

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-511212

(P2007-511212A)

(43) 公表日 平成19年5月10日(2007.5.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 C O 8 4
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 C O 8 6
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	4 C O 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 99 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-538818 (P2006-538818)	(71) 出願人	501488619
(86) (22) 出願日	平成16年11月15日 (2004.11.15)		ホルム, ペル・ゾンネ
(85) 翻訳文提出日	平成18年7月14日 (2006.7.14)		H O L M, P e r S o n n e
(86) 国際出願番号	PCT/EP2004/012931		ドイツ国、8 2 2 5 6 フェルステンフェ
(87) 国際公開番号	W02005/052143		ルトブルック、マイゼンシュトラーセ 2
(87) 国際公開日	平成17年6月9日 (2005.6.9)		7
(31) 優先権主張番号	10353152.1	(74) 代理人	100078662
(32) 優先日	平成15年11月14日 (2003.11.14)		弁理士 津国 肇
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100075225
(31) 優先権主張番号	102004018117.9		弁理士 篠田 文雄
(32) 優先日	平成16年4月14日 (2004.4.14)	(72) 発明者	ホルム, ペル・ゾンネ
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		ドイツ国、8 2 2 5 6 フェルステンフェ
			ルトブルック、マイゼンシュトラーセ 2
			7
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規アデノウイルス、それをコードする核酸及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、E 1 A タンパク質を含む群から選択される、第 2 のタンパク質を発現する前に E 1 B タンパク質および E 4 タンパク質を含む群から選択される、第 1 のタンパク質を発現する、アデノウイルスに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

E 1 A タンパク質を含む群から選択される第 2 のタンパク質に先立って、E 1 B タンパク質および E 4 タンパク質を含む群から選択される第 1 のタンパク質を発現するアデノウイルス。

【請求項 2】

第 1 のタンパク質が E 1 B タンパク質、好ましくは E 1 B 5 5 k d タンパク質であることを特徴とする、請求項 1 に記載のアデノウイルス。

【請求項 3】

第 1 のタンパク質が E 4 タンパク質、好ましくは E 4 o r f 6 タンパク質であることを特徴とする、請求項 1 に記載のアデノウイルス。 10

【請求項 4】

第 1 のタンパク質が、E 1 B タンパク質と E 4 タンパク質の組み合わせ、好ましくは E 1 B 5 5 k D タンパク質と E 4 o r f 6 タンパク質の組み合わせであることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 5】

E 1 A タンパク質が E 1 A 1 2 S タンパク質であることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 6】

アデノウイルスが、E 1 B タンパク質、E 4 タンパク質及び E 1 A タンパク質を含む群から選択されるタンパク質をコードする少なくとも 1 つの核酸を含み、その際、少なくとも 1 つのタンパク質が、野生型アデノウイルスにおけるタンパク質の発現を制御するプロモーターとは異なるプロモーターの制御下にある、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。 20

【請求項 7】

少なくとも 1 つのタンパク質が E 1 B タンパク質、好ましくは E 1 B 5 5 k D タンパク質であることを特徴とする、請求項 6 に記載のアデノウイルス。

【請求項 8】

少なくとも 1 つのタンパク質が E 4 タンパク質、好ましくは E 4 o r f 6 タンパク質であることを特徴とする、請求項 6 又は 7 に記載のアデノウイルス。 30

【請求項 9】

少なくとも 1 つのタンパク質が、E 1 A タンパク質、好ましくは E 1 A 1 2 S タンパク質であることを特徴とする、請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 10】

少なくとも 1 つのタンパク質が、E 1 B タンパク質と E 4 タンパク質の組み合わせ、好ましくは E 1 B 5 5 k D タンパク質と E 4 o r f 6 タンパク質の組み合わせであることを特徴とする、請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 11】

少なくとも 1 つのタンパク質が、E 1 B タンパク質と E 1 A タンパク質の組み合わせ、好ましくは E 1 B 5 5 k D タンパク質と E 1 A 1 2 S タンパク質の組み合わせであることを特徴とする、請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。 40

【請求項 12】

少なくとも 1 つのタンパク質が、E 4 タンパク質と E 1 A タンパク質との組み合わせ、好ましくは、E 4 o r f 6 タンパク質と E 1 A 1 2 S タンパク質の組み合わせであることを特徴とする、請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 13】

少なくとも 1 つのタンパク質が、E 1 B タンパク質と E 4 タンパク質と E 1 A タンパク質との組み合わせ、好ましくは、E 1 B 5 5 k D タンパク質と E 4 o r f 6 タンパク質と E 1 A 1 2 S タンパク質との組み合わせであることを特徴とする、請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。 50

【請求項 14】

E 1 B タンパク質の発現がプロモーターにより制御され、その際、該プロモーターが、腫瘍特異的プロモーター、器官特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、異種プロモーター、及びアデノウイルスプロモーターを含む群から選択され、その際、アデノウイルスプロモーターが E 1 B プロモーターとは異なることを特徴とする、請求項 6 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 15】

E 4 タンパク質の発現がプロモーターにより制御され、その際、該プロモーターが、腫瘍特異的プロモーター、器官特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、異種プロモーター、及びアデノウイルスプロモーターを含む群から選択され、その際、アデノウイルスプロモーターが E 4 プロモーターとは異なることを特徴とする、請求項 6 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

10

【請求項 16】

アデノウイルスプロモーターが E 1 A プロモーターである、請求項 14 又は 15 に記載のアデノウイルス。

【請求項 17】

E 1 A タンパク質の発現がプロモーターにより制御され、その際、該プロモーターが、腫瘍特異的プロモーター、器官特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、異種プロモーター、及びアデノウイルスプロモーターを含む群から選択され、その際、アデノウイルスプロモーターが E 1 A プロモーターとは異なることを特徴とする、請求項 6 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

20

【請求項 18】

E 1 A タンパク質の発現を制御するプロモーターが Y B 1 により制御されるか、又は Y B - 1 によって調節することができることを特徴とする、請求項 14 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 19】

E 1 A タンパク質の発現を制御するプロモーターがアデノウイルス E 2 後期プロモーターであることを特徴とする、請求項 14 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 20】

E 4 タンパク質、好ましくは E 4 o r f 6 タンパク質及び E 1 B タンパク質、好ましくは E 1 B 5 5 k d タンパク質が同一又は共通のプロモーターの制御下にあることを特徴とする、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

30

【請求項 21】

アデノウイルスが少なくとも 1 つのアデノウイルスタンパク質を介して核に Y B - 1 を提供するか、又は核内の Y B - 1 の提供には少なくとも 1 つのアデノウイルスタンパク質が介在し、その際、好ましくは、アデノウイルスタンパク質は E 1 A とは異なることを特徴とする、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 22】

アデノウイルスが少なくとも 1 つのアデノウイルスタンパク質を介してアデノウイルスの複製のために Y B - 1 を提供する、又はアデノウイルスの複製のための Y B - 1 の提供には少なくとも 1 つのアデノウイルスタンパク質が介在し、その際、好ましくは、アデノウイルスタンパク質は E 1 A とは異なることを特徴とする、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

40

【請求項 23】

アデノウイルスタンパク質が、E 4 o r f 6 と E 1 B 5 5 k D との複合体であることを特徴とする、請求項 21 又は 22 に記載のアデノウイルス。

【請求項 24】

アデノウイルスの核酸が少なくとも 1 つの機能的に不活性のアデノウイルス領域を含み、その際、該領域が、E 1 領域、E 3 領域、E 4 領域及びこれらの組み合わせを含む群から選択されることを特徴とする、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス

50

。

【請求項 25】

該領域が E 1 領域であることを特徴とする、請求項 24 に記載のアデノウイルス。

【請求項 26】

該領域が E 3 領域であることを特徴とする、請求項 24 又は 25 に記載のアデノウイルス。

【請求項 27】

該領域が E 4 領域であることを特徴とする、請求項 24 ~ 26 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 28】

該領域が、E 1 領域、E 3 領域、及び E 4 領域を含むことを特徴とする、請求項 24 ~ 27 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 29】

アデノウイルスが少なくとも 1 つの発現カセットを含み、その際、該発現カセットが、少なくとも 1 つのプロモーター及びアデノウイルスタンパク質をコードする核酸を含み、その際、アデノウイルスタンパク質が E 1 B タンパク質、好ましくは、E 1 B 55 k D タンパク質であることを特徴とする、請求項 1 ~ 28 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 30】

プロモーターが E 1 B プロモーターとは異なることを特徴とする、請求項 29 に記載のアデノウイルス。

【請求項 31】

プロモーターが、腫瘍特異的プロモーター、器官特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、異種プロモーター、及びアデノウイルスプロモーターを含む群から選択され、その際、該プロモーターは E 1 B プロモーターとは異なることを特徴とする、請求項 30 に記載のアデノウイルス。

【請求項 32】

アデノウイルスが少なくとも 1 つの発現カセットを含み、該発現カセットが、少なくとも 1 つのプロモーター及びアデノウイルスタンパク質をコードする核酸を含み、その際、アデノウイルスタンパク質が E 4 タンパク質、好ましくは、E 4 or f 6 タンパク質であることを特徴とする、請求項 1 ~ 31 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 33】

プロモーターが E 4 プロモーターとは異なることを特徴とする、請求項 32 に記載のアデノウイルス。

【請求項 34】

プロモーターが、腫瘍特異的プロモーター、器官特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、異種プロモーター、及びアデノウイルスプロモーターを含む群から選択され、その際、アデノウイルスプロモーターは E 4 プロモーターとは異なることを特徴とする、請求項 33 に記載のアデノウイルス。

【請求項 35】

プロモーターが E 1 A プロモーターであることを特徴とする、請求項 29 ~ 34 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 36】

アデノウイルスが少なくとも 1 つの発現カセットを含み、該発現カセットが、少なくとも 1 つのプロモーター及びアデノウイルスタンパク質をコードする核酸を含み、その際、アデノウイルスタンパク質が E 1 A タンパク質、好ましくは、E 1 A 12 S タンパク質であることを特徴とする、請求項 1 ~ 35 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 37】

プロモーターが E 1 A プロモーターとは異なることを特徴とする、請求項 36 に記載のアデノウイルス。

10

20

30

40

50

【請求項 38】

プロモーターが、腫瘍特異的プロモーター、器官特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、異種プロモーター、及びアデノウイルスプロモーターを含む群から選択されることを特徴とする、請求項 37 に記載のアデノウイルス。

【請求項 39】

アデノウイルスが核酸を含み、該核酸が Y B - 1 をコードすることを特徴とする、請求項 1 ~ 38 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 40】

Y B - 1 をコードする核酸がプロモーターの制御下にある、その際該プロモーターが好ましくは E 2 後期プロモーターであることを特徴とする、請求項 39 に記載のアデノウイルス。

10

【請求項 41】

Y B - 1 をコードする核酸がプロモーターの制御下にある、該プロモーターが Y B - 1 依存性及び Y B - 1 制御性であることを特徴とする、請求項 39 又は 40 に記載のアデノウイルス。

【請求項 42】

Y B - 1 をコードする核酸が、E 1 A タンパク質をコードする核酸、好ましくは E 1 A 1 2 S タンパク質をコードする核酸を含む発現カセットの一部であることを特徴とする、請求項 35 ~ 41 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 43】

E 1 A タンパク質をコードする核酸が、I R E S 配列を介して Y B - 1 をコードする核酸から分離されることを特徴とする、請求項 42 に記載のアデノウイルス。

20

【請求項 44】

E 4 タンパク質、好ましくは E 4 o r f 6 タンパク質をコードする核酸及び E 1 B タンパク質、好ましくは E 1 B 5 5 k D タンパク質をコードする核酸が発現カセットに含有され、その際、好ましくは 2 つのコーディング配列が I R E S 配列を介して分離されることを特徴とする、請求項 29 ~ 43 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 45】

発現カセットのプロモーターが、腫瘍特異的プロモーター、器官特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、異種プロモーター、及びアデノウイルスプロモーターを含む群から選択され、その際、アデノウイルスプロモーターが、E 4 プロモーターとは異なり、かつ E 1 B プロモーターとは異なり、好ましくは野生型 E 4 プロモーターとは異なり、かつ野生型 E 1 B プロモーターとは異なることを特徴とする、請求項 44 に記載のアデノウイルス。

30

【請求項 46】

アデノウイルスがプロモーター及び核酸配列を含む発現カセットを含み、その際、核酸配列がアプタマー、リボザイム、アプタザイム、アンチセンス分子及び s i R N A を含む群から選択されることを特徴とする、請求項 1 ~ 45 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 47】

アデノウイルスがプロモーター及び核酸配列を含む発現カセットを含み、その際、核酸配列がコーディング核酸を含み、該核酸が、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、アンチカリン、抗体及び抗体断片を含む群から選択される分子をコードすることを特徴とする、請求項 1 ~ 45 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

40

【請求項 48】

アデノウイルスが発現カセットを含み、その際、発現カセットがプロモーター及び核酸配列を含み、その際、核酸配列が、アポトーシス誘導遺伝子、プロドラッグ遺伝子、プロテアーゼ阻害剤、腫瘍抑制遺伝子、サイトカイン及び血管形成阻害剤を含む群から選択されることを特徴とする、請求項 1 ~ 45 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 49】

50

アデノウイルスが組換えアデノウイルスであることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 5 0】

アデノウイルスがアデノウイルス突然変異体であることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 5 1】

アデノウイルスが複製欠損性であることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 5 2】

アデノウイルスが、調節解除された Y B - 1 を含む細胞又は核内に Y B - 1 を有する細胞中で複製可能であることを特徴とする、請求項 5 1 に記載のアデノウイルス。 10

【請求項 5 3】

細胞周期とは無関係に、細胞が核内に Y B - 1 を含有することを特徴とする、請求項 5 2 に記載のアデノウイルス。

【請求項 5 4】

請求項 1 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルスをコードする核酸。

【請求項 5 5】

請求項 5 4 に記載の核酸及びヘルパーウイルスの核酸を含み、その際、ヘルパーウイルスの核酸が請求項 1 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルスの 1 以上の発現カセットを含む、複製システム。 20

【請求項 5 6】

アデノウイルス又はそれをコードする核酸がヘルパーウイルスが含む発現カセットを欠いていることを特徴とする、請求項 5 5 に記載の複製システム。

【請求項 5 7】

請求項 5 4 に記載の核酸及び / 又は請求項 5 5 ~ 5 6 のいずれか 1 項に記載の複製システムを含む、ベクター。

【請求項 5 8】

ベクターが発現ベクターであることを特徴とする、請求項 5 7 に記載のベクター。

【請求項 5 9】

請求項 1 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス及び / 又は請求項 5 4 に記載の核酸及び / 又は請求項 5 5 又は 5 6 に記載の複製システム及び / 又は請求項 5 7 又は 5 8 に記載のベクターを含む、細胞。 30

【請求項 6 0】

細胞が真核細胞であり、好ましくは動物細胞であり、さらに好ましくは哺乳動物細胞であることを特徴とする、請求項 5 9 に記載の細胞。

【請求項 6 1】

哺乳動物細胞が、マウス、ラット、モルモット、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ及びヒトを含む群から選択される細胞であることを特徴とする、請求項 6 0 に記載の細胞。

【請求項 6 2】 40

請求項 1 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス、請求項 5 4 に記載の核酸、請求項 5 5 又は 5 6 に記載の複製システム、請求項 5 7 又は 5 8 に記載のベクター、或いは請求項 5 9 ~ 6 1 のいずれか 1 項に記載の細胞を含み、その際、生物がマウス、ラット、モルモット、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ及びネコを含む群から選択される生物、好ましくは哺乳動物生物。

【請求項 6 3】

アデノウイルスの複製、好ましくはアデノウイルスのインビトロでの複製のための、請求項 1 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス、請求項 5 4 に記載の核酸、請求項 5 5 又は 5 6 に記載の複製システム、請求項 5 7 又は 5 8 に記載のベクター、或いは請求項 5 9 ~ 6 1 のいずれか 1 項に記載の細胞の使用。 50

【請求項 6 4】

アデノウイルスの製造、好ましくはアデノウイルスのインビトロでの製造のための、請求項 1 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス、請求項 5 4 に記載の核酸、請求項 5 5 又は 5 6 に記載の複製システム、請求項 5 7 又は 5 8 に記載のベクター、或いは請求項 5 9 ~ 6 1 のいずれか 1 項に記載の細胞の使用。

【請求項 6 5】

遺伝子の発現、好ましくは細胞溶解、好ましくはアデノウイルスの複製中の細胞溶解を促進する遺伝子、及び / 又はアデノウイルスが介在する細胞溶解を促進する遺伝子の発現のための、請求項 1 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス、請求項 5 4 に記載の核酸、請求項 5 5 又は 5 6 に記載の複製システム、請求項 5 7 又は 5 8 に記載のベクター、或いは請求項 5 9 ~ 6 1 のいずれか 1 項に記載の細胞の使用。

10

【請求項 6 6】

薬物の製造のための、請求項 1 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス、請求項 5 4 に記載の核酸、請求項 5 5 又は 5 6 に記載の複製システム、請求項 5 7 又は 5 8 に記載のベクター、或いは請求項 5 9 ~ 6 1 のいずれか 1 項に記載の細胞の使用。

【請求項 6 7】

アデノウイルスが複製している細胞が、その核内に Y B - 1 を有する、好ましくは、細胞周期とは無関係に、核内に Y B - 1 を有することを特徴とする、請求項 6 3 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 6 8】

アデノウイルスが複製している細胞が、調節解除された Y B - 1 を含むことを特徴とする、請求項 6 3 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の使用。

20

【請求項 6 9】

薬物が腫瘍性疾患の治療のためであることを特徴とする、請求項 6 6 に記載の使用。

【請求項 7 0】

腫瘍性疾患が、悪性疾患、癌、癌性疾患及び腫瘍を含む群から選択されることを特徴とする、請求項 6 9 に記載の使用。

【請求項 7 1】

腫瘍が、固形腫瘍、非固形腫瘍、悪性腫瘍及び良性腫瘍を含む群から選択されることを特徴とする、請求項 7 0 に記載の使用。

30

【請求項 7 2】

腫瘍を形成する細胞の少なくとも一部が核内に Y B - 1 を有し、好ましくは、細胞周期とは無関係に核内に Y B - 1 を有することを特徴とする、請求項 6 9 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 7 3】

腫瘍を形成する細胞の少なくとも一部が、調節解除された Y B - 1 を含むことを特徴とする、請求項 6 9 ~ 7 2 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 7 4】

腫瘍を形成する細胞の少なくとも一部が、R b 陽性又は R b 陰性であることを特徴とする、請求項 6 9 ~ 7 3 のいずれか 1 項に記載の使用。

40

【請求項 7 5】

腫瘍を形成する細胞の少なくとも一部が、医薬的に活性な薬剤に対して耐性、好ましくは多剤耐性を有することを特徴とする、請求項 6 9 ~ 7 3 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 7 6】

耐性が複合耐性であることを特徴とする、請求項 7 5 に記載の使用。

【請求項 7 7】

耐性が抗腫瘍剤、好ましくは細胞増殖抑制剤に対するものであり、及び / 又は耐性は照射により誘発されることを特徴とする、請求項 7 5 又は 7 6 に記載の使用。

【請求項 7 8】

薬物を意図する患者が複数の細胞を含み、その際、細胞が請求項 7 2 ~ 7 6 のいずれか

50

1 項に記載したような細胞であることを特徴とする、請求項 6 9 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 7 9】

薬物が少なくとの 1 つのさらなる医薬的に活性な薬剤を含むことを特徴とする、請求項 6 9 ~ 7 8 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 8 0】

薬物がさらなる医薬的に活性な薬剤と一緒に投与されるか又はそれを意図することを特徴とする、請求項 6 8 ~ 7 9 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 8 1】

さらなる医薬的に活性な薬剤が、サイトカイン、メタロプロテイナーゼ阻害剤、血管形成阻害剤、細胞増殖抑止剤、チロシンキナーゼ阻害剤、細胞周期阻害剤、プロテオソーム阻害剤、信号伝達カスケードの阻害剤、プロテインキナーゼ、及び組換え抗体を含む群より選択されることを特徴とする、請求項 7 9 又は 8 0 に記載の使用。

10

【請求項 8 2】

照射の前、その間、その後に薬物が投与されることを特徴とする、請求項 6 9 ~ 7 9 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 8 3】

腫瘍を治療する目的で、放射線が投与されることを特徴とする、請求項 8 2 に記載の使用。

【請求項 8 4】

処置されるべき細胞又は生物が手段の対象とされ、その際、手段が、照射、細胞増殖抑制剤の投与及び温熱療法を含む群から選択されることを特徴とする、請求項 6 9 ~ 8 3 のいずれか 1 項に記載の使用。

20

【請求項 8 5】

手段が局所的に、又は全身性に適用されることを特徴とする、請求項 6 9 ~ 8 4 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 8 6】

照射が、高エネルギー放射線を使用する、好ましくは、腫瘍性疾患の治療で使用されるいかなる照射も使用することを特徴とする、請求項 6 9 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載の使用。

30

【請求項 8 7】

腫瘍性疾患が、乳腫瘍、骨腫瘍、胃腫瘍、腸腫瘍、胆嚢腫瘍、膵臓腫瘍、肝腫瘍、腎臓腫瘍、脳腫瘍、卵巣腫瘍、皮膚腫瘍、皮膚付属器の腫瘍、頭頸部腫瘍、子宮腫瘍、滑膜腫瘍、咽頭腫瘍、食道腫瘍、舌腫瘍、前立腺腫瘍を含む群から選択され、好ましくは、上記腫瘍性疾患の 1 つが請求項 1 ~ 8 6 のいずれか 1 項に記載されたような特徴を有することを特徴とする、腫瘍性疾患を治療するための薬物を製造するための、請求項 1 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス、請求項 5 4 に記載の核酸、請求項 5 5 又は 5 6 に記載の複製システム、請求項 5 7 又は 5 8 に記載のベクター、或いは請求項 5 9 ~ 6 1 のいずれか 1 項に記載の細胞の使用。

【請求項 8 8】

腫瘍特異的プロモーターが、薬物が使用される腫瘍に特異的であるプロモーターである、腫瘍性疾患を治療するための薬物を製造するための、請求項 1 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス、請求項 5 4 に記載の核酸、請求項 5 5 又は 5 6 に記載の複製システム、請求項 5 7 又は 5 8 に記載のベクター、或いは請求項 5 9 ~ 6 1 のいずれか 1 項に記載の細胞の使用。

40

【請求項 8 9】

請求項 1 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス、請求項 5 4 に記載の核酸、請求項 5 5 又は 5 6 に記載の複製システム、請求項 5 7 又は 5 8 に記載のベクター、或いは請求項 5 9 ~ 6 1 のいずれか 1 項に記載の細胞、及び場合により薬学上許容可能な担体を含む医薬組成物。

50

【請求項 9 0】

薬物が少なくとも 2 つの薬剤の組合せを含み、各薬剤は細胞増殖抑制剤を含む群より個々に及び独立して選択されることを特徴とする、請求項 6 9 ~ 8 8 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 9 1】

少なくとも薬剤の 2 つが、異なる標的分子を対象にすることを特徴とする、請求項 9 0 に記載の使用。

【請求項 9 2】

少なくとも薬剤の 2 つが、異なる作用機序によって活性を有することを特徴とする、請求項 9 1 に記載の使用。

10

【請求項 9 3】

少なくとも 1 つの薬剤が、細胞が感染される能力を増加させ、そのような細胞中でウイルスが複製することを特徴とする、請求項 9 0 ~ 9 2 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 9 4】

少なくとも 1 つの薬剤が、細胞の成分の有効性に影響を及ぼし好ましくは成分の利用可能性を増し、その成分はウイルスの取り込みを仲介することを特徴とする、請求項 9 0 ~ 9 3 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 9 5】

少なくとも 1 つの薬剤が、Y B - 1 の核の中への輸送を仲介し、好ましくは前記輸送を増加させることを特徴とする、請求項 9 0 ~ 9 4 のいずれか 1 項に記載の使用。

20

【請求項 9 6】

少なくとも 1 つの薬剤がヒストンデアシラーゼ阻害剤であることを特徴とする、請求項 9 0 ~ 9 5 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 9 7】

ヒストンデアシラーゼ阻害剤が、トリコスタチン A、F R 9 0 1 2 2 8、M S - 2 7 - 2 7 5、N V P - L A Q 8 2 4、P X D 1 0 1、アピシジン、及びスクリプタイドを含む群より選択されることを特徴とする、請求項 9 6 に記載の使用。

【請求項 9 8】

少なくとも 1 つの薬剤が、トリコスタチン A、F R 9 0 1 2 2 8、M S - 2 7 - 2 7 5、N V P - L A Q 8 2 4、P X D 1 0 1、アピシジン、及びスクリプタイドを含む群より選択されることを特徴とする、請求項 9 0 ~ 9 6 のいずれか 1 項に記載の使用。

30

【請求項 9 9】

少なくとも 1 つの薬剤がトポイソメラーゼ阻害剤であることを特徴とする、請求項 9 0 ~ 9 8 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 1 0 0】

トポイソメラーゼ阻害剤がカンプトテシン、イリノテカン、トポテカン、D X - 8 9 5 I f、S N - 3 8、9 - アミノカンプトテシン、9 - ニトロカンプトテシン、ダウノルビシン及びエトポシドを含む群より選択されることを特徴とする、請求項 9 9 に記載の使用。

【請求項 1 0 1】

薬剤がトリコスタチン A 及びイリノテカンを含むことを特徴とする、請求項 6 3 ~ 1 0 0 のいずれか 1 項に記載の使用。

40

【請求項 1 0 2】

ウイルスが、特に請求項 1 ~ 1 0 1 のいずれかに記載のウイルスが、少なくとも 2 つの薬剤から分離されていることを特徴とする、請求項 6 3 ~ 1 0 1 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 1 0 3】

ウイルスの少なくとも 1 単位の用量が、1 つ又は少なくとも 2 つの薬剤の少なくとも 1 単位の用量から分離されていることを特徴とする、請求項 6 8 に記載の使用。

【請求項 1 0 4】

50

ウイルス、好ましくは先行する請求項のいずれかに記載のウイルス、及び少なくとも2つの薬剤であって、任意の薬剤が細胞増殖抑制剤を含む群より個々に及び独立して選択される薬剤を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特に、腫瘍を治療するために薬物を製造するための、アデノウイルス、それをコードする核酸及びその使用に関する。

【0002】

現在、腫瘍の治療において多数の治療概念が使用されている。外科手術の使用はともかく、化学療法及び放射線療法が主流である。しかしながら、これらの技法はすべて相当な副作用を伴う。複製選択性の腫瘍退縮性ウイルスは、腫瘍の治療に新しい基盤を提供している。それに関連して、ウイルス剤の選択的な腫瘍内複製が開始され、それは、ウイルスの増殖、感染した腫瘍細胞の溶解及び隣接する腫瘍細胞へのウイルスの拡散を生じる。ウイルスの複製能力が腫瘍細胞に限定されているので、正常細胞は複製から免れ、ウイルスによる溶解から免れる。

【0003】

今のところ、腫瘍の溶解を目標として、幾つかのウイルスシステムが臨床試験の対象となっている。そのようなアデノウイルスの一例は、d11520 (Onyx-015) であり、それは、臨床試験のフェーズI及びIIで上手く使用されている (Khuri, F. et al., *Nature Medicine* 6: 879-885, 2000)。Onyx-015は、E1B-55kDa遺伝子を完全に欠失したアデノウイルスである。アデノウイルスのE1B55kDaタンパク質の完全な欠失は、複製、従って細胞の溶解が、p53欠損 (Kim, D. et al., *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 17: 391a, 1998) を有するアデノウイルスベクターにより可能であり、そのために正常細胞は悪影響を受けないという発見に基づく。さらに詳しくは、E1B-55kDaの遺伝子産物は、p53の阻害、ウイルスmRNAの輸送及び宿主細胞のタンパク質合成のスイッチオフに関与する。p53の阻害は、p53とアデノウイルスがコードするE1B-55kDaタンパク質とから成る複合体及び/又はE1B-55kDaとE4orf6とから成る複合体の形成を介して生じる。TP53にコードされるp53は、複合体が調節するメカニズム (Zambetti, G. P., et al., *FASEB J.*, 7: 855-865, 1993) の出発点であり、それによって、とりわけ、アデノウイルスのようなウイルスの細胞性複製の効率的な阻害を生じる。遺伝子TP53は、ヒトの全腫瘍の約50%で欠失又は変異しており、それは、化学療法や放射線療法による所望の、アポトーシスの欠如を生じ、通常、腫瘍治療は不成功に終わる。

【0004】

腫瘍退縮性アデノウイルスのさらなる概念は、E1Aタンパク質が、Rb/E2F及び/又はp107/E2F及び又はp130/E2Fの結合に影響を与えない、特定の欠失形態で存在すれば、又は1又は数個の突然変異を含んでいれば、そのようなアデノウイルスは感染細胞のS期への進行を誘導せず、機能的Rbタンパク質を有さない腫瘍細胞で複製することが可能であるという発見に基づく。さらに、E1Aタンパク質は、N末端で欠失させることができ、E1Aのp300への結合を阻害するためにE1Aタンパク質のアミノ酸1位~76位の領域で1又は数個の突然変異を含むことができるので、腫瘍細胞においてさらに選択的な複製を提供することができる。これらのアプローチは、欧州特許EP0931830号に例示的に記載されている。そのようなウイルスの例は、Ad24、d1922~947、E1Ad/01/07及びCB016 (Howe, J. A. et al., *Molecular Therapy* 2: 485-495, 2000; Fueyo, J. et al., *Oncogene* 19: 2-12, 2000; Heise, C. et al., *Nature Medicine* 6: 1134-1139, 2001; Balague, C. et al., *J. Virology*, 75: 7602-7611, 2001) である。従来技術で既知のこれらのアデノウイルスのシステムは、従って、E1Aタンパク質において識別可能な欠失を含み、それによって、それぞれ、機能的なRbタンパク質及び不活性のRbとE2Fから成る複合体が生体内での効率

的な複製を阻止するという前提で、かつ、Rb - 陰性 / 変異した細胞でのみアデノウイルスの生体内での複製を提供するために、そのような欠失を行っている。従来技術に係るこれらのアデノウイルスシステムは、早期 E 2 プロモーター (E 2 早期プロモーター) 及び遊離の E 2 F (Dyson N, Genes & Development 12: 2245-2262, 1998) によって生体内の複製を制御するための E 1 A に基づく。

【0005】

腫瘍退縮性アデノウイルスシステムのさらなる形態は、ウイルス腫瘍遺伝子 E 1 A を特異的に発現する選択的なプロモーターの使用に基づき、それは、腫瘍細胞における選択的複製を提供する (Rodriguez, R. et al., Cancer Res., 57: 2559-2563, 1997)。

【0006】

上述のように、根底に作用機序がある各概念に相当する細胞のバックグラウンドを選択することはアデノウイルスの腫瘍退縮性ウイルスの種々の概念にとって重要である。言い換えれば、現在既知の種々のアデノウイルスシステムは、はっきりした分子生物学的必要条件が実現される場合においてのみ使用してもよい。このことは、そのようなシステムの使用を特定の患者群に限定する。

【0007】

いったん患者が、細胞増殖抑制剤に対する腫瘍の耐性の特によく研究された形態を表す、いわゆる多剤耐性 (複数の薬剤に対する耐性、MDR) を発生させると、腫瘍性疾患の治療には特別の問題が生じる (Gottesman and Oastan, Annu. Rev. Biochem., 62: 385-427, 1993)。それは、いわゆる ABC トランスポータ (Stein, U. et al., JBC 276: 28562-69, 2001; J. Wijnholds, Novartis Found Symp., 243: 69-79, 2002) に属する膜結合型輸送タンパク質、P - 糖タンパク質の過剰発現に基づく。Bargou, R. C.ら及び Oda, Y.ら (Bargou, R. C. et al., Nature Medicine 3: 447-450, 1997; Clin. Cancer Res., 4: 2273-2277, 1998) は、ヒトの転写因子、YB - 1 は P - 糖タンパク質の発現の活性化に直接関与することを示すことができた。さらなる研究によって、YB - 1 は、たとえば、UV 照射、細胞増殖抑制剤の投与 (Koike, K. et al., FEBS Lett., 17: 390-394, 1997) 及び温熱 (Stein, U. et al., JRC 276: 28562-69, 2001) のような種々のストレス条件によって核に輸送されることが確認された。さらなる研究によって、YB - 1 の核への局在化は、1つのさらなる ABC トランスポータに影響を有することが確認された。この ABC トランスポータは、MRP (多剤耐性関連タンパク質) と呼ばれ、いわゆる非定型的、非 P - 糖タンパク質依存性の多剤耐性の形成に関与する (Stein, U. et al., JRC 276: 28562-69, 2001)。

【0008】

本発明の課題は、生物、特にヒト、及び患者群を特に腫瘍的に活性のある作用剤で治療することができる技術的教示及び手段を提供することである。細胞増殖抑制剤に耐性である腫瘍性疾患を有する患者、特に多剤耐性を有するものにおいて腫瘍溶解を生じるのに好適な手段を提供することは、本発明のさらなる課題である。最終的に、本発明の課題は、細胞溶解に好適であるアデノウイルスを提供することである。

【0009】

第1の態様では、E 1 A タンパク質を含む群から選択される第2のタンパク質に先立って、E 1 B タンパク質及び E 4 タンパク質を含む群から選択される第1のタンパク質を発現するアデノウイルスによって、本発明の課題を解決する。

【0010】

実施態様では、第1のタンパク質は E 1 B タンパク質であり、好ましくは E 1 B 5 5 kD タンパク質である。

【0011】

さらなる実施態様では、第1のタンパク質は E 4 タンパク質であり、好ましくは E 4 or f 6 タンパク質である。

【0012】

好ましい実施態様では、第1のタンパク質は、E 1 B タンパク質と E 4 タンパク質との

組み合わせであり、好ましくは、E 1 B 5 5 k D タンパク質と E 4 o r f 6 タンパク質との組み合わせである。

【0013】

好ましい実施態様では、E 1 A タンパク質は、E 1 A 1 2 S タンパク質である。別の実施態様では、E 1 A タンパク質は、野生型アデノウイルスの、好ましくは A d 5 の、E 1 A タンパク質、又はアデノウイルスデルタ 2 4 の E A 1 である。

【0014】

第 2 の態様では、アデノウイルスが、E 1 B タンパク質、E 4 タンパク質及び E 1 A タンパク質を含む群から選択されるタンパク質をコードする少なくとも 1 つの核酸を含み、その際、少なくとも 1 つのタンパク質が野生型アデノウイルスにおけるタンパク質の発現を制御するプロモーターとは異なるプロモーターの制御下にある、アデノウイルスによって、本発明の課題を解決する。

10

【0015】

第 2 の態様の実施態様では、アデノウイルスは、本発明の第 1 の態様に係るアデノウイルスである。

【0016】

第 2 の態様の実施態様では、少なくとも 1 つのタンパク質は、E 1 B タンパク質であり、好ましくは E 1 B 5 5 k D タンパク質である。

【0017】

第 2 の態様の実施態様では、少なくとも 1 つのタンパク質は、E 4 タンパク質であり、好ましくは E 4 o r f 6 タンパク質である。

20

【0018】

第 2 の態様の実施態様では、少なくとも 1 つのタンパク質は、E 1 A タンパク質であり、好ましくは E 1 A 1 2 S タンパク質である。特に好ましい実施態様では、E 1 A 1 2 S タンパク質は、A d 5 の、好ましくは野生型 A d 5 の E 1 A 1 2 S タンパク質、又はアデノウイルスデルタ 2 4 の E 1 A 1 2 S タンパク質である。

【0019】

第 2 の態様の好ましい実施態様では、少なくとも 1 つのタンパク質は、E 1 B タンパク質と E 4 タンパク質との組み合わせであり、好ましくは、E 1 B 5 5 k D タンパク質と E 4 o r f 6 タンパク質との組み合わせである。

30

【0020】

第 2 の態様の実施態様では、少なくとも 1 つのタンパク質は、E 1 B タンパク質と E 1 A タンパク質との組み合わせであり、好ましくは、E 1 B 5 5 k D タンパク質と E 1 A 1 2 S タンパク質との組み合わせである。

【0021】

第 2 の態様の好ましい実施態様では、少なくとも 1 つのタンパク質は、E 4 タンパク質と E 1 A タンパク質との組み合わせであり、好ましくは、E 4 o r f 6 タンパク質と E 1 A 1 2 S タンパク質との組み合わせであり、より好ましくはここに定義したとおりである。

【0022】

第 2 の態様の実施態様では、少なくとも 1 つのタンパク質は、E 1 B タンパク質と E 4 タンパク質と E 1 A タンパク質との組み合わせであり、好ましくは、E 1 B 5 5 k D タンパク質と E 4 o r f 6 タンパク質と E 1 A 1 2 S タンパク質との組み合わせである。

40

【0023】

第 2 の態様の実施態様では、E 1 B タンパク質の発現はプロモーターにより制御され、その際、プロモーターは、腫瘍特異的プロモーター、器官特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、異種プロモーター、及びアデノウイルスプロモーターを含む群から選択され、その際、アデノウイルスプロモーターは、E 1 B プロモーターとは異なる。

【0024】

第 2 の態様の実施態様では、E 4 タンパク質の発現はプロモーターにより制御され、そ

50

の際、プロモーターは、腫瘍特異的プロモーター、器官特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、異種プロモーター、及びアデノウイルスプロモーターを含む群から選択され、その際、アデノウイルスプロモーターは、E 4 プロモーターとは異なる。

【0025】

第2の態様の好ましい実施態様では、アデノウイルスのプロモーターはE 1 A プロモーターである。

【0026】

第2の態様の実施態様では、E 1 A タンパク質の発現がプロモーターによって制御され、その際、プロモーターは、腫瘍特異的プロモーター、器官特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、異種プロモーター、及びアデノウイルスプロモーターを含む群から選択され、その際、アデノウイルスプロモーターは、E 1 A プロモーターとは異なる。 10

【0027】

第2の態様の好ましい実施態様では、E 1 A タンパク質の発現を制御するプロモーターはY B - 1により制御されるか、又はY B - 1によって調節されうる。

【0028】

第2の態様の好ましい実施態様では、E 1 A タンパク質の発現を制御するプロモーターは、アデノウイルスE 2 後期プロモーターである。

【0029】

第1及び第2の態様の実施態様では、E 4 タンパク質、好ましくはE 4 o r f 6 タンパク質及びE 1 B タンパク質、好ましくはE 1 B 5 5 k D タンパク質は、同一の又は共通のプロモーターの制御下にある。 20

【0030】

第3の態様では、アデノウイルスが少なくとも1つのアデノウイルスタンパク質を介して核にY B - 1を提供する、又は核におけるY B - 1の提供には、少なくとも1つのアデノウイルスタンパク質が介在し、その際、好ましくは、アデノウイルスタンパク質はE 1 Aとは異なる、アデノウイルスによって本発明の課題を解決する。

【0031】

第3の態様の実施態様では、アデノウイルスは本発明の第1の態様及び/又は第2の態様に係るアデノウイルスである。

【0032】

第4の態様では、アデノウイルスが、少なくとも1つのアデノウイルスタンパク質を介してアデノウイルスの複製にY B - 1を提供する、又は少なくとも1つのアデノウイルスタンパク質がアデノウイルスの複製へのY B - 1の提供に介在し、その際、好ましくは、アデノウイルスタンパク質はE 1 Aとは異なる、アデノウイルスによって本発明の課題を解決する。 30

【0033】

第3の態様の実施態様では、アデノウイルスは本発明の第1の態様及び/又は第2の態様及び/又は第3の態様に係るアデノウイルスである。

【0034】

第3及び第4の態様の実施態様では、アデノウイルスタンパク質は、E 4 o r f 6 とE 1 B 5 5 k D との複合体である。 40

【0035】

第5の態様では、アデノウイルスの核酸が、少なくとも1つの機能的に不活性なアデノウイルスの領域を含み、その際、領域がE 1 領域、E 3 領域、E 4 領域及びこれらの組み合わせを含む群から選択される、アデノウイルスによって、本発明の課題を解決する。

【0036】

第5の態様の実施態様では、アデノウイルスが、本発明の第1及び/又は第2及び/又は第3及び/又は第4の態様によるアデノウイルスであると考えられる。

【0037】

第5の態様の実施態様では、該領域は、E 1 領域である。 50

【 0 0 3 8 】

第 5 の態様の実施態様では、該領域は、E 3 領域である。

【 0 0 3 9 】

第 5 の態様の実施態様では、該領域は、E 4 領域である。

【 0 0 4 0 】

第 5 の態様の実施態様では、該領域は E 1 領域、E 3 領域、及び E 4 領域を含む。

【 0 0 4 1 】

第 6 の態様では、アデノウイルスが少なくとも 1 つの発現カセットを含み、その際、発現カセットが少なくとも 1 つのプロモーター及びアデノウイルスタンパク質をコードする核酸を含み、アデノウイルスタンパク質が E 1 B タンパク質であり、好ましくは E 1 B 5 5 k D タンパク質である、アデノウイルスによって、本発明の課題を解決する。 10

【 0 0 4 2 】

第 6 の態様の実施態様では、アデノウイルスは本発明の第 1 の態様及び / 又は第 2 の態様及び / 又は第 3 の態様及び / 又は第 4 の態様及び / 又は第 5 の態様に係るアデノウイルスである。

【 0 0 4 3 】

第 6 の態様の実施態様では、プロモーターは E 1 B プロモーターとは異なる。

【 0 0 4 4 】

第 6 の態様の実施態様では、プロモーターは、腫瘍特異的プロモーター、器官特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、異種プロモーター、及びアデノウイルスプロモーターを含む群から選択され、その際、プロモーターは、E 1 B プロモーターとは異なる。 20

【 0 0 4 5 】

第 7 の態様では、アデノウイルスが少なくとも 1 つの発現カセットを含み、その際、発現カセットが少なくとも 1 つのプロモーター及びアデノウイルスタンパク質をコードする核酸を含み、その際、アデノウイルスタンパク質が E 4 タンパク質であり、好ましくは E 4 o r f 6 タンパク質である、アデノウイルスによって、本発明の課題を解決する。

【 0 0 4 6 】

第 7 の態様の実施態様では、アデノウイルスは、本発明の第 1 及び / 又は第 2 及び / 又は第 3 及び / 又は第 4 及び / 又は第 5 及び / 又は第 6 の態様によるアデノウイルスである。 30

【 0 0 4 7 】

第 7 の態様の実施態様では、プロモーターは、腫瘍特異的プロモーター、器官特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、異種プロモーター、及びアデノウイルスプロモーターを含む群から選択され、その際、アデノウイルスプロモーターは、E 4 プロモーターとは異なる。

【 0 0 4 8 】

第 7 の態様の実施態様では、プロモーターは E 1 A プロモーターである。

【 0 0 4 9 】

第 8 の態様では、アデノウイルスが少なくとも 1 つの発現カセットを含み、その際、発現カセットが少なくとも 1 つのプロモーター及びアデノウイルスタンパク質をコードする核酸を含み、その際、アデノウイルスタンパク質が E 1 A タンパク質であり、好ましくは E 1 A 1 2 S タンパク質である、アデノウイルスによって、本発明の課題を解決する。 40

【 0 0 5 0 】

第 8 の態様の実施態様では、アデノウイルスは本発明の第 1 の態様及び / 又は第 2 の態様及び / 又は第 3 の態様及び / 又は第 4 の態様及び / 又は第 5 の態様及び / 又は第 6 の態様及び / 又は第 7 の態様に係るアデノウイルスである。

【 0 0 5 1 】

第 8 の態様の実施態様では、プロモーターは E 1 A プロモーターとは異なる。

【 0 0 5 2 】

第 8 の態様の実施態様では、プロモーターは、腫瘍特異的プロモーター、器官特異的プ 50

ロモーター、組織特異的プロモーター、異種プロモーター、及びアデノウイルスプロモーターを含む群から選択される。

【 0 0 5 3 】

第 1 の態様及び / 又は第 2 の態様及び / 又は第 3 の態様及び / 又は第 4 の態様及び / 又は第 5 の態様及び / 又は第 6 の態様及び / 又は第 7 の態様及び / 又は第 8 の態様の実施態様では、アデノウイルスは核酸を含み、核酸は Y B - 1 をコードする。

【 0 0 5 4 】

第 8 の態様の好ましい実施態様では、Y B - 1 をコードする核酸はプロモーターの制御下にあり、その際、プロモーターは好ましくは E 2 後期プロモーターである。

【 0 0 5 5 】

第 8 の態様の実施態様では、Y B - 1 をコードする核酸はプロモーターの制御下にあり、その際、プロモーターは、Y B - 1 依存性及び Y B - 1 に制御される。

【 0 0 5 6 】

第 8 の態様の実施態様では、Y B - 1 をコードする核酸は、E 1 A タンパク質をコードする核酸、好ましくは E 1 A 1 2 S タンパク質をコードする核酸を含む発現カセットの一部である。

【 0 0 5 7 】

第 8 の態様の実施態様では、E 1 A タンパク質をコードする核酸は、I R E S 配列を介して Y B - 1 をコードする核酸から分離される。

【 0 0 5 8 】

第 6 及び / 又は第 7 及び / 又は第 8 の態様の実施態様では、E 4 タンパク質、好ましくは E 4 o r f 6 タンパク質をコードする核酸及び E 1 B タンパク質、好ましくは E 1 B 5 5 k D をコードする核酸は発現カセットに含有され、その際、好ましくは、2 つのコーディング配列は I R E S 配列を介して分離される。

【 0 0 5 9 】

第 8 の態様の好ましい実施態様では、発現カセットのプロモーターは、腫瘍特異的プロモーター、器官特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、異種プロモーター、及びアデノウイルスプロモーターを含む群から選択され、その際、アデノウイルスプロモーターは、E 4 プロモーターとは異なり、かつ E 1 B プロモーターとは異なり、好ましくは、野生型 E 4 プロモーターとは異なり、かつ野生型 E 1 B プロモーターとは異なる。

【 0 0 6 0 】

第 1 の態様及び / 又は第 2 の態様及び / 又は第 3 の態様及び / 又は第 4 の態様及び / 又は第 5 の態様及び / 又は第 6 の態様及び / 又は第 7 の態様及び / 又は第 8 の態様の実施態様では、アデノウイルスは、プロモーター及び核酸配列を含む発現カセットを含み、その際、核酸は、アプタマー、リボザイム、アプタザイム、アンチセンス分子及び s i R N A を含む群から選択される。

【 0 0 6 1 】

第 1 の態様及び / 又は第 2 の態様及び / 又は第 3 の態様及び / 又は第 4 の態様及び / 又は第 5 の態様及び / 又は第 6 の態様及び / 又は第 7 の態様及び / 又は第 8 の態様の実施態様では、アデノウイルスは、プロモーター及び核酸配列を含む発現カセットを含み、その際、核酸配列はコーディング核酸であり、その際、核酸は、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、アンチカリン、抗体及び抗体断片を含む群から選択される分子をコードする。

【 0 0 6 2 】

第 1 の態様及び / 又は第 2 の態様及び / 又は第 3 の態様及び / 又は第 4 の態様及び / 又は第 5 の態様及び / 又は第 6 の態様及び / 又は第 7 の態様及び / 又は第 8 の態様の実施態様では、アデノウイルスは、プロモーター及び核酸配列を含む発現カセットを含み、その際、核酸配列は、アポトーシス誘導遺伝子、プロドラッグ遺伝子、プロテアーゼ阻害剤、腫瘍抑制遺伝子、サイトカイン及び血管形成阻害剤を含む群から選択される。

【 0 0 6 3 】

第 1 の態様及び / 又は第 2 の態様及び / 又は第 3 の態様及び / 又は第 4 の態様及び / 又

10

20

30

40

50

は第 5 の態様及び / 又は第 6 の態様及び / 又は第 7 の態様及び / 又は第 8 の態様の実施態様では、アデノウイルスは、組換えアデノウイルスである。

【 0 0 6 4 】

第 1 の態様及び / 又は第 2 の態様及び / 又は第 3 の態様及び / 又は第 4 の態様及び / 又は第 5 の態様及び / 又は第 6 の態様及び / 又は第 7 の態様及び / 又は第 8 の態様の実施態様では、アデノウイルスは、アデノウイルス変異体である。

【 0 0 6 5 】

第 1 の態様及び / 又は第 2 の態様及び / 又は第 3 の態様及び / 又は第 4 の態様及び / 又は第 5 の態様及び / 又は第 6 の態様及び / 又は第 7 の態様及び / 又は第 8 の態様の実施態様では、アデノウイルスは、アデノウイルス複製欠損性である。

10

【 0 0 6 6 】

第 1 の態様及び / 又は第 2 の態様及び / 又は第 3 の態様及び / 又は第 4 の態様及び / 又は第 5 の態様及び / 又は第 6 の態様及び / 又は第 7 の態様及び / 又は第 8 の態様の実施態様では、アデノウイルスは、調節解除された Y B - 1 を含む又は核に Y B - 1 を有する細胞内で複製が可能である。

【 0 0 6 7 】

第 1 の態様及び / 又は第 2 の態様及び / 又は第 3 の態様及び / 又は第 4 の態様及び / 又は第 5 の態様及び / 又は第 6 の態様及び / 又は第 7 の態様及び / 又は第 8 の態様の実施態様では、細胞は、細胞周期とは無関係に、核に Y B - 1 を含有する。

【 0 0 6 8 】

20

第 1 の態様及び / 又は第 2 の態様及び / 又は第 3 の態様及び / 又は第 4 の態様及び / 又は第 5 の態様及び / 又は第 6 の態様及び / 又は第 7 の態様及び / 又は第 8 の態様の実施態様では、アデノウイルスはいかなる E 1 A 1 3 S タンパク質を含まない、及び / 又はアデノウイルスは E 1 A 1 3 S タンパク質をコードするいかなる核酸も含まない。

【 0 0 6 9 】

第 9 の態様では、第 1 ~ 第 8 の態様のいずれか 1 項に記載のアデノウイルスをコードする核酸によって本発明の課題を解決する。

【 0 0 7 0 】

第 10 の態様では、ヘルパーウイルスの核酸が、第 1 ~ 第 8 の態様のいずれか 1 項に記載のアデノウイルスの 1 以上の発現カセットを含む、第 9 に記載の核酸及びヘルパーウイルスの核酸を含む複製システムによって本発明の課題を解決する。

30

【 0 0 7 1 】

第 10 の態様の実施態様では、アデノウイルス又はそれをコードする核酸がヘルパーウイルスが含む発現カセットを欠いている。

【 0 0 7 2 】

第 11 の態様では、第 9 の態様に記載の核酸及び第 10 の態様に記載の複製システムを含むベクターによって本発明の課題を解決する。

【 0 0 7 3 】

第 11 の態様の実施態様では、ベクターは発現ベクターである。

【 0 0 7 4 】

40

第 12 の態様では、第 1 ~ 第 8 の態様のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス及び / 又は第 9 の態様に記載の核酸及び / 又は第 10 の態様に記載の複製システム及び / 又は第 11 の態様に記載のベクターを含むアデノウイルス細胞によって本発明の課題を解決する。

【 0 0 7 5 】

第 12 の態様の実施態様では、細胞は真核細胞であり、好ましくは動物細胞であり、さらに好ましくは哺乳動物細胞である。

【 0 0 7 6 】

第 12 の態様の好ましい実施態様では、哺乳動物細胞は、マウス、ラット、モルモット、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ及びヒトを含む群から選択される。

【 0 0 7 7 】

50

第 13 の態様では、第 1 ~ 第 8 の態様のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス、第 9 の態様に記載の核酸、第 10 の態様に記載の複製システム、第 11 の態様に記載のベクター又は第 12 の態様に記載の細胞を含む生物、好ましくは哺乳動物生物によって本発明の課題を解決するが、その際、生物は好ましくは、マウス、ラット、モルモット、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ及びヒトを含む群から選択される。

【0078】

第 14 の態様では、アデノウイルスの複製、好ましくはアデノウイルスのインビトロの複製のための第 1 ~ 第 8 の態様のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス、第 9 の態様に記載の核酸、第 10 の態様に記載の複製システム、第 11 の態様に記載のベクター又は第 12 の態様に記載の細胞の使用によって本発明の課題を解決する。

10

【0079】

第 15 の態様では、アデノウイルスの製造、好ましくはアデノウイルスのインビトロの製造のための第 1 ~ 第 8 の態様のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス、第 9 の態様に記載の核酸、第 10 の態様に記載の複製システム、第 11 の態様に記載のベクター又は第 12 の態様に記載の細胞の使用によって本発明の課題を解決する。

【0080】

第 16 の態様では、遺伝子の発現、好ましくは細胞溶解を促進する、好ましくはアデノウイルスの複製中、細胞溶解を促進する、及び / 又はアデノウイルスが介在する細胞溶解を促進する遺伝子の発現のための、第 1 ~ 第 8 の態様のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス、第 9 の態様に記載の核酸、第 10 の態様に記載の複製システム、第 11 の態様に記載のベクター又は第 12 の態様に記載の細胞の使用によって本発明の課題を解決する。

20

【0081】

第 16 の態様の実施態様では、発現される遺伝子は、本明細書で開示される導入遺伝子である。

【0082】

第 17 の態様では、薬物の製造のための、第 1 ~ 第 8 の態様のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス、第 9 の態様に記載の核酸、第 10 の態様に記載の複製システム、第 11 の態様に記載のベクター又は第 12 の態様に記載の細胞の使用によって本発明の課題を解決する。

【0083】

第 14 ~ 第 17 の態様の実施態様では、その中でアデノウイルスが複製する細胞は、核に Y B - 1 を有し、好ましくは細胞周期とは無関係に核に Y B - 1 を有する。

30

【0084】

第 14 ~ 第 17 の態様の実施態様では、その中でアデノウイルスが複製する細胞は、調節解除された Y B - 1 を含む。

【0085】

第 17 の態様の実施態様では、薬物は腫瘍性疾患を治療するためのものである。

【0086】

第 17 の態様の使用の実施態様では、腫瘍性疾患は、悪性腫瘍疾患、癌、癌性疾患及び腫瘍を含む群から選択される。

40

【0087】

第 17 の態様の使用の実施態様では、腫瘍は、固形腫瘍、非固形腫瘍、悪性腫瘍及び良性腫瘍を含む群から選択される。

【0088】

第 17 の態様の使用の実施態様では、腫瘍を形成する細胞の少なくとも一部は核に Y B - 1 を有し、好ましくは細胞周期とは無関係に核に Y B - 1 を有する。

【0089】

第 17 の態様の使用の実施態様では、腫瘍を形成する細胞の少なくとも一部は調節解除された Y B - 1 を含む。

【0090】

50

第 17 の態様の使用の実施態様では、腫瘍を形成する細胞の少なくとも一部は R b 陽性又は R b 陰性である。

【 0 0 9 1 】

第 17 の態様の使用の実施態様では、腫瘍を形成する細胞の少なくとも一部は、薬学上活性のある作用剤に耐性、好ましくは、複数の耐性を有する。

【 0 0 9 2 】

第 17 の態様の使用の好ましい実施態様では、耐性は、複合耐性である。

【 0 0 9 3 】

第 17 の態様の使用の実施態様では、耐性は、抗腫瘍剤、好ましくは細胞増殖抑制剤に対するものであり、及び / 又は耐性は照射によって誘発される。

10

【 0 0 9 4 】

第 17 の態様の使用の実施態様では、薬物が意図される患者は、複数の細胞を含み、その際、細胞は、本発明の第 17 の態様に記載の種々の実施態様に記載されるような細胞である。

【 0 0 9 5 】

第 17 の態様の使用の実施態様では、薬物は少なくとも 1 つのさらなる薬学上活性のある作用剤を含む。

【 0 0 9 6 】

第 17 の態様の使用の実施態様では、薬物はさらなる薬学上活性のある作用剤と一緒に投与される、又はそのために意図される。

20

【 0 0 9 7 】

第 17 の態様の使用の実施態様では、さらなる薬学上活性のある作用剤は、サイトカイン、メタロプロテイナーゼ阻害剤、血管形成阻害剤、結腸直腸癌に対するイリノテカン及び C P T - 11 並びに白血病に対するダウノルビシンなどの細胞増殖抑制剤、C D K 2 / サイクリン E キナーゼ活性を抑制し結腸直腸腫瘍に対して用いることができる C Y C 2 0 2 (McClue S J, Int. J. Cancer 2002, 102, 463-468) 及び R a f - 1 を阻害し例えば乳癌に対して有効な B A Y 43 - 9006 (Wilhelm SM et al., Cancer Res. 2004, 64, 7099-7109) のような細胞周期阻害剤、26S プロテアソーム活性を抑制し、扁平上皮癌に対して用いられる P S - 341 (Fribley A et al., Mol Cell Biol 2004 Nov; 24(22): 9695- 704) のようなプロテオソーム阻害剤、E G F レセプターなどに対する組換え抗体 (乳癌及び前立腺腫瘍に対するハーセプチン; H.G. van der Poel, European Urology 2004, 1-17; 頭部及び頸部腫瘍に対するエルピタックス; Bauman M et al., Radiother. Oncol., 2004, 72, 257-266)、及び特に c - k i t を抑制し、胃腸の腫瘍に対して用いることができる、S T I 571、のような信号伝達カスケードの阻害剤 (H.G. van der Poel, European Urology 2004, 45, 1-17)、特に前立腺腫瘍に対して用いることのできるエンドセリン阻害剤である A B T - 627 (H.G. van der Poel, European Urology 2004, 45, 1-17)、V E G F チロシン・キナーゼ・レセプターのリン酸化を阻害し、特に膠芽腫及び前立腺癌に対して用いることができる S U 5416 (Bischof M et al Int. J. Radiat, Oncol. Biol. Phys. 2004; 60 (4): 1220-32)、E G F R チロシン活性を阻害し、特に前立腺腫瘍に対して用いることができる Z D 1839 (H.G. van der Poel, European Urology 2004, 45, 1-17)、m T O R を阻害し、前立腺腫瘍に対して用いることができる C C I - 779 及び R A D 001 のようなラパマイシン誘導体; を含む群より選択される。本明細書に記述した様々なアデノウイルス及び本発明に従って用いられるアデノウイルスを、それぞれ原則として、いずれの前述の化合物とも共に、本明細書において関連して上述したいずれの適応に対しても用いることができることは本発明の範囲内である。特に好ましい実施態様では、この適応は任意の以前に言及した薬学上活性のある化合物に対して記述される適応である。

30

40

【 0 0 9 8 】

第 17 の態様の使用の実施態様では、薬物は、照射に先立って、照射中に又は照射後に投与される。

50

【 0 0 9 9 】

第 1 7 の態様の使用の好ましい実施態様では、腫瘍を治療する目的で放射線が投与される。

【 0 1 0 0 】

第 1 7 の態様の使用の実施態様では、治療されるべき細胞又は生物は、手段の対象とされ、その際、手段が、照射、細胞増殖抑制剤の投与及び温熱療法を含む群から選択される。

【 0 1 0 1 】

第 1 7 の態様の使用の実施態様では、手段は、局所的に又は全身性で適用される。

【 0 1 0 2 】

第 1 7 の態様の使用の実施態様では、照射は高エネルギーの放射線を使用し、好ましくは、腫瘍性疾患の治療で使用されるいかなる照射も使用する。

【 0 1 0 3 】

第 1 8 の態様では、腫瘍性疾患を治療するために薬物を製造するための、第 1 ～ 第 8 の態様のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス、第 9 の態様に記載の核酸、第 1 0 の態様に記載の複製システム、第 1 1 の態様に記載のベクター又は第 1 2 の態様に記載の細胞の使用によって、本発明の課題を解決するが、その際、腫瘍性疾患は、乳癌、骨腫瘍、胃癌、腸癌、胆嚢癌、膵臓癌、肝癌、腎臓癌、脳腫瘍、卵巣癌、皮膚腫瘍、皮膚付属器の腫瘍、頭頸部癌、子宮癌、滑膜腫瘍、咽頭癌、食道癌、舌癌、前立腺癌を含む群から選択されることを特徴とする。

【 0 1 0 4 】

第 1 9 の態様では、腫瘍性疾患を治療するために薬物を製造するための、第 1 ～ 第 8 の態様のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス、第 9 の態様に記載の核酸、第 1 0 の態様に記載の複製システム、第 1 1 の態様に記載のベクター又は第 1 2 の態様に記載の細胞の使用によって、本発明の課題を解決するが、その際、腫瘍特異的プロモーターは薬物が使用される腫瘍に特異的なプロモーターである。

【 0 1 0 5 】

第 2 0 の態様では、第 1 ～ 第 8 の態様のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス、第 9 の態様に記載の核酸、第 1 0 の態様に記載の複製システム、第 1 1 の態様に記載のベクター又は第 1 2 の態様に記載の細胞及び場合により薬学上許容可能なキャリアを含む医薬組成物によって、本発明の課題を解決する。

【 0 1 0 6 】

第 2 1 の態様では、本発明の課題は、医薬の製造のための、ウイルス、好ましくはアデノウイルスの使用により解決され、その際、ウイルスは、核内に Y B - 1 を含まない正常細胞、細胞周期とは無関係に核内に Y B - 1 を含まない細胞、調節解除された Y B - 1 を含まない細胞のそれぞれにおいて複製欠損であり、そのウイルスは、癌遺伝子又は癌遺伝子産物、特に癌遺伝子タンパク質（Y B - 1 核陽性細胞内で 1 つのウイルス遺伝子、好ましくはアデノウイルス遺伝子を少なくともトランス活性化する）をコードし、その際、その遺伝子は、E 1 B 5 5 k D a、E 4 o r f 6、E 4 o r f 3 及び E 3 A D P を含む群から選択される。好ましくは、ウイルスは、ウイルスタンパク質である E 1 B 5 5 k D（本明細書では E 1 B 5 5 k D a と記載する）及び E 4 o r f 6 を発現する。

【 0 1 0 7 】

第 2 2 の態様では、本発明の課題は、Y B - 1 を核内に含む細胞における複製のための、ウイルス、好ましくはアデノウイルスの使用により解決され、その際、ウイルスは、核内に Y B - 1 を含まない正常細胞、細胞周期とは無関係に核内に Y B - 1 を含まない細胞、調節解除された Y B - 1 を含まない細胞のそれぞれにおいて複製欠損であり、そのウイルスは、癌遺伝子又は癌遺伝子産物、特に癌遺伝子タンパク質（少なくとも 1 つのウイルス性遺伝子、好ましくはアデノウイルス遺伝子をトランス活性化する）をコードし、その際、その遺伝子は、E 1 B 5 5 k D a、E 4 o r f 6、E 4 o r f 3 及び E 3 A D P を含む群から選択される。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 8 】

本発明の第 2 1 及び第 2 2 の態様による使用の更なる実施態様では、ウイルス、特にアデノウイルスが、核内に Y B - 1 を有する細胞又は細胞周期とは無関係に核内に Y B - 1 を含まない細胞、又は調節解除された Y B - 1 を含まない細胞内で複製すると考えられる。

【 0 1 0 9 】

本発明の第 2 1 及び第 2 2 の態様による使用の実施態様では、ウイルス性癌遺伝子タンパク質が E 1 A であるか / 又は癌遺伝子が E 1 A をコードする遺伝子であるか、及び / 又は癌遺伝子タンパク質が E 1 A であると考えられる。

【 0 1 1 0 】

好ましい実施態様では、ウイルス性癌遺伝子タンパク質 E 1 A は、機能的 R b 腫瘍抑制遺伝子産物に結合することができると考えられる。

【 0 1 1 1 】

代替的な実施態様では、ウイルス性癌遺伝子タンパク質 E 1 A は、機能的 R b 腫瘍抑制遺伝子産物に結合することができないと考えられる。

【 0 1 1 2 】

本発明の第 2 1 及び第 2 2 の態様による使用の更なる実施態様では、ウイルス性癌遺伝子タンパク質 E 1 A は、Y B - 1 の核局在化を誘導しないと考えられる。

【 0 1 1 3 】

本発明の第 2 1 及び第 2 2 の態様による使用の更なる態様では、医薬が、その細胞が R b 陽性又は R b 陰性のいずれかである患者のためのものであることが企図される。

【 0 1 1 4 】

好ましい実施態様では、細胞は、その医薬に影響されることになる条件の形成に参与する細胞であることが企図される。

【 0 1 1 5 】

本発明の第 2 1 及び第 2 2 の態様による使用の更なる実施態様では、細胞は、核内が R b 陰性で Y B - 1 陽性であり、特に、細胞周期とは無関係に核内が Y B - 1 陽性であることが企図される。

【 0 1 1 6 】

本発明の第 2 1 及び第 2 2 の態様による使用の更なる実施態様では、医薬は腫瘍の処置用であることが企図される。

【 0 1 1 7 】

本発明の第 2 1 及び第 2 2 の態様による使用の更なる実施態様では、細胞、特に腫瘍又はその一部を形成する細胞が、薬物、好ましくは抗腫瘍薬及びより好ましくは細胞分裂停止薬に対して耐性、特に多剤耐性であることが企図される。

【 0 1 1 8 】

本発明の第 2 1 及び第 2 2 の態様による使用の好ましい実施態様では、細胞が、膜結合輸送タンパク質である P - 糖タンパク質及び / 又は M R P を発現し、好ましくは過剰発現していることが企図される。

【 0 1 1 9 】

本発明の第 2 1 及び第 2 2 の態様による使用の更なる実施態様では、細胞は、p 5 3 陽性又は p 5 3 陰性のいずれかであることが企図される。

【 0 1 2 0 】

本発明の第 2 1 及び第 2 2 の態様による使用の実施態様では、癌遺伝子タンパク質は、野生型癌遺伝子タンパク質 E 1 A と比較して、1 つ又は複数の突然変異又は欠失を含むと考えられ、その際、欠失は、好ましくは、C R 3 領域の欠失及び N 末端の欠失、及び C 末端の欠失を含む群から選択される。E 1 A 癌遺伝子タンパク質は、R b に結合することができると考えられる。

【 0 1 2 1 】

本発明の第 2 1 及び第 2 2 の態様による使用の実施態様では、癌遺伝子タンパク質は、

10

20

30

40

50

野生型癌遺伝子タンパク質と比較して、１つ又は複数の突然変異または欠失を含み、その際、欠失は、好ましくは、ＣＲ１領域及び／又はＣＲ２領域内のものである。癌遺伝子タンパク質Ｅ１Ａは、Ｒｂに結合することができないと考えられる。

【０１２２】

本発明の第２１及び第２２の態様による使用の実施態様では、ウイルス性癌遺伝子タンパク質、特にＥ１Ａは、組織特異的及び／又は腫瘍特異的プロモーターの制御下にあると考えられる。

【０１２３】

本発明の第２１及び第２２の態様による使用の更なる実施態様では、ウイルス、特にアデノウイルスはＹＢ－１をコードしていることが企図される。

10

【０１２４】

本発明の第２１及び第２２の態様による使用の更なる実施態様では、ＹＢ－１は、組織特異的及び／又は腫瘍特異的プロモーターの制御下にあることが企図される。

【０１２５】

本発明の第２１及び第２２の態様による使用の好ましい実施態様では、ウイルス、特にアデノウイルスは、Ｅ４orf6、Ｅ４orf3、Ｅ１Ｂ55k及びアデノウイルスＥ3ADPタンパク質を含む群から選択される、少なくとも１種のタンパク質をコードすることが企図される。

【０１２６】

本発明の第２１及び第２２の態様による使用の代替的实施態様では、細胞は、核内にＹＢ－１を含み、特に腫瘍又はその一部を形成する細胞は、核内にＹＢ－１を含むことが企図される。

20

【０１２７】

本発明の第２１及び第２２の態様による使用の更なる実施態様では、腫瘍は、ＹＢ－１の核内への輸送の誘導後、核内にＹＢ－１を含むことが企図される。

【０１２８】

本発明の第２１及び第２２の態様による使用の好ましい実施態様では、ＹＢ－１の核内への輸送が、少なくとも１つの手段により惹起され、その際、その手段は、照射、細胞分裂停止剤の投与、及び温熱療法を含む群から選択されることが企図される。

【０１２９】

本発明の第２１及び第２２の態様による使用の好ましい実施態様では、手段は、細胞、器官又は生体に適用されることが企図される。

30

【０１３０】

本発明の第２１及び第２２の態様による使用の好ましい実施態様では、ウイルス、特にアデノウイルスが、Ad 24、d1922-947、E1Ad/01/07、d11119/1131、CB016、d1520および、機能的Ｒｂ腫瘍抑制遺伝子産物に結合できるウイルス性Ｅ１Ａ癌遺伝子の発現を欠いているウイルスを含む群から選択されることが企図される。

【０１３１】

第２３の態様では、課題は、医薬の製造のためのウイルス、好ましくはアデノウイルスの使用により解決され、この際、複製がＥ２後期プロモーターのＹＢ－１介在活性化を介して又はＹＢ－１により制御されるように、好ましくは大部分がＥ２後期プロモーターの活性化により制御されるように、ウイルス、特にアデノウイルスが適合されている。１つの実施態様では、ＹＢ－１は、導入遺伝子したＹＢ－１又は細胞性ＹＢ－１、特に細胞性の調節解除されたＹＢ－１、又は調節解除されたＹＢ－１である。導入遺伝子したＹＢ－１は好ましくは、細胞内でベクター、特にある種の又は特定のアデノウイルスにより発現されているＹＢ－１である。Ｅ２後期プロモーターは、好ましくは、野生型アデノウイルス内に含まれるようなアデノウイルスＥ２後期プロモーターであるか、又は本明細書に記載するような導入遺伝子の発現に関連して使用されるＥ２後期プロモーターである。

40

【０１３２】

50

第24の態様では、課題は、核内にYB-1を含む細胞における複製のための、ウイルス、特にアデノウイルスの使用により解決され、その際、複製がE2後期プロモーターの活性化を通じてYB-1により制御されるように、好ましくは大部分がE2後期プロモーターの活性化により制御されるように、ウイルス、特にアデノウイルスが適合されている。実施態様では、YB-1は、遺伝子導入したYB-1又は細胞性YB-1、特に細胞性の調節解除されたYB-1、又は調節解除されたYB-1である。遺伝子移入したYB-1は、好ましくは細胞内でベクター、特にある種の又は特定のアデノウイルスにより発現されているYB-1である。E2後期プロモーターは、野生型アデノウイルス内に存在するようなアデノウイルスE2後期プロモーターであるか、又は本明細書に記載するような導入遺伝子の発現に関連して使用されるE2後期プロモーターである。

10

【0133】

本発明の第23及び/又は第24の態様の好ましい実施態様では、アデノウイルスは、本明細書に開示されているように適合されており、特に、本発明に従って使用され得るように適合されている。

【0134】

第25の態様では、課題は、ウイルス性癌遺伝子タンパク質、特に単離されたウイルス性癌遺伝子タンパク質により解決され、その際に、ウイルス性癌遺伝子タンパク質は、下記特徴を有する：

- a) E1B55k、E3ADPならびにE4orf6及びE4orf4を含む群から選択される、YB-1核陽性細胞内の少なくとも1つのウイルス性遺伝子がトランス活性化される；そして
- b) 細胞核内、特にウイルス性癌遺伝子タンパク質が存在する細胞の細胞核内で、YB-1が誘導されない。

20

【0135】

実施態様では、ウイルス性癌遺伝子タンパク質はE1Aである。

【0136】

更なる実施態様では、ウイルス性癌遺伝子タンパク質は、野生型癌遺伝子タンパク質と比較して、1つ又は複数の突然変異又は欠失を含み、その際、欠失は、CR3領域の欠失、N末端の欠失及びC末端の欠失を含む群から好ましくは選択されることが企図される。

【0137】

30

実施態様では、ウイルス性癌遺伝子タンパク質を通じたYB-1の誘導は、E4orf6及び/又はE1B55kDがその核を含む細胞内に存在しない条件では起こらない。

【0138】

ウイルス性癌遺伝子タンパク質がRbに結合することができることが企図される。

【0139】

代替的な実施態様では、ウイルス性癌遺伝子タンパク質は、1つ又は複数の突然変異又は欠失を含み、その際、欠失は、好ましくはE1Aまたは癌遺伝子タンパク質のCR1領域及び/又はCR2領域内のものである。ウイルス性癌遺伝子タンパク質は、Rbに結合しない。

【0140】

40

第26の態様では、本発明は、ウイルス複製系、特に本発明に従って使用されるようなウイルス、特にアデノウイルスをコードする核酸を含み、ヘルペスウイルスの核酸を含むアデノウイルス複製系に関し、その際、ヘルペスウイルスの核酸は、YB-1をコードする核酸配列を含む。

【0141】

実施態様では、ウイルスの核酸、特にアデノウイルスの核酸、及び/又はヘルペスウイルスの核酸は、複製可能なベクターとして存在することを企図する。

【0142】

第27の態様では、本発明は、医薬の製造、特に腫瘍の処置のための医薬の製造のための、本発明に従って使用されるようなウイルス、特にアデノウイルスをコードする核酸の

50

使用に関する。

【0143】

好ましい実施態様では、細胞、特に腫瘍又はその一部を形成する細胞が、薬物、特に抗腫瘍剤及びより特に細胞分裂停止薬に対して耐性、特に多剤耐性であることを企図する。

【0144】

第28の態様では、本発明は、核内にYB-1を含む細胞における複製のための、本発明に従って使用されるような、ウイルス、特にアデノウイルスの核酸の使用に関し、その際、ウイルスは、核内にYB-1を含まない細胞内、細胞周期とは無関係に核内にYB-1を含まない細胞内、又は調節解除された調節YB-1を含まない細胞内では複製欠損であり、ウイルス遺伝子、好ましくはYB-1核陽性細胞内のアデノウイルス遺伝子の1つを少なくともトランス活性化する癌遺伝子又は癌遺伝子タンパク質をウイルスがコードしており、遺伝子は、E1B55kDa、E4orf6、E4orf3及びE3ADPを含む群から選択される。

10

【0145】

第29の態様では、課題は、医薬の製造のための、本発明に従って使用されるような、ウイルス、特にアデノウイルスをコードする核酸の使用により解決され、その際、ウイルスは、複製がE2後期プロモーターの活性化を通じてYB-1により、好ましくは大部分がE2後期プロモーターの活性化を通じて制御されるように、適合されている。1つの実施態様においては、YB-1は、遺伝子移入したYB-1又は細胞性YB-1、特に細胞性の調節解除されたYB-1又は調節解除されたYB-1のいずれかである。遺伝子移入されたYB-1は、好ましくは、ベクター、特にある種の又は特定のアデノウイルスにより発現されるYB-1である。E2後期プロモーターは、野生型アデノウイルスに含まれるようなアデノウイルスE2後期プロモーターであり、又は本明細書に記載の導入遺伝子の発現との関係において使用されているようなE2後期プロモーターであることが好ましい。

20

【0146】

第30の態様では、課題は、細胞内での複製のために、本願発明に従って使用されるような、ウイルス、特にアデノウイルスをコードする核酸の使用により解決され、その際、ウイルスは、複製が、E2後期プロモーターの活性化を通じたYB-1により、好ましくは大部分がE2後期プロモーターの活性化を通じて制御されるように適合されている。1つの実施態様において、YB-1は、遺伝子移入したYB-1であるか、又は細胞性、特に細胞性の調節解除されたYB-1のいずれかである。遺伝子移入したYB-1は、ベクター、好ましくはある種の又は特定のアデノウイルスにより細胞中で発現されるものであることが好ましい。E2後期プロモーターは、好ましくは野生型アデノウイルス中に存在するようなアデノウイルスE2後期プロモーターであるか、本明細書に記載の移入遺伝子の発現との関係において使用されるようなE2後期プロモーターであることが好ましい。

30

【0147】

第31の態様では、上述の核酸のうちひとつを含むベクターの、本発明の第21又は第22の態様に従った使用のための使用により解決される。

【0148】

第32の態様では、発明は、患者が、本発明に従って使用されるような、ウイルス、特にアデノウイルスと接触したか及び/又は処置されたかを決定することを目的とした細胞、腫瘍組織の細胞、又は患者の特徴付けのためのYB-1と相互作用する作用剤の使用に関する。

40

【0149】

実施態様において、作用剤は、抗体、アンチカリン、アプタマー、アプタザイム及びスビーゲルマーを含む群から選択されることを企図する。

【0150】

第32の態様において、課題は、本発明によるウイルス性癌遺伝子タンパク質、又はそれをコードする核酸の、本発明の第21及び第22の態様による使用との関係において使用されるような、ウイルス、特にアデノウイルスの製造のための使用により解決される。

50

【0151】

実施態様において、ウイルスは、移入遺伝子をコードする核酸を含むことを企図する。

【0152】

更なる実施態様において、ウイルスは、移入遺伝子の翻訳産物及び／又は転写産物を含むことを企図する。

【0153】

好ましい実施態様において、アデノウイルス複製系の核酸及び／又はヘルパーウイルスの核酸は、移入遺伝子又は移入遺伝子をコードする核酸を含むことを企図する。

【0154】

更なる実施態様において、核酸は、移入遺伝子又は移入遺伝子をコードする核酸を含むことを企図する。 10

【0155】

代替的实施態様において、移入遺伝子は、プロドラッグ、サイトカイン、アポトーシス誘導遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、メタロプロテイナーゼ阻害剤の遺伝子、血管新生阻害剤の遺伝子、チロシンキナーゼ阻害剤の遺伝子を含む群から選択されることを企図する。

【0156】

実施態様において、移入遺伝子は、*siRNA*、アプタマー、アンチセンス分子及びリボザイムの核酸を含む群から選択され、この際 *siRNA*、アプタマー、アンチセンス分子及び／又はリボザイムが、標的分子に対するものであることを特徴とすることを企図する。 20

【0157】

更なる実施態様において、標的分子は、耐性関連因子、抗アポトーシス因子、癌遺伝子、血管新生因子、DNA合成酵素、DNA複製酵素、増殖因子及びそのレセプター、転写因子、メタロプロテイナーゼ、特にマトリックスのメタロプロテイナーゼ、ならびにウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーターを含む群から選択される。実施態様において、耐性関連因子は、好ましくはP-糖タンパク質、MRP及びGSTを含む群から選択され、これらをコードする核酸をも含む。実施態様において、抗アポトーシス因子は、BCL2を含む群から選択され、それをコードする核酸をも含む。1つの実施態様において、癌遺伝子は、Ras、特に突然変異しているRas、Rb及びMYCを含む群から選択され、それらをコードする遺伝子をも含む。実施態様において、血管新生因子は、VEGF及びHMGタンパク質を含む群から選択され、これらをコードする核酸をも含む。1つの実施態様において、DNA合成酵素は、テロメラーゼを含む群から選択され、それをコードする核酸をも含む。実施態様において、DNA修復酵素は、Ku-80を含む群から選択され、それをコードする核酸をも含む。1つの実施態様において、増殖因子は、PDGF、EGF及びM-CSFを含む群から選択され、それらをコードする核酸をも含む。更なる実施態様において、レセプターは、好ましくは増殖因子のものであり、その際、増殖因子は、好ましくはPDGF、EGF、及びM-CSFから選択され、それをコードする核酸をも含む。1つの実施態様において、転写因子は、YB-1を含む群から選択され、それをコードする核酸をも含む。1つの実施態様において、メタロプロテイナーゼは、特にマトリックスのメタロプロテイナーゼである。好ましい実施態様において、マトリックスのメタロプロテイナーゼは、MMP-1及びMMP-2を含む群から選択され、それをコードする核酸をも含む。1つの実施態様において、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーターは、uPa-Rを含む群から選択され、それをコードする核酸をも含む。 30 40

【0158】

更なる実施態様において、医薬は、少なくとも1つの医薬的に活性な化合物をさらに含むことを企図する。

【0159】

好ましい実施態様では、薬学上活性のある作用剤は、サイトカイン、メタロプロテイナーゼ阻害剤、血管形成阻害剤、結腸直腸癌に対するイリノテカン及びCPT-11並びに白血病に対するダウノルビシンなどの細胞増殖抑止剤、CDK2/サイクリンEキナ 50

ーゼ活性を抑制し結腸直腸腫瘍に対して用いることができる C Y C 2 0 2 (McClue S J, Int. J. Cancer 2002, 102, 463-468) 及び R a f - 1 を阻害し例えば乳癌に対して有効な B A Y 4 3 - 9 0 0 6 (Wilhelm S M et al., Cancer Res. 2004, 64, 7099-7109) のような細胞周期阻害剤、2 6 S プロテアソーム活性を抑制し、脳腫瘍に対して用いられる P S - 3 4 1 のようなプロテオソーム阻害剤、E G F レセプターなどに対する組換え抗体 (乳癌及び前立腺腫瘍に対するハーセプチン; H.G. van der Poel, European Urology 2004, 1-17; 頭部及び頸部腫瘍に対するエルピタックス; Bauman M et al., Radiother. Oncol., 2004, 72, 257-266)、及び特に c - k i t を抑制し、胃腸の腫瘍に対して用いることができる、S T I 5 7 1 のような信号伝達カスケードの阻害剤 (H.G. van der Poel, European Urology 2004, 45, 1-17)、特に前立腺腫瘍に対して用いることのできるエンドセリン阻害剤である A B T - 6 2 7 (H.G. van der Poel, European Urology 2004, 45, 1-17)、V E G F チロシン・キナーゼ・レセプターのリン酸化を阻害し、特に首及び頭の腫瘍に対して用いることができる S U 5 4 1 6 (Yin D. et al., Oncogene 2004)、E G F R チロシン活性を阻害し、特に前立腺腫瘍に対して用いることができる Z D 1 8 3 9 (H.G. van der Poel, European Urology 2004, 45, 1-17)、m T O R を阻害し、前立腺腫瘍に対して用いることができる C C I - 7 7 9 及び R A D 0 0 1 のようなラパマイシン誘導体; を含む群より選択される。本明細書に記述した様々なアデノウイルス及び本発明に従って用いられるアデノウイルスを、それぞれ原則として、いずれの前述の化合物とも共に、本明細書においてそれに関連して上述したいずれの適応に対しても用いることができることは、本発明内である。特に好ましい実施態様では、この適応は任意の以前に言及した薬学上活性のある化合物に対して記述されている適応である。 10 20

【0160】

実施態様では、薬物は少なくとも2つの作用剤の組合せを含む。その場合、任意の作用剤が、個々に及び独立して細胞増殖抑制剤を含む群より選択される。

【0161】

好ましい実施態様では、少なくとも2つの作用剤が異なる標的分子に作用する。

【0162】

別の実施態様では、少なくとも2つの作用剤が異なる作用機序によって活性を有する。

【0163】

実施態様では、少なくとも1つの作用剤が、ウイルスがその中で複製する細胞の感染される受容能力を増加させる。 30

【0164】

実施態様では、少なくとも1つの作用剤が、細胞内の成分の有効性に影響を及ぼし、好ましくは成分の有効性を増大させ、それによって成分はウイルスの取込みを媒介する。

【0165】

実施態様では、少なくとも1つの作用剤が、核の中への Y B - I の輸送を媒介し、好ましくは前記輸送を増加させる。

【0166】

実施態様では、少なくとも1つの作用剤がヒストンデアシラーゼ阻害剤である。

【0167】

好ましい実施態様では、ヒストンデアシラーゼ阻害剤が、トリコスタチン A、F R 9 0 1 2 2 8、M S - 2 7 - 2 7 5、N V P - L A Q 8 2 4、及び P X D 1 0 1 を含む群より選択される。 40

【0168】

実施態様では、少なくとも1つの作用剤が、トリコスタチン A、F R 9 0 1 2 2 8 (膀胱腫瘍に対して、Sato N et al., Int. J. Oncol. 2004, 24, 679-685; M S - 2 7 - 2 7 5 (前立腺腫瘍に対して、Camphausen K et al., Clinical Cancer Research 2004, 10, 6066- 6071)、N V P - L A Q 8 2 4 (白血病に対して、Nimmanapalli R et al., Cancer Res. 2003, 63, 5126- 5135; P X D 1 0 1 (卵巣腫瘍に対して、Plumb JA et al, Mol. Cancer Ther. 2003, 2, 721-728)、スクリプタイド (乳癌に対して、Keen JC et 50

al., Breast Cancer Res. Treat. 2003, 81, 177- 186)、アピシジン (メラノーマに対して、Kim SH et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004, 315, 964-970)及びC I - 9 9 4 (様々な腫瘍に対して、Nemunaitis JJ et al., Cancer J. 2003, 9, 58- 66)を含む群より選択される。ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の作用機序については、特に Lindemann RK et al., Cell Cycle 2004, 3, 77-86 に記述されている。本明細書に記述される様々なアデノウイルス及び本発明に従って用いられるアデノウイルスを、それぞれ原則として前述の化合物と共に、本明細書でそれに関連して上述したいずれの適応に対しても用いることができることは、本発明の範囲内である。特に好ましい実施態様では、この適応は以前に言及した薬学上活性のあるそれぞれの化合物に対して記述された適応である。

【0169】

実施態様では、少なくとも1つの作用剤はトポイソメラーゼ阻害剤である。

【0170】

好ましい実施態様では、トポイソメラーゼ阻害剤は、カンプトテシン、イリノテカン、トポテカン、DX - 8 9 5 1 f、SN - 3 8、9 - アミノカンプトテシン、9 - ニトロカンプトテシン、エトポシド及びダウノルビシンを含む群より選択される。これらを様々な腫瘍、例えば結腸直腸腫瘍、膵臓腫瘍、卵巣癌、前立腺癌に対して用いることができる。利用される分野については特に、Recchia F et al., British J. Cancer 2004, 91, 1442-1446; Cantore M et al., Oncology 2004, 67, 93-97; Maurel J. et al., Gynecol. Oncol 2004, 95, 114-119; Amin A. et al., Urol. Oncol. 2004, 22, 398-403; Kandler HL et al., Invest. New Drugs 2004, 22, 323-327, Ahmad T. et al., Expert Opin. Pharmacother. 2004, 5, 2333-2340; Azzariti A. et al., Biochem Pharmacol. 2004, 68, 135-144; Le QT et al., Clinical Cancer Res. 2004, 10, 5418-5424 に記述されている。ここに記述した様々なアデノウイルス及び本発明に従って用いられるアデノウイルスは、それぞれ、原則として、前述の化合物と共に、本明細書でそれに関連して上述したいずれの適応に対しても用いることができることは、本発明の範囲内である。特に好ましい実施態様では、この適応は、以前に言及した医薬的に活性を有する各々の化合物に対して記述された適応である。

【0171】

好ましい実施態様では、作用剤がトリコスタチンA及びイリノテカンを含む。

【0172】

実施態様では、ウイルス、特に本発明の態様の1つによるウイルス、が少なくとも2つの作用剤から分離されている。

【0173】

好ましい実施態様では、ウイルスの少なくとも1単位の投与量が、少なくとも2つの作用剤のうちの1つの少なくとも1単位の投与量から分離されている。

【0174】

第34の態様では、本発明は、ウイルス、特に本発明の任意の態様によるウイルス、及び少なくとも2つの作用剤を含むキットに関する。その場合、任意の作用剤が、個々に及び独立して細胞増殖抑制剤を含む群より選択される。

【0175】

本発明に従って上で開示されたアデノウイルス、特に、本発明の第1～第8の態様に関連して開示されたものはまた本明細書ではグループIのアデノウイルスと呼び、たとえばE1Aのようなトランス活性化する癌遺伝子を有するアデノウイルス及び/又は本明細書でいうもの、特に上で本発明に従って使用されるべきものはまた、本明細書ではグループIIのアデノウイルスと呼ぶ。グループIのアデノウイルス及びグループIIのアデノウイルスはまた、まとめて本明細書では、アデノウイルス、又は本発明に係るアデノウイルス又は本発明に係るウイルスと呼ぶ。

【0176】

本発明は、アデノウイルス遺伝子の発現配列の反転が効率的な複製を生じ、場合により、アデノウイルスに感染した細胞の溶解を生じるという驚くべき知見に基づく。アデノウ

10

20

30

40

50

イルス遺伝子の経時的に変化する発現に関して、本明細書では個々に又はまとめて、第2のタンパク質に先立って発現される第1のタンパク質と呼ばれるE1Bタンパク質及びE4タンパク質が特に強調されるべきである。第2のタンパク質は、E1Aタンパク質を含む群から選択される。先ずE1Aタンパク質が発現し、順にE1Bタンパク質及びE4タンパク質が発現する野生型アデノウイルスに比べて、反転しているこの発現順は、転写因子が活性化され、たとえば感染した細胞の核に輸送され、そこでのさらなる複製活性に影響を与え、複製活性を制御することを保証している。野生型アデノウイルスにおけるアデノウイルス転写物の動態は、たとえば、Glenn G. M and Ricciardi R. P., *Virus Research* 9: 73-91, 1988に記載されており、彼らは、野生型のE1A転写物では、すなわち、E4orf6及びE1B55kの転写物及び翻訳産物に先立って、普通、E1A12S及びE1A13Sの転写物が検出可能であると報告している。本件の場合、E1Bタンパク質は、本明細書では一般に、他の表示がない限り、好ましくはE1B55kDタンパク質である。本件の場合、E4タンパク質は、本明細書では一般に、他の表示がない限り、好ましくはE4orf6タンパク質である。本件の場合、E1Aタンパク質は、本明細書では一般に、他の表示がない限り、好ましくはE1A12Sタンパク質又はE1A改変アデノウイルスに関連して本明細書で記載されるようなE1Aタンパク質である。

10

20

30

40

50

【0177】

E1Aタンパク質、特にまたE1A12Sタンパク質が原則として置換されてもよいことは本発明の範囲内である。そのような置換されたE1Aタンパク質及びE1A12Sタンパク質は、本明細書ではまた、E1Aタンパク質及びE1A12Sタンパク質と呼び、又は他の表示がない限り、この用語によって含まれるように判断されるべきである。E1A12タンパク質の代わりに、たとえば、Dickopp A., Esche H., Swart G., Seeber S., Kirch H. C., Opalka B., *Cancer Gene Ther.*, Jul;7(7): 1043-50, 2000によって記載されるように、腫瘍抑制機能を有するE1Aタンパク質を使用してもよい。さらに、E1Aタンパク質の誘導体、特にE1A12Sの誘導体は、本明細書で使用する及び/又は呼ばれるとき、一般に、Rb/E2F複合体から因子E2Fを放出することが可能であるタンパク質である。Chellappan S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4549-4533, 1992に記載されるように、とりわけ、シミアンウイルス40腫瘍抗原(SV40ラージT抗原)、パピローマウイルスE7タンパク質(HPVE7)がある。

【0178】

E4orf6及びE1B55kの誘導体を使用してもよいことは本発明の範囲内であり、本明細書で使用されるとき、用語E4orf6及びE1B55kはそのような誘導体を含む。誘導体は、たとえば、Shen Y. et al., *J. of Virology* 75: 4297-4307, 2001; Querido E. et al., *J. of Virology* 75: 699-709, 2001に記載されている。

【0179】

E1Bタンパク質が、E1Aタンパク質に先立って発現されること、又はE4タンパク質がE1Aタンパク質に先立って発現されること、又はE1Bタンパク質及びE4タンパク質が、それぞれ上述のようにE1Aタンパク質に先立って発現されることは本発明の範囲内である。

【0180】

そのような方法で設計されたアデノウイルスは、核にYB-1を発現する、好ましくは細胞周期とは無関係に核にYB-1を発現するか、又は調節解除されたYB-1を好ましくは細胞質に含む細胞の感染の際、特に高いレベルで複製することが可能である。以下においてそれらに束縛されることを望まないで、本発明者は、E1Bタンパク質及び/又はE4から成る複合体及びこれら2つのタンパク質の個々が調節解除されたYB-1を細胞核に輸送でき、又は、E1Aタンパク質に先立って発現しているE1Bタンパク質及び/又はE4タンパク質の影響下、そこでアデノウイルスの複製を開始できることを想定している。いったん、細胞核において、又は活性化形態でそこに存在すると、本明細書で記載するようにYB-1は、特にE2後期プロモーターを用いて効率的に複製してもよい。従って、E1Bタンパク質及び/又はE4タンパク質の時間的に早い発現は、E1Aタンパ

ク質の最初の発現と共に進む、野生型で認められるカスケードを回避する。好ましい実施態様では、E 1 A タンパク質は、E 1 B タンパク質及び/又はE 4 タンパク質をもはやトランス活性化しない、又は極めて限定された程度にしかそれをトランス活性化しないE 1 A タンパク質である。好ましくは、このトランス活性化は、核にY B - 1を有さない細胞における効率的な複製を確保するにも十分でなければ、複製を確保するにも十分ではない。トランス活性化は、細胞周期とは無関係に核にY B - 1を有さない細胞又は調節解除されたY B - 1を有さない細胞で生じないことが好ましい。

【0181】

さらに、本発明は、アデノウイルスは、少なくともタンパク質をコードする核酸を含めば特に効率的に複製することができ、その際、タンパク質は、E 1 B タンパク質、E 4 タンパク質およびE 1 A タンパク質を含む群から選択され、そのタンパク質の少なくとも1つが野生型アデノウイルスにおける各タンパク質の発現を制御するプロモーターとは異なるプロモーターの制御下にあるという驚くべき知見に基づく。そのような複製は、特に効率的であり、普通、細胞が核にY B - 1を有する、特に細胞周期とは無関係にY B - 1を有する場合、又は細胞が調節解除されたY B - 1を有する、特に調節解除されたY B - 1を細胞質に有する場合、結果として腫瘍溶解を生じる。E 1 B タンパク質、E 4 タンパク質及びE 1 A タンパク質について上で言ったことはここでも適用される。野生型アデノウイルスでは、E 1 B タンパク質はE 1 B プロモーターにより制御され、E 4 タンパク質はE 4 プロモーターにより制御され、E 1 A タンパク質はE 1 A プロモーターにより制御される。野生型アデノウイルスにおいて前述のタンパク質の発現を制御するものとは異なるプロモーターを選択することにより、前述のタンパク質の発現並びにアデノウイルスの核酸及びタンパク質の調節性相互作用が変化する。プロモーターを選択することによって、時間的に異なる発現パターンが創製され、以下においてそれに束縛されることを望まないで、それは、細胞で観察される複製を生じ、そのメカニズムは、アデノウイルスのタンパク質、E 1 B、E 4 及びE 1 Aの時間的に異なる発現に関して前に記載されたようなものであってもよい。野生型アデノウイルスにおける各タンパク質の発現を制御するものとは異なるプロモーターを介した前記タンパク質の制御のための具体的設計の例は、従属クレーム及び実施例部分から選べばよく、特に、X V i r P S J L 1 及びX V i r P S J L 2 と呼ばれるウイルスはその代表例である。好ましくは、E 1 B タンパク質はE 1 B 5 5 k D タンパク質であり、E 4 タンパク質はE 4 o r f 6 タンパク質であり、E 1 A タンパク質はE 1 A 1 2 S タンパク質である。

【0182】

E 4 タンパク質同様にE 1 B タンパク質を好ましく制御するプロモーターは、アデノウイルスプロモーターが使用されるとき、E 1 B タンパク質の発現制御の場合、それらはE 1 B プロモーターとは異なり、E 4 タンパク質の発現制御の場合、それらはE 4 プロモーターとは異なるという条件付きで、腫瘍特異的プロモーター、器官特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、異種プロモーター、及びアデノウイルスプロモーターを含む群から選択される。E 1 B タンパク質及び/又はE 4 タンパク質の発現制御にはE 1 A プロモーターの使用が特に好ましい。E 1 A プロモーターは、たとえば、Boulanger P. A and Blair G. E, Biochemical J., 275: 281-299, 1991に記載されている。さらに、各異種プロモーター及びそのほかのいかなる異種プロモーターの使用も可能であり、すなわち、野生型アデノウイルスにおける各タンパク質の発現を制御するものとは異なるプロモーター。代表的な例はC M V プロモーターであり、そのほかのプロモーターも当業者には明らかであろう。

【0183】

E 1 A の制御のために使用されるプロモーターは、アデノウイルスのプロモーターがE 1 A プロモーターとは異なるという条件付きで、腫瘍特異的プロモーター、器官特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、異種プロモーター、及びアデノウイルスプロモーターを含む群から選択されてもよい。前述のタンパク質、すなわち、E 1 B タンパク質、E 4 タンパク質又はE 1 A タンパク質の1つ又は幾つかが同一プロモーターの制御下にあ

り、にもかかわらず、E 1 B タンパク質及び E 4 タンパク質が同一プロモーターの制御下にあることが特に好ましいということは本発明の範囲内である。E 1 A タンパク質の発現は、Y B - 1 が制御するプロモーター又は Y B - 1 が調節できるプロモーターにより制御されることが特に好ましい。そのようなプロモーターは、本発明の他の態様と併せて本明細書で開示される。アデノウイルス E 2 後期プロモーターの使用は、E 1 A プロモーターの発現の制御には特に好ましく、第 1 に Y B - 1 により調節することができ、第 2 に、事実上無視できるほど、Y B - 1 の非存在下では転写をほとんど示さないもので、E 2 後期プロモーターの制御下にある核酸の発現制御が確保される。このことは、特に医学分野に適用される場合、生物学的安全性を相当に高める。

【0184】

さらに、本発明は、Y B - 1 が特に細胞核において直接的に又は間接的にのいずれかで複製に提供されれば、或いは Y B - 1 の提供に直接的に又は間接的にアデノウイルスのタンパク質が介在しており、その際、そのようなアデノウイルスが E 1 A と異なっていれば、アデノウイルスは、核に Y B - 1 を有する細胞、特に細胞周期とは無関係に核に Y B - 1 を有する細胞及び / 又は調節解除された Y B - 1 を有する細胞、好ましくは、細胞質に調節解除された Y B - 1 を有する細胞で特に複製することを見出した。本発明の本態様は、本明細書でも開示される態様とは異なる、すなわち、トランス活性化する E 1 A 変換のアデノウイルス、好ましくは、グループ I I のアデノウイルスの使用が、Y B - 1 核陽性の腫瘍細胞、特に細胞周期とは無関係に Y B - 1 陽性である Y B - 1 核陽性の細胞及び調節解除された Y B - 1 を有する、特に細胞質に Y B - 1 を含む細胞で複製ができ、その程度において、E 1 A タンパク質、特に E 1 A 1 3 S タンパク質のトランス活性化の特性がここでは使用されず、すなわち、グループ I のアデノウイルスとの関連で、しかし、むしろ、好ましい実施態様において、E 1 A 1 3 S は機能的に不活性であるので、もはや E 4 o r f 6 及び E 1 B 5 5 k をトランス活性化することができず、それは、直接的に又は間接的に Y B - 1 の輸送及び提供にそれぞれ関与する。したがって、本発明の本態様に従うと、アデノウイルスの効率的な複製は可能ではない。核における Y B - 1 の提供及びアデノウイルスの複製に対する Y B - 1 の提供の場合は、もはや E 1 A タンパク質の直接的な又は間接的な関与の制御下ではないが、E 1 A によって制御されない E 1 B タンパク質、好ましくは E 1 B 5 5 k D タンパク質及び / 又は E 4 タンパク質、好ましくは E 4 o r f 6 タンパク質の発現を介して生じる。

【0185】

アデノウイルスの本実施態様は、前述の手段の 1 つ、たとえば、E 1 A タンパク質の発現に比べて、E 1 B タンパク質及び / 又は E 4 タンパク質の時間的発現を前に進めることによって、或いは、1 又は数個の E 1 B タンパク質、E 4 タンパク質及び E 1 A タンパク質を野生型アデノウイルスにおける各タンパク質の発現を制御するプロモーターとは異なるプロモーターの制御下に置くことによって提供されてもよい。

【0186】

最終的に、本発明者は、効果的なアデノウイルスの複製は、特に核に Y B - 1 を有する、さらに特に細胞周期とは無関係に核に Y B - 1 を有する細胞、又は調節解除された Y B - 1 を好ましくは細胞質に有する細胞で生じてもよく、E 1 B タンパク質、E 4 タンパク質及び E 1 A タンパク質の少なくとも 1 つの場合、特にその好ましい形態はプロモーターの制御下の発現カセットにおいて発現されるという驚くべき知見から出発する。本発明の実施態様の 1 つでは、前記タンパク質の単一の 1 つをそれぞれ含む 3 種の発現カセットが基本的に提供される。別の実施態様では、2 以上のタンパク質、E 1 B、E 4 及び E 1 A 及び特に E 1 A 1 2 S の場合、その誘導体及び可能な置換基を含んでもよい。アデノウイルスがタンパク質、E 1 B、E 4 及び E 1 A に関する核酸を含むという態様に関連して前に述べたことは、種々のタンパク質及びそれぞれ使用するプロモーターの設計にも適用可能である。そのような発現カセットを使用する場合、タンパク質及び発現カセットの各タンパク質に相当する野生型アデノウイルスのゲノムにそれをコードする核酸は、完全に又は部分的にのいずれかで欠失されて、確実にウイルスを安定にし、少なくともさらに大き

な程度への組換えを回避することが好ましい。

【0187】

原則として、発現カセットはアデノウイルスの各領域及び各部位にクローニングされ、好ましくは、1又は数個のカセットを個々に又は互いに組み合わせてウイルスのE1領域、E3領域及び/又はE4領域に挿入する。E1領域、E3領域及びE4領域が完全に欠失される、部分的に欠失される、又は全く欠失されないことが可能であり、本発明に係るアデノウイルスに関してはE1A13S遺伝子をコードする核酸は、ウイルスによってトランス活性化するいかなるE1Aタンパク質も提供しないように不活化される又は欠失されることが好ましい。E1領域、E3領域及びE4領域の1又は数個におけるそのような欠失の程度は、使用される発現カセット、及び場合により、さらに導入されるが外来遺伝子又は導入遺伝子又はそれら、すなわち、アデノウイルス遺伝子とは異なる、少なくとも、野生型アデノウイルスで優勢であるアデノウイルス核酸の調節性の程度で提供されないセンスにおいて異なる、或いはそのような部位で野生型アデノウイルスのアデノウイルス核酸の配列で提供されない遺伝子を含むさらなる発現カセットにより決定される。E1Bタンパク質、E4タンパク質及び/又はE1Aタンパク質をコードする1又は数個の発現カセットに含有される核酸がアデノウイルスのゲノムにおいて完全に又は部分的に欠失されることは本発明の範囲内である。本発明XvirPSJL1又は2に係るアデノウイルスのような実施態様では、E4orf6をコードするアデノウイルス核酸は部分的に欠失又は完全に欠失されるが、それをコードする完全な核酸が発現カセットに含有される。好ましくは、これは、E1B55k(E155Kdともいう)タンパク質及び/又はE1A12Sタンパク質についても実現される。欠失の程度は、野生型アデノウイルスの最大パッケージサイズの約103%の最大パッケージサイズに達するように好ましい実施態様で選択されるべきであるが、この限定は単に好ましい限定に過ぎない。アデノウイルスゲノムで行われる可能性のある欠失は、たとえば、さらなる感染性の濃縮粒子が確実に製造されうるような好ましい実施態様における限定の単なる対象である。欠失の正確な程度は、標準試験と共に本明細書で提供される開示に基づいて当業者によって決定されてもよい。

【0188】

本明細書で記載されるアデノウイルスの構築のための出発点として、いかなる野生型アデノウイルスを使用してもよいが、本発明の技術的教示に従ってそれらが構築されるといいう条件で、そのほかのアデノウイルスを使用してもよい。サブグループCそして次にこのグループ内のアデノウイルス2及びアデノウイルス5に頼ることが特に好ましい。

【0189】

用語、E1Bタンパク質(単数)及びE1Bタンパク質(複数)、E4タンパク質(単数)及びE4タンパク質(複数)、並びにE1Aタンパク質(単数)及びE1Aタンパク質(複数)は、他の表示がない限り、同義的に本明細書で使用される。

【0190】

本明細書で使用するとき、用語「調節解除された」YB-1は、正常に存在する細胞、好ましくは非腫瘍細胞のYB-1とは量的に及び/又は質的に異なる形態で存在する本明細書で記載されるYB-1分子又はYB-1タンパク質をいう。特定のウイルスがそのような調節解除されたYB-1を含む細胞のバックグラウンドで調節解除されたYB-1の存在下で複製できることによって、調節解除されたYB-1を特徴づけ、同定することができる。それに関連した特定のウイルスは、そのE1Aタンパク質に突然変異があり、トランス活性化する機能を呈するものである。特定のウイルスの例は、ADデルタ24、d1922-947、E1Ad/01/07及びCB106及び/又はHowe J. A. et al., Molecular Therapy 2: 485-495, 2000; Fueyo J. et al., Oncogene 19: 2-12, 2000; Heise C. et al., Nature Medicine 6: 1134-1139, 2001; Balague C., et al., J. Virol., 75: 7602-7611, 2001; Bautista D. S. et al., Virology 182: 578-596, 1991; Jelma T. N. et al., Virology 163: 494-502, 1988; Wong H. K. and Ziff E. B. J. of Virology 68: 4910-4920, 1994に記載されるものである。そのような細胞及びそのようなバックグラウンドを有するそのような細胞は、グループIのアデノウイルス及び/又はグ

ループ I I のアデノウイルスの複製に使用することができる。さらに、そのような細胞を含む腫瘍を本発明に係るアデノウイルスによって溶解してもよい。

【 0 1 9 1 】

さらに、本発明は、Y B - 1 核陽性の腫瘍細胞における E 1 A 修飾のアデノウイルスの D N A 複製が E 2 後期プロモーターの活性化に基づくという驚くべき知見に基づく。E 1 A 改変のアデノウイルスは、(a) Y B - 1 核陰性の細胞では、野生型に比べて複製が少ない又は全く複製しない、(b) 少なくとも 1 つのウイルス遺伝子に対してトランス活性化活性を有し、その際、遺伝子は特に E 1 B - 5 5 k D a、E 4 o r f 6、E 4 o r f 3 及び E 3 A D P を含む群から選択され、及び / 又は (c) アデノウイルスによって細胞の Y B - 1 を核に転移しないものとして理解されるべきである。場合により、本発明に係るアデノウイルスは、アデノウイルスにコードされる E 1 A タンパク質の結合が E 2 F の R B への結合を妨害し、E 2 F と R b から成る各複合体を溶解することが可能であるというさらなる特性を有する。前述の特徴 (a) ~ (C) の 1 又は数個、好ましくは特徴 (a) ~ (C) のすべてを有するアデノウイルスは、Y B - 1 を核に有さない細胞では複製欠損性である。

10

【 0 1 9 2 】

実施態様では、ここで強く低下した複製は特に、野生型に比較して 2 の因子、好ましくは 5 の因子、さらに好ましくは 1 0 の因子及び最も好ましくは 1 0 0 の因子減少する複製を意味する。好ましい実施態様では、同一の又は類似の細胞株、同一の又は類似の、感染に対するウイルス力価 (感染の複合性、M O I 又はプラーク形成単位、p f u) 及び / 又は同一の又は類似の一般的実験条件を用いて、複製の比較を行う。複製は特に粒子の形成を意味する。更なる実施態様では、複製の手段がウイルス核酸の合成程度であってもよい。ウイルス核酸の合成程度の決定方法及び粒子形成の測定方法は、双方共に当業者に既知である。

20

【 0 1 9 3 】

知見、方法、使用又は核酸、タンパク質、複製システムなどは、必ずしもアデノウイルスに限定されない。基本的に、そのようなシステムは、本明細書にも含まれるそのほかのウイルスにも存在する。

【 0 1 9 4 】

本発明に係るウイルスを使用すること又は本発明に従って本明細書に記載されるウイルスの使用が従来技術に従った 1 0 ~ 1 0 0 p f u / 細胞に比べて、1 ~ 1 0 p f u / 細胞を用いた場合、野生型に匹敵する複製を生じてよい。

30

【 0 1 9 5 】

細胞性 Y B - 1 はコードされた任意の Y B - 1 でなければならず、好ましくは、細胞によって発現され、Y B - 1 は、特に、アデノウイルスによって、好ましくは本明細書で記載されるようにアデノウイルス及び / 又はヘルパーウイルスによって各細胞に感染される前に特に細胞に存在する。しかしながら、細胞性 Y B - 1 が、ウイルス、好ましくはアデノウイルスによる感染のような外因性の手段が適用される場合にのみ、細胞に導入される又は細胞によって産生される Y B - 1 であることも本発明の範囲内である。

【 0 1 9 6 】

それに束縛されることを望まないで、本発明者は、E 2 早期プロモーター、すなわち、早期 E 2 プロモーターは、本発明に従って使用されるウイルスの複製と関連した、かつ本発明のアデノウイルスの本発明に従った使用と関連したヒト細胞性 E 2 F 転写因子によってスイッチオンされないことを想定する。そのような状況下で、複製の開始は、細胞の R b の状態と無関係であり、すなわち、本明細書で開示されたウイルスを用いて感染させられ、かつ、好ましくは続いて溶解される腫瘍細胞は、機能的な R b タンパク質及び不活性の R b タンパク質のいずれかを含有してもよい。さらに、本明細書で開示されるアデノウイルスを用いた、又は本明細書で開示される条件を用いたアデノウイルスの複製は、いかなる機能的な p 5 3 タンパク質も要求しないが、その存在によって否定的な影響を受けることもない。その程度において、無傷の R b タンパク質は生体内での効率的な複製を妨害

40

50

するので、R b 陰性及び R b 変異の細胞でのみ生体内のアデノウイルスの複製が提供されるという前提で E 1 A タンパク質における 1 又は数個の欠失の対象とされてきた、A d 2 4、d 1 9 2 2 - 9 4 7、E 1 A d / 0 1 / 0 7、C B 0 1 6 又はたとえば、欧州特許 E P 0 9 3 1 8 3 0 に記載されるようなアデノウイルスの癌溶解又は腫瘍溶解のアデノウイルスの使用の原理から、技術的教示は離れる。従来技術のアデノウイルスのシステムは、早期 E 2 プロモーター (E 2 早期プロモーター) 及び「遊離の E 2 F」によるアデノウイルスの生体内複製を制御するために E 1 A に基づく。それにもかかわらず、従来技術のこれら既知のウイルスを、本発明に従って、細胞周期とは無関係に核に Y B - 1 を含有する細胞又は調節解除された Y B - 1 を含む細胞における複製に使用してもよい。

【 0 1 9 7 】

10

前記欧州特許 E P 0 9 3 1 8 3 0 号に記載されたウイルス、特にアデノウイルスは、本発明に従って使用してもよい。さらに具体的には、前記特許に記載されたウイルスは、複製欠損性であり、機能的な R b 腫瘍抑制遺伝子産物を結合することが可能であるウイルス性の癌タンパク質の発現を欠くウイルスである。アデノウイルスは、機能的な腫瘍抑制遺伝子産物、さらに詳しくは R b を結合することが可能であるウイルス性の E 1 A 癌タンパク質の発現を欠くいかなるアデノウイルスであることもできる。ウイルス性の E 1 A 癌タンパク質は、たとえば、p 1 0 5 R b タンパク質、p 1 3 0 及び p 1 0 7 タンパク質の結合に関与する、本明細書では A d 5、ヌクレオチド 6 7 9 ~ 7 9 0 位と呼ばれるアデノウイルス A d 5 におけるアミノ酸 3 0 位 ~ 8 5 位での C R 1 ドメイン及び / 又は A d 5 におけるアミノ酸 1 2 0 位 ~ 1 3 0 位、ヌクレオチド 9 2 0 ~ 9 6 7 位での C R 2 ドメインにて不活性化突然変異を示すことができる。しかしながら、アデノウイルスが 2 d 1 3 1 2 型又は 5 N t d 1 1 0 1 0 型であることは本発明の範囲内である。

20

【 0 1 9 8 】

薬物の製造、特に本明細書で開示される腫瘍性疾患及びそのほかの疾患を治療するための薬物の製造のための本発明に従ったアデノウイルスの使用に関連して、かつ、核に Y B - 1 を有する、好ましくは、細胞周期とは無関係に核に Y B - 1 を有する細胞又は調節解除された Y B - 1 を好ましくは細胞質に有する細胞での複製への本発明に従ったアデノウイルスの使用と同様に本発明のアデノウイルスの使用に関連して、複製は最終的には、核に、好ましくは細胞周期とは無関係に Y B - 1 を有する、言い換えれば Y B - 1 の核陽性の細胞、又は調節解除された Y B - 1 を含む細胞で生じる。核に Y B - 1 を有さないが細胞質にのみ Y B - 1 を含有する細胞又はいかなる調節解除された Y B - 1 も含有しない細胞ではアデノウイルスはそのままでは複製しないか、又は極めて低レベルでしか複製しないことを特に認識すべきである。その程度において、これらウイルスの成功的複製には、Y B - 1 が核に好ましくは細胞周期とは無関係に存在すること、又は調節解除された Y B - 1 が存在することが必要である。以下でも説明するように、たとえば、好ましくは細胞周期とは無関係に Y B - 1 の発現又は存在を生じる、又は核に調節解除された Y B - 1 を生じる又は調節解除された Y B - 1 の発現を生じる条件を細胞に適用することによってこれを達成することができる。各手段は、たとえば、本発明に従って使用される又は本発明の対象とされる、アデノウイルス遺伝子に加えて Y B - 1 をコードする、特にその発現をコードする遺伝情報を運んでいるアデノウイルスによる Y B - 1 のコーディング及び発現である。細胞の核への Y B - 1 の輸送、核でのその誘導及び発現を生じるそのほかの手段は、細胞及びそのような細胞を含有する生物への細胞増殖抑制剤、照射、温熱などのような投与のようなストレスの適用である。好ましい実施態様では、照射は、たとえば、腫瘍性疾患の治療で使用されている任意の放射線である。

30

40

【 0 1 9 9 】

本発明に従って特に腫瘍溶解に使用されるアデノウイルス並びに本発明に係るアデノウイルスは、好ましい実施態様では、細胞周期とは無関係で核に Y B - 1 を有さない Y B - 核陰性である細胞、又は調節解除された Y B - 1 を含まない細胞では複製しないという事実を特徴とする。

【 0 2 0 0 】

50

本発明のアデノウイルスとは異なる本発明に従って使用されるべきアデノウイルスの一部のさらなる特徴は、それらが、本明細書では癌遺伝子タンパク質と呼ぶウイルス性癌遺伝子をコードしており、癌遺伝子タンパク質は好ましくは E 1 A であり、癌遺伝子タンパク質はウイルスの複製及び / 又は前記ウイルスが感染した細胞の細胞溶解に影響を有する少なくとも 1 つのウイルス性遺伝子である。好ましくは、複製への影響は、ウイルスの癌遺伝子タンパク質が存在しない場合に比べて癌遺伝子タンパク質が存在する場合においてウイルスの複製がさらに良好であるようにする。この過程は本明細書では、トランス活性化、特にトランス活性化に E 1 A が介在している場合は E 1 A トランス活性化と呼ぶ。用語「トランス活性化の」又は「トランス活性化」は、好ましくは、ウイルスの癌遺伝子タンパク質自体をコードする遺伝子とは異なる 1 又は数個のそのほかの遺伝子の発現及び / 又は転写に、ウイルスの癌遺伝子タンパク質が影響を有すること、すなわち、その発現及び / 又は翻訳を制御する、及びそれを活性化する過程を記載する。そのようなウイルス遺伝子は、E 1 B 5 5 k D a、E 4 o r f 6、E 4 o r f 3 及び E 3 A D P 並びに前述の遺伝子及び遺伝子産物の組み合わせである。

10

20

30

40

50

【0201】

本発明に従って使用されるアデノウイルスの、並びに本発明のアデノウイルスの、さらなる、が任意にすぎない特徴は、その結合特性であり、それにコードされるタンパク質の特定のものの腫瘍抑制剤 R b への結合特性である。基本的に、本発明に従って使用されるアデノウイルスが R b に結合してもよく又はしなくてもよいことは本発明の範囲内である。アデノウイルスの 2 つの別の実施態様のいずれかの使用は、処理された細胞又は処理されるべき細胞の R b の状況に無関係である。

【0202】

R b に結合しない能力を E 1 A に付与するために、以下の欠失を E 1 A 癌タンパク質に行うことができる：C R 1 領域（A d 5 におけるアミノ酸 3 0 ~ 8 5 位）における欠失及び C R 2 領域（A d 5 におけるアミノ酸 1 2 0 ~ 1 3 9 位）の欠失。そのように行うには、C R 3 領域が保存され、そのほかの早期ウイルス遺伝子に対してトランス活性化機能を用いることができる。

【0203】

R b に結合する能力を E 1 A に付与するために、E 1 A 癌タンパク質への以下の欠失が基本的には可能である：C R 3 領域（アミノ酸 1 4 0 ~ 1 8 5 位）の欠失；N 末端（アミノ酸 1 ~ 2 9 位）の欠失；アミノ酸 8 5 ~ 1 1 9 位の欠失；C 末端（アミノ酸 1 8 6 ~ 2 8 9 位）の欠失。上に列記した領域は、E 2 F の R b への結合を妨害しない。トランス活性化機能もそのまま残るが、野生型 A d 5 に比べると低下する。

【0204】

E 1 A タンパク質、特に E 1 A 1 2 S タンパク質を、ある実施態様では R b に結合できるように設計し、別の実施態様では R b に結合できないように設計して、そのような E 1 A 1 2 S が、従来技術では改変 E 1 A 1 2 S と呼ばれることもあるにもかかわらず、本発明の意味では、E 1 A タンパク質、特に E 1 A 1 2 S タンパク質であることは、特に本発明のアデノウイルスに関して、本発明の範囲内である。E 1 A 1 2 S タンパク質の各設計は、特に本明細書では単純に E 1 A とも呼ぶ E 1 A タンパク質の前述の欠失に関して、当業者の範囲内である。

【0205】

従来技術で基本的にすでに既知であり、いかなるトランス活性化も示さないそのようなアデノウイルスは一般に複製欠損性とみなす。しかしながら、にもかかわらず、それらが好適なバックグラウンド、特に細胞のバックグラウンドで複製可能であることを認識するのは本発明のメリットである。そのような好適な細胞のバックグラウンドは、核における Y B - 1 の存在、好ましくは細胞周期とは無関係の核における Y B - 1 の存在、又は調節解除された Y B - 1 によって誘発されるか又は提供される。用語、細胞又は細胞系は、本明細書で本発明のそのほかの態様と関連して使用されるとき、インビトロ、生体内又は生体外に存在する細胞と同様に細胞抽出物の断片又は区画を含む。その程度において、用語

、細胞系又は細胞は、細胞培養、組織培養、器官培養或いは生体内及び生体外の組織又は生物に存在する細胞も含むが、それは好ましくは生体にそのまま存在してもよい。生物は好ましくは脊椎動物であり、さらに好ましくは哺乳動物である。さらに好ましくは、生物はヒトである。そのほかの好ましい生物は、本発明の種々の態様に関連して開示されるものである。

【0206】

さらに、本明細書で提供される技術的教示に基づいて、本明細書及び従来技術で記載されたアデノウイルスの複製挙動をYB-1核陽性の、好ましくは細胞周期とは無関係でのYB-1核陽性の細胞又は調節解除されたYB-1を含む細胞で示す新しいウイルスを生成することは本発明の範囲内である。言い換えれば、特に、好ましくはすでに既知のアデノウイルスから出発して、本発明に従った使用に関連する、本明細書で定義される特徴を呈するさらなるウイルスを構築することができる。

10

【0207】

本発明に関連して、本発明に従って使用されるべき種々のアデノウイルスの改変されたE1A癌タンパク質は、本発明のウイルスとは対照的に、YB-1核陽性の細胞又は調節解除されたYB-1を含む細胞におけるE1B55K、E4orf3、E4orf6、E3ADPのような早期ウイルス遺伝子をトランス活性化することができる。好ましくは、ウイルスゲノムに行われるそのほかの変更はなく、アデノウイルスは、その程度においてさもなくば、野生型アデノウイルス又はその誘導体に相当してもよい。

【0208】

本発明の意味でトランス活性化する癌遺伝子タンパク質をコードする又は含む、本明細書で開示されるウイルスは、それぞれ、E1B、E2、E3及び/又はE4のような早期遺伝子をトランス活性化することができ、かつ、野生型のアデノウイルス、特に野生型Ad5に匹敵する、たとえば、アデノウイルス、Ad24、d1922-847、E1Ad/01/07、CB106及び/又は欧州特許EP0931830に記載されるアデノウイルスを含む。これらの場合、E1Aタンパク質の識別可能な領域がトランス活性化に関与する。種々のアデノウイルスの血清型の中で、E1Aタンパク質のなかに3つの高度に保存された領域がある。アミノ酸41～80位の領域CR1、アミノ酸120～139位の領域CR2、及びアミノ酸140～188位の領域CR3。トランス活性化の機能は、E1Aタンパク質の中のCR3領域の存在に主として基づく。CR3のアミノ酸配列は上記アデノウイルスにおいて不変な状態で存在する。これによって、YB-1が核に存在するか細胞質に存在するかとは無関係に、早期遺伝子、E1B、E2、E3及びE4のトランス活性化を生じる。

20

30

【0209】

それとは対照的に、組換えアデノウイルスd1520ではCR3領域が欠失している。従って、d1520は、CR3領域のアミノ酸配列を含まないいわゆるE1A12Sタンパク質を発現する。その結果、d1520は、特にE2領域に対して非常に弱いトランス活性化機能しか行使できないので、YB-1核陰性細胞では複製しない。YB-1核陽性の細胞では、YB-1がE2領域のトランス活性化に関与するので、d1520の十分な複製が得られる。d1520のようなシステムの使用又は本明細書で開示される目的でのそれを起源とするシステムの使用は、それに基づく。たとえば、デルタ24（本明細書ではAd24とも呼ぶ）及びたとえばd1520のようなアデノウイルスの2つの上述の群の間のさらに重要な差異は、早期遺伝子、E1B、E3及びE4が、YB-1核陰性の細胞又は調節解除されたYB-1を含まない細胞に比べて、細胞周期とは無関係でYB-1核陽性の細胞又は調節解除されたYB-1を含有する細胞でさらに包括的にトランス活性化されるという事実が存在する。これとは対照的に、デルタ24には差異はないか、わずかな差異があるにすぎない。しかしながら、d1520のさらに具体的にはE1A12Sのトランス活性化は野生型アデノウイルスに比べて有意に低下している。しかしながら、このトランス活性化は、実施例10にも示すようにYB-1核陽性細胞において十分な複製を提供するのに十分である。特に、好ましくは、d1520又はAd24、d19

40

50

22~947、E1Ad/01/07、CB106及び/又は欧州特許EP0931830に記載されたアデノウイルスと関連したE1Aタンパク質の設計を含む、本明細書で記載するような、特にこの関連で記載するようなE1Aタンパク質の設計並びに、野生型癌遺伝子タンパク質E1Aに比べて、E1Aタンパク質が1又は数個の欠失及び/又は突然変異を有するような、それをコードする核酸の設計は、ウイルス、特にアデノウイルス、制御された、好ましくはE2後期プロモーターに優先的に制御された複製の実施態様である。好ましくは、欠失は、CR3領域の欠失及びN末端の欠失及びC末端の欠失を含む群から選択されるようにする。アデノウイルスのこの種の複製ができるE1Aタンパク質のさらなる実施態様は、本明細書で提供される開示に基づいて当業者が生成することができる。前に記載したE1Aタンパク質の実施態様は、本明細書で本発明のアデノウイルス又はグループIのアデノウイルスとも呼ばれる本発明のアデノウイルスに関連しても使用されてもよい実施態様である。

10

【0210】

本明細書では誘導体とも呼ばれ、本発明に従って使用してもよい、本発明のアデノウイルス、特にグループIのアデノウイルスは通常、E1欠失、E1/E3欠失及び/又はE4欠失を含む、すなわち、相当するアデノウイルスは、機能的に活性のあるE1及び/又はE3及び/又はE4の発現産物及びそれぞれ相当する産物を生成することができない。又は、言い換えれば、これらのアデノウイルスは機能的に不活性のE1、E3及び/又はE4の発現産物を生成することができ、機能的に不活性のE1、E3及び/又はE4の発現産物は、転写レベル及び/又は翻訳レベルでは発現産物として全く存在しない、或いは、野生型アデノウイルスにおいてそれに起因する機能の1つを少なくとも有さない形態で存在する発現産物である。野生型アデノウイルスにおける発現産物に固有のこの/これらの機能は、当業者に既知であり、Russell W. C. Journal of Virology 81: 2573-2604, 2000に記載されている。Russell(上記)はまた、参考として本明細書に組み入れるアデノウイルス及びアデノウイルスベクターの設計原理を記載している。改変されたE1A癌遺伝子タンパク質、すなわち、もはやトランス活性化しないE1Aタンパク質及びE1A12S、E1B55K、E4orf6及び/又はE3ADP(アデノウイルス死亡タンパク質)(Tollefson A. et al., J. Virology 70: 2296-2306, 1996)のようなそのほかのタンパク質がそのようなベクターにおいて単独で又は組み合わせで発現されていることも本発明の範囲内である。本明細書で開示される導入遺伝子と同様に、個々に言及される遺伝子も互いに独立して、E1及び/又はE3及び/又はE4の領域にクローニングされてもよく、好適なプロモーターを用いて、又は好適なプロモーターの制御のもとで発現させてもよい。基本的に、E1、E3及びE4の各領域は、アデノウイルスの核酸の中で好適なクローニング部位であり、クローニングに用いられない領域は、個々に又は全体として、部分的に及び/又は完全に欠失して存在することができる。これらの領域が存在する場合は、特にそれらの全体が存在する場合は、それらが完全で、好ましくは翻訳生成物及び/又は転写生成物を提供する、及び/又は完全ではなく、好ましくは翻訳生成物及び/転写生成物を提供しない、のいずれかであるのは本発明の範囲内である。幾つかの実施態様では、好適なプロモーターは、E1A、好ましくは改変されたE1Aの制御及び発現との関連で本明細書で開示されるものである。

20

30

40

【0211】

最後に、実施態様では、本発明に従って使用されるグループIIのアデノウイルスは、E1B欠損性であり、好ましくはE1B19kDa欠損性である。本明細書で一般的に使用されるとき、用語、欠損性は、E1Bが野生型E1Bの特性をすべて示すわけではなく、これら特性の少なくとも1つを欠く状態をいう。

【0212】

アデノウイルスBCL2のホモログE1B19kが、前アポトーシスタンパク質Bak及びBaxとの相互作用により、E1Aが誘導するアポトーシスを回避する。これにより、最大限の複製及び/又は粒子形成が感染細胞において可能である(Ramya Sundararajan and Eileen White, Journal of Virology 2001, 75, 7506-7516)。E1B19kが欠

50

失すると（もし存在する場合はそれがアデノウイルスの細胞死タンパク質の機能を、最小限にすることになる）、ウイルスがより良好に放出される結果となる。そのような欠失によって、ウイルスが誘導する細胞変性効果が増大し（Ta-Chiang Liu et al., Molecular Therapy, 2004）、したがって感染腫瘍細胞がより著しく溶解する結果となる。さらに、E1B19kの欠失は、腫瘍細胞中においてはTNFがそのような組換えアデノウイルスの複製に影響を及ぼさなくなる原因となり、一方で正常細胞では、治療によって伝染性ウイルスの複製及び放出が減少する結果になる。その限りにおいて、選択性と特異性が増加する（Ta-Chiang Liu et al., Molecular Therapy 2004, 9, 786-803）。

【0213】

本明細書で開示される本発明に従って使用されるとき、グループIIのアデノウイルスの少なくとも幾つかの実施態様は、当該技術でそれ自体既知である。本発明に従って使用されるアデノウイルスは、特に、野生型に比べて、本明細書で提供される技術的教示という意味で変更が行われていれば、好ましくは組換えアデノウイルスである。本発明に関係のないアデノウイルスの核酸配列を欠失させること及び突然変異させることは当業者の範囲内である。そのような欠失は、たとえば、本明細書でも開示されるようなE3及びE4をコードする核酸の一部に関係してもよい。E4の欠失は、そのような欠失がタンパク質E4orf6まで及ばない、言い換えれば、本発明に従って使用されるべきアデノウイルスはE4orf6をコードするという条件で、特に好ましい。好ましい実施態様では、これらのアデノウイルスの核酸は、未だにウイルスのカプシドに詰められてもよいので、感染性の粒子を形成する。このことも、本発明に従った核酸の使用について真実である。一般に、単一又は幾つかの発現産物に関してアデノウイルスシステムが欠損してもよいことも認識される。それに関連して、このことは、グループIのアデノウイルス及びグループIIのアデノウイルスの双方に関連して、発現産物をコードする核酸の突然変異又は欠失によって生じてよく、そのような突然変異及び欠失が、完全なものであるか、又は発現産物がもはや形成されない程度に行われ、又はプロモーターや転写因子のような調節要素又は発現を制御する要素が失われるか又は野生型とは異なる方法で活性化されることにより行われ、核酸のレベル（プロモーター又はシス作用要素を欠く）又は翻訳及び転写系（トランス作用要素）のレベルで行われることを考慮に入れるべきである。特に、後者の態様は、それぞれの細胞のバックグラウンドに依存してもよい。

【0214】

それ自体既知のアデノウイルスの使用から離れて、本発明に従って、本明細書で記載されるそのほかのアデノウイルスについてすでに開示された目的に、グループIIのアデノウイルスのような新規のアデノウイルスも使用してもよい。本発明の新規のアデノウイルスは、本明細書で提供される技術的教示から生じる。特に好ましい代表例は、たとえば、図16及び17で描かれるウイルスXvir03及びXvir03/01であり、実施例11及び12でさらに説明される設計原理である。

【0215】

ベクターXvir03の場合、IRES配列で分離されるE1B55k及びE4orf6に対する核酸を制御するE1領域にCMVプロモーターをクローニングした。これに関連して、E3及びE4領域は、欠失していても及び/又はインタクトな形で存在していてもよい。これら2つの遺伝子のウイルスへのクローニングにより、かつそれから生じる遺伝子産物のために、それぞれ、高い複製効率が生じ、それにより、複製が特にYB-1核陽性細胞に、より特別には本発明の開示の意味において調節解除されたYB-1を含む細胞に生じる限り、細胞における、好ましくは腫瘍細胞における選択的複製が維持される。調節解除されたYB-1が存在する細胞は、実施態様では、YB-1の発現上昇を示す、好ましくは、正常細胞又は非腫瘍細胞に比べて、区画非依存性のYB-1の発現を示す細胞である。E1B55k及びE4orf6もまた、E4領域へクローニングすることができ、その場合E3領域はインタクトなままであるか、又は/及び、部分的に又は完全に欠失する。

【0216】

ウイルスX v i r 0 3のさらなる開発は、好ましい実施態様では、特異的プロモーター、特に腫瘍特異的プロモーター又は組織特異的プロモーターの制御下で治療用遺伝子又は導入遺伝子がクローニングされているウイルスX v i r 0 3 / 0 1である。これに関連して、E 3領域及びE 4領域は欠失する、及び/又はインタクトなままであり得る。そのようなウイルスにも関連して、E 4領域は機能的に不活性である。本明細書で記載される導入遺伝子もE 4領域にクローニングされ、これは、もう1つの方法として行われるか、又は導入遺伝子のE 3領域へのクローニングに加えて行われる。

【0217】

本明細書で記載される及び特に以下で記載される導入遺伝子は、本発明のアデノウイルス、すなわち、グループIのアデノウイルス及びその核酸、又は本発明の複製システムに 10
関連して、或いはそれによって発現されてもよく、従って、プロモーター及び核酸配列を含む発現カセットに含まれ、そのような核酸配列は、1又は数個の前記導入遺伝子をコードする。E 1、E 3及びE 4の領域は、アデノウイルスのゲノムにおける特に好適なクローニング部位であるが、クローニング部位はこれに限定されない。本明細書で用いられる導入遺伝子は、ウイルス遺伝子、好ましくはアデノウイルス遺伝子、(それらは、好ましくはゲノム中に存在せず、またそれぞれ、それらが現在特定のウイルス中に存在している野生型ゲノムの部位には存在しない)、又は治療用遺伝子でよい。

【0218】

治療用遺伝子は、プロドラッグ遺伝子、サイトカインの遺伝子、アポトーシスを誘導する遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、メタロプロテイナーゼ阻害剤及び/又は血管形成阻害剤の遺 20
伝子及びチロシンキナーゼ阻害剤の遺伝子であってもよい。さらに、好ましくは、癌関連の標的を指向するs i R N A、アプタマー、アンチセンス分子及びリボザイムが発現されてもよい。好ましくは、個々の又は数個の標的分子は、耐性関連の因子、抗アポトーシス因子、癌遺伝子、血管形成因子、D N A合成酵素、D N A修復酵素、成長因子及びその受容体、転写因子、メタロプロテイナーゼ、特にマトリクスのメタロプロテイナーゼ及びウロキナーゼ型のプラスミノゲン活性化剤を含む群から選択される。その好ましい実施態様は、本発明のそのほかの態様と関連して本明細書ですでに開示されているものである。

【0219】

好ましい実施態様で使用されてもよいような可能性のあるプロドラッグは、たとえば、シトシンデアミナーゼ、チミジンキナーゼ、カルボキシペプチダーゼ、ウラシルホスホリ 30
ボシルトランスフェラーゼ、又はプリンヌクレオシドホスホリラーゼ(P N P)である[Kim et al., Trends in Molecular Medicine, 8(4)(suppl.), 2002; Wybranietz W. A. et al., Gene Therapy 8: 1654-1664, 2001; Niculescu-Duvaz et al., Curr. Opin. Mol. Therapy 1: 480-486, 1999; Koyama et al., Cancer Gene Therapy 7: 1015-1022, 2000; Rogers et al., Human Gene Therapy 7: 2235-2245, 1996; Lockett et al., Clinical Cancer Res., 3: 2075-2080, 1997; Vijayakrishna et al., J. Pharmacol. and Exp. Therapeutics 304: 1280-1284, 2003]。

【0220】

好ましい実施態様で使用されてもよいような可能性のあるサイトカインは、たとえば、G M - C S F、T N F - α 、I L - 1 2、I L - 2、I L - 6、C S F又はインターフ 40
ェロンである[Gene Therapy, Advance in Pharmacology Vol.40, editor: J. Thomas August, Academic Press; Zhang and Degroot, Endocrinology 144: 1393-1398, 2003; Descamps et al., J. Mol. Med., 74: 183-189, 1996; Majumdar et al., Cancer Gene Therapy 7: 1086-1099, 2000]。

【0221】

好ましい実施態様で使用されてもよいような可能性のあるアポトーシスを誘導する遺伝子は、たとえば、デコリン[Tralhao et al., FASEB J., 17: 464-466, 2003]、網膜芽腫 9 4 [Zhang et al., Cancer Res., 63: 760-765, 2003]、B a x及びB a d [Zhang et al., Hum. Gene Ther., 20: 2051-2064, 2002]、アポプチン[Noreborn and Pietersen, Adv. Exp. Med. Biol., 465: 153-161, 2000]、A D P [Toth et al., Cancer Gene 50

Therapy 10: 193-200, 2003]、b c l - x s [Sumantran et al., Cancer Res., 55: 2507-2512, 1995]、E 4 o r f 4 [Braithwaite and Russell, Apoptosis 6: 359-370, 2001]、F a s L、A p o - 1 及び T r a i l [Boehringer Mannheim, Guide to Apoptosis Pathways, Arai et al., PNAC 94: 13862-13867, 1997]、B r i m s [Yamaguchi et al., Gene Therapy 10: 375-385, 2003; GNR 163: Oncology News 17 June, 2000]である。

【 0 2 2 2 】

好ましい実施態様で使用されてもよいような可能性のある腫瘍抑制遺伝子は、たとえば、E 1 A、p 5 3、p 1 6、p 2 1、p 2 7 又は M D A - 7 である [Opalka et al., Cell Tissues organs 172: 126-132, 2002; Ji et al., Cancer Res., 59: 3333-3339, 1999; Su et al., Oncogene 22: 1164-1180, 2003]。 10

【 0 2 2 3 】

好ましい実施態様で使用されてもよいような可能性のある血管形成阻害剤は、たとえば、エンドスタチン又はアンギオスタチン [Hajitou et al., FASEB J., 16: 1802-1804, 2002]、及び V E G F に対する抗体である [Ferrara N., Semin Oncol., Dec. 29 (6 suppl. 16): 10-4, 2002]。

【 0 2 2 4 】

好ましい実施態様で使用されてもよいような可能性のあるメタロプロテイナーゼ阻害剤は、たとえば、T i m p - 3 [Ahonen et al., Mol. Therapy 5: 705-715, 2002]、P A I - 1 [Soff et al., J. Clin. Invest., 96: 2593-2600, 1995]、T i m p - 1 [Brand K., Gene therapy 2: 255-271, 2002]である。 20

【 0 2 2 5 】

グループ I のアデノウイルス及びグループ II のアデノウイルスの双方で発現されてもよい、本発明の意味でのさらなる導入遺伝子は、チロシンキナーゼ阻害剤である。チロシンキナーゼの例は E G F R (上皮成長因子受容体) [Onkologie, Entstehung und Progression maligner Tumoren; Author: Christoph Wagner, George Thieme Verlag, Stuttgart, 1999] である。好ましいチロシンキナーゼ阻害剤は、ハーセプチン [Zhang H. et al., Cancer Biol. Ther., Jul-Aug;2 (4 suppl 11): S122-6, 2003] である。

【 0 2 2 6 】

本発明について使用することができる S i R N A (短い干渉 R N A) は、2 つの、好ましくは、本質的には塩基対で存在することを意味する塩基相補性のために互いにハイブリッド形成する、50ヌクレオチドまでの好ましくは18~30ヌクレオチドの間の、さらに好ましくは25ヌクレオチド未満の、最も好ましくは、21、22又は23ヌクレオチドの長さを有する別個の R N A 鎖から成り、これらの形状は、s i R N A の一本鎖を言い、特に、第2の一本鎖とハイブリッド形成する、又は塩基対を作る一本鎖の伸びの長さをいう。s i R N A は m R N A の分解を誘導する、又はそれに介在する。従って、必要とされる特異性には、s i R N A の配列、すなわち結合部位が介在する。分解されるべき標的配列は、第1又は第2の s i R N A が形成する鎖に本質的に相補的である。正確な作用機序は未だはっきりとはしないが、s i R N A は、細胞が発生の間識別可能な対立遺伝子を抑制し、ウイルスからそれらを保護するための生物学的戦略であると想定されている。s i R N A が介在する R N A の干渉は、二本鎖 R N A に特異的な遺伝子の導入によるタンパク質の発現を特異的に抑制する又は完全に除去する方法として用いられる。高等生物にとって、19~23のヌクレオチドを含む s i R N A は、その程度において、インターロイキン反応のような非特異的防御反応の活性化を生じない場合、特に好適である。対称の 2 - n t 3 ' のオーバーハングを有する 21ヌクレオチドの二本鎖 R N A の直接的な形質移入は、哺乳動物細胞における R N A 干渉に介在するのに好適であったし、リボザイムやアンチセンス分子のようなそのほかの技法に比べて効率が低い (Elbashir S., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T: 21ヌクレオチドの二本鎖 R N A は培養哺乳動物細胞において R N A 干渉に介在する。Nature 411: 494-498, 2001)。標的遺伝子を抑制するにはわずかな s i R N A 分子で十分である。干渉現象の一過性の性質に 30 40 50

特に存在する外因性に添加された s i R N A 及び s i R N A 分子の特異的送達の限界を回避するために、内因性の s i R N A を発現させるベクターが従来技術では使用される。そのような目的で、たとえば、センス及びアンチセンスの双方の方向で 19ヌクレオチドの長さの標的配列を含むベクターに、64ヌクレオチドの長さを有するオリゴヌクレオチドを、たとえば9ヌクレオチドのスペーサー配列により分離して導入する。得られた転写物をたとえば19塩基対の茎構造によりヘアピン構造に折り畳む。機能的 s i R N A が生成されるようにループは急速に分解される (Brummekamp et al., Science 296: 550-553, 2002)。

【0227】

本発明に従って使用されるべきアデノウイルス、特にグループIIのアデノウイルス、しかしまた、本発明に係るアデノウイルス、すなわち、グループIのアデノウイルスの実施態様におけるアデノウイルスの一部であるYB-1をコードする核酸は、YB-1の核への輸送に介在する核酸配列を含んでもよい。本発明に係る核酸、アデノウイルス及びアデノウイルスシステム並びにたとえば、Onyx-15、Ad 24、dl922-947、E1Ad/01/07、CB016、dl520のような従来技術で既知のアデノウイルス並びに特許EP0931830に記載されたアデノウイルスを、アデノウイルス及びアデノウイルスシステム及び相当する核酸として、本発明に従った核酸との組み合わせで使用してもよい。核への輸送に介在する好適な核酸配列は当業者に既知であり、たとえば、Whittaker G. R., et al., Virology 246: 1-23, 1998; Friedberg E. C., TIBS 17: 347, 1992; Jans D. A., et al., Bioassays Jun: 22(6): 532-44, 2000; Yoneda Y., J. Biochem., 3(3): 193-227, 1993; Lyons R. H., Mol. Cell Biol., 7: 2451-2456, 1987に記載されている。核への輸送に介在する核酸配列は異なった原理を実現してもよい。そのような原理の1つは、YB-1がシグナルペプチドと共に融合タンパク質を形成する、又はシグナルペプチドを提供され、本発明に従ったアデノウイルスの複製が起きる際のシグナルペプチドのために細胞核に移動されるということである。

【0228】

本発明に従って使用されるべきアデノウイルス、特にグループIIのアデノウイルス、しかしまた、本発明に係るアデノウイルス、すなわち、グループIのアデノウイルスの設計において使用されてもよいさらなる原理は、好ましくは細胞質での合成から始まって、YB-1の細胞核への転移又は転座を生じ、そこでのウイルスの複製を促すYB-1に転移配列を提供することである。核への輸送に介在する特に有効な核酸配列の例は、たとえば、Efthymiadis A., Briggs L. J., Jans D. A., JBC 273: 1623-1628, 1998にその種のほかの好適な核酸配列と共に記載されるHIVのTAT配列である。本発明に従って使用されるべきアデノウイルス、特にグループIIのアデノウイルス、しかしまた、本発明に係るアデノウイルス、すなわち、グループIのアデノウイルスが核への輸送に介在するペプチドをコードする核酸配列を含むことは本発明の範囲内である。

【0229】

YB-1が完全長で存在する、特に野生型YB-1に相当する形態で存在することは本発明の範囲内である。さらに、YB-1が、たとえば、縮めた形態又は切り詰めた形態で誘導体として使用される又は存在することは本発明の範囲内である。本発明と関連して使用されてもよい又は存在してもよいとき、YB-1誘導体は、好ましくはE2後期プロモーターへの結合が可能であり、従ってアデノウイルスのE2領域の遺伝子発現を活性化するYB-1である。そのような誘導体は本明細書で開示されるYB-1誘導体を特に含む。N末端で、C末端で又はアミノ酸配列の中で単一の又は数個のアミノ酸を欠失することによりさらなる誘導体を生成することができる。本発明の意味においてYB-1タンパク質としてYB-1断片を使用することは本発明の範囲内である。Jurchott K. et al., (JBC 278: 27988-27996, 2003)の論文では、C末端及びN末端での欠失を特徴とする種々のYB-1断片が開示されている。種々のYB-1断片の分布は、C末端と同様に冷却ショックドメイン(CSD)もYB-1の細胞核への細胞周期に調節された輸送に関係することを示している。従って、E1B55k及びE4orf6の本発明の発現と関連した縮め

た Y B - 1 (本明細書では Y B - 1 タンパク質とも呼ぶ) がさらに良好に核に移動するので、天然の Y B - 1 に比べて、さらに良好な E 2 後期プロモーターとの結合を必要としないですらに強い C P E を誘導し、縮めた Y B - 1 がさらに良好に核に移動し、両方の効果、すなわち、C P E の誘導及び E 2 後期プロモーターへの結合を生じることにも除外できないことは本発明の範囲内である。最後に、そのような縮めた Y B - 1 断片は、さらに良好に核に移動し、さらに良好な C P E を誘導しないで E 2 後期プロモーターにさらに効率的に結合する可能性がある。縮めた Y B - 1 のタンパク質及び断片が完全長の Y B - 1、特に細胞局在化シグナル配列 (N L S) と関連して本明細書で開示されるようなさらなる配列を含むことも本発明の範囲内である。

【 0 2 3 0 】

10

アデノウイルスによりコードされ、発現される前述の種々のさらなる遺伝子及び遺伝子産物に関して、これらが組み合わせてコードされ、発現されることは原則として可能である。

【 0 2 3 1 】

用語、アデノウイルス及びアデノウイルスシステムは本質的に同一の意味を有するとして理解されるべきであることは本発明の範囲内である。用語、アデノウイルスは、カプシド及び核酸を含む完全なウイルス粒子に関係するものとして特に理解されなければならない。用語、アデノウイルスシステムは特に、野生型と比べて核酸が変化しているという事実焦点を置く。好ましくは、そのような変化は、プロモーター、調節配列、及び / 又は読み取りフレームのようなコーディング配列を欠失させた及び又は付加させた及び / 又は突然変異させた結果生じててもよいようなアデノウイルスのゲノムの設定における変化を含む。用語、アデノウイルスシステムは、加えてさらに好ましくは、それが、たとえば、遺伝子治療で使用されるベクターであるように使用される。

20

【 0 2 3 2 】

アデノウイルス及びアデノウイルスシステムの使用及び設計を含む上のコメントはまた、それらのコードする核酸にも適用可能であり、逆も可能である。

【 0 2 3 3 】

本発明と関連して、本発明に従って使用されるべきアデノウイルス、特にグループ I I のアデノウイルス、しかしまた、グループ I のアデノウイルス及びそれらのコードする核酸は、そのままで又はさらなる核酸配列と組み合わせて複製事象を生じるアデノウイルス核酸であることが可能である。本明細書で説明するように、複製に必要な配列及び / 又は遺伝子産物はヘルパーウイルスにより提供されることが可能である。それをコーディング核酸配列と言い、前記核酸配列が既知の核酸配列であるという範囲で、同一の配列だけでなく、それに由来する配列も使用するということは本発明の範囲内である。本明細書では、由来する配列は、特に、遺伝子産物、非由来の配列の機能に相当する機能を有する核酸又はポリペプチドを結果として生じるいかなる配列も意味しなければならない。当業者に既知の日常の試験によってこのことを調べることができる。そのような由来する配列の例は、同一遺伝子産物をコードする、特に同一のアミノ酸配列をコードするが、遺伝コードの変質によって異なった塩基配列を有する核酸配列である。

30

【 0 2 3 4 】

40

グループ I I の本発明に係るアデノウイルス及び / 又は本発明に係る相当するアデノウイルスシステム及び本発明に係るその使用に関して、実施態様では、アデノウイルスの核酸は、癌遺伝子タンパク質の発現についての欠損性、特に E 1 A タンパク質欠損性であり、すなわち、1 2 S E 1 A タンパク質 (本明細書では E 1 A 1 2 S タンパク質とも呼ぶ) 又は 1 3 S E 1 A (本明細書では E 1 A 1 3 S タンパク質とも呼ぶ) のいずれかをコードしない、或いは 1 2 S E 1 A タンパク質及び 1 3 S E 1 A タンパク質の双方をコードしない、或いは、本明細書で記載されるように、他の表示がない限り修飾され、アデノウイルス複製システムはヘルパーウイルスの核酸をさらに含み、ヘルパーウイルスの核酸は癌遺伝子タンパク質、特に E 1 A タンパク質をコードする核酸配列を含み、それは以下の特徴を有しアデノウイルスに以下の特徴を付与する：それは、Y B - 1 核陰性細胞では好まし

50

くは非複製であるが、Y B - 1 核陽性で細胞周期に無関係である細胞又は調節解除された T B - 1 を示す細胞では複製し、Y B - 1 核陽性の細胞で少なくとも1つのウイルス遺伝子、特に、E 1 B 5 5 k D a、E 4 o r f 6、E 4 o r f 3 及び / 又は E 3 A D P をトランス活性化し、及び / 又は細胞の Y B - 1 を核に転移しない。本明細書で記載される導入遺伝子がヘルパーウイルスに個々に又はまとめてコードされ、及び / 又は発現されることは本発明の範囲内である。このことは、グループ I のアデノウイルス及びグループ I I のアデノウイルスの双方のためのヘルパーウイルスに適用される。

【 0 2 3 5 】

さらに、本発明に従ったそのようなアデノウイルス複製システムの実施態様では、アデノウイルスの核酸及び / 又はヘルパーウイルスの核酸は、複製可能なベクターとして存在する。 10

【 0 2 3 6 】

グループ I のアデノウイルス及びグループ I I のアデノウイルスをコードする核酸が好ましくは発現ベクターに存在し、この発現ベクターが本発明に従って使用されるということは、さらに本発明の範囲内である。

【 0 2 3 7 】

さらなる態様では、本発明は、少なくとも 2 つのベクターを含むベクター群に関するものであり、ベクター群は、全体で、本明細書に記載されるようなグループ I のアデノウイルス及びグループ I I のアデノウイルスのためのアデノウイルス複製システムを含み、ベクター群は本発明に従って使用される。実施態様では、アデノウイルス複製システムの各成分は個々のベクター、好ましくは発現ベクターに配置される。 20

【 0 2 3 8 】

最後に、さらなる態様において、本発明は、本発明に従って好ましくは使用され、かつ、本発明に従って使用されるべきであるグループ I のアデノウイルス及びグループ I I のアデノウイルスをコードする 1 又は数個の核酸を含有する細胞、及び / 又は本発明に係る相当するアデノウイルス複製システム及び / 又は相当するベクター及び / 又はベクター群の、種々のアデノウイルスについて本明細書に記載されるような同一目的についての使用に関する。

【 0 2 3 9 】

上述のアデノウイルスのコンストラクト及び特にその核酸及びそれをコードする核酸は、多くの部分に分かれた形態で細胞、好ましくは腫瘍細胞に導入されてもよく、種々の個々の成分の存在によって、それらは、まるで個々の成分が単一の核酸及び単一又は数個のアデノウイルスに由来するかのよう一緒に作用する。 30

【 0 2 4 0 】

本発明に従って使用され、グループ I のアデノウイルス及び / 又はグループ I I のアデノウイルスをコードする核酸、相当するアデノウイルスシステム又はその一部はベクターとして存在してもよい。好ましくは、これらのベクターはウイルスベクターである。核酸がアデノウイルス核酸を含む場合、好ましくはウイルス粒子はベクターである。しかしながら、前記核酸がプラスミドベクターに存在することも本発明の範囲内である。各場合、ベクターは、挿入された核酸の増殖、すなわち、挿入された核酸の複製及び任意の発現を斟酌する及び制御する要素を含む。好適なベクターは好ましくは発現ベクターであり、各要素は当業者に既知であり、たとえば、Grunhaus A., Horwitz M. S., クローニングベクターとしてのアデノウイルス、In Rice C., editor, Seminars in Virology London: Saunders Scientific Publicationsに記載されている。 40

【 0 2 4 1 】

ベクター群に関する態様は、前記核酸の種々の要素が必ずしも単一のベクターのみに含有されるわけではない前述の実施態様を考慮に入れる。従って、ベクター群は少なくとも 2 つのベクターから成る。それから離れてベクターに関連して行われるいかなる記述もベクター及びベクター群にそれぞれ適用可能である。

【 0 2 4 2 】

グループ I のアデノウイルス及び / 又はグループ I I のアデノウイルスは、それぞれ、本明細書で開示される種々の核酸及び遺伝子産物を特徴とし、かつさもなければ、当業者に既知であり、野生型アデノウイルスに固有であるあらゆる要素を含んでもよい (Shenk T., Adenoviridae: ウイルスとその複製、Fields Virology Vol. 3, editors: Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M., et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996, chapter 7)。

【0243】

本発明の説明のための目的であって、本発明を限定するのではない目的で、アデノウイルスの複製を以下で手短に議論するものとする。

【0244】

アデノウイルスの複製は非常に複雑な過程であり、通常、ヒトの転写因子 E 2 F に基づく。ウイルス感染の間、先ず、「早期遺伝子」E 1、E 2、E 3 及び E 4 が発現される。「後期遺伝子」の群はウイルスの構造タンパク質の合成に参与する。2つの転写単位、E 1 A 及び E 1 B から成り、異なった E 1 A タンパク質及び E 1 B タンパク質をコードする E 1 領域は、それらが、E 2、E 3 及び E 4 の遺伝子を誘導するので、早期遺伝子及び後期遺伝子の双方の活性化に決定的な役割を担っている (Nevins J. R., Cell 26: 213-220, 1981)。さらに、E 1 A タンパク質は休止細胞の DNA 合成を開始させてもよいので、S 期への進入を誘発してもよい (Boulanger and Blair, 1991を参照のこと)。さらに、それらは R b クラスの腫瘍抑制剤と相互作用する (Whyte T. et al., Nature 334: 124-127, 1988)。そうすることで、細胞の転写因子 E 2 F が放出される。E 2 F 因子はそれに続いて細胞の遺伝子及びウイルスの遺伝子 (特に、アデノウイルスの E 2 早期プロモーター) の相当するプロモーター領域に結合し、転写と複製を開始する (Nevins J. R., Science 258: 424-429, 1992)。リン酸化により R b 及び E 2 F の活性が調節される。リン酸化の足りない形態の p R b は特に G 1 期及び M 期に存在する。それと対照的に、過剰にリン酸化された形態の p R b は S 期及び G 2 期に存在する。p R b のリン酸化によって、E 2 F は、E 2 F と少なめにリン酸化された p R b から成る複合体から放出される。E 2 F と少なめにリン酸化された p R b の複合体からの E 2 F の放出は、E 2 F 依存性の遺伝子の転写を生じる。E 1 A タンパク質は少なめにリン酸化された p R b にのみ結合し、それによって、E 1 A の p R b への結合が E 1 A 領域の C R 2 領域を介して優先的に生じる。さらに、それは C R 1 領域にも結合するが、親和性は低い (Ben-Israel and Kleiberger, Frontiers in Bioscience 7: 1369-1395, 2002; Helt and Galloway, Carcinogenesis 24: 159-169, 2003)。

【0245】

E 2 領域の遺伝子産物は、それらが 3 つの本質的なタンパク質をコードしているので、複製の開始及び完了に特に必要とされる。E 2 タンパク質の転写は、2つのプロモーター、本明細書では E 2 早期プロモーター又は早期 E 2 プロモーターとも呼ばれる「E 2 早期 E 2 F 依存性」プロモーター及び「E 2 後期」プロモーターによって制御される (Swaminathan and Thimmapaya, アデノウイルスの分子レパートリー I I I、Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol. 119: 177-194, Springer Verlag, 1995)。さらに、E 4 の産物は、E 1 A 及び E 1 B 55 k D a のタンパク質と一緒に、E 2 F の活性及び p 53 の安定性に決定的な役割を担っている。たとえば、E 2 F と D P 1 とから成るヘテロ二量体と E 4 にコードされる E 4 o r f 6 タンパク質との直接的な相互作用によって E 2 プロモーターは一層さらにトランス活性化される (Swaminathan and Thimmapaya, JBC 258: 736-746, 1996)。さらに、溶解感染サイクルを上手く完了するために、p 53 によって (Steegennga W. T. et al., Oncogene 16: 349-357, 1998) E 1 B 55 k D a と E 4 o r f 6 とから成る複合体が不活性化される。さらに、E 1 B 55 k D a は、E 4 o r f 6 と相互作用する場合、それが核からのウイルス RNA の運び出しを促進する一方で細胞の RNA は核に保持される範囲において、重要な機能を有する (Bridge and Ketner, Virology 174: 345-353, 1990)。さらに重要な観察は、E 1 B 55 k D a / E 4 o r f 6 から成るタンパク質複合体が、いわゆる「ウイルス封入体」に局在することである。これ

らの構造が複製及び転写の部位であると想定される (Ornelles and Shenk J., Virology 65: 424-429, 1991)。

【0246】

E3領域は複製にとって、特にアデノウイルスの放出にとって重要なもう1つの領域である。E3領域は、さらに正確には、インビトロ、すなわち、細胞培養でアデノウイルスの感染サイクルに本質的でない、相対的に小型の種々のタンパク質の遺伝情報を含む。しかしながら、それらは、とりわけ、免疫調節機能及びアポトーシス機能を有するので急性感染及び/又は潜在感染の間でのウイルスの生き残りに決定的な役割を担っている (Marshall S., Horwitz, Virology 279: 1-8, 2001; Russell, 上記)。約11.6 kDaのサイズを有するタンパク質は細胞死を誘導することが示されている。このタンパク質はその機能から、アデノウイルス死タンパク質、ADPと呼ばれている (Tollefson J., Virology 70: 2296-2306, 1996)。該タンパク質は、感染サイクルの後期段階で優勢に形成される。さらに、該タンパク質の過剰発現は、感染細胞のさらに良好な溶解を生じる (Dorion et al., Virology 74: 6147-6155, 2000)。

10

【0247】

さらに、E1A欠失ウイルス、すなわち、特に、12SE1Aタンパク質も13SE1Aタンパク質も発現していないウイルスは、高いMOIで非常に効率的に複製してもよいが (Nevins J. R., Cell 26: 213-220, 1981)、臨床応用では実現できないことは、本発明者に既知である。この現象は、文献では「E1A様活性」と呼ばれる。さらに、E1Aにコードされる5つのタンパク質のうち、2つのタンパク質、すなわち、12S及び13Sタンパク質がそれぞれ、そのほかのアデノウイルス遺伝子の発現を制御し、誘導することが知られていた (Nevins J. R., Cell 26: 213-220, 1981; Boulanger P and Blair E., Biochem. J., 275: 281-299, 1991)。特に13Sタンパク質のCR3領域がトランス活性化機能を呈することが明らかになった (Wong H. K., and Ziff F. B., J. Virol., 68: 4910-20, 1994)。13Sタンパク質のCR1及び/又はCR2領域及び/又はCR3領域に明瞭な欠失を有するアデノウイルスは、品質的に複製欠損性であるが、他の細胞株、ウイルス遺伝子及びプロモーター、並びに特にE2領域においてもなお、トランス活性化する (Wong H. K., and Ziff F. B., J. Virol., 68: 4910-20, 1994; Mymryk J. S. and Bayley S. T., Virus Research 33: 89-97, 1994)。

20

【0248】

細胞、通常、腫瘍細胞に野生型アデノウイルスを感染させた後、E1A、E1B55K及びE4orf6によって核にYB-1が誘導され、核の中でのウイルス封入体内でE1B55Kと同時局在し、それによってインビトロ及び生体内の双方での細胞核におけるウイルスの有効な複製を可能にする。E4orf6もE1B55Kと結合するので (Weigel S. and Dobbelstein M. J., Virology 74: 764-772, 2000; Keith N. Leppard, Seminars in Virology 8: 301-307, 1998)、最適なウイルス産生及びアデノウイルスの複製を保証するE1B55Kの核内への輸送及び分布に介入することが早くからすでに見い出されていた。核内で、いわゆるウイルス封入体の中でのE1A、E1B55K及びYB-1の共同作用によって、E1B55K/E4orf6とYB-1から成る複合体及びYB-1とE1B55Kの同時局在によって、本発明に従ったウイルスの効率的な複製が可能なので、YB-1の核陽性である細胞、好ましくは細胞周期とは無関係に核にYB-1を含む細胞及び/又は調節解除されたYB-1を含む又は呈する細胞における複製のために、及び/又はYB-1の核陽性である細胞、好ましくは細胞周期とは無関係に核にYB-1を含む細胞及び/又は調節解除されたYB-1を含む又は呈する細胞における疾患の治療のための薬剤製造のためにウイルスを使用することが含まれる。従って、この細胞のバックグラウンドで可能である複製は、腫瘍細胞及び腫瘍の感染の場合、最終的に腫瘍の溶解、すなわち腫瘍退縮性が起きるように細胞の溶解、ウイルスの放出並びに隣接細胞の感染及び溶解を生じる。

30

40

【0249】

YB-1は、Y-ボックスと呼ばれる反転したCAAT配列に結合する高度に保存され

50

た因子の群に属する。それらは、転写及び翻訳のレベルで調節的様式で作用してもよい (Wolffe A. P., Trends in Cell Biology 8: 318-323, 1998)。増殖やアポトーシスに関連した遺伝子の活性化だけでなく阻害においてもますます多くの Y ボックス依存性の調節経路が見い出されている (Swamynathan S. K. et al., FASEB J., 12: 515-522, 1998)。たとえば、Y B - 1 は p 5 3 と直接相互作用し (Okamoto T. et al., Oncogene 19: 6194-6202, 2000)、F a s 遺伝子の発現 (Lasham A. et al., Gene 252: 1-13, 2000)、M D R 及び M R P の遺伝子発現 (Stein U. et al., JBC 276: 28562-69, 2001; Bargou R. C. et al., Nature Medicine 3: 447-450, 1997) 並びにトポイソメラーゼ及びメタロプロテイナーゼの活性化 (Mertens P. R. et al., JBC 272: 22905-22912, 1997; Shibao K. et al., Int. J. Cancer 83: 732-737, 1999) に本質的な役割を担っている。また、Y B - 1 は、m R N A の安定性の調節 (Chen C. Y. et al., Gene & Development 14: 1236-1248, 2000) 及び修復過程 (Ohga T. et al., Cancer Res., 56: 4224-4228, 1996; I zumi H. et al., Nucleic Acid Research 29: 1200-1207, 2001; Ise T. et al., Cancer Res., 59: 342-346, 1999) に関与している。

10

【 0 2 5 0 】

細胞周期とは無関係に核に存在する Y B - 1 による、又は細胞質に存在し、グループ I のアデノウイルス及び / 又はグループ I I のアデノウイルスによって核に転座させられる調節解除された Y B - 1 による腫瘍細胞における Y B - 1 の核局在は、特に 1 2 S E 1 A タンパク質も 1 3 S E 1 A タンパク質も発現されず、使用されない間、E 1 A に非依存性のウイルス複製を生じ (Holm P. S. et al., JBC 277: 10427-10434, 2002)、タンパク質 Y B - 1 が過剰発現した場合、多剤耐性を生じる。さらに、たとえば、E 4 o r f 6 及び E 1 B 5 5 K のようなアデノウイルスのタンパク質はウイルス複製に陽性の効果を有し (Goodrum F. D. and Ornelles D. A., J. Virology 73: 7474-7488, 1999)、機能的な E 1 A タンパク質はそのほかの遺伝子産物 (たとえば、E 4 o r f 6、E 3 A D P 及び E 1 B 5 5 K) の活性化に関与する (Nevins J. R., Cell 26: 213-220, 1981) ことが知られている。しかしながら、このことは、1 3 S E 1 A タンパク質が存在しない当該技術で既知の E 1 A マイナスのアデノウイルスでは起きない。Y B - 1 を核に有する多剤耐性細胞における Y B - 1 の核への局在は、そのような E 1 A マイナスのウイルスの複製及び粒子形成を促す。しかしながら、これに関連して、ウイルス複製及び粒子形成の効率は、倍数による野生型 A d 5 に比べて低下する。これに比べて、Y B - 1 の組み合わせは、Y B - 1 が介在する非常に効率的なウイルス複製及び粒子形成を許容するので、Y B - 1 が腫瘍細胞の核にすでに含有されている、Y B - 1 が細胞周期とは無関係な様式で核に局在する Y B - 1 から生じてよい、又は細胞質に存在する調節解除された Y B - 1 がグループ I のアデノウイルス及び / 又はグループ I I のアデノウイルスによって核に転座されている又は外因性の因子 (たとえば、細胞増殖抑制剤又は放射線照射又は温熱の適用) により細胞核に誘導される、腫瘍溶解は、すなわち、好ましくは細胞周期とは無関係に核に存在するように誘導され、又は Y B - 1 は、システム、好ましくはアデノウイルスシステムと共にベクターによって、アデノウイルス遺伝子のスイッチを入れるがウイルス複製は示さない導入遺伝子として導入される。これはまた、その特異的設計のために及び E 1 B タンパク質、好ましくは E 1 B 5 5 K タンパク質及び / 又は E 4 タンパク質、好ましくは E 4 o r f 6 タンパク質が Y B - 1 の好ましくは核への効果的な動員を提供するという効果を用いて、効率的に複製することが可能である、本発明に基づいたアデノウイルス、すなわち、グループ I のアデノウイルスにも適用される。本発明の種々の態様と関連して本明細書で開示されるアデノウイルスと共に使用されてもよい好適な細胞増殖抑制剤は、たとえば、以下の群：たとえば、ダウノマイシン及びアドリアマイシンのようなアントラサイクリン類；たとえば、シクロホスファミドのようなアルキル化剤；エトポシドのようなアルカロイド類、ビンクリスチン及びビンブラスチンのようなピンアルカロイド類；たとえば、5 - フルオロウラシル及びメトロソレキサットのような抗代謝物；たとえば、シスプラチンのようなプラチン誘導體；たとえば、カンホテシン、C P T 1 1 のようなトポイソメラーゼ阻害剤；たとえば、タキソール、パクリタクセルのようなタキサン類；たとえば、

20

30

40

50

FR901228、MS-27-275、トリクロスタチンのようなヒストンデアセチラーゼ阻害剤；たとえば、MS-209、VX710のようなMDR調節剤並びにたとえば、17-AGのようなゲルダナマイシン誘導体に属するものである。YB-1核陽性の細胞及び好ましくは細胞質に調節されたYB-1を含有する細胞で複製することだけが可能である本明細書で開示されるアデノウイルス、特に組換えアデノウイルスは、野生型アデノウイルス、特に野生型Ad5のトランス活性化能に比べて、ウイルス遺伝子、E1B55K、E4orf6、E4orf3及びE3ADPをトランス活性化する能力で限定される。本発明者は驚くべきことに、この限定された能力は、YB-1の核局在と組み合わせ、相当する遺伝子、特にE1B55K及びE4orf6を発現させることにより克服できることを見出した。本明細書における実施例で示すように、ウイルス複製及び粒子形成は、そのような条件下で、野生型アデノウイルスの複製活性及び粒子形成に匹敵するレベルまで増加する。

10

【0251】

本発明に従って使用される本明細書で開示されるアデノウイルスの、その製造に関連した又はその製造のための薬物は、局所的に適用する又は送達することも本発明の範囲内であるが、普通、全身性に適用されることが意図される。適用はアデノウイルスを特に細胞に感染させることが意図され、アデノウイルスの複製が、特に、関与する、好ましくは、因果関係を持って、条件、通常、疾患の形成において、本発明の薬物が使用される診断及び/又は予防及び/又は治療のために、その中で生じることが意図される。

【0252】

20

そのような薬物は好ましくは、悪性腫瘍疾患、腫瘍性疾患、癌性疾患、癌及び腫瘍の治療のためであり、これらの用語は、反対に指示されない限り、本質的に同義的に本明細書では使用される。腫瘍性疾患は好ましくは、YB-1が、腫瘍性疾患のメカニズムのために、特に病理メカニズムのために、すでに、好ましくは細胞周期とは無関係に核に局在する、或いは細胞核におけるYB-1の存在が外因性の手段によって誘発されるものであり、その際、そのような外因性の手段はYB-1を細胞核に転移させる、又はそれをそこで誘導する又は発現するのに好適である。用語、腫瘍又は腫瘍性疾患は、本明細書では、悪性腫瘍及び良性腫瘍の双方、固形腫瘍及びびまん性腫瘍の双方のそれぞれ及びそれぞれの疾患を含むべきである。実施態様では、薬物は少なくとも1つのさらなる薬学上有効な化合物を含む。そのようなさらなる薬学上有効な化合物の性質及び量は、薬物が使用される適応の種類に依存する。薬物が腫瘍性疾患の治療及び/又は予防に使用される場合、通常、たとえば、シスプラチン及びタキソール、ダウノブラスチン、ダウノルピシン、アドリアマイシン及び/又はミトキサントロンのような細胞増殖抑制剤又はそのほかの細胞増殖抑制剤又は本明細書に記載される細胞増殖抑制剤の群が使用され、好ましくは、記載されるようなものは、細胞増殖抑制剤が介在するYB-1の核への局在化と関連して使用される。

30

【0253】

本発明に基づいた薬物は、種々の剤形、好ましくは液体形態で存在することができる。さらに、薬物は、剤形の当業者に既知の安定剤、緩衝液、防腐剤などのような補助剤を含有するであろう。

40

【0254】

本発明者は、さらに驚くべきことに、本明細書に記載するウイルス、特に本発明に従って用いられるウイルスの有効性を、少なくとも2つの作用剤と組み合わせるにより増大させることができることを見出した。その場合、少なくとも2つの作用剤のそれぞれは、細胞増殖抑制剤を含む群より、個々に及び独立して選択される。

【0255】

本明細書の好ましい実施態様で用いられるように、細胞増殖抑制剤は特に化学的又は生物学的化合物であって、それは細胞又はそのような細胞を含む生物への投与中に又は投与後に、もはや成長していない及び/又はもはや分裂していない及び/又は細胞分裂及び/又は細胞増殖が遅くなった細胞をもたらす。細胞増殖抑制剤は、前述のような細胞中のみ

50

で又はそのような細胞を含む生物体中のみで細胞増殖抑止剤へ変化する化合物も含む。その限りにおいて、用語、細胞増殖抑止剤は、前・細胞増殖抑止剤も含む。

【0256】

細胞増殖抑止剤は作用機序により群に分けられる。原則としてすべて本発明において用いることができる次の群が区別される：

【0257】

- アルキル化剤、すなわち核酸及びタンパク質のリン酸、アミノ、スルフヒドリル、カルボキシ及び水酸基のアルキル化により、細胞傷害作用を引き起こす化合物。そのような化合物はしばしばそれ自身が発癌性である。細胞増殖抑止剤のこの群の代表例は、シス-プラチン及びプラチン誘導体、シクロホスファミド、ダカルバジン、マイトマイシン、プロカルバジンである。

10

【0258】

- 代謝拮抗剤、すなわち、その構造類似性又は結合能力により、代謝過程を妨害するか、代謝過程に影響する化合物。代謝拮抗剤の群の中で、構造上類似の代謝拮抗剤、構造を変化させる代謝拮抗剤、及び間接的に作用する代謝拮抗剤が区別される。構造上類似の代謝拮抗剤は、化学的な類似性により代謝物質と競合するが、代謝物質の機能は発揮しない。構造を変化させる代謝拮抗剤は代謝物質と結合してその機能又は再吸収を妨害するか、又は代謝物質を化学的に修飾する。間接的に作用する代謝拮抗剤は、例えばイオンの結合によって代謝物質の機能を妨害する。この群の代表例は、メトトレキサートなどの葉酸拮抗薬、フルオロウラシルなどのピリミジン類似物質、アザチオプリン及びメルカプトプリンなどのプリン類似物である。

20

【0259】

- 有糸分裂阻害剤、すなわち細胞分裂を阻害する化合物。有糸分裂阻害剤の群の中で、細胞分裂毒素と紡錘体毒素及び染色体毒素が区別される。この群の代表例は、タキサン及びビンカルカロイドである。タキサンを次に、タキソール及びタキソテルの2つの主な群に分けることができる。特に好ましいタキソールはパクリタキセルであり、特に好ましいタキソテルはドセタキセルである。

【0260】

- DNA依存性RNAポリメラーゼに阻害作用を有する抗生物質。代表例は、例えばブレオマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン及びマイトマイシンなどの、アントラサイクリンである。

30

【0261】

- トポイソメラーゼ阻害剤、特にトポイソメラーゼI阻害剤。トポイソメラーゼ阻害剤は、3段階の過程によりDNAの撚り回数の変化を触媒することにより、DNAの三次構造を決定する化合物である。基本的に、トポイソメラーゼの2つの形が区別される。I型のトポイソメラーゼは1つのDNA鎖のみを切断し、ATPに依存しない、しかし、II型のトポイソメラーゼはDNAの両方の鎖を切断し、その場合ATPに依存する。トポイソメラーゼI阻害剤の代表例は、イリノテカン及びトポテカンであり、そしてトポイソメラーゼII阻害剤の代表例はエトポシド及びダウノルビシンである。

【0262】

本発明の範囲内で、前述の群から少なくとも1つの、また好ましくは2つの作用剤が選択される。しかし、特に、3つ、4つ、又は5つの種々の作用剤が選択されるのもまた、本発明の範囲内である。ウイルスと共に2つの作用剤だけを用いる本発明の実施態様について次の意見を述べる。これらの考察は、2つを越える薬剤を用いる場合の実施態様にもまた、基本的に適用可能である。

40

【0263】

作用剤は、異なる標的分子を対象にする又は標的とする、あるいは異なる分子を標的とすると文献に記載されている、というように、互いに異なっていることが好ましい。作用剤が、同じ標的分子に結合する2つ以上の異なる作用剤を含むのもまた、本発明の範囲内である。さらに、1つの作用剤が標的分子の第1の部位へ結合し、第2の作用剤が標的分子

50

子の第2の部位へ結合するのも本発明の範囲内である。

【0264】

少なくとも作用剤の2つが異なる作用機序を用いて活性を及ぼすのもまた本発明の範囲内である。好ましい実施態様において、活性を及ぼすとは、化合物の細胞増殖及び/又は細胞分裂を阻害又は遅延する作用が異なる作用機構によって仲介されることを意味する。特に好ましい実施態様において、用語活性を及ぼすとは、ウイルス、特に、本発明に従うウイルス、本明細書に記述されているウイルス、及び本発明に従って用いられるウイルス、の複製効率が、作用剤の1つ及び/又は両方が使用されない場合と比較して増加していることを意味する。ウイルスの複製の効率の尺度として、好ましくは細胞溶解に必要なウイルスの数が用いられ、好ましくはpfu/細胞として表現される。

10

【0265】

特に好ましい実施態様では、少なくとも2つの作用剤の少なくとも1つが、ウイルスの複製が起きる細胞の、好ましくは選択的な方式で起きる細胞の、好ましくは本明細書に記述したウイルスによる及び/又は本発明に従って用いられるウイルスによる感染力を増加させる作用剤である。これは、例えば細胞によるウイルスの取り込みを増加させることにより行うことができる。ウイルスの取り込みは、特にアデノウイルスは、例えばコクサッキーウイルス・アデノウイルスレセプター(CAR)によって媒介される(Mizuguchi and Hayakawa, GENE 285, 69-77, 2002)。CARの増加した発現が、例えばトリコスタチンAにより引き起こされる(Vigushin et al., Clinical Cancer Research, 7, 971-976, 2001)。

20

【0266】

さらなる実施態様では、少なくとも2つの作用剤の1つは、細胞内の成分の利用可能性を増すものであり、その場合、成分はウイルス、好ましくは本明細書に記述したウイルス、及び/又は本発明に従って用いられるウイルス、の複製を増加させる成分である。

【0267】

さらなる実施態様では、少なくとも2つの薬剤のうちの1つは核の中へのYB-1の輸送を媒介するものである。そのような作用剤を、トポイソメラーゼ阻害剤、アルキル化剤、代謝拮抗剤、及び有糸分裂阻害剤を含む群より選択することができる。好ましいトポイソメラーゼ阻害剤は、カンプトテシン、イリノテカン、エトポシド、及びそれぞれの類似物質である。好ましい有糸分裂阻害剤は、ダウノルビシン、ドキソルビシン、パクリタキセル及びドセタセルである。好ましいアルキル化剤はシスプラチン及びそれらの類似物質である。好ましい代謝拮抗剤は、フルオロウラシル及びメトトレキサートである。

30

【0268】

特に好ましい実施態様では、少なくとも2つの作用剤の1つは細胞の感染性、特にCARの発現、を増加させるものであり、また少なくとも2つの作用剤の2番目は、核の中へのYB-1の輸送を増加させるものであり、その場合好ましくは化合物として、好ましくは上述のようなそれぞれの必要な特性を示す化合物を用いる。

【0269】

さらなる実施態様では、少なくとも2つの作用剤の1つはヒストンデアシラーゼ阻害剤である。好ましいヒストンデアシラーゼ阻害剤は、トリコスタチンA、FR901228、MS-27-275、NVP-LAQ824及びPXD101を含む群より選択されるものである。トリコスタチンAは、例えばVigushin et al., Clinical Cancer Research, 7, 971-976, 2001に記載されている；FR901228は、例えばKitazono et al., Cancer Res., 61, 6328-6330, 2001に記載されている；MS-27-275は、Jaboin et al., Cancer Res., 62, 6108-6115, 2002に記載されている；PXD101は、Plumb et al., Mol. Cancer Ther., 8, 721-728, 2003に記載されている；NVP-LAQ824は、Atadja et al., Cancer Res., 64, 689-695, 2004に記載されている。

40

【0270】

なお更なる実施態様では、少なくとも2つの作用剤の1つがトポイソメラーゼ阻害剤、好ましくはトポイソメラーゼI阻害剤である。好ましいトポイソメラーゼ阻害剤は、カン

50

プトテシン、イリノテカン、トポテカン、S N - 3 8、9 - アミノカンプトテシン、9 - ニトロカンプトテシン、D X - 8 9 5 1 f、及びダウノルピシンを含む群より選択されるものである。イリノテカン及びS N - 3 8は、例えば Gilbert et al., Clinical Cancer Res., 9, 2940-2949, 2003 に記載されている；D X - 8 9 5 1 fは、van Hattum et al., British Journal of Cancer, 87, 665-672, 2002 に記載されている；カンプトテシンは、Avemann et al., Mol. Cell. Biol., 8, 3026-3034, 1988 に記載されている；9 - アミノカンプトテシン、9 - ニトロカンプトテシンは、Rajendra et al., Cancer Res., 63, 3228-3233, 2003 に記載されている；ダウノルピシンは、M. Binaschi et al., Mol. Pharmacol., 51, 1053- 1059 に記載されている。

【0271】

10

特に好ましい実施態様では、少なくとも2つの作用剤の1つはヒストンデアシラーゼ阻害剤であり、少なくとも2つの作用剤の他の1つはトポイソメラーゼ阻害剤である。

【0272】

ある実施態様では、本発明による手段及び/又は本発明によって準備される手段は、本発明に従ってウイルスと組み合わせた少なくとも2つの作用剤のうちの1つ又はいくつかから離れているウイルスを含む。ウイルスは、ウイルスと組み合わせたいずれの作用剤からも離れていることが好ましい。好ましくは、その分離は空間的分離である。空間的分離は、ウイルスが作用剤とは異なる包装中に存在するような状態であってよい。好ましくは、包装は1回投与単位である、すなわち、ウイルス及び作用剤を単一の用量又は1回量として包装する。単回投与単位は、次に包装を作るために組み合わせてもよい。しかし1つ又はいくつかの、ウイルスの単一用量が、1つ又はいくつか作用剤の1つ又はいくつかの単一容量と組み合わせられるか、それと一緒に包装されることは、本発明の範囲内である。

20

【0273】

包装の種類は、当業者に知られている投与の方法に依存する。好ましくは、ウイルスは、凍結乾燥された形で、又は適当な液相中に存在することになる。好ましくは、作用剤は、例えば錠剤又はカプセルとして固体の形で存在することになる。しかしそれに制限されない。あるいは、作用剤は液体の形で存在することができる。

【0274】

全身的に又は局所的にウイルスを投与することは本発明の範囲内である。さらに、ウイルスと組み合わせた作用剤を全身に又は局所的に、個々に及び互いに独立して、又は一緒に投与することも本発明の範囲内である。投与の他の様式は当業者に公知である。

30

【0275】

ウイルス及びそれと組み合わせた作用剤を時間を隔てる方式で、又は同時に投与することもまた、本発明の範囲内である。時間を隔てる方式に関連して、作用剤はウイルスの投与に先立って投与することが好ましい。ウイルスにどれくらいの時間先立って作用剤を投与するかは、用いる作用剤の種類に依存し、当業者には使用する作用剤の作用機序から明白である。さらに少なくとも2つの作用剤の投与を、同時に又は異なる時に行うことができる。時間的に異なる投与に関しては、その時点は、再び作用剤の根底にある作用機序に起因するものであり、それに基づいて当業者によって決定される。

40

【0276】

上記の考察は、医薬組成物としても本明細書に開示され参照されている本発明による薬物に関連して示したが、ウイルスの複製に使用される、好ましくは本発明によるウイルスのインビトロの複製に使用される組成物を含む任意の組成物に、概して適用可能である。上記の考察はまた、本発明によるキット及び本発明に従って用いられるキットにそれぞれ適用可能であり、それは本明細書に記述したウイルス及び本発明に従って用いられるウイルスとは別に、本明細書に記述される1つの作用剤又は作用剤の組合せもさらに含む。そのようなキットは、ウイルス及び/又はすぐに使用できる形の1つ又はいくつかの作用剤及び好ましくは使用指示書を含む。更に、上記の実施態様は、さらに本明細書に開示される核酸及び本発明に従って用いられる核酸、ならびに本発明による複製システム及びそれ

50

をコードする核酸、ならびに、それぞれ本発明に従って用いられる複製システム及び本発明に従って用いられるそれをコードする核酸に当てはまる。

【0277】

本発明者は驚くべきことに、本明細書に記載されるウイルスの発明使用、好ましくは、グループⅠのアデノウイルス及び／又はグループⅡのアデノウイルスの使用がそのような腫瘍と関連して極めて高い成功率で実施されうること、及び細胞周期とは無関係にYB-1を細胞核に有するそのような腫瘍の治療のための薬物の製造のためにそれらを使用できることを見い出した。普通、YB-1は細胞質、特に核周辺の細胞質に局在する。細胞周期のG1/S期に、正常細胞及び腫瘍細胞の双方でYB-1を核内で見い出すことができ、その際、YB-1の一部は細胞質に残る(Jurchott K. et al., JBC 278: 27988-27996, 2003)。しかしながら、そのような改変アデノウイルスを用いてウイルスの腫瘍溶解を提供するためには、これは十分ではない。従来技術で記載されるようなそのような減弱アデノウイルスの比較的低い有効性は、結局のところ、その誤った適用に基づく。言い換えれば、ウイルスの腫瘍溶解に対する分子生物学的必要条件が本明細書に記載されるようなこれら減弱した又は改変したアデノウイルス、好ましくはグループⅠのアデノウイルス及び／又はグループⅡのアデノウイルスを用いて提供される場合、高い効率と共に、そのようなアデノウイルスシステムを使用してもよい。本発明に従って使用されるべき本明細書に記載されるアデノウイルス、たとえば、Ad 24、d1922-947、E1Ad/01/07、CB016、d1520及び欧州特許EP0931830号に記載された組換えアデノウイルスの場合、必要条件是、そのような腫瘍細胞で細胞周期とは無関係にYB-1の核局在を示す細胞に与えられる。この種の核への局在化は、腫瘍自体の性質によって或いは本明細書に記載される本発明に係る手段又は発明剤によって誘発されてもよい。従って、本発明は、本発明に係るウイルス、好ましくはグループⅠのアデノウイルス及び／又はグループⅡのアデノウイルスを用いて、しかしまた従来技術ですでに記載された減弱した又は改変したアデノウイルスを用いてさらに効率的に治療されてもよい、腫瘍及び腫瘍性疾患の並びに患者の新しい群を定義する。

【0278】

グループⅠのアデノウイルス及び／又はグループⅡのアデノウイルス又はそのまま従来技術ですでに既知の本発明に従って使用されるべきアデノウイルスを用いて、或いは初めて本明細書に記載されるアデノウイルスを用いて、並びに好ましくはRb/E2fの結合を妨害しない又はYB-1核陰性の細胞では複製しない又は本明細書で定義するように強く低下した複製を示すE1Aタンパク質で突然変異又は欠損を有する、及び／又は、特にE1A、たとえばウイルスAd 24、d1922-947、E1Ad/01/07、CB016及び欧州特許EP0931830号に記載されたアデノウイルスの場合、欠損癌タンパク質を有する、又は示すアデノウイルスを用いて本発明に従って治療されてもよい患者のさらなる群は、YB-1が核に移動する又はそこで誘導される又はそこに輸送される或いは調節解除されたYB-1が存在するという特定の条件を適用する又は実現することによってそれが保証されるような患者である。この患者群と関連したグループⅠのアデノウイルス及び／又はグループⅡのアデノウイルスの使用は、ウイルス複製の誘導が、YB-1の核への局在化とそれに続くYB-1のE2後期プロモーターへの結合に基づくという知見に基づく。本明細書で開示されたこの知見のために、Ad 24、d1922-947、E1Ad/01/07、CB016及び／又は欧州特許EP0931830号に記載されたアデノウイルスのようなアデノウイルスも、本明細書の意味においてYB-1が核陽性である細胞及び／又はYB-1が調節解除された状態で存在する細胞で複製してもよい。その程度において、これらの特徴を有する細胞を含む、特に治療されるべき疾患の生成にこれらの細胞が関与していれば、本発明に従って疾患及び患者を治療するためにこれらのアデノウイルスを使用することができる。このことは、細胞周期とは無関係に核にYB-1を含有する又は本発明の意味において調節解除されたYB-1を含有する腫瘍細胞を本発明に従って治療することにおいて、Ad 24、d1922-947、E1Ad/01/07、CB016、欧州特許EP0931830号に記載されたアデノ

ウイルス並びにグループ I のアデノウイルス及び / 又はグループ II のアデノウイルスの成功の基礎である。本発明に従って使用されるべき本明細書に記載されたウイルスを用いて、及び初めて本明細書に記載されたウイルス、特にグループ I のアデノウイルス及び / 又はグループ II のアデノウイルスを用いて、本発明に従って治療されてもよい患者のさらなる群は、Y B - 1 核陽性のもの、及び / 又は以下の任意の治療の結果 Y B - 1 核陽性であるもの、及び / 又は、好ましくは治療の意味で、アデノウイルスの投与に先立って、ウイルスの適用に付随して、アデノウイルスの投与後に、以下の手段の 1 つを受ける患者である。Y B - 1 核陽性の患者が、細胞周期とは無関係に多数の腫瘍形成細胞の中で特に核に Y B - 1 を有する、及び / 又はそのような細胞で調節解除された Y B - 1 を有する患者であるということは本発明の範囲内である。これらの手段の 1 つは、全体として及び / 又は腫瘍治療に関連して使用される、本明細書に記載されるような細胞増殖抑制剤の投与である。さらに照射、特に腫瘍治療に適用される照射はこの群の手段に属する。照射は、特に高エネルギーの放射線による照射、好ましくは、腫瘍治療に使用される好ましくは放射線照射を意味する。さらなる手段は温熱及び温熱の適用、好ましくは腫瘍治療に使用される温熱である。特に好ましい実施態様では、温熱は局所に適用される。最終的に、さらなる手段は、ホルモン治療、特に腫瘍治療に適用されるホルモン治療である。そのようなホルモン治療の過程では、抗エストロゲン及び / 又は抗アンドロゲンが使用される。それに関連して、たとえば、タモキシフェンのような抗エストロゲンは特に乳癌の治療に使用され、フルタミド又はシプロテロンアセテートのような抗アンドロゲンは特に前立腺癌の治療に使用される。

10

20

【 0 2 7 9 】

本明細書で開示されるアデノウイルスは腫瘍の治療に使用されてもよく、その際、腫瘍は、原発腫瘍、二次腫瘍、三次腫瘍及び転移腫瘍を含む群から選択される。これに関連して、腫瘍は以下の特徴、すなわち、理由の如何にかかわらず、細胞周期とは無関係に核に Y B - 1 を有すること及び / 又は調節解除された Y B - 1 を含有することの 1 つを示すことが好ましい。

【 0 2 8 0 】

本発明に基づいたアデノウイルスがその中で複製する又は複製することが可能である細胞及び腫瘍は、本明細書に記載される 1 又は数個の特徴有する、好ましくは、理由にかかわらず細胞周期とは無関係に核に Y B - 1 を有する及び / 又は調節解除された Y B - 1 を有するという特徴を有するものであり、かつ、本発明に基づいたグループ I のアデノウイルス及び / 又はグループ II のアデノウイルスを用いてこれらの細胞及び腫瘍を治療してもよく、かつ、それらの治療のための薬物を製造するためにアデノウイルスを使用してもよく、その際、アデノウイルスは Y B - 1 をコードする核酸を発現することは本発明の範囲内である。従って、好ましくは、本発明に基づいたグループ I のアデノウイルス及び / 又はグループ II のアデノウイルスが複製してもよい、かつ、これらのアデノウイルスを用いて治療してもよい、好ましくは溶解してもよい細胞、従って腫瘍には 3 つのカテゴリーがある：

30

【 0 2 8 1 】

A 群：細胞周期とは無関係に核に Y B - 1 を有する細胞；

40

B 群：核に Y B - 1 を有さず、特に細胞周期とは無関係ではないが、調節解除された Y B - 1 を含む細胞；及び

C 群：核に Y B - 1 を有さず、特に細胞周期とは無関係ではなく、調節解除された Y B - 1 を含まない細胞

【 0 2 8 2 】

A 群については、本発明に基づいたアデノウイルス、特に、追加の Y B - 1 を発現しないグループ I のアデノウイルスを複製及び溶解に使用してもよい。しかしながら、本発明に基づいたアデノウイルス、特に、追加の Y B - 1 を発現するグループ I のアデノウイルスを複製及び溶解に用いることも可能である。これは B 群にも適用される。それに束縛されることを望まないで、理由は、E 1 B タンパク質、特に E 1 B 5 5 K タンパク質及び /

50

又は E 4 タンパク質、特に E 4 o r f 6 タンパク質の効果のために、核における Y B - 1 の局在化及び核へのその転移によって効率的な複製が保証されることであると思われる。アデノウイルスにより追加的に発現される Y B - 1 はこの過程を抑制する。

【 0 2 8 3 】

C 群の場合、本発明に基づいたアデノウイルス、特に、追加の Y B - 1 を発現するグループ I のアデノウイルスを複製及び溶解に使用されるであろう。この理由は、再び、それに束縛されることを望まないで、ウイルス複製の上記過程は、効率的な複製が起きてもよいように、特定の細胞のバックグラウンドでは活発ではないことであると思われる。Y B - 1 を提供し、Y B - 1 を発現させることだけで、効率的な複製が起きてもよく、その際、メカニズムは、Bargou (Bargout R. C. et al., Nature Medicine 3: 447-450, 1997) 及び Jurchott (Jurchott K. et al., JBC 278: 27988-27966, 2003) により記載されたように、Y B - 1 の過剰発現が Y B - 1 の核への局在化を招くようである。 10

【 0 2 8 4 】

固有に核に Y B - 1 を含有する、又はそのようにする又は核への誘導及び積極的な核への導入ののち核に Y B - 1 を含有する、或いは本発明の意味で調節解除された Y B - 1 を含む腫瘍を形成する細胞の一部も本発明の範囲内である。好ましくは、腫瘍形成細胞の約 5 % 又はすなわち、6 %、7 %、8 % などよりも高い比率がそのような Y B - 1 核陽性細胞又は調節解除された Y B - 1 が存在する細胞である。たとえば、乳癌、骨肉種、卵巣癌、滑膜癌又は肺癌のようなそのほかの腫瘍については、調節解除された Y B - 1 を含む又は細胞周期とは無関係に Y B - 1 の核への局在化を示す腫瘍細胞の比率は、約 3 0 ~ 5 0 % であってもよい (Kohno K. et al., BioEssays 25: 691-698, 2003)。本発明に基づくアデノウイルスを用いてそのような腫瘍を好ましく治療してもよい。Y B - 1 の核への局在化は、外からのストレス及び局所に適用されたストレスによって誘導されてもよい。この誘導は、照射、特に UV 照射、とりわけ、本明細書で開示される細胞増殖抑制剤の適用及び温熱を介して生じてもよい。温熱に関連して、Y B - 1 の核への特定の核輸送が誘発されてもよく、このために、アデノウイルスの複製並びに細胞及び腫瘍の溶解のための必要条件が与えられ、好ましくは局所的に限定されることが、特定の様式で、特に局所的に、実現されてもよいことが重要である (Stein U., Jurchott K., Walther W., Bergmann S., Schlag P. M., Royer H. D., J. Biol. Chem., 276(30): 28562-9, 2001; Hu Z., Jin S., Scotto K. W., J. Biol. Chem., 275(4): 2979-85, 2000; Ohga T., Uchiumi T., Makino Y., Koike, K., Wada M., Kuwano M., Kohno K., J. Biol. Chem., 273(11): 5997-6000, 1998)。 20 30

【 0 2 8 5 】

従って、適当な前処理又は後処理又は付随した処理によって、Y B - 1 の輸送が特に腫瘍細胞で誘発され、調節解除された Y B - 1 が細胞で生成される患者及び患者群に本発明の薬物が投与され、彼らのために設計されるであろう。

【 0 2 8 6 】

本明細書で提供される技術的教示に基づいて、本発明に基づいた使用に適用されてもよいアデノウイルスの異なった実施態様を生成するために、たとえば、欠失又は点突然変異を含んでもよい特に E 1 A を好適に改変することは当該技術の 1 つの技量の範囲内である。 40

【 0 2 8 7 】

すでに言及したように、グループ I 及び / 又はグループ II のアデノウイルスは、Y B - 1 を核に有するそのような細胞及び細胞系で複製することが可能である。これらのアデノウイルスが本発明に従って複製することができ、従って腫瘍を溶解することができるかどうかという疑問については、R b、すなわち、網膜芽腫腫瘍抑制産物の存在又は非存在に関する細胞の状況は、無関係である。さらに、本発明に従った前記アデノウイルスの使用について、Y B - 1 核陽性細胞、すなわち、細胞の状況に無関係に Y B - 1 を有する細胞と関連して本明細書で開示されるアデノウイルスを使用する場合、感染細胞の、感染されるべき細胞の、又は治療されるべき細胞の p 5 3 の状況を考慮に入れる必要はなく、R 50

b の状況と同様に p 5 3 の状況も本明細書で開示される技術的教示を实践するためのアデノウイルスの複製に何ら影響を有さない。

【0288】

好ましくは、グループ I I のアデノウイルスのトランス活性化する癌遺伝子及び癌遺伝子タンパク質、特に E 1 A は、独自の天然のアデノウイルスのプロモーターの制御下にあることができ、及び / 又は腫瘍特異的プロモーター又は組織特異的プロモーターを介して制御されることもできる。好適な非アデノウイルスプロモーターは、サイトメガロウイルスプロモーター、R S V (ラウス肉種ウイルス) プロモーター、アデノウイルスに基づいたプロモーター V a I 及び非ウイルス Y B - 1 プロモーターを含む群から選択される (Makino Y. et al., Nucleic Acids Res., 15: 1873-1878, 1996)。本明細書で開示される本発明の任意の態様と関連して使用してもよいさらなるプロモーターは、テロメラーゼプロモーター、
- フェトタンパク質 (A F P) プロモーター、癌胎児性抗原プロモーター (C E A) (Cao G., Kuriyama S., Gao J., Mitoro A., Cui L., Nakatani T., Zhang X., Kikukawa M., Pan X., Fukui H., Qi Z., Int. J. Cancer 78: 242-247, 1998)、L
- プラチンプロモーター (Chung I., Schwartz P. E., Crystal R. C., Pizzorno G., Leavitt J., Deisseroth A. B., Cancer Gene therapy 6: 99-106, 1999)、アルギニンバゾプレシンプロモーター (Coulson J. M., Staley J., Woll P. J., British J. Cancer 80: 1935-1944, 1999)、E 2 f プロモーター (Tsukada et al., Cancer Res., 62: 3428-3477, 2002)、ウロブラキン I I プロモーター (Zhang et al., Cancer Res., 62: 3743-3750, 2002)、及び P S A プロモーター (Hallenbeck P. L., Chang Y. N., Hay C., Go
lightly D., Stewart D., Lin J., Phipps S., Chiang Y. L., Human Gene Therapy 10: 1721-1733, 1999)、チロシナーゼプロモーター (Nettelbeck D. M., Anti-Cancer Drugs 14: 577-584, 2003)、シクロオキシゲナーゼ 2 プロモーター (Nettelbeck D. M. et al., Melanoma Res., 13: 287-292, 2003)、並びにテトラサイクリンのような誘導系 (Xu, X. L., Mizuguchi H., Mayumi T., Hayakawa T., Gene 309: 145-151, 2003) である。さらに、ドイツ特許出願 D E 1 0 1 5 0 9 8 4 . 7 号に記載されるようなアデノウイルスの Y B - 1 に依存した E 2 後期プロモーターは、本発明に関連して使用してもよいプロモーターである。

【0289】

テロメラーゼプロモーターについて、ヒト細胞ではそれは決定的に重要であることが知られている。従って、テロメラーゼ活性は、酵素の触媒サブユニットであるテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子 (h T E R T) の転写制御を介して調節されている。テロメラーゼの発現は、ヒト腫瘍細胞の 8 5 % で陽性である。これとは対照的に、ほとんどの正常細胞ではそれは不活性である。その例外は、生殖細胞及び胎児の組織である (Braunstein I. et al., Cancer Res., 61: 5529-5536, 2001; Majumdar A. S. et al., Gene Therapy 8: 568-578, 2001)。h T E R T の詳細な研究によって、開始コドンそれぞれ 2 8 3 b p 及び 8 2 b p から分離したプロモーターの断片は腫瘍細胞での特異的な発現に十分であることが示されている (Braunstein I. et al., Majumdar A. S. et al., 上記)。従って、本プロモーター及び特異的断片はそれぞれ、遺伝子の、特に導入遺伝子の、好ましくは本明細書で開示される導入遺伝子の 1 つの腫瘍細胞における特異的な発現に好適である。プロモーターは、腫瘍細胞においてのみ、改変された癌遺伝子、好ましくは E 1 A 癌遺伝子タンパク質の発現を認めるべきである。また、実施態様では、これらのプロモーターの制御下でのアデノウイルスベクターにおける導入遺伝子の発現、好ましくは E 4 o r f 6、E 1 B 5 5 k D、A D P 及び Y B - 1 を含む群から選択される導入遺伝子の発現が企図される。トランス活性化する癌遺伝子タンパク質、特に E 1 A タンパク質の読み取りフレームが、アデノウイルスシステムの 1 又は数個の遺伝子産物と共にインフレームであることも本発明の範囲内である。しかしながら、トランス活性化する E 1 A タンパク質の読み取りフレームはそれらとは独立していてもよい。

【0290】

様々な導入遺伝子、したがって E 1 B 5 5 k D、E 4 o r f 6、A D P その他もまた、

特にそれらがウイルス遺伝子である場合は、原則として任意のそれぞれのウイルス、好ましくはアデノウイルスからクローニングすることができる。さらに先行技術において多数のプラスミドが記述されており、それらはそれぞれの遺伝子を含んでおり、続いてそれらから遺伝子を得て本発明のアデノウイルスへならびに本発明に従って用いられるウイルスへ導入することができる。E 1 B 5 5 k Dを発現するようなプラスミドの例については、例えば Dobbelstein, M. et al., EMBO Journal, 16, 4276-4284, 1997 に記載されている。E 1 B 5 5 K D 遺伝子のコーディング領域を例えば 3' 非翻訳領域と一緒にこの遺伝子から、プラスミド p D C R E 1 B から B a m H I により切り取ることができる。E 1 B 5 5 k D 遺伝子ならびに 3' 非コード領域を含む対応する断片が、アデノウイルス 5 型のヌクレオチド 2 0 1 9 - 4 1 0 7 に対応する。しかし、E 1 B 5 5 k D 遺伝子が制限酵素 B a m H I 及び B f r I によって前記プラスミドから切り取られ、続いてアデノウイルスへクローニングされることもまた本発明の範囲内である。

10

【0291】

もし逆の言及がなければ、本発明のウイルスについて言及される場合は、それをコードする核酸ならびにアデノウイルス粒子（これは好ましくはそれぞれの核酸を含む）の両方について言及される、ということは本発明の範囲内である。それぞれの核酸はまた、異なるベクターに組み入られて存在してもよい。

【0292】

本発明に基づいたアデノウイルス、好ましくはグループ I のアデノウイルスの種々の実施態様と関連して、特に、野生型アデノウイルスにおけるタンパク質又は発現産物を制御するものとは異なるプロモーターが使用される場合、上述の種々のプロモーターも使用されることは本発明の範囲内である。従って、前述のプロモーターは本発明の意味では、異種プロモーターである。本発明に基づいたアデノウイルス、特にグループ I のアデノウイルスの好ましい実施態様では、上記で定義した A 群及び B 群の細胞にアデノウイルスを適用する場合、E 1 B タンパク質及び / 又は E 4 タンパク質の発現がそのような異種プロモーターから開始し、その際、好ましくは、しかし排他的ではなく E 1 A タンパク質が Y B - 1 に制御されるように、これが生じることが企図される。この実施態様及びそのほかの実施態様では、E 1 A タンパク質の発現は、たとえば、E 2 後期プロモーターのような Y B - 1 が制御可能なプロモーターの制御下にある。このことは、E 1 B タンパク質及び / 又は E 4 タンパク質が発現カセットで発現されている場合も真実である。

30

【0293】

本発明に基づいたアデノウイルス、特にグループ I のアデノウイルスの好ましい実施態様では、C 群の細胞に関連してアデノウイルスを適用する場合、プロモーターはそれぞれ独立して、腫瘍特異的、器官特異的又は組織特異的なプロモーターであることが企図される。それに関連して、E 1 B タンパク質、E 4 タンパク質及び / 又は E 1 A タンパク質の発現を制御する少なくとも 1 つのプロモーターがそのような特異的なプロモーターである場合、それは十分である。この腫瘍、器官及び組織の特異性によって、本発明に基づいたアデノウイルスの複製は該当する腫瘍、器官又は組織の細胞にのみ生じ、それから離れて、さらなる組織がアデノウイルスの複製によってたとえば、溶解されるように損傷されることはないことが保証される。好ましくは、第 2 のタンパク質、及びさらに好ましくは 3 つすべてのタンパク質がそのような腫瘍特異的、器官特異的又は組織特異的なプロモーターによって制御される。そのようなアデノウイルスを用いて、腫瘍を形成しない又はそのような腫瘍を発生させることができないが、そのほかの理由、たとえば医学的理由で、たとえばそれらが望ましくない因子を産生する又は高すぎるレベルでそのような因子を産生するので、生物、好ましくは哺乳動物、さらに好ましくはヒトから破壊されるべきである又は除去されるべきであるものも溶解することが可能である。

40

【0294】

実施態様では、本発明に基づいたアデノウイルスの溶解のための細胞が使用され、細胞は耐性であり、好ましくは多剤耐性を示すことが企図される。

【0295】

50

本明細書でいう、かつ治療されるべき腫瘍及び患者の特徴である耐性は、以下の遺伝子：MDR、MRP、トポイソメラーゼ、BCL2、グルタチオン-2-トランスフェラーゼ(GST)、タンパク質キナーゼC(PKC)が介在するものであるが、これらに限定されない。細胞増殖抑制剤の効果がとりわけ、アポトーシスの誘導に基づいているので、アポトーシス関連遺伝子の発現は、以下の因子、すなわち、Fas、BCL2ファミリー、HSP70及びEGFRがそれに関連して関係するようにいかなる耐性の生成においても決定的な役割を担う(Kim et al., Cancer Chemother. Pharmacol., 50: 343-352, 2002)。

【0296】

YB-1の発現は、非耐性腫瘍細胞に比べて、耐性腫瘍細胞において強く増加することがLevenson et al (Levenson V. V. et al., Cancer Res., 60: 5027-5030, 2000)によって記載されている。 10

【0297】

本明細書で使用されるとき、耐性は、本明細書で記載される細胞増殖抑制剤に対する耐性をいう。この複合耐性は、マーカーを呈する腫瘍及び患者群の細胞を決定するためのマーカーとして使用してもよい膜結合型トランスポータタンパク質、P糖タンパク質の発現、好ましくは過剰発現に付随する。本明細書で使用されるとき、用語、耐性は、P糖タンパク質が介在する古典的な耐性をいう耐性、及びMRPが介在する又はそのほかの非P糖タンパク質が介在する異型の耐性をいう耐性の双方も含む。YB-1の発現に相関するさらなるマーカーはトポイソメラーゼIIである。その程度において、成功の期待を持ってアデノウイルスを用いて本発明に従って患者を治療してもよいかどうかを決定するために、核におけるYB-1を決定する代わりに又はそれに加えて、スクリーニング法でトポイソメラーゼIIを用いてもよい。原則としてP糖タンパク質と同様に使用してもよいマーカーはMRPである。少なくとも、結腸直腸癌又は結腸直腸癌を有する患者が関係する範囲でのさらなるマーカーは、たとえばShibao K. et al (Shibao K. et al., Int. Cancer 83: 732-737, 1999)により記載されるようなPCNA(増殖細胞核抗原)(Hasan S. et al., Nature 15: 387-391, 2001)である。最終的に、乳癌及び骨肉種の分野では、MDR(多剤耐性)の発現が前述の意味でのマーカーである(Oda Y. et al., Clin. Cancer Res., 4: 2273-2277, 1998)。本発明に従って使用してもよいさらに可能性のあるマーカーは、p73である(Kamiya M., Nakazatp Y., Neurooncology 59: 143-149, 2002; Stiewe et al., J. Biol. Chem., 278: 14230-14236, 2003)。 20 30

【0298】

最後に、それは、本発明で使用してもよい乳癌における予後マーカーとしてYB-1が言われるべきである。原発腫瘍においてYB-1の発現が増加している患者においてのみ、手術及び化学療法の後で再発が起きる(Janz M. et al., Int. J. Cancer 97: 278-282, 2002)。

【0299】

さもなければ医学的臨床的な意味でもはや治療することができない、及び従来技術の方法を用いた腫瘍性疾患の治療が成功の期待を持ってはもはや可能ではない、特に、細胞増殖抑制剤及び照射の使用がもはや合理的に可能ではなく、腫瘍に影響を与える又は腫瘍を小さくするという意味でもはや上手く行うことができない患者を本発明に従って、本明細書で記載されるアデノウイルスを用いた治療の対象としてもよいということは本発明の特別の利点である。本明細書では、用語、腫瘍は、一般に、好ましくは細胞周期とは無関係に細胞核にYB-1を固有に含有する、又は外因性の手段を適用してそのようにする、及び/又は調節解除されたYB-1を含有するいかなる腫瘍又は癌性疾患をいう。 40

【0300】

さらに、本明細書に記述されたウイルスを、原則として腫瘍の治療に用いることができる。

【0301】

特に本明細書に記述されるウイルスによって治療することができる腫瘍は、神経系の腫 50

瘍、目の腫瘍、皮膚の腫瘍、軟組織の腫瘍、胃腸の腫瘍、呼吸器の腫瘍、骨格の腫瘍、内分泌系の腫瘍、女性生殖システムの腫瘍、乳腺の腫瘍、男性生殖システムの腫瘍、尿の排出系の腫瘍、造血系の腫瘍を含み、混合腫瘍及び胚の腫瘍を含む群より選択される腫瘍が好適である。これらの腫瘍が特にここに定義されたような特に耐性のある腫瘍であることは本発明の範囲内である。

【0302】

神経系の腫瘍の群は好ましくは次のものを含む：

1. 頭蓋並びに脳（頭蓋内）の腫瘍、好ましくは星状細胞腫、オリゴデンドログリオーマ、髄膜腫、神経芽細胞腫、神経細胞腫、上衣細胞腫、神経鞘膠腫、神経繊維腫、血管芽細胞腫、脂肪腫、クラニオファリンジオーマ、奇形腫、及び脊索腫；
2. 脊髄、及び脊柱管の腫瘍、好ましくは膠芽腫、髄膜腫、神経芽細胞腫、神経繊維腫、骨肉腫、軟骨肉腫、血管肉腫、繊維肉腫及び多発性骨髄腫；及び
3. 末梢神経の腫瘍、好ましくは神経鞘膠腫、神経繊維腫、神経繊維肉腫、及び神経周囲の線維芽細胞腫。

10

【0303】

目の腫瘍の群は好ましくは次のものを含む：

1. 眼瞼及び眼瞼腺の腫瘍、好ましくは腺腫、腺癌、乳頭腫、組織球腫、肥満細胞腫、基底細胞腫瘍、メラノーマ、扁平上皮癌、繊維腫及び繊維肉腫；
2. 結膜、及び瞬膜の腫瘍、好ましくは扁平上皮細胞癌、血管腫、血管肉腫、腺腫、腺癌、繊維肉腫、メラノーマ及び乳頭腫；及び
3. 眼窩、視神経、及び眼球の腫瘍、好ましくは網膜芽細胞腫、骨肉腫、肥満細胞腫、髄膜腫、細網細胞腫瘍、神経膠腫、神経鞘膠腫、軟骨腫、腺癌、扁平上皮癌、形質細胞腫瘍、リンパ腫、横紋筋肉腫、及びメラノーマ。

20

【0304】

皮膚の腫瘍の群は好ましくは：

- 組織球腫、脂肪腫、繊維肉腫、繊維腫、肥満細胞腫、悪性メラノーマ、乳頭腫、基底細胞腫瘍、角化棘細胞腫、血管周囲細胞腫、毛嚢腫瘍、汗腺腫瘍、皮脂腺の腫瘍、血管種、血管肉腫、脂肪腫、脂肪肉腫、悪性線維性組織球腫、プラズマ細胞腫及びリンパ管腫、などの腫瘍を含む。

【0305】

軟組織の腫瘍の群は好ましくは、

- 歯槽の軟部組織肉腫、類上皮細胞肉腫、軟組織の軟骨肉腫、軟組織の骨肉腫、軟組織のユーイング肉腫、未分化神経外胚葉性腫瘍（PNET）、繊維肉腫、繊維腫、平滑筋肉腫、平滑筋腫、脂肪肉腫、悪性線維性組織球腫、悪性血管周囲細胞腫、血管種、血管肉腫、悪性間葉腫、悪性末梢神経鞘腫瘍（MPNST）、悪性神経鞘膠腫、悪性メラノサイト性神経鞘膠腫、横紋筋肉腫、滑膜肉腫、リンパ管腫、及びリンパ管肉腫、などの腫瘍を含む。

30

【0306】

胃腸の腫瘍の群は好ましくは次のものを含む：

1. 口腔及び舌の腫瘍、好ましくは扁平上皮癌、繊維肉腫、マーケル細胞腫瘍、誘導性繊維エナメル芽細胞腫、繊維腫、繊維肉腫、ウイルス性乳頭腫症、特発性乳頭腫症、鼻咽頭ポリープ、平滑筋肉腫、筋芽細胞腫、及び肥満細胞腫；
2. 唾液腺の腫瘍、好ましくは腺癌；
3. 食道の腫瘍、好ましくは扁平上皮癌、平滑筋肉腫、繊維肉腫、骨肉腫、バレットの癌、及び食道周囲腫瘍；
4. 膵臓外分泌腺の腫瘍、好ましくは腺癌；及び
5. 胃の腫瘍、好ましくは腺癌、平滑筋腫、平滑筋肉腫及び繊維肉腫。

40

【0307】

呼吸器の腫瘍の群は好ましくは次のものを含む：

1. 鼻及び鼻腔、喉頭及び気管の腫瘍、好ましくは扁平上皮癌、繊維肉腫、繊維腫、

50

リンパ肉腫、リンパ腫、血管種、血管肉腫、メラノーマ、肥満細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、好酸性顆粒細胞腫（横紋筋腫）、腺癌及び筋芽細胞腫；及び

2. 肺の腫瘍、好ましくは扁平上皮癌、繊維肉腫、繊維腫、リンパ肉腫、リンパ腫、血管種、血管肉腫、メラノーマ、肥満細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、好酸性顆粒細胞腫（横紋筋腫）、腺癌、筋芽細胞腫、小細胞癌、非小細胞癌、気管支の腺癌、気管支肺胞腺癌、及び肺胞性腺癌。

【0308】

骨格の腫瘍の群は好ましくは：

骨肉腫、軟骨肉腫、傍骨性骨肉腫、血管肉腫、滑膜細胞肉腫、血管肉腫、繊維肉腫、悪性間葉腫、巨細胞腫、骨腫及び多小葉骨腫、を含む。

10

【0309】

内分泌系の腫瘍の群は好ましくは次のものを含む：

1. 甲状腺／副甲状腺の腫瘍、好ましくは腺腫及び腺癌；
2. 腎上体の腫瘍、好ましくは腺腫、腺癌及びクロム親和性細胞腫（髄質副腎腫）；
3. 視床下部／下垂体の腫瘍、好ましくは腺腫及び腺癌；
4. 膵臓内分泌腺の腫瘍、好ましくはインスリノーマ（細胞腫瘍、A P U D o m）及びゾリンジャー - エリソン症候群（膵臓デルタ細胞のガストリン分泌器官腫瘍）；ならびに、
5. 多発性内分泌腫瘍症（M E N）及び非クロム親和性傍神経節腫。

【0310】

20

女性の生殖システムの腫瘍の群は、好ましくは次のものを含む：

1. 卵巣の腫瘍、好ましくは腺腫、腺癌、嚢腺腫及び未分化癌；
2. 子宮の腫瘍、好ましくは平滑筋腫、平滑筋肉腫、腺腫、腺癌、繊維腫、繊維肉腫及び脂肪腫；
3. 頸部の腫瘍、好ましくは腺癌、腺腫、平滑筋肉腫及び平滑筋腫；
4. 膣及び陰門の腫瘍、好ましくは平滑筋腫、平滑筋肉腫、線維平滑筋腫、繊維腫、繊維肉腫、ポリープ、及び扁平上皮癌。

【0311】

乳腺の腫瘍の群は好ましくは、

線維腺腫、腺腫、腺癌、間充織腫瘍、癌、癌肉腫を含む。

30

【0312】

男性の生殖システムの腫瘍の群は好ましくは次のものを含む：

1. 睪丸の腫瘍、好ましくは精上皮腫、間細胞腫及びセルトリ細胞腫；
2. 前立腺の腫瘍、好ましくは腺癌、未分化癌、扁平上皮癌、平滑筋肉腫及び移行細胞癌；及び
3. 陰茎及び外部生殖器の腫瘍、好ましくは肥満細胞腫及び扁平上皮癌。

【0313】

尿の排出システムの腫瘍の群は好ましくは次のものを含む：

1. 腎臓の腫瘍、好ましくは腺癌、移行細胞癌（上皮性腫瘍）、繊維肉腫、軟骨肉腫（間充織の腫瘍）、ウィルムス腫瘍、腎芽腫及び胚性腎腫（胚の多分化能芽細胞腫）；
2. 尿管の腫瘍、好ましくは平滑筋腫、平滑筋肉腫、線維乳頭腫、移行細胞癌；
3. 膀胱の腫瘍、好ましくは移行細胞癌、扁平上皮癌、腺癌、ブドウ房形（胚の横紋筋肉腫）、繊維腫、繊維肉腫、平滑筋腫、平滑筋肉腫、乳頭腫、及び血管肉腫；及び
4. 尿道の腫瘍、好ましくは移行細胞癌、扁平上皮癌、及び平滑筋肉腫。

40

【0314】

造血システムの腫瘍の群は好ましくは次のものを含む：

1. リンパ腫、リンパ性白血病、非リンパ性白血病、骨髓増殖性白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫。

【0315】

混合腫瘍及び胚性腫瘍の群は好ましくは、血管肉腫、胸腺腫及び中皮腫を含む。

50

【0316】

特に好ましい実施態様ではこれらの腫瘍が、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、骨肉腫、膠芽腫、メラノーマ、小細胞肺癌、及び結腸直腸癌を含む群より選ばれる。さらなる腫瘍は、本明細書に記述された耐性の腫瘍、好ましくは複合耐性の腫瘍、さらに特に上述した群の腫瘍である。特に好ましい腫瘍は、さらに乳房腫瘍、骨腫瘍、胃腫瘍、腸腫瘍、胆嚢腫瘍、膵臓腫瘍、肝臓腫瘍、腎臓腫瘍、脳腫瘍、卵巣腫瘍、皮膚及び皮膚付属器の腫瘍、頭/首腫瘍、子宮腫瘍、滑膜腫瘍、喉頭腫瘍、食道の腫瘍、舌腫瘍、及び前立腺腫瘍を含む群より選ばれる腫瘍である。これらの腫瘍は、それらの症状発現に関して、本明細書にすべて開示されているものであることが好ましい。

【0317】

10

本発明のアデノウイルス、好ましくは、グループ I のアデノウイルス及び本発明に従って使用されるべきアデノウイルス、好ましくはグループ II のアデノウイルス。

【0318】

薬物としての、及び特に全身性投与に関連した、本明細書で開示されるアデノウイルス、特にグループ I のアデノウイルス及び/又はグループ II のアデノウイルスの使用は、アデノウイルスの好適なターゲティングによって改善することができる。アデノウイルスによる腫瘍細胞の感染は、とりわけ、ある程度まで、コクサッキーウイルス - アデノウイルスの受容体及び別個のインテグリンの存在に依存する。それらが細胞内、好ましくは腫瘍細胞内で強く発現するとまもなく、きわめて低い力価 (pfu/細胞) で感染がすでに可能である。組換えアデノウイルスのいわゆるリターゲティングに到達するために、たとえば、ファイバーノブ領域に異種配列を挿入したり、二特異的抗体を用いたり、アデノウイルスをポリマーで被覆したり、A d ファイバーにリガンドを導入したり、血清型 5 のノブ及び血清型 5 のファイバーシャフトとノブを血清型 3 のノブ及び A d 3 5 のファイバーシャフトとノブで置き換えたり、ペントン塩基を修飾したりすることによって今日まで、種々の戦略が試みられてきた (Nicklin S. et al., Molecular Therapy 4: 534-542, 2001; Magnusson M. K. et al., J. of Virology 75: 7280-7289, 2001; Barnett B. G., et al., Biochimica et Biophysica Acta 1575: 1-14, 2002)。本発明に基づいたアデノウイルス及び本発明に従って使用されるアデノウイルス、特にグループ I のアデノウイルス及びグループ II のアデノウイルスにおいて、そのようなさらなる実施態様及び特徴の本発明の種々の態様に関連した実現は、本発明の範囲内である。

20

30

【0319】

本発明は、さらなる態様において、改変されたアデノウイルス、すなわち、本発明に従って使用されるアデノウイルス、たとえば、A d 24、d 1922 - 847、E 1 A d / 01 / 07、C B 106 又は欧州特許 E P 0931830 に記載されるアデノウイルス及び/又はグループ I のアデノウイルス及び/又はグループ II のアデノウイルスを用いて治療されてもよい患者をスクリーニングする方法に関するものであり、その際、該方法は以下の工程を含む。

【0320】

- 腫瘍組織の試料を分析すること、及び
- Y B - 1 が細胞周期とは無関係に核に局在するかどうか又は細胞が調節解除された Y B - 1 を含有するかどうかを決定すること。

40

【0321】

Y B - 1 の代わりに、又は Y B - 1 に加えて、前述のマーカーの存在も評価される。

【0322】

腫瘍組織又はその一部が、好ましくは細胞周期とは無関係に核に Y B - 1 を含む又は調節解除された Y B - 1 を含む場合、本明細書で開示されたアデノウイルス、特にグループ I のアデノウイルス及び/又はグループ II のアデノウイルスを、本発明に従って使用してもよい。

【0323】

本発明に係る方法の実施態様において、腫瘍組織の分析が、Y B - 1 に対する抗体、Y

50

B - 1 に対するアプタマー、Y B - 1 に対するスピーゲルマー、Y B - 1 に対するアンチカリンを含む群から選択される作用剤によって行われることが企図される。原則として、各マーカ－には、同一種類の作用剤を作成し使用することができる。抗体、特に、モノクローナル抗体の製造は当業者に既知である。Y B - 1 の特異的な検出のためのさらなる作用剤又はマーカ－は、本件 Y B - 1 又は前記マーカ－における標的構造に高親和性で結合するペプチドである。従来技術では、そのようなペプチドを生成するために、たとえば、ファージディスプレイのような方法が知られている。そのような目的で、それはペプチドライブラリから出発するが、その際、個々のペプチドは約 8 ~ 20 のアミノ酸の長さを有し、ライブラリのサイズは、約 $10^2 \sim 10^{18}$ 、好ましくは $10^8 \sim 10^{15}$ の異なったペプチドである。標的分子を結合するポリペプチドの特定の形態はいわゆるアンチカリンであり、それは、たとえば、ドイツ特許出願 D E 1 9 7 4 2 7 0 6 号に記載されている。 10

【0324】

Y B - 1 又は本明細書で開示される相当するマーカ－に特異的に結合するための、従って、細胞周期とは無関係な Y B - 1 の核への局在化を検出するための、さらなる作用剤は、いわゆるアプタマー、すなわち、D - 核酸であり、それは、RNA 又は DNA を基にして一本鎖又は二本鎖として存在し、標的分子に特異的に結合する。アプタマーの生成は欧州特許 E P 0 5 3 3 8 3 8 号に記載されている。アプタマーの特定の実施態様はいわゆるアプタザイムであり、たとえば、Piganeau N. et al., Angew. Chem. Int. Ed., 39(29): 4369-4374, 2000 に記載されている。それらが、アプタマー部分と離れてリボザイム部分を含み、アプタマー部分に結合する標的分子の結合及び放出に際して、リボザイム部分が触媒的に活性化されて核酸基質を切断し、それがシグナル生成を伴うという範囲で、それらはアプタマーの特定の実施態様である。 20

【0325】

アプタマーのさらなる形態は、いわゆるスピーゲルマー、すなわち、L - 核酸から成る、標的分子を結合する核酸である。そのようなスピーゲルマーの生成方法は、たとえば、W O 9 8 / 0 8 8 5 6 に記載されている。

【0326】

腫瘍組織の試料は穿刺又は手術によって得ることができる。Y B - 1 が細胞周期とは無関係に核に局在するかどうかの評価は、顕微鏡技法及び/又は抗体若しくは通常、上述のさらなる作用剤のいずれかをを用いた免疫組織分析によって行われることが多い。核における Y B - 1 及び細胞周期とは無関係なその局在を検出する方法は当業者に既知である。たとえば、Y B - 1 に対して染色した組織切片を走査すれば Y B - 1 の局在化は容易に検出される。核に存在する Y B - 1 の頻度はすでに、核における局在化が細胞周期とは無関係であるという指標である。核における細胞周期とは無関係な Y B - 1 の検出のさらなる可能性は、Y B - 1 に対して染色し、Y B - 1 の核における局在を評価し、細胞周期を決定することである。しかしながら、このこと及び Y B - 1 の検出は、Y B - 1 に向けられた前述の作用剤を用いて行うことができる。作用剤の検出は当業者に既知の手順で行われる。前記作用剤は特異的に Y B - 1 に向けられているので、その程度において、分析されるべき試料内の他の構造、特に細胞の他の構造に結合することはなく、作用剤の好適な標識による前記作用剤の局在化及び Y B - 1 に対する特異的な結合による Y B - 1 の局在化の双方を、相応に検出でき、評価することができる。作用剤を標識する方法は当業者に既知である。試料の細胞が調節解除された Y B - 1 を含有しているかどうか、含有していれば、どれくらいの細胞がそれを含有しているのかを確定するために、同じ技法を使用してもよい。調節解除されていない Y B - 1 に比べて、調節解除された Y B - 1 も過剰発現を示すので、分析された細胞で Y B - 1 が調節解除されているかどうかを決定するために、参照試料と比べた Y B - 1 の相対発現を使用してもよい。 30 40

【0327】

本明細書に記述されているウイルスが、それらが本発明のウイルスであっても、又はそれらが本発明に従って用いられるウイルスであっても、疾病、好ましくは腫瘍疾病、より好ましくは腫瘍細胞の少なくとも一部が複合耐性を示す、特に Y B 1 が調節解除されてい 50

る多剤耐性を示す腫瘍疾病に関連しても用いられることは、本発明の範囲内である。これは、Y B 1 が好ましくは細胞周期と無関係に核の中に存在する細胞及び疾病を参照する範囲で、細胞及び腫瘍に関連して本明細書に記述されるいずれの他の態様にも当てはまる。

【実施例 1】

【0328】

発明により使用されるアデノウイルスが含む E 1 A 修飾のタイプ

図 1 は A d E 1 / E 3 マイナス、即ち E 1 / E 3 欠失アデノウイルスと野生型アデノウイルスおよびアデノウイルス d 1 5 2 0 の構造デザインを示している。

【0329】

アデノウイルス A d E 1 / E 3 マイナスは機能的 E 1 A または機能的 E 1 B もしくは E 3 をコードする領域を有しておらず、本実験では毒性に関するコントロールに用いられる。

【0330】

野生型 E 1 A 遺伝子は、E 1 A RNA の異なる位置でのスプライシングから生じる合計で 5 種類のタンパク質をコードしている。とりわけ 2 種類のタンパク質、即ち 289 アミノ酸タンパク質および 243 アミノ酸タンパク質が生成される。d 1 5 2 0 は E 1 A 遺伝子の C R 3 ストレッチ内に欠失を持つために 13S 遺伝子産物を欠いているため、289 アミノ酸タンパク質をコードしていない。発明に用いられるアデノウイルス d 1 5 2 0 は当業者からは 12S - E 1 A ウイルスと呼ばれる。先行技術周知のアデノウイルス d 1 3 4 7 (Wong および Ziff、J. Virol.、68、4910 ~ 4920、1994 年) はまた 12S - E 1 A で

10

20

【0331】

13S - E 1 A の mRNA によりコードされる 289 アミノ酸タンパク質の中には、各種アデノウイルスサブタイプに保存されている 3 つの領域がある。これらは C R 1、C R 2 および C R 3 と呼ばれる。C R 1 および C R 2 は両 E 1 A タンパク質 (E 1 A 12S および E 1 A 13S)、即ち 289 アミノ酸および 243 アミノ酸タンパク質に存在するが、C R 3 領域は上記タンパク質のうちの大きい方だけに存在する。

【0332】

C R 3 領域はウイルス遺伝子、特に E 1 B、E 2、E 3 および E 4 の活性化に必要である。小型、即ち 243 アミノ酸タンパク質のみを含むウイルスは、極弱くしかウイルス遺伝子をトランス活性化できず、核内に Y B - 1 を持たない細胞でのアデノウイルス複製を促進しない。Y B - 1 は腫瘍細胞でのみ核内に存在すること、そしてその中のみ見出すことができることから、このベクターは腫瘍特異的複製の誘導に好適である。

30

【0333】

d 1 5 2 0 は C R 3 を欠失していることから、このアデノウイルスは本明細書で輸送とも呼ばれる細胞質 Y B - 1 の細胞核内への移動を行うことができず、それ故に Y B - 1 核陰性である細胞では複製できないことから、このウイルスは本発明で使用可能なウイルスであり、そしてこのウイルスは本発明に必要なトランス活性化に使用できる。

【実施例 2】

【0334】

細胞の R b 状態に依存したアデノウイルスの作用様態

図 2 は p 3 0 0、p 1 0 7 および p 1 0 5 の結合に関係する E 1 A タンパク質の結合ドメインを示している。P 3 0 0 および P 1 0 7 は、細胞質結合タンパク質である。腫瘍抑制タンパク質である網膜芽細胞腫タンパク質 (p R b) の結合は、C R 1 および C R 2 を通じて媒介される。研究から p R b および p 1 0 7 / p 3 0 0 は細胞転写因子 E 2 F と組み合わせり効率的に転写制御することが示されている。野生型 E 1 A タンパク質は E 2 F の R b への結合を妨害する。即ち放出された E 2 F は E 2 初期プロモーターに結合して、アデノウイルスの複製を誘導する。

【0335】

E 1 A 発癌タンパク質内の特定の欠失が R b - 陰性細胞で優先的に複製することが可能

40

50

であり、そして本発明に用いることができる以下に述べるような組換え体アデノウイルスベクターを生成することが従来知られていた。例えばアデノウイルスベクター d 1 9 2 2 - 9 4 7 は、C R 2 領域 (アミノ酸位置 1 2 2 ~ 1 2 9) 内に欠失を持ち、ベクター C B 0 1 6 は C R 1 (アミノ酸位置 2 7 ~ 8 0) および C R 2 領域 (アミノ酸位置 1 2 2 ~ 1 2 9) に欠失がある。ベクター E 1 A d 1 0 1 / 0 7 は C R 2 領域 (アミノ酸位置 1 1 1 ~ 1 2 3) 内に欠失を持つ。更に、N - 末端 (アミノ酸位置 4 ~ 2 5) に追加の欠失があることから、タンパク質 p 3 0 0 への結合は認められない。アデノウイルスベクター A d 2 4 は C R 2 領域 (アミノ酸位置 1 2 0 ~ 1 2 7) に欠失を持っている。欧州特許第 E P 0 9 3 1 8 3 0 号に記載のアデノウイルスベクターは C R 1 領域および C R 2 領域に欠失を含んでいる。

10

【0336】

E 2 F / R B の結合メカニズムおよび E 1 A を媒介する E 2 F の放出は、本発明の基礎を成すメカニズムとは基本的に異なるものである。先行技術での予想とは異なり、ウイルス複製にとって必須ではないが、重要であるのは R b タンパク質からの E 2 F の放出ではなく、ヒト転写因子である Y B - 1 が核内に局在することである。この転写因子は、正常細胞に於いては、細胞周期の大部分について細胞質内にのみ存在している。アデノウイルスが感染すると、特定の条件の下に Y B - 1 は核内に導かれるか、例えば乳ガン、卵巣癌、前立腺癌、骨肉腫、神経芽腫、メラノーマ、小細胞肺癌および結腸直腸癌を含むが、もとよりこれらに限定されないある種の腫瘍疾患といったある種の細胞システムでは核内に既に存在している。

20

【実施例 3】

【0337】

U 2 O S 細胞の感染

1 0 0 , 0 0 0 個の U 2 O S 細胞をウェルに播いた。翌日細胞に図 3 に示すような各種アデノウイルスを感染させた。感染は無血清 D M E M 培地 5 0 0 μ l 中で、3 7 °C で 1 時間行った。続いて感染培地を取り除き、完全培地 (1 0 % F C S / D M E M) 2 ml と交換した。3 日後にクリスタルバイオレット染色で分析を行った。

【0338】

図 3 から分かるように核内に Y B - 1 を持たない U 2 O S 細胞は、本発明に使用できる 2 種類のアデノウイルス、即ち E 1 / E 3 マイナスと呼ばれる E 1 / E 3 欠失ウイルスおよびアデノウイルス d 1 5 2 0 で感染させた後にクリスタルバイオレット染色を行ったところ、溶解を示していなかった。この場合、まず培地を取り除いた。続いて細胞にクリスタルバイオレット液 (5 0 % E T O H、3 % ホルムアルデヒド、5 % 酢酸、1 % クリスタルバイオレット) を重層して室温で 5 ~ 1 0 分間インキュベーションした。続いて 6 ウェル型プレートを手でよく濯いでから室温で乾かした。これから、本発明で使用するウイルスを誘導し、感染細胞を溶解させるには、Y B - 1 の存在が必要であるという、本発明の基礎を成す発見が確認された。

30

【実施例 4】

【0339】

2 5 7 R D B 細胞の感染

1 0 0 , 0 0 0 個の 2 5 7 R D B 細胞をウェルに播いた。翌日細胞に図 4 に示すような各種アデノウイルスを感染させた。感染は無血清 D M E M 培地 5 0 0 μ l 中で、3 7 °C で 1 時間行った。続いて感染培地を取り除き、完全培地 (1 0 % F C S / D M E M) 2 ml と交換した。3 日後にクリスタルバイオレット染色で分析を行った。

40

【0340】

この実験の結果を図 4 に示す。E 1 / E 3 を欠失した E 1 / E 3 マイナスと呼ばれるアデノウイルスは、核内に Y B - 1 を持つ 2 5 7 R D B 細胞への感染については、低 M O I (p f u / 細胞) では溶解を示さなかった。これに対し実施例 3 で示した、Y B - 1 核陰性細胞では複製せず、同時に本発明に従い発癌遺伝子タンパク質をトランス活性化する E 1 A をコードしている d 1 5 2 0 は、4 0 p f u / 細胞という M O I (感染多重度) で実質完

50

全な溶解をおこし、10 pfu/細胞のMOIでも顕著な溶解を起こした。このことから、d1520およびここに記したd11119/1131またはAdXvirといった同様のウイルスが必要とするMOIは、E1欠失またはE1/E3欠失アデノウイルスに比べ約1桁(10倍)低く、臨床使用が可能であると結論される。

【0341】

図7に示すように、d1520のタンパク質E1AはそのCR3領域を欠失することを特徴とし、その結果本発明による使用に求められるトランス活性化およびYB-1核陽性細胞での複製を起こす。

【実施例5】

【0342】

d11119/1131による257RDBおよびU2OS細胞の感染

図5に示すように、E1Aタンパク質のアミノ酸4~138およびそれをコードする核酸を欠失しており、さらにアミノ酸218の後に停止コドンを含むために発現する断頭型(truncate)E1Aタンパク質が完全なE1Aタンパク質のCR3領域を含んでいるアデノウイルスd11119/1131をYB-1核陰性U2OS細胞に感染した場合、20 pfu/細胞のMOIでは溶解は起きなかった。陰性コントロールには非感染細胞層を用いた。

【0343】

これに対し核内にYB-1を含む、即ちYB-1核陽性である、257RDBの様な細胞系では、アデノウイルスd11119/1131の影響を受けて、20 pfu/細胞のMOIで細胞層は実質的に完全に溶解した。この限りにおいて本実施例は、図7に示す様に例えばCR3領域のみを含み、そしてCR1領域およびCR2領域を欠いている修飾型E1A発癌遺伝子タンパク質が、発明によるアデノウイルスの複製に必要なYB-1核陽性細胞でのトランス活性化を提供していることを示す別の証拠である。即ちアデノウイルスd11119/1131は、本発明に使用可能である別のアデノウイルスである。CR3領域に関してd11119/1131と同様にデザインされているが、それと異なりCR1領域および/またはCR2領域も含んでいるウイルスを使用できることも、本発明の範囲内である。

【実施例6】

【0344】

多剤耐性細胞での核内YB-1の検出

本実施例は核内YB-1が転写因子としてmdr1プロモーター(多剤耐性プロモーター)内にあるY-ボックス(CAAT配列)に結合しなければならないという考察に基づいている。これを検出するために、いわゆるEMSA分析(電気泳動移動度シフトアッセイ)を行った。これに関連して、核タンパク質を単離し、続いてタンパク質1~10 µgを短いDNA鎖(オリゴ)と共の37 °Cでインキュベーションした。核内YB-1を決定するために以下のオリゴヌクレオチドを使用した; U2O3と反対のmdr1プロモーター(位置-86~-67): TGAGGCTGATTGGCTGGGCA(Xボックスには下線を付した)。

【0345】

その前にこのDNA断片の5'末端を³²Pで放射線標識した。続いて未変性ポリアクリルアミドゲルを用いて分離した。タンパク質YB-1がオリゴヌクレオチド内の配列に結合すると、その結合は、結合したオリゴヌクレオチドに比べて非結合のオリゴヌクレオチドはゲル中をより早く移動することから検出できる(Holm, P.S.ら、JBC 277、10427~10434、2002年; Bargou, R.C.ら、Nature Medicine 3、447~450、1997年)。

【0346】

図6に示すように、EMSA分析よりYB-1が多剤耐性細胞257RDB、181RDBおよびMCF-7Ad細胞の核内に存在すること、そして細胞株U2OSおよびHeLa細胞には存在しないことが分かる。

【0347】

10

20

30

40

50

実施例 4 および 5 に示した結果は、アデノウイルス d1520 および d11119/1131 が 257 RDB の様な YB-1 核陽性細胞では複製してその溶解を誘導するが、U205 では複製、溶解を誘導しないことを確認した。このことは、本発明のアデノウイルスの使用に関する所見が確認された。さらに結果は、野生型のアデノウイルスと比べて、修飾型または欠失型 E1A 遺伝子産物を介した YB-1 核陽性細胞でのウイルス遺伝子の弱いトランス活性化が、例えば多剤耐性細胞を含む核内に YB-1 が存在する細胞での良好な複製および良好な細胞溶解をもたらすこと、そしてここに記したアデノウイルスがかかる腫瘍の溶解に利用できることを確認している。

【実施例 7】

【0348】

10

E1- マイナスアデノウイルスの複製効率上昇

本実施例は初期ウイルス遺伝子 E1B-55K および E4orf6 をプラスミド pE4orf6 によるトランスフェクションおよび E1/E3 欠失アデノウイルス Ad-55K による感染で置換えられることを示す。Ad-55K は E1B-55K を E1 にクローニングし、CMV の制御下に置いた E1/E3 欠失ウイルスである。この置換は、AdYB-1、即ち YB-1 を発現するアデノウイルスがこれら初期遺伝子を発現していないという事実、および本発明者が核内に YB-1 を含む複製系でのこれら初期遺伝子を置換することで複製効率および粒子形成能率をそれぞれ野生型アデノウイルスである Ad5 型のそれと同程度まで上げることができることを認識していたという事実より必要であった。

【0349】

20

以下を実施した：

リポフェクタミンを用いた各 10^5 個の U2OS 細胞へのプラスミド pE4orf6 のトランスフェクション。プラスミド pE4orf6 は CMV 制御下にある初期ウイルス遺伝子 E4orf6 をコードする DNA 配列を保持している。プラスミド pE4orf6 をトランスフェクションした 24 時間後に、細胞に YB-1 発現 E1/E3 欠失アデノウイルス AdYB-1 (50 pfu/細胞) および E1/E3 欠失 E1B-55K アデノウイルス Ad-55K (50 pfu/細胞) を感染させた。Ad-55K は CMV 制御下にあるウイルス遺伝子 E1B-55K を トランス遺伝子 として保持する E1/E3 欠失ウイルスである。

【0350】

30

続いて感染 5 日後 (= トランスフェクション後) に細胞を培地 (2 ml) から取り出した。凍結と融解 (凍結/融解) を交互に 3 回行って、単離細胞からのウイルス粒子を放出させた。次にブランクアッセイを 293 細胞を使って実施し、生成した感染粒子を決定した (ブランク形成単位 / ml (pfu/ml))。結果は図 8 および 9 に示す。図 8 は絶対量で表した場合のブランクアッセイの結果である。AdYB-1 単独感染例と最も大きな差は、プラスミド pE4orf6 を感染させた例および 2 種類のウイルス AdYB-1 および Ad-55K を同時感染させた例との間で観察された。図 9 は図 8 の結果を、AdYB-1 の複製効率の倍率として複製効率の増加の形で表したものである。細胞にプラスミド pE4orf6 を感染させた後 AdYB-1 および E1B-55K (Ad-55K) を感染させると、最大 25 倍高い pfu/ml を示した。

40

【0351】

これらの結果より、E1B-55K および E4orf6 による置換は E1/E3-欠失アデノウイルス AdYB-1 感染後に形成されるウイルス数 (pfu/ml) を最大 25 倍増加すると結論できる。ブランク形成単位 (pfu) 生成に及ぼす E1B-55K および E4orf6 の追加効果は、これら 2 遺伝子産物単独の効果に比べて有意に高かった。

【0352】

EGFP を発現するプラスミドを使ったコントロール実験は、選択した実験方法では、プラスミド pE4orf6 でトランスフェクションされたのは僅かに細胞の 10% だけであることを明瞭に示した。E1B-55K および E4orf6 の両方を発現する細胞で形成された粒子の数は、ヒトアデノウイルス 5 型 (野生型) のそれに匹敵した。このことが

50

ら、E 4 o r f 6 および E 1 B - 5 5 K の発現は、Y B - 1 の核内局在と組み合わせると、アデノウイルス、特に E 1 A - 欠失アデノウイルスの複製および粒子形成を、野生型 A d 5 のそれに匹敵する程度まで誘導できるという、本発明の基礎を成す発見が確認された。

【実施例 8】

【0353】

細胞増殖抑制薬投与による Y B - 1 核陰性細胞では複製しないアデノウイルスの Y B - 1 核陽性細胞での複製増加

各種細胞増殖抑制薬の添加がヒト転写因子 Y B - 1 の核内局在化を誘導することは、先行技術において知られていた。本発明者が見出したように、核内に局在した Y B - 1 は、アデノウイルスの E 2 - 後期プロモーターの活性化によりアデノウイルスの複製をコントロールする。両効果の組み合わせを利用すれば特異的な腫瘍溶解を得ることができる。

10

【0354】

癌溶解アッセイを実施するに当たっては、以下の手順に従った：200、000個の細胞（それぞれ H e L a および U 2 O S ）を6ウェル型プレートの核ウェル内に接種した。翌日ダウノルビシン 40 ng/ml（最終濃度）を加えた。3時間インキュベーションした後、それぞれの細胞を d 1 5 2 0 で、10～30 pfu/細胞の割合で感染させた。続いて細胞を、細胞増殖抑制薬を含まない培地でインキュベーションした。3～5日後、細胞をクリスタルバイオレットで染色した。

【0355】

図10および11から分かるように、ダウノルビシンの添加は Y B - 1 の核内局在化を通じて d 1 5 2 0 の複製を誘導した。即ち d 1 5 2 0 は、細胞増殖抑制薬と組み合わせた状態で、ダウノルビシン単独例に比べてより大きな癌溶解作用を発揮した。

20

【実施例 9】

【0356】

d 1 5 2 0 によるインビボの癌溶解

本インビボ試験で使用した H e L a（Y B - 1 核陰性）および 2 5 7 R D B（Y B - 1 核陽性）細胞は、無菌細胞培養条件にて拡大した。細胞をマウス（系統 C D 1 N u N u）に注射して皮下腫瘍を形成させる前に、細胞をトリプシン処理して集め、D M E M 培地（10% F C S）に加え、細胞数を測定してから P B S で1回洗浄した。続いて細胞を遠心分離して P B S を除き、細胞を希望数する細胞数になるよう新鮮 P B S 中に分配した。本研究で皮下注射した細胞の数は両細胞系統とも 5×10^6 細胞であった。注射は動物の一方の側腹部に行い、より区別し易いように H e L a 細胞は右側に、そして 2 5 7 R D B 細胞は左側に注射した。腫瘍の増殖を週2回調べ、ノギスを使って腫瘍の長さおよび幅を測定した。その結果を用い、次式より腫瘍の容積を計算した：

30

$$\frac{3}{4} * a / 2 * (b / 2)^2 \quad a = \text{長さ}, b = \text{幅}$$

【0357】

腫瘍の大きさが 200～520 mm³ に達した時点で、ウイルスおよび陰性コントロールである P B S をそれぞれ腫瘍内に投与した。注射量は同一で、1回 50 μl であった。この作業を3連続日繰り返した。投与したウイルスの総量は 5×10^8 pfu であった。次に腫瘍の増殖を毎週2回の割合で記録し続け、その容積を計算した。試験最終日にマウスを屠殺して、腫瘍を取り出し詳しく分析した。

40

【0358】

結果は図12および13に示した。

【0359】

図12は、腫瘍容積の経時変化を処理の種類別に示したグラフである。腫瘍が R D B 2 5 7 により形成された例では、P B S 注射時に腫瘍は約 438 mm³ から 1466 mm³ へと有意に増大した。本発明に従い用いられるベクター d 1 5 2 0 を作用させると、腫瘍の成長は有意に低下した。平均腫瘍サイズ 344 mm³ から総容積 543 mm³ へと、腫瘍サイズは僅かに 21% 増加しただけであった。

50

【0360】

本実施例では、RDB257を基本とする腫瘍にPBSを投与したのと同様にPBSを投与したHeLa細胞より成る腫瘍をコントロールとして用いた。HeLa細胞を基本とする、d1520で処理された腫瘍は、まだ有意な腫瘍成長の増加を示し、 311 mm^3 から 1954 mm^3 に増加した。

【0361】

図13はRDB257を用いて増殖した腫瘍を持つ、屠殺したヌードマウスの像である。本発明のアデノウイルスd1520を作用させた後に、腫瘍の顕著な縮小が起こったことが明瞭に分かる。本例では、腫瘍容積の減少も見られた（ウイルスd1520投与1日後： 515 mm^3 ；ウイルスd1520投与30日後： 350 mm^3 ）。

10

【実施例10】

【0362】

腫瘍DNAのサザンプロット

実施例9で発育させた腫瘍の中央部から取り出した腫瘍試料からDNAを抽出した。単離のためにQiagenのDneasy Tissue Kitを用いた。製造元の指示書に従ってDNA抽出を行った。それに従って、アルカリ溶解を介して細胞からDNAを取り出した。続いて、単離したDNAをカラムで精製した。続いて、 260 nm の光度測定により単離したDNAの濃度を決定した。制限酵素KpnI、10単位で消化したDNA試料 $2\text{ }\mu\text{g}$ を用いて解析を行った。続いて、 0.8% アガロースゲルで試料を電気泳動的に分離した。続いて、DNAをナイロン膜にプロットした（Schleicher & Schuellの系に従って）。膜にプロットさせたDNAを特異的な 1501 bp のDNAプローブとハイブリッド形成させた。 1501 bp のプローブは、E2AをコードするAd5の配列の中で 3369 bp のKpnI断片に特異的に結合する。プローブはそれに先立ってPCRで調製し（プライマー： $5' - \text{GTCGGAGATCAGATCCGCGT}$ （配列番号2）、 $5' - \text{GATCCCTCGTCTGTCCTTCGCTT}$ （配列番号3））、 ^{32}P を用いて放射性標識を行った。続いて、膜を洗浄し、フィルムに暴露した。

20

【0363】

腫瘍DNAのサザンプロットの結果は図14に示した。分析より、レーン3、4および5が示すように、d1520だけが耐性細胞RDB257でインビトロ複製することが確認された。レーン1は陽性コントロールのAd-5dを、レーン6、7、および8はd1520を感染したHeLa細胞由来のDNAを示す。HeLa細胞はYB-1核陽性ではないため、ウイルスd1520は複製せず、そのためE2A配列は検出できなかった。

30

【0364】

d1520に関するさらなる結果を図15に示した。ブランクアッセイを利用して、d1520および野生型のアデノウイルスを感染させた後の粒子形成（pfu/ml）を調べた。各種YB-1核陽性（257RDBおよび181RDB）腫瘍細胞、ならびにYB-1核陰性腫瘍細胞にd1520および野生型アデノウイルスを感染させた。

【0365】

次の手順で実施した：

100 、 $000 \sim 200$ 、 000 個の各細胞を6個のウェルを持つプレート（6ウェルプレート）、FCSを 10% 含むL15培地（耐性細胞）およびDMEM（非耐性細胞）に接種した。24時間後にd1520および野生型アデノウイルスを感染させた（ 10 pfu/細胞 ）。感染3日後（インフェクション後）、凍結と融解を3回繰り返して細胞浮遊液よりウイルス粒子を放出させた。次に293細胞を使ってブランクアッセイを行い、形成した感染粒子（ブランク形成単位/ml（pfu/ml））を決定した。結果を図15に示す。ブランクアッセイの結果は、d1520がYB-1核陽性細胞（257RDBおよび181RDB）では野生型アデノウイルスの場合と同様に複製することを示した。この限りにおいて、本発明に従ってここに記載のアデノウイルスを使用する場合には、野生型アデノウイルスと同様の複製効率が観察できた。

40

【実施例11】

50

【0366】

アデノウイルスベクター X v i r 0 3 の構造設計

図16はアデノウイルスベクター X v i r 0 3 の構造設計を示す。アデノウイルス X v i r 0 3 は、いわゆる E 1 / E 3 欠失アデノウイルスである。このことは、アデノウイルス複製に機能する E 1 A、E 1 B (E 1 B 5 5 k 及び E 1 B 1 9 k タンパク質) 及び E 3 タンパク質が生成されないことを意味する。E 1 領域の欠失は 3 4 2 ~ 3 5 2 8 の範囲に亘り ; E 3 領域の欠失は塩基位置 2 7 8 6 5 ~ 3 0 9 9 5 の欠失である。本明細書で用いられる用語「E 1 欠失ウイルス」とは、E 1 がもはや機能的に作用しないウイルスを意味する。これは、不活性である以外は核酸配列及びアミノ酸配列をそれぞれが殆どインタクトなままで不活性化することにより達成することもできるが、しかし、E 1 領域がコードする様々なサイズを有するタンパク質の欠失を意味することもできる。E 1 A 及び E 1 B タンパク質及びそれらをコードする核酸を欠くことにより、E 4 o r f 6 のような E 4 領域は弱く発現されるのみであるか (野生型アデノウイルスの約 1 ~ 5 %)、又は全く発現されない。ウイルス遺伝子 E 1 B 5 5 k 及び E 4 o r f 6 は X v i r 0 3 内に導入された異種の C M V プロモーター (Clontech : Plasmid pShuttle) により E 1 領域内で発現される。C M V プロモーターに代わって、E 1 A の発現に関連して本明細書中に開示されたいずれのプロモーターでも用いることができる。両遺伝子のオープンリーディングフレームは、いわゆる I R E S 配列 (内部リボソーム進入部位) により互いに連結している (Pelletier, J. and Sonenberg, N. Nature, 1988, 334, 320 ~ 325)。このエレメント (Novagen : pCITE) は 1 種類の m R N A から 2 種類のタンパク質を発現させる

【0367】

ベクターを以下のように作製した : Clontech 社のシステム A d e n o - X

プラスミド E 1 B 5 5 k - p S h u t t l e を、M. Dobelstein (マールブルグ大学) から得た p C G N E 1 B から、X b a I 及び B f r I によって E 1 B 5 5 k のオープンリーディングフレームを Clontech 製の p S h u t t l e ベクター内にクローニングすることによって作製した。あるいは、p C G N E 1 B ベクターから得た B a m H I 断片を、末端を平滑化した後、対応して調製した Clontech の p S h u t t l e ベクター中にクローニングした。続いて p S h u t t l e 中の E 1 B 5 5 k を A p a I を用いて直線化し、末端を、平滑末端化し、N h e I を用いて切断した。

【0368】

第二のベクターである p c D N A 3 . 1 (+) (Invitrogen) 中に、前後して、Novagen 社製の p C I T E - 4 a (+) を鋳型に用い P C R 産物である I R E S エレメントを T A クローニング法により E c o R V 切断部位にクローニングし、そしてプラスミド p C M V - E 4 o r f 6 (M. Dobelstein、マールブルグ大学) より得た E 4 o r f 6 を、B a m H I によりクローニングした = I R E S - E 4 o r f 6 - p c D N A 3 . 1 (+)。p c D N A 3 . 1 (+) 中の I R E S - E 4 o r f 6 を N o t I を用いて直線化し、末端を平滑末端化した後に断片 I R E S - E 4 o r f 6 を N h e I で切り出した。断片 I R E S - E 4 o r f 6 をオープンベクター E 1 B 5 5 k - p S h u t t l e (平滑端、N h e I) と連結した。カセットを次に、E 1 B 5 5 k - I R E S - E 4 o r f 6 - p S h u t t l e から、C M V プロモーター及びウシ成長ホルモン (B G H) - ポリ A と共に、E 1、E 3 A d e n o - X - プラスミド (Clontech) 内に I - C e u I 及び P I - S c e I を用いてクローニングし、A d c m v E 1 B / I R E S / E 4 o r f 6 と名付けた。次にアデノウイルスをメーカー (Clontech) 指示書に従い作製した。P a c I により直線化した、発現エレメント C M V - E 1 B 5 5 k - I R E S - E 4 o r f 6 - B G H ポリ A を有する、アデノプラスミドを H E K 2 9 3 細胞内にトランスフェクションし、トランスフェクション 1 1 日後に融解させる細胞を培地と共に取り出して凍結融解サイクルを繰り返し、生成されたアデノウイルスを放出させた。

【0369】

QBIOTGENE 及び Microbix のシステム A d E a s y などの他のシステムを、本発明によるアデノウイルス、好ましくは組換えアデノウイルス、特にカセット E 4 o r f 6 - I R E

S - E 1 B 5 5 k 及び Y B - 1 - I R E S - E 1 A 1 2 S を個々に及び / 又は共に含むものの製造に用いることができるということは、本発明の範囲内であり、また本明細書に提供される技術的な教示に関して当業者にとって実行可能である。さらに、個々の導入遺伝子をカセット間で交換してもよい。本発明により、カセットが E 1 B 5 5 k - I R E S - E 4 o r f 6 及び E 1 A 1 2 S - I R E S - Y B 1 の設計を有するようなアデノウイルスを製造し用いることができるのも、また本発明の範囲内である。

【 0 3 7 0 】

本発明に関連して、カセット E 4 o r f 6 - I R E S - E 1 B 5 5 k を含む、いわゆる E I / E 3 欠失組換えアデノウイルスを用いた。しかし、ウイルスが E 1 の欠失のみを含み、それは E 3 領域がインタクトなままに留まっていることを意味することは、実施態様の範囲内である。E 4 領域が部分的に及び / 又は完全に欠失してもよい。

【 0 3 7 1 】

様々なシステムを用いるベクターの作製では、以下のようにそれを進行させた。

【 0 3 7 2 】

インタクトな E 3 領域を有するアデノウイルス A d - X v i r 3 ' U T R の、G r a h a m (Microbix 社) のベクターシステムによる生成。

【 0 3 7 3 】

ベクター C M V - E 4 O R F 6 - I R E S - E 1 B 5 5 k 3 ' U T R - p o l y A の p D e l t a E 1 s p 1 A 中へのクローニング

プラスミド E 1 B 5 5 k 3 ' U T R - p S h u t t l e (Clontech) のために、3 ' U T R を有するオープンリーディングフレームを、アデノウイルス 5 型の D N A からの増幅により調製して (E 1 B 5 5 k の順方向プライマー = 5 ' - A T G G A G C G A A G A A A C C C - 3 ' 、及び、E 1 B 5 5 k 3 ' U T R の逆方向プライマー = 5 ' - C A C G T C C T G G A A A A A A T A C A C - 3 ') 、末端を平滑化した N h e l 制限部位 (それは T 末端 (T A クローニング) を有しており、C l o n t e c h 社の p S h u t t l e プラスミドへクローニングされている) に導入した。したがって、導入遺伝子は、5 ' 末端に h C M V - プロモーター及び 3 ' 末端にウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルを所持していた。

【 0 3 7 4 】

ベクター E 4 O R F 6 - I R E S - p c D N A 3 . 1 (+) のクローニング

アデノウイルス 5 型 D N A を鋳型として用いる (E 4 o r f 6 の順方向プライマー : 5 ' - C T T C A G G A T C C A T G A C T A C G T C C G G C G - 3 ' 、及び、E 4 o r f 6 の逆方向プライマー : 5 ' - G A A G T G A A T T C C T A C A T G G G G G T A G A G T C A T A A T C G T - 3 ') 、及び B a m H I により切断されたプラスミド p C M V E 4 - 3 4 k D (Dobbelstein et al., EMB0, 16, 4276- 4284, 1997) からの、増幅物 E 4 o r f 6 、及び鋳型として N o v a g e n 社の p C I T E - 4 a (+) を有する I R E S エlement (I R E S の順方向プライマー = 5 ' - T C C G G T T A T T T T C C A C C A T A T T G C - 3 ' 及び I R E S の逆方向プライマー = 5 ' - T T A T C A T C G T G T T T T T C A A A G G - 3 ') 、を続いて p c D N A 3 . 1 (+) ベクターのマルチクローニング部位へクローニングした。そのような目的のために、E 4 o r f 6 導入遺伝子に対して、オープンリーディングフレームの 5 ' 末端に B a m H I 切断部位を、及び 3 ' 末端に E c o R I 切断部位を生成するプライマーを用いた。増幅物をそれぞれの制限酵素で消化し、またその末端を、B a m H I と E c o R I を用いて開かれたベクター中への指向されたクローニングに適合するようにした。次に、p c D N A 3 . 1 (+) 中のプラスミド E 4 o r f 6 を E c o R V により直線状にして、T 末端を加え、増幅物を I R E S エlement 中へクローニングした。I R E S エlement の正確な方向をチェックした後に、ベクターをさらなるクローニングに用いた。

【 0 3 7 5 】

両方の導入遺伝子の I R E S エlement との連結は、N o t I により直線状にし、末端を平滑化し、続いて X b a I により切断した、以前に生成されたプラスミド C M V - E 1

B55k 3' UTR - polyA - pShuttle (Clontech) 中への、E4orf6 - IRES カセットのクローニングの結果であった。p cDNA3.1 (+) 中の E4orf6 - IRES を NotI により直線状にし、末端を平滑末端にして、さらに NheI により消化した。E4orf6 - IRES インサートを CMV - E1B55k 3' UTR - polyA - pShuttle (Clontech) とライゲーションさせることによって、pShuttle (Clontech) 中で Xvir - 3' UTR を生成した。

【0376】

使用するアデノウイルスのシャトルベクターの生成

現在 Microbix 社のアデノウイルス生成システムに用いられているシャトルベクター pE1sp1A は、CMV プロモーターも、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルも 10
 含まないので、これらのエレメントを pE1sp1A へクローニングした。その目的のために、ClaI で pE1sp1A を直線化し、末端を平滑化し、また EcoRI によって切断した。エレメント CMV - MCS (マルチクローニング部位) - polyA を MfeI で pShuttle (Clontech) から直線化し、末端を平滑末端化し、さらに EcoRI により切断した。続いて、カセット (Clontech から得た Xvir3' UTR pShuttle) を、さらに PmeI で切断されていて続いて脱リン酸化された CMV - MCS ポリA pE1sp1A ベクター中へ、PmeI によりクローニングした。クローニング生成物 Xvir - 3' UTR - pE1sp1A をウイルス生成に用いた。

【0377】

ウイルスの生成

Xvir - 3' UTR - pE1sp1A 及び pBHGE3 (Microbix から得た、野生型アデノウイルス 5 型に対応する E3 領域を含む) を HEK293 細胞へ共トランスフェクションした。それにより両方のベクターの相同配列の組換えによりウイルス Ad - Xvir - 3' UTR E3 が生成された。

【0378】

AdEASYS システム (Qbiogene 社) を用いるアデノウイルス Ad - Xvir3' UTR - AdEASYS E3 の生成

【0379】

使用するアデノウイルスのシャトルベクターの生成

ここで用いるシステムのためには、ベクター pShuttle - AdEASYS は、CMV プロモーターもウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルも含まないので、これらのエレメントを pShuttle - AdEASYS へクローニングした。その目的のために、プラスミドを EcoRI によって消化し、T4 ポリメラーゼ及び dNTPs で末端を満たすことによって平滑化し、骨格を脱リン酸化し、また生成された両方の消化生成物を再びライゲーションした。そうすることによって、EcoRI の制限認識部位を除去した。このようにして得られたプラスミドを pShuttle (-EcoRI) - AdEASYS と呼んだ。

【0380】

次に、Clontech の pShuttle から得たカセット CMV - MCS - polyA を MfeI 及び EcoRI により切断し、末端を平滑末端化し、そしてベクター pShuttle (-EcoRI) - AdEASYS 中へクローニングした。これはそのような目的のために、XbaI で直線化し、平滑末端化し、また脱リン酸化しておいたものである。このようにして、プラスミド CMV - MCS - polyA - pShuttle - AdEASYS が生成された。カセット E4orf6 - IRES - E1B55k - 3' UTR をこのプラスミドへ、MluI 及び EcoRI を用いて、クローニングした。そうすることによって、pShuttle AdEASYS 中のプラスミド Xvir3' UTR が生成された。これを Bst1107I 及び MroI で直線化し、エレクトロポレーションによってレスキュープラスミド pAdEASYS と共に BJ5183 (EC) バクテリアへ導入した。相同組換えによって、アデノウイルスのプラスミド Ad - Xvir - 3' UTR - pAdEASYS 40
 50

S Yが生成され、H E K 2 9 3細胞へトランスフェクションされた後にウイルス産生をもたらした。

【0381】

野生型E3領域のpA d E A S Yへの導入

プラスミドpA d E A S Yでは実質的にE3領域が欠失しているので、E3領域をプラスミドpA d E A S YからS p e I及びP a c IによってプラスミドC M V - M C S - p o l y A p S h u t t l e (A d E A S Y) 中へ再構成のためにクローニングして、プラスミドE3E4 - p S h u t t l e - A d E A S Yが生成された。

【0382】

N d e Iによる制限切断、及び再ライゲーションにより2つのN d e I制限部位のうち1つの制限部位を欠失させ、したがって、プラスミドからマルチクローニングサイトを除いた。この手続きにより、プラスミドE3E4 - p S h u t t l e (- N d e I) - A d E A S Yが生成された。

【0383】

続いて、4007bpの野生型E3領域断片を野生型アデノウイルス5型からS p e I及びN d e Iにより切り出し、S p e IとN d e Iによって開かれたE3E4 - p S h u t t l e (- N d e I) - A d E A S Yへクローニングした。このようにして生成されたベクターをw t E3E4 - p S h u t t l e (N d e I) - A d E A S Yと呼んだ。

【0384】

次に、E3E4 - p S h u t t l e (- N d e I) - A d E A S Yから野生型E3E4領域をS p e I及びP a c Iによって切断して、pA d E A S Yへクローニングし、またS p e IとP a c Iで切断した。それによってプラスミドpA d E A S Y中で、E3領域が再確立された(pA d E A S Y - E3)。B J 5 1 8 3 (E C) バクテリアをプラスミドX v i r - 3 ' U T Rによって形質転換する際の相同組換えにより、p S h u t t l e A d E A S Y及びpA d E A S Y - E3中に、X V i r - 3 ' U T R - p A d E A S Y - E3が生成された。

【0385】

言及したシステムすべてのためのE4の操作

治療用遺伝子及び導入遺伝子のためのスペースを提供するために、及び望ましくない相同組換えを回避するために、プラスミドE3E4 - p S h u t t l e (- N d e I) - A d E A S Y中のE4領域を特別に欠失させることができる。その目的のためにE4 o r f 6領域を、約0.6 kb、好ましくは634bp、P s t Iによる切断及び再ライゲーションによって短縮する。これは図17に記述されているように、X v i r 0 3 / 0 1に関連して遂行することができる。それぞれの欠失は、組換えアデノウイルスを生成するための種々のシステムにおいて、当業者によって実現可能である。

【0386】

特にA d - X v i r 3 ' U T R - A d E A S Y E3中へのR G Dモチーフのクローニング(他のシステムにも適用可能)

感染力を増加させるために、ファイバーノブドメインのH IループをDmitriev et al. 1998 (An Adenovirus Vector with Genetically Modified Fibers Demonstrates Expanded Tropism via Utilization of a Coxsackievirus and Adenovirus Receptor-Independent Cell Entry Mechanism)に従って修飾する：それぞれの領域をプライマーR G D - H p a順方向(5' - G A G g t t a a c C T A A G C A C T G C C A A G - 3')、R G D - E c o R V逆方向(5' - C A T A G A G T A T G C A G A T A T C G T T A G T G T T A C A G G T T T A G T T T T G - 3')、及びR G D - E c o R V順方向(5' - G T A A C A C T A A C G A T A T C T G C A T A C T C T A T G T C A T T T T T C A T G G - 3')及びR G D - B f r逆方向(5' - C A G C G A C A T G A A c t t a a g T G A G C T G C - 3')を用いて増幅し、これにより、E c o R V制限部位が生成された。この制限部位に、A r g - G l y - A s p (R G D) - ペプチドをコードする対のオリゴヌクレオチド：R G D - o l i g o 1 (5' - C A C A C T A A A C G G T A C

10

20

30

40

50

A C A G G A A A C A G G A G A C A C A A C T T G T G A C T G C C G C G G A G A
C T G T T T C T G C C C - 3') 及び R G D - o l i g o 2 (5' - G G G C A G A
A A C A G T C T C C G C G G C A G T C A C A A G T T G T G T C T C C T G T T T
C C T G T G T A C C G T T T A G T G T G - 3') をクローニングした。これにより、
R G D モチーフがファイバーノブドメインの H I ループ中に存在する。

【 0 3 8 7 】

上記ベクターは、原則として本発明による使用に関して、本明細書に記載したその他ウ
イルスと同様に好適である。具体的には、上記ベクターは、YB - 1 核陽性細胞及び YB - 1
が脱制御状態にある細胞、即ち YB - 1 が正常細胞及び非腫瘍細胞それぞれに比べて過剰発
現している細胞での複製及びその限りにおいて溶解始動について好適である。このベクタ
ーの使用は、特に本発明に従って用いられるものとして本明細書に記載されている他のア
デノウイルスならびに本明細書に開示されている本発明の他のアデノウイルスに関連し開
示されている疾患、患者群、又は患者集団に適応する。

10

【 実施例 1 2 】

【 0 3 8 8 】

アデノウイルスベクター X v i r 0 3 / 0 1 の構造設計

図 17 からわかるように、X v i r 0 3 / 0 1 は X v i r 0 3 を更に発展させたもので
ある。例えば本明細書に記した遺伝子の様な治療目的の遺伝子や導入遺伝子を E 3 領域内
にクローニングできる。さらに、E 4 領域内に欠失を導入して X v i r 0 3 の発現力セッ
トに由来する E 4 o r f 6 との間で相同組換えが起こるのを回避した。これによってよ
り大型の導入遺伝子をこのコンストラクト中にクローニングすることが可能になった。欠
失された E 3 領域にはカセット導入に適した S a c I、N d e I 及び N h e I 切断部位が
あり、ここに例えば治療用導入遺伝子をクローニングすることができる。しかし、E 3 領
域はまたインタクトなままでよい。また、治療用遺伝子は E 4 領域中への連続体でありう
る。これにより、特に、アデノウイルス細胞死タンパク質 A D P の発現が保証される。

20

【 0 3 8 9 】

E 3 領域内への治療用遺伝子クローニング及び E 4 領域内への欠失生成のためのプラスミ
ドの調製：Clontech のシステム A d e n o - X

Clontech 社製 p A d e n o X - P l a s m i d には 3' I T R 領域の後に野生型アデノ
ウイルスには無い S f u I 向けの制限部位がある。E 3 ~ E 4 領域を S p e I (位置 2364
4) 及び S f u I により、p A d e n o X (Clontech) から取り出し、p c D N A 3 . 1
(+) (Invitrogen) 内に移入した = p C D N A 3 . 1 - E 3 2 7 8 6 5 - 3 0 9 9 5
- E 4 。 E 4 O R F 6 の大きな部分、即ち 3 3 2 4 1 ~ 3 3 8 7 5、を P s t I を用いて
取り除いた = p c D N A 3 . 1 - E 3 2 7 8 6 5 - 3 0 9 9 5、E 4 3 3 2 4 1 -
3 3 8 7 5。X v i r 0 3 を更に進展させるために、p c D N A 3 . 1 - E 3 2 7 8 6
5 - 3 0 9 9 5、E 4 3 3 2 4 1 - 3 3 8 7 5 由来の欠失 E 3 / E 4 領域を S f u I 及
び S p e I を用いてプラスミド p A d e n o X 内にクローニングした = p A d n o X E
3 2 7 8 6 5 - 3 0 9 9 5、E 4 3 3 2 4 1 - 3 3 8 7 5。

30

【 0 3 9 0 】

発現力セットを次に、X v i r 0 3 について記載したように、I - C e u I 及び P I -
S c e I により、E 1 B 5 5 k - I R E S - E 4 O r f 6 - p S h u t t l e から、C M
V プロモーター及びウシ成長ホルモン (B G H) - ポリ A と共に p A d e n o X E 3 2
7 8 6 5 - 3 0 9 9 5、E 4 3 3 2 4 1 - 3 3 8 7 5 内にクローニングし、A d c m v
E 1 B / I R E S / E 4 o r f 6 - E 4 と命名した。次にアデノウイルスをメーカー (Clontech) の指示書に従い作製した。

40

【 0 3 9 1 】

QBI GENE 社及び Microbix 社のシステムなどの他のシステムを、本発明に従うアデノウ
イルス、特に組換えアデノウイルスの製造に用いることができるということは、本発明の
範囲内であり、また本明細書の開示に照らして当業者にとって実施可能である。

【 0 3 9 2 】

50

上記ベクターは、原則として本明細書に記載され本発明に従って使用される他ウイルスと同様に有用である。特に上記ベクターはY B - 1核陽性細胞ならびにY B - 1が脱制御状態にある、即ちY B - 1が正常細胞及び非腫瘍細胞に比べ過剰発現している細胞での複製、及びその限りにおいて溶解の誘導に好適である。このベクターは、本発明に従って用いられる他アデノウイルス、及び本発明に従うアデノウイルスに対して本明細書に開示されている疾患、患者群、及び患者集団にも使用できる。

【実施例 13】

【0393】

257 R D B 及び 181 R D B 細胞中の X v i r 03 の腫瘍溶解性作用

100,000個の細胞(257 R D B 及び 181 R D B)を6個のウェルを持つプレート(6ウェルプレート)の各ウェルに接種した。翌日細胞に、図18に示すようにA d 3 1 2 (20 pfu/細胞)及びX v i r 03 (5 pfu/細胞)を感染させた。感染は500 µl 無血清D M E M 培地中で37 °C 1時間実施した。次に感染培地を取り除き、2 mlの完全培地(10% F C S / D M E M)と交換した。分析をクリスタルバイオレット染色により5日後に行った。結果を図18 A 及び 18 B に示す。

【0394】

図18 A 及び 18 B から明らかな様に、核内にY B - 1を持つ多剤耐性細胞では、A d 3 1 2 及びX v i r 03 を感染させた後、細胞のクリスタルバイオレット染色より示されるようにX v i r 03 感染例のみ溶解を示した。この場合まず培地を取り除いた。続いて細胞をクリスタルバイオレット液(50% E T O H、3%ホルムアルデヒド、5%酢酸、1%クリスタルバイオレット)で覆い、室温で5~10分間インキュベーションした。次に6ウェルプレートを水でよく濯いでから室温で乾燥した。

【0395】

本発明者は、E 1 A 欠失ウイルス(例えばA d 3 1 2)は、本発明の意味においてトランス活性化アデノウイルスではないが、より高いM O I では極めて効率的に複製できる(Nevins J. R., Cell 26, 213-220, 1981)、しかしこれは臨床応用では実現できないことを承知している。この現象は文献では「E 1 A 様活性」と呼ばれている。本明細書で用いるアデノウイルスA d 3 1 2 はE 1 A 欠失ウイルスである。使用した力価(20 pfu/細胞)はまだ臨床応用には高すぎるが、この力価ではE 1 B 5 5 k 及びE 4 o r f 6 などの初期アデノウイルス遺伝子は発現しないか、又は極少量しか発現しない(Nevins J. R., Cell 26, 213-220, 1981)。本明細書に既に記した様に、これらの遺伝子及びタンパク質はウイルス複製において重要な役割をはたしている。これと対照的に、これらの遺伝子及びタンパク質はそれぞれアデノウイルスX v i r 03 により発現される(図16)。図18 A 及び 18 B から分かるように、遺伝子E 1 B 5 5 k 及びE 4 o r f 6 の発現は、効率的にウイルス複製及び細胞溶解を起こし、同時に必要な感染力価(pfu/細胞で表される)が低下することになる。このことから、本発明の基礎となる発見、即ちE 4 o r f 6 及びE 1 B - 5 5 K の発現(かつE 1 A が存在しない)は、Y B - 1 の核内局在と組み合わせることにより、極めて効率的なアデノウイルスの複製を誘導できることが確認される。これに必要な力価は僅かに1~5 pfu/細胞に過ぎず、今や臨床的応用が可能である。

【0396】

このことから、本発明の基礎となる発見、即ち核内にY B - 1が存在すること、特に細胞周期と無関係に存在することが、本発明に従い用いられるウイルスに感染細胞を溶解させるためには必要であることが確認される。

【実施例 14】

【0397】

アデノウイルスA d 3 1 2 のE 2 遺伝子発現のノーザンブロット解析

各場合において、100万個のA 5 4 9 細胞及びU 2 0 S 細胞を10 cmのペトリ皿に入れた。翌日、A d 3 1 2 (50 pfu/細胞)及びA d w t (対照として働く、5 pfu/細胞)を細胞に感染させた。使用した高いウイルス力価のA d 3 1 2 は結果として、腫瘍細胞

10

20

30

40

50

胞で E 1 非依存性の複製を生じた。感染は、1 ~ 2 mL の無血清 D M E M 培地にて 3 7 で 1 時間行った。続いて、感染培地を取り除き、1 0 mL の完全培地 (1 0 % F C S / D M E M) に取り替えた。3 日後、R N A を単離した。続いて、2 6 0 nm での光度測定により単離した R N A の濃度を測定した。次いで、0 . 8 % ホルムアルデヒドアガロースゲルにて R N A 試料を電気泳動的に分離した。続いて、R N A をナイロン膜にプロットした (Schleich & Schuell の系に従って)。膜にプロットした R N A を「早期プローブ」E 2 及び「後期プローブ」E 2 に対してプロットした。1 5 0 1 b p の「後期プローブ」は E 2 後期プロモーターの後に特異的に結合する。それに先立って、プローブを P C R で調製し、
【表 1】

PCR (primer: 5'- GTC GGA GAT

10

CAG ATC CGC GT (SEQ. ID. NO. 4), 5'- GAT CCT CGT CGT CTT CGC TT (SEQ. ID. NO. 5))

³² P を用いて放射性標識を行った。対照的に、早期プローブは E 2 早期プロモーターと E 2 後期プロモーターの間 (2 2 6 7 9 1 ~ 2 2 7 0 0 2 位) に結合し、P C R
【表 2】

PCR (primer: 5'- AGCTGATCTTCGCTTTTG (SEQ. ID. NO. 6), 5'-

20

GGATAGCAAGACTCTGAC AAAG (SEQ. ID. NO. 7)).

によって生成した。続いて膜を洗浄し、フィルムに暴露した。

【0398】

結果を図 1 9 に示す。野性型アデノウイルスによる対照の感染では、早期プローブも後期プローブも特異的なシグナルを提供したが、A d 3 1 2 で感染させた腫瘍細胞では、後期プローブが使用された場合のみ特異的なシグナルを提供した。このことは、E 4 o r f 6 及び E 1 B 5 5 K の発現並びに E 1 A の非存在によって過剰発現した及び調節解除された Y B - 1 が核に輸送されるので、効率的なアデノウイルスの複製の必要条件としての E 2 遺伝子の発現が誘導されるという本発明の知見を裏付けている。

30

【実施例 1 5】

【0399】

アデノウイルス A d デルタ 2 4 の E 2 遺伝子発現のノーザンプロット解析

それぞれ 1 0 0 万個の U 2 0 S 細胞を 1 0 c m のペトリ皿に入れた。翌日、アデノウイルスデルタ 2 4 (A d デルタ 2 4) (1 0 p f u / 細胞) 及び野生型アデノウイルス (A d w t) (対照として働く、1 0 p f u / 細胞) を細胞に感染させた。使用した組換えアデノウイルス A d デルタ 2 4 (Fueyo J. et al., Oncogene 19: 2-12, 2000) は E 1 A タンパク質の C R 2 領域に特異的な欠失を有するので、R b 陰性の腫瘍でのみ複製可能である。さらに、ウイルスは、野生型アデノウイルスに匹敵する遺伝子 E 1 B 5 5 K 及び E 4 o r f 6 を発現している。感染は、1 ~ 2 mL の無血清培地にて 3 7 で 1 時間行った。続いて、感染培地を取り除き、1 0 mL の完全培地 (1 0 % F C S / D M E M) に取り替えた。1 2 時間後及び 2 4 時間後、R N A を単離した。続いて、2 6 0 nm での光度測定により単離した R N A の濃度を測定した。次いで、0 . 8 % ホルムアルデヒドアガロースゲルにて R N A 試料を電気泳動的に分離した。続いて、R N A をナイロン膜にプロットした (Schleich & Schuell の系に従って)。膜にプロットした R N A を「早期プローブ」及び「後期プローブ」に対してハイブリッド形成させた。1 5 0 1 b p を含む「後期プローブ」は E 2 後期プロモーターの後に特異的に結合する。それに先立って、プローブを P C R で調製し、

40

【表 3】

PCR (primer: 5'- GTC GGA GAT CAG ATC CGC GT
(SEQ. ID. NO. 4), 5'- GAT CCT CGT CGT CTT CGC TT (SEQ. ID. NO. 5))

³²P を用いて放射性標識を行った。対照的に、早期プローブは E 2 早期プロモーターと E 2 後期プロモーターの間に結合し、PCR

【表 4】

PCR (primer: 5'-
AGCTGATCTTCGCTTTTG (SEQ. ID. NO. 6), 5'- GGATAGCAAGACTCTGACAAAG
(SEQ. ID. NO. 7)).

10

によって生成した。続いて膜を洗浄し、フィルムに暴露した。

【0400】

結果を図 20 に示す。12 時間後、後期プローブのみが特異的シグナルを提供した。24 時間後のみ、Ad デルタ 24 で感染させた細胞で早期プローブはシグナルを提供した。しかしながら、野生型アデノウイルスに比べて、シグナルは有意に弱かった。この結果もまた、E 4 or f 6 及び E 1 B 5 5 K の発現が、過剰発現した及び調節解除された Y B - 1 を核に輸送し、続いてそれが E 2 後期プロモーターに結合し、E 2 遺伝子の発現を誘導するという本発明の知見を裏付けている。

20

【実施例 16】

【0401】

アデノウイルスベクター X v i r P S J L 1 及び X v i r P S J L 2 の構造設計

ベクターの説明：本明細書でグループ I のアデノウイルスと呼ばれるウイルスの実施態様であり、アデノウイルスのベクター、X v i r P S J L 1 及び X v i r P S J L 2 で例示される X v i r P S J L 群のベクターは、アデノウイルス d l 5 2 0 と同様に、Y B - 1 核陽性の細胞、特に腫瘍細胞で複製可能であるばかりでなく、Y B - 1 が過剰発現された及び調節解除された腫瘍細胞でも複製可能である。ウイルス遺伝子 E 1 B 5 5 K 及び E 4 or f 6 は、それぞれ E 1 B プロモーター及び E 4 プロモーターの影響下 d l 5 2 0 を感染させた Y B - 1 核陽性細胞で発現されるが、X v i r P S J L における E 1 B 5 5 K 及び E 4 or f 6 の発現はサイトメガロウイルス (c m v) プロモーターによって生じる。しかしながら、c m v プロモーターの代わりに、他のプロモーター、特に腫瘍特異的、組織特異的、及び器官特異的なプロモーター、並びに天然の E 1 A プロモーター、即ち好ましくは野生型アデノウイルス、好ましくは A d s 中に存在する E 1 A プロモーターも使用してもよい。E 1 B 5 5 K 及び E 4 or f 6 の発現のために、過剰発現された Y B - 1 及び調節解除された Y B - 1 が核に輸送され、アデノウイルスの複製が開始される。本明細書で開示される X v i r P S J L 群のアデノウイルスベクターは、種々の要素を組み合わせ、アデノウイルスベクター d l 5 2 0、X v i r 0 3 及び A d Y B - 1 の機能を単一のベクターで組み合わせる。ベクター d l 5 2 0 と同様に、X v i r P S J L ウイルスは E 1 A 1 2 S 遺伝子を含む。この遺伝子及び相当する遺伝子産物は、感染細胞の S 期誘導に関与し、ウイルスの複製並びに化学療法及び照射の効果を促進する。X v i r 0 3 と同様に、X v i r P S J L ウイルスは、発現カセット C M V - E 1 B 5 5 K / I R E S / E 4 or f 6 を含有し、それは、効率的な複製及び調節解除された Y B - 1 の、好ましくは腫瘍細胞に含有される核への直接的又は間接的な輸送に必要とされる。従って、複製は、Y B - 1 が過剰発現されている、又は調節解除されている細胞、特に腫瘍細胞においてのみ可能である。さらに、E 1 B 5 5 K / E 4 or f 6 複合体により p 5 3 を分解の対象とする。ヒトの転写因子 Y B - 1 をコードする配列をウイルス A d Y B - 1 から選ぶ。内因性の、すなわち、細胞にすでに存在する Y B - 1 はウイルス複製を増幅する。E 1 A

30

40

50

1 2 S 及び Y B - 1 双方の発現は、Y B - 1 に依存したアデノウイルス E 2 後期プロモーターによって制御される。それに関連して、特異的プロモーター、特に腫瘍特異的プロモーター、組織特異的プロモーター又は器官特異的プロモーターを使用してもよい。これらウイルスのさらなる特徴は E 4 領域を欠失しているということである。ベクターはそこに制限部位を含有し、それによって、アデノウイルスベクター X v i r P S J L 1 及び X v i r P S J L 2 の場合、明細書で開示されるように、たとえば、リボザイム、アンチセンス分子、s i R N A、アポトーシス誘導遺伝子、サイトカイン及びプロドラッグの遺伝子のような種々の導入遺伝子を発現してもよい。明細書で開示されるように、その発現は、腫瘍特異的プロモーター、組織特異的プロモーター又は器官特異的プロモーターに制御されてもよい。発現カセットの局在化は、特に E 1、E 3 及び E 4 に関して又はその範囲内で固定されず、しかしいかなる方法でも配置することができる。これに関連して、必要でないものを欠失させることも、インタクトのままにしておくこともできる。ベクターは、腫瘍細胞の p 5 3 又は R b の状況に無関係に複製する。

10

【0402】

組換えアデノウイルス X v i r P S J L 1 及び X v i r P S J L 2 の構造設計は、図 2 1 及び 2 2 に示す。Clontech社のシステム A d e n o - X によるベクター X v i r P S J L の生成。

【0403】

カセット E 2 後期 - Y B - 1 I R E S / 1 2 S の生成

本明細書で出発物質として使用されたClontech/BD Biosciencesの p A d e n o X プラスミドは、アデノウイルス A d 5 のゲノム核酸を含み、野生型アデノウイルスには存在しない 3' I T R 領域の後に S f u I 制限部位を有する。S p e I (2 3 6 4 4 位) 及び p A d e n o X (Clontech) の S f u I によって、E 3 - E 4 領域を p c D N A 3 . 1 (+) (Invitrogen) に転移させ、p c D N A 3 . 1 - E 3 2 7 8 6 5 - 3 0 9 9 5 - E 4 と呼んだ。E 4 o r f 6 の大半、すなわち、塩基 3 3 2 4 1 ~ 3 3 8 7 5 を P s t I により除いた。そのように得た断片を p c D N A 3 . 1 - E 3 2 7 8 6 5 - 3 0 9 9 5、E 4 3 3 2 4 1 - 3 3 8 7 5 と呼んだ。

20

【0404】

E 2 後期プロモーターを p G L 3 - E G F P (Holm et al., JBC 277: 10427-10434, 2002) から S c a I 及び N h e I により切り出し、p c D N A 3 . 1 - E 3 2 7 8 6 5 - 3 0 9 9 5、E 4 3 3 2 4 1 - 3 3 8 7 5 にクローニングした。そのように行う中で、塩基 2 7 5 9 3 ~ 3 1 5 0 9 の領域で E 3 領域をさらに欠失させた。そのように得られた断片を E 2 後期 p c D N A 3 . 1 - E 3 2 7 5 9 3 ~ 3 1 5 0 9、E 4 3 3 2 4 1 - 3 3 8 7 5 と呼んだ。

30

【0405】

E 1 A - 2 4 3 A A 産物に対する c D N A を R T - P C R によって生成し、単離し、配列をチェックして、B a m H I 及び E c o R I を用いて p c D N A 3 . 1 (+) ベクター (Invitrogen) にクローニングした。E 1 A - 1 2 S - p c D N A 3 . 1 を N h e I 及び B a m H I により線状化し、T 4 ポリメラーゼにより平滑末端を作成し、T a q ポリメラーゼ及び d T T P により T オーバーハングを設けた。P C R 産物として (鋳型 : p C I T E、Novagen) I R E S 要素を E 1 A - 1 2 S - p c D N A 3 . 1 ベクターにクローニングした (T A クローニング戦略)。

40

【0406】

ベクター p H V a d 2 c (Holm et al., JBC 277: 10427-10434, 2002) から Y B - 1 - E c o R I 断片を単離し、平滑末端を作成した。ベクター p S h u t t l e (B D バイオサイエンスから市販されている) を X b a I で線状化し、平滑末端を作成し、脱リン酸化して、あらかじめ作製した Y B - 1 をコードする核酸に連結した。従って、得られたベクターを Y B - 1 - p S h u t t l e と呼んだ。p S h u t t l e ベクターへのクローニングはインフレームに停止コドンを持つ T B - 1 断片をコードする核酸を提供した。Y B - 1 - p S h u t t l e から、N h e I 及び B f r I によって Y B - 1 をコードする核酸

50

を p c D N A 3 . 1 (+) 中のベクター I R E S - E 1 A - 1 2 S にクローニングした。こうして得られた断片を Y B - 1 (停止コドンを持つ E c o R I - E c o R I) - I R E S - E 1 A - 1 2 S - p c D N A 3 . 1 (+) と呼んだ。

【 0 4 0 7 】

続いて、カセット Y B - 1 - I R E S - E 1 A - 1 2 S を P m e I により切り出し、N h e I で線状化し、平滑末端を作成し、脱リン酸化したベクター E 2 後期 - p c D N A 3 . 1 - E 3 2 7 5 9 3 ~ 3 1 5 0 9、E 4 3 3 2 4 1 - 3 3 8 7 5 にクローニングした。従って、第 2 のカセットは、E 3 領域の欠失領域にある。

【 0 4 0 8 】

核酸コンストラクト E 2 後期 - Y B - 1 - I R E S - E 1 A 1 2 S を含む導入遺伝子カセットを残りのアデノウイルス配列 E 3 2 7 5 9 3 ~ 3 1 5 0 9、E 4 3 3 2 4 1 ~ 3 3 8 7 5 と共に S f u I 及び S p e I によって、Clontech のベクター p A d e n o X にクローニングした (= A d e n o X / E 2 後期 - Y B - 1 - I R E S - E 1 A 1 2 S / E 3 2 7 5 9 3 - 3 1 5 0 9、E 4 3 3 2 4 1 - 3 3 8 7 5) 。

【 0 4 0 9 】

X v i r 0 3 に関連して上述した p S h u t t l e から I - C e u I 及び P I - S c e I によってカセット C M V - E 1 B 5 5 K / I R E S / E 4 o r f 6 を切り出し、ベクター、A d e n o X / E 2 後期 - Y B - 1 - I R E S - E 1 A 1 2 S / E 3 2 7 5 9 3 - 3 1 5 0 9、E 4 3 3 2 4 1 - 3 3 8 7 5 に挿入した。

【 0 4 1 0 】

続いて、P a c I によりベクターを線状化し、2 9 3 細胞に形質移入し、製造元の指示書に従って、図に示す導入遺伝子なしで組換えアデノウイルス X v i r P S J L 1 及び X v i r P S J L 2 をそれぞれ単離した。

【 0 4 1 1 】

QBI O G E N E 及び Microbix 社のシステムなどの他のシステムを、本発明によるアデノウイルス、好ましくは組換えアデノウイルス、特にカセット E 4 o r f 6 - I R E S - E 1 B 5 5 k 及び E 1 A 1 2 S - I R E S - Y B - 1 をそれぞれ、個々に及び / 又は共に含むものの生成のために用いることができるということは本発明の範囲内であり、また本明細書の開示に照らして、当業者にとって実施可能である。さらに、個々の導入遺伝子を個々のカセット内で、及び特にそれぞれのカセットの間で交換することができる。さらに、カセ

【 0 4 1 2 】

欠失した E 3 領域における、E 1 A 1 2 S を有するアデノウイルス A d P S J L - E 2 後期プロモーター 1 2 S - A d E A S Y の、A d E A S Y システム (Microbix 社) による生成。

【 0 4 1 3 】

P S J L 1 2 S のクローニング

先ず、E 2 後期プロモーターを、p G L 3 - エンハンサー・プラスミド (p G L 3 - E 2 後期) の H i n d I I I 及び B g 1 I I 切断部位へ、対のオリゴヌクレオチド (上流プライマー 5 ' - T C G A G C T C C G C A T T T G G C G G G C G G G A T T G G T C T T C G T A G A A C C T A A T C T C G T G G G C G T G G T A G T C C T C A G G T A C A A A T - 3 ' 及び下流プライマー 5 ' - A G C T T A T T T G T A C C T G A G G A C T A C C A C G C C C A C G A G A T T A G G T T C T A C G A A G A C C A A T C C C G C C C G C C A A A T G C G G A G C - 3 ') として、クローニングした。

【 0 4 1 4 】

次に、ルシフェラーゼ遺伝子を N c o I と X h a I を用いて削除し、末端を平滑化末端とし、T 末端を加えた。プライマー E 1 A 1 2 S 順方向プライマー 5 ' - A T G G C C G C C A G T C T T T T G - 3 ' 及び E 1 A 1 2 S 逆方向プライマー 5 ' - T T A T G G C C T G G G G C G T T T A C - 3 ' により増幅された導入遺伝子 E 1 A 1 2 S が、このよ

10

20

30

40

50

うにして開かれた部位へT A クローニングにより導入された。

【0415】

このカセットをP v u IとC l a Iを用いて切り出し、末端を平滑化末端とし、E 3 E 4 - p S h u t t l e (- N d e I) - A d E A S YのE 3領域中の平滑末端化され脱リン酸化されたN h e I切断部位へクローニングした。このようにして、カセットはE 2後期プロモーター、オープンリーディングフレームE l a 1 2 S及びS V - 4 0後期ポリ阿德ニル化シグナルを包含する。得られたコンストラクトは、E 2 - 後期 - E l a 1 2 S - E 3 E 4 - p S h u t t l e (- N d e I) - A d E A S Yである。

【0416】

続いて、E 2後期 - E l a 1 2 S - E 3 E 4を、E 2 - 後期 - E l a 1 2 S - E 3 E 4 - p S h u t t l e (- N d e I) - A d E A S Yから、S p e I及びP a c Iを用いて切り出し、S p e I及びP a c Iによって切断されたp A d E A S Yへクローニングした。このようにして得られたコンストラクトをE 2 - 後期 - E l a 1 2 S - E 3 E 4 - p A d E A S Yと呼んだ。

【0417】

B J 5 1 8 3 (E C) バクテリアをp S h u t t l e A d E A S Y及びE 2 - 後期 - E l a 1 2 S - E 3 E 4 - p A d E A S Y中のプラスミドX v i r - 3 ' U T Rにより形質転換する際に起きる相同組換えによりA d P S J L - 1 2 S - A d E A S Yが生成された。

【0418】

欠失したE 3領域における、E 1 A 1 2 S及びY B - 1を有するアデノウイルスA d P S J L - E 2 - 後期プロモーター1 2 S - Y B - 1 - A d E A S Yの、A d E A S Yシステム (Microbix社) を用いる生成

【0419】

ベクターE 4 O R F f 6 - I R E S - p c D N A 3 . 1 (+) のクローニング

増幅物E 1 a 1 2 S (上記参照) 及びI R E Sエレメント (上記参照) を、続いて、p c D N A 3 . 1 (+) ベクターのマルチクローニング部位へクローニングした。その目的のために、E 1 a 1 2 S増幅物を、末端を平滑化したB a m H I切断部位へT A クローニングにより導入した。次に、p c D N A 3 . 1 (+) 中のプラスミドE 1 a 1 2 SをE c o R Vで直線化し、T末端を加え、増幅物をI R E Sエレメントへクローニングした。このようにして得られたプラスミドを、続いてX h o Iにより直線化し、末端を平滑末端化し、そして停止コドンが欠けているY B - 1のE c o R I - E c o R I切断生成物。

【0420】

このようにして作成されたコンストラクトE 1 A - 1 2 S - I R E S - p c D N A 3 . 1 (+) をN o t Iを用いて直線化し、末端を平滑末端化した。Y B - 1のE c o R I切断生成物もまた、末端を平滑化して、脱リン酸化されたベクターE l A 1 2 S - I R E S - p c D N A 3 . 1 (+) へ導入した。カセットE 1 A - 1 2 S - I R E S - Y B - 1をP m e Iを用いて取り出し、N c o I及びX b a Iによってルシフェラーゼ遺伝子を除去し、平滑末端化し、脱リン酸化した後に、上述のプラスミドp G L 3 - E 2後期へクローニングした。

【0421】

カセットE 2 - 後期 - E 1 A - 1 2 S - I R E S - Y B - 1を、P v u I及びC l a Iを用いて切り出し、末端を平滑末端化し、E 3 E 4 - p S h u t t l e (- N d e I) - A d E A S YのE 3領域の平滑末端化され脱リン酸化されたN h e I切断部位へ、クローニングした。このようにして得られたコンストラクトが、E 2 - 後期プロモーターE 1 A 1 2 S - I R E S - Y B - 1 - E 3 E 4 - p S h u t t l e (- N d e I) - A d E A S Yである。

【0422】

次に、E 2後期プロモーター - E 1 A - 1 2 S - I R E S - Y B - 1 - E 3 E 4カセットを、E 2後期プロモーター - E 1 A - 1 2 S - I R E S - Y B - 1 - E 3 E 4 - p S h

10

20

30

40

50

u t t l e (- N d e I) - A d E A S Y から S p e I 及び P a c I により切除し、S p e I 及び P a c I によって切断された p A d E A S Y をクローニングした。生じたコンストラクトを E 1 a - 1 2 S - I R E S - Y B - 1 - E 3 E 4 - p A d E A S Y と呼んだ。
【0423】

A d P S J L - 1 2 S - Y b - 1 - A d E A S Y が、B J 5 1 8 3 (E C) バクテリアを p S h u t t l e A d E A S Y 及び E 1 a - 1 2 S - I R E S - Y B - 1 - E 3 E 4 - p A d E A S Y 中のプラスミド X v i r 3 ' U T R により形質転換する際に起こる相同組換えにより生成された。

【0424】

カセット E 2 - 後期プロモーター - E 1 A - 1 2 S 及び / 又は E 2 - 後期プロモーター - E 1 A - 1 2 S - I R E S - Y B - 1 の E 4 領域へのクローニング

10

P s t I を用いた E 4 領域の操作と欠失のそれぞれにより、634bp を除去した。カセット E 2 - 後期プロモーター - E 1 A - 1 2 S 及び / 又は E 2 - 後期プロモーター - E 1 A - 1 2 S - I R E S - Y B - 1 を E 4 領域へ導入することができる。あるいは、E 2 領域はそのような条件の下でインタクトのままに留まることもできる。

【0425】

R G D モチーフのクローニング

感染力の改善のために、ファイバーノブドメインの H I ループを Dmitriev et al. 1998 (An Adenovirus Vector with Genetically Modified Fibers Demonstrates Expanded Tropism via Utilization of a Coxsackievirus and Adenovirus Receptor-Independent Cell Entry Mechanism) により修飾した：それぞれの領域を、プライマー R G D - H p a 順方向 (5' - G A G g t t a a c C T A A G C A C T G C C C A A G - 3')、R G D - E c o R V 逆方向 (5' - C A T A G A G T A T G C A G A T A T C G T T A G T G T T A C A G G T T T A G T T T T G - 3')、及び R G D - E c o R V 順方向 (5' - G T A A C A C T A A C G A T A T C T G C A T A C T C T A T G T C A T T T T C A T G G - 3') 及び R G D - B f r 逆方向 (5' - C A G C G A C A T G A A c t t a a g T G A G C T G C - 3')、並びにこのようにして生成された E c o R V 切断部位を用いて増幅した。この切断部位へ、A r g - G l y - A s p (R G D) ペプチドをコードする R G D オリゴ1 (5' - C A C A C T A A A C G G T A C A C A G G A A A C A G G A G A C A C A A C T T G T G A C T G C C G C G G A G A C T G T T T C T G C C C - 3') 及び R G D オリゴ2 (5' - G G G C A G A A A C A G T C T C C G C G G C A G T C A C A A G T T G T G T C T C C T G T T T C C T G T G T A C C G T T T A G T G T G - 3') の、対のオリゴヌクレオチドをクローニングした。したがって、R G D モチーフがファイバーノブドメインの H I ループに含まれている。

20

30

【0426】

図30及び31に、クローニングされた E 1 B 5 5 k - 3' U T R についてより詳細に記述し、A d e a s y システムにおける p E 3 / E 4 シャトルプラスミドを図32に表示する。このプラスミドは、領域 E 3 及び E 4 に操作と欠失をそれぞれ施して、種々のカセットを、E 3 領域用の N h e I 及び E 4 領域用の P s t I などの様々な制限部位によって、E 4 o r f 6 及び L 5 以外のオープンリーディングフレームに悪影響を及ぼすことなくクローニングすることを可能にしたという点で特徴づけられる。さらに、R G D モチーフの配列を H I ループの領域へ導入する。

40

【0427】

欠失の、野生型アデノウイルス配列に対応する位置。

E 3 欠失：28138 - 30818

E 4 欠失：33246 - 33875

R G D モチーフ：32678 (9つのアミノ酸が導入され、中央の3つのアミノ酸が R G D である：C D C R G D C F C

【実施例17】

【0428】

50

アデノウイルス d1520 による HeLa 細胞の感染

ディッシュ当たり 100,000 個の HeLa 細胞を入れた。翌日、種々の力価のアデノウイルス d1520 を細胞に感染させた。感染は、500 μ L の無血清 DMEM 培地にて 37 で 1 時間行った。続いて、感染培地を除き、完全培地 (10% FCS / DMEM) 2 mL に取り替えた。クリスタルバイオレット染色を用いて、3 ~ 5 日後、分析を行った。

【0429】

この実験の結果を図 23 に示す。アデノウイルス d1520 は、核に YB-1 を有さない HeLa 細胞に感染させた場合、低い MOI (5 ~ 10 pfu / 細胞) でいかなる溶解も示さなかった。それとは対照的に、d1520 は、細胞当たり 100 ~ 200 pfu の MOI (感染の多重度) で実際、完全な溶解を示し、細胞当たり 50 pfu の MOI でも優勢な溶解を示した。これらのことから、高い MOI でアデノウイルス遺伝子 E1B55K 及び E4orf6 のスイッチを入れることが可能である d1520 及び類似のウイルスは、過剰発現された YB-1 又は調節解除された YB-1 を核に直接的に又は間接的に輸送し、従って細胞溶解するのに好適であると結論付けることができる。

10

【実施例 18】

【0430】

E2 後期プロモーター活性を測定するためのルシフェラーゼアッセイ

YB-1 が核においてアデノウイルス E2 後期タンパク質に結合し (Holm et al., JBC 277: 10427-20434, 2002)、このプロモーターが核酸の発現によく適していることは既知である。アデノウイルスの E2 後期プロモーターの使用は、それが YB-1 によって調節されることができ、その際、YB-1 は陽性のエフェクターとして作用する、すなわち、該プロモーターは核における YB-1 の存在下でのみ活性があるという事実によって特に動機付けられる。その程度において、前記アデノウイルス E2 後期プロモーターは、高度に選択的な様式で調節されることができるので、核に YB-1 が存在する系で使用され、実際、YB-1 がエフェクター又はレギュレーターとして核に存在しない場合、アデノウイルス E2 後期プロモーターの制御下にある核酸のいかなる発現も回避する。E2 後期プロモーターは、E2 遺伝子の活性化に関連する 3 つの Y ボックス (CCAAAT) を含む。様々な E2 後期プロモーターの構築物が調製され、その特異性及び活性について調べられている。分析は以下のように行った。

20

30

【0431】

3 種の異なった細胞濃度を用いて、6 穴プレートに、核に YB-1 を有する細胞株 EPG-257RDB (上皮性胃癌)、HeLa 細胞 (上皮性子宮頸癌) 及び U2OS (骨肉種) を播いた。翌日 70% の集密度を示したウェルを形質移入に用いた。各ウェルについて、ルシフェラーゼベクター (Promega から市販、出発プラスミド: pGL3-エンハンサ) 内の様々な E2 後期プロモーター構築物のスピンミニプレップ (Qiagen) で精製したプラスミド DNA 500 ng を、1.5 mL の密栓付き反応容器内の OpimEM 500 μ L 及び 500 μ L さらなる密栓付き反応容器内の DOTAP 5 μ L に加えた。双方の溶液を合わせて混合した。複合体形成のために混合物を室温にて 30 分間インキュベートした。細胞を PBS で 3 回すすぎ、形質移入用混合物の層で覆った。プレートを 37 で 5 時間インキュベートし、続いて再び PBS で 3 回洗浄し、完全培地を提供した。

40

【0432】

インキュベートの 48 時間後、細胞を Promega のルシフェラーゼアッセイシステムキット (カタログ番号 E1500) で処理した。各ウェルに溶解緩衝液 500 μ L を提供し、室温にて 10 分後、1 mL のピペットにてウェルプレートから細胞をすすぎ取り、1.5 mL の密栓付き反応容器に移した。4 にて 14,000 rpm で 15 分間、細胞溶解物を遠心した。各 50 μ L の上清に、100 μ L のルシフェラーゼ基質を加え、96 穴の黒色プレートにて 945 nm の波長で、トップカウント (Canberra-Packard GmbH 63303 Dreieich) マイクロプレートシンチレーション & 発光カウンタにて測定した。

【0433】

50

タンパク質は、B C A タンパク質アッセイキット、カタログ番号 2 3 2 2 7 (Pierce, Rockford, Illinois, USA) により、5 7 0 nm にて Molecular Dynamics の生物照度計 (Bio lumin 960) 動的蛍光 / 吸光プレートリーダーにおいて測定した。試料の相対的光シグナルをタンパク質量 (R L U / タンパク質 μ g) に変換した。

【0 4 3 4】

以下のプラスミドを使用した: B a m H I (2 2 5 0 b p) 及び B s a B I (2 0 0 3 b p) によりエンハンサを除いた p G L 3 - エンハンサ (Promega)、ブランクの読み取りとして働くもの。種々の E 2 プロモーターを、制限部位 A p a I 及び S a c I によってエンハンサを欠く p G L 3 ベクターでの M C S にクローニングした。h C M V プロモーターを、B g l I I 及び H i n d I I I によって p G L 3 エンハンサにクローニングし、陽性対照として働かせた。陽性対照により形質移入効率を概算し、またそれは、ルシフェラーゼ活性の参照値として役立った。各細胞株について C M V 対照を 1 0 0 % に設定し、E 2 プロモーター構築物により生じた酵素活性をそれと関係付け、図 2 4 に棒グラフとして表した。

10

【0 4 3 5】

種々のコンストラクトは以下のように引用した。

1. 塩基 2 5 9 3 2 ~ 2 6 1 7 9 に相当する Y ボックス I、I I、及び I I I を含む (野生型アデノウイルス配列をいう。後で提供されるアデノウイルス E 2 領域の部分も参照のこと)
2. 塩基 2 5 9 3 2 ~ 2 6 1 2 7 に相当する Y ボックス I I、及び I I I を含む (野生型アデノウイルス配列をいう。後で提供されるアデノウイルス E 2 領域の部分も参照のこと)
3. 塩基 2 5 9 3 2 ~ 2 6 0 0 4 に相当する Y ボックス I I I を含む (野生型アデノウイルス配列をいう。後で提供されるアデノウイルス E 2 領域の部分も参照のこと)
4. ブランクの読み取りとして作用するように Y ボックスを含まない。

20

【0 4 3 6】

アデノウイルス E 2 領域の部分 (Virology 186: 280-285, 1992 から引用)
(Y B - 1 結合部位は太字で印刷されている)

【表 5】

25561 aggaactttaicctagagcgctcaggaatctgcccgccacctgctgtgcacttcctagc
 25621 gactttgtgcccattaagtaccgcgaatgccctccgccgcttggggccactgctacott
 25681 ctgcagctagccaactaccttgcttaccactctgacataatggaagacgtgagcgggtgac
 25741 ggtctactggagtgtcactgtcgtgcaacctatgcacccgcaccgctccctggtttgc
 25801 aattcgacgtgcttaacgaaagtcaaattatcggtagctttagctgcaggggtccctcg
 25861 cctgacgaaaagtcgcggctccgggttgaaactcactccggggctgtggacgtcggct
 25921 taccttcgcaaattgtacctgaggactaccacgcccacgagattaggttctacgaaga**C**
 25981 **caat**cccgcccgccaaatgcggagcttaccgcctgcgtcattaccagggccacattott
 26041 gg**ccaat**tgaagccatcaacaaagcccgccaaagagtttctgctacgaaaggacggggg
 26101 gtttacttgacccccagtcggcgaggagctcaac**ccaat**ccccccgccgccgagccc
 26161 tatcagcagcagccgcgggccccttgcttccaggtggcaccacaaaagaagctgcagct
 26221 gccgccgccaccacggacgaggaggaatactgggacagtcaggcagaggaggttttga
 26281 cgaggaggaggaggacatgatggaagactgggagagcctagacgagggaagcttccgaggt
 26341 cgaagaggtgtcagacgaaacaccgtcacccctcggtcgattccctcgccggcgcccca
 26401 gaaatcggaaccgggtccagcatggctacaacctccgctcctcaggcgccgccgacact
 26461 gcccgttcgcggaccaaccgtagatgggacaccactggaaccaggggccggttaagtcaa
 26521 gcagccgccgccgttagcccaagagcaacaacagcgccaaggctaccgctcatggcgccg
 26581 gcacaagaacgccatagtgtgttgccttgaagactgtgggggcaacatctccttcgccg
 26641 ccgctttcttctaccatcacggcgtggccttccccgtaacatcctgcattactaccg
 26701 tcattctacagcccatactgcaccggcgccgagcggcagcggcagcaacagcagcgccca
 26761 cacagaagcaaaaggcgaccggatagcaagactctgacaaagcccaagaatccacagcgg

10

20

30

(SEQ. ID. No. 8)

【0437】

図24で提示された結果は、様々なE2後期/Yボックスを含有する個々のプロモーター断片はYB-1核陽性の腫瘍細胞における治療用導入遺伝子の発現に好適であるので、本発明の意味でプロモーターとして使用してもよいことを印象的に裏付けている。

40

【実施例19】

【0438】

アデノウイルスにより発現されたYB-1の粒子形成における効果

E1/E3を欠失したアデノウイルスベクターAdYB-1及びE1Aのみの欠失を有するAd312を、50pfu/細胞のMOIにてヒト骨肉種細胞(U2OS)に感染させた。AdYB-1は、ゲノムに、細胞性転写因子YB-1をコードする配列を含有するので、Y-ボックス結合タンパク質1(YB-1)を発現する。感染後、「プラーク形成単位(pfu)」としてのウイルス粒子の放出を評価するために、培養培地の上清及び残りの細胞層をそれぞれ、感染後2日目及び5日目に単離した。細胞内の粒子は3回の凍結乾燥により放出させた。293細胞におけるプラークアッセイによって粒子数を分析した。

50

【 0 4 3 9 】

結果は図 2 5 に示すが、黒棒は細胞内に残っていたウイルス粒子を示し、斜線の棒は放出された細胞外のウイルス粒子を示す。

【 0 4 4 0 】

図 2 5 に示された結果は、A d Y B - 1 は全体として、A d 3 1 2 よりも大きな pfu を生じ、多くの粒子を放出することを裏付けている。5 日目では、A d Y B - 1 に感染させた細胞は、A d 3 1 2 に感染させた細胞とは対照的に細胞変性効果 (C P E) を明瞭に示した。

【 実施例 2 0 】

【 0 4 4 1 】

イリノテカン添加後の細胞中のアデノウイルス複製

アデノウイルスの複製に対するイリノテカンの影響を決定するために、 10^6 個の U 3 7 3 腫瘍細胞を 10 cm^2 のペトリ皿にプレートした。最初の反応では、 $5\text{ }\mu\text{M}$ イリノテカンを 2 4 時間後に加えた。さらに 2 4 時間の後、細胞に 10 pfu/細胞 の d 1 5 2 0 を感染させた。イリノテカンなしで 3 日間インキュベーション後に、実施例 1 0 に記述した手続きに従って DNA を分離した。

【 0 4 4 2 】

並行した反応においては、このように準備した U 3 7 3 細胞を予めイリノテカンでインキュベーションしなかった。イリノテカンなしで 4 8 時間細胞を培養した後に、それらに 10 pfu/細胞 の d 1 5 2 0 を感染させ、さらに 3 日の間イリノテカンなしで続いてインキュベーションした。上述したように DNA を分離した。

【 0 4 4 3 】

続いて $2\text{ }\mu\text{g}$ DNA を制限酵素 K p n I で消化し、サザンブロット解析を行なった。PCR によって生成されたアデノウイルスゲノムの一部 (位置 : 2 2 7 3 4 - 2 4 2 3 5) をプローブとして用いた。

【 0 4 4 4 】

結果を図 2 6 に示す。図 2 6 は、イリノテカンとのインキュベーション後に、イリノテカンとインキュベーションを行なわない無処理の対照 (レーン 1) と比較して、イリノテカン処理後に (レーン 2) U 3 7 3 細胞中でアデノウイルスの複製が著しく増加することを示す。これは、イリノテカンの影響下でアデノウイルスの複製が増加することを意味する。

【 実施例 2 1 】

【 0 4 4 5 】

トリコスタチン A 投与後の細胞中のアデノウイルスの複製

アデノウイルスの複製に対するトリコスタチン A の影響をテストするために、 10^6 個の U 3 7 3 腫瘍細胞を 10 cm^2 のペトリ皿にプレートした。2 4 時間後に 0 . 2 5 、 0 . 5 、及び 0 . 7 5 μM のトリコスタチン A を加えた。さらに 2 4 時間後、細胞に 10 pfu/細胞 の d 1 5 2 0 を感染させた。

【 0 4 4 6 】

3 日間トリコスタチンのない培地でインキュベーションした後、DNA を分離した。次に $2\text{ }\mu\text{g}$ DNA を制限酵素 K p n I で消化し、サザンブロット解析を行なった。PCR によって生成されたアデノウイルスのゲノムの一部 (位置 : 2 2 7 3 4 ~ 2 4 2 3 5) をプローブとして用いた。

【 0 4 4 7 】

結果を図 2 7 に示す。図 2 7 は、トリコスタチン A 濃度を増加させてインキュベーションした後 (レーン 2 、 3 及び 4) では、U 3 7 3 細胞中のアデノウイルス複製が、トリコスタチン A とインキュベーションしなかった未処理の対照 (レーン 1) と比較して、著しく増加することを示す。これは、ウイルスの複製がトリコスタチン A の影響下で増加することを意味する。

【 実施例 2 2 】

10

20

30

40

50

【0448】

トリコスタチン A の添加に応答して、U 3 7 3 細胞のコクサッキーウイルスアデノウイルスレセプター (C A R) の発現に影響を及ぼす

2 0 0 , 0 0 0 個の U 3 7 3 細胞を 6 ウェルプレートにプレートした。2 4 時間後、細胞を 1 μ M トリコスタチンと共に 2 4 時間培養した。さらに 2 4 時間後、細胞を単離した。次に C A R 発現の解析を、F a c s 解析及び Upstate 社から得た一次抗体、抗 - C A R クローン R m c B、及び二次抗体としてウサギ - 抗 - マウス F I T C (D A K O 社) を用いる標準プロトコルにより実施した。

【0449】

結果を図 2 8 に示す。トリコスタチン処理をしない場合、細胞の 1 1 . 3 % が C A R 陽性であったが、細胞を 1 μ M トリコスタチンとインキュベーションした後は、細胞の 5 6 . 2 % が C A R 陽性であった。図はテストに用いた全細胞のパーセンテージである。

【0450】

図 2 8 から、ヒストンデアシラーゼ阻害剤トリコスタチン A の影響下で、アデノウイルスの結合の重要な因子である C A R がより高いレベルで、またより利用可能性が高く発現され、それはこのように処理した細胞のトランスフェクションの効率を増加させることが分かる。

【実施例 2 3】

【0451】

イリノテカン及びトリコスタチン A による細胞の併用処理後のアデノウイルスによる U 3 7 3 細胞の腫瘍崩壊。

2 0 0 , 0 0 0 個の U 3 7 3 細胞を 6 ウェルプレートにプレートした。2 4 時間後に、2 μ M イリノテカン又は 1 μ M トリコスタチン A、あるいは 1 μ M イリノテカン + 0 . 5 μ M トリコスタチンを培地に加えた。2 4 時間のインキュベーションの後、細胞に 1 0、2 0、及び 3 0 p f u / 細胞の d 1 5 2 0 を感染させた。3 ~ 5 日後に、クリスタルバイオレット染色を用いて、解析を行なった。分析を二重に行なった。

【0452】

結果を図 2 9 に示す。パネル 1 中に表した 6 つのプレートは、クリスタルバイオレット染色によって示される、イリノテカン及びトリコスタチン A の組合せとのインキュベーションに影響されなかった完全な細胞層を示す。パネル 1 の次の 2 つのウェルは、1 0 及び 2 0 p f u / 細胞の d 1 5 2 0 による感染後の細胞層をそれぞれ示す。そのような条件下でも、d 1 5 2 0 の複製がないため、細胞崩壊がない。したがって、1 0 又は 2 0 p f u / 細胞の d 1 5 2 0 も、1 μ M イリノテカン + 0 . 5 μ M トリコスタチン A のみも、細胞溶解を引き起こすには適当でないことを示す。

【0453】

本明細書でパネル 2、3 及び 4 とも呼ぶ、図 2 9 中に示したさらなる 6 ウェルプレート 2、3 及び 4 を、基本的にこのスキームに従って処理した。個々のウェルに、前に記述したように U 3 7 3 細胞を接種し、細胞をその中で培養した。正副 2 つのウェルに、1 0、2 0、又は 3 0 p f u / 細胞の d 1 5 2 0 を接種した。3 枚の 6 ウェルプレート間には、用いた細胞増殖抑制剤の種類に差異が存在した。パネル 2 では 2 μ M イリノテカン、パネル 3 では 1 μ M トリコスタチン A、ならびにパネル 4 では 1 μ M イリノテカン及び 0 . 5 μ M トリコスタチン A を、個々のウェルに加えた。

【0454】

2 μ M イリノテカンを加えた 6 ウェルプレート 2 (パネル 2) では、3 0 p f u / 細胞の d 1 5 2 0 により細胞が溶解された。1 μ M トリコスタチン A を加えた 6 ウェルプレート 3 (パネル 3) では、2 0 及び 3 0 p f u / 細胞の d 1 5 2 0 により細胞が溶解された。1 μ M イリノテカン + 0 . 5 μ M トリコスタチン A を加えた 6 ウェルプレート 4 (パネル 4) ではそれらと対照的に、すでに 1 0 p f u / 細胞の d 1 5 2 0 により細胞が溶解された。

【0455】

図 2 6 ~ 2 9 に結果が表されているテストは、イリノテカン + トリコスタチン + d 1 5 50

20 から成る組合せが、化合物単独のいずれよりも有効な腫瘍細胞の細胞溶解を引き起こすことを示す。これは一方では、CAR 発現を増加させ、従って細胞の感染可能性を著しく改善するトリコスタチン A に起因する。他方では、イリノテカンが YB - 1 を細胞核に移行させ、従ってアデノウイルス複製の増進を引き起こす。さらに、細胞の YB - 1 は d1520 による感染の後にアデノウイルスの複製を支援しており、もはや DNA 修復プロセスに利用できない。見方によって、これは、一方で d1520 の効率の改善をもたらす、また他方では細胞増殖抑制剤の効率の増加をもたらす。

【図面の簡単な説明】

【0456】

今や図及び実施例を用いて本発明をさらに説明すべきであり、その際、本発明の新規の特徴、実施態様及び利点はそれらから選択され、それらに関連して

10

【図1】 E1/E3 を欠失したアデノウイルスである AdE1/E3 マイナスアデノウイルスベクター、野生型アデノウイルス及びアデノウイルス d1520 と呼ばれるアデノウイルスベクターの構造設計を示す。

【図2】 p300、p107 及び p105 の結合に関する E1A タンパク質の結合ドメインを示す。

【図3】 E1/E3 マイナス Ad5 と呼ばれる E1/E3 を欠失したアデノウイルス Ad5、及び d1520 で感染させた後の、核に YB - 1 を有さない U20S 細胞を示す。

【図4】 E1/E3 マイナス Ad5 と呼ばれる E1/E3 を欠失したアデノウイルス Ad5、及びアデノウイルス d1520 で感染させた後の、核に YB - 1 を有する 257RDB 細胞を示す。

20

【図5】 アデノウイルス d11119/1131 で感染させた後の 257RDB 細胞及び U20S 細胞を示す。

【図6】 YB - 1 が、多剤耐性細胞及び細胞株 257RDB、181RDB、MCF - 7 Ad の細胞核に存在するが、U20S 及び HeLa 細胞の核には存在しないことを確認する EMSA の分析結果を示す。

【図7】 野生型アデノウイルス、アデノウイルス d1520 及びアデノウイルス d11119/1131 の E1A タンパク質の構造設計を示す。

【図8】 追加的に発現させたウイルスタンパク質の存在下アデノウイルスの複製効率を絶対値で示す棒グラフを示す。

30

【図9】 追加的に発現させたウイルスタンパク質の存在下アデノウイルスの複製効率の増加を示す棒グラフを示す。

【図10】 ダウノルビシンの投与なし及びダウノルビシン 40 ng/mL 投与した場合の 10 及び 30 pfu/細胞で d1520 を感染させた及び対照 (K) のクリスタルバイオレットで染色した U20S 細胞のウェルを示す。

【図11】 ダウノルビシンの投与なし及びダウノルビシン 40 ng/mL 投与した場合の 10 及び 30 pfu/細胞で d1520 を感染させた及び対照 (K) のクリスタルバイオレットで染色した HeLa 細胞のウェルを示す。

【図12】 PBS 及び d1520 で処理した後の異なった起源 (RDB257 及び HeLa) の腫瘍の時間の関数としての腫瘍容積の図示を示す。

40

【図13】 PBS 及び 5×10^8 pfu の d1520 で処理した後 RDB257 に基づく腫瘍を発育させ、屠殺されたマウスの写真を示す。

【図14】 d1520 を感染させた後の RDB257 細胞及び HeLa 細胞 (皮下で腫瘍を増殖させた) の細胞抽出物のサザンブロット分析の結果を示す。

【図15】 YB - 1 核陽性の腫瘍細胞 (257RDB 及び 181RDB) 及び YB - 1 核陰性の腫瘍細胞 (HeLa、U20S) における d1520 及び野生型アデノウイルスの複製効率及び粒子形成を示す棒グラフを示す。

【図16】 野生型アデノウイルス及びアデノウイルスベクター AdXvi03 の構造設計を示す。

【図17】 アデノウイルスベクター AdXvi03/01 の構造設計を示す。

50

【図 18 A】A d 3 1 2 (2 0 p f u / 細胞)、X v i r 0 3 (5 p f u / 細胞) で感染させた及び対照 (非感染) の、クリスタルバイオレットで染色した 1 8 R D B 細胞 (図 1 8 A) 及び 2 7 2 R D B (図 1 8 B) のウェルを示す。感染後 5 日目にクリスタルバイオレット染色を行った。

【図 18 B】A d 3 1 2 (2 0 p f u / 細胞)、X v i r 0 3 (5 p f u / 細胞) で感染させた及び対照 (非感染) の、クリスタルバイオレットで染色した 1 8 R D B 細胞 (図 1 8 A) 及び 2 7 2 R D B (図 1 8 B) のウェルを示す。感染後 5 日目にクリスタルバイオレット染色を行った。

【図 19】野生型アデノウイルス A d 5 及びアデノウイルス A d 3 1 2 で感染させた後の A 5 4 9 細胞及び U 2 0 S 細胞における E 2 遺伝子発現のノーザンプロットの結果を示す 10

【図 20】野生型アデノウイルス及びアデノウイルスデルタ 2 4 で感染させた 1 2 時間後及び 2 4 時間後の U 2 0 S 細胞における E 2 遺伝子発現のノーザンプロットの結果を示す。

【図 21】アデノウイルスベクター X v i r P S J L 1 の構造設計を示す。

【図 22】アデノウイルスベクター X v i r P S J L 2 の構造設計を示す。

【図 23】異なった p f u / 細胞を用いてアデノウイルス d 1 5 2 0 で感染させ、クリスタルバイオレットで染色した H e l a 細胞のウェルを示す。

【図 24】アデノウイルス E 2 後期プロモーターの異なったプロモーター断片の利用における U 2 0 S 細胞、H e l a 細胞及び 2 5 7 R D B 細胞のルシフェラーゼ活性を示す棒グラフを示す。 20

【図 25】Y B - 1 を発現するアデノウイルス及びウイルス A d 3 1 2 で感染させた 2 日後及び 5 日後の U 2 0 S 細胞におけるウイルス粒子の数を示す棒グラフである。細胞内にとどまったウイルス粒子 (黒で示す) と細胞外に放出されたウイルス粒子 (斜線で示す) との間で区別した。

【図 26】イリノテカンによって細胞を処理された、及び細胞を処理されない U 3 7 3 細胞におけるアデノウイルス d 1 5 2 0 の複製行動のサザンプロット解析の結果を示す。

【図 27】トリコスタチン A によって細胞を処理された、及び細胞を処理されない U 3 7 3 細胞におけるアデノウイルス d 1 5 2 0 の複製行動のサザンプロット解析の結果を示す。 30

【図 28】トリコスタチンで処理された U 3 7 3 細胞の、コクサッキーウイルス・アデノウイルスレセプター (C A R) の発現について F A C S 解析を行った結果を、C A R 陽性細胞のパーセンテージとして表示する。

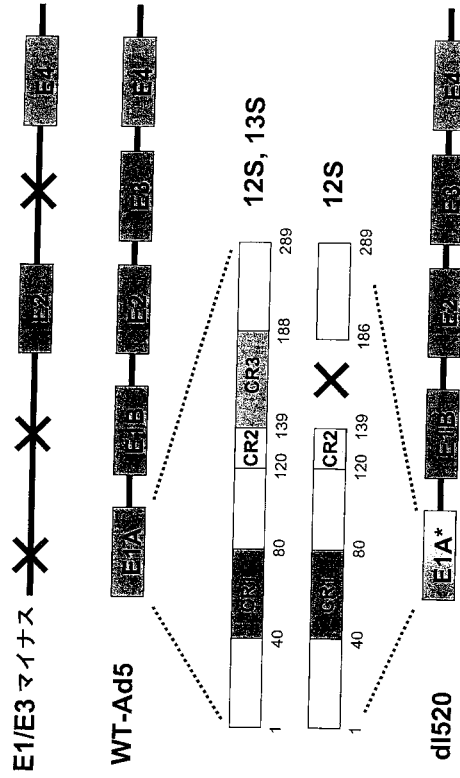
【図 29】複製中のアデノウイルス d 1 5 2 0 及びイリノテカン及びトリコスタチンの種々の組合せの効果を表示するための、細胞層の 4 枚の異なるパネルを示す；

【図 30】E 1 B 5 5 K の O R F を、3 ' U T R 断片及び位置 3 5 3 2 の制限部位 B f r I と共に、模式的に表現したものである；

【図 31】野生型 A d 5 の配列位置 3 5 0 7 ~ 4 1 0 7 に対応する、E 1 B 5 5 k - 3 ' U T R 領域の配列を示す；及び、

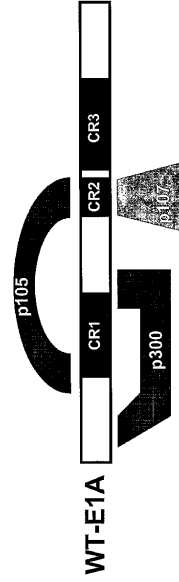
【図 32】R G D モチーフを有する E 3 / E 4 の修飾された組換えアデノウイルスを生成するための汎用シャトルプラスミドを模式的に表現したものである。 40

【 図 1 】

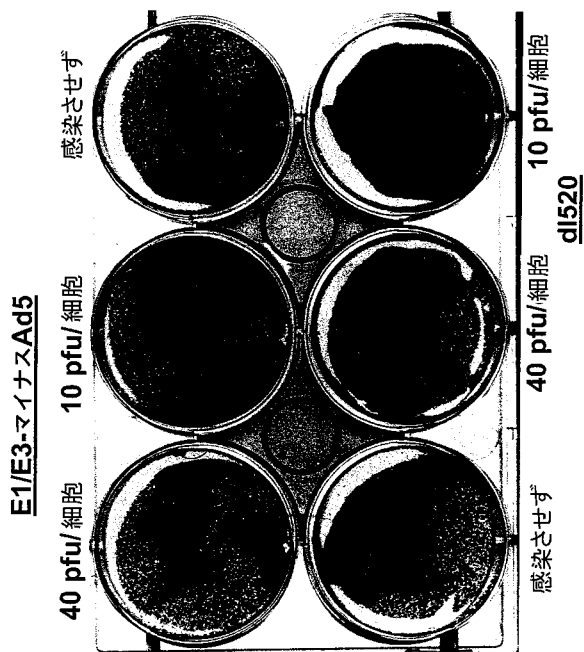


【 図 2 】

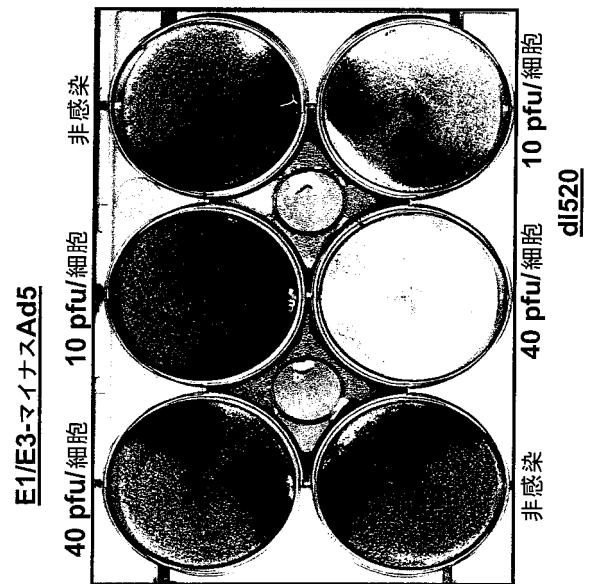
Fig. 2



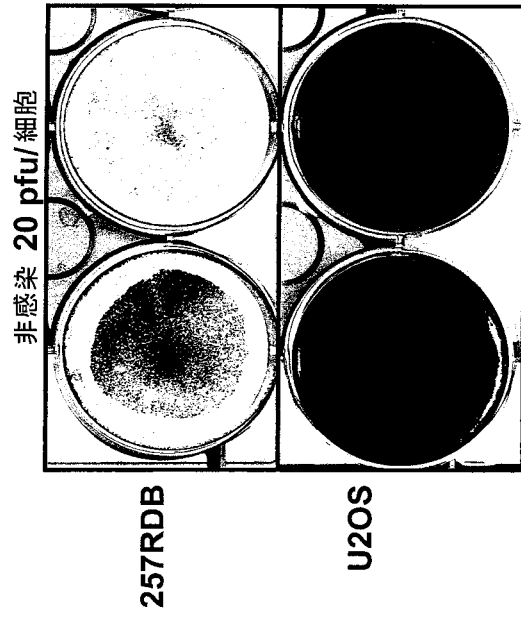
【 図 3 】



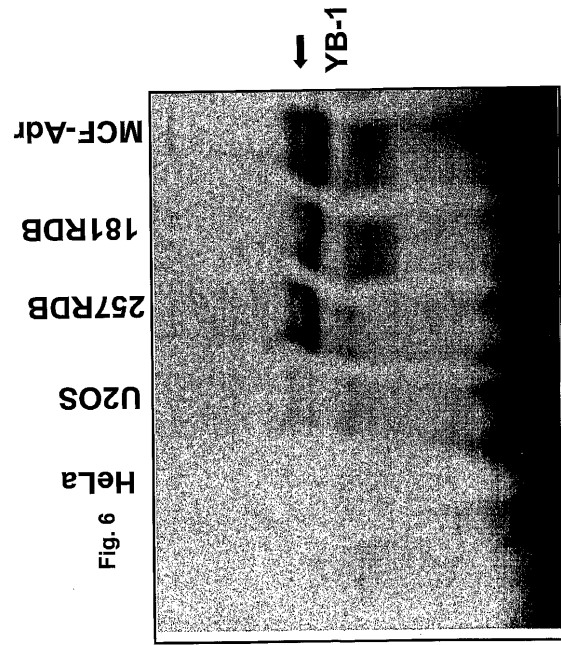
【 図 4 】



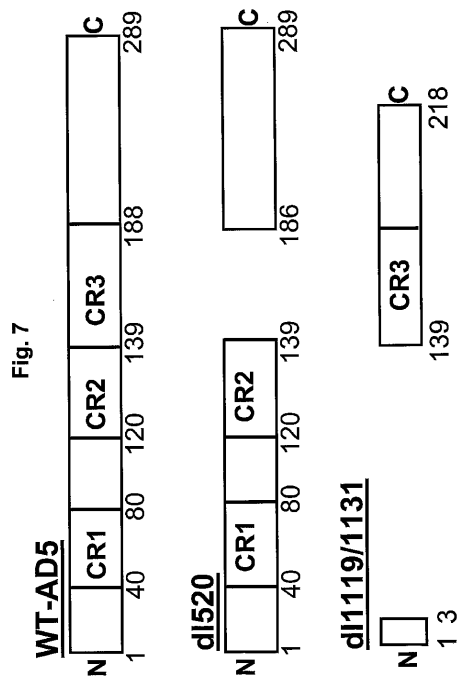
【 図 5 】



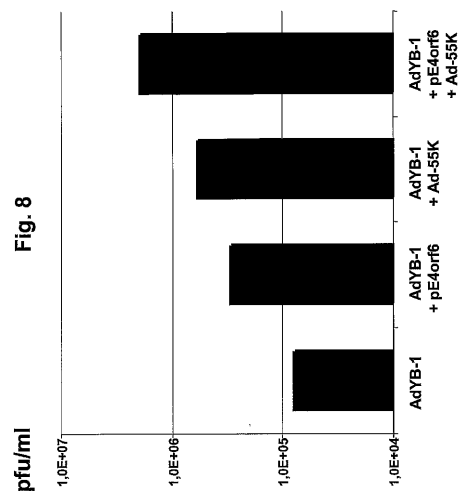
【 図 6 】



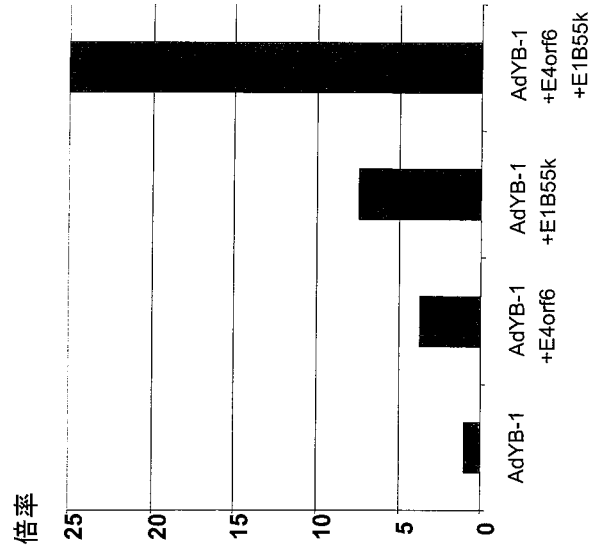
【 図 7 】



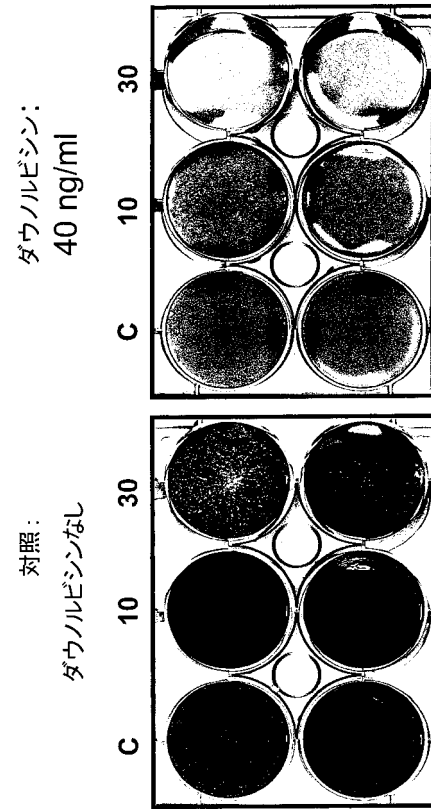
【 図 8 】



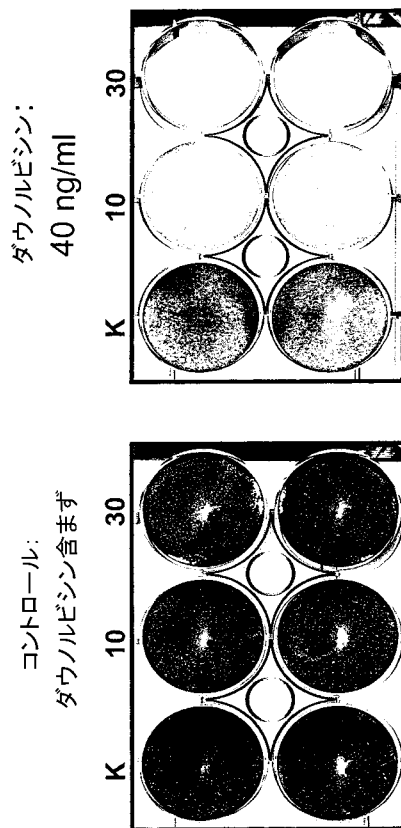
【図 9】



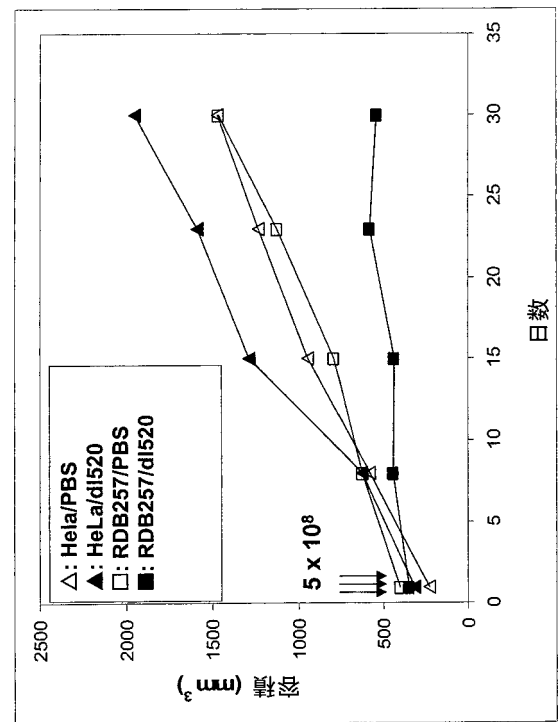
【図 10】



【図 11】



【図 12】

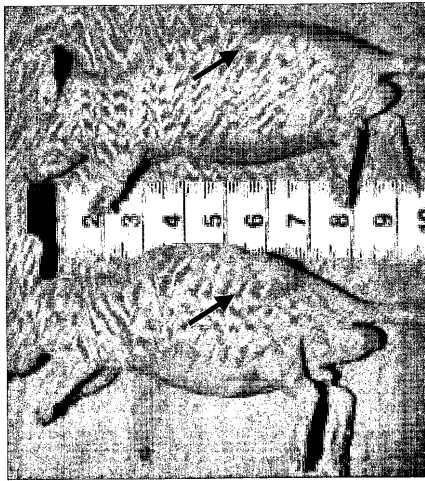


【 図 1 3 】

Fig. 13

PBS

5 x 10⁸ dl520



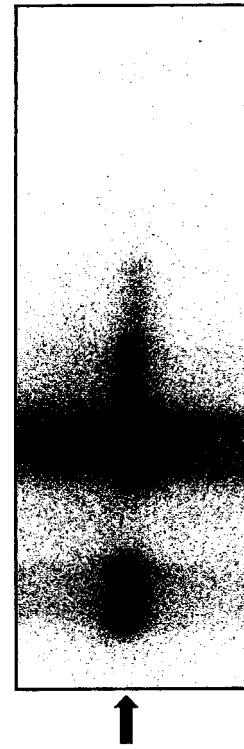
【 図 1 4 】

257RDB
YB-1 核陽性

HeLa

YB-1 核陰性

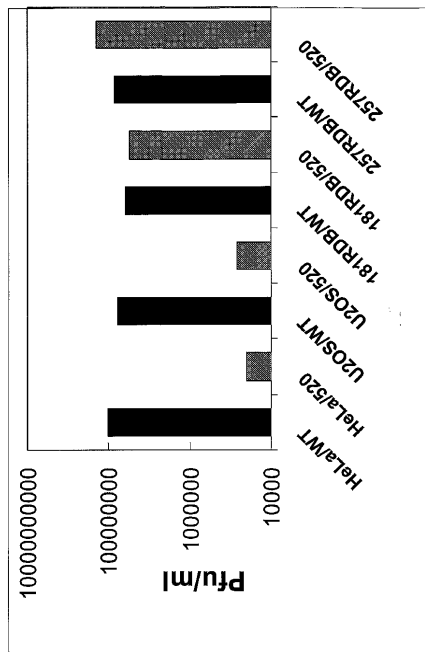
1 2 3 4 5 6 7 8



サザンブロット分析

【 図 1 5 】

Fig. 15

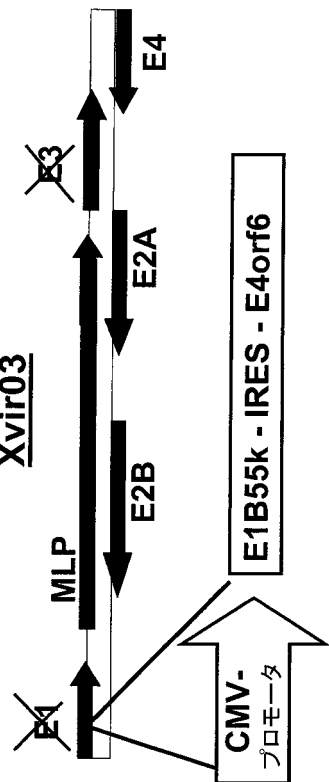


【 図 1 6 】

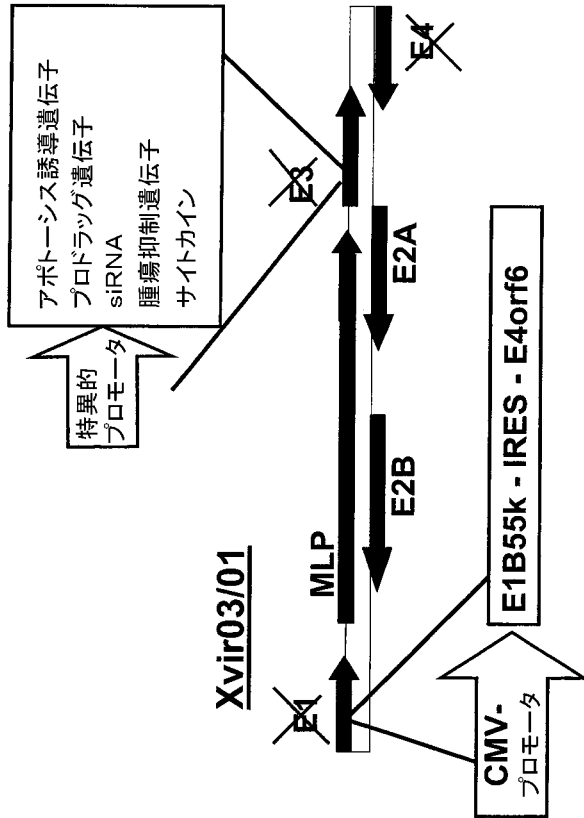
野生型アデノウイルス



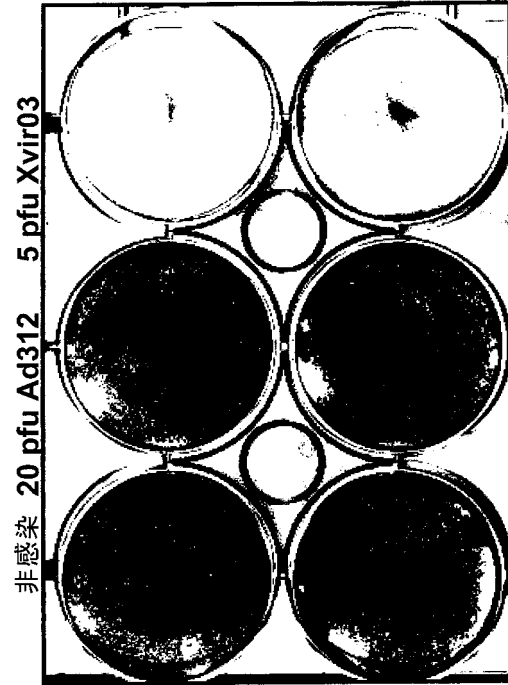
Xvir03



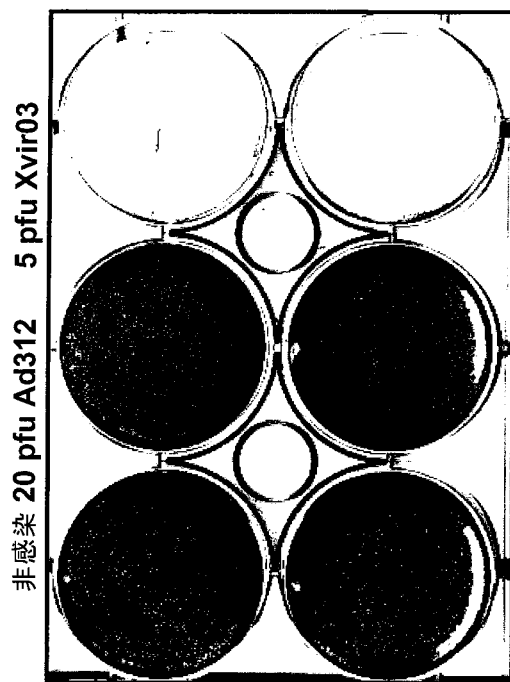
【図 17】



【図 18 A】

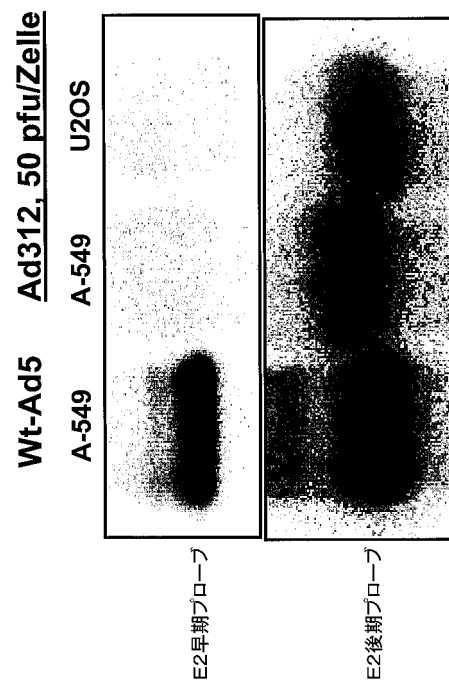


【図 18 B】



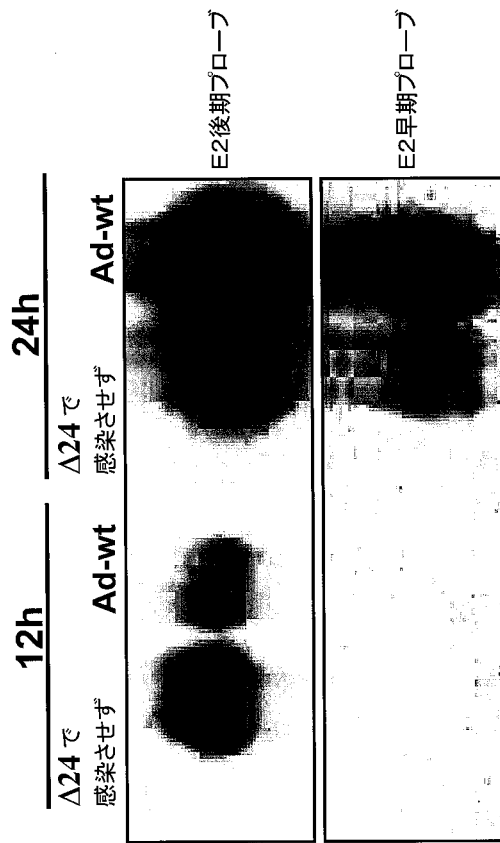
【図 19】

Ad312感染細胞におけるE2遺伝子発現のノーザンブロット解析



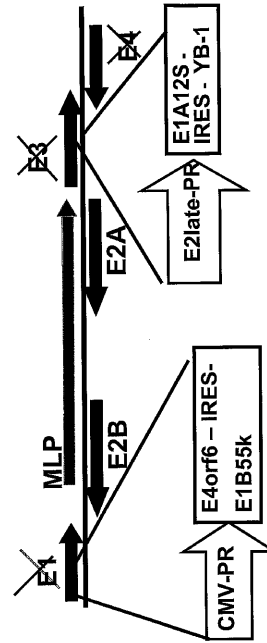
【 図 2 0 】

感染細胞におけるE2遺伝子発現のノーザンブロット解析

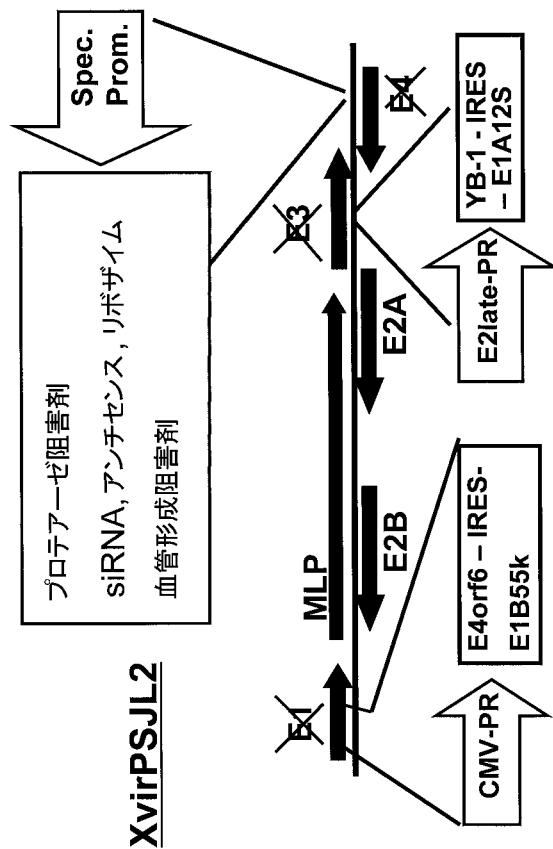


【 図 2 1 】

Fig. 21
XvirPSJL1

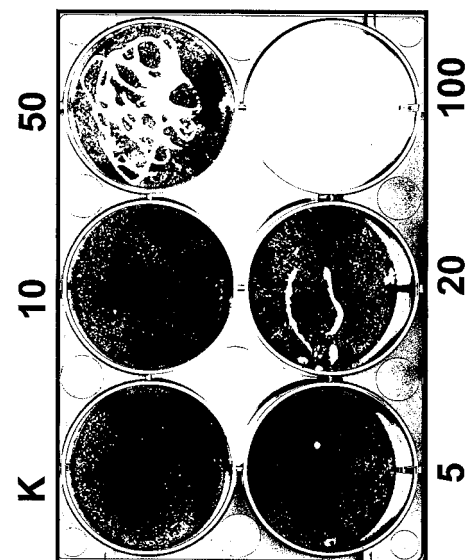


【 図 2 2 】

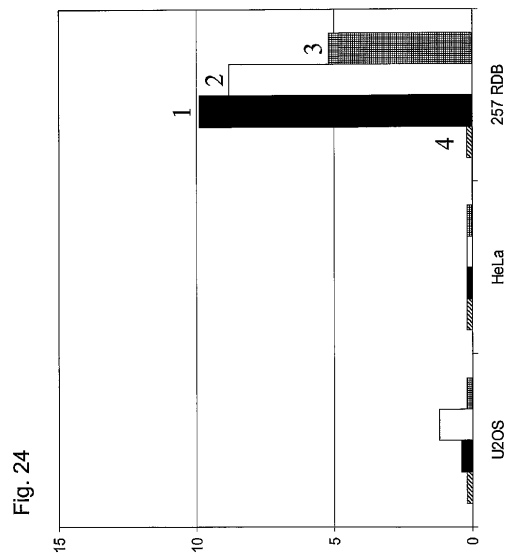


【 図 2 3 】

様々なMOI のdl520 を感染させたHeLa 細胞

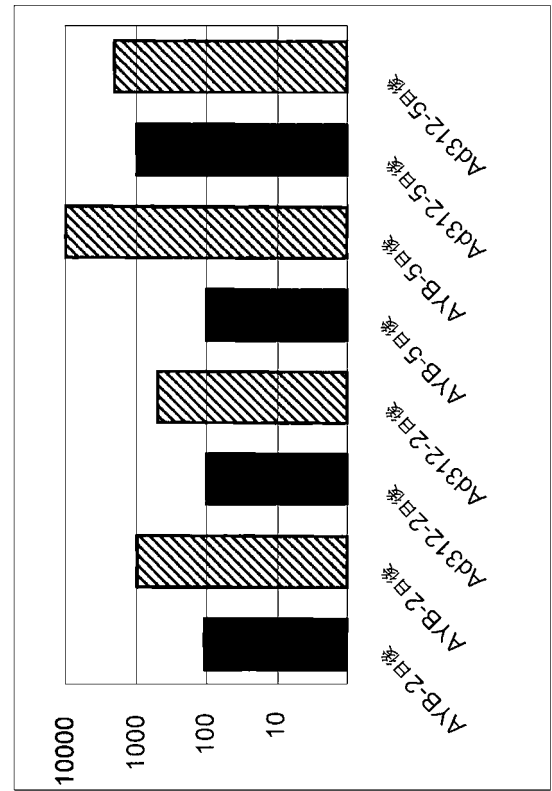


【 図 2 4 】



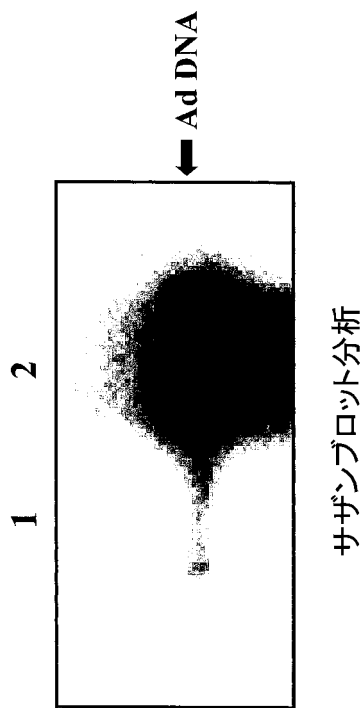
【 図 2 5 】

Ad 312と比べたAdyB-1によるウイルス粒子の放出



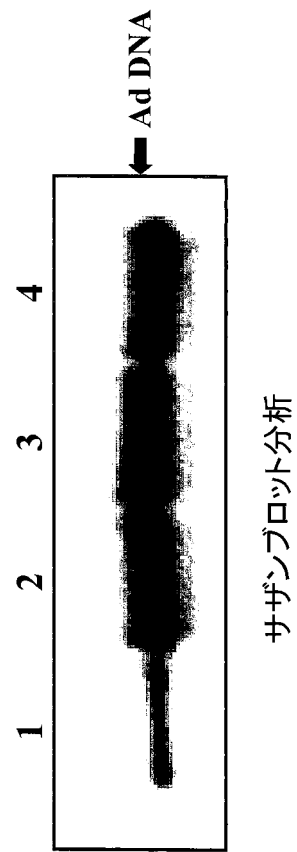
【 図 2 6 】

イリノテカン5 μ Mで24時間インキュベーション後の細胞当たり10pfuのdl520で感染させたU373細胞

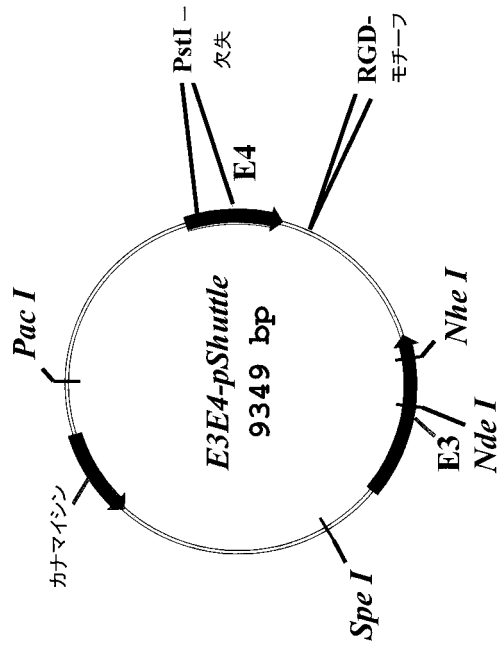


【 図 2 7 】

増加する濃度のトリコスタチンで24時間インキュベーション後の細胞当たり10pfuのdl520で感染させたU373細胞



【 図 3 2 】



【 配 列 表 】

2007511212000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP2004/012931

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K48/00 C12N15/861

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 101 50 945 A1 (SONNE HOLM, PER) 17 April 2003 (2003-04-17) claims 1-46; figure 2	1-103
A	US 2002/086411 A1 (HOLM PER SONNE ET AL) 4 July 2002 (2002-07-04) the whole document	1-103
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *I* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 July 2005

Date of mailing of the international search report

29/07/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schulz, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP2004/012931

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HOLM P S ET AL: "YB-1 relocates to the nucleus in adenovirus infected cells and facilitates viral replication E2 gene expression through the E2 late promoter" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 277, no. 12, 22 March 2002 (2002-03-22), pages 10427-10434, XP002237181 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-103
A	FUEYO JUAN ET AL: "A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo". ONCOGENE, vol. 19, no. 1, 6 January 2000 (2000-01-06), pages 2-12, XP002336078 ISSN: 0950-9232 page 1 - page 10; figure 1	1-103
T	HOLM PER S ET AL: "Multidrug-resistant cancer cells facilitate E1-independent adenoviral replication: Impact for cancer gene therapy." CANCER RESEARCH, vol. 64, no. 1, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 322-328, XP002336079 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-103

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP2004/012931

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 10150945	A1	17-04-2003	CA 2433071 A1 11-07-2002
			WO 02053711 A2 11-07-2002
			EP 1346058 A2 24-09-2003
			JP 2004535768 T 02-12-2004
			US 2004067586 A1 08-04-2004
US 2002086411	A1	04-07-2002	DE 19929569 A1 28-12-2000
			AT 287722 T 15-02-2005
			WO 0078327 A2 28-12-2000
			DE 50009365 D1 03-03-2005
			DK 1185279 T3 23-05-2005
			EP 1185279 A2 13-03-2002
			JP 2003502378 T 21-01-2003
			US 2004265277 A1 30-12-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/012931

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 A61K48/00 C12N15/861		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 A61K C12N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 101 50 945 A1 (SONNE HOLM, PER) 17. April 2003 (2003-04-17) Ansprüche 1-46; Abbildung 2	1-103
A	US 2002/086411 A1 (HOLM PER SONNE ET AL) 4. Juli 2002 (2002-07-04) das ganze Dokument	1-103
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche 14. Juli 2005		Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts 29/07/2005
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Schulz, R

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/012931

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	HOLM P S ET AL: "YB-1 relocates to the nucleus in adenovirus infected cells and facilitates viral replication E2 gene expression through the E2 late promoter" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, Bd. 277, Nr. 12, 22. März 2002 (2002-03-22), Seiten 10427-10434, XP002237181 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument	1-103
A	FUEYO JUAN ET AL: "A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo" ONCOGENE, Bd. 19, Nr. 1, 6. Januar 2000 (2000-01-06), Seiten 2-12, XP002336078 ISSN: 0950-9232 Seite 1 - Seite 10; Abbildung 1	1-103
T	HOLM PER S ET AL: "Multidrug-resistant cancer cells facilitate E1-independent adenoviral replication: Impact for cancer gene therapy." CANCER RESEARCH, Bd. 64, Nr. 1, 1. Januar 2004 (2004-01-01), Seiten 322-328, XP002336079 ISSN: 0008-5472 das ganze Dokument	1-103

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/012931

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 10150945 A1	17-04-2003	CA 2433071 A1	11-07-2002
		WO 02053711 A2	11-07-2002
		EP 1346058 A2	24-09-2003
		JP 2004535768 T	02-12-2004
		US 2004067586 A1	08-04-2004
US 2002086411 A1	04-07-2002	DE 19929569 A1	28-12-2000
		AT 287722 T	15-02-2005
		WO 0078327 A2	28-12-2000
		DE 50009365 D1	03-03-2005
		DK 1185279 T3	23-05-2005
		EP 1185279 A2	13-03-2002
		JP 2003502378 T	21-01-2003
		US 2004265277 A1	30-12-2004

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 2 0 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 35/12 (2006.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 31/4745 (2006.01)	A 6 1 K 31/4745	
A 6 1 K 31/165 (2006.01)	A 6 1 K 31/165	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA21 BA32 BA44 BA80 CA04 CA05 CA06 CA11 DA02
 DA03 EA02 FA02 FA10 GA12 GA18 GA19 HA08 HA09 HA14
 HA17
 4B065 AA90X AA91X AA93X AA93Y AA95X AA95Y AB01 AC14 AC20 BA01
 BA02 BA16 BA24 CA24 CA25 CA44
 4C084 AA13 AA19 NA14 ZB26
 4C086 AA01 AA02 CB22 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 ZB26
 4C087 AA01 AA02 BB63 BB65 BC83 MA02 NA14 ZB26
 4C206 AA01 AA02 GA28 KA01 MA02 MA04 NA14 ZB26