

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6576326号
(P6576326)

(45) 発行日 令和1年9月18日 (2019.9.18)

(24) 登録日 令和1年8月30日 (2019.8.30)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 7/01 (2006.01)

C 1 2 N 7/01 Z N A

C 1 2 N 15/34 (2006.01)

C 1 2 N 15/34

A 6 1 K 35/761 (2015.01)

A 6 1 K 35/761

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02 (2006.01)

A 6 1 P 35/02

請求項の数 15 (全 53 頁)

(21) 出願番号 特願2016-503154 (P2016-503154)
 (86) (22) 出願日 平成26年3月14日 (2014.3.14)
 (65) 公表番号 特表2016-516407 (P2016-516407A)
 (43) 公表日 平成28年6月9日 (2016.6.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/029587
 (87) 国際公開番号 W02014/153204
 (87) 国際公開日 平成26年9月25日 (2014.9.25)
 審査請求日 平成29年1月26日 (2017.1.26)
 (31) 優先権主張番号 61/782, 932
 (32) 優先日 平成25年3月14日 (2013.3.14)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 513037649
 ソーク インスティテュート フォー バ
 イオロジカル スタディーズ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 920
 37, ラ ホヤ, ノース トレイ パ
 インズ ロード 10010
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍溶解性アデノウイルス組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組換えアデノウイルスであって、前記組換えアデノウイルスは、

(i) R b 結合部位中に欠失または置換を含む E 1 A ポリペプチドをコードする遺伝子；

(i i) E 4 o r f 6 / 7 エクソンの一方または両方の欠失；および

(i i i) アデノウイルス E 1 A および E 4 プロモーター

を含み、

ここで、前記組換えアデノウイルスは、R b 欠損細胞内で選択的に複製する、組換えアデノウイルス。

【請求項 2】

前記 E 1 A ポリペプチドが、2つの R b 結合部位を含み、かつ前記 E 1 A ポリペプチドが、両方の R b 結合部位中に欠失または置換を含む、請求項 1 に記載の組換えアデノウイルス。

【請求項 3】

前記 E 1 A ポリペプチドが L X C X E モチーフの欠失を含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の組換えアデノウイルス。

【請求項 4】

前記 E 1 A ポリペプチドが、アミノ酸残基 122 ~ 126 の欠失、アミノ酸残基 2 ~ 11 の欠失、またはその両方を含む、請求項 3 に記載の組換えアデノウイルス。

【請求項 5】

10

20

前記 E 1 A ポリペプチドが、残基 Y 4 7 における置換、残基 C 1 2 4 における置換、またはその両方を含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の組換えアデノウイルス。

【請求項 6】

前記残基 Y 4 7 における置換は Y 4 7 H 置換であるか、または前記残基 C 1 2 4 における置換は C 1 2 4 G 置換であるか、またはその両方である、請求項 5 に記載の組換えアデノウイルス。

【請求項 7】

2 つの E 4 o r f 6 / 7 エクソンの一方のみの欠失を含む、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の組換えアデノウイルス。

【請求項 8】

C 末端領域中に欠失を含む E 4 o r f 1 ポリペプチドをコードする遺伝子；あるいは E 4 o r f 1 遺伝子のすべての欠失をさらに含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の組換えアデノウイルス。

【請求項 9】

前記 E 4 o r f 1 ポリペプチドが、C 末端領域中に欠失を含む、請求項 8 に記載の組換えアデノウイルス。

【請求項 10】

前記 E 4 o r f 1 ポリペプチドが、C 末端領域中の最後の 4 アミノ酸の欠失を含む、請求項 9 に記載の組換えアデノウイルス。

【請求項 11】

前記 E 4 o r f 1 ポリペプチドが、残基 1 2 5 ~ 1 2 8 の欠失を含む、請求項 9 に記載の組換えアデノウイルス。

【請求項 12】

請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の組換えアデノウイルスおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 13】

対象におけるがんを処置するための組成物であって、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の組換えアデノウイルスを含む、組成物。

【請求項 14】

前記組成物が、静脈内、脈管内、クモ膜下、筋肉内、皮下、腹腔内、または経口的に投与されることを特徴とする、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記がんが、肺がん、前立腺がん、結腸直腸がん、乳がん、甲状腺がん、腎がん、肝がん、または白血病である、請求項 13 または請求項 14 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の引用

本願は、2013 年 3 月 14 日に出願した米国出願第 61 / 782 , 932 号に対する優先権を主張する。米国出願第 61 / 782 , 932 号は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

【0002】

連邦政府支援の研究の下での権利に関する陳述

本発明は、国立衛生研究所からの認可番号 5 T 3 2 G M 0 0 7 2 4 0 - 3 5 の下での政府の資金提供によって行われた。政府は、本発明におけるある特定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

背景

がんは、毎年 50 万人超の死亡の主原因となる複雑な消耗性疾患である。がんに対するより有効な、選択的な、かつ安全な処置の深刻な必要性がある。この蔓延している生命を

10

20

30

40

50

危うくする疾患のための現存する処置、例えば、化学療法および手術などは、すべての悪性細胞を稀にしか排除せず、治療上の利益より勝り得る有害な副作用を呈することが多い。

現在のがん処置の欠点の多くに対処する潜在性を有する一手法は、腫瘍溶解性アデノウイルス療法である (Pesonen, S.ら、Molecular Pharmaceutics、8巻(1号): 12 ~ 28頁(2010年))。アデノウイルス (Ad) は、自己複製生物マシンである。これは、タンパク質コート内に包み込まれた直鎖状二本鎖36 kb DNAゲノムからなる。アデノウイルスは、再生するための細胞複製マシナリーに侵入し、これに乗っ取り、アセンブルすると、溶解細胞死を誘導して細胞を脱出し、周囲細胞に広がり、侵入する。これらのまったく同じ細胞性制御は、がんにおける突然変異によって標的にされる。この知識は、腫瘍細胞内で特異的に感染および複製し、これらをバーストさせて、可能な耐性を克服しながら遠位転移を捜し出し、破壊することができる数千のウイルス子孫を放出する、誘導ミサイルのように作用する合成ウイルスを創製するのに活用することができる。したがって、腫瘍溶解性ウイルス設計のゴールは、がん細胞内で特異的に複製するが、正常細胞を無傷のままにするウイルスを生成することである。しかし、がん細胞内で選択的に複製するウイルスを設計することにおいて課題が存在している。したがって、がん細胞内で選択的に複製する追加のウイルスの必要性がある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Pesonen, S.ら、Molecular Pharmaceutics、8巻(1号): 12 ~ 28頁(2010年)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

概要

1つまたは複数の改変を含むE1Aポリペプチド、1つまたは複数の改変を含むE4orf6/7ポリペプチド、もしくは1つまたは複数の改変を含むE4orf1ポリペプチド、またはこれらの組合せを含むアデノウイルスが本明細書に提供される。改変アデノウイルスを含む組成物およびキットも提供される。さらに、対象における増殖性障害を処置する方法であって、1つまたは複数の改変を含むE1Aポリペプチド、1つまたは複数の改変を含むE4orf6/7ポリペプチド、もしくは1つまたは複数の改変を含むE4orf1ポリペプチド、またはこれらの組合せを含むアデノウイルスを対象に投与するステップを含む、方法が提供される。

【0006】

1つまたは複数の実施形態の詳細を、添付の図面および以下の記載で示す。他の特徴、目的、および利点は、本記載および図面、ならびに特許請求の範囲から明らかとなるであろう。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

1つまたは複数の改変を含むE1Aポリペプチドを含み、1つまたは複数の改変を含むE4orf6/7ポリペプチドを含む、アデノウイルス。

(項目2)

前記E1Aポリペプチドが、E1AのRb結合部位中に改変を含む、項目1に記載のアデノウイルス。

(項目3)

前記E1Aポリペプチドが、2つのRb結合部位を含み、かつ前記E1Aポリペプチドが、両方のRb結合部位中に改変を含む、項目1に記載のアデノウイルス。

(項目4)

前記E1Aポリペプチドが、前記E1Aポリペプチドのアミノ酸残基120 ~ 130の

1 つまたは複数において改変を含む、項目 1 に記載のアデノウイルス。

(項目 5)

前記 E 1 A ポリペプチドが、前記 E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基 1 2 2 ~ 1 2 6 の 1 つまたは複数において改変を含む、項目 1 に記載のアデノウイルス。

(項目 6)

前記 E 1 A ポリペプチドが、前記 E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基 3 5 ~ 5 5 の 1 つまたは複数において改変を含む、項目 1 から 5 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 7)

前記 E 1 A ポリペプチドが、前記 E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基 3 7 ~ 4 9 の 1 つまたは複数において改変を含む、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

10

(項目 8)

前記 E 1 A ポリペプチドが欠失を含む、項目 1 から 7 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 9)

前記欠失が、前記 E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基 1 2 2 ~ 1 2 6 の欠失である、項目 8 に記載のアデノウイルス。

(項目 10)

前記欠失が、前記 E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基 2 ~ 1 1 の欠失である、項目 8 に記載のアデノウイルス。

(項目 11)

20

前記 E 1 A ポリペプチドが欠失 L X C X E を含む、項目 1 に記載のアデノウイルス。

(項目 12)

前記 E 1 A ポリペプチドが、1 つまたは複数の置換を含む、項目 1 から 1 1 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 13)

前記 E 1 A ポリペプチドが、残基 Y 4 7、残基 C 1 2 4、または残基 Y 4 7 および残基 C 1 2 4 の両方において置換を含む、項目 1 2 に記載のアデノウイルス。

(項目 14)

前記 E 1 A ポリペプチドが置換 Y 4 7 H を含む、項目 1 2 に記載のアデノウイルス。

(項目 15)

30

前記 E 1 A ポリペプチドが置換 C 1 2 4 G を含む、項目 1 2 に記載のアデノウイルス。

(項目 16)

前記 E 1 A ポリペプチドが、置換 Y 4 7 H および C 1 2 4 G を含む、項目 1 2 に記載のアデノウイルス。

(項目 17)

前記 E 1 A ポリペプチドが、アミノ酸残基 2 ~ 1 1 の欠失をさらに含む、項目 1 2 から 1 6 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 18)

前記 E 1 A ポリペプチドが、E 1 A のアミノ酸残基 1 2 2 ~ 1 2 6 の欠失および残基 Y 4 7 における置換を含む、項目 1 に記載のアデノウイルス。

40

(項目 19)

前記 E 1 A ポリペプチドが配列番号 1 を含む、項目 1 から 1 8 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 20)

前記 E 1 A ポリペプチドが配列番号 2 を含む、項目 1 から 1 8 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 21)

前記 E 4 o r f 6 / 7 ポリペプチドが、E 4 o r f 6 / 7 エクソンの一方または両方において改変を含む、項目 1 から 2 0 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 22)

50

前記 E 4 o r f 6 / 7 ポリペプチドが、E 4 o r f 6 / 7 エクソンの一方または両方の欠失を含む、項目 1 から 2 0 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 2 3)

前記 E 4 o r f 6 / 7 ポリペプチドが配列番号 3 を含む、項目 1 から 2 2 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 2 4)

前記 E 4 o r f 6 / 7 ポリペプチドが配列番号 4 を含む、項目 1 から 2 2 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 2 5)

1 つまたは複数の改変を含む E 4 o r f 1 ポリペプチドをさらに含む、項目 1 から 2 4 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

10

(項目 2 6)

前記 E 4 o r f 1 ポリペプチドが、1 つまたは複数の欠失を含む、項目 2 5 に記載のアデノウイルス。

(項目 2 7)

前記 E 4 o r f 1 ポリペプチドが、E 4 o r f 1 の C 末端領域中に欠失を含む、項目 2 5 に記載のアデノウイルス。

(項目 2 8)

前記 E 4 o r f 1 ポリペプチドが、前記 E 4 o r f 1 ポリペプチドの残基 1 2 5 ~ 1 2 8 の欠失を含む、項目 2 5 に記載のアデノウイルス。

20

(項目 2 9)

前記 E 4 o r f 1 ポリペプチドが配列番号 5 を含む、項目 2 5 から 2 8 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 3 0)

1 つまたは複数の改変を含む E 1 A ポリペプチドを含み、1 つまたは複数の改変を含む E 4 o r f 1 ポリペプチドを含むアデノウイルス。

(項目 3 1)

前記 E 4 o r f 1 ポリペプチドが、1 つまたは複数の欠失を含む、項目 3 0 に記載のアデノウイルス。

(項目 3 2)

前記 E 4 o r f 1 ポリペプチドが、E 4 o r f 1 の C 末端領域中に欠失を含む、項目 3 1 に記載のアデノウイルス。

30

(項目 3 3)

前記 E 4 o r f 1 ポリペプチドが、前記 E 4 o r f 1 ポリペプチドの残基 1 2 5 ~ 1 2 8 の欠失を含む、項目 3 1 に記載のアデノウイルス。

(項目 3 4)

前記 E 1 A ポリペプチドが、E 1 A の R b 結合部位中に改変を含む、項目 3 0 から 3 3 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 3 5)

前記 E 1 A ポリペプチドが、2 つの R b 結合部位を含み、かつ前記 E 1 A ポリペプチドが、両方の R b 結合部位中に改変を含む、項目 3 4 に記載のアデノウイルス。

40

(項目 3 6)

前記 E 1 A ポリペプチドが、前記 E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基 1 2 0 ~ 1 3 0 の 1 つまたは複数において改変を含む、項目 3 0 から 3 3 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 3 7)

前記 E 1 A ポリペプチドが、前記 E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基 1 2 2 ~ 1 2 6 の 1 つまたは複数において改変を含む、項目 3 0 から 3 3 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 3 8)

50

前記 E 1 A ポリペプチドが、前記 E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基 35 ~ 55 の 1 つまたは複数において改変を含む、項目 30 から 33 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 39)

前記 E 1 A ポリペプチドが、前記 E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基 37 ~ 49 の 1 つまたは複数において改変を含む、項目 30 から 33 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 40)

前記 E 1 A ポリペプチドが欠失を含む、項目 30 から 33 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

10

(項目 41)

前記欠失が、前記 E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基 122 ~ 126 の欠失である、項目 40 に記載のアデノウイルス。

(項目 42)

前記欠失が、前記 E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基 2 ~ 11 の欠失である、項目 40 に記載のアデノウイルス。

(項目 43)

前記 E 1 A ポリペプチドが、欠失 L X C X E を含む、項目 30 から 33 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 44)

20

前記 E 1 A ポリペプチドが、1 つまたは複数の置換を含む、項目 30 から 33 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 45)

前記 E 1 A ポリペプチドが、残基 Y 47、残基 C 124、または Y 47 および C 124 の両方において置換を含む、項目 44 に記載のアデノウイルス。

(項目 46)

前記 E 1 A ポリペプチドが置換 Y 47 H を含む、項目 44 に記載のアデノウイルス。

(項目 47)

前記 E 1 A ポリペプチドが置換 C 124 G を含む、項目 44 に記載のアデノウイルス。

(項目 48)

30

前記 E 1 A ポリペプチドが、置換 Y 47 H および C 124 G を含む、項目 44 に記載のアデノウイルス。

(項目 49)

前記 E 1 A ポリペプチドが、アミノ酸残基 2 ~ 11 の欠失をさらに含む、項目 44 から 48 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 50)

前記 E 1 A ポリペプチドが、E 1 A のアミノ酸残基 122 ~ 126 の欠失および残基 Y 47 における置換を含む、項目 30 から 33 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 51)

前記 E 1 A ポリペプチドが配列番号 1 を含む、項目 30 から 50 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

40

(項目 52)

前記 E 1 A ポリペプチドが配列番号 2 を含む、項目 30 から 50 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 53)

R b 欠損細胞内で選択的に複製する、項目 1 から 52 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

(項目 54)

項目 1 から 53 のいずれか一項に記載のアデノウイルスおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

50

(項目 5 5)項目 5 4 に記載の医薬組成物および使用のための指示書を含むキット。(項目 5 6)1 種または複数の追加の治療剤をさらに含む、項目 5 5 に記載のキット。(項目 5 7)前記治療剤が化学療法剤である、項目 5 6 に記載のキット。(項目 5 8)対象における増殖性障害を処置する方法であって、項目 1 から 5 3 のいずれか一項に記載のアデノウイルスまたは項目 5 4 に記載の医薬組成物を前記対象に投与するステップを含む、方法。(項目 5 9)前記アデノウイルスまたは医薬組成物が、静脈内、脈管内、クモ膜下、筋肉内、皮下、腹腔内、または経口的に投与される、項目 5 8 に記載の方法。(項目 6 0)1 種または複数の追加の治療剤を前記対象に投与するステップをさらに含む、項目 5 8 または 5 9 に記載の方法。(項目 6 1)前記治療剤が化学療法剤である、項目 6 0 に記載の方法。(項目 6 2)前記増殖性障害が、肺がん、前立腺がん、結腸直腸がん、乳がん、甲状腺がん、腎がん、肝がん、および白血病からなる群から選択される、項目 5 8 から 6 1 のいずれか一項に記載の方法。(項目 6 3)およそ $10^3 \sim 10^{12}$ プラーク形成単位の前記アデノウイルスが前記対象に投与される、項目 5 8 から 6 2 のいずれか一項に記載の方法。(項目 6 4)前記増殖性障害が転移性である、項目 5 8 から 6 3 のいずれか一項に記載の方法。【図面の簡単な説明】【 0 0 0 7 】【図 1】図 1 は、腫瘍溶解性ウイルスがん療法の一般的な原理を示す概略図である。【 0 0 0 8 】【図 2】図 2 は、アデノウイルス (A d) の構造的特徴、ならびにボックス内の転写単位、および標識遺伝子を伴ったアデノウイルスゲノムのマップを示す概略図である。【 0 0 0 9 】【図 3】図 3 は、野生型 A d 5 および「 R B / p 1 6 / E 2 F 経路」選択的ウイルスに感染した、感染した初代小気道上皮細胞および腫瘍細胞に由来する細胞可溶化物の免疫プロットのイメージである。腫瘍および初代ヒト細胞を、野生型ウイルス、 O N Y X - 8 3 8 (E 1 A L X C X E)、または O N Y X - 4 1 1 に感染させ、感染後の様々な時点で回収した。溶解産物を、ウイルス複製の尺度であるウイルスカプシドタンパク質 (抗 a d 5、3 つのバンドは、ヘキソン、ペントン、および繊維を含む) の発現について分析した。 O N Y X - 8 3 8 は、腫瘍および初代肺上皮細胞内で無差別に複製する。 E 1 A L X C X E をアデノウイルス E 1 A、E 1 B、および E 4 領域 (図 2 に示した) の細胞 E 2 F 制御と組み合わせる O N Y X - 4 1 1 は、正常細胞に対して腫瘍細胞内で選択的な複製を実証する (Johnson ら、Cancer Cell、1 巻 (4 号) : 3 2 5 ~ 3 3 7 頁 (2 0 0 2 年))。しかし、E 2 F プロモーターは、組換えをもたらし、また、複製を腫瘍細胞内の野生型ウイルスレベルに制限する。【 0 0 1 0 】【図 4】図 4 A および 4 B は、E 2 F を活性化し、制御されていない複製を誘発する R b / p 1 6 腫瘍抑制因子経路を活性化することに収束させる腫瘍突然変異およびアデノウイルス初期タンパク質を示す概略図である。図 4 A は、R b / p 1 6 経路腫瘍抑制因子機能

10

20

30

40

50

の喪失を生じさせる一般的な突然変異を示す。図4Bは、RbおよびE2Fを直接的に調節解除して細胞をS期へと推進するアデノウイルスタンパク質を示す。

【0011】

【図5】図5は、Rb-E2F細胞周期チェックポイントを調節解除するタンパク質をコードする複数のアデノウイルスを示す概略図である。アデノウイルスE1Aは、保存LXCXEモチーフによって細胞Rbに結合し、E2Fを放出してウイルスおよび細胞のDNA複製に要求される細胞遺伝子の転写を活性化する。E1Aは、アデノウイルスがRbチェックポイントを不活化し、E2F標的遺伝子を活性化する非常に重要な機構であると考えられている。さらに、別のアデノウイルスタンパク質、E4orf6/7は、E2F-DP1を安定化させ、細胞およびウイルスのE2プロモーターにおいて二量体化して転写活性化を増強する (Schaley, J.ら、Protein J. Virol., 74巻(5号): 2084 ~ 2093頁(2000年); Cressら、Genes & Development、7巻(10号): 1850 ~ 61頁(1993年))。

10

【0012】

【図6】図6は、本研究における最初の一連の突然変異アデノウイルスの構築を示す概略図である。野生型Ad5ゲノムを転写単位によってモジュールに分割し、モジュールのそれぞれを、異なるプラスミド中に入れた。突然変異をモジュールプラスミドに対して行い、PCRベース手法(AdSLiCR)を使用して、モジュールを再アセンブルして完全ゲノムにし、組換えアデノウイルスの産生を可能にした。

20

【0013】

【図7】図7Aおよび7Bは、E4orf6/7欠失を示す概略図である。2つのエクソンは、E4orf6/7をコードする。E4orf6およびE4orf6/7は、同じ開始コドンを利用し、58個のアミノ酸N末端残基を共有する。E4orf6/7転写物は、E4orf6終止コドンの直後でスプライスする。終止コドンを含むE4orf6/7の第2のエクソン全体を欠失させた。図7Aは、野生型E4領域を示す。図7Bは、得られたE4 E4orf6/7領域を示す。

【0014】

【図8】図8Aおよび8Bは、突然変異体Ad感染細胞からのアデノウイルス初期E1Aの発現を示す細胞可溶化物の免疫プロットの画像である。細胞を、モック(mock)(E1)、Ad-102(AdSyn-CO102とも本明細書で呼ばれる)(野生型)、Ad-181(AdSyn-CO181とも本明細書で呼ばれる)(E1A LXCXE/E4orf6/7)、Ad-189(AdSyn-CO-189とも本明細書で呼ばれる)(E1A LXCXE)、またはONYX-838(E1A CR2)に感染させた。ONYX-838は、E1AのCR2ドメイン内にあるLXCXEも欠く。図8Aについては、静止状態ヒト初代小気道上皮細胞(SAEC)を、MOI10で感染させた。溶解産物をE1A発現について分析した。Ad-102(AdSyn-CO102)は、感染中のより遅い時間においてE1Aレベルの予期される低下を示す。同様に、Ad-189(AdSyn-CO189)およびONYX-838は、感染中のより遅い時間においてE1Aの低下を示すが、より早い時点でより強い発現を有する。Ad-181(AdSyn-CO181)は、感染全体にわたってE1Aのより強い、かつ継続した発現を示し、それは、アデノウイルスライフサイクルを通じて進行することができないことを示す。図8Bについては、コンフルエントな肺腺癌細胞(A549)をMOI30で感染させた。溶解産物をE1A発現について分析した。すべての感染は、感染中のより遅い時間においてE1Aレベルの予期される低下を示し、一般的なアデノウイルスライフサイクル進行を示す。

30

40

【0015】

【図9】図9Aおよび9Bは、感染した初代細胞および腫瘍細胞内の細胞サイクリンの発現およびアデノウイルス後期タンパク質発現を示す細胞可溶化物の免疫プロットの画像である。細胞を、モック(E1)、Ad-102(AdSyn-CO102)(野生型)、Ad-181(AdSyn-CO181)(E1A LXCXE/E4orf6/

50

7)、Ad-189(AdSyn-CO189)(E1A LXCXE)、またはONYX-838(E1A CR2)に感染させた。図9Aについては、静止状態ヒト初代小気道上皮細胞(SAEC)を、MOI10で感染させた。野生型およびE1A突然変異単独を有するウイルスと対照的に、Ad-181(AdSyn-CO181)は、E2F依存性細胞周期標的、S期サイクリンAおよびサイクリンBを活性化することができない。さらに、E4orf6/7突然変異を有するAd-181(AdSyn-CO181)およびAd-210(AdSyn-CO210)は、後期タンパク質発現および複製について欠損している。これらの欠損の両方は、Ad-210(AdSyn-CO210)では、より少ない程度に明らかである。図9Bについては、ヒト肺腺癌細胞(A549)を、MOI30で感染させた。感染した初代細胞と対照的に、後期構造タンパク質の発現において明らかな欠損はまったくなく、サイクリンAおよびサイクリンBは、すべての感染させたA549試料中で存在したままである。

10

【0016】

【図10】図10Aおよび10Bは、感染したSAECおよびA549における、FACSによってPIで定量化したDNA複製を示すFACSヒストグラムである。細胞を、モック(E1)、Ad-102(AdSyn-CO102)(野生型)、Ad-181(AdSyn-CO181)(E1A LXCXE/E4orf6/7)、Ad-189(AdSyn-CO189)(E1A LXCXE)、またはAd-210(AdSyn-CO210)(E4orf6/7)に感染させ、感染させて48時間後に収集した。非感染細胞のDNA含量は、バックグラウンドプロファイル中に示されている。Y軸は、細胞の相対存在量であり、X軸は、細胞内のPIからの蛍光であり、これは、DNAの量に比例する。図10Aについては、静止状態SAECを、MOI10で感染させた。Ad-181(AdSyn-CO181)感染により、Ad-102(AdSyn-CO102)と比べてSAEC内の強いDNA複製欠損が明らかになり、これは、ウイルス複製の低下に関係している。中程度の欠損が、この時点でAd-210(AdSyn-CO210)感染SAECにおいても明らかである。図10Bについては、ヒト肺腺癌細胞(A549)を、MOI30で感染させた。DNA複製欠損は、いずれの突然変異ウイルス感染についても明らかでない。

20

【0017】

【図11】図11Aおよび11Bは、感染したSAECおよびA549からのアデノウイルスバーストを示すグラフである。細胞を、モック(E1)、Ad-102(AdSyn-CO102)(野生型)、Ad-181(AdSyn-CO181)(E1A LXCXE/E4orf6/7)、Ad-189(AdSyn-CO189)(E1A LXCXE)、Ad-210(AdSyn-CO210)(E4orf6/7)、またはONYX-838(E1A CR2)に感染させ、培地を、感染させて48および72時間後に収集した。培地中の感染性ウイルス粒子をELISAによって定量化した。図11Aについては、静止状態SAECを、MOI10で感染させた。Ad-181(AdSyn-CO181)およびAd-210(AdSyn-CO210)感染はともに、Ad-102(AdSyn-CO102)と比べてSAEC内の強い複製欠損を明らかにする。図11Bについては、A549細胞を、MOI30で感染させた。これらの時点におけるAd-210(AdSyn-CO210)を例外として、ウイルス複製における欠損はまったくない。

30

40

【0018】

【図12】図12Aおよび12Bは、感染させて7日後の感染したSAECおよびA549の細胞生存率を示すグラフである。細胞を、モック(E1)、Ad-102(AdSyn-CO102)(野生型)、Ad-181(AdSyn-CO181)(E1A LXCXE/E4orf6/7)、Ad-189(AdSyn-CO189)(E1A LXCXE)、Ad-210(AdSyn-CO210)(E4orf6/7)、またはONYX-838(E1A CR2)の連続希釈液に感染させ、細胞の代謝活性を、WST-1アッセイ(Roche、Basel、スイス)によって定量化した。図1

50

2 Aに示したように、Ad - 102 (Ad Syn - CO102)と比較して、Ad - 181 (Ad Syn - CO181)は、SAEC内の細胞殺傷能力の低下を提示する。図12 Bに示したように、本発明者らがデータを有するウイルスのうち、野生型と比べて、突然変異ウイルスによる細胞殺傷の欠損はまったくない。

【0019】

【図13】図13 Aは、細胞可溶化物の免疫プロットの画像であり、図13 Bおよび13 Cは、Ad - 181 (Ad Syn - CO181)が正常ヒト星状細胞 (NHA) 内で弱毒化された感染を有することを示すグラフである。図13 Aについては、MOI 10 感染NHAを免疫プロットに付して、アデノウイルス後期構造タンパク質発現および細胞サイクリン誘導を検出した。Ad - 181 (Ad Syn - CO181)は、サイクリンAを誘導せず、Ad - 102 (Ad Syn - CO102)と比べて後期ウイルスタンパク質発現の遅延および低下を実証し、これらのことは、複製効率を示す。図13 Bについては、NHAを、ウイルスのパネルによって感染させ、培地中の感染性粒子の数を、感染させて48および72時間後に定量化した。Ad - 181 (Ad Syn - CO181)およびAd - 189 (Ad Syn - CO189)は、Ad - 102 (Ad Syn - CO102)と比べてNHA内の複製欠損を実証する。図13 Cについては、DNA複製を、PI FACSによって、感染させて48時間後にMOI 10 感染NHA内で定量化した。非感染細胞のDNA含量は、ヒストグラムのバックグラウンドプロファイル中に示されている。Y軸は、細胞の相対存在量であり、X軸は、細胞内のPIからの蛍光であり、これは、核酸の量に比例する。Ad - 181 (Ad Syn - CO181)は、Ad - 102 (Ad Syn - CO102)と比べてDNA複製の誘導の縮小を実証し、これは、ウイルス複製の低下に関係する。

10

20

【0020】

【図14】図14 Aは、感染したグリア芽細胞腫U87細胞からの細胞可溶化物の免疫プロットの画像であり、図14 Bおよび14 Cは、突然変異Adが、グリア芽細胞腫U87細胞内で複製欠損をまったく有さないことを示すグラフである。図14 Aについては、MOI 20 感染U87細胞を免疫プロットに付して、アデノウイルス後期構造タンパク質発現および細胞サイクリン誘導を検出した。B) U87を、ウイルスのパネルによって感染させ、培地中の感染性粒子の数を、感染させて48および72時間後に定量化した。C) DNA複製を、PI FACSによって、感染させて48時間後にMOI 20 感染U87内で定量化した。非感染細胞のDNA含量は、ヒストグラムのバックグラウンドプロファイル中に示されている。Y軸は、細胞の相対存在量であり、X軸は、細胞内のPIからの蛍光であり、これは、核酸の量に比例する。

30

【0021】

【図15】図15 Aは、感染したグリア芽細胞腫U118細胞からの細胞可溶化物の免疫プロットの画像であり、図15 Bおよび15 Cは、突然変異Adが、グリア芽細胞腫U118細胞内で複製欠損をまったく有さないことを示すグラフである。図15 Aについては、MOI 20 感染U118細胞を免疫プロットに付して、アデノウイルス後期構造タンパク質発現および細胞サイクリン誘導を検出した。B) U87を、ウイルスのパネルによって感染させ、培地中の感染性粒子の数を、感染させて48および72時間後に定量化した。C) DNA複製を、PI FACSによって、感染させて48時間後にMOI 20 感染U118内で定量化した。非感染細胞のDNA含量は、ヒストグラムのバックグラウンドプロファイル中に示されている。Y軸は、細胞の相対存在量であり、X軸は、細胞内のPIからの蛍光であり、これは、核酸の量に比例する。

40

【0022】

【図16】図16 Aは、ゲルの画像であり、図16 Bおよび16 Cは、Ad - 181 (Ad Syn - CO181)が、ヒト線維芽細胞 (IMR90) 内で中程度の複製欠損を有することを示すグラフである。図16 Aについては、MOI 10 感染線維芽細胞を免疫プロットに付して、後期構造タンパク質発現を検出した。Ad - 181 (Ad Syn - CO181)は、Ad - 102 (Ad Syn - CO102)と比べて後期ウイルスタンパク質発

50

現の遅延および低下を実証し、これらのことは、複製効率を示す。図 16 B については、線維芽細胞を、ウイルスのパネルによって感染させ、培地中の感染性粒子の数を、感染させて 48 および 72 時間後に定量化した。これらの時点におけるこのアッセイでは、突然変異アデノウイルスの複製能力において明確な差異はまったくなかった。図 16 C については、DNA 複製を、PI FACS によって、感染させて 48 時間後に MOI 20 感染線維芽細胞内で定量化した。非感染細胞の DNA 含量は、ヒストグラムのバックグラウンドプロファイル中に示されている。Y 軸は、細胞の相対存在量であり、X 軸は、細胞内の PI からの蛍光であり、これは、核酸の量に比例する。Ad-181 (AdSyn-CO181) は、Ad-102 (AdSyn-CO102) と比べて DNA 複製の誘導の縮小を実証し、これは、ウイルス複製の低下に関係する。

10

【0023】

【図 17】図 17 は、感染させて 10 日後の感染した初代正常ヒト星状細胞細胞 (NHA) の細胞生存率を示すグラフである。細胞を、wt および突然変異ウイルスの連続希釈液に感染させた (以下の表 1 を参照)。代謝活性を、WST-1 アッセイ (Roche、Basel、スイス) によって定量化した。細胞 1 個当たり 3 個および 10 個の感染性粒子での細胞の生存率は、より少ない殺傷およびより多い殺傷の 2 つの群へのウイルスによる細胞殺傷の分離を示す。より少ない殺傷を呈するウイルスの群は、Rb 結合突然変異および E4orf6/7 の欠失を有する E1A の両方を持つ。より多い殺傷を呈するウイルスの群は、野生型 E1 または野生型 E4 を有する。

20

【0024】

【図 18】図 18 は、感染させて 9 日後の感染した静止状態 SAEC-hTERT 細胞の細胞生存率を示すグラフである。細胞を、wt および突然変異ウイルスの連続希釈液に感染させた (以下の表 1 を参照)。代謝活性を、WST-1 アッセイ (Roche、Basel、スイス) によって定量化した。細胞 1 個当たり 3 個および 10 個の感染性粒子での細胞の生存率は、より少ない殺傷およびより多い殺傷の 2 つの群へのウイルスによる細胞殺傷の分離を示す。より少ない殺傷を呈するウイルスの群は、Rb 結合突然変異および E4orf6/7 の欠失を有する E1A の両方を持つ。より多い殺傷を呈するウイルスの群は、野生型 E1 または野生型 E4 を有する。

【0025】

【図 19】図 19 は、感染させて 9 日後の感染した増殖中の SAEC-hTERT 細胞の細胞生存率を示すグラフである。細胞を、wt および突然変異ウイルスの連続希釈液に感染させた (以下の表 1 を参照)。代謝活性を、WST-1 アッセイ (Roche、Basel、スイス) によって定量化した。細胞 1 個当たり 3 個および 10 個の感染性粒子での細胞の生存率は、より少ない殺傷およびより多い殺傷の 2 つの群へのウイルスによる細胞殺傷の分離を示す。より少ない殺傷を呈するウイルスの群は、Rb 結合突然変異および E4orf6/7 の欠失を有する E1A の両方を持つ。より多い殺傷を呈するウイルスの群は、野生型 E1 または野生型 E4 を有する。

30

【0026】

【図 20】図 20 は、感染させて 7 日後の感染した A549 細胞の細胞生存率を示すグラフである。細胞を、wt および突然変異ウイルスの連続希釈液に感染させた (以下の表 1 を参照)。代謝活性を、WST-1 アッセイ (Roche、Basel、スイス) によって定量化した。

40

【0027】

【図 21】図 21 は、感染させて 7 日後の感染したヒト乳がん細胞 (MDA-MB231) の細胞生存率を示すグラフである。細胞を、wt および突然変異ウイルスの連続希釈液に感染させた (以下の表 1 を参照)。代謝活性を、WST-1 アッセイ (Roche、Basel、スイス) によって定量化した。

【0028】

【図 22】図 22 は、感染させて 7 日後の感染したグリア芽細胞腫細胞 (U87) の細胞生存率を示すグラフである。細胞を、wt および突然変異ウイルスの連続希釈液に感染さ

50

せた（以下の表1を参照）。代謝活性を、WST-1アッセイ（Roche、Basel、スイス）によって定量化した。

【0029】

【図23】図23は、図17～22に示した、感染した初代NHA、SAEC-hTERT（静止状態）、SAEC-hTERT（増殖中）、A549、MDA-MB231、およびU87細胞についての細胞生存率アッセイの定量化を示す表である。

【0030】

【図24】図24は、AdSyn-CO182およびAdSyn-CO183に感染した293細胞のCPE顕微鏡イメージである。AdSyn-CO182およびAdSyn-CO183はともに、E1A LXCXEおよびE4orf6/7突然変異を持ち、E3-12.5K ORFは、蛍光タンパク質mCherryをコードする配列によって置き換えられている。AdSyn-CO183では、E3-12.5K ORFは、アポトーシスのシグナルを送る切断不可能なFasLをコードする配列によって置き換えられている。

【発明を実施するための形態】

【0031】

詳細な説明

Rb/p16/E2F経路は、ほとんどあらゆる形態のヒトがんにおいて突然変異によって、または他の機構、例えば、ウイルス機構を通じて不活化されている。例として、経路は、Rb中の突然変異、p107突然変異、p130突然変異、p16突然変異/エビジェネティックなサイレンシング、サイクリン突然変異および増幅、CDK突然変異および増幅、サイクリン依存性キナーゼ（cyclin dependent kinase）阻害剤をダウンレギュレートする突然変異、E2F転写因子をアップレギュレートする突然変異、ならびに増殖因子受容体経路突然変異（EGFR、RTK、RAS、PI-3K、PTEN、RAF、MYC）を通じて不活化され得る。しかし、最も受け入れられている化学療法は、増殖毒であり、これは、E2F転写標的を阻害するが、正常細胞にも有毒であり、壊滅的な医原性合併症を有することが多い。腫瘍突然変異および小さなDNAウイルスのタンパク質は、Rbを不活化することに収束させる。アデノウイルスE1Aを用いた試験は、RbおよびE2Fへの影響力の大きい洞察をもたらした。腫瘍溶解性アデノウイルスの元の概念は、E1A LXCXE変異体であったが、作用物質は、少なくとも初代細胞培養において選択的でない。E1Aは、保存された（CR2）LXCXEモチーフを介してRbに結合し、これを不活化し（Whyteら、Nature、334巻（6178号）：124～9頁（1988年））、それにより、E2F依存性転写が活性化される（Kovesdiら、PNAS、84巻（8号）：2180～4頁（1987年））。これは、E1AがE2Fを活性化し、細胞およびウイルスゲノム複製に要求される細胞およびウイルス遺伝子の発現を推進する機構であると考えられている。したがって、アデノウイルスE1A CR2突然変異体は、Rb/p16腫瘍抑制因子経路内に突然変異を有していた腫瘍細胞内で選択的に複製するはずであることが提案された（Heiseら、Nat. Med.、6巻（10号）：1134～9頁（2000年））。しかし、意外にも、E1A CR2ウイルス突然変異体は、E2Fを依然として活性化し、初代ヒト上皮細胞内で複製する（Johnsonら、Cancer Cell、1巻（4号）：325～337頁（2002年））。本明細書に記載するように、アデノウイルスは、E1Aとは独立にE2Fを活性化する追加のウイルスタンパク質、E4orf6/7をコードすることが発見された。以前の試験では、E4orf6/7は、E2FおよびDP1に結合してウイルスE2プロモーターの転写を活性化することが示されていた（HelinおよびHarlow、J. Virol.、68巻（8号）：5027～5035頁（1994年））。E1A CR2突然変異体がE2Fを依然として活性化し、初代細胞内で複製することを考慮して、E4orf6/7は、E1Aとは独立に、E2F依存性細胞標的を活性化してS期エントリーおよびウイルス複製を推進すると仮定された。したがって、正常細胞に対して腫瘍内で選択的に複製するウイルスを設計するために、E1AおよびE4orf

10

20

30

40

50

6 / 7 の両方において突然変異を有するアデノウイルスを設計した。したがって、以下の実施例に記載するように、E 1 A C R 2 および / または E 4 o r f 6 / 7 複合突然変異 (compound mutation) を有する新規ウイルスが、正常細胞に対して腫瘍内で選択的な溶解性複製を起こすか否かを探索した。野生型および E 1 A C R 2 ウイルスと対照的に、E 1 A C R 2 / E 4 o r f 6 / 7 およびまた E 4 o r f 6 / 7 ウイルスは、カプシドタンパク質発現を欠いていること、E 2 F 標的遺伝子 - サイクリン A および B を誘導することができないこと、S 期エントリーおよびウイルス複製を誘発することができないことによって立証されるように、初代細胞内で不十分に複製する。対照的に、これらのウイルスは、A 5 4 9 細胞および腫瘍細胞株のパネル内で野生型 (W T) ウイルスレベルまで複製する。したがって、提供されるアデノウイルスは、選択的ながん治療剤である。

10

【0032】

新規 R b / p 1 6 / E 1 F 腫瘍選択的腫瘍溶解性ウイルス療法が本明細書に提供される。これらのウイルスは、自己永続的である潜在性を有し、調節された細胞死によって腫瘍細胞を殺し、腫瘍内だけでなく、転移部にも広がり得る子孫を産生する。

【0033】

定義

本明細書に言及される場合、用語「アデノウイルス」は、ヒトから単離された 5 2 超のアデノウイルスサブタイプ、ならびに他の哺乳動物およびトリからの同数のものを示す。例えば、The Adenoviruses、Ginsberg 編、Plenum Press、New York、N.Y. 中の Strauss、「Adenovirus infections in humans」、4 5 1 ~ 5 9 6 頁 (1 9 8 4 年) を参照。用語「アデノウイルス」は、血清型を示す数値が後に続いた略語「A d」、例えば、A d 5 を用いて本明細書に言及され得る。この用語は、2 つのヒト血清型、A d 2 および A d 5 に任意選択で適用する。これらのアデノウイルスの例示的な核酸配列としては、それだけに限らないが、ヒトアデノウイルス 5 (配列番号 7) およびヒトアデノウイルス 2 (配列番号 8) がある。

20

【0034】

用語「E 1 A」は、アデノウイルス初期領域 1 A (E 1 A) 遺伝子およびこの遺伝子から発現されるポリペプチドを指す。用語「E 1 A ポリペプチド」は、E 1 A 遺伝子から発現されるポリペプチドを指し、この用語は、アデノウイルス血清型のいずれかによって産生される E 1 A ポリペプチドを含む。例として、E 1 A ポリペプチドのアミノ酸配列は、少なくとも Gen Bank 受託番号 C A E 0 1 1 4 7 . 1、A P _ 0 0 0 1 6 1 . 1 (配列番号 1)、および A P _ 0 0 0 1 9 7 . 1 (配列番号 2) において見つけることができる。これらのポリペプチドをコードする核酸は、少なくとも Gen Bank 受託番号 A C _ 0 0 0 0 0 8 . 1 (配列番号 7) および A C _ 0 0 0 0 0 7 . 1 (配列番号 8) において見つけることができる。配列番号 1 または配列番号 2 と 6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、またはそれ超の配列同一性を含む E 1 A ポリペプチドも提供される。E 1 A ポリペプチドは、細胞を細胞周期へと推進することによってウイルスゲノム複製において役割を有する。様々なヒトおよびサルアデノウイルス血清型の E 1 A 配列の比較により、保存アミノ酸相同性の 3 つの領域が同定された。A d 5 では、保存領域 1 (C R 1) は、配列番号 2 と比較してアミノ酸残基 4 0 ~ 8 0 の間にマップしており、C R 2 は、配列番号 2 と比較してアミノ酸残基 1 2 1 ~ 1 3 9 の間にマップしており、C R 3 は、配列番号 2 と比較して残基 1 4 0 ~ 1 8 8 の間にマップしている。

30

40

【0035】

用語「E 4 o r f 1」は、アデノウイルスの、いくつかのオープンリーディングフレームを含有する E 4 遺伝子から産生されるアデノウイルス E 4 o r f 1 ポリペプチドを指す。用語「E 4 o r f 1 ポリペプチド」は、アデノウイルス血清型のいずれかに由来する E 4 遺伝子によって産生される E 4 o r f 1 ポリペプチドを含む。例として、E 4 o r f 1 ポリペプチドのアミノ酸配列は、少なくとも Gen Bank 受託番号 A P _ 0 0 0 1 9 6 . 1 (配列番号 5) および A P _ 0 0 0 2 3 2 . 1 (配列番号 6) において見つけること

50

ができる。これらのポリペプチドをコードする核酸は、少なくとも GenBank 受託番号 AC__000008.1 (配列番号 7) および AC__000007.1 (配列番号 8) において見つけることができる。配列番号 5 または配列番号 6 と 65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ超の配列同一性を含む E4orf1 ポリペプチドも提供される。

【0036】

用語「E4orf6/7」は、アデノウイルスの、いくつかのオープンリーディングフレームを含有する E4 遺伝子から産生されるアデノウイルス E4orf6/7 ポリペプチドを指す。用語「E4orf6/7 ポリペプチド」は、アデノウイルス血清型のいずれかに由来する E4 遺伝子によって産生される E4orf6/7 ポリペプチドを含む。例として、E4orf6/7 ポリペプチドのアミノ酸配列は、少なくとも GenBank 受託番号 AP__000191.1 (配列番号 3) および AP__000227.1 (配列番号 4) において見つけることができる。これらのポリペプチドをコードする核酸は、少なくとも GenBank 受託番号 AC__000008.1 (配列番号 7) および AC__000007.1 (配列番号 8) において見つけることができる。配列番号 3 または配列番号 4 と 65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ超の配列同一性を含む E4orf6/7 ポリペプチドも提供される。

【0037】

「核酸」は、一本鎖または二本鎖形態でのデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド、およびこれらのポリマー、ならびにこれらの相補体を指す。この用語は、合成の、天然に存在する、および天然に存在しないものであり、参照核酸と同様の結合性を有し、かつ参照ヌクレオチドと同様の様式で代謝される公知のヌクレオチド類似体または修飾骨格残基もしくは連結を含有する核酸を包含する。このような類似体の例としては、限定することなく、ホスホロチオエート、ホスホラミデート、ホスホン酸メチル、キラルホスホン酸メチル、2-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸 (PNA) がある。

【0038】

別段の指定のない限り、特定の核酸配列は、その保存的に改変されたバリエーション (例えば、縮重コドン置換) および相補配列、ならびに明示的に示された配列も暗黙的に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1 つまたは複数の選択された (またはすべての) コドンの第 3 の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を生成することによって実現され得る (Batzer ら、Nucleic Acid Res., 19 巻: 5081 頁 (1991 年); Ohtsuka ら、J. Biol. Chem., 260 巻: 2605 ~ 2608 頁 (1985 年); Rossolini ら、Mol. Cell. Probes, 8 巻: 91 ~ 98 頁 (1994 年))。用語の核酸は、遺伝子、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドと互換的に使用される。

【0039】

特定の核酸配列は、「スプライスバリエーション」も暗黙的に包含する。同様に、核酸によってコードされる特定のタンパク質は、その核酸のスプライスバリエーションによってコードされる任意のタンパク質を暗黙的に包含する。「スプライスバリエーション」は、名称が示唆するように、遺伝子の代替スプライシングの産物である。転写後、最初の核酸転写物がスプライスされ得、その結果、異なる (代替の) 核酸スプライス産物が異なるポリペプチドをコードする。スプライスバリエーションの産生の機構は様々であるが、エクソンの代替のスプライシングを含む。リードスルー転写によって同じ核酸に由来する代替のポリペプチドも、この定義によって包含される。スプライス産物の組換え型を含めたスプライシング反応の任意の産物がこの定義内に含まれる。カリウムチャンネルスプライスバリエーションの一例が、Leicher ら、J. Biol. Chem., 273 巻 (52 号): 35095 ~ 35101 頁 (1998 年) に論じられている。

【0040】

核酸は、これが別の核酸配列と機能的な関係に置かれているとき、「作動可能に連結している」。例えば、プレ配列もしくは分泌リーダーのDNAは、これがポリペプチドの分泌に参加するタンパク質前駆体として発現される場合、ポリペプチドのDNAに作動可能に連結しており、プロモーターもしくはエンハンサーは、これが配列の転写に影響する場合、コード配列に作動可能に連結しており、またはリボソーム結合部位は、これが翻訳を促進するように配置されている場合、コード配列に作動可能に連結している。一般に、「作動可能に連結した」は、連結されているDNA配列が互いに近くにあり、分泌リーダーの場合では、連続しており、リーディング相内にあることを意味する。しかし、エンハンサーは、必ずしも連続している必要はない。連結は、好都合な制限部位でのライゲーションによって達成される。このような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーは、従来の慣行に従って使用される。

10

【0041】

2つまたはそれ超の核酸またはポリペプチド配列の脈絡における用語「同一の」またはパーセント「同一性」は、以下に記載されるデフォルトのパラメータを用いてBLASTまたはBLAST2.0配列比較アルゴリズムを使用して、またはマニュアル整列および目視検査（例えば、NCBIウェブサイトなどを参照）によって測定される場合、同じである、または同じであるアミノ酸残基もしくはヌクレオチドの特定されたパーセンテージ（すなわち、比較ウィンドウもしくは指定領域にわたって最大対応について比較および整列されるとき、特定された領域にわたる約60%の同一性、好ましくは65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれ超の同一性）を有する2つまたはそれ超の配列または部分配列を指す。このとき、このような配列は、「実質的に同一」とであると言われる。この定義は、試験配列の相補体（compliment）も指し、またはそれに適用され得る。この定義は、欠失および/または付加を有する配列、ならびに置換を有するものも含む。以下に記載するように、好適なアルゴリズムは、ギャップなどを説明することができる。好ましくは、同一性は、長さが少なくとも約25アミノ酸もしくはヌクレオチドである領域にわたって、またはより好ましくは、長さが50～100アミノ酸もしくはヌクレオチドである領域にわたって存在する。

20

【0042】

配列比較について、典型的には、1つの配列が、試験配列が比較される参照配列として作用する。配列比較アルゴリズムを使用するとき、試験および参照配列がコンピュータ中に入力され、部分配列座標が指定され、必要であれば、配列アルゴリズムプログラムパラメータが指定される。好ましくは、デフォルトのプログラムパラメータを使用することができ、または代替のパラメータが指定され得る。次いで、配列比較アルゴリズムが、プログラムパラメータに基づいて、参照配列と比べた試験配列のパーセント配列同一性を計算する。

30

【0043】

「比較ウィンドウ」は、本明細書において、2つの配列が最適に整列された後、配列が連続した位置の同じ数値の参照配列と比較され得る20～600、通常約50～約200、より通常には約100～約150からなる群から選択される連続した位置の数値の任意の1つのセグメントへの言及を含む。比較のために配列を整列する方法は、当技術分野で周知である。比較のための配列の最適な整列は、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math., 2巻: 482頁(1981年)の局所相同性アルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol., 48頁: 443巻(1970年)の相同性整列アルゴリズムによって、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 85巻: 2444頁(1988年)の類似性探索法によって、これらのアルゴリズムのコンピューター化されたインプリメンテーション(the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI中のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)によって、またはマニュアル整列および目視検査

40

50

(例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、1995年増補)を参照)によって行うことができる。

【0044】

パーセント配列同一性および配列類似性を判定するのに適したアルゴリズムの好適な例は、BLASTおよびBLAST2.0アルゴリズムであり、これらはそれぞれ、Altschulら、Nuc. Acids Res.、25巻：3389～3402頁(1977年)およびAltschulら、J. Mol. Biol.、215巻：403～410頁(1990年)に記載されている。BLASTおよびBLAST2.0は、核酸およびタンパク質のパーセント配列同一性を判定するのに、本明細書に記載のパラメータを用いて使用される。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、当技術分野で公知であるように、国立バイオテクノロジー情報センターによって公的に入手可能である。このアルゴリズムは、データベース配列中の同じ長さのワードで整列されるとき、いくつかの正の値の閾値スコアTにマッチし、またはそれを満たすクエリー配列中の長さWのショートワードを同定することによって、高スコア配列対(HSP)を最初に同定する。Tは、近隣ワードスコア閾値と呼ばれる(Altschulら、上記)。これらの初期近隣ワードヒットは、これらを含むより長いHSPを見つけるための探索を開始するためのシードとして作用する。ワードヒットは、累積的な整列スコアが増大され得る限り、各配列に沿って両方向に拡張される。累積スコアは、ヌクレオチド配列については、パラメータM(マッチ残基の対についてのリワードスコア；常に0超)およびN(ミスマッチ残基についてのペナルティスコア；常に0未満)を使用して計算される。アミノ酸配列については、スコアリングマトリックスが累積スコアを計算するのに使用される。各方向でのワードヒットの拡張は、累積的整列スコアがその最大達成値から量X離れ；累積スコアが、1つもしくは複数の負のスコア残基整列の蓄積に起因してゼロもしくはゼロ未満に向かい；またはいずれかの配列の最後に到達するとき、停止される。BLASTアルゴリズムパラメータW、T、およびXは、整列の感度およびスピードを決定する。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列についての)は、デフォルトとして、11のワード長(W)、10の期待値(E)、M=5、N=-4、および両方の鎖の比較を使用する。アミノ酸配列については、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、3のワード長、10の期待値(E)、および50のBLOSUM62スコアリングマトリックス(Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89巻：10915頁(1989年)を参照)整列(B)、10の期待値(E)、M=5、N=-4、および両方の鎖の比較を使用する。

【0045】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指すのに本明細書で互換的に使用される。この用語は、1つまたは複数のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人為的な化学的模倣体であるアミノ酸ポリマーに、かつ天然に存在するアミノ酸ポリマーおよび天然に存在しないアミノ酸ポリマーに適用する。

【0046】

用語「アミノ酸」は、天然に存在するアミノ酸および合成アミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸と同様の様式で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。天然に存在するアミノ酸は、遺伝子コードによってコードされるもの、ならびに後に修飾されるアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタメート、およびO-ホスホセリンである。アミノ酸類似体は、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造、すなわち、水素に結合している炭素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基を有する化合物、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを指す。このような類似体は、修飾されたR基(例えば、ノルロイシン)または修飾されたペプチド骨格を有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造を保持する。アミノ酸模倣体は、アミノ酸の一般的な化学構造と異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様の様式で機能する化学化合物を指す。

【0047】

アミノ酸は、これらの一般に公知の3文字記号、またはIUPAC-IUB生化学命名委員会によって推奨された1文字記号によって本明細書で参照される場合がある。ヌクレオチドは、同様に、これらの一般に受け入れられている1文字コードによって参照される場合がある。

【0048】

「保存的に改変されたバリエーション」は、アミノ酸および核酸配列の両方に適用する。特定の核酸配列に関して、保存的に改変されたバリエーションは、同一もしくは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸を指し、または核酸がアミノ酸配列をコードしない場合、本質的に同一の配列を指す。遺伝コードの縮重のために、多数の機能的に同一の核酸が、任意の所与のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCG、およびGCUはすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコードによって特定されるあらゆる位置で、そのコドンは、コードされるポリペプチドを変更することなく、記載した対応するコドンのいずれかに変更され得る。このような核酸バリエーションは、「サイレントバリエーション」であり、これは、保存的に改変されたバリエーションの1つの種である。ポリペプチドをコードする本明細書のあらゆる核酸配列は、核酸のあらゆる可能なサイレントバリエーションも記述する。当業者は、核酸中の各コドン（通常、メチオニンの唯一のコドンであるAUG、および通常、トリプトファンの唯一のコドンであるTGGを除く）は、改変されて機能的に同一の分子を生じ得ることを認識するであろう。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレントバリエーションは、実際のプローブ配列に関してではなく、発現産物に関してそれぞれの記載された配列中に潜在している。

【0049】

アミノ酸配列に関して、当業者は、コードされる配列中の単一アミノ酸または小パーセンテージのアミノ酸を変更し、付加し、または欠失させる核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列への個々の置換、欠失、または付加は、変更が一アミノ酸の化学的に同様のアミノ酸との置換をもたらす「保存的に改変されたバリエーション」であることを認識するであろう。機能的に同様のアミノ酸をもたらす保存的置換表は、当技術分野で周知である。このような保存的に改変されたバリエーションは、多型バリエーション、種間同族体、および対立遺伝子に加えてのものであり、これらを除外しない。

【0050】

以下の8つの群はそれぞれ、互いに保存的置換であるアミノ酸を含有する：1) アラニン(A)、グリシン(G)；2) アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)；3) アスパラギン(N)、グルタミン(Q)；4) アルギニン(R)、リシン(K)；5) イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V)；6) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)；7) セリン(S)、トレオニン(T)；および8) システイン(C)、メチオニン(M)（例えば、Creighton、Proteins（1984年）を参照）。

【0051】

用語「組換え体」は、例えば、細胞、ウイルス、核酸、タンパク質、あるいはベクターを参照して使用される場合、細胞、ウイルス、核酸、タンパク質、またはベクターが、異種の核酸もしくはタンパク質の導入または天然の核酸もしくはタンパク質の変更によって改変されており、あるいは細胞がそのように改変された細胞に由来することを示す。したがって、例えば、組換え細胞は、細胞の天然（非組換え）型内で見出されない遺伝子を発現し、または別の方法で異常に発現され、過少発現され、もしくはまったく発現されない天然遺伝子を発現する。

【0052】

語句「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、プローブが、典型的には核酸の複合混合物中でその標的部分配列にハイブリダイズするが、他の配列にまったくハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は、配列依存性であり、異なる状況で異なることになる。より長い配列は、より高い温度で特異的にハイブリダイズする

。核酸のハイブリダイゼーションへの広範なガイドは、Tijssen、Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes、「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays」(1993年)に見出される。一般に、ストリンジェントな条件は、規定されたイオン強度、pHで特定配列の熱融点(T_m)より約5~10 低いように選択される。 T_m は、標的に相補的なプローブの50%が平衡状態で標的配列にハイブリダイズする温度(規定されたイオン強度、pH、および核濃度下の)である(標的配列は過剰に存在するので、 T_m で、プローブの50%が平衡状態で占有される)。ストリンジェントな条件は、ホルムアミドなどの不安定化剤を添加しても実現され得る。選択的または特異的なハイブリダイゼーションについて、陽性信号は、バックグラウンドの少なくとも2倍、好ましくはバックグラウンドハイブリダイゼーションの10倍である。例示的なストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、以下の通りであり得る：65 での0.2×SSCおよび0.1%SDSの洗浄を伴った、50%ホルムアミド、5×SSC、および1%SDS、42 でのインキュベーション、または5×SSC、1%SDS、65 でのインキュベーション。

【0053】

ストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズしない核酸は、これらがコードするポリペプチドが実質的に同一である場合、依然として実質的に同一である。これは、例えば、1コピーの核酸が遺伝子コードによって許容される最大コドン縮重を使用して作られるとき起こる。このような場合では、核酸は、典型的には、中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。例示的な「中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」としては、37 での40%ホルムアミド、1M NaCl、1% SDSの緩衝液中のハイブリダイゼーション、および45 での1×SSC中の洗浄がある。陽性のハイブリダイゼーションは、バックグラウンドの少なくとも2倍である。当業者は、代替のハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を利用して、同様のストリンジェンシーの条件をもたらすことができることを容易に認識するであろう。ハイブリダイゼーションパラメータを判定するための追加のガイドラインは、多数の参考文献、例えば、Current Protocols in Molecular Biology、Ausubelら編、John Wiley & Sonsに提供されている。

【0054】

PCRについて、約36 の温度が低ストリンジェンシー増幅で典型的であるが、アニーリング温度は、プライマー長に応じて約32 から約48 の間で変化し得る。高ストリンジェンシーPCR増幅については、約62 の温度が典型的であるが、高ストリンジェンシーアニーリング温度は、プライマー長および特異性に応じて約50 ~ 約65 の範囲であり得る。高および低ストリンジェンシー増幅の両方についての典型的なサイクル条件は、30秒~2分間の90 ~ 95 の変性相、30秒~2分続くアニーリング相、および1~2分間の約72 の伸長相を含む。低および高ストリンジェンシー増幅反応についてのプロトコールおよびガイドラインは、例えば、Innisら、(1990年)、PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications、Academic Press, Inc., N.Y.に提供されている。

【0055】

用語「組換え体」は、例えば、細胞、または核酸、タンパク質、またはベクターに言及して使用される場合、細胞、核酸、タンパク質、またはベクターが、実験室法によって改変されている、または実験室法の結果であることを示す。したがって、例えば、組換えタンパク質は、実験室法によって生成されるタンパク質を含む。組換えタンパク質は、タンパク質の天然(非組換え)型内に見つからないアミノ酸残基を含み得、修飾された、例えば、標識されたアミノ酸残基を含み得る。

【0056】

用語「異種の」は、核酸の部分を参照して使用される場合、核酸が、自然において互いに同じ関係内に見つからない2つまたはそれ超の部分配列を含むことを示す。例えば、新

10

20

30

40

50

しい機能的な核酸を作製するように手配された無関係の遺伝子に由来する2つまたはそれ超の配列、例えば、1つの源に由来するプロモーターおよび別の源に由来するコード配列を有する核酸が、典型的には組換えで生成される。同様に、異種タンパク質は、タンパク質が、自然において互いに同じ関係内に見つからない2つまたはそれ超の部分配列を含むことを示す(例えば、融合タンパク質)。

【0057】

本明細書において、用語「改変」は、核酸またはポリペプチド配列の配列変更を指す。例えば、アミノ酸配列改変は、典型的には、3つのクラス：置換、挿入、または欠失バリエーションの1つまたは複数に入る。挿入としては、アミノおよび/またはカルボキシル末端融合、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入がある。欠失は、タンパク質配列からの1つまたは複数のアミノ酸残基の除去によって特徴付けられる。本明細書において、記号 またはデルタは、欠失を指す。例えば、E1A LXCXEは、LXCXEドメインの欠失を有するE1Aポリペプチドを指す。置換改変は、少なくとも1つの残基が除去され、異なる残基がその場所に挿入されたものである。アミノ酸置換は、典型的には、単一残基のものであるが、いくつかの異なる位置で一度に起こり得る。置換、欠失、挿入、またはこれらの任意の組合せは、最終的なコンストラクトに達するように組み合わせることができる。これらの改変体は、タンパク質をコードするDNA中のヌクレオチドを改変し、それによって改変体をコードするDNAを生成することによって調製され得る。公知の配列を有するDNA中の所定の部位で挿入、欠失、および置換突然変異を行うための技法は、周知である。改変技法では、1つまたは複数のポリペプチド領域をコードするDNA配列を操作するための組換えDNA技術を使用することができる。任意選択で、改変技法は、例えば、組換え、M13プライマー突然変異誘発、およびPCR突然変異誘発を含む。

【0058】

用語「トランスフェクション」、「トランスダクション」、「トランスフェクトする」、または「トランスダクトする」は、互換的に使用することができ、細胞に核酸分子またはタンパク質を導入するプロセスとして定義される。核酸は、非ウイルスまたはウイルスベース方法を使用して細胞に導入される。核酸分子は、完全なタンパク質をコードする配列またはその機能的な部分であり得る。典型的には、タンパク質発現に必要なエレメント(例えば、プロモーター、転写開始部位など)を含む核酸ベクター。トランスフェクションの非ウイルス方法としては、細胞内に核酸分子を導入するための送達システムとしてウイルスDNAまたはウイルス粒子を使用しない任意の適切な方法がある。例示的な非ウイルストランスフェクション法としては、リン酸カルシウムトランスフェクション、リポソームトランスフェクション、ヌクレオフェクション、ソノポレーション、熱ショックによるトランスフェクション、マグネトフェクション(magnetofection)、および電気穿孔がある。ウイルスベース方法については、任意の有用なウイルスベクターを本明細書に記載の方法において使用することができる。ウイルスベクターの例としては、それだけに限らないが、レトロウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、およびアデノ随伴ウイルスベクターがある。一部の態様では、核酸分子は、当技術分野で周知の標準手順に従ってアデノウイルスベクターを使用して細胞内に導入される。用語「トランスフェクション」または「トランスダクション」は、外部環境から細胞内にタンパク質を導入することも指す。典型的には、タンパク質のトランスダクションまたはトランスフェクションは、細胞膜を横断することができるペプチドまたはタンパク質の目的のタンパク質への付着を利用する。例えば、Fordら(2001年)、Gene Therapy、8巻：1～4頁、およびProchiantz(2007年)、Nat. Methods、4巻：119～20を参照。

【0059】

「対照」または「標準対照」は、検査試料、測定値、または値との比較のための参照、通常公知の参照として機能を果たす試料、測定値、または値を指す。例えば、検査試料を、所与の疾患(例えば、自己免疫疾患、炎症性自己免疫疾患、がん、感染症、免疫疾患、または他の疾患)を有すると疑われる患者から採取し、既知の正常な(非疾患の)個体(

10

20

30

40

50

例えば、標準対照対象)と比較することができる。標準対照は、所与の疾患を有さない同様の個体(例えば、標準対照対象)の集団(すなわち、標準対照集団)、例えば、同様の医学的背景、同じ年齢、体重などを有する健康な個体から集めた平均の測定値または値も代表し得る。標準対照値は、同じ個体、例えば、疾患発症前の患者からのより早期に得られた試料から得ることもできる。標準対照を、任意の数のパラメータ(例えば、RNAレベル、タンパク質レベル、特定の細胞型、特定の体液、特定の組織、滑膜細胞、滑液、滑膜組織、線維芽細胞様滑膜細胞、マクロファージ様滑膜細胞など)を評価するために設計することができることを、当業者は認識するであろう。

【0060】

当業者は、どの標準対照が、所与の状況において最も適切であるかを理解し、標準対照値との比較に基づいてデータを分析することができるであろう。標準対照は、データの有意性(例えば、統計的有意性)を判定するのにも有益である。例えば、所与のパラメータの値が標準対照中で広く変わっている場合、検査試料中の変動は、有意であると見なされない。

【0061】

本明細書において、用語「増殖性障害」は、細胞が正常組織の増殖より急速に増殖する任意の細胞障害を指す。増殖性障害には、それだけに限らないが、がんが含まれる。

【0062】

本明細書において、用語「がん」は、白血病、癌腫、および肉腫を含めた、哺乳動物において見つかるすべてのタイプのがん、新生物、または悪性腫瘍を指す。例示的ながんとしては、脳、乳房、子宮頸、大腸、頭頸部、肝臓、腎臓、肺、非小細胞肺、黒色腫、中皮腫、卵巣、肉腫、胃、子宮、および髄芽腫のがんがある。追加の例としては、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、卵巣がん、横紋筋肉腫、原発性血小板増多症、原発性マクログロブリン血症、原発性脳腫瘍、がん、悪性膵インスリノーマ(malignant pancreatic insulanoma)、悪性カルチノイド、膀胱がん、前悪性皮膚病変、精巣がん、リンパ腫、甲状腺がん、神経芽細胞腫、食道がん、尿生殖路がん、悪性高カルシウム血症、子宮内膜がん、副腎皮質がん、内分泌および膵外分泌腺の新生物、ならびに前立腺がんがある。

【0063】

用語「白血病」は、造血臓器の進行性悪性疾患を広く指し、一般に、血液および骨髄中の白血球およびこれらの前駆体のゆがめられた増殖および発達によって特徴付けられる。白血病は一般に、(1)急性または慢性の疾患の継続時間および特性;(2)関与される細胞のタイプ;骨髄性(myeloid)(骨髄性(myelogenous))、リンパ性(lymphoid)(リンパ性(lymphogenous))、または単球;および(3)白血病または無白血病(亜白血病)の血液中の異常細胞の数の増加または非増加に基づいて臨床的に分類される。P₃₈。白血病モデルは、*in vivo*抗白血病活性を予測するものとして広く受け入れられている。P₃₈₈。アッセイで陽性の結果が出る化合物は、一般に、処置されている白血病のタイプにかかわらず*in vivo*であるレベルの抗白血病活性を呈すると考えられている。したがって、本願は、白血病を処置する方法、好ましくは、急性非リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病、急性顆粒球性白血病、慢性顆粒球性白血病、急性前骨髄球性白血病、成人T細胞白血病、非白血性白血病、白血球血症性白血病、好塩基球性(basophylic)白血病、芽細胞白血病、ウシ白血病、慢性骨髄球性白血病、皮膚白血病、胎生細胞性白血病、好酸球性白血病、グロス白血病、ヘアリー細胞白血病、血芽球性白血病、血球母細胞性白血病、組織球性白血病、幹細胞白血病、急性単球白血病、白血球減少性白血病、リンパ性白血病(lymphatic leukemia)、リンパ芽球性白血病、リンパ球性白血病、リンパ性白血病(lymphogenous leukemia)、リンパ性白血病(lymphoid leukemia)、リンパ肉腫細胞白血病、肥満細胞性白血病、巨核球性白血病、小骨髄芽球性白血病、単球白血病、骨髄芽球性白血病、骨髄球性白血病、骨髄性顆粒球性白血病、骨髄単球性白血病、ネーグリー白血病、プラズマ細胞白血病、多発性骨髄腫、形質細胞性白血病、前骨髄球性白血病、リーダー細胞白血病、シリング白血病、幹細胞白血病、亜白血性白血病、および

10

20

30

40

50

未分化細胞白血病を処置する方法を含む。

【 0 0 6 4 】

用語「肉腫」は、一般に、胎生結合組織のような物質で作られた腫瘍を指し、一般に、小繊維のまたは均質な物質中に包埋した密に詰まった細胞から構成される。抗新生物性チオール結合性ミトコンドリアオキシダントおよび抗がん剤の組合せを用いて処置され得る肉腫としては、軟骨肉腫、線維肉腫、リンパ肉腫、黒色肉腫、粘液肉腫、骨肉腫、アバーネシー肉腫 (Abemethy's sarcoma)、脂肪肉腫 (adipose sarcoma)、脂肪肉腫 (liposarcoma)、胞巣状軟部肉腫、エナメル上皮肉腫、ブドウ状肉腫、緑色腫肉腫、絨毛癌、胎児性肉腫、ウィルムス腫瘍肉腫、子宮内膜肉腫、間質肉腫、ユーイング肉腫、筋膜肉腫、線維芽細胞肉腫、巨細胞肉腫、顆粒球性肉腫、ホジキン肉腫、特発性多発性色素性出血性肉腫、B細胞の免疫芽球性肉腫、リンパ腫、T細胞の免疫芽球性肉腫、イエンセン肉腫、カボジ肉腫、クッパー細胞肉腫、血管肉腫、白血肉腫、悪性間葉細胞腫肉腫、傍骨性骨肉腫、細網肉腫、ラウス肉腫、漿液嚢胞性肉腫、滑膜肉腫、および毛細血管拡張性 (telangiectatic) 肉腫がある。

10

【 0 0 6 5 】

用語「黒色腫」は、皮膚および他の臓器のメラニン細胞系から生じる腫瘍を意味するものと解釈される。抗新生物性チオール結合性ミトコンドリアオキシダントおよび抗がん剤の組合せを用いて処置され得る黒色腫としては、例えば、肢端黒子型黒色腫、無色素性黒色腫、良性若年性黒色腫、クラウドマン黒色腫、S 9 1 黒色腫、ハーディング - パッセー黒色腫、若年性黒色腫、悪性黒子黒色腫、悪性黒色腫、結節型黒色腫、爪下 (subungal) 黒色腫、および表在拡大型黒色腫がある。

20

【 0 0 6 6 】

用語「癌腫」は、周囲組織に浸潤し、転移を引き起こす傾向のある、上皮細胞で作られた悪性新生物 (new growth) を指す。抗新生物性チオール結合性ミトコンドリアオキシダントおよび抗がん剤の組合せを用いて処置され得る例示的な癌腫としては、例えば、腺房癌 (acinar carcinoma)、腺房癌 (acinous carcinoma)、腺嚢癌、腺様嚢胞癌、腺腫性癌、副腎皮質の癌腫、肺癌、肺胞細胞癌、基底細胞癌、基底細胞性癌、類基底細胞癌、基底有棘細胞癌 (basosquamous cell carcinoma)、気管支肺胞上皮癌、細気管支癌、気管支原性癌、大脳様癌、胆管細胞癌、絨毛癌 (chorionic carcinoma)、膠様癌 (colloid carcinoma)、面胞癌、子宮体癌 (corpus carcinoma)、篩状癌、鑑状癌、皮膚癌、円柱癌 (cylindrical carcinoma)、円柱細胞癌、導管癌、硬膜癌、胎生期癌、脳様癌、類表皮 (epiermoid) 癌、腺様上皮癌 (carcinoma epitheliale adenoides)、外向発育癌、潰瘍癌、繊維性癌 (carcinoma fibrosum)、ゼラチン状癌 (gelatiniform carcinoma)、膠様癌 (gelatinous carcinoma)、巨細胞癌 (giant cell carcinoma)、巨細胞癌 (carcinoma gigantocellulare)、腺癌、顆粒膜細胞癌、毛母癌、血様癌 (hematoid carcinoma)、肝細胞癌、ヒュルトレ細胞癌、硝子様癌、副腎様 (hypemephroid) 癌、乳児胎生期癌、上皮内癌 (carcinoma in situ)、表皮内癌、上皮内癌 (intraepithelial carcinoma)、クロムペッヘル癌 (Krompecher's carcinoma)、クルチツキー細胞癌 (Kulchitzky-cell carcinoma)、大細胞癌、レンズ状癌 (lenticular carcinoma)、レンズ状癌 (carcinoma lenticulare)、脂肪腫性癌 (lipomatous carcinoma)、リンパ上皮癌、髄様癌 (carcinoma medullare)、髄様癌 (medullary carcinoma)、黒色癌、軟性癌 (carcinoma molle)、粘液癌 (mucinous carcinoma)、粘液癌 (carcinoma muciparum)、粘液細胞性癌 (carcinoma mucocellulare)、粘表皮癌、粘液癌 (carcinoma mucosum)、粘液性癌、粘液腫様癌、上咽頭癌、燕麦細胞癌、骨化性癌 (carcinoma ossificans)、骨様癌、乳頭状癌、門脈周囲癌、上皮内癌 (preinvasive carcinoma)、有棘細胞癌、粥状癌 (pultaceous carcinoma)、腎臓の腎細胞癌、予備細胞癌、肉腫様癌 (carcinoma sarcomatodes)、シュナイダー癌、硬性癌、陰嚢癌、印環細胞癌、単純癌、小細胞癌、パレイショ様癌 (solanoid carcinoma)、球状細胞癌、紡錘体細胞癌、海綿様癌、扁平上皮癌、扁平上皮細胞癌、ストリング癌、毛細管拡張性癌 (carcinoma telangiectaticum)、毛細管拡張性癌 (carcinoma telangiectodes)、移行上皮癌、

30

40

50

結節癌 (carcinoma tuberosum)、結節癌 (tuberous carcinoma)、いぼ状癌、および絨毛癌 (carcinoma villosum) がある。

【 0 0 6 7 】

本明細書において、用語「転移」、「転移性」、および「転移性がん」は、互換的に使用することができ、1つの臓器または別の隣接しない臓器もしくは身体部分からの増殖性疾患または障害、例えば、がんの広がりを目指す。がんは、発生部位、例えば、乳房で起こり、その部位は、原発性腫瘍、例えば、原発性乳がんと呼ばれる。原発性腫瘍または発生部位中のいくつかのがん細胞は、局所的な範囲内の周囲正常組織を貫通し、それに浸潤する能力、ならびに/またはリンパ系もしくは血管系の壁を貫通し、体内の他の部位および組織に系を通じて循環する能力を取得する。原発性腫瘍のがん細胞から形成される第2の臨床的に検出可能な腫瘍は、転移性または二次性腫瘍と呼ばれる。がん細胞が転移する場合、転移性腫瘍およびその細胞は、元の腫瘍のものと同様であると推定される。したがって、肺がんが乳房に転移する場合、乳房の部位の二次性腫瘍は、異常な肺細胞からなり、異常な乳腺細胞からなっていない。乳房内の二次性腫瘍は、転移性肺がんと呼ばれる。したがって、語句転移性がんは、対象が原発性腫瘍を有しており、または有していたことがあり、かつ1つまたは複数の二次性腫瘍を有する疾患を目指す。語句非転移性がん、または転移性でないがんを有する対象は、対象が原発性腫瘍を有するが、1つまたは複数の二次性腫瘍を有していない疾患を目指す。例えば、転移性肺がんは、原発性肺腫瘍を有し、またはその履歴を有し、かつ第2の位置または複数の位置に、例えば、乳房内に1つまたは複数の二次性腫瘍を有する対象における疾患を目指す。

10

20

【 0 0 6 8 】

用語「用量」および「投与量」は、本明細書で互換的に使用される。用量は、各投与で個体に与えられる活性成分の量を指す。用量は、いくつかの要因に応じて様々となり、要因としては、所与の療法についての正常な用量の範囲、投与の頻度；個体のサイズおよび耐容性；病状の重症度；副作用のリスク；ならびに投与経路がある。用量は、上記要因に応じて、または治療の進行に基づいて修正され得ることを当業者は認識するであろう。用語「剤形」は、医薬品または医薬組成物の特定のフォーマットを指し、投与経路に依存する。例えば、剤形は、噴霧用、例えば、吸入剤用の液体形態、例えば、経口送達用の錠剤もしくは液体、または例えば、注射剤用の食塩液であり得る。

【 0 0 6 9 】

30

本明細書において、病状、疾患、もしくは障害、または病状、疾患、もしくは障害に関連する症状を「処置する」またはその「処置」は、臨床結果を含めた有益なまたは所望の結果を得るための手法を指す。有益なまたは所望の臨床結果として、それだけに限らないが、部分的であっても全体的であっても、1つまたは複数の症状または病状の軽減または寛解、病状、障害、または疾患の程度の縮小、病状、障害、または疾患の状態の安定化、病状、障害、または疾患の発達の防止、病状、障害、または疾患の広がり防止、病状、障害、または疾患進行の遅延または減速、病状、障害、または疾患発症の遅延または減速、病状、障害、または疾患状態の寛解または緩和、および緩解を挙げることができる。「処置する」は、処置が無い場合に予期されるものを超える対象の生存期間の延長も意味し得る。「処置する」は、一時的な病状、障害、または疾患の進行の阻害、病状、障害、または疾患の減速も意味し得るが、一部の場合では、これは、永久に病状、障害、または疾患の進行を停止させる。本明細書において、用語の処置、処置する (treat)、または処置する (treating) は、プロテアーゼの発現によって特徴付けられる疾患もしくは病状の1つもしくは複数の症状の効果、またはプロテアーゼの発現によって特徴付けられる疾患もしくは病状の症状を低減する方法を指す。したがって、開示される方法では、処置は、確立した疾患、病状、または疾患もしくは病状の症状の重症度の10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%の低減を指すことができる。例えば、疾患を処置するための方法は、対照と比較して対象における疾患の1つまたは複数の症状の10%の低減がある場合、処置と見なされる。したがって、低減は、天然または対照のレベルと比較して10%、20%、30%、40%、50%、60%

40

50

、70%、80%、90%、100%、または10%から100%の間の任意のパーセントの低減であり得る。処置は、必ずしも疾患、病状、または疾患もしくは病状の症状の治癒または完全な切除を指す必要はないことが理解される。さらに、本明細書において、低下、低減、または阻害への言及は、対照レベルと比較して10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ超の変化を含み、このような用語は、完全な排除を含み得るが、必ずしもそれを含む必要はない。

【0070】

「治療有効用量または量」は、本明細書において、それが投与される効果（例えば、疾患を処置または防止する）を生じさせる用量を意味する。厳密な用量および配合は、処置の目的に依存し、公知の技法を使用して当業者によって確かめられる（例えば、Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (1~3巻、1992年) ; Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999年) ; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20版, Gennaro, 編 (2003年)、および Pickar, Dosage Calculations (1999年) を参照)。例えば、所与のパラメータについて、治療有効量は、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%、または少なくとも100%の増大または低下を示す。治療有効性は、「~倍の」増大または低下として表現することもできる。例えば、治療有効量は、標準対照に対して少なくとも1.2倍、1.5倍、2倍、5倍、またはそれ超の効果を有し得る。治療有効用量または量は、疾患の1つまたは複数の症状を寛解させ得る。治療有効用量または量は、それが投与されている効果が、疾患を発生するリスクにある者を処置することである場合、疾患、または疾患の1つもしくは複数の症状の発症を防止し、または遅延させることができる。

【0071】

用語「薬学的に許容される塩」または「薬学的に許容される担体」は、本明細書に記載の化合物に見つかる特定の置換基に応じて相対的に無毒性の酸または塩基を用いて調製される活性化合物の塩を含むことを意味する。本願の化合物が相対的に酸性の官能性を含有する場合、中性形態のこのような化合物を純粋の、または適当な不活性溶媒中の十分な量の所望の塩基と接触させることによって、塩基付加塩を得ることができる。薬学的に許容される塩基付加塩の例としては、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム、有機アミノ、もしくはマグネシウムの塩、または同様の塩がある。本願の化合物が相対的に塩基性の官能性を含有する場合、中性形態のこのような化合物を純粋の、または適当な不活性溶媒中の十分な量の所望の酸と接触させることによって、酸付加塩を得ることができる。薬学的に許容される酸付加塩の例としては、塩酸、臭化水素酸、硝酸、炭酸、一水素炭酸 (monohydrogencarbonic acid)、リン酸、一水素リン酸 (monohydrogenphosphoric acid)、二水素リン酸 (dihydrogenphosphoric acid)、硫酸、一水素硫酸 (monohydrogensulfuric acid)、ヨウ化水素酸、または亜リン酸などのような無機酸に由来するもの、および酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、マレイン酸、マロン酸、安息香酸、コハク酸、スベリン酸、フマル酸、乳酸、マンデル酸、フタル酸、ベンゼンスルホン酸、p-トリルスルホン酸、クエン酸、酒石酸、メタンスルホン酸などのような相対的に無毒性の有機酸に由来する塩がある。アルギン酸塩 (arginate) などのアミノ酸の塩、およびグルクロン酸またはガラクトン酸 (galactunoric acid) などのような有機酸の塩も含まれる（例えば、Bergeら、Journal of Pharmaceutical Science, 66巻: 1~19頁 (1977年) を参照）。当業者に公知の他の薬学的に許容される担体も、本願の組成物に適している。

【0072】

「対象」、「個体」、または「患者」は、本明細書で互換的に使用され、これは、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトを指す。哺乳動物としては、それだけに限らないが、マウス、サル、ヒト、家畜、競技動物、およびペットがある。in vitroで得られ、またはin vitroで培養される生物学的実体の組織、細胞、およびこれらの子孫も包含される。

【0073】

本明細書において、「Rb欠損」腫瘍もしくは細胞、または「Rb欠損の表現型を有する腫瘍もしくは細胞」は、腫瘍抑制因子Rbのレベルが正常もしくは対照細胞内のものより低い、またはRb経路が混乱されており、もしくは不活性である腫瘍または細胞である。用語「Rb経路」または「Rbシグナル伝達経路」は、pRb/p107、E2F-1/-2/-3、およびG1サイクリン/cdk複合体を含むpRb活性に影響する分子を少なくとも部分的に指す。現在公知でない分子もこの定義に入ることが察知されるであろう。

【0074】

本明細書において、「腫瘍溶解性ウイルス」は、増殖性障害の細胞、例えば、がん細胞を選択的に殺すウイルスである。がん細胞の殺傷は、当技術分野で確立された任意の方法、例えば、生細胞数、細胞変性効果、死(die)新生物細胞のアポトーシス、がん細胞内のウイルスタンパク質の合成(例えば、代謝標識、ウイルスタンパク質のウエスタン分析、または複製に必要なウイルス遺伝子の逆転写ポリメラーゼ連鎖反応による)、または腫瘍のサイズの低減の判定などによって検出され得る。

【0075】

本明細書において、用語「複製欠損ウイルス」は、ウイルス複製を支持する所与の表現型を有する所定の細胞集団(例えば、pRbシグナル伝達経路内の分子に応答性の腫瘍細胞)内で細胞増殖を優先的に阻害し、細胞溶解を引き起こし、またはアポトーシスを誘導する(一括して殺傷と見なされる)ウイルスを指す。このようなウイルスは、所定の細胞表現型を有さない細胞内で、細胞増殖を阻害し、細胞溶解を引き起こし、アポトーシスを誘導し、または別の方法で複製することができず、またはそうする能力が限られている。

【0076】

改変アデノウイルス

1つまたは複数の改変を含むE1Aポリペプチドを含み、かつ/または1つまたは複数の改変を含むE4orf6/7ポリペプチドを含むアデノウイルス(Ad)が本明細書に提供される。アデノウイルスは、任意選択で1つまたは複数の改変を含むE4orf1ポリペプチドを含む。1つまたは複数の改変を含むE1Aポリペプチドを含み、1つまたは複数の改変を含むE4orf1ポリペプチドを含むアデノウイルスも本明細書に提供される。したがって、E1A、E4orf1、およびE4orf6/7中に改変を伴った改変アデノウイルスが提供される。提供される改変アデノウイルスは、腫瘍溶解性である。提供される改変アデノウイルスはまた、調節が解除されたE2Fおよび正常細胞サイクルチェックポイントを伴ったがん細胞内で選択的に複製する。提供される改変アデノウイルスは、不活性なRb/p16腫瘍抑制因子経路を伴った細胞内で選択的に複製する。提供される改変アデノウイルスは、その全体が本明細書に参照により組み込まれている国際公開第WO2012/024350号および同第WO2013/138505号に記載のものを含めた1つまたは複数のさらなる改変を含み得る。

【0077】

用語「改変アデノウイルス」は、自然において見つからない遺伝子配列を有するアデノウイルス(例えば、非野生型アデノウイルス)を指す。任意選択で、改変アデノウイルスは、組換えアデノウイルスである。本明細書において、用語「改変E1A」は、それぞれポリペプチドまたは核酸配列中に1つまたは複数の改変を有するE1Aポリペプチドおよび/またはE1AポリペプチドをコードするE1A遺伝子もしくは核酸を指す。本明細書において、用語「改変E4orf1」は、それぞれポリペプチドまたは核酸配列中に1つまたは複数の改変を有するE4orf1ポリペプチドおよび/またはE4orf1ポリペプチドをコードするE1orf1遺伝子もしくは核酸を指す。本明細書において、用語「改変E4orf6/7」は、それぞれポリペプチドまたは核酸配列中に1つまたは複数の改変を有するE4orf6/7ポリペプチドおよび/またはE4orf6/7ポリペプチドをコードするE4orf6/7遺伝子もしくは核酸を指す。

【0078】

用語「Rb / p16 / E2F複製が損なわれており、または欠損している」は、本明細書において、細胞が感染した後、アデノウイルス複製が、Rb / p107 / p130 / p16 / E2F / CDK - サイクリンチェックポイントを含む正常レベルの機能細胞「ポケットタンパク質ファミリー」メンバーの存在下で部分的または十分に減弱されていることを意味する。例えば、感染細胞が、Rb / p16経路が損なわれており、または欠損している（すなわち、感染細胞が、Rb / p16経路内で正常レベルの十分に機能的なRbまたは他のタンパク質を発現しない）場合、Rb / p16 / E2F経路複製が損なわれているアデノウイルスの複製が、正常に進行する。反対に、細胞が正常レベルの機能的なRbを発現する場合（例えば、正常な活性を有するRb、「Rb発現細胞」とも本明細書で呼ばれる）、Rb複製が損なわれており、または欠損しているアデノウイルスの複製は、減弱され、または防止される。細胞は、正常レベルのRbを発現することができない（例えば、Rb遺伝子の調節（例えば、プロモーター）領域への突然変異）、または正常未満のRb活性を有する突然変異Rbを発現することによってRbが損なわれており、または欠損している場合がある。正常レベルのRbおよび正常なRb活性レベルは、同じタイプの健康な非疾患細胞内で見つかる。したがって、Rbが損なわれた細胞は、突然変異Rb遺伝子を含む。任意選択で、Rbが損なわれた細胞は、Rb遺伝子が完全または部分的に欠失されているゲノムを含む。Rbが損なわれた細胞は、がん（例えば、新生物）細胞であり得る。正常なRb機能の喪失をもたらし得る他のゲノム損傷としては、それだけに限らないが、CDK突然変異、サイクリン突然変異および増幅、p16突然変異、ならびに／またはエピジェネティックなサイレンシング、p107突然変異、p130突然変異、ならびに増殖因子受容体経路突然変異がある。

【0079】

用語「Rb / p16腫瘍抑制因子経路」または「Rb / p16経路」は、網膜芽細胞腫タンパク質（RB）、ならびにそれだけに限らないが、Cdk、E2f、非定型プロテインキナーゼC、およびSkp2を含めた経路内の他のタンパク質／タンパク質ファミリーを含む分子シグナル伝達のシグナル伝達経路全体を指す。用語「Rb / p16腫瘍抑制因子経路が損なわれており、または欠損している」は、シグナル伝達経路中の1つまたは複数の分子が、例えば、正常レベルのタンパク質を発現することができず、または正常未満の活性を有する突然変異タンパク質を発現し、その結果、経路が異常に機能することによって損なわれており、または欠損していることを意味する。このような欠損は、遊離E2Fの高発現レベルおよびE2Fプロモーターの高活性をもたらす。したがって、細胞は、Rb / p16腫瘍抑制因子経路内で正常レベルのタンパク質を発現することができない、または正常未満の活性を有する突然変異タンパク質を発現することによってRb / p16経路が損なわれており、または欠損している場合がある。

【0080】

用語「E1Aが損なわれている」、「E1Aが欠損している」、「E4orf1が欠損している」、「E4orf1が損なわれている」、「E4orf6 / 7が損なわれている」、および「E4orf6 / 7が欠損している」は、本明細書において、アデノウイルスが、正常レベルのかつ／または十分に機能的なE1A、E4orf1、またはE4orf6 / 7遺伝子産物を産生することができないことを意味する。例えば、ウイルスは、正常レベルのE1A、E4orf1、もしくはE4orf6 / 7遺伝子産物を発現することができない（例えば、E1A、E4orf1、もしくはE4orf6 / 7遺伝子の調節（例えば、プロモーター）領域への突然変異）、または正常未満のE1A、E4orf1、もしくはE4orf6 / 7遺伝子産物活性を有する突然変異したE1A、E4orf1、もしくはE4orf6 / 7遺伝子産物を発現することによって、E1A、E4orf1、またはE4orf6 / 7が欠損しており、または損なわれている場合がある。したがって、E1A、E4orf1、および／またはE4orf6 / 7が欠損しているアデノウイルスは、突然変異したE1A、E4orf1、および／またはE4orf6 / 7遺伝子を含む。任意選択で、E1A、E4orf1、および／またはE4orf6 / 7が欠損しているアデノウイルスは、E1A、E4orf1、および／またはE4orf6 / 7遺伝子が完

全または部分的に欠失されているゲノムを含む。アデノウイルスのE 1 AおよびE 4 領域は、公知であり、全体にわたって、かつ実施例に記載されている方法、および当技術分野で公知の他の方法を使用して改変され得る。例えば、その全体が本明細書に参照により組み込まれている国際公開第WO 1 9 9 8 / 0 4 6 7 7 9 号、米国特許第8 4 6 5 7 3 2 号、および国際公開第2 0 1 2 / 0 2 4 3 5 0 号を参照。例として、E 1 Aポリペプチドのアミノ酸配列は、少なくともGen Bank受託番号CAE 0 1 1 4 7 . 1、AP__0 0 0 1 6 1 . 1 (配列番号1)、およびAP__0 0 0 1 9 7 . 1 (配列番号2)において見つけることができ、E 4 or f 6 / 7 ポリペプチドのアミノ酸配列は、少なくともGen Bank受託番号AP__0 0 0 1 9 1 . 1 (配列番号3)およびAP__0 0 0 2 2 7 . 1 (配列番号4)において見つけることができる。E 4 or f 1 ポリペプチドのアミノ酸配列は、少なくともGen Bank受託番号AP__0 0 0 1 9 6 . 1 (配列番号5)およびAP__0 0 0 2 3 2 . 1 (配列番号6)において見つけることができる。これらのポリペプチドをコードする核酸は、少なくともGen Bank受託番号AC__0 0 0 0 0 8 . 1 (配列番号7)およびAC__0 0 0 0 0 7 . 1 (配列番号8)において見つけることができる。配列番号1または配列番号2と65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ超の配列同一性を含むE 1 Aポリペプチド、配列番号5または配列番号6と65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ超の配列同一性を含むE 4 or f 1 ポリペプチド、および配列番号3または配列番号4と65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ超の配列同一性を含むE 4 or f 6 / 7 ポリペプチドも提供される。

【0081】

タンパク質 (R b、E 1 A 遺伝子産物、E 4 or f 1 遺伝子産物、E 4 or f 6 / 7 遺伝子産物など) のレベルおよび活性を判定するための様々なアッセイ、例えば、増幅 / 発現法、免疫組織化学検査法、FISH および shed 抗原アッセイ、サザンブロット法、またはPCR 技法などが利用可能である。さらに、タンパク質の発現または増幅は、例えば、検出されるタンパク質に結合し、検出可能標識 (例えば、放射性同位体) でタグ付けされる分子 (抗体など) を投与し、標識の局在化について患者を外部からスキャンすることによって、in vivo 診断アッセイを使用して評価され得る。したがって、細胞内のタンパク質レベルのレベルを測定する方法は、当技術分野で一般に公知であり、適用可能な場合、本明細書に提供される方法および組成物とともにタンパク質レベルおよび / または活性を評価するのに使用され得る。これらのアッセイは、E 1 A、E 4 or f 1、およびE 4 or f 6 / 7 ポリペプチド、ならびにこれらの組合せ中の改変の効果判定して、例えば、改変がポリペプチドの正常レベルのまたは十分に機能的な遺伝子産物を産生することができないアデノウイルスをもたらすか否かを判定し、E 1 A、E 4 or f 1、およびE 4 or f 6 / 7 ポリペプチド、またはこれらの組合せの1つまたは複数のすべてまたは一部の欠失を含むアデノウイルスを確認するのに使用することができる。

【0082】

R b 欠損細胞内で選択的に複製するアデノウイルス (A d) が提供される。具体的には、1つまたは複数の改変を含むE 1 A ポリペプチドを含み、1つまたは複数の改変を含むE 4 or f 6 / 7 ポリペプチドを含み、1つまたは複数の改変を含むE 4 or f 1 ポリペプチドならびにこれらの様々な組合せを含むアデノウイルスが提供される。E 1 A 遺伝子、E 4 or f 1 遺伝子、および / またはE 4 or f 6 / 7 遺伝子のすべてまたは一部の欠失を含むゲノムを含むアデノウイルスも提供される。したがって、E 4 or f 1 ポリペプチドをコードする核酸配列を欠き、かつ / またはE 4 or f 6 / 7 ポリペプチドをコードする核酸配列を欠き、1つまたは複数の改変を有するE 1 A をコードする核酸を含むゲノムを含むアデノウイルスが提供される。上記に論じたように、用語「改変」は、遺伝子の核酸配列またはアミノ酸配列中の改変を指す。改変としては、それだけに限らないが、挿入、置換、および欠失がある。アミノ酸配列改変は、典型的には、3つのクラス：置換、

挿入、または欠失改変の1つまたは複数に入る。挿入としては、アミノおよび/または末端融合、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入がある。欠失は、タンパク質配列からの1つまたは複数のアミノ酸残基の除去によって特徴付けられる。アミノ酸置換は、典型的には単一残基のものであるが、いくつかの異なる位置で一度に起こり得る。置換改変は、少なくとも1つの残基が除去され、異なる残基がその場所に挿入されたものである。置換、欠失、挿入、またはこれらの任意の組合せは、最終的なコンストラクトに達するように組み合わせることができる。

【0083】

任意選択で、E1Aの改変は、E1AのRb結合部位中の改変を含む。任意選択で、E1Aの改変は、配列番号1または配列番号2と比較して、E1Aポリペプチドのアミノ酸残基122~126の1つまたは複数、例えば、アミノ酸残基122~126において改変を含む。任意選択で、改変は欠失である。したがって、任意選択で、E1Aおよび/またはE4orf6/7の改変は、欠失を含む。任意選択で、E1Aの改変は、例えば、配列番号1または配列番号2と比較して、E1Aのアミノ酸残基122~126の欠失である。任意選択で、改変は、E1Aの保存されたLXCXEモチーフにおける欠失であり、

LXCXEと全体にわたって呼ばれる。例として、保存されたモチーフは、配列番号1または配列番号2のアミノ酸残基122~126において見つけることができる。E4orf6/7は、図2および6に示した2つのエクソンによってコードされる。任意選択で、E4orf6/7の改変は、E4orf6/7エクソンの一方または両方において改変を含む。任意選択で、E4orf6/7の改変は、E4orf6/7エクソンの一方または両方の欠失である。任意選択で、E4orf6/7の改変は、E4orf6/7である。任意選択で、アデノウイルスは、E1A LXCXEおよびE4orf6/7を含み、Ad E1A LXCXE/E4orf6/7またはAdSyn-CO181と全体にわたって呼ばれる。

【0084】

したがって、1つまたは複数の改変を含むE1Aポリペプチドを含み、かつ/または1つまたは複数の改変を含むE4orf6/7ポリペプチドを含むアデノウイルスが提供される。E1Aポリペプチドは、E1AのRb結合部位中に改変を含み得る。E1Aポリペプチドは、2つのRb結合部位を含み得、ここでE1Aポリペプチドは、両方のRb結合部位中に改変を含む。任意選択で、E1Aポリペプチドは、E1Aポリペプチドのアミノ酸残基120~130の1つもしくは複数における改変、E1Aポリペプチドのアミノ酸残基122~126の1つもしくは複数における改変、E1Aポリペプチドのアミノ酸残基35~55の1つもしくは複数における改変、E1Aポリペプチドのアミノ酸残基37~49の1つもしくは複数における改変、またはこれらの組合せを含む。例えば、改変は、配列番号1または配列番号2と比較して、アミノ酸残基120~130、122~126、35~55、37~49、またはこれらの組合せの1つまたは複数において起こり得る。例として、E1Aポリペプチドは、E1Aポリペプチドのアミノ酸残基122~126の1つまたは複数において、かつアミノ酸残基37~49の1つまたは複数において改変を含み得、E1Aは、任意選択で配列番号1または配列番号2を含む。したがって、提供されるE1Aポリペプチドは、1つまたは複数の置換を含み得る。任意選択で、E1Aポリペプチドは、残基Y47、残基C124において、または残基Y47およびC124の両方において置換を含み、E1Aは、任意選択で配列番号1または配列番号2を含む。代替としてまたは追加的に、E1Aポリペプチドは、欠失を含む。任意選択で、欠失は、E1Aポリペプチドのアミノ酸残基122~126の欠失および/またはE1Aポリペプチドのアミノ酸残基2~11の欠失である。任意選択で、E1Aポリペプチドは、欠失LXCXEを含む。上記に論じたように、改変されるE1Aポリペプチドは、配列番号1または配列番号2を含み得る。

【0085】

提供されるアデノウイルスでは、E4orf6/7ポリペプチドは、E4orf6/7エクソンの一方または両方において改変を含み得る。したがって、E4orf6/7ポリ

10

20

30

40

50

ペプチドは、挿入、置換、および欠失、ならびにこれらの組合せを含めた1つまたは複数の改変を含み得る。任意選択で、E 4 o r f 6 / 7 ポリペプチドは、E 4 o r f 6 / 7 エクソンの一方または両方の欠失を含む。任意選択で、E 4 o r f 6 / 7 は、例えば、配列番号3または4と比較して、4 ~ 38、4 ~ 58、または38 ~ 58個のN末端アミノ酸からなる群から選択されるN末端欠失を含む。例えば、その全体が本明細書に参照により組み込まれているSchaleyら、J. Virol.、79巻(4号): 2301 ~ 8頁(2005年)を参照。任意選択で、E 4 o r f 6 / 7 ポリペプチドは、d1355、d1356、およびd1366からなる群から選択される改変を含む(その全体が本明細書に参照により組み込まれているHuangおよびHearing、Genes & Development、3巻: 1699 ~ 1710頁(1989年))。上記に論じたように、改変のためのE 4 o r f 6 / 7 ポリペ

10

【0086】

提供されるアデノウイルスでは、アデノウイルスは、1つまたは複数の改変を含むE 4 o r f 1 ポリペプチドを含み得る。任意選択で、E 4 o r f 1 ポリペプチドは、1つまたは複数の欠失を含む。任意選択で、E 4 o r f 1 ポリペプチドは、E 4 o r f 1 のC末端領域中に欠失を含む。任意選択で、E 4 o r f 1 ポリペプチドは、E 4 o r f 1 ポリペプチドのC末端領域中の最後の4個のアミノ酸の欠失を含む。任意選択で、E 4 o r f 1 ポリペプチドは、E 4 o r f 1 ポリペプチドの残基125 ~ 128の欠失を含み、任意選択で、E 4 o r f 1 ポリペプチドは、配列番号5または配列番号6を含む。任意選択で、E 4 o r f 1 ポリペプチドは、D68A、P17A、Y26A、L109A、P117A、E3A、L5A、G13T、P31A、G58T、E85A、およびL86Aからなる群から選択される改変を含む(その全体が本明細書に参照により組み込まれているChungら、J. Virol.、81巻(9号): 4787 ~ 97頁(2007年))。上記に論じたように、改変のためのE 4 o r f 1 ポリペプチドは、配列番号5または配列番号6を含み得る。したがって、1つまたは複数の改変を含むE 1 A ポリペプチドを含み、1つまたは複数の改変を含むE 4 o r f 1 ポリペプチドを含むアデノウイルスも提供される。上述したように、アデノウイルスは、1つまたは複数の改変を含むE 4 o r f 6 / 7 ポリペプチドをさらに含み得る。

20

【0087】

上述した改変アデノウイルスをコードする核酸も本明細書に提供される。任意選択で、改変アデノウイルスをコードする1つの核酸が提供される(例えば、プラスミド)。任意選択で、改変アデノウイルスをコードする複数の核酸が提供される(例えば、複数のプラスミド)。

30

【0088】

改変は、当技術分野で公知の任意の数の方法を使用してウイルスの核酸中に生成される。例えば、部位指向性突然変異誘発を、核酸配列を改変するのに使用することができる。部位指向性突然変異誘発の最も一般的な方法の1つは、オリゴヌクレオチド指向性突然変異誘発である。オリゴヌクレオチド指向性突然変異誘発では、配列中の所望の変化(複数可)をコードするオリゴヌクレオチドがアニールされて目的のDNAの一本鎖にされ、DNA合成を開始するためのプライマーとして機能する。このようにして、配列変化を含有するオリゴヌクレオチドが新しく合成される鎖中に組み込まれる。例えば、Kunkel、1985年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82巻: 488号; Kunkelら、1987年、Meth. Enzymol.、154巻: 367頁; Lewis & Thompson、1990年、Nucl. Acid Res.、18巻: 3439頁; Bohnsack、1996年、Meth. Mol. Biol.、57巻: 1頁; Deng & Nickoloff、1992年、Anal. Biochem.、200巻: 81頁; および Shimada、1996年、Meth. Mol. Biol.、57巻: 157頁を参照。他の方法も、配列中に改変を導入するのに当技術分野でごく普通に使用されている。例えば、改変核酸は、PCRもしくは化学合成を使用して生成され、またはアミノ酸配列中に所望の変化を有するポリペプチドが化学合成され得る。例えば、Bang & Kent、2005年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、102巻: 5014 ~ 9頁、およびその中の参考文献を参照。ウ

40

50

ウイルスが通常増殖されない細胞型（例えば、ヒト細胞）についての選択および／または化学的突然変異誘発（例えば、Rudd & Lemay、2005年、J. Gen. Virology、86巻：1489～97頁を参照）もウイルスの核酸中に改変を生成するのに使用され得る。

【0089】

全体にわたって記載された改変アデノウイルスに感染した細胞も提供される。細胞は、上述した改変アデノウイルスによって形質転換され得る。任意選択で、細胞は、上述した改変アデノウイルスの遺伝物質の取込み、組込み、および発現の結果として遺伝子改変されている。任意選択で、細胞は、ヒト細胞などの哺乳動物細胞である。アデノウイルスは、ヒトアデノウイルスなどの哺乳動物アデノウイルスであり得る。任意選択で、細胞は、両生類細胞（例えば、カエル細胞）または爬虫類細胞（例えば、ヘビ細胞）である。

10

【0090】

組成物

改変ウイルス（または改変アデノウイルスをコードする1種もしくは複数の核酸）を含む組成物が本明細書に提供される。組成物は、任意選択で、*in vitro*または*in vivo*での配合および投与に適している。任意選択で、組成物は、提供される作用物質の1種または複数、および薬学的に許容される担体を含む。適当な担体およびこれらの製剤は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、22版、Lloyd V. Allenら編、Pharmaceutical Press（2012年）に記載されている。薬学的に許容される担体とは、生物学的または別段に望ましくなくない材料を意味し、すなわち、その材料は、望ましくない生物学的効果を生じさせることなく、またはそれが含有されている医薬組成物の他のコンポーネントと有害な様式で相互作用することなく対象に投与される。対象に投与される場合、担体は、活性成分の劣化を最小限にし、対象における有害な副作用を最小限にするよう任意選択で選択される。

20

【0091】

改変ウイルス（または改変アデノウイルスをコードする1種もしくは複数の核酸）は、静脈内投与などの公知の方法に合わせて、例えば、ボラスとして、またはある時間にわたる持続注入によって、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内（intracerebrospinal）、皮下、関節内、滑液包内、髄腔内、経口、局部的、腫瘍内、または吸入経路によって投与される。投与は、局所的であっても全身的であってもよい。組成物は、局部的、経口的、非経口的、静脈内、関節内、腹腔内、筋肉内、皮下、腔内、経皮的、肝内、頭蓋内、噴霧／吸入を含めたいくつかの投与経路のいずれかを介して、または気管支鏡を介したインストールによって投与され得る。したがって、組成物は、局所的処置が望まれているか、全身的処置が望まれているかに応じて、かつ処置される範囲に応じていくつかの方法で投与される。

30

【0092】

投与用組成物は、一般に、薬学的に許容される担体、好ましくは水性担体中に溶解した本明細書に記載の作用物質（例えば、改変アデノウイルス、または改変アデノウイルスをコードする1種もしくは複数の核酸）を含むことになる。様々な水性担体、例えば、緩衝食塩水などが使用され得る。これらの溶液は、滅菌されており、一般に、望ましくない物質を含まない。これらの組成物は、慣例的な周知の滅菌技法によって滅菌され得る。組成物は、おおよその生理的条件に要求される薬学的に許容される補助物質、例えば、pH調整剤および緩衝剤、毒性調整剤など、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどを含有し得る。これらの製剤中の活性剤の濃度は、変化に富む場合があり、選択される特定の投与モードおよび対象の必要性によって、液量、粘度、体重などに主に基づいて選択されることになる。

40

【0093】

特に改変ウイルスの医薬製剤は、所望の程度の純度を有する改変アデノウイルス（または改変アデノウイルスをコードする1種もしくは複数の核酸）を、任意選択の薬学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤と混合することによって調製され得る。このような製剤は、凍結乾燥製剤または水溶液であり得る。

【0094】

50

許容される担体、賦形剤、または安定剤は、使用される投与量および濃度でレシピエントに無毒性である。許容される担体、賦形剤、または安定剤は、酢酸、リン酸、クエン酸、および他の有機酸；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸）、防腐剤、低分子量ポリペプチド；血清アルブミンなどのタンパク質、またはゼラチン、またはポリビニルピロリドン（polyvinylpyrrolidone）などの親水性ポリマー；ならびにアミノ酸、単糖、二糖、およびグルコース、マンノース、またはデキストリンを含めた他の炭水化物；キレート化剤；ならびにイオン性および非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート）；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；ならびに/または非イオン性界面活性剤であり得る。改変アデノウイルス（または改変アデノウイルスをコードする1種もしくは複数の核酸）は、任意の適切な濃度の感染単位で製剤化され得る。

10

【0095】

経口投与に適した製剤は、(a) 水、生理食塩水、またはPEG 400などの希釈剤中に懸濁された有効量の改変アデノウイルスなどの溶液；(b) 液体、固体、顆粒剤、またはゼラチンとして所定量の活性成分をそれぞれ含有するカプセル剤、サッシェ剤、または錠剤；(c) 適切な液体中の懸濁液；および(d) 適当なエマルジョンからなり得る。錠剤形態は、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、リン酸カルシウム、コーンスターチ、ジャガイモデンプン、微結晶性セルロース、ゼラチン、コロイド二酸化ケイ素、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、および他の賦形剤、着色剤、充填剤、結合剤、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、防腐剤、香味剤、色素、崩壊剤、および薬学的に適合性の担体の1種または複数を含み得る。ロゼンジ剤形態は、香料、例えば、スクロース、ならびに活性成分に加えて当技術分野で公知の担体を含有する不活性基剤、例えば、ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアカシアエマルジョン、ゲルなどの中に活性成分を含む香錠中に活性成分を含み得る。

20

【0096】

単独の、または他の適当なコンポーネントと組み合わせた改変アデノウイルス（または改変アデノウイルスをコードする1種もしくは複数の核酸）は、吸入を介して投与されるエアゾール製剤にすることができる（すなわち、これらは、「噴霧され」得る）。エアゾール製剤は、加圧された許容される噴霧剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などの中に入れることができる。

【0097】

例えば、関節内（intraarticular）（関節（joint）内）、静脈内、筋肉内、腫瘍内、皮内、腹腔内、ならびに皮下経路などによる非経口投与に適した製剤としては、抗酸化剤、緩衝液、静菌薬、および製剤を意図されたレシピエントの血液と等張性にする溶質を含有し得る水性および非水性等張性滅菌注射液、ならびに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、および防腐剤を含み得る水性および非水性滅菌懸濁液がある。提供される方法では、組成物は、例えば、静脈内注入、経口的、局部的、腹腔内、膀胱内、腫瘍内、またはクモ膜下によって投与され得る。非経口投与、腫瘍内投与、および静脈内投与が投与の好適な方法である。化合物の製剤は、単位用量または複数用量のシール容器、例えば、アンプルおよびバイアルなどで提供することができる。

30

【0098】

注射液および懸濁液は、以前に記載した種類の滅菌散剤、顆粒剤、および錠剤から調製され得る。ex vivo療法のためにアデノウイルスによってトランスダクトもしくは感染され、または核酸をトランスフェクトされた細胞は、上述したように、静脈内または非経口的に投与され得る。

40

【0099】

医薬製剤は、好ましくは単位剤形である。このような形態では、調製物は、適切な量の活性コンポーネントを含有する単位用量に細分される。したがって、医薬組成物は、投与方法に応じて様々な単位剤形で投与され得る。例えば、経口投与に適した単位剤形としては、それだけに限らないが、散剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、およびロゼンジ剤がある。

【0100】

50

処置の方法

提供される改変アデノウイルスおよび/または改変アデノウイルスを含む組成物は、治療的または予防的処置のために投与され得る。

【0101】

したがって、対象における増殖性障害を処置する方法が提供される。本方法は、提供されるアデノウイルスまたは組成物を対象に投与するステップを含む。全体にわたって記載されているように、アデノウイルスまたは医薬組成物は、それだけに限らないが、静脈内、脈管内、クモ膜下、筋肉内、皮下、腹腔内、または経口的を含めた任意の数の方法で投与される。任意選択で、本方法は、1つまたは複数の追加の治療剤を対象に投与するステップをさらに含む。任意選択で、治療剤は、化学療法剤である。

10

【0102】

全体にわたって記載されているように、増殖性障害は、がんであり得る。任意選択で、増殖性障害は、肺がん、前立腺がん、結腸直腸がん、乳がん、甲状腺がん、腎がん、肝がん、および白血病からなる群から選択される。任意選択で、増殖性障害は、転移性である。上記に論じたように、がんは、急速に増殖する細胞増殖または新生物によって特徴付けられる温血動物における異常な状態または病状を含む。新生物疾患には、白血病などのびまん性新生物、ならびに悪性または良性のがんおよび腫瘍（任意の癌腫、肉腫、または腺腫を含む）を含めた悪性または良性の新生物が含まれる。新生物は一般に、正常なものより急速な細胞増殖によって増殖する異常組織として認識され、新生物（new growth）を開始した刺激が止んだ後に増殖し続けることができる。新生物疾患としては、例えば、腫瘍、例えば、乳房、下垂体、甲状腺、または前立腺の腫瘍；脳、肝臓、髄膜、骨、卵巣、子宮、子宮頸などの腫瘍；ならびに単球白血病および骨髄性白血病の両方、腺癌、腺腫、神経膠星状細胞腫、膀胱腫瘍、脳腫瘍、パーキットリンパ腫、乳癌、子宮頸癌、結腸癌、腎癌、肝癌、肺癌、卵巣癌、脾癌、前立腺癌、直腸癌、皮膚癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、軟骨肉腫、絨毛癌、線維腫、線維肉腫、グリア芽細胞腫、神経膠腫、肝細胞癌、組織球腫、平滑筋芽細胞腫、平滑筋肉腫、リンパ腫、脂肪肉腫細胞、乳腺腫瘍、髄芽腫、骨髄腫、プラズマ細胞腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、骨原性肉腫、脾臓腫瘍、下垂体腫瘍、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、肉腫、精巣腫瘍、胸腺腫、ウィルムス腫瘍などがある。腫瘍としては、乳房、大腸、直腸、肺、中咽頭、下咽頭、食道、胃、脾臓、肝臓、胆嚢および胆管、小腸、尿路（腎臓、膀胱、および尿路上皮を含む）、雌生殖路（子宮頸、子宮、および卵巣、ならびに絨毛癌および妊娠性絨毛性疾患を含む）、雄生殖路（前立腺、精嚢、精巣、および胚細胞腫瘍を含む）、内分泌腺（甲状腺、副腎、および脳下垂体を含む）、および皮膚の癌腫、ならびに血管腫、黒色腫、肉腫（骨および軟組織から生じるもの、ならびにカポジ肉腫を含む）、ならびに脳、神経、眼、および髄膜の腫瘍（神経膠星状細胞腫、神経膠腫、グリア芽細胞腫、網膜芽細胞腫、神経腫、神経芽細胞腫、シュワン腫、および髄膜腫を含む）を含めた原発性および転移性固形腫瘍の両方がある。一部の態様では、リンパ腫（ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫の両方）の処置においてと同様に、白血病などの造血器悪性腫瘍から生じる固形腫瘍（すなわち、緑色腫、プラズマ細胞腫、ならびに菌状息肉腫および皮膚T細胞リンパ腫/白血病のブランクおよび腫瘍）が処置され得る。さらに、処置は、本明細書に記載の腫瘍からの転移の防止において有用であり得る。

20

30

40

【0103】

治療用途では、組成物は、「治療有効用量」で増殖性疾患または障害（例えば、がん）を罹患している対象に投与される。この使用に有効な量は、疾患の重症度、および患者の健康の一般的な状態に依存することになる。組成物の単一または複数の投与は、患者が必要とし、耐容性を示す投与量および頻度に応じて投与され得る。「患者」または「対象」には、ヒトおよび他の動物の両方、特に哺乳動物が含まれる。したがって、本方法は、ヒト療法および獣医学的用途に両方に適用可能である。

【0104】

改変配列を有するウイルスの有効量は、個別的に判定され、使用される特定のウイルス

50

；個体のサイズ、年齢、性別；ならびに増殖中の細胞のサイズおよび他の特性に少なくとも部分的に基づく。例えば、ヒトの処置については、増殖中の細胞または存在する新生物のタイプ、サイズ、および数に応じて、およそ $10^3 \sim 10^{12}$ プラーク形成単位 (PFU) のウイルスが使用される。有効量は、約 $1.0 \text{ pfu} / \text{体重} 1 \text{ kg} \sim$ 約 $10^{15} \text{ pfu} / \text{体重} 1 \text{ kg}$ (例えば、約 $10^2 \text{ pfu} / \text{体重} 1 \text{ kg} \sim$ 約 $10^{13} \text{ pfu} / \text{体重} 1 \text{ kg}$) であり得る。ウイルスは、単一用量または複数用量 (例えば、2、3、4、6、もしくはそれ超の用量) で投与される。複数用量は、同時に、または連続して (例えば、数日もしくは数週間の期間にわたって) 投与される。改変配列を有するウイルスを用いた処置は、疾患の縮小が実現されるまで、数日～数カ月続く。

【0105】

任意選択で、提供される方法は、1種または複数の追加の治療剤を対象に投与するステップを含む。したがって、提供される方法は、他のがん療法、放射線療法、ホルモン療法、または化学療法と組み合わせることができる。適当な追加の治療剤としては、それだけに限らないが、化学療法剤、CDK阻害剤、抗炎症剤、抗生物質、抗ウイルス剤、免疫学的薬剤、ビタミン、増殖因子、およびホルモンからなる群から選択される治療剤がある。したがって、提供される方法は、任意選択で、公知の抗がん化合物または化学療法剤を対象に投与するステップを含む。化学療法剤としては、それだけに限らないが、5-フルオロウラシル；マイトマイシンC；メトトレキサート；ヒドロキシウレア；シクロホスファミド；ダカルバジン；ミトキサントロン；アントラサイクリン (anthracyclins) (エピルピシンおよびドキソルピシン (doxorubicin))；ハーセプチンなどの受容体に対する抗体；エトボシド；プレグナソーム (pregnasome)；タモキシフェンおよび抗エストロゲンなどのホルモン療法；インターフェロン；アロマトラーゼ阻害剤；黄体ホルモン剤；ならびにLHRH類似体がある。CDK (サイクリン依存性キナーゼ) 阻害剤は、CDKの機能を阻害する作用物質である。提供される方法で使用するのに適したCDK阻害剤としては、それだけに限らないが、AG-024322、AT7519、AZD5363、フラボピリドール、インジスラム、P1446A-05、PD-0332991、およびP276-00がある (例えば、その全体が本明細書に参照により組み込まれているLapennaら、Nature Reviews、8巻：547～566頁 (2009年) を参照)。作用物質および投与量の選択は、処置されている所与の疾患に基づいて当業者によって容易に判定され得る。組合せ投与は、別個の製剤または単一の医薬製剤を使用する同時投与、および好ましくは両方 (またはすべて) の活性剤がその生物活性を同時に発揮する時間がある、いずれかの順序での連続投与を企図する。作用物質または組成物の組合せは、同時に (例えば、混合物として)、別個であるが同時に (例えば、別個の静脈内ラインを介して)、または逐次 (例えば、1つの作用物質が最初に投与され、その後、第2の作用物質の投与が続く) 投与され得る。したがって、用語の組合せは、2種またはそれ超の作用物質または組成物の同時、同時的、または逐次投与を指すのに使用される。

【0106】

本明細書に教示の方法によれば、対象は、有効量の本明細書に提供される作用物質の1種または複数投与される。用語の有効量および有効投与量は、互換的に使用される。用語の有効量は、所望の生理的応答 (例えば、がん細胞の殺傷) を生じさせるのに必要な任意の量として定義される。治療剤は典型的には、毎日約 $0.001 \text{ mg} / \text{kg} \sim$ 約 $1000 \text{ mg} / \text{kg}$ の初期投与量で投与される。約 $0.01 \text{ mg} / \text{kg} \sim$ 約 $500 \text{ mg} / \text{kg}$ 、または約 $0.1 \text{ mg} / \text{kg} \sim$ 約 $200 \text{ mg} / \text{kg}$ 、または約 $1 \text{ mg} / \text{kg} \sim$ 約 $100 \text{ mg} / \text{kg}$ 、または約 $10 \text{ mg} / \text{kg} \sim$ 約 $50 \text{ mg} / \text{kg}$ の用量範囲が使用され得る。しかし、投与量は、対象の必要量、処置されている病状の重症度、および使用されている化合物に応じて様々となり得る。例えば、投与量は、特定の対象において診断されるがんのタイプおよびステージを考慮して経験的に判定され得る。対象に投与される用量は、提供される方法との関連で、経時的に患者における有益な治療応答に影響するのに十分であるべきである。特定の状況についての適切な投与量の判定は、開業医のスキルの範囲内である。したがって、作用物質を投与するための有効量およびスケジュールは、当業者によって経

10

20

30

40

50

験的に判定され得る。投与のための投与量範囲は、疾患または障害の1つまたは複数の症状が影響される所望の効果（例えば、低減または遅延される）を生じさせるのに十分大きいものである。投与量は、実質的な有害な副作用、例えば、望まれない交差反応、アナフィラキシー反応などを引き起こすほど大きくないべきである。一般に、投与量は、年齢、病状、性別、疾患のタイプ、疾患もしくは障害の程度、投与経路、または他の薬物がレジメンに含まれるか否かによって様々となり、当業者によって判定され得る。投与量は、任意の禁忌のイベントにおいて個々の医師によって調整され得る。投与量は、様々となり得、1日または数日にわたって毎日1つまたは複数の用量の投与で投与され得る。所与のクラスの医薬品に関する適切な投与量についてのガイダンスは、文献で見つけることができる。

10

【0107】

本明細書において、用語の処置、処置する（*treat*）、または処置する（*treating*）は、プロテアーゼの発現によって特徴付けられる疾患もしくは病状の1つもしくは複数の症状の効果、またはプロテアーゼの発現によって特徴付けられる疾患もしくは病状の症状を低減する方法を指す。したがって、開示される方法では、処置は、確立された疾患、病状、または疾患もしくは病状の症状の重症度の10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%の低減を指すことができる。例えば、疾患を処置するための方法は、対照と比較して対象における疾患の1つまたは複数の症状の10%の低減がある場合、処置であると思なされる。したがって、低減は、天然または対照のレベルと比較して、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、または10%から100%の間の任意のパーセントの低減であり得る。処置は、必ずしも疾患、病状、または疾患もしくは病状の症状の治癒または完全な切除を指すわけではないことが理解される。さらに、本明細書において、低下、低減、または阻害への言及は、対照レベルと比較して10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ超の変化を含み、このような用語は、完全な排除を含み得るが、必ずしもそれを含む必要はない。

20

【0108】

キット

提供される改変アデノウイルスおよび/または改変アデノウイルスを含む組成物の1種または複数を含むキットが本明細書で提供される。したがって1つもしくは複数の改変を含むE1Aポリペプチドを含み、かつ/もしくは1つもしくは複数の改変を含むE4orf6/7ポリペプチドを含むアデノウイルス（Ad）、および/またはこのアデノウイルスを含む組成物を含むキットが提供される。任意選択で、アデノウイルスは、1つまたは複数の改変を含むE4orf1ポリペプチドをさらに含む。1つもしくは複数の改変を含むE1Aポリペプチドを含み、1つもしくは複数の改変を含むE4orf1ポリペプチドを含むアデノウイルス（Ad）、および/またはこのアデノウイルスを含む組成物を含むキットも提供される。任意選択で、組成物は、医薬組成物である。任意選択で、キットは、1種または複数の追加の治療剤をさらに含む。任意選択で、治療剤は、化学療法剤である。提供される医薬組成物の1種または複数、および使用のための指示書を含むキットが本明細書で提供される。任意選択で、キットは、Rb/p16腫瘍抑制因子経路欠損細胞内で選択的に複製するアデノウイルスを含む有効量の組成物の1つまたは複数の用量を含む。任意選択で、アデノウイルスは、アップレギュレートされたE2F活性を有する細胞内で選択的に複製する。任意選択で、組成物は、容器（例えば、バイアルまたは小包）内に存在する。任意選択で、キットは、組成物を投与する手段、例えば、シリンジ、針、管類、カテーテル、パッチなどを含む。キットは、使用する前に滅菌および/または希釈を必要とする製剤および/または材料も含み得る。

30

40

【0109】

開示される方法および組成物に使用され得る、これらと併せて使用され得る、これらの調製に使用され得る、またはこれらの生成物である材料、組成物、およびコンポーネントが開示される。これらおよび他の材料が本明細書に開示されており、これらの材料の組合

50

せ、サブセット、相互作用、群などが開示されているとき、これらの化合物のそれぞれの様々な個々および集団の組合せおよび並び換えの特定の言及は、明示的に開示されていない場合がある一方、それぞれは、具体的に企図され、本明細書に記載されていると理解される。例えば、一方法が開示され、論じられ、この方法を含むいくつかの分子に行うことができるいくつかの改変が論じられている場合、この方法のありとあらゆる組合せおよび並び換え、ならびに可能である改変は、それとは反対に具体的に示されていない限り、具体的に企図されている。同様に、これらの任意のサブセットまたは組合せも、具体的に企図され、開示されている。この概念は、それだけに限らないが、開示される組成物を使用する方法におけるステップを含めて、本開示のすべての態様に当てはまる。したがって、実施され得る様々な追加のステップがある場合、これらの追加のステップのそれぞれは、開示される方法の任意の特定のステップまたは方法ステップの組合せとともに実施することができ、それぞれのこのような組合せまたは組合せのサブセットは、具体的に企図されており、開示されていると見なされるべきであることが理解される。

10

【0110】

本明細書に引用される刊行物、およびこれらが引用されている資料は、その全体が参照により本明細書に具体的に組み込まれている。

【0111】

いくつかの実施形態を記載してきた。それでもやはり、様々な改変を行い得ることが理解されるであろう。したがって、他の実施形態も特許請求の範囲の射程内である。

【実施例】

20

【0112】

(実施例1)

調節が解除されたE2F活性を有する腫瘍細胞内で選択的に複製する腫瘍溶解性アデノウイルス

改変アデノウイルスを、以下に参照したコンポーネントを用いて作製した。GatewayDONRベクターを使用した。ヒトAd5DNAから、E1モジュールをPCRによって得、SLICを使用してベクターpDONR P1P4中に挿入した。attL1およびattL4組換え部位を含むpDONR P1P4ベクター骨格を、PCRを使用して増幅し、SLICによってAd5E1モジュールと組み合わせた。E3モジュールをPCRによって得ることによって、attB5およびattB3r組換え部位が隣接した産物を生成した。産物を、gatewayBP反応によってpDONR P5P3rベクター中に挿入した。E4モジュールをPCRによって得ることによって、attB3およびattB2組換え部位が隣接した産物を生成した。産物を、gatewayBP反応によってpDONR P3P2ベクター中に挿入した。pDONR P5P2ベクターに由来するattR5-ccdB-Cm(r)-attR2断片をPCRによって増幅し、AssemblyDESTベクター中に挿入した。「MultiSite Gateway (登録商標) Pro Plus」、カタログ番号12537-100; および Sone, T.ら、J Biotechnol., 2008年9月10日; 136巻(3~4号): 113~21頁を参照。Assembly法は、その全体が本明細書に参照により組み込まれている国際公開第WO2012/024351号に記載されている。

30

40

【0113】

AssemblyDESTベクターのベクター骨格は、3つの異なる源に由来する部分から構成されている。Amp(r)カセットおよびlacZ遺伝子をプラスミドpUC19から増幅した。これを、プラスミドpSB3K5-I52002、BioBricks iGEM 2007 パーツ配布(parts distribution)の一部から得たp15A複製起点と組み合わせた。p15A oriは、より低い(10~12)コピー数でプラスミドを維持し、E1毒性を低減するのに必要である。最後に、自己切除性ウイルス(self-excising virus)を創製するために、酵素IscEの哺乳動物発現カセットをプラスミドpAdZ5-CV5-E3+からPCRにかけた。このカセットをベクター骨格中にクローニングして、p15A-IscEと呼ばれるベクターを創製した。これは、ゲノムア

50

センブリーを開始するのに使用されるベクターである。遺伝子モジュールはすべて、野生型 Ad5 ウイルスから精製した DNA またはプラスミド pAd / CMV / V5 / DEST (Invitrogen) から得た。

【0114】

ヒト Ad5 の DEST ベクターに関して、E2 および L3 モジュールを 3 断片 SLIC によってプラスミド p15A - SceI 中に挿入した。attR5 および attR2 部位が隣接した ccdB および Chlor(r) を発現する対抗選択マーカーを、プラスミド pDONR P5P2 から PCR によって得た。第 2 の対抗選択マーカーをベクター pDONR P1P4 から PCR によって得た。2 つの対抗選択マーカーを、E2 および L4 モジュールの末端に操作されたユニークな制限酵素で切断した後、SLIC によって p15A - SceI E2 - L4 の右側および左側に挿入して、DEST ベクターを創製した。

10

【0115】

Amp(r) カセット：プラスミド pUC19 に関して、p15A ori：プラスミド pSB3K5 - I52002 は、BioBricks SIGEM 2007 パーツ配布の一部であった。アデノウイルス遺伝子モジュールに関して、Ad5 粒子から精製した DNA、またはプラスミド pAd / CMV / V5 / DEST (Invitrogen)。DONR ベクター pDONR P1P4、P5P2、P5P3R、P3P2 は、Jon Chesnut (Invitrogen) から受領した。

【0116】

PCR に関して、すべての PCR は、Phusion 酵素 (NEB) を使用して実施した。Ad5 から ADENOVIRAL GENE モジュールを得るための PCR は、1 × HF 緩衝液、200 μM のそれぞれの dNTP、0.5 μM のそれぞれのプライマー、および鋳型 10 ng を用いて実施した。E2 - L2 モジュールについては、3% DMSO も添加した。鋳型は、プラスミド pAd / PL - DEST (Invitrogen; E2 - L2、L3 - L4、および E4 モジュールについて)、または Ad5 ゲノム DNA (E1 および E3 モジュールについて) であった。PCR 条件は、以下の通りであった。E2 - L2 および L3 - L4：98 30 秒 - 10 サイクルの 98 10 秒、65 30 秒 (2 サイクル毎に温度を 1 低下させる)、72 7 分 - 29 サイクルの 98 10 秒、60 30 秒、72 8 分 - 72 10 分 - 4 保持。E3：98 30 秒 - 10 サイクルの 98 10 秒、70 30 秒 (サイクル毎に温度を 0.5 低下させる)、72 2 分 30 秒 - 25 サイクルの 98 10 秒、68 30 秒、72 2 分 30 秒 - 72 10 分 - 4 保持。E4：98 30 秒 - 6 サイクルの 98 10 秒、63 30 秒 (サイクル毎に温度を 0.5 低下させる)、72 2 分 - 29 サイクルの 98 10 秒、60 30 秒、72 2 分 - 72 5 分 - 4 保持。

20

30

【0117】

精製ウイルスからウイルスゲノム DNA を得ることに、精製ウイルス最大 100 μl を、10 mM Tris pH8、5 mM EDTA、200 mM NaCl、および 0.2% SDS を含有する溶解緩衝液 300 μl に添加する。混合物を 60 で 5 分間インキュベートし、その後、プロテイナーゼ K ストック (約 20 mg / mL) 5 μl を添加し、60 で 1 時間さらにインキュベートする。次いで試料を氷上に 5 分間置き、その後、15 K × g で 15 分間回転させる。上清を取り出し、等体積のイソプロパノールに添加し、十分混合し、4 にて 15 K × g で 15 分間回転させる。ペレットを 70% エタノールで洗浄し、4 で 15 分間再回転させる。ペレットを乾燥させ、使用のために再懸濁させる。

40

【0118】

SLIC に関して、線状断片は、以下の 20 μl の反応中で室温にて 20 分間処理したエキソヌクレアーゼである：50 mM Tris pH8、10 mM MgCl₂、50 μg / mL BSA、200 mM 尿素、5 mM DTT、および T4 DNA ポリメラー

50

ぜ 0.5 μ l。反応は、0.5 M EDTA 1 μ l を添加することによって停止し、その後 75 で 20 分間インキュベートする。次いで等量の T4 処理 DNA を混合して、新しいチューブ中で体積約 20 μ l にする。2 断片を組み合わせる SLIC について、各反応物 10 μ l を使用する。3 断片を組み合わせる SLIC について、各反応物 7 μ l を使用する。断片を 65 で 10 分間加熱することによってアニールし、その後、5 秒毎に温度を 0.5 低下させて 25 まで徐々に冷却する。アニールした後、反応物 5 μ l を形質転換し、クローンをスクリーニングする。

【0119】

AdSLiCR に関して、3 断片 SLIC 反応を、T4 処理 p15A - SceI (PCR によって線状化した) 100 ng、ならびに E2 および L3 モジュール (これらのそれぞれのエントリーベクターから PCR によって得た) のそれぞれ 300 ng を使用して実施する。これにより、ベクター p15A - SceI E2 - L4 が創製される。p15A - SceI E2 - L4 5 μ g を SmaI で切断し、Qiagen QiaexII を使用してゲルを精製する。E3 および E4 モジュールは、これらのそれぞれのエントリーベクターから PCR によって得られる。線状化ベクター (450 ng) および PCR 産物 (200 ng) のそれぞれを T4 DNA ポリメラーゼで処理し、SLIC を、ベクター 150 ~ 200 ng および各モジュール PCR 約 100 ng を使用して、通常通り実施する。陽性クローンを単離した後、新しいベクター 5 μ g を PacI で切断し、ゲルを精製し、次いで新しい SLIC 反応において E1 PCR 産物 (T4 処理したもの 100 ng) と組み合わせる。これによりゲノムアセンブリーが完了し、プラスミドは、ウイルスを再構成するためのトランスフェクションの準備ができている。

【0120】

E1 および E4 突然変異領域の構築に関して、個々のモジュールエントリーベクターに対して操作を実施した。ベクター骨格を有する E1 モジュールを、プライマーを用いて PCR にかけて L T C H E 配列 (残基 122 ~ 126) を欠く産物を生成し、次いで SLIC を使用して環状化することによって pENTR - E1 - E1A - L X C X E を生成した。代わりに、ベクター骨格を有する E1 モジュールを、プライマーを用いて PCR にかけて、Y47 を H に、残基 C124 を G に突然変異させ、または残基 2 ~ 11 を欠失させる E1A コドン変化を有する産物を生成することによって、それぞれ pENTR - E1 - E1A - Y47H、pENTR - E1 - E1A - C124G、または pENTR - E1 - E1A - 2 - 11 を生成した。これらの産物を、さらなる PCR 突然変異のための鋳型として使用して、これらの突然変異の組合せ: pENTR - E1 - E1A - Y47H - C124G および pENTR - E1 - E1A - Y47H - C124G - 2 - 11 を生成した。ベクター骨格を有する E4 モジュールを、プライマーを用いて PCR にかけて E4orf6 終止コドンの下流の E4orf6 / 7 特異的エクソン配列 (297 bp) を欠く産物を生成することによって、pENTR - E4 - E4orf6 / 7 を生成した。この産物はまた、プライマーを用いた PCR のための鋳型として使用して、E4orf1 の PDZ 結合モチーフ、または全 E4orf1 配列を欠く産物 (それぞれ pENTR - E4 - E4orf6 / 7 - E4orf1 PDZb および pENTR - E4 - E4orf6 / 7 - E4orf1) を生成した。

【0121】

突然変異を持つ完全ウイルスゲノムを生成するために、AdSLiCR を、wt E3 モジュールおよび wt E4 または突然変異体 E4 モジュールと組み合わせて、次いで wt E1 または突然変異体 E1 と組み合わせて、p15A - SceI E2 - L4 を使用して実施した。野生型 AdSLiCR アデノウイルスは、以下に示した表 1 に指定されている。

【表 1 - 1】

表1. E1およびE4.Adにおける アデノウイルス改変	E1	E4
Ad-102 [AdSyn-CO102]	wt	wt
Ad-210 [AdSyn-CO210]	wt	dE4orf6/7
AdSyn-CO283	wt	E4orf1 dPDZb, dE4orf6/7
AdSyn-CO284	wt	dE4orf1, dE4orf6/7
Ad-189 [AdSyn-CO189]	E1A dLXCXE	wt
Ad-181 [AdSyn-CO181]	E1A dLXCXE	dE4orf6/7

10

20

【表 1 - 2】

AdSyn-CO285	E1A dLXCXE	E4orf1 dPDZb, dE4orf6/7
AdSyn-CO286	E1A dLXCXE	dE4orf1, dE4orf6/7
AdSyn-CO235	E1A C124G	wt
AdSyn-CO287	E1A C124G	dE4orf6/7
AdSyn-CO288	E1A C124G	E4orf1 dPDZb, dE4orf6/7
AdSyn-CO289	E1A C124G	dE4orf1, dE4orf6/7
AdSyn-CO236	E1A d2-11	wt
AdSyn-CO290	E1A d2-11	dE4orf6/7
AdSyn-CO291	E1A d2-11	E4orf1 dPDZb, dE4orf6/7
AdSyn-CO292	E1A d2-11	dE4orf1, dE4orf6/7
AdSyn-CO238	E1A Y47H, C124G	wt
AdSyn-CO293	E1A Y47H, C124G	dE4orf6/7
AdSyn-CO294	E1A Y47H, C124G	E4orf1 dPDZb, dE4orf6/7
AdSyn-CO295	E1A Y47H, C124G	dE4orf1, dE4orf6/7
AdSyn-CO244	E1A Y47H, C124G, d2-11	wt
AdSyn-CO296	E1A Y47H, C124G, d2-11	dE4orf6/7
AdSyn-CO297	E1A Y47H, C124G, d2-11	E4orf1 dPDZb, dE4orf6/7

【表 1 - 3】

AdSyn-CO298	E1A Y47H, C124G, d2-11	dE4orf1, dE4orf6/7
-------------	---------------------------	--------------------

【 0 1 2 2 】

ウイルスの産生、濃度、および精製に関して、293 E4細胞を感染性粒子に感染させ、CPEが明らかである、感染させておよそ48時間後に細胞を収集し、500×gで5分間遠心分離することによって単離する。TMN緩衝液(10mM TrisClp

10

20

30

40

50

H 7.5、1 mM MgCl₂、150 mM NaCl) 中で3×凍結/解凍を介して細胞を溶解させ、3 K×g および3.5 K×g で15分間、2ラウンドの遠心分離によって細胞残屑を取り出す。塩化セシウム勾配(0.5 g/mL)を使用して、37 K×g で18~24時間、超遠心分離を介してウイルス粒子をバンド化する。バンドを収集し、10%グリセロールを含むTMN中で4 にて一晚(12~18時間)、10 k MWCO Slide-A-Lyzer (登録商標)透析カセット(Thermo Scientific)内で透析し、次いで-80 で貯蔵する。精製ウイルスの力価を、抗アデノウイルス5型一次抗体(ab6982、Abcam)、およびImmunoPure抗ウサギアルカリホスファターゼ二次抗体(Thermo Scientific)を用いた細胞ベース連続希釈感染ELISAによって、力価測定された野生型標準に対して判定する。

10

【0123】

原発性ヒト小気道上皮細胞(SAEC)の感染中のアデノウイルスタンパク質発現の評価に関して、12ウェルプレート中の静止状態SAECをMOI30アデノウイルスに感染させた。感染させて4時間後の細胞について培地を置き換える。感染させて24、36、および48時間後に、細胞を冷PBSで洗浄し、冷PBS 500 μL中に回収し、5 K rpmで4 にて5分間ペレット化し、スナップ凍結させ、-80 で貯蔵した。細胞ペレットを、RIPA緩衝液(100 mM Tris pH7.4、300 mM NaCl、2 mM EDTA、2% Triton X、2%デオキシコレート、2 mM NaF、0.2 mM NaVO₄、2 mM DTT)中で、カップ超音波処理器内での超音波処理(4 にて60振幅(60 amplitude)で2×60秒パルス)を含めて、4 で1時間溶解させた。細胞残屑を、13 K rpmで4 にて20分間遠心分離することによってペレット化した。タンパク質濃度を、Bio-radのDC(商標)タンパク質アッセイを使用して判定し、試料のタンパク質濃度を正規化した。ゲル電気泳動を、Life TechnologiesのNovex(登録商標)NuPAGE(登録商標)SDS-PAGEゲルを使用して、製造者のプロトコールに従って実施した。タンパク質をウェスタンブロットによって検出した。タンパク質を検出するのに使用した一次抗体は、以下の通りである: E1A(ab28305、Abcam)、-アクチン(A5441、Sigma)、Ad5後期タンパク質(ab6982、Abcam)、サイクリンA(Ab-66E6、NeoMarkers)、サイクリンB(Ab-3GNS1、NeoMarkers)。Life TechnologiesのAlexa Fluor(登録商標)抗体を二次抗体として使用し、信号をLI-COR ODYSSEY(登録商標)計測器を使用して検出した。肺腺癌A549細胞および正常ヒト星状細胞(NHA)の感染中のアデノウイルスタンパク質発現の評価に関して、12ウェルプレート中のコンフルエントな細胞をMOI10アデノウイルスに感染させ、SAECについて記載したのと同様にプロセッシングした。グリア芽細胞腫U87細胞、グリア芽細胞腫U118細胞、ヒト血管内皮細胞(HuVEC)、およびヒト線維芽細胞の感染中のアデノウイルスタンパク質発現の評価に関して、12ウェルプレート中のコンフルエントな細胞をMOI20アデノウイルスに感染させ、SAECについて記載したのと同様にプロセッシングした。

20

30

【0124】

細胞周期分析に関して、細胞をタンパク質発現についてと同じMOIで感染させた。感染させて48時間後、細胞をトリプシン処理してプレートから剥がし、冷PBSで洗浄した。細胞を冷PBS 500 μL中に再懸濁させ、冷えた70% EtOH/15 mMグリシン、pH2.8 3 mLで固定した。試料を4 で保ち、FACSの前に、細胞をペレット化し、冷PBS中で洗浄し、ヨウ化プロビジウム(PI)/RNase A溶液中に再懸濁させ、次いで37 にて1時間インキュベートした。少なくとも10 Kイベントを各試料についてFACSによって収集した。

40

【0125】

感染からのアデノウイルスバーストに関して、12ウェルプレート中の静止状態細胞を、MOI1または10アデノウイルスに感染させた。感染させて4時間後の細胞について

50

培地を置き換える。ウェルからの培地を感染させて48および72時間後に収集し、一度フラッシュ凍結させ、解凍し、7K rpmで4にて5分間遠心分離して細胞残屑をペレット化する。培地の体積を測定し、フラッシュ凍結させ、-80で貯蔵する。培地中のウイルスの力価を、抗アデノウイルス5型一次抗体(ab6982、Abcam)、およびImmunoPure抗ウサギアルカリホスファターゼ二次抗体(Thermo Scientific)を用いた細胞ベース連続希釈感染ELISAによって、力価測定された野生型標準に対して判定する。

【0126】

細胞生存率アッセイに関して、細胞を96ウェルプレート中に播種し、MOI30で、連続希釈で三つ組で感染させた。感染後、MOI10感染ウェル中で完全なCPEがある7~10日に、代謝活性を、細胞増殖試薬WST-1(Roche)を使用して、製造者の仕様書に従って測定する。

【0127】

データを図1~16に示す。上記に論じたように、がんは、追加の治療的処置の必要のある問題の疾患であり続ける。1つのこのような処置には、腫瘍溶解性ウイルスが含まれる。腫瘍溶解性ウイルスがん療法の一般的原理を示す概略図について図1を参照。アデノウイルスは、腫瘍溶解性ウイルスとして使用するために探索されているウイルスの1種である。図2は、アデノウイルス(Ad)の構造的特徴、ならびにボックス内の転写単位、および標識遺伝子を伴ったアデノウイルスゲノムのマップを示す概略図である。網膜芽細胞腫(Rb)腫瘍抑制因子経路機能は、Rbの直接の突然変異、突然変異/メチル化に起因するCDK阻害剤p16機能の喪失、またはCDK/サイクリンの増幅によってほとんどあらゆるヒトがんにおいて失われている。正常な非分裂細胞では、Rbは、低リン酸化型のままであり、その標的プロモーターにおいて転写因子E2Fに結合し、E2Fトランス活性化ドメインをマスキングし、かつクロマチン-リモデリング複合体およびヒストン修飾活性を動員することによって転写を抑制する。細胞周期のG1-S移行中、CDKは、Rbをリン酸化し、それによりE2F抑制が緩和される。アデノウイルスは、初期ウイルス腫瘍性タンパク質を発現し、これは、Rb腫瘍抑制因子経路を不活化して細胞を強制的に複製させ、同時にウイルスゲノムを再生させる。アデノウイルスE1Aは、部分的にLXCXEモチーフを介してRbに結合し、その腫瘍抑制因子活性を調節解除する。したがって、E1A中のLXCXEモチーフを欠失させると、Rb不活化が排除され、選択的に複製するウイルス(ONYX-838)が作製されるはずであることが提案された。しかし、Johnsonら、Cancer Cell、1巻(4号):325~337頁(2002年)は、Ad E1A LXCXE突然変異は、S期エンタリー、ウイルスDNA複製、および後期タンパク質発現を防止するのに十分でないという証拠を提供した。これは、本明細書に記載の実験からの結果と一致している。E1A突然変異体のRb選択性は、議論の余地があるけれども、この突然変異は、悪性脳腫瘍の第II相臨床試験へと移りつつある腫瘍溶解性ウイルス(DNX-2401)の基礎として進展された。より高いRb選択性を実現する試みにおいて、アデノウイルスE1およびE4領域のプロモーターをE2Fプロモーターと置き換え、それをE1A LXCXEモチーフと組み合わせたアデノウイルスが生成されて、ONYX-411が生成された(Johnsonら、Cancer Cell、1巻(4号):325~337頁(2002年);およびDubenskyら、Cancer Cell、1巻(4号):307~309頁(2002年))。これらのウイルスを試験するために、腫瘍および初代ヒト細胞を野生型ウイルス、ONYX-838(E1A LXCXE)、またはONYX-411に感染させ、感染後の様々な時点で回収した(図3)。図3に示したように、ONYX-838は、腫瘍および初代肺上皮細胞内で無差別に複製する。E1A LXCXEをアデノウイルスE1A、E1B、およびE4領域(図2に示した)の細胞E2F制御と組み合わせるONYX-411は、正常細胞に対して腫瘍細胞内で選択的な複製を実証する(Johnsonら、Cancer Cell、1巻(4号):325~337頁(2002年))。しかし、E2Fプロモーターは、組換えをもたらし、また、腫瘍細胞内の野生型ウイルスレベルまで複製を制限する。したがって、これらのウイルスは、問題のままである

。

【 0 1 2 8 】

本明細書に記載するように、E 1 A による R b 抑制からの E 2 F 放出とは独立に、細胞および A d プロモーターにおいて E 2 F タンパク質をさらに安定化させる別の A d タンパク質、E 4 o r f 6 / 7 がある。一緒に、E 1 A および E 4 o r f 6 / 7 は、E 2 F 媒介転写を推進し、S 期開始を引き起こし、同時にウイルス D N A ゲノムを伝播する。したがって、機能的な R b を欠く腫瘍細胞の選択的腫瘍溶解性ウイルス療法である、E 1 A 改変および E 4 o r f 6 / 7 改変の両方を持つアデノウイルスが本明細書に提供される。具体的には、E 1 A / E 4 o r f 6 / 7 中の複合突然変異を操作して、これらが腫瘍細胞内で選択的に複製するが、初代細胞内で複製しないかどうかを判定した。これらの突然変異の組合せは、がんの有効な自己増幅療法をもたらすことが提案されている。図 4 A および 4 B は、腫瘍突然変異およびアデノウイルス初期タンパク質が、制御されていない複製を誘発する R b 経路を活性化することに収束させることを示す概略図である。A) R b - 腫瘍抑制因子機能を喪失させる一般的な突然変異。B) アデノウイルスタンパク質は、R b および E 2 F を直接的に調節解除して細胞を S 期に推進する。図 5 は、アデノウイルスが複数のタンパク質をコードして R b - E 2 F 細胞周期チェックポイントを調節解除することを示す概略図である。アデノウイルス E 1 A は、細胞 R b に結合し、E 2 F を放出して転写を活性化する。アデノウイルス E 4 o r f 6 / 7 は、プロモーターにおいて E 2 F を安定化させて、下流遺伝子の発現を増強する。図 6 は、本研究における突然変異アデノウイルスの構築を示す概略図である。野生型 A d 5 ゲノムを転写単位によってモジュールに分割し、モジュールのそれぞれを異なるプラスミド中に入れた。突然変異をモジュールプラスミドに対して行い、A d S l i c R を使用して、モジュールを再アセンブルして完全ゲノムにし、組換えアデノウイルスの産生を可能にした。図 7 は、E 4 o r f 6 / 7 欠失を示す概略図である。2つのエクソンが E 4 o r f 6 / 7 をコードする。E 4 o r f 6 および E 4 o r f 6 / 7 は、同じ開始コドンを利用し、58個のアミノ酸 N 末端残基を共有する。E 4 o r f 6 / 7 転写物は、E 4 o r f 6 終止コドンの直後にスプライスする。終止コドンを含む E 4 o r f 6 / 7 の第2のエクソン全体を欠失させた。図 7 A は、野生型 E 4 領域を示す。図 7 B は、得られた E 4 E 4 o r f 6 / 7 領域を示す。

【 0 1 2 9 】

これらのウイルスを試験するために、細胞を、モック (E 1)、A d - 1 0 2 (A d S y n - C O 1 0 2) (野生型)、A d - 1 8 1 (A d S y n - C O 1 8 1) (E 1 A L X C X E / E 4 o r f 6 / 7)、A d - 1 8 9 (A d S y n - C O 1 8 9) (E 1 A L X C X E)、または O N Y X - 8 3 8 (E 1 A C R 2) に感染させた。O N Y X - 8 3 8 は、E 1 A の C R 2 ドメイン内にある L X C X E も欠く。静止状態ヒト初代小気道上皮細胞 (S A E C) を M O I 1 0 で感染させた。A d - 1 0 2 (A d S y n - C O 1 0 2) は、感染中のより遅い時間における E 1 A レベルの予期された低下を示す (図 8 A)。同様に、A d - 1 8 9 (A d S y n - C O 1 8 9) および O N Y X - 8 3 8 は、感染中のより遅い時間で E 1 A レベルの低下を示すが、より早い時点でより強い発現を有する。A d - 1 8 1 (A d S y n - C O 1 8 1) は、感染全体にわたって E 1 A のより強いかつ継続した発現を示し、それは、アデノウイルスライフサイクルを通じて進行することができないことを示す。コンフルエントな肺腺癌細胞 (A 5 4 9) を M O I 3 0 で感染させた。すべての感染は、感染中のより遅い時間に E 1 A レベルの予期された低下を示し、一般的なアデノウイルスライフサイクル進行を示す (図 8 B)。感染細胞内のアデノウイルス後期タンパク質、および突然変異アデノウイルスのサイクリンの発現の試験を図 9 に示す。後期構造タンパク質の発現の明らかな欠損はまったくなく、サイクリンは、すべての感染させた A 5 4 9 試料中で存在したままである。感染した S A E C および A 5 4 9 細胞の D N A 複製を図 1 0 に示す。D N A 複製欠損は、いずれの突然変異ウイルス感染でも明らかでない。図 1 1 は、感染した S A E C および A 5 4 9 からのアデノウイルスバーストを示す。このバーストアッセイについてのこれらの時点における A d - 2 1 0 (A d S y n - C O 2 1 0) を例外として、ウイルス複製の欠損はまったくない。図 1 2 は、

感染させて7日後の感染したS A E CおよびA 5 4 9の細胞生存率を示す。ウイルスのうち、野生型と比べて、突然変異ウイルスによる細胞殺傷の欠損はまったくない。図13は、突然変異ウイルスが正常ヒト星状細胞(N H A)内で減弱された感染を確かに有し、図14および15は、突然変異アデノウイルスがそれぞれグリア芽細胞腫U 8 7およびU 1 1 8細胞内で複製欠損をまったく有さないことを示す。

【0130】

したがって、データは、野生型およびE 1 A C R 2ウイルスと対照的に、E 1 A C R 2 / E 4 o r f 6 / 7およびまた E 4 o r f 6 / 7ウイルスは、カプシドタンパク質発現を欠いていること、E 2 F 標的遺伝子 - サイクリン A および B を誘導することができないこと、S 期エントリーおよびウイルス複製を誘発することができないことによって立証されるように、初代細胞内で不十分に複製することを示す。例えば、図9、10、および11を参照。対照的に、これらのウイルスは、A 5 4 9細胞、および腫瘍細胞株のパネル内で野生型(W T)ウイルスレベルまで複製する。したがって、提供されるアデノウイルスは、選択的ながん治療剤である。

【0131】

E 4 o r f 1 中の突然変異を含む突然変異アデノウイルスのより大きいセットの複製特異性の結果(表1を参照)を、図17~22に示し、図23に要約する。図17は、感染させて10日後の感染した初代正常ヒト星状細胞(N H A)の細胞生存率を示すグラフである。図18は、感染させて9日後の感染した静止状態正常小気道上皮細胞(S A E C - h T E R T)の細胞生存率を示すグラフである。図19は、感染させて10日後の感染した増殖中のS A E C - h T E R T細胞の細胞生存率を示すグラフである。図20は、感染させて7日後の感染したヒト肺腺癌細胞(A 5 4 9)の細胞生存率を示すグラフである。図21は、感染させて7日後の感染したヒト乳がん細胞(M D A M B 2 3 1)の細胞生存率を示すグラフである。図22は、感染させて7日後の感染したグリア芽細胞腫細胞(U 8 7)の細胞生存率を示すグラフである。図23は、感染させて7日後の感染した初代N H A、S A E C - h T E R T(静止状態)、S A E C - h T E R T(増殖中)、A 5 4 9、M D A M B 2 3 1、およびU 8 7細胞についての細胞生存率アッセイの定量化を示すヒートマップ表である。これらのデータは、E 1 A およびE 4 o r f 6 / 7の様々な改変の組合せが、欠損したR b 腫瘍抑制因子経路を有するがん細胞内で特異的に複製する選択的な腫瘍溶解性アデノウイルスをもたらすことを示す。

【0132】

実施形態

実施形態1 . 1つまたは複数の改変を含むE 1 A ポリペプチドを含み、1つまたは複数の改変を含むE 4 o r f 6 / 7 ポリペプチドを含む、アデノウイルス。

実施形態2 . 前記E 1 A ポリペプチドが、E 1 A のR b 結合部位中に改変を含む、実施形態1に記載のアデノウイルス。

実施形態3 . 前記E 1 A ポリペプチドが、2つのR b 結合部位を含み、かつ前記E 1 A ポリペプチドが、両方のR b 結合部位中に改変を含む、実施形態1に記載のアデノウイルス。

実施形態4 . 前記E 1 A ポリペプチドが、前記E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基120~130の1つまたは複数において改変を含む、実施形態1に記載のアデノウイルス。

実施形態5 . 前記E 1 A ポリペプチドが、前記E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基122~126の1つまたは複数において改変を含む、実施形態1に記載のアデノウイルス。

実施形態6 . 前記E 1 A ポリペプチドが、前記E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基35~55の1つまたは複数において改変を含む、実施形態1から5のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態7 . 前記E 1 A ポリペプチドが、前記E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基37~49の1つまたは複数において改変を含む、実施形態1から6のいずれか一項に記載

10

20

30

40

50

のアデノウイルス。

実施形態 8 . 前記 E 1 A ポリペプチドが欠失を含む、実施形態 1 から 7 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態 9 . 前記欠失が、前記 E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基 1 2 2 ~ 1 2 6 の欠失である、実施形態 8 に記載のアデノウイルス。

実施形態 1 0 . 前記欠失が、前記 E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基 2 ~ 1 1 の欠失である、実施形態 8 に記載のアデノウイルス。

実施形態 1 1 . 前記 E 1 A ポリペプチドが欠失 L X C X E を含む、実施形態 1 に記載のアデノウイルス。

実施形態 1 2 . 前記 E 1 A ポリペプチドが、1 つまたは複数の置換を含む、実施形態 1 から 1 1 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態 1 3 . 前記 E 1 A ポリペプチドが、残基 Y 4 7、残基 C 1 2 4、または残基 Y 4 7 および残基 C 1 2 4 の両方において置換を含む、実施形態 1 2 に記載のアデノウイルス。

実施形態 1 4 . 前記 E 1 A ポリペプチドが置換 Y 4 7 H を含む、実施形態 1 2 に記載のアデノウイルス。

実施形態 1 5 . 前記 E 1 A ポリペプチドが置換 C 1 2 4 G を含む、実施形態 1 2 に記載のアデノウイルス。

実施形態 1 6 . 前記 E 1 A ポリペプチドが、置換 Y 4 7 H および C 1 2 4 G を含む、実施形態 1 2 に記載のアデノウイルス。

実施形態 1 7 . 前記 E 1 A ポリペプチドが、アミノ酸残基 2 ~ 1 1 の欠失をさらに含む、実施形態 1 2 から 1 6 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態 1 8 . 前記 E 1 A ポリペプチドが、E 1 A のアミノ酸残基 1 2 2 ~ 1 2 6 の欠失および残基 Y 4 7 における置換を含む、実施形態 1 に記載のアデノウイルス。

実施形態 1 9 . 前記 E 1 A ポリペプチドが配列番号 1 を含む、実施形態 1 から 1 8 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態 2 0 . 前記 E 1 A ポリペプチドが配列番号 2 を含む、実施形態 1 から 1 8 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態 2 1 . 前記 E 4 o r f 6 / 7 ポリペプチドが、E 4 o r f 6 / 7 エクソンの一方または両方において改変を含む、実施形態 1 から 2 0 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態 2 2 . 前記 E 4 o r f 6 / 7 ポリペプチドが、E 4 o r f 6 / 7 エクソンの一方または両方の欠失を含む、実施形態 1 から 2 0 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態 2 3 . 前記 E 4 o r f 6 / 7 ポリペプチドが配列番号 3 を含む、実施形態 1 から 2 2 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態 2 4 . 前記 E 4 o r f 6 / 7 ポリペプチドが配列番号 4 を含む、実施形態 1 から 2 2 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態 2 5 . 1 つまたは複数の改変を含む E 4 o r f 1 ポリペプチドをさらに含む、実施形態 1 から 2 4 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態 2 6 . 前記 E 4 o r f 1 ポリペプチドが、1 つまたは複数の欠失を含む、実施形態 2 5 に記載のアデノウイルス。

実施形態 2 7 . 前記 E 4 o r f 1 ポリペプチドが、E 4 o r f 1 の C 末端領域中に欠失を含む、実施形態 2 5 に記載のアデノウイルス。

実施形態 2 8 . 前記 E 4 o r f 1 ポリペプチドが、前記 E 4 o r f 1 ポリペプチドの残基 1 2 5 ~ 1 2 8 の欠失を含む、実施形態 2 5 に記載のアデノウイルス。

実施形態 2 9 . 前記 E 4 o r f 1 ポリペプチドが配列番号 5 を含む、実施形態 2 5 から 2 8 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態 3 0 . 1 つまたは複数の改変を含む E 1 A ポリペプチドを含み、1 つまたは複数の改変を含む E 4 o r f 1 ポリペプチドを含むアデノウイルス。

10

20

30

40

50

実施形態 31 . 前記 E 4 o r f 1 ポリペプチドが、1 つまたは複数の欠失を含む、実施形態 30 に記載のアデノウイルス。

実施形態 32 . 前記 E 4 o r f 1 ポリペプチドが、E 4 o r f 1 の C 末端領域中に欠失を含む、実施形態 31 に記載のアデノウイルス。

実施形態 33 . 前記 E 4 o r f 1 ポリペプチドが、前記 E 4 o r f 1 ポリペプチドの残基 125 ~ 128 の欠失を含む、実施形態 31 に記載のアデノウイルス。

実施形態 34 . 前記 E 1 A ポリペプチドが、E 1 A の R b 結合部位中に改変を含む、実施形態 30 から 33 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態 35 . 前記 E 1 A ポリペプチドが、2 つの R b 結合部位を含み、かつ前記 E 1 A ポリペプチドが、両方の R b 結合部位中に改変を含む、実施形態 34 に記載のアデノウイルス。

10

実施形態 36 . 前記 E 1 A ポリペプチドが、前記 E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基 120 ~ 130 の 1 つまたは複数において改変を含む、実施形態 30 から 33 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態 37 . 前記 E 1 A ポリペプチドが、前記 E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基 122 ~ 126 の 1 つまたは複数において改変を含む、実施形態 30 から 33 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態 38 . 前記 E 1 A ポリペプチドが、前記 E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基 35 ~ 55 の 1 つまたは複数において改変を含む、実施形態 30 から 33 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

20

実施形態 39 . 前記 E 1 A ポリペプチドが、前記 E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基 37 ~ 49 の 1 つまたは複数において改変を含む、実施形態 30 から 33 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態 40 . 前記 E 1 A ポリペプチドが欠失を含む、実施形態 30 から 33 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態 41 . 前記欠失が、前記 E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基 122 ~ 126 の欠失である、実施形態 40 に記載のアデノウイルス。

実施形態 42 . 前記欠失が、前記 E 1 A ポリペプチドのアミノ酸残基 2 ~ 11 の欠失である、実施形態 40 に記載のアデノウイルス。

実施形態 43 . 前記 E 1 A ポリペプチドが、欠失 L X C X E を含む、実施形態 30 から 33 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

30

実施形態 44 . 前記 E 1 A ポリペプチドが、1 つまたは複数の置換を含む、実施形態 30 から 33 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態 45 . 前記 E 1 A ポリペプチドが、残基 Y 47、残基 C 124、または Y 47 および C 124 の両方において置換を含む、実施形態 44 に記載のアデノウイルス。

実施形態 46 . 前記 E 1 A ポリペプチドが置換 Y 47 H を含む、実施形態 44 に記載のアデノウイルス。

実施形態 47 . 前記 E 1 A ポリペプチドが置換 C 124 G を含む、実施形態 44 に記載のアデノウイルス。

実施形態 48 . 前記 E 1 A ポリペプチドが、置換 Y 47 H および C 124 G を含む、実施形態 44 に記載のアデノウイルス。

40

実施形態 49 . 前記 E 1 A ポリペプチドが、アミノ酸残基 2 ~ 11 の欠失をさらに含む、実施形態 44 から 48 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態 50 . 前記 E 1 A ポリペプチドが、E 1 A のアミノ酸残基 122 ~ 126 の欠失および残基 Y 47 における置換を含む、実施形態 30 から 33 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態 51 . 前記 E 1 A ポリペプチドが配列番号 1 を含む、実施形態 30 から 50 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態 52 . 前記 E 1 A ポリペプチドが配列番号 2 を含む、実施形態 30 から 50 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

50

実施形態 53. Rb 欠損細胞内で選択的に複製する、実施形態 1 から 52 のいずれか一項に記載のアデノウイルス。

実施形態 54. 実施形態 1 から 53 のいずれか一項に記載のアデノウイルスおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

実施形態 55. 実施形態 54 に記載の医薬組成物および使用のための指示書を含むキット。

実施形態 56. 1 種または複数の追加の治療剤をさらに含む、実施形態 55 に記載のキット。

実施形態 57. 前記治療剤が化学療法剤である、実施形態 56 に記載のキット。

実施形態 58. 対象における増殖性障害を処置する方法であって、実施形態 1 から 53 のいずれか一項に記載のアデノウイルスまたは実施形態 54 に記載の医薬組成物を前記対象に投与するステップを含む、方法。

実施形態 59. 前記アデノウイルスまたは医薬組成物が、静脈内、脈管内、クモ膜下、筋肉内、皮下、腹腔内、または経口的に投与される、実施形態 58 に記載の方法。

実施形態 60. 1 種または複数の追加の治療剤を前記対象に投与するステップをさらに含む、実施形態 58 または 59 に記載の方法。

実施形態 61. 前記治療剤が化学療法剤である、実施形態 60 に記載の方法。

実施形態 62. 前記増殖性障害が、肺がん、前立腺がん、結腸直腸がん、乳がん、甲状腺がん、腎がん、肝がん、および白血病からなる群から選択される、実施形態 58 から 61 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 63. およそ 10³ ~ 10¹² プラーク形成単位の前記アデノウイルスが前記対象に投与される、実施形態 58 から 62 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 64. 前記増殖性障害が転移性である、実施形態 58 から 63 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 65. 1 つまたは複数の改変を含む E1A を含み、1 つまたは複数の改変を含む E4orf6/7 を含むアデノウイルス。

実施形態 66. E1A の改変が、E1A の Rb 結合部位中の改変を含む、実施形態 65 に記載のアデノウイルス。

実施形態 67. E1A の改変が、E1A ポリペプチドのアミノ酸残基 122 ~ 126 の 1 つまたは複数において改変を含む、実施形態 65 に記載のアデノウイルス。

実施形態 68. E1A の改変が欠失を含む、実施形態 65 に記載のアデノウイルス。

実施形態 69. 欠失が、E1A のアミノ酸残基 122 ~ 126 の欠失である、実施形態 65 に記載のアデノウイルス。

実施形態 70. E1A の改変が LXCXE である、実施形態 65 に記載のアデノウイルス。

実施形態 71. E4orf6/7 の改変が、E4orf6/7 エクソンの一方または両方における改変を含む、実施形態 65 から 70 のいずれか 1 つに記載のアデノウイルス。

実施形態 72. E4orf6/7 の改変が、E4orf6/7 エクソンの一方または両方の欠失である、実施形態 65 から 70 のいずれか 1 つに記載のアデノウイルス。

実施形態 73. E4orf6/7 の改変が E4orf6/7 である、実施形態 65 から 70 のいずれか 1 つに記載のアデノウイルス。

実施形態 74. E1A LXCXE および E4orf6/7 を含む、実施形態 65 に記載のアデノウイルス。

実施形態 75. Rb 欠損細胞内で選択的に複製する、実施形態 65 から 74 のいずれか 1 つに記載のアデノウイルス。

実施形態 76. 実施形態 65 から 75 のいずれか一項に記載のアデノウイルスおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

実施形態 77. 実施形態 76 に記載の医薬組成物および使用のための指示書を含むキット。

10

20

30

40

50

実施形態 78 . 1 種または複数の追加の治療剤をさらに含む、実施形態 77 に記載のキット。

実施形態 79 . 前記治療剤が化学療法剤である、実施形態 78 に記載のキット。

実施形態 80 . 対象における増殖性障害を処置する方法であって、実施形態 65 から 75 のいずれか一項に記載のアデノウイルスまたは実施形態 76 に記載の医薬組成物を前記対象に投与するステップを含む、方法。

実施形態 81 . 前記アデノウイルスまたは医薬組成物が、静脈内、脈管内、クモ膜下、筋肉内、皮下、腹腔内、または経口的に投与される、実施形態 80 に記載の方法。

実施形態 82 . 1 種または複数の追加の治療剤を前記対象に投与するステップをさらに含む、実施形態 80 または 81 に記載の方法。

実施形態 83 . 前記治療剤が化学療法剤である、実施形態 82 に記載の方法。

実施形態 84 . 前記増殖性障害が、肺がん、前立腺がん、結腸直腸がん、乳がん、甲状腺がん、腎がん、肝がん、および白血病からなる群から選択される、実施形態 65 から 83 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 85 . およそ 103 ~ 1012 プラーク形成単位の前記アデノウイルスが前記対象に投与される、実施形態 65 から 84 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 86 . 前記増殖性障害が転移性である、実施形態 65 から 85 のいずれか一項に記載の方法。

10

【図 1】

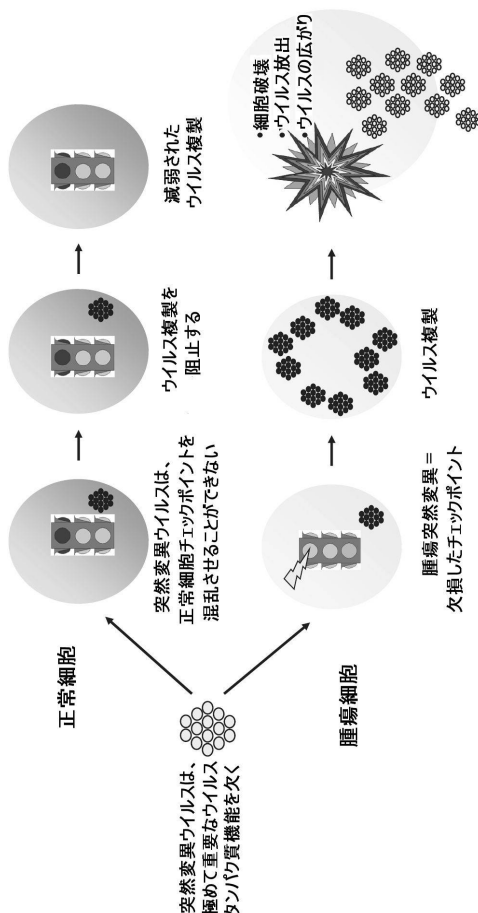


Fig. 1

【図 2】

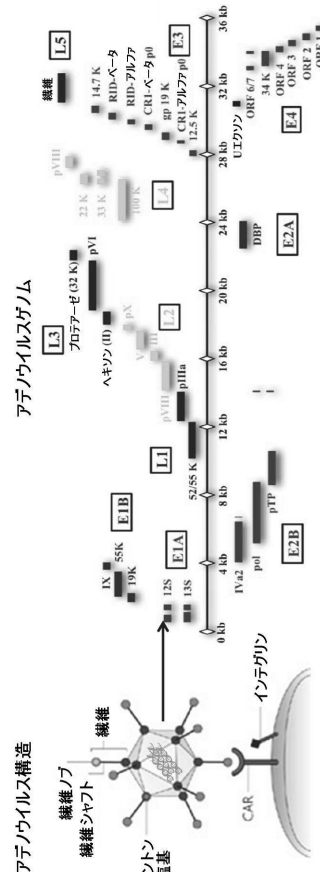
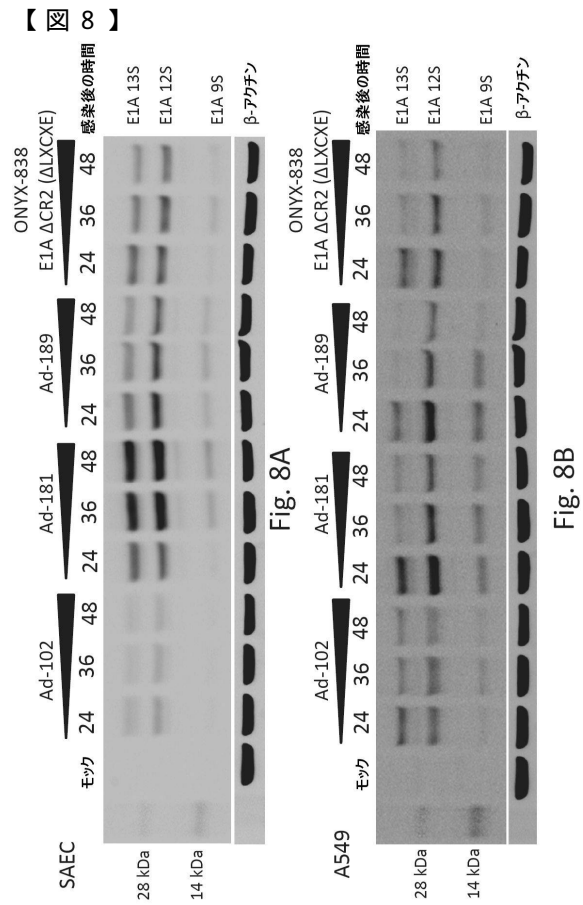
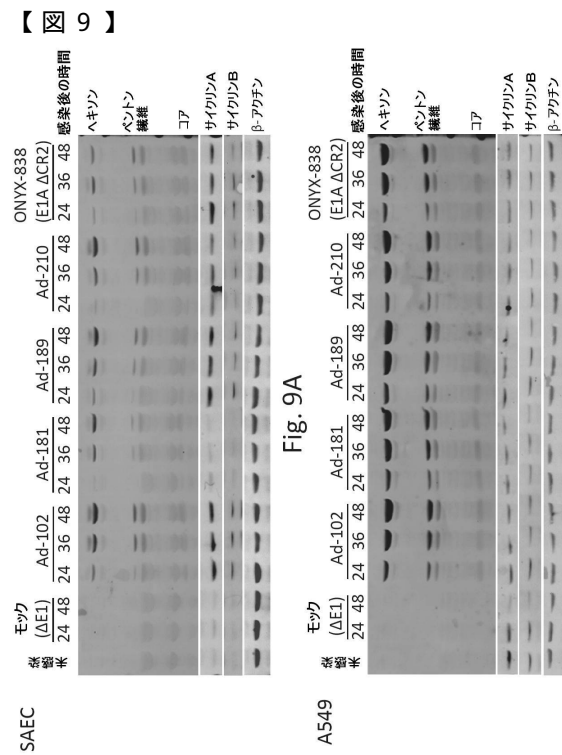
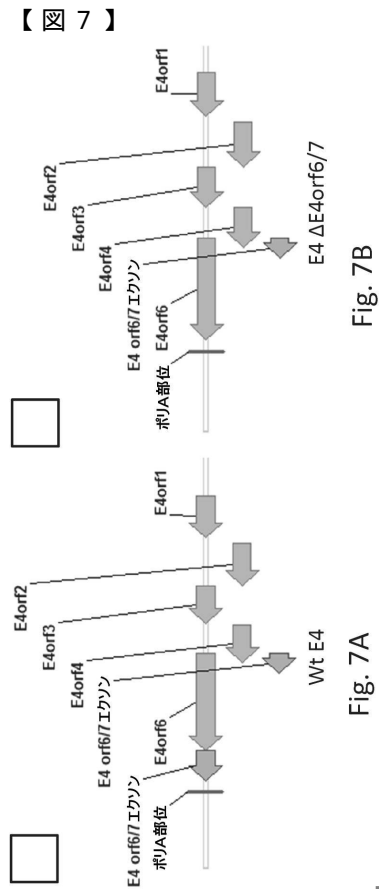
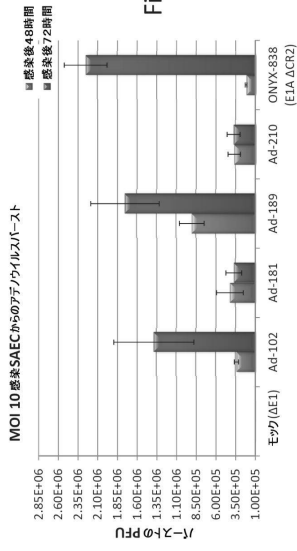


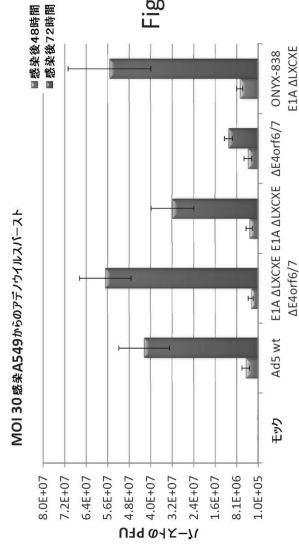
Fig. 2



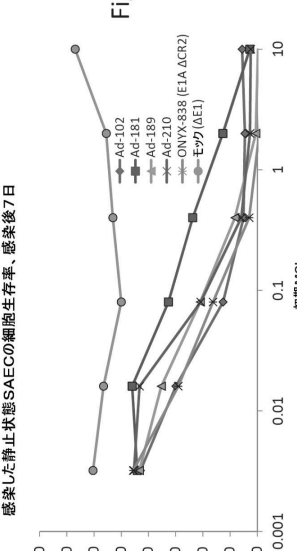
【図 1 1】



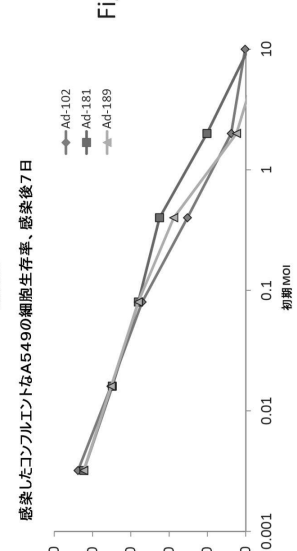
【図 1 2】



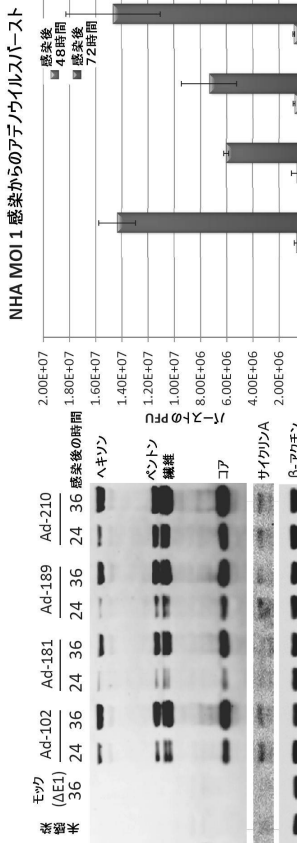
【図 1 3】



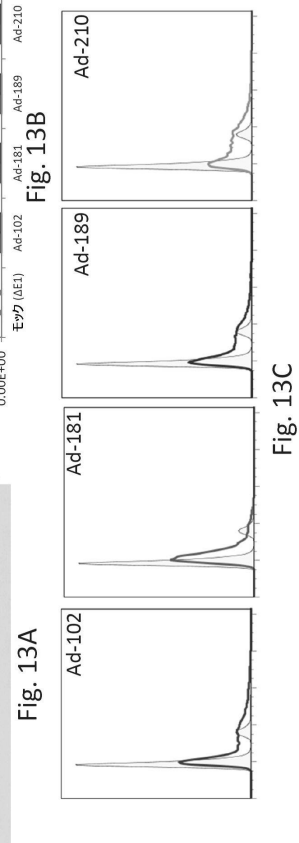
【図 1 4】



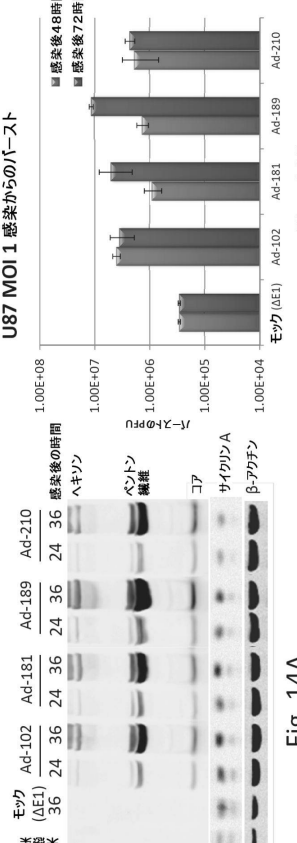
【図 1 3】



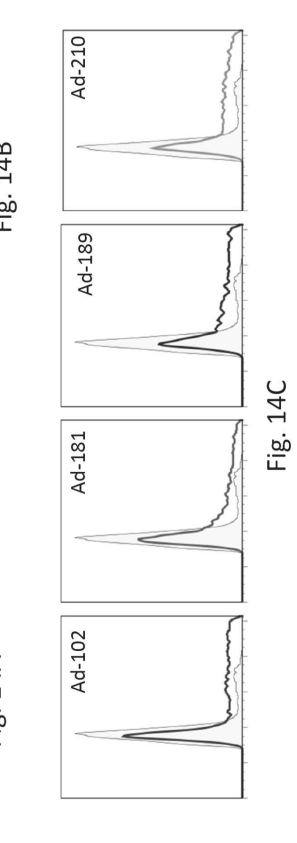
【図 1 4】



【図 1 3】



【図 1 4】



【図 15】

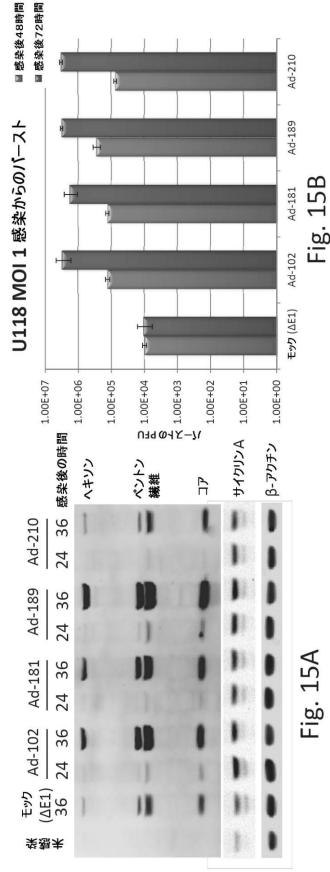


Fig. 15B

Fig. 15A

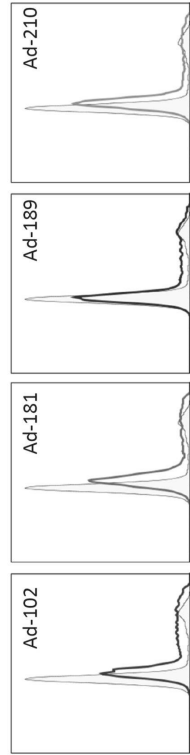


Fig. 15C

【図 16】

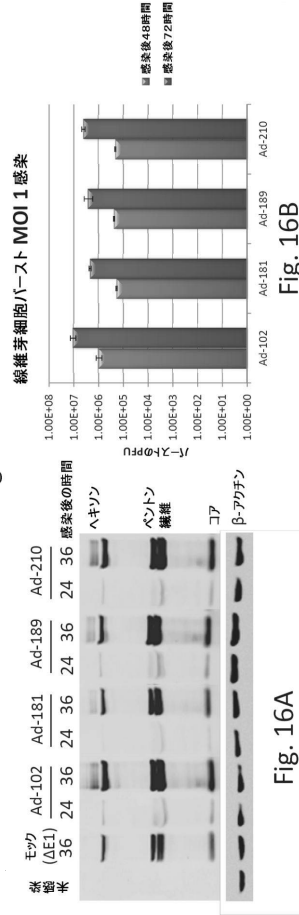


Fig. 16B

Fig. 16A

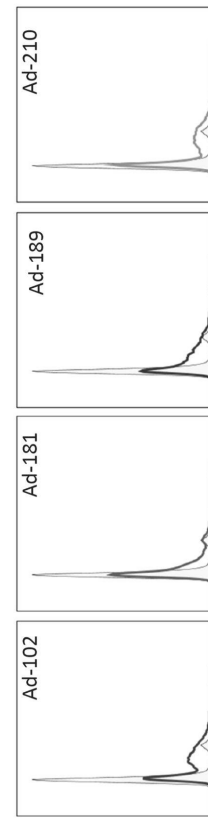


Fig. 16C

【図 17】

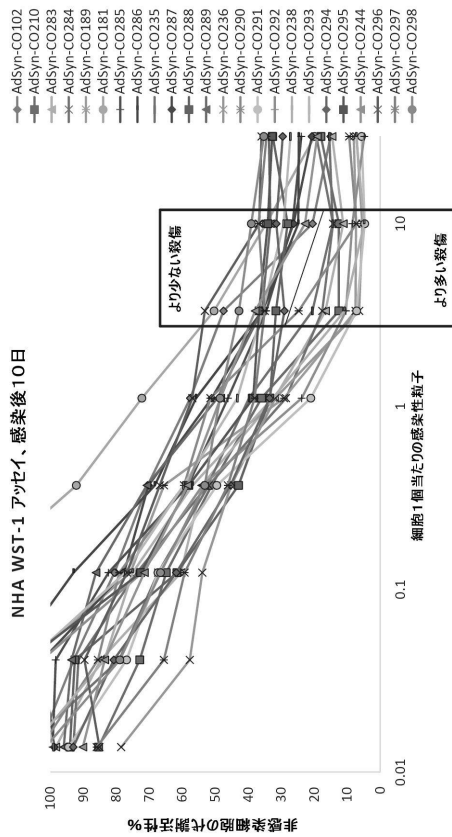


Fig. 17

【図 18】

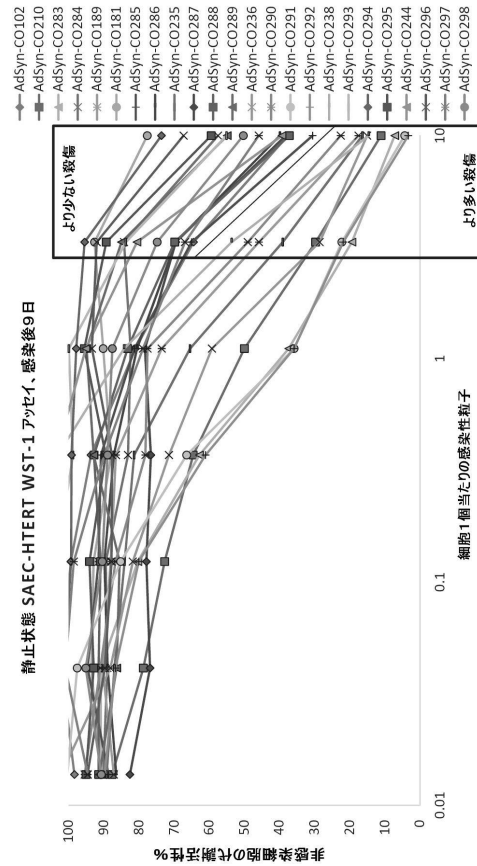


Fig. 18

【図 19】

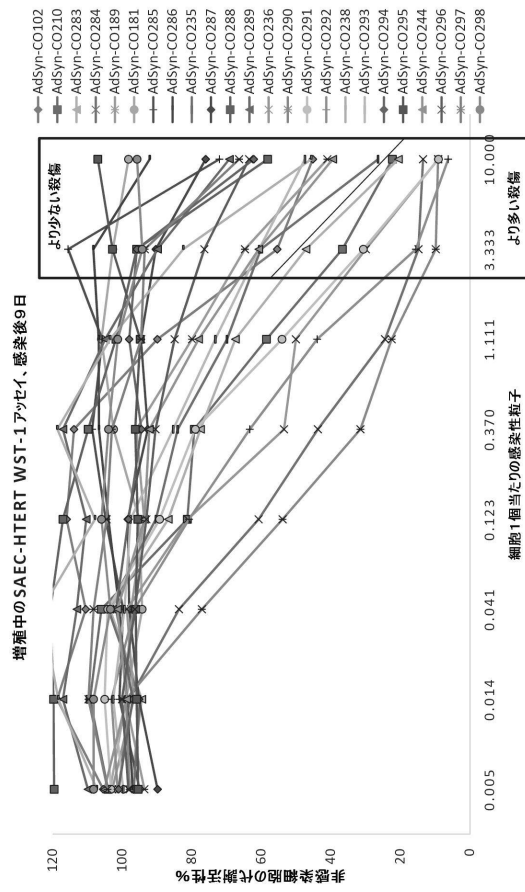


Fig. 19

【図 20】

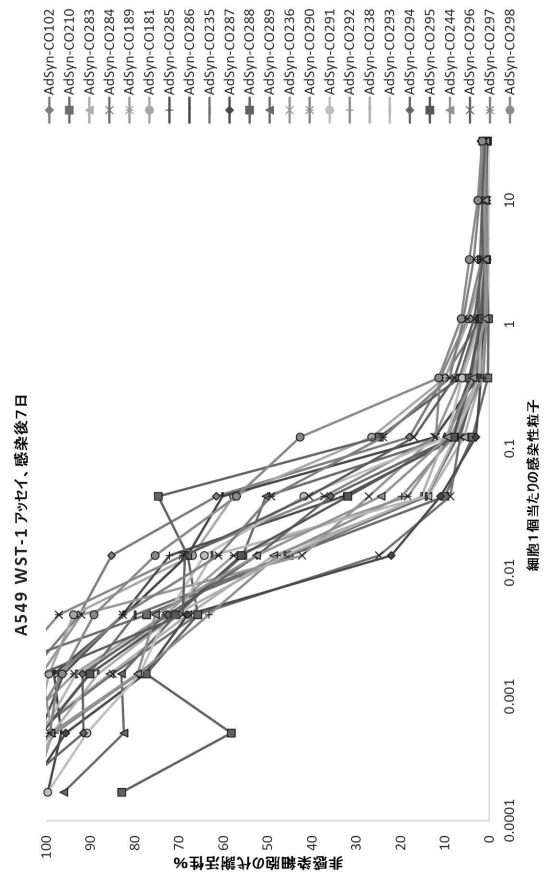


Fig. 20

【図 21】

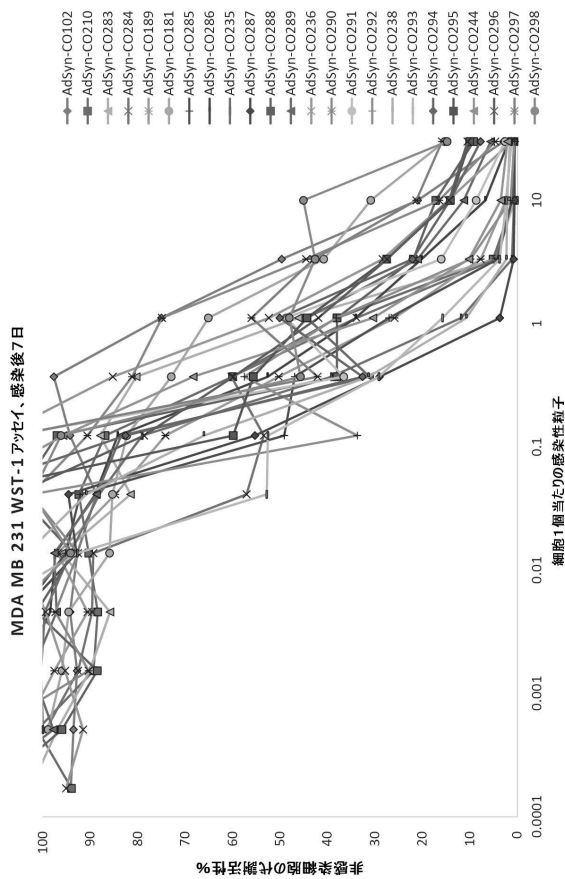


Fig. 21

【図 22】

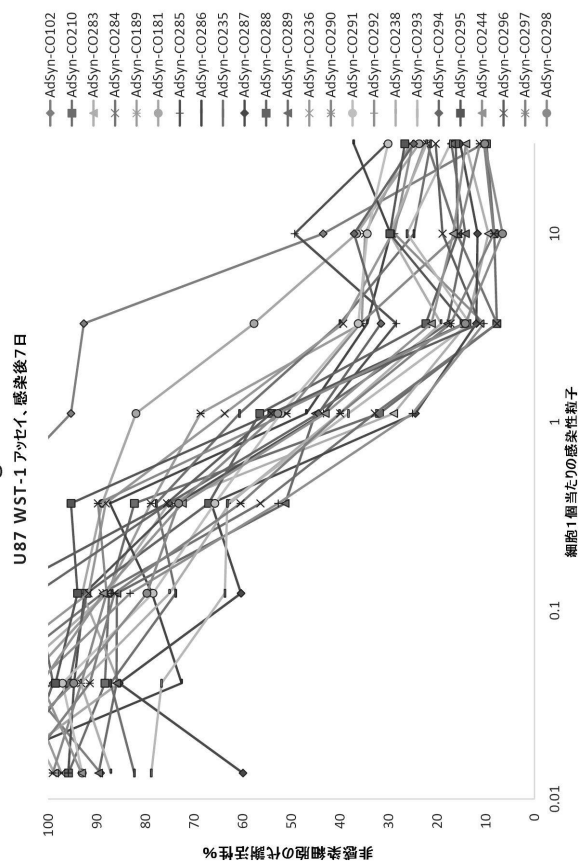


Fig. 22

【図 2 3】

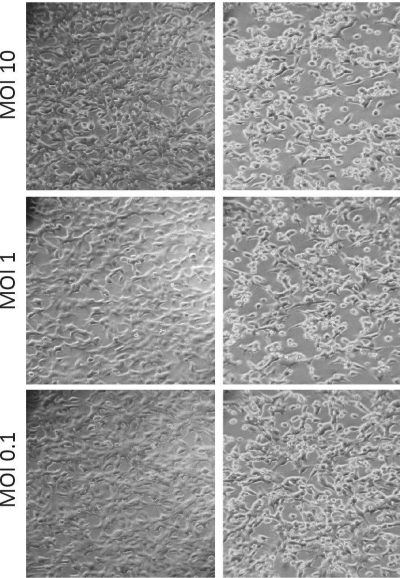
アデノウイルス 初期 MOI	NHA			静止状態 SAEC-HERT			増殖中の SAEC-HERT			AS49			MDA MB 231			U87		
	10	3.33	1.11	10	3.33	1.11	10	3.33	1.11	0.37	0.12	0.04	3.33	1.11	0.37	3.33	1.11	0.37
AdSyn-CO102*	21	47	58	38	64	81	45	55	90	10	18	62	50	75	98	93	95	113
AdSyn-CO10	13	13	36	11	30	50	22	37	59	0	4	10	5	38	60	8	32	82
AdSyn-CO283	11	17	32	7	19	37	21	47	67	2	6	14	4	46	80	14	29	75
AdSyn-CO284	14	18	29	57	84	82	13	15	24	3	7	9	5	34	60	8	33	56
AdSyn-CO189	5	6	32	15	29	59	9	30	50	6	12	27	28	52	85	39	64	88
AdSyn-CO181	7	25	51	23	49	78	9	10	22	11	12	37	44	75	81	36	51	90
AdSyn-CO285	5	7	21	4	22	36	9	31	54	6	10	42	16	49	37	36	52	66
AdSyn-CO286	8	10	24	3	22	36	6	16	44	1	8	20	10	38	58	10	25	53
AdSyn-CO235	7	7	29	17	46	74	41	65	80	2	9	18	8	26	50	36	69	79
AdSyn-CO287	35	50	72	78	93	90	58	103	106	10	27	58	41	65	73	58	82	89
AdSyn-CO288	27	35	46	31	65	81	72	116	106	2	7	33	4	27	47	28	43	74
AdSyn-CO289	25	36	56	40	70	81	92	108	107	3	12	60	20	34	53	34	47	87
AdSyn-CO286	14	21	40	16	39	65	36	60	70	3	7	14	1	12	39	40	61	78
AdSyn-CO290	26	36	51	38	69	78	76	90	95	2	3	11	1	4	29	12	24	66
AdSyn-CO291	28	32	33	37	70	83	58	96	102	7	25	75	22	38	38	22	57	67
AdSyn-CO292	33	36	49	55	85	95	69	90	105	4	9	50	4	21	44	18	45	51
AdSyn-CO238	5	11	33	15	54	84	46	82	103	2	10	15	2	11	31	19	40	63
AdSyn-CO293	29	36	43	55	84	100	47	61	73	2	8	14	4	16	29	13	38	63
AdSyn-CO294	31	29	34	74	95	98	62	96	98	4	8	36	22	50	33	32	44	75
AdSyn-CO295	34	37	38	59	89	96	107	103	95	5	8	32	28	44	56	14	54	95
AdSyn-CO244	23	38	48	39	81	95	39	61	78	4	9	24	10	30	68	21	43	72
AdSyn-CO296	37	53	57	67	92	93	64	76	85	8	17	41	27	42	60	11	54	76
AdSyn-CO297	37	35	38	46	67	79	66	94	95	9	24	49	43	56	42	17	40	60
AdSyn-CO298	39	43	49	50	75	88	96	94	101	11	43	57	43	48	46	14	53	73
AdSyn-CO182 感染後 18時間																		
最少	5	38	72	3	52	100	6	61	116	0	38	75	1	49	98	8	50	113
最大																		

Fig. 23

MOI 0.1

MOI 1

MOI 10



AdSyn-CO182
感染後 18時間

AdSyn-CO183
感染後 18時間

Fig. 24

【配列表】

0006576326000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 オーシア, クロダーグ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92107, サンディエゴ, ロング ブランチ アベニュー 5052

(72)発明者 ミヤケ - ストナー, シゲキ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037, ラ ホヤ, エイチ ミラマー ストリート 3951

審査官 小倉 梢

(56)参考文献 Cancer Cell, 2002年, Vol. 1, p. 325-337

J. Virol., 2006年, Vol. 80, p. 5349-5360

J. Virol., 2011年, Vol. 85, p. 8841-8851

EMBO J., 2005年, Vol. 24, p. 1211-1221

J. Virol., 1999年, Vol. 73, p. 10095-10103

Nat. Med., 2000年, Vol. 6, p. 1134-1139

Neoplasia, 2005年, Vol. 7, p. 723-729

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 7/00 - 7/08

A61K 35/761

A61P 35/00 - 35/04

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

WPIDS/WPIX(STN)