

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5319523号  
(P5319523)

(45) 発行日 平成25年10月16日(2013.10.16)

(24) 登録日 平成25年7月19日(2013.7.19)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 35/74 (2006.01)	A 61 K 35/74 Z N A B
A 61 K 45/00 (2006.01)	A 61 K 45/00
A 61 K 9/127 (2006.01)	A 61 K 9/127
A 61 P 35/00 (2006.01)	A 61 P 35/00
A 61 P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00 1 2 1

請求項の数 17 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-516542 (P2009-516542)	(73) 特許権者 506321481 ザ ジョンズ ホプキンス ユニバーシティ アメリカ合衆国 メリーランド州 ボルチモア ノース チャーチルズ ストリート 100 第5 フロア
(86) (22) 出願日	平成19年6月19日(2007.6.19)	(74) 代理人 100102978 弁理士 清水 初志
(65) 公表番号	特表2009-541319 (P2009-541319A)	(74) 代理人 100119507 弁理士 刑部 俊
(43) 公表日	平成21年11月26日(2009.11.26)	(74) 代理人 100128048 弁理士 新見 浩一
(86) 國際出願番号	PCT/US2007/014274	(74) 代理人 100129506 弁理士 小林 智彦
(87) 國際公開番号	W02007/149433	
(87) 國際公開日	平成19年12月27日(2007.12.27)	
審査請求日	平成22年6月18日(2010.6.18)	
(31) 優先権主張番号	60/814,546	
(32) 優先日	平成18年6月19日(2006.6.19)	
(33) 優先権主張国	米国(US)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】リポソマーゼによる治療物質の腫瘍特異的送達

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイ (*Clostridium novyi*) 胞子、および抗腫瘍薬または生物学的物質を含むリポソームを含む、腫瘍に抗腫瘍薬または生物学的物質を送達するための組成物。

## 【請求項2】

インビボで形成される、請求項1記載の組成物。

## 【請求項3】

抗腫瘍薬または生物学的物質がドキソルビシンである、請求項1記載の組成物。

## 【請求項4】

抗腫瘍薬または生物学的物質がイリノテカンである、請求項1記載の組成物。

10

## 【請求項5】

抗腫瘍薬または生物学的物質が抗体である、請求項1記載の組成物。

## 【請求項6】

抗腫瘍薬または生物学的物質がポリヌクレオチドである、請求項1記載の組成物。

## 【請求項7】

抗腫瘍薬または生物学的物質がウイルスベクターにおけるポリヌクレオチドである、請求項1記載の組成物。

## 【請求項8】

抗腫瘍薬または生物学的物質が非ウイルスベクターにおけるポリヌクレオチドである、

20

請求項1記載の組成物。

【請求項 9】

抗腫瘍薬または生物学的物質がタンパク質である、請求項1記載の組成物。

【請求項 10】

抗腫瘍薬または生物学的物質がサイトカインである、請求項1記載の組成物。

【請求項 11】

毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイ胞子、および

抗腫瘍薬または生物学的物質を含むリポソーム、

を含む、腫瘍に抗腫瘍薬または生物学的物質を送達するためのキット。

【請求項 12】

抗腫瘍薬または生物学的物質がドキソルビシンである、請求項11記載のキット。

10

【請求項 13】

抗腫瘍薬または生物学的物質がイリノテカンである、請求項11記載のキット。

【請求項 14】

抗腫瘍薬または生物学的物質が抗体である、請求項11記載のキット。

【請求項 15】

抗腫瘍薬または生物学的物質がポリヌクレオチドである、請求項11記載のキット。

【請求項 16】

抗腫瘍薬または生物学的物質がウイルスベクターにおけるポリヌクレオチドである、請求項11記載のキット。

20

【請求項 17】

抗腫瘍薬または生物学的物質が非ウイルスベクターにおけるポリヌクレオチドである、請求項11記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、その開示が参照により本明細書に明白に組み入れられる、2007年6月19日に提出された米国特許仮出願第60/814,546号の恩典を主張する。

【0002】

米国政府は、NIH, CA 62924の助成金の支給に従って本発明において一定の権利を保有する。

30

【0003】

発明の技術分野

本発明は、腫瘍学の領域に関する。特に、本発明は、抗癌剤の選択的毒性を増強する腫瘍の処置に関する。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

癌細胞を殺すことができる薬物は不足していない。問題は、特異性の達成、すなわち正常細胞に影響を及ぼさずに癌細胞を殺すことである。この特異性を成就するために現在三つの基本的戦略が用いられている。一つ（選択毒性）は、正常細胞より腫瘍細胞に対して強力な生育阻害効果を有する薬物を用いることである（1,2）。この戦略は、従来の化学療法剤の成功と共に、イマチニブのようなより新規の標的化治療の成功の基礎となっている。第二の戦略（送達）はそれぞれ、腫瘍細胞と特異的に反応するかまたは腫瘍細胞内で優勢に発現される、抗体または遺伝子のような物質を用いることである（3,4）。第三の戦略（血管新生）は、Avastin（5,6）またはリポソームに組み入れられた薬物（7）のような物質によって、腫瘍の血管系の異常な局面を活用する。リポソームは、腫瘍およびいくつかの他の臓器に存在する有窓性の内皮を通して浸透することができる比較的大きい粒子である（8,9）。リポソームが腫瘍に入ると、リポソームは、腫瘍に残ってその内容物を最終的に放出し、増強された透過性および滞留（EPR）効果を通して局所薬物濃度を上

40

50

昇させる(10)。これらの戦略のそれぞれは利点を有することが証明されているが、達成される治療結果は、通常、望ましい結果より低い。問題は部分的に、それらの任意の一つを用いて達成される特異性が不完全であって、全身毒性を引き起こすことなく安全に投与することができる薬物の量が制限されることにより発生している。

#### 【0005】

より有効かつより毒性が低い、癌に対する処置を開発することが当技術分野において継続的に必要である。

#### 【発明の概要】

#### 【0006】

本発明の一つの態様に従って、治療物質を送達するために有用な組成物が提供される。組成物は、毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイ(*Clostridium novyi*)胞子と、抗腫瘍薬または生物学的物質を含むリポソームとを含む。

10

#### 【0007】

本発明のもう一つの態様に従って、もう一つの組成物が提供される。組成物は、SEQ ID NO:1に従うかまたはGXSXGリパーゼモチーフ(SEQ ID NO:1の残基160~164位)において置換変異を有するSEQ ID NO:1に従う、毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイリポソマーゼと、抗腫瘍薬または生物学的物質を含むリポソームとを含む。

#### 【0008】

本発明のもう一つの局面はキットである。キットは、SEQ ID NO:1に従うかまたはGXSXGリパーゼモチーフにおいて置換変異を有するSEQ ID NO:1に従う、毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイリポソマーゼと、抗腫瘍薬または生物学的物質を含むリポソームとを含む。

20

#### 【0009】

本発明のさらにもう一つの局面はキットである。キットは、毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイ胞子と、抗腫瘍薬または生物学的物質を含むリポソームとを含む。

#### 【0010】

本発明のなおもう一つの態様は、癌患者を処置する方法である。毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイ胞子である第一の物質と、抗腫瘍薬または生物学的物質を含むリポソームである第二の物質とを癌患者に投与する。それによって腫瘍は退縮するか、またはその生育が遅れるかもしくは停止する。

30

#### 【0011】

本発明のさらなる局面は、第一の物質と第二の物質とが癌患者に投与される、癌患者を処置する方法である。第一の物質は、SEQ ID NO:1に従うかまたはGXSXGリパーゼモチーフにおいて置換変異を有するSEQ ID NO:1に従う、毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイリポソマーゼであり、第二の物質は、抗腫瘍薬または生物学的物質を含むリポソームである。それによって腫瘍は退縮するか、またはその生育が遅れるかもしくは停止する。

#### 【0012】

第一および第二の物質が癌患者に投与される、癌患者を処置する方法も同様に、本発明によって提供される。第一の物質は、SEQ ID NO:1に従うかまたはGXSXGリパーゼモチーフにおいて置換変異を有するSEQ ID NO:1に従う、毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイリポソマーゼをコードするベクターであり、第二の物質は抗腫瘍薬または生物学的物質を含むリポソームである。それによって腫瘍は退縮するか、またはその生育が遅れるかもしくは停止する。

40

#### 【0013】

本発明はまた、SEQ ID NO:1に従うかまたはGXSXGリパーゼモチーフにおいて置換変異を有するSEQ ID NO:1に従う、単離および精製された、毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイリポソマーゼタンパク質を含む組成物も提供する。

#### 【0014】

本発明はさらに、SEQ ID NO:1に従うかまたはGXSXGリパーゼモチーフにおいて置換変異を有するSEQ ID NO:1に従う、毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイリポソマーゼタ

50

ンパク質と、腫瘍細胞上の受容体に結合するポリペプチドリガンドとを含む、複合タンパク質を提供する。複合タンパク質をコードするポリヌクレオチドも同様に提供される。

【0015】

本発明はなあさらに、SEQ ID NO:1に従うかまたはGXSXGリパーゼモチーフにおいて置換変異を有するSEQ ID NO:1に従う、毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイリポソマーゼタンパク質をコードする、単離および精製されたポリヌクレオチドを含む組成物を提供する。

【0016】

本明細書を読むことによって当業者に明らかとなるであろうこれらおよび他の態様は、広範囲の腫瘍および広範囲の治療物質に対して広い応用性を有し得る、癌を処置するための一連の手段を当技術分野に提供する。

10

【請求項101】

毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイ(Clostridium novyi)胞子、および抗腫瘍薬または生物学的物質を含むリポソームを含む組成物。

【請求項102】

SEQ ID NO:1に従うかまたは残基160～164位のGXSXGリパーゼモチーフにおいて置換変異を有するSEQ ID NO:1に従う、毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイリポソマーゼ、および

20

抗腫瘍薬または生物学的物質を含むリポソームを含む組成物。

【請求項103】

インビボで形成される、請求項101または102記載の組成物。

【請求項104】

抗腫瘍薬または生物学的物質がドキソルビシンである、請求項101または102記載の組成物。

【請求項105】

抗腫瘍薬または生物学的物質がイリノテカンである、請求項101または102記載の組成物。

【請求項106】

30

抗腫瘍薬または生物学的物質が抗体である、請求項101または102記載の組成物。

【請求項107】

抗腫瘍薬または生物学的物質がポリヌクレオチドである、請求項101または102記載の組成物。

【請求項108】

抗腫瘍薬または生物学的物質がウイルスベクターにおけるポリヌクレオチドである、請求項101または102記載の組成物。

【請求項109】

抗腫瘍薬または生物学的物質が非ウイルスベクターにおけるポリヌクレオチドである、請求項101または102記載の組成物。

40

【請求項110】

抗腫瘍薬または生物学的物質がタンパク質である、請求項101または102記載の組成物。

【請求項111】

抗腫瘍薬または生物学的物質がサイトカインである、請求項101または102記載の組成物。

【請求項112】

SEQ ID NO:1に従うかまたは残基160～164位のGXSXGリパーゼモチーフにおいて置換変異を有するSEQ ID NO:1に従う、毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイリポソマーゼ、および

抗腫瘍薬または生物学的物質を含むリポソーム

50

を含むキット。

[請求項113]

毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイ胞子、および  
抗腫瘍薬または生物学的物質を含むリポソーム、  
を含むキット。

[請求項114]

抗腫瘍薬または生物学的物質がドキソルビシンである、請求項112または113記載のキット。

[請求項115]

抗腫瘍薬または生物学的物質がイリノテカンである、請求項112または113記載のキット

10

。

[請求項116]

抗腫瘍薬または生物学的物質が抗体である、請求項112または113記載のキット。

[請求項117]

抗腫瘍薬または生物学的物質がポリヌクレオチドである、請求項112または113記載のキット。

[請求項118]

抗腫瘍薬または生物学的物質がウイルスベクターにおけるポリヌクレオチドである、請求項112または113記載のキット。

[請求項119]

抗腫瘍薬または生物学的物質が非ウイルスベクターにおけるポリヌクレオチドである、請求項112または113記載のキット。

20

[請求項120]

毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイ胞子である第一の物質と、抗腫瘍薬または生物学的物質を含むリポソームである第二の物質とを癌患者に投与し、それによって、腫瘍が退縮するかまたはその生育が遅れるかもしくは停止する段階を含む、癌患者を処置する方法。

[請求項121]

SEQ ID NO:1に従うかまたは残基160～164位のGXSXGリパーゼモチーフにおいて置換変異を有するSEQ ID NO:1に従う、毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイリポソマーゼである第一の物質と、抗腫瘍薬または生物学的物質を含むリポソームである第二の物質とを癌患者に投与し、それによって、腫瘍が退縮するかまたはその生育が遅れるかもしくは停止する段階を含む、癌患者を処置する方法。

30

[請求項122]

SEQ ID NO:1に従うかまたは残基160～164位のGXSXGリパーゼモチーフにおいて置換変異を有するSEQ ID NO:1に従う、毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイリポソマーゼをコードするベクターである第一の物質と、抗腫瘍薬または生物学的物質を含むリポソームである第二の物質とを癌患者に投与し、それによって、腫瘍が退縮するかまたはその生育が遅れるかもしくは停止する段階を含む、癌患者を処置する方法。

40

[請求項123]

第一の物質および第二の物質が連続的に投与される、請求項120、121、または122記載の方法。

[請求項124]

第一の物質および第二の物質が同時に投与される、請求項120、121、または122記載の方法。

[請求項125]

抗腫瘍薬または生物学的物質がドキソルビシンである、請求項120、121、または122記載の方法。

[請求項126]

抗腫瘍薬または生物学的物質がイリノテカンである、請求項120、121、または122記載の

50

方法。

[請求項127]

抗腫瘍薬または生物学的物質が抗体である、請求項120、121、または122記載の方法。

[請求項128]

抗腫瘍薬または生物学的物質がポリヌクレオチドである、請求項120、121、または122記載の方法。

[請求項129]

抗腫瘍薬または生物学的物質がウイルスベクターにおけるポリヌクレオチドである、請求項120、121、または122記載の方法。

[請求項130]

抗腫瘍薬または生物学的物質が非ウイルスベクターにおけるポリヌクレオチドである、請求項120、121、または122記載の方法。

10

[請求項131]

ベクターがウイルスベクターである、請求項122記載の方法。

[請求項132]

ベクターが非ウイルスベクターである、請求項122記載の方法。

[請求項133]

SEQ ID NO:1に従うかまたは残基160～164位のGXSXGリパーゼモチーフにおいて置換変異を有するSEQ ID NO:1に従う、単離および精製された、毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイリポソマーゼタンパク質を含む、組成物。

20

[請求項134]

SEQ ID NO:1に従うかまたは残基160～164位のGXSXGリパーゼモチーフにおいて置換変異を有するSEQ ID NO:1に従う、毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイリポソマーゼタンパク質、および

腫瘍細胞上の受容体に結合するポリペプチドリガンドを含む複合タンパク質。

[請求項135]

ポリペプチドリガンドが抗体の重鎖または軽鎖の可変領域である、請求項134記載の複合タンパク質。

[請求項136]

30

リポソマーゼタンパク質とポリペプチドリガンドとの間にリンカーペプチドをさらに含む、請求項134記載の複合タンパク質。

[請求項137]

ポリペプチドリガンドが、抗体の重鎖の可変領域および軽鎖の可変領域を含む、請求項134記載の複合タンパク質。

[請求項138]

重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域との間にリンカーペプチドを含む、請求項137記載の複合タンパク質。

[請求項139]

翻訳後に結合される、請求項134記載の複合タンパク質。

40

[請求項140]

単一のポリペプチド鎖として翻訳される、請求項134記載の複合タンパク質。

[請求項141]

請求項140記載の複合タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[請求項142]

SEQ ID NO:1に従うかまたは残基160～164位のGXSXGリパーゼモチーフにおいて置換変異を有するSEQ ID NO:1に従う、毒素を欠損したクロストリジウム・ノビイリポソマーゼタンパク質をコードする単離および精製されたポリヌクレオチドを含む組成物。

[請求項143]

ポリヌクレオチドがSEQ ID NO:2に従うヌクレオチド配列を含む、請求項142記載の組成

50

物。

[請求項144]

ポリヌクレオチドがベクターを含む、請求項142記載の組成物。

[請求項145]

ポリヌクレオチドがウイルスベクターを含む、請求項142記載の組成物。

[請求項146]

ポリヌクレオチドが非ウイルスベクターを含む、請求項142記載の組成物。

[請求項147]

ポリヌクレオチドが、正常組織より腫瘍において少なくとも2倍転写活性があるプロモーターを含む、請求項142記載の組成物。

10

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1A～1Dは、C. ノビイ-NTおよびDoxilを用いた処置の効果である。表記の腫瘍を有するマウスを0日目に表記の物質の様々な組み合わせによって処置した。遊離のドキソルビシンおよびC. ノビイ-NT胞子により、2週間以内に全ての動物が死亡し、この結果は示していない。1群あたりマウス少なくとも5匹から収集したデータの平均値および標準誤差を図示する。Doxilを加えたC. ノビイ-NTと他の群との差は有意であった（p < 0.0006、ログランク検定）。図1Aおよび1BはCT26腫瘍に対する効果を示す。図1Cおよび1DはHT116腫瘍に対する効果を示す。図1Aおよび1Cは腫瘍の体積を示し、図1Bおよび1Dは生存百分率を示す。

20

【図2】図2A～2Bは、C. ノビイ-NTによる処置後のDoxilの薬物動態分布である。（図2A）：0時間目に、Doxilを、大きさ～300 mm<sup>3</sup>の腫瘍を有する無胸腺ヌードマウスに投与した。もう一つの群のマウスにC. ノビイ-NT胞子をDoxilの16時間前に静脈内注射した。マウスを表記の時点で屠殺して、ドキソルビシンを組織から抽出して、蛍光測定によって測定した。時点あたりマウス3匹の平均値および標準偏差を示す。（図2B）：Doxilの注射後16時間で腫瘍を瞬間凍結して、中心領域からの凍結切片を蛍光顕微鏡を用いて調べた。リポソームにおけるドキソルビシンからの蛍光シグナルは消失するが（補足の材料および方法を参照されたい）、放出されたドキソルビシンは、590 nmで蛍光を発する。DAPIによって染色した所、ドキソルビシン蛍光と核DNAとの同時局在が、C. ノビイ-NT胞子によって処置した腫瘍において観察される。

30

【図3】図3A～3Cは、リポソーム破壊活性の生化学的精製および同定である。（図3A）：C. ノビイ-NTを後期対数生育期まで培地において生育させて、遠心分離によって培地から細胞を除去した。40%飽和硫酸アンモニウムによる沈殿後、イオン交換クロマトグラフィーを行って、リポソーム破壊活性に関して分画を評価した。（図3B）：（図3A）からのピーク分画（30～31）をプールしてゲル濾過クロマトグラフィーによって分画した。（図3C）：（図3B）からのピーク分画（29～30）をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分画した。

【図4】図4A～4Dは、リポソームの機能的分析である。NT01CX2047遺伝子の野生型または変異体型を有するプラスミドを大腸菌に導入した。「キュアした（cured）」細菌とは、wt遺伝子を当初含有しており、プラスミドが失われるまで選択的抗生物質の非存在下で生育させた細菌を表す。IPTGによる発現の誘導後に、各細菌株の独立した三つのクローニングからの細胞溶解物を作製して、以下のために用いた。（図4A）：オリゴヒスチジンに対する抗体によるウェスタンブロッティングにより、細菌中にwtおよび変異体タンパク質が同様量存在することが確認された。（図4B）：蛍光リバーゼ基質、1,2-ジオレオイル-3-ピレンデカノイル-rac-グリセロールを用いてリバーゼ活性を分析した。（図4C）：リポソーム破壊活性をDoxilを用いて査定した。（図4D）：異なる10個の生物から精製したリバーゼのリポソーム破壊活性をDoxilを用いて査定した。少なくとも二つの独立した実験からの平均値および標準偏差を（図4B）～（図4D）に示す。

40

【図5】C. ノビイ-NTおよびリポソームCPT-11を用いた処置の効果である。表記の腫瘍を有するマウスを表記の物質の様々な濃度によって0日目に処置した。1群あたりマウス少な

50

くとも5匹から計算したデータの平均値および標準誤差を示す。Doxilを加えたC. ノビイ-NTと他の群との差は有意であった ( $p < 0.0003$ 、ログランク検定)。

【図6】図6A～6Bは、リポソーム破壊活性である。(図6A)：C. ノビイ-NT培養物からの増殖培地(「条件培地」)の存在下での、Doxilからのドキソルビシン放出の経時的变化。C. ノビイ-NTを後期対数生育期まで生育させて、遠心分離によって培地から細胞を除去した。有意なリポソーム破壊活性が認められたが(赤い印)、表記の対照において蛍光の増加は観察されなかった。(図6B)：培養物における生育時間の関数としてのリポソーム破壊活性。C. ノビイ-NT胞子を増殖培地に接種して、その後様々な時間に採取した。細菌細胞を除去した後、リポソーム破壊活性を上清において測定して、600 nmでの吸光度と相關させた。リポソーム破壊活性の少なくとも二つの独立した分析からのデータの平均値および標準偏差を示す。標準偏差は、それらを表すバーが対応するデータ点での記号より小さい場合には目に見えない。

【発明を実施するための形態】

【0018】

発明の詳細な説明

本発明者らは、腫瘍を処置する方法を開発した。方法は、処置の腫瘍特異性を増強し、それによって全身毒性を低減させる。C. ノビイ-NTによって作製されたタンパク質と、薬物または生物学的物質を封入したリポソームとの組み合わせを用いると、腫瘍の消失効率は大きく増加される。このタンパク質はリバーゼ酵素活性を有するが、リポソーム破壊物質として非酵素的に機能するように思われる。リバーゼ酵素活性は、リポソーム破壊活性にとって必要ではない。このように、野生型およびリバーゼ陰性変異体をこの機能のために用いることができる。その上、リポソーム破壊機能は、生きているC. ノビイ-NTによってインサイチューで製作されたタンパク質によって、またはタンパク質自身の無細胞調製物によって送達され得る。さらに、タンパク質を、リポソマーゼタンパク質に対してさらに望ましい機能性を提供する複合体または融合タンパク質の一部として送達することができる。

【0019】

本明細書において記述されるアプローチについて可能性がある長所の一つは、リポソームに封入することができる任意の化学療法剤または生物学的物質に一般的に適用可能であることである。これらには、例として以下のカテゴリーの薬物が含まれる：トポイソメラーゼ阻害剤、DNA合成阻害剤、細胞分裂阻害剤、血管新生阻害剤、および微小管阻害剤。リツキサン、ハーセプチニン、およびエルビツクスのような抗体および抗体複合物も同様にリポソームに封入することができる。さらに、患者の内因性の腫瘍と闘うシステムを増強する可能性があるサイトカインおよび他の生物活性タンパク質を用いてもよい。そのようなサイトカインには、以下が含まれ得るがこれらに限定されるわけではない：IL-2およびインターフェロン-2bおよびGM-CSF。用いることができる特定の薬物、サイトカイン、および抗体には、以下が含まれるがこれらに限定されるわけではない：アバレリクス、アルデスロイキン；アレムツズマブ；アリトレチノイン；アロプリノール；アルトレタミン；アミフォスチン；アナキンラ；アナストロゾール；三酸化砒素；アスパラギナーゼ；アザシチジン；BCG生菌；ベバシズマブ；ベキサロテンカプセル；ベキサロテンゲル；ブレオマイシン；ボルテゾンビ(bortezomib)；ボルテゾミブ；ブスルファン；カルステロン；カペシタビン；カルボプラチニン；カルムスチニン；セレコキシブ；セツキシマブ；クロラムブシリ；シスプラチニン；クラドリビン；クロファラビン；シクロホスファミド；シタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイシン；アクチノマイシンD；ダルテバリンナトリウム；ダルベポエチン；ダサチニブ；ダウノルビシン；ダウノマイシン；デシタビン；デニロイキン；デニロイキンディフチトックス(diftitox)；デクスラゾキサン；デクスラゾキサン；ドセタキセル；ドキソルビシン；プロピオニ酸ドロモスタノロン；エクリズマブ；エリオットB溶液；エピルビシン；塩酸エピルビシン；エポエチン；エルロチニブ；エルロチニブ；エストラムスチニン；エトポシド；リン酸エトポシド；エトポシド、VP-16；エクセメスタン；クエン酸フェンタニル；フィルグラスチム；フロクスウリジン；フル

10

20

30

40

50

ダラビン；フルオロウラシル、5-FU；フルベストラント；ゲフィチニブ；ゲムシタビン；塩酸ゲムシタビン；ゲムツズマブオゾガミシン；酢酸ゴセレリン；酢酸ヒストレリン；ヒドロキシウレア；イブリツモマブチウキセタン；イダルビシン；イフォスファミド；メシル酸イマチニブ；インターフェロン -2a；インターフェロン -2b；イリノテカン；ジトシル酸ラパチニブ；レナリドミド；レトロゾール；ロイコボリン；ロイコボリン；ロイコボリン；ロイコボリン；酢酸リュープロリド；レバミソール；ロムスチン、CCNU；メクロレタミン、ナイトロジエンマスター；酢酸メゲストロール；メルファラン、L-PAM；メルカプトブリン、6-MP；メスナ；メソトレキセート；メトクサレン；マイトマイシンC；ミトタン；ミトキサントロン；フェンプロピオン酸ナンドロロン；ネララビン；ノフェツモマブ；オプレルベキン；オプレルベキン；オキサリプラチン；パクリタキセル；パクリタキセルのタンパク質に結合された粒子；パリフェルミン；パミドロネート；パニツムマブ；ペガデマーゼ(pegademase)；ペガスバルガーゼ；ペグフィルグラスチム；ペグインターフェロン -2b；ペメトレクスドニナトリウム；ペントスタチン；ピボプロマン；ブリカマイシン、ミスラマイシン；ポルフィマーナトリウム；プロカルバジン；キナクリン；ラスブリカーゼ；リツキシマブ；サルグラモスチム；ソラフェニブ；ストレプトゾシン；スニチニブ；マレイン酸スニチニブ；タルク；タモキシフェン；テモゾロミド；テニボシド、VM-26；テストラクトン；サリドマイド；チオグアニン、6-TG；チオテバ；トポテカン；塩酸トポテカン；トレミフェン；トシツモマブ；トシツモマブ/I-131トシツモマブ；トラスツズマブ；トレチノイン、ATRA；ウラシルマスター；バルルビシン；ビンプラスチム；ビンクリスチム；ビノレルビン；ビリノスタット；ゾレドロネート；およびゾレドロン酸。

## 【0020】

リポソマーゼをコードする遺伝子はGenbankのアクセッション番号CP000382 (SEQ ID NO:2)において示される配列を有する。タンパク質は、アクセッション番号ABK60711 (SEQ ID NO:1)において示される配列を有する。最初のアミノ酸35個はシグナル配列として切断されると予想される。高度に保存されたGXSGリバーゼモチーフ (SEQ ID NO:1の残基160~164位)においてアミノ酸置換を有する変異体も同様にリポソマーゼ活性を有し、用いることができる。たとえばS127G変異体 (SEQ ID NO:1におけるセリン162位での変異)を用いて、リポソマーゼ活性を提供することができる。他のリバーゼ欠損変異体も同様に用いることができる。セリン-127 (SEQ ID NO:1における残基162位)の他の置換は、アミノ酸A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、V、W、またはYとなり得る。

## 【0021】

本発明に従う組成物を、ヒトまたは他の哺乳動物に投与する前または後に作製することができる。このように、組成物の成分を個別に、また混合して投与することができる。個別に投与する場合、成分を任意の順序で投与することができる。成分が患者または他の哺乳動物内にある場合は、成分は組成物を形成してもよい。組成物の成分はキットにおいて共にまたは個別に包装され得る。このように、一つの包装内に多数の器または容器を最終ユーザーに提供してもよい。最終ユーザーは、1回または1回より多く、個別にまたは混合された成分を投与してもよい。

## 【0022】

本発明の抗腫瘍法を実践するための有用な成分を含むキットは、カートン、瓶、アンプル、チューブ等のような分割または非分割容器に包装することが可能である。胞子、リポソマーゼ、および抗腫瘍物質は、たとえば乾燥、凍結乾燥、または液体形態で包装することが可能である。提供されるさらなる成分には、乾燥成分を溶解するための媒体が含まれ得る。好ましくは、そのような媒体は全て、無菌的で発熱物質を含まず、有害反応を引き起こすことなく哺乳動物に注射するために適している。胞子以外の抗腫瘍物質も同様に、好ましくは無菌的である。胞子は好ましくは微生物学的に純粋であり、すなわち所望の胞子形成嫌気性菌以外の他の細菌を含有しない。

## 【0023】

リポソームを作製する方法は、当技術分野において周知である。たとえばMozafari, Ce

10

20

30

40

50

II Mol Biol Lett. 2005; 10(4):711-9; Andresen et al., Prog Lipid Res. 2005 Jan; 44(1):68-97; Jensen et al., Mol Cancer Ther. 2004 Nov; 3(11):1451-8; Pupo et al., J Control Release. 2005 May 18;104(2):379-96p; Brandl, Biotechnol Annu Rev. 2001;7:59-85を参照されたい。リポソームを作製するための当技術分野において公知の任意の技術を用いてもよい。

#### 【0024】

C. ノビイ胞子は、当技術分野において公知のように調製することができる。好ましくは、胞子は、毒素欠損株を形成すると考えられる。たとえば、その全内容物が明白に参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願第20050079157号を参照されたい。毒素はバクテリオファージまたはプラスミドのキュアリング(curing)プロセスによって消失させることが可能である。開始材料として有用なC. ノビイ(ATCC 19402)は、American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110-2209から得ることができる。

#### 【0025】

株は、完全に非毒素産生性である必要はないが、細菌を宿主に対してより有害でないようにするために、毒素遺伝子の少なくとも一つが変異、欠失、またはそうでなければ不活性化されていることが望ましい。毒素遺伝子がエピソームまたはファージ上に存在する場合、エピソームまたはファージのキュアリングを用いて毒素遺伝子を消失させることができる。変異誘発および変異体のスクリーニングならびにエピソームのキュアリングに関する技術は、当技術分野において周知である。

#### 【0026】

本発明に従う単離されて細菌学的に純粋な栄養型細菌または胞子は、他の細菌または胞子が混入していない細菌または胞子である。そのような純粋な培養物を得るために微生物学技術は当技術分野において周知である。典型的に、一つのコロニーを採取して寒天栄養培地において広げて、単細胞の子孫である新しいコロニーが生じるようにコロニーを分離する。確実に純粋な培養物が得られるまでこのプロセスを典型的に繰り返す。または、液体培養物を連続希釈して、単コロニー形成のために播種することができる。単細胞から確実にコロニーが形成されるように連続的な繰り返しが望ましい。たとえばJ. H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1972を参照されたい。

#### 【0027】

胞子、リポソマーゼ、リポソマーゼ複合体、およびリポソマーゼをコードする核酸またはその融合タンパク質を、腫瘍に対するアクセスを与えるであろう任意の手段によって癌を有する哺乳動物に投与することができる。胞子は、静脈内、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、腫瘍内、髄腔内、外科的等に注入することができる。好ましい技術は静脈内および腫瘍内注射である。癌を有する哺乳動物はたとえば、ヒト、イヌおよびネコのようなペット、ウシ、ヒツジ、ヤギ、およびブタのような農場動物、ならびにラット、ハムスター、サル、マウス、およびウサギのような実験動物であり得る。

#### 【0028】

本発明の送達システムは、タンパク質治療、遺伝子治療、またはその組み合わせにとつて有用である。このように、リポソマーゼは、タンパク質として、またはリポソマーゼをコードするポリヌクレオチドとして提供することが可能である。同様に、抗腫瘍剤または生物学的物質は、タンパク質またはポリヌクレオチドであってもよいと共に、低分子化学実体、たとえば生体高分子であってもよい。ポリヌクレオチドは、ウイルスまたは非ウイルスベクター中で提供することが可能である。当技術分野において公知の任意のベクターを用いることができるが、これらに限定されない。ベクター構築物は、処置の特異性を増強するために、腫瘍特異的プロモーターを含有してもよい。そのようなプロモーターの例は当技術分野において公知である。CXCR4プロモーターは黒色腫において腫瘍特異的であり；ヘキソキナーゼII型プロモーターは肺癌において腫瘍特異的であり；TRPM4 (Transient Receptor Potential-Melastatin 4) プロモーターは、前立腺癌において選択的に活性

10

20

30

40

50

である。抗腫瘍薬は、腫瘍に直接または間接的に影響を及ぼす薬物であってもよい。このように、たとえば、これは腫瘍に対する生得の免疫応答を刺激するタンパク質であり得る。または、抗腫瘍薬は、腫瘍細胞を破壊するために他の免疫系の成分を動員する抗体であり得る。なお他の物質が腫瘍細胞に対して毒性となる可能性がある。物質の選択は当業者の能力内である。

#### 【0029】

複合タンパク質は、翻訳後に連結されたタンパク質である。それらは二つのポリペプチドの、直接または中間体を通しての化学的連結によって連結されてもよい。または、タンパク質は、一つのオープンソリーディングフレーム内の二つのコード領域の同時翻訳によって連結してもよい。本来連結していない二つのポリペプチドを連結するための任意の手段を用いることができる。用いることができる一つのタイプの複合体は、第二のタンパク質として抗体分子またはその一部を利用する。このように、例として、リポソマーゼを抗体の可変領域に連結させることができ、したがってそれに対して抗体が結合する抗原を発現する生体内の特定部位をターゲティングする手段をリポソマーゼに提供することができる。必要に応じて複合タンパク質の部分の間にリンカーを用いてもよい。

10

#### 【0030】

本発明に従う単離および精製されたリポソマーゼタンパク質は、リポソマーゼ活性が組成物におけるタンパク質の少なくとも10%、25%、40%、55%、70%、85%、または95%を含む調製物である。単離および精製されたリポソマーゼをコードするポリヌクレオチドは、C. ノビイゲノムの他の遺伝子から分離されているポリヌクレオチドである。このように、これは仮説上のタンパク質NT01CX\_2046およびNT01CX\_2048をコードするゲノム隣接配列から分離される。C. ノビイ-NTの完全なゲノムが決定されており、NCBIにおいてNC\_008593として入手可能である。これはヌクレオチド2,5478,720個の環状DNAである。

20

#### 【0031】

本発明の方法および組成物は、任意の腫瘍タイプに応用することができる。本発明が信頼する原理（腫瘍およびいくつかの他の臓器（8, 9）に存在する有窓内皮を通してリポソームが選択的に浸透できること、およびリポソマーゼの存在下でリポソームからの内容物の放出の増強のような）は、いかなる腫瘍にも当てはまる。このように、本発明を、胃、小腸、結腸、直腸、食道のような消化管の腫瘍、腎臓、乳腺、肺、肝臓、頭頸部、および脳の腫瘍を処置するために用いることができる。

30

#### 【0032】

先の開示は本発明を一般的に説明する。本明細書において開示される参考文献は全て明白に参照により本明細書に組み入れられる。本明細書において図示する目的のためだけに提供され、本発明の範囲を制限すると意図されない、以下の特異的実施例を参照することによって、より完全な理解を得ることができる。

#### 【0033】

##### 実施例1

##### 材料および方法

##### 細胞株

HCT116 (CCL-247、ヒト結腸直腸癌)、およびCT26 (CRL-2638、マウス結腸直腸腺癌) をAmerican Type Culture Collectionから購入した。いずれの細胞株も、5%FBS (Hyclone) を添加したマッコイ5A培地 (Invitrogen) において37℃で5%CO<sub>2</sub>において生育させた。

40

#### 【0034】

##### 試薬

ドキソルビシンは、Bedford Laboratories, Bedford, OHから購入した。PEG化リポソームドキソルビシン (DOXIL (登録商標)) は、Tibotec Therapeutics, Raritan, NJから購入した。鶏卵L- -ホスファチジルコリン (EPC)、水素添加鶏卵L- -ホスファチジルコリン (HEPC)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (DSPE-PEG<sub>2000</sub>)、およびコレステロール (Chol) は

50

、Avanti Polar Lipids, Alabaster, ALから購入した。塩酸イリノテカン (Camptosar) は、Pharmacia & Upjohn Co., Kalamazoo, MIから購入した。カルシマイシンA23187およびトリオレインはSigma (St. Louis, MO) から得た。1,2-ジオレオイル-3-ピレンデカノイル-rac-グリセロール (DPG) は、MarkerGene Technologies (Eugene, OR) から得た。精製リバーゼ9個の組はFluka, Switzerlandから購入した。C. ノビイ-NT胞子は既に記述されているように調製した(1)。

#### 【0035】

##### リポソームの調製

HEPC : Chol : DSPE-PEG<sub>2000</sub>のモル比50 : 45 : 5の混合物をクロロホルムに溶解して、ロタリーエバボレーションによって薄膜に乾燥させ、真空下でさらに2時間乾燥させた。被膜を300 mM MnSO<sub>4</sub>によって水和させて、65 °Cの超音波浴 (Bransonic, Danbury, CT) に沈めて大きい多重層小胞 (MLV) を形成させた。この液体懸濁液を0.1 μm Nucleporeフィルター (Whatman, Florham Park, NJ) の二枚重ねの中をLipex Thermobarrel Extruder (Northern Lipids, Vancouver, BC, Canada) を用いて10回押し出した。得られた単一の単層小胞 (SUV) のコロイド状浮遊液を濾過滅菌した後、リポソームの外部環境を交換するために300 mMショ糖に対して4 °Cで透析した。SUVの大きさの平均値は、Malvern Zetasizer 3000 (Malvern, Worcestershire, UK) を用いて準弾性光散乱によって決定した場合に100.2 nm (多分散度指数 = 0.129) であった。

#### 【0036】

##### リポソームCPT-11

CPT-11をMnSO<sub>4</sub> pH勾配ローディング法 (2-4) を用いてリポソームに能動的にローディングした。イリノテカンをリポソームと、薬物 : 脂質のモル比1 : 3で混合して65 °Cで10分間インキュベートした。カルシマイシンをカルシマイシン1 μg : 脂質10 μmolの比率で加えて、懸濁液を65 °Cで45分間インキュベートした。薬物をローディングしたリポソームを濾過滅菌して、300 mMショ糖に対して4 °Cで透析して、非封入CPT-11を除去した。薬物の光分解を最小限にするために透析を暗所で行った。封入効率は、1-ブタノールによるリポソームの破壊および蛍光プレートリーダー (Fluostar Galaxy, BMG LabTech, GmbH) を用いる蛍光測定 (390 nmでの励起、460 nmでの放射) によって決定した場合に、典型的に > 99% であった。濃度はCPT-11標準曲線を参照することによって誘導した。

#### 【0037】

##### 動物モデル

動物実験は全てJohns Hopkins大学の動物福祉委員会によって監督され、承認され、大学の標準を遵守して行われた。Harlan Breeders, INから購入した6~8週齢のマウスを腫瘍の移植試験のために用いた。Balb/cマウスを用いてCT26腫瘍を確立し、無胸腺nu/nuマウスを用いてHCT116異種移植片を確立した。最少で動物5匹をそれぞれの実験アームのために用いた。腫瘍細胞500万個を各マウスの右脇腹に皮下注射して、無作為化および処置の前~10日間生育させた。C. ノビイ-NT胞子を、リン酸緩衝生理食塩液0.2 mlに懸濁した胞子3億個のボーラス尾静脈注射として投与した。関連するアームにおいて、遊離の薬物およびリポソーム薬を同じ経路によって16時間後に投与した。Doxil、ドキソルビシン、リポソームイリノテカン、およびイリノテカンの用量はそれぞれ、10 mg/kgおよび25 mg/kgであった。腫瘍の体積は長さ × 幅<sup>2</sup> × 0.5として計算した。

#### 【0038】

##### 薬物動態試験

HCT116異種移植片を無胸腺nu/nuマウスにおいて確立して、先に記述したように処置した。組織試料を処置後の様々な時点で採取して、70%エタノール、0.3 N HClに浮遊させて、ホモジナイズし (Ultra-Turrax (登録商標) T25 Basic, IKA, NC) 、ドキソルビシンを抽出した。遠心分離後、上清におけるドキソルビシンの蛍光 (470 nmでの励起、590 nmでの放射) を蛍光プレートリーダー (FluoStar Galaxy, BMG LabTech, GmbH) によって測定した。濃度はドキソルビシン標準曲線を参照することによって誘導した。

#### 【0039】

10

20

30

40

50

### リポソーム破壊アッセイ

試料をDoxil (96ウェルプレートにおいて試料100  $\mu$ l + Doxil 5  $\mu$ lまたは384ウェルプレートにおいて試料50  $\mu$ l + DOXIL 2  $\mu$ l)と混合した。放出されたドキソルビシンの脱消光によって引き起こされた蛍光の増加を、470 nmでの励起および590 nmでの放射を用いて速度論によって30~60分間測定した(5)。測定を全て、蛍光プレートリーダーにおいて37度で行った。典型的な読み出しを図S1に示す。リポソーム破壊活性は放出曲線の最大勾配として定義された。

### 【0040】

#### 生化学的精製

C. ノビイ-NT胞子をBagadi培地20 mlに接種して(6)、嫌気性チャンバー(Type A, Coy Labs, Grass Lake, MI)において37度~16時間インキュベートした。この開始培養物1 mlを用いて、嫌気性チャンバーにおいて予め平衡にしたBagadi培地100 mlに接種した。この培養物を後期対数生育期まで生育させた後、5,000 gで遠心分離して細菌を除去した。上清を50%飽和硫酸アンモニウムによって4度1時間沈殿させた後、5,000 gで遠心分離した。上清を除去した後、沈降物をTN緩衝液(100 mMトリス塩酸、pH7.5、0.1 M NaCl)に溶解した後、濾過滅菌した。その後のクロマトグラフィーは全てAKTA Purifier FPLCシステム(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)において行った。濾過した試料を、TN緩衝液において平衡にしたmono Q 5/50 GL(Amersham)カラムにローディングした。タンパク質を、TN緩衝液および100 mMトリス塩酸、pH 7.5、1 M NaClから形成されたカラム容積の10倍の直線勾配によって溶出した。採取した分画を先に記述したようにドキソルビシン放出活性に関して分析した。mono Qカラムからの二つの最も活性な分画をプールして、100 mMトリス塩酸、pH 7.5、0.5 M NaClにおいて平衡にしたHiLoad 16/60 Superdex 200(Amersham)カラムにローディングした。カラムは、カラム容積の1.5倍の同じ緩衝液によってイソクラティック(isocratic)に溶出された。分画を、先に記述したように、ドキソルビシン破壊活性に関して分析した。二つの最も活性な分画におけるタンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動によって分離して、SilverSNAP染色キットII(Pierce, Rockford, IL)を用いて銀染色した。一つの優勢なバンド(約45 kD)をLC/MS/MSによる分析のために切り出した。

### 【0041】

#### LC/MS/MSペプチド分析

切り出したタンパク質バンドをトリプシンによってゲル内で消化して、既に記述されているように(7)分析した。簡単に説明すると、Agilent 1100 Series Capillary-LCシステムを用いて、精製トリプシン断片を150×0.3 mm Vydac逆相カラムに5%緩衝液Bにおいて10  $\mu$ l/分で5分間注入した。緩衝液A(0.1%酢酸)およびB(99.9%アセトニトリルおよび0.1%酢酸)を、LC/MS/MS分析の液体クロマトグラフィー(LC)段階において用いた。ペプチドを、緩衝液Bの10~65%勾配によって2  $\mu$ l/分の速度で90分間カラムから溶出させた。溶出したペプチドを、エレクトロスプレーイオン化源、データ依存的モードで操作するローフロー金属針アセンブリを備えたLCQ DECA XP質量分析器(Thermo, MA)によって検出した。方法は、二つのスキャン事象、すなわち完全なスキャンおよび二次データ依存的MS/MSスキャンからなった。完全なスキャンのダイナミックマスレンジを300~3000 m/zに設定した。得られたMS/MSデータ依存スキャンは、371.0、391.0、445.0、462.0、1221.89、1321.9、1421.9、1521.8、1521.9、1621.9、1721.9、および1821.9 m/zの公知の「混入」質量を拒絶した。他の方法の状況には、デフォルトの電荷状態を4に設定し、繰り返し計数のdynamic exclusionを2に設定し、反復期間1分、除外リストサイズ25および除外期間3分が含まれた。他の方法パラメータは全てXcaliberソフトウェアv1.2(Thermo, MA)によって設定されたデフォルト値であった。

### 【0042】

#### オリゴヒスチジン融合タンパク質のクローニング

N末端分泌シグナル(シグナルP3.0によって予想されるように)を欠損するNT01CX2047のコード配列を、Phusion Taqポリメラーゼ(Finnzymes, Espoo, Finland)によって、フ

10

20

30

40

50

オワードプライマー

5'-TGCACCAACCACCACCAACAAAGAAAATCAAAAGTATCACAAAATAAT  
TATCCTATAATACTTGTCAATGG (SEQ ID NO: 3)

およびリバースプライマー

5'-CTGACCGGTTATTATTACAGTTACAGGAAGATTCTAAGCATTGAGCC  
(SEQ ID NO: 4)

を用いてPCR増幅した。フォワードプライマーにおける(CAC)<sub>6</sub>配列は、コードされるタンパク質のN末端にヒスチジン残基6個を付加した。このPCR産物をAge Iによって消化して、一つの付着末端を有するインサートを作製した。クローニングベクターpCR2.1/T7-GFP (Invitrogen, Carlsbad, CA) をNde Iによって消化して、T4 DNAポリメラーゼによって平滑末端にした後、Age Iによって消化して一つの付着末端を作製した。ベクターおよびインサートをライゲーションしてpLipを作製した。インサートの予想される配列をDNAシークエンシングによって確認した。

【0043】

S127GおよびS127X変種のクローニング

pLipプラスミドをSnaB Iによって消化して、変異させるべきセリン残基を含有する45 bpの断片を切除した。pLip(S127G)プラスミドを、消化したプラスミドを配列

5'-GTAAAGTTCATTTAATAGGACACCGTCAA GGTGGACAAACTATAC (SEQ ID NO: 5)

の置換45 bp二本鎖オリゴヌクレオチドと平滑末端ライゲーションすることによって生成した。プラスミドpLip(S127X)プラスミドは、二本鎖オリゴヌクレオチド

5'-GTAAAGTTCATTTAATAGGACA

CTAATAAGGTGGACAAACTATAC (SEQ ID NO: 6)

を用いて同じように生成した。インサートの標的化変更(上記の下線部)および方向をDNAシークエンシングによって確認した。

【0044】

タンパク質発現

先に記述した発現ベクターを、大腸菌(E. coli)のRosetta-gami(DE3)pLysS株( Novagen, Madison, WI)に熱ショックによって形質転換した。発現構築物あたりクローニング3個を採取して、それぞれをHyperBroth(AthenaES, Baltimore, MD) 20 mLにおいて抗生物質選択下で(100 μg/mLアンピシリン + 34 μg/mLクロラムフェニコール)、室温で培養した。陰性対照として、pLipプラスミドを有する細菌を、選択的抗生物質の非存在下での生育を通してそのプラスミドを「キュア」した。プラスミドの喪失をPCRによって確認した。発現をIPTGを用いて1時間誘導し、OD<sub>600</sub>が~0.2に達した後、細菌を遠心分離によって沈降させて、100 mMトリス塩酸、pH 7.5に浮遊させた。溶解物をBioruptor超音波浴(Diagenode, Belgium)における超音波処理によって調製して、~14,000 gでの遠心分離を行って不溶性物質を除去した。-ポリヒスチジンマウスmAb(R&D Systems, MN)を用いるウェスタンプロットティングを用いて、予想されるタンパク質の存在を確認した。

【0045】

リバーゼアッセイ

モル比2:5:1のEPC:トリオレイン:DPGをクロロホルムにおいて混合して、ロータリー-エバボレーションによって脂質被膜に乾燥させた後、高真空中でさらに2時間乾燥させた。被膜を100 mMグリシン緩衝液、pH 9.5、19 mMデオキシコール酸ナトリウムによって水和すると、DPGの最終濃度1 mMを生じた。この懸濁液を激しく攪拌して、基質として用いるための乳剤を形成した。試料をこの基質と混合した(384ウェルプレートにおいて試料30 μL + 試料5 μL)。ピレンデカン酸の触媒的放出によって引き起こされた蛍光の増加を、

10

20

30

40

50

320 nmでの励起および405 nmでの放射を用いて2時間の間速度論的に測定した。測定は全て、FluoStar Galaxy蛍光プレートリーダーにおいて37 °Cで行った。リバーゼ活性単位はシュードモナス・セパシア (*Pseudomonas cepacia*) リバーゼ標準曲線を参照することによって導いた。1単位(U)は、トリオレインからオレイン酸1 μmol/分を放出するP.セパシアのリバーゼ活性の等量に対応する。

#### 【0046】

##### リバーゼパネル実験

精製NT01CX2047酵素および9個の他の精製リバーゼを、100 mMトリス塩酸、pH 7.5に濃度1 mg/mlとなるように溶解した。アッセイ緩衝液 (100 mMトリス塩酸、pH 7.5 + 0.125 M NaCl) 50 μlをピペットによって384ウェルプレートに移した後、関連するリバーゼ2 μl 10 およびDOXIL 1 μlを加えた。試料を、先に記述したリポソーム破壊活性に関して、二連で分析した。

#### 【0047】

##### 実施例2 - 第一のモデルにおけるインビボでの胞子およびリポソーム

本発明者らは、BALB/cマウスにおける同系のCT26結腸直腸腫瘍を用いた。C. ノビイ-NT 胞子を静脈内に注射して、腫瘍において発芽が始まった(注射後~16時間)後、1回用量のDoxilを10 mg/kgで尾静脈を通して投与した。Doxilは、DNA損傷物質であり広く用いられる化学療法剤であるドキソルビシンを封入するリポソーム製剤である。リポソーム封入ドキソルビシンは、多様な実験および臨床試験において非封入ドキソルビシンと比較して転帰の改善が得られている(18-21)。Doxilにおけるリポソームは、その循環時間を増加させるためにPEG化によって表面が改変されている(18)。既に報告されているように(11, 12)、C. ノビイ-NT胞子単独による処置によって発芽が起こり、腫瘍の中心の低酸素領域内で壊死が起こるが、酸素飽和が良好な目に見える辺縁部が残って、これが最終的に再度生育する(図1A)。ドキソルビシンもDoxilも単独ではこれらのマウスにおいて持続的な治療効果を示さなかった。しかし、DoxilをC. ノビイ-NT胞子と併用すると、効果は顕著であり、それによって全てのマウスにおける腫瘍の完全な退縮が起こり(図1A)、それらの半数より多くが治癒する(図1B)。特に、C. ノビイ-NTおよび同じ用量の遊離のドキソルビシンを処置したマウスは、劇的な罹患率を示し、マウスの100% 20 が2週間以内に死につつあり、全身毒性の低減におけるリポソーム封入の極めて重要な役割を強調している(18)。

#### 【0048】

##### 実施例3 - 第二のモデルにおけるインビボでの胞子およびリポソーム

これらの明白な抗腫瘍効果を他の腫瘍モデルシステムにおいて観察できるか否かを決定するために、本発明者らは、ヌードマウスにおいて生育する結腸直腸癌異種移植片[HCT116]を同じように処置した。図1CおよびDにおいて示されるように、C. ノビイ-NT胞子をDoxilと併用して用いると、CT26腫瘍について観察されたものと類似のHCT116腫瘍退縮が得られた。これらの腫瘍モデルにおいて用いられるリポソームドキソルビシンの用量は、癌患者を処置するために診療所で現在用いられている用量とマッチした(19-21)。

#### 【0049】

##### 実施例4 - インビボでDoxilの分布

先に記述した実験において観察された相乗効果はおそらく、C. ノビイ-NT感染症の結果として腫瘍におけるドキソルビシンの濃度の増加が原因であった。この推測を具体化するために、Doxil単独を投与したマウスにおけるドキソルビシンの分布を、DoxilおよびC. ノビイ-NT胞子によって処置したマウスにおける分布と比較した。図2Aにおいて示されるように、DoxilをC. ノビイ-NTの存在下で投与すると、ドキソルビシンの腫瘍内濃度の顕著な増加を認めた。対照的に、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、および筋肉におけるドキソルビシンレベルは、胞子の存在下または非存在下で類似であった(図2A)。感染した腫瘍において見いだされたドキソルビシンは、リポソームから放出され、免疫蛍光によって明らかとなるように腫瘍細胞の核に結合した(図2B)。通常のように処置した腫瘍におけるドキソルビシンの濃度はこれまで、ドキソルビシンの投与後よりDoxilの投与後でより高くよ 40 50

り安定であることが示されたことに注目されたい(22)。実際に、C. ノビイ-NT胞子およびDoxilの投与によって、遊離のドキソルビシンの同等量によって達成される場合と比較して、正常な組織において薬物濃度を増加させることなく、腫瘍の薬物曝露が100倍よりも大きく増加した。

【0050】

実施例5 - 予想されるリポソーム破壊因子の同定の試み

本発明者らは次に、Doxilの注射後の腫瘍においてC. ノビイ-NTがドキソルビシンを放出できることの基礎となるメカニズムを同定しようと試みた。本発明者らは、C. ノビイ-NTの生育時に使用された培養培地が強いリポソーム破壊因子を含有すること、およびこの因子の濃度が後期対数生育期において最大であることを見いだした(図6)。本発明者らは、これらの酵素が、赤血球の脂質二重層と共にリポソームの脂質二重層を破壊することが知られていることから、この因子がホスホリパーゼであろうと予測する(17)。二つのホスホリパーゼC酵素がC. ノビイから精製されており、それらの1つは溶血活性を有する(23-25)。C. ノビイ-NTゲノムは、ホスホリパーゼをコードすると予測される遺伝子4個を含有する(26)。これらの遺伝子4個のうち1個(NT01CX0979)は、細胞外ホスホリパーゼCタンパク質(23, 25)をコードして、これは生育する細菌において高レベルで発現された(26)。

10

【0051】

C. ノビイ-NTは、外因性のDNAによる形質転換に対してこれまで不応性であることが証明されていることから、本発明者らは、リポソーム破壊因子がホスホリパーゼC NT01CX0979であるという仮説を試験するために異なる戦略に訴えた。MNNG媒介変異誘発の後、本発明者らは、血液-寒天プレートに細菌~10,000個を播種して、再現よく溶血活性を欠損する一つのコロニーを同定した。このクローンはNT01CX0979ホスホリパーゼC遺伝子内での971G>Aトランジションを保有することがDNAシークエンシングによって証明され、それによって良好に保存されたグリシンからグルタミンへの変異が起こった(25)。意外にも、この溶血陰性クローンの増殖培地はそのリポソーム破壊活性を保持し、この活性がNT01CX0979の結果ではなく、実際に溶血にとって十分な他の任意の酵素の結果であったことを示している。

20

【0052】

実施例6 - リポソーム破壊因子の同定およびそのコード配列

30

リポソーム破壊因子を同定するために、本発明者らは、硫酸アンモニウム沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、およびゲル滌過の組み合わせによって後期対数生育期のC. ノビイ-NTからの増殖培地を分画した。リポソーム破壊活性の一つの主要なピークが観察された(図3A, B)。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、活性分画における優勢な銀染色バンドが明らかとなった(図3C)。このバンドを精製して、トリプシンによって消化し、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析によって分析した。参照としてC. ノビイ-NTゲノムを用いると、ポリペプチドは、推定のリパーゼであるNT001CX2047によってコードされることが見いだされた。C. ノビイ-NTゲノムにおいて同定された二つの細胞外リパーゼ(NT01CX0630およびNT01CX2047)は、互いに(47%アミノ酸同一性)、または他の細菌におけるその最も近縁の相対物(C. テタニ(C. tetani)リパーゼと50~55%のアミノ酸同一性)とは高度に相同ではなかった。NT01CX2407の産物としてのリポソーム破壊因子の同定は、C. ノビイ-NTのゲノム分析からの情報と一致し、これによってNT01CX2047が後期対数生育期に選択的に発現され、細胞外にあると予想され、C. ノビイ-NTに感染後の腫瘍において高度に発現されることが明らかとなった(26)。

40

【0053】

実施例7 - リポソーム破壊因子のORFのクローニング

NT01CX2047によってコードされるタンパク質の特性を調べるために、本発明者らは、そのORFを誘導型発現ベクターにクローニングした後、これを、C. ノビイ-NT遺伝子(大腸菌のコドン使用とは非常に異なるコドン使用を有する)の発現を許容する遺伝子改変された大腸菌株に導入した。IPTGによるタンパク質発現の誘導後、形質転換した大腸菌細胞は

50

、おそらく遺伝子産物が毒性であることから生育が不良であった。これらの細胞からの溶解物を、1,2-ジオレオイル-3-ピレンデカノイル-rac-グリセロールの加水分解によって測定したリバーゼ活性に関して試験した。NT01CX2047発現クローンはリバーゼ活性を示したが、ベクターをキュアしたクローン（以下に記述）は活性を示さなかった（図4B）。さらなる対照として、アミノ酸127位でセリン残基のかわりに終止コドンが置換されている誘導体（S127X）を生成した。本発明者らはまた、残基127位のセリンがグリシンに置換されている変異体（S127G）を生成した。S127は、高度に保存されたGXSXGリバーゼモチーフ内で見いだされ、リバーゼ活性に責任を有する本質的な触媒セリンであると予想された（27）。したがって、S127Gミスセンス変異体およびS127X切断変異体はいずれも、それぞれが類似の量のNT01CX2047ポリペプチドを産生したが、リバーゼ活性を欠損した（図4A, B）10。興味深いことに、非触媒S127G変異体は、野生型NT01CX2047と同じ生育不良を示したが、S127X変異体はかなりよりしっかり生育した。リバーゼ活性を有しないS127G変異体の見かけの毒性は、当惑させるものであったが、これは以下に記述される実験によって説明された。

#### 【0054】

##### 実施例8 - リバーゼ活性とリポソーム破壊活性の遺伝的分離

先に記述した溶解物のリポソーム破壊活性を調べるために、本発明者らは、溶解物をリポソームドキソルビシンと共にインキュベートした。NT01CX2047の野生型を含有する株は、この分析において強力な活性を保有した（図4C）。細菌が無作為分離によって発現ベクターを失うまで、この株を選択的抗生物質の非存在下で培養すると、リポソーム破壊活性は失われた（図4C）。その上、プラスミドを失った細胞は、親大腸菌およびS127X変異体と同程度に強固に生育することができた。予想されるように、S127X切断変異体は、検出可能なリポソーム破壊活性を有しなかった（図4C）。しかし、意外なことに、リバーゼ活性を欠損するS127G変異体は、実質的なリポソーム破壊活性を保持した（図4C）。リポソームの破壊能が、C. ノビイ-NTのNT01CX2047リバーゼに対して特異的であるか否かを決定するために、本発明者らは、よく定義されたリバーゼ活性を有する市販の酵素9個のリポソーム破壊活性を試験した所、いずれも有意なリポソーム破壊活性を有しなかった（図4D）20。

#### 【0055】

##### 実施例9 - 他の物質を有するリポソームも同様に有効である

したがって、本発明者らは、ドキソルビシンと同様に癌治療において広く用いられているトポイソメラーゼ阻害剤であるCPT-11（イリノテカン）を含有するリポソームを試験した。リポソームCPT-11の1回用量を単独で注射するか、またはDoxil実験の場合と同様にC. ノビイ-NT投与後16時間に注射した。いずれの腫瘍タイプ（同系マウスにおけるCT26およびヌードマウスにおけるヒト結腸直腸癌細胞異種移植片）も、単独で注射した場合、リポソームCPT-11に対して比較的耐性であった。しかし、胞子の存在下で、腫瘍は全て退縮して、長期の治癒がマウスの>60%において達成された（図5）30。

#### 【0056】

同様に、リポソマーゼ戦略は小さい腫瘍のみならず大きい腫瘍においても有効であることが、これらおよびリポソームドキソルビシン実験において認められ、体積が136 mm<sup>3</sup>もの小さい腫瘍においても治癒が観察された。これまでの試験において、小さい腫瘍は、それらの中での壊死領域が比較的小さいことから、細菌溶解性治療に対して抵抗性であることが証明された（11）。本発明者らは、リポソーム薬およびC. ノビイ-NT胞子が、相互に互いを強化することから、それらを併用すると有効であるのではないかと考える。すなわち、EPR効果を通して腫瘍に蓄積された細胞障害薬は、壊死および低酸素症を引き起こし、これがC. ノビイ-NTの発芽に至り、これによって次に、リポソマーゼを通して薬物のより多くの放出が起こる。40

#### 【0057】

腫瘍におけるDoxilからのドキソルビシンの放出の一部（図2）は、理論的に、C. ノビイ-NTまたは感染腫瘍細胞から放出された他の酵素が原因となり得る。しかし、C. ノビイ50

-NTから分泌された主要なDoxil破壊因子はリポソマーゼであり（図3）、その遺伝子は感染した腫瘍において高レベルで発現され（26）、リポソマーゼがインビボ効果に有意に寄与することを示唆している。その上、今やリポソマーゼが同定およびクローニングされており、これを他の抗癌戦略に組み入れることができる。これらの戦略には、ウイルスまたは非ウイルス送達システムを用いる癌の遺伝子治療、および抗体に基づく酵素プロドラッグ治療が含まれる（3, 4, 31, 32）。過去に、そのようなアプローチは、利用できるプロドラッグのレパートリーが小さいこと、および他の腫瘍細胞に対する傍観者効果を発揮するために薬物が細胞内で代謝される必要性のため限定されている（31, 32）。リポソマーゼによって、非常に多様な「プロドラッグ」が既に市販されており、リポソームに封入することができる任意の化学療法剤を理論的に用いることができる。それぞれの薬物が異なるリポソームにおいて併用される多剤療法も同様に認識することができる。最後に、リポソマーゼは分泌され、リポソームが腫瘍細胞に対して外部にあることから、実質的な傍観者効果が予想される。

#### 【 0 0 5 8 】

##### 参考文献

引用されるそれぞれの参考文献の開示は、明白に本明細書に組み入れられる。

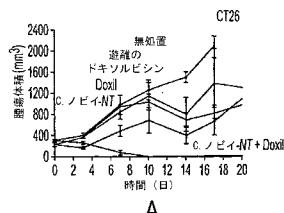
1. D. D. Von Hoff, A.-R. Hanauske, in *Cancer Medicine* D. W. Kufe *et al.*, Eds. (BC Decker, Inc., London, 2006) pp. 600-616.
2. C. Sawyers, *Nature* **432**, 294 (Nov 18, 2004).
3. S. V. Govindan, G. L. Griffiths, H. J. Hansen, I. D. Horak, D. M. Goldenberg, *Technol Cancer Res Treat* **4**, 375 (Aug, 2005).
4. M. Yamamoto, D. T. Curiel, *Technol Cancer Res Treat* **4**, 315 (Aug, 2005).
5. R. Kerbel, J. Folkman, *Nat Rev Cancer* **2**, 727 (Oct, 2002).
6. R. K. Jain, D. G. Duda, J. W. Clark, J. S. Loeffler, *Nat Clin Pract Oncol* **3**, 24 (Jan, 2006).
7. G. Thurston *et al.*, *J Clin Invest* **101**, 1401 (Apr 1, 1998).
8. H. Hashizume *et al.*, *Am J Pathol* **156**, 1363 (Apr, 2000).
9. D. C. Drummond, O. Meyer, K. Hong, D. B. Kirpotin, D. Papahadjopoulos, *Pharmacol Rev* **51**, 691 (Dec, 1999).
10. 10. J. Fang, T. Sawa, H. Maeda, *Adv Exp Med Biol* **519**, 29 (2003).
11. 11. L. H. Dang, C. Bettegowda, D. L. Huso, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, *Proc Natl Acad Sci USA* **27**, 27 (2001).
12. 12. N. Agrawal *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 15172 (Oct 19, 2004).
13. 13. R. M. Ryan, J. Green, C. E. Lewis, *Bioessays* **28**, 84 (Jan, 2006).
14. 14. A. M. Chakrabarty, *J Bacteriol* **185**, 2683 (May, 2003).
15. 15. P. Michl, T. M. Gress, *Curr Cancer Drug Targets* **4**, 689 (Dec, 2004).
16. 16. J. Theys *et al.*, *Curr Gene Ther* **3**, 207 (Jun, 2003).
17. 17. J. Sakurai, M. Nagahama, M. Oda, *J Biochem (Tokyo)* **136**, 569 (Nov, 2004).
18. 18. D. Papahadjopoulos *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 11460 (Dec 15, 1991).
19. 19. H. H. Chou *et al.*, *Gynecol Oncol* (Nov 30, 2005).
20. 20. R. E. Coleman *et al.*, *Eur J Cancer* **42**, 882 (May, 2006).
21. 21. H. Varveris *et al.*, *Strahlenther Onkol* **182**, 125 (Mar, 2006).
22. 22. H. D. Han *et al.*, *Int J Pharm* **313**, 181 (Apr 26, 2006).
23. 23. R. Taguchi, H. Ikezawa, *Biochim Biophys Acta* **409**, 75 (Oct 21, 1975).

24. R. Taguchi, H. Ikezawa, *Arch Biochem Biophys* **186**, 196 (Feb, 1978).
25. K. Tsutsui *et al.*, *J Bacteriol* **177**, 7164 (Dec, 1995).
26. C. Bettegowda *et al.*, *Science*, submitted (2006).
27. K. E. Jaeger, B. W. Dijkstra, M. T. Reetz, *Annu Rev Microbiol* **53**, 315 (1999).
28. C. R. Alving, W. H. Habig, K. A. Urban, M. C. Hardegree, *Biochim Biophys Acta* **551**, 224 (Feb 20, 1979).
29. R. Blumenthal, W. H. Habig, *J Bacteriol* **157**, 321 (Jan, 1984).
30. J. Sun *et al.*, *Eur Biophys J* **33**, 572 (Nov, 2004).
31. W. A. Denny, *Cancer Invest* **22**, 604 (2004).
32. K. D. Bagshawe, S. K. Sharma, R. H. Begent, *Expert Opin Biol Ther* **4**, 1777 (Nov, 2004).
33. L. H. Dang, C. Bettegowda, D. L. Huso, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, *Proc Natl Acad Sci U S A* **27**, 27 (2001).
34. S. A. Abraham *et al.*, *Biochim Biophys Acta* **1565**, 41 (Sep 20, 2002).
35. S. A. Abraham *et al.*, *Clin Cancer Res* **10**, 728 (Jan 15, 2004).
36. C. L. Messerer *et al.*, *Clin Cancer Res* **10**, 6638 (Oct 1, 2004).
37. W. Wu *et al.*, *Cancer Res* **66**, 970 (Jan 15, 2006).
38. H. O. Bagadi, M. M. Sewell, *Res Vet Sci* **15**, 53 (1973).
39. A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, *Anal Chem* **68**, 850 (Mar 1, 1996).

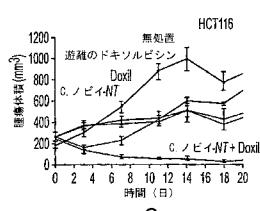
10

20

【図1】

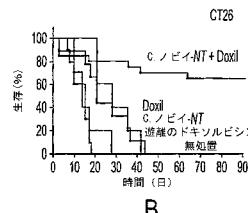


A

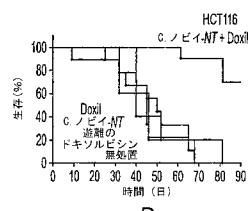


C

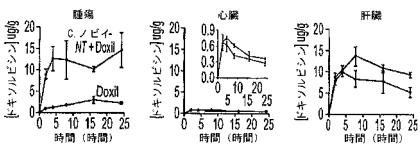
【図2】



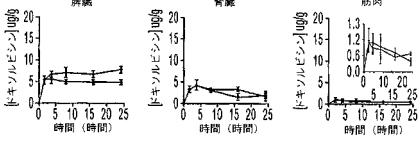
B



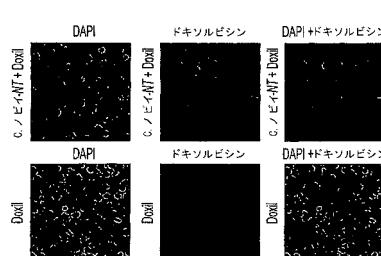
D



A

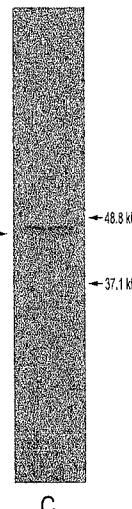
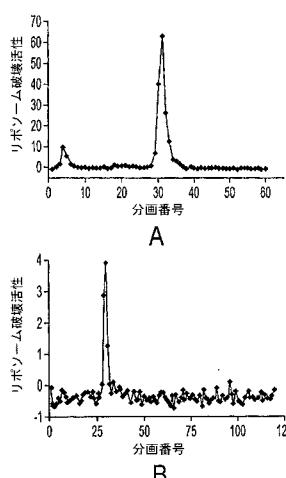


B



B

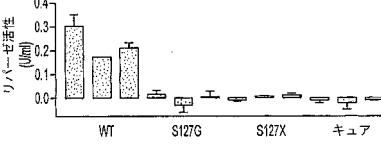
【図3】



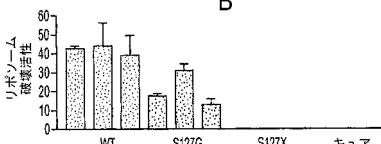
【図4】



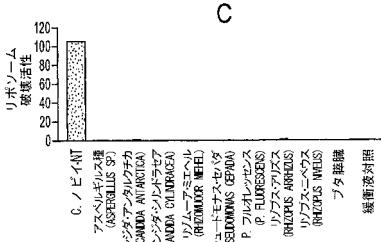
A



B

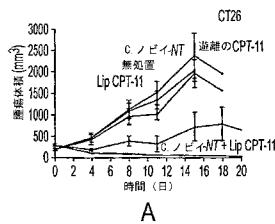


C

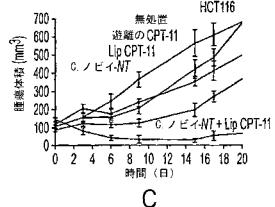


D

【図5】

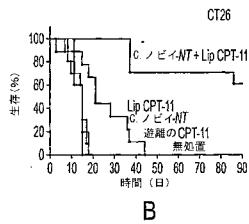


A

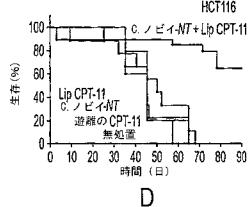


C

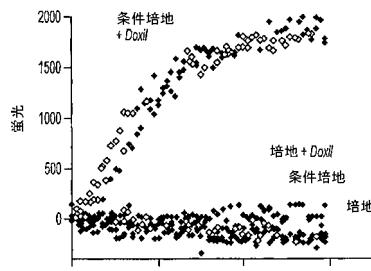
【図6】



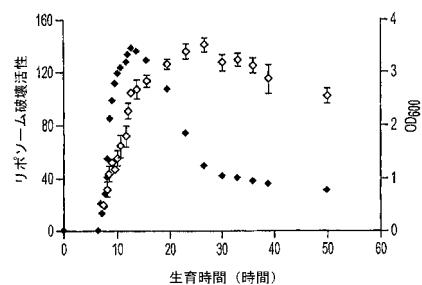
B



D



A



B

【配列表】

0005319523000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 M
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Y
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088
A 6 1 K 31/4745 (2006.01)	A 6 1 K 35/76
	A 6 1 K 37/02
	A 6 1 K 31/704
	A 6 1 K 31/4745
(74)代理人 100130845 弁理士 渡邊 伸一	
(74)代理人 100142929 弁理士 井上 隆一	
(74)代理人 100114340 弁理士 大関 雅人	
(72)発明者 チョン イアン アメリカ合衆国 メリーランド州 ポルチモア オーリンズ ストリート 1650 ザ シドニー - キンメル コンプリヘンシブ キャンサー センター	
(72)発明者 チョウ シビン アメリカ合衆国 メリーランド州 ポルチモア オーリンズ ストリート 1650 ザ シドニー - キンメル コンプリヘンシブ キャンサー センター	
(72)発明者 キンズラー ケネス ダブリュ. アメリカ合衆国 メリーランド州 ベル エア ハルカーハウジング ウェイ 1403	
(72)発明者 フォーゲルスタイン バート アメリカ合衆国 メリーランド州 ポルチモア ブレトン ウェイ 3700	
審査官 平林 由利子	
(56)参考文献 特開2005-298486 (JP, A) 特表平05-501264 (JP, A) 国際公開第06/046080 (WO, A1) 国際公開第05/037862 (WO, A1) VAN,M.E. et al., Clostridium spores as anti-tumour agents, Trends Microbiol, 2006年 4月, Vol.14, No.4, p.190-6 B. Uziely et al., Liposomal doxorubicin: antitumor activity and unique toxicities during two complementary phase I studies, Journal of Clinical Oncology, 1995年 7月 1日 , Vol. 13, No. 7, pp. 1777-1785 [ONLINE], 2004年10月10日, P1-14, URL, <a href="http://web.archive.org/web/20041009180801/www.doxil.com/05_shared_pages/01_prescribing_info.html">http://web.archive.org/web/20041009180801/www.doxil.com/05_shared_pages/01_prescribing_info.html</a> T. L. M. ten Hagen, et al., Pegylated liposomal tumor necrosis factor-alpha results in reduced toxicity and synergistic antitumor, International journal of cancer, 2002年 1月 1日, Vol. 97, No. 1, pp. 115-20 O. Lyass et al., Phase I study of doxil-cisplatin combination chemotherapy in patients with advanced malignancies., Clinical cancer research, 2001年10月, Vol. 7, No. 10, pp. 3040-3046	

H. J. Burstein et al. , Phase I study of Doxil and vinorelbine in metastatic breast cancer. , Annals of Oncology , 1999年 9月 , Vol. 10, No. 9 , pp. 1113-1116

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 61K 35 / 00 - 35 / 76

A 61K 31 / 00 - 33 / 44

A 61K 9 / 00 - 9 / 72

A 61K 47 / 00 - 47 / 48

A 61K 38 / 00 - 38 / 58

A 61K 39 / 00 - 39 / 44

A 61K 45 / 00 - 45 / 08

A 61K 48 / 00

CA / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamII)