

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-500042
(P2004-500042A)

(43) 公表日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 35/74	A 6 1 K 35/74	A 4 B O 6 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 38/43	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 7
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 35/00	4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 299 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-528552 (P2001-528552)
 (86) (22) 出願日 平成12年8月24日 (2000. 8. 24)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年4月4日 (2002. 4. 4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/023242
 (87) 国際公開番号 W02001/025397
 (87) 国際公開日 平成13年4月12日 (2001. 4. 12)
 (31) 優先権主張番号 60/157, 500
 (32) 優先日 平成11年10月4日 (1999. 10. 4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/157, 581
 (32) 優先日 平成11年10月4日 (1999. 10. 4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/157, 637
 (32) 優先日 平成11年10月4日 (1999. 10. 4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500115262
 ヴァイオン ファーマシューティカルズ、
 インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 06511 コネチカッ
 ト州、ニュー ヘイブン、フォー サイエ
 ンス パーク (番地なし)
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エフェクター分子の腫瘍標的送達のための組成物および方法

(57) 【要約】

本出願は、固形腫瘍の部位に1つ以上の一次エフェクター分子を送達するための弱毒化腫瘍標的細菌 (attenuated tumor-targeted bacteria) ベクターの作製ならびに使用を開示する。本発明の一次エフェクター分子は、癌腫、黒色腫、リンパ腫、肉腫などの固形腫瘍癌を治療するために本発明の方法において用いられる。本発明は、宿主に全身投与する場合には毒性でありうるエフェクター分子を、宿主への毒性を低下させた弱毒化腫瘍標的細菌によって腫瘍に局所送達できるという驚くべき知見に関する。本出願はまた、一次エフェクター分子と共に弱毒化腫瘍標的細菌によって送達され得る1つ以上の任意のエフェクター分子 (二次エフェクター分子と呼ばれる) の送達を開示する。

```

ATG GTA CGT AGC TCC TCT CCG ACT CCG TCC GAT AAG CCG GTT GCT
M Y R S S S R T P S D K P Y A
CAT GTA GTT GCT AAC CCT CAG GCA GAA GGT CAG CTG CAG TGG CTG
H V V A N P Q A E G Q L D W L
AAC CGT CCG GGT AAC GCC CTG CTG GCA AAC GGC GTT GAG CTC CGT
N R R A N A L L A M G V E L R
GAT AAC CAG CTC GTG GTA CCT TCT GAA GGT CTG TAC CTG ATC TAT
D N Q L Y Y P S E G L Y L I Y
TCT CAA GTA CTG TTC AAG GGT CAG GGC TGC CCG TCG ACT CAT GTT
S Q V L F K G Q G C P S T H Y
CTG CTG ACT CAC ACC ATC AGC CGT ATT GCT GTA TCT TAC CAG ACC
L L T H T I S R I A V S Y Q T
AAA GTT AAC CTG CTG AGC GGT ATC AAG TCT CCG TGC CAG GGT GAA
K V N L L S A I K S P C Q R E
ACT CCC GAG GGT GCA GAA GCG AAA CCA TGG TAT GAA CCG ATC TAC
T P E G A E A K P M Y E P I Y
CTG GGT GGC GTA TTT CAA CTG GAG AAA GGT GAC GGT CTG TCC GCA
L G G V F Q L E K G D R L E A
GAA ATC AAC CGT CCT GAC TAT CTA GAT TTC GCT GAA TCT GGC CAG
E I N R P D Y L D F A E S G Q
GTG TAC TTC GGT ATT ATC GCA CTG TAA
V Y F G I I A L *
    
```

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む、通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 2】

1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む、通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 3】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがTNFファミリーのメンバーである、請求項1または2に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 4】

TNFファミリーのメンバーが、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、腫瘍壊死因子 (TNF- β)、TNF- β 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- β 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- β 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、CD40リガンド (CD40L)、LT- α 、LT- β 、OX40L、CD40L、FasL、CD27L、CD30L、4-1BBL、APRIL、LIGHT、TL1、TNFSF16、TNFSF17、またはAITR-Lである、請求項3に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 5】

一次エフェクター分子の少なくとも1つが抗血管新生因子である、請求項1または2に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 6】

抗血管新生因子が、エンドスタチン、アンジオスタチン、抗血管新生アンチトロンピン I II、フィブロネクチンの29 kDa N末端および40 kDa C末端タンパク質分解断片、uPA受容体アンタゴニスト、プロラクチンの16 kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の7.8 kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の抗血管新生24アミノ酸断片、13.40と称する抗血管新生因子、トロンボスポンジン I の抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、RGDおよびNGRを含むペプチド、ラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲンもしくはEGFの小さい抗血管新生ペプチド、またはインテグリン α_3 もしくはVEGF受容体のペプチドアンタゴニストである、請求項5に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 7】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがバクテリオシンファミリーのメンバーであるが、ただし、該バクテリオシンはBRPでない、請求項1または2に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 8】

バクテリオシンファミリーのメンバーが、ColE1、ColE1a、ColE1b、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、ColE9、コリシンA、コリシンK、コリシンL、コリシンM、クロアシンDF13、ペスチシンA1122、スタフィロコクシン1580、プチリシン7423、ピオシンR1もしくはAP41、メガシンA-216、ピブリオシン、またはミクロシンM15である、請求項7に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 9】

一次エフェクター分子が腫瘍阻害酵素である、請求項1または2に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 10】

腫瘍阻害酵素が、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、DNAアーゼ、またはグリコシダーゼである、請求項9に記載の弱毒化腫瘍標的

10

20

30

40

50

細菌。

【請求項 1 1】

一次エフェクター分子がヘモリシン、ペロ毒素、CNF 1、CNF 2、またはPMTである、請求項 1 または 2 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 1 2】

一次エフェクター分子が動物、植物、細菌、またはウイルスに由来するものである、請求項 1 または 2 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 1 3】

二次エフェクター分子が免疫調節剤、抗腫瘍タンパク質、プロドラッグ変換酵素、アンチセンス分子、リボザイム、または抗原である、請求項 2 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

10

【請求項 1 4】

弱毒化腫瘍標的細菌がサルモネラ (*Salmonella*) である、請求項 1 または 2 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 1 5】

弱毒化腫瘍標的細菌が増強された放出系をさらに含む、請求項 1 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 1 6】

二次エフェクター分子がバクテリオシン放出因子 (BRP) である、請求項 2 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 1 7】

1 つ以上のプロモーターに機能的に連結された 1 つ以上の融合タンパク質をコードする 1 つ以上の核酸分子を含む、通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌であって、該融合タンパク質がシグナル配列とエフェクター分子からなる、上記弱毒化腫瘍標的細菌。

20

【請求項 1 8】

1 つ以上のプロモーターに機能的に連結された 1 つ以上の融合タンパク質をコードする 1 つ以上の核酸分子を含む、通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌であって、該融合タンパク質がフェリーペプチドとエフェクター分子からなる、上記弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 1 9】

融合タンパク質がシグナル配列をさらに含む、請求項 1 8 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

30

【請求項 2 0】

シグナル配列がOmp A 様タンパク質である、請求項 1 7 または 1 9 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 2 1】

フェリーペプチドが、HIV TAT タンパク質、アンテナペディアホメオドメイン (ペネトラキシン)、カポジ繊維芽細胞増殖因子 (FGF) 膜移行性配列 (MTS)、単純ヘルペスウイルス VP 2 2、ヘキサヒスチジン、ヘキサリシン、またはヘキサアルギニンから誘導される、請求項 1 3 または 1 9 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 2 2】

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項 1 7、1 8 または 1 9 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

40

【請求項 2 3】

弱毒化腫瘍標的細菌が、1 つ以上のプロモーターに機能的に連結された 1 つ以上のエフェクター分子をコードする 1 つ以上の核酸分子をさらに含む、請求項 1 7、1 8 または 1 9 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 2 4】

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項 2 3 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 2 5】

50

製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物。

【請求項26】

製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物。

【請求項27】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがTNFファミリーのメンバーである、請求項25または26に記載の医薬組成物。 10

【請求項28】

TNFファミリーのメンバーが、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、腫瘍壊死因子 (TNF- β)、TNF- β 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- β 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- β 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、CD40リガンド (CD40L)、LT- α 、LT- β 、OX40L、CD40L、FasL、CD27L、CD30L、4-1BBL、APRIL、LIGHT、TL1、TNFSF16、TNFSF17、またはAITR-Lである、請求項27に記載の医薬組成物。

【請求項29】

一次エフェクター分子の少なくとも1つが抗血管新生因子である、請求項25または26に記載の医薬組成物。 20

【請求項30】

抗血管新生因子が、エンドスタチン、アンジオスタチン、抗血管新生アンチトロンビンI I I、フィブロネクチンの29kDa N末端および40kDa C末端タンパク質分解断片、uPA受容体アンタゴニスト、プロラクチンの16kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の7.8kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の抗血管新生24アミノ酸断片、13.40と称する抗血管新生因子、トロンボスポンジンIの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、RGDおよびNGRを含むペプチド、ラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲンもしくはEGFの小さい抗血管新生ペプチド、またはインテグリン $\alpha_v \beta_3$ もしくはVEGF受容体のペプチドアンタゴニストである、請求項29に記載の医薬組成物。 30

【請求項31】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがバクテリオシンファミリーのメンバーであるが、ただし、該バクテリオシンはBRPでない、請求項25または26に記載の医薬組成物。

【請求項32】

バクテリオシンファミリーのメンバーが、ColE1、ColE1a、ColE1b、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、ColE9、コリシンA、コリシンK、コリシンL、コリシンM、クロアシンDF13、ペスチシンA1122、スタフィロコクシン1580、プチリシン7423、ピオシンR1もしくはAP41、メガシンA-216、ピプリオシン、またはミクロシンM15である、請求項31に記載の医薬組成物。 40

【請求項33】

一次エフェクター分子が腫瘍阻害酵素である、請求項25または26に記載の医薬組成物。

【請求項34】

腫瘍阻害酵素が、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、DNAアーゼ、またはグリコシダーゼである、請求項33に記載の医薬組成物。

【請求項35】

少なくとも1つの一次エフェクター分子がヘモリシン、ペロ毒素、CNF1、CNF2、またはPMTである、請求項25または26に記載の医薬組成物。

【請求項36】

一次エフェクター分子が動物、植物、細菌、またはウイルスに由来するものである、請求項25または26に記載の医薬組成物。

【請求項37】

二次エフェクター分子が免疫調節剤、抗腫瘍タンパク質、プロドラッグ変換酵素、アンチセンス分子、リボザイム、または抗原である、請求項26に記載の医薬組成物。

【請求項38】

弱毒化腫瘍標的細菌がサルモネラ (*Salmonella*) である、請求項25または26に記載の医薬組成物。 10

【請求項39】

弱毒化腫瘍標的細菌が増強された放出系をさらに含む、請求項25に記載の医薬組成物。

【請求項40】

二次エフェクター分子がバクテリオシン放出因子である、請求項26に記載の医薬組成物。

【請求項41】

製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物であって、該融合タンパク質がシグナル配列とエフェクター分子からなる、上記医薬組成物。 20

【請求項42】

製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物であって、該融合タンパク質がフェリーペプチドとエフェクター分子からなる、上記医薬組成物。

【請求項43】

融合タンパク質がシグナル配列をさらに含む、請求項42に記載の医薬組成物。

【請求項44】

シグナル配列がOmpA様タンパク質である、請求項41または43に記載の医薬組成物。 30

【請求項45】

フェリーペプチドが、HIV-TATタンパク質、アンテナペディアホメオドメイン(ペネトラキシン)、カポジ繊維芽細胞増殖因子(FGF)膜移行性配列(MTS)、単純ヘルペスウイルスVP22、ヘキサヒスチジン、ヘキサリシン、またはヘキサアルギニンから誘導される、請求項42または43に記載の医薬組成物。

【請求項46】

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項41、42または43に記載の医薬組成物。

【請求項47】

弱毒化腫瘍標的細菌が、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上のエフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子をさらに含む、請求項41、42または43に記載の医薬組成物。 40

【請求項48】

固形腫瘍癌の治療のために、そのような治療が必要な被験者に、1つ以上の一次エフェクター分子を送達する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を投与することを含んでなる上記方法。

【請求項49】

固形腫瘍癌の治療のために、そのような治療が必要な被験者に、1つ以上の一次エフェクター分子と1つ以上の二次エフェクター分子を送達する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を投与することを含んでなる上記方法。

【請求項50】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがTNFファミリーのメンバーである、請求項48または49に記載の方法。

【請求項51】

TNFファミリーのメンバーが、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、腫瘍壊死因子 (TNF- β)、TNF- β 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- β 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- β 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、CD40リガンド (CD40L)、LT- α 、LT- β 、OX40L、CD40L、FasL、CD27L、CD30L、4-1BBL、APRIL、LIGHT、TL1、TNFSF16、TNFSF17、またはAITR-Lである、請求項50に記載の方法。

10

【請求項52】

一次エフェクター分子の少なくとも1つが抗血管新生因子である、請求項48または49に記載の方法。

20

【請求項53】

抗血管新生因子が、エンドスタチン、アンギオスタチン、抗血管新生アンチトロンピン I I I、フィブロネクチンの29kDa N末端および40kDa C末端タンパク質分解断片、uPA受容体アンタゴニスト、プロラクチンの16kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の7.8kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の抗血管新生24アミノ酸断片、13.40と称する抗血管新生因子、トロンボスポンジンIの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、RGDおよびNGRを含むペプチド、ラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲンもしくはEGFの小さい抗血管新生ペプチド、またはインテグリン $\alpha_v \beta_3$ もしくはVEGF受容体のペプチドアンタゴニストである、請求項52に記載の方法。

30

【請求項54】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがバクテリオシンファミリーのメンバーであるが、ただし、該バクテリオシンはBRPでない、請求項48または49に記載の方法。

【請求項55】

バクテリオシンファミリーのメンバーが、ColE1、ColE1a、ColE1b、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、ColE9、コリシンA、コリシンK、コリシンL、コリシンM、クロアシンDF13、ペスチシンA1122、スタフィロコクシン1580、プチリシン7423、ピオシンR1もしくはAP41、メガシンA-216、ピブリオシン、またはミクロシンM15である、請求項54に記載の方法。

40

【請求項56】

一次エフェクター分子の少なくとも1つが腫瘍阻害酵素である、請求項48または49に記載の方法。

【請求項57】

腫瘍阻害酵素が、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、DNAアーゼ、またはグリコシダーゼである、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがヘモリシン、ベロ毒素、CNF1、CNF2、またはPMTである、請求項48または49に記載の方法。

【請求項59】

50

一次エフェクター分子の少なくとも1つが動物、植物、細菌、またはウイルスに由来するものである、請求項48または49に記載の方法。

【請求項60】

二次エフェクター分子の少なくとも1つが抗腫瘍タンパク質、プロドラッグ変換酵素、アンチセンス分子、リボザイム、または抗原である、請求項49に記載の方法。

【請求項61】

弱毒化腫瘍標的細菌がサルモネラ (*Salmonella*) である、請求項48または49に記載の方法。

【請求項62】

弱毒化腫瘍標的細菌が増強された放出系をさらに含む、請求項48に記載の方法。 10

【請求項63】

二次エフェクター分子がバクテリオシン放出因子である、請求項49に記載の方法。

【請求項64】

固形腫瘍癌の治療のために、そのような治療が必要な被験者に、1つ以上の融合タンパク質を送達する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を投与することを含んでなり、該融合タンパク質がシグナル配列とエフェクター分子からなる、上記方法。

【請求項65】

固形腫瘍癌の治療のために、そのような治療が必要な被験者に、1つ以上の融合タンパク質を送達する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を投与することを含んでなり、該融合タンパク質がフェリーペプチドとエフェクター分子からなる、上記方法。 20

【請求項66】

融合タンパク質がシグナル配列をさらに含む、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

シグナル配列がOmpA様タンパク質である、請求項64または66に記載の方法。 30

【請求項68】

フェリーペプチドが、HIV TATタンパク質、アンテナペディアホメオドメイン(ペネトラキシン)、カポジ繊維芽細胞増殖因子(FGF)膜移行性配列(MTS)、単純ヘルペスウイルスVP22、ヘキサヒスチジン、ヘキサリシン、またはヘキサアルギニンから誘導される、請求項65または66に記載の方法。

【請求項69】

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項64、65または66に記載の方法。

【請求項70】

弱毒化腫瘍標的細菌が、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上のエフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子をさらに含む、請求項64、65または66に記載の方法。 40

【請求項71】

動物の固形腫瘍癌を治療する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物、および1つ以上の化学療法剤を投与することを含んでなる上記方法。

【請求項72】

動物の固形腫瘍癌を治療する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフ 50

エクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物、および1つ以上の化学療法剤を投与することを含んでなる上記方法。

【請求項73】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがTNFファミリーのメンバーである、請求項71または72に記載の方法。

【請求項74】

TNFファミリーのメンバーが、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、腫瘍壊死因子 (TNF- β)、TNF- β 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- β 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- β 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、CD40リガンド (CD40L)、LT- α 、LT- β 、OX40L、CD40L、FasL、CD27L、CD30L、4-1BBL、APRIL、LIGHT、TL1、TNFSF16、TNFSF17、またはAITR-Lである、請求項73に記載の方法。

10

【請求項75】

一次エフェクター分子の少なくとも1つが抗血管新生因子である、請求項71または72に記載の方法。

【請求項76】

抗血管新生因子が、エンドスタチン、アンギオスタチン、抗血管新生アンチトロンピンEII、フィブロネクチンの29kDa N末端および40kDa C末端タンパク質分解断片、uPA受容体アンタゴニスト、プロラクチンの16kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の7.8kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の抗血管新生24アミノ酸断片、13.40と称する抗血管新生因子、トロンボスポンジンIの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、RGDおよびNGRを含むペプチド、ラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲンもしくはEGFの小さい抗血管新生ペプチド、またはインテグリン α_3 もしくはVEGF受容体のペプチドアンタゴニストである、請求項75に記載の方法。

20

【請求項77】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがバクテリオシンファミリーのメンバーであるが、ただし、該バクテリオシンはBRPでない、請求項71または72に記載の方法。

30

【請求項78】

バクテリオシンファミリーのメンバーが、ColE1、ColE1a、ColE1b、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、ColE9、コリシンA、コリシンK、コリシンL、コリシンM、クロアシンDF13、ペスチシンA1122、スタフィロコクシン1580、プチリシン7423、ピオシンR1もしくはAP41、メガシンA-216、ピブリオシン、またはマイクロシンM15である、請求項77に記載の方法。

【請求項79】

一次エフェクター分子の少なくとも1つが腫瘍阻害酵素である、請求項71または72に記載の方法。

40

【請求項80】

腫瘍阻害酵素が、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、DNAアーゼ、またはグリコシダーゼである、請求項79に記載の方法。

【請求項81】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがヘモリシン、ベロ毒素、CNF1、CNF2、またはPMTである、請求項71または72に記載の方法。

【請求項82】

一次エフェクター分子が動物、植物、細菌、またはウイルスに由来するものである、請求項71または72に記載の方法。

【請求項83】

50

二次エフェクター分子が免疫調節剤、抗腫瘍タンパク質、プロドラッグ変換酵素、アンチセンス分子、リボザイム、または抗原である、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

弱毒化腫瘍標的細菌がサルモネラ (S a l m o n e l l a) である、請求項 7 1 または 7 2 に記載の方法。

【請求項 8 5】

弱毒化腫瘍標的細菌が増強された放出系をさらに含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 8 6】

二次エフェクター分子がバクテリオシン放出因子である、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 8 7】

動物の固形腫瘍癌を治療する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物、および1つ以上の化学療法剤を投与することを含んでなり、該融合タンパク質がシグナル配列とエフェクター分子からなる、上記方法。

10

【請求項 8 8】

動物の固形腫瘍癌を治療する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物、および1つ以上の化学療法剤を投与することを含んでなり、該融合タンパク質がフェリーペプチドとエフェクター分子からなる、上記方法。

20

【請求項 8 9】

融合タンパク質がシグナル配列をさらに含む、請求項 8 8 に記載の方法。

【請求項 9 0】

シグナル配列が O m p A 様タンパク質である、請求項 8 7 または 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 1】

フェリーペプチドが、H I V T A T タンパク質、アンテナペディアホメオドメイン (ペネトラキシン)、カポジ繊維芽細胞増殖因子 (F G F) 膜移行性配列 (M T S)、単純ヘルペスウイルス V P 2 2、ヘキサヒスチジン、ヘキサリシン、またはヘキサアルギニンから誘導される、請求項 8 8 または 8 9 に記載の方法。

30

【請求項 9 2】

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項 8 7、8 8 または 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 3】

弱毒化腫瘍標的細菌が、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上のエフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子をさらに含む、請求項 8 7、8 8 または 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 4】

動物の固形腫瘍癌を治療する方法であって、製薬上許容される担体と弱毒化腫瘍標的細菌とを含有する医薬組成物、および1つ以上の化学療法剤を投与することを含んでなる、上記方法。

40

【請求項 9 5】

O m p A 様タンパク質およびエフェクター分子からなる融合タンパク質。

【請求項 9 6】

シグナル配列、フェリーペプチドおよびエフェクター分子からなる融合タンパク質。

【請求項 9 7】

シグナル配列が O m p A 様タンパク質である、請求項 9 6 に記載の融合タンパク質。

【請求項 9 8】

フェリーペプチドが、H I V T A T タンパク質、アンテナペディアホメオドメイン (ペネトラキシン)、カポジ繊維芽細胞増殖因子 (F G F) 膜移行性配列 (M T S)、単純へ

50

ルペスウイルスVP22、ヘキサヒスチジン、ヘキサリシン、またはヘキサアルギニンから誘導される、請求項96に記載の融合タンパク質。

【請求項99】

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項95または96に記載の融合タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は1999年10月4日出願の米国仮特許出願60/157,500、60/157,581、及び60/157,637に対する優先権を主張し、それらの各々の内容は参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0002】

1. 発明の分野

本発明は、固形腫瘍を治療又は阻害するための、固形腫瘍への1種以上の一次エフェクター分子(1種もしくは複数種)の送達に関する。特に、本発明は、適切な作用部位、例えば、固形腫瘍の部位に1種以上の一次エフェクター分子(1種もしくは複数種)を送達するためのベクターとしての弱毒化腫瘍標的細菌(attenuated tumor-targeted bacteria)、例えばサルモネラ(Salmonella)、の調製及び使用に関する。特に、本発明の弱毒化腫瘍標的細菌は、1種以上の一次エフェクター分子(1種もしくは複数種)をコードするように改変されている通性好気性菌又は通性嫌気性菌である。本発明の一次エフェクター分子(1種もしくは複数種)には、TNFサイトカイン・ファミリーのメンバー、抗血管新生因子、及び細胞傷害性ポリペプチドもしくはペプチドが含まれる。本発明の一次エフェクター分子は、例えば、癌腫、黒色腫、リンパ腫、肉腫、又はこれらの腫瘍から誘導される転移物のような固形腫瘍癌の治療に有用である。本発明は、さらに、一次エフェクター分子(1種もしくは複数種)、例えば、TNFファミリーのメンバー、抗血管新生因子、及び細胞傷害性ポリペプチドもしくはペプチドを、宿主に対する毒性及び免疫学的合併症を低下させた弱毒化腫瘍標的細菌によって腫瘍に局所送達できるという驚くべき発見に関する。また、本発明は、一次エフェクター分子(1種もしくは複数種)と共に弱毒化腫瘍標的細菌によって送達することができる1種以上の任意のエフェクター分子(1種もしくは複数種)(「二次エフェクター分子」と呼ばれる)の送達にも関する。この二次エフェクター分子(1種もしくは複数種)はさらなる抗腫瘍治療活性を提供し、弱毒化腫瘍標的細菌からの一次エフェクター分子(1種もしくは複数種)の放出を増強し、及び/又は適切な作用部位、例えば、固形腫瘍の部位での一次エフェクター分子(1種もしくは複数種)の取り込みを増強する。

20

30

【0003】

2. 発明の背景

新生物、すなわち腫瘍は異常な細胞の増殖の結果生じる新生物塊であり、良性又は悪性であり得る。良性腫瘍は、一般には、局在したままである。悪性腫瘍は、一般には、隣接体組織に浸潤してそれを破壊する潜在能力を有し、離れた部位まで広がって死を引き起こす(レビューには、Robins and Angell, 1976, Basic Pathology, 2d Ed, W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-122を参照)。腫瘍は、ある器官もしくは組織から別のものに広がったときに転移していると言われる。

40

【0004】

固形腫瘍癌の化学療法における主な問題は、同時に正常細胞に対する損傷を最小にしながらの、腫瘍細胞を根絶するのに十分な濃度での治療作用物質、例えば、薬物の送達である。したがって、多くの研究室における研究は生物学的送達系、例えば、薬物を標的送達するための抗体、サイトカイン、及びウイルス、プロドラッグ変換酵素、及び/又は腫瘍細胞に入れる遺伝子の設計に向けられている(例えば、Crystal, R.G., 1995, Science 270: 404-110を参照)。

【0005】

50

2.1. 細胞性免疫及びサイトカイン

癌を治療するための方策の1つは、細胞性免疫応答を増強又は活性化することを含む。自己腫瘍に向けられた細胞性免疫応答をうまく誘導することで従来の化学療法を上回る幾つかの利点が得られる：1) 免疫認識は高度に特異的であり、排他的に腫瘍に向かう；2) 免疫監視によって転移部位での増殖を抑制することができる；3) 免疫応答及び認識の多様性は腫瘍細胞によって用いられる異なる耐性機構を補償することができる；4) 細胞傷害性T細胞のクローン性増殖が増殖する腫瘍よりも迅速に起こり得、その結果として最終的に腫瘍を征圧する抗腫瘍機構が生じる；及び5) 記憶応答が、物理的な検出の前に、疾患の再発をその最初期段階で抑制することができる。応答を示す患者の臨床的研究は、成功する免疫療法が、CD4+T細胞、マクロファージ、及びNK細胞の関与について証拠が存在するものの、CD8+T細胞(クラスI応答)の活性化を含むことを示す動物モデルからの結果を支持している。例えば、Chapoval et al., 1998, J. Immunol., 161:6977-6984; Gollub et al., 1998, J. Clin. Invest., 102:561-575; Kikuchi et al., 1999, Int. J. Cancer 80:425-430; Pan et al., 1995, Int. J. Cancer 80:425-430; Saffran et al., 1998, Cancer Gene Ther., 5:321-330; 及び Zimmermann et al., 1999, Eur. J. Immunol., 29:284-290を参照のこと。

【0006】

2.2. サイトカインの腫瘍壊死因子(TNF)ファミリー

TNFファミリーの最も特徴付けられたメンバーはTNF- α である。TNF- α は免疫系に対して多面的な効果を発揮することが知られている。TNF- α は腫瘍細胞に対して強力な細胞傷害性効果を直接発揮することができるサイトカインである。TNF- α は、一般には、他の機構、例えば、増殖及び分化の刺激、並びに単球におけるアポトーシスの防止(例えば、Mangan et al., 1991, J. Immunol., 146:1541-1546; 及び Ostensen et al., 1987, J. Immunol., 138:4185-4191を参照)、最終的には腫瘍内での血餅形成につながる、組織因子様凝血原活性の促進及び内皮細胞表面抗凝血活性の抑制(Beutler and Cerami, 1989, Ann. Rev. Immunol., 7:625-655; 及び Vassalli, P., 1992, Ann. Rev. Immunol., 10:411-452においてレビューされている)。しかしながら、これらの特性の結果として、汎発性血管内凝血のため、TNF- α の全身投与は宿主に致命的な結果を生じる。

【0007】

他のサイトカインも抗腫瘍応答に関連付けられている。IL-2はクラスIサイトカインであり、やはり抗腫瘍応答において役割を果たすものと考えられている。例えば、自発的に退行する黒色腫はTNF- α 及びIL-2の腫瘍内レベルの上昇に関連付けられている。例えば、Beutler and Cerami, 1989, Ann. Rev. Immunol., 7:625-655; Lowes et al., 1997, J. Invest. Dermatol., 108:914-919; Mangan et al., 1991, J. Immunol., 146:1541-1546; Scherulich et al., 1987, J. Immunol., 138:1786-1790を参照のこと。

【0008】

TNF- α 及びIL-2の両者はリンパ球の帰巢(homing)を助け、IL-2はナチュラルキラー(NK)細胞、T細胞、及びリンホカイン活性化キラー(LAK)細胞の腫瘍浸潤を誘発することが示されている(例えば、Etter et al., 1998, Cytokine 10:395-403; Reinhardt et al., 1997, Blood 89:3837-46; Chen et al., 1997, J.

Neuropathol. Exp, Neurol. 56:541-50;Vora et al., 1996, Clin. Exp. Immunol. 105:155-62;Luscinskase et al., 1996, J. Immunol. 157:326-35;Kjaergaard et al., 1998, Scand. J. Immunol. 47, 532-540;Johansson et al., 1996, Nat. Immun. 15:87-97;及びWatanabe et al., 1997, Am. J. Pathol. 150:1869-80を参照)。TNF-及びIL-2の両者の存在下においては、TNF非感受性細胞株に向けられたときでさえ、NK及びLAK細胞の細胞溶解活性が増加する(例えば、Ostensen et al., 1987, J. Immunol. 138:4185-4191を参照)。しかしながら、IL-2の治療用レベルは宿主に対して毒性であることも示されている。 10

【0009】

明らかに、全身サイトカイン投与に起因する用量制限性の毒性は癌治療におけるサイトカインの潜在能力の実現に重大な障壁を突きつける。さらに、全身性のサイトカイン送達は、望ましくない臨床的副作用に加えて、同系T細胞の帰巢の減少を生じ、したがって、標的免疫治療に対立することがある。Addison et al., 1998. Gene Ther. 5:1400-1409;Albertini et al., 1997, Clin. Cancer Res. 3:1277-1288;Becker et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7826-7831;Book et al., 1998, J. Neuroimmunol. 92:50-59;Cao et al., 1998. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 124:88-92;D'Angelica et al., 1999. Cancer Immunol. Immunother. 47:265-271;Deszo et al., 1996, Clin. Cancer Res. 2:1543-1552;Kjaergaard et al., 1998, Scand. J. Immunol. 47:532-540;Ostensen et al., 1987, J. Immunol. 138:4185-4191;及びSchirrmacher et al., 1998, Clin. Cancer Res. 4:2635-2645を参照のこと。 20

【0010】

2.3. サイトカインの送達

近年の実験的動物及び臨床研究では、サイトカインの亜全身性(sub-systemic)又は代替送達方法により、サイトカインの全身毒性を回避し、かつより高用量を投与する試みがなされている。ネズミモデルにおいては、膜融合リポソーム封入TNF-遺伝子の投与、及び腫瘍脈管構造に局在し得るポリエチレングリコール封入TNF-の全身投与で肉腫-180腫瘍が治療されている(Tsutsumi et al., 1996, Jpn. J. Cancer Res. 87:1078-1085を参照)。内皮単球活性化ポリペプチドIIによるTNF-に対する腫瘍の感作も報告されている(Marvin et al., 1999, J. Surg. Res. 63:248-255;Wu et al., 1996, Cancer Res, 59:205-212)。 40

【0011】

臨床研究において、インターフェロン-又はメルファランと組み合わせた隔離肢灌流(isolated limb perfusion)による患者への高用量TNF-の投与の後、完全な腫瘍の根絶が観察されている。しかしながら、この技術は、治療の後にサイトカインが完全に除去されない場合、患者に重大な危険をもたらす。さらに、これらの治療は肢隔離を必要とし、これはそれ自体が患者に危険をもたらす。Eggermont et al., 1997, Semin. Oncol. 24:547-555 Fraker et al., 1995, Cancer J. Sci. Am. 1:122-130;Lejeune et al., 1998, Curr. Opin, Immunol. 10:573-580;Marvin et al., 1996, J. Surg. 50

Res. 63:248-255; Mizuguchi et al., 1998, Cancer Res. 58:5725-5730; Tsutsumi et al., 1996, Jpn. J. Cancer Res. 87:1078-1085; 及び Wu et al., 1996, Cancer Res. 59, 205-212 を参照のこと。

【0012】

Carrier et al., 1992, J. Immunol. 148:1176-81、Saltzman et al., 1997, Cancer Biother. Radiopharm. 12:37-45、Saltzman et al., 1997, J. Pediat. Surgery 32:301-306 による従来の研究では、IL-1 (Carrier) 及び IL-2 (Saltzman) を自然のサルモネラ感染部位である肝臓及び脾臓に直接送達させてワクチン株としての役割を課すか、又は肝臓転移に影響を及ぼすのに弱毒化サルモネラ株の使用が報告されている。Saltzman の研究ではサルモネラの経口投与が用いられ、ここでは細菌は GALT (腸随伴リンパ様組織 (gut associated lymphoid tissue)) によって取り込まれ、肝臓及び脾臓に輸送される。しかしながら、これらの感染は自然の感染部位に限定される。

【0013】

2.4. 血管新生及び腫瘍形成

癌を治療するための別の方策は血管新生の阻害を含む。血管新生は既存の血管からの新規毛細血管の増殖のプロセスである。新規毛細血管は、既存血管の内皮細胞が、マトリック
ス・メタロプロテアーゼのようなタンパク分解酵素を用いて、それらの近傍の基底膜を分解し、増殖させ、周囲間質組織内に移動させ、微小管を形成するプロセスによって形成される。この血管新生のプロセスは負及び正の因子の相互作用によって非常に厳密に調節されており、成人においては、通常女性の生殖周期及び創傷の修復に限定される (Malonne et al., 1999, Clin. Exp. Metastasis 17:1-14)。血管新生の異常調節が、糖尿病性網膜症、乾癬、関節リウマチ、心血管病、及び腫瘍形成を含む多くのヒト障害に関連付けられている (Folkman, 1995, Nat. Med. 1:27-31)。

【0014】

血管新生は腫瘍の成長及び転移にとって最も重要なプロセスである。腫瘍の形成は2つの段階、前血管及び血管段階に分けられる。前血管腫瘍の細胞が血管新生化腫瘍に由来する細胞と同程度に迅速に増殖することが研究によって示されている。しかしながら、前血管腫瘍が $2-3 \text{ mm}^3$ を上回るまで増殖することはほとんどなく、これは細胞増殖と細胞死との間に平衡が存在するためであり、後者は前血管腫瘍の低酸素性から生じるものである (Folkman, 1995, Nat. Med. 1:27-31)。前血管から血管段階への切り替えには、負の因子が優勢である正味のバランスから正の因子、例えば、繊維芽細胞増殖因子 (FGF) 及び血管内皮増殖因子 (VEGF) が優性であるものへの血管新生の調節因子のバランスの移動を必要とする (Cao, 1998, Prog. Mol. Subcell. Biol. 20:161-176)。調節因子間のバランスの移動は血管新生因子の上方調節とそれと同時の抗血管新生因子の下方調節の結果である (Folkman, 1995, N. Eng. J. Med. 333:1757-1763)。

【0015】

2.5. 抗血管新生因子

原発腫瘍がそれらの転移物の増殖をしばしば阻害する結果につながる幾つかの関連する現象に基づいて、抗血管新生因子が存在するものと仮定された (Cao, 1998, Prog. Mol. Subcell. Biol. 20:161-176)。単離されるべきこれらの因子のうち第1のものはマウス・アンジオスタチン、原発 Lewis 肺癌腫瘍によって循環中に放出され、二次転移物の増殖を防止するプラスミノゲンの 38 kDa タンパク分解性断片であった (O'Reilly et al., 1994, Cel

10

20

30

40

50

1 79 : 315 - 328)。ヒトにおいては、メタロエラスターゼでのプラスミノーゲンの制限タンパク分解によって産生される40、42及び45 kDaのペプチドがマウス・アンギオスタチンに匹敵する抗血管新生活性を有する(O'Reilly et al., 1994, Cell 79 : 315 - 328)。プラスミノーゲンそれ自体はそのような活性を持たない。腫瘍細胞それ自体は検出可能なアンギオスタチンmRNAを持たないため、腫瘍関連マクロファージがアンギオスタチンの産生の原因であることも考えられる。マクロファージのメタロエラスターゼの発現は、腫瘍細胞によって分泌される顆粒球コロニー刺激因子(GM-CSF)によって誘導される(Dong et al., 1997, Cell 83 : 801 - 810)。特定の腫瘍においては、アンギオスタチン産生はメタロエラスターゼではなくセリンプロテアーゼによって触媒され、セリンプロテアーゼは腫瘍細胞によって直接産生される(Gately et al., 1997, Cancer Res. 56 : 4887 - 4890)。原発腫瘍を有する実験マウスにアンギオスタチンを100 mg/kg/日の濃度で投与することで、毒性副作用なしに腫瘍増殖の強力な阻害が生じた。このアンギオスタチン処置の中止の2週間以内に腫瘍が再増殖し、この処置の結果として腫瘍は完全に死ぬのではなく休眠状態に退行することが示される(O'Reilly et al., 1996, Nat. Med. 2 : 689 - 692)。

10

20

30

40

50

【0016】

アンギオスタチンの発見後、幾つかの血管新生阻害性ペプチドを含む他の血管新生阻害物質が発見され、単離された。アンギオスタチンよりも強力な血管新生の阻害物質はクリングル5(kringl 5)、プラスミノーゲンの第5クリングル・ドメインを含むペプチドである(アンギオスタチンはクリングル・ドメイン1-4を含む)。クリングル5はプラスミノーゲンのタンパク分解によって産生することができ、組換え形態も活性である(Cao et al., 1997, J. Biol. Chem. 272 : 22924 - 22928)。

【0017】

エンドスタチンはアンギオスタチンの単離に類似する方法で単離され(O'Reilly et al., 1997, Cell 88 : 1 - 20)、その源はLewis肺癌腫ではなくネズミ血管内皮腫であった。このペプチドは20 kDaの見かけの分子量を有し、その配列はコラーゲンXVII、様々なコラーゲン分子の間で開散しているNC1と呼ばれる領域(Oh et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 4229 - 4233;及びRehn et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 4234 - 4238)のC末端に相当する(O'Reilly et al., 1997, Cell 88 : 1 - 20)。マウスにおいて、Lewis肺癌腫転移物の増殖が0.3 mg/kg/日の組換えエンドスタチンを投与することによって抑制され、このペプチドを20 mg/kg/日で投与したときには原発腫瘍が休眠状態に退行する。機能的組換えエンドスタチンは封入体から、in vitroでの変性及び再折り畳みにより、又はin vivoでの皮下投与されたエンドスタチン封入体制剤の持続性放出により、産生させることができる(O'Reilly et al., 1997, Cell 88 : 1 - 20)。エンドスタチン発現プラスミドを筋肉内投与することからなるエンドスタチン送達の代替法は、マウスモデル系において、腫瘍増殖の部分的阻害のみを生じる(Blezniger et al., 1999, Nat. Biotech. 17 : 343 - 348)。同様に、静脈内送達された、リポソームに複合体化されたエンドスタチン又はアンギオテンシン・エンコーディングプラスミドは、乳癌のヌードマウスモデルにおいて、腫瘍増殖の部分的阻害を生じた(Chen et al., 1999, Cancer Res. 59 : 3308 - 3312)。

【0018】

近年、新規抗血管新生活性がSerp in(セリンプロテアーゼ阻害物質)抗トロンビンのC末端切断ペプチドに帰されている(O'Reilly et al., 1999, S

science 285:1926-1925)。完全長抗トロンピンには固有の抗血管新生活性はないが、トロンピンによるそのタンパク質のC末端反応性ループの開裂により、抗トロンピンは強力な血管新生活性を獲得する。以下、このタンパク分解断片を抗血管新生活性抗トロンピンと呼ぶ。

【0019】

当該技術分野において公知の他の血管新生阻害性ペプチドにはフィブロネクチンの29 kDa N末端及び40 kDa C末端タンパク分解断片(Homandberg et al., 1985, J. Am. Pathol. 120:327-332); プロラクチンの16 kDaタンパク分解断片(Clapp et al., 1993, Endocrinology 133:1292-1299); 及び血小板第4因子の7.8 kDaタンパク分解断片(Gupta et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7799-7803)が含まれる。

【0020】

抗血管新生効果が示されている天然産生タンパク分解断片に加えて、公知の細胞外マトリックスタンパク質の領域に相当する幾つかの合成ペプチドが血管新生の阻害における活性について評価されている。機能的内皮阻害性物質、すなわち、血管新生阻害物質であることが示されている合成ペプチドには、血小板第4因子の断片に相当する13アミノ酸ペプチド(Maione et al., 1990, Cancer Res. 51:2077-2083); コラーゲンIの断片に相当する14アミノ酸ペプチド(Tolma et al., 1993, J. Cell Biol. 122:497-511); トロンボスポンジンIの断片に相当する19アミノ酸ペプチド(Tolsma et al., 1993, J. Cell Biol. 122:497-511); 及び、ヒト黒色腫細胞における発現が*in vitro*での細胞浸潤の減少及び*in vivo*ヌードマウスモデルにおける腫瘍形成能の減少につながる分泌性のシステインに富む細胞外マトリックス糖タンパク質である(Ledda et al., 1996, Nature Med, 3:171-176) SPARCの断片に相当する20アミノ酸ペプチド(Sage et al., 1995, J. Cell. Biochem. 57:1329-1334)が含まれる。

【0021】

血管新生を阻害し、かつラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲン、及びEGFの断片に相当する10アミノ酸未満の他のペプチドも記載されている(Cao, 1998, Prog. Mol. Subcell. Biol. 20:161-176による総説を参照)。

【0022】

血管新生を阻害する小フィブロネクチンペプチドは、一般に、モチーフRGDを含む。RGDはインテグリン分子の認識とそれに結合するためにタンパク質によって用いられるペプチドモチーフ(アミノ酸Arg-Gly-Asp)である。インテグリン $\alpha_v\beta_3$ の発現は血管新生性血管に関連し、モノクローナル抗体によるその活性の阻害は血管新生を遮断する(Brooks et al., 1994, Science 264:569-571)。これは、RGDモチーフを含む環状ペプチドの投与がフィブロネクチン受容体型インテグリンの活性を阻害し、網膜の血管新生を遮断することを示す研究によって確認されている(Hammes et al., 1996, Nature Medicine 2:529-533)。インテグリン・ブロッカー、例えば、環状ペプチド及びモノクローナル抗体の抗血管新生効果は、血管新生性血管のアポトーシスを誘導することにより腫瘍の退行を促進することが示されている(Brooks et al., 1994, Cell 79:1157-1164)。RGDモチーフ、及び他のインテグリン結合性モチーフNGR(アミノ酸Asn-Gln-Arg)を含むペプチドは顕著に強化された抗腫瘍活性を示した。

【0023】

別のタイプの細胞表面受容体、すなわち、ウロキナーゼプラスミノーゲンアクチベーター

(uPA)受容体の活性の阻害も血管新生の阻害を生じる。uPA受容体は、リガンドの結合により、血管新生の基底膜浸潤工程に必要なタンパク分解カスケードを開始する。受容体アンタゴニストによるuPA受容体の阻害は血管新生、腫瘍増殖 (Min, et al., 1996, Cancer Res. 56:2428-2433) 及び転移 (Crowley et al., 1993, Proc, Natl. Acad. Sci, USA 90:5021-5025) を阻害する。そのようなアンタゴニストは無作為ペプチドのバクテリオファージ・ペプチド表示によって同定されている (Goodson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7129-7133)。受容体のリガンド、uPAの優性ネガティブ形態も同定されている (Min et al., 1996, Cancer Res. 56:2428-2433)。

10

【0024】

アンギオスタチン、エンドスタチン及び他の抗血管新生ペプチドの発見は癌治療の刺激的な新規アプローチをもたらしたものの、これらのペプチドを1つ以上を含む治療課程の実態は、ペプチドの大量産生の非現実性 (65kg、すなわち143lbの平均的な人物について、ペプチドによっては毎日約1.3又は6.5グラムのタンパク質を生成するコスト及び/又は労力から生じる) 及び治療の持続期間 (腫瘍を退行状態に留めるには持続しなければならない) である。これらのペプチドをそのように多量に投与しなければならない2つの主な理由は、第1に、大部分が血流中で分解し、第2に、分解を免れた分子のうち、非常に限定された部分のみが腫瘍まで到達する。したがって、抗血管新生タンパク質又はペプチドをより効率的に腫瘍部に、かつより対費用効果が高く患者に優しい方法で送達することができれば、腫瘍治療の分野にとって非常に利点がある。

20

【0025】

2.6. バクテリオシン・ファミリー

コリシンE3 (以下、ColE3と呼ぶ) はバクテリオシン、すなわち、選択的活性を有するバクテリアタンパク質性毒素であり、その宿主はその毒素に対して免役される。バクテリオシンは宿主ゲノム又はプラスミドによってコードされ得、広範な、もしくは狭い範囲の宿主を有することができ、かつ1つもしくは2つのサブユニットを含む単純構造又は多サブユニット構造を有することができる (Konisky, 1982, Ann. Rev. Microbiol. 36:125-144)。加えて、バクテリオシン宿主はバクテリオシンに対する免疫を有する。この免疫は、バクテリオシンを発現しないとしても、所定の宿主集団の全ての細胞において見いだされる。

30

【0026】

ColE3の細胞傷害性はそのタンパク質合成の阻害から生じる (Nomura, 1963, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28:315-324)。ColE3活性の標的は細菌リボソームの16S成分 (これは、30S及び70Sリボソームに共通である) であり (Bowman et al., 1971, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68:964-968)、その活性はリボソームの分解を生じる (Meyhack, 1970, Proc. Natl. Acad. Sci. USA)。ColE3の活性はRNA分解酵素のうちで独特であり、RNAの全体的な分解は生じないが、mRNA分子を末端から49ヌクレオチドで開裂し、mRNAからのtRNAの分離と、それによる翻訳の阻害を生じる。ColE3のリボヌクレアーゼ活性は、他のタンパク質が介在するのではなく、その分子それ自体にある (Saunders, 1978, Nature 274:113-114)。ColE3は標的細胞の内膜及び外膜を通過することもできる。

40

【0027】

その天然形態において、ColE3は1:1比の50kDa及び10kDaタンパク質からなる60kDaタンパク質複合体であり、大きいサブユニットはヌクレアーゼ活性を有し、小さいサブユニットは50kDaサブユニットの阻害機能を有する。したがって、50kDaタンパク質は細胞傷害性タンパク質 (すなわち、毒素) として作用し、10kDaタンパク質は抗毒素として作用する。50kDaサブユニットは少なくとも2つの機能

50

的ドメイン、標的細胞膜を横切ったの転位に必要なN末端領域、及び触媒（RNA分解酵素）活性を有するC末端領域を含む。宿主生物内で、大サブユニットの活性は小サブユニットによって阻害される。これらのサブユニットは、その毒素が標的細胞内に侵入したときに、標的細胞の外膜との相互作用の結果として解離するものと考えられる（Konisky, 1982, *Ann. Rev. Microbiol.* 36:125-144による総説）。

【0028】

ColE3の大サブユニットの毒性は微生物のうちでのクローン化遺伝子の外側拡散の防止に利用されている。Diazら（1994, *Mol. Microbiol.* 13:855-861）は、ColE3のこれら2つの成分を、小（抗毒性）サブユニットが染色体に統合されたコーディング配列として発現し、大サブユニットがプラスミドから発現されるように分離した。染色体に組み込まれた小サブユニットを有する細菌はColE3大サブユニットを発現するプラスミドに対して免疫されているが、そのプラスミドが小サブユニットを欠く別のレシピエントに向けて外部に搬送された場合、その細胞は殺される。

10

【0029】

コリシンE3（ColE3）は、白血病細胞モデル系（Fiska et al., 1979, *Experimentia* 35:406-407を参照）を含む哺乳動物細胞に対する大きな細胞傷害性効果を有することも示されている（Smarada, et al., 1978, *Folia Microbiol.* 23:272-277を参照）。ColE3の活性は80S哺乳動物リボソームの40Sサブユニットを標的とする（Tumowsky et al., 1973, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52:327-334）。

20

【0030】

2.7. 細菌の感染及び癌

初期の臨床観察で、細菌が感染した患者においてある種の癌が退行することが報告された症例が報告された。Nauts et al., 1953, *Acta Medica Scandinavica* 145:1-102, (Suppl. 276); 及びShear, 1950, *J. A. M. A.* 142:383-390を参照のこと。これらの観察以来、Lee et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1847-1851 (Leeら) 及びJones et al., 1992, *Infect. Immun.* 60:2475-2480 (Jonesら) は、*in vitro*で野生型株よりかなり多くの数がHEp-2（ヒト類表皮癌腫）細胞に浸潤し得るサルモネラ菌（*Salmonella typhimurium*）の突然変異体を単離した。これらの「過剰浸潤性（hyperinvasive）」突然変異体は、HEp-2動物細胞に浸潤する野生型株の能力を通常は抑制する細菌の好気性増殖の条件下で単離した。しかしながら、Leeら及びJonesらによって記載されるような過剰浸潤性サルモネラ菌には汎浸潤性（pan-invasive）感染の危険性があり、癌患者に広範に広がる細菌感染につながる可能性がある。

30

【0031】

Carswell et al., 1975, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:3666-3669は、ウシ型弱毒結核菌ワクチン（bacillus Calmette-Guerin）（BCG）を注射したマウスでTNFの血清濃度が増加し、TNF陽性血清がマウスにおいて肉腫Meth A及び他の移植腫瘍の壊死を生じたことを示した。このような観察の結果として、BCG注射での癌患者の免疫化が現在幾つかの癌治療プロトコルにおいて用いられている。BCG治療のレビューには、Snowski, 1994, *Compr. Ther.* 20:695-701; Barth and Morton, 1995, *Cancer* 75 (Suppl. 2):726-734; Friberg, 1993, *Med. Oncol. Tumor. Pharmacother.* 10:31-36を参照のこと。

40

50

【0032】

しかしながら、TNF- α 介在敗血症性ショックが細菌に関連する主な懸念のうちであり、宿主にとって毒性もしくは致命的な結果を有する可能性がある (Bone, 1992, JAMA 268:3452-3455; Dinarello et al., 1993, JAMA 269:1829-1835)。さらに、TNF- α の用量制限性の全身毒性は有効な臨床使用の主要な障壁であった。TNF- α のレベルが毒性ではなく、治療用ベクターのより有効な濃度及び/又は持続期間を用いることができれば、この形態の免疫応答を低下させる改変は有用であろう。

【0033】

2.8. 腫瘍標的細菌

遺伝子操作されたサルモネラが、腫瘍を標的とすることが可能であり、抗腫瘍活性を有し、かつ固形腫瘍へのエフェクター遺伝子、例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼ (HSV TK) の送達において有用であることが示されている (Pawelek et al., WO 96/40238)。

【0034】

2.9. 改変細菌リポドAによるTNF- α の誘導の減少

TNF- α 産生の誘導が減少する結果として免疫応答を変化させる腫瘍標的細菌の脂質組成を改変することがPawelekら (Pawelek et al., WO 96/40238) によって示唆された。Pawelekらは、モノホスホリルリポドA (MLA) 産生の責を負うロードバクター (Rhodobacter) から遺伝子を単離するための方法を提供した。MLAは敗血症性ショックのアンタゴニストとして作用する。また、Pawelekらは、リポドA生合成における第3酵素UDP-3-O (R-30ヒドロキシルミリストイル)-グルコサミン-アシルトランスフェラーゼをコードする突然変異firA (Kelley et al., 1993, J. Biol. Chem., 268:19866-19874) を含む、リポドA生合成経路における遺伝子的改変の使用を提案した。Pawelekらは、firA遺伝子における突然変異が低レベルのTNF- α を誘導することを示した。

【0035】

大腸菌 (Escherichia coli) において、リポドAの末端ミリスチル化の原因である遺伝子msbB (mlt) が同定されている (Engel, et al., 1992, J. Bacteriol. 174:6394-6403; Karow and Georgopoulos 1992, J. Bacteriol. 174:702-710; Somerville et al., 1996, J. Clin. Invest. 97:359-365)。この遺伝子の遺伝子的破壊は安定な無条件的突然変異を生じ、これはTNF- α の誘導を低下させる (Somerville et al., 1996, J. Clin. Invest. 97:359-365; Somerville, WO 97/25061)。しかしながら、これらの参考文献は、腫瘍標的サルモネラベクターにおけるmsbB遺伝子の破壊が、病原性が低く、かつキレート剤に対してより感受性である細菌を生じるであろうことを示唆してはいない。

【0036】

細菌を遺伝子送達ベクターとして用いることに関連する問題は、正常哺乳動物細胞を直接殺す細菌の一般的な能力に加えて、宿主にとって毒性の結果を有するTNF- α を介して免疫系を過剰刺激するそれらの能力に集中している (Bone, 1992, JAMA 268:3452-3455; 及びDinarello et al., 1993, JAMA 269:1829-1835)。これらの要素に加えて、抗生物質に対する耐性は、ヒト体内での細菌の存在との対処を非常に複雑にする可能性がある (Tschape, 1996, D T W Dtsch Tierarztl Wochenschr 1996 103:273-7; Ramos et al., 1996, Enferm Infec. Microbiol. Clin. 14:345-51)。

【0037】

10

20

30

40

50

Hone and Powell、W097/18837(「Hone及びPowell」)は、非発熱性リポドA又はLPSを有するグラム陰性細菌を産生する方法を開示している。

【0038】

Maskell、W098/33923は、TNFを野生型株と比較して低レベルで誘導するmsbB遺伝子内の突然変異を有するサルモネラの突然変異株を記載している。

【0039】

Bermudesら、W099/13053は、サルモネラにおけるmsbB遺伝子を遺伝子的に破壊するための組成物及び方法を教示し、これは、野生型と比較してTNFを誘発する能力に劣り、かつ病原性が低いサルモネラを生じる。ある種の態様においては、幾つかのそのような突然変異体サルモネラは野生型サルモネラと比較してキレート剤に対する感受性を高めた。Low et al., 1999, Nature Biotech, 17: 37-47も参照のこと。

10

【0040】

セクション2又は本願のあらゆるセクションにおけるあらゆる参考文献の引用又は同定は、そのような参考文献が本発明に対する従来技術として利用可能であることを承認するものであると解釈されるべきではない。

【0041】

3. 発明の概要

本発明は、固形腫瘍に1つ以上の一次エフェクター分子を送達する方法を提供する。一つの実施形態において、この方法は高レベルの1つ以上の一次エフェクター分子の送達を提供する。特に、本発明は、宿主に全身投与した場合には毒性であるか望ましくない作用(例えば、望ましくない免疫作用)を誘導しうる一次エフェクター分子を、宿主への毒性を低下させたサルモネラ(Salmonella)のような弱毒化腫瘍標的細菌によって腫瘍に局所送達する方法を提供する。本発明は、1つ以上の一次エフェクター分子および場合により1つ以上の二次エフェクター分子を、適当な作用部位(例えば、固形腫瘍部位)に送達するためのベクターとしての弱毒化腫瘍標的細菌(例えば、サルモネラ)の作製ならびに使用を包含する。詳細には、本発明の弱毒化腫瘍標的細菌は、1つ以上の一次エフェクター分子および場合により1つ以上の二次エフェクター分子をコードするように遺伝子操作された通性好気性菌または通性嫌気性菌である。

20

30

【0042】

本発明は、固形腫瘍の部位で一次エフェクター分子をコードする核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。特定の実施形態において、弱毒化腫瘍標的細菌は1つの一次エフェクター分子をコードする核酸分子を発現するように遺伝子操作される。別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。この実施形態に従うと、1つの細菌株が固形腫瘍の部位で1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。別の実施形態においては、2つ以上の弱毒化腫瘍標的細菌株が1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。この実施形態の様式では、弱毒化腫瘍標的細菌株が同一の種のものである。この実施形態の別の様式では、弱毒化腫瘍標的細菌株が異なる種(例えば、リステリア属とサルモネラ属)のものである。

40

【0043】

本発明の一次エフェクター分子は癌腫、黒色腫、リンパ腫、肉腫などの固形腫瘍癌を治療するのに有用である。本明細書中で用いる「固形腫瘍の治療」または「固形腫瘍を治療する」とは、腫瘍もしくは腫瘍細胞の増殖を阻害すること、腫瘍の体積を縮小すること、腫瘍細胞を殺すこと、または腫瘍細胞の広がり(転移)を防止することを包含する。特定の実施形態において、本発明の一次エフェクター分子は腫瘍部位で局所免疫応答を引き出して、結果的に腫瘍もしくは腫瘍細胞の増殖を阻害し、腫瘍細胞を死滅させ、または腫瘍細胞の他の身体部分への転移を防止する。したがって、一次エフェクター分子は腫瘍治療効

50

果をもたらす。

【0044】

一次エフェクター分子は、動物、植物、細菌、真菌、原生生物、ウイルスを含むがこれらに限らない、あらゆる既知の生物から誘導することができる。本発明の一実施形態の好ましい様式において、一次エフェクター分子は哺乳動物に由来するものである。この実施形態のより好ましい様式では、一次エフェクター分子はヒト由来のものである。本発明の一次エフェクター分子としては、TNFファミリーのメンバー、抗血管新生因子、細胞傷害性ポリペプチドもしくはペプチド、腫瘍阻害酵素、およびこれらの機能性断片が挙げられる。

【0045】

特定の実施形態において、本発明の一次エフェクター分子はTNFファミリーのメンバーまたはその機能性断片である。TNFファミリーのメンバーの例として、制限するものではないが、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、腫瘍壊死因子 (TNF- β)、TNF- γ 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TNF- α 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、CD40リガンド (CD40L)、LT- α (リンホトキシン)、LT- β (リンホトキシン)、OX40L (OX40リガンド)、FasL、CD27L (CD27リガンド)、CD30L (CD30リガンド)、4-1BBL、APRIL (増殖誘導性リガンド)、LIGHT (活性化T細胞により産生される29kDaタイプII膜貫通タンパク質)、TL1 (腫瘍壊死因子様サイトカイン)、TNFSF16、TNFSF17、およびAITR-L (活性化により誘導されるTNFRファミリーのメンバーのリガンド)がある。好ましい実施形態において、本発明の一次エフェクター分子は腫瘍壊死因子 (TNF- α)、腫瘍壊死因子 (TNF- β)、TNF- γ 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TNF- α 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、およびCD40リガンド (CD40L)、またはこれらの機能性断片である。

【0046】

別の特定の実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は抗血管新生因子またはその機能性断片である。抗血管新生因子の例として、制限するものではないが、エンドスタチン、アンジオスタチン、抗血管新生アンチトロンピンIII、フィブロネクチンの29kDa N末端および40kDa C末端タンパク質分解断片、uPA受容体アンタゴニスト、プロラクチンの16kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の7.8kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の抗血管新生24アミノ酸断片、13.40と称する抗血管新生因子、トロンボスポンジンIの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、RGDおよびNGRを含むペプチド、ラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲンもしくはEGFの小さい抗血管新生ペプチド、ならびにインテグリン α_3 およびVEGF受容体のペプチドアンタゴニストがある。本発明の好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子はエンドスタチン、アポミグレンまたはトロンボスポンジンIの機能性断片である。

【0047】

別の特定の実施形態において、本発明の一次エフェクター分子は細胞傷害性ポリペプチドもしくはペプチド、またはその機能性断片である。細胞傷害性ポリペプチドもしくはペプチドの例として、制限するものではないが、バクテリオシンファミリーのメンバー、ベロ毒素、細胞傷害性壊死因子1 (CNF1)、細胞傷害性壊死因子2 (CNF2)、Pasteurella multocida毒素 (PMT)、Pseudomonas内毒素、ヘモリシン、ファルネシルトランスフェラーゼの強力な競合阻害剤であるCAAXテトラペプチド、サイクリン阻害剤、Rafキナーゼ阻害剤、CDCキナーゼ阻害剤、カスパーゼ、p53、p16およびp21がある。好ましい実施形態では、一次エフェクター分子はバクテリオシンファミリーのメンバーであるが、ただし、バクテリオシンファミリーのメンバーはバクテリオシン放出タンパク質 (BRP) ではない。バクテリオシンファ

10

20

30

40

50

ミリーのメンバーの例として、制限するものではないが、ColE1、ColE1a、ColE1b、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、ColE9、コリシンA、コリシンK、コリシンL、コリシンM、クロアシンDF13、ペスチシンA1122、スタフィロコクシン1580、プチリシン7423、ピオシンR1もしくはAP41、メガシンA-216、およびピブリオシンがある。特定の実施形態において、一次エフェクター分子はコリシンE3である。

【0048】

別の特定の実施形態において、本発明の一次エフェクター分子は腫瘍阻害酵素またはその機能性断片である。腫瘍阻害酵素の例として、制限するものではないが、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、リボヌクレアーゼ(colE3を除く)、DNAアーゼ、およびグリコシダーゼがある。好ましい実施形態では、一次エフェクター分子はメチオナーゼである。

10

【0049】

本発明はまた、弱毒化腫瘍標的細菌(例えば、サルモネラ)により固形腫瘍に1つ以上の一次エフェクター分子と1つ以上の二次エフェクター分子を局所組合せ送達するための方法を提供する。特定の実施形態において、弱毒化腫瘍標的細菌は1つの一次エフェクター分子と1つの二次エフェクター分子をコードする1つの核酸分子を発現するように遺伝子操作される。別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は1つ以上の一次エフェクター分子と1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。この実施形態に従うと、1つの細菌株が固形腫瘍の部位で1つ以上の一次エフェクター分子と1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。別の実施形態においては、2つ以上の弱毒化腫瘍標的細菌株が固形腫瘍の部位で1つ以上の一次エフェクター分子と1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。この実施形態の様式では、弱毒化腫瘍標的細菌株が同一の種のものである。この実施形態の別の様式では、弱毒化腫瘍標的細菌株が異なる種(例えば、リステリア属とサルモネラ属)のものである。

20

【0050】

本発明の二次エフェクター分子は、追加の抗腫瘍治療活性をもたらし、弱毒化一次エフェクター分子に加えて、本発明の方法により送達されて標的細菌からの一次エフェクター分子の放出を促進し、そして/また、作用部位(例えば、固形腫瘍の部位)での内在化を高める。本発明の二次エフェクター分子は、癌腫、黒色腫、リンパ腫、肉腫などの固形腫瘍癌を治療するために、一次エフェクター分子に加えて、本発明の方法により送達される分子(例えば、細胞毒素、酵素、バクテリオシンを含むがこれに限らない抗腫瘍タンパク質、プロドラッグ変換酵素、アンチセンス分子、リボザイム、抗原など)からなる。

30

【0051】

二次エフェクター分子は、動物、植物、細菌、真菌、原生生物、ウイルスを含むがこれらに限らない、あらゆる既知の生物から誘導することができる。特定の実施形態において、二次エフェクター分子は細菌またはウイルスに由来するものである。本発明のいくつかの好ましい実施形態では、二次エフェクター分子は細菌由来のもの(例えば、BRP)である。本発明の他の好ましい実施形態では、二次エフェクター分子はウイルス由来のもの(例えば、TAT)である。本発明のさらに他の好ましい実施形態では、二次エフェクター分子は哺乳動物に由来するものである。いくつかの好ましい実施形態において、二次エフェクター分子はヒト由来である。

40

【0052】

本発明は、プラスミドまたはトランスフェクトしうる核酸によりコードされるエフェクター分子を含む弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。本発明の好ましい実施形態において、弱毒化腫瘍標的細菌はサルモネラである。2つ以上のエフェクター分子(例えば、一次または二次)が弱毒化腫瘍標的細菌(例えば、サルモネラ)において発現される場合、それらのエフェクター分子は同一のプラスミドまたは核酸によりコードされても、2つ以上のプラ

50

スミドまたは核酸によりコードされてもよい。本発明はまた、細菌ゲノムに組み込まれる核酸によりコードされるエフェクター分子を含む弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。組み込まれるエフェクター分子は、弱毒化腫瘍標的細菌（例えば、サルモネラ）に対して内因性であってもよいし、また、（例えば、プラスミド、トランスフェクトしうる核酸、トランスポゾンのような、エフェクター分子をコードする核酸の導入により）弱毒化腫瘍標的細菌に導入されてもよい。結果的に、エフェクター分子をコードする核酸が弱毒化腫瘍標的細菌のゲノムに組み込まれるようにする。本発明は、適切なプロモーターに機能的に連結されたエフェクター分子をコードする核酸分子を提供する。エフェクター分子をコードする核酸に機能的に連結されるプロモーターは、同種（すなわち、天然）であっても異種（すなわち、エフェクター分子をコードする核酸本来のものではない）であってもよい。適切なプロモーターの例としては、制限するものではないが、Tetプロモーター、trc、pepT、lac、sulA、polII(dinA)、ruv、recA、uvrB、uvrD、umuDC、lexA、cea、caa、recN、およびpagCが挙げられる。

【0053】

本発明はまた、弱毒化腫瘍標的細菌によりシグナル配列とエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質を局所送達するための方法を提供する。好ましい実施形態において、弱毒化腫瘍標的細菌は、Omp様タンパク質またはその一部（例えば、シグナル配列、リーダー配列、周辺細胞質領域、膜貫通ドメイン、複数回膜貫通ドメイン、またはそれらの組合せ；「Omp様タンパク質」の定義については下記の第3.1節を参照のこと）およびエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。作用機構に関して制限されるものではないが、本発明は、Omp様タンパク質が外膜にエフェクター分子を固定もしくははつなぎ止める働きをしているか、細菌外膜にエフェクター分子を局在させるように働く、と考えられる。いくつかの実施形態において、エフェクター分子は細菌外膜への送達が増加される。ある実施形態では、Omp様タンパク質にエフェクター分子を融合させることで、エフェクター分子の周辺細胞質への局在が増加される。Omp様タンパク質の例として、制限するものではないが、OmpA、OmpB、OmpC、OmpD、OmpE、OmpF、OmpT、ポーリン様タンパク質、PhoA、PhoE、lamB、 β -ラクタマーゼ、エンテロトキシン、プロテインA、エンドグルカナーゼ、ペプチドグリカン関連リポタンパク質（PAL）、FepA、FhuA、NmpA、NmpB、NmpC、および主要外膜リポタンパク質（例えば、LLP）のそれぞれの少なくとも一部が挙げられる。本発明の他の実施形態では、本発明の融合タンパク質はタンパク質分解切断部位を含む。このタンパク質分解切断部位はエフェクター分子またはOmp様タンパク質に内因性のものであってもよく、あるいはタンパク質分解切断部位を融合タンパク質中に構築してもよい。

【0054】

本発明はまた、弱毒化腫瘍標的細菌により固形腫瘍にフェリーペプチドとエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質を局所送達するための方法を提供する。融合タンパク質中で用いるフェリーペプチドは、その生産または導入の拡散範囲内のほぼすべての細胞への目的のポリペプチドまたはペプチドの送達を促進することが分かっている（例えば、Bayley, 1999, Nature Biotechnology 17: 1066-1067; Fernandezら, 1998, Nature Biotechnology 16: 418-420; Derossiら, 1998, Trends Cell Biol. 8: 84-87を参照のこと）。したがって、フェリーペプチドとエフェクター分子からなる融合タンパク質を発現するように弱毒化腫瘍標的細菌を遺伝子操作することは、腫瘍細胞に内在化されるエフェクター分子の能力を高める。特定の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌はフェリーペプチドとエフェクター分子からなる1つの融合タンパク質をコードする1つの核酸分子を発現するように遺伝子操作される。別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌はフェリーペプチドとエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。

これらの実施形態によれば、エフェクター分子は一次または二次エフェクター分子でありうる。フェリーペプチドの例として、制限するものではないが、HIV TATタンパク質、アンテナペディアホメオドメイン（ペネトラキシン）、カポジ繊維芽細胞増殖因子（FGF）膜移行性配列（MTS）、および単純ヘルペスウイルスVP22がある。

【0055】

本発明はまた、弱毒化腫瘍標的細菌により固形腫瘍にシグナル配列とフェリーペプチドとエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質を局所送達するための方法を提供する。特定の実施形態において、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナル配列とフェリーペプチドとエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。この実施形態において、エフェクター分子は一次または二次エフェクター分子でありうる。

10

【0056】

本発明はまた、弱毒化腫瘍標的細菌により固形腫瘍にシグナル配列、タンパク質分解切断部位、フェリーペプチドおよびエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質を局所送達するための方法を提供する。特定の実施形態において、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナル配列、タンパク質分解切断部位、フェリーペプチドおよびエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。この実施形態において、エフェクター分子は一次または二次エフェクター分子でありうる。

【0057】

いくつかの実施形態では、1つの細菌株が固形腫瘍の部位で本発明の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。いくつかの他の実施形態では、2つ以上の弱毒化腫瘍標的細菌株が固形腫瘍の部位で本発明の1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。これらの実施形態の様式において、弱毒化腫瘍標的細菌株は同一種のものである。これらの実施形態の別の様式において、弱毒化腫瘍標的細菌株は異なる種（例えば、リステリア属とサルモネラ属）のものである。

20

【0058】

本発明はまた、弱毒化腫瘍標的細菌により固形腫瘍の部位に本発明の1つ以上の融合タンパク質および本発明の1つ以上のエフェクター分子を局所送達するための方法を提供する。好ましくは、弱毒化腫瘍標的細菌により固形腫瘍の部位で融合タンパク質とエフェクター分子の両方が発現されると、融合タンパク質のみまたはエフェクター分子のみが発現される場合に比べて、腫瘍または腫瘍細胞の増殖の阻害されるレベルが向上する。

30

【0059】

本発明はまた、高められた放出系をもつサルモネラのような弱毒化腫瘍標的細菌における一次エフェクター分子および場合により二次エフェクター分子の発現を提供する。本発明の好ましい実施形態において、高められた放出は弱毒化腫瘍標的細菌による放出因子の発現と関係する。一つの実施形態では、かかる放出により細胞質または細胞周辺腔からのエフェクター分子の放出が増大する。放出因子は弱毒化腫瘍標的細菌に内因性のものであっても、外因性のものであってもよい。放出因子はプラスミドからなる核酸によってコードされてもよいし、弱毒化腫瘍標的細菌のゲノムに組み込まれる核酸によってコードされてもよい。放出因子は一次エフェクター分子をコードする核酸もしくはプラスミドと同じもの、または別個の核酸もしくはプラスミドでコードされ得る。放出因子は二次エフェクター分子をコードする核酸もしくはプラスミドと同じもの、または別個の核酸もしくはプラスミドでコードされ得る。好ましい実施形態において、放出因子はバクテリオシン放出タンパク質（BRP）である。特定の実施形態において、BRPはクロアシンDF13プラスミドのもの、コリシンE1～E9プラスミドのもの、またはコリシンA、NまたはDプラスミドのものである。好ましい実施形態では、BRPはクロアシンDF13のもの（pCloDF13 BRP）である。本発明の別の実施形態では、高められた放出系はポー

40

50

リンタンパク質の過剰発現を含む。

【0060】

本発明はまた、高められた放出系をもつサルモネラのような弱毒化腫瘍標的細菌における本発明の融合タンパク質の発現を提供する。特定の実施形態において、放出因子はOmp様タンパク質に融合された一次エフェクター分子からなる融合タンパク質を発現する細胞において発現される。この実施形態では、放出因子の共発現が細胞周辺腔からの融合タンパク質の放出を高める。

【0061】

一つの実施形態において、本発明は、エフェクター分子または融合タンパク質を発現しながら腫瘍内に選択的に蓄積する、改変された弱毒化腫瘍標的細菌株を用いて、高レベルのエフェクター分子または融合タンパク質を送達するための方法を提供する。特定の様式において、改変された弱毒化腫瘍標的細菌株は腫瘍内でエフェクター分子を選択的に増幅する。以下の分節の教示内容は、単純化するために、特にサルモネラに関して述べるが、本発明の組成物および方法は、いかなる場合も、サルモネラに限定されるものではなく、その教示内容が当てはまる他のあらゆる細菌を包含するものである。特定的には、本発明は通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。弱毒化腫瘍標的細菌の例として、制限するものではないが、大腸菌（腸侵入性大腸菌を含む）、*Salmonella* spp.、*Shigella* spp.、*Yersinia enterocolitica*、*Listeria monocytogenes*、*Mycoplasma hominis*、および*Streptococcus* spp. が挙げられる。

【0062】

本発明はさらに、製薬上許容される担体と、1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を提供する。本発明はさらに、製薬上許容される担体と、1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を提供する。本発明はさらに、製薬上許容される担体と、1つ以上の本発明の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を提供する。さらに、本発明は、製薬上許容される担体と、1つ以上の本発明の融合タンパク質および1つ以上のエフェクター分子（すなわち、一次および/または二次分子）をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を提供する。好ましい実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌がサルモネラである。

【0063】

本発明の医薬組成物は固形腫瘍の治療に有用である。固形腫瘍には、肉腫、癌腫、リンパ腫、その他の固形腫瘍癌（例えば、生殖細胞系の腫瘍、中枢神経系の腫瘍、乳癌、前立腺癌、子宮頸癌、子宮癌、肺癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、星状細胞腫、グリオーム、膵臓癌、胃癌、肝臓癌、大腸癌、黒色腫、腎臓癌、膀胱癌、中皮腫）が含まれるが、これらに限らない。

【0064】

本発明は、固形腫瘍癌の治療のために一次エフェクター分子を送達する方法を提供し、この方法は、そのような治療が必要な動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトに、1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌を含有する医薬組成物を投与することを含んでなる。本発明はまた、固形腫瘍癌の治療のために一次エフェクター分子を送達する方法を提供し、この方法は、そのような治療が必要な動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトに、1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌を含有する医薬組成物を投与することを含んでなる。本発明はまた、固形腫瘍癌の治療のために一次エフェクター分子を送達する方法を提供し、この方法は、そのような治療が必要な動物、好ましくは

哺乳動物、最も好ましくはヒトに、1つ以上の本発明の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌を含有する医薬組成物を投与することを含んでなる。さらに、本発明は、固形腫瘍癌の治療のために一次エフェクター分子を送達する方法を提供し、この方法は、そのような治療が必要な動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトに、1つ以上の本発明の融合タンパク質および1つ以上のエフェクター分子（すなわち、一次および/または二次分子）をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌を含有する医薬組成物を投与することを含んでなる。好ましい実施形態において、弱毒化腫瘍標的細菌はサルモネラである。特定の様式では、弱毒化腫瘍標的細菌が高められた放出系を含む。

【0065】

いくつかの実施形態においては、1つ以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌は、他の公知の癌治療法と共に使用することができる。例えば、1つ以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌は、化学療法剤と共に用いられる。化学療法剤の例として、制限するものではないが、シスプラチン、イホスファミド (ifosfamide)、パクリタキソール、タキサン類、トポイソメラーゼI阻害剤（例えば、CPT-11、トポテカン、9-AC、およびGG-211）、ゲムシタピン (gemcitabine)、ビノレルビン (vinorelbine)、オキサリプラチン (oxaliplatin)、5-フルオロウラシル (5-FU)、レウコボリン (leucovorin)、ピノレルビン (vinorelbine)、テモダール (temodal)、タキソール、サイトカラシン (cytocalasin) B、グラミシジン D、エメチン、ミトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシン D、1-デヒドロテストステロン、メルファラン、グルココルチコイド類、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン同族体、ならびにサイトキサンが挙げられる。あるいはまた、1つ以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌は、放射線療法と共に用いられる。

【0066】

本発明は、抗癌剤と、1つ以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、の連続的または並行投与を含む。本発明は、抗癌剤と、1つ以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、の相加的または相乗的組合せを包含する。

【0067】

本発明はまた、作用部位がそれぞれ異なっている、抗癌剤と、1つ以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、の組合せを包含する。そのような組合せは、その組合せが相加的であろうと相乗的であろうと、これらの治療薬の二重作用に基づく向上した治療を提供する。したがって、本発明の新規組合せ療法は、単一薬剤療法として用いられるいずれか一方の薬剤と比べて、向上した効力をもたらす。

【0068】

3.1. 定義と略語

本明細書で用いる用語「サルモネラ」とは、チフス菌、ブタコレラ菌、および腸炎菌等のすべてのサルモネラ種を包含する。また、例えば、腸炎菌の亜群であり、一般にネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) と呼ばれる、ネズミチフス菌等のサルモネラの血清型も含まれる。

【0069】

10

20

30

40

50

類似体： 本明細書で用いる用語「類似体」は、一次または二次エフェクター分子として類似または同一の機能を有するが、一次または二次エフェクター分子の類似または同一のアミノ酸配列を必ずしも含まない、あるいは、一次または二次エフェクター分子の類似または同一の構造を必ずしも有していないポリペプチドを意味する。類似アミノ酸配列を含むポリペプチドとは、下記事項の少なくとも1つを満たすポリペプチドを意味する：(a) 本明細書に記載した一次または二次エフェクター分子のアミノ酸配列に対して少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチド；(b) 少なくとも5個連続したアミノ酸残基、少なくとも10個連続したアミノ酸残基、少なくとも15個連続したアミノ酸残基、少なくとも20個連続したアミノ酸残基、少なくとも25個連続したアミノ酸残基、少なくとも40個連続したアミノ酸残基、少なくとも50個連続したアミノ酸残基、少なくとも60個連続したアミノ酸残基、少なくとも70個連続したアミノ酸残基、少なくとも80個連続したアミノ酸残基、少なくとも90個連続したアミノ酸残基、少なくとも100個連続したアミノ酸残基、少なくとも125個連続したアミノ酸残基、または少なくとも150個連続したアミノ酸残基の、本明細書に記載した一次または二次エフェクター分子をコードするヌクレオチドに、ストリンジエントな条件下で、ハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド；(c) 本明細書に記載した一次または二次エフェクター分子をコードするヌクレオチドに対して少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド。本明細書に記載した一次または二次エフェクター分子と類似した構造を有するポリペプチドとは、本明細書に記載した一次または二次エフェクター分子と類似した二次、三次または四次構造を有するポリペプチドを意味する。ポリペプチドの構造は、当業者には公知の方法により決定することができ、このような方法として、限定するものではないが、ペプチド配列決定、X線結晶検査、核磁気共鳴、円二色性、結晶電子顕微鏡検査法が挙げられる。

10

20

30

【0070】

抗血管新生因子： 抗血管新生因子は、抗血管新生活性を有するタンパク質性分子、あるいは、このようなタンパク質性分子をコードする核酸である。好ましい実施形態では、抗血管新生因子は、ペプチド断片、またはこれより大きいタンパク質の切断断片である。

【0071】

弱毒化： 弱毒化は、微生物またはベクターの病原性が弱まるような改変である。弱毒化が目的とする結果は、上記微生物またはベクターを患者に投与したとき、毒性や他の副作用等の危険性が低減することである。

【0072】

バクテリオシン： バクテリオシンは、細菌の宿主が毒素に対して免疫性であるという点で、選択的活性を有する細菌タンパク質性毒素である。バクテリオシンは、細菌の宿主ゲノムまたはプラスミドによりコードされ、広いもしくは狭い範囲の他の細菌に対して毒性であり、1つまたは2つのサブユニットからなる単純な構造であるか、あるいは、多サブユニット構造である。さらに、バクテリオシンを発現する宿主は、該バクテリオシンに対する免疫を有する。

40

【0073】

キレート剤感受性： キレート剤感受性は、細菌の増殖が影響を受ける有効濃度として定義されるか、または、回収可能なコロニー形成単位(c.f.u.)によって決定されるような、細菌の生存能が低下する濃度として定義される。

【0074】

50

誘導体： 本明細書において、「ポリペプチドの誘導体」という表現で用いる用語「誘導体」とは、アミノ酸残基の置換、欠失もしくは付加の導入、またはあらゆるタイプの分子のポリペプチドへの共有結合により、改変された一次または二次エフェクター分子のようなポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドを意味する。本明細書において、「一次または二次エフェクター分子の誘導体」という表現で用いられる用語「誘導体」は、例えば、あらゆるタイプの分子の上記一次または二次エフェクター分子への共有結合により、そのように修飾された一次または二次エフェクター分子を意味する。例えば、限定するものではないが、一次または二次エフェクター分子は、例えば、タンパク質分解切断、細胞リガンドもしくはその他のタンパク質との連結等により、修飾することができる。一次または二次エフェクター分子の誘導体は、当業者には公知の技法を用いた化学的修飾（例えば、アシル化、リン酸化、カルボキシル化、グルコシル化、セレン修飾および硫酸化）により修飾することができる。さらに、一次または二次エフェクター分子の誘導体は、1個以上の非古典的アミノ酸を含んでいてもよい。ポリペプチド誘導体は、本明細書に記載した一次または二次エフェクター分子と類似または同一の機能を有する。本明細書において、「msbB⁻弱毒化腫瘍標的サルモネラ突然変異体の誘導体」という表現で用いる用語「誘導体」は、国際公開番号WO 99/13053（本明細書に、参照により全文が組み込まれる）の第17頁に定義された修飾msbB⁻サルモネラ突然変異体を意味する。

10

【0075】

断片： 本明細書で用いる用語「断片」とは、一次または二次エフェクター分子のアミノ酸配列の少なくとも2個連続したアミノ酸残基、少なくとも5個連続したアミノ酸残基、少なくとも10個連続したアミノ酸残基、少なくとも15個連続したアミノ酸残基、少なくとも20個連続したアミノ酸残基、少なくとも25個連続したアミノ酸残基、少なくとも40個連続したアミノ酸残基、少なくとも50個連続したアミノ酸残基、少なくとも60個連続したアミノ酸残基、少なくとも70個連続したアミノ酸残基、少なくとも80個連続したアミノ酸残基、少なくとも90個連続したアミノ酸残基、少なくとも100個連続したアミノ酸残基、少なくとも125個連続したアミノ酸残基、少なくとも150個連続したアミノ酸残基の、少なくとも175個連続したアミノ酸残基の、少なくとも200個連続したアミノ酸残基の、もしくは少なくとも250個連続したアミノ酸残基の、アミノ酸配列を含むペプチドまたはポリペプチドを意味する。

20

【0076】

機能性断片： 本明細書で用いる用語「機能性断片」とは、上記一次または二次エフェクター分子の少なくとも1つの機能（例えば、エフェクター分子の酵素活性、抗血管新生活性、もしくは抗腫瘍活性等）を保持する一次または二次エフェクター分子の断片を意味する。

30

【0077】

融合タンパク質： 一次もしくは二次エフェクター分子のアミノ酸配列、またはその機能性断片もしくは誘導体と、異種ポリペプチド（例えば、非一次または非二次エフェクター分子）のアミノ酸配列と、を含むポリペプチドを意味する。

【0078】

Omp様タンパク質： 本明細書で用いる用語「Omp様タンパク質」とは、あらゆる細菌の外膜タンパク質またはその一部分（例えば、シグナル配列、リーダー配列、周辺細胞質領域、膜貫通ドメイン、複数回膜貫通ドメイン、またはこれらの組合せ）を意味する。具体的態様では、Omp様タンパク質は、OmpA、OmpB、OmpC、OmpD、OmpE、OmpF、OmpT、ポーリン様タンパク質、PhoA、PhoE、lamB、ラクターゼ、エンテロトキシン、プロテインA、エンドグルカナーゼ、ペプチドグリカン結合リポタンパク質（PAL）、FepA、FhuA、NmpA、NmpB、NmpC、または主要な外膜リポタンパク質（例えばLLP）等の少なくとも一部分である。

40

【0079】

精製された： 本明細書で用いる「精製された」弱毒化腫瘍標的細菌株は、混入タンパク質またはアミノ酸（例えば、死滅した細菌からの残屑）または培地を実質的に含まない。

50

混入タンパク質またはアミノ酸を実質的に含まない弱毒化腫瘍標的細菌株はまた、約30%、20%、10%、もしくは5%（乾燥重量基準）以下の混入タンパク質またはアミノ酸を含む弱毒化腫瘍標的細菌も意味する。

【0080】

放出因子：本明細書で用いる放出因子は、細菌成分の放出を増強するあらゆるタンパク質またはその一部分を意味する。一実施形態では、放出因子は、バクテリオシン放出タンパク質である。放出因子としては、限定するものではないが、クロアシンD13プラスミドによってコードされるバクテリオシン放出タンパク質（BRP）、コリシンE1～E9プラスミドによりコードされるBRP、あるいは、コリシンA、NまたはDプラスミドによりよりコードされるBRPが挙げられる。

10

【0081】

敗血症性ショック：敗血症性ショックは、TNF-により開始される複合サイトカインカスケードによる内部臓器不全の状態である。微生物またはベクターがTNF-を誘導する相対能力は、敗血症性ショックを誘導するその相対能力を示す1つの基準として用いられる。

【0082】

腫瘍標的（tumor-targeted）：腫瘍標的とは、非癌性の対応細胞または組織に比べて、癌性の標的細胞または組織に優先的に局在化し、複製する能力として定義される。従って、サルモネラのような腫瘍標的細菌は、癌性の標的細胞または腫瘍環境に優先的に結合し、感染し、かつ/または依然として生存可能である。

20

【0083】

毒力：毒力は、疾病を引き起こす一般的能力を表す相対語であり、正常細胞を死滅させる能力、または敗血症性ショック（以下の具体的定義を参照）を誘導する能力が含まれる。

【0084】

本明細書において、株の名称VNP20009（国際公開番号WO99/13053）、YS1646および41.2.9は、互換的に用いられ、それぞれ、American Type Culture Collectionに寄託され、受託番号202165が与えられた株を指す。株の名称YS1456および8.7は、互換的に用いられ、それぞれ、American Type Culture Collectionに寄託され、受託番号202164が与えられた株を指す。

30

【0085】

本発明は、以下に行う詳細な説明、具体的実施形態の例示、および添付の図面を参照することにより、さらによく理解されるであろう。

【0086】

4. 図面の簡単な説明

図面の簡単な説明については本明細書の最後を参照のこと。

【0087】

5. 本発明の詳細な説明

本発明は、弱毒化腫瘍標的細菌株を用いて、高レベルの治療用一次エフェクター分子を腫瘍に送達するものである。本発明は、所定の一次エフェクター分子の潜在的全身性毒性（例えば、TNF-によって起こる敗血症性ショック）を回避するという利点をもたらす。本発明は、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子を固形腫瘍に送達する。さらに具体的には、本発明は、適切な作用部位、例えば、固形腫瘍の部位への、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子を送達するためのベクターとして、例えば、サルモネラ等の弱毒化腫瘍標的細菌を調製および使用することを包含する。具体的には、本発明の弱毒化腫瘍標的細菌は、通性好気性菌または通性嫌気性菌であり、これらは、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子をコードするように操作されている。

40

50

【0088】

ここに記載される弱毒化腫瘍標的細菌に基づく送達系は、固形腫瘍の部位への1つ以上のエフェクター分子の局所送達を提供する。本発明は、宿主に全身投与する場合には、毒性でありうる、または望ましくない副作用（例えば、望ましくない免疫作用）を誘導する恐れがある一次エフェクター分子を、宿主への毒性を低下させたサルモネラ等の弱毒化腫瘍標的細菌によって腫瘍に局所送達することができる、安全かつ効果的な方法を提供する。本発明はまた、サルモネラ等の弱毒化腫瘍標的細菌により送達される、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に依りて、1つ以上の二次エフェクター分子の組合せ送達を提供する。さらに本発明は、1つ以上の異なる一次エフェクター分子、および場合に依りて、1つ以上の異なる二次エフェクター分子を保有する、異なる弱毒化腫瘍標的細菌の組合せ送達を提供する。

10

【0089】

また、本発明は、固形腫瘍の部位で該融合タンパク質を発現させるように操作された弱毒化腫瘍標的細菌によって、エフェクター分子を含む1つ以上の融合タンパク質を局所送達する方法を提供する。一実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナルペプチドとエフェクター分子からなる融合タンパク質を発現するように操作される。別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナルペプチドと、タンパク質分解切断部位と、エフェクター分子からなる融合タンパク質を発現させるように操作される。別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、フェリーペプチドとエフェクター分子からなる融合タンパク質を発現させるように操作される。さらに別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナルペプチドと、フェリーペプチドと、エフェクター分子からなる融合タンパク質を発現させるように操作される。さらにまた別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナルペプチドと、タンパク質分解切断部位と、フェリーペプチドと、エフェクター分子からなる融合タンパク質を発現させるように操作される。弱毒化腫瘍標的細菌は、本発明の1つ以上の融合タンパク質と、本発明の1つ以上のエフェクター分子を発現させるように操作される。

20

【0090】

本発明はまた、製薬上許容される担体と、1つ以上のエフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を提供する。さらに、本発明は、製薬上許容される担体と、1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物も提供する。さらに、本発明は、製薬上許容される担体と、1つ以上の融合タンパク質および1つ以上のエフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を提供する。

30

【0091】

本発明は、動物における固形腫瘍癌を治療する方法であって、1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように操作された弱毒化腫瘍標的細菌を、治療を要する動物に投与することを含んでなる方法を提供する。本発明はまた、動物における固形腫瘍癌を治療する方法であって、そのような治療が必要な動物に、1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように操作された弱毒化腫瘍標的細菌を投与することを含んでなる方法を提供する。さらに、本発明は、動物における固形腫瘍癌を治療する方法であって、そのような治療が必要な動物に、1つ以上の融合タンパク質および1つ以上のエフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように操作された弱毒化腫瘍標的細菌を投与することを含んでなる方法を提供する。好ましくは、上記動物は、哺乳動物（例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、サル、またはブタ）であり、さらに好ましくは、動物はヒトである。固形腫瘍癌の例として、限定するものではないが、肉腫、癌腫、リンパ腫が挙げられ、その他の固形腫瘍癌として、限定するものではないが、乳癌、前立腺癌、子宮頸癌、子宮癌、肺癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、星状細胞腫、グリオーマ、膵臓癌、胃癌、肝臓癌

40

50

、大腸癌、中枢神経系の癌、生殖細胞系の癌、腎臓癌、膀胱癌、および中皮種が挙げられる。

【0092】

特定の作用機構に制限する意図はないが、本発明者らは、本発明に従い、エフェクター分子を含む弱毒化腫瘍標的細菌ベクターの送達によって、腫瘍の部位にエフェクター分子の標的発現が達成されると考える。

【0093】

明瞭にするため、詳細な説明を次の小節に分けるものとする：細菌ベクター；腫瘍治療のための一次エフェクター分子；一次エフェクター分子との共発現のための二次エフェクター分子；誘導体と類似体；融合タンパク質；発現ベクター；ならびに、送達のための方法および組成物。

10

【0094】

5.1. 細菌ベクター

本発明の方法では、あらゆる弱毒化腫瘍標的細菌を用いることができる。さらに具体的には、本発明の方法で用いられる弱毒化腫瘍標的細菌は、通性好気性菌または通性嫌気性菌である。本発明の方法で用いられる、通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌の例としては、限定するものではないが、腸管組織侵入性大腸菌等の大腸菌、サルモネラ種 (*Salmonella* spp.)、赤痢菌種 (*Shigella* spp.)、エルシニア・エンテロコリチカ (*Yersinia enterocolitica*)、単球症リステリア (*Listeria monocytogenes*)、ヒトマイ

20

【0095】

弱毒化および腫瘍ターゲティングに寄与する因子を本明細書に記載するが、これらを用いて、本発明の方法で使用する好適な細菌株を構築または選択することができる。例えば、腫瘍標的細菌を選択および単離する方法については、国際公開番号W096/40238の第6.1節に記載され、また、細菌を弱毒化する方法については、同第6.2節に記載されている。尚、この文献は、参照により本明細書に全文を組み込むものとする。弱毒化腫瘍標的細菌の例は、国際出願W099/13053（参照により本明細書に全文を組み込む）にも記載されている。本発明の特定の実施形態では、当業者には公知の方法で細菌を修飾することにより、弱毒化または高度に弱毒化することができる。

30

【0096】

本発明は、1つ以上の一次エフェクター分子（例えば、TNFファミリーメンバー、細胞傷害性ペプチドまたはポリペプチド、腫瘍阻害酵素、もしくは抗血管新生因子）を単独で、または1つ以上の二次エフェクター分子と組み合わせて送達するベクターとして、弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。本発明はまた、1つ以上の本発明の融合タンパク質を単独で、または1つ以上のエフェクター分子と組み合わせて送達するベクターとして、弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。本発明の好ましい実施形態では、エフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように操作された弱毒化腫瘍標的細菌は、サルモネラである。

40

【0097】

以下の節では、特にサルモネラに関して教示するが、本発明の組成物および方法は、何らサルモネラに限定されるわけではなく、教示が適用するあらゆる他の細菌を包含する。適した細菌種として、限定するものではないが、腸管組織侵入性大腸菌等の大腸菌、サルモネラ種、赤痢菌種、エルシニアエンテロコリチカ、単球症リステリア、ヒトマイコプラズマ、およびレンサ球菌種が挙げられ、ここで、該細菌は、通性好気性菌または通性嫌気性菌である。

【0098】

5.1.1 サルモネラベクター

本発明の教示に従い、あらゆる弱毒化腫瘍標的細菌を修飾して、1つ以上の一次エフェク

50

ター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子をコードすることにより、本発明の1つ以上のエフェクター分子を固形腫瘍に送達するのに有用な新規の弱毒化腫瘍標的細菌を作製することができる。さらに、本発明の教示に従い、あらゆる弱毒化腫瘍標的細菌を修飾して、本発明1つ以上の融合タンパク質および場合に応じて、本発明の1つ以上のエフェクター分子をコードすることにより、本発明の融合タンパク質およびエフェクター分子を固形腫瘍に送達するのに有用な新規の弱毒化腫瘍標的細菌を作製することができる。

【0099】

サルモネラ等の細菌は、ヒトおよび動物の疾病を引き起こす病原体である。サルモネラによって発生し得る疾病の1つは、敗血症であり、これは、敗血症性ショックの発作に関連する高い死亡率 (Bone, 1993, *Clinical Microbiol. Revs.* 6: 57-68) のために、深刻な問題である。従って、本発明で、サルモネラベクターを安全に使用できるようにするためには、サルモネラ等の細菌ベクターの病原性を低減(弱毒化)する。本発明では、弱毒化は、微生物ベクターを修飾することにより、該微生物ベクターの病原性を低減するという従来の定義に加えて、微生物ベクターを修飾することにより、低力価の該誘導微生物ベクターを患者に投与し、それでも尚、高力価の親微生物ベクターを投与したのと同等の結果を達成できるようにすることも含む。その結果、ベクターを患者に投与したことによる毒性ショックまたはその他の副作用の危険性を低下させることができる。このように弱毒化された細菌は、多数の技法により単離される。例えば、宿主細胞、特にマクロファージおよび好中球内での細菌の生存を確実にするビルレンス(virulence)因子をコードするDNA配列の欠失または破壊により、弱毒化を達成することができる。このような欠失または破壊技法は、当業者には公知であり、例えば、相同的組換え、化学的突然変異誘発、放射線突然変異誘発、もしくはトランスポゾン突然変異誘発が挙げられる。マクロファージ内での生存に関連するビルレンス因子は、例えば、酸性化のようなストレスシグナルに応答して、またはマクロピノサイトーシス等の宿主細胞防御機構に応答して、通常、マクロファージ内で特異的に発現される (Fieldsら、1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5189-5193)。国際公開番号WO96/40238の表4には、欠失によって弱毒化が起こるサルモネラ・ビルレンス因子が例示的に列挙されている。

【0100】

サルモネラのような細菌ベクターの弱毒化の別の方法は、細菌の毒性の原因となる細菌の置換基を修飾するものである。例えば、リポ多糖(LPS)または内毒素は、細菌性敗血症の病理作用の主な原因である。この応答を起こすLPSの成分は、リピドA(「LA」)である。LAの毒性作用の排除または軽減により、1)患者における敗血症性ショックの危険性が低下すると共に、2)さらに高レベルの細菌ベクターを許容できることから、弱毒化細菌が得られる。

【0101】

サルモネラのような細菌のLA含有率の改変は、LPS生合成経路に突然変異を導入することにより達成することができる。LPS生合成におけるいくつかの酵素段階、およびサルモネラ内でそれらを制御する遺伝子座、ならびに対応する突然変異体が確認されている (Raetz, 1993, *J. Bacteriol.* 175: 5745-5753およびその中の参考文献)。このような突然変異体の一例として、firAがあるが、これは、酵素UDP-3-O(R-30ヒドロキシミリストール)-グリコシアミンN-アシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子内の突然変異であり、該酵素は、内毒素生合成における第3段階を調節する (Kelleyら、1993, *J. Biol. Chem.* 268: 19866-19874)。このタイプの突然変異を担持する細菌株はリピドAを生産するが、これは第7脂肪酸、すなわちヘキサデカン酸、を含むという点で野生型リピドAとは異なる (RoyおよびColeman, 1994, *J. Bacteriol.* 176: 1639-1646)。RoyおよびColemanは、内毒素生合成における第3段階の遮断のほかに、firA突然変異は、リピドA生合成の第6段階を

10

20

30

40

50

調節するリポド A₄ キナーゼの酵素活性を低下させることも明らかにした。

【0102】

弱毒化に加えて、本発明の細菌ベクターは腫瘍ターゲティングされる。すなわち、細菌は、正常組織、非腫瘍または非腫瘍細胞に対して、腫瘍または腫瘍細胞に優先的に結合し、感染し、かつ/または依然として生存可能である。弱毒化腫瘍標的細菌を取得するのに適した方法は、国際公開WO96/40238の第6.1節(第25~32頁;腫瘍ターゲティング)および第6.2.2節(第43~51頁;弱毒化)に記載されており、該文献は、参照により本発明に組み込まれるものとする。こうして得られるベクターは高度に特異的で、かつ重感染性であることから、標的腫瘍または腫瘍細胞に存在する感染細菌の数と、非癌性対応部でのそれとの差は、微生物培養物の稀釈度が増加するほど大きくなるため、これまでより低力価の微生物ベクターを用いて、正の結果を得ることができる。また、国際公開WO96/40238に記載される技法を用いて、弱毒化腫瘍標的サルモネラまたは非サルモネラ細菌ベクターを作製することも可能である。

10

【0103】

LSP経路突然変異を有する弱毒化腫瘍標的細菌の一例が、国際公開WO99/13053に記載されたmsbB⁻サルモネラ突然変異体である。尚、該文献は、参照により本明細書に組み込むものとする。特に、msbB⁻サルモネラ突然変異体の特徴について説明する第6.1.2節を参照されたい。msbB⁻サルモネラの1つの特徴は、野生型細菌ベクターと比較して、TNF- α 応答を誘導する能力が低下していることである。msbB⁻サルモネラは、野生型細菌ベクターの誘導レベルと比較して、約5%から約40%のレベルでTNF- α 発現を誘導する。

20

【0104】

全細菌または単離もしくは精製されたLPSにより誘導されるTNF- α 応答は、固相酵素免疫検定法(ELISA)等、市販のアッセイ装置を用いて、*in vitro*または*in vivo*で評価することができる。コロニー形成単位(c.f.u.)当たりの、または $\mu\text{g}/\text{kg}$ に基づくTNF- α 生産の比較を用いて、相対活性を決定する。単位当たりのTNF- α レベルが低いほど、TNF- α 生産の誘導が減少していることを示す。好ましい実施形態では、msbB⁻サルモネラベクターを修飾して、本発明の1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子を含むようにする。

30

【0105】

本発明はまた、msbB⁻弱毒化腫瘍標的サルモネラ突然変異体の誘導体の使用も包含する。本発明の教示に従い、msbB⁻弱毒化腫瘍標的サルモネラ突然変異体の誘導体を修飾し、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子をコードすることにより、本発明の1つ以上のエフェクター分子を固形腫瘍に送達するのに有用な新規の腫瘍標的細菌を作製することができる。

【0106】

患者への治療の過程で、さらに毒性の高い表現型に復帰しないような、弱毒化表現型の安定性は重要である。このような安定性は、例えば、ビルレンス遺伝子が、エピスタシス的(epistatically)ではなく、欠失または染色体レベルでのその他の非復帰突然変異によって破壊されるように備えることにより、獲得することができる。

40

【0107】

弱毒化表現型を安全にする別の方法は、例えば、msbB⁻突然変異(国際公開WO99/13053)のように、リポドA生産用の経路における突然変異や、Bochner, 1980, J. Bacteriol. 143:926-933により記載されたウラシル生合成、プリン生合成、およびアルギニン生合成のように、1以上の栄養素または代謝物の栄養要求性突然変異体への1以上の突然変異等、1以上の方法で弱毒化されるように、細菌を操作することである。好ましい実施形態では、少なくとも1種の一次エフェクター分子をコードまたは発現する腫瘍標的msbB⁻サルモネラもまた、プリンに対して栄養要求性である。特定の実施形態では、少なくとも1種の一次エフェクター分子をコー

50

ドまたは発現する弱毒化腫瘍標的細菌は、A r o A、m s b B、P u r IまたはS e r Cにおける突然変異の存在によって、弱毒化される。他の実施形態では、少なくとも1種の一次エフェクター分子をコードする弱毒化腫瘍標的細菌は、A r o A、m s b B、P u r IまたはS e r Cにおける欠失の存在によって、弱毒化される。

【0108】

従って、本発明の方法では、あらゆる弱毒化腫瘍標的細菌を用いて、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子を発現し、固形腫瘍癌に送達することができる。好ましい実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子を発現するように構築する。さらに、本発明の方法では、あらゆる弱毒化腫瘍標的細菌を用いて、1つ以上の融合タンパク質および場合に応じて、1つ以上のエフェクター分子を発現し、固形腫瘍癌に送達することができる。好ましい実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、1つ以上の融合タンパク質および場合に応じて、1つ以上のエフェクター分子を発現するように構築する。

10

【0109】

5.2. 腫瘍治療のための一次エフェクター分子

本発明は、サルモネラ等の弱毒化腫瘍標的細菌による、一次（および場合に応じて、二次）エフェクター分子の送達を達成する。本発明のエフェクター分子は、タンパク質性分子（例えば、タンパク質（限定するものではないが、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、翻訳後修飾タンパク質等を含む））である。本発明はさらに、本発明の一次エフェクター分子をコードする核酸分子を提供する。

20

【0110】

一次エフェクター分子は、あらゆる公知の生物、例えば、限定するものではないが、動物、植物、細菌、真菌、および原生生物、またはウイルス等に由来するものでよい。本発明の好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、哺乳動物に由来する。さらに好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、ヒトに由来する。本発明の一次エフェクター分子は、TNFファミリーのメンバー、抗血管新生因子、細胞傷害性ポリペプチドまたはペプチド、腫瘍阻害酵素、ならびに、これらの機能性断片を含む。

【0111】

具体的実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、TNFファミリーのメンバーまたはその機能性断片である。TNFファミリーのメンバーの例としては、限定するものではないが、腫瘍壊死因子（TNF- α ）、腫瘍壊死因子（TNF- β ）、TNF- γ 、関連アポトーシス誘導性リガンド（TRAIL）、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン（TRANCE）、TNF- α 関連の弱いアポトーシス誘導物質（TWEAK）、CD40リガンド（CD40L）、LT- α 、LT- β 、LT- γ 、OX40L、CD40L、FasL、CD27L、CD30L、4-1BBL、APRIL、LIGHT、TL1、TNFSF16、TNFSF16、TNFSF17およびAITR-Lが挙げられる。好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、腫瘍壊死因子（TNF- α ）、腫瘍壊死因子（TNF- β ）、TNF- γ 、関連アポトーシス誘導性リガンド（TRAIL）、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン（TRANCE）、TNF- α 関連の弱いアポトーシス誘導物質（TWEAK）、CD40リガンド（CD40L）、もしくはこれらの機能性断片である。これらについて詳しくは、例えば、TNFファミリーのメンバーを記載したKwon, B.ら、1999, Curr. Opin. Immunol. 11: 340-345を参照されたい。また、以下の表1は、TNFファミリーのメンバー例の古典的名称および標準化された名称の一覧を示す。本発明の好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、腫瘍壊死因子（TNF- α ）、腫瘍壊死因子（TNF- β ）、TNF- γ 、関連アポトーシス誘導性リガンド（TRAIL）、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン（TRANCE）、TNF- α 関連の弱いアポトーシス誘導物質（TWEAK）、もしくはCD40リガンド（CD40L）である。

30

40

50

【 0 1 1 2 】

【 表 1 】

TNF ファミリーのメンバー	
古典的名称	標準化された名称
LT- α	TNFSF1
TNF- α	TNFSF2
LT- β	TNFSF3
OX40L	TNFSF4
CD40L	TNFSF5
F _{as} L	TNFSF6
CD27L	TNFSF7
CD30L	TNFSF8
4-1BBL	TNFSF9
TRAIL	TNFSF10
TRANCE	TNFSF11
TWEAK	TNFSF12
APRIL	TNFSF13
LIGHT	TNFSF14
TL1	TNFSF15
---	TNFSF16
---	TNFSF17
AITR-L	TNFSF18

10

20

30

【 0 1 1 3 】

別の具体的実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、抗血管新生因子もしくはその機能性断片である。抗血管新生因子の例として、限定するものではないが、エンドスタチン、アンジオスタチン、アポミグレン、抗血管新生抗トロンピンIII、フィブロネクチンの29kDa N末端および40kDa C末端タンパク質分解断片、uPA受容体アンタゴニスト、プロラクチンの16kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の7.8kDaタンパク質分解断片、13.40と称する抗血管新生因子、トロンボスポンジンIの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、RGDおよびNGR含有ペプチド、ラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲンおよびEGFの小さい抗血管新生ペプチド、ならびに、インテグリン_{v₃}およびVEGF受容体のペプチドアンタゴニストが挙げられる。

40

【 0 1 1 4 】

本発明の好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子はエンドスタチンである。天然のエンドスタチンは、コラーゲンXVIIのC末端の約180アミノ酸からなる(コラーゲンXVIIの2つのスプライス形態をコードするcDNAは、Genbank登録番号AF1801およびAF18082を有する)。

【 0 1 1 5 】

50

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、プラスミノゲン断片である（プラスミノゲンのコード配列は、Genbank登録番号NM-000301およびA33096）にみいだすことができる）。アンギオスタチンペプチドは、言うまでもなく、プラスミノゲンの4つのクリングルドメイン、すなわち、クリングル1～クリングル4を含む。組換えクリングル1, 2および3は、天然ペプチドの抗血管新生特性を有するのに対し、クリングル4にはそのような活性がない（Caoら、1996, *J. Biol. Chem.* 271:29461-29567）。従って、本発明のアンギオスタチンエフェクター分子は、クリングル1、クリングル2およびクリングル3からなる群より選択される少なくとも1つの、好ましくは、1つ以上のクリングルドメインを含む。具体的実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、40 kDaイソ型、42 kDaイソ型、45 kDaイソ型、またはこれらの組合せからなる群より選択されるヒトアンギオスタチン分子である。別の実施形態では、該一次エフェクター分子は、プラスミノゲンのクリングル5ドメインであり、これは、アンギオスタチン（アンギオスタチンはクリングルドメイン1～4からなる）より強力な血管新生阻害物質である。

10

20

30

40

50

【0116】

別の実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、アンチトロンビンIIIである。アンチトロンビンIIIは、以後アンチトロピンと呼び、これは、タンパク質を血管壁に連結するヘパリン結合ドメインと、トロンピンと相互作用する活性部位ループとを含む。アンチトロンピンをヘパリンと結合させると、タンパク質はコンホメーション変化を引き起こし、これによって、活性ループがトロンピンと相互作用し、その結果、トロンピンによる該ループのタンパク質分解切断が起こる。タンパク質分解切断事象により、アンチトロンピンのコンホメーションにさらに別の変化が起こり、これによって(i)トロンピンとアンチトロンピンとの間の相互作用界面が改変され、(ii)ヘパリンから複合体が放出される（Carrell, 1999, *Science* 285:1861-1862、およびその中の参考文献）。O'Reillyら（1999, *Science* 285:1926-1928）は、切断されたアンチトロンピンが、強力な抗血管新生活性を有することをみいだした。従って、一実施形態では、本発明の抗血管新生因子は、抗血管新生形態のアンチトロンピンである。本発明の方法に従う固形腫瘍への上記タンパク質の送達のために、細菌ベクターを修飾し、全長アンチトロンピンGenbank登録番号NM-000488およびアンチトロンピンの切断を触媒するタンパク質分解酵素を発現させることにより、抗血管新生形態のタンパク質を生成する。タンパク質分解酵素は、トロンピン、膵エラスターゼ、およびヒト好中球エラスターゼからなる群より選択される。好ましい実施形態では、タンパク質分解酵素は膵エラスターゼである。機能性膵エラスターゼの組換え発現の方法は、Shirasuにより教示されている（Shirasuら、1987, *J. Biochem.* 102:1555-1563）。

【0117】

本発明の別の実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、フィブロネクチンの40 kDaおよび/または29 kDaタンパク質分解断片である。これら断片の発現ベクターは、フィブロネクチン前駆体タンパク質をコードする全長核酸配列（Genbank登録番号X02761）、およびコードされたタンパク質の成熟化についての記載事項（description）を用いた標準的方法により生成することができる。好ましい実施形態では、フィブロネクチンの40 kDaおよび/または29 kDa断片は、例えば、pTrc99Aプラスミドへの挿入により、trcプロモーターの制御下で細胞質タンパク質として発現させる。

【0118】

本発明の別の実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子（uPA）受容体のアンタゴニストである。実施形態の一態様では、該アンタゴニストは、uPAのドミナントネガティブ突然変異体である（例えば、Crowleyら、1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5021-5025）。実施形態の別の態様では、アンタゴニストは、ペプチドアンタゴニス

トまたはその融合タンパク質である (Goodsonら、1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7129-7133)。実施形態のさらに別の態様では、アンタゴニストは、ドミナントネガティブ可溶性uPA受容体である (Minら、1996, Cancer Res. 56:2428-2433)。

【0119】

本発明の別の実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、約120のアミノ酸からなる、プロラクチンの16 kDa N末端断片、またはその生物学的に活性な断片である (プロラクチンのコード配列は、Genbank登録番号NM_000948にみいだすことができる)。具体的実施形態では、上記プロラクチン断片は、ジスルフィド結合によるタンパク質の不要な架橋を回避するため、Cys58 Ser58突然変異を有する。

10

【0120】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、7.8 kDa血小板第4因子断片である。具体的実施形態では、7.8 kDa血小板第4因子断片は、融合タンパク質として発現され、該融合タンパク質において、アミノ末端は、大腸菌グルクロニダーゼの最初の35アミノ酸からなる。別の実施形態では、血小板第4因子のヘパリン結合性リシンをグルタミン酸残基に突然変異させることにより、強力な抗血管新生活性を有する変異型タンパク質が得られる (Maioneら、1991, Cancer Res. 51:2077-2083)。血小板第4因子のコード配列は、Genbank登録番号NM-002619である。

【0121】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、血小板第4因子の抗血管新生13アミノ酸断片、13.40と称する抗血管新生因子、トロンボスポジンIの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、ラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲンもしくはEGFの小さい抗血管新生ペプチド、またはインテグリン_{v₃}もしくはVEGF受容体の小さいペプチドアンタゴニストに相当する小さなペプチドである。具体的実施形態では、小さいペプチドをタンデムに発現させることにより、タンパク質安定性が高まる。小さいペプチドの配列は、VEGF受容体アンタゴニスト (Sokerら、1993, J. Biol. Chem. 272:31582-31588)を除いて、Cao (1998, Prog. Mol. Subcell. Biol. 20:161-176)により提供されている。極めて好ましい実施形態では、小さいペプチドは、RGDまたはNGRモチーフを含む。この実施形態の特定の様式では、RGDまたはNGRモチーフを含むペプチドは、例えば、OmpAの1つ以上の細胞外ループをコードする核酸と、読み枠を合わせて該ペプチドをコードする核酸を融合することにより、宿主細菌の細胞表面上に提示される。

20

30

【0122】

別の具体的実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、細胞傷害性ポリペプチドまたはペプチド、もしくはそれらの機能性断片である。細胞傷害性ポリペプチドまたはペプチドは、例えば、タンパク質合成の干渉または細胞周期の破壊を介して、細胞増殖を阻害することにより、細胞に対して毒性を有するか、または細胞分裂を抑制する。このような物質は、rRNAまたはリボ核タンパク質を切断するか、伸長因子を阻害するか、mRNAを切断することにより、あるいは、タンパク質合成を、細胞が生存できないようなレベルにまで低下させるその他の機構によって、作用すると考えられる。

40

【0123】

細胞傷害性ポリペプチドまたはペプチドの例として、限定するものではないが、下記のものが挙げられる：バクテリオシンファミリーのメンバー、ベロ毒素、細胞傷害性壊死因子1 (CNF1; 例えば、大腸菌CNF1およびVibrio fischeri CNF1)、細胞傷害性壊死因子2 (CNF2)、Pasteurella multocida毒素 (PMT)、溶血素、ファルネシルトランスフェラーゼの強力な競合阻害物質であるCAA Xテトラペプチド、サポリン、リシン、アブリン、その他のリポソーム不活性化タンパク質 (RIP)、シュードモナス外毒素、DNA、RNAまたはタンパク質合成の

50

阻害剤、アンチセンス核酸、その他の代謝阻害物質（例えば、DNAアーゼおよびリボヌクレアーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ等のDNAまたはRNA切断分子）、プロドラッグ変換酵素（例えば、HSV由来のチミジンキナーゼおよび細菌シトシンデアミナーゼ）、光活性化ポルフィリン、リシン、リシンA鎖、トウモロコシRIP、ゲロニン、細胞致死拡大（cytotoxic distending）毒素、ジフテリア毒素、ジフテリア毒素A鎖、トリコサンチン、トリチン、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質（PAP）、ミラビリス（mirabilis）抗ウイルスタンパク質（MAP）、ジアンチン32および30、アプリン、モノドリン、プリオジン、志賀毒素（shiga）、キュウリの種子からのタンパク質生合成の触媒阻害物質（例えば、国際公開WO93/24620を参照）、シュードモナス外毒素、大腸菌熱不安定性毒素、大腸菌熱安定性毒素、EaggEC安定性毒素-1（EAST）、細胞毒素の生物学的に活性の断片、ならびに、当業者には公知のその他の物質。大腸菌およびサルモネラの毒素については、例えば、Escherichia and Salmonella, Cellular and Molecular Biology, Neidhardtら（編）におけるO'BrianおよびHolmesによるProtein Toxins of Escherichia coli and Salmonella, pp. 2788 - 2802, ASM Press, ワシントンD.C.を参照されたい。

10

【0124】

好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、バクテリオシンファミリーのメンバー（例えば、Konisky, 1982, Ann. Rev. Microbiol. 36: 125 - 144参照）であるが、ただし、該バクテリオシンファミリーのメンバーは、バクテリオシン放出タンパク質（BRP）ではない。バクテリオシンファミリーのメンバーの例として、限定するものではないが、ColE1、ColE1a、ColE1b、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、ColE9、コリシンA、コリシンK、コリシンL、コリシンM、クロアシンDF13、ペスチシンA1122、スタフィロコクシン1580、ブチリシン7423、ピオシンR1またはAP41、メガシンA-216、ミクロシンM15、およびビプリオシン（JayawardeneおよびFarkas-Himsley, 1970, J. Bacteriology vol. 102 pp 382 - 388）が挙げられる。最も好ましくは、一次エフェクター分子は、コリシンE3またはVであるが、コリシンA、E1、E2、Ia、Ib、K、L、およびM（Konisky, 1982, Ann. Rev. Microbiol. 36: 125 - 144参照）も、一次エフェクター分子として適している。この実施形態の別の好ましい態様では、バクテリオシンは、クロアシンであり、最も好ましくは、クロアシンDF13である。

20

30

【0125】

好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、ColE1、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、またはColE9である。コリシンE3（ColE3）は、白血病細胞モデル系（Fiskaら、1978, *Experientia* 35: 406 - 40）等の哺乳動物細胞（Sardaら、1978, *Folia Microbiol.* 23: 272 - 277）に深く細胞傷害性作用を及ぼすことがわかっている。ColE3の細胞毒性は、タンパク質合成を停止する機能であり、これは、80Sリボソームの阻害により媒介される（Turnowskyら、1973, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 52: 327 - 334）。さらに具体的には、ColE3は、リボヌクレアーゼ活性（Saunders, 1978, *Nature* 274: 113 - 114）を有する。その天然形態では、ColE3は、1:1の比で50kDaおよび10kDaタンパク質からなる60kDaタンパク質複合体であり、大きい方のサブユニットはヌクレアーゼ活性を有し、また、小さい方のサブユニットは50kDaサブユニットの阻害機能を有する。このように、50kDaタンパク質は、細胞傷害性タンパク質（または毒素）として作用し、10kDaタンパク質は、抗毒素として作用する。従って、一実施形態では、ColE3を二次エフ

40

50

エクター分子として用いる場合には、大きい方のColE3サブユニットもしくはその活性断片を単独で、または小さい方のサブユニットより高いレベルで発現させる。本発明の別の実施形態では、ColE3 50 kDa毒素および10 kDa抗毒素を、サルモネラ等の弱毒化腫瘍標的細菌内の単一プラスミドにコードさせる。この実施形態では、毒素/抗毒素は、プラスミドを保有するサルモネラの選択系として作用することができ、これにより、該プラスミドを欠失したサルモネラは上記毒素により死滅する。別の実施形態では、10 kDa抗毒素は、プラスミド上のcolE3毒素から離れて染色体上にあり、他の細菌に対する透過障壁を形成している(以下の第5.6節を参照)。

【0126】

本発明の別の好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、クロアシンDF13である。クロアシンDF13は、ColE3と同様に機能する。タンパク質複合体は、67 kDa分子量である。個々の成分のサイズは、57 kDaおよび9 kDaである。リボヌクレアーゼ活性以外に、DF13は、細胞カリウムの漏出を引き起こすことができる。

10

【0127】

別の好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、コリシンVである(Plasmids, a Practical Approach 1987, K.G. Hardy編におけるPugsley, A.P.およびOudega, B.による"Methods for Studying Colicins and Their Plasmids"; Gilson, L.ら、EMBO J. 9:3875-3884)。

【0128】

別の実施形態では、一次エフェクター分子は、下記のものである: コリシンE2(構造は、ColE3に類似した二重サブユニットであるが、リボヌクレアーゼ活性ではなく、エンドヌクレアーゼ活性を有する); イオン透過性チャンネルを形成し、細胞のプロトン駆動力を崩壊させ、細胞死に至らしめるコリシンA、E1、Ia、IbまたはK; タンパク質、DNAおよびRNA合成を阻害するコリシンL; 細胞の浸透圧環境を改変することにより、細胞敗血症を引き起こすコリシンM; コリシンBと同様に機能するペスチシンA1122; 細孔形成バクテリオシンであるスタフィコクシン1580; 未知の標的を介して、RNA、DNAおよびタンパク質合成を間接的に阻害するプチリシン7423; ピオシンP1、すなわち、溶質輸送からの呼吸を脱共役することにより、細胞を死滅させるバクテリオファージテールタンパク質に似たタンパク質; コリシンE2様の作用を有するピオシンAP41; または細胞内物質の漏出を引き起こすホスホリパーゼであるメガシンA-216(バクテリオシンの概要については、Konisky, 1982, Ann. Rev. Microbiol. 36:125-144を参照): コリシンA(Plasmids, a Practical Approach 1987, K.G. Hardy編におけるPugsley, A.P.およびOudega, B.による"Methods for Studying Colicins and Their Plasmids")

20

30

【0129】

従って、一次エフェクター分子は、本明細書に記載した、または当業者には公知のあらゆるバクテリオシンを含んでよいが、ただし、該バクテリオシンは、バクテリオシン放出タンパク質ではない。

40

【0130】

別の具体的な実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、腫瘍阻害酵素またはその機能性断片である。腫瘍阻害酵素の例として、限定するものではないが、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、リボヌクレアーゼ、DNAアーゼ、およびグリコシダーゼが挙げられる。好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、メチオナーゼである。

【0131】

本発明の一次エフェクター分子は、例えば、癌腫、黒色腫、リンパ腫、肉腫等の固形腫瘍癌を治療または予防する上で有用である。

50

【0132】

本発明は、一次エフェクター分子をコードする核酸分子を提供する。本発明はまた、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子をコードする核酸分子を提供する。本発明は、適したプロモーターに機能的に連結された本発明のエフェクター分子をコードする核酸を提供する。場合に応じて、エフェクター分子をコードする核酸は、転写、翻訳、局在化、安定性等に關与するその他のエレメントに機能的に連結することもできる。

【0133】

一次エフェクター分子をコードする核酸分子は、長さが約6～約100,000塩基対である。好ましくは、この核酸分子は、長さが約20塩基対～約50,000塩基対である。さらに好ましくは、この核酸分子は、長さが約20塩基対～約10,000塩基対である。さらにまた好ましくは、この核酸分子は、長さが約20塩基対～約4,000塩基対である。

【0134】

5.3. 一次エフェクター分子との共発現のための二次エフェクター分子

本発明の特定の実施形態では、一次エフェクター分子（例えば、TNFファミリーのメンバー、細胞傷害性ペプチドもしくはポリペプチド、抗血管新生因子、または腫瘍抑制酵素）は、場合に応じて、別の分子、すなわち、二次エフェクター分子と一緒に、細菌ベクター内で共発現させる。二次エフェクター分子は、付加的治療価値を提供し、かつ/または、周囲の環境へ（少なくとも1種の一次エフェクター分子、および、場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子を発現させる）修飾細菌ベクターの内容物の放出を促進する。本明細書で用いる用語「付加的治療価値」とは、一次エフェクター分子が提供するもの以外に、二次エフェクター分子が、腫瘍に対し、付加的もしくは相乗的、細胞分裂抑制性、または細胞傷害性作用をもたらすことを指す。従って、二次エフェクター分子は、付加的治療因子および/または放出因子として機能する。好ましくは、二次エフェクター分子は、付加的治療因子もしくは放出因子（または両方）のいずれであっても、所望の部位、すなわち、腫瘍の部位で、優先的または特異的に活性化もしくは発現させる。特定の実施形態では、二次エフェクター分子は、2つの機能を果たす、すなわち、細菌細胞内容物の放出を促進する（例えば、細菌細胞溶解または準溶解を促進することにより）と同時に、治療価値を提供する（例えば、腫瘍細胞に対する細胞毒性により）ことができる。特定の非制限的实施形態では、二次エフェクター分子の細胞毒性は、患者の免疫系が介在しうる；従って、このような二次エフェクター分子は、免疫調節剤として機能することができる。

【0135】

本明細書の特定の実施形態では、本発明の弱毒化腫瘍標的細菌ベクターは、抗腫瘍活性を有する少なくとも1種の二次エフェクター分子を発現させるように操作する。すなわち、二次エフェクター分子の発現により、腫瘍または腫瘍細胞の死滅または成長の障害が起こる。

【0136】

二次エフェクター分子は、タンパク質性または核酸分子である。核酸分子は、二本鎖もしくは一本鎖DNAまたは二本鎖もしくは一本鎖RNA、ならびに、三重らせん核酸分子のいずれでもよい。核酸分子は、リボザイム、またはアンチセンス核酸等として機能することができる。

【0137】

アンチセンスヌクレオチドは、mRNAまたはDNA等の核酸に、配列特異的に結合するオリゴヌクレオチドである。相補的配列を有するmRNAに結合すると、アンチセンスは、mRNAの翻訳を阻止する（例えば、米国特許第5,168,053；5,190,931；5,135,917；および5,087,617号参照）。三重らせん分子とは、二重らせんDNAと結合して、共直線性三重らせん分子を形成し、これにより、転写を阻止する一本鎖DNAを意味する（例えば、米国特許第5,176,996号を参照）。

【0138】

10

20

30

40

50

リボザイムは、mRNA等のRNA基質を特異的に切断することにより、細胞成長もしくは発現を阻害または干渉するRNA分子である。RNA鎖の切断および/または連結に關与するリボザイムとして、少なくとも5クラスのリボザイムが知られている。リボザイムは、任意のRNA転写産物を標的とすることができ、その転写産物を触媒的に切断することができる(例えば、米国特許第5,272,262号;米国特許第5,144,019号;および米国特許第5,168,053、5,180,818、5,116,742および5,093,246号を参照)。

【0139】

一次エフェクター分子についてすでに記載したように、二次エフェクター分子をコードまたは含有する核酸には、機能的連結で、選択したプロモーターを付与する、また、場合に
10 応じて、機能的連結で、転写、翻訳、局在化、安定性および/またはその他に参加する他のエレメントを付与する。さらに、二次エフェクター分子は、一次エフェクター分子および内部リボソーム結合部位と同じプロモーターを用いて、または、一次エフェクター分子とは異なるプロモーターを用いて、発現させることができる。

【0140】

二次エフェクター分子をコードする核酸分子は、長さが約6塩基対から約100,000
20 塩基対である。好ましくは、核酸分子の長さは、約20塩基対から約50,000塩基対である。より好ましくは、核酸分子の長さは、約20塩基対から約10,000塩基対である。さらにより好ましくは、核酸分子の長さは、約20塩基対から約4,000塩基対である。

【0141】

下記の二次エフェクター分子をコードするエフェクター分子のヌクレオチド配列は、よく知られている(GenBank参照)。二次エフェクター分子(この二次エフェクター分子は、細胞傷害性もしくは細胞分裂抑制因子、またはその生物学的に活性の断片、変異体もしくは誘導体である)をコードする核酸分子は、増幅(例えば、PCR)、ゲノムまたはcDNAライブラリーのプローブハイブリダイゼーション、発現ライブラリーの抗体スクリーニング等の標準的方法により単離してもよいし、化学的に合成しても、または市販の、もしくは他の供給源から得られたものでもよい。

【0142】

本明細書に記載した用途で使用する核酸分子およびオリゴヌクレオチドは、当業者には公
30 知である任意の方法により合成することができる(例えば、国際公開WO93/01286、米国特許第5,218,088;5,175,269;および5,109,124号参照)。アンチセンス試薬として使用するオリゴヌクレオチドおよびリボザイムの同定は、当業者には公知の方法を含む。

【0143】

5.3.1. 付加的治療価値をもたらす因子

本発明の特定の実施形態では、少なくとも1種の一次エフェクター分子を発現し、かつ好ましくは、サルモネラベクターである本発明の弱毒化腫瘍標的細菌ベクターは、抗腫瘍活性を有する少なくとも1種の二次エフェクター分子を発現する。すなわち、該二次エフェクター分子の発現により、腫瘍もしくは腫瘍細胞の死滅、またはそれらの成長の阻害、あ
40 るいは、腫瘍細胞の転移の阻害が起こり、これによって、一次エフェクター分子の細胞傷害性または細胞分裂抑制作用を増強する。一実施形態では、二次エフェクター分子の腫瘍への作用は、一次エフェクター分子の作用に付加的なものである。好ましい実施形態では、この作用は、超付加的または相乗的である、すなわち、一次および二次エフェクター分子を個別に投与した場合の作用を合わせたものより大きい。

【0144】

特定の実施形態では、二次エフェクター分子は、タンパク質合成との干渉、または細胞周期の破壊により細胞成長を阻害することによって、細胞に対し、細胞傷害性または細胞分裂抑制性である。このような物質は、例えば、rRNAもしくはリボ核タンパク質を切断する、伸張因子を阻害する、mRNAを切断する、または、タンパク質合成を細胞が生存
50

できないレベルまで低下させるその他の機構により、作用すると考えられる。このような二次エフェクター分子の例として、限定するものではないが、サポリン、リシン、アブリン、およびその他のタンパク質不活性化リボソーム (RIP) が挙げられる。

【0145】

別の実施形態では、二次エフェクター分子は、プロドラッグ変換酵素またはこれをコードする核酸、すなわち、薬物の化学的性質を調節して、細胞傷害性薬剤を生成する酵素である。プロドラッグ変換酵素の例は、Pawelekらにより国際公開WO96/40238の第33頁の表2に一覧が記載されている。尚、この文献は、参照により本明細書に組み入れる。国際公開WO96/40238はまた、このようなプロドラッグ変換酵素を含む分泌融合タンパク質の生成方法も教示している。本発明によれば、プロドラッグ変換酵素は、BRPのような放出因子と共発現させた場合、分泌タンパク質である必要はない(以下の第5.3.2節を参照)。具体的実施形態では、プロドラッグ変換酵素は、マイトマイシンCおよびポルフィロマイシン (Murrayら、1994, J. Pharmacol. Exp. Therapeut. 270:645-649) に作用するシクロム p450 NADPHオキシドレダクターゼである。別の実施形態では、二次エフェクター分子を、BRPのような放出因子と共発現させて、補因子(例えば、NADH、NADPH、ATP等)の放出を起こすことにより、プロドラッグ変換酵素の活性を増強する。この実施形態の別の態様では、二次エフェクター分子を、BRPのような放出因子と共発現させて、活性化薬物(例えば、細菌細胞質または周辺細胞質内で活性化され、細菌ベクターから放出された薬物)を放出させる。

10

20

【0146】

別の実施形態では、二次エフェクター分子は、誘導性酸化窒素シンターゼ (NOS) または内皮性酸化窒素シンターゼの阻害剤である。酸化窒素 (NO) は、血管成長の調節および動脈硬化に関与すると考えられている。NOは、酸化窒素シンターゼ (NOS) によりL-アルギニンから形成され、免疫、炎症および心臓血管応答を調節する。

【0147】

別の実施形態では、二次エフェクター分子は、癌遺伝子もしくは増殖因子(例えば、bFGF、int-2、hst-1/K-FGF、FGF-5、hst-2/FGF-6、FGF-8) または細胞受容体もしくはリガンド等の細胞増殖に関与するタンパク質の生成または活性を阻害することによって、細胞に対し、毒性を有する、または細胞分裂を抑制する。阻害は、転写または翻訳(リボザイムまたは三重らせんDNAである二次エフェクター分子により媒介される)のレベルで、あるいは、タンパク質活性(ドミナントネガティブ突然変異体等の増殖因子経路の阻害剤である二次エフェクター分子により媒介される)のレベルで、行うことができる。

30

【0148】

別の実施形態では、二次エフェクター分子は、サイトカイン、ケモカイン、または免疫調節タンパク質もしくはこれをコードする核酸、例えば、インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-5 (IL-5)、インターロイキン-10 (IL-10)、インターロイキン-15 (IL-15)、インターロイキン-18 (IL-18); 内皮単球活性化タンパク質-2 (EMAP2)、GM-CSF、IFN-、IFN-、MIP-3、SLC、MIP-3、またはHLA-B7のようなMHC遺伝子である。このような免疫調節エフェクター分子の送達は、免疫系を調節し、宿主の抗腫瘍免疫の能力を高めるであろう。あるいは、B7.1およびB7.2等の共刺激分子、CD28およびCTLA-4両方に対するリガンドをコードする核酸分子も送達することにより、T細胞性免疫を増強することもできる。さらに別の免疫調節剤は、-1, 3-ガラクトシルトランスファーゼであり、これを腫瘍細胞に発現させると、補体性細胞死を可能とする。さらに、別の免疫調節剤は、腫瘍関連抗原、すなわち、対応する非癌性細胞には発現しないが、腫瘍細胞に特異的に発現する分子、または対応する非癌性細胞よりも高いレベルで、腫瘍細胞に発現する分子である。腫瘍関連抗原の例は、Kuby, Immunology, W.H.

40

50

Freeman and Company, ニューヨーク、NY, 第1版(1992)、pp. 515-520(本明細書に参照により組み入れる)に記載されている。腫瘍関連抗原の他の例は、当業者には公知である。

【0149】

別の実施形態では、二次エフェクター分子は、Flt-3リガンドまたはこれをコードする核酸である。別の実施形態では、二次エフェクター分子は、BRPである。

【0150】

具体的実施形態では、二次エフェクター分子は、一次エフェクター分子がTNFファミリーのメンバーのとき、TNFファミリーメンバーではない。別の具体的実施形態では、二次エフェクター分子は、一次エフェクター分子が抗血管新生因子のとき、抗血管新生因子ではない。別の具体的実施形態では、二次エフェクター分子は、一次エフェクター分子が細胞傷害性ペプチドまたはポリペプチドのとき、細胞傷害性ペプチドまたはポリペプチドではない。別の具体的実施形態では、二次エフェクター分子は、一次エフェクター分子が腫瘍抑制酵素のとき、腫瘍抑制酵素ではない。

10

【0151】

5.3.2. 腫瘍環境への抗腫瘍エフェクター分子の放出を促進する因子

本発明の他の実施形態では、少なくとも1種の一次エフェクター分子を発現し、かつ好ましくは、サルモネラベクターである本発明の弱毒化腫瘍標的細菌ベクターは、少なくとも1種の二次エフェクター分子を発現するが、該二次エフェクター分子は、細菌細胞膜を透過可能にする、もしくは細胞外環境への細胞内成分の放出を増強する機能を果たし、これによって、一次および/または二次エフェクター分子の送達を増強する。このように、細菌細胞を透過可能にする、または放出を増強する二次エフェクター分子は、「放出因子」と呼ぶ。特定の実施形態では、放出因子は抗腫瘍活性も有するのが有利である。

20

【0152】

本発明の細菌ベクターにより発現させる放出因子は、修飾弱毒化腫瘍標的細菌に内在性のものでも、あるいは、外因性のもの(例えば、弱毒化腫瘍標的細菌にネイティブではない核酸によりコードされたもの)でもよい。放出因子は、プラスミドを含む核酸、または弱毒化腫瘍標的細菌のゲノムに組み込まれた核酸により、コードすることができる。放出因子は、一次エフェクター分子をコードする同じ核酸またはプラスミドでコードしてもよいし、あるいは、別々の核酸またはプラスミドでコードしてもよい。放出因子は、二次エフェクター分子をコードする同じ核酸またはプラスミドでコードしてもよいし、あるいは、別々の核酸またはプラスミドでコードしてもよい。一実施形態では、放出因子は、Omp様タンパク質と融合させた一次エフェクター分子を含む融合タンパク質も発現する細胞内で発現させる。この実施形態では、放出因子の共発現により、細胞周辺腔からの融合タンパク質の放出を増強することができる。

30

【0153】

好ましい実施形態では、このような因子は、バクテリオシン放出タンパク質、すなわち、BRP(本明細書では、一般にBRPと呼ぶ)の1つである。本発明で用いるBRPは、限定するものではないが、クロアシンDF13プラスミド、コリシンE1~E9プラスミドの1つ、もしくはコリシンA、NまたはDプラスミドを含む当業者には公知の任意の供給源に由来するものでよい。好ましい実施形態では、BRPはクロアシンDF13(pC1oDF13 BRP)から成る。

40

【0154】

一般に、BRPは、45~52アミノ酸ペプチドであり、これは、初め、シグナルエンドペプチダーゼによって切断されないシグナル配列を含む前駆体分子(PreBRP)として合成される。BRP活性は、少なくとも部分的に、デタージェント耐性外膜ホスホリパーゼA(PlidA)により媒介されると考えられ、通常、外膜リン脂質の分解の増加に関連している(BRPの概要については、van der Walら、1995、FEMS Microbiology Review 17:381-399を参照されたい)。機構に関して制限するわけではないが、BRPは、周辺細胞質成分の優先的放出を促進するが

50

、これより少ない程度での細胞質成分の放出も検出されている。適度に過剰発現させると、BRPは細菌膜を脆弱にし、細胞質成分の準溶解および高放出を誘導する。さらに、BRPは、超高レベルで発現させると、このタンパク質が細菌細胞溶解を引き起こし、溶菌放出により細胞内容物を送達することができると考えられる。この実施形態で、BRP発現は、BRP活性（例えば、細菌内容物の放出）と相関すると考えられる。例えば、超高BRP活性により、実質的にすべての細菌の細菌細胞溶解が起こる。従って、本明細書で用いる「超高発現」は、実質的に全細菌の細菌細胞溶解を引き起こすBRPの発現レベルとして定義される。BRPを発現しない対照細菌と比較して、適度のBRP活性は、細菌の溶解を必要とせずに、細菌内容物の部分的または増強された放出を伴う。従って、この実施形態では、BRPの適度な過剰発現とは、実質的にすべての細菌の細菌溶解を伴わずに、細胞質成分の放出が増加される発現レベルを意味する。本明細書で用いる実質的にすべての細菌とは、細菌の60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらにより好ましくは90%以上、最も好ましくは90~100%を意味する。

10

【0155】

本発明の具体的実施形態では、BRPタンパク質は、pClODF13BRP突然変異体であり、その溶菌機能は、そのタンパク質放出機能とは分離されているため、細菌溶解なしに、タンパク質放出を増強する(van der Walら、1998, App. Env. Microbiol. 64:392-398)。この実施形態により、細菌ベクターからのタンパク質放出が長くなると共に、ベクターの頻繁な投与の必要性が減少する。別の具体的実施形態では、本発明のBRPは、C末端を短くしたpClODF13BRP

20

【0156】

本発明の別の実施形態では、増強された放出系は、ポーリンタンパク質の過剰発現を含む；例えば、Sugawara, E.およびNikaido, H., 1992, J. Biol. Chem. 267:2507-11を参照のこと。

【0157】

特定の実施形態では、本発明の細菌ベクターによりBRPを発現させる場合、BRPは、修飾弱毒化腫瘍標的細菌に内在性でも、あるいは、外因性のもの（例えば、弱毒化腫瘍標的細胞にネイティブではない核酸によりコードされたもの）でもよい。BRPは、プラスミドを含む核酸により、または弱毒化腫瘍標的細胞のゲノムに組み込まれたタンパク質核酸によりコードすることができる。また、BRPは、一次エフェクター分子をコードする同じ核酸またはプラスミドでコードしてもよいし、あるいは、別々の核酸またはプラスミドでコードしてもよい。さらに、BRPは、二次エフェクター分子をコードする同じ核酸またはプラスミドでコードしてもよいし、あるいは、別々の核酸またはプラスミドでコードしてもよい。一実施形態では、BRP様タンパク質は、Omp様タンパク質と融合させたエフェクター分子を含む融合タンパク質も発現する細胞内で発現させる。この実施形態では、BRPの共発現により、融合タンパク質の放出を増強することができる。

30

【0158】

本発明の好ましい具体的実施形態では、BRPをコードする核酸は、コリシンプラスミドによりコードされる。本発明の別の具体的実施形態では、BRPコード核酸は、ネイティブのBRPプロモーターの制御下で発現させるが、その際のプロモーターは、その正常な宿主(BRPの場合、Enterococcus cloacae)においてストレス（例えば、紫外線等のDNA損傷を起こす条件）に応答するSOSプロモーターであり、しかも、サルモネラにおいて部分的に構成的である。好ましい実施形態では、BRPコード核酸は、pepTプロモーターの制御下で発現させるが、その際、該プロモーターは、腫瘍環境の嫌気性性質に応答して活性化する（例えば、Lombardoら、1977, J. Bacteriol. 179:1909-17）。

40

【0159】

あるいは、プロモーターは、Tn10トランスポゾンのtetプロモーター等の抗生物質

50

誘導プロモーターであることができる。好ましい実施形態では、tetプロモーターは、単量体 (singlemer) であり、該単量体は、ドキシサイクリンおよびアンヒドロテトラサイクリン等のテトラサイクリンまたはその類似体の存在に、悉無律的に応答し、遺伝学的に安定したオン-オフスイッチを提供する。別の実施形態では、tetプロモーターは、多量体化 (例えば、3倍) する。このような多量体は、テトラサイクリンの存在に段階的に応答し、エフェクター分子レベルの制御をより操作しうる系を提供する。次に、本発明の弱毒化腫瘍標的細菌で治療している被験者に、適した用量のテトラサイクリンを投与することにより、プロモーター活性を誘導する。tet誘導性発現系は、当初、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) (FaryarおよびGatz, 1992, *Current Genetics* 21: 345-349) および哺乳動物細胞 (LangおよびFeingold, 1996, *Gene* 168: 169-171) 等の真核細胞系について記載されていたが、近年の研究で、細菌細胞までその適用性が広がっている。例えば、Stiegerら (1999, *Gene* 226: 243-252) は、tetプロモーターに機能的に連結させたtet誘導における、ホタル (firefly) ルシフェラーゼ遺伝子の80倍誘導を明らかにした。このプロモーターの利点は、非常に低レベルのテトラサイクリン、すなわち、抗生物質活性に必要な用量の約1/10で、誘導される点である。

10

【0160】

5.4. 誘導體と類似体

本発明は、さらに、誘導體をコードまたは送達するように修飾された細菌ベクターを包含する。この誘導體として、限定するものではないが、一次および/または二次エフェクター分子、もしくはこれをコードする核酸の断片、類似体、あるいは変異型が挙げられる。誘導體、類似体または変異型は、機能的に活性であり、例えば、全長の、野生型エフェクター分子に関連する1以上の機能活性を示すことができる。一例として、所望の治療特性を有するこのような誘導體、類似体または変異型を用いて、腫瘍成長または腫瘍細胞の分散 (転移) を阻害することができる。エフェクター分子の誘導體または類似体は、本明細書に記載したもの等、当業者には公知の方法により、所望の活性について試験することができる。

20

【0161】

特に、野生型エフェクター分子と同じ、もしくはこれより高い抗腫瘍機能を有する分子を提供する置換、付加 (例えば、挿入) または欠失により、エフェクター分子コード配列を改変することにより、変異型を作製することができる。例えば、本発明の変異型としては、限定するものではないが、一次アミノ酸配列として、エフェクター分子のアミノ酸配列の全部または一部を含むものが挙げられ、これには、機能的に同等のアミノ酸残基を配列内で、サイレント変化を起こす残基で置換した、改変された配列がある。すなわち、改変された配列は、少なくとも1の保存的置換を有する。

30

【0162】

哺乳動物に由来する一次または二次エフェクターコード核酸のいずれかを改変して、当業者には公知の方法により、細菌コドン使用頻度を用いることができる。好ましいコドン使用頻度は、下記に例示されている: *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates, Inc., および *John Wiley & Sons, Inc.* ニューヨーク, および Zhangら, 1991, *Gene* 105: 61-72。

40

【0163】

具体的実施形態では、一次または二次エフェクター分子の誘導體、類似体または変異型は、一次または二次エフェクター分子、またはその断片をコードするヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む。ここで、ハイブリダイゼーションは、ストリジェントな条件下で、例えば、約45で6x塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム (SSC) 中でフィルターに結合させたDNAとハイブリダイズさせた後、約50~65で0.2xSSC/0.1%SDS中で1回以上洗浄することにより行う。または、

50

高度にストリンジェントな条件下で、例えば、約45で6×SSC中でフィルターに結合させた核酸とハイブリダイズさせた後、約68で0.1×SSC/0.2%SDS中で1回以上洗浄することにより実施する。あるいは、当業者には公知の他のストリンジェントな条件下で実施することができる(例えば、Ausubel, F.M.ら、編、1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., およびJohn Wiley & Sons, Inc. ニューヨーク、pages 6.3.1~6.3.6および2.10.3)。

【0164】

一次もしくは二次エフェクター分子の誘導体または類似体としては、限定するものではないが、一次もしくは二次エフェクター分子またはその断片に実質的に相同的な領域を含む分子(例えば、様々な実施形態における、挿入または欠失を一切含まない同じサイズのアミノ酸配列に対して、あるいは、アラインメントが当業者には公知のコンピュータ同源性プログラムにより実施されたアラインメント済配列と比較して、少なくとも60%または70%または80%または90%または95%同一性)、あるいは、そのコード核酸が、高ストリンジェンシー、中ストリンジェンシーまたは低ストリンジェンシー条件下で、エフェクター分子タンパク質エフェクター分子コード配列にハイブリダイズすることができる分子が挙げられる。

【0165】

例えば、一次エフェクター分子の配列と他の既知配列間の、2つのアミノ酸配列または2つの核酸の同一性百分率を決定するために、最適な比較目的に合わせて配列をアラインメントする(例えば、第1アミノ酸または核酸配列の配列にギャップを導入して、第2アミノ酸または核酸配列との最適アラインメントを達成することができる)。次に、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置にあるアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1配列における位置が、第2配列における対応位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドにより占められている場合には、分子は、その位置で同一である。2つの配列間の同一性百分率は、配列が共有する同一位置の数の関数である(すなわち、%同一性=同一位置の数#/位置の総数#(例えば、重複位置)×100)。一実施形態では、2つの配列は、同じ長さである。

【0166】

2つの配列間の同一性百分率は、数学アルゴリズムを用いて達成することができる。2つの配列の比較に用いられる数学アルゴリズムの好ましい非制限的例は、KarlinおよびAltschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 87:2264-2268のアルゴリズム(KarlinおよびAltschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 90:5873-5877に記載されているように修正された)である。このようなアルゴリズムは、Altschulら、1990, J. Mol. Biol. 215:403-410のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれている。BLASTヌクレオチド検索を、NBLASTプログラム、スコア=100、語長=12を用いて実施することにより、本発明の核酸分子と相同のヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索を、XBLASTプログラム、スコア=50、語長=3を用いて実施することにより、本発明のタンパク質分子と相同のアミノ酸配列を得ることができる。比較目的のためにギャップアラインメントを得るためには、Altschulら、1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載されているように、ギャップBLASTを用いることができる。あるいは、PSI-Blastを用いて、分子間の距離関係を検出する反復検索を実施してもよい(同上)。BLAST、ギャップBLAST、およびPSI-Blastプログラムを用いる場合には、それぞれのプログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメーターを用いることができる。http://www.ncbi.nlm.nih.gov.を参照のこと。配列の比較に用いられる数学アルゴリズムの別の好ましい非制限的例は、MyersおよびMil

10

20

30

40

50

lerのアルゴリズム, C A B I O S (1 9 8 9) である。このようなアルゴリズムは、G C G 配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部である、A L I G N プログラム (バージョン 2.0) に組み込まれている。A L I G N プログラムを使用してアミノ酸配列を比較する場合には、P A M 1 2 0 重量残基表、12のギャップ長ペナルティー、および、4のギャップペナルティーを用いることができる。配列分析のためのさらなるアルゴリズムは、当業者には公知であり、次のものが挙げられる: T o r e l l i s および R o b o t t i , 1 9 9 4 , C o m p u t . A p p l . B i o s c i . , 1 0 : 3 - 5 に記載された A D V A N C E および A D A M ; P e a r s o n および L i p m a n , 1 9 8 8 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 8 5 : 2 4 4 4 - 8 に記載された F A S T A 。 F A S T A では、k t u p が、検索の鋭敏性および速度を設定する制御オプションである。k t u p = 2 であれば、比較している2つの配列における類似領域は、アラインメント済残基対を調べることによりみつけれられる。また、k t u p = 1 であれば、単一のアラインメント済アミノ酸を調べる。k t u p は、タンパク質配列の場合は、2 または 1 に、DNA 配列の場合は、1 ~ 6 に設定することができる。k t u p が指定されていない場合には、デフォルトは、タンパク質については2、DNA については6 である。F A S T A パラメーターのさらに詳細な説明については、

10

<http://bioweb.pasteur.fr/docs/man/fasta.1.html#sect2>

を参照されたい。尚、この内容は、本明細書に参照により組み入れる。

【0167】

20

あるいは、タンパク質配列アラインメントは、H i g g i n s ら、1 9 9 6 , M e t h o d s E n z y m o l . 2 6 6 : 3 8 3 - 4 0 2 に記載されている C L U S T A L W アルゴリズムを用いて実施することができる。

【0168】

2つの配列間の同一性百分率は、ギャップのあるなしに拘わらず、前述したものと同様の技法を用いて決定することができる。同一性百分率を計算する際には、正確に同じものだけを計数する。

【0169】

一次エフェクター分子もしくは二次エフェクター分子、またはその誘導体または類似体は、当業者には公知の様々な方法により生成することができる。これらを生成するための操作は、核酸またはタンパク質レベルで行うことができる。例えば、エフェクター分子をコードする、クローン化されたエフェクター分子コード配列は、当業者には公知の多数の戦略のいずれかによって修飾することが可能である (S a m b r o o k ら、1 9 8 9 , M o l e c u l a r C l o n i n g , A L a b o r a t o r y M a n n u a l , 第2版、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o r , ニューヨーク)。該配列は、制限エンドヌクレアーゼを用いて、適切な部位で切断し、次いで、所望であれば、さらに酵素による修飾を施し、単離した後、i n v i t r o で連結することができる。一次または二次エフェクター分子の誘導体または類似体をコードする修飾エフェクター分子の生成の際、所望の一次または二次エフェクター分子活性がコードされるエフェクター分子コード配列領域において、修飾エフェクター分子コード配列が、翻訳停止シグナルにより中断されない状態で、ネイティブタンパク質と同じ翻訳リーディングフレーム内に残ることを確実にするよう注意しなければならない。

30

40

【0170】

さらに、エフェクター分子をコードする核酸を i n v i t r o または i n v i v o で突然変異させることにより、翻訳、開始、および/または終結配列を形成および/または破壊する、あるいは、コード領域に変異を発生させる、および/または新しい制限エンドヌクレアーゼ部位を形成する、もしくは既存のものを破壊することにより、i n v i t r o 修飾をさらに促進することができる。好ましい具体的実施形態では、エフェクター分子コード核酸を突然変異させることにより、例えば、さらに強力な変異型を生成する。当業

50

者には公知の任意の突然変異誘発技法を用いることができ、この技法には、限定するものではないが、下記のもの挙げられる：化学的突然変異誘発、*in vitro*部位指定突然変異誘発（Hutchinsonら、1978、*J. Biol. Chem.* 253:6551）、TAB（登録商標）リンカー（Pharmacia）の使用、突然変異を含むプライマーを用いるPCR等。好ましい実施形態では、エフェクター分子の1以上の推定非必須アミノ酸残基の位置において、保存的アミノ酸置換物を作製する。「保存的アミノ酸置換物」とは、アミノ酸残基を、類似した電荷を帯びた側鎖を有するアミノ酸残基で置換したものを意味する。類似した電荷を帯びた側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当業界で定義されている。これらのファミリーとしては、下記のもの挙げられる：塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、枝分かれ側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）をそれぞれ有するアミノ酸。あるいは、突然変異は、例えば、飽和突然変異誘発により、コード配列の全部または部分に沿って、ランダムに導入することができ、こうして得られた突然変異体を生物学的活性についてスクリーニングすることにより、活性を保持する突然変異体を同定することができる。突然変異誘発の後、コードタンパク質を発現させ、該タンパク質の活性を決定することができる。

10

20

【0171】

別の実施形態では、プロテアーゼ切断部位を含むように、本発明のエフェクター分子または融合タンパク質を構築する。

【0172】

5.5. 融合タンパク質

特定の実施形態では、本発明は、融合タンパク質（例えば、別のタンパク質と共有結合している）として構築される一次または二次エフェクター分子を提供する。本発明は、このような融合タンパク質をコードする核酸を提供する。本発明の特定の実施形態では、融合タンパク質をコードする核酸を、適したプロモーターに機能的に連結する。

【0173】

特定の実施形態では、エフェクター分子は、別のタンパク質のアミノ酸配列とのペプチド結合を介して、そのアミノ-またはカルボキシ-末端に結合したエフェクター分子もしくはその断片（好ましくは、該エフェクター分子の少なくともドメインもしくはモチーフ、または、該エフェクター分子の少なくとも5、少なくとも10、少なくとも25、少なくとも50、少なくとも75、もしくは少なくとも100のアミノ酸からなる）を含むキメラタンパク質または融合タンパク質として構築される。特定の実施形態では、融合物は、機能的に活性である異種ポリペプチドまたはその断片の少なくとも2、少なくとも6、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも50、少なくとも75、もしくは少なくとも100の連続したアミノ酸を含む。一実施形態では、このようなキメラタンパク質または融合タンパク質は、別のタンパク質のコード配列にフレーム内結合した一次エフェクター分子をコードする核酸（例えば、TNFコード配列、抗血管新生因子コード配列、腫瘍抑制酵素コード配列、もしくは細胞傷害性ポリペプチドコード配列）の組換え発現により生成する。このようなキメラタンパク質は、当業者には公知の方法により、適正なコードフレーム内で、所望のアミノ酸配列をコードする適切な核酸配列を互いに連結した後、当業者には公知の方法で最適の発現運搬体にキメラ産物を発現することにより、作製することができる。任意の異種ポリペプチドコード配列と融合させたエフェクター分子をコードする核酸部分を含むキメラ核酸を構築してもよい。具体的実施形態は、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも25、少なくとも50、もしくは少なくとも100のアミノ酸からなる一次または二次エフェクター分子の断片、あるいは、全長一次または二次エフェクター分子の1以上の機能活性を示す断片を含むキメラタンパク質に關す

30

40

50

る。

【0174】

具体的実施形態では、融合タンパク質は、ヘキサヒスチジンタグ等のアフィニティータグ、または精製、単離、同定もしくは発現アッセイで用いることができるその他のアフィニティータグを含む。別の具体的実施形態では、融合タンパク質は、メタルプロテアーゼまたはセリン切断部位等のプロテアーゼ部位を含む。この実施形態では、腫瘍部位で活性であるプロテアーゼに対応するプロテアーゼ部位を本発明の融合タンパク質中に構築するのが好ましい場合もある。いくつかの実施形態では、エフェクター分子は、Omp様タンパク質、もしくはその断片（例えば、シグナル配列、リーダー配列、周辺細胞質領域、膜貫通ドメイン、多重膜貫通ドメイン、あるいは、これらの組合せ；以下の第3.1節、Omp様タンパク質の定義を参照）との融合タンパク質として構築する。 10

【0175】

好ましい実施形態では、本発明のエフェクター分子（一次または二次）は、外膜タンパク質（Omp様タンパク質）を含む融合タンパク質として発現させる。細菌外膜タンパク質は、細菌外膜の膜内在性タンパク質であり、多重膜貫通（multiple membrane-spanning）ドメインを有し、多くの場合、1以上の脂質成分に結合している。外膜タンパク質は、初め、タンパク質を膜に向かわせるアミノ末端シグナルペプチドを有する前駆体の形態で発現し、その際に、シグナルペプチドをシグナルペプチダーゼにより切断して、成熟タンパク質を生成する。一実施形態では、エフェクター分子は、Omp様タンパク質との融合タンパク質として発現させる。この実施形態では、一次エフェクター分子は、細菌の外膜への送達が増強されている。機構に関して制限するわけではないが、本発明者は、Omp様タンパク質が、外膜に対するエフェクター分子のアンカーまたは連結鎖（tether）として働く、あるいは、細菌外膜にタンパク質を局在化させる役割を果たすと考える。一実施形態では、Omp様タンパク質とのエフェクター分子との融合を用いて、周辺細胞質へのエフェクター分子の局在化を増強する。別の実施形態では、Omp様タンパク質とエフェクター分子の融合を用いて、エフェクター分子の放出を増強する。具体的実施形態では、Omp様タンパク質は、OmpA、OmpB、OmpC、OmpD、OmpE、OmpF、OmpT、ポーリン様タンパク質、PhoA、PhoE、IamB、ラクタマーゼ、エンテロトキシン、プロテインA、エンドグルカナーゼ、ペプチドグリカン関連リポタンパク質（PAL）、FepA、FhuA、NmpA、NmpB、NmpC、もしくは主要な外膜リポタンパク質（LPP等）の少なくとも一部である。本発明の特定の実施形態では、シグナル配列は、疎水性を高めて構築する（例えば、疎水性アミノ酸（例えば、ロイシン）への、シグナル配列内のアミノ酸の挿入または置換による）。実施例については、以下の第7.1～7.4節を参照のこと。 20

【0176】

本発明の別の実施形態では、本発明の融合タンパク質は、タンパク質分解切断部位を含む。タンパク質分解切断部位は、エフェクター分子に内在的またはOmp様タンパク質に内在的である、あるいは、タンパク質分解切断部位を融合タンパク質中に構築してもよい。特定の具体的実施形態では、本発明のOmp様タンパク質は、別々のタンパク質に由来する構造エレメントを含むハイブリッドOmpである。 30

【0177】

上記実施形態の態様例では、Omp様タンパク質はOmpAである。具体的Omp様タンパク質の構造的立体配置に留意しながら、OmpA様融合タンパク質の構築に用いた同じ原理を他のOmp様タンパク質に適用することができる。 40

【0178】

例えば、ネイティブOmpAタンパク質は、該タンパク質の170アミノ酸N末端ドメイン内に8つのアンチパラレル膜貫通鎖を含む。膜貫通ドメインの各対の間には、膜貫通ドメインの挿入方向に応じて、細胞外または細胞内ループがある。C末端ドメインは、155アミノ酸からなり、これらは、細胞内に位置し、恐らく、細胞周辺腔を占めるペプチドグリカンと接触していると思われる。OmpA融合タンパク質の生成を促進する発現ベ 50

クターが作製されている。例えば、Hobomら(1995, Dev. Biol. Strand, 84:255-262)は、OmpAオープンリーディングフレームを含むベクターを開発しており、これは、第3または第4細胞外ループをコードする配列内にリンカーが挿入されている。該ループにより、選択した異種タンパク質のフレーム内挿入が可能になる。

【0179】

本発明の一実施形態では、一次エフェクター分子を含むOmpA融合タンパク質部分は、周辺細胞質において発現を増強させた。該実施形態の一態様では、融合タンパク質は、成熟前に、シグナル配列、または、一次エフェクター分子もN末端に位置するOmpAの少なくとも1の膜貫通ドメインが続くシグナル配列を含む。シグナル配列は切断され、成熟タンパク質から欠失している。上記実施形態の別の態様では、一次エフェクター分子は、OmpA融合タンパク質のN末端にあるため、融合タンパク質が安定している限り、使用したOmpAの膜貫通ドメインの数は、一次エフェクター分子の位置決定にとって重要ではなくなる。上記実施形態のさらに別の態様では、一次エフェクター分子は、OmpAのNおよびC末端ドメインの間に配置し、これによって、可溶性周辺細胞質タンパク質は、周辺細胞質内の周辺細胞質プロテアーゼによる切断の際に、一次エフェクター分子を含有する。この実施形態の特定の態様では、周辺細胞質一次エフェクター分子を発現する細菌ベクターは、BPRも共発現することにより、細菌細胞からのエフェクター分子の放出を増強する。

10

【0180】

本発明の別の実施形態では、一次エフェクター分子を含むOmpA融合タンパク質部分は、細胞外細菌表面にある。該実施形態の一態様では、融合タンパク質は、一次エフェクター分子のN末端に位置するOmpAの偶数または奇数の膜貫通ドメインを含む。上記実施形態の別の態様では、一次エフェクター分子をOmpAの2つの細胞外ループ間に配置して、細菌細胞による腫瘍細胞への表示を達成する。具体的実施形態では、本発明は、細菌細胞外表面に位置するエフェクター分子融合タンパク質の発現プラスミドを提供する。例えば、Trc(lpp)ompAと称されるプラスミドは、切断型ompA膜貫通配列に融合したtrcプロモーター駆動リポポリタンパク質(lpp)アンカー配列を含む。別の例として、上記プラスミドは、Trc ompAと称し、trcプロモーター駆動ompAコードシグナル配列を含む。このようなプラスミドは、本発明の1以上のエフェクター

20

30

【0181】

場合に依りて、エフェクター分子は、腫瘍に豊富に存在するメタロプロテアーゼまたはセリンプロテアーゼの共通切断部位に先行されるか、もしくは該部位と隣接させることにより、腫瘍環境にエフェクター分子の放出を起こす。一次エフェクター分子が、プロテアーゼ切断部位に先行されるか、隣接させるかは、それぞれ、融合タンパク質内の末端に位置するか、内部に位置するかによる。

【0182】

同様の融合タンパク質は、OmpAに関して前述した戦略を使用し、任意のOmp様タンパク質と構築することができる。このような融合タンパク質の構築に際して、当業者には明らかかなように、エフェクター分子に融合させるOmp様タンパク質部分の選択は、エフェクター分子の発現のために望ましい位置(例えば、周辺細胞質に、細胞外に、膜に結合して等)に依りて異なる。一次エフェクター分子に関して、本明細書に記載したこのようなタンパク質構築は、二次エフェクター分子に対しても適切である。

40

【0183】

好ましい実施形態では、エフェクター分子はフェリーペプチドに融合させる。融合タンパク質に用いられるフェリーペプチドは、その生成または導入の拡散範囲(diffusion limits)内で、実質的にあらゆる細胞へ、目的とするポリペプチドまたはペプチドの送達を促進することが明らかにされている(例えば、Bayley, 1999, Nature Biotechnology 17:1066-1067; Ferna

50

andezら、1998, *Nature Biotechnology* 16: 418 - 420; および Derossiら、1998, *Trends Cell Biol.* 8: 84 - 87)。従って、弱毒化腫瘍標的細菌が、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む融合タンパク質を発現するように、該細菌を操作することにより、エフェクター分子が腫瘍細胞によって取り込まれる能力を増強する。具体的実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む融合タンパク質をコードする核酸を発現するように操作する。別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む1以上の融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するように操作する。これらの実施形態によれば、エフェクター分子は、一次または二次エフェクター分子でよい。フェリーペプチドの例として、限定するものではないが、HIV TATタンパク質に由来するペプチド、アンテナペディアホメオドメイン（ペネトラキシン）、カポジ繊維芽細胞増殖因子（FGF）膜移行性配列（MTS）、単純ヘルペスウイルスVP22、ポリヒスタジン（例えば、ヘキサヒスタジン；6H）、ポリリシン（例えば、ヘキサリシン；6K）およびポリアルギニン（例えば、ヘキサアルギニン；6R）（例えば、Blankerら、1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8437 - 8442）が挙げられる。

10

【0184】

別の好ましい実施形態では、融合タンパク質は、シグナルペプチド、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む。この実施形態の具体的態様では、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナル配列、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む1以上の融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するように操作する。この態様によれば、エフェクター分子は、一次または二次エフェクター分子でよい。

20

【0185】

別の好ましい実施形態では、融合タンパク質は、弱毒化腫瘍標的細菌により固形腫瘍癌に送達するための、シグナルペプチド、タンパク質分解切断部位、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む。具体的実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナル配列、タンパク質分解切断部位、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む1以上の融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するように操作する。この態様によれば、エフェクター分子は、一次または二次エフェクター分子でよい。

30

【0186】

非制限的例として、コリシン活性は、HIV TAT、単純ヘルペスウイルスVP22、アンテナペディア、6H、6Kおよび6Rに由来する取り込み用ペプチドを添加することにより増強することができる。融合は、C末端、N末端または内部のいずれにおいても可能である。内部での融合は、N末端シグナル配列切断ペプチドの後に融合が続く場合、特に好ましい。融合タンパク質は、さらに、OmpA等のN末端シグナル配列、またはhlyA等のC末端シグナル配列を含む。

【0187】

好ましい実施形態では、エフェクター分子を毒素の送達部分に融合させる。様々な毒素が、自己送達能力を有することで知られており、その際、毒素の一部が、毒素の第2部分の送達因子として働く。例えば、Ballardら（1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12531 - 12534）は、哺乳動物細胞の細胞質ゾルコンパートメントへの致死因子（LF）および浮腫因子のエントリーを媒介する炭疽（anthrax）保護剤（PA）が、LFの切断型（LF_n；255アミノ酸残基）へのタンパク質融合物のエントリーも媒介できることを明らかにした。従って、本発明のエフェクター分子は、細胞の外部で機能するものを除き、LF_n、またはその他の毒素系（限定するものではないが、ジフテリア毒素A鎖残基1-193等）（Blankerら、1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8437 - 8442）、コレラ毒素、ペロ毒素、大腸菌熱不安定性毒素（LT）、大腸菌熱安定性毒素（ST）、腸溶血素、エンテロトキシン、細胞毒素、EaggEC安定性毒素1（EAST）、CNF、細胞致死性膨張毒素、溶血素、溶血素、およびSheA溶血素に融合

40

50

することができる（詳しくは、例えば、O'BrienおよびHolmes, 1996, Protein toxins of Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology, Neidhardtら（編）, ASM Press, ワシントンD.C., pp2788-2802参照）。具体的実施形態では、一次エフェクター分子を毒素の送達部分に融合する。別の具体的実施形態では、二次エフェクター分子を毒素の送達部分に融合する。

【0188】

細菌内で発現させるための融合タンパク質の構築は、当業者には公知であり、このような方法は、本発明の範囲に含まれる（例えば、Makrides, S., 1996, Microbiol. Revs 60:512-538を参照。尚、この文献は、参照により本明細書にその全文を組み入れる）。 10

【0189】

5.6 発現運搬体

本発明は1以上の一次エフェクター分子および1以上の任意の二次エフェクター分子をコードするよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。本発明はプラスミドまたはトランスフェクト可能な核酸にコードされるエフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。本発明の好ましい実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌はサルモネラ菌である。サルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌において2以上のエフェクター分子（例えば、一次または二次）が発現される場合には、エフェクター分子は同一のプラスミドもしくは核酸にコードされていてもよいし、または2以上のプラスミドもしくは核酸分子にコードされていてもよい。本発明はまた細菌ゲノムに組み込まれた核酸分子にコードされるエフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌も提供する。組み込まれるエフェクター分子はサルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌の内生のものであってもよいし、またはエフェクター分子をコードする核酸分子が弱毒化腫瘍標的細菌のゲノムに組み込まれるように、弱毒化腫瘍標的細菌に導入してもよい（例えば、プラスミド、トランスフェクト可能な核酸、トランスポゾンなどのようなエフェクター分子をコードする核酸の導入による）。本発明の好ましい実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌はサルモネラ菌である。本発明は適当なプロモーターに機能的に連結されている、エフェクター分子をコードする核酸分子を提供する。エフェクター分子をコードする核酸分子に機能的に連結されているプロモーターは同種（すなわち、天然のもの）または異種（すなわち、エフェクター分子をコードする核酸分子に対して天然のものでない）であっててもよい。 20 30

【0190】

本発明のエフェクター分子をコードするヌクレオチド配列またはその機能的に活性な類似体もしくは断片もしくはその他の誘導体は、挿入されたタンパク質をコードする配列の転写および翻訳のための必須エレメントを含む適当な発現運搬体、例えばプラスミドに挿入してもよい。必須転写および翻訳シグナルはエフェクター分子および/またはそのフランキング領域によって供給されてもよい。あるいは、発現運搬体は、DNA操作の分野で公知の種々の方法の1つを用いて、所望のタンパク質をコードする構造DNA配列を、好適な翻訳開始および終結シグナルとともに、機能性プロモーターと機能可能な読み取り相で挿入することによって構築する。概論として、Sambrookら, 1989, Molecular Biology: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubelら, 1995, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing, New York, NYを参照。これらの方法はin vitro組換えDNAおよび合成技術およびin vivo組換え（遺伝子組換え）を含み得る。本発明は適当なプロモーターに機能的に連結されている、エフェクター分子をコードする核酸分子を提供する。 40

【0191】

本発明はまた1以上の融合タンパク質および1以上の任意のエフェクター分子をコードするよう改変された弱毒化腫瘍標的細菌も提供する。本発明はプラスミドまたはトランスフ 50

エクト可能な核酸にコードされる融合タンパク質を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。サルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌において2以上の融合タンパク質および/またはエフェクター分子(例えば、一次または二次)が発現される場合には、融合タンパク質および/もしくはエフェクター分子は同一のプラスミドもしくは核酸にコードされていてもよいし、または2以上のプラスミドもしくは核酸にコードされていてもよい。本発明はまた細菌ゲノムに組み込まれた核酸にコードされる融合タンパク質を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌も提供する。本発明はまた適当なプロモーターに機能的に連結されている融合タンパク質をコードする核酸分子も提供する。本発明の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、挿入されたタンパク質をコードする配列の転写および翻訳のための必須エレメントを含む適当な発現運搬体、例えばプラスミドに挿入してもよい。

10

【0192】

本発明のある特定の実施形態では、本発明の発現運搬体はプラスミドである。当業者には多数の好適なプラスミドが知られており、また市販のものを入手して本発明の組換え構築物を作製することもできる。

【0193】

かかる市販のプラスミドとしては、例えば、pKK223-3(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)およびGEM1(Promega Biotec, Madison, WI, USA)が挙げられる。これらのpBR322「基幹」部分を適当なプロモーターおよび発現されるべき構造配列と組み合わせる。pBR322は低コピー数プラスミドであると考えられている。高レベルの発現を望む場合には、プラスミドは高コピー数プラスミド、例えば、pUC基幹を含むプラスミドであってもよい。pUCプラスミドとしては、限定されるものではないが、pUC19(例えば、Yanisch-Perronら、1985、Gene 33:103-119参照)およびpBluescript(Stratagene)が挙げられる。

20

【0194】

以下のプラスミドが例として挙げられ、本発明の方法とともに使用できる。細菌性:pBs、phagescript、phiX174、pbluescriptSK、pBsKS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a(Stratagene); pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5(Pharmacia)。pBR322「基幹」を含む市販のプラスミド、例えば、pKK223-3(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)およびGEM1(Promega Biotec, Madison, WI, USA)も使用できる。これらを適当なプロモーターおよび発現されるべき構造配列と組み合わせる。pCET、pTS(本明細書の第6節に記載されるような)。

30

【0195】

本発明の特定の実施形態では、エフェクター分子をコードするプラスミドは本明細書の第6節に記載されるpTS-TNF-プラスミド、pTS-BRPプラスミド、またはpTS-BRPTNF-プラスミドである。

【0196】

本発明の特定の実施形態では、OmpAシグナル配列および一次エフェクタータンパク質を含んでなる、細胞膜周辺腔への分泌のための本発明の融合タンパク質はプラスミドpIN-III-ompA-Hindにコードされており、これは一次エフェクター分子のコード配列がクローニングされ得るリンカー配列の上流にompAシグナル配列をコードするDNA配列を含む。好ましい特定の実施形態では、pIN-III-ompA-Hindベクターのlac誘導性プロモーターをpepTまたはtetプロモーターで置換する(Rentier-DeIruera(1988), Nuc. Acids Res. 16:8726参照)。

40

【0197】

本発明はまたエフェクター分子のトランスポゾン媒介性染色体組込みを提供する。本発明の方法には、エフェクター分子をコードする核酸がトランスポゾンカセット中に構築され

50

得る限り、当技術分野で公知のいずれのトランスポゾンプラスミドを用いてもよい。例えば、本発明はトランスポゾンまたはミニトランスポゾンおよびMCSを含んでなるトランスポゾンプラスミドを提供する。

【0198】

本発明のある実施形態では、本発明のプラスミドはトランスポゾンプラスミドである、すなわち、注目されるエフェクター分子をコードする配列が挿入されたトランスポゾンを含んでなる。トランスポゾンプラスミドはトランスポゾンカセットを含み、このカセットが細菌ゲノムに組み込まれる。従って、エフェクター分子またはその融合タンパク質をコードする核酸をトランスポゾンカセットに挿入する。このようにして、トランスポゾン挿入によりそのカセットが細菌ゲノムに組み込まれる。エフェクター分子のコード配列はプロモーターに機能的に連結していてもよいし、またはプロモーターなしでもよい。後者の場合には、選択マーカの発現は細菌ゲノムへのトランスポゾン挿入部位にあるプロモーターによってなされる。トランスポゾンが挿入された細菌のコロニーを本発明の要件に一致する発現レベルについて、例えば、腫瘍の細胞傷害性、静止、退縮を増強するのに十分なレベルのサイトカインを発現するものをスクリーニングする。

10

【0199】

ある実施形態では、トランスポゾンプラスミドがトランスポゾンの他に、トランスポゾンの逆位反復配列の外側に、トランスポゾンとともに運ばれることなく、トランスポゾンの細菌ゲノムへの挿入を触媒するトランスポザーゼ遺伝子を含んでなり、そのようにして安定なトランスポゾン挿入を有する細菌菌株を作製する。

20

【0200】

本発明に利用されるトランスポゾンとしては、限定されるものではないが、Tn7、Tn9、Tn10およびTn5が挙げられる。好ましい実施形態では、トランスポゾンプラスミドはTn10挿入エレメントの外側に位置するアンピシリン耐性遺伝子を有するpNK2883(ATCC)であり、1以上のエフェクター分子をコードする核酸が2個のTn10挿入エレメントの間(例えば、トランスポゾンカセット内)に挿入されている。好ましくは、構築物はその他のエレメントをコードするさらなる配列が2個のTn10挿入エレメントの間に挿入されるように作製する。特定の実施形態では、かかるエレメントは所望により(1)プラスミドを含む細菌の陽性選抜のための選択マーカ(例えば、SerC、AroAなど)のプロモーターのないコピー；(2)BRP遺伝子、(3)1以上の一次エフェクター分子(TNF-、またはその融合タンパク質、例えば、Omp-A-TNF-融合物など)をコードする核酸に機能的に連結されたエフェクター分子(trcなど)のプロモーター、(4)1以上のエフェクター分子をコードする核酸のターミネーターを含んでもよい。

30

【0201】

ある実施形態では、必要に応じてプラスミドを操作し、プラスミドにコードされるアンピシリン耐性特性を用いて所望の構築物を有するクローンを選抜した後、プラスミドの喪失によって抗生物質選抜が除去され、ヒト患者への投与のための染色体トランスポゾン挿入部分を有する菌株を選択する(例えば、選択培地にプレーティングすることによる)。

【0202】

もう1つの特定の実施形態では、標的特異性が変化したトランスポザーゼ遺伝子およびプロモーターのないserC遺伝子のコード配列およびMCSを含むミニトランスポゾンを含んでなるプラスミドpTSを用いる。もう1つの特定の実施形態では、標的特異性が変化したトランスポザーゼ遺伝子およびプロモーターのないserC遺伝子のコード配列、およびアルキル化剤誘導性バクテリオシン放出因子およびMCSを含むミニトランスポゾンを含んでなるプラスミドpTS-BRPを用いる。

40

【0203】

好ましい実施形態では、トランスポゾン媒介性染色体組込み体の選抜のためのトランスポゾンプラスミドは以下を含んでなる：

a) トランスポゾン挿入配列の外側に(例えば、トランスポゾンカセットの外側に)位置

50

するトランスポゾン切り出しおよび組込みのためのトランスポザーゼ遺伝子；

b) 細菌菌株において欠失した選択遺伝子（例えば、*serC*）に相当する野生型コード配列ならびにリボソーム結合部位および野生型遺伝子のターミネーター（ただし、プロモーターは欠く）。この配列は好ましくは左側のTN10トランスポゾン挿入配列の直後に位置する；

c) 所望により、右側および左側の挿入配列の間が放出増強核酸（例えば、BRP）をコードする核酸配列である；ならびに

d) 右側および左側の挿入配列の間に位置し、プラスミド内に唯一の制限部位を複数含む、エフェクター分子の組込みのためのマルチプルクロニング部位（MCS）。MCSは好ましくは放出増強核酸の直後（使用する場合には）、かつ、右側のTN10挿入配列の直前に位置する。

10

【0204】

もう1つの実施形態では、宿主染色体へのエフェクター分子のランダムな組込みに起因する遺伝子破壊により、エフェクター挿入の遺伝子位置の適性を確認する。

【0205】

さらにもう1つの実施形態では、発現運搬体は抗生物質選抜を必要としない安定な、すなわち、自己維持される染色体外プラスミドである。限定するものではないひとつの実施例では、自己維持型発現運搬体はサルモネラ病原性プラスミドである。

【0206】

例えば、本発明のある実施形態では、プラスミド選抜系をサルモネラ菌などの細菌が失っている機能を提供することで維持し、それに基づいて機能を有するサルモネラ菌をそうでないものから選抜することができる。ある実施形態では、本発明のサルモネラ菌は栄養要求性変異菌株であり、発現プラスミドは変異株すなわち生合成酵素機能が欠けたものを提供する。発現プラスミドを含むサルモネラ菌は細胞を所望の細胞、すなわち、発現プラスミドを含むもののみが代謝できる栄養素を欠く増殖培地で増殖させることで選抜できる。この実施形態の非常に好ましい態様では、最も好ましくは*asd*遺伝子の欠失によって、本発明のサルモネラ菌はDAP（メソ-ジアミノピメリン酸）を不可避に要求する。DAPはグラム陰性菌の周辺細胞質に存在するペプチドグリカンの構成要素であり、完全な細菌外膜に必要である。DAPがないと細菌細胞は外膜が完全でないために溶解してしまう。*asd*（-アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ）遺伝子はDAP生合成経路中の酵素をコードしている。*asd*機能を欠くグラム陰性菌は培養培地にDAPを供給することで増殖させられる。同種または異種プロモーターに機能しうる形で連結した*asd*遺伝子配列を保持するプラスミド、例えば、本発明の発現プラスミドはDAPの不在下で*asd*活性を欠くグラム陰性菌を増殖させることで選抜できる（例えば、Curtiss, IIIの米国特許第5,840,483号参照）。

20

30

【0207】

その他の非抗生物質選抜系が当技術分野で知られており、かつ、本発明の範囲内にある。例えば、安定な毒素とあまり安定でない抗毒素を含んでなるプラスミドを利用する選抜系を使用してかかるプラスミドを維持する細菌を選抜してもよい。

【0208】

もう1つの実施形態では、発現運搬体は非抗生物質的方法で選抜できる染色体外プラスミド、例えば、コリシンプラスミドである。本明細書において、コリシンプラスミドは最低限コリシン毒素および抗コリシンをコードし（コリシン毒素は抗コリシンよりもより安定である）、その結果、コリシンプラスミドを欠く細菌はいずれもコリシン毒素が継続する結果として死滅する。好ましい実施形態では、コリシン毒素はColE3の大サブユニットであり、抗コリシンはColE3の小サブユニットである。

40

【0209】

本発明のその他の実施形態では、発現運搬体はベクター、より詳しくは溶原性ベクターである。好ましい実施形態では、ベクターを含んでなる細菌宿主は30では機能的であるが37ではそうでない温度感受性リプレッサーをさらに含んでなる。従って、

50

細菌宿主は30で細菌細胞にとって毒性であり得る一次および/または二次エフェクター分子を発現せずに *in vivo* で増殖させ操作できる。細菌菌株の患者への導入の際には、リプレッサーは正常な体温により不活化され、一次エフェクター分子および所望により二次エフェクター分子の発現が活性化される。

【0210】

エフェクター分子または融合タンパク質をコードする核酸配列の発現は、エフェクター分子が組換えDNA分子で形質転換された細菌において発現されるよう第2の核酸配列によって調節できる。例えば、エフェクター分子の発現は当技術分野で公知のいずれかのプロモーター/エンハンサーエレメントによって制御できる。プロモーター/エンハンサーは同種(すなわち、天然のもの)または異種(すなわち、天然のものでない)であってもよい。細菌におけるエフェクター分子、例えば、サイトカイン、または融合タンパク質の発現を制御するために使用できるプロモーターとしては、限定されるものではないが、*lactamase* プロモーター(Villa-Kamaroffら, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731)、または *lac* プロモーター(DeBoerら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25; Scientific American, 1980, 242:74-94)などの原核生物プロモーターが挙げられる。本発明に包含されるその他のプロモーターとしては、限定されるものではないが、*lacI*、*lacZ*、*T3*、*T7*、*gpt*、*P_R*、*P_L*、*trc*、*pagC*、*sulA*、*polII* (*dinA*)、*ruv*、*recA*、*uvrA*、*uvrB*、*uvrD*、*umuDC*、*lexA*、*cea*、*caa*、および *recN* が挙げられる(例えば、Schnarrら, 1991, Biochimie 73:423-431参照)。好ましい実施形態では、プロモーターは *trc* である(例えば、Amannら, 1988, Gene 69:301-15参照)。

【0211】

一次エフェクター分子がSOS応答性プロモーターの制御下で発現されるコリシンである特定の実施形態では、弱毒化細菌菌株をコリシンの発現が増加するようX線、紫外線、アルカリ化剤または別のDNA損傷剤で処理してもよい。例示的SOS応答性プロモーターとしては、限定されるものではないが、*recA*、*sulA*、*umuC*、*dinA*、*ruv*、*uvrA*、*uvrB*、*uvrD*、*lexA*、*cea*、*caa*、*rccN*などが挙げられる。

【0212】

もう1つの好ましい実施形態では、プロモーターは腫瘍環境において増大した活性を有する、例えば、*pepT* 遺伝子のP1プロモーターなどの腫瘍の嫌気環境により活性化されるプロモーターである。P1プロモーターの活性化はFNR転写アクチベーターに依存している(Strauchら, 1985, J. Bacteriol. 156:743-751)。特定の実施形態では、P1プロモーターは嫌気条件下で *pepT200* プロモーターなどの天然のP1プロモーターよりも高レベルで誘導される変異体プロモーターであり、嫌気条件に応じてその活性がFNRではなくCRP-cAMPによって誘導される(Lombardoら, 1997, J. Bacteriol. 179:1909-1917)。もう1つの実施形態では、嫌氣的に誘導されるプロモーター、例えば、*potABCD* プロモーターを用いる。*potABCD* は嫌気条件下で *pepT* から分岐して発現されるオペロンである。*pepT* 遺伝子においてこの発現にあずかっているプロモーターは単離されており(Lombardoら, 1997, J. Bacteriol. 179:1909-1917)、本発明の方法に従って使用できる。

【0213】

あるいは、プロモーターはTn10トランスポゾンの *tet* プロモーターなどの抗生物質誘導性プロモーターであってもよい。好ましい実施形態では、*tet* プロモーターは例えば三倍に多量化されている。次いで、プロモーター活性は本発明の弱毒化腫瘍標的細菌で治療された患者に適当な用量のテトラサイクリンを投与することによって誘導される。t

tet誘導可能な発現系は最初にスチゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) (Faryar and Gatz, 1992, *Current Genetics* 21:345-349) および哺乳類細胞 (Lang and Feingold, 1996, *Gene* 168:169-171) などの真核細胞系について記載されたが、最近の研究はその適用を細菌細胞にまで広げている。例えば、Stiegerら (1999, *Gene* 226:243-252) はtetプロモーターに機能しうる形で連結される場合のtet誘導でホタルルシフェラーゼ遺伝子の80倍の誘導を示した。このプロモーターの利点は極めて低いレベルのテトラサイクリン、すなわち抗生物質活性に必要とされる用量の約1/10で誘導されるということである。

【0214】

ひとたび、エフェクター分子または融合タンパク質を含んでなるプラスミドを構築し、弱毒化腫瘍標的細菌に導入すれば、エフェクター分子発現または融合タンパク質発現は、限定するものではないが、生物学的活性、酵素活性、ノーザンプロット解析、およびウェスタンプロット解析をはじめとする当技術分野で公知のいずれかの方法によってアッセイできる (Sambrookら, 1989, *Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubelら, 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing, New York, NY参照)。

【0215】

5.7. 組合せ療法

ある実施形態では、固形癌腫瘍を治療するために弱毒化腫瘍標的細菌をその他の公知の癌療法とともに用いる。あるその他の実施形態では、固形癌腫瘍を治療するために1以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌をその他の公知の癌療法とともに用いる。例えば、1以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌を化学療法薬とともに使用してもよい。化学療法薬の例としては、限定されるものではないが、シスプラチン、イホスファミド、タキソールおよびパクリタキソールなどのタキサン、トポイソメラーゼI阻害剤 (例えば、CPT-11、トポテカン、9-AC、およびGG-211)、ゲムシタピン、ピノレルピン、オキサリプレチン、5-フルオロウラシル (5-FU)、ロイコボリン、ピノレルピン、テモダール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルチシン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトザントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびプロマイシン相同物、およびサイトキサンが挙げられる。あるいは、1以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌を放射線療法 (例えば、 γ 線またはx線照射) とともに使用してもよい。治療される癌の種類によっていずれの放射線療法プロトコルを用いてもよい。例えば、限定されるものではないが、x線を照射してもよく、特に、深い腫瘍には高エネルギーメガボルト (1 MeV エネルギー以上の照射) を用いてもよく、皮膚癌には電子ビームおよび正中電圧x線照射を用いてもよい。放射線に組織を曝露するためにラジウム、コバルトおよびその他の元素の放射活性アイソトープなどの線放射性ラジオアイソトープを投与してもよい。

【0216】

本発明は抗癌剤と弱毒化腫瘍標的細菌の逐次または同時投与を含む。本発明は、相加的または相乗的である、抗癌剤と弱毒化腫瘍標的細菌の組み合わせを包含する。

【0217】

本発明はまた、異なる作用部位を有する、1以上の抗癌剤と弱毒化腫瘍標的細菌の組み合わせも包含する。かかる組み合わせは、組み合わせが相乗的であろうと相加的であろうと

10

20

30

40

50

、これらの治療の二重作用に基づいて改善された治療法を提供する。従って、本発明の新規組合せ療法は単一薬剤療法として用いられるいずれかの薬剤よりも向上した効力をもたらす。

【0218】

本発明はまた抗癌剤と1以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌との逐次または同時投与を含む。本発明は、相加的であるか相乗的である、抗癌剤と1以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌との組み合わせを包含する。

【0219】

本発明はまた、異なる作用部位を有する、1以上の抗癌剤と、1以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌との組み合わせを包含する。かかる組み合わせは、組み合わせが相乗的であろうと相加的であろうと、これらの治療の二重の作用に基づいて改善された治療法を提供する。従って、本発明の新規組合せ療法は単一薬剤療法として用いられるいずれかの薬剤よりも向上した効力をもたらす。

【0220】

5.8 送達のための方法および組成物

本発明は、宿主に対する毒性を低下させた弱毒化腫瘍標的細菌によって、宿主の全身に送達されれば有毒であり得る1以上の一次エフェクター分子を腫瘍に局所的に送達できる方法を提供する。ある実施形態では、一次エフェクター分子は肉腫、リンパ腫、癌腫、またはその他の固形腫瘍癌を治療するのに有用である。ある限定するものではない実施形態では、エフェクター分子は腫瘍の部位での局所免疫応答の誘導に有用である。

【0221】

本発明によれば、1以上の一次エフェクター分子をコードする核酸分子を含む弱毒化腫瘍標的細菌ベクターおよび所望により1以上の一次エフェクター分子を、固形腫瘍癌を有するヒト患者をはじめとする動物において腫瘍の増殖を阻害するか、腫瘍の容積を減少させるか、または腫瘍細胞の蔓延を防ぐ方法に用いるのが有利である。

【0222】

本発明はかかる治療を必要とする動物に、1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された1以上の一次エフェクター分子をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を投与することを含んでなる、固形腫瘍癌の治療のための1以上の一次エフェクター分子の送達法を提供する。本発明はまたかかる治療を必要とする動物に、1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された1以上の一次エフェクター分子および1以上の二次エフェクター分子をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を投与することを含んでなる、固形腫瘍癌の治療のための1以上の一次エフェクター分子の送達法を提供する。ある実施形態では、一次エフェクター分子はTNFファミリーのメンバー、細胞傷害性ペプチドまたはポリペプチド、抗血管新生因子、腫瘍阻害酵素、またはその機能的断片である。

【0223】

本発明はかかる治療を必要とする動物に、1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された本発明の1以上の融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を投与することを含んでなる、固形腫瘍癌の治療のための本発明の1以上の融合タンパク質の送達法を提供する。本発明はまたかかる治療を必要とする動物に、1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された本発明の1以上の融合タンパク質および1以上のエフェクター分子をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を投与することを含んでなる、固形腫瘍癌の治療のための本発明の1以上の融合タンパク質および1以上のエフェクター分子の送達法を提供する。

【0224】

10

20

30

40

50

好ましい実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌はサルモネラ菌である。もう1つの実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は増強された放出系を含んでなる。好ましい実施形態では、動物は哺乳類である。高度に好ましい実施形態では、動物はヒトである。

【0225】

本発明はまたサルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌によって送達される、1以上の一次エフェクター分子と所望により1以上の二次エフェクター分子の組み合わせ送達を提供する。本発明はまた1以上の異なる一次エフェクター分子および/または所望により1以上の異なる二次エフェクター分子を保持する、異なる弱毒化腫瘍標的細菌の組み合わせ送達も提供する。

【0226】

本発明はまたサルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌により送達される、本発明の1以上の融合タンパク質の送達を提供する。本発明はまた、サルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌によって送達される、本発明の1以上の融合タンパク質と所望により本発明の1以上のエフェクター分子の組み合わせ送達を提供する。本発明はまた1以上の異なる融合タンパク質および/または所望により1以上の異なるエフェクター分子を保持する、異なる弱毒化腫瘍標的細菌の組み合わせ送達を提供する。

【0227】

固形腫瘍としては、限定されるものではないが、肉腫、癌腫および限定されるものではないが生殖細胞系腫瘍、中枢神経系の腫瘍、乳癌、前立腺癌、子宮頸癌、子宮癌、肺癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、星状細胞腫、神経膠腫、膵臓癌、胃癌、肝臓癌、大腸癌、黒色腫、腎臓癌、膀胱癌、および中皮腫をはじめとするその他の固形腫瘍癌が挙げられる。患者は好ましくは、限定されるものではないが、ウシ、ブタ、ニワトリ、イヌ、ネコ、ウマなどのような動物をはじめとする動物であり、好ましくは哺乳類であり、最も好ましくはヒトである。本明細書において、固形腫瘍の治療とは、限定されるものではないが、腫瘍増殖を阻害すること、腫瘍細胞増殖を阻害すること、腫瘍容積を減少させること、または腫瘍細胞の身体のその他の部分への蔓延(転移)を阻害することを含む。

【0228】

本発明は医薬上許容される担体および1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された1以上の一次エフェクター分子をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を提供する。本発明は医薬上許容される担体ならびに1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された1以上の一次エフェクター分子および1以上の二次エフェクター分子をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を提供する。

【0229】

本発明は医薬上許容される担体および1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された本発明の1以上の融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を提供する。本発明は医薬上許容される担体ならびに1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された本発明の1以上の融合タンパク質および1以上のエフェクター分子をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を提供する。

【0230】

本発明はまた医薬上許容される担体および弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物も提供する。本発明はまた医薬上許容される担体ならびに1以上の一次エフェクター分子および所望により1以上の二次エフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物も提供する。かかる組成物は治療上有効な量の、1以上の一次エフェクター分子および所望により1以上の二次エフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌ベクターならびに医薬上許容される担体を含んでなる。本発明はまた医薬上許容される担体ならびに本発明の1以上の融合タンパク質および所望により1以上のエフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌を含んでなる医薬組成物も提供する。かかる組成物は治療上有効な量の、本発明の1以上の融合タンパク質および所望により1

10

20

30

40

50

以上のエフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌ベクターならびに医薬上許容される担体を含んでなる。

【0231】

特定の実施形態では、「医薬（製薬）上許容される」とは、連邦または州政府の監督官庁によって承認された、または米国薬局方もしくは動物、より詳しくはヒトに使用するためのその他の一般に認められた薬局方に記載されていることを意味する。「担体」とはそれとともに治療薬が投与される希釈剤、佐剤、賦形剤、またはビヒクルを指す。かかる医薬担体は水および、ピーナツ油、ダイズ油、無機油、ゴマ油、オリーブ油などのような石油、動物、植物からのまたは合成起源のものをはじめとする油などの滅菌液体であってよい。医薬組成物が静脈投与される場合には生理食塩水が好ましい担体である。また、生理食塩水溶液および水性デキストロスおよびグリセロール溶液は特に注射用溶液のための液体担体として使用できる。好適な医薬賦形剤としてはデンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、胡粉、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノールなどが挙げられる。組成物は所望により少量の湿潤剤または乳化剤、またはpH緩衝剤を含んでもよい。これらの組成物は溶液、懸濁液、エマルション、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、徐法性製剤などの形態をとり得る。経口製剤は医薬等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどのような標準的な担体を含み得る。好適な医薬担体の例はE. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。かかる組成物は治療上有効な量の、精製された形態の治療用の弱毒化腫瘍標的細菌を、患者への適当な投与のための形態を提供する好適な量の担体とともに含む。製剤は投与様式に適合すべきである。

【0232】

好ましい実施形態では、組成物は慣例の手順に従ってヒト生命体への静脈投与に合わせた医薬組成物として処方される。典型的には、静脈投与用組成物は滅菌等張水性バッファ中の溶液である。必要であれば、組成物はまた沈殿防止剤および注射部位で痛みを和らげるにはリグノカインなどの局所麻酔剤を含んでもよい。一般に、成分は個別にまたは混合して単位用量形態で、例えば、有効薬剤の量を示すアンプルまたはサッシュなどの密閉容器中の凍結乾燥散剤または水を含まない濃縮物として供給される。組成物を点滴によって投与する場合には、滅菌医薬等級水または生理食塩水を含む点滴ボトルで調剤してもよい。組成物を注射によって投与する場合には、成分を投与前に混合できるよう注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルが提供され得る。

【0233】

固形腫瘍癌の治療または予防に有効である本発明の医薬組成物量は癌の性質によって異なり、標準的な臨床技術によって決定できる。さらに、所望により最適な用量範囲を確認するのを補助するために *in vitro* アッセイを使用してもよい。処方中使用される正確な用量は投与経路、および癌の重篤度によっても異なり、開業医の判断および各患者の状況に従って決定されるべきである。しかしながら、一般には、好適な用量範囲は約 1.0 c.f.u. / kg ないし約 $1 \times 10^{10} \text{ c.f.u. / kg}$; 所望により約 1.0 c.f.u. / kg ないし約 $1 \times 10^8 \text{ c.f.u. / kg}$; 所望により約 $1 \times 10^2 \text{ c.f.u. / kg}$ ないし約 $1 \times 10^8 \text{ c.f.u. / kg}$; 所望により約 $1 \times 10^4 \text{ c.f.u. / kg}$ ないし約 $1 \times 10^8 \text{ c.f.u. / kg}$; および所望により約 $1 \times 10^4 \text{ c.f.u. / kg}$ ないし約 $1 \times 10^{10} \text{ c.f.u. / kg}$ である。有効な用量は *in vitro* で得られる用量応答曲線または動物モデル試験系から推定できる。

【0234】

種々の送達系が知られており、本発明の医薬組成物を投与するために使用できる。導入方法としては、限定されるものではないが、皮内、筋内、腹腔内、静脈内、皮下、くも膜下腔内、鼻腔内、硬膜外、および経口経路が挙げられる。導入方法はまた腫瘍内（例えば、

腫瘍領域への直接投与による)であってもよい。

【0235】

組成物はいずれの便宜な経路で、例えば、点滴またはボラス投与によって、上皮または粘膜皮膚(例えば、口腔粘膜、直腸および腸粘膜など)を介する吸収によって投与してもよいし、その他の生物学的に活性な薬剤とともに投与してもよい。投与は全身性であっても局所であってもよい。さらに、本発明の医薬組成物を脳室内およびくも膜下腔内注射をはじめとするいずれかの好適な経路によって中枢神経系に導入することが望ましい場合もあり、脳室内注射は例えば、Ommayaリザーバーなどのリザーバーに取り付けた脳室内カテーテルによって容易になり得る。肺投与も例えば、吸入器または噴霧器およびエアロゾル化剤を含む処方の使用によって使用できる。

10

【0236】

特定の実施形態では、本発明の医薬組成物を治療を必要とする領域に局所的に投与することが望ましい場合もあり、これは例えば、限定されるものではないが、手術の際の局所注入、カテーテルによる注入、またはシアラスティック(sialastic)膜などの膜もしくは繊維をはじめとする多孔性、非多孔性、もしくはゼラチン状物質であるインプラントによって達成できる。ある実施形態では、悪性腫瘍または新生物もしくは新生物発生前組織の部位(または元の部位)に直接注射によって投与し得る。

【0237】

1以上の一次エフェクター分子および所望により1以上の二次エフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌は徐放システムで送達できる。本発明の1以上の融合タンパク質および所望により1以上のエフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌も徐放システムで送達できる。ある実施形態では、ポンプを使用する場合もある(Langer, 上記; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201(1987); Buchwaldら, 1980, Surgery 88:507; および Saudek ら, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574 参照)。もう1つの実施形態では、高分子材料を使用する場合もある(Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise(編), CRC Press., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball(編), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61(1983) 参照; Levyら, 1985, Science 228:190; Duringら, 1989, Ann. Neurol. 25:351; および Howardら, 1989, J. Neurosurg. 71:105 も参照)。さらにもう1つの実施形態では、徐放システムを治療標的、すなわち、全身用量の一部のみを必要とする脳の近くに置くこともできる(例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, 上記, 2巻, 115-138頁(1984) 参照)。

20

30

【0238】

その他の徐放システムはLanger(1990, Science 249:1527-1533)による総説で論じられており、1以上の一次エフェクター分子および所望により1以上の二次エフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌の投与と関連して使用できる。

40

【0239】

本発明はまた本発明の医薬組成物の1以上の成分を充填した1以上の容器を含んでなる医薬パックまたはキットを提供する。かかる容器に関しては、随意的に、医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関によって指示される形の通知がある場合もあり、この通知はヒト投与のための製造、使用または販売に関する機関による承認を反映している。

50

【0240】

本発明はまた本発明の医薬組成物および少なくとも1種のその他の既知の癌治療をそれを必要とする動物に投与することを含んでなる固形腫瘍の治療法を提供する。特定の実施形態では、固形腫瘍癌の動物に本発明の医薬組成物および少なくとも1種の化学療法薬を投与する。化学療法薬の例としては、限定されるものではないが、シスプラチン、イホスファミド、タキソールおよびパクリタキソールなどのタキサン、トポイソメラーゼI阻害剤（例えば、CPT-II、トポテカン、9-ACおよびGG-211）、ゲムシタピン、ピノレルピン、オキサリプラチン、5-フルオロウラシル（5-FU）、ロイコボリン、ピノレルピン、テモダール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルチシン、ドキシルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびプロマイシン相同物、およびサイトキサンが挙げられる。

10

【0241】

本発明は本発明の医薬組成物と化学療法薬などの抗癌剤の逐次または同時投与を含む。特定の実施形態では、本発明の医薬組成物を抗癌剤の投与前に（例えば、2時間、6時間、12時間、1日、4日、6日、12日、14日、1ヶ月または数ヶ月前）投与する。もう1つの特定の実施形態では、本発明の医薬組成物を抗癌剤の投与後に（例えば、2時間、6時間、12時間、1日、4日、6日、12日、14日、1ヶ月または数ヶ月後）投与する。特定の実施形態では、本発明の医薬組成物を抗癌剤と同時に投与する。本発明は、相加的または相乗的である、抗癌剤と1以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌の組み合わせを包含する。

20

【0242】

本発明はまた、異なる作用部位を有する、抗癌剤と1以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌の組み合わせも包含する。かかる組み合わせは、組み合わせが相乗的であろうと相加的であろうと、これらの治療の二重の作用に基づいて改善された治療法を提供する。従って、本発明の新規組合せ療法は単一薬剤療法として用いられる薬剤のいずれかよりも向上した効力をもたらす。

30

【0243】

ある実施形態では、固形腫瘍癌の動物に本発明の医薬組成物を投与し、かつ、放射線療法（例えば、線またはx線照射）で治療する。特定の実施形態では、本発明は放射線療法では効果がないと示されている癌の治療法または予防法を提供する。医薬組成物は放射線療法と同時に投与してもよい。あるいは、放射線療法を本発明の医薬組成物の投与後に、好ましくは医薬組成物の投与の少なくとも1時間、5時間、12時間、1日、1週間、1ヶ月、より好ましくは数ヶ月（例えば、3ヶ月まで）後に投与してもよい。

【0244】

本発明の医薬組成物の投与前、同時、またはその後投与される放射線療法は当技術分野で公知のいずれかの方法で投与できる。治療される癌の種類次第でいずれの放射線療法プロトコルを使用してもよい。例えば、限定されるものではないが、x線照射を投与してもよく、特に、深い腫瘍には高エネルギーメガボルト（1MeVエネルギーより高い照射）を用いてもよく、皮膚癌には電子ビームおよび正中電圧x線照射を用いてもよい。放射線に組織を曝露するためにラジウム、コバルトおよびその他の元素の放射活性アイソトープなどの線放射性ラジオアイソトープを投与してもよい。

40

【0245】

さらに、本発明はまた放射線療法があまりにも毒性を示すか、または示し得る、すなわち、治療を受けている患者にとって受け入れられないか、または耐えがたい副作用をもたらす場合に、放射線療法の代替として癌を医薬組成物で治療する方法を提供する。

50

【0246】

5.9 本発明の医薬組成物の治療または予防有用性の証明

本発明の医薬組成物はヒトにおける使用に先立って所望の治療または予防活性について好ましくは *in vitro* で、次いで *in vivo* で試験される。例えば、特定の医薬組成物の投与が指示されるかどうか決定するために使用できる *in vitro* アッセイとしては、患者組織サンプルを培養で増殖させ、医薬組成物に曝露するか、あるいはこれを投与し、かかる組成物の組織サンプルに対する作用を観察する、*in vitro* 細胞培養アッセイが挙げられる。

【0247】

本発明の医薬組成物は免疫細胞を試験医薬組成物または対照と接触させ、試験医薬組成物の免疫細胞の生物学的活性を調節する（例えば、増大させる）能力を調べることによって、活性化された免疫細胞を増強するその能力について試験できる。試験組成物の免疫細胞の生物学的活性を調節する能力はサイトカインまたは抗原の発現を検出すること、免疫細胞の増殖を検出すること、シグナル伝達分子の活性化を検出すること、免疫細胞のエフェクター機能を検出すること、または免疫細胞の分化を検出することで評価できる。これらの活性の測定には当業者に公知の技術を使用できる。例えば、細胞増殖は³H-チミジン取込みアッセイおよびトリパブルー細胞計数によってアッセイできる。サイトカインおよび抗原発現は、例えば、限定されるものではないが、ウェスタンブロット、免疫組織化学放射免疫アッセイ、ELISA（酵素免疫吸着アッセイ）、「サンドウィッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル内沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射線アッセイ、蛍光免疫アッセイ、タンパク質A免疫アッセイおよびFACS解析などの技術を用いる競合アッセイおよび非競合アッセイ系をはじめとする免疫アッセイによってアッセイできる。シグナル伝達分子の活性化は、例えば、キナーゼアッセイおよび電気移動度シフトアッセイ（EMSA）によってアッセイできる。T細胞のエフェクター機能は、例えば、⁵¹Cr放出アッセイによって測定できる（例えば、Palladinoら、1987、Cancer Res、47:5074-5079およびBlachereら、1993、J. Immunotherapy 14:352-356参照）。

【0248】

本発明の医薬組成物は癌を患う動物において腫瘍形成を低下させるその能力について試験できる。本発明の医薬組成物はまた固形腫瘍癌に関係する1以上の症状を軽減するその能力について試験できる。さらに、本発明の医薬組成物は固形腫瘍癌を患う患者の生存期間を延長するその能力について試験できる。当業者に公知の技術を用いて動物における本発明の医薬組成物の機能を分析できる。

【0249】

種々の特定実施形態では、固形腫瘍癌に関与する細胞種のうち代表的な細胞を用いて *in vitro* アッセイを実施し、本発明の医薬組成物がかかる細胞種に対して所望の作用を及ぼすかどうかを調べることができる。

【0250】

治療用の本発明の医薬組成物はヒトにおける試験に先立って、限定されるものではないが、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ブタ、イヌ、ウサギなどをはじめとする好適な動物モデル系で試験できる。ヒトへの投与に先立つ *in vivo* 試験のために、当技術分野で公知のいずれの動物モデル系を用いてもよい。

【0251】

以下の一連の実施例は例示のために示されるのであって、本発明の範囲を限定するものではない。

【0252】

6. 実施例：弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌によるTNF- の発現

以下の実施例は、TNFファミリーのメンバーをコードする核酸分子を含有する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌などの細菌がTNFファミリーのメンバーを発現できることを証明す

10

20

30

40

50

る。

【0253】

6.1 TNF - プラスミドの構築

本明細書に記載されるプラスミドは本発明の特定の実施形態の実施例を示すためのものである。当業者には明らかであろうが、trcプロモーターおよび/またはTNF - をコードする核酸などのプロモーターおよび/またはエフェクター分子をコードする核酸は当技術分野で公知の方法によってその他の適当なプロモーターまたはエフェクター分子で置換してもよい。

【0254】

trcプロモーターを用いる、エフェクター分子をコードする核酸のプラスミドに基づく細菌による発現のために、プラスミドTrc99A (Pharmaciaから市販されている)またはTrcHisB (In Vitrogenから市販されている)を用いた。両プラスミドとも開始コドンとしてのNcoI部位とそれに続くマルチプルクローニング部位を用いる。

【0255】

6.1.1. pCETプラスミド

二重 P_L または P_R プロモーターを用いるエフェクター分子をコードする核酸のプラスミドに基づく細菌による発現のために、以下のようにpCETプラスミドを構築した。プラスミドpCE33 (Elvinら, 1990, Gene 87:123-126)を逐次、制限酵素ClaIで切断し、mung beanヌクレアーゼで平滑末端とし、次いで制限酵素BamHIで切断した。次いで、得られた1.4kbの断片を2.1kbのpUC19 (GIBCOから市販されている)のSspI/BamHI断片に結合してプラスミドpCIを作製した。プラスミドpCIを制限酵素BamHIで切断し、mung beanヌクレアーゼで平滑末端とし、次いで制限酵素AflIIIで切断した。得られた3.1kbのバンドを単離した。プラスミドTrcHisBを制限酵素ClaIで部分消化し、T4DNAポリメラーゼで平滑末端とし、次いでAflIIIで切断した。次いで、得られたミニストロンおよびターミネーターを含む0.6kbのバンドを3.1kbのpCI断片に結合してプラスミドpCETを得た。pCETは、Trc99AまたはTrcHisBと同様に、開始コドンとしてのNcoI部位とそれに続くTrcHisBマルチプルクローニング部位を用いる。P_L または P_R プロモーターを含むいずれかのプラスミドを保持する細菌を30で増殖させた。

【0256】

6.1.2. pTSプラスミド

トランスポゾン媒介性染色体組込みおよびエフェクター分子をコードする核酸のセリン原栄養性選抜を行う、pTSと示されるプラスミドを以下のように構築した。プラスミドpNK2883 (American Type Culture Collection (ATCC)から市販されている)を制限酵素BamHIで切断し、4.8kbのバンドを単離した。配列GAAGATCTTCCGGAGGAGGGGAAATG (配列番号1)からなる正プライマーおよび配列CGGGATCCGAGCTCGAGGGGCCCGGGAAGGATCTAAGAAGATCC (配列番号2)からなる逆プライマーを用いるPCRによってネズミチフス菌 (Salmonella typhimurium) 株14028 (ATCCから市販されている)からネズミチフス菌serCをコードする核酸を単離した。PCR反応混合物を制限酵素BglIIおよびBamHIで切断し、1.1kbのPCR産物を単離して4.8のpNK2883断片に結合してpTSと示されるプラスミドを得た。serCをコードする核酸のすぐ3'側にエフェクター分子をコードする核酸の挿入のためのクローニング部位が存在した。

【0257】

6.1.3. pTS - TNF - プラスミド

trcプロモーターによって制御されるヒトTNF - をコードする核酸のpTS媒介性染色体組込みのために、プラスミド (pTS - TNF -) を以下のように構築した。プ

ラスミド P Y A 3 3 3 2 は、複製開始点が c o l E 1 プラスミド (例えば、B a z a r a l および H e l s i n k i , 1 9 7 0 , B i o c h e m 9 : 3 9 9 - 4 0 6 参照) の複製開始点で置換されている A S D プラスミド P Y A 2 7 2 である (例えば、C u r t i s s , I I I の米国特許第 5 , 8 4 0 , 4 8 3 号参照)。プラスミド P Y A 3 3 3 2 を制限酵素 N c o I で切断し、m u n g b e a n ヌクレアーゼで平滑末端とした。次いで、平滑末端とした断片を制限酵素 H i n d I I I で切断して 3 . 3 k b の DNA 断片を単離した。次いで、図 1 に示される大腸菌最適化ヒト T N F - をコードする核酸 (P e n n i c a r a , 1 9 8 4 N a t u r e 3 1 2 : 7 2 4 - 7 2 9 ; および S a l z t m a n r a , 1 9 9 6 , C a n c e r B i o t h e r a p y 1 1 : 1 4 5 - 1 5 3 参照) を制限酵素 N d e I で切断し、T 4 DNA ポリメラーゼで平滑末端とし、次いで、制限酵素 H i n d I I I で切断した。得られた 0 . 5 k b の断片を 3 . 3 k b の P Y A 3 3 3 2 断片に結合してプラスミド A s d 3 4 T N F - を得た。次いで、A s d 3 4 T N F - を制限酵素 B g l I I I で切断し、t r c プロモーターによって制御される T N F - をコードする核酸をコードする 1 . 1 k b の断片を p T S の B a m H I 部位に結合してプラスミド p T S - T N F - を得た。

10

20

30

40

50

【0258】

6.1.4. p T S - B R P プラスミド

B R P をコードする核酸のトランスポゾン媒介性染色体組込みおよびエフェクター分子をコードする核酸のセリン原栄養性選抜を行う、p T S - B R P と示されるプラスミドを以下のように構築した。配列 C C G A C G C G T T G A C A C C T G A A A A C T G G A G (配列番号 5) からなる正プライマーおよび配列 C C G A C G C G T G A A A G G A T C T C A A G A A G A T C (配列番号 6) からなる逆プライマーを用いる P C R によって B R P をコードする核酸をプラスミド p S W I (B i o 1 0 1 , V i s t a , C A から市販されている) から単離して T O P O - T A クローニングプラスミド (I n V i t r o g e n , C a r l s b a d , C A から市販されている) にクローニングして p B R P # 5 と示されるプラスミドを得た。プラスミド p B R P # 5 を制限酵素 A p a I および B a m H I で切断し、得られた B R P をコードする核酸を含む 0 . 6 k b のバンドを 5 . 9 k b の A p a I / B a m H I p r o t o - p T S 断片に結合してプラスミド p T S - B R P を得た。エフェクター分子をコードする核酸の挿入のためのクローニング部位は B R P をコードする核酸の 5 ' および 3 ' の両側に存在した。

【0259】

6.1.5. p T S - B R P T N F - プラスミド

B R P および t r c プロモーターによって制御される T N F - をコードする核酸の p T S 媒介性染色体組込みのために、プラスミド (p T S - B R P T N F -) を以下のように構築した。p T S - T N F - の構築のために上記に記載したプラスミド A s d 3 4 T N F - を制限酵素 B g l I I I で切断し、t r c プロモーターによって制御される T N F - をコードする核酸をコードする 1 . 1 k b の断片を p T S - B R P の B a m H I 部位に結合してプラスミド p T S - B R P T N F - を得た。

【0260】

6.2. エフェクター分子をコードする核酸のサルモネラ菌宿主染色体への組込み 本明細書に記載される系は、セリンまたはグリシン栄養要求性の s e r C - サルモネラ菌株および活発に転写される領域への染色体組込みの際にセリン/グリシン原栄養性を回復するプラスミドを用いる。しかしながら、染色体組込み体を選抜するためにその他の選択マーカーを使用してもよいということは当技術分野では十分に知られており、かかるマーカーは本発明の範囲内にある。例えば、K l e c k n e r r a , 1 9 9 1 , M e t h . E n z y m o l . 2 0 4 : 1 3 9 - 1 8 0 参照。

【0261】

エフェクター分子をコードする核酸を含む p T S または p T S - B R P プラスミドを化学的形質転換およびエレクトロポレーションをはじめとする当技術分野で十分に公知のいくつかの手段によって s e r C - サルモネラ菌株に導入してもよい。エフェクター分子をコ

ードする核酸の導入後、サルモネラ菌をアンピシリン含有増殖培地で最小限2時間、より好ましくは6時間以上増殖させる。次いで、セリン原栄養性の細菌を選抜できる培地、例えば、M56培地、Atlas, R. M. 「Handbook of Microbiological Media」 L. C. Parks, 編, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1993に細菌をおく。エフェクター分子をコードする核酸の染色体組込みを有する細菌は選抜培地で増殖できる。次いで、エフェクター分子をコードする核酸の発現を以下に示されるように測定する。エフェクター分子をコードする核酸の発現は酵素活性、生物学的活性、ノーザンブロット解析、またはウェスタンブロット解析などの当業者に公知のいくつかの方法のいずれかで測定してもよい。

【0262】

10

6.2.1. サルモネラ菌によって発現されたTNF- の送達および発現

上記のように、trcプロモーターによって制御されるTNF- をコードする核酸をpTS-BRPのBamHI部位に挿入してpTS-BRPTNF- と示されるプラスミドを得た。当技術分野で公知の標準的な方法によって、プラスミドpTS-BRPTNF- を、遺伝形質がmsbB、purI、serC(図2)となるようにserC-として構築したネズミチフス菌の弱毒化菌株、菌株VNP20009(国際特許WO99/13053参照)にエレクトロポレーションした。メカニズムについて限定するものではないが、プラスミドの細菌ゲノムへの組込みによりserCをコードする核酸の活性化が可能となり、serC⁺表現型をもたらす。従って、エレクトロポレーションした細菌をアデニンを添加したM56寒天プレートにプレーティングすることでTNF- をコードする核酸の染色体組込みを有する細菌を選択した。細菌を、プラスミドの喪失および同時にプラスミドに基づくTNF- 発現の喪失を示す、アンピシリン耐性の喪失についてさらに特性決定した。

20

【0263】

本発明の腫瘍を標的とする細菌によるTNF- の発現を調べて定量するために、TNF- をコードする核酸の染色体組込みを有するサルモネラ菌を一晩増殖させ、培養物の測定したサンプルをウェスタンブロット解析に用いた。特に、pTS-BRPTNF- クローン2と示される代表的なserC⁺アンピシリン感受性クローンからのTNF- の発現が図3に示されている。ウェスタンブロット解析により、 3.9×10^7 cfuのpTS-BRPTNF- クローン2細菌に相当する(レーン1)細菌タンパク質が50ngより多いTNF- を発現するということが示され(レーン5)、このことは10ng/10⁷細菌より多いレベルでのTNF- の発現を示唆する。従って、ヒトTNF- は、サルモネラ菌において、染色体に組み込まれた、trcプロモーターによって制御されるTNF- をコードする核酸から上手く発現された。

30

【0264】

7. OMPA融合タンパク質を発現する弱毒化腫瘍標的細菌

種々のシグナルペプチドへの融合によるタンパク質の周辺細胞質局在化はシグナルペプチドとタンパク質の双方に依存している。例えば、タンパク質はタンパク質のアミノ末端へのシグナルペプチドの融合によって細菌の細胞周辺コンパートメントに局在化され得る。限定することはないが、周辺細胞質局在化は、細菌の成分(タンパク質など)が周囲の環境に放出されるために単一の膜のみを通過すればよいので、細菌の成分の放出を促進すると考えられている。対照的に、細胞質内局在化は、成分が周囲の環境に放出されるためには細菌の内膜と外膜の双方を通過することを要求する。さらに、特定のタンパク質の周辺細胞質局在化は生物学的活性を補助する場合もある。

40

【0265】

本発明のエフェクター分子を周辺細胞質に向けるためには当技術分野で公知の種々の方法を使用できる。本実施例はTNF-、TRAIL(TNF- 関連アポトーシス誘導性リガンド)、およびインターロイキン-2(IL-2)などのエフェクター分子のアミノ末端へのompAシグナルペプチドの融合が周辺細胞質局在化とその後のタンパク質のプロセッシングをもたらすということを証明している。

50

【0266】

7.1. OMPA-TNF-融合タンパク質のプロセッシング

4種の異なるクローンにおけるTNF-発現、すなわちJM109細菌においてプラスミドに基づくtrcプロモーターによって動かされるompA-TNF-融合タンパク質の発現を全細胞溶解物のウェスタンブロット解析によって調べた。周辺細胞質に局在する酵素であるシグナルペプチダーゼによる前駆体融合タンパク質の成熟TNF-への切断によって周辺細胞質局在が証明された。4種のクローンすべてにおいて、IPTGでの誘導後のTNF-の過剰発現により、TNF-が、プロセッシングされていない型とプロセッシングされた型の双方に対応する約20kdで移動する二重線として現れた(図5、レーン4~7)。比較のために、染色体に組み込まれたTNF-をコードする核酸を有する成熟(プロセッシングされた)型のTNF-を発現するサルモネラ菌株を正の対照として用いた(図5、レーン3)。TNF-をコードする核酸を欠いている細菌ではTNF-発現は検出されなかった(図5、レーン2)。

【0267】

これらの結果は、成熟ヒトTNF-タンパク質の大腸菌ompAシグナルペプチドへの融合(図4に示されるような)は大腸菌で発現される場合には周辺細胞質局在およびプロセッシングもたらすということを証明する。さらに、分泌されるタンパク質の過剰発現が細菌宿主にとって毒性であるかどうかは、正常な分泌組織が圧倒的に多いためにわからなかった。プロセッシングされたompA-TNF-融合タンパク質の発現についてのこの証明は正常な分泌組織は分泌されるタンパク質の高レベル発現に適応できるということを示唆した。

【0268】

7.2. OMPA-TRAIL融合タンパク質のプロセッシング

ompAシグナルペプチドのTNFファミリーのメンバーを周辺細胞質に局在させる能力を、TNFファミリーのもう1つのメンバーであるTRAIL(TNF-関連アポトーシス誘導性リガンド)にまで拡張した。これらの実験のために、ヒトTRAIL(hTRAIL)の成熟型をコードする、trcプロモーターによって動かされるTRAILをコードする核酸をompAシグナルペプチドのコード配列に融合した(図6に示されるように)。一方はNcoI部位をコードし、もう一方はNdeI部位をコードする2種の異なるompA/TRAIL接合点を調べた(NdeIを含む配列については図6参照)。両種のクローンのウェスタン解析が図7に示されている。抗hTRAIL抗体を用いるウェスタンブロット解析によってNcoI接合したompA-TRAILを過剰発現する細菌はhTRAILのプロセッシングされた型(28.2kd)とプロセッシングされていない型(30.2kd)の双方を発現し(図7、レーン2~4)、他方、NdeI接合したompA-TRAILを過剰発現する細菌はもっぱらプロセッシングされた型を発現する(図7、レーン4~7)ということが示され、このことはNdeI接合がより効率的なプロセッシングをもたらしたということを示唆する。

【0269】

これらの結果は、成熟ヒトTRAILタンパク質の大腸菌ompAシグナルペプチドへの融合は周辺細胞質局在およびプロセッシングをもたらすということを証明した。さらに、分泌されるタンパク質の過剰発現が細菌宿主にとって毒性であるかどうかは正常な分泌組織が圧倒的に多いためにわからなかった。プロセッシングされたompA-TRAIL融合タンパク質の発現についてのこの証明は正常な分泌組織は分泌されるタンパク質の高レベル発現に適応できるということを示唆した。

【0270】

7.3. OMPA(8L)-IL-2融合タンパク質のプロセッシング

二次エフェクター分子(IL-2)を融合タンパク質として発現させた。成熟(C125A)hIL-2の、TNF-およびTRAILについて上記で用いたような、野生型ompAシグナル配列への融合ではIL-2のプロセッシングが可能にならなかった。ヒトIL-2サイトカインの周辺細胞質局在およびプロセッシングを調べるために、成熟ヒト(

C125A) IL-2を図8に示されるように、ompA(8L)と示される改変ompAシグナルペプチドに融合させた。改変ompAシグナルペプチドはompAシグナルのアミノ酸6~17を図8に示されるもので置換することによって改変した。発現およびプロセッシングが図9に示されている(レーン6および7)。各レーンは単一のクローンを表す。ウェスタンブロット解析の結果はompA(8L)シグナルペプチドを用いることで、事実上完全なプロセッシングが認められるということを示した(図9、レーン6および7)。

【0271】

7.4. PHOA(8L) - IL-2 融合タンパク質のプロセッシング

ヒトIL-2の周辺細胞質局在およびプロセッシングについて第2の融合タンパク質を調べ、7.3.節の融合タンパク質と比較した。図10中で、phoA(8L)と示される改変phoAシグナルペプチドに融合した成熟ヒト(C125A)IL-2の発現およびプロセッシングを調べた。発現およびプロセッシングが図9に示されている。ompA(8L)シグナルペプチドを用いてより完全なプロセッシングが認められたのに対し(図9、レーン6および7)、合成phoA(8L)シグナルペプチドでは部分的なプロセッシングしか認められなかった(図9、レーン4および5)。

【0272】

これらの結果はIL-2の局在およびプロセッシングが異なるシグナルペプチドによって提供されたということを示す。この結果はまた、種々のシグナルペプチドへの融合によるタンパク質の周辺細胞質局在はシグナルペプチドとタンパク質の双方に依存しているということを示す。

【0273】

融合タンパク質研究の結果は、IL-2などの本発明の二次エフェクタータンパク質はompAまたはPhoAなどのタンパク質シグナルペプチドとの融合によって発現され、細菌の周辺細胞質に局在され得るということを示す。当業者には明らかであろうが、その他のシグナル配列を用いて利用され得るエフェクター分子の周辺細胞質局在を引き起こすこともできる。当業者にはさらに明らかであろうが、本発明のその他のエフェクター分子を本明細書の実施例に記載されるエフェクター分子と置換することもできる。

【0274】

8. 実施例：成熟型のTNF- を発現するサルモネラ(MSBB、PURI)の抗腫瘍効果

以下の実験は、一次エフェクター分子(例えば、TNFファミリーのメンバー)をコードする核酸を含むサルモネラなどの弱毒化腫瘍標的細菌は哺乳類腫瘍に一次エフェクターを送達することができ、腫瘍体積を減少させることを証明する。

【0275】

TNF- のネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)の抗腫瘍効果を高める能力は段階的なネズミ大腸38癌腫モデルで評価した。これらの実験では、大腸38腫瘍由来の1mm³の腫瘍断片をC57BL/6マウス腫瘍へ移植し、腫瘍を平均サイズ約0.3gまで増殖させ、この時、動物を以下の処理群(n=10)に無作為に配置した：1)無処理；2)ネズミチフス菌(msbB、purI、serC)(親株)；および3)pTS-BRPTNF-(上記の大腸2)。各群のマウスは処理しないか、あるいは適当な細菌株1×10⁶cfuの静脈注射を1回施した。細菌接種時から始め、毎週腫瘍サイズを測定した。

【0276】

TNF- を発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラを施した群では、処理後2週間で腫瘍の退縮が明白であり、処理後4週間以内に動物のうち6個体で完全な退縮が見られた(図11)。無処理群では腫瘍は徐々に大きくなったが、ネズミチフス菌親株(msbB、purI、serC)で処理した群の腫瘍は処理後3ないし4週の間部分的退縮を示したが、その後徐々に大きくなった(図11)。

【0277】

10

20

30

40

50

これらの結果は、弱毒化腫瘍標的サルモネラが T N F ファミリーのメンバーなどのエフェクター分子を発現して腫瘍へ送達できることを証明するものである。このようなサルモネラは腫瘍の治療に有用であり、T N F ファミリーのメンバーを発現しないサルモネラ親株と比較して腫瘍退縮の結果を増強する。

【0278】

染色体に組み込まれた核酸から T N F - を発現するサルモネラにより完全な腫瘍退縮が示されることは、染色体に組み込まれたエフェクター分子をコードするからから生物学的に有効な発現が生じるということを示す。

【0279】

9. 実施例：BRPを発現する細菌による核酸分子の送達の増強

BRP 活性がサルモネラなどの弱毒化腫瘍標的細菌からのプラスミドの放出を増強することを示すため、プラスミドならびに放出マーカー（AMP マーカーを有する p T r c 9 9 a）として用いられる第2のプラスミドに BRP を含んだ弱毒化腫瘍標的サルモネラ株を構築した。BRP の活性を評価するため、BRP を含む、あるいは含まないサルモネラを標準法による培養で増殖させた。次ぎに得られた上清から遠心分離および濾過によって残存する細菌を除去した後、明澄な上清をコンピテント細胞に加え、形質転換反応を行った。次ぎにこれらのレシピエント細胞を L B a m p 培地で平板培養し、AMP マーカープラスミドの取り込みを調べた。BRP を有する AMP 耐性コロニー数が増加していれば、より多くのプラスミドが BRP 発現株から培地へ放出されたことを示す。

【0280】

結果は以下の表2に要約されている。

【0281】

【表2】

プラスミド	Amp の平均数 コロニー／形質転換
pTrc99a 単独	125
pTrc99a+BRP (pSW1)	383

【0282】

これらの結果は BRP が存在すると培地へ分泌される amp プラスミドの量が増えたことを示している。このように、BRP 発現細胞由来上清の「レシピエント細胞」への形質転換ではコロニー数が増える。これらの結果は、BRP が核酸プラスミドを含む二次エフェクター分子の放出を増強したことを示す。従って、これらの結果は、BRP がプラスミドの放出または DNA 送達に有用であることを示す。さらに、BRP を発現し、DNA を送達することができるこれらのサルモネラ株は集団として複製能を留めていた。

【0283】

10. 実施例：BRP 発現は弱毒化腫瘍標的サルモネラの腫瘍標的化能または腫瘍阻害能を損なわない

以下の実施例は、弱毒化腫瘍標的細菌が1以上のエフェクター分子と共に BRP を発現するよう操作して細菌の腫瘍標的能を阻害することなくエフェクター分子の腫瘍への送達を増強することができることを示す。

【0284】

固形腫瘍モデルは B 1 6 メラノーマ細胞を C 5 7 B L / 6 マウスの右後脚の腿に皮下注射することで得た。腫瘍の移植のために、トリプシン処理によりフラスコから細胞を解離させ、洗浄し、リン酸緩衝生理食塩水に 2.5×10^6 細胞 / ml で懸濁させた。細胞懸濁液 0.2 ml アリコート（総数 5×10^5 細胞 / マウス）を第0日目に注射した。腫瘍の体積が 150 ないし 200 mm³ に達した際（移植後約10日）、マウスを無作為に10個体の群に分け、各群に異なる処理を施した。対照群（図12の曲線#1）には0.2 ml の P B S を施した。別の群にはサルモネラ V N P 2 0 0 0 9 の弱毒化腫瘍標的株 2×10^6 c . f . u . / マウスを含有する 0.2 ml を施した（図12の曲線#2）。第3の

10

20

30

40

50

群には、その天然プロモーターの制御下にBRP遺伝子を含むプラスミドであるpSW1を含む弱毒化腫瘍標的サルモネラ株 2×10^6 c.f.u./マウスを含有する0.2 mlを施した(図12の曲線#3)。BRP遺伝子は大腸菌内ではSOS誘導性である。しかしながら本発明者らは、メカニズムは特定できないが、BRP遺伝子はサルモネラ菌内では部分的に構成的であり、低レベルから中レベルのBRPタンパク質を産生するが、腫瘍環境におけるSOSの性質によってその産生はさらに増強すると信じている。BRP発現VNP20009サルモネラを注射したマウスは非BRP発現VNP20009を注射したものとほぼ同様の抗腫瘍応答を示したが、このことはこれらのサルモネラ菌の生存または腫瘍標的化能がBRPの発現によって変化しないし、腫瘍増殖阻害能も変化しないことを示している。弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌におけるBRP発現の結果は分泌型HSVチミジンキナーゼ(HSV-TK)の発現の効果と対照的である。HSV-TKの発現はVNP20009の腫瘍阻害能の欠損をもたらす(Pawelekら, 1997, Cancer Res. 57:4537-4544)。このようにBRP系はさなる改変を伴わずに一次および/または二次エフェクター分子の腫瘍への送達を増強するのに使用できる。

10

【0285】

11. 実施例：pepTプロモーター発現運搬体

この実施例はサルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌におけるpepTプロモーターの制御下、-galなどのレポーターをコードする核酸分子の*in vitro*および*in vivo*発現を示す。

20

【0286】

11.1 実施例：pepT-BRP-GAL発現プラスミドの構築

pepTプロモーターは、以下のプライマー：

フォワード：5' - AGT CTA GAC AAT CAG GCG AAG AAC GG - 3' (配列番号15)

リバーズ：5' - AGC CAT GGA GTC ACC CTC ACT TTT C - 3' (配列番号16)

を用いて、単離した野生型ネズミチフス菌(ATCC14028)のコロニー由来の領域のPCR増幅によりクローニングした。

【0287】

PCR条件は、95℃にて5分間を1サイクル、95℃にて1分間、65℃にて1分間、72℃にて2分間を35サイクル、および72℃にて10分間を1サイクルであった。このPCR産物をPCR2.1クローニングベクター(Invitrogen, Carlsbad, California)へクローニングし、PepT/PCR2.1と名付けた。

30

【0288】

このPepT/PCR2.1ベクターをNcoIおよびXbaIで切断した。PepT断片をゲルで単離し、同じ酵素で切断した-gal Z termベクターへ連結した。Z term(Temporary Genbank Bankit No. 296495)は、GalオープンリーディングフレームをpUC19へクローニングすることによって作製されたプロモーターのない-galプラスミドである。得られたプラスミドをpepT-GALと名付けた。

40

【0289】

11.2 pepT-GALの*in vitro*発現とpepT-GAL活性の測定

pepT-GALを担持するサルモネラ株YS1456(図13AのCC14;この菌株の遺伝構成についてはWO96/40238参照)またはVNP20009(図13AのCC16)を嫌気または好気条件のいずれかの下でOD₆₀₀が~0.5ないし0.8まで増殖させた。-gal活性はBirgeおよびLow(1974, J. Mol. Biol. 83:447-457)の方法で測定した。結果は図13Aに示しているが、嫌気条件下での細菌の増殖時の-gal活性が約1.4ないし2.4倍誘導されたことを

50

示す。

【0290】

11.3 pepT - GALのin vivo発現とpepT - GAL活性の測定
 pepT - gal発現プラスミド、BRP発現プラスミド(BIO101由来のpSW1 (Vista, California)、これはその天然プロモーターの制御下にpClODF13 BRPコード配列を含む)、または双方の発現プラスミドを担持するサルモネラ株YS1456の細胞を腫瘍担持マウスに静脈注射した。注射後5日目に腫瘍および肝臓をホモジナイズし、細菌を単離してpepT - galおよび/またはBRPのプラスミドの存在がこれらの細菌の腫瘍標的化能を阻害しなかったことを示した。さらに、腫瘍および肝臓ホモジネートを用いて - gal活性を測定し、活性型 - galがin vivoで測定可能かどうか、またpepTプロモーターが嫌気性腫瘍環境において誘導されるかどうかを調べた。結果は図13Bに示されており、腫瘍環境における極めて高レベルのpepTプロモーター活性を示す。バックグラウンドレベルに対して肝臓の - gal発現における有意な増強は見られず、これは好気性の肝臓環境におけるpepTプロモーターの低活性および/または細菌ベクターの肝臓への標的化能が低いことに帰因するものと思われる。

【0291】

12. 実施例：テトラサイクリン誘導発現系

この実施例はサルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌のtetプロモーターの制御下にある - galなどのリポーター遺伝子をコードする核酸分子の発現を示す。

【0292】

tetプロモーターは以下のプライマー：

フォワード：5' - GGA TCC TTA AGA CCC ACT TTC ACA TTT AAG - 3' (配列番号17)

リバーズ：5' - GGT TCC ATG GTT CAC TTT TCT CTA TCA C - 3' (配列番号18)

を用いてPCR増幅によりミニ-TN10トランスポゾンからクローニングした。

【0293】

PCR条件は以下の通りであった：95にて5分間を1サイクル、95にて1分間、60にて1分間、72にて2分間を35サイクル、および72にて10分間を1サイクル。

【0294】

~400bpのPCR断片をゲルで単離し、PCR2.1ベクター(Invitrogen)にクローニングした。PCR2.1/tetプロモーターベクターをNcoIおよびBamHIで切断した。この~400bpのtetプロモーター断片をゲル単離し、同じ2酵素で切断したプロモーターのない - galベクター-Ztermに連結した。連結混合物を形質転換し、形質転換した細菌をテトラサイクリン/X-galプレート上で平板培養した。陽性コロニーを青色を基に単離した。いくつかの陽性コロニーからの抽出物を作製し、BirgeおよびLow(1974, J. Mol. Biol. 83:447-457)の方法によりテトラサイクリンの存在下での - gal活性に関してアッセイした。1つのクローンを単離し、一定の範囲のテトラサイクリン濃度にわたって - gal発現に関してアッセイした。アッセイの結果はテトラサイクリンによって用量依存的に - gal活性が誘導されることを示し、図14に示されている。

【0295】

13. 実施例：エンドスタチンを発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌による腫瘍増殖の阻害

以下の実施例はエンドスタチンを発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌の作製、およびin vivoにおけるかかるサルモネラ菌による腫瘍治療の効果を示す。

【0296】

13.1 エンドスタチン発現プラスミドの構築

10

20

30

40

50

エンドスタチンは、以下のプライマー：

フォワード：5' - GTG TCC ATG GGG CAC AGC CAC CGC GAC
TTC CAG - 3' (配列番号19)

リバース：5' - ACA CGA GCT CCT ACT TGG AGG CAG TCA
TGA AGC T - 3' (配列番号20)

を用いてヒト胎盤cDNAライブラリーからPCR増幅した。

【0297】

得られたPCR産物をPCR2.1ベクター(Invitrogen)へクローニングした。ヘキサヒスチジン-エンドスタチンは以下のプライマー：

フォワード：5' - GTG TCC ATG GCT CGG CGG GCA AGT GTC
GGG ACT GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAC AGC C
AC CGC GAC TTC - 3' (配列番号21) 10

リバース：5' - GTG CGG ATC CCT ACT TGG AGG CAG TCA
TGA AGC TG - 3' (配列番号22)

とともに、鋳型として上記で構築したプラスミドを用いてPCR増幅した。

【0298】

PCR増幅条件は、95にて5分間を1サイクル、95にて1分間、55にて1分間、72にて2分間を30サイクル、および72にて10分間を1サイクルであった。

【0299】

得られた産物はそのアミノ末端にペプチド配列MARRASVGT DHHHHHH (配列番号23)を有するヒトエンドスタチンをコードするNcoI(5')およびBamHI(3')制限部位を持つDNA断片であった。 20

【0300】

このPCR産物をNcoIおよびBamHIで切断し、550bpの産物をゲルで単離し、同じ酵素で予め切断したpTrc99Aベクターへ連結した。この連結反応産物を大腸菌DH5および弱毒化腫瘍標的サルモネラ株VNP20009へ形質転換した。

【0301】

ヘキサヒスチジン-エンドスタチンコード配列もまた、NcoI/BamHI断片として発現ベクターYA3334にクローニングした。YA3334はColeIの複製起点に置き換えられた複製起点を有する(BazaralおよびHelsinki, 1970, Biochem 9:399-406)asdプラスミドPYA272(Curtiss III, 米国特許第5,840,483号)である。陽性クローンから調製したプラスミドDNAを単離し、サルモネラ株8324へ形質転換し、これがasd変異を有するVNP20009である。この菌株はCurtiss III(米国特許第5,840,483号)に記載の方法に従って作製した。 30

【0302】

13.2 弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌によるエンドスタチンのin vitro発現
pTrc99A-ヘキサヒスチジン-エンドスタチンプラスミドを含む種々のサルモネラ菌VNP20009株および大腸菌DH5株を対数増殖中期(O.D.₆₀₀が~0.6ないし0.8)まで増殖させ、この時点で各培養物を分割し、一方にはtrcプロモーター活性の誘導のために0.1mM IPTGを施し、もう一方にはIPTGは施さなかった。さらに3時間増殖させた後、細菌抽出物を調製し、ヘキサヒスチジン-エンドスタチンの発現を抗ヒスチジン抗体(Clontech, Palo Alto, California)を用いてウエスタンブロット解析により確認した。図15Aおよび15Bはそれぞれ大腸菌DH5およびサルモネラ菌VNP20009におけるpTrc99A-ヘキサヒスチジン-エンドスタチン(HexHIS-エンドスタチン)の発現を示すウエスタンブロットの結果を示している。trcプロモーターはIPTGの不在下の大腸菌では活性は見られなかったが、同じプロモーターがサルモネラ菌では構造的に活性であった。ヘキサヒスチジン-エンドスタチンは約25kDの単一のバンドで現れ、これがこの融 40 50

合タンパク質の推定分子量である。

【0303】

ヘキサヒスチジン - エンドスタチン融合タンパク質は同様に、発現の支配に *t r c* プロモーターを利用する *Y A 3 3 3 4* プラスミドからも発現した。図 1 6 に示されているように抗ヒスチジン抗体を用いて推定分子量 2 5 k D a のタンパク質を検出した。図 1 6 では、サンプルが由来する全ての細菌培養物を 0 . 1 m M I P T G で 3 時間誘導した。

【0304】

1 3 . 3 C 3 8 ネズミ大腸癌に対するエンドスタチンを発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌の効果

2 × 2 × 2 m m ³ の体積の大腸 3 8 腫瘍断片を 9 週齢の雌 C 5 7 B L / 6 マウスに皮下移植した。腫瘍体積が 1 0 0 0 m m ³ に達した際、それらを摘出し、2 × 2 × 2 m m ³ の断片に切断した。これらの断片をもう 1 回一連のサイクルを経させ、得られた 2 × 2 × 2 m m ³ の断片を雌 C 5 7 B L / 6 マウスの右腿に皮下移植した。腫瘍体積が 1 5 0 ないし 2 0 0 m m ³ に達した際（移植後約 2 4 日後）、マウスを 1 0 個体 6 群に無作為に分け、各群に異なる処理を施した。1 つの対照群には 0 . 2 m l の P B S を施した。もう 1 つの対照群には対照 *a s d* プラスミド（すなわち、上記第 5 . 6 に記載のように *a s d* プラスミドは挿入されていない）を有する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌株 V N P 2 0 0 0 9 を 1 × 1 0 ⁶ c . f . u . 含む 0 . 2 m l を施した。第 1 の実験群には *a s d* プラスミドにおいてヘキサヒスチジン - エンドスタチン融合タンパク質を発現する V N P 2 0 0 0 9 を 1 × 1 0 ⁶ c . f . u . 含む 0 . 2 m l を施した。第 2 の実験群には第 1 の群と同じ発現構築物およびさらに発現される B R P を有する V N P 2 0 0 0 9 を施した。

【0305】

図 1 7 はこれらの実験の結果を示したものであり、ヘキサヒスチジン - エンドスタチンを発現する V N P 2 0 0 0 9 株による腫瘍抑制の効果を示す。処理後 6 0 日では、エンドスタチンを発現する V N P 2 0 0 0 9 サルモネラ菌の腫瘍サイズ中間値は、対照動物の腫瘍サイズ中間値の約 1 3 % であり、空のベクターを担持する V N P 2 0 0 0 9 サルモネラ菌で処理した動物の腫瘍サイズ中間値より 3 0 % 以上低かった。生き残った動物のうちの多くが、正味の腫瘍サイズの小さな変化によって示されるように腫瘍増殖にほとんど変化が無いことを示し、あるものは強い腫瘍抑制を示した。処理の浸透または効果が不十分なことが、エンドスタチン送達系が不十分であることに反映されている可能性が最も高い。このことは、エンドスタチンが封入体に集積することを見出している O ' R e i l l y ら（1 9 9 7 , C e l l 8 8 : 2 7 7 - 2 8 5 ）と合致する。エンドスタチン送達系は B R P の発現によって増強される。B R P の発現はその天然プロモーターによって制御されるが、通常は細菌で S O S 応答を示す。B R P 発現は対照集団の平均腫瘍体積の約 6 % まで平均腫瘍体積を小さくすることが示された。さらに、ヘキサヒスチジン - エンドスタチンおよび B R P で処理したマウス集団では、数個体のマウスが経時的に腫瘍体積に著しい減少を示し、腫瘍体積は最初の腫瘍体積の約 1 0 以下まで退縮した。B R P の効果は二重であると考えられ、1 つは B R P 自体が抗腫瘍活性を有すること、もう 1 つは B R P が周辺細胞質内容物の放出、およびエンドスタチンをはじめ細胞質内容物の放出をある程度は促進し、これが封入体でタンパク質が集積するのを防ぐということである。

【0306】

1 3 . 4 D L D ヒト大腸癌に対するエンドスタチンを発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌の効果

対数増殖期まで増殖させた D L D 1 細胞培養物にトリプシン処理を施し、P B S で洗浄し、P B S 中 5 × 1 0 ⁷ 細胞 / m l の懸濁液を再構成した。各々 5 × 1 0 ⁶ 細胞を含む単一の細胞懸濁液のアリコート 0 . 1 m l を 9 週齢の雌ヌードマウス（C h a r l e s R i v e r からの N u / N u - C D 1 ）の右腿に皮下注射した。マウスを各 1 0 個体 3 群に無作為に分けた後、注射後 1 0 ないし 1 5 日、または腫瘍体積が 2 0 0 ないし 4 0 0 m m ³ に達するまで同期化した。

【0307】

10

20

30

40

50

第1群のマウスは対照群であり、各々に0.3mlのPBS注射を施した。第2群のマウスには対照asdプラスミドを担持する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌VNP2を 0.009×10^6 c.f.u.含む0.3mlを施した。第3群のマウスにはヘキサヒスチジン-エンドスタチン融合タンパク質およびBRPを発現するasdプラスミドを担持する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌VNP20009を 1×10^6 c.f.u.含む0.3mlを施した。腫瘍をモニターし、1週間に2回測定した。図13は3処理の投与後の腫瘍体積をグラフで表したものであり、DL1ヒト大腸癌の増殖に対する、ヘキサヒスチジン-エンドスタチンを発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌の抑制作用が示されている。

【0308】

空のベクターPYA3332を担持するVNP20009は腫瘍増殖を有意に阻害することはできなかった。しかし、エンドスタチンおよびBRPを発現するVNP20009は腫瘍増殖を阻害することができた。これらの結果は、エンドスタチンとBRPの組合せがPYA3332ベクターを担持するVNP20009(8324株)のいずれかの抗腫瘍作用を増強することを示している。

【0309】

14. 実施例：弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌による抗血管新生因子の発現

以下の実施例は、サルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌を、抗血管新生因子トロンボスポンジンAHR、血小板第4因子およびアポミグレンを発現するように操作するために用いられる方法論を示す。

【0310】

14.1 トロンボスポンジンAHRをコードする核酸配列を含むプラスミドの構築

トロンボスポンジンの抗血管新生相同領域(AHR)に相当するペプチド配列TiP13.40: AYRWRLSHRPKTGFIRVVMYEG(配列番号24)(例えば、特許出願第C07K-14/78参照)を逆転操作し、サルモネラ菌での発現のためにコードンの至適化を行い、DNA配列:

GCGTACCGCTGGCGCCTGTCCCATCGCCCGAAAACC
CCGGCTTTATCCGCGTGGTGTATGTACGAAGGCTAAAggatccgac 3' (配列番号25)を得た。このペプチドを合成するため相補的オリゴヌクレオチド(オリゴ13:40-1およびオリゴ13:40-2)を作製した。5'末端において、OMPAのプロセッシング領域をコードする配列およびSpeI制限部位を付加した。3'末端において、BamHI制限部位とともに停止コドン(コドン)を付加した。この2つのオリゴをアニーリングして二本鎖DNA断片を作製した。このDNA断片をSpeI/BamHIで切断し、SpeI/BamHI切断ベクターpTrc801IL2に連結して、全長改変OmpAリーダー配列を含むプラスミドpTrc801-13.40を作製した。プロセッシングされると、この配列は完全長の13.40トロンボスポンジンペプチドとなる。

【0311】

オリゴ 13.40-1

5'gtgtactagtggtgagcagcgcgGCGTACCGCTGGCGCCTGTCCCATCGCCCGAAAACC
GGCTTTATCCGCGTGGTGTATGTACGAAGGCTAAAggatccgac 3' (配列番号26)

オリゴ 13.40-2

5'gagcggatccTTAGCCTTCGTACATCACCACGCGGATAAAGCCGGTTTTTCGGGC
GATGGGACAGGCGCCAGCGGTACGCGcgcctgcccacactagtacac 3' (配列番号27)

(制限部位はイタリックで示し、OmpAプロセッシング認識部位は下線で示す)

【0312】

14.2 血小板第4因子ペプチド(47-70)をコードする核酸配列を含むプラスミドの構築

血小板第4因子(PF-4; 例えばMaioneら, 1990, Science 24 50

7 : 77 - 79 および Jouanら, 1999, Blood 94 : 984 - 993 参照) の C 末端のアミノ酸残基 47 - 70 からなるペプチドを、サルモネラ菌での発現のためにコドンの至適化を行った。以下に示されるこのペプチドは、CFU - GM 始原細胞上で PF - 4 の活性阻害に關与する DLQ モチーフおよび主なヘパリン結合ドメインである塩基性アミノ酸クラスターを含む。

【0313】

血小板第4因子：

MSSAAGFCASRPGLLFLGLLLLPLVVAFASAEAEEDGDLQCLCVKTTSQV
RPRHITSLEVIKAGPHCPTAQLIATLKNRKCICLDLOAPLYKKIHKLLES
 (配列番号 28)

10

シグナルペプチド = 下線・太字

Ly s 61、62、65、66 = 主なヘパリン結合ドメイン (太字)

DLQ (7 - 9、54 - 56) = CFU - GM 始原細胞に対する阻害活性 (太字)

【0314】

このペプチドを合成するため、相補的オリゴヌクレオチド (オリゴ PF4 - 1 およびオリゴ PF4 - 2) を作製した。5' 末端において Omp A および Spe I 制限部位のプロセッシング領域コードする配列を付加した。3' 末端において、Bam H I 制限部位とともに停止コドン付加した。この2つのオリゴをアニーリングして二本鎖 DNA 断片を作製した。制限切断した後、この断片を Spe I / Bam H I で制限処理したベクター pTrc 801 に連結してプラスミド pTrc 801 - PF4 を作製した。プロセッシングされると、この配列は完全長の PF - 4 (47 - 70) ペプチドとなる。

20

【0315】

オリゴ PF4-1

5' cttcactagtggtgcccagccg AACGGCCGCAAAATCTGCCTGGACCTGCAGGCGCCGCT
 GTACAAAAAATCATCAAAAACTGCTGGAAAGCTAA *ggatcc gcg*3'
 (配列番号 29)

30

オリゴ PF4-2

5' *cgcgatcc* TTAGCTTTCCAGCAGTTTTTTTGATGATTTTTTTGTACAGCGGCGCCTG
 CAGGTCCAGCCAGATTTTGC GGCCGTT ggcctgcgccacactagtagaag3' (配列番号 30)

(制限部位はイタリックで示し、Omp A プロセッシング認識部位は下線で示す)

【0316】

14.3 アポミグレンをコードする核酸配列を含むプラスミドの構築

抗血管新生ペプチドアポミグレン

(I Y S F D G R D I M T D P S W P Q K V I W H G S S P H G V R L V D N Y C E A W
 R T A D T A V T G L A S P L S T G K I L D Q K A Y S C A N R L I V L C I E N S F
 M T D A R K (配列番号 31) ; 例えば、国際公報 WO 99 / 29856 参照) はコラーゲン XV のタンパク質分解断片であるレスチンの C 末端に相当する。オリゴヌクレオチド (オリゴ Apom 5 F およびオリゴ Apom 6 F) を、ヒト cDNA 由来の DNA 断片を増幅するように設計した。5' 末端において、Omp A のプロセッシング領域をコードする配列および Spe I 制限部位を付加した。3' 末端において、Bam H I 制限部位とともに停止コドン付加した。

40

【0317】

オリゴ Apom5F: 5'- ggcttc actagt gtggcgcaaggcg ATATACTCCTTTGATGGTCG -3'.

(配列番号 32)

オリゴ Apom6R: 5'- cgc ggatcc TTA~~CTT~~CCTAGCGTCTGTCATGAAACTG -3'

(配列番号 33)

(制限部位はイタリックで示し、OmpAプロセッシング認識部位は下線で示す)

【0318】

正確なサイズの断片を、鋳型として胎盤cDNAを用いてPCRによって得た。PCR産物をSpeI/BamHIで切断し、改変ompAシグナル配列を含むSpeI/BamHIで制限処理したベクターpTrc801に連結してプラスミドpTrc801-ApOmを作製した。プロセッシングされると、この配列はアポミグレンペプチドとなる。

【0319】

14.4 内皮細胞増殖を阻害するサルモネラ菌によって産生される抗血管新生ペプチド pTrcOmpA-エンドスタチン、pTrc801-PF4およびpTrc801-13.40プラスミドを弱毒化腫瘍標的サルモネラVNP20009株にエレクトロポレートした。pTrcOmpA-エンドスタチン、pTrc801-PF4およびpTrc801-13.40を発現するサルモネラ株を、Feldmanら, 2000, Cancer Res. 60:1503-1506およびBlezingerら, 1999, Nature Biotech. 17:343-348により記載されてように、抗増殖活性に関してスクリーニングした。各コロニーの培養物5mlを4時間増殖させた。100mg/mlゲンタマイシンを含有する1/20容量のHUVEC培地に細胞ペレットを再懸濁させ、3回連続して凍結/解凍サイクルを行うことで細胞溶菌液を作製した。この溶菌液を遠心分離して明澄化し、0.2mmのシリジフィルターを用いて濾過除菌した。この溶菌液25または50mlを、100ml基本培地2%FCSおよび10ng/mlFGFを含有する96ウェルプレート中のヒト静脈内皮細胞(HUVEC)に添加した。対照として空のpTrcベクターを含むサルモネラ菌を用いた。プレートを72時間インキュベートし、増殖をMSTアッセイによって測定した(Mosmanら, 1983, J. Immunol. Methods 65:55-63)。

【0320】

図19および20で得られた予備的結果は、サルモネラ菌によって産生された血小板第4因子ペプチド(PF4-2)、トロンボスポンジンペプチド13.40(13.40-3)およびエンドスタチンが40ないし60%の抗増殖活性を有すると思われることが示される。

【0321】

15. 実施例：弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌によるバクテリオシンファミリーのメンバーの発現

この実施例はバクテリオシンファミリーのメンバーをコードする核酸を含む、サルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌がバクテリオシンファミリーのメンバーを発現することができることを示す。

【0322】

15.1 COLE3プラスミドの構築

本明細書に記載のプラスミドは本発明の特定の実施形態の例を示すものである。当業者には明らかなように、trcプロモーターおよび/またはバクテリオシンをコードする核酸のようなプロモーターおよび/またはエフェクター分子をコードする核酸は、当業者に公知の方法によって他の適当なプロモーターまたはエフェクター分子と置き換えてもよい。

【0323】

15.1.1. pE3.シャトル-1(shuttle-1)中間体ベクタープラスミ

10

20

30

40

50

ド

pE3.シャトル-1は、複数のクローニング部位及びプラスミドベクターColE3-CA38(配列番号34)中へのクローニング/選択のためのlacZ断片を含むカセットを作製するために用いられる中間体ベクターを示す。BRPのE3へのクローニングを容易にするために、BRPを先ず中間体シャトルベクター上にクローニングした(図21)。このベクターは、染色体lacZ中の突然変異(群)を有する細菌株中のラクトースに関してクローンを選択するために使用できるlacZ断片を含んでいる。次いで、BRP断片を、lacZ相補性断片を含むカセットとして、E3プラスミドSmaI部位(図22)中にクローニングした。lacZ断片によって、このステップにおけるインサートの選択(すなわち、Lac+)が可能になる。天然に存在するE3プラスミドは、抗生物質選択マーカーを有していない(図23)が、プラスミドの存在の選択は、ハローアッセイ(halo assay; Pugsley, A. P. 及びOudega, B., "Colicin類及びそれらのプラスミドの研究方法(Methods for Studying Colicins and Their Plasmids)", 「Plasmids, a Practical Approach」1987, K. G. Hardy編集; Gilson, L.ら, EMBO J. 9:3875-3884)を用いることによって可能である。このシャトルベクターは、BRPのE3プラスミド上へのクローニングだけでなく、E3又はE3/BRPと組み合わせうる任意のDNAのクローニングをも容易にするはずである。次いで、新規なE3/BRPプラスミドを、41.2.9中に形質転換し、活性を試験した。予備的なハロー形成アッセイ(halo forming assay)によって、プラスミド上のBRPの存在が、この株のE3を産生する能力を妨害しないことが証明された。41.2.9 E3/BRPが、41.2.9 E3を超えて活性を増大させたか否かを判定するため、各株によって産生されたE3の致死ユニット量を測定した(図24)。41.2.9 E3/BRPは、41.2.9 E3単独よりも100%多い致死ユニットを産生し、これにより、この株が41.2.9 E3単独を超える増大した活性を有することが証明された。

【0324】

15.1.2. E3活性に関するハロー「穿刺」アッセイ(halo "stab" assay)

感受性試験株(SK522)を、OD₆₀₀が0.8になるまで増殖させる。試験株100 µlを、(100×15mmディッシュに対して)3mlの加温した(約55℃)LB軟寒天に添加し、素早くLB寒天プレート上に注ぐ。このプレートを穏やかに揺とうしてプレート全体に均一に広げ、寒天を10~15分間かけて固化させる。E3活性アッセイが望まれる大腸菌又はサルモネラ(Salmonella)のコロニーを、滅菌したつまようじ(toothpick)で単離し、寒天中に「穿刺(stabbed)」する。次いで、この寒天プレートを、逆さまにして37℃で一晩インキュベートする。次の日、分泌されたコリシンE3が感受性株を殺傷するので、ハロー又は透明領域(clearing zone)がE3穿刺の周囲に現れる。コロニーは、さらに誘導されて、アルキル化剤(例えば、マイトマイシン)、紫外線又はX線などの多様なSOS誘導試薬のいずれかによる処理によって、E3の産生又は分泌を増加させることができる。

【0325】

1つのハローアッセイの結果を図25に示す。ある細菌株がペトリ皿上の細菌巢(lawn)上で増殖した感受性株の存在下でコリシンを分泌すると、分泌されたコリシンは、外側に広がり(diffuses out)、細菌巢中に含まれている細菌細胞を殺傷し、それらを溶解して透明領域又はハローを作りだす。ハローの大きさは、分泌されたコリシン量に対応している。図25に示される結果は、多数の株を示している。colE3-CA38プラスミドを含んでいない株の回りには、ハローは絶対に観察されない。誘導剤(induction)の不存在下では、コリシンはサルモネラ株によって産生される。また、種々のタイプの誘導剤(すなわち、アルキル化剤、紫外線、X線)によって、全てのハローは用量依存的にその大きさを増すという証拠がある。

【0326】

15.1.3. 選択的E3クローンのオーバーレイアッセイ

形質転換体を種々の希釈濃度(1:10, 000まで)でLB上にプレーティングし、37で2時間増殖させる。次いで、感受性試験株をハローアッセイで上記の様に調製し、軟寒天によってオーバーレイを注ぐ。10分間固化させた後、次いで、プレートを逆さまにし、37で一晩インキュベートする。次いで、次の日に、透明領域の中央に小さなコロニー(又はコロニー群)を伴って、(バクテリオファージのブランクに似た)小さな透明領域が現れる。

【0327】

15.1.4. 「ブランク」又はハロー精製アッセイ

次に、上記のオーバーレイ寒天の透明領域の中心の小さなコロニーを、滅菌したパスツールピペットを用いて単離する。目に見えるコロニーが無いが、又は1つのハロー中に複数のコロニー群が有る場合のいずれかの場合には、ハロー全体を滅菌したパスツールピペットで吸い取る。コロニー又はハローを500µlのLB中に移す。希釈(1:10, 000まで)を行い、LB寒天に戻し、37で2時間増殖させる。次いで、オーバーレイを上述した感受性試験株に注ぐ。次の日、コロニー群の全部又は殆どが、それらの回りにハローを有するはずである。

【0328】

16. 実施例: E3の*in vivo*注射、及びサルモネラ中のプラスミド保持率(%)の測定

下記実施例によって、*in vivo*でのサルモネラ中のcolE3-CA38プラスミドの保持を証明する。

【0329】

41.2.9(又は41.2.9E3-CA38)のいずれかの注射の30日後の2匹のマウス由来の腫瘍及び肝臓のホモジェネートを、この研究に用いた。下記の記載中において、L=肝臓、T=腫瘍である。4つ全てのホモジェネートをCFUのためにプレーティングし、コロニー群をmsbB PCRによる分析及びコリシン産生のためにかきとった。41.2.9に類似するコロニーのほぼ純粋な培養物を全てのホモジェネートから得た。それぞれから、5つのコロニーを、コリシン及びPCR分析のためにかきとった。さらに41.2.9E3肝臓ホモジェネート中のコリシン産生体(producer)及び非産生体の混合集団であるように見える30個のコロニーを、さらなる分析のために、41.2.9E3T及びLプレートからかきとった。これらの結果に基づいて、41.2.9E3腫瘍及び肝臓由来のさらに100個のコロニーをかき取り、コリシン産生及びmsbB PCRについて試験した。分布及びプラスミド保持率を組み合わせた日付(combined date)から算出した。

【0330】

*in vivo*でのE3注射、サルモネラ中のプラスミドの保持率(%)の測定の結果を下記表3に示す。

【0331】

【表3】

組織	CFU/ml	組織重量	CFU/gm	コリシン陽性数	msbB PCRでの陽性率(%)	プラスミド保持率(%)
41.29L	1.07E+03	1.33	4.02E+03	0/5	100%	n/a
41.29T	1.26e+07	0.26	2.42E+08	0/5	100%	n/a
41.29E3L	1.15E+04	2.34	2.46E+04	87/135	100%	64.44
41.29E3T	1.09e+06	0.35	1.56E+07	134/135	100%	99.26

【0332】

10

20

30

40

50

colE3プラスミドが*in vivo*で効果を有するようにするため、及びそれが*in vivo*で腫瘍部位に他の遺伝子を運搬するために、colE3プラスミドは、*in vivo*で効力を有するように保持されていなければならない。エフェクターの標的は腫瘍であるので、この実験で得られた結果は、驚くべきことであり、また利点を有し、従って、肝臓それ自体への影響は少ないであろう。

【0333】

17. 実施例：M27肺腫瘍モデルでの種々の41.2.9株の腫瘍標的化

下記実験によって、41.2.9 colE3及び41.2.9 colE3 BRP及び41.2.9 colE3 BRP-m(改変BRP)サルモネラ株の腫瘍を標的とする能力を証明する。

【0334】

下記表4に列挙されたサルモネラ株をM27肺腫瘍を有する動物に注射し、動物を7日目に犠牲にした。臓器重量を、cfu/gの算出のために、次の日にアッセイした。腫瘍及び肝臓をホモジェネートし、msbB上に置き、コロニー形成単位(c.f.u.)を測定した。グループ1、2、4、及び6では、全ての株が、肝臓では $6 \times 10^4 \sim 4 \times 10^6$ cfu/gの範囲で種々の蓄積量を伴って、腫瘍中では約 4×10^8 cfu/gまで蓄積された。表4は、全てのグループのデータをまとめたものであり、平均cfu/gで示されている。全ての株が良好な腫瘍蓄積量(10^8 c.f.u./グラム組織より良好)を有することが見出され、全ての株が正の腫瘍対肝臓比を与えた。BRP colE3は、最良の比を有するが、他の全ての利用可能な株よりも必ずしも良好ではなかった。E3及びE3 BRP株は、腫瘍対肝臓比が100~200:1の間で腫瘍において相当に高い濃度まで蓄積する。

【0335】

【表4】

グループ	株	腫瘍 (T) 肝臓 (L)	cfu/g 組織	比 (腫瘍:肝臓)
1	41.2.9/E3	T	$5.1 \pm 1.1 \times 10^8$	131:1
1	41.2.9/E3	L	$3.9 \pm 3.6 \times 10^6$	
2	41.2.9/E3 BRP	T	$4.6 \pm 2.7 \times 10^8$	209:1
2	41.2.9/E3 BRP	L	$2.2 \pm 1.3 \times 10^6$	
6 ¹	41.2.9/E3BRP _m	T	$3.5 \pm 0.15 \times 10^8$	90:1
6 ¹	41.2.9/E3BRP _m	L	$3.9 \pm 3.6 \times 10^6$	

¹: BRP_mとは、96位(GからAへの変異であり、グリシンからアルギニンへのアミノ酸変化をもたらす)及び114位(TからAへの変異であり、セリンからスレオニンへのアミノ酸変化をもたらす)での点突然変異を含む改変BRPをいう。突然変異体BRP_mは、もはや同様の溶解(quasi lysis)を起こさないが、まだ細菌からのタンパク質分泌能を有する(van der Wal, F., Koningstein, G., Ten Hagen, C.M., Oudega, B.及びLuirink, J. (1998)、大腸菌によるバクテリオシン放出タンパク質(BRP)仲介タンパク質放出の最適化:タンパク質放出から致死率及び同様の溶解を切り離すためのpClodF13誘導性BRP遺伝子の無作為突然変異(Optimization of Bacteriocin Release Protein (BRP)-Mediated Protein Release by Escherichia coli: Random Mutagenesis of pClodF13-Derived BRP Gene to Uncouple Lethality and Quasi-Lysis from Protein Release), Applied and Environmental Microbiology, Vol. 64, pp. 392-398)。

【0336】

18. 実施例：C38ネズミ大腸癌への41.2.9/ColE3の効力

下記実施例によって、C38ネズミ大腸癌の増殖を阻害する41.2.9/ColE3の能力を証明する。

【0337】

大腸38腫瘍断片(2×2×2mm³)を、C57BL/6マウス(雌、9週令)の皮下に埋め込んだ。腫瘍の体積が1,000mm³に達した後、滅菌条件下でマウスから腫瘍を除去し、小さな断片(約2×2×2mm³/断片)に切断し、上記操作を5回繰り返した。腫瘍埋め込みの0日目に腫瘍埋め込み針(tumor implantation needle)を用いて、断片をマウスの右脇腹の皮下に埋め込んだ。

【0338】

腫瘍体積が150~200mm³に達したときに、動物をサルモネラ投与の0日目に無作為化した。凍結保存されていた41.2.9及び41.2.9/ColE3を室温で解凍し、PBSで希釈してそれぞれ最終濃度7.5×10⁶cfu/mlとした。0.2mlの細菌懸濁液のアリコート(1.5×10⁶CFU/マウス)を、0日目に記載のグループのマウスに静脈内投与した。細菌懸濁液を1×10³CFUまで希釈し、msbBプレート上にプレティングし、一晚インキュベートして、投与された細菌cfuの数を測定した。実験の終わりまで、週2回腫瘍を測定した。各グループ(ColE3)の3つの腫瘍を解剖し、cfu及びプラスミドの保持率を測定するために処理した。

【0339】

グループ:

		マウス
1.	未処置コントロール	8
2.	41.2.9 (1.5×10 ⁶ /マウス)	8
3.	41.2.9/ColE3 (1.5×10 ⁶ /マウス)	8

【0340】

41.2.9/ColE3のC38ネズミ大腸癌への効力の結果を図26に示す。このデータは、VNP20009(41.2.9)の静脈内注射によって処置されたマウスがC38ネズミ大腸癌の増殖を有意に阻害することができることを証明している。さらに、マウスをColE3プラスミドを含有するVNP20009で処置すると、腫瘍退化(すなわち、腫瘍が、実験の初めよりも実験の終わりの方が小さい)が達成された。

【0341】

19. 実施例：ヌードマウス中のDLD1ヒト大腸癌に対するVNP20009/ColE3の抗腫瘍活性

下記実施例によって、サルモネラ突然変異体41.2.9に対するDLD1ヒト大腸癌の増殖を阻害する、サルモネラ突然変異体VNP20009/ColE3(41.2.9/ColE3)の増大した能力を証明する。

【0342】

対数増殖期に増殖したDLD1細胞をトリプシン処理によって除去し、PBSで洗浄し、5×10⁷細胞/ml PBSに再構成した。細胞懸濁液(0.1ml)をヌードマウス(Nu/Nu-CD1雌、9週令; Charles River社より)の右脇腹に、0日目に単回皮下注射した(5×10⁶細胞/マウス)。10匹の動物を各グループで用い、腫瘍サイズが300~400mm³に達する、腫瘍埋め込みの約10~15日後に無作為化し、供試した(staged)。サルモネラ突然変異体41.2.9及び41.2.9/ColE3のCFUを1日前に計数した。細菌(41.2.9及び41.2.9/ColE3)を1×10⁷CFU/mlに希釈した。0.2mlの細菌懸濁液のアリコート(2×10⁶CFU/マウス)を、所定の日マウスに皮下注射した。細菌懸濁液を1×10³CFUに希釈し、各溶液100µlをmsbBプレート上にプレティングし、このプレートを一晩インキュベートした。次の日に細菌コロニーを計数した。腫瘍は、週2

10

20

30

40

50

回測定した。

【0343】

グループ：

		マウス
1.	未処置コントロール (PBS)	10
2.	41.2.9 (2×10^6 /マウス)	10
3.	41.2.9/ColE3 (2×10^6 /マウス)	10

ヌードマウス中のDLD1ヒト大腸癌に対する41.2.9/ColE3の抗腫瘍活性の結果を図27に示す。コリシンE3含有41.2.9株は、41.2.9株単独に比べて増大した活性を示す。

【0344】

20. 実施例：C57BL/6マウスのB16ネズミ黒色腫に対する41.2.9/ColE3の効力

下記実施例によって、サルモネラ突然変異体41.2.9/ColE3の、B16-F10黒色腫の増殖を阻害する能力を証明する。

【0345】

対数増殖期で増殖するB16-F10細胞を、トリプリン処理によって除去し、PBSで洗浄し、 5×10^6 細胞/ml PBSに再構成した。細胞懸濁液(0.1ml)をC57BL/6マウス(雌、9週令)の右脇腹に0日目に単回皮下注射した(5×10^5 細胞/マウス)。10匹の動物を各グループで用い、腫瘍体積が $150 \sim 200 \text{ mm}^3$ に達する9日目に無作為化した。凍結保存されていたサルモネラクローン41.2.9及び41.2.9/ColE3を室温で解凍し、PBSで希釈してそれぞれ最終濃度 7.5×10^6 cfu/mlとした。0.2mlの細菌懸濁液のアリコート(1.5×10^6 CFU/マウス)を、9日目に所定のグループのマウスに静脈内投与した。細菌懸濁液を 1×10^3 CFUに希釈し、msbBプレート上にプレティングし、一晚インキュベートして、投与された細菌cfuの数を測定した。腫瘍は、実験の終わりまで週2回測定した。

【0346】

グループ：

		マウス
1.	未処置コントロール	10
2.	41.2.9 (1.5×10^6 /マウス)	10
3.	41.2.9/ColE3 (1.5×10^6 /マウス)	10

C57BL/6マウス中のB16ネズミ黒色腫に対する41.2.9/ColE3の効力の結果を図28に示す。データは、41.2.9(41.2.9)による静脈内注射によって処置されたマウスが、B16ネズミ黒色腫の増殖を有意に阻害できることを証明している。さらに、41.2.9/ColE3によって処置されたマウスは、41.2.9単独に比べて早い時点(最高37日まで)に腫瘍サイズの有意な減少を示した。より小さい腫瘍サイズは、より容易に他の治療剤(例えば、化学療法剤及びX線などの照射)の影響を受け易いので、この知見は非常に重要である。

【0347】

21. 実施例：BRPと組み合わせた41.2.9/E3の抗腫瘍効力

下記実施例によって、サルモネラ突然変異体41.2.9におけるBRPとE3の共発現が突然変異体の抗腫瘍効力を増加させることを証明する。

【0348】

サルモネラ突然変異体41.2.9におけるBRPとE3の共発現は、*in vitro*で細菌から分泌されるE3の量を増加させる。BRPが*in vivo*でサルモネラから

分泌されるE3の量を増加させうる場合には、この追加的な細胞外E3が腫瘍細胞に容易に利用可能であり、従ってこれらの細胞に対する細胞毒性を増加させるという仮説を立てることができるであろう。この実験では、4つの動物グループ(グループ当たり10匹の動物)を試験した:

グループ番号	処置
1	コントロール(未処置)
2	41.2.9
3	41.2.9/E3
4	41.2.9/E3/BRP

10

この実験で用いたモデルは、ヒト肺癌系統HTB177とした。細胞を1日目にマウスの脇腹の皮下に埋め込んだ。腫瘍がおよそ500mm³に達した14日目に、動物に上記表に記載の株の1×10⁶cfu、又はグループ1の場合には生理食塩水を静脈内注射により注射した。腫瘍体積は、24日目まで毎週測定した。表5の結果は、41.2.9が単独で腫瘍増殖を阻害でき(40%阻害)、一方、E3との組み合わせは抗腫瘍効力を増大させる(63%)ことができることを示している。しかしながら、E3及びBRPの両者を有する株をこのモデルで用いた場合、抗腫瘍効力はさらに増大し(未処置コントロールに比べて67%阻害)、増大した阻害率は、より早い時点で非常に有意である(表5)

20

【0349】

【表5】

表5: 未処置コントロールと比較した腫瘍増殖阻害率(%)

株	17日目	20日目	24日目
41.2.9	50	38	40
41.2.9/E3	63	58	63
41.2.9/E3/BRP	97	82	67

【0350】

結論として、細胞毒性コリシンE3及び機能強化された(enhanced)分泌系BRPの両者を有するサルモネラによる処置によって、未処置コントロール及び41.2.9/E3単独での処置に比べて抗腫瘍効力が増加する。

30

【0351】

2.2. 実施例: コリシンE3含有サルモネラとX線処置との組合せ

下記実施例によって、41.2.9と2つの用量のX線との組み合わせが、X線単独で見られるよりもマウスの生存期間を有意に延長することを証明する。

【0352】

スケジュールは次の通りである: 0日目に、100匹のC57B6雌マウス(5~7週令)の身体を中心(midbody)の右側の皮下にB16F10黒色腫(5×10⁵細胞/マウス)を投与することによって腫瘍を埋め込んだ。8日目に、コリシンE3含有サルモネラ41.2.9を注射し、12日目及び26日目に、X線を照射した。

40

【0353】

コリシンE3含有サルモネラとX線処置との組み合わせの結果を表6に示す。

【0354】

【表6】

カテゴリー	n()	lg に対する日	平均	T/C
A sham 15Gy	(6)	12, 12, 18, 18, 18, 21	17	1.0
J 15Gy X線 12dpt, 26dpt	(9)	14, 14, 18, 21, 25, 35, 35, 67, 67	33	1.9
K 41.2.9+15Gy X線 12dpt, 26dpt 退化 #1, 2	(9)	21, 28, 35, 35, 56, 60, 60, 60, 67	47	2.8
L 41.2.9/E3+15Gy X線 12dpt, 26dpt 退化 d32	(9)	28, 39, 53, 56, 56, 60, 67, 74, 78	57	3.3

10

【0355】

このデータは、41.2.9と2つの用量のX線との組み合わせが、X線単独で見られるよりもマウスの生存期間を有意に延長することを証明している。E3は、41.2.9+X線で見られるよりもマウスの生存期間をさらに延長させた。

【0356】

23. 実施例：腫瘍標的細菌による細胞傷害性壊死因子の発現

下記実施例によって、腫瘍標的細菌による大腸菌細胞傷害性壊死因子1(CNF1)の発現を証明する。

20

【0357】

細胞傷害性壊死因子としては、以下に限定されないが、大腸菌細胞傷害性壊死因子1(CNF1; Falboら, 1993, Infect. Immun. 61:4904-4914)、ピブリオ・フィシェリ(*Vibrio fischeri*) CNF1(Linら, 1998, Biochem. Biophys. Res. Comm. 250:462-465)及び大腸菌細胞傷害性壊死因子2(CNF2; Sugaiら, 1999, Infect. Immun. 67:6550-6557)が挙げられる。また、CNFファミリーとしては、CNF2のN末端部分と、27%の同一の残基及び80%の保存された残基を有するパスツレラ・ムルチオシダ(*Pasteurella multocida*)毒素(PMT)(Oswaldら, 1994, Proc. Acad. Sci. USA 91:3814-3818)も挙げられる。

30

【0358】

CNF1は、大腸菌196(ATCC 700336)から、標準的なPCRを用いて、プライマー、(フォワード)5'-GTGTCATGAAAATGGGTAACCAATGGCAAC-3'(配列番号35)及び(リバース)5'-CACAGAGCTCGCGCTAACAAAACAGCACAAAGGGAG-3'(配列番号36)を用いたPCRによってクローニングした。約3100bpの産物が得られ、タンパク質の発現並びにDNAクローニング宿主として大腸菌を用いるDNAシーケンシングのためにpTrc99aのNcoI及びSacI部位中にクローニングした。DNAシーケンシングは、エール大学ケックバイオテクノロジー研究室(Yale University Keck Biotechnology Laboratory)の標準的な方法によって行った。DNAシーケンシングによって、クローン化PCR産物が、3065塩基対のうちの6つのほんの小さな配列変異を有するCNF1であることを確認した。

40

【0359】

CNF1プラスミドを、大腸菌DNAクローニング宿主DH5及びサルモネラYS1646株(国際公開第WO99/13053号)中に電気穿孔した。標準的なLDHアッセイ(Promega社製、マディソン、ウィスコンシン州、Cytotox 96(登録商標))を用いて、大腸菌DNAクローニング宿主及びサルモネラYS1649株におけるCNF1の発現を測定した。図29は、CNF含有プラスミドの存在が細胞毒性の増大をもたらすことを示している。続くアッセイを用いて、CNF含有プラスミドを有するサ

50

ルモネラが多核化 (multinucleation) (Ryckera, 1990, J. Clin. Microbiol. 28:694-699) などのCNF1の他の既知の特性をも示すことを示した。CNF1に暴露したHeLa細胞の核を、光学顕微鏡法によって試験した。図30の結果は、サルモネラ中にCNF1が存在することによって期待される多核化及び細胞肥大 (cell enlargement) がもたらされることを明瞭に示している。

【0360】

2.4. 実施例：腫瘍標的細菌によるペロ毒素の発現

下記実施例によって、ペロ毒素ABを発現するように遺伝子操作された腫瘍標的細菌によって産生されるペロ毒素ABの細胞毒性を証明する。

10

【0361】

ペロ毒素 (合成 (syn.) HSC10毒素、シガ (Shiga) 毒素、シガ様毒素、シゲラ (Shigella) 毒素)。この毒素は、コリシン産生大腸菌HSC10株から単離されたものであり、元々はコリシンであると考えられていた (Farkas-Himsleyら, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. 92(15):6996-7000)。それは抗腫瘍活性、特に卵巣癌及び脳腫瘍に対する抗腫瘍活性の長い歴史を有しているが、この抗腫瘍活性は、生きている細菌全体ではなく、精製された調製物と関係している。

【0362】

ペロ毒素を、ペロ毒素Iの公開されている配列に基づくプライマーを用いて大腸菌HSC10 (ATCC 55227) からクローニングし、標準的なDNAシーケンシング法を用いて、エール・ケック・バイオテクノロジー・センター (Yale Keck Biotechnology Center) でのDNAシーケンシングによって確認した。ペロ毒素の発現は、ペロ毒素A及びBサブユニットによる多シストロン性のテトラサイクリン誘導性プロモーターの制御下で、BRP遺伝子を用いて達成した。このテトラサイクリン誘導性BRPペロ毒素ABを、msbB遺伝子を用いる染色体組み込みのためのベクター中にクローニングした。

20

【0363】

2.4.1. ベクターの構築

2.4.1.1. ABの増幅及びクローニング

ペロ毒素AB (AB) は、下記プライマーを用いるPCRによって生成した：

H19B-7：フォワード：5' - GTGTC CATGGCTAAAACA TTA TTA ATAGCTGCATCGC - 3' (配列番号37)；及び
QSTX-R1：リバーズ：5' - GTGTC TGCAGAACTGACTGAATTG AGATG - 3' (配列番号38)。

30

【0364】

また、これらのプライマーは、ptrc99AのNcoI及びPstI部位中にクローニングするための外側のNcoI (5') 及びPstI (3') 制限エンドヌクレアーゼ部位を含んでいる。

【0365】

2.4.1.2. TetBRPの増幅及びクローニング

TetBRP-ABを、中間体ベクターpSP72-F6/R6中に構築した。TetBRPは、次のプライマーを用いてPCRによって生成した：Tet-5'：フォワード5' - GTGTAGATCTTTAAGACCCACTTTTCA CATTTAAGTTG - 3' (配列番号39) 及びBRP-TET-3'：リバーズ5' - CACAGGATCCCTTACTGAACCGCGATCCCG - 3' (配列番号40)。これらのプライマーは、pSP72-F6/R6ベクターのBglII及びBamHI部位中にクローニングするためのBglII (5') 及びBamHI (3') 制限エンドヌクレアーゼ部位を含んでいる。

40

【0366】

50

24.1.3. pSP72-F6/R6-TetBRP中へのABのサブクローニング
 ptrc99A-ABを、pSP72F6/R6-TetBRP中に挿入するためにBamHI及びAvaI制限エンドヌクレアーゼで消化してABを除去し、また、BamHI及びAvaI制限エンドヌクレアーゼで消化した。pSP72F6/R6ベクターは、トランスで(intrans)lacZ-相補性のための-gal遺伝子の部分の他に、クローニングのための複数の制限エンドヌクレアーゼ部位を含んでいる。ベクター(pSP72F6/R6-TetBRP)及びABインサートの両者は、0.8%1XTAEアガロースゲル上で分離し、キアゲン(Qiagen)ゲル抽出キットを用いて精製した。T4リガーゼを用いて、ベクター及びインサートを連結し、熱ショック法を用いてDH5a大腸菌細胞中に形質転換した。この細胞を、100µg/mlのAmp及び40µg/mlのX-galを含有するLBプレートにプレATINGした。アンピシリン耐性及び機能性-gal遺伝子の存在に基づいて陽性コロニーを選択した(陽性コロニーは青色だった)。

10

【0367】

24.1.4. pCDV442中へのTetBRP-ABのサブクローニング
 pSP72F6/R6-TetBRP-ABを、pCVD442ベクター中にサブクローニングするためにNotI及びSfiI制限エンドヌクレアーゼで消化し、また、NotI及びSfiI制限エンドヌクレアーゼで消化した。

【0368】

24.1.5. msbB染色体ベクター

20

VNP20009株の染色体中のDmsbB遺伝子との相同組み換えを行うことができるベクター(国際公開第WO99/13053号中のa.k.a.YS1646)を、自殺ベクターpCVD442(Donnenberg及びKaper, 1991, Infection and Immunity 59: 4310-4317)中に構築した。2つの別の産物としてVNP20009中に存在するmsbB欠損の5'及び3'側切片の部分を生産する、PCR用のプライマーを設計した(msbB-5':フォワード5'-GTG TGA GCT CGA TCA ACC AGC AAG CCG TTA ACC CTC TGA C-3'(配列番号41)及びリバーズ5'-GTG TGC ATG CGG GGG GCC ATA TAG GCC GGG GAT TTA AAT GCA AAC GTC CGC CGA AAC GCC GAC GCA C-3'(配列番号42);並びにmsbB-3':フォワード5'-GTG TGC ATG CGG GGT TAA TTA AGG GGG CCG CCG CGT GGT ATT GGT TGA ACC GAC GGT GCT CAT GAC ATC GC-3'(配列番号43)及びリバーズ5'-GTG TCT CGA GGA TAT CAT TCT GGC CTC TGA CGT TGT G-3'(配列番号44))。また、これらのプライマーは、これらの2つの断片が共通のSphI部位を介して結合するとき、pCVD442のSacI及びSalI部位中へのクローニングを容易にするために、外側のSacI(5')及びAcaI(3')制限エンドヌクレアーゼ部位を含み、抗生物質耐性を伴わない安定な染色体組み込みのためのDNA断片のDmsbB中へのクローニングを容易にするために、内部のNotI、PacI、SphI、SfiI、SwaI及びDraIを生成する(図31)。このベクターをpCVD442-msbBと呼ぶ(図32及び33を参照されたい)。

30

40

【0369】

Tet-BRP-ABをpCVD442-msbB中にクローニングするために、Tet-BRP-ABプラスミドDNAを制限消化し、適当なDNAを精製し、T4リガーゼを用いて、これら2つの構成要素を含む連結反応を行った。次いで、連結反応物をDH51pirに形質転換し、コロニーをTet-BRP-ABの存在及び配向でスクリーニングした。Tet-BRP-ABクローンをSM101pir株(前記Donnenberg及びKaper, 1991)中に形質転換し、そのプラスミドをpCVD442-Tet-BRP-ABと称した。SM101pirのコロニーを、PCRによるTet-BRP-AB遺伝子についてスクリーニングし、サルモネラ株に対する交配ドナー(m

50

ating donor)として用いるために、SM10 1 pirクローンpCVD442-Tet-BRP-ABを選択した。pCVD442-Tet-BRP-ABを含有するSM10 1 pirを、標準的な方法(Davis, R. W., Botstein, D., 及びRoth, J. R., 1980, 最新細菌遺伝学(Advanced Bacterial Genetics), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor)によって、サルモネラYS50101株(Difco MacConkey寒天に対する増強された耐性を有するテトラサイクリン耐性YS82株(前記Lowら, 1999)の自然発生誘導体)と交配し、50 µg/mLのカルベニシリン(carb)及び300 µg/mLのストレプトマイシン(strep)を含むプレート上で選択した。得られたYS50102-pCVD442-Tet-BRP-ABクローンを、PCRによりpCVD442-Tet-BRP-AB遺伝子についてチェックした。 10

【0370】

24.2. 41.2.9-Tet-BRP-AB株を生産するために染色体に組み込まれたpCVD442-Tet-BRP-ABの41.2.9(YS1646)中への送達ドナーとしてYS50102-Tet-BRP-AB株を用い、バクテリオファージP22(突然変異体HT105/1 int-201; Davisら, 1980)によって、カルベニシリン耐性を41.2.9に形質導入した。pCVD442由来のbla及びsacB遺伝子の存在によって、DmsbB及びDmsbB-Tet-BRP-AB遺伝子の両者を含む41.2.9-pCVD-Tet-BRP-AB-1を表すcarb^r(又はamp^r)suc^s株の選択が可能になる(図33、#3)。41.2.9-Tet-BRP-AB-1株をLBスクロース上にプレATINGし、suc^rcarb^s誘導体を選択し、DmsbB遺伝子を除去し、LB-スクロース寒天プレートを、NaCl無しで作製する以外は、前記Donnenberg及びKaper, 1991(図33、#4)の方法に従ってDmsbB-Tet-BRP-AB遺伝子を残し、プレートを30でインキュベートした。これらのプレート上でコロニーが増殖した後、それらをmsbBプレートにグリッドを据え(gridde)、抗生物質及びスクロースマーカの両方を欠損したクローンの存在を検出するために、複製をカルベニシリン又はスクロースのいずれかを含有するプレートにプレATINGした。得られたクローンを、PCRによりTet-BRP-AB遺伝子の存在についてチェックした。染色体に組み込まれたTet-BRP-ABを含有し、スクロース感受性及びカルベニシリン耐性を欠損している1つの誘導体を、41.2.9-Tet-BRP-ベロ毒素ABと表示した。 20 30

【0371】

標準的なLDH細胞毒性アッセイ(Cytotox⁹⁶(登録商標); Promega社製、マディソン、ウイコンシン州)を用いてin vitroで41.2.9-Tet-BRP-ベロ毒素ABの細胞毒性を試験した。結果を図34に示す。この結果は、ベロ毒素発現クローン26及び31の毒性特性を証明している。クローン26及び31は、テトラサイクリンで処理しなかったときよりもテトラサイクリンで処理したときの方が有意に高い細胞毒性率(%)を有していた。

【0372】

25. 実施例：腫瘍標的細菌による溶血素の発現

下記実施例によって、腫瘍標的細菌を遺伝子操作して溶血素などの溶血性タンパク質を、構成的に又は誘導性制御下で発現できることを証明する。

【0373】

溶血素は、赤血球細胞を溶解させる能力を有する、周知の細胞毒性タンパク質である(例えば、Beutin, 1991, Med. Microbiol. Immunol. 180:167-182)を参照されたい)。SheA(Genbank番号ECO238954)は、殆どが野生型大腸菌で見出される、通常は発現されないサイレントな溶血素である(Fernandezら, 1998, FEMS Microbiol Lett. 168:85-90)。SheA(a.k.a. hlyE; Genbank番号U5 40

7430)は、野生型大腸菌(2507株、エール大学大腸菌遺伝子保存センター(Yale University E. coli Genetic Stock Center)から、下記プライマー(フォワード)5'-TTTTTTTCCATGGCTATTA TGACTGAAATCGTTGCAGATAA AACGG-3'(配列番号45)及び(リバース)5'-TTTTTTTAAGC TTCCCGGGTCAGACTTCA GGTACCTCAAAGAGTGTC-3'(配列番号46)を用いたPCRによって、標準的なPCR条件下でクローニングした。正しいサイズのPCR産物を、部分的に構成性のtrcプロモーター下に置くために、ptrc99a(Pharmacia社製)のNcoI及びHindIII部位中にクローニングした。また、PCR産物をNcoI及びEcoRVによって切断したtet-bgal-Z-termベクター(前記)中にクローニングした。次いで、大腸菌DH5a(Gibco社製)を、そのプラスミドで形質転換し、0.2µg/mlのテトラサイクリンを添加した及び添加しない血液寒天培地(5%ヒツジ血液を有するトリプシン性ダイズ寒天培地; BioMerieux社製、ロンバード、イリノイ州)にプレティングした。溶血を示すコロニーの周りの透明なハローを含むコロニーを陽性コロニーとして取り上げた。陽性コロニーを標準的なプラスミド精製に付し、サルモネラYS501に形質転換し、再度ハローについてスクリーニングした。

【0374】

構成性のハロー形成を、テトラサイクリンの添加によって又は添加無しにハローが観察される、trc99a構築物について図35(2A及び2B)に示す。テトラサイクリン依存性ハロー形成を、テトラサイクリンの添加を伴わずにハローが観察されない、テトラサイクリン-プロモーター誘導性SheAについて図35(3A及び3B)に示す。これらの結果は、腫瘍標的細菌が、構成的に又は誘導性制御下で、溶血性タンパク質を発現できることを証明している。

【0375】

2.6. 実施例：腫瘍標的細菌によるメチオナーゼの発現

下記実施例によって、サルモネラなどの弱毒化腫瘍標的細菌を遺伝子操作して、メチオナーゼを発現させることができることを証明する。

【0376】

メチオナーゼは、腫瘍増殖に必要な必須アミノ酸であるメチオニンを分解する酵素である。腫瘍増殖を阻害するための又はメチオナーゼをコードするDNA若しくはウイルスベクターを投与するための精製メチオナーゼの投与に関しては報告されている(Xu及びTanによる国際公開第WO00/29589号)。Xu及びTanは、メチオナーゼの送達のための腫瘍特異的細菌ベクターの使用方を開示しておらず、精製タンパク質によって効力を達成するためには、大量のメチオナーゼが必要である。メチオナーゼを直接腫瘍に送達する新規な方法は、腫瘍標的細菌を用いて酵素を発現させる。

【0377】

Genbank番号L43133に基づくニュードマス・プティダ(Pneudomasputida)から、下記プライマーを、メチオナーゼ用に生成した：

フォワード：METH-XHOI

5'-CCGCTCGAGATGCACGGCTCCAACAAGCTCCCA-3'(配列番号47)；及び

リバース：METH-BAM

5'-CGCGGATCCTTAGGCACCTCGCCTTGAGTGCCTG-3'(配列番号48)

上記列挙したプライマー(4mM)及び鋳型として、ニュードマス・プティダの単離されたコロニーを用いて、メチオナーゼの配列を下記条件下でのPCRによって増幅した：

94、5分間を1サイクル、次いで94にて1分間、60にて1分間及び72で2分間を35サイクル。72、10分間の最終増幅工程は、PCR反応の最後の工程として行った。PCR産物を0.8%1XTAEアガロースゲル上で分離し、メチオナー

10

20

30

40

50

ゼの予想されるサイズ(約1196bp)からなるPCR産物を同定した。バンドを、ゲルから切り取り、キアーゲンゲル抽出キットを用いて精製した。

【0378】

pSP72ベクター及び上記で得られた単離したゲル精製メチオナーゼ遺伝子の両者を制限酵素XhoI及びBamHIで消化した。消化したベクター及びメチオナーゼを、0.8%1XTAEアガロースゲル上で分離した。線状化ベクターに対応する消化生成物及び消化されたメチオナーゼ遺伝子をゲルから切り取り、キアーゲンゲル抽出キットを用いて精製した。線状化ベクター及びインサート(メチオナーゼ)をT4リガーゼを用いて一緒に連結した。連結混合物を、熱ショック法によってDh5a大腸菌細胞中に形質転換した。細胞を、回収した後、100mg/mLのアンプシリン(Amp)を含有するLB培地にプレティングして、完全なpSP72ベクターを含有する細胞を選択した。Amp耐性コロニーを同定し、キアーゲンミニ-プレップキット(Qiagen mini-prep kit)を用いたプラスミド調製並びに酵素EcoRI及びBspHIによる制限消化によって、メチオナーゼ遺伝子を含有するpSP72ベクターの存在を確認した。クローン#9を、配列決定のために、エール大学医学部(Yale University School of Medicine)のエール・シーケンシング・ファシリティ(Yale sequencing Facility)に送った。SP6(フォワード)及びT7(リバーズ)シーケンシング・プライマーの両者を用いて配列決定がなされた。結果は、配列が、PCRによってTAAに変わっているTGA停止コドンを除いて、公表されているメチオナーゼの配列と100%一致することを証明している。

10

20

【0379】

メチオナーゼ活性は、Horira, 1996, Cancer Research 56: 2116-2122に記載のメチオナーゼアッセイを用いて測定できる。

【0380】

27. 実施例：弱毒化腫瘍標的細菌でのTAT融合物としてのアポチン(apoptin)タンパク質の発現

下記実施例によって、弱毒化腫瘍標的細菌を遺伝子操作して、エフェクター分子、並びにTAT、アンテナペディア(antennapedia)、VP22、及びカポジ(Kaposi)FGFMTSなどのフェリー・ペプチド(ferry peptide)を含む融合タンパク質を発現させ分泌させることができることを証明する。

30

【0381】

27.1. TAT-アポチンベクターの構築

カナリア・ウイルス(CAV)タンパク質であるアポチンは、アデノウイルスベクターによって送達されたときに、新生物細胞中でアポトーシスを誘導することが知られている(例えば、Notebornら, 1999, Gene Therapy 6: 882-892を参照されたい)。

【0382】

サルモネラの細胞質中で転写されるが、腫瘍細胞の核に輸送され、アポトーシスを引き起こす能力を有するタンパク質を生産するために、アポチンタンパク質をヒト免疫不全症ウイルス(HIV)TATタンパク質から誘導されるペプチドに融合した(例えば、Schwartzera, 1999, Science 285: 1569-2572を参照されたい)。TATタンパク質融合物は、正電荷を増加させ、タンパク質精製を容易にもするポリヒスチジン(ヘキサヒスチジン)アミノ酸と融合した場合に、機能性であることも示されているので(前記Schwartzera, 1999)、TAT-アポチン融合物を、ヘキサヒスチジンによって及びそれ無しで生産した(図36A及びB)。さらに、TAT-アポチン融合物は、OmpA-8Lシグナル配列によって及びそれ無しに生産できる(図36A及びC)。

40

【0383】

アポチン及びヘキサヒスチジン・アポチンは、オーバーラップ・オリゴヌクレオチドを用いて構築される。アポチンをコードする核酸配列は、下記オリゴヌクレオチドを用いるP

50

C R によって生成した :

TAP1: 5'-GATCCCATGG CTTATGGCAG AAAAAACGC CGTCAGCGCC
GTCGCATGAA CGCGCTGCAG GAAGATACCC CGCCGGGCCC GTCCACCGTG
TTTCGCCCCG C-3' (配列番号 49)

TAP2: 5'-GGGACAGGGT GATGGTGATG CCCGCGATGC CGATGCGGAT
TTCGCGGCAA TCGGGGTTT CCAGCGGGCG GGAGGAGGTC GGCGGGCGAA
ACACGGTGGA C-3' (配列番号 50)

10

TAP3: 5'-GGCATCGCGG GCATCACCAT CACCCTGTCC CTGTGCGGCT
GCGCGAACGC GCGCGCGCCG ACCCTGCGCT CCGCGACCGC GGATAACTCC
GAAAACACCG C-3' (配列番号 51)

TAP4: 5'-GCGATATTCG GACGGATCGC AGGAGCGTTT TTTGGACGGC
GGTTTCGGCT GATCGGTGCG CAGATCCGGG ACGTTTTTAA AGCCGGTGTT
TTCGGAGTTA TCCGCGGTCC C-3' (配列番号 52)

20

TAP5: 5'-CCTGCGATCC GTCCGAATAT CGCGTCTCCG AACTGAAAGA
ATCCCTGATC ACCACCACCC CGTCCC GCCGACCGCC CGCCGCTGCA
TCCGCCTCTG AAAGCTTCAT C-3' (配列番号 53)

TAP6: 5'-CATGAAGCTT TCAGAGGCGG ATGCAGCGGC GGGCGGTGCG C-3'
(配列番号 54)

T A P 2 - T A P 6 オリゴヌクレオチド及び T A P 6 H 1 オリゴヌクレオチド
(5'-GATCCCATGG CTCATCACCA TCACCACCAT TATGGCCGCA
AAAAACGCCG TCAGCGCCGT CGCATGAACG CGCTGCAGGA AGATACCCCG
CCGGGCCC-3'; 配列番号 55)

30

を用いて、T A T - アポチン融合タンパク質のヘキサヒスチジン含有バージョンをコードする核酸配列を生成した。T A P 6 オリゴヌクレオチド及び o m p 8 L F 1 オリゴヌクレオチド

(5'-GATCCCATGG CTA AAAAAGAC GGCTCTGGCG CTTCTGCTCT
TGCTGTTAGC GCTGACTAGT GTAGCGCAGG CCTATGGCCG CAAAAACGC
CGTCAGCGCC -3'; 配列番号 56)

40

を用いて P C R により、T A P 1 - T A P 6 オリゴヌクレオチドの P C R 産物から、T A T - アポチン融合タンパク質の O m p A 8 L 含有バージョンをコードする核酸配列を生成した。

【 0 3 8 4 】

各オリゴヌクレオチドを、4 μ M 濃度の保存溶液に調製した。予め混合された P C R 反応ビーズ (P h a r m a c i a 社製、R e a d y - t o - g o b e a d s) を用い、各オリゴヌクレオチドの 2 μ l を使用した。P C R 反応は、95 °C で5分間を1サイクル; 95 °C で1分間、60 °C で1分間、72 °C で1分間を35サイクル; 及び72 °C で10分間を1サイクルから構成されていた。次いで、P C R 産物を、フェノール/クロロホルムで

50

抽出し、エタノールで沈殿させ、水中に再び溶解し、Nco I及びHind IIIによる制限消化に付した。制限消化されたPCR産物を、ゲル電気泳動によって分離し、正しいサイズの産物(TAT-アポチン及びヘキサヒスチジン-TAT-アポチンに対して、それぞれ約420及び450bp)をゲルから切り取り、標準的な分子生物学的方法を用いて単離した。これらの産物をNco I及びHind III消化されたptrc99a(Pharmacia社製)中に連結し、ptrc99a-TAT-アポチン構築物を得た。TAT-アポチン(図37)及びヘキサヒスチジンTAT-アポチン(図38)の両者の正しいDNA配列を得た。

【0385】

27.2. TAT-アポチンの分泌及び取り込みの証明

弱毒化腫瘍標的細菌を、当業界で公知の標準的な方法によって(例えば、熱ショック又は電気穿孔によって)ptrc99a-TAT-アポチン構築物によって形質転換し、培地中で培養する。当業者に公知の方法(例えば、ウエスタンブロット分析又はELISA)を用いて、TAT-アポチンの存在について、細菌培養物からの上清を試験する。一旦、細菌培養物の上清中のTAT-アポチンの存在が確認されたなら、細菌培養上清を哺乳動物細胞(例えば、NIH3T3、CHO、293、及び293T細胞)と共にインキュベートし、細胞内部のTAT-アポチンの存在を、当業者に公知のアポチンアッセイによって確認する。

【0386】

27.3. 腫瘍内へのTAT-アポチンの取り込みの証明

TAT-アポチン又はアポチンを発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌を、B16腫瘍モデルに静脈内投与する。マウスは、細菌の投与後数日で犠牲にし、臓器重量を測定する。当業者に公知のアポトーシスアッセイ(例えば、DNAラダーリング(DNA ladder ing)及びフルオレセインin situ細胞死検出キット(Boehringer Mannheim社製、マンハイム、ドイツ)を用いてTAT-アポチン又はアポチンの存在及び局在について腫瘍をアッセイする。さらに、腫瘍のサイズをアッセイし、TAT-アポチンの抗腫瘍活性を測定する。また、腫瘍をホモジェネートし、プレーティングして、コロニー形成単位(c.f.u.)を測定する。

【0387】

28. 実施例：マウスのM27肺癌の増殖に対するVNP20009と化学療法剤との組合せの効力

下記実施例によって、化学療法剤と組み合わせた弱毒化腫瘍標的細菌の投与が、相乗的又は相加的に働いて、肺癌などの固形腫瘍の増殖を阻害できることを証明する。

【0388】

28.1. マウスのM27肺癌の増殖に対するVNP20009とサイトキサン(cytosan)又はVNP20009とマイトマイシンCとの組合せの効力

液体窒素保存されたM27ネズミ肺癌細胞(1×10^6 / ml \times 1 ml)を、37 で細胞を素早く解凍することによって正常な状態に戻し、37、5%CO₂で10%ウシ胎仔血清(FCS)を含有するDMEM培養培地10mlで培養した。細胞を2世代継代させた後、対数増殖期にあるM27細胞をトリプシン処理によって取り出し、1xPBSで洗淨し、腫瘍埋め込みのために、1xPBSで 2.5×10^6 細胞/mlに再構成した。M27細胞懸濁液を、0日目に、100匹のC57BL/6マウス(雌、8週令、20g; 5×10^5 細胞/マウス)の右脇腹の皮下に埋め込んだ。マウスを、各グループが10匹のマウスからなるように、無作為に10のグループに分けた。

【0389】

サルモネラVNP20009株を、本発明者の標準的な希釈方法によって、1xPBSで 5×10^6 CFU/mlに希釈した。各マウスに、下記表6に従って12日目に、希釈したサルモネラ(1×10^6 CFU/マウス)0.2mlを静脈内投与した。注射した細菌の実数を測定するため、 5×10^6 CFU/mlの細菌懸濁液を、さらに 1×10^3 CFU/mlに希釈し、栄養寒天培地(MsbBプレート; 国際公開第WO99/13053

10

20

30

40

50

号)上にプレーティングした。形成されたコロニーを翌日計数した。

【0390】

マイトマイシンC (Sigma社製)及びサイトキサン (Sigma社製)を、下記表7に従ってマウスに投与した。マイトマイシンCの2回目の用量を22日目に組み合わせグループには投与したが、腫瘍のサイズが大きいために、マイトマイシンC単独で処置されたグループには投与しなかった。VNP20009+サイトキサンで処置したグループで、重篤な中毒反応が観察されたので、シプロ(Cipro; Bayer Inc.社製、ウエストハーベン、コネチカット州)200mpkを、VNP20009単独又はVNP20009+化学療法剤で処置した各マウスに投与した。実験の終わりまで、腫瘍体積を週2回測定した。動物の行動、外観及び死亡率を毎日観察した。マウスは、清潔で、一定温度の実験室に保持した。床敷きを週2回取り換え、マウスには十分な食物と飲料水を与えた。

10

【0391】

【表7】

グループ	マウス数
未処置コントロール	10
3 mpk マイトマイシンC、静脈内、15日	10
5 mpk マイトマイシンC、静脈内、15日	10
150 mpk サイトキサン、腹腔内、15日	10
200 mpk サイトキサン、腹腔内、15日	10
VNP20009、 1×10^6 /マウス、静脈内、12日	10
VNP20009、 1×10^6 /マウス、静脈内、12日+ 3 mpk マイトマイシンC、静脈内、15及び22日	10
VNP20009、 1×10^6 /マウス、静脈内、12日+ 5 mpk マイトマイシンC、静脈内、15及び22日	10
VNP20009、 1×10^6 /マウス、静脈内、12日+ 150 mpk サイトキサン、腹腔内、15日	10
VNP20009、 1×10^6 /マウス、静脈内、12日+ 200 mpk サイトキサン、腹腔内、15日	10

20

30

【0392】

図39に示すように、VNP20009+サイトキサンによる組み合わせ処理は、VNP20009処置単独又はサイトキサン処置単独よりもM27肺癌の増殖を強く阻害した。図40に示すように、VNP20009+マイトマイシンCの組み合わせは、マイトマイシンC単独よりもM27肺癌の増殖を強く阻害した。しかしながら、VNP20009+マイトマイシンCの組み合わせは、VNP20009処置単独よりもM27肺癌の増殖を強く阻害しなかった(図40)。これらの結果は、化学療法剤と組み合わせた弱毒化腫瘍標的細菌の投与が、相乗的又は相加的に働き、肺癌などの固形腫瘍の増殖を阻害できることを示唆している。

40

【0393】

2.8.2. マウスのM27肺癌の増殖に対するVNP20009とシスプラチンとの組合せの効力

液体窒素保存されたM27ネズミ肺癌細胞(1×10^6 /ml \times 1ml)を、37で素早く細胞を解凍することによって正常な状態に戻し、37、5%CO₂でウシ胎仔血清(FCS)を含有するDMEM培養培地25mlで培養した。細胞を2世代継代させた後、対数増殖期(約90~95%飽和)にあるM27細胞を、トリプシン処理によって取り出し、1xPBSで洗浄し、腫瘍埋め込みのために、1xPBSで 2.5×10^6 細胞/mlに再構成した。M27細胞懸濁液(0.2ml)を、0日目に、36匹のC57BL

50

／6マウス（雌、8週令、20g； 5×10^5 細胞／マウス）の右脇腹の皮下に埋め込んだ。マウスを、各グループが9匹のマウスからなるように、無作為にグループ分けした。

【0394】

サルモネラVNP20009株を、本発明者の標準的な希釈方法によって $1 \times \text{PBS}$ で 5×10^6 CFU/mlに希釈した。下記表8に従って12日目にサルモネラ（ 1×10^6 CFU／マウス）0.2mlを、各マウスに尾静脈経由で投与した。注射した細菌の実数を測定するために、 5×10^6 CFU/mlの細菌懸濁液を、 1×10^3 CFU/mlにさらに希釈し、MsBbプレート上にプレーティングした。形成されたコロニーを翌日計数した。

【0395】

細菌注射の2日後の14日目に、マウスにシスプラチンを投与した（下記表8）。シスプラチンを、投与前に、正常生理食塩水で0.5mg/mlに希釈した。腫瘍体積は、実験の終わりまで週2回測定した。動物の行動、外観及び死亡率を毎日観察した。マウスは、清潔で、一定温度の実験室内に保持した。床敷きは週2回取り換え、マウスには十分な食物と飲料水を与えた。

【0396】

【表8】

グループ	マウス数
コントロール（未処置）	9
VNP20009、 1×10^6 /マウス、静脈内、12日	9
5 mpk シスプラチン、腹腔内、qw×2、14、19日	9
NP20009、 1×10^6 /マウス、静脈内、12日＋ 5 mpk シスプラチン、腹腔内、qw×2、14、19、33日	9

【0397】

図41に示すように、VNP20009＋シスプラチンによる組み合わせ処置は、VNP20009処置単独又はシスプラチン処置単独よりもM27肺癌の増殖を強く阻害した。これらの結果は、シスプラチンなどの化学療法剤と組み合わせた弱毒化腫瘍標的細菌の投与は、相乗的又は相加的に働き、肺癌などの固形腫瘍の増殖を阻害できることを示唆している。

【0398】

本発明は、本明細書中に記載された特定の実施態様によってその範囲を限定されるものではない。実際に、先行する記載及び添付の図面から、本明細書中に記載されているものの他に、本発明の多様な変形が存在することは、当業者には明らかであろう。そのような変形は、特許請求の範囲内に入ることを意図する。

【0399】

種々の刊行物が本明細書中で引用されており、それらの開示は、参照によってそれらの全体が本明細書中に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

成熟ヒトTNF- α のコード配列を示す図である。DNA配列（配列番号3）とタンパク質配列（配列番号4）の両方を示す。

【図2】

サルモネラVNP20009 serC株の誘導を示す図である。

【図3】

ネズミチフス菌における、染色体に組み込まれたtrcプロモーター駆動TNF- α 遺伝子からのTNF- α 発現を示す図である。

【図4】

成熟ヒトTNF- α （ヌクレオチド67-543）との合成OmpAシグナル配列（ヌク

10

20

30

40

50

レオチド 1 - 63) 融合物のコード配列を示す図である。融合構築物についての DNA 配列 (配列番号 7) とタンパク質配列 (配列番号 8) の両配列を示す。

【図 5】

大腸菌 (JM109 株) における OmpA / TNF - 融合タンパク質の周辺細胞質局在化およびプロセッシングを示す図である。

【図 6】

成熟ヒト TRAIL (ヌクレオチド 67 - 801) との OmpA シグナル配列 (ヌクレオチド 1 - 63) 融合物のコード配列を示す図である。融合構築物についての DNA 配列 (配列番号 9) とタンパク質配列 (配列番号 10) の両配列を示す。

【図 7】

大腸菌 (JM109 株) における OmpA TRAIL 融合タンパク質の発現およびプロセッシングを示す図である。

【図 8】

成熟 (C125A) ヒト IL-2 (ヌクレオチド 64 - 462) との修飾 OmpA シグナル配列 (ヌクレオチド 1 - 63) 融合物のコード配列を示す図である。融合構築物についての DNA 配列 (配列番号 11) とタンパク質配列 (配列番号 12) の両配列を示す。

【図 9】

phoA (8L) または ompA (8L) 合成シグナルペプチドに融合した成熟ヒト IL-2 の発現およびプロセッシングを示す図である。

【図 10】

成熟 (C125A) ヒト IL-2 (ヌクレオチド 64 - 462) との修飾 phoA シグナル配列 (ヌクレオチド 1 - 63) 融合物のコード配列を示す図である。融合構築物についての DNA 配列 (配列番号 13) とタンパク質配列 (配列番号 14) の両配列を示す。

【図 11】

ヒト TNF - の成熟形態を発現するネズミチフス菌弱毒化株の *in vivo* 抗腫瘍効力を示す図である。

【図 12】

BRP 発現が *in vivo* 抗腫瘍効力に及ぼす影響を示す図である。同図は、(1) PBS 対照; (2) VNP20009; および (3) BRP 遺伝子を含む pSW1 プラスミドを保有する VNP20009 で治療した、B16 黒色腫を有する C57BL/6 マウス集団の時間経過に対する平均腫瘍サイズを示したグラフである。

【図 13】

サルモネラにおける、pepT プロモーターの制御下での -gal 遺伝子発現の嫌気性菌誘導を示す図である。図 13A は、2 株のサルモネラ、YS1456 および VNP20009 の嫌気性条件に应答する -gal 発現の *in vitro* 誘導を示す図である。図 13B は、BRP、-gal、もしくは BRP と -gal を発現する VNP20009 サルモネラの、腫瘍対肝細胞における -gal の *in vivo* 誘導を示す図である。

【図 14】

サルモネラにおける、Tet プロモーターの制御下での -gal 遺伝子発現のテトラサイクリン誘導を示す図である。用量応答は、約 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度までテトラサイクリンに対し線形応答を示すが、これを超えると、応答の低下がみられ、これは恐らく、テトラサイクリンの抗生物質作用によるものと考えられる。

【図 15】

pTrc99a ベクターからのヘキサヒスチジン - エンドスタチン (ヘキサ HIS - エンドスタチン) 発現を示す図である。図 15A は、サルモネラ (VNP20009) に形質転換させた 3 つの独立したクローンからのヘキサ HIS - エンドスタチンの発現を示す図である。図 15B は、大腸菌 (DH5) に形質転換させた 5 つの独立したクローンからのヘキサ HIS - エンドスタチンの発現を示す図である。偶数番号のレーンは、非誘導培養物からの抽出物を、また、奇数番号のレーンは、対応する IPTG 誘導培養物からの抽

10

20

30

40

50

出物をそれぞれ示す。

【図16】

プラスミド Y A 3 3 3 4 からのヘキサ H I S - エンドスタチンの発現を示す図である。a s d 系 (t r c プロモーターを用いる) におけるヘキサ H I S - エンドスタチンは、抗ヒスチジン抗体を用いたウェスタン分析によりヘキサ H I S - エンドスタチン (~ 2 5 k D) の適正サイズのバンドを発現することができる。

【図17】

C 3 8 マウス大腸癌に対するエンドスタチンを発現する V N P 2 0 0 0 9 細胞の効力を示す図である。同図は、(1) P B S 対照 ; (2) 空の Y A 3 3 3 4 ベクターを保有する a s d - V N P 2 0 0 0 9 ; (3) ヘキサヒスチジン - エンドスタチンを発現する a s d - V N P 2 0 0 0 9 ; および (4) ヘキサヒスチジン - エンドスタチンと B R P を発現する V N P 2 0 0 0 9 でそれぞれ治療した、確立された C 3 8 腫瘍を有するマウス集団の時間経過に対する平均腫瘍サイズを示すグラフである。

10

【図18】

D L D 1 ヒト大腸癌に対するエンドスタチンを発現する V N P 2 0 0 0 9 細胞の効力を示す図である。同図は、(1) P B S 対照 ; (2) 空の Y A 3 3 3 4 ベクターを保有する a s d - V N P 2 0 0 0 9 ; および (3) ヘキサヒスチジン - エンドスタチンと B R P を発現する V N P 2 0 0 0 9 でそれぞれ治療した、確立された D L D 1 腫瘍を有するヌードマウス集団の時間経過に対する平均腫瘍サイズを示すグラフである。

【図19】

内皮細胞に対するヒトエンドスタチンを発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラからの溶解物の抗増殖活性を示す図である。同図は、b F G F および 8×10^8 細菌に相当する溶解物に应答するヒト静脈内皮細胞 (H U V E C) 増殖の阻害を示す。対照として、空の p T r c ベクターを含むサルモネラを使用した。各データの点数は、4 回反復して行なった代表的実験からの平均値である。サンプルを細菌数で基準化した。

20

【図20】

内皮細胞に対する血小板第 4 因子ペプチド (血小板第 4 因子のアミノ酸 4 7 - 7 0) および トロンボスポンジンペプチド (1 3 . 4 0) を発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラからの溶解物の抗増殖活性を示す図である。同図は、b F G F および 8×10^8 細菌に相当する溶解物に应答するヒト静脈内皮細胞 (H U V E C) 増殖の阻害を示す。対照として、空の p T r c ベクターを含むサルモネラを使用した。各データの点数は、4 回反復して行なった代表的実験からの平均値である。サンプルを細菌数で基準化した。

30

【図21】

p E 3 . シヤトル - 1 ベクターの構築を示す図である。

【図22】

C o l E 3 - C A 3 8 ベクター (G e n B a n k 登録番号 A F 1 2 9 2 7 0) の構築を示す図である。C o l E 3 - C A 3 8 ベクターのヌクレオチド配列を配列番号 1 に示す。C o l E 3 - C A 3 8 ベクターは、配列番号 2 ~ 5 にそれぞれ示すように、5 つのオープンリーディングフレームを含む。

【図23】

C o l E 3 - C A 3 8 / B R P - 1 ベクターの構築を示す図である。

40

【図24】

各株によって産生されたコリシン E 3 の致死単位の量を示す棒グラフである。

【図25】

紫外線または X 線に暴露された各種菌株についてのハロー (h a l o) アッセイを示す図である。

【図26】

C 3 8 マウス大腸癌に対する 4 1 . 2 . 9 / C o l E 3 の効力を示す図である。

【図27】

N U / N u マウスにおける D L D 1 ヒト大腸癌に対する 4 1 . 2 . 9 / C o l / E 3 の抗

50

腫瘍活性を示す図である。

【図 28】

B 1 6 マウス黒色腫に対する 4 1 . 2 . 9 / C o l E 3 の効力を示す図である。

【図 29】

クローン化大腸菌 C N F 1 を発現するサルモネラの細胞毒性を示す図である。

【図 30】

C N F に暴露された H e L a 細胞 (A) は、正常な H e L a 細胞 (B) と比べて、腫脹および多核形成を示す。

【図 31】

3 ' から 5 ' 方向 (図 3 2 のマップからわかるように) の p C V D 4 4 2 - m s b B ベクターの m s b B 部分を示す図であり、該部分は、m s b B の中央に欠失を有し、かつその箇所に内部 N o t I、P a c I、S p h I、S f i I、S w a I および D r a I ポリリンカーを含む (配列番号 6 1)。図 3 2 参照。

【図 32】

D m s b B 領域に D N A をクローン化し、続いて染色体に挿入するための p C V D 4 4 2 - m s b B ベクターの制限マップおよび概略図である。M s b B d e l は、D m s b B の 5 ' および 3 ' 領域であり；m o b R P 4 は、プラスミドを 1 つの株から別の株に転移させるための可動化エレメントである。b l a は、カルベニシリンおよびアンピシリン等の b - ラクタム抗生物質に対する感受性を賦与する ラクタマーゼである。S a c B は、スクロースに対する感受性を賦与する遺伝子である。

【図 33】

1) p C V D 4 4 2 - T e t - B R P - A B ベクター、2) サルモネラ Y S 5 0 1 0 2 における D m s b B 染色体コピーによる相対的組換え、3) サルモネラ Y S 5 0 1 0 2 への染色体組込みと、これに続く株 V N P 2 0 0 0 9 へのファージ形質導入、4) 株 4 1 . 2 . 9 - T e t - B R P - A B をもたらすスクロース分離を示す図である。O r i R 6 K はプラスミド複製起点であり；m o b R P 4 は、プラスミドを 1 つの株から別の株に転移させるための可動化エレメントである。a m p は、カルベニシリンおよびアンピシリン等の b - ラクタム抗生物質に対する感受性を賦与する ラクタマーゼである。s a c B は、スクロースに対する感受性を賦与する遺伝子である。定尺度で表示していないことに注意。

【図 34】

S K O V 3 細胞 (平均数 = 8) に 7 2 時間暴露した後の、陽性および陰性対照 (H S C 1 0 および 4 1 . 2 . 9) と比較した t e t B R P A B クローン # 2 6 およびクローン # 3 1 の細胞毒性 % を示す図である。ペロ毒素の発現は、テトラサイクリンにより誘導した (クローン 2 6 および 3 1 を参照)。テトラサイクリン治療あり (+) ; およびテトラサイクリン治療なし (-)。大腸菌株 H S C 1 0 は、細胞毒性 % の陽性対照として使用した。

【図 35】

テトラサイクリンの不在下 (1 A) およびテトラサイクリンの存在下 (1 B) で、弱毒化腫瘍標的サルモネラの、血液寒天上でのハロー形成を示す。また、テトラサイクリンの不在下 (2 A) およびテトラサイクリンの存在下 (2 B) で、構成的に S h e A . を発現するよう操作された弱毒化腫瘍標的サルモネラについてのハロー形成を示す。さらに、テトラサイクリンの不在下 (3 A) およびテトラサイクリンの存在下 (3 B) で、テトラサイクリン誘導性 S h e A . を発現するよう操作された弱毒化腫瘍標的サルモネラについてのハロー形成を示す。

【図 36】

(A) ヘキサヒスタジントグを含まない T A T - アポプチン融合タンパク質を示す。(B) ヘキサヒスタジントグを含む T A T - アポプチン融合タンパク質を示す。(C) O m p A - 8 L シグナル配列を含む T A T - アポプチン融合タンパク質を示す。

【図 37】

T A T - アポプチン融合タンパク質のコード配列を示す図である。D N A (配列番号 5 7

）およびタンパク質（配列番号58）の両配列を示す。

【図38】

ヘキサヒスチジン-TAT-アポプチン融合タンパク質のコード配列を示す図である。DNA（配列番号59）およびタンパク質（配列番号60）の両配列を示す。

【図39】

C57BL/6マウスにおけるM27肺癌増殖に対するVNP20009/サイトキサン組合せ治療の効力を示す図である。

【図40】

C57BL/6マウスにおけるM27肺癌増殖に対するVNP20009/マイトマイシン組合せ治療の効力を示す図である。

【図41】

C57BL/6マウスにおけるM27肺癌増殖に対するVNP20009/シスプラチン組合せ治療の効力を示す図である。

10

【図1】

ATG GTA CGT AGC TCC TCT CGC ACT CCG TCC GAT AAG CCG GTT GCT
M V R S S S R T P S D K P V A

CAT GTA GTT GCT AAC CCT CAG GCA GAA GGT CAG CTG CAG TGG CTG
H V V A N P Q A E G Q L Q W L

AAC CGT CGC GCT AAC GCC CTG CTG GCA AAC GGC GTT GAG CTC CGT
N R R A N A L L A N G V E L R

GAT AAC CAG CTC GTG GTA CCT TCT GAA GGT CTG TAC CTG ATC TAT
D N Q L V V P S E G L Y L I Y

TCT CAA GTA CTG TTC AAG GST CAG GGC TGC CCG TCG ACT CAT GTT
S Q V L F K G Q G C P S T H V

CTG CTG ACT CAC ACC ATC AGC CGT ATT GCT GTA TCT TAC CAG ACC
L L T H T I S R I A V S Y Q T

AAA GTT AAC CTG CTG AGC GCT ATC AAG TCT CCG TGC CAG CGT GAA
K V N L L S A I K S P C Q R E

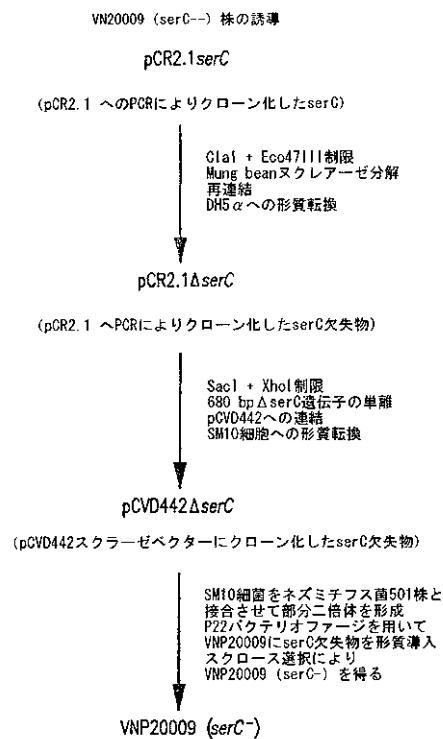
ACT CCC GAG GGT GCA GAA GCG AAA CCA TGG TAT GAA CCG ATC TAC
T P E G A E A K P W Y E P I Y

CTG GGT GGC GTA TTT CAA CTG GAG AAA GGT GAC CGT CTG TCC GCA
L G G V F Q L E K G D R L S A

GAA ATC AAC CGT CCT GAC TAT CTA GAT TTC GCT GAA TCT GGC CAG
E I N R P D Y L D F A E S G Q

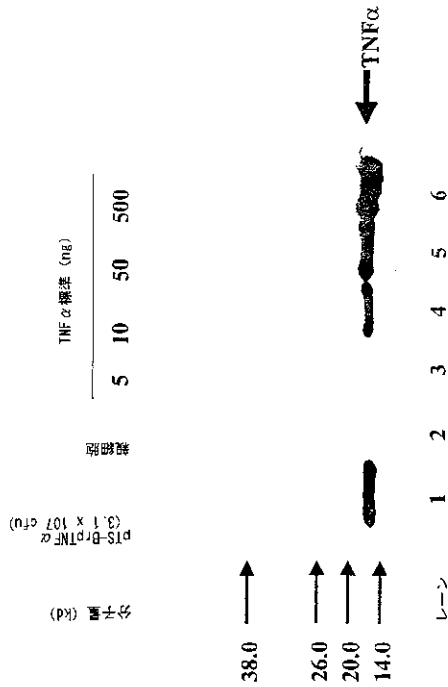
GTG TAC TTC GGT ATT ATC GCA CTG TAA
V Y F G I I A L *

【図2】



【 図 3 】

pTS-BrpTNF αクローン2によるTNF α発現の定量化



【 図 4 】

ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC
 M K K T A I A I A V A L A G F

GCT ACC GTA GCG CAG GCC CAT ATG GTA CGT AGC TCC TCT CGC ACT
 A T V A Q A H M V R S S S R T

CCG TCC GAT AAG CCG GTT GCT CAT GTA GTT GCT AAC CCT CAG GCA
 P S D K P V A H V V A N P Q A

GAA GGT CAG CTG CAG TGG CTG AAC CGT CGC GCT AAC GCC CTG CTG
 E G Q L Q W L N R R A N A L L

GCA AAC GGC GTT GAG CTC CST GAT AAC CAG CTC GTG GTA CCT TCT
 A N G V E L R D N Q L V V P S

GAA GGT CTG TAC CTG ATC TAT TCT CAA GTA CTG TTC AAG GGT CAG
 E G L Y L I Y S Q V L F K G Q

GGC TGC CCG TCG ACT CAT GTT CTG CTG ACT CAC ACC ATC AGC CGT
 G C P S T H V L L T H T I S R

ATT GCT GTA TCT TAC CAG ACC AAA GTT AAC CTG CTG AGC GCT ATC
 I A V S Y Q T K V N L L S A I

AAG TCT CCG TGC CAG CGT GAA ACT CCC GAG GGT GCA GAA GCG AAA
 K S P C Q R E T P E G A E A K

CCA TGG TAT GAA CCG ATC TAC CTG GGT GGC GTA TTT CAA CTG GAG
 P W Y E P I Y L G G V F Q L E

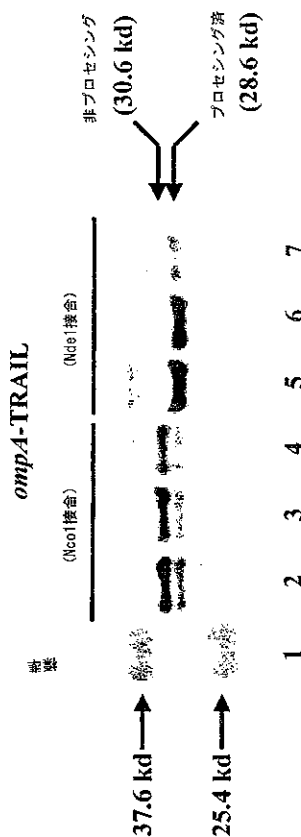
AAA GGT GAC CGT CTG TCC GCA GAA ATC AAC CGT CCT GAC TAT CTA
 K G D R L S A E I N R P D Y L

GAT TTC GCT GAA TCT GGC CAG GTG TAC TTC GGT ATT ATC GCA CTG
 D F A E S G Q V Y F G I I A L

TAA
 *

【 図 5 】

JM109細菌におけるtrcプロモーター駆動
ompA-TRAIL融合遺伝子産物の発現およびプロセッシング



【 図 6 】

ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC
 N K K T A I A I A V A L A G F

GCT ACC GTA GCG CAG GCC CAT ATG GCT AAC GAG CTG AAG CAG ATG
 A T V A Q A H M A N E L K Q H

CAG GAC AAG TAC TCC AAA AGT GGC ATT GCT TGT TTC TTA AAA GAA
 Q D K Y S K S G I A C F L K E

GAT GAC AGT TAT TGG GAC CCC AAT GAC GAA GAG AGT ATG AAC AGC
 C D S Y W D P N D E E S H R S

CCC TGC TGG CAA GTC AAG TGG CAA CTC CGT CAG CTC GTT AGA AAG
 P C W Q V K W Q L R Q L V R K

ATG ATT TTG AGA ACC TCT GAG GAA ACC ATT TCT ACA GTT CAA GAA
 M I L R T S E E T I S I V Q E

AAG CAA CAA AAT ATT TCT CCC CTA CTG AGA GAA AGA GGT CCT CAG
 K Q Q N I S P L V R E R G P Q

ACA GTA GCA GCT CAC ATA ACT GGG ACC AGA GGA AGA AGC AAC ACA
 R V A A H I T G T R E G R S N T

TTG TCT TCT CCA AAC TCC AAG AAT GAA AAG GCT CTG GGC CGC AAA
 L S S P N S K K E K A L G R K

ATA AAC TCC TGG GAA TCA TCA AGG AGT GGG CAT TCA TCT CTG AGC
 I N S W E S S R S G F S F L S

AAC TTG CAC TTG AGG AAT GGT GAA CTG GTC ATC CAT GAA AAA GGG
 N L H L R N G E L V I H E K G

TTT TAC TAC ATC TAT TCC CAA ACA TAC TTT CGA TTT CAG GAG GAA
 F Y Y I Y S Q T Y F R F Q F E

ATA AAA GAA AAC ACA AAG AAC GAC AAA CAA ATG GTC CAA TAT ATT
 I K E N T K N D K Q M V Q Y I

TAC AAA TAC ACA AGT TAT CCT GAC CCT ATA TTG TTG ATG AAA AGT
 Y K Y T S Y P D P I L L M K S

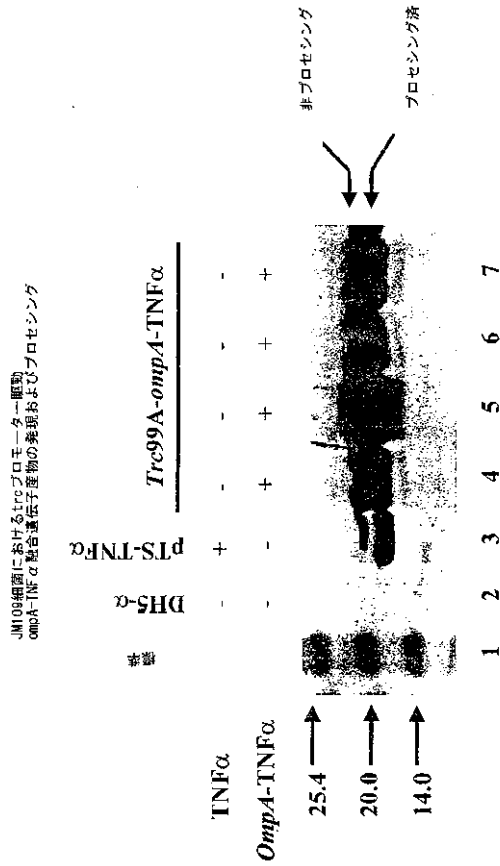
GCT AGA AAT AGT TGT TGG TCT AAA SAT GCA GAA TAT GGA CTC TAT
 A R N S C W S K D A E Y G L Y

TCC ATC TAT CAA GGG GGA ATA TTT SAG CTT AAG GAA AAT GAC AGA
 S I Y Q G G I F E L K E N D R

ATT TTT GTT TCT GTA ACA AAT GAG CAC ITG ATA GAC ATG GAC CAT
 I F V S V T N E H L I D M D H

GAA GCC AGT TTT TTC GGG GCC TTT TTA GTT GGC TAA
 E A S F F G A F L V G *

【 図 7 】



【 図 8 】

ATG AAA AAG ACG GCT CTG GCG CTT CTG CTC TTG CTG TTA GCG CTG
M K K T A L A L L L L L L A L

ACT AGT GTA GCG CAG GCC GCT CCT ACT AGC TCG AGC ACT AAG AAA
T S V A Q A A P T S S S T K K

ACT CAA CTG CAA TTG GAG CAT CTG CTG CTG GAT CTG CAG ATG ATT
T Q L Q L E H L L L D L Q M I

CTG AAT GGC ATC AAT AAC TAC AAG AAC CCT AAG CTG ACT CGC ATG
L N G I N N Y K N P K L T R M

CTG ACT TTC AAA TTC TAC ATG CCG AAA AAG GCT ACC GAG CTC AAA
L T F K F Y M P K K A T E L K

CAT CTC CAG TGC CTG GAA GAG GAA CTG AAG CCG CTG GAG GAA GTA
H L Q C L E E E L K P L E E V

CTT AAC CTG GCA CAG TCT AAG AAC TTC CAC CTG CGT CCG CGT GAC
L N L A Q S K N F H L R P R D

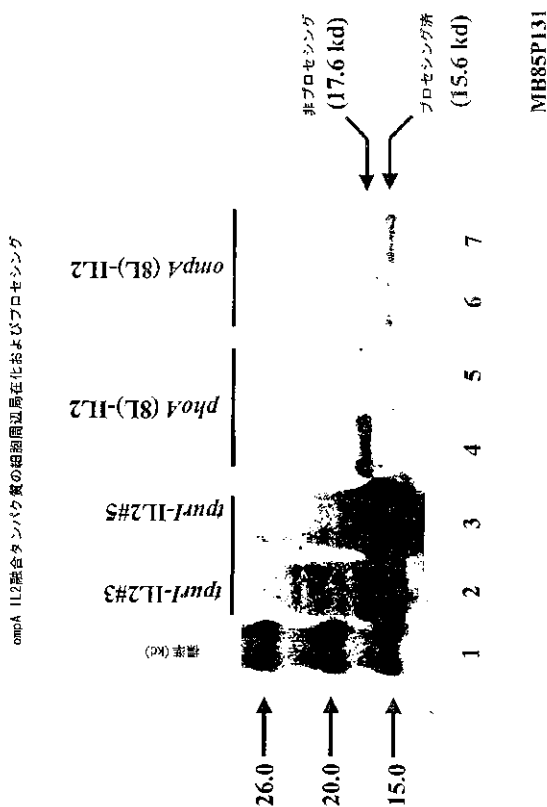
CTG ATC TCC AAC ATC AAT GTA ATC GTT CTT GAG CTG AAG GGA TCC
L I S N I N V I V L E L K G S

GAA ACC ACC TTC ATG TGC GAA TAC GCT GAC GAA ACC GCC ACC ATT
E T T F M C E Y A D E T A T I

GTG GAG TTC CTG AAC CGT TGG ATC ACC TTT GCC CAA TCG ATC ATT
V E F L N R W I T F A Q S I I

AGC ACG TTA ACT TAA
S T L T *

【 図 9 】



【 図 10 】

ATG AAA CAG TCG ACT CTG GCG CTT CTG CTC TTG CTG TTA GCG CTG
M K Q S T L A L L L L L L A L

ACT AGT GTG GCC AAA GCG GCT CCT ACT AGC TCG AGC ACT AAG AAA
T S V A K A A P T S S S T K K

ACT CAA CTG CAA TTG GAG CAT CTG CTG CTG GAT CTG CAG ATG ATT
T Q L Q L E H L L L D L Q M I

CTG AAT GGC ATC AAT AAC TAC AAG AAC CCT AAG CTG ACT CGC ATG
L N G I N N Y K N P K L T R H

CTG ACT TTC AAA TTC TAC ATG CCG AAA AAG GCT ACC GAG CTC AAA
L T F K F Y M P K K A T E L K

CAT CTC CAG TGC CTG GAA GAG GAA CTG AAG CCG CTG GAG GAA GTA
H L Q C L E E E L K P L E E V

CTT AAC CTG GCA CAG TCT AAG AAC TTC CAC CTG CGT CCG CGT GAC
L N L A Q S K N F H L R P R D

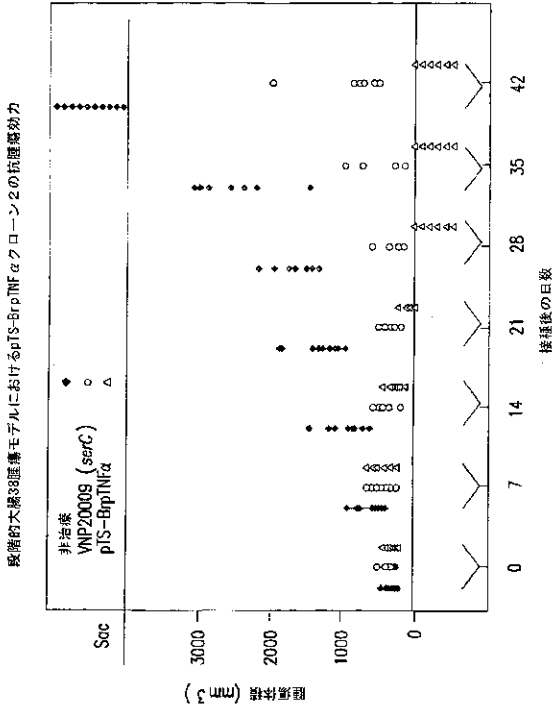
CTG ATC TCC AAC ATC AAT GTA ATC GTT CTT GAG CTG AAG GGA TCC
L I S N I N V I V L E L K G S

GAA ACC ACC TTC ATG TGC GAA TAC GCT GAC GAA ACC GCC ACC ATT
E T T F M C E Y A D E T A T I

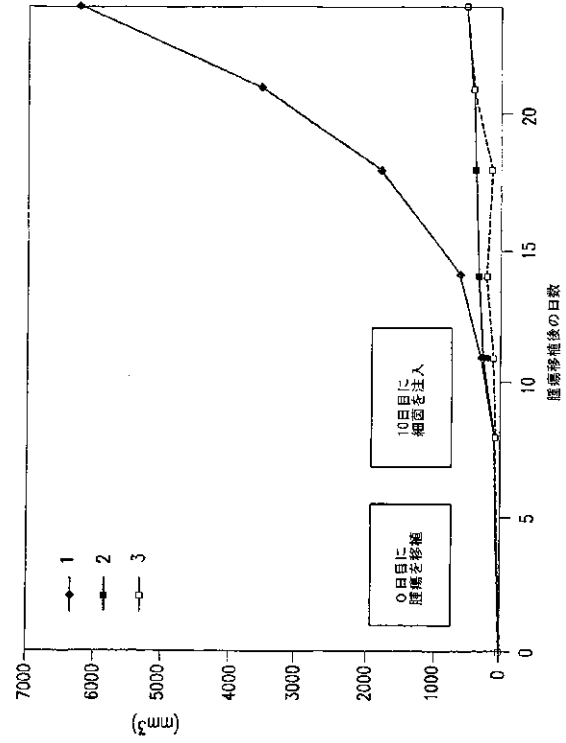
GTG GAG TTC CTG AAC CGT TGG ATC ACC TTT GCC DAA TCG ATC ATT
V E F L N R W I T F A Q S I I

AGC ACG TTA ACT TAA
S T L T *

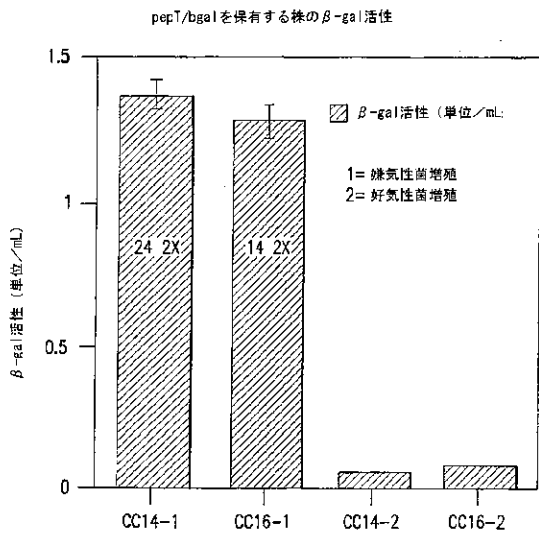
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】

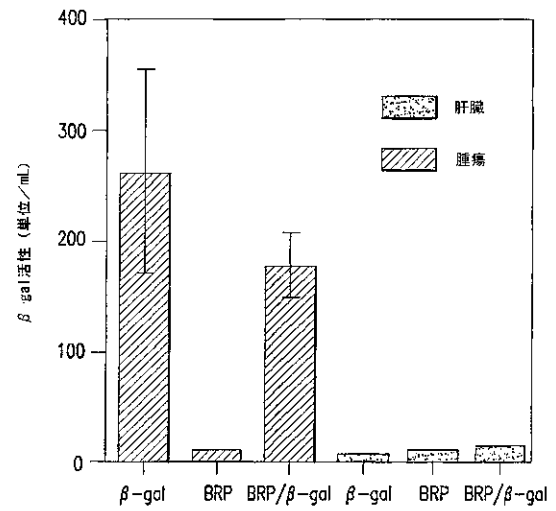


【 図 1 3 】



13A

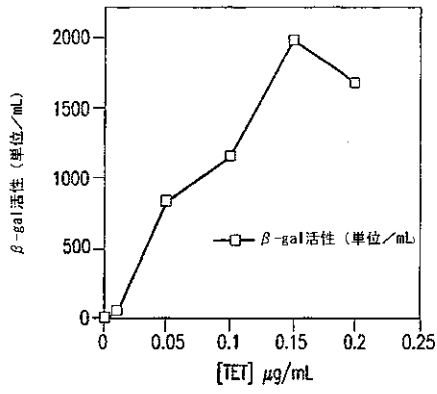
in vivoでのβ-gal活性、pepTβ-gal±BRP



13B

【 図 1 4 】

TETプロモーターを用いたβ-galの発現



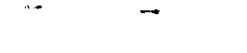
【 図 1 5 】

~25 kD →
ヘキサHIS-エンドスタチン



+ - + - + -
15A

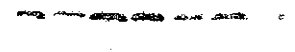
~25 kD →
ヘキサHIS-エンドスタチン



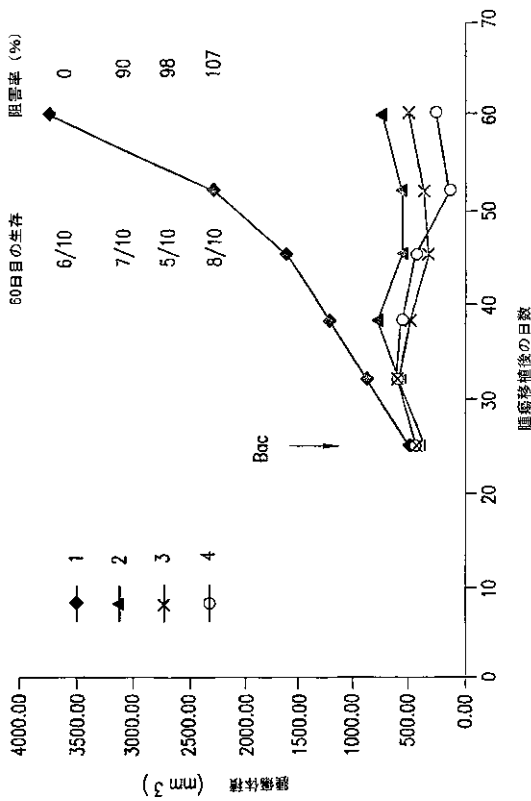
+ - + - + - + -
15B

【 図 1 6 】

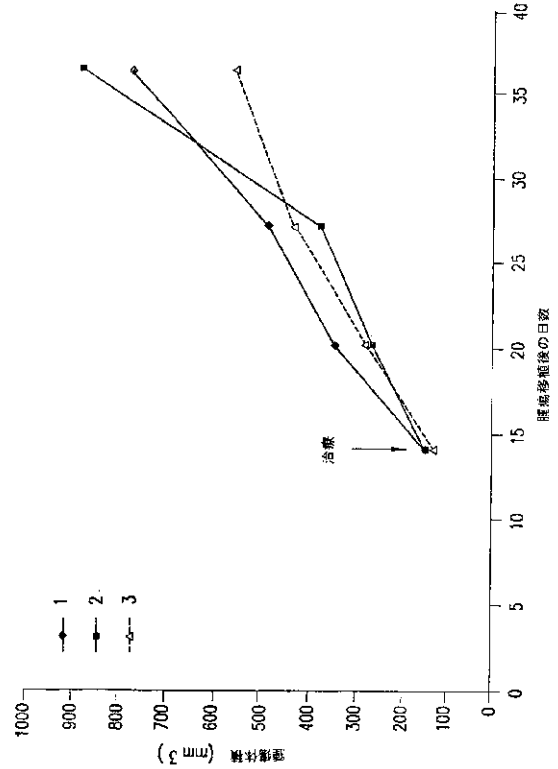
~25 kD →
ヘキサHIS-エンドスタチン



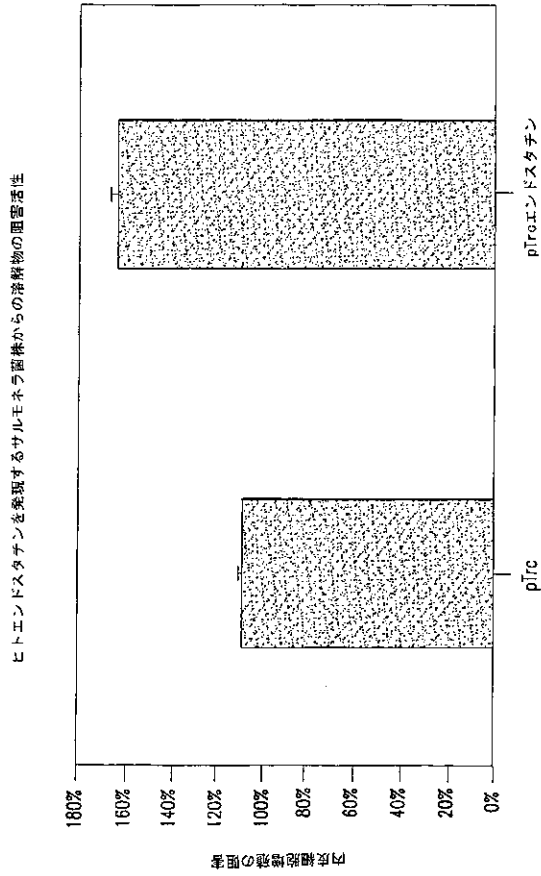
【 図 1 7 】



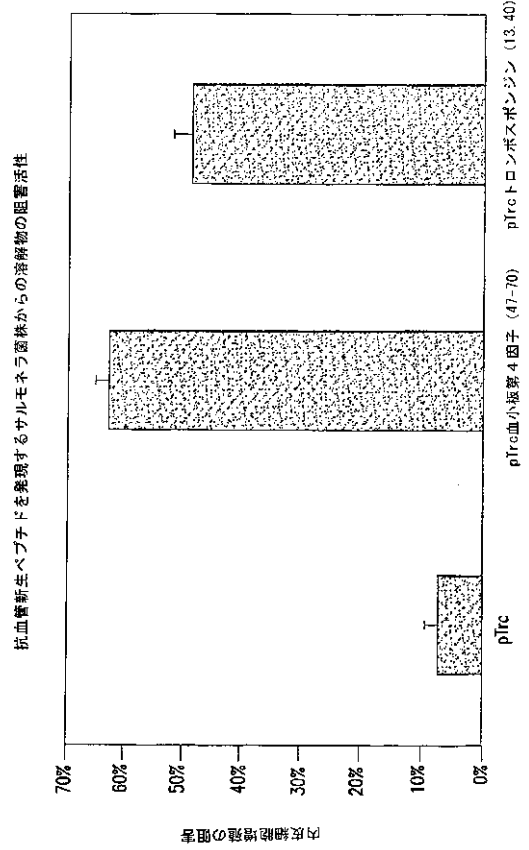
【 図 1 8 】



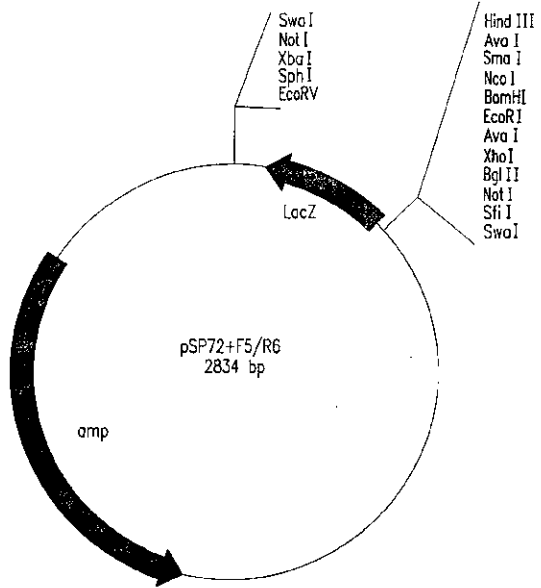
【 図 19 】



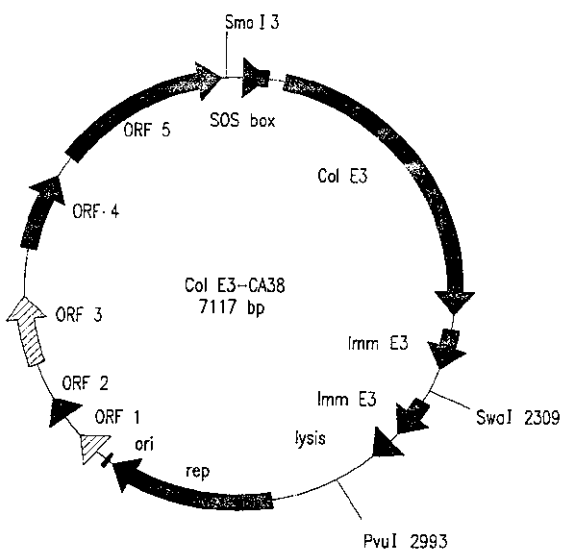
【 図 20 】



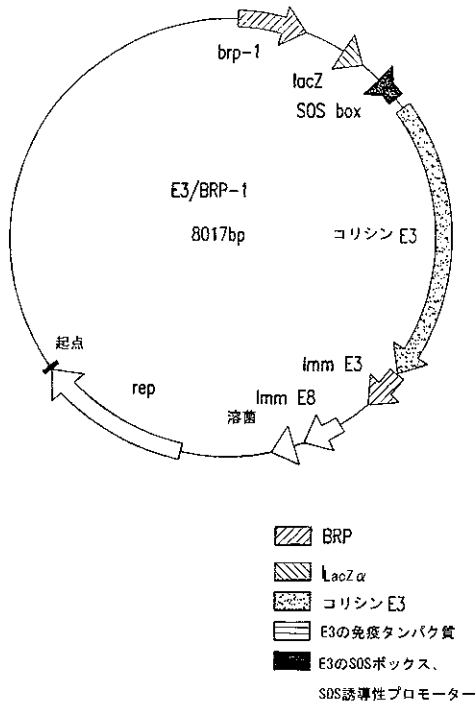
【 図 21 】



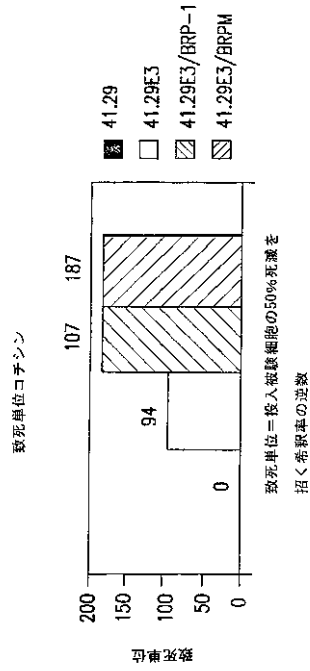
【 図 22 】



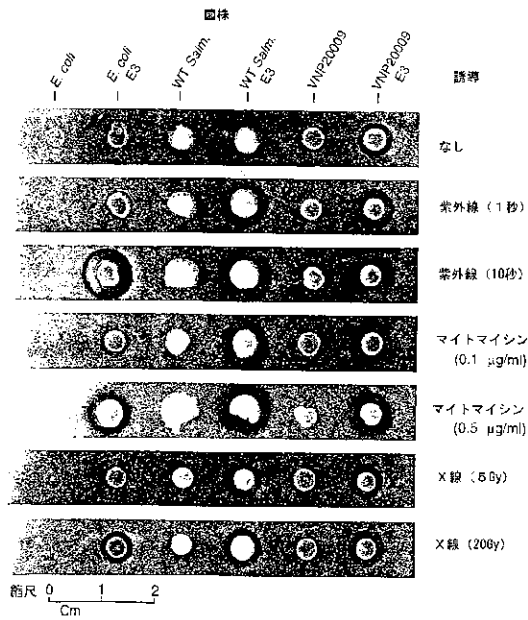
【 図 2 3 】



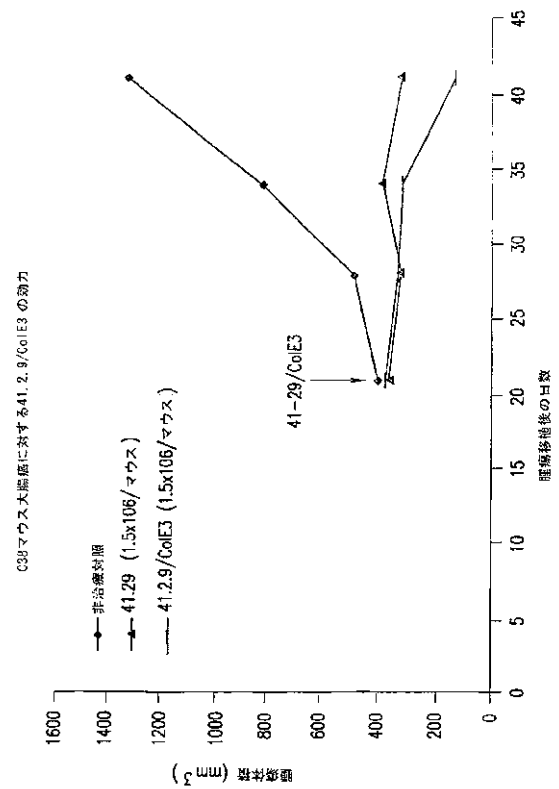
【 図 2 4 】



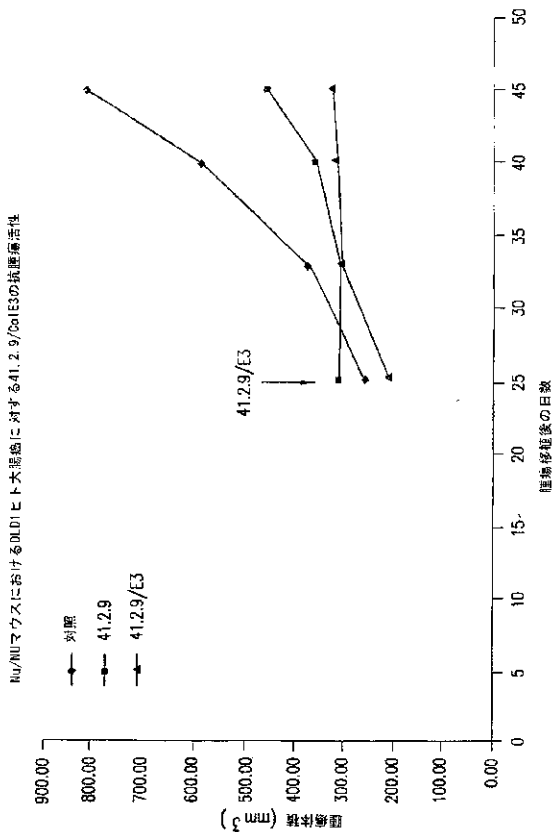
【 図 2 5 】



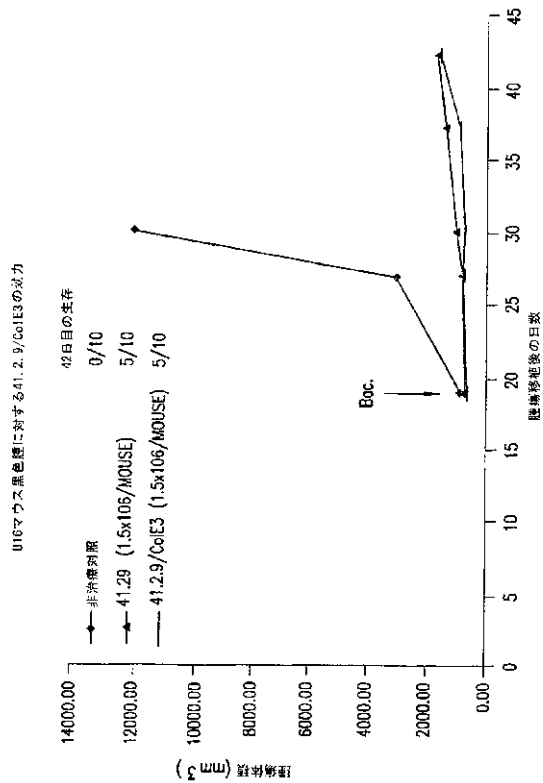
【 図 2 6 】



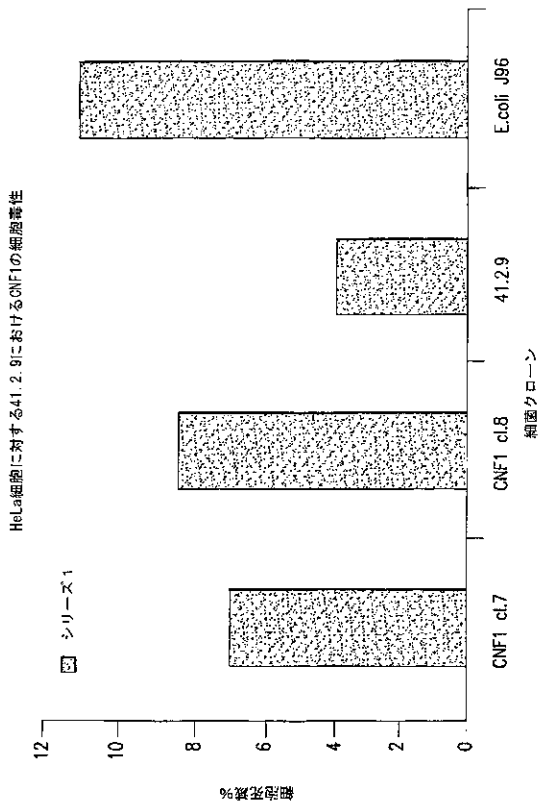
【 図 27 】



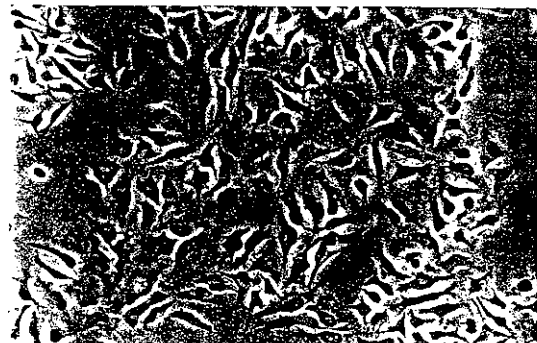
【 図 28 】



【 図 29 】



【 図 30 】



30A



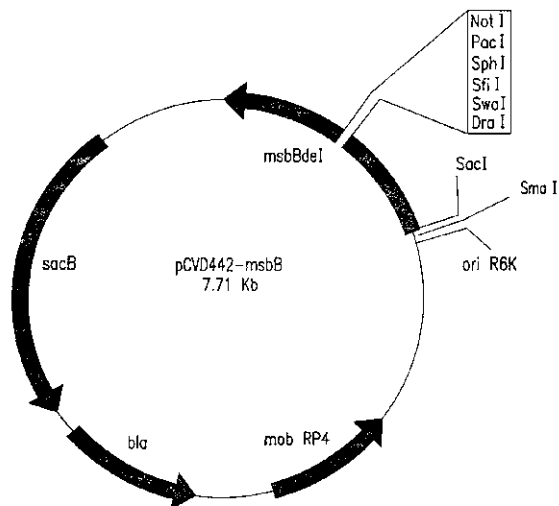
30B

【 図 3 1 】

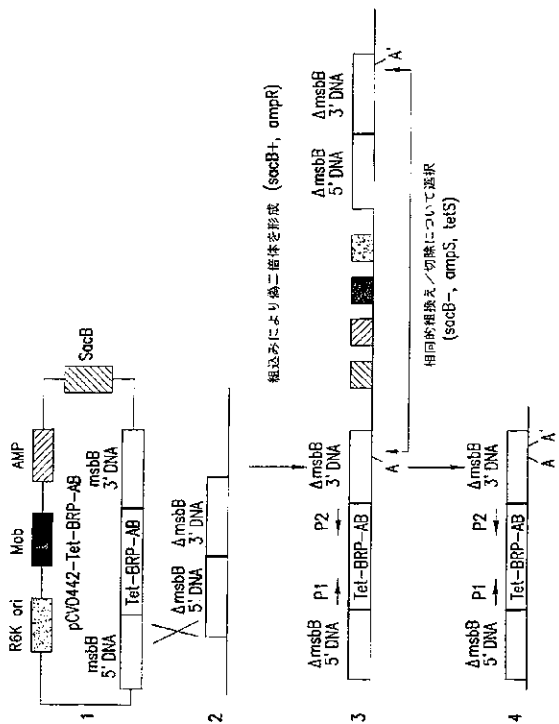
```

GATATGATTC TG90CTCTSA CCTTGTGATG CTGCGACSTG GCGATC168G CGT16AAATC G32BATCC86 70
A6CTG8T16G TATCC3A4AA G2GCTGA1TC G22GTG2G2G TCAGCTPAAC CG3GCACTCA H3ACCGCAAC 140
GCAAT8ATG S8T13ATGA TCACCAACCC GAT8G8S8C CGT8CGDAAG TGAT8EACG B5CGAAG8C8 210
GTCTG8ATG GCAC83ATG Q8T1A1G1G1 TCT8G8GAA CG8CAG8C8G TGAT8ATCC TCT8AAAC8G 280
TTCCCGAAT G3G3G3G3TC TGCT866G1G CAGAAAAAA1 CUCCAGCATC AAT8T8TCTA KACACCTCT 350
CGACT8CAG TTC8ACAC8G TTGAAGA8C CATT8CCATG TCT8G8A1G AT8G8GCAA SCATCT8AAA 420
88CGTACC8 C8AT8ATCAC CAT8AG8AA TT88GT8GT8 CCG8CT8AAT GACTTC8CG1 AT8AG8T8C8 490
88CT8CC8A1 I11888CAT8 TC88CGCAT8 A8G8C8G8T G8ACCT8AAC C8GCTCT8ATC 88G8G8T8AC 560
CGCGT8CAT FT88AT8AG8 G888T8AT8 C888T8AT8 G888T8AT8 G888T8AT8 G888T8AT8 630
AA88G8T8C T88T8T8CG8 CG8CT8G8T AT8G8T8C88 AG88G8T8G C888G8C8C 8T888T8T8A 700
C8AAT8AC8C 8888888888 C8T8AAT8A C8C8C8C8C8 G88888888 AT88888888 G8111AAAT8 770
C8A8G8T8C8 C88A888888 G888C8T8T8 GTT8C8A8T8 T8GTC8AAAA C888T8AT8C C88AAT8T8A 840
AG8AT8C8C8 C8AT8T8T8T8 C8C8C8C8C8 G8C8T8C8C8 T888T88AAT 8T88888888 C888C8AT8G 910
G8C8G888A8 AAT88C8T8T8 T888T88T8 G8C8AT8C8 C888A8AT8 T888A8AT8 T888A8C8T8 C8C8G8T8AC 988
AG88T8T88A AT8T8T8T8G C8C8888888 G8C8A8C8A G8C8AT8C88 C8AT8888T8 1888888888 1058
G888C8AT8C C8T8C8A8AT C88T888888 T888T8888 T888C88888 C8C8A8A8T8A 1128
T88888888 8888888888 C8T8T8C8A C8C8T8C888 A88888888 A88888888 G8C8A8A8T8A 1198
CG88A8T8G8 C8C88T8T8A AT8888T8C8 C888A8T88C 8888888888 A88888888 C8A8A8G8T8 1268
G8AT8888A8 AG8AT8T8T8 G8AT8A888 AT8AT8T8C8 T8T8T8T8T8 111888T8C8 AT8C8T8T8C8 1338
A888T8T8C8 G8C8G8AAA8 G8A8T8T8G8 AT8AT8T8C8 G8C8T8C8G T8T8C8A8A8 A8C8AAAA88 1408
C888C8A8C8 T888T8A8C8 88C8T8T8C8 C8C8AT8T8T8 AAT88A8888 C88T888888 A8A8C8T8T8 1478
T8C8C8T8T8C8 C888T8T8C8 C88888T8C8 A8C8C8T8C8 ACCT8C8G8T8 C8C888A8T8 T88C8T8C8A8 1538
A888T8A8C8 8C8T8C8168T T8AT8 1558
    
```

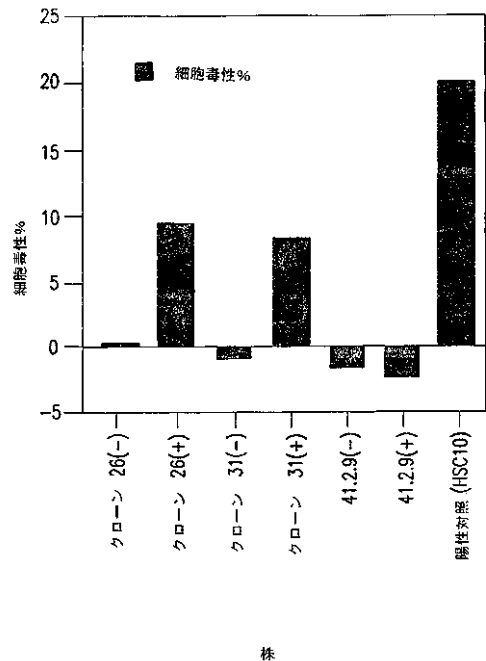
【 図 3 2 】



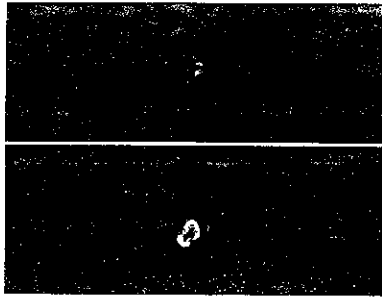
【 図 3 3 】



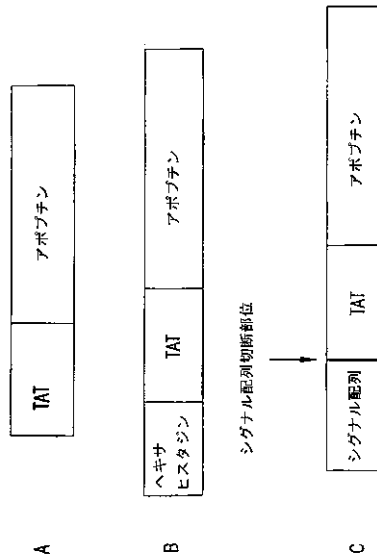
【 図 3 4 】



【 図 3 5 】



【 図 3 6 】



【 図 3 7 】

616-4 Fのタンパク質配列

616-4 Fの長さ : 551 bp; 1から551まで列挙
7から409まで(全領域)翻訳

使用した遺伝子コード: Universal; Wed, Aug 16, 2000 1:40 PM

フレーム 1

NAG	ACC	ATG	GCT	TAT	GCC	AGA	AAA	AAA	AGA	AGA	CAG	AGA	AGA	AGA	ATC	AAC
9			18		27		36		45							

A L Q E D T P P G P S T V F R P P T S
 GCG CTG CAG GAA GAT ACC CCG CCG GGC CCG TCC ACC GTG TTT CCG CCG ACC ACC TCC
 60 69 73 87 96 105

S R P L E T P H C R E I R I G I A G I
 TCC CCG CCG CTG GAA ACC CCG CAT TGC CCG GAA ATC CCG ATC GCG ATC GCG GCG GCG ATC
 117 126 135 144 153 162

F I T L S L C G C A N A R A P T L R S
 ACC ATC ACC CTG TCC CTG TGC GGC TGC GCG AAC GCG CCG CCG ACC CTG CCG TCC
 174 183 192 201 210 219

A T A D N S E N T G F K N V P D L R T
 GCG ACC CCG GAT AAC TCC GAA AAC ACC GCG TTT AAA AAC GTC CCG GAT CTG CCG ACC
 231 240 249 258 267 276

D Q P K P P S K K R S C D P S E Y R V
 GAT CAG CCG AAA CCG CCG TCC AAA AAA CCG TCC TCC GAT CCG TCC GAA TAT CCG GTC
 288 297 306 315 324 333

S E L K E S L I T T F P S R P R T A R
 TCC GAA CTG AAA GAA TCC CTG ATC ACC ACC CCG TCC CCG CCG CCG ACC GCG CCG
 345 354 363 372 381 390

R C I R L
 CCG TGC ATC CCG CTC TGA AAG CTT GGC TGT TTT GGC GGA TGA GAG AAG ATT TTC AGC
 402 411 420 429 438 447

CTG ATA CAG ATT AAA TCA GAA CCG AGA AGC GGT CTG ATA AAA CAG AAT TCG CCT GCG
 459 468 477 486 495 504

GGC AGT AGC GCG GTG GTC CCA CCT GAC CCC ATG CCG AAC TCA GA
 516 525 534 543

【 図 3 8 】

TAP68B trcFのタンパク質配列

TAP68B trcFの長さ : 751 bp; 1から444まで列挙

7から427まで(全領域)翻訳
使用した遺伝子コード: Universal; Mon, Aug 14, 2000 3:25 PM

フレーム 1

NAG	ACC	ATG	GCT	GAT	CAC	CAC	CAC	CAT	TAT	GGC	GCG	AAA	AAA	CGC	CGT
9			18		27		36		45						

Q R R R R M N A L O E D T P P G P S T V
 CAG CCG CGT CCG ATG AAC GCG CTG CAG GAA GAT ACC CCG CCG GCG CCG TCC ACC GTG
 60 69 78 87 96 105

F R P P F S S R P I F T P H C R F I R
 TTT CCG CCG CCG ACC TCC TCC CCG CCG CTG GAA ACC CCG CAT TGC CCG GAA ATC CCG
 117 126 135 144 153 162

J G I A G I T J I T L S L C G C A N A R
 ATC GGC ATC GCG GGC ATC ACC ATC ACC CTG TCC CTG TCC GCG TGC GCG AAC GCG CCG
 174 183 192 201 210 219

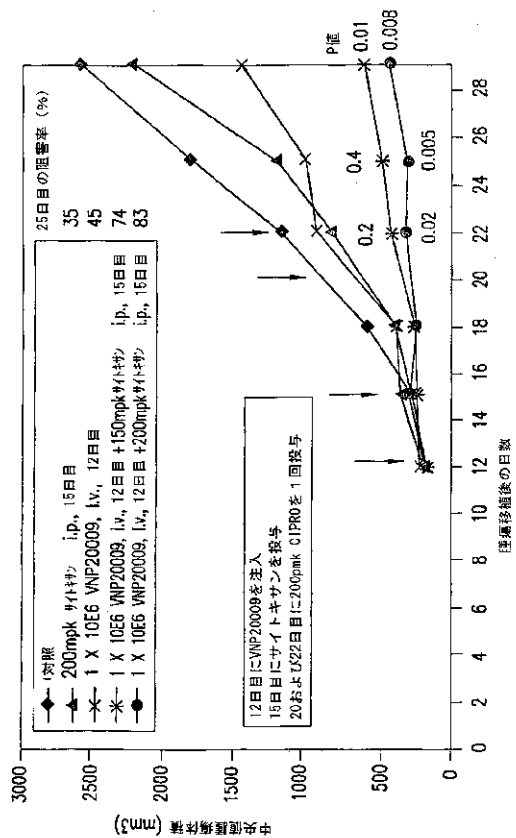
A P T L R S A T A D K S E N T G F K N
 GCG CCG ACC CTG CCG TCC CCG ACC GCG GAT AAC TCC GAA AAC ACC GCG TTT AAA AGC
 231 240 249 258 267 276

V P D L R T D O P K P P S K K R S C D
 GTC CCG GAT CTG CCG ACC CAT CAG CCG AAA CCG CCG TCC AAA AAA CCG TCC TCC GAT
 288 297 306 315 324 333

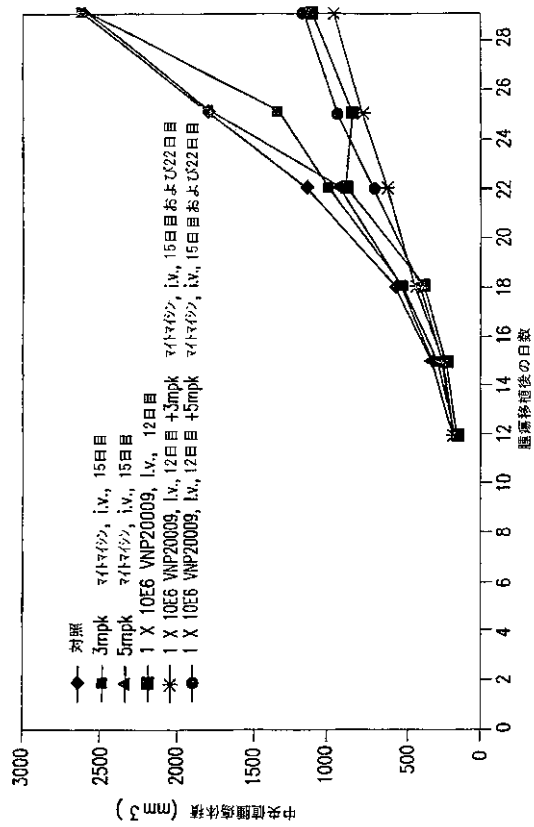
P S E Y R V S E L K E S L I T T T P S
 CCG TCC GAA TAT CCG GTC TCC GAA CTG AAA GAA TCC CTG ATC ACC ACC ACC CCG TCC
 345 354 363 372 381 390

R P R T A R R C I R L *
 CCG CCG CCG ACC GCG CCG CCG TCC ATC CCG CTC TGA AAG CTT GGC TGT TTT
 402 411 420 429 438

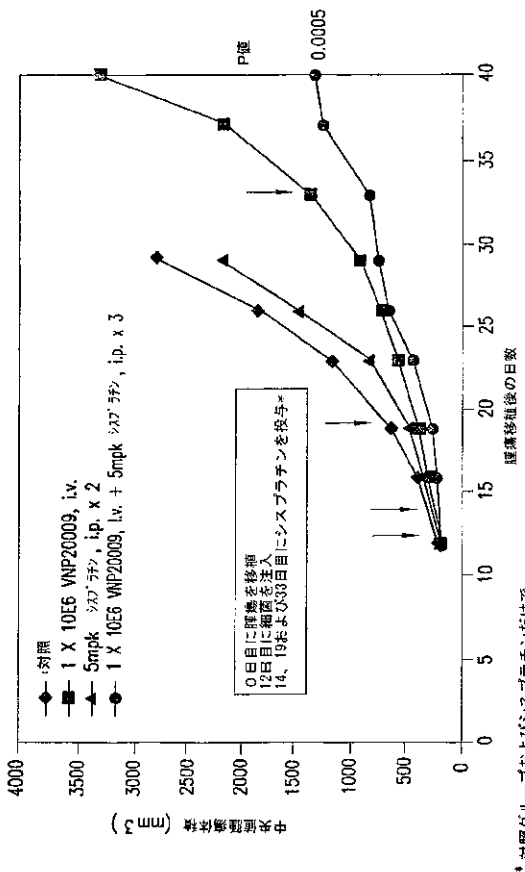
【 図 3 9 】



【 図 4 0 】



【 図 4 1 】



* 対照グループおよびシスプラチンだけで治療したグループは28日目に中止した。

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
12 April 2001 (12.04.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/25397 A2

(51) International Patent Classification: C12N
(21) International Application Number: PCT/US00/23242
(22) International Filing Date: 24 August 2000 (24.08.2000)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data:
60/157,500 4 October 1999 (04.10.1999) US
60/157,581 4 October 1999 (04.10.1999) US
60/157,637 4 October 1999 (04.10.1999) US

(71) Applicant (for all designated States except US): VION PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; Four Science Park, New Haven, CT 06511 (US).

(72) Inventors and
(75) Inventors/Applicants (for US only): BERMUDEZ, David, G. [US/US]; 524 North Main Street, Wallingford, CT 06492 (US). KING, Ivan, C. [US/US]; 65 Blue Hills

Road, New Haven, CT 06473 (US). CLAIRMONT, Caroline, A. [US/US]; 80 Marwin Circle, Cheshire, CT 06410 (US). LIN, Stanley, L. [US/US]; 173 Old Toll Road, Madison, CT 06143 (US). BELCOURT, Michael [US/US]; 9 Algonquin Drive, Wallingford, CT 06442 (US).

(74) Agents: BALDWIN, Geraldine, E. et al.; Pennic & Edmonds LLP, 1155 Avenue of the Americas, New York, NY 10036 (US).

(81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NG, NZ, NL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, JS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,

[Continued on next page]

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR TUMOR TARGETED DELIVERY OF EFFECTOR MOLECULES

ATG GTA GGT AGC TCG TCG ACC CCG GCG GAT AAG GCG GTT GCT
R Y R S S S S S T P S C K P V A
CAT GTA GTT GTT AAC GTT CAG GGA GAA GGT CAG CAG TAG CAG
K Y A A L P D A E G U R G W L
AAG GCG GCG GGT AAC GCG CCG CCG GAG AAG GCG GTT GAG CAG CAG
Y X R A K A A I L A R S Y E L K
GAT AAC CAG CCG CCG GGT GAT TGT GAA GGT CAG CAG CAG CAG
D R O L P Y P S E R I Y L S Y
TGT GAA GGA CCG TCA AAG GAT CAG GCG TAC GCG TAG ACC GAT GTT
S G Y L F R S R G C F S T H Y
GTC CCG ACT CAG ACC ATC AAG GGT ATT GGT GGA TGT CAG CAG ACC
L L F R S I D R I A V S Y Q T
AAA GTT AAC CCG CCG ACC GGT AAG CAG TCG CCG CAG GGT GAA
Y V A L L S A T K S F C Q R E
ACT CCG GAG GGT GGA GGA GCG AAA GGA TGG TAT GAA GCG ATC CAG
T F E C A E A E P M Y E P I S
GAG GGT GCG GGT TTT CAG CCG GAA GAA GGT GAG CAG CAG CCG GAA
L G G P P C E E K G E R K S A
GAA AAG AAC GGT GGT GAT GAT GAT TTT GCG GAA GCG GCG CAG
E S R R P D P A P A L S G G
GAG TAC TCG ATT AAC GCA CCG TAA
Y Y D S I C A L Y

WO 01/25397 A2

(57) Abstract: The present application discloses the preparation and use of attenuated tumor-targeted bacteria vectors for the delivery of one or more primary effector molecule(s) to the site of a solid tumor. The primary effector molecule(s) of the invention is used in the methods of the invention to treat a solid tumor cancer such as a carcinoma, melanoma, lymphoma, or sarcoma. The invention relates to the surprising discovery that effector molecules, which may be toxic when administered systemically to a host, can be delivered locally to tumors by attenuated tumor-targeted bacteria with reduced toxicity to the host. The application also discloses the delivery of one or more optional effector molecule(s) (termed secondary effector molecules) which may be delivered by the attenuated tumor targeted bacteria in conjunction with the primary effector molecule(s).

WO 01/25397 A2



IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BI, CE, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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

Published:

— Without international search report and to be republished upon receipt of that report.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

**COMPOSITIONS AND METHODS FOR TUMOR-TARGETED
DELIVERY OF EFFECTOR MOLECULES**

This application claims priority to U.S. provisional patent applications Nos. 60/157,500, 60/157,581, and 60/157,637, filed on October 4, 1999, the contents of each of which is incorporated herein by reference its entirety.

1. FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to the delivery of one or more primary effector molecule(s) to a solid tumor for the treatment or inhibition of the tumor. More particularly, the invention is related to the preparation and use of attenuated tumor-targeted bacteria, such as, e.g., *Salmonella*, as a vector for the delivery of one or more primary effector molecule(s) to an appropriate site of action, e.g., the site of a solid tumor. Specifically, the attenuated tumor-targeted bacteria of the invention is a facultative aerobe or facultative anaerobe which is modified to encode one or more primary effector molecule(s). The primary effector molecule(s) of the invention include members of the TNF cytokine family, anti-angiogenic factors, and cytotoxic polypeptides or peptides. The primary effector molecules of the invention are useful, for example, to treat a solid tumor cancer such as a carcinoma, melanoma, lymphoma, sarcoma, or metastases derived from these tumors. The invention further relates to the surprising discovery that primary effector molecule(s) such as TNF family members, anti-angiogenic factors, and cytotoxic polypeptides or peptides can be delivered locally to tumors by attenuated tumor-targeted bacteria with reduced toxicity and reduced immunological complications to the host. The invention also relates to the delivery of one or more optional effector molecule(s) (termed "secondary effector molecules") which may be delivered by the attenuated tumor-targeted bacteria in conjunction with the primary effector molecule(s). The secondary effector molecule(s) provide additional anti-tumor therapeutic activity, enhance release of the primary effector molecule(s) from the attenuated tumor-targeted bacteria, and/or enhance uptake of the primary effector molecule(s) at the appropriate site of action, e.g., at the site of a solid tumor.

2. BACKGROUND OF THE INVENTION

A neoplasm, or tumor, is a neoplastic mass resulting from abnormal cell growth, which can be benign or malignant. Benign tumors generally remain localized. Malignant tumors generally have the potential to invade and destroy neighboring body tissue and spread to distant sites and cause death (for review, see Robins and Angell, 1976, *Basic*

WO 01/25397

PCT/US00/23242

Pathology, 2d Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-122). A tumor is said to have metastasized when it has spread from one organ or tissue to another.

A major problem in the chemotherapy of solid tumor cancers is delivery of therapeutic agents, such as drugs, in sufficient concentrations to eradicate tumor cells while at the same time minimizing damage to normal cells. Thus, studies in many laboratories are directed toward the design of biological delivery systems, such as antibodies, cytokines, and viruses for targeted delivery of drugs, pro-drug converting enzymes, and/or genes into tumor cells (see, e.g., Crystal, R.G., 1995, *Science* 270:404-410).

2.1. CELLULAR IMMUNITY AND CYTOKINES

One strategy for the treatment of cancer involves enhancing or activating a cellular immune response. Successful induction of a cellular immune response directed toward autologous tumors offers several advantages over conventional chemotherapy: 1) immune recognition is highly specific, being directed exclusively toward tumors; 2) growth at metastatic sites can be suppressed through immune surveillance; 3) the diversity of immune response and recognition can compensate for different resistance mechanisms employed by tumor cells; 4) clonal expansion of cytotoxic T cells can occur more rapidly than the expanding tumor, resulting in antitumor mechanisms which ultimately overwhelm the tumor; and 5) a memory response can suppress disease recurrence in its earliest stages, prior to physical detection. Clinical studies of responding patients have borne out results from animal models demonstrating that successful immunotherapy involves the activation of CD8+ T cells (class I response), although evidence exists for participation of CD4+ T cells, macrophages, and NK cells. See, e.g., Chapoval *et al.*, 1998, *J. Immunol.* 161:6977-6984; Gollub *et al.*, 1998, *J. Clin. Invest.* 102:561-575; Kikuchi *et al.*, 1999, *Int. J. Cancer* 80:425-430; Pan *et al.*, 1995, *Int. J. Cancer* 80:425-430; Saffran *et al.*, 1998, *Cancer Gene Ther.* 5:321-330; and Zimmermann *et al.*, 1999, *Eur. J. Immunol.* 29:284-290.

2.2. TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF) FAMILY OF CYTOKINES

The best characterized member of the TNF family is TNF- α . TNF- α is known to exert pleiotropic effects on the immune system. TNF- α is a cytokine which can exert potent cytotoxic effects directly on tumor cells. TNF- α is generally thought to exert its anti-tumor effects via other mechanisms such as stimulation of proliferation and differentiation, and prevention of apoptosis in monocytes (see, e.g., Mangan *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 146:1541-1546; and Ostensen *et al.*, 1987, *J. Immunol.* 138:4185-4191), promotion of tissue factor-like procoagulant activity and suppression of endothelial cell surface anticoagulant activity, ultimately leading to clot formation within the tumor (reviewed in Beutler and Cerami, 1989, *Ann. Rev. Immunol.* 7:625-655; and Vassalli, P.,

WO 01/25397

PCT/US00/23242

1992, *Ann. Rev. Immunol.* 10:411-452). However, as a result of these properties, systemic administration of TNF- α results in lethal consequences in the host due to disseminated intravascular coagulation.

Other cytokines have also been implicated in anti-tumor responses. IL-2 is a class I cytokine and is also thought to play a role in anti-tumor response. For example, spontaneously regressing melanomas have been associated with elevated intratumoral levels of TNF- α and IL-2. See, e.g., Beutler and Cerami, 1989, *Annu. Rev. Immunol.* 7:625-655; Lowes *et al.*, 1997, *J. Invest. Dermatol.* 108:914-919; Mangan *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 146:1541-1546; Scheruich *et al.*, 1987, *J. Immunol.* 138: 1786-1790.

Both TNF- α and IL-2 aid in lymphocyte homing, and IL-2 has been shown to induce tumor infiltration of natural killer (NK) cells, T-cells, and lymphokine activated killer (LAK) cells (see, e.g., Etter *et al.*, 1998, *Cytokine* 10:395-403; Reinhardt *et al.*, 1997, *Blood* 89:3837-46; Chen *et al.*, 1997, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56:541-50; Vora *et al.*, 1996, *Clin. Exp. Immunol.* 105:155-62; Lusinskas *et al.*, 1996, *J. Immunol.* 157:326-35; Kjaergaard *et al.*, 1998, *Scand. J. Immunol.* 47, 532-540; Johansson *et al.*, 1996, *Nat. Immun.* 15:87-97; and Watanabe *et al.*, 1997, *Am. J. Pathol.* 150:1869-80). In the presence of both TNF- α and IL-2, the cytolytic activity of NK and LAK cells is increased, even when directed against TNF-insensitive cell lines (see, e.g. Ostensen *et al.*, 1987, *J. Immunol.* 138:4185-4191). However, therapeutic levels of IL-2 have also been shown to be toxic to the host.

Clearly, dose-limiting toxicity from systemic cytokine administration poses a significant barrier to realizing the potential of cytokines in cancer therapy. Moreover, systemic cytokine delivery can result in decreased homing of syngeneic T cells, thus opposing targeted immunotherapy, in addition to resulting in unwanted clinical side effects. See Addison *et al.*, 1998, *Gene Ther.* 5:1400-1409; Albertini *et al.*, 1997, *Clin. Cancer Res.* 3:1277-1288; Becker *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7826-7831; Book *et al.*, 1998, *J. Neuroimmunol.* 92:50-59; Cao *et al.*, 1998, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 124:88-92; D'Angelica *et al.*, 1999, *Cancer Immunol. Immunother.* 47:265-271; Deszo *et al.*, 1996, *Clin. Cancer Res.* 2:1543-1552; Kjaergaard *et al.*, 1998, *Scand. J. Immunol.* 47:532-540; Ostensen *et al.*, 1987, *J. Immunol.* 138:4185-4191; and Schirmacher *et al.*, 1998, *Clin. Cancer Res.* 4:2635-2645.

2.3. DELIVERY OF CYTOKINES

Recent experimental animal and clinical studies have attempted to bypass systemic toxicity of cytokines and administer higher doses, through sub-systemic or alternative methods of delivery of cytokines. In murine models, sarcoma-180 tumors have been treated with administration of a fusogenic liposome-encapsulated TNF- α gene, and systemic administration of polyethylene glycol-encapsulated TNF- α , which could localize

WO 01/25397

PCT/US00/23242

to the tumor vasculature (see Tsutsumi *et al.*, 1996, *Jpn. J. Cancer Res.* 87:1078-1085). Sensitization of tumors to TNF- α by endothelial-monocyte-activating polypeptide II has also been reported (see, Marvin *et al.*, 1999, *J. Surg. Res.* 63:248-255; Wu *et al.*, 1996, *Cancer Res.* 59:205-212).

In clinical studies, complete tumor eradication has been observed following high-dose TNF- α administration to patients via isolated limb perfusion, in combination with interferon- α or melphalan. However, this technique presents severe risks to the patient if the cytokines are not completely removed following treatment. Further, these treatments require limb isolation, which, in itself presents risks to the patient. See Eggermont *et al.*, 1997, *Semin. Oncol.* 24:547-555; Fraker *et al.*, 1995, *Cancer J. Sci. Am.* 1:122-130; Lejeune *et al.*, 1998, *Curr. Opin. Immunol.* 10:573-580; Marvin *et al.*, 1996, *J. Surg. Res.* 63:248-255; Mizuguchi *et al.*, 1998, *Cancer Res.* 58:5725-5730; Tsutsumi *et al.*, 1996, *Jpn. J. Cancer Res.* 87:1078-1085; and Wu *et al.*, 1996, *Cancer Res.* 59, 205-212.

Previous studies by Carrier *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148:1176-81, Saltzman *et al.*, 1997, *Cancer Biother. Radiopharm.* 12:37-45, Saltzman *et al.*, 1997, *J. Pediat. Surgery* 32:301-306 have reported the use of attenuated *Salmonella* strains to deliver IL-1 β (Carrier) and IL-2 (Saltzman) directly to livers and spleens, the natural sites of *Salmonella* infection, to serve as vaccine strains or affect hepatic metastases. Saltzman's studies used oral administration of *Salmonella* in which bacteria are taken up by GALT (gut associated lymphoid tissue) and transported to liver and spleen. However, these infections are limited to the natural sites of infection.

2.4. ANGIOGENESIS AND TUMORIGENESIS

Another strategy for the treatment of cancer involves the inhibition of angiogenesis. Angiogenesis is the process of growth of new capillaries from preexisting blood vessels. New capillaries are formed by a process in which the endothelial cells of the preexisting blood vessel, using proteolytic enzymes such as matrix metalloproteases, degrade the basement membranes in their vicinity, proliferate, migrate into surrounding stromal tissue and form microtubes. The process of angiogenesis is very tightly regulated by an interplay between negative and positive factors, and in adults is normally restricted to the female reproductive cycle and wound repair (Malonne *et al.*, 1999, *Clin. Exp. Metastasis* 17:1-14). Aberrant or abnormal regulation of angiogenesis has been implicated in many human disorders, including diabetic retinopathy, psoriasis, rheumatoid arthritis, cardiovascular disease, and tumorigenesis (Folkman, 1995, *Nat. Med.* 1:27-31).

Angiogenesis is a critical process for tumor growth and metastasis. Tumor formation is divided into two stages, the prevascular and vascular stages. Studies have shown that cells of prevascular tumors proliferate as rapidly as do cells from vascularized tumors. However, prevascular tumors rarely grow to more than 2-3 mm³ because of the

WO 01/25397

PCT/US00/23242

existence of an equilibrium between cell proliferation and cell death, the latter resulting from the hypoxic nature of the prevascular tumor (Folkman, 1995, *Nat. Med.* 1:27-31). The switch from the prevascular to vascular stage requires a shift in the balance of the regulatory factors of angiogenesis from a net balance favoring negative factors to one in which the positive factors, such as fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF), predominate (Cao, 1998, *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 20:161-176).
5 The shift in balance between regulatory factors is a result of the up-regulation of the angiogenic factors and the simultaneous down-regulation of anti-angiogenic factors (Folkman, 1995, *N. Eng. J. Med.* 333:1757-1763).

10 2.5. ANTI-ANGIOGENIC FACTORS

Anti-angiogenic factors were postulated to exist on the basis of several related phenomena that led to the conclusion that primary tumors often inhibited the growth of their metastases (Cao, 1998, *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 20:161-176). The first of these factors to be isolated was mouse angiostatin, a 38 kDa proteolytic fragment of plasminogen that is released into the circulation by primary Lewis lung carcinoma tumors and prevents
15 the growth of secondary metastases (O'Reilly *et al.*, 1994, *Cell* 79:315-328). In humans, peptides of 40, 42 and 45 kDa produced by the limited proteolysis of plasminogen with metalloelastase have anti-angiogenic activity comparable to mouse angiostatin (O'Reilly *et al.*, 1994, *Cell* 79:315-328). Plasminogen itself has no such activity. It is also thought that tumor-associated macrophages are responsible for the production of angiostatin, since
20 tumor cells themselves have no detectable angiostatin mRNA. Macrophage metalloelastase expression is induced by granulocyte colony stimulating factor (GM-CSF) secreted by the tumor cells (Dong *et al.*, 1997, *Cell* 88:801-810). In certain tumors, angiostatin production is catalyzed by serine proteases rather than metalloelastase, where serine proteases are
25 produced directly by the tumor cells (Gately *et al.*, 1997, *Cancer Res.* 56:4887-4890). Administration of angiostatin at a concentration of 100mg/kg/day to experimental mice with primary tumors resulted in a strong inhibition of tumor growth without toxic side effects. The tumors regrew within 2 weeks of cessation of the angiostatin treatment, indicating that the tumors regress into a dormant state rather than completely die as a result
30 of the treatment (O'Reilly *et al.*, 1996, *Nat. Med.* 2:689-692).

After the discovery of angiostatin, other angiogenesis inhibitors, including several angiogenesis-inhibiting peptides, were discovered and isolated. A more potent inhibitor of angiogenesis than angiostatin is kringle 5, a peptide comprising the fifth kringle domain of plasminogen (angiostatin comprises kringle domains 1-4). Kringle 5 can be produced by
35 the proteolysis of plasminogen, and recombinant forms are also active (Cao *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.* 272:22924-22928).

WO 01/25397

PCT/US00/23242

Endostatin was isolated in a manner similar to the isolation of angiostatin (O'Reilly et al., 1997, Cell 88:1-20), the source being a murine hemangioendothelioma rather than a Lewis lung carcinoma. The peptide has an apparent molecular mass of 20 kDa whose sequence corresponds to the C-terminal of collagen XVIII (O'Reilly et al., 1997, Cell 88:1-20), a region called NC1 that is divergent among various collagen molecules (Oh et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4229-4233; and Rehn et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4234-4238). In mice, the growth of Lewis lung carcinoma metastases is suppressed by the administration 0.3 mg/kg/day of recombinant endostatin, and the primary tumor regresses to a dormant state when the peptide is administered at 20 mg/kg/day. Functional recombinant endostatin can be produced from inclusion bodies, either *in vitro* by denaturation and refolding, or *in vivo* by the sustained release of subcutaneously administered endostatin inclusion body preparations (O'Reilly et al., 1997, Cell 88:1-20). An alternative method of endostatin delivery consisting of intramuscular administration of an endostatin expression plasmid results in only the partial inhibition of tumor growth in a mouse model system (Blezinger et al., 1999, Nat. Biotech. 17:343-348). Similarly, endostatin or angiotensin-encoding plasmids complexed to liposomes that were delivered intravenously resulted in a partial inhibition of tumor growth in a nude mouse model of breast cancer (Chen et al., 1999, Cancer Res. 59:3308-3312).

Recently, a novel anti-angiogenic activity has been attributed to a C-terminal truncation peptide of the Serpin (Serine Protease Inhibitor) anti-thrombin (O'Reilly et al., 1999, Science 285:1926-1928). Full length anti-thrombin has no inherent anti-angiogenic activity, but upon cleavage of the C-terminal reactive loop of the protein by thrombin, anti-thrombin acquires potent angiogenic activity. The proteolytic fragment is referred to hereinafter as anti-angiogenic anti-thrombin.

Other angiogenesis-inhibiting peptides known in the art include the 29 kDa N-terminal and a 40 kDa C-terminal proteolytic fragments of fibronectin (Homandberg et al., 1985, J. Am. Pathol. 120:327-332); the 16 kDa proteolytic fragment of prolactin (Clapp et al., 1993, Endocrinology 133:1292-1299); and the 7.8 kDa proteolytic fragment of platelet factor-4 (Gupta et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7799-7803).

In addition to those naturally produced proteolytic fragments that have demonstrated anti-angiogenic effects, several synthetic peptides that correspond to regions of known extracellular matrix proteins have been assessed for activity in inhibiting angiogenesis. Synthetic peptides which have been demonstrated to be functional endothelial inhibitors, *i.e.* angiogenesis inhibitors, include a 13 amino acid peptide corresponding to a fragment of platelet factor-4 (Maione et al., 1990, Cancer Res. 51:2077-2083); a 14 amino acid peptide corresponding to a fragment of collagen I (Tolma et al., 1993, J. Cell Biol. 122:497-511); a 19 amino acid peptide corresponding to a fragment of Thrombospondin I (Tolsma et al., 1993, J. Cell Biol. 122:497-511); and a 20 amino acid

WO 01/25397

PCT/US00/23242

peptide corresponding to a fragment of SPARC (Sage *et al.*, 1995, J. Cell. Biochem. 57:1329-1334), a secreted cysteine-rich extracellular matrix glycoprotein whose expression in human melanoma cells leads to reduced cellular invasion *in vitro* and reduced tumorigenicity in an *in vivo* nude mouse model (Ledda *et al.*, 1996, Nature Med. 3:171-176). Other peptides of less than 10 amino acids that inhibit angiogenesis and correspond to fragments of laminin, fibronectin, procollagen, and EGF have also been described (see the review by Cao, 1998, Prog. Mol. Subcell. Biol. 20:161-176).

The small fibronectin peptides that inhibit angiogenesis generally comprise the motif RGD. RGD is a peptide motif (amino acids Arg-Gly-Asp) used by proteins for recognition and binding to integrin molecules. The expression of integrin $\alpha_5\beta_1$ is associated with angiogenic blood vessels and inhibition of its activity by monoclonal antibodies blocks vascularization (Brooks *et al.*, 1994, Science 264:569-571). This has been confirmed by a study showing that the administration of cyclic pentapeptides containing the RGD motif inhibits the activity of vitronectin receptor-type integrins and block retinal neovascularization (Hammes *et al.*, 1996, Nature Medicine 2:529-533). The anti-angiogenic effect of integrin blockers such as cyclic pentapeptides and monoclonal antibodies has been shown to promote tumor regression by inducing the apoptosis of angiogenic blood vessels (Brooks *et al.*, 1994, Cell 79:1157-1164). Peptides comprising the RGD motif, and another integrin binding motif, NGR (amino acids Asn-Gln-Arg), showed markedly enhanced anti-tumor activity.

The inhibition of the activity of another type of cell surface receptor, namely the urokinase plasminogen activator (uPA) receptor, also results in the inhibition of angiogenesis. The uPA receptor, upon ligand binding, initiates a proteolytic cascade that is necessary for the basement membrane invasion step of angiogenesis. Inhibition of the uPA receptor by receptor antagonists inhibits angiogenesis, tumor growth (Min *et al.*, 1996, Cancer Res. 56: 2428-2433) and metastasis (Crowley *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5021-5025). Such antagonists have been identified by bacteriophage peptide display of random peptides (Goodson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7129-7133). Dominant negative forms of the receptor's ligand, uPA, have also been identified (Min *et al.*, 1996, Cancer Res. 56: 2428-2433).

While the discovery of angiostatin, endostatin and other anti-angiogenic peptides provided an exciting new approach for cancer therapy, the reality of a course of treatment involving one or more of these peptides is the impracticality of the production of immense amounts of peptides (stemming from the cost and/or labor of having to produce, for an average person of 65 kg or 143 lbs, approximately 1.3 or 6.5 grams of protein per day, depending on the peptide) and the duration of the treatment (which has to be sustained if the tumor is to stay in regression). It is thought that the two main reasons that these peptides have to be administered in such large quantities are that, first, a majority are

WO 01/25397

PCT/US00/23242

degraded in the blood stream and, second, of the molecules that do survive degradation only a very limited proportion make their way to the tumor. Thus, it would be a great advantage to the field of tumor therapy if anti-angiogenic proteins or peptides could be delivered more efficiently to the tumor and in a more cost-effective and patient-friendly manner.

5

2.6. BACTERIOCIN FAMILY

Colicin E3 (referred to hereinafter as ColE3) is a bacteriocin, *i.e.*, a bacterial proteinaceous toxin with selective activity, in that its host is immune to the toxin. Bacteriocins may be encoded by the host genome or by a plasmid, may have a broad or narrow range of hosts, and may have a simple structure comprising one or two subunits or may be a multi-subunit structure (Konisky, 1982, *Ann. Rev. Microbiol.* 36:125-144). In addition, a bacteriocin host has an immunity against the bacteriocin. The immunity is found in all cells of a given host population, even those that do not express the bacteriocin.

10

15

20

25

30

35

The cytotoxicity of ColE3 results from its inhibition of protein synthesis (Nomura, 1963, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28:315-324). The target of ColE3 activity is the 16S component of bacterial ribosomes, which is common to the 30S and 70S ribosomes (Bowman *et al.*, 1971, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68:964-968), and the activity results in the degradation of the ribosome (Meyhack, 1970, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*). ColE3 activity is unique among RNAses, in that it does not cause the overall degradation of RNA, but cleaves mRNA molecules 49 nucleotides from the end, resulting in the separation of the rRNA from the mRNA and thereby inhibiting translation. The ribonuclease activity of ColE3 resides in the molecule itself, rather than being mediated by another protein (Saunders, 1978, *Nature* 274:113-114). ColE3 is also able to penetrate the inner and outer membranes of the target cell.

In its naturally occurring form, ColE3 is a 60kDa protein complex consisting of a 50kDa and a 10kDa protein in a 1:1 ratio, the larger subunit having the nuclease activity and the smaller subunit having inhibitory function of the 50kDa subunit. Thus, the 50kDa protein acts as a cytotoxic protein (or toxin), and the 10kDa protein acts as an anti-toxin. The 50 kDa subunit comprises at least two functional domains, an N-terminal region required for translocation across target cell membranes, and a C-terminal region with catalytic (RNase) activity. Within the host organism, the activity of the large subunit is inhibited by the small subunit. The subunits are thought to dissociate upon entry of the toxin into the target cell as a result of interaction with the target cell's outer membrane (reviewed by Konisky, 1982, *Ann. Rev. Microbiol.* 36:125-144).

The toxicity of the large subunit of ColE3 has been utilized to prevent the lateral spread of cloned genes among microorganisms. Diaz *et al.* (1994, *Mol. Microbiol.* 13:855-861) separated the two components of ColE3 such that the small (anti-toxic) subunit was

WO 01/25397

PCT/US00/23242

expressed as a chromosomally integrated coding sequence and the large subunit was expressed from a plasmid. Bacteria with the chromosomally integrated small subunit are immune to plasmids that express the ColE3 large subunit, but if the plasmid were to be laterally transferred to another recipient that lacked the small subunit, that cell would be killed.

5 Colicin E3 (ColE3) has also been shown to have a profoundly cytotoxic effect on mammalian cells (see Smarda *et al.*, 1978, *Folia Microbiol.* 23:272-277), including a leukemia cell model system (see Fiska *et al.*, 1979, *Experimentia* 35:406-407). ColE3 activity targets the 40S subunit of the 80S mammalian ribosome (Turnowsky *et al.*, 1973, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 52:327-334).

10

2.7. BACTERIAL INFECTIONS AND CANCER

Early clinical observations reported cases in which certain cancers were reported to regress in patients with bacterial infections, See Nauts *et al.*, 1953, *Acta Medica Scandinavica* 145:1-102, (Suppl. 276); and Shear, 1950, *J.A.M.A.* 142:383-390. Since these observations, Lee *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1847-1851 (Lee *et al.*)
15 and Jones *et al.*, 1992, *Infect. Immun.* 60:2475-2480 (Jones *et al.*) isolated mutants of *Salmonella typhimurium* that were able to invade HEP-2 (human epidermoid carcinoma) cells *in vitro* in significantly greater numbers than the wild-type strain. The "hyperinvasive" mutants were isolated under conditions of aerobic growth of the bacteria that normally repress the ability of wild-type strains to invade HEP-2 animal cells.
20 However, such hyperinvasive *Salmonella typhimurium* as described by Lee *et al.* and Jones *et al.* carry the risk of pan-invasive infection and could lead to wide-spread bacterial infection in the cancer patient.

Carswell *et al.*, 1975, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:3666-3669, demonstrated that mice injected with bacillus Calmette-Guerin (BCG) have increased serum levels of TNF
25 and that TNF-positive serum caused necrosis of the sarcoma Meth A and other transplanted tumors in mice. As a result of such observations, immunization of cancer patients with BCG injections is currently utilized in some cancer therapy protocols. See Sosnowski, 1994, *Compr. Ther.* 20:695-701; Barth and Morton, 1995, *Cancer* 75 (Suppl. 2):726-734; Friberg, 1993, *Med. Oncol. Tumor. Pharmacother.* 10:31-36 for reviews of BCG therapy.
30

However, TNF- α -mediated septic shock is among the primary concerns associated with bacteria, and can have toxic or lethal consequences for the host (Bone, 1992, *JAMA* 268:3452-3455; Dinarello *et al.*, 1993, *JAMA* 269:1829-1835). Further, dose-limiting, systemic toxicity of TNF- α has been the major barrier to effective clinical use.
35 Modifications which reduce this form of an immune response would be useful because TNF- α levels would not be toxic, and a more effective concentration and/or duration of the therapeutic vector could be used.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

2.8. TUMOR-TARGETED BACTERIA

Genetically engineered *Salmonella* have been demonstrated to be capable of tumor targeting, possess anti-tumor activity and are useful in delivering effector genes such as the herpes simplex thymidine kinase (HSV TK) to solid tumors (Pawelek *et al.*, WO 96/40238).

5

2.9. DECREASED INDUCTION OF TNF- α BY MODIFIED BACTERIAL LIPID A

Modifications to the lipid composition of tumor-targeted bacteria which alter the immune response as a result of decreased induction of TNF α production were suggested by Pawelek *et al.* (Pawelek *et al.*, WO 96/40238). Pawelek *et al.* provided methods for
10 isolation of genes from *Rhodobacter* responsible for monophosphoryl lipid A (MLA) production. MLA acts as an antagonist to septic shock. Pawelek *et al.* also suggested the use of genetic modifications in the lipid A biosynthetic pathway, including the mutation *firA*, which codes for the third enzyme UDP-3-O (R-3 β -hydroxylmyristoyl)-glucosamine
15 -acyltransferase in lipid A biosynthesis (Kelley *et al.*, 1993, J. Biol. Chem. 268:19866-19874). Pawelek *et al.* showed that mutations in the *firA* gene induce lower levels of TNF α .

In *Escherichia coli*, the gene *msbB* (*mlt*) which is responsible for the terminal myristylation of lipid A has been identified (Engel, *et al.*, 1992, J. Bacteriol. 174:6394-6403; Karow and Georgopoulos 1992, J. Bacteriol. 174:702-710; Somerville *et al.*, 1996, J.
20 Clin. Invest. 97:359-365). Genetic disruption of this gene results in a stable non-conditional mutation which lowers TNF α induction (Somerville *et al.*, 1996, J. Clin. Invest. 97:359-365; Somerville, WO 97/25061). These references, however, do not suggest that disruption of the *msbB* gene in tumor-targeted *Salmonella* vectors would result in bacteria which are less virulent and more sensitive to chelating agents.

25 The problems associated with the use of bacteria as gene delivery vectors center on the general ability of bacteria to directly kill normal mammalian cells as well as their ability to overstimulate the immune system via TNF α which can have toxic consequences for the host (Bone, 1992, JAMA 268:3452-3455; and Dinarello *et al.*, 1993, JAMA 269:1829-1835). In addition to these factors, resistance to antibiotics can severely
30 complicate coping with the presence of bacteria within the human body (Tschape, 1996, D T W Dtsch Tierarztl Wochenschr 1996 103:273-7; Ramos *et al.*, 1996, Enferm Infec. Microbiol. Clin. 14: 345-51).

Hone and Powell, WO97/18837 ("Hone and Powell"), disclose methods to produce gram-negative bacteria having non-pyrogenic Lipid A or LPS.

35 Maskell, WO98/33923, describes a mutant strain of *Salmonella* having a mutation in the *msbB* gene which induces TNF α at a lower level as compared to a wild type strain.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

Bermudes *et al.*, WO 99/13053, teach compositions and methods for the genetic disruption of the *msbB* gene in *Salmonella*, which results in *Salmonella* possessing a lesser ability to elicit TNF α and reduced virulence compared to the wild type. In certain embodiments, some such mutant *Salmonella* have increased sensitivity to chelating agents as compared to wild type *Salmonella*. See also, Low *et al.*, 1999, Nature Biotech. 17:37-47.

Citation or identification of any reference in Section 2, or any section of this application shall not be construed as an admission that such reference is available as prior art to the present invention.

3. SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides methods for delivering one or more primary effector molecule(s) to a solid tumor. In an embodiment, the methods provide for delivery of a high level of one or more primary effector molecules. In particular, the invention provides methods by which a primary effector molecule(s), which may be toxic or induce unwanted effects (e.g., unwanted immunological effects) when delivered systemically to a host, can be delivered locally to tumor by an attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella* with reduced toxicity to the host. The present invention encompasses the preparation and the use of attenuated tumor-targeted bacteria, such as, e.g., *Salmonella*, as a vector for the delivery of one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s), to an appropriate site of action, e.g., the site of a solid tumor. Specifically, the attenuated tumor-targeted bacteria of the invention are facultative aerobes or facultative anaerobes which are engineered to encode one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s).

The present invention provides attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express nucleic acid molecules encoding primary effector molecules at the site of a solid tumor. In a specific embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express a nucleic acid molecule encoding a primary effector molecule. In another embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules. In accordance with this embodiment, a single bacterial strain is engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules at the site of a solid tumor. In another embodiment, more than one attenuated tumor-targeted bacterial strain is engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules. In a mode of this embodiment, the attenuated tumor-targeted bacterial strains are of the same species. In another mode of this embodiment, the attenuated tumor-targeted bacterial strains are of different species (e.g., *Listeria* and *Salmonella*).

WO 01/25397

PCT/US00/23242

The primary effector molecules of the invention are useful for the treatment of a solid tumor cancer such as a carcinoma, melanoma, lymphoma, or sarcoma. As used herein, "treatment of a solid tumor" or "treat a solid tumor" encompasses inhibiting the growth of a tumor or tumor cells, reducing the volume of a tumor, killing tumor cells, or spreading of tumor cells (metastasis). In a specific embodiment, the primary effector molecules of the invention induce a local immune response at the site of the tumor that results in the inhibition of growth of a tumor or tumor cells, the killing of tumor cells, or the prevention of the spread of tumor cells to other parts of the body. Accordingly, the primary effector molecules provide a therapeutic effect for treatment of a tumor.

The primary effector molecules can be derived from any known organism, including, but not limited to, animals, plants, bacteria, fungi, and protista, or viruses. In a preferred mode of one embodiment of the invention, the primary effector molecule(s) is derived from a mammal. In a more preferred mode of this embodiment, the primary effector molecule(s) is derived from a human. The primary effector molecules of the invention include members of the TNF family, anti-angiogenic factors, cytotoxic polypeptides or peptides, tumor inhibitory enzymes, and functional fragments thereof.

In a specific embodiment, the primary effector molecules of the invention are members of the TNF family or functional fragments thereof. Examples of TNF family members, include, but are not limited to, tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor necrosis factor- β (TNF- β), TNF- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TNF- α -related activation-induced cytokine (TRANCE), TNF- α -related weak inducer of apoptosis (TWEAK), CD40 ligand (CD40L), LT- α (lymphotoxin alpha), LT- β (lymphotoxin beta), OX40L (OX40 ligand), FasL, CD27L (CD27 ligand), CD30L (CD30 ligand), 4-1BBL, APRIL (a proliferation-inducing ligand), LIGHT (a 29 kDa type II transmembrane protein produced by activated T cells), TL1 (a tumor necrosis factor-like cytokine), TNFSF16, TNFSF17, and AITR-L (ligand of the activation-inducible TNFR family member). In a preferred embodiment, a primary effector molecule of the invention is tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor necrosis factor- β (TNF- β), TNF- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TNF- α -related activation-induced cytokine (TRANCE), TNF- α -related weak inducer of apoptosis (TWEAK), and CD40 ligand (CD40L), or a functional fragment thereof.

In another specific embodiment, the primary effector molecules of the invention are anti-angiogenic factors or functional fragments thereof. Examples of anti-angiogenic factors, include, but are not limited to, endostatin, angiostatin, apomigren, anti-angiogenic antithrombin III, the 29 kDa N-terminal and a 40 kDa C-terminal proteolytic fragments of fibronectin, a uPA receptor antagonist, the 16 kDa proteolytic fragment of prolactin, the 7.8 kDa proteolytic fragment of platelet factor-4, the anti-angiogenic 24 amino acid fragment of platelet factor-4, the anti-angiogenic factor designated 13.40, the anti-

WO 01/25397

PCT/US00/23242

angiogenic 22 amino acid peptide fragment of thrombospondin I, the anti-angiogenic 20 amino acid peptide fragment of SPARC, RGD and NGR containing peptides, the small anti-angiogenic peptides of laminin, fibronectin, procollagen and EGF, and peptide antagonists of integrin $\alpha_v\beta_3$ and the VEGF receptor. In a preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is a functional fragment of endostatin, apomigren or thrombospondin I.

5 In another specific embodiment, the primary effector molecules of the invention are cytotoxic polypeptides or peptides, or functional fragments thereof. Examples of cytotoxic polypeptides or peptides include, but are not limited to, members of the bacteriocin family, verotoxin, cytotoxic necrotic factor 1 (CNF1), cytotoxic necrotic factor 2 (CNF2), *Pasteurella multocida* toxin (PMT), *Pseudomonas* endotoxin, hemolysin, CAAX
10 tetrapeptides which are potent competitive inhibitors of farnesyltransferase, cyclin inhibitors, Raf kinase inhibitors, CDC kinase inhibitors, caspases, p53, p16, and p21. In a preferred embodiment, the primary effector molecule is a member of the bacteriocin family, with the proviso that said bacteriocin family member is not a bacteriocin release protein (BRP). Examples of bacteriocin family members, include, but are not limited to,
15 ColE1, ColE1a, ColE1b, ColE2, ColE3, ColE4, ColE5, ColE6, ColE7, ColE8, ColE9, Colicins A, Colicin K, Colicin L, Colicin M, cloacin DF13, pesticin A1122, staphylococcin 1580, butyricin 7423, pyocin R1 or AP41, megacin A-216, and vibriocin. In a specific embodiment, the primary effector molecule is colicin E3.

20 In another specific embodiment, the primary effector molecules of the invention are tumor inhibitory enzymes or functional fragments thereof. Examples of tumor inhibitory enzymes include, but are not limited to, methionase, asparaginase, lipase, phospholipase, protease, ribonuclease (excluding colE3), DNAase, and glycosidase. In a preferred embodiment, the primary effector molecule is methionase.

25 The present invention also provides methods for local, combinatorial delivery of one or more primary effector molecule(s) and one or more secondary effector molecule(s) to solid tumors by attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella*. In a specific embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express a nucleic acid molecule encoding a primary effector molecule and a secondary effector molecule. In
30 another embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules. In accordance with this embodiment, a single bacterial strain is engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more
35 primary effector molecules and one or more secondary effector molecules at the site of a solid tumor. In another embodiment, more than one attenuated tumor-targeted bacterial strain is engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules at the site of a

WO 01/25397

PCT/US00/23242

solid tumor. In a mode of this embodiment, the attenuated tumor-targeted bacterial strains are of the same species. In another mode of this embodiment, the attenuated tumor-targeted bacterial strains are of different species (e.g., *Listeria* and *Salmonella*).

The secondary effector molecule(s) of the invention provide additional anti-tumor therapeutic activity, enhance release of the primary effector molecule(s) from the attenuated tumor-targeted bacteria, and/or enhance internalization at the site of action, e.g., at the site of a solid tumor. The secondary effector molecule(s) of the invention comprise a molecule (such as an anti-tumor protein, including but not limited to a cytotoxin, an enzyme and a bacteriocin; a pro-drug converting enzyme; an antisense molecule; a ribozyme; an antigen; etc.) which is delivered in addition to the primary effector molecule(s) by the methods of the invention to treat a solid tumor cancer such as a carcinoma, melanoma, lymphoma, or sarcoma.

The secondary effector molecules can be derived from any known organism, including, but not limited to, animals, plants, bacteria, fungi, and protista, or viruses. In certain embodiments, the secondary effector molecule is derived from a bacteria or virus. In certain preferred embodiments of the invention, the secondary effector molecule(s) is derived from a bacterium (e.g., BRP). In other preferred embodiments of the invention, the secondary effector molecule(s) is derived from a virus (e.g., TAT). In yet other preferred embodiments of the invention, the secondary effector molecule(s) is derived from a mammal. In certain preferred embodiments, the secondary effector molecule(s) is derived from a human.

The invention provides attenuated tumor-targeted bacteria comprising effector molecule(s) which are encoded by a plasmid or transfectable nucleic acid. In a preferred embodiment of the invention, the attenuated tumor-targeted bacteria is *Salmonella*. When more than one effector molecule (e.g., primary or secondary) is expressed in an attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella*, the effector molecules may be encoded by the same plasmid or nucleic acid, or by more than one plasmid or nucleic acid. The invention also provides attenuated tumor-targeted bacteria comprising effector molecule(s) which are encoded by a nucleic acid which is integrated into the bacterial genome. Integrated effector molecule(s) may be endogenous to an attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella*, or may be introduced into the attenuated tumor-targeted bacteria (e.g., by introduction of a nucleic acid which encodes the effector molecule, such as a plasmid, transfectable nucleic acid, transposon, etc.) such that the nucleic acid encoding the effector molecule becomes integrated into the genome of the attenuated tumor-targeted bacteria. The invention provides a nucleic acid molecule encoding an effector molecule which nucleic acid is operably linked to an appropriate promoter. A promoter operably linked to a nucleic acid encoding an effector molecule may be homologous (i.e., native) or heterologous (i.e., not native to the nucleic acid encoding the effector molecule).

WO 01/25397

PCT/US00/23242

Examples of suitable promoters include but are not limited to the Tet promoter, *trc*, *pepT*, *lac*, *sulA*, *pol II* (*dinA*), *ruv*, *recA*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrD*, *umuDC*, *lexA*, *cea*, *caa*, *recN* and *pagC*.

The present invention also provides methods for local delivery of one or more fusion proteins comprising a signal sequence and an effector molecule by attenuated tumor-targeted bacteria. In a preferred embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins comprising an Omp-like protein, or portion thereof (e.g., signal sequence, leader sequence, periplasmic region, transmembrane domain, multiple transmembrane domains, or combinations thereof; see *infra*, Section 3.1 for definition of "Omp-like protein") and an effector molecule. Without intending to be limited as to mechanism, the present inventors believe that the Omp-like protein acts as an anchor or tether for the effector molecule to the outer membrane, or serves to localize the effector molecule to the bacterial outer membrane. In certain embodiments, the effector molecule has enhanced delivery to the outer membrane of the bacteria. In one embodiment, the fusion of an effector molecule to an Omp-like protein is used to enhance localization of an effector molecule to the periplasm. In certain other embodiments, the fusion of an effector molecule to an Omp-like protein is used to enhance release of the effector molecule. Examples of Omp-like proteins include, but are not limited to, at least a portion of each of the following: OmpA, OmpB, OmpC, OmpD, OmpE, OmpF, OmpT, a porin-like protein, PhoA, PhoE, lamB, β -lactamase, an enterotoxin, protein A, endoglucanase, peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL), FepA, FhuA, NmpA, NmpB, NmpC, and a major outer membrane lipoprotein (such as LPP). In other embodiments of the invention, a fusion protein of the invention comprises a proteolytic cleavage site. The proteolytic cleavage site may be endogenous to the effector molecule or endogenous to the Omp-like protein, or the proteolytic cleavage site may be constructed into the fusion protein.

The present invention also provides methods for local delivery of one or more fusion proteins comprising a ferry peptide and an effector molecule to a solid tumor by attenuated tumor-targeted bacteria. Ferry peptides used in fusion proteins have been shown to facilitate the delivery of a polypeptide or peptide of interest to virtually any cell within diffusion limits of its production or introduction (see, e.g., Bayley, 1999, *Nature Biotechnology* 17:1066-1067; Fernandez *et al.*, 1998, *Nature Biotechnology* 16:418-420; and Derossi *et al.*, 1998, *Trends Cell Biol.* 8:84-87). Accordingly, engineering attenuated tumor-targeted bacteria to express fusion proteins comprising a ferry peptide and an effector molecule enhances the ability of an effector molecule to be internalized by tumor cells. In a specific embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express a nucleic acid molecule encoding a fusion protein comprising a ferry peptide and an effector molecule. In another embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are

WO 01/25397

PCT/US00/23242

engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins comprising a ferry peptide and an effector molecule. In accordance with these embodiments, the effector molecule may be a primary or secondary effector molecule. Examples of ferry peptides include, but are not limited to, peptides derived from the HIV TAT protein, the antennapedia homeodomain (penetratin), Kaposi fibroblast growth factor (FGF) membrane-translocating sequence (MTS), and herpes simplex virus VP22.

5 The present invention also provides methods for local delivery of one or more fusion proteins comprising a signal peptide, ferry peptide and an effector molecule to a solid tumor by attenuated tumor-targeted bacteria. In a specific embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins comprising a signal sequence, a ferry peptide and an effector molecule. In accordance with this embodiment, the effector molecule may be a primary or secondary effector molecule.

10 The present invention also provides methods for local delivery of one or more fusion proteins comprising a signal peptide, a proteolytic cleavage site, a ferry peptide and an effector molecule to a solid tumor by attenuated tumor-targeted bacteria. In a specific embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins comprising a signal sequence, a proteolytic cleavage site, a ferry peptide and an effector molecule. In accordance with this embodiment, the effector molecule may be a primary or secondary effector molecule.

15 In certain embodiments, a single bacterial strain is engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding a fusion protein of the invention at the site of a solid tumor. In certain other embodiments, more than one attenuated tumor-targeted bacterial strain is engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins of the invention at the site of a solid tumor. In modes of these 20 embodiments, the attenuated tumor-targeted bacterial strains are of the same species. In another modes of these embodiments, the attenuated tumor-targeted bacterial strains are of different species (e.g., *Listeria* and *Salmonella*).

25 The present invention also provides methods for local delivery of one or more fusion proteins of the invention and one or more effector molecules of the invention to the site of a solid tumor by attenuated tumor-targeted bacteria. Preferably, the expression of both the fusion protein(s) and effector molecule(s) at the site of the solid tumor by an attenuated tumor-targeting bacteria improves the level of tumor or tumor cell growth inhibited compared to when either fusion protein(s) alone or the effector molecule(s) alone is expressed.

30 The present invention also provides expression of a primary effector molecule and optionally, a secondary effector molecule in an attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella*, which bacteria has an enhanced release system. In a preferred embodiment of

WO 01/25397

PCT/US00/23242

the invention, the enhanced release is associated with expression of a release factor by the attenuated tumor-targeted bacteria. In one embodiment, the release allows enhanced release of effector molecules from the cytoplasmic or periplasmic space. A release factor may be endogenous to the attenuated tumor-targeted bacteria or it may be exogenous (*i.e.*, encoded by a nucleic acid molecule that is not native to the attenuated tumor-targeted bacteria). A release factor may be encoded by a nucleic acid comprising a plasmid, or by a nucleic acid which is integrated into the genome of the attenuated tumor-targeted bacteria. A release factor may be encoded by the same nucleic acid or plasmid that encodes a primary effector molecule, or by a separate nucleic acid or plasmid. A release factor may be encoded by the same nucleic acid or plasmid that encodes a secondary effector molecule, or by a separate nucleic acid or plasmid. In a preferred embodiment, the release factor is a Bacteriocin Release Protein (BRP). In a specific embodiment, the BRP is that of the cloacin DF13 plasmid, one of colicin E1-E9 plasmids, or the colicin A, N or D plasmids. In a preferred embodiment, the BRP is of cloacin DF13 (pCloDF13 BRP). In another embodiment of the invention, the enhanced release system comprises overexpression of a porin protein.

The present invention also provides expression of a fusion protein of the invention in an attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella*, which bacteria has an enhanced release system. In a specific embodiment, the release factor is expressed in a cell which also expresses a fusion protein comprising a primary effector molecule fused to an Omp-like protein. In this embodiment, the co-expression of the release factor allows for enhanced release of the fusion protein from the periplasmic space.

In one embodiment, the present invention provides methods of delivering high levels of effector molecules or fusion proteins using modified, attenuated tumor-targeted strains of bacteria, which selectively accumulate within tumors while expressing the effector molecules or fusion proteins. In a specific mode, a modified, attenuated tumor-targeted strain of bacteria selectively amplifies effector molecules within tumors. While the teachings of the following sections are discussed, for simplicity, with reference specifically to *Salmonella*, the compositions and methods of the invention are in no way meant to be restricted to *Salmonella* but encompass any other bacteria to which the teachings apply. Specifically, the invention provides an attenuated tumor-targeted bacterium which is a facultative aerobe or facultative anaerobe. Examples of attenuated tumor-targeted bacteria include, but are not limited to, *Escherichia coli*, including enteroinvasive *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma hominis*, and *Streptococcus spp.*

The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector

WO 01/25397

PCT/US00/23242

5 molecules. The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules. The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins of the invention. Further, the present invention provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins of the invention and one or more effector molecules (*i.e.*, primary or/and secondary molecules). In a preferred embodiment, 10 the attenuated tumor-targeted bacteria is *Salmonella*.

The pharmaceutical compositions of the invention are useful for the treatment of solid tumors. Solid tumors include, but are not limited to, sarcomas, carcinomas, lymphomas, and other solid tumor cancers, including, but not limited to germ line tumors, tumors of the central nervous system, breast cancer, prostate cancer, cervical cancer, 15 uterine cancer, lung cancer, ovarian cancer, testicular cancer, thyroid cancer, astrocytoma, glioma, pancreatic cancer, stomach cancer, liver cancer, colon cancer, melanoma, renal cancer, bladder cancer, and mesothelioma.

The present invention provides methods for delivering a primary effector molecule for the treatment of a solid tumor cancer comprising administering, to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, in need of such treatment, a pharmaceutical composition comprising an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules. The present invention also provides methods for delivering a primary effector molecule for the treatment of a solid tumor cancer comprising administering, to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, in need of such treatment, a pharmaceutical composition comprising an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules. The present invention also provides methods for delivering a primary effector molecule for the treatment of a solid tumor cancer comprising administering, to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, in need of such treatment, a pharmaceutical composition comprising an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins of the invention. Further, the present invention provides methods for delivering a primary effector molecule for the treatment of 35 a solid tumor cancer comprising administering, to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, in need of such treatment, a pharmaceutical composition

WO 01/25397

PCT/US00/23242

comprising an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins of the invention and one or more effector molecules (*i.e.*, primary or/and secondary molecules). In a preferred embodiment, the attenuated tumor-targeted bacteria is *Salmonella*. In a specific mode, the attenuated tumor-targeted bacteria comprises an enhanced release system.

5 In certain embodiments, attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins can be used in conjunction with other known cancer therapies. For example, attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins can be used in
10 conjunction with a chemotherapeutic agent. Examples of chemotherapeutic agents include, but are not limited to, cisplatin, ifosfamide, paclitaxol, taxanes, topoisomerase I inhibitors (*e.g.*, CPT-11, topotecan, 9-AC, and GG-211), gemcitabine, vinorelbine, oxaliplatin, 5-fluorouracil (5-FU), leucovorin, vinorelbine, temodal, taxol, cytochalasin B, gramicidin D, emetine, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dione, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D,
15 1-dehydrotestosterone, melphalan, glucocorticoids, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol, and puromycin homologs, and cytoxin. Alternatively, attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins can be used in conjunction with radiation therapy.

20 The present invention includes the sequential or concomitant administration of anti-cancer agents and attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins. The invention encompasses combinations of anti-cancer agents and attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one
25 or more effector molecules and/or fusion proteins that are additive or synergistic.

The invention also encompasses combinations of anti-cancer agents and attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins that have different sites of action.
30 Such a combination provides an improved therapy based on the dual action of these therapeutics whether the combination is synergistic or additive. Thus, the novel combinational therapy of the present invention yields improved efficacy over either agent used as a single-agent therapy.

3.1. DEFINITIONS AND ABBREVIATIONS

35 As used herein, *Salmonella* encompasses all *Salmonella* species, including: *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis*, and *Salmonella enteritidis*. Serotypes of

WO 01/25397

PCT/US00/23242

Salmonella are also encompassed herein, for example, *typhimurium*, a subgroup of *Salmonella enteritidis*, commonly referred to as *Salmonella typhimurium*.

Analog: As used herein, the term "analog" refers to a polypeptide that possesses a similar or identical function as a primary or secondary effector molecule but does not necessarily comprise a similar or identical amino acid sequence of a primary or secondary effector molecule, or possess a similar or identical structure of a primary or secondary effector molecule. A polypeptide that has a similar amino acid sequence refers to a polypeptide that satisfies at least one of the following: (a) a polypeptide having an amino acid sequence that is at least 30%, at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95% or at least 99% identical to the amino acid sequence of a primary or secondary effector molecule described herein; (b) a polypeptide encoded by a nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions to a nucleotide sequence encoding a primary or secondary effector molecule described herein of at least 5 contiguous amino acid residues, at least 10 contiguous amino acid residues, at least 15 contiguous amino acid residues, at least 20 contiguous amino acid residues, at least 25 contiguous amino acid residues, at least 40 contiguous amino acid residues, at least 50 contiguous amino acid residues, at least 60 contiguous amino residues, at least 70 contiguous amino acid residues, at least 80 contiguous amino acid residues, at least 90 contiguous amino acid residues, at least 100 contiguous amino acid residues, at least 125 contiguous amino acid residues, or at least 150 contiguous amino acid residues; and (c) a polypeptide encoded by a nucleotide sequence that is at least 30%, at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95% or at least 99% identical to the nucleotide sequence encoding a primary or secondary effector molecule described herein. A polypeptide with similar structure to a primary or secondary effector molecule described herein refers to a polypeptide that has a similar secondary, tertiary or quaternary structure of primary or secondary effector molecule described herein. The structure of a polypeptide can be determined by methods known to those skilled in the art, including but not limited to, peptide sequencing, X-ray crystallography, nuclear magnetic resonance, circular dichroism, and crystallographic electron microscopy.

Anti-angiogenic factor: An anti-angiogenic factor is any proteinaceous molecule which has anti-angiogenic activity, or a nucleic acid encoding such a proteinaceous molecule. In a preferred embodiment, the anti-angiogenic factor is a peptide fragment or cleavage fragment of a larger protein.

Attenuation: Attenuation is a modification so that a microorganism or vector is less pathogenic. The end result of attenuation is that the risk of toxicity as well as other side-effects is decreased, when the microorganism or vector is administered to the patient.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

Bacteriocin: A bacteriocin is a bacterial proteinaceous toxin with selective activity, in that the bacterial host is immune to the toxin. Bacteriocins may be encoded by the bacterial host genome or by a plasmid, may be toxic to a broad or narrow range of other bacteria, and may have a simple structure comprising one or two subunits or may be a multi-subunit structure. In addition, a host expressing a bacteriocin has immunity against the bacteriocin.

5 Chelating agent sensitivity: Chelating agent sensitivity is defined as the effective concentration at which bacteria proliferation is affected, or the concentration at which the viability of bacteria, as determined by recoverable colony forming units (c.f.u.), is reduced.

10 Derivative: As used herein, the term "derivative" in the context of a "derivative of a polypeptide" refers to a polypeptide that comprises an amino acid sequence of a polypeptide, such as a primary or secondary effector molecule, which has been altered by the introduction of amino acid residue substitutions, deletions or additions, or by the covalent attachment of any type of molecule to the polypeptide. The term "derivative" as used herein in the context of a "derivative of a primary or a secondary effector molecule" refers to a primary or secondary effector molecule which has been so modified, e.g., by the
15 covalent attachment of any type of molecule to the primary or secondary molecule. For example, but not by way of limitation, a primary or secondary effector molecule may be modified, e.g., by proteolytic cleavage, linkage to a cellular ligand or other protein, etc. A derivative of a primary or secondary effector molecule may be modified by chemical modifications using techniques known to those of skill in the art (e.g., by acylation,
20 phosphorylation, carboxylation, glycosylation, selenium modification and sulfation). Further, a derivative of a primary or secondary effector molecule may contain one or more non-classical amino acids. A polypeptide derivative possesses a similar or identical function as a primary or secondary effector molecule described herein. The term
25 "derivative" in the context of a "derivative of an msbB attenuated tumor-targeted *Salmonella* mutant" refers to a modified msbB *Salmonella* mutant as defined in International Publication No. WO 99/13053 at page 17, incorporated herein by reference in its entirety.

Fragment: As used herein, the term "fragment" refers to a peptide or polypeptide comprising an amino acid sequence of at least 2 contiguous amino acid residues, at least 5
30 contiguous amino acid residues, at least 10 contiguous amino acid residues, at least 15 contiguous amino acid residues, at least 20 contiguous amino acid residues, at least 25 contiguous amino acid residues, at least 40 contiguous amino acid residues, at least 50 contiguous amino acid residues, at least 60 contiguous amino residues, at least 70
35 contiguous amino acid residues, at least contiguous 80 amino acid residues, at least contiguous 90 amino acid residues, at least contiguous 100 amino acid residues, at least contiguous 125 amino acid residues, at least 150 contiguous amino acid residues, at least

WO 01/25397

PCT/US00/23242

contiguous 175 amino acid residues, at least contiguous 200 amino acid residues, or at least contiguous 250 amino acid residues of the amino acid sequence of a primary or secondary effector molecule.

Functional fragment: As used herein, the term "functional fragment" refers to a fragment of a primary or secondary effector molecule that retains at least one function of the primary or secondary effector molecule (e.g., enzymatic activity, anti-angiogenic activity, or anti-tumor activity of the effector molecule).

Fusion protein: As used herein, the term "fusion protein" refers to a polypeptide that comprises an amino acid sequence of primary or secondary effector molecule, or functional fragment or derivative thereof, and an amino acid sequence of a heterologous polypeptide (e.g., a non-primary or non-secondary effector molecule).

Omp-like protein: As used herein, an Omp-like protein includes any bacterial outer membrane protein, or portion thereof (e.g., signal sequence, leader sequence, periplasmic region, transmembrane domain, multiple transmembrane domains, or combinations thereof). In specific embodiments, the Omp-like protein is at least a portion of OmpA, OmpB, OmpC, OmpD, OmpE, OmpF, OmpT, a porin-like protein, PhoA, PhoE, IamB, β -lactamase, an enterotoxin, protein A, endoglycanase, peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL), FepA, FhuA, NmpA, NmpB, NmpC, or a major outer membrane lipoprotein (such as LPP), etc.

Purified: As used herein, "purified" attenuated tumor-targeted bacterial strain is substantially free of contaminating proteins or amino acids (e.g., debris from dead bacteria), or media. An attenuated tumor-targeted bacterial strain that is substantially free of contaminating proteins or amino acids includes preparations of attenuated tumor-targeted bacteria having less than about 30%, 20%, 10%, or 5% (by dry weight) of contaminating protein or amino acid.

Release factor: As used herein, a release factor includes any protein, or functional portion thereof which enhances release of bacterial components. In one embodiment a release factor is a bacteriocin release protein. Release factors include, but are not limited to, the bacteriocin release protein (BRP) encoded by the cloacin D13 plasmid, the BRPs encoded by the colicin E1-E9 plasmids, or BRPs encoded by the colicin A, N or D plasmids.

Septic shock: Septic shock is a state of internal organ failure due to a complex cytokine cascade, initiated by TNF- α . The relative ability of a microorganism or vector to elicit TNF- α is used as one measure to indicate its relative ability to induce septic shock.

Tumor-targeted: Tumor-targeted is defined as the ability to preferentially localize to a cancerous target cell or tissue relative to a non-cancerous counterpart cell or tissue and replicate. Thus, a tumor-targeted bacteria such as *Salmonella* preferentially attaches to, infects and/or remains viable in the cancerous target cell or the tumor environment.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

Virulence: Virulence is a relative term describing the general ability to cause disease, including the ability to kill normal cells or the ability to elicit septic shock (see specific definition below).

As used herein, the strain designations VNP20009 (International Publication No. WO 99/13053), YS1646 and 41.2.9 are used interchangeably and each refer to the strain deposited with the American Type Culture Collection and assigned Accession No. 202165.

As used herein, the strain designations YS1456 and 8.7 are used interchangeably and each refer to the strain deposited with the American Type Culture Collection and assigned Accession No. 202164.

The present invention may be understood more fully by reference to the following detailed description, illustrative examples of specific embodiments and the appended figures.

4. BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIG. 1. Coding sequence for the mature human TNF- α . Both DNA (SEQ ID NO:3) and protein (SEQ ID NO:4) sequences are indicated.

FIG. 2. Derivation of the *Salmonella* VNP20009 *serC*-strain.

FIG. 3. TNF- α , expression from a chromosomally-integrated *trc* promoter driven TNF- α , gene in *Salmonella typhimurium*.

FIG. 4. Coding sequence for the synthetic OmpA signal sequence (nucleotides 1-63) fusion to the mature human TNF- α (nucleotides 67-543). Both DNA (SEQ ID NO:7) and protein (SEQ ID NO:8) sequences are indicated for the fusion construct.

FIG. 5. Periplasmic localization and processing of an OmpA/TNF- α , fusion protein in E-coli (JM109 strain).

FIG. 6. Coding sequence for the OmpA signal sequence (nucleotides 1-63) fusion to the mature human TRAIL (nucleotides 67-801). Both DNA (SEQ ID NO:9) and protein (SEQ ID NO:10) sequences are indicated for the fusion construct.

FIG. 7. Expression and processing of an OmpA TRAIL fusion protein in E-coli (JM109 strain).

WO 01/25397

PCT/US00/23242

FIG. 8. Coding sequence for the modified OmpA signal sequence (nucleotides 1-63) fusion to the mature (C125A) human IL-2 (nucleotides 64-462). Both DNA (SEQ ID NO:11) and protein (SEQ ID NO:12) sequences are indicated for the fusion construct.

FIG. 9. Expression and processing of mature human IL-2 fused to the phoA(8L) or ompA (8L) synthetic signal peptides.

FIG. 10. Coding sequence for the modified phoA signal sequence (nucleotides 1-63) fusion to the mature (C125A) human IL-2 (nucleotides 64-462). Both DNA (SEQ ID NO:13) and protein (SEQ ID NO:14) sequences are indicated for the fusion construct.

FIG. 11. *In vivo* anti-tumor efficacy of an attenuated strain of *Salmonella typhimurium* expressing the mature form of human TNF- α .

FIG. 12. Effect of BRP expression on anti-tumor efficacy *in vivo*. The figure shows a graphic representation of mean tumor size over time of a C57BL/6 mouse population with B16 melanoma tumors treated with (1) a PBS control; (2) VNP20009; and (3) VNP20009 harboring the pSW1 plasmid, which comprises the BRP gene.

FIG. 13. Anaerobic induction of β -gal gene expression under the control of the pepT promoter in *Salmonella*. FIG. 13A demonstrates the *in vitro* induction of β -gal expression in response to anaerobic conditions of two strains of *Salmonella*, YS1456 and VNP20009. FIG. 13B demonstrates the *in vivo* induction of β -gal in tumor v. liver cells of VNP20009 *Salmonella* expressing BRP, β -gal, or BRP and β -gal.

FIG. 14. Tetracycline induction of β -gal gene expression under the control of the Tet promoter in *Salmonella*. The dose-response indicates a linear response to Tetracycline up to a concentration of approximately 0.15 μ g/ml, after which there response declines, presumably as a result of the antibiotic function of Tetracycline.

FIG. 15. Hexahistidine-endostatin (HexaHIS-endostatin) expression from the pTet99a vector. FIG. 15A shows the expression of HexaHIS-endostatin from three independent clones transformed into *Salmonella* (VNP20009). FIG. 15B shows the expression of HexaHIS-endostatin from five independent clones transformed into *E.coli* (DH5 α). Even numbered lanes indicate extracts from uninduced cultures, whereas odd numbered lanes indicate the corresponding IPTG-induced cultures.

FIG. 16. Expression of HexaHIS-endostatin from the plasmid YA3334.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

HexaHIS-endostatin in the *asd* system (utilizing the *trc* promoter) is able to express a band of the correct size for HexaHIS-endostatin (~25kD) by Western analysis with an anti-histidine antibody (lanes 1-8 correspond to eight independent clones).

5 FIG. 17. Efficacy of VNP20009 cells expressing endostatin on C38 murine colon carcinoma. The figure shows a graphic representation of mean tumor size over time of a mouse population with established C38 tumors treated with (1) a PBS control; (2) *asd*⁻ VNP20009 carrying an empty YA3334 vector; (3) *asd*⁻ VNP20009 which expresses hexahistidine-endostatin; (4) and VNP20009 which expresses hexahistidine-endostatin and BRP.

10 FIG. 18. Efficacy of VNP20009 cells expressing endostatin on DLD1 human colon carcinoma. The figure shows a graphic representation of mean tumor size over time of a nude mouse population with established DLD1 tumors treated with (1) a PBS control; (2) *asd*⁻ VNP20009 carrying an empty YA3334 vector; and (3) VNP20009 which expresses hexahistidine-endostatin and BRP.

15 FIG. 19. Anti-proliferative activity of lysates from attenuated tumor-targeted *Salmonella* expressing human endostatin on endothelial cells. This figure shows the inhibition of human vein endothelial cell (HUVEC) proliferation in response to bFGF and lysates corresponding to 8×10^8 bacteria. As a control *Salmonella* containing the empty pTrc vector was used. Each data point is a mean of quadruplicate values from a representative experiment. Samples were normalized by the number of bacteria.

20 FIG. 20. Anti-proliferative activity of lysates from attenuated tumor-targeted *Salmonella* expressing platelet factor-4 peptide (amino acids 47-70 of platelet factor-4) and thrombospondin peptide(13.40) on endothelial cells. This figure shows the inhibition of human vein endothelial cell (HUVEC) proliferation in response to bFGF and lysates corresponding to 3.2×10^8 bacteria. As a control *Salmonella* containing the empty pTrc vector was used. Each data point is a mean of quadruplicate values from a representative experiment. Samples were normalized by the number of bacteria.

30 FIG. 21. Construction of the pE3.shuttle -1 Vector.

FIG. 22. Construction of the Col E3-CA38 Vector (GenBank Accession Number AF129270). The nucleotide sequence of the Col E3-CA38 Vector is as depicted in SEQ ID NO: 1. The Col E3-CA38 Vector contains 5 open reading frames as depicted in SEQ ID Nos: 2-5, respectively.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

FIG. 23. Construction of the Col E3-CA38/BRP-1 vector.

FIG. 24. Bar Graph showing the amount of lethal units of colicin E3 produced by each strain.

5 FIG. 25. Halo assay for various strains exposed to ultraviolet light or x-rays.

FIG. 26. Efficacy of 41.2.9/Col E3 on C38 murine colon carcinoma.

10 FIG. 27. Anti-tumor activity of 41.2.9/Col/E3 on DLD1 human colon carcinoma in NU/NU mice.

FIG. 28. Efficacy of 41.2.9/Col E3 on B16 murine melanoma.

FIG. 29. Cytotoxicity of *Salmonella* expressing cloned *E. coli* CNF1.

15 FIG. 30. HeLa cells exposed to CNF1 (A) show enlargement and multinucleation relative to normal HeLa cells (B).

20 FIG. 31. The *msbB* portion of the pCVD442-*msbB* vector in the 3' to 5' orientation (as viewed in th FIG. 32 map), with a deletion in the middle of *msbB* and containing internal *NotI*, *PacI*, *SphI*, *SfiI*, *SwaI* and *DraI* polylinker in its place (SEQ ID NO:61). See FIG. 32.

25 FIG. 32. Restriction map and schematic of the pCVD442-*msbB* vector for cloning DNA in the *DmsbB* region and subsequent insertion on the chromosome. *msbB*del, the 5' and 3' regions of *DmsbB*; *mob* RP4, the mobilization element in order for the plasmid to be transferred from one strain to another. *bla*; the beta-lactamase gene which confers sensitivity to b-lactam antibiotic such as carbenicillin and ampicillin. *sacB*, the gene which confers sensitivity to sucrose.

30 FIG. 33. 1) pCVD442-Tet-BRP-AB vector, 2) homologous recombination with the *DmsbB* chromosomal copy in *Salmonella* YS50102, 3) chromosomal integration in *Salmonella* YS50102, and following phage transduction to strain VNP20009, 4) sucrose resolution resulting in strain 41.2.9-Tet-BRP-AB. *oriR6K*, the plasmid origin of replication; *mobRP4*, the mobilization element in order for the plasmid to be transferred from one strain to another. *amp*; the beta-lactamase gene which confers sensitivity to b-

35

WO 01/25397

PCT/US00/23242

lactam antibiotic such as carbenicillin and ampicillin. *sacB*, the gene which confers sensitivity to sucrose. Note: not drawn to scale.

5 FIG. 34. Percent cytotoxicity of tetBRPAB clone #26 and clone #31 compared to positive and negative controls (HSC10 and 41.2.9) following 72 hours of exposure to SKOV3 cells (Ave N=8). Expression of verotoxin was induced by tetracycline (see clones 26 and 31). Tetracycline treatment (+); and no tetracycline treatment (-). The *E. coli* strain HSC10 was used as a positive control for percent cytotoxicity.

10 FIG. 35. Halo formation on blood agar for attenuated tumor-targeted *Salmonella* in the absence of tetracycline (1A) and the presence of tetracycline (1B). Halo formation for attenuated tumor-targeted *Salmonella* engineered to constitutively express *SheA*, in the absence of tetracycline (2A) and the presence of tetracycline (2B). Halo formation for attenuated tumor-targeted *Salmonella* engineered to express tetracycline inducible *SheA* in the absence of tetracycline (3A) and the presence of tetracycline (3B).

15 FIG. 36. (A) An illustration of the TAT-apoptin fusion protein without the hexahistidine tag. (B) An illustration of the TAT-apoptin fusion protein with the hexahistidine tag. (C) A) An illustration of the TAT-apoptin fusion protein with an OmpA-8L signal sequence.

20 FIG. 37. Coding sequence for TAT-apoptin fusion protein. Both DNA (SEQ ID NO:57) and protein (SEQ ID NO:58) sequences are indicated.

25 FIG. 38. Coding sequence for hexahistidine-TAT-apoptin fusion protein. Both DNA (SEQ ID NO:59) and protein (SEQ ID NO:60) sequences are indicated.

FIG. 39. Efficacy of VNP20009/cytosar combination therapy on M27 lung carcinoma growth in C57BL/6 mice.

30 FIG. 40. Efficacy of VNP20009/mitomycin combination therapy on M27 lung carcinoma growth in C57BL/6 mice.

FIG. 41. Efficacy of VNP20009/cisplatin combination therapy on M27 lung carcinoma growth in C57BL/6 mice.

35

WO 01/25397

PCT/US00/23242

5. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention utilizes attenuated tumor-targeted strains of bacteria to deliver high levels of therapeutic primary effector molecule(s) to tumors. The present invention provides the advantage of bypassing potential systemic toxicity of certain primary effector molecules (e.g., septic shock caused by TNF- α). The present invention provides delivery of one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s) to a solid tumor. More particularly, the invention encompasses the preparation and the use of attenuated tumor-targeted bacteria, such as, e.g., *Salmonella*, as a vector for the delivery of one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s), to an appropriate site of action, e.g., the site of a solid tumor. Specifically, the attenuated tumor-targeted bacteria of the invention are facultative aerobes or facultative anaerobes, which are engineered to encode one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s).

The attenuated tumor-targeted bacterial-based delivery system presently described provides local delivery of one or more effector molecule(s) to the site of solid tumors. The invention provides safe and effective methods by which a primary effector molecule(s), which may be toxic or induce an unwanted side effect (e.g., an unwanted immunological effect) when delivered systemically to a host, can be delivered locally to tumors by an attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella* with reduced toxicity to the host. The invention also provides combinatorial delivery of one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s) which are delivered by an attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella*. The invention also provides combinatorial delivery of different attenuated tumor-targeted bacteria carrying one or more different primary effector molecule(s) and/or optionally, one or more different secondary effector molecule(s).

The present invention also provides methods for local delivery of one or more fusion proteins comprising an effector molecule by attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express said fusion proteins at the site of the solid tumor(s). In one embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express a fusion protein comprising a signal peptide and an effector molecule. In another embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express a fusion protein comprising a signal peptide, a proteolytic cleavage site, and an effector molecule. In another embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express a fusion protein comprising a ferry peptide and an effector molecule. In another embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express a fusion protein comprising a signal peptide, a ferry peptide and an effector molecule. In yet another embodiment, attenuated tumor-targeted

WO 01/25397

PCT/US00/23242

bacteria are engineered to express a fusion protein comprising a signal peptide, a proteolytic cleavage site, a ferry peptide and an effector molecule. Attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express one or more fusion proteins of the invention and one or more effector molecules of the invention.

5 The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules. The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules. Further, the present invention provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins and one or more effector molecules.

10 The present invention provides methods of treating solid tumor cancers in an animal, said methods comprising administering to an animal in need thereof an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules. The present invention also provides methods of treating solid tumor cancers in an animal, said methods comprising administering to an animal in need thereof an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules. Further, the present invention provides methods of treating solid tumor cancers in an animal, said methods comprising administering to an animal in need thereof an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins and one or more effector molecules. Preferably, the animal is a mammal (*e.g.*, a dog, a cat, a horse, a cow, a monkey, or a pig) and more preferably the animal is a human. Examples of solid tumor cancers include, but are not limited to, sarcomas, carcinomas, lymphomas, and other solid tumor cancers, including but not limited to, breast cancer, prostate cancer, cervical cancer, uterine cancer, lung cancer, ovarian cancer, testicular cancer, thyroid cancer, astrocytoma, glioma, pancreatic cancer, stomach cancer, liver cancer, colon cancer, central nervous system cancer, germ cell line cancer, melanoma, renal cancer, bladder cancer, and mesothelioma.

15 Although not intending to be limited to any one mechanism, the inventors believe that the present invention results in the targeted expression of the effector molecule(s) at the site of a tumor by delivery of the attenuated tumor-targeted bacterial vector containing the effector molecule(s).

WO 01/25397

PCT/US00/23242

For reasons of clarity, the detailed description is divided into the following subsections: Bacterial Vectors; Primary Effector Molecules for Tumor Therapy; Secondary Effector Molecules for Co-expression With Primary Effector Molecules; Derivatives and Analogs; Fusion Proteins; Expression Vehicles; and Methods and Compositions for Delivery.

5

5.1. BACTERIAL VECTORS

Any attenuated tumor-targeted bacteria may be used in the methods of the invention. More specifically, the attenuated tumor-targeted bacteria used in the methods of the invention are facultative aerobes or facultative anaerobes. Examples of attenuated tumor-targeted bacteria that are facultative aerobes or facultative anaerobes which may be used in the methods of the invention include, but are not limited to, *Escherichia coli* including enteroinvasive *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma hominis*, and *Streptococcus spp.*

Factors contributing to attenuation and tumor-targeting are described herein and may be used to construct or select an appropriate bacterial strain for use in the methods of the invention. For example, methods to select and isolate tumor-targeted bacteria are described in Section 6.1, and methods to attenuate bacteria are described in Section 6.2 of International publication WO96/40238, which are incorporated herein by reference. Examples of attenuated tumor-targeted bacteria are also described in International Application WO99/13053, which is incorporated herein by reference in its entirety. In certain embodiments of the invention, a bacteria may be modified by methods known in the art to be attenuated or highly attenuated.

The present invention provides attenuated tumor-targeted bacteria as a vector for the delivery of one or more primary effector molecules (e.g., a TNF family member, a cytotoxic peptide or polypeptide, a tumor inhibitory enzyme, or an anti-angiogenic factor) alone or in combination with a one or more secondary effector molecule(s). The present invention also provides attenuated tumor-targeted bacteria as a vector for the delivery of one or more fusion proteins of the invention alone or in combination with one or more effector molecules. In a preferred embodiment of the invention, the attenuated tumor-targeted bacteria which is engineered to express one or more nucleic acid molecule encoding effector molecules and/or fusion proteins is *Salmonella*.

While the teachings of the following section refers specifically to *Salmonella*, the compositions and methods of the invention are in no way meant to be restricted to *Salmonella* but encompass any other bacterium to which the teachings apply. Suitable bacterial species include, but are not limited to, *Escherichia coli* including enteroinvasive *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria*

WO 01/25397

PCT/US00/23242

monocytogenes, *Mycoplasma hominis*, *Streptococcus spp.*, wherein the bacterium is a facultative aerobe or facultative anaerobe.

5.1.1 *SALMONELLA* VECTORS

Any attenuated tumor-targeted bacteria can be modified using the teaching of the invention to encode one or more primary effector molecules and optionally, one or more secondary effector molecules to produce a novel attenuated tumor-targeted bacteria useful for the delivery of one or more effector molecules of the invention to a solid tumor. Further, any attenuated tumor-targeted bacteria can be modified using the teaching of the invention to encode one or more fusion proteins of the invention and optionally, one or more effector molecules to produce a novel attenuated tumor-targeted bacteria useful for the delivery of fusion proteins and effector molecules of the invention to a solid tumor.

Bacteria such as *Salmonella* is a causative agent of disease in humans and animals. One such disease that can be caused by *Salmonella* is sepsis, which is a serious problem because of the high mortality rate associated with the onset of septic shock (Bone, 1993, Clinical Microbiol. Revs. 6:57-68). Therefore, to allow the safe use of *Salmonella* vectors in the present invention, the bacterial vectors such as *Salmonella* are attenuated in their virulence for causing disease. In the present application, attenuation, in addition to its traditional definition in which a microorganism vector is modified so that the microorganism vector is less pathogenic, is intended to include also the modification of a microorganism vector so that a lower titer of that derived microorganism vector can be administered to a patient and still achieve comparable results as if one had administered a higher titer of the parental microorganism vector. The end result serves to reduce the risk of toxic shock or other side effects due to administration of the vector to the patient. Such attenuated bacteria are isolated by means of a number of techniques. For example, attenuation can be achieved by the deletion or disruption of DNA sequences which encode for virulence factors that insure survival of the bacteria in the host cell, especially macrophages and neutrophils. Such deletion or disruption techniques are well known in the art and include, for example, homologous recombination, chemical mutagenesis, radiation mutagenesis, or transposon mutagenesis. Those virulence factors that are associated with survival in macrophages are usually specifically expressed within the macrophages in response to stress signals, for example, acidification, or in response to host cell defensive mechanisms such as macrophagocytosis (Fields *et al.*, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5189-5193). Table 4 of International Publication WO 96/40238 is an illustrative list of *Salmonella* virulence factors whose deletion results in attenuation.

Yet another method for the attenuation of the bacterial vectors, such as *Salmonella*, is to modify substituents of the bacteria which are responsible for the toxicity of that bacteria. For example, lipopolysaccharide (LPS) or endotoxin is primarily responsible for

WO 01/25397

PCT/US00/23242

the pathological effects of bacterial sepsis. The component of LPS which results in this response is lipid A ("LA"). Elimination or mitigation of the toxic effects of LA results in an attenuated bacteria since 1) the risk of septic shock in the patient is reduced and 2) higher levels of the bacterial vector can be tolerated.

Altering the LA content of bacteria, such as *Salmonella*, can be achieved by the introduction of mutations in the LPS biosynthetic pathway. Several enzymatic steps in LPS biosynthesis and the genetic loci controlling them in *Salmonella* have been identified (Raetz, 1993, J. Bacteriol. 175:5745-5753 and references therein), as well as corresponding mutants. One such illustrative mutant is *firA*, a mutation within the gene that encodes the enzyme UDP-3-O-(R-30 hydroxymyristoyl)-glycoylamine N-acyltransferase, which regulates the third step in endotoxin biosynthesis (Kelley *et al.*, 1993, J. Biol. Chem. 268:19866-19874). Bacterial strains bearing this type of mutation produce a lipid A that differs from wild-type lipid A in that it contains a seventh fatty acid, a hexadecanoic acid (Roy and Coleman, 1994, J. Bacteriol. 176:1639-1646). Roy and Coleman demonstrated that in addition to blocking the third step in endotoxin biosynthesis, the *firA* mutation also decreases enzymatic activity of lipid A 4' kinase that regulates the sixth step of lipid A biosynthesis.

In addition to being attenuated, the bacterial vectors of the invention are tumor-targeted, *i.e.* the bacteria preferentially attaches to, infects, and/or remains viable in a tumor or tumor cell versus a normal tissue, non-tumor or non-tumor cell. Suitable methods for obtaining attenuated tumor-targeted bacteria are described in Section 6.1 (pages 25-32; tumor-targeting) and Section 6.2.2 (pages 43-51; attenuation) of International Publication WO 96/40238, which are incorporated herein by reference. As the resulting vectors are highly specific and super-infective, the difference between the number of infecting bacteria found at the target tumor or tumor cell as compared to the non-cancerous counterparts becomes larger and larger as the dilution of the microorganism culture is increased such that lower titers of microorganism vectors can be used with positive results. The techniques described in International Publication WO 96/40238 can also be used to produce attenuated tumor-targeted *Salmonella* or non-*Salmonella* bacterial vectors.

An illustrative example of an attenuated tumor-targeted bacterium having an LPS pathway mutant is the *msbB* *Salmonella* mutant described in International Publication WO99/13053, which is incorporated herein by reference in its entirety; see especially Section 6.1.2 which describes the characteristic of the *msbB*-*Salmonella* mutant. One characteristic of the *msbB* *Salmonella* is decreased ability to induce a TNF- α response compared to the wild-type bacterial vector. The *msbB* *Salmonella* induce TNF- α expression at levels of about 5 percent to about 40 percent compared to the levels induced by wild-type *Salmonella*.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

The TNF- α response induced by whole bacteria or isolated or purified LPS can be assessed *in vitro* or *in vivo* using commercially available assay systems such as by enzyme linked immunoassay (ELISA). Comparison of TNF- α production on a per colony forming unit ("c.f.u.") or on a $\mu\text{g}/\text{kg}$ basis, is used to determine relative activity. Lower TNF- α levels on a per unit basis indicate decreased induction of TNF- α production. In a preferred embodiment, the *msbB* *Salmonella* vector is modified to contain one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s) of the invention.

The present invention also encompasses the use of derivatives of *msbB* attenuated tumor-targeted *Salmonella* mutants. Derivatives of *msbB* attenuated tumor-targeted *Salmonella* mutants can be modified using the teaching of the invention to encode one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s) to produce a novel attenuated tumor-targeted bacteria useful for the delivery of one or more effector molecule(s) of the invention to a solid tumor.

The stability of the attenuated phenotype is important such that the strain does not revert to a more virulent phenotype during the course of treatment of a patient. Such stability can be obtained, for example, by providing that the virulence gene is disrupted by deletion or other non-reverting mutations on the chromosomal level rather than epistatically.

Another method of insuring the attenuated phenotype is to engineer the bacteria such that it is attenuated in more than one manner, e.g., a mutation in the pathway for lipid A production, such as the *msbB* mutation (International Publication WO 99/13053) and one or more mutations to auxotrophy for one or more nutrients or metabolites, such as uracil biosynthesis, purine biosynthesis, and arginine biosynthesis as described by Bochner, 1980, J. Bacteriol. 143:926-933. In a preferred embodiment, the tumor-targeted *msbB* *Salmonella* encoding or expressing at least one primary effector molecule is also auxotrophic for purine. In certain embodiments, the attenuated tumor-targeted bacteria encoding or expressing at least one primary effector molecule are attenuated by the presence of a mutation in *AroA*, *msbB*, *PurI* or *SerC*. In other embodiments, the attenuated tumor targeted bacteria encoding at least one primary effector molecule are attenuated by the presence of a deletion in *AroA*, *msbB*, *PurI* or *SerC*.

Accordingly, any attenuated tumor-targeted bacteria may be used in the methods of the invention to express and deliver one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s) to a solid tumor cancer. In preferred embodiments, the attenuated tumor-targeted bacteria are constructed to express one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s). Further, any attenuated tumor-targeted bacteria may be used in the methods of the invention to express and deliver one or more fusion proteins and optionally, one or

WO 01/25397

PCT/US00/23242

more effector molecules to a solid tumor cancer. In preferred embodiments, the attenuated tumor-targeted bacteria are constructed to express one or more fusion proteins and optionally, one or more effector molecules.

5.2. PRIMARY EFFECTOR MOLECULES FOR TUMOR THERAPY

5 The invention provides for delivery of primary (and optionally secondary) effector molecule(s) by attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella*. The effector molecules of the invention are proteinaceous molecules, (e.g., protein (including but not limited to peptide, polypeptide, protein, post-translationally modified protein, etc.). The invention further provides nucleic acid molecules which encode the primary effector

10 molecules of the invention.

The primary effector molecules can be derived from any known organism, including, but not limited to, animals, plants, bacteria, fungi, and protista, or viruses. In a preferred embodiment of the invention, the primary effector molecule(s) is derived from a mammal. In a more preferred embodiment, the primary effector molecule(s) is derived

15 from a human. The primary effector molecules of the invention comprise members of the TNF family, anti-angiogenic factors, cytotoxic polypeptides or peptides, tumor inhibitory enzymes, and functional fragments thereof.

In a specific embodiment, the primary effector molecules of the invention are members of the TNF family or functional fragments thereof. Examples of TNF family members, include, but are not limited to, tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor necrosis factor- β (TNF- β), TNF- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TNF- α -related activation-induced cytokine (TRANCE), TNF- α -related weak inducer of apoptosis (TWEAK), CD40 ligand (CD40L), LT- α , LT- β , OX40L, CD40L, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, APRIL, LIGHT, TL1, TNFSF16, TNFSF17, and AITR-L. In a preferred

25 embodiment, a primary effector molecule of the invention is tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor necrosis factor- β (TNF- β), TNF- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TNF- α -related activation-induced cytokine (TRANCE), TNF- α -related weak inducer of apoptosis (TWEAK), and CD40 ligand (CD40L), or a functional fragment thereof. For review see, e.g., Kwon, B. *et al.*, 1999, *Curr. Opin. Immunol.* 11:340-345, which describes

30 members of the TNF family. Also, Table 1 herein below, lists classic and standardized nomenclature of exemplary members of the TNF family. In a preferred embodiment of the invention the primary effector molecule of the invention is tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor necrosis factor- β (TNF- β), TNF- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TNF- α -related activation-induced cytokine (TRANCE), TNF- α -related weak

35 inducer of apoptosis (TWEAK), or CD40 ligand (CD40L).

WO 01/25397

PCT/US00/23242

TABLE 1

TNF FAMILY MEMBERS	
Classic Nomenclature	Standardized Nomenclature
LT- α	TNFSF1
TNF- α	TNFSF2
LT- β	TNFSF3
OX40L	TNFSF4
CD40L	TNFSF5
F _{as} L	TNFSF6
CD27L	TNFSF7
CD30L	TNFSF8
4-1BBL	TNFSF9
TRAIL	TNFSF10
TRANCE	TNFSF11
TWEAK	TNFSF12
APRIL	TNFSF13
LIGHT	TNFSF14
TL1	TNFSF15
---	TNFSF16
---	TNFSF17
AITR-L	TNFSF18

In another specific embodiment, the primary effector molecules of the invention are anti-angiogenic factors or functional fragments thereof. Examples of anti-angiogenic factors, include, but are not limited to, endostatin, angiostatin, apomigren, anti-angiogenic antithrombin III, the 29 kDa N-terminal and a 40 kDa C-terminal proteolytic fragments of fibronectin, a uPA receptor antagonist, the 16 kDa proteolytic fragment of prolactin, the 7.8 kDa proteolytic fragment of platelet factor-4, the anti-angiogenic 24 amino acid fragment of platelet factor-4, the anti-angiogenic factor designated 13.40, the anti-angiogenic 22 amino acid peptide fragment of thrombospondin I, the anti-angiogenic 20 amino acid peptide fragment of SPARC, RGD and NGR containing peptides, the small anti-angiogenic peptides of laminin, fibronectin, procollagen and EGF, and peptide antagonists of integrin α, β , and the VEGF receptor.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

In a preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is endostatin. Naturally occurring endostatin consists of the C-terminal ~180 amino acids of collagen XVIII (cDNAs encoding two splice forms of collagen XVIII have Genbank Accession No. AF18081 and AF18082).

In another preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is plasminogen fragments (the coding sequence for plasminogen can be found in Genbank Accession No. NM_000301 and A33096). Angiostatin peptides naturally include the four kringle domains of plasminogen, kringle 1 through kringle 4. It has been demonstrated that recombinant kringle 1, 2 and 3 possess the anti-angiogenic properties of the native peptide, whereas kringle 4 has no such activity (Cao et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:29461-29467). Accordingly, the angiostatin effector molecule of the invention comprises at least one and preferably more than one kringle domain selected from the group consisting of kringle 1, kringle 2 and kringle 3. In a specific embodiment, the primary effector molecule of the invention is a human angiostatin molecule selected from the group consisting of 40 kDa isoform, the 42 kDa isoform, the 45 kDa isoform, or a combination thereof. In another embodiment, the primary effector molecule is the kringle 5 domain of plasminogen, which is a more potent inhibitor of angiogenesis than angiostatin (angiostatin comprises kringle domains 1-4).

In another preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is antithrombin III. Antithrombin III, which is referred to hereinafter as antithrombin, comprises a heparin binding domain that tethers the protein to the vasculature walls, and an active site loop which interacts with thrombin. When antithrombin is tethered to heparin, the protein elicits a conformational change that allows the active loop to interact with thrombin, resulting in the proteolytic cleavage of said loop by thrombin. The proteolytic cleavage event results in another change of conformation of antithrombin, which (i) alters the interaction interface between thrombin and antithrombin and (ii) releases the complex from heparin (Carrell, 1999, Science 285:1861-1862, and references therein). O'Reilly *et al.* (1999, Science 285:1926-1928) have discovered that the cleaved antithrombin has potent anti-angiogenic activity. Accordingly, in one embodiment, the anti-angiogenic factor of the invention is the anti-angiogenic form of antithrombin. For the delivery of said protein to a solid tumor according to the methods of the invention, the bacterial vector is modified to express full length antithrombin Genbank Accession No. NM_000488 and a proteolytic enzyme that catalyzes the cleavage of antithrombin to produce the anti-angiogenic form of the protein. The proteolytic enzyme is selected from the group comprising thrombin, pancreatic elastases, and human neutrophil elastase. In a preferred embodiment, the proteolytic enzyme is pancreatic elastase. Methods for the recombinant expression of functional pancreatic elastase are taught by Shirasu (*Shirasu et al.*, 1987, J. Biochem. 102:1555-1563).

WO 01/25397

PCT/US00/23242

In another preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is the 40 kDa and/or 29 kDa proteolytic fragment of fibronectin. The expression vehicles for these fragments can be generated by standard methods using the full length nucleic acid sequence encoding the fibronectin precursor protein (Genbank Accession No. X02761), and a description of the maturation of the encoded protein. In a preferred embodiment the 40 kDa and/or the 29 kDa fragment of fibronectin is expressed as a cytoplasmic protein under the control of the *trc* promoter, for example by insertion into the pTrec99A plasmid.

In another preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is a urokinase plasminogen activator (uPA) receptor antagonist. In one mode of the embodiment, the antagonist is a dominant negative mutant of uPA (see, e.g., Crowley *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5021-5025). In another mode of the embodiment, the antagonist is a peptide antagonist or a fusion protein thereof (Goodson *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7129-7133). In yet another mode of the embodiment, the antagonist is a dominant negative soluble uPA receptor (Min *et al.*, 1996, Cancer Res. 56:2428-2433).

In another preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is the 16 kDa N-terminal fragment of prolactin, comprising approximately 120 amino acids, or a biologically active fragment thereof (the coding sequence for prolactin can be found in Genbank Accession No. NM_000948). In a specific embodiment, said prolactin fragment has a Cys58 → Ser58 mutation to circumvent undesired cross-linking of the protein by disulfide bonds.

In another preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is the 7.8 kDa platelet factor-4 fragment. In a specific embodiment, the 7.8 kDa platelet factor-4 fragment is expressed as a fusion protein wherein the amino terminal comprises the first 35 amino acids of *E. coli* β -glucuronidase. In another embodiment, the heparin binding lysines of platelet factor-4 are mutated to glutamic acid residues, which results in a variant protein having potent anti-angiogenic activity (Malone *et al.*, 1991, Cancer Res. 51:2077-2083). The coding sequence for platelet factor-4 has the Genbank Accession No. NM_002619.

In another preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is a small peptide corresponding to the anti-angiogenic 13 amino acid fragment of platelet factor-4, the anti-angiogenic factor designated 13.40, the anti-angiogenic 22 amino acid peptide fragment of thrombospondin 1, the anti-angiogenic 20 amino acid peptide fragment of SPARC, the small anti-angiogenic peptides of laminin, fibronectin, procollagen, or EGF, or small peptide antagonists of integrin $\alpha_v\beta_3$ or the VEGF receptor. In a specific embodiment, the small peptides are expressed in tandem to increase protein stability. The sequences of the small peptides are provided by Cao (1998, Prog.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

Mol. Subcell. Biol. 20:161-176), with the exception of VEGF receptor antagonists (Soker *et al.*, 1993, J. Biol. Chem. 272:31582-31588). In a highly preferred embodiment, the small peptide comprises an RGD or NGR motif. In certain modes of the embodiment, the RGD or NGR containing peptide is presented on the cell surface of the host bacteria, for example by fusing the nucleic acid encoding the peptide in frame with a nucleic acid encoding one or more extracellular loops of OmpA.

In another specific embodiment, the primary effector molecules of the invention are cytotoxic polypeptides or peptides, or functional fragments thereof. A cytotoxic polypeptide or peptide is cytotoxic or cytostatic to a cell, for example, by inhibiting cell growth through interference with protein synthesis or through disruption of the cell cycle. Such a product may act by cleaving rRNA or ribonucleoprotein, inhibiting an elongation factor, cleaving mRNA, or other mechanism that reduced protein synthesis to a level such that the cell cannot survive.

Examples of cytotoxic polypeptides or peptides include, but are not limited to, members of the bacteriocin family, verotoxin, cytotoxic necrotic factor 1 (CNF1; *e.g.*, *E. coli* CNF1 and *Vibrio fischeri* CNF1), cytotoxic necrotic factor 2 (CNF2), *Pasteurella multocida* toxin (PMT), hemolysin, CAAX tetrapeptides which are potent competitive inhibitors of farnesyltransferase, saporin, the ricins, abrin, other ribosome inactivating proteins (RIPs), *Pseudomonas* exotoxin, inhibitors of DNA, RNA or protein synthesis, antisense nucleic acids, other metabolic inhibitors (*e.g.*, DNA or RNA cleaving molecules such as DNase and ribonuclease, protease, lipase, phospholipase), prodrug converting enzymes (*e.g.*, thymidine kinase from HSV and bacterial cytosine deaminase), light-activated porphyrin, ricin, ricin A chain, maize RIP, gelonin, cytolethal distending toxin, diphtheria toxin, diphtheria toxin A chain, trichosanthin, tritin, pokeweed antiviral protein (PAP), mirabilis antiviral protein (MAP), Dianthins 32 and 30, abrin, monodrin, bryodin, shiga, a catalytic inhibitor of protein biosynthesis from cucumber seeds (*see, e.g.*, International Publication WO 93/24620), *Pseudomonas* exotoxin, *E. coli* heat-labile toxin, *E. coli* heat-stable toxin, EggEC stable toxin-1 (EAST), biologically active fragments of cytotoxins and others known to those of skill in the art. *See, e.g.*, O'Brien and Holmes, Protein Toxins of Escherichia coli and Salmonella in Escherichia and Salmonella, Cellular and Molecular Biology, Neidhardt *et al.* (eds.), pp. 2788-2802, ASM Press, Washington, D.C. for a review of *E. coli* and *Salmonella* toxins.

In a preferred embodiment, the primary effector molecule is a member of the bacteriocin family (*see e.g.*, Konisky, 1982, Ann. Rev. Microbiol. 36:125-144), with the proviso that said bacteriocin family member is not a bacteriocin release protein (BRP). Examples of bacteriocin family members, include, but are not limited to, ColE1, ColE1a, ColE1b, ColE2, ColE3, ColE4, ColE5, ColE6, ColE7, ColE8, ColE9, Colicin A, Colicin K, Colicin L, Colicin M, cloacin DF13, pesticin A1122, staphylococin 1580, butyricin 7423,

WO 01/25397

PCT/US00/23242

pyocin R1 or AP41, megacin A-216, microcin M15, and vibriocin (Jayawardene and Farkas-Himsley, 1970, J. Bacteriology vol. 102 pp 382-388). Most preferably the primary effector molecule(s) is colicin E3 or V, although colicins A, E1, E2, Ia, Ib, K, L, and M (see, Konisky, 1982, Ann. Rev. Microbiol. 36:125-144) are also suitable as a primary effector molecule(s). In another preferred mode of this embodiment, the bacteriocin is a cloacin, most preferably cloacin DF13.

5 In a preferred embodiment, the primary effector molecule(s) is ColE1, ColE2, ColE3, ColE4, ColE5, ColE6, ColE7, ColE8, or ColE9. Colicin E3 (ColE3) has been shown to have a profoundly cytotoxic effect on mammalian cells (Smarda *et al.*, 1978, Folia Microbiol. 23:272-277), including a leukemia cell model system (Piska *et al.*, 1978, Experientia 35:406-40). ColE3 cytotoxicity is a function of protein synthesis arrest, mediated by inhibition of 80S ribosomes (Turnowsky *et al.*, 1973, Biochem. Biophys. Res. Comm. 52:327-334). More specifically, ColE3 has ribonuclease activity (Saunders, 1978) Nature 274:113-114). In its naturally occurring form, ColE3 is a 60kDa protein complex consisting of a 50kDa and a 10kDa protein in a 1:1 ratio, the larger subunit having the nuclease activity and the smaller subunit having inhibitory function of the 50kDa subunit. Thus, the 50kDa protein acts as a cytotoxic protein (or toxin), and the 10kDa protein acts as an anti-toxin. Accordingly, in one embodiment, when ColE3 is used as a secondary effector molecule, the larger ColE3 subunit or an active fragment thereof is expressed alone or at higher levels than the smaller subunit. In another embodiment of the invention, the ColE3 50kDa toxin and 10kDa anti-toxin are encoded on a single plasmid within an attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella*. In this embodiment, the toxin/anti-toxin can act as a selection system for the *Salmonella* which carry the plasmid, such that *Salmonella* which lose the plasmid are killed by the toxin. In another embodiment, the 10 kDa anti-toxin is on the chromosome, separate from the ColE3 toxin on the plasmid, resulting in a barrier to transmission to other bacteria. (See Section 5.6, *infra*).

25 In another preferred embodiment, the primary effector molecule(s) is cloacin DF13. Cloacin DF13 functions in an analogous manner to ColE3. The protein complex is of 67kDa molecular weight. The individual components are 57kDa and 9kDa in size. In addition to its ribonuclease activity, DF13 can cause the leakage of cellular potassium.

30 In another preferred embodiment, the primary effector molecule(s) is colicin V (Pugsley, A.P. and Oudega, B. "Methods for Studying Colicins and Their Plasmids" in Plasmids, a Practical Approach 1987, ed. By K.G. Hardy, Gilson, L. *et al.* EMBO J. 9: 3875-3884).

35 In another embodiment, the primary effector molecule(s) is colicin E2 (a dual subunit colicin similar to ColE3 in structure but with endonuclease rather than ribonuclease activity); colicins A, E1, Ia, Ib, or K, which form ion-permeable channels, causing a collapse of the proton motive force of the cell and leading to cell death; colicin L which

WO 01/25397

PCT/US00/23242

inhibits protein, DNA & RNA synthesis; colicin M which causes cell sepsis by altering the osmotic environment of the cell; pesticin A1122 which functions in a manner similar to colicin B function; staphyococin 1580, a pore-forming bacteriocin; butyricin 7423 which indirectly inhibits RNA, DNA and protein synthesis through an unknown target; Pyocin P1, or protein resembling a bacteriophage tail protein that kills cells by uncoupling respiration from solute transport; Pyocin AP41 which has a colicin E2-like mode of action; 5 or megacin A-216 which is a phospholipase that causes leakage of intracellular material (for a general review of bacteriocins, see Konisky, 1982, Ann. Rev. Microbiol. 36:125-144); colicin A (Pugsley, A.P. and Oudega, B. "Methods for Studying Colicins and Their Plasmids" in Plasmids, a Practical Approach 1987, ed. By K.G. Hardy).

Accordingly, a primary effector molecule may comprise any bacteriocin described herein or known in the art, with the proviso that said bacteriocin is not a bacteriocin release 10 protein.

In another specific embodiment, the primary effector molecules of the invention are tumor inhibitory enzymes or functional fragments thereof. Examples of tumor inhibitory 15 enzymes include, but are not limited, methionase, asparaginase, lipase, phospholipase, protease, ribonuclease, DNAase, and glycosidase. In a preferred embodiment, the primary effector molecule is methionase.

The primary effector molecules of the invention are useful, for example, to treat, or prevent a solid tumor cancer such as a carcinoma, melanoma, lymphoma, or sarcoma.

The invention provides nucleic acid molecules encoding a primary effector 20 molecule. The invention also provides nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s). The invention provides nucleic acids encoding effector molecule(s) of the invention which is operably linked to an appropriate promoter. Optionally, the nucleic acids encoding an 25 effector molecule(s) may be operably linked to other elements that participate in transcription, translation, localization, stability and the like.

The nucleic acid molecule encoding a primary effector molecule is from about 6 to about 100,000 base pairs in length. Preferably, the nucleic acid is from about 20 base pairs to about 50,000 base pairs in length. More preferably, the nucleic acid molecule is from 30 about 20 base pairs to about 10,000 base pairs in length. Even more preferably, the nucleic acid molecule is about 20 base pairs to about 4000 base pairs in length.

5.3. SECONDARY EFFECTOR MOLECULES FOR CO-EXPRESSION WITH PRIMARY EFFECTOR MOLECULES

In certain embodiments of the invention, the primary effector molecule (e.g., a TNF 35 family member, a cytotoxic peptide or polypeptide, an anti-angiogenic factor, or a tumor

WO 01/25397

PCT/US00/23242

inhibitory enzyme) is optionally co-expressed in a bacterial vector with another molecule, *i.e.* a secondary effector molecule. The secondary effector molecule provides additional therapeutic value and/or facilitates the release of the contents of the modified bacterial vector (which expresses at least one primary effector molecule and optionally one or more secondary effector molecules) into the surrounding environment. As used herein, the term "additional therapeutic value" indicates that the secondary effector molecule provides an additive or synergistic, cytostatic, or cytotoxic effect on a tumor, *e.g.*, in addition to that provided by the primary effector molecule(s). Thus, a secondary effector molecule functions as an additional therapeutic factor and/or a release factor. Preferably, the secondary effector molecule, whether a therapeutic or release factor (or both), is preferentially or specifically activated or expressed at the desired site, *i.e.* at the site of the tumor. In certain embodiments, the secondary effector molecule can serve two functions, *i.e.* promote the release of the bacterial cell contents (*e.g.*, by promoting bacterial cell lysis or quasi lysis) and provide therapeutic value (*e.g.*, by cytotoxicity to the tumor cells). In certain non-limiting embodiments, the cytotoxicity of the secondary effector molecule can be mediated by the patient's immune system; accordingly such a secondary effector molecule can function as an immunomodulator.

In certain embodiments of the invention, the attenuated tumor-targeted bacterial vector of the invention is engineered to express at least one secondary effector molecule which has anti-tumor activity, *i.e.* expression of the secondary effector molecule results in killing or inhibition of the growth of a tumor or tumor cells.

The secondary effector molecule is proteinaceous or a nucleic acid molecule. The nucleic acid molecule can be double-stranded or single-stranded DNA or double-stranded or single-stranded RNA, as well as triplex nucleic acid molecules. The nucleic acid molecule can function as a ribozyme, or antisense nucleic acid, *etc.*

Antisense nucleotides are oligonucleotides that bind in a sequence-specific manner to nucleic acids, such as mRNA or DNA. When bound to mRNA that has complementary sequences, antisense prevents translation of the mRNA (see, *e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,168,053; 5,190,931; 5,135,917; and 5,087,617). Triplex molecules refer to single DNA strands that bind duplex DNA forming a colinear triplex molecule, thereby preventing transcription (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,176,996).

A ribozyme is an RNA molecule that specifically cleaves RNA substrates, such as mRNA, resulting in inhibition or interference with cell growth or expression. There are at least five known classes of ribozymes involved in the cleavage and/or ligation of RNA chains. Ribozymes can be targeted to any RNA transcript and can catalytically cleave that transcript (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,272,262; U.S. Patent No. 5,144,019; and U.S. Patent Nos. 5,168,053, 5,180,818, 5,116,742 and 5,093,246).

WO 01/25397

PCT/US00/23242

As described above for the primary effector molecule, a nucleic acid encoding or comprising a secondary effector molecule is provided in operative linkage with a selected promoter, and optionally in operative linkage with other elements that participate in transcription, translation, localization, stability and/or the like. Further, the secondary effector molecule can be expressed using the same promoter as the primary effector molecule and an internal ribosome binding site, or using a different promoter than the primary effector molecule.

The nucleic acid molecule encoding the secondary effector molecule is from about 6 base pairs to about 100,000 base pairs in length. Preferably the nucleic acid molecule is from about 20 base pairs to about 50,000 base pairs in length. More preferably the nucleic acid molecule is from about 20 base pairs to about 10,000 base pairs in length. Even more preferably, it is a nucleic acid molecule from about 20 pairs to about 4,000 base pairs in length.

The nucleotide sequences of the effector molecules encoding the secondary effector molecules described below are well known (see GenBank). A nucleic acid molecule encoding a secondary effector molecule, which secondary effector molecule is a cytotoxic or cytostatic factor or a biologically active fragment, variant or derivative thereof, may be isolated by standard methods, such as amplification (e.g., PCR), probe hybridization of genomic or cDNA libraries, antibody screening of expression libraries, chemically synthesized or obtained from commercial or other sources.

Nucleic acid molecules and oligonucleotides for use as described herein can be synthesized by any method known to those of skill in this art (see, e.g., International Publication WO 93/01286, U.S. Patent Nos. 5,218,088; 5,175,269; and 5,109,124). Identification of oligonucleotides and ribozymes for use as antisense agents involve methods well known in the art.

5.3.1. FACTORS PROVIDING ADDITIONAL THERAPEUTIC VALUE

In certain embodiments of the invention, the attenuated tumor-targeted bacterial vector of the invention, which expresses at least one primary effector molecule and is preferably a *Salmonella* vector, expresses at least one secondary effector molecule which has anti-tumor activity, i.e. expression of the secondary effector molecule results in killing or inhibition of the growth of a tumor or tumor cells or spread of tumor cells, thereby augmenting the cytotoxic or cytostatic action of the primary effector molecule. In one embodiment, the effects on the tumor of the secondary effector molecule are additive to those of the primary effector molecule. In a preferred embodiment, the effects are supra-additive or synergistic, i.e. greater than the sum of the effects of the primary and secondary effector molecules if administered separately.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

In certain embodiments, the secondary effector molecule is cytotoxic or cytostatic to a cell by inhibiting cell growth through interference with protein synthesis or through disruption of the cell cycle. Such a product may act, for example, by cleaving rRNA or ribonucleoprotein, inhibiting an elongation factor, cleaving mRNA, or other mechanism that reduced protein synthesis to a level such that the cell cannot survive. Examples of such secondary effector molecules include but are not limited to saporin, the ricins, abrin, and other ribosome inactivating proteins (RIPs).

In another embodiment, the secondary effector molecule is a pro-drug converting enzyme or nucleic acid encoding the same, *i.e.* an enzyme that modulates the chemical nature of a drug to produce a cytotoxic agent. Illustrative examples of pro-drug converting enzymes are listed on page 33 and in Table 2 of WO 96/40238 by Pawelek *et al.*, which is incorporated herein by reference. WO 96/40238 also teaches methods for production of secreted fusion proteins comprising such pro-drug converting enzymes. According to the present invention, a pro-drug converting enzyme need not be a secreted protein if co-expressed with a release factor such as BRP (See, *infra*, Section 5.3.2). In a specific embodiment, the pro-drug converting enzyme is cytochrome p450 NADPH oxidoreductase which acts upon mitomycin C and porfiromycin (Murray *et al.*, 1994, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 270:645-649). In another embodiment, the secondary effector molecule(s) is co-expressed with a release factor such as BRP, and cause the release of co-factors (*e.g.*, NADH, NADPH, ATP, etc.) which enhance pro-drug converting enzyme activity. In another mode of the embodiment, a secondary effector molecule is co-expressed with a release factor such as BRP, leading to the release of an activated drug (*e.g.*, a drug which is activated within the bacterial cytoplasm or periplasm, and then released from the bacterial vector).

In another embodiment, a secondary effector molecule is an inhibitor of inducible nitric oxide synthase (NOS) or of endothelial nitric oxide synthase. Nitric oxide (NO) is implicated to be involved in the regulation of vascular growth and in arteriosclerosis. NO is formed from L-arginine by nitric oxide synthase (NOS) and modulates immune, inflammatory and cardiovascular responses.

In another embodiment, the secondary effector molecule is cytotoxic or cytostatic to a cell by inhibiting the production or activity of a protein involved in cell proliferation, such as an oncogene or growth factor, (*e.g.*, bFGF, int-2, hst-1/K-FGF, FGF-5, hst-2/FGF-6, FGF-8) or cellular receptor or ligand. The inhibition can be at the level of transcription or translation (mediated by a secondary effector molecule that is a ribozyme or triplex DNA), or at the level of protein activity (mediated by a secondary effector molecule that is an inhibitor of a growth factor pathway, such as a dominant negative mutant).

In another embodiment, a secondary effector molecule is a cytokine, chemokine, or an immunomodulating protein or a nucleic acid encoding the same, such as interleukin-1

WO 01/25397

PCT/US00/23242

(IL-1), interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interleukin-10 (IL-10), interleukin-15 (IL-15), interleukin-18 (IL-18), endothelial monocyte activating protein-2 (EMAP2), GM-CSF, IFN- γ , IFN- α , MIP-3 α , SLC, MIP-3 β , or an MHC gene, such as HLA-B7. Delivery of such immunomodulating effector molecules will modulate the immune system, increasing the potential for host antitumor immunity. Alternatively, nucleic acid molecules encoding costimulatory molecules, such as B7.1 and B7.2, ligands for both CD28 and CTLA-4, can also be delivered to enhance T cell mediated immunity. Yet another immunomodulating agent is, α -1,3-galactosyl transferase, whose expression on tumor cells allows complement-mediated cell killing. Further, another immunomodulating agent is a tumor-associated antigen, *i.e.* a molecule specifically that is expressed by a tumor cell and not in the non-cancerous counterpart cell, or is expressed in the tumor cell at a higher level than in the non-cancerous counterpart cell. Illustrative examples of tumor-associated antigens are described in Kuby, *Immunology*, W.H. Freeman and Company, New York, NY, 1st Edition (1992), pp. 515-520 which is incorporated by reference herein. Other examples of tumor-associated antigens are known to those of skill in the art.

In another embodiment, a secondary effector molecule is a Flt-3 ligand or nucleic acid encoding the same. In another embodiment, a secondary molecule is BRP.

In a specific embodiment, a secondary effector molecule is not a TNF family member when the primary effector molecule is a TNF family member. In another specific embodiment, a secondary effector molecule is not an anti-angiogenic factor when the primary effector molecule is an anti-angiogenic factor. In another specific embodiment, a secondary molecule is not a cytotoxic peptide or polypeptide when the secondary molecule is a cytotoxic peptide or polypeptide. In another specific embodiment, a secondary molecule is not a tumor inhibiting enzyme when the primary effector molecule is a tumor inhibiting enzyme.

5.3.2. FACTORS THAT PROMOTE THE RELEASE OF ANTI-TUMOR EFFECTOR MOLECULES INTO THE TUMOR ENVIRONMENT

In certain other embodiments of the invention, the attenuated tumor-targeted bacterial vector of the invention, which expresses at least one primary effector molecule and is preferably a *Salmonella* vector, expresses at least one secondary effector molecule which functions to permeabilize the bacteria cell membrane(s) or enhance the release of intracellular components into the extracellular environment, *e.g.* at the tumor site, thereby enhancing the delivery of the primary and/or secondary effector molecule(s). Such secondary effector molecule which permeabilizes the bacterial cell or enhances release is designated "a release factor". In certain embodiments, the release factor also advantageously has anti-tumor activity.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

The release factor expressed by the bacterial vector of the invention may be endogenous to the modified attenuated tumor-targeted bacteria or it may be exogenous (e.g., encoded by a nucleic acid that is not native to the attenuated tumor-targeted bacteria). A release factor may be encoded by a nucleic acid comprising a plasmid, or by a nucleic acid which is integrated into the genome of the attenuated tumor-targeted bacteria. A release factor may be encoded by the same nucleic acid or plasmid that encodes a primary effector molecule, or by a separate nucleic acid or plasmid. A release factor may be encoded by the same nucleic acid or plasmid that encodes a secondary effector molecule, or by a separate nucleic acid or plasmid. In one embodiment, the release factor is expressed in a cell which also expresses a fusion protein comprising a primary effector molecule fused to an Omp-like protein. In this embodiment, the co-expression of the release factor allows for enhanced release of the fusion protein from the periplasmic space.

In a preferred embodiment, such a factor is one of the Bacteriocin Release Proteins, or BRPs (herein referred to in the generic as BRP). The BRP employed in the invention can originate from any source known in the art including but not limited to the cloacin DF13 plasmid, one of colicin E1-E9 plasmids, or from colicin A, N or D plasmids. In a preferred embodiment, the BRP is of cloacin DF13 (pCloDF13 BRP).

Generally, BRPs are 45-52 amino acid peptides that are initially synthesized as precursor molecules (PreBRP) with signal sequences that are not cleaved by signal endopeptidases. BRP activity is thought to be mediated, at least in part, by the detergent-resistant outer membrane phospholipase A (PldA) and is usually associated with an increase in the degradation of outer membrane phospholipid (for a general review on BRPs, see van der Wal *et al.*, 1995, *FEMS Microbiology Review* 17:381-399). Without limitation as to mechanism, BRP promotes the preferential release of periplasmic components, although the release of cytoplasmic components is also detected to a lesser extent. When moderately overexpressed, BRP may cause the bacterial membrane to become fragile, inducing quasi-lysis and high release of cytoplasmic components. Additionally, it is thought that when BRP is expressed at superhigh levels, the protein can cause bacterial cell lysis, thus delivering cellular contents by lytic release. In this embodiment, BRP expression may be correlated with BRP activity (e.g., release of bacterial contents). For example, superhigh BRP activity results in bacterial cell lysis of substantially all bacteria. Thus, as used herein, "superhigh expression" is defined as the expression level of BRP which results in bacterial cell lysis of substantially all bacteria. Moderate BRP activity, is associated with partial or enhanced release of bacterial contents as compared to a control bacteria which is not expressing BRP, without obligate lysis of the bacteria. Thus, in this embodiment, moderate overexpression of BRP is defined as the expression level at which release of cytoplasmic components is enhanced, without bacterial lysis of substantially all of the bacteria. Substantially all of the bacteria, as used herein, is more than 60% of the bacteria,

WO 01/25397

PCT/US00/23242

preferably more than 70%, more preferably 80%, still more preferably more than 90% and most preferably 90-100% of bacteria.

In a specific embodiment of the invention, the BRP protein is a pCl₀DF13 BRP mutant whose lytic function has been uncoupled from its protein release function, thereby enhancing protein release without bacterial lysis (van der Wal *et al.*, 1998, *App. Env. Microbiol.* 64:392-398). This embodiment allows for prolonged protein release from the bacterial vector, while reducing the need for frequent administration of the vector. In another specific embodiment, the BRP of the invention is a pCl₀DF13 BRP with a shortened C-terminus, which in addition to protein release causes cell lysis (Luirink *et al.*, 1989, *J. Bacteriol.* 171:2673-2679).

In another embodiment of the invention, the enhanced release system comprises overexpression of a porin protein; *see e.g.*, Sugawara, E. and Nikaido, H., 1992, *J. Biol. Chem.* 267:2507-11.

In certain embodiments when a BRP is expressed by the bacterial vector of the invention, the BRP may be endogenous to the modified attenuated tumor-targeted bacteria or it may be exogenous (*e.g.*, encoded by a nucleic acid that is not native to the attenuated tumor-targeted bacteria). A BRP may be encoded by a nucleic acid comprising a plasmid, or by a nucleic acid which is integrated into the genome of the attenuated tumor-targeted bacteria. A BRP may be encoded by the same nucleic acid or plasmid that encodes a primary effector molecule, or by a separate nucleic acid or plasmid. A BRP may be encoded by the same nucleic acid or plasmid that encodes a secondary effector molecule, or by a separate nucleic acid or plasmid. In one embodiment, the BRP-like protein is expressed in a cell which also expresses a fusion protein comprising an effector molecule fused to an Omp-like protein. In this embodiment, the co-expression of the BRP allows for enhanced release of the fusion protein.

In a preferred specific embodiment of the invention a BRP encoding nucleic acid is encoded by a colicin plasmid. In another specific embodiment of the invention, the BRP encoding nucleic acid is expressed under the control of the native BRP promoter, which is an SOS promoter that responds to stress (*e.g.*, conditions that lead to DNA damage such as UV light) in its normal host (for BRP, *Enterococcus cloacae*), yet is partially constitutive in *Salmonella*. In a preferred embodiment, the BRP encoding nucleic acid is expressed under the control of the pepT promoter, which is activated in response to the anaerobic nature of the tumor environment (*see e.g.*, Lombardo *et al.*, 1997, *J. Bacteriol.* 179:1909-17).

Alternatively, the promoter can be an antibiotic-induced promoter, such as the *tet* promoter of the Tn10 transposon. In a preferred embodiment, the *tet* promoter is a singlemer, which singlemer responds in an all-or-nothing manner to the presence of tetracycline or analogs thereof such as doxycycline and anhydrotetracycline and provides a

WO 01/25397

PCT/US00/23242

genetically stable on-off switch. In another embodiment, the *tet* promoter is multimerized, for example three-fold. Such a multimer responds in a graded manner to the presence of tetracycline and provides a more manipulable system for control of effector molecule levels. Promoter activity would then be induced by administering to a subject who has been treated with the attenuated tumor-targeted bacteria of the invention an appropriate dose of tetracycline. Although the *tet* inducible expression system was initially described for eukaryotic systems such as *Schizosaccharomyces pombe* (Faryar and Gatz, 1992, Current Genetics 21:345-349) and mammalian cells (Lang and Feingold, 1996, Gene 168:169-171), recent studies extend its applicability to bacterial cells. For example, Stieger et al. (1999, Gene 226:243-252) have shown 80-fold induction of the firefly luciferase gene upon *tet* induction when operably linked to the *tet* promoter. An advantage of this promoter is that it is induced at very low levels of tetracycline, approximately 1/10th of the dosage required for antibiotic activity.

5.4. DERIVATIVES AND ANALOGS

The invention further encompasses bacterial vectors that are modified to encode or deliver a derivative, including but not limited to a fragment, analog, or variant of a primary and/or secondary effector molecule, or a nucleic acid encoding the same. The derivative, analog or variant is functionally active, *e.g.*, capable of exhibiting one or more functional activities associated with a full-length, wild-type effector molecule. As one example, such derivatives, analogs or variants which have the desired therapeutic properties can be used to inhibit tumor growth or the spread of tumor cells (metastasis). Derivatives or analogs of an effector molecule can be tested for the desired activity by procedures known in the art, including those described herein.

In particular, variants can be made by altering effector molecule encoding sequences by substitutions, additions (*e.g.*, insertions) or deletions that provide molecules having the same or increased anti-tumor function relative to the wild-type effector molecule. For example, the variants of the invention include, but are not limited to, those containing, as a primary amino acid sequence, all or part of the amino acid sequence of an effector molecule, including altered sequences in which functionally equivalent amino acid residues are substituted for residues within the sequence resulting in a silent change, *i.e.*, the altered sequence has at least one conservative substitution.

Any of the primary or secondary effector-encoding nucleic acids that are of mammalian origin can be altered to employ bacterial codon usage by methods known in the art. Preferred codon usage is exemplified in Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc. New York, and Zhang et al., 1991, Gene 105:61-72.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

In a specific embodiment, a derivative, analog or variant of a primary or secondary molecule comprises a nucleotide sequence that hybridizes to the nucleotide sequence encoding the primary or secondary molecule, or fragment thereof under stringent conditions, *e.g.*, hybridization to filter-bound DNA in 6x sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45 °C followed by one or more washes in 0.2xSSC/0.1% SDS at about 50-65 °C, under highly stringent conditions, *e.g.*, hybridization to filter-bound nucleic acid in 6xSSC at about 45 °C followed by one or more washes in 0.1xSSC/0.2% SDS at about 68 °C, or under other stringent hybridization conditions which are known to those of skill in the art (see, for example, Ausubel, F.M. et al., eds., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York at pages 6.3.1-6.3.6 and 2.10.3).

Derivatives or analogs of a primary or secondary effector molecule include but are not limited to those molecules comprising regions that are substantially homologous to the primary or secondary effector molecule or fragment thereof (*e.g.*, in various embodiments, at least 60% or 70% or 80% or 90% or 95% identity over an amino acid sequence of identical size without any insertions or deletions or when compared to an aligned sequence in which the alignment is done by a computer homology program known in the art) or whose encoding nucleic acid is capable of hybridizing to an effector molecule protein effector molecule encoding sequence, under high stringency, moderate stringency, or low stringency conditions.

To determine the percent identity of two amino acid sequences or of two nucleic acids, *e.g.* between the sequences of a primary effector molecule and other known sequences, the sequences are aligned for optimal comparison purposes (*e.g.*, gaps can be introduced in the sequence of a first amino acid or nucleic acid sequence for optimal alignment with a second amino or nucleic acid sequence). The amino acid residues or nucleotides at corresponding amino acid positions or nucleotide positions are then compared. When a position in the first sequence is occupied by the same amino acid residue or nucleotide as the corresponding position in the second sequence, then the molecules are identical at that position. The percent identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences (*i.e.*, % identity = # of identical positions/total # of positions (*e.g.*, overlapping positions) x 100). In one embodiment, the two sequences are the same length.

The determination of percent identity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm. A preferred, non-limiting example of a mathematical algorithm utilized for the comparison of two sequences is the algorithm of Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modified as in Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Such an algorithm is incorporated into the NBLAST and XBLAST programs of Altschul, *et al.*, 1990, J. Mol.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

Biol. 215:403-410. BLAST nucleotide searches can be performed with the NBLAST program, score = 100, wordlength = 12 to obtain nucleotide sequences homologous to a nucleic acid molecules of the invention. BLAST protein searches can be performed with the XBLAST program, score = 50, wordlength = 3 to obtain amino acid sequences homologous to a protein molecules of the invention. To obtain gapped alignments for comparison purposes, Gapped BLAST can be utilized as described in Altschul *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Alternatively, PSI-Blast can be used to perform an iterated search which detects distant relationships between molecules (*Id.*). When utilizing BLAST, Gapped BLAST, and PSI-Blast programs, the default parameters of the respective programs (*e.g.*, XBLAST and NBLAST) can be used. See <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Another preferred, non-limiting example of a mathematical algorithm utilized for the comparison of sequences is the algorithm of Myers and Miller, CABIOS (1989). Such an algorithm is incorporated into the ALIGN program (version 2.0) which is part of the GCG sequence alignment software package. When utilizing the ALIGN program for comparing amino acid sequences, a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12, and a gap penalty of 4 can be used. Additional algorithms for sequence analysis are known in the art and include ADVANCE and ADAM as described in Torellis and Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci., 10:3-5; and FASTA described in Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-8. Within FASTA, ktup is a control option that sets the sensitivity and speed of the search. If ktup=2, similar regions in the two sequences being compared are found by looking at pairs of aligned residues; if ktup=1, single aligned amino acids are examined. ktup can be set to 2 or 1 for protein sequences, or from 1 to 6 for DNA sequences. The default if ktup is not specified is 2 for proteins and 6 for DNA. For a further description of FASTA parameters, see <http://bioweb.pasteur.fr/docs/man/man/fasta.1.html#sect2>, the contents of which are incorporated herein by reference.

Alternatively, protein sequence alignment may be carried out using the CLUSTAL W algorithm, as described by Higgins *et al.*, 1996, Methods Enzymol. 266:383-402.

The percent identity between two sequences can be determined using techniques similar to those described above, with or without allowing gaps. In calculating percent identity, only exact matches are counted.

A primary effector molecule or a secondary effector molecule, or derivatives, or analogs thereof can be produced by various methods known in the art. The manipulations which result in their production can occur at the nucleic acid or protein level. For example, a cloned effector molecule encoding sequence encoding, for example, an effector molecule can be modified by any of numerous strategies known in the art (Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory

WO 01/25397

PCT/US00/23242

Press, Cold Spring Harbor, New York). The sequence can be cleaved at appropriate sites with restriction endonuclease(s), followed by further enzymatic modification if desired, isolated, and ligated *in vitro*. In the production of a modified effector molecule encoding a derivative or analog of a primary or secondary effector molecule, care should be taken to ensure that the modified effector molecule encoding sequence remains within the same translational reading frame as the native protein, uninterrupted by translational stop signals, in the effector molecule encoding sequence region where the desired primary or secondary effector molecule activity is encoded.

Additionally, a nucleic acid sequence encoding an effector molecule can be mutated *in vitro* or *in vivo*, to create and/or destroy translation, initiation, and/or termination sequences, or to create variations in coding regions and/or to form new restriction endonuclease sites or destroy preexisting ones, to facilitate further *in vitro* modification. In a preferred specific embodiment, an effector molecule-encoding nucleic acid sequence is mutated, for example, to produce a more potent variant. Any technique for mutagenesis known in the art can be used, including but not limited to, chemical mutagenesis, *in vitro* site-directed mutagenesis (Hutchinson et al., 1978, J. Biol. Chem. 253:6551), use of TAB® linkers (Pharmacia), PCR with primers containing a mutation, etc. In a preferred embodiment, conservative amino acid substitutions are made at one or more predicted non-essential amino acid residues of an effector molecule. A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a side chain with a similar charge. Families of amino acid residues having side chains with similar charges have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (e.g., lysine, arginine, histidine), acidic side chains (e.g., aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (e.g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (e.g., threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Alternatively, mutations can be introduced randomly along all or part of the coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the resultant mutants can be screened for biological activity to identify mutants that retain activity. Following mutagenesis, the encoded protein can be expressed and the activity of the protein can be determined.

In other embodiments, the effector molecules or fusion proteins of the invention are constructed to contain a protease cleavage site.

5.5. FUSION PROTEINS

In certain embodiments, the invention provides a primary or secondary effector molecule which is constructed as a fusion protein (e.g., covalently bonded to a different

WO 01/25397

PCT/US00/23242

protein). The invention provides nucleic acids encoding such fusion proteins. In certain other embodiments of this invention, the nucleic acid encoding a fusion protein of the invention is operably linked to an appropriate promoter.

In a specific embodiment, an effector molecule is constructed as a chimeric or fusion protein comprising an effector molecule or fragment thereof (preferably consisting of at least a domain or motif of the effector molecule, or at least 5, at least 10, at least 25, at least 50, at least 75, or at least 100 amino acids of the effector molecule) joined at its amino- or carboxy-terminus via a peptide bond to an amino acid sequence of a different protein. In specific embodiments, fusion comprises at least 2, at least 6, at least 10, at least 20, at least 30, at least 50, at least 75, or at least 100 contiguous amino acids of a heterologous polypeptide or fragment thereof that is functionally active. In one embodiment, such a fusion protein or chimeric protein is produced by recombinant expression of a nucleic acid encoding the primary effector molecule (e.g., a TNF-coding sequence, an anti-angiogenic factor-coding sequence, a tumor inhibitory enzyme-coding sequence, or a cytotoxic polypeptide-coding sequence) joined in-frame to a coding sequence for a different protein. Such a chimeric product can be made by ligating the appropriate nucleic acid sequences encoding the desired amino acid sequences to each other by methods known in the art, in the proper coding frame, and expressing the chimeric product into the expression vehicle of choice by methods commonly known in the art. Chimeric nucleic acids comprising portions of a nucleic acid encoding an effector molecule fused to any heterologous polypeptide-encoding sequences may be constructed. A specific embodiment relates to a chimeric protein comprising a fragment of a primary or secondary effector molecule of at least 5, at least 10, at least 25, at least 50, or at least 100 amino acids, or a fragment that displays one or more functional activities of the full-length primary or secondary effector molecule.

In a specific embodiment, a fusion protein comprises an affinity tag such as a hexahistidine tag, or other affinity tag that may be used in purification, isolation, identification, or assay of expression. In another specific embodiment, a fusion protein comprises a protease cleavage site such as a metal protease or serine cleavage site. In this embodiment, it is in some cases preferred that a protease site corresponding to a protease which is active at the site of a tumor is constructed into a fusion protein of the invention. In several embodiments, an effector molecule is constructed as a fusion protein to an Omp-like protein, or fragment thereof (e.g., signal sequence, leader sequence, periplasmic region, transmembrane domain, multiple transmembrane domains, or combinations thereof; see *infra*, Section 3.1 for definition of "Omp-like protein").

In a preferred embodiment, an effector molecule (primary or secondary) of the invention is expressed as a fusion protein with an outer membrane protein (Omp-like protein). Bacterial outer membrane proteins are integral membrane proteins of the

WO 01/25397

PCT/US00/23242

bacterial outer membrane, possess multiple membrane-spanning domains and are often attached to one or more lipid moieties. Outer membrane proteins are initially expressed in precursor form (the pro-Omp) with an amino terminal signal peptide that directs the protein to the membrane, upon which the signal peptide is cleaved by a signal peptidase to produce the mature protein. In one embodiment, an effector molecule is constructed as a fusion protein with an Omp-like protein. In this embodiment, the primary effector molecule has enhanced delivery to the outer membrane of the bacteria. Without intending to be limiting as to mechanism, the Omp-like protein is believed by the inventors to act as an anchor or tether for the effector molecule to the outer membrane, or serves to localize the protein to the bacterial outer membrane. In one embodiment, the fusion of an effector molecule to an Omp-like protein is used to enhance localization of an effector molecule to the periplasm. In another embodiment, the fusion of an effector molecule to an Omp-like proteins is used to enhance release of an effector molecule. In specific embodiments, the Omp-like protein is at least a portion of OmpA, OmpB, OmpC, OmpD, OmpE, OmpF, OmpT, a porin-like protein, PhoA, PhoE, lamB, β -lactamase, an enterotoxin, protein A, endoglucanase, peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL), PepA, FhuA, NmpA, NmpB, NmpC, or a major outer membrane lipoprotein (such as LPP), etc. In certain embodiments of the invention, the signal sequence is constructed to be more hydrophobic (e.g., by the insertion or replacement of amino acids within the signal sequence to hydrophobic amino acids, e.g., leucine). As illustrative examples, see Sections 7.1-7.4, *infra*.

In other embodiments of the invention, a fusion protein of the invention comprises a proteolytic cleavage site. The proteolytic cleavage site may be endogenous to the effector molecule or endogenous to the Omp-like protein, or the proteolytic cleavage site may be constructed into the fusion protein. In certain specific embodiments, the Omp-like protein of the invention is a hybrid Omp comprising structural elements that originate from separate proteins.

In an exemplary mode of the embodiment, the Omp-like protein is OmpA; the same principles used in the construction of OmpA-like fusion proteins are applied to other Omp fusion proteins, keeping in mind the structural configuration of the specific Omp-like protein.

For example, the native OmpA protein contains eight anti-parallel transmembrane β -strands within the 170 amino acid N-terminal domain of the protein. Between each pair of transmembrane domains is an extracellular or intracellular loop, depending on the direction of insertion of the transmembrane domain. The C-terminal domain consists of 155 amino acids which are located intracellularly and presumably contact the peptidoglycan occupying the periplasmic space. Expression vectors have been generated that facilitate the generation of OmpA fusion proteins. For example, Hobom *et al.* (1995, Dev. Biol. Strand. 84:255-262) have developed vectors containing the OmpA open reading

WO 01/25397

PCT/US00/23242

frame with linkers inserted within the sequences encoding the third or fourth extracellular loops that allow the in-frame insertion of the heterologous protein of choice.

In one embodiment of the invention, the portion of the OmpA fusion protein containing the primary effector molecule has enhanced expression in the periplasm. In one aspect of the embodiment, the fusion protein comprises prior to maturation either the signal sequence or the signal sequence followed by at least one membrane-spanning domain of OmpA, located N-terminal to the primary effector molecule. The signal sequence is cleaved and absent from the mature protein. In another aspect of the embodiment, the primary effector molecule is at the N-terminus of the OmpA fusion, rendering inconsequential to the positioning of the primary effector molecule the number of membrane spanning domains of OmpA utilized, as long as the fusion protein is stable. In yet another aspect of the embodiment, the primary effector molecule is situated between the N- and C-terminal domains of OmpA such that a soluble periplasmic protein containing the primary effector molecule upon cleavage by a periplasmic protease within the periplasm. In certain aspects of this embodiment, it is preferred that a bacterial vector which expresses a periplasmic primary effector molecule also coexpresses BRP to enhance release of the effector molecule from the bacterial cell.

In another embodiment of the invention, the portion of the OmpA fusion protein containing the primary effector molecule is at the extracellular bacterial surface. In one aspect of the embodiment, the fusion protein comprises an even number or odd number of membrane-spanning domains of OmpA located N-terminal to the primary effector molecule. In another aspect of the embodiment, the primary effector molecule is situated between two extracellular loops of OmpA for presentation to the tumor cell by the bacterial cell. In specific embodiments, the invention provides expression plasmids of effector molecule fusion proteins at the bacterial extracellular surface. For example, the plasmid denoted Trc(lpp)ompA, comprises a *trc* promoter-driven lipopolyprotein (lpp) anchor sequence fused to a truncated *ompA* transmembrane sequence. As another example, the plasmid is denoted TrcompA comprises a *trc* promoter-driven *ompA* encoding signal sequence. Such plasmids may be constructed to comprise a nucleic acid encoding one or more effector molecule(s) of the invention.

Optionally, an effector molecule is preceded or flanked by consensus cleavage sites for a metalloprotease or serine protease that is abundant in tumors, for release of the effector molecule into the tumor environment. Whether the primary effector molecule is preceded or flanked by protease cleavage sites depends on whether it is located terminally or internally in the fusion protein, respectively.

Similar fusion proteins may be constructed with any of the Omp-like proteins using the strategies described above in terms of OmpA. In the construction of such fusion proteins, as will be apparent to one of ordinary skill in the art, the selection of the portion

WO 01/25397

PCT/US00/23242

of the Omp-like protein to be fused to an effector molecule will depend upon the location that is desired for the expression of the effector molecule (e.g., periplasmic, extracellular, membrane bound, etc.). Such fusion protein constructions as described herein for primary effector molecules are also appropriate for secondary effector molecules.

In a preferred embodiment, an effector molecule is fused to a ferry peptide. Ferry peptides used in fusion proteins have been shown to facilitate the delivery of a polypeptide or peptide of interest to virtually any cell within diffusion limits of its production or introduction (see, e.g., Bayley, 1999, *Nature Biotechnology* 17:1066-1067; Fernandez *et al.*, 1998, *Nature Biotechnology* 16:418-420; and Derossi *et al.*, 1998, *Trends Cell Biol.* 8:84-87). Accordingly, engineering attenuated tumor-targeted bacteria to express fusion proteins comprising a ferry peptide and an effector molecule enhances the ability of an effector molecule to be internalized by tumor cells. In a specific embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express a nucleic acid molecule encoding a fusion protein comprising a ferry peptide and an effector molecule. In another embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins comprising a ferry peptide and an effector molecule. In accordance with these embodiments, the effector molecule may be a primary or secondary effector molecule. Examples of ferry peptides include, but are not limited to, peptides derived from the HIV TAT protein, the antennapedia homeodomain (penetratin), Kaposi fibroblast growth factor (FGF) membrane-translocating sequence (MTS), herpes simplex virus VP22, polyhistidine (e.g., hexahistidine; 6H), polylysine (e.g., hexalysine; 6K), and polyarginine (e.g., hexaarginine; 6R) (see, e.g., Blanke *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8437-8442).

In another preferred embodiment, a fusion protein comprises a signal peptide, ferry peptide and an effector molecule. In a specific mode of this embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins comprising a signal sequence, a ferry peptide and an effector molecule. In accordance with this mode, the effector molecule is a primary or secondary effector molecule.

In another preferred embodiment, a fusion protein comprises a signal peptide, a proteolytic cleavage site, a ferry peptide and an effector molecule to a solid tumor by attenuated tumor-targeted bacteria. In a specific embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins comprising a signal sequence, a proteolytic cleavage site, a ferry peptide and an effector molecule. In accordance with this embodiment, the effector molecule may be a primary or secondary effector molecule.

By way of non-limiting example, colicin activity may be enhanced by addition of internalizing peptides derived from HIV TAT, herpes simplex virus VP22, antennapedia,

WO 01/25397

PCT/US00/23242

6H, 6K, and 6R. The fusion can be either C-terminal, N-terminal, or internal. Internal fusions are especially preferred where the fusion follows the N-terminal signal sequence cleavage peptide. The fusion protein may further comprise an N-terminal signal sequence such as OmpA or a C-terminal signal sequence such as hlyA.

In a preferred embodiment, an effector molecule is fused to the delivery portion of a toxin. Various toxins are known to have self-delivery capacity, where one portion of the toxin acts as a delivery agent for the second portion of the toxin. For example, Ballard *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:12531-12534 demonstrated that the anthrax protective agent (PA) which mediates the entry of lethal factor (LF) and edema factor into the cytosolic compartment of mammalian cells, is also capable of mediating entry of protein fusions to a truncated form of LF (LF₀; 255 amino acid residues). Thus, effector molecules of the invention, except those that function outside the cell, can be fused to the LF₀, or other toxin systems, including, but limited to, diphtheria toxin A chain residues 1-193 (Blanke *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8437-8442), cholera toxin, verotoxin, *E. coli* heat labile toxins (LTs), *E. coli* heat stable toxins (STs), enterohemolysins, enterotoxins, cytotoxins, EA_gEC stable toxin 1 (EAST), CNFs, cytolethal distending toxin, α -hemolysins, β -hemolysins, and *Shed* hemolysins (for review see, *e.g.*, O'Brien and Holmes, 1996, Protein toxins of *Escherichia coli* and *Salmonella*). Cellular and Molecular Biology, Neidhardt *et al.* (eds), ASM Press, Washington, D.C., pp2788-2802). In a specific embodiment, a primary effector molecule is fused to the delivery portion of a toxin. In another specific embodiment, a secondary effector molecule is fused to the delivery portion of a toxin.

Construction of fusion proteins for expression in bacteria are well known in the art and such methods are within the scope of the invention. (See, *e.g.*, Makrides, S., 1996, Microbiol. Revs 60:512-538 which is incorporated herein by reference in its entirety).

5.6. EXPRESSION VEHICLES

The present invention provides attenuated tumor-targeted bacteria which have been engineered to encode one or more primary effector molecules and optionally, one or more secondary effector molecules. The invention provides attenuated tumor-targeted bacteria comprising effector molecule(s) which are encoded by a plasmid or transfectable nucleic acid. In a preferred embodiment of the invention, the attenuated tumor-targeted bacteria is *Salmonella*. When more than one effector molecule (*e.g.*, primary or secondary) is expressed in an attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella*, the effector molecules may be encoded by the same plasmid or nucleic acid, or by more than one plasmid or nucleic acid molecule. The invention also provides attenuated tumor-targeted bacteria comprising effector molecule(s) which are encoded by a nucleic acid molecule which is integrated into the bacterial genome. Integrated effector molecule(s) may be

WO 01/25397

PCT/US00/23242

endogenous to an attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella*, or may be introduced into the attenuated tumor-targeted bacteria (e.g., by introduction of a nucleic acid which encodes the effector molecule, such as a plasmid, transfectable nucleic acid, transposon, etc.) such that the nucleic acid molecule encoding the effector molecule becomes integrated into the genome of the attenuated tumor-targeted bacteria. In a preferred embodiment of the invention, the attenuated tumor-targeted bacteria is *Salmonella*. The invention provides a nucleic acid molecule encoding an effector molecule which nucleic acid is operably linked to an appropriate promoter. A promoter operably linked to a nucleic acid molecule encoding an effector molecule may be homologous (i.e., native) or heterologous (i.e., not native to the nucleic acid molecule encoding the effector molecule).

The nucleotide sequence coding for an effector molecule of the invention or a functionally active analog or fragment or other derivative thereof, can be inserted into an appropriate expression vehicle, e.g., a plasmid which contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted protein-coding sequence. The necessary transcriptional and translational signals can be supplied by the effector molecule and/or its flanking regions. Alternatively, an expression vehicle is constructed by inserting a structural DNA sequence encoding a desired protein together with suitable translation initiation and termination signals in operable reading phase with a functional promoter using one of a variety of methods known in the art for the manipulation of DNA. See, generally, Sambrook et al., 1989, *Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al., 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing, New York, NY. These methods may include *in vitro* recombinant DNA and synthetic techniques and *in vivo* recombinants (genetic recombination). The invention provides a nucleic acid molecule encoding an effector molecule which nucleic acid is operably linked to an appropriate promoter.

The present invention also provides attenuated tumor-targeted bacteria which have been modified to encode one or more fusion proteins and optionally, one or more effector molecules. The invention provides attenuated tumor-targeted bacteria comprising fusion proteins which are encoded by a plasmid or transfectable nucleic acid. When more than one fusion protein and/or effector molecule (e.g., primary or secondary) is expressed in an attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella*, the fusion proteins and/or effector molecules may be encoded by the same plasmid or nucleic acid, or by more than one plasmid or nucleic acid. The invention also provides attenuated tumor-targeted bacteria comprising fusion proteins which are encoded by a nucleic acid which is integrated into the bacterial genome. The invention also provides a nucleic acid molecule encoding an fusion protein which nucleic acid molecule is operably linked to an appropriate promoter. The nucleotide sequence coding for a fusion protein of the invention can be inserted into an

WO 01/25397

PCT/US00/23242

appropriate expression vehicle, e.g., a plasmid which contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted protein-coding sequence.

In certain specific embodiments of the invention, the expression vehicle of the invention is a plasmid. Large numbers of suitable plasmids are known to those of skill in the art and are commercially available for generating the recombinant constructs of the present invention.

5 Such commercial plasmids include, for example, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) and GEM 1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). These pBR322 "backbone" sections are combined with an appropriate promoter and the structural sequence to be expressed. pBR322 is considered to be a low copy number plasmid. If higher levels of expression are desired, the plasmid can be a high copy number plasmid, for
10 example a plasmid with a pUC backbone. pUC plasmids include but are not limited to pUC19 (see e.g., Yanisch-Perron et al. 1985, Gene 33:103-119) and pBluescript (Stratagene).

The following plasmids are provided by way of example and may be used in conjunction with the methods of the invention. Bacterial: pBs, phagescript, phiX174,
15 pbluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRJT5 (Pharmacia). A commercial plasmid with a pBR322 "backbone" may also be used, for example, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) and GEM 1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). These are combined with an appropriate promoter and the structural sequence to be expressed.
20 pCET, pTS (as described in Section 6 herein).

In specific embodiments of the invention, a plasmid encoding an effector molecule is the pTS-TNF- α plasmid, the pTS-BRP plasmid, or the pTS-BRP-TNF- α plasmid as described in Section 6 herein.

In a specific embodiment of the invention, the fusion protein of the invention for
25 secretion into the periplasmic space comprising the OmpA signal sequence and the primary effector protein are encoded by the plasmid pIN-III-ompA-Hind, which contains the DNA sequence encoding the ompA signal sequence upstream of a linker sequence into which the coding sequence for the primary effector molecule can be cloned. In a preferred specific embodiment, the *lac* inducible promoter of pIN-III-ompA-Hind vector is replaced by a
30 pepT or tet promoter. (See, Reantier-Delrue et al. (1988), Nuc. Acids Res. 16:8726).

The present invention also provides transposon-mediated chromosomal integration of effector molecules. Any transposon plasmid known in the art may be used in the methods of the invention so long as a nucleic acid encoding an effector molecule can be
35 constructed into the transposon cassette. For example, the invention provides a transposon plasmid, comprising a transposon or minitransposon, and an MCS.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

In certain embodiments of the invention, the plasmid of the invention is a transposon plasmid, *i.e.*, comprises a transposon in which the sequence encoding an effector molecule of interest is inserted. Transposon plasmids contain transposon cassettes which cassette becomes integrated into the bacterial genome. Accordingly, a nucleic acid encoding an effector molecule or fusion protein thereof is inserted into the transposon cassette. Thus, a transposon insertion integrates the cassette into the bacterial genome.

5 The coding sequence of the effector molecule can be operably linked to a promoter, or can be promoterless. In the latter case, expression of the selectable marker is driven by a promoter at the site of transposon insertion into the bacterial genome. Colonies of bacteria having a transposon insertion are screened for expression levels that meet the requirements

10 of the invention, *e.g.* that express sufficient levels of cytokine to promote tumor cytotoxicity, stasis, or regression.

In certain embodiments, in addition to the transposon, the transposon plasmid comprises, outside the inverted repeats of the transposon, a transposase gene to catalyse the insertion of the transposon into the bacterial genome without being carried along with the transposon, so that bacterial strains with stable transposon insertions are generated.

15

Transposons to be utilized by the present invention include but are not limited to Tn7, Tn9, Tn10 and Tn5. In a preferred embodiment, the transposon plasmid is pNK2883 (ATCC) having an ampicillin resistance gene located outside the Tn10 insertion elements and the nucleic acids encoding one or more effector molecule(s) is inserted between the two Tn10 insertion elements (*e.g.*, within the transposon cassette). Preferably, the

20 construct is made such that additional sequences encoding other elements is inserted between the two Tn10 insertion elements. In specific embodiments, such elements may optionally include (1) a promoterless copy a selectable marker (*e.g.*, *SerC*, *AroA*, etc) for positive selection of the bacteria containing the plasmid; (2) a BRP gene, (3) a promoter for the effector molecule (such as *trc*) operably linked to the nucleic acid encoding the one or

25 more primary effector molecule(s) (such as TNF- α , or a fusion protein thereof, *e.g.*, an OmpA-TNF- α fusion), (4) a terminator for the nucleic acid encoding the one or more effector molecule(s).

In one embodiment, after the manipulation of the plasmid as appropriate and selection of those clones having the desired construct using the ampicillin resistance

30 properties encoded by the plasmid, the antibiotic selection is removed through plasmid loss and strains having a chromosomal transposon insert are chosen for administering to human subjects (*e.g.*, by plating on selective media).

In another specific embodiment, the plasmid pTS is used which comprises an altered target specificity transposase gene and a minitransposon, containing the coding

35 sequences for a promoterless *serC* gene and an MCS. In another specific embodiment, the plasmid pTS-BRP is used which comprises an altered target specificity transposase gene

WO 01/25397

PCT/US00/23242

and a minitransposon, containing the coding sequences for a promoterless *serC* gene, and alkylating agent-inducible bacteriocin release factor, and an MCS.

In a preferred embodiment, a transposon plasmid for selection of transposon-mediated chromosomal integrants, comprises:

- 5 a) a transposase gene, for transposon excision and integration, located outside of the transposon insertion sequence (e.g., outside of the transposon cassette);
- b) a wild-type coding sequence corresponding to the selection gene deleted in the bacterial strain (e.g., *serC*) as well as a ribosomal binding site and terminator for the wild-type gene, but lacking a promoter. This sequence is preferably located immediately following the left TN10 transposon insertion sequence;
- 10 c) optionally, between the right and left insertion sequences is a nucleic acid sequence encoding a release enhancing nucleic acid (e.g., BRP); and
- d) a multiple cloning site (MCS) located between the right and left insertion sequences, containing unique restriction sites within the plasmid, for the incorporation of effector molecule. The MCS is preferably located immediately following the release enhancing nucleic acid (if used) and just prior to the right TN10 insertion sequence.
- 15

In another embodiment, the gene disruption resulting from random integration of effector molecules onto the host chromosome, identifies the suitability of the gene location for effector insertion.

20

In yet another embodiment, the expression vehicle is an extrachromosomal plasmid that is stable without requiring antibiotic selection, i.e. is self-maintained. In one non-limiting example, the self-maintained expression vehicle is a *Salmonella* virulence plasmid.

For example, in one embodiment of the invention, the plasmid selection system is maintained by providing a function which the bacteria, such as *Salmonella*, lacks and on the basis of which those *Salmonella* having the function can be selected for at the expense of those that do not. In one embodiment, the *Salmonella* of the invention is an auxotrophic mutant strain and the expression plasmid provides the mutant or absent biosynthetic enzyme function. The *Salmonella* which contain the expression plasmid can be selected for by growing the cells on growth medium which lacks the nutrient that only the desired cells, i.e. those with the expression plasmid, can metabolize. In a highly preferred aspect of this embodiment, the *Salmonella* of the invention has an obligatory requirement for DAP (meso-diaminopimelic acid), most preferably by deletion of the *asd* gene. DAP is a component of the peptidoglycan present in the periplasm of Gram-negative bacteria, which is required for the integrity of the bacterial outer membrane. Absence of DAP results in bacterial cell lysis resulting from the loss of outer membrane integrity. The *asd* (β -

25

30

35

WO 01/25397

PCT/US00/23242

aspartate semialdehyde dehydrogenase) gene encodes an enzyme in the DAP biosynthetic pathway. Gram-negative bacteria which lack *asd* function can be grown by supplying DAP to the culture media. Plasmids, e.g. the expression plasmids of the invention, that carry the *asd* gene sequence operably linked to a homologous or heterologous promoter can be selected for by growing Gram-negative bacteria that lack *asd* activity in the absence of DAP (see, e.g., U.S. Patent No. 5,840,483 to Curtiss, III).

5 Other non-antibiotic selection systems are known in the art and are within the scope of the invention. For example, a selection system utilizing a plasmid comprising a stable toxin and less stable anti-toxin may be used to select for bacteria which maintain such a plasmid.

10 In another embodiment, the expression vehicle is an extrachromosomal plasmid that is selectable by non-antibiotic means, for example a colicin plasmid. As used herein, a colicin plasmid minimally encodes a colicin toxin and an anti-colicin, the colicin toxin being more stable than the anti-colicin, such that any bacteria which loses the colicin plasmid is killed as a result of the perdurance of the colicin toxin. In a preferred embodiment, the colicin toxin is the large subunit of ColE3 and the anti-colicin is the small
15 subunit of ColE3.

In other embodiments of the invention, the expression vehicle is a λ vector, more specifically a lysogenic λ vector. In a preferred embodiment, the bacterial host comprising the λ vector further comprises a temperature-sensitive λ repressor which is functional at
20 30°C but not 37°C. Consequently, the bacterial host can be grown and manipulated *in vivo* at 30°C without expression of the primary and/or secondary effector molecule which may be toxic to the bacterial cell. Upon introduction of the bacterial strain into the subject, the λ repressor is inactivated by normal body temperature and expression of the primary effector molecule, and optionally a secondary effector molecule, is activated.

25 Expression of a nucleic acid sequence encoding an effector molecule or fusion protein may be regulated by a second nucleic acid sequence so that the effector molecule is expressed in a bacteria transformed with the recombinant DNA molecule. For example, expression of an effector molecule may be controlled by any promoter/enhancer element known in the art. A promoter/enhancer may be homologous (*i.e.*, native) or heterologous
30 (*i.e.*, not native). Promoters which may be used to control the expression of an effector molecule, e.g. a cytokine, or fusion protein in bacteria include, but are not limited to prokaryotic promoters such as the β -lactamase promoter (Villa-Komaroff *et al.*, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731), or the *lac* promoter (DeBoer *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25; Scientific American, 1980, 242:74-94). Other promoters encompassed by the present invention include, but are not limited to, *lacI*, *lacZ*,
35 *T3*, *T7*, *gpt*, *lambda P_R*, *lambda P_L*, *trc*, *pagC*, *sulA*, *pol II (dinA)*, *ruv*, *recA*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrD*, *umuDC*, *lexA*, *cca*, *caa*, and *recN* (see, e.g., Schnarr *et al.*, 1991. Biochimie 73:423-

WO 01/25397

PCT/US00/23242

431). In a preferred embodiment, the promoter is *trc*, (see, e.g., Amann *et al.*, 1988, *Gene* 69:301-15).

In a particular embodiment, in which the primary effector molecule is a colicin expressed under the control of a SOS-responsive promoter, the attenuated bacterial strain may be treated with x-rays, ultraviolet radiation, an alkylating agent or another DNA damaging agent such that expression of the colicin is increased. Exemplary SOS-responsive promoters include, but are not limited to, *rccA*, *suIA*, *umuC*, *dinA*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrD*, *JexA*, *cea*, *caa*, *recN*, etc.

In another preferred embodiment, the promoter has enhanced activity in the tumor environment; for example, a promoter that is activated by the anaerobic environment of the tumor such as the P1 promoter of the *pepT* gene. Activation of the P1 promoter is dependent on the FNR transcriptional activator (Strauch *et al.*, 1985, *J. Bacteriol.* 156:743-751). In a specific embodiment, the P1 promoter is a mutant promoter that is induced at higher levels under anaerobic conditions than the native P1 promoter, such as the *pepT200* promoter whose activity in response to anaerobic conditions is induced by CRP-cAMP instead of FNR (Lombardo *et al.*, 1997, *J. Bacteriol.* 179:1909-1917). In another embodiment, the anaerobically-induced promoter is used, e.g., the *potABCD* promoter. *potABCD* is an operon that is divergently expressed from *pepT* under anaerobic conditions. The promoter in the *pepT* gene responsible for this expression has been isolated (Lombardo *et al.*, 1997, *J. Bacteriol.* 179:1909-1917) and can be used according to the methods of the present invention.

Alternatively, the promoter can be an antibiotic-induced promoter, such as the *tet* promoter of the Tn10 transposon. In a preferred embodiment, the *tet* promoter is multimerized, for example three-fold. Promoter activity would then be induced by administering to a subject who has been treated with the attenuated tumor-targeted bacteria of the invention an appropriate dose of tetracycline. Although the *tet* inducible expression system was initially described for eukaryotic systems such as *Schizosaccharomyces pombe* (Faryar and Gatz, 1992, *Current Genetics* 21:345-349) and mammalian cells (Lang and Feingold, 1996, *Gene* 168:169-171), recent studies extend its applicability to bacterial cells. For example, Stieger *et al.* (1999, *Gene* 226:243-252) have shown 80-fold induction of the firefly luciferase gene upon *tet* induction when operably linked to the *tet* promoter. An advantage of this promoter is that it is induced at very low levels of tetracycline, approximately 1/10th of the dosage required for antibiotic activity.

Once a plasmid is constructed comprising an effector molecule or fusion protein is introduced into the attenuated tumor-targeted bacteria, effector molecule expression or fusion protein expression can be assayed by any method known in the art including but not limited to biological activity, enzyme activity, Northern blot analysis, and Western blot analysis. (See Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Cold

WO 01/25397

PCT/US00/23242

Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al., 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing, New York, NY).

5.7. COMBINATION THERAPY

In certain embodiments, attenuated tumor-targeted bacteria are used in conjunction with other known cancer therapies to treat a solid cancer tumor. In certain other
5 embodiments, attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins are used in conjunction with other known cancer therapies to treat a solid cancer tumor. For example, attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid
10 molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins can be used in conjunction with a chemotherapeutic agent. Examples of chemotherapeutic agents include, but are not limited to, cisplatin, ifosfamide, taxanes such as taxol and paclitaxol, topoisomerase I inhibitors (e.g., CPT-11, topotecan, 9-AC, and GG-211), gemcitabine, vinorelbine, oxaliplatin, 5-fluorouracil (5-FU), leucovorin, vinorelbine, temodal, cytochalasin B, gramicidin D, emetine, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine,
15 vinblastine, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dione, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosterone, glucocorticoids, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol, and puromycin homologs, and cytoxin. Alternatively, attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins can be used
20 in conjunction with radiation therapy (e.g., gamma radiation or x-ray radiation). Any radiation therapy protocol can be used depending upon the type of cancer to be treated. For example, but not by way of limitation, x-ray radiation can be administered, in particular, high-energy megavoltage (radiation of greater than 1 MeV energy) can be used for deep tumors, and electron beam and orthovoltage x-ray radiation can be used for skin cancers.
25 Gamma ray emitting radioisotopes, such as radioactive isotopes of radium, cobalt and other elements may also be administered to expose tissues to radiation.

The present invention includes the sequential or concomitant administration of an anti-cancer agent and attenuated tumor-targeted bacteria. The invention encompasses
30 combinations of anti-cancer agents and attenuated tumor-targeted bacteria that are additive or synergistic.

The invention also encompasses combinations of one or more anti-cancer agents and attenuated tumor-targeted bacteria that have different sites of action. Such a combination provides an improved therapy based on the dual action of these therapeutics
35 whether the combination is synergistic or additive. Thus, the novel combinational therapy of the present invention yields improved efficacy over either agent used as a single-agent therapy.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

The present invention also includes the sequential or concomitant administration of an anti-cancer agent and attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins. The invention encompasses combinations of anti-cancer agents and attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins that are additive or synergistic.

The invention also encompasses combinations of one or more anti-cancer agents and attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins that have different sites of action. Such a combination provides an improved therapy based on the dual action of these therapeutics whether the combination is synergistic or additive. Thus, the novel combinational therapy of the present invention yields improved efficacy over either agent used as a single-agent therapy.

5.8. METHODS AND COMPOSITIONS FOR DELIVERY

The invention provides methods by which one or more primary effector molecules which may be toxic when delivered systemically to a host, can be delivered locally to tumors by an attenuated tumor-targeted bacteria with reduced toxicity to the host. In one embodiment, the primary effector molecule is useful to treat sarcomas, lymphomas, carcinomas, or other solid tumor cancers. In certain non-limiting embodiments, the effector molecule is useful for inducing local immune response at the site of the tumor.

According to the present invention, the attenuated tumor-targeted bacterial vectors containing a nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and optionally one or more primary effector molecules are advantageously used in methods to inhibit the growth of a tumor, reduce the volume of a tumor, or prevent the spread of tumor cells in an animal, including a human patient, having a solid tumor cancer.

The present invention provides methods for delivering one or more primary effector molecules for the treatment of a solid tumor cancer comprising administering, to an animal in need of such treatment, a pharmaceutical composition comprising an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules operably linked to one or more appropriate promoters. The present invention also provides methods for delivering one or more primary effector molecules for the treatment of a solid tumor cancer comprising administering, to an animal in need of such treatment, a pharmaceutical composition comprising an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules operably linked to one or more appropriate promoters. In one embodiment, the primary effector molecule

WO 01/25397

PCT/US00/23242

is a TNF family member, a cytotoxic peptide or polypeptide, an anti-angiogenic factor, a tumor inhibitory enzyme, or a functional fragment thereof.

The present invention provides methods for delivering one or more fusion proteins of the invention for the treatment of a solid tumor cancer comprising administering, to an animal in need of such treatment, a pharmaceutical composition comprising an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins of the invention operably linked to one or more appropriate promoters. The present invention also provides methods for delivering one or more fusion proteins of the invention and one or more effector molecules for the treatment of a solid tumor cancer comprising administering, to an animal in need of such treatment, a pharmaceutical composition comprising an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins of the invention and one or more effector molecules operably linked to one or more appropriate promoters.

In a preferred embodiment, the attenuated tumor-targeted bacteria is *Salmonella*. In another embodiment, the attenuated tumor-targeted bacteria comprises an enhanced release system. In a preferred embodiment, the animal is a mammal. In a highly preferred embodiment, the animal is a human.

The invention also provides combinatorial delivery of one or more primary effector molecules and optionally, one or more secondary effector molecules which are delivered by an attenuated tumor-targeted bacteria such as *Salmonella*. The invention also provides combinatorial delivery of different attenuated tumor-targeted bacteria carrying one or more different primary effector molecules and/or optionally, one or more different secondary effector molecules.

The invention also provides delivery of one or more fusion proteins of the invention which are delivered by an attenuated tumor-targeted bacteria such as *Salmonella*. The invention also provides combinatorial delivery of one or more fusion proteins of the invention and optionally, one or more effector molecules of the invention, which are delivered by an attenuated tumor-targeted bacteria such as *Salmonella*. The invention also provides combinatorial delivery of different attenuated tumor-targeted bacteria carrying one or more different fusion proteins and/or optionally, one or more different effector molecules.

Solid tumors include, but are not limited to, sarcomas, carcinomas and other solid tumor cancers, including, but not limited to germ line tumors, tumors of the central nervous system, breast cancer, prostate cancer, cervical cancer, uterine cancer, lung cancer, ovarian cancer, testicular cancer, thyroid cancer, astrocytoma, glioma, pancreatic cancer, stomach cancer, liver cancer, colon cancer, melanoma, renal cancer, bladder cancer, and mesothelioma. The subject is preferably an animal, including but not limited to animals such as cows, pigs, chickens, dogs, cats, horses, etc., and is preferably a mammal, and most

WO 01/25397

PCT/US00/23242

preferably human. As used herein, treatment of a solid tumor, includes but is not limited to, inhibiting tumor growth, inhibiting tumor cell proliferation, reducing tumor volume, or inhibiting the spread of tumor cells to other parts of the body (metastasis).

The present invention provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules operably linked to one or more appropriate promoters. The present invention provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules operably linked to one or more appropriate promoters.

The present invention provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins of the invention operably linked to one or more appropriate promoters. The present invention provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins of the invention and one or more effector molecules operably linked to one or more appropriate promoters.

The present invention also provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria. The present invention also provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more primary effector molecules and optionally, one or more secondary effector molecules. Such compositions comprise a therapeutically effective amount of an attenuated tumor-targeted *Salmonella* vector comprising one or more primary effector molecules and optionally one or more secondary effector molecules, and a pharmaceutically acceptable carrier. The present invention also provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted *Salmonella* comprising one or more fusion proteins of the invention and optionally, one or more effector molecules. Such compositions comprise a therapeutically effective amount of an attenuated tumor-targeted *Salmonella* vector comprising one or more fusion proteins of the invention and optionally one or more effector molecules, and a pharmaceutically acceptable carrier.

In a specific embodiment, the term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, and more particularly in humans. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or

WO 01/25397

PCT/US00/23242

vehicle with which the therapeutic is administered. Such pharmaceutical carriers can be sterile liquids, such as water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, such as peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil, olive oil, and the like. Saline is a preferred carrier when the pharmaceutical composition is administered intravenously. Saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions can also be employed as liquid carriers, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical
5 excipients include starch, glucose, lactose, sucrose, gelatin, malt, rice, flour, chalk, silica gel, sodium stearate, glycerol monostearate, talc, sodium chloride, dried skim milk, glycerol, propylene, glycol, water, ethanol and the like. The composition, if desired, can also contain minor amounts of wetting or emulsifying agents, or pH buffering agents. These compositions can take the form of solutions, suspensions, emulsion, tablets, pills,
10 capsules, powders, sustained-release formulations and the like. Oral formulation can include standard carriers such as pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, cellulose, magnesium carbonate, etc. Examples of suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin. Such compositions will contain a therapeutically effective amount of the
15 therapeutic attenuated tumor-targeted bacteria, in purified form, together with a suitable amount of carrier so as to provide the form for proper administration to the patient. The formulation should suit the mode of administration.

In a preferred embodiment, the composition is formulated in accordance with routine procedures as a pharmaceutical composition adapted for intravenous administration
20 to human beings. Typically, compositions for intravenous administration are solutions in sterile isotonic aqueous buffer. Where necessary, the composition may also include a suspending agent and a local anesthetic such as lignocaine to ease pain at the site of the injection. Generally, the ingredients are supplied either separately or mixed together in
25 unit dosage form, for example, as a dry lyophilized powder or water free concentrate in a hermetically sealed container such as an ampoule or sachette indicating the quantity of active agent. Where the composition is to be administered by infusion, it can be dispensed with an infusion bottle containing sterile pharmaceutical grade water or saline. Where the composition is administered by injection, an ampoule of sterile water for injection or saline
30 can be provided so that the ingredients may be mixed prior to administration.

The amount of the pharmaceutical composition of the invention which will be effective in the treatment or prevention of a solid tumor cancer will depend on the nature of the cancer, and can be determined by standard clinical techniques. In addition, *in vitro*
assays may optionally be employed to help identify optimal dosage ranges. The precise
35 dose to be employed in the formulation will also depend on the route of administration, and the seriousness of the cancer, and should be decided according to the judgment of the practitioner and each patient's circumstances. However, suitable dosage ranges are

WO 01/25397

PCT/US00/23242

generally from about 1.0 c.f.u./kg to about 1×10^{10} c.f.u./kg; optionally from about 1.0 c.f.u./kg to about 1×10^8 c.f.u./kg; optionally from about 1×10^2 c.f.u./kg to about 1×10^9 c.f.u./kg; optionally from about 1×10^1 c.f.u./kg to about 1×10^8 c.f.u./kg; and optionally from about 1×10^4 c.f.u./kg to about 1×10^{10} c.f.u./kg. Effective doses may be extrapolated from dose-response curves derived from *in vitro* or animal model test systems.

5 Various delivery systems are known and can be used to administer a pharmaceutical composition of the present invention. Methods of introduction include but are not limited to intradermal, intramuscular, intraperitoneal, intravenous, subcutaneous, intrathecal, intranasal, epidural, and oral routes. Methods of introduction may also be intra-tumoral (*e.g.*, by direct administration into the area of the tumor).

10 The compositions may be administered by any convenient route, for example by infusion or bolus injection, by absorption through epithelial or mucocutaneous linings (*e.g.*, oral mucosa, rectal and intestinal mucosa, etc.) and may be administered together with other biologically active agents. Administration can be systemic or local. In addition, it may be desirable to introduce the pharmaceutical compositions of the invention into the central nervous system by any suitable route, including intraventricular and intrathecal
15 injection; intraventricular injection may be facilitated by an intraventricular catheter, for example, attached to a reservoir, such as an Ommaya reservoir. Pulmonary administration can also be employed, *e.g.*, by use of an inhaler or nebulizer, and formulation with an aerosolizing agent.

20 In a specific embodiment, it may be desirable to administer the pharmaceutical compositions of the invention locally to the area in need of treatment; this may be achieved by, for example, and not by way of limitation, local infusion during surgery, by injection, by means of a catheter, or by means of an implant, said implant being of a porous, non-porous, or gelatinous material, including membranes, such as sialastic membranes, or fibers. In one embodiment, administration can be by direct injection at the site (or former
25 site) of a malignant tumor or neoplastic or pre-neoplastic tissue.

The attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more primary effector molecules and optionally, one or more secondary effector molecules may be delivered in a controlled release system. The attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more
30 fusion proteins of the invention and optionally, one or more effector molecules may also be delivered in a controlled release system. In one embodiment, a pump may be used (*see* Langer, *supra*; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald *et al.*, 1980, Surgery 88:507; and Saudek *et al.*, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). In another embodiment, polymeric materials can be used (*see* Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug
35 Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61

WO 01/25397

PCT/US00/23242

(1983); see also Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; Doring *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; and Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105). In yet another embodiment, a controlled release system can be placed in proximity of the therapeutic target, *i.e.*, the brain, thus requiring only a fraction of the systemic dose (see, *e.g.*, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

5 Other controlled release systems are discussed in the review by Langer (1990, *Science* 249:1527-1533) and may be used in connection with the administration of the attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s).

10 The invention also provides a pharmaceutical pack or kit comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of the pharmaceutical compositions of the invention. Optionally associated with such container(s) can be a notice in the form prescribed by a governmental agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products, which notice reflects approval by the agency of manufacture, use or sale for human administration.

15 The present invention also provides methods for treating a solid tumor comprising administering to an animal in need thereof, a pharmaceutical composition of the invention and at least one other known cancer therapy. In a specific embodiment, an animal with a solid tumor cancer is administered a pharmaceutical composition of the invention and at least one chemotherapeutic agent. Examples of chemotherapeutic agents include, but are not limited to, cisplatin, ifosfamide, taxanes such as taxol and paclitaxol, topoisomerase I
20 inhibitors (*e.g.*, CPT-11, topotecan, 9-AC, and GG-211), gemcitabine, vinorelbine, oxaliplatin, 5-fluorouracil (5-FU), leucovorin, vinorelbine, temodal, cytochalasin B, granacidin D, emetine, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dione, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosterone, glucocorticoids, procaine, tetracaine,
25 lidocaine, propranolol, and puromycin homologs, and cytoxan.

The present invention includes the sequential or concomitant administration of pharmaceutical composition of the invention and an anti-cancer agent such as a chemotherapeutic agent. In a specific embodiment, the pharmaceutical composition of the invention is administered prior to (*e.g.*, 2 hours, 6 hours, 12 hours, 1 day, 4 days, 6 days, 12
30 days, 14 days, 1 month or several months before) the administration of the anti-cancer agent. In another specific embodiment, the pharmaceutical composition of the invention is administered subsequent to (*e.g.*, 2 hours, 6 hours, 12 hours, 1 day, 4 days, 6 days, 12 days, 14 days, 1 month or several months after) the administration of an anti-cancer agent. In a specific embodiment, the pharmaceutical composition of the invention is administered
35 concomitantly with an anti-cancer agent. The invention encompasses combinations of anti-cancer agents and attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more

WO 01/25397

PCT/US00/23242

nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins that are additive or synergistic.

The invention also encompasses combinations of anti-cancer agents and attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins that have different sites of action.

Such a combination provides an improved therapy based on the dual action of these therapeutics whether the combination is synergistic or additive. Thus, the novel combinational therapy of the present invention yields improved efficacy over either agent used as a single-agent therapy.

In one embodiment, an animal with a solid tumor cancer is administered a pharmaceutical composition of the invention and treated with radiation therapy (e.g., gamma radiation or x-ray radiation). In a specific embodiment, the invention provides a method to treat or prevent cancer that has shown to be refractory to radiation therapy. The pharmaceutical composition may be administered concurrently with radiation therapy. Alternatively, radiation therapy may be administered subsequent to administration of a pharmaceutical composition of the invention, preferably at least an hour, five hours, 12 hours, a day, a week, a month, more preferably several months (e.g., up to three months), subsequent to administration of a pharmaceutical composition.

The radiation therapy administered prior to, concurrently with, or subsequent to the administration of the pharmaceutical composition of the invention can be administered by any method known in the art. Any radiation therapy protocol can be used depending upon the type of cancer to be treated. For example, but not by way of limitation, x-ray radiation can be administered; in particular, high-energy megavoltage (radiation of greater than 1 MeV energy) can be used for deep tumors, and electron beam and orthovoltage x-ray radiation can be used for skin cancers. Gamma ray emitting radioisotopes, such as radioactive isotopes of radium, cobalt and other elements may also be administered to expose tissues to radiation.

Additionally, the invention also provides methods of treatment of cancer with a pharmaceutical composition as an alternative to radiation therapy where the radiation therapy has proven or may prove too toxic, i.e., results in unacceptable or unbearable side effects, for the subject being treated.

5.9. DEMONSTRATION OF THERAPEUTIC OR PROPHYLACTIC UTILITY OF PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS OF THE INVENTION

The pharmaceutical compositions of the invention are preferably tested *in vitro*, and then *in vivo* for the desired therapeutic or prophylactic activity, prior to use in humans. For example, *in vitro* assays which can be used to determine whether administration of a

WO 01/25397

PCT/US00/23242

specific pharmaceutical composition is indicated, include *in vitro* cell culture assays in which a patient tissue sample is grown in culture, and exposed to or otherwise administered a pharmaceutical composition, and the effect of such composition upon the tissue sample is observed.

Pharmaceutical compositions of the invention can be tested for their ability to augment activated immune cells by contacting immune cells with a test pharmaceutical composition or a control and determining the ability of the test pharmaceutical composition to modulate (*e.g.*, increase) the biological activity of the immune cells. The ability of a test composition to modulate the biological activity of immune cells can be assessed by detecting the expression of cytokines or antigens, detecting the proliferation of immune cells, detecting the activation of signaling molecules, detecting the effector function of immune cells, or detecting the differentiation of immune cells. Techniques known to those of skill in the art can be used for measuring these activities. For example, cellular proliferation can be assayed by ³H-thymidine incorporation assays and trypan blue cell counts. Cytokine and antigen expression can be assayed, for example, by immunoassays including, but are not limited to, competitive and non-competitive assay systems using techniques such as western blots, immunohisto-chemistry radioimmunoassays, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoprecipitation assays, precipitin reactions, gel diffusion precipitin reactions, immunodiffusion assays, agglutination assays, complement-fixation assays, immunoradiometric assays, fluorescent immunoassays, protein A immunoassays and FACS analysis. The activation of signaling molecules can be assayed, for example, by kinase assays and electromobility shift assays (EMSA). The effector function of T-cells can be measured, for example, by a ⁵¹Cr-release assay (see, *e.g.*, Palladino *et al.*, 1987, *Cancer Res.* 47:5074-5079 and Blachere *et al.*, 1993, *J. Immunotherapy* 14:352-356).

Pharmaceutical compositions of the invention can be tested for their ability to reduce tumor formation in animals suffering from cancer. Pharmaceutical compositions of the invention can also be tested for their ability to alleviate of one or more symptoms associated with a solid tumor cancer. Further, pharmaceutical compositions of the invention can be tested for their ability to increase the survival period of patients suffering from a solid tumor cancer. Techniques known to those of skill in the art can be used to analyze the function of the pharmaceutical compositions of the invention in animals.

In various specific embodiments, *in vitro* assays can be carried out with representative cells of cell types involved in a solid tumor cancer, to determine if a pharmaceutical composition of the invention has a desired effect upon such cell types.

Pharmaceutical compositions of the invention for use in therapy can be tested in suitable animal model systems prior to testing in humans, including but not limited to rats,

WO 01/25397

PCT/US00/23242

mice, chicken, cows, monkeys, pigs, dogs, rabbits, etc. For *in vivo* testing, prior to administration to humans, any animal model system known in the art may be used.

The following series of examples are presented by way of illustration and not by way of limitation on the scope of the invention.

5
6. **EXAMPLE: EXPRESSION OF TNF- α BY ATTENUATED TUMOR-TARGETED SALMONELLA**

The following example demonstrates that attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella*, containing a nucleic acid molecule encoding a TNF family member are capable of expressing the TNF family member.

10

6.1. **CONSTRUCTION OF TNF- α PLASMIDS**

The plasmids described herein serve to illustrate examples of specific embodiments of the invention. As will be apparent to one of ordinary skill in the art, promoter and/or effector molecule-encoding nucleic acids such as the *trc* promoter and/or TNF- α encoding nucleic acids may be replaced with other appropriate promoter or effector molecules by methods known in the art.

15

For plasmid-based bacterial expression of effector molecule-encoding nucleic acids using the *trc* promoter, the plasmid Trc99A (commercially available from Pharmacia) or TrcHisB (commercially available from InVitrogen) were used. Both plasmids employ an Nco I site, as the start codon, followed by a multiple cloning site.

20

6.1.1. **THE pCET PLASMID**

For plasmid-based bacterial expression of effector molecule encoding nucleic acids using a dual λP_L , or λP_R promoter, the pCET plasmid was constructed as follows. Plasmid pCE33 (Elvin *et al.*, 1990, Gene 87:123-126) was sequentially cleaved with the restriction enzyme *Cla* I and blunt-ended with mung bean nuclease, followed by cleavage with the restriction enzyme *Bam*HI. Next, the resulting 1.4 kb fragment was ligated into a 2.1 kb *Ssp* I/*Bam* HI fragment of pUC19 (commercially available from GIBCO) to create plasmid pCI. Plasmid pCI was cleaved with restriction enzyme *Bam*HI and blunt-ended with mung bean nuclease, followed by cleavage with restriction enzyme *Afl* III. The resultant 3.1 kb band was isolated. Plasmid TrcHisB was partially digested with the restriction enzyme *Cla*I, blunt-ended with T4 DNA polymerase, followed by cleavage with *Afl* III. The resultant 0.6 kb band, containing the minicistron and terminator, was then ligated into the 3.1 kb pCI fragment to give plasmid pCET. As with Trc99A or TrcHisB, pCET employs an NcoI site as the start codon, followed by the TrcHisB multiple cloning site. Growth of

25

30

35

WO 01/25397

PCT/US00/23242

bacteria harboring any plasmid containing the λP_L , or λP_R promoter, was performed at 30°C.

6.1.2. THE pTS PLASMID

A plasmid, denoted pTS, employing transposon-mediated chromosomal integration and serine prototrophic selection of effector molecule-encoding nucleic acids, was constructed as follows. The plasmid pNK2883 (commercially available from the American Type Culture Collection (ATCC)) was cleaved with restriction enzyme *Bam* HI and the 4.8 kb band isolated. The *Salmonella typhimurium serC* encoding nucleic acid was isolated from *S. typhimurium* strain 14028 (commercially available from the ATCC) by PCR using a forward primer of sequence GAAGATCTTCCGGAGGAGGGGAAATG (SEQ ID NO:1), and a reverse primer, of sequence CGGGATCCGAGCTCGAGGGCCCGGAAAGGATCTAAGAAGATCC (SEQ ID NO:2). The PCR reaction mixture was cleaved with restriction enzymes *Bgl* II and *Bam* HI, and the 1.1 kb PCR product isolated and ligated into the 4.8 pNK2883 fragment to give a plasmid, denoted pTS. A cloning sited immediately 3' to the *serC* encoding nucleic acid was present for the insertion of effector molecule-encoding nucleic acids.

6.1.3. THE pTS-TNF- α PLASMID

A plasmid (pTS-TNF- α), for the pTS-mediated chromosomal integration of a *trc* promoter-driven human TNF- α encoding nucleic acid, was constructed as follows. Plasmid PYA3332 is the ASD plasmid PYA272 (see, e.g., U.S. Patent No. 5,840,483 to Curtiss, III) with the origin of replication replaced by that of the *colE1* plasmid (see, e.g., Bazara and Helsinki, 1970, *Biochem* 9:399-406). Plasmid PYA3332 was cleaved with restriction enzyme *Nco* I and blunt-ended with mung bean nuclease. The blunt-ended fragment was then cleaved with restriction enzyme *Hind* III and the 3.3 kb DNA fragment was isolated. An *E. coli*-optimized human TNF- α encoding nucleic acid (see, Pernica *et al.*, 1984 *Nature* 312:724-729; and Saltzman, *et al.*, 1996, *Cancer Biotherapy* 11:145-153) as depicted in FIG.1, was then cleaved with restriction enzyme *Nde* I, blunt-ended with T4 DNA polymerase, and then cleaved with restriction enzyme with *Hind* III. The resulting 0.5 kb fragment was ligated into the 3.3 kb PYA3332 fragment to give plasmid Asd34TNF- α . Asd34TNF- α was then cleaved with restriction enzyme *Bgl* II, and the 1.1 kb fragment, encoding the *trc* promoter-driven TNF- α encoding nucleic acid, and ligated into the *Bam* HI site of pTS to give plasmid pTS-TNF- α .

6.1.4. THE pTS-BRP PLASMID

A plasmid, denoted pTS-BRP, employing transposon-mediated chromosomal integration of the BRP encoding nucleic acid and serine prototrophic selection of effector molecule-encoding nucleic acids, was constructed as follows. A *BRP* encoding nucleic

WO 01/25397

PCT/US00/23242

acid was isolated from plasmid pSW1 (commercially available from Bio101, Vista, CA) by PCR using a forward primer, of sequence CCGACGCGTTGACACCTGAAAAGTGGAG (SEQ ID NO:5), and a reverse primer, of sequence CCGACGCGTGAAAAGGATCTCAAGAAGATC (SEQ ID NO:6), and cloned into a TOPO-TA cloning plasmid (commercially available from InVitrogen, Carlsbad, CA) to give a plasmid, denoted pBRP#5. Plasmid pBRP#5 was cleaved with restriction enzymes *Apa* I and *Bam* HI, and the resultant 0.6 kb band, containing the *BRP* encoding nucleic acid, was ligated into the 5.9 kb *Apa* *UBam* HI proto-pTS fragment to give the plasmid pTS-BRP. Cloning sites both 5' and 3' to the *BRP* encoding nucleic acids were present for the insertion of effector molecule-encoding nucleic acids.

10

6.1.5. THE pTS-BRPTNF- α PLASMID

A plasmid (pTS-BRPTNF- α), for the pTS-mediated chromosomal integration of the *BRP* and *trc* promoter-driven TNF- α encoding nucleic acids, was constructed as follows. Plasmid *Asd34*TNF- α , described above for the construction of pTS-TNF- α , was cleaved with restriction enzyme *Bgl* II, and the 1.1 kb fragment, encoding the *trc* promoter-driven TNF- α encoding nucleic acid, was ligated into the *Bam* HI site of pTS-BRP to give plasmid pTS-BRPTNF- α .

15

6.2. INTEGRATION OF EFFECTOR MOLECULE-ENCODING NUCLEIC ACID INTO THE *SALMONELLA* HOST CHROMOSOME

20

The system described here employs Δ *serC*-*Salmonella* strains auxotrophic for serine or glycine, and plasmids which restore serine/glycine prototrophy upon chromosomal integration into an actively transcribed region. However, it is well known in the art that other selection markers can be used to select for chromosomal integrants, and such markers are within the scope of the invention. See, e.g., Kleckner *et al.*, 1991, Meth. Enzymol. 204:139-180.

25

pTS or pTS-BRP plasmids containing effector molecule-encoding nucleic acids may be introduced into *serC*-*Salmonella* strains by a number of means well-known in the art, including chemical transformation and electroporation. Following the introduction of effector molecule-encoding nucleic acids, *Salmonella* are grown in ampicillin-containing growth medium for a minimum of 2 hours, and more preferably 6 hours or longer. Bacteria are then placed in medium capable of selecting bacteria prototrophic for serine, e.g., M56 medium. Atlas, R.M. "Handbook of Microbiological Media." L.C. Parks, ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1993. Bacteria harboring chromosomal integrations of effector molecule-encoding nucleic acids are capable of growth in the selective media. Effector molecule-encoding nucleic acid expression is then measured, as illustrated below.

35

WO 01/25397

PCT/US00/23242

Effector molecule-encoding nucleic acid expression may be measured by any of several methods known to those skilled in the art, such as by enzymatic activity, biological activity, Northern blot analysis, or Western blot analysis.

6.2.1. DELIVERY AND EXPRESSION OF *SALMONELLA*-EXPRESSED TNF- α

5 A *trc* promoter-driven TNF- α encoding nucleic acid was inserted into the Bam HI site of pTS-BRP to give a plasmid, denoted pTS-BRPTNF- α , as described above. Plasmid pTS-BRPTNF- α was electroporated into an attenuated strain of *S. typhimurium*, strain VNP20009, (see International Publication WO 99/13053) constructed to be *serC*⁻ such that the genotype was $\Delta msbB, \Delta purI, \Delta serC$ (FIG. 2), by standard methods known in the art. Without limitation as to mechanism, integration of the plasmid into the bacterial genome allows for activation of the *serC* encoding nucleic acid and leads to a *serC*⁺ phenotype. Accordingly, bacteria harboring a chromosomal integration of the TNF- α encoding nucleic acid were selected by plating the electroporated bacteria on M56 agar plates supplemented with adenine. Bacteria were further characterized for loss of ampicillin resistance, 15 indicative of plasmid loss, and concomitant loss of plasmid-based TNF- α expression.

In order to examine and quantify TNF- α expression by the tumor-targeted bacteria of the invention, *Salmonella* harboring a chromosomal integration of the TNF- α encoding nucleic acids were grown overnight, and a measured sample of the culture was used in Western blot analysis. Specifically, TNF- α expression from a representative *serC*⁺, 20 ampicillin-sensitive clone, denoted pTS-BRPTNF- α Clone 2, is shown in FIG. 3. Western blot analysis revealed that bacterial protein, corresponding to 3.9×10^7 cfu of pTS-BRPTNF- α Clone 2 bacteria (Lane 1), expressed more than 50 ng TNF- α (Lane 5), indicating expression of TNF- α at levels greater than 10 ng/ 10^7 bacteria. Therefore, the human TNF- α was successfully expressed from a chromosomally-integrated, *trc* promoter-driven, TNF- α encoding nucleic acid in *Salmonella*. 25

7. EXAMPLE: ATTENUATED TUMOR-TARGETED BACTERIA EXPRESSING OMPA FUSION PROTEINS

30 Periplasmic localization of proteins by fusion to various signal peptides is dependent on both the signal peptide and the protein. For example, proteins can be localized to the periplasmic compartment of bacteria by fusion of a signal peptide to the amino terminus of the protein. Without limitation, periplasmic localization is believed to facilitate release of bacterial components (such as proteins) by requiring the component to 35 traverse only a single membrane in order to be released into the surrounding environment. In contrast, cytoplasmic localization requires that the component traverse both the inner

WO 01/25397

PCT/US00/23242

and outer membranes of bacteria in order to be released into the surrounding environment. Further, periplasmic localization of certain proteins may aid in biological activity.

A variety of methods known in the art may be used to target an effector molecule of the invention to the periplasm. This example demonstrates that the fusion of the *ompA* signal peptide to the amino terminus of an effector molecule such as a TNF- α , TRAIL (TNF- α -related apoptosis-inducing ligand), and interleukin-2 (IL-2) results in the periplasmic localization and subsequent processing of proteins.

7.1. PROCESSING OF AN *OMP*A-TNF- α FUSION PROTEIN

TNF- α expression in four different clones, expressing a plasmid-based *trc* promoter-driven *ompA*-TNF- α fusion protein in JM109 bacteria, was examined by Western blot analysis of whole cell lysate. Periplasmic localization was demonstrated by cleavage of the precursor fusion proteins to mature TNF- α by signal peptidase, an enzyme located in the periplasm. In all four clones, following induction with IPTG, overexpression of TNF- α resulted in the appearance of TNF- α as a doublet migrating at approximately 20 kd (FIG. 5, lanes 4-7), corresponding to both unprocessed and processed forms. For comparison, a *Salmonella* strain harboring a chromosomally-integrated TNF- α encoding nucleic acids, expressing the mature (processed) form of TNF- α , was used as a positive control (FIG. 5, lane 3). TNF- α expression was not detected in bacteria lacking the TNF- α encoding nucleic acids (FIG. 5, lane 2).

These results demonstrated that fusion of the mature human TNF- α protein to the *E. coli ompA* signal peptide (as depicted in FIG. 4) resulted in periplasmic localization and processing when expressed in *E. coli*. Further, it was unknown whether overexpression of a secreted protein would be toxic to the bacterial host as a result of overwhelming the normal secretory apparatus. The present demonstration of expression of a processed *ompA*-TNF- α fusion protein indicated that the normal secretory apparatus was capable of accommodating the high-level expression of secreted proteins.

7.2. PROCESSING OF AN *OMP*A-TRAIL FUSION PROTEIN

The ability of the *ompA* signal peptide to periplasmically localize TNF family members was extended to TRAIL (TNF- α -related apoptosis-inducing ligand), another member of the TNF family. For these experiments, a *trc* promoter-driven TRAIL encoding nucleic acids, encoding the mature form of human TRAIL (hTRAIL), was fused to the coding sequence of the *ompA* signal peptide (as depicted in FIG. 6). Two different *ompA*/TRAIL junctions were examined, one encoding an NcoI site and one encoding an NdeI site (See FIG. 6 for NdeI containing sequence). Western analysis of both types of clones is shown in FIG. 7. Using an anti-hTRAIL antibody, Western blot analysis revealed that bacteria over-expressing the *ompA*-TRAIL with the Nco I junction expressed both

WO 01/25397

PCT/US00/23242

processed (28.2 kd) and unprocessed (30.2 kd) forms of hTRAIL (FIG. 7, lanes 2-4), whereas bacteria over-expressing the *ompA*-TRAIL with the Nde I junction expressed the processed form exclusively (FIG. 7, lanes 4-7), indicating that the Nde I junction provided more efficient processing.

5 These results demonstrated that fusion of the mature human TRAIL protein to the *E. coli ompA* signal peptide resulted in periplasmic localization and processing. Further, it was unknown whether overexpression of the secreted protein would be toxic to the bacterial host as a result of overwhelming the normal secretory apparatus. The present demonstration of expression of a processed *ompA*-TRAIL fusion protein indicated that the normal secretory apparatus was capable of accommodating the high-level expression of
10 secreted proteins.

7.3. PROCESSING OF AN *OMP*A(8L)-IL-2 FUSION PROTEIN

A secondary effector molecule (IL-2) was expressed as a fusion protein. Fusion of mature (C125A) hIL-2 to the wild-type *OmpA* signal sequence, used above for TNF- α and TRAIL, did not permit processing of IL-2. In order to examine the periplasmic
15 localization and processing of the human IL-2 cytokine, mature human (C125A) IL-2 was fused to a modified *ompA* signal peptide, denoted *ompA*(8L), as depicted in FIG. 8. The modified *ompA* signal peptide was modified by replacing amino acids 6-17 of the *ompA* signal with those depicted in Figure 8. Expression and processing are shown in FIG. 9 (lanes 6 and 7). Each lane represents a single clone. Results of Western blot analysis
20 indicated that virtually complete processing was observed with the *ompA*(8L) signal peptide (FIG. 9, lanes 6 and 7).

7.4. PROCESSING OF AN *PHO*A(8L)-IL-2 FUSION PROTEIN

A second fusion protein was examined for periplasmic localization and processing
25 of human IL-2, and compared with the fusion protein of Section 7.3. The expression and processing of mature human (C125A) IL-2 fused to a modified *phoA* signal peptide, denoted *phoA*(8L), as depicted in FIG. 10 was examined. Expression and processing are shown in FIG. 9. Partial processing was observed with the synthetic *phoA*(8L) signal peptide (FIG. 9, lanes 4 and 5), whereas more complete processing was observed with the
30 *ompA*(8L) signal peptide (FIG. 9, lanes 6 and 7).

These results indicate that localization and processing of IL-2 was provided by different signal peptides. The results also demonstrate that periplasmic localization of proteins by fusion to various signal peptides is dependent on both the signal peptide and
35 the protein.

The results of the fusion protein studies indicate that a secondary effector protein of the invention, such as IL-2, can be expressed and localized to the bacterial periplasm by

WO 01/25397

PCT/US00/23242

fusion with the a protein signal peptide such as OmpA or PhoA. As will be apparent to one of ordinary skill in the art, other signal sequences can be used to cause periplasmic localization of an effector molecule can be used. As will further be apparent to one of ordinary skill in the art, other effector molecules of the invention can be substituted for the effector molecules described in the examples herein.

5

8. **EXAMPLE: ANTI-TUMOR EFFICACY OF *SALMONELLA* (Δ MSBB, Δ PURJ) EXPRESSING THE MATURE FORM OF TNF- α**

The following experiment demonstrates that an attenuated tumor-targeted bacteria such as *Salmonella* containing a nucleic acid encoding a primary effector molecule (e.g., a TNF family member) can deliver the primary effector to mammalian tumors and cause a decrease in tumor volume.

The ability of TNF- α expression to increase the anti-tumor efficacy of *Salmonella typhimurium* was evaluated in a staged murine Colon 38 carcinoma model. For these experiments, 1 mm³ tumor fragments, derived from a Colon 38 tumor, were implanted into C57BL/6 mice and tumors were allowed to grow to a mean size of approximately 0.3 g, at which time animals were randomly placed into the following treatment groups (n=10): 1) untreated; 2) *Salmonella typhimurium* (Δ msbB, Δ purJ, serC) (parental strain); and 3) pTS-BRPTNF- α (Clone 2 described above). Mice in each group either remained untreated or received a single intravenous injection of 1 x 10⁸ cfu of the appropriate bacterial strain. Tumor size was measured weekly, beginning at the time of bacteria inoculation.

In the group receiving attenuated tumor-targeted *Salmonella* expressing TNF- α , tumor regression was apparent by the second week following treatment, with complete regression observed in 6 of the animals within 4 weeks following treatment (FIG. 11). Tumors in the untreated group progressively increased in size, whereas tumors in the group treated with the parental *Salmonella typhimurium* (Δ msbB, Δ purJ, Δ serC) strain displayed partial regression between weeks 3-4 following treatment, after which tumors progressively increased in size (FIG. 11).

These results demonstrate that attenuated tumor-targeted *Salmonella* are able to express and deliver an effector molecule such as a TNF family member to a tumor. Such *Salmonella* are useful in the treatment of tumors and provide enhanced tumor regression results as compared to parent *Salmonella* strains which do not express the TNF family member.

The demonstration of complete tumor regression, by *Salmonella* expressing TNF- α from chromosomally-integrated nucleic acid, indicates that biologically effective expression can result from chromosomally integrated-effector molecule encoding nucleic acids.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

9. **EXAMPLE: ENHANCED DELIVERY OF NUCLEIC ACID MOLECULES BY BRP EXPRESSING BACTERIA**

In order to demonstrate that BRP activity could enhance the release of a plasmid from a tumor-targeted attenuated bacteria such as *Salmonella*, a tumor-targeted attenuated *Salmonella* strain was constructed that contained BRP on a plasmid as well as a second plasmid used as a marker for release (pTrc99a with AMP marker). To assay activity of BRP, the *Salmonella* with or without BRP was grown in culture by standard methods. The resulting supernatant was then cleared of any remaining bacteria by centrifugation and filtration and the cleared supernatant was then added to competent cells and underwent a transformation reaction. These "recipient" cells were then plated onto LB amp to look for uptake of the AMP marker plasmid. An increase in the number of AMP resistant colonies with BRP would indicate that more plasmid was released into the media from strains expressing BRP. Results are summarized in Table 2 below:

Table 2

Plasmid	Average # of Amp Colonies/Transformation
pTrc99a alone	125
pTrc99a+BRP (pSW1)	383

These results demonstrate that the presence of BRP increased the amount of amp plasmid secreted to the media. Thus, transformation into "recipient cells" with supernatants from cells expressing BRP gave higher number of colonies. These results demonstrate that BRP enhanced release of a secondary effector molecule, which comprised a nucleic acid plasmid. Accordingly, the results show that BRP is useful for plasmid release or DNA delivery. In addition, these *Salmonella* strains that expressed BRP and were able to deliver DNA and remained replication competent as a population.

10. **EXAMPLE: BRP EXPRESSION DOES NOT IMPAIR TUMOR-TARGETING OR TUMOR-INHIBITING ABILITY OF ATTENUATED TUMOR-TARGETED SALMONELLA**

The following example demonstrates that attenuated tumor-targeted bacteria can be engineered to express BRP in conjunction with one or more effector molecules to enhance the delivery of effector molecules to tumors without inhibiting the ability of bacteria to target the tumor.

Solid tumor models were obtained by subcutaneous injection of B16 melanoma cells in the right hind flank of C57BL/6 mice. For tumor implantation, cells were

WO 01/25397

PCT/US00/23242

detached from the flask by trypsinization, washed, and suspended in phosphate buffered saline at 2.5×10^6 cells/ml. An aliquot of 0.2 ml of the cell suspension, for a total of 5×10^5 cells/mouse, was injected on Day 0. When tumor volumes reached 150-200 mm³, approximately 10 days after implantation, the mice were randomized into three groups of ten mice and each group received a different treatment. The control group (curve #1 on FIG. 12) received 0.2mls of PBS. Another group received 0.2 ml containing 2×10^6 c.f.u./mouse of the attenuated tumor-targeted strain of *Salmonella* VNP20009 (curve #2 on FIG. 12). The third group received 0.2 ml containing 2×10^6 c.f.u./mouse of the attenuated tumor-targeted strain of *Salmonella* comprising pSW1, a plasmid comprising the BRP gene under the control of its native promoter (curve #3 on FIG. 12). The BRP gene is SOS inducible in *E. coli*, although the inventors believe, without limitation as to mechanism, that it is partially constitutive in *Salmonella*, producing low to moderate levels of the BRP protein, which are further enhanced by the SOS nature of the tumor environment. Mice injected with BRP-expressing VNP20009 *Salmonella* showed nearly identical anti-tumor responses to those injected with non-BRP-expressing VNP20009, indicating that the survival or tumor-targeting ability of these *Salmonella* is not altered by BRP expression, nor is their ability to inhibit tumor growth. The outcome of BRP-expression on attenuated tumor-targeted *Salmonella* is in direct contrast to the effect of the expression of secreted HSV-thymidine kinase (HSV-TK), which HSV-TK expression results in the loss of VNP20009's tumor-inhibiting abilities (Pawelek *et al.*, 1997, *Cancer Res.* 57:4537-4544). Thus, the BRP system can be used to enhance the delivery of primary and/or secondary effector molecules to tumors without further modification.

11. EXAMPLE: pepT PROMOTER EXPRESSION VEHICLES

This example demonstrates the *in vitro* and *in vivo* expression of a nucleic acid molecule encoding reporter such as β -gal under the control of the *pepT* promoter in an attenuated tumor-targeted bacteria such as *Salmonella*.

11.1. CONSTRUCTION OF pepT-BRP- β GAL EXPRESSION PLASMIDS

The *pepT* promoter was cloned by PCR amplification of the region from an isolated colony of wild type *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) using the following primers:

Forward: 5'-AGT CTA GAC AAT CAG GCG AAG AAC GG-3' (SEQ ID NO:15)

Reverse: 5'AGC CAT GGA GTC ACC CTC ACT TTT C-3' (SEQ ID NO:16).

The PCR conditions consisted of 1 cycle of 95°C for 5 minutes, 35 cycles of 95°C for 1 minute, 65°C for 1 minute, 72°C for 2 minutes and 1 cycle of 72°C for 10 minutes.

The PCR product was cloned into the PCR 2.1 cloning vector (Invitrogen, Carlsbad, California), and is referred to as *PepT/PCR 2.1*.

The *PepT/PCR 2.1* vector was digested with *NcoI* and *XbaI*. The *pepT* fragment

WO 01/25397

PCT/US00/23242

was gel isolated and ligated into the β -gal Zterm vector digested with the same enzymes. Zterm (Temporary Genbank Bankit No. 296495) is a promoterless β -gal plasmid generated by cloning the β Gal open reading frame into pUC19. The resultant plasmid was called pepT- β GAL.

5 11.2. IN VITRO EXPRESSION OF pepT- β GAL AND MEASUREMENT OF pepT- β GAL ACTIVITY

Salmonella strains YS1456 (CC14 in FIG. 13A; for the genetic make up of the strain, see WO 96/40238) or VNP20009 (CC16 in FIG. 13A) harboring pepT- β GAL were grown under either anaerobic or aerobic conditions to an OD₆₀₀ of ~0.5-0.8. β -gal activity was measured by the method of Birge and Low (1974, J. Mol. Biol. 83:447-457). The results are shown in FIG. 13A, and demonstrate approximately 14- to 24- fold induction of β -gal activity upon growth of the bacteria under anaerobic conditions.

10 11.3. IN VIVO EXPRESSION OF pepT- β GAL AND MEASUREMENT OF pepT- β GAL ACTIVITY

15 Cells of the *Salmonella* strain YS1456 harboring the pepT- β gal expression plasmids, a BRP expression plasmid (pSW1 from BIO101 (Vista, California), which comprises the pCloDF13 BRP coding sequence under the control of its native promoter) or both expression plasmids were injected intravenously into tumor bearing mice. Five days post injection, tumors and livers were homogenized and bacteria were isolated to show that 20 the presence of plasmids for pepT- β gal and/or BRP did not interfere with the ability of these bacteria to target tumors. In addition, the tumor and liver homogenates were used to measure β gal activity to determine whether active β gal could be measured *in vivo* and whether the pepT promoter was induced in an anaerobic tumor environment. The results, shown in FIG. 13B, indicate very high levels of pepT promoter activity in the tumor 25 environment. There is no significant increase in liver expression of β gal over the background level, which is thought to arise from the low activity of the pepT promoter in the aerobic liver environment and/or the low targeting of the bacterial vector to the liver.

30 12. EXAMPLE: TETRACYCLINE INDUCIBLE EXPRESSION SYSTEM

This example demonstrates the expression of a nucleic acid molecule encoding a reporter gene such as β -gal under the control of the *tet* promoter in an attenuated tumor-targeted bacteria such as *Salmonella*.

The *tet* promoter was cloned from a mini-TN10 transposon by PCR amplification using the following primers:

35 Forward: 5'-GGA TCC TTA AGA CCC ACT TTC ACA TTT AAG T-3' (SEQ ID NO:17)
Reverse: 5'-GGT TCC ATG GTT CAC TTT TCT CTA TCA C-3' (SEQ ID NO:18).

WO 01/25397

PCT/US00/23242

The PCR conditions were as follows: one cycle of 95°C for 5 minutes; 35 cycles of 95°C for 1 minute, 60°C for 1 minute, 72°C for 2 minutes; and one cycle of 72°C for 10 minutes.

The ~400bp PCR fragment was gel isolated and cloned into the PCR 2.1 vector (Invitrogen). The PCR2.1/*tet* promoter vector was digested with NcoI and BamHI. The ~400 bp *tet* promoter fragment was gel isolated and ligated into the promoterless β-gal vector Zterm that had been digested with the same two enzymes. The ligation mixture was transformed and the transformed bacteria were plated to tetracycline/X-gal plates. Positive colonies were isolated on the basis of their blue color. Extracts from several positive clones were made, and assayed by the method of Birge and Low (1974, J. Mol. Biol. 83:447-457) for β-gal activity in the presence of tetracycline. One clone was isolated and assayed for β-gal expression over a range of tetracycline concentrations. The results of the assay, which demonstrate the induction of β-gal activity by tetracycline in a dose-dependent manner, are shown in FIG. 14.

15
13. **EXAMPLE: INHIBITION OF TUMOR GROWTH BY
ATTENUATED TUMOR-TARGETED
SALMONELLA EXPRESSING ENDOSTATIN**

The following example demonstrates the generation of endostatin-expressing attenuated tumor-targeted *Salmonella*, and the *in vivo* efficacy of tumor treatment by such
20 *Salmonella*.

**13.1 CONSTRUCTION OF ENDOSTATIN
EXPRESSION PLASMIDS**

Endostatin was PCR amplified from a human placental cDNA library using the following primers:
25 Forward: 5'-GTG TCC ATG GGG CAC AGC CAC CGC GAC TTC CAG-3' (SEQ ID NO:19)
Reverse: 5'-ACA CGA GCT CCT ACT TGG AGG CAG TCA TGA AGC T-3' (SEQ ID NO:20).

The resulting PCR product was cloned into the PCR2.1 vector (Invitrogen).
30 Hexahistidine-endostatin was PCR amplified using the above constructed plasmid as a template with the following primers:
Forward: 5'-GTG TCC ATG GCT CGG CGG GCA AGT GTC GGG ACT GAC CAT CAT CAT CAT CAC AGC CAC CGC GAC TTC-3' (SEQ ID NO:21)
Reverse: 5'-GTG CGG ATC CCT ACT TGG AGG CAG TCA TGA AGC TG-3' (SEQ ID
35 NO:22).

The conditions for the PCR amplification consisted of 1 cycle of 95°C 5 min; 30

WO 01/25397

PCT/US00/23242

cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 1 minute, and 72°C for 2 minutes, and 1 cycle of 72°C for 10 minutes.

The resulting product was a DNA fragment with NcoI (5') and BamHI (3') restriction sites encoding human endostatin having the peptide sequence MARRASVGTDDHHHHHH (SEQ ID NO:23) at its amino terminus.

5 The PCR product was digested with NcoI and BamHI and the 550 bp product was gel isolated and ligated into the pTrc99A vector that had been previously cut with the same enzymes. The ligation reaction products were transformed into *E. coli* DH5 α and the attenuated tumor-targeted *Salmonella* strain VNP20009.

10 The hexahistidine-endostatin coding sequence was also cloned into the expression vector YA3334 as a NcoI/BamHI fragment. YA3334 is the *asd* plasmid PYA272 (Curtiss III, U.S. Patent No. 5,840,483) with the origin of replication replaced by that of the ColE1 (Bazaral and Helsinki, 1970, Biochem 9:399-406). Plasmid DNA prepared from positive clones was isolated and transformed into the *Salmonella* strain 8324, which is VNP20009 with an *asd* mutation. This strain was generated according to the methods described in Curtiss III (U.S. Patent No. 5,840,483).

13.2. IN VITRO EXPRESSION OF ENDOSTATIN BY ATTENUATED TUMOR-TARGETED SALMONELLA

15 Different strains of *Salmonella* VNP20009 and *E. coli* DH5 α strains containing the pTrc99A-hexahistidine-endostatin plasmid were grown to mid-log phase (O.D.₆₀₀ ~0.6-0.8), at which point each culture was split, one half receiving 0.1 mM IPTG for induction of *trc* promoter activity and the other half receiving no IPTG. After three further hours of growth, bacterial extracts were prepared and the expression of hexahistidine-endostatin was confirmed by Western blot analysis with an anti-histidine antibody (Clontech, Palo Alto, California). FIGS. 15A and 15B show the results of the Western blots which demonstrate pTrc99A hexahistidine-endostatin (HexHIS-endostatin) expression in *E. coli* DH5 α and *Salmonella* VNP20009, respectively. While the *trc* promoter shows no activity in *E. coli* in the absence of IPTG, the same promoter is constitutively active in *Salmonella*. Hexahistidine-endostatin is expressed a single band of approximately 25kD, which is the predicted molecular weight for the fusion protein.

20
25
30 The hexahistidine-endostatin fusion protein was similarly expressed from the YA3334 plasmid, which utilizes the *trc* promoter to direct expression. A protein of the predicted mass of 25 kDa was detected using the anti-histidine antibody, as shown in FIG. 16. In FIG. 16, all bacterial cultures from which the samples were derived had been induced with 0.1mM IPTG for three hours.

35

WO 01/25397

PCT/US00/23242

**13.3. EFFICACY OF ATTENUATED TUMOR-TARGETED
SALMONELLA EXPRESSING ENDOSTATIN ON
C38 MURINE COLON CARCINOMA**

Colon 38 tumor fragments of 2x2x2 mm³ volume were implanted subcutaneously in 9 week old female C57BL/6 mice. When the tumor volumes reached 1000 mm³, they were removed, cut into fragments of 2x2x2 mm³. The fragments were serially passaged for further cycles and the resulting 2x2x2 mm³ fragments were implanted subcutaneously at the right flanks of female C57BL/6 mice. When tumor volumes reached 150-200 mm³, approximately 24 days after implantation, the mice were randomized into six groups of ten mice and each group received a different treatment. One control group received 0.2mls of PBS. Another control group received 0.2 ml containing 1x10⁶ c.f.u. of the attenuated tumor-targeted strain of *Salmonella* VNP20009 carrying a control *asd* plasmid, i.e. an *asd* plasmid that has no insert, as described in Section 5.6, *supra*. The first experimental group received 0.2 ml containing 1x10⁶ c.f.u. of VNP20009 expressing a hexahistidine-endostatin fusion protein in an *asd* plasmid. The second experimental group received VNP20009 with the same expression construct as the first group and further expressed BRP.

FIG. 17 shows the results of these experiments, which demonstrate the efficacy of tumor inhibition by the VNP20009 strains expressing hexahistidine-endostatin. After 60 days of treatment, the median tumor size in those VNP20009 *Salmonella* expressing endostatin was approximately 13% of the median tumor size in control animals, and over 30% less than the median tumor size in animals treated with VNP20009 *Salmonella* harboring an empty vector. Of the surviving animals, many exhibited static tumor growth, as indicated by small changes in net tumor size, and one exhibited a strong regression of the tumor. Incomplete penetrance or effectiveness of the treatment most likely reflects an imperfect delivery system for endostatin, in concordance with O'Reilly *et al.*'s (1997, Cell 88:277-285) finding that endostatin accumulates in inclusion bodies. The delivery system for endostatin is enhanced by the expression of BRP. BRP expression is controlled by its natural promoter, which normally shows an SOS response in bacteria. BRP expression was shown to decrease mean tumor volume to approximately 6% of the mean tumor volume of the control population. Furthermore, within the mouse populations treated with hexahistidine-endostatin and BRP, several of the mice exhibited striking reductions in tumor volume over time, wherein the tumor volume regressed to approximately 10% or less of the initial tumor volume. The effect of BRP is likely to be two-fold: first, BRP itself may possess anti-tumor activity, and second, BRP promotes the release of periplasmic contents and to some extent the release of cytoplasmic contents, including endostatin, which prevents the protein from accumulating in inclusion bodies.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

**13.4. EFFICACY OF ATTENUATED TUMOR-TARGETED
SALMONELLA EXPRESSING ENDOSTATIN
ON DLD HUMAN COLON CARCINOMA**

Cultures of DLD1 cells grown in log phase were trypsinized, washed with PBS and the cells reconstituted to a suspension of 5×10^7 cells/ml in PBS. 0.1ml aliquots of single cell suspensions, each containing 5×10^6 cells, were injected subcutaneously into the right
5 flanks of 9-week old nude female mice (Nu/Nu-CD1 from Charles River). The mice were randomly divided into three groups of ten animals each, then staged at 10-15 days after injection, or when tumor volume reached 200-400 mm³.

The first group of mice was the control group, and each received an 0.3ml injection of PBS. The second group of mice received 0.3ml containing 1×10^6 c.f.u. of the attenuated
10 tumor-targeted strain of *Salmonella* VNP20009 carrying a control *asd* plasmid. The third group of mice received 0.3ml containing 1×10^6 c.f.u. of the attenuated tumor-targeted strain of *Salmonella* VNP20009 carrying an *asd* plasmid which expresses a hexahistidine-endostatin fusion protein and BRP. The tumors were monitored and measured twice a week. FIG. 18 is a graphic representation of tumor volume after administration of the three
15 treatments, demonstrating the inhibitory effect of the hexahistidine-endostatin expressing attenuated tumor targeted *Salmonella* on the growth of DLD1 human colon carcinoma.

VNP20009 carrying the empty vector PYA3332 was not able to significantly inhibit tumor growth. However, VNP20009 expressing endostatin and BRP was able to inhibit tumor growth. These results demonstrate that the combination of endostatin plus BRP
20 increases the anti-tumor effect of either the VNP20009 carrying the PYA3332 vector (strain 8324).

**14. EXAMPLE: EXPRESSION OF ANTI-ANGIOGENIC
FACTORS BY ATTENUATED
TUMOR-TARGETED SALMONELLA**

25 The following example shows the methodology used to engineer attenuated tumor-targeted bacteria such as *Salmonella* to express the anti-angiogenic factors thrombospondin AHR, platelet factor-4 and apomigran.

**14.1. CONSTRUCTION OF A PLASMID CONTAINING THE NUCLEIC
ACID SEQUENCE ENCODING THROMBOSPONDIN AHR**

30 The peptide sequence, Tip 13.40: AYRWRLSHRPKGTGFIRVVMYEG (SEQ ID NO:24), corresponding to the anti-angiogenic homology region (AHR) of thrombospondin (see, e.g., Patent application No. C07K-14/78), was reverse engineered and codon optimized for expression in *Salmonella*, resulting in the DNA sequence:
35 GCG TAC CGC TGG CGC CTG TCC CAT CGC CCG AAA ACC GGC TTT ATC
CGC GTG GTG ATG TAC GAA GGC (SEQ ID NO:25). Complementary

WO 01/25397

PCT/US00/23242

oligonucleotides (Oligo 13:40-1 and Oligo 13:40-2) were produced to synthesize this peptide. At the 5' end a sequence coding for the processing region of OMPA and an *SpeI* restriction site were added. At the 3' end, a stop codon was added with a *BamHI* restriction site. The two oligos were annealed to generate the double stranded DNA fragment. The DNA fragment was cut with *SpeI/BamHI* and ligated to the *SpeI/BamHI* cut vector pTrc801IL2 to produce the plasmid pTrc801-13:40 containing the full length modified OmpA leader sequence. When processed, the sequence produces the full length 13:40 thrombospondin peptide.

Oligo 13:40-1:

5' *gtgta**ctag**gtggcagggc*GCGTACCGCTGGCCCTGTCCCATCGCCGAAAACC
GGCTTTATCCGCGTGGTGATGTACGAAGGCTAA*ggatcc*gcgc 3' (SEQ ID NO:26)

Oligo 13:40-2:

5' *ggcgatc**TTAGCCTTCGTACATCACCACGCGGATAAAGCCGGTTTTCGGGC*
GATGGGACAGGCGCCAGCGGTACGC*gcctgcaccactag*taac 3' (SEQ ID NO:27)

(Restriction sites are italicized and the OmpA processing recognition site is underlined.)

14.2. CONSTRUCTION OF A PLASMID CONTAINING THE NUCLEIC ACID SEQUENCE ENCODING PLATELET FACTOR-4 PEPTIDE (47-70)

The peptide consisting of amino acid residues 47-70 of the C-terminus of platelet factor-4 (PF-4; see, e.g., Maione *et al.*, 1990, *Science* 247:77-79 and Jouan *et al.*, 1999, *Blood* 94:984-993) was codon-optimized for expression in *Salmonella*. The peptide, which is depicted below, includes a DLQ-motif responsible for inhibitory activity of PF-4 on CFU-GM progenitor cells and a clusters of basic amino acids which is the major heparin binding domain.

Platelet Factor-4:

MSSAAGFCASRPGLLEFLGILLPLVYAFASAEABEDGDLQCLCVKITSQV
RPRHITSLEVIKAGPHCPAQLIATLKNR**KICLDLQAPLYKKI**IKL**LES** (SEQ ID NO:28)

Signal peptide = underlined & in bold

Lys 61,62, 65,66 = major heparin binding domain (in bold)

DLQ (7-9, 54-56) = inhibitory activity on CFU-GM progenitor cells (in bold)

Complementary oligonucleotides (oligo PF4-1 and oligo PF4-2) were produced to

WO 01/25397

PCT/US00/23242

synthesize this peptide. At the 5' end a sequence coding for the processing region of OmpA and a *SpeI* restriction site were added. At the 3' end, a stop codon was added with a *Bam*HI restriction site. The two oligos were annealed to generate the double stranded DNA fragment. After restriction digest the fragment was ligated into the *SpeI*/*Bam*HI restricted vector pTrc801 to produce the plasmid pTrc801-PF4. When processed, the sequence produces the full length PF-4 (47-70) peptide.

Oligo PF4-1

5' *cttca**ctag**gtg**ggccagccg**AACGGCCGCAAAATCTGCCTGGACCTGCAGGCGCCGCT*
GTACAAAAAATCATCAAAAACTGCTGAAAAGCTAA *ggatcc* *gag*3' (SEQ ID
NO:29)

Oligo PF4-2

5' *cggg**atc**TTAGCTTCCAGCAGTTTTTTGATGATTTTTTTGTACAGCGGCGCCTG*
CAGGTCAGGCAGATTTTGGGCGGTT*cgctg**ccac**actag**gaag*3' (SEQ ID NO:30)

(Restriction sites are italicized and the ompA processing recognition site is underlined.)

14.3. CONSTRUCTION OF A PLASMID CONTAINING THE NUCLEIC ACID SEQUENCE ENCODING APOMIGREN

The anti-angiogenic peptide apomigren

(IYSFDGRDIMTDPSPQKVIWHGSSPHGVRLVDNYCEA
WRTADTAVTGLASPLSTGKILDQKAYSCANRLIVUCIENSFMTDARK (SEQ ID
NO:31; see, e.g., International Publication No. WO99/29856) corresponds to the C-
terminus of restin, which is a proteolytic fragment of collagen XV. Oligonucleotides

(oligo Apom5F and oligo Apom6F) were designed to amplify the DNA fragment from
human cDNA. At the 5' end a sequence coding for the processing region of OmpA and a
SpeI restriction site were added. At the 3' end, a stop codon was added with a *Bam*HI
restriction site:

Oligo Apom5F: 5'- *ggcttc* *actag**t**gtg**ccagccg**ATATACTCCTTTGATGGTGC* -3' (SEQ
ID NO:32)

Oligo Apom6R: 5'- *cgc* *ggatcc* *TTACTTCCTAGCGTCTGTCATGAAACTG* -3' (SEQ ID
NO:33)

(Restriction sites are italicized and the OmpA processing recognition site is underlined.)

WO 01/25397

PCT/US00/23242

A fragment of the correct size was obtained by PCR using placental cDNA as template. The PCR product was cut with *SpeI/BamHI* and ligated to the *SpeI/BamHI* restricted vector pTrc801 containing the modified ompA signal sequence to produce the plasmid pTrc801-Apom. When processed, the sequence produces the Apomigren peptide.

5 **14.4. ANTI-ANGIOGENIC PEPTIDES PRODUCED BY *SALMONELLA* INHIBITING ENDOTHELIAL CELL PROLIFERATION**

pTrcOmpA-Endostatin, pTrc801-PF4 and pTrc801-13.40 plasmids were electroporated into attenuated tumor-targeted *Salmonella* VNP20009 strains. *Salmonella* strains expressing pTrcOmpA-Endostatin, pTrc801-PF4 and pTrc801-13.40 were screened for anti-proliferative activity as described by Feldman *et al.*, 2000, Cancer Res. 60:1503-1506 and Blezinger *et al.*, 1999, Nature Biotech.17:343-348. Five-ml cultures of individual colonies were grown for 4 hours. Cell lysates were produced by resuspending the cell pellet in 1/20 volume HUVEC medium containing 100 mg/ml gentamycin and performing 3 consecutive freeze/thaw cycles. The lysates were cleared by centrifugation and filter sterilized using a 0.2 µm syringe filter. Ten, twenty-five or fifty ml of the lysates were added to human vein endothelial cells (HUVECs) in 96 well plates containing 100 µl basal medium 2% FCS plus 10 ng/ml FGF. As a control *Salmonella* containing the empty pTrc vector were used. Plates were incubated for 72 hours and proliferation was measured by MST assay (Mosman *et al.*, 1983, J. Immunol. Methods 65:55-63).

15 The preliminary results in FIGS. 19 and 20 show that the platelet factor-4 peptide (PF4-2), the thrombospondin peptide 13.40 (13.40-3) and endostatin produced by *Salmonella* seem to have anti-proliferative activity between 40-60%.

25 **15. EXAMPLE: EXPRESSION OF A BACTERIOICIN FAMILY MEMBER BY ATTENUATED TUMOR-TARGETED *SALMONELLA***

This example demonstrates that attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella*, containing a nucleic acid encoding a bacteriocin family member are capable of expressing the bacteriocin family member.

30 **15.1. CONSTRUCTION OF COLE3 PLASMIDS**

The plasmids described herein serve to illustrate examples of specific embodiments of the invention. As will be apparent to one of ordinary skill in the art, promoter and/or effector molecule-encoding nucleic acids such as the *trc* promoter and/or bacteriocin encoding nucleic acids may be replaced with other appropriate promoter or effector molecules by methods known in the art.

35

WO 01/25397

PCT/US00/23242

15.1.1. THE pE3.SHUTTLE-1 INTERMEDIATE VECTOR PLASMID

pE3-shuttle-1 represents the intermediate vector used to create a cassette containing a multiple cloning site and lacZ fragment for cloning/selection into the plasmid vector ColE3-CA38 (SEQ ID NO:34). To facilitate the cloning of BRP into E3, BRP was first cloned onto an intermediate shuttle vector (FIG. 21). This vector contains a lacZ fragment which can be used to select clones on lactose in a bacterial strain with a mutation(s) in chromosomal lacZ. The BRP fragment was then cloned into the E3 plasmid SmaI site (FIG. 22) as a cassette containing the lacZ alpha complementation fragment. The lacZ fragment makes insert selection possible (*i.e.* Lac+) at this step. Although the naturally occurring E3 plasmid has no antibiotic selection markers (FIG. 23), selection for the presence of the plasmid is possible by using a halo assay (Pugsley, A.P. and Oudega, B. "Methods for Studying Colicins and Their Plasmids" in Plasmids, a Practical Approach 1987, ed. By K.G. Hardy; Gilson, L. *et al.* EMBO J. 9: 3875-3884). This shuttle vector should facilitate not only the cloning of BRP onto the E3 plasmid, but any DNA that could be combined with E3 or E3/BRP. The new E3/BRP plasmid was then transformed into 41.2.9 and tested for activity. Preliminary halo forming assays demonstrated that the presence of BRP on the plasmid did not interfere with the ability of this strain to produce E3. To determine if 41.2.9 E3/BRP had enhanced activity over 41.2.9 E3 the amount of lethal units of E3 produced by each strain was determined (FIG. 24). 41.2.9 E3/BRP produces 100% more lethal units than 41.2.9 E3 alone, demonstrating that this strain has an enhanced activity over 41.2.9 E3 alone.

15.1.2. HALO "STAB" ASSAY FOR E3 ACTIVITY

The sensitive tester strain (SK522) is grown to an OD₆₀₀ of 0.8. One hundred µl of tester strain is added to 3ml of warm (~55°C) LB soft agar (for a 100x15mm dish) and quickly poured onto an LB agar plate. The plate is rocked gently to spread the overlay evenly over the plate and the agar allowed to solidify for 10-15 minutes. Colonies of *E. coli* or *Salmonella* for which E3 activity assay is desired are isolated with a sterile toothpick and "stabbed" into the agar. The agar plates are then inverted and incubated at 37°C overnight. The following day a halo or clearing zone appears around the E3 stab as the secreted Colicin E3 kills the sensitive strain. The colonies can be further induced to increase E3 production or secretion by treatment with any of a variety of SOS-inducing agents such as an alkylating agent (*e.g.*, mitomycin), ultraviolet light or X-ray.

The results of one of the halo assays are shown in FIG. 25. When a bacterial strain secretes a colicin in the presence of a sensitive strain grown on a bacterial lawn on a petri dish, the secreted colicin diffuses out and kills the bacterial cells contained in the bacterial

WO 01/25397

PCT/US00/23242

lawn, lysing them thus creating a clear zone or halo. The size of the halo corresponds to the amount of colicin secreted. The results shown in FIG. 25 show a number of strains. No halos are ever observed around strains not containing the colE3-CA38 plasmid. In the absence of induction, colicin is produced by the *Salmonella* strains. Also evident is that with various types of induction (*i.e.*, alkylating agents, UV light, X-rays), all of the halos increase in size in a dose-dependent manner.

15.1.3. OVERLAY ASSAY FOR SELECTIVE E3 CLONES

Transformants are plated with various dilutions (up to 1:10,000) onto LB and grown for 2 hours at 37°C. The sensitive tester strain is then prepared as above in the halo assay and an overlay poured with soft agar. After allowing to solidify for 10 minutes, the plate is then inverted and incubated overnight at 37°C. Small clearing zones then appear the following day (which resemble bacteriophage plaques) with a small colony (or colonies) in the middle of the clearing zone.

15.1.4. "PLAQUE" OR HALO PURIFICATION ASSAY

The small colony at the center of the clearing zone in the overlay agar described above is then isolated using a sterile pasteur pipette. In the case of either no visible colony or for the case of multiple colonies in one halo, the entire halo is picked with a sterile pasteur pipette. The colony or halo is transferred into 500µL of LB. Dilutions (up to 1:10,000) are made and replated on LB agar and allowed to grow for 2 hours at 37°C. An overlay is then poured with the sensitive tester strain as outlined above. The following day, all or most of the colonies should have halos around them.

16. EXAMPLE: E3 INJECTION *IN VIVO*, AND DETERMINATION OF THE PERCENT RETENTION OF PLASMID IN *SALMONELLA*

The following example demonstrates the retention of the colE3-CA38 plasmid in *Salmonella in vivo*.

Homogenates of tumor and liver from two mice 30 days post injection of either 41.29 (or 41.2.9E3-CA38) were used for the studies. In the description to follow, L=Liver, T=Tumor. All four homogenates were plated for CFU and colonies were picked for analysis by msbB PCR and for colicin production. Almost pure cultures of colonies similar to 41.2.9 were obtained from all homogenates. Five colonies were picked from each for colicin and PCR analysis. An additional 30 colonies were picked from the 41.2.9 E3 T and L plates for further analysis as there seemed to be a mixed population of colicin producers and non producers in the 41.2.9E3 liver homogenate. Based on these results, an additional 100 colonies from 41.2.9E3 tumor and liver were picked and tested for colicin production

WO 01/25397

PCT/US00/23242

and msbB PCR. Distribution and plasmid retention were calculated from the combined date.

The results of the E3 Injection *in vivo*, Determination of the Percent retention of plasmid in *Salmonella* are shown below in Table 3.

Table 3

Tissue	CFU/ml	Tissue weight	CFU/gm	number positive for colicin	% positive in msbB PCR	% plasmid retention
41.29L	1.07E+03	1.33	4.02E+03	0/5	100%	n/a
41.29T	1.26e+07	0.26	2.42E+08	0/5	100%	n/a
41.29E3L	1.15E+04	2.34	2.46E+04	87/135	100%	64.44
41.29E3T	1.09e+06	0.35	1.56E+07	134/135	100%	99.26

In order for the colE3 plasmid to have an effect *in vivo*, and in order for it to carry other genes to the site of the tumor *in vivo*, the colE3 plasmid must be effectively retained *in vivo*. The results obtained in this experiment were surprising and also advantageous since the target of the effector is the tumor, and therefore there would be less effect on the liver itself.

17. EXAMPLE: TUMOR TARGETING OF VARIOUS 41.2.9 STRAINS IN THE M27 LUNG TUMOR MODEL

The following experiment demonstrates that the ability of 41.2.9 colE3 and 41.2.9 colE3 BRP and 41.2.9 colE3 BRP-m (modified BRP) *Salmonella* strains to target tumors.

The *Salmonella* strains listed in Table 4 below were injected into M27 lung tumor-bearing animals and animals were sacrificed on Day 7. Organ weights were assayed the next day for calculation of cfu/g. Tumors and livers were homogenized and plated on msbB to determine the colony forming units (c.f.u.). In groups 1, 2, 4, and 6, the strains all accumulated in the tumors to approximately 4×10^8 cfu/g with varying accumulation in the livers ranging from 6×10^4 to 4×10^6 cfu/g. Table 4 summarizes the data for all groups and is represented by the average cfu/g. All strains were found to have good tumor accumulation (better than 10^6 c.f.u./gram tissue) and all strains gave positive tumor to liver ratios. The BRP colE3 had the best ratio, but was not necessarily better than all other strains available. The E3 and E3BRP strains accumulate to fairly high levels in tumors with tumor to liver ratios between 100-200:1.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

Table 4

Group	Strain	Tumor (T) Liver (L)	cfu/g tissue	Ratio (Tumor:Liver)
1	41.2.9/E3	T	$5.1 \pm 1.1 \times 10^8$	131:1
1	41.2.9/E3	L	$3.9 \pm 3.6 \times 10^6$	
2	41.2.9/E3BRP	T	$4.6 \pm 2.7 \times 10^8$	209:1
2	41.2.9/E3BRP	L	$2.2 \pm 1.3 \times 10^6$	
6 ¹	41.2.9/E3BRP _{in}	T	$3.5 \pm 0.15 \times 10^8$	90:1
6 ¹	41.2.9/E3BRP _{in}	L	$3.9 \pm 3.6 \times 10^6$	

BRP_{in} refers to a modified BRP that contains point mutations at position 96 (G to an A resulting in an amino acid change of a glycine to an arginine) and at position 114 (T to an A resulting in an amino acid change of a serine to a threonine). The mutant BRP_{in} no longer causes quasi lysis but is still able to secrete proteins from the bacteria (van der Wal, F., Koningstein, G., Ten Hagen, C.M., Oudega, B. and Luirink, J. (1998) Optimization of Bacteriocin Release Protein (BRP)-Mediated Protein Release by *Escherichia coli*: Random Mutagenesis of the pCloDF13-Derived BRP Gene to Uncouple Lethality and Quasi-Lysis from Protein Release. Applied and Environmental Microbiology vol. 64 pp 392-398).

18. EXAMPLE: EFFICACY OF 41.2.9/COLE3 ON C38 MURINE COLON CARCINOMA

The following example demonstrates the ability of 41.2.9/ColE3 to inhibit the growth of C38 murine colon carcinoma.

Colon 38 tumor fragment (2x2x2 mm³) was implanted in C57BL/6 mice (female, Age: 9 weeks) subcutaneously. After tumor volume reached to 1,000 mm³, the tumors were removed from the mice under sterile condition and cut into small fragments (about 2x2x2 mm³ mm³/fragment), and repeated above procedure for 5 cycles. The fragments were implanted into mice subcutaneously at the right flank by using a tumor implantation needle on Day 0 of tumor implants.

Animals were randomized on Day 0 of *Salmonella* administration when tumor volume reached 150-200 mm³. Frozen stocks of 41.2.9 and 41.2.9/ColE3 were thawed at room temperature, and diluted in PBS to a final concentration of 7.5×10^6 cfu/ml, respectively. Aliquots of 0.2 ml bacterial suspension (1.5×10^6 CFU/mouse) were administered intravenously into mice as group indicated on Day 0. The bacteria suspension were diluted to 1×10^5 CFU, plated on msbB plates and incubated overnight to determine the number of bacterial cfu which were administered. The tumors were measured twice per week up to the end of the experiment. Three tumors of each group

WO 01/25397

PCT/US00/23242

(ColE3) were dissected and processed for determining cfu and retention of plasmid.

Groups:

		Mice
1.	Untreated control	8
2.	41.2.9 (1.5×10^6 /mouse)	8
3.	41.2.9/ColE3 (1.5×10^6 /mouse)	8

The results for the efficacy of 41.2.9/ColE3 on C38 murine colon carcinoma are shown in FIG. 26. The data demonstrate that mice treated by intravenous injection with VNP20009 (41.2.9) are able to significantly inhibit the growth of C38 murine colon carcinoma. In addition, when mice were treated with VNP20009 containing the ColE3 plasmid, tumor regression (*i.e.*, tumors were smaller at the end of the experiment than at the beginning) was achieved.

19. EXAMPLE: ANTI-TUMOR ACTIVITY OF VNP20009/COLE3 ON DLD1 HUMAN COLON CARCINOMA IN NUDE MICE

The following example demonstrates the enhanced ability of *Salmonella* mutant VNP20009/ColE3 (41.2.9/ColE3) to inhibit the growth of DLD1 human colon carcinoma relative to *Salmonella* mutant 41.2.9.

DLD1 cells grown in log phase were removed by trypsinization, washed with PBS, and reconstituted to 5×10^7 cell/ml PBS. Single cell suspensions (0.1 ml) were injected into Nude mice (Nu/Nu-CD1 female, Age: 9 weeks; from Charles River) subcutaneously on Day 0 (5×10^6 cells/mouse) at right flank. Ten animals were used in each group, randomized and staged at about 10-15 days after tumor implantation, when tumor size reached 300-400mm³. CFU of *Salmonella* mutant 41.2.9 and 41.2.9/ColE3 were counted one day ahead. Bacteria (41.2.9 and 41.2.9/ColE3) were diluted to 1×10^7 CFU/ml. Aliquots of 0.2 ml bacterial suspensions (2×10^5 CFU/mouse) were injected intravenously into mice on days indicated. The bacteria suspension was diluted to 1×10^3 CFU, plated each solution 100ul on msbB plates and the plates incubated overnight. The bacteria colonies were counted next day. The tumors were measured twice per week.

Groups:

		Mice
1.	Untreated control (PBS)	10
2.	41.2.9 (2×10^6 /mouse)	10
3.	41.2.9/ColE3 (2×10^6 /mouse)	10

The results of the anti-tumor activity of 41.2.9/ColE3 on DLD1 human colon carcinoma in nude mice are shown in FIG. 27. The colicin E3-containing 41.2.9 strain

WO 01/25397

PC/T/US00/23242

shows enhanced activity as compared to strain 41.2.9 alone.

20. EXAMPLE: EFFICACY OF 41.2.9/COLE3 ON B16 MURINE MELANOMA IN C57BL/6 MICE

The following example demonstrates the ability of *Salmonella* mutant 41.2.9/ColE3 to inhibit the growth B16-F10 melanoma.

5 B16-F10 cells grown in log phase were removed by trypsinization, washed with PBS, and reconstituted to 5 x10⁶ cell/ml PBS. Single cell suspensions (0.1 ml) were injected into C57BL/6 mice (female, Age: 9 weeks) subcutaneously on Day 0 (5 x10⁵ cells/mouse) at right flank. Ten animals were used in each group, and randomized at day 9, when tumor volume reached 150-200 mm³. Frozen stocks of *Salmonella* clones 41.2.9 and 41.2.9/ColE3 were thawed at room temperature, and diluted in PBS to a final concentration of 7.5 x 10⁶ cfu/ml, respectively. Aliquots of 0.2 ml bacterial suspension (1.5x10⁶ CFU/mouse) were administered intravenously into mice as group indicated on Day 9. The bacteria suspension were diluted to 1x10³ CFU, plated on msbB plates and incubated overnight to determine the number of bacterial cfu which were administered. 15 The tumors were measured twice per week up to the end of the experiment.

Groups:

		Mice
20	1. Untreated control	10
	3. 41.2.9 (1.5x10 ⁶ /mouse)	10
	5. 41.2.9/ColE3 (1.5x10 ⁶ /mouse)	10

The results of the efficacy of 41.2.9/ColE3 on B16 murine melanoma in C57BL/6 mice are shown in FIG. 28. The data demonstrate that mice treated by intravenous injection with 41.2.9 (41.2.9) are able to significantly inhibit the growth of B16 murine melanoma. In addition, mice treated with 41.2.9/ColE3 showed a significant decrease in tumor size at early time points (up to day 37) compared to 41.2.9 alone. This finding is very important because smaller tumor sizes are more readily susceptible to other therapeutics (e.g., chemotherapeutic agents and radiation such as x-rays).

30

21. EXAMPLE: ANTI-TUMOR EFFICACY OF 41.2.9/E3 COMBINED WITH BRP

The following example demonstrates that the coexpression of BRP and E3 in *Salmonella* mutant 41.2.9 increases the anti-tumor efficacy of mutant.

35 The coexpression of BRP and E3 in *Salmonella* mutant 41.2.9 increases the amount of E3 secreted from the bacteria *in vitro*. If BRP was able to increase the amount of E3 secreted from the *Salmonella in vivo* then it could be hypothesized that this

WO 01/25397

PCT/US00/23242

additional extracellular E3 would be readily available to the tumor cells and thus increase the cytotoxicity to these cells. In this experiment 4 groups of animals (10 animals per group) were tested:

Group number	Treatment
1	Control (no treatment)
2	41.2.9
3	41.2.9/E3
4	41.2.9/E3/BRP

The model used in this experiment was the human lung carcinoma line HTB177. The cells were implanted into the flank of mice subcutaneously on day 1. When the tumors reached to approximately 500mm³, on day 14 the animals were injected by intravenous injection with 1x10⁶ cfu of the strain described in the above table, or with saline in the case of group 1. The tumor volume was measured weekly up to day 24. The results in Table 5 show that while 41.2.9 by itself is able to inhibit tumor growth (40% inhibition), the combination with E3 is able to increase the anti-tumor efficacy (63%). However, when the strain carrying both E3 and BRP is used in this model, the anti-tumor efficacy is further enhanced (67% inhibition compared to untreated control) and the enhanced inhibition is quite significant at the earlier time points (Table 5).

Table 5: Percent Tumor Growth Inhibition Compared to Untreated Control

Strain	Day 17	Day 20	Day 24
41.2.9	50	38	40
41.2.9/E3	63	58	63
41.2.9/E3/BRP	97	82	67

In conclusion, treatment with *Salmonella* carrying both the cytotoxic colicin E3 and the enhanced secretion system BRP results in an increase in anti-tumor efficacy compared to the untreated control and to treatment with 41.2.9/E3 alone.

22. EXAMPLE: COMBINATION OF COLICIN E3-CONTAINING SALMONELLA WITH X-RAY TREATMENT

The following example demonstrates that the combination of 41.2.9 with two doses of X-ray significantly increases the survival time of mice above that seen for X-ray alone.

The schedule was as follows: At day 0, tumors were implanted by the administration of B16F10 melanoma (5 x 10⁵ cells/mouse) s.c. in the right side, at mid body of 100 C57B6 female mice (5-7 wks of age). At day 8, colicin E3-containing *Salmonella* 41.2.9 was injected and at days 12, and 26, x-rays were administered.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

The results of the combination of colicin E3-containing *Salmonella* with x-ray treatment are shown in Table 6.

Table 6

Category	n=()	Days to lg	mean	T/C
5 A sham 15Gy	(6)	12, 12, 18, 18, 18, 21	17	1.0
J 15Gy x-rays 12dpt, 26dpt	(9)	14, 14, 18, 21, 25, 35, 35, 67, 67	33	1.9
10 K 41.2.9 +15Gy x-rays 12dpt, 26dpt regression #1,2	(9)	21, 28, 35, 35, 56, 60, 60, 60, 67	47	2.8
L 41.2.9/E3+15Gy x-rays 12dpt, 26dpt regression #3,2	(9)	28, 39, 53, 56, 56, 60, 67, 74, 78	57	3.3

15 This data demonstrates that the combination of 41.2.9 with two doses of X-ray significantly increases the survival time of mice above that seen for X-ray alone. E3 further increased the survival time of mice above that seen for 41.2.9 plus X-ray.

20 23. EXAMPLE: EXPRESSION OF CYTOTOXIC NECROTIC FACTORS BY TUMOR-TARGETED BACTERIA

The following example demonstrates that the expression of *E. coli* cytotoxic necrotic factor 1 (CNF1) by tumor-targeted bacteria.

Cytotoxic necrotic factors include, but are not limited to, *E. coli* cytotoxic necrotic factor 1 (CNF1; Falbo *et al.*, 1993, *Infect. Immun.* 61:4904-4914), *Vibrio fischeri* CNF1 (Lin *et al.*, 1998, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 250:462-465) and *E. coli* cytotoxic necrotic factor 2 (CNF2; Sugai *et al.*, 1999, *Infect. Immun.* 67:6550-6557). The CNF-family also includes *Pasteurella multocida* toxin (PMT) which shares 27% identical residues and 80% conserved residues of the n-terminal portion of CNF2 (Oswald *et al.*, 1994, *Proc. Acad. Sci. USA* 91:3814-3818).

30 CNF1 was cloned from *E. coli* J96 (ATCC 700336) by PCR using the primers (forward) 5'- GTGTCATGAAAA TGGGTAACCAATGGCAAC -3' (SEQ ID NO:35) and (reverse) 5'- CACAGAGCTCGCGCTAACAAAACAGCACAAAGGGAG -3' (SEQ ID NO:36) using standard PCR. An approximately 3100 bp product was obtained and cloned into the NcoI and SacI sites of pTrec99a for expression of the protein as well as DNA
35 sequencing using *E. coli* as the DNA cloning host. DNA sequencing was performed by standard methods at the Yale University Keck Biotechnology laboratory. The DNA

WO 01/25397

PCT/US00/23242

sequencing confirmed that the cloned PCR product was CNF1 with only minor sequence variation of 6 of 3065 base pairs.

The CNF1 plasmid was electroporated into an *E. coli* DNA cloning host DH5 α and *Salmonella* strain YS1646 (International Publication No. WO 99/13053). The expression of CNF1 was determined in the *E. coli* DNA cloning host and *Salmonella* strain YS1649 using a standard LDH assay (Promega, Madison, WI, Cytotox 96 Φ). FIG. 29 shows that the presence of the CNF-containing plasmid results in enhanced cytotoxicity. A subsequent assay was used to show that *Salmonella* carrying the CNF-containing plasmid also exhibit other known properties of CNF1 such as multinucleation (Ryeke et al., 1990, J. Clin. Microbiol. 28: 694-699). HeLa cells exposed to CNF1 were examined for nuclei by light microscopy. The results in FIG. 30 clearly show that the presence of CNF1 in *Salmonella* results in the expected multinucleation and cell enlargement.

24. EXAMPLE: EXPRESSION OF VEROTOXIN BY TUMOR-TARGETED BACTERIA

The following example demonstrates the cytotoxicity of verotoxin AB produced by tumor-targeted bacteria engineered to express verotoxin AB.

Verotoxin (syn. HSC10 toxin, Shiga toxin, shiga-like toxin, *Shigella* toxin). This toxin was isolated from a colicin-producing *E. coli* strain HSC10, and was originally thought to be a colicin (Farkas-Himsley et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. 92(15):6996-7000). It has a long history of antitumor activity, especially for ovarian cancer and brain tumors, however, the antitumor activity is associated with purified preparations, not with whole live bacteria.

Verotoxin was cloned from *E. coli* HSC10 (ATCC 55227) using primers based upon the published sequence for verotoxin 1 and confirmed by DNA-sequencing at the Yale Keck Biotechnology Center using standard DNA sequencing techniques. The expression of verotoxin was accomplished using the BRP gene under control of the tetracyclin-inducible promoter polycistronic with the verotoxin A and B subunits. This tetracyclin-inducible BRP verotoxin AB was cloned into a vector for chromosomal integration using the *msbB* gene.

24.1. CONSTRUCTION OF VECTORS

24.1.1. AMPLIFICATION AND CLONING OF AB

Verotoxin AB (AB) was generated by PCR using the following primers:

H19B-7: forward: 5'-GTGTCCATGGCTAAAACATTATTAATAGCTGCATCGC-3'
(SEQ ID NO:37); and

WO 01/25397

PCT/US00/23242

QSTX-R1: reverse 5'-GTGTCTGCAGAACTGACTGAATTGAGATG-3' (SEQ ID NO:38).

These primers also contain outer NcoI(5') and PstI(3') restriction endonuclease sites for cloning into the NcoI and PstI sites of ptrc99A.

5

24.1.2. AMPLIFICATION AND CLONING OF TETBRP

TetBRP-AB was constructed in the intermediate vector pSP72-F6/R6. TetBRP was generated by PCR using the following primers: Tet-5': forward 5'-GTGTAGATCTTTAAGACCCACTTTCACATTTAAGTTG-3' (SEQ ID NO:39) and BRP-TET-3': reverse 5'-CACAGGATCCTTACTGAACCGCGATCCCCG-3' (SEQ ID NO:40). These primers contain BglII(5') and BamHI(3') restriction endonuclease sites for cloning into BglII and BamHI sites of pSP72-F6/R6 vector.

10

24.1.3. SUBCLONING OF AB INTO pSP72-F6/R6-TETBRP

ptrc99A-AB was digested with BamHI and Aval restriction endonucleases to remove AB for insertion into pSP72F6/R6-TetBRP, also digested with BamHI and Aval restriction endonucleases. The pSP72F6/R6 vector contains multiple restriction endonuclease sites for cloning in addition to a portion of the β -gal gene for lacZ-alpha complementation in trans. Both the vector (pSP72F6/R6-TetBRP) and the AB insert were resolved on a 0.8% 1XTAE agarose gel and purified using the Qiagen gel extraction kit. The vector and insert were ligated using T4 ligase and transformed into DH5a *E. coli* cells using the heat shock method. The cells were plated to LB plates containing 100 μ g/ml Amp and 40 μ g/ml X-gal. Positive colonies were selected based on ampicillin resistance and the presence of a functional β -gal gene (positive colonies were blue).

15

20

25

24.1.4. SUBCLONING OF TETBRP-AB INTO pCDV442

pSP72F6/R6-TetBRP-AB was digested with NotI and SfiI restriction endonucleases for subcloning into the pCVD442 vector, also digested with NotI and SfiI restriction endonucleases.

30

24.1.5. *msbB* CHROMOSOMAL VECTOR

A vector capable of undergoing homologous recombination with the *DmsbB* gene in the chromosome of strain VNP20009 (a.k.a. YS1646 in International Publication No. WO 99/13053) was constructed in the suicide vector pCVD442 (Donnenberg and Kaper, 1991, *Infection and Immunity* 59: 4310-4317). Primers for PCR were designed that would generate portions of the 5' and 3' sections of the *msbB* deletion occurring in VNP20009 as two separate products (*msbB*-5': forward 5'-GTG TGA GCT CGA TCA ACC AGC AAG

35

WO 01/25397

PCT/US00/23242

CCG TTA ACC CTC TGA C-3' (SEQ ID NO:41) and reverse 5' GTG TGC ATG CGG
 GGG GCC ATA TAG GCC GGG GAT TTA AAT GCA AAC GTC CGC CGA AAC GCC
 GAC GCA C-3' (SEQ ID NO:42); and *msbB*-3'-forward 5'-GTG TGC ATG CGG GGT
 TAA TTA AGG GGG CGG CCG CGT GGT ATT GGT TGA ACC GAC GGT GCT CAT
 GAC ATC GC-3' (SEQ ID NO:43) and reverse 5'-GTG TCT CGA GGA TAT CAT TCT
 GGC CTC TGA CGT TGT G-3' (SEQ ID NO:44). These primers also contain outer *SacI*
 5 (5') and *AvaI* (3') restriction endonuclease sites to facilitate cloning into the *SacI* and *Sall*
 sites of pCVD442 when these two fragments are joined via a common *SphI* site and
 generate internal *NotI*, *PacI*, *SphI*, *SfiI*, *SwaI* and *DraI*, in order to facilitate cloning of DNA
 fragments into the *DmsbB* for stable chromosomal integration without antibiotic resistance
 10 (FIG. 31). This vector is referred to as pCVD442-*msbB* (see FIGS. 32 and 33).

In order to clone the *Tet-BRP-AB* into the pCVD442-*msbB*, the *Tet-BRP-AB*
 plasmid DNA was restriction digested and the appropriate DNA was purified and a ligation
 reaction containing these two components was performed using T4 ligase. The ligation
 reaction was then transformed to DH5 1 pir and colonies screened for the presence and
 orientation of the *Tet-BRP-AB*. The *Tet-BRP-AB* clone was transformed into the strain
 15 SM10 1 pir (Donnenberg and Kaper, 1991, *supra*) and the plasmid designated pCVD442-
Tet-BRP-AB. Colonies of SM10 1 pir were screened for *Tet-BRP-AB* gene by PCR, and a
 SM10 1 pir clone pCVD442-*Tet-BRP-AB* was chosen for use as a mating donor to
Salmonella strains. SM10 1 pir containing the pCVD442-*Tet-BRP-AB* was mated to a
 20 *Salmonella* strain YS50101 (a spontaneous derivative of the tetracycline-resistant strain
 YS82 (Low *et al.*, 1999, *supra*) with enhanced resistance to Difco MacConkey agar by
 standard methods (Davis, R. W., Bolstein, D., and Roth, J. R. 1980. *Advanced Bacterial*
Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor) and selected for on
 plates containing 50 µg/mL carbenicillin (carb) and 300 µg/mL streptomycin (strep). The
 25 resulting YS50102- pCVD442-*Tet-BRP-AB* clones were checked for pCVD442-*Tet-BRP-AB*
AB gene by PCR.

24.2. TRANSFER OF THE CHROMOSOMALLY INTEGRATED pCVD442-*Tet-BRP-AB* INTO 41.2.9 (YS1646) TO GENERATE THE STRAIN 41.2.9-*Tet-BRP-AB*

Using bacteriophage P22 (mutant HT105/1 int-201; Davis *et al.*, 1980), 41.2.9 was
 30 transduced to carbenicillin resistance using strain YS50102-*Tet-BRP-AB* as donor. The
 presence of the *bla* and *sacB* genes from pCVD442 allowed the selection of a *carb^r* (or
amp^r) *suc^s* strain denoted 41.2.9- pCVD-*Tet-BRP-AB*-1 which contained both the *DmsbB*
 and *DmsbB*-*Tet-BRP-AB* genes (FIG. 33, #3). Strain 41.2.9-*Tet-BRP-AB* -1 was plated
 35 on LB sucrose to select a *suc^r carb^s* derivative to remove the *DmsbB* gene and leave the
DmsbB-*Tet-BRP-AB* gene according to the methods of Donnenberg and Kaper, 1991,

WO 01/25397

PCT/US00/23242

supra (FIG. 33, #4) except that the LB-sucrose agar plates were made without NaCl, and the plates were incubated at 30°C. After the growth of colonies on these plates, they were gridded to an *tnsB* plate and replica plated to either carbenicillin- or sucrose-containing plates in order to detect the presence of a clone which lacked both the antibiotic and sucrose markers. The resulting clones were checked for the presence of the Tet-BRP-AB gene by PCR. One such derivative containing the chromosomally integrated Tet-BRP-AB and lacking sucrose sensitivity and carbenicillin resistance was denoted as 41.2.9-Tet-BRP-verotoxin AB.

41.2.9-Tet-BRP-verotoxin AB was tested for cytotoxicity *in vitro* using a standard LDH cytotoxicity assay (Cytotox[®]; Promega, Madison, Wisconsin). The results are shown in FIG. 34, demonstrating the toxic properties of verotoxin-expressing clones 26 and 31. Clones 26 and 31 had a significantly higher percentage of cytotoxicity when treated with tetracycline than when not treated with tetracycline.

25. EXAMPLE: EXPRESSION OF HEMOLYSIN BY TUMOR-TARGETED BACTERIA

The following example demonstrates that tumor-targeted bacteria can be engineered to express hemolytic proteins such as hemolysin constitutively or under inducible control.

Hemolysins are well known cytotoxic proteins which have the ability to lyse red blood cells (see, e.g., Beutin, 1991, *Med. Microbiol. Immunol* 180:167-182). *SheA* (Genbank Number ECO238954) is a silent hemolysin found in most wild type *E. coli* which is not normally expressed (Fernandez *et al.*, 1998, *FEMS Microbiol Lett* 168:85-90). *SheA* (a.k.a. *hlyE*; Genbank Number U57430) was cloned by PCR using the following primers (forward) 5'-TTTTTCCAT GGCTATTATG ACTGAAATCG TTGCAGATAA AACGG-3' (SEQ ID NO:45) and (reverse) 5'-TTTTTAAAG TTCCCGGGTC AGACTTCAGG TACCTCAAAG AGTGTC-3' (SEQ ID NO:46) from wild type *E. coli* (strain 2507, Yale University *E. coli* Genetic Stock Center) under standard PCR conditions. The PCR product of the correct size was cloned into the *NcoI* and *HindIII* sites of *ptc99a* (Pharmacia) in order to place it under the partially constitutive *trc* promoter. The PCR product was also cloned into the *tet-bgal-Z-term* vector (described *supra*) cut with *NcoI* and *EcoRV*. *E. coli* DH5a (Gibco) were then transformed with the plasmids and plated to blood agar (tryptic soy agar with 5% sheep blood; BioMerieux, Lombard, IL) with and without the addition of 0.2 ug/ml tetracycline. Positive colonies were picked as those containing halos of clearing around the colony which indicates hemolysis. Positive colonies were subjected to standard plasmid purification and transformed to *Salmonella* YS501 and re-screened for halos.

Constitutive halo formation is shown in FIG. 35 (2A and 2B) for the *trc99a* construct, where a halo is observed with or without added tetracycline. Tetracycline-

WO 01/25397

PCT/US00/23242

dependent halo formation is shown in FIG. 35 (3A and 3B) for the tetracycline-promoter driven *SheA*, where no halo is observed without the addition tetracycline. These results demonstrate that a tumor-targeted bacterium can express a hemolytic protein, either constitutively or under inducible control.

5 26. **EXAMPLE: EXPRESSION OF METHIONASE BY
 TUMOR-TARGETED BACTERIA**

The following example demonstrates that attenuated tumor-targeted bacteria such as *Salmonella* can be engineered to express methionase.

10 Methionase is an enzyme that degrades methionine, an essential amino acid necessary for tumor growth. Methods have been described for administration of purified methionase to inhibit tumor growth or to administer a DNA or viral vector which codes for methionase (International Publication No. WO00/29589 by Xu and Tan). Xu and Tan did not disclose methods for using tumor-specific bacterial vectors for delivery of methionase, and, in order to achieve efficacy with purified protein, large amounts of methionase are required. A novel method for delivering methionase directly to the tumors it to express the
15 enzyme using tumor-targeted bacteria.

The following primers were generated for methionase from *Pseudomas putida* based upon Genbank No. L43133:

Forward: METH-XHOI

20 5'-CCGCTCGAGATGCACGGCTCCAACAAGCTCCCA-3' (SEQ ID NO:47); and

Reverse: METH-BAM

5'-CGCGGATCCTTAGGCACTCGCCTTGAGTGCCTG-3' (SEQ ID NO:48)

25 Using the above listed primers (4 mM) and an isolated colony of *Pseudomas putida* as the template, the sequence of methionase was amplified by PCR under the following conditions:

one cycle of 94°C for 5 minutes, followed by 35 cycles of: 94°C for 1 minute, 60°C for 1
30 minute and 72°C for 2 minutes. A final amplification step of 72°C for 10 minutes was included as the last step of the PCR reaction. PCR products were resolved on 0.8% 1X TAE agarose gel and a PCR product of the expected size for methionase (~ 1196 bp) was identified. The band was excised from the gel and purified using the Qiagen gel extraction kit.

35 Both the pSP72 vector and the isolated gel purified methionase gene obtained above were digested with the restriction enzymes Xho I and Bam HI. The digested vector and methionase were resolved on a 0.8% 1XTAE agarose gel. The products of the digestion

WO 01/25397

PCT/US00/23242

corresponding to the linearized vector and digested methionase gene were excised from the gel and purified using the Qiagen gel extraction kit. The linearized vector and the insert (methionase) were ligated together using T4 ligase. The ligation mixture was transformed into Dh5a *E.coli* cells by a heat shock method. After recovery, the cells were plated to LB media containing 100 mg/mL of ampicillin (Amp) to select for those cells that contain the intact pSP72 vector. Amp resistant colonies were identified and the presence of the pSP72 vector containing the methionase gene were confirmed by plasmid preparation using a Qiagen mini-prep kit and restriction digest with the enzymes Eco RI and Bsp HI. Clone #9, was sent for sequencing to the Yale sequencing Facility, Yale University School of Medicine. Sequence was done using both the SP6 (forward) and T7 (reverse) sequencing primers. Results demonstrate 100% sequence match to published methionase sequence with the exception of the TGA stop codon which was changed to TAA by PCR.

Methionase activity can be determined using the methionase assay described in Hori *et al.*, 1996, Cancer Research 56:2116-2122

27. **EXAMPLE: EXPRESSION OF APOPTIN PROTEIN AS A TAT FUSIONS IN ATTENUATED TUMOR-TARGETED BACTERIA**

The following example demonstrates that attenuated tumor-targeted bacteria can be engineered to express and secrete fusion proteins comprising an effector molecule and a ferry peptide such as TAT, antennapedia, VP22, and Kaposi FGF MTS.

27.1. **CONSTRUCTION OF TAT-APOPTIN VECTORS**

The canary virus (CAV) protein apoptin is known to induce apoptosis in neoplastic cells, as when delivered by adenoviral vectors (see, *e.g.*, Noteborn *et al.*, 1999, Gene Therapy 6:882-892).

In order to generate a protein which could be transcribed in the cytoplasm of *Salmonella* and yet have the ability to be transported to the nucleus of a tumor cell and cause apoptosis, the apoptin protein was fused to a peptide derived from the human immunodeficiency virus (HIV) TAT protein (see, *e.g.*, Schwartz *et al.*, 1999, Science 285:1569-1572). Since TAT protein fusions have also been shown to be functional when fused to poly-histidine (hexahistidine) amino acids which both increase the positive charge and facilitate protein purification (Schwartz *et al.*, 1999, *supra*), the TAT-apoptin fusion was generated with and without the hexahistidine (FIG. 36 A and B). Further, the TAT-apoptin fusion can be generated with and without an OmpA-8L signal sequence (FIG. 36A and C).

The apoptin and hexahistidine apoptin are assembled using overlapping oligonucleotides. The nucleic acid sequence encoding apoptin was generated by PCR using the following oligonucleotides:

WO 01/25397

PCT/US00/23242

TAP1: 5'-GATCCCATGG CTTATGGCAG AAAAAACGC CGTCAGCGCC
 GTCGCATGAA CGCGCTGCAG GAAGATACCC CGCCGGGCC GTCCACCGTG
 TTTCGCCGC CG-3' (SEQ ID NO:49)

5 TAP2: 5'-GGGACAGGGT GATGGTGATG CCCCGATGC CGATGCGGAT
 TTCGGGCAA TCGGGGTTT CCAGCGGCG GGAGGAGTC GGCGGCGAA
 ACACGGTGGA CGG-3' (SEQ ID NO:50)

10 TAP3: 5'-GGCATCGCG GCATCACCAT CACCCTGTCC CTGTGCGGCT
 GCGGAAACGC GCGCGCGCC ACCCTGCGCT CCGCGACCG GGATAACTCC
 GAAAAACCCG GC-3' (SEQ ID NO:51)

TAP4: 5'-GCGATATTC GACGGATGC AGGAGCGTTT TTTGGACGGC
 GGTTCGGCT GATCGGTGCG CAGATCCGGG ACGTTTTTAA AGCCGGTGT
 TTCGGAGTTA TCCGCGTGC C-3' (SEQ ID NO:52)

15 TAP5: 5'-CCTGCGATCC GTCCGAATAT CGCGTCTCC AACTGAAAGA
 ATCCCTGATC ACCACCACC CGTCCGCC GCGACCCGC CGCCGCTGCA
 TCCGCCTG AAAGCTTCAT G-3' (SEQ ID NO:53)

20 TAP6: 5'-CATGAAGCTT TCAGAGCGG ATGCAAGCGG GGGCGGTGCG C-3'
 (SEQ ID NO:54)

The nucleic acid sequence encoding the hexahistidine-containing version of the TAT-
 apoptin fusion protein was generated using TAP 2-TAP6 oligonucleotides and TAP6H1
 oligonucleotide (5'-GATCCCATGG CTCATCACCA TCACCACCAT TATGGCCGCA
 25 AAAAAACCCG TCAGCGCCGT CGCATGAACG CGTGCAGGA AGATACCCCG
 CCGGCC-3'; SEQ ID NO:55). The nucleic acid sequence encoding the Omp8L-
 containing version of the TAT-apoptin fusion protein is generated from the PCR product of
 TAP1-TAP6 oligonucleotides by PCR using TAP6 oligonucleotide and omp8LF1
 oligonucleotide (5'-GATCCCATGG CTAAAAGAC GGCTCTGGCG CTTCTGCTCT
 30 TGCTGTAGC GCTGACTAGT GTAGCGCAGG CCTATGGCCG CAAAAACGC
 CGTCAGCGCC-3'; SEQ ID NO:56).

Each oligonucleotide is formulated into a stock solution which is 4 μ M in
 concentration. Using premixed PCR reaction beads (Pharmacia, Ready-to-go beads), 2 μ l
 of each oligonucleotide was used. The PCR reaction consisted of one cycle at 95° for 5
 35 minutes; thirty-five cycles at 95°C for 1 minute, 60 °C for 1 minute, 72 °C for 1 minute; and
 one cycle at 72 °C for 10 minutes. The PCR reaction was then extracted with

WO 01/25397

PCT/US00/23242

phenol/chloroform, precipitated with ethanol, redissolved in water and subjected to restriction digestion with Nco I and Hind III. The restriction-digested PCR product was resolved by gel electrophoresis and the product of the correct size (approximately 420 and 450 bp for TAT-apoptin and hexahistadine-TAT-apoptin, respectively) were excised from the gel and isolated using standard molecular biology techniques. These products are ligated into Nco I and Hind III digested ptc99a (Pharmacia) and result in the ptc99a-TAT-apoptin construct. The correct DNA sequence was obtained for both the TAT-apoptin (FIG. 37) and the hexahistadine TAT-apoptin (FIG 38).

27.2. DEMONSTRATION OF SECRETION AND UPTAKE OF TAT-APOPTIN

Attenuated tumor-targeted bacteria are transformed with the ptc99a-TAT-apoptin construct by standard techniques known in the art (e.g., by heat shock or electroporation) and cultured in medium. The supernatant from the bacterial culture is tested for the presence of TAT-apoptin using techniques known to those of skill in the art (e.g., Western Blot analysis or ELISA). Once the presence of the TAT-apoptin in the supernatant of the bacterial culture is confirmed, the bacterial culture supernatant is incubated with mammalian cells (e.g., NIH3T3, CHO, 293, and 293T cells) and the presence of the TAT-apoptin inside the cells is confirmed by apoptin assays known to those of skill in the art.

27.3. DEMONSTRATION THE UPTAKE OF TAT-APOPTIN INTRATUMORALLY

Attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express TAT-apoptin or apoptin are administered intravenously to a B16 tumor model. The mice are sacrificed several days after administration of the bacteria and the organ weights are determined. Tumors are assayed for the presence and localization of TAT-apoptin or apoptin using apoptosis assays (e.g., DNA laddering and Fluorescein In Situ Cell Death Detection Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)) known to those of skill in the art. Further, the size of the tumors are assayed to determine anti-tumor activity of the TAT-apoptin. Tumors are also homogenized and plated to determine the colony forming units (c.f.u.).

28. EXAMPLE: EFFICACY OF THE COMBINATION OF VNP20009 AND CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS ON THE GROWTH OF M27 LUNG CARCINOMA IN MICE

The following example demonstrates that the administration of attenuated tumor-targeted bacteria in combination with a chemotherapeutic agent may act synergistically or additively to inhibit the growth of solid tumors such as lung carcinoma.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

28.1. EFFICACY OF THE COMBINATION OF VNP20009 AND CYTOXAN OR VNP20009 AND MITOMYCIN C ON THE GROWTH OF M27 LUNG CARCINOMA IN MICE

Liquid nitrogen stored M27 murine lung carcinoma cells (1×10^6 /ml x 1ml) were recovered by rapidly thawing the cells at 37°C and cultured with 10 ml of DMEM culture medium containing 10% fetal calf serum (FCS) at 37°C, 5% CO₂. After passing the cells for two generations, M27 cells in log phase were removed by trypsinization, washed with 1 x PBS, and reconstituted to 2.5×10^5 cells/ml with 1 x PBS for tumor implantation. An M27 cell suspension was implanted into 100 C57BL/6 mice (female, aged 8 weeks, 20 g; 5×10^5 cells/mouse) subcutaneously at the right flank on Day 0. The mice were randomly divided into ten groups with each group consisting of 10 mice.

Salmonella strain VNP20009 was diluted to 5×10^8 CFU/ml with 1 x PBS with our standard dilution procedures. Each mouse was intravenously administered 0.2 ml of diluted *Salmonella* (1×10^8 CFU/mouse) on day 12 according to Table 6, *infra*. In order to determine the actual number of injected bacteria, the 5×10^8 CFU/ml bacterial suspensions were further diluted to 1×10^3 CFU/ml and plated on nutrient agar (MsbB plates; International Publication No. WO 99/13053). The colonies formed were counted the next day.

The mitomycin C (Sigma) and cytoxan (Sigma) were administered to mice according to Table 7, *infra*. The second dose of mitomycin C was given to the combination groups on day 22 but not those treated with mitomycin C only due to the large size of the tumor. 200 mpk of Cipro (Bayer Inc., West Haven, CT) was administered to each mouse treated with VNP20009 alone or VNP20009 + chemotherapeutic drugs since severe toxic reactions were observed in groups treated with VNP20009 + cytoxan. The tumor volume was measured twice a week until the end of the experiment. The behavior, appearance and mortality of the animals was observed daily. The mice were kept in a clean, temperature constant laboratory. The bedding was changed twice a week and the mice were provided with enough food and drinking water.

Table 7

Group	Number of Mice
No treatment control	10
3 mpk mitomycin C, i.v., day 15	10
5 mpk mitomycin C, i.v., day 15	10
150 mpk cytoxan, i.p., day 15	10
200 mpk cytoxan, i.p., day 15	10
VNP20009, 1×10^8 /mouse i.v., day 12	10

WO 01/25397

PCT/US00/23242

Group	Number of Mice
VNP20009, 1×10^6 /mouse i.v., day 12 + 3 mpk mitomycin C, i.v., days 15 & 22	10
VNP20009, 1×10^6 /mouse i.v., day 12 + 5 mpk mitomycin C, i.v., days 15 & 22	10
VNP20009, 1×10^6 /mouse i.v., day 12 + 150 mpk cytoxan, i.p., day 15	10
VNP20009, 1×10^6 /mouse i.v., day 12 + 200 mpk cytoxan, i.p., day 15	10

10 As shown to FIG. 39, the combination treatment with VNP20009 + cytoxan inhibited the growth of the M27 lung carcinoma more than VNP20009 treatment alone or cytoxan treatment alone. As shown in FIG. 40, the combination of VNP20009 + mitomycin C inhibited the growth of the M27 lung carcinoma more than mitomycin C alone. However, 15 the combination of VNP20009 + mitomycin C did not inhibit the growth of the M27 lung carcinoma more than VNP20009 treatment alone (FIG. 40). These results suggest that the administration of attenuated tumor-targeted bacteria in combination with a chemotherapeutic agent may act synergistically or additively to inhibit the growth of solid tumors such as lung carcinoma.

20 **28.2. EFFICACY OF THE COMBINATION OF VNP20009 AND CISPLATIN ON THE GROWTH OF M27 LUNG CARCINOMA IN MICE**

Liquid nitrogen stored M27 murine lung carcinoma cells (1×10^6 /ml x 1 ml) were recovered by rapidly thawing the cells at 37°C and cultured with 25 ml of DMEM culture 25 medium containing 10% fetal calf serum (FCS) at 37°C , 5% CO_2 . After passing the cells for two generations, M27 cells in log phase (about 90-95% saturation) were removed by trypsinization, washed with 1 x PBS, and reconstituted to 2.5×10^6 cells/ml with 1 x PBS for tumor implantation. An M27 cell suspension (0.2 ml) was implanted into 36 C57BL/6 mice (female, aged 8 weeks, 20 g; 5×10^3 cells/mouse) subcutaneously at the right flank on day 0. 30 The mice were randomly divided into groups with each group consisting of 9 mice.

Salmonella strains VNP20009 was diluted to 5×10^6 CFU/ml with 1 x PBS with our standard dilution procedures. Each mouse was administered via the tail vein 0.2 ml of *Salmonella* (1×10^6 CFU/mouse) on day 12 according to Table 8, *infra*. In order to determine the actual number of injected bacteria, the 5×10^6 CFU/ml bacterial suspensions 35 were further diluted to 1×10^3 CFU/ml and plated on MsBb plates. The colonies formed were counted the next day.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

The cisplatin was administered to mice on day 14, two days post bacterial injection (Table 8, *infra*). The cisplatin was diluted to 0.5 mg/ml with normal saline prior to administration. The tumor volume was measured twice a week until the end of the experiment. The behavior, appearance and mortality of the animals was observed daily. The mice were kept in a clean, temperature constant laboratory. The bedding was changed twice a week and the mice were provided with enough food and drinking water.

Table 8

Group	Number of Mice
Control (no treatment)	9
VNP20009, 1×10^8 /mouse i.v., on day 12	9
5 mpk cisplatin, i.p. qw x 2, on day 14, 19	9
VNP20009, 1×10^8 /mouse i.v., on day 12 + 5 mpk cisplatin, i.p. qw x 2, on day 14, 19, 33	9

As shown in FIG. 41, the combination treatment with VNP20009 + cisplatin inhibited the growth of the M27 lung carcinoma more than VNP20009 treatment alone or cisplatin treatment alone. These results suggest that the administration of attenuated tumor-targeted bacteria in combination with chemotherapeutic agent such as cisplatin may act synergistically or additively to inhibit the growth of solid tumors such as lung carcinoma.

The present invention is not to be limited in scope by the specific embodiments described herein. Indeed, various modifications of the invention in addition to those described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and accompanying figures. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

Various publications are cited herein, the disclosures of which are incorporated by reference in their entireties.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe.
5
2. An attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe.
10
3. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 1 or 2, wherein at least one of the primary effector molecules is a TNF family member.
4. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 3, wherein the TNF family member is tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor necrosis factor- α (TNF- α), TNF- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TNF- α -related activation-induced cytokine (TRANCE), TNF- α -related weak inducer of apoptosis (TWEAK), CD40 ligand (CD40L), LT- α , LT- β , OX40L, CD40L, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, APRIL, LIGHT, TL1, TNFSF16, TNFSF17, or AITR-L.
15
20
5. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 1 or 2, wherein at least one of the primary effector molecules is an anti-angiogenic factor.
6. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 5, wherein the anti-angiogenic factor is endostatin, angiostatin, anti-angiogenic antithrombin III, the 29 kDa N-terminal and a 40 kDa C-terminal proteolytic fragments of fibronectin, a uPA receptor antagonist, the 16 kDa proteolytic fragment of prolactin, the 7.8 kDa proteolytic fragment of platelet factor-4, the anti-angiogenic 24 amino acid fragment of platelet factor-4, the anti-angiogenic factor designated 13.40, the anti-angiogenic 22 amino acid peptide fragment of thrombospondin I, the anti-angiogenic 20 amino acid peptide fragment of SPARC, RGD and NGR containing peptides, the small anti-angiogenic peptides of laminin, fibronectin, procollagen and EGF, and peptide antagonists of integrin $\alpha_v\beta_3$, or VEGF receptor.
25
30
7. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 1 or 2, wherein at least one of the primary effector molecules is a bacteriocin family member with the proviso said bacteriocin is not BRP.
35

WO 01/25397

PCT/US00/23242

8. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 7, wherein the bacteriocin family member is ColE1, ColE1a, ColE1b, ColE2, ColE3, ColE4, ColE5, ColE6, ColE7, ColE8, ColE9, Colicin A, Colicin K, Colicin L, Colicin M, cloacin DF13, pesticin A1122, staphylococcin 1580, butyricin 7423, pyocin R1 or AP41, megacin A-216, vibriocin, or microcin M15.
- 5 9. The attenuated tumor targeted bacteria of claim 1 or 2, wherein the primary effector molecule is a tumor inhibitory enzyme.
- 10 10. The attenuated tumor targeted bacteria of claim 9, wherein the tumor inhibitory enzyme is methionase, asparaginase, lipase, phospholipase, protease, DNAase or glycosidase.
11. The attenuated tumor targeted bacteria of claim 1 or 2, wherein the primary effector molecule is hemolysin, verotoxin, CNF1, CNF2, or PMT.
- 15 12. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 1 or 2, wherein the primary effector molecule is derived from an animal, plant, bacteria, or virus.
13. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 2, wherein the secondary effector molecule is an immunomodulating agent, an anti-tumor protein, a pro-drug converting enzyme, an antisense molecule, a ribozyme, or an antigen.
- 20 14. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 1 or 2, wherein the attenuated tumor-targeted bacteria is *Salmonella*.
- 25 15. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 1, wherein the attenuated tumor-targeted bacteria further comprises an enhanced release system.
16. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 2, wherein the secondary effector molecule is a bacteriocin release factor (BRP).
- 30 17. An attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe and said fusion protein comprises a signal sequence and an effector molecule.
- 35 18. An attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins operably linked to one or more promoters,

WO 01/25397

PCT/US00/23242

wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe and said fusion protein comprises a ferry peptide and an effector molecule.

19. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 18, wherein the fusion protein further comprises a signal sequence.
- 5 20. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 17 or 19, wherein the signal sequence is an OmpA-like protein.
21. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 18 or 19, wherein the ferry peptide is derived from the HIV TAT protein, the antennapedia homeodomain (penetraxin), 10 Kaposi fibroblast growth factor (FGF) membrane-translocating sequence (MTS), herpes simplex virus VP22, hexahistidine, hexalysine, or hexaarginine.
22. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 17, 18 or 19, wherein the 15 effector molecule is a primary or secondary effector molecule.
23. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 17, 18 or 19, wherein the attenuated tumor-targeted bacteria further comprises one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules operably linked to one or more promoters.
- 20 24. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 23, wherein the effector molecule is a primary or secondary effector molecule.
25. A pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier 25 and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe.
26. A pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier 30 and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe.
- 35 27. The pharmaceutical composition of claim 25 or 26, wherein at least one of the primary effector molecules is a TNF family member.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

28. The pharmaceutical composition of claim 27, wherein the TNF family member is tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor necrosis factor- α (TNF- α), TNF- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TNF- α -related activation-induced cytokine (TRANCE), TNF- α -related weak inducer of apoptosis (TWEAK), CD40 ligand (CD40L), LT- α , LT- β , OX40L, CD40L, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, APRIL, LIGHT, TL1, TNFSF16, TNFSF17, or AITR-L.
29. The pharmaceutical composition of claim 25 or 26, wherein at least one of the primary effector molecules is an anti-angiogenic factor.
30. The pharmaceutical composition of claim 29, wherein the anti-angiogenic factor is endostatin, angiostatin, anti-angiogenic antithrombin III, the 29 kDa N-terminal and a 40 kDa C-terminal proteolytic fragments of fibronectin, a uPA receptor antagonist, the 16 kDa proteolytic fragment of prolactin, the 7.8 kDa proteolytic fragment of platelet factor-4, the anti-angiogenic 24 amino acid fragment of platelet factor-4, the anti-angiogenic factor designated 13.40, the anti-angiogenic 22 amino acid peptide fragment of Thrombospondin I, the anti-angiogenic 20 amino acid peptide fragment of SPARC, RGD and NGR containing peptides, the small anti-angiogenic peptides of laminin, fibronectin, procollagen and EGF, and peptide antagonists of integrin $\alpha_v\beta_3$, or VEGF receptor.
31. The pharmaceutical composition of claim 25 or 26, wherein at least one of the primary effector molecules is a bacteriocin family member with the proviso said bacteriocin is not BRP.
32. The pharmaceutical composition of claim 31, wherein the bacteriocin family member is ColE1, ColE1a, ColE1b, ColE2, ColE3, ColE4, ColE5, ColE6, ColE7, ColE8, ColE9, Colicin A, Colicin K, Colicin L, Colicin M, cloacin DF13, pesticin A1122, staphylococcin 1580, butyricin 7423, pyocin R1 or AP41, megacin A-216, vibriocin or microcin M15.
33. The pharmaceutical composition of claim 25 or 26, wherein at least one of the primary effector molecule is a tumor inhibitory enzyme.
34. The pharmaceutical composition of claim 33, wherein the tumor inhibitory enzyme is methionase, asparaginase, lipase, phospholipase, protease, DNAase or glycosidase.
35. The pharmaceutical composition of claim 25 or 26, wherein at least one of the primary effector molecule is hemolysin, verotoxin, CNF1, CNF2, or PMT.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

36. The pharmaceutical composition of claim 25 or 26, wherein the primary effector molecule is derived from an animal, plant, bacteria, or virus.
37. The pharmaceutical composition of claim 26, wherein the secondary effector molecule is an immunomodulating agent, an anti-tumor protein, a pro-drug converting enzyme, an antisense molecule, a ribozyme, or an antigen.
38. The pharmaceutical composition of claim 25 or 26, wherein the attenuated tumor-targeted bacteria is *Salmonella*.
39. The pharmaceutical composition of claim 25, wherein the attenuated tumor-targeted bacteria further comprises an enhanced release system.
40. The pharmaceutical composition of claim 26, wherein the secondary effector molecule is a bacteriocin release factor.
41. A pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe and said fusion protein comprises a signal sequence and an effector molecule.
42. A pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe and said fusion protein comprises a ferry peptide and an effector molecule.
43. The pharmaceutical composition of claim 42, wherein the fusion protein further comprises a signal sequence.
44. The pharmaceutical composition of claim 41 or 43, wherein the signal sequence is an OmpA-like protein.
45. The pharmaceutical composition of claim 42 or 43, wherein the ferry peptide is derived from the HIV TAT protein, the antennapedia homeodomain (penetraxin), Kaposi fibroblast growth factor (FGF) membrane-translocating sequence (MTS), herpes simplex virus VP22, hexahistadine, hexalysine, or hexaarginine.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

46. The pharmaceutical composition of claim 41, 42 or 43, wherein the effector molecule is a primary or secondary effector molecule.

47. The pharmaceutical composition of claim 41, 42 or 43, wherein the attenuated tumor-targeted bacteria further comprises one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules operably linked to one or more promoters.

48. A method for delivering one or more primary effector molecules for the treatment of a solid tumor cancer to a subject in need of such treatment, comprising administering a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobic or facultative anaerobe.

49. A method for delivering one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules for the treatment of a solid tumor cancer to a subject in need of such treatment, comprising administering a pharmaceutical composition a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobic or facultative anaerobe.

50. The method of claim 48 or 49, wherein at least one of the primary effector molecules is a TNF family member.

51. The method of claim 50, wherein the TNF family member is tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor necrosis factor- α (TNF- α), TNF- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TNF- α -related activation-induced cytokine (TRANCE), TNF- α -related weak inducer of apoptosis (TWEAK), CD40 ligand (CD40L), LT- α , LT- β , OX40L, CD40L, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, APRIL, LIGHT, TL1, TNFSF16, TNFSF17, or AITR-L.

52. The method of claim 48 or 49, wherein at least one of the primary effector molecules is an anti-angiogenic factor.

53. The method of claim 52, wherein the anti-angiogenic factor is endostatin, angiotensin, anti-angiogenic antithrombin III, the 29 kDa N-terminal and a 40 kDa C-terminal proteolytic fragments of fibronectin, a uPA receptor antagonist, the 16 kDa proteolytic fragment of prolactin, the 7.8 kDa proteolytic fragment of platelet factor-4, the anti-

WO 01/25397

PCT/US00/23242

angiogenic 24 amino acid fragment of platelet factor-4, the anti-angiogenic factor designated 13.40, the anti-angiogenic 22 amino acid peptide fragment of thrombospondin I, the anti-angiogenic 20 amino acid peptide fragment of SPARC, RGD and NGR containing peptides, the small anti-angiogenic peptides of laminin, fibronectin, procollagen and EGF, and peptide antagonists of integrin $\alpha_v\beta_3$, or VEGF receptor.

5 54. The method of claim 48 or 49, wherein at least one of the primary effector molecules is bacteriocin family member with the proviso said bacteriocin is not BRP.

10 55. The method of claim 54, wherein the bacteriocin family member is ColE1, ColE1a, ColE1b ColE2, ColE3, ColE4, ColE5, ColE6, ColE7, ColE8, ColE9, Colicin A, Colicin K, Colicin L, Colicin M, cloacin DF13, pesticin A1122, staphylococcin 1580, butyricin 7423, pyocin R1 or AP41, megacin A-216, vibriocin or microcin M15.

15 56. The method of claim 48 or 49, wherein at least one of the primary effector molecules is a tumor inhibitory enzyme.

57. The method of claim 56, wherein the tumor inhibitory enzyme is methionase, asparaginase, lipase, phospholipase, protease, DNAase or glycosidase.

20 58. The method of claim 48 or 49, wherein at least one of the primary effector molecules is hemolysin, verotoxin, CNF1, CNF2 or PMT.

59. The method of claim 48 or 49, wherein at least one of the primary effector molecules are derived from an animal, plant, bacteria, or virus.

25 60. The method of claim 49, wherein at least one of the secondary effector molecule is an anti-tumor protein, a pro-drug converting enzyme, an antisense molecule, a ribozyme, or an antigen.

30 61. The method of claim 48 or 49, wherein the attenuated tumor-targeted bacteria is *Salmonella*.

62. The method of claim 48, wherein the attenuated tumor-targeted bacteria further comprises an enhanced release system.

35 63. The method of claim 49, wherein the secondary effector molecule is a bacteriocin release factor.

WO 01/25397

PCT/US00/23242

64. A method for delivering one or more fusion proteins for the treatment of a solid tumor cancer to a subject in need of such treatment, comprising administering a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe and said fusion proteins comprise a signal sequence and an effector molecule.
65. A method for delivering one or more fusion proteins for the treatment of a solid tumor cancer to a subject in need of such treatment, comprising administering a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe and said fusion proteins comprise a ferry peptide and an effector molecule.
66. The method of claim 65, wherein the fusion protein further comprises a signal sequence.
67. The method of claim 64 or 66, wherein the signal sequence is an OmpA-like protein.
68. The method of claim 65 or 66, wherein the ferry peptide is derived from the HIV TAT protein, the antennapedia homeodomain (penetraxin), Kaposi fibroblast growth factor (FGF) membrane-translocating sequence (MTS), herpes simplex virus VP22, hexahistidine, hexalysine, or hexaarginine.
69. The method of claim 64, 65 or 66, wherein the effector molecule is a primary or secondary effector molecule.
70. The method of claim 64, 65 or 66, wherein the attenuated tumor-targeted bacteria further comprises one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules operably linked to one or more promoters.
71. A method of treating a solid tumor cancer in an animal, comprising administering one or more chemotherapeutic agents and a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector

WO 01/25397

PCT/US00/23242

molecules operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe.

72. A method of treating a solid tumor cancer in an animal, comprising administering one or more chemotherapeutic agents and a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecule operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe.

73. The method of claim 71 or 72, wherein at least one of the primary effector molecules is a TNF family member.

74. The method of claim 73, wherein the TNF family member is tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor necrosis factor- α (TNF- α), TNF- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TNF- α -related activation-induced cytokine (TRANCE), TNF- α -related weak inducer of apoptosis (TWEAK), CD40 ligand (CD40L), LT- α , LT- β , OX40L, CD40L, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, APRIL, LIGHT, TL1, TNFSF16, TNFSF17, or AITR-L.

75. The method of claim 71 or 72, wherein at least one of the primary effector molecules is an anti-angiogenic factor.

76. The method of claim 75, wherein the anti-angiogenic factor is endostatin, angiostatin, anti-angiogenic antithrombin III, the 29 kDa N-terminal and a 40 kDa C-terminal proteolytic fragments of fibronectin, a uPA receptor antagonist, the 16 kDa proteolytic fragment of prolactin, the 7.8 kDa proteolytic fragment of platelet factor-4, the anti-angiogenic 24 amino acid fragment of platelet factor-4, the anti-angiogenic factor designated 13.40, the anti-angiogenic 22 amino acid peptide fragment of thrombospondin 1, the anti-angiogenic 20 amino acid peptide fragment of SPARC, RGD and NGR containing peptides, the small anti-angiogenic peptides of laminin, fibronectin, procollagen and EGF, and peptide antagonists of integrin $\alpha_v\beta_3$, or VEGF receptor.

77. The method of claim 71 or 72, wherein at least one of the primary effector molecules is a bacteriocin family member with the proviso said bacteriocin is not BRP.

78. The method of claim 77, wherein the bacteriocin family member is ColE1, ColE1a, ColE1b, ColE2, ColE3, ColE4, ColE5, ColE6, ColE7, ColE8, ColE9, Colicin A,

WO 01/25397

PCT/US00/23242

Colicin K, Colicin L, Colicin M, cloacin DF13, pesticin A1122, staphylococin 1580, butyricin 7423, pyocin R1 or AP41, megacin A-216, vibriocin, or microcin M15.

79. The method of claim 71 or 72, wherein at least one of the primary effector molecule is a tumor inhibitory enzyme.
- 5 80. The method of claim 79, wherein the tumor inhibitory enzyme is methionase, asparaginase, lipase, phospholipase, protease, DNAase or glycosidase.
81. The method of claim 71 or 72, wherein at least one of the primary effector molecule is hemolysin, verotoxin, CNF1, CNF2, or PMT.
- 10 82. The method of claim 71 or 72, wherein the primary effector molecule is derived from an animal, plant, bacteria, or virus.
- 15 83. The method of claim 82, wherein the secondary effector molecule is an immunomodulating agent, an anti-tumor protein, a pro-drug converting enzyme, an antisense molecule, a ribozyme, or an antigen.
84. The method of claim 71 or 72, wherein the attenuated tumor-targeted bacteria is *Salmonella*.
- 20 85. The method of claim 71, wherein the attenuated tumor-targeted bacteria further comprises an enhanced release system.
- 25 86. The method of claim 72, wherein the secondary effector molecule is a bacteriocin release factor.
87. A method of treating a solid tumor cancer in an animal, comprising administering one or more chemotherapeutic agents and a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe and said fusion protein comprises a signal sequence and an effector molecule.
- 30 88. A method of treating a solid tumor cancer in an animal, comprising administering one or more chemotherapeutic agents and a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria
- 35

WO 01/25397

PCT/US00/23242

comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe and said fusion protein comprises a ferry peptide and an effector molecule.

5 89. The method of claim 88, wherein said fusion protein further comprises a signal sequence.

90. The method of claim 87 or 89, wherein the signal sequence is an OmpA-like protein.

10 91. The method of claim 88 or 89, wherein the ferry peptide is derived from the HIV TAT protein, the antennapedia homeodomain (penetraxin), Kaposi fibroblast growth factor (FGF) membrane-translocating sequence (MTS), herpes simplex virus VP22, hexahistidine, hexalysine, or hexaarginine.

15 92. The method of claim 87, 88 or 89, wherein the effector molecule is a primary or secondary effector molecule.

20 93. The method of claim 87, 88 or 89, wherein the attenuated tumor-targeted bacteria further comprises one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules operably linked to one or more promoters.

25 94. A method of treating a solid tumor cancer in an animal, comprising administering one or more chemotherapeutic agents and a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria.

95. A fusion protein comprising an OmpA-like protein and an effector molecule.

30 96. A fusion protein comprising a signal sequence, a ferry peptide and an effector molecule.

97. The fusion protein of claim 96, wherein the signal sequence is an OmpA-like protein.

35 98. The fusion protein of claim 96, wherein the ferry peptide is derived from the HIV TAT protein, the antennapedia homeodomain (penetraxin), Kaposi fibroblast growth factor (FGF) membrane-translocating sequence (MTS), herpes simplex virus VP22,

WO 01/25397

PCT/US00/23242

hexahistadine, hexalysine, or hexaarginine.

99. The fusion protein of claim 95 or 96, wherein the effector molecule is a primary or secondary effector molecule.

5

10

15

20

25

30

35

WO 01/25397

PCT/US00/23242

1/42

ATG GTA CGT AGC TCC TCT CGC ACT CCG TCC GAT AAG CCG GTT GCT
M V R S S S R T P S D K P V A

CAT GTA GTT GCT AAC CCT CAG GCA GAA GGT CAG CTG CAG TGG CTG
H V V A N P Q A E G Q L Q W L

AAC CGT CGC GCT AAC GCC CTG CTG GCA AAC GGC GTT GAG CTC CGT
N R R A N A L L A N G V E L R

GAT AAC CAG CTC GTG GTA CCT TCT GAA GGT CTG TAC CTG ATC TAT
D N Q L V V P S E G L Y L I Y

TCT CAA GTA CTG TTC AAG GGT CAG GGC TGC CCG TCG ACT CAT GTT
S Q V L F K G Q G C P S T H V

CTG CTG ACT CAC ACC ATC AGC CGT ATT GCT GTA TCT TAC CAG ACC
L L T H T I S R I A V S Y Q T

AAA GTT AAC CTG CTG AGC GCT ATC AAG TCT CCG TGC CAG CGT GAA
K V N L L S A I K S P C Q R E

ACT CCC GAG GGT GCA GAA GCG AAA CCA TGG TAT GAA CCG ATC TAC
T P E G A E A K P W Y E P I Y

CTG GGT GGC GTA TTT CAA CTG GAG AAA GGT GAC CGT CTG TCC GCA
L G G V F Q L E K G D R L S A

GAA ATC AAC CGT CCT GAC TAT CTA GAT TTC GCT GAA TCT GGC CAG
E I N R P D Y L D F A E S G Q

GTG TAC TTC GGT ATT ATC GCA CTG TAA
V Y F G I I A L *

FIG.1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/25397

PCT/US00/23242

2/42

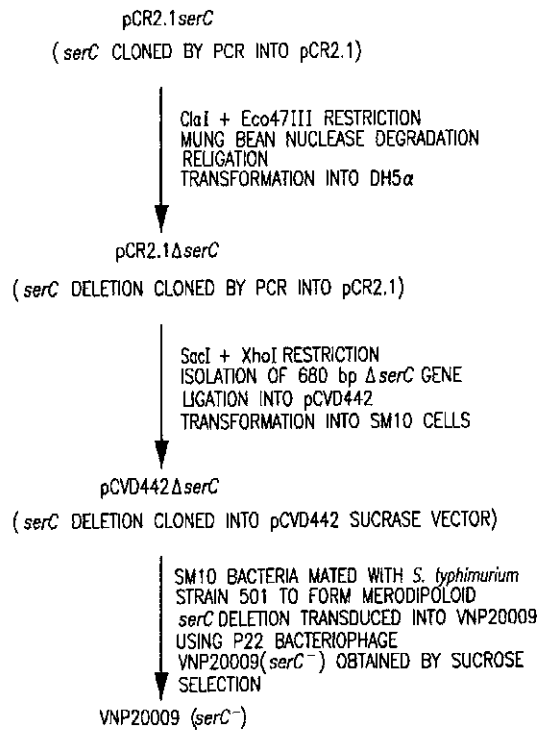
DERIVATION OF THE VNP20009(*serC*⁻) STRAIN.

FIG.2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Quantitation of TNF α expression by pTS-BrpTNF α Clone 2.

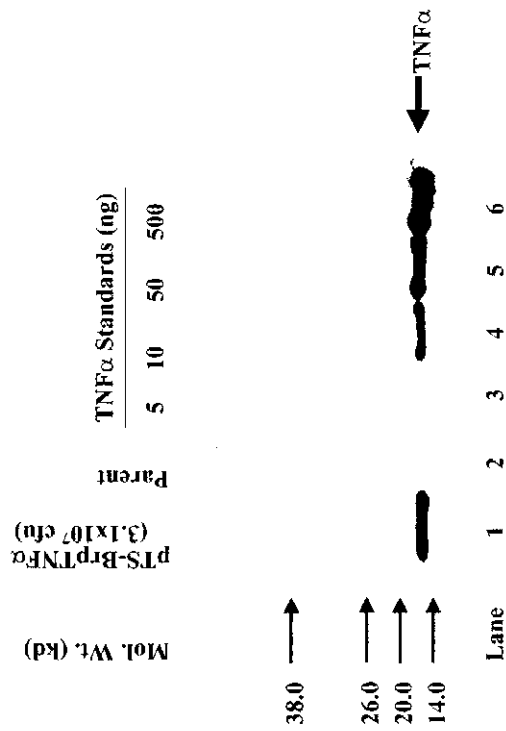


FIG.3

WO 01/25397

PCT/US00/23242

4/42

ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC
 M K K T A I A I A V A L A G F

 GCT ACC GTA GCG CAG GCC CAT ATG GTA CGT AGC TCC TCT CGC ACT
 A T V A Q A H M V R S S S R T

 CCG TCC GAT AAG CCG GTT GCT CAT GTA GTT GCT AAC CCT CAG GCA
 P S D K P V A H V V A N P Q A

 GAA GGT CAG CTG CAG TGG CTG AAC CGT CGC GCT AAC GCC CTG CTG
 E G Q L Q W L N R R A N A L L

 GCA AAC GGC GTT GAG CTC CGT GAT AAC CAG CTC GTG GTA CCT TCT
 A N G V E L R D N Q L V V P S

 GAA GGT CTG TAC CTG ATC TAT TCT CAA GTA CTG TTC AAG GGT CAG
 E G L Y L I Y S Q V L F K G Q

 GGC TGC CCG TCG ACT CAT GTT CTG CTG ACT CAC ACC ATC AGC CGT
 G C P S T H V L L T H T I S R

 ATT GCT GTA TCT TAC CAG ACC AAA GTT AAC CTG CTG AGC GCT ATC
 I A V S Y Q T K V N L L S A I

 AAG TCT CCG TGC CAG CGT GAA ACT CCC GAG GGT GCA GAA GCG AAA
 K S P C Q R E T P E G A E A K

 CCA TGG TAT GAA CCG ATC TAC CTG GGT GGC GTA TTT CAA CTG GAG
 P W Y E P I Y L G G V F Q L E

 AAA GGT GAC CGT CTG TCC GCA GAA ATC AAC CGT CCT GAC TAT CTA
 K G D R L S A E I N R P D Y L

 GAT TTC GCT GAA TCT GGC CAG GTG TAC TTC GGT ATT ATC GCA CTG
 D F A E S G Q V Y F G I I A L

TAA

*

FIG.4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Expression and processing of a *trc* promoter-driven *ompA*-TRAIL fusion gene product in JM109 bacteria.

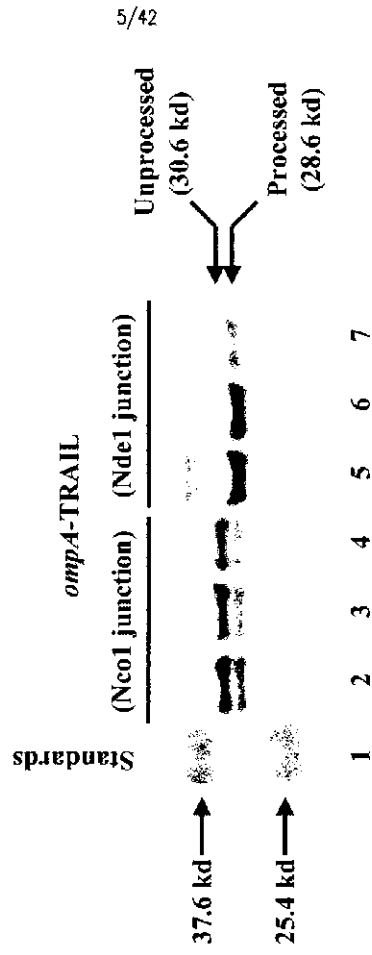


FIG.5

WO 01/25397

PCT/US00/23242

6/42

ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC
 M K K T A I A I A V A L A G F
 GCT ACC GTA GCG CAG GCC CAT ATG GCT AAC GAG CTG AAG CAG ATG
 A T V A Q A H M A N E L K Q M
 CAG GAC AAG TAC TCC AAA AGT GGC ATT GCT TGT TTC TTA AAA GAA
 Q D K Y S K S G I A C F L K E
 GAT GAC AGT TAT TGG GAC CCC AAT GAC GAA GAG AGT ATG AAC AGC
 D D S Y W D P N D E E S M N S
 CCC TGC TGG CAA GTC AAG TGG CAA CTC CGT CAG CTC GTT AGA AAG
 P C W Q V K W Q L R Q L V R K
 ATG ATT TTG AGA ACC TCT GAG GAA ACC ATT TCT ACA GTT CAA GAA
 M I L R T S E E T I S T V Q E
 AAG CAA CAA AAT ATT TCT CCC CTA GTG AGA GAA AGA GGT CCT CAG
 K Q Q N I S P L V R E R G P Q
 AGA GTA GCA GCT CAC ATA ACT GGG ACC AGA GGA AGA AGC AAC ACA
 R V A A H I T G T R G R S N T
 TTG TCT TCT CCA AAC TCC AAG AAT GAA AAG GCT CTG GGC CGC AAA
 L S S P N S K N E K A L G R K
 ATA AAC TCC TGG GAA TCA TCA AGG AGT GGG CAT TCA TTC CTG AGC
 I N S W E S S R S G H S F L S
 AAC TTG CAC TTG AGG AAT GGT GAA CTG GTC ATC CAT GAA AAA GGG
 N L H L R N G E L V I H E K G
 TTT TAC TAC ATC TAT TCC CAA ACA TAC TTT CGA TTT CAG GAG GAA
 F Y Y I Y S Q T Y F R F Q E E
 ATA AAA GAA AAC ACA AAG AAC GAC AAA CAA ATG GTC CAA TAT ATT
 I K E N T K N D K Q M V Q Y I
 TAC AAA TAC ACA AGT TAT CCT GAC CCT ATA TTG TTG ATG AAA AGT
 Y K Y T S Y P D P I L L M K S
 GCT AGA AAT AGT TGT TGG TCT AAA GAT GCA GAA TAT GGA CTC TAT
 A R N S C W S K D A E Y G L Y
 TCC ATC TAT CAA GGG GGA ATA TTT GAG CTT AAG GAA AAT GAC AGA
 S I Y Q G G I F E L K E N D R
 AIT TTT GTT TCT GTA ACA AAT GAG CAC TTG ATA GAC ATG GAC CAT
 I F V S V T N E H L I D M D H
 GAA GCC AGT TTT TTC GGG GCC TTT TTA GTT GGC TAA
 E A S F F G A F L V G *

FIG.6

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

ATG AAA AAG ACG GCT CTG GCG CTT CTG CTC TTG CTG TTA GCG CTG
 M K K T A L A L L L L L L A L

 ACT AGT GTA GCG CAG GCC GCT CCT ACT AGC TCG AGC ACT AAG AAA
 T S V A Q A A P T S S S T K K

 ACT CAA CTG CAA TTG GAG CAT CTG CTG CTG GAT CTG CAG ATG ATT
 T Q L Q L E H L L L D L Q M I

 CTG AAT GGC ATC AAT AAC TAC AAG AAC CCT AAG CTG ACT CGC ATG
 L N G I N N Y K N P K L T R M

 CTG ACT TTC AAA TTC TAC ATG CCG AAA AAG GCT ACC GAG CTC AAA
 L T F K F Y M P K K A T E L K

 CAT CTC CAG TGC CTG GAA GAG GAA CTG AAG CCG CTG GAG GAA GTA
 H L Q C L E E E L K P L E E V

 CTT AAC CTG GCA CAG TCT AAG AAC TTC CAC CTG CGT CCG CGT GAC
 L N L A Q S K N F H L R P R D

 CTG ATC TCC AAC ATC AAT GTA ATC GTT CTT GAG CTG AAG GGA TCC
 L I S N I N V I V L E L K G S

 GAA ACC ACC TTC ATG TGC GAA TAC GCT GAC GAA ACC GCC ACC ATT
 E T T F M C E Y A D E T A T I

 GTG GAG TTC CTG AAC CGT TGG ATC ACC TTT GCC CAA TCG ATC ATT
 V E F L N R W I T F A Q S I I

 AGC ACG TTA ACT TAA
 S T L T *

FIG.8

Periplasmic localization and processing of *ompA*-IL2 fusion proteins.

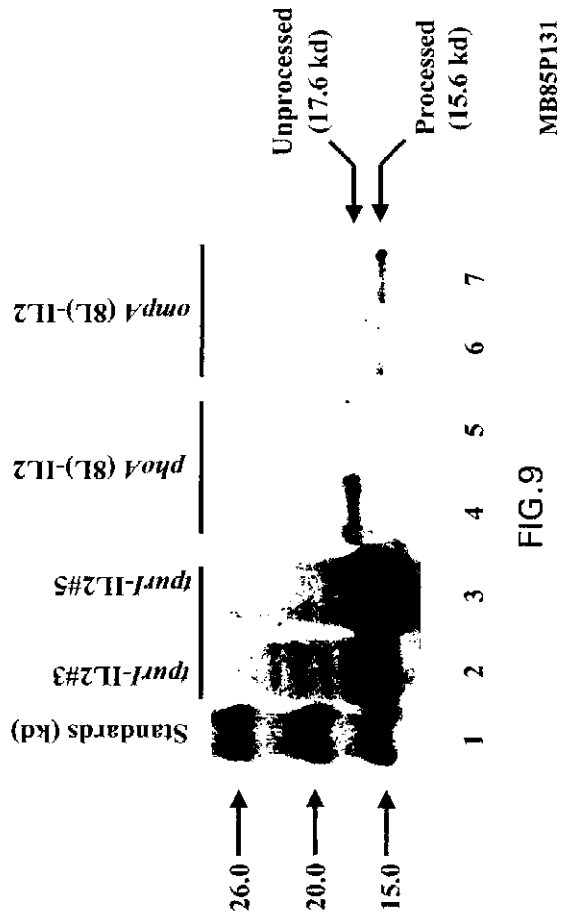


FIG.9

WO 01/25397

PCT/US00/23242

10/42

ATG AAA CAG TCG ACT CTG GCG CTT CTG CTC TTG CTG TTA GCG CTG
 M K Q S T L A L L L L L L L A L
 ACT AGT GTG GCC AAA GCG GCT CCT ACT AGC TCG AGC ACT AAG AAA
 T S V A K A A P T S S S T K K
 ACT CAA CTG CAA TTG GAG CAT CTG CTG CTG GAT CTG CAG ATG ATT
 T Q L Q L E H L L L D L Q M I
 CTG AAT GGC ATC AAT AAC TAC AAG AAC CCT AAG CTG ACT CGC ATG
 L N G I N N Y K N P K L T R M
 CTG ACT TTC AAA TTC TAC ATG CCG AAA AAG GCT ACC GAG CTC AAA
 L T F K F Y M P K K A T E L K
 CAT CTC CAG TGC CTG GAA GAG GAA CTG AAG CCG CTG GAG GAA GTA
 H L Q C L E E E L K P L E E V
 CTT AAC CTG GCA CAG TCT AAG AAC TTC CAC CTG CGT CCG CGT GAC
 L N L A Q S K N F H L R P R D
 CTG ATC TCC AAC ATC AAT GTA ATC GTT CTT GAG CTG AAG GGA TCC
 L I S N I N V I V L E L K G S
 GAA ACC ACC TTC ATG TGC GAA TAC GCT GAC GAA ACC GCC ACC ATT
 E T T F M C E Y A D E T A T I
 GTG GAG TTC CTG AAC CGT TGG ATC ACC TTT GCC CAA TCG ATC ATT
 V E F L N R W I T F A Q S I I
 AGC ACG TTA ACT TAA
 S T L T *

FIG.10

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

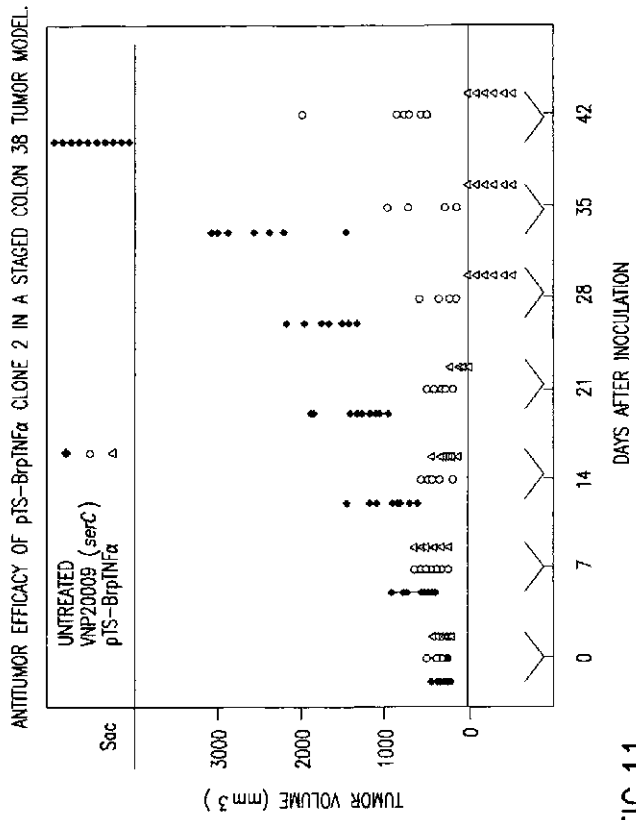


FIG.11

12/42

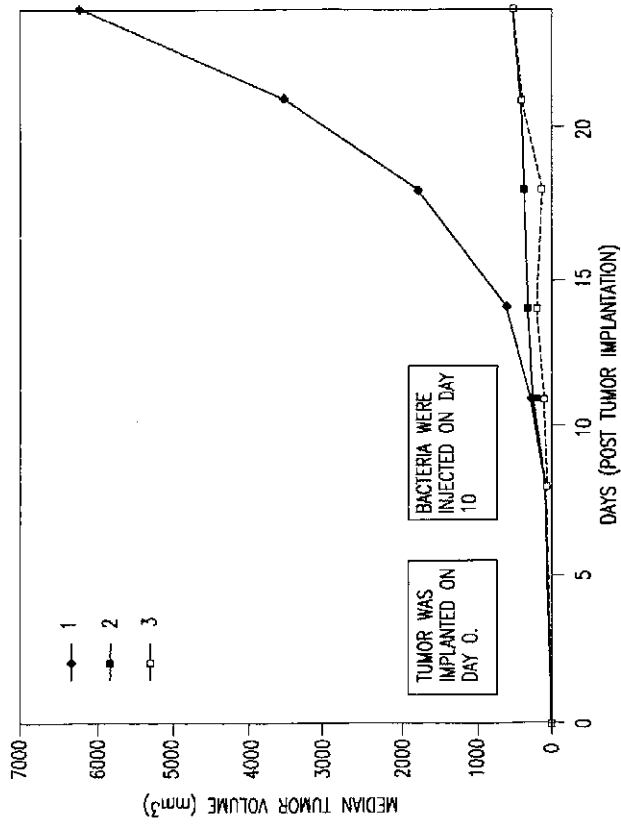


FIG.12

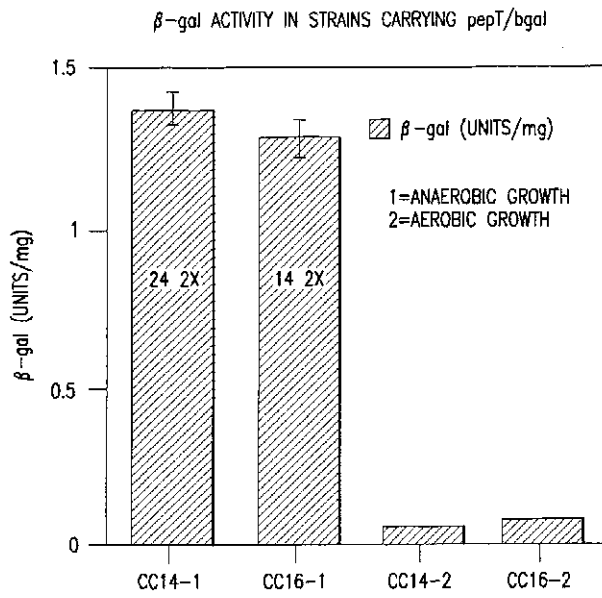


FIG.13A

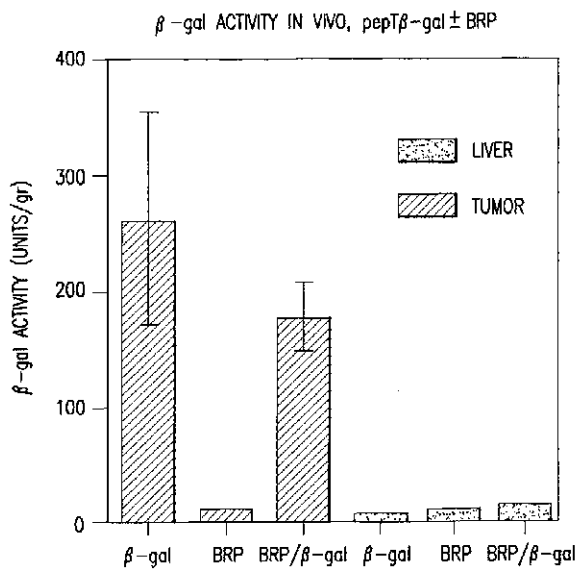


FIG.13B

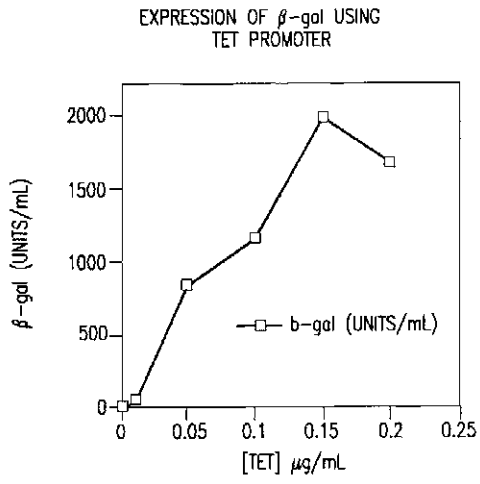


FIG.14

WO 01/25397

PCT/US00/23242

16/42

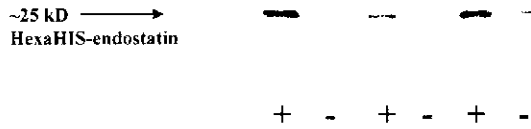


FIG.15A

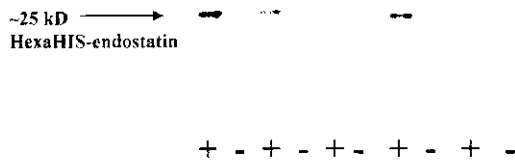


FIG.15B

WO 01/25397

PCT/US00/23242

17/42

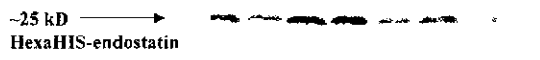


FIG. 16

WO 01/25397

PCT/US00/23242

18/42

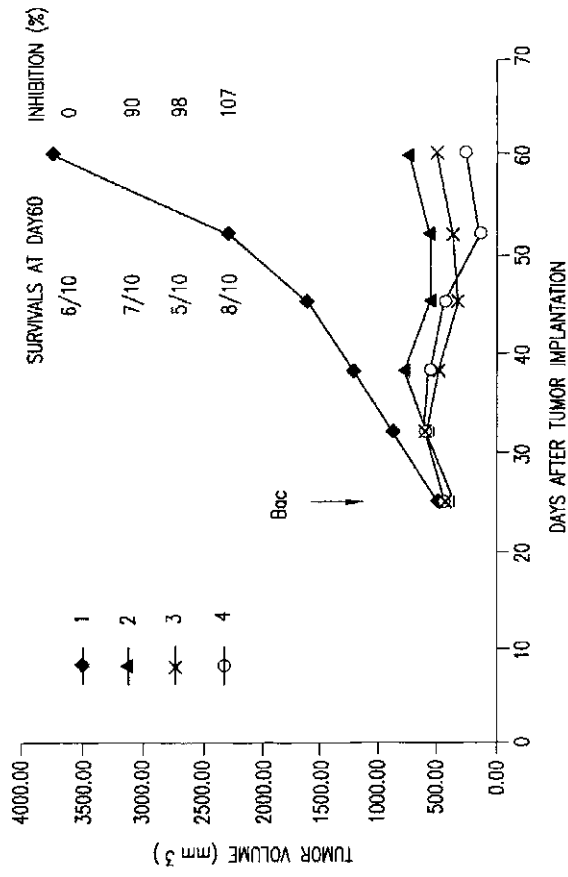


FIG.17

19/42

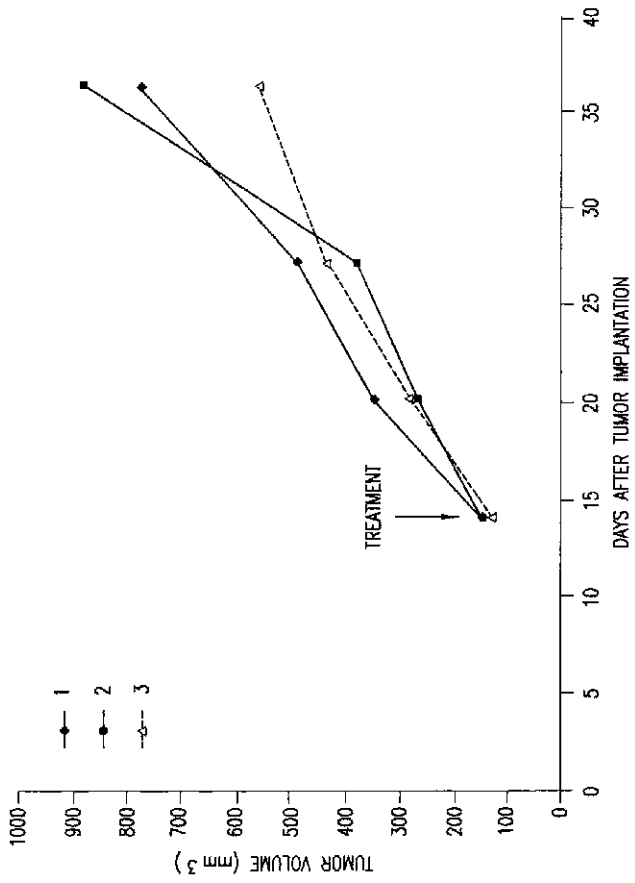


FIG.18

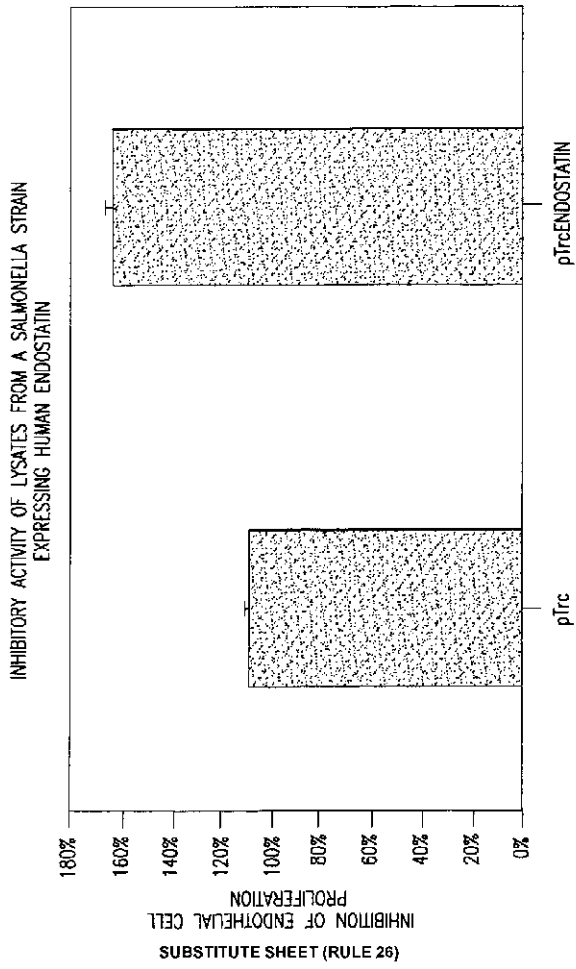


FIG.19

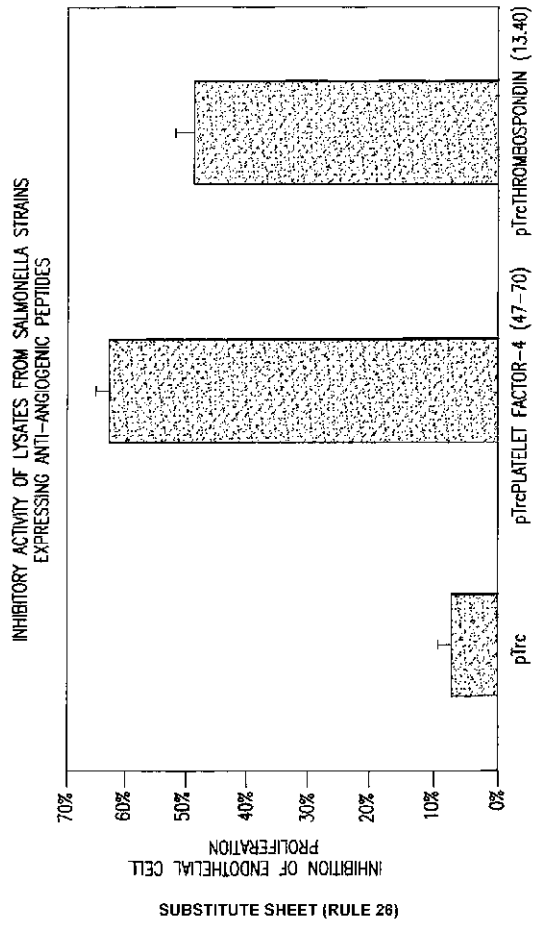


FIG.20

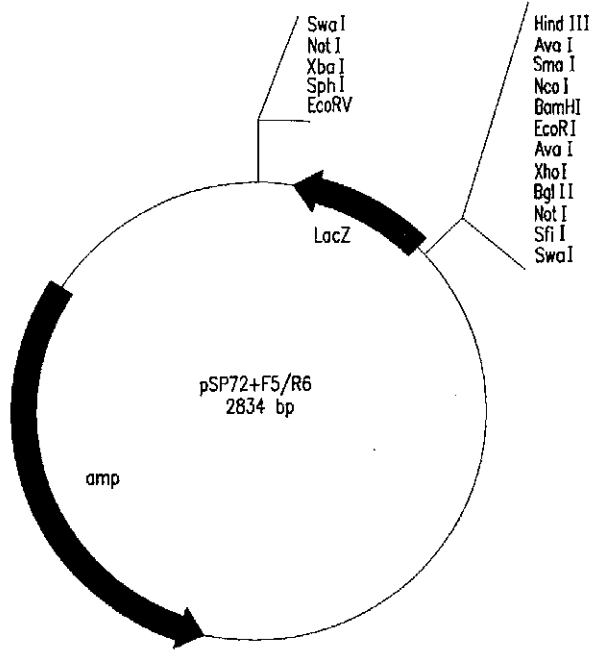


FIG.21

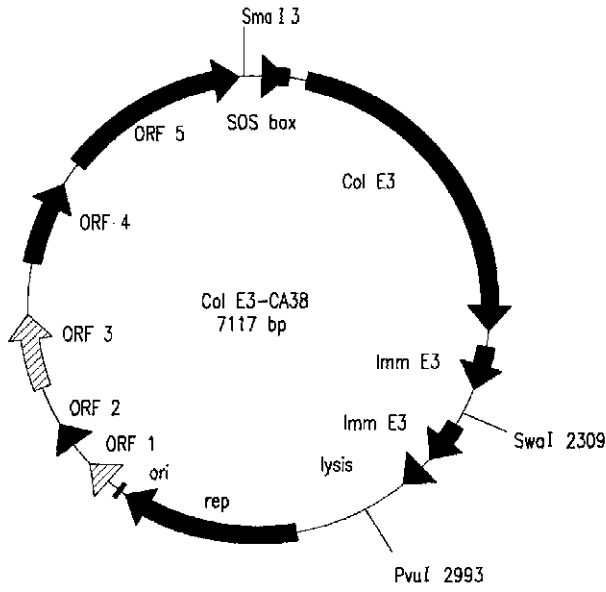


FIG.22

24/42

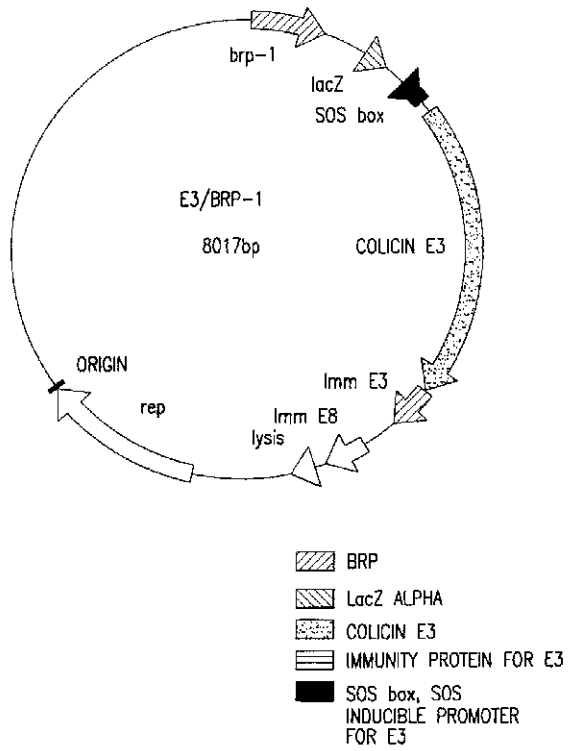


FIG.23

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

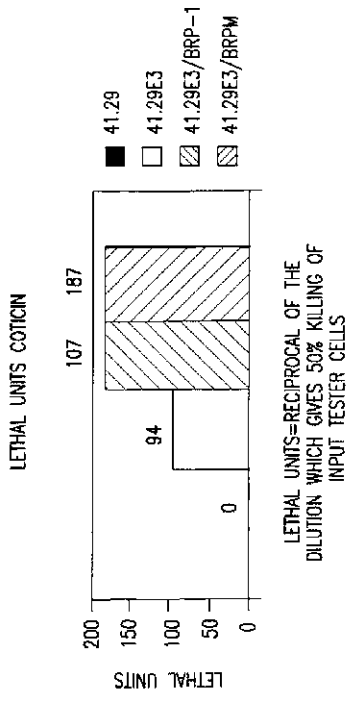


FIG.24

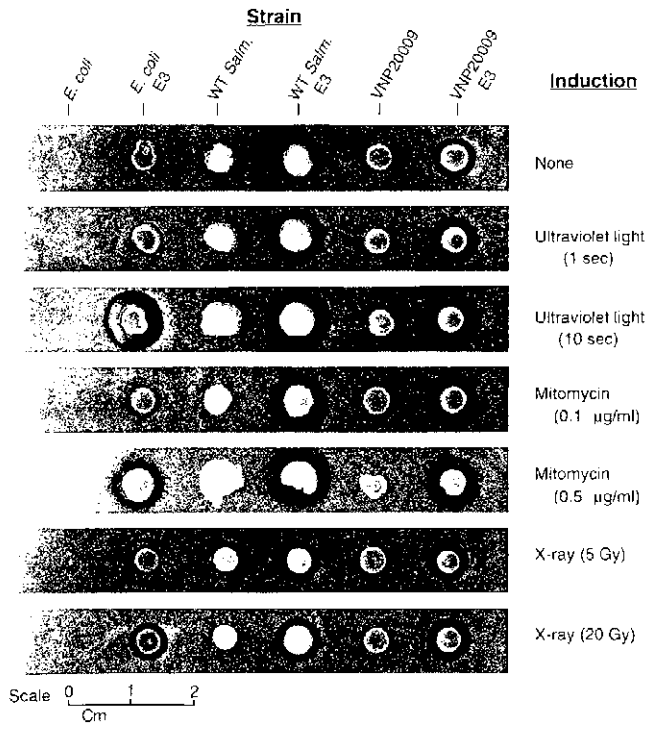


FIG.25

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

27/42

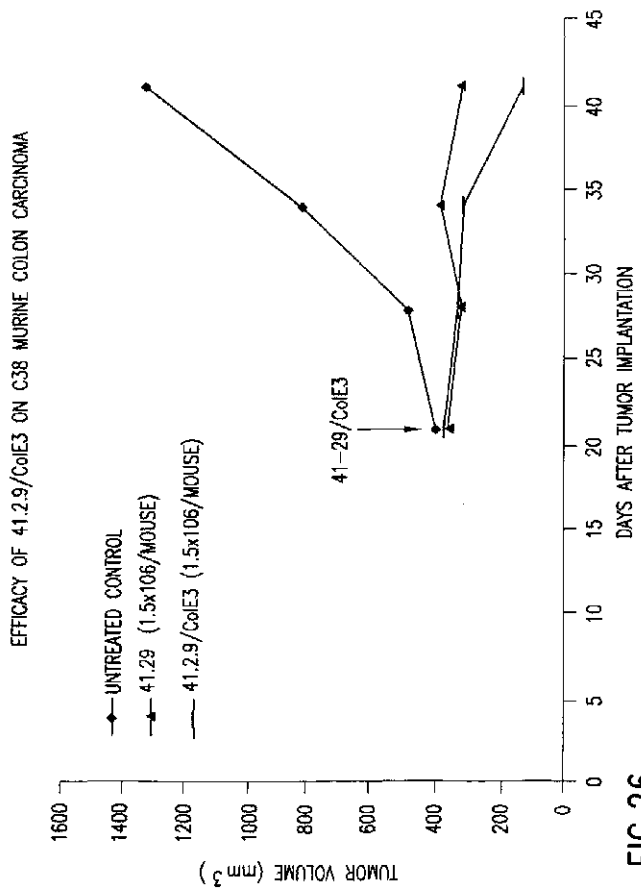
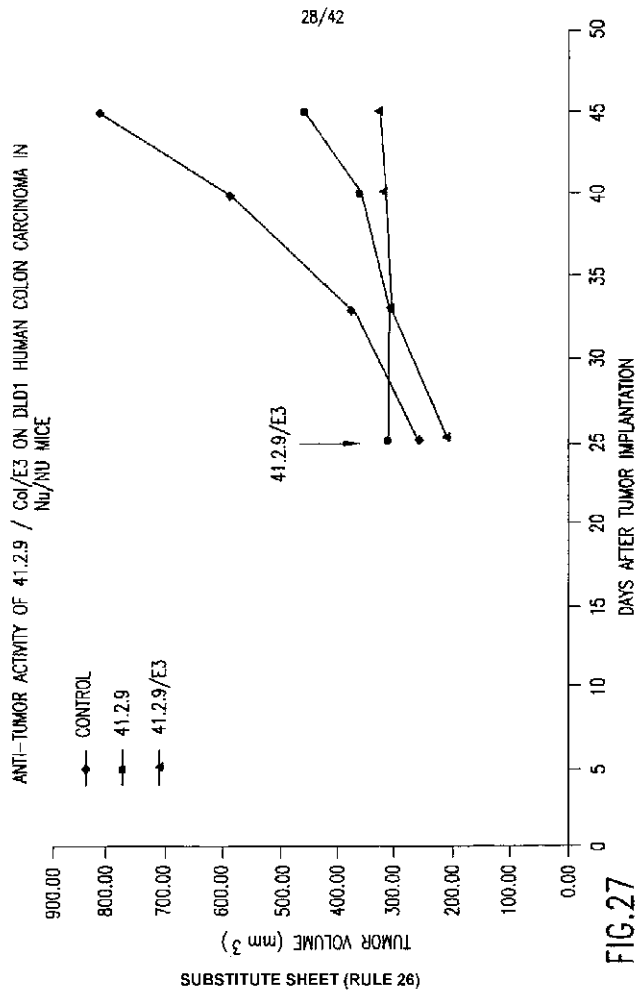
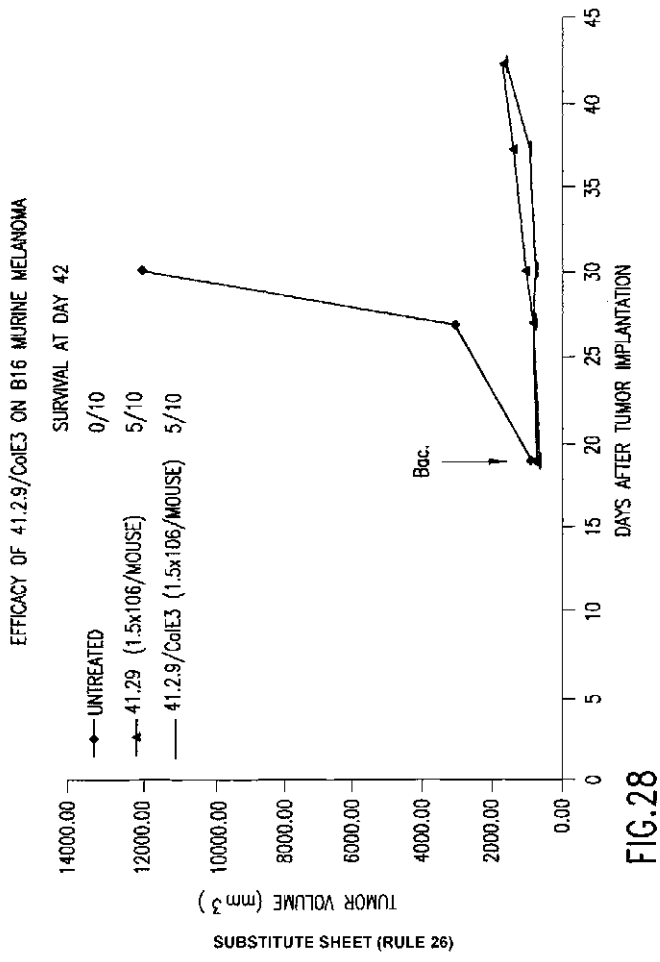


FIG.26

WO 01/25397

PC/T/US00/23242





WO 01/25397

PCT/US00/23242

30/42

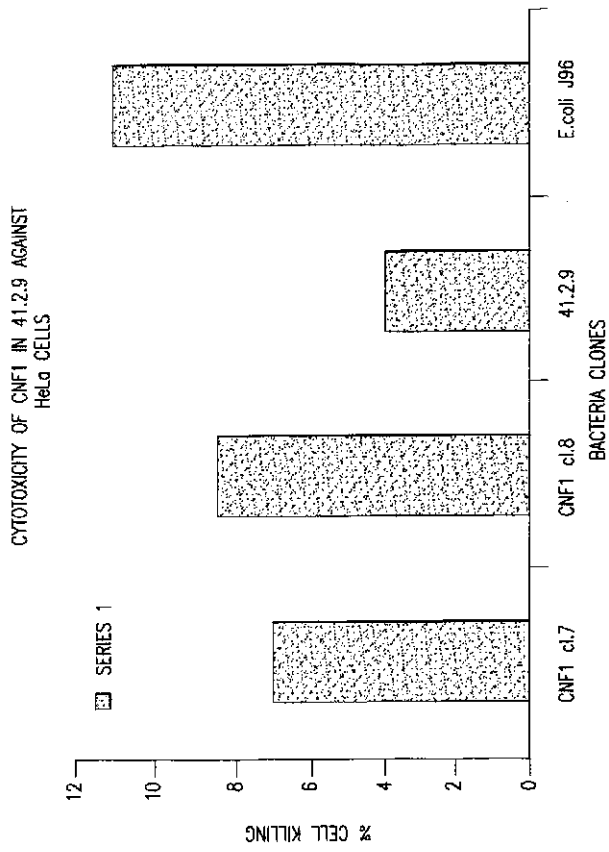
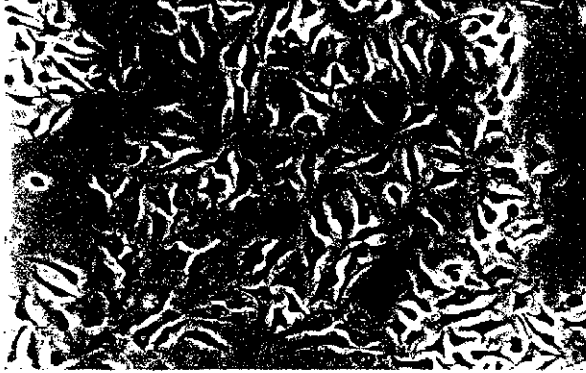


FIG.29

WO 01/25397

PCT/US00/23242

31/42



HeLa untreated (20x Obj.)

FIG.30A



HeLa CNF1 in DH5 cl.15 (20x Obj.)

FIG.30B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

GATATCATTG TGGCCTCTGA CGTTGTGATG GTGCGACGTG GCGATCTGGG CGTTGAAATC GGCATCCGG 70
AGCTGGTGG TATCCAGAAA GCGCTGATTG GCGGTGCGCG TCAGCTAAAC CGCGCAGTCA TCACCCCAAC 140
GCAAAATGATG GAGTCGATGA TCACCAACCC GATGCCGACC CGTGCGBAAG TGATGGACGT GGCBAACGCC 210
GTCCCTGGATG GCACGSGATG GBTATGCTG TCTGCCGAAA CGGCAGCCGG TCAGTATCCT TCTGAAACCG 280
TTGCCGCAAT GCGCGCGCTC TGCTTGGGCG CAGAAAAAAT CCCCAGCATC AATGTGTCTA AACACCGTCT 350
CGAAGTGCAG TTGACAAAGC TTGAAGAAGC CATTGCCATG TCTGGGATGT ATGCGGCAAA CCATCTGAAA 420
GGGTTACCG CGATCATCAC CATGACGGAA TCGGTCTGTA CCGCGTAAT GACTTCCCGT ATCAGCTCCG 490
GCTGGCCGAT YTTGCCCATG TGGGCCATG AACGCACGCT GAACCTGACC GCGCTCTATC GGGGASTAAC 560
GCGGGTGCAT TTTGATAGCG CCGCTGATGG CGTTGTCCCG GCACATGAAG CTGTTAATCT GCTGCCCGAT 630
AAAGGGTATC TGGTTTCCGG CGACCTGGTT ATCGTGACCC AGGGCGATGT CATGAGCACC GTCGGTTCAA 700
CCAATACCAC GCGGCCGCC CCTTAATTAA CCCCAGTCC GGGGGCCAT ATAGCCCGGG GATTTAAATG 770
CAAAAGTCCG CCGAAACGCC GACGCACTGT GTTCCAGATA TAGTCAAAAA CCGGATTACC CTGATTATGA 840
AACATGGCGG CCATTTTTTG CCGCTGAGAG GCCATCAGCA TGGCTGGAAT GTCGACGCC CAGCCATGCG 910
GTADGAGAAA AATGACTTTT TCGTCTTAC GACGCATCTC CTCGATAATC TCCAGACCTT CCGAGTCAAC 980
AGCTGTGTA ATTTTTTTGG GACCGCGCAT CGCCAACTCA GCCATCATCG CCATTGECTG TGGCGCGGTG 1050
GCGAATCTCT CATCGACAAT CGCTTCCGCG TCAGCTTGGG TACGCTGGGG AAAGCACAC GACAGATTAA 1120
TTAGCGCCCG GCGACGAGAA CTCTTCCCA GCGTCCGCG AAAACGCCCG AGGTCGCCA GCAAAGGTC 1190
GCGGAATGAT GCGGGTGTTA ATGCGATCCC CGCCATTGCC GCGCGGCCCA ACCAGGCGCC CCAATACTGT 1260
GGATAGCGAA AGGATTTTTT GAATCAGGG ATATACTCAC TATTATTTTT TTTGTTTTCC ATGCTTTTTCC 1330
AGGCTCTGCT GACCGAAAA GGAATTGTGA ATAGTGTAGC GACGTCTGGG TCTCACAGAA AACAAAAAAG 1400
CGGCACACA TCGCGTACCG GCTCTGTGAG CGCATTGTGT AATGGAAGCG CAGTTGGGG ASAACCTCTT 1470
TCACCTGTGC CAGGTATTCA CGACGATCG ACCCGTCAG ACCTTCCGTG CGGGCAAIT TTGCTGTGAG 1530
AGGGTTAACG GCTTGTGGT TGATC 1555

FIG.31

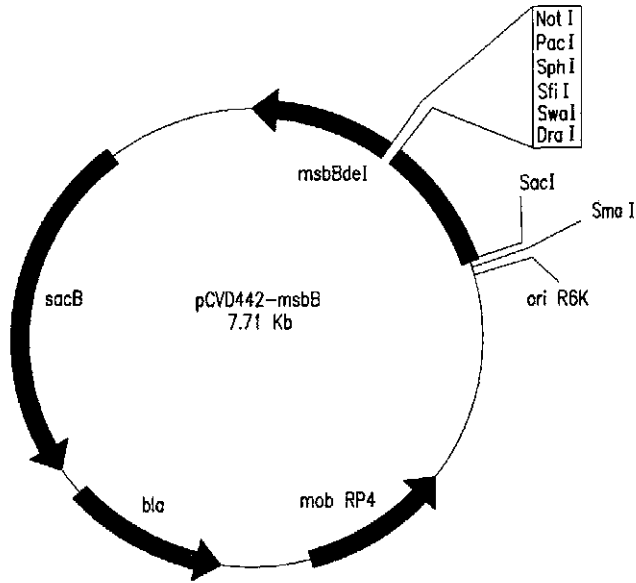
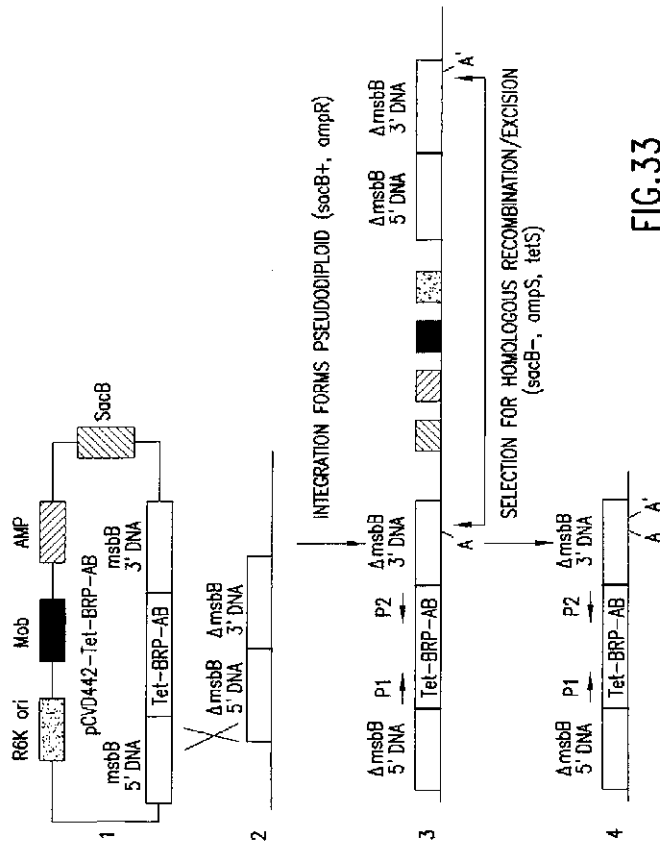


FIG.32



35/42

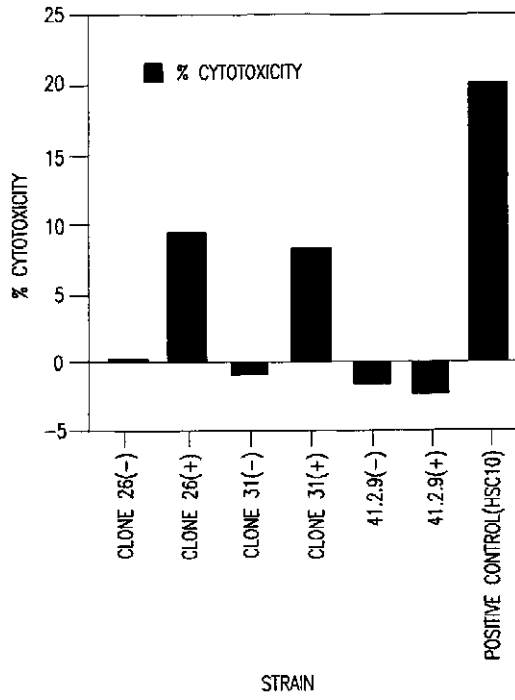


FIG.34

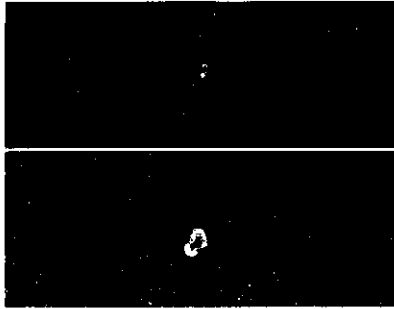


FIG.35

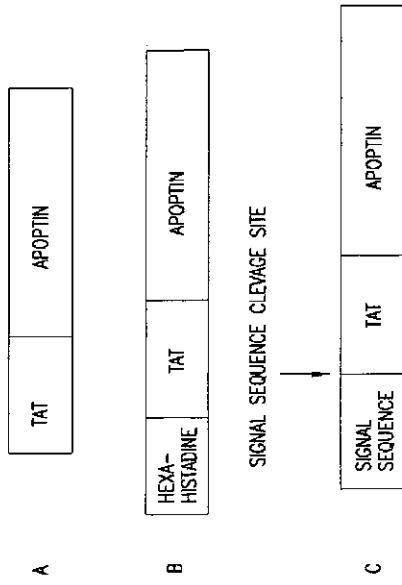


FIG.36

WO 01/25397

PCT/US00/23242

38/42

Protein Sequence of 616-4 F

Length of 616-4 F: 551 bp; Listed from: 1 to: 551;

Translated from: 7 to: 409 (Entire region);

Genetic Code used: Universal; Wed, Aug 16, 2000 1:40 PM

```

Frame 1      M A Y G R K K R R Q R R R M N
             NAG ACC ATG GCT TAT GGC AGA AAA AAA AGA AGA CAG AGA AGA AGA ATC AAC
             9          18          27          36          45

A L Q E D T P P G P S T V F R P P T S
GCG CTG CAG GAA GAT ACC CCG CCG GGC CCG TCC ACC GTG TTT CCG CCG CCG ACC TCC
   60          69          78          87          96          105

S R P L E T P H C R E I R I G I A G I
TCC CGC CCG CTG GAA ACC CCG CAT TGC CGC GAA ATC CGC ATC GGC ATC GCG GGC ATC
   117          126          135          144          153          162

T I T L S L C G C A N A R A P T L R S
ACC ATC ACC CTG TCC CTG TGC GGC TGC GCG AAC GCG CGC GCG CCG ACC CTG CCG TCC
   174          183          192          201          210          219

A T A D N S E N T G F K N V P D L R T
GCG ACC CCG GAT AAC TCC GAA AAC ACC GGC TTT AAA AAC GTC CCG GAT CTG CCG ACC
   231          240          249          258          267          276

D Q P K P P S K K R S C D P S E Y R V
GAT CAG CCG AAA CCG CCG TCC AAA AAA CCG TCC TGC GAT CCG TCC GAA TAT CCG GTC
   288          297          306          315          324          333

S E L K E S L I T T T P S R P R T A R
TCC GAA CTG AAA GAA TCC CTG ATC ACC ACC ACC CCG TCC CCG CCG CCG ACC GCC CCG
   345          354          363          372          381          390

R C I R L .
CGC TGC ATC CGC CTC TGA AAG CTT GGC TGT TTT GGC GGA TGA GAG AAG ATT TTC AGC
   402          411          420          429          438          447

CTG ATA CAG ATT AAA TCA GAA CCG AGA AGC GGT CTG ATA AAA CAG AAT TTG CCT GGC
   459          468          477          486          495          504

GGC AGT AGC GCG GTG GTC CCA CCT GAC CCC ATG CCG AAC TCA GA
   516          525          534          543

```

FIG.37

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/25397

PCT/US00/23242

39/42

Protein Sequence of TAP6H8 trcF

Length of TAP6H8 trcF: 751 bp; Listed from: 1 to: 444;

Translated from: 7 to: 427 (Entire region);

Genetic Code used: Universal; Mon, Aug 14, 2000 3:19 PM

```

Frame 1      M A H H H H H Y G R K K R R
             NAG ACC ATG GCT CAT CAC CAT CAC CAC CAT TAT GGC CGC AAA AAA CGC CGT
             9          18          27          36          45

Q R R R M N A L Q E D T P P G P S T V
CAG CGC CGT CGG ATG AAC GCG CTG CAG GAA GAT ACC CCG CGG GGC CGG TCC ACC GTG
          60          69          78          87          96          105

F R P P T S S R P L E T P H C R E I R
TTT CGC CCG CCG ACC TCC TCC CGC CCG CTG GAA ACC CCG CAT TGC CGC GAA ATC CGC
          117          126          135          144          153          162

I G I A G I T I T L S L C G C A N A R
ATC GGC ATC GCG GGC ATC ACC ATC ACC CTG TCC CTG TGC GGC TGC GCG AAC GCG CGC
          174          183          192          201          210          219

A P T L R S A T A D N S E N T G F K N
GCG CGC ACC CTG CGC TCC GCG ACC GCG GAT AAC TCC GAA AAC ACC GGC TTT AAA AAC
          231          240          249          258          267          276

V P D L R T D Q P K P P S K K R S C D
GTC CGC GAT CTG CGC ACC GAT CAG CCG AAA CCG CCG TCC AAA AAA CGC TCC TGC GAT
          288          297          306          315          324          333

P S E Y R V S E L K E S L I T T T P S
CCG TCC GAA TAT CGC GTC TCC GAA CTG AAA GAA TCC CTG ATC ACC ACC ACC CCG TCC
          345          354          363          372          381          390

R P R T A R R C I R L *
CGC CGC CGC ACC GCC CGC CGC TGC ATC CGC CTC TGA AAG CTT GGC TGT TTT
          402          411          420          429          438

```

FIG.38

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/25397

PCT/US00/23242

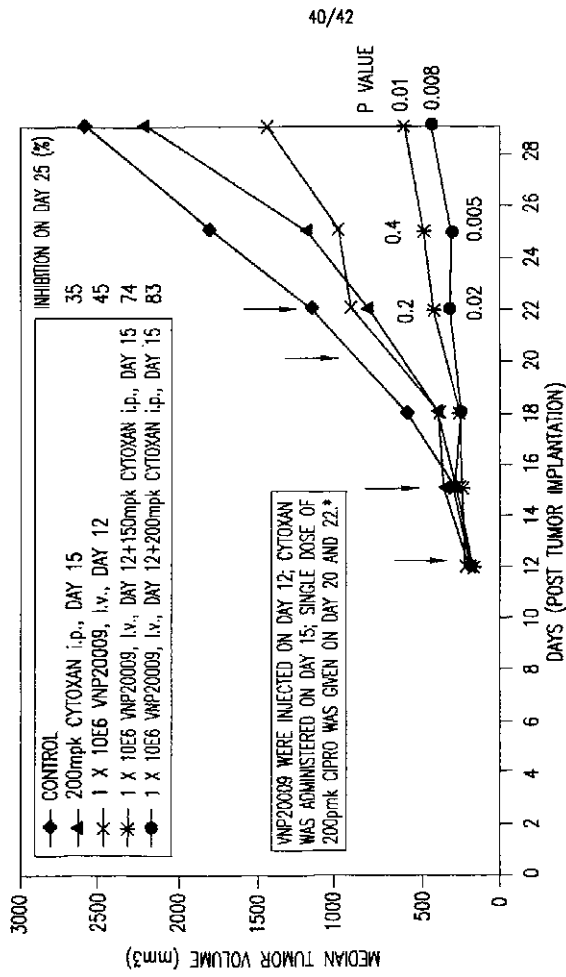


FIG.39

41/42

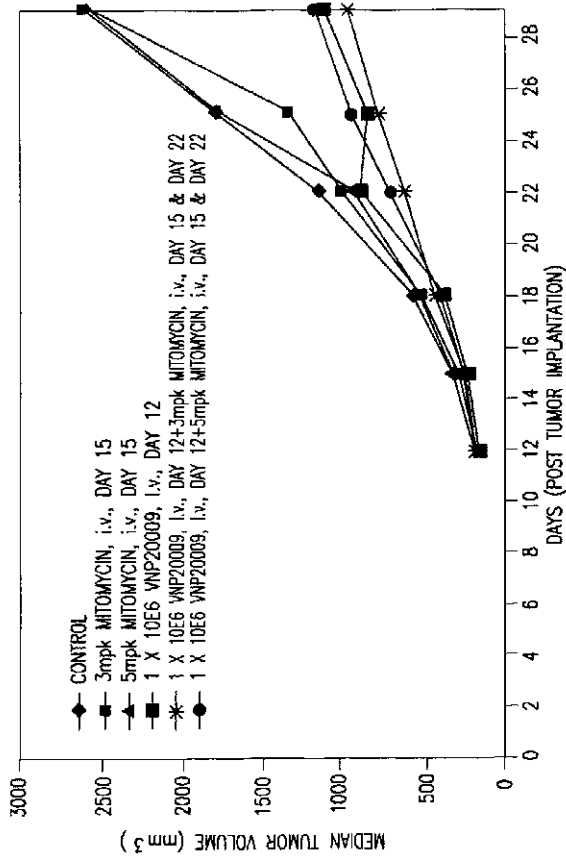


FIG.40

WO 01/25397

PC/T/US00/23242

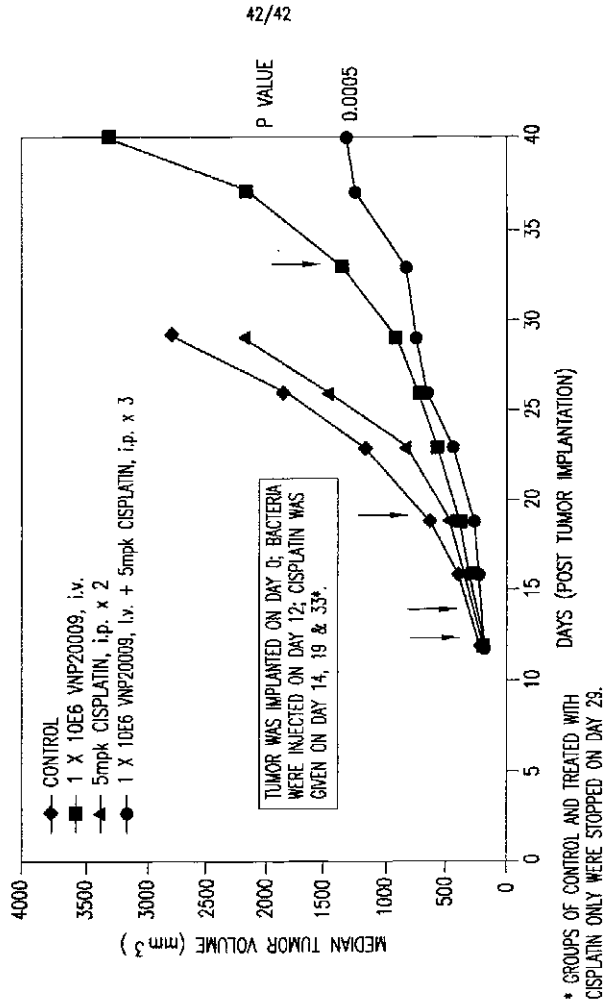


FIG.41

WO 01/25397

PCT/US00/23242

SEQUENCE LISTING

<110> VION PHARMACEUTICALS, INC.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR TUMOR-TARGETED DELIVERY OF EFFECTOR MOLECULES

<130> 8002-059-228

<150> 60/157,581
<151> 1999-10-04

<150> 60/157,637
<151> 1999-10-04

<160> 61

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 1
gaagatcttc cggaggaggg gaaatg 26

<210> 2
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 2
cgggatccga gctcgagggc ccgggaaagg atctaagaag atcc 49

<210> 3
<211> 477
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(474)

<400> 3
atg gta cgt agc tcc tct cgc act ccg tcc gat aag ccg gtt gcc cat 48
Met Val Arg Ser Ser Ser Arg Thy Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His
1 5 10 15

WO 01/25397

PCT/US00/23242

```

gta gtt gct aac cct cag gca gaa ggt cag ctg cag tgg ctg aac cgt      96
Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg
      20                25                30

cgc gct aac gcc ctg ctg gca aac ggc gtt gag ctg cgt gat aac cag      144
Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln
      35                40                45

ctc gtg gta cct tct gaa ggt ctg tac ctg atc tat tct caa gta ctg      192
Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu
      50                55                60

ttc aag ggt cag gcc tgc ccg tgg act cat gtt ctg ctg act cac acc      240
Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr
      65                70                75                80

atc agc cgt att gct gta tct tac cag acc aaa gtt aac ctg ctg agc      288
Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser
      85                90                95

gct atc aag tct ccg tgc cag cgt gaa act ccc gag ggt gca gaa gcg      336
Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala
      100                105                110

aaa cca tgg tat gaa ccg atc tac ctg ggt gcc gta ttt caa ctg gag      384
Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu
      115                120                125

aaa ggt gac cgt ctg tcc gca gaa atc xac cgt cct gac tat cta gat      432
Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp
      130                135                140

ttc gct gaa tct gcc cag gtg tac ttc ggt att atc gcc ctg      474
Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
      145                150                155

taa                                                                 477

<210> 4
<211> 158
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Met Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His
 1      5      10      15
Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg
 20     25     30
Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln
 35     40     45
Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu
 50     55     60
Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr
 65     70     75     80
Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser
 85     90     95
Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala
100    105    110

```

WO 01/25397

PCT/US00/23242

```

Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu
    115          120          125
Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp
    130          135          140
Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
    145          150          155

<210> 5
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 5
ccgacgcggt gacacctgaa aactggag                28

<210> 6
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 6
ccgacgcgtg aaaggatctc aagaagatc                29

<210> 7
<211> 543
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fusion construct

<221> CDS
<222> (3)...(540)

<400> 7
atg aaa aag aca gct atc gcg att gca gtg gaa ctg gct ggt ttc got                48
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
  1          5          10          15

acc gta gcg cag gcc cat atg gta cgt agc tcc tct cgc act ccg tcc                96
Thr Val Ala Gln Ala His Met Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser
  20          25          30

gat aag ccg gtt gct cat gra gtt gct aac cct cag gca gaa ggt cag                144
Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln
  35          40          45

ctg cag tgg ctg aac cgt cgc gct aac gcc ctg ctg gca aac ggc gtt                192
Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val
  50          55          60

```

WO 01/25397

PC1/US00/23242

```

gag ctc cgt gat aac cag ctc gtg gta cct tct gaa ggt ctg tac ctg      240
Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu
65              70              75              80

atc tat tct caa gta ctg ttc aag ggt cag gcc tgc cgg tcg act cat      288
Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His
85              90              95

ggt ctg ctg act cac acc atc agc cgt att gct gta tct tac cag acc      336
Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr
100             105             110

aaa gtt aac ctg ctg agc gct atc aag tct cgg tgc cag cgt gaa act      384
Pro Glu Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr
115             120             125

ccc gag ggt gca gaa gcg aaa cca tgg tat gaa cgg atc tac ctg ggt      432
Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly
130             135             140

ggc gta ttt caa ctg gag aaa ggt gac cgt ctg tcc gca gaa atc aac      480
Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn
145             150             155             160

cgt cct gac tat cta gat ttc gct gaa tct ggc cag gtg tac ttc ggt      528
Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly
165             170             175

att atc gca ctg caa
Ile Ile Ala Leu
180

```

```

<210> 6
<211> 180
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<480> 8
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10
Thr Val Ala Gln Ala His Met Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser
20 25 30
Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln
35 40 45
Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val
50 55 60
Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His
85 90 95
Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr
100 105 110
Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr
115 120 125
Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly
130 135 140

```

WO 01/25397

PC1/US00/23242

Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn
 145 150 155 160
 Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly
 165 170 175
 Ile Ile Ala Leu
 180

<210> 9
 <211> 801
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Fusion construct

<221> CDS
 <222> [1]... (798)

<400> 9

atg aag aca gct atc gcg att gca gtg gca ctg gct ggt ttc gct 48
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15
 acc gta gcg cag gcc cat atg gct aac gag ctg aag cag atg cag gac 96
 Thr Val Ala Gln Ala His Met Ala Asn Glu Leu Lys Gln Met Gln Asp
 20 25 30
 aag tac tcc aaa agt ggc att gct tgt ttc tta aaa gaa gat gac agt 144
 Lys Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys Phe Leu Lys Glu Asp Asp Ser
 35 40 45
 tat tgg gac ccc aat gac gaa gag agt atg aac agc ccc tgc tgg caa 192
 Tyr Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser Pro Cys Trp Gln
 50 55 60
 gtc aag tgg caa ctc cgt cag ctc gtt aga aag atg att ttg aga acc 240
 Val Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys Met Ile Leu Arg Thr
 65 70 75 80
 tct gag gaa acc att tct aca gtt caa gaa aag caa caa aat att tct 288
 Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser
 85 90 95
 ccc cta gtg aga gaa aga ggt cct cag aga gta gca gct cac ata act 336
 Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr
 100 105 110
 ggg acc aga gga aga agc aac aca ttg tct tct cca aac tcc aag aat 384
 Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn
 115 120 125
 gaa aag gct ctg gcc cgc asa ata aac tcc tgg gaa tca tca agg agt 432
 Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser
 130 135 140
 ggg cat tca ttc ctg agc aac ttg cac ttg agg aat ggt gaa ctg gtc 480
 Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val
 145 150 155 160

WO 01/25397

PC1/US00/23242

atc cat gaa aaa ggg ttt tac tac atc tat tcc caa aca tac ttt cga 528
 Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg
 165 170 175

ttt cag gag gaa ata aaa gaa aac aca aag aac gac aaa caa atg gtc 576
 Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val
 180 185 190

caa tat att tac aaa tac aca agt tat cct gac cct ata ttg ttg atg 624
 Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met
 195 200 205

aaa agt gct aga aat agt tgt tgg tct aaa gat gca gaa tat gga ctc 672
 Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu
 210 215 220

tat tcc atc tat caa ggg gga ata ttt gag ctt aag gaa aat gac aga 720
 Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg
 225 230 235 240

att ttt gtt tct gta aca aat gag cac ttg ata gac atg gac cat gaa 768
 Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu
 245 250 255

gcc agt ttt ttc ggg gcc ttt tta gtt gcc taa 801
 Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 260 265

<210> 10
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 10
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Ala Gln Ala His Met Ala Asn Glu Leu Lys Gln Met Gln Asp
 20 25 30
 Lys Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys Phe Leu Lys Glu Asp Asp Ser
 35 40 45
 Tyr Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser Pro Cys Trp Gln
 50 55 60
 Val Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys Met Ile Leu Arg Thr
 65 70 75 80
 Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser
 85 90 95
 Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr
 100 105 110
 Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn
 115 120 125
 Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser
 130 135 140
 Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val
 145 150 155 160
 Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg
 165 170 175

WO 01/25397

PC1/US00/23242

```

Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val
180 185 190
Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met
195 200 205
Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu
210 215 220
Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg
225 230 235 240
Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu
245 250 255
Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
260 265

<210> 11
<211> 465
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fusion construct

<221> CDS
<222> (1)...(462)

<400> 11
atg aaa aag acg gct ctg gcg ctt ctg ctc ttg ctg tta gcg ctg act 46
Met Lys Lys Thr Ala Leu Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Thr
1 5 10 15

agt gta gcg cag gcc gct cct act agc tgg agc act aag aaa act caa 96
Ser Val Ala Gln Ala Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln
20 25 30

ctg caa ttg gag cat ctg ctg ctg gat ctg cag atg att ctg aat gcc 144
Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly
35 40 45

atc aat aac tac aag aac cct aag ctg act cgc atg ctg act ttc aaa 192
Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys
50 55 60

ttc tac atg ccg aaa aag gct acc gag ctg aaa cat ctc cag tgc ctg 240
Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu
65 70 75 80

gaa gag gaa ctg aag ccg ctg gag gaa gta ctt aac ctg gca cag tct 288
Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser
85 90 95

aag aac ttc cac ctg cgt ccg cgt gac ctg atc tcc aac atc aat gta 336
Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val
100 105 110

atc gtt ctt gag ctg aag gga tcc gaa acc acc ttc atg tgc gaa tac 384
Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr
115 120 125

```

WO 01/25397

PC1/US00/23242

```

gct gac gaa acc gcc acc att gtg gag ttc ctg aac cgt tgg atc acc 432
Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr
130 135 140

```

```

ttt gcc caa tcg atc att agc acg tta act taa 465
Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145 150

```

```

<210> 12
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<400> 12
Met Lys Lys Thr Ala Leu Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Thr
1 5 10 15
Ser Val Ala Gln Ala Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln
20 25 30
Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly
35 40 45
Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys
50 55 60
Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu
65 70 75 80
Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser
85 90 95
Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val
100 105 110
Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr
115 120 125
Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr
130 135 140
Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145 150

```

```

<210> 13
<211> 465
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<221> Fusion construct

```

```

<221> CDS
<222> (1)...(462)

```

```

<400> 13
atg aaa cag tcg act ctg gcg ctt ctg ctc ttg ctg tta gcg ctg act 48
Met Lys Gln Ser Thr Leu Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Thr
1 5 10 15

```

```

agt gtg gcc aaa gcg gct cct act agc tcg agc act aag aaa act caa 96
Ser Val Ala Lys Ala Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln
20 25 30

```

WO 01/25397

PC1/US00/23242

```

ctg caa ttg gag cat ctg ctg ctg gat ctg cag atg att ctg aat ggc      144
Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly
      35              40              45

atc aat aac tac aag aac cct aag ctg act cgc atg ctg act ttc aaa      192
Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys
      50              55              60

ttc tac atg ccg aaa aag gct acc gag ctc aaa cat ctc cag tgc ctg      240
Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu
      65              70              75              80

gaa gag gaa ctg aag ccg ctg gag gaa gta ctt aac ctg gca cag tct      288
Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser
      85              90              95

aag aac ttc caa ctg cgt ccg cgt gac ctg atc tcc aac atc aat gta      336
Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val
      100             105             110

atc gtt ctt gag ctg aag gga tcc gaa acc acc ttc atg tgc gaa tac      384
Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr
      115             120             125

gct gac gaa acc gcc acc att gtg gag ttc ctg aac cgt tgg atc acc      432
Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr
      130             135             140

ttt gcc caa tgg atc att agc acg tta act taa      465
Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
      145             150

```

<210> 14

<211> 154

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 14

```

Met Lys Gln Ser Thr Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Leu Thr
 1      5      10      15
Ser Val Ala Lys Ala Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln
 20     25     30
Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly
 35     40     45
Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys
 50     55     60
Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu
 65     70     75     80
Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser
 85     90     95
Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val
100    105    110
Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr
115    120    125
Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr
130    135    140

```

WO 01/25397

PC1/US00/23242

Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 145 150

```

<210> 15
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 15
agtctagaca atcaggcgaa gaacgg          26

<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 16
agccatggag tcaccctcac ttttc          25

<210> 17
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 17
ggatccttaa gaccacttt cacatttaag t          31

<210> 18
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 18
ggtccatgg ttcacttttc tctaccac          28

<210> 19
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 19
gtgtccatgg ggcacagcaa ccggaattc cag          33

```

WO 01/25397

PC1/US00/23242

```

<210> 20
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 20
acacgagctc ctacttggag gcagtcatga agct          34

<210> 21
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 21
gtgtccatgg ctggggggc aagtgctggg actgaccatc atcatcatca tcatacaaga          60
caccggact tc          72

<210> 22
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 22
gtgggatcc ctacttggag gcagtcatga agctg          35

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Met Ala Arg Arg Ala Ser Val Gly Thr Asp His His His His His His          1
1          5          10          15

<210> 24
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide sequence TIP 13.40

<400> 24
Ala Tyr Arg Trp Arg Leu Ser His Arg Pro Lys Thr Gly Phe Ile Arg          1
1          5          10          15
Val Val Met Tyr Glu Gly          20

<210> 25

```

WO 01/25397

PC1/US00/23242

```

<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleotide sequence encoding TfP13.40

<400> 25
ggtaccgct ggcgcctgtc ccategcccg aanaaccgct ttatccgct ggtgatgtac 60
gaaggc                                         66

<210> 26
<211> 101
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 26
gtgtactagt gtggcgaagg cggcgtaccg ctgggcctcg tcccacgcc cgaaaacogg 60
ctttaccgc gtggtgatgt acgaaggcta aggatccgcg c 101

<210> 27
<211> 101
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 27
gcgcgatcc ttagcctcg tacatcacc cgcggataaa gcgggttttc gggcgatggg 60
acaggcgcca gcggtaccgc gactgcacca cactagtaca c 101

<210> 28
<211> 101
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Met Ser Ser Ala Ala Gly Phe Cys Ala Ser Arg Pro Gly Leu Leu Phe
1 5 10 15
Leu Gly Leu Leu Leu Leu Pro Leu Val Val Ala Phe Ala Ser Ala Glu
20 25 30
Ala Glu Glu Asp Gly Asp Leu Gln Cys Leu Cys Val Lys Thr Thr Ser
35 40 45
Gln Val Arg Pro Arg His Ile Thr Ser Leu Glu Val Ile Lys Ala Gly
50 55 60
Pro His Cys Pro Thr Ala Gln Leu Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Arg
65 70 75 80
Lys Ile Cys Leu Asp Leu Gln Ala Pro Leu Tyr Lys Lys Ile Ile Lys
85 90 95
Lys Leu Leu Glu Ser
100

<210> 29
<211> 106

```

WO 01/25397

PC1/US00/23242

```

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 29
cttcactagt gtggcgcagg cgaacggcgg caaatctgc ctggaactgc aggcgccgct    60
gtacaaaaaa atcatcaaaa aactgctgga aagctaagga tccgcg                               106

<210> 30
<211> 106
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 30
cgcggatcct tagctttcca gcagtttttt gatgattttt ttgtaacgcg gcgcctgcag    60
gtccaggcag attttgccc cgttcgctcg cgccacacta gtgaag                               106

<210> 31
<211> 85
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31
Ile Tyr Ser Phe Asp Gly Arg Asp Ile Met Thr Asp Pro Ser Trp Pro
1      5      10      15
Gln Lys Val Ile Trp His Gly Ser Ser Pro His Gly Val Arg Leu Val
20     25     30
Asp Asn Tyr Cys Glu Ala Trp Arg Thr Ala Asp Thr Ala Val Thr Gly
35     40     45
Leu Ala Ser Pro Leu Ser Thr Gly Lys Ile Leu Asp Gln Lys Ala Tyr
50     55     60
Ser Cys Ala Asn Arg Leu Ile Val Leu Cys Ile Glu Asn Ser Phe Met
65     70     75     80
Thr Asp Ala Arg Lys
85

<210> 32
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 32
ggcttcaacta gtgtggcgca ggcgatatac tcttttgatg gtcc                               44

<210> 33
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

```


WO 01/25397

PC1/US00/23242

```

<223> Oligonucleotide
<400> 33
cggggacact taactctag cgtctgcat gaaactg 37

<210> 34
<211> 7117
<212> DNA
<213> B. coli

<400> 34
cccgggcaact tccggggcaat gactatgtga tatccggggc tgcacccggg acccccgcaa 60
ccatccacgg gccacaaaat tttttgtggc ccgctctgcg ttttctaagt gttatccctc 120
ctgatttcta aaaaattttc cacctgaact tgacagaaaa aacgatgacg agtacttttt 180
gatctgtaca taaaccocgt gggtttatgt acagatatac tctgttaatc aattgtttta 240
acgottaaaa gagggaattt ttatgagcgg tggcagatga cgcggccata acacggcgcc 300
gcatagcaca agtggtaaca ttaatggtag cccgacgggg ctgggtgtag gtagtggtgc 360
ttctgatggc tccggatgga gttcggaaaa taaccogtgg ggtgggtggt ccgtagcggg 420
cattccactgg ggtggtggtt ccggtcatgg taatggcggg ggggatggta attccgggtg 480
tggttcggga acacggcgga atctgtcagc agtagctcgc ccagtggtat ttggttttcc 540
ggcactttcc aotccaggag ctggcggctct ggcggtcagt attcagcgg gagcattatc 600
ggcagctatt gctgatatta tggctgcccc gaaaggacgg tttaaaattg gtctttgggg 660
gggtggttta tatggtgat tgcctacaca aatagcggaa gatgacccca atatgatgtc 720
aaagattggt agtccatcac ccgcagatga tattactgaa tcaactgtca gttcattacc 780
tctctgtaag gcaacagtaa acgtaaatgt tctgtttgtt gatgatgaa aagacagacc 840
acagaatact tgggtgtttt caggtgttcc gatgagtggt ccggtggttg atgcaaaacc 900
taccgaactg ccgggtgttt ttaccggatc aattccaggt gcaactgttc tgaatattcc 960
agttaataac agtacgccag cagtacagac attaagccca ggtgttacia ataatactga 1020
taaggatggt ccccccggag gatttactca ggttggttat accagggatg cagtattctg 1080
attcccgagg gacagcggtc ataatgcogt atatgtttca gtgagtgatg ttcttagccc 1140
tgaccaggtt aacaaacgct aagatgaaga aatcgccgt cagcaggaat gggatgctac 1200
gcatccggtt gaacggctg agcgaatata tgaacggcgg cgcgcagcgc tgaatcagcc 1260
aaatgaagat gttaccagaa atccggagcc acaggtataa gctgttcagg ttataatctc 1320
gggtaaaagc gaacttgatg cagcgaatata aactcttgct gatgcaatag ctgaaataaa 1380
acaatttaac cgaattgccc atgacccaat ggttagcggc cagcagatgt ggcgaatggc 1440
cgggttataa gcccaacggg ccagacagga tctaaataat aagcagcgtg catltgatgc 1500
tgcgtcaaaa gagaagtcaq atgctgatgc tgcattgagt tctgctatgg aaagcagaaa 1560
gaagaagaaa gataagaaaa gtagtgctga aatataatta aacgatgaaa agaatagccc 1620
cagaaagggt tttaaagatt accggcatga ttatcatcca gctccgaaaa ctgagaaat 1680
taagggtctt ggtgatctta agcctgggat accaaaaaca ccaaaagcaga atggtggtgg 1740
aaaaacagc cgtcggactg gagataaagg gcgtaagatt tatggtggg attctcagca 1800
tggtagcttt gaggggtatc gtcocagtaa tggtaacat ctgagctat ttgacctaa 1860
aacggcaat cagttgaaa gttccagatcc gaaacgaaat atcaagaat atctttgga 1920
ggaagttatg ggccttaaat tggatttaac ttggtttgat aaaagtacag aagattttaa 1980
gggtgagggg tattcaaaag attttggaga tgacggttca gttatggaaa gttctagglt 2040
gcctttbaag gataatgtaa ataacgggtt ctttgatgtt atagctgat ggttaccttt 2100
gctacaacca tactttaac atcaaatgta tatttcogat aargagtatt ttggttcgtt 2160
tgattatcgt gatggtgat ggtgatcaaa tattatcagg gatgagtga tatacgggct 2220
tctagtgttc atgatgaac gctggagcct ccaaatgtag aatgtbata ttttttattg 2280
agtcttgggt tataattgct ccgcaatgat taaataagc attattttaa acattctcag 2340
gagaggtgaa ggtggcgcta aaaaaaagta ttggtgatta cactgaaacc gaattcaaaa 2400
aatattatga agaatctac aattgtgaag gtagtgaaaa aaaaacagat gataccctc 2460
agtattttat aaatgttact gagcatccta gtggttctga tctgatttat taccacaga 2520
acgtaaatga tggtagccct gaaggtgcta taaagagat taaagaatgg cagcccgcta 2580
cgtggaatgc aggtttaaa cagggctgaa atatgaatgc cggttgttta tggatgaat 2640
gctggcattc ttcaacaca aggagctggt atgaaaaaaa taacagggat tattttattg 2700
ctctctcag teattattct gctcgcattg cgggcaacct atatccggga tgttcagggc 2760
gggacgcatc ctccgtcac aacagctgaa gtgaccggat tagcaacgca gtaeccgaa 2820

```

WO 01/25397

PC1/US00/23242

```

atctctttg acaaaaacaa agcgtgtcag gctgattcgg atgcgctttt ttttgaaat 2880
gtcacaiaaaa ttccatgtgg gagatgggat ctaaaatcct cgtgcagaac tttccatcoa 2940
ggggggaaaa acttgttgtt ttgagccgtt cgtgttccag aacgcacgaa accgatcccg 3000
cgatcgctt tegtgaatag ttatgcagge cctgaaaac gattctgagc cgttttttcg 3060
gttttgcctg gtgtttctct gtcttttttgc gtttttttgc tcagaaacgcg tctgaggcgcg 3120
ttttaegggg tgcgtacaac gggagtattg gtaaatggat cggtttttcg ggaaggatcg 3180
acaggatttg cgttgggtg tagtgttaag gactgaaaaa caaacgcccc gtaaatcgtg 3240
ctctcaccgc caagattgat caagaaatta cagggcgcgc ggttcgcgct ttcccgatgg 3300
gaaagcgcgg ttagttaaac tgtgtaccga gagaatcgt atcacatgag cgcgctactt 3360
caacgctca tggaaaaaatt accgcacaaa ccgtactgta cgaacgattt cgcgtacggc 3420
gttcgcattc tgcgaaaaaa cattgcccatt cttgcccgtt tcaccacgca gaaccagcoa 3480
agtcgactgt actggcttcc ctttgacgtg gaccggaagg gggcatcaat cgcctggagc 3540
gaccggaatt gtccggcccc gaacatcacc gtaaaaaatc cccgtaacgg gacgcgcgat 3600
ctgctctaac cgtcgcacct tccgttgaga actgcgcgg atgcateggc ttccggcctc 3660
agatacctg cgcctatgga gctgtcgttg tgtgaaaaac tgggcgcgga tgtgaattac 3720
agcggctga tctgcaaaaa tccgtccacc cctgaatggc agaaagtga atggcgcgag 3780
gaaccctaca cctcagcaga actggctgat tatctcgatt tgagcgcctc agcgccgct 3840
agctcagata aaaattacgg gctggggcga naactgctatc tgttcaaaaa gggcctgaaa 3900
tgggtctaac gggctattcg tcagggctgg ccggcattct cacaatggct tgaatcggtg 3960
attcagcgtg tcaaaaatga caacgcacgc ctcgccgttc cgccttccacc tctggaigt 4020
cgggtatgt gcaagatgat tgcgaaatca acgcacagga acttaccgcc ggaacctttc 4080
gcacagtatg tggctgatac gcaacgcgca gaaatcagg ctacacgagg tcgcaaggcg 4140
ggcttcaagt ctaagcgcgg cacagtacct acatengcag gacagctgaa acctgggag 4200
aaattcaggga ttagtcgcgc ctggatttac caactgaaaa aacagagctc cgtagatag 4260
accaaataag cctataatag ataacagcgc ctttttggcg cctttttgag cagctgggtt 4320
tgttctatt tccctcgttg aatcccgcaa tggcgcgctc ttccgcatga ttgagctggt 4380
agcctcgcgc gacgtctcat gaccgagcgt agcgagcgaa tggcgcgagg agcccaagg 4440
cgtccgctgg tcaatgtggc acttaagcgc cggggcttag tggttctggc gtttcgcgg 4500
tggctgggt agcttctcca gctcgttaat cagcggttg agtcggttca catccacctg 4560
tcttctgact tctttccgca gaaactggag caggaacgca cgcagctggc ctctttccgg 4620
ctcccgtaac cttgcacgca tggctgcccc cacaatgact ttttgccgcs tctccaggct 4680
tcggtcttc gcttcaggc gctgtaact ggcctcagct tggcaatct tctgttcgag 4740
tgtctctctc attctgtgac tccgtgtcgc gtgaaaaac gcatittagc gcgtcactgg 4800
tagtttaaaa actaaactgg cataatgcac ggcacatcac gaagtgcgc cttatacaat 4860
ctccacttg tttcgaattt gtggggctg cgaagctaaa agaaacgca aaaaaggct 4920
tacgycagaa atgscgattt atcactcag cabgaaatc attttgcgaa aaaaaggcta 4980
cagcgtggtt gctctgtctg cctaccgttc cggctctgic ataccgagtg accgtaccg 5040
aatatcac gattacaacc gtaaacgcgg cgttgatgat cgggtcattc tcaacctcga 5100
gaatgcacc tccgtgtgtg ttagccgttc cgttcttgg aatggggtgc agaaagcga 5160
acagcgcggg aactcctcag tggcaaggga gtttgaact gccattctcc gtaggatttc 5220
ccgcgagcc gcaaggagga ccgttctcgc ttttccggg aaaaacttgc cagtcggggc 5280
atgattgag atgtgscgtt ccataccatg gaccgagcca atcccattgc gtcacatctg 5340
ctgaccacga gagctgtcgg ggaaacgga ttccgagaa aggtcagga tggaaacgac 5400
gggcactcgc cgagactgag cgcgcactca tggctgacca tgcgaacga gctgttcgca 5460
acgcgggcta caaggaagag atagaccat gttcatacga grgtcagga ctggagaag 5520
cgcgcgctt caactcgaaa agcctgctgc tgcgatgaa aaacgggaa tggaaacaga 5580
acgcggtgag cagaaccgtc tgattaaacg ccttaacctg gaaatcacgg tttccgcac 5640
gcagcttgt ctaagcagg ttcaggaaac gcagcgttag cgggaactca cgcagtctgc 5700
acgtcgtgca gtggaagccc ttaacctgac cattccgct gcgaatgct cagcggatac 5760
cctcgggaaa tctattgcca cgtgcgcgca ggaatcggg aacgcgtgg agatgacccc 5820
ggagtctctg cgcattgagc ggaaggtgaa cgaactgaa cgtgagggga atgcgctgct 5880
gaaagcagca gccattctgc aaaaaggagat gaccggactc aaaaagcac gccctgtcgc 5940
gtccctctg tcagagattc cctgatgac atggcctgaa ccggaatacc gcaaaagaca 6000
actccgttct tggaaactc gggaaacaga ttgaatctct tcgccgcacc tacaggcccg 6060
tgaagaacg gcacattccc gccctcgtc aggccttga aacgcagtg aatcagtgga 6120
ttgcgcgga atggcagagc tgaagaaaaa actgtcagca cgggaagcgg agcggcgcg 6180
ggaggagccc gaaagggaag cgcgcgggaa ggaacagag catgagcgc ggcgtaaacg 6240
toatgataac acccgtctga gccgtgaaac ggcattgctc ggggttatta cggagctggg 6300

```

WO 01/25397

PC1/US00/23242

```

gctgcccaga gaggcgggaa cgggcaggat aaccgcctac atgatgttga gtaacagagc 6360
cggagaatcc acggtatggg gtgatgagct ggcgcatcac ccccagatg ttcctgacc 6420
ggtagaatgtt tacctgtcgc caggcggggc tgtgatggtc tcggatatac gtgaggggat 6480
gcccagaatct catgagacga tggcgcggcc tgagcgtgtg agaattgtatt cgggtgggac 6540
ggtcgggcat gtactgggac agatgcgcga ggggtggccc tottacggtt tcccgccctc 6600
gcgcgcatcac tggcgggata atttttatct caggcagcac cgcaggccc tagcctctcc 6660
gctgcgctct ggcacccggg tggacgtcac cgttatgca gacccgggac aactcatgcc 6720
cgttgtattt tcgacagagc gaacacgca gacgtgaat ctgctgtgtt gcaagggccc 6780
ggaggaagtg cttgtcggat ttgtgcgcga ggaggacggg ctgctgccc ttcttgccct 6840
tccgtcgcgc gattacagtc atctgatggt cagcaccate acggagacg ggggatgcct 6900
ggcagggttac ggagaagcta taaacctga tgcgatact ccgtaccac cggaacccca 6960
cctgatgcag ttccgcctca aaggccatca tgacaggctt ttggctgctg tccacaacc 7020
ggaagagatg ccgattatc tcttccctca actcgggttt aatcagacct ggcctgagtg 7080
gaaagcgggac gaacagcaca ggcacaaca acgcgcg 7117

```

```

<210> 35
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Forward primer

```

```

<400> 35
gtgtcatgaa aatgggtaac caatggcaac 30

```

```

<210> 36
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Reverse primer

```

```

<400> 36
cacagagctc gcgctaaca aacagcaca gggag 35

```

```

<210> 37
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Forward primer

```

```

<400> 37
gtgtccatgg ctaaaacatt attaatagct gcctcgc 37

```

```

<210> 38
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Reverse primer

```

WO 01/25397 PCT/US00/23242

<400> 38
gtgtctgcag aactgaactga attgagatg 29

<210> 39
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 39
gtgtagatct ttaagacctca ctttcacatt taagttg 37

<210> 40
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 40
cacaggatcc ttactgaacc gcgatccccc 30

<210> 41
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 41
gtgtgagctc gatcaaccag caagccgcta accctctgac 40

<210> 42
<211> 67
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 42
gtgtgcctgc ggggggcat ataggccggg gatttaaatg caaacgtccg ccgaaacgcc 60
gacgcac 67

<210> 43
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 43
gtgtgcctgc ggggttaatt aagggggcgg ccgctggtta ttggttgaac cgacggtgct 60

WO 01/25397 PC1/US00/23242

catgacatcg c 71

<210> 44
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Reverse primer

<400> 44
 gtgtctcgag gatatcattc tggcctctga cgttgtg 37

<210> 45
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Forward primer

<400> 45
 tttttccat ggcattatg actgaaatcg ttgcagataa aacgg 45

<210> 46
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Reverse primer

<400> 46
 tttttaagc ttccggggtc agacttcagg tccctcaag agtgtc 46

<210> 47
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Forward primer

<400> 47
 ccgctcgaga tgcacggctc caacaagctc cca 33

<210> 48
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Reverse primer

<400> 48
 ccgggatcct taggcaotcg ccttgagtgc ctg 33

<210> 49

WO 01/25397

PC1/US00/23242

```

<211> 102
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 49
gatcccatgg cttatggcag aaaaaaacgc cgtcagcgc gtcgcctgaa cgcgctgcag   60
gaagataccc cgcggggccc gtccaccgtg ttccgccgc cg                               102

<210> 50
<211> 103
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 50
gggacagggt gatgatgatg cccgcgatgc cgtcgggat ttccggcaa tgcgggggtt   60
ccagcgggcy ggaggaggtc ggcggcgcaa acacggtaga cgg                               103

<210> 51
<211> 102
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 51
ggcatcgggg gactaccat caccctgccc ctgtcgggt gcgcgaacc gcgcgcggcc   60
accctgcgct ccgcgacgc ggataactcc gaaaacaccg gc                               102

<210> 52
<211> 111
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 52
gcatatttcg gacggatcgc aggagcgttt ttggacgyc ggtttcggct gatcggtcgc   60
cagatccggg acgtttttta agccgctggt ttccggagta tcccggtcgc c                               111

<210> 53
<211> 111
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 53
ctgcgatcc gtccgaatat cgcgttccg aactgaaaga atccctgatc accaccacc   60
cgtccgcccc ggcaccgcc cgcgctgca tccgcctctg aaagcttcat g                               111

```

WO 01/25397

PC1/US00/23242

```

<210> 54
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 54
catgaagctt tcagagcgg atgcagcggc gggcggtagc c          41

<210> 55
<211> 98
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 55
gatcccatgg ctcatcaaca tcaccaccat tatggccgca aaaaacgccc tcagcgcctg          60
cgcataaagc cgcgcagga agataccgc cggggccc          98

<210> 56
<211> 100
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 56
gatcccatgg ctaaaaagac ggcctggcgc cttctgctct tgctgttagc gctgactagt          60
gtagccagag cctatggccc caaaaaagc cgtcagcgc          100

<210> 57
<211> 551
<212> DNA
<213> Bacteriophage

<220>
<221> CDS
<222> (7)...(408)

<223> modified_base
<222> (1)...(1)
<223> n=a, c, g, or t

<400> 57
nagacc atg gct tat ggc aga aaa aaa aga aga cag aga aga aga atg          48
Met Ala Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Met
      1          5          10

aac gcg ctg cag gaa gat acc ccg ccg ggc ccg tcc acc gtg ttt cgc          56
Asn Ala Leu Gln Glu Asp Thr Pro Pro Gly Pro Ser Thr Val Phe Arg
      15          20          25          30

```

WO 01/25397

PC1/US00/23242

```

cgc cgc acc tcc tcc cgc cgc ctg gaa acc cgc cat tgc cgc gaa atc 144
Pro Pro Thr Ser Ser Arg Pro Leu Glu Thr Pro His Cys Arg Glu Ile
          35          40          45

cgc atc ggc atc ggc ggc atc acc atc acc ctg tcc ctg tgc ggc tgc 192
Arg Ile Gly Ile Ala Gly Ile Thr Ile Thr Leu Ser Leu Cys Gly Cys
          50          55          60

cgc aac cgc cgc ggc cgc acc ctg cgc tcc ggc acc ggc gat aac tcc 240
Ala Asn Ala Arg Ala Pro Thr Leu Arg Ser Ala Thr Ala Asp Asn Ser
          65          70          75

gaa aac acc ggc ttt aaa aac gtc cgc gat ctg cgc acc gat cag cgc 288
Glu Asn Thr Gly Phe Lys Asn Val Pro Asp Leu Arg Thr Asp Gln Pro
          80          85          90

aaa cgc cgc tcc aaa aaa cgc tcc tgc gat cgc tcc gaa tat cgc gtc 336
Lys Pro Pro Ser Lys Lys Arg Ser Cys Asp Pro Ser Glu Tyr Arg Val
          95          100          105          110

tcc gaa ctg aaa gaa tcc ctg atc acc acc acc cgc tcc cgc cgc cgc 394
Ser Glu Leu Lys Glu Ser Leu Ile Thr Thr Thr Pro Ser Arg Pro Arg
          115          120          125

acc gcc cgc cgc tgc atc cgc ctc tgaagcttg gctgctttgg eggatgagag 439
Thr Ala Arg Arg Cys Ile Arg Leu
          130

aagattttca gctgatata gattaataca gaaagcagaa gggatctgat aaaacagaat 498
ttgctggcgc gcagtagcgc ggtggctcca cctgacccca tgcgcaactc ag* 551

<210> 58
<211> 134
<212> PRT
<213> Bacteriophage

<400> 58
Met Ala Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Met Asn Ala
 1          5          10          15
Leu Gln Glu Asp Thr Pro Pro Gly Pro Ser Thr Val Phe Arg Pro Pro
 20          25          30
Thr Ser Ser Arg Pro Leu Glu Thr Pro His Cys Arg Glu Ile Arg Ile
 35          40          45
Gly Ile Ala Gly Ile Thr Ile Thr Leu Ser Leu Cys Gly Cys Ala Asn
 50          55          60
Ala Arg Ala Pro Thr Leu Arg Ser Ala Thr Ala Asp Asn Ser Glu Asn
 65          70          75          80
Thr Gly Phe Lys Asn Val Pro Asp Leu Arg Thr Asp Gln Pro Lys Pro
 85          90          95
Pro Ser Lys Lys Arg Ser Cys Asp Pro Ser Glu Tyr Arg Val Ser Glu
100          105          110
Leu Lys Glu Ser Leu Ile Thr Thr Thr Pro Ser Arg Pro Arg Thr Ala
115          120          125
Arg Arg Cys Ile Arg Leu
130

<210> 59
<211> 444

```


WO 01/25397

PC1/US00/23242

```

<212> DNA
<213> Bacteriophage

<220>
<221> modified_base
<222> (1)...(1)
<223> n=a, c, g, or t

<221> CDS
<222> (7)...(427)

<400> 59
nagacc atg gct cat cac cat cac cac cat tat ggc cgc aaa aaa cgc      48
Met Ala His His His His His His Tyr Gly Arg Lys Lys Arg
      1          5          10

cgt cag cgc cgt cgc atg aac gcg ctg cag gaa gat acc ccg cag ggc      96
Arg Gln Arg Arg Arg Met Asn Ala Leu Gln Glu Asp Thr Pro Pro Gly
      15          20          25          30

cgg tcc acc gtg ttt cgc cgg cgg acc tcc tcc cgc cgg ctg gaa acc      144
Pro Ser Thr Val Phe Arg Pro Pro Thr Ser Ser Arg Pro Leu Glu Thr
      35          40          45

cgg cat tgc cgc gaa atc cgc atc ggc atc gcg ggc atc acc atc acc      192
Pro His Cys Arg Glu Ile Arg Ile Gly Ile Ala Gly Ile Thr Ile Thr
      50          55          60

ctg tcc ctg tgc ggc tgc gcy aac gcg cgc gcg cgg acc ctg cgc tcc      240
Leu Ser Leu Cys Gly Cys Ala Asn Ala Arg Ala Pro Thr Leu Arg Ser
      65          70          75

gcg acc gcg gat aac tcc gas aac acc ggc ttt aaa aac gtc cgg gat      288
Ala Thr Ala Asp Asn Ser Glu Asn Thr Gly Phe Lys Asn Val Pro Asp
      80          85          90

ctg cgc acc gat cag cgg aaa cgg cgg tcc aaa aaa cgc tcc tgc gat      336
Leu Arg Thr Asp Gln Pro Lys Pro Pro Ser Lys Lys Arg Ser Cys Asp
      95          100          105          110

cgg tcc gaa tat cgc gtc tcc gaa ctg aaa gaa tcc ctg atc acc acc      384
Pro Ser Glu Tyr Arg Val Ser Glu Leu Lys Glu Ser Leu Ile Thr Thr
      115          120          125

acc cgg tcc cgc cgg cgc acc gcc cgc cgc tgc atc cgc etc t          427
Thr Pro Ser Arg Pro Arg Thr Ala Arg Arg Cys Ile Arg Leu
      130          135          140

gaaagcttgg ctgtttt                                                444

<210> 60
<211> 140
<212> PRT
<213> Bacteriophage

<400> 60
Met Ala His His His His His Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln
      1          5          10          15

```

WO 01/25397

PC1/US00/23242

Arg Arg Arg Met Asn Ala Leu Gln Glu Asp Thr Pro Pro Gly Pro Ser
 20 25 30
 Thr Val Phe Arg Pro Thr Ser Arg Pro Leu Glu Thr Pro His
 35 40 45
 Cys Arg Glu Ile Arg Ile Gly Ile Ala Gly Ile Thr Ile Thr Leu Ser
 50 55 60
 Leu Cys Gly Cys Ala Asn Ala Arg Ala Pro Thr Leu Arg Ser Ala Thr
 65 70 75 80
 Ala Asp Asn Ser Glu Asn Thr Gly Phe Lys Asn Val Pro Asp Leu Arg
 85 90 95
 Thr Asp Gln Pro Lys Pro Pro Ser Lys Lys Arg Ser Cys Asp Pro Ser
 100 105 110
 Glu Tyr Arg Val Ser Glu Leu Lys Glu Ser Leu Ile Thr Thr Pro
 115 120 125
 Ser Arg Pro Arg Thr Ala Arg Cys Ile Arg Leu
 130 135 140

<210> 61
 <211> 1565
 <212> DNA
 <213> Salmonella

<400> 61
 gatatacattc tggcctctga cgttctgatg gtcgcacgtg gcgatctggg cgttgaatc 60
 ggcaatcccg agctcgttgg tatccgaaaa gcctcgtatc gcctcgcgcg tcagctaaac 120
 cggcagatca tcaactgcaac gcaaatgatg gagtcgatga tcaccaacc gatgccgacc 180
 cgtcgggaag tgatggcagt gccgaacgcc gtctctggag gcacggatgc agttatcctg 240
 tctgccgaaa ccgcagcccg teagtatcct tctgaaaccg ttgcgcgaat ggccgcgctc 300
 tgcctgggag cagaaaaaat cccacagcct aatgtgtcta aacaccgtct cgacgtcag 360
 ttgcgcaacg ttgcggaagc cattgcctag tctcgtatgt atcgcgcaaa ccactcgaac 420
 ggagtaacg agatcaltac catgacggaa tccggtcgtc ccgcctaat gacttccgt 480
 atcagctccg cctcgcgat tttcgcctag tccgcccag aacgcacgct gaacctgacc 540
 gcctctatc gccgagtaac gccctgcct tttgatagcg cgcctgatgg cgttctcgcg 600
 gcacatgaa ctgtaaatct gctgcgcgat aaaggatctc tggtttccgg cgcctcgtt 660
 atcgtgacc agggcagatg catgagcacc gtccggtcaa ccaatccac cggcctcgtt 720
 ccttaataa ccccagatgc gggggccat atagggcggg gatttaaatg caaacgtccg 780
 ccgaacgcc gacgcactgt gtccagata tagcaaaaa cgggattacc ctgattatga 840
 aacatgccg cctttttttg cccctgagag gccatcagca tgcctggaat gtcgacgcc 900
 cagccatcgg gtacagaaaa aatgaatttt tctcgtttac gacgcctctc ccgataacc 960
 tccagactt ccaatgcaac acgctgttga attttttctg gaccccgcat cgcacaacta 1020
 gccatactg ccaatgcctg tggcgcggcg gcgaacatc cctcgcacat cgttctcgcg 1080
 tccgcttctg tacgtcggg aaagcaccac gacagattaa ttacgcccc gcgacgaa 1140
 ctctcccca ccgtccggc aaagcaccac agcctcggca gcaaaaggtc ccgaaatgat 1200
 gccggtgta atgcgatccc ccgcatgcc gccgcgccca accagagccc ccaatactgt 1260
 ggatagcga aggatttttc gaattcaggg atatactcac tattattttt tttggtttcc 1320
 atgttttcc aggtctcctc gacgcgaaaa ggaattctga atagtgtac gacgtctcgg 1380
 tctccacaa aacaaaaaag ccggcacaca tccgtaccg gctctgtcag cgaatttctt 1440
 aatcgaagcg cagttcggcc agaacctctt tccctcttgc caggtattca ccacgatctg 1500
 accccctcag accttccgtg ccggcgaatt ttgctgtcag aggttaaac gcttctcgtt 1560
 tgcctc 1565

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(18) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
12 April 2004 (12.04.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/25397 A3

- (51) International Patent Classification: **A61K 39/02** (39/12)
- (21) International Application Number: PCT/US00/25397
- (22) International Filing Date: 24 August 2000 (24.08.2000)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60157500 4 October 1999 (04.10.1999) US
60157581 4 October 1999 (04.10.1999) US
60157657 4 October 1999 (04.10.1999) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): VION PHARMACEUTICALS, INC. [US/AU]; Four Science Park, New Haven, CT 06511 (US).
- (72) Inventors and Inventors/Applicants (for US only): **BERMUDES, David, G.** [US/US]; 524 North Main Street, Wallingford, CT 06492 (US); **KING, Ivan, C.** [US/US]; 65 Blue Hills Road, New Haven, CT 06473 (US); **CLAIRMONT, Caroline, A.** [US/US]; 80 Merwin Circle, Cheshire, CT 06410 (US); **LIN, Stanley, L.** [US/US]; 175 Old Toll Road, Madison, CT 06443 (US); **BELCOURT, Michael** [US/US]; 9 Algonquin Drive, Wallingford, CT 06442 (US).
- (74) Agents: **BALDWIN, Geraldine, F.** et al.; Pennic & Edmonds LLP, 1155 Avenue of the Americas, New York, NY 10036 (US).
- (81) Designated States (optional): AF, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (optional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (86) Date of publication of the international search report: 24 January 2002
- Use two letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/25397 A3

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR TUMOR-TARGETED DELIVERY OF EFFECTOR MOLECULES

(57) Abstract: The present application discloses the preparation and use of attenuated tumor-targeted bacteria vectors for the delivery of one or more primary effector molecule(s) to the site of a solid tumor. The primary effector molecule(s) of the invention is used in the method of the invention to treat a solid tumor cancer such as a carcinoma, melanoma, lymphoma, or sarcoma. The invention relates to the surprising discovery that effector molecules, which may be toxic when administered systemically to a host, can be delivered locally to tumors by attenuated tumor targeted bacteria with reduced toxicity to the host. The application also discloses the delivery of one or more optional effector molecule(s) (termed secondary effector molecule(s) which may be delivered by the attenuated tumor targeted bacteria in conjunction with the primary effector molecule(s).

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/23242
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 39/02, 39/12 US CL : 424/ 200.1, 234.1, 258.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) I.F.S. : 424/ 200.1, 234.1, 258.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, WEST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,080,849 (BERMUDES et al.) 10 September 1997 (10.09.1997), entire document, esp. column 13.	1,9,12,14,25,26,33,36,38,71,82,84
X	WO 96/40238 (PAWLEK et al.) 19 December 1996 (19.12.1996), pages 1, 147-156	1,9,12,14,25,26,38,71,82,84
X	PAWLEK et al. "Tumor Targeted Salmonella as a Novel Anticancer Vector", Cancer Research, Vol. 57, October 1997, entire article	1,9,12,14,25,26,38,71,82,84
X	LOW et al. "Lipid A mutant Salmonella with suppressed virulence and TNF α induction retain tumor-targeting in vivo". Nature Biotechnology, Vol. 17, January 1999, entire document.	1,9,12,14,25,26,38,71,82,84
Y	see page 39, second column	2
Y	MARR et al. "Tumor immunotherapy using an adenoviral vector expressing a membrane-bound mutant of murine TNF alpha". Gene Ther. Vol. 4, No. 11, November 1997, abstract only.	3,4,27,28,73,74
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"I" later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application, but cited to understand the procedure or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may be relevant to priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special cases (as specified)	"Y" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"R" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 04 November 2000 (04.11.2000)	Date of mailing of the international search report 12 APR 2001	
Name and mailing address of the ISA/US International Bureau of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20535 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer <i>A. Patricia Lawrence</i> Carly (PCT/US) Telephone No. 703-308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/23242
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEN et al. "Liposomes conjugated to platinum encoding angiotensin and endothelin inhibit breast cancer in nude mice." <i>Cancer Res.</i> Vol. 59, No. 14, July 1999, abstract only.	5,6,29,30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/23242

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2. Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 1-12,14,16-36,38,40-47,71,73-74,82,84
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU500/23242

This International Search Authority has found 49 inventions claimed in the International Application covered by the claims indicated below:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group 1, claim(s) 1,3-4,12,14,25,27-28,36,38, drawn to an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more primary effector molecules, wherein at least one of the primary effector molecules is a TNF family member, operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe.

Group 2, claim(s) 2-4,12,14,26-28,36,38, drawn to an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules, wherein at least one of the primary effector molecules is a TNF family member, operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe.

Group 3, claim(s) 1,5-6,12,14,25,29-30,36,38 drawn to an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more primary effector molecules, wherein at least one of the primary effector molecules is an anti-angiogenic factor, operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe.

Group 4, claim(s) 2,5-6,12,14,26,29-30,36,38, drawn to an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules, wherein at least one of the primary effector molecules is an anti-angiogenic factor, operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe.

Group 5, claim(s) 1,7-8,12,14,25,31-32,36,38, drawn to an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more primary effector molecules, wherein at least one of the primary effector molecules is a bacteriocin family member with the proviso said bacteriocin is not BRP, operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe.

Group 6, claim(s) 2,7-8,12,14,26,32-32,36,38, drawn to an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules, wherein at least one of the primary effector molecules is a bacteriocin family member with the proviso said bacteriocin is not BRP, operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe.

Group 7, claim(s) 1,9-10,12,14,25,33-34,36,38, drawn to an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more primary effector molecules, wherein the primary effector molecule is a tumor inhibitory enzyme, operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe.

Group 8, claim(s) 2,9-10,12,14,26,33-34,36,38 drawn to an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules, wherein the primary effector molecule is a tumor inhibitory enzyme, operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe.

Group 9, claim(s) 1,11-12,14,25,35-36,38, drawn to an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more primary effector molecules, wherein the primary effector molecule is hemolysin, verotoxin, CNF1, CNF2, or PMT, operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe.

Group 10, claim(s) 2,11-12,14,26,35-36,38, drawn to an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules, wherein the primary effector molecule is hemolysin, verotoxin, CNF1, CNF2, or PMT, operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe.

Group 11, claim(s) 2,13-14,26,37-38, drawn to an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules operably linked to one or more promoters, wherein the secondary effector molecule is an immunomodulating agent, an anti-tumor protein, a pro-drug converting enzyme, an antisense molecule, a ribozyme or an antigen, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe.

Group 12, claim(s) 1,15,25,39, drawn to an attenuated tumor-targeted bacteria, further comprising an enhanced release system, comprising one or more primary effector molecules, operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US00/23242

- Group 13, claim(s) 2, 15, 26, 30, drawn to an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules, wherein the secondary effector molecule is a bacteriocin release factor (BRF), operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe.
- Group 14, claim(s) 17, 20, 22-24, 41, 44, 46, 47, drawn to an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins wherein said fusion protein comprises a signal sequence and an effector molecule.
- Group 15, claim(s) 18-24, 42-47 drawn to an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins wherein said fusion protein comprises a ferry peptide and an effector molecule.
- Group 16, claim(s) 48, 50-51, 59, 61, drawn to a method for treating cancer comprising administering an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more primary effector molecules, wherein at least one of the primary effector molecules is a TNF family member, operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe.
- Group 17, claim(s) 49-51, 59, 61, drawn to a method for treating cancer comprising administering an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules, wherein at least one of the primary effector molecules is a TNF family member, operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe.
- Group 18, claim(s) 48, 52-53, 59, 61, drawn to a method for treating cancer.
- Group 19, claim(s) 49, 52-53, 59, 61, drawn to a method for treating cancer.
- Group 20, claim(s) 48, 54-55, 59, 61, drawn to a method for treating cancer.
- Group 21, claim(s) 49, 54-55, 59, 61, drawn to a method for treating cancer.
- Group 22, claim(s) 48, 56-57, 59, 61 drawn to a method for treating cancer.
- Group 23, claim(s) 49, 56-57, 59, 61, drawn to a method for treating cancer.
- Group 24, claim(s) 48, 58-59, 61, drawn to a method for treating cancer.
- Group 25, claim(s) 49, 58-59, 61, drawn to a method for treating cancer.
- Group 26, claim(s) 49, 60-61, drawn to a method for treating cancer.
- Group 27, claim(s) 48, 62, drawn to a method for treating cancer.
- Group 28, claim(s) 49, 63, drawn to a method for treating cancer.
- Group 29, claim(s) 64, 67, 69-70, drawn to a method for treating cancer comprising fusion proteins.
- Group 30, claim(s) 65-70, drawn to a method for treating cancer comprising fusion proteins.
- Group 31, claim(s) 71, 73-74, 82, 84, drawn to a method for treating cancer comprising administering one or more chemotherapeutic agents.
- Group 32, claim(s) 72-74, 82, 84, drawn to a method for treating cancer comprising administering one or more chemotherapeutic agents.
- Group 33, claim(s) 71, 75-76, 82, 84, drawn to a method for treating cancer comprising administering one or more chemotherapeutic agents.
- Group 34, claim(s) 72, 75-76, 83, 84, drawn to a method for treating cancer comprising administering one or more chemotherapeutic agents.
- Group 35, claim(s) 71, 77-78, 82, 84, drawn to a method for treating cancer comprising administering one or more chemotherapeutic agents.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US00/23242

- Group 36, claim(s) 72,77-78,82,84, drawn to a method for treating cancer comprising administering one or more chemotherapeutic agents.
- Group 37, claim(s) 71,79-80,82,84, drawn to a method for treating cancer comprising administering one or more chemotherapeutic agents.
- Group 38, claim(s) 72,79-80,82,84, drawn to a method for treating cancer comprising administering one or more chemotherapeutic agents.
- Group 39, claim(s) 71,81-82,84, drawn to a method for treating cancer comprising administering one or more chemotherapeutic agents.
- Group 40, claim(s) 72,81-82,84, drawn to a method for treating cancer comprising administering one or more chemotherapeutic agents.
- Group 41, claim(s) 71,82-84, drawn to a method for treating cancer comprising administering one or more chemotherapeutic agents.
- Group 42, claim(s) 72,82-84, drawn to a method for treating cancer comprising administering one or more chemotherapeutic agents.
- Group 43, claim(s) 71,85, drawn to a method for treating cancer comprising administering one or more chemotherapeutic agents.
- Group 44, claim(s) 72,86, drawn to a method for treating cancer comprising administering one or more chemotherapeutic agents.
- Group 45, claim(s) 87,90,92-93, drawn to a method for treating cancer comprising administering one or more chemotherapeutic agents.
- Group 46, claim(s) 88-93, drawn to a method for treating cancer comprising administering one or more chemotherapeutic agents.
- Group 47, claim(s) 94, drawn to a method for treating cancer comprising administering one or more chemotherapeutic agents.
- Group 48, claim(s) 95,99, drawn to a fusion protein.
- Group 49, claim(s) 96-99, drawn to a fusion protein.

The inventions listed as Groups 1-49 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: there are multiple products which lack a special technical feature so as to link each process of using those products. If multiple products, processes of manufacture or uses are claimed, the first invention of the category first mentioned in the claims of the application and the first recited invention of each of the other categories related thereto will be considered as the main invention in the claims, see PCT Article 17(3)(a) and § 1.476(c).

Additionally, the following Groups require an election of species:

- Group 1 (Claims 4 and 28)
- Group 2 (Claims 4 and 28)
- Group 3 (Claims 6 and 30)
- Group 4 (Claims 6 and 30)
- Group 5 (Claims 8 and 32)
- Group 6 (Claims 8 and 32)
- Group 7 (Claims 10 and 34)
- Group 8 (Claims 10 and 34)
- Group 9 (Claims 11 and 35)
- Group 10 (Claims 11 and 35)
- Group 11 (Claims 13 and 37)
- Group 15 (Claims 21 and 45)
- Group 16 (Claim 51)
- Group 17 (Claim 51)
- Group 18 (Claim 53)
- Group 19 (Claim 53)
- Group 20 (Claim 55)
- Group 21 (Claim 55)
- Group 22 (Claim 57)
- Group 23 (Claim 57)

Form PCT/ISA/210 (continuation sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/23242

- Group 34 (Claim 58)
- Group 25 (Claim 58)
- Group 26 (Claim 60)
- Group 30 (Claim 68)
- Group 31 (Claim 74)
- Group 32 (Claim 74)
- Group 33 (Claim 76)
- Group 34 (Claim 76)
- Group 35 (Claim 78)
- Group 36 (Claim 78)
- Group 37 (Claim 80)
- Group 38 (Claim 80)
- Group 39 (Claim 81)
- Group 40 (Claim 81)
- Group 41 (Claim 83)
- Group 42 (Claim 83)
- Group 49 (Claim 98)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 35/00	C 0 7 K 7/06	
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/035	
C 0 7 K 7/06	C 0 7 K 14/16	
C 0 7 K 14/035	C 0 7 K 14/225	
C 0 7 K 14/16	C 0 7 K 14/50	
C 0 7 K 14/225	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 14/50	C 1 2 N 1/21	
C 0 7 K 19/00	A 6 1 K 37/48	
C 1 2 N 1/21	A 6 1 K 37/02	

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

- (72) 発明者 バームデス、デヴィッド、ジー。
アメリカ合衆国 0 6 4 9 2 コネティカット州、ウォーリングフォード、ノース メイン ストリート 5 2 4
- (72) 発明者 キング、イヴァン、シー。
アメリカ合衆国 0 6 4 7 3 コネティカット州、ニュー ヘブーン、ブルー ヒルズ ロード 6 5
- (72) 発明者 クレアモント、キャロライン、エー。
アメリカ合衆国 0 6 4 1 0 コネティカット州、チェシャー、マーウィン サークル 8 0
- (72) 発明者 リン、スタンレー、エル。
アメリカ合衆国 0 6 4 4 3 コネティカット州、マディソン、オールド トール ロード 1 7 3
- (72) 発明者 ベルコート、マイケル
アメリカ合衆国 0 6 9 4 2 コネティカット州、ウォーリングフォード、アルゴンキン ドライブ 9

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA28 BA80 CA04 DA05 HA17
4B065 AA46X AB01 CA24 CA31 CA44
4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 AA19 BA03 CA53 DC02 DC22 DC50
MA02 NA14 ZB212 ZB262
4C087 AA01 AA02 AA03 BC35 CA09 MA02 NA14 ZB21 ZB26
4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 DA01 DA14 DA83 DA89 EA20 FA74