

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7015551号

(P7015551)

(45)発行日 令和4年2月15日(2022.2.15)

(24)登録日 令和4年1月26日(2022.1.26)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/861 (2006.01)

C 1 2 N 15/861

Z Z N A

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

C 1 2 N 15/40 (2006.01)

C 1 2 N 15/40

C 1 2 N 15/41 (2006.01)

C 1 2 N 15/41

C 1 2 N 15/42 (2006.01)

C 1 2 N 15/42

請求項の数 20 (全41頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-544177(P2018-544177)

(86)(22)出願日 平成29年2月23日(2017.2.23)

(65)公表番号 特表2019-509037(P2019-509037
A)

(43)公表日 平成31年4月4日(2019.4.4)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/019086

(87)国際公開番号 WO2017/147269

(87)国際公開日 平成29年8月31日(2017.8.31)

審査請求日 令和2年2月10日(2020.2.10)

(31)優先権主張番号 62/298,653

(32)優先日 平成28年2月23日(2016.2.23)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 513037649

ソーク インスティテュート フォー バ

イオロジカル スタディーズ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0

3 7 , ラ ホヤ , ノース トレイ パイ

ンズ ロード 1 0 0 1 0

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ウイルス動態への影響を最小限にするための治療用アデノウイルスにおける外因性遺伝子発現

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

異種オープンリーディングフレーム(ORF)および自己切断ペプチドコーディング配列を、いずれも内因性アデノウイルスORFと同じリーディングフレーム内に、前記内因性アデノウイルスORFと作動可能に連結した状態で含む、組換えアデノウイルスゲノムであって、前記自己切断ペプチドコーディング配列が、前記異種ORFと前記内因性ORFとの間に位置し、かつ

前記内因性ORFが、E1B-55kであり、前記異種ORFが、E1B-55kの3'にあるか、

前記内因性ORFが、DNAポリメラーゼであり、前記異種ORFが、DNAポリメラーゼの5'にあるか、

前記内因性ORFが、DNA結合タンパク質(DBP)であり、前記異種ORFが、DBPの3'にあるか、

前記内因性ORFが、アデノウイルス死タンパク質(ADP)であり、前記異種ORFが、ADPの5'にあるか、

前記内因性ORFが、E3-14.7kであり、前記異種ORFが、E3-14.7kの3'にあるか、

前記内因性ORFが、E4-ORF2であり、前記異種ORFが、E4-ORF2の5'にあるか、または

前記内因性ORFが、ファイバーであり、前記異種ORFが、ファイバーの3'にあり、

前記異種 O R F が、がんの処置に好適な治療用タンパク質をコードし、
前記自己切断ペプチドが、2 A ペプチドである、組換えアデノウイルスゲノム。

【請求項 2】

前記治療用タンパク質が、免疫調節因子を含み、
前記免疫調節因子が、サイトカイン、ケモカイン、T 細胞活性化リガンド、共刺激分子、
およびチェックポイント遮断阻害剤からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組換え
アデノウイルスゲノム。

【請求項 3】

前記 2 A ペプチドが、プタテッシュウウイルス - 1 (P T V 1) 2 A (P 2 A) ペプチド
もしくは G l y - S e r - G l y をその N 末端に含むバリエーション、口蹄疫ウイルス (F M
D V) 2 A (F 2 A) ペプチドもしくは G l y - S e r - G l y をその N 末端に含むバリエーション、
ウマ鼻炎 A ウイルス (E R A V) 2 A (E 2 A) ペプチドもしくは G l y - S e
r - G l y をその N 末端に含むバリエーション、または Thosea asigna ウイルス (T a V)
2 A (T 2 A) ペプチドもしくは G l y - S e r - G l y をその N 末端に含むバリエーション
を含む、請求項 1 または 2 に記載の組換えアデノウイルスゲノム。

【請求項 4】

前記自己切断ペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 1 4 ~ 2 1 のうちのいずれか 1 つのア
ミノ酸配列に対して、少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 % 同一であり、
前記自己切断ペプチドは、リボソームスキップと、前記内因性 O F R および異種 O R F の
それぞれにコードされた別個のタンパク質の放出とを引き起こすことができるものである
、請求項 1 または 2 に記載の組換えアデノウイルスゲノム。

【請求項 5】

前記自己切断ペプチドが、配列番号 1 4 ~ 2 1 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列から
なる、請求項 1 または 2 に記載の組換えアデノウイルスゲノム。

【請求項 6】

前記自己切断ペプチドが、P 2 A もしくは G l y - S e r - G l y をその N 末端に含むバ
リエーションである、請求項 3 に記載の組換えアデノウイルスゲノム。

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の組換えアデノウイルスゲノムと、薬学的に許容さ
れる担体とを含む、組成物。

【請求項 8】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の組換えアデノウイルスゲノムを含む、組換えアデ
ノウイルス。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の組換えアデノウイルスと、薬学的に許容される担体とを含む、組成物。

【請求項 10】

前記治療用タンパク質を被験体に送達する方法において使用するための、請求項 1 から 6
のいずれか一項に記載の組換えアデノウイルスゲノムもしくは請求項 8 に記載の組換えア
デノウイルスを含む組成物、または請求項 7 もしくは 9 に記載の組成物であって、前記方
法が、前記被験体に前記組成物を投与することを含む、組成物。

【請求項 11】

腫瘍細胞の生存度および / または腫瘍細胞の増殖を阻害する方法において使用するための
、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の組換えアデノウイルスゲノムもしくは請求項 8
に記載の組換えアデノウイルスを含む組成物、または請求項 7 もしくは 9 に記載の組成物
であって、前記方法が、前記腫瘍細胞を前記組成物と接触させることを含む、組成物。

【請求項 12】

前記方法が、i n v i t r o 方法である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記方法が、i n v i v o 方法であり、前記腫瘍細胞を接触させることが、前記組成物
を、腫瘍を有する被験体に投与することを含む、請求項 11 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

被験体における腫瘍の進行を阻害するかまたは腫瘍の体積を低減させる方法において使用するための、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の組換えアデノウイルスゲノムもしくは請求項 8 に記載の組換えアデノウイルスを含む組成物、または請求項 7 もしくは 9 に記載の組成物であって、前記方法が、前記被験体に前記組成物を投与することを含む、組成物。

【請求項 15】

被験体におけるがんを処置する方法において使用するための、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の組換えアデノウイルスゲノムもしくは請求項 8 に記載の組換えアデノウイルスを含む組成物、または請求項 7 もしくは 9 に記載の組成物であって、前記方法が、前記被験体に前記組成物を投与することを含む、組成物。

10

【請求項 16】

前記方法が、前記被験体に、追加の治療剤を投与することをさらに含む、請求項 13 から 15 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 17】

(i) 請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の組換えアデノウイルスゲノム、請求項 8 に記載の組換えアデノウイルス、または請求項 7 もしくは請求項 9 に記載の組成物と、
(i i) 1 つもしくは複数の追加の治療剤および / または 1 つもしくは複数の診断剤とを含む、キット。

【請求項 18】

前記 1 つまたは複数の追加の治療剤が、化学療法薬、生物製剤、またはそれらの組合せを含む、請求項 17 に記載のキット。

20

【請求項 19】

前記 1 つまたは複数の診断剤が、腫瘍マーカーに特異的な 1 つまたは複数の抗体を含む、請求項 17 または 18 に記載のキット。

【請求項 20】

前記 1 つまたは複数の診断剤が、腫瘍マーカーに特異的な 1 つまたは複数の核酸分子を含む、請求項 17 または 18 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

30

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2016年2月23日に出願された米国仮出願第62/298,653号(その全体が参照によって本明細書中に組み込まれる)の利益を主張する。

【0002】

本開示は、組換えアデノウイルス構築物における外因性オープンリーディングフレームの最適な配置、および組換えウイルスの治療的適用に関する。

【背景技術】**【0003】**

アデノウイルス血清型5(Ad5)は、基礎研究適用、マウス肺がんモデル、およびヒト遺伝子療法の治験において最適なベクターである。アデノウイルスは、感染を特定の細胞型上の受容体に標的化するAdファイバータンパク質突起(spike)で覆われたタンパク質キャプシドによって保護された安定な36kbの二本鎖DNAゲノムを有する。アデノウイルスは、宿主DNAに組み入れられず、確立されたプロトコルを使用して高い力価で産生させることができ、ヒト遺伝子療法およびがんでの適用における安全性が証明されている。したがって、Adに基づくベクターは、がんの診断および治療法において非常に有望である。

40

【発明の概要】**【課題を解決するための手段】****【0004】**

50

異種オープンリーディングフレーム（ORF）および自己切断ペプチドコーディング配列を含む、組換えアデノウイルスゲノムが、本明細書において開示される。異種ORFは、例えば、治療用タンパク質をコードし得る。組換えアデノウイルスゲノムおよび開示されるゲノムによって産生される組換えアデノウイルスは、例えば、がんの処置のためなど、治療的適用において使用することができる。

【0005】

異種ORFおよび自己切断ペプチドコーディング配列を、いずれも内因性アデノウイルスORFと同じリーディングフレーム内に、それと作動可能に連結した状態で含む、組換えアデノウイルスゲノムが、本明細書において提供される。自己切断ペプチドコーディング配列は、異種ORFと内因性ORFとの間に位置する。一部の実施形態では、内因性ORFが、E1B - 55kであり、異種ORFが、E1B - 55kの3'にあるか、内因性ORFが、DNAポリメラーゼであり、異種ORFが、DNAポリメラーゼの5'にあるか、内因性ORFが、DNA結合タンパク質（DBP）であり、異種ORFが、DBPの3'にあるか、内因性ORFが、アデノウイルス死タンパク質（adenovirus death protein）（ADP）であり、異種ORFが、ADPの5'にあるか、内因性ORFが、E3 - 14.7kであり、異種ORFが、E3 - 14.7kの3'にあるか、内因性ORFが、E4 - ORF2であり、異種ORFが、E4 - ORF2の5'にあるか、または内因性ORFが、ファイバーであり、異種ORFが、ファイバーの3'にある。一部の実施例では、異種ORFは、治療用タンパク質をコードする。

【0006】

本明細書において開示される組換えアデノウイルスゲノムを含む、組換えアデノウイルスが、本明細書においてさらに提供される。本明細書において開示される組換えアデノウイルスゲノムまたは組換えアデノウイルスと、薬学的に許容される担体とを含む、組成物もまた、提供される。

【0007】

本明細書において開示される組換えアデノウイルスゲノムまたは組換えアデノウイルス（またはその組成物）を被験体に投与することによって、被験体に治療用タンパク質を送達する方法もまた、提供される。これらの方法において、組換えアデノウイルスゲノムまたは組換えアデノウイルスの異種ORFは、治療用タンパク質をコードする。

【0008】

本明細書において開示される組換えアデノウイルスゲノムまたは組換えアデノウイルス（またはその組成物）を投与することによって、腫瘍細胞の生存度を阻害する方法、腫瘍細胞の増殖を阻害する方法、腫瘍の進行を阻害する方法、腫瘍の体積を低減させる方法、およびがんを有する被験体を処置する方法が、さらに提供される。これらの方法において、組換えアデノウイルスゲノムまたは組換えアデノウイルスの異種ORFは、がんの処置に好適な治療用タンパク質をコードする。

【0009】

本開示の上述およびその他の目的および特性は、以下の詳細な説明、続いて添付の図面への参照により、さらに明らかとなる。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

（項目1）

異種オープンリーディングフレーム（ORF）および自己切断ペプチドコーディング配列を、いずれも内因性アデノウイルスORFと同じリーディングフレーム内に、それと作動可能に連結した状態で含む、組換えアデノウイルスゲノムであって、前記自己切断ペプチドコーディング配列が、前記異種ORFと前記内因性ORFとの間に位置し、かつ

前記内因性ORFが、E1B - 55kであり、前記異種ORFが、E1B - 55kの3'にあるか、

前記内因性ORFが、DNAポリメラーゼであり、前記異種ORFが、DNAポリメラーゼの5'にあるか、

前記内因性ORFが、DNA結合タンパク質（DBP）であり、前記異種ORFが、D

B P の 3 ' にあるか、

前記内因性 O R F が、アデノウイルス死タンパク質 (A D P) であり、前記異種 O R F が、A D P の 5 ' にあるか、

前記内因性 O R F が、E 3 - 1 4 . 7 k であり、前記異種 O R F が、E 3 - 1 4 . 7 k の 3 ' にあるか、

前記内因性 O R F が、E 4 - O R F 2 であり、前記異種 O R F が、E 4 - O R F 2 の 5 ' にあるか、または

前記内因性 O R F が、ファイバーであり、前記異種 O R F が、ファイバーの 3 ' にあり、前記異種 O R F が、治療用タンパク質をコードする、組換えアデノウイルスゲノム。

(項目 2)

前記治療用タンパク質が、免疫調節因子を含む、項目 1 に記載の組換えアデノウイルスゲノム。

(項目 3)

前記自己切断ペプチドが、2 A ペプチドまたはそのバリエーションである、項目 1 または項目 2 に記載の組換えアデノウイルスゲノム。

(項目 4)

前記 2 A ペプチドが、ブタテッシュウイルス - 1 (P T V 1) 2 A (P 2 A) ペプチド、口蹄疫ウイルス (F M D V) 2 A (F 2 A) ペプチド、ウマ鼻炎 A ウイルス (E R A V) 2 A (E 2 A) ペプチド、または Thosea asigna ウイルス (T a V) 2 A (T 2 A) ペプチド、またはそれらのバリエーションを含む、項目 3 に記載の組換えアデノウイルスゲノム。

(項目 5)

前記自己切断ペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 1 4 ~ 2 1 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列に対して、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 % 同一である、項目 4 に記載の組換えアデノウイルスゲノム。

(項目 6)

前記自己切断ペプチドが、配列番号 1 4 ~ 2 1 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、項目 4 に記載の組換えアデノウイルスゲノム。

(項目 7)

項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の組換えアデノウイルスゲノムと、薬学的に許容される担体とを含む、組成物。

(項目 8)

項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の組換えアデノウイルスゲノムを含む、組換えアデノウイルス。

(項目 9)

項目 8 に記載の組換えアデノウイルスと、薬学的に許容される担体とを含む、組成物。

(項目 1 0)

治療用タンパク質を被験体に送達する方法であって、前記被験体に、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の組換えアデノウイルスゲノム、項目 8 に記載の組換えアデノウイルス、または項目 7 もしくは項目 9 に記載の組成物を投与することを含む、方法。

(項目 1 1)

腫瘍細胞の生存度および / または腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、前記腫瘍細胞を、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の組換えアデノウイルスゲノム、項目 8 に記載の組換えアデノウイルス、または項目 7 もしくは項目 9 に記載の組成物と接触させることを含む、方法。

(項目 1 2)

i n v i t r o 方法である、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 3)

前記方法が、i n v i v o 方法であり、前記腫瘍細胞を接触させることが、前記組換えアデノウイルスゲノム、組換えアデノウイルス、または組成物を、腫瘍を有する被験体に

10

20

30

40

50

投与することを含む、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 4)

被験体における腫瘍の進行を阻害するかまたは腫瘍の体積を低減させる方法であって、前記被験体に、治療有効量の、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の組換えアデノウイルスゲノム、項目 8 に記載の組換えアデノウイルス、または項目 7 もしくは項目 9 に記載の組成物を投与し、それによって、前記被験体における腫瘍の進行を阻害するか、または腫瘍の体積を低減させることを含む、方法。

(項目 1 5)

被験体におけるがんを処置する方法であって、前記被験体に、治療有効量の、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の組換えアデノウイルスゲノム、項目 8 に記載の組換えアデノウイルス、または項目 7 もしくは項目 9 に記載の組成物を投与し、それによって、前記被験体におけるがんを処置することを含む、方法。

(項目 1 6)

前記被験体に、追加の治療剤を投与することをさらに含む、項目 1 3 から 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 7)

(i) 項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の組換えアデノウイルスゲノム、項目 8 に記載の組換えアデノウイルス、または項目 7 もしくは項目 9 に記載の組成物と、

(i i) 1 つもしくは複数の追加の治療剤および / または 1 つもしくは複数の診断剤とを含む、キット。

(項目 1 8)

前記 1 つまたは複数の追加の治療剤が、化学療法薬、生物製剤、またはそれらの組合せを含む、項目 1 7 に記載のキット。

(項目 1 9)

前記 1 つまたは複数の診断剤が、腫瘍マーカーに特異的な 1 つまたは複数の抗体を含む、項目 1 7 または 1 8 に記載のキット。

(項目 2 0)

前記 1 つまたは複数の診断剤が、腫瘍マーカーに特異的な 1 つまたは複数の核酸分子を含む、項目 1 7 または 1 8 に記載のキット。

【図面の簡単な説明】

【0 0 1 0】

【図 1】図 1 は、アデノウイルス構築物を試験するための例示的な作業フローの概略図である。全ウイルスゲノムプラスミドを産生し、マルチウェルプレートにおいて、好適な細胞、例えば、2 9 3 - E 4 細胞にトランスフェクトする。トランスフェクトした細胞が増え、それらを、凍結 / 解凍に供して、ウイルス粒子を放出させ、続いて、遠心分離によって細胞残屑をペレットにする。上清（ウイルス粒子を含有する）を、複数のより大きな培養プレートに移す。ウイルス粒子を、トランスフェクトした細胞から採取し、C s C 1 精製し、感染ウイルス力価を、E L I S A によって測定する。次いで、目的の細胞型に、精製したウイルスを公知の M O I で感染させる。感染の 4 8 時間後または 7 2 時間後に、アデノウイルス後期タンパク質、アデノウイルスゲノム、またはブランクを、それぞれ、ウエスタンブロット、q - P C R、またはブランクアッセイによって測定する。

【0 0 1 1】

【図 2】図 2 は、指数関数的ウイルス増殖を示す概略図である。腫瘍内のすべての細胞の腫瘍溶解性殺滅には、指数関数的ウイルス増殖が必要である。しかしながら、ほとんどの事例において、腫瘍細胞のうち、初回に感染されるものはわずかな割合のみである。したがって、1 回の複製当たりの子孫の数のわずかな違いが、たった数回の複製後でも粒子の総数に大きな違いをもたらす。1 サイクル当たり 3 ビリオンを産生するウイルスと、1 サイクル当たり 5 ビリオンを産生するウイルスとの間の比較を示す。グラフに示されているように、5 ~ 6 回の複製後に、これら 2 つのウイルスのウイルス力価は、有意に異なる。

【0 0 1 2】

【図3】図3は、蛍光に基づくウイルス動態（F B V K）アッセイの例示的な作業フローを示す概略図である。全ウイルスゲノムプラスミドを産生し（例えば、A d s e m b l y またはA d S L I Cによって）、これを、マルチウェルプレートにおいて目的の細胞型にトランスフェクトするために使用する。あるいは、細胞に、組換えアデノウイルス粒子を感染させる。アデノウイルスゲノムは、ウイルス複製動態を実質的に変化させないウイルスゲノム内の位置に、蛍光タンパク質をコードする少なくとも1つのオープンリーディングフレーム（O R F）を含む。蛍光を経時的にモニタリングして、ウイルス複製動態を計算する。腫瘍溶解性ウイルスの候補は、腫瘍細胞と正常細胞との間でウイルス動態に最も大きな差を呈するものである。

【0013】

【図4A】図4A～4Bは、アデノウイルスゲノムプラスミドを用いて開始した場合の動態アッセイ環境を概説する。このアッセイは、初回トランスフェクション効率の正確な把握を必要としない。トランスフェクション条件は、細胞のうちのおよそ5～10%が、初回にトランスフェクトされるように選択される。示されている実施例では、48ウェルプレートを使用しており、これにより、3つの模擬感染ウェルおよびツール感度変動を補償するためのF L U O R E S B R I T E（商標）ビーズを有する3つのウェルとともに、14種類の異なるウイルス構築物を3連で試験することが可能となる。（図4A）48ウェルプレートの上半分のウェルは、6種類の異なるウイルスのゲノムプラスミドをトランスフェクトした細胞、模擬感染細胞、およびブランク（F L U O R E S B R I T E（商標）ビーズ）を、それぞれ3連で含有する。（図4B）48ウェルプレートの下半分のウェルは、8種類の異なるウイルスのゲノムプラスミドをトランスフェクトした細胞を、3連で含有する。マルチウェルプレートは、継続的な蛍光モニタリングのために、プレートリーダー（T E C A Nプレートリーダーなど）に設置する。

【図4B】図4A～4Bは、アデノウイルスゲノムプラスミドを用いて開始した場合の動態アッセイ環境を概説する。このアッセイは、初回トランスフェクション効率の正確な把握を必要としない。トランスフェクション条件は、細胞のうちのおよそ5～10%が、初回にトランスフェクトされるように選択される。示されている実施例では、48ウェルプレートを使用しており、これにより、3つの模擬感染ウェルおよびツール感度変動を補償するためのF L U O R E S B R I T E（商標）ビーズを有する3つのウェルとともに、14種類の異なるウイルス構築物を3連で試験することが可能となる。（図4A）48ウェルプレートの上半分のウェルは、6種類の異なるウイルスのゲノムプラスミドをトランスフェクトした細胞、模擬感染細胞、およびブランク（F L U O R E S B R I T E（商標）ビーズ）を、それぞれ3連で含有する。（図4B）48ウェルプレートの下半分のウェルは、8種類の異なるウイルスのゲノムプラスミドをトランスフェクトした細胞を、3連で含有する。マルチウェルプレートは、継続的な蛍光モニタリングのために、プレートリーダー（T E C A Nプレートリーダーなど）に設置する。

【0014】

【図5】図5は、組換えウイルスを用いて開始した場合の動態アッセイ環境を概説する。このアッセイは、ウイルス力価の正確な把握を必要としない。組換えウイルスを連続希釈し、これを使用して、マルチウェルプレートに播種した細胞に感染させる。示されている実施例では、96ウェルプレートを使用しており、各ウイルスを1：100、1：300、1：900、1：2700、1：8100、1：24,300、1：72,900、および1：218,700に希釈し、11種類のウイルスを同時に試験することが可能である。4つのウェルは模擬感染であり、ツールの感度および変動を補償するために、F L U O R E S B R I T E（商標）ビーズを4つのウェルに入れる。マルチウェルプレートは、継続的な蛍光モニタリングのために、プレートリーダー（T E C A Nプレートリーダーなど）に設置する。

【0015】

【図6A】図6A～6Cは、組換えアデノウイルスのコンビナトリアルアセンブリのためのA d s e m b l y 技法およびA d S L I C技法の概略図を示す。（図6A）アデノウイ

10

20

30

40

50

ルスゲノムを、4つのモジュール - E 1、コア、E 3、およびE 4に分ける。(図6B) Ad s e m b l y は、マルチサイトG a t e w a y 反応を使用したゲノムの再アセンブリを伴う。(図6C) A d S L I C は、配列およびライゲーション非依存性クローニング (S L I C) を利用して、アデノウイルスモジュールをアセンブリする。

【図6B】図6A～6Cは、組換えアデノウイルスのコンピナトリアルアセンブリのためのA d s e m b l y 技法およびA d S L I C 技法の概略図を示す。(図6A) アデノウイルスゲノムを、4つのモジュール - E 1、コア、E 3、およびE 4に分ける。(図6B) A d s e m b l y は、マルチサイトG a t e w a y 反応を使用したゲノムの再アセンブリを伴う。(図6C) A d S L I C は、配列およびライゲーション非依存性クローニング (S L I C) を利用して、アデノウイルスモジュールをアセンブリする。

10

【図6C】図6A～6Cは、組換えアデノウイルスのコンピナトリアルアセンブリのためのA d s e m b l y 技法およびA d S L I C 技法の概略図を示す。(図6A) アデノウイルスゲノムを、4つのモジュール - E 1、コア、E 3、およびE 4に分ける。(図6B) A d s e m b l y は、マルチサイトG a t e w a y 反応を使用したゲノムの再アセンブリを伴う。(図6C) A d S L I C は、配列およびライゲーション非依存性クローニング (S L I C) を利用して、アデノウイルスモジュールをアセンブリする。

【0016】

【図7】図7は、E 1領域における蛍光タンパク質をコードする組換えアデノウイルスの自然対数スロープ (l n - s l o p e) を示す、棒グラフである。直接的な融合による構築物Y P e t - E 1 A、ならびにそれぞれP 2 A部位を含有するY P e t - P 2 A - E 1 A、E 1 A - P 2 A - m C h e r r y、およびE 1 B - 5 5 k - P 2 A - Y P e t 構築物の値を示す。Y P e t - P 2 A - A D P 構築物は、比較のために示される。

20

【0017】

【図8】図8は、蛍光に基づくウイルス動態アッセイの動態データの分析および解釈の概略図である。

【0018】

【図9A】図9A～9Cは、A d 5、A d 9、またはA d 3 4に由来し、E 3 - 1 4 . 7 k (またはA d 9およびA d 3 4におけるその同等物) O R Fの3'に異種O R Fを含有する、組換えアデノウイルスの自然対数スロープ値を示す、棒グラフである。293細胞(図9A)、A 5 4 9細胞(図9B)、およびU 2 O S細胞(図9C)におけるA d 5 (E 3 - 1 4 . 7 k - P 2 A - Y P e t、P C M N - 8 8 7)、A d 9 (E 3 - 1 5 k - P 2 A - Y P e t、P C M N - 8 8 8)、およびA d 3 4 (E 3 - 1 4 . 8 k - P 2 A - Y P e t、P C M N - 8 8 9)の値を示す。A d 5 コア (E 3 - 1 4 . 7 k - P 2 A - Y P e tを含む)、ならびにA d 9 (A d 5 / A d 9) またはA d 3 4 (A d 5 / A d 3 4) のいずれかに由来するファイバーシャフト/ノブを含む、キメラウイルスの値もまた、それぞれの図に示す。

30

【図9B】図9A～9Cは、A d 5、A d 9、またはA d 3 4に由来し、E 3 - 1 4 . 7 k (またはA d 9およびA d 3 4におけるその同等物) O R Fの3'に異種O R Fを含有する、組換えアデノウイルスの自然対数スロープ値を示す、棒グラフである。293細胞(図9A)、A 5 4 9細胞(図9B)、およびU 2 O S細胞(図9C)におけるA d 5 (E 3 - 1 4 . 7 k - P 2 A - Y P e t、P C M N - 8 8 7)、A d 9 (E 3 - 1 5 k - P 2 A - Y P e t、P C M N - 8 8 8)、およびA d 3 4 (E 3 - 1 4 . 8 k - P 2 A - Y P e t、P C M N - 8 8 9)の値を示す。A d 5 コア (E 3 - 1 4 . 7 k - P 2 A - Y P e tを含む)、ならびにA d 9 (A d 5 / A d 9) またはA d 3 4 (A d 5 / A d 3 4) のいずれかに由来するファイバーシャフト/ノブを含む、キメラウイルスの値もまた、それぞれの図に示す。

40

【図9C】図9A～9Cは、A d 5、A d 9、またはA d 3 4に由来し、E 3 - 1 4 . 7 k (またはA d 9およびA d 3 4におけるその同等物) O R Fの3'に異種O R Fを含有する、組換えアデノウイルスの自然対数スロープ値を示す、棒グラフである。293細胞(図9A)、A 5 4 9細胞(図9B)、およびU 2 O S細胞(図9C)におけるA d 5 (E

50

3 - 1 4 . 7 k - P 2 A - Y P e t、P C M N - 8 8 7)、A d 9 (E 3 - 1 5 k - P 2 A - Y P e t、P C M N - 8 8 8)、およびA d 3 4 (E 3 - 1 4 . 8 k - P 2 A - Y P e t、P C M N - 8 8 9)の値を示す。A d 5 コア (E 3 - 1 4 . 7 k - P 2 A - Y P e tを含む)、ならびにA d 9 (A d 5 / A d 9)またはA d 3 4 (A d 5 / A d 3 4)のいずれかに由来するファイバーシャフト/ノブを含む、キメラウイルスの値もまた、それぞれの図に示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 9 】

(配 列 表)

添付の配列表に列挙されている核酸配列およびアミノ酸配列は、3 7 C . F . R . 1 . 8 2 2 に定義されるように、ヌクレオチド塩基の標準的な略字およびアミノ酸の3文字コードを使用して示されている。それぞれの核酸配列の一方の鎖のみが示されているが、相補鎖は、提示された鎖に対する任意の参照により含まれると理解される。配列表は、2 0 1 7 年 2 月 2 1 日に作成された7 0 3 K BのA S C I Iテキストファイルとして提出されており、参照により本明細書に組み込まれる。添付の配列表においては、以下の通りである。

配列番号 1 は、合成アデノウイルスゲノム C M B T - 3 7 9 (Y P e t - P 2 A - E 1 A) のヌクレオチド配列である。

配列番号 2 は、合成アデノウイルスゲノム C M B T - 4 3 2 (E 1 A - P 2 A - Y P e t) のヌクレオチド配列である。

配列番号 3 は、合成アデノウイルスゲノム C M B T - 4 5 6 (E 1 B - 5 5 k - P 2 A - Y P e t) のヌクレオチド配列である。

配列番号 4 は、合成アデノウイルスゲノム C M B T - 4 9 9 (E 1 B - 5 5 k - P 2 A - m C h e r r y) のヌクレオチド配列である。

配列番号 5 は、合成アデノウイルスゲノム C M B T - 5 3 0 (Y P e t - P 2 A - (D N A ポリ)) のヌクレオチド配列である。

配列番号 6 は、合成アデノウイルスゲノム C M B T - 8 8 6 (D B P - P 2 A - Y P e t) のヌクレオチド配列である。

配列番号 7 は、合成アデノウイルスゲノム C M B T - 4 0 3 (Y P e t - P 2 A - A D P) のヌクレオチド配列である。

配列番号 8 は、合成アデノウイルスゲノム C M B T - 4 2 9 (A D P - P 2 A - Y P e t) のヌクレオチド配列である。

配列番号 9 は、合成アデノウイルスゲノム P C M N - 8 8 7 (E 3 - 1 4 . 7 k - P 2 A - Y P e t) のヌクレオチド配列である。

配列番号 1 0 は、合成アデノウイルスゲノム C M B T - 4 5 7 (Y P e t - P 2 A - E 4 - O R F 2) のヌクレオチド配列である。

配列番号 1 1 は、合成アデノウイルスゲノム C M B T - 6 3 3 (m C h e r r y - P 2 A - E 4 - O R F 2) のヌクレオチド配列である。

配列番号 1 2 は、合成アデノウイルスゲノム C M B T - 4 0 7 (Y P e t - P 2 A - ファイバー) のヌクレオチド配列である。

配列番号 1 3 は、合成アデノウイルスゲノム C M B T - 4 4 5 (ファイバー - P 2 A - Y P e t) のヌクレオチド配列である。

配列番号 1 4 は、P 2 A のアミノ酸配列である。

配列番号 1 5 は、F 2 A のアミノ酸配列である。

配列番号 1 6 は、E 2 A のアミノ酸配列である。

配列番号 1 7 は、T 2 A のアミノ酸配列である。

配列番号 1 8 は、N 末端に G S G を含む修飾された P 2 A のアミノ酸配列である。

配列番号 1 9 は、N 末端に G S G を含む修飾された F 2 A のアミノ酸配列である。

配列番号 2 0 は、N 末端に G S G を含む修飾された E 2 A のアミノ酸配列である。

配列番号 2 1 は、N 末端に G S G を含む修飾された T 2 A のアミノ酸配列である。

配列番号 22 は、合成アデノウイルスゲノム PCMN - 888 (Ad9 E3 - 15k - P2A - YPet) のヌクレオチド配列である。

配列番号 23 は、合成アデノウイルスゲノム PCMN - 889 (Ad34 E3 - 14.8k - P2A - YPet) のヌクレオチド配列である。

【0020】

I. 略語

Ad アデノウイルス

ADP アデノウイルス死タンパク質

BFP 青色蛍光タンパク質

E2A ウマ鼻炎Aウイルス2A

ELISA 酵素結合免疫吸着法

ERAV ウマ鼻炎Aウイルス

F2A 口蹄疫ウイルス2A

FACS 蛍光活性化細胞分取

FMDV 口蹄疫ウイルス (food and mouth disease virus)

GFP 緑色蛍光タンパク質

MOI 感染多重度

OD 光学密度

ORF オープンリーディングフレーム

P2A ブタテッショウウイルス - 1 2A

pIX タンパク質IX

PTV1 ブタテッショウウイルス - 1

RFP 赤色蛍光タンパク質

SLIC 配列およびライゲーション非依存性クローニング

T2A Thosea assignaウイルス2A

TaV Thosea assignaウイルス

YFP 黄色蛍光タンパク質

【0021】

II. 用語および方法

別途注記されない限り、技術用語は、従来の使用法に従って使用される。分子生物学における一般用語の定義は、Oxford University Pressによって1994年に刊行されたBenjamin Lewin、Genes V (ISBN 0-19-854287-9); Blackwell Science Ltd.によって1994年に刊行されたKendrewら(編)、The Encyclopedia of Molecular Biology (ISBN 0-632-02182-9); およびVCH Publishers, Inc.によって1995年に刊行されたRobert A. Meyers(編)、Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference (ISBN 1-56081-569-8)に見出すことができる。

【0022】

本開示の様々な実施形態の考察を容易にするために、特定の用語の説明を、以下に提供する。

【0023】

2Aペプチド：一部のRNAウイルス、例えば、ピコルナウイルスによってコードされる自己切断ペプチドの一種である。2Aペプチドは、リボソームが2AエレメントのC末端におけるペプチド結合の合成をスキップするようにし、2A配列の末端と下流のペプチドとの分離をもたらすことによって機能する(Kimら、PLoS One、6巻(4号)、e18556、2011年)。「切断」は、2AペプチドのC末端に見出されるグリシン残基とプロリン残基との間に生じる。例示的な2Aペプチドとしては、本明細書において配列番号14~17として記載されている、Thosea assignaウイルス(T

10

20

30

40

50

a V)、ウマ鼻炎Aウイルス(E R A V)、ブタテッショウウイルス - 1 (P T V 1)、および口蹄疫ウイルス(F M D V)によってコードされる2 A ペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、2 A ペプチドは、切断効率を改善するために、N末端に、G l y - S e r - G l yを含む(配列番号18~21)。

【0024】

アデノウイルス：線形二本鎖DNAゲノムおよび正二十面体キャプシドを有する、非エンベロープ型ウイルスである。現在、ヒトアデノウイルスには、68種類の血清型が公知であり、7つの種(種A、B、C、D、E、F、およびG)に分類される。異なる血清型のアデノウイルスは、異なる種類の疾患と関連付けられており、一部の血清型は、呼吸器疾患(主として種BおよびC)、結膜炎(種BおよびD)、ならびにノまたは胃腸炎(種FおよびG)を引き起こす。

10

【0025】

アデノウイルス死タンパク質(ADP)：他の細胞に感染するために細胞の溶解およびアデノウイルスの放出を媒介する、アデノウイルス感染の後期に合成されるタンパク質である。ADPは、核膜、小胞体、およびゴルジ体に局在化する、101個のアミノ酸の内在性膜糖タンパク質である。ADPは、以前、E3 - 11 . 6 Kと称されていた)。

【0026】

投与：被験体に、治療剤(例えば、組換えウイルス)などの薬剤を、任意の有効な経路によって提供することまたは与えることである。例示的な投与経路としては、注射(皮下、筋肉内、皮内、腹腔内、腫瘍内、および静脈内など)、経口、管内、舌下、直腸、経皮、鼻内、膣、および吸入の経路が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0027】

キメラ：起源が異なる少なくとも2つの部分から構成されるものである。本開示の文脈において、「キメラアデノウイルス」とは、少なくとも2つの異なる血清型に由来する(例えば、Ad5および第2の血清型のアデノウイルスに由来する)遺伝物質およびノまたはタンパク質を有するアデノウイルスである。この文脈において、「キャプシド交換型」アデノウイルスとは、キャプシドタンパク質が、1つの血清型のアデノウイルスに由来し、残りのタンパク質が、別のアデノウイルス血清型に由来する、キメラアデノウイルスを指す。同様に、「キメラファイバー」とは、少なくとも2つの異なる血清型のアデノウイルスに由来するアミノ酸配列を有するファイバータンパク質である。例えば、キメラファイバーは、Ad5由来のファイバーシャフトおよび第2の血清型のアデノウイルスに由来するファイバーノブから構成され得る。別の実施例では、キメラファイバーは、Ad5テール、ならびに第2の血清型のアデノウイルス(Ad9またはAd34など)に由来するファイバーシャフトおよびノブから構成される。

30

【0028】

接触させること：直接的な物理的会合におくことであり、固体形態および液体形態の両方を含む。

【0029】

縮重バリエーション：本開示の文脈において、「縮重バリエーション」とは、遺伝子コードの結果として縮重となる配列を含むペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。天然のアミノ酸が20個あり、その大半が、1つを上回るコドンによって指定される。したがって、ヌクレオチド配列によってコードされるペプチドのアミノ酸配列が変化しない限り、そのペプチドをコードするすべての縮重ヌクレオチド配列が、含まれる。

40

【0030】

欠失した：「欠失した」タンパク質(E4orf1またはE4orf6/7タンパク質など)をコードするアデノウイルスゲノムは、タンパク質コーディング配列の完全な欠失、またはタンパク質発現の不在をもたらす部分的欠失を有するアデノウイルスを指す。

【0031】

E2Fの脱制御(deregulation)：E2F転写因子および下流の標的遺伝子の活性の増加を指し、これは、ほぼすべての種類のヒトのがんにおいて生じる。E2F経

50

路活性および転写の脱制御は、Rb、p107、およびp130腫瘍抑制因子の機能喪失変異および欠失など、経路の上流の任意の構成要素における様々な異なる変異の結果として生じ得る。Rbは、特定された最初の腫瘍抑制因子であり、ヒト腫瘍の少なくとも3分の1で、不在であるか、または変異している。加えて、p16変異および/またはエピジェネティックサイレンシングは、腫瘍細胞においてE2Fを活性化し得る。サイクリンDおよびCDK4の変異、遺伝子増幅、または過剰発現もまた、ヒト腫瘍においてE2F活性の脱制御をもたらす。加えて、E2Fは、EGFR、RTK、RAS、RAF、PI-3K、PTEN、RAF、MYCを含む、増殖因子受容体経路の変異によって活性化される。p16INK4a-サイクリンD:cdk4/6-RB-E2F経路における変異は、概して、相互排他的様式で生じるため、一方の「ヒット」（例えば、p16）が、他方（例えば、Rb変異またはサイクリンD:cdk4過剰発現）を伴うことはない。しかしながら、現在の化学療法はほとんどが、E2Fの転写標的を阻害するが、正常な細胞に対しても毒性であり、破壊的な医原性合併症を有することの多い、増殖性の毒である。本明細書において開示されるように、代替的な治療的アプローチは、p16-サイクリンD:cdk4-RB-E2F経路の脱制御を有するがん細胞病変部において選択的な溶解性複製を起こすウイルスを使用することである。

10

【0032】

DNA結合タンパク質（DBP）：このアデノウイルスタンパク質は、一本鎖DNAおよびRNA、ならびに二本鎖DNAに結合する。72キロダルトンのタンパク質であるDBPは、アデノウイルスDNAの複製に必須である。

20

【0033】

E1A：アデノウイルス初期領域1A（E1A）遺伝子およびこの遺伝子から発現されるポリペプチドである。E1Aタンパク質は、細胞を、細胞周期に入れることによって、ウイルスゲノム複製における役割を果たす。本明細書において使用されるとき、「E1Aタンパク質」という用語は、E1A遺伝子から発現されるタンパク質を指し、この用語には、あらゆるアデノウイルス血清型によって産生されるE1Aタンパク質が含まれる。

【0034】

E3-RID / RID およびE3-14.7k：E3遺伝子によって産生される初期発現タンパク質である。E3-RID、E3-RID、およびE3-14.7kタンパク質は、受容体内部移行分解複合体（receptor internalization and degradation complex）（RID）を成し、これが、核膜に局在化し、感染した細胞を宿主の抗ウイルス応答から保護するように、CD95（FasL受容体）ならびにTNFR1および2（TNF/TRAIL受容体）を含む様々な受容体のエンドサイトーシスおよび分解を引き起こす。E3-RID、E3-RID、およびE3-14.7kのコーディング配列は、この順序で、互いに隣接している。

30

【0035】

E4orf1：E4遺伝子によって産生されるアデノウイルスタンパク質である。「E4orf1タンパク質」という用語には、あらゆるアデノウイルス血清型に由来するE4遺伝子によって産生されるE4orf1タンパク質が含まれる。

【0036】

E4orf6/7：アデノウイルスE4遺伝子によってコードされるタンパク質である。「E4orf6/7タンパク質」という用語には、あらゆるアデノウイルス血清型に由来するE4遺伝子によって産生されるE4orf6/7タンパク質が含まれる。

40

【0037】

ファイバー：アデノウイルスのファイバータンパク質は、細胞表面受容体への結合を媒介する、三量体タンパク質である。ファイバータンパク質は、長いN末端側のシャフトおよび球状のC末端側のノブから構成される。

【0038】

蛍光タンパク質：特定の波長の光に曝露したときに、ある特定の波長の光を放出するタンパク質である。蛍光タンパク質としては、緑色蛍光タンパク質（GFP、EGFP、Ac

50

GFP1、Emerald、Superfolder GFP、Azami Green、mWasabi、TagGFP、TurboGFP、およびZsGreenなど)、青色蛍光タンパク質(EBFP、EBFP2、Sapphire、T-Sapphire、Azurite、およびmTagBFPなど)、シアン蛍光タンパク質(ECFP、mECFP、Cerulean、CyPet、AmCyan1、Midori-Ishicyan、mTurquoise、およびmTFP1など)、黄色蛍光タンパク質(EYFP、Topaz、Venus、mCitrine、YPet、TagYFP、PhiYFP、ZsYellow1、およびmBanana)、橙色蛍光タンパク質(Kusabira Orange、Kusabira Orange2、mOrange、mOrange2、およびmTangerine)、赤色蛍光タンパク質(mRuby、mApple、mStrawberry、AsRed2、mRFP1、JRed、mCherry、HcRed1、mRaspberry、dKeima-Tandem、HcRed-Tandem、mPlum、AQ143、tdTomato、およびE2-Crimson)、橙色/赤色蛍光タンパク質(dTomato、dTomato-Tandem、TagRFP、TagRFP-T、DsRed、DsRed2、DsRed-Express(T1)、およびDsRed-Monomer)、ならびにこれらの修飾されたバージョンが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0039】

融合タンパク質：少なくとも2つの異なる(異種)タンパク質またはペプチドに由来するアミノ酸配列を含有するタンパク質である。融合タンパク質は、例えば、2つの異なる(異種)タンパク質の少なくとも一部分をコードする核酸配列から操作された核酸配列の発現によって、生成することができる。融合タンパク質を作出するためには、核酸配列は、同じリーディングフレーム内になければならず、内部終止コドンを含んではならない。融合タンパク質、特に、短い融合タンパク質は、化学的合成によって生成することもできる。

20

【0040】

異種：異種タンパク質または異種ポリペプチドとは、異なる供給源または種に由来するタンパク質またはポリペプチドを指す。

【0041】

ヘキソン：主要なアデノウイルスキャプシドタンパク質である。

30

【0042】

免疫調節因子：免疫系を変化させる(例えば、活性化する、強化する、または抑制する)作用物質である。免疫調節因子としては、サイトカイン(インターロイキン2(IL-2)、IL-7、IL-12、GM-CSF、FLT3リガンド、またはインターフェロンなど)、ケモカイン(CCL3、CCL26、CXCL7、CXCL9、およびCXCL10など)、T細胞活性化リガンド(抗CD3抗体または同種抗原など)、共刺激分子(B7.1/B7.2、OX40L、4-1-BBL、またはCD40Lなど)、チェックポイント遮断阻害剤(抗PD-1抗体または抗CTLA4抗体など)、ならびに小分子免疫調節因子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0043】

40

単離された：「単離された」生物学的構成要素(核酸分子、タンパク質、ウイルス、または細胞など)は、その構成要素が天然に存在する、生物の細胞もしくは組織または生物自体における他の生物学的構成要素、例えば、他の染色体および染色体外DNAおよびRNA、タンパク質、ならびに細胞から実質的に分離または精製されている。「単離された」核酸分子およびタンパク質には、標準的な精製方法によって精製されたものが含まれる。この用語はまた、宿主細胞における組換え発現によって調製された核酸分子およびタンパク質、ならびに化学的に合成された核酸分子およびタンパク質を包含する。

【0044】

修飾：核酸の配列またはタンパク質配列における変化である。例えば、アミノ酸配列の修飾には、例えば、置換、挿入、および欠失、またはそれらの組合せが含まれる。挿入には

50

、アミノ末端および／またはカルボキシル末端の融合、ならびに配列内への単一もしくは複数のアミノ酸残基の挿入が含まれる。欠失は、タンパク質配列からの、１つまたは複数のアミノ酸残基の除去によって特徴付けられる。本明細書における一部の実施形態では、修飾（置換、挿入、または欠失など）は、タンパク質の特定の活性の低減または強化など、機能の変化をもたらす。本明細書において使用されるとき、「 Δ 」または「デルタ」は、欠失を指す。置換修飾は、少なくとも１つの残基が、除去され、その場所に異なる残基が挿入されているものである。アミノ酸置換は、典型的に、単一の残基のものであるが、いくつかの異なる位置で同時に生じてよい。置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組合せを、最終的な変異体の配列に到達するように組み合わせてもよい。これらの修飾は、タンパク質をコードするDNAにおけるヌクレオチドの修飾によって調製することができ、それによって、この修飾をコードするDNAが産生される。公知の配列を有するDNAの所定の部位において、挿入、欠失、および置換の変異を行うための技法は、当該技術分野において周知である。「修飾された」タンパク質、核酸、またはウイルスは、上記に概説された１つまたは複数の修飾を有するものである。

10

【0045】

新形成、悪性疾患、がん、および腫瘍：新生物は、過剰な細胞分裂の結果として生じる、組織または細胞の異常な増殖である。新生物性増殖により、腫瘍が産生され得る。個体における腫瘍の量は、「腫瘍量」であり、腫瘍の数、体積、または重量として測定することができる。転移しない腫瘍は、「良性」と称される。周囲の組織に侵入する、および／または転移し得る腫瘍は、「悪性」と称される。悪性腫瘍は、「がん」とも称される。

20

【0046】

血液系がんは、血液または骨髄のがんである。血液系（または造血系）がんの例としては、白血病、例えば、急性白血病（急性リンパ性白血病、急性骨髄球性白血病、急性骨髄性白血病、ならびに骨髄芽球性、前骨髄球性（promyelocytic）、骨髄単球性、単球性、および赤白血病など）、慢性白血病（慢性骨髄球性（顆粒球性）白血病、慢性骨髄性白血病、および慢性リンパ性白血病など）、真性赤血球増加症、リンパ腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫（無痛性および高悪性度形態）、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖病、骨髄異形成症候群、有毛細胞性白血病、ならびに脊髄形成異常が挙げられる。一部の事例では、リンパ腫は、固形腫瘍とみなされる。

【0047】

30

固形腫瘍は、通常は嚢胞も液体区域も含有しない、異常な組織の塊である。固形腫瘍は、良性の場合も悪性の場合もある。異なる種類の固形腫瘍は、それらを形成する細胞の種類に応じて命名される（肉腫、癌腫、およびリンパ腫など）。肉腫および癌腫など、固形腫瘍の例としては、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、および他の肉腫、滑膜性腫瘍、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、リンパ性悪性疾患、膵臓がん、乳がん、肺がん、卵巣がん、前立腺がん、肝細胞癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭状癌、褐色細胞腫、脂腺癌、乳頭状癌、ヒトパピローマウイルス（HPV）感染新形成、乳頭状腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、ヘパトーム、胆管癌、絨毛癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん（cervical cancer）、精巣腫瘍、精上皮腫、膀胱癌、黒色腫、ならびにCNS腫瘍（膠腫など（脳幹膠腫および混合性膠腫など）、膠芽腫（多形性膠芽腫としても公知である）星状細胞腫、CNSリンパ腫、胚細胞腫、髄芽細胞腫、神経鞘腫、頭蓋咽頭腫（cranio-pharyngioma）、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫（meningioma）、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、および脳転移など）が挙げられる。

40

【0048】

腫瘍溶解性ウイルス：増殖性障害の細胞、例えば、がん／腫瘍細胞を、選択的に殺滅させるウイルスである。がん細胞の殺滅は、当該技術分野において確立されている任意の方法、例えば、生存細胞数を決定すること、またはがん細胞における細胞変性効果、アポトーシス、もしくはウイルスタンパク質の合成（例えば、複製に必要なウイルス遺伝子の代謝

50

標識、イムノブロット、もしくはRT-PCRによって)または腫瘍のサイズの低減を検出することによって、検出することができる。

【0049】

作動可能に連結した：第1の核酸配列が、第2の核酸配列との機能的関係にある場合、第1の核酸配列は、第2の核酸配列に作動可能に連結している。例えば、プロモーターが、コーディング配列の転写または発現に影響を及ぼす場合、プロモーターは、コーディング配列に作動可能に連結している。一般に、作動可能に連結したDNA配列は、連続的であり、2つのタンパク質コーディング領域を接合する必要がある場合、同じリーディングフレーム内にある。

【0050】

薬学的に許容される担体：本開示において有用な薬学的に許容される担体(ビヒクル)は、従来のものである。E. W. MartinによるRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 第15版(1975年)は、1つまたは複数の治療用化合物、分子、または薬剤(例えば、本明細書において開示される組換えウイルス)の薬学的送達に好適な組成物および製剤について記載している。

【0051】

一般に、担体の性質は、用いられる具体的な投与様式に依存することになる。例えば、非経口製剤は、通常、ビヒクルとして、水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロールなどといった、薬学的および生理学的に許容される流体を含む、注射可能な流体を含む。固体組成物(例えば、粉末、丸剤、錠剤、またはカプセルの形態)については、従来の非毒性の固体担体は、例えば、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、またはステアリン酸マグネシウムを含み得る。生物学的に中性な担体に加えて、投与しようとする医薬組成物は、少量の非毒性補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、保存剤、およびpH緩衝剤など、例えば、酢酸ナトリウムまたはモノラウリン酸ソルビタンを含有してもよい。

【0052】

ポリペプチド、ペプチド、またはタンパク質：モノマーがアミノ酸残基であり、それらが、アミド結合を通じて一緒に接合された、ポリマーである。アミノ酸が、アルファアミノ酸である場合、L-光学異性体またはD-光学異性体のいずれも使用することができる。用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、本明細書において互換可能に使用される。これらの用語は、1つまたは複数のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工的な化学的模倣体であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマー、および天然に存在しないアミノ酸ポリマーに適用される。「残基」または「アミノ酸残基」という用語には、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに組み込まれているアミノ酸への参照が含まれる。

【0053】

ポリペプチドにおける保存的置換は、タンパク質配列における1つのアミノ酸残基を、類似の生物学的特質を有する異なるアミノ酸残基の代わりに使用することである。典型的に、保存的置換は、結果として得られるポリペプチドの活性にほとんど影響を及ぼさないかまたは全く影響を及ぼさない。例えば、1つまたは複数の保存的置換(例えば、1つを上回らない、2つを上回らない、3つを上回らない、4つを上回らない、または5つを上回らない置換)を含むタンパク質またはペプチドは、野生型のタンパク質またはペプチドの構造および機能を保持する。ポリペプチドは、例えば、部位特異的変異誘発またはPCRなどの標準的な手順を使用して、そのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を操作することによって、1つまたは複数の保存的置換を含有するように産生させることができる。一実施例では、そのようなバリエーションは、抗体の交差反応性または抗体が免疫応答を誘導する能力を試験することによって、容易に選択することができる。保存的置換の例を、以下に示す。

10

20

30

40

50

【表 1】

元の残基	保存的置換	
Ala	Ser	
Arg	Lys	
Asn	Gln, His	
Asp	Glu	10
Cys	Ser	
Gln	Asn	
Glu	Asp	
His	Asn; Gln	
Ile	Leu, Val	
Leu	Ile; Val	
Lys	Arg; Gln; Glu	20
Met	Leu; Ile	
Phe	Met; Leu; Tyr	
Ser	Thr	
Thr	Ser	
Trp	Tyr	
Tyr	Trp; Phe	
Val	Ile; Leu	30

【0054】

保存的置換は、一般に、(a)置換の区域における、例えば、シートコンフォメーションもしくはヘリックスコンフォメーションとしての、ポリペプチド骨格の構造、(b)標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、または(c)側鎖の嵩高さを維持する。

【0055】

一般に、タンパク質特質に最も大きな変化をもたらすことが予測される置換は、非保存的なもの、例えば、(a)親水性残基、例えば、セリルもしくはスレオニルが、疎水性残基、例えば、ロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリル、もしくはアラニルを置換する(もしくはそれらによって置換される)変化、(b)システインもしくはプロリンが、任意の他の残基を置換する(もしくはそれらによって置換される)変化、(c)電気陽性の側鎖を有する残基、例えば、リシル、アルギニル、もしくはヒスタジルが、電気陰性の残基、例えば、グルタミルもしくはアスパルチルを置換する(もしくはそれらによって置換される)変化、または(d)嵩高い側鎖を有する残基、例えば、フェニルアラニンが、側鎖を有さないもの、例えば、グリシンを置換する(もしくはそれらによって置換される)変化であろう。

【0056】

疾患を予防、処置、または緩和する(ameliorate)こと：疾患を「予防すること」とは、疾患の完全な発症を阻害することを指す。「処置すること」とは、疾患または病態の発症が

10

20

30

40

50

開始された後に、その徴候または症状を緩和する治療的介入を指す。「緩和すること」とは、疾患の徴候または症状の数または重症度の低減を指す。

【0057】

プロモーター：核酸（例えば、遺伝子）の転写を導く／開始するDNAの領域である。プロモーターは、転写の開始部位の近傍に必要な核酸配列を含む。典型的に、プロモーターは、転写する遺伝子の近傍に位置する。プロモーターはまた、任意選択で、転写開始部位から数千塩基対程度離れて位置し得る、遠位エンハンサーまたはリプレッサーエレメントも含む。「構成的プロモーター」は、継続的に活性であり、外部シグナルまたは分子による制御に供されないプロモーターである。対照的に、「誘導的プロモーター」の活性は、外部シグナルまたは分子（例えば、転写因子またはテトラサイクリン）によって制御される。

10

【0058】

タンパク質IX（pIX）：ヘキソンタンパク質と会合するアデノウイルスキャプシドの主要ではない構成要素である。

【0059】

精製された：「精製された」という用語は、絶対的な純度を必要とするものではなく、相対的な用語として意図される。したがって、例えば、精製されたペプチド、タンパク質、ウイルス、または他の活性化合物は、天然に会合するタンパク質および他の混入物質から、全体または部分的に単離されているものである。ある特定の実施形態では、「実質的に精製された」という用語は、細胞、細胞培養培地、または他の粗調製物から単離されており、初期調製物の様々な構成要素、例えば、タンパク質、細胞残屑、および他の構成要素を除去するために分画に供されている、ペプチド、タンパク質、ウイルス、または他の活性化合物を指す。

20

【0060】

組換え：組換え核酸分子、タンパク質、またはウイルスは、天然に存在しない配列を有するもの、または他の点で別個である配列の2つのセグメントの人工的な組合せによって作製された配列を有するものである。この人工的な組合せは、化学的合成によって、または単離された核酸分子のセグメントの人工的な操作によって、例えば、遺伝子操作技法によって、達成することができる。「組換え」という用語には、天然の核酸分子、タンパク質、またはウイルスの一部分の付加、置換、または欠失のみによって変化されている、核酸、タンパク質、およびウイルスも含まれる。

30

【0061】

複製欠損：（腫瘍細胞と比較して）非腫瘍細胞において「複製欠損」を呈するアデノウイルスは、正常細胞において、腫瘍細胞と比較して低減されたウイルス複製を呈するアデノウイルスを指す。複製欠損は、例えば、腫瘍細胞と比較して、正常細胞におけるウイルス後期タンパク質発現の欠如、ウイルスDNA合成の低減、E2F標的遺伝子（例えば、サイクリンAおよびB）を誘導する能力の低減、S期進入を誘起する能力の低減、ならびに／または細胞殺滅を誘導する能力の低減によって、明らかである。

【0062】

複製欠乏ウイルス：所与の表現型を有する所定の細胞集団（例えば、E2F経路の脱制御を有する腫瘍細胞）において、細胞増殖を優先的に阻害するか、細胞溶解を引き起こすか、またはアポトーシス（集合的に、殺滅とみなされる）を誘導する、ウイルスである。そのようなウイルスは、細胞増殖の低減もしくは阻害、細胞溶解の発生、アポトーシスの誘導、またはそれ以外では所定の細胞表現型を有さない細胞（正常な非腫瘍細胞など）における複製を行うことができないか、またはその能力が限定されている。

40

【0063】

自己切断ペプチド：リボソームがC末端におけるペプチド結合の合成をスキップするように誘導し、そのペプチド配列と下流のポリペプチドとの分離をもたらす、ペプチドである。ウイルスによってコードされる2Aペプチドは、自己切断ペプチドの一種である。ウイルスによってコードされる2Aペプチドとしては、例えば、プタテッシュウウイルス-1

50

(P T V 1)、口蹄疫ウイルス (F M D V)、ウマ鼻炎 A ウイルス (E R A V)、および T h o s e a a s i g n a ウイルス (T a V) に由来する 2 A ペプチドが挙げられる。

【 0 0 6 4 】

配列同一性：2 つもしくはそれよりも多い核酸配列間または 2 つしくはそれよりも多いアミノ酸配列間における同一性または類似性は、配列間の同一性または類似性として表される。配列同一性は、同一性の割合として測定することができ、割合が高いほど、配列がより同一である。配列類似性は、類似性 (保存的アミノ酸置換を考慮に入れる) の割合として測定することができ、割合が高いほど、配列がより類似している。核酸配列またはアミノ酸配列のホモログまたはオルソログは、標準的な方法を使用してアラインメントした場合に、比較的高い程度の配列同一性 / 類似性を有する。この相同性は、オルソログなタンパク質または c D N A が、より緊密に関連する種に由来する場合に (例えば、ヒト配列およびマウス配列)、関連性がより遠い種 (例えば、ヒト配列および C . E l e g a n s 配列) と比較して、より顕著である。

10

【 0 0 6 5 】

比較のための配列のアラインメント方法は、当該技術分野において周知である。様々なプログラムおよびアラインメントアルゴリズムが、説明されている： S m i t h および W a t e r m a n、A d v . A p p l . M a t h .、2 巻 4 8 2 頁、1 9 8 1 年；N e e d l e m a n および W u n s c h、J . M o l . B i o l .、4 8 巻、4 4 3 頁、1 9 7 0 年；P e a r s o n および L i p m a n、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、8 5 巻、2 4 4 4 頁、1 9 8 8 年；H i g g i n s および S h a r p、G e n e、7 3 巻、2 3 7 ~ 4 4 頁、1 9 8 8 年；H i g g i n s および S h a r p、C A B I O S、5 巻、1 5 1 ~ 3 頁、1 9 8 9 年；C o r p e t r a、N u c . A c i d s R e s .、1 6 巻、1 0 8 8 1 ~ 9 0 頁、1 9 8 8 年；H u a n g r a、C o m p u t e r A p p l s . i n t h e B i o s c i e n c e s、8 巻、1 5 5 ~ 6 5 頁、1 9 9 2 年；ならびに P e a r s o n r a、M e t h . M o l . B i o .、2 4 巻、3 0 7 ~ 3 1 頁、1 9 9 4 年。A l t s c h u l r a、J . M o l . B i o l .、2 1 5 巻、4 0 3 ~ 1 0 頁、1 9 9 0 年は、配列アラインメント方法および相同性の計算に関する詳細な考察を提示している。

20

【 0 0 6 6 】

N C B I の B a s i c L o c a l A l i g n m e n t S e a r c h T o o l (B L A S T) (A l t s c h u l r a、J . M o l . B i o l .、2 1 5 巻、4 0 3 ~ 1 0 頁、1 9 9 0 年) が、N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o l o g i c a l I n f o r m a t i o n (N C B I) およびインターネットを含む、複数の供給元から、配列分析プログラム b l a s t p、b l a s t n、b l a s t x、t b l a s t n、および t b l a s t x と併せて使用するために、入手可能である。追加の情報は、N C B I のウェブサイトにおいて見出すことができる。

30

【 0 0 6 7 】

血清型：特徴的な抗原セットによって区別される緊密に関連する微生物 (ウイルスなど) の群である。

【 0 0 6 8 】

被験体：ヒトおよび非ヒト哺乳動物を含むカテゴリーの、生きた多細胞脊椎動物の生物である。

40

【 0 0 6 9 】

合成：研究室において人工的な手段によって産生されたものであり、例えば、合成核酸またはタンパク質は、研究室において化学的に合成され得る。

【 0 0 7 0 】

治療剤：被験体に適正に投与された場合に、所望される治療効果または予防効果を誘導することができる任意の薬剤である。治療剤としては、化学的化合物、小分子、組換えウイルス、アンチセンス化合物、抗体 (もしくはその抗原結合性断片)、ペプチド、または核酸分子が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、がんを処置するための治療剤に

50

は、腫瘍の増殖、腫瘍の発達、および腫瘍の転移を予防または阻害する薬剤が含まれる。

「治療用タンパク質」は、タンパク質またはペプチドである治療剤であり、抗体またはその抗原結合性断片が含まれる。本明細書における一部の実施形態では、治療用タンパク質は、免疫調節因子である。他の実施形態では、治療用タンパク質は、毒素、FasもしくはFasL、可溶性デスファクター（death factor）、バースタンダー破壊の媒介因子、腫瘍抗原、ネオ抗原、または同種抗原を含む。

【0071】

治療有効量：特定の医薬品または治療剤（例えば、組換えウイルス）で処置されている被験体または細胞において、所望される効果を達成するのに十分なそれらの量である。薬剤の有効量は、処置されている被験体または細胞、ならびに治療用組成物の投与様式を含むがこれらに限定されない、複数の因子に依存し得る。

10

【0072】

UEクソン（Uexon）：鎖（左方向への転写）において初期E3領域とファイバー遺伝子との間に位置するオープンリーディングフレームである（Tollersonら、J Virol、81巻（23号）、12918～12926頁）。

【0073】

別途説明されない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって広く理解されているものと同じ意味を有する。単数形の「1つの（a）」、「1つの（an）」、および「その（the）」という用語は、文脈により別途明確に示されない限り、複数形の参照物を含む。「AまたはBを含む」とは、A、もしくはB、またはAおよびBを含むことを意味する。核酸またはポリペプチドに関して与えられる、すべての塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、およびすべての分子量または分子質量値は、およそのものであり、説明のために提供されることを、さらに理解されたい。本明細書において記載されるものに類似であるかまたはそれと同等である方法および材料を、本開示の実施または試験において使用することができるが、好適な方法および材料が、以下に記載されている。本明細書において言及されるすべての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、参照によりその全体が組み込まれる。矛盾が生じた場合には、用語の説明を含め、本明細書が優先される。加えて、材料、方法、および実施例は、例示に過ぎず、限定することを意図するものではない。

20

【0074】

III. 実施形態の概要

異種オープンリーディングフレーム（ORF）および自己切断ペプチドコーディング配列を含む、組換えアデノウイルスゲノムが、本明細書において開示される。異種ORFは、例えば、治療用タンパク質（例えば、免疫調節因子）をコードすることができる。組換えアデノウイルスゲノムおよび開示されるゲノムによって産生される組換えアデノウイルスは、例えば、がんの処置など、様々な異なる治療的適用において使用することができる。

30

【0075】

異種ORFおよび自己切断ペプチドコーディング配列を、いずれも内因性アデノウイルスORFと同じリーディングフレーム内に、それと作動可能に連結した状態で含む、組換えアデノウイルスゲノムが、本明細書において提供される。自己切断ペプチドコーディング配列は、異種ORFと内因性ORFとの間に位置する。一部の実施形態では、内因性ORFが、E1B-55kであり、異種ORFが、E1B-55kの3'にあるか、内因性ORFが、DNAポリメラーゼであり、異種ORFが、DNAポリメラーゼの5'にあるか、内因性ORFが、DNA結合タンパク質（DBP）であり、異種ORFが、DBPの3'にあるか、内因性ORFが、アデノウイルス死タンパク質（ADP）であり、異種ORFが、ADPの5'にあるか、内因性ORFが、E3-14.7kであり、異種ORFが、E3-14.7kの3'にあるか、内因性ORFが、E4-ORF2であり、異種ORFが、E4-ORF2の5'にあるか、または内因性ORFが、ファイバーであり、異種ORFが、ファイバーの3'にある。

40

【0076】

50

一部の実施形態では、異種ORFは、治療用タンパク質をコードする。

【0077】

一部の実施形態では、自己切断ペプチドは、2Aペプチドまたはそのバリエーションである。一部の実施例では、2Aペプチドは、ブタテッショウウイルス-1 (PTV1) 2A (P2A) ペプチド、口蹄疫ウイルス (FMDV) 2A (F2A) ペプチド、ウマ鼻炎Aウイルス (ERAV) 2A (E2A) ペプチド、またはThosea asignaウイルス (TaV) 2A (T2A) ペプチド、またはそれらのバリエーションを含む。特定の実施例では、P2Aペプチド配列は、配列番号14または配列番号18のアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である。一部の実施例では、2Aペプチドバリエーションは、N末端に追加のアミノ酸配列 (GSGなど) を含む。

10

【0078】

特定の実施例では、F2Aペプチド配列は、配列番号15または配列番号19のアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である。特定の実施例では、E2Aペプチド配列は、配列番号16または配列番号20のアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である。特定の実施例では、T2Aペプチド配列は、配列番号17または配列番号21のアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である。特定の非限定的な実施例では、自己切断ペプチドは、配列番号14~21のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

20

【0079】

一部の実施形態では、アデノウイルスは、アデノウイルス5型 (Ad5) である。他の実施形態では、アデノウイルスは、Ad2、Ad3、Ad9、Ad11、Ad12、またはAd34である。さらに他の実施形態では、アデノウイルスは、キメラアデノウイルス、例えば、Ad5 / Ad9またはAd5 / Ad34キメラアデノウイルスであるが、これらに限定されない。

30

【0080】

本明細書において開示される組換えアデノウイルスゲノムを含む、組換えアデノウイルスが、本明細書においてさらに提供される。

【0081】

本明細書において提供される組換えアデノウイルス (および組換えアデノウイルスゲノム) は、任意選択で、例えば、ウイルスを特定の細胞型に対して標的化するため、肝臓への標的化およびそこでの複製を阻害するため、腫瘍細胞における選択的な複製を可能にするため、および共通のアデノウイルス血清型に対する既存の中和抗体を避けるために、追加の修飾を含む。追加の修飾は、組換えアデノウイルスの所望される使用に応じて変動し得る。アデノウイルス修飾は、例えば、PCT出願第PCT/US2015/051745号 (2015年9月23日に出版)、国際公開第2012/024350号、同第2013/138505号、および同第2014/153204号に記載されており、これらは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0082】

組換えアデノウイルスゲノムまたは組換えアデノウイルスと、薬学的に許容される担体とを含む、組成物もまた、本開示によって提供される。

【0083】

治療用タンパク質を被験体に送達する方法もまた、本明細書において提供される。一部の実施形態では、本方法は、被験体に、本明細書において開示される組換えアデノウイルス

50

ゲノム、組換えアデノウイルス、または組成物を投与することを含む。これらの方法において、組換えアデノウイルスまたは組換えアデノウイルスゲノムの異種ORFは、治療用タンパク質をコードする。

【0084】

腫瘍細胞の生存度および/または腫瘍細胞の増殖を低減または阻害する方法が、さらに提供される（例えば、開示される治療法の不在時と比較して、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%の低減）。一部の実施形態では、本方法は、腫瘍細胞を、本明細書において開示される組換えアデノウイルスゲノム、組換えアデノウイルス、または組成物と接触させることを含む。これらの方法において、異種ORFは、治療用タンパク質をコードする。一部の実施例では、本方法は、*in vitro*方法である。他の実施例では、本方法は、*in vivo*方法であり、腫瘍細胞を接触させることは、組換えアデノウイルスゲノム、組換えアデノウイルス、または組成物を、腫瘍を有する被験体に投与することを含む。

10

【0085】

転移の数および/もしくはサイズを低減させるか、または被験体における腫瘍の体積を低減させることなどによって、腫瘍の進行を低減または阻害する方法が、本明細書においてさらに提供される（例えば、開示される治療法の不在時と比較して、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%の低減）。一部の実施形態では、本方法は、被験体に、治療有効量の、本明細書において開示される組換えアデノウイルスゲノム、組換えアデノウイルス、または組成物を投与することを含む。これらの方法において、異種ORFは、治療用タンパク質をコードする。

20

【0086】

被験体におけるがんを処置する方法が、さらに提供される。一部の実施形態では、本方法は、被験体に、治療有効量の、本明細書において開示される組換えアデノウイルスゲノム、組換えアデノウイルス、または組成物を投与することを含む。これらの方法において、異種ORFは、治療用タンパク質をコードする。

【0087】

本明細書における一部の実施形態では、本方法は、被験体に、追加の治療剤を投与することをさらに含む。例えば、追加の治療剤には、抗がん剤、例えば、化学療法剤、生物製剤（抗体もしくはその断片、例えば、モノクローナル抗体など）、または核酸分子、例えば、阻害性核酸分子、または他の治療的処置、例えば、腫瘍の外科切除もしくは腫瘍の照射が含まれ得る。

30

【0088】

本明細書において開示される組換えアデノウイルスゲノム、組換えアデノウイルス、または組成物と、1つもしくは複数の追加の治療剤および/または1つもしくは複数の診断剤とを含む、キットもまた、本明細書において提供される。一部の実施形態では、1つまたは複数の追加の治療剤は、化学療法薬、生物製剤、またはそれらの組合せを含む。一部の実施例では、1つまたは複数の診断剤は、腫瘍マーカーに特異的な1つもしくは複数の抗体もしくは核酸分子、または*in vitro*もしくは*in vivo*でウイルスもしくは腫瘍細胞を追跡するために使用することができる画像化プローブを含む。

40

【0089】

IV. 外因性ORFの最適な配置

36 kbのアデノウイルスゲノムは、小型であり、様々な遺伝子のコーディングにトップストランド(*top strand*)とボトムストランド(*bottom strand*)の両方を使用する。アデノウイルスゲノム内の多数の位置において、トップストランドとボトムストランドとの両方が、別個の遺伝子のコーディングに同時に使用される。ゲノムのサイズは、そのキャプシドへの挿入に最適となるように進化してきた。結果として、外因性遺伝子の挿入は、キャプシドのサイズ容量によって制限されるが、これは、外因性核

50

酸の過剰な追加により、キャプシドへのゲノムローディング (genome loading) が不完全となり、ウイルス動態が低減されるためである。

【 0 0 9 0 】

アデノウイルスゲノムにおいて利用できる空間が制限されていることにより提示される課題の解決策は、外因性オープンリーディングフレーム (O R F) を、融合生成物として本来のアデノウイルス O R F 内に位置づけることである。この戦略は、すでにゲノムにコードされているアデノウイルスプロモーター、5' U T R、およびポリ A 尾部を利用する。しかしながら、本来のアデノウイルスタンパク質と外因性タンパク質との融合体の発現は、一方または両方のタンパク質機能に有害となり得、アデノウイルス複製動態の有意な減少をもたらし得る。

10

【 0 0 9 1 】

本開示は、本来の (内因性) O R F と外因性 (異種) O R F との間に配置される自己切断ペプチド配列を使用することによって、この問題に対する解決策を提供する。単一の m R N A 上の 2 つの O R F の間に配置された場合、自己切断ペプチド配列の存在により、リボソームスキップが生じ、第 1 のタンパク質が第 2 のタンパク質とは別個に放出される。本明細書において開示される一部の実施形態では、自己切断ペプチドは、2 A ペプチド (P 2 A) である。

【 0 0 9 2 】

アデノウイルスゲノム内における異種 O R F の最適な配置部位の特定もまた、本明細書において開示される。自己切断ペプチド配列と、異種 O R F の良好な配置とを組み合わせることにより、高い発現がもたらされ、ウイルス動態に及ぼす影響が最小限となるか全くなくなる。

20

【 0 0 9 3 】

以下の実施例 1 に記載されるように、異種 O R F を挿入したときにアデノウイルス複製動態が阻害されなかった、アデノウイルスゲノム内の複数の部位が、特定された。具体的には、異種 O R F は、E 1 B - 5 5 k O R F の C 末端側、DNA ポリメラーゼ O R F の N 末端側、D B P O R F の C 末端側、A D P O R F の N 末端側、E 3 - 1 4 . 7 k O R F の C 末端側、または E 4 - O R F 2 の N 末端側に挿入することができると決定された。それぞれの事例において、自己切断ペプチド配列 (P 2 A 部位) を、アデノウイルス O R F と異種 O R F との間に挿入した。異種 O R F をファイバーの C 末端側に挿入することにより、複製欠損アデノウイルスが産生されたことが、本明細書においてさらに開示されるが、しかしながら、この組換えウイルスは、感染細胞において極めて高いレベルの異種タンパク質を産生することが可能であったため、これにより、いくつかの治療的適用において有用であることが証明され得る。

30

【 0 0 9 4 】

したがって、本開示は、治療的適用のための、以下の組換えアデノウイルスの使用を企図する (「 S C 」 は、P 2 A など、自己切断ペプチドをコードする配列を指す) 。

E 1 B - 5 5 k - S C - 異種 O R F

異種 O R F - S C - (D N A ポリメラーゼ)

D B P - S C - 異種 O R F

40

異種 O R F - S C - A D P

E 3 - 1 4 . 7 k - S C - 異種 O R F

異種 O R F - S C - E 4 - O R F 2

ファイバー - S C - 異種 O R F

【 0 0 9 5 】

本明細書における一部の実施形態では、自己切断ペプチドは、ウイルスによってコードされる 2 A ペプチド、または以下にさらに記載されるようなその修飾バージョンである。

【 0 0 9 6 】

V . 自己切断ペプチド配列

自己切断ペプチドは、リボソームが C 末端におけるペプチド結合の合成をスキップするよ

50

うに誘導し、そのペプチド配列と下流のポリペプチドとの分離をもたらす、ペプチドである。自己切断ペプチドの使用により、単一のORFから、自己切断ペプチドに隣接する複数のタンパク質の発現が可能となる。ウイルスによってコードされる2Aペプチドは、自己切断ペプチドの一種である。

【0097】

他の自己切断ペプチドと同様に、2Aペプチドは、リボソームが2AエレメントのC末端におけるペプチド結合の合成をスキップするようにし、2A配列の末端と下流のペプチドとの分離をもたらすことによって機能する(Kimら、PLOS One、6巻(4号)、e18556、2011年)。「切断」は、2AペプチドのC末端に見出されるグリシン残基とプロリン残基との間に生じる。例示的な2Aペプチドとしては、Thoseaasigनावイルス(TaV)、ウマ鼻炎Aウイルス(ERAV)、ブタテッシュウウイルス-1(PTV1)、および口蹄疫ウイルス(FMDV)によってコードされる2Aペプチド、またはそれらの修飾バージョンが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0098】

本明細書における特定の実施例では、2Aペプチドは、PTV1 2A(P2A)、FMDV 2A(F2A)、ERAV 2A(E2A)、またはTaV 2A(T2A)を含み、これらの配列は、配列番号14~17として、以下に示され、本明細書に記載されている。

【化1】

P2A: ATNFSLLKQAGDVEENPGP (配列番号 14)

20

F2A: VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (配列番号 15)

E2A: QCTNYALLKLAGDVESNPGP (配列番号 16)

T2A: EGRGSLTTCGDVEENPGP (配列番号 17)

【0099】

一部の実施例では、2Aペプチドは、切断効率を改善するために、N末端に、Gly-Ser-Glyを含むように修飾される。修飾されたP2A、F2A、E2A、およびT2Aの配列は、配列番号14~17として、以下に示され、本明細書に記載されている。

【化2】

30

修飾されたP2A: GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (配列番号 18)

修飾されたF2A: GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (配列番号 19)

修飾されたE2A: GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP (配列番号 20)

修飾されたT2A: GSGEGRGSLTTCGDVEENPGP (配列番号 21)

【0100】

一部の実施形態では、2Aポリペプチドは、本明細書において開示される2Aポリペプチドのバリエーションである。バリエーションは、野生型または本明細書において開示される修飾された2Aポリペプチドに対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはそれよりも高い配列同一性を有するポリペプチド配列を含み得る。バリエーションは、例えば、配列番号14~21のうちのいずれか1つの2Aポリペプチドから、少なくとも1つのN末端アミノ酸が欠失しているもの、例えば、1個、2個、3個、4個、または5個のアミノ酸(列挙された値のうちのいずれか2つの間の範囲を含む)が欠失しているものを含み得る。バリエーションは、配列番号14~21のうちのいずれか1つの2Aポリペプチドから、少なくとも1つのC末端アミノ酸が欠失しているもの、例えば、1個、2個、3個、4個、または5個のアミノ酸(列挙された値のうちのいずれか2つの間の範囲を含む)が欠失しているものを含み得る。バリエーションは、少なくとも1個、2個、3個、4個、または5個のアミノ酸置換、例えば、保存的アミノ酸置換も含み得る。

40

50

【 0 1 0 1 】

V I . 医薬組成物

組換えアデノウイルスまたは組換えアデノウイルスゲノムを含む組成物が、本明細書において提供される。本組成物は、任意選択で、*in vitro*または*in vivo*での製剤化および投与に好適である。任意選択で、本組成物は、提供される薬剤のうちの1つまたは複数および薬学的に許容される担体を含む。好適な担体およびそれらの製剤は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第22版、Lloyd V. Allenら編、Pharmaceutical Press (2012年)に記載されている。薬学的に許容される担体としては、生物学的にもそれ以外にも望ましくないことのない材料が挙げられる。すなわち、この材料は、望ましくない生物学的作用を引き起こすことも、この材料が含有されている医薬組成物中の他の構成成分と有害な様式で相互作用することなく、被験体に投与される。被験体に投与される場合、担体は、任意選択で、活性成分の分解を最小限に抑え、被験体における有害な副作用を最小限に抑えるように選択される。

10

【 0 1 0 2 】

組換えウイルス（または組換えアデノウイルスをコードする1つもしくは複数の核酸もしくはベクター）は、公知の方法に従って、例えば、静脈内投与、例えば、ボーラスまたは長期間にわたる連続注入によって、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内（intracerebrospinal）、皮下、関節内、関節滑液嚢内、髄腔内、経口、局所、腫瘍内、または吸入の経路によって、投与される。投与は、局所的であっても全身的であってもよい。本組成物は、局所、経口、非経口、静脈内、関節内、腹腔内、筋肉内、皮下、体腔内（intracavity）、経皮、肝内、頭蓋内、噴霧化/吸入、または気管支鏡法を介した設置によるものを含む、複数の投与経路のうちのいずれかを介して投与することができる。したがって、本組成物は、局所的処置が所望されるか全身処置が所望されるかに応じて、また処置しようとする領域に応じて、いくつかの手段で投与される。

20

【 0 1 0 3 】

一部の実施形態では、投与のための組成物は、薬学的に許容される担体、好ましくは水性担体中に溶解した、本明細書において記載される組換えアデノウイルス（または組換えゲノム）を含む。様々な水性担体、例えば、緩衝食塩水などを、使用することができる。これらの溶液は、滅菌であり、通常、望ましくない物質を含まない。これらの組成物は、従来の周知の滅菌技法によって、滅菌することができる。本組成物は、生理学的条件に近づけるために、必要に応じて、薬学的に許容される補助物質、例えば、pH調整剤および緩衝剤、毒性調整剤など、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、乳酸ナトリウムなどを含有してもよい。これらの製剤における活性な薬剤の濃度は、広範に変動し得、主として、選択された具体的な投与様式および被験体の必要性に応じて、流体の体積、粘度、体重などに基づいて、選択されるであろう。

30

【 0 1 0 4 】

医薬製剤、特に、組換えウイルスの医薬製剤は、所望される度合いの純度を有する組換えアデノウイルス（または組換えアデノウイルスをコードする1つもしくは複数の核酸）を、任意選択の薬学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤と混合することによって、調製することができる。そのような製剤は、凍結乾燥製剤または水溶液であり得る。

40

【 0 1 0 5 】

許容される担体、賦形剤、または安定剤は、使用される投薬量および濃度で、レシipientにとって非毒性である。許容される担体、賦形剤、または安定剤は、酢酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸）、保存剤、低分子量ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミンもしくはゼラチン、または親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；ならびにアミノ酸、単糖類、二糖類、および他の炭水化物、例えば、グルコース、マンノース、もしくはデキストリン；キレート剤；ならびにイオン性および非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート）；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；ならびに/または非イオン性界面活性剤であり得る。組換えアデノウイルス（または組換えアデノウ

50

イルスをコードする１つもしくは複数の核酸）は、任意の適切な濃度の感染単位で、製剤化することができる。

【 0 1 0 6 】

経口投与に好適な製剤は、（ a ）液体溶液、例えば、希釈剤、例えば、水、生理食塩水、または P E G 4 0 0 中に懸濁させた、有効量の組換えアデノウイルス、（ b ）それぞれ所定の量の活性成分を液体、固体、顆粒、またはゼラチンとして含有するカプセル、サシェ剤（ sachet ）、または錠剤、（ c ）適切な液体中の懸濁物、および（ d ）好適なエマルジョンからなり得る。錠剤形態には、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、リン酸カルシウム、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、微晶質セルロース、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、および他の賦形剤、着色剤、充填剤、結合剤、希釈剤、緩衝剤、加湿剤（ moistening agent ）、保存剤、矯味矯臭剤、色素、崩壊剤、ならびに薬学的に適合性のある担体のうちの１つまたは複数が含まれ得る。ロゼンジ形態は、活性成分を、矯味矯臭薬、例えば、スクロース中に、ならびに活性成分に加えて当該技術分野において公知の担体を含有する、活性成分を不活性基剤、例えば、ゼラチンおよびグリセリンまたはスクロースおよびアカシアのエマルジョン、ゲルなどに含む香錠に、含み得る。

10

【 0 1 0 7 】

組換えアデノウイルス（または組換えアデノウイルスをコードする１つもしくは複数の核酸）は、単独または他の好適な構成成分と組み合わせて、吸入によって投与されるエアロゾル製剤にすることができる（すなわち、それらは、「噴霧化」することができる）。エアロゾル製剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などの加圧された許容される噴霧体に入れることができる。

20

【 0 1 0 8 】

非経口投与、例えば、例として、関節内（関節の中）、静脈内、筋肉内、腫瘍内、皮内、腹腔内、および皮下の経路によるものに好適な製剤としては、水性および非水性の等張性滅菌注射溶液（抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および製剤を意図されるレシピエントの血液と等張性にするための溶質を含有し得る）、ならびに懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、および保存剤を含み得る水性および非水性の滅菌懸濁物が挙げられる。提供される方法において、組成物は、例えば、静脈内注入によって、経口、局所、腹腔内、膀胱内、腫瘍内、または髄腔内に、投与することができる。非経口投与、腫瘍内投与、および静脈内投与が、好ましい投与方法である。化合物の製剤は、単回用量または複数回用量の密封された容器、例えば、アンプルおよびバイアルで提示され得る。

30

【 0 1 0 9 】

注射溶液および懸濁物は、前述の種類の滅菌の粉末、顆粒、および錠剤から調製することができる。アデノウイルスによって形質導入もしくは感染させた細胞、または ex vivo 療法については核酸をトランスフェクトした細胞もまた、上述のように静脈内または非経口で投与することができる。

【 0 1 1 0 】

一部の実施例では、医薬調製物は、単位剤形である。そのような形態では、調製物は、適切な量の活性な構成成分を含有する単位用量にさらに分割される。したがって、医薬組成物は、投与の方法に応じて、様々な単位剤形で投与され得る。例えば、経口投与に好適な単位剤形としては、粉末、錠剤、丸剤、カプセル、およびロゼンジが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【 0 1 1 1 】

V I I . 処置の方法

本明細書において開示される組換えアデノウイルス、組換えアデノウイルスゲノム、および組成物は、治療的処置または予防的処置のために投与することができる。具体的には、被験体における腫瘍細胞の生存度もしくは増殖を低減もしくは阻害する方法、被験体における腫瘍の進行を低減もしくは阻害する方法、転移の数を低減させる方法、転移のサイズおよび／もしくは体積を低減させる方法、被験体における腫瘍のサイズおよび／もしくは

50

体積を低減させる方法、ならびに／または被験体におけるがんを処置する方法が、提供される。本方法は、被験体に、治療有効量の組換えアデノウイルスまたは組換えアデノウイルスゲノム（またはその組成物）を投与することを含む。全体を通じて記載されるように、アデノウイルスまたは医薬組成物は、静脈内、血管内、髄腔内、筋肉内、皮下、腫瘍内、腹腔内、または経口を含むがこれらに限定されない、任意の多数の方法で投与される。任意選択で、本方法は、被験体に、１つまたは複数の追加の治療剤、例えば、化学療法剤、生物製剤、および／または照射を投与することをさらに含む。

【 0 1 1 2 】

一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、肺、前立腺、結腸直腸、乳房、甲状腺、腎臓、脾臓、骨、頭頸部、もしくは肝臓のがんもしくは腫瘍であるか、または白血病の一種である。一部の事例では、がんは、転移性である。一部の実施例では、腫瘍は、乳腺、下垂体、甲状腺、もしくは前立腺の腫瘍；脳、肝臓、髄膜、骨、卵巣、子宮、もしくは子宮頸部（cervix）の腫瘍；単球性もしくは骨髄性の白血病；腺癌、腺腫、星状細胞腫、膀胱腫瘍、脳腫瘍、パーキットリンパ腫、乳癌、子宮頸癌、結腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、脾臓癌、前立腺癌、直腸癌、皮膚癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、軟骨肉腫、絨毛癌、線維腫、線維肉腫、膠芽腫、膠腫、ヘパトーム、組織球腫、平滑筋芽腫(leiomyoblastoma)、平滑筋肉腫、リンパ腫、脂肪肉腫細胞、乳房腫瘍、髄芽細胞腫、骨髄腫、形質細胞腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、骨原性肉腫、脾臓腫瘍、下垂体腫瘍、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、肉腫、睾丸腫瘍、胸腺腫、またはウィルムス腫瘍である。腫瘍には、原発性固形腫瘍および転移性固形腫瘍の両方が含まれ、乳房、結腸、直腸、肺、口腔咽頭部、下咽頭、食道、胃、脾臓、肝臓、胆嚢および胆管、小腸、尿路（腎臓、膀胱、および尿路上皮を含む）、女性生殖管（子宮頸部、子宮、および卵巣、ならびに絨毛癌および妊娠性絨毛性疾患を含む）、男性生殖管（前立腺、精囊、精巣、および生殖細胞腫瘍を含む）、内分泌腺（甲状腺、副腎、および下垂体を含む）、および皮膚の癌腫、ならびに血管腫、黒色腫、肉腫（骨および軟組織から生じるもの、ならびにカボジ肉腫を含む）、ならびに脳、神経、眼、および髄膜の腫瘍（星状細胞腫、膠腫、膠芽腫、網膜芽細胞腫、神経腫、神経芽細胞腫、神経鞘腫、および髄膜腫を含む）が含まれる。一部の態様では、白血病などの造血系悪性疾患（すなわち、緑色腫、形質細胞腫、ならびに菌状息肉腫のプラークおよび腫瘍、ならびに皮膚T細胞性リンパ腫／白血病）により生じる固形腫瘍、ならびにリンパ腫（ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫の両方）の処置において生じる固形腫瘍が、処置され得る。加えて、処置は、本明細書において記載される腫瘍からの転移の予防に有用であり得る。

【 0 1 1 3 】

治療的適用において、組換えアデノウイルスまたはその組成物は、治療有効量または治療有効用量で、被験体に投与される。この使用に有効な量は、疾患の重症度および患者の全般的な健康状態に依存するであろう。本組成物の単回投与または複数回投与が、患者によって必要とされ、許容される、投薬量および頻度に応じて、投与され得る。「患者」または「被験体」には、ヒトおよび他の動物の両方、特に、哺乳動物が含まれる。したがって、本方法は、ヒト治療法および獣医学的適用、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ウマ、ブタ、ニワトリなどのいずれにも適用可能である。

【 0 1 1 4 】

修飾された配列を有するアデノウイルスの有効量は、個体ごとに決定され、少なくとも部分的に、使用される具体的な組換えアデノウイルス、個体のサイズ、年齢、性別、ならびに増殖している細胞のサイズおよび他の特徴に基づく。例えば、ヒトの処置については、少なくとも 10^3 プラーク形成単位（PFU）の組換えウイルスが使用され、例えば、増殖している細胞または存在する新生物の種類、サイズ、および数に応じて、少なくとも 10^4 、少なくとも 10^5 、少なくとも 10^6 、少なくとも 10^7 、少なくとも 10^8 、少なくとも 10^9 、少なくとも 10^{10} 、少なくとも 10^{11} 、または少なくとも 10^{12} PFU、例えば、およそ $10^3 \sim 10^{12}$ PFU の組換えウイルスが使用される。有効量は、約 $1.0 \text{ pfu} / \text{体重 kg} \sim$ 約 $10^{15} \text{ pfu} / \text{体重 kg}$ （例えば、約 10^2 pfu

10

20

30

40

50

/ 体重 $\text{kg} \sim \text{約 } 10^{13} \text{ pfu} / \text{体重 } \text{kg}$) であり得る。組換えアデノウイルスは、単回用量または複数回用量（例えば、2回、3回、4回、6回、またはそれよりも多い用量）で、投与される。複数回用量は、同時発生的または継続的に（例えば、数日間もしくは数週間の期間にわたって）投与され得る。

【0115】

一部の実施形態では、提供される方法は、被験体に、1つまたは複数の追加の治療剤、例えば、抗がん剤または他の治療的処置（腫瘍の外科切除など）を投与することを含む。例示的な抗がん剤としては、化学療法剤、例えば、有糸分裂阻害剤、アルキル化剤、代謝拮抗物質、挿入抗生物質（intercalating antibiotic）、増殖因子阻害剤、細胞周期阻害剤、酵素、トポイソメラーゼ阻害剤、抗生存剤（anti-survival agent）、生物学的応答修飾因子、抗ホルモン剤（例えば、抗アンドロゲン剤）、抗血管新生剤、およびCDK阻害剤などが挙げられるが、これらに限定されない。他の抗がん処置としては、放射線療法およびがん細胞を特異的に標的化する他の抗体が挙げられる。

10

【0116】

アルキル化剤の非限定的な例としては、ナイトロジェンマスタード（メクロレタミン、シクロホスファミド、メルファラン、ウラシルマスタード、またはクロラムブシルなど）、アルキルスルホネート（ブスルファンなど）、ニトロソ尿素（カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシン、またはダカルバジンなど）が挙げられる。

【0117】

代謝拮抗物質の非限定的な例としては、葉酸類似体（メトトレキサートなど）、ピリミジン類似体（5-FUまたはシタラビンなど）、およびプリン類似体、例えば、メルカプトプリンまたはチオグアニンが挙げられる。

20

【0118】

天然産物の非限定的な例としては、ピンカアルカロイド（ピンブラスチン、ピンクリスチン、またはビンデシンなど）、エポドフィロトキシン（エトポシドまたはテニポシドなど）、抗生物質（ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン、またはマイトマイシンCなど）、および酵素（L-アスパラギナーゼなど）が挙げられる。

【0119】

その他の薬剤の非限定的な例としては、白金配位錯体（シスプラチンとしても公知であるシス-ジアミン-ジクロロ白金IIなど）、置換尿素（ヒドロキシ尿素など）、メチルヒドラジン誘導体（プロカルバジンなど）、および副腎皮質抑制剤（ミトタンおよびアミノグルテチミドなど）が挙げられる。

30

【0120】

ホルモンおよびアンタゴニストの非限定的な例としては、副腎皮質ステロイド（プレドニゾンなど）、プロゲステロン（カブロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン、および酢酸メゲストロール（magestrol acetate）など）、エストロゲン（ジエチルスチルベストロールおよびエチニルエストラジオールなど）、抗エストロゲン薬（タモキシフェンなど）、ならびにアンドロゲン（プロピオン酸テストステロンおよびフルオキシメステロンなど）が挙げられる。

40

【0121】

最も一般的に使用されている化学療法薬の例としては、アドリアマイシン、アルケラン、Arac、BicNU、ブスルファン、CCNU、カルボプラチン（Carboplatinum）、シスプラチン（Cisplatinum）、シトキサン、ダウノルビシン、DTIC、5-FU、フルダラビン、ハイドレア、イダルビシン、イホスファミド、メトトレキサート、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、ナイトロジェンマスタード、タキソール（または他のタキサン類、例えば、ドセタキセル）、ベルバン（Velban）、ピンクリスチン、VP-16が挙げられるが、いくつかのより新しい薬物としては、ゲムシタピン（Gemzar）、ハーセプチン、イリノテカン（Campthosar、CPT-11）、ロイスタチン、ナベルピン、リツキサンSTI-571、タキソテール、トポテカン（ハイ

50

カムチン)、ゼローダ(カペシタピン)、ゼベリン(Zevelin)、およびカルチトリオールが挙げられる。

【0122】

使用することができる免疫調節因子の非限定的な例としては、AS-101(Wyeth-Ayerst Labs.)、プロピリミン(Uppjohn)、ガンマインターフェロン(Genentech)、GM-CSF(顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、Genetics Institute)、IL-2(CetusまたはHoffman-La Roche)、ヒト免疫グロブリン(Cutter Biological)、IMREG(New Orleans, La.のImregより)、SK&F 106528、およびTNF(腫瘍壊死因子、Genentech)が挙げられる。

10

【0123】

CDK(サイクリン依存性キナーゼ)阻害剤は、CDKの機能を阻害する薬剤である。提供される方法において使用するためのCDK阻害剤の非限定的な例としては、AG-024322、AT7519、AZD5438、フラボピリドール、インジスラム、P1446A-05、PD-0332991、およびP276-00が挙げられる(例えば、Lapennaら、Nature Reviews、8巻、547~566頁、2009年を参照されたい)。他のCDK阻害剤としては、LY2835219、パルボシクリブ、LEE011(Novartis)、汎CDK阻害剤AT7519、セリシクリブ(seliciclib)、CYC065、プチロラクトンI、ヒメニアルジシン(hymenialdisine)、SU9516、CINK4、PD0183812、またはファスカプリシン(fascaplysin)が挙げられる。

20

【0124】

一部の実施例では、CDK阻害剤は、広範囲阻害剤(フラボピリドール、オロモウシン、ロスコピチン、ケンパウロン、SNS-032、AT7519、AG-024322、(S)-ロスコピチン、またはR547など)である。他の実施例では、CDK阻害剤は、特異的阻害剤(ファスカプリシン、リュビジン(ryuvidine)、プルバラノール(purvalanol)A、NU2058、BML-259、SU9516、PD0332991、またはP-276-00など)である。

【0125】

一部の実施形態では、提供される方法は、被験体に、治療有効量の免疫療法を投与することをさらに含む。使用することができる免疫調節因子の非限定的な例としては、AS-101(Wyeth-Ayerst Labs.)、プロピリミン(Uppjohn)、ガンマインターフェロン(Genentech)、GM-CSF(顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、Genetics Institute)、IL-2(CetusまたはHoffman-La Roche)、ヒト免疫グロブリン(Cutter Biological)、IMREG(New Orleans, La.のImregより)、SK&F 106528、およびTNF(腫瘍壊死因子、Genentech)が挙げられる。免疫療法剤は、PD-1アンタゴニストまたはPD-L1アンタゴニスト、例えば、PD-1またはPD-L1に特異的に結合する抗体、例えば、アテゾリズマブ、MPDL3280A、BNS-936558(ニボルマブ)、ペンブロリズマブ、ピディリズマブ、CT011、AMP-224、AMP-514、MEDI-0680、BMS-936559、BMS935559、MEDI-4736、MPDL-3280A、MSB-0010718Cであり得る。免疫療法剤はまた、CTLA-4、LAG-3、またはB7-H3アンタゴニスト、例えば、トレメリムマブ、BMS-986016、およびMGA271であってよい。

30

40

【0126】

一部の実施形態では、提供される方法は、被験体に、治療有効量の、血管の増殖を低減させるか、またはさらには阻害するように機能する、1つまたは複数の抗血管新生剤、例えば、タンパク質、酵素、多糖類、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA、および組換えベクター、ならびに小分子を投与することをさらに含む。好適な血管新生阻害剤の例としては、限定することなく、アンジオスタチンK1-3、スタウロスポリン、ゲニステイン、

50

フマギリン、メドロキシプロゲステロン、スラミン、インターフェロン - アルファ、メタロプロテイナーゼ阻害剤、血小板因子4、ソマトスタチン、トロンボスポンジン、エンドスタチン、サリドマイド、ならびにこれらの誘導体および類似体が挙げられる。例えば、一部の実施形態では、抗血管新生剤は、VEGFに特異的に結合する抗体（例えば、AVASTIN（登録商標）、Roche）またはVEGF受容体に特異的に結合する抗体（例えば、VEGFR2抗体）である。一実施例では、抗血管新生剤は、VEGFR2抗体またはDMXA（バジメザンまたはASA404としても公知であり、例えば、Sigma Corp.、St. Louis、MOから市販されている）、またはその両方を含む。抗血管新生剤は、ペバシズマブ、スニチニブ、抗血管新生チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）、例えば、スニチニブ、キシチニブ（xitinib）、およびダサチニブであり得る。これらは、個別に使用してもよく、または任意の組合せで使用してもよい。

10

【0127】

一部の実施形態では、提供される方法は、被験体に、治療有効量の、増殖因子のリン酸化および活性化を防止する1つまたは複数のキナーゼ阻害剤、例えば、GLEEVEC（登録商標）、IRESSA（登録商標）、およびTARCEVA（登録商標）、スニチニブ、ソラフェニブ、アニチニブ（anitininib）、およびダサチニブを投与することをさらに含む。使用することができる抗体としては、増殖因子および血管新生経路を遮断する、HERCEPTIN（登録商標）およびAVASTIN（登録商標）が挙げられる。これらは、個別に使用してもよく、または組み合わせて使用してもよい。

【0128】

20

一部の実施形態では、提供される方法は、被験体に、治療有効量の、1つまたは複数の治療用モノクローナル抗体、例えば、3F8、アバゴボマブ（Abagovomab）、アデカツムマブ（Adecatumumab）、アフツズマブ、アラシズマブ（Alacizumab）、アレムツズマブ、アルツモマブペンテテート（Altumomabpentetate）、アナツモマブマフェナトクス（Anatumomab mafenatox）、アボリズマブ、アルシツモマブ、バビツキシマブ（Bavituximab）、ベクツモマブ（Bectumomab）、ベリムマブ、ベジレソマブ、ペバシズマブ、ピバツズマブメルタンシン（Bivatuzumab mertansine）、ブリナツモマブ（Blinatumomab）、ブレンツキシマブベドチン、カンツズマブメルタンシン、カプロマブペンデチド、カツマキシマブ、CC49、セツキシマブ、シタツズマブボガトクス（Citatumomab bogatox）、シクスツムマブ、クリバツズマブテトラキセタン（Clivatuzumab tetraxetan）、コナツムマブ、ダセツズマブ、デツモマブ（Detumomab）、エクロメキシマブ（Ecromeximab）、エクリズマブ、エドレコロマブ、エブラツズマブ、エルツマキシマブ（Ertumaxomab）、エタラシズマブ、ファルレツズマブ（Farletuzumab）、フィギツムマブ（Figitumumab）、ガリキシマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、ギレンツキシマブ（Girentuximab）、グレムバツムマブベドチン（Glembatumumab vedotin）、イブリツモマブチウキセタン、イゴボマブ（Igovomab）、イムシロマブ（Imciromab）、インテツムマブ、イノツズマブオゾガマイシン、イピリムマブ、イラツムマブ（Iratumomab）、ラベツズマブ、レクサツムマブ、リンツズマブ、ロルボツズマブメルタンシン（Lorvotuzumab mertansine）、ルカツムマブ（Lucatumumab）、ルミリキシマブ、マパツムマブ、マツズマブ、メボリズマブ、メテリムマブ（Metelimumab）、ミラツズマブ、ミツモマブ（Mitumomab）、モロリムマブ（Morolimomab）、ナコロマブタフェナトクス（Nacolumab tafenoate）、ナブツモマブエスタフェナトクス、ネシツムマブ、ニモツズマブ（Nimotuzumab）、ノフェツモマブメルペンタン、オフアツムマブ、オララツマブ、オボルツズマブモナトクス（Opportuzumab monatox）、オレゴボマブ（Oregovomab）、パニツムマブ、ペムツモマブ（Pemtumomab）、ペルツズマブ、ピンツモマブ（Pintumomab）、プリツムマブ（Pritumumab）、ラムシルマブ、リロツムマブ（Rilotumumab）、リツキシマブ、ロバツムマブ（Robatumumab）、サツモマブペンデチド（Satumomab pendetide）、シブロツズマブ（Sibrotuzumab）、ソネプシズマブ（Sonepcizumab）、タカツズマブテトラキセタン、タブリツモマブパプトクス（Taplitumomab paptox）、テナツモマブ（Tenatumomab）、TGN1412、チシリムマブ

30

40

50

(トレメリムマブ)、チガツズマブ (Tigatuzumab)、TNX-650、トラスツズマブ、トレメリムマブ、ツコツズマブセルモロイキン (Tucotuzumab celmoleukin)、ベルツズマブ、ボロキシマブ (Volociximab)、ボツムマブ (Votumumab)、またはザルツムマブを投与することをさらに含む。一部の実施例では、異種ORFは、これらの治療用抗体のうちの1つをコードする。

【0129】

一部の種類のがんの別の一般的な処置は、外科処置、例えば、がんまたはその一部分の外科切除である。処置の別の例は、腫瘍を根絶させるか外科切除の前にそれを退縮させるのを補助するために、放射線療法、例えば、放射性材料またはエネルギー（外部光線療法など）を、腫瘍部位に投与することである。

【0130】

薬剤および投薬量の選択は、処置されている所与の疾患に基づいて、当業者によって容易に決定することができる。薬剤または組成物の組合せは、並行して（例えば、1つの混合物として）、別個であるが同時に（例えば、別個の静脈ラインを介して）、または順次に（例えば、1つの薬剤がまず投与され、その後第2の薬剤が投与される）のいずれかで投与され得る。したがって、組合せという用語は、2つまたはそれよりも多い薬剤または組成物の並行投与、同時投与、または順次投与を指して使用される。

【0131】

本明細書において開示される方法によると、被験体には、有効量の、本明細書において提供される薬剤のうちの1つまたは複数投与される。有効量は、所望される生理学的応答（例えば、がん細胞の殺滅）をもたらすのに必要な任意の量として定義される。治療剤は、典型的に、1日当たり約0.001 mg/kg ~ 約1000 mg/kgの初回投薬量で投与される。約0.01 mg/kg ~ 約500 mg/kg、または約0.1 mg/kg ~ 約200 mg/kg、または約1 mg/kg ~ 約100 mg/kg、または約10 mg/kg ~ 約50 mg/kgの用量範囲を、使用することができる。投薬量は、しかしながら、被験体の要件、処置されている状態の重症度、および用いられている化合物に応じて変動し得る。例えば、投薬量は、特定の被験体において診断されたがんの種類およびステージを考慮して、経験的に決定され得る。被験体に投与される用量は、提供される方法の文脈では、患者において経時的に有益な治療応答をもたらすのに十分であるものとする。特定の状況にとって適正な投薬量の決定は、当業者の技能の範囲内である。したがって、薬剤を投与するのに有効な量およびスケジュールは、当業者によって経験的に決定され得る。投薬量は、望ましくない交差反応、アナフィラキシー反応などといった実質的な有害な副作用を引き起こすまでに多量であるべきではない。投薬量は、いずれかの禁忌が生じた場合には、個々の医師によって調整することができる。所与のクラスの医薬品の適切な投薬量についてのガイダンスは、文献において見出すことができる。

【0132】

腫瘍細胞を、本明細書において開示される組換えアデノウイルス、組換えアデノウイルスゲノム、またはその組成物と接触させることによって、腫瘍細胞の生存度または増殖を阻害する方法が、本明細書において提供される。一部の実施形態では、本方法は、*in vitro*方法である。他の実施形態では、本方法は、*in vivo*方法であり、腫瘍細胞を接触させることは、組換えアデノウイルス、組換えアデノウイルスゲノム、または組成物を、腫瘍を有する被験体に投与することを含む。

【0133】

被験体に、治療有効量の、本明細書において開示される組換えアデノウイルスまたは組換えアデノウイルスゲノム（またはその組成物）を投与することによって、被験体における腫瘍の進行を阻害するか、または腫瘍の体積を低減させる方法が、さらに提供される。

【0134】

被験体に、治療有効量の、本明細書において開示される組換えアデノウイルスまたは組換えアデノウイルスゲノム（またはその組成物）を投与することによって、被験体におけるがんを処置する方法もまた、提供される。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 5 】

V I I I . A d s e m b l y および A d S L I C

アデノウイルスゲノムは、E 1、E 2、E 3、E 4、および L 1 - 5 とラベル付けされた複数の機能的な群に組織化される。E 1 領域は、すべての他のウイルス遺伝子の転写を調節するタンパク質をコードし、宿主細胞に S 期を誘導する。E 2 領域は、ウイルス DNA 複製を駆動させるタンパク質をコードする。E 3 領域のタンパク質は、宿主細胞の免疫応答をモジュレートし、細胞培養においては必須ではない。E 4 領域は、異なる機能セットの遺伝子を含む。そして L 1 - 5 領域は、ウイルス粒子の構造タンパク質をコードする。

【 0 1 3 6 】

機能性のこの天然の隔離を利用し、本発明者らは、これまでに、図 6 A に示されるように、E 1、E 3、E 4、およびコアの 4 つのプラスミドに分離することによって、3 6 k b の A d ゲノムの迅速かつ容易な操作を可能にする、組換えアデノウイルスアセンブリの方法を開発した (A d s e m b l y および A d S L I C、国際公開第 2 0 1 2 / 0 2 4 3 5 1 号を参照されたく、これは、参照により本明細書に組み込まれる)。それらのより合理的なサイズのため、これらのより小さなプラスミドは、標準的な技法を使用して操作することが容易である。

【 0 1 3 7 】

A d s e m b l y および A d S L I C により、適合性のあるゲノムライブラリーの部分から、4 時間以内に、新規な特質を有するアデノウイルスの *i n v i t r o* でのコンビナトリアルアセンブリを可能とする。A d s e m b l y および A d S L I C は、新規な特質を有する合成ウイルスを、4 つの機能的部分のライブラリーを使用してアセンブリすることを可能にする、一般的なゲノム設計プラットフォームを提供する (図 6 A)。これらの部分のライブラリーは、複数部位特異的組換え部位 (A d s e m b l y、図 6 B) または配列非依存性シームレスクローニング (A d S L I C、図 6 C) のいずれかを使用して、あらゆる可能な組合せで再アセンブリすることができる。

【 0 1 3 8 】

A d s e m b l y および A d S L I C の技術は、固有の能力を有するアデノウイルスのモジュール設計および産生を可能にする。自動化された高スループットの様式でウイルスを設計、製造、および試験する能力を開発することにより、治療研究、診断研究、および調査研究のための新しいウイルスの開発が、加速し、拡大されるであろう。

【 0 1 3 9 】

クローニングステップは、かつては、新しいウイルス構築物の産生の障害であったが、A d s e m b l y および A d S L I C の出現により、ウイルスゲノムを構築する能力は、それらを試験する能力を凌ぐようになった。同等に高スループットの動態アッセイは、A d s e m b l y および A d S L I C の方法を使用して、合成の個別化されたウイルス治療および診断の最大限の可能性および高コンテンツなアセンブリを引き出すために、極めて重要である。

【 0 1 4 0 】

以下の実施例は、ある特定の具体的な特性および / または実施形態を例示するために提供される。これらの実施例は、本開示を、記載される特定の特性または実施形態に限定するとみなされるものではない。

【 実施例 】

【 0 1 4 1 】

(実施例 1 : アデノウイルスゲノムにおける外因性 O R F の最適な位置の特定)

この実施例では、ウイルス動態を破壊することなく、自己切断ペプチド配列とともに、外因性 O R F を挿入することができる、アデノウイルスゲノム内での特異的な位置の特定について記載する。

【 0 1 4 2 】

アデノウイルスベクターへの外因性遺伝子の挿入は、アデノウイルスキャプシドのサイズ

10

20

30

40

50

容量によって制限される。外因性核酸の過剰な追加により、キャプシドへのゲノムローディングが不完全となり、ウイルス動態が低減される。アデノウイルスゲノムにおいて利用できる空間が制限されていることにより提示される課題の解決策は、外因性オープンリーディングフレーム（ORF）を、融合生成物として本来のアデノウイルスORF内に位置づけることである。この戦略は、すでにゲノムにコードされているアデノウイルスプロモーター、5'UTR、およびポリA尾部を利用する。しかしながら、本来のアデノウイルスタンパク質と外因性タンパク質との融合体の発現は、一方または両方のタンパク質機能に有害となり得、アデノウイルス複製動態の有意な減少をもたらす得る。実際に、本明細書において開示される研究は、外因性ORFのアデノウイルスE1A、DNAポリメラーゼ、またはADPのORFへの直接的な融合が、アデノウイルス複製動態を有意に阻害することを実証している。加えて、本発明者らは、これまでに、内部リボソーム進入部位（IRES）を使用して外因性ORFを挿入することを試みたが、これも、野生型動態を有する組換えウイルスの産生に失敗している。

10

【0143】

この実施例では、本来のアデノウイルスORFと外因性ORFとの間に配置される自己切断ペプチド配列を使用することによる、この問題に対する解決策について記載する。単一のmRNA上の2つのORFの間に配置された場合、自己切断ペプチド配列の存在により、リボソームスキップが生じ、第1のタンパク質が第2のタンパク質とは別個に放出される。この実施例において生成されるアデノウイルス構築物では、自己切断ペプチドP2Aおよび異種ORFとして蛍光タンパク質（例えば、YPet、mCherry）を使用する。

20

【0144】

以下の表は、生成した構築物の一覧を提供し、2つの異なる細胞株（293-E4細胞およびA549細胞）における外因性ORFの発現レベル（低い、中等度、または高い）およびウイルス複製動態のレベル（低い、中等度、または高い）を示す。

30

40

50

【表 2】

構築物	表記	配列 番号	発現レベ ル	293-E4 細胞に おける動態	A549 細胞に おける動態
YPet-GS-E1A	CMBT-352		低い	高い	低い
YPet-P2A-E1A	CMBT-379	1	高い	高い	中等度
E1A-P2A-YPet	CMBT-432	2	中等度	高い	中等度
E1A-P2A-YPet-PEST	CMBT-569		中等度	高い	中等度
E1A-P2A-mCherry	CMBT-455		中等度	高い	中等度
E1B-55k-P2A-YPet	CMBT-456	3	高い	高い	高い
E1B-55k-P2A-mCherry	CMBT-499	4	高い	高い	高い
YPet-P2A-(DNA ポリ)	CMBT-530	5	中等度	高い	高い
YPet-(DNA ポリ)	CMBT-590		中等度	なし	未試験
DBP-GS-BFP	CMBT-612		高い	高い	未試験
DBP-P2A-YPet	CMBT-886	6	高い	高い	高い
mCherry-GS-ADP	CMBT-402		高い	中等度	未試験
Δ ADP[mCherry]	CMBT-599		高い	高い	中等度
YPet-P2A-ADP	CMBT-403	7	高い	高い	高い
ADP-P2A-YPet	CMBT-429	8	高い	低い	なし
E3-14.7k-P2A-YPet	PCMN-887	9	高い	高い	高い
YPet-P2A-E4-ORF2	CMBT-457	10	中等度	高い	高い
mCherry-P2A-E4-ORF2	CMBT-633	11	中等度	高い	高い

【0145】

両方の細胞型において「高い」複製動態（すなわち、野生型アデノウイルスに匹敵する複製動態）を呈する構築物を、治療用アデノウイルス構築物を生成するための候補と考える（太字で示す）。加えて、ファイバー - P2A - 異種ORF構築物は、ウイルス複製に有意な欠損を呈したが、極めて高いレベルの異種タンパク質の発現をもたらした。したがって、これらのファイバー構築物もまた、組換え欠損アデノウイルスの文脈において、高いレベルの治療用タンパク質の産生のために治療的適用において使用することができる。

【0146】

直接的な融合とP2A部位の挿入との比較

蛍光タンパク質をアデノウイルスORFに直接的に融合したいいくつかの構築物を、生成した。具体的には、以下の直接的融合体を、生成した：YPet-E1A、YPet(DNAポリメラーゼ)、およびmCherry-ADP。

【0147】

YPet-E1Aアデノウイルスは、ウイルス動態における有意な減損を呈した。P2A部位をYPetとE1Aとの間に挿入すること（YPet-P2A-E1A）により、ウイルス動態は改善されたが、ウイルス動態が野生型レベルまで回復することはなかった。次いで、E1AのC末端へのP2AおよびYPetの融合を試験するために、別の構築物を生成した（E1A-P2A-YPet）。この構築物は、ウイルス動態がさらに改善さ

れたが、ここでも、動態が野生型アデノウイルスのレベルまで回復することはなかった。

【0148】

YPet - (DNA - ポリ) ゲノムプラスミドをトランスフェクトする試みを数回行ったが、生存能力のあるウイルスの産生は失敗した（ブランクが全く形成されなかった）。しかしながら、YPet - P2AをDNAポリメラーゼのN末端に融合させると（YPet - P2A - (DNAポリ)）、上記の表に示されるように、野生型動態を有するウイルスが産生された。

【0149】

加えて、mCherryのADPへの直接的な融合（mCherry - ADP）により、有意に減損された動態を有するウイルスが産生された。しかしながら、P2A部位をmCherry ORFとADP ORFとの間に挿入すると、野生型動態を有するウイルスが得られた（mCherry - P2A - ADP）。異なる蛍光タンパク質を使用しても、同じ結果が得られ、YPet - P2A - ADP構築物は、野生型ウイルス動態を呈した。しかしながら、ADPのC末端側にP2Aおよび異種ORFを配置すると、複製しないウイルスが産生された。したがって、ADPについては、異種ORFは、N末端に配置しなければならない。

【0150】

ファイバーへの直接的な融合、およびファイバーと異種ORFとの間へのP2A部位の挿入のいずれによっても、有意に減損された複製動態を有するウイルスが産生された。しかしながら、ファイバー - P2A - 異種ORFを含む組換えアデノウイルスは、極めて高い異種タンパク質（この実施例ではYPetまたは青色蛍光タンパク質（BFP））の発現レベルを呈した。

【0151】

野生型ウイルス動態を有する追加の構築物

図7は、6種類の異なる構築物の自然対数スロープの比較を示す：YPet - E1A、YPet - P2A - E1A、E1A - P2A - mCherry、E1B - 55k - P2A - YPet、YPet - P2A - ADP、およびファイバー - P2A - YPet。上述のように、YPetのE1Aへの直接的な融合により、有意に減損された動態を有するウイルスが産生され、P2A部位をN末端（YPet - P2A - E1A）またはC末端（E1A - P2A - mCherry）のいずれかに付加することにより、ウイルス動態は改善されたが、野生型レベルには至らなかった。しかしながら、P2A部位および異種ORFを、E1B - 55kのC末端（E1B - 55k - P2A - YPet）またはADPのN末端（YPet - P2A - ADP）に挿入することにより、野生型ウイルス動態を有する組換えウイルスが生成された。

【0152】

P2A部位および異種ORFをDBPのC末端（DBP - P2A - YPet）もしくはE3 - 14.7kのC末端（E3 - 14.7k - P2A - YPet）に有する構築物、またはP2A部位および異種ORFをE4 - ORF2のN末端（YPet - P2A - E4 - ORF2およびmCherry - P2A - E4 - ORF2）に有する構築物のウイルス動態の評価により、野生型複製動態を有するウイルスが得られた。

【0153】

これらのデータの結果は、少なくとも以下のアデノウイルスゲノム構築物を、治療用アデノウイルス構築物を開発するために使用することができることを示す。

E1B - 55k - P2A - 異種ORF

異種ORF - P2A - (DNAポリメラーゼ)

DBP - SC - 異種ORF

異種ORF - SC - ADP

E3 - 14.7k - SC - 異種ORF

異種ORF - P2A - E4 - ORF2

ファイバー - P2A - 異種ORF

【0154】

治療的適用について、異種ORFは、治療用タンパク質をコードする。

【0155】

他のアデノウイルス血清型

これまでに説明されているウイルス動態を測定する方法は、すべて、細胞型特異的アッセイに高度に依存し、したがって、それぞれのアデノウイルス血清型の多様な親和性に起因して、血清型特異的である。本明細書において開示されるアデノウイルス動態アッセイは、いずれか1つの細胞型に依存するものではなく、そのため、Ad5以外の血清型に拡張することが可能である。すべてのアデノウイルス血清型は、Ad5 E3-14.7kと同等のORFを含有する。したがって、Ad9 (E3-15kを含有する) および Ad34 (E3-14.8kを含有する) を使用して、Ad5 E3-14.7k-P2A-YPet (PCMN-887、配列番号9) と同等のウイルスを生成した：PCMN-888 (Ad9 E3-15k-P2A-YPet、配列番号22) および PCMN-889 (Ad34 E3-14.8k-P2A-YPet、配列番号23)。Ad5コア、ならびにAd9またはAd34のいずれかに由来するファイバーシャフトおよびノブを含有するキメラウイルスもまた、生成した。次いで、4つの組換えウイルスを、293細胞 (図9A)、A549細胞 (図9B)、およびU2OS細胞 (図9C) を使用して、FBVKアッセイにおいて試験した。4つすべての組換えウイルスは、高いレベルのYPet発現を呈し、外因性ORFの挿入によって生じるウイルス動態への影響は最小限であった。

【0156】

(実施例2：アデノウイルスの複製動態を評価するための方法)

組換えアデノウイルスをアセンブリするためのAssembly方法およびAdSLIC方法は、短時間で、多数の組換えウイルスゲノムおよびウイルスを生成するための手段を提供する。しかしながら、臨床上および治療上の使用のために設計された組換えアデノウイルスの複製動態を評価する高速かつ高スループットな方法に対する必要性が存在する。この実施例では、組換えアデノウイルスのウイルス複製動態を試験するために使用することができる、蛍光に基づくウイルス動態アッセイについて説明する (図3)。このアッセイは、組換えアデノウイルスゲノムプラスミドまたは組換えアデノウイルス粒子のいずれかを出発材料として用いて、行うことができる。

【0157】

組換えアデノウイルスゲノムを用いて開始する場合、アッセイには、細胞にアデノウイルスゲノムプラスミド (実施例1において上述のものなど) をトランスフェクトし、フルオロフォアの発現を経時的にモニタリングすることが含まれる (図4A~4B)。トランスフェクション条件は、細胞のうちの約5~10%が、初回にトランスフェクトされるように、選択する。初回にトランスフェクトされなかった細胞は、初回のトランスフェクションによって産生されたウイルス粒子による二次感染に利用可能である。対数スローブを、二次感染、三次感染、および四次感染 (など) に基づく動態の尺度として使用するため、初回にトランスフェクトされた細胞の割合を把握する必要はない。図4Aおよび4Bは、組換えアデノウイルスゲノムプラスミドを用いて開始する例示的なウイルスに基づく動態アッセイを示す。この実施例では、48ウェルプレートを使用しており、これにより、14種類の異なるウイルス構築物を (3連で) 同時に試験することが可能となる。48ウェルプレートの上半分 (図4A) には、6種類の異なるウイルス、3つの模擬感染ウェル、およびツール感度変動を補償するFLUORESBRITE (商標) ビーズを有する3つの「ブランク」ウェルが含まれる。48ウェルプレートの下半分 (図4B) には、8種類の異なるウイルス構築物の3連のウェルが含まれる。細胞をトランスフェクトしたら、プレートを、継続的な蛍光モニタリングのために、TECAN (商標) プレートリーダーに設置する。収集したデータを使用して、各構築物の自然対数スローブを計算する (図8)。

【0158】

このアッセイは、細胞に組換えウイルス粒子を感染させることによって行うこともできる。このバージョンのアッセイでは、細胞に、組換えウイルス粒子を感染させ、フルオロフ

10

20

30

40

50

ォア発現を、経時的にモニタリングする（図5）。ゲノムプラスミドバージョンのアッセイと同様に、開始時のウイルスストックの正確な力価を把握する必要はない。典型的には、図5に示されるように、希釈系列、例えば、1：100から1：218，700の範囲の希釈系列を、初回感染に使用する。1：100の希釈物では、一般に、すべての細胞の感染がもたらされ、一方で、1：218，700の希釈物では、一般に、非常に少ない細胞の初回感染がもたらされる。この実施例では、96ウェルプレートを使用しており、11種類の異なるウイルス構築物を、8つの異なる希釈物（1：100、1：300、1：900、1：2700、1：8100、1：24，300、1：72，900、および1：218，700）で同時に試験する。プレートには、模擬感染細胞の4つのウェルおよびFLUORESBRITE（商標）ビーズの4つのウェルも含まれる。細胞を感染させたら、プレートを、継続的な蛍光モニタリングのために、TECAN（商標）プレートリーダーに設置する。収集したデータを使用して、各構築物の自然対数スロープを計算する（図8）。

【0159】

TECAN（商標）プレートリーダーは、インキュベーション機能も提供する（適切な温度、ならびにCO₂レベルおよびO₂レベルを維持する）。データ点を、15分ごとに取得して、自然対数スロープを計算する。これらの方法を使用することで、多数の異なるウイルス間および異なる細胞型間で、動態を高速かつ効率的に比較することが可能である。例えば、特定の組換えアデノウイルスが、腫瘍溶解性ウイルスとして治療的に使用することができかどうかを評価するためには、このアッセイを用いて、腫瘍細胞において高い複製動態を呈するが、非腫瘍細胞においては緩徐なウイルス動態を呈するウイルスを見出すことができる。さらに、組換えウイルスのウイルス動態は、このアッセイにおいて目的の腫瘍細胞型に感染またはトランスフェクトを行うことによって、評価することができる。

【0160】

対数スロープの計算

対数スロープを測定するために、時間に対する蛍光強度の線形プロットを、それぞれの時点で測定した蛍光強度の自然対数を取得することによって、片対数プロットに変換する。蛍光強度は、ウイルス複製時には指数関数的増殖を呈するため、この変換は、時間に対する自然対数（蛍光強度）をプロットすると直線となる。次いで、この直線を、標準的な最小二乗法を使用して当てはめる。この当てはめにより產生された結果として得られるスロープは、時間に対する蛍光の自然対数スロープであり、したがって、時間に対するウイルス増殖の自然対数スロープである。式を、以下に示す。

【数1】

$$FI(t) = F_0 e^{\alpha(t-t_0)}$$

式中、FIは、測定された蛍光強度であり、tは時間であり、F₀は、時間 = t₀における初期蛍光強度であり、 α は自然対数スロープである。

両側の自然対数を取得すると：

【数2】

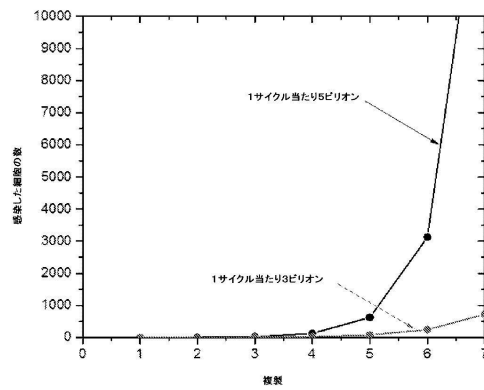
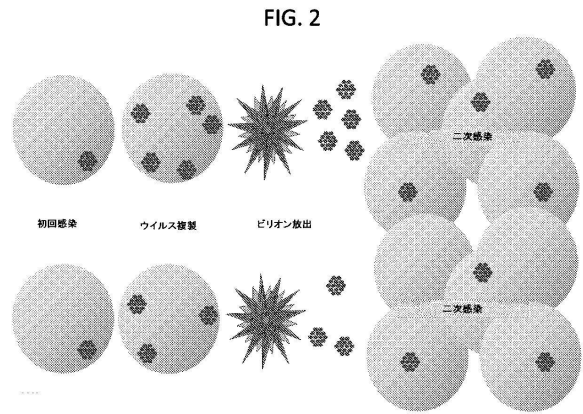
$$\ln[FI(t)] = \ln[F_0 e^{\alpha(t-t_0)}] = \ln(F_0) + \alpha(t-t_0)$$

右手側は、 α の自然対数スロープを有する線形方程式となる。

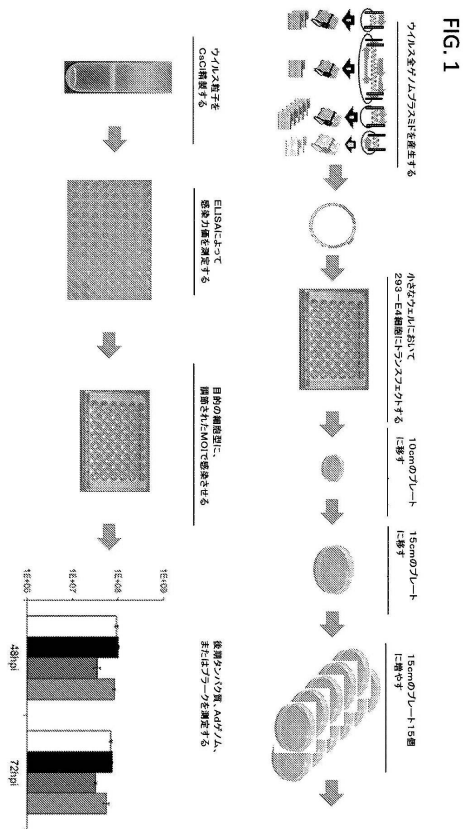
【0161】

本開示の原理を適用することができる多数の可能性のある実施形態を考慮して、例示された実施形態が、本発明の例にすぎず、本発明の範囲を限定するものとして捉えられるものではないことを認識されたい。むしろ、本発明の範囲は、以下の特許請求の範囲によって定められる。したがって、本発明者らは、これらの特許請求の範囲の範囲および趣旨の範囲内のものすべてに関して、本発明者らの発明として権利を主張する。

【図 2】



【 図 面 】
【 図 1 】



【 図 4 A 】

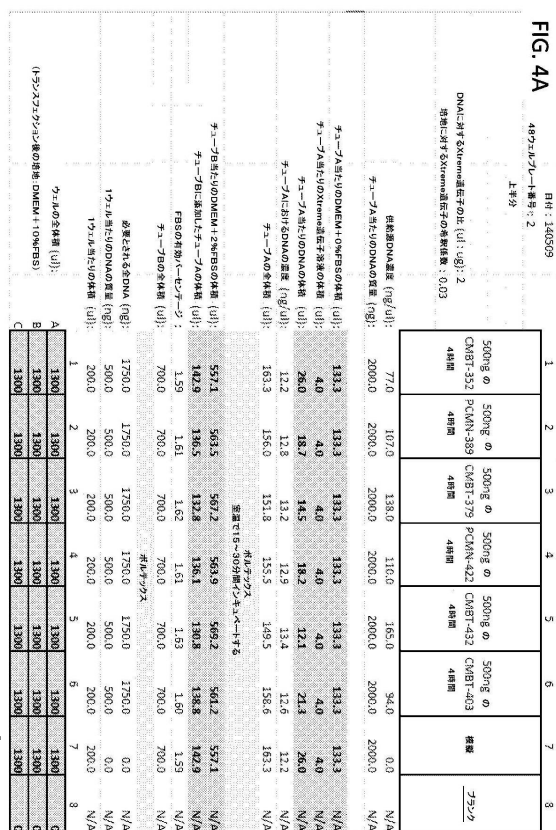
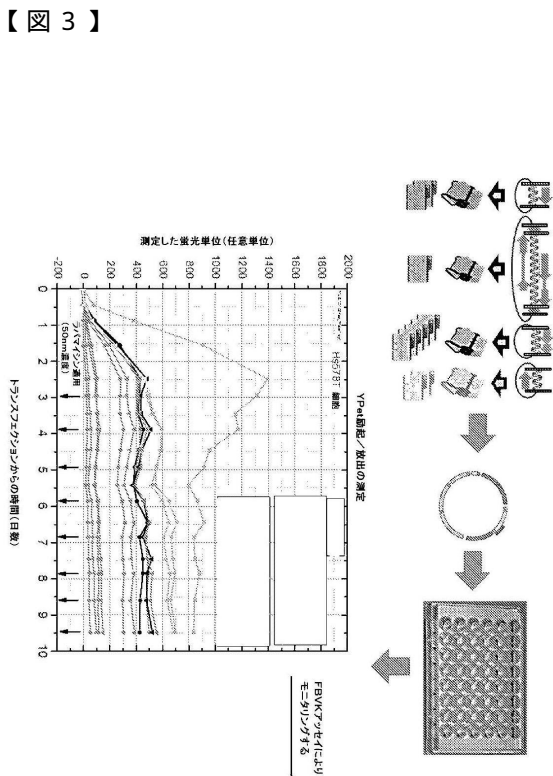
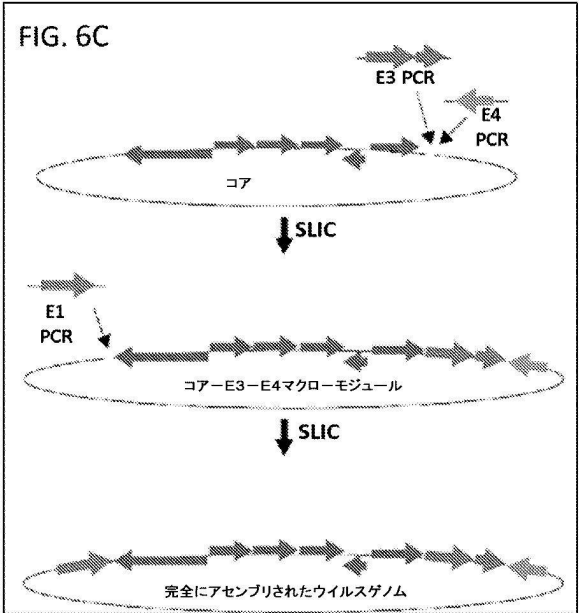


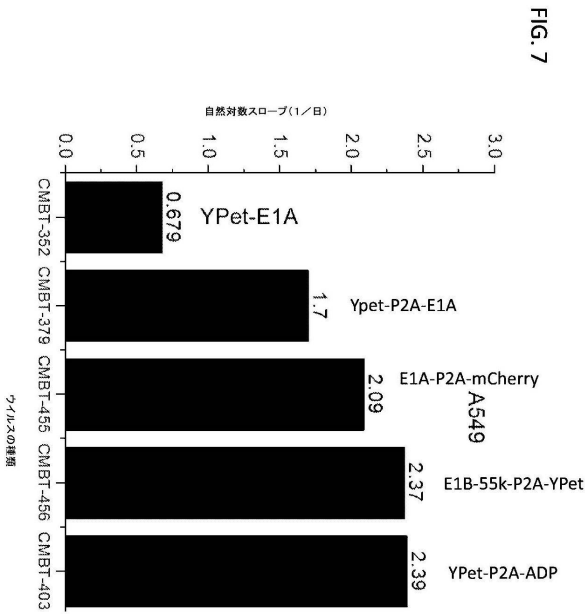
FIG. 3



【図 6 C】



【図 7】



【図 8】

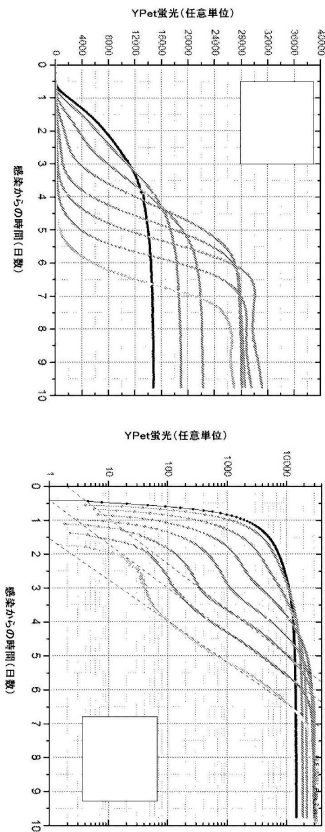
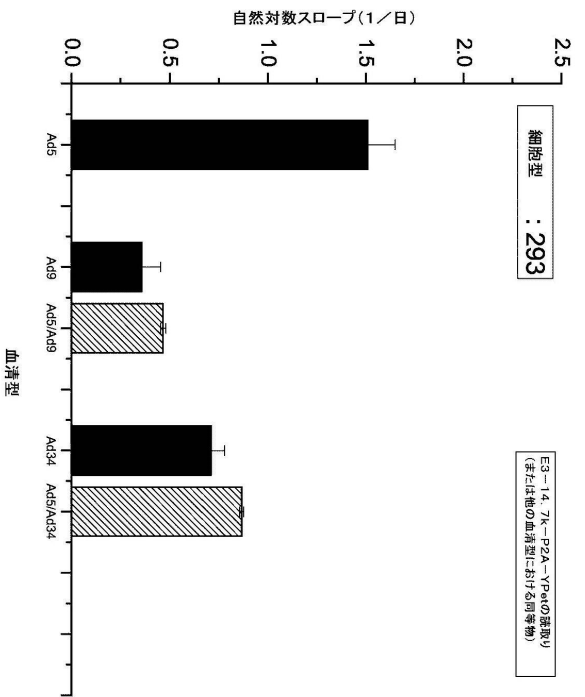


FIG. 8 動態データの分析および解釈

- 複数のウイルス複製サイクルにわたり蛍光を測定する
- 片対数グラフにより、自然対数スロープを得る
 - 酵母または細菌の増殖曲線に類似の分析
- ウイルスおよび細胞株全体にわたって動態を比較することができる

$F(t) = Ae^{\alpha(t-t_0)}$ \rightarrow $\ln[F(t)] = \ln(A) + \alpha t - \alpha t_0$

【図 9 A】



10

20

30

40

50

【図 9 B】

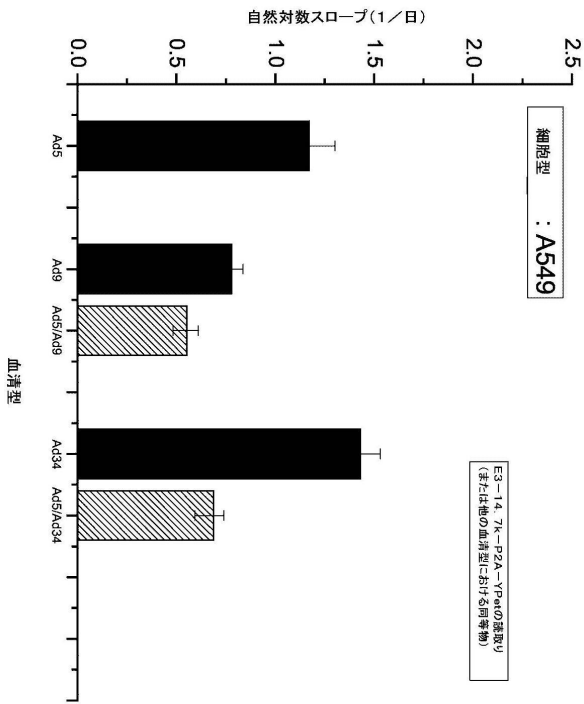


FIG. 9B

【図 9 C】

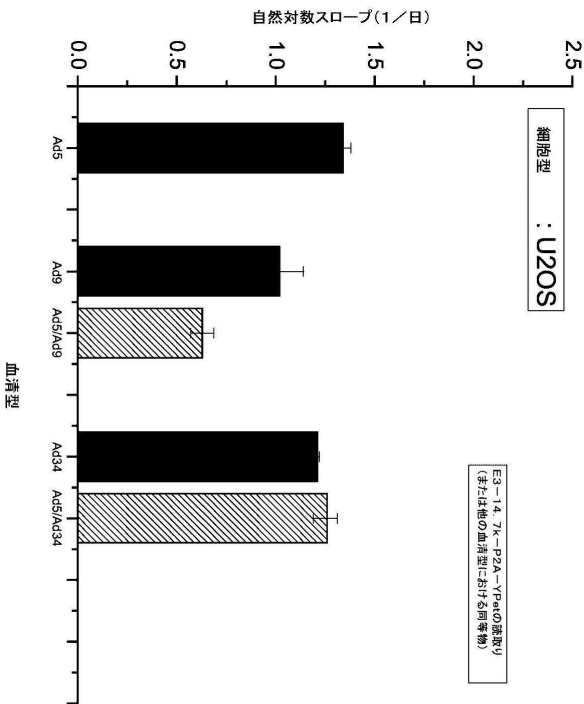


FIG. 9C

【配列表】

0007015551000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 7/01 (2006.01)

C 1 2 N 7/01

A 6 1 K 35/761 (2015.01)

A 6 1 K 35/761

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

弁護士 山本 健策

(72)発明者 オシェア, クローダ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 3 7 - 1 0 0 2 , ラ ホヤ, エヌ. トレイ パインズ
ロード 1 0 0 1 0

(72)発明者 パートロ, ウィリアム

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 3 7 - 1 0 0 2 , ラ ホヤ, エヌ. トレイ パインズ
ロード 1 0 0 1 0

(72)発明者 パワーズ, コリン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 3 7 - 1 0 0 2 , ラ ホヤ, エヌ. トレイ パインズ
ロード 1 0 0 1 0

審査官 小田 浩代

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 5 / 1 5 5 3 7 0 (W O , A 1)

Funston, G. M. et al. , Expression of heterologous genes in oncolytic adenoviruses using pic
ornaviral 2A sequences that trigger ribosome skipping , J. Gen. Virol. , 2008年 , Vol. 89 ,
pp. 389-396

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P
I D S (S T N)

P u b M e d