

(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2008-510493

(P2008-510493A)

(43) 公表日 平成20年4月10日 (2008.4.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 35/76 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/76	4 C O 8 7
<b>A 6 1 K 35/12 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/12	
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁)

(21) 出願番号	特願2007-530107 (P2007-530107)	(71) 出願人	597078983
(86) (22) 出願日	平成17年8月25日 (2005.8.25)		セル ジェネシス インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成19年4月3日 (2007.4.3)		アメリカ合衆国, カリフォルニア 940
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/030196		80, サウス サンフランシスコ, フォー
(87) 国際公開番号	W02006/026331		ブス ブールバード 500
(87) 国際公開日	平成18年3月9日 (2006.3.9)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/604,009		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成16年8月25日 (2004.8.25)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
(31) 優先権主張番号	11/201,384	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成17年8月11日 (2005.8.11)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ポリス, セシダー レディー
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 944
			04, フォスター シティー, アルバ
			コア レーン 157

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍細胞の形質導入強化のための線維改変アデノウイルスベクター

## (57) 【要約】

原発性腫瘍細胞に効果的に形質導入するアデノウイルスベクターが提供される。このアデノウイルスベクターは、サブグループCアデノウイルス線維シャフトの少なくとも一部、および、サブグループBアデノウイルスまたは血清型37アデノウイルスヘッドの少なくとも一部を含む、キメラアデノウイルス線維タンパク質を含み、ここで、ヘッド領域はCD46に結合する。原発性腫瘍細胞において異種核酸を発現させる方法であって、キメラ線維タンパク質を含むアデノウイルスベクターで該原発性腫瘍細胞を形質導入する工程を包含し、該キメラ線維タンパク質は、サブグループCアデノウイルスシャフト領域の少なくとも一部、およびサブグループBアデノウイルスのヘッド領域の少なくとも一部を含み、該ヘッド領域はCD46に結合する、方法。

Vector designation	Capsid	Fiber Shaft	Fiber Knob	Cartoon
<u>Beta-gal</u>	<u>GFP</u>			
Av1nBg	Ad5-CMV5-GFP	Ad5	Ad5	
Av1nBg-5T35H	Ad5-CMV5-GFP-35F	Ad5	Ad35	
Av1nBg-35F	Ad5-CMV5-GFP-35F	Ad5	Ad35	
Av1nBg-3H	Ad5-CMV5-GFP-3H	Ad5	Ad3	
	Ad5-CMV5-GFP-3H-RGD	Ad5	Ad3	

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

原発性腫瘍細胞において異種核酸を発現させる方法であって、キメラ線維タンパク質を含むアデノウイルスベクターで該原発性腫瘍細胞を形質導入する工程を包含し、該キメラ線維タンパク質は、サブグループ C アデノウイルスシャフト領域の少なくとも一部、およびサブグループ B アデノウイルスのヘッド領域の少なくとも一部を含み、該ヘッド領域は C D 4 6 に結合する、方法。

## 【請求項 2】

前記キメラ線維タンパク質は、A d 5 または A d 2 のシャフトの少なくとも一部、および、A d 3 5 ヘッドの少なくとも一部を含む、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 3】

前記細胞はインビトロにおいて形質導入される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記細胞はインビボにおいて形質導入される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記キメラ線維タンパク質は、配列番号 6 のアミノ酸約 4 6 ~ 1 3 6 を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記キメラ線維タンパク質は、配列番号 2 のアミノ酸約 4 7 ~ 3 9 9 または配列番号 4 のアミノ酸約 4 7 ~ 3 9 9 を含む、請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 7】

前記キメラ線維タンパク質は、配列番号 2 のアミノ酸約 4 7 ~ 3 9 9 または配列番号 4 のアミノ酸約 4 7 ~ 3 9 9 を含む、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記原発性腫瘍細胞は、肺腫瘍細胞、前立腺腫瘍細胞、頭頸部腫瘍細胞、膀胱腫瘍細胞、および腎臓腫瘍細胞からなる群より選択される細胞である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記原発性腫瘍細胞は、非小細胞肺腫瘍細胞である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記アデノウイルスは、前記原発性腫瘍細胞において優先的に複製する、請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 11】

前記アデノウイルスは、複製に必須の少なくとも一つのアデノウイルスコード配列に作動可能に連結された異種転写調節エレメント ( T R E ) を含む、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記 T R E は、細胞特異的 T R E 、細胞状態特異的 T R E および組織特異的 T R E からなる群より選択される、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記 T R E は、P S A T R E 、E 2 F T R E 、テロメラーゼ ( T E R T ) T R E 、ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子 ( u P A ) T R E 、プロバシン T R E 、チロシナーゼ関連タンパク質 - 2 T R E 、M A R T - 1 T R E 、C R G L 2 T R E 、および P R L - 3 タンパク質チロシンホスファターゼ T R E からなる群より選択される、請求項 11 に記載の方法。

40

## 【請求項 14】

前記アデノウイルスコード配列は、E 1 a 、E 1 b 、E 2 a 、E 2 b 、および E 4 からなる群より選択されるアデノウイルスコード領域にある、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記アデノウイルスは、E 1 B 1 9 - k D a 領域の一部または全部の欠失を含む、請求項 10 に記載の方法。

50

**【請求項 16】**

前記アデノウイルスは、複製に必須のアデノウイルスコード配列の欠失を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 17】**

前記アデノウイルスは、前記原発性腫瘍細胞において複製不能である、請求項 16 に記載の方法。

**【請求項 18】**

前記複製に必須のアデノウイルスコード配列は、E 1 a、E 1 b、E 2 a、E 2 b、および E 4 からなる群より選択される、請求項 17 に記載の方法。

**【請求項 19】**

前記アデノウイルスは、少なくとも 1 個のアデノウイルス E 3 コード配列の欠失を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 20】**

前記アデノウイルス E 3 コード配列は、19 K、14.7 K、14.5 K、12.5 K、11.6 K、10.4 K、および 6.7 K の E 3 タンパク質のコード配列からなる群より選択される、請求項 19 に記載の方法。

**【請求項 21】**

E 3 コード配列の全てが欠失している、請求項 19 に記載の方法。

**【請求項 22】**

前記アデノウイルスは、10.4 K、14.5 K、および 14.7 K の E 3 コード配列を含む、請求項 19 に記載の方法。

**【請求項 23】**

前記アデノウイルスは、天然の E 3 コード配列を全て含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 24】**

前記アデノウイルスは、調節エレメントに作動可能に連結された GM - CSF コード配列を含み、GM - CSF は前記原発性腫瘍細胞において発現される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 25】**

前記 GM - CSF コード配列は、ヒトの配列である、請求項 24 に記載の方法。

**【請求項 26】**

前記形質導入された腫瘍細胞を不活性化する工程、および該形質導入された原発性腫瘍細胞を哺乳動物に投与する工程をさらに包含する、請求項 24 に記載の方法。

**【請求項 27】**

前記腫瘍細胞は、前記哺乳動物に対して自己の細胞である、請求項 26 に記載の方法。

**【請求項 28】**

前記腫瘍細胞は、前記哺乳動物に対して同種異系の細胞である、請求項 26 に記載の方法。

**【請求項 29】**

前記哺乳動物は、前記形質導入腫瘍細胞と同じタイプの腫瘍細胞を含む、請求項 26 に記載の方法。

**【請求項 30】**

前記哺乳動物はヒトである、請求項 29 に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

(関連出願の引用)

本出願は、2004 年 8 月 25 日出願の米国仮出願第 60 / 604 , 009 号の優先権の利益を主張する。米国仮出願第 60 / 604 , 009 号は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

**【0002】**

10

20

30

40

50

( 発明の背景 )

( 発明の分野 )

本発明は、キメラ線維タンパク質を含み、非キメラアデノウイルスベクターと比べて、腫瘍細胞、特に、原発性腫瘍細胞への形質導入の強化を示すアデノウイルスベクターに関する。

【背景技術】

【 0 0 0 3 】

( 技術の背景 )

遺伝子治療は、外因性ヌクレオチド配列を細胞に供給する手段としての機能を果たし、もっとも革新的で強力な可能性がある疾患治療ツールの内、いくつかのツールの基礎である。このアプローチは、がんだけでなく、嚢胞性線維症、貧血症、血友病、糖尿病、ハンティングトン病、AIDS、異常に高い血清コレステロールレベル、特定の免疫不全、および様々な形のがんを含めた他の多くの疾患の処置に大きな可能性を持つ。遺伝子治療は、一般に、外因性配列を細胞に供給するために、送達ビヒクル、例えば、ウイルスベクターに依存する。これらの疾患に対しては、組み換えアデノウイルスベクターが、ある程度の治療効力を示した。概説については、非特許文献 1、および非特許文献 2 を参照のこと。

10

【 0 0 0 4 】

アデノウイルスベクターには主要な 2 つのタイプがある。複製不能 ( r e p l i c a t i o n - i n c o m p e t e n t ) ( 複製欠損 ) 型および複製可能型 ( r e p l i c a t i o n - c o m p e t e n t ) である。伝統的に、複製欠損ベクターは、複製に必須の 1 種以上の遺伝子を欠く。これらの複製不能ウイルスは、欠けている必須遺伝子を補う細胞において増殖される。インビトロおよびインビボで細胞に形質導入し、各種導入遺伝子を発現させるために、複製不能型アデノウイルスベクターが広く使われている。伝統的に、複製可能型アデノウイルスベクターは、複製に必須のアデノウイルス遺伝子がどれも欠けていないので、特定の細胞において選択的に複製されるように操作され得る。

20

【 0 0 0 5 】

免疫系は、多種多様ながんの病因において決定的に重要な役割を果たす。がんが進行する場合、免疫系は十分には反応できないか、または適切に反応できず、そのためにがん細胞の増殖を許すと広く考えられている。最近、がんの標準的医療処置 ( 化学療法、手術、放射線療法、および細胞治療が挙げられる ) が、効力および毒性の両面において明らかな限界に来ている。今日まで、これらのアプローチは、がんのタイプ、患者の一般的健康状態、診断時における疾患の段階等に応じて程度の差はあれ成功を収めてきた。がんに対する免疫応答の特異的操作を標準的医療処置と組み合わせた改善された戦略は、効力を強化し毒性を下げる手段を提供し得る。

30

【 0 0 0 6 】

ここしばらくの間、抗腫瘍免疫を増強するためのワクチンとして自己のがん細胞を用いる方法が研究されている ( 非特許文献 3 ~ 5 ) 。

【 0 0 0 7 】

腫瘍に対する免疫応答の調節には数多くのサイトカインが役割を果たしていることが明らかにされている。例えば、特許文献 1 は、既存の腫瘍と戦うための、相乗的に効果的な量の TNF、IL - 2、および IFN - の組み合わせの使用を記載する。特許文献 2 ~ 特許文献 4 は、腫瘍の処置のための GM - CSF の使用を記載する。しかしながら、サイトカインはしばしば全身毒性であるので、がん治療のためのサイトカインの直接投与は、実用的でない可能性がある ( 例えば、非特許文献 6、および非特許文献 7 を参照のこと ) 。

40

【 0 0 0 8 】

このアプローチを拡張したものとしては、ワクチン部位においてサイトカインを局所的に発現する遺伝子改変された腫瘍細胞の使用が挙げられる。様々な免疫調節性サイトカイン ( それぞれ、非特許文献 8 ; 非特許文献 9 ; 非特許文献 10 ; 非特許文献 11 ; 非特許

50

文献 12 ; 非特許文献 13 ; 非特許文献 14 ; 非特許文献 15 ; 非特許文献 16 ; 非特許文献 17 ; 非特許文献 18 ; および非特許文献 19 に記載される通り、IL - 4、IL - 2、TNF - 、G - CSF、IL - 7、IL - 6、および、GM - CSF が挙げられる ) を用いた腫瘍モデルにおいて活性が証明されている。

【 0 0 0 9 】

GM - CSF を発現する自己または同種異系細胞ワクチン ( GVAX ( 登録商標 ) ) を用いた臨床試験が、前立腺がん、メラノーマ、肺がん、膵臓がん、腎臓がん、および多発性骨髄腫の処置に関して始まっている ( 非特許文献 20 ; 非特許文献 21 ; 非特許文献 22 ; 非特許文献 23 ; 非特許文献 24 ; および非特許文献 25 ) 。

【特許文献 1】米国特許第 5 , 0 9 8 , 7 0 2 号明細書

10

【特許文献 2】米国特許第 5 , 0 7 8 , 9 9 6 号明細書

【特許文献 3】米国特許第 5 , 6 3 7 , 4 8 3 号明細書

【特許文献 4】米国特許第 5 , 9 0 4 , 9 2 0 号明細書

【非特許文献 1】Kim et al . ( 1996 ) Mol . Med . Today 12 : 519 - 527

【非特許文献 2】Smith et al . ( 1996 ) Gene Therapy 3 : 496 - 502

【非特許文献 3】Oettgen et al . , 「The History of Cancer Immunotherapy」, Biologic Therapy of Cancer , Devita et al . ( 編 ) J . Lippincot Co . , pp 87 - 199 , 1991

20

【非特許文献 4】Armstrong , TD and Jaffee EM , Surg Oncol Clin N Am . 11 ( 3 ) : 681 - 96 , 2002

【非特許文献 5】Bodey B et al . , Anticancer Res 20 ( 4 ) : 2665 - 76 , 2000

【非特許文献 6】Asher et al . , J . Immunol . 146 : 3227 - 3234 , 1991

【非特許文献 7】Havell et al . , J . Exp . Med . 167 : 1067 - 1085 , 1988

【非特許文献 8】Golumbeck PT et al . , Science 254 : 13 - 716 , 1991

30

【非特許文献 9】Gansbacher B et al . , J . Exp . Med . 172 : 1217 - 1224 , 1990

【非特許文献 10】Fearon ER et al . , Cell 60 : 397 - 403 , 1990

【非特許文献 11】Gansbacher B et al . , Cancer Res . 50 : 7820 - 25 , 1990

【非特許文献 12】Teng M et al . , PNAS 88 : 3535 - 3539 , 1991

【非特許文献 13】Columbo MP et al . , J . Exp . Med . 174 : 1291 - 1298 , 1991

40

【非特許文献 14】Aoki et al . , Proc . Natl . Acad . Sci . USA . 89 ( 9 ) : 3850 - 4 , 1992

【非特許文献 15】Porgador A . , et al . , Nat Immun . 13 ( 2 - 3 ) : 113 - 30 , 1994

【非特許文献 16】Dranoff G . et al . , PNAS 90 : 3539 - 3543 , 1993

【非特許文献 17】Lee CT et al . , Human Gene Therapy 8 : 187 - 193 , 1997

【非特許文献 18】Nagai E et al . , Cancer Immunol . I

50

mm on t h e r . 4 7 : 2 - 8 0 , 1 9 9 8

【非特許文献19】Chang A et al., Human Gene Therapy 11: 839 - 850, 2000

【非特許文献20】Dummer R., Curr Opin Investig Drugs 2(6): 844 - 8, 2001

【非特許文献21】Simons J et al., Cancer Res. 15; 59(20): 5160 - 8, 1999

【非特許文献22】Soiffer R et al., PNAS 95: 13141 - 13146, 1998

【非特許文献23】Simons et al., Cancer Res. 15; 57: 1537 - 1546, 1997 10

【非特許文献24】Jaffee E et al., J. Clin Oncol. 19: 145 - 156, 2001

【非特許文献25】Salgia R et al., J. Clin Oncol. 21: 624 - 630, 2003

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

腫瘍細胞に形質導入するために従来からアデノウイルスベクターが使用されているが、原発性腫瘍細胞への形質導入は一般に非効率的であった。従って、腫瘍細胞、特に原発性腫瘍細胞への形質導入の効率の向上が求められている。 20

【課題を解決するための手段】

【0011】

(発明の要旨)

本発明は、キメラ線維タンパク質を有するアデノウイルスを腫瘍細胞に形質導入することによって該腫瘍細胞において異種核酸を発現させるための組成物および方法を提供し、ここで、このキメラ線維タンパク質は、サブグループBアデノウイルスまたは血清型37アデノウイルスのヘッドの少なくとも一部、およびサブグループCアデノウイルスまたはウシアデノウイルスの線維シャフトの少なくとも一部を含む。一つの実施態様では、腫瘍細胞は、インビトロ、エキソビボ、またはインビボにおいて形質導入される。ある好ましい実施態様では、腫瘍細胞は、原発性腫瘍細胞である。 30

【0012】

本発明を実施するに際しては、アデノウイルスは、複製可能(すなわち、腫瘍崩壊性)であってもよいし、あるいは複製不能であってもよく、そして、導入遺伝子をコードしてもよいし、またはコードしていなくともよい。

【0013】

従って、一つの局面では、選択的細胞溶解の方法、すなわち、細胞集団における新生物細胞を殺傷する方法であって、本発明の複製可能ウイルスベクターおよび/またはウイルス粒子の有効量を、該ウイルスベクターおよび/または粒子が新生物細胞において選択的に複製し該新生物細胞を殺傷する条件下で、この細胞集団と接触させることを含む方法が提供される。細胞集団は、インビボ、インビトロ、または、エキソビボの環境に存在し得る。 40

【0014】

一つの局面では、本発明は、腫瘍細胞において、導入遺伝子、例えば、サイトカイン(例えばGM-CSF)を発現する方法を提供する。ある好ましい局面では、腫瘍細胞は原発性腫瘍細胞である。さらに、腫瘍ワクチンを作製する方法が提供される。また、本発明の腫瘍ワクチンを哺乳動物に送達する方法も提供される。

【0015】

本発明は、アデノウイルス粒子であって、標的リガンドがこの粒子のキャプシドタンパク質に含まれるアデノウイルス粒子をさらに提供する。さらなる実施態様では、このキャ 50

プシドタンパク質は線維タンパク質であり、リガンドは、この線維タンパク質のC末端またはHIループにある。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

(発明の詳細な説明)

本発明は、キメラ線維タンパク質を有するアデノウイルスによって腫瘍細胞に形質導入することにより、該腫瘍細胞において異種核酸(例えば、導入遺伝子)を発現させるためのアデノウイルス組成物および方法を提供する。その際、キメラ線維タンパク質は、サブグループBアデノウイルスまたは血清型37アデノウイルスのヘッドの少なくとも一部、および、サブグループCアデノウイルスまたはウシアデノウイルス線維シャフトの少なくとも一部を含む。一つの実施態様では、キメラ線維タンパク質は、Ad5またはAd2シャフトの少なくとも一部、および、Ad35ヘッドの少なくとも一部を含む。典型的には、腫瘍細胞は原発性腫瘍細胞である。

10

【0017】

理論または機構によって縛られることを望むものではないが、本発明は、Ad5またはAd2シャフト(またはテール)領域、およびAd35ヘッド(ノブ)領域を有するキメラ線維を含むアデノウイルスベクターの方が、Ad2、Ad5、またはAd35の自然のままの線維を有するものよりも、ある種のがん細胞に対しより効率的に形質導入するという所見に基づく。特に興味あるのは、第1血清型の線維シャフトと第2血清型の線維ヘッドを有するキメラアデノウイルス(例えば、Ad5またはAd2シャフト(テール)、および、サブグループBアデノウイルスまたは血清型37アデノウイルスのヘッドを有するアデノウイルス)は、単一血清型の非キメラアデノウイルスよりも効率的に原発性腫瘍細胞に形質導入する能力を持つことである。本発明のキメラアデノウイルスベクターによってより効率的に形質導入される、腫瘍細胞の非限定的例としては、肺腫瘍細胞、前立腺腫瘍細胞、頂頸部腫瘍細胞、膀胱腫瘍細胞、および腎臓腫瘍細胞が挙げられる。腫瘍細胞への形質導入は、マーカー遺伝子(例えば、ベータ-ガラクトシダーゼまたはGFP)の発現によって測定されるが、本発明のアデノウイルスには、任意の導入遺伝子を含めること、および発現させることが可能である。

20

【0018】

Ad5はサブグループCアデノウイルスであり、Ad35はサブグループBウイルスである。アデノウイルス血清型3(Sirena et al., J. Virol. 2004 May; 78(9): 4454-62)、11、14、16、21、35、37、および50と同様、Ad35線維ヘッド領域はCD46に結合する。Ad37は、アデノウイルスサブグループDに属する。本発明の好ましい実施態様は、サブグループCアデノウイルス、例えば、Ad2またはAd5の線維シャフト、および、CD46に結合する、アデノウイルスのヘッドを有する。

30

【0019】

本発明の実施は、別様に指示しない限り、従来技術の能力の範囲にある、化学、分子生物学、微生物学、組み換えDNA、遺伝学、免疫学、細胞生物学、細胞培養、およびトランスジェニック生物学の通例の技術を用いる。例えば、Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Sambrook and Russel, 2001, Molecular Cloning, 3rd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Ausubel et al., 1992, Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, 定期的な更新

40

50

を含む) ; Glover , 1985 , DNA Cloning ( IRL Press , Oxford ) ; Anand , 1992 , Techniques for the Analysis of Complex Genomes , Academic Press , New York ; Guthrie and Fink , 1991 , Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology , Academic Press , New York ; Harlow and Lane , 1988 , Antibodies , ( Cold Spring Harbor Laboratory Press , Cold Spring Harbor , New York ) ; Jakoby and Pastan , 1979 ; Nucleic Acid Hybridization ( B. D. Hames & S. J. Higgins eds . 1984 ) ; Transcription and Translation ( B. D. Hames & S. J. Higgins eds . 1984 ) ; Culture of Animal Cells ( R. I. Freshney , Alan R. Liss , Inc . , 1987 ) ; Immobilized Cells and Enzymes ( IRL Press , 1986 ) ; B. Perbal , A Practical Guide To Molecular Cloning ( 1984 ) ; 学位論文、Methods In Enzymology ( Academic Press , Inc . , N. Y . ) ; Gene Transer Vectors For Mammalian Cells ( J. H. Miller and M. P. Calos eds . , 1987 , Cold Spring Harbor Laboratory ) ; Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology ( Mayer and Walker , eds . , Academic Press , Londong , 1987 ) ; Handbook of Experimental Immunology , Volumes I - IV ( D. M. Weir and C. C . Blackwell , eds . , 1986 ) ; Riott , Essential Immunology , 6th Edition , Blackwell Scientific Publications , Oxford , 1988 ; Hogan et al . , Manipulating the Mouse Embryo , ( Cold Spring Harbor Laboratory Press , Cold Spring Harbor , N. Y . , 1986 ) 。

#### 【 0020 】

##### ( 定義 )

別様に指示しない限り、本明細書で用いる用語は全て、当業者に対する意味と同じ意味を持ち、本発明の実施は、微生物学および組み換えDNA技術において、当業者の知識の範囲内に含まれる、通例の技術を用いる。

#### 【 0021 】

本明細書に引用される出版物およびその他の資料、すなわち、全ての特許、特許出願、公報 ( 公開特許出願を含む ) 、およびデータベースアクセス番号を含む資料は、本発明の背景、特に、実施に関するさらなる詳細を与える事例を具体的に明らかにするために用いられる。本明細書に引用される出版物およびその他の資料、すなわち、全ての特許、特許出願、公報 ( 公開特許出願を含む ) 、およびデータベースアクセス番号を含む資料は、参照することにより、それぞれその全体が本明細書に含まれる。

#### 【 0022 】

本発明を記述するに際して、下記の用語が用いられるが、後述のように定義されることが意図される。

#### 【 0023 】

略語「p f u」は、ブランク形成単位を表す。

#### 【 0024 】

用語「ウイルス」、「ウイルス粒子」、「ベクター粒子」、「ウイルスベクター粒子」、および「ビリオン」は、相互交換的に用いられ、感染性ウイルス粒子、例えば、本発明



のウイルスベクターが、感染性粒子生成のために適切な細胞または細胞株の中に形質導入された場合に形成される、感染性ウイルス粒子を広く意味するものと理解されなければならない。本発明によるウイルス粒子は、インビトロかインビボのいずれかにおいてDNAを細胞に転送するために利用されてもよい。本発明の目的のためには、これらの用語は、アデノウイルス、本発明のアデノウイルスベクターがアデノウイルスキャプシドに被覆された場合に形成される組み換えアデノウイルスを含むアデノウイルスを指す。

#### 【0025】

本明細書で呼ばれる「アデノウイルスベクター」または「アデノウイルス様ベクター」（相互交換的に使用される）とは、アデノウイルス様ビリオンにパックされるポリヌクレオチド構築物である。いくつかの実施態様では、本発明のアデノウイルス様ベクターは、治療遺伝子配列、例えばサイトカイン遺伝子配列を含む。本発明の、例示のアデノウイルス様ベクターは、DNA、アデノウイルスコートに被覆されたDNA、別のウイルスまたはウイルス様形態（例えば、単純ヘルペス、およびAAV）にパックされたアデノウイルスDNA、リボソームに被覆されたアデノウイルスDNA、ポリリシンと複合体を形成するアデノウイルスDNA、合成ポリカチオン分子と複合体を形成するアデノウイルスDNA、トランスフェリンと接合体を形成するアデノウイルスDNA、または、抗原性を免疫学的に「マスク」するために、および/または、半減期を増すために、PEGのような化合物と複合体を形成するアデノウイルスDNA、あるいは、非ウイルス性タンパク質と接合体を形成するアデノウイルスDNAを含むが、ただしこれらに限定されない。

#### 【0026】

本発明のアデノウイルス様ベクターに関連して、本明細書で用いられる「複製可能」という用語は、本発明のアデノウイルス様ベクターと粒子とは、ある種の細胞または組織では好んで複製するが、別の種類のものではその程度が劣るか、全く複製しないことを意味する。本発明の一つの実施態様では、アデノウイルス様ベクターおよび/または粒子は、腫瘍細胞および/または異常増殖細胞、例えば、固形腫瘍およびその他の新生物において選択的に複製する。そのようなベクターまたは粒子としては、米国特許第5,677,178、5,698,443、5,871,726、5,801,029、5,998,205、および6,432,700号、および国際公開WO95/19434、WO98/39465、WO98/39467、WO98/39466、WO99/06576、WO98/39464、およびWO00/15820によって開示されるものが挙げられる。このようなウイルスは、「腫瘍崩壊性ウイルス」または「腫瘍崩壊性ベクター」と呼ばれてもよく、「細胞溶解性」または「細胞病原性」と見なしてもよく、標的細胞の選択的「細胞溶解」を実行すると考えてもよい。

#### 【0027】

本明細書で用いる「ウイルスベクター」という用語は、従来技術で認知済みの意味に従って使用される。この用語は、ウイルス起源を持つ少なくとも一つの要素を含み、ウイルスベクター粒子にパックされてもよい核酸ベクター構築物を指す。このウイルスベクターおよび/または粒子は、インビトロまたはインビボのいずれかにおいて、DNA、RNA、または他の核酸を細胞中に転送する目的のために利用されてもよい。アデノウイルス様ベクターを含む様々な形のウイルスベクターが従来技術で知られる。

#### 【0028】

あるアデノウイルス様ベクターに関連して使用される場合「由来の」という用語は、そのアデノウイルス様ベクターゲノムと相同の、アデノウイルス血清型を意味する。多くの場合、アデノウイルスゲノムの大部分は一つの血清型から到来するものであり、この場合、アデノウイルスベクターは、一つの血清型由来であると言われる。アデノウイルス様ベクターゲノムが、第2血清型から、ただ一つのアデノウイルスコード配列を持つ場合、このアデノウイルス様ベクターは、第1アデノウイルス血清型からのみ由来すると言われる。

#### 【0029】

「キメラ線維タンパク質」という用語は、天然の線維アミノ酸配列の一部に加えて、ま

10

20

30

40

50

たは、一部に代えて、非天然のアミノ酸配列を含むアデノウイルス線維タンパク質を指す。非天然アミノ酸配列は、異なる血清型のアデノウイルス線維タンパク質からのものであってもよい。非点念アミノ酸配列は、適切なものであれば任意の長さを持っていてよい（例えば、3から約200アミノ酸）。例示の「キメラ線維タンパク質」は、一つのアデノウイルス血清型由来のシャフトと、異なるアデノウイルス血清型由来のヘッドとを持つ。

【0030】

「ベクター」、「ポリヌクレオチドベクター」、「ポリヌクレオチドベクター構築物」、「核酸ベクター構築物」、および「ベクター構築物」という用語同士は、本明細書では、当業者によって理解されるものと同じ意味で遺伝子転送のための任意の核酸構築物を意味するために相互交換的に使用される。

10

【0031】

「複製のために必須の遺伝子」という用語は、ウイルスが標的細胞で複製するためには、その転写が必要であるヌクレオチド配列を指す。例えば、本発明のアデノウイルスベクターでは、複製のために必須の遺伝子は、E1a、E1b、E2a、E2b、およびE4遺伝子からなる群から選ばれてもよい。

【0032】

本明細書で用いる「パッケージング細胞」とは、アデノウイルスゲノムまたは改変ゲノムをパックして、ウイルス粒子を生成することが可能な細胞である。この細胞は、欠失遺伝子産物、またはその等価物を供給することが可能である。従って、パッケージング細胞は、アデノウイルスゲノムにおいて欠失した遺伝子のための補償機能を果たすことが可能であり、アデノウイルスゲノムをパックして、アデノウイルス粒子とすることが可能である。このような粒子の産生は、ゲノムが複製され、かつ、成分を取り集めて感染性ウイルスとするのに必要なタンパク質が生産されることを必要とする。この粒子はまた、該ウイルス粒子の成熟に必要なある種のタンパク質を必要とすることがある。このようなタンパク質は、ベクターによって、またはパッケージング細胞によって供給することが可能である。

20

【0033】

「HeLa-S3」という用語は、米国基準菌株保存機関(ATCC、Manassas、バーモント州)から入手が可能で、ATCC番号CCL-2.2と表示される、ヒト頸部腫瘍由来細胞株を意味する。HeLa-S3は、1955年にT. T. Puck等によってクローンされた(J. Exp. Med. 103: 273-284 (1956))。

30

【0034】

本明細書で用いる「自己プロセッシング切断部位」または「自己プロセッシング切断配列」は、DNAまたはアミノ酸配列であって、その翻訳時または翻訳される際に、自己プロセッシング切断部位を含むポリペプチドの速やかな分子内(cis)切断が起こり、それぞれ別々の成熟タンパク質またはポリペプチド産物の発現をもたらすDNAまたはアミノ酸配列である。このような「自己プロセッシング切断部位」はまた、翻訳後、または翻訳時処理切断部位、例えば、2A部位、配列、またはドメインと呼ばれてもよい。2A部位、配列、またはドメインは、リボソームの活性を改変してエステル結合の加水分解を増進し、それによって、ある1個の下流翻訳産物の合成の進行を可能とするやり方で、翻訳複合体からポリペプチドを放出する(Donnelly, 2001)。それとは別に、2A部位、配列、またはドメインは、自身のC末端をシスにおいて切断することによって「自己タンパク質分解」または「切断」を示し、一次切断産物を生産する(Furler; Palmenberg, Ann. Rev. Microbiol. 44: 603-623 (1990))。

40

【0035】

「核酸」という用語は、1本鎖形または2本鎖形のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド、およびそのポリマー(「ポリヌクレオチド」)を指す。特に限定されない限り、この用語は、参照核酸と近似の結合特性を有する、天然ヌクレオチドの既知の類縁体を含む核酸を含み、天然に見られるヌクレオチドと同様のやり方で代謝される。別様

50

に指示されない限り、ある特定の核酸分子および／またはポリヌクレオチドはまた、明白に表示される配列の外に、その保存的に改変された変異種（例えば、縮重コドン置換体）、および相補的配列をも含む。特に、縮重コドン置換体は、１個以上の選択された（または全ての）コドンの第３位置が、混合塩基および／またはデオキシイノシン残基によって置換される配列を生成することによって実現される（Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260: 2605 - 2608 (1985); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8: 91 - 98 (1994)）。ヌクレオチドは、その塩基によって、下記の標準的略語、すなわち、アデニン（A）、シトシン（C）、チミン（T）、およびグアニン（G）に基づいて表される。

10

#### 【0036】

核酸は、別の核酸と機能的な関係に置かれた場合、「動作的に結合される。」例えば、プロモーター、または調節的DNA配列は、RNAおよび／またはタンパク質をコードするDNA配列に対し、この二つのヌクレオチド配列が動作的に結合、または配置され、その結果、プロモーターまたは調節的DNA配列が、コード、または構造的DNA配列の発現レベルに影響を及ぼすように配置された場合、該DNA配列に「動作的に結合される」と言われる。動作的に結合されたDNA配列同士は、通常隣接するが、必ずしも隣接していなくともよい。

#### 【0037】

「コード配列」および「コード領域」という用語は、RNA、例えば、mRNA、rRNA、tRNA、snRNA、センスRNA、またはアンチセンスRNAに転写されるヌクレオチド配列を指す。一つの実施態様では、RNAは次に細胞内で翻訳されてタンパク質を生産する。

20

#### 【0038】

「ORF」は、オープンリーディングフレームを意味する。

#### 【0039】

「遺伝子」という用語は、ゲノム内に存在する定義された領域で、前述のコード配列の外に、コード部分の発現、すなわち、その転写および翻訳の調節に与る、他の、主に調節的ヌクレオチド配列を含む領域を指す。遺伝子はまた、他の5'および3'非翻訳配列および終結配列を含んでもよい。遺伝子の供給源に依存するが、さらにその他に存在する可能性のあるエレメントは、例えば、イントロンである。

30

#### 【0040】

核酸分子、例えば、プロモーターおよび遺伝子コード配列の参照の下に本明細書で用いる「異種性」および「外来性」という用語は、ある特定のウイルス、または宿主細胞に対して外来の供給源から得られたヌクレオチド配列、あるいは、供給源が同じ場合には、元の形から改変されたヌクレオチド配列を指す。従って、ウイルスまたは細胞における異種遺伝子は、その特定のウイルスにとって内因性ではあるが、例えば、コドン最適化を通じて改変された遺伝子を含む。この用語はまた、天然に見られるヌクレオチド配列の、非天然的に起こる複数コピーを含む。従って、本用語は、ウイルスまたは細胞に対して外来の、または異種の核酸分節、あるいは、ウイルスまたは細胞に対して同種ではあるが、宿主ウイルスまたは細胞ゲノムにおいて、通常は認められない位置にある核酸分節を指す。

40

#### 【0041】

核酸分子参照の下に本明細書で用いる「相同的」という用語は、天然状態で宿主ウイルスまたは細胞と連結するヌクレオチド配列を指す。

#### 【0042】

「相補体」および「相補的」という用語は、逆平行ヌクレオチド配列を含む、二つのヌクレオチド配列であって、その逆平行ヌクレオチド配列の相補的塩基残基の間に水素結合を形成することによって相互に対合することが可能な二つのヌクレオチド配列を指す。

#### 【0043】

「天然」という用語は、野生型ウイルスまたは細胞のゲノム中に存在する遺伝子または

50

タンパク質を指す。

【 0 0 4 4 】

「天然に見られる」または「野生型」という用語は、ヒトによって人工的に生産されるのとは違って、天然に認められる対象物を記載するのに用いられる。例えば、生物体（ウイルスを含む）中に存在し、天然の供給源から単離することが可能であるが、実験室でヒトによって意図的に改変されることのないタンパク質またはヌクレオチド配列は天然に見られるものである。

【 0 0 4 5 】

本明細書で用いる「標的化リガンド」という用語は、所望の細胞タイプおよび/または組織に向けてアデノウイルス粒子を積極的に指向させる化学的機能基を指す。このようなリガンドのカテゴリーとしては、ペプチド、ポリペプチド、1本鎖抗体、およびマルチマータンパク質が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。特異的リガンドとしては、腫瘍壊死因子（またはTNF）、例えば、TNF-アルファおよびTNF-ベータを含むリガンドのTNFスーパーファミリー、リンフォトキシン（LT）、例えば、LT-アルファおよびLT-ベータ、Fas抗原に結合するFasリガンド；Bリンパ球のCD40受容体に結合するCD40リガンド；ホジキンリンパ腫の新生物細胞のCD30受容体に結合するCD30リガンド；CD27リガンド、NGFリガンド、およびOX-40リガンド；腫瘍細胞、活性化T細胞、および神経組織細胞に局在するトランスフェリン受容体に結合するトランスフェリン；肝臓細胞のLDL受容体に結合するApoB；肝臓細胞のLRP受容体に結合するアルファ-2-マクログロブリン；肝臓のアシアロ糖タンパク質受容体に結合するアルファI酸性糖タンパク質；マクロファージのマンノース受容体に結合するマンノース含有ペプチド；活性化内皮細胞のELAM-1受容体に結合するシアリル-ルイス-X抗原含有ペプチド；造血先駆細胞のCD34受容体に結合するCD34リガンド；リンパ球のLFA-I（CD11b/CD18）受容体、または、マクロファージのMac-I（CD11a/CD18）受容体に結合するICAM-I；脾臓および骨髄マクロファージのc-fms受容体に結合するM-CSF；肝臓細胞の肝熱帯熱マラリア原虫に結合するスポロゾイト辺縁タンパク質；活性化内皮細胞のVCAM-I受容体に結合するVLA-4；Tヘルパー細胞のCD4受容体に結合するHIVgp120およびクラスII MHC抗原；アポ脂質タンパク質E（ApoE）分子のLDL受容体結合領域；CSF受容体に結合するコロニー刺激因子、またはCSF；インスリン様増殖因子であって、例えば、それぞれIGF-IおよびIGF-IIに結合するIGF-IおよびIGF-II；それぞれインターロイキン1から14までの受容体に結合するインターロイキン1から14まで；免疫グロブリンのFv抗原結合部位；ゼラチナーゼ（MMP）阻害剤；ボンベスチン、ガストリン放出ペプチド；P物質；ソマトスタチン；黄体ホルモン放出ホルモン（LHRH）；血管作動性ポリペプチド（VIP）；ガストリン；メラノサイト刺激ホルモン（MSH）；環状RGDペプチド、および他の任意のリガンド、または細胞表面タンパク質結合（または標的化）分子が挙げられる。本発明の一つの実施態様では、ペプチド標的化リガンドが、アデノウイルス様ベクターのキャプシドタンパク質、通常、アデノウイルス様ベクターの線維タンパク質中に挿入される。

【 0 0 4 6 】

核酸分子参照の下に本明細書で用いる「組み換え」という用語は、複数の核酸分子であって、組み換えDNA技術を用いて結合されて先駆核酸分子となる核酸分子の組み合わせを指す。ウイルス、細胞、および生物体を参照しながら本明細書で用いる場合、「組み換え」、「形質転換」、および「トランスジェニック」という用語は、異種核酸分子が導入された、宿主ウイルス、細胞、または生物体を指す。この核酸分子は、宿主のゲノム中に安定に取り込まれるか、あるいは、この核酸分子は、染色体外分子として存在することも可能である。このような染色体外分子は自己複製することも可能である。組み換えウイルス、細胞、および生物体は、形質変換過程の最終産物ばかりでなく、その組み換え先駆体を含むものと理解される。「非形質変換」、「非トランスジェニック」、または「非組み換え」宿主とは、異種核酸分子を含まない、野生型のウイルス、細胞、または生物体を指

10

20

30

40

50

す。

【0047】

「調節エレメント」とは、核酸発現の調節に関与する核酸配列である。調節エレメントとしては、プロモーター、エンハンサー、および終結信号が挙げられる。これらは、通常、ヌクレオチド配列の適切な翻訳のために必要とされるヌクレオチド配列を含む。

【0048】

「プロモーター」という用語は、通常コード領域の上流に位置し、RNAポリメラーゼIIに対する結合部位を含み、DNAの転写を開始する、非翻訳DNA配列を指す。プロモーター領域はまた、遺伝子発現の調節因子として作動する他のエレメントも含んでもよい。「最小プロモーター」という用語は、不活性で、上流の活性化エレメントが不在の場合にはプロモーターの活性を大きく減じてしまうプロモーターエレメント、特にTATAエレメントを指す。

10

【0049】

本発明の意味における「エンハンサー」という用語は、任意の遺伝エレメント、例えば、ヌクレオチド配列であって、プロモーターに動作的に連結するコード配列の転写を、該コード配列に動作的に連結された場合、プロモーター自体によって実行される転写活性化よりも増大させる、すなわち、プロモーターからの転写を増大させる、任意の遺伝エレメントであってもよい。

【0050】

「発現」という用語は、細胞中の内因性遺伝子、導入遺伝子、またはコード領域の転写および/または翻訳を指す。アンチセンス構築物の場合、発現は、アンチセンスDNAのみの転写を指してもよい。

20

【0051】

本明細書で用いる「上方調節」とは、ある特定の遺伝子について、別の細胞に比べて、より大量のRNAが標的細胞において検出されることを意味する。例えば、腫瘍細胞が、非腫瘍細胞に比べてより多量のテロメラーゼRNAを生産する場合、該腫瘍細胞は、テロメラーゼの発現を上方調節したわけである。標的細胞（例えば、腫瘍細胞）における特定RNAの量が、別の細胞（非腫瘍細胞）の量よりも少なくとも3倍高ければ、発現は上方調節されると考えられる。別の実施態様では、特定RNAの量は少なくとも5倍より多い。別の実施態様では、特定RNAの量は少なくとも10倍多い。当業者であれば、ある特定のRNA配列についてRNAレベルを測定する方法（例えば、ノーザンアッセイ）を知っている。

30

【0052】

本明細書で用いる「腫瘍選択的プロモーター活性」という用語は、腫瘍細胞における、本発明のプロモーター断片のプロモーター活性は、非腫瘍細胞タイプの活性よりも高いことを意味する。

【0053】

本明細書で用いる「内部的リボソーム進入部位」または「アイレス(IRES)」とは、シストロン(タンパク質コード領域)の開始コドン、例えば、ATGに対する内部的リボソーム直接進入を促進し、それによって遺伝子のキャップ独立性翻訳を実現するエレメントを指す。Jackson RJ, Howell MT, Kaminski A (1990) Trends Biochem Sci 15(12): 477-83) および Jackson RJ and Kaminski, A. (1995) RNA 1(10): 985-1000)。本発明は、シストロンの開始コドンへの内部的リボソーム直接進入を促進することが可能な、任意のIRESエレメントの使用を含む。本発明で用いる「IRESの翻訳調節下」とは、翻訳がIRESと連結し、キャップ独立的に進行することを意味する。従来技術で既知の「IRES」の例としては、ピコルナウイルスから獲得可能なIRES (Jackson et al., 1990, Trends Biochem Sci 15(12): 477-483); およびウイルスまたは細胞mRNA供給源、例えば、免疫グロブリン重鎖結合タンパク質(BiP)、血管内皮細胞増殖因子(

40

50

VEGF) (Huez et al. (1998) Mol. Cell. Biol. 18 (11): 6178 - 6190)、線維芽細胞増殖因子2およびインスリン様増殖因子、翻訳起動因子eIF4G、酵母転写因子TFIIDおよびHAP4が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。「IRES」はまた、様々なウイルス、例えば、カルジオウイルス、ライノウイルス、アフトウイルス、HCV、フレンドのネズミ白血病ウイルス(FrMLV)とモロニーのネズミ白血病ウイルス(MoMLV)においても報告されている。本明細書で用いる「IRES」は、IRES配列の機能的変異種であって、その変異種が、シストロンの開始コドンにたいする内部的リボソーム直接進入を促進可能なものである限り、該変異種を含む。好ましい実施態様では、IRESは哺乳類由来である。別の実施態様では、IRESはウイルスまたは原虫由来である。本明細書に開示される一つの例示の実施態様では、IRESは、脳心筋炎ウイルス(ECMV)から獲得が可能である(Novogenから市販されている、Duke et al., (1992) J. Virol. 66(3): 1602 - 1609)。本明細書に開示される別の例示の実施態様では、IRESはVEGF由来である。IRES配列の例は、米国特許第6,692,736号に記載される。

10

20

30

40

50

#### 【0054】

二つ以上のヌクレオチドまたはタンパク質配列に関する話題において「同一」または、パーセント「同一」という用語は、二つ以上の配列またはサブ配列において、比較され、最大一致を示すように整列させられ、本明細書に記載される配列比較アルゴリズムの内の一つ、例えば、Smith-Watemanアルゴリズムを用いて、または目視によって測定した場合、同じである、あるいは、一定パーセントの、同一アミノ酸残基またはヌクレオチドを有する、二つ以上の配列またはサブ配列を指す。

#### 【0055】

「正常細胞状態」または「正常生理状態」とは、正常な生理的状态にあって、分裂していない、または調節的に分裂する細胞の状態、すなわち、正常な生理的状态にある細胞の状態である。「異常細胞状態」とは、同じタイプの、非分裂/調節分裂状態にあって、正常な生理的状态にある細胞に関して定義される。従って、「異常細胞状態」を有する細胞は、非調節的細胞分裂を呈することになる。

#### 【0056】

本明細書で用いる「がん」、「がん細胞」、「新生物細胞」、「新形成」、「腫瘍」、および「腫瘍細胞」(相互交換的に使用される)は、比較的自律的成長を示し、そのために異常な成長表現型、または、細胞増殖調節の著明な消失によって特徴付けられる異常な細胞状態を示す。腫瘍細胞は、過形成細胞、インビトロまたはインビボにおいて接触成長抑制の欠如を示す細胞、インビボで転移不能な細胞、または、インビボで転移可能な細胞であってもよい。新形成細胞は、悪性であっても良性であってもよい。従って、がん細胞は、異常な細胞状態を有すると見なされる。

#### 【0057】

「原発性腫瘍細胞」という用語は、従来技術における意味に従って用いられる。原発性腫瘍細胞は、哺乳動物の腫瘍から単離され、インビトロで広く培養されていないがん細胞である。

#### 【0058】

本明細書において、ある特定のヌクレオチド配列の参照下に用いられる、「から事実上成る。」、または「から事実上成るところの」という用語は、特定のヌクレオチド配列が、5'または3'末端のいずれか、または両端においてさらに別の残基を持つ可能性があり、その際、その追加の残基は、言及配列の基本的および新規の特性に実質的に影響を及ぼさないことを意味する。

#### 【0059】

「サイトカイン」という用語、または文法的にそれと等価な用語によって本明細書中で意味されるものは、免疫系細胞の、一般クラスのホルモン、例えば、リンフォカイン、モノカインその他を含むホルモンである。この定義は、局所的に動作し、血液中を循環しな

いホルモン、および、本発明に従って用いられると、個体の免疫応答の変更をもたらすホルモンを含むが、ただしそれらに限定されない。

【0060】

「腫瘍細胞由来の抗原」という用語、または文法的にそれと等価な用語によって本明細書中で意味されるものは、免疫応答を惹起することが可能な腫瘍細胞から得られる、任意のタンパク質、糖質またはその他の成分である。この定義は、全腫瘍細胞であって、その関連抗原の全てを抗原として含む細胞を始め、細胞体から分離される任意の成分、例えば、細胞膜、細胞質タンパク質、膜貫通タンパク質、細胞表面または膜から精製されたタンパク質、または、細胞表面と関連する独特な糖質機能基を含むことを意味するが、ただし上記に限定されない。本定義はまた、それに達するには細胞の特別処理を要求する、細胞表面由来の抗原も含む。

10

【0061】

本明細書で用いられる「遺伝学的に改変された腫瘍細胞」という用語は、導入遺伝子を発現するように遺伝学的に改変された細胞集団を含む組成物であって、がん治療投与スケジュールの一部として患者に投与される組成物を指す。遺伝学的に改変された腫瘍細胞ワクチンは、治療を受ける患者に対し「自己」または「同種」である腫瘍細胞を含むか、あるいは、患者から採取された腫瘍細胞と混ぜ合わされる「傍系細胞」を含む。GM-CSF発現を遺伝学的に改変された腫瘍細胞ワクチンは、本明細書では「GVAX」と呼ばれることがある。

【0062】

本明細書において「全身免疫応答」またはその文法的等価物によって意味されるものは、局所的ではなく、その個体全体に影響を及ぼす免疫応答であって、同じ刺激に対して、特定順序の反応を可能とする免疫応答である。

20

【0063】

本明細書において「確立腫瘍の逆転」またはその文法的等価物によって意味されるものは、既存の腫瘍の抑圧、抗体、あるいは部分的または完全消失である。本定義の意味は、既存腫瘍のサイズ、活力、または増殖率における任意の減少を含む。

【0064】

「腫瘍の成長を遅延させる」という用語によって意味されるものは、腫瘍の成長速度の低下、腫瘍サイズまたは腫瘍細胞数増加の抑制、あるいは、腫瘍細胞数、腫瘍サイズ、または腫瘍数の低下である。

30

【0065】

「形質導入」という用語によって意味されるものは、物理的手段による外来性核酸の細胞内への導入である。例えば、形質導入は、本発明のウイルス粒子による、外来性核酸の細胞内への導入を含む。哺乳類細胞の操作に関する各種技術については、Keown et al., Methods of Enzymology 185: 527-537 (1990)を参照のこと。

【0066】

本明細書で用いる「治療」、「治療的使用」、または「医療的使用」という用語は、病状または症状を治療する、あるいは、その他のやり方で、疾患またはその他の不快症状の進行をどのようなやり方でもよいから予防、妨害、遅延、または逆転させる、主張される組成物の任意の、かつ全ての使用を指す。

40

【0067】

本明細書で用いる「治療的有效量」という用語、または文法的等価物は、個体の全身免疫応答を、刺激によるか抑圧によるかして改変するのに十分な量の調剤を指す。本発明のがんワクチンの場合、がん細胞に対する哺乳動物の免疫応答を刺激することである。この量は、異なる個体、異なる腫瘍タイプ、および異なる調剤では異なってもよい。この「治療的有效量」は、「改善された治療結果」がもたらされるように当業者によって通例的に採用される手順を用いて決定される。

【0068】

50

がんに関して、本明細書で用いる「改善された治療結果」および「強化された治療効力」という用語は、がん細胞または固形腫瘍の成長遅滞または減少、あるいは、がん細胞全数または腫瘍の全体負荷の低下を指す。従って、「改善された治療結果」および「強化された治療効力」という用語は、任意の臨床的に受容可能な基準に基づいても患者の状態に改善があること、すなわち、余命の延長、クオリティオブライフの改善を含む改善があることを意味する。本明細書における「不活性化細胞」および「増殖不能細胞」、またはその文法的等価物によって意味されるものは、細胞を増殖不能とならしめる処置によって不活性化された細胞である。この処置によって、多数回の有糸分裂を経過することはできないが、サイトカインおよび/または腫瘍抗原のようなタンパク質を発現することのできる能力を保持する細胞が得られる。このことは、当業者には既知の数多くの方法によって実現することが可能である。

10

#### 【0069】

「照射細胞」は、そのような不活性化細胞の一例である。このような照射細胞は、該細胞を増殖不能とするのに十分な照射に暴露される。

#### 【0070】

「個体」、「被験体」、またはその文法的等価物によって、任意の個別の哺乳動物が意味される。

#### 【0071】

(標的細胞)

本発明は、標的細胞、例えば、原発性腫瘍細胞において異種核酸を発現する方法を提供する。標的細胞は、インビトロ、インビボ、またはエキソビボにおいて、キメラ線維タンパク質を有するアデノウイルスによって形質導入される。その際、キメラ線維タンパク質は、A d 5またはA d 2シャフトの少なくとも一部、およびA d 3 5ヘッ드의少なくとも一部を含む。

20

#### 【0072】

標的細胞は、いずれの細胞タイプまたは組織タイプであってもよい。好ましい方法では、標的細胞は腫瘍細胞、通常原発性腫瘍細胞である。一つの実施態様では、原発性腫瘍細胞は、肺腫瘍細胞(例えば、非小細胞型肺腫瘍細胞)、前立腺腫瘍細胞、頭頸部腫瘍細胞、膀胱腫瘍細胞、メラノーマ腫瘍細胞、リンパ腫細胞、および腎臓腫瘍細胞からなる群より選択される細胞である。

30

#### 【0073】

ある好ましい実施態様では、原発性腫瘍細胞は、膀胱がん、乳がん、結腸がん、腎臓がん、肝臓がん、肺がん(例えば、非小細胞型肺がん)、卵巣がん、頸がん、膵臓がん、直腸がん、前立腺がん、胃がん、上皮がん;リンパまたは骨髄系統の造血細胞がん;中胚葉起源のがん、例えば、線維肉腫または黄紋筋肉腫;その他の腫瘍タイプ、例えば、メラノーマ、奇形がん、神経芽細胞腫、グリオーマ、および腺がんからなる群より選択されるタイプのがん細胞である。

#### 【0074】

本発明のキメラアデノウイルスベクターによって実現される利点は、腫瘍細胞、特に、原発性腫瘍細胞の形質導入の増加である。形質導入効率の上昇は、アデノウイルスベクターの必要がより少なくなることを意味する。このことは、生産しなければならないアデノウイルスベクター量の低下をもたらす。さらに、アデノウイルスベクターの形質導入効率はより強力になるわけであるから、同じ形質導入効率を実現するのに、非キメラアデノウイルスベクターの場合に通常必要とされるものよりも少容量のウイルスを用いることが可能となる。

40

#### 【0075】

本発明のアデノウイルスベクターと方法はいくつかの利便性を有する。例えば、アデノウイルスベクターは、数十年に渡って異種コード配列を細胞に導入し発現するために使われてきた。本発明は、さらに効率的に異種コード配列を原発性腫瘍細胞に導入し発現するアデノウイルスベクターおよび方法を提供する。これによって、原発性腫瘍細胞に対する

50



様々の導入遺伝子の作用を研究するための効率的なツールが得られる。本発明のベクターおよび方法はまた、腫瘍細胞、特に原発性腫瘍細胞において様々な治療用導入遺伝子を試験するためにも使用されてよい。本発明のアデノウイルスベクターおよび方法は、治療用、例えば、哺乳動物におけるがん治療のためのベクターおよび方法を提供する。本発明の方法は、インビトロ、インビボ、および/またはエキソビボ設定条件下に腫瘍細胞の形質導入のために使用されてもよい。

#### 【0076】

(本発明のアデノウイルスベクター)

本明細書で用いる「アデノウイルス」および「アデノウイルス粒子」という用語は、アデノウイルスとして分類される任意の、全てのウイルスであって、ヒトまたは動物に感染する任意のアデノウイルス、および、全てのグループ、サブグループ、および血清型を含む、任意の、および全てのウイルスを指す。従って、本発明で用いる場合、「アデノウイルス」および「アデノウイルス粒子」は、別様に指示しない限り、ウイルスそれ自体、またはその誘導体を指し、天然に見られるもの、および組み換え型両方の、全ての血清型およびサブタイプを含む。このようなアデノウイルスは、野生型であってもよいし、従来技術で既知の、または、本明細書に開示される方法に従って様々なやり方で改変されてもよい。そのような改変としては、感染性ウイルスを作製するために、粒子の中にバックされるアデノウイルスゲノムに施される改変を含む。そのような改変は、従来技術で既知の欠失、例えば、E 1 a、E 1 b、F 2 a、F 2 b、E 3、またはE 4 コード領域の内の一つ以上の欠失を含む。この用語はまた、複製特異的アデノウイルスを含む。すなわち、ある種の細胞または組織では好んで複製するが、別の種類のものではその程度が劣るか、全く複製しないウイルスである。このようなウイルスは、時に、「細胞溶解性」または「細胞病原性」ウイルス（またはベクター）とも呼ばれ、かつ、該ウイルスが新生物細胞に作用を及ぼす場合には、「腫瘍崩壊性」ウイルス（またはベクター）と呼ばれる。

#### 【0077】

本発明のアデノウイルスベクターは、キメラ線維タンパク質をコードし、本発明のアデノウイルス粒子はキメラ線維タンパク質を含む。その際、前記キメラ線維タンパク質は、A d 3 5 ヘッドの少なくとも一部、およびA d 5 またはA d 2 シャフトの少なくとも一部を含む。保持されたA d 3 5 ヘッドおよびA d 5 またはA d 2 シャフトの一部は、がん細胞の効率的形質導入を実現する。本発明を実施するのに有用なキメラアデノウイルス線維タンパク質を下記にさらに説明する。

#### 【0078】

本発明に従って用いられるアデノウイルス株は、任意のアデノウイルス血清型を含む。アデノウイルス血清型 1 から 5 1 は、最近、米国基準菌株保存機関（ATCC、Manassas、バーモント州）から入手が可能であり、かつ、本発明は、任意の供給源から得られる、他の、任意の血清型のアデノウイルスを含む。本発明に従って用いられるアデノウイルスは、ヒト起源のものであっても、あるいは、非ヒト起源、例えば、ウシ、ブタ、イヌ、サル、トリ起源のものであってもよい。例えば、アデノウイルスは、サブグループ A（例えば、血清型 1 2、1 8、3 1）、サブグループ B（例えば、血清型 3、7、1 1、1 4、1 6、2 1、3 4、3 5、5 0）、サブグループ C（例えば、血清型 1、2、5、6）、サブグループ D（例えば、血清型 8、9、1 0、1 3、1 5、1 7、1 9、2 0、2 2 - 3 0、3 2、3 3、3 6 - 3 9、4 2 - 4 7、4 9、5 1）、サブグループ E（血清型 4）、サブグループ F（血清型 4 0、4 1）、または他の任意のアデノウイルス血清型であってもよい。本明細書全体を通じて、アデノウイルスタイプ 5 における特定のヌクレオチドに対して参照が行われる。当業者であれば、他の血清型における対応ヌクレオチドを定め、従って、他のアデノウイルス血清型における類似のアデノウイルスベクターを構築することが可能である。一つの好ましい実施態様では、アデノウイルス核酸バックボーンは、アデノウイルス血清型 2（A d 2）、5（A d 5）、または 3 5（A d 3 5）から得られるか、あるいは、アデノウイルス血清型 2（A d 2）または 5（A d 5）の一部と、アデノウイルス血清型 3 5（A d 3 5）の一部との組み合わせを含むアデノウイルス

スキメラバックボーンである。ヒトおよび動物アデノウイルスの数多くの実例が、例えば、<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/CellBiology.cfm>において見出される米国基準菌株保存機関において入手が可能である。

#### 【0079】

アデノウイルス血清型2、5、35（Holden株）、および35（35p株）のDNAおよびタンパク質配列は、それぞれ、GenBankのアクセス番号NC\_001405、AY339865、AY128640、およびAY271307において見出すことができる。なお、これら全てについて、参照することによりその全体を本明細書に含める。アデノウイルス血清型11および14の線維のタンパク質配列は、GenBankにおいて、それぞれ、アクセス番号BAD11205およびBAB83691の下に見出すことができ、アデノウイルス血清型3の線維のDNA配列は、GenBankにおいてアクセス番号X01998およびM12411の下に見出すことができる。これら全てについて、参照することによりその全体を本明細書に含める。アデノウイルス血清型16および21のDNA配列は、GenBankにおいて、それぞれ、アクセス番号AB073632およびAB073222の下に見出すことができる。この両方を、参照することによりその全体を本明細書に含める。配列情報と共に、GenBankの書き込み記事は、有用な詳細、例えば、参考文献、スプライシングシグナルの位置、ポリアデニル化部位、TATAシグナル、イントロン、各特定遺伝子の開始および終結コドン、タンパク質配列、各遺伝子のcDNA、および、文献を通じて存在する配列変異のリストを含む。

10

20

#### 【0080】

アデノウイルスベクターは、そのゲノムのサイズによって制限される（Beattie et al., J. Virol. 67:5911-5921, 1993）。これは次に、ベクターに挿入される異種DNAの量を制限し、従って、アデノウイルスゲノムに取り込まれる異種コード配列の量および/または長さを制限する。従って、複製不能ウイルスは、一般に、最大の異種DNA挿入体を容れることが可能であるが、それでも、アデノウイルスゲノムDNAのサイズと、欠失したアデノウイルスDNAの量によって制限される。

#### 【0081】

アデノウイルスベクターに関連して言うと、「5」という用語は、「上流」と相互交換的に用いられ、左の逆方向末端反復配列（ITR）方向を意味する。アデノウイルスベクターに関連して言うと、「3」という用語は、「下流」と相互交換的に用いられ、右のITR方向を意味する。

30

#### 【0082】

本発明のアデノウイルスベクターは、複製不能および複製可能ベクターを含む。複製不能ベクターは、標的細胞において複製をしないか、または極めて低レベルでしか複製しない。一つの局面では、複製不能ベクターは、E1a、E2a、E2b、またはE4の内の少なくとも一つのコード領域を、通常、そのコード領域の一部または全部を欠失するか、または突然変異されることによって不活性化される。上記ベクターを継代させる方法は従来技術においてよく知られる。

#### 【0083】

別の局面では、アデノウイルスベクターは複製可能である。複製可能ベクターは、標的細胞において複製することができる。複製可能ウイルスは、野生型ウイルス、および、標的細胞において複製するように加工されたウイルスを含む。これらは複製特異的ウイルスを含む。複製特異的ウイルスは、別タイプの細胞に比べて、あるタイプの細胞において特異的に、または好んで複製するように設計される。

40

#### 【0084】

複製欠損および複製可能アデノウイルスベクターは、両方とも、がん治療用の治療剤として現在開発中のものである。これらのベクターは、少なくとも一つのE3コード領域において欠失を持っていてもよいが、ある場合にはE3領域を保持してもよい（例えば、WO02/067861、WO01/02540を参照のこと）。

50

## 【0085】

標的細胞において選択的に複製するアデノウイルスベクターの例では、特異的に減衰された複製可能ウイルスベクターであって、がん細胞における選択的複製がそれらのがん細胞を好んで破壊する、そのようなベクターが開発されている。ある特定の細胞タイプにおいて好んで複製（従って破壊）する、各種の細胞特異的複製可能アデノウイルス構築物が、例えば、WO 95 / 19434、WO 96 / 17053、WO 98 / 39464、WO 98 / 39465、WO 98 / 39467、WO 98 / 39467、WO 98 / 39466、WO 99 / 06576、WO 99 / 25860、WO 00 / 15820、WO 00 / 46355、WO 02 / 067861、WO 02 / 06862、米国特許出願公報 US 20010053352、および米国特許第5,698,443、5,871,726、5,998,205、および6,432,700号に記載される。複製可能アデノウイルスベクターは、腫瘍細胞において選択的に複製するように設計されている。

10

## 【0086】

標的細胞は、ある細胞タイプ、組織タイプであってもよいし、ある細胞状態を有していてもよい。本発明の組成物および方法に便利に用いられる複製特異的ウイルスの例が、さらに、米国特許第5,998,205、5,846,945、5,801,029号、およびPCT特許WO 95 / 19434、WO 98 / 39465、WO 98 / 39467、WO 98 / 39466、WO 99 / 06576、WO 98 / 39464、およびWO 00 / 15820に記載される。

## 【0087】

「条件付複製ウイルス」、「複製指向型ウイルス」、「特異的複製ウイルス」、および「選択的複製ウイルス」という用語は、相互交換的に用いられる用語であり、ある種の細胞または組織では好んで複製するが、別の種類のものではその程度が劣るか、全く複製しない複製可能型ウイルスベクターである。本発明の一つの実施態様では、ウイルスベクターおよび/または粒子は、腫瘍細胞および/または異常増殖組織、例えば、固形腫瘍およびその他の新生物において選択的に複製する。このようなウイルスは、「腫瘍崩壊性ウイルス」、または「腫瘍崩壊性ベクター」と呼ばれてもよく、「細胞溶解性」または「細胞病原性」と見なされてもよく、標的細胞の「選択的細胞溶解」を実行すると考えられる。

20

## 【0088】

「指向的複製」、「選択的複製」、および「特異的複製」は相互交換的に用いられるが、ウイルスは、非標的細胞よりは、標的細胞においてより盛んに複製することを意味する。ウイルスは、非標的細胞に比べて標的細胞においてより高い率で、例えば、少なくとも約3倍、少なくとも約10倍、少なくとも約50倍、ある場合には、少なくとも約100倍、400倍、500倍、1000倍、または極端な場合  $1 \times 10^6$  倍高い率で複製する。一つの実施態様では、ウイルスは、標的細胞でのみ複製する（すなわち、非標的細胞では全く、または極めて低レベルでしか複製しない）。

30

## 【0089】

本発明の別の実施態様では、アデノウイルスベクターは、E1B 19 - kDa領域の一部または全ての欠失を含む。一つの実施態様では、アデノウイルスベクターは、E1b 19 kDaコード配列の完全な、または部分的な欠失を除いて、E1コード配列の全てを含む。この欠失のために、E1b 19 kDaタンパク質は発現されないか、または該タンパク質は機能を失う。アデノウイルスE1B 19 - kDa領域は、E1B 19 - kDa産物をコードするアデノウイルスE1B遺伝子のゲノム領域を指す。野生型Ad5によれば、E1B 19 - kDa領域は、ヌクレオチド(nt)1714とnt2244の間に配される261bp領域である。このE1B 19 - kDa領域は、例えば、Raoteal, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:7742-7746に記載される。本発明は、E1B 19 - kDa領域の一部または全部の欠失の外に、E1B 19 - kDa領域が突然変異される実施態様を、その欠失または突然変異が、E1B 19 - kDaに関連するアポトーシスの抑制を減衰、または除去する限り、含む。

40

50

## 【 0 0 9 0 】

本発明の一つの実施態様では、キメラ線維タンパク質は、アデノウイルスのヘッドの少なくとも一部において、C D 4 6 に結合する異種アミノ酸配列（例えばリガンド）、例えば、A d 3 5 を含む。本発明のある実施態様では、異種アミノ酸配列、例えば、A d 3 5 は、C D 4 6 に結合する、アデノウイルスのヘッドの少なくとも一部のH I - ループまたはC末端に配される。

## 【 0 0 9 1 】

本発明の一つの実施態様では、アデノウイルスは、複製に必須のアデノウイルスコード配列の欠失を含む。一つの実施態様では、複製欠損アデノウイルスは、下記の領域の内の少なくとも一つにおいて少なくとも一つの欠失を持つ。その領域とは、すなわち、E 1 a、E 1 b、E 2 a、E 2 b、およびE 4 である。一つの実施態様では、アデノウイルスは、原発性腫瘍細胞において複製不能である。

## 【 0 0 9 2 】

本発明のある実施態様では、アデノウイルスベクターは、少なくとも一つのアデノウイルスE 3 コード配列の欠失を含む。一つの実施態様では、前記少なくとも一つのアデノウイルスE 3 コード配列は、1 9 K、1 4 . 7 K、1 4 . 5 K、1 2 . 5 K、1 1 . 6 K、1 0 . 4 K、および6 . 7 K E 3 タンパク質のコード配列からなる群より選択される。一つの実施態様では、前記E 3 コード配列の全てが、対応するタンパク質が発現されないように、または機能を失うように、欠失される、および/または、突然変異される。一つの実施態様では、アデノウイルスは、1 0 . 4 K、1 4 . 5 K、および1 4 . 7 K E 3 コード配列を含む。一つの実施態様では、天然E 3 コード配列の全てがベクターの中に保持される。

## 【 0 0 9 3 】

本発明のある実施態様では、アデノウイルスベクターは、がん細胞において好んで複製するが、その複製指向は、がん標的細胞における複製レベル（例えば、細胞殺作用および/または力価）を、非標的細胞、例えば、正常またはコントロール細胞における複製レベルと比較することによって示される。標的がん細胞におけるアデノウイルスの力価を、非標的細胞タイプにおける力価と比較することによって、総合的複製指向性が標的細胞において強化されているかどうか、および/または、複製が非標的細胞において低下しているかどうかについて決定的指標が得られる。

## 【 0 0 9 4 】

本発明の一つの局面では、アデノウイルスベクターは、二つ以上のコード配列の翻訳を連結する遺伝子間I R E S エlement（単数または複数）を含む。リンクされるコード領域は、二つのアデノウイルスコード領域であってもよいし、二つの導入遺伝子であってもよいし、または、一つのアデノウイルスコード領域と一つの導入遺伝子コードであってもよい。

## 【 0 0 9 5 】

二つのアデノウイルスコード領域を連結するI R E S を含むアデノウイルスベクターは安定であり、ある実施態様では、I R E S を含まないベクターに比べ、より優れた特異性が得られる。遺伝子間I R E S を含むアデノウイルスベクターのもう一つの利点は、第2のT R E ではなくI R E S を用いることによって、ベクターにおいて追加の遺伝子、例えば、治療遺伝子のためのスペースが得られることである。I R E S を含むアデノウイルスベクターの例は、米国特許第6,692,736号に記載される。本発明の一つの局面では、本明細書に記載されるウイルスベクターは通常、マルチシストロン転写体の中に少なくとも一つのI R E S を含む。その際、マルチシストロン転写体の生産は、異種の、標的細胞特異的T R E によって調節される。I R E S の調節下に置かれる第2のアデノウイルスコード領域を含むアデノウイルスベクターの場合、I R E S の翻訳調節下に置かれる第2コード領域の内因性プロモーターは、それが第2コード領域の転写を妨げることがないよう取り除かれることが好ましい。第2コード領域は、I R E S が開始コドンを含む場合、該I R E S とフレームが一致していることが好ましい。開始コドン、例えば、A T G が

I R E S 中にある場合、第 2 コード配列の開始コドンは取り除かれ、かつ、I R E S と第 2 コード配列はフレーム一致していることが好ましい。それとは別に、I R E S が開始コドンを含まない場合、あるいは、開始コドンが I R E S から取り除かれている場合、第 2 コドン領域の開始コドンが使われる。一つの実施態様では、アデノウイルスベクターは、異種 T R E の転写調節下に、アデノウイルス必須遺伝子、E 1 A および E 1 B 遺伝子を、そして、E 1 A と E 1 B の間に導入された I R E S を含む。従って、E 1 A と E 1 B の両方とも共通の転写調節の下にあり、E 1 B コード領域の翻訳は、I R E S の存在のお蔭で得られる。一つの実施態様では、E 1 A は、その内因性プロモータを除去される。別の実施態様では、E 1 A は、内因性エンハンサーを除去され、さらに別の実施態様では、E 1 A は、その内因性プロモーターおよび E 1 A エンハンサーが除去される。別の実施態様では、E 1 B は、その内因性プロモーターが除去される。さらに別の実施態様では、E 1 B は、E 1 B の 1 9 - k D a 領域の一部または全部の欠失を受ける。

10

#### 【 0 0 9 6 】

腫瘍崩壊性アデノウイルスプラットフォームの、ある好ましい実施態様では、自己プロセシング切断配列、例えば、2 A、または 2 A 様配列を含む、ニシストロン性、またはマルチシストロン性カセットは、ウイルスの生涯サイクルにおいて、アデノウイルスの早期のウイルス遺伝子 ( E 1 A、E 1 B、E 2、E 3、および / または E 4 )、または後期に発現される遺伝子 ( 線維、ペントン、およびヘキソン ) を含む。

#### 【 0 0 9 7 】

ある事例では、がん標的細胞の、例えば、比較的難治性または特定の攻撃性のために、細胞傷害活性の程度、および / または、速度の強化が望ましい場合がある。細胞傷害性に貢献するウイルス遺伝子の例としては、アデノウイルス死亡タンパク質 ( A D P ) 遺伝子が挙げられるが、ただしそれに限定されない。本明細書に開示される別の実施態様では、アデノウイルスは、その内因性プロモーター中に欠失を、またはそれ自身の欠失を有するアデノウイルス E 1 B 遺伝子を含む。本明細書に開示される別の実施態様では、E 1 B の 1 9 - k D a 領域が除去される。

20

#### 【 0 0 9 8 】

標的細胞に対する細胞毒性を強化するために、細胞毒性作用を持つ、1 個以上の導入遺伝子がベクターの中に存在してもよい。さらに、または別に、細胞毒性および / または細胞死に寄与するアデノウイルス遺伝子、例えば、アデノウイルス死亡タンパク質 ( A D P ) 遺伝子をベクター中に、要すれば任意に異種 T R E の選択的転写調節下に、および、要すれば任意に I R E S、または自己プロセシング切断配列、例えば、2 A、または 2 A 様配列の翻訳調節下に含めてもよい。これは、標的細胞特異的細胞傷害活性を、異種遺伝子または導入遺伝子の細胞特異的発現と結合させることによって実現されると考えられる。

30

#### 【 0 0 9 9 】

本発明の、例示のアデノウイルスベクターは、D N A、アデノウイルスコートに被覆された D N A、別のウイルスまたはウイルス様形態 ( 例えば、単純ヘルペス、および A A V ) にパックされたアデノウイルス D N A、リボソームに被覆されたアデノウイルス D N A、ポリリシンと複合体を形成するアデノウイルス D N A、合成ポリカチオン分子と複合体を形成するアデノウイルス D N A、トランスフェリンと接合体を形成するアデノウイルス D N A、または、抗原性を免疫学的に「マスク」するために、および / または、半減期を増すために、P E G のような化合物と複合体を形成するアデノウイルス D N A、あるいは、非ウイルス性タンパク質と接合体を形成するアデノウイルス D N A を含むが、ただしこれらに限定されない。

40

#### 【 0 1 0 0 】

アデノウイルスベクター粒子はまた、後述するように、線維タンパク質に対しさらに別の改変を含んでもよい。一つの実施態様では、本発明のアデノウイルスベクターは、粒子のキャプシドタンパク質に含まれる標的化リガンドをさらに含む。標的化アデノウイルスの例については、例えば、W O 0 0 / 6 7 5 7 6、W O 9 9 / 3 9 7 3 4、米国特許第 6、6 8 3、1 7 0、6、5 5 5、3 6 8、5、9 2 2、3 1 5、5、5 4 3、3 2 8、5

50

、 770、442、および5、846、782号を参照のこと。

【0101】

さらに、本発明のアデノウイルスベクターはまた、他のウイルスキャプシドタンパク質に対する改変を含んでもよい。この突然変異の例としては、米国特許第5、731、190、6、127、525、および5、922、315号に記載されるものが挙げられるが、ただしそれらに限定されない。その他の改変アデノウイルスが米国特許第6、057、155、5、543、328、および5、756、086号に記載される。

【0102】

「E3領域」（「E3」と相互交換的に使われる）は、従来技術においてよく理解される用語であり、E3遺伝子産物をコードする、アデノウイルスゲノム領域を意味する。E3領域は、各種出版物、例えば、Wold et al. (1995) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 199: 237-274に記載されている。E3領域の「一部」は、全E3領域よりも小さいことを意味し、従って、ポリヌクレオチド欠失の外に、E3領域の1種以上のポリペプチド産物をコードするポリヌクレオチドを含む。

【0103】

E3領域を含むアデノウイルス構築物であって、E3含有アデノウイルスプラスミド、例えば、BHGE3 (Microbix Biosystems Inc., トロント) と、非E3含有アデノウイルスプラスミドの間の相同組み換えが行われる構築物を生成することが可能である。

【0104】

別態様として、E3領域を含むアデノウイルスベクターを、アデノウイルス構築物、またはアデノウイルスプラスミド構築物と共に、細胞、例えば、293細胞に導入することが可能である。その際、ベクターおよび構築物は、相同組み換えを受け、E3領域を含むアデノウイルスを生成する。この場合、E3含有アデノウイルスベクターとアデノウイルス構築物またはプラスミド構築物とは、アデノウイルスの相補領域を含む、例えば、一方は左手領域を、他方は右手領域を含み、しかも両者は相同的組み換えを可能とするほど十分な重複を有する。

【0105】

別態様として、本発明のE3含有アデノウイルスベクターは、他の通例法、例えば、標準的組み換え法（例えば、制限ヌクレアーゼおよび/またはPCRによる方法）、化学的合成、または上記の任意のものの組み合わせを含む方法を用いて構築することが可能である。さらに、E3領域の部分の欠失は、分子生物学の標準的技術を用いて実行される。

【0106】

いくつかの実施態様では、E3領域の内部にコードされる、アデノウイルス死亡タンパク質 (ADP) はアデノウイルスベクターにおいても維持される。主要後期プロモーター (MLP) の調節下に置かれるADP遺伝子は、宿主細胞の分解の促進に重要なタンパク質 (ADP) をコードするようである。Tollefson et al. (1996) J. Virol. 70 (4): 2296; Tollefson et al. (1992) J. Virol. 66 (6): 3633. 従って、ADP遺伝子を含むアデノウイルスベクターは、アデノウイルスベクターをより強力にするから、治療はより有効となり、および/または、用量要求はより下がる。

【0107】

一つの実施態様では、複製可能ベクターは、選択的TREの転写調節下に複製に必須な遺伝子を含む。一つの実施態様では、アデノウイルスベクターは、E1Bを含む、複製可能がん特異的ベクターである。E1Bは、19-kDa領域の一部または全ての欠失を有する。本発明のいくつかの実施態様では、複製に必須な、アデノウイルス遺伝子は、早期遺伝子、例えば、E1A、E1B、E2a、E2b、およびE4の内の一つ以上である。さらに別の実施態様では、さらに一つ以上のTREが、複製に必須の、1個以上のアデノウイルス遺伝子、または、導入遺伝子、例えば、治療遺伝子に対し動作的に連結されても

よい。

【0108】

アデノウイルスベクターは、標的細胞特異的 T R E と同じ遺伝子（単複）に対し動作的に連結されていても、されていなくともよい、さらに別の異種 T R E を含んでもよい。例えば、T R E（例えば、細胞タイプ特異的または細胞状態特異的 T R E）は、第 2 タイプの標的特異的 T R E に接続されてもよい。「接続」とは、標的細胞特異的 T R E と第 2 T R E とが、同じ遺伝子を転写に関して調節することを意味する。上記実施態様では、標的細胞特異的 T R E と第 2 T R E とは、いくつかの形態、例えば、（a）隣接（すなわち、当接）；（b）両方とも、転写調節される遺伝子に対し 5' 側；（c）一方の T R E は、遺伝子に対し 5' 側、他方の T R E は、遺伝子に対し 3' 側、を含む形態の内の任意のものであってよい。ただし、形態は上記に限定されない。

10

【0109】

（転写調節エレメント）

転写調節エレメント、および、その特定、単離、特性、遺伝学的操作、動作的に連結されるコード配列調節のための使用を実行する方法は従来技術で既知である。T R E は、単一遺伝子の転写調節配列から得られてもよいし、異なる遺伝子の配列を組み合わせる機能的な T R E を生成してもよいし、あるいは、T R E は合成的に生成されてもよい（例えば、C T P 4 プロモーター）。

【0110】

T R E は、組織または細胞中に存在する細胞タイプに応じて、組織特異的、腫瘍特異的、発達段階特異的、細胞状態特異的等であってもよい。このような T R E は、本明細書では、まとめて組織特異的または標的細胞特異的と呼ばれる。下記にさらに詳述するように、標的細胞特異的 T R E は、任意の数の形態、例えば、標的細胞特異的プロモーターおよび標的細胞特異的エンハンサー；異種プロモーターおよび標的細胞特異的エンハンサー；標的細胞特異的プロモーターおよび異種エンハンサー；異種プロモーターおよび異種エンハンサー；および前記のもののマルチマーを含む形態を含んでもよいが、ただしこれらに限定されない。標的細胞特異的 T R E のプロモーターおよびエンハンサー成分は、所望の標的細胞特異的転写活性が得られる限り、対象コード配列に対し任意の方向を持ち、該配列から任意の距離離れていてもよい。

20

【0111】

転写活性化は、従来技術で既知のいくつかのやり方で測定が可能であるが（かつ、下記にさらに詳述されるが）、一般に、その標的細胞特異的 T R E 調節下の（すなわち、動作的に結合される）コード配列の m R N A またはタンパク質産物の検出および/または定量によって測定される。

30

【0112】

本明細書にさらに詳述されるように、標的細胞特異的 T R E は、様々な長さを持ってよいし、様々な配列構成を持ってよい。標的細胞特異的 T R E は、限られた細胞集団（またはタイプ）、例えば、前立腺細胞、肝臓細胞、メラノーマ細胞等において機能的であることが好ましい。従って、ある実施態様では、使用される T R E は、下記の組織タイプ、すなわち、前立腺；肝臓；乳房；尿道（膀胱）；結腸；肺；卵巣；脾臓；胃；および子宮の内のどれかにおいて機能的であることが好ましい。

40

【0113】

既に当業者には察知されるように、T R E はポリヌクレオチド配列であり、従って、様々な配列組み合わせにまたがって機能を発現することが可能である。ヌクレオチド置換、付加、および欠失の方法は従来技術で既知であり、簡単に利用可能な機能的アッセイ（例えば、C A T、またはルシフェラーゼリポーター遺伝子アッセイ）を用いて、通常の鎌度を持つ当業者でも、ある配列変異種が、必要な細胞特異的転写調節機能を示すかどうかを判定することが可能である。従って、核酸置換、付加、および/または欠失を含む、機能的に保存された T R E 変異種は、本明細書に開示されるベクターに使用が可能である。従って、変異 T R E は、標的細胞において機能を保持するが、最大機能を発揮する必要はな

50

い。事実、T R E の最大転写活性化活動は、所望の結果を実現するのに必ずしも必要ではなく、ある種の応用では、T R E の断片によって実現される誘発レベルが十分であることもある。例えば、病状の治療または寛解のために使用される場合、最大未満の反応性が、例えば、標的細胞が特に悪性ではなく、および / または、病気の範囲が比較的限局されている場合は、十分であることがある。

#### 【 0 1 1 4 】

ある種の塩基改変が、発現レベル、および / または細胞特異性の強化をもたらす場合がある。例えば、従来技術で知られるように、T R E 内の核酸配列の欠失または付加が、転写調節タンパク質結合部位同士を、正常な形態の場合と比べて、互いに近づけたり、遠ざけたり、あるいは、両者を回転させて D N A 螺旋の対向側に位置づけ、そうすることによって、T R E 結合転写因子の間の空間関係を変え、それが、転写の減少または増加を招くことがある。従って、だからと言って理論に拘束されることを望むものではないが、本開示は、T R E のある種の改変は、T R E によって指示される発現レベルの変調を、細胞特異性の強化を含む変調をもたらす可能性がある」と推察する。比較的侵襲性の高い新生物増殖の場合、および / または、より速やかなおよび / または攻撃的なパターンの細胞殲滅が必要とされる場合（例えば、免疫機能が侵されている被験体）には、発現レベルの強化の実現が特に望ましい。

10

#### 【 0 1 1 5 】

本発明で使用される T R E は、サイレンサーを含んでもよいし、含まなくともよい。サイレンサー（すなわち、従来技術で既知の、陰性調節エレメント）の存在は、非標的細胞における転写（従って、複製）の遮断を助ける。従って、サイレンサーの存在は、非標的細胞における複製を効果的に阻止することによって、細胞特異的ベクターの複製強化の実現を可能とする。別態様として、サイレンサーの欠如は、標的細胞における複製を刺激し、標的細胞特異性の強化を実現する可能性がある。

20

#### 【 0 1 1 6 】

T R E （抑制と強化の両方を含む）によって指令される転写活性は、従来技術で既知のいくつかのやり方で測定が可能であるが（かつ、下記にさらに詳述されるが）、一般に、T R E 調節下の（すなわち、動作的に結合される）配列の m R N A または配列によってコードされるタンパク質産物の検出および / または定量によって測定される。

30

#### 【 0 1 1 7 】

本明細書に論じられるように、T R E は、様々な長さを持ってよいし、様々な配列構成を持ってよい。異種 T R E のサイズは、一部はウイルスベクターの容量によって決められ、容量の方は、ベクターの予想形状に依存する。一般に、T R E には最小サイズが好まれる。なぜなら、好ましい他の配列、例えば、導入遺伝子および / または追加の調節配列の挿入用の余地を提供するからである。一つの実施態様では、そのような追加の調節配列は、自己プロセッシング切断配列、例えば、2 A , または 2 A 様配列である。

#### 【 0 1 1 8 】

例を挙げて述べると、アデノウイルスは、ウイルス配列の欠失を要することなく、余分の配列、最大ではゲノムサイズの約 1 0 5 %、すなわち 1 . 8 k b まで含めてパックすることが可能である。必須ではない配列がアデノウイルスから取り除かれた場合、さらに 4 . 6 k b の挿入体の受け入れが可能である（すなわち、約 6 . 4 k b の合計挿入体容量）。

40

#### 【 0 1 1 9 】

複製可能アデノウイルスベクターの場合、非特異的複製を防ぐために、内因性（アデノウイルス）T R E （すなわち、天然の E 1 A および / または E 1 B プロモーター）はベクターから取り除かれるのが好ましい。標的細胞特異的複製を促進する外に、内因性 T R E の除去はまた、ベクターの中により大きな挿入体容量を与える。これは、アデノウイルスベクターがウイルス粒子の中にパックされなければならない場合には重大な関心事となる。さらに重要なことは、内因性 T R E の欠失は、異種 T R E が除去され、内因性 T R E が、それぞれのアデノウイルスコード配列の転写調節を扱う（従って、非特異的複製を可能

50



とする)という組み換え事象の可能性を阻止する。一つの実施態様では、アデノウイルスベクターは、1個以上のアデノウイルス遺伝子の内因性転写調節配列が除去され、1個以上の異種TREによって置換されるように構築される。一方、内因性TREは、十分な細胞特異的複製指向が維持される限り、アデノウイルスベクター(単複)中に維持されてもよい。これらの実施態様は、異種TREを、内因性TREと、複製に必要な遺伝子コード分節との間に挿入することによって構築される。必要な、細胞特異的複製指向性は、異種TREの機能を可能とする細胞におけるアデノウイルスベクターの複製を、異種TREの機能を可能としない細胞における複製と比較するアッセイを実行することによって定量される。

#### 【0120】

ある実施態様では、TREは、標的細胞におけるベクターの複製を、TREを欠く複製の基本レベルと比べ、少なくとも約2倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約20倍、少なくとも約50倍、少なくとも約100倍、少なくとも約200倍、少なくとも約400から500倍、少なくとも約1000倍増す。受容可能な差は経験的に定められるが(例えば、RNAプロットアッセイ、RNAアーゼ保護アッセイ、または従来技術で既知の、その他のアッセイを用いてmRNAレベルを測定することによって)、ベクターの予想使用法および/または所望結果に依存する。

#### 【0121】

特定の標的細胞に向けられるアデノウイルスベクターは、標的細胞に機能的指向性を持つTREを用いることによって生成される。本発明の一つの実施態様では、標的細胞特異的、または細胞状態特異的異種TREは、腫瘍細胞特異的である。ベクターは、単一の腫瘍細胞特異的TRE、または、腫瘍細胞特異的であり、同じ細胞において機能する複数の異種TREを含んでもよい。別の実施態様では、ベクターは、全ての細胞が同じ細胞で機能的となるように、腫瘍細胞特異的な、1種以上の異種TREを含み、さらに、組織特異的な1種以上の異種TREを含む。

#### 【0122】

一つの実施態様では、腫瘍崩壊アデノウイルスプラットフォームのために、ニシストロンまたは複数シストロンカセットは、自己プロセシング切断配列、例えば、2A、または2A様配列を含むカセットは、アデノウイルス早期ウイルス遺伝子(E1A、E1B、E2、E3、および/またはE4)、あるいは、ウイルスの生涯サイクルにおいて後期に発現される遺伝子(線維、ペントン、およびヘキソン)を含む。

#### 【0123】

ある事例では、がん標的細胞の、例えば、比較的難治性または特定の攻撃性のために、細胞傷害活性の程度、および/または、速度の強化が望ましい場合がある。細胞傷害性に貢献するウイルス遺伝子の例としては、アデノウイルス死亡タンパク質(ADP)遺伝子が挙げられるが、ただしそれに限定されない。本明細書に開示される別の実施態様では、アデノウイルスは、その内因性プロモーター中に欠失を、またはそれ自身の欠失を有するアデノウイルスE1B遺伝子を含む。本明細書に開示される別の実施態様では、E1Bの19-kDaコード領域は、該19kDaタンパク質が発現されない、または非機能的となるように、部分的または完全欠失される。

#### 【0124】

標的細胞に対する細胞毒性を強化するために、細胞毒性作用を持つ、1個以上の導入遺伝子がベクターの中に存在してもよい。さらに、または別に、細胞毒性および/または細胞死に寄与するアデノウイルス遺伝子、例えば、アデノウイルス死亡タンパク質(ADP)遺伝子をベクター中に、要すれば任意に異種TREの選択的転写調節下に、および、要すれば任意にIRES、または自己プロセシング切断配列、例えば、2A、または2A様配列の翻訳調節下に含めてもよい。これは、標的細胞特異的細胞傷害活性を、異種遺伝子または導入遺伝子の細胞特異的発現と結合させることによって実現されと考えられる。

#### 【0125】

いくつかの異種治療遺伝子または導入遺伝子の内の任意のものが、下記に後述するよう

10

20

30

40

50

に、本発明の複製可能ウイルスベクターの中に含まれる。

【0126】

通常、前述のニシストロンまたはマルチシストロンカセットは、転写反応エレメント、一般に、がんまたは腫瘍細胞において好んで発現される、細胞タイプまたは細胞状態関連転写調節エレメントの調節の下に置かれる。従って、任意の構築物に含まれる治療遺伝子は、治療されるがんのタイプに応じて変動する。

【0127】

従来技術で知られるように、TREの活動は誘発が可能である。誘発可能なTREは、一般に、誘発因子が無い場合には低い活性しか示さず、誘発因子の存在下に上方調節される。誘発因子としては、例えば、核酸、ポリペプチド、小型分子、有機化合物、および/または、温度、圧、または低酸素状態のような環境条件が挙げられる。誘発性TREは、発現がある時点またはある場所で望まれる場合、あるいは、誘発因子を用いて発現レベルを定量することば望ましい場合に好ましい。例えば、PSE-TRE、PB-TRE、およびhKCLK2-TREの転写活性は、本明細書およびPCT/US98/04080に記載されるように、アンドロゲンによって誘発が可能である。なお、上記特許を、参照することにより本明細書に含めることを明言する。従って、本発明の一つの実施態様では、アデノウイルスベクターは、誘発性異種TREを含む。

【0128】

本発明で用いられるTREは、様々な形態として存在してよい。TREはマルチマーを含むことも可能である。例えば、TREは、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個の、標的細胞特異的TREから成る直列配列を含んでもよい。これらのマルチマーも、異種プロモーターおよび/またはエンハンサー配列を含んでもよい。別態様として、TREは、1個以上のエンハンサー領域と共に1個以上のプロモーター領域を含むことも可能である。TREマルチマーはまた、異なる遺伝子由来のプロモーターおよび/またはエンハンサーを含んでもよい。TREのプロモーターおよびエンハンサー成分は、互いに任意の方向性を取ってよく、所望の細胞特異的転写活性が得られる限り、対象コード配列に対し任意の方向および/または任意の距離において存在してよい。

【0129】

一つの実施態様では、アデノウイルスは、腫瘍細胞において好んで複製する。一つの実施態様では、アデノウイルスは、複製に必須の、少なくとも1本のアデノウイルスコード配列に動作的に結合する異種転写調節エレメント(TRE)を含む。TREは、細胞特異的TRE、細胞状態特異的TRE、および組織特異的TREを含むが、ただしこれらに限定されない。本発明で使用が可能な特異的TREの例としては、PSA-TRE、E2F

TRE、テロメナーゼ(TERT)TER、ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子(uPA)TRE、ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子受容体(uPAR)TRE、PRL-3タンパク質チロシンホスファターゼTREが挙げられるが、ただしこれらに限定されない。本発明はまた、TREの組み合わせの使用も考慮に入れる。複製に必須のアデノウイルスコード配列は、1個を超える異種TREと動作的に連結されてよい。それとは別にまたはそれに加えてさらに、複製に必須の、1本を超えるアデノウイルスコード配列は、1個以上の異種TREに動作的に結合されてよい。複製に必須のアデノウイルスコード配列の例は、E1a、E1b、E2a、E2b、およびE4領域に配されるコード配列である。複製に必要な複数コード領域は、1個のTRE、または複数のTREの組み合わせと、例えば、IRESによって動作的に結合される。一つの実施態様では、少なくとも1個のTREは、複製に必須の第1アデノウイルスコード配列に動作的に結合され、他方、第1アデノウイルスコード配列の方はIRESに動作的に結合され、前記IRESは、複製に必須の第2アデノウイルスコード配列に結合される。例えば、少なくとも1個の異種TREは、E1aコード領域のコード配列に動作的に結合され、これらのE1aコード配列もまた、下流のIRESに動作的に結合される。ここでIRESも、E1b領域のコード配列に動作的に結合される。

【0130】

本明細書では、ある特定の遺伝子から得られたTREは、その由来の遺伝子によって呼ばれ、その遺伝子を発現する宿主細胞中の動作的に結合するポリヌクレオチド配列の転写を調節するポリヌクレオチド配列である。例えば、本明細書で用いる「ヒト分泌腺カリクライン転写調節エレメント」または「hKLLK2-TRE」は、hKLLK2-TREが機能することを可能とする宿主細胞、例えば、アンドロゲン受容体を発現する細胞（好ましくは哺乳類細胞、さらに好ましくはヒト細胞）、例えば、前立腺細胞において、動作的に結合するポリヌクレオチド配列の転写を増進するポリヌクレオチド配列、好ましくはDNA配列である。従って、hKLLK2-TREは、アンドロゲン受容体への結合に対して反応性を持ち、hKLLK2プロモーターおよび/またはhKLLK2エンハンサーの少なくとも一部（すなわち、ARE、またはアンドロゲン受容体結合部位）を含む。ヒト内分泌腺カリクラインエンハンサー、および該エンハンサーを含むアデノウイルスベクターは、WO99/06576に記載される。なお、この特許を参照することにより本明細書に含めることを明言する。

10

20

30

40

50

#### 【0131】

本明細書で用いる「プロバシン (probasin) (PB) 転写調節エレメント」、または「PB-TRE」は、PB-TREが働くのを可能とする宿主細胞、例えば、アンドロゲン受容体を発現する細胞（好ましくは、哺乳類細胞、さらに好ましくは、ヒト細胞、さらに好ましくは前立腺細胞）において動作的に結合するポリヌクレオチド配列の転写を選択的に増大させるポリヌクレオチド配列、好ましくはDNA配列である。従って、PB-TREは、アンドロゲン受容体への結合に対して反応性を持ち、PBプロモーターおよび/またはPBエンハンサーの少なくとも一部（すなわち、ARE、またはアンドロゲン受容体結合部位）を含む。アンドロゲンを発現する細胞に対して特異的なアデノウイルスベクターは、WO98/39466に記載される。なお、この特許を参照することにより本明細書に含めることを明言する。

#### 【0132】

本明細書で用いる「前立腺特異的抗原 (PSA) の転写調節エレメント」、または「PSA-TRE」、または「PSE-TRE」は、PSA-TREが働くのを可能とする宿主細胞、例えば、アンドロゲン受容体を発現する細胞（好ましくは、哺乳類細胞、さらに好ましくは、ヒト細胞、さらに好ましくは前立腺細胞）において動作的に結合するポリヌクレオチド配列の転写を選択的に増大させるポリヌクレオチド配列、好ましくはDNA配列である。従って、PSA-TREは、アンドロゲン受容体への結合に対して反応性を持ち、PSAプロモーターおよび/またはPSAエンハンサーの少なくとも一部（すなわち、ARE、またはアンドロゲン受容体結合部位）を含む。前立腺において活性を持ち、アデノウイルスベクターにおいて使用される組織特異的エンハンサーは、WO95/19434およびWO97/01358に記載される。なお、これらの特許それぞれを参照することにより本明細書に含めることを明言する。

#### 【0133】

本明細書で用いる「がん胎児性抗原 (CEA) 転写調節エレメント」、または「CEA-TRE」は、CEA-TREが働くのを可能とする宿主細胞、例えば、CEAを発現する細胞（好ましくは、哺乳類細胞、さらに好ましくは、ヒト細胞）において動作的に結合するポリヌクレオチド配列の転写を選択的に増大させるポリヌクレオチド配列、好ましくはDNA配列である。従って、CEA-TREは、CEA生産細胞に関連する転写因子および/または補因子（単複）に対して反応性を持ち、CEAプロモーターおよび/またはCEAエンハンサーの少なくとも一部を含む。がん胎児性抗原を発現する細胞に対して特異的なアデノウイルスベクターは、WO98/39467に記載される。なお、この特許を参照することにより本明細書に含めることを明言する。

#### 【0134】

本明細書で用いる「アルファ-フェトプロテイン (AFP) 転写調節エレメント」または「AFP-TRE」は、AFP-TREが働くのを可能とする宿主細胞、例えば、AFPを発現する細胞（好ましくは、哺乳類細胞、さらに好ましくは、ヒト細胞）において動

作的に結合するポリヌクレオチド配列の転写を選択的に増大させるポリヌクレオチド配列、好ましくはDNA配列である。従って、AFP-TREは、AFP-生産細胞に関連する転写因子および/または補因子(単複)に対して反応性を持ち、AFPプロモーターおよび/またはエンハンサーの少なくとも一部を含む。アルファ-フェトプロテインを発現する細胞に対して特異的なアデノウイルスベクターは、WO98/39465に記載される。なお、この特許を参照することにより本明細書に含めることを明言する。

#### 【0135】

本明細書で用いる「ムチン遺伝子(MUC)転写調節エレメント」または「MUC1-TRE」は、MUC1-TREが働くのを可能とする宿主細胞、例えば、MUC1を発現する細胞(好ましくは、哺乳類細胞、さらに好ましくは、ヒト細胞)において動作的に結合するポリヌクレオチド配列の転写を選択的に増大させるポリヌクレオチド配列、好ましくはDNA配列である。MUC1-TREは、MUC1-生産細胞に関連する転写因子および/または補因子(単複)に対して反応性を持ち、MUC1プロモーターおよび/またはエンハンサーの少なくとも一部を含む。

10

#### 【0136】

本明細書で用いる「尿路細胞特異的転写反応エレメント」または「尿路細胞特異的TRE」は、尿路上皮特異的TREが働くのを可能とする宿主細胞、例えば、標的細胞において動作的に結合するポリヌクレオチド配列の転写を選択的に増大させるポリヌクレオチド配列、好ましくはDNA配列である。様々の尿路上皮細胞特異的TREが既知であり、細胞タンパク質(尿路上皮細胞と関連する転写因子および/または補因子(単複))に対して反応性を持ち、かつ、尿路上皮特異的プロモーターおよび/または尿路上皮特異的エンハンサーの少なくとも一部を含む。例示の尿路上皮細胞特異的転写調節配列は、ヒトまたはげっ歯類のウロプラキン(ur opl a k i n ; U P)、例えば、UPI、UPII、UPIII等を含む。ヒトの尿路上皮細胞特異的ur opl a k i n転写調節配列、および、同配列を含むアデノウイルスベクターは、WO01/72994に記載される。なお、この特許を参照することにより本明細書に含めることを明言する。

20

#### 【0137】

本明細書で用いる「メラノサイト細胞特異的転写反応エレメント」または「メラノサイト細胞特異的TRE」は、メラノサイト特異的TREが働くのを可能とする宿主細胞、例えば、標的細胞において動作的に結合するポリヌクレオチド配列の転写を選択的に増大させるポリヌクレオチド配列、好ましくはDNA配列である。様々のメラノサイト細胞特異的TREが既知であり、細胞タンパク質(メラノサイト細胞と関連する転写因子および/または補因子(単複))に対して反応性を持ち、かつ、メラノサイト特異的プロモーターおよび/またはメラノサイト特異的エンハンサーの少なくとも一部を含む。本明細書には、メラノサイト特異的TREの活性を測定するための方法、従って、任意の細胞が、メラノサイト細胞特異的TREを機能させるかどうかを決めるための方法が記載される。本発明の実施の際に使用されるメラノサイト特異的TREの例としては、チロシナーゼ遺伝子の5'隣接領域から得られるTRE、チロシナーゼ関連タンパク質1遺伝子、チロシナーゼ関連タンパク質-2遺伝子の5'隣接領域から得られるTRE、MART-1遺伝子の5'隣接領域から得られるTRE、または、メラノーマにおいて異常に発現される遺伝子の5'隣接領域から得られるTREが挙げられるが、ただしこれらに限定されない。

30

40

#### 【0138】

別の局面では、本発明は、アデノウイルス複製に必須の遺伝子、または導入遺伝子に動作的に結合されるPRL-3遺伝子から得られる、転移性結腸がん特異的TREを含むアデノウイルスベクターを提供する。本明細書で用いる「PRL-3遺伝子から得られる、転移性結腸がん特異的TRE」、または「PRL-3 TRE」は、PRL-3 TREが働くのを可能とする宿主細胞、例えば、細胞(好ましくは、哺乳類細胞、さらに好ましくは、ヒト細胞、さらに好ましくは転移性結腸がん細胞)において動作的に結合するポリヌクレオチド配列の転写を選択的に増大させるポリヌクレオチド配列、好ましくはDNA配列である。転移性結腸がん特異的TREは、1個以上の調節配列、例えば、同じ、また

50

は異なる遺伝子から得られてもよいエンハンサー、プロモーター、転写因子結合部位等を含んでもよい。一つの好ましい実施態様では、PRL-3 TREは、PRL-3プロモーターを含む。一つの好ましいPRL-3 TREは、WO04/009790に記載されるように、PRL-3遺伝子の翻訳開始コドンの0.6 kb配列上流から得られる。なお、この特許を参照することにより本明細書に含めることを明言する。

#### 【0139】

別の局面では、本発明は、アデノウイルス複製に必須の遺伝子、または導入遺伝子に動作的に結合されるCRG-L2遺伝子から得られる、肝臓がん特異的TREを含むアデノウイルスベクターを提供する。本明細書で用いる「CRG-L2遺伝子から得られる、肝臓がん特異的TRE」、または「CRG-L2 TRE」は、CRG-L2が働くのを可能とする宿主細胞、例えば、細胞（好ましくは、哺乳類細胞、さらに好ましくは、ヒト細胞、さらに好ましくは肝臓がん細胞）において動作的に結合するポリヌクレオチド配列の転写を選択的に増大させるポリヌクレオチド配列、好ましくはDNA配列である。肝臓がん特異的TREは、1個以上の調節配列、例えば、同じ、または異なる遺伝子から得られてもよいエンハンサー、プロモーター、転写因子結合部位等を含んでもよい。一つの好ましい実施態様では、CRG-L2 TREは、米国仮出願第60/511,812号に記載されるように、CRG-L2遺伝子の翻訳開始コドンの0.8 kb配列上流から、または該0.8 kb配列内に含まれる0.7 kb配列から、または該0.8 kb配列から得られるEcoRIからNcoIまでの断片から得られてもよい。なお、この特許文書を参照することにより本明細書に含めることを明言する。

10

20

#### 【0140】

別の局面で、本発明は、アデノウイルス複製に必須の遺伝子、または導入遺伝子に動作的に結合されるEBV-特異的転写調節エレメント(TRE)を含むアデノウイルスベクターを提供する。一つの局面では、EBV特異的TREは、米国仮出願第60/423,203号にさらに記載されるように、LMP1、LMP2A、またはLMP2B遺伝子の翻訳開始コドンの上流の配列から得られる。なお、この特許文書を参照することにより本明細書に含めることを明言する。EBV-特異的TREは、1個以上の調節配列、例えば、同じ、または異なる遺伝子から得られてもよいエンハンサー、プロモーター、転写因子結合部位等を含んでもよい。

#### 【0141】

さらに別の局面では、本発明は、アデノウイルス複製に必須の遺伝子、または導入遺伝子に動作的に結合される低酸素症特異的転写調節エレメント(HRE)を含むアデノウイルスベクターを提供する。HREは、転写複合体HIF-1、または低酸素症誘発因子-1に対する結合部位を含む転写調節エレメントであり、血管内皮増殖因子を含むいくつかの遺伝子の調節領域、および、enolase-1を含む糖分解酵素をコードするいくつかの遺伝子と相互作用を持つ。従って、一つの実施態様では、アデノウイルスベクターは、WO00/15820にさらに記載されるように、細胞状態特異的TRE、例えば、HREの転写調節下に、アデノウイルス遺伝子、好ましくは、複製に必須の、アデノウイルス遺伝子を含む。なお、この特許文書を参照することにより本明細書に含めることを明言する。

30

40

#### 【0142】

さらに別の局面では、本発明は、アデノウイルス複製に必須の遺伝子、または導入遺伝子に動作的に結合される「テロメラーゼプロモーター」または「TERTプロモーター」を含むアデノウイルスベクターを提供する。本明細書で用いる「テロメラーゼプロモーター」または「TERTプロモーター」は、天然のTERTプロモーター、および、その機能的断片、突然変異、および誘導体を指す。TERTプロモーターは、全長のプロモーター、または野生型のプロモーターである必要はない。当業者であれば、TERTプロモーターから断片を誘導し、所望の選択性についてそれらを試験する方法を知っている。本発明のTERTプロモーター断片は、腫瘍細胞に対して選択的なプロモーター活性を持つ、すなわち、動作的に連結するコード配列の腫瘍選択的発現を駆動する。一つの実施態様で

50

は、本発明のTERTプロモーターは、哺乳類のTERTプロモーターである。別の実施態様では、哺乳類TERTプロモーターは、ヒトのTERT(hTERT)プロモーターである。本発明の組成物および方法において有用性が認められる、例示のTERTプロモーターについては、例えば、WO98/14593およびWO00/46355を参照のこと。

#### 【0143】

さらに別の局面では、本発明は、アデノウイルス複製に必須の遺伝子、または導入遺伝子に動作的に結合される「E2Fプロモーター」を含むアデノウイルスベクターを提供する。本明細書で用いる「E2Fプロモーター」は、天然のE2Fプロモーター、および、その機能的断片、突然変異、および誘導体を指す。E2Fプロモーターは、全長のプロモーター、または野生型のプロモーターである必要はない。当業者であれば、E2Fプロモーターから断片を誘導し、所望の選択性についてそれらを試験する方法を知っている。本発明のE2Fプロモーター断片は、腫瘍細胞に対して選択的なプロモーター活性を持つ、すなわち、動作的に連結するコード配列の腫瘍選択的発現を駆動する。E2Fプロモーターについてはいくつかの例が知られている。例えば、Parr et al. Nature Medicine 1977:3(10)1145-1149、WO02/067861、US20010053352、およびWO98/13508を参照のこと。

10

#### 【0144】

プロテインウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子(uPA)、およびその細胞表面受容体、ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子受容体(uPAR)は、もっとも頻繁に見られる新生物の多くに発現し、がん転移において重要なタンパク質を代表するように見える。両タンパク質共、乳がん、結腸がん、前立腺がん、肝臓がん、腎臓がん、肺がん、および卵巣がんに関与している。uPAおよびuPARの転写を調節する配列エレメントは広範に研究されている。(Riccio et al. (1985) Nucleic Acid Res. 13:2759-2771; Cannio et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19:2303-2308; さらにWO98/39464も参照)。

20

#### 【0145】

(アデノウイルスベクターの調製および生産)

挿入配列発現用アデノウイルスベクター生成のための標準システムは、従来技術で既知であり、市場の供給業者から入手が可能である。例えば、Clontech(Palo Alto, カリフォルニア州)から市販されるAdeno-X(登録商標)(Clontech techniques(2000年1月)p.10-12)、共にQbiogene(Carlsbad, カリフォルニア州)から市販されるAdenovator(登録商標)アデノウイルスベクターシステムおよびAdEasy(登録商標)である。

30

#### 【0146】

好都合なことに、アデノウイルスの必要部分を供給するプラスミドの利用が可能である。プラスミドpXC.1(McKinnon(1982)Gene 19:33-42)は、Ad5の野生型の左手末端を含む。pBHG10(Bett et al. (1994); Microbix Biosystems Inc., トロント)は、E3における欠失を含む、Ad5の右手末端を提供する。pBHG11は、さらに大きなE3欠失を提供する。すなわち、さらに0.3kbが除去される(Bett et al. (1994))。それとは別に、pBHG E3(Microbix Biosystems, Inc.)を用いることによって、E3の全長を含む、Ad5の右手末端が得られる。

40

#### 【0147】

早期遺伝子の操作のために、Ad5 E1Aの転写開始部位は498にあり、E1Aコード分節のATG開始部位は、ウイルスゲノムの560にある。この領域は、異種TREの挿入のために使用することが可能である。

#### 【0148】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いることによって制限部位を導入してもよい。そ

50

の際、使用されるプライマーはA d 5 ゲノムに限定されてもよいし、あるいは、A d 5 ゲノムDNAを担うプラスミド部分を含んでもよい。例えば、p B R 3 2 2を用いる場合、プライマーは、p B R 3 2 2バックボーンにE c o R I部位を、そして、A d 5のn t 1 3 3 9にX b a I部位を用いてもよい。P C Rを2段階実行することによって、その際、領域の中央で重複するプライマーがヌクレオチド配列変化を導入し、これが一意的な制限部位をもたらすと、その部位に異種T R Eを挿入することが可能になる。

#### 【0149】

E 1 Bに対し動作的に結合する異種T R Eエレメントの挿入にも類似の戦略を使用してよい。A d 5のE 1 Bプロモーターは、S p 1およびT A T Aボックスに対して高い親和性を持つ単一認識部位から成る。この領域は、A d 5 n t 1 6 3 6から1 7 0 1に延びる。この領域に細胞特異的異種T R Eを挿入することによって、E 1 B遺伝子の細胞特異的転写を実現することが可能となる。細胞特異的反応エレメント調節性E 1 Aによって改変された左手領域を、E 1 Bを調節する異種T R Eを導入するための鋳型として用いることによって、得られたアデノウイルスベクターは、E 1 AとE 1 B両方の発現について細胞特異的転写因子に依存するようになる。いくつかの実施態様では、E 1 Bの1 9 - k D a領域の一部または全部が除去される。

10

#### 【0150】

同様に、細胞特異的異種T R Eは、その発現を細胞特異的とするために、E 2遺伝子の上流に挿入されてもよい。A d 5の約2 7 0 5 0 - 2 7 1 5 0にマップされる、E 2早期プロモーターは、大および小転写開始部位であって、後者は、E 2転写の約5%を占める二つの開始部位、2個の非標準的T A T Aボックス、2個のE 2転写因子結合部位、および、1個のA T F転写因子結合部位から成る(E 2プロモーター構造の詳細については、Swaminathan et al., Curr. Topics in Micro. and Immunol. (1995) 199 (part 3): 177 - 194の総説を参照のこと)。

20

#### 【0151】

E 2後期プロモーターは、対向鎖によってコードされる遺伝子のコード配列と重複し、従って遺伝子操作に応じない。しかしながら、E 2早期プロモーターは、僅か数塩基ペアの範囲ではあるが、対向鎖の3 3 k Dタンパク質をコードする配列と重複する。特に、S p e I制限部位(A d 5位置2 7 0 8 2)は、前述の3 3 k Dタンパク質の開始コドンの一部であり、好都合にも、大E 2早期転写開始部位とT A T A結合タンパク質部位とを、上流の転写因子結合部位E 2 FおよびA T Fとから隔てる。従って、S p e I末端を持つ異種T R EのS p e I部位への挿入は、A d 5の内因性E 2早期プロモーターを破壊することになり、E 2転写の細胞特異的発現を可能とする筈である。

30

#### 【0152】

E 4については、アデノウイルスゲノムの右手部分を用いなければならない。E 4転写開始部位は、A d 5では主に約n t 3 5 6 0 5にあり、T A T Aボックスは約n t 3 5 6 3 1にあり、O R F Iの最初のA U G / C U Gは約n t 3 5 5 3 2にある。Virtanen et al. (1984) J. Virol. 51: 822 - 831. 他の遺伝子についても上記の戦略の内の任意のものを用いて、異種T R Eが転写開始部位の上流に導入される。E 4領域に異種T R Eを挿入させた全長アデノウイルスを構築するには、E 4タンパク質をtransで供給し、これらのタンパク質の合成における欠陥を補償するW 1 6 2細胞において同時トランスフェクションおよび相同組み換えを行ってもよい(Weinberg et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 5383 - 5386)。

40

#### 【0153】

一つの実施態様では、本発明は、アデノウイルスベクターであって、アデノウイルス遺伝子が第1 T R Eの転写調節下にあり、A D Pをコードするポリヌクレオチド配列が第2 T R Eエレメントの調節下にあり、かつ、前記アデノウイルス遺伝子が複製に必須であることが好ましいアデノウイルスベクターを提供する。A D PをコードするDNA配列、お

50

よび A D P のアミノ酸配列は、公共機関から入手が可能である。手短に言うと、A D P コード配列は、従来技術で既知の技術、例えば、P C R を用いて A d から得られる。Y リーダー（後期遺伝子の適正な発現にとって重要な配列である）も入手され、A D P コード配列に連結される。A D P コード配列（Y リーダーを持つ、または持たない）は次に、アデノウイルスゲノムに、例えば、E 3 領域（ここでは、A D P コード配列は、M L P によって駆動される）の中に導入される。A D P コード配列はまた、アデノウイルスゲノムの他の場所に、例えば、E 4 領域に挿入することも可能である。別態様として、A D P コード配列は、異なるタイプの T R E、例えば、別のウイルス T R E、ただしこれに限定されない、を含む T R E に動作的に連結されてもよい。一つの実施態様では、本発明のベクターは、その天然の T R E に動作的に結合される A D P を持つ。

10

#### 【0154】

本発明のウイルスベクターは、従来技術で標準的な組み換え技術を用いて調製が可能である。複製可能または複製不能ウイルスベクターを改変する方法は、従来技術においてよく知られており、本明細書に、また、本明細書に引用される出版物にも記載される。アデノウイルスベクターを改変し、導入遺伝子および所望の転写エレメントをアデノウイルスにおいてクローンするための、様々の方法は、本明細書に記載され、標準的であり、従来技術でよく知られる。アデノウイルスゲノムの様々な部分を含む各種のプラスミドが、アデノウイルスの全ゲノムを含むプラスミドを含めて従来技術には存在する。これらのプラスミドの構築は、従来技術（例えば、U S 2 0 0 3 0 1 0 4 6 2 5）に十分に記載されている。一旦改変される部位が選択されたならば、適切なプラスミドを用いてその改変を実行することが可能である。次に、改変を、例えば、相同組み換え、またはインビトロ連結を用いて、全長アデノウイルスベクターゲノムの中に導入してもよい。相同組み換えは、例えば、哺乳類細胞（例えば、P e r C 6）、または細菌細胞（例えば、E . c o l i、W O 9 6 1 7 0 7 0 を参照のこと）中で行ってもよい。それとは別に、またはそれに加えてさらに、ウイルスベクターゲノムの操作は、よく知られた分子生物学方法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）、P C R - S O E i n g、および制限酵素消化、ただしこれらに限定されないが、を含む方法を含んでもよい。相同組み換えを用いる場合には、二つのプラスミドは、少なくとも約 5 0 0 b p の配列重複を共有すべきである。もっとも、通常は効率は低くなるが、それよりも小さい重複領域でも組み換えは起こる。要すれば、各プラスミドは独立に操作され、次にコンピテントな宿主に同時トランスフェクトされると、アデノウイルスベクターの継代に好適な相補的遺伝子を提供する。プラスミドは一般に、適切な形質導入手段、例えば、陽イオン性リポソーム、またはリン酸カルシウムを用いて、適切な宿主細胞（例えば、2 9 3、P e r C . 6、H e l a - S 3 細胞）に導入される。別態様として、アデノウイルスゲノムの右手および左手部分のインビトロ連結を用いて、アデノウイルスゲノムの全ての複製必須部分を含む組み換えアデノウイルス誘導体を構築することが可能である。B e r k n e r e t a l . ( 1 9 8 3 ) N u c l e i c A c i d R e s e a r c h 1 1 : 6 0 0 3 - 6 0 2 0 ; B r i d g e e t a l . ( 1 9 8 9 ) J . V i r o l . 6 3 : 6 3 1 - 6 3 8。

20

30

#### 【0155】

ウイルスベクター用「プロデューサー細胞」は従来技術でよく知られる（例えば、P C T / U S 9 8 / 0 4 0 8 0）。プロデューサー細胞とは、アデノウイルスベクターがその中で運ばれ、複製され、バックされてビリオンとなる細胞である。好ましいパッケージング細胞は、野生型アデノウイルス粒子となる可能性のある相同組み換えを制限するように設計されたものである。ウイルスベクターの必須遺伝子が除去されたり、または不活性化された場合、プロデューサー細胞が、その不活性化遺伝子を補う。本発明のアデノウイルス粒子を生産するために使用することが可能な細胞としては、ヒト胎児腎臓細胞株 2 9 3（G r a h a m e t a l . , J . G e n . V i r o l . 3 6 : 5 9 - 7 2 ( 1 9 7 7 )）、ヒト胎児網膜芽細胞株 P E R . C 6（米国特許第 5, 9 9 4, 1 2 8 および 6, 0 3 3, 9 0 8 号；F a l l a u x e t a l . , H u m . G e n e T h e r . 9 : 1 9 0 9 - 1 9 1 7 ( 1 9 9 8 )）、およびヒト頸部腫瘍由来細胞株 H e L a - S 3（P C

40

50



T出願番号US 04 / 1 1 8 5 5 ) が挙げられる。それとは別に、またはそれに加えて、プロデューサー細胞は、ウイルスベクターにおいて選択的に調節または不活性化される遺伝子を発現してもよい。本発明の一つの実施態様は、本発明のアデノウイルスベクターを含むプロデューサー細胞を含む。

#### 【0156】

(キメラアデノウイルス線維タンパク質)

アデノウイルスの線維タンパク質は、ビリオンの、細胞受容体に対する付着にとって重要な役割を果たす。従来技術において、数種の異なるアデノウイルス血清型から得られた線維遺伝子の配列が知られる。線維タンパク質は三つのドメインに分割される。保存されるN末端は、ペントン基との連結、および核局在信号を担当する配列を含む。様々の長さを持つロッド様「シャフト」は、15 - アミノ酸ベータ構造から成る反復を含み、反復の数は、Ad 3の6から、Ad 5の22の範囲に渡る。配列TLWTを含む、アミノ酸の保存直線部が、シャフトのベータ構造の反復単位と、小球状のヘッドドメインとの間の境界を識別する。C末端ヘッドドメインは、サイズにおいて、Ad 41の短線維における157アミノ酸残基から、Ad 5線維の188残基までの範囲に渡る。線維スパイクはホトリマーであり、ビリオン当たり12本のスパイクがあり、これらは、ペントン基複合体との連結を介して付着する。線維タンパク質は、機能的であるためには、3重合することができなければならない。3重合ドメインは、天然ドメインであっても、または異種の3重合ドメインであってもよい。

10

#### 【0157】

本発明において有用なキメラアデノウイルス線維は、サブグループCアデノウイルス(例えば、Ad 1、2、5、および6血清型)のシャフト領域の少なくとも一部、および、サブグループBアデノウイルス(例えば、Ad 3、7、11、14、16、21、35、および50)のヘッド領域の少なくとも一部を含む。その際、ヘッド領域はCD 46に結合する。一つの実施態様では、完全なシャフト領域がAd 2またはAd 5から得られ、完全なヘッド領域がAd 35から得られる。別の実施態様では、キメラ線維は、サブグループCアデノウイルスシャフト領域の一部、および、CD 46に結合するアデノウイルスのヘッド領域を含む。CD 46に結合する線維ヘッド領域は、Ad 3 (Sirena et al., J. Virol., 2004 May; 78(9): 4454-62)、11、14、16、21、35、37、および50から得られるものであるが、ただしそれらに限定されない。別の実施態様では、キメラ線維タンパク質は、ウシのアデノウイルスシャフトドメイン、および、Ad 3、7、11、14、16、21、35、37、50、およびサブグループDアデノウイルスからなる群より選択されるアデノウイルス血清型から得られたヘッド領域の一部を含む。別の実施態様では、キメラ線維タンパク質は、サブグループCアデノウイルスシャフト領域の一部、および、サブグループDアデノウイルスのヘッド領域の一部を含む。下記の実施例において、Ad 2またはAd 5由来アデノウイルスベクターで、Ad 2またはAd 5シャフトおよびAd 35ヘッド領域を含むキメラ線維を有するアデノウイルスベクターは、天然のAd 5またはAd 35線維タンパク質を有する同じアデノウイルスベクターよりも効率的にある種の原因性腫瘍細胞に形質導入することが証明された。当業者であれば、原因性腫瘍細胞に対する形質導入の強化を維持しながら、キメラ線維タンパク質に対しさらに別の改変を施すことが可能であることは認識されるであろう。

20

30

40

#### 【0158】

GenBank AAA75331は、Ad 35線維の配列を開示する。これは例示の配列であり、いくつかのゲノム変異種が存在する(Flomenberg et al., J. Infect. Dis., 155(6) 1127-1134 (1987))。本発明を実施するに際し、Ad 35ヘッド領域から得られるアデノウイルスのタンパク質部分は、任意のAd 35ゲノム変異種から得られてもよい。

#### 【0159】

従来技術および本明細書で与えられる参考文献案内で知られるAd 2、Ad 5、および

50

A d 3 5 の配列情報があるからには、当業者であれば、腫瘍細胞、特に、原発性腫瘍細胞に対する形質導入の強化を実現するために、A d 2 または A d 5 シャフトの適切な部分、および A d 3 5 ヘッドの適切部分を組み合わせることは可能である。例えば、当業者であれば、様々な配列部分の組み合わせ方を決めるために、欠失および置換分析を実行することが可能である。

#### 【 0 1 6 0 】

一つの実施態様では、キメラ線維タンパク質は、アデノウイルス血清型 5 ( A d 5 ) の完全な線維シャフト ( 配列番号 2 のアミノ酸 4 7 から 3 9 9 )、または、A d 2 の完全な線維シャフト ( 配列番号 4 のアミノ酸 4 7 から 3 9 9 ) を含む。別の実施態様では、キメラ線維タンパク質は、アデノウイルス血清型 3 5 の線維タンパク質由来のヘッド領域 ( 配列番号 6 のアミノ酸 4 6 から 1 3 2 ) を含む。別の実施態様では、キメラ線維タンパク質は、アデノウイルス血清型 5 ( A d 5 ) の完全な線維シャフト ( 配列番号 2 のアミノ酸 4 7 から 3 9 9 )、または、A d 2 の完全な線維シャフト ( 配列番号 4 のアミノ酸 4 7 から 3 9 9 )、および、アデノウイルス血清型 3 5 の線維タンパク質由来のヘッド領域 ( 配列番号 6 のアミノ酸 4 6 から 1 3 2 ) を含む。別の実施態様では、キメラ線維タンパク質は、A d 2 または A d 5 線維シャフトから得られた配列部分、および、A d 3 5 のヘッド領域から得られた配列部分を含む。

10

#### 【 0 1 6 1 】

一つの実施態様では、A d 5 または A d 2 シャフト領域は、K K T K 配列 ( 配列番号 2 または配列番号 4 のアミノ酸 9 1 - 9 4 ) を保持する。別の実施態様では、天然シャフト配列中の K K T K 配列 ( 配列番号 2 または配列番号 4 の残基 9 1 - 9 4 ) は、除去されるか、変異される。一つの実施態様では、A d 5 シャフトは、K L G T G L S F D 配列 ( 配列番号 2 のアミノ酸 3 7 6 - 3 8 4 ) を保持し ( Wu et al. J. Virol. 2003 Jul; 77 ( 13 ) : 7225 - 35 )、A d 2 シャフトは、K L G A G L S F D 配列 ( 配列番号 4 のアミノ酸 3 7 6 - 3 8 4 ) を保持するか、あるいは、該シャフトは、共通モチーフ K L G X G L X F D / N ( 配列番号 7 ; Wu et al. 2003 ) を含む。一つの実施態様では、A d 5 シャフトは、屈曲性ドメインを持つ、シャフトの第 3 反復領域を含む G N L T S Q N V T T V S P P L K K T K ( 配列番号 2 のアミノ酸 7 6 - 9 4 ) を保持する。ある別の実施態様では、A d 3 5 シャフトは、該シャフトの第 3 反復列 ( G T L Q E N I R A T A P I T K N N ) を含む。これは、線維の屈曲性に与る配列 ( 配列番号 6 のアミノ酸 7 6 - 9 2 ) を欠く。

20

30

#### 【 0 1 6 2 】

キメラ線維タンパク質は、さらに別の改変、例えば、ある特定の細胞タイプ、または 1 種を超える細胞タイプに対するウイルスベクター粒子の結合を低減するもの、ある特定の細胞タイプ、または 1 種を超える細胞タイプに対するウイルスベクター粒子の結合を強化するもの、および / または、動物におけるアデノウイルスベクターに対する免疫応答を低減させるものを含む改変をさらに含んでもよいが、改変は上記に限定されない。このような改変の例は、米国出願第 1 0 / 4 0 3 , 3 3 7 号、W O 9 8 / 0 7 8 7 7、W O 0 1 / 9 2 2 9 9、W O 2 0 0 3 / 6 2 4 0 0、および米国特許第 5 , 9 6 2 , 3 1 1、6 , 1 5 3 , 4 3 5、6 , 4 5 5 , 3 1 4、および Wu et al. ( J. Virol. 2003 Jul 1; 77 ( 13 ) : 7225 - 7235 ) に記載されるものを含むが、ただしこれらに限定されない。

40

#### 【 0 1 6 3 】

キメラ線維タンパク質の H I ループ、またはカルボキシル末端には非天然性リガンドが含まれてもよい。

#### 【 0 1 6 4 】

( 自己プロセッシング切断部位および 2 A 様配列 )

本発明の別の局面では、一つの m R N A から二つのポリペプチドを発現するために、「自己プロセッシング切断部位」( 例えば、2 A 様配列 ) が利用される。「自己プロセッシング切断部位」または「自己プロセッシング切断配列」は、D N A またはアミノ酸配列であって

50

、翻訳されると、自己プロセッシング切断部位を含むポリペプチドの、速やかな分子内 (cis) 切断が起こり、それぞれ別々の成熟タンパク質、またはポリペプチド産物が得られる、DNA またはアミノ酸配列と定義される。このような「自己プロセッシング切断部位」はまた、翻訳後、または翻訳時処理切断部位と呼ばれてもよく、本明細書では、2A 部位、配列、またはドメインと表示される。本明細書で用いる「自己プロセッシングペプチド」は、事故処理切断部位または配列であって、翻訳されると、自己プロセッシング切断部位を含むタンパク質またはポリペプチドの、速やかな分子内 (cis) 切断を仲介し、それぞれ別々の成熟タンパク質、またはポリペプチド産物を生成する、事故処理切断部位または配列をコードする DNA 配列のペプチド発現産物と、本明細書では定義される。2A 部位、配列、またはドメインは、リボソームの活性を改変してエステル結合の加水分解を促進し、それによって、ある 1 個の下流翻訳産物の合成の進行を可能とするやり方で、翻訳複合体からポリペプチドを放出させる、そのような翻訳作用を呈示することが報告されている (Donnelly et al., J. Gen. Virol. 2001 May; 82 (Pt 5): 1013 - 25)。それとは別に、2A 部位、配列、またはドメインは、cis の、自身の C 末端を切断することによって「自己タンパク質分解」または「切断」を呈示し、一次切断産物を生成することも報告されている (Furler; Palmenberg, Ann. Rev. Microbiol. 44: 603 - 623 (1990))。

10

#### 【0165】

2A 配列の変異種について、その、ポリタンパク質の効率的処理仲介能力に関して試験された (Donnelly et al., J. Gen. Virol. 82: 1027 - 1041 (2001))。相同体および変異 2A 配列は、本発明の範囲内に含まれる。

20

#### 【0166】

オープンリーディングフレームの間において、自己プロセッシング切断配列、例えば、2A または 2A 様配列をコードする配列を含むベクター構築物は、切断後、自己プロセッシング切断配列を含むアミノ酸を取り除くために、該自己プロセッシング切断配列に隣接してさらに別のタンパク質分解切断部位を含んでもよい。この「追加のタンパク質分解性切断部位」という用語は、自己プロセッシング切断部位、例えば、2A または 2A 様配列に接続して本発明のアデノウイルスベクターに組み込まれ、自己プロセッシング切断配列による切断後に残留する付加的アミノ酸を除去する手段を与える配列を指す。例示の「追加のタンパク質分解性切断部位」は本明細書に記載されるが、共通配列 R X K (R) R を有するフリン切断部位を含むが、ただしそれに限定されない。オープンリーディングフレームの間において、自己プロセッシング切断配列、例えば、2A または 2A 様配列をコードする配列を含み、さらに追加のタンパク質分解切断部位を含むベクター構築物が、これも米国特許出願第 10 / 831, 302 号に記載されている。なお、この特許を参照することにより本明細書に含めることを明言する。

30

#### 【0167】

一つの実施態様では、本発明は、残留アミノ酸を除去するための方法、および、同方法発現のための組成物を提供する。タンパク質の C 末端からの付加的アミノ酸の除去を実行する、新規の構築物がいくつか設計されている。フリン切断は、C 末端における、共通配列 R X R (K) R を持つ切断部位で起こる。X は任意のアミノ酸である。一つの局面で、本発明は、カルボキシペプチダーゼ (CP) と呼ばれる一群の酵素、例えば、カルボキシペプチダーゼ D、E、および H (CPD、CPE、CPH) を含む、がそれらに限定されない、酵素群から選ばれる酵素を用いることによって、タンパク質の C 末端から、新規に暴露された塩基性アミノ酸残基 R または K を除去するための手段を提供する。CP は、タンパク質の C 末端における塩基性アミノ酸残基を取り除くことが可能であるから、もっぱら塩基性アミノ酸残基 R または K、例えば、R K K R (配列番号 25)、R K R R (配列番号 26)、R R R R (配列番号 27) を含む、フリン切断部位から得られる全てのアミノ酸残基は、CP によって除去することが可能である。

40

#### 【0168】

50

本発明の一つの実施態様では、自己プロセッシング切断部位（例えば、2 Aまたは2 A様配列）は、アデノウイルスタンパク質コード領域および導入遺伝子に動作的に結合される。アデノウイルスタンパク質CDSは、導入遺伝子を下流とし、自己プロセッシング切断部位の上流にあってもよい。別態様として、導入遺伝子CDSは、アデノウイルスタンパク質CDSを下流とし、自己プロセッシング切断部位の上流にあってもよい。

【0169】

複数のCDSは、自己プロセッシング切断部位によって結合されてもよい。一つの実施態様では、Ad CDSは、自己プロセッシング切断部位によって、第1導入遺伝子に動作的に結合され、前記第1導入遺伝子は、自己プロセッシング切断部位によって、第2導入遺伝子に動作的に結合される。一つの実施態様では、第1および第2導入遺伝子は、同じか、または異なるタンパク質をコードする。

10

【0170】

（導入遺伝子）

本発明のベクターは、1個以上の導入遺伝子を含んでもよい。このようにして、様々な遺伝的能力を標的細胞に導入することが可能である。

【0171】

「サイトカイン」、またはその文法的等価物としては、ただし限定されないが、局所的に作用し、血液中を循環しないホルモンであって、本発明に従って用いられると、個体の免疫応答の変更をもたらすホルモンが挙げられる。さらに、サイトカインの定義に含まれるものとして、個体の免疫応答の変更をもたらす接着または補助分子が挙げられる。従って、サイトカインの例としては、ただし限定されないが、IL-1（aまたはP）、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、GM-CSF、M-CSF、G-CSF、LIF、LT、TGF- $\beta$ 、 $\gamma$ -IFN、 $\alpha$ -IFN、P-IFN、TNF- $\alpha$ 、BCGF、CD2、またはICAMが挙げられる。前述のサイトカイン、およびその他の適用可能な免疫調節剤の記述は、「Cytokines and Cytokine Receptors」, A. S. Hamlin, D. Male (ed.), Oxford University Press, New York (1993)、または、「Guidebook to Cytokines and Their Receptors」, N. A. Nicola (ed.), Oxford University Press, New York, NY (1995)の中に見出すことが可能である。ヒトにおける治療的使用を意図する場合、サイトカインは、ヒトのタンパク質形と実質的に類似することが好ましく、あるいは、ヒトの配列（すなわち、ヒト起源の）から得られたものであることが好ましい。一つの良い実施態様では、導入遺伝子は、サイトカイン、例えば、GM-CSFである。

20

30

【0172】

さらに、IL-2、GM-CSF、TNF- $\alpha$ 、およびその他に対し、実質的に構造的な相同性、および/または、アミノ酸配列同一性を持つ、他の哺乳類のサイトカインも、免疫系に対し類似の活性を示すことが証明された場合は、本発明にとって有用である。同様に、任意の特定のサイトカインと実質的に類似するが、タンパク質配列の保存的变化を持つタンパク質も、本発明にとって有用と考えられる。従って、タンパク質配列における保存的置換は、タンパク質分子の機能性を妨げることなく可能と考えられるから、本発明においてサイトカインとして機能しながら、現在既知の配列とは若干異なるアミノ酸配列を持つタンパク質を調製することは可能である。このような保存的置換としては、通常、下記のグループ、すなわち、グリシン、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リシン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン、内部における置換が挙げられる。

40

【0173】

最後に、本出願書における「サイトカイン」の単数形または複数形は、指示詞として使用されるのではなく、本発明および請求項の解釈を制限するものではない。サイトカイン

50

の外に、接着または補助分子、またはそれらの組み合わせも、単独、またはサイトカインと組み合わせる用いることが可能である。

【0174】

顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) は、線維芽細胞、内皮細胞、T細胞、およびマクロファージによって生産されるサイトカインである。このサイトカインは、顆粒球およびマクロファージ系統の造血細胞の増殖を誘発することが明らかにされている。さらに、このサイトカインは、免疫系の主要抗原提示細胞 (APC) である樹状細胞の抗原処理および提示機能を活性化する。動物モデル実験の結果は、GM-CSF 生産腫瘍細胞 (すなわち、GVAX) は、両親から受け継いだ、非形質導入性腫瘍細胞に対する免疫応答を誘起することが可能であることを疑問の余地無く示した。

10

【0175】

GM-CSF は、強力な抗腫瘍反応を刺激することが可能な、樹状細胞 (DC) サブクラスの抗原提示能力を増強する (Gasson et al. Blood 1991 Mar 15; 77 (6): 1131-45; Mach et al. Cancer Res. 2000 Jun 15; 60 (12): 3239-46; Mach および Dranoff による総説、Curr Opin Immunol. 2000 Oct; 12 (5): 571-5)。例えば、Boon and Old, Curr Opin Immunol. 1997 Oct 1; 9 (5): 681-3) を参照のこと。排出リンパ節において T 細胞に対し腫瘍抗原エピトープを提示することは、腫瘍転移に対する全身の免疫応答をもたらすことが予測される。さらに、GM-CSF を発現する腫瘍細胞の照射は、腫瘍攻勢に対する強力なワクチンとして機能することが示された (「GVAX」という表題の下に、本節の下記にさらに説明される)。一般に改変細胞によって運ばれる、ある種のサイトカインの高濃度の局在は、腫瘍の減衰をもたらすことが見出されている (Abe et al., J. Canc. Res. Clin. Oncol. 121: 587-592 (1995); Gansbacher et al., Cancer Res. 50: 7820-7825 (1990); Forni et al., Cancer and Met. Reviews 7: 289-309 (1988))。国際公開 WO 2000 72686 は、各種サイトカインを発現する腫瘍細胞を記載する。

20

【0176】

本発明の一つの実施態様では、アデノウイルスは、原発性腫瘍細胞において発現されるように、調節エレメントに動作的に結合される GM-CSF コード配列を含む。一つの実施態様では、この GM-CSF コード配列は、ヒトの GM-CSF をコードする。別態様として、GM-CSF コード配列は、ネズミの GM-CSF をコードしてもよい。ある実施態様では、GM-CSF のコード配列は、cDNA 配列 (例えば、配列番号 16) である。言い換えると、GM-CSF のコード配列は、翻訳の前にスプライシングで切り落とされるイントロン配列を含まない。別の実施態様では、GM-CSF のコード配列は、ゲノムコード配列 (例えば、配列番号 15) である。言い換えると、このコード配列は、翻訳の前にスプライシングによって切り落とされる、少なくとも 1 個の天然 GM-CSF イントロンを含む。一つの実施態様では、GM-CSF コード配列は、配列番号 14 をコードする。GM-CSF コード配列の、他の例が、GenBank のアクセス番号、AF373868、AC034228、AC034216, M10663、および NM000758 において見られる。

30

40

【0177】

一つの実施態様では、導入遺伝子はマーカーをコードする。別の実施態様では、導入遺伝子は、細胞傷害性タンパク質をコードする。細胞傷害性タンパク質をコードするベクターは、細胞傷害活性の速度を強化することによって治療効力の程度を増強するために使用されてもよい。これは、調節されるウイルス複製と対応する選択的細胞傷害性を、1 種以上の代謝的酵素の発現と結合させることによって実現が可能である。そのような酵素としては、例えば、HSV-tk、ニトロレダクターゼ、シトクローム P450 または シトシンデアミナーゼ (CD)、これらの酵素は、細胞に、5-フルオロシトシン (5-FC)

50

を分解して化学療法剤 5 - フルオロウラシル ( 5 - F U ) とする能力を与える、カルボキシエステラーゼ ( C A )、デオキシシチジンキナーゼ ( d C K )、プリンヌクレオチドフォスホリラーゼ ( P N P )、カルボキシペプチダーゼ G 2 ( C P G 2 ; N i c u l e s c u - D u v a z e t a l . J . M e d C h e m . 2 0 0 4 M a y 6 ; 4 7 ( 1 0 ) : 2 6 5 1 - 2 6 5 8 )、チミジンフォスホリラーゼ ( T P )、チミジンキナーゼ ( T K )、またはキサンチン - グアニンフォスロリボシルトランスフェラーゼ ( X G P R T ) がある。このタイプの導入遺伝子は、バイスタンダー効果を付与するために使用してもよい。

#### 【 0 1 7 8 】

本発明のアデノウイルスベクターに含めてもよい導入遺伝子のさらに別の例としては、アポトーシス、アンチセンス、またはリボザイムを起動することが可能な因子であって、特に、細胞または病原体の増殖にとって必須のタンパク質をコードする mRNA に向けられる因子が挙げられる。そのようなタンパク質としては、例えば、構造タンパク質、転写因子、ポリメラーゼ等、ウイルスまたは他の病原性タンパク質であって、病原体が細胞内で増殖するもの、細胞傷害性タンパク質、例えば、ジフテリア連鎖、リシン、アブリン等、ヌクレアーゼ ( 例えば、R N アーゼ ) またはプロテアーゼ ( 例えば、トリプシン、パパイン、プロテイナーゼ K、カルボキシペプチダーゼ等 ) の加工された細胞質変異種をコードする遺伝子、ケモカイン、例えば、M C P 3 アルファまたは M I P - 1、ウイルス、細菌、または哺乳類細胞から得られる孔形成タンパク質、融合起動遺伝子、化学療法感受性強調遺伝子、および放射線感受性強調遺伝子がある。興味のある他の遺伝子としては、サイトカイン、抗原、膜貫通タンパク質など、例えば、I L - 1、I L - 2、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 10、I L - 12、I L - 18、または f l t 3、G M - C S F、G - C S F、M - C S F、L I F、I F N - 、 、 、 T N F - 、 、 T G F - 、 、 N G F、M D A - 7 ( メラノーマ分化関連遺伝子 - 7、m d a - 7 / インターロイキン - 24 ) が挙げられる。さらに他の例としては、アポトーシス促進遺伝子、例えば、F a s、B a x、カスパーゼ、T R A I L、F a s リガンド、酸化窒素シンターゼ ( N O S ) 等；細胞融合をもたらす、または細胞融合を促進する融合遺伝子、例えば、V 2 2、V S V 等；腫瘍抑制遺伝子、例えば、p 5 3、R B、p 1 6、p 1 7、W 9 等；細胞サイクルに関連する遺伝子、および、抗血管形成タンパク質、例えば、エンドスタチン、アンギオスタチン等をコードする遺伝子が挙げられる。

#### 【 0 1 7 9 】

本発明の実施に際しては、関連する任意の遺伝子またはコード配列の使用が可能であるが、ある種の遺伝子、またはその断片が特に好適である。例えば、免疫原性ポリペプチド、トキシン、免疫トキシン、およびサイトカインをコードするコード領域は、本発明の実施において有用である。これらのコード領域は、前述のものを含むが、さらに新たなコード領域としては、下記をコードするものが挙げられる。すなわち、免疫細胞との相互作用を刺激するタンパク質、例えば、B 7、C D 2 8、M H C クラス I、M H C クラス I I、T A P、腫瘍関連抗原、例えば、M A R T - 1 から得られる免疫原性配列、g p 1 0 0 ( p m e 1 - 1 7 )、チロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質 1、チロシナーゼ関連タンパク質 - 2、メラノサイト刺激ホルモン受容体、M A G E 1、M A G E 2、M A G E 3、M A G E 1 2、B A G E、G A G E、N Y - E S O - 1、カテニン、M U M - 1、C D K - 4、カスパーゼ 8、K I A 0 2 0 5、H L A - A 2 R 1 7 0 1、フェトプロテイン、テロメラーゼ触媒タンパク質、G - 2 5 0、M U C - 1、がん胎児性タンパク質、p 5 3、H e r 2 / n e u、トリオースフォスフェートイソメラーゼ、C D C - 2 7、L D L R - F U T、テロメラーゼ逆転写酵素、P S M A、抑制シグナルを阻止する ( C T L A 4 阻止 ) 抗体の c D N A、ケモカイン類 ( M I P 1、M I P 3、C C R 7 リガンド、およびカルレチクリン )、抗血管形成遺伝子で、M E T H - 1、M E T H - 2、T r p R S 断片をコードする遺伝子を含むが、ただしそれらに限定されない、プロリフェリン関連タンパク質、プロラクチン断片、P E D F、バソスタチン、細胞外基質タンパク質および増殖因子 / サイトカイン阻害剤の各種断片、細胞外基質タンパク質、例えば、アンギ

オテンシン、エンドスタチン、キニノスタチンを含む、ただしそれらに限定されない、細胞外基質タンパク質の各種断片、フィブリノーゲンE断片、トロンボスポンジン、ツムスタチン、カンスタチン、レスチン、増殖因子/サイトカイン抑制因子であって、VEGF/VEGFR拮抗剤を含む、ただしそれらに限定されない、増殖因子/サイトカイン抑制因子、sFlt-1、sFlk、sNRP1、アンジオポエチン/tie拮抗因子、sTie-2、ケモカイン(IP-10, PF-4、Gro-ベータ、IFN-ガンマ(Mig)、IFN、FGF/FGFR拮抗因子(sFGFR)、エフリン/Eph拮抗因子(sEphB4およびセフリンB2)、PDGF、TGF、およびIGF-1である。本発明の実施において好適に使用される遺伝子は、下記のタンパク質をコードしてもよい。すなわち、酵素(例えば、ウレアーゼ、レニン、トロンピン、金属プロテアーゼ、酸化窒素シンターゼ、スーパーオキシドムターゼ、カタラーゼ、および当業者に既知の他のもの)、酵素抑制因子(例えば、アルファ1-アンチトリプシン、アンチトロンピンIII、細胞性またはウイルス性プロテアーゼ抑制因子、プラスミノゲン活性化抑制因子-1、金属プロテアーゼの組織抑制因子等)、嚢胞性線維症膜貫通コンダクタンス調節(CFTR)タンパク質、インスリン、ジストロフィン、または、クラスIまたはIIの、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)抗原である。さらに有用なのは、対応遺伝子の発現を変調/調節することが可能なポリペプチド、細菌、寄生虫、またはウイルスの感染、またはその発達を抑制することが可能なポリペプチド(例えば、抗原性ポリペプチド、抗原性エピトープ、および、競合によって天然タンパク質を抑制する膜貫通タンパク質変異種)、アポトーシス誘発因子または抑制因子(例えば、Bax、Bcl2、BclX、および、その他の、当業者に既知のもの)、静菌性因子(例えば、p21、p16、Rb等)、アポリポタンパク質(例えば、ApoAI、ApoAIV、ApoE等)、酸素ラジカル捕食因子、抗腫瘍作用を持つポリペプチド、抗体、トキシン、免疫トキシン、マーカー(例えば、ベータ-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ等)をコードする遺伝子、あるいは、臨床状態の治療または予防のために有用であると従来技術において認知済みの、他の、任意の興味の遺伝子である。さらに別の導入遺伝子としては、細胞分裂またはシグナル変換を抑制するポリペプチド、腫瘍抑制タンパク質(例えば、p53、Rb、p73)、宿主の免疫系を活性化するポリペプチド、任意にサイトカインと組み合わせられる、腫瘍関連抗原(例えば、MUC-1、BRCA-1、HPV早期または後期抗原、例えば、E6、E7、L1、L2等)をコードする遺伝子が挙げられる。

#### 【0180】

本発明はさらに、2個以上の導入遺伝子の組み合わせを含むアデノウイルスベクターを含む。ある場合には、2個以上の導入遺伝子は、協調的、相補的、および/または、非重複的毒性および作用法を持つ。

#### 【0181】

本発明のアデノウイルスベクターを設計するに際しては、導入遺伝子の生物学的活性が考慮される。例えば、ある場合には、導入遺伝子は、アデノウイルス感染の早期段階または後期段階においては、該導入遺伝子のみが、または多くの場合発現されるようにベクターに挿入されると有利である。いくつかの導入遺伝子の場合、導入遺伝子を、ウイルスのライフサイクルの早い時期に発現することが好ましい。そのような場合、導入遺伝子は、早期領域(例えば、E3)の内の任意のもの、または上流のL1領域に挿入される。

#### 【0182】

##### (GVAX)

本発明はまた、キメラ線維タンパク質を持つアデノウイルスによって形質導入された腫瘍細胞を供給することによって、標的抗原(単数)または抗原(複数)に対する個体の免疫応答を変える方法にも関する。その際、キメラ線維タンパク質は、Ad5またはAd2シャフトの少なくとも一部、および、Ad35ヘッドの少なくとも一部を含む。典型的には、腫瘍細胞は原発性腫瘍細胞である。例示の腫瘍細胞としては、同じ個体(自己由来)から得られた、または、異なる個体(同種異系)から得られた腫瘍細胞が挙げられる。別の実施態様では、腫瘍細胞は、治療される腫瘍またはがんと同じタイプの腫瘍細胞株由来

のものである。

【0183】

本発明はさらに、キメラ線維タンパク質を持つアデノウイルスによって形質導入された腫瘍細胞を哺乳動物に投与することによって、腫瘍細胞に対する免疫応答を増強する方法にも関する。その際、キメラ線維タンパク質は、A d 5 または A d 2 シャフトの少なくとも一部、および、A d 3 5 ヘッドの少なくとも一部を含み、腫瘍細胞に対する哺乳動物の免疫応答は増強される。一つの実施態様では、増強免疫応答は体液性である。別の実施態様では、増強免疫応答は細胞性である。さらに別の実施態様では、増強免疫応答は、細胞性および体液性の両方である。

【0184】

関連実施態様では、方法はさらに、形質導入された腫瘍細胞を不活性化し、該細胞を哺乳動物に投与することを含む。投与される腫瘍細胞は、自己由来の形質導入腫瘍細胞、異種細胞、またはバスタンダー細胞（下記にさらに定義する）であってもよい。通常、形質導入腫瘍細胞は、投与前に増殖不能とされる。一つの実施態様では、哺乳動物は、形質導入腫瘍細胞と同じタイプの腫瘍細胞を抱えるヒトである。ある好ましい実施態様では、哺乳動物の腫瘍細胞は、形質導入腫瘍細胞の投与の後増殖抑制または細胞死を呈する。

【0185】

さらに別の局面では、本発明は、少なくとも一つのヒトサイトカインをコードする核酸を含む、キメラ組み換えアデノウイルスの形質導入によって遺伝学的に改変された、増殖不能腫瘍細胞の治療的有効量を投与することによって、腫瘍に対する哺乳動物の、全身の免疫応答を刺激する方法を提供する。その際、形質導入腫瘍細胞と腫瘍は同じタイプであり、少なくとも一つの共通抗原を発現する。

【0186】

ある実施態様では、腫瘍に対する全身性免疫応答は、腫瘍の後退をもたらすか、または、腫瘍の増殖を抑制する。

【0187】

一つの実施態様では、腫瘍細胞は、腫瘍を抱える哺乳動物、例えば、ヒトから得られる。ある実施態様では、腫瘍細胞は、投与前に寒冷保存される。ある実施態様では、治療される腫瘍細胞のタイプは、前立腺腫瘍、メラノーマ、非小細胞型肺がん、乳がん、上皮がん、膀胱がん、前立腺がん、頭頸部がん、先行性新生病変、がん性ポリープ、卵巣がん、頸がん、白血病、および腎臓がんからなる群より選択される。治療される腫瘍細胞のタイプが前立腺がんである場合、前立腺腫瘍細胞株が、D U 1 4 5、P C - 3、および L n C a P からなる群より選択される。

【0188】

本発明の一つの好ましい実施態様では、本発明のアデノウイルスベクターは、ヒトの G M - C S F 導入遺伝子を、体外で、ヒトの原発性腫瘍細胞に伝播するために利用される。形質導入後、細胞は照射されて増殖不能とされる。次に、この増殖不能 G M - C S F 発現細胞は、（例えば、皮内または皮下ルートを通じて）患者に再び投与されることによって、がんワクチンとして働く。

【0189】

腫瘍細胞は、自己由来腫瘍細胞、異種腫瘍細胞、および腫瘍細胞株からなる群より選択される。腫瘍細胞は、インビトロ、エキソビボ、またはインビボにおいて形質導入されてよい。サイトカイン、例えば、G M - C S F を発現するように遺伝学的に改変され、次に、がんの治療のために患者に再投与される、自己由来および異種がん細胞は、米国特許第 5, 6 3 7, 4 8 3、5, 9 0 4, 9 2 0、および 6, 3 5 0, 4 4 5 号に記載される。なお、これらの特許を、参照することにより本明細書に含めることを明言する。膵臓がんの治療のために、G M - C S F を発現するように遺伝学的に改変された腫瘍細胞の 1 形、すなわち、「サイトカイン発現細胞ワクチン」（「G V A X」）が米国特許第 6, 0 3 3, 6 7 4 および 5, 9 8 5, 2 9 0 号に記載されている。なお、これらの特許を、参照することにより本明細書に含めることを明言する。遺伝学的に改変された汎用免疫変調バイ

10

20

30

40

50



スタンダー細胞株が、米国特許第 6, 464, 973 号に記載されている。なお、この特許を、参照することにより本明細書に含めることを明言する。

【0190】

GM-CSF 発現細胞ワクチン (GVAX) を用いた臨床試験が、前立腺がん、メラノーマ、肺がん、膵臓がん、腎臓がん、および多発性骨髄症の治療のために行われた。GVAX 細胞ワクチンを用いたいくつかの臨床試験が、特にメラノーマにおいて、また、前立腺がん、腎臓がん、および膵臓がんについて記載されている (Simons JW et al. Cancer Res. 1999; 59: 5160-5168; Simons JW et al. Cancer Res. 1997; 57: 1537-1546; Soiffer R et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998; 95: 13141-13146; Jaffee, et al. J Clin Oncol 2001; 19: 145-156; Salgia et al. J Clin Oncol 2003 21: 624-30; Soiffer et al. J Clin Oncol 2003 21: 3343-50; Nemunaitis et al. J Natl Cancer Inst. 2004 Feb 18 96(4): 326-31)。

10

【0191】

本発明は、哺乳類被験体、好ましくはヒトの患者において、がんに対する免疫応答の改善を刺激する方法を提供する。方法は、がんに対して、全身性免疫応答、すなわち、T 細胞反応および/または B 細胞反応を実現することが望ましい。改善は、遺伝学的に改変された腫瘍細胞を患者に投与することを含み、その際、腫瘍細胞は、患者の抱える腫瘍細胞によって発現される少なくとも 1 種の抗原を発現し、遺伝学的改変は、キメラ線維タンパク質を持つアデノウイルスベクターを用いて実現される。ここに、キメラ線維タンパク質は、サブグループ C アデノウイルス (例えば、Ad 1、2、5、および 6 血清型) のシャフト領域の少なくとも一部、および、サブグループ B アデノウイルス (例えば、Ad 3、7、11、14、16、21、35、および 50) の、CD 46 に結合するヘッド領域の少なくとも一部、例えば、Ad 5 または Ad 2 のシャフトと、Ad 35 ヘッドの少なくとも一部を含む。このようなアデノウイルスベクターの使用は、形質導入および導入遺伝子発現を促進する。この遺伝学的に改変された腫瘍細胞は、典型的には照射によって増殖不能とされる。もっとも、細胞を増殖不能とすることが可能である限り、どのような既知の方法、または後に発見される方法であっても使用することは可能である。この遺伝学的に改変された腫瘍細胞が被験体に投与されると、がん抗原 (単複) に対する免疫応答が刺激される。

20

30

【0192】

一つのアプローチでは、遺伝学的に改変された腫瘍細胞は、サイトカインを発現するように改変された細胞の単一集団を含み、治療処方の一部として被験体に投与される。別の方法では、遺伝学的に改変された腫瘍細胞の二つ以上の集団が、異なる導入遺伝子が発現するように個別に改変され、被験体に投与される。治療処方は、さらに 1 種以上のがん治療剤または処置を含んでもよい。

【0193】

一般に、本発明を実施する際に使用される遺伝学的に改変される腫瘍細胞は、自己由来腫瘍細胞、異種腫瘍細胞、および腫瘍細胞株 (すなわち、バースタンダー細胞) の内の 1 種以上を含む。例として挙げると、一つの方法では、遺伝学的に改変された腫瘍細胞 (すなわち、GVAX) が、異種またはバースタンダー細胞株として与えられ、さらに 1 種以上のがん治療剤が自己由来細胞によって発現される。別の方法では、さらに 1 種以上の導入遺伝子が異種またはバースタンダー細胞株によって発現され、一方、サイトカイン (すなわち、GM-CSF) が自己由来細胞によって発現される。各種サイトカインを形質導入されたネズミ腫瘍細胞同士を直接比較したところ、GM-CSF 分泌腫瘍細胞が、全体として、もっとも良好な抗腫瘍保護を誘発したことが証明された。一つの好ましい実施態様では、本発明の、遺伝学的に改変された腫瘍細胞によって発現されるサイトカインは G

40

50

M - C S F (「G V A X」)である。このGM - C S Fコード配列は、キメラ線維タンパク質を有する改良型アデノウイルスベクターを用いて導入される。該キメラ線維タンパク質は、サブグループCアデノウイルスシャフト領域の少なくとも一部、および、サブグループBアデノウイルスの、CD 4 6に結合するヘッド領域の少なくとも一部を含み、例えば、Ad 5またはAd 2のシャフトと、Ad 3 5ヘッドの少なくとも一部を含む。GM - C S Fの好ましいコード配列は、Huebner K . et al . , Science 2 3 0 ( 4 7 3 1 ) : 1 2 8 2 - 5 , 1 9 8 5に記載されるゲノム配列である。しかしながら、ある場合には、GM - C S Fのc D N A形が本発明を実行するのに役立つ (Cantrell et al . , Proc . Natl . Acad . Sci . 8 2 , 6 2 5 0 - 6 2 5 4 , 1 9 8 5 )。

10

#### 【0194】

ある実施態様では、遺伝学的に改変された腫瘍細胞は、投与前に寒冷保存される。ある好ましい実施態様では、遺伝学的に改変された腫瘍細胞は、それが得られた同じ個体に対して投与される。別の好ましい実施態様では、遺伝学的に改変された腫瘍細胞と腫瘍は異なる個体から得られる。ある好ましい実施態様では、治療される腫瘍タイプは、膀胱がん、乳がん、結腸がん、腎臓がん、肝臓がん、肺がん、卵巣がん、頸がん、膵臓がん、直腸がん、前立腺がん、胃がん、上皮がん；リンパまたは骨髓系統の造血細胞がん；中胚葉起源のがん、例えば、線維肉腫または黄紋筋肉腫；その他の腫瘍タイプ、例えば、メラノーマ、奇形がん、神経芽細胞腫、グリオーマ、腺がん、および非小細胞型肺細胞がんからなる群より選択される。

20

#### 【0195】

遺伝学的に改変される腫瘍細胞は、患者に対して投与する前に、好ましくは約50から約200rad/分、さらに好ましくは約120から約140rad/分の用量で照射される。細胞は、該細胞の実質的に100%をその後の増殖から抑制するのに十分な合計用量で照射するのが好ましい。従って、細胞は、約10,000から20,000rad、もっとも好適には約15,000radの合計用量で照射することが好ましい。

#### 【0196】

(自己由来)

遺伝学的に改変された導入遺伝子発現型自己由来腫瘍細胞の使用はいくつかの利点を提供する。なぜなら、患者の腫瘍はそれぞれ、別の患者から得られた、組織学的には類似した、MHC適合腫瘍細胞の表面に認められるものとは違った、独特の一組の腫瘍抗原を発現するからである。例えば、Kawakami et al . , J . Immunol . , 1 4 8 , 6 3 8 - 6 4 3 ( 1 9 9 2 ) ; Darrow et al . , J . Immunol . , 1 4 2 , 3 3 2 9 - 3 3 3 5 ( 1 9 8 9 ) ; Horn et al . , J . Immunol . , 1 0 , 1 5 3 - 1 6 4 ( 1 9 9 1 )を参照のこと。それとは対照的に、MHC適合腫瘍細胞では、患者は、遺伝学的に改変された腫瘍細胞の生産のため自分の腫瘍サンプルを提供するために手術の場に連れていかれる必要がないという利点を提供する。

30

#### 【0197】

一つの好ましい局面では、本発明は、下記の工程を実行することによってがんを治療する方法を含む。すなわち、(a)腫瘍を抱える哺乳動物被験体から腫瘍細胞を入手する工程；(b)該腫瘍細胞を、キメラ線維タンパク質を持つアデノウイルスベクターを用いて改変し、未改変腫瘍細胞に比べて、1種以上の導入遺伝子について、その生産レベルの増大を可能とさせる工程、ここに、該キメラ線維タンパク質は、サブグループCアデノウイルスシャフト領域の少なくとも一部、および、サブグループBアデノウイルスの、CD 4 6に結合するヘッド領域の少なくとも一部を含み、例えば、Ad 5またはAd 2のシャフトと、Ad 3 5ヘッドの少なくとも一部を含む；(c)改変腫瘍細胞を増殖不能とする工程；および、(d)改変腫瘍細胞を、それから腫瘍細胞が得られた哺乳動物被験体に対し、または、腫瘍細胞が得られた哺乳動物と同じMHCタイプを持つ哺乳動物に対し再度投与する工程を含む方法である。投与される腫瘍細胞は、宿主に対し、自己由来で、MHC適合性である。組成物は、哺乳動物被験体の皮下、皮内、または腫瘍内部に投与される

40

50

ことが好ましい。

【0198】

単一自己由来腫瘍細胞は、1種を超える導入遺伝子を発現してよいし、あるいは、各導入遺伝子は、異なる自己由来腫瘍細胞によって発現されてもよい。本発明の一つの局面では、自己由来腫瘍細胞は、本明細書に記載される、キメラ線維タンパク質、および、導入遺伝子、例えば、サイトカイン、例えば、GM-CSFをコードする核酸配列であって、プロモーター、および、その導入遺伝子の発現のために必要な発現/調節配列に動作的に結合される核酸配列を含むアデノウイルスベクターの導入によって改変される。別の局面では、同じ自己由来腫瘍細胞、または第2自己由来腫瘍細胞は、少なくとも1種の追加の導入遺伝子をコードする核酸配列を含むベクターの導入によって改変される。該追加の導入遺伝子は、プロモーター、および、その導入遺伝子の発現のために必要な発現/調節配列に動作的に結合される。1種以上の導入遺伝子をコードする核酸配列は、同じまたは異なるベクターを用いて、同じまたは異なる自己由来腫瘍細胞に導入される。導入遺伝子(単複)をコードする核酸配列は、プロモーターに動作的に結合される選択性マーカー配列をさらに含んでもよいし、含まなくともよい。

10

【0199】

(同種異系)

研究者たちは、腫瘍ワクチンとして、自己由来およびMHC適合細胞に代わるものを求めてきた。これについては、Jaffee et al., *Seminars in Oncology*, 22, 81-91 (1995) に総覧される通りである。初期の腫瘍ワクチン戦略は、腫瘍細胞にワクチン作用を施すことは、自らのMHCクラスIおよびクラスII分子の上に腫瘍抗原を提示する抗原提示細胞と同様に機能し、免疫系のT細胞側を直接活性化するという理解に基づく。Huang et al. (*Science*, 264, 961-965, 1994)の結果から、ワクチン作用腫瘍細胞ではなく、宿主の本来のAPCが、GM-CSFのようなサイトカイン(単複)を分泌することによって免疫系のT細胞側の準備を整え、それによって、骨髄由来APCが腫瘍領域に招集されることが示された。骨髄由来APCは、腫瘍の全細胞タンパク質を取り上げて処理し、次に、そのMHCクラスIおよびII分子の上に抗原ペプチド(単複)を提示し、そうすることによって免疫系のCD4+およびCD8+両T細胞の態勢を整え、これによって全身的な腫瘍特異的な、抗腫瘍免疫応答が実現される。これらの結果は、抗がん免疫応答を惹起するためには、自己由来またはMHC適合腫瘍細胞を用いることは必要でも、最善でもないかもしれないこと、および、同種異系MHC遺伝子(同じ種に属する遺伝的に不等な個体から得られたもの)の転送が、腫瘍免疫原性を強化することができるかもしれないことを示唆する。さらに具体的に言うと、ある場合には、同種異系MHCクラスI分子を発現する腫瘍に対する拒絶は、未改変の、両親から受け継いだ腫瘍による、その後の抗原惹起に対して強調された全身的免疫応答をもたらした。

20

30

【0200】

本明細書で用いる「腫瘍細胞株」は、始め腫瘍から得られた細胞を含む。そのような細胞は通常は変形される(すなわち、培養下に無限の増殖を示す)。一つの好ましい局面では、本発明は、下記の工程を実行することによってがんを治療する方法を提供する。すなわち、(a)腫瘍細胞株を獲得する工程；(b)該腫瘍細胞株を、キメラ線維タンパク質を持つアデノウイルスベクターを用いて改変し、未改変腫瘍細胞に比べて、1種以上の導入遺伝子について、その生産レベルの増大を可能とさせる工程、ここに、該キメラ線維タンパク質は、サブグループCアデノウイルスシャフト領域の少なくとも一部、および、サブグループBアデノウイルスの、CD46に結合するヘッド領域の少なくとも一部を含み、例えば、Ad5またはAd2のシャフトと、Ad35ヘッドの少なくとも一部とを含み；(c)改変腫瘍細胞株を増殖不能とする工程；および、(d)それから腫瘍細胞株が得られたものと同じタイプの腫瘍である少なくとも一つの腫瘍を持つ、哺乳動物被験体(宿主)に対し、腫瘍細胞株を投与する工程を含む方法である。投与された腫瘍細胞株は、同種異系であり、宿主に対してMHC適合性ではない、このような同種異系細胞株は、あら

40

50

はじめ調製し、特性を解明し、既知の数の、導入遺伝子発現性細胞を含む瓶に分液し、保存（すなわち、凍結）することが可能であり、このため、患者に投与するに際し、十分その特徴が解明された細胞が利用可能であるという利点を提供する。遺伝子改変同種異系細胞の生産法は、例えば、W O O O / 7 2 6 8 6 A 1 に記載される。なお、この特許を参照することにより本明細書に含めることを明言する。

#### 【 0 2 0 1 】

遺伝学的に改変された導入遺伝子発現性同種異系細胞を調製するための一つのアプローチとして、1種以上の治療因子をコードする核酸配列（導入遺伝子）が、同種異系腫瘍細胞株である（すなわち、治療される個体とは別の個体から得られた）細胞株の中に導入される。別の方法では、1種以上の導入遺伝子は、別々の同種異系腫瘍細胞株の中に導入される。一般に、細胞、または細胞集団は、治療される腫瘍またはがんと同じタイプの腫瘍細胞株から得られる。腫瘍および/または腫瘍細胞株は、どのような形態のがんであっても、例えば、膀胱、乳房、結腸、腎臓、肝臓、肺、卵巣、頸部、脾臓、直腸、前立腺、胃、上皮のがん；リンパまたは骨髄系統の造血細胞がん；中胚葉起源のがん、例えば、線維肉腫または黄紋筋肉腫；その他の腫瘍、例えば、メラノーマ、奇形がん、神経芽細胞腫、グリオーマ、腺がん、および非小細胞型肺細胞がん含むがんであってもよいが、ただしこれらに限定されない。

10

#### 【 0 2 0 2 】

本発明の一つの局面では、同種異系腫瘍細胞は、キメラ線維タンパク質を持つアデノウイルスベクターを導入することによって改変される。ここに、該キメラ線維タンパク質は、サブグループCアデノウイルスシャフト領域の少なくとも一部、および、サブグループBアデノウイルスの、CD46に結合するヘッド領域の少なくとも一部を含み、例えば、Ad5またはAd2のシャフトと、Ad35ヘッドの少なくとも一部とを含み、かつ、Ad35ヘッドは、導入遺伝子、例えば、GM-CSFのようなサイトカインをコードする核酸を、その発現のために必要なプロモーターおよび発現調節配列に対し動作的に結合された状態で含む。別の局面では、同じ同種異系腫瘍細胞、または第2同種異系腫瘍細胞は、前述のようなキメラ線維タンパク質を持つ別のアデノウイルスベクターであって、少なくとももう一つの導入遺伝子を、その発現のために必要なプロモーターおよび発現調節配列に対し動作的に結合された状態で含むアデノウイルスベクターの導入によって改変される。導入遺伝子（単複）をコードする核酸配列が、同じ、または異なるベクターを用いて、同じ、または異なる同種異系腫瘍細胞中に導入されてもよい。導入遺伝子（単複）をコードする核酸配列は、プロモーターに動作的に結合される選択性マーカー配列をさらに含んでもよいし、含まなくともよい。同種異系細胞株は、高レベルのサイトカイン、例えば、GM-CSFを発現することが好ましい。

20

30

#### 【 0 2 0 3 】

本発明を実施するに当たって、1種以上の同種異系細胞株が、自己由来がん抗原、例えば、自己由来腫瘍細胞とインキュベートされ（これらは合わさって同種異系細胞株組成物を含む）、次に、この同種異系細胞株組成物が患者に投与される。典型的には、がん抗原は、治療されるがんの細胞、すなわち、自己由来がん細胞によって（の上に）供給される。このような場合、組成物は、通常照射によって増殖不能とされる。そのためには、同種異系細胞とがん細胞は、組織培養プレートに静置され、上に詳述したようにCs光源によって室温で照射される。ある任意の投与における自己がん細胞に対する同種異系細胞の比は、組み合わせに応じて変動する。

40

#### 【 0 2 0 4 】

同種異系細胞株組成物を患者の体内に導入するためには、適切であればいずれの投与ルートを用いてもよいが、組成物は、皮下、皮内、または筋肉内に投与されることが好ましい。

#### 【 0 2 0 5 】

本発明の実施において同種異系細胞株を用いることは、がんを抱える患者に対し、遺伝学的に改変された導入遺伝子発現性細胞株を、自己由来がん抗原と共に投与することによ

50

って、治療的導入遺伝子の傍分泌生産、例えば、サイトカインが、腫瘍に対して効果的な免疫応答をもたらすという治療的利点を提供する。これは、各患者について自己由来腫瘍細胞を培養し、形質導入する必要を解消する。

#### 【0206】

##### (バISTアンダー)

もう一つの局面では、本発明は、少なくとも一つの導入遺伝子を発現する、遺伝学的に改変された導入遺伝子発現性、汎用免疫変調性バISTアンダー細胞を提供する。同じ汎用バISTアンダー細胞株が、1種を超える導入遺伝子を発現してもよいし、あるいは、個々の導入遺伝子が、異なる汎用バISTアンダー細胞株によって発現されてもよい。汎用バISTアンダー細胞株は、腫瘍組織適合遺伝子複合体クラスI (MHC - 1) 抗原、および腫瘍組織適合遺伝子複合体クラスII (MHC - 2) 抗原を、元々欠くか、または、MHC - 1 抗原およびMHC - 2 抗原を欠くように改変された細胞を含む。本発明の一つの局面では、汎用バISTアンダー細胞株は、キメラ線維タンパク質を持つアデノウイルスベクターを導入することによって改変される。ここに、該キメラ線維タンパク質は、サブグループCアデノウイルスシャフト領域の少なくとも一部、および、サブグループBアデノウイルスの、CD46に結合するヘッド領域の少なくとも一部を含み、例えば、Ad5またはAd2のシャフトと、Ad35ヘッドの少なくとも一部とを含み、かつ、該ベクターは、導入遺伝子、例えば、GM-CSFのようなサイトカインをコードする核酸を、その発現のために必要なプロモーターおよび発現調節配列に対し動作的に結合された状態で含む。別の局面では、同じ汎用バISTアンダー細胞株、または第2汎用バISTアンダー細胞株は、少なくとももう一つの導入遺伝子を、その発現のために必要なプロモーターおよび発現調節配列に対し動作的に結合された状態で含むアデノウイルスベクターの導入によって改変される。導入遺伝子(単複)をコードする核酸配列が、同じ、または異なるベクターを用いて、同じ、または異なる汎用バISTアンダー細胞株中に導入されてもよい。導入遺伝子(単複)をコードする核酸配列は、プロモーターに動作的に結合される選択性マーカ配列をさらに含んでもよいし、含まなくともよい。抗腫瘍免疫応答を刺激する導入遺伝子(単複)の組み合わせは、いずれのものでも、本発明の実施に役立つ。本汎用バISTアンダー細胞株は、成分の確定した、すなわち、血清無添加培養体において、懸濁液として育成されることが好ましい。

10

20

30

#### 【0207】

好ましい汎用バISTアンダー細胞株は、K562 (ATCC CCL - 243; L o z z i o e t a l . , B l o o d 45 (3) : 321 - 334 (1975); K l e i n e t a l . , I n t . J . C a n c e r 18 : 421 - 431 (1976)) である。ヒトのバISTアンダー細胞株の生成に関する詳細な記述は、例えば、米国特許第6,464,973号に記載される。なお、この特許を参照することにより本明細書に含めることを明言する。

#### 【0208】

汎用バISTアンダー細胞株は、高レベルのサイトカイン、例えば、GM-CSFを発現することが望ましい。

#### 【0209】

本発明を実施するに当たって、1種以上の汎用バISTアンダー細胞株が、自己由来がん抗原、例えば、自己由来腫瘍細胞とインキュベートされ(これらは合わさって汎用バISTアンダー細胞株組成物を含む)、次に、この汎用バISTアンダー細胞株組成物が患者に投与される。汎用バISTアンダー細胞株組成物を患者の体内に導入するためには、適切であれがいずれの投与ルートを用いてもよい。組成物は、皮下、皮内、または筋肉内に投与されることが好ましい。

40

#### 【0210】

典型的には、がん抗原は、治療されるがんの細胞、すなわち、自己由来がん細胞によって(の上に)供給される。このような場合、組成物は、通常照射によって増殖不能とされる。そのためには、バISTアンダー細胞とがん細胞は、組織培養プレートに静置され、上

50

に詳述したようにC s 光源によって室温で照射される。

【0211】

ある任意の投与における自己がん細胞に対するバースタンダー細胞の比は、組み合わせに応じて変動する。GM - CSF 生産バースタンダー細胞に関しては、ある任意の投与におけるバースタンダー細胞の自己由来がん細胞に対する比は、治療的に有効なレベルのGM - CSF が生産されるようになっていなければならない。GM - CSF の閾値に加え、バースタンダー細胞の、自己由来がん細胞に対する比は、1 : 1 以下でなければならない。バースタンダー細胞の、腫瘍細胞、または腫瘍抗原に対する適切な比は、従来技術で既知の通例法を用いて決めることが可能である。

【0212】

本発明の実施においてバースタンダー細胞株を用いることは、がんを抱える患者に対し、サイトカイン発現性バースタンダー細胞株と、少なくとも1種の追加のがん治療剤（同じ、または異なる細胞によって発現される）を、自己由来がん抗原と共に投与することによって、免疫変調サイトカインの傍分泌生産が、腫瘍に対して効果的な免疫応答をもたらすという治療的利点を提供する。これは、各患者について自己由来腫瘍細胞を培養し、形質導入する必要を解消する。

【0213】

典型的には、細胞を不活性化し、該細胞を増殖不能とするためには、約3500radの最小用量で十分である。ただし、最大約30,000Radの用量は受容可能である。ある実施態様では、細胞は、哺乳動物に対して投与する前に、約50から約200rad / 分、または約120から約140rad / 分の用量で照射される。照射を用いる場合、典型的には、必要とされる照射は、2,500rad、5,000rad、10,000rad、15,000rad、または20,000radである。一つの実施態様では、細胞を不活性化し、それを増殖不能にするために、約10,000radの用量が用いられた。照射は、細胞を増殖不能にするための、僅かに一つの方法であるにすぎないこと、細胞が多数回の細胞分裂を実行することはできないが、導入遺伝子（例えば、サイトカイン）を発現する能力は保持することを可能とする、他の不活性化法（例えば、マイトマイシンC、シクロヘキシイミド、および概念的に類似の薬剤による処理、または、細胞による自殺遺伝子の取り込み）も本発明に含められることを理解しなければならない。

【0214】

（本発明を実施するための組成物および方法）

本発明は、本発明の組み換えアデノウイルスベクターおよび/または粒子、および/または、本発明の組み換えアデノウイルスベクターおよび/または粒子を用いて遺伝学的に改変された腫瘍細胞を含む製薬組成物を、該組成物を使用する方法と共に提供する。

【0215】

一つの局面では、本発明は、製薬学的に受容可能な担体に溶解した、治療有効量の本発明のアデノウイルスベクターを含む組成物であって、単位剤形として、無菌の非経口液または懸濁液として、水中油または油中水乳剤として、個体に対し、局所的または全身的投与するのに好適な組成物を提供する。非経口的、および経口的薬剤送達のための処方従来技術で既知である。組成物はまた、本発明のアデノウイルスベクターおよび粒子の凍結乾燥、および/または、再建形態を含む。受容可能な製薬学的担体としては例えば、生食液、硫酸プロタミン（Elkins - Sinnen, Inc., Cherry Hill, ニュージャージー州）、水、水性バッファー、例えばリン酸バッファーおよびTrisバッファー、またはPolybrene（Sigma Chemical, セントルイス、ミズーリ州）、およびリン酸バッファー生食液、およびスクロースがある。適切な製薬学的担体の選択は、本明細書に含まれる教示から当業者には明白と思われる。これらの溶液は無菌であり、一般に、所望のアデノウイルスビリオンを除いては粒状物質を含まない。組成物は、生理的条件を近似させるために必要な、製薬学的に受容可能な補助物質、例えば、pH調整剤および緩衝剤、毒性調節剤等、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム等を含んでもよい。アデノウイルスによ

10

20

30

40

50

る細胞の感染を強化する賦形剤も含まれてよい。

【0216】

一つの実施態様では、本発明のアデノウイルスベクターは、腫瘍細胞の増殖を抑制、防止、または破壊するのに有効な量（すなわち、治療有効量）として宿主に投与される。これは、例えば、腫瘍細胞におけるウイルスベクターの複製、および/または、腫瘍細胞の形質導入後における導入遺伝子の発現によって実行されてもよい。この投与は、アデノウイルスベクターを腫瘍標的細胞に送達する、例えば、全身投与によって、あるいは、ベクターを直接腫瘍に注入することによって送達するのに効果的な量であれば、いずれの量であってもよい。一つの局面では、ベクターは、体重  $kg$  当たり少なくとも  $5 \times 10^9$  ウイルス粒子の量として全身的に投与されるが、一般に、その量は、体重  $kg$  当たり  $1 \times 10^{10}$  ウイルス粒子を超えない。別の方法では、ベクターは、少なくとも  $2 \times 10^{10}$  ウイルス粒子の量として腫瘍内部に投与されるが、一般にその量は体重  $kg$  当たり  $1 \times 10^{10}$  ウイルス粒子を超えない。さらに別の方法では、ベクターは、被験体の膀胱に注入される。その場合、膀胱は、US 20040131590 に記載されるように、膀胱強化剤によって事前処理されてもよい。投与される正確な用量は、様々な因子、例えば、患者の年齢、体重、および性別、治療される腫瘍のサイズおよび重度に依存する。ベクターは、1 回以上に渡って投与されてよい。組成物の単回または複数回投与は、用量レベルおよびパターンは、治療に当たる医師によって選択されて実行される。要すれば、免疫応答は、各種免疫抑制剤の使用、既存の抗体の除去によって減衰させ、ウイルスに対する免疫応答を下げることによって反復投与を可能としたり、および/または、複製を強化してもよい。本発明のアデノウイルスベクターの投与は、他の抗新生物プロトコールと組み合わせてもよい。そのようなプロトコールの多数の例が従来技術で既知である。この抗新生物プロトコールは、治療される腫瘍のタイプに応じて変動する。抗新生物プロトコールの例示の成分は下記にさらに記載される。

10

20

【0217】

送達は、様々な方法、すなわち、リボソーム、直接注入、全身性注入、カテーテル、局所塗布、吸入等による方法によって実現が可能である。

【0218】

本発明は、新生物病態（典型的にはがん患者）を有する被験体を治療する方法であって、本発明のアデノウイルスベクターの治療的有效量を該被験体に投与することを含む方法を提供する。アデノウイルスベクターは、複製可能、または複製不能であってもよい。本発明の一つの局面は、増殖不能とされ（すなわち、照射によって）、被験体に投与される、遺伝学的に改変された、導入遺伝子発現性腫瘍細胞の使用に関する。この遺伝学的に改変された、増殖不能腫瘍細胞は、治療的有效量として、被験体に、典型的にはヒトのがん患者に投与される。

30

【0219】

腫瘍細胞は、前述のように、本発明のアデノウイルスベクターの形質導入によって改変される。一つの実施態様では、本発明は、1 種以上の導入遺伝子をコードする 1 種の組み換えアデノウイルスベクターによる、腫瘍細胞集団の単回形質導入を利用する。別の実施態様では、本発明は、同じ組み換えアデノウイルスベクターによる、腫瘍細胞集団の複数回形質導入（感染）を利用する。さらに別の実施態様では、本発明は、様々な導入遺伝子をコードする複数の組み換えアデノウイルスによる、複数回、または単回形質導入を利用する。

40

【0220】

形質導入細胞の、哺乳動物に対する投与は、個体の全身性免疫応答を、刺激方向に調整する。別の局面では、本発明は、1 種以上の導入遺伝子を発現する、改変腫瘍細胞（例えば、原発性腫瘍細胞）を、既存の腫瘍の逆転または抑制のために使用することに関する。腫瘍細胞はまた、複数薬剤耐性タンパク質（MDR）を発現するように形質導入されてもよい。MDR は、同じアデノウイルスベクターに、異なるアデノウイルスベクターに、または、非アデノウイルスベクターにコードされてもよい。腫瘍細胞に形質導入するために

50

、本発明のアデノウイルスベクターと組み合わせて他のベクターを用いてもよい。様々なベクターは、事実上同時に腫瘍細胞に送達されてもよいし、あるいは、所望の作用によって適切な別の時点に送達されてもよい。

【0221】

別の局面では、本発明は、腫瘍抗原に対する免疫応答を強化する方法を提供する。この方法では、原発性腫瘍細胞は、本発明のアデノウイルスベクターによって、導入遺伝子を発現するように改変され、被験体、例えば、ヒトのがん患者に投与される。この改変腫瘍細胞は、治療的有効量として、かつ、抗原にたいする哺乳動物の免疫応答の増加が実現されるようなやり方で投与される（例えば、皮内、または皮下）。

【0222】

関連実施態様では、遺伝学的に改変された腫瘍細胞と、本発明のアデノウイルスベクターの両方が被験体に投与される。この遺伝学的に改変された腫瘍細胞は、自己由来細胞、同種異系細胞、またはパistanダー細胞であってもよく、投与は、同時であっても、継続的であってもよい。

【0223】

導入遺伝子を発現するように形質導入された細胞と、哺乳動物の抱える腫瘍細胞とは必ずしも同じ腫瘍タイプではない。例えば、パistanダー細胞は、インビボで導入遺伝子を発現してもよいが、哺乳動物の抱える腫瘍とは同じ細胞、または腫瘍でないかもしれない。別の例で、GM-CSFを発現するように形質導入された細胞は、哺乳動物の腫瘍細胞と同じ腫瘍タイプではないが、共通の腫瘍抗原を発現するかもしれない。この場合、哺乳動物の腫瘍に対する免疫応答を増強する。

【0224】

腫瘍、および形質導入された腫瘍細胞（すなわち、原発性腫瘍細胞）は、通常は、同じタイプのがんであり、共通の抗原を持つ。がんはいずれのタイプのものであってもよく、例えば、膀胱がん、骨がん、脳および脊髄がん、脳および脊髄がん、頸がん、結腸直腸がん、子宮内膜および子宮がん、食道がん、胆嚢および胆管がん、胃がん、頭頸部がん、腎臓がん、白血病、肝臓がん、肺がん、リンパ腫、メラノーマ、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、血液学的障害、網膜芽細胞腫、皮膚がん、軟部組織肉腫、睾丸がん、甲状腺がん、子宮がん、ウィルムス腫瘍、先行性新生病変、がん性ボリープ等が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。

【0225】

一つの実施態様では、本発明は、形質導入されない増殖不能腫瘍細胞、および、アジュバント、例えば、本発明のアデノウイルスベクターを投与することを含む。ただし、アジュバントは、サイトカイン発現性腫瘍細胞の投与と同時に、またはその後に投与される。一つの方法では、本発明のアデノウイルスベクターは、導入遺伝子、例えば、GM-CSFのようなサイトカインのコード配列を含み、増殖不能腫瘍細胞と同時に投与される。その際、腫瘍細胞は自己由来のものか、同種異系のものである。

【0226】

典型的には、被験体はヒトの患者である。ヒト患者では、異種コード配列がベクターに含まれた場合、その異種コード配列は、ヒト起源のものであってよい。ただし、ヒトの機能と高い相溶性および、生物学的に同じ、または等価な機能を示す、極めて近縁な種の遺伝子を使用することは、その異種コード配列の産物が、レシピエントにおいて有害な免疫応答を生成／惹起しないのであれば、可能である。一つの実施態様では、異種コード配列は、治療タンパク質、または治療RNAをコードする。治療的活性量の核酸配列または治療遺伝子とは、所望の結果を実現するために必要な投与回数および期間において有効な量である。この量は、様々な要因、例えば、被験体の性別、年齢、および体重等を含む要因に従って変動してよい。

【0227】

当業者であれば、医療従事者または患者の立場から見れば、不快な症状（例えば、病気に関連する症状、環境因子に対する過敏、正常な加齢等）の寛解または阻止は、たとえそ

10

20

30

40

50



れがどんなものであっても、それは望ましいものであることが了解されるであろう。

【0228】

本発明の製薬組成物は、個体における免疫応答の生成またはがんの治療に関連する他の治療の後で、の前に、の代わりに、または、と組み合わせ与えられてもよい。例えば、哺乳動物は、化学療法、放射線療法、および他の形の免疫療法および養子免疫細胞移入によって、その前に、または同時に治療されてもよい。例えば、本発明の組成物は、シスプラチン、シスプラチン/シクロフォスファミド、タキソールまたはシスプラチン/シクロフォスファミド/ドキシソルピシンの組み合わせのような化学療法剤と組み合わせ使用されてもよい。このような方式が使用される場合、それは、本発明の組成物の免疫原性を妨げないやり方、またはタイミングで用いられる。哺乳動物はまた、免疫応答を刺激するために、他のワクチン、または他の組成物を投与されてもよい。このような代替組成物としては、腫瘍抗原ワクチン、腫瘍抗原をコードする核酸ワクチン、抗イディオタイプワクチン、および、サイトカイン発現性腫瘍細胞株を含む他のタイプの細胞性ワクチンが挙げられる。

10

【0229】

一つの実施態様では、形質導入細胞は、該細胞を調製する際に使用された多くの付加的成分を除去するために処理される。特に、培養液中の、ウシ胎児血清、ウシ血清成分、または、他の生物学的添加物は取り除かれる。一つの実施態様では、細胞は、例えば、反復される穏やかな遠心によって洗浄され、適切な製薬学的に適合的な賦形剤に投入される。適合的賦形剤としては等張生食液であって、生理的に適合するバッファー、例えばリン酸塩またはHepes、および、栄養素、例えば、デキストロース、生理的に適合するイオンまたはアミノ酸、および、各種培養液、特に、他の免疫原性成分を含まないものを含有する、または含有しない等張生食液が挙げられる。担体試薬、例えば、アルブミン、および血漿分画、非活性増粘剤も使用してよい。一つの実施態様では、非活性生物成分も、製剤に許される程度まで、ヒトから得られるが、場合によっては、治療される被験体から前もって獲得されてもよい。

20

【0230】

本発明のさらに他の局面は、腫瘍抗原に対する哺乳動物の免疫応答を調節するためのキットに関する。このキットは、キメラ線維タンパク質を持つ、本発明の組み換えアデノウイルスを含む。ここに、該キメラ線維タンパク質は、サブグループCアデノウイルスシャフト領域の少なくとも一部、および、サブグループBアデノウイルスの、CD46に結合するヘッド領域の少なくとも一部を含み、例えば、Ad5またはAd2のシャフトと、Ad35ヘッドの少なくとも一部とを含み、かつ、導入遺伝子、例えば、GM-CSFのようなサイトカインをコードする核酸をさらに含んでもよいし、含まなくともよい。キットはさらに、例えば、腫瘍細胞または腫瘍断片を収容し、含むのに有用な容器であって、その内部で腫瘍細胞が組み換えウイルスによって形質導入される容器を含む。ある実施態様では、キットはさらに、腫瘍組織は、単一細胞懸濁液に変換する消化酵素を含む。ある実施態様では、酵素はコラゲナーゼである。ある実施態様では、キットはさらに、サイトカインをコードする遺伝物質を含む、組み換えウイルスによって形質導入されなかった増殖不能腫瘍細胞を含むアジュバントを含む。

30

40

【実施例】

【0231】

本発明は、下記の実施例を参照することによって記載される。これらの実施例は、例示のために提供されるものであって、いかなる意味でも本発明を限定する意図をもってなされるものではない。従来技術でよく知られる標準的技術、または下記に特異的に記述される技術が利用される。当業者であれば、本明細書に特異的に記述される特異的实施態様に対し、多くの等価物を認識し、または、ほんの通例の実験を用いるだけで、それらを確かめることが可能であろう。このような等価物は、下記の特許請求項の範囲内に含まれることが意図される。

【0232】

50

(実施例 1 : ヒト腫瘍細胞株および細胞培養)

本明細書に記載される実施例で用いた、ヒトの頭頸部がん細胞株、およびヒトのメラノーマ細胞株が、表 1 に列挙される。

【 0 2 3 3 】

【 表 1 】

表 1. 腫瘍細胞株

細胞株	説明	供給源／カタログ番号
<b>頭頸部細胞株</b>		
A-253	ヒト類表皮がん	ATCC, HTB-41
A431	ヒト類表皮がん	ATCC, CRL-2592
FaDU	ヒト扁平上皮がん (SQCC)	ATCC, HTB-43
SCC-9	ヒト、舌、SQCC	ATCC, CRL-1629
SCC-15	ヒト、舌、SQCC	ATCC, CRL-1623
デトロイト 562	ヒト喉頭がん	ATCC, CCL-138
CAL 27	ヒト、舌、SQCC	ATCC, CRL-2095
RPMI 2650	ヒト、鼻中隔、SQCC	ATCC, CCL-30
<b>メラノーマ細胞株</b>		
A375-luc	ヒト、皮膚、悪性メラノーマ	CRL-1619 (ルシフェラーゼを発現するように改変)
A2058	ヒト、皮膚、悪性メラノーマ	ATCC, CRL-11147
C32	ヒト、皮膚、悪性メラノーマ	ATCC, CRL-1585
SK-Mel-28	ヒト、皮膚、悪性メラノーマ	ATCC, HTB-72
WM-266-4	ヒト、皮膚、悪性メラノーマ	ATCC, CRL-1676
G-361	ヒト、皮膚、悪性メラノーマ	ATCC, CRL-1424

表 1 に列挙したヒト頭頸部がん細胞株およびヒトメラノーマ細胞株は、10% FBS を含む RPMI 1640 培養液中で培養した。ヒト前立腺がん細胞株、PC3M-2AC6 は、10% FBS を含む RPMI 1640 培養液中で培養した。ヒト前立腺がん細胞株、LNCaP (ATCC、CRL-10995) は、10% FBS、L-グルタミン (2 mM)、非必須アミノ酸 (0.1 mM)、炭酸ナトリウム (0.075%)、およびピルビン酸ナトリウム (1 mM) を含む RPMI 中で培養した。ヒト前立腺がん細胞株、PC-3 (ATCC、CRL-1435) は、10% FBS および L-グルタミン (2 mM) を添加した RPMI 中で培養した。

【 0 2 3 4 】

(実施例 2 : E1 欠損、GFP 発現線維キメラ状 A5 ベクターの構築)

A d5 ベクターに基づく線維キメラを生成するために、まず、シャトルプラスミド pAd5Ltrt-SmaI を後述のように構築する。まず、Ad5 DNA の左端 (bp 1 - 1009 bp) を二つのプライマーを用いて PCR によって増幅した。

プライマー 1 (5' - GAATTCTAGGGATAACAGGGTAATCATCATCAATAATATACCTT - 3' ; 配列番号 17) およびプライマー 2 (5' - CCGGGGTGCTCCACATAAATCT - 3' ; 配列番号 18)。Ad5 DNA の右端 580 は、プライマー 3 (5' - AAGCTTTAGGGATAACAGGGTA A

T C A T C A T C A A T A A T A T A C C T T -3' ; 配列番号 19 ) およびプライマー 4 ( 5' - C C C G G G G G A A T A C A T A C C C G C A G G - 3' ; 配列番号 20 ) と表示される第 2 組のプライマーを用いて増幅した。I - S c e I の認識配列は、プライマー 1 および 3 に組み込まれた。第 1 P C R 産物は、E c o R I と S m a I によって消化し、第 2 P C R 産物は、H i n d I I I と S m a I によって消化した。得られた断片をゲル精製し、p B l u e S c r i p t ( S t r a t a g e n e 、ラホヤ、カリフォルニア州) の E c o R I および H i n d I I I 部位に 3 方ライゲーションによってクローンし、p A d 5 L t R t - S m a I を生成した。I - S c e I 部位によって区分される A d 5 G F P ベクターゲノムを含むプラスミド p F L A d 5 . C M V 5 - G F P は、S m a I - 直線化 p A d 5 L t R t - S m a I と、A d 5 . C M V 5 - G F P ( Q b i o g e n e 、C a r l s b a d 、カリフォルニア州) とを、E . c o l i において結合させて生成した。

10

#### 【0235】

線維キメラベクターは、いくつかの工程を経て生成された。まず、プラスミド p F L A d 5 . C M V 5 - G F P を S m a I で消化し、A d 5 . C M V 5 - G F P の左端および右端断片 (それぞれ、n t 1 から 3047、および 32652 から 33231) をゲル精製し、自己ライゲーションして p A d 5 L t & R t S m a I - C M V 5 - G F P を生成した。これらのプラスミド、p F L A d 5 . C M V 5 - G F P 5 T 3 5 H、p F L A d 5 . C M V 5 - G F P 3 5 F、p F L A d 5 . C M V 5 - G F P - 5 T 3 H、p F L A d 5 . C M V 5 - G F P - 5 T 3 H - R G D は、E 1 コード領域を G F P コード領域が置換した状態で A d 5 D N A 全長を含み、かつ、キメラ線維コード領域を含むが、これらのプラスミドは、S m a I 直線化 p A d 5 L t & R t S m a I - C M V 5 - G F P と、それぞれ、A v 1 n B g 5 T 3 5 H、A v 1 n B g 3 5 F、A v 1 n B g - 5 T 3 H ( S m i t h e t a l . 2003 )、および、C R A d : h U P I I - E 1 a - I R E S - E 1 b / F b 5 / 3 L L - R G D のゲノム D N A とを結合することによって生成した。条件付き複製可能アデノウイルス C R A d : h U P I I - E 1 a - I R E S - E 1 b / F b 5 / 3 L L - R G D における線維タンパク質のシャフト部分をコードする遺伝子は、A d 5 から得られ、一方、ノブコード領域は、A d 3 から得られた。このウイルスのキメラ線維部分は、タンパク質のカルボキシル末端において R G D リガンドを取り込むことによってさらに改変された。キメラ線維ベクターを生成するために、全長プラスミドを I - S c e I によって消化し、P E R . C 6 細胞にトランスフェクトした。

20

30

#### 【0236】

( 実施例 3 : E 1 欠損およびヒト G M - C S F 発現線維キメラ A d 5 ベクターの構築 )  
上記のベクターを生成するために、まず、シャトルプラスミド、p A d 5 L t R t S m a - C a G h G M を後述のように構築する。h G M C S F をコードする遺伝子は、下記のプライマーを用いて p D R 20 h G M F から P C R 増幅する。プライマーは、P S R 3 ( 5 - C T T C G A G G A A T T C A G G A T G T G G C T G C A G A G C C T G C T G - 3 ; 配列番号 21 ) と P S R 4 ( 5 - C T T C G A G A A G C T T A C T C C T G G A C T G G C T C C C A G - 3 ; 配列番号 22 ) 。制限酵素認識配列は、クローニングを容易にするために、プライマー P S R 3 ( E c o R I ) および P S R 4 ( H i n d I I I ) に組み込まれる。P C R 産物 ( 435 b p ) を E c o R I および H i n d I I I で消化し、得られた断片をゲル精製する。S V 40 後期ポリ ( A ) シグナルを、下記のプライマーを用いて p C A T - b a s i c から P C R 増幅する。プライマーは、P S R 6 ( 5 - C T T C G A G A A G C T T C A G A C A T G A T A A G A T A C A T T G - 3 ; 配列番号 23 ) および P S R 7 ( 5 - C T T C G A G G G A T C C T A C C A C A T T T G T A G A G G T T T A C - 3 ; 配列番号 24 ) 。制限酵素認識配列は、プライマー P S R 6 ( H i n d I I I ) および P S R 7 ( B a m H I ) に組み込まれる。P C R 産物 ( 222 b p ) を H i n d I I I および B a m H I で消化し、得られた断片をゲル精製する。この二つのゲル精製断片を、p G E M - 7 Z ( P r o m e g a C o r p , マジソン、ウィスコンシン州) の E c o R I および B a m H I 部位にクローンし、p G M C S F - S V 40 p A - 7 Z を生成する。

40

50

## 【0237】

得られたプラスミドをBamHIで消化し、両端を、Klenow断片を用いて、dNTPミックスで充填する。フェノール-クロロフォルム抽出およびエタノール沈殿の後で、得られたDNAをEcoRIで消化し、670bp断片をゲル精製する。次に、pAd5Lt&RtSmaI-CMV5-GFPをBglIIIで消化し、得られた両端を、Klenow断片を用いて、dNTPミックスで充填する。Ad5 DNAの左端(357bp)および右端(583bp)、およびプラスミドバックボーンをゲル精製する。CAGプロモーターを含む1.6KB断片(CMVエンハンサー、ニワトリベータアクチンプロモーターおよびイントロン、およびウサギグロビンイントロン)が、HindIIIおよびBamHI消化およびゲル精製により、pRRLSinhCAG.gammapptprre(Shoji et al., 1997. J. Gen. Virol. 78: 2657-2664; Miyazaki et al., 1989. Gene 79: 269-277. urce)から得られる。合計3本のゲル精製断片は連結されてシャトルプラスミド、pAd5LtRtSma-CAGhGMを生成する。SmaI直線化pAd5LtRtSma-CAGhGMを、E. coliにおいてAd5-CMV5-GFP(配列番号1を参照)のゲノムDNAと結合すると、全長プラスミド、pFLAd5-CAG-hGM-5Fが得られる。Ad35およびAd3由来のノブコード領域を含む、類似の全長クローンを生成するために、新規のシャトルプラスミドpAd5Lt&RtStu-CAG-hGMを、pFLAd5-CAG-hGM-5Fから、StuIによる消化後、左端および右端断片を含む制限酵素断片をゲル精製し、自己ライゲーションすることによって構築する。得られたプラスミドをStuIによって直線化し、E. coliにおいてAd5-CMV5-GFP-5T35HおよびAd5-CMV5-GFP-5T3H-RGD由来のゲノムDNAと結合して、それぞれ、pFLAd5-CAG-hGM-5T35およびpFLAd5-CAG-hGM-5T3H-RGDを生成する。この全長プラスミドをI-SceIで消化し、PER.C6細胞にトランスフェクトさせると、Ad5-CAG-hGM, Ad5-CAG-hGM-5T35H、およびAd5-CAG-hGM-5T3H-RGDを生成する。

10

20

## 【0238】

(実施例4: 原発性腫瘍細胞の調製法)

外科的に得られた腫瘍組織(例えば、肺)について、腫瘍組織としてのその本体(すなわち、非小細胞型肺癌)を確認するために病理学的評価を行った。残りの腫瘍は、輸送媒体(Td媒体、1%ヒト血清アルブミンを含むアルファMEM)に40 で浸して、実験室に出荷/輸送する。多くの場合、腫瘍の輸送は、24時間未満に行われる。到着直後、輸送媒体は吸引され、腫瘍は50mlのTd媒体で洗浄され、Stomacher実験用ブレンダー(Brinkmann, Westbury, ニューヨーク州)を用いて30分機械的に消化することにより単一細胞懸濁液とする。細胞片および凝集塊をろ過およびFicoll密度勾配遠心(Amersham Pharmacia、ウプサラ、スウェーデン)にて取り出す。この細胞を、6ウェル組織培養皿にプレートする。

30

## 【0239】

(実施例5: 実施例3の手順により細胞株または単離原発性腫瘍細胞の感染、および形質導入パーセントの定量)

プレートされた原発性腫瘍細胞または細胞株は、2%ウシ胎児血清(FBS)を含む培養液中で、Ad5系GFPベクター(例えば、キメラ線維を持つ)に対し、1種または数種の感染倍数(MOI)の下で、37 で2時間暴露される。血清濃度を4-10%に増し、さらに24時間インキュベートし、GFPを発現させる。細胞をPBSで洗浄し、フローサイトメトリーにより形質導入パーセントを定量する。

40

## 【0240】

Ad5線維キメラの形質導入効率を、野生型線維を担うAd5のそれと比較するために、選択されたヒト細胞株に対し、細胞当たり50粒子(ppc)のベクターによって、0.5mlの合計容量を持つ、2%FBSを含む培養液において37 で2時間形質導入し

50

た。感染培養液を、4% FBSを含む、適切な培養液2mlで置換する。導入遺伝子（ベータガラクトシダーゼ、または緑色蛍光タンパク質、GFP）を発現させるために、細胞を24時間インキュベートする。ベータガラクトシダーゼの発現を監視するために、細胞単層を固定し、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-ベータ-D-ガラクトピラノシド（X-Gal）で24時間染色する。形質導入のパーセンテージは、光学顕微鏡により高倍視野における全細胞数当たりの、形質導入された青色細胞の数をカウントすることによって定量する。ウェル当たり三つの視野をカウントし、平均形質導入パーセントを求める。GFP発現を監視するために、細胞単層をトリプシン処理で剥がし、次に細胞をPBSで洗浄する。形質導入パーセントはフローサイトメトリーで定量する。ベクター形質導入の各実験は3重ウェルにて実行し、平均形質導入パーセントを求める。

10

## 【0241】

（実施例6：Ad5およびキメラ線維ベクター仲介による、ヒト細胞のインビトロ形質導入）

細胞は、実施例5に記載される通り、細胞当たり50粒子の比で形質導入される。感染された細胞は、感染後24時間、ベータガラクトシダーゼ発現について監視される。結果は、表2に示されるが、形質導入細胞のパーセンテージを反映する。

## 【0242】

## 【表2】

表2. Ad5およびAd5キメラ線維ベクターによって媒介されたインビトロでのヒト細胞の形質導入

20

		Av1nbg	-5T35H	-35F	-5T3H
肺	MRC-5	2	31	14	16
	H1299	63	85	55	83
	H460	16	60	15	17
	DMS 114	22	44	31	6
	H446	72	95	54	15
	A549	22	74	42	43
前立腺	PC3	1	35	13	17
	DU145	16	43	28	27
	LNCaP	4	7	5	1
頭頸部	SCC9	5	22	10	9
	Fadu	0.5	15	7	9
	Detroit 562	0.25	6	2	3
	A253	0.3	3	1	1
膀胱	SW780	9	36	18	17
	RT4	4	24	13	10
	UC14	4	22	6	7
腎臓	SW839	3	21	8	4
	786-0	1	28	12	14

30

40

（実施例7：Ad5およびキメラ線維ベクター仲介による、ヒト一次非小細胞型肺癌細胞のインビトロ形質導入）

細胞に、キメラ線維ベクターによって形質導入し、細胞の形質導入パーセントを、実施例5に記載する通り、感染24時間後にGFP発現をFACSによって監視することによって定量する。結果を表3に示す。

## 【0243】

50

## 【表 3】

表3. Ad5およびAd5キメラ線維ベクターによって媒介されたインビトロでの  
原発性ヒト非小細胞肺癌細胞の形質導入

ベクター	形質導入%
Ad5.CMV5-GFP	5.8
Ad5.CMV5-GFP-35F	8.4
Ad5.CMV5-GFP-5T35H	10.6
Ad5.CMV5-GFP-5T3H	7.9
Ad5.CMV5-GFP-5T3H- RGD	8.05

10

(実施例 8：ヒト腫瘍細胞株における選択細胞表面受容体の密度)

前述のように、メラノーマおよび頭頸部がん (HNC) 細胞株は、キメラ線維アデノウイルスベクターと比べて、Ad5 感染に対して比較的感受性が低い。これらの細胞株が、Ad5 に対しては比較的耐性を持つのに、キメラ線維ベクターに対してはそうでないことの生物学的根拠を調べるために、アデノウイルスベクターによって使用される受容体の細胞レベルを定量した。培養腫瘍細胞を PBS で洗浄し、0.025%トリプシンでプレートから剥がし、PBS (pH 7.4) で 1 回洗浄し、かつ、再懸濁した。細胞を、cox sackie - アデノウイルス受容体 (CAR、Rmcb、Upstate biotechnology, Lake placid, ニューヨーク州)、CD46 (Clone E4.3, BD Biosciences, Pharmingen, サンディエゴ、カリフォルニア州)、<sub>3</sub> (Chemicon International, Temecula, カリフォルニア州)、または <sub>5</sub> (Chemicon International, Temecula, カリフォルニア州) に向けたマウス抗体と共に 4 で 30 分インキュベートした。続いて、細胞を、PBS で 3 回洗浄し、FITC - 接合二次抗マウス IgG (BD Biosciences, Pharmingen, サンディエゴ、カリフォルニア州) と共に 4 で 30 分インキュベートした。PBS で洗浄後、細胞を PBS に懸濁し、フローサイトメトリーで分析し、陽性細胞のパーセントを定量した。ヒトの頭頸部がん細胞株、およびメラノーマ細胞株のデータを、それぞれ、表 4 および 5 に示す。

20

30

## 【0244】

## 【表 4】

表4. ヒト頭頸部がん細胞株における、選択された細胞表面受容体の発現  
(陽性細胞%)

ウイルス	A-253	A431	FaDu	SCC-9	デトロイト 562
CAR	16	22	2	6	3
CD46	79	64	94	95	93

40

## 【0245】

【表 5】

表5. ヒトメラノーマ細胞株における、選択された細胞表面受容体の発現  
(陽性細胞%)

ウイルス	WM-266-4	A375-luc	SK-MEL-28	G361	A2058
CAR	0.3	2	9	2	39
CD46	14	69	5	4	25
$\alpha v\beta 3$	62	44	32	1	39
$\alpha v\beta 5$	2	28	2	1	3

10

これらの実験は、メラノーマおよびHNC細胞株は、低レベルのCARしか発現しないことを示す。逆に、検出されるCD46のレベルは比較的高く、特に、頭頸部がん細胞株ではそうである。さらに、試験された5種の頭頸部細胞株は、きわめて低レベルの<sub>3</sub>および<sub>5</sub>インテグリンしか持たず、従って、フローサイトメトリーでは検出されなかった。一方、大多数のメラノーマ細胞では、<sub>3</sub>インテグリンの発現レベルは高かった。従って、キメラ線維ベクターに対して相対的に感受性の高いこと、および、Ad5に対して耐性を有することは、メラノーマおよびHNC細胞における、Ad3およびAd35の主要受容体であるCD46の高い発現レベル、および、Ad5に対する主要受容体であるCAR発現は低レベルであることによって説明されるようである。

20

## 【0246】

(実施例9：E1含有およびヒトGM-CSF発現キメラ線維Ad5ベクターの構築)

キメラ線維を含むE1含有腫瘍崩壊性ベクターはいくつかの工程を経て生成された。まず、全長プラスミドpFLAd5が、E.coliにおいて、SmaI直線化pAd5LtrtSmaIとAd5のゲノムDNAを結合することによって構築された。得られたシャトルプラスミドpFLAd5は、I-SceI部位によって区分されるAd5ゲノムを含む。次に、pFLAd5をXhoIで消化し、Ad5の左右の末端断片を含む断片をゲル精製し、自己連結して、pAd5-LtrtXhoIを生成した。線維コード領域全体をPCRによって除去し、SwaIの認識配列を挿入して、pAd5-LtrtXhodelfiberを生成した。XhoI直線化pAd5LtrtXhodelfiberとCG0070(例えば、WO2005030261に記載される通り)とを結合し、全長CG0070DNA、マイナス、線維コード領域を含むプラスミドpFLAr20pAEfhGmdelfiberが得られた。Genetic Therapy Inc., (GTI)から購入し、Ad5線維シャフト、およびAd35線維ノブをコードする遺伝子を含む組み換えプラスミドpFBSE5T35Hを、XbaIおよびEcoRVで消化し、キメラ線維領域を含む断片を標準技術を用いてゲル精製した。Ad5シャフトおよびAd35ノブが、Ad5線維コード領域を置換する、プラスミドpFLAr20pAE2fGm-5T35Hが、E.coliにおいて、SwaI直線化pFLAr20pAE2fhGmdelfiberを、ゲル精製断片と結合することによって生成された。キメラ線維腫瘍崩壊性アデノウイルスベクターOV1191が、pFLAr20pAE2fGm-5T35HをI-SceIで消化し、PER.C6細胞にトランスフェクトすることによって生成された。

30

40

## 【0247】

E1含有腫瘍崩壊性ベクターOV1192を生成するために、キメラ線維タンパク質(Ad5シャフトおよびAd3ノブ)をコードする遺伝子を含む、3.6kb EcoRIおよびKpnI制限酵素断片を、CRAd:hUPII-E1a-IRES-Eib/Fb5/3LL-RGDのゲノムDNAから得、pBlueScriptにクローンし、pBlue-5T3H-RGDを生成した。次に、線維コード領域に跨る3.16kb制限酵素断片を、pBlue-5T3H-RGDをEagIおよびKpnIで消化することに

50

よって得た。このゲル精製ダンペンを、E. coliにおいて、Swa I - 直線化 pFLAr20pAE2fhGmdelfiber と結合させて pFLAr20pAE2fhGM-5T3H-RGD を生成した。得られたプラスミドを I-Sce I で消化し、PER.C6 細胞にトランスフェクトすることによって OV1192 を生成した。

#### 【0248】

CG0070、OV1191 および 1192 に近似する、さらに 3 個の E1 含有腫瘍崩壊性ベクターで、正規の E1A ATG の上流に配される余分の ATG が除去されるベクターが数工程を経て生成された。まず、pFLAr21pAe2fF から得られた左右端 Kpn I 制限酵素断片を自己連結して pAr21Lt&RtKpn-E2f を生成した。1.3 kb Nhe I - Kpn I 断片を、全長プラスミド pAr21pAE2fe (GTI) から得た。この全長プラスミドでは、E1A ATG の上流の余分の ATG は除去された。この制限酵素断片を用いて、pAr21LtRt-Kpn-E2f の対応断片を置換して、pAr21LtRtKpn-E2fe を生成した。Kpn I 直線化 pAr21LtRtKpn-E2fe を、CG0070、OV1191、および OV1192 のゲノム DNA と結合し、それぞれ、3 個の、全長プラスミド、pFLAr20pAE2fe-5fiber、pFLAr20pAE2fe-5T35H、および pFLAr20pAE2fe-5T3H-RGD を生成した。I-Sce I 消化による直線化、および、pFLAr20pAE2fe-5fiber、pFLAr20pAE2fe-5T35H、および pFLAr20pAE2fe-5T3H-RGD を PER.C6 細胞にトランスフェクトすることによって、それぞれ、OV1193、OV1194、および OV1195 を得た。

10

20

#### 【0249】

さらに、E1A の発現が hTERT プロモーターの調節下に置かれるがん崩壊性アデノウイルスベクターが生成された。まず、E2F-1 プロモーターを hTERT プロモーターによって置換するために、pAr21LtRtKpn-E2f の Nhe I - Kpn I 制限酵素断片が、pAr6pATrteX3F から得られた 1293 bp Nhe - Kpn I 断片によって置換された。得られたプラスミド pAr21LtRtKpn-TrteX を Kpn I によって直線化し、CG0070、OV1191、OV1192 から得られたゲノム DNA と結合すると pFLAr20pATrex-5fiber、pFLAr20pATrex-5T35H、および pFLAr20pATrex-5T3H-RGD が得られた。I-Sce I 酵素消化による直線化、および、pFLAr20pATrex-5fiber、pFLAr20pATrex-5T35H、および pFLAr20pATrex-5T3H-RGD を PER.C6 細胞にトランスフェクトすることによって、それぞれ、OV1196、OV1197、および OV1198 を得た。

30

#### 【0250】

本明細書で用いられるその他のアデノウイルスベクターとしては、全ての野生型 DNA 配列を含む野生型 Ad5 であり、陽性コントロールとして使用される CV802 が挙げられる。Add/312 は、E1a 遺伝子に欠失を持つ複製欠損ベクターであり、陰性コントロールベクターとして用いられた。

#### 【0251】

全ての E1 含有ベクターは、2 回の塩化セシウム密度勾配遠心によって精製された。ウイルス粒子の力価は、以前に記載した通り（例えば、Mittereder, et al. 1996）分光光度法によって定量した。

40

#### 【0252】

（実施例 10：Ad5 およびキメラ線維ベクター仲介による、ヒト細胞のインビトロ形質導入および細胞傷害性）

本発明の Ad5 および Ad5 キメラ線維ベクターのインビトロ細胞傷害性を、一連の腫瘍および正常細胞を、連続希釈液に 7 日間暴露することによって定量した。細胞の生存率は、メーカーの指示に従って行われる、MTS 細胞傷害性アッセイによって測定した（Cell Titer（登録商標）AQueous Non-Radioactive Cel

50



1 P r o f l i f e r a t i o n A s s a y , P r o m e g a、マジソン、ウィスコンシン州)。吸収値は、非感染コントロールのパーセントとして表し、ベクター用量に対してプロットした。データにはS字状の用量 - 反応曲線がフィットした。G r a p h P a d P r i s mソフトウェア、バージョン3.0を用いて各実験についてEC<sub>50</sub>値を計算した。EC<sub>50</sub>値とは、暴露細胞培養体の最大光吸収能力を50%低下させる、細胞当たりの粒子数で表したベクターの用量である。

#### 【0253】

キメラ線維の、腫瘍崩壊性アデノウイルスベクターのインビトロにおける細胞傷害性を、4種の代表的な、頭頸部細胞株およびメラノーマ細胞株で試験した。このデータは、表6および7に要約される。

#### 【0254】

##### 【表6】

表6: 代表的頭頸部細胞株のEC<sub>50</sub>値

ウイルス	A-253	SCC-9	FaDu	A431
CV802	16	12	72	31
OV1193	205	59	323	291
OV1194	20	6	23	55
OV1195	7	4	34	20
OV1191	20	39	23	49
OV1192	14	24	60	30
OV1196	189	40	206	302
OV1197	13	5	9	28
OV1198	11	1	25	38

#### 【0255】

##### 【表7】

表7: 代表的メラノーマ細胞株のEC<sub>50</sub>値

ウイルス	WM-266-4	A375-luc	G-361	A2058
CV802	667	45	52	16
OV1193	882	377	177	29
OV1194	13	58	161	30
OV1195	9	19	40	23
OV1191	17	27	101	21
OV1192	25	14	83	34
OV1196	1253	102	88	34
OV1197	8	13	23	15
OV1198	9	7	18	23

これらのデータは、キメラ線維ベクター、OV1194、OV1195、OV1197、およびOV1198による感染に対しEC<sub>50</sub>値が比較的低いこと、および、Ad5に対に対応する耐性が見られることを示すが、これは、メラノーマおよびMHC細胞では、Ad3およびAd35の主要受容体であるCD46の発現レベルが高く、Ad5の主要受容体であるCARの発現レベルが低いことによって説明される。

#### 【0256】

(実施例11: キメラ線維Adベクターによって発現されるヒトGM-CSFレベルの定量)

ヒトGM-CSF発現を評価するために、培養腫瘍細胞に50ウイルス粒子/細胞で感染し、感染後24および72時間に上清を収集し、市販のELISAアッセイ(R&D Systems, ミネアポリス、ミネソタ州)を用いて、発現した全GM-CSFを定量した。培養細胞上清は、アッセイバッファーで10倍から1000倍に希釈した。データは、分光光度計にて490nmにおいて得、SoftMaxソフトウェアパッケージを用いて分析した。ヒトのGM-CSFの標準曲線は、通常、R<sup>2</sup>値>0.995を持ち、ア

10

20

30

40

50

ッセイの感度は、典型的には  $7.8 \text{ pg/mL}$  であった。頭頸部がん細胞株に対する代表的キメラ線維ベクターに関して表されるヒト GM-CSF の量を、表 8 A ( 24 時間 ) および表 8 B ( 72 時間 ) に示す。また、メラノーマ細胞株に関するデータを、表 9 A ( 24 時間 ) および表 9 B ( 72 時間 ) に示す。

【 0 2 5 7 】

【 表 8 A 】

表8A. 感染24時間後の代表的頭頸部がん細胞株におけるヒト GM-CSF 発現 (ng/10<sup>6</sup>細胞/日)

Virus	A-253	A431	Detroit 562	FaDu	SCC-9
OV1193	5	10	2	5	7
OV1194	132	212	135	809	561
OV1195	147	212	107	398	476

10

【 0 2 5 8 】

【 表 8 B 】

表8B. 感染72時間後の代表的頭頸部がん細胞株におけるヒト GM-CSF 発現 (ng/10<sup>6</sup>細胞/日)

ウイルス	A-253	A431	Detroit 562	FaDu	SCC-9
OV1193	285	81	84	131	154
OV1194	659	384	360	1073	2011
OV1195	468	376	323	1163	1469

20

【 0 2 5 9 】

【 表 9 A 】

表9A. 感染24時間後に代表的メラノーマ細胞株で見られるヒト GM-CSF 発現 (ng/10<sup>6</sup>細胞/日)

ウイルス	A375	WM-266-4	A2058	G-361	SK-MEL-28
CG0070	4	0.4	7	0.3	1.3
OV1194	370	17	68	11	15
OV1195	312	21	63	8	14

30

【 0 2 6 0 】

【 表 9 B 】

表9B. 感染72時間後に代表的メラノーマ細胞株で見られるヒト GM-CSF 発現 (ng/10<sup>6</sup>細胞/日)

ウイルス	A375	WM-266-4	A2058	G-361	SK-MEL-28
CG0070	76	14	145	25	70
OV1194	2074	188	672	130	146
OV1195	1347	246	302	177	158

40

結果から、高レベルのヒト GM-CSF の発現は、代表的頭頸部およびメラノーマ細胞株が、キメラ線維ベクター OV 1 1 9 4 および OV 1 1 9 5 によって感染された場合に得られることが示された。

【 0 2 6 1 】

( 実施例 1 2 : 異種移植片腫瘍モデルにおけるキメラ線維 A d ベクターのインビボ効力 )

F a D u ( 頭頸部がん ) または A 3 7 5 - l u c ( メラノーマ ) 異種移植片を負荷されたヌードマウスにおいて、E 1 含有キメラ線維 A d ベクターの効力を評価した。ヌードマウス ( H s d : 無胸腺ヌード n u ; S i m o n s e n L a b o r a t o r i e s , G i l r o y , カリフォルニア州 ) の右横腹に、F a d u ( 1 0 0  $\mu$  l の H B S S に懸濁させ

50

た  $5 \times 10^6$  細胞) または A 3 7 5 - 1 u c (  $100 \mu\text{l}$  の H B S S に懸濁させた  $2 \times 10^6$  細胞) を植えつけた。腫瘍が  $50 - 150 \text{ mm}^3$  に達した時点で、マウスを数群 (  $n = 10$  ) に分割し、 $50 \mu\text{l}$  用量において  $1 \times 10^{10}$  ウイルス粒子または P B S を、腫瘍内部に 4 回投与した。腫瘍のサイズを、週に 2 度、2 次元的に測定し、腫瘍容量を、 $W \times (L)^2 \times H / 6$  として計算した。各治療グループの平均腫瘍容量  $\pm$  S E 平均を、ベクター感染後の日数に対してプロットした。

#### 【0262】

(実施例 13 : 原発性腫瘍細胞を単離し、本発明のアデノウイルスを形質導入し、その細胞を再度哺乳動物に投与する一つの方法)

腫瘍細胞を、皮膚病変および皮下病変、リンパ節、および、肺、肝臓、および軟部組織転移部から切り出した。摘出後、標本を無菌的に、滅菌容器に移し、実験室に輸送した。

#### 【0263】

その後の手順は全て、無菌状態の下で行われることが好ましい。腫瘍組織は、コラゲナーゼ処理、または機械的解離によってバラバラにされ、次に、培養体として育成するか、および/または、50 パーセント F C S (コラゲナーゼ処理) またはヒトアルブミン (機械的解離) を含む D M S O において凍結する。一次および二次自己由来腫瘍細胞の数を培養において拡張し、その後、それらの細胞の一部または全てを、h G M - C S F をコードする本発明の組み換えアデノウイルスを用いて h G M - C S F を生産するように形質導入する。

#### 【0264】

好ましくは、形質導入細胞は、無菌で、生存しており、サイトカインを生産することを確認した後に、この形質導入細胞に照射し、正常生食液に懸濁し、元のドナーに注入 (皮内と皮下両方に、 $0.25 - 1.0 \text{ ml}$  容量で、最大 5 箇所) によって戻す。1 回の注入当たりの細胞の量は、通常、 $5 \times 10^5$  から  $5 \times 10^8$  であるが、一つの実施態様では、 $4 \times 10^6$  から  $5 \times 10^7$  細胞である。複数回の注入を行ってもよい。一つの実施態様では、複数回の注入が、異なる日にちに行われる (例えば、7 日、14 日、21 日、1 ヶ月の間隔、またはそれらの組み合わせ)。一つの実施態様では、最大 3 回の注入が行われる。注入スケジュールは、特に、形質導入細胞の収率に依存する。

#### 【0265】

(実施例 14 : 原発性腫瘍細胞を単離し、本発明のアデノウイルスを形質導入し、その細胞を再度哺乳動物に投与する別法)

外科的手法を用いて、ワクチン製剤用の腫瘍組織 (例えば、自己由来) を得る。ワクチン細胞調製は、48 時間の製造工程を含む。ワクチンは、リンパ節、肺、胸水、副腎、甲状腺皮下結節、および傍棘突起塊を含む部位から得られる転移性腫瘍から製造される。

#### 【0266】

簡単に言うと、腫瘍標本が、個体から取り出され、H B S S バッファーで洗浄され、好ましくは 3 グラム以下の複数部分に切り分けられる。各部分は、個別のペトリ皿に移され、そこに、組織 1 グラム当たり  $5 \text{ ml}$  のコラゲナーゼが加えられる。腫瘍組織は、1 から  $3 \text{ mm}^3$  切片にスライスされ、S t o m a c h e r バッグに移される。

#### 【0267】

容量は  $20 \text{ ml}$  未満であることが好ましい。バッグは密封され、機械的ホモジェナイザー、または、S t o m a c h e r L a b B l e n d e r の中に収められ、消化が完了するまでホモジェナイズされる (通常 30 から 40 分、すなわち、バッグの中身が、あったとしても、ごく僅かな未消化の組織片を留めるだけの、粘ちょうなミルク状の懸濁液となるまで)。次に、このホモジェネートを、 $20 \text{ ml}$  の培養液で希釈し、最終容量を  $40 \text{ ml}$  とし、 $2000 \text{ RPM}$  で、4 で 10 分遠心する。上清を廃棄し、細胞ペレットを、氷上で、 $10 \text{ ml}$  の培養液に再懸濁する。これらの工程を、標本全部が消化され、事実上完全に酵素 (例えば、コラゲナーゼ) が洗い流されるまで洗浄され、培養液に懸濁される。次に、この懸濁液における細胞の数と生存率をトリパンブルーによって定量することが可能である。

10

20

30

40

50

## 【0268】

次に、この細胞懸濁液を、2,000rpm、4 で10分遠心することによって、形質導入に好適な密度にまで濃縮してもよい。次に、このペレットを再懸濁して、形質導入に好適な最終細胞密度（例えば、 $10^7$ 細胞/ml）とする。若干の細胞は取り分けて、遅延型過敏症（DTH）試験、細胞株の決定、および、寒冷保存のために使用してもよい。残余の細胞は、組み換えアデノウイルス、例えば、ヒトGM-CSFをコードするアデノウイルスによって形質導入される。

## 【0269】

形質導入を実行するのに必要なプラーク形成単位（pfu）の数またはウイルス粒子の数は、全体細胞数（死亡+生存、腫瘍消化後に計算される）を掛けることによって求められる。例えば、10という感染倍数が所望ならば、細胞全体数に10を掛ける。次に、ウイルスは、培養液で、最終濃度の10倍に希釈される。次に、腫瘍懸濁液1ml当たり0.1mlのアデノウイルス-GM-CSF懸濁液が、細胞懸濁液に加えられる。組み換えアデノウイルスは、例えば、標準的な第1世代E1およびE2遺伝子欠損複製不能ウイルスで、ヒトGM-CSF cDNAを、そのE1欠失領域に挿入させたウイルスであってもよい。もちろんサイトカインcDNAは、ウイルスゲノムの他の領域に導入させることも可能である。

## 【0270】

細胞は、10分毎に穏やかに掻き回しながら、室温（すなわち、約23-25）で1時間インキュベートする。次に、腫瘍細胞懸濁液の容量を、この懸濁液に適切容量の培養液を加えることによって2倍にする。細胞懸濁液を、適切な組織培養容器に移し、細胞を37 でインキュベートする。

## 【0271】

この腫瘍細胞を、組み換えアデノウイルスによって37で一晩形質導入する。一晩の形質導入後、細胞を、HBSSで十分に洗浄した後、ガンマ照射器を用い10,000Radで24時間照射する。小分液の細胞（最大全体の10%）を培養液の存在下48時間培養する。

## 【0272】

GM-CSFが導入遺伝子である場合、形質導入細胞からのGM-CSF分泌は、GM-CSF生産の適切な標的レベルを記録するために、ELISA（例えば、市販のキット、例えば、R&D Laboratories, ミネアポリス、ミネソタ州から販売されるキットを用いて）で定量してもよい。本発明のある実施態様では、標的レベルは、少なくとも20ng GM-CSF/ $10^6$ 細胞/24時間であり、少なくとも40ng GM-CSF/ $10^6$ 細胞/24時間、少なくとも100ng GM-CSF/ $10^6$ 細胞/24時間、または、1000ng GM-CSF/ $10^6$ 細胞/24時間以上である。

## 【0273】

さらに、操作される細胞の無菌性を保証するために、細菌および真菌の通例培養を実施してもよい。ワクチン接種および免疫学的評価用の細胞は、10% DMSO/90% ウシ胎児血清で凍結し、液体窒素中で保存する。

## 【0274】

ワクチン接種手順の例は下記の通りである。細胞は解凍し、Hank's バッファー塩（HBSS）液で2回洗浄する。投与するには、細胞を、投与前1時間以内に解凍し、無菌の生食液中で、全体1ml以下の容量で懸濁する。ワクチン接種は、単回注入で、できれば全体が1ml以下の容量で、皮内に23または25ゲージ針で、上腕と大腿に交互に投与されるのが好ましい。各注入の合計容量は、投与される容量レベルに依存する。

## 【0275】

（配列表における配列の説明）

本開示に関連する配列表は、本開示中に参考として援用される。下記は、配列表に含まれる配列の説明である。

## 【0276】

配列番号 1 は、A d 5 線維タンパク質をコードするヌクレオチド配列である ( A d 5 - C M V 5 - G F P ; B p 位置 : 2 8 3 3 8 - 3 0 0 8 3 ) 。

【 0 2 7 7 】

配列番号 2 は、5 8 1 アミノ酸長の A d 5 線維アミノ酸配列である。

【 0 2 7 8 】

配列番号 3 は、A d 2 線維タンパク質をコードするヌクレオチド配列である。

【 0 2 7 9 】

配列番号 4 は、A d 2 線維アミノ酸配列である。

【 0 2 8 0 】

配列番号 5 は、A d 3 5 線維タンパク質をコードするヌクレオチド配列である ( A d 5 - C M V 5 - G F P - 3 5 F ; B p 位置 2 8 3 3 7 - 2 9 3 0 8 ) 。

【 0 2 8 1 】

配列番号 6 は、3 2 3 アミノ酸長の A d 3 5 線維アミノ酸配列である。

【 0 2 8 2 】

配列番号 7 は、アデノウイルス線維共通モチーフ K L G X G L X F D / N である。

【 0 2 8 3 】

配列番号 8 は、5 T 3 5 H 線維タンパク質をコードする遺伝子 ( O R F ) のヌクレオチド配列である ( A d 5 - C M V 5 - G F P - 5 T 3 5 H ; B p 位置 2 8 3 3 8 - 3 0 1 1 0 ) 。

【 0 2 8 4 】

配列番号 9 は、5 T 3 5 H 線維 ( A d 5 由来のテールおよびシャフト、ならびに、A d 3 5 から得られたノブ領域 ) のアミノ酸配列である : 5 9 0 アミノ酸長。

【 0 2 8 5 】

配列番号 1 0 は、5 T 3 H 線維タンパク質をコードする遺伝子 ( O R F ) のヌクレオチド配列である ( A d 5 - C M V 5 - G F P - 5 T 3 H ; B p 位置 2 8 3 3 8 - 3 0 0 9 7 ) 。

【 0 2 8 6 】

配列番号 1 1 は、5 T 3 H 線維 ( A d 5 由来のテールおよびシャフト、ならびに、A d 3 から得られたノブ領域 ) のアミノ酸配列である : 5 8 7 アミノ酸長。

【 0 2 8 7 】

配列番号 1 2 は、5 T 3 H - R G D 線維タンパク質をコードする遺伝子 ( O R F ) のヌクレオチド配列である ( A d 5 - C M V 5 - G F P - 5 T 3 H - R G D ; B p 位置 3 0 2 1 7 - 3 2 0 5 2 ) 。

【 0 2 8 8 】

配列番号 1 3 は、5 T 3 H - R G D 線維 ( A d 5 由来のテールおよびシャフト、ならびに、A d 3 から得られたノブ領域 ) のアミノ酸配列である : 6 1 1 アミノ酸長。R G D 配列は、線維タンパク質のカルボキシル末端に位置する。

【 0 2 8 9 】

配列番号 1 4 は、h G M - C S F のアミノ酸配列である。

【 0 2 9 0 】

配列番号 1 5 は、h G M - C S F をコードするヌクレオチド配列である。

【 0 2 9 1 】

配列番号 1 6 は、h G M - C S F をコードする c D N A のヌクレオチド配列である。

【 0 2 9 2 】

配列番号 1 7 は、アデノウイルス 5 P C R プライマー 1 である。

【 0 2 9 3 】

配列番号 1 8 は、アデノウイルス 5 P C R プライマー 2 である。

【 0 2 9 4 】

配列番号 1 9 は、アデノウイルス 5 P C R プライマー 3 である。

【 0 2 9 5 】

10

20

30

40

50

配列番号 20 は、アデノウイルス 5 PCR プライマー 4 である。

【0296】

配列番号 21 は、ヒト GM - C S F PCR プライマー P S R 3 である。

【0297】

配列番号 22 は、ヒト GM - C S F PCR プライマー P S R 4 である。

【0298】

配列番号 23 は、SV 40 後期ポリ (A) シグナル PCR プライマー P S R 6 である。

【0299】

配列番号 24 は、SV 40 後期ポリ (A) シグナル PCR プライマー P S R 7 である。

【0300】

配列番号 25 は、カルボキシラーゼによって除去され得る、フリン切断部位由来のアミノ酸残基 R K K R である。

【0301】

配列番号 26 は、カルボキシラーゼによって除去され得る、フリン切断部位由来のアミノ酸残基 R K R R である。

【0302】

配列番号 27 は、カルボキシラーゼによって除去され得る、フリン切断部位由来のアミノ酸残基 R R R R である。

【図面の簡単な説明】

【0303】

【図 1】図 1 は、野生型線維構築物および例示的なキメラ線維構築物の代表を提供する。全ての改変された線維は、アデノウイルスベクターに組み込まれ得る (例えば、E 1 領域が欠失した Ad 5 ベースのベクター)。Av 1 n B g ベースのベクターは、RSV プロモーターの制御下で - ガラクトシダーゼを発現する。Ad 5 - C M V 5 - G F P ベースのベクターは、C M V 前初期プロモーターの制御下で緑色蛍光タンパク質を発現する。各ベクターについてのシャフト領域およびノブ領域の供給源も図に示されている。

【図 2】図 2 は、FaDu ヒト頭頸部腫瘍異種移植片腫瘍モデルにおける、OV 1991 の抗腫瘍効力を図示するグラフである。

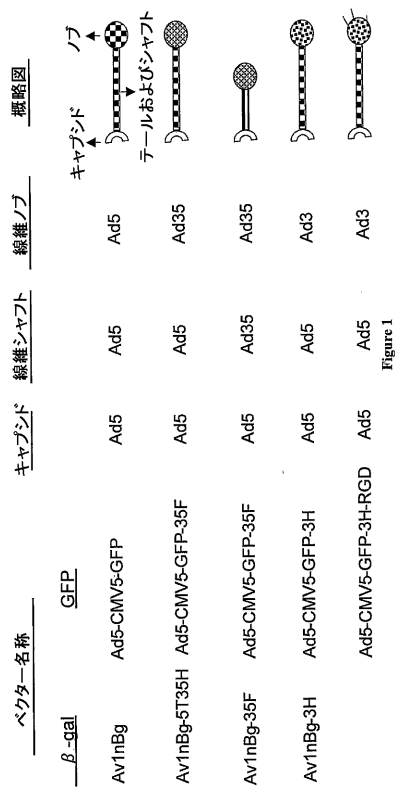
【図 3】図 3 は、A 375 - l u c ヒトメラノーマ異種移植片腫瘍モデルにおける、キメラ線維腫瘍崩壊性ベクターの抗腫瘍効力を図示するグラフである。

10

20

30

【図 1】



【配列表】

2008510493000001.app

【図 2】

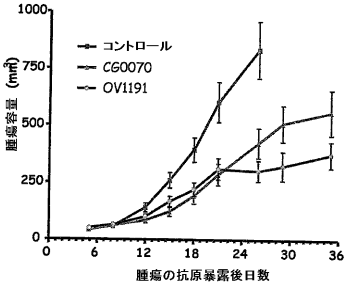


Figure 2

【図 3】

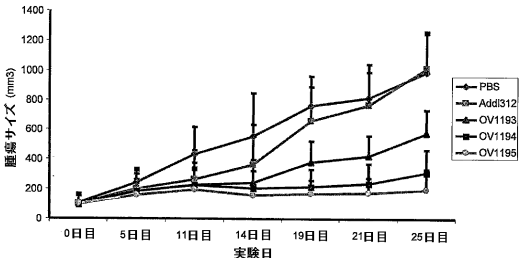


Figure 3

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/30196

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : C12P 21/06; C12N 15/00; 15/83, 15/64; A61K 39/12; A01N 63/00

US CL : 435/69.1, 455, 456, 320.1 ; 424, 93.2, 93.21, 199.1

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/69.1, 455, 456, 320.1 ; 424, 93.2, 93.21, 199.1

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
Please See Continuation Sheet

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 20040002060 (KALEKO et al) 1 January 2004 (01.01.2004), see e.g. entire document especially paragraph 0003, 0030, 0122, 0140, 0141, 0175, 0168, 0183, 0288 and 0306.	1-7, 10-26 and 30
A	Gaggar et al, CD46 is a cellular receptor for group B adenovirus, Nature Medicine, November 2003, Vol 9, No. 11, pages 1408-1412.	1-30
Y	US 2004/0071660 (Havenga et al) 15 April 2004 (15.04.2004), see e.g. paragraph 001, 0027 and abstract	1-7 and 10-30

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" 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

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 November 2005 (13.11.2005)

Date of mailing of the international search report

20 JUN 2006

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Arm: ISA/US  
Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized officer

Maria B. Marvich, PhD

Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US05/30196

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:  
East databases- USPAT, PGPUB, EPO, JPO, Derwent, IBM-DB  
STN databases- Medline, Caplus, Scisearch  
key words ad35 adenovirus serotype cd46, tumor, chimeric

## フロントページの続き

(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, LT, LU, LV, 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, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ガネシュ, シャンティ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 0 7, サンフランシスコ, タウンゼンド ストリート 2, アパートメントナンバー 2 - 2 0 9

(72)発明者 ユ, デチャオ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 4, フォスター シティ, ドルフィン アイル 3 5 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA30 CA04 CA05 CA06 CA07 CA09 CA10 DA02 DA03

EA02 EA04 FA02 FA10 GA11 GA18 HA08 HA09 HA14 HA17

4C087 AA01 AA02 BB65 BC83 CA12 NA14 ZB26