン染色((48)、データは示されていない)の実験により確証された。

【0049】

活性化IRF-1はIFN分泌を誘導する

IFN-βの誘導は、IRF-1活性化後に観察される典型的特性である。分泌IFN-βの量は、IRF-1活性の測定値とみなされ得る(17)。IFNは免疫調節に関連があるため、抗ウイルスアッセイによりIFN-βの分泌を確定した(表1)。IRF-1は、3つの細胞クローンすべてにおいて、β-エストラジオールにより活性化されることが示された。最高IFN分泌は、クローン22により示されたが、これは、IRF-1発現の強度(図1A)および増殖阻害(図1B)と一致する。IFN-βに対して誘導される中和抗体を用いて、分泌抗ウイルス活性が専らIFN-βであることを本発明者等は確認するものであった。IFNは、細胞増殖を阻害することが既知である。しかしながらHepa1～6細胞クローンにより分泌されるIFN-βの量は、匹敵する量の組換えネズミIFN-βによる対照細胞の処置により確定されるように細胞成長に及ぼす観察された作用を媒介するのに十分でない(データは示されていない)。

【0050】

IRF-1活性化中の足場非依存性成長の低減

腫瘍原性細胞を非腫瘍原性細胞と区別する最も決定的な*in vitro*特徴は、足場非依存性成長である。IRF-1が*in vitro*でのこのHCC細胞系の形質転換表現型を逆転するか否かを確定するために、不活性または活性IRF-1の存在下で足場非依存性コロニーを形成するその能力を、本発明者等は試験した(図2)。非トランスフェクト腫瘍細胞クローンは、軟寒天中で良好に増殖した。IRF-1hERを発現しない形質転換野生型Hepa1～6細胞系のコロニー形成は、β-エストラジオールにより影響されなかった。対照的に、軟寒天成長の能力は、異なる細胞クローン中では、活性化IRF-1により有意に低減された。非トランスフェクト細胞と対照的に、IRF-1hER保有細胞はより少ないが、しかしやや大きいコロニーを形成した。E2の存在下では、クローン22は軟寒天中で最低量のコロニーを形成したが、これはIRF-1hER発現の強度と逆相関する。クローン9は、E2処置細胞を上回る最高比率の、非処置細胞からの軟寒天コロニー形成を示した。したがってクローンc9(以下で簡単にHepaIRF-1hERと示す)を、さらなる*in vitro*特性化のために、かつ*in vivo*腫瘍モ

デルのために用いた。

【0051】

活性化 I R F - 1 h E R は免疫学的に関連がある細胞表面タンパク質発現を調整する

I R F - 1 発現は、M H C 遺伝子の発現を増大することが既に示されている (7 、 3 1) 。 F A C S 分析により、一エストラジオールによる I R F - 1 活性化の前後の細胞表面における M H C クラス I 、 M H C クラス I I 、 C D 5 4 、 C D 8 0 、 および C D 8 6 発現のレベルを、本発明者等は調べた。野生型 H e p a 1 ~ 6 および E 2 未処置 H e p a I R F - 1 h E R 細胞は、M H C クラス I I 、 C D 8 0 、 および C D 8 6 発現の欠如により特性化された。M H C クラス I (H - 2 K ^b / H - 2 D ^b) は低レベルで、C D 5 4 は高レベルで発現された。H e p a I R F - 1 h E R 細胞の E 2 処置は H - 2 K ^b / H - 2 D ^b の強力な上向き調節を生じ、C D 5 4 発現は依然として変化せず、M H C クラス I I 発現は弱く上向き調節された (図 3) 。 C D 8 0 および C D 8 6 発現は、陰性のままであった (データは示されていない) 。

【0052】

I R F - 1 のアデノウイルス媒介性発現は H C C 細胞の強力な I F N - β 分泌をもたらす
広範囲の細胞中に I R F - 1 を移入するために、かつ *i n v i v o* 形質導入のための送達系として、I R F - 1 - h E R 融合タンパク質のための p A d c o s 4 5 含有発現カセットに基づいたアデノウイルスベクターを構築した。I R F - 1 - h E R の c D N A をアデノウイルスベクター p A d c o s 4 5 中に導入し、ウイルスを調製した。

【0053】

H e p a 1 ~ 6 細胞を p A d - 1 H 、 p A d - I H E G 、 p A d - L T R - T B T I H E G および p A d - L T R - T B T I H E G *i n v* ウイルスで感染させた (図 4 A) 。感染の 4 8 時間後に、ウエスタンブロット分析により I R F - 1 - h E R 発現を分析した。これらのアデノウイルスに感染した細胞中で、高レベルの I R F - 1 h E R 発現が見出された (図 4 B) 。感染細胞の E 2 処置または偽処置後に、I F N 分泌を測定した。E 2 処置後に I R F - 1 h E R 遺伝子を含有するアデノウイルスで感染させた細胞の培養上清中に I F N を検出したが、これは、I R F - 1 活性化のみが I F N 分泌を誘導するが、感染自体では誘導しないことを示す (表 2) 。アデノウイルス性形質導入細胞における分泌 I F N の量は、I R F - 1 h E R 融合タンパク質を安定的に発現するトランスフェクタントより 3 . 5 ~ 6 倍多かった。

【0054】

I R F - 1 は癌遺伝子性形質転換 N I H 3 T 3 細胞中で作用する

癌遺伝子性形質転換 N I H 3 T 3 細胞中の I R F - 1 の作用を調べた。癌遺伝子 c - m y c および c - H a - r a s を条件付で発現する N I H 3 T 3 細胞を用いた。両癌遺伝子は、テトラサイクリン調節可能プロモーターの制御下でニストロンの的に発現された (K r o g e r , D i s s e r t a t i o n , U n i v e r s i t a t B r a u n s c h w e i g , 1 9 9 9) 。細胞は、I R F - 1 - h E R 融合タンパク質コード構築物で安定的にトランスフェクトされた。この細胞系は、非形質転換 N I H 3 T 3 細胞中 (ドキシサイクリンの存在下) での、ならびに細胞の形質転換状態 (ドキシサイクリンの非存在下) での I R F - 1 作用の研究を可能にする。I R F - 1 の *i n v i t r o* での抗腫瘍活性を調べた：増殖に及ぼす影響、軟寒天成長、ならびに E 2 処置による I R F - 1 h E R 活性化を伴うおよび伴わない I F N 誘導を測定した。これは、非形質転換状態ならびに形質転換状態で行われた。E 2 およびドキシサイクリンを 5 日間添加した。E 2 の非存在下での形質転換細胞は細胞成長の強化を示すという事実にもかかわらず、活性化 I R F - 1 - h E R は、非形質転換細胞および形質転換細胞の両方で、細胞成長の顕著な低減を同程度にもたらした (表 3) 。

【0055】

I R F - 1 が細胞の形質転換表現型を逆転するか否かを確定するために、軟寒天中のコロニーの形成をアッセイした。非形質転換状態の細胞は、軟寒天中で成長しなかった。対照的に、ドキシサイクリン (形質転換状態) の非存在下では、細胞は良好に成長し、軟寒天クローンを形成した。軟寒天増殖の能力は、E 2 贈与による I R F - 1 の活性化により完全

に撤廃された(表3)。抗ウイルスアッセイにより確定した場合のIRF-1分泌は、IRF-1活性の測定値とみなされた。E2処置によるIRF-1活性化は、非形質転換細胞および形質転換細胞において等価であると実証された(表3)。

【0056】

IRF-1活性化はヌードマウスにおける形質転換細胞の腫瘍成長を低減する

IRF-1は癌遺伝子性形質転換NIH3T3細胞において*in vitro*で細胞形質転換を阻害したので、*in vivo*での腫瘍原性に及ぼすその作用を評価した。IRF-1の考え得る抗腫瘍活性を立証するために、細胞をヌードマウスの側腹部に皮下注射した。腫瘍形成をアッセイした。形質転換細胞の注射は4週間以内に腫瘍形成をもたらし、移植された動物の100%が6週間以内に腫瘍を発症した(図5)。マウスに形質転換細胞を接種し、E2で処置した場合、腫瘍成長の動態は劇的に変化した。1500mm³までの腫瘍サイズに達したのは未処置動物の場合より4週間遅く、E2処置マウスの40%が腫瘍を発症しなかった。これらの結果は、IRF-1hER融合タンパク質の活性化が、TおよびB細胞を欠く動物の形質転換細胞における腫瘍原性の動態を延長するのに十分であることを実証する。

10

【0057】

*in vivo*分析

IRF-1活性化はHCC成長を阻害する

C57L/Jマウスにおいて皮下で成長するネズミHepa1-6HCCに対するIRF-1hER発現の抗腫瘍効力を確定するために、異なる処置群を無作為に計画した。同系C57L/Jマウスにおける腫瘍モデルのために用いられたHepa1-6HCC細胞系は、中等度に速い腫瘍成長により特徴付けられ、移植された動物の100%が腫瘍を発症した。野生型Hepa1-6およびHepaIRF-1hER細胞はともに、*in vivo* s. c. 注射後にほぼ同一の腫瘍原性を示したが、これは、E2非処置HepaIRF-1hER細胞中の不活性IRF-1hER融合タンパク質の存在を示唆する(図6A、 $p > 0.5$)。17日以内に、大型腫瘍が発症し、平均サイズは1500mm³であった。野生型Hepa1-6細胞を接種したマウスをE2で処置した場合、E2処置を伴わずにHepa1-6またはHepaIRF-1hER細胞で攻撃されたマウスと比較して、腫瘍発症に及ぼす作用はまったく観察されなかった。これらの結果は、E2処置それ自体が腫瘍成長および動物の健康に及ぼす負の作用を有さないことを実証する。しかしながらHepaIRF-1hERを接種されたC57L/Jマウスが腫瘍接種の時点で開始するE2による2日毎の*i. p.*注射を受けた場合、腫瘍成長はかなり抑制された。8匹の動物のうちの6匹の動物が腫瘍成長に対して完全に防御され、2匹の動物が遅い増殖速度により特徴付けられる非常に小さい腫瘍のみを発症したことは重要な知見であった(図6A)。40日後、腫瘍サイズは450mm³に過ぎず、42日目にE2処置を中止しても、腫瘍の増殖速度が速まることはなかった。

20

30

【0058】

腫瘍細胞におけるIRF-1活性化は、T細胞記憶を誘導する

HepaIRF-1hERによる攻撃に対して防御されたE2処置マウスにおける腫瘍特異的記憶T細胞の存在を調べることに、本発明者等は興味を持った。したがって、腫瘍攻撃後28日目およびE2処置中止後11日目に、腫瘍無含有マウスに 1×10^7 個の野生型Hepa1-6($n = 3$)またはHepaIRF-1hER細胞($n = 3$)を接種した。これらのマウスが任意のさらなるE2処置を受けなかったことは重要である。図6Bに示したように、両群のマウスはすべて腫瘍成長に対して防御されたが、しかしCD8+T細胞*in vivo*枯渇後は防御されなかった($n = 2$ 、データは示されていない)。対照的に、E2処置を伴わないナイーブC57L/Jマウスは、迅速なHepa1-6およびHepaIRF-1hER腫瘍成長により特徴付けられた。これらの結果は、活性IRF-1hERの発現による腫瘍特異的免疫性の初回抗原刺激後の腫瘍特異的T細胞記憶の存在を示唆する。

40

【0059】

50

I R F - 1 活性化腫瘍細胞による C T L 活性の誘導

実際、照射 H e p a 1 ~ 6 細胞を用いた i n v i t r o 刺激後の H e p a 1 ~ 6 標的細胞に対する強力な C T L 活性は、H e p a I R F - 1 h E R 細胞を用いて攻撃され、かつ E 2 で処置されたマウスにおいて観察された(図 7 A)。腫瘍攻撃されなかったマウスから、あるいは H e p a I R F - 1 h E R 細胞で攻撃され、3 L L 細胞で i n v i t r o 刺激された E 2 処置マウス由来の脾臓細胞が H e p a 1 ~ 6 標的に対する弱いバックグラウンド殺害活性のみを示したため、この C T L 活性は H e p a 1 ~ 6 腫瘍細胞に対して特異的であった(図 7 A)。I n v i v o でサイトカイン産生細胞をモニタリングすることにより、一次 T 細胞応答を評価した。照射 H e p a 1 ~ 6 細胞による刺激時の I F N - γ (5, 000 のうち 1) および I L - 4 (10, 000 のうち 1) を分泌する脾臓細胞の数の有意の増大(図 7 B)は、E 2 非処置 / H e p a I R F - 1 h E R、E 2 非処置 / H e p a 1 ~ 6、または E 2 処置 / H e p a 1 ~ 6 攻撃マウスと比較して、H e p a I R F - 1 h E R 腫瘍を接種された E 2 処置マウスにおいて観察された(20, 000 I F N - γ のうち 1 および 40, 000 I L - 4 分泌 T 細胞のうち 1、 $p = 0.01$)が、このことは、T H 1 および T H 2 腫瘍免疫性の両方の有意の発症を示唆する。エリスポット (E L I S P O T) 分析により得られた i n v i v o 結果とは対照的に、⁵¹ C r 放出アッセイ (図 7 A) における C T L i n v i t r o 殺害活性の差は、異なる群間で統計学的に有意でなかった。これは、エリスポット (E L I S P O T) 技法と比較した場合の、腫瘍特異的 T 細胞の i n v i t r o 展開、ならびに ⁵¹ C r 放出アッセイのより低い感受性の結果であり得る。

10

20

【0060】

I R F - 1 活性化は腫瘍特異的自己抗原無視を打破する

より詳細に H C C に対する免疫応答を確定し、活性化 I R F - 1 の発現が腫瘍特異的抗原に対する免疫応答を初回抗原刺激し得たか否かを見出すために、標的として H C C 細胞中で高レベルでしばしば発現される H C C 特異的自己抗原 A F P を本発明者等は選択する。高レベルで A F P を内因的に発現する H e p a 1 ~ 6 H C C に対する中間体 C T L 活性は、E 2 処置 / H e p a I R F - 1 h E R 攻撃マウスで観察された(図 8 A)。他の群 (1, 000, 000 のうち 1) と比較した場合、これらのマウスにおいては、C T L 活性は有意に強く ($p = 0.02$)、A F P 特異的 I F N - γ (図 8 B) 産生脾臓細胞 (11, 000 のうち 1) の数はより多かった ($p = 0.001$)。腫瘍を伴わない対照動物においては、特異的 C T L 活性または H e p a 1 ~ 6 または 3 L L 標的細胞に対するバックグラウンド溶解強化は観察されなかった。さらに、これらの標的細胞の溶解の増大は、H e p a I R F - 1 h E R 細胞で攻撃された E 2 処置マウス由来の r V V - p S C 1 1 によるエフェクター細胞の i n v i t r o 刺激後に認められず、これは、A F P に対する C T L 活性の特異性を示唆する(図 8 A)。エフェクターを伴わない r V V - A F P 感染脾臓細胞単独を用いた、あるいはエフェクターのみを用いたエリスポットの実施はバックグラウンドスポット形成の増加を生じなかったが、これはさらに、A F P 特異性を示唆する(データは示されていない)。これらのデータは、H C C 腫瘍成長制御におそらくは関与するメカニズムである自己抗原 A F P に対する耐性が活性化 I R F - 1 の腫瘍内発現により破壊され得ることを実証する。

30

40

【0061】

宿主免疫応答ではない他の因子は I R F - 1 活性化腫瘍細胞の拒絶に関与する

宿主抗腫瘍免疫応答が腫瘍拒絶に関与する唯一のパラメーターであるか否かを確定するために、i n v i v o で T 細胞枯渇実験を H e p a I R F - 1 h E R 腫瘍を用いて攻撃された E 2 処置マウスで実施した(図 9 A)。非枯渇マウスは、腫瘍成長に対して再び防御された。C D 4 および C D 8 T 細胞枯渇はともに、すべてのマウスにおいて腫瘍成長を生じたが、しかしながらこれは E 2 処置を受けなかった非枯渇マウスと比較して、有意に遅延されていた。この知見は、宿主免疫応答が腫瘍防御における重要な因子であるということを暗に意味するが、腫瘍成長の初期制御においては部分的なものに過ぎないと思われる。

50

【0062】

IRF-1 活性化は活発に成長する腫瘍の増大を停止する

E2 非処置 C57L/J マウスにおいて皮下で成長中の HepaIRF-1 hER HCC に対する IRF-1 hER 活性化の治療的効力を評価するために、腫瘍攻撃後 19 日目に E2 処置を開始した。この時点で、腫瘍は約 2000 mm³ の平均サイズに達していた。図 9B に示したように、腫瘍成長は E2 処置の開始後 4 日目という早期に恒久的に停止されたが、これは、HCC に対する IRF-1 活性化の有意の治療的な可能性を実証する。対照的に、HepaIRF-1 hER 腫瘍は E2 非処置マウスにおいて急速に増殖した。9 日間の E2 処置は、長期腫瘍成長制御を誘導するのに十分であった。これは、E2 処置が 28 日目に再び中止された 6 匹の E2 処置マウスのうちの 2 匹において容易に実証された。これらのマウスにおける腫瘍成長は、二日毎の E2 注射を受け続けたマウスと比較して、異ならなかった。

10

【0063】

一側腹部における腫瘍の IRF-1 活性化は両側腹部の腫瘍成長に影響を及ぼす

腫瘍に対する治療的ワクチンとしての IRF-1 活性化の効力を調べた。マウスの右側腹部に HepaIRF-1 hER 細胞を皮下注射し、野生型 Hepa1~6 細胞を左側腹部に注射した。動物を 1.5 mg の E2 で 2 日毎に処置するか、または非処置のままにした。IRF-1-hER の活性化は、マウスの右側腹部の HepaIRF-1 hER 細胞の腫瘍成長を撤廃した。さらに、左側腹部に野生型 Hepa1~6 の腫瘍成長も、1 日目に開始された Hepa1~6 腫瘍成長と比較して低減されたが、それが非処置動物において起きたようなさらなる展開は抑制された。

20

【0064】

考察

HCC は、予後は不十分で、治療的意見も少なく非常に悪性の腫瘍である。IRF-1 の活性化を意図する新規の免疫療法的アプローチを検討した。β-エストラジオールの存在下で活性になる IRF-1/ヒトエストロゲン受容体融合タンパク質をコードするネズミ HCC 細胞系 (HepaIRF-1 hER) を構築した。in vitro 表現型、細胞成長、in vitro での足場非依存性成長、in vivo での免疫原性、および IRF-1 の治療的な可能性をすべて調べた。安定的構成的 IRF-1 発現は、低発現クローンを選択するという欠点を有する。このような細胞系における実際的導入遺伝子発現は、内因性 IRF-1 発現の多くを無効にするというわけではない。さらに構成的発現は、長期に亘って IRF-1 応答性の損失に対する選択を誘導する (4, 40)。対照的に、本発明に用いられる活性化可能 IRF-1 hER 系は、IRF-1 活性の厳密な調節を可能にし、腫瘍細胞中でかなり高レベルの IRF-1 を発現させる。E2 (E2 = β-エストラジオール) 活性化可能系は広範に研究されており、野生型 IRF-1 遺伝子のテトラサイクリン調節性転写活性化とも比較されてきた。差異は見出されなかった (Kirchhoff et al., 1995; Koster et al., 1995)。突然変異体エストラジオール受容体遺伝子 (49) の使用のために、融合タンパク質は、低エストラジオール濃度に対して無反応性であり、したがって内因性エストロゲンレベルにより活性化されることなくマウスにおいて用いられ得る。しかしながら IRF-1 hER のそれぞれのタモキシフェン特異的突然変異体 (50) は、IRF-1 活性の厳密な調節を示さなかった (A. Kroger, 未発表)。したがって β-エストラジオール誘導系を用いて、IRF-1 の抗腫瘍作用をより詳細に本発明者等は取り扱い、かつその異なる抗腫瘍性エフェクターアームの活性化を分析し得た。

30

40

【0065】

Hepa1~6 細胞の成長および形質転換の阻害を in vitro で実証し、IRF-1 の先天免疫活性に帰すべき特性を確認した。異所性 IRF-1 発現は、myc、fos B (29)、IRF-2 (51, 52)、EGFR および Ela/b (24) のような異なる癌遺伝子により誘導される細胞形質転換特性を in vitro で抑制する。野生型細胞中の c-Ha-ras 癌遺伝子の発現が成長制限条件下で細胞にアポトーシスを被ら

50

せるが I R F - 1^{-/-} 細胞中ではそうではない I R F - 1^{-/-} マウスからの胚性繊維芽細胞を用いて早期に得られた結果 (Tanaka et al., 1994) の通りに、N I H 3 T 3 細胞における E G F R および I R F - 1 の組合せ活性は、アポトーシスによる有意の細胞死を誘導することが示された (24)。しかしながらこの報告に提示されたデータは、*in vitro*での癌遺伝子依存性腫瘍抑制がアポトーシスにより媒介される必要がないことを示す。したがって形質転換阻害のその他のメカニズムが働くことが予測される。I R F - 1 は、形質転換阻害に寄与し得る多数の遺伝子の D N A 結合およびトランス活性化によりその作用を発揮する。それらの例としては、リシルオキシダーゼ (16)、P K R (17、53)、2'-5' O A S E (18)、インドールアミン 2, 3-ジオキシゲナーゼ (19)、および I I 型アンジオテンシン受容体 (20) がある。この状況での I F N - β 分泌の役割は明らかでないが、これらの遺伝子のフィードバックエンハンサーとして作用し得る。

10

【0066】

I R F - 1 は、いくつかのその他の関連する *in vivo* 抗腫瘍活性を有する。これらは、I R F - 1 の免疫調節作用、例えばヘルパー T および N K 細胞の刺激 (54、55)、M H C 遺伝子 (4、31、56、57) の、ならびに抗原提示に関与する遺伝子 (38、58) の転写の強化によるものである。したがって I R F - 1 の発現または活性を強化するほとんどの事象または薬剤が、形質転換細胞の特異的殺害を誘導することにより癌療法に有用であり得る。実際、マウスにおける実験が記載され、攻撃的非免疫原性肉腫細胞における I R F - 1 の発現が悪性表現型を抑制することが実証されている (40)。

20

【0067】

高腫瘍原性 H C C 細胞系の *in vivo*での抑制および制御は、I R F - 1 の最も重要な活性であった。E 2 処置は、H e p a I R F - 1 h E R 腫瘍を用いた攻撃に対して 75% のマウスを防御し、腫瘍を発症するマウスは、E 2 非処置動物と比較して、腫瘍成長の有意の抑制および生存強化により特徴付けられた。同様の結果は、肉腫細胞系中での I R F - 1 の構成的発現が部分的な腫瘍制御を生じた近年の研究において観察された (40)。T 細胞枯渇実験により、C D 4 + および C D 8 + T 細胞が腫瘍成長の制御に重要な役割を果たすということが実証されたが、これは、T H 1 分化の誘導における I R F - 1 の既知の重要性を確認する (55)。さらに、腫瘍成長に対して相乗的に作用し得る腫瘍特異的 T H 2 細胞の有意の活性化を、本発明者等は観察した (59、60)。C D 4 + および C D 8 + の両方の枯渇実験の作用は、I R F - 1 媒介性腫瘍成長制御の全体的作用を説明することができない。I F N - β は N K 細胞を活性化し得ることが示された。したがって N K 細胞は腫瘍制御に寄与することができる。

30

【0068】

I R F - 1 の腫瘍内発現が、H C C 特異的自己抗原 A F P のような腫瘍関連抗原に対する有意の T 細胞応答を誘導することがはじめて実証されたことはさらに重要であり、これは、A F P に対する耐性がこのアプローチにより破壊され得ることを示唆する。A F P 特異的 C T L 活性は、高免疫原性ウイルス抗原、例えば H B V または H C V 構造タンパク質と比較して、低かった (61、62)。これは、低 C T L 前駆体頻度および/または低親和性 T C R の結果であり得る。しかしながら近年の研究は、D N A または樹状細胞ベースの免疫接種後の A F P 特異的 T 細胞が A F P 発現ネズミ H C C に対して *in vivo*で機能的であることを実証した (44、63) が、これは、A F P 特異的 T 細胞が、本発明に提示されたような抗腫瘍作用に寄与したことを示唆する。細胞性免疫のみの *in vivo* 枯渇実験により実証されるように腫瘍成長を完全に制御し得なかったが、腫瘍に対する有意の T 細胞記憶が誘導され、これは、さらなる E 2 処置を用いずに H e p a I R F - 1 h E R を用いた再攻撃、野生型 H e p a 1 ~ 6 細胞を用いてさえの再攻撃に対してマウスを防御した。H C C 診断後の臨床状態を反映する I R F - 1 発現の考え得る治療的効力が示されたことはさらに重要である。E 2 を用いた大型 H e p a I R F - 1 h E R 腫瘍を保有するマウスの処置は、4 日以内に腫瘍の成長停止を生じた。9 日間に亘る E 2 処置は、任意のさらなる E 2 処置を伴わずに長期間腫瘍成長を制御するのに十分であっ

40

50

た。上記の腫瘍防御試験によれば、この長期腫瘍制御は主として免疫媒介され得る。

【0069】

I R F-1を発現するH C C腫瘍の免疫原性強化は、上記のようにM H CクラスIおよびI I分子の上向き調節により媒介され得るが、M H CクラスI I誘導はH C C細胞中では低かった。共刺激性分子C D 8 0およびC D 8 6は検出することができなかったが、このことは、抗腫瘍性免疫応答の初回抗原刺激が、プロ抗原提示細胞により排液リンパ節で起きたに違いないことを示唆する。I R F-1媒介性腫瘍成長制御に関与する付加的因子は、プロテアソームによる免疫系への提示のための次世代のM H CクラスI制限抗原性ペプチドであり得る(38、39、58)。

【0070】

Yim等(40)が予知したように、異所性I R F-1発現は有意の治療的抗腫瘍性免疫応答を誘導し、組織特異的自己腫瘍抗原、例えばA F Pに対する免疫を初回抗原刺激することが初めて示された。したがって本発明者等の結果は、H C Cの局所的小およびA F Pベースの免疫療法との関連を有し得る。

【0071】

要約すると、肝細胞癌(H C C)は、予後は不十分で、治療的意見も少ない非常に悪性の腫瘍である。

【0072】

H C Cは、他の腫瘍存在物の一例とみなされる。I R F-1は他の腫瘍種において同一の全身性作用を有するという良好な証拠がある。以下の例は、この仮説を支持する：

1. Yim等(1997; 40)は、肉腫細胞系は、I R F-1を発現する場合、拒絶および免疫性を部分的に誘導すると報告した。I R F-1は十分に発現されなかったため、作用は完全でなかった。

2. 癌遺伝子性形質転換3 T 3細胞を用いた例は、活性I R F-1が発現された場合、ヌードマウスにおいてさえ、腫瘍成長が有意に低減されるという見解を支持する。ヌードマウスにおける腫瘍成長の遅延は、i n v i t r oデータから予測されたものより非常に高く、これは、この動物における免疫系の残りの部分に関与したことを示す。

3. 多数の異なる癌遺伝子性形質転換細胞系を用いたi n v i t r oデータは、I R F-1が軟寒天成長を有意にまたは完全に抑制し、インターフェロン分泌を誘導し、M H C上向き調節を活性化することを示す(Kirchhoff et al., 1999およびKroger et al., 30未発表データ)。

【0073】

マウスにおける腫瘍防御の詳細な分子機能は既知でないが、提示されたデータは、免疫細胞(C T L、T H 1およびT H 2細胞)に関与することを示す。ヌードマウス実験は、N K細胞も関与することを示唆する。I F N-βはN K細胞活性の強力な活性剤であることが既知である。さらにI F N-βは、適応免疫系における多様な活性化機能に関しても既知である。最後に、I R F-1のアポトーシスならびに成長阻害作用は、I R F-1を過剰発現する細胞中で観察される腫瘍阻害作用に寄与し得る。免疫学的作用はM H C上向き調節およびインターフェロン分泌により媒介されと考えられるが、I R F-1により誘導されるその他の、今のところ未知の活性が抗腫瘍作用に寄与し得る。

【0074】

I R F-1活性化時に分泌されるインターフェロンは、全身的に、ならびに局所的に作用し得る。したがって、抗原提示細胞(例えばI R F-1を過剰発現するもの)の周囲におけるI F Nの産生は、抗腫瘍活性の高度の刺激をもたらすと考えられる。

【0075】

本発明の研究において、I R F-1は抗腫瘍活性を誘導することが実証された。I R F-1と比較した場合、他のI R Fが類似の結合特性を有することはよく知られている。例えばI R F-3は、I R F-1により活性化されるのと同じのまたは類似の組の遺伝子を活性化し得ると思われる。したがって構成的に活性である恒久的活性化I R F-3またはI R F-3変異体は、ここに示されたのと同じの抗腫瘍活性を有し得る。

10

20

30

40

50

【0076】

動物腫瘍モデルにおいて観察された作用はどのようにヒト療法に転換され得るであろうか。シナリオはすべて、IRF-1または関連転写因子の強力な活性に基づいている(上記参照)。

【0077】

1. 細胞療法:

ウイルス感染またはその他の遺伝子移入方法により、患者の腫瘍細胞または同一腫瘍実態を有する他の患者からの腫瘍細胞(同種異系細胞)に遺伝子をチャージすることができた。これらの遺伝子が一時的に発現されるかまたは長期間発現されるかは重要でない。あるいは、標的腫瘍に関連する腫瘍抗原を提示し得るかまたは提示させ得る非特異的細胞またはプロフェッショナル抗原提示細胞が、IRF構築物によりチャージされる。これらの細胞は、患者由来か、または同種異系であり得る。これらの細胞中でのIRF遺伝子の活性化は、患者への贈与の直前に*in vitro*で活性化され得る。あるいは、それらはそれぞれの活性剤(β -エストラジオールまたはテトラサイクリン)の贈与により患者内で活性化され得る。ヒトにおいては、細胞療法は、通常は他の細胞を不活性化することにより、UVまたは γ 線照射のような方法により実行される。

10

【0078】

2. ウイルス移入法による遺伝子療法

例えば上記のようなIRFは、上記のアデノウイルスベクターのようなウイルスベクターにより形質導入され得る。好ましくはこれは腫瘍中または腫瘍付近の組織中へのウイルスの感染により行われる。ある場合には、それは、全身的適用によっても行われ得る。これは典型的には、血流中へのアデノウイルスの適用による肝臓腫瘍の場合に行われる。アデノウイルスは主に肝臓で捕捉され、したがって遺伝子移入は極端に肝臓特異的であることがよく知られている。ウイルスベクターにより保有されるIRFの活性化または低減は、それぞれの作用物質により患者において*in vivo*で活性化される。非腫瘍細胞中でのIRF-1活性化が可逆的増殖阻害を引き起こすが、阻止作用をもたらさないということを初期の研究は示したことに言及する必要がある。

20

【0079】

3. 非ウイルス法による遺伝子療法

遺伝子がヒト組織中に移入され得る多数の方法が既知である。それらの例としては、リポフェクション、遺伝子銃、電気穿孔等がある。IRFは、これらの方法によりそれぞれの腫瘍組織中にトランスフェクトされ得る。

30

【0080】

4. 患者の腫瘍中のまたは抗原提示細胞中の内因性IRF-1の活性化または誘導は、サイトカインおよびその他の生物学的応答修飾剤のような多数の化合物から活性化または誘導され得る。それらがIRF-1の転写および産生を活性化することは既知である。強力な誘導物質またはこのような組合せを用いて、IRF-1を誘導し、かつ観察された抗腫瘍作用を誘導し得る。内因性IRF-1を活性化する、ハイスループットスクリーニングにより典型的に見出されるその他の化合物も、同一方法で用い得る。

【0081】

【表3】

40

表1 I R F - 1 活性化は I F N 分泌をもたらす^c

クローン	I F N 分泌 (I U / m l)		
	- E 2	+ E 2 ^a	+ E 2 ^a + 抗 I F N - a b ^b
w t	n. d	n. d	n. d
c 4	n. d	1 2 5	n. d
c 9	n. d	1 2 5	n. d
c 2 2	n. d	1 8 0	n. d

n. d : 検出されなかった

^a 1 μ M の β - エストラジオール^b 5 0 0 I U を中和する抗 I F N - β 抗体

^c H e p a 1 ~ 6 細胞および H e p a I R F - 1 h E R 細胞クローンを、1 μ M の β - エストラジオールで5日間処理した。材料と方法の節に記載されたように、上清中で蓄積 I F N を測定し、1 0 ⁶ 細胞に正規化した。

10

【 0 0 8 2 】

【 表 4 】

表2 β - エストラジオール処置後に I R F - 1 - h E R 含有アデノウイルスを感染させた細胞中の I F N 分泌

t 形質導入アデノウイルス構築物	I F N 分泌 (I U / m l)	
	- E 2	+ E 2 ^b
偽	n d ^c	N d
A d - C M V I H	n d	5 0 0 0
A d - C M V I H E G	n d	5 0 0 0
A d - L T R - T B T I H E G	n d	5 0 0 0
A d - L T R - T B T I H E G i n v	n d	2 5 0 0

^a アデノウイルス感染の24時間後に、H e p a 1 ~ 6 細胞を1 μ M の E 2 で24時間処置した。上清中で蓄積 I F N を測定し、1 0 ⁶ 細胞に正規化した。

^b 1 μ M の β - エストラジオール^c 検出されなかった

30

【 0 0 8 3 】

【 表 5 】

表3 NIH3T3TA/IH/MR細胞中のIRF-1活性化の表現型

	+Dox ^a		-Dox	
	-E2	+E2 ^b	-E2	+E2 ^b
増殖 ^c (%)	100	60	130	65
軟寒天成長 ^d (クローン数)	0	0	130	0
IFN分泌 ^e (IU/ml)	nd ^f	750	nd	750

^a 2 μ g/mlのドキサイクリン^b 1 μ Mの β -エストラジオール^c 細胞の細胞成長に関する測定値としての代謝活性を、処置後7日目に測定した。^d 軟寒天中の細胞の足場非依存性成長。処置後2週間目にコロニー数を確定した。^e IFNの蓄積を上清中で処置後5日目に測定し、10⁶細胞に正規化した。^f 検出されなかった

10

【0084】

【表6】

表4 一側腹部における腫瘍中のIRF-1活性化は両側腹部における腫瘍成長に影響を及ぼす

20

注入した細胞の種類 ^a	腫瘍容積 (mm ³) (平均 $\pm$ SD)	
	-E2	+E2 ^b
Hepa1-6 (wt)	1630 $\pm$ 596	1630 $\pm$ 596
HepaIH	1317 $\pm$ 380	22, 4 $\pm$ 179
Hepa1-6 (左)	1630 $\pm$ 596	179 $\pm$ 288
+		
HepaIH (右) ^c	1630 $\pm$ 596	nd ^d

^a 5 $\times$ 10⁶個のHepa1-6細胞またはHepaIRF-1hER細胞をマウスの側腹部中に皮下接種した

30

^b マウスを1.5mgのE2を用いて2日毎にi.p. 処置した

^c マウスの右側腹部に5 $\times$ 10⁶個のHepaIRF-1hER細胞を、左側腹部に5 $\times$ 10⁶個の細胞を接種した

^d 検出されなかった

【0085】

参考文献

40

1. ボッシュ, X., ライプス, J., アンド ボラス, J. エピデマイオロジー・オブ・プライマリー・リバー・キャンサー、セミナー・リバー・Dis. 19: 271-285, 1999
2. オクダ, K. ヘパトセルラー カルシノマ、J., ヘパノール, 32: 225-237, 2000
3. ハロッシュ, S., レベル, M., アンド セバス, J. インダクション・バイ・インターロイキン-6・オブ・インターフェロン レギュラトリー ファクター 1 (IRF1) ジーン エクスプレッション スルー ザ パラリンドロミック インターフェロン レスpons エレメント pIRE アンド セル タイプ-ディペンデント コントロール オブ IRF-1 バインディング ツウ DNA、Embo

50

J. 13: 1942-9, 1994

【0086】

4. カーシュホフ, S., シャパー, F. アンド ハウザー, H. インターフェロン レギュラトリー ファクター 1 (IRF-1) メディエーツ セル グロース インヒビション バイ トランスアクチベーション オブ ダウンストリーム ターゲット ジーンズ, スクレイック アシズ Res., 21, 2881, 1993
5. バイン, R. コンスティチューティブ エクスプレッション オブ アン I S G F 2 / I R F 1 トランスジーン リーズ ツウ インターフェロン-インディペンデント アクチベーション オブ インターフェロン-インディウシブル ジーンズ アンド レジスタンス ツウ ビールス インフェクション, J V i r o l. 66, 4470-8, 1992
6. リース, L. F., ハラダ, H., ウォルコック, J. D., タニグチ, T., アンド ビルセック, J. クリティカル ロール オブ ア コモン トランスクリプション ファクター, I R F - 1, イン ザ レギュレーション オブ I F N - ベータ アンド I F N - インディウシブル ジーンズ, E m b o J. 11, 185-93, 1992
7. チャン, C. H., ハマー, J., ロー, J. E., フォダー, W. L. アンド フラベル, R. A. ザ アクチベーション オブ メジャー ヒストコンパティビリティ コンプレックス クラス I ジーンズ バイ インターフェロン レギュラトリー ファクター-1 (IRF-1), イnmノジェネティックス 35: 378-84, 1992

【0087】

8. キムラ, T., ナカヤマ, K., ペニンガー, J., キタガワ, M., ハラダ, H., マツヤマ, T., タナカ, N., カミジョー, R., ビルセック, J., マック, T. W., アンド エト アル インボルブメント オブ ザ I R F - 1 トランスクリプション ファクター イン アンチビール レスpons ツウ インターフェロンズ, サイエンス 264: 1921-4, 1994
9. フジタ, T., キムラ, Y., ミヤモト, M., バーソーミアン, E. L., アンド タニグチ, T. インダクション オブ エンドジェニアス I F N - アルファ アンド I F N - ベータ ジーンズ バイ ア レギュラトリー トランスクリプション ファクター, I R F - 1, ネイチャー 337: 270-2, 1989
10. ハラダ, H., フジタ, T., ミヤモト, M., キムラ, Y., マルヤマ, M., フリア, A., ミヤタ, T., アンド タニグチ, T. ストラクチュアリー シミラー バット ファンクショナルリー ディスティンクト ファクターズ, I R F - 1 アンド I R F - 2, バインド ツウ ザ セイム レギュレイトリー エレメンツ オブ I F N アンド I F N - インディウシブル ジーンズ, セル 58: 729-39, 1989
11. マツヤマ, T., キムラ, T., キタガワ, M., プフェファー, K., カワカミ, T., ワタナベ, N., クンディー, T. M., アマカワ, R., キシハラ, K., ベアッケム, A., アンド エト アル ターゲットッド ディスループション オブ I R F - 1 オア I R F - 2 リザルツ イン アブノーマル タイプ I I F N ジーン インダクション アンド エイベラント リンフォカイト デベロップメント, セル 75: 83-97, 1993

【0088】

12. ラフナー, H., リース, L. F., ナフ, D., アンド ヴァイスマン, C. インダクション オブ タイプ I インターフェロン ジーンズ アンド インターフェロン-インディウシブル ジーンズ イン エンブリオナル システム セルズ デヴォイド オブ インターフェロン レギュラトリー ファクター 1, P r o c N a t l A c a d S c i U S A. 90: 11503-7, 1993
13. リース, L. F., ラフナー, H., スターク, G., エイグエト, M., ア

ンド ヴァイスマン, C. マイス デヴォイド オブ インターフェロン レギュラトリー
ファクター 1 (IRF-1) ショウ ノーマル エクスプレッション オブ
タイプ I インターフェロン ジーンズ, Emb o J. 13: 4798-806, 1994

14. ペレグリニ, S. アンド シンドラー, C. アーリー イベンツ イン シグ
ナリング バイ インターフェロンズ, トレンズ バイオケミ ソサイエティー 18
: 338-42, 1993

【0089】

15. カミジョー, R. , ハラダ, H. , マツヤマ, T. , ポスランド, M. , ゲレチ
ターノ, J. , シャピロー, D. , ル, J. , コー, S. I. , キムラ, T. , グリー
ン, S. J. , アンド エト アル リクイアメント フォー トランスク립ショ
ン ファクター IRF-1 イン NO シンザーゼ インダクション イン マクロ
ファージズ, サイエンス 263: 1612-5, 1994

16. タン, R. S. , タニグチ, T. , およびハラダ, H. (Tan, R. S., Taniguchi, T.,
and Harada, H.)、アイデンティフィケーション・オブ・ザ・リシル・オキシダーゼ・
ジーン・アズ・ターゲット・オブ・ジ・アンチオンコジェニック・トランスク립ション
・ファクター、IRF-1、アンド・イツ・ポッシブル・ロール・イン・チューマー・
サプレッション、キャンサー・レス (Cancer Res.)、56: 2417-21, 1996.

17. キルコッフ, S. , コロミラス, A. E. , シャペル, F. , グラシヨフ, M. , ソ
ネンベルグ, N. , およびハウザー, H. (Kirchhoff, S., Koromilas, A. E., Schaper
, F., Grashoff, M., Sonenberg, N., and Hauser, H.)、IRF-1・インデュースド・
セル・グロース・インヒビション・アンド・インターフェロン・インダクション・リク
ワイヤーズ・ジ・アクティビティ・オブ・ザ・プロテインキナーゼ・PKR、オンコジーン
(Oncogene)、11: 439-45, 1995.

【0090】

18. ベネチェ, P. , ビグネロン, M. , ペレツ, D. , レベル, M. , およびチェバス,
J. (Benech, P., Vigneron, M., Peretz, D., Revel, M., and Chebath, J.)、インタ
ーフェロン・レスポンス・レギュラトリー・エレメンツ・イン・ザ・プロモーター・オブ
・ザ・ヒューマン・2', 5'-オリゴ (A) ・シンターゼ・ジーン、モル・セル・バ
イオ (Mol Cell Biol.)、7: 4498-504, 1987.

19. タキカワ, O. , クロイワ, T. , ヤマザキ, F. , およびキド, R. (Takikawa,
O. , Kuroiwa, T., Yamazaki, F., and Kido, R.)、メカニズム・オブ・インターフェ
ロン・ガンマ・アクション。キャラクタライゼーション・オブ・インドレアミン 2, 3-
ジオキシゲナーゼ・イン・カルチャード・ヒューマン・セルズ・インデュースド・バイ・
インターフェロン・ガンマ・アンド・エバリューション・オブ・ジ・エンザイム・メディ
アイティッド・トリプトファン・デグラデーション・イン・イツ・アンチセルラー・ア
クティビティ、ジェイ・バイオロ・ケム (J Biol Chem.)、263: 2041-8, 1988.

20. ホリグチ, M. , ヤマダ, T. , ハヤシバ, W. , およびダザウ, V. -J. (Hori
uchi, M., Yamada, T., Hayashida, W., and Dzau, V.-J.)、インターフェロン・レギ
ュレトリー・ファクター-1・アップ・レギュレイテス・アンジオテンシン II ・タイプ
2 レセプター・アンド・インデュースズ・アポトーシス、ジェイ・バイオロ・ケム (J B
iol Chem.)、272: 11952-8, 1997.

【0091】

21. タナカ, N. , イシカワ, M. , キタガワ, M. , ハラダ, H. , キムラ, T. , マ
ツヤマ, T. , ランピアー, M. S. , アイザワ, S. , マック, T. W. , およびタニ
グチ, T. (Tanaka, N., Ishihara, M., Kitagawa, M., Harada, H., Kimura, T., Mats
uyama, T., Lamphier, M. S., Aizawa, S., Mak, T. W., and Taniguchi, T.)、セルラ
ー・コミットメント・トゥ・オンコジーン・インデュースド・トランスフォーメーション
・オア・アポトーシス・イズ・ディペンデント・オン・ザ・トランスク립ション・ファ
クター・IRF-1、セル (Cell)、77: 829-39, 1994.

10

20

30

40

50

22. ロウエ, S. W. およびルレイ, H. E. (Lowe, S. W. and Ruley, H. E.) スタビライゼーション・オブ・ザ・p53・チューマー・サプレッサー・イズ・インデュースト・バイ・アデノウイルス5 E1A・アンド・アコンパニス・アポトーシス、ジーン・デヴィ (Genes Dev.) 7: 535-45,1993.
23. アッターディ, L. D., ロウエ, S. W., ブルガロラス, J., アンド ジャックッス, T. トランスクリプショナル アクティベーション バイ p53, バット ノット インダクション オブ ザ p21 ジーン, イズ エッセンシャル フォー オンコジーン-メディケイティッド アポトーシス, エンボ J. 15 : 3693-701,1996.
24. キルヒホッフ, S. アンド ハウザー, H. コーペラティブ アクティビティー ビトインハー オンコジーン アンド ザ チュモア サプレッサー IRF-1 リザルト イン アポトーシス, オンコジーン 18 : 3725-36,1999. 10
25. チン, Y. E., キタガワ, M., マカイダ, K., フラベル, R. A., アンド FU, X. Y. アクティベーション オブ ザ スタット シグナリング パスウェイ キャン コーズ エクスプレッション オブ キャスパス 1 アンド アポトーシス, モル セル バイオル. 17: 5328-37,1997.
26. タムラ, T., イシハラ, M., ランフィア, M. S., タナカ, N., オオイシ, I., アイザワ, S., マツヤマ, T., マック, T. W., タキ, S., アンド タニグチ, T. DNA ダメージ-インデュースト アポトーシス アンド アイス ジーン インダクション イン ミトジェニカリー アクティベイトッド T リムファシテス リクワイヤ IRF-1, ルーケミア. 11 SUPP L 3: 439-40,1997. 20
- 【0092】
27. ヤマダ, G., オガワ, M., アカギ, K., ミヤモト, H., ナカノ, N., イトウ, S., ミヤザキ, J., ニシカワ, S., ヤマムラ, K., アンド タニグチ, T. スペシフィック デイプレッション オブ ザ B-セル ポピュレーション インデュースト バイ アベラント エクソプレッション オブ ヒューマン インターフェロン レギュラトリー ファクター 1 ジーン イン トランスジェニック マイス, Proc Natl Acad Sci U S A. 88: 532-6,1991.
28. ウィリアム, C. L., シーバー, C. E., パラビシン, M. G., ハラダ, H., タナカ, N., スロバク, M. L., ヤマモト, H., ハラダ, K., ミーカー, T. C., リスト, A. F., アンド et al. デリション of IRF-1, マッピング トゥー クロモソーム 5q31. 1, イン ヒューマン ルーキーミア アンド プレルーキック ミエロディスプラシア, サイエンス. 259 : 968-71,1993. 30
29. タナカ, N., イシハラ, M., アンド タニグチ, T. スプレッション オブ c-myc or FOSB-インデュースト セル トランスフォーメーション バイ ザ トランスクリプション ファクター IRF-1, キャンサー レット. 83: 191-6,1994.
30. ノザワ, H., オダ, E., ナカオ, K., イシハラ, M., ウエダ, S., ヨコチ T., オガサワラ, K., ナカツル, Y., シミズ, S., オオヒラ, Y., ヒオキ, K., アイザワ, S., イシカワ, T., カツキ M., ムトウ, T., タニグチ, T., アンド タナカ, N. ロス オブ トランスクリプション ファクター IRF-1 アフェクツ チュモア サスセプティビリティー イン マイス キャリング ザ Ha-ras トランスジーン オア ナリジゴスティー フォー P53, ジーンズ Dev. 13 : 1240-5,1999. 40
31. ホバート, M., ラマサール, V., ゴエス, N., アームソン, J., アンド ハロラン, P. F. ザ インダクション オブ クラスI アンド II メジャー ヒストコンパチビリチコンプレックス アロゲニック スチムレーション イズ デペンダント オン ザ トランスクリプション ファクター インターフェロン レギュラトリー ファクター 1 (IRF-1): オブザベーション イン IRF-1 ノックアウト マイス, トランスプランテーション. 62 : 1895-901,1996.
- 【0093】
32. サルコウスキ, C. A., バーバー, S. A., デトーレ, G. R., アンド ボーゲル, S. N. デファレンシャル ディスレギュレーション オブ ニトリックオキシド プロダクシ 50

ヨン イン マクロファージス ウイズ ターゲッテド ディスラプションズ イン IFN レギュラトリ ファクタ-1 アンド-2 ジーン, J Immunol. 3107-10, 1996.

33. オガサワラ, K., ヒダ, S., アジミ N., タガヤ, Y., サトー, T., ヨコチ-フクダ, T., ワルドマン, T. A., タニグチ, T., アンド タキ, S. レクアイアメント フォア IRF-1 イン ザ マイクロエンピロンメント サポートイング デベロップメント オフ ナチュラル キラー サイボウ, ネイチャー. 391 : 700-3, 1998.

34. ハラダ, H., ウイリソン, K., サカキンバラ, J., ミヤモト, M., フジタ, T., アンド タニグチ, T. アブセンス オフ ザ タイプ I IFN システム イン EC セルス: トランスクリプショナル アクチベーター (IRF-1) アンド レプレッサー (IRF-2) ジーンズ アー デベロップメンタリー レグレートッド, セル. 63 : 303-12, 1990.

35. キルヒホッフ, S., ヴィルヘルム, D., アンゲル, P., アンド ハーサー, H. NFkappaB アクチベーション イズ レクアイアド フォア インターフェロン レギュラトリ ファクター-1-メヂィエートド インターフェロン ベータ インダクション, ユーロ J バイオケム. 261 : 546-54, 1999.

10

【0094】

36. オーテキ, T ヨシダ, H., マツヤマ, T., ダンカン, G. S., マック, T. W., アンド オーハシ, P. S. ザ トランスクリプション ファクター インターフェロン レギュラトリ ファクター 1 (IRF-1) イズ インポートアント ダーリング ザ マチャーション オフ ナチュラル キラー 1.1+ T セル レセプター- アルファ/ベータ+ (NK1+ T) セルズ, ナチュラル キラー セルス, アンド インテスチナル イントラエピセリアル T セル, J E xp Med. 187: 967-72, 1998.

20

37. タナカ, N., イシハラ, M., ランフィアル, M. S., ノザワH., マツヤマ, マック. W., アイザワ, トキノ, T オーレン, タニグチ, T コーポレーション オブ ザ ツマー ア サプレッサーズ IRF-1 and p53 イン レスポンス ツー DNA ダメージ, ネイチャー . 382: 816-8, 1996.

38. ホワイト, L. C., ライト, K. L., フェレックス, N. J., ルッフナー, H., レイス パイン, R., アンド チング, J. P. レギュレーション オブ LMP2 アンド TAP1 ジーンズ バイ IRF-1 エクスプレインズ ザ パウシチー オブ CD8+ T セルズ イン IRF-1-/-マイス イミュニティー. 5: 365-76, 1996.

39. フォッス, G. S. アンド プライズド, H. インターヘロンレギュレタリー ファクター ーズ1 メヂィエート ザ インターフェロン-ガンマ インダクション オブ ザ ヒュマン イミュノプロテオゾーム サブユニット マルチカタリチク エンドペプチダーゼ コンプレックス-ライク 1, J バイオル ケム. 274: 35196-202, 1999.

30

40. イム, J. H., フー, S. J., カーシー, M. J., ノートン, J. A., アンド ドーハティ, G. M. IFN レギュラトリ ファクター-1 ジーン トランスファー インツァン アグレッシブ, ノンイミュノジェニック サルコーマ サプレッスズ ザ マリグナント フェノタイプ アンド エンハンスズ イミュノゲニシチィ イン シンゲネイック マイス, J イミュノル. 1581284-92, 1997.

【0095】

41. ダイ ビィシェグリー, A. M., カリサーズ Jr., R. L., アンド ゴレス, G. J. ヘパトセルラー カルシノーマ, ヘパトロジー. 28: 1161-1165, 1998.

40

42. バラ, J. A., ポルテラ, A., オーチン, J., アンド ジメネズ, A. エクスプレッションズ イン マンマリアンズ セルズ オブ ア ジーン フローム ステファロミセス アルボニガー コンファーニング ピューロマイシンレジスタンス, ヌクレイック アシズ レス. 14: 4617-24, 1986.

【0096】

43. ジンター, H. アンド ハーサー, H. スーパーインダクション オブ ザ ヒューマン インターフェロン-ベータ プロモーター, エンボ J. 6: 599-604, 1987.

44. グリム, C., オートマン, D. モール, L., ミカラック, S., クローネ, T. U., メッキエル, S., エイセレ, S., エンケ, J., ブルム, H. E., アンド ゲイスラー, M. ト

50

リートメント オブ ヘパトセルラー カルシノーマ バイ ブリーキング イミューノロギカル イグノーランス トワード アルファ ユージンゲル ゲネチック イミュニゼーション イン マイス, ガストロエンタロロギイ 119 : 1104-1112, 2000.

【0097】

45. シルムベック, R., ワイルド, J., ブルーム, H. E., チサリ, F. V., ガイスラー, M., および ライマン, J. 「オンゴング T1 オア T2 イムノ レスポンス トゥ ザ ヘパティティス B サーフェイス アンチゲン (HBsAg) アー エクスクルーデッド フロム ザ レバー オブ マイス イン フィッチ トランスジーン-エンコーデッド HBsAg イズ エクスプレスト」, J. Immunol. 164 : 4235-4243, 2000.

46. ワイルド, J., グルスビー, M. J., シルムベック, R., および ライマン, J. 「ブライミング MHC-I-レストリクテッド サイトトキシック T リンフォサイト レスポンシズ トゥ エクソジェニアウス ヘパティティス B サーフェイス アンチゲン イズ CD4+ T セル ディペンデント」, J. Immunol. 163 : 1880-1887, 1999. 10

【0098】

47. ニコレッティ, I., ミグリオラチ, G., パグリアチ, M. C., グリニャーニ, F., および リカルディ, C. A 「ラピッド アンド シンプル メソッド フォー メジャリング チモサイト アポトーシス バイ プロピヂウム アイオダイド ステイニング アンド フローサイトメトリー」, J Immunol Methods. [139 : 271-9,] 1991.

48. ファドック, V. A., フェルカー, D. R., カンベル, P. A., コーヘン, J. J., ブラットン, D. L., および ヘンソン, P. M. 「エキスポージャ オブ フォスファティジルセリン オン ザ サーフェイス オブ アポプトチック リンフォサイト トリッガーズ スペシフィック レコグニッション アンド リムーバル バイ マクロファージ」, J Immunol. 148 : 2207-16, 1992. 20

49. トーラ, L., ムリック, A., メツガー, D., ポンリキトモンコール, M., パーク, I., および シャボン, P. 「ザ クローンド ヒューマン オエストロゲン レセプター コンテインズ ア ミューテーション フィッチ オルタース イッツ ホルモン バインディング プロパティーズ」, Embo J. 8 : 1981-6, 1989.

50. ダニエリアン, P. S., ホワイト, R., ホアレ, S. A., フェイウエル, S. E., および パーカー, M. G. 「アイデンティフィケーション オブ レシジュー イン ザ エストロゲン レセプター ザット カンファア ディファレンシャル センシティブィティー トゥ エストロゲン アンド ヒドロキシタモキシフェン」, Mol Endocrinol. 7 : 232-40, 1993. 30

51. ハラダ, H., キタガワ, M., タナカ, N., ヤマモト, H., ハラダ, K., イシハラ, M., および タニグチ, T. 「アンチ-オンコジェニック アンド オンコジェニック ポテンシャルズ オブ インターフェロン レギュラトリー ファクター-1 アンド-2」, Science. 259 : 971-4, 1993.

【0099】

52. フタキ, M., イノクチ, K., ハナワ, H., タノサキ, S., ダン, K., および ノムラ, T. 「パッシブル トランスフォーミング アクティビティ オブ インターフェロン レギュラトリー ファクター 2 イン チューモリジェニシティ アッセイ オブ NIH3T3 セル トランスフェクテッド ウィズ DNA フロム クロニック ミエロジェニニアス ロイケミア ペイシェンツ」, Leuk Res. 20 : 601-5, 1996. 40

53. タナカ, H. および サミュエル, C. E. 「メカニズム オブ インターフェロン アクション : ストラクチャー オブ ザ マウス PKR ジーン エンコーディング ザ インターフェロン-インデュシブル RNA-ディペンデント プロテイン キナーゼ」, Proc Natl Acad Sci U S A. 91 : 7995-9, 1994.

54. ダンカン, G. S., ミッツルッカー, H. W., カギ, D., マツヤマ, T., および マク, T. W. 「ザ トランスクリプション ファクター インターフェロン レギュラトリー ファクター-1 イズ エッセンシャル フォー ナチュラル キラー セル ファンクション in vivo」, J Exp Med. 184 : 2043-8, 1996.

55. ロホッフ, M., フェリック, D., ミッツルッカー, H. W., ダンカン, G. S., ビショ 50

ッフ, S., ローリンホッフ, M., および マク, T. W. 「インターフェロン レギュラトリー ファクター-1 イズ リクワイアド フォー ア T ヘルパー 1 イムノ レスポンス in vivo」, Immunity. 6 : 681-9,1997.

【0100】

56. ドリユー, P. D., フランゾーソ, G., ベッカー, K. G., バウアス, V., カールソン, L. M., シーベンリスト, U., および オウザト, K. 「NF カッパー B アンド インターフェロン レギュレイトリー ファクター 1 フィジカリー インタラクト アンド シナージ スティックカリー インデュース メジャー ヒストコンパチビリティ クラス I ジーン エキスプレッション」, J Interferon Cytokine Res. 15: 1037-45,1995.

57. マッサ, P. T. および ウー, H. 「インターフェロン レギュレイトリー ファクター エレメント アンド インターフェロン レギュレイトリー ファクター 1 イン ザ インダクション オブ メジャー ヒストコンパチビリティ コンプレックス クラス I ジーンズ イン ニューラル セルズ」, J Interferon Cytokine Res. 15: 799-810,1995. 10

58. チャタージー-キショワ, M., キショワ, R., ヒックリン, D. J., マリンコーラ, F. M., および フェロン, S. 「ディファレント リクワイアメンツ フォー シグナル トランジューサー アンド アクチベーター オブ トランスクリプション 1 アルファ アンド インターフェロン レギュレイトリー ファクター 1 イン ザ レギュレイション オブ ロウ モレキュラー マス ポリペプチド 2 アンド トランスポーター アソシエイテッド ウィズ アンチゲン プロセッシング 1 ジーン エクスプレッション」, J Biol Chem. 273: 16177-83,1998. 20

59. ハン, K., ハヤシ, R., ラフオンド-ウォーカー, A., ローレンシュタイン, C., パードール, D., アンド レビッスキイ, H. セントラル ロール オブ CD4 (+) Tセルズ イン ザ アンチチューマー イムノ レスポンス, J Exp Med. 188: 2357-68,1998.

60. ザジャック, A. J., ムライ-クリシュナ, K., ブラットマン, J. N., アンド アーメド, R. セラピューティック ヴァッシネイション アゲインスト クロニック ヴァイラル インфекション: ザ インポートانس オブ コーポレーション ビトウィーン CD4+ アンド CD8+ T セルズ, Curr Opin Immunol. 10: 444-9,1998.

61. ゲイスラー, M., ゲイジェン, A., トクシゲ, K., アンド ウァンズ, J. R. エンハンズメント オブ セルラー アンド ヒューモラル イムノ レスポンシーズ トゥ ヘパティティス C ウィルス (HCV) コア プロテイン ユージニング DNA ベースド ワクチン オーギュメンテッド ウィズ サイトカイン エクスプレッシング プラスミド, J Immunol. 158: 1231-1237,1997. 30

62. ゲイスラー, M., ブラス, V., ミチャラク, S., オートマン, D., ウァンズ, J. R., アンド ブルム, H. E. インターセルラー リテンション オブ ヘパティティス B ウィルス サーフェース プロテインズ リデュース ザ イムノ レスポンス オーギュメンテイング エFFECTS オブ IL-2 アフター サイトカイン ジェネティック コイミュナイゼーションズ., J. Virol. 73: 4284-4292,1999.

【0101】

63. ヴォルマー, C. M., Jr., エイルバー, F. C., バターフィールド, L. H., ライバス, A., ディセッテ, V. B., コウ, A., モンテージョ, L. D., リー, M. C., アンドリューズ, K. J., マクブライド, W. H., グラスピー, J. A., アンド エコノモウ, J. S. アルファ-フェトプロテイン-スペシフィック ジェネティック イムノセラピー フォー ヘパタトセルラー カルシノーマ, Cancer Res. 59 : 3064-7,1999. 40

64. スパイツァー D., ハウザー H. アンド ワース D. テクニカル レポート. コンプリメント-プロテクテッド アンフォトロフィック レトロウィルス フロム ムリン パッケージング セル. Human Gene Therapy 10,1893-1902 (1999)

65. Unsinger, J., Kroger, A., ハウザー, H., アンド ワース, D.: レトロヴァイラル ベクターズ フォー トランスダクション オブ アン オートレギュレーテッド バイダイレクショナル エクスプレッション カセット. Molecular Therapy, 4,484- 489. (2001)

66. アンシンガー J., リンデンメイアー W., ハウザー H. アンド ワース D. LTR-フラ 50

ンクド オートレギュレーテッド エクスプレッション カセット フォー ホモゲノウス ア
ンド, ストリクトリイ コントロールド エクスプレッション イン アデノヴァイラル ベ
クターズ. サブミット 2002

【0102】

67. コルベア-ガーピン F., ホロドニセアヌ F., コーリルスキー P., アンド ガラピン A. C. ア ニュー ドミナント ハイブリッド セレクティブ アーカー フォー ハイヤー ユーカリオティック セルズ. J Mol. Biol. 150,1-13. (1981).
68. コースター, M., キリチホフ, S., シャーパー, F. アンド ハウザー, H.: プロライ
フレーション コントロール オブ マンマリアン セルズ バイ ザ チューマー サプレッサー IRF-1. Cytotechnology, 18,67-75 (1995)
69. キルシホフ, S., コースター, M., ワース, M., シェーパー, F., ゴッセン, M., ブ
ジャード, H. アンド ハウザー, H.: アイデンフィケーション オブ マンマリアン セル
クローンズ イクスヒビッティング ハイリー レギュレーテッド エクスプレッション フ
ロム インデュシブル プロモーターズ. TIG, 11,219-220 (1995)
70. クロガー A. エヴァルエールング ダー チューマースプレッシヴェン エイゲンシャ
フテン ダス インターフェロン レギュレーター ファクター-ワン (IRF-1). Dissertatio
n, Technische Universitat Braunschweig (1999)

10

【図面の簡単な説明】

【0103】

【図1】 IRF-1 は Hepa1~6 細胞における細胞成長阻害を媒介する。A: IRF-1 hER でトランスフェクトされた Hepa1~6 細胞における IRF-1 hER 融合タンパク質のウェスタンブロット分析。これらの細胞クロンから得られた溶解物(タンパク質 50 μ g) を SDS-PAGE に付して、抗 ER 抗体を用いて分析した(上パネル)。膜を剥いで、抗アクチン抗体で再プローブして、試料のタンパク質チャージを制御した(下パネル)。B: 細胞成長の確定のために、同一クロン由来の細胞をマイクロタイタープレートのウェル中に播種して、 β -エストラジオール 1 μ M を用いて(黒棒)または用いずに(白棒)成長させた。処置の7日後に、培養の代謝活性を測定した。個々の Hepa1~6 細胞クロンの成長特性はわずかに異なるため、未処置細胞の代謝活性を 100% と設定した。

20

【図2】 IRF-1 の活性化は、Hepa1~6 細胞の腫瘍原性表現型を復帰させる。A: 軟寒天中の IRF-1 トランスフェクト細胞クロンの足場非依存性成長。B: β -エストラジオール 1 μ M を用いずに(黒棒)または用いて(白棒)3週間培養後、指示細胞クロンのコロニー数を測定した。

30

【図3】 IRF-1 の活性化は、MHC クラス I および MHC クラス II 発現の増大をもたらす。IRF-1-hER を発現する Hepa1~6 細胞の表面タンパク質の FACS 分析(クロン9)を、H2K^b/D^b (A)、I-A/I-B (B) および CD54 (C) に対して誘導される抗体を用いて行った。エストロゲン無含有培地中または 1mM の β -エストラジオールの 1:1, 000 希釈物を含む培地中で、Hepa1~6 IRF-1 hER 細胞を 3~4 日間培養した。その後、適切な FITC 標識または PE 標識抗体を用いて細胞を染色した。特異性に関する対照として、FITC 標識または PE 標識非特異的アイソタイプ対照で細胞を染色した。データは、3つの個々の実験から得られる。

40

【図4】 IRF-1-hER のアデノウイルス形質導入は IRF-1 媒介性表現型をもたらす A 材料と方法の節に記載されたような異なるアデノウイルスベクターの模式図。矢印: サイトメガロウイルスプロモーター(CMV); 二方向矢印: 二方向 tTA-プロモーター(bi-tTA); 黒丸: SV40 ポリアデニル化シグナル; 黒長方形: ポリオウイルス由来内部リボソーム進入部位(IRES); eGFP: 強化グリーン蛍光タンパク質; LTR: レトロウイルス末端反復配列; tTA: トランス活性化因子。B 指示アデノウイルスに感染された Hepa1~6 細胞における IRF-1-hER 融合タンパク質のウェスタンブロット分析。感染後 48 時間目の細胞由来の溶解物(タンパク質 50 μ g) を SDS-PAGE に付して、ヒトエストロゲン受容体に対して誘導される抗体を用いて分析し

50

た。

【図5】IRF-1の活性化はヌードマウスにおける腫瘍成長を遅延し、部分的に阻害する。NMRIヌードマウスの右側腹部に 10^6 細胞/マウスを皮下注射した。1.5mgのE2の2日毎のi.p.でマウスを処置するかまたは未処置のままにした。データは、5匹の動物の平均値を示す。A 腫瘍容積により腫瘍成長を測定した。B 腫瘍無含有ヌードマウス生存率を示す Kaplan-Meier プロット。

【図6】同系免疫応答性C57L/JマウスにおけるE2処置および腫瘍再攻撃に対する防御に依存するHepaIRF-1hERおよびHepa1~6細胞のin vivo特性。A:マウスの右側腹部に 1×10^7 Hepa1~6またはHepaIRF-1hER細胞を接種し、2日毎の1.5mg β -エストラジオールi.p.でマウスを処置するか、または未処置のままにした。8匹のE2処置動物のうちの6匹はHepaIRF-1hER腫瘍成長に対して完全に防御され、2匹は、E2処置停止後でさえ非常に遅い成長速度を特徴とする小腫瘍を発症しただけであることに留意されたい。B:ナイーブC57L/JマウスまたはHepaIRF-1hER腫瘍成長に対して防御されたE2処置動物を、E2処置停止後11日目(最初の腫瘍接種後28日目)に、 1×10^7 野生型Hepa1~6($n=3$)またはHepaIRF-1hER($n=3$)腫瘍細胞を用いて再攻撃させた。これらのマウスが任意のさらなるE2処置を受けなかったことは重要である。

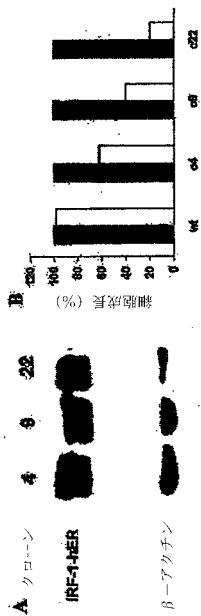
【図7】Hepa1~6腫瘍に対するCTL活性ならびにT細胞前駆体頻度。A:腫瘍攻撃処置または対照マウス(各群 $n=5$)由来の脾臓細胞を、放射線照射Hepa1~6細胞を用いて再刺激し、その後、指示されたE:T比で、同系Hepa1~6およびルイス肺癌細胞に対する細胞傷害性活性に関して分析した。特異性の対照のために、HepaIRF-1hER細胞を用いて攻撃されたE2処置マウスを3LL細胞でin vitro刺激して、その後、同系Hepa1~6および3LL癌細胞に対する細胞傷害性活性に関して分析した。Hepa1~6腫瘍特異的溶解物は、Hepa1~6標的に対する溶解値から3LLに対する溶解値を差し引くことにより提示された。値は、3重反復試験確定値の平均を表す。B:腫瘍攻撃または非攻撃処置マウス(各群 $n=5$)由来の脾臓細胞を、Hepa1~6または3LL細胞を用いて20時間刺激した。その後、IFN- γ およびIL-4エリスロット(ELISPOT)アッセイを実施した。各ウェル中のスポットを顕微鏡下で計数し、その値を、培養の開始時に各ウェルに添加された脾臓細胞数に対するスポット形成細胞の数として表す。

【図8】AFP特異的CTL応答およびCTL-p頻度。A:腫瘍攻撃処置または対照マウス(各群 $n=5$)由来の脾臓細胞を、UV不活性化rVV-mAFPに感染させた放射線照射自系脾臓細胞を用いて再刺激し、その後、指示されたE:T比で、同系Hepa1~6およびルイス肺癌細胞に対する細胞傷害性活性に関して分析した。特異性の対照のために、HepaIRF-1hER細胞を用いて攻撃されたE2処置マウスをrVV-pSC11に感染させた脾臓細胞でin vitro刺激して、その後、同系Hepa1~6およびルイス肺癌細胞に対する細胞傷害性活性に関して分析した。AFP特異的溶解物は、Hepa1~6標的に対する溶解値から3LLに対する溶解値を差し引くことにより示された。値は、3重反復試験測定値の平均を表す。B:腫瘍攻撃または非攻撃処置マウス(各群 $n=5$)由来の脾臓細胞を、UV不活性化rVV-AFPまたはrVV-pSC11感染同系放射線照射脾臓細胞を用いて20時間刺激した。その後、IFN- γ エリスロット(ELISPOT)アッセイを実施した。

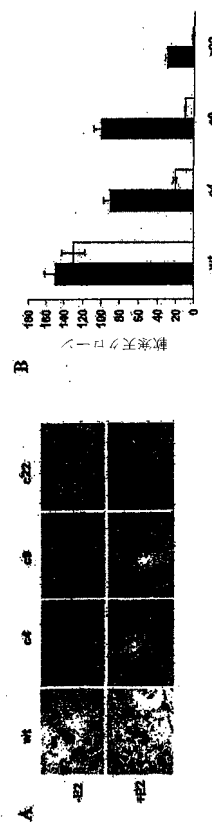
【図9】in vivoおよびIRF-1媒介性HCC療法における抗腫瘍免疫反応性の同定。A:抗腫瘍免疫は部分的に、CD4+およびCD8+T細胞の両方の関与を要した。材料と方法において記載されたような精製ハイブリドーマ上清のi.p.注射により、HepaIRF-1hER細胞を接種されたE2処置または未処置マウスのCD4およびCD8 T細胞亜集団を枯渇させた。各群は、マウス2匹を含有した。B:C57L/Jマウスの右側腹部に 1×10^7 HepaIRF-1hER(群1および2)細胞を接種した。両群は、いかなるE2処置も受けなかった。19日目に、腫瘍は両群で約 2000 mm^3 のサイズに達した。19日目を開始して、28日目まで2日毎に、群2($n=6$)に1.5

mg の E 2 を i . p . 注射した。その後、E 2 処置は 2 匹のマウスで再度中止されたが、一方、残りの 4 匹のマウスは E 2 療法を維持された。腫瘍成長における差異は観察されなかった。群 1 (n = 3) のマウスには E 2 処置を施さず、その後、腫瘍が 10 , 000 mm³ に達した場合に屠殺した。

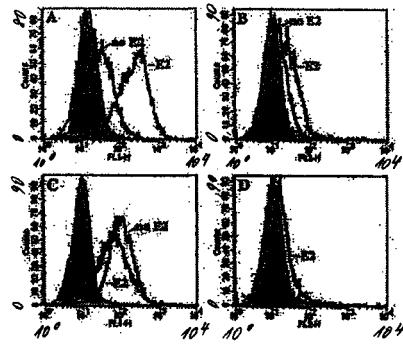
【図 1】



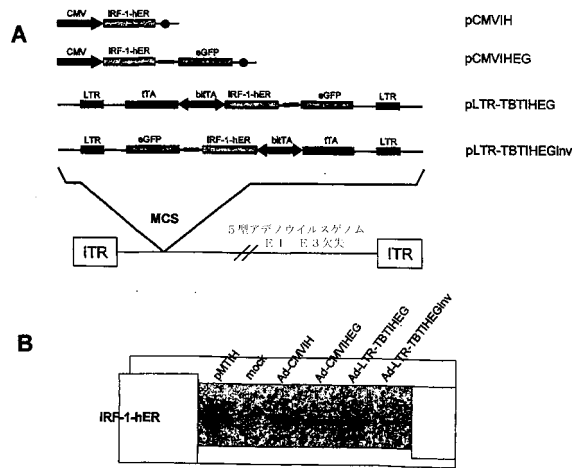
【図 2】



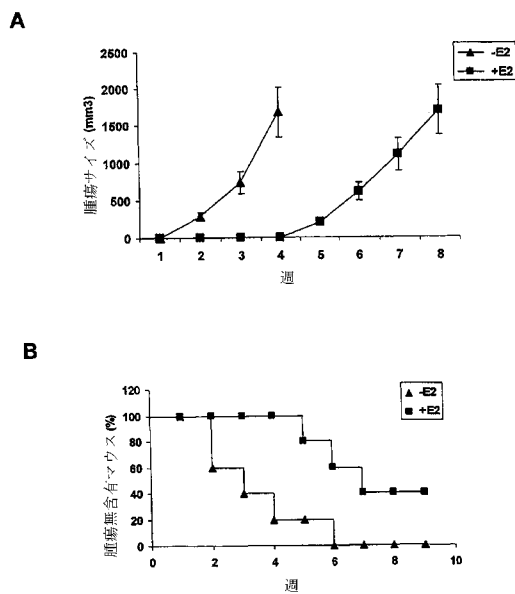
【図 3】



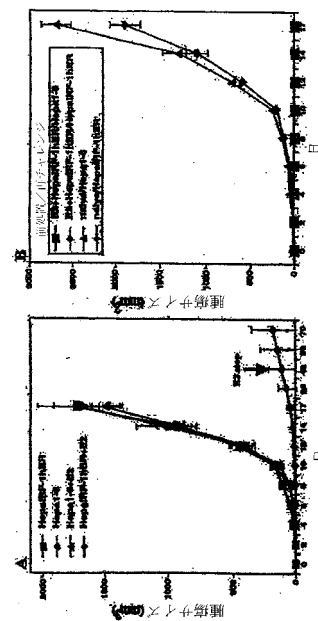
【図 4】



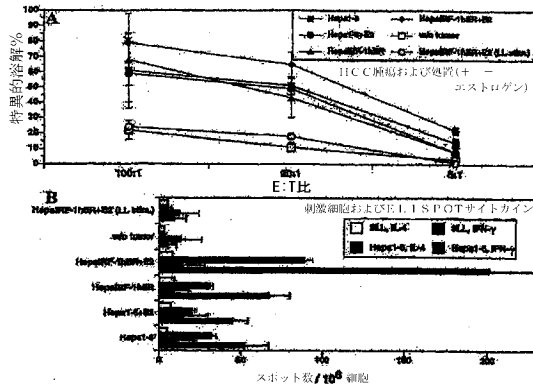
【図 5】



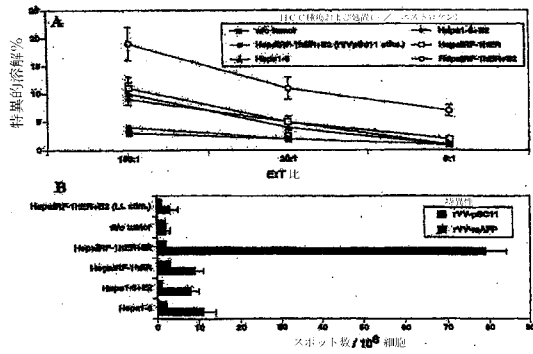
【図 6】



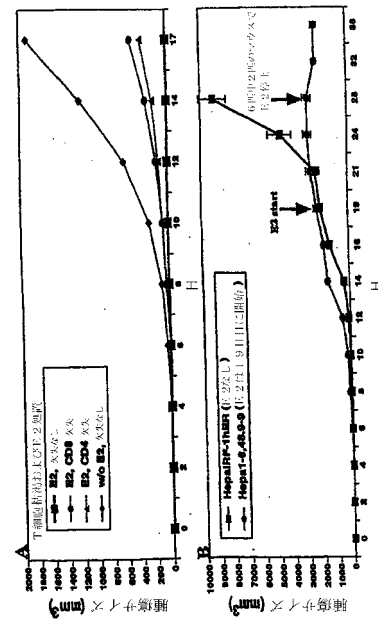
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
6 September 2002 (06.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/068614 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 5/00 (74) Agent: BOETERS, Hans; Boeters & Bauer, Bereit-
cranger 15, 81541 München (DE).
- (21) International Application Number: PCT/EP02/02036 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) International Filing Date: 26 February 2002 (26.02.2002) (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CH, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NI, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 01104423.7 26 February 2001 (26.02.2001) EP
(71) Applicant (for all designated States except US):
GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE
FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder
Weg 1, 83124 Braunschweig (DE).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): KROEGER, An-
drea [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, 83124 Braunschweig
(DE); GEISLER, Michael [DE/DE]; Mascheroder Weg
1, 83124 Braunschweig (DE); HAUSER, Hansjoerg
[DE/DE]; Mascheroder Weg 1, 83124 Braunschweig (DE).
- Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/068614 A2

(54) Title: INTERFERON REGULATORY FACTOR-1/HUMAN ESTROGEN RECEPTOR FUSION PROTEIN AND ITS USE
FOR TREATING CARCINOMAS(57) Abstract: The invention relates to an interferon regulatory factor-1/human estrogen receptor fusion protein which is reversibly
activatable by β -estradiol and its use for treating carcinomas, particularly for treating hepatocellular carcinoma.

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

Interferon regulatory factor-1/human estrogen receptor fusion
protein and its use for treating carcinomas

The invention relates to the development of methods for
5 treating tumors. The methods are based on IRF-1, particularly
the activation of an IRF-1/human estrogen receptor fusion
protein which is reversible activatable by β -estradiol.

Abbreviations used in this description:

- .0 AFP = alpha fetoprotein
c-Ha-ras = ras - oncogen
c-myc = myc oncogen
CTL = cytotoxic T lymphocyte
E2 = β -estradiol
15 FCS = fetal calf serum
fosB = transcription factor fosB
HCC = hepatocellular carcinoma cell
HER1 = EGF receptor
ICE = caspase
20 IL-15 = interleucin-15
iNOS = inducible NO synthase
ISG = interferon stimulated gene
ISGF3 = IRF-1 related subunit
ISRE = interferone stimulated response element
25 LMP2 = Protein processing factor
mAFP = murine alpha fetoprotein
MECL1 = multicatalytic endopeptidase complex 1
MHC = Major histocompatibility complex
NK cell = natural killer cell
30 OASE = 2',5'-Oligo (A) Synthetase
PKR = Protein Kinase R
ras induction = induction of the ras protein

CONFIRMATION COPY

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 2 -

TAP-1 = Protein processing factor

TH1 = T helper cell type 1

A complete list of the cited references with detailed
5 bibliographic information can be found at the end of this
description.

Hepatocellular carcinoma (HCC) ranks fifth in frequency among
all malignancies in the world with an estimated number of
10 437,000 new cases in 1990 (1). Although various nonsurgical
treatment modalities have been developed and the surgical
techniques much improved, none of these therapies has
significantly improved the extremely poor prognosis of
patients with HCC. The overall 5-yr survival rate worldwide
15 is only 2% (2) and, therefore, novel gene and
immunotherapeutic strategies for HCC are being developed. The
inventors attempted to employ the broad role of interferon
regulatory factor-1 (IRF-1) (3) as a tumor suppressor and
immune modulator for the treatment of tumors. They used an
20 immunocompetent syngeneic HCC tumor model in mice and another
tumor cell line for test in immunodeficient mice.

IRF-1 expression leads to the induction of many interferon
stimulated genes (ISGs) (4-6) and thereby induces typical
25 IFN-functions including induction of histocompatibility
antigens (7) and an antiviral state (5, 8). Since the IRF-1
gene per se is inducible by IFNs it was suggested that it
might be involved in IFN-mediated cellular responses (5, 9,
10). However, in mice and cells lacking functional IRF-1
30 genes the IFN-induced induction of typical ISGs (e.g., 9-27,
1-8, PKR) is not affected (8, 11-13). Thus, IRF-1 seems to
stimulate the IFN-specific induction of ISGs by ISGF-3 which

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 3 -

binds the ISG-promoter with the IRF-1 related subunit ISGF3 (14). A specific alteration in these mice is the lack of iNOS (inducible NO synthase) induction in response to IFN- β (15).

- 5 IRF-1 exerts an antiproliferative effect by DNA binding and transactivation (4). It is known to induce a number of genes which exert growth inhibitory effects. Among them are Lysyl oxidase (16), PKR (17), 2'-5' OASE (18), Indoleamine 2,3-dioxygenase (19), and Angiotensin type II receptor (20). In
- 10 established cell lines of fibroblast and epithelial origin, IRF-1 leads to cell growth arrest without signs of apoptosis (21). However, similar to the activity of the tumor suppressor p53 required for ras induced apoptosis (22, 23), IRF-1 is able to exert oncogene dependent apoptosis. The
- 15 inventors have shown that 3T3 cells which are growth inhibited by IRF-1, undergo apoptosis after conditional HER1 oncogene activation (24). Indeed, the promoter regions of certain caspase genes like ICE contain ISRE-like sequences (25). These genes might be targets for IRF-1 (26).
- 20 IRF-1 has been identified as a tumor suppressor (4, 17, 24, 27). Chromosomal deletions of the IRF-1 locus in humans are associated with myelodysplasia and certain leukemias (28). Primary embryonic fibroblasts with a null mutation in the
- 25 IRF-1 gene are susceptible to transformation by the expression of a single oncogene (c-Ha-ras). These IRF-1^{-/-} cells do not undergo apoptosis upon c-Ha-ras oncogene expression and serum starvation while wild type cells harboring IRF-1 genes undergo programmed cell death (21).
- 30 IRF-1 expression also reverts the tumorigenic phenotype exerted by the c-myc and fosB oncogenes (29). Further data

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 4 -

indicated that mice lacking c-Ha-ras and IRF-1 exhibit a higher rate of tumorigenicity (30).

The in vivo function of IRF-1 as a tumor suppressor is complex. Depending on the cell type, IRF-1 induces growth inhibition, apoptosis, effects the extracellular matrix as well as immunomodulatory functions. IRF-1 induces a number of immunomodulatory effects like MHC class I (31, 32), iNOS (15), IFN- β (11) transcription, and is also necessary for proper expression of IL-15 (33). Transient expression of IRF-1 leads to the activation of the IFN- β gene (9, 34, 35). Studies with IRF-1 knock-out cells demonstrate that IRF-1 is involved in the differentiation and function of NK cells (33, 36), in the generation of the TH1 type of T helper cells, and DNA damage (26, 37). IRF-1 is further involved in up-regulation of the antigen presentation by transcriptional induction of LMP2, TAP-1 and MECL1 (38, 39) as well as an induction of MHC class II (7, 40). These facts suggest that IRF-1 might act as a costimulator for presentation of antigens.

The aim of the present invention was to demonstrate the potential of IRF-1 for therapeutic approaches for tumors. This report details the construction of plasmids and murine cell lines encoding an IRF-1/human estrogen receptor fusion protein, which becomes active in the presence of β -estradiol (E2) (4) and the detailed characterization of the in vitro phenotype of these cell lines. Furthermore, the inventors describe the protective and therapeutic potential of this activatable IRF-1 system against tumor growth in vivo using immune competent and incompetent mice, characterize the T cell response against the tumor, and demonstrate that

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 5 -

immunologic tolerance to the HCC specific self differentiation antigen mouse α -fetoprotein (AFP) (41) can be broken by this approach. Finally, the inventors results demonstrate that IRF-1 mediates its antitumoral effects
5 through both a direct antitumor growth effect and through enhanced immune cell recognition of the tumor.

The problem of the present invention can be solved by the use of a gene construct or a polynucleotide by means of which the
10 activity of its gene product, a member of the IRF family, can become activated, for the treatment, prevention, protective treatment and/or prophylactic immunisation against tumoral, infectious and/or immune diseases. A characteristic embodiment of the present invention comprises the use as
15 mentioned above, wherein the member of the IRF family as gene product is selected from the group consisting of wild-type IRF-1, synthetic IRF-1, immunologically active IRF-1 variants, a wild-type member of the IRF family other than IRF-1, a synthetic member of the IRF family other than IRF-1,
20 immunologically active variants of a member of the IRF family other than IRF-1, and fusion proteins thereof. The present invention relates to the use as mentioned above for the treatment of mammals and especially humans.

25 A further embodiment comprises the use as mentioned above, wherein the gene construct encodes a member of the IRF family as a fusion protein comprising said member as one of the domains of the fusion protein and a foreign protein as another domain of the fusion protein, wherein the activity of
30 the fusion protein can be switched on and off by chemical or physical means, especially, wherein the gene construct encodes the expression of an IRF-1/hER fusion protein, the

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 6 -

activity of which can be regulated by compounds with estrogenic or anti-estrogenic activity.

5 A further embodiment comprises the use as mentioned above, wherein the gene construct or the polynucleotide is provided as a product for transfer into mammalian cells, especially a viral vector, preferably an adenoviral vector.

10 A characteristic feature of the present invention consists of the expression of proteins mentioned above which can be switched on by chemical or by physical activation, for example thermally or by irradiation. A further characteristic feature consists of the expression of said proteins, wherein the expression can be switched on or off by means of a
15 regulatable promoter, for example by an external stimulus, especially by tetracyclines.

An advantageous embodiment of the present invention consists of a vaccine comprising a gene construct or a polynucleotide
20 as defined in one or more of the preceding claims, together with one or more antigens selected from the group consisting of viral, bacterial, fungal, and parasitic origin or one or more antigen encoding genes derived from tumor cells. The advantage of this embodiment consists of avoiding the use of
25 tumor cells. The vaccination can be carried out by applying merely a gene construct or polynucleotide and the antigen encoding sequence(s) are provided by means of separate vectors, a vector which provides all components, or as polycistronic expression units. A further advantageous
30 embodiment comprises a vaccine as mentioned above, wherein the gene construct or polynucleotide and the antigen encoding sequence(s) are provided as viral or bacterial carrier.

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 7 -

Another embodiment of the present invention consists of the use as mentioned above for the production of preparations for the treatment, prevention, protective treatment and/or
5 prophylactic immunisation of tumoral, infectious and/or immune diseases.

Further, another embodiment relates to a member of the IRF family or a fusion protein comprising or consisting of said
10 member as one of the components of the fusion protein and a therapeutically acceptable protein as another component of the fusion protein for the treatment, prevention, protective treatment and/or prophylactic immunisation of tumoral, infectious and/or immune diseases, especially a fusion
15 protein, wherein IRF-1 is one of its components and/or hER is the other component of the fusion protein.

The present invention comprises further a prophylactic and/or therapeutic composition consisting of or comprising a member
20 of the IRF family or a fusion protein comprising or consisting of said member as one of the components of the fusion protein and a therapeutically acceptable protein as another component of the fusion protein for the treatment, prevention, protective treatment and/or prophylactic
25 immunisation of tumoral, infectious and/or immune diseases, especially a composition, wherein IRF-1 is one of the components of the fusion protein and/or hER is the other one of its components.

30 Additionally, the present invention concerns a human cell charged ex vivo with a gene construct or polynucleotide as mentioned above for the expression of a member of the IRF

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 8 -

family, preferably by charging a cell by gene transfer, physical transduction, more preferably by electroporation, chemical transduction or viral transduction. The human cell mentioned above may be an autologous or an allogenic cell.

- 5 Further, the human cell mentioned above may be a tumor cell, preferably a carcinoma cell, more preferably a hepatocellular carcinoma cell, a sarcoma cell or a tumor derived from the hematopoietic system. Additionally, the human cell mentioned above is suited for the treatment, prevention, protective
- 10 treatment and/or prophylactic immunisation against tumoral, infectious and/or immune diseases.

- A preferred advantageous embodiment of the present invention relates to a human antigen presenting cell (APC), wherein the
- 15 cell has been subjected to a gene transfer, physical transduction, especially electroporation, chemical transduction or viral transduction, with one or more genes mentioned in the embodiments of vaccination.

- 20 Finally, the invention contains an embodiment of a human cell as mentioned above, wherein the active level of the member of the IRF family is higher than that of IRF-1 induced by interferon-beta.

- 25 The objects of the invention, the various features thereof, as well as the invention itself, may be more fully understood from the following description, when read together with the accompanying figures/drawings, in which shows:

- 30 **Figure 1.** IRF-1 mediates cell growth inhibition in Hepa 1-6 cells. **A:** Western blot analysis of IRF-1hER fusion protein in Hepa1-6 cells transfected with IRF-1hER. Lysates (50 µg of

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 9 -

protein) derived from these cell clones were subjected to SDS-PAGE and analyzed using an anti-ER antibody (top panel). The membrane was stripped and reprobed with an anti-actin antibody to control protein loading of the samples (bottom panel). B: For determination of cell growth, cells derived from the same clones were seeded in wells of microtiter plates and grown with (black bars) or without (white bars) 1 μ M β -estradiol. The metabolic activity of the cultures was measured after 7 days of treatment. Since the growth characteristics of individual Hepa1-6 cell clones differ slightly, the metabolic activity of untreated cells was set as 100%.

Figure 2. Activation of IRF-1 reverts the tumorigenic phenotyp of Hepa 1-6 cells. A: Anchorage independent growth of IRF-1 transfected cell clones in soft agar. B: The number of colonies of the indicated cell clones was determined after 3 weeks culture without (black bars) and with (white bars) 1 μ M β -estradiol.

Figure 3. Activation of IRF-1 leads to increased MHC class I and MHC class II expression. FACS analysis of surface proteins of Hepa 1-6 cells expressing IRF-1-hER (clone 9) was done using antibodies directed against H2K^b / D^b (A), I-A/I-B (B), and CD54 (C). HepaIRF-1hER cells were cultured for 3-4 days in estrogen free medium or in medium containing a 1:1,000 dilution of 1mM β -estradiol. Subsequently, cells were stained with the appropriate FITC- or PE-labeled antibodies. As controls for specificity cells were stained with FITC- or PE-labeled unspecific isotype controls. Data are derived from 3 independent experiments.

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 10 -

FIG. 4. ADENOVIRAL TRANSDUCTION OF IRF-1-HER LEADS TO IRF-1 MEDIATED PHENOTYPES

A, Schematic presentation of the different adenoviral vectors as described in the material and method section. Arrow: Cytomegalovirus promoter (CMV); Bidirectional arrow: bidirectional tTA-Promoter (bitTA); Black dots: SV40 polyadenylation signal; black rectangle: polio virus derived internal ribosomal entry site (IRES); eGFP: enhanced green fluorescence protein; LTR: Retroviral long terminal repeat; tTA: transactivator. B, Western Blot analysis of IRF-1-her fusion protein in Hepal-6 cells infected with the indicated adenoviruses. Lysates (50 µg of protein) derived from cells 48 h after infection were subjected to SDS-PAGE and analysed using antibodies directed against the human estrogen receptor.

FIG. 5. ACTIVATION OF IRF-1 RETARDS AND PARTIALLY INHIBITS TUMOR GROWTH IN NUDE MICE

10⁶ cells per mouse were injected subcutaneously into right flank of NMRI nude mice. Mice were either treated with 1,5 mg E2 every 2 days i.p. or left untreated. Data represent mean values of 5 animals. A, Tumor growth was measured by the tumor volume. B, Kaplan-Meier plot showing the percentage of tumor free nude mice survival.

Fig. 6. In vivo characteristics of HepaIRF-1hER and Hepal-6 cells dependent on E2 treatment in syngeneic immunocompetent C57L/J mice and protection against tumor rechallenge. **A:** Mice were inoculated with 1 x 10⁷ Hepal-6 or HepaIRF-1hER cells into the right flank and either treated with 1.5 mg β-estradiol every 2 days i.p. or left untreated. Note that 6

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 11 -

out of 8 E2 treated animals were completely protected against HepaIRF-1hER tumor growth and 2 animals developed only small tumors which were characterized by a very slow growth rate even after stopping E2 treatment. B: Naive C57L/J mice or E2 treated animals protected against HepaIRF-1hER tumor growth were rechallenged with 1×10^7 wild-type Hepa1-6 (n=3) or HepaIRF-1hER (n=3) tumor cells 11 days after stopping E2 treatment (28 days after the initial tumor inoculation). Importantly, these mice did not receive any further E2 treatment.

Fig. 7. CTL activity and T cell precursor frequency against Hepa1-6 tumors. A: Spleen cells derived from tumor challenged or control mice (n=5 in each group) were restimulated using irradiated Hepa1-6 cells and subsequently analyzed for cytotoxic activity against syngeneic Hepa1-6 and Lewis lung carcinoma cells at the E:T ratios indicated. For control of specificity, E2 treated mice challenged with HepaIRF-1hER cells were in vitro stimulated with 3LL cells and subsequently analyzed for cytotoxic activity against syngeneic Hepa1-6 and 3LL carcinoma cells. Hepa1-6 tumor specific lysis was presented by subtraction of lysis values against 3LL from lysis values against Hepa1-6 targets. Values represent means of triplicate determinations. **B:** Spleen cells derived from tumor challenged or unchallenged mice (n=5 in each group) were stimulated for 20 hours with Hepa1-6 or 3LL cells. Subsequently, IFN- γ and IL-4 ELISPOT assays were performed. The spots in each well were counted under a microscope, and the values are expressed as numbers of spot-forming cells relative to the number spleen cells added to each well at the start of the culture.

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 12 -

- Fig. 8.** AFP specific CTL responses and CTL-p frequencies. **A:** Spleen cells derived from tumor challenged or control mice (n=5 in each group) were restimulated using irradiated autologous spleen cells infected with UV-inactivated rVV-mAFP and subsequently analyzed for cytotoxic activity against syngeneic Hepa1-6 and Lewis lung carcinoma cells at the E:T ratios indicated. For control of specificity, E2 treated mice challenged with HepaIRF-1hER cells were in vitro stimulated with spleen cells infected with rVV-pSC11 and subsequently analyzed for cytotoxic activity against syngeneic Hepa1-6 and Lewis lung carcinoma cells. AFP specific lysis was presented by subtraction of lysis values against 3LL from lysis values against Hepa1-6 targets. Values represent means of triplicate determinations. **B:** Spleen cells derived from tumor challenged or unchallenged mice (n=5 in each group) were stimulated for 20 hours with UV-inactivated rVV-AFP or rVV-pSC11 infected syngeneic irradiated spleen cells. Subsequently, IFN- γ ELISPOT assays were performed.
- Fig. 9.** Identification of antitumoral immune reactivities in vivo and IRF-1 mediated HCC therapy. **A:** Antitumoral immunity partially required the participation of both CD4+ and CD8+ T cells. CD4 and CD8 T cell subpopulations of E2 treated or untreated mice inoculated with HepaIRF-hER cells were depleted by i.p. injection of purified hybridoma supernatant as described in Materials and Methods. Each group contained 2 mice. **B:** C57L/J mice were inoculated with 1×10^7 HepaIRF-1hER (groups 1 and 2) cells into the right flank. Both groups did not receive any E2 treatment. At day 19 tumors had reached a size of about 2000 mm³ in both groups. Starting at day 19 group 2 (n=6) was i.p. injected with 1.5 mg E2 every 2 days until day 28. Subsequently, E2 treatment was stopped

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 13 -

again in 2 mice whereas the remaining 4 mice were maintained on E2 therapy. No differences in tumor growth was observed. Mice of group 1 (n=3) did not receive E2 treatment and were subsequently sacrificed if tumors had reached 10.000 mm³.

5 In the following the invention is disclosed in more detail with reference to examples and to drawings. However, the described specific forms or preferred embodiments are to be considered in all respects as illustrative and not
10 restrictive, the scope of the invention being indicated by the appended claims rather than by the following description, and all changes which come within the meaning and range of equivalency of the claims are therefore intended to be embraced therein.

15

Materials and Methods

Vector construction:

pBTTAHis: The BbrPI/NotI fragment containing the hisdidinol
20 gene was isolated from pDAF2HIS (Spitzer et al., 1998) and inserted into the correspondingly restricted pRBtTA (Unsinger et al., 2001). The resulting plasmid is entitled pBTTAHis. For stably transfection of Hepa 1-6 cells we used an expression construct IRF-1-hER (**pMT7RF-1-hER**) (4) and a
25 puromycin resistance conferring plasmid (42). **pHBTMRS:** The EcoRI/NotI fragment containing the c-myc, the c-Ha-ras and the SEAP gene as a tricistronic expression cassette was inserted on the 3' end of the bidirectional tetracycline responsible promoter from pRBt (Unsinger et al., 2001).
30 Hyromycin-B-phosphotransferase was PCR amplified and inserted via PmeI 5' from the bidirectional tetracycline responsible promoter in pRBtMRS resulting in pHBTMRS (Kröger, 1999).

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 14 -

pcMVIHEG: The SpeI/EcoRI fragment containing the IRF-1hER fusion protein gene and a polio IRES sequence were inserted between a CMV promoter and the eGFP gene resulting in a plasmid expressing IRF-1hER and eGFP on a bicistronic mRNA.

- 5 **pcMVIH:** The sequence encoding for polio IRES and eGFP was eliminated by digestion and religation of pcMVIHEG with PmaCI/HpaI. **pLTR-TBTIHEG:** The PmeI/NotI fragment containing the bicistronic expression cassette for IRF-1-hER and eGFP were inserted into the correspondingly restricted LTR-THTG
- 10 (Unsinger et al., 2002) resulting in pLTR-TBTIHEG.

Preparation of Adenovirus cosmids:

- Ad-IH, Ad-IHEG, Ad-IHEGinv, Ad-LTR-TBTIHEG, Ad-LTR-TBTIHEGinv: Recombinant adenoviruses were constructed using a
- 15 cosmid cloning procedure which allows direct assembly of recombinant adenovirus genomes by cloning in *E. coli*. Cosmid vector pAdcos45 (Unsinger et al., 2002) was digested with XbaI at a single cloning site in the E1 region and filled in. The following cassettes were inserted into this site: the
- 20 CMVIHEG cassette of pcMVIHEG as a PmeI/SwaI fragment, the LTR-TBTIHEG of pLTR-TBTIHEG as BsrBI/FspI fragment and the CMVIH cassette from pcMVIH as Pme/SwaI fragment. DNA was ligated and packaged in vitro using packaging extracts. Ampicillin resistant clones were isolated after transduction
- 25 into *E. coli* DH5 α . Cosmid preparations for Ad-IH, Ad-IHEG, Ad-IHEGinv, Ad-LTR-TBTIHEG, Ad-LTR-TBTIHEGinv were obtained after in vitro packaging and propagation in *E. coli*. Restriction analysis confirmed the expected structures.

30 **Cell culture and gene transduction:**

Murine fibroblast NIH3T3 cells (ATCC CRL-1658) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM),

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 15 -

Hepal-6 cells (murine H-2b-restricted HCC cell line; 92110305; European Collection of Animal Cell Cultures) were grown in RPMI 1640 medium and 293 cells (human embryonal kidney cells at low passages; Microbix PD-02-01) were
5 cultivated in minimum essential medium (MEM). Media were supplemented with 10% estrogen-free, heat inactivated fetal calf serum, 2 mM L-glutamine penicillin (10U/ml) and streptomycin (100µg/ml). Transfected NIH3T3 cells were
10 selected with 128 U/ml hygromycin B, 800 µg/ml histidinol or 800 µg/ml G418. For selection of Hepal-6 cells 1 µg/ml puromycin was used.

NIH3T3 cells were stably cotransfected with pBTTAHis, pHBTMRS, pMT7IRH-1-hER and the neomycin resistance-conferring
15 plasmid pAG60 (Colbere et al., 1981). Hepal-6 cells were stably cotransfected using an expression construct encoding IRF-1-hER (4) and and puromycin resistance-conferring plasmid (42). Transfectants were selected and single clones were
20 picked and expanded. Clones were subsequently screened for protein expression by Western blotting.

PRODUCTION OF RECOMBINANT ADENOVIRUSES

For the production of recombinant adenoviruses 20µg of circular adenovirus cosmid DNA was transfected into 293
25 helper cells using calcium phosphate coprecipitation. 10 to 14 d after transfection when the formation of adenoviral plaques became evident. Viruses were harvested and 293 cells were reinfected. After cytopathic effects were observed virus
30 particles were harvested and the titer determined by infection of 293 cells. DNA (Graham et al., 1991) confirmed the expected structures, that is correct excision of the viral sequences from the cosmid DNA was controlled by

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 16 -

restriction analysis. For adenoviral infection cells were seeded in MEM medium. The following day cells were infected using an MOI of 100 (Hepal-6 cells) or 2 (293 cells). Recombinant adenoviruses were diluted in 1 ml PBS
5 supplemented with 2% FCS. One hour after adenoviral infection cells were further cultivated in medium supplemented with 5% FCS.

For activation of IRF-1 in the IRF-1-hER fusion protein, E2 (SERVA, Frankfurt, Germany) was added to the cell culture
10 medium to reach a final concentration of 1 μ M.

Western Blotting. Immunoblots derived from whole cell extracts were probed with antibodies directed against the hormone binding domain of the human estrogen receptor (HC-30,
15 Santa Cruz Biotechnology, USA) and visualized by ECL (Amersham, Arlington Heights, IL, USA) according to manufacturer's specifications.

IFN-Test. The interferon concentrations in the cell culture supernatants were determined by an antiviral assay employing
20 mouse L929 cells (43). To confirm the specificity of the antiviral activity a neutralizing monoclonal antibody directed against mouse IFN- β was added to the supernatant before addition to the test cells.

25
Measurement of cell growth. For determination of cell growth 2×10^3 cells/well were seeded into microtiter plates and serial dilutions (1:1) were performed allowing several independent measurement points. Cells were treated with the
30 indicated concentration of β -estradiol. Cell growth was determined using the WST kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) following the manufacturer's instruction. Mean

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 17 -

values of triplicates resulting in less than 10% deviation were plotted.

Assay for anchorage independent growth. Anchorage-independent growth capability was determined by assessing the colony-formation efficiency of cells suspended in soft agar. 1×10^3 cells were seeded in 50 μ l of 0,3% overlay agar in microtiter plates coated with 50 μ l 0,6% underlay agar. The induction medium was added to the top (50 μ l/well). Colonies were counted 3 weeks after plating.

Mice. Male C57L/J (H-2b) mice were kept in the animal facility of the University Hospital Freiburg and used between the age of 10 to 25 weeks.

15

Nude mice experiments

Male 6-8-week old NMRI nude mice (Harlan Winkelmann, Borcheln, Germany) were maintained in the SPF unit of the animal facility of German Research Centre for Biotechnology. Mice were divided into two experimental groups, 5 mice for each group. 1×10^6 cells in 0,2 ml PBS NIH3T3TA/MR/IH cells were injected subcutaneously into the flanks of the mice. The groups were treated as follows: group 1: no treatment (n = 5); group 2: 1,5 mg of E2 every 2 days i.p. (n = 4). Tumor volumes were measured and recorded three times a week using calipers. Data are presented as mean value of tumor volume.

Tumor model. The Hepal-6 tumor model in C57L/J mice (44) was chosen because they show reliable growth in the syngeneic host. Hepal-6 cells are a derivative of the BW7756 mouse hepatoma that arose in a C57L mouse. MHC class I and II expression is identical between C57L and C57L/J mice and

30

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 18 -

Hepal-6 HCCs are characterized by AFP expression. It could be demonstrated that a reliable tumor growth of Hepal-6 murine HCC cells in 100% of mice was achieved using 1×10^7 or 5×10^6 Hepal-6 cells injected in 100 μ l serum free MEM medium into the right flank of mice. After 6 days, tumors were visible and reached a size of about 2000 mm³ after a mean time of 18 days. This tumor size was used as endpoint in the invention, and mice were subsequently sacrificed. Tumor incidence and volume were assessed every two days using calipers. Data are presented as mean volume $\pm$ SE.

Flow cytometry. MHC class I and CD80 expression in Hepal-6 and HepaIRF-1hER cells were examined by FACS analysis using an anti-mouse H-2Kb / H-2Db and anti-mouse CD80 specific antibody (clones 28-8-6 and 01940B, respectively) and a subsequent FITC-labeled anti-mouse (clone 02014D) or FITC-labeled anti-rat (clone 10094D) antibody, respectively. Furthermore, expression of CD54 (clone 01544D), I-A/I-E (clone 06355A), and CD86 (clone 09274) was determined by PE- or FITC-labeled antibodies (all antibodies derived from PharMingen, San Diego, CA, USA).

Generation of recombinant vaccinia viruses. To study CTL responses an AFP expressing and pSc11 (empty vector negative control) recombinant vaccinia virus were generated as previously described (44).

Cytotoxicity Assays. Spleen cells derived from tumor challenged or control mice were suspended and after 6 days of in vitro stimulation in 24 well plates the spleen cells were analyzed for cytotoxic activity. In vitro stimulation was performed by incubating 4×10^7 of tumor primed spleen cells

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 19 -

with 1×10^7 wild-type Hepal-6 cells or, as a negative control for specificity, syngeneic Lewis lung carcinoma cells (3LL), both irradiated with 8000 rad. To assess AFP specific immune responses spleen cells derived from tumor challenged or control mice were stimulated in vitro with spleen cells of untreated syngeneic donor mice which had been infected by UV-inactivated (300mJ) rVV-AFP or, as a negative control for specificity, rVV-pSC11 at a multiplicity of infection (MOI) of five and then irradiated with 20 Gy (2000 rad) to prevent stimulator cells from proliferation. Subsequently, a 6-hour ^{51}Cr release assay was performed. As target cells AFP expressing syngeneic Hepal-6 cells and AFP negative syngeneic Lewis lung carcinoma cells were used. Results were expressed according to the formula: % lysis = (experimental release - spontaneous release) / (maximum release - spontaneous release). Experimental release represents the mean counts per minute released by target cells in the presence of effector cells. Total release represents the radioactivity released after total lysis of target cells with 5% Triton X-100. Spontaneous release represents the radioactivity present in medium derived from target cells only. Hepal-6 tumor or mAFP specific lysis was presented by subtraction of lysis values against 3LL from lysis values against Hepal-6 targets.

IFN- γ and IL-4 ELISPOT assays. Multiscreen-HA 96-well filter plates were coated with 4 $\mu\text{g/ml}$ rat anti-mouse IFN- γ or rat anti-mouse IL-4 antibody (PharMingen, San Diego, CA, USA, clone R46A2 or 18191A, respectively) at 4°C overnight. Spleen cells ($1 \times 10^5/\text{well}$) derived from tumor challenged or unchallenged mice were cultured in triplicates for 20 hours with 1×10^4 irradiated stimulator cells (Hepal-6, 3LL, or

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 20 -

rVV-AFP infected spleen cells) per well in 200 μ l medium. After culture, the cells were washed out and 2 μ g/ml biotinylated rat-anti-mouse IFN- γ or IL-4 antibody (PharMingen, San Diego, CA, USA, clone XMG1.2 or 18042D, respectively) was added; and the plates were incubated for 3 hours at room temperature. The plates were again washed, incubated with a 1:1000 dilution of Streptavidin-Alkaline Phosphatase polymer (Mabtech, Köln, Germany) for 30 minutes at room temperature and then developed with ALP conjugate substrate solution (BCIP/NBT, BioRad, Richmond, USA). The spots in each well were counted under a microscope, and the values are expressed as numbers of spot-forming cells relative to the number spleen cells added to each well at the start of the culture. As a control for specificity spleen cells of tumor challenged mice and the different irradiated stimulator cells were cultured alone.

Experimental design of in vivo tumor experiments.

Tumor protection studies. C57L/J mice were inoculated with 1×10^7 Hepa1-6 (groups 1 and 2) or HepaIRF-1hER (groups 3 and 4) cells into the right flank. Group 5 was not inoculated with any tumor. The different groups were treated as follows:

Group 1: No treatment (n=3)
Group 2: 1.5 mg β -estradiol every 2 days i.p. (n=3)
Group 3: no treatment (n=8)
Group 4: 1.5 mg β -estradiol every 2 days i.p. (n=8)
Group 5: 1.5 mg β -estradiol every 2 days i.p. (n=2)

Protection against rechallenge. Naive C57L/J mice or E2 treated animals which had been protected against HepaIRF-1hER

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 21 -

tumor growth were rechallenged with 1×10^7 wild-type Hepa1-6 (n=3) or HepaIRF-1hER (n=3) tumor cells 11 days after stopping E2 treatment (28 days after the initial tumor inoculation). Importantly, these mice did not receive any further E2 treatment.

Tumor therapy. C57L/J mice were inoculated with 1×10^7 HepaIRF-1hER (groups 1 and 2) cells into the right flank. Both groups did not receive any E2 treatment. At day 19 tumors had reached a size of about 2000 mm³ in both groups. Starting at day 19 group 2 (n=6) was injected i.p. with 1.5 mg β -estradiol every 2 days until day 28. Subsequently, E2 treatment was stopped again in 2 mice whereas the remaining 4 mice were maintained on E2 therapy. Mice of group 1 (n=3) did not receive E2 treatment and were subsequently sacrificed if tumors had reached 10.000 mm³.

In vivo monoclonal antibody ablation. CD4 and CD8 T cell subpopulations were depleted by i.p. injection of purified hybridoma supernatant. A total of 1 mg per mouse per injection of anti-CD8 (clone YTS 169) or anti-CD4 (clone YTS 191.1) (45, 46) was injected on days 5, 3, and 1 before HepaIRF-1hER tumor inoculation and every 5 days thereafter. The different groups were treated as follows:

1. 1.5 mg β -estradiol every 2 days i.p., no depletion (n=2)
2. 1.5 mg β -estradiol every 2 days i.p., CD8 depletion (n=2)
3. 1.5 mg 4 β -estradiol every 2 days i.p., CD4 depletion (n=2)
4. no treatment, no depletion (n=2)

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 22 -

Statistical Analysis. All data were analyzed by Wilcoxon's signed rank test. A two-sided p value of less than 0.05 was considered statistically significant. Tumor appearance and growth to 2500 mm³ was calculated by the Kaplan-Meier method, presented as standard deviation of the mean for each group, and differences between immunized and control mice were calculated by the Mantel-Haenszel test.

Results

In vitro analysis

IRF-1 inhibits cell growth of the HCC cell line Hepa 1-6

Constitutive expression of IRF-1 imposes a strong cell growth inhibition to several cell lines (4, 24, 40). This results in stable transfectants which are selected for very low, often instable expression of the heterologous IRF-1. To determine the activity of IRF-1 as a growth inhibitor of the HCC cell line Hepa1-6, we, therefore, used a conditionally active IRF-1hER fusion protein. It has been demonstrated that in the absence of hormone stimulation, constitutively expressed chimeric proteins are inactive but can change to an active conformation upon binding of E2 to the hER part of the protein (4, 17, 24). IRF-1-hER was stably transfected into Hepa1-6 cells. Different levels of IRF-1hER expression were observed in the transfectants (Fig. 1A, top panel) and normalized to actin expression (Fig. 1A, bottom panel). Three cell clones with different strength of IRF-1hER expression were selected (c4, c9, c22). Cell growth of these clones was determined 7 days after IRF-1 activation. As shown in Fig. 1B, cells derived from the three cell clones were sensitive to IRF-1 activity with respect to growth inhibition. The

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 23 -

extent of proliferation inhibition varied between 40 and 80% between the different cell clones and correlated with the different expression amounts of IRF-1. Wild-type Hepal-6 cells not expressing IRF-1-hER were used as a control. The
5 nontransfected cell line did not respond to β -estradiol with alterations in cell growth. This indicates that all three cell clones expressed activatable IRF-1 and responded to the typical growth inhibitory properties of the IRF-1 phenotype. It should be, however, noted that growth inhibition of the
10 Hepal-6 cells was not very strong, if compared to other cell lines (24). Despite the reduction in cell proliferation the cells could be cultivated for a considerable time in this state. Furthermore, these cells did not show any signs of apoptosis upon IRF-1 activation by β -estradiol. This was
15 confirmed by examination of subdiploid DNA ((47) and data not shown) and Annexin staining ((48) and data not shown).

Activated IRF-1 induces IFN secretion

20 The induction of IFN- β is a typical property observed after IRF-1 activation. The amount of secreted IFN- β can be taken as a measure of IRF-1 activity (17). Since IFNs are relevant for immunomodulation, the secretion of IFN- β was determined by an antiviral assay (table 1). IRF-1 was shown to be
25 activated by β -estradiol in all three cell clones. The highest IFN secretion was shown by clone 22, which is in agreement with the strength of IRF-1 expression (Fig. 1A) and proliferation inhibition (Fig. 1B). Using neutralizing antibodies directed against IFN- β the inventors confirmed
30 that the secreted antiviral activity was exclusively IFN- β . IFNs are known to inhibit cell proliferation. However, the

amount of IFN- β secreted by the Hepal-6 cell clones is not sufficient to mediate the observed effect on cell growth as determined by the treatment of control cells with comparable amounts of recombinant murine IFN- β (data not shown).

5

Decreased anchorage-independent growth during IRF-1 activation.

The most definitive in vitro characteristics distinguishing
10 tumorigenic cells from nontumorigenic cells is anchorage-independent growth. To determine whether IRF-1 reverses the transformed phenotype of this HCC cell line in vitro, the inventors tested its ability to form anchorage-independent colonies in the presence of inactive or activated IRF-1 (Fig.
15 2). The untransfected tumor cell clones grew well in soft agar. The colony formation of the transformed wild-type Hepal-6 cell line not expressing IRF-1hER was not influenced by β -estradiol. In contrast, the ability of soft agar growth was significantly decreased by the activated IRF-1 in the
20 different cell clones. In contrast to untransfected cells the IRF-1hER bearing cells formed fewer but somewhat bigger colonies. In presence of E2, clone 22 formed the lowest amount of colonies in soft agar which inversely correlates to the strength of IRF-1hER expression. Clone 9 showed the
25 highest ratio of soft agar colony formation from untreated over E2 treated cells. Therefore, clone c9, in following simply designated HepaIRF-1hER, was used for further in vitro characterization and for the in vivo tumor model.

30 Activated IRF-1hER modulates immunologically relevant cell surface protein expression

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 25 -

- IRF-1 expression has been previously shown to increase expression of MHC genes (7, 31). The inventors examined the levels of MHC class I, MHC class II, CD54, CD80, and CD86 expression on the cell surface before and after IRF-1
- 5 activation with α -estradiol by FACS analysis. Wild-type Hepal-6 and E2 untreated HepaIRF-1hER cells were characterized by the lack of MHC class II, CD80, and CD86 expression. MHC class I (H-2K^b/H-2D^b) was expressed at low and CD54 at high levels. E2 treatment of HepaIRF-1hER cells
- 10 resulted in a strong upregulation of H-2K^b/H-2D^b, CD54 expression remained unchanged, and MHC class II expression was weakly upregulated (Fig. 3). CD80 and CD86 expression remained negative (data not shown).
- 15 Adenoviral mediated expression of IRF-1 leads to strong IFN- β secretion of HCC cells
- To transfer IRF-1 in a wide variety of the cells and as a delivery system for in vivo transduction adenoviral vectors based on pAdcos45 containing expression cassettes for the
- 20 IRF-1-hER fusion protein were constructed. The cDNA of IRF-1-hER was introduced into the adenoviral vector pAdcos45 and viruses were prepared.
- Hepal-6 cells were infected with either pAd-IRF, pAd-IHFG, pAd-LTR-TBTIHFG and pAd-LTR-TBTIHFGinv viruses (Fig. 4A).
- 25 IRF-1-hER expression was analysed by Western blot analysis 48 h after infection. High levels of IRF-1hER expression was found in cells infected with these adenoviruses (Fig. 4B). IFN secretion was measured after E2 treatment or mock treatment of the infected cells. IFN was detected in the
- 30 culture supernatants of cells infected with adenoviruses containing the IRF-1 hER gene after E2 treatment, indicating that only IRF-1 activation but not the infection as such

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 26 -

induces IFN secretion (Table 2). The amount of secreted IFN in adenovirally transduced cells was 3,5 - 6 fold higher than from transfectants which stably express the IRF-1hER fusion protein.

5

IRF-1 effects in oncogenically transformed NIH3T3 cells

The effects of IRF-1 in oncogenically transformed NIH3T3 cells were examined. NIH3T3 cells conditionally expressing the oncogenes c-myc and c-Ha-ras were used. Both oncogenes were bicistrically expressed under the control of the tetracycline regulatable promoter (Kröger, Dissertation, Universität Braunschweig, 1999). The cells were stably transfected with the IRF-1-hER fusion protein encoding construct. This cell line allows the investigation of IRF-1 effects in the non-transformed NIH3T3 cells (presence of Doxycycline) and in the transformed state of the cells (absence of Doxycycline). The antitumoral activity of IRF-1 in vitro was investigated: Influence on proliferation, soft agar growth and IFN induction with and without IRF-1hER activation by E2 treatment were measured. This was done in the non-transformed as well as in the transformed state. E2 and Doxycycline were added for 5 days. Activation IRF-1-hER led to marked reduction of cell growth in both, non transformed and transformed cells to the same level, despite the fact that transformed cells in the absence of E2 showed enhanced cell growth (Table 3).

To determine whether IRF-1 reverses the transformed phenotype of the cells to the formation of colonies in soft agar was assayed. The cells in the non-transformed status did not grow in soft agar. In contrast, in the absence of Doxycycline (transformed status) the cells grew well and formed soft agar

30

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 27 -

- clones. The ability of soft agar growth was completely abolished by the activation of IRF-1 by E2 gift (Table 3). IFN secretion as determined by an antiviral assay was taken as a measure of IRF-1 activity. IRF-1 activation by E2 treatment was demonstrated to be equivalent in non-transformed and transformed cells (Table 3).

IRF-1 ACTIVATION DECREASES TUMOR GROWTH OF TRANSFORMED CELLS IN NUDE MICE

- As IRF-1 inhibited cell transformation *in vitro* in oncogenically transformed NIH3T3 cells its effects on tumorigenicity *in vivo* were assessed. To verify the possible anti-tumor activity of IRF-1, the cells were injected subcutaneously into the flanks of nude mice. Tumor formation was assayed. Injection of the transformed cells led to tumor formation within 4 weeks and 100% of implanted animals developed a tumor within 6 weeks (Fig. 5). If mice were inoculated with transformed cells and were treated with E2, the kinetics of tumor growth was dramatically changed. Tumor sizes up to 1500 mm³ were reached 4 weeks later than in untreated animals and 40% of the E2 treated mice developed no tumors. These results demonstrate that activation of IRF-1hER fusion protein is sufficient to prolong kinetics of tumorigenicity in transformed cells in animals lacking T- and B-cells.

In vivo analysis

IRF-1 activation inhibits HCC growth

- To determine the antitumoral efficacy of IRF-1hER expression against murine Hepal-6 HCCs growing subcutaneously in C57L/J mice, different treatment groups were randomly designed. The

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 28 -

Hepal-6 HCC cell line used for the tumor model in syngeneic C57L/J mice was characterized by moderately fast tumor growth and 100% of implanted animals developed a tumor. Both wild-type Hepal-6 and HepaIRF-1hER cells exhibited nearly identical tumorigenicity after s.c. injection in vivo suggesting the presence of an inactive IRF-1hER fusion protein in E2 untreated HepaIRF-1hER cells (Fig. 6A, $p > 0.5$). Within 17 days large tumors developed with an average size of 1500 mm³. If mice inoculated with wild-type Hepal-6 cells were treated with E2 no effect on tumor development was observed in comparison to mice challenged with Hepal-6 or HepaIRF-1hER cells without E2 treatment. These results demonstrate that the E2 treatment itself has no negative effect on tumor growth and animal health. If C57L/J mice inoculated with HepaIRF-1hER, however, received 2-daily i.p. injections with E2 starting at the time of tumor inoculation, tumor growth was significantly suppressed. It was an important finding that 6 out of 8 animals were completely protected against tumor growth and 2 animals developed only very small tumors which were characterized by a slow growth rate (Fig. 6A). After 40 days the tumor size was only 450 mm³ and stopping E2 treatment at day 42 did not result in a faster growth rate of the tumor.

25 IRF-1 activation in tumor cells induces T-cell memory

The inventors were interested to investigate the presence of tumor specific memory T cells in E2 treated mice protected against challenge with HepaIRF-1hER. Therefore, tumor free mice were inoculated with 1×10^7 wild-type Hepal-6 (n=3) or HepaIRF-1hER cells (n=3) 28 days after tumor challenge and 11 days after stopping E2 treatment. Importantly, these mice did

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 29 -

not receive any further E2 treatment. As demonstrated in Fig. 6B all mice in both groups were protected against tumor growth but not after CD8+ T cell in vivo depletion (n=2, data not shown). In contrast, naive C57L/J mice without E2

5... treatment were characterized by rapid Hepa1-6 and HepaIRF-1hER tumor growth. These results suggest the presence of tumor specific T cell memory after primary priming of tumor specific immunity by the expression of active IRF-1hER.

10 Induction of CTL activity through IRF-1 activated tumor cells

In fact, strong CTL activity against Hepa1-6 target cells after in vitro stimulation using irradiated Hepa1-6 cells was observed in mice challenged with HepaIRF-1hER cells and

15 treated with E2 (Fig. 7A). This CTL activity was specific against Hepa1-6 tumor cells because spleen cells derived from mice which were not tumor challenged or from E2 treated mice challenged with HepaIRF-1hER cells and in vitro stimulated with 3LL cells displayed only weak background killing
20 activity against Hepa1-6 targets (Fig. 7A). Primary T cell responses were evaluated by monitoring cytokine-producing cells in vivo. A significant increase in the number of spleen cells secreting IFN- γ (1 in 5,000) and IL-4 (1 in 10,000) (Fig. 7B) upon stimulation with irradiated Hepa1-6 cells was
25 observed in E2 treated mice inoculated with HepaIRF-1hER tumors in comparison to E2 untreated/HepaIRF-1hER, E2 untreated/Hepa1-6, or E2 treated/Hepa1-6 challenged mice (1 in 20,000 IFN- γ and 1 in 40,000 IL-4 secreting T cells, $p=0.01$) suggesting significant development of both TH1 and
30 TH2 tumor immunity. In contrast to the in vivo results obtained by ELISPOT analysis, the differences of CTL in vitro killing activity in the ^{51}Cr -release assay (Fig. 7A) were not

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 30 -

statistically significant between the different groups. This may be the result of in vitro expansion of tumor specific T cells and the lower sensitivity of the ^{51}Cr -release assay in comparison to the ELISPOT technique.

5 IRF-1 activation breaks ignorance to tumor specific self antigens

To determine immune responses against HCCs in more detail and to find out if expression of activated IRF-1 was able to
10 prime immune responses against a tumor specific antigen the inventors chose the HCC specific self antigen AFP which is frequently expressed at high levels in HCC cells as a target. Intermediate CTL activity against Hepa1-6 HCCs endogenously expressing AFP at high levels was observed in E2
15 treated/HepaIRF-1hER challenged mice (Fig. 8A). CTL activity was significantly stronger ($p = 0.02$) and number of AFP specific IFN- γ (Fig. 8B) producing spleen cells (1 in 11,000) was higher ($p = 0.001$) in these mice in comparison to the other groups (1 in 1,000,000). In control animals without
20 tumors no specific CTL activity or enhanced background lysis against Hepa1-6 or 3LL target cells was observed. In addition, no increased lysis of these target cells was seen after in vitro stimulation of effector cells with rVV-pSC11 derived from E2 treated mice challenged with HepaIRF-1hER
25 cells suggesting specificity of CTL activity against AFP (Fig. 8A). Performing ELISPOTs using rVV-AFP infected spleen cells alone without effectors or using effectors alone did not result in increased background spot formation, additionally suggesting AFP specificity (data not shown).
30 These data demonstrate that tolerance to the self antigen AFP can be broken by intratumoral expression of activated IRF-1,

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 31 -

a mechanism presumably participating in HCC tumor growth control.

Other factors than host immune response participate in

5 rejection of IRF-1 activated tumor cells

To determine if the host antitumoral immune response is the only parameter responsible for tumor rejection, in vivo T cell depletion experiments were performed in E2 treated mice challenged with HepaIRF-1hER tumors (Fig. 9A). Undepleted mice were again protected against tumor growth. Both CD4 and CD8 T cell depletion resulted in tumor growth in all mice which, however, was significantly delayed in comparison to undepleted mice which did not receive E2 treatment. This finding implies that the host immune response is an important factor in tumor protection but seems to be only partial in the initial control of tumor growth.

IRF-1 activation stops increase of actively growing tumors

20 To assess therapeutic efficacy of IRF-1hER activation against HepaIRF-1hER HCCs growing subcutaneously in E2 untreated C57L/J mice, E2 treatment was started at day 19 after tumor challenge. At this point in time tumors had reached an average size of about 2000 mm³. As demonstrated in Fig. 9B, tumor growth was permanently arrested as early as 4 days after starting of E2 treatment demonstrating a significant therapeutic potential of IRF-1 activation against HCCs. By contrast, HepaIRF-1hER tumors grew rapidly in E2 untreated mice. E2 treatment for 9 days was sufficient to induce long term tumor growth control. This was readily demonstrated in 2 out of 6 E2 treated mice which E2 treatment was stopped at

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 32 -

day 28 again. Tumor growth in these mice did not differ as compared to mice which continued to receive two daily E2 injections.

5. IRF-1 activation in tumors on the one flank influences tumor growth in both flanks

The efficacy of IRF-1 activation as a therapeutic vaccine against tumors was examined. Mice were injected subcutaneously with HepaIRF-1hER cells in the right flank and wt Hepa1-6 cells into the left flank. The animals were either treated with 1,5 mg E2 every two days or were left untreated. Activation of IRF-1-hER abolished tumor growth of HepaIRF-1hER cells on the right flank of the mice. In addition, although tumor growth of wt Hepa1-6 cells on the left flank was also decreased in comparison to Hepa1-6 tumor growth which was initiated in the first days, a further expansion as it took place in untreated animals was inhibited.

Discussion

20 HCC is a highly malignant tumor with a poor prognosis and few therapeutic options. A new immunotherapeutic approach aimed at the activation of IRF-1 was examined. A murine HCC cell line (HepaIRF-1hER) encoding an IRF-1/human estrogen receptor fusion protein, which becomes active in the presence of β -estradiol, was constructed. The in vitro phenotype, cell growth, anchorage-independent growth in vitro, immunogenicity in vivo, and the therapeutic potential of IRF-1 all were examined. Stable constitutive IRF-1 expression has the disadvantage to select for low expressing clones. The actual transgene expression in such cell lines does not much override endogenous IRF-1 expression. Furthermore, constitutive expression induces a selection towards loss of

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 33 -

IRF-1 responsiveness over time (4, 40). In contrast, the activatable IRF-1hER system used in the present invention allows the tight regulation of IRF-1 activity and to express rather high levels of IRF-1 in the tumor cells. The E2 (E2 = β -estradiol) activatable system has been extensively studied and also compared with the tetracycline regulated transcription activation of the wild type IRF-1 gene. No differences were found (Kirchhoff et al., 1995; Köster et al., 1995). Because of the use of a mutant estradiol receptor gene (49) the fusion protein is insensitive to low estradiol concentrations and thus can be used in mice without being activated by endogenous estrogen levels. A respective tamoxifen specific mutant of IRF-1hER* (50), however, did not show tight regulation of IRF-1 activity (A. Kröger, unpublished). Using the β -estradiol inducible system we, therefore, could address the antitumoral effects of IRF-1 in more detail and dissect the activation of its different antitumoral effector arms.

Inhibition of growth and transformation of Hepal-6 cells was demonstrated in vitro confirming a property which has to be attributed to the innate immune activity of IRF-1. Ectopic IRF-1 expression suppresses cellular transformation properties in vitro induced by different oncogenes, such as myc, fosB (29), IRF-2 (51, 52), EGFR and E1a/b (24). In accordance with results obtained earlier with embryonic fibroblasts from IRF-1^{-/-} mice in which expression of c-Ha-ras oncogene in wild type cells but not in IRF-1^{-/-} cells forces the cells to undergo apoptosis under growth restricted conditions (Tanaka et al., 1994), the combined activity of EGFR and IRF-1 in NIH3T3 cells was shown to induce significant cell death by apoptosis (24). However, the data

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 34 -

presented in this report indicate that oncogene dependent tumor suppression in vitro is not necessary to be mediated by apoptosis. Thus, other mechanisms of transformation inhibition are expected to act. IRF-1 exerts its effects by DNA-binding and transactivation of a number of genes which might contribute to transformation inhibition. Among them are Lysyl oxidase (16), PKR (17, 53), 2'-5' OASE (18), Indoleamine 2,3-dioxygenase (19), and Angiotensin type II receptor (20). The role of IFN- β secretion in this context is not clear but might act as a feed-back enhancer of these genes.

IRF-1 has several other relevant in vivo antitumor activities. These are due to the immunomodulatory effects of IRF-1, such as the stimulation of helper T and NK cells (54, 55), transcriptional enhancement of MHC genes (4, 31, 56, 57) and of genes involved in antigen presentation (38, 58). Thus, most events or drugs which enhance the expression or activity of IRF-1 might be useful in cancer therapy by inducing specific killing of transformed cells. Indeed, experiments in mice have been described demonstrating that expression of IRF-1 in aggressive nonimmunogenic sarcoma cells suppresses the malignant phenotype (40).

The suppression and control of a highly tumorigenic HCC cell line in vivo were the most important activities of IRF-1. E2 treatment protected 75% of mice against challenge with the HepaIRF-1hER tumor and mice developing tumors were characterized by a significant suppression of tumor growth and enhanced survival as compared to E2 untreated animals. Similar results were observed in a recent study where the constitutive expression of IRF-1 in a sarcoma cell line

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 35 -

resulted in partial tumor control (40). By T cell depletion experiments it was demonstrated that CD4+ and CD8+ T cells play an important role in control of tumor growth confirming the known importance of IRF-1 in induction of TH1 differentiation (55). In addition, the inventors observed a significant activation of tumor specific TH2 cells which may synergistically act against tumor growth (59, 60). The effect of both CD4+ and CD8+ depletion experiments cannot explain the whole effect of IRF-1 mediated tumor growth control. It was shown that IFN- β can activate NK cells. Therefore, it is possible that NK cells contribute to tumor control.

More importantly, it was demonstrated for the first time that intratumoral expression of IRF-1 induces significant T cell responses against a tumor associated antigen such as the HCC specific self antigen AFP suggesting that tolerance towards AFP can be broken by this approach. AFP specific CTL activity was low as compared to highly immunogenic viral antigens, such as HBV or HCV structural proteins (61, 62). This may be the result of the low CTL precursor frequencies and/or low affinity TCRs. Recent studies, however, demonstrated that AFP specific T cells after DNA- or dendritic cell-based immunization are functional in vivo against AFP expressing murine HCCs (44, 63) suggesting that AFP specific T cells contributed to the antitumoral effects as presented in this invention. Although cellular immunity alone was not able to completely control tumor growth as demonstrated by the in vivo depletion experiments, significant T cell memory against the tumor was induced which protected mice against a rechallenge with HepaIRF-1hER and even wild-type Hepa1-6 cells without further E2 treatment. More important, the potential therapeutic efficacy of IRF-1 expression reflecting

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 36 -

the clinical situation after HCC diagnosis was shown.

Treatment of mice bearing large HepaIRF-1hER tumors with E2 resulted in a growth arrest of the tumor within 4 days. E2 treatment over a period of 9 days was sufficient to control tumor growth long term without any further E2 treatment. According to the tumor protection studies described above this long term tumor control may be primarily immune mediated.

- 10 Enhanced immunogenicity of HCC tumors expressing IRF-1 may be mediated by upregulation of MHC class I and II molecules as previously described, though MHC class II induction was low in HCC cells. The costimulatory molecules CD80 and CD86 could not been detected suggesting that priming of antitumoral
- 15 immune responses must have occurred in the draining lymph nodes by professional antigen presenting cells. Additional factors involved in IRF-1 mediated tumor growth control may be the increased generation of MHC class I restricted antigenic peptides for presentation to the immune system by
- 20 proteasomes (38, 39, 58).

- As predicted by the Yim et al. (40) it was shown for the first time that ectopic IRF-1 expression induces significant therapeutic antitumoral immune responses and primes immunity
- 25 against a tissue specific self tumor antigen, e.g. AFP. Therefore, the inventors results may have implications for local and AFP-based immunotherapy of HCC.

- Summing up, hepatocellular carcinoma (HCC) is a highly
- 30 malignant tumor with a poor prognosis and few therapeutic options.

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 37 -

HCC is regarded as an example for other tumor entities. There is good evidence that IRF-1 will have the same systemic effects in other tumor species. The following examples support this hypothesis:

- 5 1. Yim et al. (1997; 40) reported that a sarcoma cell line when expressing IRF-1 partially induced rejection and immunity. The effects are not complete because IRF-1 was not sufficiently expressed.
- 10 2. The example with oncogenically transformed 3T3 cells supports the version that tumor growth is significantly reduced when active IRF-1 is expressed, even in nude mice. The delay of the tumor growth in nude mice is much higher than it was expected from in vitro data, indicating that the remaining part of the immune system in these animals has been
- 15 involved.
3. In vitro data with a number of different oncogenically transformed cell lines show that IRF-1 can significantly or completely suppress soft agar growth, induce interferon secretion, and activate MHC upregulation. (Kirchhoff et al.,
- 20 1999, and Kröger et al., unpublished data).

Although detailed molecular function of tumor defence in mice is not known, the presented data indicate that immune cells (CTL, TH1 and TH2 cells) are involved. The nude mice

25 experiments suggest that NK cells are also involved. It is known that IFN- β is a strong activator of NK-cell activity. Further IFN- β is also known for diverse activation functions in the adaptive immune system. Finally, apoptosis as well as growth inhibitory effects of IRF-1 might contribute to the

30 tumor inhibitory effect which is seen in the cells overexpressing IRF-1. While immunological effects are thought to be mediated by MHC upregulation and interferon secretion

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 38 -

other, as yet unknown activities induced by IRF-1 could contribute to the antitumor action.

5 The interferon which is secreted upon IRF-1 activation could act systemically as well as local. It is thus possible that the production of IFN in the surrounding of the antigen presenting cells (those ones overexpressing IRF-1) lead to high stimulation of the antitumor activities.

10 In the present invention work IRF-1 was demonstrated to induce antitumor activities. It is well known that other IRFs have similar binding properties if compared to IRF-1. E.g., IRF-3 seems to be able to activate the same or a similar set of genes that are activated by IRF-1. Thus, permanently
15 activated IRF-3 or IRF-3 variants, which are constitutively active could have the same antitumor activity as demonstrated here.

20 How can the observed effects in the animal tumor model be converted to human therapy? All scenarios are based on the strong activity of IRF-1 or related transcription factors (see above).

25 1. Cellular therapies:

Tumor cells of the patients or tumor cells from other patients with the same tumor entity (allogenic cells) could be loaded with genes by virus infection or other gene transfer methods. It is unimportant if these genes are
30 expressed only transiently or for a long time period. Alternatively, non-specific cells or professional antigen presenting cells which are able or forced to present tumor

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 39 -

antigens which are relevant for the target tumor would be loaded by IRF constructs. These cells could be derived from the patient or could be allogenic. The activation of the IRF genes in those cells could be either activated in vitro immediately before the gift to the patient. Alternatively, they might be activated within the patient by gift of respective activators. (β -estradiol or tetracyclines). In humans, cellular therapies are usually carried out by inactivating other cells, by methods like UV or gamma irradiation.

2. Gene therapies by viral transfer methods
IRFs, like those ones described above could be transduced by viral vectors like the described adenoviral vector.
15 Preferentially, this would be done by infection of the viruses into the tumor or into tissue close to the tumor. In certain cases it could also be done by systemic application. This would be typically done in the case of liver tumors by application of adenoviruses into the blood stream. It is well known that adenoviruses are mainly captured in liver and gene transfer would be thus far liver-specific. The activation or reduction of the IRF harboured by the viral vectors would be activated in vivo in the patients by respective agents. It should be mentioned that earlier work has shown that IRF-1
25 activation in non-tumor cells causes reversible proliferation inhibition but does not lead to detrimental effects.

3. Gene therapy by non-viral methods.
A number of methods by which genes could be transferred into human tissue are known. Amongst them is lipofection, gene gun, electroporation and others. IRF's could be transfected by these methods into the respective tumor tissues.

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 40 -

4. Activation or induction of endogenous IRF-1 in the patients' tumor or antigen presenting cells could be activated or induced. From a number of compounds like
 5 cytokines and other biological response modifiers it is known that they activate the transcription and production of IRF-1. Strong inducers or combinations of such could be used to induce IRF-1 and to induce the observed antitumor effects. Other compounds typically found by high throughput screening
 10 which would activate endogenous IRF-1 could be used in the same way.

Table 1. IRF-1 activation leads to IFN secretion^c

Clone	IFN secretion (IU/ml)		
	-E2	+E2 ^a	+E2 ^a + anti-IFN- Ab ^b
wt	n.d	n.d	n.d
c4	n.d	125	n.d
c9	n.d	125	n.d
c22	n.d	180	n.d

15

n.d: not detectable

^a 1 μ M β -estradiol^b anti-IFN- β antibody neutralizing 500IU

20 ^c Hepa1-6 cells and HepaIRF-1hER cell clones were treated with 1 μ M of β -estradiol for 5 days. Accumulated IFN was measured in the supernatant as described in Material and Methods and normalized to 10⁶ cells.

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 41 -

Table 2. IFN secretion in cells infected with IRF-1-hER containing adenoviruses after β -estradiol treatment

transduced adenoviral construct	IFN secretion (IU/ml)	
	-E2	+E2 ^b
mock	nd ^c	Nd
Ad-CMVIH	nd	5000
Ad-CMVIHEG	nd	5000
Ad-LTR-TETIHEG	nd	5000
Ad-LTR-TETIHEGinv	nd	2500

5 ^a Hepa1-6 cells were 24h after infected with adenovirus treated with 1 μ M E2 for 24h. Accumulation of IFN was measured in the supernatant and normalized to 10⁶ cells.

^b 1 μ M β -estradiol

^c not detectable

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 42 -

Table 3. Phenotype of IRF-1 activation in NIH3T3TA/IH/MR cells

	+ Dox ^a		- Dox	
	- E2 ^b	+E2 ^b	-E2	+E2 ^b
Proliferation ^c (%)	100	60	130	65
Soft agar growth ^d (number of clones)	0	0	130	0
IFN secretion ^e (IU/ml)	nd ^f	750	nd	750

5 ^a 2 µg/ml Doxycyclin^b 1 µM β-estradiol^c The metabolic activity as a measure for cell growth of the cells were measured 7 days after treatment10 ^d Anchorage independent growth of the cells in soft agar. The number of colonies were determined 2 weeks after treatment.^e Accumulation of IFN was measured 5 days after treatment in the supernatant and normalized to 10⁶ cells.^f not detectable

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 43 -

Table 4. IRF-1 activation in tumors on the one flank influences tumor growth in both flanks

cell type injected ^a	Tumor volume (mm ³) (mean $\pm$ SD)	
	-E2	+E2 ^b
Hepa1-6 (wt)	1630 $\pm$ 596	1630 $\pm$ 596
HepaIH	1317 $\pm$ 380	22,4 $\pm$ 179
Hepa1-6 (left) +	1630 $\pm$ 596	179 $\pm$ 288
HepaIH (right) ^c	1630 $\pm$ 596	nd ^d

^a 5 x 10⁶ Hepa1-6 or HepaIRF-1hER cells were inoculated

5 subcutaneously in the flank of the mice

^b mice were treated with 1,5 mg E2 every 2 days i.p.

^c mice were inoculated with 5 x 10⁶ HepaIRF-1hER cells on the right flank and with 5 x 10⁶ cells on the left flank

^d not detectable

10

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 44 -

Bibliography

1. Bosch, X., Ribes, J., and Borrás, J. Epidemiology of primary liver cancer., *Seminars Liver Dis.* 19: 271-285, 1999.
5. 2.. Okuda, K. Hepatocellular carcinoma., *J. Hepatol.* 32: 225-237, 2000.
3. Harroch, S., Revel, M., and Chebath, J. Induction by interleukin-6 of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) gene expression through the palindromic interferon response element pIRE and cell type-dependent control of IRF-1 binding to DNA, *Embo J.* 13: 1942-9, 1994.
- 10 4. Kirchhoff, S., Schaper, F., and Hauser, H. Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) mediates cell growth inhibition by transactivation of downstream target genes., *Nucleic Acids Res.* 21: 2881, 1993.
- 15 5. Pine, R. Constitutive expression of an ISGF2/IRF1 transgene leads to interferon-independent activation of interferon-inducible genes and resistance to virus infection, *J Virol.* 66: 4470-8, 1992.
- 20 6. Reis, L. F., Harada, H., Wolchok, J. D., Taniguchi, T., and Vilcek, J. Critical role of a common transcription factor, IRF-1, in the regulation of IFN-beta and IFN-inducible genes, *Embo J.* 11: 185-93, 1992.
7. Chang, C. H., Hammer, J., Loh, J. E., Fodor, W. L., and Flavell, R. A. The activation of major histocompatibility complex class I genes by interferon regulatory factor-1 (IRF-1), *Immunogenetics.* 35: 378-84, 1992.
- 25 8. Kimura, T., Nakayama, K., Penninger, J., Kitagawa, M., Harada, H., Matsuyama, T., Tanaka, N., Kamiyo, R., Vilcek, J., Mak, T. W., and et al. Involvement of the IRF-1 transcription factor in antiviral responses to interferons, *Science.* 264: 1921-4, 1994.
- 30

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 45 -

9. Fujita, T., Kimura, Y., Miyamoto, M., Barsoumian, E. L.,
and Taniguchi, T. Induction of endogenous IFN-alpha and IFN-
beta genes by a regulatory transcription factor, IRF-1,
Nature. 337: 270-2, 1989.
- 5 10. Harada, H., Fujita, T., Miyamoto, M., Kimura, Y.,
Maruyama, M., Furia, A., Miyata, T., and Taniguchi, T.
Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1
and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and
IFN-inducible genes, Cell. 58: 729-39, 1989.
- 10 11. Matsuyama, T., Kimura, T., Kitagawa, M., Pfeffer, K.,
Kawakami, T., Watanabe, N., Kundig, T. M., Amakawa, R.,
Kishihara, K., Wakeham, A., and et al. Targeted disruption of
IRF-1 or IRF-2 results in abnormal type I IFN gene induction
and aberrant lymphocyte development, Cell. 75: 83-97, 1993.
- 15 12. Ruffner, H., Reis, L. F., Naf, D., and Weissmann, C.
Induction of type I interferon genes and interferon-inducible
genes in embryonal stem cells devoid of interferon regulatory
factor 1, Proc Natl Acad Sci U S A. 90: 11503-7, 1993.
13. Reis, L. F., Ruffner, H., Stark, G., Aguet, M., and
20 Weissmann, C. Mice devoid of interferon regulatory factor 1
(IRF-1) show normal expression of type I interferon genes,
Embo J. 13: 4798-806, 1994.
14. Pellegrini, S. and Schindler, C. Early events in
signalling by interferons, Trends Biochem Sci. 18: 338-42,
25 1993.
15. Kamiyo, R., Harada, H., Matsuyama, T., Bosland, M.,
Gerecitano, J., Shapiro, D., Le, J., Koh, S. I., Kimura, T.,
Green, S. J., and et al. Requirement for transcription factor
IRF-1 in NO synthase induction in macrophages, Science. 263:
30 1612-5, 1994.
16. Tan, R. S., Taniguchi, T., and Harada, H. Identification
of the lysyl oxidase gene as target of the antioncogenic

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 46 -

- transcription factor, IRF-1, and its possible role in tumor suppression, *Cancer Res.* 56: 2417-21, 1996.
17. Kirchhoff, S., Koromilas, A. E., Schaper, F., Grashoff, M., Sonenberg, N., and Hauser, H. IRF-1 induced cell growth inhibition and interferon induction requires the activity of the protein kinase PKR, *Oncogene.* 11: 439-45, 1995.
18. Benech, P., Vigneron, M., Peretz, D., Revel, M., and Chebath, J. Interferon-responsive regulatory elements in the promoter of the human 2',5'-oligo(A) synthetase gene, *Mol Cell Biol.* 7: 4498-504, 1987.
19. Takikawa, O., Kuroiwa, T., Yamazaki, F., and Kido, R. Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity, *J Biol Chem.* 263: 2041-8, 1988.
20. Horiuchi, M., Yamada, T., Hayashida, W., and Dzau, V.-J. Interferon regulatory factor-1 up-regulates angiotensin II type 2 receptor and induces apoptosis, *J Biol Chem.* 272: 11952-8, 1997.
21. Tanaka, N., Ishihara, M., Kitagawa, M., Harada, H., Kimura, T., Matsuyama, T., Lamphier, M. S., Aizawa, S., Mak, T. W., and Taniguchi, T. Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1, *Cell.* 77: 829-39, 1994.
22. Lowe, S. W. and Ruley, H. E. Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis, *Genes Dev.* 7: 535-45, 1993.
23. Attardi, L. D., Lowe, S. W., Brugarolas, J., and Jacks, T. Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis, *Embo J.* 15: 3693-701, 1996.

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 47 -

24. Kirchhoff, S. and Hauser, H. Cooperative activity between HER oncogenes and the tumor suppressor IRF-1 results in apoptosis, *Oncogene*. 18: 3725-36, 1999.
25. Chin, Y. E., Kitagawa, M., Kuida, K., Flavell, R. A.,
5 and Fu, X.-Y. Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis, *Mol Cell Biol*. 17: 5328-37, 1997.
26. Tamura, T., Ishihara, M., Lamphier, M. S., Tanaka, N., Oishi, I., Aizawa, S., Matsuyama, T., Mak, T. W., Taki, S.,
10 and Taniguchi, T. DNA damage-induced apoptosis and Ice gene induction in mitogenically activated T lymphocytes require IRF-1, *Leukemia*. 11 Suppl 3: 439-40, 1997.
27. Yamada, G., Ogawa, M., Akagi, K., Miyamoto, H., Nakano, N., Itoh, S., Miyazaki, J., Nishikawa, S., Yamamura, K., and
15 Taniguchi, T. Specific depletion of the B-cell population induced by aberrant expression of human interferon regulatory factor 1 gene in transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88: 532-6, 1991.
28. Willman, C. L., Sever, C. E., Pallavicini, M. G.,
20 Harada, H., Tanaka, N., Slovak, M. L., Yamamoto, H., Harada, K., Meeker, T. C., List, A. F., and et al. Deletion of IRF-1, mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia, *Science*. 259: 968-71, 1993.
29. Tanaka, N., Ishihara, M., and Taniguchi, T. Suppression
25 of c-myc or fosB-induced cell transformation by the transcription factor IRF-1, *Cancer Lett*. 83: 191-6, 1994.
30. Nozawa, H., Oda, E., Nakao, K., Ishihara, M., Ueda, S., Yokochi, T., Ogasawara, K., Nakatsuru, Y., Shimizu, S., Ohira, Y., Hioki, K., Aizawa, S., Ishikawa, T., Katsuki, M.,
30 Muto, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. Loss of transcription factor IRF-1 affects tumor susceptibility in mice carrying

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 48 -

- the Ha-ras transgene or nullizygosity for p53, *Genes Dev.* 13: 1240-5, 1999.
31. Hobart, M., Ramassar, V., Goes, N., Urmson, J., and Halloran, P. F. The induction of class I and II major histocompatibility complex by allogeneic stimulation is dependent on the transcription factor interferon regulatory factor 1 (IRF-1): observations in IRF-1 knockout mice, *Transplantation*. 62: 1895-901, 1996.
32. Salkowski, C. A., Barber, S. A., Detore, G. R., and Vogel, S. N. Differential dysregulation of nitric oxide production in macrophages with targeted disruptions in IFN regulatory factor-1 and -2 genes, *J Immunol.* 156: 3107-10, 1996.
33. Ogasawara, K., Hida, S., Azimi, N., Tagaya, Y., Sato, T., Yokochi-Fukuda, T., Waldmann, T. A., Taniguchi, T., and Taki, S. Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells, *Nature*. 391: 700-3, 1998.
34. Harada, H., Willison, K., Sakakibara, J., Miyamoto, M., Fujita, T., and Taniguchi, T. Absence of the type I IFN system in EC cells: transcriptional activator (IRF-1) and repressor (IRF-2) genes are developmentally regulated, *Cell*. 63: 303-12, 1990.
35. Kirchhoff, S., Wilhelm, D., Angel, P., and Hauser, H. NFkappaB activation is required for interferon regulatory factor-1-mediated interferon beta induction, *Eur J Biochem.* 261: 546-54, 1999.
36. Ohteki, T., Yoshida, H., Matsuyama, T., Duncan, G. S., Mak, T. W., and Ohashi, P. S. The transcription factor interferon regulatory factor 1 (IRF-1) is important during the maturation of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ (NK1+ T) cells, natural killer cells, and

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 49 -

- intestinal intraepithelial T cells, *J Exp Med.* 187: 967-72, 1998.
37. Tanaka, N., Ishihara, M., Lamphier, M. S., Nozawa, H., Matsuyama, T., Mak, T. W., Aizawa, S., Tokino, T., Oren, M., and Taniguchi, T. Cooperation of the tumour suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage, *Nature.* 382: 816-8, 1996.
38. White, L. C., Wright, K. L., Felix, N. J., Ruffner, H., Reis, L. F., Pine, R., and Ting, J. P. Regulation of LMP2 and TAP1 genes by IRF-1 explains the paucity of CD8+ T cells in IRF-1-/- mice, *Immunity.* 5: 365-76, 1996.
39. Foss, G. S. and Prydz, H. Interferon regulatory factor 1 mediates the interferon-gamma induction of the human immunoproteasome subunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1, *J Biol Chem.* 274: 35196-202, 1999.
40. Yim, J. H., Wu, S. J., Casey, M. J., Norton, J. A., and Doherty, G. M. IFN regulatory factor-1 gene transfer into an aggressive, nonimmunogenic sarcoma suppresses the malignant phenotype and enhances immunogenicity in syngeneic mice, *J Immunol.* 158: 1284-92, 1997.
41. Di Bisceglie, A. M., Carithers Jr., R. L., and Gores, G. J. Hepatocellular carcinoma, *Hepatology.* 28: 1161-1165, 1998.
42. Vara, J. A., Portela, A., Ortin, J., and Jimenez, A. Expression in mammalian cells of a gene from *Streptomyces alboniger* conferring puromycin resistance, *Nucleic Acids Res.* 14: 4617-24, 1986.
43. Dinter, H. and Hauser, H. Superinduction of the human interferon-beta promoter, *Embo J.* 6: 599-604, 1987.
44. Grimm, C., Ortmann, D., Mohr, L., Michalak, S., Krohne, T. U., Meckel, S., Eisele, S., Encke, J., Blum, H. E., and Geissler, M. Treatment of hepatocellular carcinoma by breaking immunological ignorance towards alpha-fetoprotein

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 50 -

- using genetic immunization in mice, *Gastroenterology* 119: 1104-1112, 2000.
45. Schirmbeck, R., Wild, J., Blum, H. E., Chisari, F. V., Geissler, M., and Reimann, J. Ongoing T1 or T2 immune responses to the hepatitis B surface antigen (HBsAg) are excluded from the liver of mice in which transgene-encoded HBsAg is expressed, *J. Immunol.* 164: 4235-4243, 2000.
46. Wild, J., Grusby, M. J., Schirmbeck, R., and Reimann, J. Priming MHC-I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to exogenous hepatitis B surface antigen is CD4+ T cell dependent, *J. Immunol.* 163: 1880-1887, 1999.
47. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., and Riccardi, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, *J Immunol Methods.* 139: 271-9, 1991.
48. Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., and Henson, P. M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages, *J Immunol.* 148: 2207-16, 1992.
49. Tora, L., Mullick, A., Metzger, D., Ponglikitmongkol, M., Park, I., and Chambon, P. The cloned human oestrogen receptor contains a mutation which alters its hormone binding properties, *Embo J.* 8: 1981-6, 1989.
50. Danielian, P. S., White, R., Hoare, S. A., Fawell, S. E., and Parker, M. G. Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen, *Mol Endocrinol.* 7: 232-40, 1993.
51. Harada, H., Kitagawa, M., Tanaka, N., Yamamoto, H., Harada, K., Ishihara, M., and Taniguchi, T. Anti-oncogenic

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 51 -

- and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2, *Science*. 259: 971-4, 1993.
52. Futaki, M., Inokuchi, K., Hanawa, H., Tanosaki, S., Dan, K., and Nomura, T. Possible transforming activity of
- 5 interferon regulatory factor 2 in tumorigenicity assay of NIH3T3 cells transfected with DNA from chronic myelogenous leukemia patients, *Leuk Res*. 20: 601-5, 1996.
53. Tanaka, H. and Samuel, C. E. Mechanism of interferon action: structure of the mouse PKR gene encoding the
- 10 interferon-inducible RNA-dependent protein kinase, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91: 7995-9, 1994.
54. Duncan, G. S., Mittrucker, H. W., Kagi, D., Matsuyama, T., and Mak, T. W. The transcription factor interferon regulatory factor-1 is essential for natural killer cell
- 15 function in vivo, *J Exp Med*. 184: 2043-8, 1996.
55. Lohoff, M., Ferrick, D., Mittrucker, H. W., Duncan, G. S., Bischof, S., Rollinghoff, M., and Mak, T. W. Interferon regulatory factor-1 is required for a T helper 1 immune response in vivo, *Immunity*. 6: 681-9, 1997.
- 20 56. Drew, P. D., Franzoso, G., Becker, K. G., Bours, V., Carlson, L. M., Siebenlist, U., and Ozato, K. NF kappa B and interferon regulatory factor 1 physically interact and synergistically induce major histocompatibility class I gene expression, *J Interferon Cytokine Res*. 15: 1037-45, 1995.
- 25 57. Massa, P. T. and Wu, H. Interferon regulatory factor element and interferon regulatory factor 1 in the induction of major histocompatibility complex class I genes in neural cells, *J Interferon Cytokine Res*. 15: 799-810, 1995.
58. Chatterjee-Kishore, M., Kishore, R., Hicklin, D. J.,
- 30 Marincola, F. M., and Ferrone, S. Different requirements for signal transducer and activator of transcription 1alpha and interferon regulatory factor 1 in the regulation of low

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 52 -

- molecular mass polypeptide 2 and transporter associated with antigen processing 1 gene expression, *J Biol Chem.* 273: 16177-83, 1998.
59. Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D., and Levitsky, H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response, *J Exp Med.* 188: 2357-68, 1998.
60. Zajac, A. J., Murali-Krishna, K., Blattman, J. N., and Ahmed, R. Therapeutic vaccination against chronic viral infection: the importance of cooperation between CD4+ and CD8+ T cells, *Curr Opin Immunol.* 10: 444-9, 1998.
61. Geissler, M., Gesien, A., Tokushige, K., and Wands, J. R. Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus (HCV) core protein using DNA based vaccines augmented with cytokine expressing plasmids, *J Immunol.* 158: 1231-1237, 1997.
62. Geissler, M., Bruss, V., Michalak, S., Ortmann, D., Wands, J. R., and Blum, H. E. Intracellular retention of hepatitis B virus surface proteins reduces the immune response augmenting effects of IL-2 after cytokine genetic coimmunizations., *J. Virol.* 73: 4284-4292, 1999.
63. Vollmer, C. M., Jr., Bilber, F. C., Butterfield, L. H., Ribas, A., Dissette, V. B., Koh, A., Montejo, L. D., Lee, M. C., Andrews, K. J., McBride, W. H., Glaspy, J. A., and Economou, J. S. Alpha-fetoprotein-specific genetic immunotherapy for hepatocellular carcinoma, *Cancer Res.* 59: 3064-7, 1999.
64. Spitzer D., Hauser H. and Wirth D. Technical repot. Complement-protected amphotrophic retroviruses from murine packaging cells. *Human Gene Therapy* 10, 1893-1902 (1999)
65. Unsinger, J., Kröger, A., Hauser, H., and Wirth, D.: Retroviral vectors for transduction of an autoregulated

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 53 -

- bidirectional expression cassette. *Molecular Therapy*, 4, 484-489. (2001)
66. Unsinger J., Lindenmaier W., Hauser H. and Wirth D. LTR-flanked autoregulated expression cassettes for homogeneous and strictly controlled expression in adenoviral vectors. submitted 2002
67. Colbère-Garpin F., Horodniceanu F., Khouilsky P., and Garapin A.C. A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. *J Mol. Biol.* 150, 1-13. (1981).
- 10 68. Köster, M., Kirchhoff, S., Schaper, F. and Hauser, H.: Proliferation control of mammalian cells by the tumor suppressor IRF-1. *Cytotechnology*, 18, 67-75 (1995)
69. Kirchhoff, S., Köster, M., Wirth, M., Schaper, F., Gossen, M., Bujard, H. and Hauser, H.: Identification of
- 15 mammalian cell clones exhibiting highly regulated expression from inducible promoters. *TIG*, 11, 219-220 (1995)
70. Kröger A. Evaluierung der tumorsuppressiven Eigenschaften des Interferon Regulatory factor-one (IRF-1). Dissertation, Technische Universität Braunschweig (1999)

20

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 54 -

Patent Claims

- 5 1. Use of a gene construct or a polynucleotide by means of which the activity of its gene product, a member of the IRF family, can become activated, for the treatment, prevention, protective treatment and/or prophylactic immunisation against tumoral, infectious and/or immune diseases.
- 10 2. Use according to claim 1, wherein the member of the IRF family as gene product is selected from the group consisting of wild-type IRF-1, synthetic IRF-1, immunologically active IRF-1 variants, a wild-type member of the IRF family other than IRF-1, a synthetic member of the IRF family other than
- 15 IRF-1, immunologically active variants of a member of the IRF family other than IRF-1, and fusion proteins thereof.
3. Use according to claim 1 and/or 2 for the treatment of
- 20 mammals and especially humans.
4. Use according to one or more of the preceding claims, wherein the gene construct encodes a member of the IRF family as a fusion protein comprising said member as one of the
- 25 domains of the fusion protein and a foreign protein as another domain of the fusion protein, wherein the activity of the fusion protein can be switched on and off by chemical or physical means.
- 30 5. Use according to one or more of the preceding claims, wherein the gene construct encodes the expression of an IRF-

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 55 -

1/hER fusion protein, the activity of which can be regulated by compounds with estrogenic or anti-estrogenic activity.

6. Use according to one or more of the preceding claims, wherein the gene construct or the polynucleotide is provided as a product for transfer into mammalian cells, especially a viral vector, preferably an adenoviral vector.

7. Use according to one or more of the preceding claims, wherein the expression can be switched on by chemical or by physical activation.

8. Use according to claim 7, wherein the expression can be switched on thermally or by irradiation.

9. Use according to claim 7 and/or 8, wherein the expression can be switched on by means of a regulatable promoter.

10. Use according to claim 9, wherein the expression can be switched on or off by an external stimulus, especially by tetracyclines.

11. Vaccine comprising a gene construct or a polynucleotide as defined in one or more of the preceding claims, together with one or more antigens selected from the group consisting of viral, bacterial, fungal, and parasitic origin or one or more antigen encoding genes derived from tumor cells.

12. Vaccine according to claim 11, wherein the gene construct or polynucleotide and the antigen encoding sequence(s) are provided by means of separate vectors, a vector which

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 56 -

provides all components, or as polycistronic expression units.

13. Vaccine according to claim 11 and/or 12, wherein the gene
5 construct or polynucleotide and the antigen encoding
sequence(s) are provided as viral or bacterial carrier.
14. Use according to one or more of the preceding claims for
the production of preparations for the treatment, prevention,
10 protective treatment and/or prophylactic immunisation of
tumoral, infectious and/or immune diseases.
15. A member of the IRF family or a fusion protein comprising
or consisting of said member as one of the components of the
15 fusion protein and a therapeutically acceptable protein as
another component of the fusion protein for the treatment,
prevention, protective treatment and/or prophylactic
immunisation of tumoral, infectious and/or immune diseases.
- 20 16. Fusion protein according to claim 15, wherein IRF-1 is
one of its components and/or hER is the other component of
the fusion protein.
17. Prophylactic and/or therapeutical composition consisting
25 of or comprising a member of the IRF family or a fusion
protein comprising or consisting of said member as one of the
components of the fusion protein and a therapeutically
acceptable protein as another component of the fusion protein
for the treatment, prevention, protective treatment and/or
30 prophylactic immunisation of tumoral, infectious and/or
immune diseases.

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

- 57 -

18. Composition according to claim 17, wherein IRF-1 is one of the components of the fusion protein and/or hER is the other one of its components.
- 5 19. Human cell charged ex vivo with a gene construct or polynucleotide as defined in one or more of claims 1 to 10 for the expression of a member of the IRF family.
- 10 20. Human cell according to claim 19, wherein the cell has been charged by gene transfer, physical transduction, especially electroporation, chemical transduction or viral transduction.
- 15 21. Human cell according to claim 19 and/or 20, wherein the cell is an autologous or an allogenic cell.
- 20 22. Human cell according to one or more of claims 19 to 21, wherein the cell is a tumor cell, especially a carcinoma cell, preferably a hepatocellular carcinoma cell, a sarcoma cell or a tumor derived from the hematopoietic system.
- 25 23. Human cell according to one or more of claims 19 to 22 for the treatment, prevention, protective treatment and/or prophylactic immunisation against tumoral, infectious and/or immune diseases.
- 30 24. Human antigen presenting cell (APC), wherein the cell has been subjected to a gene transfer according to claim 20 with genes according to one or more of claims 11 to 13.

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

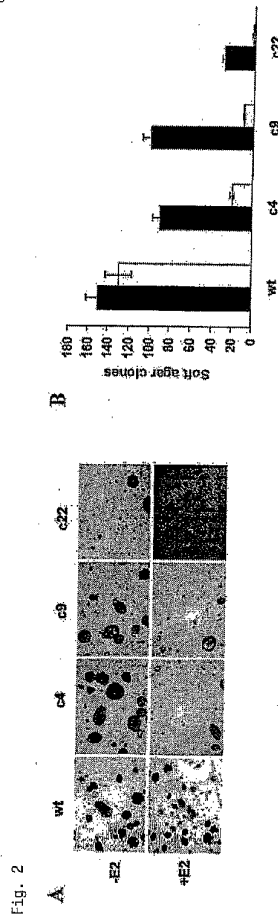
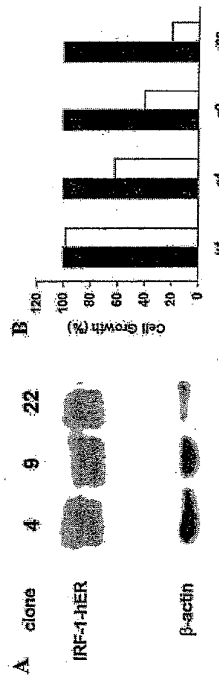
- 58 -

25. Human cell according to one or more of claims 19 to 24, wherein the active level of the member of the IRF family is higher than that of IRF-1 induced by interferon-beta.

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

1/6



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

2/6

Fig. 3

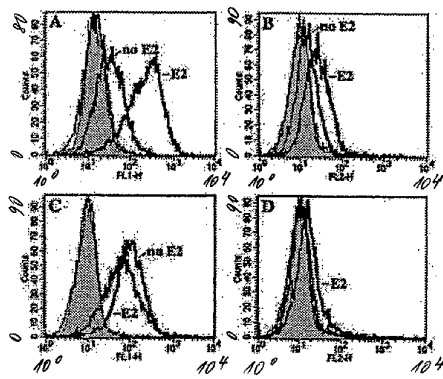
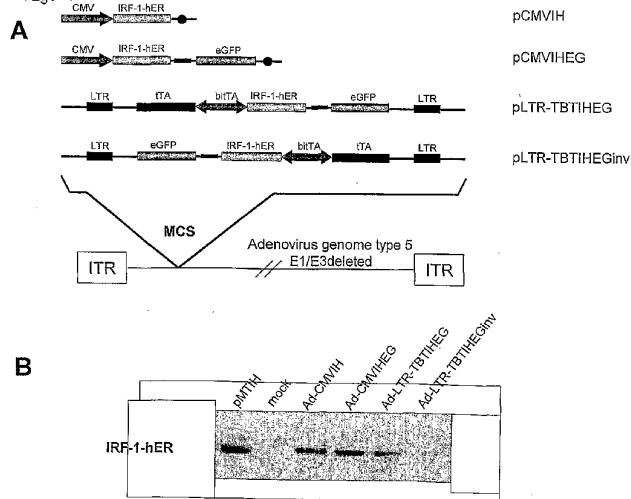


Fig. 4



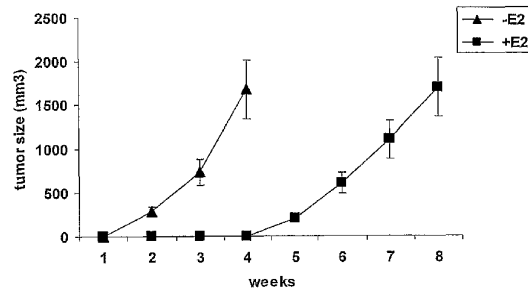
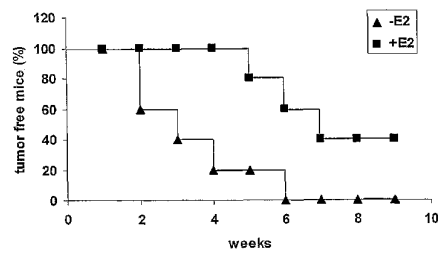
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

3/6

Fig. 5

A**B**

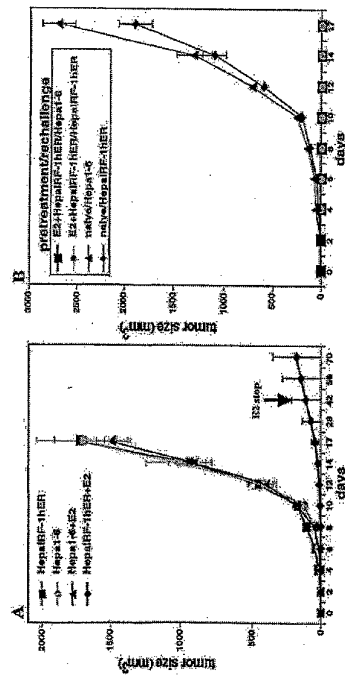
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

4/6

Fig. 6



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

5/6

Fig. 7

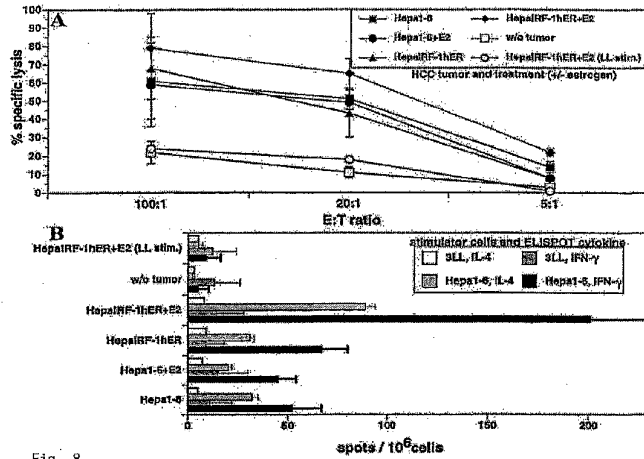
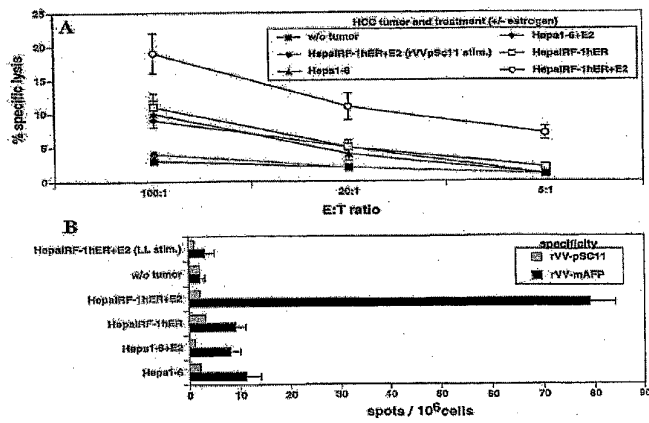


Fig. 8

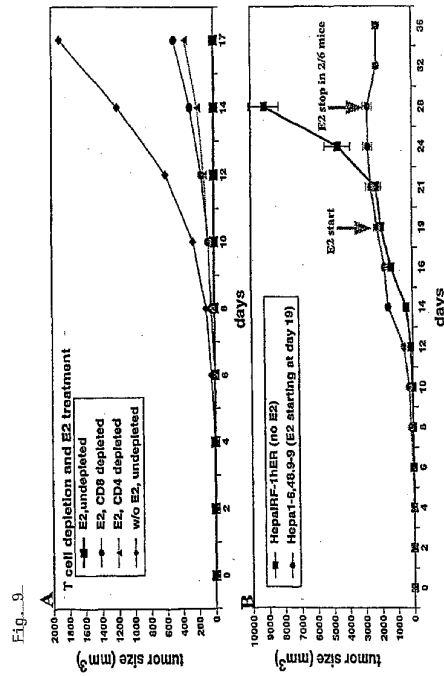


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/068614

PCT/EP02/02036

6/6



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
6 September 2002 (06.09.2002)

PCT

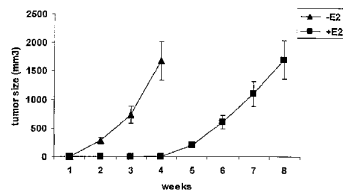
(10) International Publication Number
WO 02/068614 A3

- (51) International Patent Classification: C07K 14/47, 14/72, A61K 39/00, 48/00, C12N 15/62
- (21) International Application Number: PCT/EP02/02036
- (22) International Filing Date: 26 February 2002 (26.02.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 01104423.7 26 February 2001 (26.02.2001) LP
- (71) Applicant (for all designated States except US): GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, 83124 Braunschweig (DE).
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): KROEGER, Andrea [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, 83124 Braunschweig (DE). GEISLER, Michael [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, 83124 Braunschweig (DE). HAUSER, Hansjoerg [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, 83124 Braunschweig (DE).
- (74) Agent: BOETERS, Hans; Boeters & Baucr, Berchinger 15, 81541 München (DE).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, ES, FI, GB, GD, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW).

[Continued on next page]

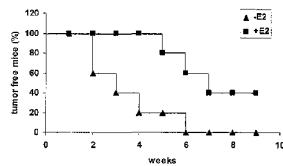
(54) Title: INTERFERON REGULATORY FACTOR-1/HUMAN ESTROGEN RECEPTOR FUSION PROTEIN AND ITS USE FOR TREATING CARCINOMAS

A



(57) Abstract: The invention relates to an interferon regulatory factor-1/human estrogen receptor fusion protein which is reversibly activatable by β -estradiol and its use for treating carcinomas, particularly for treating hepatocellular carcinoma.

B



WO 02/068614 A3

WO 02/068614 A3



Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report:
7 November 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:
with international search report
before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

【手続補正書】

【提出日】平成15年5月22日(2003.5.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) 遺伝子構築物またはポリヌクレオチドであって、それにより I R F ファミリーのメンバーである該遺伝子構築物またはポリヌクレオチドの遺伝子産物の活性を腫瘍性、感染性および／または免疫疾患に対する治療、予防、防御的治療および／または予防免疫接種のために活性化される 遺伝子構築物またはポリヌクレオチドと、(i i) ウイルス、細菌、真菌および寄生生物起源、あるいは腫瘍細胞由来の1つまたは複数の抗原コード遺伝子からなる群から選択される1つまたは複数の抗原とを一緒に含有してなるワクチン。

【請求項2】

遺伝子産物としての I R F ファミリーの前記メンバーは、野生型 I R F - 1、合成 I R F - 1、免疫学的活性 I R F - 1 変異体、I R F - 1 以外の I R F ファミリーの野生型メンバー、I R F - 1 以外の I R F ファミリーの合成メンバー、I R F - 1 以外の I R F ファミリーのメンバーの免疫学的活性変異体およびそれらの融合タンパク質から成る群から選択される請求項1記載の ワクチン。

【請求項3】

哺乳類、特にヒトの治療のための請求項1および／または2記載の ワクチン。

【請求項4】

前記遺伝子構築物は、融合タンパク質のドメインの1つとしての前記 I R F フェミリーのメンバーおよび該融合タンパク質の別のドメインとしての外来タンパク質を含む融合タンパク質としての前記 I R F ファミリーのメンバーをコードし、前記融合タンパク質の活性は、化学的または物理的手段によりスイッチを切り換えられ得る1つまたは複数の先行の請求項で特定された ワクチン。

【請求項5】

前記遺伝子構築物は、I R F - 1 / h E R 融合タンパク質の前記発現をコードし、該融合タンパク質の活性は、エストロゲンまたは抗エストロゲン活性を有する化合物により制御され得る1つまたは複数の先行の請求項で特定された ワクチン。

【請求項6】

前記遺伝子構築物または前記ポリヌクレオチドは、哺乳類細胞中への移入のための生成物として、特にウイルスベクター、好ましくはアデノウイルスベクターとして提供される1つまたは複数の先行の請求項で特定された ワクチン。

【請求項7】

前記発現は、化学的または物理的活性化によりスイッチを入れられ得る1つまたは複数の先行の請求項で特定された ワクチン。

【請求項8】

前記発現は、加熱によりまたは放射線照射によりスイッチを入れられ得る請求項7記載の ワクチン。

【請求項9】

前記発現は、調節可能プロモーターによりスイッチを入れられ得る請求項7および／または8記載の ワクチン。

【請求項10】

前記発現は、外的刺激により、特にテトラサイクリンによりスイッチを切り換えられ得る請求項9記載の ワクチン。

【請求項11】

前記遺伝子構築物またはポリヌクレオチドおよび前記抗原コード配列(単数または複数)は、複数の別個のベクター、すべての構成成分を提供するベクター、またはポリシストロン発現ユニットを用いて提供される1つまたは複数の先行の請求項で特定されたワクチン。

【請求項12】

前記遺伝子構築物またはポリヌクレオチドおよび前記抗原コード配列(単数または複数)は、ウイルスまたは細菌担体として提供される請求項11および／または12記載のワクチン。

【請求項13】

請求項1(特徴(i))ないし10のうちの1つまたは複数に記載される遺伝子構築物またはポリヌクレオチドを用いて *ex vivo* で、ならびに請求項1(特徴(ii))および請求項11ないし12のうちの1つまたは複数に記載の遺伝子を用いて遺伝子移入を施されたヒト抗原提示細胞(APC)。

【請求項14】

物理的形質導入、特に電気穿孔、化学的形質導入またはウイルス形質導入によりチャージされた請求項13記載のヒト細胞。

【請求項15】

自系または同種異系細胞である請求項13および／または14記載のヒト細胞。

【請求項16】

腫瘍細胞、特に癌細胞、好ましくは肝細胞癌細胞、肉腫細胞または造血系由来の腫瘍である請求項13ないし15のうちの1つまたは複数に記載のヒト細胞。

【請求項17】

腫瘍性、感染性および／または免疫疾患に対する治療、予防、防御的治療および／または予防免疫接種のための請求項13ないし16のうちの1つまたは複数に記載のヒト細胞。

【請求項18】

IRFファミリーの前記メンバーの活性レベルは、インターフェロン- γ により誘起されるIRF-1のレベルより高い請求項13ないし17のうちの1つまたは複数に記載のヒト細胞。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/02036
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 C07K14/72 A61K39/00 A61K48/00 C12N15/62		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
Biosis, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YIM J H ET AL: "IFN regulatory factor-1 gene transfer into an aggressive, nonimmunogenic sarcoma suppresses the malignant phenotype and enhances immunogenicity in syngeneic mice." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) UNITED STATES 1 FEB 1997, vol. 158, no. 3, 1 February 1997 (1997-02-01), pages 1284-1292, XP001079506 ISSN: 0022-1767 figures 4-7; table 2 --- -/--	1-25
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in 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 document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims) 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 *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
31 July 2002		28/08/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2940, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lanzrein, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/02036

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KROGER A (REPRINT) ET AL: "Interferon regulatory factor -1, a potential target for tumor therapy" EUROPEAN CYTOKINE NETWORK, (SEP 1998) VOL. 9, NO. 3, PP. 385-385. PUBLISHER: JOHN LIBBEY EUROTEXT LTD, 127 AVE DE LA REPUBLIQUE, 92120 MONTRouGE, FRANCE. ISSN: 1148-5493., XP001084677 NATL RES INST BIOTECHNOL, GBF, DEPT GENE REGULAT & DIFFERENTIAT, D-38124 BRAUNSCHWEIG, GERMANY the whole document	1-25
X	WO 94 06818 A (TANIGUCHI TADATSUGU ;HARADA HISASHI (JP); TANAKA NOBUYUKI (JP); PA) 31 March 1994 (1994-03-31) page 40, line 3-9; claims 21-24; example 10; table 3	1-25
X	TANAKA NOBUYUKI ET AL: "The interferon regulatory factors and oncogenesis." SEMINARS IN CANCER BIOLOGY, vol. 10, no. 2, April 2000 (2000-04), pages 73-81, XP002208226 ISSN: 1044-579X page 75, right-hand column, last paragraph -page 76, left-hand column, last paragraph	1-25
X	KIRCHHOFF S ET AL: "Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) mediates cell growth inhibition by transactivation of downstream target genes" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 21, no. 12, 1993, pages 2881-2889, XP002121655 ISSN: 0305-1048 page 2884, paragraph 2 -page 2886, paragraph 1; figures 2,3	1-25
A	EP 1 046 710 A (BIOTECHNOLOGISCHE GES) 25 October 2000 (2000-10-25) figure 5	4,5,15, 16
P,X	KROEGER ANDREA ET AL: "Growth suppression of the hepatocellular carcinoma cell line Hepai-6 by an activatable interferon regulatory factor-1 in mice." CANCER RESEARCH, vol. 61, no. 6, 15 March 2001 (2001-03-15), pages 2609-2617, XP001080034 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 02/02036

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9406818	A	31-03-1994	AU 682321 B2	02-10-1997
			AU 5141793 A	12-04-1994
			CA 2145412 A1	31-03-1994
			CN 1098140 A , B	01-02-1995
			EP 0662976 A1	19-07-1995
			HU 71768 A2	29-01-1996
			JP 8501691 T	27-02-1996
			MX 9305855 A1	31-01-1995
			NZ 256623 A	24-04-1997
			WO 9406818 A1	31-03-1994
			US 5652095 A	29-07-1997
			US 5807836 A	15-09-1998
			ZA 9307083 A	26-06-1995
EP 1046710	A	25-10-2000	EP 1046710 A1	25-10-2000
			WO 0065074 A1	02-11-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/002	A 6 1 K 39/002	4 C 0 8 7
A 6 1 K 39/02	A 6 1 K 39/02	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/12	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/04	A 6 1 P 37/04	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/705	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 5/00	B
	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ガイスラー, ミヒャエル

ドイツ連邦共和国 D-3 8 1 2 4 ブラウンシュバイグ マッセルオーダー ベッグ 1

(72)発明者 ハウザー, ハンスヨルグ

ドイツ連邦共和国 D-3 8 1 2 4 ブラウンシュバイグ マッセルオーダー ベッグ 1

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA63 BA80 CA04 DA03 EA04 FA02 GA11 HA01

4B065 AA93X AA93Y AB01 BA01 CA24 CA44

4C084 AA02 AA07 AA13 BA03 BA44 DA27 NA14 ZB091 ZB092 ZB261

ZB262 ZB321 ZB322

4C085 AA03 BA02 BA07 BA49 BA51 BB01 CC03 CC07 CC08

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB09 ZB26 ZB32

4C087 AA01 AA02 BB63 BB65 BC83 CA12 NA13

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 DA50 EA20 FA72 FA74