

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6499825号  
(P6499825)

(45) 発行日 平成31年4月10日(2019.4.10)

(24) 登録日 平成31年3月22日(2019.3.22)

(51) Int.Cl.

F I

<b>C 1 2 N</b>	<b>15/34</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>15/34</b>	<b>Z N A</b>
<b>A 6 1 K</b>	<b>38/16</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>38/16</b>	
<b>A 6 1 P</b>	<b>1/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>1/00</b>	
<b>A 6 1 P</b>	<b>1/04</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>1/04</b>	
<b>A 6 1 P</b>	<b>1/10</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>1/10</b>	

請求項の数 25 (全 116 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-514398 (P2013-514398)  
 (86) (22) 出願日 平成23年6月10日 (2011.6.10)  
 (65) 公表番号 特表2013-538040 (P2013-538040A)  
 (43) 公表日 平成25年10月10日 (2013.10.10)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/040053  
 (87) 国際公開番号 W02011/156761  
 (87) 国際公開日 平成23年12月15日 (2011.12.15)  
 審査請求日 平成26年6月9日 (2014.6.9)  
 審判番号 不服2016-13517 (P2016-13517/J1)  
 審判請求日 平成28年9月9日 (2016.9.9)  
 (31) 優先権主張番号 61/353,652  
 (32) 優先日 平成22年6月10日 (2010.6.10)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/470,663  
 (32) 優先日 平成23年4月1日 (2011.4.1)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 512205245  
 ユニバーシティ オブ ワシントン スル  
 ー イッツ センター フォー コマーシ  
 ャリゼーション  
 アメリカ合衆国 ワシントン 98105  
 , シアトル, 11番 アヴェニュー  
 ノースイースト 4311, スイート  
 500  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74) 代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 デスモグレイン2 (DSG2) とのアデノウイルスの相互作用のための方法およびシステム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドを含む、組換え A d B - 2 / 3 線維多量体であって、前記組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドが、

a) デスモグレイン2 (DSG2) に結合する、アデノウイルス血清型 (A d B - 2 / 3) に由来する1つまたはそれより多い線維ポリペプチドシャフトドメインであって、各シャフトドメインが、A d 3 線維ポリペプチドシャフトドメイン、A d 7 線維ポリペプチドシャフトドメイン、A d 1 1 線維ポリペプチドシャフトドメイン、A d 1 4 線維ポリペプチドシャフトドメイン、および A d 1 4 a 線維ポリペプチドシャフトドメインからなる群より選択される、線維ポリペプチドシャフトドメインと、

b) 前記1つまたはそれより多い A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドシャフトドメインに作動可能に連結され、そのC末端側に位置する、DSG2への結合に必要な A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドノブドメインと、

c) 前記1つまたはそれより多い A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドシャフトドメインに作動可能に連結され、そのN末端側に位置する、前記ポリペプチドの多量体化を可能にする1つまたはそれより多い非 A d B - 2 / 3 由来ペプチドドメインと

を含み、ここで、前記組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドは、ホモ三量体であり、かつ、前記ホモ三量体の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドが二量体形成して、上皮細胞のデスモグレイン2 (DSG2) に結合することが可能な前記組換え A d B - 2 / 3 線維多量体を生成する、組換え A d B - 2 / 3 線維多量体。

10

20

## 【請求項 2】

組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドを含む、組換え A d B - 2 / 3 線維多量体であって、前記組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドが、

a) デスモグレイン 2 ( D S G 2 ) に結合する、アデノウイルス血清型 ( A d B - 2 / 3 ) に由来する 1 つまたはそれより多い線維ポリペプチドシャフトドメインであって、各シャフトドメインが、A d 3 線維ポリペプチドシャフトドメイン、A d 7 線維ポリペプチドシャフトドメイン、A d 1 1 線維ポリペプチドシャフトドメイン、A d 1 4 線維ポリペプチドシャフトドメイン、および A d 1 4 a 線維ポリペプチドシャフトドメインからなる群より選択される、線維ポリペプチドシャフトドメインと、

b) 前記 1 つまたはそれより多い A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドシャフトドメインに作動可能に連結され、その C 末端側に位置する A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドノブドメインと

を含み、ここで、前記組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドは、ホモ三量体であり、かつ、前記ホモ三量体の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドが二量体形成して、上皮細胞のデスモグレイン 2 ( D S G 2 ) に結合することが可能な前記組換え A d B - 2 / 3 線維多量体を生成する、組換え A d B - 2 / 3 線維多量体。

## 【請求項 3】

前記 A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドが A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド尾部ドメインを含まない、請求項 1 または 2 に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維多量体。

## 【請求項 4】

前記 1 つまたはそれより多いシャフトドメインが 1 ~ 2 2 個のシャフトドメインを含む、請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維多量体。

## 【請求項 5】

各シャフトドメインが、配列番号 1 1 :

## 【化 1 3】

GVL(T/S)LKC(L/V)(T/N)PLTT(T/A){G/S}GSLQLKVG(G/S)GLTVD(D/T)T(D/N)G(T/F/S)L(Q/K/E)ENI{G/S/K}{A/V}(T/N)TPL(V/T)K(T/S){G/N}HSI(G/N)L(S/P){L/I}G(A/P/N)GL(G/Q){T/I}{D/E}{E/Q}NKL  
C(T/S/A)KLG(E/Q/N)GLTF(N/D)S(N/S)N(I/S){C/I}{I/A}{D/N/L}{D/K}N(I/-)NTL.

によるアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 4 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維多量体。

## 【請求項 6】

各シャフトドメインが、配列番号 1 2 :

## 【化 1 4】

GVLTLKCLTPLTTTGGSLQLKVGGLT(V/I)DDTDG(T/F)L(Q/K)ENI{G/S)ATTPLVKTGHSIGL(S/P)LG{A/P)GLGT(D/N)ENKLC(T/A)KLG(E/Q)GLTFNSNNICI(D/N)DNINTL.

によるアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維多量体。

## 【請求項 7】

各シャフトドメインが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、および配列番号 5 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 4 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維多量体。

## 【請求項 8】

前記ノブドメインが、A d 3 線維ポリペプチドノブドメイン、A d 7 線維ポリペプチドノブドメイン、A d 1 1 線維ポリペプチドノブドメイン、A d 1 4 線維ポリペプチドノブドメイン、および A d 1 4 a 線維ポリペプチドノブドメインからなる群より選択される、請求項 1 から 7 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維多量体。

## 【請求項 9】

前記ノブドメインが、配列番号 1 3 :

10

20

30

40

50

## 【化 1 5】

WTG(V/P)(N/K)P(T')(E/R)ANC(Q/I)(M/I)(M/E)(Y/A/N/D)(S/K)(S/K)(E/Q)(S/N)  
 (N/P)D(C/S)KL(I/T)L(I/T)LVK(T/N)G(A/I)(L/I)V(T/N)(A/G)(F/Y)V(Y/T)(V/L)(I/M)G(V/A)S(N/D)(N/  
 D/Y)(F/V)N(M/T)L(T/F)(T/K)(Y/H/N)(R/K)N(I/V)(N/S)(F/I)(T/N)(A/V)EL(F/Y)FD(S/A)(A/T)G(N/H  
 )(L/I)L(T/P)(S/R/D)(L/S)SSLKT(P/D)L(N/E)(H/L)K(S/Y)(G/K)Q(N/T)(M/--)(A/--)(T/--)(G/--  
 )A(I/L/D)(T/F)(N/S)  
 A(K/R)(S/G)FMPSTTAYPF(--V)(--L)(N/P)(N/D/V)(N/A)(S/G)(R/T)(E/H)(N/K/--)(--E)  
 NYI(Y/F)G(T/Q)C(H/Y)Y(T/K)ASD(H/G)(T/A)(A/L)FP(I/L)(D/E)(I/V)(S/T)VMLN(Q/R/K)R(A/L)  
 (I/L/P)(R/N/D)(A/D/N/S)(D/E/R)TSY(C/V)(I/M)(R/T)(I/V/F)(T/L)WS(W/L)N(T/A)G(D/L/V)APE(G  
 /V/--)(Q/--)T(S/T)(A/Q)(T/A)TL(V/I)TSPFTF(Y/S)YIREDD.

10

によるアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 8 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維多量体。

## 【請求項 1 0】

前記ノブドメインが、配列番号 1 4 :

## 【化 1 6】

WTGVNPT(E/R)ANCQ(M/I)(M/I)(D/N/A)SSESNDCKLILTLVKTGALVTAFVYVIGVSN(N/D)FNMLTT(  
 Y/H)(R/K)NINFTAELFFDS(A/T)GNLLT(S/R)LSSLKTPLNHKSGQNMATGA(I/L)TNAK(S/G)FMPSTTA  
 YPFN(N/D/V)NSRE(--K)(-E)NYIYGTC(H/Y)YTASD(H/R)  
 TAFPIDISVMLN(Q/R)RA(I/L)(R/N)(A/D/N)  
 (D/E)TSYCIR(I/V)TWSWNTG(D/V)APE(G/V)QTSATTLVTSPFTFYIREDD.

20

によるアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 8 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維多量体。

## 【請求項 1 1】

前記ノブドメインが、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、および配列番号 1 0 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 8 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維多量体。

## 【請求項 1 2】

前記ポリペプチドの多量体化を可能にする 1 つまたはそれより多い非 A d B - 2 / 3 由来ペプチドドメインが、E V S A L E K (配列番号 2 2) および / または K V S A L K E (配列番号 2 3) からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維多量体。

30

## 【請求項 1 3】

前記 A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドが、

a) それぞれが A d 3 シャフトドメイン (配列番号 1) を含む 1 つまたはそれより多いシャフトドメインと、

b) A d 3 ノブドメイン (配列番号 6) を含むノブドメインと  
 を含む、請求項 1 から 1 2 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維多量体

40

## 【請求項 1 4】

前記 A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドが、単一の A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドシャフトドメインを含有する、請求項 1 から 1 3 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維多量体。

## 【請求項 1 5】

前記組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドに結合体化した、1 種またはそれより多い種の化合物をさらに含む、請求項 1 から 1 4 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維多量体。

## 【請求項 1 6】

50

前記 1 種またはそれより多い種の化合物が、治療薬、診断薬、およびイメージング剤からなる群より選択される、請求項 15 に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維多量体。

【請求項 17】

前記 1 種またはそれより多い種の化合物が、少なくとも 1 種の治療薬を含み、前記治療薬が、抗体、免疫複合体、ナノ粒子、化学療法薬、放射性粒子、ウイルス、ワクチン、細胞免疫療法薬、遺伝子療法構築物、核酸治療薬、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 16 に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維多量体。

【請求項 18】

a) 請求項 1 から 17 までのいずれか一項に記載の A d B - 2 / 3 線維多量体と、  
b) 薬学的に許容される担体と  
を含む医薬組成物。

10

【請求項 19】

上皮組織に関連する障害を処置するために十分な量の 1 種またはそれより多い種の治療薬、および / または上皮組織に関連する障害を診断するために十分な量の診断薬をさらに含む、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

上皮組織に関連する障害の治療的処置または診断を増強するため、および / または上皮組織をイメージングするための、請求項 1 から 17 までのいずれか一項に記載の A d B - 2 / 3 線維多量体を含む組成物、または請求項 18 または 19 に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

20

前記上皮組織に関連する障害が、固形腫瘍、過敏性腸症候群、炎症性腸障害、クローン病、潰瘍性大腸炎、便秘、胃食道逆流性疾患、バレット食道、慢性閉塞性肺疾患、喘息、気管支炎、肺気腫、嚢胞性線維症、間質性肺疾患、肺炎、原発性肺高血圧症、肺塞栓症、肺サルコイドーシス、結核、膵炎、膵管障害、胆管閉塞症、胆嚢炎、総胆管結石症、脳障害、乾癬、皮膚炎、糸球体腎炎、肝炎、糖尿病、甲状腺障害、蜂巣炎、感染症、腎盂腎炎、および胆石からなる群より選択される、請求項 20 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 22】

上皮組織への化合物の送達を改善するための、請求項 1 から 17 までのいずれか一項に記載の A d B - 2 / 3 線維多量体を含む組成物、または請求項 18 または 19 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 23】

診断薬またはイメージング剤を含む、請求項 22 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 24】

デスモグレイン 2 ( D S G 2 ) を発現している組織への物質の送達を改善するための、請求項 1 から 17 までのいずれか一項に記載の A d B - 2 / 3 線維多量体を含む組成物、または請求項 18 または 19 に記載の医薬組成物。

【請求項 25】

組織における上皮間葉転換 ( E M T ) を誘導するための、請求項 1 から 17 までのいずれか一項に記載の A d B - 2 / 3 線維多量体を含む組成物、または請求項 18 または 19 に記載の医薬組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、2010年6月10日に提出された米国仮出願第61/353,652号、2011年1月5日に提出された米国仮出願第61/430,091号、および2011年4月1日に提出された米国仮出願第61/470,663号の利益を主張する。これらの仮出願の全ては、それらの全体が参考として本明細書に援用される。

【0002】

政府の権利についての声明

50



本発明は、National Institutes of Healthによって付与されたR01 CA080192およびR01 HLA078836の下、米国政府の支援を受けてなされた。米国政府は、本発明に一定の権利を有する。

#### 【背景技術】

##### 【0003】

ヒトアデノウイルス(Ad)は、現在51種の血清型を含有する6種(A~F)に分類されている。大部分のAd血清型は、主要な付着受容体としてコクサッキー・アデノウイルス受容体(CAR)を利用する(非特許文献1)。しかし、B種のAd血清型の場合は違う。最近、本発明者らは、それらの受容体の使用に基づいたB種Adの新しいグループ分けを提案した(非特許文献2)。グループ1(Ad16、Ad21、Ad35、Ad50)は、ほぼCD46のみを受容体として利用する；グループ2(Ad3、Ad7、Ad14)は、共通の未確認の受容体(複数可)を共有し、それは、CD46ではなく、仮に受容体Xと名付けた；グループ3(Ad11)は、優先的にCD46と相互作用するが、CD46が遮断されている場合には受容体Xも利用する。

10

##### 【0004】

B種Adは、一般的なヒト病原体である。2005年から、大多数の米国の軍事訓練施設において多様なB種血清型の同時出現が観察された。これには、血清型Ad3、Ad7、およびAd14が含まれた(Metzgarら、2007年)。2007年に、米国およびアジアのいくつかの場所でAd14の新規の病原性が高い株および毒性が強いと思われる株であるAd14aが発見された(Louieら、2008年；Tateら、2009年)。本発明者らは最近、Ad14aが、それらの受容体の使用に関してAdのB種グループ2に属することを実証した(Wangら、2009年)。まとめると、受容体Xを利用する血清型(Ad3、Ad7、Ad14、Ad14a、およびAd11)は全て、本明細書ではAdB-2/3と称される。

20

##### 【0005】

AdB-2/3は、特に、大部分の固形腫瘍を代表する上皮起源の腫瘍との関連において、遺伝子伝搬ベクターとして極めて重要である(YamamotoおよびCurie、2010年)。上皮細胞は、いくつかの細胞間結合および頂端-基底極性を維持する。上皮細胞の重要な特徴は、上皮内がん(epithelial cancers in situ)において、およびがん細胞株において保存されている(Turleyら、2008年)。CARおよびCD46はどちらも、多くの場合、上皮がん細胞の密着結合および接着結合内に閉じ込められており、これらの付着受容体を使用するAdは接近することができない(CoyneおよびBergelson、2005年；Straussら、2009年)。対照的に、AdB-2/3は、上皮がん細胞に効率的に感染し、これは、部分的に、上皮間葉転換(epithelial to mesenchymal transition)(EMT)によく似たプロセスを誘導することによって実現される(Straussら、2009年)。AdB-2/3の別の示差的特徴は、それらが、複製時にAd線維とペントンベースとからなるウイルス成分の12面体粒子を産生することができることである(Norrbbyら、1967年)。ペントン12面体(PtDd)は、全長のペントンベースタンパク質から組み立てることはできず、残基37と残基38の間におけるタンパク質分解による自発的なN末端の切断を必要とする(Fuschiottiら、2006年)。この切断部位はAd3、Ad7、Ad11、およびAd14において保存されているが、Ad2およびAd5には存在しない。Ad3の場合では、PtDdは、感染性ウイルス当たりPtDd5.5×10<sup>6</sup>個という非常に過剰に形成され(Fenderら、2005年)、PtDdが、細胞間結合を妨害することによってAd3の感染性を増強し、したがって、ウイルスの伝播に好都合であることが示されている(Waltersら、2002年)。

30

40

##### 【0006】

受容体Xを同定するための最初の試みは、1995年に遡る。最近、CD46、CD80および/またはCD86などの、受容体Xのいくつかの候補が提唱された(Fleis

50

chliら、2007年；Shortら、2004年；Shortら、2006年；Sirenaら、2004年）。しかし、これらのタンパク質が、AdB-2/3に対する高親和性受容体としての機能を果たし得ることは、これまで誰も検証することができていない（Gaggarら、2003年b；Gustafssonら、2006年；Marttilaら、2005年；Perssonら、2008年；Segermanら、2003年；非特許文献2）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Bergelson, J.M.ら、Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. Science (1997) 275, 1320~1323

10

【非特許文献2】Tuve, S.ら、A new group B adenovirus receptor is expressed at high levels on human stem and tumor cells. J Virol (2006) 80, 12109~12120

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

20

第1の態様では、本発明は、上皮組織に関連する障害の治療的処置または診断を増強する、かつ/または上皮組織をイメージングするための方法であって、それを必要とする被験体に、

a) 障害を処置するために十分な量の1種またはそれより多い種の治療薬、障害を診断するために十分な量の診断薬、および/または上皮組織をイメージングするために十分な量のイメージング剤と、

b) 1種またはそれより多い種の治療薬、診断薬、および/またはイメージング剤の有効性を増強するために十分な量のAdB-2/3線維多量体またはその機能的等価物を投与することを含む方法を提供する。

【0009】

30

本発明の方法は、上皮組織に関連する障害を処置する、かつ/または診断する、かつ/または、上皮組織、例えば、そのような障害が存在すると考えられる上皮組織などをイメージングするために用いることができ、そのような障害としては、これらに限定されないが、固形腫瘍、過敏性腸症候群、炎症性腸障害、クローン病、潰瘍性大腸炎、便秘、胃食道逆流性疾患（gastroesophageal reflux disease）、慢性閉塞性肺疾患、喘息、気管支炎、肺気腫、嚢胞性線維症、間質性肺疾患、肺炎、原発性肺高血圧症、肺塞栓症、肺サルコイドーシス、結核、脾炎、脾管障害、脳障害（すなわち：上皮の血液脳関門を通る薬物の輸送を改善することが有効であり得る任意の脳障害）、胆管閉塞症、胆嚢炎、総胆管結石症、感染症（これらに限定されないが、蜂巣炎、肺炎、および腎盂腎炎を含む）、および胆石が挙げられる。好ましい実施形態では、障害は、これらに限定されないが、乳房の腫瘍、肺の腫瘍、結腸の腫瘍、直腸の腫瘍、胃の腫瘍（stomach tumor）、前立腺の腫瘍、卵巣の腫瘍、子宮の腫瘍、子宮頸部の腫瘍（cervical tumor）、腎臓の腫瘍、皮膚の腫瘍、黒色腫、脾臓の腫瘍、肝臓の腫瘍、内分泌の腫瘍、脳腫瘍、頭頸部の腫瘍、鼻咽頭の腫瘍、胃の腫瘍（gastric tumor）、扁平上皮癌、腺癌、膀胱の腫瘍、および食道の腫瘍を含めた固形腫瘍である。

40

【0010】

本発明の任意の実施形態の方法では、例えば、Ad3線維多量体、およびAd7線維多量体、Ad11線維多量体、Ad14線維多量体、Ad14a線維多量体、それらの組み合わせ、およびそれらの機能的等価物からなる群より選択されるAdB-2/3線維多量

50

体を利用することができる。好ましい実施形態では、A d B - 2 / 3 線維多量体は、A d 3 線維多量体、またはそれらの機能的等価物である。別の実施形態では、A d B - 2 / 3 線維多量体は、A d B - 2 / 3 ビリオン、A d B - 2 / 3 カプシド、A d B - 2 / 3 の 1 2 面体粒子 ( P t D d )、組換え A d B - 2 / 3 線維多量体、およびそれらの機能的等価物を含んでよい。好ましい実施形態では、A d B - 2 / 3 線維多量体は、A d 3 の P t D d または結合開口薬 ( j u n c t i o n o p e n e r ) 1 ( J O - 1 ) ( 配列番号 2 0 ) を含む。

#### 【 0 0 1 1 】

任意の適切な治療薬、診断薬、またはイメージング剤をこれらの方法において使用することができる。治療薬を使用する実施形態では、そのような治療薬としては、これらに限定されないが、抗体、免疫複合体 ( i m m u n o c o n j u g a t e )、ワクチン、放射性粒子 / 放射線療法 ( 「 照射 」 )、化学療法薬、養子 T 細胞療法および樹状細胞療法を含めた細胞免疫療法、ナノ粒子、吸入治療薬、遺伝子療法構築物、および核酸治療薬、またはそれらの組み合わせを挙げることができる。好ましい実施形態では、治療薬は、化学療法薬または抗腫瘍モノクローナル抗体を含む。本発明の方法において使用することができる例示的な抗腫瘍モノクローナル抗体としては、これらに限定されないが、トラスツズマブ ( t r a s t u z u m a b )、セツキシマブ ( c e t u m i x i m a b )、ペルツズマブ ( p e t u z u m a b )、アポマブ ( a p o m a b )、コナツムマブ ( c o n a t u m u m a b )、レクサツムマブ ( l e x a t u m u m a b )、ベバシズマブ ( b e v a c i z u m a b )、ベバシズマブ ( b e v a c i z u m a b )、デノスマブ ( d e n o s u m a b )、ザノリムマブ ( z a n o l i m u m a b )、リンツズマブ ( l i n t u z u m a b )、エドレコロマブ ( e d r e c o l o m a b )、リツキシマブ ( r i t u x i m a b )、チシリムマブ ( t i c i l i m u m a b )、トシツモマブ ( t o s i t u m o m a b )、アレムツズマブ ( a l e m t u z u m a b )、エブラツズマブ ( e p r a t u z u m a b )、ミツモマブ ( m i t u m o m a b )、ゲムツズマブ ( g e m t u z u m a b )、オゾガマイシン ( o z o g a m i c i n )、オレゴボマブ ( o r e g o v o m a b )、ペムブモマブ ( p e m t u m o m a b )、ダクリズマブ ( d a c l i z u m a b )、パニツムマブ ( p a n i t u m u m a b )、カツマキシマブ ( c a t u m a x o m a b )、オフアツムマブ ( o f a t u m u m a b )、およびイブリツモマブ ( i b r i t u m o m a b ) が挙げられる。

#### 【 0 0 1 2 】

好ましい一実施形態では、上皮組織に関連する障害は、H e r - 2 陽性腫瘍を含む。この実施形態の下で処置することができる例示的な H e r - 2 陽性腫瘍としては、これらに限定されないが、乳房の腫瘍、胃の腫瘍、結腸の腫瘍、および卵巣の腫瘍が挙げられる。この実施形態では、治療薬が、トラスツズマブを含むことがさらに好ましく；さらに好ましい実施形態では、治療薬が、1 種またはそれより多い種の化学療法薬および / または照射をさらに含む。この実施形態では、A d B - 2 / 3 線維多量体が、A d 3 の P t D d、J O - 1 ( 配列番号 2 0 )、またはそれらの機能的等価物を含むことがさらに好ましい。別の好ましい実施形態では、処置される被験体は、トラスツズマブ療法に応答していない。

#### 【 0 0 1 3 】

別の好ましい実施形態では、上皮組織に関連する障害は、E G F R 陽性腫瘍を含む。例示的な E G F R 陽性腫瘍としては、これらに限定されないが、肺の腫瘍、結腸の腫瘍、乳房の腫瘍、直腸の腫瘍、頭頸部の腫瘍、および膵臓の腫瘍が挙げられる。この実施形態では、治療薬が、セツキシマブを含むことが好ましく；さらに好ましい実施形態では、治療薬が、1 種またはそれより多い種の化学療法薬および / または照射をさらに含む。この実施形態では、A d B - 2 / 3 線維多量体が、A d 3 の P t D d、J O - 1 ( 配列番号 2 0 )、またはそれらの機能的等価物を含むことがさらに好ましい。別の好ましい実施形態では、処置される被験体は、セツキシマブ療法に応答していない。

#### 【 0 0 1 4 】

別の実施形態では、上皮組織に関連する障害は固形腫瘍を含み、治療薬は血管内皮増殖因子（VEGF）阻害剤を含む。

【0015】

第2の態様では、本発明は、上皮組織に関連する障害を処置するための方法であって、それを必要とする被験体に、障害を処置するために十分な量のAdB-2/3線維多量体またはその機能的等価物を投与することを含む方法を提供する。この実施形態では、AdB-2/3線維多量体を単独療法として投与する。一実施形態では、この方法を、AdB-2/3ウイルス感染症を処置するために使用する。別の実施形態では、処置される障害は固形腫瘍である。本発明のこの態様を使用して処置することができる例示的な固形腫瘍としては、これらに限定されないが、乳房の腫瘍、肺の腫瘍、結腸の腫瘍、直腸の腫瘍、胃の腫瘍、前立腺の腫瘍、卵巣の腫瘍、子宮の腫瘍、子宮頸部の腫瘍、腎臓の腫瘍、皮膚がん、黒色腫、脾臓の腫瘍、肝臓の腫瘍、内分泌の腫瘍、脳腫瘍、頭頸部の腫瘍、鼻咽頭の腫瘍、胃の腫瘍、扁平上皮癌、腺癌、膀胱の腫瘍、および食道の腫瘍が挙げられる。この態様では、使用するための例示的なAdB-2/3線維多量体としては、これらに限定されないが、Ad3線維多量体、およびAd7線維多量体、Ad11線維多量体、Ad14線維多量体、Ad14a線維多量体、それらの組み合わせ、およびそれらの機能的等価物が挙げられる。好ましい実施形態では、AdB-2/3線維多量体は、Ad3線維多量体、およびそれらの機能的等価物である。さらに好ましい実施形態では、AdB-2/3線維多量体は、AdB-2/3ピリオン、AdB-2/3カプシド、AdB-2/3の12面体粒子（PtDd）、組換えAdB-2/3線維多量体、およびそれらの機能的等価物からなる群より選択される。種々のさらに好ましい実施形態では、AdB-2/3線維多量体は、Ad3のPtDdまたは結合開口薬1（JO-1）（配列番号20）を含む。

【0016】

第3の態様では、本発明は、

a) 1つまたはそれより多いAdB-2/3線維ポリペプチドシャフトドメイン、またはそれらの機能的等価物と、

b) 1つまたはそれより多いAdB-2/3線維ポリペプチドシャフトドメインに作動可能に連結され、そのC末端側に位置するAdB-2/3線維ポリペプチドノブドメイン、またはその機能的等価物と、

c) 1つまたはそれより多いAdB-2/3線維ポリペプチドシャフトドメインに作動可能に連結され、そのN末端側に位置する1つまたはそれより多い非AdB-2/3由来二量体形成ドメインと

を含む組換えAdB-2/3線維ポリペプチドを提供する。

【0017】

一実施形態では、組換えAdB-2/3線維ポリペプチドは、AdB-2/3尾部ドメインを含まない。別の実施形態では、各シャフトドメインは、Ad3シャフトドメイン、Ad7シャフトドメイン、Ad11シャフトドメイン、Ad14シャフトドメイン、Ad14aシャフトドメイン、それらの組み合わせ、およびそれらの機能的等価物からなる群より選択される。別の実施形態では、1つまたはそれより多いシャフトドメインは、1~22個のシャフトドメインを含む。種々の別の実施形態では、各シャフトドメインは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号11または配列番号12によるアミノ酸配列を含む、またはそれからなる。別の実施形態では、ノブドメインは、Ad3ノブドメイン、Ad7ノブドメイン、Ad11ノブドメイン、Ad14ノブドメイン、Ad14aノブドメイン、およびそれらの機能的等価物からなる群より選択される。種々の別の実施形態では、ノブドメインは、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号13または配列番号14によるアミノ酸配列を含む、またはそれからなる。別の実施形態では、二量体形成ドメインは、EVSALEK（配列番号22）および/またはKVSALEK（配列番号23）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。好ましい実施形態では、組換えAdB-2/3ポリペプチドは、(a) それぞれがAd3シャフトドメイン（配列番号1）を含む、またはそれからなる

1つまたはそれより多いシャフトドメインを含み、(b)ノブドメインがA d 3ノブドメイン(配列番号6)を含む、またはそれからなる。

【0018】

さらに好ましい実施形態では、組換えA d B - 2 / 3線維ポリペプチドは、J O - 1(配列番号20)のアミノ酸配列を含む、またはそれからなる。さらに好ましい実施形態では、A d B - 2 / 3線維ポリペプチドは、多量体を形成しており、二量体を形成していることが最も好ましい。

【0019】

他の態様では、本発明は、本発明の組換えA d B - 2 / 3線維ポリペプチドをコードする単離された核酸；本発明の単離された核酸を含む組換え発現ベクター；本発明の組換え発現ベクターを含む宿主細胞；および本明細書に記載のA d B - 2 / 3多量体を含む医薬組成物を提供する。

10

【0020】

別の態様では、本発明は、上皮組織への化合物の送達を改善するための方法であって、上皮組織を、(a)上皮組織に送達すべき1種またはそれより多い種の化合物；および(b)上皮組織への1種またはそれより多い種の化合物の送達を増強するために十分な量のA d B - 2 / 3線維多量体、またはその機能的等価物と接触させることを含む方法を提供する。この方法により、これらに限定されないが診断用化合物およびイメージング化合物を含めた、上皮細胞を標的とする任意の化合物の送達を改善することが可能になる。好ましい実施形態では、上皮組織は固形腫瘍を含む。

20

【0021】

さらに別の態様では、本発明は、デスモグレイン2(D S G 2)を発現している組織への化合物の送達を改善するための方法であって、D S G 2を発現している組織を、(a)組織に送達すべき1種またはそれより多い種の化合物；および(b)組織への1種またはそれより多い種の化合物の送達を増強するために十分な量のA d B - 2 / 3線維多量体、またはその機能的等価物と接触させることを含む方法を提供する。本発明のこの態様の方法は、D S G 2を発現している組織への、任意の対象の化合物の送達を改善するために用いることができる。

【0022】

さらなる態様では、本発明は、組織における上皮間葉転換(E M T)を誘導する方法であって、上皮組織を、E M Tを誘導するために十分な量のA d B - 2 / 3線維多量体、またはその機能的等価物と接触させることを含む方法を提供する。

30

【0023】

これらの本発明のさらなる態様のそれぞれの好ましい実施形態では、A d B - 2 / 3線維多量体は、A d 3線維多量体、およびA d 7線維多量体、A d 11線維多量体、A d 14線維多量体、A d 14a線維多量体、それらの組み合わせ、およびそれらの機能的等価物からなる群より選択される。種々のさらに好ましい実施形態では、A d B - 2 / 3線維多量体は、A d 3線維多量体、またはその機能的等価物であり；A d B - 2 / 3線維多量体は、A d B - 2 / 3ピリオン、A d B - 2 / 3カプシド、A d B - 2 / 3の12面体粒子(P t D d)、組換えA d B - 2 / 3線維多量体、およびそれらの機能的等価物からなる群より選択され；A d B - 2 / 3線維多量体は、A d 3のP t D dを含み；A d B - 2 / 3線維多量体は、結合開口薬1(J O - 1)(配列番号20)を含み；A d B - 2 / 3線維多量体は二量体である。

40

【0024】

別の態様では、本発明は、上皮組織に関連する障害を処置すること、上皮組織への物質の送達を改善すること、D S G 2を発現している組織への物質の送達を改善すること、組織におけるE M Tを誘導すること、および/またはA d B - 2 / 3感染症を処置することのうちの1つまたは複数に対する候補化合物を同定するための方法であって、(a)A d B - 2 / 3線維多量体とD S G 2を、D S G 2への多量体の結合を促進する条件下、1種またはそれより多い種の試験化合物の存在下で接触させるステップと；(b)対照と比較

50

して、A d B - 2 / 3 線維多量体が D S G 2 と結合することに競合する陽性の試験化合物を同定するステップとを含み、陽性の試験化合物が、上皮組織に関連する障害を処置すること、上皮組織への物質の送達を改善すること、D S G 2 を発現している組織への物質の送達を改善すること、組織における E M T を誘導すること、および / または A d B - 2 / 3 感染症を処置することのうちの 1 つまたは複数に対する候補化合物である方法を提供する。

本発明の好ましい実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

( 項目 1 )

a ) 1 つまたはそれより多い A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドシャフトドメイン、またはそれらの機能的等価物と、

10

b ) 前記 1 つまたはそれより多い A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドシャフトドメインに作動可能に連結され、その C 末端側に位置する A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドノブドメイン、またはそれらの機能的等価物と、

c ) 前記 1 つまたはそれより多い A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドシャフトドメインに作動可能に連結され、その N 末端側に位置する 1 つまたはそれより多い非 A d B - 2 / 3 由来二量体形成ドメインと

を含む組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

( 項目 2 )

A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド尾部ドメインを含まない、項目 1 に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

20

( 項目 3 )

各シャフトドメインが、A d 3 線維ポリペプチドシャフトドメイン、A d 7 線維ポリペプチドシャフトドメイン、A d 1 1 線維ポリペプチドシャフトドメイン、A d 1 4 線維ポリペプチドシャフトドメイン、A d 1 4 a 線維ポリペプチドシャフトドメイン、それらの組み合わせ、およびそれらの機能的等価物からなる群より選択される、項目 1 または 2 に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

( 項目 4 )

前記 1 つまたはそれより多いシャフトドメインが 1 ~ 2 2 個のシャフトドメインを含む、項目 1 から 3 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

( 項目 5 )

各シャフトドメインが、配列番号 1 1 :

30

【化 1 3】

GVL(T/S)LKC(L/V)(T/N)PLTT(T/A)(G/S)GSLQLKVG(G/S)GLTVD(D/T)T(D/N)G(T/F/S)L(Q/K/E)ENI(G/S/K)(A/V)(T/N)TPL(V/T)K(T/S)(G/N)HSI(G/N)L(S/P)(L/I)G(A/P/N)GL(G/Q)(T/I)(D/E)(E/Q)NKL  
C(T/S/A)KLG(E/Q/N)GLTF(N/D)S(N/S)N(I/S)(C/I)(I/A)(D/N/L)(D/K)N(I/-)NTL.

によるアミノ酸配列を含む、項目 1 から 4 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

( 項目 6 )

40

各シャフトドメインが、配列番号 1 2 :

【化 1 4】

GVLTCLKLPLTTTGGSLQLKVGGLT(V/I)DDTDG(T/F)L(Q/K)ENI(G/S)ATPLVKTGHSIGL(S/P)LG(A/P)GLGT(D/N)ENKLC(T/A)KLG(E/Q)GLTFNSNNICI(D/N)DNINTL.

によるアミノ酸配列を含む、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

( 項目 7 )

各シャフトドメインが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、および配

50

列番号 5 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、項目 1 から 4 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

(項目 8)

前記ノブドメインが、A d 3 線維ポリペプチドノブドメイン、A d 7 線維ポリペプチドノブドメイン、A d 1 1 線維ポリペプチドノブドメイン、A d 1 4 線維ポリペプチドノブドメイン、A d 1 4 a 線維ポリペプチドノブドメイン、およびそれらの機能的等価物からなる群より選択される、項目 1 から 7 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

(項目 9)

前記ノブドメインが、配列番号 1 3 :

【化 1 5】

WTG(V/P)(N/K)P(T/)(E/R)ANC(Q/I)(M/I)(M/E)(Y/A/N/D)(S/K)(S/K)(E/Q)(S/N)  
(N/P)D(C/S)KL(I/T)(L/I)LVK(T/N)G(A/I)(L/I)V(T/N)(A/G)(F/Y)V(Y/T)(V/L)(I/M)G(V/A)S(N/D)(N/  
D/Y)(F/V)N(M/T)L(T/F)(T/K)(Y/H/N)(R/K)N(I/V)(N/S)(F/I)(T/N)(A/V)EL(F/Y)FD(S/A)(A/T)G(N/H  
(L/I)L(T/P)(S/R/D)(L/S)SSLKT(P/D)L(N/E)(H/L)K(S/Y)(G/K)Q(N/T)(M/--)(A/--)(T/--)(G/--  
)A(I/L/D)(T/F)(N/S)  
A(K/R)(S/G)FMPSTTAYPF(--V)(--L)(N/P)(N/D/V)(N/A)(S/G)(R/T)(E/H)(N/K/--)(--E)  
NYI(Y/F)G(T/Q)C(H/Y)Y(T/K)ASD(H/G)(T/A)(A/L)FP(I/L)(D/E)(I/V)(S/T)VMLN(Q/R/K)R(A/L)  
(I/L/P)(R/N/D)(A/D/N/S)(D/E/R)TSY(C/V)(I/M)(R/T)(I/V/F)(T/L)WS(W/L)N(T/A)G(D/L/V)APE(G  
/V/--)(Q/--)T(S/T)(A/Q)(T/A)TL(V/I)TSPFTF(Y/S)YIREDD.

10

20

によるアミノ酸配列を含む、項目 1 から 8 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

(項目 10)

前記ノブドメインが、配列番号 1 4 :

【化 1 6】

WTGVNPT(E/R)ANCQ(M/I)(M/I)(D/N/A)SSESDCKLILTLVKTGALVTAFVYVIGVSN(N/D)FNMLTT(  
Y/H)(R/K)NINFTAELFFDS(A/T)GNLLT(S/R)LSSLTPLNHKSGQNMATGA(I/L)TNAK(S/G)FMPSTTA  
YPFN(N/D/V)NSRE(--K)(-E)NYIYGTC(H/Y)YTASD(H/R)  
TAFPIDISVMLN(Q/R)RA(I/L)(R/N)(A/D/N)  
(D/E)TSYCIR(I/V)TWSWNTG(D/V)APE(G/V)QTSATTLVTSPFTFYIREDD.

30

によるアミノ酸配列を含む、項目 1 から 8 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

(項目 11)

前記ノブドメインが、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、および配列番号 10 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、項目 1 から 8 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

40

(項目 12)

前記二量体形成ドメインが、E V S A L E K (配列番号 2 2) および / または K V S A L K E (配列番号 2 3) からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、項目 1 から 11 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

(項目 13)

a) それぞれが A d 3 シャフトドメイン (配列番号 1) を含む 1 つまたはそれより多いシャフトドメインと、

b) A d 3 ノブドメイン (配列番号 6) を含むノブドメインと

を含む、項目 1 から 12 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペ

50

チド。

(項目 1 4)

結合開口薬 - 1 ( J O - 1 ) ( 配列番号 2 0 ) のアミノ酸配列を含む、項目 1 3 に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

(項目 1 5)

単一の A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドシャフトドメインを含有する、項目 1 から 1 4 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

(項目 1 6)

多量体形成している、項目 1 から 1 5 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

10

(項目 1 7)

二量体形成している、項目 1 から 1 5 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

(項目 1 8)

前記組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドに結合体化した、1 種またはそれより多い種の化合物をさらに含む、項目 1 から 1 7 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

(項目 1 9)

前記 1 種またはそれより多い種の化合物が、治療薬、診断薬、およびイメージング剤からなる群より選択される、項目 1 8 に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

20

(項目 2 0)

前記 1 種またはそれより多い種の化合物が、少なくとも 1 種の治療薬を含み、前記治療薬が、抗体、免疫複合体、ナノ粒子、化学療法薬、放射性粒子、ウイルス、ワクチン、細胞免疫療法薬、遺伝子療法構築物、核酸治療薬、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目 1 9 に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

(項目 2 1)

項目 1 から 1 9 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドをコードする単離された核酸。

(項目 2 2)

項目 2 1 に記載の単離された核酸を含む組換え発現ベクター。

30

(項目 2 3)

項目 2 2 に記載の組換え発現ベクターを含む宿主細胞。

(項目 2 4)

a ) A d B - 2 / 3 線維多量体、またはその機能的等価物と、  
b ) 薬学的に許容される担体と  
を含む医薬組成物。

(項目 2 5)

前記 A d B - 2 / 3 線維多量体が、項目 1 6 から 2 0 までのいずれか一項に記載の多量体形成している組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドを含む、項目 2 3 に記載の医薬組成物。

40

(項目 2 6)

上皮組織に関連する障害の治療的処置または診断を増強するため、および / または上皮組織をイメージングするための方法であって、それを必要とする被験体に、

a ) 前記障害を処置するために十分な量の 1 種またはそれより多い種の治療薬、前記障害を診断するために十分な量の診断薬、および / または前記上皮組織をイメージングするために十分な量のイメージング剤と、

b ) 前記 1 種またはそれより多い種の治療薬、診断薬、および / またはイメージング剤の有効性を増強するために十分な量の A d B - 2 / 3 線維多量体、またはその機能的等価物と

を投与することを含む、方法。

50



(項目 27)

前記上皮組織に関連する障害が、固形腫瘍、過敏性腸症候群、炎症性腸障害、クローン病、潰瘍性大腸炎、便秘、胃食道逆流性疾患、バレット食道、慢性閉塞性肺疾患、喘息、気管支炎、肺気腫、嚢胞性線維症、間質性肺疾患、肺炎、原発性肺高血圧症、肺塞栓症、肺サルコイドーシス、結核、膵炎、膵管障害、胆管閉塞症、胆嚢炎、総胆管結石症、脳障害、乾癬、皮膚炎、糸球体腎炎、肝炎、糖尿病、甲状腺障害、蜂巣炎、感染症、腎盂腎炎、および胆石からなる群より選択される、項目 26 に記載の方法。

(項目 28)

前記上皮組織に関連する障害が固形腫瘍である、項目 26 に記載の方法。

(項目 29)

前記固形腫瘍が、乳房の腫瘍、肺の腫瘍、結腸の腫瘍、直腸の腫瘍、胃の腫瘍、前立腺の腫瘍、卵巣の腫瘍、子宮の腫瘍、皮膚の腫瘍、内分泌の腫瘍、子宮頸部の腫瘍、腎臓の腫瘍、黒色腫、膵臓の腫瘍、肝臓の腫瘍、脳腫瘍、頭頸部の腫瘍、鼻咽頭の腫瘍、胃の腫瘍、扁平上皮癌、腺癌、膀胱の腫瘍、および食道の腫瘍からなる群より選択される、項目 28 に記載の方法。

(項目 30)

前記 A d B - 2 / 3 線維多量体が、A d 3 線維多量体、A d 7 線維多量体、A d 1 1 線維多量体、A d 1 4 線維多量体、A d 1 4 a 線維多量体、それらの組み合わせ、およびそれらの機能的等価物からなる群より選択される、項目 26 から 29 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 31)

前記 A d B - 2 / 3 線維多量体が、A d 3 線維多量体、またはその機能的等価物である、項目 26 から 30 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 32)

前記 A d B - 2 / 3 線維多量体が、A d B - 2 / 3 ビリオン、A d B - 2 / 3 カプシド、A d B - 2 / 3 の 1 2 面体粒子 (P t D d)、組換え A d B - 2 / 3 線維多量体、およびそれらの機能的等価物からなる群より選択される、項目 26 から 31 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 33)

前記 A d B - 2 / 3 線維多量体が A d 3 の P t D d を含む、項目 26 から 32 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 34)

前記 A d B - 2 / 3 線維多量体が、結合開口薬 1 (J O - 1) (配列番号 20) を含む、項目 26 から 32 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 35)

1 種またはそれより多い種の化合物が、少なくとも 1 種の治療薬を含み、前記治療薬が、抗体、免疫複合体、ウイルス、ナノ粒子、化学療法薬、放射性粒子、ワクチン、細胞免疫療法薬、遺伝子療法構築物、核酸治療薬、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目 26 から 34 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 36)

前記治療薬が、化学療法薬またはモノクローナル抗体を含む、項目 25 から 35 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 37)

前記治療薬が、抗腫瘍モノクローナル抗体を含む、項目 25 から 35 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 38)

前記抗腫瘍モノクローナル抗体が、トラスツズマブ、セツキシマブ、ペルツズマブ、アボマブ、コナツムマブ、レクサツムマブ、ベバシズマブ、ベバシズマブ、デノスマブ、ザノリムマブ、リンツズマブ、エドレコロマブ、リツキシマブ、チシリムマブ、トシツモマブ、アレムツズマブ、エブラツズマブ、ミツモマブ、ゲムツズマブ、オゾガマイシン、オ

10

20

30

40

50

レゴボマブ、ペムブモマブ、ダクリズマブ、パニツムマブ、カツマキシマブ、オフアツムマブ、およびイブリツモマブからなる群より選択される抗体を含む、項目 37 に記載の方法。

(項目 39)

前記上皮組織に関連する障害が、Her - 2 陽性腫瘍を含む、項目 25 から 38 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 40)

前記 Her - 2 陽性腫瘍が、乳房の腫瘍、胃の腫瘍、結腸の腫瘍、および卵巣の腫瘍からなる群より選択される、項目 39 に記載の方法。

(項目 41)

前記治療薬が、トラスツズマブを含む、項目 39 または 40 に記載の方法。

(項目 42)

前記治療薬が、化学療法薬、照射、またはそれらの組み合わせを含む、項目 39 から 41 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 43)

前記 Ad B - 2 / 3 線維多量体が、Ad 3 の Pt D d、JO - 1、またはその機能的等価物を含む、項目 39 から 42 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 44)

前記被験体が、トラスツズマブ療法に応答しなかった、項目 39 から 43 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 45)

前記上皮組織に関連する障害が、EGFR 陽性腫瘍を含む、項目 26 から 38 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 46)

前記 EGFR 陽性腫瘍が、肺の腫瘍、結腸の腫瘍、乳房の腫瘍、直腸の腫瘍、頭頸部の腫瘍、および脾臓の腫瘍からなる群より選択される、項目 45 に記載の方法。

(項目 47)

前記治療薬が、セツキシマブを含む、項目 45 または 46 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 48)

前記治療薬が、VEGF 阻害剤を含む、項目 28 から 34 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 49)

前記治療薬が、化学療法薬、照射、またはそれらの組み合わせを含む、項目 45 から 48 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 50)

前記 Ad B - 2 / 3 線維多量体が、Ad 3 の Pt D d、JO - 1、またはそれらの機能的等価物を含む、項目 45 から 49 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 51)

前記被験体が、セツキシマブ療法に応答しなかった、項目 45 から 50 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 52)

前記 Ad B - 2 / 3 線維多量体が二量体である、項目 26 から 51 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 53)

前記 Ad B - 2 / 3 線維多量体が、JO - 1、またはその機能的等価物を含む、項目 52 に記載の方法。

(項目 54)

上皮組織に関連する障害を処置するための方法であって、前記障害の処置を必要とする被験体に、前記障害を処置するために十分な量の Ad B - 2 / 3 線維多量体、またはその

10

20

30

40

50

機能的等価物を投与することを含む、方法。

(項目55)

前記障害が、A d B - 2 / 3 ウイルス感染症または固形腫瘍である、項目54に記載の方法。

(項目56)

前記障害が、固形腫瘍であり、前記固形腫瘍が、乳房の腫瘍、肺の腫瘍、結腸の腫瘍、直腸の腫瘍、胃の腫瘍、前立腺の腫瘍、卵巣の腫瘍、子宮の腫瘍、皮膚の腫瘍、内分泌の腫瘍、子宮頸部の腫瘍、腎臓の腫瘍、黒色腫、脾臓の腫瘍、肝臓の腫瘍、脳腫瘍、頭頸部の腫瘍、鼻咽頭の腫瘍、胃の腫瘍、扁平上皮癌、腺癌、膀胱の腫瘍、および食道の腫瘍からなる群より選択される、項目55に記載の方法。

10

(項目57)

前記A d B - 2 / 3 線維多量体が、A d 3 線維多量体、A d 7 線維多量体、A d 1 1 線維多量体、A d 1 4 線維多量体、A d 1 4 a 線維多量体、それらの組み合わせ、およびそれらの機能的等価物からなる群より選択される、項目54から56までのいずれか一項に記載の方法。

(項目58)

前記A d B - 2 / 3 線維多量体が、A d 3 線維多量体、およびそれらの機能的等価物である、項目54から57までのいずれか一項に記載の方法。

(項目59)

前記A d B - 2 / 3 線維多量体が、A d B - 2 / 3 ビリオン、A d B - 2 / 3 カプシド、A d B - 2 / 3 の12面体粒子(P t D d)、組換えA d B - 2 / 3 線維多量体、およびそれらの機能的等価物からなる群より選択される、項目54から58までのいずれか一項に記載の方法。

20

(項目60)

前記A d B - 2 / 3 線維多量体がA d 3 のP t D dを含む、項目54から59までのいずれか一項に記載の方法。

(項目61)

前記A d B - 2 / 3 線維多量体が、結合開口薬1(J O - 1)(配列番号20)を含む、項目54から59までのいずれか一項に記載の方法。

(項目62)

前記A d B - 2 / 3 線維多量体が二量体である、項目54から61までのいずれか一項に記載の方法。

30

(項目63)

前記A d B - 2 / 3 線維多量体が、J O - 1、またはその機能的等価物を含む、項目62に記載の方法。

(項目64)

上皮組織への化合物の送達を改善するための方法であって、前記上皮組織を、  
a) 前記上皮組織に送達すべき1種またはそれより多い種の化合物、および  
b) 前記上皮組織への前記1種またはそれより多い種の化合物の送達を増強するために十分な量のA d B - 2 / 3 線維多量体、またはその機能的等価物  
と接触させることを含む、方法。

40

(項目65)

前記1種またはそれより多い種の化合物が、診断薬またはイメージング剤を含む、項目64に記載の方法。

(項目66)

前記上皮組織が固形腫瘍を含む、項目65に記載の方法。

(項目67)

前記固形腫瘍が、乳房の腫瘍、肺の腫瘍、結腸の腫瘍、直腸の腫瘍、胃の腫瘍、前立腺の腫瘍、卵巣の腫瘍、子宮の腫瘍、皮膚の腫瘍、内分泌の腫瘍、子宮頸部の腫瘍、腎臓の腫瘍、黒色腫、脾臓の腫瘍、肝臓の腫瘍、脳腫瘍、頭頸部の腫瘍、鼻咽頭の腫瘍、胃の腫

50

瘍、扁平上皮癌、腺癌、膀胱の腫瘍、および食道の腫瘍からなる群より選択される、項目 66 に記載の方法。

(項目 68)

デスモグレイン 2 (DSG2) を発現している組織への物質の送達を改善するための方法であって、DSG2 を発現している前記組織を、

a) 前記組織に送達すべき 1 種またはそれより多い種の化合物、および

b) 前記組織への前記 1 種またはそれより多い種の化合物の送達を増強するために十分な量の AdB - 2 / 3 線維多量体、またはその機能的等価物と接触させることを含む、方法。

(項目 69)

組織における上皮間葉転換 (EMT) を誘導するための方法であって、上皮組織を、EMT を誘導するために十分な量の AdB - 2 / 3 線維多量体、またはその機能的等価物と接触させることを含む、方法。

(項目 70)

前記 AdB - 2 / 3 線維多量体が、Ad3 線維多量体、Ad7 線維多量体、Ad11 線維多量体、Ad14 線維多量体、Ad14a 線維多量体、それらの組み合わせ、およびそれらの機能的等価物からなる群より選択される、項目 64 から 69 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 71)

前記 AdB - 2 / 3 線維多量体が、Ad3 線維多量体、またはその機能的等価物である、項目 64 から 70 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 72)

前記 AdB - 2 / 3 線維多量体が、AdB - 2 / 3 ビリオン、AdB - 2 / 3 カプシド、AdB - 2 / 3 の 12 面体粒子 (PtDd)、組換え AdB - 2 / 3 線維多量体、およびそれらの機能的等価物からなる群より選択される、項目 64 から 71 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 73)

前記 AdB - 2 / 3 線維多量体が Ad3 の PtDd を含む、項目 64 から 72 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 74)

前記 AdB - 2 / 3 線維多量体が、結合開口薬 1 (JO - 1) (配列番号 20) を含む、項目 64 から 73 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 75)

前記 AdB - 2 / 3 線維多量体が二量体である、項目 64 から 74 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 76)

前記 AdB - 2 / 3 線維多量体が、JO - 1 (配列番号 20)、またはその機能的等価物を含む、項目 75 に記載の方法。

(項目 77)

上皮組織に関連する障害を処置すること、上皮組織への物質の送達を改善すること、DSG2 を発現している組織への物質の送達を改善すること、組織における EMT を誘導すること、および / または AdB - 2 / 3 感染症を処置することのうちの 1 つまたはそれより多いための候補化合物を同定するための方法であって、

a) AdB - 2 / 3 線維多量体、またはその機能的等価物を、1 種またはそれより多い種の試験化合物の存在下、DSG2 への多量体の結合を促進する条件下で DSG2 と接触させるステップと、

b) 対照と比較して、DSG2 との結合について AdB - 2 / 3 線維多量体と競合する陽性の試験化合物を同定するステップと

を含み、前記陽性の試験化合物が、上皮組織に関連する障害を処置すること、上皮組織への物質の送達を改善すること、DSG2 を発現している組織への物質の送達を改善するこ

10

20

30

40

50

と、組織における E M T を誘導すること、および / または A d B - 2 / 3 感染症を処置することのうちの 1 つまたはそれより多いための候補化合物である、方法。

( 項目 7 8 )

前記 A d B - 2 / 3 線維多量体が、A d 3 線維多量体、A d 7 線維多量体、A d 1 1 線維多量体、A d 1 4 線維多量体、A d 1 4 a 線維多量体、それらの組み合わせ、およびそれらの機能的等価物からなる群より選択される、項目 7 7 に記載の方法。

( 項目 7 9 )

前記 A d B - 2 / 3 線維多量体が、A d 3 線維多量体、またはその機能的等価物である、項目 7 7 または 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 8 0 )

前記 A d B - 2 / 3 線維多量体が、A d B - 2 / 3 ピリオン、A d B - 2 / 3 カプシド、A d B - 2 / 3 の 1 2 面体粒子 ( P t D d )、組換え A d B - 2 / 3 線維多量体、およびそれらの機能的等価物からなる群より選択される、項目 7 7 から 7 9 までのいずれか一項に記載の方法。

( 項目 8 1 )

前記 A d B - 2 / 3 線維多量体が、A d 3 の P t D d を含む、項目 7 7 から 8 0 までのいずれか一項に記載の方法。

( 項目 8 2 )

前記 A d B - 2 / 3 線維多量体が、結合開口薬 1 ( J O - 1 ) ( 配列番号 2 0 ) を含む、項目 7 7 から 8 0 までのいずれか一項に記載の方法。

( 項目 8 3 )

前記 A d B - 2 / 3 線維多量体が二量体である、項目 7 7 から 8 2 までのいずれか一項に記載の方法。

( 項目 8 4 )

前記 A d B - 2 / 3 線維多量体が、J O - 1、またはその機能的等価物を含む、項目 8 3 に記載の方法。

( 項目 8 5 )

前記 A d B - 2 / 3 線維多量体が J O - 1 二量体を含む、項目 2 4 または 2 5 に記載の医薬組成物。

( 項目 8 6 )

上皮組織に関連する障害を処置するために十分な量の 1 種またはそれより多い種の治療薬、上皮組織に関連する障害を診断するために十分な量の診断薬、および / または上皮組織をイメージングするために十分な量のイメージング剤をさらに含む、項目 2 4、2 5 または 8 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 5 】

【図 1】図 1 は、A d 受容体の同定および A d の付着についての競合試験のツールを示す図である。a ) A d ペントンの N 末端のアミノ酸アラインメントである。アミノ酸 3 7 / 3 8 におけるプロテアーゼ切断部位がオレンジ色で示されている。b ) この試験で使用したウイルス粒子および粒子成分の略図である。P t D d は、ペントンベースおよび三量体の線維を含有する 1 2 ユニットを保有する。B s D d は、ペントンベースのみを含有する。c ) <sup>3</sup> H で標識した A d 1 4 ウイルス、A d 1 4 a ウイルス、A d 1 1 ウイルスおよび A d 3 5 ウイルスの、A d 3 の B s D d、P t D d、または抗 C D 4 6 抗体 ( a C D 4 6 ) と一緒にプレインキュベートした後の H e L a 細胞への付着の競合。P B S で処置した細胞における付着を 1 0 0 % とした。n = 5。特に、P t D d が A d 3 5 を部分的に遮断するという所見は、H e L a 細胞において D S G 2 と C D 4 6 が物理的に近傍にあることに起因し得る。d ) A d 3 線維ノブと B s D d の両方と一緒にプレインキュベートした後の、c ) の場合と同様の A d 3 付着試験 ( B s D d + A d 3 K )。A d 3 K のモル濃度は競合のために使用した P t D d 内部の線維ノブのモル濃度と同等であった。e ) A d 3 - G F P ベクターの略図である。ベクターは、野生型 A d に基づき、ヌクレオチド 2 9 , 8

10

20

30

40

50

92～30, 947を欠失させてCMV-GFP-ポリA発現カセットに適応させたものである。下のパネルは、野生型Ad3およびAd3-GFPの、予測される断片を用いた制限酵素分析を示す。M: DNAサイズマーカー。fおよびg)組換えAd3線維ノブに対するポリクローナルウサギ抗体の検証である。f)ウエスタンブロットである。Adノブ(Ad3K、Ad5K、14K、14aK、Ad11K、Ad35K)またはPtDdを、PAG細胞において、試料を変性させて(B)、および試料を変性させずに(UB)分離した。フィルターを、抗Ad3K抗血清および抗ウサギ-HRP抗体と一緒にインキュベートした。g)Adの付着の阻害: <sup>3</sup>Hで標識したAd3ウイルス、Ad14ウイルスおよびAd5ウイルスを、PBS(白棒)またはウサギ抗Ad3K血清(灰色の棒)と一緒に、氷上で1時間インキュベートし、次いで、付着試験のためにHeLa細胞に加えた。

10

【図2】図2は、Ad3ピリオンおよびAd3のPtDdを使用した受容体Xの同定を示す図である。a)Ad3のBsDd、PtDd、またはAd線維ノブと一緒にプレインキュベートした後の、<sup>3</sup>Hで標識したAd3ウイルスおよびAd5ウイルスのHeLa細胞への付着の競合。PBSで処置した細胞における付着を100%とした。n=5。データは、平均+/-SEMとして示されている。Ad3-PtDd対Ad3ノブ、P=0.0033。b)Ad3-GFPおよびAd35-GFPのウイルス感染の競合。HeLa細胞を、漸増濃度のAd3線維ノブまたはPtDdを用いて前処置し、次いで、Ad3-GFPウイルス(左側のパネル)またはAd35-GFPウイルス(右側のパネル)に細胞当たり100pfuのMOIで曝露させた。18時間後にフローサイトメトリーによってGFPの発現を測定した。データは、平均として示されている。標準偏差は全てのデータポイントについて10%未満であった。c)<sup>3</sup>Hで標識したAd3ウイルスおよびAd35ウイルスの、ヒト細胞株および非ヒト細胞株への付着。Y79およびRamossは、それぞれヒト網膜芽細胞腫細胞およびリンパ腫細胞である。CHO細胞はチャニーズハムスター卵巣細胞である。MMC細胞およびTC1細胞は、それぞれマウスの乳がん細胞および肺がん細胞である。TC1-CD46細胞は、ヒトCD46を発現する。細胞当たりの付着したウイルス粒子の平均数が示されている。n=5。dおよびe)親和性捕捉およびMS/MSによる受容体Xの同定。HeLa細胞およびRamoss細胞から膜タンパク質画分を調製した。タンパク質ブロットを、Ad5/35++ピリオン(d)と、Ad3ピリオンまたはAd3のPtDd(e)とハイブリダイズさせた。結合を、Ad35++ノブ(d)またはAd3ノブ(e)に対するポリクローナル抗体を用いて可視化した(図1fおよび図1gも参照されたい)。可溶化されたHeLa細胞膜溶解物も、プロテインA/Gプラスアガロースと架橋結合したDSG2 mAb 6D8を用いて免疫沈降させた。免疫沈降物のウエスタンブロットを、DSG2モノクローナル抗体AH12.2(抗DSG2-IPを参照されたい)を用いて実施した。f)160kDaのバンドのMS/MS分析。上のパネル: DSG2の構造。EC: 細胞外ドメイン、EA: 膜近傍細胞外アンカードメイン、TM: 膜貫通ドメイン。下のパネル: DSG2のアミノ酸配列。160kDaのバンドのMS/MS分析によって捕捉されたペプチド配列が強調表示されている。DSG2の略図(一番上のパネル)中の三角形は、異なるドメインに関して同定されたペプチドの局在を示す。MS/MS分析により、高信頼因子(タンパク質の適用範囲20.8%および個々のペプチドについて2.6~5.5にわたるSequence相互相関係数スコア)で14ペプチドのDSG2が検出された。g~i)センサーチップ上に固定化した組換えヒトDSG2を用いたBiacore表面プラズモン共鳴試験。1ml当たりvp5.10<sup>9</sup>個のAd2、Ad3およびAd5(g)、異なる濃度のPtDd(h)またはPtDdおよびAd3線維ノブ(i)を、活性化した表面一面に注入し、示されている期間にわたって反応シグナルを収集した。

20

30

40

【図3】図3は、Ad受容体としてのDSG2の検証を示すグラフである。「機能の損失」試験。a)組換えDSG2による、<sup>3</sup>Hで標識したAdの結合の競合。<sup>3</sup>H-Ad3ウイルス、<sup>3</sup>H-Ad7ウイルス、<sup>3</sup>H-Ad14ウイルス、<sup>3</sup>H-Ad14aウイルス、<sup>3</sup>H-Ad11ウイルス、<sup>3</sup>H-Ad5ウイルスおよび<sup>3</sup>H-Ad35ウイルスを、6μ

50

g / m l の組換えヒト D S G 2 タンパク質と一緒にブレインキュベートした。P B S と一緒にインキュベートしたウイルス粒子の付着を 1 0 0 % とした。A d 1 1 の付着を分析するために、細胞を、5 0 μ g / m l の A d 3 5 K と一緒に氷上で 1 時間インキュベートした後に A d 1 1 ウイルスを加えて C D 4 6 を遮断した。b ) 組換え D S G 1 タンパク質、組換え D S G 2 タンパク質または組換え D S C 2 タンパク質による A d 形質導入の競合。c ) D S G 2 特異的抗体による <sup>3</sup> H - A d 結合の競合。n = 5。P B S 対 6 D 8 : P = 0 . 0 1 3 ; P B S 対 8 E 5 : P = 0 . 0 0 1 4。異なる D S G 2 ドメインに対する m A b の特異性は以下の通りである ( D S G 2 の略図については、図 1 f を参照されたい ) : 2 0 G 1 ( プロペプチド領域 )、7 H 9 ( P r o / E C 1 )、1 3 B 1 1 ( E C 1 / E C 2 )、1 0 D 2 ( E C 1 / E C 2 )、8 E 5 ( E C 3 )、6 D 8 ( E C 3 / E C 4 )。d ) および e ) s i R N A に媒介される D S G 2 の下方制御の、A d の付着 ( d ) および形質導入 ( e ) に対する効果。平均蛍光強度の値が示されている。n = 5。感染後 1 8 時間の時点では、A d 3 5 - G F P および A d 5 / 3 5 - G F P について G F P レベルは同程度であり、それにより、第一世代の A d 5 / 3 5 - G F P ベクターをさらなる試験において使用することができたことに注目されたい。f ) A d 3 - G F P を感染させた B T 4 7 4 細胞の、感染の 7 日後の細胞溶解。s i R N A をトランスフェクトした細胞に、同等の最初の形質導入速度が可能になるように調整した M O I、すなわち、D S G 2 s i R N A で処置した細胞および対照 s i R N A で処置した細胞に対して、それぞれ細胞当たり 1 . 0 p f u の M O I および細胞当たり 0 . 5 p f u の M O I で感染させた。7 日後に、生存細胞をクリスタルバイオレットで染色した。ウイルス用量が多いにもかかわらず、D S G 2 s i R N A をトランスフェクトした細胞で見られた死滅は少なく、これは、A d 3 の側方伝播における D S G 2 の重要性を示している。g ) A d 3 - G F P 感染細胞の、感染の 7 日後の細胞溶解。s i R N A をトランスフェクトした小気道上皮細胞を、調整した M O I で感染させた。7 日後に、細胞の生存率を W S T - 1 アッセイによって測定した。P B S で処置した細胞の生存率を 1 0 0 % とした。n = 3。A d 3 - G F P s i R N A / 対照 s i R N A 対 A d 3 - G F P D S G 2 s i R N A : P < 0 . 0 0 1。

【図 4】図 4 は、A d 受容体としての D S G 2 の検証を示すグラフである。「機能獲得」試験。a ) 異なる D S G 2 レベルを発現するヒト細胞株の形質導入。ヒト骨髄赤芽球細胞 ( e r y t h r o m y e l o b l a s t o i d ) 白血病 K 5 6 2 細胞およびパーキット B 細胞リンパ腫である B J A B 細胞および R a m o s 細胞を、A d 3 - G F P および A d 5 / 3 5 - G F P に M O I を上昇させて感染させ、1 8 時間後に G F P の発現を測定した。N = 3。標準偏差は全てのデータポイントについて 1 0 % 未満であった。b ) D S G 2 の異所発現。ヒト組織球性リンパ腫 U 9 3 7 細胞を、E F 1 プロモーターの制御下で、D S G 2 c D N A を保有するレンチウイルスベクターに感染させた。フローサイトメトリーにより、レンチウイルスで形質導入された細胞の > 9 8 % において安定な D S G 2 の発現が検出された。c ) <sup>3</sup> H - A d 3 および <sup>3</sup> H - A d 3 5 の、R a j i 細胞、U 9 3 7 細胞および D S G 2 を発現している U 9 3 7 ( U 9 3 7 - D S G 2 ) 細胞への付着。A d 3 5 の付着は C D 4 6 によって媒介され、可溶性の C D 4 6 によって遮断することができることに注目されたい ( データは示していない )。d ) U 9 3 7 細胞および U 9 3 7 - D S G 2 細胞に A d 3 - G F P および A d 5 / 3 5 - G F P を形質導入した後の G F P の発現。n = 3。

【図 5】図 5 は、ヒト上皮細胞における D S G 2 の局在および A d 3 との相互作用を示す画像である。a ) ヒト結腸、包皮および卵巣がんのパラフィン切片に対する、D S G 2 特異的抗体を用いた免疫組織学的試験。陽性染色は褐色で現れる。b ) 極性ヒト結腸がん T 8 4 細胞の、D S G 2 ( 緑色 ) および細胞間結合タンパク質クローディン 7 ( 赤色 ) についての共焦点顕微鏡免疫蛍光分析。核は青色である。X Y 平面および X Z 平面が示されている。c ) A d 3 と D S G 2 の結合。T 8 4 細胞を、C y 3 で標識した A d 3 粒子 ( 赤色 ) と一緒に 1 5 分間インキュベートし、洗浄し、共焦点顕微鏡にかけた。上の X Z 画像の方が拡大率が高い。少なくとも 2 つの ( 緑色の ) D S G 2 シグナルが 1 つの ( 赤色の ) C y 3 - A d 3 シグナルに付随していることに注目されたい。d ) 正常なヒト小気道上皮細胞

胞 (Transwell チャンバーにおいて成長させていない) の共焦点顕微鏡写真。細胞を、Cy 5 で標識した Pt D d と一緒に 15 分間インキュベートし、次いで、PBS で洗浄した。上の X Z パネルは、DSG 2 (赤色) と E - カドヘリン (緑色) の共局在を示す。下の X Z パネルは、紫色の Cy 5 - Pt D d シグナルと緑色の E - カドヘリンシグナルの共局在を示す同じ画像である。XY パネルは、紫色の (Pt D d) および緑色の E - カドヘリンチャンネルを示す。薄い矢印は、膜局在 Pt D d を示し、太い矢印は、細胞質内の DSG 2 を標識する。e) ヒト子宮頸癌 HeLa 細胞 (上の X Z パネルおよび XY パネル) および Cy 3 - Ad 3 と一緒に 15 分間インキュベートした HeLa 細胞 (下の X Z パネル) の共焦点顕微鏡免疫蛍光分析。全ての共焦点顕微鏡写真のスケールバーは 20  $\mu$  m である。

10

【図 6】図 6 は、上皮細胞において Ad 3 ビリオンおよび Pt D d によって誘導される上皮間葉転換シグナル伝達を示す図である。a ~ d) 乳がん上皮細胞において Pt D d によって誘発される表現型の変化。BT 474 細胞  $1 \times 10^5$  個を、50 ng の Pt D d または Bs D d と一緒に、示されている時間にわたってインキュベートし、抗体を用いて染色した。スケールバーは、全ての Z Y 共焦点画像 (a、b) で 20  $\mu$  m であり、標準の免疫蛍光試験 (c、d) では 40  $\mu$  m である。e) 上方制御された遺伝子および下方制御された遺伝子 (Pt D d で処置した細胞対 PBS で処置した細胞) のアレイデータの図表による実証。各ドットが 1 つの遺伝子を表す。f) BT 474 細胞を、示されている濃度の Pt D d 特異的抗体、Bs D d 特異的抗体、DSG 2 特異的抗体 (10 D 2、13 B 11、または 6 D 8)、または対照抗体 (抗 GAPDH) と一緒に 6 時間インキュベートした後

20

に分析した、ERK 1 / 2 - MAPK および PI 3 K のリン酸化のウエスタンブロット分析。経路を阻害するために、細胞を、Erk 1 / 2 阻害剤である UO 126 (5  $\mu$  M) または PI 3 K 阻害剤である Wortmannin (2.5  $\mu$  M) を用いて一晩処置した後に Pt D d を加えた。特異的な経路の阻害に対する薬物の有効性を以前の試験<sup>8</sup>において検証した。均等なローディングを実証するために GAPDH を使用する。

【図 7】図 7 は、上皮乳がん細胞 (epithelial breast cancer cell) における、Ad 3 ビリオンまたは Pt D d と DSG 2 の相互作用による細胞間結合の開口についての図である。a) BT 474 細胞の単層を通じた FITC - デキストラン拡散。孔サイズが 0.4  $\mu$  m の transwell チャンバー内で培養した BT 474 細胞を、0.5  $\mu$  g / ml の Bs D d、Pt D d または 1 ml 当たり  $2 \times 10^8$  個の Ad 粒子を用いて 2 時間にわたって処置し、次いで、4 kDa の FITC - デキストランを頂端区画に加えた。頂端チャンバーおよび基底チャンバーからの一定分量において傍細胞の流束を評価した。Bs D d 対 Pt D d :  $P < 0.001$ 。b) Pt D d による <sup>3</sup>H - Ad 35 の取り込みの容易化。左側のパネル : T 84 細胞の細胞間結合における CD 46 の閉じ込め。黄色シグナルをもたらす CD 46 および細胞間結合タンパク質クロードイン 7 の共局在。右側のパネル : <sup>3</sup>H - Ad 35 の付着。BT 474 細胞を、Pt D d または Bs D d、および <sup>3</sup>H - Ad 35 と一緒に氷上で 2 時間インキュベートし、洗浄し、次いで、37 °C で 60 分インキュベートした。内部移行しなかった Ad 粒子をトリプシン消化によって除去し、細胞に伴う放射活性を測定した。c) 皮下 ovc 316 腫瘍を担持するマウスに、50  $\mu$  g の Pt D d または Bs D d を静脈内注射した 8 時間後に、 $1 \times 10^9$  pfu の Ad 5 / 35 - bGal を静脈内注射した。注射した 72 時間後に切片を X - gal で染色した。スケールバーは 40  $\mu$  m である。d) Her 2 / neu 陽性ヒト乳がん細胞株 BT 474 における Her 2 / neu およびクロードイン 7 についての共焦点顕微鏡写真。これらの細胞は、単層を形成しない。PBS で処置した細胞では、大部分の Her 2 / neu シグナル (緑色) がクロードイン 7 (赤色) と共局在し、黄色シグナルをもたらすことに注目されたい。Pt D d で処置すると、クロードイン 7 シグナルは減少するが、一方、細胞表面上に現れる Her 2 / neu 染色は増える。e) PBS または Pt D d を用いて処置した 2 時間後の BT 474 細胞の共焦点顕微鏡写真。f) Ad 3 および Pt D d は、ハーセプチンによる Her 2 / neu 陽性乳がん細胞の死滅を増強する。PBS で処置した細胞の生存率を 100 % とした。n = 5、\*  $P < 0.05$ 。g) Ad 3 およ

30

40

50



び P t D d によるハーセプチン療法の増強は、D S G 2 によって媒介され、E R K / M A P K 経路および P I 3 K 経路を必要とする。図 2 d に記載の通り、B T 4 7 4 細胞に、対照 s i R N A および D S G 2 s i R N A をトランスフェクトし、48 時間後に、g) に記載の通り A d 3 または P t D d およびハーセプチンで処置した。阻害剤の試験のために、B T 4 7 4 細胞を、示されている作用剤と一緒に一晩インキュベートした。細胞を洗浄し、上記の通り P t D d / A d 3 およびハーセプチンで処置した。n = 5、P B S 対 W o r t m a n n i n、U O 1 2 6 : P < 0 . 0 5。h) i n v i v o におけるハーセプチン療法の P t D d に媒介される増強。B T 4 7 4 - M 1 細胞を注射した後の異なる日数における個々のマウスの腫瘍体積が示されている。

【図 8】図 8 は、m A b 療法に対する P t D d の効果についての図である。a) A d 3 および P t D d は、ハーセプチンによる H e r 2 / n e u - 陰性 M D A - M B - 2 3 1 乳がん細胞の死滅を増強しない。M D A - M B - 2 3 1 乳がん細胞を、0 . 5 m g / m l の B s D d もしくは P t D d、または u v により不活化した A d 5 または A d 3 のウイルス粒子 1 m l 当たり  $2 \times 10^8$  個と一緒に 12 時間インキュベートし、その後ハーセプチン (15 m g / m l) と一緒に 30 分インキュベートした。2 時間後に、R o c h e B i o s c i e n c e s の W S T - 1 アッセイによって細胞の生存率を測定した。P B S で処置した細胞の生存率を 100 % とした。b) A d 3 および P t D d により、アービタックス (抗 E G F R) による E G F R 陽性の結腸がん細胞の死滅が増強される。L o V o 細胞 (E G F R 陽性) を、0 . 5 m g / m l の P t D d と一緒に 12 時間インキュベートし、その後、アービタックス (15 m g / m l) と一緒に 30 分インキュベートした。2 時間後に、W S T - 1 アッセイによって細胞の生存率を測定した。P B S で処置した細胞の生存率を 100 % とした。\* P < 0 . 0 5。c) B T 4 7 4 細胞の接着結合に対する D S G 2 s i R N A の効果。P B S または D S G 2 s i R N A で処置した 2 日後における B T 4 7 4 細胞のクローディン 7 染色が示されている。スケールバーは 40 μm である。

【図 9】図 9 は、キメラ A d 5 / 3 ベクターの形質導入における D S G 2 の役割を示す図である。A) A d 5 / 3 ベクターの構造。ベクターは、A d 5 に基づき、E 1 領域および E 3 領域が欠失している。どちらのベクターも、E 3 領域に挿入された G F P 発現カセットを含有している。A d 5 / 3 L - G F P では、A d 5 線維ノブドメインが A d 3 由来の線維ノブドメインで置き換わっている。A d 5 / 3 S - G F P では、A d 5 シャフトドメインおよび A d 5 ノブドメインを、A d 3 由来の対応するドメインと置き換えた。A d 3 シャフトドメインは、6 個のシャフトモチーフを含有するが、A d 5 シャフトドメインは、22 個のシャフトモチーフを含有する。B) 組換え D S G 2 タンパク質による A d の付着の遮断。H<sup>3</sup> で標識した A d を、6 m g / m l の組換えヒト D S G 2 タンパク質と一緒に氷上で 1 時間インキュベートし、次いで、氷上で 1 時間にわたって H e L a 細胞に加えた。D S G 2 の代わりに P B S と一緒にインキュベートした細胞への A d の付着を 100 % とした。n = 3、すなわち、3 つの別々のウェル。A d 3 - G F P は、A d 5 / 3 ベクターと同じ G F P 発現カセットを含有する、A d 3 に由来するベクターである。C) 組換え D S G 2 タンパク質による A d の付着の遮断。A d ベクターを、漸増濃度の D S G 2 タンパク質と一緒に室温で 60 分インキュベートした。次いで、H e L a 細胞を、細胞当たり 100 p f u の M O I で 60 分にわたって感染させ、その後ウイルスを除去し、新しい培地を加えた。18 時間後にフローサイトメトリーによって G F P 蛍光を測定した。n = 3。平均値が示されている。標準偏差は全ての試料で 10 % 未満であった。D) A d 3 の P t D d による、A d 感染の競合。H e L a 細胞を、漸増濃度の P t D d と一緒に 60 分インキュベートし、次いで、A d ベクターに細胞当たり 100 p f u の M O I で 60 分にわたり感染させ、その後ウイルスを除去し、新しい培地を加えた。18 時間後に G F P 蛍光を測定した。N = 3。平均値が示されている。標準偏差は全ての試料で 10 % 未満であった。E) D S G 2 s i R N A は、A d 5 / 3 ベクターの感染を遮断する。H e L a 細胞  $1 \times 10^5$  個に合計 1 マイクログラムの s i R N A をトランスフェクトした。トランスフェクトした 48 時間後に、V e r s e n e によって細胞を収集し、細胞  $1 \times 10^5$  個を再度播いた。2 日目に、細胞を、A d ベクターに細胞当たり 100 p f u の M O I で感染

10

20

30

40

50

させた。18時間後にGFP蛍光を測定した。

【図10】図10は、Ad3線維ノブの架橋を必要とするAd3の感染の遮断を示す図である。A) N末端のHisタグ、6個のシャフトモチーフ(S6)、およびノブドメイン(Kn)を含有する組換えAd3線維ノブ(S6/Kn)の構造。追加的な線維ノブ変異体は、5個、4個、3個、2個、または1個のシャフトモチーフを含有し、それぞれS5/Kn、S4/Kn、S3/Kn、S2/Kn、およびS/Knと標識した。B) 組換えAd3線維ノブのウエスタンブロット分析。フィルターを、組換えDSG2と一緒にインキュベートし、その後、マウスモノクローナル抗DSG2抗体および抗マウスIgG-HRP結合体と一緒にインキュベートした。50~70kDaの範囲内の三量体型のAd3線維ノブが目に見える。(三量体)S6/Kn、S5/Kn、S4/Kn、S3/Kn、S2/Kn、およびS/Knの理論分子量は、93.9kDa、89.7kDa、84.3kDa、79.2kDa、74.4kDa、および69.3kDaである。S6/KnおよびS2/Knは、他のノブより多くの線維ノブの多量体(>75kDa)を形成し、E.coliにおいて封入体を生成する傾向があった。線維ノブが変性することにより、25~30kDaの単量体がもたらされられると思われる(示されていない)。C) Ad3線維ノブに対する抗体をプローブとして用いたウエスタンブロット。DおよびE) Ad3-GFPの形質導入の競合。HeLa細胞を、漸増濃度のPtDdおよび異なるAd3線維ノブと一緒に60分インキュベートし、次いで、Ad3-GFPに細胞当たり100pfuのMOIで60分にわたって感染させ、その後ウイルスを除去し、新しい培地を加えた。18時間後にGFP蛍光を測定した。n=3。GFP陽性細胞の百分率の平均値(D)および平均のGFP蛍光(E)が示されている。標準偏差は全ての試料で10%未満であった。明確にするために、S5/Knは示していない。F) Hisタグを付けた線維ノブ(S/Kn)と抗His抗体の架橋。抗His mAbをPBSまたはS/Knと一緒に15分インキュベートし、ネイティブなポリアクリルアミドゲルに流した。抗体の分子量は150kDaである。S/Knの存在下では、それよりも分子量が大きい追加的なバンドが現れ、これは、両方のタンパク質の複合体を反映している。ノブ単独は示されていない。G) Ad3線維ノブと抗His抗体の架橋の、Ad3-GFPの形質導入の阻害に対する効果。5mg/mlのAd3線維ノブを、20mg/mlのマウス抗His mAbと一緒に室温で60分インキュベートし、次いで、HeLa細胞1×10<sup>5</sup>個に加えた。60分インキュベートした後、細胞当たり100pfuのAd3GFPウイルスを加え、D)に記載の通りGFPを分析した。全てのAd3線維ノブについて「ノブ」と「ノブ+抗His」の間の差異は有意であった(P<0.005)。比較のために、この試験にAd35線維ノブ(非二量体形成性)も含めた。H) Ad35-GFPの形質導入に対する架橋したAd3線維ノブまたはAd35線維ノブの効果。Ad35-GFPは、CMV-GFP発現カセットを含有する、Ad35に由来するベクターである(33)。Ad3線維ノブおよびAd35線維ノブは、Hisタグ、1つのシャフトモチーフ、および対応するノブを含有するタンパク質である(31)(Ad3ノブは、S/Knと同じである)。G)に記載の通り実験を実施した。「ノブ」と「ノブ+抗His」の間の差異は有意でなかった。

【図11】図11は、E-コイル/K-コイルを介したAd3線維ノブの二量体形成についての図である。A) N末端のHisタグ、二量体形成ドメイン(E-コイルまたはK-コイル(37))、可動性のリンカー、2つの線維シャフトモチーフ(5番目および6番目)、およびAd3線維ノブドメインを含有する組換えAd3線維ノブタンパク質の模式的な構造。Ad3-S2/Knは、二量体形成ドメインを欠く線維である。B) Ad3-GFPの形質導入の競合。HeLa細胞を、漸増濃度のPtDdおよび異なるAd3線維ノブと一緒に60分インキュベートし、次いで、Ad3-GFPに細胞当たり100pfuのMOIで60分にわたって感染させ、その後ウイルスを除去し、新しい培地を加えた。18時間後にGFP蛍光を測定した。n=3。GFP陽性細胞の百分率の平均値が示されている。Ad3-K/S2/Kn+Ad3-E/S2/Knは、両方の線維ノブの1:1混合物である。PtDd対Ad3-E/S2/Kn:p=0.074; PtDd対Ad

10

20

30

40

50

3 - K / S 2 / K n + A d 3 - E / S 2 / K n : P = 0 . 0 3 ; A d 3 - K / S 2 / K n  
 対 A d 3 - K / S 2 / K n + A d 3 - E / S 2 / K n : P = 0 . 6 2 。 C ) A d 3 線維ノ  
 ブと抗 H i s 抗体の架橋。5 m g / m l の A d 3 線維ノブを、2 0 m g / m l のマウス抗  
 H i s m A b と一緒に室温で 6 0 分インキュベートし、次いで、H e L a 細胞  $1 \times 10^5$   
 個に加えた。6 0 分インキュベートした後、細胞当たり 1 0 0 p f u の A d 3 - G F P  
 ウイルスを添加し、B ) に記載の通り G F P を分析した。「ノブ」と「ノブ + 抗 H i s」  
 の間の差異は、A d 3 - E / S 2 / K n については有意である (  $P < 0 . 0 5$  ) が、他の  
 試料については有意でない。

【図 1 2】図 1 2 は、シャフトモチーフを 1 つのみ含有する二量体の線維ノブの分析につ  
 いて示す図である。A ) 組換え A d 3 線維ノブタンパク質である A d 3 - K / S / K n およ  
 び A d 3 - E / S / K n の模式的な構造。各線維ノブ三量体の理論分子量は約 6 0 k D  
 a である。B ) クーマシーブルー染色したゲル。試料を、トリス/グリシン/0.1% S  
 D S 緩衝液中 4 ~ 1 5 % 勾配のポリアクリルアミドゲルに流した。U B - 煮沸していない  
 試料、B - 煮沸した試料。L a e m m l i 緩衝液中で煮沸することにより、三量体タンパ  
 ク質の構造が攪乱され、約 2 5 k D a の線維ノブ単量体がもたらされることに注目されたい。  
 C ) 精製した A d 3 - K / S / K n および A d 3 - E / S / K n と混合した A d 3 -  
 K / S / K n の陰性染色電子顕微鏡写真。左上の画像は、両方の調製物中の線維ノブ二量  
 体を示す。線維ノブ自体は三量体であることに注目されたい。下の画像は、3 つ以上の線  
 維ノブを含有する凝集体を示す。右側のパネルは、写真の模式図を示す。D ) 組換え A d  
 3 線維ノブまたは P t D d による、 $^3\text{H}$  - A d 3 の付着の遮断。P B S と一緒にインキュ  
 ベートした細胞への A d の付着を 1 0 0 % とした。N = 3。E ) 組換え A d 3 線維ノブま  
 たは P t D d による、 $^3\text{H}$  - A d 5 の付着の遮断。P B S と一緒にインキュベートした細  
 胞への A d の付着を 1 0 0 % とした。N = 3。F および G ) A d 3 - G F P の形質導入の  
 競合。H e L a 細胞を、漸増濃度の線維ノブまたは P t D d と一緒に 6 0 分インキュベ  
 ートし、次いで、A d 3 - G F P を細胞当たり 1 0 0 p f u の M O I で 6 0 分にわたって感  
 染させ、その後ウイルスを除去し、新しい培地を加えた。1 8 時間後に G F P 蛍光を測定  
 した。n = 3。G F P 陽性細胞の百分率の平均値 ( F ) および平均の G F P 蛍光 ( G ) が  
 示されている。標準偏差は全ての試料で 1 0 % 未満であった。H および I ) F および G )  
 と同じ試験を、A d 3 - K / S / K n および 2 つのシャフトモチーフを有する線維ノブで  
 ある A d 3 - K / S 2 / K n を用いて実施した。

【図 1 3】図 1 3 は、A d 3 - K / S / K n + A d 3 - E / S / K n の S P R 分析および  
 A d 3 - K / S / K n と D S G 2 の相互作用について示す図である。A ) ビオチン化した  
 線維ノブを、ストレプトアビジンを連結したセンサーチップに固定化した。示されている  
 濃度 ( 3 m g / m l および 1 0 m g / m l ) で D S G 2 を注射した。示されている期間に  
 わたり、自動的にバックグラウンドを差し引きながら反応シグナルを収集した。B ) D S  
 G 2 をセンサーチップ上に固定化し、対照フローセルからバックラウンドを自動的に差し  
 引いた。A d 3 線維ノブ ( 非二量体形成性 )、A d 3 - K / S / K n および A d 3 - E /  
 S / K n + A d 3 - K / S / K n を 1 0 m g / m l で、および P t D d を 3 m g / m l で  
 注入して、全ての反応を約 1 0 0 R U に正規化する ( 1 2 面体は 1 2 個の線維を有するこ  
 と、および S P R シグナルはアナライトの分子量に左右されることを考慮に入れる ) 。C )  
 B ) に示されている S P R データの要約および注入を終えた 1 5 0 秒後に算出された残  
 りのシグナル。D ) 上皮の結腸がん T 8 4 細胞上の D S G 2 および A d 3 粒子の共焦点免  
 疫蛍光分析。側方からの細胞、すなわち、積み重なった X Z 共焦点像の層が示されている  
 。細胞を、C y - 3 で標識した A d 3 粒子に 1 5 分曝露させ、洗浄し、固定し、抗 D S G  
 2 抗体 ( 緑色 ) で染色した。A d 3 粒子は赤色で現れる。スケールバーは 2 0 m m である  
 。右側のパネルは、A d 3 粒子が群がる 2 つの D S G 2 ユニットを伴う共焦点像の模式図  
 を示す。E ) 細胞表面およびそれよりも 1 m m 深部の X Y 切片。この画像は、A d 3 が、  
 細胞表面上に露出している D S G 2 分子と結合することを示唆している。D S G 2 の大部  
 分が、より深部、すなわち、タイトジャンクションの遠位に局在することに注目されたい  
 。

10

20

30

40

50

【図14】図14は、上皮の結合の分析について示す図である。transwellチャンパー内で20日間培養した極性結腸癌T84細胞に対して試験を実施した。A)共焦点免疫蛍光顕微鏡。代表的な積み重なったXZ画像が示されている。上のパネル：DSG2(緑色)が、クローディン7(赤色)がマーカーとなる側底の結合の頂端部位に現れている。下のパネル：密着結合のマーカーであるZO-1(赤色)がDSG2(緑色)の頂端側に局在している。クローディン7染色によって外側の膜内に「筋をつける」DSG2の下部が隠れており、一方ZO-1染色によってDSG2シグナルの上部が覆われている。スケールバーは20mmである。B)DSG2(緑色)およびZO-1(赤色)について染色された、細胞表面および1mm深部由来のXY切片が示されている。C)細胞を、Ad3-K/S/Kn(5mg/ml)で処置し、12時間後にDSG2およびZO-1について分析した。D)T84細胞の結合領域の透過型電子顕微鏡。細胞を、PBS(左側のパネル)またはAd3-K/S/Kn(右側のパネル)のいずれかをを用いて氷上で1時間処置し、洗浄し、次いで、37℃で1時間インキュベートした。この時に、高電子密度の色素であるルテニウムレッド(1)を固定液と一緒に加えた。密着結合(デスモソームの上)が閉じている場合、この色素では、頂端膜のみが染色される(黒い線)。密着結合が開いている場合、この色素は細胞間に浸透し、側底膜が染色される。スケールバーは1mmである。拡大率は40,000xである。E)より高い拡大率(100,000x)により、Ad3-K/S/Knで処置した後のデスモソームの崩壊が示されている(矢印で示されている)。スケールバーは0.2mmである。

10

【図15】図15は、上皮の結合開口の機能分析について示す図である。A)T84細胞を、ポリエステル膜transwellインサート内で、経上皮の抵抗性が一定になるまで、つまり、細胞間密着結合が形成されるまで、21日間成長させた。Transwellチャンパー内で培養した極性T84細胞を通じた<sup>14</sup>C-PEG-4,000の拡散が示されている。細胞を、PBSまたは種々のDSG2リガンドと一緒に15分インキュベートし、その後、<sup>14</sup>C-PEG-4,000を内部チャンパーに加えた。他に記載の通り(1)、頂端チャンパーおよび基底チャンパーからの一定分量において傍細胞の流束を評価した。以下のDSG2の異なる細胞外ドメイン(ECD)に対するモノクローナル抗体を使用した：13B11-mAb(ECD1/2に対する)および6D8-mAb(ECD3/4に対する)。Ad3-K/S/Knは、二量体形成型である。Ad3-E/S/Knは二量体を形成することができない。B)Her2/neu陽性乳がんBT474-M1細胞のトラスツズマブによる死滅に対するDSG2リガンドの効果。細胞を、100%集密で2日間インキュベートした。リガンドを1時間にわたって内部チャンパーに加えた後、PBSまたはトラスツズマブを加えた。2時間後に細胞の生存率を測定した(材料および方法を参照されたい)。13B11-mAbおよび6D8-mAbに加えて、以下の抗DSG2抗体を使用した：7H9(プロペプチドドメインに対する)、10D2(ECD2に対する)、8E5(ECD3/4に対する)。希釈緩衝液で処置した細胞の生存率を100%とした。n=5、すなわち、5つの別々のウェル。\*：希釈緩衝液と比較してP<0.05。C)希釈緩衝液またはAd3-K/S/Knで処置したT84細胞におけるCARの共焦点顕微鏡写真(積み重なったXZ層)。T84細胞を、ポリエステル膜transwellインサート内で21日間成長させた。Ad3-K/S/Kn(40mg/ml)または希釈緩衝液を60分にわたり加え、その後、細胞を洗浄し、免疫蛍光分析にかけた。CARは緑色に染色される。核は青色である。スケールバーは20mmである。D)極性T84細胞におけるCARの共焦点顕微鏡写真。細胞表面および細胞表面の1mm下の層(右側のパネル)のXY画像を取得した。実験条件はC)の場合と同様であった。スケールバーは20mmである。E)T84細胞へのAdの形質導入。T84細胞を、ポリエステル膜transwellインサート内で21日間成長させた。Ad3-GFPおよびAd5-GFPを細胞当たり250pfuのMOIで、希釈緩衝液(上のパネル)またはAd3-K/S/Kn(40mg/ml)と一緒に内部チャンパーに加えた。3時間後にウイルスを除去し、細胞を洗浄した。20時間インキュベートした後にGFPの発現を分析した。代表的な画像が示されている。数量化するために、3回の独立した

20

30

40

50

実験の独立した10画像からのGFP陽性細胞を計数した。スケールバーは20mmである。F) Ad5-GFP感染細胞のフローサイトメトリー。T84細胞を、希釈緩衝液または40mg/mlのDSG2リガンドのいずれかの存在下で、E)に記載の通りAd5-GFPに感染させた。n=3。\*:希釈緩衝液と比較して $P<0.05$ 。

【図16】図16は、JO-1による、上皮の結合の一過性の開口を示す図である。A) Ad3ウイルス粒子の構造。左側のパネル：完全な、感染性のAd3粒子。カプシドタンパク質の線維およびペントンベースがそれぞれ緑色および青色で示されている。三量体の線維ノブが赤色で示されている。中央のパネル：12個の組換えペントン（線維+ペントンベース）の自然発生的な組立てによって形成されたAd3ペントン12面体（pentondodecahedra）（PtDd）。右側のパネル：二量体Ad3線維（JO-1）。B) N末端のHisタグ、二量体形成ドメイン[K-コイル（Zengら、2008年）]、可動性のリンカー、1つの線維シャフトモチーフ、およびホモ三量体のAd3線維ノブドメインを含有するJO-1の模式的な構造。JO-1をE-coliにおいて産生させ（約10mg/lの収量で）、Ni-カラムを用いて精製した。C) 左側のパネル：密着結合、デスモソーム、および接着結合を有する上皮の結合の簡易化した構造。DSG2はデスモソームタンパク質である。クローディン7は接着結合タンパク質である。右側のパネル：T84細胞の共焦点免疫蛍光顕微鏡写真。代表的な積み重なったXZ画像が示されている。細胞を、JO-1（5μg/ml）を用いて氷上で1時間処置した。JO-1を除去した後、細胞を37℃でインキュベートし、0分後、30分後および60分後に分析した。上のパネル：DSG2（緑色）は、クローディン7（赤色）がマーカーとなる側底の結合の頂端部位に現れる。中央のパネル：JO-1を加えた後30分以内に、クローディン7染色が増加し、外側の膜の上部に沿ってDSG2染色が目に見えるようになる（黄色シグナル）。下のパネル：60分まで、側方結合は、「0分」時点のものと類似している。スケールバーは40μmである。D) 極性結腸がんT84細胞の結合領域の透過型電子顕微鏡写真。細胞を、PBS（左側のパネル）またはJO-1（右側のパネル）のいずれかを用いて氷上で1時間処置し、洗浄し、次いで、37℃で1時間インキュベートした。この時に、高電子密度の色素であるルテニウムレッド（Amievら、2003年）を固定液と一緒に加えた。密着結合（デスモソームの上、矢印によって示されている）が閉じている場合、この色素では、頂端膜のみが染色される（黒い線）。密着結合が開いている場合、この色素は細胞間に浸透し、側底膜が染色される。スケールバーは1μmである。拡大率は40,000×である。E) JO-1または抗DSG2抗体（6D8、ECD3/4を対象とする）を加えた後の異なる時点における、T84細胞の単層を通じた<sup>14</sup>C-PEG-4,000の拡散。細胞をDSG2リガンドと一緒に氷上で1時間インキュベートし、洗浄した。次いで、<sup>14</sup>C-PEG-4,000を含有する新鮮な培地を内部チャンバーに加えた。他で記載されている通り（Amievら、2003年）、頂端チャンバーおよび基底チャンバーからの一定分量において傍細胞の流束を評価した。実験を3回繰り返した。

【図17】図17は、in vivoでの腫瘍におけるJO-1の作用機構の分析について示す図である。合計 $4 \times 10^6$ 個のヒト乳がんHCC1954細胞を、CB17-SCID/ベージュマウスの乳房の脂肪パッドに注射した。30日後、腫瘍の体積が約200mm<sup>3</sup>に達した時、JO-1（200μlのPBS中2mg/kg）を静脈内注射した。JO-1を注射した1時間後または12時間後に腫瘍を採取した。対照マウスには200μlのPBSを受けさせ、1時間後に腫瘍を収集した。A) 腫瘍におけるJO-1の蓄積の動力学。左側のパネル：抗Hisタグ抗体を用いた（JO-1を可視化するため）腫瘍切片の免疫蛍光分析。代表的な切片が示されている。スケールバーは20μmである。右側のパネル：Ad3-線維ノブ特異的抗体を用いた腫瘍組織のウェスタンブロット分析（Wangら、2011年b）。JO-1を示す特異的なバンドに矢印がつけられている。代表的な画像が示されている。実験を3回繰り返した。B) 腫瘍中のDSG2の分析。左側のパネル：DSG2抗体（DSG2の細胞外ドメイン3/4に対するmAbである6D8）を用いた腫瘍切片の免疫蛍光法分析。挿入写真はより高い拡大率を示す。右側のパネ

10

20

30

40

50

ル：同じ抗 D S G 2 抗体を腫瘍組織のウエスタンブロット分析に使用した。C) *in vivo*における細胞内シグナル伝達。左側のパネル：E - カドヘリンおよびリン酸化された E - カドヘリン、E r k 1 / 2、リン酸化された E r k 1 / 2、クローディン 7、およびビメンチンについての腫瘍組織のウエスタンブロット分析。ガンマ - チュープリンに対する抗体を使用して試料のローディングを評価した（「ローディング対照」）。右側のパネル：E - カドヘリンおよびリン酸化された E r k 1 / 2 に対する抗体を用いた免疫蛍光法分析。代表的な画像が示されている。実験を 3 回繰り返した。

【図 18 A】図 18 は、J O - 1 により、H C C 1 9 5 4 乳がん上皮内腫瘍 ( b r e a s t c a n c e r t u m o r s i n s i t u ) におけるトラスツズマブの浸透が改善されることを示す図である。腫瘍を担持するマウスに、P B S または J O - 1 ( 2 m g / k g ) を静脈内注射し、その 1 時間後にトラスツズマブを静脈内注射した。トラスツズマブを注射した 1 時間後または 1 2 時間後に腫瘍を採取した。A) 切片を、ヒト I g G ( すなわち、トラスツズマブ ) について染色した。陽性染色は緑色で現れる。代表的な切片が示されている。スケールバーは 2 0  $\mu$  m である。B) 腫瘍におけるヒト I g G ( トラスツズマブ ) についてのウエスタンブロット分析。I g の重鎖 ( H C ) および軽鎖 ( L C ) が矢印により示されている。膜にプロットされた総タンパク質についての P o n c e a u S 染色がローディング対照としての機能を果たす。代表的な画像が示されている。

【図 18 B】図 18 は、J O - 1 により、H C C 1 9 5 4 乳がん上皮内腫瘍 ( b r e a s t c a n c e r t u m o r s i n s i t u ) におけるトラスツズマブの浸透が改善されることを示す図である。腫瘍を担持するマウスに、P B S または J O - 1 ( 2 m g / k g ) を静脈内注射し、その 1 時間後にトラスツズマブを静脈内注射した。トラスツズマブを注射した 1 時間後または 1 2 時間後に腫瘍を採取した。A) 切片を、ヒト I g G ( すなわち、トラスツズマブ ) について染色した。陽性染色は緑色で現れる。代表的な切片が示されている。スケールバーは 2 0  $\mu$  m である。B) 腫瘍におけるヒト I g G ( トラスツズマブ ) についてのウエスタンブロット分析。I g の重鎖 ( H C ) および軽鎖 ( L C ) が矢印により示されている。膜にプロットされた総タンパク質についての P o n c e a u S 染色がローディング対照としての機能を果たす。代表的な画像が示されている。

【図 19】図 19 は、J O - 1 により、標的受容体が上皮の結合内に閉じ込められている細胞の m A b による死滅が増加することを示す図である。A) 極性 B T 4 7 4 細胞培養物に対する H e r 2 / n e u 染色 ( 緑色 ) および D S G 2 染色 ( 赤色 ) の共焦点顕微鏡写真 ( X Y 画像および X Z 画像 )。P B S で処置した細胞が左側のパネルに示されている。真ん中のパネルおよび右側のパネル：細胞を、J O - 1 ( 2 0  $\mu$  g / m l ) を用いて氷上で 1 時間処置した。J O - 1 を除去した後、細胞を 3 7  $^{\circ}$  C でインキュベートし、1 時間後および 1 6 時間後に分析した。X Y 画像は、細胞表面 ( 左側 ) および細胞表面の 2  $\mu$  m 下の切片を示す。スケールバーは 4 0  $\mu$  m である。B) 極性 A 5 4 9 肺がん細胞に対する E G F R ( 赤色 ) および密着結合タンパク質である E - カドヘリン ( 緑色 ) の共焦点顕微鏡写真。C) J O - 1 により、トラスツズマブによる H e r 2 / n e u 陽性乳がん細胞の死滅が増強される。B T 4 7 4 細胞を、J O - 1 ( 5  $\mu$  g / m l ) または P B S と一緒にインキュベートした。1 時間後にトラスツズマブ ( 1 5  $\mu$  g / m l ) を加えた。3 時間後に、以前に記載の通り ( W a n g ら、2 0 1 0 年 ) W S T - 1 アッセイによって細胞の生存率を測定した。P B S で処置した細胞の生存率を 1 0 0 % とした。n = 5、トラスツズマブ対 J O - 1 + トラスツズマブについて P < 0 . 0 5。代表的な画像が示されている。実験を 3 回繰り返した。D) J O - 1 により、E G F R 陽性 A 5 4 9 細胞のセツキシマブによる死滅が増強される。n = 5、セツキシマブ対 J O - 1 + セツキシマブに対して P < 0 . 0 5。

【図 20】図 20 は、J O - 1 により、H e r 2 / n e u 陽性乳がんモデルにおけるトラスツズマブ療法が改善されることを示す図である。A) 合計 4  $\times$  1 0 <sup>6</sup> 個の B T 4 7 4 - M 1 細胞、( B T 4 7 4 の腫瘍形成性サブクローン ) を、C B 1 7 - S C I D / ベージュ

10

20

30

40

50

マウスの乳房の脂肪パッドに注射した。29日後（腫瘍の体積が約 $100\text{ mm}^3$ に達した時）、マウスに $50\text{ }\mu\text{g}$ のJO-1（ $2\text{ mg/kg}$ ）またはPBSを静脈内注射し、その10時間後にトラスツズマブ（ $10\text{ mg/kg}$ ）\*またはPBSを腹腔内注射した。36日目に第2の治療サイクルを開始した（矢印によって示されている）。個々の動物において腫瘍の体積の増加が示されている（29日目に処置前のレベルと比較して）。 $n = 5$ 。40日目に於ける腫瘍体積はJO-1 + トラスツズマブで処置したマウスにおいて、トラスツズマブを単独で受けた動物における腫瘍体積よりも有意に低かった（ $P < 0.01$ ）。\* このトラスツズマブの用量およびその適用経路は、マウスにおいて常套的に用いられている（Beyerら、2011年）。B）同様の療法試験を、HCC1954 Her2/neu陽性乳がん由来腫瘍を用いて実施した。これらの腫瘍はトラスツズマブ処置に対する抵抗性が高い。合計 $4 \times 10^6$ 個のHCC1954細胞を、CB17-SCID/ベージュマウスの乳房の脂肪パッドに注射した。18日後（腫瘍の体積が約 $100\text{ mm}^3$ に達した時）、マウスに $50\text{ }\mu\text{g}$ のJO-1（ $2\text{ mg/kg}$ ）またはPBSを静脈内注射し、その10時間後にトラスツズマブまたはPBSを腹腔内注射した。 $n = 5$ 。トラスツズマブ対JO-1 + トラスツズマブ、 $P < 0.001$ 。C）JO-1注射とトラスツズマブ注射の間の種々の時間間隔の治療転帰に対する効果。HCC1954乳がん腫瘍を担持するマウスに、JO-1およびトラスツズマブの混合物、JO-1とその10時間後にトラスツズマブ、およびJO-1とその10時間後にトラスツズマブを注射した。注射を週1回繰り返した。 $n = 5$ 、トラスツズマブ対JO-1 + トラスツズマブ（10時間） $P < 0.001$ ；トラスツズマブ対JO-1 + トラスツズマブ（1時間） $P < 0.0058$ ；トラスツズマブ対JO-1 + トラスツズマブ（混合） $P < 0.0074$ 。JO-1 + トラスツズマブ（10時間）対JO-1 + トラスツズマブ（1時間） $P < 0.17$ 、有意でない（ $ns$ ）；JO-1 + トラスツズマブ（10時間）対JO-1 + トラスツズマブ（混合） $P < 0.47$ 、 $ns$ 。

【図21】図21は、JO-1により、Her2/neu陽性乳がんモデルにおけるトラスツズマブ療法が改善されることを示す図である。左側のパネル：Her2/neu陽性ヒト乳がん細胞（NCI-N87）の免疫蛍光顕微鏡写真。スケールバーは $20\text{ }\mu\text{m}$ である。右側のパネル：皮下のヒト乳がん（NCI-N87）異種移植腫瘍を担持するマウスのJO-1/トラスツズマブ処置。 $n = 5$ 、トラスツズマブ対JO-1 + トラスツズマブ（29日目および33日目）： $P < 0.05$ 。

【図22A】図22は、JO-1により、肺がん異種移植モデルにおけるセツキシマブ療法が改善されることを示す図である。A）免疫不全のCB17-SCID/ベージュマウスに、A549細胞 $1 \times 10^6$ 個を皮下注射した。11日目にJO-1を静脈内注射（ $2\text{ mg/kg}$ ）または腹腔内注射（ $4\text{ mg/kg}$ ）し、その10時間後にセツキシマブまたはPBSを腹腔内注射した。1つの群には、 $1\text{ mg/kg}$ のJO-1を静脈内注射し、 $1\text{ mg/kg}$ のJO-1を腫瘍内注射した。 $n = 5$ 、セツキシマブ対JO-1、 $i.v.$  +  $i.t.$  + セツキシマブ、 $P < 0.001$ ；セツキシマブ対JO-1、 $i.v.$  + セツキシマブ $P < 0.001$ ；セツキシマブ対JO-1、 $i.p.$  + セツキシマブ、 $P < 0.001$ 。JO-1注射の異なる経路間の差異は有意ではなかった。B）免疫不全のCB17-SCID/ベージュマウスに、A549細胞 $1 \times 10^6$ 個を皮下注射した。11日後（腫瘍の体積が約 $100\text{ mm}^3$ に達した時）、マウスに $2\text{ mg/kg}$ のPtDdを静脈内注射し、その10時間後にセツキシマブ（ $10\text{ mg/kg}$ ）またはPBSを腹腔内注射した。15日目に第2の治療サイクルを開始した（矢印によって示されている）。 $n = 5$ 。セツキシマブ対PtDd + セツキシマブ、 $P < 0.001$ 。C）転移性肺がんモデル。CB17-SCID/ベージュマウスに、A549細胞 $1 \times 10^6$ 個を静脈内注射した。10日後に、マウスに $2\text{ mg/kg}$ のJO-1またはPBSを静脈内注射し、その10時間後にセツキシマブ（ $10\text{ mg/kg}$ ）またはPBSを腹腔内注射した。この処置を38日まで3日ごとに繰り返した。 $n = 10$ 。左側のパネル：墨汁で染色した個々のマウス由来の肺。健康な組織は黒色で現れる。腫瘍組織は白色に染色される。右側のパネル：H&Eで染色した肺の代表的な切片。

10

20

30

40

50

【図22B】図22は、JO-1により、肺がん異種移植モデルにおけるセツキシマブ療法が改善されることを示す図である。A)免疫不全のCB17-SCID/ベージュマウスに、A549細胞 $1 \times 10^6$ 個を皮下注射した。11日目にJO-1を静脈内注射(2 mg/kg)または腹腔内注射(4 mg/kg)し、その10時間後にセツキシマブまたはPBSを腹腔内注射した。1つの群には、1 mg/kgのJO-1を静脈内注射し、1 mg/kgのJO-1を腫瘍内注射した。n = 5、セツキシマブ対JO-1、i.v. + i.t. + セツキシマブ、 $P < 0.001$ ; セツキシマブ対JO-1、i.v. + セツキシマブ  $P < 0.001$ ; セツキシマブ対JO-1、i.p. + セツキシマブ、 $P < 0.001$ 。JO-1注射の異なる経路間の差異は有意ではなかった。B)免疫不全のCB17-SCID/ベージュマウスに、A549細胞 $1 \times 10^6$ 個を皮下注射した。11日後(腫瘍の体積が約 $100 \text{ mm}^3$ に達した時)、マウスに2 mg/kgのPtDdを静脈内注射し、その10時間後にセツキシマブ(10 mg/kg)またはPBSを腹腔内注射した。15日目に第2の治療サイクルを開始した(矢印によって示されている)。n = 5。セツキシマブ対PtDd + セツキシマブ、 $P < 0.001$ 。C)転移性肺がんモデル。CB17-SCID/ベージュマウスに、A549細胞 $1 \times 10^6$ 個を静脈内注射した。10日後に、マウスに2 mg/kgのJO-1またはPBSを静脈内注射し、その10時間後にセツキシマブ(10 mg/kg)またはPBSを腹腔内注射した。この処置を38日まで3日ごとに繰り返した。n = 10。左側のパネル：墨汁で染色した個々のマウス由来の肺。健康な組織は黒色で現れる。腫瘍組織は白色に染色される。右側のパネル：H&Eで染色した肺の代表的な切片。

10

20

【図22C】図22は、JO-1により、肺がん異種移植モデルにおけるセツキシマブ療法が改善されることを示す図である。A)免疫不全のCB17-SCID/ベージュマウスに、A549細胞 $1 \times 10^6$ 個を皮下注射した。11日目にJO-1を静脈内注射(2 mg/kg)または腹腔内注射(4 mg/kg)し、その10時間後にセツキシマブまたはPBSを腹腔内注射した。1つの群には、1 mg/kgのJO-1を静脈内注射し、1 mg/kgのJO-1を腫瘍内注射した。n = 5、セツキシマブ対JO-1、i.v. + i.t. + セツキシマブ、 $P < 0.001$ ; セツキシマブ対JO-1、i.v. + セツキシマブ  $P < 0.001$ ; セツキシマブ対JO-1、i.p. + セツキシマブ、 $P < 0.001$ 。JO-1注射の異なる経路間の差異は有意ではなかった。B)免疫不全のCB17-SCID/ベージュマウスに、A549細胞 $1 \times 10^6$ 個を皮下注射した。11日後(腫瘍の体積が約 $100 \text{ mm}^3$ に達した時)、マウスに2 mg/kgのPtDdを静脈内注射し、その10時間後にセツキシマブ(10 mg/kg)またはPBSを腹腔内注射した。15日目に第2の治療サイクルを開始した(矢印によって示されている)。n = 5。セツキシマブ対PtDd + セツキシマブ、 $P < 0.001$ 。C)転移性肺がんモデル。CB17-SCID/ベージュマウスに、A549細胞 $1 \times 10^6$ 個を静脈内注射した。10日後に、マウスに2 mg/kgのJO-1またはPBSを静脈内注射し、その10時間後にセツキシマブ(10 mg/kg)またはPBSを腹腔内注射した。この処置を38日まで3日ごとに繰り返した。n = 10。左側のパネル：墨汁で染色した個々のマウス由来の肺。健康な組織は黒色で現れる。腫瘍組織は白色に染色される。右側のパネル：H&Eで染色した肺の代表的な切片。

30

40

【図23】図23は、HCC1854乳がんモデルにおけるJO-1とレラキシンの併用療法について示す図である。A)実験の模式図。偽形質導入したLin<sup>+</sup>造血幹細胞またはLV-EF1a/R1xを形質導入したLin<sup>+</sup>造血幹細胞のいずれかを受けさせたマウスに致死的に放射線を照射した。6週間後にHSCが生着した後、マウスの乳房の脂肪パッドにHCC1854細胞 $4 \times 10^6$ 個を注射した。7日後に、レラキシンの発現をドキシサイクリンによって活性化した。マウスを、PBS、PBS/トラスツズマブまたはJO-1/トラスツズマブで週1回処置し、腫瘍体積を測定した。B)個々のマウスの腫瘍体積。n = 5。トラスツズマブ対JO-1 + トラスツズマブ、 $P < 0.001$ ; R1x JO-1 + トラスツズマブ対R1xトラスツズマブ、 $P < 0.001$ ; R1x PBS対PBS、 $P < 0.001$ 。

50



【図 24】図 24 は、Ad 3、Ad 7、Ad 11、Ad 14、および Ad 14 a の線維ポリペプチドアラインメントおよびそれらのドメイン構造を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0026】

引用されている参考文献は全て、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。本出願の範囲内では、別段の指定のない限り、利用される技法は、いくつかの周知の参考文献、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrookら、1989年、Cold Spring Harbor Laboratory Press)、Gene Expression Technology (Methods in Enzymology、185巻、D. Goeddel 編、1991年、Academic Press、San Diego、CA)、「Guide to Protein Purification」、Methods in Enzymology (M. P. Deutscher 編、(1990年) Academic Press, Inc.); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innisら、1990年、Academic Press、San Diego、CA)、Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique、第2版 (R. I. Freshney、1987年、Liss, Inc. New York、NY)、Gene Transfer and Expression Protocols、109~128頁、E. J. Murray 編、The Humana Press Inc.、Clifton、N. J.)、および Ambion 1998年 Catalog (Ambion、Austin、TX) などのいずれかにおいて見ることができる。

【0027】

本明細書で使用される場合、単数形である「a (1つの)」、「an (1つの)」および「the (その)」は、文脈により明確に別段の規定がなされない限り、複数の指示対象を包含する。「および (and)」は、本明細書で使用される場合、明示的に別段の規定がない限り「または (or)」と互換的に使用される。

【0028】

本明細書で使用される場合、アミノ酸残基は以下の通り省略される：アラニン (Ala; A)、アスパラギン (Asn; N)、アスパラギン酸 (Asp; D)、アルギニン (Arg; R)、システイン (Cys; C)、グルタミン酸 (Glu; E)、グルタミン (Gln; Q)、グリシン (Gly; G)、ヒスチジン (His; H)、イソロイシン (Ile; I)、ロイシン (Leu; L)、リジン (Lys; K)、メチオニン (Met; M)、フェニルアラニン (Phe; F)、プロリン (Pro; P)、セリン (Ser; S)、トレオニン (Thr; T)、トリプトファン (Trp; W)、チロシン (Tyr; Y)、およびバリン (Val; V)。

【0029】

本明細書で使用される場合、「Ad」という略語は、アデノウイルスを指し、一般には、その後にアデノウイルスの血清型を示す数が続く。例えば、「Ad 3」とは、アデノウイルス血清型 3 を指す。

【0030】

本発明の任意の態様の実施形態は全て、文脈により明確に別段の規定がなされない限り組み合わせて用いることができる。

【0031】

第1の態様では、本発明は、上皮組織に関連する障害の治療的処置、診断、またはイメージングを増強するための方法であって、それを必要とする被験体に、(a) 障害を処置するために十分な量の1種またはそれより多い種の治療薬、障害を診断するために十分な量の診断薬、および/または上皮組織をイメージングするために十分な量のイメージング剤; および (b) 1種またはそれより多い種の治療薬、診断、および/またはイメージン

グ剤の有効性を増強するために十分な量の A d B - 2 / 3 線維多量体、またはその機能的等価物を投与することを含む方法を提供する。

【 0 0 3 2 】

本発明のこの態様の方法を用いて、治療薬、診断薬、および/またはイメージング剤の、それらの標的への接近および上皮組織への散在を改善することにより、上皮組織に関連する障害の治療的処置、診断、またはイメージングを増強することができる。いかなる機構にも縛られるものではないが、出願人らは、これは、相補的な機構を通じて生じると考える：したがって標的受容体が側底から頂端の細胞表面に移動することにより、受容体を標的とする治療薬、診断薬、および/またはイメージング剤、例えば、モノクローナル抗体などの標的となる上皮組織への接近が向上すること、および細胞間結合の破壊を通じて治療薬の浸透が向上することが可能になる。本明細書において詳細に開示されている通り、出願人らは、デスモグレイン ( d e s m o g e l i n ) - 2 ( D S G 2 ) が A d B - 2 / 3 に対する主要な高親和性受容体であることを発見した。D S G 2 は、カドヘリンタンパク質ファミリーに属するカルシウム結合性膜貫通糖タンパク質である。上皮細胞では、D S G 2 は細胞間接着構造の構成成分である。その細胞質尾部は、細胞接着および細胞間結合/細胞形態の調節因子と直接接触している一連のタンパク質と相互作用する。D S G 2 は、胃がん、扁平上皮癌、黒色腫、転移性前立腺がん、および膀胱がんを含めた一連の上皮の悪性疾患において過剰発現されることが示されている。

10

【 0 0 3 3 】

特定の作用機構に縛られるものではないが、出願人らは、A d B - 2 / 3 線維多量体が D S G 2 と結合することは、D S G 2 に媒介される一過性の細胞間結合の開口を誘発するために役立ち、D S G 2 に媒介される一過性の細胞間結合の開口は、そうでなければ少なくともいくらかの程度で細胞間結合内に閉じ込められている上皮細胞内の標的と結合する治療薬、診断薬、イメージング剤、または任意の他の対象の化合物の接近を改善するために役立つと考える。そのような活性の詳細な例は本明細書において提供される。

20

【 0 0 3 4 】

D S G 2 は上皮細胞において広範に発現されるので、本発明の方法は、対象の標的への接近が限定され得る細胞間結合を含む上皮組織に任意の治療薬、診断薬、イメージング剤、または他の化合物を送達するための広範な適用を有する。本明細書で使用される場合、「上皮組織に関連する障害」とは、上皮細胞/上皮組織に投与される/接近する治療薬、診断薬、またはイメージング剤により、治療の有効性、診断の有効性、および/またはイメージングの有効性のいずれの改善であろうと患者に臨床的利益がもたらされる任意の障害である。そのような障害としては、これらに限定されないが、固形腫瘍（すなわち：上皮細胞結合を有する任意の腫瘍）、胃腸障害（これらに限定されないが、過敏性腸症候群、炎症性腸障害、クローン病、潰瘍性大腸炎、便秘、胃食道逆流性疾患、バレット食道などを含む）、皮膚疾患（これらに限定されないが、乾癬および皮膚炎を含む）、肺障害（これらに限定されないが、慢性閉塞性肺疾患、喘息、気管支炎、肺気腫、嚢胞性線維症、間質性肺疾患、肺炎を含む）、膵管障害、脳障害（すなわち：血液脳関門を通る薬物の輸送を改善することが有効であり得る任意の脳障害）、原発性肺高血圧症、肺塞栓症、肺サルコイドーシス、結核など）、腎障害（これに限定されないが、糸球体腎炎を含む）、肝疾患（これに限定されないが、肝炎を含む）、内分泌障害（これらに限定されないが、糖尿病および甲状腺障害を含む）、膵管障害（これらに限定されないが、膵炎を含む）、および胆管障害（これらに限定されないが、胆管閉塞症、胆嚢炎、総胆管結石症、胆石などを含む）および上皮組織の感染症（これらに限定されないが、蜂巣炎、肺炎、肝炎、および腎盂腎炎を含む）が挙げられる。好ましい一実施形態では、上皮組織に関連する障害は、これらに限定されないが、乳房の腫瘍、肺の腫瘍、結腸の腫瘍、直腸の腫瘍、皮膚の腫瘍、内分泌の腫瘍、胃の腫瘍、前立腺の腫瘍、卵巣の腫瘍、子宮の腫瘍、子宮頸部の腫瘍、腎臓の腫瘍、黒色腫、脾臓の腫瘍、肝臓の腫瘍、脳腫瘍、頭頸部の腫瘍、鼻咽頭の腫瘍、胃の腫瘍、扁平上皮癌、腺癌、膀胱の腫瘍、および食道の腫瘍を含めた固形腫瘍を含む。当業者には理解される通り、そのような腫瘍は、原発腫瘍、局所浸潤性腫瘍、ならびに

30

40

50

転移した腫瘍を包含する。

#### 【 0 0 3 5 】

本明細書で使用される場合、「有効性の増強」とは、治療薬、診断薬、および/またはイメージング剤を単独で使用すると見られるものに対する治療の有効性、診断の有効性、および/またはイメージングの有効性の任意の増大を意味する。例えば、治療効果の測定は、処置されている障害に応じて変動するが、主治医によりすぐに同定される。例えば、そのような効力の増大としては、これらに限定されないが、治療薬を単独で用いた処置と比較して、

( a ) 障害の重症度が軽減すること；

( b ) 処置されている障害（複数可）に特徴的な症状の発生が限定または予防されること；

( c ) 処置されている障害（複数可）に特徴的な症状の悪化が阻害されること；

( d ) 以前障害（複数可）を有していた患者における障害（複数可）の再発（ r e c u r r e n c e ）が限定または予防されること；および

( e ) 以前、障害（複数可）の症候があった患者における症状の再発（ r e c u r r e n c e ）が限定または予防されることのうちの1つまたは複数が増大することが挙げられる。1つの非限定的な例では、固形腫瘍の治療により、腫瘍受容体が上皮細胞の基底外側から出て来ることを誘導して、接近の改善および腫瘍の死滅を可能にする能力がもたらされる。

#### 【 0 0 3 6 】

がんに関して、腫瘍の反応を定義するための標準および反応を測定する標準の方法がある。これらとしては、腫瘍サイズの変化をモニタリングによって決定する腫瘍の反応または疾患の血清マーカーが挙げられる。部分奏効とは、腫瘍が50%超縮小することであり、一方、完全奏効は、腫瘍が完全に消失することと定義される。腫瘍を測定するために用いられる方法は、医師には周知であり、それらとしては、理学的検査、放射線学的検査、例えば、CTスキャン、MRI、PETスキャン、X線など、ならびに血清マーカー、例えば、前立腺がんをモニターするために使用される前立腺特異的抗原などが挙げられる。癌治療の治療有効性の他の測定としては、無進行期間、無増悪生存および全生存の測定が挙げられる。

#### 【 0 0 3 7 】

診断有効性の改善としては、これらに限定されないが、診断検査の特異度および/または感度の増大を含めた、診断薬単独での投与と比較した有効性の任意の改善が挙げられる。イメージングの有効性の改善としては、これらに限定されないが、特異度、感度、再現性、コントラスト増強、疾患のより小さな部位の検出、腫瘍、膿瘍などの疾患のサイズおよび形状などの疾患のより正確な描写を含めた、イメージング剤単独での投与と比較した有効性の任意の改善が挙げられる。

#### 【 0 0 3 8 】

種々の実施形態では、有効性の増大は、患者集団全体にわたって治療薬、診断薬、および/またはイメージング剤を単独で用いた有効性と比較して、5%、10%、15%、20%、25%、50%、75%、100%、またはそれ以上の利益である。

#### 【 0 0 3 9 】

本発明の方法を用いて任意の適切な被験体、好ましくはヒト被験体を処置することができる。

#### 【 0 0 4 0 】

本明細書で使用される場合、「A d B - 2 / 3」とは、ウイルスが結合するための上皮細胞受容体としてD S G 2を使用する任意のアデノウイルス血清型である。現在まで、A d 3、A d 7、A d 1 1、A d 1 4、およびA d 1 4 aの血清型が同定されている。他のA d血清型が同定されるので、当業者は、本明細書に開示されているD S G 2結合アッセイに基づいて、A b D - 2 / 3ファミリーに属するものを容易に同定することができる。例えば、固定化した組換えD S G 2を含有するセンサーを使用した表面プラズモン共鳴（

10

20

30

40

50

S P R ) 試験を用いて、D S G 2 競合試験と組み合わせて、新規の A d 血清型が D S G 2 と結合するかどうかを決定することができる。機能の損失および獲得についての分析などの別の例示的な試験は、実施例 1 に詳しく記載されている。

#### 【 0 0 4 1 】

アデノウイルスビリオンは、カプシドの 1 2 個の頂点のそれぞれの基部に位置する線維を特徴とする 2 0 面体である。ビリオン上の線維は、3 つの個々の線維ポリペプチドからなるホモ三量体の構造である。アデノウイルス線維ポリペプチドのそれぞれは、N 末端尾部からなる非対称な構造であり、カプシドのペントンベースタンパク質と相互作用し、また、タンパク質を細胞核へ輸送するために必要なシグナル；いくつかの 1 5 残基の繰り返し単位を含有するシャフト；および受容体の結合に対する決定因子を含有する C 末端ノブドメインを含有する ( J . S . H o n g および J . A . E n g l e r , J o u r n a l o f V i r o l o g y 7 0 巻 : 7 0 7 1 ~ 7 0 7 8 頁 ( 1 9 9 6 年 ) ) 。全てのアデノウイルスは、それらの受容体に線維の末端上のノブ構造を通じて付着する。

10

#### 【 0 0 4 2 】

したがって、本明細書で使用される場合、A d B - 2 / 3 「線維ポリペプチド」という用語は、A d B - 2 / 3 によって発現される、N 末端尾部ドメイン、シャフトドメイン、および C 末端ノブドメインを含む全長の線維ポリペプチドを指す ( 例えば、配列番号 1 5 ~ 1 9 、配列番号 1 5 は A d 3 線維ポリペプチドであり、配列番号 1 6 は A d 7 線維ポリペプチドであり、配列番号 1 7 は A d 1 1 ポリペプチドであり、配列番号 1 8 は A d 1 4 線維ポリペプチドであり、配列番号 1 9 は A d 1 4 ( a ) 線維ポリペプチドである ) 。線維ポリペプチドは、自然にホモ三量体に組み立てられ、それは「線維」と称され、カプシドの 1 2 個の頂点のそれぞれの基部においてアデノウイルスビリオンの外側に位置する。

20

#### 【 0 0 4 3 】

本明細書で使用される場合、「A d B - 2 / 3 線維多量体」とは、A d B - 2 / 3 線維の多量体 ( 二量体、三量体など ) 、またはその機能的等価物を含む任意の構築物である。当業者には理解される通り、A d B - 2 / 3 線維は、ホモ三量体のノブを含む。A d B - 2 / 3 線維多量体は、ホモ三量体の A d B - 2 / 3 線維の多量体、例えば、二量体などである。下記の実施例において詳細に開示されている通り、A d B - 2 / 3 線維多量体は、そうでなければ細胞間結合内に閉じ込められている標的への治療薬の接近を改善するために役立つ、D S G 2 に媒介される一過性の細胞間結合の開口を誘発する D S G 2 との結合のために必要である。

30

#### 【 0 0 4 4 】

一実施形態では、A d B - 2 / 3 線維多量体は、A d 3 線維多量体、A d 7 線維多量体、A d 1 1 線維多量体、A d 1 4 線維多量体、A d 1 4 a 線維多量体、それらの組み合わせ、およびそれらの機能的等価物からなる群より選択される。好ましい実施形態では、A d B - 2 / 3 線維多量体は、A d 3 線維多量体である。

#### 【 0 0 4 5 】

1 種またはそれより多い種の A d B - 2 / 3 線維多量体 ( またはそれらのキメラ / 機能的等価物 ) を含む例示的な構築物としては、これらに限定されないが、A d B - 2 / 3 ビリオン ( 例えば、「死滅した」ビリオン、例えば、U V 処理されたビリオンなど ) 、A d B - 2 / 3 カプシド、A d B - 2 / 3 の 1 2 面体粒子 ( P t D d ) ( A d B - 2 / 3 の複製時にそれらにより産生されるウイルス成分の 1 2 面体粒子 ) 、組換え A d B - 2 / 3 線維多量体 ( これらに限定されないが、下記の実施形態のいずれか、または複数の実施形態の組み合わせにおいて開示されているものを含めた ) 、およびそれらの機能的等価物が挙げられる。好ましい実施形態では、1 種またはそれより多い種の A d B - 2 / 3 線維多量体は、A d 3 の P t D d などの A d B - 2 / 3 の P t D d を含む、またはそれからなる。別の好ましい実施形態では、1 種またはそれより多い種の A d B - 2 / 3 線維多量体は、下記の本発明の組成物の実施形態のいずれか、または複数の実施形態の組み合わせを含む、またはそれからなる。さらに好ましい実施形態では、A d B - 2 / 3 線維多量体は、本明細書において J O - 1 ( 結合開口薬 - 1 ) と称される、ポリペプチド ( 配列番号 2 0 )

40

50

、またはそれらの機能的等価物を含む、またはそれからなる。下記の実施例に示されている通り、J O - 1（実施例において自己二量体形成性 A d 3 線維誘導体と記載されている）は、単鎖の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドドメインの多量体であり、ポリペプチドは、ホモ三量体化することができるノブドメインを含む。したがって、J O - 1 は、本発明による A d B - 2 / 3 線維多量体である。

【 0 0 4 6 】

多量の A d B - 2 / 3 ビリオンおよびカプシドを調製するための方法は当技術分野で周知であり、同様に、P t D d を大規模生産するための方法も当技術分野で周知である。同様に、二量体形成ドメインを組換えポリペプチドに組み入れることによって A d B - 2 / 3 線維多量体（例えば、J O - 1 など）を組換え作製するための方法は、本明細書における教義に基づいて、十分に当業者のレベルの範囲内である。

10

【 0 0 4 7 】

したがって、本発明の方法は、D S G 2 と結合し、D S G 2 に媒介される一過性の細胞間結合の開口を誘発することができる任意の A d B - 2 / 3 線維多量体を用いて行うことができる。したがって、本明細書に開示されている A d B - 2 / 3 線維多量体に対する天然に存在しない修飾（異なる A d 血清型線維タンパク質およびそのドメインなどの欠失、付加、置換、キメラ）は、A d B - 2 / 3 線維多量体の「等価物」であり、D S G 2 と結合する働きをし、また、多量体形成し、D S G 2 に媒介される細胞間結合の開口を誘発することができる限りは本発明の範囲内である。D S G 2 との結合についての試験および D S G 2 に媒介される細胞間結合の開口についての評価に関する本明細書における教義に基づいて、そのような A d B - 2 / 3 線維多量体の機能的等価物を同定することは十分に当業者のレベルの範囲内である。1つの非限定的な例では、標識した化合物（例えば、F I T C - デキストランなど）の、候補 A d B - 2 / 3 線維多量体の存在下における集密的な分極上皮細胞を通る流束を評価するためのアッセイが、下記の実施例 1 および 2 において実証されている。別の非限定的な例では、候補 A d B - 2 / 3 線維多量体の存在下での、上皮細胞結合に起因して通常は利用できないタンパク質（例えば、C D 4 6、クローディン 7、および Z O - 1 など）への接近を評価するためのアッセイは、下記の実施例 1 および 2 において実証されている。別のそのようなアッセイも本明細書において開示されている。

20

【 0 0 4 8 】

A d B - 2 / 3 線維の多量体形成は、当業者に周知の方法に従って決定することができる。例えば、組換え A d B - 2 / 3 線維構築物の多量体形成は、ショ糖勾配での沈降、トリプシンによるタンパク質分解に対する抵抗性、およびポリアクリルアミドゲルにおける電気泳動移動度を含めた判断基準によって評価することができる（H o n g および E n g l e r、J o u r n a l o f V i r o l o g y 70 巻：7071～7078 頁（1996 年））。電気泳動移動度に関しては、線維多量体は、非常に安定な複合体であり、S D S - P A G E の前に試料を煮沸しない場合、多量体の分子量と一致する分子量で流れる。しかし、煮沸すると、多量体の構造は破壊され、その後、タンパク質は、タンパク質単量体と一致するサイズで流れる。上皮組織を標的とすることができる任意の治療薬、診断薬、イメージング剤、または他の化合物およびその上皮組織への送達は、本発明の方法において用いることができる一過性の細胞間結合の開口によって改善することができる。一実施形態では、治療薬は、抗体、免疫複合体、ナノ粒子、核酸治療薬、およびそれらの組み合わせ、化学療法薬、ワクチン、放射性粒子 / 放射線療法（「照射」）、養子 T 細胞療法および樹状細胞療法を含めた細胞免疫療法（例：投与された T 細胞の腫瘍内への浸透）、吸入治療薬、遺伝子療法構築物（これらに限定されないが、遺伝子療法ベクターとしての A d B - 2 / 3 ウイルス、および A d 5 に基づく遺伝子療法ベクターとの同時投与を含む）、他の核酸治療薬、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。

30

40

【 0 0 4 9 】

種々の実施形態では、治療薬は、アルキル化剤、血管新生阻害剤、抗体、代謝拮抗薬、抗有糸分裂薬、抗増殖薬、オーロラキナーゼ阻害剤、アポトーシスプロモーター（例えば

50

、Bcl-xL、Bcl-wおよびBfl-1)阻害剤、細胞死受容体経路の活性化因子、Bcr-Ablキナーゼ阻害剤、BiTE(Bi-Specific T cell Engager)抗体、生物学的応答修飾因子、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、細胞周期阻害剤、シクロオキシゲナーゼ-2阻害剤、増殖因子阻害剤、熱ショックタンパク質(HSP)-90阻害剤、脱メチル化剤、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤、ホルモン療法、免疫薬(immunological)、アポトーシスタンパク質の阻害剤(IAP)、インターカレーティング抗生物質、キナーゼ阻害剤、ラパマイシン阻害剤の哺乳動物標的、マイクロRNAのミトジェン活性化細胞外シグナル調節キナーゼ阻害剤、多価の結合性タンパク質、非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)、ポリADP(アデノシンニリン酸)-リボースポリメラーゼ(PARP)阻害剤、プラチナ化学療法薬、ポロ様キナーゼ(Plk)阻害剤、プロテアソーム阻害剤、プリン類似体、ピリミジン類似体、受容体チロシンキナーゼ阻害剤、レチノイド/デルトイド(deltoid)植物アルカロイド、低分子阻害性リボ核酸(siRNA)、トポイソメラーゼ阻害剤などからなる群より選択される。

#### 【0050】

これらの種々のクラスの中に入る例示的な治療薬としては、これらに限定されないが、ドセタキセル、ドキソルビシン、イリノテカン、パクリタキセル(Taxol(登録商標))、パクリタキセルアルブミン結合粒子(Abraxane(登録商標))、ドキソルビシンHCLリポソーム(Doxil(登録商標))、BiTE抗体、例えば、アデカツムマブ(adecatumumab)(Micromet MT201)、ブリナツモマブ(blinatumomab)(Micromet MT103)など、siRNAに基づく治療薬、アルトレタミン、AMD-473、AP-5280、アパジコン、ベンダムスチン、プロスタリシン、ブスルファン、カルボコン、カルムスチン(BCNU)、クロラムブシル、CLORETAZINE(登録商標)(ラロムスチン(laromustine)、VNP40101M)、シクロホスファミド、ダカルバジン、デシタビン、5'-アザシチジン、エストラムスチン、フォテムスチン、グルホスファミド、イホスファミド、KW-2170、ロムスチン(CCNU)、マホスファミド、メルファラン、ミトブロニトール、ミトラクトール、ニムスチン、ナイトロジェンマスタードN-オキシド、ラニムスチン、テモゾロミド、チオテパ、TREANDA(登録商標)(ベンダムスチン)、トレオスルファン、ロホスファミド(rofosfamide)などを含めたアルキル化剤；内皮特異的受容体チロシンキナーゼ(Tie-2)阻害剤、上皮増殖因子受容体(EGFR)阻害剤、インスリン増殖因子-2受容体(IGFR-2)阻害剤、マトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP-2)阻害剤、マトリックスメタロプロテイナーゼ-9(MMP-9)阻害剤、血小板由来増殖因子受容体(PDGFR)阻害剤、トロンボスポンジン類似体、血管内皮増殖因子受容体チロシンキナーゼ(VEGFR)阻害剤などを含めた血管新生阻害剤；ALIMTA(登録商標)(ペメトレキセド二ナトリウム、LY231514、MTA)、5'-アザシチジン、XELODA(登録商標)(カペシタビン)、カルモフル、LEUSTAT(登録商標)(クラドリビン)、クロファラビン、シタラビン、シタラビンオクホスファート、シトシンアラビノシド、デシタビン、デフェロキサミン、ドキシフルリジン、エフロルニチン、EICAR(5-エチニル-1-D-リボフラノシルイミダゾール-4-カルボキサミド)、エノシタビン、エチニルシチジン(ethnylcytidine)、フルダラビン、5-フルオロウラシル単独、または5-フルオロウラシルとロイコボリンの組み合わせ、GEMZAR(登録商標)(ゲムシタビン)、ヒドロキシウレア、ALKERAN(登録商標)(メルファラン)、メルカプトプリン、6-メルカプトプリンリボシド、メトトレキサート、メトトレキサート類似体(例えば、トリメトレキサート(trimetrexate)およびプララトレキサート(pralatrexate)など)、ミコフェノール酸、ネララビン、ノラトレキシド、オクホスファート、ペリトレキソール(pelitrexol)、ペントスタチン、ラルチトレキセド、リバピリン、トリアピン(triapine)、トリメトレキサート、S-1、チアゾプリン、テガフル、TS-1、ビダラビンなどを含めた代謝拮抗

10

20

30

40

50

薬；AT-101(( - )ゴシポール)、GENASENSE(登録商標)(G3139  
 またはオブリメルセン(Bcl-2-ターゲティングアンチセンスオリゴヌクレオチド)  
 )、IPI-194、IPI-565、N-(4-(4-(4'-クロロ(1,1'-  
 ビフェニル)-2-イル)メチル)ピペラジン-1-イル)ベンゾイル)-4-((1R)-3-(ジメチルアミノ)-1-(フェニルスルファニル)メチル)プロピル)  
 アミノ)-3-ニトロベンゼンスルホンアミド)(ABT-737)、N-(4-(4-(2-(4-クロロフェニル)-5,5-ジメチル-1-シクロヘキサ-1-エン-1-  
 イル)メチル)ピペラジン-1-イル)ベンゾイル)-4-((1R)-3-(モル  
 ホリン-4-イル)-1-(フェニルスルファニル)メチル-)プロピル)アミノ)-  
 3-(トリフルオロメチル)スルホニル)ベンゼンスルホンアミド(ABT-263)  
 10、GX-070(オバトクラックス)などを含めたBcl-2タンパク質阻害剤；DAS  
 ATINIB(登録商標)(BMS-354825)、GLEEVEC(登録商標)(イ  
 マチニブ)などを含めたBcr-Ablキナーゼ阻害剤；AZD-5438、BMI-1  
 040、BMS-032、BMS-387、CVT-2584、フラボピリドール(fl  
 avopyridol)、GPC-286199、MCS-5A、PD0332991、  
 PHA-690509、セリシクリブ(seliciclib)(CYC-202、R-  
 ロスコビチン)、ZK-304709などを含めたCDK阻害剤；ABX-EGF、抗E  
 GFR免疫リポソーム(immunoliposome)、EGF-ワクチン、EMD-  
 7200、ERBITUX(登録商標)(セツキシマブ)、HR3、IgA抗体、IRE  
 SSA(登録商標)(ゲフィチニブ)、TARCEVA(登録商標)(エルロチニブまた  
 20はOSI-774)、TP-38、EGFR融合タンパク質、TYKERB(登録商標)  
 (ラパチニブ)などを含めたEGFR阻害剤；CP-724-714、CI-1033(  
 カネルチニブ)、HERCEPTIN(登録商標)(トラスツズマブ)、TYKERB(  
 登録商標)(ラパチニブ)、OMNITARG(登録商標)(2C4、ペルツズマブ)、  
 TAK-165、GW-572016(イオナファルニブ(ionafarnib))、  
 GW-282974、EKB-569、PI-166、dHER2(HER2ワクチン)  
 、APC-8024(HER-2ワクチン)、抗HER/2neu二重特異性抗体、B7  
 .her2IgG3、AS HER2三機能性二重特異性抗体、mAb AR-209、  
 mAb 2B-1などを含めたErbb2受容体阻害剤；ロミデブシン、LAQ-824  
 30、MS-275、トラボキシニン、ヒドロキサミン酸サブエロイルアニリド(SAHA)、  
 TSA、バルプロ酸などを含めたヒストン脱アセチル化酵素阻害剤；17-AAG-na  
 b、17-AAG、CNF-101、CNF-1010、CNF-2024、17-DM  
 AG、ゲルダナマイシン、IPI-504、KOS-953、MYCOGRAB(登録商  
 標)(HSP-90に対するヒト組換え抗体)、NCS-683664、PU24FC1  
 、PU-3、ラディシコール、SNX-2112、STA-9090 VER49009  
 などを含めたHSP-90阻害剤；TRAIL、TRAIL受容体または細胞死受容体(  
 例えば、DR4およびDR5)を標的とする抗体または他の作用剤、例えば、アポマブ(  
 apomab)、コナツムマブ(conatumumab)、ETR2-ST01、GD  
 C0145、(レクサツムマブ)、HGS-1029、LBY-135、PRO-176  
 2およびトラスツズマブなどを含めた細胞死受容体経路の活性化因子；シスプラチン、E  
 40LOXATIN(登録商標)(オキサリプラチン)エプタプラチン(eptaplatin)、  
 ロバプラチン、ネダプラチン、PARAPLATIN(登録商標)(カルボプラチ  
 ン)、サトラプラチン、ピコプラチン(picoplatin)などを含めたプラチナ化  
 学療法薬；AVASTIN(登録商標)(ベバシズマブ)、ABT-869、AEE-7  
 88、アキシチニブ(AG-13736)、AZD-2171、CP-547、632、  
 IM-862、MACUGEN(ペガプタニブ(pegaptamib)、NEXAVAR  
 (登録商標)(ソラフェニブ、BAY43-9006)、パゾパニブ(GW-7860  
 34)、バタラニブ(PTK-787、ZK-222584)、SUTENT(登録商標)  
 (スニチニブ、SU-11248)、VEGFトラップ、ZACTIMATHi(バン  
 デタニブ、ZD-6474)などを含めたVEGFR阻害剤；樹状細胞療法(シプロイセ

10

20

30

40

50

ル T、P r o v e n g e（登録商標））；アクラルピシン、9 - アミノカンプトテシン、  
 アモナファイド、アムサクリン、ベカテカリン（b e c a t e c a r i n）、ペロテカン  
 、B N - 8 0 9 1 5、C A M P T O S A R（登録商標）（塩酸イリノテカン）、カンプト  
 テシン、デクスラゾキサソ（d e x r a z o x i n e）、ジフロモテカン（d i f l o m  
 o t e c a n）、エドテカリン、E L L E N C E（登録商標）またはP H A R M O R U B  
 I C I N（登録商標）（エピルピシン）、エトボシド、エクサテカン（e x a t e c a n  
 ）、アブラキサソ、イリノテカン（i r e n o t e c a n）、10 - ヒドロキシカンプト  
 テシン、ジャイマテカン、ラルトテカン、ミトキサントロン、オラテシン（o r a t h e  
 c i n）、ピラルピシン（p i r a r b u c i n）、ピキサントロン、ルピテカン（r u  
 b i t e c a n）、ソブゾキサソ、S N - 3 8、タフルボシド（t a f l u p o s i d e 10  
 ）、トボテカンなどを含めたトポイソメラーゼ阻害剤；A V A S T I N（登録商標）（ベ  
 バシズマブ）、C D 4 0 特異的抗体、c h T N T - 1 / B、デノスマブ、E R B I T U X  
 （登録商標）（セツキシマブ）、H U M A X - C D 4（登録商標）（ザノリムマブ（z a  
 n o l i m u m a b））、I G F I R 特異的抗体、リンツズマブ（l i n t u z u m  
 a b）、P A N O R E X（登録商標）（エドレコロマブ）、R E N C A R E X（登録商標  
 ）（W X G 2 5 0）、R I T U X A N（登録商標）（リツキシマブ）、チシリムマブ、  
 トラスツズマブ（t r a s t u z i m a b）などを含めた抗体；A R I M I D E X（登録  
 商標）（アナストロゾール）、A R O M A S I N（登録商標）（エキセメスタン）、アル  
 ゴキシフェン、C A S O D E X（登録商標）（ピカルタミド）、C E T R O T I D E（登  
 録商標）（セトロレリクス）、デガレリクス、デスロレリン、D E S O P A N（登録商標 20  
 ）（トリロスタン）、デキサメタゾン、D R O G E N I L（登録商標）（フルタミド）、  
 E V I S T A（登録商標）（ラロキシフェン）、A F E M A（登録商標）（ファドロゾー  
 ル）、F A R E S T O N（登録商標）（トレミフェン）、F A S L O D E X（登録商標）  
 （フルベストラント）、F E M A R A（登録商標）（レトロゾール）、ホルメスタン、グ  
 ルココルチコイド、H E C T O R O L（登録商標）（ドキセルカルシフェロール）、R E  
 N A G E L（登録商標）（セベラマー炭酸塩）、ラソフォキシフェン、酢酸リユープロリ  
 ド、M E G A C E（登録商標）（メゲストロール（m e g e s t e r o l）、M I F E P  
 R E X（登録商標）（ミフェプリストン）、N I L A N D R O N（登録商標）（ニルタミ  
 ド）、N O L V A D E X（登録商標）（クエン酸タモキシフェン）、P L E N A X I S（  
 登録商標）（アバレリクス）、プレドニゾン、P R O P E C I A（登録商標）（フィナス 30  
 テリド）、トリロスタン（r i l o s t a n e）、S U P R E F A C T（登録商標）（ブ  
 セレリン）、T R E L S T A R（登録商標）（黄体形成ホルモン放出ホルモン（L H R H  
 ））、V A N T A S（登録商標）（ヒストレリンインプラント（H i s t r e l i n i  
 m p l a n t））、V E T O R Y L（登録商標）（トリロスタンまたはモドラスタン（m  
 o d r a s t a n e））、Z O L A D E X（登録商標）（フォスレリン（f o s r e l i  
 n）、ゴセレリン）などを含めたホルモン療法薬；インターフェロンアルファ、インター  
 フェロンアルファ - 2 a、インターフェロンアルファ - 2 b、インターフェロンベータ、  
 インターフェロンガンマ - 1 a、A C T I M M U N E（登録商標）（インターフェロンガン  
 マ - 1 b）またはインターフェロンガンマ - n 1 を含めた免疫薬、それらの組み合わせ  
 などが挙げられる。他の作用剤としては、A L F A F E R O N E（登録商標）（I F N - 40  
 アルファ）、B A M - 0 0 2（酸化型グルタチオン）、B E R O M U N（登録商標）（タ  
 ソネルミン）、B E X X A R（登録商標）（トシツモマブ）、C A M P A T H（登録商標  
 ）（アレムツズマブ）、C T L A 4（細胞傷害性リンパ球抗原 4）、デカルバジン、デニ  
 ロ

イキン（d e n i l e u k i n）、エブラツズマブ、G R A N O C Y T E（登録商標）（  
 レノグラスチム）、レンチナン、白血球アルファインターフェロン、イミキモド、M D X  
 - 0 1 0（抗 C T L A - 4）、黒色腫ワクチン、ミツモマブ（m i t u m o m a b）、モ  
 ルグラモスチム、M Y L O T A R G（商標）（ゲムツズマブ、オゾガマイシン）、N E U 50



P O G E N (登録商標) (フィルグラスチム)、O n c o V A C - C L、O V A R E X (登録商標) (オレゴボマブ)、ペムブモマブ (p e m t u m o m a b) (Y - m u H M F G 1)、P R O V E N G E (登録商標) (シプロイセルT)、サルグラモスチム (s a r g a r a m o s t i m)、シゾフィラン、テセロイキン、T H E R A C Y S (登録商標) (カルメット - グラン桿菌)、ウベニメクス、V I R U L I Z I N (登録商標) (免疫療  
 法薬、L o r u s P h a r m a c e u t i c a l s)、Z - 1 0 0 (丸山ワクチン (S  
 S M))、W F - 1 0 (テトラクロロデカオキシド (T e t r a c h l o r o d e c a o  
 x i d e) (T C D O))、P R O L E U K I N (登録商標) (アルデスロイキン)、Z  
 A D A X I N (登録商標) (チマルファシン)、Z E N A P A X (登録商標) (ダクリズ  
 マブ)、Z E V A L I N (登録商標) (9 0 Y - イブリツモマブチウキセタン) など; オ  
 ファツムマブ (o f a t u m u m a b); クレスチン、レンチナン、シゾフィラン (s i  
 z o f u r a n)、ピシバニール P F - 3 5 1 2 6 7 6 (C p G - 8 9 5 4)、ウベニメ  
 クスなどを含めた生物学的反応修飾剤; シタラビン (a r a C またはアラビノシド C)  
 、シトシンアラビノシド、ドキシフルリジン、F L U D A R A (登録商標) (フルダラビ  
 ン)、5 - F U (5 - フルオロウラシル)、フロクスウリジン、G E M Z A R (登録商標)  
 (ゲムシタピン)、T O M U D E X (登録商標) (ラルチトレキセド (r a t i t r e  
 x e d))、T R O X A T Y L (登録商標) (トリアセチルウリジントロキサシタピン)  
 などを含めたピリミジン類似体; L A N V I S (登録商標) (チオグアニン) および P U  
 R I - N E T H O L (登録商標) (メルカプトプリン) を含めたプリン類似体; パタブリ  
 ン (b a t a b u l i n)、エポチロン D (K O S - 8 6 2)、N - (2 - ((4 - ヒド  
 ロキシフェニル) アミノ) ピリジン - 3 - イル) - 4 - メトキシベンゼンスルホンアミド  
 、イキサベピロン (B M S 2 4 7 5 5 0)、パクリタキセル、T A X O T E R E (登録商  
 標) (ドセタキセル)、P N U 1 0 0 9 4 0 (1 0 9 8 8 1)、パツピロン (p a t u p  
 i l o n e)、X R P - 9 8 8 1 (ラロタキセル)、ピンフルニン、Z K - E P O (合成  
 エポチロン) などを含めた抗有糸分裂薬; および他の化学療法剤、例えば、A B R A X A  
 N E (登録商標) (A B I - 0 0 7)、A B T - 1 0 0 (ファルネシルトランスフェラー  
 ゼ阻害剤)、A D V E X I N (登録商標) (A d 5 C M V - p 5 3 ワクチン)、A L T O  
 C O R (登録商標) または M E V A C O R (登録商標) (ロバスタチン)、A M P L I G  
 E (登録商標) (ポリ I : ポリ C 1 2 U、合成 RNA)、A P T O S Y N (登録商標) (エ  
 クシスリンド)、A R E D I A (登録商標) (パミドロン酸)、アルグラビン、L - ア  
 スパラギナーゼ、アタメスタン (1 - メチル - 3, 1 7 - ジオン - アンドロスタ - 1, 4  
 - ジエン)、A V A G E (登録商標) (タザロテン)、A V E - 8 0 6 2 (コンブレタス  
 タチン (c o m b r e a s t a t i n) 誘導体) B E C 2 (ミツモマブ (m i t u m o m  
 a b))、カケクチンまたはカケキシン (c a c h e x i n) (腫瘍壊死因子)、カンバ  
 キシン (c a n v a x i n) (ワクチン)、C E A V A C (登録商標) (がんワクチン)  
 、C E L E U K (登録商標) (セルモロイキン)、C E P L E N E (登録商標) (ヒスタ  
 ミン二塩酸塩)、C E R V A R I X (登録商標) (ヒトパピローマウイルスワクチン)、  
 C H O P (登録商標) (C : C Y T O X A N (登録商標) (シクロホスファミド); H :  
 A D R I A M Y C I N (登録商標) (ヒドロキシドキシソルピシン); O : ピンクリスチン  
 (O N C O V I N (登録商標)); P : プレドニゾン)、C Y P A T (登録商標) (酢酸  
 シプロテロン)、コンブレタスタチン (c o m b r e s t a t i n) A 4 P、D A B (3  
 8 9) E G F (H i s - A l a リンカーを介してヒト上皮増殖因子と融合したジフテリア  
 毒素の触媒ドメインおよび転座ドメイン (t r a n s l o c a t i o n d o m a i n)  
 ) または T r a n s M I D - 1 0 7 R (登録商標) (ジフテリア毒素)、ダカルバジン、  
 ダクチノマイシン、5, 6 - ジメチルキサンテノン - 4 - 酢酸 (D M X A A)、エニルウ  
 ラシル、E V I Z O N (商標) (乳酸スクアラミン)、D I M E R I C I N E (登録商標)  
 (T 4 N 5 リポソームローション剤)、ディスコデルモリド、D X - 8 9 5 1 f (メシ  
 ル酸エキサテカン)、エンザスタウリン、E P O 9 0 6 (エポチロン (e p i t h i l o  
 n e) B)、G A R D A S I L (登録商標) (四価のヒトパピローマウイルス (型 6、1  
 1、1 6、1 8) 組換えワクチン)、G A S T R I M M U N E (登録商標)、G E N A S

10

20

30

40

50

ENSE (登録商標)、GMK (ガングリオシド結合体化ワクチン)、GVAX (登録商標) (前立腺がんワクチン)、ハロフジノン、ヒストレリン (histrelin)、ヒドロキシカルバミド、イバンドロン酸 (ibandronic acid)、IGN-101、IL-13-PE38、IL-13-PE38QQR (シントレデキン・ベストトクス (cintredekin besudotox))、IL-13-シュードモナス外毒素、インターフェロン-アルファ、インターフェロン-ガンマ、JUNOVAN (登録商標) または MEPACT (登録商標) (ミファミルチド)、ロナファルニブ、5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸、ミルテホシン (ヘキサデシルホスホコリン)、NEOVASTAT (登録商標) (AE-941)、NEUTREXIN (登録商標) (グルクロン酸トリメトレキサート)、NIPENT (登録商標) (ペントスタチン)、ONCONASE (登録商標) (リボヌクレアーゼ酵素)、ONCOPHAGE (登録商標) (黒色腫ワクチン治療薬)、ONCOVAX (登録商標) (IL-2 ワクチン)、ORATHECIN (登録商標) (ルビテカン (rubitecan)、OSIDEM (登録商標) (抗体ベースの細胞薬 (cell drug))、OVAREX (登録商標) MAb (マウスモノクローナル抗体)、パクリタキセル、PANDIMEX (登録商標) (20 (S) プロトパナキサジオール (aPPD) および 20 (S) プロトパナキサトリオール (aPPT) を含む、チョウセンニンジン由来のアグリコンサポニン)、パニツムマブ、PANVAC (登録商標) - VF (治験がんワクチン)、ペグアスパラガーゼ、PEGインターフェロンA、フェノクソディオール、プロカルバジン、レビマスタト、REMOVAB (登録商標) (カツマキソマブ)、REVLIMID (登録商標) (レナリドマイド)、RSR13 (エファブプロキシラル)、SOMATULINE (登録商標) LA (ランレオチド)、SORIATANE (登録商標) (アシトレチン)、スタウロスポリン (Streptomyces staurosporus)、タラボスタット (PT100)、TARGRETIN (登録商標) (ベキサロテン)、TAXOPREXIN (登録商標) (DHA-パクリタキセル)、TELCYTA (登録商標) (カンホスファミド (canfosfamide)、TLK286)、テミリフェン (temilifene)、TEMODAR (登録商標) (テモゾロミド)、テスミリフェン (tesmilifene)、サリドマイド、THERATOPE (登録商標) (STn-KLH)、チミタク (2-アミノ-3, 4-ジヒドロ-6-メチル-4-オキソ-5-(4-ビリジルチオ) キナゾリンジヒドロクロリド)、TNFERADE (登録商標) (アデノベクター：腫瘍壊死因子-アルファの遺伝子を含有するDNA担体)、TRACLEER (登録商標) または ZAVESCA (登録商標) (ボセンタン)、トレチノイン (Retin-A)、テトランドリン、TRISENOX (登録商標) (三酸化ヒ素)、VIRULIZIN (登録商標)、ウクライン (より大きなクサノオウ植物体由来のアルカロイドの誘導体)、ビタキシン (抗アルファvベータ3抗体)、XCYTRIN (登録商標) (モテキサフィンガドリニウム)、XINLAY (登録商標) (アトラセンタン)、XYOTAX (登録商標) (パクリタキセルポリグルメクス)、YONDELIS (登録商標) (トラベクテジン)、ZD-6126、ZINECARD (登録商標) (デクスラゾキサン)、ZOMETA (登録商標) (ゾレドロン酸)、クリゾチニブ、ゾルピシンなどが挙げられる。

#### 【0051】

別の好ましい実施形態では、治療薬は、デスモグレイン-2と結合する化合物、好ましくは、DSG2と結合し、密着結合を開口させる化合物を含む。

#### 【0052】

他の実施形態では、治療薬は、放射性粒子/放射線療法を含む。これらに限定されないが、コバルト-60、ヨウ素131、イリジウム-192、ストロンチウム89、サマリウム153、レニウム186および鉛212を含めた、主治医により適切だとみなされる任意の適切な放射性の療法または粒子を用いることができる。

#### 【0053】

好ましい実施形態では、治療薬は、抗腫瘍治療薬であり、本明細書に記載の化学療法薬または抗腫瘍モノクローナル抗体を含む。さらに好ましい実施形態では、抗腫瘍治療薬は

、トラスツズマブ、セツキシマブ、ペルツズマブ、アボマブ、コナツムマブ、レクサツムマブ、ベバシズマブ、ベバシズマブ、デノスマブ、ザノリムマブ、リンツズマブ、エドレコロマブ、リツキシマブ、チシリムマブ、トシツモマブ、アレムツズマブ、エブラツズマブ、ミツモマブ、ゲムツズマブ、オゾガマイシン、オレゴボマブ、ペムツモマブ、ダクリズマブ、パニツムマブ、カツマキソマブ、オフアツムマブ、およびイブリツモマブからなる群より選択される抗体を含む。有用な抗腫瘍mAbおよびそれらの特定の使用の非限定的な例が表1に列挙されており、また、参照により本明細書に組み込まれるCampoli、M.ら、Principles & Practice of Oncology 23巻(1&2号):1~19頁(2009年)においてさらに記載されている。

【0054】

【表1】

10

表1: がんを処置するための腫瘍抗原特異的なmAb

抗体	アイソタイプ	標的	適応疾患
SGN-75	ヒト化IgG1	CD70	腎細胞がん、CD70+血液悪性疾患を含めた固形腫瘍
トラスツズマブ	ヒト化IgG1	HER2/neu	Her2/neu(+)乳がん*
セツキシマブ	キメラIgG1	EGFR	EGFR(+)結腸がん*
パニツムマブ	完全ヒトIgG2	EGFR	EGFR(+)結腸がん*
マツズマブ	ヒト化IgG1	EGFR	非扁平上皮非小細胞肺癌(非- squamous non-small cell lung cancer) (NSCLC)、頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)、乳がんおよび膀胱がん、結腸がん(CC)
ペルツズマブ	ヒト化IgG1	EGFR	NSCLC、HNSCC、CC、乳がんおよび卵巣がん
イピリムマブ(MDX-010)	ヒト化IgG1	CTLA-4	NSCLC、RCC、転移性黒色腫
トレメリムマブ(Tremelimumab)(CP-675,206)	ヒト化IgG1	CTLA-4	NSCLC、RCC、転移性黒色腫
シブロツズマブ(Sibrotuzumab)	ヒト化IgG1	FAP**	NSCLC、CC
DR-4-特異的マパツムマブ(TRM-1、HGS-ETR1)	ヒト化IgG1	TRAIL	NSCLC、CC、卵巣がん、多発性骨髄腫、
DR-5-特異的レクサツムマブ(HGS-ETR2、TRA-8)	ヒト化IgG1	TRAIL	固形腫瘍
カンツズマブメルタンシン	ヒト化IgG1-マイタンシノイド	CanAg***	CC、膀胱がん
ベバシズマブ(アバスタチン(Avastatin))	ヒト化IgG1	血管内皮増殖因子(VEGF)	結腸がん*、非扁平上皮非小細胞肺癌(非- squamous non-small cell lung cancer) (NSCLC)*、転移性乳がん*

20

30

40

【0055】

50

モノクローナル抗体治療薬は、これらに限定されないが、マウスまたは他の供給源から生成した標準モノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、完全ヒト抗体、キメラモノクローナル、およびその断片を含めた任意の種類のモノクローナル抗体であってよい。「ヒト化モノクローナル抗体」とは、マウスモノクローナル抗体などの非ヒトモノクローナル抗体に由来するモノクローナル抗体を指す。あるいは、ヒト化モノクローナル抗体は、親の非ヒトモノクローナル抗体の抗原結合性を保持する、または実質的に保持するが、親のモノクローナル抗体と比較してヒトに投与される場合の免疫原性が減弱しているキメラ抗体に由来してよい。例えば、キメラモノクローナル抗体は、ヒト抗体断片とマウス抗体断片、一般にヒト定常領域とマウス可変領域とを含んでよい。ヒト化モノクローナル抗体は、これらに限定されないが、(1)非ヒトモノクローナル抗体由来の相補性決定領域をヒトフレームワーク領域および定常領域にグラフトングすること(「ヒト化」)、および(2)非ヒトモノクローナル抗体の可変ドメインを移植するが、表面残基を交換することによってそれらをヒト様表面で「覆い隠す」こと(「ベニアリング」)を含めた、当技術分野で公知の種々の方法を用いて調製することができる。これらの方法は、例えば、Jonesら、Nature 321巻:522~525頁(1986年); Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81巻:6851~6855頁(1984年); MorrisonおよびOi、Adv. Immunol., 44巻:65~92頁(1988年); Verhoeyerら、Science 239巻:1534~1536頁(1988年); Padlan、Molec. Immun., 28巻:489~498頁(1991年); Padlan、Molec. Immunol., 31巻(3号):169~217頁(1994年); および Kettlborough、C. A.ら、Protein Eng., 4巻(7号):773~83頁(1991年)において開示されている。モノクローナル抗体は、従来の技法を使用して断片化し、その断片を、全抗体についてと同じ方法で有用性についてスクリーニングすることができる。例えば、抗体をペプシンで処理することによってF(ab')<sub>2</sub>断片を生成することができる。生じたF(ab')<sub>2</sub>断片を、ジスルフィド架橋が減るように処理してFab'断片を作製することができる。Fab断片は、IgG抗体をパイプンで処理することによって得ることができ; F(ab')断片はIgG抗体をペプシンによって消化して得ることができる。F(ab')断片は、下記のFab'をチオエーテル結合またはジスルフィド結合を介して結合させることによってでも作製することができる。Fab'断片は、F(ab')<sub>2</sub>のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断することによって得られる抗体断片である。Fab'断片は、F(ab')<sub>2</sub>断片をジチオスレイトールなどの還元剤で処理することによって得ることができる。抗体断片ペプチドは、そのようなペプチドをコードする核酸を組換え細胞において発現させることによってでも生成することができる(例えば、Evansら、J. Immunol. Meth., 184巻:123~38頁(1995年)を参照されたい)。例えば、F(ab')<sub>2</sub>断片の一部をコードするキメラ遺伝子は、そのような切断された抗体断片分子をもたらすために、H鎖のCH1ドメインおよびヒンジ領域をコードするDNA配列、その後に翻訳終止コドンを含んでよい。モノクローナル抗体断片の非限定的な例としては、(i)VLドメイン、VHドメイン、CLドメインおよびCH1ドメインから本質的になる一価の断片であるFab断片; (ii)ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結した2つのFab断片を含む二価の断片であるF(ab)<sub>2</sub>およびF(ab')<sub>2</sub>断片; (iii)VHドメインおよびCH1ドメインから本質的になるFd断片; (iv)抗体の単一の腕のVLドメインおよびVHドメインから本質的になるFv断片; (v)VHドメインから本質的になるdAb断片(Wardら、(1989年)Nature 341巻:544~546頁); および(vi)1種またはそれより多い種の単離されたCDRまたは機能的なパトープが挙げられる。

#### 【0056】

本発明の実施形態のいずれか、または複数の実施形態の組み合わせと組み合わせることができる好ましい一実施形態では、障害はHer-2陽性腫瘍を含み、方法は、単独で、

10

20

30

40

50

または化学療法薬、照射、またはそれらの組み合わせと組み合わせて、A d B - 2 / 3 線維多量体を適切なモノクローナル抗体療法薬と同時投与することを含む。さらに好ましい実施形態では、モノクローナル抗体はトラスツズマブである。これらの実施形態のいずれかと組み合わせることができるさらに好ましい実施形態では、H e r - 2 陽性腫瘍は、乳房の腫瘍、胃の腫瘍、結腸の腫瘍、および卵巣の腫瘍からなる群より選択される。最も好ましい実施形態では、A d B - 2 / 3 線維多量体は、A d 3 の P t D d、J O - 1 多量体（配列番号 2 0）、またはそれらの機能的等価物を含む。下記の実施例に示されている通り、A d B - 2 / 3 線維多量体をトラスツズマブと同時投与することにより、乳房の腫瘍モデルにおいてトラスツズマブの H e r - 2 受容体への接近が改善され、それにより、トラスツズマブの治療有効性が著しく改善される。さらに好ましい実施形態では、方法を、腫瘍の寛解の欠乏によって、腫瘍の再発（r e l a p s e）によって、またはトラスツズマブに対する抵抗性の発生によってなど、トラスツズマブに対する応答が十分でない患者に対して行う。これらの実施形態の方法は、治療有効性を得るために必要なトラスツズマブの投与量を減少させることを補助するためにも使用することができ、したがって、副作用（例えば、トラスツズマブに関連する心毒性など）を限定する機能を果たし得る。

10

## 【 0 0 5 7 】

本発明の実施形態のいずれか、または複数の実施形態の組み合わせと組み合わせることができる別の好ましい実施形態では、障害は、E G F R 陽性腫瘍を含み、方法は、単独で、または化学療法薬、照射、またはそれらの組み合わせと組み合わせて、A d B - 2 / 3 線維多量体を適切なモノクローナル抗体療法薬と同時投与することを含む。さらに好ましい実施形態では、モノクローナル抗体はセツキシマブである。これらの実施形態のいずれかと組み合わせることができるさらに好ましい実施形態では、E G F R 陽性腫瘍は、肺の腫瘍、結腸の腫瘍、乳房の腫瘍、直腸の腫瘍、頭頸部の腫瘍、および膵臓の腫瘍からなる群より選択される。最も好ましい実施形態では、A d B - 2 / 3 線維多量体は、A d 3 の P t D d、J O - 1 多量体（配列番号 2 0）、またはそれらの機能的等価物を含む。下記の実施例に示されている通り、A d B - 2 / 3 線維多量体をセツキシマブと同時投与することにより、肺の腫瘍モデルにおいてセツキシマブの E G F R 受容体への接近が改善され、それにより、セツキシマブの治療有効性が著しく改善される。さらに好ましい実施形態では、方法を、腫瘍の寛解の欠乏によって、腫瘍の再発（r e l a p s e）によって、またはセツキシマブに対する抵抗性の発生によってなど、セツキシマブに対する応答が十分でない患者に対して行う。これらの実施形態の方法は、治療有効性を得るために必要なセツキシマブの投与量を減少させることを補助するためにも使用することができ、したがって、副作用（例えば、セツキシマブ療法中に起こることも多い蕁麻疹など）を限定する機能を果たし得る。

20

30

## 【 0 0 5 8 】

本発明の実施形態のいずれか、または複数の実施形態の組み合わせと組み合わせることができる好ましい一実施形態では、障害は上皮腫瘍を含み、方法は、単独で、または他の化学療法薬、照射、またはそれらの組み合わせと組み合わせて、A d B - 2 / 3 線維多量体を血管内皮増殖因子（V E G F）阻害剤とを同時投与することを含む。これに限定されないが、ベバシズマブを含めた任意の適切な V E G F 阻害剤を使用することができる。

40

## 【 0 0 5 9 】

本明細書の実施形態のいずれか、または複数の実施形態の組み合わせと組み合わせることができる別の実施形態では、固形腫瘍に関する方法は、腫瘍間質タンパク質を分解することができる化合物を投与することをさらに含む。下記の実施例に示されている通り、そのような手法（腫瘍間質タンパク質を分解するための化合物と J O - 1 多量体（配列番号 2 0）およびトラスツズマブとの組み合わせ）により、乳がんモデルにおいて腫瘍が完全に根絶する。これらに限定されないが、レラキシン、コラゲナーゼ、トリプシン、ディスパーゼ、M M P（メタロプロテイナーゼ）- 1、および M M P 8 を含めた、腫瘍間質タンパク質を分解するための任意の適切な化合物を使用することができる。そのような化合物の送達は、遺伝子療法、A d B - 2 / 3 線維多量体および治療薬とは別に投与すること、

50

またはA d B - 2 / 3 線維または治療薬との結合体として投与することを含めた任意の適切な機構によるものであってよい。

【 0 0 6 0 】

本明細書の実施形態のいずれか、または複数の実施形態の組み合わせと組み合わせることが出来る別の実施形態では、方法は、A d B - 2 / 3 多量体を他の結合開口薬と組み合わせ投与することをさらに含む。本明細書で使用される場合、「結合開口薬」は、細胞間結合を一過性に開口させることができる化合物である。任意の適切な結合開口薬を使用することができる。1つの非限定的な実施形態では、結合開口薬は、腸の上皮の結合を可逆的に変化させ、巨大分子が粘膜閉門を通して通過することを可能にする能力を保有する、*Vibrio cholerae* (*V. cholerae*) により産生される毒素である *Zona occludens* 毒素 (*Zot*) を含む (*Fasano* ら (1991年) *Proc Natl Acad Sci U S A* 88巻: 5242 ~ 5246頁) ]。 *Zot* 由来のヘキサペプチド (*AT-1001*) が開発されてきた)。別の実施形態では、*Clostridium perfringens* エンテロトキシンにより、密着結合からクロードイン3およびクロードイン4を除去して、細菌の浸潤を容易にする (*Sonoda* *N* ら (1999年) *J Cell Biol* 147巻: 195 ~ 204頁]。別の実施形態では、ヒトAd、HPV、HTLV-1にコードされる腫瘍性タンパク質により、結合タンパク質ZO-1を誤った場所に局在化させることによって上皮の結合を一過性に開口させることができる (*Latorre IJ* ら (2005年) *J Cell Sci* 118巻: 4283 ~ 4293頁)。他の実施形態では、いくつかのヒトウイルスが、密着結合または他の細胞結合分子に関与して上皮細胞への侵入を実現する。これらのウイルスとしては、C型肝炎ウイルス (*Evans MJ* ら (2007年) *Nature* 446巻: 801 ~ 805頁)、レオウイルス (*Barton ES* ら (2001年) *Cell* 104巻: 441 ~ 451頁)、および単純ヘルペスウイルス (*Geraghty RJ* ら (1998年) *Science* 280巻: 1618 ~ 1620頁) がある。

【 0 0 6 1 】

別の実施形態では、治療薬は吸入治療薬である。任意の適切な吸入治療薬を本発明の方法において使用することができる。種々の非限定的な実施形態では、吸入治療薬は、コルチコステロイド、気管支拡張薬、ベータアゴニスト、抗コリン作用薬、アルブテロール (*PROVENTIL* (登録商標); *VENOLIN* (登録商標); *ACCUNE B* (登録商標); *PROAIR* (登録商標))、レバルブテロール (*levalbuterol*) (*XOPENEX* (登録商標))、ピルブテロール (*pirbutrol*) (*MAXAIR* (登録商標))、臭化イプラトロピウム (*ATROVENT* (登録商標))、ベクロメタゾン、ブデソニド、フルニソリド (*AEROBID* (登録商標))、フルチカゾン、トリウムシノロンアセトニド、フルチカゾン (コルチコステロイド) およびサルメテロール (*ADVAIR* (登録商標))、ホルモテロール (*formotorol*) (長時間作用性、ベータ - アゴニスト気管支拡張薬) およびブデソニド (コルチコステロイド) (*SYMICORT* (登録商標))、アルブテロール (ベータアゴニスト) およびイプラトロピウム (*COMBIVENT* (登録商標); 抗コリン作用薬) (ブデソニド (*PULMICORT RESPULES* (登録商標))、およびチオトロピウム (*tiotropium*) (*SPIRIVA* (登録商標); 抗コリン作用性気管支拡張薬) からなる群より選択される。

【 0 0 6 2 】

別の実施形態では、化合物は、診断薬またはイメージング剤を含む。本発明の方法には、任意の診断薬、イメージング剤、または他の化合物を、対象の標的への接近が限定され得る細胞間結合を含む上皮組織に送達するための広範な適用がある。種々の非限定的な実施形態では、イメージング剤は、検出可能なシグナルを直接的または間接的に生じさせることができる任意の化学化合物を含んでよい。多くのそのようなイメージング剤は、当業者に公知である。本開示の方法および組成物において使用するために適したイメージング

剤の例は放射性同位元素、蛍光分子、磁気粒子（ナノ粒子を含む）、金属粒子（ナノ粒子を含む）、リン光分子、酵素、抗体、リガンド、およびそれらの組み合わせであり、一方診断薬は、そのようなイメージング剤と結合した、特定の上皮の障害に対する診断マーカーである化合物を含んでよい。イメージング剤によって生成されるシグナルを検出し、測定するための方法も当業者に公知である。例えば、放射性同位元素はシンチレーション測定または直接的な可視化によって検出することができ；蛍光分子は蛍光分光光度計を用いて検出することができ；リン光分子は分光光度計を用いて検出すること、またはカメラを用いて直接可視化することができ；酵素は酵素によって触媒される反応の生成物を検出または可視化することによって検出することができ；抗体は抗体とカップリングさせた二次的な検出用標識を検出することによって検出することができる。好ましい一実施形態では、イメージング剤および/または診断薬は、直接腫瘍と結合することによって、またはイメージング剤または診断薬を腫瘍と結合することができる化合物とカップリングさせることによってのいずれであっても、腫瘍を検出するために使用することができるものである。

### 【 0 0 6 3 】

一実施例では、イメージング剤は、蛍光イメージング剤を含んでよく、一方診断薬は、蛍光イメージング剤と結合した、特定の上皮の障害に対する診断マーカーである化合物を含んでよい。蛍光イメージング剤は、検出可能な蛍光シグナルを有する任意の化学的部分である。このイメージング剤は、単独で、または他のイメージング剤と組み合わせて使用することができる。本明細書に開示されている組成物および方法において使用することができる適切な蛍光剤の例としては、これらに限定されないが、フルオレセイン（F I T C）、5 - カルボキシフルオレセイン - N - ヒドロキスクシンイミドエステル、5 , 6 - カルボキシメチルフルオレセイン、ニトロベンズ - 2 - オキサ - 1 , 3 - ジアゾール - 4 - イル（N B D）、フルオレスカミン、O P A、N D A、インドシアニングリーン色素、シアニン色素（例えば、C y 3、C y 3 . 5、C y 5、C y 5 . 5およびC y 7）、4 - アセタミド - 4 ' - イソチオシアナート、5 - ( 2 ' - アミノエチル ) アミノナフタレン - 1 - スルホン酸（E D A N S）、4 - アミノ - N - [ 3 - ピニルスルホニル ] フェニルナフタリイミド（p h e n y l i n a p h t h a l i m i d e）- 3 , 5ジスルホネート、N - ( 4 - アニリノ - 1 - ナフチル ) マレイミド、アントラニルアミド、B O D I P Y、ブリリアントイエロー、クマリン、7 - アミノ - 4 - メチルクマリン（A M C、C o u m a r i n 1 2 0）、7 - アミノ - 4 - トリフルオロメチルクマリン（C o u m a r a n 1 5 1）、シアノシン、4 ' , 6 - ジアミニジノ - 2 - フェニルインドール（D A P I）、5 ' , 5 ' ' - ジプロモピロガロール - スルホナフタレイン（プロモピロガロールレッド）、7 - ジエチルアミノ - 3 - ( 4 ' - イソチオシアナトフェニル ) - 4 - メチルクマリンジエチレントリアミンペンタアセテート、4 , 4 ' - ジイソチオシアナトジヒドロ - スチルベン - 2 , 2 ' - ジスルホン酸、4 , 4 ' - ジイソチオシアナトスチルベン - 2 , 2 ' - ジスルホン酸、5 - [ ジメチルアミノ ] ナフタレン - 1 - スルホニルクロリド（D N S、ダンシルクロリド）、4 - ( 4 ' - ジメチルアミノフェニルアゾ ) 安息香酸（D A B C Y L）、4 - ジメチルアミノフェニルアゾフェニル - 4 ' - イソチオシアネート（D A B I T C）、エオシン、エオシンイソチオシアネート、エリスロシン B、エリスロシン、イソチオシアネート、臭化エチジウム、エチジウム、5 - カルボキシフルオレセイン（F A M）、5 - ( 4 , 6 - ジクロロトリアジン - 2 - イル ) アミノフルオレセイン（D T A F）、2 ' , 7 ' - ジメトキシ - 4 ' 5 ' - ジクロロ - 6 - カルボキシフルオレセイン（J O E）、フルオレセインイソチオシアネート、I R 1 4 4、I R 1 4 4 6、マラカイトグリーンイソチオシアネート、4 - メチルウンベリフェロン、オルトクレゾールフタレイン、ニトロチロシン、パラローザニリン、フェノールレッド、B - フィコエリトリン、o - フタルジアルデヒド、ピレン、ピレン醌酸、スクシンイミジル 1 - ピレン醌酸、リアクティブレッド 4（C i b a c r o n [ R ] ブリリアントレッド 3 B - A）、6 - カルボキシ - X - ローダミン（R O X）、6 - カルボキシローダミン（R 6 G）、リサミンローダミン B

10

20

30

40

50

スルホニルクロリドローダミン (Rhod)、5, 6-テトラメチルローダミン、ローダミン B、ローダミン 123、ローダミン X イソチオシアネート、スルホローダミン B、スルホローダミン 101、スルホローダミン 101 のスルホニルクロリド誘導体 (Texas Red)、N, N, N', N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン (TAMRA)、テトラメチルローダミン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート (TRITC)、リボフラビン、ロゾール酸、クマリン-6 などが、それらの組み合わせを含め、挙げられる。これらの蛍光イメージング部分は、Molecular Probes、Eugene、Oregon および Research Organics、Cleveland、Ohio を含めた種々の商業的な供給源から入手することができる、または当業者が合成することができる。

10

#### 【0064】

別の例では、イメージング剤は、磁気共鳴画像法 (MRI) 作用剤を含んでよく、一方、診断薬は、MRI 作用剤と結合した、特定の上皮の障害に対する診断マーカーである化合物を含んでよい。MRI 作用剤は、検出可能な磁気共鳴シグナルを有する、または別の作用剤の磁気共鳴シグナルに影響を及ぼし得る (例えば、増加またはシフト) 任意の化学的部分である。この種類のイメージング剤は、単独で、または他のイメージング剤と組み合わせて使用することができる。さらに別の例では、ガドリニウムベースの MRI 作用剤が、イメージング剤としての機能を果たし得る。開示されているイメージング剤に組み入れることができる適切な MRI 作用剤の例は、パラ-アミノ-ベンジルジエチレントリアミン五酢酸 (p-NH<sub>2</sub>-Bz-DTPA、化合物 7)、結合体化可能な形態のジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) であり、ガドリニウムに強力と結合することが公知であり、磁気共鳴造影剤としての臨床使用について認可されている。本明細書に開示されているデンドリマー基質などの大きな巨大分子に MRI 作用剤を組み入れることにより、大きな T1 弛緩 (高い対比) および単一分子における作用剤の多数のコピーが可能になり得、それによりシグナルが増加し得る。MRI イメージング剤と、例えば、蛍光イメージング剤とを組み合わせることにより、生じた作用剤を、MRI を介してリアルタイムで検出、画像化、および追跡することができる。他のイメージング剤としては、18F、または 64Cu もしくは 68Ga のキレート化剤を組み入れることによって調製することができる PET 作用剤が挙げられる。また、放射性核種を添加することを用いて、SPECT イメージングまたは放射線量の送達を容易にすることができ、一方診断薬は、PET 作用剤と結合した、特定の上皮の障害に対する診断マーカーである化合物を含んでよい。

20

30

#### 【0065】

いくつかの実施形態では、診断薬は、これらに限定されないが、ポジトロン放出断層撮影法 (PET) 作用剤、コンピュータ断層撮影法 (CT) 作用剤、磁気共鳴画像法 (MRI) 作用剤、核磁気イメージング剤 (NMI)、蛍光透視法作用剤および超音波造影剤を含めた診断的なイメージング作用剤である。そのような診断薬としては、<sup>123</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I などを含めたヨウ素 (I)、バリウム (Ba)、ガドリニウム (Gd)、<sup>99</sup>Tc を含めたテクネチウム (Tc)、<sup>31</sup>P を含めたリン (P)、鉄 (Fe)、マンガン (Mn)、タリウム (Tl)、<sup>51</sup>Cr を含めたクロム (Cr)、<sup>14</sup>C を含めた炭素 (C) などの元素の放射性同位元素、蛍光標識した化合物、またはそれらの複合体、キレート、付加物および結合体が挙げられる。これらに限定されないが、炭素 11、窒素 13、酸素 15、フッ素 18、11C-メトミデート、および、これらに限定されないが、フルデオキシグルコース (フッ素 18 で標識したグルコース類似体を含めたそのグルコース類似体を含めた任意の適切な PET 作用剤を使用することができる。

40

#### 【0066】

他の実施形態では、診断薬は、細胞において発現されるとすぐに検出可能なタンパク質をコードするマーカー遺伝子 (これらに限定されないが、ベータガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼなどを含む) および標識した核酸プローブ (例えば、放射標識したプローブまたは蛍光標識したプローブ) である。いくつかの実施形態では、診断作用剤と本明細書において提供される AdB-2/3 多量体との共有結合性結合体化は

50



種々の結合体化プロセスに従って実現される。他の実施形態では、診断薬は、提供される A d B - 2 / 3 多量体と非共有結合的に結びついている。

【 0 0 6 7 】

別の態様では、本発明は、上皮組織への物質の送達を改善するための方法であって、上皮組織を、( a ) 上皮組織に送達すべき 1 種またはそれより多い種の化合物；および ( b ) 上皮組織への 1 種またはそれより多い種の化合物の送達を増強するために十分な量の A d B - 2 / 3 線維多量体、またはその機能的等価物と接触させることを含む方法を提供する。この態様では、化合物は、上に詳細に記載されているものなどの任意の適切な化合物であってよい。好ましい実施形態では、1 種またはそれより多い種の化合物は、イメージング剤を含む。さらに好ましい実施形態では、上皮組織は、本出願に開示されている任意のものを含めた固形腫瘍を含む。種々の非限定的な実施形態では、固形腫瘍は、乳房の腫瘍、肺の腫瘍、結腸の腫瘍、直腸の腫瘍、胃の腫瘍、前立腺の腫瘍、卵巣の腫瘍、子宮の腫瘍、皮膚の腫瘍、内分泌の腫瘍、子宮頸部の腫瘍、腎臓の腫瘍、黒色腫、膵臓の腫瘍、肝臓の腫瘍、脳腫瘍、頭頸部の腫瘍、鼻咽頭の腫瘍、胃の腫瘍、扁平上皮癌、腺癌、膀胱の腫瘍、および食道の腫瘍からなる群より選択される。

10

【 0 0 6 8 】

さらに別の態様では、本発明は、デスモグレイン 2 ( D S G 2 ) を発現している細胞または組織への物質の送達を改善するための方法であって、D S G 2 を発現している細胞または組織を、( a ) 細胞または組織に送達すべき 1 種またはそれより多い種の化合物；および ( b ) 組織への 1 種またはそれより多い種の化合物の送達を増強するために十分な量の A d B - 2 / 3 線維多量体、またはその機能的等価物と接触させることを含む方法を提供する。D S G 2 を発現している例示的な組織の種類としては、これらに限定されないが、上皮細胞 / 組織 (例えば、本明細書に開示されているものなど)、ヒト血小板および顆粒球が挙げられる。下記の実施例に示されている通り、D S G 2 は、非極性細胞において受容体としても作用する。したがって、これらの方法は、上皮細胞および組織における適用だけでなく、例えば、A d B - 2 / 3 の病態発生および遺伝子療法のために A d B - 2 / 3 ベクターを血管内の適用に関連することを見いだす。

20

【 0 0 6 9 】

さらに別の態様では、本発明は、組織における上皮間葉転換 ( E M T ) を誘導するための方法であって、上皮組織を、E M T を誘導するために十分な量の A d B - 2 / 3 線維多量体、またはその機能的等価物と接触させることを含む方法を提供する。E M T は、上皮細胞が細胞間結合などの特性を失い、間葉細胞の性質を獲得する細胞の分化転換プログラムである。E M T は、間葉系のマーカーの発現の増加、細胞外マトリックス化合物の発現の増加、上皮のマーカーの発現の減少、転写因子の位置の変更、およびキナーゼの活性化、および細胞間結合の解離を特徴とする。

30

【 0 0 7 0 】

これらのさらなる態様のそれぞれでは、本明細書に記載の化合物および A d B - 2 / 3 線維多量体の任意の実施形態を用いることができる。1 つの非限定的な実施形態では、A d B - 2 / 3 線維多量体は、A d 3 線維多量体、A d 7 線維多量体、A d 1 1 線維多量体、A d 1 4 線維多量体、A d 1 4 a 線維多量体、それらの組み合わせ、およびそれらの機能的等価物からなる群より選択される。別の実施形態では、A d B - 2 / 3 線維多量体は、A d 3 線維多量体、またはその機能的等価物である。別の実施形態では、A d B - 2 / 3 線維多量体は、A d B - 2 / 3 ピリオン、A d B - 2 / 3 カプシド、A d B - 2 / 3 の 1 2 面体粒子 ( P t D d )、組換え A d B - 2 / 3 線維多量体、およびそれらの機能的等価物からなる群より選択される。種々の好ましい実施形態では、A d B - 2 / 3 線維多量体は、A d 3 の P t D d または結合開口薬 1 ( J O - 1 ) ( 配列番号 2 0 ) 多量体 (例えば、二量体など)、またはその機能的等価物を含む。これらの実施形態のそれぞれと組み合わせることができるさらに好ましい実施形態では、A d B - 2 / 3 線維多量体は二量体である。

40

【 0 0 7 1 】

50

特定の作用機構に縛られるものではないが、これらのさらなる態様のそれぞれは、細胞間結合を攪乱する機能を果たす A d B - 2 / 3 線維多量体を活用すると考えられている。本発明の方法の全ての態様および実施形態では、治療薬、診断薬、および / またはイメージング剤は、A d B - 2 / 3 多量体と一緒に投与することができる、または、一緒に投与することができる。一実施形態では、治療薬と A d B - 2 / 3 多量体は、任意の適切な共有結合または非共有結合によって付着する。1つの非限定的な実施形態では、固形腫瘍細胞を死滅させるために、A b B - 2 / 3 多量体を毒素または他の薬物に付着することができる。

#### 【0072】

A d B - 2 / 3 線維多量体および / または治療薬は、局所的な投与形式または全身投与形式のどちらが処置されている状態に最適であるかに応じて、主治医により適切だとみなされる任意の形で投与することができる。本明細書で使用される場合、「全身送達」および「全身投与」という用語は、これらに限定されないが、送達作用剤を、単一または多数の意図された治療の作用部位に有効に分散させる筋肉内 ( I M ) 投与経路、皮下投与経路、静脈内 ( I V ) 投与経路、動脈内投与経路、吸入による投与経路、舌下投与経路、頬側投与経路、局部投与経路、経皮投与経路、経鼻投与経路、直腸投与経路、膣投与経路、および他の投与経路を含めた経口経路および非経口経路を包含するものとする。本組成物を全身送達するための好ましい経路としては、静脈内経路、筋肉内経路、皮下経路、および吸入による経路が挙げられる。好ましい一実施形態では、例えば、播種性腫瘍を処置するために ( およびモノクローナル抗体を送達するために ) 、静脈内投与を使用する。別の実施形態では、例えば、胃腸 ( G I ) 上皮の障害を処置するために経口送達が良い場合がある。別の実施形態では、肺に送達するため、例えば、肺上皮の障害に対してなど経鼻送達またはエアロゾル送達が良い場合がある。

#### 【0073】

ポリペプチドを酵素による分解から保護するために、A d B - 2 / 3 線維多量体を脂質またはリボソームなどの別の分子と併せて導入することができる。例えば、特定のタンパク質を体内での酵素による加水分解から保護し、したがって、半減期を延長するために、ポリマー、特にポリエチレングリコール ( P E G ) の共有結合による付着が用いられている。

#### 【0074】

A d B - 2 / 3 線維多量体および / または治療薬は、所望のレベルの治療効果を維持するように決定された間隔で定期的に全身投与することができる。例えば、静脈内注射による投与は、1日1回、1週間に1回、2 ~ 4週間ごと、またはそれよりも頻度が少ない間隔であってよい。投薬レジメンは、医師が、作用剤の組み合わせの作用に影響を及ぼす可能性があるさまざまな因子を考慮することによって決定する。これらの因子としては、処置されている状態の進行の程度、患者の年齢、性別および体重、ならびに他の臨床的因子が挙げられる。A d B - 2 / 3 線維多量体および / または治療薬の投与量は、投与されている多量体および / または治療薬、ならびに任意の薬物送達ビヒクル ( 例えば、持続的放出送達ビヒクル ) の存在および本質に応じて変動する。さらに、投与の頻度および送達される作用剤 ( 複数可 ) の薬物動態学的挙動が変動するように投与量を調整することができる。A d B - 2 / 3 線維多量体の投与量の範囲は、一般に 0 . 0 1 m g / k g から 2 5 0 m g / k g の間にわたり、好ましくは 0 . 1 m g / k g から 1 0 m g / k g の間にわたり、より好ましくは、0 . 1 0 m g / k g から 0 . 5 m g / k g の間にわたる。認可された治療薬の投与量は、医者が容易に同定することができる。治療薬は、がんなどの上皮組織への浸透を増強させることにより用量を減らして投与することも可能であり得る。

#### 【0075】

A d B - 2 / 3 線維多量体は、被験体に、治療薬を投与する前、それと同時に、またはその後に投与することができる。好ましい実施形態では、治療薬および A d B - 2 / 3 線維多量体を同時に投与する。A d B - 2 / 3 線維多量体に対して治療薬を投与するタイミングは、最大の治療効果を実現するために変動し得る。治療薬は、それを、A d B - 2 /

10

20

30

40

50

3線維多量体とDSG2が結合することによって引き起こされる一過性の細胞間結合の開口と確実に接触する時に投与することが好ましい。例えば、治療薬は、AdB-2/3線維多量体の各投与の前に、それと同時に、その後に投与することができる。他の好ましい実施形態では、治療薬は、AdB-2/3線維多量体を投与した後、例えば、AdB-2/3線維多量体を投与した最大5分後、10分後、15分後、30分後、45分後、1時間後、2時間後、3時間後、4時間後、5時間後、6時間後、8時間後、10時間後、12時間後、18時間後、24時間後、30時間後、36時間後、40時間後、42時間後、48時間後、54時間後、60時間後、66時間後、72時間後、78時間後、84時間後、90時間後、または、さらには最大96時間後に投与することができる。

【0076】

別の態様では、本発明は、上皮組織に関連する障害を処置するための方法であって、それを必要とする被験体に、障害を処置するために十分な量のAdB-2/3線維多量体、またはその機能的等価物を投与することを含む方法を提供する。この実施形態では、他の治療薬は送達されない。非限定的な実施形態では、AdB-2/3ウイルス感染症、固形腫瘍、またはAdB-2/3ベースの遺伝子送達ベクターを用いて処置することができる障害からなる群より選択される障害を処置するために単独療法を使用する。例えば、固形腫瘍の治療では、方法は、浸透などによる免疫系細胞の障害部位への接近（例えば、既存のナチュラルキラー細胞、T細胞または樹状細胞の腫瘍内への浸透など）を改善することを含む。該方法は、免疫系細胞の、標的上皮細胞への接近を改善することが有益であり得る上記の任意の上皮細胞に関連する障害を処置するためにも使用することができる。好ましい実施形態では、障害は、固形腫瘍であり、該方法は、免疫系による腫瘍の攻撃を改善することを含む。該方法は、上記の任意の固形腫瘍と一緒に使用することができる。文脈により明確に別段の規定がなされない限り、本発明の第1の態様の全ての実施形態および複数の実施形態の組み合わせをこの第2の態様においても同様に使用することができる。

【0077】

したがって、この第2の態様の種々の実施形態では、AdB-2/3線維多量体は、Ad3線維多量体、Ad7線維多量体、Ad11線維多量体、Ad14線維多量体、およびAd14a線維多量体からなる群より選択される。同様に、本発明のこの態様において使用するための1種またはそれより多い種のAdB-2/3線維多量体（またはそれらのキメラ/機能的等価物）を含む例示的な構築物としては、これらに限定されないが、AdB-2/3ピリオン、AdB-2/3カプシド、AdB-2/3の12面体粒子（PtDd）（AdB-2/3の複製時にそれらにより産生されるウイルス成分の12面体粒子）、組換えAdB-2/3線維多量体（これに限定されないが、JO-1多量体、例えば、JO-1二量体などの、下記の実施形態のいずれか、または複数の実施形態の組み合わせにおいて開示されているものを含む）、およびそれらの機能的等価物が挙げられる。好ましい実施形態では、1種またはそれより多い種のAdB-2/3線維多量体は、Ad3のPtDdなどのAdB-2/3のPtDdを含む、またはそれからなる。別の好ましい実施形態では、1種またはそれより多い種のAdB-2/3線維多量体は、JO-1二量体などの、下記の本発明の組成物の実施形態のいずれか、または複数の実施形態の組み合わせを含む、またはそれからなる。さらに、本発明のこの態様の方法は、DSG2と結合し、DSG2に媒介される一過性の細胞間結合の開口を誘発することができる任意のAdB-2/3線維多量体を用いて行うことができる。したがって、本明細書に開示されているAdB-2/3線維多量体に対する天然に生じない修飾（異なるAd血清型線維タンパク質およびそのドメインなどの欠失、付加、置換、キメラ）は、それらが、DSG2と結合し、DSG2に媒介される細胞間結合の開口を誘発する働きをする限りは本発明の範囲内である。DSG2との結合についての試験およびDSG2に媒介される細胞間結合の開口についての評価に関する本明細書における教義に基づいて、そのようなAdB-2/3線維多量体の機能的等価物を同定することは、十分に当業者のレベルの範囲内である。

【0078】

別の態様では、本発明は、(a) 1つまたはそれより多いA d B - 2 / 3 線維ポリペプチドシャフトドメイン、またはそれらの機能的等価物と、(b) 1つまたはそれより多いA d B - 2 / 3 線維タンパク質シャフトドメインに作動可能に連結され、そのC末端側に位置するA d B - 2 / 3 線維ポリペプチドノブドメイン、またはその機能的等価物と；(c) 1つまたはそれより多いA d B - 2 / 3 線維ポリペプチドシャフトドメインに作動可能に連結され、そのN末端側に位置する1つまたはそれより多い非A d B - 2 / 3 由来二量体形成ドメインとを含む組換えA d B - 2 / 3 線維ポリペプチドを提供する。

#### 【0079】

好ましい実施形態では、組換えポリペプチドはA d 線維ポリペプチド由来の尾部ドメインを含まない。下で詳細に開示されている通り、出願人らは、線維ポリペプチドの多量体形成およびD S G 2 とA d B - 2 / 3 タンパク質のシャフトドメインおよびノブドメインの結合のために必要な部位を突き止めた。したがって、本発明のこの態様のポリペプチドは、例えば、上記の本発明の種々の方法において使用するためのA d B - 2 / 3 線維多量体を形成するために使用することができる。この態様では、組換えポリペプチドは、任意のA d B - 2 / 3 ウイルス由来のシャフトドメインおよびノブドメイン、または、D S G 2 に対する結合親和性を保持または改善し、二量体形成ドメインを介して多量体（例えば、二量体など）を形成することができる、そのようなシャフトドメインおよびノブドメインに対する任意の突然変異体（置換体、付加体、欠失体、キメラなど）（機能的等価物）を含んでよい。そのような突然変異体を生成することは、十分に当業者のレベルの範囲内であり、また、そのような突然変異体をD S G 2 との結合について試験すること、および結果として生じる、本発明の組換えポリペプチドにおいて使用するための適合性も、本明細書における教義に基づいて当業者のレベルの範囲内である。例えば、固定化した組換えD S G 2 を含有するセンサーを使用した表面プラズモン共鳴（S P R）試験を用いて、D S G 2 競合試験と組み合わせて、評価されている組換えポリペプチドがD S G 2 と結合するかどうかを決定することができる。1つの非限定的な実施形態では、ポリペプチドは、当業者に周知の技法を用いてそのアミノ酸配列を変化させることにより、その免疫原性が低下するように修飾することまたは突然変異させることができる。機能の損失および獲得についての分析などの別の例示的な試験は、実施例1に詳しく記載されている。

#### 【0080】

本出願全体を通して使用される場合、「ポリペプチド」という用語は、その最も広範な意味で使用され、サブユニットアミノ酸の配列を指す。本発明のポリペプチドは、L - アミノ酸、D - アミノ酸（*in vivo*においてL - アミノ酸に特異的なプロテアーゼに対して抵抗性である）、またはD - アミノ酸とL - アミノ酸の組み合わせを含んでよい。本明細書に記載のポリペプチドは、化学的に合成すること、または組み換えによって発現させることができる。ポリペプチドは、*in vivo*における半減期の増加を促進するために、例えば、ペグ化、H E S 化（H E S y l a t i o n）、P A S 化（P A S y l a t i o n）、グリコシル化によってなど、他の化合物と連結させることができる、または、F c 融合物としてもしくは脱免疫化（*de immunized*）変異体で作製することができる。そのような連結は、当業者には理解される通り、共有結合性または非共有結合性であってよい。

#### 【0081】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」という用語は、ドメインが、それらの意図された目的のための単位として機能するように形づくられる、要素の配置を指す。この用語は、ドメインがポリペプチドのすぐ隣にあることを必要とせず、ドメイン間にスペーサー／リンカー配列が存在してよく、その長さは、かなり変動してよい。1つの非限定的な実施形態では、組換えA d B - 2 / 3 線維ポリペプチドの任意の2つのドメイン間のスペーサーの長さは、約0アミノ酸から約20アミノ酸の間であってよい。種々の他の非限定的な実施形態では、スペーサーの長さは、

#### 【0082】

## 【化 1】

0-20, 0-19, 0-18, 0-17, 0-16, 0-15, 0-14, 0-13, 0-12, 0-11, 0-10, 0-9, 0-8, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4, 0-3, 0-2, 0-1, 1-20, 1-19, 1-18, 1-17, 1-16, 1-15, 1-14, 1-13, 1-12, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-20, 2-19, 2-18, 2-17, 2-16, 2-15, 2-14, 2-13, 2-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-20, 3-19, 3-18, 3-17, 3-16, 3-15, 3-14, 3-13, 3-12, 3-11, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-20, 4-19, 4-18, 4-17, 4-16, 4-15, 4-14, 4-13, 4-12, 4-11, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-20, 5-19, 5-18, 5-17, 5-16, 5-15, 5-14, 5-13, 5-12, 5-11, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-20, 6-19, 6-18, 6-17, 6-16, 6-15, 6-14, 6-13, 6-12, 6-11, 6-10, 6-9, 6-8, 6-7, 7-20, 7-19, 7-18, 7-17, 7-16, 7-15, 7-14, 7-13, 7-12, 7-11, 7-10, 7-9, 7-8, 8-20, 8-19, 8-18, 8-17, 8-16, 8-15, 8-14, 8-13, 8-12, 8-11, 8-10, 8-9, 9-20, 9-19, 9-18, 9-17, 9-16, 9-15, 9-14, 9-13, 9-12, 9-11, 9-10, 10-20, 10-19, 10-18, 10-17, 10-16, 10-15, 10-14, 10-13, 10-12, 10-11, 11-20, 11-19, 11-18, 11-17, 11-16, 11-15, 11-14, 11-13, 11-12, 12-20, 12-19, 12-18, 12-17, 12-16, 12-15, 12-14, 12-13, 13-20, 13-19, 13-18, 13-17, 13-16, 13-15, 13-14, 14-20, 14-19, 14-18, 14-17, 14-16, 14-15, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 15-16, 16-20, 16-19, 16-18, 16-17, 17-20, 17-19, 17-18, 18-20, 18-19, 19-20, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, または、0 アミノ酸

10

## 【0083】

の長さであってよい。

20

## 【0084】

本明細書で使用される場合、「組換えポリペプチド」とは、天然に生じないタンパク質産物を意味し、組換えポリペプチドのドメインは、1種またはそれより多い種の他のタンパク質または人工的に誘導された配列に由来する。例えば、各ドメインは、異なる天然に存在するタンパク質配列に由来してよい（例えば：ある A d B - 2 / 3 血清型由来のシャフト配列；異なる A d B - 2 / 3 血清型由来のノブドメイン；など）。組換えポリペプチドは、これらに限定されないが、標準の D N A 操作技法および組換えポリペプチドのサブユニット部分を介した化学的な組立てを含めた種々の機構によって構築することができる。化学的な組立てにより、分子遺伝的な形態としての等価形態または等価な機能を伴う代替物がもたらされ得る。好ましい実施形態では、標準の組換え D N A 技法によって組換えポリペプチドを作製する。本発明の組換えポリペプチドをそのように組換えにより作製し単離するための技法は、本明細書における教示に基づいて、十分に当業者のレベルの範囲内である。

30

## 【0085】

一実施形態では、各シャフトドメインは、A d 3 シャフトドメイン、A d 7 シャフトドメイン、A d 1 1 シャフトドメイン、A d 1 4 シャフトドメイン、A d 1 4 a シャフトドメイン、それらの組み合わせ、およびそれらの機能的等価物からなる群より選択される。D S G 2 と結合し、それにより一過性の細胞間結合の開口をもたらすために必要である線維ノブ二量体形成のためにはシャフトドメインが必要である。したがって、これらの A d ウイルス血清型のシャフトドメインの機能的等価物は、以下に提供される実施例に基づいて当業者が容易に決定することができる。例えば、固定化した組換え D S G 2 を含有するセンサーを使用した表面プラズモン共鳴（S P R）試験を用いて、D S G 2 競合試験と組み合わせて、評価されている組換えポリペプチドが D S G 2 と結合するかどうかを決定することができる。機能の損失および獲得についての分析などの別の例示的な試験は、実施例 1 に詳しく記載されている。

40

## 【0086】

組換えポリペプチドは、1個から22個の間の A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドシャフトドメインを含んでよい。したがって、種々の実施形態では、ポリペプチドは、

## 【0087】

## 【化 2】

1-22, 1-21, 1-20, 1-19, 1-

18, 1-17, 1-16, 1-15, 1-14, 1-13, 1-12, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-22, 2-21, 2-20, 2-19, 2-18, 2-17, 2-16, 2-15, 2-14, 2-13, 2-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-22, 3-21, 3-20, 3-19, 3-18, 3-17, 3-16, 3-15, 3-14, 3-13, 3-12, 3-11, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-22, 4-21, 4-20, 4-19, 4-18, 4-17, 4-16, 4-15, 4-14, 4-13, 4-12, 4-11, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-22, 5-21, 5-20, 5-19, 5-18, 5-17, 5-16, 5-15, 5-14, 5-13, 5-12, 5-11, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-22, 6-21, 6-20, 6-19, 6-18, 6-17, 6-16, 6-15, 6-14, 6-13, 6-12, 6-11, 6-10, 6-9, 6-8, 6-7, 7-22, 7-21, 7-20, 7-19, 7-18, 7-17, 7-16, 7-15, 7-14, 7-13, 7-12, 7-11, 7-10, 7-9, 7-8, 8-22, 8-21, 8-20, 8-19, 8-18, 8-17, 8-16, 8-15, 8-14, 8-13, 8-12, 8-11, 8-10, 8-9, 9-22, 9-21, 9-20, 9-19, 9-18, 9-17, 9-16, 9-15, 9-14, 9-13, 9-12, 9-11, 9-10, 10-22, 10-21, 10-20, 10-19, 10-18, 10-17, 10-16, 10-15, 10-14, 10-13, 10-12, 10-11, 11-22, 11-21, 11-20, 11-19, 11-18, 11-17, 11-16, 11-15, 11-14, 11-13, 11-12, 12-22, 12-21, 12-20, 12-19, 12-18, 12-17, 12-16, 12-15, 12-14, 12-13, 13-22, 13-21, 13-20, 13-19, 13-18, 13-17, 13-16, 13-15, 13-14, 14-22, 14-21, 14-20, 14-19, 14-18, 14-17, 14-16, 14-15, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 15-16, 16-22, 16-21, 16-20, 16-19, 16-18, 16-17, 17-22, 17-21, 17-20, 17-19, 17-18, 18-22, 18-21, 18-20, 18-19, 19-22, 19-21, 19-20, 20-22, 20-21, 21-22, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, または22個の AdB-2/3 線維タンパク質シャフトドメイン

10

20

## 【0088】

を含む。単一の組換えポリペプチドにおいて、2個以上の AdB - 2 / 3 線維タンパク質シャフトドメインが存在する場合、各シャフトドメインは同一であってよい、またはシャフトドメインの1つまたはそれより多いコピーは異なってよい。好ましい実施形態では、組換え AdB - 2 / 3 線維ポリペプチドは単一のシャフトドメインを有する。

## 【0089】

別の実施形態では、組換えポリペプチド内の1つまたはそれより多い（または全ての）シャフトドメインは、配列番号11：

## 【0090】

## 【化 3】

GVL(T/S)LKC(L/V)(T/N)PLTT(T/A)(G/S)GSLQLKVG(G/S)GLTVD(D/T)T(D/N)G(T/F/S)L(Q/K/E)ENI(G/S/K)(A/V)(T/N)TPL(V/T)K(T/S)(G/N)HSI(G/N)L(S/P)(L/I)G(A/P/N)GL(G/Q)(T/I)(D/E)(E/Q)NKLC(T/S/A)KLG(E/Q/N)GLTF(N/D)S(N/S)N(I/S)(C/I)(I/A)(D/N/L)(D/K)N(I/--)NTL.

30

## 【0091】

によるアミノ酸配列を含む、またはそれからなる。この配列および本明細書において示されている他の可変性配列では、可変性の残基は括弧内に示されており、「-」は、その残基が存在しない場合があることを示す。

## 【0092】

別の実施形態では、組換えポリペプチド内の1つまたはそれより多い（または全ての）シャフトドメインは、配列番号12：

40

## 【0093】

## 【化 4】

GVLTLKCLPLTTTGGSLQLKVGGLT(V/I)DDTDG(T/F)L(Q/K)ENI(G/S)ATPLVKTGHSIGL(S/P)LG(A/P)GLGT(D/N)ENKLC(T/A)KLG(E/Q)GLTFNSNNICI(D/N)DNNTL

## 【0094】

によるアミノ酸配列を含む、またはそれからなる。

## 【0095】

さらに別の実施形態では、組換えポリペプチド内の1つまたはそれより多い（または全

50

ての)シャフトドメインは、配列番号1(A d 3)、配列番号2(A d 7)、配列番号3(A d 1 1)、配列番号4(A d 1 4)、および配列番号5(A d 1 4(a))からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、またはそれからなる。A d B - 2 / 3線維ポリペプチドのアラインメントおよびそれらのドメイン構造については図24を参照されたい。一実施形態では、組換えポリペプチド内のノブドメインは、A d 3ノブドメイン、A d 7ノブドメイン、A d 1 1ノブドメイン、A d 1 4ノブドメイン、A d 1 4 aノブドメイン、およびそれらの機能的等価物からなる群より選択される。D S G 2と結合するためにはノブドメインが必要である。したがって、これらのA d ウイルス血清型のノブドメインの機能的等価物は、D S G 2との結合を評価するためのさまざまなアッセイの本明細書における教義に基づいて当業者が容易に決定することができる。例えば、固定化した組換えD S G 2を含有するセンサーを使用した表面プラズモン共鳴(S P R)試験を用いて、D S G 2競合試験と組み合わせて、評価されている組換えポリペプチドがD S G 2と結合するかどうかを決定することができる。機能の損失および獲得についての分析などの別の例示的な試験は、実施例1に詳しく記載されている。

10

【0096】

別の実施形態では、ノブドメインは、配列番号13：

【0097】

【化5】

WTG(V/P)(N/K)P(T/)(E/R)ANC(Q/I)(M/I)(M/E)(Y/A/N/D)(S/K)(S/K)(E/Q)(S/N)(N/P)D(C/S)  
 KL(I/T)L(I/T)LVK(T/N)G(A/I)(L/I)V(T/N)(A/G)(F/Y)V(Y/T)(V/L)(I/M)G(V/A)S(N/D)(N/D/Y)(F/V)N(  
 M/T)L(T/F)(T/K)(Y/H/N)(R/K)N(I/V)(N/S)(F/I)(T/N)(A/V)EL(F/Y)FD(S/A)(A/T)G(N/H)(L/I)L(T/P)(  
 S/R/D)(L/S)SSLKT(P/D)L(N/E)(H/L)K(S/Y)(G/K)Q(N/T)(M/--)(A/--)(T/--)(G/--  
 )A(I/L/D)(T/F)(N/S)A(K/R)(S/G)FMPSTTAYPF(--V)(--  
 /L)(N/P)(N/D/V)(N/A)(S/G)(R/T)(E/H)(N/K/--)(--E)NYI(Y/F)G(T/Q)C  
 (H/Y)Y(T/K)ASD(H/G)(T/A)(A/L)FP(I/L)(D/E)(I/V)(S/T)VMLN(Q/R/K)R(A/L)(I/L/P)(R/N/D)  
 (A/D/N/S)(D/E/R)TSY(C/V)(I/M)(R/T)(I/V/F)(T/L)WS(W/L)N(T/A)G(D/L/V)APE(G/V/--)(Q/--)  
 T(S/T)(A/Q)(T/A)TL(V/I)TSPFTF(Y/S)YIREDD.

20

【0098】

によるアミノ酸配列を含む、またはそれからなる。

30

【0099】

別の実施形態では、ノブドメインは、配列番号14：

【0100】

【化6】

WTGVNPT(E/R)ANCQ(M/I)(M/I)(D/N/A)SSESNCKLILTLVKTGALVTAFFVYVIGVSN(N/D)FNMLTT(  
 Y/H)(R/K)NINFTAELFFDS(A/T)GNLLT(S/R)LSSSLKTPLNHKSQGNMATGA(I/L)TNAK(S/G)FMPSTTA  
 YPFN(N/D/V)NSRE(--K)(-/E)NYIYGTC(H/Y)YTASD(H/R)TAFPIDISVMLN(Q/R)RA(I/L)(R/N)  
 (A/D/N)(D/E)TSYCIR(I/V)TWSWNTG(D/V)APE(G/V)QTSATTLVTSPFTFYIREDD

40

【0101】

によるアミノ酸配列を含む、またはそれからなる

さらに別の実施形態では、ノブドメインは、配列番号6(A d 3)、配列番号7(A d 7)、配列番号8(A d 1 1)、配列番号9(A d 1 4)、および配列番号10(A d 1 4 a)からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、またはそれからなる。A d B - 2 / 3線維ポリペプチドのアラインメントおよびそれらのドメイン構造については図24を参照されたい。

【0102】

本明細書で使用される場合、「二量体形成ドメイン」とは、それを含有する組換えポリペプチド内の、二量体形成を促進するペプチド配列である。本発明の組換えポリペプチド

50

には、それにより組換えポリペプチドの二量体形成、したがって、D S G 2 との結合が可能になる限りは、任意の適切な非 A d B - 2 / 3 由来二量体形成ドメインを使用することができる。二量体形成ドメインは非 A d B - 2 / 3 由来である、すなわち、A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド内に天然に存在するドメインではない。

#### 【 0 1 0 3 】

当業者に公知であり、本発明において使用するために適した多数の二量体形成ドメインの非限定的な例としては、これらに限定されないが、少なくとも1つのヘリックスを含むペプチドヘリックス、またはヘリックス、コイルおよび別のヘリックスなどによって形成される構造、コイルドコイル構造、例えば、多くの細胞表面シグナル伝達受容体内の二量体形成ドメイン、抗体の F c 領域またはヒンジ領域、ロイシンジッパー、S T A T タンパク質の N 末端ドメイン、F K 5 0 6 結合性タンパク質、L e x A タンパク質の C 末端ドメイン、核受容体、F k p A の N 末端ドメイン、A . m a x i m a 由来のオレンジ色のカルテノイドタンパク質、インフルエンザ由来の M 1 マトリックスタンパク質、インフルエンザウイルス由来のノイラミニダーゼ、E . c o l i フクロスアルドラーゼなどが挙げられる。例えば、O ' S h e a、S c i e n c e . 2 5 4 巻 : 5 3 9 頁 ( 1 9 9 1 年 )、B a r a h m a n d - P o u r ら、C u r r . T o p . M i c r o b i o l . I m m u n o l . 2 1 1 巻 : 1 2 1 ~ 1 2 8 頁 ( 1 9 9 6 年 ) ; K l e m m ら、A n n u . R e v . I m m u n o l . 1 6 巻 : 5 6 9 ~ 5 9 2 頁 ( 1 9 9 8 年 ) ; K l e m m ら、A n n u . R e v . I m m u n o l . 1 6 巻 : 5 6 9 ~ 5 9 2 頁 ( 1 9 9 8 年 ) ; H o ら、N a t u r e . 3 8 2 巻 : 8 2 2 ~ 8 2 6 頁 ( 1 9 9 6 年 ) ; および P o m e r a n z ら、B i o c h e m . 3 7 巻 : 9 6 5 頁 ( 1 9 9 8 年 ) ) を参照されたい。さらなる例としては、ウシパピローマウイルス E 2 タンパク質内の残基 3 2 5 ~ 4 1 0 ( D o s t a t n i、N . ら、E M B O J 7 巻 ( 1 9 8 8 年 ) 3 8 0 7 ~ 3 8 1 6 頁 ; H a u g e n、T . ら E M B O J 7 巻 ( 1 9 8 8 年 ) 4 2 4 5 ~ 4 2 5 3 頁 ; M c B r i d e、A . ら、E M B O J 7 巻 ( 1 9 8 8 年 ) 5 3 3 ~ 5 3 9 頁 ; M c B r i d e、A . ら、P r o c N a t l A c a d S c i U S A 8 6 巻 ( 1 9 8 9 年 ) 5 1 0 ~ 5 1 4 頁 )、1 型脱ヨード酵素 ( D 1 ) : D F L V I Y I E E A H A S D G W ( 配列番号 2 4 ) または A D F L - - Y I - E A H - D G W ( 配列番号 2 5 ) ; H I V - 1 カプシドタンパク質 : Q G P K E P F R D Y V D R F Y K T L R A ( 配列番号 2 6 ) ; 酵母 G C N 4 のロイシンジッパー二量体形成モチーフ : H M K Q L D V E E L S N Y H L N V A R L K V G E R ( 配列番号 2 7 ) ; E s c h e r i c h i a c o l i 転写性抗ターミネータータンパク質内のロイシンジッパー ; および B g l G : G V T Q L M R E M L Q L I K F Q F S L N Y Q E E S L S Y Q R L V T ( 配列番号 2 8 ) が挙げられる。好ましい実施形態では、二量体形成ドメインは、E V S A L E K ( 配列番号 2 2 ) および / または K V S A L K E ( 配列番号 2 3 ) の 1 つまたはそれより多いコピーを含む。

#### 【 0 1 0 4 】

本発明の組換えポリペプチド内の、二量体形成ドメインとしての機能を果たし得る適切なペプチド配列、およびその突然変異体を同定することは、下記の実施例 2 において開示されているものなどの本明細書における教義に基づいて、十分に当業者のレベルの範囲内である。例えば、組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドの二量体形成は、ショ糖勾配での沈降、トリプシンによるタンパク質分解に対する抵抗性、およびポリアクリルアミドゲルにおける電気泳動移動度を含めた判断基準によって評価することができる ( H o n g および E n g l e r、J o u r n a l o f V i r o l o g y 7 0 巻 : 7 0 7 1 ~ 7 0 7 8 頁 ( 1 9 9 6 年 ) ) 。

#### 【 0 1 0 5 】

組換えポリペプチドは、1 つまたはそれより多い非 A d B - 2 / 3 由来二量体形成ドメインを含んでよい。したがって、種々の実施形態では、組換えポリペプチドは、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個、またはそれ以上の非 A d B - 2 / 3 由来二量体形成ドメインを含む。ポリペプチド内に多数のドメインが存在する場合



、二量体形成ドメインのそれぞれは同じであることが好ましい。

【0106】

好ましい実施形態では、スペーサーペプチドは、二量体形成ドメインと1つまたはそれより多いシャフトドメインの間に位置する。さらに好ましい実施形態では、スペーサーペプチドは、構造が柔軟なペプチドである。実質的にあらゆる、構造が柔軟なペプチドを使用することができる。例として、可動性のペプチドは、アミノ酸残基の繰り返し、例えば、G l y - G l y - G l y - S e r など、または任意の他の適切なアミノ酸残基の繰り返しを含んでよい。別の実施形態では、抗体のヒンジ領域を使用することができる。スペーサーは、組換えポリペプチドの二量体を形成する能力が維持され、組換えポリペプチドとD S G 2の結合が維持される任意の適切な長さであってよい。

10

【0107】

好ましい実施形態では、組換えA d B - 2 / 3ポリペプチドは、  
(a) それぞれがA d 3シャフトドメイン(配列番号1)を含む、またはそれからなる1つまたはそれより多いシャフトドメインと  
(b) A d 3ノブドメイン(配列番号6)を含む、またはそれからなるノブドメインとを含む。

【0108】

この好ましい実施形態は、本明細書に記載の実施形態のいずれかまたは複数の実施形態の組み合わせと一緒に用いることができる。例えば、これらに限定されないが、E V S A L L E K (配列番号22)および/またはK V S A L K E (配列番号23)の1つまたはそれより多いコピーを含めた任意の適切な二量体形成ドメインを使用することができる。同様に、二量体形成ドメインとシャフトドメインの間および/またはシャフトドメインとノブドメインの間の任意の適切なスペーサーペプチドを使用することができる。最も好ましい実施形態では、組換えA d B - 2 / 3ポリペプチドは、J O - 1 (配列番号20)、またはその多量体(例えば、二量体など)を含む、またはそれからなる。

20

【0109】

組換えポリペプチドは、別のドメイン、例えば、ポリペプチドを単離するためのドメインおよび/または検出ドメインなどを含んでよい。例えば、実施例および配列番号21のH i s タグを有するJ O - 1を参照されたい)。例えば、組換えポリペプチドを作製した後にポリペプチドの精製/単離を容易にするために、単離ドメインを付加することができる。これらに限定されないが、H I S、C B P、C Y D (共有結合性だが解離可能なN o r p Dペプチド)、S t r e p I I、F L A G、H P C (プロテインCの重鎖)ペプチドタグ、G S T親和性タグおよびM B P親和性タグを含めた任意の適切な単離ドメインを使用することができる。本明細書で使用される場合、「検出ドメイン」とは、検出することができる1つまたはそれより多いアミノ酸配列を意味する。これらに限定されないが、本質的に蛍光性のタンパク質(例えば、非生物発光性A n t h o z o a種由来の緑色蛍光タンパク質および蛍光タンパク質)、補因子要求性蛍光タンパク質または発光タンパク質(例えば、フィコビリタンパク質またはルシフェラーゼ)、および特異的抗体に認識され得るエピトープ、またはこれらに限定されないが、蛍光性または発光性に標識した、色素、酵素補因子および遺伝子工学で操作された結合性分子を含めた他の特異的な天然または非天然の結合性プローブを含めた任意の適切な検出ドメインを使用することができる。

30

40

【0110】

別の実施形態では、組換えポリペプチドは、多量体の形態、例えば、二量体、三量体などである。好ましい実施形態では、J O - 1 (配列番号20)多量体は、J O - 1ホモ三量体のそれぞれの二量体形成ドメインを通じた二量体形成によって形成されたJ O - 1二量体を含む(すなわち: J O - 1ポリペプチドは、ノブドメインの三量体形成によるホモ三量体である)。多量体の形態(例えば、二量体など)では、組換えポリペプチドは、A d B - 2 / 3線維多量体を含み、上記の本発明の種々の方法において使用することができる。当業者には理解される通り、そのような多量体は、本発明の同一の組換えポリペプチドの多量体を含んでよい、または、本発明の異なる組換えポリペプチドの多量体を含んで

50

よい。一実施形態では、多量体の一部を形成している組換えポリペプチドのそれぞれにおいて二量体形成ドメインは同じである。別の実施形態では、多量体の一部を形成している組換えポリペプチドのそれぞれにおいて二量体形成ドメインは異なる。別の実施形態では、多量体の一部を形成している組換えポリペプチドのそれぞれにおいてシャフトドメインおよび/またはノブドメインは同じである。別の実施形態では、多量体の一部を形成している組換えポリペプチドのそれぞれにおいてシャフトドメインおよび/またはノブドメインは異なる。

【0111】

A d B - 2 / 3 線維の多量体形成は、当業者に周知の方法に従って決定することができる。例えば、組換え A d B - 2 / 3 線維構築物の多量体形成は、ショ糖勾配での沈降、トリプシンによるタンパク質分解に対する抵抗性、およびポリアクリルアミドゲルにおける電気泳動移動度を含めた判断基準によって評価することができる (Hong および Engler, Journal of Virology 70 巻: 7071 ~ 7078 頁 (1996 年))。電気泳動移動度に関しては、線維多量体は、非常に安定な複合体であり、SDS-PAGE の前に試料を煮沸しない場合、多量体の分子量と一致する分子量で流れる。しかし、煮沸すると、多量体の構造は破壊され、その後、タンパク質は、タンパク質単量体と一致するサイズで流れる。

10

【0112】

組換えポリペプチド、またはその多量体型は、溶液中で、または凍結させて保管することができる。

20

【0113】

別の実施形態では、本発明の組換えポリペプチドを、上皮組織に関連する障害に対する 1 種またはそれより多い種の治療薬と組み合わせる (例えば、それと結合体化するなど)。そのような結合体は、例えば、本発明の治療方法において使用することができる。本発明のポリペプチドと対象の治療薬を結合体化するための方法、例えば、共有結合または化学的架橋によるものなどは、当業者に周知である。それらに限定されないが、上に開示されているもの、ならびにレキサシンなどの腫瘍間質分解性化合物を含めた任意の適切な治療薬を使用して、本発明のこの実施形態による結合体を形成することができる。好ましい実施形態では、治療薬は、抗腫瘍治療薬であり、本明細書に記載の化学療法薬または抗腫瘍モノクローナル抗体を含む。さらに好ましい実施形態では、抗腫瘍治療薬は、トラスツ

30

ズマブ、セツキシマブ、ベルツズマブ、アボマブ、コナツマブ、レクサツマブ、ペバシズマブ、ペバシズマブ、デノスマブ、ザノリムマブ、リンツズマブ、エドレコロマブ、リツキシマブ、チシリムマブ、トシツモマブ、アレムツズマブ、エブラツズマブ、ミツモマブ、ゲムツズマブ、オゾガマイシン、オレゴボマブ、ペムブモマブ、ダクリズマブ、パニツマブ、カツマキソマブ、オフアツマブ、およびイブリツモマブからなる群より選択される抗体を含む。

40

【0114】

別の態様では、本発明は、本発明の任意の実施形態のポリペプチドをコードする核酸を提供する。核酸は、RNA または DNA を含んでよく、また、標準の分子生物学的技法を用いて本明細書における教義に基づいて調製および単離することができる。核酸は、これらに限定されないが、ポリ A 配列、修飾されたコザック配列、ならびにエピトープタグ、輸出シグナル、および分泌シグナルをコードする配列、核局在化シグナル、ならびに原形質膜局在化シグナルを含めた、コードされるタンパク質の発現および/または精製を促進するために有用な追加的なドメインを含んでよい。

【0115】

別の態様では、本発明は、プロモーターに作動可能に連結された本発明の任意の態様の核酸を含む組換え発現ベクターを提供する。「組換え発現ベクター」は、核酸のコード領域または遺伝子を、遺伝子産物の発現に影響を及ぼすことができる任意のプロモーターと作動可能に連結させるベクターを含む。哺乳動物系において開示されている核酸の発現を駆動するために使用するプロモーター配列は、構成的なもの (これらに限定されないが、

50

CMV、SV40、RSV、アクチン、EFを含めた種々のプロモーターのいずれかによって駆動される)または誘導性のもの(これらに限定されないが、テトラサイクリン反応性プロモーター、エクジソン反応性プロモーター、ステロイド反応性プロモーターを含めたいくつもの誘導性プロモーターのいずれかによって駆動される)であってよい。原核細胞のトランスフェクトにおいて使用するための発現ベクターの構築も当技術分野で周知であり、したがって、標準の技法によって実現することができる(例えば、Sambrook、Fritsch、およびManiatis、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年; Gene Transfer and Expression Protocols、109~128頁、E. J. Murray編、The Humana Press Inc.、Clifton、N. J.)、およびAmbion 1998年 Catalog (Ambion、Austin、TX)を参照されたい。発現ベクターは、宿主生物体において、エピソームとしてか、または宿主染色体DNAに組み込まれることによって複製可能でなければならず、また、これらに限定されないが、抗生物質抵抗性遺伝子などの選択マーカーを含めた、所与の使用に適しているものとみなされる任意の他の構成要素を含んでよい。

#### 【0116】

さらに別の態様では、本発明は、本明細書に開示されている組換え発現ベクターを含む宿主細胞、およびその後代を提供し、宿主細胞は原核生物であっても真核生物であってもよい。細胞は、一過性または安定にトランスフェクトすることができる。そのような、原核細胞および真核細胞への発現ベクターのトランスフェクションは、これらに限定されないが、標準の細菌の形質転換、リン酸カルシウム共沈澱、電気穿孔、またはリポソーム媒介性トランスフェクション、DEAEデキストラン媒介性トランスフェクション、ポリカチオン媒介性トランスフェクション、またはウイルス媒介性トランスフェクションを含めた、当技術分野で公知の任意の技法によって実現することができる(例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrookら、1989年、Cold Spring Harbor Laboratory Press; Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique、第2版(R. I. Freshney、1987年、Liss, Inc. New York、NYを参照されたい)。発現ベクターをトランスフェクトした培養細胞を利用して多量のポリペプチドを作製する技法は当技術分野で周知である。

#### 【0117】

別の態様では、本発明は、

(a) AdB - 2 / 3 線維多量体、またはその機能的等価物と、

(b) 薬学的に許容される担体と

を含む医薬組成物を提供する。

#### 【0118】

AdB - 2 / 3 線維多量体は、本発明の態様、実施形態のいずれか、または複数の実施形態の組み合わせにより本明細書に記載されている多量体のいずれであってもよい。種々の好ましい実施形態では、AsB - 2 / 3 線維多量体は、本発明のAdB - 2 / 3 ビリオン、AdB - 2 / 3 カプシド、AdB - 2 / 3 のPtDd、または組換えAdB - 2 / 3 線維多量体、またはそれらの機能的等価物を含む。種々の他の好ましい実施形態では、AdB - 2 / 3 線維多量体は、Ad3 線維多量体、Ad7 線維多量体、Ad11 線維多量体、Ad14 線維多量体、Ad14a 線維多量体、およびそれらの組み合わせまたはキメラからなる群より選択される。好ましい実施形態では、1種またはそれより多い種のAdB - 2 / 3 線維多量体は、AdB - 2 / 3 のPtDd(例えば、Ad3のPtDdなど)を含む、またはそれからなる。別の好ましい実施形態では、1種またはそれより多い種のAdB - 2 / 3 線維多量体は、本明細書に記載の本発明の実施形態のいずれか、または複数の実施形態の組み合わせの組成物、例えば、JO - 1 (配列番号20) 二量体などを含む

、またはそれからなる。

【0119】

医薬組成物は、これらに限定されないが、上に開示されているものを含めた、上皮組織に関連する障害を処置するための1種またはそれより多い種の治療薬をさらに含んでよい。好ましい実施形態では、治療薬は、抗腫瘍治療薬であり、本明細書に記載の化学療法薬または抗腫瘍モノクローナル抗体を含む。さらに好ましい実施形態では、抗腫瘍治療薬は、トラスツズマブ、セツキシマブ、ペルツズマブ、アボマブ、コナツムマブ、レクサツムマブ、ペバシズマブ、ペバシズマブ、デノスマブ、ザノリムマブ、リンツズマブ、エドレコロマブ、リツキシマブ、チシリムマブ、トシツモマブ、アレムツズマブ、エブラツズマブ、ミツモマブ、ゲムツズマブ、オゾガマイシン、オレゴボマブ、ペムブモマブ、ダクリズマブ、パニツムマブ、カツマキソマブ、オフアツムマブ、およびイブリツモマブからなる群より選択される抗体を含む。

10

【0120】

薬学的に許容される担体は、無毒性であり、生体適合性であり、多量体（およびそれと組み合わせた任意の他の治療剤）の生物活性に有害な影響を及ぼさないように選択される。例示的な、ペプチドに対する薬学的に許容される担体は、Yamadaの米国特許第5,211,657号に記載されている。組成物は、経口投与、非経口投与、または外科的投与が可能になる、固体の形態、半固体の形態、ゲルの形態、液体の形態または気体の形態の調製物、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、軟膏剤、溶液、坐剤、吸入剤、および注射剤などに製剤化することができる。注射、注入、または洗浄および局部送達によって非経口的に送達するための適切な担体としては、蒸留水、リン酸緩衝生理食塩水、規定のリンゲル液または乳酸リンゲル液、ブドウ糖溶液、ハンクス液、またはプロパンジオールが挙げられる。さらに、滅菌した不揮発性油を、溶媒または懸濁媒として使用することができる。この目的のために、合成のモノグリセリドまたはジグリセリドを含めた任意の生体適合性油を使用することができる。さらに、オレイン酸などの脂肪酸が、注射剤の調製において使用される。担体および作用剤は、液剤、懸濁剤、重合性ゲルまたは非重合性ゲル、ペースト剤または膏薬として配合することができる。担体は、作用剤（複数可）の送達を持続させる（すなわち、延長する、遅延させる、または調節する）ため、または治療剤（複数可）の送達、取り込み、安定性、または薬物動態を増強するための送達ビヒクルも含んでよい。そのような送達ビヒクルとしては、非限定的な例として、微小粒子、ミクロスフェア、ナノスフェア、またはタンパク質で構成されるナノ粒子、リボソーム、炭水化物、合成の有機化合物、無機化合物、ポリマーヒドロゲルまたはコポリマーヒドロゲル、およびポリマーミセルを挙げることができる。適切なヒドロゲル送達系およびミセル送達系としては、国際特許公開第WO2004/009664A2号に開示されているPEO:PHB:PEOコポリマーおよびコポリマー/シクロデキストリン複合体、および米国特許出願公開第2002/0019369A1号に開示されているPEOおよびPEO/シクロデキストリン複合体が挙げられる。そのようなヒドロゲルは、意図された作用部位に、または皮下または筋肉内に局所的に注射して、持続的放出デポ剤を形成することができる。

20

30

【0121】

くも膜下腔内（IT）または脳室内（ICV）に送達するために、適切に滅菌された送達系（例えば、液体；ゲル、懸濁液など）を使用して組成物を投与することができる。非ペプチド作用剤を経口投与するためには、組成物を不活性な増量剤または希釈剤、例えば、スクロース、コーンスターチ、またはセルロースなどに担持させることができる。

40

【0122】

本発明の組成物は、生体適合性賦形剤、例えば、分散剤または湿潤剤、懸濁化剤、希釈剤、緩衝液、浸透エンハンサー、乳化剤（emulsifier）、結合剤、増粘剤、調味料（経口投与用）なども含んでよい。例示的な製剤は、注射可能な投与量の、水、油、生理食塩水、グリセロール、またはエタノールなどの滅菌された液体であってよい医薬担体を伴う生理的に許容される希釈剤中の多量体の溶液または懸濁剤として非経口的に投与

50

することができる。さらに、補助的な物質、例えば、湿潤剤または乳化剤 (emulsifying agent)、界面活性物質、pH緩衝物質などが修飾されたポリペプチドを含む組成物に存在してよい。医薬組成物の追加的な構成成分としては、石油 (例えば、動物起源、植物起源、または合成起源のものなど)、例えば、大豆油および鉱油が挙げられる。一般に、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなどのグリコールが注射用溶液に好ましい液体担体である。

#### 【0123】

医薬組成物は、多量体および他の治療薬 (存在する場合) の持続性放出またはパルス放出が可能になるように製剤化することができるデポ剤注射剤または埋め込み調製物の形態で投与することもできる。

#### 【0124】

医薬組成物は、本発明のポリペプチドに加えて、(a) 分散保護剤 (lyoprotectant); (b) 界面活性物質; (c) 充填剤; (d) 張度調整剤; (e) 安定剤; (f) 保存料および/または (g) 緩衝液を含んでよい。いくつかの実施形態では、医薬組成物中の緩衝液は、トリス緩衝液、ヒスチジン緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液または酢酸緩衝液である。医薬組成物は、分散保護剤、例えば、スクロース、ソルビトールまたはトレハロースも含んでよい。ある特定の実施形態では、医薬組成物は、保存料、例えば、塩化ベンザルコニウム、ベンゼトニウム、クロロヘキシジン、フェノール、m-クレゾール、ベンジルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロロブタノール、o-クレゾール、p-クレゾール、クロロクレゾール、硝酸フェニル水銀、チメロサル、安息香酸、および種々のそれらの混合物を含む。他の実施形態では、医薬組成物は、グリシンのような充填剤を含む。さらに他の実施形態では、医薬組成物は、界面活性物質、例えば、ポリソルベート-20、ポリソルベート-40、ポリソルベート-60、ポリソルベート-65、ポリソルベート-80、ポリソルベート-85、ポロキサマー-188、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミタート、ソルビタンモノステアレート、ソルビタントリオレエート (sorbitan trioleate)、またはそれらの組み合わせを含む。医薬組成物は、張度調整剤、例えば、製剤に、ヒト血液との実質的な等張性 (isotonic) または等浸透圧性 (isosmotic) を与える化合物も含んでよい。例示的な張度調整剤としては、スクロース、ソルビトール、グリシン、メチオニン、マンニトール、ブドウ糖、イノシトール、塩化ナトリウム、アルギニンおよびアルギニン塩酸塩が挙げられる。他の実施形態では、医薬組成物は、安定剤、例えば、対象のタンパク質と組み合わせると、凍結乾燥した形態または液体の形態における対象のタンパク質の化学的な不安定性および/または物理的な不安定性を実質的に予防するまたは低下させる分子をさらに含む。例示的な安定剤としては、スクロース、ソルビトール、グリシン、イノシトール、塩化ナトリウム、メチオニン、アルギニン、およびアルギニン塩酸塩が挙げられる。

#### 【0125】

医薬組成物は、任意の適切な様式に包装することができる。一実施形態では、医薬組成物を、AdB-2/3線維多量体の容器 (例えば、バイアルなど) を含有するキットとして包装する。好ましい実施形態では、キットは、同じ容器または別の容器 (例えば、バイアルなど) 内に、AdB-2/3線維多量体と一緒に、被験体に投与しようとする治療薬、診断薬、またはイメージング剤をさらに含む。任意の適切なAdB-2/3線維多量体をキットに使用することができる; 最も好ましい実施形態では、AdB-2/3線維多量体は、JO-1の多量体 (例えば、二量体など) である。

#### 【0126】

別の態様では、本発明は、(a) 1種またはそれより多い種の組換えポリペプチド/AdB-2/3線維多量体、単離された核酸、組換え発現ベクター、および/または本発明の宿主細胞; および (b) その/それらの、上皮組織に関連する障害を処置することにおける使用についての説明書を含むキットを提供する。キットは、本発明の方法において使

10

20

30

40

50

用するための治療薬をさらに含んでよい。

【0127】

別の態様では、本発明は、上皮組織に関連する障害を処置すること、上皮組織への物質の送達を改善すること、DSG2を発現している組織への物質の送達を改善すること、組織におけるEMTを誘導すること、および/またはAdB-2/3感染症を処置することのうちの1つまたはそれより多いための候補化合物を同定するための方法であって、(a) AdB-2/3線維多量体とDSG2を、1種またはそれより多い種の試験化合物の存在下、DSG2への多量体の結合を促進する条件下で接触させるステップと；(b) 対照と比較して、DSG2との結合についてAdB-2/3線維多量体と競合する陽性の試験化合物を同定するステップとを含み、陽性の試験化合物が、上皮組織に関連する障害を処置すること、上皮組織への物質の送達を改善すること、DSG2を発現している組織への物質の送達を改善すること、組織におけるEMTを誘導すること、および/またはAdB-2/3感染症を処置することのうちの1つまたはそれより多いための候補化合物である方法を提供する。

10

【0128】

DSG2との結合についてAdB-2/3線維多量体と競合する陽性の試験化合物は、それらがDSG2と相互作用することによる、細胞内の結合の一過性の開口のための候補化合物である。化合物の、それらがDSG2と相互作用することによって細胞内の結合を一過性に開口させる能力を検証するための経過観察アッセイは、これらに限定されないが、続く実施例に開示されている試験を含めた任意の適切な方法によって行うことができる。そのように、上皮組織に関連する障害を処置すること、上皮組織への物質の送達を改善すること、DSG2を発現している組織への物質の送達を改善すること、または組織におけるEMTを誘導することについて同定された化合物は、本発明の方法のいずれにおいてもAdB-2/3多量体の代替物として使用することができる。さらに、AdB-2/3は、気道感染症（いくらか重篤な）および咽頭結膜熱を引き起こす重要なヒト病原体を示す。したがって、AdB-2/3感染症を処置することができる化合物が有用であると思われる。本明細書に開示されている通り、DSG2はAdB-2/3により主要な高親和性受容体として使用され、したがって、AdB-2/3とDSG2の結合を減らすことができる化合物は、AdB-2/3感染症の発症を処置または限定するための候補化合物である。

20

30

【0129】

この態様では、AdB-2/3多量体は、実施形態のいずれかまたは複数の実施形態の組み合わせに開示されているAdB-2/3多量体のいずれであってもよい。したがって、種々の非限定的な実施形態では、AdB-2/3多量体は、AdB-2/3ビリオン、AdB-2/3カプシド、AdB-2/3の12面体粒子(PtDd)(AdB-2/3の複製時にそれらにより産生されるウイルス成分の12面体粒子)、組換えAdB-2/3線維多量体（これらに限定されないが、下記の実施形態のいずれか、または複数の実施形態の組み合わせにおいて開示されているものを含めた）、およびそれらの機能的等価物であってもよい。好ましい実施形態では、1種またはそれより多い種のAdB-2/3線維多量体は、AdB-2/3のPtDdなどのAdB-2/3のPtDdを含む、またはそれからなる。別の好ましい実施形態では、1種またはそれより多い種のAdB-2/3線維多量体は、下記の本発明の組成物の実施形態のいずれか、または複数の実施形態の組み合わせを含む、またはそれからなる。さらに好ましい実施形態では、AdB-2/3線維多量体は、JO-1（配列番号20）二量体、またはそれらの機能的等価物を含む、またはそれからなる。

40

【0130】

これに限定されないが、試験化合物の非存在下におけるAdB-2/3多量体とDSG2の結合を含めた任意の適切な対照を使用することができる。

【0131】

一実施形態では、DSGは、組換えDSG2を含む。別の実施形態では、方法は、細胞

50

表面上にDSG2（内因的にまたは組換えによって）を発現している細胞を使用する。

【0132】

1つの非限定的な実施形態では、固定化した組換えDSG2を含有するセンサーを使用した表面プラズモン共鳴（SPR）試験を用いて、DSG2競合試験と組み合わせて、DSG2と結合するAdB-2/3線維多量体である候補化合物を同定することができる。機能の損失および獲得についての分析などの別の例示的な試験は、実施例1に詳しく記載されている。

【0133】

別の実施形態では、同定は、実施例1に開示されているものなどの、試験化合物の、結合を減少させる能力が、DSG2を発現している上皮細胞に機能的なAdB-2/3ピリオンを形質導入する能力の減少として検出される形質導入試験を含む。

10

【0134】

別の実施形態では、DSG2を発現している細胞抽出物を電気泳動によって分離し、ウエスタンブロット分析し、標識したAdB-2/3線維多量体を使用して、試験化合物の存在下でウエスタンブロットを探索する。別の実施形態では、Wangら、J. Virology（2007年）81巻：12785～12792頁；およびWangら（2008年）82巻：10567～10579年に記載のものなどのドットブロットアッセイを使用することができる。

【0135】

AdB-2/3感染症を処置するための候補化合物を同定するための技法のさらなる例が、続く実施例において提供される。

20

【0136】

試験化合物がポリペプチド配列を含む場合、そのようなポリペプチドは、化学的に合成すること、または組み換えによって発現させることができる。組換え発現は、上に開示されている通り当技術分野における標準の方法を用いて実現することができる。そのような発現ベクターは、細菌発現ベクターまたはウイルス発現ベクターを含んでよく、そのような宿主細胞は、原核生物または真核生物であってよい。固相、液相、またはペプチド縮合技法の周知の技法、またはそれらの任意の組み合わせを用いて調製した合成ポリペプチドは、天然アミノ酸および非天然アミノ酸を含んでよい。ペプチド合成のために使用するアミノ酸は、標準の脱保護、中和、カップリングおよび洗浄のプロトコルを用いた標準のBoc（N-アミノ保護されたN-t-ブチルオキシカルボニル）アミノ酸樹脂、または標準の塩基に不安定なN-アミノ保護された9-フルオレニルメトキシカルボニル（Fmoc）アミノ酸であってよい。Fmoc-N-アミノ保護されたアミノ酸およびBoc-N-アミノ保護されたアミノ酸はどちらも、Sigma、Cambridge Research Biochemical、または当業者によく知られている他の化学薬品会社から入手することができる。さらに、他のN-保護基を用いて合成することができるポリペプチドは当業者によく知られている。固相ペプチド合成は、当業者によく知られている技法によって実現することができ、例えば自動合成機を使用することによって提供することができる。

30

【0137】

試験化合物が抗体を含む場合、そのような抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであってよい。抗体は、ヒト化形態、完全ヒト形態、またはマウス形態の抗体であってよい。そのような抗体は、HarlowおよびLane、Antibodies；A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、N.Y.、（1988年）に記載のものなどの周知の方法によって作出することができる。

40

【0138】

試験化合物が核酸配列を含む場合、そのような核酸は、同様に、化学的に合成すること、または組み換えによって発現させることができる。組換え発現技法は、当業者に周知である（例えば、Sambrookら、1989年、上記を参照されたい）。核酸は、DN

50

AまたはRNAであってよく、一本鎖または二本鎖であってよい。同様に、そのような核酸は、当技術分野における標準の技法を用いて、手動の反応または自動化された反応により化学的または酵素的に合成することができる。化学的にまたは*in vitro*酵素的合成により合成された場合、核酸は、細胞に導入する前に精製することができる。例えば、核酸は、溶媒または樹脂、沈澱、電気泳動、クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせを用いて抽出することによって混合物から精製することができる。あるいは、核酸は、試料を加工することによる損失を回避するために、精製することなく、または最小限に精製して使用することができる。

#### 【0139】

試験化合物がポリペプチド、抗体、または核酸以外の化合物を含む場合、そのような化合物は、有機化学合成を行うための当技術分野の種々の方法の任意の変形によって作出することができる。

#### 【実施例】

#### 【0140】

##### (実施例1)

デスモグレイン2は、アデノウイルス血清型3、7、11、および14に対する受容体である

##### 要約

アデノウイルス(A<sub>d</sub>)血清型A<sub>d</sub>3、A<sub>d</sub>7、A<sub>d</sub>11、およびA<sub>d</sub>14によって使用される主要な高親和性受容体としてデスモグレイン2(DSG2)を同定した。これらの血清型は、気道感染症を引き起こす重要なヒト病原体を示す。上皮細胞において、アデノウイルスがDSG2と結合することにより、上皮間葉転換によく似た事象が誘発され、一過性の細胞間結合の開口がもたらされる。これにより、細胞間結合内に閉じ込められている受容体、例えば、CD46およびHer2/neuへの接近が改善される。組換えA<sub>d</sub>3のPtDdを用いた試験によって示されている通り、完全なビリオンに加えて、ウイルスの複製時にウイルスのペントンおよび線維によって過剰に形成される12面体粒子(PtDd)により、DSG2に媒介される細胞間結合の開口が誘発され得る。本発明者らの発見は、アデノウイルスの生物学的性質および病原性を明らかにし、また、がん療法のために意味を有する。

#### 【0141】

##### 諸言

ヒトアデノウイルス(A<sub>d</sub>)は、現在55血清型を含有する6種(A~F)に分類されている。A<sub>d</sub>血清型の大部分は、主要な付着受容体としてコクサッキーアデノウイルス受容体(CAR)を利用する<sup>1</sup>。しかしこれは、B種のA<sub>d</sub>血清型の場合は違う。最近、本発明者らはそれらの受容体の使用に基づいたB種A<sub>d</sub>の新しいグループ分けを提案した<sup>2</sup>。グループ1(A<sub>d</sub>16、A<sub>d</sub>21、A<sub>d</sub>35、A<sub>d</sub>50)は、ほぼCD46のみを受容体として利用する；グループ2(A<sub>d</sub>3、A<sub>d</sub>7、A<sub>d</sub>14)は、CD46ではない、仮に受容体Xと名付けた一般的な、未確認の受容体(複数可)を共有する；グループ3(A<sub>d</sub>11)は、CD46と優先的に相互作用するが、CD46が遮断されている場合には受容体Xも利用する。

#### 【0142】

B種A<sub>d</sub>は、一般的なヒト病原体である。2005年から、血清型A<sub>d</sub>3、A<sub>d</sub>7、およびA<sub>d</sub>14を含めた多様なB種血清型の同時出現が観察された。2007年に、米国およびアジアのいくつかの場所で、A<sub>d</sub>14の新規の病原性が高く毒性が強いと思われる株であるA<sub>d</sub>14aが発見された<sup>3-4</sup>。本発明者らは最近、A<sub>d</sub>14aが、それらの受容体の使用に関してA<sub>d</sub>のB種グループ2に属することを実証した<sup>5</sup>。まとめると、受容体Xを利用する血清型(A<sub>d</sub>3、A<sub>d</sub>7、A<sub>d</sub>14、A<sub>d</sub>14a、およびA<sub>d</sub>11)は全て、A<sub>d</sub>B-2/3と称する。

#### 【0143】

A<sub>d</sub>B-2/3は、特に上皮起源の腫瘍に関して、遺伝子移入ベクターとしての潜在的

10

20

30

40

50



を有する<sup>6</sup>。上皮細胞は、いくつかの細胞間結合（密着結合、接着結合、ギャップ結合、およびデスモソーム）を維持し、その特徴は、多くの場合、上皮内がんにおいて、およびがん細胞株において保存されている<sup>7</sup>。CARとCD46はどちらも上皮がん細胞の細胞間結合内に閉じ込められており、これらの付着受容体を使用するAdと接近できない<sup>8-9</sup>。対照的に、AdB-2/3は、上皮がん細胞に効率的に感染し、これは、部分的に、上皮細胞が細胞間結合などの特性を失い、間葉細胞の性質を獲得する細胞の分化転換プログラムである<sup>10</sup>上皮間葉転換（EMT）によく似たプロセスを誘導することによって実現される<sup>8</sup>。AdB-2/3の別の示差的な特徴は、それらが、複製時にAd線維とペントンベースとからなるウイルス成分の12面体粒子を産生することができることである<sup>11</sup>。ペントン12面体（PtDd）は、全長のペントンベースタンパク質から組み立てることができないが、残基37と残基38の間におけるタンパク質分解による自然発生的なN末端の切断を必要とする<sup>12</sup>。この切断部位はAd3、Ad7、Ad11、およびAd14において保存されているが、Ad2およびAd5には存在しない（図1a）。Ad3の場合では、PtDdは、非常に過剰に形成され（感染性ウイルス当たりPtDd5.5×10<sup>6</sup>個）、PtDdがウイルスの脱出および伝播の一因となるという仮説が立てられている<sup>13</sup>。

#### 【0144】

受容体Xを同定するための最初の試みは、1995年に遡る。これらの最初の試験により、Ad3と、約130kDaのHeLa細胞タンパク質との相互作用が示されている<sup>14</sup>。最近、CD46、CD80および/またはCD86などに対する受容体Xのいくつかの候補が提唱された<sup>15-18</sup>。しかし、本発明者らおよび他者は、これらのタンパク質がAdB-2/3に対する高親和性受容体としての機能を果たし得ることをこれまでに検証することができていない<sup>2, 19-23</sup>。

#### 【0145】

本試験では、Ad3ビリオンおよび組換えAd3のPtDdを受容体Xについてのプローブとして使用し、AdB-2/3血清型に対する高親和性受容体としてデスモグレイン2（DSG2）を同定した。DSG2は、カドヘリンタンパク質ファミリーに属するカルシウム結合性膜貫通糖タンパク質である。上皮細胞において、DSG2は、細胞間接着構造の構成成分である<sup>24</sup>。その細胞質尾部は、細胞接着および細胞間結合/細胞形態の調節因子と直接接触している一連のタンパク質と相互作用する<sup>25</sup>。DSG2は、胃癌<sup>26</sup>、扁平上皮癌<sup>27</sup>、黒色腫<sup>28</sup>、転移性前立腺がん<sup>29</sup>、および膀胱がん<sup>30</sup>を含めた一連の上皮の悪性疾患において過剰発現されることが示されている。

#### 【0146】

##### 結果

DSG2は、AdB-2/3ウイルスに対する受容体である。本発明者らの以前の試験により、Ad3が、高密度細胞受容体にナノモルの親和性で結合することが示された<sup>2</sup>。Ad3の結合は、トリプシンに対して感受性であり、EDTAによって遮断することができた、つまり、結合には二価カチオンが必要であった。まず、細胞との高親和性結合を媒介するAd3カプシドタンパク質を同定し、後にそれを用いて高親和性受容体Xを検索した。特に、Ad5とCARの高親和性結合およびAd35とCD46の結合は、それぞれ、対応する線維ノブによって媒介される<sup>31</sup>。しかし、本発明者らの以前の試験により、単一の組換えの三量体Ad3ノブでは、非常に高い濃度を使用した場合でさえ、Ad3ウイルスの結合を完全に遮断することができないことが明らかになり、これは、他のまたは追加的なカプシド部分がAd3の結合に関与していることを示している<sup>32</sup>。したがって、本発明者らは、Ad3の結合と競合させるためにAd3ペントンベース（BsDd）またはAd3ペントンベースと線維（PtDd）で構成される組換えAd312面体を利用した（図1b）<sup>33</sup>。PtDdはAd3の細胞への付着を遮断するが、BsDdはそれを遮断しないことが示された（図2a）。PtDdはまた、CD46も遮断されている場合、他のAdB-2/3、例えば、Ad14、Ad14a、ならびにAd11の結合も遮断したが、Ad5の結合は阻害せず、Ad35の結合は部分的にのみ遮断した（図2a、

10

20

30

40

50

図1c)。細胞をP t D dと一緒にブレインキュベートすることにより、B s D dと混合したA d 3ノブよりもA d 3の結合が阻害された(図1d)。形質導入試験では、P t D dは、A d 3ベクター(A d 3 - G F P)を効率的に遮断したが、A d 3 5ベクター(A d 3 5 - G F P(受容体としてC D 4 6を使用する)の形質導入は遮断せず(図2b)、P t D dのA d 3と競合する能力も確認された。A d 3 - G F P(図1e)およびA d 3 5 - G F P<sup>3 4</sup>は、E 3領域にC M V - G F P発現カセットを挿入した、野生型A d 3ベースのベクターおよび野生型A d 3 5ベースのベクターである。

#### 【0147】

受容体Xを同定するために最適な細胞株を選択するために、いくつかのヒト細胞株および動物細胞株へのA d 3ウイルスの結合を比較した(図2c)。A d 3はげっ歯類細胞には結合せず、これは、これらの細胞において受容体Xが発現されていなかった、またはA d 3に接近できなかったことを示している。最初に試験したヒト細胞株10株(HeLa、K562、SKOV3、293、HT29、SKHeP1、Saos、Y79、Ramos)のうち、A d 3の結合は、Ramos(ヒトパーキットリンパ腫)細胞においてのみ見られなかった。

#### 【0148】

A d受容体候補を同定するために、HeLa細胞膜タンパク質を可溶化し、ポリアクリルアミドゲル上で分離し、プロットングした。プロットをウイルス粒子とハイブリダイズさせ、ウイルス線維ノブ特異的抗体を用いて結合を可視化した。特異的なゲルバンドを切り取り、タンデムな質量分析法(MS/MS)によって分析した。まず、このアッセイによって公知のA d受容体であるC D 4 6を検出することができるかどうかを試験した。フィルターを、C D 4 6 - ターゲティングA d 5 / 3 5 + + ビリオンと一緒にインキュベートし<sup>3 5</sup>、C D 4 6と一致する単一のバンドが見いだされた(図2d)。フィルターをA d 3 ビリオンと一緒にインキュベートすることにより、160 kDaの分子量および90 kDaの分子量の2つのバンドが明らかになった(図2e)。これらの2つのバンドに加えて、A d 3のP t D dは、130 kDaの範囲内のHeLaタンパク質とも反応した。Ramos細胞、すなわち、A d 3と結合しない細胞では、160 kDaのバンドおよび90 kDaのバンドはどちらも存在しなかった。HeLa細胞およびRamos細胞の両方で約130 kDaのP t D d結合バンドが現れ、これは、それがA d 3ウイルス受容体ではないことを示している。160 kDaのバンドのMS/MS分析により、ヒトデスマグレイン2(DSG2)と一致する14ペプチドが同定された(図2f)。HeLa膜タンパク質のIP/ウエスタン分析により、160 kDaのバンドおよび90 kDaのバンドがどちらも、DSG2特異的抗体によって認識されたことが実証された(図2e、右側のパネル)。これは、160 kDaのバンドが完全なサイズのDSG2を表すこと、および90 kDaのバンドが、細胞内ドメイン、膜貫通ドメイン、および膜近傍細胞外アンカードメインを欠くDSG2変異体であることを示す以前のウエスタンブロット試験と一致する<sup>3 6 ~ 3 7</sup>。

#### 【0149】

固定化した組換えヒトDSG2を含有するセンサーを用いたBIAcore表面プラズモン共鳴(SPR)試験により、A d 3 ビリオンはDSG2と相互作用するが、A d 2 ビリオンまたはA d 5 ビリオンはDSG2と相互作用しないことが実証された(図2g)。組換えP t D dはDSG2と結合したが、B s D d粒子はDSG2と結合しなかった(図2h)。P t D d - DSG2相互作用のK<sub>D</sub>(平衡解離定数)は2.5 nMであった。固定化したDSG2とP t D dの結合は、可溶性のDSG2がそれと競合したという事実によって実証された通り特異的であった(データは示していない)。結合動力学的SPR分析により、A d 3線維ノブがDSG2からより早く解離することも示され、これは、線維シャフト内に追加的なDSG2結合部位(複数可)が存在すること、および/またはDSG2と高親和性で結合するために線維多量体形成が必要であることを示している(図2i、図1dも参照されたい)。

#### 【0150】

D S G 2 を A d B - 2 / 3 の結合 / 感染についての重大な受容体として検証するために、細胞株に対して機能の損失および獲得試験を実施した。組換え D S G 2 タンパク質は、A d 3 ならびに他の A d B 2 / 3 A d、すなわち、A d 7、A d 1 4、A d 1 4 a、および A d 1 1 と H e L a 細胞の結合を遮断したが、A d 5 および A d 3 5 の結合は遮断しなかった (図 3 a)。A d 3 - G F P の感染は、D S G 2 タンパク質によって効率的に阻害されたが、カドヘリンスーパーファミリーの他の構造的に関連するメンバー (デスモグレイン 1 - D S G 1 およびデスモコリン 1 - D S C 1) によっては阻害されなかった<sup>3 8</sup> (図 3 b)。この試験により、D S G 2 タンパク質は、C D 4 6 - ターゲティングベクター (A d 3 5 - G F P) による形質導入に影響を及ぼさなかったことも示された。細胞外ドメイン 3 および 4 に対するモノクローナル抗体 (m A b) を用いると A d 3 の付着の有意な阻害が観察された (図 3 c) (D S G 2 の概略図については、図 2 f を参照されたい)。D S G 2 特異的 s i R N A のプールを H e L a 細胞にトランスフェクトすることにより、表面の D S G 2 レベルが約 7 分の 1 に下方制御された (データは示していない)。A d 3 の付着は、D S G 2 - s i R N A で処置した H e L a 細胞では、対照 s i R N A で処置した細胞と比較して 3 分の 1 であった ( $P < 0.001$ ) (図 3 d)。A d 3 - G F P に感染した後の G F P の発現レベルは、D S G 2 - s i R N A をトランスフェクトした細胞では、対照 s i R N A をトランスフェクトした細胞の 13.9 分の 1 であった (図 3 e)。D S G 2 特異的 s i R N A は、C A R - ターゲティングベクター A d 5 - G F P を用いた形質導入に影響を及ぼさなかった。しかし、D S G 2 - s i R N A をトランスフェクトすることにより、結合および C D 4 6 特異的ベクター A d 3 5 - G F P および A d 5 / 3 5 - G F P の形質導入も減少した。D S G 2 - s i R N A により H e L a 細胞における C D 4 6 レベルは低下しなかった。この時点では、この現象を説明することができない。しかし、これは H e L a 細胞に特異的であると思われる。D S G 2 - s i R N A をトランスフェクトした 2 9 3 細胞または乳がん B T 4 7 4 細胞では A d 3 5 - G F P または A d 5 / 3 5 - G F P の形質導入の低下は検出されなかった (データは示していない)。

#### 【0151】

s i R N A に媒介される D S G 2 の下方制御によっても、100%集密において細胞当たり 1 p f u の M O I で A d 3 - G F P を感染させた細胞におけるウイルス細胞溶解および拡散が減少した。感染多重度 (M O I) を調整して用いて (感染の 16 時間後に匹敵する G F P の発現の百分率の実現されるように)、ある期間にわたってウイルス細胞溶解を追跡し、感染の 7 日後に、対照 s i R N A をトランスフェクトした細胞において、D S G 2 s i R N A をトランスフェクトした細胞よりも大規模な溶解性ブランクが見いだされた。これは、組織培養ウェルに付着したままである生存細胞、すなわちウイルス感染による細胞変性の影響を生じなかった細胞のクリスタルバイオレット染色に反映される (図 3 f)。細胞の生存率の定量的分析により、s i R N A によって D S G 2 が下方制御されている細胞において、対照 s i R N A で処置した細胞と比較して有意に少ない細胞死が示された (図 3 g)。

#### 【0152】

機能獲得試験のために、D S G 2 の発現レベルが異なる一連の細胞株を選択し、A d 3 - G F P の形質導入を測定した (図 4 a)。D S G 2 の発現を欠く全ての細胞株 (リンパ腫 R a m o s 細胞、R a j i 細胞、M i n o 細胞、および H H 細胞) は、A d 3 - G F P が形質導入されにくかったが、C D 4 6 ターゲティング A d 5 / 3 5 - G F P ベクターにより形質導入することができた (これらの細胞では C D 4 6 も発現しているため<sup>3 9</sup>)。他方では、D S G 2 陽性 K 5 6 2 細胞には A d 3 - G F P を効率的に形質導入することができた。B J A B 細胞の約 70% が D S G 2 陽性であり、対応して、G F P 陽性細胞の百分率は約 50% でプラトーに達した。A d 3 の感染における D S G 2 の決定的な役割を決定するために、レンチウイルスベクター遺伝子移入により、A d 3 - G F P が形質導入されにくい組織球性リンパ腫細胞株 U 9 3 7 において D S G 2 を異所発現させた (図 4 b)。U 9 3 7 - D S G 2 細胞における D S G 2 の異所発現により、効率的な A d 3 の付着および形質導入が付与されたが、一方これらの細胞における A d 3 5 の付着および

A d 5 / 3 5 - G F P の形質導入は影響を受けなかった ( 図 4 c および 4 d ) 。

#### 【 0 1 5 3 】

ヒト細胞における D S G 2 の局在：予測通り、正常な上皮組織（包皮および結腸）および上皮がん（乳がんおよび卵巣がん）の細胞膜において D S G 2 が見いだされた（図 5 a）。極性結腸がん T 8 4 および C a C o - 2 細胞の共焦点免疫蛍光顕微鏡検査により、D S G 2 と細胞間結合タンパク質であるクローディン 7 の共局在が実証された（図 5 b）。積み重なった X Z 画像切片において（図 5 b）（または細胞層の異なる深さで取得した X Y 切片（データは示していない）、D S G 2 は細胞間結合の先端に現れる。D S G 2 は、上皮細胞において接着結合タンパク質である E - カドヘリンとも共局在した（）。C y 3 で標識した A d 3 を極性細胞に加えた 1 5 分後、ウイルス粒子は結合に局在する D S G 2 に伴って検出可能であった（図 5 c）。C y 5 - P t D d、D S G 2、および E - カドヘリンの三重の標識によって示されている通り、P t D d と一緒に 1 5 分インキュベートした正常な小気道上皮細胞で同様の結果が得られた（図 5 d、上のパネル）。P t D d シグナルは細胞膜上（図 5 d、下のパネル、薄い矢印）および細胞質内（太い矢印）にあり、内部移行した粒子を反映する可能性が最も高い。

10

#### 【 0 1 5 4 】

分極上皮細胞株と対照的に、H e L a 細胞などの非極性細胞では、細胞間結合（すなわち、膜に局在するクローディン 7 および E - カドヘリンシグナル）は存在しなかった。D S G 2 および A d 3 が細胞表面に分散して見いだされた（図 5 e）。

#### 【 0 1 5 5 】

20

H e L a 細胞の A d 3 の感染についての本発明者らの試験（図 2 および 3）は、D S G 2 が非極性細胞においても受容体として作用することを示している。この場合、ヒト血小板および顆粒球において D S G 2 および A d 3 の結合 / 形質導入が検出されたことに注目すべきである（データは示していない）。これらの発見は A d 3 の病原性および遺伝子療法のための A d 3 ベクターの血管内適用と関連するが、本発明者らは、この試験では、分極上皮細胞における A d 3 - D S G 2 相互作用の影響を分析することに焦点を合わせた。

#### 【 0 1 5 6 】

A d 3 と D S G 2 の相互作用により E M T が誘発される。最近、本発明者らは、A d B - 2 / 3 と上皮の卵巣がん細胞の相互作用により、E M T が誘発されることを見いだした。E M T は、間葉系のマーカーの発現の増加、細胞外マトリックス化合物の発現の増加、上皮のマーカーの発現の減少、転写因子の位置の変更、およびキナーゼの活性化を特徴とする<sup>7</sup>。本発明では、A d 3 と D S G 2 の相互作用により E M T 様事象が誘発されることを証明することを試みた。ウイルス遺伝子の発現による細胞形態に対する潜在的な副作用を回避するために、試験では紫外線（U V）により不活化した A d 粒子および組換え A d 3 の P t D d を利用した。全体的に、どちらの種類の粒子を用いた結果も同様であった。上皮がん細胞を P t D d（図 6）または U V により不活化した A d 3（示されていない）と一緒にインキュベートすることにより、膜 / 結合に局在するクローディン 7（図 6 a）または E - カドヘリンシグナル（図 6 b）の減少に反映される通り、結合のリモデリングが引き起こされた。さらに、P t D d で処置した後、間葉系のマーカーであるビメンチンおよびリボカリン 2 のより強力な免疫蛍光法シグナルが見いだされた（図 6 c および d）。P t D d と D S G 2 の相互作用によって誘発される細胞内シグナル伝達経路を同定するために、m R N A 発現プロファイルを試験した。極性 B T 4 7 4 細胞を、P B S、B s D d、または P t D d と一緒に 1 2 時間インキュベートした後、A f f y m e t r i x ヒト S T 遺伝子アレイを用いて m R N A を分析した。P t D d で処置することにより、P B S で処置した細胞と比較して 4 3 0 の遺伝子が > 1 . 5 倍に上方制御され、3 5 2 の遺伝子が > 1 . 5 分の 1 に下方制御されることが見いだされた（図 6 e）。遺伝子の変更の一覧を、P a t h w a y - E x p r e s s ソフトウェア<sup>4 0</sup>によってさらに加工した。このコンピュータによる計算により、P t D d が、ホスファチジルイノシトール（P I）、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（M A P K a k a E R K）、W n t、接着結合、限局性の接着、およびアクチン細胞骨格シグナル伝達経路の調節を含めた E M T に関与す

30

40

50

るいくつかのシグナル伝達経路の顕著な活性化を媒介したことが示唆された。

【0157】

リン酸化特異的抗体を使用したウエスタンブロット分析により、P t D dは、P I 3 KおよびM A P K / E R K 1 / 2、すなわち、E M Tに関与する重要なキナーゼの活性化を誘発するが、B s D dはそれを誘発しないことが示された(図6 f)。これらの経路の活性化は、D S G 2特異的m A b(6 D 8、およびそれよりも劣った程度で、1 0 D 2、および1 3 B 1 1)によっても誘発されたが、C D 4 6を対象とするm A bでは誘発されなかった。D S G 2 s i R N Aをトランスフェクトした細胞におけるM A P K / E R K 1 / 2およびP I 3 Kのリン酸化が減少したが、対照s i R N Aで処置した細胞ではそれが減少しなかったため、経路のP t D dによる活性化はD S G 2によって媒介される。最後に、細胞を、E R K 1 / 2阻害剤であるU O 1 2 6(上のパネル)またはP I 3 K阻害剤であるW o r t m a n n i n(下のパネル)を用いて前処置した場合には、P t D dに誘発されるキナーゼのリン酸化は存在しなかった。総合すると、本発明者らのデータにより、上皮細胞においてA d 3またはA d 3 P t D dがD S G 2と結合することによりE M Tが誘発されることが示唆されている。

【0158】

A d 3およびP t D dにより、細胞間結合内に閉じ込められている受容体への接近が増大する。A d 3ピリオンに誘発されるE M TまたはA d 3のP t D dに誘発されるE M Tにより、細胞間結合の開口ももたらされるかどうかを試験するために、上皮細胞の単層における閉鎖の性質について試験した。まず、4 k D aのF I T C - デキストランの、t r a n s w e l lチャンパー内で培養した集密的な極性B T 4 7 4細胞を通る流束を測定した(図7 a)。P t D dインキュベーションにより、リン酸緩衝生理食塩水(P B S)と比較して透過係数が有意に増加するがB s D dインキュベーションによっても増加しないことが見いだされた。次いで、A d 3に誘発されるE M TまたはP t D dに誘発されるE M Tおよび一過性の結合の開口により、通常は上皮細胞結合が原因で接近できないタンパク質への接近が増大するかどうかを試験した。そのような結合に局在する受容体の例は、A d 3 5およびA d 5 / 3 5に対する高親和性受容体であるC D 4 6である<sup>8</sup>。多数のC D 4 6分子がB T 4 7 4細胞の結合に局在することが確認された(図7 b、左側のパネル)。P t D dで前処置することにより、B s D d処置と比較して<sup>3</sup>H - A d 3 5のB T 4 7 4細胞への付着が有意に増加した(図7 b、右側のパネル)。皮下の上皮腫瘍においてi n v i v oで、C D 4 6 - ターゲティングA dベクターの形質導入に対するP t D dの効果の増強も実証された(図7 c)。A d 5 / 3 5 - b G a lを適用する8時間前にP t D dを静脈内注射することにより、ウイルスの形質導入が増加した。A dを注射した3日後に腫瘍溶解物において測定されたベータガラクトシダーゼ活性は、偽注射したマウス、B s D dを同時注射したマウス、およびP t D dを同時注射したマウスについて、それぞれタンパク質1 μg当たり2.3(+/-0.2) × 10<sup>5</sup> r l u、2.7(+/-0.6) × 10<sup>5</sup> r l u、および38(+/-3.5) × 10<sup>5</sup> r l uであった。

【0159】

乳がん細胞培養物における一連の別の実験では、広く使用されているモノクローナル抗体であるハーセプチン(トラスツズマブ)に対する受容体であるH e r 2 / n e uが、細胞間結合タンパク質であるクローディン7と共染色されることが見いだされた(図7 d)。これは、H e r 2 / n e u分子の全てがハーセプチンと接近できるわけではないことを示唆している。H e r 2 / n e u陽性乳がん細胞株B T 4 7 4をP t D dと一緒にインキュベートすることにより、H e r 2 / n e uの細胞表面への再局在が誘発された(図7 e)。この知見を強化するために、A d 3またはA d 3 P t D dにより、ハーセプチンによるB T 4 7 4細胞死が改善されるかどうかを試験した。以前の試験と一致して<sup>41</sup>、ハーセプチンにより、B T 4 7 4細胞のおよそ25%の死が引き起こされた(図7 f)。B T 4 7 4細胞を、UVにより不活化したA d 3粒子またはP t D dと一緒にブレインキュベートすることにより、ハーセプチン細胞傷害性が2倍超増加した。UVにより不活化したA d 5粒子またはB s D dと一緒にインキュベートすることはハーセプチンによる死滅に

影響を及ぼさなかった。さらに、ハーセプチンおよびP t D d /ハーセプチンは、H e r 2 / n e u 陰性乳がん細胞株M D A - M B - 2 3 1 に対して細胞傷害性効果を有さなかった(図8 a)。B T 4 7 4 細胞のハーセプチンによる死滅に対するP t D d およびA d 3 の効果の増強は、B T 4 7 4 細胞においてD S G 2 s i R N A によりD S G 2 が下方制御されることによってこの効果が消失したので、D S G 2 によって媒介された(図7 g)。E M T に関与する重要な経路を阻害することが、ハーセプチン細胞傷害性に対するP t D d の効果の増強に影響を及ぼすかどうかとも試験した。これらの試験により、W o r t m a n n i n によってP I 3 K を阻害すること、ならびにU O 1 2 6 によってM A P K / E R K を阻害することにより、ハーセプチン療法のP t D d による増強が打ち消されることが示された(図7 g)。重要なことに、ハーセプチン処置の前にB T 4 7 4 - M 1 - 腫瘍を担持するマウスにP t D d (2 m g / k g) を静脈内注射することにより、ハーセプチン注射を単独で用いた場合には実現することができなかった転帰である腫瘍の排除がもたらされた(図7 h)。P t D d で前処置すると、E G F R 特異的m A b であるアービタックス(セツキシマブ)をi n v i t r o で用いたE G F R 陽性結腸がんL o V o 細胞の死滅が増加するので、この抗体の治療効果を発展させることも可能である(図8 b)。

#### 【0160】

##### 考察

この試験では、2つの主要な発見：i) D S G 2 は、一般的な病原体であり、重要な生物医学的ツールである一連のヒトアデノウイルスの感染のために重大な受容体であること、i i) A d とD S G 2 の相互作用により細胞間結合が開口し、したがって、その中に閉じ込められている受容体への接近が増大することについて説明する。

#### 【0161】

D S G 2 は、A d の付着受容体である。完全なA d 3 粒子またはP t D d を受容体プローブとして使用することは、A d 3、A d 7、A d 1 1、およびA d 1 4 に対する付着受容体としてD S G 2 を同定することにおいて役に立った。A d 3 線維ノブドメインをベイトとして用いた以前の試みでは、意味のある受容体候補はもたらされなかった<sup>3 2</sup>。図2 に示されている本発明者らの競合試験および表面プラズモン共鳴試験により、A d 3 内のD S G 2 相互作用ドメイン(複数可)は線維により、ウイルス粒子に存在する空間的配置でのみ形成されることが示されている。これにより、これまで、線維ノブと細胞受容体、すなわち、C A R またはC D 4 6 の高親和性相互作用にのみ関連すると考えられていたA d の付着機構に関する本発明者らの理解が明確に広がる。

#### 【0162】

ウイルス伝播におけるA d 3 とD S G 2 の相互作用およびP t D d とD S G 2 の相互作用の役割。A d 5 の複製時、線維が過剰に産生されることにより、C A R 二量体形成(結合を維持するために重要である)が干渉されることによってか、または細胞間結合の再編成をもたらす細胞内シグナル伝達が誘発されることによって、上皮の結合が破壊される<sup>4 2 - 4 3</sup>。どちらの機構も、A d 3 ビリオン/D S G 2 に媒介される細胞間結合の開口およびA d 3 のP t D d /D S G 2 に媒介される細胞間結合の開口にも関与し得る。本発明者らは、上皮細胞においてA d 3 とD S G 2 の結合およびP t D d とD S G 2 の結合によって誘発される細胞内シグナル伝達についての実験的な裏付けを有する。免疫蛍光法、P I 3 K / M A P K リン酸化、m R N A 発現アレイ、および代謝経路の阻害のデータにより、上皮細胞においてA d 3 およびP t D d によりE M T が誘発され、それにより一過性の細胞間結合の開口がもたらされることが示唆されている。A d 3 粒子または組換えP t D d とD S G 2 の相互作用によって媒介される細胞間結合の開口は、細胞浸透性および細胞間結合内に閉じ込められている受容体(C D 4 6 およびH e r 2 / n e u) への接近が増大することによってさらに裏付けられる。これに沿って、最近の試験により、D S G 2 の細胞外ドメインに対する抗体により、C a C o - 2 細胞の単層における細胞間結合の開口がもたらされることが示された<sup>4 4</sup>。

#### 【0163】

A d 3 ビリオンに誘発されるE M T およびP t D d に誘発されるE M T、すなわち、細

胞間結合の解離は、重要な生物学的役割を有すると思われる。特に、ウイルス感染の間に P t D d が大量に過剰産生されること、および P t D d と D S G 2 の相互作用により、上皮細胞における側方へのウイルスの拡散、および潜在的に、A d の上皮下の細胞層および血流への浸透が容易になることが推測される。

#### 【0164】

A d 病原性に対する意味。D S G 2 が、さらなるウイルスの拡散を容易にする付着受容体であるという本発明者らの発見により、気道上皮の A d 3 の感染機構が明らかになる。さらに、A d 3 が血小板および顆粒球上で D S G 2 と結合するという知見は、このウイルスが一度血流に侵入すれば全身に拡散することについて潜在的な意味を有する。マウス D S G 2 はヒト D S G 2 と 76% の相同性を共有するが<sup>4 5</sup>、本発明者らのデータでは、マウス細胞は A d 3 - G F P に感染しにくいことが示されており、これは、マウス D S G 2 が A d 3 受容体として機能することができないことを示している。A d B - 2 / 3 血清型の病原性を試験するために、D S G 2 をヒトと同様のパターンおよびレベルで発現させる適切な内在性の調節エレメントの制御下でヒト D S G 2 を発現するトランスジェニックマウスが重要なツールになるであろう。

10

#### 【0165】

がん療法に対する意味。D S G 2 は、上皮腫瘍のマーカーとして提唱された<sup>4 6</sup>。がん細胞の上皮の表現型および物理的閉門を形成する能力は、薬物、抗体、腫瘍退縮ウイルス、または免疫細胞の腫瘍部位への接近を制限する機構を示し、したがって、そのような治療モダリティの有効性を減らす<sup>4 7</sup>。本発明では、3つの例(A d 5 / 35ベクター、ハーセプチン、およびアーピタックス)において、D S G 2 と相互作用する A d 3 構成成分を使用することによって、癌療法におけるこの重要な問題に対処することができ得ることを実証した。

20

#### 【0166】

結論として、本発明者らは、一連の一般的なヒト A d に対する高親和性受容体の発見について報告する。本発明者らの試験は、上皮組織に接近するために、A d が細胞のプロセスをどのように誘導するかを理解することに寄与する。本発明者らの発見は、がん療法を改善するために意味がある。

#### 【0167】

##### 方法

タンパク質および抗体。A d 3 線維、A d 5 線維、および A d 3 5 線維のノブドメインを、他で記載されている通り E . c o l i において産生させた<sup>4 8</sup>。組換え A d 3 ペントン 12 面体 ( P t D d ) および基部の 12 面体 ( B s D d ) を、以前に記載されている通り昆虫細胞において産生させ、精製した<sup>3 3</sup>。精製された組換え A d 3 および A d 3 5 K + + ノブに対するポリクローナルウサギ抗体は、P i c k C e l l L a b o r a t o r i e s B . V . ( A m s t e r d a m , T h e N e t h e r l a n d s ) によって作製された。D S G 2 特異的モノクローナル抗体である 20G1、7H9、13B11、10D2 および 8E5<sup>4 9</sup> を、ハイブリドーマ培養物の上清から精製した。

30

#### 【0168】

細胞株。S I に記載の通り細胞を培養した。B T 4 7 4 は、上皮細胞の特徴を有する H e r 2 / n e u 陽性乳がん細胞株である。細胞の極性化を実現するために、 $1.4 \times 10^5$  個の B T 4 7 4 細胞、T 8 4 細胞および C a C o - 2 細胞を、コラーゲンでコーティングした 6.5 mm の T r a n s w e l l インサート (孔サイズ 0.4  $\mu$ m) (C o s t a r T r a n s w e l l C l e a r s) 中で、経上皮抵抗性が安定するまで 10 日間にわたって培養した。

40

#### 【0169】

アデノウイルス。野生型の A d 3 (G B 株)、A d 7 p (G o m e n 染色)、A d 11 p (S l o b i t s k i 株)、A d 14 (D e W i t 株)、および A d 35 (H o l d e n 株) を、A T C C から得た。A d 14 a は A d 14 の新規のゲノム変異体である<sup>5</sup>。A d の繁殖、メチル - <sup>3</sup> H チミジンによる標識、精製および力価決定を他で記載されている

50

通り実施した<sup>2</sup>。Ad5/35-GFPおよびAd5-GFPは、Ad35線維およびAd5線維とCMV-GFP発現カセットとを含有するAd5ベクターである<sup>50</sup>。Ad3-GFPおよびAd35-GFPは、E3領域にCMV-GFP発現カセットを挿入した、野生型Ad3ベースのベクターおよび野生型Ad35ベースのベクターである。Ad3-GFPの構築については、SIに記載されている。Ad35-GFPについては以前に記載されている<sup>34</sup>。形質導入試験のために、細胞を、示されているMOIで1時間にわたってAdベクターに曝露させ、洗浄し、18時間後にフローサイトメトリーによってGFPの発現を測定した。

#### 【0170】

膜タンパク質の調製。HeLa細胞膜タンパク質を以前に記載されている通り調製した<sup>51</sup>。簡単に述べると、HeLa細胞ペレットを氷冷の均質化緩衝液(20mMのHepes、1.5mMのMgCl<sub>2</sub>、5mMのKCl、150mMのNaCl、15%のグリセロール、0.25Mのスクロース、0.1mMのEDTA、2mMのβ-メルカプトエタノール、1mMのPMSF)に再懸濁させた。溶解物を、3mlのシリンジおよび21Gのニードルを用いて破壊した後、400×gで15分間遠心分離した。上清を2倍体積のPBSで希釈し、Beckman超遠心機において35,000rpmで1時間遠心分離した。膜タンパク質ペレットを可溶化緩衝液(50mMのHepes、5mMのMgCl<sub>2</sub>、5mMのKCl、150mMのNaCl、15%のグリセロール、0.25Mのスクロース、0.1mMのEDTA、2mMのβ-メルカプトエタノール、1mMのPMSF、0.5%のBrij96V(Fluka, St. Louis, MO)に再懸濁させた。デスモソームタンパク質は、極めて不溶性であるのでBrij96Vを界面活性剤として使用することが役立った。

#### 【0171】

Ad3およびPtDdを用いたウエスタンブロット。質量分析についての技術的な詳細は、他で記載されている<sup>51</sup>。DSG2を可溶性の粗製の膜タンパク質調製物から免疫沈降させるために、DSG2特異的mAb 6D8、およびPierce Crosslink Immunoprecipitation Kit(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)を使用した。HeLa細胞由来の粗製の膜タンパク質を、0.5%の界面活性剤Brij96Vを用いて可溶化し、対照樹脂と一緒に4で3時間ブレインキュベートして、非特異的な結合を減少させ、次いで、プロテインA/Gアガロースと架橋結合したDSG2抗体と一緒に4で一晩インキュベートした。結合したタンパク質を製造者の説明書に従って溶出させた。

#### 【0172】

表面プラズモン共鳴(SPR)分析。BIAcore3000機器で取得を行った。全ての実験において、2mMのCaCl<sub>2</sub>を補充したHBS-N(GE-Healthcare, Pittsburgh, PA)を毎分5μlの流速でランニング緩衝液として使用した。DSG2(Leinco Technology, Inc.)を10mMの酢酸ナトリウム緩衝液、pH4.2中に0.1mg/mlに希釈し、EDC-NHSで活性化したフローセルに10分間注入してCM4センサーチップ(BIAcore)への固定化を行った。対照フローセルを、EDC-NHSによって活性化し、エタノールアミンによって不活化した。異なる濃度のPtDd、BsDd、Ad3線維ノブを5分間注入し、その後3分を解離時間とし、シグナルをエタノールアミンで非活性化したEDC-NHSフローセルのバックラウンドから自動的に差し引いた。アデノウイルス結合実験のために、野生型Ad2、Ad3およびAd5を1ml当たり5.10<sup>9</sup>vpで注入し、同様のプロトコールを使用した。

#### 【0173】

siRNA試験。DSG2特異的siRNAのセットはDharmacon(Thermo Scientific)によって合成された。標的配列は、CAAUAUACCU GUAGUAGAA(配列番号29)、GAGAGGAUCUGUCCAAAGAA(配列番号30)、CCUUAGAGCUACGC AUUAA(配列番号31)およびCCAG



UGUUCUACCUAAUA (配列番号32)であった。対照 siRNA は、Qiagen、Valencia、CA から購入した。Hyperfect トランスフェクション試薬 (Qiagen) を使用して siRNA トランスフェクションを実施した。

#### 【0174】

DSG2 を発現している U937 細胞。Capital Biosciences (Rockville, MD) からの DSG2 cDNA (受託番号 BC099657) を EF1 プロモーターの対照下でレンチウイルスベクター pRRL-SIN<sup>5.2</sup> にクローニングした。以前に記載されている通り VSVG - 偽型レンチウイルスベクターを作製し、力価を決定した<sup>5.3</sup>。

#### 【0175】

動物試験：動物を必要とする全ての実験は、University of Washington により定められた施設のガイドラインに従って行った。マウスを特定の病原体を含まない施設内に収容した。マトリゲル中のがん細胞 (1:1 vol/vol) を CB17 SCID - ベージュマウスの乳房の脂肪パッドに注射することによって乳がん異種移植を確立した。ハーセプチンを 10 mg/kg の用量で腹腔内に注射した。PtDd を 2 mg/kg の用量で静脈内に与えた。腫瘍体積を以前に記載されている通り測定した<sup>5.4</sup>。

#### 【0176】

実施例 1 の参考文献：

#### 【0177】

#### 【数 1】

1. Bergelson, J.M., et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**, 1320-1323. (1997).
2. Tuve, S., et al. A new group B adenovirus receptor is expressed at high levels on human stem and tumor cells. *J Virol* **80**, 12109-12120 (2006).
3. Louie, J.K., et al. Severe pneumonia due to adenovirus serotype 14: a new respiratory threat? *Clin Infect Dis* **46**, 421-425 (2008).
4. Tate, J.E., et al. Outbreak of severe respiratory disease associated with emergent human adenovirus serotype 14 at a US air force training facility in 2007. *J Infect Dis* **199**, 1419-1426 (2009).
5. Wang, H., Tuve, S., Erdman, D.D. & Lieber, A. Receptor usage of a newly emergent adenovirus type 14. *Virology* **387**, 436-441 (2009).
6. Yamamoto, M. & Curiel, D.T. Current issues and future directions of oncolytic adenoviruses. *Mol Ther* **18**, 243-250 (2010).
7. Turley, E.A., Veisheh, M., Radisky, D.C. & Bissell, M.J. Mechanisms of Disease: epithelial-mesenchymal transition-does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nat Clin Pract Oncol* (2008).
8. Strauss, R., et al. Epithelial phenotype of ovarian cancer mediates resistance to oncolytic adenoviruses. *Cancer Research* **15**, 5115-5125 (2009).

#### 【0178】

## 【 数 2 】

9. Coyne, C.B. & Bergelson, J.M. CAR: a virus receptor within the tight junction. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 869-882 (2005).
10. Thiery, J.P. & Sleeman, J.P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 131-142 (2006).
11. Norrby, E., Nyberg, B., Skaaret, P. & Lengyel, A. Separation and characterization of soluble adenovirus type 9 components. *J Virol* **1**, 1101-1108 (1967).
12. Fuschiotti, P., *et al.* Structure of the dodecahedral penton particle from human adenovirus type 3. *J Mol Biol* **356**, 510-520 (2006). 10
13. Fender, P., Boussaid, A., Mezin, P. & Chroboczek, J. Synthesis, cellular localization, and quantification of penton-dodecahedron in serotype 3 adenovirus-infected cells. *Virology* **340**, 167-173 (2005).
14. Di Guilmi, A.M., Barge, A., Kitts, P., Gout, E. & Chroboczek, J. Human adenovirus serotype 3 (Ad3) and the Ad3 fiber protein bind to a 130-kDa membrane protein on HeLa cells. *Virus Res* **38**, 71-81 (1995).
15. Fleischli, C., *et al.* Species B adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 35 share similar binding sites on the membrane cofactor protein CD46 receptor. *J Gen Virol* **88**, 2925-2934 (2007). 20
16. Short, J.J., *et al.* Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors. *Virology* **322**, 349-359 (2004).
17. Short, J.J., Vasu, C., Holterman, M.J., Curiel, D.T. & Pereboev, A. Members of adenovirus species B utilize CD80 and CD86 as cellular attachment receptors. *Virus Res* **122**, 144-153 (2006).
18. Sirena, D., *et al.* The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. *J Virol* **78**, 4454-4462 (2004).
19. Gaggar, A., Shayakhmetov, D.M. & Lieber, A. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med* **9**, 1408-1412 (2003). 30
20. Marttila, M., *et al.* CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. *J Virol* **79**, 14429-14436 (2005).
21. Segerman, A., Arnberg, N., Erikson, A., Lindman, K. & Wadell, G. There are two different species B adenovirus receptors: sBAR, common to species B1 and B2 adenoviruses, and sB2AR, exclusively used by species B2 adenoviruses. *J Virol* **77**, 1157-1162 (2003).
22. Gustafsson, D.J., Segerman, A., Lindman, K., Mei, Y.F. & Wadell, G. The Arg279Gln [corrected] substitution in the adenovirus type 11p (Ad11p) fiber knob abolishes EDTA-resistant binding to A549 and CHO-CD46 cells, converting the phenotype to that of Ad7p. *J Virol* **80**, 1897-1905 (2006). 40

## 【 0 1 7 9 】

## 【 数 3 】

23. Persson, B.D., *et al.* An arginine switch in the species B adenovirus knob determines high-affinity engagement of the cellular receptor CD46. *J Virol* (2008).
24. Chitaev, N.A. & Troyanovsky, S.M. Direct Ca<sup>2+</sup>-dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell-cell adhesion. *J Cell Biol* **138**, 193-201 (1997).
25. Cowin, P. Unraveling the cytoplasmic interactions of the cadherin superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10759-10761 (1994).
26. Biedermann, K., *et al.* Desmoglein 2 is expressed abnormally rather than mutated in familial and sporadic gastric cancer. *J Pathol* **207**, 199-206 (2005).
27. Harada, H., Iwatsuki, K., Ohtsuka, M., Han, G.W. & Kaneko, F. Abnormal desmoglein expression by squamous cell carcinoma cells. *Acta Derm Venereol* **76**, 417-420 (1996).
28. Schmitt, C.J., *et al.* Homo- and heterotypic cell contacts in malignant melanoma cells and desmoglein 2 as a novel solitary surface glycoprotein. *J Invest Dermatol* **127**, 2191-2206 (2007).
29. Trojan, L., *et al.* Identification of metastasis-associated genes in prostate cancer by genetic profiling of human prostate cancer cell lines. *Anticancer Res* **25**, 183-191 (2005).
30. Abbod, M.F., Hamdy, F.C., Linkens, D.A. & Catto, J.W. Predictive modeling in cancer: where systems biology meets the stock market. *Expert Rev Anticancer Ther* **9**, 867-870 (2009).
31. Leopold, P.L. & Crystal, R.G. Intracellular trafficking of adenovirus: many means to many ends. *Adv Drug Deliv Rev* **59**, 810-821 (2007).
32. Tuve, S., *et al.* Role of cellular heparan sulfate proteoglycans in infection of human adenovirus serotype 3 and 35. *PLoS Pathog* **4**, e1000189 (2008).
33. Fender, P., Ruigrok, R.W., Gout, E., Buffet, S. & Chroboczek, J. Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer. *Nat Biotechnol* **15**, 52-56 (1997).
34. Gao, W., Robbins, P.D. & Gambotto, A. Human adenovirus type 35: nucleotide sequence and vector development. *Gene Ther* **10**, 1941-1949 (2003).
35. Wang, H., *et al.* In vitro and in vivo properties of adenovirus vectors with increased affinity to CD46. *J Virol* **82**, 10567-10579 (2008).
36. Nava, P., *et al.* Desmoglein-2: a novel regulator of apoptosis in the intestinal epithelium. *Mol Biol Cell* **18**, 4565-4578 (2007).
37. Kowalczyk, A.P., *et al.* Structure and function of desmosomal transmembrane core and plaque molecules. *Biophys Chem* **50**, 97-112 (1994).
38. Getsios, S., Huen, A.C. & Green, K.J. Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 271-281 (2004).

## 【 0 1 8 0 】

## 【 数 4 】

39. Wang, H., *et al.* A recombinant adenovirus type 35 fiber knob protein sensitizes lymphoma cells to rituximab therapy. *Blood* **115**, 592-600 (2010).
40. Khatri, P., *et al.* New Onto-Tools: Promoter-Express, nsSNPCounter and Onto-Translate. *Nucleic Acids Res* **34**, W626-631 (2006).
41. Bostrom, J., *et al.* Variants of the antibody herceptin that interact with HER2 and VEGF at the antigen binding site. *Science* **323**, 1610-1614 (2009).
42. Walters, R.W., *et al.* Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* **110**, 789-799 (2002). 10
43. Coyne, C.B., Shen, L., Turner, J.R. & Bergelson, J.M. Coxsackievirus entry across epithelial tight junctions requires occludin and the small GTPases Rab34 and Rab5. *Cell Host Microbe* **2**, 181-192 (2007).
44. Schlegel, N., *et al.* Desmoglein 2-mediated adhesion is required for intestinal epithelial barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**, G774-783 (2010).
45. Mahoney, M.G., Simpson, A., Aho, S., Uitto, J. & Pulkkinen, L. Interspecies conservation and differential expression of mouse desmoglein gene family. *Exp Dermatol* **11**, 115-125 (2002).
46. Schafer, S., Koch, P.J. & Franke, W.W. Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp Cell Res* **211**, 391-399 (1994). 20
47. Green, S.K., Karlsson, M.C., Ravetch, J.V. & Kerbel, R.S. Disruption of cell-cell adhesion enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity: implications for antibody-based therapeutics of cancer. *Cancer Res* **62**, 6891-6900 (2002).
48. Wang, H., *et al.* Identification of CD46 binding sites within the adenovirus serotype 35 fiber knob. *J Virol* **81**, 12785-12792 (2007).
49. Keim, S.A., Johnson, K.R., Wheelock, M.J. & Wahl, J.K., 3rd. Generation and characterization of monoclonal antibodies against the proregion of human desmoglein-2. *Hybridoma (Larchmt)* **27**, 249-258 (2008). 30
50. Shayakhmetov, D.M., Papayannopoulou, T., Stamatoyannopoulos, G. & Lieber, A. Efficient gene transfer into human CD34(+) cells by a retargeted adenovirus vector. *J Virol* **74**, 2567-2583 (2000).
51. Gaggar, A., Shayakhmetov, D. & Lieber, A. Identifying functional adenovirus-host interactions using tandem mass spectrometry. *Methods Mol Med* **131**, 141-155 (2007).
52. Seppen, J., Barry, S.C., Harder, B. & Osborne, W.R. Lentivirus administration to rat muscle provides efficient sustained expression of erythropoietin. *Blood* **98**, 594-596 (2001). 40
53. Li, Z., *et al.* Toward a stem cell gene therapy for breast cancer. *Blood* **113**, 5423-5433 (2009).

## 【 0 1 8 1 】

## 【 数 5 】

54. Tuve, S., *et al.* Combination of tumor site-located CTL-associated antigen-4 blockade and systemic regulatory T-cell depletion induces tumor-destructive immune responses. *Cancer Res* **67**, 5929-5939 (2007).

## 【 0 1 8 2 】

## (実施例2)

ウイルスがデスモグレイン2と効率的に結合するためおよびその後の上皮の結合の開口のためには、アデノウイルス血清型3線維ノブドメインの多量体形成が必要である。

## 【0183】

## 要約

実施例1では、ヒト集団において広範に分布している血清型であるAd3を含めたB種アデノウイルス(Ad)の一群に対する主要な受容体として、デスモグレイン2(DSG2)を同定した。本実施例では、Ad3とDSG2の相互作用の構造的な詳細を説明することを試みた。CARと相互作用するAd血清型およびCD46と相互作用するAd血清型について、細胞への付着は、過剰な組換え線維ノブタンパク質によって完全に遮断することができ、一方、可溶性のAd3線維ノブでは、Ad3の感染は非効率的にしか遮断されない。Ad3内のDSG2相互作用ドメイン(複数可)はウイルス粒子に存在する空間的配置になければならないいくつかの線維ノブドメインによって形成されることが見いだされた。この発見に基づいて、Ad3線維ノブを含有する小さな組換え自己二量体形成性タンパク質を生成した(Ad3-K/S/Kn)。Ad3-K/S/KnはDSG2と高親和性で結合し、Ad3の感染を遮断した。共焦点免疫蛍光法および透過型電子顕微鏡分析により、Ad3-K/S/Knは、DSG2と結合することにより上皮細胞における一過性の細胞間結合の開口を誘発することが実証された。上皮細胞をAd3-K/S/Knで前処置することにより、上皮の結合に局在している、またはそれにより遮蔽されている受容体、例えば、CARまたはHer2/neuへの接近が増大した。Ad3-K/S/Knで処置することにより、密着結合からCARが解放され、したがって、血清型Ad5ベースのベクターによる上皮細胞への形質導入が増加する。さらに、Her2/neu陽性乳がん細胞をAd3-K/S/Knで前処置することにより、Her2/neu-ターゲティングモノクローナル抗体であるトラスツズマブ(ハーセプチン)によるがん細胞の死滅が増加した。この試験により、Adが、それらの受容体に対する高い結合活性および上皮組織への感染をどのように実現するかに関する本発明者らの理解が広がる。小さな組換えタンパク質Ad3-K/S/Knは、上皮がんの療法および正常な上皮組織への遺伝子/薬物送達に対する実用的な意味を有する。

## 【0184】

## 諸言

突出線維は、主要な付着受容体との親和性の高い結合を媒介するAdカプシド内の部分である。Adカプシドはそれぞれ、ペントンベースに連結した12個の線維を有する。線維はそれぞれ、ペントンベースの内部に繋ぎ止められている尾部ドメインと、-シート(異なる血清型において6から23までにわたる反復の数を有する)を形成する最大14アミノ酸の反復からなるシャフトドメインと、C末端のホモ三量体ノブドメインとからなる。CARと相互作用するAdおよびCD46と相互作用するAdに関して、ノブドメインは、受容体と高親和性で結合し、可溶性の線維ノブは感染を完全に遮断する。

## 【0185】

この試験では、Ad3とDSG2の相互作用の構造的な詳細を説明することを試みた。本発明者らは、DSG2と高親和性で結合するためにはAd3線維ノブの多量体(三量体)が必要であることを報告する。これは、CARと相互作用するAd血清型およびCD46と相互作用するAd血清型の、感染を実現するための戦略とは明確に異なる。このAd3-DSG2相互作用の特異的な方式は、それにより上皮の結合の開口が可能になるので、Ad3にとって機能的に重大である。

## 【0186】

## 材料および方法

タンパク質および抗体。組換えヒトDSG2タンパク質はLeinco Technologies, Inc. (St. Louis, MO) から入手した。組換えAd3線維は、他で記載されている通り、N末端の6-Hisタグを使用し、pQE30発現ベクター(Qiagen, Valencia, CA)を用いてE. coliにおいて産生させ、N

i - N T A アガロースクロマトグラフィーによって精製した ( 3 4 ) 。組換え A d 3 ペントン 1 2 面体 ( P t D d ) は、以前に記載されている通り昆虫細胞において産生させ、精製した ( 8 ) 。

#### 【 0 1 8 7 】

免疫蛍光法試験のために以下の抗体を使用した：ポリクローナルヤギ抗 D S G 2 ( R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN)、マウス m A b 抗 D S G 2 ( クローン 6 D 8 ) ( Cell Sciences, Canton, MA)、ウサギ抗 クローディン 7 ( a b c a m, Cambridge, MA)、F I T C と結合体化したヤギ抗 アデノウイルス ( M i l l i p o r e B i l l e r i c a, MA)、モノクローナル抗 6 x H i s ( S e r o t e c, M C A 1 3 9 6)、ウサギ抗 Z O - 1 抗体 ( C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y I n c., Beverly, MA)。精製された組換え A d 3 ノブに対するポリクローナルウサギ抗体は、P i c k C e l l L a b o r a t o r i e s B . V. ( A m s t e r d a m, T h e N e t h e r l a n d s ) によって作製された。モノクローナル抗 D S G 2 抗体である 2 0 G 1、7 H 9、1 3 B 1 1、1 0 D 2 および 8 E 5 ( 1 2 ) は、ハイブリドーマ培養物の上清から精製した。

10

#### 【 0 1 8 8 】

組換え A d 3 線維 ノブ。組換え A d 3 線維 ノブである S / K n、S 2 / K n、S 3 / K n、S 4 / K n、S 5 / K n、および S 6 / K n を、A d 3 ゲノム DNA を鋳型として用いた P C R によって生成した。次いで、P C R 産物を、B c l I / H i n d I I I 断片または B a m H I / H i n d I I I 断片として E . c o l i 発現ベクター p Q E 3 0 にクローニングした。以下のプライマーを使用した：

20

#### 【 0 1 8 9 】

##### 【 化 7 】

S6/Kn-フォワード：5'-CTGATGAATTCTTGATCAGGGGTTTAAAGTCTTAAATGTGTTAATCC-3' (配列番号33)

S5/Kn-フォワード：5'-TTACTGATGAATTCTTGATCA GGCTCCCTCCAACCTAAAGTGGGAAGTGGT-3' (配列番号34)

S4/Kn-フォワード：5'-TTACTGATGAATTCTGGATCC TTAGAAGAAAACATCAAAGTTAACAC-3' (配列番号35)

30

S3/Kn-フォワード：5'-TTACTGATGAATTCTGGATCC CATTCTATAAATTTACCAATAGGAAACGGT-3' (配列番号36)

S2/Kn-フォワード：5'-TTACTGATGAATTCTGGATCC AACAACTTTGCAGTAACTCGGAAATGG-3' (配列番号37)

S/Kn-フォワード：5'-ACCATCACGGATCCAATTCTATTGCACTGAA-3' (配列番号38)

全ての構築物に対するリバーズ：5'-AGCTAATTAAAGCTTAGTCATCTTCTCTAATAATAGG-3' (配列番号39)

#### 【 0 1 9 0 】

A d 3 線維 ノブを含有する K - コイルまたは E - コイルを生成するために、以下のオリゴヌクレオチドをアニーリングし、B a m H I 断片として p Q E 3 0 にクローニングした。

40

#### 【 0 1 9 1 】

## 【化8】

pQE30-Kcoil用：

5' ATCAAAGGTAAGCGCTTTAAAGGAGAAAGTTTCAGCACTTAAAGAAAAGGTATCCGCTTTAAAGGAGAAAGTTTCAGC  
ACTTAAAGAAAAAGTGCCGCTCTGAAAGAAG-3' (配列番号40)および

5' GATCCTTCTTTCAGAGCGGACACTTTTCTTTAAGTGTGAAACTTTCTCCTTTAAAGCGGATACCTTTTCTTTAAGT  
GCTGAAACTTTCTCCTTTAAAGCGCTTACCTTT-3' (配列番号41)

pQE30-Ecoil用

5' ATCAGAGGTAAGCGCTTTAGAGAAAGAAGTTTCAGCACTTGAGAAGGAGGTATCCGCTTTAGAGAAAGAAGTTTCAGC  
ACTTGAGAAGGAAGTGCCGCTCTGGAAAAAG-3' (配列番号42)および

5' GATCCTTTTTCAGAGCGGACACTTCCTTCTCAAGTGTGAAACTTTCTTCTCTAAAGCGGATACCTCCTTCTCAAGT  
GCTGAAACTTCTTCTCTAAAGCGCTTACCTCT-3' (配列番号43)

10

## 【0192】

Ad3-E/S2/KnおよびAd3-K/S2/Knを生成するために、以下のプライマーを使用した：

## 【0193】

## 【化9】

フォワード：

5' ATCTAGGATCCGGTGGCGTTCTGGCGGTGGCTCCGGTGGCGGTCTAACAACTTTGCAGTAACTCGGAAATGGTC  
TTACATTTGACT-3' (配列番号44)

20

リバーズ：5' AGCTAATTAAGCTTAGTCATCTTCTCTAATATAGG-3' (配列番号45)

## 【0194】

次いで、PCR産物を、pQE30-KcoilおよびpQE30-EcoilのBamHI/HindIII部位にクローニングした。

Ad3-E/S/KnおよびAd3-K/S/Knを生成するために、以下のプライマーを使用した：

## 【0195】

## 【化10】

30

フォワード：

5' TTATTGCTACTGGATCCGGTGGCGTTCTGGCGGTGGCTCCGGTGGCGGTCTAATTCTATTGCACTGAAAAATAACA  
C-3' (配列番号46)

リバーズ：5' AGCTAATTAAGCTTAGTCATCTTCTCTAATATAGG-3' (配列番号47)

## 【0196】

次いで、PCR産物を、pQE30-KcoilおよびpQE30-EcoilのBamHI/HindIII部位にクローニングした。

## 【0197】

40

細胞株。293 (Microbix、Toronto、Ontario、Canada)、HeLa (American Type Culture Collection、ATTC) を、10%のウシ胎仔血清 (FCS)、2 mmol/LのL-グルタミン (Glu)、100 ユニット/mLのペニシリン、および100 μg/mLのストレプトマイシン (P/S) を補充したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中で培養した。BT474-M1細胞 (16) を、10%のFBS、1%のPen/StrepおよびL-グルタミンを伴うDMEM/F:12中で培養した。結腸がんT84細胞 (ATCC CCL-248) を、Ham's F12培地とDMEMの1:1混合物、10%のFBS、GluおよびP/S中で培養した。細胞の極性化を実現するために、T84細胞  $1.4 \times 10^5$  個を6.5 mmのTranswellインサート (孔サイズ0.4 μm) (Co

50

star Transwell Clears) 内で、経上皮抵抗性が安定するまで 21 日以上培養した。

#### 【0198】

アデノウイルス。Ad の繁殖、メチル - <sup>3</sup>H チミジンによる標識、精製および力価決定を他で記載されている通り実施した (31)。Ad5 / 35 - GFP および Ad5 - GFP は、Ad35 線維および Ad5 線維と CMV - GFP 発現カセットとを含有する Ad5 ベクターである (24)。Ad3 - GFP は、E3 領域に CMV - GFP 発現カセットを挿入した野生型 Ad3 ベースのベクターである (33)。Ad5 / 3L - GFP および Ad5 / 3S - GFP は、E1 / E3 が欠失した Ad5 ベースのベクターであり、同じ CMV - GFP 発現カセットが E3 領域に挿入されている。キメラ Ad ベクターの構築は、以前に記載されているプロトコールに従った (23)。キメラ線維遺伝子を構築するために使用したプライマー配列は以下の通りである：Ad5 / 3L - GFP 用

#### 【0199】

#### 【化11】

SF (5'-GACACGGAACCGGTCCTCCAACCTGTGCCTTTTCTTACTCC-3') (配列番号48)

、SR (5'-GCAGTTGGCTTCTGGTTTTGGACCTGTCCACAAAGTTAGCTTATCATTATTTTGTTC-3') (配列番号49)、KF (5'-GGAAACAAAAATAATGATAAGCTAACTTTGTGGACAGGTCCAAAACGAGCAACTGC-3') (配列番号50)、KR (5'-TGAAAAATAAACACGTTGAAACATAACACAACCTAGTTCTTTATTCTTGGGCATTTAGTCATCTTCTAATATAGGAAAAGGTAAATG-3') (配列番号51)、R1 (5'-CATTTACCTTTTCCTATATTAGAGAAGATGACTAAAATGCCCAAGAATAAAGAACTAGTTGTGTTATGTTCAACGTGTTTATTTTCA-3') (配列番号52) および R2 (5'-ATACTTAGGGTACCAATCGATATGGCCACGTGGGTTCTGTGGTCCC-3') (配列番号53)。Ad5/3S-GFP用、SF (5'-ACGGAACCGGTCCTCCAACCTGTGCCTTTTCTTACTCCTCCCTTTGTATCCCCCAATGGGTTTCAAGAGAGTCCCCCTGGGGTTTAAAGTCTTAAATGTG-3') (配列番号54)、KR (5'-GAAAATAAACACGTTGAAACATAACACACTCGAGTCTTTATTCTTGGGCATTTTAGTCATCTTCTAATATAGGAAAAGGTAAATG-3') (配列番号55)、R1 (5'-CATTTACCTTTTCCTATATTAGAGAAGATGACTAAAATGCCCAAGAATAAAGACTCGAGTGTGTTATGTTCAACGTGTTTATTTTC-3') (配列番号56) および R2 (5'-ATACTTAGGGTACCAATCGATATGGCCACGTGGGTTCTGTGGTCCC-3') (配列番号57)。

#### 【0200】

SpeI 制限部位または XhoI 制限部位を、それぞれ Ad5 / 3L - GFP または Ad5 / 3S - GFP についての線維終止コドンの後ろに導入した。全長の E1 / E3 を欠失したベクターゲノムを生成するために、対応する、キメラ線維遺伝子および GFP 発現カセットを含有するシャトルプラスミドを、E.coli 株 BJ1583 において相同組換えによって pAdHM4 に挿入した。生じたプラスミド pAd5 / 3L - GFP および pAd5 / 3S - GFP を制限分析および配列決定によって分析した。対応するウイルスを作製するために、以前に記載されている通り、pAd5 / 3L - GFP および pAd5 / 3S - GFP を PacI で消化してウイルスのゲノムを放出させ、293 細胞にトランスフェクトした。組換えウイルスを 293 細胞において繁殖させ、標準の方法によって精製した。

#### 【0201】

260nm における光学濃度 (OD<sub>260</sub>) を測定することによって分光光度法で Ad 粒子 (ウイルス粒子、VP) 濃度を決定し、他で記載されている通り、293 細胞を使用してブラーク力価決定 (ブラーク形成単位、pfu) を実施した (24)。全てのウイルス調製物について VP と pfu の比は 20 : 1 であった。

#### 【0202】

付着および形質導入アッセイ。Versene と一緒にインキュベートすることによって接着性細胞を培養皿から引き離し、PBS で洗浄した。チューブ当たり合計 1.8 × 10<sup>5</sup> 個の細胞を、<sup>3</sup>H で標識した Ad を細胞当たり 8,000 VP の感染多重度 (MOI) で含有する氷冷の接着緩衝液 100 μl に再懸濁させた。4 で 1 時間インキュベートした後、細胞をペレットにし、氷冷の洗浄緩衝液 (PBS、1% FBS) 0.5 ml で 2



回洗浄した。最後の洗浄後、上清を除去し、シンチレーション計数器を用いて細胞に伴う放射活性を決定した。細胞当たりの結合したウイルス粒子 (VP) の数を、ピリオンに特異的な放射活性および細胞の数を用いることによって算出した。競合試験のために、競合剤 (PtDd、線維ノブ、抗体)  $4.5 \mu\text{g}$  を接着緩衝液中、4 で60分にわたり付着させ、細胞をPBSで2回洗浄することによって結合していない競合剤を除去した後、細胞を、 $^3\text{H}$ で標識したAdを含有する付着緩衝液に再懸濁させた。形質導入試験のために、細胞を、示されているMOIで1時間にわたってAdベクターに曝露させ、洗浄し、18時間後に、細胞20,000個におけるGFPの発現をフローサイトメトリーによって測定した。

#### 【0203】

Ad5感染試験。HeLaの形質導入試験の全てにおいて、形質導入の線形範囲内に入るように以前に最適化されている条件 (MOI、ウイルス濃度、曝露時間) を用いた (33)。

#### 【0204】

ウェスタンブロット: Mini-PROTEANプレキャストゲル (BIO-RAD、Hercules、CA) を、4~15%勾配のポリアクリルアミドを用いて使用した。図2Bに示されている試験のために、合計  $0.5 \mu\text{g}$  のタンパク質を2xローディング緩衝液 (10 mMのトリス-HCl、pH 6.8、200 mMのDTT、4%のSDS、20%のグリセロール、0.2%のプロモフェノールブルー) と混合した。試料を、5分間煮沸 (B) するか、または煮沸せずに (UB) ローディングするかした。以下のランニング緩衝液を使用した: 25 mMのトリス、0.192 Mのグリシン、0.1%のSDS、pH 8.3。以前に記載されている通り、電気泳動した後、タンパク質をニトロセルロースに転写し、抗DSG2抗体または抗Ad3ノブ抗体と一緒にインキュベートした (33)。

#### 【0205】

ネイティブなポリアクリルアミドゲル電気泳動: 図2Fに示されている試験のために、合計  $0.4 \mu\text{g}$  のタンパク質を2x試料緩衝液 (62.5 mMのトリス-HCl、pH 6.8、40%のグリセロール、0.01%のプロモフェノールブルー) 中に混合し、煮沸せず、25 mMのトリス、pH 8.3、0.192 Mのグリシン中に流した。

#### 【0206】

浸透性アッセイ。合計  $5 \times 10^5$  個のT84細胞を、12 mmのtranswellインサート (PET膜、孔サイズ  $0.4 \mu\text{m}$  (Corning、NY) に播種し、経上皮抵抗性が安定するまで > 20日間培養した。培地を2~3日ごとに交換した。細胞を接着培地 (DMEM、1% FBS、2 mMのMgCl<sub>2</sub>、20 mMのHEPES) 中のDSG2リガンド ( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) に室温で15分間曝露させた。次いで、DMEM/K12培地で希釈した1 mCiの [ $^{14}\text{C}$ ] ポリエチレングリコール-4000 (PEG-4000); (Perkin Elmer、Covina CA) を内部チャンバーに加えた。15分の時点および30分の時点で内部チャンバーおよび外側のチャンバーから培地の一定分量を採取し、シンチレーション計数器によって測定した。浸透性を他で記載されている通り算出した (36)。

#### 【0207】

トラスツズマブ細胞毒性アッセイ。ウェル当たり  $5 \times 10^4$  個のBT474-M1細胞を、96ウェルプレートに3連で播種し、集密になるまで成長させた。Ad3線維ノブまたはモノクローナル抗体 ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を内部チャンバーに加えた。1時間後、トラスツズマブ (Genentech、San Francisco、CA) ( $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を加え、2時間後にWST-1アッセイ (Roche、San Francisco、CA) によって細胞の生存率を測定した。3回の独立した試験を実施した。

#### 【0208】

免疫蛍光分析。8つのチャンバーガラススライド (BD Falcon) において細胞を培養し、氷冷のPBSで2回洗浄し、次いで、メタノール/アセトン (1:1 vol /

10

20

30

40

50

v o l ) を用いて 4 で 15 分間、または 4 % のパラホルムアルデヒドを用いて 4 で 30 分間、固定した。固定した後、細胞を P B S で 2 回洗浄し、500  $\mu$  l の P B S / 2 % の粉乳を用いて室温で 20 分間遮断した。抗体染色を、100  $\mu$  l の P B S 中、37 で 90 分間または 4 で一晩実施した。必要であれば、P B S を用いて室温で 45 分にわたって 3 回洗浄した後に、適切な宿主を対象とする二次抗体を適用した。P B S で 3 回洗浄した後、D A P I を伴う V E C T A S H I E L D ( V e c t o r L a b s ) を用いてガラススライドをマウントした。L e i c a D F C 300 F X デジタルカメラを用いて写真を取得した。Z e i s s M E T A 共焦点顕微鏡で、40  $\times$  油浸レンズ ( o i l l e n s ) または 100  $\times$  油浸レンズおよび Z e i s s 510 ソフトウェア ( Z e i s s M i c r o I m a g i n g , T h o r n w o o d , N Y ) を使用して共焦点像を取得した。

10

#### 【0209】

電子顕微鏡。T r a n s w e l l チャンバー内の極性細胞を、半強度カルノフスキー固定液 ( 2 % のパラホルムアルデヒド、2.5 % のグルタルアルデヒド、0.2 M のカコシル酸緩衝液 ) を用いて室温で 1 時間にわたって固定した。内部チャンバー内の固定液は、0.2 % のルテニウムレッドを含有した。ルテニウムレッド ( 塩化ルテニウム ( I I I ) 酸化物、アンモニア処理されている ) は、A l f a A e s a r ( W a r d H i l l , M A ) から購入した。1 % の O s O <sub>4</sub> - リン酸緩衝液を用いた後固定を行った。次いで、T r a n s w e l l チャンバーから膜を切り取り、M e d c a s t ( T e d P e l l a , R e d d i n g , C A ) 中に包埋した。超薄切片を酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で染色した。加工した格子を J E O L J E M 1200 E X I I 透過形電子顕微鏡を用いて評価した。O l y m p u s S I S M o r a d a デジタル C C D カメラを用いて画像を獲得し、画像を加工するために i T E M ソフトウェアを使用した。

20

#### 【0210】

s i R N A 試験。D S G 2 特異的 s i R N A のセットは、D h a r m a c o n ( T h e r m o S c i e n t i f i c ) によって合成された。標的配列は、C A A U A U A C C U G U A G U A G A A ( 配列番号 29 )、G A G A G G A U C U G U C C A A G A A ( 配列番号 30 )、C C U U A G A G C U A C G C A U U A A ( 配列番号 31 ) および C C A G U G U U C U A C C U A A A U A ( 配列番号 32 ) であった。対照 s i R N A は、Q i a g e n 、V a l e n c i a 、C A から購入した。H y p e r F e c t トランスフェクション試薬 ( Q i a g e n ) を使用して s i R N A トランスフェクションを実施した。合計 1  $\times$  10<sup>5</sup> 個の H e L a に、1  $\mu$  g の D S G 2 s i R N A または対照 s i R N A をトランスフェクトした。s i R N A をトランスフェクトした 48 時間後、上記の通り v e r s e n e を用いて細胞を収集し、<sup>3</sup> H - A d 3 ウイルスまたは <sup>3</sup> H - A d 35 ウイルスの付着を分析した。s i R N A をトランスフェクトした 48 時間後、細胞を、A d ベクターを 50 p f u / 細胞の M O I で用いて感染させ、18 時間後に G F P の発現を分析した。

30

#### 【0211】

表面プラズモン共鳴 ( S P R ) 分析。B I A c o r e X 機器で取得を行った。全ての実験において、2 m M の C a C l <sub>2</sub> を補充した H B S - N ( G E - H e a l t h c a r e , P i t t s b u r g h , P A ) をランニング緩衝液として、毎分 5  $\mu$  l の流速で使用した。D S G 2 ( L e i n c o T e c h n o l o g y , I n c . ) を 10 m M の酢酸ナトリウム緩衝液、p H 4.2 中に 0.1  $\mu$  g / m l に希釈し、E D C - N H S で活性化したフローセルに 10 分間注入して C M 4 センサーチップ ( B I A c o r e ) への固定化を行った。対照フローセルを、エチル ( ジメチルアミノプロピル ) カルボジイミド ( E D C ) / N - ヒドロキシスクシンイミド ( N H S ) によって活性化し、エタノールアミンによって不活化した。異なる濃度の A d 3 線維ノブまたは P t D d を 5 分間の会合、その後 3 分の解離時間で注入し、シグナルをエタノールアミンにより非活性化した E D C - N H S フローセルのバックラウンドから自動的に差し引いた。

40

#### 【0212】

ビオチン化したリガンドを用いた実験のために、C M 4 センサーチップの 2 つのフローセルを上記の通り活性化し、次いで、ストレプトアビジン ( 酢酸緩衝液中 0.1  $\mu$  g / m

50

1、pH 4.1) を5分間にわたって注入することによってコーティングした。次いで、ビオチン化したりガンドをこれらの2つのフローセルのうちの一方のランニング緩衝液中に0.1 μg/mlで5分間にわたって注入し、他方は、実行中のバックグラウンド除去のために使用した。次いで、これらのフローセル上のランニング緩衝液中に異なる濃度の可溶性のDSG2を注入し、バックグラウンドを自動的に差し引いた。

#### 【0213】

陰性染色電子顕微鏡法。組換え線維ノブタンパク質を陰性染色EMによって可視化して、それらの組立ての状態を評価した。標準の雲母/炭素調製物を、タンパク質を0.1 mg/mlで用いて使用した。1% (w/v) ケイタングステン酸ナトリウム (pH 7.0) を使用して試料を染色し、Philips CM12電子顕微鏡において100 kVで可視化した。

10

#### 【0214】

統計分析：結果は全て、平均 + / - SDとして表されている。適用可能な場合にはウィルコクソンの符号順位検定を適用した。p値 < 0.05を有意とみなした。

#### 【0215】

##### 結果

Ad3線維を含有するキメラAd5ベクターは受容体としてDSG2を使用する。本発明者らの予備試験により、Ad3内のDSG2相互作用ドメイン(複数可)はウイルス粒子に存在する空間的配置にある線維または線維/ペントンのみ、すなわち、Ad3ピリオンまたはPtDdによって形成されることが示された。DSG2との結合におけるAd3ペントンの(PtDdに存在する)の潜在的な役割を評価するために、Ad3線維を含有するが、他のカプシドタンパク質(ペントンを含む)は全てAd5に由来するAdベクター(Ad5/3S-GFP)を生成した。Ad3線維シャフトが、Ad3-DSG2相互作用において極めて重要な役割を有する、例えばDSG2が追加的な結合部位を含有するかどうかを評価するために、Ad3シャフトをAd5シャフトで置換したキメラAd5/3ベクターも生成した(Ad5/3L-GFP)(図9A)。特に、Ad3線維シャフトは6個のシャフト反復モチーフを含有するが、一方Ad5シャフトはそれよりも長く、22個のシャフトモチーフを含有する。比較のために、Ad5/3ベクター(33)と同じGFP発現カセットを含有するAd3ベクター(Ad3-GFP)を使用した。Ad5/3S-GFPベクターおよびAd5/3L-GFPベクターが、感染するためにDSG2を使用するかどうかを分析した。<sup>3</sup>Hで標識したAdベクターのHeLa細胞への付着は、組換えDSG2タンパク質により、Ad3-GFP、Ad5/3S-GFP、およびAd3/5L-GFPに対してと同じ程度で遮断された(図9B)。予測通り、HeLa細胞を感染させた18時間後にGFP強度に基づいて測定したところ、この3種のベクター全ての形質導入も組換えDSG2によって遮断された(図9C)。Adピリオン内のDSG2相互作用ドメインに対する競合剤として使用したPtDdにより、Ad3-GFP、Ad5/3S-GFP、およびAd3/5L-GFPの形質導入が同様のレベルで遮断された(図9D)。Ad3ベクターおよびAd5/3ベクターの感染におけるDSG2の極めて重要な役割を証明するために、HeLa細胞にDSG2 mRNAに特異的なsiRNAまたは対照siRNAをトランスフェクトした。siRNAをトランスフェクトした48時間後のDSG2の平均蛍光強度は、DSG2 siRNAをトランスフェクトしたHeLa細胞および対照siRNAをトランスフェクトしたHeLa細胞について、それぞれ22.1および19.5であり、これは、DSG2の発現がDSG2 siRNAにより効率的に阻害されることを示している。DSG2 mRNAをノックダウンすることにより、Ad3-GFP、Ad5/3S-GFP、およびAd3/5L-GFPの形質導入が有意に減少した(P < 0.001)(図9E)。興味深いことに、DSG2をノックダウンすることにより、Ad5/3L-GFPの形質導入が、Ad3線維を含有するベクター(Ad3-GFPおよびAd5/3S-GFP)の形質導入よりも低い程度(P < 0.01)で減少した。Ad5/3L-GFPは、DSG2以外の受容体を使用し得ることが推測される。総合すると、これらの試験では、i) Ad5/3ベクターが受容体としてD

20

30

40

50

S G 2を使用することを示す。これは、A d 5 / 3 ベクターは患者に使用されているので ( 1 4、3 5 ) 臨床試験に対して意味を有する、および i i ) A d 3 の D S G 2 相互作用ドメインは、線維内に位置する。A d ペントン ( P t D d または A d 5 ビリオンおよび A d 3 ビリオン内にある ) は、ただ単に、A d 3 線維ノブと D S G 2 の相互作用のための空間的配置を補正するための足場をもたらすだけだと思われる。

#### 【 0 2 1 6 】

D S G 2 と効率的に結合するには、A d 3 線維ノブの架橋が必要である。本発明者らは、次いで、A d 3 線維に着目した。E . c o l i において、線維ノブを含有し、A d 3 シャフトの反復の数が増加した ( 1 ~ 6 の反復 ) 一連の組換え A d 3 線維ノブタンパク質を産生させた ( 図 1 0 A )。D S G 2 または抗 A d 3 線維ノブ抗体を用いたウエスタンブロット分析により、全ての組換え線維ノブが三量体を形成したことが示された ( 図 1 0 B、C )。以前に観察された通り ( 3 3 )、A d 3 線維ノブ + 1 つのシャフトドメイン ( S / K n ) はウエスタンブロット分析において D S G 2 と結合せず、これは、A d 3 ノブコンフォメーションに対するシャフトモチーフの立体的な影響の可能性を示している。6 個のシャフトモチーフを含有するタンパク質 ( S 6 / K n ) は、凝集体を形成する傾向があり、したがって、さらなる試験では使用しなかった。競合試験において使用した場合、全ての組換え線維ノブタンパク質により、A d 3 - G F P の形質導入が P t D d よりも有意に低く阻害された ( 図 1 0 D、E )。次いで、A d 3 線維ノブの二量体形成により、D S G 2 との結合が増加するかどうかを試験することを試みた。全ての組換え線維ノブは N 末端の H i s タグ ( タンパク質を精製するために使用する ) を含有したので、A d 3 線維ノブと、H i s タグに対する抗体を混合してそれらの架橋を実現した。ネイティブなポリアクリルアミドゲルにおける電気泳動により抗 H i s タグ抗体と線維ノブとの間の複合体の形成が実証された ( 図 1 0 F )。抗 H i s 抗体と架橋結合した線維ノブを競合剤として使用した場合、A d 3 - G F P の形質導入の有意な阻害 ( 対照 I g G と混合した線維ノブと比較して ) が観察され ( 図 1 0 G )、これは、D S G 2 と結合するためには A d 3 線維ノブの二量体が必要であることを示唆している。これは、A d 3 5 線維ノブと抗 H i s 抗体の架橋は、C D 4 6 と相互作用するベクターである A d 3 5 - G F P による感染には影響を及ぼさなかったため、A d 3 に独特の新しい A d 結合戦略であると思われる ( 図 1 0 H )。

#### 【 0 2 1 7 】

A d 3 線維ノブ二量体は A d 3 の感染を遮断する。抗体と架橋することにより、含有するシャフトモチーフが野生型 A d 3 線維ノブよりも少ない A d 3 線維ノブの遮断効果が増強された。A d 3 線維ノブを結合開口薬として治療に適用する可能性のために、さらなる試験の焦点を、最小数のシャフトモチーフを有する線維ノブ変異体、すなわち、S 2 / K n を評価することによって分子のサイズを縮小することに合わせた。線維ノブの架橋により D S G 2 との結合が増加したという所見に基づいて、二量体形成ドメインを組み入れることによって S 2 / K n の二量体を生成した。E . c o l i において産生される間の自然発生的な線維ノブ二量体形成および潜在的な封入体の形成を回避するために、高親和性で互いと相互作用する E - コイルペプチドと K - コイルペプチドとからなるヘテロ二量体系を利用した ( 1 7 )。それぞれ E V S A L E K ( 配列番号 2 2 ) ( K - コイル ) の 5 つの反復および K V S A L K E ( 配列番号 2 3 ) ( E - コイル ) の 5 つの反復を含有する 2 つの線維ノブ変異体、後ろに 2 つのシャフトモチーフが続く G / S リッチ柔軟性ドメインおよびホモ三量体の線維ノブドメインを生成した ( 図 1 1 A )。A d 3 - K / S 2 / K n および A d 3 - E / S 2 / K n を別々に E . c o l i において産生させ、親和性クロマトグラフィーによって精製した。二量体形成させるために、精製されたタンパク質の両方を 1 : 1 の濃度比で混合した。A d 3 - K / S 2 / K n と A d 3 - E / S 2 / K n の混合物により、P t D d と同様の効率で A d 3 の感染が遮断された ( 図 1 1 B )。興味深いことに、A d 3 - K / S 2 / K n 単独では両方のペプチドの混合物と同じ競合強度があるが、一方 A d 3 - E / S 2 / K n 単独では、感染は非効率的にしか遮断されなかった。これは、A d 3 - K / S 2 / K n はホモ二量体化することができるが、A d 3 - E / S 2 / K n は

ホモ二量体化することができないことを示唆している。この裏付けにおいて、抗H i s抗体とさらに架橋することにより、A d 3 - E / S 2 / K nの遮断効果が増大するが( P < 0 . 0 5 )、A d 3 - K / S 2 / K nの遮断効果は増大しないことが見いだされた( 図 1 1 C )。

#### 【 0 2 1 8 】

最小の二量体A d 3 線維ノブタンパク質とD S G 2の結合。次いで、K - コイル二量体形成ドメインまたはE - コイル二量体形成ドメイン、ただ1つのシャフトモチーフ、およびホモ三量体のA d 3 線維ノブを含有する最小のA d 3 線維ノブ二量体( A d 3 - K / S / K nおよびA d 3 - E / S / K n )を作製することを試みた( 図 1 2 A )。そのようなタンパク質はサイズがより小さいので、血管からの放出、組織への浸透において潜在的な治療上の利点を有し、理論的に、含有する免疫原性エピトープも少ない。A d 3 - K / S / K nおよびA d 3 - E / S / K nをE . c o l iにおいて産生させ、親和性クロマトグラフィーによって精製した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析により、A d 3 - K / S / K nおよびA d 3 - E / S / K nの大部分が三量体( 約6 5 ~ 7 0 k D a )として存在していたことが示された( 図 1 2 B )。A d 3 - K / S / K n単独、およびA d 3 - E / S / K nとの組み合わせを陰性染色電子顕微鏡検査によって分析して、それらの組立ての状態を評価した( 図 1 2 C )。A d 3 - K / S / K nおよびA d 3 - K / S / K n + A d 3 - E / S / K nの両方について線維ノブの二量体およびその凝集体が見いだされたが、より大きな凝集体は、A d 3 - K / S / K n調製物のほうが少なかった。A d 3 - K / S / K nとA d 3 - K / S / K n + A d 3 - E / S / K nのどちらによっても、A d 3のH e L a細胞への付着がP t D dに匹敵するレベルで遮断された( 図 1 2 D )。H e L a細胞をA d 3 - K / S / K nと一緒にプレインキュベートすることおよびA d 3 - K / S / K n + A d 3 - E / S / K nと一緒にプレインキュベートすることは、A d 5の付着に影響を及ぼさなかった( 図 1 2 E )。予測通り、A d 3 - K / S / K nおよびA d 3 - K / S / K n + A d 3 - E / S / K nによっても、A d 3の感染が効率的に阻害された( 図 1 2 F、G )。線維ノブと2つのシャフトモチーフおよび1つのシャフトモチーフを並べた比較では、それらのA d 3の感染を遮断する能力に有意差は示されなかった( 図 1 2 H、I )。

#### 【 0 2 1 9 】

二量体A d 3 線維ノブとD S G 2の結合のS P R分析。A d 3 - K / S / K nおよびA d 3 - K / S / K n + A d 3 - E / S / K nの、D S G 2との相互作用をより詳細に試験するために、表面プラズモン共鳴( S P R )試験を実施した。最初に、結合実験を設計し、D S G 2分子を、固定化した線維ノブと結合させた( 図 1 3 A )。固定化するために、線維ノブをビオチン化し、ストレプトアビジンを介してセンサーチップに連結させた。動力学分析により、A d 3 - K / S / K nおよびA d 3 - K / S / K n + A d 3 - E / S / K nはどちらもD S G 2を同様に認識し、注入の終わりの時点の解離は少なかったことが示された。明確に、可溶性のD S G 2と線維の結合は、細胞表面とウイルスの間の生理的相互作用を不十分にしか模倣しない。したがって、受容体であるD S G 2をセンサーチップ表面に固定化し、A d 3 - K / S / K nおよびA d 3 - K / S / K n + A d 3 - E / S / K n、および比較のためにP t D dおよび( 単量体の ) A d 3 線維ノブを同様のS P R反応を生じる濃度で注入した( 図 1 3 B )。これらの試験の転帰は線維ノブの数価に依存するはずであり、数価は、A d 3 線維ノブ( 単量体 )については三量体、A d 3 - K / S / K nおよびA d 3 - K / S / K n + A d 3 - E / S / K nについては2 × 三量体、P t D dについては1 2 × 三量体である。これは、P t D d内の全ての線維が同時にD S G 2と相互作用し得るわけではないという事実により、さらに複雑になる。線維ノブ二量体の会合は同様であったが( 図 1 3 C 「会合終了時の結合」 )、解離挙動には明白な差異があった。A d 3 線維ノブ( 非二量体形成性、以前に記載されている( 3 3 ) ) ( 「A d 3 ノブ」 ) は、他の3 種のリガンドよりも速く解離した。P t D dおよびA d 3 - K / S / K n + A d 3 - E / S / K nについては、解離はほとんど見られなかった。A d 3 - K / S / K nの解離は、A d 3 線維ノブの解離とA d 3 - K / S / K n + A d 3 - E / S / K n

の解離の間であった。複雑ではあるが、これらのデータは、二量体の  $Ad3 - K / S / Kn$  および  $Ad3 - K / S / Kn + Ad3 - E / S / Kn$  が、 $Ad3$  線維ノブよりもゆっくりと  $DSG2$  から解離することを明確に示している。これは、結合活性機構、つまり、 $Ad3 - K / S / Kn$  および  $Ad3 - K / S / Kn + Ad3 - E / S / Kn$  がいくつかの  $DSG2$  分子と結合すること；全体的な低解離速度および高度に安定な付着の実現を可能にする機構によって説明することができる。特に、 $Ad3 - K / S / Kn + Ad3 - E / S / Kn$  内の全ての二量体が  $Ad3 - K / S / Kn$  によって形成される可能性があるが、それは解離速度の差異により反証される。これを詳細に証明するために、さらなる試験が必要である。

#### 【0220】

10

$Ad3$  といくつかの  $DSG2$  分子の相互作用は、上皮細胞の免疫蛍光分析によって裏付けられる（図13DおよびE）。Cy3で標識した  $Ad3$  ビリオンを使用したこれらの試験により、1つのビリオンがその周りのいくつかの  $DSG2$  タンパク質を群がらせることが示唆される。後で概説している通り、本発明者らは、この特異的な受容体が群がることは、細胞内シグナル伝達および上皮の結合の開口を誘発することに関して機能的な重要性を有するという仮説を立てている。特に、実施例1において、 $PtDd$  と  $DSG2$  が結合することにより、上皮細胞において上皮間葉転換（EMT）が誘発され、それにより一過性の細胞間結合の開口がもたらされることが示された。

#### 【0221】

20

多量体の  $DSG2$  リガンド（ $Ad3$  ビリオン、 $PtDd$ 、 $Ad3 - K / S / Kn$ ）により上皮の結合の開口が誘発される。上皮細胞は、いくつかの細胞間結合（密着結合、接着結合、ギャップ結合、およびデスモソーム）を維持し、その特徴は、多くの場合、上皮内がんおよびがん細胞株において保存されている（29）。図14Aは、極性結腸がんT84細胞の共焦点免疫蛍光顕微鏡画像を示す。側方からの細胞、すなわち、積み重なったXZ層の細胞が示されている。細胞間結合は、接着結合タンパク質であるクローディン7およびデスモソームタンパク質である  $DSG2$  がマーカーとなる長い垂直方向の筋として目に見える。 $DSG2$ （緑色）はクローディン7シグナルの頂端に局在する。密着結合タンパク質であるZO-1は、 $DSG2$  のさらに頂端に見いだすことができる（下のパネル）。後者は、XY画像においても可視化され、頂端の細胞表面のZO-1がマーカーとなる密着結合の「金網」ネットワークを示し、一方、1  $\mu m$  深部の切片は、 $DSG2$  染色を示す（図14B）。重要なことに、T84細胞を  $Ad3 - K / S / Kn$  に曝露させることにより、上皮の結合の部分的な溶解が誘発され、これは、無処置の細胞と比較して（図14A、下のパネル） $DSG2$  およびZO-1に対する染色が減少する（図14C）ことに反映される。

30

#### 【0222】

$Ad3 - K / S / Kn$  による上皮の結合の開口を、電子顕微鏡（EM）試験によってさらに確認した。無処置の上皮細胞のEM画像は、頂端に適用された色素であるルテニウムレッドが側底の空間には入れないことによって判定されるインタクトな密着結合およびデスモソーム結合を示す（図14D、左側のパネル）。この色素は、細胞膜表面に沿った高電子密度の線として現れる。上皮細胞を  $Ad3 - K / S / Kn$  と一緒にインキュベートすることにより、 $Ad3 - K / S / Kn$  を加えてから1時間以内にルテニウムレッドが側方への空間に深く漏出する（図14D、右側のパネル）。図14Eでは、 $Ad3 - K / S / Kn$  で処置した細胞においてデスモソームの部分的な分解（矢印によって示されている）がはっきり目に見える。 $Ad3 - K / S / Kn$  に加えて、 $Ad3$  ビリオン、 $PtDd$ 、および  $Ad3 - K / S / Kn + Ad3 - E / S / Kn$  を用いた共焦点免疫蛍光法およびEM試験において上皮の結合の開口が観察された（データは示していない）。細胞を  $Ad3$  線維ノブ（非二量体形成性）または  $Ad3 - E / S / Kn$ 、すなわち、多量体形成することができない  $DSG2$  リガンドに曝露させることは上皮の結合に影響を及ぼさなかった（データは示していない）。これらの試験は、上皮の結合の開口には  $Ad3$  線維ノブの二量体または多量体が必要であることを示している。

40

50

## 【0223】

ルテニウムレッドを用いた漏出試験に加えて、3つの機能アッセイを用いてAd3-K/S/Knによる上皮の結合の開口を実証した：i) <sup>14</sup>C-PEG-4000貫流(transflux)試験によって示されている通り、分極上皮細胞をAd3-K/S/Knに曝露させることにより、30分以内に経上皮の浸透性が増加した(図15A)。重要なことに、非二量体形成性Ad3-E/S/Kn線維ノブまたはDSG2の細胞外ドメインの種々の領域に対するmAbと一緒にインキュベートした後の浸透性は、Ad3-K/S/Knと一緒にインキュベートした後の浸透性よりも>5分の1低かった。ii) 以前の試験により、極性乳がんBT474-M1細胞において、ハーセプチン/トラスツズマブの標的であるHer2/neuが上皮の結合内に閉じ込められていること、およびBT474-M1細胞をAd3のPtDdと一緒にインキュベートすることにより、Her2/neuへの接近が増大し、トラスツズマブによるがん細胞の死滅が増加することが示された(33)。本発明では、このアッセイを用いて、追加的なDSG2リガンドのトラスツズマブの細胞傷害性に対する効果を試験した(図15B)。Ad3-K/S/Knにより、トラスツズマブによるBT474-M1細胞の死滅が有意に増加したことが見いだされた。対照的に、二量体を形成することができないDSG2リガンド、すなわち、Ad3-E/S/Knおよび一連の抗DSG2抗体は、トラスツズマブによる死滅に対して有意な効果を有さなかった。特に、細胞外ドメイン3/4に対する抗DSG2抗体の1つ(mAb 6D8)が腫瘍細胞の増殖を刺激すると思われた。iii) Ad5に対する受容体であるCARは極性T84上皮細胞の密着結合内に局在する(3)。これは、T84細胞の共焦点免疫蛍光顕微鏡によって示されている(図15C、上のパネルおよび図15D、上のパネル)。これらの細胞をAd3-K/S/Knと一緒にインキュベートすることにより、CAR染色が著しく増加し、今では側膜に沿って(図15C、下のパネル)および細胞表面に(図15D、下のパネル)現れている。これは、密着結合が分解し、T84細胞の頂端側に適用されたCARが抗CAR抗体へより接近しやすくなった結果であると推測された。密着結合の破壊およびCARの接近しやすさについての別の潜在的なアッセイは、CAR-ターゲティングAdベクターを形質導入することである。極性T84細胞(頂端側)にAd5-GFPを細胞当たり250pfuのMOIで感染させることにより、細胞の8(+/-2)%が形質導入された(感染の20時間後に計数されたGFP陽性細胞に基づく)(図15E)。Ad5-GFPをAd3-K/S/Knの存在下で感染させることにより、38(+/-9)%のGFP-陽性細胞がもたらされた。希釈緩衝液またはAd3-K/S/Knの存在下では、それぞれ、T84細胞の17(+/-6)%または68(+/-17)%にAd3-GFPが形質導入された。後者は、以前の試験と一致し、Ad3が、Ad5よりも効率的に分極上皮細胞に感染することを示している(28)。これは、そのDSG2と結合し、結合開口を誘発する能力に起因する可能性が最も高い。Ad3-K/S/Knにより、Ad3-GFPの形質導入が増加した。比較的小さなAd3-K/S/Knタンパク質およびその高濃度が、Ad3ピリオンよりも多くのDSG2受容体に最初に到達し、したがって、密着結合の開口を増強することが推測される。図15Eに示されている全ての設定において、単層の周辺にある細胞(すなわち、密着結合せずに内部チャンバーの壁と接触している細胞)の大部分がGFP陽性であった。したがって、transwellの中央の領域にあるGFP陽性細胞を計数した。後者は、希釈緩衝液またはAd3-K/S/Knの存在下でAd5-GFPを感染させた後のGFPの発現のフローサイトメトリー分析を解釈する際に考慮しなければならない(図15F)。バックグラウンドのGFP蛍光レベルは比較的高かったが、Ad5-GFPを感染させた後のGFPの発現レベルは、Ad3-K/S/Knが存在することによっては有意に上昇したが、Ad3-E/S/Knまたは抗DSG2 mAbが存在することによっては有意に上昇しなかった。全体的に、本発明者らの機能的試験により、Ad3-K/S/Knにより上皮の結合の開口が誘発され得るが、多量体形成することができないリガンドは結合に影響を及ぼさないことが示された。

## 【0224】

## 考察

この試験では、2つの発見：i) 高親和性かつ安定なDSG2との結合を実現するためにはAd3線維ノブの多量体形成が必要であること、およびii) 多量体型のAd3-線維ノブ/DSG2相互作用により、上皮の結合の開口が誘発されることについて説明する。

### 【0225】

CARと相互作用するAd5、DSG2と相互作用するAd3、およびCD46と相互作用するAd35による感染を含めたAd感染の大部分は、気道上皮を標的とする(22)。Adが感染するためには、ウイルスと標的細胞の接触を維持するため、およびより重要なことに、ウイルスが上皮の閉門を破壊し、標的細胞に進入し、標的組織内に拡散することを可能にするその後の事象を誘発するために、受容体に対する低解離速度の高い結合活性を実現することが極めて重要であると思われる。CAR結合性AdおよびCD46結合性Adについては、高い結合活性の結合は、三量体の線維ノブと3つの受容体ユニットの間の相互作用によって実現される。さらに、Ad11とCD46の相互作用について示されている通り、最初のAdと受容体の結合により、受容体のコンフォメーションの変化が誘発されて、結合が安定化し得るが(21)；Ad11以外のAdが後者の機構を使用することはまだ示されていない。CARと相互作用するAdおよびCD46と相互作用するAdに関して、付着には線維ノブおよび受容体が関与し、これは過剰な可溶性の線維ノブによって完全に遮断することができる。これは、DSG2結合性Ad3の場合は違う。Ad3の結合および感染を完全に阻害するには、物理的な連結、および、大概是、少なくとも2つの線維ノブの特異的な空間的配置が必要であることが示された。これは、Adビリオン、Ad3のPtDdまたは二量体のAd3-K/S/Knを用いて実現される。これらのリガンドは、一方では、高い結合活性をもたらし、他方では、上皮の結合の開口に機能的に関連する、いくつかのDSG2分子への同時の結合を実現すると思われる。Ad3-DSG2相互作用に関する本発明者らの発見をさらに裏付けるために、本発明者らは現在、結晶構造試験および突然変異誘発試験を行っている。

### 【0226】

感染を開始するために、多くの病原体が結合の完全性を破壊するための機構を進化させてきた。*Vibrio cholera*株は、腸の上皮の結合を可逆的に変化させ、巨大分子が粘膜閉門を通して通過することを可能にすることができるZona occludens毒素(Zot)を産生する(6)。*Clostridium perfringens*エンテロトキシンにより、密着結合からクローディン3およびクローディン4が除去され、細菌の浸潤が容易になる(25)。さらに、ヒトAd、HPV、HTLV-1にコードされる腫瘍性タンパク質により、結合タンパク質であるZO-1を誤った場所に局在化させることによって上皮の結合を一過性に開口させることができる(15)。ウイルスが使用する後者の機構は、側方へのウイルスの拡散において役割を果たすと思われる。しかし、効率的な初感染のためには、ウイルスの付着が上皮の結合の開口を誘発することと連携しなければならない。

### 【0227】

免疫蛍光法、PI3K/MAPKリン酸化、mRNA発現アレイ、および代謝経路阻害手法を用いた実施例1において、Ad3ビリオンおよびAd3のPtDdがDSG2と結合することにより、上皮細胞において上皮間葉転換が誘発され、それにより一過性の細胞間結合の開口がもたらされることを報告した。Ad3粒子または組換えPtDdとDSG2の相互作用によって媒介される細胞間結合の開口は、上皮細胞の浸透性および細胞間結合内に閉じ込められている受容体(例えば、Her2/neu)への接近が増大したことによってさらに裏付けられた。本試験では、Ad3-K/S/Knによっても結合の開口が誘発されることを示す形態学的なデータ(共焦点免疫蛍光法、EM)および機能的なデータ(浸透性、トラストズマブによる死滅、Ad5の感染)を提供する。重要なことに、多量体形成し、DSG2を群がらせることができない他のDSG2リガンド、例えば、単量体のAd3-E/S/KnまたはDSG2の異なる領域に対するモノクローナル抗体な

10

20

30

40

50



どは、結合を効率的に開口することができなかった。しかし、A d 3 が、D S G 2 / デスモソームの頂端側に位置する密着結合をどのように通過することができるのかは疑問のままである。A d - D S G 2 に媒介される結合開口は数分以内に起こり、それにより、結合の内部に閉じ込められているD S G 2 が感染部位に存在するウイルス粒子に曝露されるので、効率的な感染は正のフィードフォワード機構を通じて起こることが推測される。

【 0 2 2 8 】

A d 3 の感染機構の考察では、A d 3 の複製時に、P t D d が、感染性ウイルス当たり P t D d 5 . 5 × 1 0 <sup>6</sup> 個と、非常に過剰に形成されることにも注目すべきである ( 7 ) 。これは、P t D d の形成が、A d 3 にとって機能的に重要である、すなわち、A d 3 の拡散または持続にとって有利であることを示唆している。同様の機構が、上皮細胞への A d 5 の感染において起こると思われる。A d 5 の複製時に線維が過剰に産生されることにより、C A R 二量体形成が干渉されることによってか、または細胞内シグナル伝達が誘発され、それにより細胞間結合の再編成がもたらされることによって、上皮の結合が破壊される ( 4 , 3 2 ) 。最近、( i n v i t r o 試験に基づいて ) C D 4 6 は極性呼吸上皮細胞の頂端に露出しており、したがって、i n v i v o における初感染の A d 受容体としてより機能しやすいことが示された ( 9 ) 。これは、C D 4 6 の発現パターンが A d の形質導入と相関しなかったヒト C D 4 6 トランスジェニックマウスにおいては確認することができなかった ( 1 9 ) 。さらに、極性上皮がん培養物において、細胞間結合内に閉じ込められていて、細胞表面に適用された A d 3 5 と接近できない C D 4 6 が見いだされた ( 3 3 ) 。この時点では、本発明者らは、C D 4 6 結合性 A d がどのように上皮性閉門を破壊するかという疑問の答えは得られていないままであると考える。

【 0 2 2 9 】

細胞間結合は、抗がん治療薬の接近および腫瘍内への散在に対する物理的な障害を意味するので、A d 3 - K / S / K n により結合の開口が誘発されるという知見には実用的な意味がある ( 2 6 - 2 7 ) 。上皮の結合開口薬は、上皮の結合内に閉じ込められている腫瘍に関連する抗原 ( 例えば、H e r 2 / n e u または E G F R 1 ) に対するモノクローナル抗体を用いたがん療法と関連すると思われる ( 3 3 ) 。結合開口薬により、養子 T 細胞療法 ( 5 ) またはリポソーム化学療法薬を用いた治療 ( 1 0 ) の有効性も改善される可能性がある。最後に、A d 3 - K / S / K n により、A d 5 ベースの遺伝子療法ベクターによる正常な組織または悪性の組織への形質導入の有効性が増大する可能性がある。A d 3 - K / S / K n のバイオテクノロジーへの適用性は、その産生および精製の容易さによって、およびそれが自然発生的にホモ二量体を形成するという事実によってさらに強まる。

【 0 2 3 0 】

結論として、本発明者らの試験により、上皮細胞への A d 3 の感染の機構が明らかになる。小さな組換えタンパク質である A d 3 - K / S / K n により、上皮の結合の開口が誘発されるという所見はがん療法および上皮組織への薬物送達に関して意味を有する。

【 0 2 3 1 】

実施例 2 の参考文献

【 0 2 3 2 】

## 【 数 6 】

1. **Arnberg, N.** 2009. Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting. *Rev Med Virol* **19**:165-178.
2. **Chitaev, N. A., and S. M. Troyanovsky.** 1997. Direct Ca<sup>2+</sup>-dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell-cell adhesion. *J Cell Biol* **138**:193-201.
3. **Coyne, C. B., and J. M. Bergelson.** 2005. CAR: a virus receptor within the tight junction. *Adv Drug Deliv Rev* **57**:869-882.
4. **Coyne, C. B., L. Shen, J. R. Turner, and J. M. Bergelson.** 2007. Coxsackievirus entry across epithelial tight junctions requires occludin and the small GTPases Rab34 and Rab5. *Cell Host Microbe* **2**:181-192. 10
5. **Disis, M. L.** 2009. Enhancing cancer vaccine efficacy via modulation of the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* **15**:6476-6478.
6. **Fasano, A., B. Baudry, D. W. Pumpllin, S. S. Wasserman, B. D. Tall, J. M. Ketley, and J. B. Kaper.** 1991. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:5242-5246.
7. **Fender, P., A. Boussaid, P. Mezin, and J. Chroboczek.** 2005. Synthesis, cellular localization, and quantification of penton-dodecahedron in serotype 3 adenovirus-infected cells. *Virology* **340**:167-173. 20
8. **Fender, P., R. W. Ruigrok, E. Gout, S. Buffet, and J. Chroboczek.** 1997. Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer. *Nat Biotechnol* **15**:52-56.
9. **Granio, O., K. J. Ashbourne Excoffon, P. Henning, P. Melin, C. Norez, G. Gonzalez, P. H. Karp, M. K. Magnusson, N. Habib, L. Lindholm, F. Becq, P. Boulanger, J. Zabner, and S. S.**

## 【 0 2 3 3 】

## 【 数 7 】

- Hong**, 2010. Adenovirus 5-fiber 35 chimeric vector mediates efficient apical correction of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator defect in cystic fibrosis primary airway epithelia. *Hum Gene Ther* **21**:251-269.
10. **Harper, B. W., A. M. Krause-Heuer, M. P. Grant, M. Manohar, K. B. Garbutcheon-Singh, and J. R. Aldrich-Wright**. 2010. Advances in platinum chemotherapeutics. *Chemistry* **16**:7064-7077.
  11. **Kalin, S., B. Amstutz, M. Gastaldelli, N. Wolfrum, K. Boucke, M. Havenga, F. DiGennaro, N. Liska, S. Hemmi, and U. F. Greber**. 2010. Macropinocytotic uptake and infection of human epithelial cells with species B2 adenovirus type 35. *J Virol* **84**:5336-5350. 10
  12. **Keim, S. A., K. R. Johnson, M. J. Wheelock, and J. K. Wahl, 3rd**. 2008. Generation and characterization of monoclonal antibodies against the proregion of human desmoglein-2. *Hybridoma (Larchmt)* **27**:249-258.
  13. **Kirby, I., E. Davison, A. J. Bevil, C. P. Soh, T. J. Wickham, P. W. Roelvink, I. Kovesdi, B. J. Sutton, and G. Santis**. 2000. Identification of contact residues and definition of the CAR-binding site of adenovirus type 5 fiber protein. *J Virol* **74**:2804-2813.
  14. **Koski, A., L. Kangasniemi, S. Escutenaire, S. Pesonen, V. Cerullo, I. Diaconu, P. Nokisalmi, M. Raki, M. Rajacki, K. Guse, T. Ranki, M. Oksanen, S. L. Holm, E. Haavisto, A. Karioja-Kallio, L. Laasonen, K. Partanen, M. Ugolini, A. Helminen, E. Karli, P. Hannuksela, T. Joensuu, A. Kanerva, and A. Hemminki**. 2010. Treatment of cancer patients with a serotype 5/3 chimeric oncolytic adenovirus expressing GMCSF. *Mol Ther* **18**:1874-1884. 20
  15. **Latorre, I. J., M. H. Roh, K. K. Frese, R. S. Weiss, B. Margolis, and R. T. Javier**. 2005. Viral oncoprotein-induced mislocalization of select PDZ proteins disrupts tight junctions and causes polarity defects in epithelial cells. *J Cell Sci* **118**:4283-4293.
  16. **Lee, C., J. Dhillon, M. Y. Wang, Y. Gao, K. Hu, E. Park, A. Astanehe, M. C. Hung, P. Eirew, C. J. Eaves, and S. E. Dunn**. 2008. Targeting YB-1 in HER-2 overexpressing breast cancer cells induces apoptosis via the mTOR/STAT3 pathway and suppresses tumor growth in mice. *Cancer Res* **68**:8661-8666. 30
  17. **Litowski, J. R., and R. S. Hodges**. 2002. Designing heterodimeric two-stranded alpha-helical coiled-coils. Effects of hydrophobicity and alpha-helical propensity on protein folding, stability, and specificity. *J Biol Chem* **277**:37272-37279.
  18. **Lortat-Jacob, H., E. Chouin, S. Cusack, and M. J. van Raaij**. 2001. Kinetic analysis of adenovirus fiber binding to its receptor reveals an avidity mechanism for trimeric receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* **276**:9009-9015. 40

## 【 0 2 3 4 】

## 【 数 8 】

19. **Ni, S., A. Gaggar, N. Di Paolo, Z. Y. Li, Y. Liu, R. Strauss, P. Sova, J. Morihara, Q. Feng, N. Kiviat, P. Toure, P. S. Sow, and A. Lieber.** 2006. Evaluation of adenovirus vectors containing serotype 35 fibers for tumor targeting. *Cancer Gene Ther* **13**:1072-1081.
20. **Norrby, E., B. Nyberg, P. Skaaret, and A. Lengyel.** 1967. Separation and characterization of soluble adenovirus type 9 components. *J Virol* **1**:1101-1108.
21. **Persson, B. D., D. M. Reiter, M. Marttila, Y. F. Mei, J. M. Casasnovas, N. Arnberg, and T. Stehle.** 2007. Adenovirus type 11 binding alters the conformation of its receptor CD46. *Nat Struct Mol Biol* **14**:164-166. 10
22. **Sanchez, M. P., D. D. Erdman, T. J. Torok, C. J. Freeman, and B. T. Matyas.** 1997. Outbreak of adenovirus 35 pneumonia among adult residents and staff of a chronic care psychiatric facility. *J Infect Dis* **176**:760-763.
23. **Shayakhmetov, D. M., and A. Lieber.** 2000. Dependence of adenovirus infectivity on length of the fiber shaft domain. *J Virol* **74**:10274-10286.
24. **Shayakhmetov, D. M., T. Papayannopoulou, G. Stamatoyannopoulos, and A. Lieber.** 2000. Efficient gene transfer into human CD34(+) cells by a retargeted adenovirus vector. *J Virol* **74**:2567-2583. 20
25. **Sonoda, N., M. Furuse, H. Sasaki, S. Yonemura, J. Katahira, Y. Horiguchi, and S. Tsukita.** 1999. Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol* **147**:195-204.
26. **Strauss, R., and A. Lieber.** 2009. Anatomical and physical barriers to tumor targeting with oncolytic adenoviruses in vivo. *Curr Opin Mol Ther* **11**:513-522.
27. **Strauss, R., P. Sova, Y. Liu, Z.-Y. Li, S. Tuve, D. Pritchard, P. Brinkkoetter, T. Moller, O. Wildner, S. Pesonen, A. Hemminki, N. Urban, C. Drescher, and A. Lieber.** 2009. Epithelial phenotype of ovarian cancer mediates resistance to oncolytic adenoviruses. *Cancer Research* **15**:5115-5125. 30
28. **Strauss, R., P. Sova, Y. Liu, Z. Y. Li, S. Tuve, D. Pritchard, P. Brinkkoetter, T. Moller, O. Wildner, S. Pesonen, A. Hemminki, N. Urban, C. Drescher, and A. Lieber.** 2009. Epithelial phenotype confers resistance of ovarian cancer cells to oncolytic adenoviruses. *Cancer Res* **69**:5115-5125.
29. **Turley, E. A., M. Veiseh, D. C. Radisky, and M. J. Bissell.** 2008. Mechanisms of Disease: epithelial-mesenchymal transition-does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nat Clin Pract Oncol*. 40

## 【 0 2 3 5 】

## 【 数 9 】

30. Tuve, S., H. Wang, J. D. Jacobs, R. C. Yumul, D. F. Smith, and A. Lieber. 2008. Role of cellular heparan sulfate proteoglycans in infection of human adenovirus serotype 3 and 35. *PLoS Pathog* 4:e1000189.
31. Tuve, S., H. Wang, C. Ware, Y. Liu, A. Gaggar, K. Bernt, D. Shayakhmetov, Z. Li, R. Strauss, D. Stone, and A. Lieber. 2006. A new group B adenovirus receptor is expressed at high levels on human stem and tumor cells. *J Virol* 80:12109-12120.
32. Walters, R. W., P. Freimuth, T. O. Moninger, I. Ganske, J. Zabner, and M. J. Welsh. 2002. Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* 110:789-799. 10
33. Wang, H., Z. Y. Li, Y. Liu, J. Persson, I. Beyer, T. Moller, D. Koyuncu, M. R. Drescher, R. Strauss, X. B. Zhang, J. K. Wahl, 3rd, N. Urban, C. Drescher, A. Hemminki, P. Fender, and A. Lieber. 2011. Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. *Nat Med* 17:96-104.
34. Wang, H., Y. C. Liaw, D. Stone, O. Kalyuzhnyi, I. Amiraslanov, S. Tuve, C. L. Verlinde, D. Shayakhmetov, T. Stehle, S. Roffler, and A. Lieber. 2007. Identification of CD46 binding sites within the adenovirus serotype 35 fiber knob. *J Virol* 81:12785-12792. 20
35. Yang, S. W., J. J. Cody, A. A. Rivera, R. Waehler, M. Wang, K. J. Kimball, R. A. Alvarez, G. P. Siegal, J. T. Douglas, and S. Ponnazhagan. 2011. Conditionally Replicating Adenovirus Expressing TIMP2 for Ovarian Cancer Therapy. *Clin Cancer Res* 17:538-549.
36. Yang, Z., M. Horn, J. Wang, D. D. Shen, and R. J. Ho. 2004. Development and characterization of a recombinant madin-darby canine kidney cell line that expresses rat multidrug resistance-associated protein 1 (rMRP1). *AAPS J* 6:77-85.

## 【 0 2 3 6 】

## ( 実施例 3 )

組換え上皮の結合開口薬により、がんのモノクローナル抗体療法が改善される  
要約

がん治療のためのモノクローナル抗体 ( m A b ) の治療有効性は、上皮腫瘍細胞を互いにしっかりと連結している細胞間結合によって限定される。本発明者らは、上皮の結合タンパク質であるデスモグレイン 2 ( D S G 2 ) と結合する小さな組換えアデノウイルス血清型 3 由来タンパク質である結合開口薬 1 ( J O - 1 ) を生成した。 H e r 2 / n e u 陽性ヒトがん細胞株および E G F R 陽性ヒトがん細胞株に由来する腫瘍を有するマウスモデルにおいて、静脈内注射後 1 時間以内に、 J O - 1 により細胞間結合における D S G 2 二量体の切断が媒介されること、ならびに密着結合タンパク質である E - カドヘリンのレベルの低下を導く細胞内シグナル伝達経路の活性化を実証する。 J O - 1 に誘発される上皮の結合の変化により、抗 H e r 2 / n e u m A b であるトラスツズマブ ( ハーセプチン ) の腫瘍内への浸透の向上、ならびに部分的に結合内に閉じ込められている、その標的受容体である H e r 2 / n e u への接近の改善が可能になった。これは、 H e r 2 / n e u 陽性の乳がん細胞、胃がん細胞、および卵巣がん細胞を用いた異種移植モデルにおけるトラスツズマブのより優れた治療効果に直接転換される。さらに、 J O - 1 と E G F R ターゲティング m A b であるセツキシマブ ( アービタックス ) の組み合わせにより、転移性 E G F R 陽性肺がんのモデルにおける治療転帰が有意に改善された。 J O - 1 / トラスツズマブ処置と腫瘍間質タンパク質の一過性の分解を可能にする追加的な手法の組み合わせにより、腫瘍が完全に根絶する。癌治療に対するその臨床的な関連性に加えて、この試験では、上皮細胞へのアデノウイルス血清型 3 の感染の機構も明らかになる。

30

40

50

## 【0237】

## 諸言

モノクローナル抗体 (mAb) は、新規の腫瘍治療薬の1つのクラスとして現れた。現在までに、がんを治療するための治療用mAbは21種販売されており、数百種超が現在臨床開発中である。販売されているmAbの中にトラスツズマブ (ハーセプチン) およびセツキシマブ (アービタックス) がある。トラスツズマブは、ヒト上皮増殖因子受容体2 (Her2/Erbb-2) を標的とする。セツキシマブに対する受容体は、ヒト上皮増殖因子受容体1 (Her1/Erbb-1) である。どちらの受容体も、チロシンキナーゼ受容体ファミリーに属し、細胞の生存および増殖を促進するいくつかの経路を通じてシグナル伝達を開始する (Harariら、2007年)。トラスツズマブは、Her2/neu陽性乳がん患者において第一選択療法として使用され、転移性Her2/neu陽性胃がんについても認可されている。現在FDAに認可されているセツキシマブに対する適応症としては、結腸直腸がん、頭頸部癌、肺がん、および膀胱癌が挙げられる (Wheelerら、2010年)。初期の乳がんまたは結腸がんの患者の大部分は、トラスツズマブ療法およびセツキシマブ療法に対して、測定可能な腫瘍の応答がある。しかし、進行疾患または再発疾患の患者では、これらのmAbに対する応答率はたったの8%~10%である (AdamsおよびWeiner、2005年)。

10

## 【0238】

トラスツズマブおよびセツキシマブの作用機構は、抗体依存性細胞毒性または補体依存性細胞毒性の活性化、および腫瘍細胞が生存するために必要なチロシンキナーゼ受容体シグナル伝達への干渉を含む (Wheelerら、2010年)。これらの機構の間の統一的な態様は、腫瘍細胞の増殖阻害がmAbとそれらの対応する受容体の結合に左右されることである。したがって、受容体への接近および結合を、血管から悪性細胞への腫瘍内輸送を物理的に阻害することによってか、または受容体を遮蔽することによって妨げる分子は、トラスツズマブおよびセツキシマブの活性を遮断することが予測される (Lesniakら、2009年)。これらの分子としては、コラーゲンまたはラミニンなどの腫瘍間質タンパク質が挙げられる (Liら、2004年)。最近の試験において、本発明者らは、これらの間質タンパク質が一過性に分解されることにより、トラスツズマブ療法が有意に改善されたことを実証した (Beyerら、2011年)。

20

## 【0239】

腫瘍間質タンパク質によって形成される障害に加えて、がん細胞の上皮の表現型によっても、がん療法に対する物理的関門が創出される (StraussおよびLieber、2009年; Straussら、2009年)。いくつかの試験により、上皮のタンパク質の発現または上方制御が、乳がんのトラスツズマブ療法 (Fesslerら、2009年) および結腸直腸がんのセツキシマブ療法 (Oliveras-Ferrarosら、2011年) に対する抵抗性の増加と関連したことが実証された。上皮細胞は、いくつかの細胞間結合 (密着結合、接着結合、ギャップ結合、およびデスモソーム) を維持し、その特徴は、多くの場合、上皮内がんおよびがん細胞株において保存されている (Tuleyら、2008年)。上皮の結合は、2つの隣接する細胞に由来するカドヘリン分子からなる接着性二量体で構成される (Koeserら、2003年)。デスモグレイン1、2、および3 (DSG1~3) およびデスモコリン1、2、および3 (DSC1~3) は、カドヘリンのサブクラスである。DSC2およびDSG2は広範に発現され、上皮細胞の基底層のデスモソームにおいて共に見いだされる。デスモソームのカドヘリンの細胞質尾部は、原形質膜と細胞骨格を、プラコグロビン、デスモプラキン、およびプラコフィリンを含むタンパク質の複合体を通じて連結する。デスモグレイン2 (DSG2) は、乳がん (Wangら、2011年b) (付録図1)、卵巣がん (Wangら、2011年b) (付録図1)、肺がん (Wangら、2011年b)、胃がん (Biedermannら、2005年)、扁平上皮癌 (Haradaら、1996年)、黒色腫 (Schmittら、2007年)、転移性前立腺がん (Trojanら、2005年)、および膀胱がん (Abbodら、2009年) を含めた一連の上皮の悪性疾患において過剰発現される。

30

40

50

## 【0240】

実施例1において、ヒトアデノウイルス（Ad）の一群（Ad血清型3、7、11、および14）は、細胞に感染するための主要な付着受容体としてDSG2を使用することが実証された。重要なことに、上皮細胞においてAd3がDSG2と結合することにより、シグナル伝達経路の活性化が誘発され、それにより、一過性の上皮の結合の開口がもたらされる。結合の開口は、経上皮の浸透性が増大すること、および密着結合内に閉じ込められているタンパク質、例えば、コクサッキー・アデノウイルス受容体またはzonula occludens-1タンパク質が露出することにより反映された。上皮の結合の開口は、組換えウイルス成分の粒子、例えば、ペントンベースと連結した12個のAd3線維からなるペントン12面体（PtDd）などによっても実現された（Fuschio et al., 2006年; Norrby et al., 1967年）。その後、本発明者らは2つの線維ノブドメインによって形成される最小のAd3由来のDSG2リガンドを生成した。このタンパク質は、分子量がおよそ50kDaであり、E. coliにおいて産生され、また容易に精製することができる。一連の機能的試験において、本発明者らは、このタンパク質により、結合の開口が効率的に誘発されることを実証した。したがって、以下の試験では、このタンパク質を結合開口薬-1（JO-1）と称する。

10

## 【0241】

この試験では、JO-1に媒介される結合の開口のin vivo機構を部分的に説明した。異種移植腫瘍においてHer2/neuおよびEGFRが細胞間結合内に閉じ込められていることが示された。JO-1処置により、腫瘍におけるmAbの浸透が有意に増加し、また、一連の異種移植腫瘍モデルにおけるトラスツズマブ療法およびセツキシマブ療法の有効性が有意に増大した。

20

## 【0242】

## 結果

JO-1により、上皮の結合の開口が誘発される。上記の実施例において、Ad3粒子または組換えAd3ペントン12面体（PtDd）（図16A）がDSG2と結合し、一過性の上皮の結合の開口を誘発し、それが今度は、Her2/neu陽性のBT474乳がん細胞のトラスツズマブによる死滅を増加させることが示された。大きなサイズのAd3またはPtDd粒子は、それらの血管からの放出および組織への浸透に影響を及ぼし得るので、本発明者らは、上皮の結合開口薬として機能的に活性なより小さなAd3由来のDSG2リガンドを生成した。DSG2との高親和性結合およびその後の結合開口には、Ad3線維二量体が必要であることが見いだされた。この所見に基づいて、結合開口薬1（JO-1）と称する小さな自己二量体形成性Ad3線維誘導体を設計した（図16A、B）。JO-1の分子量は約50kDaであり、E. coliにおいて産生させた後、親和性クロマトグラフィーにより精製する。

30

## 【0243】

極性結腸がんT84細胞においてJO-1の機能活性を試験した。これにより、クロードイン7およびDSG2についての共焦点顕微鏡検査によって示されている通り、細胞をJO-1と一緒にインキュベートすることにより、上皮の結合のリモデリングが誘発されることが実証された（図16C）。デスモソームタンパク質であるDSG2は、クロードイン7がマーカーとなる接着結合とオーバーラップしている。JO-1がDSG2と結合してから30分以内に、クロードイン7の染色が増加し、これは、大概是、クロードイン7に対する抗体（transwell培養物の内部チャンバー、すなわち、分極上皮細胞の頂端側に適用される）がより接近しやすいことの結果である。デスモソーム結合および接着結合に対して頂端に同在する密着結合の開口が電子顕微鏡により例示されている（図16D）。無処置の上皮細胞の顕微鏡検査により、頂端に適用された色素であるルテニウムレッドが側底の空間には入れないことによって判定されるインタクトな密着結合が示されている。上皮細胞をJO-1と一緒に1時間インキュベートすることにより、密着結合が分解され、ルテニウムレッドが側底の空間に漏出する（図16D、右側のパネル）。分極上皮細胞をJO-1に曝露させることによっても、分子量が4000Daである<sup>14</sup>C

40

50

- PEG-4000の貫流によって示されている通り、経上皮の浸透性が増大した(図16E)。重要なことに、DSG2の細胞外ドメインの種々の領域に対するモノクローナル抗体によっては経上皮の浸透性は有意に増大しなかった。結合の開口を誘発するためには、いくつかのDSG2分子のライゲーションが必要であることが推測される。顕微鏡検査および浸透性試験により、JO-1により数分以内に結合の開口が誘発されることが示された。JO-1パルス処置を解除した60分後に、結合構造および浸透性は正常な形態に回復したという事実によって例示されるように、JO-1の効果は一過性である。JO-1を細胞上に放置した場合、最初にJO-1を加えた24時間後に、依然として形態学的な上皮の結合の変化を見ることができた(データは示していない)。

#### 【0244】

*in vivo*において、JO-1により、細胞内シグナル伝達が誘発され、上皮腫瘍内へのmAbの浸透が増大する。乳がん異種移植モデルを使用して、*in vivo*における上皮の結合に対するJO-1の効果を試験した。ヒト乳がんHCC1954細胞を、CB17-SCID/ベージュマウスの乳房の脂肪パッドに注射した。生じた腫瘍は、ヒトにおける乳がんの組織構造と似ていた(Liら、2004年)、すなわち、腫瘍は血管化し、上皮の結合でくっついた上皮細胞の巣を含有し、細胞外マトリックスで囲まれていた)。腫瘍の体積が約200mm<sup>3</sup>に達した時、JO-1を静脈内注射した。JO-1は、早ければ注射した1時間後に、免疫蛍光顕微鏡により、腫瘍内で検出することができた。注射した12時間後に免疫蛍光が増大したことによって示される通り、JO-1は腫瘍内に蓄積した(図17A、左側の3つのパネル)。これは、腫瘍溶解物のウエスタンブロット分析によっても確認された(図17A、右側のパネル)。PBSで処置した動物における、免疫蛍光顕微鏡検査による腫瘍切片についてのDSG2の分析により、膜局在シグナルが示された(図17B、左側のパネル)。JO-1を注射した1時間後には、DSG2分子は、主に腫瘍細胞の細胞質において見いだされた(2番目のパネル)。12時間までに、DSG2の膜局在化が部分的に回復すると思われた(3番目のパネル)。DSG2の細胞外ドメインに対する抗DSG2抗体を使用したウエスタンブロット分析により、1時間の時点で、おそらくタンパク質分解性の切断によって産生されるDSG2細胞外ドメイン(ECD)のより小さな断片が明らかになった(図17B、右側のパネル)。総合すると、これらのデータにより、JO-1により、DSG2 ECD内部の切断およびDSG2の内部移行が誘発されることが示唆されている。これにより、2つの隣接する上皮腫瘍細胞間のDSG2二量体が破壊され、側方結合のリモデリングの一因となることが推測される。JO-1で処置した動物の組織学的検査では、胃腸管または気道の正常な上皮組織に毒性の副作用または変化は観察されなかった。

#### 【0245】

上記の実施例において、*in vitro*試験において、Ad3が上皮細胞のDSG2と結合することにより、上皮間葉転換(EMT)に関与する経路を含めた細胞内シグナル伝達が誘発されることが見いだされた。EMTは胚発生に関与する再プログラミング過程であるが、腫瘍における転移にも関与する。EMTを特徴付ける特徴としては、上皮のマーカーの発現の減少、転写因子の位置の変更、およびErk1/2(MAPK)の活性化が挙げられる(Turleyら、2008年)。異種移植腫瘍を用いた本発明者らの試験では、JO-1を静脈内注射した12時間後に腫瘍内に見られたリン酸化されていない形態およびリン酸化された形態のE-カドヘリンは少なかった(図17C、左側のパネル)。E-カドヘリンの変化に先立って、リン酸化されたErk1/2が増大した(図17C、pErk1/2PBSとJO-1を比較(1時間))。ERK1/2が活性化されることにより、EMT時のE-カドヘリンの発現およびリン酸化が減少することはよく確立されている(Andarawewaら、2007年; Larsenら、2003年; Turleyら、2008年)。JO-1を注射すると、E-カドヘリンが減少し、また、リン酸化されたErk1/2のシグナルが増加することも、免疫蛍光顕微鏡によって確認された(図17C、右側のパネル)。全体的に、これらの試験は、HCC1954腫瘍において、*in vivo*においてJO-1によりErk1/2経路の活性化が誘発されること

10

20

30

40

50



を示している。これに基づいて、本発明者らは、J O - 1 が D S G 2 と結合することによる上皮の結合の開口には、少なくとも2つの機構：i) D S G 2 E C D の切断、およびその後の内部移行を伴う D S G 2 二量体の破壊；ならびに i i) E r k 1 / 2 の活性化による E M T 様事象の誘導が関与するという仮説を立てている。

#### 【0246】

次に、腫瘍における J O - 1 に誘発される上皮の結合の開口により、異種移植腫瘍へのモノクローナル抗体の浸透が増大するかどうかを試験した。この試験のためにヒト化 I g G 1 m A b であるトラスツズマブを最初に利用した。以前の試験の場合と同様に、トラスツズマブを 10 m g / k g の用量で腹腔内に注射した。ヒト I g G に特異的な抗体を用いて腫瘍内のトラスツズマブを可視化した。腫瘍切片の分析およびウエスタンブロット分析において、トラスツズマブは、注射した1時間後に検出可能であり、注射した12時間後にはより高レベルで検出可能であった(図18)。トラスツズマブを投与する1時間前に J O - 1 を静脈内注射することにより、腫瘍内のトラスツズマブの量が目に見えて増加し、これは、血管から放出したこと、腫瘍内への浸透が向上したこと、および/または腫瘍内の半減期が長くなったことのいずれかを示している。

#### 【0247】

m A b 標的は上皮の結合内に閉じ込められている。乳がん異種移植切片および培養した乳がん細胞において、H e r 2 / n e u と接着結合タンパク質であるクローディング7の共染色が見いだされた(図19A)。乳がん B T 4 7 4 細胞の共焦点顕微鏡写真により、H e r 2 / n e u が側方結合内に閉じ込められていることが確認された。これは、以前の試験と一致し、H e r 2 / n e u が、密着結合が破壊された際にのみ頂端の表面から接近可能になる側底のタンパク質であることを実証している(V e r m e e r ら、2003年)。H e r 2 / n e u 陽性乳がん細胞株 B T 4 7 4 (図19)または H C C 1 9 5 4 (示されていない)を J O - 1 と一緒にインキュベートすることにより、1時間以内に上皮の側方結合の組成が変化した。この結果として、H e r 2 / n e u 染色が、細胞表面では染まり方がより強くなったが、細胞表面より遠位の領域ではあせた。これは、J O - 1 に媒介される結合の開口により、H e r 2 / n e u の側膜から細胞表面への移行が誘発されたことを示唆している。側方結合に対する J O - 1 の効果は一過性であり、細胞の形態は、J O - 1 パルス処置した16時間後までに対照細胞の形態に戻った。上皮の結合内に閉じ込められていることはまた、E G F R と密着結合タンパク質である E - カドヘリンの共染色によって示唆されるように、E G F R 1 (セツキシマブ/アービタックスの標的)などの他のがん療法の標的に関しても問題であると思われる(図19B)。セツキシマブを用いた本発明者らの試験では、結腸がん細胞株は大部分がセツキシマブに対する抵抗性を付与する K - r a s の突然変異を有するので(K a r a m o u z i s ら、2007年)、肺がんモデル(A 5 4 9 細胞)に焦点を合わせている。H e r 2 / n e u に関して観察されたことと同様に、A 5 4 9 細胞を J O - 1 と一緒にインキュベートすることにより、E G F R が細胞表面に移行した。

#### 【0248】

m A b 受容体が閉じ込められている状態から解放されることは、トラスツズマブおよびセツキシマブによるがん細胞の死滅が増強されることによって裏付けられる。トラスツズマブによる B T 4 7 4 乳がんの i n v i t r o における死滅およびセツキシマブによる A 5 4 9 肺がん細胞の i n v i t r o における死滅は、それぞれ非効率的であった(図19CおよびD)。これらの細胞を J O - 1 で前処置することにより、どちらの抗体も i n v i t r o での対応する細胞株における細胞傷害性が有意に増大する。

#### 【0249】

全体的に、これらの試験は、J O - 1 により、結合の開口が媒介され、それにより、m A b の腫瘍内への浸透を向上させること、ならびに、そうでなければ結合内に閉じ込められているそれらの標的受容体への接近を改善することが可能になることを示す。これに基づいて、J O - 1 で前処置することにより、異種移植モデルにおける m A b の治療効果が改善され得るかどうかを調査するために一連の i n v i v o 試験を実施した。

## 【0250】

J O - 1により、*in vivo*でトラスツズマブ療法が改善される。まず、トラスツズマブ療法のJ O - 1による潜在的な増強を、Her2/neu陽性BT474-M1細胞に基づく同所性乳がんモデルにおいて試験した。J O - 1を単独で注射することは、腫瘍の増殖に対して有意な効果がなかった(図20A)。BT474-M1腫瘍は、トラスツズマブに最初に良好に応答したが、J O - 1を前注射することにより、トラスツズマブの治療効果が有意に増強された(図20A)。これらの発見は、このモデルにおいてPtDdを用いた本発明者らの試験と一致する。処置したマウスを長期、すなわち、136日間にわたって追跡すると、J O - 1での前処置の増強効果がより明白になる。トラスツズマブ単独療法を受けた動物の60%が、およそ100日目に再発(*relapse*)し、J O - 1+トラスツズマブで処置した動物はいずれも腫瘍の再増殖を示さなかった(データは示していない)。

10

## 【0251】

第2の乳がんモデルはHCC1954細胞を伴う。これらの細胞に由来する腫瘍は、トラスツズマブに対する抵抗性がより高い(図20B)。BT474-M1モデルにおいて見られるように、J O - 1で前処置することにより、トラスツズマブ療法が有意に改善され、腫瘍の増殖が失速した。J O - 1の増強効果は、PtDdの増強効果に匹敵した(データは示していない)。PtDdを用いた本発明者らの試験に基づいて、J O - 1注射とトラスツズマブ注射の間に10時間の時間間隔を選択した。このレジメンは、腫瘍におけるJ O - 1の蓄積の動力学およびE-カドヘリン減少の動力学によって裏付けられる(図17AおよびCを参照されたい)。他方では、結合の開口、すなわち、DSG2の切断またはErk1/2が活性化されることに関連づけられると思われる事象は、J O - 1を注射してから1時間以内にすでに起こる。したがって、J O - 1/トラスツズマブを同時に注射すること、およびJ O - 1を適用した1時間後にトラスツズマブを注射することが、治療転帰にどのように影響を及ぼすかを調査した(図20C)。この試験では、最初に用いた治療手法(J O - 1の10時間後にトラスツズマブ)と比較して有意差は見いだされなかった。これは、腫瘍におけるタンパク質の蓄積が相対的に遅いことに起因することが推測される。

20

## 【0252】

トラスツズマブに対する併用治療薬としてのJ O - 1の臨床的な関連性をさらに強化するために、Her2/neu陽性胃がん(NCI-N87)モデルにおいて有効性試験を実施した(図21)。乳がんモデルと同様に、NCI-N87培養物および異種移植腫瘍においてHer2/neuとクローディン7の共染色が見いだされ、これは、Her2/neuが上皮の結合に閉じ込められていることを示唆している。胃がん異種移植モデルを確立するために、NCI-N87細胞を皮下注射した。腫瘍を担持するマウスをJ O - 1で前処置することにより、腫瘍の増殖が遅延したことに反映された通り、トラスツズマブ療法が有意に改善された。

30

## 【0253】

J O - 1により、*in vivo*でセツキシマブ療法が改善される。A549肺がん細胞に由来する皮下腫瘍を有する異種移植モデルを最初に利用した。以前確立されたA549腫瘍を有するマウスをセツキシマブで処置することでは、PBS処置と比較して腫瘍の増殖の有意な遅延はもたらされなかった。J O - 1を静脈内注射または腹腔内注射した12時間後にセツキシマブを注射した。どちらの処置手法でも有意な治療効果があり、腫瘍体積が減少した(図22A)。J O - 1の静脈内注射と結合開口薬の腫瘍内適用の追加的な組み合わせで治療効果がさらには増大することはなかった。乳がんモデルにおいて見られるように、J O - 1処置単独では、有意な抗腫瘍効果は発揮されなかった。J O - 1で前処置することにより、セツキシマブ療法がPtDdで見られるのと同程度に増強された(図22B)。

40

## 【0254】

次に、同所性肺がんモデルにおいて併用療法を試験した。このモデルを確立するために

50

、A549細胞を静脈内注射した。このモデルでは、マウスは腫瘍細胞を移植してから37日以内に罹患し、腫瘍は肺に優勢に局在した(図22C、「PBS」群)。マウスの処置は、10日目、すなわち、対照群の動物が試験のエンドポイントに到達する27日前に開始した。全ての動物を40日目に屠殺した。対照群、JO-1群、ならびにセツキシマブで処置した動物では肺転移がはっきり目に見えたが、JO-1+セツキシマブで処置した動物の肺の80%で、肉眼検査時には腫瘍がなかった。肺切片の顕微鏡検査により、PBS処置した動物では、腫瘍細胞はほぼ完全に正常な肺組織にとって代わり、細気管支も満たしたことが示された(図22C、右側のパネル)。細気管支への浸潤は、セツキシマブを注射した動物において有意性が低かった。重要なことに、セツキシマブで処置した動物はかなりの浸潤性腫瘍の増殖を有したが、大多数のJO-1+セツキシマブを注射した動物は微小転移のみを示した。

10

#### 【0255】

腫瘍間質タンパク質分解と結合の開口の組み合わせ。本発明者らは最近、がん患者由来の腫瘍切片および異種移植片の免疫組織化学的試験において、細胞外マトリックスタンパク質が、悪性の乳がんおよび結腸がん細胞の巣をしっかりと包囲する腫瘍間質を形成していることを示した(Liら、2009年)。ペプチドホルモンであるレキシシンが腫瘍内で発現することによる腫瘍間質タンパク質の一過性の分解により、トラスツズマブ療法が有意に増強された(Beyerら、2011年)。本発明では、追加的な一過性の腫瘍間質タンパク質分解により、トラスツズマブ療法に対するJO-1の効果がさらに増大するかどうかを試験するために、HCC1954モデルを利用した(図23A)。レキシシン遺伝子を腫瘍に送達するために、造血幹細胞(HSC)に基づいた手法(Liら、2009年)を用いた。この手法では、腫瘍細胞が、骨髓から骨髓系前駆細胞を活発に動員し、それらを、そこでそれらが腫瘍間質マクロファージ(TAM)に分化する腫瘍間質に動員するいくつかのケモカインを分泌するという知見を利用する。TAMは、腫瘍の増殖、血管新生、免疫エスケープおよび間質発生を誘発/支持する因子を産生するので、腫瘍が生存するために重要である。この手法は、骨髓由来HSCに、ドキサイクリン(Dox)誘導性転写カセットの制御下で、導入遺伝子を発現しているレンチウイルスベクターをex vivoで形質導入すること、およびこれらの細胞を、骨髓に植え付け、腫瘍に向かう遺伝子改変された細胞の長期供給源をもたらす骨髓調整(myelo-conditioned)レシピエントに移植することを伴う。この試験(図23B)により、レキシシンの発現単独で、有意に腫瘍の増殖が遅延し、トラスツズマブ療法が増大したことが示された。レキシシンの発現とJO-1処置の組み合わせにより、腫瘍の増殖が停止した。処置終了時に、レキシシン+トラスツズマブ療法またはJO-1+トラスツズマブ療法のいずれかを受けた群とは対照的に、腫瘍は再成長しなかった。観察期間の最後にJO-1/レキシシン/トラスツズマブ群に残留していた腫瘍の組織学的分析では結合組織のみが示された。対照的に、他の群から外植された腫瘍は腫瘍細胞を含有し、それは腫瘍をプロテアーゼによって消化した際にin vitroで培養することができた。特に、三重の組み合わせ(JO-1/レキシシン/トラスツズマブ)処置を受けたマウスにおいて有害な副作用は観察されなかった。

20

30

#### 【0256】

本発明者らのデータにより、腫瘍における物理的な障害がトラスツズマブ療法に対する抵抗性の媒介に関与することが強調される。

40

#### 【0257】

JO-1に対する抗体の存在下での、in vitro細胞毒性アッセイに対する効果。Ad3は、広範に分布した病原体である。そのため、JO-1は、潜在的に免疫原性であり得、繰り返し投与した後にその治療的活性に干渉し得るウイルスタンパク質である。試験した乳がん患者由来の血清試料30のうち10が、中和性Ad3抗体について陽性であった(データは示していない)。これは、ヒトにおける(10歳まで)中和性抗Ad3抗体の血清分布率は約40%であるという報告と一致する(Sakamotoら、1995年)。しかし、本発明者らは、抗Ad3抗体陽性ヒト血清がJO-1と反応しないこと

50

を示した（データは示していない）。中和性抗体の大部分はA dのヘキソンを対象とするので、これは驚くべきことではない（Sumidaら、2005年）。抗JO-1陽性血清を得るために、マウスに、JO-1を用いてワクチン接種した（データは示していない）。in vitro細胞毒性試験では、抗JO-1抗体による、Her2/neu陽性BT474細胞のトラスツズマブによる死滅に対するJO-1の増強効果への干渉は見いだされなかった（データは示していない）。これに沿って、健康なボランティアまたは乳がん患者由来のプールしたヒト血清も、JO-1の機能に干渉しなかった。

#### 【0258】

##### 考察

新規の併用治療薬としてのJO-1。多くの領域におけるそれらの成功にもかかわらず、mAbの治療有効性は限られており、少数の患者のみが単独療法としてのこれらの作用剤に応答している。トラスツズマブおよびセツキシマブを含めた多くの抗がんmAbの作用は、腫瘍細胞上の対応する標的受容体に結合することを必要とする。標的受容体が遮蔽されることまたはmAbの腫瘍内の散在が妨げられることは、がん細胞の潜在的な遮蔽およびエスケープ機構である（Lesniakら、2009年）。コラーゲンまたはラミニンなどの腫瘍間質タンパク質によって形成される関門に加えて、上皮がんの上皮の表現型によっても、mAb療法に対する障害が創出される。最近の試験では、ムチン1などの上皮の特徴の発現が、トラスツズマブ抵抗性と相関することが報告された（Fesslerら、2009年）。さらに、E-カドヘリンが上方制御されることが、結腸直腸がんのセツキシマブ療法に対する抵抗性の一因となる（Oliveras-Ferrarosら、2011年）。

#### 【0259】

腫瘍の浸潤および転移はEMTを伴うことが長年にわたり公知であるが、最近の試験により、このプロセスは、間葉上皮転換（MET）によって逆転させることができることが示された（ThieryおよびSleeman、2006年）。上皮の結合を含めた上皮の特徴を回復させることは、同様に腫瘍を抗がん治療から遮蔽する腫瘍の防御機構を示すと思われる（Brennanら、2010年；Straussら、2009年；ThieryおよびSleeman、2006年）。この状況において、主要な卵巣がん細胞に対する試験において、化学療法抵抗性の獲得および推定上のがん幹細胞の形成は、METによく似た過程を伴うことが見いだされた（Straussら、2011年）。

#### 【0260】

本発明者らは、上皮の結合の一過性の溶解を可能にする手法により、トラスツズマブおよびセツキシマブなどのmAbの治療有効性が改善され得るという仮説を立てた。基本的なアデノウイルス学的（adenovirological）試験の状況において、小さな組換えタンパク質JO-1を設計した。JO-1がDSG2と結合することにより、一過性の密着結合の開口がもたらされた。これにより、ヒト上皮腫瘍細胞を伴う一連の異種移植モデルにおいて、腫瘍におけるトラスツズマブの浸透が増大し、mAb標的受容体へより接近しやすくなり、それが今度は、mAb療法を容易にした。潜在的に、JO-1とトラスツズマブおよびJO-1とセツキシマブの組み合わせにより、これらのmAbの有効用量を減らし、それにより、重大な副作用、すなわち、トラスツズマブに関連する心毒性およびセツキシマブ療法中に起こることも多いざ瘡様発疹を軽減することが可能になり得る。

#### 【0261】

JO-1は、E.coliにおいて高収率で産生させることができるので、開発するのに魅力的な治療薬である。特に、DSG2を群がらせることができないDSG2リガンド、例えば、DSG2に対するモノクローナル抗体などは、この試験において使用する腫瘍モデルにおける結合の開口において非効率的である。本発明者らの知るところでは、DSG2と結合し、腫瘍をmAbに対して感作することができる他の開発中の療法はない。一連の病原体は、結合の完全性を破壊するための機構を進化させてきた。例えば、Vibrio cholerae株は、腸の上皮の結合を可逆的に変化させ、巨大分子が粘膜関門

を通過することを可能にすることができる Z o n a o c c l u d e n s 毒素 ( Z o t ) を産生する ( F a s a n o ら、1991年)。Z o t 由来のヘキサペプチド ( A T - 1001 ) が開発されてきたが、セリアック病の患者における臨床試験は、最近、安全性の懸念および有効性の欠如により中止された。

#### 【0262】

作用機構。本発明者らのデータにより、J O - 1 により、上皮腫瘍において、2つの潜在的に関連する機構：細胞間結合における D S G 2 二量体の破壊および/または E - カドヘリンおよび潜在的に他の結合タンパク質を減少させる細胞内シグナル伝達を通じて、結合の開口が誘発されることが示唆されている。カドヘリンは隣接する細胞間で二量体を形成するので、いくつかの病原体は、カドヘリンの細胞外ドメイン内の切断を誘発するための機構を進化させてきた。胃腸管を介して血流に浸潤することができる生物体である C a n d i d a a l b i c a n s は、E - カドヘリンと結合し、E - カドヘリンの細胞内ドメインと細胞外ドメインの両方の切断を誘発し、それにより、近接する上皮細胞間のホモタイプの相互作用を不安定にする ( F r a n k および H o s t e t t e r、2007年)。さらに、B a c t e r o i d e s f r a g i l i s エンテロトキシンおよび P o r p h y r o m o n a s g i n g i v a l i s ジンジバインが E - カドヘリンの分解に関連づけられている ( K a t z ら、2000年; W u ら、1998年)。これらの試験ではどちらも、E - カドヘリンの切断の原因が、特異的な細菌のプロテアーゼであるとされた。本発明者らのデータにより、A d 3 が同様の機構を使用して気道内の上皮性閉門を突破することが示唆されている。本発明者らは現在、D S G 2 切断の機構について試験している。進行中の試験では、J O - 1 の結合により、D S G 2 内部のコンフォメーションの変化が誘発されることを決定することを試みている。最近考察されている通り、D S G 2 二量体の溶解により、今度は、頂端により多く局在している密着結合が不安定になり得る ( K o e s e r ら、2003年)。

#### 【0263】

上記の i n v i t r o 試験に基づいて、A d 3 が D S G 2 と結合することにより、E r k 1 / 2 および E M T に関与する他の経路の活性化が誘発される。この試験により、静脈内に J O - 1 を注射してから1時間以内に腫瘍における E r k 1 / 2 が活性化されることが示されている。本発明者らの所見は、カドヘリンが、受容体チロシンキナーゼを伴う双方向的なシグナル伝達に関わって細胞間結合を調節することを示す以前の報告と一致する ( K l e s s n e r ら、2009年)。本発明者らは現在、上皮の結合の維持における D S G 2 の役割をよりよく説明するために、種々の D S G 2 ノックアウトモデルおよび切断/突然変異 D S G 2 変異体を生成している。

#### 【0264】

正常な上皮組織に対する副作用。ヒトおよび非ヒト霊長類において、D S G 2 は胃腸管および気道で発現される ( L i ら、2011年)。D S G 2 のマウスオルソログは A d 3 または J O - 1 によって認識されない ( W a n g ら、2011年 b )、正常なマウスにおける安全性試験は比較的十分である。したがって、ヒト D S G 2 遺伝子座を含有するトランスジェニックマウスを生成した。これらの動物におけるヒト D S G 2 の発現パターンおよびレベルは、ヒトにおいて見いだされるものと同様であった。さらに、トランスジェニックマウス上皮細胞において J O - 1 がヒト D S G 2 と結合することにより、ヒト細胞において観察されたデータと同様の程度に結合の開口が誘発されることが示された。D S G 2 - トランスジェニックマウスを用いた予備試験では、静脈内に J O - 1 を注射すること ( 2 m g / k g ) による重大な副作用は見いだされなかった ( L i ら、2011年)。正常な上皮細胞内の D S G 2 は、静脈内に適用された J O - 1 とすぐには接近可能ではないことが推測される。他方では、腫瘍に関連する血管の漏出および厳密な細胞の極化の欠如が増すことにより、上皮腫瘍の J O - 1 に対する反応性がより高くなる可能性がある。J O - 1 リガンドを静脈内注射した後の毒性がないことは、A d 3 線維を含有するアデノウイルスを用いた試験によっても強調される。これらのウイルスは、D S G 2 と結合し、J O - 1 と同じ様に結合に作用する。A d 5 / 3 腫瘍退縮ベクターまたは A d 3 腫

瘍退縮ベクターのヒトへの静脈内注射は安全であることが見いだされた (Hemminkiら、2010年; Koskilaら、2010年)。本発明者らは現在、安全な治療薬としてのJO-1の可能性を検証するために、非ヒト霊長類およびDSG2-トランスジェニックマウスにおいて詳細な毒性試験を行っている。

#### 【0265】

JO-1免疫原性。JO-1は、ウイルスタンパク質であるので、特に、繰り返し注射した後はヒトにおいて適応性の免疫応答が発生する可能性がある。しかしこれは、臨床的な問題ではないと思われる。Her2/neu陽性転移性乳がんの第一選択治療は、化学療法薬(ドキシソルピシン、シクロホスファミド、パクリタキセル、またはドセタキセル)と組み合わせたトラスツズマブである。また、非小細胞肺癌患者においては、セツキシマブを化学療法薬(ビノレルピン+シスプラチン)と組み合わせて使用する。免疫抑制性の化学療法により、JO-1に対する免疫応答予防される可能性がある。さらに、この予想は、腫瘍退縮性のアデノウイルスベクターを用いた試験によって裏付けられる。これらの試験では、免疫抑制により、繰り返しベクターを適用することが可能になる(Thomasら、2008年)。他方では、免疫適格性のがん患者においてJO-1を使用することができれば、有益だと思われる。例えば、JO-1は、理論的に、既存の抗腫瘍T細胞または移植された抗腫瘍T細胞の接近および腫瘍内への浸透を増大させることにより、免疫賦活性の単独療法としての機能を果たし得る。腫瘍に特異的なT細胞は、無処置の乳がん患者において、疾患の後期においてさえ頻繁に見いだし、これらの細胞をマウスに移すと、異種移植された自己の腫瘍を拒絶することが示されている(Beckhoveら、2004年; Disissら、1994年; Disissら、2000年; Feuererら、2001年; Tosora、1996年)。したがって、本発明者らは、JO-1免疫原性のより詳細な調査を開始した。ヒトのおよそ3分の1がAd3に対する中和性抗体を有するという事実にもかかわらず、本発明者らの試験により、これらの抗体はJO-1と相互作用しないことが示された(付録図5)。さらに、マウスにワクチン接種することにより生成された抗JO-1抗体は、*in vitro*において、トラスツズマブによる死滅に対するJO-1の増強効果に影響を及ぼさなかった。これは、JO-1-DSG2相互作用の親和性が高いことに起因する可能性が最も高い(Wangら、2011年a)。本発明者らは現在、抗JO-1免疫応答が、その有効性にどのように影響を及ぼすかを調査するために、hu-DSG2-トランスジェニックマウスにおいて同系の腫瘍を確立している。

#### 【0266】

腫瘍の浸潤および転移の増強に対する潜在的な危険性。他の試験(Wangら、2011年b)、(Biedermannら、2005年)、(Haradara、1996年)、(Schmittら、2007年)、(Trojanら、2005年)、(Abbodら、2009年)と一致して、本発明者らは、悪性の組織におけるDSG2の発現が周囲の正常な上皮組織よりも高いことを見いだした。さらに、子宮頸部扁平上皮がん(squamous cell cervical cancer)における最近の試験により、他の全てのデスモソームタンパク質とは対照的に、DSG2は浸潤がんにおいて上方制御されることが実証された(Kurzenら、2003年)。しかし、浸潤性の膵臓癌または胃がんにおいてDSG2の量が減少していることが報告されている試験もある(Ramaniら、2008年; Yashiroら、2006年)。後者、ならびにJO-1によりEMT様シグナル伝達が誘発されるという所見は、JO-1により転移が容易になるかどうかという疑問を生じる可能性がある。特に、この試験において使用する全てのモデルでは、JO-1単独で処置した動物において腫瘍の増殖への刺激または肉眼で見える/顕微鏡レベルの転移の徴候は見られなかった。腫瘍の浸潤および転移には、一過性を超えるEMT経路の活性化が必要である。上皮がんからの脱離および腫瘍細胞の遊走は、腫瘍間質の変化および上皮細胞の間葉細胞への表現型の再プログラミングをもたらす悪性細胞と腫瘍微小環境の間の長期のクロストーク後にのみ可能である(Guarino、2007年)。

10

20

30

40

50

## 【0267】

要約すると、上皮の結合開口薬であるJO-1は、がんのmAb療法を有効性と安全性の両方に関して、すなわち、治療用mAbの用量の低減を可能にすることによって改善する可能性を有する。この試験により、上皮細胞でのAd3の感染の機構も明らかになる。

## 【0268】

## 材料および方法

タンパク質および抗体。JO-1(Ad3-K/S/Knとしても公知)の生成については、以前に記載されている(Wangら、2011年a)。JO-1は、他で記載されている通り、pQE30発現ベクター(Qiagen、Valencia、CA)を用いてE.coliにおいて産生させ、Ni-NTAアガロースクロマトグラフィーによって精製した(Wangら、2007年)。組換えAd3ペントン12面体(PtDd)タンパク質複合体は、他で記載されている通り、昆虫細胞において産生させ、精製した(Fenderら、1997年)。

## 【0269】

免疫蛍光試験またはウエスタンブロットのために以下の抗体を使用した：ポリクローナルヤギ抗DSG2(R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN)、マウスmAb抗DSG2(クローン6D8)(Cell Sciences, Canton, MA)、ウサギ抗クローデイン7(Abcam, Cambridge, MA)、抗ヒトIgG-FITC(Santa Cruz)、ウサギ抗EGFR(Abcam)、マウス抗Her2/neu(Abcam)、マウス抗E-カドヘリン(Cell Signaling)、マウス抗ヒトIgG Fc(R&D Systems)、ホスホ-p44/42 MAPKに対するマウスmAb(Erk1/2)(Thr202/Tyr204)(Cell Signaling)、マウス抗Erk1/2(Cell Signaling)、マウス抗ホスホ-E-カドヘリン(pS838/840)(Epitomics, Inc.)、マウス抗6-His(Qiagen)。

## 【0270】

細胞株。BT474-M1細胞は、10%のFBS、1%のPen/Strepおよび2mMのL-グルタミンを伴うDMEM/F12中で培養した。HCC1954乳がん、A549肺がんおよびNCI-N87???細胞は、10%のFBSおよび1%のPen/Strepを伴うRPMI中で培養した。SKOV3-ip1細胞はMEBM培地中で培養した。結腸がんT84細胞は、10%のFBS、GluおよびPen/Strepを加えたHam's F12培地とDMEMの1:1混合物中で培養した。細胞の極性化を実現するために、 $1.4 \times 10^5$  T84細胞をコラーゲンでコーティングした6.5mmのTranswellインサート(孔サイズ0.4  $\mu$ m)(Costar Transwell Clears)中で、経上皮抵抗性が安定するまで14~20日の期間にわたり培養した(Wangら、2011年b)。

## 【0271】

免疫蛍光分析。細胞をチャンバーガラススライド(BD Falcon)内で培養し、氷冷のPBSで2回洗浄し、次いで、メタノール/アセトン(1:1 vol/vol)を用いて4で15分間にわたって、または4%のパラホルムアルデヒドを用いて4で30分間わたって固定した。固定後に細胞をPBSで2回洗浄し、その後、2%の粉乳(BioRad)を含有するPBSを用いて室温で20分間にわたって遮断した。抗体をPBS中に希釈し(クローデイン7 1:100、DSG2 1:100、Her2/neu 1:50、EGFR 1:50、E-カドヘリン1:100、ヒトIgG 1:400、ホスホ-p44/42 MAPK 1:400、Penta-His 1:500)、細胞を室温で90分間にわたって、または4で一晩染色した。必要な場合には、PBSを用いて室温で30分間にわたって3回洗浄した後に、適切に指向させた二次抗体を適用した。DAPIを伴うVECTASHIELD(Vector Labs)を用いてガラススライドをマウントした。写真をLeica DFC300FXデジタルカメラを使用して得た。Zeiss META共焦点顕微鏡で、40 $\times$ 油浸レンズまたは100 $\times$ 油浸

レンズおよびZeiss 510ソフトウェア (Zeiss Micro Imaging, Thornwood, NY) を使用して共焦点像を取得した。

#### 【0272】

組織。ヒト乳がんのパラフィン切片を脱パラフィンし、再水和させた。Vector Antigen Unmasking solutions pH 6.0 (Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA) を用いて抗原の回収 (retrieval) を実施した。マウス抗DSG2抗体 (3G132) (Abcam) を1:10に希釈した。Polink-2 HRP Broad Kit (Golden Bridge International, Inc. Mukilteo, WA) および基質としてDABを使用して免疫組織学的検査を実施した。

10

#### 【0273】

ウエスタンブロット。異種移植腫瘍組織を解剖し、手動でホモジナイズし (組織破壊器)、タンパク質溶解緩衝液 [20 mMのHepes (pH 7.5)、2 mMのEGTA、10%のグリシン、1%のトリトンX100、150 mMのNaCl (全てSigma-Aldrichから入手)、およびプロテアーゼ/ホスファターゼ (phosphatase) 阻害剤 (Complete Protease Inhibitor Cocktail and PhosSTOP, Roche)] 中、氷上で30分インキュベートした。集密になった培養細胞を氷冷のPBSで2回洗浄し、次いで、タンパク質溶解緩衝液中、氷上で30分溶解させた。試料をペレットにし (10分、4℃、15,000 RPM、タンパク質を含有する上清を-80℃で保管した。ウエスタンブロット手順のために合計80 µgの総タンパク質を使用した。タンパク質試料を煮沸し (95℃で5分)、10%のビス-トリスゲルおよびMOPS緩衝液 (Novex, Invitrogen) を用いたポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) によって分離し、次いで、供給者 (iBlot, Invitrogen) のプロトコールに従ってニトロセルロース膜に転写した。膜を0.1%のTween 20 (PBS-T, Sigma) および5%の粉乳を含有するPBS中でブロックした。一次抗体および二次抗体についてのインキュベーション時間は、それぞれ4℃で16時間および室温で1時間であった。抗体をPBS-Tおよび5%の粉乳中に希釈した [ヒトIgG 1:1000、DSG2 1:500、Ad3-K血清 1:2000、p-E-カドヘリン 1:2000、E-カドヘリン 1:1000、クローディング 1:500、ビメンチン 1:2000、ホスホ-p44/42 MAPK (Erk1/2) 1:2000、Erk1/2 1:2000]。抗体をインキュベートしている間に膜をPBS-T中で5回洗浄し、ECLプラス (Amersham) またはOdysseyシステム (LI-COR Biosciences) を用いて薄膜を展開した。

20

30

#### 【0274】

DSG2 mRNA PCR: 乳がんにおけるDSG2の発現レベルを評価するために、1 µgの全RNAについて、Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を使用して逆転写を実施した。ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHの発現を参照として使用した。7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems/Life Technologies) においてSensiMix SYBR Kit (Quanta) を使用して定量的PCR (qPCR) を3連で実行した。以下のプライマーを使用した:

40

#### 【0275】

##### 【化12】

DSG2 QT-PCRフォワード 5'-ATG ACG GCT AGG AAC ACC AC -3' (配列番号58)

DSG2 QT-PCRリバース 5'-TCA GGT ACA TTG GAA ACA TGA AA -3' (配列番号59)

GAPDH QT-PCRフォワード 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC -3' (配列番号60)

GAPDH QT-PCRリバース 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG -3' (配列番号61)

50



## 【0276】

qPCRを以下の条件下で実施した：最初の95℃で10分の酵素活性化ステップの後、それぞれ95℃で15秒および60℃で1分間からなる増幅サイクルを40サイクル行った。最後に、最終的な伸長ステップを60℃で2分実施した。

## 【0277】

浸透性アッセイ。合計 $5 \times 10^5$ 個のT84細胞を12mmのtranswellインサート[PET膜(Corning、NY)、孔サイズ $0.4 \mu\text{m}$ ]に播種し、経上皮抵抗性が安定するまで14~20日間培養した。2~3日ごとに培地を交換した。細胞を、接着培地(DMEM、1%のFBS、2mMの $\text{MgCl}_2$ 、20mMのHEPES)中でDSG2リガンド( $20 \mu\text{g/ml}$ )に室温で15分間にわたって曝露させた。その後、DMEM/F12培地で希釈した1mCiの $[^{14}\text{C}]$ ポリエチレングリコール-4000(PEG-4000)(Perkin Elmer、Covina CA)を内部チャンバーに加えた。15分の時点および30分の時点で内部チャンバーおよび外側のチャンバーから培地の一定分量を採取し、シンチレーション計数器によって測定した。浸透性を他で記載されている通り算出した(Yangら、2004年)。

10

## 【0278】

トラスツズマブおよびセツキシマブ細胞毒性アッセイ。

## 【0279】

BT474細胞またはA549細胞を、3連で、96ウェルプレートにウェル当たり細胞 $5 \times 10^4$ 個の密度で播き、集密になるまで成長させた。JO-1( $500 \text{ ng/ml}$ )を培地に加えた。12時間後に、トラスツズマブまたはセツキシマブ( $15 \mu\text{g/ml}$ )を加え、その2時間後にWST-1アッセイ(Roche、San Francisco、CA)によって細胞の生存率を測定した。3回の独立した試験を実施した。

20

## 【0280】

電子顕微鏡法。transwellチャンバー内の極性細胞を、半強度カルノフスキー固定液(2%のパラホルムアルデヒド、2.5%のグルタルアルデヒド、および0.2Mのカコジル酸緩衝液)を用いて、室温で1時間にわたって固定した。内部チャンバー内の固定液は、0.2%のルテニウムレッドを含有した。ルテニウムレッド[塩化ルテニウム(III)酸化物、アンモニア処理した]は、Alfa Aesar(Ward Hill、MA)から購入した。1%の $\text{OsO}_4$ -リン酸緩衝液を用いて後固定を行った。transwellチャンバーから膜を切り取り、Medcast(Ted Pella、Redding、CA)に包埋した。超薄切片を酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で染色した。加工した格子をJEOL JEM1200EXII透過形電子顕微鏡を用いて評価した。Olympus SIS MoradaデジタルCCDカメラを用いて画像を獲得し、画像を加工するためにITEMソフトウェアを使用した。

30

## 【0281】

動物試験：動物を必要とする全ての実験は、University of Washingtonにより定められた施設のガイドラインに従って行った。マウスを特定の病原体を含まない施設内に収容した。がん細胞 $4 \times 10^6$ 個をCB17 SCID-ベージュマウスの乳房の脂肪パッドに注射することによって乳がん異種移植片を確立した。トラスツズマブを $10 \text{ mg/kg}$ の用量で腹腔内に注射した(i.p.)。PtDdまたはJO-1を $2 \text{ mg/kg}$ の用量で静脈内に与えた(i.v.)。腫瘍体積を以前に記載されている通り測定した(Tuveら、2007年)。腫瘍体積が $1,000 \text{ mm}^3$ に到達するか、または潰瘍化したらマウスを屠殺した。 $4 \times 10^6$ 個のA549をCB17 SCIDベージュマウスの右側腹部に皮下注射(s.c.)することによって肺がん異種移植片を確立した。12日目にJO-1をi.v.注射した10時間後にセツキシマブを $10 \text{ mg/kg}$  i.p.で注射し、これを3日後に繰り返した。播種性肺の腫瘍モデルについては、8週齢の雄のCB17 SCID-ベージュマウスに、1日目にA549細胞 $2 \times 10^6$ 個を静脈内注射した。JO-1( $2 \text{ mg/kg}$  i.v.)およびセツキシマブ( $10 \text{ mg/kg}$  i.p.)を用いた処置を10日目に開始し、3日ごとに繰り返した。動物

40

50

を、体重減少および呼吸困難の徴候についてモニターした。非処置群の最初のマウスが瀕死の状態になったら動物を屠殺した。墨汁（PBS中15%）を気管内に注射した後、肺を取り出した。正常な組織が黒いのに対して転移は非染色（白色）として現れた。抗JO-1抗体を産生させるために、他で記載されている通りマウスにフロイントアジュバントと混合したJO-1を皮下注射した（Liら、2009年）。

#### 【0282】

HSCベースのレキシンの発現：プロトコールは、他で記載されている（Beyerら、2011年）。簡単に述べると、移植レシピエントは、6～10週齢の雌のCB17 SCID-ベージュマウスであり、レンチウイルスベクターで形質導入された、5-FU-処置したマウス由来の骨髄細胞 $6 \times 10^5$ 個を尾静脈注射する直前に350 cGyを用いて亜致死的に放射線を照射した。細胞がレシピエントの骨髄に生着したことを確認した後、合計 $4 \times 10^6$ 個のHCC1954を乳房の脂肪パッドに注射した。ドキサイクリン（Dox）の制御下で、レキシンを発現しているレンチウイルスベクターについては、以前に記載されている（Beyerら、2011年）。

#### 【0283】

中和性抗体アッセイ：患者に化学療法を行う前にがん患者由来の血清試料を取得した。簡単に述べると、293細胞を、96ウェルプレートにウェル当たり細胞 $4 \times 10^4$ 個で播種し、37℃でインキュベートした。次の日に、血清試料を56℃で30分間にわたって熱失活させ、2%のFCSを含有するMEM中に1:2から1:1、204まで段階的に希釈した。100  $\mu$ lのMEM中の野生型Ad5または野生型Ad11の細胞当たり合計20のプラーク形成単位（PFU）を各血清希釈液100  $\mu$ lと一緒に37℃で1時間インキュベートした。前日に播いた細胞から培地を除去し、ウイルスを含有する血清55  $\mu$ lを293増殖培地45  $\mu$ lと一緒に細胞に加えた。感染後3日目および6日目に、さらに100  $\mu$ lの293増殖培地を細胞に加えた。感染後8日目に、細胞を、細胞変性の効果（CPE）の存在について分析し、1:2以上の希釈度においてCPEが見られなかった場合、血清試料を中和性抗体の存在について正にスコア化した。

#### 【0284】

統計分析：

結果は全て、平均 $\pm$ SDとして表されている。多数の試験に対して、適用可能な場合学生t検定または二元配置ANOVAを適用した。p値<0.05を有意とみなした。

#### 【0285】

実施例3の参考文献

#### 【0286】

#### 【数10】

Abbod, M.F., F.C. Hamdy, D.A. Linkens, and J.W. Catto. 2009. Predictive modeling in cancer: where systems biology meets the stock market. *Expert Rev Anticancer Ther* 9:867-870.

Adams, G.P., and L.M. Weiner. 2005. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 23:1147-1157.

Amieva, M.R., R. Vogelmann, A. Covacci, L.S. Tompkins, W.J. Nelson, and S. Falkow. 2003. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* 300:1430-1434.

#### 【0287】

10

20

30

40

## 【数 1 1】

Andarawewa, K.L., A.C. Erickson, W.S. Chou, S.V. Costes, P. Gascard, J.D. Mott, M.J. Bissell, and M.H. Barcellos-Hoff. 2007. Ionizing radiation predisposes nonmalignant human mammary epithelial cells to undergo transforming growth factor beta induced epithelial to mesenchymal transition. *Cancer Res* 67:8662-8670.

Beckhove, P., M. Feuerer, M. Dolenc, F. Schuetz, C. Choi, N. Sommerfeldt, J. Schwendemann, K. Ehlert, P. Altevogt, G. Bastert, V. Schirmmacher, and V. Umansky. 2004. Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors. *J Clin Invest* 114:67-76.

10

Beyer, I., Z. Li, J. Persson, Y. Liu, R. van Rensburg, R. Yumul, X.B. Zhang, M.C. Hung, and A. Lieber. 2011. Controlled extracellular matrix degradation in breast cancer tumors improves therapy by trastuzumab. *Mol Ther* 19:479-489.

Biedermann, K., H. Vogelsang, I. Becker, S. Plaschke, J.R. Siewert, H. Hofler, and G. Keller. 2005. Desmoglein 2 is expressed abnormally rather than mutated in familial and sporadic gastric cancer. *J Pathol* 207:199-206.

Brennan, K., G. Offiah, E.A. McSherry, and A.M. Hopkins. 2010. Tight junctions: a barrier to the initiation and progression of breast cancer? *J Biomed Biotechnol* 2010:460607.

20

Disis, M.L., E. Calenoff, G. McLaughlin, A.E. Murphy, W. Chen, B. Groner, M. Jeschke, N. Lydon, E. McGlynn, R.B. Livingston, and et al. 1994. Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Res* 54:16-20.

Disis, M.L., K.L. Knutson, K. Schiffman, K. Rinn, and D.G. McNeel. 2000. Pre-existent immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with HER-2/neu overexpressing breast and ovarian cancer. *Breast Cancer Res Treat* 62:245-252.

Fasano, A., B. Baudry, D.W. Pumphlin, S.S. Wasserman, B.D. Tall, J.M. Ketley, and J.B. Kaper. 1991. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5242-5246.

30

Fender, P., R.W. Ruigrok, E. Gout, S. Buffet, and J. Chroboczek. 1997. Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer. *Nat Biotechnol* 15:52-56.

Fessler, S.P., M.T. Wotkowicz, S.K. Mahanta, and C. Bamdad. 2009. MUC1\* is a determinant of trastuzumab (Herceptin) resistance in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 118:113-124.

Feuerer, M., P. Beckhove, L. Bai, E.F. Solomayer, G. Bastert, I.J. Diel, C. Pedain, M. Oberniedermayr, V. Schirmmacher, and V. Umansky. 2001. Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow. *Nat Med* 7:452-458.

40

## 【 0 2 8 8 】

## 【 数 1 2 】

- Frank, C.F., and M.K. Hostetter. 2007. Cleavage of E-cadherin: a mechanism for disruption of the intestinal epithelial barrier by *Candida albicans*. *Transl Res* 149:211-222.
- Fuschiotti, P., G. Schoehn, P. Fender, C.M. Fabry, E.A. Hewat, J. Chroboczek, R.W. Ruigrok, and J.F. Conway. 2006. Structure of the dodecahedral penton particle from human adenovirus type 3. *J Mol Biol* 356:510-520.
- Guarino, M. 2007. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 39:2153-2160.
- Harada, H., K. Iwatsuki, M. Ohtsuka, G.W. Han, and F. Kaneko. 1996. Abnormal desmoglein expression by squamous cell carcinoma cells. *Acta Derm Venereol* 76:417-420.
- Harari, P.M., G.W. Allen, and J.A. Bonner. 2007. Biology of interactions: antiepidermal growth factor receptor agents. *J Clin Oncol* 25:4057-4065.
- Hemminki, O., G. Bauerschmitz, S. Hemmi, A. Kanerva, V. Cerullo, S. Pesonen, and A. Hemminki. 2010. Preclinical and clinical data with a fully serotype 3 oncolytic adenovirus Ad3-hTERT-E1A in the treatment of advanced solid tumors. *Molecular Therapy* 18:S74.
- Karamouzis, M.V., J.R. Grandis, and A. Argiris. 2007. Therapies directed against epidermal growth factor receptor in aerodigestive carcinomas. *JAMA* 298:70-82.
- Katz, J., V. Sambandam, J.H. Wu, S.M. Michalek, and D.F. Balkovetz. 2000. Characterization of *Porphyromonas gingivalis*-induced degradation of epithelial cell junctional complexes. *Infect Immun* 68:1441-1449.
- Klessner, J.L., B.V. Desai, E.V. Amargo, S. Getsios, and K.J. Green. 2009. EGFR and ADAMs cooperate to regulate shedding and endocytic trafficking of the desmosomal cadherin desmoglein 2. *Mol Biol Cell* 20:328-337.
- Koeser, J., S.M. Troyanovsky, C. Grund, and W.W. Franke. 2003. De novo formation of desmosomes in cultured cells upon transfection of genes encoding specific desmosomal components. *Exp Cell Res* 285:114-130.
- Koski, A., L. Kangasniemi, S. Escutenaire, S. Pesonen, V. Cerullo, I. Diaconu, P. Nokisalmi, M. Raki, M. Rajacki, K. Guse, T. Ranki, M. Oksanen, S.L. Holm, E. Haavisto, A. Karioja-Kallio, L. Laasonen, K. Partanen, M. Ugolini, A. Helminen, E. Karli, P. Hannuksela, T. Joensuu, A. Kanerva, and A. Hemminki. 2010. Treatment of Cancer Patients With a Serotype 5/3 Chimeric Oncolytic Adenovirus Expressing GMCSF. *Mol Ther*
- Kurzen, H., I. Munzing, and W. Hartschuh. 2003. Expression of desmosomal proteins in squamous cell carcinomas of the skin. *J Cutan Pathol* 30:621-630.
- Larsen, M., M.L. Tremblay, and K.M. Yamada. 2003. Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:700-711.

10

20

30

40

## 【 0 2 8 9 】

## 【 数 1 3 】

- Lesniak, D., Y. Xu, J. Deschenes, R. Lai, J. Thoms, D. Murray, S. Gosh, J.R. Mackey, S. Sabri, and B. Abdulkarim. 2009. Beta1-integrin circumvents the antiproliferative effects of trastuzumab in human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer. *Cancer Res* 69:8620-8628.
- Li, Z., Y. Liu, S. Tuve, Y. Xun, X. Fan, L. Min, Q. Feng, N. Kiviat, H.P. Kiem, M.L. Disis, and A. Lieber. 2009. Toward a stem cell gene therapy for breast cancer. *Blood* 113:5423-5433.
- Li, Z., J. Persson, H. Wang, H. Song, I. Beyer, R. Yumul, and A. Lieber. 2011. Biodistribution of DSG2 in humans, macaques, and DSG2 transgenic mice. *in preparation* 10
- Li, Z.Y., S. Ni, X. Yang, N. Kiviat, and A. Lieber. 2004. Xenograft models for liver metastasis: Relationship between tumor morphology and adenovirus vector transduction. *Mol Ther* 9:650-657.
- Norrby, E., B. Nyberg, P. Skaaret, and A. Lengyel. 1967. Separation and characterization of soluble adenovirus type 9 components. *J Virol* 1:1101-1108.
- Oliveras-Ferraro, C., A. Vazquez-Martin, S. Cufi, B. Queralt, L. Baez, R. Guardeno, X. Hernandez-Yague, B. Martin-Castillo, J. Brunet, and J.A. Menendez. 2011. Stem cell property epithelial-to-mesenchymal transition is a core transcriptional network for predicting cetuximab (Erbix) efficacy in KRAS wild-type tumor cells. *J Cell Biochem* 112:10-29. 20
- Ramani, V.C., L. Hennings, and R.S. Haun. 2008. Desmoglein 2 is a substrate of kallikrein 7 in pancreatic cancer. *BMC Cancer* 8:373.
- Sakamoto, M., N. Yazaki, N. Katsushima, K. Mizuta, H. Suzuki, and Y. Numazaki. 1995. Longitudinal investigation of epidemiologic feature of adenovirus infections in acute respiratory illnesses among children in Yamagata, Japan (1986-1991). *Tohoku J Exp Med* 175:185-193.
- Schmitt, C.J., W.W. Franke, S. Goerdt, B. Falkowska-Hansen, S. Rickelt, and W.K. Peitsch. 2007. Homo- and heterotypic cell contacts in malignant melanoma cells and desmoglein 2 as a novel solitary surface glycoprotein. *J Invest Dermatol* 127:2191-2206. 30
- Strauss, R., Z.Y. Li, Y. Liu, I. Beyer, J. Persson, P. Sova, T. Moller, S. Pesonen, A. Hemminki, P. Hamerlik, C. Drescher, N. Urban, J. Bartek, and A. Lieber. 2011. Analysis of epithelial and mesenchymal markers in ovarian cancer reveals phenotypic heterogeneity and plasticity. *PLoS One* 6:e16186.
- Strauss, R., and A. Lieber. 2009. Anatomical and physical barriers to tumor targeting with oncolytic adenoviruses in vivo. *Curr Opin Mol Ther* 11:513-522.
- Strauss, R., P. Sova, Y. Liu, Z.Y. Li, S. Tuve, D. Pritchard, P. Brinkkoetter, T. Moller, O. Wildner, S. Pesonen, A. Hemminki, N. Urban, C. Drescher, and A. Lieber. 2009. Epithelial phenotype 40

## 【 0 2 9 0 】

【 数 1 4 】

- confers resistance of ovarian cancer cells to oncolytic adenoviruses. *Cancer Res* 69:5115-5125.
- Sumida, S.M., D.M. Truitt, A.A. Lemckert, R. Vogels, J.H. Custers, M.M. Addo, S. Lockman, T. Peter, F.W. Peyerl, M.G. Kishko, S.S. Jackson, D.A. Gorgone, M.A. Lifton, M. Essex, B.D. Walker, J. Goudsmit, M.J. Havenga, and D.H. Barouch. 2005. Neutralizing antibodies to adenovirus serotype 5 vaccine vectors are directed primarily against the adenovirus hexon protein. *J Immunol* 174:7179-7185.
- Thiery, J.P., and J.P. Sleeman. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:131-142. 10
- Thomas, M.A., J.F. Spencer, K. Toth, J.E. Sagartz, N.J. Phillips, and W.S. Wold. 2008. Immunosuppression enhances oncolytic adenovirus replication and antitumor efficacy in the Syrian hamster model. *Mol Ther* 16:1665-1673.
- Toso, J.F., C. Oei, F. Oshidari, J. Tartaglia, E. Paoletti, H.K. Lyerly, S. Talib, and K.J. Weinhold. 1996. MAGE-1-specific precursor cytotoxic T-lymphocytes present among tumor-infiltrating lymphocytes from a patient with breast cancer: characterization and antigen-specific activation. *Cancer Res* 56:16-20. 20
- Trojan, L., A. Schaaf, A. Steidler, M. Haak, G. Thalmann, T. Knoll, N. Gretz, P. Alken, and M.S. Michel. 2005. Identification of metastasis-associated genes in prostate cancer by genetic profiling of human prostate cancer cell lines. *Anticancer Res* 25:183-191.
- Turley, E.A., M. Veiseh, D.C. Radisky, and M.J. Bissell. 2008. Mechanisms of Disease: epithelial-mesenchymal transition-does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nat Clin Pract Oncol*
- Tuve, S., B.M. Chen, Y. Liu, T.L. Cheng, P. Toure, P.S. Sow, Q. Feng, N. Kiviat, R. Strauss, S. Ni, Z.Y. Li, S.R. Roffler, and A. Lieber. 2007. Combination of tumor site-located CTL-associated antigen-4 blockade and systemic regulatory T-cell depletion induces tumor-destructive immune responses. *Cancer Res* 67:5929-5939. 30
- Vermeer, P.D., L.A. Einwalter, T.O. Moninger, T. Rokhlina, J.A. Kern, J. Zabner, and M.J. Welsh. 2003. Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. *Nature* 422:322-326.
- Wang, H., Z. Li, R. Yumul, S. Lara, A. Hemminki, P. Fender, and A. Lieber. 2011a. Multimerization of adenovirus serotype 3 fiber knob domains is required for efficient binding of virus to desmoglein 2 and subsequent opening of epithelial junctions. *J Virol*

【 0 2 9 1 】

40

## 【数 1 5】

- Wang, H., Z.Y. Li, Y. Liu, J. Persson, I. Beyer, T. Moller, D. Koyuncu, M.R. Drescher, R. Strauss, X.B. Zhang, J.K. Wahl, 3rd, N. Urban, C. Drescher, A. Hemminki, P. Fender, and A. Lieber. 2011b. Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. *Nat Med* 17:96-104.
- Wang, H., Y.C. Liaw, D. Stone, O. Kalyuzhnyi, I. Amiraslanov, S. Tuve, C.L. Verlinde, D. Shayakhmetov, T. Stehle, S. Roffler, and A. Lieber. 2007. Identification of CD46 binding sites within the adenovirus serotype 35 fiber knob. *J Virol* 81:12785-12792.
- Wang, H., Y. Liu, Z.Y. Li, X. Fan, A. Hemminki, and A. Lieber. 2010. A recombinant adenovirus type 35 fiber knob protein sensitizes lymphoma cells to rituximab therapy. *Blood* 115:592-600.
- Wheeler, D.L., E.F. Dunn, and P.M. Harari. 2010. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol* 7:493-507.
- Wu, S., K.C. Lim, J. Huang, R.F. Saidi, and C.L. Sears. 1998. Bacteroides fragilis enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14979-14984.
- Yang, Z., M. Horn, J. Wang, D.D. Shen, and R.J. Ho. 2004. Development and characterization of a recombinant madin-darby canine kidney cell line that expresses rat multidrug resistance-associated protein 1 (rMRP1). *AAPS J* 6:77-85.
- Yashiro, M., N. Nishioka, and K. Hirakawa. 2006. Decreased expression of the adhesion molecule desmoglein-2 is associated with diffuse-type gastric carcinoma. *Eur J Cancer* 42:2397-2403.
- Zeng, Y., M. Pinard, J. Jaime, L. Bourget, P. Uyen Le, M.D. O'Connor-McCourt, R. Gilbert, and B. Massie. 2008. A ligand-pseudoreceptor system based on de novo designed peptides for the generation of adenoviral vectors with altered tropism. *J Gene Med* 10:355-367.

10

20

## 【図 1】

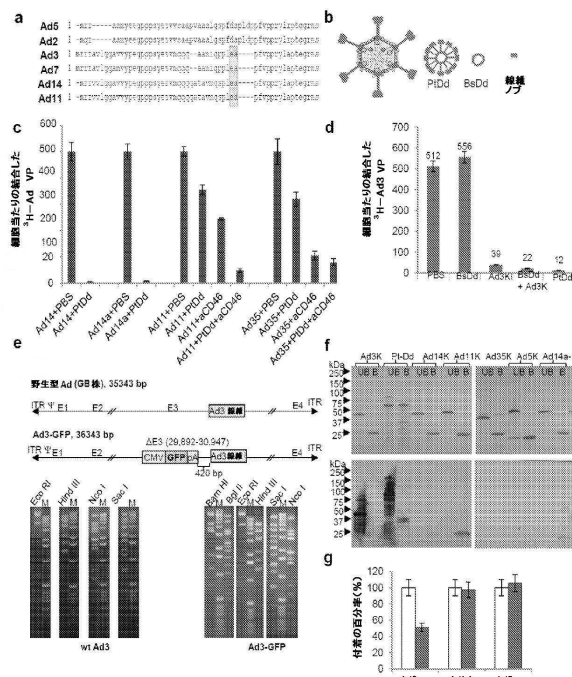


FIGURE 1

## 【図 2】

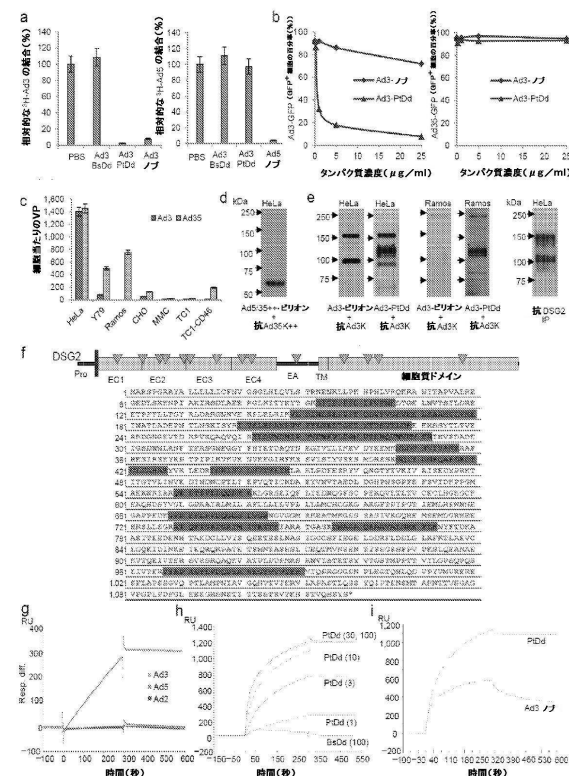


FIGURE 2

【 図 3 】

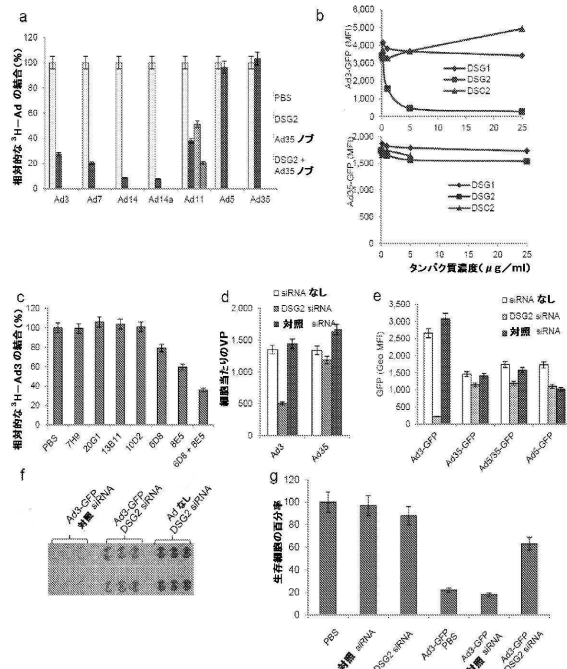


FIGURE 3

【 図 4 】

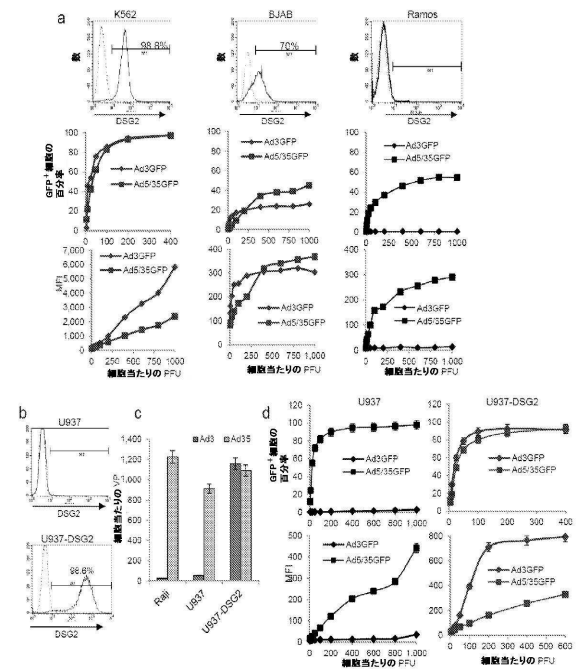


FIGURE 4

【 図 5 】

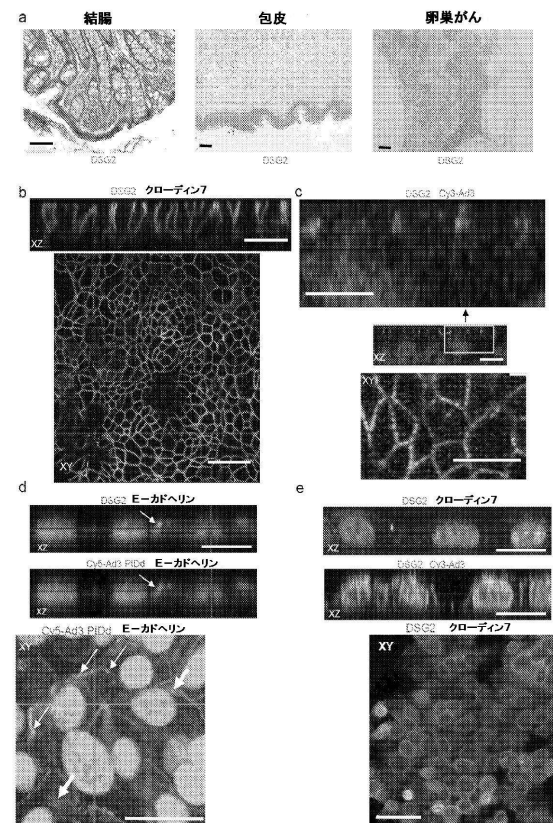


FIGURE 5

【 図 6 】

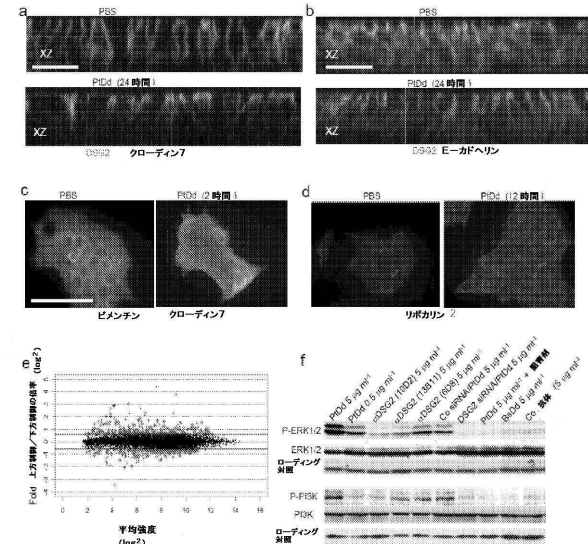


FIGURE 6



【図 7】

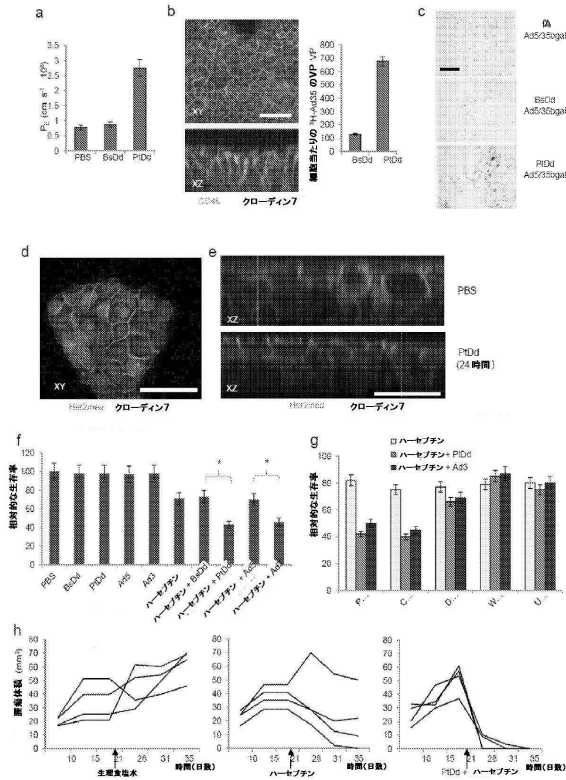


FIGURE 7

【図 9】

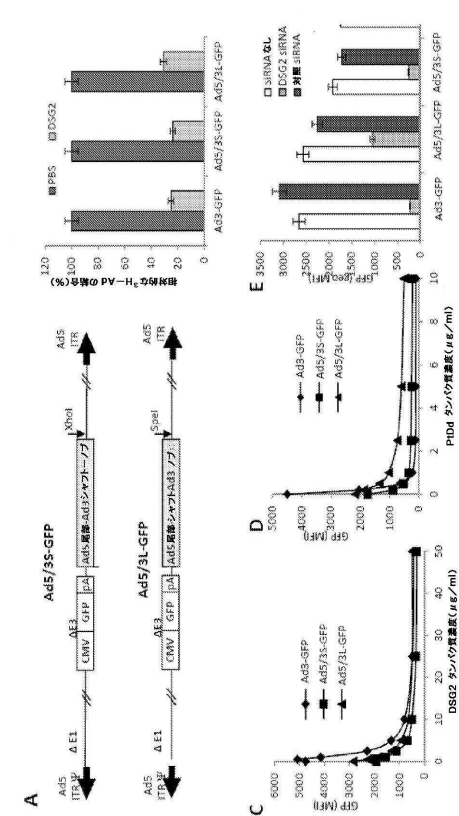


FIGURE 9

【図 8】

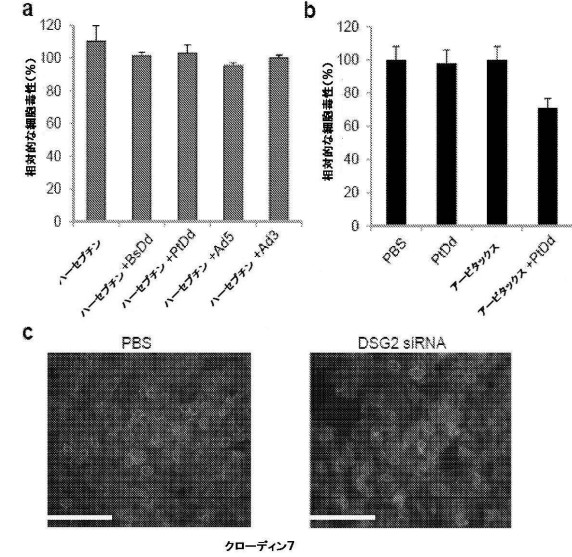


FIGURE 8

【図 10】

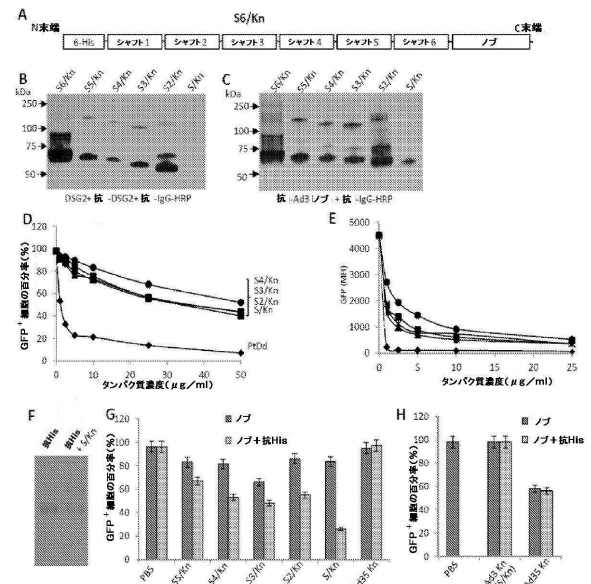


FIGURE 10

## 【図 11】

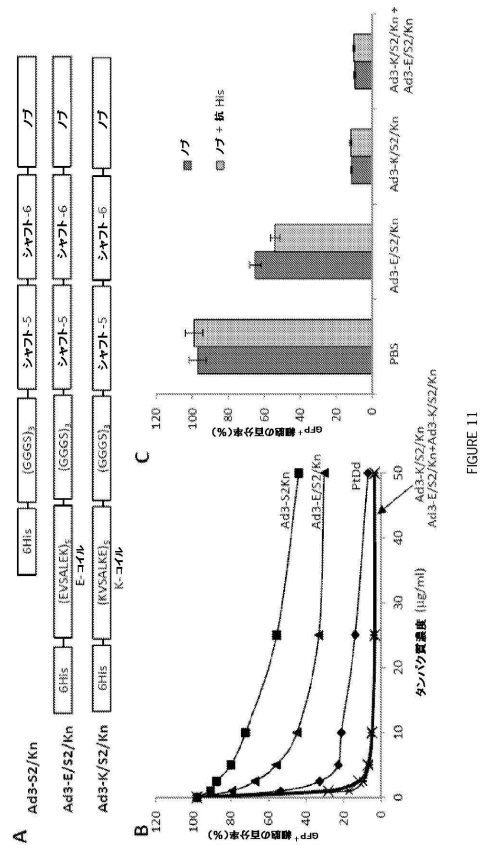


FIGURE 11

## 【図 12】

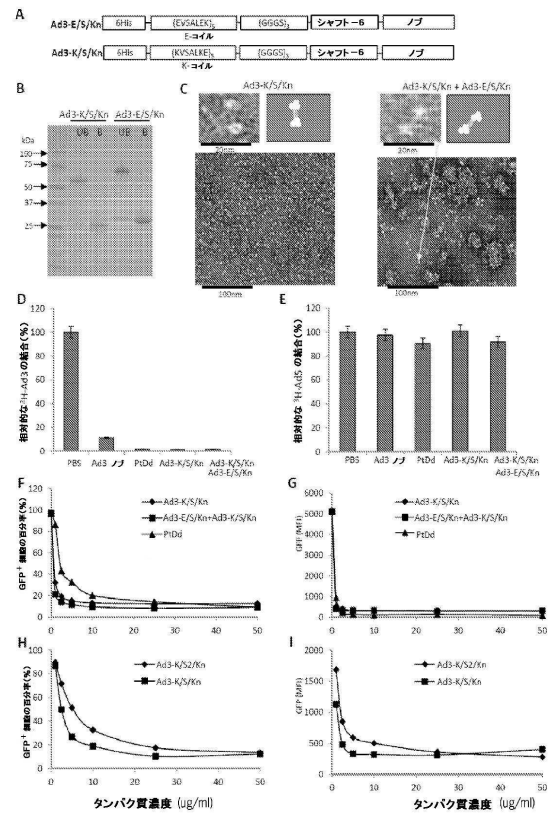


FIGURE 12

## 【図 13】

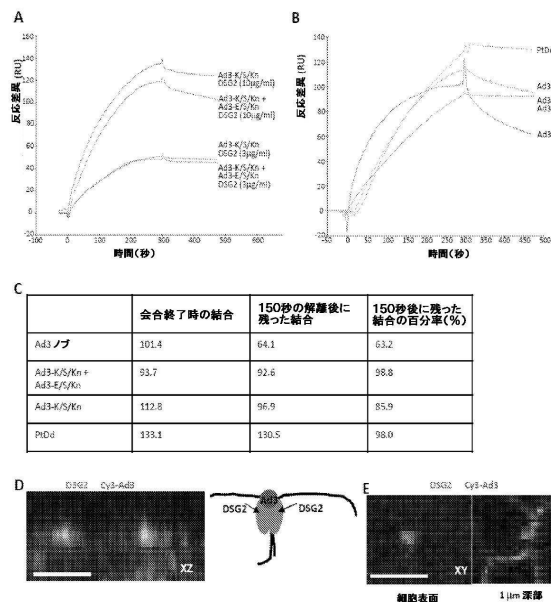


FIGURE 13

## 【図 14】

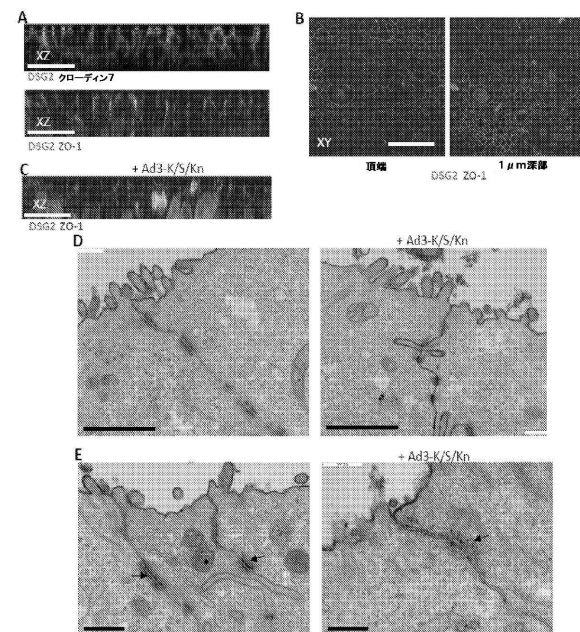


FIGURE 14

**A**

PEG 吸着量  
( $\text{cm}^2 \times 10^{-7}$ )

Condition	PEG Adsorption ( $\text{cm}^2 \times 10^{-7}$ )
PBS	~10
13B1 mAb	~10
8D9 mAb	~60
Ad3-K/S/Kn	~430
Ad3-E3/Kn	~100

**B**

相対ウイルスの吸着率 (%)

Condition	Relative Viral Adsorption (%)
未感染細胞	100
ラズマズマ	~100
PBS	~100
Ad3-E3/Kn	~100
Ad3-K/S/Kn	~100
8D9 mAb	~100
13B1 mAb	~100
10D1 mAb	~100
8S5 mAb	~240*
8S5 mAb + PEG	~150*
ラズマズマ	~100
PBS	~100
Ad3-E3/Kn	~100
Ad3-K/S/Kn	~60
13B1 mAb	~100
10D1 mAb	~100
8D9 mAb	~100
8S5 mAb	~200*
8S5 mAb + トラスナズマップ	~100

**C**

XZ

+Ad3-K/S/Kn(60 min)

CAR

**D**

細胞表面

XY

1  $\mu\text{m}$  露部

+Ad3-K/K (60 min)

**E**

Ad5-GFP

Ad3-GFP

Ad3-K/S/Kn + Ad5-GFP

Ad3-K/S/Kn + Ad3-GFP

**F**

MFI

Condition	MFI
未感染細胞	~750
Ad5-K/S/Kn	~850
Ad3-K/S/Kn	~1450*
20G1 mAb	~950
13B1 mAb	~750
10D1 mAb	~850
8S5 mAb	~950

**A**

Ad3

PtDd  
(Ad3-K/S/Kn)

**B**

JO-1

98kDa	K-コイル	(GGG) <sub>3</sub> N	シャフトモチーフ6	ノブ
-------	-------	----------------------	-----------	----

**C**

頂端

密着結合

接着結合

デスモソーム

クローディン7

DSG2

基底

0 分

30 分

60 分

シローディン7 DSG2

**D**

JO-1

**E**

PEG 相対量

PBS JO-1 抗 DSG2

0 分 30 分 60 分

**A**

PBS JO-1 (1時間) JO-1 (12時間)

kDa 99 28 19

JO-1

**B**

PBS JO-1 (1時間) JO-1 (12時間)

kDa 120 80 45

**C**

PBS JO-1 (1時間) JO-1 (12時間)

E-カドヘリン  
p-E-カドヘリン  
p-Erk 1/2  
Erk 1/2  
クローディング  
ビメンチン  
ローディング  
対照

E-カドヘリン  
p-Erk 1/2

**A**

Condition	Time (h p.i.)	Image
PBS		
トラスツズマブ	(1h p.i.)	
トラスツズマブ	(12h p.i.)	
JO-1 + トラスツズマブ	(1h p.i.)	
JO-1 + トラスツズマブ	(12h p.i.)	

FIGURE 18A

【図 18 B】

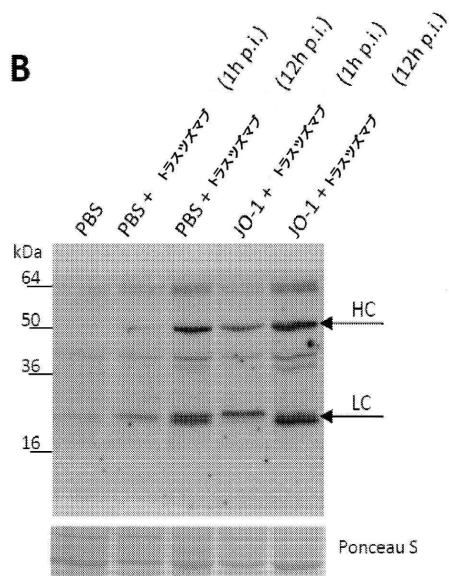


FIGURE 18B

【図 19】

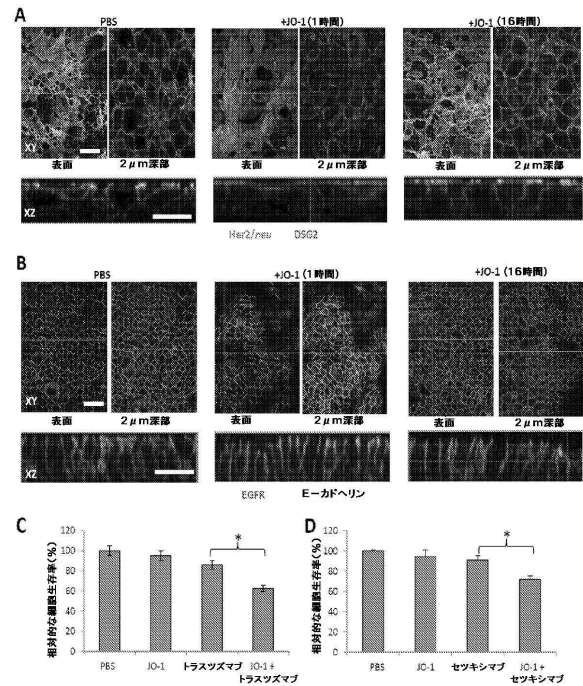


FIGURE 19

【図 20】

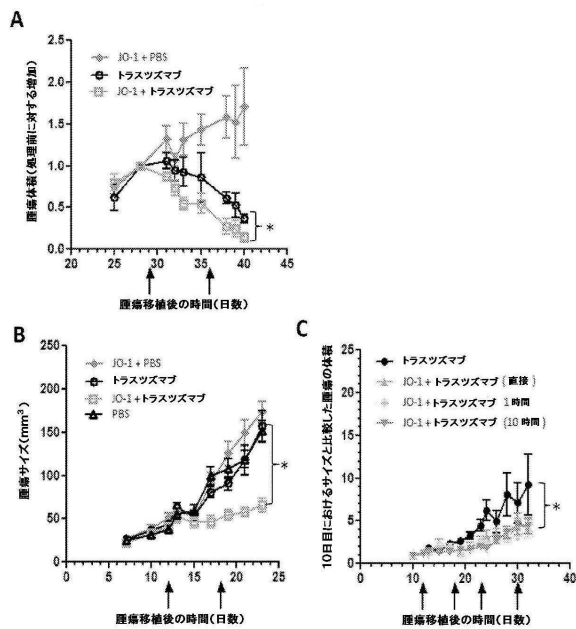


FIGURE 20

【図 21】

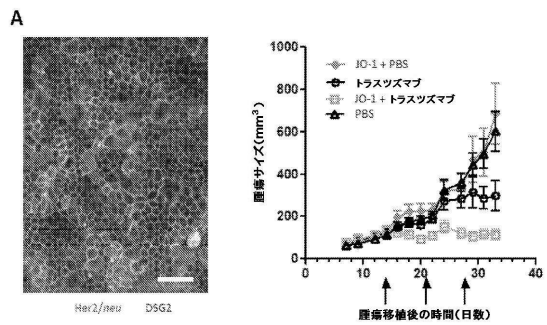


FIGURE 21

【 図 2 2 B 】

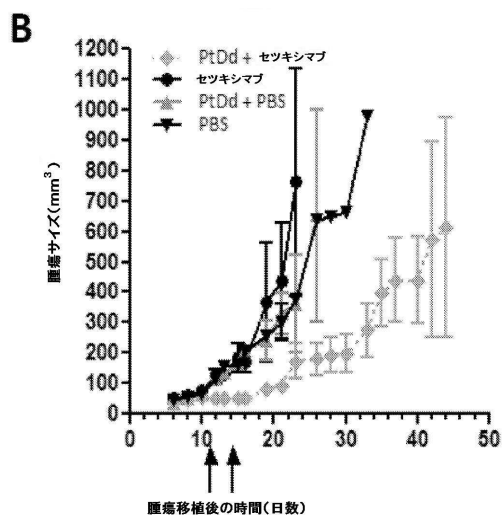


FIGURE 22B

【 図 2 3 】

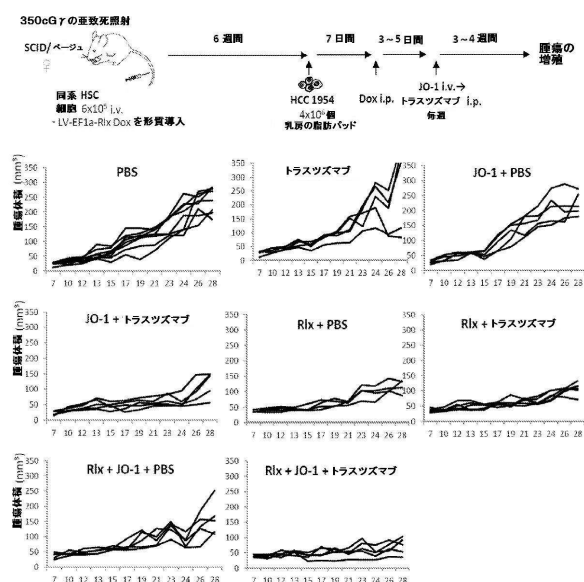


FIGURE 22C

【 図 2 4 】

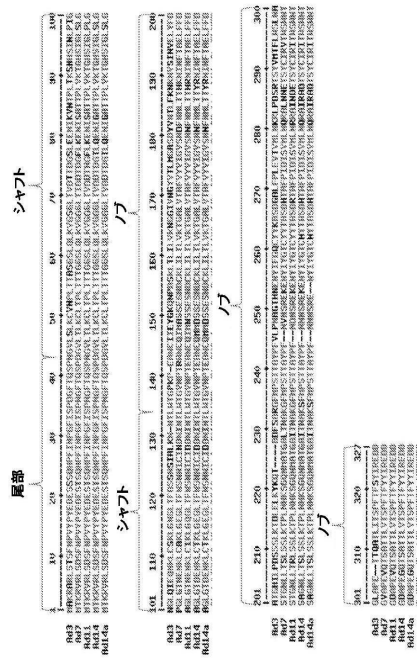


FIGURE 24

【配列表】

0006499825000001 . app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P 1/16
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P 1/16 1 0 5
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P 1/18
A 6 1 P	5/16	(2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P 5/16
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/12
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P 11/06
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P 13/12
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/06
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P	31/06	(2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/06
C 0 7 K	14/075	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K 14/075
			C 0 7 K 19/00

(31)優先権主張番号 61/430,091

(32)優先日 平成23年1月5日(2011.1.5)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 リーバー, アンドレ

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 1 5, シアトル, 2 9 ティーエイチ アベニュー エヌ  
イー 7 2 5 1

(72)発明者 ワン, ホンジー

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 1 5, シアトル, エヌイー 6 5 ティーエイチ ストリ  
ート 5 7 2 1

## 合議体

審判長 中島 庸子

審判官 高堀 栄二

審判官 小暮 道明

(56)参考文献 特開平10-501684(JP,A)

国際公開第2005/40333(WO,A2)

特表2003-514577(JP,A)

特表2002-534130(JP,A)

特表2002-503459(JP,A)

J. Biol. Chem. (1991) Vol. 266, No. 6, p. 3961-3967

J. Virology (1985) Vol. 53, No. 2, p. 672-678

Mol. Therapy (2010. May) Vol. 18, No. 5, p. 1046-1053

J. Virology (2004) Vol. 78, No. 9, p. 4454-4462

V i l r o l o g y ( 1 9 9 3 ) V o l . 1 9 4 , p 4 5 3 - 4 6 2

N a t . M e d . ( E p u b 2 0 1 0 . D e c . ) V o l . 1 7 , N o . 1 , p . 9 6 - 1 0

4

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N15/00-15/34

C07K14/00-19/00

C A / B I O S I S ( S T N )

P u b M e d

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q