

(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2009-507853

(P2009-507853A)

(43) 公表日 平成21年2月26日(2009.2.26)

(51) Int.Cl.

A61K 35/76 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 39/275 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

F 1

A 61 K 35/76
A 61 K 48/00
A 61 K 39/275
A 61 P 35/00
A 61 P 35/02

テーマコード(参考)

4 B 02 4
4 C 08 4
4 C 08 5
4 C 08 7

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 85 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-530209 (P2008-530209)
(86) (22) 出願日 平成18年9月7日 (2006.9.7)
(85) 翻訳文提出日 平成20年4月25日 (2008.4.25)
(86) 國際出願番号 PCT/US2006/034945
(87) 國際公開番号 WO2007/030668
(87) 國際公開日 平成19年3月15日 (2007.3.15)
(31) 優先権主張番号 60/714,679
(32) 優先日 平成17年9月7日 (2005.9.7)
(33) 優先権主張国 米国(US)

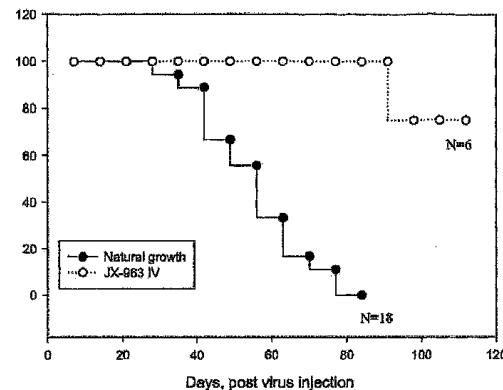
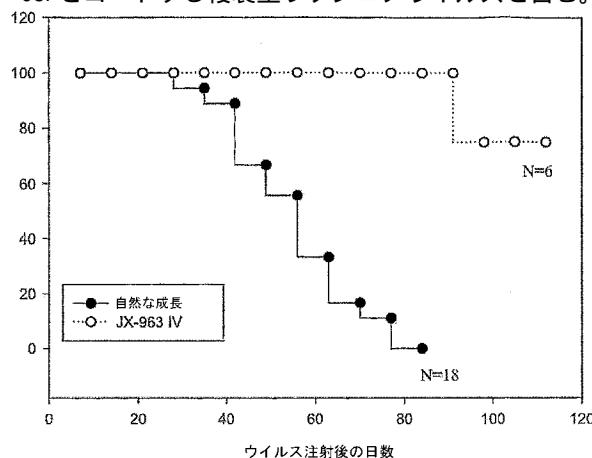
(71) 出願人 508069589
ジェンネレックス インコーポレイティッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 マウンテン ビュー フェアブルック ドライブ 2704
(74) 代理人 100102978
弁理士 清水 初志
(74) 代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 GM-CSF 発現ワクシニーウイルスを用いる転移性および／または全身播種性癌の全身処置

(57) 【要約】

本発明は、ワクシニーウイルスの血管内投与を用いて癌および癌細胞を処置するための方法および組成物に関する。いくつかの態様において、方法および組成物は、GM-CSFをコードする複製型ワクシニーウイルスを含む。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

投与が血管内である、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)をコードする核酸の発現を指示するプロモーターと共に発現領域を有する複製型ワクシニアウイルスの有効量を被験者に投与する段階を含む、被験者における癌細胞を殺す方法。

【請求項 2】

ワクシニアウイルスが静脈内投与される、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

ワクシニアウイルスが動脈内投与される、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

ワクシニアウイルスが薬学的に許容される製剤で存在する、請求項1記載の方法。

10

【請求項 5】

ワクシニアウイルスがそのゲノムに欠失を有する、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

ワクシニアウイルスが1つまたは複数の遺伝子において変異を有する、請求項5記載の方法。

10

【請求項 7】

変異が欠失である、請求項6記載の方法。

【請求項 8】

少なくともチミジンキナーゼ遺伝子が欠失している、請求項6記載の方法。

20

【請求項 9】

ワクシニアウイルスが、

(a) ワクシニアウイルス増殖因子；

(b) インターフェロンに直接結合する、機能的インターフェロン調節ポリペプチド；

(c) 変異によって少なくとも1つの機能的補体制御ポリペプチドを欠損するウイルスが得られる、補体制御ポリペプチド；

(d) 変異によって少なくとも1つの機能的TNF調節ポリペプチドを欠損するウイルスが得られる、TNF調節ポリペプチド；

(e) 変異によって少なくとも1つの機能的セリンプロテアーゼ阻害剤を欠損するウイルスが得られる、セリンプロテアーゼ阻害剤；

30

(f) 変異によって少なくとも1つの機能的IL-1 調節ポリペプチドを欠損するウイルスが得られる、IL-1 調節ポリペプチド；

(g) 変異によってA41L、B7R、N1L、vCKBP、またはC11Rの少なくとも1つの機能を欠損するウイルスが得られる、機能的A41L、B7R、N1L、もしくはvCKBPケモカイン結合ポリペプチド、またはC11R EGF様ポリペプチド；または

(h) 変異によってワクシニアウイルスの感染性EEV型の増加が起こる、ポリペプチド、をコードする遺伝子において変異を有する、請求項6記載の方法。

【請求項 10】

ワクシニアウイルス増殖因子において変異をさらに含む、請求項8記載の方法。

40

【請求項 11】

ワクシニアウイルスがWyethまたはWestern Reserve(WR)株である、請求項1記載の方法。

【請求項 12】

ワクシニアウイルスがWR株である、請求項11記載の方法。

【請求項 13】

プロモーターがワクシニアウイルスプロモーターである、請求項1記載の方法。

【請求項 14】

プロモーターが合成プロモーターである、請求項13記載の方法。

【請求項 15】

プロモーターが感染の少なくとも初期相のあいだに転写を指示する、請求項13記載の方

50

法。

【請求項 16】

プロモーターが感染の少なくとも後期相のあいだに転写を指示する、請求項13記載の方法。

【請求項 17】

被験者がワクシニアウイルスを複数回投与される、請求項1記載の方法。

【請求項 18】

第二の処置が第一の処置の3週間以内に起こる、請求項17記載の方法。

【請求項 19】

第二の処置が第一の処置の2週間以内に起こる、請求項18記載の方法。

10

【請求項 20】

同じ用量が投与される、請求項17記載の方法。

【請求項 21】

被験者がウイルス約 10^5 ~ 約 10^{13} pfuを投与される、請求項1記載の方法。

【請求項 22】

被験者がウイルス約 10^7 ~ 約 10^{10} pfuを投与される、請求項1記載の方法。

【請求項 23】

投与が注射によって血管内で起こる、請求項1記載の方法。

【請求項 24】

投与が静脈内点滴またはボーラスを用いて血管内で起こる、請求項1記載の方法。

20

【請求項 25】

投与がポンプを用いて血管内で起こる、請求項1記載の方法。

【請求項 26】

癌細胞が転移癌細胞である、請求項1記載の方法。

【請求項 27】

被験者が、肺癌、結腸直腸癌、乳癌、前立腺癌、膵臓癌、肝細胞癌、白血病、リンパ腫、骨髄腫、または黑色腫を有する、請求項1記載の方法。

【請求項 28】

投与が血管内である、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)をコードする核酸の発現を指示するプロモーターと共に発現領域を有する複製型ワクシニアウイルスの有効量を被験者に投与する段階を含む、被験者における癌を処置するための方法。

30

【請求項 29】

投与が血管内である、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)をコードする核酸の発現を指示するプロモーターと共に発現領域を有する複製型ワクシニアの有効量を被験者に投与する段階を含む、被験者における1つまたは複数の転移を処置するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

I. 発明の分野

本発明は、一般的に腫瘍学およびウイルス学の分野に関する。より具体的には、本発明は、GM-CSFを発現するワクシニアウイルスおよび癌を処置するための全身投与におけるその利用に関する。なお、本出願はその全内容が参照により本明細書に組み入れられる、2005年9月7日に提出された米国特許仮出願第60/714,679号に対する優先権を主張する。

40

【背景技術】

【0002】

II. 関連技術に関する説明

正常組織の恒常性は、細胞増殖および細胞死の高度に調節されたプロセスである。細胞増殖または細胞死のいずれかの不均衡は、癌様状態に発展しうる(Solyanikら、1995；Stokkeら、1997；Mumby and Walter、1991；Natoliら、1998；Magi-Galluzziら、1998)。

50

例えば、子宮頸癌、腎臓癌、肺癌、膵臓癌、結腸直腸癌、および脳癌は、起こりうる多くの癌のごく少数の例である (Erlandsson、1998 ; Kolmel、1998 ; Mangray and King、1998 ; Gertig and Hunter、1997 ; Mouginら、1998)。実際に、癌の発生は非常に高く、米国だけでも毎年500,000人以上の死亡は癌が原因である。

【0003】

細胞増殖および細胞死の維持は、癌原遺伝子および腫瘍抑制因子によって少なくとも部分的に調節される。癌原遺伝子または腫瘍抑制因子は、細胞増殖を誘導するタンパク質(例えば、sis、erbB、src、ras、およびmyc)、細胞増殖を阻害するタンパク質(例えば、Rb、p16、p19、p21、p53、NF1、およびWT1)、またはプログラムされた細胞死を調節するタンパク質(例えば、bcl-2) (Ochiら、1998 ; Johnson and Hamdy、1998 ; Liebermannら、1998) をコードしうる。しかし、これらの癌原遺伝子および腫瘍抑制因子の遺伝子再配列または変異によって、強力な癌を引き起こす腫瘍遺伝子への癌原遺伝子の転換、または腫瘍抑制因子の不活性なポリペプチドへの転換が起こる。形質転換を得るためにしばしば、一点の突然変異で十分である。例えば、p53腫瘍抑制タンパク質における点突然変異によって、野生型p53機能の完全な喪失が起こる (Vogelstein and Kinzler、1992)。

10

【0004】

現在、多くの共通の癌タイプの治療にとって有効な選択肢はほとんどない。所定の個体に対する治療経過は、診断、疾患が進行した段階、ならびに患者の年齢、性別、および全身健康のような要因に依存する。癌治療の最も通常の選択肢は、手術、放射線療法、および化学療法である。手術は、癌の診断および治療において中心的な役割を果たす。典型的に、手術のアプローチは、生検のため、および癌様増殖を切除するために必要である。しかし、癌が転移して広がっている場合、手術によって治癒が得られる可能性は低く、代替アプローチを講じなければならない。放射線療法、化学療法、および免疫療法は、癌の外科治療の代替法である (Mayer、1998 ; Ohara、1998 ; Hoら、1998)。放射線療法は、癌細胞を破壊するために高エネルギー放射線照射を正確に照準することを含み、手術と同様に、転移していない局在癌細胞の治療において主に有効である。放射線療法の副作用には、皮膚の刺激、嚥下困難、口の渴き、恶心、下痢、脱毛、および脱力が含まれる (Curran、1998 ; Brizel、1998)。

20

【0005】

化学療法、すなわち抗癌剤による癌の治療は、もう一つの癌治療様式である。所定の抗癌剤治療の有効性はしばしば、固体腫瘍全体に薬物を輸送することが難しいために制限される (el-Kareh and Secomb、1997)。化学療法の戦略は、腫瘍組織の増殖に基づき、抗癌剤は急速に分裂しつつある癌細胞にターゲティングされる。ほとんどの化学療法アプローチには、広く多様な癌の反応率を増加させることが証明されている一つより多い抗癌剤の併用が含まれる(参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,824,348号；米国特許第5,633,016号、および米国特許第5,798,339号)。化学療法剤の主な副作用は、それらが正常組織の細胞にも影響を及ぼす点であり、影響を受ける可能性が最も高い細胞は場合によっては急速に分裂する細胞(例えば、骨髄、消化管、生殖器官および毛囊)である。化学療法剤の他の毒性作用には、口のただれ、嚥下困難、口の渴き、恶心、下痢、嘔吐、疲労、出血、脱毛、および感染症が含まれる。

30

【0006】

免疫療法は、特定のタイプの癌の治療にとってのもう一つの選択肢である。理論的には、免疫系が刺激されて、腫瘍細胞を異物であると同定して、それらを破壊の標的とする。残念なことに、反応は典型的にほとんどの腫瘍の増殖を予防するためには不十分である。しかし、近年、免疫系の本来の防御メカニズムを増強または補足する方法を開発するために、免疫治療の領域に注目が集まっている。現在治験中または用いられている免疫治療の例は、免疫アジュvant(例えば、ウシ結核菌 (*Mycobacterium bovis*)、熱帯熱マラリア (*Plasmodium falciparum*)、ジニトロクロロベンゼン、および芳香族化合物)(米国特許第5,801,005号；米国特許第5,739,169号；Hui and Hashimoto、1998；Christodoulidesら、1998)、サイトカイン治療(例えば、インターフェロン (IL-1、GM-CSF、およびTN

40

50

F)) (Bukowskiら、1998 ; Davidsonら、1998 ; Hellstrandら、1998) 、および遺伝子治療(例えば、TNF、IL-1、IL-2、p53) (Qinら、1998 ; Austin-Ward and Villaseca、1998 ; 米国特許第5,830,880号および米国特許第5,846,945号) およびモノクローナル抗体(例えば、抗ガングリオシドGM2、抗HER-2、抗p185) (Pietrasら、1998 ; Hanibuchiら、1998 ; 米国特許第5,824,311号) である。そのような方法はある程度有望であるが、成功は限定期であることが示された。

【0007】

複製選択性的腫瘍細胞破壊性ウイルスは、癌の治療にとって有望である(Kirnら、2001)。これらのウイルスは、直接的な複製依存的および/またはウイルス遺伝子発現依存的腫瘍細胞破壊作用を通して腫瘍細胞死を引き起こしうる(Kirnら、2001)。さらに、ウイルスは、宿主における細胞媒介抗腫瘍免疫の誘導を増強することができる(Todoら、2001 ; Sinkovicsら、2000)。これらのウイルスはまた、抗腫瘍有効性を増強するために腫瘍内で治療的トランスジーンを発現するように操作することができる(Hermiston、2000)。

10

【0008】

しかし、この治療アプローチには大きい制限が存在する。いくつかのウイルス種に関して、ある程度の天然の腫瘍選択性の程度を証明することができるが、安全性を最大限にするためには、腫瘍細胞破壊性ウイルスの腫瘍選択性を操作および/または増強するための新しいアプローチがなお必要である。この選択性は、静脈内投与を用いる場合、および抗腫瘍有効性を増強するために毒性の可能性がある治療遺伝子をこれらのウイルスに加える場合には特に重要となるであろう；遺伝子発現は、正常組織において厳密に制限される必要があるであろう。さらに、抗腫瘍免疫の誘導または腫瘍関連血管のターゲティングのようなさらなるメカニズムによる抗腫瘍有効性の増加は非常に望ましい。

20

【0009】

したがって、癌の治療にとってより有効でより毒性の低い治療法が必要である。腫瘍細胞破壊性ウイルスの使用および免疫治療は、開発されうる領域であるが、先に述べた制限を克服する必要がある。このように、本発明はそれらの制限に取り組む。

【発明の開示】

【0010】

発明の概要

このように、本発明に従って、投与が血管内である、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)をコードする核酸の発現を指示するプロモーターと共に発現領域を有する複製型ワクシニアウイルスの有効量を被験者に投与する段階を含む、被験者における癌細胞を殺す方法が提供される。核酸はヒトGM-CSFをコードすることが具体的に企図される。

30

【0011】

ワクシニアウイルスは、静脈内または動脈内、たとえば静脈内点滴もしくはボーラス、またはポンプを用いて投与されてもよい。ワクシニアウイルスは、薬学的に許容される製剤に分散されてもよい。被験者は、ウイルス約 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 ～約 10^9 、 10^{10} 、 10^{12} 、 10^{13} pfuを投与されてもよく、またはウイルス約 10^7 ～約 10^{10} pfuを投与されてもよい。被験者は、ワクシニアウイルスを複数回(1、2、3、4、5、6回またはそれより多く)投与されてもよく、たとえば第二の処置は、第一の処置の1、2、3、4、5、6、7日以内に、もしくは数週間以内に行うか、または第二の処置は第一の処置の二週間以内に行う。同じまたは異なる用量を投与しうる。癌細胞は転移癌細胞であってもよい。被験者は、脳癌、頭頸部癌、腎臓癌、卵巣癌、精巣癌、子宮癌、胃癌、肺癌、結腸直腸癌、乳癌、前立腺癌、膵臓癌、肝細胞癌、白血病、リンパ腫、骨髄腫、または黑色腫を有してもよい。

40

【0012】

ワクシニアウイルスは、そのゲノムにおいて欠失を有してもよく、または1つもしくは複数の遺伝子において変異を有してもよい。ワクシニアウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子は欠失していてもよい。ワクシニアウイルスは、(a)ワクシニアウイルス増殖因子；(b)インターフェロンに直接結合する、機能的インターフェロン調節ポリペプチド；(c)

50

) 变異によって少なくとも1つの機能的補体制御ポリペプチドを欠損するウイルスが得られる、補体制御ポリペプチド；(d) 变異によって少なくとも1つの機能的TNF調節ポリペプチドを欠損するウイルスが得られるTNF調節ポリペプチド；(e) 变異によって少なくとも1つの機能的セリンプロテアーゼ阻害剤を欠損するウイルスが得られる、セリンプロテアーゼ阻害剤；(f) 变異によって、少なくとも1つの機能的IL-1 調節ポリペプチドを欠損するウイルスが得られる、IL-1 調節ポリペプチド；(g) 变異によってA41L、B7R、N1L、vCKBP、またはC11Rの少なくとも1つの機能を欠損するウイルスが得られる、機能的A41L、B7R、N1L、もしくはvCKBPケモカイン結合ポリペプチド、またはC11R EGF様ポリペプチド；または(h) 变異によってワクシニアウイルスの感染性EEV型の増加が起こる、ポリペプチド、をコードする遺伝子において変異を有してもよい。さらにワクシニアウイルスは、ワクシニアウイルス増殖因子において変異を含んでもよい。ワクシニアウイルスは、WyethまたはWestern Reserve(WR)株であってもよい。プロモーターは、ワクシニアウイルスプロモーター、合成プロモーター、感染の少なくとも初期相のあいだ転写を指示するプロモーター、または感染の少なくとも後期相のあいだ転写を指示するプロモーターであってもよい。

10

【0013】

もう1つの態様において、投与が血管内である、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)をコードする核酸の発現を指示するプロモーターと共に発現領域を有する複製型ワクシニアウイルスの有効量を被験者に投与する段階を含む、被験者における癌を処置するための方法が提供される。

20

【0014】

なおもう1つの態様において、投与が血管内である、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)をコードする核酸の発現を指示するプロモーターと共に発現領域を有する複製型ワクシニアの有効量を被験者に投与する段階を含む、被験者における1つまたは複数の転移を処置するための方法が提供される。

【0015】

他の態様において、血管内に投与される、複製コンピメントワクシニアウイルスを含む方法は、GM-CSF以外のタンパク質またはRNAをコードする核酸を含んでもよいと企図される。特定の態様において、核酸は、もう1つのサイトカインをコードする。特定の態様において、核酸は、IL-12、IL-2およびその他のような他の免疫刺激サイトカインまたはケモカインをコードする。さらなる態様において、核酸は、チミジンデアミナーゼまたはTNF-αのような腫瘍壊死因子(TNF)をコードしてもよい。その上、複製型ワクシニアウイルスは、1つより多い異種配列を発現してもよいと企図される。たとえば、GM-CSFタンパク質ともう1つのタンパク質またはRNA分子とを発現してもよい。

30

【0016】

特定の方法または組成物に関して考察した任意の態様は、本発明の他の方法および組成物に関して実行してもよいと特に企図される。

【0017】

請求の範囲および/または明細書において「含む」という用語と共に用いられる「一つの(a)」または「一つの(an)」という用語の使用は、「1個」を意味してもよいが、同様に「一つまたはそれ以上」、「少なくとも一つ」、および「一つまたは一つより多く」という意味と一貫する。

40

【0018】

本発明の他の目的、特徴、および長所は、以下の詳細な説明から明らかとなるであろう。しかし、詳細な説明および特定の例は、本発明の特定の態様を示しているが、説明するために提供され、この詳細な説明から当業者には様々な変更および改変が明らかとなるであろうが、それらも本発明の趣旨および範囲に含まれると理解しなければならない。

【0019】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、本発明の特定の局面をさらに証明するために含まれる。本発明は、本明細書において示した特定の態様の詳細な説明と共にこれらの図面

50

の一つまたはそれ以上を参照してよりよく理解されるであろう。

【0020】

実例となる態様の説明

GM-CSFを発現するポックスウイルスは、黒色腫を有する動物および患者における腫瘍内注射後の有効性および安全性が証明された (Mastrangelo et al, 1999; 2000)。腫瘍の退縮および安定化を含む、局所注射部位および遠隔効果が認められた (Mastrangelo et al, 1999)。有効性は哺乳動物における癌細胞に対する免疫応答の誘導によると提唱された。米国特許第6,093,700号および第6,475,999号は、黒色腫、頭頸部癌、前立腺癌、および膀胱癌に対してインサイチューで免疫するために、ヒトにおいてGM-CSFを腫瘍内注射によって送達するためにポックスウイルスを用いることを提唱している (Mastrangelo et al, 2002)。これらの癌は、腫瘍内注射を指示するためにその表在性の本質および近づきやすさのために選択された。これらの癌はまた、全身性の腫瘍特異的細胞障害性Tリンパ球を誘導する免疫治療アプローチに対しても感受性があることが報告されている。GM-CSFは腫瘍特異的細胞障害性Tリンパ球 (CTL) の強力な誘導物質であることが証明された (Dranoff et al., 1993)。ウイルスは、免疫細胞の浸潤および前炎症性サイトカインを誘導することから、ウイルスは、腫瘍塊内でGM-CSFを送達および発現する理想的な方法となる可能性がある。

【0021】

しかし、腫瘍内注射経路は、大きい制限を有する。これは、腫瘍内注射を安全にするために近づくことができる腫瘍、通常、先に記述した腫瘍のような表在部腫瘍に対する処置に限定される。さらに、非注射腫瘍に対する有効性は、十分に強力な腫瘍特異的細胞障害性Tリンパ球の誘導を必要とする。これらの弱点により、表在性であって十分に強力な腫瘍特異的細胞障害性Tリンパ球を全身的に誘導することができる癌に対するこのアプローチの有用性は制限される。そのような腫瘍はまれである。このアプローチに対する応用可能性の唯一の明確な例は、転移性黒色腫である。しかし、この腫瘍タイプにおいても、遠位反応は遅く、表在性の皮膚転移に限定された。臓器に基づくまたは内臓の腫瘍は反応しなかった。これらの腫瘍は、ほとんど全ての癌関連罹患率および死亡の原因であることから、全身性細胞障害性Tリンパ球は、持続性の全身性の内臓反応または治癒を誘導するために十分ではないように思われる。したがって、ヒト腫瘍の大多数はこのアプローチによる有効性の成功に対して影響を受けない。

【0022】

転移性腫瘍および免疫組織（たとえば、細網内皮細胞）に送達するための血管内投与（すなわち静脈内、動脈内）は、多数の理論的長所を有する。第一に、哺乳動物の体における大多数の腫瘍部位、または全ての腫瘍部位に対するGM-CSF発現ポックスウイルスの送達により、局所腫瘍内効果（感染した腫瘍内の局所でのポックスウイルス複製およびGM-CSF効果による）および腫瘍特異的細胞障害性Tリンパ球誘導の双方による全身性の腫瘍の破壊、ならびに感染腫瘍部位および遠位（初回投与によって直接感染していない腫瘍部位）の双方でのその後の有効性が可能となる。血流を通しての腫瘍にウイルスを送達することによってまた、腫瘍における癌細胞のより均一で広範な感染が可能となる。したがって、本発明者らはここに、多重病巣播種性転移性腫瘍は、GM-CSFを発現する血管内ポックスウイルスによって効果的に処置されうることを提唱する。腫瘍内アプローチに対して影響を受けないであろう多くの癌タイプおよび/または進行期も同様に、おそらく血管内注射アプローチによって処置可能となるであろう。例には、肺、結腸直腸、乳腺、前立腺、脾臓、肝細胞、白血病、リンパ腫、骨髄腫、および黒色腫が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

【0023】

しかし、GM-CSFを発現する血管内ポックスウイルスの安全かつ有効な使用は、当業者によって起こりうる問題によって負の影響を受けると見なされた。第一に、安全性の懸念は有意であった。血管内投与後、多数の正常組織がポックスウイルス感染症に曝露されるであろう。GM-CSFのような強力な前炎症性サイトカインのその後の発現は、おそらく肝臓、

10

20

30

40

50

肺、腎臓、心臓、脳、およびその他のような多数の臓器において有意な炎症が起こると予想されるであろう。さらに、ウイルス血症に対する全身性の曝露はおそらく、敗血症およびその関連する合併症（たとえば、低血圧症）を誘導しうる。たとえば、マウスまたはヒトの脳におけるポックスウイルス感染症は、臨床的に有意な、致死的でさえある脳炎を引き起こしうる。GM-CSF発現は、炎症の増強によりおそらくこの合併症を有意に悪化させうるであろう。

【0024】

第二に、GM-CSF発現を通しての腫瘍特異的CTLの全身性の誘導は、これまで直接腫瘍内注射（たとえば、ワクシニア-GM-CSF、HSV-GM-CSF）を通して、またはGM-CSFを発現させるための自己もしくは同種異系腫瘍細胞のエクスピボ感染／トランスフェクション（たとえば、GVAXアプローチ）の後に皮膚にGM-CSF細胞を注入することを通して局在するGM-CSF発現のみを通して行われた。

10

【0025】

これらの可能性がある欠点にもかかわらず、本発明者らは今では異なる2つのGM-CSF発現ポックスウイルスが静脈内で良好に認容され、播種性腫瘍および転移に対して非常に有効であることを証明した。さらに、GM-CSF発現ポックスウイルスは、静脈内投与後にその非GM-CSF発現対照より原発性腫瘍および肺転移の双方に対して有意に良好な有効性を示した。同様に、このウイルスは、他のウイルスに存在しないvgf遺伝子におけるさらなる欠失にもかかわらず、同等のウイルス（Wyethワクチン株）より原発腫瘍および肺転移の双方に対して有意に良好な有効性を示した。したがって、ヒトGM-CSFを発現するワクシニアの静脈内投与によって、GM-CSFを含まない同じワクシニアに対して有意に良好な有効性が得られ、ヒトGM-CSFを発現するWR株欠失変異体の血管内投与は、GM-CSFを発現する標準的なワクチン株より有意に良好であった。これらのウイルスは、腫瘍を有する（ラットおよびウサギ）および正常動物（ウサギ）の双方に対して静脈内投与後に良好に認容された。処置した動物は、体重が減少しなかったが、処置を行わなかった腫瘍を有する動物は、体重が減少した。生存は、静脈内処置後に増加した。血液検査または組織病理学によって有意な臓器毒性を認めなかった。唯一の再現可能な組織病理学的知見は、処置後に認められた多数のリンパ様過形成部位であった（全身性の免疫刺激と一致する）。組織病理学には有意な毒性を認めなかった。したがって、これらのGM-CSF発現ポックスウイルスは、全身の癌に対して非常に有効である用量で良好に認容される。

20

【0026】

I. ポックスウイルス

A. ワクシニアウイルス

ワクシニアウイルスはウイルス学にとって不可解である。ワクシニアウイルスが遺伝子組み換えの産物であるか否か、持続的な連續継代による牛痘ウイルスもしくは天然痘ウイルスに由来する種であるか、または現在は絶滅したウイルスの生存例であるか否かはわからっていない。ワクシニアウイルスは、上腕の皮膚の表層への接種による天然痘ワクチン接種のために用いられた。しかし、天然痘の絶滅により、ワクシニアウイルスによるルーチンのワクチン接種は終了した。ワクシニアに関する最近の関心は、他のウイルスに対する免疫および遺伝子治療のためのベクターとしての可能性がある用途に集中した。

30

【0027】

ワクシニアウイルスは、ポックスウイルス科、コードポックスウイルス亜科およびオルトポックスウイルス属のメンバーである。ビリオンは、RNAポリメラーゼ、初期転写因子、ポリ(A)ポリメラーゼ、キャッピング酵素複合体、RNA(ヌクレオシド-2')メチルトランスフェラーゼ、ヌクレオシド三リン酸ホスホヒドロラーゼII、ニック接合酵素、DNAトポイソメラーゼ、およびタンパク質キナーゼを含む。ゲノムは、10 kBの逆方向末端反復を特徴とする180,000塩基対に及ぶ二本鎖DNAである。ウイルスは、細胞質膜とのpH非依存的融合を通して、または低pH依存的エンドソーム経路によって細胞に入る。

40

【0028】

B. 他のポックスウイルス

50

オルトポックスウイルス属は、チョルドポックスウイルス亜科の他のメンバーより比較的均一であり、これには、ワクシニアウイルス、痘瘡ウイルス（天然痘の原因物質）、牛痘ウイルス、バッファロー痘ウイルス、サル痘ウイルス、マウス痘ウイルス、およびウマ痘ウイルス種と共にその他が含まれる、異なるが近縁の11種が含まれる（Moss、1996を参照されたい）。本明細書において記述されるように本発明の特定の態様は、オルトポックスウイルス属の他のメンバーのみならず、バラポックスウイルス、アビポックスウイルス、カプリポックスウイルス、レポリポックスウイルス、スイポックスウイルス、モルシポックスウイルス、およびヤタポックスウイルス属に拡大してもよい。ポックスウイルス科の属は、一般的に、実験動物における中和および交叉反応性を含む血清学的手段によって定義される。オルトポックスウイルス属の様々なメンバーと共にチョルドポックスウイルス亜科の他のメンバーは、宿主生物の免疫応答に拮抗するために免疫調節分子を利用し、その例を本明細書において提供する。このように、本明細書に記述の本発明は、ワクシニアウイルスに限定されないが、多くのウイルスに応用可能でありうる。

10

【0029】

II. ポックスウイルスの操作

ウイルスは、しばしばインターフェロン（-、-、-）および腫瘍壊死因子-（TNF）（Moss、1996）のような免疫調節分子によって不活化、阻害、または排泄される。宿主組織および炎症免疫細胞はしばしば、ウイルス感染に反応してこれらの分子を分泌する。これらの分子は、直接の抗ウイルス作用を有しうる、および／または炎症細胞およびリンパ球の動員および／または活性化を通して間接的な作用を有しうる。これらの免疫学的排泄メカニズムの重要性を考慮すると、ウイルスは、これらのサイトカイン／ケモカインおよびインターフェロンの誘導および／または機能を阻害する遺伝子産物の発現に関与する。例えば、ワクシニアウイルス（VV；およびいくつかの他のポックスウイルス）は、CCケモカイン（例えば、RANTES、エオタキシン、MIP-1-）に結合して阻害する分泌型タンパク質vCKBP（B29R）をコードする（Alcamiら、1998）。いくつかのVV株も同様に、TNFに結合して不活化する分泌型ウイルスタンパク質（例えば、リスターA53R）を発現する（Alcamiら、1999）。ほとんどのポックスウイルス株は、インターフェロン-／（例えば、B18R）またはインターフェロン-（B8R）に結合してその機能を阻害する分泌型蛋白質をコードする遺伝子を有する。vC12Lは、IL-18によるIFN-およびNK細胞／細胞障害性T細胞活性化の誘導を妨害するIL-18結合タンパク質である。

20

【0030】

ほとんどのポックスウイルスのビルレンスに関する研究はマウスにおいて行われている。多くのしかし全てではないこれらのタンパク質がマウスにおいて活性である（例えば、B18Rは活性ではない）。これらのタンパク質が、標的サイトカインのマウス版に対して活性である状況において、これらの遺伝子の欠失によってビルレンスの減少が起こり、これらの遺伝子が欠失しているまたは機能的変異を有するVV変異体では安全性が増加する。さらに、これらの変異体に対する炎症／免疫応答およびウイルス排泄はしばしば、阻害タンパク質を発現する親ウイルス株と比較して増加する。例えば、ポックスウイルス分泌タンパク質のT1/35 kDaファミリー（ケモカイン結合／阻害タンパク質）の欠失によって、ウイルス感染組織への白血球浸潤の顕著な増加が起こりうる（Grahamら、1997）。VVにおけるvC12L遺伝子の欠失によって、マウスにおける鼻腔内投与後のウイルス力価／毒性の減少が起こる；さらに、NK細胞および細胞障害性Tリンパ球活性は、IFN-の誘導と共に増加する（Smithら、2000）。粘液腫ウイルスT7遺伝子（IFN-および広範囲のケモカインに結合することができる）の欠失によって、毒性モデルにおいてビルレンスの減少および有意に増加した組織炎症／浸潤が起こる（Uptonら、1992；Mossmanら、1996）。粘液腫ウイルスではM-T2遺伝子の欠失によっても、ウサギモデルにおいてビルレンスの減少が起こった（Uptonら、1991）。B18R抗インターフェロン-／遺伝子産物の欠失によっても、IFN媒介排泄に対するウイルス感受性の増強が起こり、正常組織における力価は減少し、ビルレンスは減少する（Symonsら、1995；Colamoniciら、1995；Alcamiら、2000）。要約すると、これらのウイルス遺伝子産物は、抗ウイルス免疫応答およびウイルス感染組織への

30

40

50

炎症細胞浸潤を減少させるように機能する。欠失 / 変異によるタンパク質機能の喪失によって、宿主組織におけるビルレンスの減少および / またはウイルスの前炎症特性の増加が起こる。参照により本明細書に組み入れられるPCT/US2003/025141を参照されたい。

【0031】

サイトカインおよびケモカインは、強力な抗腫瘍効果を有しうる (Vicariら、2002 ; Holmeyら、2002)。これらの作用は、腫瘍細胞自身に直接作用しうる (例えば、TNF) 、またはそれらは非癌様細胞に対する作用によって間接的となりうる。後者の例はTNFであり、これは腫瘍関連血管に対して毒性を引き起こすことによって抗腫瘍効果を発揮しうる ; これによって腫瘍への血流が失われた後腫瘍の壊死が起こる。さらに、ケモカインは、好中球、好酸球、マクロファージおよび / またはリンパ球のような免疫エフェクター細胞を動員するように (場合によっては活性化するように) 作用しうる。これらの免疫エフェクター細胞は、多くのメカニズムによって腫瘍の破壊を引き起こしうる。これらのメカニズムには、抗腫瘍サイトカイン (例えば、TNF) の発現、fasリガンドの発現、パーフォリンおよびグランザイムの発現、ナチュラルキラー細胞の動員等が含まれる。炎症反応によって、最終的に全身性の腫瘍特異的免疫の誘導が起こりうる。最後に、これらのサイトカイン (例えば、TNF) またはケモカインの多くが、化学療法および / または放射線療法と相乗作用して腫瘍を破壊することができる。

10

【0032】

これらの免疫刺激タンパク質の組換え型版の臨床的に有効な全身投与は、1) 全身投与により重度の毒性が誘導されるため ; および2) 局所浸潤および抗腫瘍効果を刺激するためには腫瘍内の局所発現が必要であるために、現実的ではない。全身循環におけるレベルを最小限にしながら、腫瘍塊の内部でこれらの分子の高い局所濃度を得るアプローチが必要である。ウイルスは、その有効性を増強する試みでサイトカインまたはケモカイン遺伝子を発現するように操作することができる。複製選択的ベクターからのこれらの遺伝子の発現は、非複製ベクターからの発現に対して長所を有する可能性がある。複製ウイルスからの発現によって、腫瘍塊内により高い局所濃度が得られうる ; さらに複製するウイルスは、前炎症環境において腫瘍細胞の破壊 / 腫瘍細胞溶解および腫瘍抗原の放出を通して抗腫瘍免疫を誘導するために役立つ。しかし、このアプローチにはいくつかの制限がある。高い局所濃度で発現されれば毒性となりうる遺伝子を有する複製コンピテントウイルス (腫瘍選択的であるにもかかわらず) が環境に放出される可能性から、重篤な安全性の懸念が生じている。したがって、そのゲノムから強力な前炎症性遺伝子を発現するウイルスは、治療患者および一般大衆に対して安全性のリスクを提起する。腫瘍のターゲティング、これらの遺伝子を発現する複製選択的ウイルスを用いても、遺伝子発現が正常組織に起こりえて毒性が生じる。さらに、大きさの制限から、アデノウイルスのようなウイルスからの多数および / または大きい遺伝子の発現が阻害される ; これらの分子は併用すると明確により有効に作用するであろう。最後に、用いられている腫瘍細胞溶解性ウイルスの多くは、抗炎症性タンパク質を発現し、したがって、これらのウイルスは、感染した腫瘍塊における前炎症環境の誘導と拮抗するであろう。その結果、抗腫瘍免疫の誘導、抗血管作用および化学療法 / 放射線療法感作を阻害するであろう。

20

30

【0033】

40

A. ワクシニアウイルス

1. インターフェロン調節ポリペプチド

インターフェロン- / - は、いくつかのメカニズムを通してウイルス複製を遮断する。インターフェロン- は、直接のウイルス阻害作用はより弱いが、いくつかのメカニズムを通して細胞媒介免疫の強力な誘導物質である。ウイルスは、インターフェロンの抗ウイルス作用に拮抗できる分泌型遺伝子産物を発現するように進化した。例えば、ワクシニアウイルス (および他のポックスウイルス) は、インターフェロン- および / - にそれぞれ結合する分泌型蛋白質B8RおよびB18Rをコードする (Smithら、1997 ; Symonsら、1995 ; Alcamiら、2000)。インターフェロン誘導を減少させるワクシニア遺伝子産物のさらなる例は、インターフェロン- 誘導因子であるIL-18の活性化を阻害するカスパーゼ-1阻

50

害剤B13Rである。インターフェロン調節ポリペプチドには、ワクシニアウイルスのコペンハーゲン株のような、他のウイルス株ではB19Rと呼ばれることがあるB18R；B8R；B13R；vC12L；A53R；E3Lおよび類似の活性または特性を有する他のウイルスポリペプチドが含まれるがこれらに限定されない。IFN調節ポリペプチドは、選択的にIFN および / または経路を調節するポリペプチド（B18R、B8R、B13R、またはvC12Lのような）、およびIFN 経路を調節するポリペプチド（例えば、B8R、B13R、またはvC12L）の非排他的分類に分類してもよい。

【0034】

癌細胞はしばしば、インターフェロンの作用に対して抵抗性である。多くのメカニズムが関係している。これらには、癌細胞の共通の特徴であるrasシグナル伝達経路の活性化（例えば、ras変異、上流の増殖因子受容体の過剰発現 / 変異等）によってPKR阻害が起こるという事実が含まれる。さらに、リンパ球はしばしば腫瘍塊において、IL-10産生および腫瘍細胞によるfas-L発現を含む多様なメカニズムによって阻害される。リンパ球は、主なインターフェロン- γ 産生源であることから、リンパ球の阻害によって、腫瘍におけるインターフェロン- γ 産生の減少が起こる。したがって、腫瘍塊は、インターフェロンの作用が届かない聖域となる傾向がある。例えば、IFN- γ は、MHCクラスI関連抗原の提示を増加させうる；これによって、腫瘍細胞のより効率的なCTL媒介殺細胞が可能となるであろう。例えば、IFN- γ / IL-12は、腫瘍塊内の血管新生を遮断して、それによって腫瘍の増殖を遮断することができる。

【0035】

2. 補体制御ポリペプチド

ウイルス病原体の排泄に関する主なメカニズムは、補体依存的メカニズムによって宿主細胞内の感染細胞または生物内のビリオンを殺すことである。感染細胞は死滅するため、感染ウイルスを產生し続けることは不可能である。さらに、アポトーシスの際に、DNAを分解する細胞内酵素が放出される。これらの酵素によってウイルスDNAの分解およびウイルスの不活化が起こりうる。アポトーシスは、活性化された補体の結合および補体膜攻撃複合体を含む多数のメカニズムによって誘導することができる。ワクシニアのようなポックウイルスは、ウイルスおよび / またはウイルス感染細胞の補体媒介排泄に拮抗することができる遺伝子産物を発現するように進化した。これらの遺伝子はそれによってアポトーシスを阻害して、補体依存的メカニズムによってウイルス排泄を阻害し、このように、ウイルス感染を進行させて、ウイルスのビルレンスを増加させることができる。例えば、ワクシニアウイルス補体制御タンパク質（VCP；例えばC21L）は、補体媒介殺細胞および / またはウイルス不活化の防止において役割を有する（Isaacsら、1992）。VCPはまた、その発現によってウイルス感染組織への白血球の浸潤が減少することから、抗炎症作用も有する。補体制御ポリペプチドには、C3LまたはC21Lとしても知られるVCPが含まれるがこれらに限定されない。

【0036】

癌細胞はしばしば、細胞の抗補体タンパク質を過剰発現する；これによって癌細胞は補体の攻撃 ± 腫瘍特異的抗体から生き延びることができる（Caragineら、2002；Durrantら、2001；Andohら、2002）。したがって、補体媒介殺細胞に対するその固有の抵抗性のために腫瘍細胞を選択的に標的とする物質は、広範なヒト癌において選択性およびおそらく有効性を有するであろう（Durrantら、2001）。さらに、癌細胞の顕著な特徴の一つまたはそれ以上は、正常なアポトーシスマカニズムの喪失である（Grossら、1999）。アポトーシスに対する抵抗性は、発癌を促進するのみならず、免疫療法、化学療法、および放射線療法剤を含む抗腫瘍物質に対する抵抗性を促進する（Eliopoulosら、1995）。アポトーシスの阻害はプロアポトーシスマ分子機能（例えば、bax）の喪失、抗アポトーシスマ分子（例えば、bcl-2）のレベル / 機能の増加、および最終的に補体感受性の喪失によって媒介されうる。

【0037】

3. TNF調節ポリペプチド

10

20

30

40

50

ウイルス病原体の排泄に関する様々なメカニズムの一つは、上記のようにアポトーシスの誘導によって宿主内で感染細胞を殺すことである。アポトーシスは、細胞内シグナル伝達カスケードの誘因となる細胞TNF受容体に対するTNFおよびリンフォトキシン-_α (LT_α) の結合を含む、多数のメカニズムによって誘導することができる。TNF受容体の活性化は、免疫および炎症反応の調節と共にアポトーシス細胞死の誘導において機能する (Wallachら、1999)。

【0038】

いくつかのワクシニアウイルス株を含む様々な株のポックスウイルスは、ウイルスおよび／またはウイルス感染細胞のTNF媒介排泄に拮抗することができる遺伝子産物を発現するように進化した。これらの遺伝子によってコードされるタンパク質は、細胞外TNFに結合してこれを分離することによってTNFの前炎症性およびアポトーシス誘導活性を迂回し、その結果ウイルス排泄の阻害が起こる。ウイルスが排泄されないために、ウイルス感染症が進行し、このようにウイルスのビルレンスは増加する。ポックスウイルス科の様々なメンバーが分泌型ウイルスTNF受容体 (vTNFR) を発現する。例えば、粘液腫 (T2タンパク質)、牛痘、およびリスターのようなワクシニアウイルス株のような、vTNFRをコードするいくつかのポックスウイルスは、一つまたはそれ以上のCrmB、CrmC (A53R)、CrmD、CrmE、B28Rタンパク質および／またはその同等物をコードする可能性がある。これらのvTNFRは、TNF媒介殺細胞および／またはウイルスの不活化の防止において役割を有する (Saraiya and Alcamini、2001)。TNF調節ポリペプチドには、A53R、B28R (このタンパク質は存在するが、ワクシニアウイルスのコペンハーゲン株では不活性である可能性がある) および類似の活性または特性を有する他のポリペプチドが含まれるがこれらに限定されない。

10

20

20

【0039】

癌細胞の顕著な特徴の一つは、それによってTNFの抗癌活性に対する感受性のような、増殖調節に関する多くの分子メカニズムに対する感受性の喪失が起こる可能性がある異常な遺伝子発現である。このように、ウイルスの免疫調節メカニズムは、腫瘍の微小環境におけるウイルスの増殖にとって必要でない可能性がある。

【0040】

4. セリンプロテアーゼ阻害剤

ウイルス病原体の排泄に関する主なメカニズムは、宿主における感染細胞のアポトーシスの誘導である。感染細胞は死滅するため、感染ウイルスを產生し続けることは不可能である。さらに、アポトーシスの際に、DNAを分解する細胞内酵素が放出される。これらの酵素はウイルスDNAの分解およびウイルスの不活化を引き起こしうる。アポトーシスは、サイトカイン (例えば、腫瘍壞死因子) の結合、細胞障害性Tリンパ球によるグランザイム产生、またはfas-リガンド結合を含む多数のメカニズムによって誘導することができる；カスパーーゼ活性化は、最終的に一般的なアポトーシス経路の重要な部分である。ウイルスは、fasリガンドまたは腫瘍壞死因子 (TNF) /TNF関連分子 (例えば、アデノウイルスのE3 10.4/14.5、14.7遺伝子 (Woldら、1994)；アデノウイルスのE1B-19 kD (Boydら、1994)；牛痘ウイルスからのcrmA；ワクシニアウイルスからのB13R) を含むそのような分子によって誘導される細胞内シグナル伝達カスケードに拮抗することができる遺伝子産物を発現するように進化した (Dobbelsteinら、1996；Kettleら、1997)。これらの遺伝子産物は、アポトーシス誘導分子によるアポトーシスを阻害して、このように抗ウイルス性のアポトーシス誘導サイトカイン、fas、グランザイム、または他のアポトーシス刺激物質の存在にもかかわらず、ウイルス複製を進行させる。

30

40

40

【0041】

VV SPI-2/B13Rは、牛痘CrmAと非常に相同である；SPI-1 (VV) は、CrmAと弱く相同である (Dobbelsteinら、1996)。これらのタンパク質はセルピン (セリンプロテアーゼ阻害剤) であり、CrmAおよびSPI-2はいずれも、様々な型のアポトーシスの防止において役割を有する。インターロイキン-1 変換酵素 (ICE) およびグランザイムの阻害は、例えば感染細胞のアポトーシスを妨害しうる。これらの遺伝子産物はまた、抗炎症作用も有する。それらは、IL-18の活性化を阻害することができ、これは次にIFN-_γ のIL-18媒介誘導を

50

減少させるであろう。細胞媒介免疫に及ぼすIFN- γ の免疫刺激作用はそれによって阻害される(Kettleら、1997)。SPIには、B13R、B22R、および類似の活性または特性を有する他のポリペプチドが含まれるがこれらに限定されない。

【0042】

癌細胞の顕著な特徴の一つは、正常なアポトーシスメカニズムの喪失である(Grossら、1999)。アポトーシスに対する抵抗性は、発癌を促進するのみならず、免疫療法、化学療法、および放射線療法剤を含む抗腫瘍物質に対する抵抗性を促進する(Eliopoulosら、1995)。アポトーシスの阻害は、プロアポトーシス分子機能(例えば、bax)の喪失、または抗アポトーシス分子(例えば、bcl-2)のレベル/機能の増加によって媒介されうる。

10

【0043】

5. IL-1 調節ポリペプチド

IL-1は、局所そして全身性に作用する生物活性因子である。IL-1 α とIL-1 β とのあいだの機能的な差はごくわずかであることが記述されている。IL-1の多数の生物活性の例は、IL-1を記述する際の多くの異なる頭字語によって示されている。IL-1は、ブタ細胞において不活性であるヒトIL-1を例外として種特異性を示さない。IL-1の生物活性のいくつかは、ACTH(コルチコトロピン)、PGE2(プロスタグランジンE2)、PF4(血小板因子-4)、CSF(コロニー刺激因子)、IL-6、およびIL-8を含む他のメディエータの合成の誘導によって間接的に媒介される。IL-1の合成は、TNF- α 、IFN- α 、IFN- β およびIFN- γ を含む他のサイトカインによって誘導される可能性があり、同様に細菌エンドトキシン、ウイルス、マイトケンおよび抗原によって誘導される可能性がある。IL-1の主な生物活性は、T-ヘルパー細胞の刺激であり、これはIL-2を分泌して、IL-2受容体を発現するように誘導される。ウイルス感染マクロファージは、大量のIL-1阻害剤を産生し、これはT細胞成熟欠損患者における日和見感染および細胞のトランスフォーメーションを支持する可能性がある。IL-1は、B細胞に直接作用して、その増殖および免疫グロブリンの合成を促進する。IL-1はまた、B細胞をIL-5に対して反応性にするプライミング因子の一つとしても機能する。IL-1は、NK細胞および線維芽細胞、胸腺細胞、神経膠芽細胞の増殖および活性化を刺激する。

20

【0044】

ウイルスタンパク質によるIL-1の合成の遮断は、IL-1によって誘発される全身性の抗ウイルス反応を抑制または減少させるウイルスの戦略であると見なされる。B15Rと類似の活性を有するIL-1の機能を有效地に遮断する結合タンパク質もまた、牛痘ウイルスの遺伝子によってコードされることが判明した。ワクシニアウイルスはまた、サイトカインの受容体のような挙動を示すB8Rと呼ばれるもう一つのタンパク質をコードする(Alcami and Smith、1992；Spriggsら、1992)。IL-1調節ポリペプチドには、B13R、B15R、および類似の活性または特性を有する他のポリペプチドが含まれるがこれらに限定されない。

30

【0045】

癌細胞の顕著な特徴の一つは、異常な遺伝子発現であり、これによって、IL-1の抗癌活性に対する感受性のような増殖調節に関する多くの分子メカニズムに対する感受性の喪失が起こる可能性がある。このように、ウイルスの免疫調節メカニズムは、腫瘍の微小環境においてウイルスの増殖にとって必要ではない可能性がある。

40

【0046】

6. EEV型

ウイルスは伝播して腫瘍部位に転移し、さらに感染した固形腫瘍塊内でも伝播するが、一般的に非効率的である(Heiseら、1999)。静脈内投与では典型的に、抗体(例えば、アデノウイルス)(Kayら、1997)および/または補体系(例えば、HSV)(Ikedaら、1999)によるウイルスの排泄または不活化が起こる。これらの免疫媒介メカニズムの他に、これらのウイルスの生体内分泌によって、腫瘍塊よりむしろ正常組織内で静脈内ウイルスの大多数が沈着する。例えば、静脈内のアデノウイルスは、主に肝臓および脾臓にたどり着く；免疫欠損マウスにおいても、腫瘍内に沈着するのは投与されたウイルスの0.1%未

50

満である(Heiseら、1999)。したがって、免疫欠損マウスの腫瘍モデルにおいて、極端に高い相対量によって何らかの控えめな抗腫瘍有効性が証明されうるもの、静脈内輸送は極めて非効率的であり、有効性を有意に制限する。

【0047】

ワクシニアウイルスは、 固形腫瘍内で複製能を有し壊死を引き起こす。さらに、チミジンキナーゼ欠失変異体は、腫瘍塊および卵巣組織に感染して、マウス腫瘍モデル系において選択的にマーカー遺伝子を発現する(Gnantら、1999)。しかし、これらの研究は一般的に、5日以上後でのマーカー遺伝子発現に基づいて腫瘍のターゲティングを決定したため、ウイルスが腫瘍 / 卵巣組織に選択的に沈着する、そこで遺伝子を発現する、または複製するか否かは不明である(Puhmannら、2000)。メカニズムにかかわりなく、さらなるトランスジーンを有しないこのウイルスの抗腫瘍有効性は、統計学的に有意ではなかった(Gnantら、1999)。対照的に、腫瘍内ウイルス注射は、有意な抗腫瘍有効性を示した(McCartら、2000)。したがって、静脈内注射の有効性は、腫瘍への静脈内輸送が改善されれば改善することができるであろう。

10

【0048】

ワクシニアウイルスは、細胞において複製して、細胞内ウイルス(IMV、細胞内成熟ウイルス；IEV、細胞内エンベロープウイルス)および細胞外ウイルス(EEV、細胞外エンベロープウイルス；CEV、細胞関連細胞外ウイルス)(Smithら、1998)の双方を産生する。IMVは、野生型ワクシニアウイルス株による複製後のウイルス量の約99%を占める。このウイルス型は環境において比較的安定であり、したがって個体間での伝播に主に関与している；対照的にこのウイルスは、細胞からの放出が非効率的であることおよび補体および/または抗体による中和に対する感受性のために、感染宿主内では効率的に伝播しない。これとは対照に、EEVは細胞外環境に放出されて、典型的にウイルス量の約1%を占めるに過ぎない(Smithら、1998)。EEVは、感染宿主内でのウイルス伝播に関与して、宿主外では比較的容易に分解される。重要なことは、EEVは、血流内でその中和を阻害するいくつかのメカニズムを開発した点である。第一に、EEVは、補体に対して比較的抵抗性である(Vanderplasschenら、1998)；この特徴は、その外膜への補体の宿主細胞阻害剤の組み入れ、プラスワクシニアウイルス補体制御タンパク質(VCP)の局所細胞外環境への分泌による。第二に、EEVは、IMVと比較して中和抗体の作用に対して比較的抵抗性である(Smithら、1997)。EEVはまた、IMV(細胞死の際 / 後に限って放出される)より感染後早期の時点(例えば、4~6時間)に放出され、したがって、EEV型の伝播はより速い(Blascoら、1993)。

20

【0049】

しかし、残念なことに、野生型ワクシニア株は、比較的ごく少量のEEVを産生するに過ぎない。さらに、ワクシニアウイルスによる治療(すなわちウイルスの投与量)は、今日まで細胞内ウイルス型に限定されていた。標準的なワクシニアウイルス(VV)の製造および精製技法によってEEVの不活化が起こり(Smithら、1998)、そしてウイルスを作製するために、ヒト以外の細胞株がしばしば用いられている；ヒト以外の細胞からのEEVは、補体媒介排泄から保護されないであろう(EEVによって細胞から獲得された補体阻害タンパク質は、種に限定された作用を有する)。したがって、ワクシニアウイルスの有効性は、中和に対するIMV型の相対的感受性によって、および固形腫瘍塊内のその非効率的な伝播によって限定されている；この伝播は典型的に、細胞から隣接する細胞へと起こる。血流またはリンパ管のいずれかを通しての遠位腫瘍塊へのIMVの伝播も同様に非効率的である。

30

【0050】

したがって、ワクシニアウイルスのまれなEEV型は、本来獲得した特徴を有し、そのために今まで患者に用いられるワクシニアウイルス型(IMV)より優れている；EEVは、固形腫瘍の内部を限局的に、そして局所または遠位腫瘍部位に迅速かつ効率的に伝播するように最適にされている。EEVは、補体の作用に対して比較的抵抗性であることから、同じ種からの細胞タイプにおいて増殖させた場合に、このウイルス型は安定性の増強を有し、

40

50

血管内投与後の血液においてワクシニアウイルスの標準的な調製物（ほぼ専らIMVを含む）より長く活性を保持するであろう（Smithら、1998）。EEVは、抗体媒介中和に対して抵抗性であることから、このウイルス型は、ワクシニアウイルスの標準的な調製物（ほぼ専らIMVを含む）より静脈内投与後の血液において長く活性を保持するであろう（Vanderplasschenら、1998）。この特徴は、中和抗体レベルが増加した後の反復投与の場合には特に重要であろう；承認された全ての抗癌治療は反復投与を必要とする。したがって、ワクシニアおよび他のポックスウイルスのEEV型によって、血流を通して治療ウイルスおよびその遺伝子積載物の腫瘍への優れた輸送が得られるであろう。これによって、標準的なポックスウイルス調製物と比較して全身有効性の増強が得られるであろう。最後に、一般大衆の個人に対する伝播のリスクは、EEVが体外では極めて不安定であることから有意に減少するはずである。ウイルスのEEV型の調節に関与するポリペプチドには、A34R、B5R、およびポックスウイルスのEEV型の産生に影響を及ぼす様々な他のタンパク質が含まれるがこれらに限定されない。A34Rのコドン151でのリジンからアスパラギン酸への変異（K151D変異）により、A34Rタンパク質はEEV型を細胞膜に束縛する能力が低下する。B5Rは、補体に結合する可能性があるEEV膜結合ポリペプチドである。A43Rを全て欠失させることによって、EEV放出の増加が起こる可能性があるが、ウイルスの感染性は顕著に減少し、一方K151D変異は放出されたウイルスの感染性を維持しながらEEV放出を増加させる。B5Rは、VCP（抗補体）と配列相同意を有するが、補体の阻害はまだ証明されていない。

10

【0051】

簡単に説明すると、強化EEV型を同定する一つの方法は以下の通りである。EEVを氷冷MEMにおいて希釈して、氷冷MEMにおいて希釈した（血清の最終希釈、10倍、20倍、または30倍）活性型または熱不活化（56℃、30分、対照）血清と混合する（容積比1:1）。7℃で75分間インキュベートした後、試料を氷中で冷却して、mAb 5B4/2F2を新鮮なEEV試料に加えて如何なる混入物（IMVおよび破壊されたEEV）も中和する。次に、ビリオンをRK13細胞に氷中で1時間結合させて、補体および未結合のビリオンを洗浄して、2日後にブラーク数を係数する。ブラーク数がより多ければ、補体に対する抵抗性はより大きくなる。参照として本明細書に組み入れられる、Vanderplasschenら（1998）。ワクシニアウイルスのEEV型の単離を記述する例としての方法は、Blascoら、1992（参照として本明細書に組み入れられる）に認められうる。

20

【0052】

7. 他のポリペプチド

他のウイルス免疫調節ポリペプチドには、免疫応答の他のメディエータに結合しておよび/または免疫応答に関連した分子経路を調節するポリペプチドが含まれてもよい。例えば、B29R（このタンパク質は存在するが、ワクシニアウイルスのコベンハーゲン株では不活性である可能性がある）、C23L、vCKBP、A41Lおよび類似の活性または特性を有するポリペプチドのようなケモカイン結合ポリペプチド。ウイルスEGF様増殖因子であるワクシニアウイルス増殖因子（例えば、C11L）のような他のワクシニアウイルスタンパク質も同様に、本発明のいくつかの態様において変更の標的となる可能性がある。ウイルス調節因子として分類されてもよい他のポリペプチドには、B7R、N1L、またはその活性もしくは特性がポックスウイルスのビルレンスを増加させる他のポリペプチドが含まれるがこれらに限定されない。

30

【0053】

8. ワクシニアウイルス誘導細胞融合

本発明の特定の態様において、A56RまたはK2Lコード核酸遺伝子の変更、欠失、または変異によって、VV感染症によって誘導される細胞細胞融合または融合体形成が起こる可能性がある。ワクシニアウイルス誘導細胞融合は典型的に、腫瘍内ウイルス伝播によりVVの抗腫瘍効率を増加させるであろう。細胞融合による腫瘍内のウイルス伝播によって、典型的に、ウイルスは中和抗体および免疫応答を回避することができるであろう。隣接する非感染細胞（すなわち、「傍観者作用」）の殺細胞および感染は、これらの遺伝子の一つまたは双方において変異を有するVVではより効率的となる可能性があり、それによって改善

40

50

された局所抗腫瘍効果が得られる可能性がある。

【0054】

B. ウィルスの増殖

ワクシニアウイルスは、参考として本明細書に組み入れられる、Ausbelら、「Current Protocols in Molecular Biology」、16.15.1～16.18.10頁においてEarlおよびMossによって記述された方法を用いて増殖させてもよい。

【0055】

III. タンパク質様および核酸組成物

本発明は、患者における癌細胞および癌の試験および治療において都合がよいポックスウイルスに関する。これは、ウイルスが癌細胞に対して用いるために所望の特性を有するが、非癌細胞に対しては毒性が低い、または非毒性となるように、野生型と比較して一つまたはそれ以上の変異を有するように構築されていてもよいワクシニアウイルスに関する。そのようなポックスウイルスは、参考により本明細書に組み入れられるPCT/US2003/025141に記載されている。下記の教示は、例として、本発明の方法および組成物を実行するための様々なプロトコールを提供する。それらは、組換えDNA技術を用いて変異ウイルスを作製するためのバックグラウンドを提供する。

10

【0056】

A. タンパク質様組成物

特定の態様において、本発明は、一つまたはそれ以上の機能的ポリペプチドまたはタンパク質を欠損していてもよいワクシニアウイルスを作製すること、および／または感染性のEEV型のようなウイルスの特定の型をより多く放出する能力を有するポックスウイルスを產生することに関する。他の態様において、本発明は、ポックスウイルスに関し、および薬学的に許容される製剤の一部としての蛋白質様組成物と併用してそれらを利用するこ²⁰とに関する。

20

【0057】

本明細書において用いられるように、「タンパク質」または「ポリペプチド」とは、少なくとも一つのアミノ酸残基を含む分子を指す。いくつかの態様において、タンパク質またはポリペプチドの野生型版が用いられるが、本発明の多くの態様においてウイルスタンパク質またはポリペプチドは、存在しないかまたはウイルスが患者における癌細胞または癌の治療にとってより有用となるように改変されている。上記の用語は本明細書において互換的に用いられる可能性がある。「改変蛋白質」または「改変ポリペプチド」は、野生型蛋白質またはポリペプチドに関してその化学構造が改変されているタンパク質またはポリペプチドを指す。いくつかの態様において、改変タンパク質またはポリペプチドは、少なくとも一つの改変活性または機能（タンパク質またはポリペプチドは、多数の活性または機能を有する可能性があることを認識する）を有する。改変された活性または機能は、野生型蛋白質またはポリペプチドにおける活性または機能に関して何らかの他の方法で（特異性のような）低下、減少、消失、増強、改善、または変化させててもよい。改変タンパク質またはポリペプチドは、一つの活性または機能に関して改変されるが、他の局面において野生型活性または機能を保持するように改変されてもよいと特に企図される。または、改変タンパク質は、完全に非機能的であってもよく、またはその同源の核酸配列は、ポリペプチドがもはや全く発現されないように、切断されるように、またはフレームシフトの結果として異なるアミノ酸配列を発現するように改変されていてもよい。

30

【0058】

特定の態様において、改変タンパク質またはポリペプチドの大きさは、アミノ酸残基5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、275、300、325、350、375、4

40

50

00、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、800、825、850、875、900、925、950、975、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1750、2000、2250、2500個またはそれ以上、およびそこから誘導可能な任意の範囲を含んでもよいがこれらに限定されない。ポリペプチドは、切断によってそれらを対応する野生型より短くすることによって変異させてもよいと企図される。

【0059】

本明細書において用いられるように、「アミノ分子」は、当業者に既知である任意のアミノ酸、アミノ酸誘導体、またはアミノ酸模倣体を指す。特定の態様において、タンパク質様分子の残基は連続的であり、アミノ分子残基の配列のあいだには如何なる非アミノ分子も存在しない。他の態様において、配列は一つまたはそれ以上の非アミノ分子部分を含んでもよい。特定の態様において、タンパク質様分子の残基の配列は、一つまたはそれ以上の非アミノ分子部分によって中断されてもよい。

10

【0060】

したがって、「タンパク質様組成物」という用語は、天然に合成されたタンパク質において一般的なアミノ酸20個の少なくとも一つまたは少なくとも一つの改変もしくは珍しいアミノ酸を含むアミノ酸配列を含む。

【0061】

蛋白質様組成物は、標準的な分子生物学技術を通してのタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの発現、天然起源からのタンパク質様化合物の単離、またはタンパク質様材料の化学合成を含む、当業者に既知の任意の技術によって作製してもよい。様々な遺伝子に関するヌクレオチドおよびタンパク質、ポリペプチド、およびペプチド配列が、既に開示されており、当業者に既知のコンピューターデータベースにおいて認められる可能性がある。そのような一つのデータベースは国立バイオテクノロジー情報センターのGenBankおよびGenPeptデータベース(www.ncbi.nlm.nih.gov)である。これらの既知の遺伝子のコード領域は、本明細書に開示の技術を用いて、または当業者に既知のように、増幅または発現してもよい。

20

【0062】

1. 機能的局面

本出願がウイルスタンパク質またはポリペプチドの機能または活性に言及する場合、特に明記していない限り、生理的条件でのウイルスタンパク質またはポリペプチドの活性または機能を指すと意味する。例えば、インターフェロン調節ポリペプチドは、少なくとも一つのインターフェロンおよびその活性に直接または間接的に影響を及ぼすポリペプチドを指す。ポリペプチドは、インターフェロンの活性を直接または間接的に誘導、増強、上昇、増加、減少、弱化、低下、阻害、または隠す可能性がある。インターフェロンに直接影響を及ぼす例は、いくつかの態様において、インターフェロンに特異的に結合するインターフェロン調節ポリペプチドを含む。どの分子がこの活性を有するかを決定することは、当業者に周知のアッセイを用いて行ってもよい。例えば、インターフェロンまたはその変種を調節する産物をコードする遺伝子を、そのような遺伝子の移入を有する細胞と比較してインターフェロン活性が誘導されている細胞に移入して、インターフェロン反応の異なるレベルによって、インターフェロン調節機能を有するそれらの分子を同定してもよい。

30

【0063】

調節物質は、インターフェロンコード転写物に結合することによるよう、標的分子経路に関するタンパク質様組成物の発現に影響を及ぼす分子であってもよい。どの分子がインターフェロン、IL-1、TNF、または治療利益を有する他の分子の適した調節物質であるかを決定することは、そのいくつかが本明細書に開示される当業者に周知のアッセイを用いて行ってもよく、例えば、天然のおよび/または組換え型ウイルスタンパク質を用いることが含まれてもよい。

40

【0064】

2. ウイルスポリペプチドの変種

50

本発明のポリペプチドのアミノ酸配列変種は、置換、挿入、または欠失変種となりうる。ウイルスタンパク質をコードする遺伝子における変異は、野生型と比較して、ポリペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500個またはそれ以上の非隣接または隣接アミノ酸に影響を及ぼしてもよい。ワクシニアウイルスによってコードされる様々なポリペプチドは、そのそれが参照として本明細書に組み入れられる、Roselら(1986)、Goebelら(1990)、およびGenBankアクセスション番号NC_001559号を参照して同定される可能性がある。

10

【0065】

欠失変種は、天然または野生型蛋白質の一つまたはそれ以上の残基を欠損する。個々の残基を欠失させることができ、またはドメインの全てもしくは一部(触媒または結合ドメインのような)を欠失させることができる。終止コドンをコード核酸配列に導入して(置換または挿入によって)切断型蛋白質を作製してもよい。挿入変異体は典型的に、ポリペプチドにおいて末端でない点での材料の付加を含む。これには、免疫反応性エピトープまたは単なる一つもしくはそれ以上の残基の挿入が含まれてもよい。融合タンパク質と呼ばれる末端の付加も同様に作製してもよい。

20

【0066】

置換変種は典型的に、タンパク質内での一つまたはそれ以上の部位で一つのアミノ酸をもう一つのアミノ酸に交換することを含み、他の機能または特性を喪失して、または喪失せずに、ポリペプチドの一つまたはそれ以上の特性を調節するように設計してもよい。置換は保存的であってもよく、すなわち一つのアミノ酸が類似の形状および電荷を有するアミノ酸に置換されてもよい。保存的置換は当技術分野で周知であり、例えば、以下の変化が含まれる:アラニンからセリン;アルギニンからリジン;アスパラギンからグルタミンまたはヒスチジン;アスパラギン酸からグルタミン酸;システインからセリン;グルタミンからアスパラギン;グルタミン酸からアスパラギン酸;グリシンからプロリン;ヒスチジンからアスパラギンまたはグルタミン;イソロイシンからロイシンまたはバリン;ロイシンからバリンまたはイソロイシン;リジンからアルギニン;メチオニンからロイシンまたはイソロイシン;フェニルアラニンからチロシン、ロイシンまたはメチオニン;セリンからトレオニン;トレオニンからセリン;トリプトファンからチロシン;チロシンからトリプトファンまたはフェニルアラニン;およびバリンからイソロイシンまたはロイシン。または、置換は、ポリペプチドの機能または活性が影響を受けるように非保存的であってもよい。非保存的置換は典型的に、極性または荷電アミノ酸を非極性または非荷電アミノ酸に置換することおよびその逆のような、一つの残基を化学的に異なる残基に置換することを含む。

30

【0067】

「機能的に同等なコドン」という用語は、本明細書において、アルギニンまたはセリンに関して6個のコドンのような同じアミノ酸をコードするコドンを指すために用いられ、同様に生物学的に同等のアミノ酸をコードするコドンを指す(下記の表1を参照されたい)。

40

【0068】

同様に、アミノ酸および核酸配列には、さらなるN-もしくはC-末端アミノ酸または5'もしくは3'配列のような、さらなる残基が含まれてもよいと理解され、配列が、タンパク質発現が関係する生物タンパク質活性の維持を含む上記の基準を満たす限り、本明細書に開示の配列の一つであると本質的に記載されるであろう。末端配列の付加は、特にコード領域の5'もしくは3'部分のいずれかに隣接する様々な非コード配列が含まれてもよい、また

50

は様々な内部配列、すなわち遺伝子内で起こることがわかっているイントロンが含まれてもよい核酸配列に適用される。

【0069】

(表1) コドン表

アミノ酸			コドン					
アラニン	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
システイン	Cys	C	UGC	UGU				
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU				
グルタミン酸	Glu	E	GAA	GAG				
フェニルアラニン	Phe	F	UUC	UUU				10
グリシン	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
ヒスチジン	His	H	CAC	CAU				
イソロイシン	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
リジン	Lys	K	AAA	AAG				
ロイシン	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
メチオニン	Met	M	AUG					
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU				
プロリン	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG				
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
セリン	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
トレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
バリン	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
トリプトファン	Trp	W	UGG					
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU				20

【0070】

以下は、同等の、または改善された第二世代分子を作製するためにタンパク質のアミノ酸を変化させることに基づく考察である。例えば、特定のアミノ酸は、例えば、抗体の抗原結合領域または基質分子上の結合部位のような構造との相互作用的結合能を認識可能に喪失することなく、タンパク質構造における他のアミノ酸に置換してもよい。タンパク質の生物機能活性を定義するのはタンパク質の相互作用能および特性であることから、特定のアミノ酸置換をタンパク質配列、およびその基礎となるDNAコード配列に行ってもよく、それにもかかわらず、類似の特性を有するタンパク質を產生することができる。このように、下記のようにその生物学的利用率または活性を認識可能に喪失することなく、様々な変更をDNA配列に行ってもよいことは本発明者らによって企図される。表1は、特定のアミノ酸をコードするコドンを示す。

【0071】

そのような変化を作製する場合、アミノ酸のハイドロパシー指数を検討してもよい。相互作用的生物機能をタンパク質に付与する際のハイドロパシーアミノ酸指数の重要性は、当技術分野において一般的に理解されている(Kyte and Doolittle, 1982)。アミノ酸の相対的ハイドロパシー特徴は、得られたタンパク質の二次構造に関与して、次に、他の分子、例えば酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原等とのタンパク質の相互作用を定義することは容認されている。

【0072】

同様に、親水性に基づいて、類似のアミノ酸の置換を有効に行うことができることは、当技術分野において理解されている。参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第4,554,101号は、その隣接するアミノ酸の親水性によって支配されるように、タンパク質の最大の局所平均親水性がタンパク質の生物学的特性に相關することを述べている。米国特許第4,554,101号に詳細に記述しているように、以下の親水性値がアミノ酸残基に割付されている：アルギニン(+3.0)；リジン(+3.0)；アスパラギン酸(+3.0±1)；グルタミン酸(+3.0±1)；セリン(+0.3)；アスパラギン(+0.2)；グルタミン(+0.2)；グリシン(0)；トレオニン(-0.4)；プロリン(-0.5±1)；アラニン(-0.5)；ヒスチジン(-0.5)；システイン(-1.0)；メチオニン(-1.3)；バリン(-1.5)；ロイシン(-1.8)；イソロイシン(-1.8)；チロシン(-2.3)；フェニルアラニン(-2.5)；トリプ

30

40

50

トファン（-3.4）。

【0073】

アミノ酸は、類似の親水性値を有するもう一つのアミノ酸に置換することができ、それでもなお生物学的に同等で免疫学的に同等のタンパク質を產生すると理解される。そのような変化において、その親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、および±0.5以内であるアミノ酸の置換がより特に好ましい。

【0074】

先に概要したように、アミノ酸の置換は一般的に、アミノ酸側鎖の置換の相対的類似性、例えばその疎水性、親水性、電荷、大きさ等に基づいている。前述の様々な特徴を考慮に入れる例としての置換は、当業者に周知であり、これには：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびトレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシンおよびイソロイシンが含まれる。

【0075】

IV. 核酸分子

A. 天然のタンパク質または改変タンパク質をコードするポリヌクレオチド

本発明は、タンパク質またはポリペプチドの全てまたは一部を発現することができる、細胞から単離可能なポリヌクレオチドに関する。本発明のいくつかの態様において、これは、特定の機能的ウイルスポリペプチドを欠損するウイルスを作製するように特異的に変異させたウイルスゲノムに関する。ポリヌクレオチドは、ウイルスアミノ酸配列の全てもしくは一部を含むペプチドもしくはポリペプチドをコードしてもよく、またはそれらがそのようなウイルスポリペプチドをコードしないように、もしくは少なくとも一つの機能もしくは活性が低下、減少もしくは存在しないウイルスポリペプチドをコードするように操作してもよい。組換え型蛋白質は、活性なタンパク質を生じるように発現細胞から精製することができる。ゲノムは、ワクシニアウイルスのコード領域に関する定義と同様に、そのそれが参照として本明細書に組み入れられる、Roselら（1986）、Goebelら（1990）、および／またはGenBankアクセスション番号NC_00159号において認められる可能性がある。

【0076】

本明細書において用いられるように、「DNAセグメント」という用語は、特定の種の全ゲノムDNAを含まずに単離されているDNA分子を指す。したがって、ポリペプチドをコードするDNAセグメントは、野生型、多形、または変異体ポリペプチドコード配列を含むが、なおも全哺乳類またはヒトゲノムDNAから単離された、またはそれらを含まずに精製されたDNAセグメントを指す。「DNAセグメント」という用語に含まれるのは、ポリペプチドまたはポリペプチド、ポリペプチドより小さいDNAセグメント、および例えばプラスミド、コスミド、ファージ、ウイルス等を含む組換え型ベクターである。

【0077】

本出願において用いられるように、「ポックスウイルスポリヌクレオチド」という用語は、全ゲノム核酸を含まずに単離されているポックスウイルスポリペプチドをコードする核酸分子を指す。同様に、「ワクシニアウイルスポリヌクレオチド」は、全ゲノム核酸を含まずに単離されているワクシニアウイルスポリペプチドをコードする核酸を指す。「ポックスウイルスゲノム」または「ワクシニアウイルスゲノム」は、ヘルパーウイルスの存在下または非存在下でウイルス粒子を生じるために宿主細胞に提供されうる核酸分子を指す。ゲノムは、野生型ウイルスと比較して組換えによって変異していくなくてもよい。

【0078】

「cDNA」という用語は、鑄型としてメッセンジャーRNA（mRNA）を用いて調製されたDNAを指すと意図される。ゲノムDNA、またはゲノム、非プロセシングもしくは部分的プロセシングRNA鑄型から重合化されたDNAとは対照的に、cDNAを用いる長所は、cDNAが主に対応するタンパク質のコード配列を含む点である。非コード領域が最適な発現にとって必要で

10

20

30

40

50

ある場合、またはイントロンのような非コード領域がアンチセンス戦略において標的とされる場合のように、完全または部分的ゲノム配列が好ましい場合があつてもよい。

【0079】

同様に、所定の種からの特定のポリペプチドは、わずかに異なる核酸配列を有するが、それにもかかわらず同じタンパク質をコードする天然の変種によって表される可能性があると企図される（上記表1を参照されたい）。

【0080】

同様に、単離または精製野生型または変異体ポリペプチド遺伝子を含むポリヌクレオチドは、野生型または変異体ポリペプチドコード配列および特定の局面において、他の天然に存在する遺伝子またはタンパク質コード配列から実質的に単離されている調節配列を含むDNAセグメントを指す。この局面において、「遺伝子」という用語は、機能的タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドコード単位（適切な転写、翻訳後改変、または局在にとって必要な任意の配列を含む）を指すために単純に用いられる。当業者に理解されるように、この機能的用語には、ゲノム配列、cDNA配列、ならびにタンパク質、ポリペプチド、ドメイン、ペプチド、融合タンパク質、および変異体を発現するまたは発現するように改変されてもよいより小さい遺伝子操作された遺伝子セグメントが含まれる。天然または改変ポリペプチドの全てまたは一部をコードする核酸は、以下の長さのそのようなポリペプチドの全てまたは一部をコードする隣接する核酸配列を含んでもよい：10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、1010、1020、1030、1040、1050、1060、1070、1080、1090、1095、1100、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、9000、10000個またはそれ以上のヌクレオチド、ヌクレオシドまたは塩基対。

【0081】

特定の態様において、本発明は、そのアミノ酸配列において天然のポリペプチドに従う、または本質的に対応する隣接アミノ酸配列を含む野生型または変異体ポックスウイルスポリペプチドまたはペプチドをコードするDNA配列を組み入れる、単離されたDNAセグメントおよび組換え型ベクターに関する。このように、単離されたDNAセグメントまたはDNAセグメントを含むベクターは、例えば、TNF調節物質、またはTNF活性を阻害もしくは減少させるTNF調節ポリペプチドをコードしてもよい。「組換え型」という用語は、ポリペプチドまたは特定のポリペプチドの名称に関連して用いてもよく、これは一般的に、インビトロで操作されている、またはそのような分子の複製産物である核酸分子から產生されたポリペプチドを指す。

【0082】

他の態様において、本発明は、そのアミノ酸配列においてポリペプチドに従うまたは本質的に対応する隣接アミノ酸配列を含むポリペプチドまたはペプチドをコードするDNA配列を組み入れた単離DNAセグメントおよび組換え型ベクターに関する。

【0083】

本発明において用いられる核酸セグメントは、自身のコード配列の長さにかかわらず、その全長がかなり変化してもよいように、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、さらなる制限酵素部位、多クローニング部位、他のコードセグメント等のような他の核酸配列と組み合わせてもよい。したがって、ほぼ如何なる長さの核酸断片も用いてもよいが、全長は好ましくは調製の容易さおよび意図する組換えDNAセグメントプロトコールにおける用途によって制限されると企図される。

【0084】

本発明の核酸構築物は、任意の起源からの完全長ポリペプチドをコードしてもよく、ま

10

20

30

40

50

たはコード領域の転写物が切斷型を表すように、ポリペプチドの切斷型、例えば切斷型ワクシニアウイルスポリペプチドをコードしてもよいと企図される。次に、切斷型転写物を切斷型蛋白質に翻訳してもよい。または、核酸配列は、例えばポリペプチドの精製、輸送、分泌、翻訳後改変を行うために、またはターゲティングもしくは有効性のような治療利益を得るために、さらなる異種コード配列を有する完全長のポリペプチド配列をコードしてもよい。先に考察したように、「異種」が改変ポリペプチドと同じでなくてもよいポリペプチドを指す、タグまたは他の異種ポリペプチドを改変ポリペプチドコード配列に加えてよい。

【0085】

非制限的な例において、B18R遺伝子のような特定の遺伝子と同一または相補的である隣接ヌクレオチド鎖を含む一つまたはそれ以上の核酸構築物を調製してもよい。核酸構築物は、酵母の人工染色体のような核酸構築物の到来が当業者に既知であることを考慮すると、長さが少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、15,000、20,000、30,000、50,000、100,000、250,000、500,000、750,000、少なくとも1,000,000ヌクレオチドであってもよいと共に、染色体の大きさまでおよび染色体の大きさを含む（中間の長さおよび中間の範囲の全てを含む）大きさがより大きい構築物あってもよい。本明細書において用いられるように「中間の長さ」および「中間の範囲」は、引用された値を含むまたはそのあいだの任意の長さまたは範囲（すなわち、そのような値を含むそのあいだの全ての整数）を意味する。10

【0086】

本発明において用いられるDNAセグメントは、生物学的に機能的に同等の改変ポリペプチドおよびペプチドを含み、例えば改変ゲロニン毒素を含む。そのような配列は、核酸配列およびこのようにコードされるタンパク質内で天然に存在することが知られているコドン重複性および機能的同等性の結果として生じる可能性がある。または、置換されるアミノ酸の特性に関する検討に基づいてタンパク質構造の変化が操作される組換えDNA技術を応用することによって、機能的に同等のタンパク質またはペプチドを作製してもよい。ヒトによって設計された変化は、部位特異的変異誘発技術の応用によって、例えばタンパク質の抗原性を改善するために、タンパク質を投与される被験体にインビボでタンパク質の毒性効果を減少させるために、またはタンパク質を含む任意の治療の有効性を増加させるために、導入してもよい。20

【0087】

特定の他の態様において、本発明は、その配列内に、本明細書において同定された（および／または参照として組み入れられた）配列において示されるものからの隣接核酸配列を含む単離DNAセグメントおよび組換え型ベクターに関する。しかし、そのような配列は、その活性が野生型に関して変化しているタンパク質産物を生じるように変異させてよい。

【0088】

同様に、本発明は、これらの同定された配列の特定の核酸およびアミノ酸配列に限定されないと理解されるであろう。したがって、組換え型ベクターおよび単離DNAセグメントには、ポックスウイルスコード領域そのもの、基礎コード領域において選択された変更または改変を有するコード領域が多様に含まれてもよく、またはそれらはそれにもかかわらずポックスウイルスコード領域を含むより大きいポリペプチドをコードしてもよく、もしくは変種アミノ酸配列を有する生物学的機能的同等のタンパク質もしくはペプチドをコードしてもよい。40

【0089】

本発明のDNAセグメントは、生物学的に機能的に同等のポックスウイルスタンパク質およびペプチドを含む。そのような配列は、核酸配列およびこのようにコードされたタンパク質において、天然に存在することが知られているコドン重複性および機能的同等性の結50

果として生じてもよい。または、機能的に同等のタンパク質またはペプチドは、置換されるアミノ酸の特性に関する検討に基づいて、タンパク質構造における変化を操作する組換えDNA技術の応用によって作製してもよい。例えば、タンパク質の抗原性を改善するために、人為的に設計された改変を部位特異的変異誘発技術の応用によって導入してもよい。

【0090】

B. ポックスウイルスポリヌクレオチドの変異誘発

様々な状態において、ポックスウイルスポリヌクレオチドを改変してもよくまたは変異誘発してもよい。改変または変異には、挿入、欠失、点突然変異、逆位等が含まれてもよく、それによって特定の経路または分子メカニズムの調節、活性化、および／または不活性と共に、特に遺伝子産物を非機能的にするような、遺伝子産物の機能、位置、または発現の変化が起こってもよい。用いられる場合、ポックスウイルスの全てまたは一部をコードするポリヌクレオチドの変異誘発は、多様な標準的な変異誘発技法によって行ってもよい(Sambrookら、1989)。変異は、それによって生物の量または構造に変化が起こるプロセスである。変異は、単一の遺伝子、遺伝子のブロックまたは染色体全体のヌクレオチド配列の改変を含みうる。単一の遺伝子における変化は、DNA配列内の一つのヌクレオチド塩基の除去、付加、もしくは置換を含む点突然変異の結果であってもよく、またはそれらは多数のヌクレオチドの挿入もしくは欠失を含む変化の結果であってもよい。

【0091】

変異は、化学的または物理的変異原物質に暴露後に誘発してもよい。そのような変異誘発物質には、電離放射線、紫外線、ならびにその全てが核酸と直接または間接的に(一般的に、いくつかの代謝性の生体還元後)相互作用することができるアルキル化剤および多環式芳香族炭化水素のような多様な化学物質が含まれる。そのような物質によって誘導されたDNA損傷によって、改変されたDNAが複製または修復される場合に塩基配列の改変が起こり、このように変異が起こる可能性がある。変異はまた、特定のターゲティング法を用いて部位特異的にすることができる。

【0092】

1. ランダム変異誘発

a. 挿入変異誘発

挿入変異誘発は、既知のDNA断片の挿入による遺伝子の不活性に基づく。これはいくつかのタイプのDNA断片の挿入を含むことから、生成された変異は一般的に、機能獲得変異よりはむしろ機能喪失変異である。しかし、機能獲得変異を生じる挿入にはいくつかの例がある。挿入的変異は細菌およびショウジョウバエ(Cooleyら、1988)において非常に成功しており、近年トウモロコシ(シロイヌナズナ(Arabidopsis; (Marksら、1991; Konczら、1990); およびキンギョソウ(Sommerら、1990)において強力なツールとなった。

挿入変異誘発は、標準的な分子生物学技術を用いて行ってもよい。

【0093】

b. 化学的変異誘発

化学的変異誘発は、表現型の重症度が異なる広範な変異を発見する能力のような特定の長所を提供し、実施が容易で安価である。多数の化学的発癌物質がDNAにおいて変異を生じる。ベンゾ[a]ピレン、N-アセトキシ-2-アセチルアミノフルオレンおよびアフロトキシンB1は、細菌および哺乳類細胞においてGCからTAのトランスバージョンを引き起こす。ベンゾ[a]ピレンはまた、ATからTAのような塩基置換を生じる。N-ニトロソ化合物は、GCからATの転移を生じる。n-ニトロソウレアへの暴露によるチミンのO4位置でのアルキル化によって、TAからCGの転移が起こる。

【0094】

c. 放射線変異誘発

生体分子は電離放射線によって分解される。入射エネルギーの吸着によって、イオンおよびフリーラジカルの形成が起こり、いくつかの共有結合の切断が起こる。放射線障害に対する感受性は、分子間で、そして同じ分子であっても異なる結晶構造間で非常に多様であるように思われる。これは、総蓄積線量に依存し、同様に線量率にも依存する(フリー

10

20

30

40

50

ラジカルが存在する場合、それらが引き起こす分子の損傷はその本来の拡散速度およびこのようにリアルタイムに依存する）。損傷は、試料を可能な限り低温にすることによって減少および制御される。電離放射線は、一般的に線量率に比例してDNA損傷を引き起こす。

【0095】

本発明において、「電離放射線」という用語は、電離（電子の獲得または喪失）を生じるために十分なエネルギーを有するまたは十分なエネルギーを産生することができる粒子または光子を含む放射線を意味する。例としてのそして好ましい電離放射線はx線である。所定の細胞または特定の分子にとって必要な電離放射線の量は、一般的にその細胞または分子の特性および変異標的の特性に依存する。放射線の有効線量を決定する手段は当技術分野で周知である。

10

【0096】

d. インビトロスキャニング変異誘発

ランダム変異誘発はまた、誤りがちなPCRを用いて導入してもよい。変異誘発率は、鑄型の希釈液を含む多数の試験管においてPCRを行うことによって増加させてもよい。

【0097】

一つの特に有用な変異誘発技術は、タンパク質のコンフォメーションにおける大規模な混乱のリスクを最小限にして、側鎖の相互作用を失う効果を決定することができるよう、多数の残基がアミノ酸アラニンに個々に置換されるアラニンスキャン変異誘発である（Cunninghamら、1989）。

20

【0098】

インビトロスキャニング飽和変異誘発は、以下を含む大量の構造機能情報を得る迅速な方法を提供する：(i) リガンド結合特異性を調節する残基の同定；(ii) 活性を保持するアミノ酸および所定の位置で活性を消失するアミノ酸の同定に基づくりガンド結合のよりよい理解；(iii) 活性部位またはタンパク質サブドメインの全体的な可塑性の評価；(iv) 結合の増加が得られるアミノ酸置換の同定。

【0099】

2. 部位特異的変異誘発

構造に従う部位特異的変異誘発は、タンパク質-リガンド相互作用を解剖して操作するための強力なツールである（Wells、1996；Braistedら、1996）。この技術は、選択されたDNAに一つまたはそれ以上のスクレオチド配列を導入することによって配列変種の調製および試験を提供する。

30

【0100】

部位特異的変異誘発は、所望の変異のDNA配列をコードする特異的オリゴスクレオチド配列のみならず、十数の隣接する非変異スクレオチドを用いる。このようにして、プライマー配列に十分な大きさおよび複雑度が提供されて、横断される欠失接合部に安定な二本鎖を形成する。配列の接合部の両側の約5～10残基が変化している長さが約17～25スクレオチドのプライマーが好ましい。

【0101】

技術は典型的に、一本鎖および二本鎖型の双方で存在するバクテリオファージベクターを用いる。部位特異的変異誘発において有用なベクターには、M13ファージのようなベクターが含まれる。これらのベクターは市販されており、その用途は一般的に当業者に周知である。二本鎖プラスミドも同様に部位特異的変異誘発において日常的に用いられており、これらは対象遺伝子をファージからプラスミドに移入する段階を省略する。

40

【0102】

一般的に、まずその配列内に、所望のタンパク質もしくは遺伝子要素をコードするDNA配列を含む一本鎖ベクターを得て、または二本鎖ベクターの二つの鎖を融解する。次に、合成によって調製された所望の変異配列を有するオリゴスクレオチドプライマーを、ハイブリダイゼーション条件を選択した場合のミスマッチの程度を考慮して、一本鎖DNA調製物とアニールする。ハイブリダイズした産物を、変異を有する鎖の合成を終結させるため

50

に、大腸菌ポリメラーゼIのようなDNAポリメラーゼ酵素に供する（クレノウ断片）。このように、一つの鎖が当初の非変異配列をコードして、第二の鎖が所望の変異を有するヘテロ二本鎖が形成される。このヘテロ二本鎖ベクターを用いて大腸菌細胞のような適当な宿主細胞を形質転換して、変異配列の配置を有する組換え型ベクターを含むクローンを選択する。

【0103】

タンパク質の所定の残基の機能的重要性および情報内容量に関する包括的な情報は、その中で19個全てのアミノ酸置換を調べる飽和変異誘発によって最もよく得られる。このアプローチの短所は、多残基飽和変異誘発のロジスティクスが圧倒的である点である (Warrenら、1996; Zengら、1996; Burton and Barbas、1994; Yeltonら、1995; Hiltonら、1996)。何百もの、そしておそらく何千もの部位特異的変異体を調べなければならない。しかし、改善された技術によって、変異体の産生および迅速なスクリーニングがはるかにより簡単となっている。同様に、「ウォークスルー」変異誘発に関する記述については、米国特許第5,798,208号および第5,830,650号を参照されたい。部位特異的変異誘発の他の方法は、米国特許第5,220,007号；第5,284,760号；第5,354,670号；第5,366,878号；第5,389,514号；第5,635,377号；および第5,789,166号に開示されている。

10

【0104】

C. ベクター

「ベクター」という用語は、外因性の核酸配列が、それが複製されうる細胞に導入するために挿入されうる担体核酸分子を指すために用いられる。核酸配列は、ベクターが導入される細胞に対して異物であること、または配列は細胞における配列と相同であるが、配列が本来認められない宿主細胞内での位置に存在することを意味する「外因性」となりうる。ベクターには、プラスミド、コスミド、ウイルス（バクテリオファージ、動物ウイルス、および植物ウイルス）、および人工染色体（例えば、YAC）が含まれる。当業者は、いずれも参考として本明細書に組み入れられる、Sambrookら（1989）およびAusubelら（1994）に記述される標準的な組換え技術によってベクターを構築するために必要なものを十分に有するであろう。改変ゲロニンのような改変されたポリペプチドをコードする他に、ベクターは、タグまたはターゲティング分子のような非改変ポリペプチド配列をコードしてもよい。そのような融合タンパク質をコードする有用なベクターには、pINベクター（Inouyeら、1985）、ヒスチジン鎖をコードするベクター、および後に精製および分離または切断するためのグルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）可溶性融合タンパク質を作製するために用いられるpGEXベクターが含まれる。ターゲティング分子は、改変ポリペプチドを被験体の体における特定の臓器、組織、細胞、または他の位置に向ける分子である。

20

【0105】

「発現ベクター」という用語は、転写されうる遺伝子産物の少なくとも一部をコードする核酸配列を含むベクターを指す。場合によっては、次にRNA分子をタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに翻訳する。他の場合、これらの配列は、アンチセンス分子またはリボザイムの産生の際に翻訳されない。発現ベクターは、特定の宿主生物において機能的に結合したコード配列の転写およびおそらく翻訳にとって必要な核酸配列を指す多様な「制御配列」を含みうる。転写および翻訳を支配する制御配列の他に、ベクターおよび発現ベクターは、他の機能も同様に供給し、下記の核酸配列を含んでもよい。

30

【0106】

本発明に従って、ワクシニアウイルスはそれ自身発現ベクターである。本発明のワクシニアウイルスを操作するために同様に用いてもよい他のウイルスおよび非ウイルスベクターが存在する。1つの態様において、そのようなベクターは、GM-CSFを発現するように操作されてもよい。

40

【0107】

1. プロモーターおよびエンハンサー

「プロモーター」は、そこで転写の開始および速度が制御される核酸配列の領域である

50

。これは、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子のような、調節タンパク質および分子が結合する可能性がある遺伝子要素を含んでもよい。「機能的に配置された」、「機能的に結合した」、「制御下である」、および「転写制御下である」という句は、その配列の転写開始および／または発現を制御するために核酸配列に関してプロモーターが正確な機能的位置および／または方向に存在することを意味する。プロモーターは、核酸配列の転写活性化に関するシス作用調節配列を指す、「エンハンサー」と共に用いてもよく用いなくてよい。

【0108】

プロモーターは、コードセグメントおよび／またはエキソンの上流に存在する5'非コード配列を単離することによって得てもよいように、遺伝子または配列に天然に会合したプロモーターであってもよい。そのようなプロモーターは、「内因性」であると呼ぶことができる。同様に、エンハンサーは、その配列の下流または上流のいずれかに存在する核酸配列に天然に会合したエンハンサーであってもよい。または、特定の長所はその天然の環境において核酸配列に通常関連しないプロモーターを指す組換え型または異種プロモーターの制御下にコード核酸セグメントを配置することによって得られるであろう。組換え型または異種エンハンサーはまた、その天然の環境において核酸配列に通常関連しないエンハンサーも指す。そのようなプロモーターまたはエンハンサーには、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、および「天然に存在」しない、すなわち異なる転写調節領域の異なる要素および／または発現を変化させる変異を含むプロモーターまたはエンハンサーが含まれてもよい。プロモーターおよびエンハンサーの核酸配列を合成によって產生する他に、配列は、本明細書に開示される組成物に関連してPCR（商標）を含む組み換えクローニングおよび／または核酸增幅技術を用いて产生してもよい（そのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第4,683,202号、米国特許第5,928,906号を参照されたい）。さらに、ミトコンドリア、葉緑素等のような核以外のオルガネラ内の配列の転写および／または発現を指示する制御配列も同様に用いることができると企図される。

10

20

30

40

50

【0109】

本来、発現のために選択された細胞タイプ、オルガネラ、および生物においてDNAセグメントの発現を有効に指示するプロモーターおよび／またはエンハンサーを用いることは重要であるかも知れない。本発明の一定の態様において、プロモーターは、ワクシニアウイルスの複製サイクルのあいだ活性であるワクシニアウイルスプロモーターである。特に、プロモーターはワクシニアウイルス後期プロモーターであってもよく、後期プロモーターの制御下での発現は、複製サイクルにおけるより後期の段階に発現を拘束して、それによって癌の選択性の増強が起こる（後期遺伝子発現は正常な組織では最小でなければならず、または存在しない）。遺伝子発現はまた、遺伝子発現の期間およびレベルを最大限にするために合成の初期-後期プロモーターの下で制御されうる。参照により本明細書に組み入れられる、Mastrangelo et al., 1999。

【0110】

分子生物学の当業者は、タンパク質を発現させるためにプロモーター、エンハンサー、および細胞タイプの組み合わせを用いることを一般的に承知しており、例えば、参照として本明細書に組み入れられる、Sambrookら（1989）を参照されたい。用いられるプロモーターは、組換え型蛋白質および／またはペプチドの大規模產生において都合がよいように、構成的、組織特異的、誘導型および／または導入されたDNAセグメントの高レベル発現を指示するための適当な条件下で有用であってもよい。プロモーターは異種または内因性であってもよい。ウイルスは細胞質で複製するため、特定のプロモーターは、細胞質において活性でありうるものである。

【0111】

表2は、遺伝子の発現を調節するために本発明の特定の態様の状況において用いてもよいいくつかの要素／プロモーターを記載する。この一覧は、発現の促進に関与する起こりうる全ての要素を網羅することを意図しておらず、単なる例に過ぎない。表3は、特異的

刺激に反応して活性化することができる核酸配列の領域である誘導型要素の例を提供する。

【0112】

(表2) プロモーターおよび／またはエンハンサー

プロモーター／エンハンサー	参考文献
免疫グロブリン重鎖	Banerji <i>et al.</i> , 1983; Gilles <i>et al.</i> , 1983; Grosschedl <i>et al.</i> , 1985; Atchinson <i>et al.</i> , 1986, 1987; Imler <i>et al.</i> , 1987; Weinberger <i>et al.</i> , 1984; Kiledjian <i>et al.</i> , 1988; Porton <i>et al.</i> ; 1990
免疫グロブリン軽鎖	Queen <i>et al.</i> , 1983; Picard <i>et al.</i> , 1984
T細胞受容体	Luria <i>et al.</i> , 1987; Winoto <i>et al.</i> , 1989; Redondo <i>et al.</i> ; 1990
HLA DQ α および／またはDQ β	Sullivan <i>et al.</i> , 1987
β -インターフェロン	Goodbourn <i>et al.</i> , 1986; Fujita <i>et al.</i> , 1987; Goodbourn <i>et al.</i> , 1988
インターロイキン-2	Greene <i>et al.</i> , 1989
インターロイキン-2受容体	Greene <i>et al.</i> , 1989; Lin <i>et al.</i> , 1990
MHCクラスII 5	Koch <i>et al.</i> , 1989
MHCクラスII HLA-DRA	Sherman <i>et al.</i> , 1989
β -アクチン	Kawamoto <i>et al.</i> , 1988; Ng <i>et al.</i> ; 1989
筋クレアチンキナーゼ (MCK)	Jaynes <i>et al.</i> , 1988; Horlick <i>et al.</i> , 1989; Johnson <i>et al.</i> , 1989
プレアルブミン (トランスチレテイン)	Costa <i>et al.</i> , 1988
エラスターーゼI	Omitz <i>et al.</i> , 1987
メタロチオネイン (MTII)	Karin <i>et al.</i> , 1987; Culotta <i>et al.</i> , 1989
コラゲナーゼ	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987
アルブミン	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Tronche <i>et al.</i> , 1989, 1990
α -フェトプロテイン	Godbout <i>et al.</i> , 1988; Campere <i>et al.</i> , 1989
γ -グロビン	Bodine <i>et al.</i> , 1987; Perez-Stable <i>et al.</i> , 1990
β -グロビン	Trudel <i>et al.</i> , 1987
c-fos	Cohen <i>et al.</i> , 1987
c-HA-ras	Triesman, 1986; Deschamps <i>et al.</i> , 1985
インスリン	Edlund <i>et al.</i> , 1985
神経細胞接着分子 (NCAM)	Hirsh <i>et al.</i> , 1990

10

20

30

プロモーター／エンハンサー	参考文献
α_1 -アンチトリペイン	Latimer <i>et al.</i> , 1990
H2B(TH2B)ヒストン	Hwang <i>et al.</i> , 1990
マウスおよび／またはタイプIコラーゲン	Ripe <i>et al.</i> , 1989
グルコース調節タンパク質 (GRP94 およびGRP78)	Chang <i>et al.</i> , 1989
ラット成長ホルモン	Larsen <i>et al.</i> , 1986
ヒト血清アミロイドA (SAA)	Edbrooke <i>et al.</i> , 1989
トロポニンI (TN I)	Yutzey <i>et al.</i> , 1989
血小板由来増殖因子 (PDGF)	Pech <i>et al.</i> , 1989
デュシェンヌ型筋ジストロフィー	Klamut <i>et al.</i> , 1990
SV40	Banerji <i>et al.</i> , 1981; Moreau <i>et al.</i> , 1981; Sleigh <i>et al.</i> , 1985; Firak <i>et al.</i> , 1986; Herr <i>et al.</i> , 1986; Imbra <i>et al.</i> , 1986; Kadesch <i>et al.</i> , 1986; Wang <i>et al.</i> , 1986; Ondek <i>et al.</i> , 1987; Kuhl <i>et al.</i> , 1987; Schaffner <i>et al.</i> , 1988
ポリオーマ	Swartzendruber <i>et al.</i> , 1975; Vasseur <i>et al.</i> , 1980; Katinka <i>et al.</i> , 1980, 1981; Tyndell <i>et al.</i> , 1981; Dandolo <i>et al.</i> , 1983; de Villiers <i>et al.</i> , 1984; Hen <i>et al.</i> , 1986; Satake <i>et al.</i> , 1988; Campbell <i>et al.</i> , 1988
レトロウイルス	Kriegler <i>et al.</i> , 1982, 1983; Levinson <i>et al.</i> , 1982; Kriegler <i>et al.</i> , 1983, 1984a, b, 1988; Bosze <i>et al.</i> , 1986; Miksicek <i>et al.</i> , 1986; Celander <i>et al.</i> , 1987; Thiesen <i>et al.</i> , 1988; Celander <i>et al.</i> , 1988; Chol <i>et al.</i> , 1988; Reisman <i>et al.</i> , 1989
乳頭腫ウイルス	Campo <i>et al.</i> , 1983; Lusky <i>et al.</i> , 1983; Spandidos and Wilkie, 1983; Spalholz <i>et al.</i> , 1985; Lusky <i>et al.</i> , 1986; Cripe <i>et al.</i> , 1987; Gloss <i>et al.</i> , 1987; Hirochika <i>et al.</i> , 1987; Stephens <i>et al.</i> , 1987
B型肝炎ウイルス	Bulla <i>et al.</i> , 1986; Jameel <i>et al.</i> , 1986; Shaul <i>et al.</i> , 1987; Spandau <i>et al.</i> , 1988; Vannice <i>et al.</i> , 1988
ヒト免疫不全ウイルス	Muesing <i>et al.</i> , 1987; Hauber <i>et al.</i> , 1988; Jakobovits <i>et al.</i> , 1988; Feng <i>et al.</i> , 1988; Takebe <i>et al.</i> , 1988; Rosen <i>et al.</i> , 1988; Berkhout <i>et al.</i> , 1989; Laspia <i>et al.</i> , 1989; Sharp <i>et al.</i> , 1989; Braddock <i>et al.</i> , 1989
サイトメガロウイルス (CMV)	Weber <i>et al.</i> , 1984; Boshart <i>et al.</i> , 1985; Foecking <i>et al.</i> , 1986
テナガザル白血病ウイルス	Holbrook <i>et al.</i> , 1987; Quinn <i>et al.</i> , 1989

10

20

30

【 0 1 1 3 】
 (表3) 誘導型要素

要素	誘導物質	参考文献
MT II	ホルボルエステル (TFA) 重金属	Palmiter <i>et al.</i> , 1982; Haslinger <i>et al.</i> , 1985; Searle <i>et al.</i> , 1985; Stuart <i>et al.</i> , 1985; Imagawa <i>et al.</i> , 1987, Karin <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987b; McNeall <i>et al.</i> , 1989
MMTV (マウス乳腺 腫瘍ウイルス)	グルココルチコイド	Huang <i>et al.</i> , 1981; Lee <i>et al.</i> , 1981; Majors <i>et al.</i> , 1983; Chandler <i>et al.</i> , 1983; Lee <i>et al.</i> , 1984; Ponta <i>et al.</i> , 1985; Sakai <i>et al.</i> , 1988
β -インターフェロン	ポリ (rI)x ポリ (rc)	Tavernier <i>et al.</i> , 1983
アデノウイルス 5 E2	E1A	Imperiale <i>et al.</i> , 1984
コラグナーゼ	ホルボルエステル (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987a
ストロメリシン	ホルボルエステル (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
SV40	ホルボルエステル (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
マウスMX遺伝子	インターフェロン、 ニューカッスル病ウイルス	Hug <i>et al.</i> , 1988
GRP78遺伝子	A23187	Resendez <i>et al.</i> , 1988
α -2-マクログロブリン	IL-6	Kunz <i>et al.</i> , 1989
ビメンチン	血清	Rittling <i>et al.</i> , 1989
MHCクラスI遺伝子H-2 κ b	インターフェロン	Blanar <i>et al.</i> , 1989
HSP70	E1A、SV40ラージT抗原	Taylor <i>et al.</i> , 1989, 1990a, 1990b
プロリフェリン	ホルボルエステル-TPA	Mordacq <i>et al.</i> , 1989
腫瘍壞死因子	PMA	Hensel <i>et al.</i> , 1989
甲状腺刺激ホルモン α 遺伝子	甲状腺ホルモン	Chatterjee <i>et al.</i> , 1989

【 0 1 1 4 】

組織特異的プロモーターまたは要素の同一性は、その活性の特徴を調べるアッセイと共に、当業者に周知である。そのような領域の例には、ヒトLIMK2遺伝子 (Nomotoら、1999)、ソマトスタチン受容体2遺伝子 (Krausら、1998)、マウス精巣上体レチン酸結合遺伝子 (Lareyreら、1999)、ヒトCD4 (Zhao-Emonetら、1998)、マウス 2 (XI) コラーゲン (Tsumakiら、1998)、D1Aドーパミン受容体遺伝子 (Leeら、1997)、インスリン様増殖因子II (Wuら、1997)、ヒト血小板内皮細胞接着分子-1 (Almendroら、1996)、およびSM 22 プロモーターが含まれる。

【 0 1 1 5 】

デクチン-1およびデクチン-2プロモーターも同様に、本発明において有用であると企図される。本発明と共に用いることができるさらなるウイルスプロモーター、細胞プロモーター / エンハンサーおよび誘導型プロモーター / エンハンサーを、表2および3に記載する。さらに、任意のプロモーター / エンハンサーの組み合わせ (真核細胞プロモーターデータベースEPDBによる) も同様に、オリゴ糖プロセシング酵素、タンパク質折りたたみ補助タンパク質、選択マーカータンパク質、または対象異種タンパク質をコードする構造遺伝子の発現を促進するために用いることができるであろう。または、癌の遺伝子治療のため (表4) および腫瘍のターゲティングのため (表5) の組織特異的プロモーターを、本発明の核酸分子と共に用いてもよい。

【 0 1 1 6 】

(表4) 癌の遺伝子治療の候補となる組織特異的プロモーター

10

20

30

40

組織特異的プロモーター	プロモーターが活性である癌	プロモーターが活性である 正常細胞
癌胎児抗原 (CEA)*	ほとんどの結腸直腸癌；肺癌の50%；胃癌の40~50%；ほとんどの胰臓癌；多くの乳癌	結腸粘膜；胃粘膜；肺上皮；エクリン汗腺；精巣の細胞
前立腺特異抗原 (PSA)	ほとんどの前立腺癌	前立腺上皮
血管活性腸管ペプチド (VIP)	大多数の肺非小細胞癌	ニューロン：リンパ球；肥満細胞；好酸球
界面活性プロテインA (SP-A)	多くの肺腺癌細胞	II型肺細胞；クラーラ細胞
ヒトアカエテースキュート相同体 (hASH)	ほとんどの肺小細胞癌	肺における神経内分泌細胞
ムチン-1 (MUC1)**	ほとんどの腺癌 (任意の組織由来)	乳房および呼吸器、消化管、および尿生殖器管の腺上皮細胞
α -フェトプロテイン	ほとんどの肝細胞癌；おそらく多くの精巣癌	肝細胞（特定の条件下）；精巣
アルブミン	ほとんどの肝細胞癌	肝細胞
チロシナーゼ	ほとんどの黒色腫	メラニン細胞；星状細胞；シュワン細胞；いくつかのニューロン
チロシン結合タンパク質 (TRP)	ほとんどの黒色腫	メラニン細胞；星状細胞；シュワン細胞；いくつかのニューロン
ケラチン14	おそらく多くの扁平上皮癌 (例えば頭頸部癌)	ケラチノサイト
EBV LD-2	多くの頭頸部扁平上皮癌	上部消化管の ケラチノサイト
神経膠線維酸性タンパク質 (GFAP)	多くの星状細胞腫	星状細胞
ミエリン塩基性タンパク質 (MBP)	多くの神經膠腫	乏突起神經膠細胞
精巣特異的アンジオテンシン 変換酵素（精巣特異的ACE）	おそらく多くの精巣癌	精子
オステオカルシン	おそらく多くの骨肉腫	骨芽細胞

10

20

30

【 0 1 1 7 】

(表5) 腫瘍の組織特異的ターゲティングに用いられる候補プロモーター

プロモーター	プロモーターが活性である癌	プロモーターが活性である正常細胞
E2F調節プロモーター	ほとんど全ての癌	増殖しつつある細胞
HLA-G	多くの結腸直腸癌；多くの黒色腫；おそらく多くの他の癌	リンパ球；単球；精母細胞；トロホblast
FasL	ほとんどの黒色腫；多くの肺腺癌；ほとんどの星状細胞腫；おそらく多くの他の癌	活性化白血球；ニューロン；内皮細胞；ケラチノサイト；免疫特権組織の細胞；肺、卵巣、肝臓、および前立腺におけるいくつかの細胞
Myc調節プロモーター	ほとんどの肺癌（小細胞癌および非小細胞の双方）；ほとんどの結腸直腸癌	増殖しつつある細胞（いくつかの細胞タイプのみ）；乳腺上皮細胞（非増殖を含む）
MAGE-1	多くの黒色腫；いくつかの肺の非小細胞癌；いくつかの乳癌	精巣
VEGF	全ての癌の70%（多くの癌において構成的に過剰発現）	血管新生部位での細胞（しかし、腫瘍とは異なり、発現は一過性で、強くなく、決して構成的ではない）
bFGF	bFGF発現は虚血状態で誘導されることから、おそらく多くの異なる癌	虚血部位での細胞（しかし、腫瘍とは異なり、発現は一過性で、強くなく、決して構成的ではない）
COX-2	ほとんどの結腸直腸癌；多くの肺癌；おそらく多くの他の癌	炎症部位での細胞
IL-10	ほとんどの結腸直腸癌；多くの肺癌；多くの頭頸部扁平上皮癌；おそらく多くの他の癌	白血球
GRP78/BiP	GRP78の発現は腫瘍特異的条件によって誘導されることから、おそらく多くの異なる癌	虚血部位での細胞
Egr-1からのCarG要素	電離放射線によって誘導されるので、放射線照射によるほとんどの腫瘍が考えられる	電離放射線に曝露された細胞；白血球

【0118】

40

2. 開始シグナルおよびリボソーム内部認識部位

特異的開始シグナルも同様に、コード配列の効率的な翻訳にとって必要であるかも知れない。これらのシグナルには、ATG開始コドンまたは隣接配列が含まれる。ATG開始コドンを含む外因性の翻訳制御シグナルを提供する必要があるかも知れない。当業者は、容易にこれを決定して、必要なシグナルを提供することができるであろう。開始コドンは、インサート全体の翻訳を確実にするために所望のコード配列の読み取り枠と「フレームが一致して」いなければならぬ。外因性の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは天然または合成のいずれかとなりうる。発現効率は、適当な転写エンハンサー要素を含めることによって増強してもよい。

【0119】

50

本発明の特定の態様において、リボソーム内部認識配列(IRES)要素を用いることは、多遺伝子の、または多シストロン性のメッセージを作製するために用いられる。IRES要素は、5'-メチル化Cap依存的翻訳のリボソームスキニングモデルを迂回して、内部部位で翻訳を開始することができる(Pelletier and Sonenberg, 1988)。ピコルナウイルス科の二つのメンバー(ポリオおよび脳心筋炎ウイルス)からのIRES要素(Pelletier and Sonenberg, 1988)と共に、哺乳類のメッセージからのIRES(Macejak and Sarnow, 1991)が記述されている。IRES要素は、異種オープニングフレームに結合させることができる。それぞれがIRESによって隔てられた多数のオープニングフレームを共に転写することができ、多シストロン性メッセージを作製することができる。IRES要素によって、それぞれのオープニングフレームは、効率的な翻訳のためにリボソームにアクセス可能である。単一のプロモーター/エンハンサーを用いて、単一のメッセージを転写するために、多数の遺伝子を効率よく発現させることができる(参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,925,565号および第5,935,819号を参照されたい)。

【0120】

3. 多クローニング部位

ベクターには、多数の制限酵素部位を含む核酸領域であって、そのいずれもがベクターを消化するために標準的な組換え技術と共に用いることができる多クローニング部位(MCS)が含まれる。(参照として本明細書に組み入れられる、Carbonelliら、1999、Levensonら、1998、およびCocea、1997を参照されたい)。「制限酵素消化」は、核酸分子における特定の位置に限って機能する酵素によって核酸分子を触媒的に切断することを指す。これらの制限酵素の多くは市販されている。そのような酵素を用いることは当業者に広く理解されている。しばしば、ベクターは、外因性の配列をベクターにライゲーションできるように、MCS内で切断する制限酵素を用いて直線または断片にする。「ライゲーション」とは、互いに隣接してもしなくてよい二つの核酸断片のあいだのホスホジエステル結合を形成するプロセスを指す。制限酵素およびライゲーション反応を含む技術は、組換え技術の当業者に周知である。

【0121】

4. スプライシング部位

ほとんどの転写された真核細胞RNA分子は、一次転写物からイントロンを除去するためにRNAスプライシングを受けるであろう。ゲノム真核細胞配列を含むベクターは、タンパク質発現のために転写物の適切なプロセシングを確実にするためにドナーおよび/またはアクセプタースプライシング部位を必要とする可能性がある(参照として本明細書に組み入れられる、Chandlerら、1997を参照されたい)。

【0122】

5. 終結シグナル

本発明のベクターまたは構築物は一般的に、少なくとも一つの終結シグナルを含むであろう。「終結シグナル」または「ターミネータ」は、RNAポリメラーゼによってRNA転写物の特異的終結に関係するDNA配列を含む。このように、特定の態様において、RNA転写物の産生で終結する終結シグナルが企図される。ターミネータは、所望のメッセージレベルを得るためにインピボで必要となる可能性がある。

【0123】

真核細胞系において、ターミネータ領域はまた、ポリアデニル化部位を曝露するために、新しい転写物の部位特異的切断を可能にする特異的DNA配列を含んでもよい。これは、転写物の3'末端に約200 A残基(ポリア)の枝を付加するように専門的な内因性ポリメラーゼにシグナルを送る。このポリアテールによって改変されたRNA分子は、より安定でより効率的に翻訳されるように思われる。このように、真核細胞を含む他の態様において、ターミネータは、RNAの切断のためのシグナルを含むことが好ましく、ターミネータシグナルは、メッセージのポリアデニル化を促進することがより好ましい。ターミネータおよび/またはポリアデニル化部位要素は、メッセージレベルを増強して、および/または他の配列へのカセットから読み過ごしを最小限にるように作用しうる。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 4 】

本発明において用いることが企図されるターミネータは、例えばウシ成長ホルモンターミネータまたはウイルス終結配列、例えばSV40ターミネータのような遺伝子の終結配列が含まれるがこれらに限定されない、本明細書に記述のまたは当業者に既知の任意の既知の転写ターミネータが含まれる。特定の態様において、終結シグナルは、配列の切断によるような、転写可能なまたは翻訳可能な配列の欠如であってもよい。

【 0 1 2 5 】**6. ポリアデニル化シグナル**

発現において、特に真核細胞発現において、典型的に、転写物の適當なポリアデニル化を行うためにポリアデニル化シグナルを含めるであろう。ポリアデニル化シグナルの特性は、本発明の実践の成功にとって重要ではないと考えられ、および／またはそのような如何なる配列を用いてもよい。好ましい態様には、様々な標的細胞において都合がよく、および／または十分に機能することがわかっている、SV40ポリアデニル化シグナルおよび／またはウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルが含まれる。ポリアデニル化は、転写物の安定性を増加させる可能性があり、または細胞質輸送を促進する可能性がある。

10

【 0 1 2 6 】**7. 複製開始点**

宿主細胞においてベクターを増殖させるために、ベクターは、複製が開始される特異的核酸配列である一つまたはそれ以上の複製開始部位（しばしば「ori」と呼ばれる）を含んでもよい。または、宿主細胞が酵母である場合、自律的に複製する配列（ARS）を用いることができる。

20

【 0 1 2 7 】**8. 選択およびスクリーニング可能なマーカー**

本発明の特定の態様において、本発明の核酸構築物を含む細胞は、発現ベクターにマーカーを含めることによってインビトロまたはインビボで同定してもよい。そのようなマーカーは、細胞に対して同定可能な変更を付与して、発現ベクターを含む細胞の容易な同定を可能にするであろう。一般的に、選択マーカーは、選択を可能にする特性を付与するマーカーである。陽性選択マーカーは、マーカーが存在することによって選択が可能となるマーカーであり、陰性選択マーカーは、マーカーが存在することによってその選択が妨害されるマーカーである。陽性選択マーカーの例は、薬物耐性マーカーである。

30

【 0 1 2 8 】

通常、薬物選択マーカー、例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ヒグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシン、およびヒスチジノールに対する抵抗性を付与する遺伝子を含めることは、形質転換体のクローニングおよび同定に役立つ。条件の実行に基づいて形質転換体の識別を可能にする表現型を付与するマーカーの他に、その基礎が比色分析であるGFPのようなスクリーニング可能なマーカーを含む他のタイプのマーカーも同様に企図される。または、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（tk）またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）のようなスクリーニング可能な酵素を用いてもよい。当業者は同様に、おそらくFACS分析に関連して免疫学的マーカーを用いる方法を承知しているであろう。用いられるマーカーは、それが遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現されうる限り、重要ではないと考えられる。選択およびスクリーニング可能なマーカーのさらなる例は、当業者に周知である。

40

【 0 1 2 9 】**D. 核酸の検出**

ポックスウイルスタンパク質、ポリペプチド、および／またはペプチドの発現を指示するために用いられる他に、本明細書に開示の核酸配列は、多様な他の用途を有する。例えば、それらは、核酸ハイブリダイゼーションを含む態様に関してプローブまたはプライマーとして有用性を有する。それらは、本発明の診断またはスクリーニング法において用いてもよい。ポックスウイルスまたはポックスウイルスポリペプチド調節物質をコードする核酸の検出は本発明に含まれる。

50

【0130】

1. ハイブリダイゼーション

長さが13～100ヌクレオチド、好ましくは17～100ヌクレオチド、または本発明のいくつかの局面において長さが1～2キロベースもしくはそれ以上のプローブまたはプライマーを用いることによって、安定かつ選択的な二本鎖分子が形成される。長さが20塩基より大きい隣接する枝に対して相補的配列を有する分子は、得られたハイブリッド分子の安定性および／または選択性を増加させるために一般的に好ましい。一般的に20～30ヌクレオチド、または望ましい場合にはそれより長い一つまたはそれ以上の相補的配列を有する核酸分子をハイブリダイゼーションのために設計することが好まれるであろう。そのような断片は、例えば化学的手段によって断片を直接合成することによって、または選択した配列を組換え産生のために組換えベクターに導入することによって、容易に調製されるであろう。

【0131】

したがって、本発明のヌクレオチド配列は、DNAおよび／またはRNAの相補鎖による二本鎖分子の選択的形成能のために、または試料からDNAもしくはRNAの増幅のためのプライマーを提供するために用いてもよい。想像される応用に応じて、標的配列に関するプローブまたはプライマーの多様な程度の選択性を得るために、多様なハイブリダイゼーション条件を用いることが望まれるであろう。

【0132】

高い選択性を必要とする応用の場合、典型的に比較的高いストリンジエンシー条件を用いてハイブリッドを形成することが望まれるであろう。例えば、温度約50～約70で約0.02M～約0.10M NaClによって提供されるように、比較的低い塩濃度および／または高い温度条件。そのような高ストリンジエンシー条件は、あるとしてもプローブまたはプライマーと鋳型または標的鎖とのミスマッチをほとんど認容せず、特異的遺伝子を単離するために、または特異的mRNA転写物を検出するために特に適しているであろう。一般的に、条件は、ホルムアミドの増加量を加えることによってよりストリンジエントにすることができる。

【0133】

特定の応用に関して、例えば部位特異的変位誘発の場合、より低いストリンジエンシー条件が好ましいことが認識されている。これらの条件では、ハイブリダイズする鎖が完全には相補的でないが、一つまたはそれ以上の位置でミスマッチを有する場合でも、ハイブリダイゼーションが起こる可能性がある。塩濃度を増加させることによって、および／または温度を低下させることによって条件をよりストリンジエントでないようにしてもよい。例えば、中間のストリンジエンシー条件は、温度約37～約55で約0.1～0.25M NaClによって提供されうるが、低ストリンジエンシー条件は、温度範囲約20～約55で約0.15M～約0.9Mの塩濃度によって提供されうるであろう。ハイブリダイゼーション条件は、所望の結果に応じて容易に操作することができる。

【0134】

他の態様において、ハイブリダイゼーションは、例えば、温度約20～約37で50mMトリス塩酸(pH 8.3)、75mM KCl、3mM MgCl₂、1.0mMジチオスレイトールの条件で行ってもよい。利用される他のハイブリダイゼーション条件には、温度範囲が約40～約72で約10mMトリス塩酸(pH 8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂が含まれうるであろう。

【0135】

特定の態様において、ハイブリダイゼーションを決定するための標識のような適当な手段と組み合わせて本発明の既定の配列の核酸を用いることが都合がよいであろう。蛍光、放射活性、酵素、またはアビジン／ビオチンのような他のリガンドを含む、検出されうる広範な適当な指標手段が当技術分野で既知である。好ましい態様において、放射活性または他の環境的に望ましくない試薬の代わりに、蛍光標識またはウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、もしくはペルオキシダーゼのような酵素タグを用いることが望まれるかも知れない。酵素タグの場合、相補的核酸含有試料との特異的ハイブリダイゼーションを同定

するために肉眼的または分光光度法によって検出可能である検出手段を提供するために用いることができる、比色指標基質が知られている。

【0136】

一般的に、本明細書に記述のプローブまたはプライマーは、PCR（商標）の場合のように対応する遺伝子の発現を検出するための溶液ハイブリダイゼーションにおける試薬としてのみならず、固相を用いる態様においても有用であろう。固相を含む態様において、試験DNA（またはRNA）を、選択されたマトリクスまたは表面上に吸着またはそうでなければ固定する。次に、この固定された一本鎖核酸を、所望の条件で、選択したプローブとハイブリダイズさせる。選択する条件は、特定の状況に依存するであろう（例えば、G+C含量、標的核酸のタイプ、核酸の起源、ハイブリダイゼーションプローブの大きさ等に応じて）。対象となる特定の応用に関するハイブリダイゼーション条件の最適化は当業者に周知である。非特異的結合プローブ分子を除去するためにハイブリダイズした分子を洗浄後、結合標識量を決定することによって、ハイブリダイゼーションを検出、および／または定量する。代表的な固相ハイブリダイゼーション法は、米国特許第5,843,663号、第5,900,481号、および第5,919,626号に開示される。本発明の実践において用いてよい他のハイブリダイゼーション法は、米国特許第5,849,481号、第5,849,486号、および第5,851,772号に開示される。明細書の本章において同定されたこれらおよび他の参考文献の関連する部分は、参照として本明細書に組み入れられる。

10

【0137】

2. 核酸の増幅

20

増幅の鋳型として用いられる核酸は、標準的な方法論に従って（Sambrookら、1989）細胞、組織、または他の試料から単離してもよい。特定の態様において、鋳型核酸を実質的に精製することなく、細胞全体もしくは組織ホモジネート、または生体液試料について分析を行う。核酸は、ゲノムDNAまたは分画もしくは全細胞RNAであってもよい。RNAを用いる場合、まずRNAを相補的DNAに変換することが望ましいかも知れない。

【0138】

本明細書において用いられる「プライマー」という用語は、鋳型依存的プロセスにおいて新生核酸の合成をプライミングすることができる任意の核酸を含むことを意味する。典型的に、プライマーは、長さが10～20および／または30塩基対のオリゴヌクレオチドであるが、より長い配列を用いることができる。プライマーは二本鎖および／または一本鎖型で提供してもよいが、一本鎖型が好ましい。

30

【0139】

本明細書において同定された遺伝子の配列に対応する核酸と選択的にハイブリダイズするように設計されたプライマー対を、選択的ハイブリダイゼーションを許容する条件で鋳型核酸に接触させる。所望の応用に応じて、プライマーと完全に相補的である配列とのハイブリダイゼーションに限って可能にする高ストリンジエンシー条件を選択してもよい。他の態様において、ハイブリダイゼーションは、プライマー配列と一つまたはそれ以上のミスマッチを含む核酸の増幅を可能にするためにより低いストリンジエンシー条件で行ってもよい。ハイブリダイズした後、鋳型プライマー複合体を、鋳型依存的核酸合成を促進するために一つまたはそれ以上の酵素に接触させる。増幅産物の十分量が產生されるまで、「サイクル」とも呼ばれる多数回の増幅ラウンドを行う。

40

【0140】

増幅産物は、検出または定量してもよい。特定の応用において、検出は視覚的手段によって行ってもよい。または検出は、化学発光、組み入れた放射標識の放射活性シンチグラフィーもしくは蛍光標識、または電気および／または熱衝撃シグナルを用いる系による産物の間接的な同定を含んでもよい（Bellus、1994）。

【0141】

所定の鋳型試料に存在するオリゴヌクレオチド配列を増幅するために、多くの鋳型依存的プロセスが利用できる。最もよく知られている増幅法の一つは、そのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第4,683,195号、第4,683,202号、および第4,80

50

0,159号ならびにInnisら、1988に詳細に記載されるポリメラーゼ連鎖反応（PCR（商標）と呼ばれる）である。

【0142】

逆転写酵素PCR（商標）増幅技法は、増幅されたmRNAの量を定量するために行つてもよい。RNAをcDNAに逆転写する方法は周知である（Sambrookら、1989を参照されたい）。逆転写酵素に関するもう一つの方法は、熱安定DNAポリメラーゼを利用する。これらの方
法は、国際公開公報第90/07641号に記載されている。ポリメラーゼ連鎖反応方法論は、当技術分野で周知である。代表的なRT-PCR法は米国特許第5,882,864号に記載されている。

【0143】

もう一つの増幅法は、その全文が参照として本明細書に組み入れられる、欧州特許出願第320 308号に開示されるリガーゼ連鎖反応（「LCR」）である。米国特許第4,883,750号は、標的配列にプローブ対を結合させるためにLCRと類似の方法を記述している。米国特許第5,912,148号に開示されるPCR（商標）およびオリゴヌクレオチドリガーゼアッセイ（OLA）に基づく方法も同様に用いてもよい。

10

【0144】

本発明の実践において用いてもよい標的核酸配列を増幅するもう一つの方法は、そのそれぞれの全文が参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,843,650号、第5,846,709号、第5,846,783号、第5,849,546号、第5,849,497号、第5,849,547号、第5,858,652号、第5,866,366号、第5,916,776号、第5,922,574号、第5,928,905号、第5,928,906号、第5,932,451号、第5,935,825号、第5,939,291号、および第5,942,391号、英国特許出願第2 202 328号、ならびにPCT出願番号PCT/US89/01025号に開示されている。

20

【0145】

PCT出願PCT/US87/00880号に記載されるQ レプリカーゼも同様に、本発明における増幅法として用いてもよい。この方法において、標的の領域と相補的である領域を有するRNAの複製配列を、RNAポリメラーゼの存在下で試料に加える。ポリメラーゼは複製配列をコピーして、次にこれを検出してもよい。

20

【0146】

制限部位の一つの鎖にヌクレオチド5'-[-チオ]-三磷酸を含む標的分子の増幅を得るために制限酵素とリガーゼとを用いる等温増幅法もまた、本発明において核酸を増幅するために有用となる可能性がある（Walkerら、1992）。米国特許第5,916,779号に開示される鎖置換増幅（SDA）は、鎖の置換および合成のラウンド、すなわちニックトランスレーションを多数回含む核酸の等温増幅を行うためのもう一つの方法である。

30

【0147】

他の核酸増幅法には、核酸配列に基づく増幅（NASBA）および3SR（その全文が参照として本明細書に組み入れられる、Kwohら、1989；PCT出願国際公開公報第88/10315号）を含む、転写に基づく増幅システム（TAS）が含まれる。欧州特許出願第329 822号は、本発明に従って用いてもよい一本鎖RNA（「ssRNA」）、ssDNA、および二本鎖DNA（dsDNA）を繰り返し合成することを含む核酸増幅プロセスを開示している。

【0148】

PCT出願国際公開公報第89/06700号（その全文が参照として本明細書に組み入れられる）は、標的一本鎖DNA（「ssDNA」）に対するプロモーター領域／プライマー配列のハイブリダイゼーション後に配列の多くのRNAコピーの転写を行うことに基づく核酸増幅スキームを開示している。このスキームは繰り返しではなく、すなわち得られたRNA転写物から新しい鋳型が産生されるのではない。他の増幅法には、「RACE」および「片側PCR」（Frohman、1990；Oharaら、1989）が含まれる。

40

【0149】

3. 核酸の検出

任意の増幅の後、鋳型および／または過剰のプライマーから増幅産物を分離することが望ましいかも知れない。一つの態様において、増幅産物は、標準的な方法（Sambrookら、1989）を用いてアガロース、アガロース-アクリルアミド、またはポリアクリルアミドゲ

50

ル電気泳動によって分離される。分離された増幅産物を、さらに操作するためにゲルから切断して溶出させてもよい。低融点アガロースゲルを用いて、ゲルを加熱することによって、分離したバンドを採取してその後核酸の抽出を行う。

【0150】

核酸の分離はまた、当技術分野で既知のクロマトグラフィー技術によって行ってもよい。吸着、分配、イオン交換、ヒドロキシリアパタイト、分子ふるい、逆相、カラム、ペーパー、薄層、およびガスクロマトグラフィーと共にHPLCを含む本発明の実践において用いてもよい多くの種類のクロマトグラフィーが存在する。

【0151】

特定の態様において、増幅産物を可視化する。典型的な可視化法は、エチジウムプロマイドによってゲルを染色して、UV光の下でバンドを可視化することを含む。または、増幅産物が放射、または蛍光標識ヌクレオチドによって完全に標識されている場合、分離された増幅産物をX線フィルムに曝露して、適当な励起波長の下で可視化することができる。

【0152】

一つの態様において、増幅産物の分離後、標識された核酸プローブを増幅されたマーク配列に接触させる。プローブは好ましくは発色団に結合させるが、放射標識してもよい。もう一つの態様において、プローブは、抗体またはビオチンのような結合パートナー、または検出部分を有するもう一つの結合パートナーに結合させる。

【0153】

特定の態様において、検出は、標識プローブによるサザンブロッティングおよびハイブリダイゼーションによって行う。サザンブロッティングに含まれる技術は当業者に周知である(Sambrookら、1989を参照されたい)。前述の一例は、核酸の自動電気泳動および転写のための装置および方法を開示する、参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,279,721号に記述される。装置は、ゲルを外部から操作することなく、電気泳動およびプロッティングを可能にし、本発明に従う方法を行つたために理想的に適している。

【0154】

本発明の実践において用いてもよい他の核酸検出法は、そのそれぞれが参考として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,840,873号、第5,843,640号、第5,843,651号、第5,846,708号、第5,846,717号、第5,846,726号、第5,846,729号、第5,849,487号、第5,853,990号、第5,853,992号、第5,853,993号、第5,856,092号、第5,861,244号、第5,863,732号、第5,863,753号、第5,866,331号、第5,905,024号、第5,910,407号、第5,912,124号、第5,912,145号、第5,919,630号、第5,925,517号、第5,928,862号、第5,928,869号、第5,929,227号、第5,932,413号、および第5,935,791号に開示されている。

【0155】

4. 他のアッセイ

遺伝子スクリーニングのための他のアッセイは、例えばゲノムDNA、cDNAおよび/またはRNA試料における変異を検出するために、本発明の範囲において用いてもよい。点突然変異を検出するために用いられる方法には、変性勾配ゲル電気泳動(「DGGE」)、制限断片長多形分析(「RFLP」)、化学または酵素切斷法、PCR(商標)によって増幅された標的領域の直接シークエンシング(上記を参照されたい)、一本鎖構造多形分析(「SSCP」)、および当技術分野で周知の他の方法が含まれる。

【0156】

点突然変異をスクリーニングする一つの方法は、RNA/DNAまたはRNA/RNAヘテロ二本鎖における塩基対ミスマッチのRNアーゼによる切断に基づく。本明細書において用いられるように、「ミスマッチ」という用語は、二本鎖RNA/RNA、RNA/DNA、またはDNA/DNA分子における一つまたはそれ以上の、対を形成していないまたは誤って対を形成した領域として定義される。このように、この定義は、挿入/欠失変異のみならず単一または多数の塩基の点突然変異によるミスマッチが含まれる。

【0157】

米国特許第4,946,773号は、一本鎖DNAまたはRNA試験試料をRNAプローブにアニールさせ

10

20

30

40

50

て、その後RNアーゼAによって核酸二本鎖を処理することを含む、RNアーゼミスマッチ切断アッセイを記述する。ミスマッチを検出する場合、大きさに従って電気泳動によって分離されたRNアーゼA処置の一本鎖産物を、同様に処置した対照二本鎖と比較する。対照二本鎖において認められないより小さい断片（切断産物）を含む試料は、陽性であると採点される。

【0158】

他の研究者らは、ミスマッチアッセイにおいてRNアーゼIを用いることを記述している。ミスマッチ検出のためにRNアーゼIを用いることは、プロメガバイオテック（Promega Biotech）の文献に記述されている。プロメガ社は既知のミスマッチ4個のうち3個を切斷すると報告されているRNアーゼIを含むキットを販売している。他の研究者は、一塩基ミスマッチを検出するためにMutSタンパク質または他のDNA修復酵素を用いることを記述している。10

【0159】

本発明の実践において用いてもよい欠失、挿入、または置換変異を検出するもう一つの方法は、その全文が参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,849,483号、第5,851,770号、第5,866,337号、第5,925,525号、および第5,928,870号に開示されている。

【0160】

E. 遺伝子移入法

本発明の組成物の発現を行うために核酸輸送の適した方法は、本明細書に記述されるように、または当業者に既知であるように、それによって核酸（例えば、ウイルスおよび非ウイルスベクターを含むDNA）がオルガネラ、細胞、組織、または生物に導入されうる実質的に如何なる方法も含まれると考えられる。そのような方法には、マイクロインジェクション（Harlan and Weintraub、1985；参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,789,215号）を含む注入（参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,994,624号、第5,981,274号、第5,945,100号、第5,780,448号、第5,736,524号、第5,702,932号、第5,656,610号、第5,589,466号、および第5,580,859号）；エレクトロポレーション（参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,384,253号）；磷酸カルシウム沈殿（Graham and Van Der Eb、1973；Chen and Okayama、1987；Rippeら、1990）；DEAE-デキストランの後にポリエチレングリコールを用いることによって（Gopal、1985）；直接超音波負荷（Fechheimerら、1987）；リポソーム媒介トランスフェクション（Nicolau and Sene、1982；Fraleyら、1979；Nicolauら、1987；Wongら、1980；Kanedaら、1989；Katoら、1991）；微小発射物の衝突（そのそれが参照として本明細書に組み入れられる、PCT出願国際公開公報第94/09699号および第95/06128号；米国特許第5,610,042号、第5,322,783号、第5,563,055号、第5,550,318号、第5,538,877号、および第5,538,880号）；炭化ケイ素纖維との攪拌（Kaepllerら、1990；そのそれが参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,302,523号および第5,464,765号）；アグロバクテリウム（Agrobacterium）媒介形質転換（そのそれが参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,591,616号および第5,563,055号）；またはプロトプラストのPEG媒介形質転換（Omiru Ilehら、1993；そのそれが参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第4,684,611号および第4,952,500号）；乾燥／阻害媒介DNA取り込み（Potrykusら、1985）のような方法によるDNAの直接輸送が含まれるがこれらに限定されない。これらののような技術の応用によって、オルガネラ、細胞、組織、または生物は、安定または一過性に形質転換される可能性がある。3040

【0161】

5. 脂質成分と部分

特定の態様において、本発明は、核酸、ペプチドのようなアミノ酸分子、またはもう一つの低分子化合物に関連した一つまたはそれ以上の脂質を含む組成物に関する。本明細書において考察した任意の態様において、分子は、ポックスウイルスポリペプチドまたはポックスウイルスポリペプチド調節物質、例えばポックスウイルスポリペプチドの全てもしくは一部をコードする核酸、またはポックスウイルスポリペプチド調節物質の全てもしく50

は一部をコードするアミノ酸分子であってもよい。脂質は、特徴的に水に不溶性で、有機溶媒によって抽出可能な物質である。本明細書において特に記述した化合物以外の化合物は、当業者によって脂質であると理解され、それらも本発明の組成物および方法に含まれる。脂質成分および非脂質は、共有結合または非共有結合によって互いに結合させてもよい。

【0162】

脂質は天然に存在してもよく、または合成（すなわち、ヒトの手によって設計または產生された）であってもよい。しかし、脂質は通常、生体物質である。生体脂質は当技術分野で周知であり、これには例えば、中性脂肪、燐脂質、ホスホグリセリド、ステロイド、テルペン、リゾ脂質、グリコスフィンゴリピッド、グルコリピッド、スルファチド、エーテルおよびエーテル結合脂肪酸を有する脂質、および重合化脂質、ならびにその組み合わせが含まれる。

【0163】

脂質に会合した核酸分子またはペプチドのようなアミノ酸分子は、脂質を含む溶液中で分散させる、脂質によって溶解する、脂質によって乳化させる、脂質と混合する、脂質と配合する、脂質に共有結合させる、脂質中の懸濁液として含む、またはそうでなければ脂質に会合させてもよい。本発明の脂質または脂質／ポックスウイルス会合組成物は、如何なる特定の構造に限定されない。例えば、それらは、おそらく大きさまたは形状の点で均一ではない凝集体を形成して、溶液中に単に散在させてもよい。もう一つの例において、それらは、ミセルのような二層構造で存在してもよく、「崩壊した」構造を有してもよい。もう一つの非制限的な例において、リポフェクタミン (Gibco BRL) - ポックスウイルスまたはスーパーフェクト (Qiagen) - ポックスウイルス複合体も同様に企図される。

【0164】

特定の態様において、脂質組成物は、特定の脂質、脂質タイプ、または薬物、タンパク質、糖、核酸または本明細書に開示のもしくは当業者に既知の他の材料のような非脂質成分の約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約11%、約12%、約13%、約14%、約15%、約16%、約17%、約18%、約19%、約20%、約21%、約22%、約23%、約24%、約25%、約26%、約27%、約28%、約29%、約30%、約31%、約32%、約33%、約34%、約35%、約36%、約37%、約38%、約39%、約40%、約41%、約42%、約43%、約44%、約45%、約46%、約47%、約48%、約49%、約50%、約51%、約52%、約53%、約54%、約55%、約56%、約57%、約58%、約59%、約60%、約61%、約62%、約63%、約64%、約65%、約66%、約67%、約68%、約69%、約70%、約71%、約72%、約73%、約74%、約75%、約76%、約77%、約78%、約79%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約100%、またはそこから誘導される任意の範囲を含む。非制限的な例において、脂質組成物は、約10%～約20%中性脂質、約33%～約34%セレブロシド、および約1%コレステロールを含んでもよい。もう一つの非制限的な例において、リポソームは、ミセルの約1%が特にリコペンである約4%～約12%テルペンを含んでもよく、リポソームの約3%～約11%は他のテルペンを含み、および約10%～約35%ホスファチジルコリン、および約1%の薬物を含んでもよい。このように、本発明の脂質組成物は、任意の組み合わせまたは百分率の範囲の任意の脂質、脂質タイプ、または他の成分を含んでもよいと企図される。

【0165】

V. GM-CSF

本発明の特定の局面において、ワクシニアウイルスは、GM-CSFをコードする遺伝子を有するであろう。GM-CSFは、より多くの白血球、特に顆粒球、マクロファージ、および血小板になる細胞を作製するために役立つ物質である顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子である。これは造血（血液形成）物質と呼ばれる薬物ファミリーに属するサイトカインであり、サルグラモスチムとしても知られる。GM-CSFは、Cantrell et al. (1985)によって1985年に初めてクローニングおよびシークエンシングされた。ヒトGM-CSFは、予想分子

10

20

30

40

50

量16,293ダルトンの1つのオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸144個の糖タンパク質である。ヒトGM-CSFは、マウスGM-CSFと69%のヌクレオチド相同性および54%のアミノ酸相同性を示し、1コピー遺伝子として存在する。

【0166】

GM-CSFは、サイトカインまたは免疫および炎症刺激に反応して異なる多くの細胞タイプ（活性化T細胞、B細胞、マクロファージ、肥満細胞、内皮細胞、および線維芽細胞）によって産生される。顆粒球-マクロファージ前駆体のほかに、GM-CSFはまた、赤血球、巨核球、および好酸球前駆体の増殖因子でもある。成熟造血細胞において、GM-CSFは、顆粒球、単球／マクロファージ、および好酸球の生存因子であり、それらのエフェクター機能を活性化させる。GM-CSFはまた、非造血細胞に対して機能的役割を有することも報告されている。これは、ヒト内皮細胞を遊走および増殖するように誘導することができる。10

【0167】

GM-CSFは種特異的であって、ヒトGM-CSFはマウス細胞に対して生物効果を有しない。GM-CSFは特異的細胞表面受容体に対する結合を通してその生物効果を発揮する。ヒトGM-CSFのシグナル伝達にとって必要な高親和性受容体は、GM-CSF特異的鎖ならびにIL-3およびIL-5に関する高親和性受容体と共有される一般的な鎖からなるヘテロ二量体であることが示されている。

【0168】

GM-CSFは、骨原性肉腫、癌腫および腺癌細胞株を含む多くの腫瘍細胞株の増殖を刺激することができ、GM-CSFの臨床試験（単独または他の免疫治療と併用して）が、黒色腫、白血病、リンパ腫、および神経芽腫、カポジ肉腫、中皮腫、肺癌、乳癌、前立腺癌、結腸直腸癌、脳腫瘍、腎臓癌および子宮頸癌を有する人々に関して進行中である。GM-CSFの一般的な副作用には、風邪様症状（発熱、頭痛、筋肉痛）、発疹、顔の潮紅、および骨痛が含まれる。20

【0169】

VI. 他の異種遺伝子

いくつかの態様において、本発明の方法において用いられるワクシニアウイルスは、GM-CSFをコードしないが、もう1つの異種配列をコードする異種配列を発現する核酸配列を含む。特定の態様において、異種配列はもう1つのサイトカインをコードする。またはもしくはさらに、ワクシニアウイルスは、IL-12、チミジンデアミナーゼ、TNF等をコードする核酸を含んでもよい。さらに、本明細書において考察されるいかなる遺伝子産物も、ワクシニアウイルス内に含まれる核酸によってコードされてもよく、本発明の方法において用いてもよい。30

【0170】

VII. 薬学的製剤、輸送、および治療レジメ

本発明の一つの態様において、ワクシニアウイルスの輸送によって、癌のような過増殖性疾患を治療するための方法が企図される。治療に企図される癌の例には、肺癌、頭頸部癌、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、腎臓癌、子宮癌、骨癌、精巣癌、子宮頸癌、消化器癌、リンパ腫、肺の前新生物病変、結腸癌、黒色腫、膀胱癌、および処置しうる任意の他の癌または腫瘍が含まれる。

【0171】

薬学的組成物の有効量は一般的に、疾患またはその症状の程度を改善、減少、最小限、または制限するために検出可能および繰り返すために十分な量であると定義される。疾患の消失、根治、または治癒を含むより厳密な定義を当てはめてよい。

【0172】

好みしくは、患者は、適当な骨髄機能（末梢の顆粒球の絶対数 $> 2,000\text{個}/\text{mm}^3$ および血小板数 $100,000\text{個}/\text{mm}^3$ として定義される）、適当な肝機能（ビリルビン $< 1.5\text{mg/dl}$ ）および適当な腎機能（クレアチニン $< 1.5\text{mg/dl}$ ）を有するであろう。

【0173】

本発明の方法および組成物によって処置される可能性がある癌細胞には、膀胱、血液、50

骨、骨髄、脳、乳腺、結腸、食道、胃腸管、歯肉、頭部、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、頸部、卵巣、前立腺、皮膚、胃、精巣、舌、または子宮の細胞が含まれる。さらに、癌は具体的には以下の組織型の癌であってもよいがこれらに限定されない：悪性新生物；癌；未分化型癌；巨細胞紡錘細胞癌；小細胞癌；乳頭癌；扁平上皮癌；リンパ上皮癌；基底細胞癌；毛質癌；移行上皮癌；乳頭移行上皮癌；腺癌；悪性ガストリノーマ；胆管癌；肝細胞癌；複合肝細胞癌および胆管癌；索状腺癌；腺様囊胞癌；腺腫様ポリープの腺癌；大腸家族性ポリポーシス腺癌；固形癌；悪性類癌腫；鰓-肺胞腺癌；乳頭腺癌；嫌色素癌；好酸性癌；酸親和性腺癌；好塩基性癌；明細胞腺癌；顆粒細胞癌；濾胞状腺癌；乳頭濾胞状腺癌；非被包化硬化性癌；副腎皮質癌；類内膜癌；皮膚付属器癌；アポクリン腺癌；皮脂腺癌；耳垢腺癌；粘膜類表皮癌；囊胞腺癌；乳頭囊胞腺癌；乳頭漿液囊胞腺癌；粘液性囊胞腺癌；粘液性腺癌；環状体細胞癌；浸潤性管癌；髓様癌；小葉癌；炎症性癌；乳腺ページェット病；腺房細胞癌；腺扁平上皮癌；扁平化生を有する腺癌；悪性胸腺腫；悪性卵巣間質腫瘍；悪性莢膜腫；悪性顆粒細胞腫瘍；悪性男性胚腫；セルトリ細胞癌；悪性ライディッヒ細胞腫瘍；悪性脂質細胞腫瘍；悪性傍神経節腫；悪性乳腺外傍神経節腫；褐色細胞腫；グロムス血管肉腫；悪性黒色腫；メラニン欠乏性黒色腫；表在拡大性黒色腫；巨大色素性母斑における悪性黒色腫；類上皮細胞黒色腫；悪性青色母斑；肉腫；線維肉腫；悪性線維性組織球腫；粘液肉腫；脂肪肉腫；平滑筋肉腫；横紋筋肉腫；胎児横紋筋肉腫；肺胞横紋筋肉腫；間質肉腫；悪性混合腫瘍；ミューラー混合腫瘍；腎芽細胞腫；肝芽細胞腫；癌肉腫；悪性間葉腫；悪性ブレンナー腫瘍；悪性葉状腫瘍；滑膜肉腫；悪性中皮腫；未分化胚細胞腫；胎児性癌；悪性奇形腫；悪性卵巣甲状腺腫；絨毛癌；悪性中腎腫；血管肉腫；悪性血管内皮腫；カポジ肉腫；悪性血管周囲細胞腫；リンパ管肉腫；骨肉腫；傍皮質骨肉腫；軟骨肉腫；悪性軟骨芽細胞腫；間葉軟骨肉腫；骨の巨細胞腫瘍；ユーイング肉腫；悪性歯原性腫瘍；エナメル上皮性歯原性肉腫；悪性エナメル上皮腫；エナメル上皮線維肉腫；悪性松果体腫；脊索腫；悪性神経膠腫；上衣腫；星状細胞腫；原形質性星状細胞腫；線維性星状細胞腫；星状芽細胞腫；神経膠芽腫；乏突起神経膠腫；乏突起膠芽細胞腫；始原神経外胚葉；小脳肉腫；節芽細胞腫；神経芽腫；網膜芽腫；嗅神経原性腫瘍；悪性髓膜腫；神経線維肉腫；悪性神経鞘腫；悪性顆粒細胞腫瘍；悪性リンパ腫；ホジキン病；ホジキン側肉芽腫；小リンパ球性悪性リンパ腫；大細胞びまん性悪性リンパ腫；濾胞性悪性リンパ腫；菌状息肉腫；他の明記された非ホジキンリンパ腫；悪性組織球症；多発性骨髓腫；肥満細胞肉腫；免疫増殖性小腸疾患；白血病；リンパ様白血病；プラズマ細胞白血病；赤白血病；リンパ肉腫細胞白血病；骨髓性白血病；好塩基球性白血病；好酸球性白血病；単球性白血病；肥満細胞白血病；巨核芽球性白血病；骨髓様肉腫；およびヘアリーセル白血病。

【0174】

本発明は、任意のタイプの原発性癌の局所浸潤および／または転移を阻害または防止するための方法を企図する。たとえば、原発性癌は、黒色腫、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肺、肝癌、網膜芽腫、星状細胞腫、神経膠芽腫、歯肉、舌、白血病、神経芽腫、頭部、頸部、乳腺、脾臓、前立腺、腎臓、骨、精巣、卵巣、中皮腫、子宮頸部、胃腸管、リンパ腫、脳、結腸、または膀胱であってもよい。本発明の特定の態様において、原発性癌は肺癌である。たとえば、肺癌は非小細胞肺癌であってもよい。

【0175】

その上、本発明は、癌を予防するため、または化生、異形成、および過形成を含む前癌もしくは前悪性細胞を処置するために用いることができる。同様に、扁平上皮化生、異形成、良性前立腺過形成細胞、過形成病変等のような、望ましくないが良性の細胞を阻害するために用いてもよい。癌またはより重度の型の癌への進行は、本明細書において考察されるワクシニアウイルスによってコードされるGM-CSFポリペプチドまたは他のポリペプチドを含む本発明の方法によって停止、破壊、または遅延される可能性がある。

【0176】

A. 投与

本発明の方法および組成物を用いて、細胞を殺すため、細胞増殖を阻害するため、転移

10

20

30

40

50

を阻害するため、腫瘍または組織の大きさを減少させるため、およびそうでなければ腫瘍細胞の悪性の表現型を逆転または減少させるために、一般的に、ポリペプチドまたはポリペプチドをコードする発現構築物のような治療化合物を、過増殖細胞に接触させるであろう。投与経路は当然、病変の位置および特性によって変化して、これには例えば、皮内、経皮、非経口、静脈内、筋肉内、鼻腔内、皮下、局所、経皮、気管内、腹腔内、動脈内、小胞内、腫瘍内、吸入、還流、洗浄、直接注射、および経口投与ならびに製剤が含まれるであろう。

【0177】

本発明は、具体的に本発明のワクシニアウイルスの血管内投与に関する。「血管内」という用語は、患者の血管または複数の血管の中、内部、またはそれらにおけることを意味する、患者の血管への送達を指すと理解される。特定の態様において、投与は、静脈（静脈内）であると見なされる血管に行われ、一方他の多投与は動脈であると見なされる血管に行われる。静脈には、内頸静脈、末梢静脈、冠状静脈、肝静脈、門脈静脈、大伏在静脈、肺静脈、上大静脈、下大静脈、胃静脈、脾静脈、下腸間膜静脈、上腸間膜静脈、頭静脈、および／または大腿静脈が含まれるがこれらに限定されるわけではない。動脈には、冠状動脈、肺動脈、上腕動脈、内頸動脈、大動脈弓、大腿動脈、末梢動脈、および／または毛様体動脈が含まれるがこれらに限定されるわけではない。送達は、細動脈または毛細管を通して、またはそれらに行ってもよいと企図される。

【0178】

腫瘍内注射または腫瘍血管への注入は、異なる、固体の、近づきやすい腫瘍に関して特に企図される。局所、限局または全身投与も同様に、適当であろう。4cmより大きい腫瘍に関して、投与容量は約4～10ml（好ましくは10ml）であるが、4cmより小さい腫瘍に関しては、容量約1～3ml（好ましくは3ml）が用いられるであろう。1回投与として輸送される多数回注射は、容量約0.1～約0.5mlを含む。ウイルス粒子は、約1cmの間隔をあけて腫瘍に多数回注射を投与することによって都合よく接触される可能性がある。

【0179】

外科的介入の場合、本発明は、手術不能の腫瘍を切除されるようにするために、術前にもよい。または、本発明は、残留または転移疾患を治療するために手術時、および／または手術後に用いてもよい。例えば、切除された腫瘍床に、ポックスウイルスを癌または癌細胞の治療にとって都合がよいようにする変異を含むポックスウイルスポリペプチドまたはポックスウイルスを含む製剤を注射または灌流してもよい。灌流は、カテーテルを手術部位に留置することによって切除後も継続してもよい。周期的な術後治療も同様に想像される。

【0180】

持続的投与はまた、適当であれば、腫瘍を切除して、残留の微小疾患を消失させるために腫瘍床を治療する場合に、応用してもよい。シリンジまたはカテーテル挿管による輸送が好ましい。そのような連続灌流は、治療開始後約1～2時間、約2～6時間、約6～12時間、約12～24時間、約1～2日、約1～2週間、またはそれ以上までの期間行ってもよい。一般的に、持続的灌流による治療的組成物の用量は、1回または、灌流を行う期間にわたって補正された多数回注射によって投与された用量と同等であろう。脚の灌流を用いて、特に黒色腫および肉腫の治療において、本発明の治療組成物を投与してもよいとさらに企図される。

【0181】

治療レジメも同様に変わり得、しばしば腫瘍のタイプ、腫瘍の位置、疾患の進行、ならびに患者の健康および年齢に依存する。明らかなことであるが、特定のタイプの腫瘍は、より積極的な治療を必要とするが、同時に特定の患者はより負担の多いプロトコールに認容できない。臨床医は、治療製剤の既知の有効性および毒性（もしあれば）に基づいてそのような決定を行うために最も適しているであろう。

【0182】

特定の態様において、治療すべき腫瘍は、少なくとも最初切除可能でなくてもよい。治

10

20

30

40

50

療的ウイルス構築物による治療は、周辺部の収縮による、または特定の特に侵襲性の部分の消失によって、腫瘍の切除可能性を増加させる可能性がある。治療後、切除が可能となる可能性がある。切除後のさらなる治療は、腫瘍部位での微小残留疾患を消失させるために役立つであろう。

【0183】

原発腫瘍または切除後の腫瘍床に関して典型的な治療経過は、多数回投与を含むであろう。典型的な原発腫瘍の治療は、2週間のあいだに6回投与を含む。2週間レジメは、1、2、3、4、5、6回またはそれ以上繰り返してもよい。治療経過において、計画された投与を完了する必要があるか否かを再評価してもよい。

【0184】

治療には、様々な「単位用量」が含まれてもよい。単位用量は、治療組成物の既定量を含むと定義される。投与すべき量、および特定の経路および製剤は、臨床分野の当業者の技術範囲である。単位用量は、1回注射として投与される必要はないが、一定期間にわたって連続的注入を含んでもよい。本発明の単位用量は、ウイルス構築物に関してブラーク形成単位 (pfu) に関する記述することが都合がよいかも知れない。単位用量は 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} pfuおよびそれ以上の範囲である。またはウイルスおよび達成可能な力価の種類に応じて、患者または患者の細胞に感染性ウイルス粒子 (vp) 1～100個、10～50個、100～1000個、または約 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、または 1×10^{15} 個またはそれ以上を輸送するであろう。

10

20

【0185】

B. 注射可能な組成物および製剤

本発明において、ポックスウイルスゲノムの全てまたは一部をコードする発現構築物またはウイルスを癌または腫瘍細胞に輸送するための好ましい方法は、腫瘍内注射である。しかし、または本明細書に開示の薬学的組成物は、米国特許第5,543,158号、米国特許第5,641,515号、および米国特許第5,399,363号（そのそれぞれの全文が参照として本明細書に組み入れられる）に記述されるように、非経口、静脈内、皮内、筋肉内、経皮、または腹腔内投与してもよい。

30

【0186】

核酸構築物の注入は、発現構築物が注射のために必要な特定のゲージの針の中を通過することができる限り、溶液の注射のために用いられるシリンジまたは他の任意の方法によって輸送してもよい。溶液を保持するためのアンプル室を定めるノズルと、輸送部位にノズルから溶液を押し出すためのエネルギー装置とを有する、新しい針のない注射システムが最近記述されている（米国特許第5,846,233号）。正確に任意の深さに溶液の規定量を多数回注射することができるシリンジシステムもまた、遺伝子治療において用いるために記述されている（米国特許第5,846,225号）。

【0187】

遊離の塩基または薬学的に許容される塩としての活性化合物の溶液は、ヒドロキシリプロピルメチロースのような界面活性剤と適切に混合される水において調製してもよい。分散液はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびその混合物ならびに油において調製してもよい。通常の保存および使用条件において、これらの調製物は、微生物の増殖を防止するための保存剤を含む。注射での使用に適した薬学剤形には、滅菌注射用溶液または分散液の即時調製物のための滅菌水溶液または分散液と滅菌粉末とが含まれる（その全文が特に参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,466,468号）。全ての場合において、製剤は滅菌でなければならず、容易な注入操作性が存在する程度に流動性でなければならない。製剤は、製造および保存条件で安定でなければならず、細菌および真菌のような微生物の混入作用に対して保護されなければならない。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）、その適した混合物および/または植物油を含む溶媒または分散媒体となりうる。適當な流動性は、例えばレシチンのようなコーティングを用い

40

50

ることによって、分散剤の場合には必要な粒子径を維持することによって、および界面活性剤を用いることによって維持してもよい。微生物の作用の保護は、様々な抗菌および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によって得ることができる。多くの場合において、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含めることが好ましいであろう。注射用組成物の持続的な吸収は、吸収を遅らせる物質、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物において用いることによって得ができる。

【0188】

水溶液での非経口投与の場合、溶液は、必要であれば適当に緩衝作用を有しなければならず、例えば、液体の希釈液は十分な生理食塩液またはグルコースによってまず等張にしなければならない。これらの特定の水溶液は静脈内、筋肉内、皮下、腫瘍内、および腹腔内投与に特に適している。これに関連して、用いることができる滅菌水性媒体は、本開示に照らして当業者に既知であろう。例えば、1用量を等張NaCl溶液1mlに溶解して、これを皮下注入液1000mlに加えるか、または提案される注入部位で注入してもよい(例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、第15版、1035～1038頁および1570～1580頁)。何らかの用量の変更は、治療される被験体の病態に応じて必ず起ころう。投与責任者は、いずれにせよ、個々の被験体の適当な用量を決定するであろう。その上、ヒトでの投与に関して、調製物は、FDA生物標準局によって要求される滅菌性、発熱性、全身安全性および純度標準を満たさなければならない。

【0189】

滅菌注射用溶液は、必要であれば濾過滅菌後、先に列挙した様々な他の成分と共に適当な溶媒に必要量の活性化合物を組み入れることによって調製される。一般的に、分散液は、基礎分散媒体と先に列挙した媒体からの必要な他の成分とを含む滅菌媒体に様々な滅菌活性成分を組み入れることによって調製される。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製法は、予め濾過滅菌されたその溶液から活性成分プラス任意のさらなる所望の成分の粉末を生じる真空乾燥または凍結乾燥技術である。

【0190】

本明細書に開示の組成物は、中性または塩の形で製剤化してもよい。薬学的に許容される塩には、酸付加塩(タンパク質の遊離のアミノ基によって形成される)が含まれ、これらは例えば塩酸または磷酸のような無機酸、または酢酸、シウ酸、酒石酸、マンデル酸等のような有機酸から形成される。遊離のカルボキシル基によって形成された塩も同様に、例えば、水酸化ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または第2鉄のような無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン等のような有機塩基に由来しうる。製剤化した後、溶液は、投与製剤と適合するように、治療的に有効である量で投与されるであろう。製剤は、注射用溶液、薬物放出カプセル等のような多様な投与剤形で容易に投与される。

【0191】

本明細書において用いられるように、「担体」には、任意の全ての溶媒、分散培地、媒体、コーティング、希釈剤、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤、緩衝剤、担体溶液、懸濁剤、コロイド等が含まれる。薬学的に活性な物質に関してそのような媒体および物質を用いることは、当技術分野で周知である。如何なる通常の媒体または物質も活性成分と非適合性である場合を除き、治療組成物におけるその使用が企図される。補助活性成分も同様に組成物に組み入れることができる。

【0192】

「薬学的に許容される」または「薬理学的に許容される」という句は、ヒトに投与した場合にアレルギーまたは類似の望ましくない反応を生じない分子実体および組成物を指す。活性成分としてタンパク質を含む水性組成物の調製は当技術分野で十分に理解されている。典型的に、そのような組成物は、液体溶液または懸濁液として適した固体剤形として調製される；注射の前に液体において溶液または懸濁液として適した固体剤形も同様に調製することができる。

10

20

30

40

50

【0193】

C. 併用治療

本発明の化合物および方法は、癌およびアテローム性動脈硬化症を含む過増殖性疾患 / 病態の状況において用いてもよい。弱毒化ワクシニアウイルスのような本発明の組成物による治療の有効性を増加させるために、それらの疾患および病態の治療において有効な他の物質とこれらの組成物とを併用することが望ましいかも知れない。例えば、癌の治療は、本発明の治療化合物と、抗癌物質または手術のような他の抗癌治療とによって行ってもよい。

【0194】

例えばワクシニアウイルスのような弱毒化ポックスウイルスを「A」として第二の抗癌治療を「B」とするような、様々な併用を用いてもよい。

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

【0195】

本発明の治療的発現構築物の患者への投与は、もしあればポックスウイルス治療の毒性を考慮に入れて、特定の二次治療の投与のための一般的プロトコールに従うであろう。治療サイクルは必要に応じて繰り返されるであろうと予想される。同様に、記述の癌または腫瘍細胞治療と併用して、様々な標準的な治療と共に外科的介入を応用してもよいと企図される。

【0196】

1. 抗癌治療

「抗癌」物質は、例えば、癌細胞を殺す、癌細胞においてアポトーシスを誘導する、癌細胞の増殖速度を減少させる、転移の発生または数を減少させる、腫瘍の大きさを減少させる、腫瘍の増殖を阻害する、腫瘍または癌細胞への血液供給を減少させる、癌細胞または腫瘍に対する免疫応答を促進させる、癌の進行を予防または阻害する、または癌を有する被験体の生命を延長させることによって被験体における癌に負の影響を及ぼすことができる。抗癌剤には、生体物質（生物治療）、化学療法剤、および放射線療法が含まれる。より一般的に、これらの他の組成物は、細胞を殺すまたは増殖を阻害するために有効な併用量で提供されるであろう。このプロセスは、発現構築物および物質または多数の因子を細胞に同時に接触させることを含んでもよい。これは、単一の組成物もしくは双方の物質を含む薬理学的製剤を細胞に接触させることによって、または一つの組成物に発現構築物が含まれ、他の組成物に第二の物質が含まれる、二つの異なる組成物もしくは製剤を細胞に同時に接触させることによって行ってもよい。

【0197】

化学療法および放射線療法剤に対する腫瘍細胞の耐性は、臨床腫瘍学において大きい問題である。現在の癌治療の一つの目標は、これを遺伝子治療と組み合わせることによって化学療法および放射線療法の有効性を改善する方法を見いだすことである。例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼ (HS-tK) 遺伝子を、レトロウイルスベクター系によって脳腫瘍に輸送すると、抗ウイルス剤であるガンシクロビルに対する感受性の誘導に成功した (Culverら、1992)。本発明の状況において、ポックスウイルス治療は、同様に他のプロアポトーシスまたは細胞周期調節物質の他に、化学療法、放射線療法、免疫療法、または他の生物学的介入と共に用いることができるであろうと企図される。

【0198】

または、遺伝子治療は、数分から数週間の間隔で他の物質治療の前後に行ってもよい。他の物質および発現構築物が細胞に個別に適用される態様において、一般的に、物質と発現構築物がなおも細胞に対して有利な併用効果を発揮できるように、それぞれの輸送時間のあいだに有意な期間が経過しないことを確実にするであろう。そのような場合、細胞を

10

20

30

40

50

双方の療法に互いに約12～24時間以内、より好ましくは互いに約6～12時間以内に接觸させてもよいと企図される。状況によっては、それぞれの投与のあいだに数日（2、3、4、5、6または7日）から数週間（1、2、3、4、5、6、7、8週間）が経過する場合には、治療期間を有意に延長することが望ましいかも知れない。

【0199】

a. 化学療法

癌の療法にはまた、化学および放射線に基づく治療との多様な併用治療が含まれる。併用化学療法には、例えばシスプラチン（CDDP）、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトテシン、イフオスファミド、メルファラン、クロラムブシリ、ブルファン、ニトロソウレア、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、ブリコマイシン、マイトイマイシン、エトボシド（VP16）、タモキシフェン、ラロキシフェン、エストロゲン受容体結合剤、タキソール、ゲムシタビン、ナベルビン、ファルネシル-タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、トランスプラチン、5-フルオロウラシル、ビンクリスチン、ビンプラスチニン、およびメトトレキセート、テマゾロミド（DTICの水溶型）、または前述の任意の誘導体もしくは類似体が含まれる。化学療法と生物療法との併用は生化学療法として知られている。10

【0200】

b. 放射線療法

DNA損傷を引き起こし、広範に用いられている他の物質には、一般的に 線、X線として一般的に知られている放射線、および／または放射性同位元素の腫瘍細胞への直接輸送が含まれる。マイクロ波およびUV照射のような他の型のDNA損傷剤も同様に企図される。これらの因子は全て、DNA、DNAの前駆体、DNAの複製および修復、ならびに染色体の構築および維持に対して広範囲の損傷を与える可能性が最も高い。X線の線量範囲は、1日量50～200レントゲンを長期間（3～4週間）から、2000～6000レントゲンの1回線量に及ぶ。放射性同位元素の用量範囲は広く異なり、同位元素の半減期、放出される放射線の強度およびタイプ、ならびに新生細胞による取り込みに依存する。20

【0201】

細胞に適用した場合に「接觸される」および「曝露される」という用語は、本明細書において、治療構築物と化学療法または放射線療法剤とが標的細胞に輸送される、または標的細胞の直接近位に置かれるプロセスを記述するために用いられる。殺細胞または細胞抑制を得るために、双方の物質は、細胞を殺すために、または分裂を防止するために有効な併用量で細胞に輸送される。30

【0202】

c. 免疫療法

免疫療法は一般的に、癌細胞を標的として破壊するために免疫エフェクター細胞および分子を用いることに依存する。免疫エフェクターは、例えば腫瘍細胞の表面上のいくつかのマーカーに対して特異的な抗体であってもよい。抗体単独は、治療のエフェクターとして役立ってもよく、または殺細胞を実際に行うために他の細胞を動員してもよい。抗体はまた、薬物または毒素（化学療法剤、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素等）に結合させてもよく、単にターゲティング剤として作用してもよい。または、エフェクターは、腫瘍細胞標的と直接または間接的に相互作用する表面分子を有するリンパ球であってもよい。様々なエフェクター細胞には、細胞障害性T細胞およびNK細胞が含まれる。治療様相の併用、すなわち直接細胞障害活性と特定のポックスウイルスポリペプチドの阻害または減少との併用は、癌の治療において治療利益を提供するであろう。40

【0203】

免疫療法もまた、併用治療の一部として用いることができるであろう。併用治療の一般的なアプローチを下記に示す。免疫治療の一つの局面において、腫瘍細胞は、ターゲティングに対して感受性がある、すなわち他の大多数の細胞には存在しないいくつかのマーカーを有しなければならない。多くの腫瘍マーカーが存在し、これらのいずれも本発明の状況においてターゲティングのために適している可能性がある。一般的な腫瘍マーカーには50

、癌胎児抗原、前立腺特異抗原、尿中腫瘍関連抗原、胎児抗原、チロシナーゼ(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、シアリルルイス抗原、MucA、MucB、PLAP、エストロゲン受容体、ラミニン受容体、erbBおよびp155が含まれる。もう一つの局面の免疫治療は、免疫刺激効果を有する抗癌作用である。IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、IFN のようなサイトカイン、MIP-1、MCP-1、IL-8のようなケモカイン、およびFLT3リガンドのような増殖因子を含む免疫刺激分子も同様に存在する。免疫刺激分子をタンパク質としてまたは遺伝子輸送を用いてmda-7のような腫瘍抑制物質と併用すると、抗腫瘍効果を増強することが示されている(Juら、2000)。

【0204】

先に考察したように、現在試験中または用いられている免疫療法の例は、免疫アジュvant(例えば、ウシ型結核菌(*Mycobacterium bovis*)、プラスモジウム・ファルシバルム(*Plasmodium falciparum*)、ジニトロクロロベンゼン、および芳香族化合物)(米国特許第5,801,005号;米国特許第5,739,169号;Hui and Hashimoto、1998;Christodoulidesら、1998)、サイトカイン療法(例えば、インターフェロン、およびIL-1、GM-CSF、ならびにTNF)(Bukowskiら、1998;Davidsonら、1998;Hellstrandら、1998)、遺伝子治療(例えば、TNF、IL-1、IL-2、p53)(Qinら、1998;Austin-Ward and Villaseca、1998;米国特許第5,830,880号および米国特許第5,846,945号)およびモノクローナル抗体(例えば、抗ganglioside GM2、抗HER-2、抗-p185)(Pistrasら、1998;Hanibuchiら、1998;米国特許第5,824,311号)である。ハーセプチン(トラツズマブ)は、HER2-neu受容体を阻害するキメラ(マウス-ヒト)モノクローナル抗体である。これは抗腫瘍活性を有し、悪性腫瘍の治療に用いることが承認されている(Dillman、1999)。癌とヘルセプチンおよび化学療法との併用治療は、個々の治療より有効であることが示されている。このように、一つまたはそれ以上の抗癌治療を本明細書に記述のポックスウイルス関連治療と共に用いてもよいと企図される。

10

20

30

【0205】

受動免疫療法

癌の受動免疫療法には多くの異なるアプローチが存在する。それらは、以下の分類に広く分類される可能性がある:抗体単独の注射、毒素または化学療法剤に共役させた抗体の注射、放射活性同位元素に共役させた抗体の注射、抗イディオタイプ抗体の注射、および最後に、骨髄における腫瘍細胞の追放。

30

【0206】

好ましくは、ヒトモノクローナル抗体は患者においてほとんどまたは全く副作用を生じないことから、ヒトモノクローナル抗体は受動免疫療法において用いられる。しかし、それらが稀少であることからその応用は幾分制限され、これまで病変内に投与されてきたに過ぎない。ganglioside抗原に対するヒトモノクローナル抗体は、皮膚再発性黒色腫を有する患者に病変内に投与されている(Irie and Morton、1986)。病変内注射を毎日または毎週行った後に、患者10人中6人において退縮を認めた。もう一つの試験において、二つのヒトモノクローナル抗体の病変内注射によって中等度の成功を認めた(Irieら、1989)。

40

【0207】

二つの異なる抗原に対する一つより多いモノクローナル抗体、または多数の抗原特異性を有する抗体を投与することが好ましいかも知れない。治療プロトコールにはまた、Bajarinら(1988)によって記述されるようにリンフォカインまたは他の免疫エンハンサーの投与が含まれてもよい。ヒトモノクローナル抗体の作製は、本明細書の他所でさらに詳しく記述される。

【0208】

能動的免疫治療

能動的免疫治療において、抗原性ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質、または自己もしくは同種異系腫瘍細胞組成物または「ワクチン」は、一般的に異なる細菌アジュvant(Ravindranath and Morton、1991;Mortonら、1992;Mitchellら、1990;Mitchel

50

Iら、1993)と共に投与される。黒色腫の免疫療法において、高いIgM反応を誘発する患者はしばしば、全くIgM抗体を誘発しないまたは低いIgM抗体を誘発する患者より長く生存する(Mortonら、1992)。IgM抗体はしばしば一過性の抗体であるが、この規則の例外は、抗ガングリオシドまたは抗炭化水素抗体であるように思われる。

【0209】

養子免疫療法

養子免疫療法において、患者の循環中のリンパ球または腫瘍浸潤リンパ球をインビトロで単離して、IL-2のようなリンフォカインによって活性化して、腫瘍壊死に関する遺伝子を形質導入して再投与する(Rosenbergら、1988; 1989)。これを行うために、動物またはヒト患者に、本明細書に記述のアジュバントを組み入れた抗原ペプチド組成物と併用して活性化リンパ球の免疫学的有効量が投与されるであろう。活性化リンパ球は最も好ましくは、血液または腫瘍試料から予め単離されてインビトロで活性化された(または「増殖させた」)患者自身の細胞であろう。この型の免疫治療によって、黒色腫および腎癌の数例の退縮が引き起こされたが、反応者の割合は反応しなかった人と比較すると少数であった。

【0210】

d. 遺伝子

さらにもう一つの態様において、二次治療は、弱毒化ポックスウイルスが投与される前、後、または同時に治療ポリヌクレオチドが投与される遺伝子治療である。以下の遺伝子産物の一つをコードするベクターと共にポックスウイルスを輸送すれば、標的組織に対して併用抗癌作用を有するであろう。または、ポックスウイルスは、ウイルスベクターとして治療ポリヌクレオチドを含めるように操作してもよい。多様なタンパク質が本発明に含まれ、そのいくつかを下記に記す。表7は、本発明と共にいくつかの型の遺伝子治療のために標的とされる可能性がある様々な遺伝子を一覧にする。

【0211】

細胞増殖の誘導物質

細胞増殖を誘導するタンパク質はさらに、機能に応じて様々な分類に分けられる。これらのタンパク質の全ての一般性は、細胞増殖の調節能である。例えば、PDGFの一つの型であるsis腫瘍遺伝子は、分泌型増殖因子である。腫瘍遺伝子はまれに増殖因子をコードする遺伝子から生じるが、現在のところ、sisは、既知の唯一の天然に存在する腫瘍遺伝子増殖因子である。本発明の一つの態様において、細胞増殖の特定の誘導物質に向けられるアンチセンスマRNAを用いて、細胞増殖の誘導物質の発現を阻害することが企図される。

【0212】

タンパク質FMS、ErbA、ErbBおよびneuは、増殖因子受容体である。これらの受容体の変異によって、調節可能な機能の喪失が起こる。例えば、Neu受容体タンパク質の膜貫通ドメインに影響を及ぼす点突然変異によってneu腫瘍遺伝子が得られる。erbA腫瘍遺伝子は、甲状腺ホルモンの細胞内受容体に由来する。改変型腫瘍遺伝子ErbA受容体は、内因性の甲状腺ホルモン受容体と競合して、制御されない増殖を引き起こすと考えられる。

【0213】

最も大きいクラスの腫瘍遺伝子には、シグナル伝達タンパク質(例えば、Src、Ab1、およびRas)が含まれる。タンパク質Srcは、細胞質タンパク質-チロシンキナーゼであり、場合によっては癌原遺伝子から癌遺伝子へのその形質転換は、チロシン残基527位での変異によって起こる。対照的に、GTPアーゼタンパク質rasの癌原遺伝子から癌遺伝子への形質転換は一例において、配列におけるアミノ酸12位でのバリンからグリシンへの変異が原因で起こり、ras GTPアーゼ活性を減少させる。

【0214】

タンパク質Jun、Fos、およびMycは、転写因子として核機能にその影響を直接発揮するタンパク質である。

【0215】

細胞増殖の阻害剤

10

20

30

40

50

腫瘍抑制癌遺伝子は、過度の細胞増殖を阻害するように機能する。これらの遺伝子の不活性化は、その阻害活性を破壊して調節されない増殖を生じる。腫瘍抑制因子p53、p16およびC-CAMを下記に記述する。

【0216】

先に記述されているp53の他に、細胞増殖のもう一つの阻害剤はp16である。真核細胞周期の主な移動は、サイクリン依存的キナーゼまたはCDKによって誘発される。一つのCDKであるサイクリン依存的キナーゼ4(CDK4)は、G₁を通しての進行を調節する。この酵素の活性は、G₁後期でRbを磷酸化することである可能性がある。CDK4の活性は、活性化サブユニット、D型サイクリンおよび阻害サブユニットによって制御され、p16^{INK4}は、CDK4に特異的に結合して阻害するタンパク質であると生化学的に特徴が調べられており、このようにRb磷酸化を調節する可能性がある(Serranoら、1993; Serranoら、1995)。p16^{INK4}タンパク質はCDK4阻害剤であることから(Serrano、1993)、この遺伝子の欠失はCDK4の活性を増加させて、その結果Rbタンパク質の過磷酸化が起こる可能性がある。p16はまた、CDK6の機能を調節することが知られている。

10

【0217】

p16^{INK4}は、p16^B、p19、p21^{WAF1}、およびp27^{KIP1}が含まれるCDK阻害タンパク質の新たに記述されたクラスに属する。p16^{INK4}遺伝子は、多くの腫瘍タイプにおいてしばしば欠失している9p21にマッピングされる。p16^{INK4}遺伝子のホモ接合欠失および変異は、ヒト腫瘍細胞株において頻繁である。この証拠は、p16^{INK4}遺伝子が腫瘍抑制遺伝子であることを示唆する。しかし、p16^{INK4}遺伝子の変化の頻度は培養細胞株より原発性非培養腫瘍においてかなり低いという知見から、この解釈は疑われている(Caldasら、1994; Chengら、1994; Hussussianら、1994; Kambら、1994; Kambら、1994; Moriら、1994; Okamotoら、1994; Noboriら、1994; Orlowら、1994; Arapら、1995)。プラスミド発現ベクターのトランスフェクションによる野生型p16^{INK4}機能の回復によって、いくつかのヒト癌細胞株によるコロニー形成は減少した(Okamoto、1994; Arap、1995)。

20

【0218】

本発明に従って用いてよい他の遺伝子には、Rb、APC、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-I、MEN-II、zac1、p73、VHL、MMAC1/PTEN、DBCCR-1、FCC、rsk-3、p27、p27/p16融合体、p21/p27融合体、抗血栓遺伝子(例えば、COX-1、TFPI)、PGS、Dp、E2F、ras、myc、neu、raf、erb、fms、trk、ret、gsp、hst、abl、E1A、p300、血管新生に関する遺伝子(例えば、VEGF、FGF、トロンボスポンジン、BAI-1、GDAIF、またはその受容体)およびMCCが含まれる。

30

【0219】

プログラムされた細胞死の調節因子

アポトーシスまたはプログラムされた細胞死は、正常な胎児発達の本質的なプロセスであり、成体組織における恒常性を維持し、発癌を抑制する(Kerrら、1972)。Bcl-2ファミリータンパク質およびICE-様プロテアーゼは、他の系におけるアポトーシスの重要な調節物質およびエフェクターであることが証明されている。濾胞性リンパ腫に関連して発見されたBcl-2タンパク質は、アポトーシスの制御および多様なアポトーシス刺激に反応した細胞生存の増強に顕著な役割を有する(Bakhshiら、1985; Cleary and Sklar、1985; Clearyら、1986; Tsujimotoら、1985; Tsujimoto and Croce、1986)。進化的に保存されたBcl-2タンパク質は現在では、デスマゴニストまたはデスアンタゴニストとして分類することができる関連タンパク質ファミリーのメンバーであると認識されている。

40

【0220】

その発見後、Bcl-2は、多様な刺激によって誘発される細胞死を抑制するように作用することが示された。同様に、共通の構造および配列相同性を有するBcl-2細胞死調節タンパク質ファミリーが存在することは今では明らかである。これらの異なるファミリーメンバーは、Bcl-2と類似の機能を有する(例えば、Bcl_{XL}、Bcl_W、Bcl_S、Mcl-1、A1、Bfl-1)、またはBcl-2機能に拮抗して細胞死を促進する(例えば、Bax、Bak、Bik、Bim、Bid、Bad、Harakiri)ことが示されている。

50

【0221】

D. 手術

癌患者の約60%が何らかのタイプの手術を受け、その中には、予防的、診断的または進行期決定、治癒的および待期的手術が含まれる。治癒的手術は、本発明の治療、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、遺伝子治療、免疫療法および/またはもう一つの治療のような他の治療と共に用いてもよい癌治療である。

【0222】

治癒的手術には、癌組織の全てまたは一部が物理的に除去、切除、および/または破壊される切除が含まれる。腫瘍の切除は、腫瘍の少なくとも一部の物理的切除を指す。腫瘍の切除の他に、手術による治療には、レーザー手術、凍結手術、電気手術、および顕微鏡による手術(Moh's手術)が含まれる。本発明は、表層部癌、前癌、および正常組織の偶発的量の除去と共に用いてもよいとさらに企図される。

【0223】

癌細胞、組織、または腫瘍の一部または全てを切除した場合、体内に腔が形成される可能性がある。治療は、さらなる抗癌治療によるその領域の還流、直接注入または局所適用によって行ってもよい。そのような治療は、例えば1、2、3、4、5、6、もしくは7日毎、1、2、3、4、および5週間毎、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12ヶ月毎に繰り返してもよい。これらの治療は、同様に用量を変化させた治療であってもよい。

【0224】

E. 他の物質

治療の治療的有効性を改善するために、他の物質を本発明と併用して用いてもよいと企図される。これらのさらなる物質には、免疫調節剤、細胞表面受容体のアップレギュレーションおよびGAP接合部に影響を及ぼす物質、細胞抑制および分化物質、細胞接着阻害剤、アポトーシス誘導物質に対する過増殖細胞の感受性を増加させる物質、または他の生体物質が含まれる。免疫調節剤には、腫瘍壞死因子；インターフェロン、、および；IL-2および他のサイトカイン；F42Kおよび他のサイトカイン類似体；またはMIP-1、MIP-1、MCP-1、RANTES、および他のケモカインが含まれる。Fas/Fasリガンド、DR4またはDR5/TRAIL(Apo-2リガンド)のような細胞表面受容体またはそのリガンドのアップレギュレーションは、過増殖細胞に対するオートクライインまたはパラクライイン効果を確立することによって本発明のアポトーシス誘導能を増強するであろう。GAP接合部の数を増加させることによる細胞内シグナル伝達の増加は、隣接する過増殖細胞集団に対する抗過増殖効果を増加するであろう。他の態様において、細胞抑制または分化因子を、治療の抗過増殖有効性を改善するために本発明と併用して用いることができる。細胞接着阻害剤は、本発明の有効性を改善すると企図される。細胞接着阻害剤の例は、局所接着キナーゼ(FAK)阻害剤およびロバスタチンである。抗体c225のようなアポトーシスに対する過増殖細胞の感受性を増加させる他の物質を、治療の有効性を改善するために本発明と併用して用いることができるであろう。

【0225】

Apo2リガンド(Apo2L、TRAILとも呼ばれる)は、腫瘍壞死因子(TNF)サイトカインファミリーのメンバーである。TRAILは、多くのタイプの癌細胞において急速なアポトーシスを活性化するが、正常細胞に対しては毒性ではない。TRAIL mRNAは、広範な組織に起こる。ほとんどの正常細胞は、TRAILの細胞障害作用に対して抵抗性であるように思われ、TRAILによるアポトーシス誘導に対して保護することができるメカニズムの存在を示唆している。TRAILに関して記述された第一の受容体は、デス受容体4(DR4)と呼ばれ、細胞質の「デスドメイン」を含む；DR4は、TRAILによって運ばれるアポトーシスシグナルを伝搬する。TRAILに結合するさらなる受容体が同定されている。DR5と呼ばれる一つの受容体は、DR4と同様に細胞質デスドメインを含み、アポトーシスのシグナルを送る。DR4およびDR5 mRNAは、多くの正常組織および腫瘍細胞株において発現されている。最近、TRAILによるDR4およびDR5を通してのアポトーシスの誘導を防止するDcR1およびDcR2のようなおとり

10

20

30

40

50

受容体が同定されている。このように、これらのおとり受容体は、細胞表面で直接、プロアポトーシスサイトカインに対する感受性を調節するための新規メカニズムを表す。正常組織におけるこれらの阻害受容体の選択的発現は、TRAILが、正常細胞を容赦しながら、癌細胞においてアポトーシスを誘導する抗癌剤として有用となる可能性があることを示唆している(Marstersら、1999)。

【0226】

細胞障害性化学療法剤の導入後、癌の治療は大きく進歩した。しかし、化学療法の結果の一つは、薬剤耐性表現型の発生／獲得と、多剤耐性の発生である。薬剤耐性の発生は、そのような腫瘍の治療において依然として主な障害であり、したがって、遺伝子治療のようなもう一つのアプローチが明らかに必要である。

10

【0227】

化学療法、放射線治療または生物治療と共に用いられるもう一つの治療型には、患者の組織を高温(106°Fまで)に曝露する技法である温熱療法が含まれる。外部または内部加熱装置は、局所、限局、または全身温熱療法の適用に関与する可能性がある。局所温熱療法は、腫瘍のような小さい領域に対する熱の適用を含む。熱は、体外の装置から腫瘍を標的とする高周波によって外部から產生されてもよい。内部の熱は、薄い、加熱したワイヤまたは温水を満たした中空管を含む滅菌プローブ、埋め込み型マイクロ波アンテナ、または高周波電極を含んでもよい。

20

【0228】

患者の臓器または肢は、限局治療のために加熱され、これは磁石のような高エネルギーを発生する装置を用いて行われる。または、患者の血液の一部を採取して、加熱してから、内部加熱される領域に灌流してもよい。全身加熱はまた、体全体に癌が伝搬した症例において行ってもよい。温水ブランケット、ホットワックス、誘導コイル、および熱チャنبーをこの目的のために用いてもよい。

30

【0229】

ホルモン療法も同様に、本発明と併用して、または既に記述した任意の他の癌治療と併用して用いてもよい。ホルモンの使用は、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、または子宮頸癌のような特定の癌の治療において、またはテストステロンもしくはエストロゲンのような特定のホルモンのレベルを低下させるためもしくは作用を遮断するために用いてもよい。この治療はしばしば、治療の選択肢として、または転移のリスクを減少させるために少なくとも一つの他の癌治療と併用して用いられる。

40

【0230】

(表6) 腫瘍遺伝子

遺伝子	起源	ヒト疾患	機能
増殖因子			FGFファミリーメンバー
<i>HST/KS</i>	トランスフェクション		
<i>INT-2</i>	MMTVプロモーター 挿入		FGFファミリーメンバー
<i>INT1/WNT1</i>	MMTVプロモーター 挿入		因子様
<i>SIS</i>	シミアン肉腫ウイルス		PDGF B
受容体チロシンキナーゼ			
<i>ERBB/HER</i>	トリ赤芽球症ウイルス； ALVプロモーター挿入； 増幅された ヒト腫瘍	増幅、欠失された 扁平上皮癌； 神經膠芽腫	EGF/TGF- α / アンフィレグリン / ヘタセルリン受容体
<i>ERBB-2/NEU/HER-2</i>	ラット神經膠芽腫から トランスフェクト	増幅された乳癌、 卵巣癌、胃癌	NDF/ヘレグリンおよび EGF-関連因子によって調節
<i>FMS</i>	SMネコ肉腫ウイルス		CSF-1受容体
<i>KIT</i>	HZネコ肉腫ウイルス		MGF/スチール受容体 造血

50

遺伝子	起源	ヒト疾患	機能	
<i>TRK</i>	ヒト結腸癌からの トランスフェクション		NGF (神経生長因子) 受容体	
<i>MET</i>	ヒト骨肉腫からの トランスフェクション		スキャッター因子/HGF 受容体	
<i>RET</i>	転座および 点突然変異	散発性甲状腺癌 ; 家族性甲状腺腫瘍癌 ; 多発性内分泌新生物 2Aおよび2B	オーファン受容体Tyr キナーゼ	
<i>ROS</i>	URII トリ肉腫 ウイルス		オーファン受容体Tyr キナーゼ	10
PDGF受容体	転座	慢性 骨髓単球性 白血病	TEL (ETS様 転写因子) / PDGF受容体遺伝子 融合体	
TGF- β 受容体		結腸癌 ミスマッチ変異 標的		
非受容体チロシンキナーゼ				
<i>ABI</i>	アベルソンMu1.V	BCRによる慢性骨髓性 白血病 転座	RB、RNA ポリメラーゼ、CRK、 CBLと相互作用	20
<i>FPS/FES</i>	トリフジナミSV ; GA FeSV			
<i>LCK</i>	Mu1.V (マウス白血病 ウイルス) プロモーター 挿入		Srcファミリー ; T細胞 シグナル伝達 ; CD4/CD8 T細胞 と相互作用	
<i>SRC</i>	トリラウス肉腫 ウイルス		シグナル伝達機能を 有する膜会合型 Tyrキナーゼ ; 受容体キナーゼによる 活性化	
<i>YES</i>	トリY73ウイルス		Srcファミリー ; シグナル伝達	
SER/THRタンパク質キナーゼ				
<i>AKT</i>	AKT8マウスレトロウイルス		PI(3)Kによって調節? ; 70kd S6kを調節?	30
<i>MOS</i>	モロニーマウス SV		GVBD ; 細胞分裂停止(cystostatic) 因子 ; MAPキナーゼ キナーゼ	
<i>PIM-1</i>	プロモーター挿入 マウス			
<i>RAF/MIL</i>	3611マウスSV ; MH2 トリSV		RAS経路におけるシグナル 伝達	
その他の細胞表面				
<i>APC</i>	腫瘍抑制因子	結腸癌	カテニンと相互作用	40
<i>DCC</i>	腫瘍抑制因子	結腸癌	CAMドメイン	
E-カドヘリン	候補腫瘍抑制 因子	乳癌	細胞外同型結合 ; カテニンと細胞内 相互作用	
<i>PTC/NBCCS</i>	腫瘍抑制因子および ショウジョウバエ相同性	母斑様基底細胞癌 症候群 (ゴーリン 症候群)	12回膜貫通ドメイン ; ヘッジホッギング経路に 拮抗するためにGli相同体CIを 通してのシグナル伝達	

遺伝子	起源	ヒト疾患	機能
TAN-1 Notch 相同体	転座	T-ALI.	シグナル伝達
その他のシグナル伝達			
BCL-2	転座	B細胞リンパ腫	アポトーシス
CBL	Mu Cas NS-1 V		チロシン 磷酸化RING フィンガー相互作用Ab1
CRK	CT1010 ASV		適合SH2/SH3 相互作用Ab1
DPC4	腫瘍抑制因子	肺臓癌	TGF- β 関連シグナル 伝達経路
MAS	トランスフェクションおよび 腫瘍形成性		おそらくアンジオテンシン 受容体
NCK			アダプターSH2/SH3
グアニンヌクレオチド交換因子および結合 タンパク質			
BCR		CMLにおいてABLによる 転座	交換因子；タンパク質 キナーゼ
DBL	トランスフェクション		交換因子
GSP			
NF-1	遺伝性腫瘍抑制 因子	腫瘍抑制因子 神經線維腫症	RAS GAP
OST	トランスフェクション		交換因子
ハーベイ-キルシュテン, N- RAS	HaRat SV; Ki RaSV; Balb-MoMuSV; トランスフェクション	多くのヒト腫瘍における 点突然変異	シグナルカスケード
VAV	トランスフェクション		S112/S113; 交換因子
核タンパク質および転写因子			
BRCA1	遺伝性抑制因子	乳癌／ 卵巣癌	場所不安定
BRCA2	遺伝性抑制因子	乳癌	機能不明
ERBA	トリ赤芽球症 ウイルス		甲状腺ホルモン 受容体（転写）
ETS	トリE26ウイルス		DNA結合
EVII	MuLVプロモーター 挿入	AML	転写因子
FOS	FBI/FBRマウス 骨肉腫ウイルス		c-JUNを有する 転写因子
GLI	增幅された神経膠腫	神経膠腫	ジンクフィンガー； キュビタス・インターラブタス 相同体はヘッジホッグシグナル 伝達経路に存在する；PTC およびヘッジホッグに 阻害性に連鎖する
HMGI /LIM	転座 t(3;12) t(12;15)	脂肪腫	遺伝子融合体高移動基 HMGI-C (XT-フック) および転写因子LIM または酸性ドメイン
JUN	ASV-17		FOSを有する 転写因子AP-1
MLL/VHRX ELIMEN	+ MLL三胸様遺伝子を有する 転座／融合体ELL	急性骨髓性白血病	ELI RNA pol II 伸長因子とDNA結合 およびメチル トランスフェラーゼMLLの 遺伝子融合体

遺伝子	起源	ヒト疾患	機能
<i>MYB</i>	トリ骨髓芽球症 ウイルス		DNA結合
<i>MYC</i>	トリMC29 ; 転座B細胞リンパ腫 ; プロモーター挿入 トリ白血症 ウイルス	バーキットリンパ腫	MAXパートナーとの DNA結合 ; サイクリン調節 ; RBと相互作用 ? ; アポトーシスを調節 ?
<i>N-MYC</i>	増幅	神経芽腫	
<i>L-MYC</i>		肺癌	
<i>REL</i>	トリ 細網内皮症 ウイルス		NF-κBファミリー 転写因子
<i>SKI</i>	トリ SKV770 レトロウイルス		転写因子
<i>VHL</i>	遺伝性抑制因子	フォンヒッペルーリンダウ 症候群	負の調節因子または エロンギン ; 転写 伸長複合体
<i>WT-1</i>		ウィルムス腫瘍	転写因子
細胞周期/DNA損傷反応			
<i>ATM</i>	遺伝性障害	運動失調-血管拡張	タンパク質/脂質キナーゼ 相同性 ; p53経路の 上流でのDNA 損傷反応
<i>BCL-2</i>	転座	濾胞性リンパ腫	アポトーシス
<i>FACC</i>	点突然変異	ファンコーニ貧血 C群 (素因) 白血病	
<i>FHIT</i>	脆弱部位3p14.2	肺癌	ヒスチジン3構造関連 ジアデノシン5',3"- P ¹ .p ⁴ テトラホスフェート 非対称ヒドロラーゼ
<i>hMLI/MutL</i>		HNPPCC	ミスマッチ修復 ; MutL 相同体
<i>HMSH2/MutS</i>		HNPPCC	ミスマッチ修復 ; MutS 相同体
<i>HPMS1</i>		HNPPCC	ミスマッチ修復 ; MutL 相同体
<i>hPMS2</i>		HNPPCC	ミスマッチ修復 ; MutL 相同体
<i>INK4/MTS1</i>	9p21での 隣接INK-4B ; CDK複合体	候補MTS1 抑制剤およびMLM 黒色腫遺伝子	p16 CDK阻害剤
<i>INK4B/MTS2</i>		候補抑制因子	p15 CDK阻害剤
<i>MDM-2</i>	増幅	肉腫	負の調節因子p53
p53	SV40 T抗原に 関連	遺伝性リ・フラウメニ 症候群を含む、 >50%ヒト 腫瘍において変異	転写因子 ; チェックポイント制御 ; アポトーシス
<i>PRAD1/BCL1</i>	副甲状腺ホルモン またはIgGによる 転座	副甲状腺腺腫 ; B-CLL	サイクリンD

10

20

30

40

遺伝子	起源	ヒト疾患	機能
<i>RB</i>	遺伝性網膜芽腫； 多くのDNAウイルス 腫瘍抗原に 関連	網膜芽腫； 骨肉腫；乳癌； 他の散発性癌	サイクリン/cdkと相互作用； E2F転写因子を 調節
<i>XPA</i>		色素性乾皮症； 皮膚癌素因	切除修復；光化学反応 生成物認識； ジンクフィンガー

【0231】

VIII. 実施例

10

以下の実施例は、本発明の好ましい態様を証明するために含まれる。下記の実施例に開示された技術は、本発明の実践にあたって十分に機能すると本発明者らによって発見された技術の代表的なものであり、このように、本発明の実践の好ましい様式を構成すると見なすことができると当業者によって認識されるべきである。しかし、当業者は、本開示に照らして、開示される特定の態様に多くの変更を行うことができ、それでも同様または類似の結果を得ることができると、それらも本発明の趣旨および範囲に含まれることを認識しなければならない。

【0232】

実施例1：材料および方法

20

ウイルスおよび細胞株

野生型ポックスウイルスのパネル (Wyeth、Western Reserve (WR)、USSR、Tian Tan、Tash Kent、Patwadangar、Lister、King、IHD-W、IHD-J、およびEvans) は、Dr Geoff Smith, Imperial College, Londonの厚意により提供された。ヒトアデノウイルス血清型5型 (Ad5) は、ATCCから得た。WRのウイルス増殖因子 (VGF) 欠失株 (vSC20) は、Dr Bernie Moss, NIHの厚意により提供された。WRのチミジンキナーゼ欠失株 (vJS6) およびWRのTK-、VGF-二重欠失株 (vvDD) は、Puhlmann et al. (2000) およびMcCart et al. (2001)において記述されている。発光飛翔昆虫のルシフェラーゼを発現するWR株は、Dr Gary Luke (Uni Michigan)の厚意によって提供された。

【0233】

ワクシニア株JX-963は、大腸菌gptおよびヒトGM-CSF遺伝子を含むpSC65プラスミドのバージョンを、WRのvSC20 (VGF欠失) 株のチミジンキナーゼ遺伝子に組み換える（それぞれ、p7.5およびpSE/Lプロモーターの制御下で）ことによって構築した。X-Galにおけるウイルスの繁殖後の白色ブラークのさらなる選択によって、非機能的lacZ (lacZはvSC20におけるVGF内から発現される) を有するウイルスが產生された。TK遺伝子への正確な挿入およびlacZ機能の喪失は、シークエンシングによって確認して、GM-CSF産生をELISAによって確認した。

30

【0234】

vvDD発現ルシフェラーゼは、ルシフェラーゼを有するpSC65プラスミドのバージョンをp7.5プロモーターの制御下でvSC20に挿入することによって構築した。生体発光は、IVIS 50システム (Xenogen, Alameda) を用いて確認した。

40

【0235】

ヒト腫瘍細胞株には、A2780 (卵巣、ECACCから得た)、A549 (肺、ECACCから得た)、HT-116、HT-29、およびSW620 (結腸、ATCCから得た)、HT-1080 (線維肉腫、ATCCから得た)、LNCaP (前立腺、ATCCから得た)、PANC-1 (膵臓、ATCCから得た)、MCF-7 (乳腺、ATCCから得た) が含まれる。非形質転換細胞には、MRC-5 (肺線維芽細胞、ATCCから得た)、Beas-2B (気管支上皮、Tony Reid, UCSDの厚意により提供)、ならびにいずれも Clonetics (Walkersville, MD) から得られた初代培養正常細胞NHBE (正常ヒト気管支上皮) およびSAEC (小気道気管支上皮) が含まれる。

【0236】

マウス腫瘍細胞株には、CMT 64 (C57/B6肺、Cancer Research UKから得られた)、JC (

50

BALB/c乳腺、ATCCから得られた)、MC38(C57/B6結腸、NIHから得られた)、およびTIB-75(BNL 1ME A.7R.1)(BALB/c肝臓、ATCCから得られた)が含まれる。細胞株NIH 3T3およびH-Rasを過剰発現するNIH 3T3は、Richard Marais(ICR, London)の厚意により提供された。ウサギ腫瘍細胞株VX2は、既に記述されている(Kidd, 1940; Tjernberg, 1962; Chen et al, 2004)。

【0237】

インビトロ複製および細胞障害効果アッセイ

細胞株を6ウェルプレートにおいて 5×10^6 個/ウェルで播種して、終夜放置した。次に、ウイルスを感染多重度(MOI)1.0 plaque forming unit(PFU)/細胞で加えて、2時間感染させた。感染の終了時、培地を交換して、プレートを48時間インキュベートした後、細胞を培地の中にこすり取って採取した。細胞を凍結融解3ラウンドの後に超音波によって溶解した後、粗ウイルス溶解物の連続希釈液をBSC-1細胞に加えて、ウイルス力値を測定した。plaques assayは既に記述されているように(Earl et al, 1998)行った。アデノウイルスはA549細胞(Earl et al, 1998)において力値を測定した。試験は典型的に1試料あたり3個ずつ行う。

【0238】

ウイルスの細胞障害効果(CPE)を査定するために、細胞を96ウェルプレートにおいて1000個/ウェルで播種して、終夜接着させた。試験されるウイルスの連続希釈液をプレートに1試料あたり3個ずつ加えて(MOIは100~0.001の範囲)、プレートをさらに72時間インキュベートした。この後、培地を、血清を含まない培地に交換してMTS(Promega)をプレートに加えた。2~4時間インキュベートした後、450 nmでの吸光度をELISAプレートリーダーにおいて読み取った。細胞障害効果は、細胞のみを含む無処置ウェル(100%生存)および無細胞ウェル(0%生存)の双方と比較した試験ウェルの生存率の低減として決定した。結果を細胞層の50%が生存しているMOIとして表記した(有効濃度50%、EC50)。

【0239】

マウス同系および異種移植片腫瘍モデル試験

免疫コンピテントマウスの皮下に同系腫瘍細胞(1×10^6 個/マウス)を、JCおよびTIB-75細胞がBALB/cマウスに、ならびにMC38およびCMT 64細胞がC57/B6マウスに移植されるように移植した。特定のヒト異種移植片モデルは、SCIDマウス(マウスは全て8~10週齢であり性別を一致させた)に皮下移植したHT29細胞 1×10^7 個を含んだ。腫瘍が $50 \sim 100 \text{ mm}^3$ に達した後、動物を再度群分けして、表記のように処置した。腫瘍の大きさをキャリパーによる測定によって追跡した。

【0240】

ルシフェラーゼ発現ウイルスによって処置したマウスはIVIS 100システム(Xenogen, Alameda)を用いて造影することができる。マウスにルシフェリン(30 mg/kg)を腹腔内注射して、造影の前に麻酔した(2%イソフルラン)。

【0241】

マウス数匹を表記の処置前の時期に屠殺して、臓器をウイルス生体分布または免疫組織化学試験のために回収する。ウイルス生体分布に関して、臓器を瞬間凍結してすりつぶし、記述のようにplaques assayを行う。免疫組織化学試験に関して、切片を作製するために、臓器をホルマリンにおいて固定した後、パラフィンブロックに包埋する。切片をヘマトキシリンおよびエオジン(H&E)ならびにウイルス外皮タンパク質(ポリクローナル抗ワクシニア抗体またはアデノウイルス処置動物に関してはポリクローナル抗ヘキソン抗体)によって染色する。

【0242】

ウサギモデル

VX2腫瘍のニュージーランドホワイトウサギの肝臓への移植ならびにCTおよび超音波スキャンによる腫瘍の進行および肺への転移の測定は、既に記述されている(Paeng et al, 2003)。

【0243】

10

20

30

40

50

細胞障害性Tリンパ球（CTL）アッセイ

これはVX2腫瘍細胞に関して示されているように処置したウサギから得た標識末梢血リンパ球（PBL）を混合することによって行う。4時間後、細胞のアポトーシスをヨウ化プロピジウム染色およびフローサイトメトリーによって測定した。

【0244】

中和抗体アッセイ

抗ワクシニア中和抗体の產生は、処置後のウサギから得られた血漿において測定する。血漿の希釈液をワクシニア1000 PFUと終夜混合した後、A2780細胞を含む96ウェルプレートに加える。72時間後、細胞の生存率をMTSアッセイによって測定する。ウイルスの中和は、ウイルス不活化を防止するために必要な血漿の希釈液として測定される。

10

【0245】

統計分析

カプラン-マイヤー曲線を、一般化ウィルコキソン検定を用いて比較する。腫瘍の反応率および無転移率は、典型的にフィッシャーの正確確率検定によって比較する。

【0246】

実施例2：ラット腫瘍モデル

ラット（スプレージ-ドーリー、雄性）をその飲料水において発癌物質（N-ニトロソモルホリン、NNM）（175 mg/L）に8週間曝露して、その期間に肝硬変を発症した後、平均して16～20週のあいだ（Oh et al, 2002において既に記述されたモデル）に肝臓内でインサイチューで腫瘍（肝細胞癌または胆管癌）が発生した。腫瘍の検出および評価は、超音波造影を用いて経験のある超音波技師が行った。腫瘍の大きさは、処置開始直前のベースラインで直径約0.75～1.5 cmであった；腫瘍の体積は、対照群と処置群のあいだでベースラインにおいて有意差がなかった（推定平均体積は400～500 mm³）。対照動物（n=17）には、処置を与えず、処置動物（n=6）には、合成初期-後期プロモーター（Mastrangelo et al, 1999において記述されたウイルス構築物）からヒトGM-CSFを発現するポックスウイルス（Wyeth株、チミジンキナーゼ遺伝子欠失が存在する）の静脈内注射（尾静脈により）を行った。ウイルスを、10⁸ プラーク形成単位（Earl et al, 1998のように力価測定）の用量で全量0.75 ml（ウイルス浮遊液を10 mM Trisと混合して所望の容積とする）で尾静脈により60秒間かけて静脈内投与した。処置は、2週間毎に繰り返して全体で3回投与（1、15および29日目）した。

20

【0247】

処置開始後10週間のあいだ、対照腫瘍の大きさは、平均で約3000 mm³に達するまで、有意に増加した（S.E. 500）（図1）。対照動物は、この時点で腫瘍の進行により倫理的理由から屠殺する必要があった。腫瘍は全て大きさが有意に増加した。対照的に、処置した腫瘍6例中5例は、完全に退縮した（超音波による検出限界未満）。処置群における平均腫瘍体積は約50 mm³（S.E. < 10；対照に対してp < 0.01）であった。

30

【0248】

実施例3：ウサギVX2腫瘍モデル

試験はVX2ウサギ癌モデルにおいて行った（Paeng et al, 2003において記述されるとおり）。ヒトGM-CSFはこれまでにウサギにおいて有意な生物活性を有することが証明されたことから、ウサギ（マウスに対して）を種として選択した。VX2腫瘍をニュージーランドホワイトウサギの筋肉において成長させて、腫瘍の1～2 mm³断片からの細胞を解離させて、生理食塩液0.1 mlに浮遊させて、肝臓囊の下に注射して（21ゲージ針；手術用小片を巾着縫合することによって注射部位を覆う）、原発腫瘍が確立される（平均直径、1.5～2.0 cm；推定体積2～4 cm³）まで14日間成長させた。VX2細胞は、標準的なバーストアッセイにおいてエクスピボでワクシニアポックスウイルスによって感染可能であることが証明された。腫瘍の大きさをCTスキャンおよび超音波によって経時的にモニターした。翌7週間にわたって、対照（無処置）動物（n=18）は、肝臓内で腫瘍の進行を示し、推定平均腫瘍体積は約100 cm³（S.E. 約20）に達した。さらに、多数の腫瘍の転移が進行して、肺および肝臓において経時的に検出可能となった（図2A～B）。7週目までに、対照動物は全て

40

50

検出可能な転移を有し、肺転移の平均数は17(S.E. 2.3)であった。これらの対照動物の生存期間の中央値は55日(処置動物において処置開始後)であり、全てのマウスが80日以内に死亡した。

【0249】

第一の実験における処置動物($n=3$)に、合成初期-後期プロモーター(Mastrangelo et al, 1999において記述されたウイルス構築物)からヒトGM-CSFを発現するポックスウイルス(Wyeth株、チミジンキナーゼ遺伝子欠失が存在する)の単回静脈内注射(尾静脈経由)を行った。ウイルスは、 10^9 プラーク形成単位(Earl et al, 1998のように力価測定)の用量で全量7 ml(ウイルス浮遊液を10 mM Trisと混合して所望の容積とする)で耳静脈により60秒間かけて静脈内投与した。対照動物とは対照的に7週目までに、処置動物は、CTスキャンによって検出可能な肺転移を示さなかった(図2A~2B)。生存も同様に有意に増加した。処置開始後110日目までに、生存の中央値に到達せず、約70%がなおも生存した。

10

【0250】

第二の実験における処置動物($n=6$ /群)に、合成初期-後期プロモーター(参照により本明細書に組み入れられる、Mastrangelo et al, 1999において記述されたウイルス構築物)からヒトGM-CSFを発現するJX-594、ポックスウイルス(Wyeth株、チミジンキナーゼ遺伝子欠失が存在する)、vvDD、チミジンキナーゼとワクシニア増殖因子遺伝子の欠失を有するワクシニアWR株(McCart et al, 1999によって記述されるvvDD)、またはJX-963、チミジンキナーゼおよびワクシニア増殖因子遺伝子を欠失して、合成初期-後期プロモーターからのヒトGM-CSFを発現するワクシニアWR株の静脈内注射(尾静脈経由)を週毎に3回行った。ウイルスは、 10^8 プラーク形成単位(Earl et al, 1998のように力価測定)の用量で全量7 ml(ウイルス浮遊液を10 mM Trisと混合して所望の容積とする)で耳静脈により60秒間かけて静脈内投与した。対照とは対照的に7週目までに、JX-963処置動物はCTスキャンによって検出可能な肺転移を示さなかった(対照に対して $p < 0.01$)(図4)。JX-594処置動物は、平均で8個の肺腫瘍を有した(S.E. 2; 対照に対して $p < 0.05$)。vvDD処置動物は、平均で5個の肺腫瘍を有した(S.E. 2; 対照に対して $p < 0.05$)。注目すべきことに、JX-963およびvvDDもまた、この用量でのJX-594とは対照的に肝臓における原発腫瘍の成長に対して有意な有効性を示し(図3)、JX-963はこれらの動物の生存を劇的に増加させた(図5)。

20

【0251】

GM-CSF発現ウイルスJX-963は、その非GM-CSF発現対照vvDDより、原発腫瘍および肺転移の双方に対して有意に良好な有効性を示した; 2) GM-CSF発現ウイルスJX-963は、そのGM-CSF発現Wyeth株対照より、原発腫瘍および肺転移の双方に対して有意に良好な有効性を示した(vgf遺伝子におけるさらなる欠失がJX-594に存在しないにもかかわらず)。したがって、ヒトGM-CSFを発現するワクシニアの静脈内投与によって、GM-CSFを有しない同じワクシニアに対して有意に良好な有効性が得られ、ヒトGM-CSFを発現するWR株欠失変異体の血管内投与は、GM-CSFを発現するWyeth株(標準的なワクチン株)欠失変異体より有意に良好であった。

30

【0252】

実施例4: JX-963の全身の癌の有効性

40

標的化治療は、癌の処置にとって非常に有望であるが、標的分子の変異および/または経路の重複による腫瘍の逃避を通してしばしば耐性が発達することから、新規物質が必要である。腫瘍崩壊性のウイルスは、固有に、または遺伝子操作を通してその複製が悪性細胞タイプに限定されるウイルスである(Thorne et al, 2005)¹。選択的な腫瘍内複製により、ウイルスの繁殖、独自のおよびアポトーシス非依存的メカニズム(腫瘍崩壊)による感染した癌細胞の殺細胞、ならびに他の腫瘍細胞へのウイルスの伝搬が起こる。したがって、ウイルス治療物質は、不応性の癌を有効に処置する能力を有し、いくつかの腫瘍崩壊性ウイルスの局所または限局的投与に関して、臨床での概念の証明が得られている(Parato et al, 2005)²。しかし、腫瘍崩壊性ウイルスが患者の生存に関して主要な

50

影響を有するためには、全身での有効性および静脈内送達が必要であろう。

【0253】

したがって、本発明者らは、より有効な全身物質を作製するために段階的設計および開発戦略をとった。第一に、本発明者らは、全身性の播種ならびに補体および抗体による消失に対する耐性に関して進化したウイルス種としてワクシニアのようなポックスウイルスを同定した (Smith et al, 1997 ; Buller and Palumbo, 1991)。ワクシニアは、不活化がなければ血液中で輸送されるための十分に定義されたメカニズムを有し、組織内で急速に散布することができ、これはまた天然痘絶滅キャンペーンのあいだ、ヒトによって用いられるという長い歴史を有する。ワクチン接種プログラムの際に用いられたワクシニアウイルスのパネルおよびいくつかの関連する株を、正常 (NHBE) および腫瘍 (A2780) 細胞におけるその複製能に関してスクリーニングした。ワクシニア株は全て、正常細胞より腫瘍細胞株において高レベルまで複製したが (図6A)、治療指数 (腫瘍対正常細胞複製比) は株によって異なった。研究室において広く用いられている株 (Western Reserve (WR) のような) は、その親ワクチン株 (Wyeth) よりインビトロでより大きい固有の腫瘍選択性を示す傾向があった。これは、野生型ワクシニア株が、正常細胞と比較して腫瘍細胞株において固有の優れた複製を示すことが示された最初の報告である。しかし、アデノウイルス血清型5型 (Ad5) (臨床において腫瘍崩壊性ウイルスの大部分の骨格) はそのような選択性を示さなかったことから、これは必ずしも全てのウイルスに当てはまらない (図10A)。

10

【0254】

腫瘍崩壊性物質のもう1つの望ましい属性は急速な腫瘍内散布である (Wein et al, 2003)。これは、感染した細胞からウイルスの短い複製サイクルおよび早期放出を通して得ることができる。したがって、ワクシニアのWR株が腫瘍細胞を破壊できるか否かを、感染後早期の時点 (72時間) で調べて、Ad5および腫瘍崩壊性アデノウイルス株dI1520 (ONYX-015) (Heise et al, 1997) と比較した (図6B)。WRは、Ad5およびdI1520の双方と比較してこの時点で腫瘍細胞において殺細胞能の5対数までの増加と共に、いずれかのアデノウイルス株より大きい腫瘍選択性を示した。

20

【0255】

今日まで試験されたほとんどの腫瘍崩壊性ウイルスの主要な制限は、Ad5の 1×10^9 プラーケ形成単位 (PFU) をマウスの皮下腫瘍モデルに静脈内に送達した場合に認められるように、全身送達後に腫瘍に効率的に感染できることである (図6Cおよび図10B)；このことは、70 kgのヒトにおける 3.5×10^{12} PFUの用量と等しく、これは患者に投与するよりも高い量である。腫瘍において複製するウイルスはほとんどまたは全く認められなかつた (ウイルス送達後48および72時間でウイルス外皮タンパク質に関して免疫組織化学染色によって検出されるように)。しかし、ワクシニア株WRは、これらの同じモデルにおいて腫瘍に対して効率的に移動して感染することができ、腫瘍細胞の50%までが48時間以内の処置で染色陽性となった。さらに、ワクシニアは、免疫応答がこの時点で開始されているであろうという事実にもかかわらず、腫瘍において少なくとも10日間持続することが可能であった (図10B)。

30

【0256】

特に免疫欠損癌患者における静脈内投与の安全性を最大限にするために、弱毒化および腫瘍標的化遺伝子欠失をウイルスに導入した。本発明者らは、ワクシニアチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子への挿入を有するウイルス遺伝子ならびにTKおよびウイルス増殖因子 (VGF) 二重欠失を有するウイルス遺伝子の優先的腫瘍発現に関して既に記述した (Puhmann et al, 1999 ; McCart et al, 2001)。これらの欠失の標的化メカニズムはこれまで証明されていないが、その理論的解釈は、上昇したE2Fレベル (E2Fは細胞のチミジンキナーゼ遺伝子産物の産生を促進することから (Hengstschlager et al 1994)) および上皮細胞増殖因子 (EGF) 受容体経路の活性化 (この経路のVGFによる活性化は有効なウイルス複製にとって必要であることから (Andrade et al, 2004)) を有する癌細胞に対するウイルス複製および腫瘍崩壊を制限することであった。本明細書において、TKおよびVGF二重欠

40

50

失ウイルス(vvDD)は、異なる起源の広範囲の腫瘍細胞を破壊する印象的な能力を示したことが示される(図7)。同様に、ワクシニアTKまたはVGF遺伝子のいずれかにおける1つの欠失は、非増殖、非形質転換ヒト細胞株におけるワクシニアの複製能を減弱させるが、二重欠失ウイルス(vvDD)はさらに減弱されることが見いだされた(図11)。これらの株はいずれも、ヒト腫瘍細胞におけるその複製能が減弱されなかつた。

【0257】

非増殖非形質転換細胞におけるVGF-欠失ウイルスの複製能の遮断は、活性化H-rasを発現する細胞において克服されうることがさらに見いだされた(図8A)。H-rasの活性化によってWRさえも複製の増加が起こり($p = 0.0094$)、VGF欠失は、H-ras活性化細胞においてウイルス複製を阻害しなかつたが、TK欠失は阻害した($p = 0.016$)。徐々に増殖しつつあるまたは非増殖細胞でさえ、EGF-R/Ras/MAPキナーゼシグナル伝達経路に変異を含む場合、標的化されうることから、このことは、vvDDにおける遺伝子枯渇によって導入された腫瘍の選択性は、増殖しつつある細胞の単純な優先性より大きいことを示している。

10

【0258】

二重欠失ワクシニア(vvDD)が、正常な増殖細胞(腸管の上皮細胞、骨髄、または卵巣細胞のような)を標的化することによって毒性を生じるか否かを決定するために、インビボウイルス遺伝子発現を非侵襲的生体発光イメージングによって調べ(図8B)、ウイルスの生体分布を死後に調べた(図12)。WRまたはvvDD発現ルシフェラーゼの 1×10^7 PFUのIV送達後の生体発光イメージングは、双方のウイルスが類似の初回感染およびウイルス遺伝子発現パターン(脾臓、肺、肝臓、および腫瘍を含む)を示したことを示した(図8B)。しかし、vvDDからの生体発光シグナルは、免疫欠損マウスにおいてさえ腫瘍よりほとんどの臓器から急速に消失したが、WRは、標的臓器において複製し続け、骨髄、皮膚、および脳を含む他の組織に散布し続けた(図8Bおよび8C)。vvDDは、腫瘍外でいくつかの感染点を產生したが、これらは、一過性におよび後期に出現して、複製を行わない二次的な散布を示している(データは示していない)。vvDD 1×10^9 PFU(WRに関する致死量)によってIV処置したマウスの組織からの感染性ウイルス単位の回復は、処置後8日までに腫瘍はウイルス力価の増加を示し、他の任意の臓器より組織1 mgあたり1,000倍より多くのウイルスコピーを示したのに対し、正常組織は全て検出限界未満であったかまたはウイルス力価の低下を示したことを見らかにした(図12)。

20

【0259】

30

vvDDの抗腫瘍効果を免疫コンピテントマウスマodelにおいて分析した。vvDDは、いずれも静脈内に送達した場合にWyeth TK欠失ワクシニア株(通常、ワクチンとして用いられる、臨床試験における最も一般的なワクチン株)より有意に大きい抗腫瘍効果を有した(図13)。さらなる試験により、ヒト腫瘍異種移植片を有する免疫欠損マウスおよび同系腫瘍を有する免疫コンピテントマウスマの双方にvvDD 1×10^9 PFUを全身性または腫瘍内注射のいずれかによって送達した場合に、vvDDは有意な抗腫瘍効果を行うことができることが示された(図13)。

【0260】

40

vvDDの抗腫瘍能を増加させるために、およびIV投与時期に血管を形成していない顕微鏡的腫瘍沈着物の派生物を抑制するために、サイトカインGM-CSFをTK遺伝子の部位に挿入した(合成E/Lプロモーターの制御下で);このウイルスをJX-963と命名した。ヒトGM-CSFは齧歯類においては活性ではないが、ウサギにおいて活性であること(Cody et al., 2005)、および再現性よく転移するより大きい原発腫瘍に対する活性を査定するために、原発性(VX2)肝腫瘍および肺転移を有するウサギモデル(Kim et al., 2006)においてJX-963を用いた。マウスマodelの場合と同様に、静脈内vvDDの 1×10^9 PFUは、有意な抗腫瘍効果を示した(図9A)。vvDDウイルスはまた、顕微鏡的肺転移の派生物を阻害することができた。同時GM-CSF発現によるさらなる有効性を査定するために、JX-963をvvDDと直接比較した。JX-963は、原発腫瘍に対してより大きい有効性を產生し、肺転移の派生物を完全に遮断した。GM-CSFは、ELISAによってJX-963処置マウスマの血漿において検出された(データは示していない)。直接の腫瘍崩壊効果のほかに、JX-963はまた、VX2腫瘍細胞に対す

50

るCTL反応を上昇させることによって、腫瘍に対して動物を交叉保護することが見いだされた（図9B）。

【0261】

抗腫瘍物質としてワクシニアウイルスを用いることにおける1つの懸念は、たとえ腫瘍に対する全身送達が生得の個体において当初可能であるとしても、ウイルスに対する前回の曝露によって生じた免疫応答は、その後の処置の有効性を阻害する可能性がある点である。試験したウサギにおいて初回感染の3週間以内に強い抗ウイルス抗体反応が得られた（図14）。中和抗体形成後の繰り返し投与の実現可能性を調べるために、処置に当初反応したが治療の4週間後に腫瘍の進行を示したウサギ4匹を再度処置した。初回処置後6週目に静脈内に送達したJX-963 1×10^9 PFUによって、処置した動物4匹中3匹において原発腫瘍の大きさの減少が起こった（図9C）。

10

【0262】

したがって、造血系を通して散布するように進化したワクシニアウイルスを選択すること、および腫瘍選択性的複製に関して株をスクリーニングすることによって、本発明者らは、急速な腫瘍崩壊効果を有する全身腫瘍送達を行うことができるウイルスを発見することができた。このウイルスの安全性を改善するために、その治療指数を増加することができるいくつかの欠失を導入して、作用メカニズムを記述して、その生体分布をインビボで試験した。全身送達後の大きい原発腫瘍に対する劇的な治療効果が証明された。最後に、全身的なウイルス送達の後でさえも、腫瘍細胞が全て感染する可能性はないことから、GM-CSFはこのウイルス骨格から発現された。GM-CSFを加えると、原発腫瘍に対するこのウイルスの有効性を増加させること、微小転移の派生物を予防すること、および抗腫瘍CTL反応を産生することができた。このことは、このウイルスJX-963を腫瘍に対して全身送達することができ、腫瘍部位でこのウイルスは、正常臓器に影響を及ぼさずに腫瘍組織を迅速かつ効率的に破壊して、同時にインサイチューで産生された腫瘍抗原を認識することができる腫瘍内で免疫応答を誘導することを示している。繰り返し投与はさらに、直接腫瘍崩壊によって、または抗腫瘍免疫応答を強化することによってさらなる抗腫瘍効果を產生することが示された。したがって、JX-963は多様な腫瘍を有効に処置する能力を有する。

20

【0263】

本明細書に開示および請求される組成物および方法は全て、本開示に照らして不適当な実験を行うことなく作製および実行されうる。本発明の組成物および方法を、好みの態様に関して記述してきたが、本明細書に記述の組成物および/または方法、ならびに方法の段階または段階の順序を変化させてもよく、それらも本発明の概念、趣旨、および範囲に含まれることは当業者に明らかであろう。より詳しく述べると、化学および生理的に関連する特定の物質を、本明細書に記述の物質に置換してもよく、それでも同じまたは類似の結果が得られるであろうことは明らかであろう。当業者に明らかであるそのような類似の置換および改変は全て、添付の請求の範囲によって定義される本発明の趣旨、範囲、および概念に含まれると見なされる。

30

【0264】

IX. 参考文献

以下の参考文献は、本明細書に記載の内容に対して補助的な例示的技法または他の詳細をそれらが提供する程度に、参照により本明細書に具体的に組み入れられる：

40

- 米国特許第4,554,101号
- 米国特許第4,683,195号
- 米国特許第4,683,202号
- 米国特許第4,684,611号
- 米国特許第4,800,159号
- 米国特許第4,879,236号
- 米国特許第4,883,750号
- 米国特許第4,946,773号

50

米国特許第4,952,500号	
米国特許第5,220,007号	
米国特許第5,279,721号	
米国特許第5,284,760号	
米国特許第5,302,523号	
米国特許第5,322,783号	
米国特許第5,354,670号	
米国特許第5,366,878号	
米国特許第5,384,253号	
米国特許第5,389,514号	10
米国特許第5,399,363号	
米国特許第5,464,765号	
米国特許第5,466,468号	
米国特許第5,538,877号	
米国特許第5,538,880号	
米国特許第5,543,158号	
米国特許第5,550,318号	
米国特許第5,563,055号	
米国特許第5,580,859号	
米国特許第5,589,466号	20
米国特許第5,591,616号	
米国特許第5,610,042号	
米国特許第5,633,016号	
米国特許第5,635,377号	
米国特許第5,641,515号	
米国特許第5,656,610号	
米国特許第5,702,932号	
米国特許第5,736,524号	
米国特許第5,739,169号	
米国特許第5,780,448号	30
米国特許第5,789,166号	
米国特許第5,789,215号	
米国特許第5,798,208号	
米国特許第5,798,339号	
米国特許第5,801,005号	
米国特許第5,824,311号	
米国特許第5,824,348号	
米国特許第5,830,650号	
米国特許第5,830,880号	
米国特許第5,840,873号	40
米国特許第5,843,640号	
米国特許第5,843,650号	
米国特許第5,843,651号	
米国特許第5,843,663号	
米国特許第5,846,225号	
米国特許第5,846,233号	
米国特許第5,846,708号	
米国特許第5,846,709号	
米国特許第5,846,717号	
米国特許第5,846,726号	50

米国特許第5,846,729号	
米国特許第5,846,783号	
米国特許第5,846,945号	
米国特許第5,849,481号	
米国特許第5,849,483号	
米国特許第5,849,486号	
米国特許第5,849,487号	
米国特許第5,849,497号	
米国特許第5,849,546号	
米国特許第5,849,547号	10
米国特許第5,851,770号	
米国特許第5,851,772号	
米国特許第5,853,990号	
米国特許第5,853,992号	
米国特許第5,853,993号	
米国特許第5,856,092号	
米国特許第5,858,652号	
米国特許第5,861,244号	
米国特許第5,863,732号	
米国特許第5,863,753号	20
米国特許第5,866,331号	
米国特許第5,866,337号	
米国特許第5,866,366号	
米国特許第5,871,740号	
米国特許第5,871,986号	
米国特許第5,882,864号	
米国特許第5,900,481号	
米国特許第5,905,024号	
米国特許第5,910,407号	
米国特許第5,912,124号	30
米国特許第5,912,145号	
米国特許第5,912,148号	
米国特許第5,916,776号	
米国特許第5,916,779号	
米国特許第5,919,626号	
米国特許第5,919,630号	
米国特許第5,922,574号	
米国特許第5,925,517号	
米国特許第5,925,525号	
米国特許第5,925,565号	40
米国特許第5,928,862号	
米国特許第5,928,869号	
米国特許第5,928,870号	
米国特許第5,928,905号	
米国特許第5,928,906号	
米国特許第5,928,906号	
米国特許第5,929,227号	
米国特許第5,932,413号	
米国特許第5,932,451号	
米国特許第5,935,791号	50

米国特許第5,935,819号
米国特許第5,935,825号
米国特許第5,939,291号
米国特許第5,942,391号
米国特許第5,945,100号
米国特許第5,981,274号
米国特許第5,994,624号
Alcami and Smith, *Cell*, 71(1):153-67, 1992.

Alcami *et al.*, *Sem. Virol.*, 5:419-427, 1998.

Alcami *et al.*, *Virology*, 74(23):11230-9, 2000.

Almendro *et al.*, *J. Immunol.*, 157(12):5411-5421, 1996.

Andoh *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, 50(12):663-72, 2002.

Andrade *et al.*, *Biochem J.*, 381, 437-46, 2004.

Angel *et al.*, *Cell*, 49:729, 1987b.

Angel *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2256, 1987.

Angel *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2256, 1987a.

Arap *et al.*, *Cancer Res.*, 55(6):1351-1354, 1995.

Atchison and Perry, *Cell*, 46:253, 1986.

10

20

- Atchison and Perry, *Cell*, 48:121, 1987.
- Austin-Ward and Villaseca, *Rev. Med. Chil.*, 126(7):838-45, 1998.
- Ausubel *et al.*, In: *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc, New York, 1994.
- Bajorin *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 6(5):786-92, 1988.
- Bakhshi *et al.*, *Cell*, 41(3):899-906, 1985.
- Banerji *et al.*, *Cell*, 27(2 Pt 1):299-308, 1981.
- Banerji *et al.*, *Cell*, 33(3):729-740, 1983.
- Barker and Berk, *Virology*, 156, 107-21, 1987.
- Bellus, *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, A31(1): 1355-1376, 1994.
- Berkhout *et al.*, *Cell*, 59:273-282, 1989.
- Blanar *et al.*, *EMBO J.*, 8:1139, 1989.
- Blasco and Moss, *J. Virology*, 66(7): 4170-4179, 1992.
- Blasco *et al.*, *J. Virology*, 67(6):3319-3325, 1993.
- Bodine and Ley, *EMBO J.*, 6:2997, 1987.
- Boshart *et al.*, *Cell*, 41:521, 1985.
- Bosze *et al.*, *EMBO J.*, 5(7):1615-1623, 1986.
- Boyd *et al.*, *Cell*, 79:341-351, 1994.
- Braddock *et al.*, *Cell*, 58:269, 1989.
- Braisted and Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(12):5688-5692, 1996.
- Brizel, *Semin. Radiat. Oncol.*, 8(4):237-246, 1998.
- Bukowski *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 4(10):2337-47, 1998.
- Bulla and Siddiqui, *J. Virol.*, 62:1437, 1986.
- Buller and Palumbo, *Microbiol Rev*, 55, 80-122, 1991.
- Buller *et al.*, *J Virol*, 62, 866-74, 1988.
- Burton and Barbas, *Adv. Immunol.*, 57:191-280, 1994.
- Caldas *et al.*, *Nat. Genet.*, 8(1):27-32, 1994.
- Campbell and Villarreal, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1993, 1988.
- Campere and Tilghman, *Genes and Dev.*, 3:537, 1989.
- Campo *et al.*, *Nature*, 303:77, 1983.
- Cantrell *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:6250-6254, 1985.
- Caragine *et al.*, *Cancer Res.*, 62(4):1110-5, 2002.
- Carbonelli *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 177(1):75-82, 1999.

10

20

30

40

- Celander and Haseltine, *J. Virology*, 61:269, 1987.
- Celander *et al.*, *J. Virology*, 62:1314, 1988.
- Chandler *et al.*, *Cell*, 33:489, 1983.
- Chandler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(8):3596-601, 1997.
- Chang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2153, 1989.
- Chatterjee *et al.*, *Proc Natl. Acad Sci. U.S.A.*, 86:9114, 1989.
- Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.
- Chen *et al.*, *Lab Anim*, 38, 79-84, 2004.
- Cheng *et al.*, *Cancer Res.*, 54(21):5547-5551, 1994.
- Choi *et al.*, *Cell*, 53:519, 1988.
- Christodoulides *et al.*, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-37, 1998.
- Cleary and Sklar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (21):7439-7443, 1985.
- Cleary *et al.*, *J. Exp. Med.*, 164(1):315-320, 1986.
- Cocea, *Biotechniques*, 23(5):814-816, 1997.
- Cody *et al.*, *Vet Immunol Immunopathol*, 103:163-72, 2005.
- Cohen *et al.*, *J. Cell. Physiol.*, 5:75, 1987.
- Colamonici *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270:15974-15978, 1995.
- Cooley *et al.*, *Science*, 239(4844):1121-1128, 1988.
- Costa *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:81, 1988.
- Cripe *et al.*, *EMBO J.*, 6:3745, 1987.
- Culotta and Hamer, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1376, 1989.
- Culver *et al.*, *Science*, 256(5063):1550-1552, 1992.
- Cunningham and Wells, *Science*, 244(4908):1081-1085, 1989
- Curran, *Semin. Radiat. Oncol.*, 8(4 Suppl 1):2-4, 1998.
- Dandolo *et al.*, *J. Virology*, 47:55-64, 1983.
- Davidson *et al.*, *J. Immunother.*, 21(5):389-98, 1998.
- De Villiers *et al.*, *Nature*, 312(5991):242-246, 1984.
- Deschamps *et al.*, *Science*, 230:1174-1177, 1985.
- Dillman, *Cancer Biother. Radiopharm.*, 14(1):5-10, 1999.
- Dobbelstein and Shenk, *J. Virology*, 70:6479-6485, 1996.
- Dranoff *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:3539-3543, 1993.
- Durrant and Spendlove, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2(7):959-66, 2001.

10

20

30

40

Earl *et al.*, In: *Preparation of Cell Cultures and Vaccinia Virus Stocks*. Ausubel *et al.* (Eds.),

Current Protocols In Molecular Biology, 16(16):1-16, John Wiley & Sons, 1998.

Edbrooke *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1908, 1989.

Edlund *et al.*, *Science*, 230:912-916, 1985.

Eliopoulos *et al.*, *Oncogene*, 11(7):1217-28, 1995.

el-Kareh and Secomb, *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, 25(6):503-571, 1997.

Erlandsson, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 104(1):1-18, 1998.

10

European Appl. 320 308

European Appl. 329 822

Feng and Holland, *Nature*, 334:6178, 1988.

Firak and Subramanian, *Mol. Cell. Biol.*, 6:3667, 1986.

Foecking and Hofstetter, *Gene*, 45(1):101-105, 1986.

Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.

Frohman, In: *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*, Academic Press, N.Y.,

20

1990.

Fujita *et al.*, *Cell*, 49:357, 1987.

GB Application 2 202 328

GenBank Accession Number NC_001559

Gertig *et al.*, *Semin. Cancer Biol.*, 8(4): 285-98, 1998.

Gilles *et al.*, *Cell*, 33:717, 1983.

Gloss *et al.*, *EMBO J.*, 6:3735, 1987.

30

Gnant *et al.*, *Cancer Res.*, 59(14):3396-403, 1999.

Godbout *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1169, 1988.

Goebel *et al.*, *Virology*, 179(1): 247-66 and 517-63, 1990.

Goodbourn and Maniatis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:1447, 1988.

Goodbourn *et al.*, *Cell*, 45:601, 1986.

Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.

Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.

40

Graham *et al.*, *Virology*, 229(1):12-24, 1997.

Greene *et al.*, *Immunology Today*, 10:272, 1989

Gross *et al.*, *Genes Dev.*, 13(15):1899-911, 1999.

Grosschedl and Baltimore, *Cell*, 41:885, 1985.

Hanibuchi *et al.*, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-5, 1998.

- Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.
- Haslinger and Karin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:8572, 1985.
- Hauber and Cullen, *J. Virology*, 62:673, 1988.
- Heise *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 6(6):499-504, 1999.
- Heise *et al.*, *Nat Med*, 3, 639-45, 1997.
- Hellstrand *et al.*, *Acta Oncol.*, 37(4):347-353, 1998.
- Hen *et al.*, *Nature*, 321:249, 1986.
- Hengstschlager *et al.*, *J Biol Chem*, 269, 13836-42, 1994.
- Hensel *et al.*, *Lymphokine Res.*, 8:347, 1989.
- Hermiston, *J. Clin. Invest.*, 105:1169-1172, 2000.
- Herr and Clarke, *Cell*, 45:461, 1986.
- Hilton *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271(9):4699-4708, 1996.
- Hirochika *et al.*, *J. Virology*, 61:2599, 1987.
- Hirsch *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1959, 1990.
- Ho *et al.*, *Environ Health Perspect*, 106(5):1219-1228, 1998.
- Holbrook *et al.*, *Virology*, 157:211, 1987.
- Homey *et al.*, *Nature. Rev. Immunol.*, 2:175-184, 2002.
- Horlick and Benfield, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2396, 1989.
- Huang *et al.*, *Cell*, 27:245, 1981.
- Hug *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:3065, 1988.
- Hui and Hashimoto, *Infect. Immun.*, 66(11):5329-36, 1998.
- Hussussian *et al.*, *Nat. Genet.*, 8(1):15-21, 1994.
- Hwang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:585, 1990.
- Ikeda *et al.*, *Nat. Med.*, 5(8):881-7, 1999.
- Imagawa *et al.*, *Cell*, 51:251, 1987.
- Imbra and Karin, *Nature*, 323:555, 1986.
- Imler *et al.*, *Mol. Cell. Biol*, 7:2558, 1987.
- Imperiale and Nevins, *Mol. Cell. Biol.*, 4:875, 1984.
- Innis *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(24):9436-9440, 1988.
- Inouye and Inouye, *Nucleic Acids Res.*, 13:3101-3109, 1985.
- Irie and Morton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(22):8694-8698, 1986.
- Irie *et al.*, *Lancet..*, 1(8641):786-787, 1989.
- Isaacs *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(2):628-32, 1992.

10

20

30

40

- Jakobovits *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:2555, 1988.
- Jameel and Siddiqui, *Mol. Cell. Biol.*, 6:710, 1986.
- Jaynes *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:62, 1988.
- Johnson and Hamdy, *Oncol. Rep.*, 5(3):553-7, 1998.
- Johnson *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3393, 1989.
- Ju *et al.*, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 59(3):241-50, 2000.
- Kadesch and Berg, *Mol. Cell. Biol.*, 6:2593, 1986. 10
- Kaeppler *et al.*, *Plant Cell Reports*, 9: 415-418, 1990.
- Kamb *et al.*, *Nat. Genet.*, 8(1):23-2, 1994.
- Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.
- Karin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:606, 1987.
- Karin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:606, 1987.
- Katinka *et al.*, *Cell*, 20:393, 1980.
- Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991. 20
- Kawamoto *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:267, 1988.
- Kay *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(9):4686-91, 1997.
- Kerr *et al.*, *Br. J. Cancer*, 26(4):239-257, 1972.
- Kettle *et al.*, *J. Gen. Virology*, 78:677-685, 1997.
- Kidd, *J Exp Med*, 71, 813-37, 1940.
- Kiledjian *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:145, 1988.
- Kim *et al.*, *Mol Ther*, 14, 361-70, 2006. 30
- Kirn *et al.*, *Nat. Med.*, 7(7):781-787, 2001.
- Klamut *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:193, 1990.
- Koch *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:303, 1989.
- Kolmel, *J. Neurooncol.*, 38(2-3):121-5, 1998.
- Koncz *et al.*, *EMBO J.*, 9(5):1337-1346, 1990.
- Kraus *et al.*, *FEBS Lett.*, 428(3):165-170, 1998.
- Kriegler and Botchan, *In: Eukaryotic Viral Vectors*, Gluzman (ed), Cold Spring Harbor: 40
Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982.
- Kriegler and Botchan, *Mol. Cell. Biol.*, 3:325, 1983.
- Kriegler *et al.*, *Cell*, 38:483, 1984.
- Kriegler *et al.*, *Cell*, 53:45, 1988.
- Kuhl *et al.*, *Cell*, 50:1057, 1987.

- Kunz *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 17:1121, 1989.
- Kwoh *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1173, 1989.
- Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 57(1):105-32, 1982.
- Lareyre *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274(12):8282-8290, 1999.
- Larsen *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, 83:8283, 1986.
- Laspia *et al.*, *Cell*, 59:283, 1989.
- Latimer *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:760, 1990. 10
- Lee *et al.*, *DNA Cell. Biol.*, 16(11):1267-75, 1997.
- Lee *et al.*, *Nature*, 294:228, 1981.
- Lee *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 12:4191-206, 1984.
- Levenson *et al.*, *Hum Gene Ther.* 20;9(8):1233-1236, 1998.
- Levinson *et al.*, *Nature*, 295:79, 1982.
- Liebermann, *Oncogene*, 17(10):1189-94, 1998.
- Lin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:850, 1990. 20
- Luker *et al.*, *Virology*, 341, 284-300, 2005.
- Luria *et al.*, *EMBO J.*, 6:3307, 1987.
- Lusky and Botchan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:3609, 1986.
- Lusky *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 3:1108, 1983.
- Macejak and Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- Magi-Galluzzi *et al.*, *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, 20(5):343-50, 1998.
- Majors and Varmus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:5866, 1983. 30
- Mangray and King, *Front Biosci.*, 3:D1148-60, 1998.
- Marks *et al.*, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 45:77-87, 1991.
- Marsters *et al.*, *Recent Prog Horm Res*, 54:225-234, 1999.
- Mastrangelo and Lattime, *Cancer Gene Ther.*, 9:1013-1021, 2002.
- Mastrangelo *et al.*, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 465:391-400, 2000.
- Mastrangelo *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 6:409-422, 1999.
- Mayer *et al.*, *Radiat. Oncol. Investig.*, 6(6):281-288, 1998. 40
- McCart *et al.*, Am. Soc. Gene Therapy, 160, 1999.
- McCart *et al.*, *Cancer Res*, 61, 8751-57, 2001.
- McCart *et al.*, *Gene Ther.*, 7(14):1217-23, 2000.
- McNeall *et al.*, *Gene*, 76:81, 1989.
- Miksicek *et al.*, *Cell*, 46:203, 1986.

- Mitchell *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.*, 690:153-166, 1993.
- Mitchell *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 8(5):856-869, 1990.
- Monks *et al.*, *J Natl Cancer Inst*, 83, 757-66, 1991.
- Mordacq and Linzer, *Genes and Dev.*, 3:760, 1989.
- Moreau *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 9:6047, 1981.
- Mori *et al.*, *Cancer Res.*, 54(13):3396-3397, 1994.
- Morton *et al.*, *Arch. Surg.*, 127:392-399, 1992. 10
- Moss, In: *Fields Virology*, Fields (ed.), Lippincott-Raven Publ, Phila., 3:3637,2672, 1996.
- Mossmann *et al.*, *Virology*, 215(1):17-30, 1996.
- Mougin *et al.*, *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 56(1): 21-8, 1998.
- Muesing *et al.*, *Cell*, 48:691, 1987.
- Mumby and Walter, *Cell Regul.*, 2(8):589-98, 1991.
- Natoli *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, 56(8):915-20, 1998.
- Ng *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 17:601, 1989. 20
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Nielsen *et al.*, *Cancer Gene Therapy*, 4(6):S12, 1997.
- Nielsen *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 4(4):835-846, 1998.
- Nobori *et al.*, *Nature*, 368(6473):753-6, 1994.
- Nomoto *et al.*, *Gene*, 236(2):259-71, 1999.
- Ochi *et al.*, *Am. J. Gastroenterol.*, 93(8):1366-1368, 1998. 30
- Oh *et al.*, *Exp. Mol. Path.*, 73:67-73, 2002.
- Ohara *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:5673-5677, 1989.
- Ohara, *Gan To Kagaku Ryoho*, 25(6): 823-8, 1998.
- Okamoto *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1(23):11045-11049, 1994.
- Omirulleh *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 21(3):415-428, 1993.
- Ondek *et al.*, *EMBO J.*, 6:1017, 1987.
- Orlow *et al.*, *Cancer Res.*, 54(11):2848-2851, 1994. 40
- Ornitz *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3466, 1987.
- Paeng *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 44:2033-2038, 2003.
- Palmiter *et al.*, *Nature*, 300:611, 1982.
- Parato *et al.*, *Nat Rev Cancer*, 5, 965-76, 2005.
- PCT WO 88/10315

PCT WO 89/06700

PCT WO 90/07641

PCT WO 94/09699

PCT WO 95/06128

PCT/US03/025141

PCT/US87/00880

PCT/US89/01025

10

Pech *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:396, 1989.

Pelletier and Sonenberg, *Nature*, 334(6180):320-325, 1988.

Perez-Stable and Constantini, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1116, 1990.

Picard and Schaffner, *Nature*, 307:83, 1984.

Pietras *et al.*, *Oncogene*, 17(17):2235-49, 1998.

Pinkert *et al.*, *Genes and Dev.*, 1:268, 1987.

Ponta *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1020, 1985.

20

Porton *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1076, 1990.

Potrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 199:183-188, 1985.

Puhlmann *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 7(1):66-73, 2000.

Puhlmann *et al.*, *Hum Gene Ther.*, 10: 649-57, 1999.

Qin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.

Queen and Baltimore, *Cell*, 35:741, 1983.

Quinn *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:4713, 1989.

30

Ravindranath and Morton, *Intern. Rev. Immunol.*, 7: 303-329, 1991.

Redondo *et al.*, *Science*, 247:1225, 1990.

Reisman and Rotter, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3571, 1989.

Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580

Resendez Jr. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:4579, 1988.

Ripe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2224, 1989.

Rippe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:689-695, 1990.

40

Rittling *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 17:1619, 1989.

Rosel *et al.*, *J. Virology*, 60(2):436-449, 1986.

Rosen *et al.*, *Cell*, 41:813, 1988.

Rosenberg *et al.*, *Ann. Surg.* 210(4):474-548, 1989.

Rosenberg *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 319:1676, 1988.

- Sakai *et al.*, *Genes and Dev.*, 2:1144, 1988.
- Sambrook *et al.*, *In Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- Saraiva and Alcami, *J. Virology*, 75(1):226-33, 2001.
- Satake *et al.*, *J. Virology*, 62:970, 1988.
- Schaffner *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 201:81, 1988.
- Searle *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1480, 1985. 10
- Seet *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(16):9008-13, 2001.
- Serrano *et al.*, *Nature*, 366:704-707, 1993.
- Serrano *et al.*, *Science*, 267(5195):249-252, 1995.
- Sharp and Marciniak, *Cell*, 59:229, 1989.
- Shaul and Ben-Levy, *EMBO J.*, 6:1913, 1987.
- Sherman *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:50, 1989.
- Sinkovics and Horvath, *J. Clin. Viro.*, 16:1-15, 2000. 20
- Sleigh and Lockett, *J. EMBO*, 4:3831, 1985.
- Smith and Vanderplasschen, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 440:395-414, 1998.
- Smith *et al.*, *Immunol. Rev.*, 159:137-154, 1997.
- Solyanik *et al.*, *Cell. Prolif.*, 28(5):263-78, 1995.
- Sommer *et al.* *EMBO J.*, 9(3):605-613, 1990.
- Spalholz *et al.*, *Cell*, 42:183, 1985.
- Spandau and Lee, *J. Virology*, 62:427, 1988. 30
- Spandidos and Wilkie, *EMBO J.*, 2:1193, 1983.
- Spriggs *et al.*, *Cell*, 71(1):145-52, 1992.
- Stephens and Hentschel, *Biochem. J.*, 248:1, 1987.
- Stokke *et al.*, *Cell. Prolif.*, 30(5):197-218, 1997.
- Stuart *et al.*, *Nature*, 317:828, 1985.
- Sullivan and Peterlin, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3315, 1987.
- Swartzendruber and Lehman, *J. Cell. Physiology*, 85:179, 1975. 40
- Symons *et al.*, *Cell*, 81:551-560, 1995.
- Takebe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:466, 1988.
- Tavernier *et al.*, *Nature*, 301:634, 1983.
- Taylor and Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:165, 1990a.
- Taylor and Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:176, 1990b.

- Taylor *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:15160, 1989.
- Thiesen *et al.*, *J. Virology*, 62:614, 1988.
- Thorne *et al.*, *Semin Oncol*, 32, 537-48, 2005.
- Tjernberg, *Acta Radiol*, suppl no. 214, 1962.
- Todo *et al.*, *Cancer Res.*, 61:153-161, 2001.
- Treisman, *Cell*, 42:889, 1985.
- Tronche *et al.*, *Mol. Biol. Med.*, 7:173, 1990. 10
- Trudel and Constantini, *Genes and Dev.* 6:954, 1987.
- Tsujimoto and Croce, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(14):5214-5218, 1986.
- Tsujimoto *et al.*, *Science*, 228(4706):1440-1443, 1985.
- Tsumaki *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273(36):22861-4, 1998.
- Tyndell *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 9:6231, 1981.
- Upton *et al.*, *Virology*, 184(1):370-82, 1991.
- Vanderplasschen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(13):7544-9, 1998. 20
- Vannice and Levinson, *J. Virology*, 62:1305, 1988.
- Vasseur *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 77:1068, 1980.
- Vicari and Caus, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 13:143-154, 2002.
- Vogelstein and Kinzler, *Cell*, 70(4):523-6, 1992.
- Walker *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:392-396 1992.
- Wallach *et al.*, In: *The cytokine network and immune functions*, Theze (ed.), Oxford Univ. Press, Oxford, UK, 51-84, 1999. 30
- Wang and Calame, *Cell*, 47:241, 1986.
- Warren *et al.*, *Biochemistry*, 35(27):8855-8862, 1996.
- Weber *et al.*, *Cell*, 36:983, 1984.
- Wein *et al.*, *Cancer Res*, 63, 1317-24, 2003.
- Weinberger *et al.* *Mol. Cell. Biol.*, 8:988, 1984.
- Weislow *et al.*, *J Natl Cancer Inst*, 81, 577-86, 1989.
- Winoto and Baltimore, *Cell* 59:649, 1989.
- Wold *et al.*, *Trends Microbiol.*, 2:437-443, 1994. 40
- Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.
- Yelton *et al.*, *J. Immunol.*, 155(4):1994-2004, 1995.
- Yutzey *et al.* *Mol. Cell. Biol.*, 9:1397, 1989.
- Zeng *et al.*, *Biochemistry*, 35(40):13157-13164, 1996.
- Zhao-Emonet *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1442(2-3):109-119, 1998.
- 【図面の簡単な説明】 50

【0265】

【図1】自然発生ラット肝細胞癌（HCC）のJX-594静脈内（IV）処置。ラットに変異原物質N-ニトロソモルホリン（NMM）を飲料水（175 mg/L）において8週間投与した後、HCC腫瘍が形成されて300～400 mm³（典型的に16～20週後）となるまで超音波（US）によって追跡した。動物にPBS（n = 17）またはJX-594ウイルス 1×10^8 PFU（n = 6）のいずれかを静脈内に3回（2週間毎に1回、矢印）投与した。次に、USイメージングからの腫瘍測定に基づいて腫瘍体積を計算した。

【図2】ウサギにおけるVX2肝腫瘍のJX-594静脈内投与処置、原発腫瘍および転移に対する有効性。VX2細胞（解剖した1 mm³腫瘍から）をニュージーランドホワイトウサギの肝臓に移植して、腫瘍の成長を超音波（US）およびCTスキャンによって追跡した。腫瘍が2～4 cm³に達した後、動物をPBS（n = 7）またはJX-594（ 1×10^9 PFU）の静脈内またはUS誘導T注射（n = 3/群）による1回投与によって処置した。（図2A）肝臓におけるその後の腫瘍体積をCTスキャンによって7週間後に測定して、（図2B）肺における検出可能な腫瘍転移の数を6週目および7週目にCTスキャンに従って計数した。

【図3】ウサギにおけるVX2肝腫瘍のJX-594およびJX-963の低用量静脈内反復処置。腫瘍細胞を（図2A～2B）において記述されるとおりに移植した。腫瘍が2～4 cm³に達した後、動物にJX-594、JX-963、もしくはvvDD（n = 6/群） 1×10^8 PFUまたはPBS（n = 18）によって3回（2週間毎、矢印）静脈内に処置を行った。その後の原発腫瘍の体積をCTスキャンによって追跡した。

【図4】VX2肝腫瘍を有するウサギにおける肺転移に及ぼすJX-594、vvDD、およびJX-963の効果。動物（図3において記述される試験から）を、治療開始後毎週の間隔でCTスキャンによって肝転移に関して調べた。各群の動物あたりの検出可能な転移数の平均値を示す。

【図5】JX-963のIV送達後のVX2肝腫瘍を有するウサギの生存。肝腫瘍を有する動物を、図3において記述されるようにJX-963 1×10^8 PFUの3回投与によって処置した。これらの動物および対照処置群のカプラン-マイヤー生存曲線を示す。JX-594およびvvDD群は生存に有意差を示さなかったことから、JX-594およびvvDD群を含めなかった。

【図6】ワクシニア株のバースト比、細胞障害効果、およびウイルス株の腫瘍への全身送達。（図6A）正常細胞に対する腫瘍におけるワクシニア株のバースト比。異なるワクシニア株を用いて、初代培養正常細胞（NHBE）および腫瘍細胞株（A2780）の双方に感染多度（MOI）1.0 プラーク形成単位（PFU）/細胞で感染させた。48時間後に採取したウイルスをプラークアッセイによって力価を測定して、正常細胞に対して腫瘍において産生された（細胞あたり）ウイルス比を表記する。（図6B）ウイルス感染によって産生された細胞障害効果。Western Reserve、アデノウイルス血清型5型およびアデノウイルス株dI1520（ON YX-015）（いくつかのアッセイにおいて）を細胞株にMOI（PFU/細胞）の範囲で加えて、MTS（Promega）を用いて72時間後に細胞生存率を測定した。無処置対照ウェルの50%まで細胞生存率を低減させるために必要なウイルスのMOI（PFU/細胞）（ED₅₀）をプロットする。（図6C）腫瘍に対するウイルス株の全身送達。ワクシニア株Western Reserveまたはアデノウイルス血清型5型 1×10^9 PFUを皮下CMT 64またはJC腫瘍を有する免疫コンピテントマウスに静脈内送達した。マウスを48または72時間後に屠殺して、腫瘍組織のパラフィン抱埋切片においてウイルス外皮タンパク質に対して免疫組織化学を行った。グラフは、それぞれの腫瘍における陽性細胞（*=検出不能）のスコアを示す。それぞれの条件に関して、結果はマウス3匹の腫瘍に基づき、それぞれの腫瘍に関して無作為に選択した視野10個を採点した。

【図7】ヒト腫瘍細胞株のパネルに及ぼすWRおよびvvDDの細胞障害効果。WRまたはvvDDによる腫瘍細胞株の感染後72時間にEC₅₀値を決定した。無処置対照ウェルの50%まで細胞生存率を低減させるために必要なウイルスのMOI（PFU/細胞）（ED₅₀）をプロットする。

【図8】腫瘍を有するマウスに全身送達後のWRおよびvvDDのウイルス複製、生体分布に及ぼすH-Rasの過剰発現の効果、および光の産生によって定量したウイルス遺伝子発現。（図7A）ウイルス複製に及ぼすH-Rasの過剰発現の効果。増殖中または血清枯渇した、NIH 3

10

20

30

40

50

T3細胞および活性化H-Rasを発現するNIH 3T3細胞に、異なる株のワクシニアをMOI 1.0 PFU/細胞で感染させた。ウイルス株は親Western Reserve (WR)、およびチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子 (vJS6)、ウイルス増殖因子 (VGF) 遺伝子 (vSC20) のいずれかにおいて欠失もしくは挿入を含むWR、または双方の遺伝子の欠失を含むWR (vvDD) であった。感染性ウイルスを48時間後にプラークアッセイによって力価測定した。(図7B) 腫瘍を有するマウスに対する全身送達後のWRおよびvvDDの生体分布。皮下ヒトHCT 116腫瘍 (矢印) を有する無胸腺CD1 nu/nuマウスを、尾静脈注射によってワクシニア株 1×10^7 PFUによって処置した。ウイルス株 (WRおよびvvDD) はルシフェラーゼを発現して、ウイルス遺伝子発現のその後の生体分布を、基質ルシフェリンを加えた後の表示の処置後の時間でIVIS100システム (Xenogen Corp, Alameda) における生物発光イメージングによって検出した。(図7C) 光の産生によって定量したウイルス遺伝子発現を、皮下JC腫瘍 (マウスn=5/群) を有する、およびいずれかのウイルス 1×10^7 PFUを尾静脈注射によって処置したBALB/cマウスの、全身を含む対象領域 (腹側の画像) (破線、白い記号)、または腫瘍のみの対象領域 (背側) (実線、黒い記号) に関して経時的にプロットした。

【図9】腫瘍移植後の時間でCTイメージングによって追跡した肝臓にVX2腫瘍を移植したウサギ、VX2腫瘍細胞に対するCTLアッセイ、およびJX-963によって再処置したウサギ。(図9A) 肝臓にVX2腫瘍を移植したウサギを腫瘍の移植後の時間でCTイメージングによって追跡した。ウイルスvvDDおよびJX-963 1×10^9 PFUを、腫瘍移植 (矢印) 後腫瘍が 5 cm^3 と測定された際に2、3、および4週目に耳静脈注射によって送達した。検出可能な肺転移の数も同様にこれらの動物において測定した(原発性肝腫瘍の代表的なCT画像を8週目で示す) (対照処置動物に関してn=18; vvDD処置動物に関してn=6; JX-963処置動物に関してn=6)。(図9B) VX2腫瘍細胞を標的とするCTLアッセイ。CTLアッセイは、VX2腫瘍を有し、JX-963によって処置したウサギから、VX2腫瘍を有する無処置の動物から、および無処置の動物からの非標識末梢血リンパ球12.5×、25×、および50×と混合した予め標識したVX2細胞を用いてFACS分析によって行った。細胞死はACT1アッセイ (Cell Technology, Mountain View) によって定量した。(図9C) JX-963によって(A)のように処置したウサギ4匹を移植 (矢印) 後42日目にJX-963 1×10^9 PFUによって再処置して、その後腫瘍の体積をCTスキャンによって追跡した。

【図10】WRまたはAd5のいずれかを感染させた細胞株のウイルス產生およびウイルス感染によって產生された細胞障害効果。(図10A) 異なる細胞株に、Western Reserveまたはアデノウイルス血清型5型のいずれかをMOI 1.0 PFU/細胞で感染させた。48時間後に產生されたウイルス量 (感染単位/細胞) をプラークアッセイによって力価測定した。(図10B) 図1Cのように処置したマウスを屠殺して腫瘍切片をウイルス外皮タンパク質に関して染色した。代表的な写真は処置後72時間および10日目の切片を示す。

【図11】WRまたはAd5のいずれかを感染させた細胞株のウイルス產生。増殖中または接触阻害まで成長した(N.B.腫瘍細胞は接触阻害を受けなかった)、ヒト腫瘍細胞株 (Panc-1およびMCF-7) またはヒト不死化であるが非形質転換細胞株 (Beas-2BおよびMRC-5) を異なる株のワクシニアによってMOI 1.0 PFU/細胞で処置した。用いた株は、Western Reserve (WR)、およびチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子 (vJS6)、ウイルス増殖因子 (VGF) 遺伝子 (vSC20) のいずれかにおいて欠失もしくは挿入を含むWR、または双方の遺伝子の欠失を含むWR (vvDD) であった。48時間後に產生されたウイルスをプラークアッセイによって力価測定した。

【図12】全身送達vvDDの回復。vvDDを全身送達した (1×10^9 PFUの腹腔内注射) 皮下MC38腫瘍を有するC57B/6マウスの回復。マウスを処置後5日または8日目に屠殺して (n=8/群)、異なる組織を採取してウイルス感染単位 (PFU/mg組織) をプラークアッセイによって力価測定した (* = 検出限界未満)。

【図13】腫瘍を有するマウスマルモデルに異なる経路によって送達後のvvDDの有効性。(図13A) ウイルス株vvDDまたはチミジンキナーゼ欠失を有するワクシニアWyeth株 1×10^9 PFUの1回静脈内注射を、皮下TIB 75腫瘍 ($50 \sim 100 \text{ mm}^3$) を有する免疫コンピテントマウスに送達した。腫瘍の体積をキャリパーによって測定した (n=8/群)。(図13B) vvDD 1×10^9

10

20

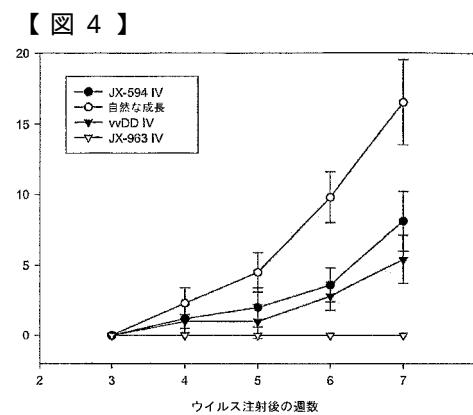
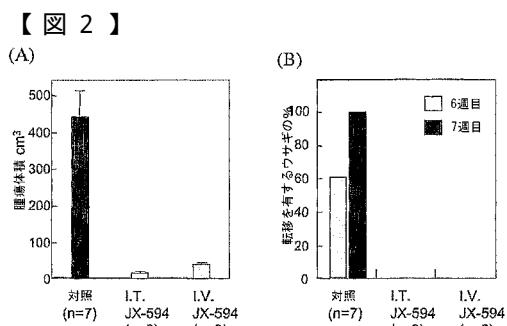
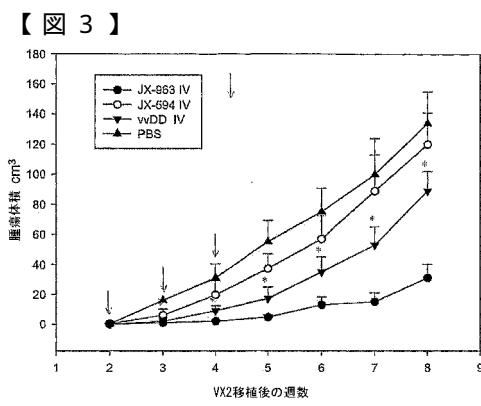
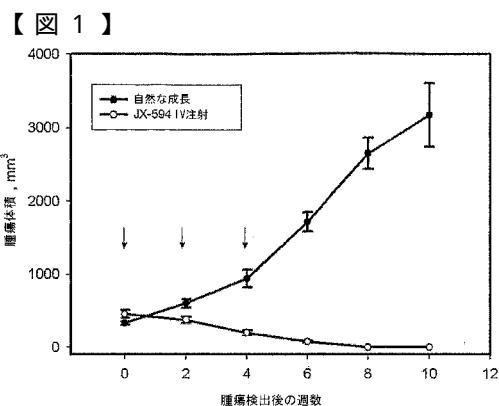
30

40

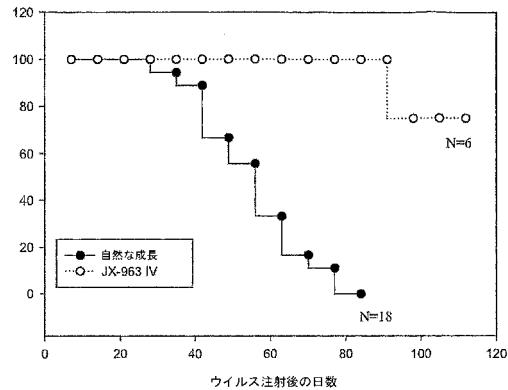
50

⁹ PFUを、皮下HT29腫瘍を有するSCIDマウスまたは皮下MC38腫瘍を有するC57B/6マウスに腫瘍内(IT)または腹腔内(IP)に送達した後、腫瘍の体積を非感染对照群(n = 8/群)と比較した。

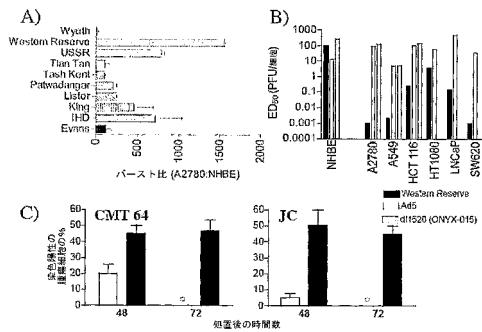
【図1】VX2腫瘍を有するウサギのJX-963(1×10^8 PFU)による処置後の中和抗体の形成。表記の時間にウサギから得た血漿の希釈液を既知数のウイルスPFUと共にインキュベートして、ブラークの50%を保持するために必要な希釈を示す(n = 3)。



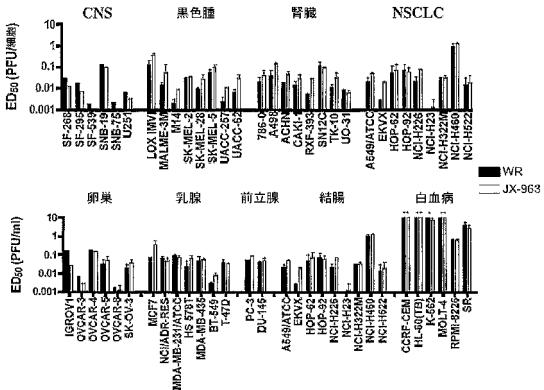
【図5】



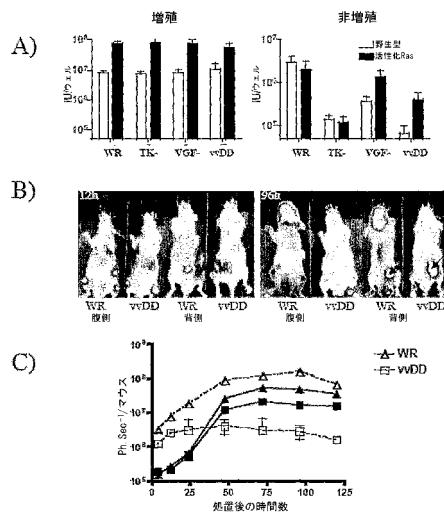
【図6】



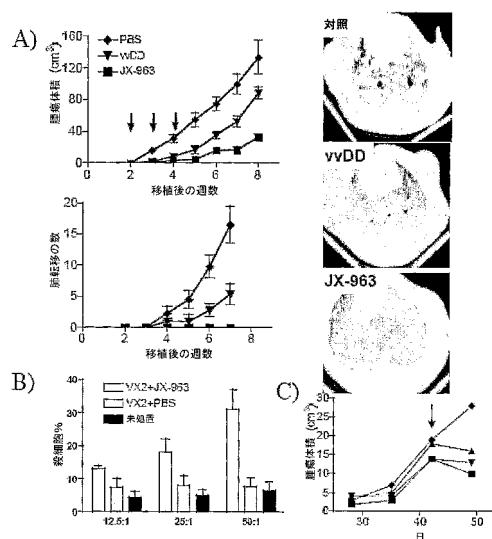
【図7】



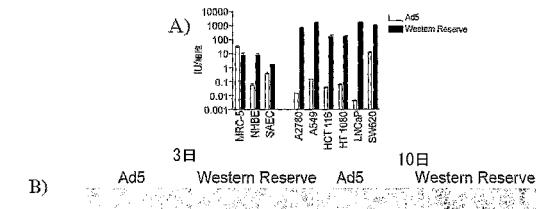
【図8】



【図9】



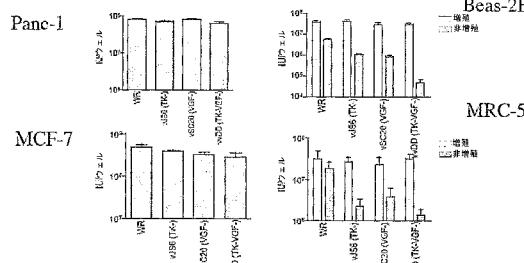
【図10】



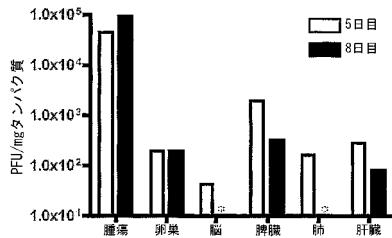
CMT 64

JC

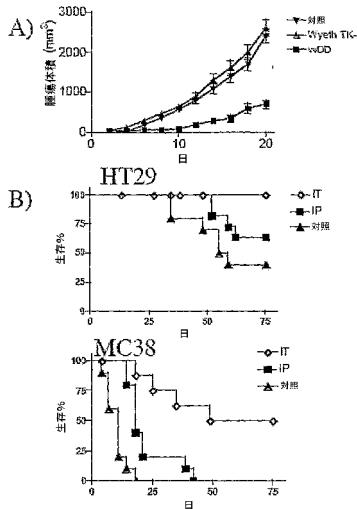
【図11】



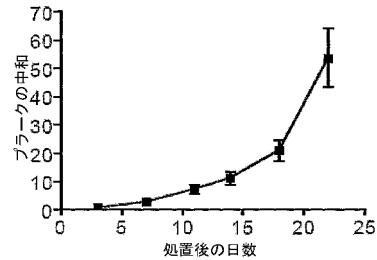
【図12】



【図13】



【図14】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/034945

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. A61K35/76 A61P35/00 C12N15/27		
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) A61K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM ET AL: "167. Both Oncolysis and Tumor Immunity Are Involved in an Autitumoral Efficacy by Intratumoral Injection of Recombinant Vaccinia Virus (TK Deleted, hGM-CSF Inserted Wyeth Strain) in a VX2 Rabbit Model" MOLECULAR THERAPY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 11, 15 August 2005 (2005-08-15), page 67, XP005015506 ISSN: 1525-0016 abstract	1,2,4-8, 11, 14-16, 21-24, 26-29
Y	----- -----	3,9,10, 12,13, 17-20,25 -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the International search	Date of mailing of the International search report	
7 March 2007	23/03/2007	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Brouns, Gaby	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/034945

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	THORNE STEVE H ET AL: "Future directions for the field of oncolytic virotherapy: a perspective on the use of vaccinia virus." EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY AUG 2004, vol. 4, no. 8, August 2004 (2004-08), pages 1307-1321, XP008075681 ISSN: 1744-7682 page 1314, last paragraph - page 1316, paragraph 1	3,9,10, 12,13, 17-20,25
Y	THORNE STEPHEN H ET AL: "THE USE OF ONCOLYTIC VACCINIA VIRUSES IN THE TREATMENT OF CANCER: A NEW ROLE FOR AN OLD ALLY?" CURRENT GENE THERAPY, XX, XX, vol. 5, no. 4, 2005, pages 429-443, XP008075683 ISSN: 1566-5232 page 435, left-hand column, paragraph 4 - page 436, right-hand column, paragraph 1	3,9,10, 12,13, 17-20,25
Y	MCCART J ANDREA ET AL: "Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes" CANCER RESEARCH, vol. 61, no. 24, 15 December 2001 (2001-12-15), pages 8751-8757, XP002331814 ISSN: 0008-5472 cited in the application table 2 page 8756 figures 1,5	3,9,10, 12,13, 17-20,25
A	THORNE ET AL: "169. The Creation of Novel Oncolytic Vaccinia Virus Vectors for Efficient Systemic Delivery of Transgenes to Tumors" MOLECULAR THERAPY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 11, 15 August 2005 (2005-08-15), page 67, XP005015508 ISSN: 1525-0016 abstract	
A	WO 2004/014314 A (KIRN DAVID [US]) 19 February 2004 (2004-02-19)	
A	WO 00/73479 A (US HEALTH [US]; MCCART J ANDREA [US]; BARTLETT DAVID L [US]; MOSS BERN) 7 December 2000 (2000-12-07)	
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/034945

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,Y	<p>KIM J H ET AL: "Systemic armed oncolytic and immunologic therapy for cancer with JX-594, a targeted poxvirus expressing GM-CSF."</p> <p>MOLECULAR THERAPY : THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY SEP 2006, vol. 14, no. 3, September 2006 (2006-09), pages 361-370, XP002422135</p> <p>ISSN: 1525-0016</p> <p>figure 4</p> <p>-----</p> <p>KIRN ET AL: "Systemic Oncolytic and Immunologic Therapy for Cancer with JX-594, a Targeted Poxvirus Expressing GM-CSF"</p> <p>MOLECULAR THERAPY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US,</p> <p>vol. 13, 2006, pages S244-S245,</p> <p>XP005675742</p> <p>ISSN: 1525-0016</p> <p>abstract</p> <p>-----</p>	3,9,10, 12,13, 17-20,25
P,Y		3,9,10, 12,13, 17-20,25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/034945

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 1-29 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 5.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2006/034945

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2004014314	A 19-02-2004	AU 2003258168 A1		25-02-2004
		CA 2494844 A1		19-02-2004
		CN 1754002 A		29-03-2006
		EP 1578396 A2		28-09-2005
		JP 2006506974 T		02-03-2006
		KR 20050074436 A		18-07-2005
WO 0073479	A 07-12-2000	AU 5446700 A		18-12-2000
		CA 2375189 A1		07-12-2000
		EP 1180157 A1		20-02-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/04 C 1 2 N 15/09	(2006.01)	A 6 1 P 35/04 C 1 2 N 15/00
		A

(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,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,L
C,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG
,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(72)発明者 キルン デイビッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ミル バレー ラ バーン アベニュー 4 4 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA30 CA04 CA05 CA06 CA09 CA10 DA02 DA03 EA02
FA02 GA11 GA18 HA08 HA09 HA14 HA17
4C084 AA13 MA66 NA14 ZB261 ZB272
4C085 AA03 BA85 BB01 CC08 EE01 GG02
4C087 AA01 AA02 BC83 MA65 NA14 ZB26 ZB27