

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-156501

(P2020-156501A)

(43) 公開日 令和2年10月1日(2020.10.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/54 (2006.01)	C 1 2 N 15/54	4 B 0 5 0
C 1 2 N 15/38 (2006.01)	C 1 2 N 15/38 Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/10 (2006.01)	C 1 2 N 15/10 2 0 0 Z	4 C 0 8 6
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867 Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/19 (2006.01)	C 1 2 N 15/19	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 114 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2020-102788 (P2020-102788)	(71) 出願人	505389271
(22) 出願日	令和2年6月15日 (2020.6.15)		ジェンビーボ・インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2016-503227 (P2016-503227) の分割		GENVIVO, INC.
原出願日	平成26年3月14日 (2014.3.14)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 911
(31) 優先権主張番号	61/784, 901		08, サン マリノ, ハンチントン ドラ
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013.3.14)	(74) 代理人	イブ 475
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		100118902
			弁理士 山本 修
		(74) 代理人	100106208
			弁理士 宮前 徹
(特許庁注：以下のものは登録商標)		(74) 代理人	100120112
1. テフロン			弁理士 中西 基晴
2. TRITON		(74) 代理人	100122644
			弁理士 寺地 拓己

最終頁に続く

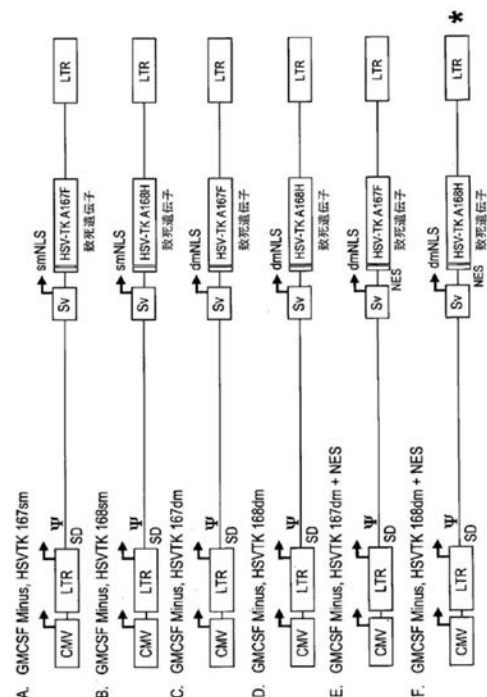
(54) 【発明の名称】 改善されたチミジンキナーゼ遺伝子

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 改善された単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼをコードする核酸配列の提供。

【解決手段】 ヒト単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ (HSV-TK) の突然変異した形態をコードするポリヌクレオチド配列であって、コードされるHSV-TKが、アミノ酸残基25、26、32、33、167、168またはそれらの組合せで突然変異しており、ポリヌクレオチド配列が、ある特定の塩基配列のポリヌクレオチド配列と比較して突然変異している、ポリヌクレオチド配列。

【選択図】 図11



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ（HSV-TK）の突然変異した形態をコードするポリヌクレオチド配列であって、コードされるHSV-TKが、アミノ酸残基25、26、32、33、167、168またはそれらの組合せで突然変異しており、ポリヌクレオチド配列が、配列番号3のポリヌクレオチド配列と比較して突然変異している、ポリヌクレオチド配列。

【請求項 2】

コードされるHSV-TKが、アミノ酸残基167、168またはそれらの組合せで、極性、非極性、塩基性または酸性アミノ酸に突然変異している、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項 3】

コードされるHSV-TKが、アミノ酸残基167で、極性、非極性、塩基性または酸性アミノ酸に突然変異している、請求項1または2に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

コードされるHSV-TKが、アミノ酸残基168で、極性、非極性、塩基性または酸性アミノ酸に突然変異している、請求項1または2に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

コードされるHSV-TKが、アミノ酸残基167および168の両方で、極性、非極性、塩基性または酸性アミノ酸に突然変異している、請求項1または2に記載のポリヌクレオチド。

20

【請求項 6】

コードされるHSV-TKのアミノ酸残基167が、セリンまたはフェニルアラニンに突然変異している、請求項1または2に記載のポリヌクレオチド配列。

【請求項 7】

コードされるHSV-TKのアミノ酸残基168が、ヒスチジン、リシン、システイン、セリンおよびフェニルアラニンからなる群から選択されるアミノ酸に突然変異している、請求項1または2に記載のポリヌクレオチド配列。

【請求項 8】

コードされるHSV-TKが、アミノ酸25および26で突然変異している、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

30

【請求項 9】

アミノ酸残基25および26が、グリシン、セリンおよびグルタミン酸からなる群から選択されるアミノ酸に突然変異している、請求項8に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 10】

コードされるHSV-TKが、アミノ酸残基32および33で突然変異している、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 11】

アミノ酸残基32および33が、グリシン、セリンおよびグルタミン酸からなる群から選択されるアミノ酸に突然変異している、請求項10に記載のポリヌクレオチド。

40

【請求項 12】

コードされるHSV-TKが、アミノ酸残基25、26、32および33で突然変異している、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 13】

アミノ酸残基25、26、32および33が、グリシン、セリンおよびグルタミン酸からなる群から選択されるアミノ酸に突然変異している、請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 14】

コードされるHSV-TKが、アミノ酸残基25、26、32および33からなる群から選択される少なくとも1つの突然変異ならびにアミノ酸残基167および168からな

50

る群から選択される少なくとも1つの突然変異を含む、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項15】

コードされるHSV-TK配列が、核外輸送シグナルをさらに含む、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項16】

核外輸送シグナル配列が、HSV-TK配列の5'末端にまたはその付近に挿入される、請求項15に記載のポリヌクレオチド。

【請求項17】

核外輸送シグナル配列が、LQKKLEELD G（配列番号24）である、請求項15に記載のポリヌクレオチド。

【請求項18】

コードされる突然変異体HSV-TKが、核領域に排他的に局在しない、請求項1から17のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項19】

コードされる修飾されたHSV-TKが、野生型HSV-TKと比較して、低下した量のチミジンキナーゼ活性を示す、請求項1から18のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド配列。

【請求項20】

コードされる修飾されたHSV-TKの活性が、約1.5倍、約2倍、約5倍、約10倍、約20倍、約30倍または約50倍低下する、請求項19に記載のポリヌクレオチド配列。

【請求項21】

コードされる修飾されたHSV-TKの活性が、約1.5%、約2%、約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%または約100%低下する、請求項19に記載のポリヌクレオチド配列。

【請求項22】

コードされるHSV-TKが、アミノ酸残基25、26、32、33および168での突然変異を含む、請求項1に記載のポリヌクレオチド配列。

【請求項23】

コードされるHSV-TKが、突然変異R25G、R26S、R32G、R33SおよびA168Hを含む、請求項22に記載のポリヌクレオチド配列。

【請求項24】

配列番号12～22のいずれか1種として示される核酸配列を含む、請求項1から23のいずれかに記載の修飾されたポリヌクレオチド配列。

【請求項25】

配列番号16～22のいずれか1種として示される核酸配列を含む、請求項1から24のいずれかに記載の修飾されたポリヌクレオチド配列。

【請求項26】

HSV-TK168dmNES（配列番号18）を含む、請求項1から25に記載のポリヌクレオチド配列。

【請求項27】

修飾されたHSV-TKポリペプチドをコードする請求項1から26のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むレトロウイルスベクター。

【請求項28】

第2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列をさらに含み、前記第2のポリペプチドが、治療用ポリペプチドである、請求項27に記載のレトロウイルスベクター。

【請求項29】

第2の治療用ポリペプチドが、第2の自殺遺伝子または成長因子である、請求項28に記載のレトロウイルスベクター。

10

20

30

40

50

【請求項 30】

成長因子が、上皮成長因子 (EGF)、血管内皮成長因子 (VEGF)、エリスロポエチン、G-CSF、GM-CSF、TGF- α 、TGF- β および線維芽細胞成長因子からなる群から選択される、請求項 29 に記載のレトロウイルスベクター。

【請求項 31】

第 2 の自殺遺伝子が、シトシンデアミナーゼ、VSV-tk、IL-2、ニトロレダクターゼ (NR)、カルボキシシルエステラーゼ、 β -グルクロニダーゼ、シトクロム p450、 β -ガラクトシダーゼ、ジフテリア毒素 A-鎖 (DT-A)、カルボキシペプチド G2 (CPG2)、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP) およびデオキシシチジンキナーゼ (dCK) からなる群から選択される、請求項 29 に記載のレトロウイルスベクター。

10

【請求項 32】

Pi T-2 または Pi T-1 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 27 に記載のレトロウイルスベクター。

【請求項 33】

ターゲッティングポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 27 に記載のレトロウイルスベクター。

【請求項 34】

ターゲッティングポリペプチドが、細胞外タンパク質と結合する、請求項 33 に記載のレトロウイルスベクター。

20

【請求項 35】

細胞外タンパク質が、コラーゲンである、請求項 34 に記載のレトロウイルスベクター。

【請求項 36】

それを必要とする対象に、請求項 27 から 35 に記載のレトロウイルスベクターを含む治療有効量のレトロウイルス粒子を投与し、その後、ヌクレオシドプロドラッグを投与することを含む、それを必要とする対象において新生物細胞を死滅させる方法。

【請求項 37】

レトロウイルス粒子が、静脈内に、筋肉内に、皮下に、動脈内に、肝動脈内に、髄腔内に、腹膜内におよび／または腫瘍内に投与される、請求項 36 に記載の方法。

30

【請求項 38】

レトロウイルス粒子が、腫瘍内にまたは静脈内に投与される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 39】

レトロウイルスベクター粒子が、動脈内に投与される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 40】

少なくとも 1×10^{15} TVP のレトロウイルスベクターが、それを必要とする対象に累積的に投与される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 41】

少なくとも 1×10^9 TVP のレトロウイルスベクターが、それを必要とする対象に一度に投与される、請求項 36 に記載の方法。

40

【請求項 42】

プロドラッグが、レトロウイルスベクター粒子の投与後、約 1～2 日の間投与される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 43】

プロドラッグが、ガンシクロビル、バルガンシクロビル、アシクロビル、バラシクロビル、ペンシクロビルからなる群から選択される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 44】

プロドラッグが、ガンシクロビルである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 45】

50

それを必要とする患者に、治療有効量の請求項 27 から 35 に記載のレトロウイルスベクター粒子を送達し、その後、ヌクレオシドプロドラッグを投与することを含む、それを必要とする患者において癌を治療する方法。

【請求項 46】

レトロウイルス粒子が、静脈内に、筋肉内に、皮下に、動脈内に、肝動脈内に、髄腔内に、腹膜内におよび／または腫瘍内に投与される、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 47】

レトロウイルス粒子が、腫瘍内にまたは静脈内に投与される、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 48】

レトロウイルスベクター粒子が、動脈内に投与される、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 49】

少なくとも 1×10^{15} TVP のレトロウイルスベクターが、それを必要とする対象に累積的に投与される、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 50】

少なくとも 1×10^9 TVP のレトロウイルスベクターが、それを必要とする対象に一度に投与される、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 51】

プロドラッグが、レトロウイルスベクター粒子の投与後、約 1 ～ 2 日の間投与される、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 52】

プロドラッグが、ガンシクロビル、バルガンシクロビル、アシクロビル、バラシクロビル、ペンシクロビルからなる群から選択される、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 53】

プロドラッグが、ガンシクロビルである、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 54】

ギャップ結合依存性細胞内情報伝達 (GJIC) を増大する処理とともに、対象に治療有効量の、HSV-TK を含むレトロウイルスベクター粒子を送達することを含む、対象における新生物細胞の HSV-TK ガンシクロビル、バルガンシクロビル、アシクロビル、バラシクロビル、ペンシクロビル媒介性死滅を増大する方法。

【請求項 55】

レトロウイルスベクター粒子が、請求項 27 から 35 に記載のレトロウイルスベクターを含む、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

GJIC を増大する処理が、少なくとも 1 種のギャップ結合サブユニットをコードするポリヌクレオチド配列を送達することを含む、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 57】

ギャップ結合サブユニットが、コネキシン 43、コネキシン 30 またはコネキシン 26 である、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

ギャップ結合サブユニットが、翻訳後修飾を防ぐよう修飾されたギャップ結合サブユニットである、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 59】

GJIC を増大する処理が、E-カドヘリンをコードするポリヌクレオチド配列を送達することを含む、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 60】

GJIC を増大する処理が、対象に、ゲムシタビン、cAMP、レチノイン酸、カロテノイド、グルココルチコイド、フラバノイド、アピゲニンまたはロバスタチンからなる群からの化合物を送達することを含む、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 61】

10

20

30

40

50

G J I Cを増大する処理が、プロテアソーム阻害を含む、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 2】

プロテアソーム阻害が、N-アセチル-L e u-L e u-N l e-CHO (A L L N) および／またはクロロキンの投与を含む、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

G J I Cを増大する処理が、放射線処理を含む、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 4】

G J I Cを増大する処理が、電氣的処理を含む、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 5】

レトロウイルス粒子が、T K 1 6 8 d m N E S (配列番号 1 8) を含む、請求項 5 4 に記載の方法。 10

【請求項 6 6】

a) 細胞に、請求項 1 から 2 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド配列を導入することと、

b) 細胞が、発現されるチミジンキナーゼまたはその変異体を発現するのを可能にするまたは開始させることと、

c) 細胞を、チミジンキナーゼによって細胞傷害性薬剤に変換される薬剤と接触させることと

を含む、細胞を死滅させる方法。

【請求項 6 7】

H S V-T Kが、請求項 1 から 2 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 6 6 に記載の方法。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

相互参照

本願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、2 0 1 3 年 3 月 1 4 日に出願された米国特許仮出願番号第 6 1 / 7 8 4 , 9 0 1 号の利益を主張する。

【0 0 0 2】

本願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、本明細書と同日に出願された、以下の同時係属特許出願番号 [まだ割り当てられていない]、代理人整理番号第 3 0 8 6 3 - 7 2 2 . 2 0 2 号に関連する。 30

【背景技術】

【0 0 0 3】

癌などの増殖性疾患は、社会に対して容易でない課題を提示する。悪性癌性成長を含めた癌性成長は、例えば、悪性組織の調節されない成長をもたらす制御不能な細胞増殖、局所、さらには遠隔組織にまで浸潤する能力、分化の欠如、検出可能な症状の欠如および最も著しくは、有効な治療および予防の欠如などの独特の特徴を有する。

【0 0 0 4】

癌は、任意の年齢で任意の臓器の任意の組織において発達し得る。癌の病因論は、明確に規定されていないが、遺伝的感受性、染色体切断障害、ウイルス、環境因子および免疫学的障害などの機序はすべて、悪性細胞成長および形質転換と関係していた。癌は、世界中で何百万人もの個人に影響を及ぼす医学的状態の大きなカテゴリーを包含する。癌細胞は、身体のおほとんどいかなる臓器および／または組織においても生じ得る。世界中で、毎年 1 0 0 0 万人超が、癌と診断され、この数字は、2 0 2 0 年までに毎年 1 5 0 0 万の新規症例まで増大すると推測されている。癌は、毎年 6 0 0 万人の死亡、すなわち、世界中の死亡の 1 2 % を引き起こす。 40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 5】

ヒト単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ（H S V－T K）の突然変異形態をコードするポリヌクレオチド配列が、本明細書において提供され、ここで、コードされるH S V－T Kは、アミノ酸残基25、26、32、33、167、168またはそれらの組合せで突然変異しており、ポリヌクレオチド配列は、配列番号1または3のポリヌクレオチド配列と比較して突然変異している。

【課題を解決するための手段】

【0006】

ヒト単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ（H S V－T K）の突然変異した形態をコードするポリヌクレオチド配列であって、コードされるH S V－T Kが、アミノ酸残基25、26、32、33、167、168またはそれらの組合せで突然変異しており、ポリヌクレオチド配列が、配列番号3のポリヌクレオチド配列と比較して突然変異している、ポリヌクレオチド配列。一実施形態では、コードされるH S V－T Kは、アミノ酸残基167、168またはそれらの組合せで、極性、非極性、塩基性または酸性アミノ酸に突然変異している。別の実施形態では、コードされるH S V－T Kは、アミノ酸残基167で、極性、非極性、塩基性または酸性アミノ酸に突然変異している。なお別の実施形態では、コードされるH S V－T Kは、アミノ酸残基168で、極性、非極性、塩基性または酸性アミノ酸に突然変異している。さらに別の実施形態では、コードされるH S V－T Kは、アミノ酸残基167および168の両方で、極性、非極性、塩基性または酸性アミノ酸に突然変異している。

【0007】

一実施形態では、コードされるH S V－T Kのアミノ酸残基167は、セリンまたはフェニルアラニンに突然変異している。別の実施形態では、コードされるH S V－T Kのアミノ酸残基168は、ヒスチジン、リシン、システイン、セリンおよびフェニルアラニンからなる群から選択されるアミノ酸に突然変異している。さらに別の実施形態では、コードされるH S V－T Kは、アミノ酸25および26で突然変異している。なお別の実施形態では、アミノ酸残基25および26は、グリシン、セリンおよびグルタミン酸からなる群から選択されるアミノ酸に突然変異している。別の実施形態では、コードされるH S V－T Kは、アミノ酸残基32および33で突然変異している。一実施形態では、アミノ酸残基32および33は、グリシン、セリンおよびグルタミン酸からなる群から選択されるアミノ酸に突然変異している。一実施形態では、コードされるH S V－T Kは、アミノ酸残基25、26、32および33で突然変異している。別の実施形態では、アミノ酸残基25、26、32および33は、グリシン、セリンおよびグルタミン酸からなる群から選択されるアミノ酸に突然変異している。さらに別の実施形態では、コードされるH S V－T Kは、アミノ酸残基25、26、32および33からなる群から選択される少なくとも1つの突然変異およびアミノ酸残基167および168からなる群から選択される少なくとも1つの突然変異を含む。

【0008】

さらに他の実施形態では、コードされるH S V－T K配列は、核外輸送シグナル（N E S）をさらに含む。別の実施形態では、核外輸送シグナル配列は、H S V－T K配列の5'末端にまたはその付近に挿入される。別の実施形態では、核外輸送シグナル配列は、L Q K K L E E L E L D G（配列番号24）である。一実施形態では、コードされる突然変異体H S V－T Kは、核領域に排他的に局在しない。

【0009】

一実施形態では、コードされる修飾されたH S V－T Kは、野生型H S V－T Kと比較して、低下した量のチミジンキナーゼ活性を示す。別の実施形態では、コードされる修飾されたH S V－T Kの活性は、約1.5倍、約2倍、約5倍、約10倍、約20倍、約30倍または約50倍低下する。さらに別の実施形態では、コードされる修飾されたH S V－T Kの活性は、約1.5%、約2%、約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%または約100%低下する。

10

20

30

40

50

【0010】

一実施形態では、コードされるHSV-TKは、アミノ酸残基25、26、32、33および168での突然変異を含む。別の実施形態では、コードされるHSV-TKは、突然変異R25G、R26S、R32G、R33SおよびA168Hを含む。

【0011】

一実施形態では、修飾されたポリヌクレオチド配列は、配列番号12～22のいずれか1種として示される核酸配列を含む。さらに別の実施形態では、修飾されたポリヌクレオチド配列は、配列番号16～22のいずれか1種として示される核酸配列を含む。一実施形態では、配列は、TK168dmNES（配列番号18）を含む。さらに別の実施形態では、ポリヌクレオチドは、修飾されたHSV-TKポリペプチドをコードする。

10

【0012】

さらに他の実施形態では、ポリヌクレオチドは、第2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列をさらに含み、前記の第2のポリペプチドは、治療用ポリペプチドである。さらに他の実施形態では、第2の治療用ポリペプチドは、第2の自殺遺伝子または成長因子である。いくつかの実施形態では、成長因子は、上皮成長因子（EGF）、血管内皮成長因子（VEGF）、エリスロポエチン、G-CSF、GM-CSF、TGF- α 、TGF- β および線維芽細胞成長因子からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第2の自殺遺伝子は、シトシンデアミナーゼ、VSV-tk、IL-2、ニトロレダクターゼ（NR）、カルボキシエステラーゼ、 β -グルクロニダーゼ、シトクロムp450、 β -ガラクトシダーゼ、ジフテリア毒素A鎖（DT-A）、カルボキシペプチドG2（CPG2）、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ（PNP）およびデオキシシチジンキナーゼ（dCK）からなる群から選択される。

20

【0013】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、PiT-2ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。さらに他の実施形態では、本明細書において開示されるポリヌクレオチドは、ターゲッティングポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。一実施形態では、ターゲッティングポリペプチドは、細胞外タンパク質と結合する。別の実施形態では、細胞外タンパク質は、コラーゲンである。

【0014】

本明細書において記載されるように、治療有効量のレトロウイルス粒子を投与することを含み、レトロウイルスベクターがHSV-TK修飾されたペプチドをコードする、それを必要とする対象において新生物細胞を死滅させる方法も、本明細書において提供される。

30

【0015】

いくつかの実施形態では、レトロウイルス粒子は、静脈内に、筋肉内に、皮下に（subcutaneously）、動脈内に、肝動脈内に、髄腔内に、腹膜内におよび／または腫瘍内に投与される。他の実施形態では、レトロウイルス粒子は、腫瘍内にまたは静脈内に投与される。さらに他の実施形態では、レトロウイルスベクター粒子は、動脈内に投与される。他の実施形態では、少なくとも 1×10^{12} TVPのレトロウイルスベクターが、それを必要とする対象に累積的に投与される。さらに他の実施形態では、少なくとも 1×10^9 TVPのレトロウイルスベクターが、それを必要とする対象に一度に投与される。

40

【0016】

さらに他の実施形態では、プロドラッグは、レトロウイルスベクター粒子の投与後、約1～2日の間投与される。いくつかの実施形態では、プロドラッグは、ガンシクロビル、バルガンシクロビル、アシクロビル、バラシクロビル、ペンシクロビルからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、プロドラッグは、ガンシクロビルである。

【0017】

また、それを必要とする患者に、本明細書において記載されるような、HSV-TK修飾されたペプチドをコードする治療有効量のレトロウイルスベクター粒子を送達し、その後、ヌクレオシドプロドラッグを投与することを含む、それを必要とする患者において癌

50

を治療する方法が本明細書において提供される。

【0018】

また、ギャップ結合依存性細胞内情報伝達（G J I C）を増大する処理とともに、対象に治療有効量の、H S V-T Kを含むレトロウイルスベクター粒子を送達することを含む、対象における新生物細胞のH S V-T Kガンシクロビル、バルガンシクロビル、アシクロビル、バラシクロビル、ペンシクロビル媒介性死滅を増大する方法も本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、G J I Cを増大する処理は、少なくとも1種のギャップ結合サブユニットをコードするポリヌクレオチド配列を送達することを含む。他の実施形態では、ギャップ結合サブユニットは、コネキシン43、コネキシン30またはコネキシン26である。さらに他の実施形態では、ギャップ結合サブユニットは、翻訳後修飾を防ぐよう修飾されたギャップ結合サブユニットである。さらに他の実施形態では、G J I Cを増大する処理は、E-カドヘリンをコードするポリヌクレオチド配列を送達することを含む。さらに他の実施形態では、G J I Cを増大する処理は、対象に、ゲムシタビン、c A M P、レチノイン酸、カロテノイド、グルココルチコイド、フラバノイド、アピゲニンまたはロバスタチンからなる群からの化合物を送達することを含む。さらに他の実施形態では、G J I Cを増大する処理は、プロテアソーム阻害を含む。一実施形態では、プロテアソーム阻害は、N-アセチル-L e u-L e u-N l e-CH O（A L L N）および/またはクロロキンの投与を含む。他の実施形態では、G J I Cを増大する処理は、放射線または電気的処理を含む。

【0019】

また、a) 細胞に、請求項1から26のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド配列を導入することと、b) 細胞が、発現されるチミジンキナーゼまたはその変異体を発現するのを可能にするまたは開始させることと、c) 細胞を、チミジンキナーゼによって細胞傷害性薬剤に変換される薬剤と接触させることとを含む、細胞を死滅させる方法も本明細書において提供される。

【0020】

一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の修飾を含む、ヒト単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ（H S V-T K）の突然変異形態をコードする。別の実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の修飾を含む、ヒト単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ（H S V-T K）の突然変異形態をコードする。別の実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の修飾を含む、ヒト単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ（H S V-T K）の突然変異形態をコードする。別の実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の修飾を含む、ヒト単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ（H S V-T K）の突然変異形態をコードする。別の実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の修飾を含む、ヒト単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ（H S V-T K）の突然変異形態をコードする。

【0021】

一実施形態では、コードされるH S V-T Kは、アミノ酸残基167、168またはそれらの組合せで、極性、非極性、塩基性または酸性アミノ酸に突然変異し得る。例えば、コードされるH S V-T Kは、アミノ酸残基167で、極性、非極性、塩基性または酸性アミノ酸に突然変異し得る。別の例では、コードされるH S V-T Kは、アミノ酸残基168で、極性、非極性、塩基性または酸性アミノ酸に突然変異し得る。別の例では、コードされるH S V-T Kは、アミノ酸残基167および168の両方で、極性、非極性、塩基性または酸性アミノ酸に突然変異し得る。

【0022】

別の実施形態では、コードされるH S V-T Kのアミノ酸残基167は、セリンまたはフェニルアラニンに突然変異し得る。

【0023】

別の実施形態では、コードされるHSV-TKのアミノ酸残基168は、ヒスチジン、リシン、システイン、セリンおよびフェニルアラニンからなる群から選択されるアミノ酸に突然変異し得る。

【0024】

別の実施形態では、コードされるHSV-TKは、アミノ酸25および26で突然変異し得る。例えば、アミノ酸残基25および26は、グリシン、セリンおよびグルタミン酸からなる群から選択されるアミノ酸に突然変異し得る。

【0025】

別の実施形態では、コードされるHSV-TKは、アミノ酸残基32および33で突然変異し得る。例えば、アミノ酸残基32および33は、グリシン、セリンおよびグルタミン酸からなる群から選択されるアミノ酸に突然変異し得る。

10

【0026】

別の実施形態では、コードされるHSV-TKは、アミノ酸残基25、26、32および33で突然変異し得る。例えば、アミノ酸残基25、26、32および33は、グリシン、セリンおよびグルタミン酸からなる群から選択されるアミノ酸に突然変異し得る。

【0027】

別の実施形態では、コードされる突然変異体HSV-TKは、核領域に排他的に局在しない。

【0028】

別の実施形態では、コードされる修飾されたHSV-TKは、野生型HSV-TKと比較して低下した量のチミジンキナーゼ活性を示す。

20

【0029】

別の実施形態では、コードされる修飾されたHSV-TKのチミジンキナーゼ活性は、約1.5倍、約2倍、約5倍、約10倍、約20倍、約30倍または約50倍低下され得る。

【0030】

別の実施形態では、コードされる修飾されたHSV-TKのチミジンキナーゼ活性は、約1.5%、約2%、約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%または約100%低下され得る。

【0031】

30

別の実施形態では、コードされる修飾されたHSV-TKのチミジンキナーゼ活性は、約1.5倍、約2倍、約5倍、約10倍、約20倍、約30倍または約50倍増大され得る。

【0032】

別の実施形態では、コードされる修飾されたHSV-TKのチミジンキナーゼ活性は、約1.5%、約2%、約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%または約100%増大され得る。

【0033】

コードされるHSV-TKが、突然変異A167F、A168Hまたは両方を含む、上記のポリヌクレオチド配列が本明細書において提供される。

40

【0034】

本明細書において記載されるポリヌクレオチド配列は、治療用ポリペプチドである第2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列をさらに含み得る。治療用ポリペプチドは、いくつかの場合には、自殺遺伝子であり得る。自殺遺伝子として、それだけには限らないが、シトシンデアミナーゼ、VSV-tk、IL-2、ニトロレダクターゼ(NR)、カルボキシルエステラーゼ、 β -グルクロニダーゼ、シトクロムp450、 β -ガラクトシダーゼ、ジフテリア毒素A鎖(DT-A)、カルボキシペプチドG2(CPG2)、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ(PNP)、グアニレートキナーゼおよびデオキシチミジンキナーゼ(dCK)が挙げられる。

【0035】

50

一実施形態では、本明細書に記載された修飾されたポリヌクレオチド配列は、配列番号 1 2 ~ 2 4 のいずれか 1 種として示される核酸配列を含み得る。

【0036】

別の実施形態では、本明細書に記載された修飾されたポリヌクレオチド配列は、配列番号 2 2 ~ 2 4 のいずれか 1 種として示される核酸配列を含み得る。

【0037】

一実施形態では、本明細書に記載されたポリヌクレオチド配列は、核外輸送シグナルを含む。例えば、ポリヌクレオチド配列は、H S V - T K A 1 6 8 H d m N E S (配列番号 1 8) を含み得る。

【0038】

別の実施形態では、本明細書に記載された方法において使用するためのレトロウイルスベクターは、1 つまたは複数のスプライシング部位修飾を含む。

【0039】

別の実施形態では、本明細書に記載された方法において使用するためのレトロウイルスベクターは、H S V - T K A 1 6 7 F s m を含み、ここで、「s m」とは、単一の突然変異対 R 2 5 G - R 2 6 S (配列番号 1 3) を指す。

【0040】

別の実施形態では、本明細書に記載された方法において使用するためのレトロウイルスベクターは、H S V - T K A 1 6 8 H s m (配列番号 1 2) を含む。

【0041】

別の実施形態では、本明細書に記載された方法において使用するためのレトロウイルスベクターは、H S V - T K A 1 6 7 F d m を含み、ここで、「d m」とは、二重の突然変異対 R 2 5 G - R 2 6 S、R 3 2 G - R 3 3 S (配列番号 1 7) を指す。

【0042】

別の実施形態では、本明細書に記載された方法において使用するためのレトロウイルスベクターは、H S V - T K A 1 6 8 H d m (配列番号 1 6) を含む。

【0043】

別の実施形態では、本明細書に記載された方法において使用するためのレトロウイルスベクターは、H S V - T K A 1 6 7 F d m およびマイトジェン活性化タンパク質キナーゼ由来の核外輸送配列を含み、その一例として、配列番号 1 9 がある。

【0044】

別の実施形態では、本明細書に記載された方法において使用するためのレトロウイルスベクターは、H S V - T K A 1 6 8 H d m および N E S (配列番号 1 8) を含む。このような一実施形態では、配列は、H S V - T K A 1 6 8 H を含む。

【0045】

別の実施形態では、本明細書に記載された方法において使用するためのレトロウイルスベクターは、H S V - T K を含み、ここで、このようなベクターは、改良された基質結合ドメインおよび m N L S / N E S セットを含む。この例示的实施形態の例として、配列番号 1 8 および 1 9 が挙げられる。

【0046】

別の実施形態では、本明細書に記載された方法において使用するためのレトロウイルスベクターは、H S V - T K を含み、ここで、ベクターは、選択マーカー、蛍光を発する遺伝子および／または 1 種もしくは複数の死滅遺伝子を含む。

【0047】

別の実施形態では、本明細書に記載された方法において使用するためのレトロウイルスベクターは、2 つの修飾を含む。

【0048】

別の実施形態では、レトロウイルス粒子は、P i T - 2 ポリヌクレオチド配列を含み、レトロウイルス粒子は、標的細胞の表面上の P i T - 2 受容体と特異的に結合し、それによって、レトロウイルス粒子の細胞への取り込みを可能にする。

10

20

30

40

50

【0049】

別の実施形態では、本明細書に記載された方法において使用するためのレトロウイルスベクターは、HSV-TKを含み、ここで、ポリヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列は、TK168dmNESを含む。

【0050】

ギャップ結合依存性細胞内情報伝達(GJIC)を増大する処理とともに、対象にHSV-TKをコードする治療有効量のベクター粒子を送達することを含む、FHBG(9-[4-フルオロ-3-(ヒドロキシメチル)ブチル]グアニン)、FHPG(9-[3-フルオロ-1-ヒドロキシ-2-プロポキシ]メチル)グアニン)、FGCV(フルオロガンシクロビル)、FPCV(フルオロペンシクロビル)、FIAU(1-(2'-デオキシ-2'-フルオロ-1-β-D-アラビノフラノシル)-5-ヨードウラシル)、FEAU(フルオロ-5-エチル-1-β-D-アラビノフラノシルウラシル)、FMAU(フルオロ-5-メチル-1-β-D-アラビノフラノシルウラシル)、FHOMP(6-((1-フルオロ-3-ヒドロキシプロパン-2-イルオキシ)メチル)-5-メチルピリミジン(methylpyrimidine)-2,4(1H,3H)-ジオン)、ガンシクロビル、バルガンシクロビル、アシクロビル、バラシクロビル(valaciclovir)、ペンシクロビル、放射標識された、N-1に4-ヒドロキシ-3-(ヒドロキシメチル)ブチル側鎖を有するピリミジン(HHG-5-FEP)または2,3-ジヒドロキシプロピルを有する、5-(2-ヒドロキシエチル)-および5-(3-ヒドロキシプロピル)置換ピリミジン誘導体、アシクロビル-、ガンシクロビル-およびペンシクロビル-様側鎖によって媒介される、対象における新生物細胞の死滅を増大する方法が、本明細書において提供される。

【0051】

一実施形態では、このような方法において使用されるHSV-TKは、本明細書に記載されるポリヌクレオチド配列のいずれかによってコードされ得る。

【0052】

GJICを増大する処理は、例えば、少なくとも1種のギャップ結合サブユニットをコードするポリヌクレオチド配列を送達することを含み得る。ギャップ結合サブユニットは、例えば、コネキシン43、コネキシン30またはコネキシン26であり得る。ギャップ結合サブユニットは、翻訳後修飾を防ぐよう修飾されたギャップ結合サブユニットであり得る。

【0053】

一実施形態では、GJICを増大する処理は、E-カドヘリンをコードするポリヌクレオチド配列を送達することを含む。

【0054】

別の実施形態では、GJICを増大する処理は、対象に、ゲムシタビン、cAMP、レチノイン酸、カロテノイド、グルココルチコイド、フラバノイド、アピゲニンまたはロバスタチンからなる群からの化合物を送達することを含む。

【0055】

別の実施形態では、GJICを増大する処理は、プロテアソーム阻害を含む。プロテアソーム阻害は、N-アセチル-Leu-Leu-Nle-CHO(ALLN)および/またはクロロキンの投与を含み得る。

【0056】

別の実施形態では、GJICを増大する処理は、酸化剤およびMAPキナーゼを活性化する薬剤との同時投与を含めた、放射線または光力学処理を含む。

【0057】

別の実施形態では、GJICを増大する処理は、電気的処理を含む。

【0058】

(a)細胞に、本明細書において記載されるポリヌクレオチド配列を導入することと、
(b)細胞が、発現されるチミジンキナーゼまたはその変異体を発現するのを可能にする

または開始させることと、(c)細胞を、チミジンキナーゼによって細胞傷害性薬剤に変換される薬剤と接触させることとを含む、細胞を死滅させる方法が、本明細書において提供される。

【0059】

ギャップ結合サブユニットをコードする配列を、HSV-TKをコードするレトロウイルスベクター粒子とともに送達することを含む、チミジンキナーゼバイスタンダー効果を増大する方法が本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、レトロウイルス粒子は、対象の細胞または系にターゲティングされ得る。いくつかの実施形態では、レトロウイルスターゲティング法は、対象の細胞または系を認識またはそれと結合する因子の組み込みを含み得る。いくつかの実施形態では、レトロウイルスターゲティング法は、抗体、受容体結合タンパク質またはそれだけには限らないが、コラーゲンを含めた細胞成分と結合するタンパク質を含めた、対象の系の細胞の表面上のタンパク質または受容体との結合を含めた、ターゲティングタンパク質の組み込みを含み得る。いくつかの実施形態では、ターゲティングタンパク質は、それだけには限らないが、コラーゲン結合ドメインを含む、ペプチド、タンパク質および／またはタンパク質ドメインを含めた、コラーゲンと結合するタンパク質を含み得る。

【0060】

本発明の新規特徴を、添付の特許請求の範囲における詳細とともに示す。本発明の原理が使用される例示的实施形態を示す以下の詳細な説明および添付の図面を参照して、本発明の特徴および利点の良好な理解が得られる。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】図1は、HSV-TKスプライシング部位の除去が、HSV-TKの不活性化形態を避ける方法を例示する。スプライシング部位が除去されたか(HuT-SF/Tk/mut)またはされていない(HuT-G1Tk1SvNa)HSV-TKベクターを用いて形質導入された、T細胞株および一次T細胞のPCR解析。

【図2】図2は、本明細書に記載される組成物を用いる第I A相臨床試験の例示的概略図を提供する。

【図3】図3は、本明細書に記載される組成物を用いる第I B相臨床試験の例示的概略図を提供する。

【図4】図4は、コホート1～3の第I A相臨床試験の事象の例示的スケジュールを提供する。

【図5】図5は、コホート4以上の第I A相臨床試験の事象の例示的スケジュールを提供する。

【図6】図6は、本明細書に記載される組成物を用いる第I B相臨床試験の例示的概略図を提供する。

【図7】図7は、本明細書に記載される組成物を用いる治療の臨床試験のスケジュールAの例示的概略図を提供する。

【図8】図8は、本明細書に記載される組成物を用いる治療の臨床試験のスケジュールBの例示的概略図を提供する。

【図9】図9は、Pit-2膜貫通分子の例示を提供する。四角は、抗Pit-2ウエスタン抗体結合部位のおよその位置を表す。

【図10】図10は、Pit-2膜貫通分子の例示を提供する。四角は、抗Pit-2 IHC抗体結合部位のおよその位置を表す。

【図11】図11は、種々のHSV-TK修飾を有する例示的Reximmuneコンストラクトを提供する。図11A: GM-CSF Minus、HSV-TK 167 sm。図11B: GM-CSF Minus、HSV-TK 168 sm。図11C: GM-CSF Minus、HSV-TK 167 dm。図11D: GM-CSF Minus、HSV-TK 168 dm。図11E: GM-CSF Minus、HSV-TK 167 dm + NES。図11F: GM-CSF Minus、HSV-TK 168 d

10

20

30

40

50

m + NES。

【図12】図12は、図11に示されるレトロウイルスベクターのウエスタン解析によるmHSV-TK、タンパク質検出である。ウイルスDNAを、293Tベクター産生細胞にトランスフェクトし、細胞を溶解し、抗HSV-TK抗体を用いてHSV-TKタンパク質を検出した。HSV-TKウイルスベクターのすべてが、高レベルのHSV-TKタンパク質を発現するとわかった。

【図13】図13は、例示的レトロウイルスベクターを提供する。図13A: RexRed-TK A168H。図13B: RexRed-TK 167-dm。図13C: RexRed-TK 168 dm。

【図14】図14は、特定の形態のコドン最適化が使用されるさらなる例示的レトロウイルスベクターを提供する。図14A: RexRed-TK 167-dm+NES。図14B: RexRed-TK 168-dm+NES。図14C: RexRed-TK 167-dm+NES JCO。図14D: RexRed-TK 168-dm+NES JCO。JCO=正しいとされるコドン最適化。

【図15】図15は、さらなる例示的レトロウイルスベクターを提供する。図15A: RexRed-TK A168F。図15B: RexRed-TK A168F (GCV特異的)。図15C: ハイグロマイシン耐性遺伝子を含むRex-Hygro-R-TK A168F。

【図16】図16は、さらなる例示的レトロウイルスベクターを提供する。図16A: Rex-Hygro-R-TK A167F。図16B: Q-Pi T-2は、標的細胞の表面上のPi T-2受容体と結合するウイルス受容体遺伝子を含むベクターである。

【図17】図17は、さらなる例示的レトロウイルスベクターを提供する。図17A: 元のReximmune-C。図17B: ネオマイシン耐性遺伝子(Neo_R)および選択マーカーが挿入された、mTK39 (HSV-TKSR39) 死滅遺伝子を用いる改良を含むReximmune-C。

【図18】図18は、Reximmune-C+突然変異した細菌シチジンデアミナーゼ(mBCD)死滅遺伝子の例示を提供する。

【図19】図19は、Reximmune-C+突然変異した酵母シチジンデアミナーゼ(mYCD)死滅遺伝子の例示を提供する。

【図20】図20は、蛍光を発する遺伝子(RFP)および記された位置に同定された配列を含むRexRed Super TKの一例を例示する。

【図21】図21は、Reximmune-C1または2、SR-39および野生型HSV-TK遺伝子間の配列の相違を強調し、LTRおよびSV40プロモーターの間にRFP遺伝子の代わりに第2の治療用遺伝子が導入された、改良された基質結合ドメインおよび+/−mNLSおよび/または+/−NESセットを有するレトロウイルスベクターの例示を提供する。

【図22】図22は、蛍光を発する遺伝子(RFP)および159~161位および167~169位に記された配列を含むRexRed Super TK A167Fを例示する。

【図23】図23は、LNCE A375形質導入細胞のReximmune-Cマルチカラークローンである例示的レトロウイルスベクターを提供する。図23A: 蛍光を発する遺伝子として高感度緑色蛍光タンパク質を含むLNCE-GFP。図23B: 蛍光を発する遺伝子として赤色蛍光タンパク質を含むRexRed。

【図24】図24は、蛍光を発する遺伝子のみまたはハイグロマイシン耐性遺伝子選択マーカーのみである例示的ベクターを提供する。

【図25】図25: 親およびPi T-2-CHO-K1株におけるTk-GCV死滅結果。グラフは、単一RxC2-形質導入プロトコルのデータを例示する。すべての実験にRxC2の同一バッチが使用された(ミリリットルあたり、定量的ポリメラーゼ連鎖反応(RT-qPCR)と合わせて逆転写酵素によって決定される、力価およそ5E+10総ウイルス粒子(TVP))。図25A: GCV中4日(4用量)後のRxC2が形質導入

10

20

30

40

50

されたCHO-K1親株のGCV死滅。図25B：GCV中4日（4用量）後のRxC2が形質導入されたPiT-2-CHO-K1のGCV死滅。

【図26】図26：親および三重RxC2-形質導入プロトコル後のPiT-2-CHO-K1におけるTk-GCV死滅。図26A：9日目（10%プレート、5用量GCV）のRxC2三重形質導入CHO-K1親のGCV死滅。図26B：9日目（10%プレート、5用量GCV）のRxC2三重形質導入PiT-2-CHO-K1のGCV死滅。

【図27】図27は、MIA-PaCa-2ヒト膵臓癌腫細胞株におけるReximmu-ne-C2（HSV-TKA168HdmNES）（配列番号18）を用いた三重形質導入後のTK-GCV死滅を例示する。種々の濃度のGCVを用いた、8日目の、最初の細胞の25%が再播種されたRxC2三重形質導入MIA-PaCa2のGCV死滅。

【図28】Reximmu-ne-C2を用いるPiT-2-MIA-PaCa-2細胞の三重形質導入後のTK-GCV死滅を例示する。種々の濃度のGCVを用いた、8日目の、RxC2三重形質導入PiT-2-MIA-PaCa2、最初の細胞の25%のGCV死滅。

【図29】ヒト黒色腫A375 Hygro TKクローンが、20mM GCVを用いて処理されたバistanダーインビトロ（in vitro）アッセイから得たグラフ。

【図30】C6-Hygro-TKクローンが、20mM GCVを用いて処理されたバistanダーインビトロアッセイから得たグラフ。

【図31】図31は、種々の癌細胞株のReximmu-ne-C2三重形質導入後のGCV死滅のパーセンテージを表すグラフである。

【図32】図32は、GCVにおいて4日後のRxC2形質導入CHO-K1細胞株のグラフを示す。

【図33】図33は、GCVにおいて4日後のRxC2形質導入PiT-2-HA-CHO-K1細胞株のグラフを示す。

【図34】図34は、RexC1 HSV-TK（左パネル）およびRexC2 HSV-TK（右パネル）を用いた、293T細胞一時的トランスフェクション、24時間一次抗体（Santa Cruz）におけるHSV-TK細胞内局在性の免疫組織化学（IHC）を示す。

【発明を実施するための形態】

【0062】

HSV-TK遺伝子治療用製品は入手可能であるが、癌遺伝子療法を含めたインビトロおよびインビボ（in vivo）の両方で最大遺伝子発現および腫瘍死滅活性に関しては最適ではない。

【0063】

ウイルスまたはシュドウイルス（pseudoviral）遺伝子送達系との関連で、プロドラッグ活性化性能が増強された改善された自殺遺伝子を製造するためのHSV-TK遺伝子内のコドンの最適化が、本明細書において初めて開示される。最適化された遺伝子送達系は、最適HSV-TKプロドラッグ酵素活性および高力価のウイルス粒子の製造の両方を保証する。

【0064】

したがって、生物情報科学ソフトウェアならびに遺伝子およびウイルスベクター系の機能および制限の知識を利用した本発明者らによるカスタム分析の両方を使用して調製された候補最適化HSV-TK遺伝子の最適化が、本明細書において開示される。

【0065】

以下の最適化工程は、本明細書に記載される実施形態に達するために本発明者らによって利用された例示的方法を表す。ソフトウェアを利用したコドン最適化が、使用頻度の稀なおよび低いコドン除去して、HSV-TKタンパク質発現を改善するために利用され得る。新たにコドン最適化された遺伝子内のGC含量は、遺伝子合成および他の問題を避けるよう調整され得る。

【0066】

H S V - T K 内の既知スプライス受容およびスプライス供与配列は除去され得る。

【0067】

スプライシングに関与し得る、ポリーピリミジンのトラクト、特に、コドン最適化によって導入されたものは除去され得る。

【0068】

1つの単一の強力なK o z a k 翻訳開始配列が、開始コドン (A T G) の前に含まれ得る一方で、H S V - T K オープンリーディングフレーム内の可能性あるK o z a k 配列は除去され得る。これらの配列のうち一部は、コドン最適化によって導入された可能性もあり、改善された殺腫瘍活性のために遺伝子を最適化するために、修飾が複数回反復して行われることが必要である場合もあるということは理解されよう。

10

【0069】

H S V - T K 内の核局在性配列 (N L S) は、発現されたH S V - T K を排出するように除去され得、これでは、発現されたH S V - T K タンパク質は、核に排他的に局在せず、代わりに、細胞質に蓄積する。

【0070】

遺伝子を、開示されたレトロウイルスベクター中の多数の位置にクローニングすることを可能にするH S V - T K 遺伝子のそれぞれの両端に位置する制限部位が付加され得、一方で、H S V - T K 遺伝子自体内のこれら同一の制限部位は排除される。

【0071】

H S V - T K 遺伝子の末端の二重の停止コドンは、H S V - T K 翻訳の完全な終結を保証するために含まれ得る。

20

【0072】

H S V - T K 遺伝子内のアミノ酸位置159~161の基質結合ドメイン付近の突然変異が、評価され得る。

【0073】

H S V - T K 遺伝子内のアミノ酸位置167での基質結合ドメイン中の突然変異体は、ガンシクロビル (ganciclovir) および同様のプロドラッグなどのプロドラッグヌクレオシド類似体に対する酵素活性の増大ならびに癌細胞を死滅させる能力の選択性について評価され得る。

【0074】

30

H S V - T K 遺伝子内のアミノ酸位置168での基質結合ドメイン中の突然変異体は、プロドラッグG C V 酵素活性の増大および癌細胞を死滅させるその能力の選択性について評価され得る。

【0075】

H S V - T K 遺伝子内のアミノ酸位置167+168での基質結合ドメイン中の突然変異体は、プロドラッグG C V 酵素活性の増大および癌細胞を死滅させるその能力の選択性について評価され得る。

【0076】

H S V - T K の、他の遺伝子およびタンパク質とのタグ、融合タンパク質およびリンカーの使用が、評価され得る。

40

【0077】

最適化のさらなる方法はまた、本明細書に記載される方法における使用について考慮され得る。遺伝子がこの方法で最適化されると、その遺伝子配列は、カスタム遺伝子合成のために遺伝子合成会社に送られ得る。

【0078】

定義

別に定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同一の意味を有する。すべての特許、特許出願、公開された出願および刊行物、GenBank配列、ウェブサイトおよび本明細書における全開示を通じて参照される他の公開された材料は、別

50

に記載されない限り、参照によりその全体が組み込まれる。本明細書において用語について複数の定義がある事象では、この節におけるものが優先する。URLまたは他のこのような識別子もしくはアドレスが参照される場合には、このような識別子は、変わり得ることおよびインターネットでの特定の情報は移り変わる場合があるが、同等の情報は、インターネットを検索することによって見出され得ることは理解される。それに対する参照によって、このような情報の利用の可能性および一般への普及が証明される。

【0079】

本明細書において、「核酸」とは、少なくとも2つの共有結合によって連結されたヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体サブユニットを含有するポリヌクレオチドを指す。核酸は、一般に、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)またはDNAもしくはRNAの類似体である。ヌクレオチド類似体は、市販されており、このようなヌクレオチド類似体を含有するポリヌクレオチドを調製する方法は、公知である(Lin et al. (1994) Nucl. Acids Res. 22:5220-5234; Jellinek et al. (1995) Biochemistry 34:11363-11372; Pagratis et al. (1997) Nature Biotechnol. 15:68-73)。核酸は、一般に、一本鎖、二本鎖またはそれらの混合物である。本明細書における目的上、別に明記されない限り、核酸は、二本鎖であるか、または文脈から明らかである。

【0080】

本明細書において、「DNA」とは、cDNA、プラスミドならびに修飾されたヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体を含むDNAを含めた、すべての種類および大きさのDNA分子を含むものとする。

【0081】

本明細書において、「ヌクレオチド」は、ヌクレオシド一、二および三リン酸を含む。ヌクレオチドはまた、それだけには限らないが、ホスホロチオエートヌクレオチドおよびデアザプリンヌクレオチドおよび他のヌクレオチド類似体などの修飾されたヌクレオチドも含む。

【0082】

本明細書において用語「ポリヌクレオチド」とは、任意の長さのヌクレオチドの多量体形態を意味し、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドを含む。このような用語はまた、一本鎖および二本鎖DNAならびに一本鎖および二本鎖RNAを含む。この用語はまた、メチル化またはキャップドポリヌクレオチドなどの修飾されたポリヌクレオチドも含む。

【0083】

本明細書において、用語「対象」とは、大きなDNA分子が導入される、動物、植物、昆虫および鳥類を指す。ヒト、霊長類、げっ歯類、ウシ、ブタ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、マウス、ラット、モルモット、ネコ、イヌ、ウマ、ニワトリなどを含めた哺乳動物および鳥類などの高等生物が含まれる。

【0084】

本明細書において、「対象に投与すること」は、1種または複数の送達物質および／または大きな核酸分子が、一緒にかまたは別個に、対象中に導入されるかまたは対象に適用され、その結果、対象中に存在する標的細胞が、物質および／または大きな核酸分子と均一に接触される手順である。

【0085】

本明細書において、「送達ベクター」または「送達媒体」または「治療用ベクター」または「治療系」とは、外因性核酸分子を有し、標的細胞または組織に輸送する、ウイルスおよび非ウイルス粒子の両方を指す。ウイルス媒体として、それだけには限らないが、レトロウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルスおよびアデノ随伴ウイルスが挙げられる。非ウイルス媒体として、それだけには限らないが、マイクロ粒子、ナノ粒子、リソソームおよびリボソームが挙げられる。「ターゲティングされた」とは、本明細書において、送達媒体と関連しており媒体を細胞または組織にターゲティングするリガンドの使用を指す。リガンドとして、それだけには限らないが、抗体、

受容体およびコラーゲン結合ドメインが挙げられる。

【0086】

本明細書において、「形質導入」と同義的に使用される「送達」とは、外因性核酸分子が細胞中に移動され、その結果、それらが細胞内に局在するプロセスを指す。核酸の送達は、核酸の発現とは別個のプロセスである。

【0087】

本明細書において、「多重クローニング部位（MCS）」とは、複数の制限酵素部位を含有し、そのうちいずれかが、ベクターを消化するために標準組換え技術とともに使用され得るプラスミド中の核酸領域である。「制限酵素消化」とは、核酸分子中の特定の位置でのみ機能する酵素での核酸分子の触媒切断を指す。これらの制限酵素のうち多数が市販されている。このような酵素の使用は、当業者によって広く理解されている。MCS内で切断し、外因性配列がベクターと連結されることを可能にする制限酵素を使用して、ベクターが線形化されるか断片化されることが頻繁にある。

【0088】

本明細書において、「複製起点」（「ori」と呼ばれることが多い）は、複製が開始される特定の核酸配列である。あるいは、宿主細胞が酵母である場合には、自立複製配列（ARS）が使用され得る。

【0089】

本明細書において、「選択可能なまたはスクリーニング可能なマーカー」は、細胞に同定可能な変化を付与し、発現ベクターを含有する細胞の容易な同定を可能にする。一般に、選択マーカーは、選択を可能にする特性を付与するものである。陽性選択マーカーは、マーカーの存在がその選択を可能にするものであり、陰性選択マーカーは、その存在がその選択を阻止するものである。陽性選択マーカーの一例として、薬物耐性マーカーがある。

【0090】

普通、薬物選択マーカーを含むことは、形質転換体のクローニングおよび同定に役立ち、例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシンおよびヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子が、有用な選択マーカーである。条件の実施に基づく形質転換体の区別を可能にする表現型を付与するマーカーに加えて、その基礎が比色分析であるGFPなどのスクリーニング可能なマーカーを含めた他の種類のマーカーも考慮される。いくつかの実施形態では、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（tk）またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）などのスクリーニング可能な酵素が利用される。当業者ならばまた、恐らくはFACS解析とともに免疫学的マーカーを使用する方法を承知するであろう。使用されるマーカーは、遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現されることができさえすれば、重要であると考えられない。選択可能な、スクリーニング可能なマーカーのさらなる例は、当業者にとって周知である。

【0091】

用語「トランスフェクション」は、細胞による外来DNAの取り込みを指すよう使用される。外因性DNAが細胞膜の内側に導入されている場合に、細胞は「トランスフェクトされている」。いくつかのトランスフェクション技術は、一般に、当技術分野で公知である。例えば、Graham et al., Virology 52:456 (1973); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986); Chu et al., Gene 13:197 (1981)を参照のこと。このような技術は、ヌクレオチド組込みベクターおよび他の核酸分子などの1種または複数の外因性DNA部分を適した宿主細胞中に導入するために使用され得る。この用語は、化学的、電気的およびウイルス媒介性トランスフェクション手順を獲得する。

【0092】

本明細書において、「発現」とは、核酸がペプチドに翻訳されるか、またはRNAに転写され、これが例えば、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質に翻訳され得るプロセ

10

20

30

40

50

スを指す。核酸がゲノムDNAに由来する場合には、発現は、適当な真核細胞宿主細胞または生物が選択される場合には、mRNAのスプライシングを含む。異種核酸が宿主細胞において発現されるには、最初に細胞に送達され、次いで、細胞中にあれば、最終的に核中に存在しなくてはならない。

【0093】

本明細書において、「治療経過」とは、規定された期間内の、本明細書に開示されるベクターの周期的投与または時限投与を指す。このような期間は、少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも3日、少なくとも5日、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月または少なくとも6ヶ月である。投与はまた、慢性的に、すなわち、規定されない期間、起こり得る。周期的投与または時限投与は、1日1回、1日2日、1日3回または他のセットの時限投与を含む。

10

【0094】

本明細書において、用語「同時投与」、「と組み合わせて投与された」およびその文法上の等価物などは、単一患者への選択された治療剤の投与を包含するものとし、薬剤が同一もしくは異なる投与経路によって、または同時にもしくは異なる時間に投与される治療計画を含むものとする。いくつかの実施形態では、本願に開示されるような治療剤は、他の薬剤と同時投与される。これらの用語は、両薬剤および／またはその代謝産物が同時に動物中に存在するような動物への2種以上の薬剤の投与を包含する。それらは、別個の組成物での同時投与、別個の組成物での異なる時点での投与および／または両薬剤が存在する組成物での投与を含む。したがって、いくつかの実施形態では、治療剤および他の薬剤（複数可）は、単一組成物で投与される。いくつかの実施形態では、治療剤および他の薬剤（複数可）は、組成物中に混合される。さらなる実施形態では、治療剤および他の薬剤（複数可）は、別個の用量で別個の時間で投与される。

20

【0095】

用語「宿主細胞」は、例えば、送達ベクターを製造するための複数のコンストラクトのレシピエントとして使用され得るかまたは使用されている、微生物、酵母細胞、昆虫細胞および哺乳類細胞を示す。この用語は、トランスフェクトされている元の細胞の後代を含む。したがって、本明細書において「宿主細胞」とは、一般に、外因性DNA配列を用いてトランスフェクトされている細胞を指す。単一親細胞の後代は、天然の、偶発的または計画的突然変異のために元の親と、形態においてまたはゲノムもしくは総DNA相補体において必ずしも完全に同一でないということは理解される。

30

【0096】

本明細書において、「遺伝子治療」は、治療または診断が探し求められる障害または状態を有する哺乳類、特に、ヒトの特定の細胞、標的細胞への異種DNAの移動を含む。異種DNAが発現され、それによってコードされる治療用生成物が製造されるような方法で、DNAが選択された標的細胞中に導入される。いくつかの実施形態では、異種DNAは、治療用生成物をコードするDNAの発現を直接的または間接的に媒介する。いくつかの実施形態では、異種DNAは、治療用生成物の発現を直接的または間接的に媒介するペプチドまたはRNAなどの生成物をコードする。いくつかの実施形態では、遺伝子治療は、欠陥のある遺伝子と置き換わるよう、または導入される哺乳類または細胞によって製造される遺伝子産物を補完するよう、遺伝子産物をコードする核酸を送達ために使用される。いくつかの実施形態では、導入された核酸は、したがって、哺乳類宿主では一般に産生されないかまたは治療有効量もしくは治療上有用な時間で産生されない受容体などの、成長因子もしくはその阻害剤または腫瘍壊死因子もしくはその阻害剤など治療用化合物をコードする。いくつかの実施形態では、治療用生成物をコードする異種DNAは、生成物またはその発現を増強するかまたはそうでなければ変更するよう、苦しんでいる宿主の細胞中への導入に先立って修飾される。

40

【0097】

本明細書において、「異種核酸配列」は、一般に、発現される細胞によってインビボで普通製造されないRNAおよびタンパク質をコードするか、または転写、翻訳もしくは他

50

の調節可能な生化学的プロセスに影響を及ぼすことによって内因性DNAの発現を変更するメディエーターを媒介もしくはコードするDNAである。当業者が、発現される細胞にとって異種もしくは外来と認識するかまたは考える任意のDNAが、本明細書において異種DNAによって包含される。異種DNAの例として、それだけには限らないが、薬物耐性を付与するタンパク質などの追跡可能なマーカータンパク質をコードするDNA、抗癌剤、酵素およびホルモンなどの治療上有効な物質をコードするDNAならびに抗体などの他の種類のタンパク質をコードするDNAが挙げられる。いくつかの実施形態では、異種DNAによってコードされる抗体は、異種DNAが導入されている細胞の表面上に分泌または発現される。

【0098】

本明細書において、用語「チミジンキナーゼ突然変異体」とは、本明細書に記載される特定のタンパク質（ならびにこれらのタンパク質をコードする核酸配列）だけでなく、生物活性を保持する一次タンパク質の種々の構造形態を含み得るそれらの誘導体も指す。

【0099】

本明細書において、「突然変異していないチミジンキナーゼ」とは、天然または野生型チミジンキナーゼポリペプチド配列を指す。

【0100】

本明細書において、「自殺遺伝子」とは、それ自体によって、または他の化合物の存在下で細胞死を引き起こす生成物をコードする核酸を指す。

【0101】

本明細書において、用語「突然変異した」または「別のヌクレオチドによって置き換えられた」とは、特定の位置のヌクレオチドが、突然変異していないかまたはこれまでに突然変異した配列中に存在するもの以外のヌクレオチドによってその位置で置き換えられていることを意味する。すなわち、いくつかの場合には、種々のヌクレオチドにおいて、特定の修飾が行われ得る。いくつかの実施形態では、置換は、関連スプライス供与および／または受容部位が、遺伝子中にもはや存在しないように行われる。例えば、図1を参照のこと。

【0102】

本明細書において、「極性アミノ酸」とは、アミノ酸残基Asp(N)、Cys(C)、Gln(Q)、Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)またはTyr(Y)を指す。

【0103】

本明細書において、「非極性アミノ酸」とは、アミノ酸残基Ala(A)、Ile(I)、Leu(L)、Met(M)、Phe(F)、Pro(P)、Trp(W)またはVal(V)を指す。

【0104】

本明細書において、「塩基性アミノ酸」とは、アミノ酸残基Arg(R)、His(H)またはLys(K)を指す。

【0105】

本明細書において、「酸性アミノ酸」とは、アミノ酸残基Asp(D)またはGlu(E)を指す。

【0106】

改善されたHSV-TK

チミジンキナーゼは、天然のヌクレオシド基質ならびにヌクレオシド類似体をリン酸化するサルベージ経路酵素である。一般に、ウイルスチミジンキナーゼは、ウイルスチミジンキナーゼを発現する細胞へのガンシクロビルまたはアシクロビルなどのヌクレオシド類似体の投与によって治療上利用され、ここで、ウイルスチミジンキナーゼは、ヌクレオシド類似体をリン酸化して、細胞を死滅させることができる毒性生成物を作製する。

【0107】

本発明のウイルスチミジンキナーゼをコードするポリヌクレオチド配列は、さまざまな

10

20

30

40

50

ウイルスチミジンキナーゼから調製され得る。いくつかの実施形態では、ウイルスチミジンキナーゼ突然変異体は、例えば、霊長類ヘルペスウイルスおよび鳥類ヘルペスウイルスなどの非霊長類ヘルペスウイルスの両方を含めたヘルペスウイルス科 (Herpesviridae) チミジンキナーゼに由来する。適したヘルペスウイルスの代表例として、例えば、単純ヘルペスウイルス (HSV) 1 型、単純ヘルペスウイルス 2 型、水痘帯状疱疹ウイルス、マーモセットヘルペスウイルス、ネコヘルペスウイルス 1 型、仮性狂犬病ウイルス、ウマヘルペスウイルス 1 型、ウシヘルペスウイルス 1 型、シチメンチョウヘルペスウイルス、マレック病ウイルス、ヘルペスウイルスサイミリおよびエプスタインバーウイルスが挙げられる。

【0108】

ヘルペスウイルスは、American Type Culture Collection (「ATCC」、Rockville, Md.) などの商業的供給源から容易に入手できる。ヘルペスウイルスはまた、天然に存在する供給源 (例えば、感染動物) から単離され得る。

【0109】

TK 遺伝子の改善

いくつかの実施形態では、HSV-TK をコードするポリヌクレオチド配列が本明細書において開示される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、野生型 HSV-TK アミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、突然変異した HSV-TK アミノ酸配列をコードする。

【0110】

本明細書において提供される最適化されたポリヌクレオチド配列の調製において使用され得る例示的手順として、それだけには限らないが、コドン最適化、スプライシング部位の修正、ポリーピリミジンのトラクトおよび過剰の GC 含量の除去、単一の Kozak 配列の付加、不要な Kozak 配列の除去、レトロウイルスまたは他のベクターへのサブクロニングのための制限部位を含めること、核局在性配列の除去または核外輸送配列の付加、突然変異配列の付加、二重停止コドン配列の付加、タグ、リンカーおよび融合配列の付加、遺伝子合成会社への寄託のための配列ファイルの準備、レトロウイルスベクターへの合成された遺伝子のサブクロニング、レトロウイルスベクターに蛍光タンパク質遺伝子を含めること、レトロウイルスベクターに選択マーカー遺伝子を含めること、Maxi prep プラスミド DNA の調製、レトロウイルス産生株または他の細胞のトランスフェクション、レトロウイルスの実験室、パイロットまたは GMP 規模の製造、レトロウイルスを用いた標的細胞の形質導入、GCV または類似体プロドラッグ媒介性細胞死滅アッセイ、ヒポキサンチン／アミノプテリン／チミジン (HAT) 選択アッセイ、レトロウイルスによって形質導入された細胞株を製造するための選択マーカー薬物選択手順、レトロウイルスによって形質導入された標的細胞を検出し、記録するための蛍光顕微鏡観察および写真撮影、レトロウイルスによって形質導入された標的細胞の定量的蛍光検出、ウエスタンタンパク質発現アッセイ、HSV-TK 解析に必要な他の手順およびアッセイまたはそれらの組合せが挙げられる。このような方法のプロトコールは、本明細書に記載されるか、市販されているかまたは公開文献およびデータベースに記載されている。

【0111】

いくつかの実施形態では、改善された HSV-TK 配列を得る方法が、本明細書において記載される。いくつかの実施形態では、方法は、a) スプライシング部位の修正および／もしくは除去、ならびに／または b) 単一 Kozak 配列への調整を含む。任意選択で、いくつかの実施形態では、方法は、HSV-TK 配列のサブクロニングのための制限部位を含めることをさらに含む。任意選択で、またはさらに、いくつかの実施形態では、方法は、核局在性配列の除去をさらに含む。

【0112】

コードされる HSV-TK が、アミノ酸残基 25、26、32、33、167、168 またはそれらの組合せで突然変異しており、ポリヌクレオチド配列が、配列番号 1 または

10

20

30

40

50

3 のポリヌクレオチド配列と比較して突然変異している、ヒト単純ウイルス（H S V－T K）由来のチミジンキナーゼの突然変異形態をコードするポリヌクレオチド配列が本明細書において提供される。このような配列では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14の突然変異が行われ得る。

【0113】

コードされるH S V－T Kが、アミノ酸残基25、26、32、33、167、168またはそれらの組合せで突然変異しており、ポリヌクレオチド配列が、配列番号1のポリヌクレオチド配列と比較して突然変異している、ヒト単純ウイルス（H S V－T K）由来のチミジンキナーゼの突然変異形態をコードするポリヌクレオチド配列が本明細書において提供される。このような配列では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14の突然変異が行われ得る。

10

【0114】

コードされるH S V－T Kが、アミノ酸残基25、26、32、33、167、168またはそれらの組合せで突然変異しており、ポリヌクレオチド配列が、配列番号3のポリヌクレオチド配列と比較して突然変異している、ヒト単純ウイルス（H S V－T K）由来のチミジンキナーゼの突然変異形態をコードするポリヌクレオチド配列が本明細書において提供される。このような配列では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14の突然変異が行われ得る。

【0115】

修飾は、保存的または非保存的突然変異であり得る。突然変異は、コードされるアミノ酸が極性、非極性、塩基性または酸性アミノ酸に修飾されるよう行われ得る。

20

【0116】

コードされるH S V－T Kが、核外輸送配列を含む、ヒト単純ウイルス（H S V－T K）由来のウイルスチミジンキナーゼの突然変異した形態をコードするポリヌクレオチド配列が本明細書において提供される。コードされるH S V－T Kが、野生型H S V－T Kと比較して機能において改善され、A168H d m N E S（L T Rプロモーター領域と適宜融合しているC Lシステム－C M Vエンハンサー）を含み、N E Sが、核外輸送配列を指す、ヒト単純ウイルス（H S V－T K）由来のチミジンキナーゼの突然変異した形態をコードするポリヌクレオチド配列が本明細書において提供される。一実施形態では、突然変異体H S V－T K A168H d m N E Sは、R e x i m m u n e－C2中に含むための突然変異体H S V－T K遺伝子である。一実施形態では、N E Sは、M A Pキナーゼキナーゼ（M A P K K）に由来する。なお別の実施形態では、N E Sのポリヌクレオチド配列は、C T G C A G A A A A A G C T G G A A G A G C T G G A A C T G G A T G G C（配列番号23）である。他の実施形態では、N E Sポリペプチド配列は、L Q K K L E E L E L D G（配列番号24）である。

30

【0117】

いくつかの実施形態では、突然変異が野生型H S V－T Kのポリペプチド配列に行われていないヒト単純ウイルスチミジンキナーゼ（H S V－T K）をコードするポリヌクレオチド配列に対する突然変異が本明細書において開示される。

【0118】

ヌクレオチド位置は、配列番号1（野生型（w t）H S V1－T Kヌクレオチド配列）または配列番号3（R e x i m m u n e－C H S V－T KにおけるH S V－T K；S R39突然変異体およびH S V－T K核局在性シグナル（N L S）のR25G－R26S突然変異）における位置を参照して呼ばれる。

40

【0119】

一実施形態では、突然変異体H S V－T K S R39突然変異体領域のクローニング可能な二本鎖オリゴヌクレオチドの境界となるS a c I－K p n I制限部位が提供される。例えば、S a c IおよびK p n I部位が、それぞれ左側および右側に示されている示される配列番号6および7を参照のこと。太字、下線は、突然変異が行われ得る部位を示す。配列番号8および9は、S a c IおよびK p n Iで切断した後の例示的配列

50

を示す。突然変異を行うために使用され得る例示的フォワードおよびリバースプライマーは、配列番号10および11として示されている。

【0120】

例示的最適化HSV-TKポリヌクレオチド配列は、例えば、配列番号12～24として提供される。

【0121】

しかし、このような参照がなされる場合には、本発明は、配列番号1または3に示されるようなまさにその配列に制限されるものではなく、その変異体および誘導体を含む。したがって、他のチミジンキナーゼ配列中のヌクレオチド位置の同定（すなわち、当業者が、配列番号1または3において列挙された位置に対応すると考える位置のヌクレオチドの同定）が考慮される。

10

【0122】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、コドンが、同一のアミノ酸残基をコードする異なるコドンに変更されるような遺伝暗号に気付くことによって置き換えられる。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、HSV-TKをコードする核酸配列のコーディング領域内で置き換えられるが、核酸配列は野生型HSV-TKタンパク質発現を維持する。

【0123】

いくつかの実施形態では、コドンは、コードされるHSV-TKが活性の増大を示すよう突然変異する。いくつかの実施形態では、コドンGCTは、アラニンを表すよう使用される。いくつかの実施形態では、コドンAGAは、アルギニンを表すよう使用される。いくつかの実施形態では、コドンAATは、アスパラギンを表すよう使用される。いくつかの実施形態では、コドンGATは、アスパラギン酸を表すよう使用される。いくつかの実施形態では、コドンTGTは、システインを表すよう使用される。いくつかの実施形態では、コドンCAGは、グルタミンを表すよう使用される。いくつかの実施形態では、コドンGAAは、グルタミン酸を表すよう使用される。いくつかの実施形態では、コドンGGAは、グリシンを表すよう使用される。いくつかの実施形態では、コドンCATは、ヒスチジンを表すよう使用される。いくつかの実施形態では、コドンATTは、イソロイシンを表すよう使用される。いくつかの実施形態では、コドンCTGは、ロイシンを表すよう使用される。いくつかの実施形態では、コドンAAAは、リシンを表すよう使用される。いくつかの実施形態では、コドンATGは、メチオニンを表すよう使用される。いくつかの実施形態では、コドンTTTは、フェニルアラニンを表すよう使用される。いくつかの実施形態では、コドンCCTは、プロリンを表すよう使用される。いくつかの実施形態では、コドンTCTは、セリンを表すよう使用される。いくつかの実施形態では、コドンACAは、トレオニンを表すよう使用される。いくつかの実施形態では、コドンTGGは、トリプトファンを表すよう使用される。いくつかの実施形態では、コドンTATは、チロシンを表すよう使用される。いくつかの実施形態では、コドンGTGは、バリンを表すよう使用される。いくつかの実施形態では、コドンTGAは、停止コドンとして使用される。突然変異のための例示的コドン位置は、以下の表に提供されている。

20

30

【0124】

40

【表 1】

ヒト遺伝子を設計するための改善されたコドン使用、G/C含量を低減する第一選択コドン最適化

	アミノ酸	コドン
1	アラニン(Ala)(A)	GCT
2	アルギニン(Arg)(R)	AGA
3	アスパラギン(Asp)(N)	AAT
4	アスパラギン酸(Asp)(D)	GAT
5	システイン(Cys)(C)	TGT
6	グルタミン(Gln)(Q)	CAG
7	グルタミン酸(Glu)(E)	GAA
8	グリシン(Gly)(G)	GGA
9	ヒスチジン(His)(H)	CAT
10	イソロイシン(Ile)(I)	ATT
11	ロイシン(Leu)(L)	CTG
12	リシン(Lys)(K)	AAA
13	メチオニン(Methonine)(Met)(M)	ATG
14	フェニルアラニン(Phe)(F)	TTT
15	プロリン(Pro)(P)	CCT
16	セリン(Ser)(S)	TCT
17	トレオニン(Thr)(T)	ACA
18	トリプトファン(Trp)(W)	TGG
19	チロシン(Tyr)(Y)	TAT
20	バリン(Val)(V)	GTG
21	停止(Term)(*)	TGA

【0125】

このような実施形態では、5 / 21 種のコドンが、3 番目の位置に「C または G」を含有し（24 %）、0 / 21 種のコドンが、3 番目の位置に「C」を含有し（0 %）、5 / 21 種のコドンが、3 番目の位置に「G」を含有し（24 %）、16 / 21 種のコドンが、3 番目の位置に「A または T」を含有する（76 %）。

【0126】

さらに他の実施形態では、21 種のコドンのうち約 3 ~ 7 種のコドンが、3 番目の位置に「C または G」を含有し、21 種のコドンのうち 0 ~ 3 種を超えるコドンが、3 番目の位置に「C」を含有し、21 種のコドンのうち約 3 ~ 7 種のコドンが、3 番目の位置に「G」を含有し、21 種のコドンのうち約 14 ~ 18 種のコドンが、3 番目の位置に「A または T」を含有する。

【0127】

いくつかの実施形態では、コドン G C A は、アラニンを表すために使用される。いくつかの実施形態では、コドン A G G は、アルギニンを表すために使用される。いくつかの実施形態では、コドン A A C は、アスパラギンを表すために使用される。いくつかの実施形態では、コドン G A C は、アスパラギン酸を表すために使用される。いくつかの実施形態では、コドン T G C は、システインを表すために使用される。いくつかの実施形態では、コドン C A A は、グルタミンを表すために使用される。いくつかの実施形態では、コドン G A G は、グルタミン酸を表すために使用される。いくつかの実施形態では、コドン G G C は、グリシンを表すために使用される。いくつかの実施形態では、コドン C A C は、ヒスチジンを表すために使用される。いくつかの実施形態では、コドン A T C は、イソロイシンを表すために使用される。いくつかの実施形態では、コドン C T C は、ロイシンを表すために使用される。いくつかの実施形態では、コドン A A G は、リシンを表すために使用される。いくつかの実施形態では、コドン A T G は、メチオニンを表すために使用され

る。いくつかの実施形態では、コドン T T C は、フェニルアラニンを表すために使用される。いくつかの実施形態では、コドン C C A は、プロリンを表すために使用される。いくつかの実施形態では、コドン A G C は、セリンを表すために使用される。いくつかの実施形態では、コドン A C T は、トレオニンを表すために使用される。いくつかの実施形態では、コドン T G G は、トリプトファンを表すために使用される。いくつかの実施形態では、コドン T A C は、チロシンを表すために使用される。いくつかの実施形態では、コドン G T C は、バリンを表すために使用される。いくつかの実施形態では、T A A は、停止コドンとして使用される。

【0128】

【表2】

ヒト遺伝子設計のための改善されたコドン使用、G/C含量を低減する第二選択コドン最適化

	アミノ酸	コドン
1	アラニン(Ala)(A)	GCA
2	アルギニン(Arg)(R)	AGG
3	アスパラギン(Asp)(N)	AAC
4	アスパラギン酸(Asp)(D)	GAC
5	システイン(Cys)(C)	TGC
6	グルタミン(Gln)(Q)	CAA
7	グルタミン酸(Glu)(E)	GAG
8	グリシン(Gly)(G)	GGC
9	ヒスチジン(His)(H)	CAC
10	イソロイシン(Ile)(I)	ATC
11	ロイシン(Leu)(L)	CTC
12	リシン(Lys)(K)	AAG
13	メチオニン(Methionine)(Met)(M)	ATG
14	フェニルアラニン(Phe)(F)	TTC
15	プロリン(Pro)(P)	CCA
16	セリン(Ser)(S)	AGC
17	トレオニン(Thr)(T)	ACT
18	トリプトファン(Trp)(W)	TGG
19	チロシン(Tyr)(Y)	TAC
20	バリン(Val)(V)	GTC
21	停止(Term)(*)	TAA

【0129】

このような実施形態では、16／21種のコドンが、3番目の位置に「CまたはG」を含有し（76％）、11／21種のコドンが、3番目の位置に「C」を含有し（52％）、5／21種のコドンが、3番目の位置に「G」を含有し（24％）、5／21種のコドンが、3番目の位置に「AまたはT」を含有する（24％）。

【0130】

さらに他の実施形態では、21種のコドンのうち約14～18種のコドンが、3番目の位置に「CまたはG」を含有し、21種のコドンのうち約9～13種のコドンが、3番目の位置に「C」を含有し、21種のコドンのうち約3～7種のコドンが、3番目の位置に「G」を含有し、21種のコドンのうち約3～7種のコドンが、3番目の位置に「AまたはT」を含有する。

【0131】

いくつかの実施形態では、以下の稀なコドンは、稀なコドン配列を変更することが、突然変異体 H S V－T K またはその変異体をコードするポリヌクレオチドのコーディング領域内で、新規スプライス受容および／または代替 K o z a k 部位を作り出さない限り、ま

たは不要な制限部位もしくは他の問題のある配列を付加しない限り、可能であれば避けられる。アラニンについてはG C G、アルギニンについてはC G AまたはC G T、ロイシンについてはT T AまたはC T A、プロリンについてはC C G、セリンについてはT C G、トレオニンについてはA C GおよびバリンについてはG T A。可能であれば避けられるべき稀なコドンは、0.12以下のコドン／アミノ酸／アミノ酸あたりのコドンあたりの割合を有するものである。

【0132】

【表3】

稀なコドン

UUU P 0.46	UCU S 0.19	UAU Y 0.44	UGU C 0.46
UUC P 0.54	UCC S 0.22	UAC Y 0.56	UGC C 0.54
UUA L 0.08	UCA S 0.15	UAA * 0.30	UGA * 0.47
UUG L 0.13	UCG S 0.09	UAG * 0.24	UGG W 1.00
CUU L 0.13	CCU P 0.29	CAU H 0.42	CGU R 0.08
CUC L 0.20	CCC P 0.32	CAC H 0.58	CGC R 0.18
CUA L 0.07	CCA P 0.28	CAA Q 0.27	CGA R 0.11
CUG L 0.40	CCG P 0.11	CAG Q 0.73	CGG R 0.20
AUU I 0.36	ACU T 0.25	AAU N 0.47	AGU S 0.15
AUC I 0.47	ACC T 0.36	AAC N 0.53	AGC S 0.24
AUA I 0.17	ACA T 0.28	AAA K 0.43	AGA R 0.21
AUG M 1.00	ACG T 0.11	AAG K 0.57	AGG R 0.21
GUU V 0.18	GCU A 0.27	GAU D 0.46	GGU G 0.16
GUC V 0.24	GCC A 0.40	GAC D 0.54	GGC G 0.34
GUA V 0.12	GCA A 0.23	GAA E 0.42	GGA G 0.25
GUG V 0.46	GCG A 0.11	GAG E 0.58	GGG G 0.25

【コドン／アミノ酸／アミノ酸あたりのコドンあたりの割合】
コドン使用データベースから得たヒト(Homo sapiens)データ

10

20

30

【0133】

いくつかの実施形態では、本明細書において記載されるようなコドンを変更することは、活性の約2%、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%またはそれ以上のパーセンテージの増大をもたらす。

【0134】

高いパーセンテージコドン最適化は、タンパク質発現を改善するが、GC遺伝子含量を増大するとわかった。コドン最適化は、評価され、以下の特徴を有すると決定された。

【0135】

40

【表 4 - 1】

アミノ酸	コドン	ヒト頻度	頻度による順位	3 番目の塩基がGCでないことによる順位	先の両方による順位
メチオニン (Met)(M)	ATG	1	1	1	1
トリプトファン (Trp)(W)	TGG	1	1	1	1
アスパラギン (Asn)(N)	AAT	0.47	2	1	1
アスパラギン (Asn)(N)	AAC	0.53	1	2	2
アスパラギン酸 (Asp)(D)	GAT	0.46	2	1	1
アスパラギン酸 (Asp)(D)	GAC	0.54	1	2	2
システイン (Cys)(C)	TGT	0.46	2	1	1
システイン (Cys)(C)	TGC	0.54	1	2	2
グルタミン酸 (Glu)(E)	GAA	0.42	2	1	1
グルタミン酸 (Glu)(E)	GAG	0.58	1	2	2
グルタミン (Gln)(Q)	CAG	0.73	1	2	1
グルタミン (Gln)(Q)	CAA	0.27	2	1	2

10

20

30

【表 4 - 2】

ヒスチジン (His)(H)	CAT	0.42	2	1	1
ヒスチジン (His)(H)	CAC	0.58	1	2	2
リジン(Lys)(K)	AAA	0.43	2	1	1
リジン(Lys)(K)	AAG	0.57	1	2	2
フェニルアラニン (Phe)(F)	TTT	0.46	2	1	1
フェニルアラニン (Phe)(F)	TTC	0.54	1	2	2
チロシン(Tyr)(Y)	TAT	0.44	2	1	1
チロシン(Tyr)(Y)	TAC	0.56	1	2	2
アラニン(Ala)(A)	GCT	0.27	2	1	1
アラニン(Ala)(A)	GCA	0.23	3	2	2
アラニン(Ala)(A)	GCC	0.4	1	3	3
イソロイシン (Ile)(I)	ATT	0.36	2	1	1
イソロイシン (Ile)(I)	ATC	0.47	1	3	2
イソロイシン (Ile)(I)	ATA	0.17	3	2	3

10

20

【表 4 - 3】

プロリン(Pro)(P)	CCT	0.29	2	1	1
プロリン(Pro)(P)	CCA	0.28	3	2	2
プロリン(Pro)(P)	CCC	0.32	1	3	3
停止(Term)(*)	TGA	0.47	1	1	1
停止(Term)(*)	TAA	0.3	2	2	2
停止(Term)(*)	TAG	0.24	3	3	3
トレオニン (Thr)(T)	ACA	0.28	2	1	1
トレオニン (Thr)(T)	ACT	0.25	3	2	2
トレオニン (Thr)(T)	ACC	0.36	1	3	3
バリン(Val)(V)	GTG	0.46	1	2	1
バリン(Val)(V)	GTC	0.24	2	3	2
バリン(Val)(V)	GTT	0.18	3	1	3
アルギニン (Arg)(R)	AGA	0.21	1	1	1
アルギニン (Arg)(R)	AGG	0.21	1	2	2
アルギニン (Arg)(R)	CGG	0.2	2	3	3
アルギニン (Arg)(R)	CGC	0.18	3	4	4

【表 4 - 4】

グリシン(Gly)(G)	GGA	0.25	2	1	1
グリシン(Gly)(G)	GGC	0.34	1	3	2
グリシン(Gly)(G)	GGG	0.25	3	4	3
グリシン(Gly)(G)	GGT	0.16	4	2	4
ロイシン(Lue)(L)	CTG	0.4	1	2	1
ロイシン(Lue)(L)	CTC	0.2	2	3	2
ロイシン(Lue)(L)	CTT	0.13	4	1	3
ロイシン(Lue)(L)	TTG	0.13	3	4	4
セリン(Ser)(S)	TCT	0.19	3	1	1
セリン(Ser)(S)	AGC	0.24	1	3	2
セリン(Ser)(S)	TCC	0.22	2	4	3
セリン(Ser)(S)	TCA	0.15	4	2	4
セリン(Ser)(S)	AGT	0.15	4	2	4

【0136】

十分に自動化されたコドン最適化ソフトウェアプログラムを用いて得られる不満足な結果のために、カスタマイズされたコドン最適化を実施して、得られるタンパク質発現および力価の両方を増大した。最初の工程は、各コドンを正しいリーディングフレームについてヒトを含む対象種において最も好ましいものに設定するための、第1のスクリーンとし

てのコドン最適化プログラムの使用を含み、「生」コドン最適化をもたらす。一般に、任意の所望のクローニング制限部位は、プロセスのこの段階の間、使用から排除される。

【0137】

結果は、DNA編集プログラムにおいてDNA配列を編集することおよびピリミジンなどの縮重コドンを探すことによって（例えば、「Y」コドンを探すことによって）さらに精緻化される。次いで、以下の操作がこの順序で実施される：

【0138】

「Y」のラン、一般に、少なくとも5以上の「Y」連続ランについて配列を手作業で探すこと。これらの配列は、所与の配列中で強調されており、コドンへの変更が、翻訳されるタンパク質に影響を及ぼさないことを確実にするよう、ペプチド配列への登録一覧表に
10
列挙されるDNA配列を含む翻訳を決定するために、DNA編集プログラムが使用される。

【0139】

5以上のYのランにおける各コドンが評価される。利用可能である場合には、各コドンのゆらぎ塩基が、アミノ酸にとって最も好ましいA-G塩基（普通、アデニン）に変換され、結果が調べられる。変更の結果が、3'AGにまたはその付近にプリンリッチなラン末端を作製する場合には、変更は、手作業で取り消される。ゆらぎ塩基に利用可能な最も好ましいA-T塩基がない場合には、またはそれが別の配列矛盾を引き起こす場合には、ゆらぎ塩基に最も好ましいC-G塩基が使用される。

【0140】

結果が稀なコドン（<10%使用）である場合には、そのコドンは、フレーム中の次に利用可能なコドンに移される。
20

【0141】

別のコドン変更が推定受容部位を切断し得る場合には、変更は元の配列に戻るよう行われる。このような代替変更が利用可能ではない場合には、元の変化が実行される。

【0142】

このプロセスが完了すると、配列が代替リーディングフレームについて5'から3'に調べられる。各リーディングフレームで、ATGコドンの5塩基3'が、Kozak配列としてのその適合性について調べられる。ATGが所望の遺伝子のリーディングフレームでメチオニンを与える場合には、まず、ATGの「-1」ゆらぎ塩基の、次いで、「-4」ゆらぎ塩基のゆらぎ塩基を「T」に変換すること（可能な場合には）によって、選択肢はKozak配列の切断に制限される。
30

【0143】

稀な場合には、リーディングフレーム中の第2のコドンを、元は「AGN」塩基（Ser/Arg）である場合に、T（セリンのため）またはC（アルギニンのため）で始まるコドンに変換することが望ましいものである場合がある。しかし、「AGN」コドンは、「AG」配列対のために避けられるので、この状況は、上記のアルゴリズムを厳密に適用する場合には一般には遭遇されない。

【0144】

代替リーディングフレームが、メッセージのものと異なり、その周囲のKozak配列が「CCACCAtgG」と適合する場合には、インフレームコドンのゆらぎ塩基は、開始コドンを除くよう変更される。これは、コドン最適化および／またはスプライス受容切断プロセスの結果として一般に起こる（しかし、常にではない）。
40

【0145】

ペプチド配列が変更されないことを確実にするために、インプロセスチェックが一般に実施される。最終チェック段階で、多すぎる「稀な」コドンが使用されている（一般に2個以上）場合には、使用されるものに優先順位をつけることが望ましい場合があり、「生」コドン最適化配列からのより長いピリミジンランに与えられる変更が好ましい。最後に、任意の必要な制限部位が付加され、ポリペプチドが、最適化プロセスが始められる前の元の配列から変更されないことおよび任意の所望の制限部位が、クローニング目的で付加
50

されるものに対して独特なままであることを確実にするために最後のチェックが実施される。

【0146】

スプライス部位修飾

エキソンを接続するために、一般に、イントロンはRNAからスプライスされる。スプライス供与部位は、スプライシングプロセスの際に除去されるRNAの5'側のRNA中の部位であり、切断され、スプライス受容部位内のヌクレオチド残基と再接続される部位を含有する。したがって、スプライス供与部位は、エキソンの最後とイントロンの開始点の間の接合点ある。一般に、RNA中のスプライス供与部位は、ジヌクレオチドGU（または対応するDNA配列中のGTジヌクレオチド）である。

10

【0147】

スプライス受容部位は、スプライシングプロセスの際に除去されるRNAの3'側のRNA中の部位であり、切断され、スプライス供与部位内のヌクレオチド残基と再接続される部位を含有する。したがって、スプライス受容部位は、イントロンの最後（通常、ジヌクレオチドAGで終結する）と下流のエキソンの開始点の間の接合点である。

【0148】

いくつかの実施形態では、スプライス供与部位に対応する少なくとも1つのヌクレオチドが、別のヌクレオチドによって置き換えられる、チミジンキナーゼをコードする核酸配列が本明細書において開示される。例えば、図1（Chalmers et al., Mol. Ther. 4:146-8 (2001)）を参照のこと。さらなる実施形態では、スプライス受容部位のヌクレオチドは、変更されない。いくつかの実施形態では、スプライス受容部位に対応する少なくとも1つのヌクレオチドが、別のヌクレオチドによって置き換えられる。

20

【0149】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド配列（例えば、配列番号1または3）の329位および330位のスプライス供与部位ヌクレオチドに対応するヌクレオチドのうち少なくとも1つが、別のヌクレオチドによって置き換えられるチミジンキナーゼをコードする核酸配列が、本明細書において開示される。いくつかの実施形態では、327位および555位のヌクレオチドの両方が、他のヌクレオチドによって置き換えられる。例えば、327位は、G～Aから選択されるアミノ酸残基に突然変異し得る。あるいは、またはさらに、555位は、G～Aから選択されるアミノ酸残基に突然変異し得る。一実施形態では、修飾されたHSV-TKは、HSV-TKが以下の方法で改善された配列番号18のポリヌクレオチド配列を有する：

30

【0150】

HSV-TK NESdmNLS A168H、CO & SC

NES=MAPキナーゼキナーゼ（MAPKK）由来の核外輸送シグナル配列

dmNLS=二重突然変異HSV-TK核局在性配列

CO=最適化されたコドン

SC=327および555の修正されたスプライス供与／受容部位

下線を引いた配列

【0151】

40

【化 1】

配列番号18

gtcaGCGGCCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCCTGCAGAAAAAGCTGGAAGAGCTGGAAGCTGGAACTGGATGG
 CAGCTACCCCGGCCACCAGCACGCCAGCGCCTTCGACCAGGCCGCCCGCAGCCGCGGCCACAGCAACGGC
 AGCACCGCaCTGCGgCCaGGATCTCAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCGAGCAGAAGATGCCCACCC
 TGCTGCGCGTGTACATCGACGGaCCaCACGGCATGGGCAAGACCACCACCACCCAGCTGCTGGTGGCCCT
 GGGCAGCCGCGACGACATCGTGTACGTGCCCCGAGCCCATGACCTACTGGCGCGTGTGGGCGCCAGCGAG
 ACCATCGCCAACATCTACACCACCCAGCACCGCCTGGACCa^aGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCGCCCG
 TGGTGATGACCAGCGCCAGATtACaATGGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCGCGTGTGGCaCCaCA
 CATCGGCGGCGAGGCCGGCAGCAGCCACGCaCCaCCaCCaGCaCTGACCCTGATCTTCGACCGgCACCCa
 ATCGCaCACCTGCTGTGCTACCCgGCaGCaCGCTACCTGATGGGCTccATGACaCCaCA^aGCCGTGCTGG
 CCTTCGTGGCCCTGATCCCaCCaACaCTGCCCGGCACCAACATCGTGTGGGCGCCCTGCCCGAGGACCG
 CCACATCGACCGCCTGGCCAAGCGCCAGCGCCCCGCGAGCGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCATC
 CGCCGCGTGTACGGCCTGTGGCCAACACCGTGCCTACCTGCAGTGCGGCGGCAGCTGGCGCGAGGACT
 GGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCCaCCaCAGGGCGCCGAGCCaCAGAGCAACGCCGgaCCaCGaCC
 aCACATCGGCGACACCCGTTCACCCCTGTTCCGgGCaCCaGAGCTGCTGGCaCCaAACGGCGACCTGTAC
 AACGTGTTTCGCTGGGCCCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCGTccATGCACGTGTTTCATCTGGA
 ACGACCAgTcaCCgGCCGGCTGCCGCGACGCCCTGCTGCAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGT
 GACaACaCCCGGCAGCATCCCaCaATCTGCGACCTGGCCCGCACCTTCGCCCCGAGATGGGCGAGGCC
 AACTAATAGGGATCCCTCGAGAAGCTTgtca

10

【0152】

いくつかの実施形態では、野生型配列の554位および555位のスプライス受容部位
 ヌクレオチドに対応するヌクレオチドのうち少なくとも1つまたは662位および663
 位のスプライス受容部位ヌクレオチドに対応するヌクレオチドのうち少なくとも1つまた
 は541位および542位のスプライス受容部位に対応するヌクレオチドのうち少なくと
 も1つが、別のヌクレオチドによって置き換えられるチミジンキナーゼをコードする核酸
 配列が本明細書において開示される。例えば、541位は、G～Aから選択されるアミノ
 酸残基に突然変異し得る。542位は、G～Aから選択されるアミノ酸残基に突然変異し
 得る。554位は、G～Aから選択されるアミノ酸残基に突然変異し得る。555位は、
 G～Aから選択されるアミノ酸残基に突然変異し得る。662位は、G～Aから選択され
 るアミノ酸残基に突然変異し得る。663位は、G～Aから選択されるアミノ酸残基に突
 然変異し得る。

20

【0153】

30

いくつかの実施形態では、野生型H S V-T Kコード配列のヌクレオチドのうち少なく
 とも1つが、以下の表1に記載されるように置き換えられる。

【0154】

【表 5】

表1			
位置	突然変異	位置	突然変異
84	C→A	843	C→A
90	C→G	846	C→A
93	C→A	879	C→G
96	C→G	882	C→A
168	C→A	885	C→A
171	C→A	897	C→A
378	C→T	900	C→A
381	C→A	961	A→T
420	C→A	962	G→C
423	C→A	994	A→T
456	C→A	995	G→C
459	C→A	996	C→A
462	C→A	999	C→G
465	C→A	1059	C→A
468	C→A	1062	A→C
475	A→C	1077	C→A
477	C→G	1080	C→A
478	T→A		
481	C→T		
483	G→C		
489	C→G		
495	C→A		
501	C→A		
502	T→C		
503	T→A		
505	A→C		
518	C→G		
522	C→A		
525	C→A		
541	A→T		
542	G→C		
585	C→A		
588	C→A		
591	C→A		
804	C→A		
807	C→A		
822	C→A		
837	C→A		

10

20

30

【0155】

Kozak配列は、mRNA内のAUG開始コドンの両側に隣接し、真核細胞のリボソームによる開始コドンの認識に影響を及ぼす。いくつかの実施形態では、HSV-TKをコードするポリヌクレオチド配列は、わずか1つのKozak配列しか含まない。いくつかの実施形態では、Kozak配列は、DNA配列のコーディング部分の上流である。いくつかの実施形態では、HSV-TKをコードするポリヌクレオチドのKozak配列は、哺乳類細胞においてより高い効率の翻訳開始を伴うKozak配列を製造するよう修飾される。いくつかの実施形態では、Kozak配列の修飾は、コードされるHSV-TKポリペプチド産物におけるアミノ酸置換を引き起こさない。いくつかの実施形態では、Kozak配列の修飾は、コードされるHSV-TKポリペプチド産物において少なくとも1種のアミノ酸置換をもたらす。一実施形態では、修飾されたHSV-TKは、配列番号

40

50

18のポリヌクレオチド配列を有する。

【0156】

いくつかの実施形態では、HSV-TKをコードするポリヌクレオチド配列は、1種または複数の制限部位を挿入する修飾を含む。1種または複数の制限部位の挿入のための最適部位は、経験的におよび／または配列を分析するためのコンピュータプログラムを使用して決定され得る。1つの限定されない実施形態では、第1の制限部位は、KozakおよびATG開始部位の上流に挿入され、第2の制限部位は、配列の3'末端に挿入される。例えば、配列番号18、以下の下線が引かれた部分を参照のこと。

【0157】

HSV TK NESdmNLS A168H、CO & SC
 NES = MAPKK由来の核外輸送シグナル配列
 dmNLS = 二重突然変異核局在性配列
 CO = 最適化されたコドン
 SC = 先に記載された、327および555の修正されたスプライス
 先に記載されたkozak配列
 下線を引いた、以下として特定される制限部位：

【0158】

【化2】

(GCGGCCGC ACCGGT ACGCGT = Not-I, Age-I, および MLU-I)
 (GGATCC CTCGAG AAGCTT = BamH-I, Xho-I および Hind-III)

【0159】

【化3】

配列番号18

gtcaGCGGCCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCCTGCAGAAAAAGCTGGAAGAGCTGGAAGCTGGATGG
 CAGCTACCCCGGCCACACGACGCGCGCTTCGACCAAGGCCGCGCCGACAGCAACGGC
 AGCACCGCaCTGCGGCCaGGATCTCAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCGAGCAGAAGATGCCCACCC
 TGCTGCGCGTGTACATCGACGCaCCaCAGGCGATGGGCAAGACCACACACCCAGCTGCTGGTGGCCCT
 GGGCAGCCGCGCAGCATCGTGTACGTGCCCCGAGCCCATGACCTACTGGCGCGTGTGGGCGCCAGCGAG
 ACCATCGCCAACATCTACACCAACCCAGCACCCTGGACCAaGGCGAGATCAGCGCCGCGCAGCGCCCGG
 TGGTGATGACCAAGCGCCAGATtACaATGGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGCaCCaCA
 CATCGGCGGCGAGGCCGCGCAGCAGCCAGCaCCaCCaCCaGCaCTGACCCTGATCTTCGACCGgCACCCa
 ATCGCaCACCTGCTGTGTACCCgGCaGCaCGCTACCTGATGGGCTccATGACaCCaCaAGCCGTGCTGG
 CCTTCGTGGCCCTGATCCCaCCaACaCTGCCCGGCCACCAACATCGTGTGGGCGCCCTGCCCGAGGACCG
 CCACATCGACCGCTGGCCAAGCGCCAGCGCCCCGCGAGCGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCATC
 CGCCGCGTGTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGCCTACCTGCAGTGGCGCGGCGAGTGGCGCGAGGACT
 GGGGCCAGCTGAGCGGCAACCGCGTGCaCCaCAGGGCGCGGAGCCaCAGAGCAACGCCGCaCCaCGaCC
 aCACATCGGCGACACCCGTGTTTACCCTGTTCCGgGCaCCaGAGCTGCTGGCaCCaAACGGCGACCTGTAC
 AACGTGTTGCGCTGGGCCCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCGCTccATGCAGTGTTCATCTGGACT
 ACGACCAgTcaCCgGCCGGTGCCGCGACGCCCTGTGTCAGCTGACCAAGCGGCTGTTGTCAGACCCACGT
 GACaCaCCCGGCGACATCCCaACaATCTGCGACCTGGCCCGCACCTTCGCCCGCGAGATGGGCGAGGCC
 AACTAATAGGGATCCCTCGAGAAGCTTgtca

【0160】

他のスプライシング部位修飾は、以下の例において開示され、特許請求される方法において使用され得る修飾されたTK配列として含めるために考慮される。

【0161】

いくつかの実施形態では、HSV-TKをコードするポリヌクレオチド配列は、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、60、75、80、85、90、95、100またはそれ以上のコドン置換を含む。いくつかの実施形態では、HSV-TKをコードするポリヌクレオチド配列は、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、60、75、80、85、90、95、100またはそれ以上のコドン置換を含み、ここで、コ

ドン置換は、その位置で野生型コドンよりも哺乳類細胞においてより高頻度の使用を有するコドンの置換を含む。しかし、いくつかの実施形態では、特定の状況に応じて、個々のアミノ酸のために、より好ましくないコドンが選択され得る。

【0162】

いくつかの実施形態では、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、60、75、80、85、90、95、100またはそれ以上のコドン置換を含むHSV-TKをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号1または3に対して、約65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%未満の配列同一性を有し、ここで、配列同一性は、グローバルアラインメント法を使用してコード配列の全長にわたって決定される。いくつかの実施形態では、対応するコードされるポリペプチド配列は、HSV-TKアミノ酸配列、例えば、配列番号2または4に対して、少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する。

10

【0163】

いくつかの実施形態では、HSV-TKをコードするポリヌクレオチド配列は、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、60、75、80、85、90、95、100またはそれ以上のコドン置換を含み、ここで、コドン置換は、その位置の野生型コドンの、哺乳類細胞において最高頻度の使用を有するコドンとの置換を含む。いくつかの実施形態では、対応するコードされるポリペプチド配列は、HSV-TKアミノ酸配列、例えば、配列番号2または4に対して、少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する。

20

【0164】

いくつかの実施形態では、HSV-TKをコードするポリヌクレオチド配列は、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、60、75、80、85、90、95、100またはそれ以上のコドン置換を含み、ここで、置換コドンは、約0.1、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.2、0.21、0.22、0.23、0.24、0.25、0.26、0.27、0.28、0.29、0.3、0.31、0.32、0.33、0.34、0.35以上またはそれより高い使用の頻度を有する。いくつかの実施形態では、対応するコードされるポリペプチド配列は、HSV-TKアミノ酸配列、例えば、配列番号2または4に対して、少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する。

30

40

【0165】

いくつかの実施形態では、HSV-TKをコードするポリヌクレオチド配列は、約45、40、35、30、25、20未満またはそれより少ないコドンを含み、ここで、コドンは、約0.1、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.2、0.21、0.22、0.23、0.24または0.25未満の使用の頻度を有する。いくつかの実施形態では、対応するコードされるポリペプチド配列は、HSV-TKアミノ酸配列、例えば、配列番号2または4に対して、少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する

50

。

【0166】

いくつかの実施形態では、HSV-TKをコードするポリヌクレオチド配列は、少なくとも78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%またはそれ以上の、約0.1、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.2、0.21、0.22、0.23、0.24、0.25、0.26、0.27、0.28、0.29、0.3、0.31、0.32、0.33、0.34、0.35以上またはそれより高い使用の頻度を有するコドンを含む。いくつかの実施形態では、対応するコードされるポリペプチド配列は、HSV-TKアミノ酸配列、例えば、配列番号2または4に対して、少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する。

10

【0167】

いくつかの実施形態では、HSV-TKをコードするポリヌクレオチド配列は、少なくとも35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%またはそれ以上の、哺乳類細胞において使用の最高頻度を有するコドンを含む。いくつかの実施形態では、対応するコードされるポリペプチド配列は、HSV-TKアミノ酸配列、例えば、配列番号2または4に対して、少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する。

20

【0168】

いくつかの実施形態では、HSV-TKをコードするポリヌクレオチド配列は、約21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%未満またはそれより少ない、約0.1、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.2、0.21、0.22、0.23、0.24または0.25未満の使用の頻度を有するコドンを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、約21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%未満またはそれより少ない、哺乳類細胞において約0.1、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.2、0.21、0.22、0.23、0.24または0.25未満の使用の頻度を有するコドンを含む。いくつかの実施形態では、対応するコードされるポリペプチド配列は、HSV-TKアミノ酸配列、例えば、配列番号2または4に対して、少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する。

30

40

【0169】

いくつかの実施形態では、HSV-TKをコードするポリヌクレオチド配列は、コドン置換を含み、ここで、少なくとも35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上のコドンが、野生型配列と比較して変更されている。いくつかの実施形態では、HSV-TKをコードするポリヌクレオチド配列は、コドン置換を含み、ここで、少なくとも30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、4

50

6 %、47 %、48 %、49 %、50 %、51 %、52 %、53 %、54 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %またはそれ以上のコドンが、野生型配列と比較して、哺乳類細胞において使用のより高い頻度を有するコドンに変更されている。いくつかの実施形態では、対応するコードされるポリペプチド配列は、HSV-TKアミノ酸配列、例えば、配列番号2または4に対して、少なくとも75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %または100 %の配列同一性を有する。

【0170】

いくつかの実施形態では、HSV-TKをコードするポリヌクレオチド配列は、コドン置換を含み、ここで、少なくとも19 %、20 %、21 %、22 %、23 %、24 %、25 %、26 %、27 %、28 %、29 %、30 %、31 %、32 %、33 %、34 %、35 %、36 %、37 %、38 %、39 %、40 %、41 %、42 %、43 %、44 %、45 %、46 %、47 %、48 %、49 %、50 %、51 %、52 %、53 %、54 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %またはそれ以上のコドンが、野生型配列と比較して、哺乳類細胞において使用のより高い頻度を有するコドンに変更されている。いくつかの実施形態では、対応するコードされるポリペプチド配列は、HSV-TKアミノ酸配列、例えば、配列番号2または4に対して、少なくとも75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %または100 %の配列同一性を有する。

【0171】

保存されない突然変異

選択されたヘルペスウイルス由来のウイルスチミジンキナーゼ遺伝子は、突然変異していない野生型チミジンキナーゼと比較して、チミジンキナーゼの生物活性を増大する1つまたは複数の突然変異を含むチミジンキナーゼ酵素をコードする核酸分子を構築するために、以下に記載されるように、容易に単離され、突然変異し得る。チミジンキナーゼの生物活性は、例えば、ヌクレオシド類似体取り込みの割合の決定またはヌクレオシドまたはヌクレオシド類似体リン酸化の割合の決定を含めた、当技術分野で公知のアッセイのいずれかを利用して容易に決定され得る。さらに、熱安定性およびタンパク質安定性などの他の生物学的特性を特徴とするチミジンキナーゼ突然変異体は、容易に選択され得る。

【0172】

いくつかの実施形態では、HSV-TKをコードするポリヌクレオチド配列は、予測されるシグナル配列を除去または修飾するよう修飾される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、核局在性配列(NLS)を除去または修飾するよう修飾される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、核局在性配列を除去するよう修飾される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、HSV-TKを核に排他的に局在するよう、もはや機能しないようにNLSを修飾するよう修飾される。

【0173】

いくつかの実施形態では、HSV-TKポリペプチド配列は、アミノ酸残基167、168または両方で突然変異する。1つの例では、配列は、アミノ酸残基167で突然変異する。別の例では、配列は、アミノ酸残基168で突然変異する。別の例では、配列は、アミノ酸残基167および168で突然変異する。アミノ酸残基167は、セリンまたはフェニルアラニンに突然変異し得る。アミノ酸残基168は、ヒスチジン、リシン、システイン、セリンまたはフェニルアラニンに突然変異し得る。いくつかの実施形態では、HSV-TKポリペプチド配列は、アミノ酸残基25および/または26で突然変異する。アミノ酸残基25および/または26は、グリシン、セリンおよびグルタミン酸からなる群から選択されるアミノ酸に突然変異し得る。いくつかの実施形態では、HSV-TKポリペプチド配列は、アミノ酸残基32および/または33で突然変異する。アミノ酸残基32および/または33は、グリシン、セリンおよびグルタミン酸からなる群から選択さ

れるアミノ酸に突然変異し得る。いくつかの実施形態では、H S V-T Kポリペプチドは、アミノ酸残基25、26、32および／または33で突然変異する。アミノ酸残基25、26、32および／または33は、グリシン、セリンおよびグルタミン酸からなる群から選択されるアミノ酸に突然変異し得る。アミノ酸残基修飾は、配列番号2または4のポリペプチド配列と比較して行われ得る。

【0174】

本発明に従って、上記の核酸分子によってコードされる突然変異体チミジンキナーゼ酵素ならびにこのような分子を発現できるベクターが提供される。いくつかの実施形態では、本発明の核酸分子と作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ベクターは、核酸分子の発現を指示できるウイルスベクターである。このようなウイルスベクターの代表例として、単純ヘルペスウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルス随伴ウイルスベクター、ポックスベクター、パルボウイルスベクター、バキュロウイルスベクターおよびレトロウイルスベクターが挙げられる。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の突然変異を含み、突然変異のうち少なくとも1つが、突然変異していない（すなわち、野生型）チミジンキナーゼと比較して、チミジンキナーゼの生物活性を増大する、チミジンキナーゼ酵素をコードする核酸分子の発現を指示できるウイルスベクターが提供される。

【0175】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供される核酸分子は、ヌクレオシド類似体を、野生型チミジンキナーゼ酵素によるヌクレオシド類似体のリン酸化のレベルよりも、少なくとも10%高いレベルでリン酸化できるチミジンキナーゼ酵素をコードする。いくつかの実施形態では、チミジンキナーゼ酵素は、ヌクレオシド類似体を、野生型チミジンキナーゼ酵素によるヌクレオシド類似体のリン酸化のレベルよりも、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも100%、少なくとも150%、少なくとも200%、少なくとも300%または少なくとも500%高いレベルでリン酸化できる。適したヌクレオシド類似体の代表例として、ガンシクロビル、アシクロビル、ファムシクロビル、ブシクロビル (buciclovir)、ペンシクロビル、バルシクロビル (valciclovir)、トリフルオロチミジン、1-[2-デオキシ、2-フルオロ、 β -D-アラビノフラノシル]-5-ヨードウラシル、ara-A、araT1- β -D-アラビノフラノキシルチミン、5-エチル-2'-デオキシウリジン、5-ヨード-5'-アミノ-2、5'-ジデオキシウリジン、イドクスウリジン、AZT、AIU、ジデオキシシチジンおよびaraCが挙げられる。いくつかの実施形態では、改善されたTK突然変異体は、チミジンキナーゼ活性を欠く。

【0176】

いくつかの実施形態では、開示されるH S V-T K突然変異体のチミジンキナーゼ活性の K_m 値は、少なくとも2.5 μ mである。いくつかの実施形態では、開示されるH S V-T K突然変異体のチミジンキナーゼ活性の K_m 値は、少なくとも5 μ m、少なくとも10 μ m、少なくとも15 μ m、少なくとも20 μ m、少なくとも25 μ m、少なくとも30 μ m、少なくとも40 μ m、少なくとも50 μ m、少なくとも60 μ m、少なくとも70 μ m、少なくとも80 μ m、少なくとも90 μ m、少なくとも100 μ m、少なくとも150 μ m、少なくとも200 μ m、少なくとも250 μ m、少なくとも300 μ m、少なくとも400 μ m、少なくとも500 μ m、少なくとも600 μ m、少なくとも700 μ m、少なくとも800 μ m、少なくとも900 μ mまたは少なくとも1000 μ mである。いくつかの実施形態では、野生型H S V-T Kと比較した、開示されるH S V-T K突然変異体のパーセント K_m は、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも100%、少なくとも150%、少なくとも200%、少なくとも300%または少なくとも500%である。

【0177】

本発明の一実施形態内で、H S V-T K突然変異体の切断型誘導体が提供される。例えば、部位特異的突然変異誘発は、チミジンキナーゼ突然変異体のN末端の45個のアミノ

酸を欠失し、その生物活性を保持する突然変異体の切断型を構築するよう容易に実施され得る。

【0178】

チミジンキナーゼ突然変異体の誘導体の発現のために構築されたヌクレオチド配列中の突然変異は、コード配列のリーディングフレーム相を保たなくてはならない。さらに、突然変異は、好ましくは、ハイブリダイズして、受容体mRNAの翻訳に悪影響を及ぼすであろうループまたはヘアピンなどの二次的mRNA構造を製造できる相補的領域を作製しない。このような誘導体は、上記で議論されたものを含めたさまざまな技術を使用して容易に構築され得る。

【0179】

修飾されたチミジンキナーゼ突然変異体

本発明者らは、本明細書において記載された方法を使用して、最適化されたHSV-TK遺伝子の候補の大部分が、レトロウイルス発現系と匹敵し、生物学的に有用なレトロウイルス力価をもたらすようであると決定した。

【0180】

さらに、これらの最適化のほとんどを組み込んだ最適化されたHSV-TK遺伝子（配列番号18）は、レトロウイルス形質導入送達後に、プロドラッグGCV酵素活性および癌細胞を死滅させるその能力の選択性を示した。コドン最適化され、スプライス修正された突然変異体HSV-TK遺伝子A168Hは、最高のGCV媒介性癌死滅活性を有すると思われた（配列番号12、16、18または22）。このHSV-TK遺伝子A168Hの同じ型で、アミノ酸159～161でLIFからIFLに突然変異したものは、GCV媒介性癌細胞死滅活性を示した。

【0181】

コドン最適化され、スプライス修正された突然変異体HSV-TK遺伝子A167F（配列番号13、17または19）は、レトロウイルス形質導入送達後に極めて高いGCV媒介性癌死滅活性を有していたが、より驚くべきことに、HAT培地を用いて選択された3T3 TK（-）細胞におけるレトロウイルス形質導入送達後のこの遺伝子の発現によって決定されるように、チミジンキナーゼ活性は有していなかった。本発明者らの知る限りでは、これは、これまでに生物学的に評価されたチミジン活性を有さない（HATアッセイ）GCV活性化のための最もGCV選択的なHSV-TK合成遺伝子産物である。

【0182】

二重突然変異体HSV-TK遺伝子A167F+A168H（配列番号14）は、予期しないことに、極めてわずかなGCV媒介性癌死滅活性および極めてわずかなチミジン活性（HATアッセイ）を示すことによって、GCVおよびチミジン酵素活性の両方を除去した。

【0183】

本発明者らは、細菌シトシンデアミナーゼ、酵母シトシンデアミナーゼ、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼなどの遺伝子の機能的HSV-TK融合物を製造し、リンカー配列を含み、HSV-TK GCV媒介性癌細胞死滅活性を保持することが可能であると明らかにした。

【0184】

一実施形態では、1種または複数の他の治療用遺伝子と融合されていない1種または複数の核局在性配列を保持する、GCV媒介性癌死滅活性を有するコドン最適化されたHSV-TK遺伝子が作製され得る。

【0185】

本明細書に記載される最適化されたHSV-TK遺伝子へのさらなる修飾および／またはその評価は、以下：HSV-TK内の公知の核局在性配列の除去、プロドラッグGCV酵素活性および癌細胞を死滅させるその能力の選択性の増大のうち1つまたは複数を含み得、HSV-TKの、他の遺伝子およびタンパク質との、より多くのタグ、融合タンパク質およびリンカーの使用、癌細胞におけるHSV-TK最適化遺伝子の、他の最適化自殺

10

20

30

40

50

および癌死滅遺伝子との同時発現を評価し得、R e x i m m u n e - C 型レトロウイルスベクター系中の最適化H S V - T K 遺伝子、R e x i m m u n e - C 型G M P 生成物またはそれらの任意の組合せの製造および試験を含み得る。

【0186】

例示的ポリヌクレオチド配列

一実施形態では、本明細書に記載されるポリヌクレオチド配列は、核外輸送シグナルを含む。例えば、ポリヌクレオチド配列は、T K 1 6 8 d m N E S を含み得る。

【0187】

別の実施形態では、本明細書に記載される方法において使用するためのレトロウイルスベクターは、1 種または複数のスプライシング部位修飾を含む。

10

【0188】

別の実施形態では、本明細書に記載される方法において使用するためのレトロウイルスベクターは、H S V - T K A 1 6 7 F s m (配列番号13)を含む。

【0189】

別の実施形態では、本明細書に記載される方法において使用するためのレトロウイルスベクターは、H S V - T K A 1 6 8 H s m (配列番号12)を含む。

【0190】

別の実施形態では、本明細書に記載される方法において使用するためのレトロウイルスベクターは、H S V - T K A 1 6 7 F d m (配列番号17)を含む。

【0191】

別の実施形態では、本明細書に記載される方法において使用するためのレトロウイルスベクターは、H S V - T K A 1 6 8 d m (配列番号16)を含む。

20

【0192】

別の実施形態では、本明細書に記載される方法において使用するためのレトロウイルスベクターは、H S V - T K A 1 6 7 F d m および N E S (配列番号19)を含む。

【0193】

別の実施形態では、本明細書に記載される方法において使用するためのレトロウイルスベクターは、H S V - T K A 1 6 8 H d m および N E S (配列番号18)を含む。このような一実施形態では、配列は、H S V - T K A 1 6 8 H を含む。

【0194】

別の実施形態では、本明細書に記載される方法において使用するためのレトロウイルスベクターは、H S V - T K を含み、このようなベクターは、改良された基質結合ドメインおよび m N L S / N E S セットを含む。

30

【0195】

別の実施形態では、本明細書に記載される方法において使用するためのレトロウイルスベクターは、H S V - T K を含み、ベクターは、選択マーカー、蛍光を発する、蛍光または生物発光遺伝子および／または1 種もしくは複数の死滅遺伝子を含む。

【0196】

別の実施形態では、本明細書に記載される方法において使用するためのレトロウイルスベクターは、少なくとも2 つの修飾を含む。

40

【0197】

チミジンキナーゼ突然変異体の構築

本発明のチミジンキナーゼ突然変異体は、さまざまな技術を使用して構築され得る。例えば、突然変異は、突然変異体配列を含有し、天然配列の断片との連結を可能にする制限部位によって両側に隣接されるオリゴヌクレオチドを合成することによって特定の遺伝子座に導入され得る。連結後、得られた再構築された配列は、所望のアミノ酸挿入、置換または欠失を有する誘導体をコードする。

【0198】

あるいは、オリゴヌクレオチドによって指示される部位特異的（またはセグメント特異的）突然変異誘発手順は、必要な置換、欠失または挿入に従って変更された、特定のコード

50

ンを有する変更された遺伝子を提供するよう使用され得る。チミジンキナーゼ突然変異体の欠失または切断誘導体はまた、所望の欠失に隣接する好都合な制限エンドヌクレアーゼ部位を利用することによって構築され得る。制限後に、オーバーハングが埋められ、DNAが再連結され得る。上記で示される変更を行う例示的方法は、Sambrook et al. (Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)によって開示されている。

【0199】

本明細書において開示されるチミジンキナーゼ突然変異体の他の誘導体は、他のタンパク質またはポリペプチドとともにチミジンキナーゼ突然変異体のコンジュゲートを含む。これは、例えば、チミジンキナーゼ突然変異体の精製または同定を促進するよう付加され得るN末端またはC末端融合タンパク質の合成によって達成され得る（米国特許第4, 851, 341号を参照のこと、Hopp et al., Bio/Technology 6:1204, 1988も参照のこと）。

10

【0200】

H S V 媒介性死滅の改善

いくつかの実施形態では、H S V-T Kをコードするポリヌクレオチド配列は、二次的治療薬またはポリペプチドをコードする配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、二次的治療薬またはポリペプチドは、診断薬または治療薬またはポリペプチドである。

【0201】

いくつかの実施形態では、二次的治療薬またはポリペプチドは、それ自体によって、または他の化合物の存在下で細胞死を引き起こすさらなる「自殺タンパク質」である。いくつかの実施形態では、第2の自殺遺伝子は、ペニシリン-V-アミダーゼ、ペニシリン-G-アミダーゼ、 β -ラクタマーゼ、カルボキシペプチダーゼA、リナマラーゼ（ β -グルコシダーゼとも呼ばれる）、大腸菌（*E. coli*）g p t 遺伝子および大腸菌D e o 遺伝子、シトシンデアミナーゼ、V S V-t k、I L-2、ニトロレダクターゼ（NR）、カルボキシエステラーゼ、 β -グルクロニダーゼ、シトクロムp 450、 β -ガラクトシダーゼ、ジフテリア毒素A鎖（D T-A）、カルボキシペプチドG 2（C P G 2）、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ（P N P）およびデオキシシチジンキナーゼ（d C K）を含む群から選択される。

20

【0202】

いくつかの実施形態では、第2の自殺タンパク質は、プロドラッグを毒性化合物に変換する。本明細書において、「プロドラッグ」とは、毒性の、すなわち、腫瘍細胞に対して毒性の生成物に変換され得る、本明細書において開示される方法において有用な任意の化合物を意味する。プロドラッグは、自殺タンパク質によって毒性生成物に変換される。このようなプロドラッグの代表例として、F H B G（9-[4-フルオロ-3-(ヒドロキシメチル)ブチル]グアニン）、F H P G（9-([3-フルオロ-1-ヒドロキシ-2-プロポキシ]メチル)グアニン）、F G C V（フルオロガンシクロビル）、F P C V（フルオロペンシクロビル）、F I A U（1-(2'-デオキシ-2'-フルオロ-1- β -D-アラビノフラノシル)-5-ヨードウラシル）、F E A U（フルオロ-5-エチル-1- β -D-アラビノフラノシルウラシル）、F M A U（フルオロ-5-メチル-1- β -D-アラビノフラノシルウラシル）、F H O M P（6-((1-フルオロ-3-ヒドロキシプロパン-2-イルオキシ)メチル)-5-メチルピリミジン-2, 4(1H, 3H)-ジオン）、ガンシクロビル、バルガンシクロビル、アシクロビル、バラシクロビル（valaciclovir）、ペンシクロビル、放射標識された、N-1に4-ヒドロキシ-3-(ヒドロキシメチル)ブチル側鎖を有するピリミジン（H H G-5-F E P）または2, 3-ジヒドロキシプロピルを有する、5-(2-)ヒドロキシエチル-および5-(3-ヒドロキシプロピル)置換ピリミジン誘導体、チミジンキナーゼのためのアシクロビル-、ガンシクロビル-およびペンシクロビル-様側鎖、オキシドレダクターゼのためのイホスファミド、V Z V-T Kのための6-メトキシプリンアラビノシド、シトシンデアミナーゼのための5-フルオロシトシン、 β -グルクロニダーゼのためのドキソルビシン、ニ

30

40

50

トロレダクターゼのためのC B 1 9 5 4およびニトロフラゾンおよびN-（シアノアセチル）-L-フェニルアラニンまたはカルボキシペプチダーゼAのためのN-（3-クロロプロピオニル）-L-フェニルアラニンが挙げられる。

【0203】

いくつかの実施形態では、二次的治療薬またはポリペプチドは、それだけには限らないが、細胞周期制御物質、サイクリンAおよび／またはD遺伝子に対するアンチセンスポリヌクレオチドなどのサイクリンタンパク質を阻害する物質、例えば、上皮成長因子（EGF）、血管内皮増殖因子（VEGF）、エリスロポエチン、G-CSF、GM-CSF、TGF- α 、TGF- β および線維芽細胞成長因子などの成長因子、それだけには限らないが、インターロイキン1から13および腫瘍壊死因子を含めたサイトカイン、抗凝固薬、抗血小板薬、抗炎症薬、抗血管新生因子、腫瘍抑制タンパク質、第VII因子、第VII因子および第IX因子を含めた凝固因子、タンパク質S、タンパク質C、抗トロンビンIII、フォンウィルブランド因子、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（CFTR）および陰性選択マーカーを含めた群から選択される。

10

【0204】

いくつかの実施形態では、二次的治療剤またはポリペプチドは、癌抑制、例えば、p53もしくはRbまたはこのようなタンパク質もしくはポリペプチドをコードする核酸である。

【0205】

二次的治療剤またはポリペプチドの他の例として、アポトーシス促進性治療用タンパク質およびポリペプチド、例えば、p15、p16またはp21/WAF-1が挙げられる。

20

【0206】

いくつかの実施形態では、二次的治療剤またはポリペプチドは、サイトカインである。サイトカインの例として、GM-CSF（顆粒球マクロファージコロニー刺激因子）、TNF- α （腫瘍壊死因子 α ）、それだけには限らないが、IFN- α およびIFN- γ を含めたインターフェロンおよびそれだけには限らないが、インターロイキン-1（IL1）、インターロイキン- β （IL- β ）、インターロイキン-2（IL2）、インターロイキン-4（IL4）、インターロイキン-5（IL5）、インターロイキン-6（IL6）、インターロイキン-8（IL8）、インターロイキン-10（IL10）、インターロイキン-12（IL12）、インターロイキン-13（IL13）、インターロイキン-14（IL14）、インターロイキン-15（IL15）、インターロイキン-16（IL16）、インターロイキン-18（IL18）、インターロイキン-23（IL23）、インターロイキン-24（IL24）を含めたインターロイキンが挙げられるが、他の実施形態は、当技術分野で公知である。

30

【0207】

いくつかの実施形態では、二次的治療剤またはポリペプチドは、アポトーシス促進性である。アポトーシス促進性タンパク質またはポリペプチドの例として、それだけには限らないが、Bax、Bad、Bik、Bak、Bim、チトクロームC、アポトーシス誘導因子（AIF）、Puma、CT10調節性キナーゼ（CRK）、Bok、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素、前立腺アポトーシス応答タンパク質-4（Par-4）、Smac、キナーゼC δ 、Fas、阻害性PASドメインタンパク質（IPAS）およびHrkが挙げられる。

40

【0208】

いくつかの実施形態では、二次的治療剤またはポリペプチドは、細胞間情報伝達に参与している。いくつかの実施形態では、二次的治療剤またはポリペプチドは、ギャップ細胞結合に参与している。いくつかの実施形態では、二次的治療剤またはポリペプチドは、コネキシンである。いくつかの実施形態では、治療用タンパク質またはポリペプチドは、群コネキシン43、コネキシン32およびコネキシン26から選択されるコネキシンである。

50

【0209】

いくつかの実施形態では、二次的治療剤またはポリペプチドは、ヒト受容体遺伝子 P i T-2 (S L C 2 0 A 2) によってコードされる。R e x i m m u n e - C 1 および 2 レトロウイルスベクターに含まれる両種指向性のエンベロープ遺伝子産物は、標的細胞感染に先立って P i T-2 受容体と結合する。いくつかの実施形態では、二次的治療剤またはポリペプチドは、ヒト受容体遺伝子 P i T-1 (S L C 2 0 A 1) によってコードされる。テナガザル白血病ウイルス (G A L V) エンベロープ遺伝子産物は、標的細胞感染に先立って P i T-1 受容体と結合する。

【0210】

いくつかの実施形態では、二次的治療剤またはポリペプチドは、レトロウイルスタンパク質の N 末端切断であり、N 末端切断は、エンベロープタンパク質の機能的受容体結合ドメインを含む。

【0211】

治療を改善するための細胞内情報伝達の増大

バイスタンダー効果の増大

いくつかの実施形態では、H S V-T K プロドラッグ基質バイスタンダー効果を増大する方法が、本明細書において開示される。本明細書において、「バイスタンダー効果」とは、H S V-T K 陽性細胞における H S V-T K 発現の発現の誘導後に、H S V-T K 陽性が、隣接する H S V-T K 陰性細胞に対して死滅効果を発揮する現象を指す。

【0212】

いくつかの実施形態では、例えば、ギャップ結合依存性細胞内情報伝達の増大とともに G C V を用いる処理後に、H S V-T K プロドラッグ媒介性バイスタンダー効果を増大する方法である。いくつかの実施形態では、H S V-T K プロドラッグ媒介性バイスタンダー効果は、死滅率を 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% または 100% またはそれ以上、増大する。

【0213】

ギャップ結合は、ある細胞の細胞質を別の細胞の細胞質と直接接続するギャップ結合チャネルのクラスターを有する細胞膜の領域である。ギャップ結合チャネルは、2 種の隣接する細胞の各々によって提供される 2 つのヘミチャネル (コネクソン) から構成される。コネクソンは、4 つの膜貫通ドメイン、2 つの細胞外ループおよび細胞質ループを含む基本構造を有するタンパク質の大きなファミリーである 6 種のコネキシンタンパク質を含むことが最も多い。

【0214】

ギャップ結合は、成長制御およびホメオスタシス (すなわち、細胞間のイオン、栄養分および流体の迅速平衡) などの種々の生理学的役割に役立つ。さらに、ギャップ結合は、心筋細胞、平滑筋細胞およびニューロンなどの電気的シグナルを伝播できる細胞において電気シナプスとして働く。

【0215】

リン酸化されると、G C V は、G J を通って、結合を共有する隣接する細胞中に移動し得る。G C V-P は、それらの細胞においてさらにリン酸化され、H S K-T K 発現細胞におけるように細胞死を引き起こす。バイスタンダー効果の程度は、ギャップ結合の存在に応じて変わり、したがって、細胞型の間で異なる。しかし、Dahle et al. 「Gap junctional intercellular communication is not a major mediator in the bystander effect in photodynamic treatment of MDCKII cells.」 Radiation Res. 154: 331-341 (Sept. 2000) を参照のこと。

【0216】

ウイルス T K 酵素は、D N A 塩基グアニンと似ているプロドラッグガンシクロビル (G C V) に対して感受性である。

【0217】

G C V が細胞培地に添加される際に、ウイルス T K (宿主非ウイルス T K は、そうでは

10

20

30

40

50

ない)は、G C Vをリン酸化し、それを薬物に変換するが、これは、リン酸化されると、グアニンとの類似性のためにD N Aへの組込みについてd G T Pと競合するからである。

【0218】

組込みは、D N A鎖合成の終結を引き起こす。G C VーモノPの非癌細胞への移動は、それらが活発に分裂する限り、それらにとって毒性ではない。危険にある正常細胞は、高レベルのG C V薬物で処理される際にウイルスT K発現細胞と密接に接触しているものだけである。

【0219】

いくつかの実施形態では、ギャップ結合依存性細胞内情報伝達(G J I C)を増大する処理とともに、H S VーT Kをコードするベクター粒子を送達することを含む、対象において標的細胞のウイルスチミジンキナーゼ媒介性死滅を増大する方法が、本明細書において開示される。いくつかの実施形態では、標的細胞は、新生物細胞である。いくつかの実施形態では、G J I Cを増大する処理は、細胞に少なくとも1種のギャップ結合サブユニットをコードするポリヌクレオチド配列を送達することを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1種のギャップ結合サブユニットは、野生型または突然変異体コネキシンである。いくつかの実施形態では、ギャップ結合サブユニットは、野生型または突然変異体コネキシン43、コネキシン30およびコネキシン26からなる群から選択される。他の実施形態では、ギャップ結合サブユニットは、コネキシン30.3、コネキシン31、コネキシン31.1、コネキシン32、コネキシン33、コネキシン37、コネキシン40、コネキシン45、コネキシン46およびコネキシン50である。いくつかの実施形態では、ギャップ結合サブユニットは、翻訳後修飾を防ぐよう修飾される。いくつかの実施形態では、G J I Cを増大する処理は、細胞にEーカドヘリンをコードするポリヌクレオチド配列を送達することを含む。

【0220】

いくつかの実施形態では、G J I Cを増大する処理は、対象への化合物の送達を含む。いくつかの実施形態では、G J I Cを増大する処理は、対象に、ゲムシタビン、c A M P、レチノイン酸、カロテノイド、グルココルチコイド、フラバノイド、アピゲニンおよび/またはロバスタチンを含む群からの化合物を送達することを含む。

【0221】

いくつかの実施形態では、G J I Cを増大する処理は、プロテアソーム阻害を含む。いくつかの実施形態では、G J I Cを増大する処理は、Nーアセチル-L e uーL e uーN l eーC H O (A L L N) および/またはクロロキンの投与によるプロテアソーム阻害を含む。

【0222】

いくつかの実施形態では、G J I Cを増大する処理は、放射線処理を含む。

【0223】

いくつかの実施形態では、G J I Cを増大する処理は、電氣的処理を含む。

【0224】

検出の方法

いくつかの実施形態では、a)細胞を、H S VーT Kおよび第1の蛍光タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を用いてトランスフェクトすることと、b)細胞を、第1の蛍光タンパク質と光学的に識別可能である第2の蛍光タンパク質をコードする第2のポリヌクレオチド配列を用いてトランスフェクトすることと、c)細胞を、滴定された用量のガンシクロビルを用いて処理することと、d)第1の蛍光タンパク質および第2の蛍光タンパク質の発現の相対量を測定することとを含む、H S VーT K媒介性バイスタンダー効果を測定する方法が、本明細書において開示される。

【0225】

一実施形態では、赤色蛍光タンパク質(R F P)が、第1の蛍光タンパク質蛍光タンパク質および第2の両方を用いて形質導入された標的腫瘍細胞の数を定量するために使用され、すべてがH y g r o (登録商標) およびH S VーT Kの両方を発現する腫瘍細胞の集

団を選択するために、H y g r o（登録商標）が使用され得る。R F Pは市販されており、本明細書における使用のために考慮される（例えば、以下の参考文献1～14に記載されるR F Pを参照のこと。

【0226】

別の実施形態では、緑色蛍光タンパク質（G F P）が、形質導入された標的腫瘍細胞の数を定量するために使用される。G F Pは、市販されており、本明細書における使用のために考慮され、それだけには限らないが、高感度緑色蛍光タンパク質（E G F P）を含む。

【0227】

H S V-T Kのプラスミドおよび製造

いくつかの実施形態では、適した転写または翻訳調節エレメントと作動可能に連結している、H S V-T Kまたはその突然変異体および／または誘導体をコードする核酸分子が、本明細書において開示される。いくつかの実施形態では、適した調節エレメントは、細菌、真菌、ウイルス、哺乳類、昆虫または植物遺伝子に由来している。適当な調節エレメントの選択は、選択される宿主細胞に応じて変わり、いくつかの実施形態では、転写プロモーターおよびエンハンサーまたはR N Aポリメラーゼ結合配列および翻訳開始シグナルを含むリボソーム結合配列を含む。

【0228】

上記のような、H S V-T Kまたはその突然変異体および／または変異体をコードする核酸配列を含むプラスミドが、本明細書において記載される。いくつかの実施形態では、第2のペプチド成分と融合しているH S V-T Kをコードするプラスミドが本明細書において開示される。いくつかの実施形態では、第2のペプチド成分は、治療剤またはポリペプチドである。いくつかの実施形態では、第2のペプチド成分は、診断用ポリペプチドである。

【0229】

いくつかの実施形態では、本明細書において開示されるH S V-T Kをコードする核酸分子の発現を指示するのに適した種々のウイルスおよび非ウイルス両方のベクターが、本明細書において開示される。

【0230】

いくつかの実施形態では、治療および診断手順において使用するための送達ベクターまたは治療用ベクターをトランスフェクトおよび製造するためのプラスミドが、本明細書において開示される。一般に、このようなプラスミドは、本明細書において開示されるターゲティングされるベクターのウイルスまたは非ウイルス成分をコードする核酸配列を提供する。このようなプラスミドは、例えば、M o M L Vエンベロープタンパク質をコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、M o M L Vエンベロープタンパク質は、コラーゲン結合ドメインを含有するよう修飾される。さらなるプラスミドは、プロモーターと作動可能に連結している核酸配列を含み得る。配列は、一般に、ウイルスg a g-p o lポリペプチドをコードする。プラスミドは、プロモーターと作動可能に連結している核酸配列をさらに含み、配列は、産生株細胞に薬物耐性を付与するポリペプチドをコードする。複製起点もまた含まれる。いくつかの実施形態では、さらなるプラスミドは、本明細書において開示されるような、改善されたH S V-T Kコード配列、5'および3'長い末端反復配列、Ψレトロウイルスパッケージング配列、5' L T Rプロモーター上流のC M Vエンハンサー、プロモーターと作動可能に連結している核酸配列およびS V 4 0複製起点を含む。

【0231】

いくつかの実施形態では、H S V-T Kをコードするポリヌクレオチドは、適したプロモーターの制御下にある。適したプロモーターとして、それだけには限らないが、レトロウイルスL T R、S V 4 0プロモーター、サイトメガロウイルス（C M V）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（R S V）プロモーター、ヒストンプロモーター、p o l I I Iプロモーター、β-アクチンプロモーター、M M T Vプロモーター、メタロチオネインプロ

10

20

30

40

50

モーターなどの誘導プロモーター、熱ショックプロモーター、アデノウイルスプロモーター、アルブミンプロモーター、A p o A I プロモーター、B 1 9 パルボウイルスプロモーター、ヒトグロビンプロモーター、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼプロモーターなどのウイルスチミジンキナーゼプロモーター、レトロウイルス L T R、ヒト成長ホルモンプロモーターおよび M x I F N 誘導プロモーターが挙げられる。いくつかの実施形態では、プロモーターは、組織特異的プロモーターである。いくつかの実施形態では、組織特異的プロモーターは、チロシナーゼ関連プロモーター（T R P - 1 および T R P - 2）、D F 3 エンハンサー（乳房細胞の）、S L P I プロモーター（分泌型ロイコプロテアーゼ阻害剤—多数の種類の癌腫において発現される）、T R S（組織特異的調節配列）、 α -フェットタンパク質プロモーター（それぞれ、正常肝細胞および形質転換された肝細胞に特異的な）、癌胎児性抗原プロモーター（胃腸管、肺、乳房および他の組織の形質転換された細胞において使用するための）、チロシンヒドロキシラーゼプロモーター（メラノサイトの）、コリンアセチルトランスフェラーゼまたは神経芽細胞腫において使用するためのニューロン特異的エノラーゼプロモーター、グリアの線維芽腫（glial fibroblastomas）の調節配列、チロシンヒドロキシラーゼプロモーター、c - e r b B - 2 プロモーター、P G K プロモーター、P E P C K プロモーター、ホエイ酸性プロモーター（乳房組織）およびカゼインプロモーター（乳房組織）および脂肪細胞 P 2 プロモーターを含む群から選択される。いくつかの実施形態では、プロモーターは、ウイルス特異的プロモーター（例えば、レトロウイルスプロモーターならびに H I V プロモーターなどの他のもの）、肝炎、ヘルペス（例えば、E B V）である。いくつかの実施形態では、プロモーターは、天然 H S V - T K プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、細菌、真菌または寄生虫（例えば、マラリア）特異的プロモーターであり、ウイルス、細菌、真菌または寄生虫に感染している特定の細胞または組織をターゲッティングするために利用される。

【0232】

いくつかの実施形態では、送達ベクターまたは治療用ベクターは、送達ベクターまたは治療用ベクターを所望の細胞または系にターゲッティングするターゲッティング部分を含み得る。いくつかの実施形態では、ターゲッティング部分は、送達媒体と関連しており、媒体を細胞または組織にターゲッティングする、送達ベクターまたは治療用ベクターによって発現されるリガンドを指す。いくつかの実施形態では、リガンドは、それだけには限らないが、ターゲッティングされる細胞または系中で露出されるかまたはその上にある細胞成分と結合する、抗体、受容体およびタンパク質を含み得る。いくつかの実施形態では、露出される細胞成分は、コラーゲンを含み得る。いくつかの実施形態では、露出される細胞成分とのリガンド結合は、コラーゲン結合ドメインを含むタンパク質を含む。

【0233】

本明細書において開示されるプラスミドは、当業者に公知の遺伝子工学技術によって製造され得る。さらに、プラスミドは、細菌、哺乳類、酵母または他の真菌、ウイルス、昆虫または植物細胞を含めたさまざまな原核生物および真核細胞宿主細胞によって容易に発現され得る。外来 D N A を発現するよう、このような細胞を形質転換またはトランスフェクトする方法は、当技術分野に周知である（例えば、Itakura et al., 米国特許第 4, 7 0 4, 3 6 2 号; Hinnen et al., PNAS USA 75:1929-1933, 1978; Murray et al., 米国特許第 4, 8 0 1, 5 4 2 号; Upshall et al., 米国特許第 4, 9 3 5, 3 4 9 号; Hagen et al., 米国特許第 4, 7 8 4, 9 5 0 号; Axel et al., 米国特許第 4, 3 9 9, 2 1 6 号; Goeddel et al., 米国特許第 4, 7 6 6, 0 7 5 号および Sambrook et al. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 を参照のこと; 植物細胞については、Czako and Marton, Plant Physiol. 104:1067-1071, 1994; および Paszkowski et al., Biotech. 24:387-392, 1992 を参照のこと）。

【0234】

哺乳類細胞のトランスフェクションのためのプロトコールは、当業者に周知である。代表的な方法として、リン酸カルシウムおよび／またはマグネシウム媒介性トランスフェク

ション、エレクトロポレーション、リポフェクション、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルスおよびプロトプラスト融合媒介性が挙げられる。

【0235】

いくつかの実施形態では、HSV-TKまたはその突然変異体は、組換えチミジンキナーゼ突然変異体を発現するために、上記の宿主／ベクター系を培養することによって調製される。組換えによって製造されたチミジンキナーゼ突然変異体は、当技術分野で周知の方法に従ってさらに精製され得る。

【0236】

いくつかの実施形態では、本明細書において開示される核酸分子は、さまざまな宿主細胞中に導入される。このような宿主細胞の代表例として、植物細胞、真核細胞および原核細胞が挙げられる。いくつかの実施形態では、核酸分子は、ヒト、マカクザル、イヌ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ラット、ハムスター、マウスまたは魚の細胞またはそれらの任意のハイブリッドなどの、脊椎動物または温血動物から得た細胞中に導入される。

【0237】

いくつかの実施形態では、本明細書において記載される核酸分子は、哺乳類細胞中に導入される。いくつかの実施形態では、哺乳類細胞は、COS、BHK、CHO、HeLa、293およびNS-1細胞を含む群から選択される。いくつかの実施形態では、哺乳類細胞において発現を指示するのに適した発現ベクターは、プロモーターならびに他の転写および翻訳制御配列を含む。一般的なプロモーターとして、SV40、MMTV、メタロチオネイン-1、アデノウイルスE1a、サイトメガロウイルス前初期プロモーターおよびサイトメガロウイルス前後期 (Immediate Late) プロモーターが挙げられる。

【0238】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される核酸分子は、酵母または真菌細胞に導入される。本発明を実施するのに適した酵母および真菌宿主細胞として、中でも、サッカロミセス・ポンベ (*Saccharomyces pombe*)、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、ピキア (*Pichia*) またはクルイベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属およびアスペルギルス (*Aspergillus*) 属の種々の種が挙げられる。酵母および真菌に適した発現ベクターとして、中でも、酵母のためのY Cp 50およびamdSクローニングベクターpV3が挙げられる。いくつかの実施形態では、酵母の形質転換は、DNAととも酵母のスフェロプラストの調製によってか、またはLiClなどのアルカリ塩を用いる処理のいずれかによって達成される。いくつかの実施形態では、真菌の形質転換は、ポリエチレングリコールを使用して実施される。

【0239】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される核酸分子は、細菌細胞中に導入される。本発明を実施するのに適した細菌宿主細胞として、大腸菌、枯草菌 (*B. subtilis*)、サルモネラ・チフィリウム (*Salmonella typhimurium*) ならびにシュードモナス (*Pseudomonas*)、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) およびスタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属内の種々の種ならびに当業者に周知の多数の他の細菌が挙げられる。細菌宿主細胞の代表例として、DH5αが挙げられる (Stratagene, La Jolla, Calif.)。

【0240】

いくつかの実施形態では、細菌発現ベクターは、宿主細胞において機能するプロモーター、1種または複数の選択可能な表現型マーカーおよび細菌複製起点を含む。代表的なプロモーターとして、β-ラクタマーゼ (ペニシリナーゼ) およびラクトースプロモーター系、T7 RNAポリメラーゼプロモーター、λプロモーター、trpプロモーターおよびtacプロモーターが挙げられる。代表的な選択マーカーとして、カナマイシンまたはアンピシリン耐性遺伝子などの種々の抗生物質耐性マーカーが挙げられる。いくつかの実施形態では、宿主細菌細胞を形質転換するのに適したプラスミドとして、中でも、pBR322、pUCプラスミドpUC18、pUC19、pUC118、pUC119、pNH8A、pNH16a、pNH18aおよびBluescript M13 (Stratagene, La Jolla, Calif.) が挙げられる。

【0241】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される核酸分子は、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、イヌおよびブタなどの非ヒトトランスジェニック動物において発現される。いくつかの実施形態では、適宜配置された発現制御配列と一緒に発現されるべき核酸分子を含めた発現単位が、例えば、マイクロインジェクションによって受精卵の前核中に導入される。いくつかの実施形態では、注入されたDNAの組込みは、組織サンプルから得たDNAのプロット分析によって検出される。いくつかの実施形態では、導入されたDNAは、動物の後代に伝えられるよう、動物の生殖系列中に組み込まれる。いくつかの実施形態では、組織特異的発現は、組織特異的プロモーターの使用によって、または導入遺伝子の調節された発現を可能にするメタロチオネイン遺伝子プロモーターなどの誘導プロモーターの使用によって達成される

10

【0242】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される核酸分子は、例えば、リン酸カルシウム媒介性トランスフェクション、リポフェクション、遺伝子銃、エレクトロポレーション、レトロウイルス、アデノウイルス、プロトプラスト融合媒介性トランスフェクションまたはDEAE-デキストラン媒介性トランスフェクションを含めたさまざまな機序によって宿主細胞中に導入される

【0243】

ベクターおよびその製造方法

所望の細胞において発現される、上記のような、改善されたHSV-TKコード配列を含むベクター粒子が、本明細書において開示される。いくつかの実施形態では、ベクター粒子は、ウイルスベクター粒子である。いくつかの実施形態では、ウイルスベクター粒子は、レトロウイルスベクター粒子である。

20

【0244】

いくつかの実施形態では、改善されたHSV-TKコード配列を含むベクター粒子は、改善されたHSV-TKコード配列に加えてさまざまなさらなる核酸分子を含有するかまたは発現する。いくつかの実施形態では、ベクターは、リンホカイン、アンチセンス配列、毒素または「補充」タンパク質（例えば、アデノシンデアミナーゼ）をさらに発現する。リンホカインの代表例として、例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、 γ -インターフェロンおよび腫瘍壊死因子（TNF）が挙げられる。アンチセンス配列の代表例として、それだけには限らないが、アンチセンスmyc、アンチセンスp53、アンチセンスrasならびにHIV、HBVおよびHCVなどのウイルスの発現または製造を阻止するアンチセンス配列が挙げられる。毒素の代表例として、それだけには限らないが、リシン、アブリン、ジフテリア毒素、コレラ毒素、ゲロニン、ボツリヌス、ブタクサ抗ウイルス薬タンパク質、トリチン（trititin）、赤痢菌属（Shigella）毒素およびシュードモナス（Pseudomonas）外毒素Aが挙げられる。自殺遺伝子の代表例として、それだけには限らないが、シトシンデアミナーゼ、VSV-tk、IL-2、ニトロレダクターゼ（NR）、カルボキシシルエステラーゼ、 β -グルクロニダーゼ、シトクロムp450、 β -ガラクトシダーゼ、ジフテリア毒素A鎖（DT-A）、カルボキシペプチドG2（CPG2）、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ（PNP）およびデオキシシチジンキナーゼ（dCK）が挙げられる。いくつかの場合には、ベクターは、酵母および／または細菌シトシンデアミナーゼをさらに発現する。

30

40

【0245】

さらなる治療用配列として、それだけには限らないが、酵母または細菌シトシンデアミナーゼ、他の自殺遺伝子、p53および他のアポトーシス遺伝子、グアニレートキナーゼ、IL-12および他の免疫刺激性またはサイトカイン遺伝子、GFP、RFP、iRFP、LUC2、GLUCならびに他の蛍光および生物発光遺伝子、サイクリンA、Dおよび他の細胞周期調節遺伝子、ウイルス遺伝子、細菌遺伝子、ヒト遺伝子、合成遺伝子、S

50

I R N A、R N A i、マイクロR N A、遺伝子のアンチセンス、阻害性または刺激性配列、ライブラリー戦略から獲得された遺伝子、反復配列、複製配列、プロモーターまたはエンハンサー配列、D N A結合配列、任意の治療用配列などが挙げられる。

【0246】

いくつかの実施形態では、 γ レトロウイルスの受容体をコードするポリヌクレオチド配列が含まれる。両種指向性のウイルスベクターエンベロープ遺伝子産物の受容体結合ドメイン(RBD)が、標的細胞の細胞膜上のP i T-2受容体と結合し、ウイルスベクター形質導入の増強を可能にすることを実証する実験が、本願において本明細書において開示される。CHO-K1およびBHK細胞でのP i T-2およびマウス白血病ウイルス(A-MuLV)受容体結合実験の形態的モデルを使用して、Feldman et al. (Eiden MV. J Virol. (2004) 78: 595-602)は、ヒトP i T-2受容体の細胞外ドメイン1(ECD1)を、両種指向性ウイルス結合および感染にとって重要であると同定した。BottgerおよびPetersen(2004)による研究は、ウイルスを結合するのに必要な部分は、182アミノ酸のN末端領域および170アミノ酸のC末端領域に狭められ得ると示した。

【0247】

したがって、選択実施形態において、コードされるHSV-TKが、P i T-2、P i T-1、MCATおよび γ レトロウイルスによって使用される他の受容体をコードするようポリヌクレオチド配列を含む、ヒト単純ウイルス由来のチミジンキナーゼ(HSV-TK)の突然変異した形態をコードするポリヌクレオチド配列が本明細書において提供される。

【0248】

ギャップ結合依存性細胞内情報伝達

いくつかの実施形態では、ベクター粒子は、本明細書に記載されるようなギャップ結合依存性細胞内情報伝達(GJIC)を増大する処理をさらに含む。いくつかの実施形態では、ベクター粒子は、チミジンキナーゼの生物活性を促進または増大するタンパク質をコードする1種または複数の遺伝子をさらに発現する。いくつかの実施形態では、ベクターは、DNAポリメラーゼ(例えば、ヘルペスDNAポリメラーゼ)および/またはグアニレートキナーゼをコードする配列をさらに含む。

【0249】

遺伝子療法を達成するために最も頻繁に使用される送達系の1つは、ウイルスベクター、最も一般的には、アデノウイルスおよびレトロウイルスベクターを含む。例示的なウイルスベースの媒体として、それだけには限らないが、組換えレトロウイルス(例えば、各々が組換えレトロウイルスに関する開示に関して、参照により組み込まれる、WO90/07936、WO94/03622、WO93/25698、WO93/25234、米国特許第5,219,740号、WO93/11230、WO93/10218、米国特許第4,777,127号、英国特許第2,200,651号;EP0345242およびWO91/02805を参照のこと)、アルファウイルスベースのベクター(例えば、シンドビスウイルスベクター、セムリキ森林ウイルス(ATCC VR-67、ATCC VR-1247)、ロスリバーウイルス(ATCC VR-373、ATCC VR-1246)およびベネズエラウマ脳炎ウイルス(ATCC VR-923、ATCC VR-1250、ATCC VR-1249、ATCC VR-532))およびアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター(例えば、WO94/12649、WO93/03769、WO93/19191、WO94/28938、WO95/11984およびWO95/00655)が挙げられる。Curiel (Hum. Gene Ther. (1992) 3:147)によって記載されるような死滅したアデノウイルスと連結されたDNAの投与も使用され得る。

【0250】

レトロウイルスは、一般に、3種の共通オープンリーディングフレーム、gag、polおよびenvを有し、これらは、それぞれ、マトリックス、gagおよびヌクレオカプシド構造タンパク質をコードし、逆転写酵素、インテグラーゼおよびプロテアーゼを含めた酵素をコードし、エンベロープタンパク質および膜貫通膜融合性タンパク質をコードす

る。一般に、レトロウイルスベクター粒子は、必要な g a g、p o l および e n v 遺伝子産物をトランスに提供するパッケージング細胞株によって製造される。このアプローチは、哺乳類細胞を形質導入するが、細胞のゲノム中に組み込まれた後にさらに複製することはできないレトロウイルスベクター粒子の製造をもたらす。

【0251】

遺伝子送達目的で、ウイルス粒子は、標的細胞にとって天然であるウイルスからか、または標的細胞にとって非天然であるウイルスから開発され得る。一般に、天然ウイルスベクターよりも非天然ウイルスベクターを使用することが望ましい。天然ウイルスベクターは、標的細胞に対して自然な親和性を有し得るものの、このようなウイルスは、それらが、標的細胞における増殖についてより大きな可能性を有するので、より大きな危険をもたらす。この関連で、ヒト細胞における増殖のために天然には設計されていない動物ウイルスベクターは、ヒト細胞への遺伝子送達のために有用であり得る。しかし、遺伝子送達において使用するためのこのような動物ウイルスベクターの十分な収量を得るために、天然動物パッケージング細胞における製造を実施することが必要である。しかし、このようにして製造されたウイルスベクターは、普通、エンベロープの一部としてか、またはヒト細胞に対する指向性を提供し得るキャプシドの部分のいずれかとしての任意の成分を欠く。例えば、MMLVのようなエコトロピックマウス（ネズミ）レトロウイルスなどの非ヒトウイルスベクターの製造のための現在の実行は、マウスパッケージング細胞株において製造される。ヒト細胞指向性に必要な別の成分が提供されなければならない。

【0252】

一般に、ウイルスベクター（ヘルパーウイルスを伴わない）の増殖は、パッケージング成分の核酸配列が細胞ゲノム中に安定に組み込まれるパッケージング細胞において進行し、ウイルス核酸の核酸コーディングが、このような細胞株に導入される。

【0253】

いくつかの実施形態では、レトロウイルスプラスミドベクターは、改善されたHSV-TKコード配列を含むポリヌクレオチドを含み、改善されたHSV-TKコード配列を含むポリヌクレオチドを含む発現媒体が、g a g、p o l および野生型（すなわち、修飾されていない）e n v レトロウイルスタンパク質をコードする核酸配列を含むパッケージング細胞株中に形質導入される。このようなパッケージング細胞株の例として、それだけには限らないが、PE501、PA317（ATCC番号CRL9078）、'-2、-AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、TCRE、TCRIP、GP+E-86、GP+envAm12および参照によりその全体が本明細書に組み込まれるMiller, Human Gene Therap, Vol. 1, pgs. 5-14 (1990)に記載されるようなDAN細胞株または293T細胞株（米国特許第5,952,225号）が挙げられる。ベクター（単数または複数）は、当技術分野で公知の任意の手段によってパッケージング細胞中にトランスフェクトされ得る。このような手段として、それだけには限らないが、エレクトロポレーションおよび本明細書において上記に記載されるものなどのリボソームの使用およびCaPO₄沈殿が挙げられる。このような産生株細胞は、一般に、第1のまたは修飾されていない野生型レトロウイルスエンベロープタンパク質、キメラレトロウイルスエンベロープタンパク質および治療薬または診断薬をコードするポリヌクレオチドを含む感染性レトロウイルスベクター粒子を作製する。

【0254】

いくつかの実施形態では、g a g および p o l タンパク質をコードするポリヌクレオチド、非レトロウイルスペプチド（いくつかの実施形態では、野生型レトロウイルスエンベロープタンパク質である）を含まない第1のレトロウイルスエンベロープタンパク質をコードするポリヌクレオチドおよびキメラレトロウイルスエンベロープタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むパッケージング細胞が提供される。いくつかの実施形態では、第1のおよびキメラエンベロープタンパク質を含むレトロウイルスベクター粒子を作製するための産生株細胞は、このようなパッケージング細胞中に、各場合において、治療剤または診断剤をコードするポリヌクレオチドを含む、レトロウイルスベクター粒子または

レトロウイルスプラスミドベクターのいずれかを導入することによって製造される。いくつかの実施形態では、産生株細胞株は、改善されたH S V-T Kコード配列を含むポリヌクレオチドを含む感染性レトロウイルスベクター粒子をこのように作製する。

【0255】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの製造のためのキット、a) 核酸配列がプロモーターと作動可能に連結されたレトロウイルスエンベロープタンパク質をコードする核酸配列を含む第1のプラスミドを含有する容器と、b) ウイルスg a g-p o lポリペプチドをコードする、プロモーターと作動可能に連結している核酸配列と、産生株細胞に薬物耐性を付与するポリペプチド、S V 4 0複製起点をコードする、プロモーターと作動可能に連結された核酸配列とを含む第2のプラスミドを含有する容器と、c) プロモーターと作動可能に連結された改善されたH S V-T Kコード配列と、5'および3'長い末端反復配列(L T R)と、Ψレトロウイルスパッケージング配列と、5' L T Rの上流のC M Vプロモーターと、産生株細胞に薬物耐性を付与するポリペプチド、S V 4 0複製起点をコードする、プロモーターと作動可能に連結している核酸配列とを含む第3のプラスミドを含有する容器と、d) S V 4 0 ラージT抗原を発現する産生株細胞を含有する容器と、e) a)、b)およびc)のプラスミドを用いてd)の産生株細胞を一時的にトランスフェクトし、ウイルス粒子が製造されるのを可能にする条件下でトランスフェクトされた産生株細胞を培養するための使用説明書とを含むキットが、本明細書において開示される。

10

【0256】

本明細書において開示される送達ベクターまたは治療用ベクターは、ウイルスおよび非ウイルス粒子を含むと認識される。例えば、カチオン性リボソームポリカチオンを含めたマイクロ粒子またはナノ粒子などの非ウイルス送達系は、送達系の代替方法を提供し、本開示によって包含される。非ウイルス粒子は、脂質二重層中に、完全にまたは部分的に組み立てられたウイルス粒子を含む、カプセル封入された核タンパク質を含む。ウイルスを脂質二重層中にカプセル封入するための方法は、当技術分野で公知である。それらは、脂質二重層によって包み込まれる小胞(リボソーム)中への受動的封入およびビリオンのリボソームとともインキュベーション(米国特許第5, 962, 429号; Fasbender, et al., J. Biol. Chem. 272:6479-6489; Hodgson and Solaiman, Nature Biotechnology 14:339-342 (1996))を含む。理論に捉われようとは思わないが、本発明者らは、ビリオンの表面上に曝露された酸性タンパク質が、送達ベクターまたは治療用ベクターのカチオン性脂質/カチオン性ポリマー成分との複合体形成のための界面を提供し、中性脂質成分による二重膜形成のための「スキヤフォールド」として働くと考えた。

20

30

【0257】

非ウイルス送達系の例として、例えば、Wheeler et al., 米国特許第5, 976, 567号および同5, 981, 501号が挙げられる。これらの特許は、プラスミドの水溶液を、カチオン性および非カチオン性脂質を含有する有機溶液と接触させることによる血清安定プラスミド脂質粒子の調製を開示する。Thierry et al., 米国特許第6, 096, 335号は、全体的にアニオン性の生物活性物質、カチオン性成分およびアニオン性成分を含む複合体の調製を開示している。AllenおよびStuart、P C T/U S 98/12937 (W O 98/58630)は、カチオン性脂質の可溶化に適した脂質溶媒中でポリヌクレオチドカチオン性脂質粒子を形成すること、粒子を含有する溶媒へ中性小胞形成性脂質を添加することおよび脂質溶媒を蒸発させて、ポリヌクレオチドが中に封入されたりリボソームを形成することを開示している。AllenおよびStuart、米国特許第6, 120, 798号は、第1の、例えば、水性溶媒にポリヌクレオチドを溶解すること、前記の第1の溶媒とは不混和性の、第2の、例えば、有機溶媒中に脂質を溶解すること、第3の溶媒を添加して、単一相の形成を達成することおよび一定量の第1および第2の溶媒をさらに添加して、2つの液相の形成を達成することによってポリヌクレオチド-脂質マイクロ粒子を形成することを開示している。Bally et al. 米国特許第5, 705, 385号およびZhang et al. 米国特許第6, 110, 745号は、核酸を、非カチオン性脂質およびカチオン性

40

50

脂質を含有する溶液と接触させて、脂質-核酸混合物を形成することによって脂質-核酸粒子を調製する方法を開示している。Maurer et al., PCT/CA00/00843 (WO01/06574) は、小胞を不安定化するが、破壊しない不安定化溶媒中で、予め形成された脂質小胞、荷電治療薬および不安定化剤を組み合わせ、その混合物を形成すること、続いて、不安定化剤を除去することを含む、十分に脂質によってカプセル封入された、荷電治療剤の治療剤粒子を調製する方法を開示している。

【0258】

粒子形成性成分（「PFC」）は、通常、カチオン性脂質などの脂質を、カチオン性脂質以外のPFCと組み合わせて含んでもよい。カチオン性脂質は、その分子が、約3～約10のpHの範囲で、好ましくは、約4～約9の生理学的pH範囲で電離して、正味の陽性イオン電荷をもたらしことができる脂質である。このようなカチオン性脂質は、例えば、単一炭化水素鎖を有するカチオン性両親媒性物質などのカチオン性界面活性剤を包含する。特許および科学文献は、核酸トランスフェクション増強特性を有する多数のカチオン性脂質を記載する。これらのトランスフェクション増強性カチオン性脂質として、例えば、1,2-ジオレイルオキシ-3-(N,N,N-トリメチルアンモニオ)プロパンクロリド、DOTMA（米国特許第4,897,355号）、DOSPA（Hawley-Nelson, et al., Focus 15(3):73 (1993)を参照のこと）、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミドまたはDDAB（米国特許第5,279,833号）、1,2-ジオレイルオキシ-3-(N,N,N-トリメチルアンモニオ)プロパンクロリドDOTAP（Stamatatos, et al., Biochemistry 27: 3917-3925 (1988)）、グリセロールベースの脂質（Leventis, et al., Biochem. Biophys. Acta 1023:124 (1990)を参照のこと）、アルギニル-PE（米国特許第5,980,935号）、リシニル-PE（Puyal, et al. J. Biochem. 228:697 (1995)）、リポポリアミン（米国特許第5,171,678号）およびコレステロールベースの脂質（WO93/05162、米国特許第5,283,185号）、CHIM（1-(3-コレステリル)-オキシカルボニル-アミノメチルイミダゾール）などが挙げられる。トランスフェクションのためのカチオン性脂質は、例えば、Behr, Bioconjugate Chemistry, 5:382-389 (1994)に概説されている。好ましいカチオン性脂質は、DDAB、CHIMまたはそれらの組合せである。カチオン性界面活性剤であるカチオン性脂質の例として、(C12-C18)-アルキル-および(C12-C18)-アルケニル-トリメチルアンモニウム塩、N-(C12-C18)-アルキル-およびN-(C12-C18)-アルケニル-ピリジニウム塩などが挙げられる。

【0259】

いくつかの実施形態では、送達ベクターまたは治療用ベクターの大きさは、約40～約1500nmの範囲内である。いくつかの実施形態では、送達ベクターまたは治療用ベクターは、約50～500nmの範囲の大きさである。いくつかの実施形態では、送達ベクターまたは治療用ベクターは、約20～150nmの範囲の大きさである。この大きさの選択は、送達ベクターが、身体に投与されると、血管から悪性腫瘍などの罹患組織へ浸透し、治療用核酸をその中に移動させるのを有利に補助する。例えば、動的光散乱法によって測定されるようなその大きさが、インビトロ細胞培養培地または血漿などの細胞外生物学的流体の存在下で実質的に増大しないことは、送達ベクターの特徴的で、有利な特性である。

【0260】

あるいは、いくつかの実施形態では、レトロウイルスを製造する細胞は、腫瘍中に注入される。いくつかの実施形態では、そのように導入されるレトロウイルスを製造する細胞は、ウイルスベクター粒子などの送達ベクターを活発に製造するよう操作され、その結果、ベクターの継続製造が生体内原位置で腫瘍量内で起こる。いくつかの実施形態では、増殖中の腫瘍細胞は、レトロウイルスベクターを製造する細胞に近接することによってインビボで形質導入される。

【0261】

使用方法

いくつかの実施形態では、標的細胞に、本明細書において開示されるようなH S V-T Kをコードするポリヌクレオチドを提供する方法が、本明細書において開示され、方法は、次いで、毒性物質に変換される適当な基質に対して細胞を曝露して、突然変異体H S V-1チミジンキナーゼ遺伝子を発現する細胞、突然変異体H S V-1チミジンキナーゼ遺伝子を発現する細胞の近くのもの、すなわち、バイスタンダー細胞を死滅させることを含む。突然変異体H S V-1チミジンキナーゼ遺伝子は、ターゲッティングされる細胞または所望の細胞に直接的に、または特定のウイルスベクターまたは送達製剤の選択によってなど、ターゲッティング手段と組み合わせて全身的に投与され得る。細胞は、治療される患者内でインビボで治療され得るか、またはインビトロで治療され、次いで、患者に注入され得る。突然変異体H S V-1チミジンキナーゼ遺伝子の患者中の細胞への導入後、プロドラッグが、突然変異体H S V-1チミジンキナーゼによって、ターゲッティングされる細胞を死滅させるのに十分な量の毒性物質に変換される有効量で全身にまたは局所に投与される。標的細胞を死滅させる毒性物質を生成するH S V-1 T Kの基質であるヌクレオシド類似体は、本明細書において、「プロドラッグ」と呼ばれる。

10

【0262】

いくつかの実施形態では、i) 細胞に、本明細書において開示されるようなポリヌクレオチドまたはベクターを導入すること、ii) 細胞がチミジンキナーゼを発現するのを可能にするか、または指示することと、iii) 細胞を、チミジンキナーゼによって細胞傷害性薬剤に変換される薬剤と接触させることとを含む、細胞を死滅させる方法が、本明細書において開示される。

20

【0263】

本発明のいくつかの実施形態では、(i) 宿主に、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを含むよう遺伝子操作されたT細胞を投与することと、(ii) 前記宿主に、移植片対宿主病が発生する前に、チミジンキナーゼによって細胞傷害性薬剤に変換され得る薬剤を、G v H Dを生じさせることができる遺伝子操作されたT細胞を死滅させるのに有効な量で投与することとを含む、患者において移植片対宿主病(G v H D)を防ぐ方法が本明細書において提供される。同種異系骨髄移植の際に、移植片対宿主病を防ぐために移植片からアロ反応性Tリンパ球が除去され得る。G v H Dは、移植された幹細胞移植片中のT細胞が、移植レシピエントの身体を攻撃する場合に起こる。しかし、T細胞の除去は、疾患再発の罹患率、移植片拒絶およびウイルス感染の再活性化を増大し得る。G v H Dの可能性に対抗するために、同種異系骨髄移植患者は、同種異系の骨髄移植後、遅れてドナーTリンパ球を導入することによって治療され得る。しかし、同種異系骨髄移植後のドナーTリンパ球の遅れた導入は、G v H D、治療の頻繁な、致命的となり得る合併症によって制限される。移植レシピエントに、「自殺遺伝子」をコードするポリヌクレオチドを含むよう遺伝子操作されたT細胞を投与することによって、T細胞は、移植レシピエントの身体を攻撃し始めた場合、死滅され得る。

30

【0264】

いくつかの実施形態では、宿主において治療剤を発現させるために、キメラレトロウイルスエンベロープタンパク質および治療剤をコードするポリヌクレオチドを含むレトロウイルスベクター粒子が、宿主に投与される。いくつかの実施形態では、治療剤をコードするポリヌクレオチドは、本明細書において開示されるような、H S V-T Kまたはその突然変異体および／または変異体をコードするポリヌクレオチドである。

40

【0265】

いくつかの実施形態では、細胞は、患者から得られ、治療剤またはポリペプチドを細胞中に導入するために、レトロウイルスベクター粒子が使用され、このような修飾された細胞が患者に投与される。いくつかの実施形態では、レトロウイルスベクター粒子が、患者にインビボで投与され、それによって、レトロウイルスベクター粒子が、患者の細胞をインビボで形質導入する。

【0266】

50

いくつかの実施形態では、i) キメラレトロウイルスエンベロープタンパク質と、ii) 治療用ポリペプチドをコードする少なくとも1種のポリヌクレオチドとを含むレトロウイルス粒子を、組織傷害部位に直接的または静脈内で送達することを含む、対象における組織傷害部位に治療剤またはポリペプチドを送達する方法が、本明細書において開示され、ここで、ウイルス粒子は、組織傷害部位で露出するコラーゲンと結合し、組織傷害部位で治療用ポリペプチドを発現する。いくつかの実施形態では、組織傷害は、腫瘍浸潤、血管病変、潰瘍性病変、炎症性組織傷害、眼のレーザー傷害、手術、関節炎の関節、瘢痕およびケロイドによる組織傷害からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、組織傷害は、宿主における腫瘍の成長による組織の病変である。

【0267】

10

いくつかの実施形態では、本明細書において開示されるような治療用ベクターは、悪性および非悪性腫瘍を含めた癌の治療において使用される。いくつかの実施形態では、治療用ベクターは、細胞外マトリックス結合ペプチドまたはペプチドドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞外マトリックス結合ペプチドまたはペプチドドメインは、コラーゲン結合ドメインまたはペプチドである。いくつかの実施形態では、腫瘍として、それだけには限らないが、すべての固形腫瘍が挙げられる。

【0268】

いくつかの実施形態では、本明細書において開示されるような治療用ベクターは、乳癌、皮膚癌、骨癌、前立腺癌、肝臓癌、肺癌、脳癌、喉頭、胆嚢、膵臓、直腸、上皮小体、甲状腺、副腎、神経組織、頭頸部、結腸、胃、気管支、腎臓の癌、基底細胞癌、潰瘍型および乳頭型両方の扁平上皮癌、転移性皮膚癌腫、黒色腫、骨肉腫、ユーイング肉腫、細網肉腫 (vetericulum cell sarcoma)、骨髄腫、巨細胞腫、小細胞肺腫瘍、胆石、島細胞腫瘍、原発性脳腫瘍、急性および慢性リンパ性および顆粒球性腫瘍、ヘアリー細胞腫瘍、腺腫、肥厚化、髄様癌、褐色細胞腫、粘膜ニューロン、腸管神経節神経腫、過形成性角膜神経腫瘍、マルファノイド体質性腫瘍、ウィルムス腫瘍、セミノーマ、卵巣腫瘍、平滑筋腫瘍 (leiomyomater tumor)、子宮頸部異形成および上皮内癌腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、軟組織肉腫、悪性カルチノイド、局所皮膚病変、菌状息肉症、横紋筋肉腫、カボジ肉腫、骨肉腫および他の肉腫、悪性高カルシウム血症、腎細胞腫瘍、真性多血症、腺癌、多形神経膠芽腫、白血病、リンパ腫、悪性メラノーマおよび類表皮癌からなる群から選択される癌の治療において使用される。他の実施形態では、治療されている癌は、膵臓癌、肝臓癌、乳癌、骨肉腫、肺癌、軟組織肉腫、喉頭の癌、黒色腫、卵巣癌、脳癌、ユーイング肉腫または結腸癌である。

20

30

【0269】

他の実施形態では、治療されるべき癌は、原発性肝細胞癌腫、肝臓への転移性乳房癌腫、肝臓への転移性膵臓癌、肝臓への転移性胃癌、肝臓への転移性食道癌、肝臓への転移性肺癌、肝臓への転移性黒色腫、肝臓への転移性卵巣癌腫および肝臓への転移性腎臓癌からなる群から選択される。

【0270】

治療用ベクターは、単独でまたは他の治療的処置または活性薬剤とともに投与され得る。使用され得る他の活性薬剤の例として、それだけには限らないが、化学療法剤、抗炎症剤、HIVプロテアーゼ阻害剤などのプロテアーゼ阻害剤、AZTなどのヌクレオシド類似体が挙げられる。いくつかの実施形態では、治療方法は、対象に、治療用ウイルス粒子の投与に先立って、それと同時に、またはその後、化学療法剤、生物学的薬剤または放射線療法を投与することをさらに含む。当業者ならば、本明細書において記載されるレトロウイルス粒子は、1種または複数の薬剤（例えば、レトロウイルスベクターおよび薬剤は両方とも静脈内に投与される）と同一経路によってか、または異なる経路によって（例えば、レトロウイルスベクターは、静脈内に投与され、1種または複数の薬剤は経口的に投与される）のいずれかで投与され得ることは理解するであろう。

40

【0271】

治療用ウイルス粒子の投与量は、好ましくは、ED₅₀を含む循環濃度の範囲内にあり

50

、毒性はほとんどないかまたは全くない。投与量は、使用される剤形および利用される投与経路に応じてこの範囲内で変わり得る。治療上有効な用量は、細胞培養アッセイから最初に推定され得る。用量は、細胞培養において決定されるような IC_{50} （すなわち、最大半量感染または最大半量阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するよう、動物モデルにおいて処方され得る。このような情報は、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定するために使用され得る。血漿中のレベルは、例えば、RT-qPCRまたはddPCR法によって測定され得る。

【0272】

治療を必要とする対象に投与されるべき本明細書において開示されるレトロウイルス粒子の有効量または治療上有効なものは、種々の方法で決定され得る。例として、量は、動物モデルにおけるウイルス力価または有効性に基づいたものであり得る。あるいは、臨床試験において使用される投与計画は、一般的ガイドラインとして使用され得る。

【0273】

いくつかの実施形態では、1日用量は、単回用量でまたは1日の種々の時間に小分けして投与され得る。いくつかの実施形態では、最適開始反応が得られる場合には、高投与量が必要とされ得、経時的に低減され得る。いくつかの実施形態では、治療は、数日間、数週間または数年間連続し得、または間隔を置いてであり、介在する休止期間を有し得る。いくつかの実施形態では、投与量は、個体が受けている可能性がある他の治療に従って修飾される。しかし、治療方法は、特定の濃度または範囲のレトロウイルス粒子に決して制限されず、治療されている各個体のためにおよび使用される各誘導体のために変わり得る。

【0274】

所与の個体に対して最大効果を達成するために、投与量の個別化が必要とされ得る。いくつかの実施形態では、治療されている個体に投与される投与量は、個体の年齢、疾患の重症度またはステージおよび治療の経過に対する応答に応じて変わる。いくつかの実施形態では、投与量を決定するための臨床パラメータとして、それだけには限らないが、腫瘍の大きさ、特定の悪性度について臨床試験において使用される腫瘍マーカーのレベルの変更が挙げられる。いくつかの実施形態では、治療医師が、所与の個体のために使用されるべき治療有効量を決定する。いくつかの実施形態では、本明細書において開示される療法は、必要なだけ、治療医師によって必要と判断される期間投与される。

【0275】

それだけには限らないが、対象の細胞または系に対して特異的である治療用レトロウイルス粒子を含めた治療用ベクターは、治療を必要とする対象に、全身にかまたは領域的に（局所的に）送達される。例えば、治療用ベクターは、静脈内に全身に投与され得る。あるいは、治療用ベクターはまた、動脈内に投与され得る。治療用ベクターはまた、局所的に、静脈内に、動脈内に、腫瘍内に、結腸内に、気管内に、腹膜内に、鼻腔内に、血管内に、くも膜下腔内に、頭蓋内に、骨髄内に、胸膜内に、皮内に、皮下に、筋肉内に、眼内に、骨内におよび／または滑膜内にまたは定位的に（stereotactically）投与され得る。送達様式の組合せも使用され得、例えば、患者は、治療用ベクターの治療を用いて腫瘍反応を改善するために治療用ベクターを全身におよび領域的に（局所的に）受け取り得る。

【0276】

いくつかの実施形態では、治療と必要とする対象に、複数の治療経過（例えば、第1および第2の治療経過）が投与される。いくつかの実施形態では、第1および／または第2の治療経過が、静脈内に投与される。他の実施形態では、第1および／または第2の治療経過は、それだけには限らないが、肝動脈、大動脈、冠動脈、肺動脈、腸骨動脈、腸腔動脈、胃動脈、脾動脈、腎動脈、生殖腺動脈、鎖骨下動脈、椎骨動脈、腋窩動脈、上腕動脈、橈骨動脈、尺骨動脈、頸動脈、大腿動脈、下腸間膜動脈および／または上腸間膜動脈による注入を含めた動脈内注入によって投与される。動脈内注入は、血管内手順、経皮の手順または開腹外科的アプローチを使用して達成され得る。いくつかの実施形態では、第1および第2の治療経過は、逐次投与され得る。さらに他の実施形態では、第1および第2

の治療経過は、同時に投与され得る。さらに他の実施形態では、任意選択の第3の治療経過が、第1および第2の治療経過と逐次または同時に投与され得る。

【0277】

いくつかの実施形態では、本明細書において開示される治療用ベクターは累積方式で高用量で、逐次または同時投与された治療経過（単数または複数）とともに投与され得る。例えば、いくつかの実施形態では、それを必要とする患者は、全身に投与され得る、例えば、累積方式で少なくとも 1×10^9 TVP、少なくとも 1×10^{10} TVP、少なくとも 1×10^{11} TVP、少なくとも 1×10^{12} TVP、少なくとも 1×10^{13} TVP、少なくとも 1×10^{14} TVP、少なくとも 1×10^{15} TVP、少なくとも 1×10^{16} TVP、少なくとも 1×10^{17} TVP、少なくとも 1×10^{18} TVP、少なくとも 1×10^{19} TVP、少なくとも 1×10^{20} TVP、少なくとも 1×10^{21} TVPまたは少なくとも 1×10^{22} TVPの送達ベクターの第1の治療経過を用いて静脈内に投与され得る。第1の治療経過は全身に投与され得る。あるいは、第1の治療経過は、局所法で、例えば、動脈内に投与され得る、例えば、それを必要とする患者は、累積方式で、少なくとも 1×10^9 TVP、少なくとも 1×10^{10} TVP、少なくとも 1×10^{11} TVP、少なくとも 1×10^{12} TVP、少なくとも 1×10^{13} TVP、少なくとも 1×10^{14} TVP、少なくとも 1×10^{15} TVP、少なくとも 1×10^{16} TVP、少なくとも 1×10^{17} TVP、少なくとも 1×10^{18} TVP、少なくとも 1×10^{19} TVP、少なくとも 1×10^{20} TVP、少なくとも 1×10^{21} TVPまたは少なくとも 1×10^{22} TVPの送達ベクターを用いて動脈内注入によって投与され得る。

【0278】

さらに他の実施形態では、それを必要とする対象は、高用量の送達ベクターの全身および動脈内注入投与の組合せを、逐次または同時のいずれかで受け取り得る。例えば、それを必要とする患者は、まず、累積方式で少なくとも 1×10^9 TVP、少なくとも 1×10^{10} TVP、少なくとも 1×10^{11} TVP、少なくとも 1×10^{12} TVP、少なくとも 1×10^{13} TVP、少なくとも 1×10^{14} TVP、少なくとも 1×10^{15} TVP、少なくとも 1×10^{16} TVP、少なくとも 1×10^{17} TVP、少なくとも 1×10^{18} TVP、少なくとも 1×10^{19} TVP、少なくとも 1×10^{20} TVP、少なくとも 1×10^{21} TVPまたは少なくとも 1×10^{22} TVPの送達ベクターを用いて全身に、続いて、動脈内注入、例えば、肝動脈注入のさらなる治療経過、累積方式で、少なくとも 1×10^9 TVP、少なくとも 1×10^{10} TVP、少なくとも 1×10^{11} TVP、少なくとも 1×10^{12} TVP、少なくとも 1×10^{13} TVP、少なくとも 1×10^{14} TVP、少なくとも 1×10^{15} TVP、少なくとも 1×10^{16} TVP、少なくとも 1×10^{17} TVP、少なくとも 1×10^{18} TVP、少なくとも 1×10^{19} TVP、少なくとも 1×10^{20} TVP、少なくとも 1×10^{21} TVPまたは少なくとも 1×10^{22} TVPの投与される送達ベクターを用いて投与され得る。さらに別の実施形態では、それを必要とする患者は、動脈内注入および高用量の送達ベクターの全身投与の組合せを受け取り得る。例えば、それを必要とする患者は、まず、累積方式で、少なくとも 1×10^9 TVP、少なくとも 1×10^{10} TVP、少なくとも 1×10^{11} TVP、少なくとも 1×10^{12} TVP、少なくとも 1×10^{13} TVP、少なくとも 1×10^{14} TVP、少なくとも 1×10^{15} TVP、少なくとも 1×10^{16} TVP、少なくとも 1×10^{17} TVP、少なくとも 1×10^{18} TVP、少なくとも 1×10^{19} TVP、少なくとも 1×10^{20} TVP、少なくとも 1×10^{21} TVPまたは少なくとも 1×10^{22} TVPの送達ベクターを用いる動脈内注入によって、続いて、累積方式で、少なくとも 1×10^9 TVP、少なくとも 1×10^{10} TVP、少なくとも 1×10^{11} TVP、少なくとも 1×10^{12} TVP、少なくとも 1×10^{13} TVP、少なくとも 1×10^{14} TVP、少なくとも 1×10^{15} TVP、少なくとも 1×10^{16} TVP、少なくとも 1×10^{17} TVP、少なくとも 1×10^{18} TVP、少なくとも 1×10^{19} TVP、少なくとも 1×10^{20} TVP、少なくとも 1×10^{21} TVPまたは少なくとも 1×10^{22} TVPの送達ベクターを用いて投与され得る。

TVPの全身投与される送達ベクターのさらなる治療経過によって投与され得る。治療経過はまた、同時に投与され得る、すなわち、例えば、動脈内注入、例えば、肝動脈注入の治療経過、累積方式で、少なくとも 1×10^9 TVP、少なくとも 1×10^{10} TVP、少なくとも 1×10^{11} TVP、少なくとも 1×10^{12} TVP、少なくとも 1×10^{13} TVP、少なくとも 1×10^{14} TVP、少なくとも 1×10^{15} TVP、少なくとも 1×10^{16} TVP、少なくとも 1×10^{17} TVP、少なくとも 1×10^{18} TVP、少なくとも 1×10^{19} TVP、少なくとも 1×10^{20} TVP、少なくとも 1×10^{21} TVPまたは少なくとも 1×10^{22} TVPの投与される送達ベクターと一緒に、累積方式で、少なくとも 1×10^9 TVP、少なくとも 1×10^{10} TVP、少なくとも 1×10^{11} TVP、少なくとも 1×10^{12} TVP、少なくとも 1×10^{13} TVP、少なくとも 1×10^{14} TVP、少なくとも 1×10^{15} TVP、少なくとも 1×10^{16} TVP、少なくとも 1×10^{17} TVP、少なくとも 1×10^{18} TVP、少なくとも 1×10^{19} TVP、少なくとも 1×10^{20} TVP、少なくとも 1×10^{21} TVPまたは少なくとも 1×10^{22} TVPの送達ベクターの高用量の送達ベクターの治療経過。

【0279】

さらに他の実施形態では、それを必要とする対象はさらに、第1および第2の治療経過と逐次または同時のいずれかで、送達ベクター、例えば、累積方式で、少なくとも 1×10^9 TVP、少なくとも 1×10^{10} TVP、少なくとも 1×10^{11} TVP、少なくとも 1×10^{12} TVP、少なくとも 1×10^{13} TVP、少なくとも 1×10^{14} TVP、少なくとも 1×10^{15} TVP、少なくとも 1×10^{16} TVP、少なくとも 1×10^{17} TVP、少なくとも 1×10^{18} TVP、少なくとも 1×10^{19} TVP、少なくとも 1×10^{20} TVPまたは少なくとも 1×10^{22} TVPの送達ベクターの累積用量のさらなる治療経過（例えば、第3の治療経過、第4の治療経過、第5の治療経過）を受け取り得る。

【0280】

いくつかの実施形態では、治療を必要とする対象は、少なくとも 1×10^{11} TVPの用量を全身に（例えば、静脈内に）投与され、続いて、少なくとも 1×10^{11} TVPの用量の動脈内注入（例えば、肝動脈注入）によって投与される。他の実施形態では、治療を必要とする患者は、少なくとも 1×10^{12} TVPの累積用量を全身に（例えば、静脈内に）投与され、続いて、少なくとも 1×10^{12} TVPの用量の動脈内注入（例えば、肝動脈注入）によって投与され得る。一実施形態では、治療を必要とする患者は、少なくとも 1×10^{13} TVPの用量を全身に（例えば、静脈内に）投与され、続いて、少なくとも 1×10^{13} TVPの用量の動脈内注入（例えば、肝動脈注入）によって投与され得る。さらに他の実施形態では、治療を必要とする患者は、少なくとも 1×10^{14} TVPの用量を全身に（例えば、静脈内に）投与され、同時に、少なくとも 1×10^{14} TVPの用量の動脈内注入（例えば、肝動脈注入）によって投与され得る。さらに他の実施形態では、治療を必要とする患者は、少なくとも 1×10^{15} TVPの用量を全身に（例えば、静脈内に）投与され、一緒に、少なくとも 1×10^{15} TVPの用量の動脈内注入（例えば、肝動脈注入）によって投与され得る。さらに他の実施形態では、治療を必要とする患者は、少なくとも 1×10^{16} TVPの用量を全身に（例えば、静脈内に）投与され、同時に、少なくとも 1×10^{16} TVPの用量の動脈内注入（例えば、肝動脈注入）によって投与され得る。さらに他の実施形態では、治療を必要とする患者は、少なくとも 1×10^{13} TVPの用量を全身に（例えば、静脈内に）投与され、一緒に、少なくとも 1×10^{17} TVPの用量の動脈内注入（例えば、肝動脈注入）によって投与され得る。

【0281】

治療を必要とする対象はまた、全身にかまたは局所に（例えば、肝動脈注入などの動脈内注入）のいずれかで、送達ベクターの治療経過を既定の期間投与され得る。いくつかの実施形態では、期間は、少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも7日、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも5週間、少なくとも6週間

、少なくとも7週間、少なくとも8週間、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも4ヶ月、少なくとも5ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも7ヶ月、少なくとも8ヶ月、少なくとも9ヶ月、少なくとも10ヶ月、少なくとも11ヶ月、少なくとも1年、少なくとも2年、少なくとも3年、少なくとも4年または少なくとも5年であり得る。投与は、慢性的な方法で、すなわち、規定されないかまたは不確定の期間起こり得る。

【0282】

治療用ベクターの投与はまた、周期的な方法で、例えば、少なくとも1日1回、少なくとも1日2回、少なくとも1日3回、少なくとも1日4回、少なくとも1日5回起こり得る。送達ベクターの周期的投与は、送達ベクターの時間ならびに投与様式に応じて変わり得る。例えば、非経口投与は、長期間にわたって1日に1回のみ起こり得るが、送達ベクターの経口投与は、1日に2回以上起こり得、これでは、送達ベクターの投与は、短期間にわたって起こる。

10

【0283】

一実施形態では、対象は、第1の治療経過と第2の治療経過との間に1～2日休止することが許される。いくつかの実施形態では、対象は、第1の治療経過と第2の治療経過との間に2～4日休止することが許される。他の実施形態では、対象は、第1と第2の治療経過との間に少なくとも2日間休止することが許される。さらに他の実施形態では、対象は、第1と第2の治療経過との間に少なくとも4日間休止することが許される。さらに他の実施形態では、対象は、第1と第2の治療経過との間に少なくとも6日間休止することが許される。いくつかの実施形態では、対象は、第1と第2の治療経過との間に少なくとも1週間休止することが許される。さらに他の実施形態では、対象は、第1と第2の治療経過との間に少なくとも2週間休止することが許される。一実施形態では、対象は、第1と第2の治療経過との間に少なくとも1ヶ月休止することが許される。いくつかの実施形態では、対象は、第2の治療経過と任意選択の第3の治療経過との間に少なくとも1～7日休止することが許される。さらに他の実施形態では、対象は、第2の治療経過と任意選択の第3の治療経過との間に少なくとも1～2週間休止することが許される。

20

【0284】

いくつかの実施形態では、治療用ベクターは、ペプチドまたはベクターの局所濃度を増大するよう投与される。いくつかの実施形態では、治療用ベクターは、特定の臓器系の治療用ベクターの局所濃度を増大する動脈内注入によって投与される。さらに他の実施形態では、治療用ベクターは、腫瘍内に投与される。いくつかの実施形態では、標的病変の位置に応じて、肝病変を局所的にターゲティングするために、肝動脈のカテーテル留置に、それぞれ、脾十二指腸、右肝および中肝動脈中への注入が続けられる。いくつかの実施形態では、ペプチドまたは送達ベクターの、肺、胃腸管、脳、生殖系、脾臓または他の既定の臓器系を含めた他の臓器系への局在化された分布は、カテーテル留置または他の局在化される送達系によって達成される。いくつかの実施形態では、動脈内注入は、それだけには限らないが、肝動脈、大動脈、冠動脈、肺動脈、腸骨動脈、腸腔動脈、胃動脈、脾臓動脈、腎動脈、生殖腺動脈、鎖骨下動脈、椎骨動脈、腋窩動脈、上腕動脈、橈骨動脈、尺骨動脈、頸動脈、大腿動脈、下腸間膜動脈および／または上腸間膜動脈による注入を含め、任意の他の利用可能な動脈性供給源によって達成される。いくつかの実施形態では、動脈内注入は、血管内手順、経皮的手順または開腹手術アプローチを使用して達成される。

30

40

【0285】

製剤

治療用ベクターを含む医薬組成物は、選択された量の治療用ベクターを、1種または複数の生理学的に許容される担体または賦形剤と混合することによって任意の従来法で製剤化され得る。例えば、治療用ベクターは、PBS（リン酸緩衝生理食塩水）などの担体中に懸濁され得る。活性化化合物は、例えば、経口的に、非経口的に、静脈内に、皮内に、皮下にまたは局所に、液体、半液体または固体形態で任意の適当な経路によって投与され得、各投与経路に適した方法で、製剤化される。

【0286】

50

いくつかの実施形態では、治療用ベクターおよび生理学的に許容される塩および溶媒和物は、吸入または吹送による投与（口または鼻のいずれかによる）のために、または経口、頬側、非経口もしくは直腸投与のために製剤化される。いくつかの実施形態では、吸入による投与のために、治療用ベクターは、適した噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適したガスの使用を伴う、加圧パックまたは噴霧器からのエアゾールスプレー提示の形態で送達される。いくつかの実施形態では、加圧されたエアゾール投与量単位または定量を送達するためのバルブ。いくつかの実施形態では、吸入具または吸入器において使用するための、治療用化合物およびラクトースまたはデンプンなどの適した粉末基剤の粉末混合物を含有するカプセルおよびカートリッジ（例えば、ゼラチンの）が製剤化される。

10

【0287】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、結合剤（例えば、アルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、増量剤（例えば、ラクトース、微晶質セルロースまたはリン酸水素カルシウム）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルクまたはシリカ）、崩壊剤（例えば、ジャガイモデンプンまたはデンプングリコール酸ナトリウム）または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）などの医薬上許容される賦形剤とともに、従来手段によって調製された錠剤またはカプセル剤として経口投与するために製剤化される。いくつかの実施形態では、錠剤は、当技術分野で周知の方法によってコーティングされる。いくつかの実施形態では、経口投与のための液体調製物は、例えば、溶液、シロップもしくは懸濁液の形態であり、またはそれらは使用前に水もしくは他の適した媒体を用いて構成するための無水生成物として製剤化される。いくつかの実施形態では、このような液体調製物は、沈殿防止剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体または硬化食用脂）、乳化剤（例えば、レシチンまたはアカシア）、非水性媒体（例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコールまたは分画植物油）および保存料（例えば、メチルまたはプロピル-p-ヒドロキシベンゾエートまたはソルビン酸）などの医薬上許容される添加物を用いて従来手段によって調製される。いくつかの実施形態では、調製物はまた、必要に応じて、バッファー塩、芳香料、着色料および甘味料を含有する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、活性化合物の制御された放出を与える製剤化された経口投与である。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、従来法で製剤化された錠剤またはロゼンジ剤の形態で頬側用に製剤化される。

20

30

【0288】

いくつかの実施形態では、治療用ベクターは、注射による、例えば、ボーラス注射による、または連続注入による非経口投与用に製剤化される。いくつかの実施形態では、注射用製剤は、単位剤形で、例えば、添加された防腐剤とともに、アンプル中または複数回用量容器中にある。いくつかの実施形態では、組成物は油性または水性媒体中の、懸濁液、溶液またはエマルジョンとして製剤化される。いくつかの実施形態では、製剤は、沈殿防止剤、安定化剤および／または分散剤などの製剤化剤を含む。あるいは、いくつかの実施形態では、有効成分は、使用前に、適した媒体、例えば、滅菌パイロジェンフリー水を用いて構成するための粉末凍結乾燥形態である。

40

【0289】

いくつかの実施形態では、治療用ベクターは、デポー調製物として製剤化される。いくつかの実施形態では、このような長時間作用型製剤は、移植（例えば、皮下にまたは筋肉内に）によってかまたは筋肉内注射によって投与される。したがって、例えば、いくつかの実施形態では、治療用化合物は、適したポリマー材料または疎水性材料（例えば、許容されるオイル中のエマルジョンとして）またはイオン交換樹脂を用いて、または難溶性誘導体として、例えば、難溶性塩として製剤化される。

【0290】

いくつかの実施形態では、活性剤は、ゲル、クリームおよびローションの形態で、皮膚および粘膜への局所（topical）適用用など、眼中などの、局所（local）または局所（to

50

pical) 適用用に、眼への適用用に、または大槽内もしくは脊髄内適用用に製剤化される。いくつかの実施形態では、このような溶液、特に、眼の使用用に意図されるものは、適当な塩を用いて 0.01%~10% の等張性溶液、pH 約 5~9 として製剤化される。いくつかの実施形態では、化合物は、吸入によるなどの局所適用用エアゾールとして製剤化される。

【0291】

薬物組成物中の活性化合物の濃度は、活性化合物の吸収、不活性化および排泄速度、投与量スケジュールおよび投与される量ならびに当業者に公知の他の因子に応じて変わる。

【0292】

いくつかの実施形態では、組成物は、有効成分を含有する 1 種または複数の単位剤形を含むパックまたはディスペンサー装置中で提示される。いくつかの実施形態では、ブリスターパックなどのパックは、金属またはプラスチックホイルを含み得る。いくつかの実施形態では、パックまたはディスペンサー装置は、投与のための使用説明書を伴う。

【0293】

いくつかの実施形態では、活性薬剤は、パッケージング材料、本明細書において提供される薬剤および薬剤が提供される障害を示す表示を含有する製造品としてパッケージングされる。

【0294】

動物モデル

いくつかの実施形態では、本明細書において上記で記載されるレトロウイルスベクター粒子は、遺伝子療法治療の有効性の研究のための動物モデルの一部として、動物にインビボで投与される。いくつかの実施形態では、レトロウイルスベクター粒子は、同一種の異なる動物に変動する用量で投与される。次いで、動物は、所望の治療剤または診断剤のインビボ発現について評価される。いくつかの実施形態では、このような評価から得られたデータから、当業者は、ヒト患者に投与されるべきレトロウイルスベクター粒子の量を決定する。

【0295】

キット

また、本明細書に記載される方法において使用するための組成物を含むキットまたは薬物送達系も提供される。本明細書に記載されるレトロウイルス粒子の投与に必要なすべての必須材料および試薬は、キットに集められ得る（例えば、パッケージング細胞コンストラクトまたは細胞株、サイトカイン発現ベクター）。キットの成分は、上記のような種々の製剤で提供され得る。1 種または複数の治療用レトロウイルス粒子は、1 種または複数の薬剤（例えば、化学療法剤）とともに単一の医薬上許容される組成物または別個の医薬上許容される組成物に製剤化され得る。

【0296】

これらのキットまたは薬物送達系の成分は、乾燥形態または凍結乾燥形態で提供され得る。試薬または成分が、乾燥形態として提供される場合には、再構成は、一般に、別の容器手段中で提供され得る適した溶媒の添加によってである。

【0297】

キットの容器手段は、一般に、少なくとも 1 種の物質が入れられ得る、少なくとも 1 種のバイアル、試験管、フラスコ、瓶、シリンジおよび／または他の容器手段を含み得る。

【0298】

本明細書において開示されるキットはまた、レトロウイルス粒子の投与量および／または投与情報に関する使用説明書を含み得る。使用説明書は、治療方法を含めた本明細書に記載される方法のいずれかを実施するための使用説明書を含み得る。使用説明書は、満足のいく臨床エンドポイントの適応症または生じ得る任意の不都合な症状またはヒト対象で使用するために食品医薬品局などの監督官庁によって必要とされるさらなる情報をさらに含み得る。

【0299】

使用説明書は、キット内のまたはキットに貼られた、「印刷物」で、例えば、紙またはボール紙で、またはキットもしくはパッケージング材料に貼られた、もしくはキットの成分を含有するバイアルもしくは試験管に取り付けられた表示であり得る。使用説明書は、ディスク（フロッピーディスクまたはハードディスク）、CD—またはDVD—ROM／RAMなどの光学CD、磁気テープ、RAMおよびROMなどの電氣的ストレージ媒体、ICチップおよび磁気／光学ストレージ媒体などのこれらのハイブリッドなどのコンピュータで読み取り可能な媒体にさらに含まれ得る。

【0300】

いくつかの実施形態では、キットまたは薬物送達系は、例えば、中に所望のバイアルが保持される注射または中空成形プラスチック容器などの商業的販売のための厳重な管理下にあるバイアルを含有するための手段を含む。容器の数または種類に関わらず、キットはまた、対象の身体内に最終的な複合組成物を注射／投与または配置するのを補助する機器を含み得るかまたはそれを用いてパッケージングされ得る。このような機器は、アプリケーションター、吸入具、シリンジ、ピペット、鉗子、計量スプーン、点滴器または任意のこのような医学的に承認された送達媒体であり得る。

【0301】

パッケージおよびキットは、例えば、製品説明、投与様式および／または治療の適応症を明記する表示をさらに含み得る。本明細書において提供されるパッケージは、本明細書において記載される組成物のいずれかを含み得る。パッケージはさらに、1種または複数の疾患および／または状態を治療するための表示を含み得る。

【0302】

用語「パッケージング材料」とは、キットの成分を収納する物理的構造を指す。パッケージング材料は、成分を無菌的に維持し得、このような目的のために一般的に使用される材料（例えば、紙、波型のファイバー、ガラス、プラスチック、ホイル、アンブルなど）からなり得る。表示または添付文書は、適当な書面による使用説明書を含み得る。したがって、キットはさらに、本明細書に記載される任意の方法においてキット成分を使用するための表示または使用説明書を含み得る。キットは、パックまたはディスペンサー中の化合物を、本明細書に記載される方法において化合物を投与するための使用説明書と一緒に含み得る。

【実施例】

【0303】

当業者が、本明細書に記載される組成物および方法をより良好に実施できるために、例示目的で以下の実施例を提供する。

【0304】

実施例1：細胞株作製

第1に、3または4種のプラスミド系をリン酸カルシウム試薬を用いて293T細胞にトランスフェクションすることによってレトロウイルス上清を作製する。上清を0.45 μmのフィルターをとおして濾過する。濾過された上清は、新鮮なままで、48時間までは4℃で、または-80℃で貯蔵されて使用され得る。

【0305】

細胞株を、6ウェル組織培養ディッシュに 1×10^4 個の細胞／ウェルを播種することによって作製する。翌日、8 μg/mLポリブレンを用いてレトロウイルス上清を16～24時間添加し、適当な用量の選択薬（G418、ハイグロマイシンまたはピューロマイシン）を用いて選択する。選択薬の用量は、細胞に対する過剰な毒性を避けるために、非HSV-TK細胞で薬物の添加後少なくとも4日で100%死滅を引き起こすための最小量とする。

【0306】

実施例2：GCV感受性アッセイ

HSV-TKまたはその突然変異体および／または変異体を発現する細胞を、6ウェルディッシュに 1×10^5 個で播種する。翌日、GCVの5種の段階10倍希釈を、1 mM

～0.1 μmの範囲の最終濃度を用いて添加する。GCV処理の3（3）日後、メチレンブルーを添加して、生細胞を染色する。

【0307】

実施例3：バイスタンダーアッセイ

細胞を、0～100%の範囲のTK細胞の混合物とともに、96ウェルプレートに1～4×10⁴個の細胞／ウェルで3連で播種する。翌日、GCVを10 μm～1 mMの範囲の用量で添加する。GCV添加の20～24時間後、コンフルエンスの細胞プレートを1：30で分割して、3プレートする。5日後、細胞を、Presto Blueによって生細胞代謝について分析し、マイクロプレートリーダーで読み取る。Presto Blueによって、GCV処理の3日後にサブコンフルエンスの細胞プレートを分析する。

10

【0308】

1アッセイでは、本発明らが使用したHSV-TKクローン細胞株は、ネオマイシン-HSV-TK、ハイグロマイシン-HSV-TK、赤色蛍光タンパク質（RFP）-HSV-TK細胞株および使用して作製し、HSV-TK遺伝子のいくつかの突然変異体を比較した。

【0309】

RexC2は、改善された型の単純ヘルペスウイルス（HSV）チミジンキナーゼ遺伝子（TK）を保持する。RxC2を用いて効率的に感染した（形質導入した）細胞宿主は、そのゲノム中にウイルスTKを組み込み、この酵素を発現する。HSV-TKは、分裂細胞における新規に合成されたDNAへのその組み込みのためにDNA塩基チミジンをリン酸化する。

20

【0310】

細胞播種およびGCV処理の通常の96ウェルプレートプランは、以下の表に示されている（HK=HSV-TK）：

【0311】

【表6】

	培地	20uM	20uM	20uM	10uM	10uM	10uM	NO G CV	NO G CV	NO G CV	NO G CV
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地
B	培地	0% T K	0% T K	0% T K	0% T K	0% T K	0% T K	0% T K	0% T K	0% T K	0% T K
C	培地	2% T K	2% T K	2% T K	2% T K	2% T K	2% T K	2% T K	2% T K	2% T K	2% T K
D	培地	5% T K	5% T K	5% T K	5% T K	5% T K	5% T K	5% T K	5% T K	5% T K	5% T K
E	培地	10% T K	10% T K	10% T K	10% T K	10% T K	10% T K	10% T K	10% T K	10% T K	10% T K
F	培地	25% T K	25% T K	25% T K	25% T K	25% T K	25% T K	25% T K	25% T K	25% T K	25% T K
G	培地	100% TK	100% TK	100% TK	100% TK	100% TK	100% TK	100% TK	100% TK	100% TK	100% TK
H	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地

30

40

【0312】

バイスタンダーアッセイ実験の図式結果が図19および20に示されている。

【0313】

種々の突然変異体HSV-TKおよびクローン集団を使用して、40種を超えるバイスタンダーアッセイを実施した。

50

【0314】

データは、GCV感受性および酵素動態学測定値および潜在力を有する突然変異体の製造物のウイルス力価を用いてまとめた。

【0315】

すべてのこれらのパラメータの注意深い調査によって、Reximmune C-2中のTK遺伝子である突然変異体HSV-TK168dmNESの選択が可能となった。

【0316】

実施例4：リアルタイムPCRによるTK RNAのスプライシングされた形態の定量化
HSV-TKのスプライシングされていない切断型形態を、pCR2.1 TOPOベクター (invitrogen) 中にサブクローニングする。TaqMan (登録商標) /ABI PRISM7700配列検出システムを使用して、HSV-TKのスプライシングされていない形態およびスプライシングされた形態を選択的に増幅および検出できるプライマーおよびプローブの2種の異なるセットを用いて、2種の定量的リアルタイムPCRを設定する。HSV-TKスプライシングされていない形態については、プライマーおよびプローブを、HSV-tk遺伝子のスプライシングされる領域中に設計する。

【0317】

スプライシングされていない形態のリアルタイムPCRを、100~500ngのゲノムDNAまたは10μlのcDNA、1×TaqMan (登録商標) Universal PCR Master Mix、300nMの2種のプライマーTKwtfor (5'-CGG CGG TGG TAA TGA CAA G-3') およびTkwtrev (5'-GCG TCG GTC ACG GCA TA-3') の各々および200nMのTKwt MGBプローブ (5'-FAM CCA GAT AAC AAT GG G C-3') を含有する25μlの反応混合物中で実施する。

【0318】

スプライスジャンクションを包含するTaqMan (登録商標) プローブを、HSV-TKのスプライシングされた形態を選択的に検出するよう設計する。TKのスプライシングされた (切断型) 形態に特異的な定量的リアルタイムPCRを、100~500ngのゲノムDNAまたは10μlのcDNA、1×Master Mix (PE Applied Biosystems) 300nMの2種のプライマーの各々を含有する25μlの反応混合物中で実施した。熱サイクル条件は、以下のとおりである：50℃で2分間のUNGの最初の活性化、続く、95℃で15分間のTaq Goldの活性化およびUNGの不活性化。その後、95℃で15秒および60℃で1分間で40サイクルの増幅を実施する。ABI Prism 7700配列検出システム (Applied Biosystems) を使用し、MicroAmp (登録商標) 光学96ウェル反応プレート (Applied Biosystems) において、両PCRを並行して実施する。PCRサイクル3~15から平均ベースライン蛍光を算出し、Ctをリポーター色素の正規化された蛍光強度が0.05に等しいPCRサイクルと規定した。Ct値をDNAの初期投入量の対数に対してプロットすることによって、各TaqMan (登録商標) アッセイにおいて既知コピー数 (10<6>~4コピー/反応) を用いて2種の標準曲線を作成する。標準希釈物およびcDNAサンプルを、それぞれ、2連、3連で分析する。

【0319】

実施例5：臨床試験

原発性肝細胞癌腫または肝臓に転移性の腫瘍を有する難治性対象において用量漸増試験を実施して、Reximmune-C2 (チミジンキナーゼおよびGM-CSF遺伝子) の安全性、薬物動態および薬物動力学を評価した。

【0320】

背景および論理的根拠

Reximmune-C2は、対象の治療用タンパク質をコードする内部ペイロードを含有する遺伝子送達プラットフォームを含む。遺伝子送達プラットフォームは、世界中で280人を超える対象に投与されており、およそ270人の対象が、ペイロードとしてd

10

20

30

40

50

nG1を含有するベクターを用いて(Rexin-G)、16人の対象がペイロードとしてチミジンキナーゼ(vTK)および免疫促進剤顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を用いて(Reximmune-C)治療された。遺伝子送達プラットフォームは、高度に遺伝子操作された非組換えマウスモロニーウイルスベクター(MoMLV)である。これまでに、難治性原発性または転移性固形腫瘍を有する対象においてRexin-GおよびReximmune-Cの組合せを調べる第I相用量漸増試験が実施された(Genevieve試験)。この提案された第I相臨床試験(Genevieve 2試験と題された)は、チミジンキナーゼおよびGM-CSFの組合せ中で改善された形態のチミジンキナーゼを使用して、Reximmune-C 2単独-Rexin-Gを伴わない-を調べて行われた試験の延長である。

10

【0321】

元のGenevieve試験では、16人の対象が、 8.0×10^{10} cfu s (pts数=7)である最高用量群および最長期間6サイクル(3~6サイクルの範囲)において、平均曝露で3用量レベルにわたって補充された。研究のパートAについては、治療は、これまでに決定された安全な、有効な(最適)用量のRexin-Gおよび漸増用量のReximmune-Cからなっていた。具体的には、1サイクルとして、1、3、5、8、10および12日目にRexin-G、 2×10^{11} cfu、3日目にReximmune-C、1.0、2.0または 3.0×10^{10} cfu(それぞれ、用量レベルI、II、III)および6~19日目に1 gm p. o. 1日3回でバラシクロビル。研究のパートBパートについては、毒性がなかったか、毒性がグレード1以下に消滅した対象が、合計6治療サイクルまで療法のさらなるサイクルを受け取ることができた。

20

【0322】

いずれの用量レベルでも用量を制限する毒性はなかった。研究中の16人の対象について無関係の有害事象が報告されたが、事象の数は少なく(ほとんどの場合に、望ましい期間あたり1または2の出現)、ほとんどは、グレード1または2であった。2人の対象において関連非重篤有害事象が起こり、両方ともグレード2であった。4人の対象は、重篤有害事象を経験し、それらのすべては、研究薬物と関連していないと考えられた。

【0323】

この第I相試験の継続の論理的根拠は、(1)チミジンキナーゼ自体が、特に、その腫瘍がバイスタンダー効果を実証する対象において有効な抗癌剤であると証明し得ること(2)対象の国際グループへの今までの遺伝子送達プラットフォームの投与が、極めて高度の安全性を実証したことおよび(3)動物における体内分布が、肝臓への高度の体内分布を示唆することである。さらに、GM-CSFの添加は、適当な免疫細胞の補充による免疫学的効果および腫瘍関連抗原による腫瘍細胞死滅の増強に寄与し得る。

30

【0324】

ウイルス粒子の体内分布は、肝臓へが最高であり、脾臓、次いで、肺が続く。これが、肝細胞腫瘍に最初に焦点を合わせることの論理的根拠であり、ここで、用量強度が最高でなくてはならない。また、これらの癌の有効な抗癌剤に対して、高い臨床的に満たされていない要求がある。

【0325】

本明細書において開示される実施形態は、特定の方法および成分および記載されるその他のプロセスに制限されないが、これはこれらが変わり得るからであるということは理解される。本明細書において使用される技術用語は、単に特定の実施形態を説明する目的で使用されるのであって、本発明の範囲を制限するよう意図されないということも理解されるべきである。本明細書においておよび、添付の特許請求の範囲において、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、別に明確に指示しない限り、複数の言及を含む。したがって、例えば、「タンパク質」への言及は、1種または複数のタンパク質への言及であり、当業者に公知のその等価物などを含むということも留意しなくてはならない。

40

【0326】

50

別に定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同一の意味を有する。具体的な方法、装置および材料が記載されているが、本明細書に記載されるものと同様の任意の方法および材料または等価物は、本発明の実施または試験において使用され得る。

【0327】

学術論文、書籍、マニュアル、公開特許出願および交付済み特許を含めた、本明細書において引用されたすべての刊行物は、参照により本明細書に組み込まれる。さらに、本明細書、実施例および添付の特許請求の範囲において使用される特定の用語および語句の意味が提供される。定義は、本来、制限であるものではなく、本発明の特定の態様のより明確な理解を提供するよう働く。

10

【0328】

実施例6：遺伝子療法適用のための臨床試験

この臨床試験は、2相に分割される：5日のうち3日で、Reximmune-C2を単回静脈内用量として投与する第IA相。バルガンシクロビル（ガンシクロビルの経口形態）投薬を、PETスキャン結果に関わらず8日目に5日間開始する。およそ1週間の休薬期間が続く。各サイクルは3週間の期間とする。

【0329】

用量制限毒性（DLT）を経験するまで、またはNCI-CTCグレード2毒性の2症例が研究薬によって起こるまで（悪心／嘔吐、疲労、拒食症、脱毛症または貧血を除く）、第1およびその後のコホートにおいて3人の患者とする。DLTがない場合には、対象は次の用量レベルに移動する。DLTがない場合には、コホートは、6人の患者に拡大され、2人以上の患者がDLTを示す場合には、用量レベルは進行しない。

20

【0330】

最大投与用量（MAD）に到達すると、DLTがなかったコホート用量で出発し、ある用量レベルで2人の患者において用量制限毒性が観察されるまで継続する、修飾されたフィボナッチスケジュールが続く。推奨される第2相用量（RP2D）が規定されると、6～12人の患者が補充される。

【0331】

第IB相は、第IA相データに基づいて既定の腫瘍種およびステージの、1用量（RP2D）のReximmune-C2後、3～6日目に $[^{18}\text{F}]$ FHBGスキャン陽性である患者において、Reximmune-C2の活性を調査するために設計される。スキャンが陽性である場合には、患者は、プロトコルの第IB相治療相に承認され、RP2Dが、5日以内に3用量として投与され、その相の8日目に開始する5日のバルガンシクロビルが続き、1週間の休薬期間が続く。各サイクルは、3週間の期間である。単回用量のReximmune-C2後に $[^{18}\text{F}]$ FHBG PETスキャンを有する陰性患者は、5日のバルガンシクロビルが投与され、研究は継続しない。

30

【0332】

患者DLTは、Reximmune-C2に起因し、薬物投与の最初のサイクル（3週間）の間に生じる以下の事象のうちいずれかの出現として規定される。

40

【0333】

グレード4の7連続日以上的好中球減少症（すなわち、絶対好中球数（ANC） < 500 個細胞/ mm^3 ）または熱性好中球減少症（すなわち、ANC < 1000 個細胞/ mm^3 を伴う発熱 $\geq 38.5^\circ\text{C}$ ）；グレード4の血小板減少症（ $< 25,000$ 個細胞/ mm^3 または血小板輸血を必要とする出血エピソード）；適切な／最大医療介入および／または予防の使用にもかかわらずグレード3以上の吐き気および／または嘔吐；任意のグレード3以上の非血液学的毒性（グレード3注射部位反応、脱毛症、疲労を除く）；Reximmune-C2を用いた治療と関連する毒性からの回復の遅延による3週間超の再治療遅延；および前投与の適当な使用にもかかわらずグレード3以上の過敏症反応（「じんま疹を伴うか伴わない、非経口薬物適用（単数または複数）を必要とする症候性気管支

50

痙攣；アレルギー関連浮腫血管性浮腫」として規定される共通毒性基準によって）。

【0334】

Reximmune-C2は、注入ポンプによって15～60分かけて（用量に応じて）静脈内に注入される。Reximmune-C2は、 $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ で保存された30mlのバイアル中で提供される。

【0335】

この第I相試験では、漸増用量のReximmune-C2の安全性、薬物動態および薬物動力学が調べられる。Reximmune-C2の最大耐用量が同定され、推奨される第2相用量が規定される。Reximmune-C2治療の任意の抗腫瘍活性および臨床反応が記載される。

10

【0336】

この試験での出発用量は、関連ベクタープラットフォーム薬物製品Rexin-GおよびReximmune-Cを用いるヒト臨床安全性実験およびReximmune-C2の21日ラットGLP毒性学研究の結果に基づいている。

【0337】

目的

研究の主目的は、肝臓への進行した原発性または転移性腫瘍を有すると診断されたこの研究に登録された患者における、1週目における5日内で静脈内に投与される一連の3用量と、それに続く、2週目におけるバルガンシクロビルの5日用量からなる3週間のサイクルにわたって投与されるReximmune-C2の、最大耐用量（MTD）、用量制限毒性（DLT）、安全性および推奨される第2相用量（RP2D）を決定することである。

20

【0338】

第2の目的として、（i）Reximmune-C2の血漿薬物動態の評価、（ii）一連の $[^{18}\text{F}]$ FHBG PETおよび／またはSPECTイメージングによるReximmune-C2からのHSV-TK-m2タンパク質発現の代用物の評価、（iii）Reximmune-C2の抗腫瘍活性の任意の予備的証拠の説明および評価および（iv）レトロベクターgp70 env、末梢血リンパ球（PBL）において複製可能なレトロウイルスに対する抗体、PBLのゲノムDNAへのベクター組込みおよび循環hGM-CSFタンパク質について試験する臨床研究を提供するためが挙げられる。

30

【0339】

方法

研究デザイン：並行群、オープンラベル用量漸増、3センター臨床試験

【0340】

階層化：なし。

【0341】

療法：Reximmune-C2が、静脈内注入として別個の患者に投与される。第I A相ではReximmune-C2を調べる一用量は、DLTが観察されるまで、患者のコホート間で漸増される。RP2Dでは、さらなる患者が補充される。第I B相では、患者は、HSV-TK-m2の発現について $[^{18}\text{F}]$ FHBG PETによってプレスクリーニングされる。HSV-TK-m2を発現するものは、さらなる用量のReximmune-C2を受け取る。患者は、過敏症反応が生じるまで前投薬されない。

40

【0342】

統計的手法：統計分析には、記述統計学が使用される。

【0343】

サンプルサイズ決定：正確なサンプルサイズは、観察された毒性に応じて変わるので規定され得ない。各スケジュールについて、3～6人の対象のコホートが、MTDが規定されるまで各用量レベルで治療される。MTDが同定されると、この用量レベルが、最大12人の患者に拡大され、用量およびスケジュールの耐容性および薬物動態をより良好に規定するために治療される。45～70人の対象が登録され、I A部分では33～46人を

50

有すると予測される。

【0344】

登録基準

対象は、研究における無作為化に適格であるために、以下の組み入れ基準のすべてを満たさなければならない。

【0345】

1. 標準療法に対して難治性であるか、またはそれに対する根治的標準療法が存在しない、組織学的に確認された、進行したステージの、原発性または転移性の肝臓の成人固形腫瘍の診断。

【0346】

2. X線写真上で測定可能または評価可能な疾患の証拠。

【0347】

3. 米国国立癌研究所 (National Cancer Institute) (NCI) 共通毒性基準 (CTC) (バージョン 4.0) グレード < 1 に、任意の先行する放射線療法、化学療法または外科的手順のすべての急性毒性効果が消滅していなくてはならない。

【0348】

4. 年齢は、> 18歳でなくてはならない。

【0349】

5. ホルモン療法を除く抗新生物療法の最終用量が、> 21日でなくてはならない。外部照射療法は、< 25% 骨髄含有骨格でなくてはならない。

【0350】

6. 患者は、B型およびC型肝炎陽性であってもよい（患者は、その抗ウイルス薬物適用を継続し得る）。

【0351】

7. 患者は、脳照射されており、6週間安定であれば、任意の数の頭蓋内転移を有してもよい。患者は、抗発作医薬を服用していてもよいが、ステロイドを使用していない。

【0352】

8. カルノフスキーパフォーマンスステータスが、 ≥ 70 でなくてはならない。

【0353】

9. 少なくとも3ヶ月の平均余命

【0354】

10. 患者は、PETスキャンのためにセントルークスメディカルセンター (St. Luke's Medical Center) を訪問できなくてはならない。

【0355】

11. 必要なベースライン実験室データとして以下が挙げられる：

【0356】

【表7】

絶対好中球数(ANC)	$\geq 1,500/\text{mm}^3$ [SI単位 $10^9/\text{L}$]
血小板	$\geq 75,000/\text{mm}^3$ [SI単位 $10^9/\text{L}$]
ヘモグロビン	$\geq 8.0\text{gm/dL}$ [SI単位 mmol/L]
血清クレアチニン	$\leq 1.5 \times$ 正常値の実験室上限(L-ULN)
ビリルビン	$\leq 2.0\text{mg/dL}$
アルカリホスファターゼ	$\leq 5 \times \text{L-ULN}$
AST、ALT	$\leq 5 \times \text{L-ULN}$
LDH	$\leq 5 \times \text{L-ULN}$
妊娠試験(妊娠の可能性のある女性)	出発プロトコルの7日内陰性

【0357】

12. その疾患の新生物的性質を承知しており、続く手順、療法の実験性、代替案、可能性ある利益、副作用、危険および不快症状を知らされていることを示す、署名したインフォームドコンセント。

【0358】

13. 予定された訪問、治療プランおよび実験室検査に従う意思および能力。

【0359】

以下のいずれかの存在が、研究登録から対象を排除する。

【0360】

1. 任意のその他の治験剤を含めた任意の抗癌療法との併用療法。

【0361】

2. スクリーニングの6週間以内の既知頭蓋内浮腫またはCVA。

【0362】

3. 妊娠中または母乳栄養中の女性。女性対象は、有効な避妊を使用することに同意しなくてはならないか、外科的に生殖不能でなくてはならないか、または閉経後でなくてはならない。男性対象は、有効な避妊を使用することに同意しなくてはならないか、または外科的に生殖不能でなくてはならない。有効な避妊の定義は、治験責任医師または指定された同僚の判断に基づく。すべての危険な状態にある女性対象は、研究治療の開始前7日以内に陰性妊娠検査を有さなくてはならない。

【0363】

4. 臨床的に有意な候補疾患（ニューヨーク心臓協会、クラスIIIまたはIV）。

【0364】

5. インフォームドコンセントを妨げる認知症または精神状態の変化。

【0365】

6. 主席治験責任医師の判断において、研究参加または研究薬物投与に関連する危険を増大し得るか、または研究結果の解釈を干渉し得る、その他の重度の、急性もしくは慢性の医学的もしくは精神医学的状态または検査所見の異常は、対象をこの研究に不適切とする。

【0366】

7. ガンシクロビルクラスの抗ウイルス薬に対する既知副作用。

【0367】

8. HIV陽性であるとわかっている患者。

【0368】

9. 患者は、スクリーニングの時点でステロイドを服用してはならない。

【0369】

出発用量およびスケジュールの論理的根拠

Reximmune-Cは、1.0、2.0または3.0×10¹⁰cfu（サイクルの3日目に、それぞれ、用量レベルI、II、III）の範囲にわたって16人の患者に投薬された。いずれの用量レベルでも用量制限毒性はなかった。研究中の16人の患者について無関係の有害事象は報告されたが、事象の数は少なく（ほとんどの場合に、望ましい期間あたり1または2の出現）、ほとんどは、グレード1または2であった。2人の患者において関連非重篤有害事象が起こり、両方ともグレード2であった。4人の患者は、重篤有害事象を経験し、それらのすべては、研究薬物と関連していないと考えられた。Reximmune-Cの最適用量およびスケジュールを決定する前に治験を終えた。この治験、新規Genevieve-2試験では、最初の投薬は、21日目毒性学およびHSV-TK-m1研究に基づく。将来の投薬は、mLあたりのcfuよりもより正確な力価の尺度である総ウイルス粒子（TVP）/mLを使用して進行する。

【0370】

スケジュールは、Reximmune-C2曝露は、腫瘍細胞のすべてを形質導入しないという論理的根拠に基づいている。したがって、患者は、5日の期間にわたってサイクル中で3回投薬される。

10

20

30

40

50

【0371】

GDSに対する曝露とHSV-TK-m2（およびhGM-CSF）の発現の間の時間は、48～72時間であると推定される。したがって、Reximmune-C2の3回目の用量の72時間後、バルガンシクロビルを開始する。用量（腎機能のために調整される）は、従来の抗ウイルス薬用量レベルで与える。バルガンシクロビルの可能性ある毒性およびガンシクロビルの5日間は、HSV-TK-m2を含有生する細胞の大部分を死滅させるのに十分であるはずであるという公開された知見のために、5日の療法を選択した。Reximmune-C2およびバルガンシクロビルの両方の可能性がある毒性のために、これに、およそ9日の休薬期間を続ける。hGM-CSFは、バルガンシクロビル添加の時点で、腫瘍細胞アポトーシスの際に現れ得る任意の腫瘍関連抗原（TAA）の提示に影響を及ぼすのに十分な濃度であり得る。

10

【0372】

薬物動態のために、血漿サンプルを、サイクル1中の第1および第3の用量の後およびサイクル2中の第1の用量後に採取する。

【0373】

分布は、主として肝臓であるので、そこでおおよび関連のために骨髄で毒性を注意深くモニタリングする。

【0374】

この臨床プロトコールは、原発性肝細胞または肝臓へ転移性の腫瘍のいずれかの進行した悪性腫瘍を有する患者への静脈内注入によるReximmune-C2の投与を求める。2つのパートとなる：第IA相（用量漸増3用量／週、どの3週間も）および第IB相（Reximmune-C2の1用量後のプレスクリーニングおよび $[^{18}\text{F}]$ FHBGスキャン）。PETスキャンが陽性である場合には、患者は研究を継続する。PETスキャンが陰性である場合には、患者は、5日のバルガンシクロビルを受け取り、治験を継続しない。第IA相のために、用量漸増は、加速された力価測定設計をたどり、研究薬物に起因するDLTの1症例またはNCI-CTCグレード2毒性の2症例のいずれか（悪心／嘔吐、疲労、拒食症、脱毛症または貧血を除く）が観察されるまで、用量レベルあたり3人の患者を組み込む。その後、臨床プロトコールにおける投薬は、用量制限毒性が達成されるまで、修飾されたフィボナッチスケジュールをたどる。

20

【0375】

治験設計

これは第1相、オープンラベル、4センター用量漸増試験である。DLTが観察され、MTDが規定されるまで、用量を増大する。

30

【0376】

Reximmune-C2は、15～60分かけてIV注入として投与される。33～70人の患者が研究の経過の間に治療されると予想される。

【0377】

第IA相のために、Reximmune-C2の用量は、 6.0×10^{11} TVPから漸増される。加速された用量漸増相では、各用量レベルで3人の患者のコホートが登録される。用量漸増増分は、DLTまたは2人のCTCグレード2以上毒性が観察されるまでに100%となる。加速された用量漸増が終了すると、標準用量漸増における新規患者の用量漸増は、修飾されたフィボナッチスキームをたどる（すなわち、67%、50%、40%、33%および25%の用量増分）。用量レベルあたり最小で3人の患者が登録される。第IB相のために、Reximmune-C2の用量は、RP2Dとなる。DLTが評価される。ある用量レベルで6人の患者のうち ≥ 2 人でDLTが観察される場合には、さらなる用量漸増はなく、この用量レベルが、最大投与用量（MAD）を規定する。

40

【0378】

MADを少し下回る用量は、MTDと考えられる。MTDが規定されると、第2相臨床研究のための推奨される用量として、薬物動態および薬物動力学パラメータおよび適合性をさらに特性決定するために、この用量レベルは、最大12人の患者に拡大され得る。

50

【0379】

患者の治療

それ自体に対するおよび環境に対する過度の曝露を最小化する手順に精通する有資格者のみが、適当な環境における生物学的薬剤の調製、取り扱いおよび安全な廃棄に取り組まなければならない。

【0380】

Reximmune C2は、HSV-TK-m2およびhGM-CSFをコードする遺伝子を含むモロニーマウス複製不能レトロベクター粒子である。薬物製品は、DMEM（低グルコース）、RD-レトロベクター粒子、L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム、ヒト血清アルブミン、n-酪酸、Pulmozyme（登録商標）、マグネシウムおよびその他の賦形剤を含む。

10

【0381】

薬物製品は、1バイアルサイズ：20mmフィニッシュを有する30mLタイプ1透明ガラスバイアル（25mLの $\geq 1.0 \times 10^{10}$ TVPを含む）で入手可能である。バイアルは、20mmテフロンコートされた血清ストッパーおよび20mmフリップオフラッカー塗フリップトップで閉じられる。

【0382】

Reximmune-C2は、注入ポンプによって15分かけて最大100mL、30分かけて>100mL~200mL、45分かけて>200mL~300mL、60分かけて>300mL~400mLの容量が静脈内に投与される。400mLを超える容量が、治験責任医師およびGleneagles Medical Monitorによって決定される速度で投与される。スケジュールのためにMTDが同定されると、必要であれば（また治験責任医師およびGleneagles Medical Monitor間で一致するように）、投与の時間を変更され得る。

20

【0383】

バルガンシクロビルは経口的に投与され、食物とともに摂取されなければならない。血清クレアチニンまたはクレアチニンクリアランスレベルは、注意深くモニタリングされなければならない。投与量調整は、以下の表に示されるようなクレアチニンクリアランスに基づいて必要とされる。バルガンシクロビル投薬は、サイクルの7~9日目に始まり得るが、5連続日間与えられなければならない。

30

【0384】

クレアチニンクリアランスは、血清クレアチニンから以下の式によって算出され得る：

【0385】

男性について = $\{ (140 - \text{年齢} [\text{年}]) \times (\text{体重} [\text{kg}]) \} / \{ (72) \times (0.011 \times \text{血清クレアチニン} [\text{micromol/L}]) \}$

【0386】

女性について = $0.85 \times \text{男性値}$ 。

【0387】

【表8】

表I.腎性障害患者のバルガンシクロビル投薬

Cr CL(ml/分)	用量1日目	用量2~5日目
$\geq 60\text{ml/分}$	900mg(2個の450mg錠剤)bid	900mg(2個の450mg錠剤)qday
40~59ml/分	450mg bid	450mg qday
25~39ml/分	450mg	450mg 3日および5日目
10~24ml/分	450mg	450mg 4日目
<10ml/分	推奨されない	推奨されない

40

【0388】

第1相研究の目的は、治験剤のMTD、DLT、安全性およびRP2Dを確立することである。したがって、毒性効果は主な研究エンドポイントであり、継続的に評価される。

50

容易に測定され、再評価され得る患者が疾患を有する場合には、反応情報が得られる。これらの評価は、どのサイクルでも行われる。さらに、反応は、療法に対する確認された反応として実証されるために、少なくとも6週間離れた2つの実験の間に留意されなければならない。

【0389】

－ 毒性について評価可能－すべての患者が、任意の研究薬物を受け取る場合には、毒性について評価可能となる。

－ 反応について評価可能－少なくとも単一サイクルの治療を受け、腫瘍再評価を有していたすべての患者が、反応について評価可能と考えられる。さらに、早期の進行性の疾患を発症する患者はまた、反応について評価可能と考えられる。少なくとも2サイクルの治療の間、療法を受けている患者は、その反応が評価される。

10

【0390】

抗腫瘍有効性の決定は、評価の免疫関連反応基準（i r R C）システムに従ってなされた目的腫瘍評価に基づき、治験責任医師による治療決定は、これらの評価に基づく。

【0391】

R e x i m m u n e - C 2におけるGM-C S F導入遺伝子の存在および腫瘍効果に寄与する免疫応答の可能性を考え、免疫応答基準が、臨床反応のために利用される。免疫応答基準対R E C I S T 1. 1を使用する理由は以下のとおりである：（1）測定可能な抗腫瘍活性の出現は、細胞傷害性療法についてよりも免疫療法についてより長くかかり得る；（2）免疫療法に対する反応は、従来のPD後に起こる；（3）免疫療法の中断は、いくつの場合には、PDが確認されるまで（普通、反応に対して行われるように）適当ではないことがある；（4）「臨床的に不十分な」PD（例えば、その他の反応性病変の存在下での少ない新規病変）の許容が推奨される；および（5）耐久性のあるSDが、抗腫瘍活性を表し得る。

20

【0392】

R E C I S T 1. 1と免疫関連反応基準間との比較が、以下に列挙される：

【0393】

【表 9】

表II.WHO RECISTおよび免疫関連反応基準の比較

WHO		irRC
新規の測定可能な病変 (i.e., $\geq 5 \times 5$ mm)	常にPDを表す	腫瘍量への組込み
新規の測定可能ではない病変(i.e., $< 5 \times 5$ mm)	常にPDを表す	進行を規定しない(しかし、i rCRを妨げる)
非指標病変	変化は、CR、PR、SDおよびPD のBORの規定に寄与する	irCRの規定に寄与する(完全 な消失が必要とされる)
CR	4週間以上離れた2つの連続観 察結果におけるすべての病変 の消失	4週間以上離れた2つの連続 観察結果におけるすべての 病変の消失
PR	新規病変または非指標病変の 明確な進行の不在下での、4週 間以上離れた2つの連続観察結 果におけるベースラインと比 較した、すべての指標病変のSP Dの $\geq 50\%$ 減少	少なくとも4週間以上離れた 2つの連続観察結果における ベースラインと比較した腫 瘍量における $\geq 50\%$ 減少
SD	新規病変または非指標病変の 明確な進行の不在下での、ベ ースラインと比較したSPDの50% 減少は確立され得ず、最下点と 比較して25%増大も確立され得 ない	ベースラインと比較した腫 瘍量の50%の減少は確立され 得ず、最下点と比較して25% の増大も確立され得ない
PD	最下点と比較してSPDの少なく とも25%の増大および/または 非指標病変の明確な進行およ び/または新規病変の出現(任意 の単一時点)	4週間以上離れた2つの連続 観察結果における最下点と 比較した腫瘍量の少なくと も25%の増大(任意の単一時 点での)

10

20

【0394】

評価のタイミングおよび種類

すべてのベースラインイメージングベースの腫瘍評価は、治療の開始に先立って14日
内に実施されるべきである。この研究の目的上、第I A相および第I B相の両方について
、すべての患者の腫瘍評価は、治療の開始の9週間後に開始し、その後6週間ごとに再評
価されなければならない(例えば、9週間、15週間、21週間など)。反応性腫瘍(i
rCRまたはirPR)を有するすべての患者は、反応の最初の実証の6週間以上後に確
認される反応を有さなくてはならない。腫瘍進行を有するすべての患者は、進行の最初
の実証の6週間以上後に確認される進行を有さなくてはならない。

30

【0395】

ベースラインおよびフォローアップの間に各々同定され、報告された病変を特性決定す
るために、評価の同一方法および同一技術が、使用されなくてはならない。治療の抗腫瘍
効果を評価するために両方法が使用された場合には、イメージングベースの評価が、臨床
実験による評価にとって好ましい。すべての測定値は、メートル表記法で記録されなけれ
ばならない。

40

【0396】

CTおよびCT/PETは、腫瘍評価のための方法である。従来のCTは、連続してス
ライス厚が10mm以下の切断で実施されなければならない。スパイラルCTは、5mm
の連続再構成アルゴリズムを使用して実施されなければならない。これは、胸部、腹部お
よび骨盤に適用される。

【0397】

50

胸部CTは、肺病変の評価のために使用される。

【0398】

臨床病変は、それらが表在性である（例えば、皮膚結節、触知できるリンパ節）場合にのみ測定可能と考えられる。皮膚病変の場合には、病変の大きさを推定するための定規を含むカラー写真による実証が推奨される。

【0399】

[¹⁸F] FHBG PET-CTスキャンは、患者が第IA相において第1のRe x i m m u n e - C 2 の3用量（サイクル1）を受け取った後に、また第IB相におけるRe x i m m u n e - C 2 のスクリーニング用量後に得る。第IA相では、治験責任医師の裁量で、メディカル 모니터の承認をもって、その後のサイクルにおいてさらなる [¹⁸F] FHBG PET-CTスキャンを得てもよい。

10

【0400】

目的の反応評価のために臨床的に容易に近づけない腫瘍病変、例えば、内臓病変を測定するために、超音波が使用されてはならない。表在性の触知できる節、SC病変および甲状腺結節の臨床測定の可能性ある代替案である。超音波はまた、普通は、臨床検査によって評価される表在性病変の完全消失を確認するのに有用である可能性がある。

【0401】

内視鏡、腹腔鏡検査および放射性核種スキャンは、反応評価に使用されてはならない。

【0402】

供給源確認のために、すべての患者のファイルおよび放射線学的イメージが入手可能でなくてはならず、抗腫瘍活性の最終評価のための院外再検討のために提出され得る。

20

【0403】

腫瘍病変の測定可能性

ベースラインでは、腫瘍病変は、治験責任医師によって、以下に記載されるような基準によって測定可能または測定不能と分類される。

ー 測定可能：少なくとも1次元（記録されるべき最長直径）で、従来技術を用いて $\geq 20\text{ mm}$ と、またはスパイラルCTスキャンを用いて $\geq 10\text{ mm}$ と正確に測定され得る病変。臨床病変は、それらが表在性である（例えば、皮膚結節、触知できるリンパ節）場合にのみ測定可能と考えられる。

ー 測定不能：小さい病変（従来技術を用いて最長直径 $< 20\text{ mm}$ またはスパイラルCTスキャンを用いて $< 10\text{ mm}$ ）および、骨病変、軟膜疾患、腹水症、胸腔または心膜液貯留、皮膚または肺のリンパ管炎、確認されずイメージング技術によってたどられる腹部腫瘍、嚢胞性病変、これまでに放射線照射された病変および間接的な証拠のみによって実証された疾患（例えば、アルカリホスファターゼなどの臨床検査によって）を含めたすべてのその他の病変。

30

【0404】

注記：細胞学および組織学：測定可能な疾患が、孤立性病変に制限される場合には、その新生物的性質は、細胞学／組織学によって確認されなければならない。

【0405】

療法に対する反応はまた、独立した、中心的、放射線学的盲検再検討によって評価され得る。

40

【0406】

腫瘍測定値の記録

臓器に含まれるすべてを代表する、最大10病変までのすべての測定可能な病変が、ベースラインで、および治療の間の規定された間隔で、標的病変として同定され、測定され、記録されなければならない。標的病変は、その大きさ（最長直径を有する病変）および正確な反復性測定（イメージング技術かまたは臨床的にいずれか）に対するその適合性に基づいて選択されなければならない。

【0407】

各標的病変の最長直径を記録する。すべての標的病変の最長直径の合計を算出し、ペー

50

スラインとして記録する。最長直径の合計は、治療の間の疾患の測定可能な寸法の目的腫瘍反応をさらに特性決定するための参照として使用される。すべての測定値は、センチメートルでメートル表記法で記録されなければならない。

【0408】

すべてのその他の病変（または疾患の部位）は、非標的病変として同定されなければならない。同様にベースラインとして記録されなければならない。測定値は必要ではなく、これらの病変は、「存在」または「不在」としてたどられる。

【0409】

腫瘍反応の定義

腫瘍反応の評価のために、免疫関連反応基準基準に従う。

10

【0410】

免疫関連反応基準による全体的な反応の決定

固形腫瘍の標的病変

－ 完全寛解（i r C R）は、すべての病変の消失（測定可能であろうとなかろうと、および新規病変なし）；最初に実証された日付から6週間以上の反復した連続評価による確認として定義される。

－ 部分反応（i r P R）は、最初の実証から少なくとも6週間後の連続評価によって確認された、ベースラインに対する腫瘍量の $> 50\%$ 減少として定義される。

－ 進行性疾患（i r P D）は、治療が開始してから記録された最初に実証された病変の日付から6週間以上の反復した連続評価によって確認される、最下点（最小の記録された腫瘍量）に対する腫瘍量の $> 25\%$ 増大または1つもしくは複数の新規病変の出現として定義される。

20

－ 安定疾患（i r S D）は、i r P Dの不在下でi r C Rまたはi r P Rの基準を満たさないこととして定義される。

【0411】

固形腫瘍の非標的病変

測定可能な腫瘍が、反応またはi r S Dの基準を満たした場合には、反応またはi r S Dとi r P D間を区別するために、治療の間に現れるかまたは悪化させる任意の滲出液の新生物の起源の細胞学的確認が必須である。

【0412】

腫瘍反応の確認

i r P Rまたはi r C Rの状態が割り当てられるには、反応性腫瘍を有する患者における腫瘍測定値の変化は、反応の基準が最初に満たされた後 ≥ 6 週間実施されなければならない反復研究によって確認されなければならない。i r S Dの場合には、フォローアップ測定は、6週間の最小間隔で研究エントリー後少なくとも1回i r S D基準を満たしていなければならない。標的および非標的病変の両方存在する場合には、個々の評価を別個に記録する。反応の全体的な評価は、表I I Iに表されるようなすべてのパラメータを含む。

30

【0413】

最良の全体的な反応は、治療の開始から疾患進行／再発までの記録される最良の反応である（腫瘍進行の参照として、治療が開始してから記録された最小の測定値をとり）。患者の最良の反応の割り当ては、測定および基準の確認の両方の達成に応じて変わる。

40

【0414】

患者は、無作為化後腫瘍評価がない場合に、反応について評価可能ではない（N E）と定義される。これらの患者は、腫瘍反応データの分析において失敗とカウントする。

【0415】

臨床有効性評価：パフォーマンスステータス

患者を、カルノフスキーパフォーマンスステータススケールに従って段階分けする。

【0416】

腫瘍マーカー反応

50

評価の方法

多数の悪性腫瘍において有効性の十分に検証された尺度ではないが、腫瘍マーカーの連続決定が、療法の間の病気の経過をたどるための可能性のあるさらなる手段としての、容易に実施される、高価でない、定量的な臨床ツールの評価を可能にし得る。

【0417】

腫瘍マーカー減少または増加は、結果の目的手段として評価されない。特に、腫瘍マーカー値が上がることは、腫瘍進行の定義において考慮されないが、X線写真腫瘍進行が起こったか否かを実証するための反復性のX線写真評価を促さなくてはならない。

【0418】

算出されたエンドポイント定義

生存は、最初の研究薬物治療の日付から死亡の日付までの時間として定義される。死亡の確認がない場合には、生存時間は、フォローアップの最終日で打ち切られる。

【0419】

腫瘍反応速度は、目的のi r C Rまたはi r P Rの何らかの証拠を有する患者の割合として規定される。

【0420】

T T Pは、治療から腫瘍進行の最初に確認される実証まで、または任意の原因による死亡までの時間と定義される。腫瘍進行の目的証拠を有さない患者および研究治療から除去されるかまたは研究治療以外の抗腫瘍治療が与えられる患者については、T T Pは打ち切られる。腫瘍マーカー進行の基準を満たす腫瘍マーカー増大は、腫瘍進行の適切な目的証拠を構成しない。しかし、このような腫瘍マーカー増大は、目的腫瘍進行が起こったか否かを実証するための反復性のX線写真評価を促さなくてはならない。

【0421】

T T Fは、治療から腫瘍進行の最初に確認される実証まで、または治療から離れる日付まで、またはどれでも最初に来る任意の原因による死亡までの時間と定義される。分析の時点で依然として治療中である患者および目的反応の間に医師によって療法から除去される患者および治療から離れる日付で、目的腫瘍進行の証拠がない患者は、離脱が医学事象の出現によらない限り、治療失敗を経験したと考えられない。これらの患者については、T T Fは、研究から離れた日付で打ち切られる。T T Fの打ち切りはまた、最初の目的腫瘍進行、研究から離れる日付または死亡の前に、研究治療以外の抗腫瘍治療が与えられる患者において実施される。腫瘍マーカー進行の基準を満たす腫瘍マーカー増大は、治療失敗の適切な目的証拠を構成しない。しかし、このような腫瘍マーカー増大は、目的腫瘍進行（ひいては、治療失敗）が起こったか否かを実証するための反復性のX線写真評価を促さなくてはならない。

【0422】

最初の決定的なパフォーマンスステータス悪化までの時間は、治療から、パフォーマンスステータスがベースラインでよりも悪くなかった最後の時間まで、または決定的な確認されたパフォーマンスステータス悪化の事前の実証がない中での任意の原因による死亡までの時間である。決定的なパフォーマンスステータス悪化がない患者および研究から除去されるかまたは研究治療以外の抗腫瘍治療を与えられた患者については、決定的なパフォーマンスステータス悪化は打ち切られる。

【0423】

最初の決定的な体重減少までの時間は、治療からベースラインからの体重減少パーセントが<5%であった最後の時間まで、または決定的な体重減少の事前の実証のない中での任意の原因による死亡までの時間と定義される。決定的な体重減少がない患者および研究から除去されるかまたは研究治療以外の抗腫瘍治療を与えられた患者については、決定的な体重減少は打ち切られる。

【0424】

データのさらなる評価は、最良の目的反応、確認されたおよび確認されていない目的反応割合、研究治療の期間、新規病変の最初の出現までの時間、腫瘍反応までの時間、24

10

20

30

40

50

週での安定な疾患および24週での進行のない生存の割合を含み得る。データは、必要に応じて、RECIST 1.1基準によって評価され得る。

【0425】

治療投与評価

第IA相および第IB相の両方について、用量強度は、総用量／サイクル×治療の開始から最後の治療の間の週数＋13日として規定される。

【0426】

相対用量強度パーセントは、同一期間に対して計画された用量強度によって除された実際の用量強度の割合として規定される。

【0427】

実施例7：RxC2-GCV死滅アッセイ

死滅アッセイを以下のとおりに実施した。RxC2を用いる処理後のGCVによる細胞死滅のパーセンテージは、試験された癌細胞の感染力（形質導入度）に応じて変わる。各細胞株の細胞を、6ウェルディッシュにプレーティングした。翌日、1：5希釈したEGFP（高感度緑色蛍光タンパク質遺伝子）を含有するレトロベクターを用いて細胞を形質導入した。48時間後、細胞を回収した。自動蛍光細胞カウンターを使用して蛍光および非蛍光細胞をカウントして、形質導入されたパーセントを決定した。緑色蛍光タンパク質の遺伝子を保持するウイルスを使用して形質導入の効率を調べ、ここで、形質導入効率が降順で示されている。

【0428】

【表10】

組織起源	細胞株	EGFP+細胞(%)
乳房	Hs578T	66+/-5
乳房	HCC-38	59+/-2.3
皮膚	A375	57.7+/-7.1
肺	NCI-H460	25.9+/-1.7
肝臓	SkHep1	21.4+/-4
脾臓	MLA Paca-2	19.7+/-2
脾臓	Su8686	19.6+/-3.3
肝臓	HepG2	18.4+/-4.3
肺	A549	16.3+/-1.5
脾臓	BxPC3	13.8+/-3.2
肺	NCI-H23	7.9+/-1.2
結腸	DLD-1	3.9+/-2.3
結腸	HT-29	0.7+/-0.3
結腸	HCT-15	0.3+/-1.5
結腸	RKO	0.13+/-0.2

【0429】

本明細書において示されるすべての細胞株に同一ウイルス調製物を使用した（力価2.72E+10 TVP）。

【0430】

実施例8：PiT-2を発現する細胞株のReximmune-C2媒介性GCV死滅の分析

PiT-2およびネオマイシン耐性遺伝子を含有するE-Rex発現レトロウイルスベクターを用いる標的細胞形質導入によって、PiT-2を発現する細胞株を確立した。次いで、安定な細胞株を薬物選択して（G418）、PiT-2発現細胞の純粋な集団を確立した。PiT2発現細胞へのLUC-2遺伝子の両種指向性のレトロウイルスベクター形質導入と、それに続く、生物発光分析によって、細胞株を検証した。Reximmune-C2細胞死滅分析のために、次いで、PiT2発現細胞株を48ウェルプレートにブ

レーティングした。翌日、R e x i m m u n e - C 2 レトロベクターを用いて細胞を形質導入した。形質導入後、20～40 μ M G C V の1日用量に細胞を曝露した。G C V 処理の4日後、細胞を、P r e s t o B l u e 試薬を使用して細胞生存力について分析した。この試薬は、生細胞における還元性環境の存在下では、試薬を、吸光度測定を使用して定量化される蛍光に変換する、レザズリンベースの溶液である。

【0431】

R e x i m m u n e - C 2 形質導入およびG C V 曝露後に、ヒト結腸癌株H C T - 1 5 は、不十分なH S V - T K - G C V 死滅を実証し、R K O 細胞株は、細胞死滅を実証しなかった。P i T - 2 発現H C T - 1 5 およびP K O 株を作製し、その形質導入効率を調べ、結果が以下の表に提供されている。

10

【0432】

【表11】

細胞株	EGFP+細胞(%)
PiT-2-CHO-K1	34+/-2.9
PiT-2-MIA-PaCa-2	78.6+/-2.2
PiT-2-HA-HCT-15	14.9+/-1.2
PiT-2-RKO	43.1+/-1.6

【0433】

すべてのP i T - 2 発現細胞株において、L N C E - R V E 形質導入効率の相当な増加が観察され、標的細胞がP i T 2 を発現する場合には、死滅活性が増大することを実証した。

20

【0434】

P i T - 2 を発現する細胞株を使用することで、データは、L N C E - R V E 形質導入にP i T - 2 受容体の存在が必要であることは、蛍光顕微鏡によって分析される細胞におけるE G F P 発現のレベルによって反映される（示されていないデータ）と示す。R e x i m m u n e - C 2 感染性にP i T - 2 の存在が必要であることも、G C V 細胞死滅アッセイによって示された。したがって、P i T - 2 は、R e x i m m u n e - C 2 の良好なバイオマーカーに相当する。

【0435】

P i T 2 発現が、R e x i m m u n e - C 2 媒介性G C V 細胞死滅と相関することが決定された。C H O - K 1 親株対P i T 2 発現C H O - K 1 株のH S V - T K - G C V 死滅。

30

【0436】

図25および26は、グラフ結果P i T - 2 の不在下（各図のパネルA）またはP i T - 2 の存在下（各図のパネルB）での一重または三重形質導入後の、種々の細胞株における一重または三重形質導入後のH S V - T K - G C V 死滅を提供する。

【0437】

図27は、M I A - P a C a - 2 ヒト膵臓癌腫細胞株におけるR e x i m m u n e - C 2 を用いる三重形質導入後のT K - G C V 死滅の結果を提供する。G C V 死滅は、高濃度のT V P で有効であった。

40

【0438】

図28は、P i T - 2 - M I A - P a C a - 2 細胞のR e x i m m u n e - C 2 を用いる三重形質導入後のH S V - T K - G C V 死滅の結果を提供する。R x C 2 三重形質導入されたP i T - 2 - M I A - P a C a 2 ヒト膵臓癌腫細胞株のG C V 死滅。P i T - 2 の存在は、低濃度のT V P で細胞死滅量を著しく増大した。

【0439】

図32は、G C V において4日後のR x C 2 形質導入されたC H O - K 1 細胞株のグラフを示す。

【0440】

50

図 3 3 は、G C Vにおいて4日後のR x C 2形質導入されたP i T - 2 - H A - C H O - K 1細胞株のグラフを示す。

【0 4 4 1】

最低濃度のG C Vでさえ、P i T - 2の存在が、有意に多い形質導入および細胞死滅を可能にすることは、極めて明らかである。

【0 4 4 2】

実施例 9：R e x i m m u n e C 2 三重形質導入後の形質導入効率対G C V死滅

形質導入効率およびG C V死滅を実証するために、細胞を48ウェルプレートにプレATINGした。翌日、細胞を1：40～1：5120の範囲で希釈したR e x i m m u n e - C 2を用いて形質導入する。3回の形質導入の最後ののち、細胞をG C Vの1日用量（20～40 μ M）に4日間曝露した。G C Vの最後の用量の翌日、P r e s t o b l u e 試薬を使用して、細胞生存力について細胞を分析した。この試薬は、生細胞の還元環境の存在下では、試薬を、吸光度測定を使用して定量化される蛍光に変換するレザズリンベースの溶液である。結果は、非形質転換細胞生存力に基づく死滅パーセントとして報告されている。

【0 4 4 3】

【表 1 2】

細胞株	EGFP+細胞(%)
HCC-38	59+/-2.3
A375	57.7+/-7.1
NCI-H460	25.9+/-1.7
A549	16.3+/-1.5
BxPC3	13.8+/-3.2
HCT-15	0.3+/-1.5

【0 4 4 4】

図 3 1 は、種々の癌細胞株のR e x i m m u n e - C 2 三重形質導入後のG C V死滅のパーセンテージを表すグラフである。グラフは、種々の細胞株の中でのG C V死滅の変動を実証する。細胞株は、細胞死滅パーセントに対して総ウイルス粒子/mLに変換された各希釈物にわたって同等である。表は、グラフ中に表される細胞株の形質導入効率を示す。効率パーセントは、細胞死滅と直接の相関を有さないと思われるが、効率が高いほど高い細胞死滅につながる傾向は明らかである。

【0 4 4 5】

実施例 10：突然変異体H S V - T K細胞タンパク質発現の免疫組織化学（I H C）

R e x i m m u n e C 1またはC 2プラスミドのいずれかを、293T細胞中に一時的にトランスフェクトし、組織培養スライド器具上で標準条件下でインキュベートし、2、3日後、細胞を約2%ホルマリンを用いて固定し、PBSを用いて洗浄し、0.1% t r i t o n $\times$ 100または同等の界面活性剤を用いて透過処理した。有効希釈の一次抗H S V - T K抗体（S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y）を、これらの細胞とともに4℃で終夜インキュベートする。細胞を洗浄し、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（H R P O）とコンジュゲートした二次抗一次抗体とともに周囲温度で1～2時間インキュベートする。細胞を再度洗浄し、H R P O検出染色試薬を、室温で5～30分間適用する。C C Dデジタルカメラを取り付けた光学顕微鏡を用いてI H Cイメージを得、画像解析ソフトウェアを用いて像を獲得する。注記：この実施例におけるI H Cはまた、免疫細胞化学（I C C）として記載され得る。

【0 4 4 6】

野生型ベクターは、核に局在するとわかった（野生型H S V - T Kと融合した蛍光遺伝子を用いて決定されたように）、示されていないデータ。

【0 4 4 7】

R e x C 1は、蛍光融合物では核および細胞質の間に分布する（示されていないデータ

）が、免疫組織化学では、大部分は、核である（IHC；図37、左パネル参照のこと）。

【0448】

Re x C 2は、蛍光融合物ではほぼ完全に細胞質である（示されていないデータ）が、一部は、細胞質に移動するとIHCにおいて見られる（図37、右パネルを参照のこと）。

【0449】

実施例11：改善された突然変異体

種々の突然変異の効果を、Margaret Blackによって記載されるものなどのこれまでに開示されたコンストラクトと比較した。HSV-TK変異体pETコンストラクトによるBL21 DE3 tk（-）細胞の救出が、以下の表に示されている。

【0450】

【表13】

	チミジン濃度(mg/mL)				
コンストラクト名	2	5	10	100	200
野生型	+++	+++	+++	N.D.	N.D.
SR39	+++	+++	+++	N.D.	N.D.
A167Y(SR39)	-	-	-	-	-
A167F-dmNES	-	-	+	+	+
A168H-dmNES	-	-	++	+++	+++

【0451】

以下の表は、HSV-TK変異体pETコンストラクトによるBL21 DE3 tk（-）細胞の救出後のGCV死滅を表す。

【0452】

【表14】

37℃で24時間インキュベーション後の成長									
IPTG	-	+	-	+	-	+	-	+	2xYT
GCV	-	-	2μg/ml	2μg/ml	20μg/ml	20μg/ml	50μg/ml	50μg/ml	-
pTK1	-	++	-	++	-	++	-	++	+++
pTK2	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
pTK3	-	++	-	++	-	++	-	-	+++
pTK4	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
pTK5	-	++	-	+	-	+	-	+	+++
pET24a	-	-	-	-	-	-	-	-	+++

【0453】

Key：pTK番号=HSV-TK遺伝子または変異体をコードするpET30aベースの細菌タンパク質発現ベクター；pTK1=野生型HSV-TK；pTK2=HSV-TK NESdmNLS A167Y（SR39）；pTK3=HSV-TK（SR39）（Re x immune-C1におけるような）；pTK4=HSV-TK-NESdmNLS A167F；pTK5=HSV-TK-NESdmNLS A168H（Re x immune-C2におけるような）；pET24a=陰性対照としての空の発現ベクター；GCV=ガンシクロビル（示された濃度の）、IPTG=イソプロピルβ-D-1-チオガラクトピラノシド（HSV-TKタンパク質発現のlacオペロンインデューサーとして）；2xYT=寒天プレートでの2x酵母／トリプトン細菌培地、これでは、そのように表示された列中の試験は、IPTGおよびGCVの両方を欠く。これらのHSV-TKのすべては、原核生物における発現のためにコドン最適化されており、IPTG誘導性pET30aプラスミドにおいて発現される。注記；チミジン酵素活性を有さないHS

V-TK突然変異体は、これらのTK-細菌細胞の成長を支持しない。

【0454】

実施例12：インビトロバイスタンダーアッセイ

実験を、本発明者らの実験室で実施して、種々のTK突然変異体を発現する癌細胞の発現しない細胞との混合物で、インビトロでバイスタンダー効果を実証した。A168H突然変異HSV-TK-m2遺伝子を含む、A375ヒト黒色腫およびC6ラット神経膠腫安定純粋集団細胞株を確立した。親の非HSV-TK-m2細胞の、0~100% HSV-TK-m2の範囲の対応するHSV-TK-m2細胞株との混合物を用いて癌細胞をプレーティングすることによって、バイスタンダーアッセイを実施した。続いて、癌細胞の混合物を5~20 μ M GCVに曝露し、細胞死滅が以下の表にプロットされている。結果は、バイスタンダー効果を伴わない、理論的に考えられるものを上回る、混合集団における有意な増大を明確に示す。

10

【0455】

種々の突然変異体TKおよびクローン集団を使用して、40超のバイスタンダーアッセイを実施した。データは、GCV感受性および酵素動態学測定値ならびに潜在力を有する突然変異体の製造物のウイルス力価を用いてまとめた。

【0456】

図29は、種々の突然変異体の1つのバイスタンダーインビトロアッセイから得られたグラフ結果を提供する。データは、突然変異HSV-TK A168H遺伝子が、HSV-TK 167またはMargaret Black突然変異体よりも高い細胞死滅およびバイスタンダー効果を有することを支持する。

20

【0457】

図30は、C6-Hygro-TKクローンを、20mM GCVを用いて処理したバイスタンダーインビトロアッセイから得られたグラフを提供する。データは、HSV-TK Margaret Black突然変異体は、試験されたその他の突然変異体の最低細胞死滅を有していたということをさらに支持する。

【0458】

突然変異体のすべての分析が、突然変異体TK168dmNESが、Reximmun C-2におけるTK遺伝子のリード候補であると同定した。

【0459】

実施例13：修飾されたTK分子の配列

【0460】

HSV-TKスプライシング部位除去；コドン最適化されたTK1（スプライス部位が修正された）

【0461】

30

【化 4】

ATGGCCAGCTACCCCGGCCACCAGCACGCCAGCGCCTTCGACCAGGCCGCCCGCAG
 CCGCGGCCACAGCAACGGCAGCACCGCCCTGCGCCCCCGCGCCAGCAGGAGGCCA
 CCGAGGTGCGCCCCGAGCAGAAGATGCCCCACCCTGCTGCGCGTGTACATCGACGGC
 CCCCACGGCATGGGCAAGACCACCACCACCCAGCTGCTGGTGGCCCTGGGGAGCCG
 CGACGACATCGTGTACGTGCCCGAGCCCATGACCTACTGGCGCGTGTCTGGGCGCCA
 GCGAGACCATCGCCAACATCTACACCACCCAGCACCGCCTGGACCAaGGCGAGATC
 AGCGCCGGCGACGCCGCCGTGGTGATGACCAGCGCCCGAGATCACCATGGGGCATGCC
 CTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGCCCCCACATCGGCGGGCAGGGCCGGCAGCA
 GCCACGCCCCCCCCCGCCCTGACCATCTTCCTGGACCGCCACCCCATCGCCTTCA
 TGCTGTGCTACCCCGCCGCCCGCTACCTGATGGGCAGCATGACaCCaCaGCCGTGCT
 GGCTTCGTGGCCCTGATCCCCCCCCACCCTGCCCGGCACCAACATCGTGCTGGGCGC
 CCTGCCCGAGGACCGCCACATCGACCGCCTGGCCAAGCGCCAGCGCCCCGGCGAGC
 GCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCATCCGCCGCGTGTACGGCCTGCTGGCCAAC
 ACCGTGCGCTACCTGCAGTGCGGCGGCAGCTGGCGCGAGGACTGGGGCCAGCTGAG
 CGGCACCGCCGTGCCCCCCCCAGGGCGCCGAGCCCCAGAGCAACGCCGGCCCCCGCC
 CCCACATCGGCGACACCCTGTTACCCCTGTTCCGCGCCCCCGAGCTGCTGGCCCCCA
 ACGGCGACCTGTACAACGTGTTCCGCTGGGCCCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTG
 CGCAGCATGCACGTGTTTCATCCTGGACTACGACCAGAGCCCCGCCGGCTGCCGCGA
 CGCCCTGCTGCAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAAGCCACGTGACCACCCCCGGCA
 GCATCCCCACCATCTGCGACCTGGCCCGCACCTTCGCCCGCGAGATGGGCGAGGCC
 AACTAA

10

20

【0462】

コドン最適化された、すべて推定スプライス受容部位が切除された、RE's, +Koz
 akを有するTK1、2xTK A168H(LIF・・・AHL)

30

【0463】

【化 5】

gteaGCGGGCCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCAGCTACCCCGGGCCACCAGCACGC
 CAGCGCCTTCGACCAGGCCGCCCGCAGCCGCGGCCACAGCAACGGCAGCACCGCaC
 TGCgGCCaCGgCGCCAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCGAGCAGAAGATGCCC
 ACCCTGCTGCGCGTGTACATCGACGGaCCaCACGGCATGGGCAAGACCACCACCACC
 CAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGACGACATCGTGTACGTGCCCGAGCCCAT
 GACCTACTGGCGCGTGTGGGCGCCAGCGAGACCATCGCCAACATCTACACCACCC
 AGCACCGCCTGGACCAaGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCCGTGGTGATGACC
 AGCGCCCAAGATtACaATGGGCATGCCCTACGCCGTGACCGAAGCCCGTGTGGCaCCa
 CACATCGGCGGGCAGGCCCGGCAGCAGCCACGCaCCCaCCaGCaCTGACCCCTGATC
 TTCGACCGgCACCCaATCGCaCACCTGCTGTGCTACCCgGCaGCACGCTACCTGATGG
 GCtccATGACaCCCaAaGCCGTGCTGGCCCTTCGTGGCCCTGATECCCaCCaACaCTGCCCC
 GCACCAACATCGTGTGGGCGCCCTGCCCCGAGGACCGCCACATCGACCGCCTGGCC
 AAGCGCCAGCGCCCCCGGCAGCGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCATCCGCCC
 CGTGTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGCCTACCTGCAGTGGCGGGCAGCTGGC
 GCGAGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCCaCCaCAGGGCGCCGAGCCa
 CAGAGCAACGCCGGaCCaCGaCCaCACATCGGCGACACCCTGTTACCCCTGTTCCGgG
 CaCCaGAGCTGCTGGCaCCaAACGGCGACCTGTACAACGTGTTTCGCTGGGCCCTGG
 ACGTGTGGCCAAGCGCCTGCGCtccATGCACGTGTTTCATCCTGGACTACGACCAGtca
 CCgGCCGGCTGCCGCGACGCCCTGCTGCAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCA
 CGTGACaACaCCCGGCAGCATCCCaACaATCTGCGACCTGGCCCGCACCTTCGCCCCG
 GAGATGGGCGAGGCCAACTAATAGGGATCCCTCGAGAGCTTgtea

10

20

【0464】

H S V - T K スプライシング部位除去がコドン最適化を改善する

30

【0465】

【化 6】

gtcaGCGGCCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCAGCTACCCCGGCCACCAGCACGC
 CAGCGCCTTCGACCAGGCCGCCCGCAGCCGCGGCCACAGCAACGGCAGCACCGCaC
 TGCgCCaCCgCGCCAGCAGGAGGCCACCAGAGGTGCGCCCCGAGCAGAAGATGCCC
 ACCCTGCTGCGCGTGTACATCGACGGaCCaCACGGCATGGGCAAGACCACCACCACC
 CAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGACGACATCGTGTACGTGCCCCGAGCCCAT
 GACCTACTGGCGCGTGTGGGCGCCAGCGAGACCATCGCCAACATCTACACCACCC
 AGCACCGCCTGGACCAaGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCCGTGGTGATGACC
 AGCGCCCAGATiACaATGGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGCaCCaC
 ACATCGGCGGCGAGGCCGGCAGCAGCCACGCaCCaCCaCCaGCaCTGACCCCTGATCTT
CGACCGgCACCCaATCGCaCACCTGCTGTGCTACCCgGCaGCaCGCTACCTGATGGGct
 ccATGACaCCaCaAGCCGTGCTGGCCTTCGTGGCCCTGATCCCaCCaACaCTGCCCCGGCA
 CCAACATCGTGTGGGCGCCCTGCCCCGAGGACCGCCACATCGACCGCCTGGCCAAG
 CGCCAGCGCCCCGGCGAGCGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCATCCGCCGCGT
 GTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGCCTACCTGCAGTGGCGCGGCAGCTGGGCGCG
 AGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACC'GCCGTGCCaCCaCAGGGCGCCGAGCCaCAG
 AGCAACGCCGGaCCaCCaCCaCACATCGGCGACACCCTGTTcACCCTGTTCCGgGCaCC
 aGAGCTGCTGGCaCCaAACGGCGACCTGTACAACGTGTTcGCCTGGGCCCTGGACGT
 GCTGGCCAAGCGCCTGCGCtccATGCACGTGTTcATCCTGGACTACGACCAGtcaCCgG
CCGGCTGCCGCGACGCCCTGCTGCAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGTG
 ACaACaCCCCGGCAGCATCCCaACaATCTGCGACCTGGCCCCGCACCTTCGCCCCGCGAGA
 TGGGCGAGGCCAACTAATAGGGATCCC7CG4GAAGCTTgtca

10

20

【0466】

N E S における H S V - T K N L S 除去および置換

30

【0467】

【化 7】

gtcaGCGGCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCAGCTACCCCGGCCA
 CCAGCACGCCAGCGCCTTCGACCAGGCCGCCCGCAGCCGCGGCCACAGCAACGGCA
 GCACCCGCaCTGCGgCCaCGgCGCCAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCGAGCAGA
 AGATGCCCCACCCTGCTGCGCGTGTACATCGACGGaCCaCACGGCATGGGCAAGACCA
 CCACCACCCAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGACGACATCGTGTACGTGCCC
 GAGCCCATGACCTACTGGCGCGTGTGCTGGGCGCCAGCGAGACCATCGCCAACATCTA
 CACCACCCAGCACCGCCTGGACCAaGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCCGTGG
 TGATGACCAGCGCCAGATtACaATGGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGC
 TGGCaCCaCACATCGGCGGCGAGGCCGGCAGCAGCCACGCaCCaCCaCCaGCaCTGAC
 CCTGATCTTCGACCGgCACCCaATCGCaCACCTGCTGTGCTACCCgGCaGCaCGCTACC
 TGATGGGCTccATGACaCCaCaAaGCCGTGCTGGCCCTTCGTGGCCCTGATCCCaCCaACaC
 TGCCCGGCACCAACATCGTGTGCTGGGCGCCCTGCCCCAGGACCGCCACATCGACCGC
 CTGGCCAAGCGCCAGCGCCCCGGCGAGCGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCAT
 CCGCCGCGTGTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGCCTACCTGCAGTGCGGGCGGCA
 GCTGGCGCGAGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCCaCCaCAGGGCGCC
 GAGCCaCAGAGCAACGCCGGaCCaCGaCCaCACATCGGCGACACCCCTGTTACCCCTGT
 TCCGgGCaCCaGAGCTGCTGGCaCCaAACGGCGACCTGTACAACGTGTTTCGCTGGGC
 CCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCGCTccATGCACGTGTTTCATCCTGGACTACGAC
 CAGtcaCCgGCCGGCTGCCGCGACGCCCTGCTGCAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAG
 ACCCACGTGACaACaCCCCGGCAGCATCCCaACaATCTGCGACCTGGCCCCGCACCTTCG
 CCCGCGAGATGGGCGAGGCCAACTAATAGGGATCCCTCGAGAAAGCTTgtca

10

20

【0 4 6 8】

H S V - T K N L S 除去

30

【0 4 6 9】

【化 8】

gtcaGCGGCCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCAGCTACCCCGGCCACCAGCACGC
 CAGCGCCTTCGACCAGGCCGCCCGCAGCCGCGGCCACAGCAACGGCAGCACCGCaC
 TGCgCCaGGATCTCAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCGAGCAGAAGATGCCC
 ACCCTGCTGCGCGTGTACATCGACGGaCCaCACGGCATGGGCAAGACCACCACCAC
 CAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGACGACATCGTGTACGTGCCCCGAGCCCCAT
 GACCTACTGGCGCGTGTGGGCGCCAGCGAGACCATCGCCAACATCTACACCACCC
 AGCACCGCCTGGACCAaGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCGGTGGTGATGACC
 AGCGCCCAGATtACaATGGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGCaCCaC
 ACATCGGCGGCAGGCCCGGCAGCAGCCACGCaCCaCCaCCaGCaCTGACCCTGATCTT
 CGACCgGCACCCaATCGCaCACCTGCTGTGCTACCCgGCaGCaCGCTACCTGATGGGct
 ccATGACaCCaCaAaGCCGTGCTGGCCCTTCGTGGCCCTGATCCCaCCaACaCTGCCCGGCA
 CCAACATCGTGCTGGGCGCCCTGCCCCGAGGACCGCCACATCGACCGCCTGGCCAAG
 CGCCAGCGCCCCGGCGAGCGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCATCCGCCGCGT
 GTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGCGCTACCTGCAGTGCGGGCGGCAGCTGGCGCG
 AGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCCaCCaCAGGGCGCCGAGCCaCAG
 AGCAACGCCGGaCCaCGaCCaCACATCGGCGACACCCTGTTACCCCTGTTCCGgGCaCC
 aGAGCTGCTGGCaCCaAACGGCGACCTGTACAACGTGTTTCGCCTGGGCCCTGGACGT
 GCTGGCCAAGCGCCTGCGCtccATGCACGTGTTTCATCCTGGACTACGACCAGtcaCCgG
 CCGGCTGCCCGCAGCGCCCTGCTGCAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGTG
 ACaACaCCCGGCAGCATCCCaACaATCTGCGACCTGGCCCGCACCTTCGCCCCGCGAGA
 TGGGCGAGGCCAACTAATAGGGATCCC7CGAGAAGCTTgtca

10

20

【0470】

H S V - T K カスタムコドン最適化

30

【0471】

【化 9】

gteaGCGGCCGC4CCGGTACGCGTCCACCATGGCCCTGCAGAAAAAGCTGGAAGAGC
 TGGAACTGGATGGCTCTTATCCT
 GGACATCAGCATGCTTCTGCTTTTGATCAGGCTGCCAGATCTAGAGGACATTCTAAT
 GGCAGCACAGCACTGCGGCCAGGATCTCAGCAGGAAGCTACAGAAGTGAGACCTG
 AACAGAAAATGCCTACACTGCTGAGAGTGTATATTGATGGACCACATGGAATGGGA
 AAAACAACCACAACCCAGCTGCTGGTGGCTCTCGGATCTAGAGATGATATTGTGTA
 TGTGCCTGAACCTATGACATATTGGAGAGTGCTGGGAGCTTCTGAAACAATTGCTA
 ATATCTATAACAACACAGCATAGACTGGATCAAGGAGAAATTTCTGCCGGAGATGCT
 GCCGTGGTGATGACATCTGCTCAGATTACAATGGGAATGCCTTATGCTGTGACAGAT
 GCTGTGCTGGCACCACATATTGGAGGCGAAGCTGGAAGCTCTCATGCACCACCACC
 AGCACTGACACTGATTTTTGATCGGCATCCAATTGCACATCTGCTGTGTTATCCGGC
 AGCAAGATATCTGATGGGAAGCATGACACCACAAGCCGTGCTGGCTTTTGTGGCTC
 TGATTCCACCAACACTGCCTGGAACAAACATCTGTGCTGGGAGCTCTGCCTGAAGAT
 AGACATATCGATCGGCTGGCCAAACGGCAGAGACCTGGAGAACGGCTGGATCTGGC
 CATGCTGGCTGCCATTCTGGAGAGTGTATGGCCTGCTGGCTAACACAGTGAGATATCT
 GCAGTGTGGAGGCTCTTGGAGAGAGGATTGGGGACAGCTGTCTGGCACAGCTGTGC
 CACCACAGGGAGCCGAACCACAGAGCAATGCTGGACCACGACCACATATCGGAGA
 CACACTGTTTACACTGTTTCGGGCACCAGAACTGCTGGCACCAAATGGAGACCTGT
 ACAACGTGTTTGCCTGGGCTCTGGATGTGCTGGCTAAACGGCTGAGATCTATGCATG
 TGTTTATCCTGGACTATGATCAGTCACCGGCCGGATGTGCGGATGCCCTGCTGCAGC
 TGACATCTGGGATGGTGCAGACACATGTGACAACACCTGGATCTATCCCAACAATC
 TGTGATCTGGCTAGAACATTCCCTAGGGAGATGGGAGAGGGCCAACCTAATAGGGATC
 CCTCG4GAAGCTTgtea

10

20

30

【0 4 7 2】

H S V - T K N L S 除去 N E S および付加

【0 4 7 3】

【化 1 0】

gteaGCGGCCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCCTGCAGAAAAAGCTGGAAGAGC
 TGGAAGTGGATGGCAGCTACCCCGGCCACCAGCACGCCAGCGCCTTCGACCAGGCC
 GCGCGCAGCGCGGCCACAGCAACGGCAGCACCGCaCTGCGgCCaGGATCTCAGCAG
 GAGGCCACCGAGGTGCGCCCCGAGCAGAAGATGCCCCACCCTGCTGCGCGTGTACAT
 CGACGGaCCaCACGGCATGGGCAAGACCACCACCACCCAGCTGCTGGTGGCCCTGG
 GCAGCCGCGACGACATCGTGTACGTGCCCCGAGCCCATGACCTACTGGCGCGTGTCTG
 GGCGCCAGCGAGACCATCGCCAACATCTACACCACCCAGCACCGCCTGGACCaAG
 CGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCCGTGGTGATGACCAGCGCCCAGATtACaATGGG
 CATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGCaCCaCACATCGCGGGCGAGGCCGG
 CAGCAGCCACGCaCCaCCaCCaGCaCTGACCCCTGATCTTCGACCGgCACCCaATCGCaC
 ACCTGCTGTGCTACCCgGCaGCaCGCTACCTGATGGGCtccATGACaCCaCaAGCCGTGC
 TGGCCTTCGTGGCCCTGATCCCaCCaACaCTGCCCCGGCACCAACATCGTGCTGGGCGC
 CTTGCCCGAGGACCGCCACATCGACCGCCTGGCCAAAGCGCCAGCGCCCCGGCGAGC
 GCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCATCCGCCGCGTGTACGGCCTGCTGGCCAAC
 ACCGTGCGCTACCTGCAGTGCGGGCGCAGCTGGCGCGAGGACTGGGGCCAGCTGAG
 CGGCACCGCCGTGCCaCCaCAGGGCGCCGAGCCaCAGAGCAACGCCGGaCCaCGaCCa
 CACATCGGCGACACCCCTGTTACCCCTGTTCCGgGCaCCaGAGCTGCTGGCaCCaAACG
 GCGACCTGTACAACGTGTTGCCTGGGCCCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCGCt
 ccATGCACGTGTTATCCTGGACTACGACCAGtcaCCgGCCGGCTGCCGCGACGCCCTG
 CTGCAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGTGACaACaCCCGGCAGCATCCCa
 ACaATCTGCGACCTGGCCCCGCACCTTCGCCCCGCGAGATGGGCGAGGCCAACTAATA
 GGGATCCCTCGAGAAAGCTTgtea

10

20

30

【0 4 7 4】

H S V - T K カスタムコドン最適化

【0 4 7 5】

【化 1 1】

gtcaGCGGCCGCACCGGTACCGCTCCACCATGGCCCTGCAGAAAAAGCTGGAAGAGC
 TGGAAGCTGGATGGCTCTTATCCT
 GGACATCAGCATGCTTCTGCTTTTGATCAGGCTGCCAGATCTAGAGGACATTCTAAT
 GGCAGCACAGCACTGCGGCCAGGATCTCAGCAGGAAGCTACAGAAGTGAGACCTG
 AACAGAAAAATGCCTACACTGCTGAGAGTGTATATTGATGGACCACATGGAATGGGA
 AAAACAACCACAACCCAGCTGCTGGTGGCTCTCGGATCTAGAGATGATATTGTGTA
 TGTGCCTGAACCTATGACATATTGGAGAGTGTCTGGGAGCTTCTGAAACAATTGCTA
 ATATCTATACAACACAGCATAGACTGGATCAAGGAGAAATTTCTGCCGGAGATGCT
 GCCGTGGTGATGACATCTGCTCAGATTACAATGGGAATGCCTTATGCTGTGACAGAT
 GCTGTGCTGGCACCACATATTGGAGGCGAAGCTGGAAGCTCTCATGCACCACCACC
 AGCACTGACACTGATTTTTGATCGGCATCCAATTGCACATCTGCTGTGTTATCCGGC
 AGCAAGATATCTGATGGGAAGCATGACACCACAAGCCGTGCTGGCTTTTGTGGCTC
 TGATTCCACCAACACTGCCTGGAACAAACATCGTGCTGGGAGCTCTGCCTGAAGAT
 AGACATATCGATCGGCTGGCCAAACGGCAGAGACCTGGAGAACGGCTGGATCTGGC
 CATGCTGGCTGCCATTCCGGAGAGTGTATGGCCTGCTGGCTAACACAGTGAGATATCT
 GCAGTGTGGAGGCTCTTGGAGAGAGGATTGGGGACAGCTGTCTGGCACAGCTGTGC
 CACCACAGGGAGCCGAACCACAGAGCAATGCTGGACCACGACCACATATCGGAGA
 CACACTGTTTACACTGTTTCCGGGCACCAGAACTGCTGGCACCAAATGGAGACCTGT
 ACAACGTGTTTGCCTGGGCTCTGGATGTGCTGGCTAAACGGCTGAGATCTATGCATG
 TGTTTATCCTGGACTATGATCAGTCACCGGCCCGGATGTCCGATGCCCTGCTGCAGC
 TGACATCTGGGATGGTGCAGACACATGTGACAACACCTGGATCTATCCCAACAATC
 TGTGATCTGGCTAGAACATTCGCTAGGGAGATGGGAGAGGCCAACTAATAGGGATC
 CCTCGAGAAGCTTgtca

10

20

30

【0 4 7 6】

実施例 1 4 : H A T アッセイ

R e x R e d S u p e r T K A 1 6 8 H および R e x R e d T K 1 6 7 F の
 レトロウイルスベクターを 2 9 3 T 細胞において製造し、3 T 3 (T K -) 細胞を形質導
 入するために使用した。これらの形質導入された細胞を、7 ~ 1 4 日間 H A T 選択した。
 形質転換されていない 3 T 3 (T K -) 細胞は、H A T 選択後に死滅する。R e x R e d
 S u p e r T K A 1 6 8 H を用いて形質導入されたこれらの同一細胞は、H A T 選
 択を生き延びなかったが、R e x R e d T K 1 6 7 F を用いて形質導入した 3 T 3 (T K -)
 細胞は、H A T 選択を生き延びた。これは + / - 細胞生存アッセイであり、生存
 細胞を固定し、メタノール中、1 % メチレンブルーを用いて染色する。

40

【0 4 7 7】

これまでに形質導入をベースとする H A T 細胞死滅アッセイは、R F P マーカーを含有
 するレトロウイルスベクター中の A 1 6 7 F H S V - T K 突然変異体に対してチミジンを上
 回る G C V 特異性を示す。その特異性は、1 × H A T 用量での 7 2 時間および 7 日ア
 セイで N I H 3 T 3 細胞において見られる。

【0 4 7 8】

現在の形質導入をベースとする H A T 細胞死滅アッセイは、R F P マーカーを含有する
 レトロウイルスベクター中の A 1 6 7 F H S V - T K 突然変異体に対してチミジンを上
 回る G C V 特異性を示す。その特異性は、2 × H A T 用量での 7 日アッセイで N I H 3

50

T 3 細胞において見られる。

【0479】

形質導入をベースとするH A T細胞死滅アッセイは、R F Pマーカーを含有するレトロウイルスベクター中のA 1 6 7 F H S V-T K突然変異体に対してチミジンを上回るG C V特異性を示す。その特異性は、1×H A T用量での72時間アッセイおよび7日アッセイでN I H 3 T 3細胞において見られる。

【0480】

形質導入をベースとするH A T細胞死滅アッセイは、H y g r o Rマーカーを含有するレトロウイルスベクター中のA 1 6 7 F H S V-T K突然変異体に対してチミジンを上回るG C V特異性を示す。その特異性は、1×H A T用量での72時間アッセイおよび7日アッセイでN I H 3 T 3細胞において見られる。

10

【0481】

実施例15：G C V死滅アッセイ

細胞を24ウェルディッシュに播種した。翌日、レトロウイルスベクターの6種の希釈物（1：4～4096）を用いて細胞を形質導入した。翌日、細胞に0～200μMのG C Vを添加した。G C V処理の7日後、細胞を固定し、メタノール中の1%メチレンブルーを用いて生細胞を染色した。ウイルス突然変異体の効力が高いほど、より多い細胞死滅につながる。

【0482】

これまでの形質導入をベースとするH S V-T K/G C V細胞死滅アッセイは、R F Pマーカーを含有するレトロウイルスベクター中で、A 1 6 8 F、A 1 6 7 FおよびA 1 6 8 H H S V-T K突然変異体の効力順序を示す。その順序は、高G C V用量（1mM～125mM）での72時間および7日アッセイでR g A 3 7 5細胞において試験された場合には、A 1 6 8 H>A 1 6 8 F=A 1 6 7 Fである。

20

【0483】

現在の形質導入をベースとするH S V-T K/G C V細胞死滅アッセイは、R F Pマーカーを含有するレトロウイルスベクター中で、A 1 6 7 FおよびA 1 6 8 H H S V-T K突然変異体の効力順序を示す。その順序は、高G C V用量（0.2mM～0.05mM）での7日アッセイでR g A 3 7 5細胞において試験された場合には、A 1 6 8 H>A 1 6 8 Fである。d m N L SまたはN E S用量の添加は、この順序を変更しないと思われる。J C Oの使用は、力価および凝集体H S V-T K細胞死滅活性を低下させられると思われる。

30

【0484】

形質導入をベースとするH S V-T K/G C V細胞死滅アッセイは、R F Pマーカーを含有するレトロウイルスベクター中で、A 1 6 8 F、A 1 6 7 FおよびA 1 6 8 H H S V-T K突然変異体の効力順序を示す。その順序は、高G C V用量（1mM～125mM）での72時間アッセイでA 3 7 5およびR g A 3 7 5細胞において試験された場合には、A 1 6 8 H>A 1 6 8 F=A 1 6 7 Fである。

【0485】

形質導入をベースとするH S V-T K/G C V細胞死滅アッセイは、R F Pマーカーを含有するレトロウイルスベクター中で、A 1 6 8 F、A 1 6 7 FおよびA 1 6 8 H H S V-T K突然変異体の効力順序を示す。その順序は、高G C V用量（1mM～500mM）での72時間アッセイでN I H 3 T 3細胞において試験された場合には、A 1 6 8 H>A 1 6 8 F=A 1 6 7 Fである。

40

【0486】

形質導入をベースとするH S V-T K/G C V細胞死滅アッセイは、R F Pマーカーを含有するレトロウイルスベクター中で、A 1 6 8 F、A 1 6 7 FおよびA 1 6 8 H H S V-T K突然変異体の効力順序を示す。その順序は、高G C V用量（1mM～125mM）での72時間および7日アッセイでR g A 3 7 5細胞において試験された場合には、A 1 6 8 H>A 1 6 8 F=A 1 6 7 Fである。

50

【0487】

形質導入をベースとするHSV-TK/GCV細胞死滅アッセイは、RFPまたはHygroRマーカ含有するレトロウイルスベクター中で、A168F、A167FおよびA168H HSV-TK突然変異体の効力順序を示す。その順序は、高GCV用量（1mM～125mM）での72時間アッセイでA375、RgA375またはNIH3T3細胞において試験された場合には、A168H>A168F=A167Fである。

【0488】

形質導入をベースとするHSV-TK/GCV細胞死滅アッセイは、HygroRマーカ含有するレトロウイルスベクター中で、A168F、A167FおよびA168H HSV-TK突然変異体の効力順序を示す。その順序は、高GCV用量（1mM～125mM）での72時間アッセイでA375およびRgA375細胞において試験された場合には、A168H>A168F=A167Fである。

10

【0489】

形質導入をベースとするHSV-TK/GCV細胞死滅アッセイは、HygroRマーカ含有するレトロウイルスベクター中で、A168F、A167FおよびA168H HSV-TK突然変異体の効力順序を示す。その順序は、高GCV用量（1mM～500mM）での72時間アッセイでNIH3T3細胞において試験された場合には、A168H>A168F=A167Fである。

【0490】

実施例16: Hygro耐性

20

レトロベクターHygro-HSV-TK突然変異体を用いて形質導入された細胞株を、ハイグロマイシンの存在下で選択して、Hygro-HSV-TK突然変異体含有し、ハイグロマイシン耐性遺伝子を発現する細胞の純粋な集団を製造する。

【0491】

A375 Rex immune-C2様細胞株: A375 Hygro選択されたHSV-TK dmNES A168H細胞株は、Luc (+)に変換されていた。上記の細胞株は、親株と同一のGCV死滅を有する。A375 Luc (+)のみの細胞株は、上記の細胞株と同一のLuc活性を有する。

【0492】

C6 Rex immune-C2様細胞株: C6 Hygro選択されたHSV-TK dmNES A168H細胞株は、Luc (+)に変換されていた。上記の細胞株は、親株と同一のGCV死滅を有する。C6 Luc (+)のみの細胞株は、上記の細胞株と同一のLuc活性を有する。

30

【0493】

本明細書において、好ましい実施形態が示され、記載されているが、このような実施形態は単に例として提供されるということは当業者には明らかであろう。多数の変法、変更および置換が、開示される実施形態から逸脱することなく当業者には自明であろう。実施形態の実施において、本明細書に記載される実施形態の種々の代替物が使用され得ることは理解されなくてはならない。以下の特許請求の範囲が、実施形態の範囲を規定し、これらの特許請求の範囲内の方法および構造ならびにその等価物がそれによって対象とされ

40

【0494】

【表 1 5 - 1】

略語		
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ	
ANC	絶対好中球数	
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	
AUC	血漿中濃度-時間曲線下面積	
BSA	身体表面積(m^2)	
CL	全身血漿クリアランス	
C_{max}	ピーク血漿中濃度	
CR	完全寛解	10
CRF	症例報告書	
CT	コンピュータ断層撮影	
CTC	共通毒性基準	
DLT	用量制限毒性	
EOI	注入終了	
FDA	食品医薬品局	
G-CSF	顆粒球-コロニー刺激因子(フィルグラスチム、Neupogen(登録商標))	
GCP	医薬品の臨床試験の実施の基準	
GM-CSF	顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(サルグラモスチム、Leukine(登録商標))	
HIV	ヒト免疫不全ウイルス	20
HR	危険率	
IEC	独立倫理委員会	
i.p.	腹腔内	
IRB	治験審査委員会	
IV	静脈内の、静脈内に	
LD_{10} または LD_{50}	動物の10%に致死または50%に致死である用量	
LDH	乳酸デヒドロゲナーゼ	
MAD	最大投与用量	
MRI	磁気共鳴画像法	
MTD	最大耐用量	30
NCI	米国国立癌研究所	
NE	腫瘍反応について評価可能でない	

【表 1 5 - 2】

NOAEL	観察されない有害作用レベル	
Non-CR	非完全寛解	
Non-PD	非進行性疾患	
PBMC	末梢血単核細胞	
PCE	プロピレングリコール:Cremophor(登録商標)EL:エタノール	
PD	進行性疾患	40
PR	部分反応	
SAER-S	重篤有害事象報告-研究	
SC	皮下、皮下に	
SD	安定疾患	
STD_{10}	動物の10%に重度に毒性である用量	
TTP	進行までの時間	
TTF	失敗までの時間	
$T_{1/2}$	半減期	
T_{max}	最大血漿中濃度の時間	
V_d	定常状態分布容積	50

【 0 4 9 5 】

参考文献

1. Lentivirus-based DsRed-2-transfected pancreatic cancer cells for deep in vivo imaging of metastatic disease. Yu Z, Zhou J, Hoffman RM., *Methods Mol Biol.* 2012;872:69-83. doi: 10.1007/978-1-61779-797-2_5.
2. Color-coded real-time subcellular fluorescence imaging of the interaction between cancer and host cells in live mice.Yamauchi K, Tome Y, Yamamoto N, Hayashi K, Kimura H, Tsuchiya H, Tomita K, Bouvet M, Hoffman RM.*Anticancer Res.* 2012 Jan ;32(1):39-43.
3. Lentivirus-based DsRed-2-transfected pancreatic cancer cells for deep in vivo imaging of metastatic disease.Zhou J, Yu Z, Zhao S, Hu L, Zheng J, Yang D, Bouvet M, Hoffman RM.*J Surg Res.* 2009 Nov;157(1):63-70. doi: 10.1016/j.jss.2008.08.027. Epub 2008 Oct 9. 10
4. Fluorescent LYVE-1 antibody to image dynamically lymphatic trafficking of cancer cells in vivo.McElroy M, Hayashi K, Garmy-Susini B, Kaushal S, Varner JA, Moossa AR, Hoffman RM, Bouvet M.*J Surg Res.* 2009 Jan;151(1):68-73. doi: 10.1016/j.jss.2007.12.769. Epub 2008 Jan 18.
5. Lentiviral reporter constructs for fluorescence tracking of the temporospatial pattern of Smad3 signaling.Stuelten CH, Kamaraju AK, Wakefield LM, Roberts AB. *Biotechniques.* 2007 Sep;43(3):289-90, 292, 294. 20
6. Subcellular imaging in the live mouse.Hoffman RM, Yang M.*Nat Protoc.* 2006;1(2):775-82.
7. In vivo color-coded imaging of the interaction of colon cancer cells and splenocytes in the formation of liver metastases.Bouvet M, Tsuji K, Yang M, Jiang P, Moossa AR, Hoffman RM.*Cancer Res.* 2006 Dec 1;66(23):11293-7.
8. Dual-color imaging of nuclear-cytoplasmic dynamics, viability, and proliferation of cancer cells in the portal vein area.Tsuji K, Yamauchi K, Yang M, Jiang P, Bouvet M, Endo H, Kanai Y, Yamashita K, Moossa AR, Hoffman RM.*Cancer Res.* 2006 Jan 1;66(1):303-6.
9. FL-CTL assay: fluorolysometric determination of cell-mediated cytotoxicity using green fluorescent protein and red fluorescent protein expressing target cells.Chen K, Chen L, Zhao P, Marrero L, Keoshkerian E, Ramsay A, Cui Y.*J Immunol Methods.* 2005 May;300(1-2):100-14. 30
10. Murine leukemia virus (MLV) replication monitored with fluorescent proteins. Sliva K, Erlwein O, Bittner A, Schnierle BS.*Virol J.* 2004 Dec 20;1:14.
11. Real-time whole-body imaging of an orthotopic metastatic prostate cancer model expressing red fluorescent protein.Yang M, Jiang P, Yamamoto N, Li L, Geller J, Moossa AR, Hoffman RM.*Prostate.* 2005 Mar 1;62(4):374-9.
12. Cellular dynamics visualized in live cells in vitro and in vivo by differential dual-color nuclear-cytoplasmic fluorescent-protein expression.Yamamoto N, Jiang P, Yang M, Xu M, Yamauchi K, Tsuchiya H, Tomita K, Wahl GM, Moossa AR, Hoffman RM.*Cancer Res.* 2004 Jun 15;64(12):4251-6. 40
13. In vivo imaging with fluorescent proteins: the new cell biology.Hoffman RM.*Acta Histochem.* 2004;106(2):77-87.
14. Real-time imaging of individual fluorescent-protein color-coded metastatic colonies in vivo.Yamamoto N, Yang M, Jiang P, Xu M, Tsuchiya H, Tomita K, Moossa AR, Hoffman RM.*Clin Exp Metastasis.* 2003;20(7):633-8.
15. Yaghoubi S, Barrio JR, Dahlbom M, Iyer M, Namavari M, Satyamurthy N, Goldman R, Herschman HR, Phelps ME, Gambhir SS. Human pharmacokinetic and dosimetry studies of [(18)F]FHBG: a reporter probe for imaging herpes simplex virus type-1 th 50

- ymidine kinase reporter gene expression. *J Nucl Med.* 2001 Aug;42(8):1225-34.
16. Paneda A, Collantes M, Beattie SG, Otano I, Snapper J, Timmermans E, Gueembe L, Petry H, Lanciego JL, Benito A, Prieto J, Rodriguez-Pena MS, Penuelas I, Gonzalez-Aseguinolaza G. Adeno-associated virus liver transduction efficiency measured by in vivo [^{18}F]FHBG positron emission tomography imaging in rodents and nonhuman primates. *Hum Gene Ther.* 2011 Aug;22(8):999-1009. doi: 10.1089/hum.2010.190. Epub 2011 Apr 6.
 17. Johnson M, Karanikolas BD, Priceman SJ, Powell R, Black ME, Wu HM, Czernin J, Huang SC, Wu L. Titration of variant HSV1-tk gene expression to determine the sensitivity of ^{18}F -FHBG PET imaging in a prostate tumor. *J Nucl Med.* 2009 May;50(5):757-64. doi: 10.2967/jnumed.108.058438. Epub 2009 Apr 16. 10
 18. Penuelas I, Mazzolini G, Boan JF, Sangro B, Marti-Climent J, Ruiz M, Ruiz J, Satyamurthy N, Qian C, Barrio JR, Phelps ME, Richter JA, Gambhir SS, Prieto J. Positron Emission Tomography Imaging of Adenoviral-Mediated Transgene Expression in Liver Cancer Patients *Gastro* (2005)128:1787.
 19. Sangro B, Mazzolini G, Ruiz M, Ruiz J, Quiroga J, Herrero I, Qian C, Benito A, Larrache J, Olague C, Boan J, Penuelas I, Sadaba B, Prieto J. A phase I clinical trial of thymidine kinase-based gene therapy in advanced hepatocellular carcinoma *Can. Gene Ther.* (2010) 17: 837-843.
 20. Willmann JK, Paulmurugan R, Rodriguez-Porcel M, Stein W, Brinton TJ, Connolly AJ, Nielsen CH, Lutz AM, Lyons J, Ikeno F, Suzuki Y, Rosenberg J, Chen IY, Wu JC, Yeung AC, Yock P, Robbins RC, Gambhir SS. Imaging gene expression in human mesenchymal stem cells: from small to large animals. *Radiology.* 2009 Jul;252(1):17-27. doi: 10.1148/radiol.2513081616. Epub 2009 Apr 14. PubMed PMID: 19366903; PubMed Central PMCID: PMC2702468. 20
 21. Yaghoubi SS, Jensen MC, Satyamurthy N, Budhiraja S, Paik D, Czernin J, Gambhir SS. Noninvasive detection of therapeutic cytolytic T cells with ^{18}F -FHBG PET in a patient with glioma. *Nat Clin Pract Oncol.* 2009 Jan;6(1):53-8. doi: 10.1038/ncponc1278. Epub 2008 Nov 18. PubMed PMID: 19015650; PubMed Central PMCID: PMC3526373. 30
 22. Roelants V, Labar D, de Meester C, Havaux X, Tabilio A, Gambhir SS, Di Ianni M, Bol A, Bertrand L, Vanoverschelde JL. Comparison between adenoviral and retroviral vectors for the transduction of the thymidine kinase PET reporter gene in rat mesenchymal stem cells. *J Nucl Med.* 2008 Nov;49(11):1836-44. doi: 10.2967/jnumed.108.052175. Erratum in: *J Nucl Med.* 2009 Jan;50(1):17. PubMed PMID: 18984872.
 23. Lee SW, Padmanabhan P, Ray P, Gambhir SS, Doyle T, Contag C, Goodman SB, Biswal S. Stem cell-mediated accelerated bone healing observed with in vivo molecular and small animal imaging technologies in a model of skeletal injury. *J Orthop Res.* 2009 Mar;27(3):295-302. doi: 10.1002/jor.20736. PubMed PMID: 18752273. 40
 24. Chin FT, Namavari M, Levi J, Subbarayan M, Ray P, Chen X, Gambhir SS. Semiautomated radiosynthesis and biological evaluation of [^{18}F]FEAU: a novel PET imaging agent for HSV1-tk/sr39tk reporter gene expression. *Mol Imaging Biol.* 2008 Mar-Apr;10(2):82-91. Epub 2007 Dec 22. PubMed PMID: 18157580.
 25. Yaghoubi SS, Gambhir SS. PET imaging of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSV1-tk) or mutant HSV1-sr39tk reporter gene expression in mice and humans using [^{18}F]FHBG. *Nat Protoc.* 2006;1(6):3069-75. PubMed PMID: 17406570.
 26. Deroose CM, De A, Loening AM, Chow PL, Ray P, Chatziioannou AF, Gambhir SS. Multimodality imaging of tumor xenografts and metastases in mice with combined small-animal PET, small-animal CT, and bioluminescence imaging. *J Nucl Med.* 2007 50

- Feb;48(2):295-303. PubMed PMID: 17268028; PubMed Central PMCID: PMC3263830.
27. Kim SJ, Doudet DJ, Studenov AR, Nian C, Ruth TJ, Gambhir SS, McIntosh CH. Quantitative micro positron emission tomography (PET) imaging for the in vivo determination of pancreatic islet graft survival. *Nat Med.* 2006 Dec;12(12):1423-8. Epub 2006 Dec 3. PubMed PMID: 17143277.
 28. Yaghoubi SS, Couto MA, Chen CC, Polavaram L, Cui G, Sen L, Gambhir SS. Preclinical safety evaluation of ^{18}F -FHBG: a PET reporter probe for imaging herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSV1-tk) or mutant HSV1-sr39tk's expression. *J Nucl Med.* 2006 Apr;47(4):706-15. PubMed PMID: 16595506.
 29. Xiong Z, Cheng Z, Zhang X, Patel M, Wu JC, Gambhir SS, Chen X. Imaging chemically modified adenovirus for targeting tumors expressing integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ in living mice with mutant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase PET reporter gene. *J Nucl Med.* 2006 Jan;47(1):130-9. PubMed PMID: 16391197. 10
 30. Shu CJ, Guo S, Kim YJ, Shelly SM, Nijagal A, Ray P, Gambhir SS, Radu CG, Witte ON. Visualization of a primary anti-tumor immune response by positron emission tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 29;102(48):17412-7. Epub 2005 Nov 17. PubMed PMID: 16293690; PubMed Central PMCID: PMC1283986.
 31. Sen L, Gambhir SS, Furukawa H, Stout DB, Linh Lam A, Laks H, Cui G. Noninvasive imaging of ex vivo intracoronarily delivered nonviral therapeutic transgene expression in heart. *Mol Ther.* 2005 Jul;12(1):49-57. PubMed PMID: 15963920. 20
 32. Yaghoubi SS, Barrio JR, Namavari M, Satyamurthy N, Phelps ME, Herschman HR, Gambhir SS. Imaging progress of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase suicide gene therapy in living subjects with positron emission tomography. *Cancer Gene Ther.* 2005 Mar;12(3):329-39. PubMed PMID: 15592447.
 33. Miyagawa M, Anton M, Haubner R, Simoes MV, Stadele C, Erhardt W, Reder S, Lehner T, Wagner B, Noll S, Noll B, Grote M, Gambhir SS, Gansbacher B, Schwaiger M, Bengel FM. PET of cardiac transgene expression: comparison of 2 approaches based on herpesviral thymidine kinase reporter gene. *J Nucl Med.* 2004 Nov;45(11):1917-23. PubMed PMID: 15534063.
 34. Green LA, Nguyen K, Berenji B, Iyer M, Bauer E, Barrio JR, Namavari M, Satyamurthy N, Gambhir SS. A tracer kinetic model for ^{18}F -FHBG for quantitating herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene expression in living animals using PET. *J Nucl Med.* 2004 Sep;45(9):1560-70. PubMed PMID: 15347725. 30
 35. Wu JC, Chen IY, Wang Y, Tseng JR, Chhabra A, Salek M, Min JJ, Fishbein MC, Crystal R, Gambhir SS. Molecular imaging of the kinetics of vascular endothelial growth factor gene expression in ischemic myocardium. *Circulation.* 2004 Aug 10;110(6):685-91. PubMed PMID: 15302807.
 36. Su H, Forbes A, Gambhir SS, Braun J. Quantitation of cell number by a positron emission tomography reporter gene strategy. *Mol Imaging Biol.* 2004 May-Jun;6(3):139-48. PubMed PMID: 15193248. 40
 37. Chen IY, Wu JC, Min JJ, Sundaresan G, Lewis X, Liang Q, Herschman HR, Gambhir SS. Micro-positron emission tomography imaging of cardiac gene expression in rats using bicistronic adenoviral vector-mediated gene delivery. *Circulation.* 2004 Mar 23;109(11):1415-20. Epub 2004 Mar 8. PubMed PMID: 15007006.
 38. Sundaresan G, Paulmurugan R, Berger F, Stiles B, Nagayama Y, Wu H, Gambhir SS. MicroPET imaging of Cre-loxP-mediated conditional activation of a herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene. *Gene Ther.* 2004 Apr;11(7):609-18. PubMed PMID: 14724687.
 39. Green LA, Yap CS, Nguyen K, Barrio JR, Namavari M, Satyamurthy N, Phelps ME, Sandgren EP, Herschman HR, Gambhir SS. Indirect monitoring of endogenous gene e 50

- xpression by positron emission tomography (PET) imaging of reporter gene expression in transgenic mice. *Mol Imaging Biol.* 2002 Jan;4(1):71-81. PubMed PMID: 14538050.
40. Miller, A. and Wolgamot, G. Murine retroviruses use at least six different receptors for entry into Mus dunni cells. *J. Virol.* 1997 June; 9:4531-35.
41. Chaudry G.J., et al. Gibbon ape leukemia virus receptor functions of Type II I phosphate transporters from CHOK1 cells are disrupted by two mechanisms. *J. Virol.* 1999 Apr.; 73:2916-20.
42. Xu and Eiden. Primate gammaretroviruses require an ancillary factor not required for murine gammaretroviruses to infect BHK cells. *J. Virol.* 2011 April; 85: 10 3498-506.
43. Zeijl et al. A human amphotrophic retrovirus receptor is a second member of the gibbon ape leukemia virus receptor family. *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 1994 Feb.; 91:1168-72.
44. Feldman et al. Identification of an extracellular domain within the Human PiT-2 receptor that is required for amphotrophic murine leukemia virus binding. *J. Virol.* 2004 Jan; 78:595-602.
45. MacDonald et al. Effect of changes in the expression of the amphotrophic retroviral receptor PiT-2 on transduction efficiency and viral titer: Implications for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 2000 March; 11:587-95. 20
46. Farrell et al. New structural arrangement of the extracellular regions of the phosphate transporter SLC20A1, the receptor for gibbon ape leukemia virus. *J. Biol. Chem.* 2009 Oct.; 284:29979-987.
47. Farrell et al. Fusion defective gibbon ape leukemia virus vectors can be rescued by homologous but not heterologous soluble envelope proteins. *J. Virol.* 2002 May; 76:4267-74.
48. Orlic et al. The level of mRNA encoding the amphotrophic retrovirus receptor in mouse and human hematopoietic stem cells is low and correlates with the efficiency of retrovirus transduction. *Proc. Nat'l Acad. Sci* 1996 Oct; 93:1109 7-102. 30
49. Naviaux et al. pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J. Virol.* 1996 Aug; 70:5701-5.
50. Fuchita et al. Bacterial cytosine deaminase mutants created by molecular engineering show improved 5-fluorocytosine-mediated cell killing in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2009 Jun; 69:4791-9.
51. Stolworthy et al. Yeast cytosine deaminase mutants with increased thermostability impart sensitivity to 5-fluorocytosine. *J. Mol. Biol.* 2008 Mar; 377:854-69.
52. Grabarczyk et al. Expression of PiT-1 and PiT-2 retroviral receptors and transduction efficiency of tumor cells. *Acta Biochim. Pol.* 2002; 49:333-9. 40
53. Miller and Rosman. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* 1989 Oct; 7:980-2; 984-6; 989-90.
54. Chalmers et al. Elimination of the truncated message from the herpes simplex virus thymidine kinase suicide gene. *Mol. Ther.* 4:146-8 (2001).

【 0 4 9 6 】

配列

【 0 4 9 7 】

配列番号1: 野生型HSV1-TKヌクレオチド配列

[illegible]

10

【 0 4 9 8 】

【化 1 3】

配列番号2:野生型HSV1-TKアミノ酸配列

MASYPGHQHASAFDQAARSRGHSNRRTALRPRRQQEATEVRPEQKMPTLLRVYIDGPHGMGKTTTTQLLVALGSRDD
IVY
VPEPMTYWVRLGASETIANIYTTQHRLDQGEISAGDAAVVMTSAQITMGMPYAVTDAVLAPHIGGEAGSSHAPPPAL
TLI
FDRHPIAALLCYPAARYLMGSMTPQAVLAFVALIPPTLPGTNIVLGALPEDRHIDRLAKRQRPGERLDLAMLAAIRR
VYG
LLANTVRYLQCGGSWREDWGQLSGTAVPPQGAEPQSNAGPRPHIGDTLFTLFRAPELLAPNGDLYNVFAWALDVLAK
RLR
SMHVFILDYDQSPAGCRDALLQLTSGMVQTHVTTPGSIPTICDLARTFAREMGEAN

20

【 0 4 9 9 】

【化 1 4】

配列番号3: Reximmune-C HSV-TK中のHSV-TK;NLSのSR39突然変異体およびR25G-R26S突然変異

30

atggcctcgtagcccgccatcaacacgcgtctgcggttcgaccaggctgcgcggttctcgcgccatagca
acggatccacggcggttgccgctcgccggcagcaaaagccacggaagtccgcccggagcagaaaatgcc
cacgctactgcgggtttatatagacggtccccacgggatgggaaaaccaccaccacgcaactgctggtg
gccctgggttcgcgcgacgatatcgtctacgtacccgagccgatgacttactggcgggtgctgggggctt
ccgagacaatcggaacatctacaccacacaacacgcctcgaccagggtgagatatcggcgggggacgc
ggcgggtggtaatgacaagcgcccagataacaatgggcatgccttatgccgtgaccgacgcggttctggct
cctcatatcgggggggaggctgggagctcacatgccccgcccccgccctcaccatcttctctgaccgcc
atcccatcgcttcatgctgtgctacccggcgcgcggtaccttatgggcagcatgacccccaggccgt
gctggcggttctgaggccctcatcccgccgaccttgcccggcaccaacatcgtgcttggggcccttccggag
gacagacacatcgaccgcctggcctaaacgcacgcgccggcgagcggctggacctggtatgctggctg
cgattcgccgcggtttacgggctacttgccaatacgggtgcggtatctgcagtgcggcggggtcgtggcgga
ggactggggacagctttcggggacggcggtgcgcgccagggtgccgagcccagagcaacgcggggcca
cgaccccatatcggggacagcttattaccctgtttcgggcccccgagttgctggcccccaacggcgacc
tgtataacgtgtttgcctgggccttgagcgtcttgccaaacgcctccgttccatgacgtctttatcct
ggattacgaaccaatcgcccgccggtgcgggacgcctgctgcaacttacctccgggatggtccagacc
cacgtcaccacccccggctccataaccgacgatatgcgacctggcgcgcacggttgcccgggagatggggg
aggctaactga

40

【 0 5 0 0 】

【化 1 5】

配列番号4(配列番号3によってコードされるアミノ酸配列)

MASYPGHQHASAFDQAARSRGHSNGSTALRPRRQQEATEVRPEQKMPTLLRVYIDGPHGMGKTTTTQLLV
 ALGSRDDIVYVPEPMTYWRVLGASETIANIYTTQHRLDQGEISAGDAAVVMTSAQITMGMPYAVTDAVLA
 PHIGGEAGSSHAPPPALTIFLDRHPIAFMLCYPAARYLMGSMT PQAVLAFVALIPPTLPGTNIVLGALPE
 DRHIDRLAKRQRPGERLDLAMLAAIRRVYGLLANTVRYLQCGGSWREDWGQLSGTAVPPQGAEPQSNAGP
 RPHIGDTLFTLFRAPELLAPNGDLYNVFAWALDVLAKRLRSMHVFILDYDQSPAGCRDALLQLTSGMVQT
 HVTTPGSIPTICDLARTFAREMGAN

【0 5 0 1】

10

【化 1 6】

配列番号5:突然変異するためのHSV-TK部位が太字であり、下線が引かれている
 (HSV-TK核局在性配列、RRおよび基質結合ドメイン、LIFおよびAAL

atggcctcgtaaccccgccatcaacacgcgtctgcgttcgaccaggctgcgcgttctcgc 60
 M A S Y P G H Q H A S A F D Q A A R S R
 ggccatagcaac**cgacgt**acggcgttgccct**cgccgg**cagcaagaagccacggaagtc 120
 G H S N **R R** T A L R P **R R** Q Q E A T E V
 cgcgcggagcagaaaatgccacgcctactgcgggtttatatagacggtcccccacgggatg 180
 R P E Q K M P T L L R V Y I D G P H G M
 gggaaaaccaccaccacgcaactgctgggtggccctgggttcgcgcgacgatatcgtctac 240
 G K T T T T Q L L V A L G S R D D I V Y
 gtacccgagccgatgacttactggcgggtgctgggggttcgcgagacaatcgcaacatc 300
 V P E P M T Y W R V L G A S E T I A N I
 tacaccacacaacccgcctcgaccagggtgagatatcgccgggggacgcggcggtggtta 360
 Y T T Q H R L D Q G E I S A G D A A V V
 atgacaagcgcgcagataacaatgggcacgtccttatgccgtgaccgacgcggttctggct 420
 M T S A Q I T M G M P Y A V T D A V L A
 cctcatatcgggggggaggetgggagctcacatgccccgccccggcctcacc**ctcacc** 480
 P H I G G E A G S S H A P P P A L T **L I**
ttcgaccgcatcccatcgccgcctcctgtgctacccggcgcgcggtaccttatgggc 540
F D R H P I **A A L** L C Y P A A R Y L M G
 agcatgacccccagggcgtgctggcgttcgtggccctcatcccgccgaccttgcccggc 600
 S M T P Q A V L A F V A L I P P T L P G
 accaaccatcgtgcttggggcccttcgcggaggacacacatcgaccgcctggccaaacgc 660
 T N I V L G A L P E D R H I D R L A K R
 cagcgccccggcgagcggttgacctggctatgctggctgcgattcgccgcgtttacggg 720
 Q R P G E R L D L A M L A A I R R V Y G
 ctacttgccaatacgggtgcggtatctgcagtgcggcggttcgtggcgaggactgggga 780
 L L A N T V R Y L Q C G G S W R E D W G
 cagctttcggggacggcggtgcgcgccccagggtgccgagccccagagcaacgcggggcca 840
 Q L S G T A V P P Q G A E P Q S N A G P
 cgaccccatatcggggacacgttatccctgtttcgggcccccgagttgctggccccc 900
 R P H I G D T L F T L F R A P E L L A P
 aacggcgacctgtataacgtgtttgcctgggccttgacgtcttgccaaacgcctccgt 960
 N G D L Y N V F A W A L D V L A K R L R
 tccatgcacgtctttatccctggattacgaccaatcgcccgccggtgcggggacgccttg 1020
 S M H V F I L D Y D Q S P A G C R D A L
 ctgcaacttacctccgggatggtccagacccacgtcaccacccccgggtccataccgacg 1080
 L Q L T S G M V Q T H V T T P G S I P T
 atatgcgacctggcgcgacgtttgcccgggagatgggggaggctaactga
 I C D L A R T F A R E M G E A N *

20

30

40

【0 5 0 2】

【化 1 7】

配列番号6および7: Sac I-Kpn I (SR39) 突然変異体領域

GAGCTCACATGCCCCGCCCCGGCCCTCACCATCTTCCTCGACCGCCATCCCATCGCC-
 CTCGAGTGTACGGGGCGGGGGCCGGGAGTGGTAGAAGGAGCTGGCGGTAGGGTAGCGG-
 Sac I

-TTCATGCTGTGCTACCCGGCCGCGCGGTACC (配列番号6)

-AAGTACGACACGATGGGCGGCGCGCCATGG (配列番号7)

Kpn I

10

【0 5 0 3】

【表 1 6】

Kpn I	GGTACC	G		G		T		A		C	/	C	GTAC - 3'
		C	/	C		A		T		G		G	

【0 5 0 4】

【表 1 7】

<u>Sac I</u>	GAGCTC	G		A		G		C		T	/	C	AGCT - 3'
		C	/	T		C		G		A		G	

20

【0 5 0 5】

【化 1 8】

配列番号8および9: Sac I-Kpn I (SR39) 突然変異体領域 (切断)

CACATGCCCCGCCCCGGCCCTCACCATCTTCCTCGACCGCCATCCCATCGCCTTCATG
 TCGAGTGTACGGGGCGGGGGCCGGGAGTGGTAGAAGGAGCTGGCGGTAGGGTAGCGGAA
 Sac I (切断)

CTGTGCTACCCGGCCGCGCGGTAC (配列番号8)

GTACGACACGATGGGCGGC (配列番号9)

Kpn I (切断)

30

【0 5 0 6】

【表 1 8】

Kpn I	GGTACC	G		G		T		A		C	/	C	GTAC - 3'
		C	/	C		A		T		G		G	

【0 5 0 7】

【化 1 9】

配列番号10および11: プライマー

SR39sackpn F1

5' CACATGCCCCGCCCCGGCCCTCACCATCTTCCTCGACCGCCATCCCATCGCCTTCATGCTGTGCTAC
 CCGGCCGCGCGGTAC 3' (配列番号10)

SR39sackpn R1

5' CGCGCGGCCGGGTAGCACAGCATGAAGGCGATGGGATGGCGGTGAGGGAAGATGGTGAGGGCCGGGG
 CGGGGCATGTGAGCT 3' (配列番号11)

40

【0 5 0 8】

【化 2 0】

配列番号12遺伝子番号3 mHSV-TK CO A168H(LIF... AHL):長さ:1185
GTCAGCGGCCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCAGCTACCCCGGCCACCAGCACGCCAGCGC
CTTCGACCAGGCCGCCCCGAGCCGCGGCCACAGCAACGGCAGCACCGCACTGCGGCCACGGCGC
CAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCGAGCAGAAGATGCCCACCCTGCTGCGCGTGTACATCG
ACGGACCACACGGCATGGGCAAGACCACCACCACCCAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGA
CGACATCGTGTACGTGCCCGAGCCCATGACCTACTGGCGCGTGTCTGGGCGCCAGCGAGACCATC
GCCAACATCTACACCACCCAGCACCGCCTGGACCAAGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCCG
TGGTGATGACCAGCGCCCAGATTACAATGGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGC
ACCACACATCGGCGGCGAGGCCGGCAGCAGCCACGCACCACCACCAGCACTGACCCTGATCTTC
GACCGGCACCCAATCGCACACCTGCTGTGCTACCCGGCAGCACGCTACCTGATGGGCTCCATGA
CACCACAAGCCGTGCTGGCCTTCGTGGCCCTGATCCCACCAACACTGCCCGGCACCAACATCGT
GCTGGGCGCCCTGCCCGAGGACCGCCACATCGACCGCCTGGCCAAGCGCCAGCGCCCCGGCGAG
CGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCATCCGCCGCGTGTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGC
GCTACCTGCAGTGGCGCGCAGCTGGCGCGAGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCC
ACCACAGGGCGCCGAGCCACAGAGCAACGCCGGACCACGACCACACATCGGCGACACCCTGTTC
ACCCTGTTCCGGGCACCAAGAGCTGCTGGCACCAACGGCGACCTGTACAACGTGTTTCGCTGGG
CCCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCGCTCCATGCACGTGTTTCATCCTGGACTACGACCAGTC
ACCGGCCGGCTGCCGCGACGCCCTGCTGCAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGTGACA
ACACCCGGCAGCATCCCAACAATCTGCGACCTGGCCCGCACCTTCGCCCGCGAGATGGGCGAGG
CCAACATAATAGGGATCCCTCGAGAAGCTTGTCAT

10

20

【0 5 0 9】

【化 2 1】

配列番号13遺伝子番号4 mHSV-TK CO TK A167F(LIF... FAL):長さ:
1185

GTCAGCGGCCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCAGCTACCCCGGCCACCAGCACGCCAGCGC
CTTCGACCAGGCCGCCCCGAGCCGCGGCCACAGCAACGGCAGCACCGCACTGCGGCCACGGCGC
CAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCGAGCAGAAGATGCCCACCCTGCTGCGCGTGTACATCG
ACGGACCACACGGCATGGGCAAGACCACCACCACCCAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGA
CGACATCGTGTACGTGCCCGAGCCCATGACCTACTGGCGCGTGTCTGGGCGCCAGCGAGACCATC
GCCAACATCTACACCACCCAGCACCGCCTGGACCAAGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCCG
TGGTGATGACCAGCGCCCAGATTACAATGGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGC
ACCACACATCGGCGGCGAGGCCGGCAGCAGCCACGCACCACCACCAGCACTGACCCTGATCTTC
GACCGGCACCCAATCTTCGCACTGCTGTGCTACCCGGCAGCACGCTACCTGATGGGCTCCATGA
CACCACAAGCCGTGCTGGCCTTCGTGGCCCTGATCCCACCAACACTGCCCGGCACCAACATCGT
GCTGGGCGCCCTGCCCGAGGACCGCCACATCGACCGCCTGGCCAAGCGCCAGCGCCCCGGCGAG
CGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCATCCGCCGCGTGTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGC
GCTACCTGCAGTGGCGCGCAGCTGGCGCGAGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCC
ACCACAGGGCGCCGAGCCACAGAGCAACGCCGGACCACGACCACACATCGGCGACACCCTGTTC
ACCCTGTTCCGGGCACCAAGAGCTGCTGGCACCAACGGCGACCTGTACAACGTGTTTCGCTGGG
CCCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCGCTCCATGCACGTGTTTCATCCTGGACTACGACCAGTC
ACCGGCCGGCTGCCGCGACGCCCTGCTGCAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGTGACA
ACACCCGGCAGCATCCCAACAATCTGCGACCTGGCCCGCACCTTCGCCCGCGAGATGGGCGAGG
CCAACATAATAGGGATCCCTCGAGAAGCTTGTCAT

30

40

【0 5 1 0】

【化 2 2】

配列番号14遺伝子番号5 mHSV-TK CO二重突然変異体A167F-A168H
(LIF...FHL):長さ:1185

GTCAGCGGCGCCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCAGCTACCCCGGCCACCAGCACGCCAGCGC
CTTCGACCAGGCGCGCCGCGAGCCGCGGCCACAGCAACGGCAGCACCGCACTGCGGCCACGGCGC
CAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCGAGCAGAAGATGCCACCCCTGCTGCGCGTGTACATCG
ACGGACCACACGGCATGGGCAAGACCACCACCCAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGA
CGACATCGTGTACGTGCCCGAGCCCATGACCTACTGGCGCGTGC'TGGGCGCCAGCGAGACCA'FC
GCCAACATCTACACCACCCAGCACCGCCTGGACCAAGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCCG
TGGTGATGACCAGCGCCCAGATTACAATGGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGC
ACCACACATCGGCGGGCAGGCGCGCAGCAGCCACGCACCACCAGCACTGACCCTGATCTTC
GACCGGCACCCAATCTTCCACCTGCTGTGCTACCCGGCAGCAUGCTACCTGATGGGGCTCCATGA
CACCACAAGCCGTGCTGGCCCTTCGTGGCCCTGATCCCACCAACACTGCCCGGCACCAACATCGT
GCTGGGCGCCCTGCCCGAGGACCGCCACATCGACCGCCTGGCCAAGCGCCAGCGCCCCGGCGAG
CGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCATCCGCCGCGTGTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGC
GCTACCTGCAGTGGCGCGCAGCTGGCGCGAGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCC
ACCACAGGGCGCCGAGCCACAGAGCAACGCCGGACCACGACCACACATCGGCGACACCCTGTTC
ACCCCTGTTCCGGGCACCAGAGCTGCTGGCACCAACGGCGACCTGTACAACGTGTTCCGCTGGG
CCCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCGCTCCATGCACGTGTTTCATCCTGGACTACGACCACTC
ACCGGCCGGCTGCCCGCAGCGCCCTGCTGCAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGTGACA
ACACCCGGCAGCATCCCAACAATCTGCGACCTGGCCCCGCACCTTCGCCCCGCGAGATGGGCGAGG
CCAACTAATAGGGATCCCTCGAGAAGCTTGTCA

10

20

【0 5 1 1】

【化 2 3】

配列番号15遺伝子番号6 mHSV-TK CO MB-IFL A168H(IFL...AHL):
長さ:1185

GTCAGCGGCGCCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCAGCTACCCCGGCCACCAGCACGCCAGCGC
CTTCGACCAGGCGCGCCGCGAGCCGCGGCCACAGCAACGGCAGCACCGCACTGCGGCCACGGCGC
CAGCAGGAGGCCACCSAGGTGCGCCCCGAGCAGAAGATGCCACCCCTGCTGCGCGTGTACATCG
ACGGACCACACGGCATGGGCAAGACCACCACCCAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGA
CGACATCGTGTACGTGCCCGAGCCCATGACCTACTGGCGCGTGTGCTGGGCGCCAGCGAGACCATC
GCCAACATCTACACCACCCAGCACCGCCTGGACCAAGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCCG
TGGTGATGACCAGCGCCCAGATTACAATGGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGC
ACCACACATCGGCGGGCAGGCGCGCAGCAGCCACGCACCACCACCAGCACTGACCATCTTCCTG
GACCGGCACCCAATCGCACACCTGCTGTGCTACCCGGCAGCACGCTACCTGATGGGGCTCCATGA
CACCACAAGCCGTGCTGGCCCTTCGTGGCCCTGATCCCACCAACACTGCCCGGCACCAACATCGT
GCTGGGCGCCCTGCCCGAGGACCGCCACATCGACCGCCTGGCCAAGCGCCAGCGCCCCGGCGAG
CGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCATCCGCCGCGTGTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGC
GCTACCTGCAGTGGCGCGCAGCTGGCGCGAGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCC
ACCACAGGGCGCCGAGCCACAGAGCAACGCCGGACCACGACCACACATCGGCGACACCCTGTTC
ACCCCTGTTCCGGGCACCAGAGCTGCTGGCACCAACGGCGACCTGTACAACGTGTTCCGCTGGG
CCCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCGCTCCATGCACGTGTTTCATCCTGGACTACGACCACTC
ACCGGCCGGCTGCCCGCAGCGCCCTGCTGCAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGTGACA
ACACCCGGCAGCATCCCAACAATCTGCGACCTGGCCCCGCACCTTCGCCCCGCGAGATGGGCGAGG
CCAACTAATAGGGATCCCTCGAGAAGCTTGTCA

30

40

【0 5 1 2】

【化 2 4】

配列番号16遺伝子番号1 HSV-TK A168H dmNLS CO SC:長さ:1185

GTCAGCGGCGCCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCAGCTACCCCGGCCACCAGCAGCCAGCGC
 CTTCGACCAGGCGCGCCGAGCCGCGGCCACAGCAACGGCAGCACCGCACTGCGGCCAGGATCT
 CAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCGAGCAGAAGATGCCACCCCTGCTGCGCGTGTACATCG
 ACGGACCACACGGCATGGGCAAGACCACCACCACCCAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGA
 CGACATCGTGTACGTGCCCCGAGCCCATGACCTACTGGCGCGTGTCTGGGCGCCAGCGAGACCATC
 GCCAACATCTACACCACCCAGCACCGCCTGGACCAAGGCGAGATCAGCCCCGGCGACGCCGCCG
 TGGTGATGACCAGCGCCAGATTACAATGGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGC
 ACCACACATCGGCGGCGAGGCCGSCAGCAGCCACGCACCACCACCAGCACTGACCCTGATCTTC
 GACCGGCACCCAATCGCACACCTGCTGTGCTACCCSGCAGCACGCTACCTGATGGGCTCCATGA
 CACCACAAGCCGIGCTGGCCCTTCGTGGCCCTGATCCACCAACACTGCCCGGCACCAACATCGT
 GCTGGCGCGCCCTGCCCGAGGACCGCCACATCGACCCGCTGCCCAAGCGCCAGCGCCCCGGCGAG
 CGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCATCCGCCGCGTGTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGC
 GCTACCTGCAGTGCGGCGGCAGCTGGCGCGAGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCC
 ACCACAGGGCGCCGAGCCACAGAGCAACGCCGGACCACGACCACACATCGGCGACACCCTGTTC
 ACCCTGTTCCGGGCACCAGAGCTGCTGGCACCAAAACGGCGACCTGTACAACGTGTTCCGCTGGG
 CCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCGCTCCATGCACGTGTTTCATCCTGGACTACGACCAGTC
 ACCGGCCGGCTGCCGCGACGCCCTGCTGCAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGTGACA
 ACACCCGGCAGCATCCCAACAATCTGCGACCTGGCCCGCACCTTCGCCCGCGAGATGGGCGAGG
 CCAACTAATAGGGATCCCTCGAGAAGCTTGTCA

10

20

【0 5 1 3】

【化 2 5】

配列番号17遺伝子番号2 HSV-TK A167F dmNLS CO SC:長さ:1185

GTCAGCGGCGCCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCAGCTACCCCGGCCACCAGCAGCCAGCGC
 CTTCGACCAGGCGCGCCGAGCCGCGGCCACAGCAACGGCAGCACCGCACTGCGGCCAGGATCT
 CAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCGAGCAGAAGATGCCACCCCTGCTGCGCGTGTACATCG
 ACGGACCACACGGCATGGGCAAGACCACCACCACCAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGA
 CGACATCGTGTACGTGCCCCGAGCCCATGACCTACTGGCGCGTGTCTGGGCGCCAGCGAGACCATC
 GCCAACATCTACACCACCCAGCACCGCCTGGACCAAGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCCG
 TGGTGATGACCAGCGCCAGATTACAATGGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGC
 ACCACACATCGGCGGCGAGGCCGSCAGCAGCCACGCACCACCACCAGCACTGACCCTGATCTTC
 GACCGGCACCCAATCTTCGCACTGCTGTGCTACCCGGCAGCACGCTACCTGATGGGCTCCATGA
 CACCACAAGCCGTGCTGGCCCTTCGTGGCCCTGATCCACCAACACTGCCCGGCACCAACATCGT
 GCTGGGCGCCCTGCCCGAGGACCGCCACATCGACCGCCTGGCCAAGCGCCAGCGCCCCGGCGAG
 CGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCATCCGCCGCGTGTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGC
 GCTACCTGCAGTGCGGCGGCAGCTGGGCGGAGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCC
 ACCACAGGGCGCCGAGCCACAGAGCAACGCCGGACCACGACCACACATCGGCGACACCCTGTTC
 ACCCTGTTCCGGGCACCAGAGCTGCTGGCACCAAAACGGCGACCTGTACAACGTGTTCCGCTGGG
 CCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCGCTCCATGCACGTGTTTCATCCTGGACTACGACCAGTC
 ACCGGCCGGCTGCCGCGACGCCCTGCTGCAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGTGACA
 ACACCCGGCAGCATCCCAACAATCTGCGACCTGGCCCGCACCTTCGCCCGCGAGATGGGCGAGG
 CCAACTAATAGGGATCCCTCGAGAAGCTTGTCA

30

40

【0 5 1 4】

【化 2 6】

配列番号18遺伝子番号3 HSV-TK A168H NESdmNLS CO SC:長さ:

1221

GTCAGCGGCCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCCTGCAGAAAAAGCTGGAAGAGCTGGAAC
 GGATGGCAGCTACCCCGGCCACCAGCACGCCAGCGCTTCGACCAGGCCGCCCGCAGCCGCGGC
 CACAGCAACGGCAGCACCGCACTGCGGCCAGGATCTCAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCG
 AGCAGAAGATGCCCCACCTGCTGCGCGTGTACATCGACGGACCACACGGCATGGGCAAGACCAC
 CACCACCCAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGACGACATCGTGTACGTGCCCGAGCCCATG
 ACCTACTGGCGCGTGTGGGCGCCAGCGAGACCATCGCCAACATCTACACCACCCAGCACCGCC
 TGGACCAAGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCCGTGGTGATGACCAGCGCCAGATTACAAT
 GGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGCACCACACATCGGCGGCGAGGCCGGCAGC
 AGCCACGCACCAACCACCAGCACTGACCCCTGATCTTCGACCGGCACCCAATCGCACACCTGCTGT
 GCTACCCGGCAGCACGCTACCTGATGGGCTCCATGACACCACAAGCCGTGCTGGCCTTCGTGGC
 CCTGATCCCAACCAACTGCCCCGGCACCAACATCGTGTGTTGGCGCCCTGCCCGAGGACCGCCAC
 ATCGACCCGCTGGCCAAGCGCCAGCGCCCCCGCGAGCGCCTGGACCTGCCCATGCTGGCCGCCA
 TCCGCGCGCTGTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGCGCTACCTGCAGTGCGGCGGCAGCTGGCG
 CGAGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCCACCACAGGGCGCCGAGCCACAGAGCAAC
 GCCGGACCACGACCACACATCGGCGACACCCCTGTTACCCCTGTTCCGGGCACCAGAGCTGCTGG
 CACCAAACGGCGACCTGTACAACGTGTTCCGCTGGGCCCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCG
 CTCCATGCACCTGTTTCATCCTGCACTACGACCAGTCAACCGCCGCGCTGCCGCGACCCCTCTCT
 CAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGTGACAACACCCGGCAGCATCCCAACAATCTGCG
 ACCTGGCCCCGACCTTCGCCCCGCGAGATGGGCGAGGCCAACTAATAGGGATCCCTCGAGAAGCT
 TGTCA

10

20

【0 5 1 5】

【化 2 7】

配列番号19遺伝子番号4 HSV-TK A167F NESdmNLS CO SC:長さ:

1221

GTCAGCGGCCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCCCTGCAGAAAAAGCTGGAAGAGCTGGAAC
 GGATGGCAGCTACCCCGGCCACCAGCACGCCAGCGCTTCGACCAGGCCGCCCGCAGCCGCGGC
 CACAGCAACGGCAGCACCGCACTGCGGCCAGGATCTCAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCG
 AGCAGAAGATGCCCCACCTGCTGCGCGTGTACATCGACGGACCACACGGCATGGGCAAGACCAC
 CACCACCCAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGACGACATCGTGTACGTGCCCGAGCCCATG
 ACCTACTGGCGCGTGTGGGCGCCAGCGAGACCATCGCCAACATCTACACCACCCAGCACCGCC
 TGGACCAAGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCCGTGGTGATGACCAGCGCCAGATTACAAT
 GGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGCACCACACATCGGCGGCGAGGCCGGCAGC
 AGCCACGCACCAACCACCAGCACTGACCCCTGATCTTCGACCGGCACCCAATCTTCGCACTGCTGT
 GCTACCCGGCAGCACGCTACCTGATGGGCTCCATGACACCACAAGCCGTGCTGGCCTTCGTGGC
 CCTGATCCCAACCAACTGCCCCGGCACCAACATCGTGTGTTGGCGCCCTGCCCGAGGACCGCCAC
 ATCGACCGCCTGGCCAAGCGCCAGCGCCCCGGCGAGCGCCTGGACCTGGCCATGCTGGCCGCCA
 TCCGCGCGCTGTACGGCCTGCTGGCCAACACCGTGCGCTACCTGCAGTGCGGCGGCAGCTGGCG
 CGAGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCCACCACAGGGCGCCGAGCCACAGAGCAAC
 GCCGGACCACGACCACACATCGGCGACACCCCTGTTACCCCTGTTCCGGGCACCAGAGCTGCTGG
 CACCAAACGGCGACCTGTACAACGTGTTCCGCTGGGCCCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCG
 CTCCATGCACGTGTTTCATCCTGCACTACGACCAGTCAACCGCCGCGCTGCCGCGACGCCCTGCTG
 CAGCTGACCAGCGGCATGGTGCAGACCCACGTGACAACACCCGGCAGCATCCCAACAATCTGCG
 ACCTGGCCCCGACCTTCGCCCCGCGAGATGGGCGAGGCCAACTAATAGGGATCCCTCGAGAAGCT
 TGTCA

30

40

【0 5 1 6】

【化 2 8】

配列番号20遺伝子番号5 HSV-TK A168H NESdmNLS JCO SC:長さ:
1221

GTCAGCGGCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCTCTGCAGAAAAAGCTGGAAGAGCTGGAAC
GGATGGCTCTTATCCTGGACATCAGCATGCTTCTGCTTTTGATCAGGCTGCCAGATCTAGAGGA
CATTCTAATGGCAGCACAGCACTGCGGCCAGGATCTCAGCAGGAAGCTACAGAAGTGAGACCTG
AACAGAAAAATGCCTACACTGCTGAGAGTGTATATTGATGGACCACATGGAATGGGAAAAACAAC
CACAACCCAGCTGCTGGTGGCTCTCGGATCTAGAGATGATATTTGTGTATGTGCCTGAACCTATG
ACATATTGGAGAGTGTGGGAGCTTCTGAAACAATTGCTAATATCTATAACAACACAGCATAGAC
TGGATCAAGGAGAAAATTTCTGCCGAGATGCTGCCGTGGTGATGACATCTGCTCAGATTACAAT
GGGAATGCCTTATGCTGTGACAGATGCTGTGCTGGCACCACATATTGGAGGCGAAGCTGGAAGC
TCTCATGCACCAACCAGCACTGACACTGATTTTTTGATCGGCATCCAATTGCACATCTGCTCT
GTTATCCGGCAGCAAGATATCTGAIGGGAAGCAIGACACCACAAGCCGTGCTGGCTTTTGTGGC
TCTGATTCCACCAACACTGCCTGSAACAAACATCGTGCTGGGAGCTCTGCCTGAAGATAGACAT
ATCGATCGGCTGGCCAAACGGCAGAGACCTGGAGAACGGCTGGATCTGGCCATGCTGGCTGCCA
TTCGGAGAGTGTATGGCCTGCTGGCTAACACAGTGAGATATCTGCAGTGTGGAGGCTCTTGGAG
AGAGGATTGGGGACAGCTGTCTGGCACAGCTGTGCCACCACAGGGAGCCGAACCACAGAGCAAT
GCTGGACCACGACCACATATCGGAGACACACTGTTTACACTGTTTCGGGCACCAGAAGCTGCTGG
CACCAAATGGAGACCTGTACAACGTTGTTTGCCTGGGCTCTGGATGTGCTGGCTAAACGGCTGAG
ATCTATGCATGTGTTTATCCTGGACTATGATCAGTCACCGGCCGGATGTGCGGATGCCCTGCTG
CAGCTGACATCTGGGATGGTGCAGACACATGTGACAACACCTGGATCTATCCCAACAATCTGTG
ATCTGGCTAGAACATTCGCTAGGGAGATGGGAGAGGCCAACTAATGAGGATCCCTCGAGAAGCT
TGTCAT

10

20

【0 5 1 7】

【化 2 9】

配列番号21遺伝子番号6 HSV-TK A167F NESdmNLS JCO SC:長さ:
1221

GTCAGCGGCGCACCGGTACGCGTCCACCATGGCTCTGCAGAAAAAGCTGGAAGAGCTGGAAC
GGATGGCTCTTATCCTGGACATCAGCATGCTTCTGCTTTTGATCAGGCTGCCAGATCTAGAGGA
CATTCTAATGGCAGCACAGCACTGCGGCCAGGATCTCAGCAGGAAGCTACAGAAGTGAGACCTG
AACAGAAAAATGCCTACACTGCTGAGAGTGTATATTGATGGACCACATGGAATGGGAAAAACAAC
CACAACCCAGCTGCTGGTGGCTCTCGGATCTAGAGATGATATTGTGTATGTGCCTGAACCTATG
ACATATTGGAGAGTGTGGGAGCTTCTGAAACAATTGCTAATATCTATAACAACACAGCATAGAC
TGGATCAAGCAGAAAATTTCTGCCGAGATGCTGCCGTGGTGATGACATCTGCTCAGATTACAAT
GGGAATGCCTTATGCTGTGACAGATGCTGTGCTGGCACCACATATTGGAGGCGAAGCTGGAAGC
TCTCATGCACCAACCAGCACTGACACIGATTTTTTGATCGGCATCCAATTTTCGCACCTGCTGT
GTTATCCGGCAGCAAGATATCTGATGGGAAGCATGACACCACAAGCCGTGCTGGCTTTTGTGGC
TCTGATTCCACCAACACTGCCTGGAACAAACATCGTGCTGGGAGCTCTGCCTGAAGATAGACAT
ATCGATCGGCTGGCCAAACGGCAGAGACCTGGAGAACGGCTGGATCTGGCCATGCTGGCTGCCA
TTCGGAGAGTGTATGGCCTGCTGGCTAACACAGTGAGATATCTGCAGTGTGGAGGCTCTTGGAG
AGAGGATTGGGGACAGCTGTCTGGCACAGCTGTGCCACCACAGGGAGCCGAACCACAGAGCAAT
GCTGGACCACGACCACATATCGGAGACACACTGTTTACACTGTTTCGGGCACCAGAAGCTGCTGG
CACCAAATGGAGACCTGTACAACGTTCTTGCCTGGGCTCTGGATGTGCTGGCTAAACGGCTGAG
ATCTATGCATGTGTTTATCCTGGACTATGATCAGTCACCGGCCGGATGTGCGGATGCCCTGCTG
CAGCTGACATCTGGGATGGTGCAGACACATGTGACAACACCTGGATCTATCCCAACAATCTGTG
ATCTGGCTAGAACATTCGCTAGGGAGATGGGAGAGGCCAACTAATGAGGATCCCTCGAGAAGCT
TGTCAT

30

40

【0 5 1 8】

配列番号 2 2

H S V - T K d m N L S A 1 6 8 H、C O & S C

50

d m N L S = 二重突然変異した核局在性配列

C O = コドン最適化

S C = 3 2 7 および 5 5 5 でスプライス修正された

K o z a k 配列、下線が引かれている

【 0 5 1 9 】

【 化 3 0 】

gtcaGCGGCCGCACCGGTACGGTCCACCATGGCCAGCTACCCCGGCCACCAGCACGCCAGCGC
CTTCGACCAGGCCGCCCGCAGCCGCCGCCACAGCAACGGCAGCACCGCaCTGCCgCCaGGATCT
CAGCAGGAGGCCACCGAGGTGCGCCCCGAGCAGAAGATGCCACCCTGCTGCGCGTGTACATCG
ACGGaCCaCAGGCATGGGCAAGACCACCACCACCCAGCTGCTGGTGGCCCTGGGCAGCCGCGA
CGACATCGTGTACGTGCCCCGAGCCCATGACCTACTGGCGCGTGTGGGGCGCCAGCGAGACCATC
GCCAACATCTACACCACCCAGCACCGCCTGGACCAaGGCGAGATCAGCGCCGGCGACGCCGCCG
TGGTGTATGACCAGCGCCAGATtACaATGGGCATGCCCTACGCCGTGACCGACGCCGTGCTGGC
aCCaCACATCGGCGGCGAGGCCGGCAGCAGCCACGCaCCaCCaCCaGCaCTGACCCTGATCTTC
GACCGgCACCCaATCGCaCACCTGCTGTGCTACCCgGCaGCaCGCTACCTGATGGGctccATGA
CaCCaCAaGCCGTGCTGGCCTTCGTGGCCCTGATCCCaCCaACaCTGCCCGGCACCAACATCGT
GCTGGGCGCCCTGCCCGAGGACCGCCACATCGACCGCCTGGCCAAAGCGCCAGCGCCCCGGCGAG
CGCCTGGAACCTGGCCATGCTGGCCGCCATCCGCCCGGTGTACGGCCTGCTGGCCAAACCCGTGC
GCTACCTGCACTGCGGCGGCAGCTGGCGCGAGGACTGGGGCCAGCTGAGCGGCACCGCCGTGCC
aCCaCAGGGCGCCGAGCCaCAGAGCAACGCCGGaCCaCGaCCaCACATCGGCGACACCCTGTTC
ACCCTGTTCCGgGCaCCaGAGCTGCTGGCaCCaAACGGCGACCTGTACAACGTGTTGCTTGGG
CCCTGGACGTGCTGGCCAAGCGCCTGCGctccATGCACGTGTTATCCTGGACTACGACCAGtc
aCCgGCCCGCTGCCCGACGCCCTGCTGCAGCTGACCAGCGCATGGTGCAGACCCACGTGACa
ACaCCCGGCAGCATCCCaACaATCTGCGACCTGGCCCGCACCTTCGCCCGCGAGATGGGCGAGG
CCAACtaATAGGGATCCCTCGAGAAGCTTgtca

10

20

【 0 5 2 0 】

【 化 3 1 】

配列番号23-MAPキナーゼキナーゼ核外輸送ポリヌクレオチド配列

CTGCAGAAAAAGCTGGAAGAGCTGGAACCTGGATGGC

30

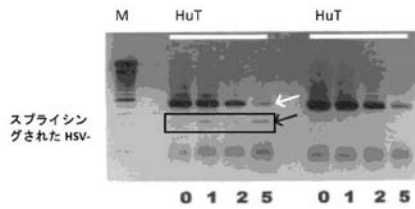
【 0 5 2 1 】

【 化 3 2 】

配列番号24MAPキナーゼキナーゼ核外輸送ポリペプチド配列

LQKKLEELELDG

【 図 1 】

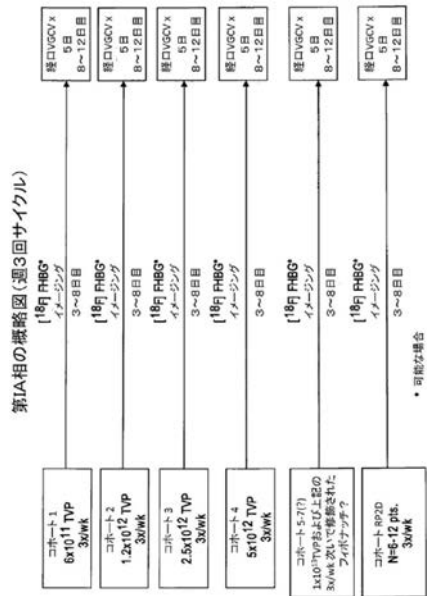


Mol Ther. 2001 Aug;4(2):146-8.

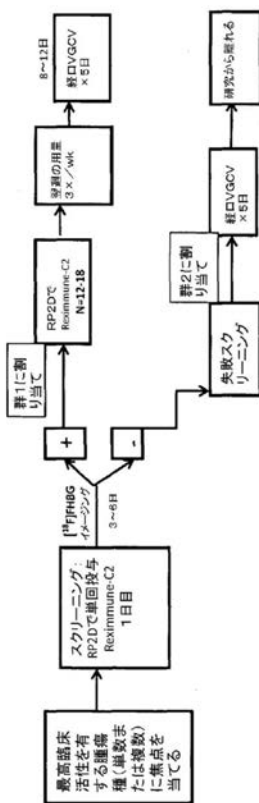
単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ自殺遺伝子からの切断型メッセージの排除

Chalmers D(1), Ferrand C, Apperley JF, Melo JV, Ebeling S, Newton I, Duperrier A, Hagenbeck A, Garrett E, Tiberghien P, Garin M.

【図 2】



【 図 3 】



【図 4】

図4									
車載のスケジュール画面 I/A 用ポート 1~3(通3回サイクル)									
研究	研究 関与	イメージ 4台目の 1日目 (1回)	イメージ 4台目の 4日目 (4回)	イメージ 4台目の 5日目 (5回)	通2	各サイ クル先 行つ て (通3回)	4回 目	研究が 合致	研究 アプ ロー グ
車長とインシ ードコメント	X								
前席	X								
ICU	X								
PE、車庫	X					X	X	X	
居住計画	X					X	X	X	X ¹⁾
ビルドアップ (I/O, I/O)	X	X ¹⁾		X			X	X	
(ICU、I/O)、急小 断	X					X ¹⁾	X ¹⁾	X	
FEET	X					X	X ¹⁾	X	
最適化 ²⁾	X					X	X ¹⁾	X	
車庫	X					X	X	X	
車庫									
Reinforcement ²⁾ 使 用	X ¹⁾			X ¹⁾					
前席 PC サンプリ ング	X ¹⁾			X ¹⁾					
後 PC サンプリ ング									
研究車サンプリ ング	X ¹⁾			X ¹⁾					
図4 続き									
車載のスケジュール画面 I/A 用ポート 1~3(通3回サイクル)									
経路決定 ³⁾	X						X	X	X
FEET/ICU/PE サンプリ ング	X								
エンジンロギ ング	X								

【図 5】

[illegible]

【図 6】

図 6 事象のスケジュール(第18相(第3回サイクル))									
研究	研究前	過ごと	各サイ クルに先 立って	投薬 1日目	3日目	5日目	イメー ジ	6週 後	研究が 終わる 時
署名したインフォームド コンセント	X								
試験	X								
ELG	X								
PEI、体重	X	X	X					X	
毒性評価 ¹	X	X	X				X ²		
バイタルサイン(HR, temp)	X	X	X ³	X ³	X ³			X	
CBC, DdP、血小板 ¹	X	X ⁴	X ⁴					X	
PT/PTT	X	X	X ⁴					X	
血液化学 ⁵	X	X	X ⁴					X	
尿検査	X	X	X					X	
前投薬									
Resimune-C2(Resimune- C)				X ¹⁰	X ¹⁰	X ¹⁰			
血液PKサンプリング				X ¹¹	X ¹¹				
研究血液サンプル				X ¹²	X ¹²				
経緯測定 ¹⁴	X						X		X
FD/PET スキャン							X		
ランシタロビタ8~12日目									

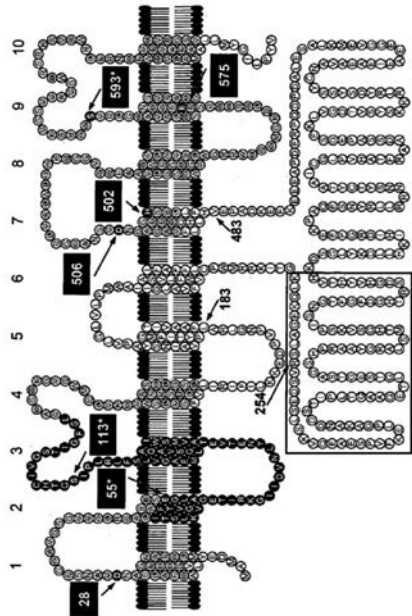
【図 7】

図 7 事象のスケジュール(スケジュール(A))									
研究	研究前	過ごと	各サイ クルに先 立って	投薬日 1日目	2日目	6週後	研究が 終わる 時	研究が 終わる 時	研究が 終わる 時
署名したインフォームド コンセント	X								
試験	X								
ELG	X								
PEI、体重	X	X	X				X		
毒性評価 ¹	X	X	X				X	X ⁴	
神経学的評価 ²	X	X	X				X		
バイタルサイン(HR, temp)	X			X ³			X		
CBC、DdP、血小板 ¹	X	X ⁴	X ⁴				X		
PT/PTT	X	X	X ⁴				X		
血液化学 ⁵	X	X	X ⁴				X		
尿検査	X	X	X				X		
前投薬									
Epo-D 投与				X ¹⁰					
血液PKサンプリング				X ¹¹			X ¹²		
研究PKサンプリング				X ¹¹	X ¹²				
研究血液サンプル				X ¹²					
経緯測定 ¹⁴	X						X		X

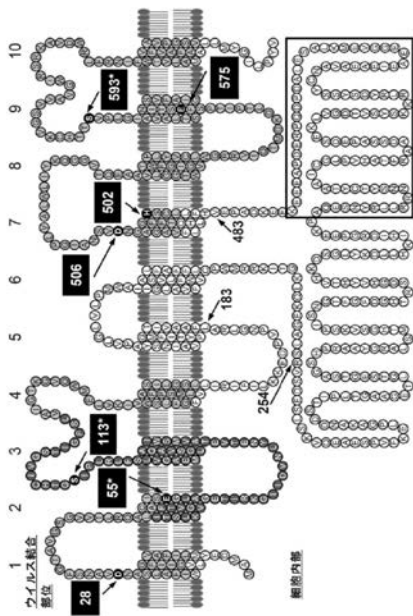
【図 8】

図 8 事象のスケジュール(スケジュール(B))									
研究	研究前	過ごと	各サイ クルに先 立って	投薬日 1日目	2日目	3日目	4日目	6週後	研究が 終わる 時
署名したインフォームド コンセント	X								
試験	X								
ELG	X								
PEI、体重	X	X	X					X	
毒性評価 ¹	X	X	X					X ⁴	
神経学的評価 ²	X	X	X ³	X ³	X ³			X	
バイタルサイン(HR, temp)	X	X	X ³	X ³	X ³			X	
CBC、DdP、血小板 ¹	X	X ⁴	X ⁴					X	
PT/PTT	X	X ⁴	X ⁴					X	
血液化学 ⁵	X	X ⁴	X ⁴					X	
尿検査	X	X	X					X	
前投薬									
Epo-D 投与				X ¹⁰	X ¹⁰	X ¹⁰			
血液PKサンプリング				X ¹¹	X ¹¹	X ¹¹			
研究血液サンプル				X ¹²	X ¹²	X ¹²			
経緯測定 ¹⁴	X							X	X

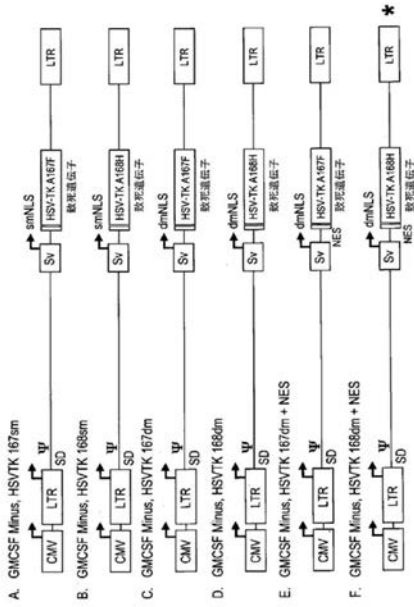
【図 9】



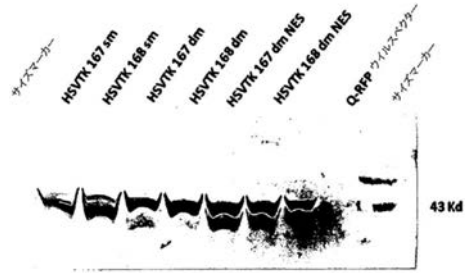
【図 10】



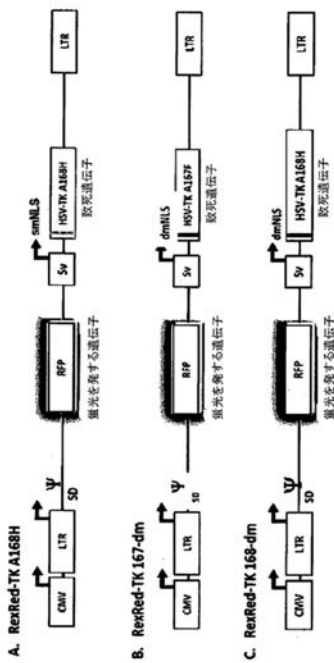
【图 1-1】



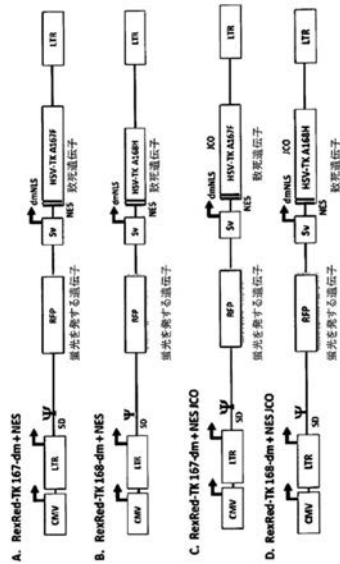
【 図 1 2 】



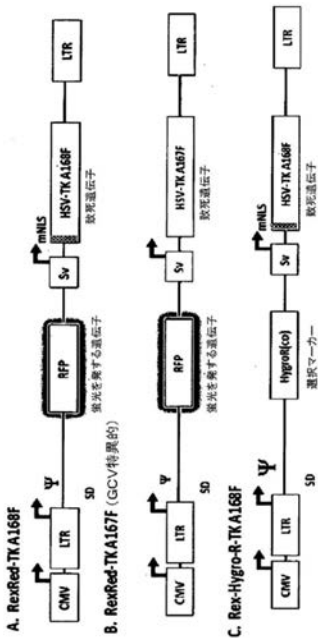
【 例 1 3 】



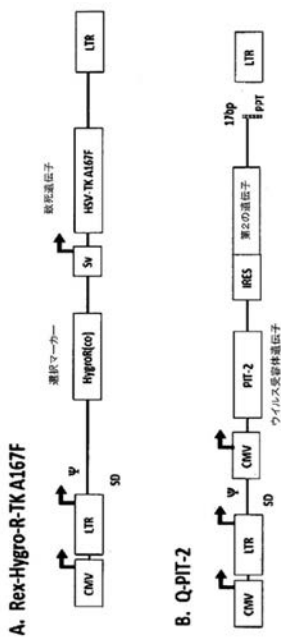
【 図 1 4 】



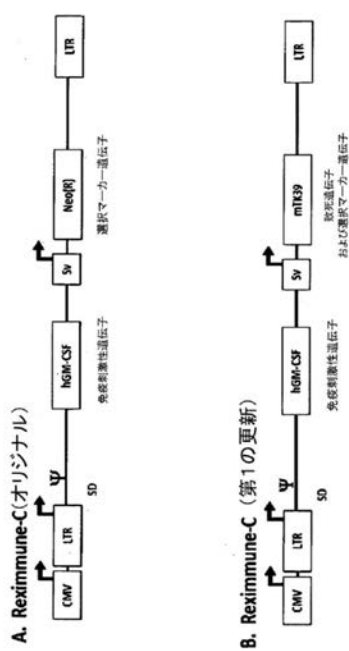
【図 15】



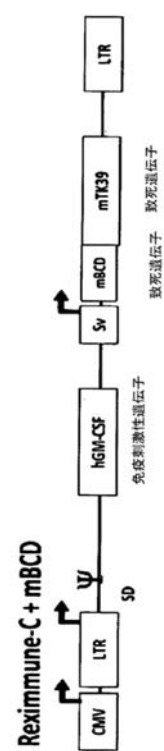
【図 16】



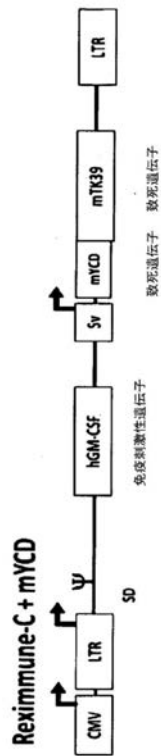
【図 17】



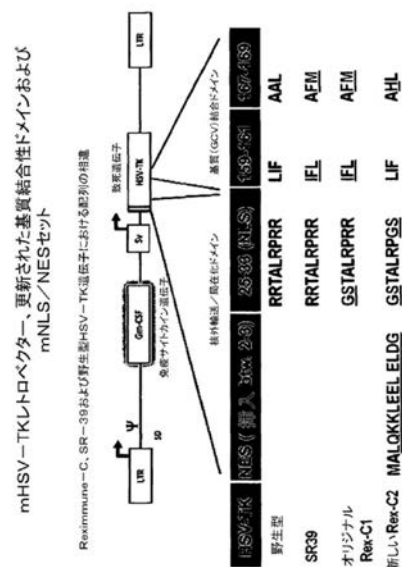
【図 18】



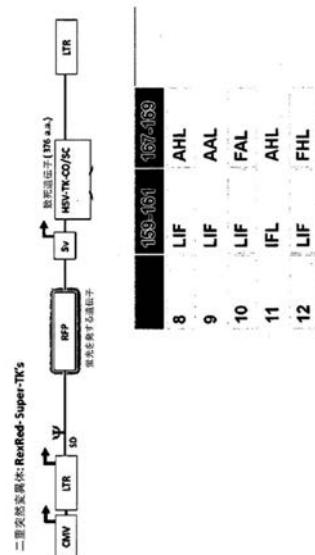
【図 19】



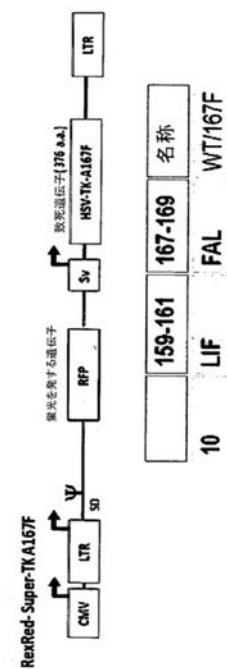
【図 21】



【図 20】

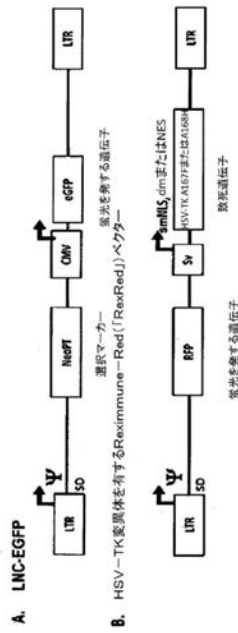


【図 22】



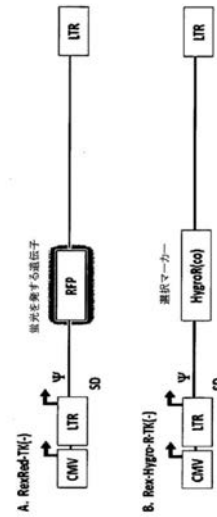
【図 23】

LNCE A375形質導入細胞のReximmune-Cマルチカラークローン



【図 24】

レトロベクター、REPまたはHygroのみ (HSV-TK-) セット



【図 25】

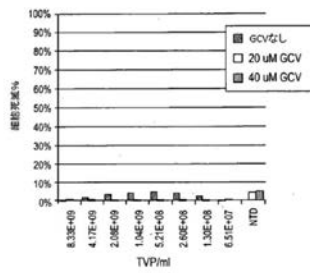


FIG. 25A

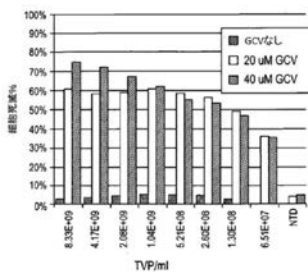


FIG. 25B

【図 26】

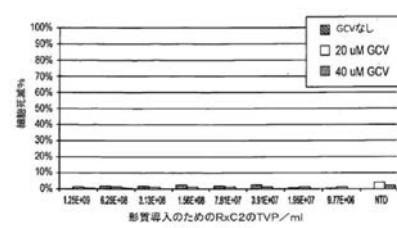


FIG. 26A

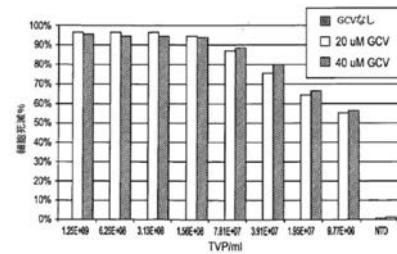
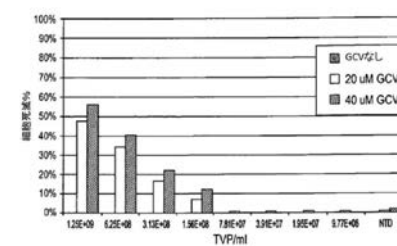
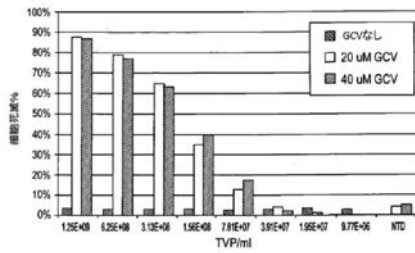


FIG. 26B

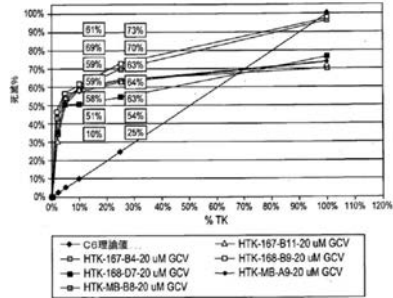
【図 27】



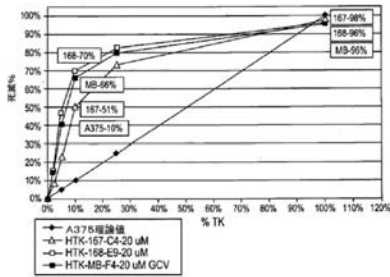
【图 28】



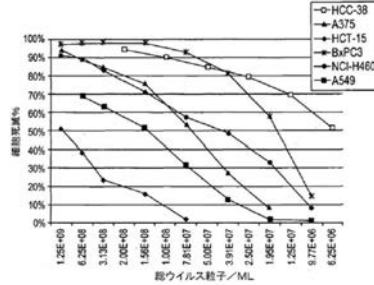
【 図 3 0 】



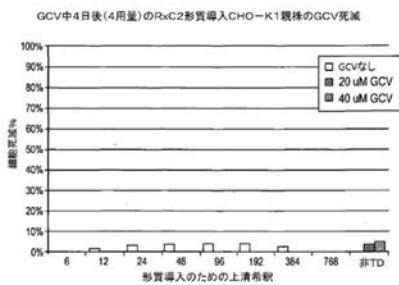
【图 29】



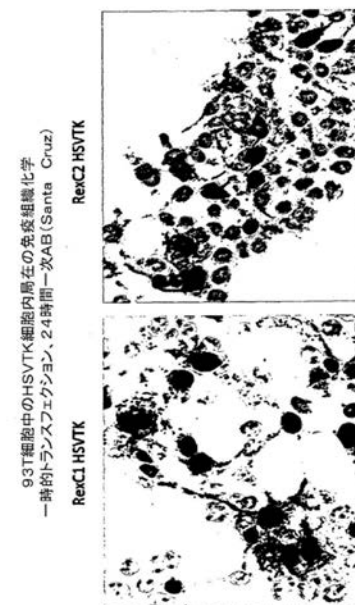
【図 3 1】



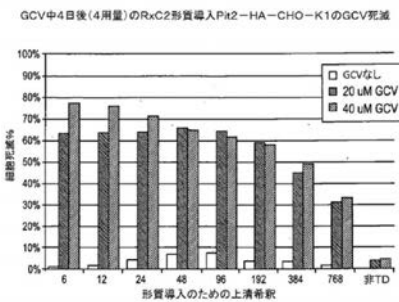
【図 3 2】



【图 3 4】



【图 3 3】



【配列表】

2020156501000001.app

【手続補正書】

【提出日】 令和2年7月15日 (2020.7.15)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許請求の範囲

【補正対象項目名】 全文

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ（HSV-TK）の突然変異した形態をコードするポリヌクレオチド配列であって、コードされるHSV-TKが、アミノ酸残基25、26、32、33、167、168またはそれらの組合せで突然変異しており、ポリヌクレオチド配列が、配列番号3のポリヌクレオチド配列と比較して突然変異している、ポリヌクレオチド配列。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N	15/27	(2006.01)	C 1 2 N	15/27
C 1 2 N	15/26	(2006.01)	C 1 2 N	15/26
C 1 2 N	15/52	(2006.01)	C 1 2 N	15/52 Z
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62 Z
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K	31/522	(2006.01)	A 6 1 K	31/522
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 0 5
C 1 2 N	9/12	(2006.01)	C 1 2 N	9/12
A 6 1 K	38/22	(2006.01)	A 6 1 K	38/22
A 6 1 K	38/43	(2006.01)	A 6 1 K	38/43
A 6 1 K	38/44	(2006.01)	A 6 1 K	38/44
A 6 1 K	38/20	(2006.01)	A 6 1 K	38/20
A 6 1 K	38/47	(2006.01)	A 6 1 K	38/47
A 6 1 K	38/46	(2006.01)	A 6 1 K	38/46

- (72)発明者 ジョン・ピー・レビ
アメリカ合衆国 9 2 5 3 2 カリフォルニア州レイク・エルシノア、プラザ・バレンザ 1 9 番
- (72)発明者 レベッカ・エイ・リード
アメリカ合衆国 9 1 4 2 3 カリフォルニア州シャーマン・オークス、ベントウラ・キャニオン・ア
ベニュー 4 7 5 1 番
- (72)発明者 ジョセフ・マクナルティ
アメリカ合衆国 9 1 1 0 3 カリフォルニア州パサデナ、イースト・モンタナ・ストリート 3 6 番
- (72)発明者 ロバート・ジー・ジョンソン・ジュニア
アメリカ合衆国 9 4 5 4 9 カリフォルニア州ラファイエット、ハッピー・バレー・ロード 3 6 5 6
番

F ターム(参考) 4B050 CC04 CC05 DD01 EE10 LL01 LL03
4C084 AA13 AA19 DA19 DB53 DB54 DB56 DB57 DB61 DC23 DC26
MA66 NA14 ZB211 ZB212 ZB261 ZB262
4C086 AA01 AA02 CB07 MA02 MA04 NA05 ZB21 ZB26
4C087 AA01 AA02 BC83 CA08 CA12 MA66 NA14 ZB21 ZB26

【外国語明細書】
2020156501000001.pdf